

0/19、1/24、0/17 及び 2/22 例であり、媒体対照群と BPA 群及び EE 群との間に差は認められなかった。BPA 400 mg/kg 群においては 1 例ではあるが 3 ヶ月齢時に性周期の異常(constant estrus)を示す動物が観察され、4 ヶ月齢時にはその性周期の回復がみられたが、その原因は不明であった。

以上より、今回、低用量 BPA のラット経胎盤・経母乳曝露により pre-middle age に性周期異常が誘発された可能性が示されたと考える。

本研究で観測された影響には用量相関性が乏しいものが多い。これらは、従来の毒性学評価によるならば BPA 固有の影響であるかは明らかではない。しかしながら、核内受容体を介した作用であるならば、少ない分子数でもシグナルを伝えることが可能であり、また、受容体数が有限であることから飽和する現象が考えられるなど一般的な毒性とは異なる用量相関性を示すことが考えられる。

これまでリスク評価のための試験法として考えられてきた多世代繁殖試験や EPA によって提案されている *in utero through lactational exposure* 案には、遅発性の性周期異常等を評価するための長期観察項目は設定されていない。本実験の結果は、内分泌かく乱化学物質においては長期間にわたる影響に関する評価が必要であることを示していると考ええる。

【内分泌かく乱性確定試験開発研究、一生涯試験等】

〈OECD Conceptual Frame Work Level 5 対応試験開発〉

1) 神経・行動

Bisphenol A をモデルとした妊娠期及び授乳期曝露による行動影響の評価とその機序解明
鈴木 勉

1. C57BL/6J 系マウスにおいて、ddY 系マウスと同様、morphine に対する反応性の亢進が認められたことから、今後、ドパミン D₃ 受容体及びエストロゲン受容体遺伝子欠損マウスに応用可能であると考えられる。

2. E₂ 慢性曝露により、morphine に対する反応性の亢進は認められなかったことから、BPA はエストロゲン作用とは異なった機構により依存性薬物に対する反応性の亢進を引き起こすと考えられる。

3. 初代培養アストロサイト及び神経/グリア共培養細胞に極めて低用量の BPA を処置することに

より、アストロサイトの形態変化及び dopamine 誘発 Ca 応答の亢進が引き起こされ、E₂ の処置ではこのような変化が認められなかったことから、BPA 慢性曝露によって引き起こされる依存性薬物に対する反応性の亢進は、エストロゲン作用とは異なった機構によりアストロサイトを活性化させることが考えられる。

マウスのオペラント条件付けを用いた内分泌かく乱化学物質の神経系高次機序の評価 宮川 宗之

餌を報酬とした SCOB 訓練では、空腹による動因を一定にするために、給餌量を調節して体重を一定に保つ等の手続きが必要となる。今回、ラットでは、雄 300g、雌 200g を目標体重として、またマウスでは自由摂食ベースラインの 85% (20g ~28g) を目標体重として SCOB の訓練・測定を行った。通常の飼育状態での体重や必要とする餌の量は、当然種あるいは性によって異なり、今回の設定条件でマウスとラットが同程度の動因レベル(空腹状態)となったかどうかは保証されていない。また、オペラント条件付けは反応に伴って報酬が呈示されることによって学習が漸進的に進行する過程であって、日々のセッションにおける反応-報酬呈示の反復回数は学習進行に大きな影響を及ぼす。この点からは、セッション内の報酬呈示回数を可能なかぎり多くすることが望ましいと考えられるが、訓練中に飽食状態となつては、粒餌は強化子として機能しなくなる。今回のデータでも示されているように、ラットでは現在の条件設定で確実に学習が進行する。マウスの SCOB 訓練が、最終目標とするタイムアウト付交替型混合 FR DRO スケジュールまでラットと同様に進行するかどうかは、体重統制と報酬呈示回数設定が第一に重要な要因と考えられる。今回実施した予備的検討結果にしたがえば、1 セッションでの報酬呈示数は 50 個程度が適当と考えられるが、平日のホームケージでの給餌を少なくすれば 100 個も不可能ではないと考えられた。なお、乾燥した粒餌を容易に摂取できるように、実験中飲用水を呈示することを考慮したが、今回の予備的検討の結果をみると、飲水行動が出現することで粒餌の摂取が中断することから、一連の SCOB の遂行状況に影響を与えることが懸念されたため、SCOB における飲用水同時呈示は実施しないこととした。

マウスの SCOB 訓練は、以上述べた基礎的な条

件検討結果にもとづいて1セッションでの報酬呈示上限をラットと同様100個として開始した。結果は自動反応形成訓練及びFR訓練ともにレバー押し反応の習得は順調に進み、これまでのラットの背景データと比較しても、ラットと同様の訓練セッション数で反応形成が確実にこなされる結果となった。反応率についてみると、一時期を除きマウスの方が低い値を示しているが、学習の進行自体は得られた学習曲線からみればラットより遅いものとはなっていない。反応率の絶対値は粒餌の摂食に要する時間によって影響を受けるものであり、100個の粒餌をマウスが摂取する時間はラットよりかなり長くなる(予備的検討の結果や自動反応形成訓練の最終段階における1セッション終了に要する時間などから推定可能)こと、マウスではFR率の切替に応じて直ちに反応率の上昇が示され、FR10になってから徐々に反応率の上昇を示すラットよりも早く天井値に到達していることをみると、学習の進行はラットに劣らないものと解釈できる。

なお、粒餌100個は連続した餌の摂取としては限界に近いものと考えられ、ホームケージにおける給餌量によっては直ちにパフォーマンスに影響が及ぶものと考えられた。ホームケージでの給餌量は最終的に適当な結果が得られたが、これが得られる前に今回のSCOB訓練を開始しており、FR訓練前半は体重が目標値をやや下回った状態で実施された。一方9回目のセッションで反応率が低下したのは、休日を挟んで給餌量が影響した(給餌が多すぎた)ものと考えられる。今後実施する交替型混合スケジュールの訓練では給餌条件にしたがう予定である。

試験方法の開発では、このような基礎的条件の設定とそのための試行錯誤が重要であるが、細部の実験実施条件はいわゆるノウハウとして公開されない場合も多い。行動試験においては、このような条件の差異が、試験の感度に影響を与える可能性があり、追試の実施や結果の解釈において注意が必要である。本報告では、このような観点からマウスを用いた実験手続きの細部に関わる事項について記載することとした。

今回報告したBPAに関するラットのSCOB実験では、妊娠・授乳期に10 mg/kgのBPAの強制経口投与を行い、生まれた仔ラットを成長後に被験体として使用している。仔ラットの数は1群雌雄各10匹を確保しているものの、母動物の個体数が

1群2匹と少なく予備的なものであり、本報告書では統計的検定を実施していない。FRスケジュール訓練段階で雌の暴露群で比較的高い反応率が得られ、また交替型混合FR DROスケジュール訓練初期で雄のBiasがやや低くなるという結果が得られたが、母動物数が少ないデータである点と単一用量実験であることから、暴露影響を示すデータとしては不十分である。今後、マウスでBPAに関する実験を行う場合の比較参考データを示したものと考えている。

今回使用した強化スケジュールは、タイムアウト時間をセッション内で変化させることで、短期記憶の保持等の認知機能に対する影響把握も可能なようにわれわれが開発したものであり、今後、変動長タイムアウト条件までマウスで訓練を実施するとともに、暴露影響の解析に進む予定である。他の試験法(特に異なる行動試験)によってポジティブな影響が認められたとする暴露条件で、マウスの実験を実施し、我々の試験方法の感度や結果の示す意味について検討しようと考えている。

内分泌かく乱化学物質の脳の性分化への影響に関する研究

今井 清

ドーパミン作動性神経の指標として、チロシンヒドロキシラーゼ免疫組織化学染色法をラット新生児にも適用したが、生後1日目~10日目までの新生児において、本来多数のドーパミン作動性神経細胞が存在する黒質において多数の陽性細胞が観察された。このことは、今回用いた免疫組織化学的染色法がドーパミン作動性神経細胞の指標として十分に使用可能であることを意味するものと考えられる。

新生児の視床下部では、SDN-POAに相当する部位(内側視索前野)においても、生後3日目から明らかにチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞数が増加したが、その数には雌雄差はなく、SDN-POAの容積の雌雄差を形成する要因としてドーパミン陽性神経細胞の数が関与している可能性は少ないと思われる。

一方、ER α 陽性細胞は雌雄ともに視床下部内側視索前野において、生後1日目から観察され、生後の日齢が増加するに従ってその数も増加する傾向にあったが、雌雄を比較すると雌のほうがむしろ多数のER α 陽性細胞が観察されることから、ER α 陽性細胞の数もSDN-PONの容積の雌雄差

を形成する要因になっている可能性は低いと考えられる。なお、特に雄では生後 1 日～3 日目にかけて視床下部後核に相当する部位に一時的に多数のチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞が観察されたが、この部位では ER α 陽性細胞はほとんど観察されず、性ホルモンとの関係を含めその生理学的意義については現時点では不明である。

2) 免疫

内分泌かく乱化学物質の免疫異常に及ぼす影響に関する研究

林 良夫

EDCs が免疫機能に及ぼす影響が *in vitro* の解析に基づいて指摘されているが実験動物を用いた詳細な検討は為されていない。EDCs の新生児期投与による体重の変動に関しては、BPA 及び E₂ 投与により対照群と比較して 2 週目で BPA:85.6%、E₂:87.8%と約 15%の体重減少がみられた。Dex 投与の影響は 2 週、4 週目とも 65.6%と約 35%の著明な体重減少がみられたが、8 週目では回復していた。臓器湿重量については、胸腺への影響が Dex で最も大きく 2 週、4 週で 56.3%、76.6%と減少していた。BPA 投与群、E₂ 投与群における胸腺重量は 2 週目に約 15%～25%の萎縮が認められた。EDCs の新生児期投与によって生後 2 週目に胸腺萎縮がもたらされることは生直後に開始される胸腺内 T 細胞分化へ機能的な障害を与えている可能性が考えられる。その他の臓器として、BPA 投与によって子宮重量の減少が 4 週目でみられたが (76.4%)、8 週目ではほぼ回復していた (92.4%)。Dex 投与群の子宮重量は 4 週目に 25%と顕著な影響がみられたが 8 週では回復がみられた。BPA 及び Dex 投与後 4 週目に認められる子宮重量の減少については機能的な解析を含めた検討が必要である。

免疫担当細胞への影響について胸腺及び脾細胞を用いてフローサイトメトリーによる解析を実施した。脾臓 T 細胞に対する BPA 及び Dex の影響は投与後 2 週目に 35.3%、34.7%と顕著に認められたが、その後は回復していた。さらに、末梢脾臓 T 細胞の CD4 及び CD8 分画の変動について検討した結果、BPA 投与後 2 週目に CD4 陽性 T 細胞:32.4%、CD8 陽性 T 細胞:35.7%と著明な減少が認められた。Dex 投与群でも同じく 2 週後の CD4 陽性、及び CD8 陽性 T 細胞に著明な減少が認められている。これらの減少傾向は 4 週目以降回復が

みられ、新生児期投与による影響は 2 週目までの初期段階に末梢 T 細胞分画の障害として出現する可能性が示唆される。また、脾臓 B220 陽性 B 細胞に対する BPA 及び Dex の影響が投与 2 週後に認められ、B220 陽性 B 細胞が high 分画と low 分画の 2 相性を示していた。新生児期 BPA 投与後及び Dex 投与後 2 週目にみられるこれらの T 細胞分画、B 細胞分画への影響は免疫機能障害と関連している可能性が示唆され、今後の詳細な検討が不可欠である。全身諸臓器の病理組織学的検索の結果、BPA、E₂、及び Dex を投与したいずれの実験群においても 4 週齢、8 週齢において軽度ながら唾液腺 (顎下腺)、及び涙腺における炎症性病変 (White らの分類の grade 1 または grade 2) の出現が認められた。生後 3 日目の胸腺摘出によって成立する自己免疫病変と比較するとごく軽度の変化であるが、これらの炎症性病変が自己免疫に起因するの否か実験群の n 数を増加して詳細に解析することや、長期間にわたる影響を観察することが必要と考えられる。

現在までに EDCs の免疫機能に及ぼす *in vitro* における影響が検討されている。ヒト末梢リンパ球への影響についてはリンパ球を刺激するマイトジェン (コンカナバリン A) に EDCs を加え、リンパ球増殖反応が検討されている。その結果によるとニルフェノール、BPA、フタル酸エステルなどの EDCs が末梢リンパ球の増殖反応を抑制すると報告されている。また、マクロファージの分化能への影響について BPA がマクロファージ前駆細胞からの分化誘導能を促進する作用のあることが報告されている。ヒトを含めた哺乳類の免疫系は胎児期も含め、生後まもない時期に完成することが知られている。この時期に胸腺内 T 細胞分化を中心とする自己と非自己の識別機構に何らかの障害が生じることによって免疫異常を基盤とした自己免疫疾患の発症に至ることが推定される。

新生児期に EDCs を投与した初年度の検討結果から、投与後 2 週目に主としてみられた胸腺萎縮、T 細胞分画、B 細胞分画の異常、及び軽度ながら出現した唾液腺・涙腺における炎症性病変は出生直後に EDCs が体内に取り込まれることによって免疫機能障害が誘導されたことに起因する可能性が示唆された。エストロゲンと類似した作用を示す EDCs が、エストロゲンレセプターを介して遺伝子を活性化し、生体反応を起こすことが知られていることから、次年度以降は T 細胞、B 細胞の

機能解析に加え、エストロゲンレセプターの動態解析を含めた動物実験を実施する予定である。

Local lymph node assay を指標とした内分泌かく乱化学物質の免疫系への影響評価

武吉 正博

CBA/JN マウスに 10 $\mu\text{g/kg/day}$ 及び 50 $\mu\text{g/kg/day}$ の用量で Ethynylestradiol (EE) を経胎盤・経乳汁暴露した結果、50 $\mu\text{g/kg}$ 投与群では産子は得られず、10 $\mu\text{g/kg}$ 投与群においても産子数は減少し、着床痕数は用量依存的に減少した。繁殖成績に影響が認められたが、離乳時の親動物及び仔動物の胸腺細胞の Subpopulation に明白な変化はみられなかったが、今後、仔動物の免疫機能に対する影響について詳細に検討する必要がある。

3) 生殖器

内分泌かく乱化学物質の雄性生殖器発達及びその機能に及ぼす影響

長尾 哲二

エストロゲン高感受性マウス系統の C57BL/6 を用いて E_2 の胎生期暴露後、自然分娩にて得た雄次世代児の成熟後に精巣重量を測定した結果、低用量域から統計学的に有意な低値がみられたが、エストロゲン低感受性マウス系統の ICR では有意な低値はみられず、 E_2 に関しては先の報告と一致した (Spearow et al., 1999)。しかし、低用量 BPA (2 $\mu\text{g/kg}$ 体重) を同様に暴露した結果、C57BL/6 マウスに BPA の毒性変化はみられなかった。また、GEN の暴露では、精巣組織にみられた形態学的毒性変化ならびに精巣重量の低下には両系統間の感受性に差はみられなかった。これらのことから本実験条件下では、C57BL/6 雄マウスの性腺は E_2 に対しては高感受性を示すが、BPA あるいは GEN などの内分泌かく乱性が報告されている化学物質に対しては高感受性を示さないと考えられる。同様のことは幼若マウスの子宮に対する肥大反応においても確認している (長尾、2002)。

DES、 E_2 、EE、EB、TAM あるいは ATZ のマウス胎生期暴露により生殖巣に早期に現れる組織学的変化を電顕観察した結果、間質細胞の細胞質に脂肪滴の増加ならびにグリコーゲン顆粒の集簇などを認めた。これらの変化はテストステロンなどのステロイドホルモンの合成異常に関連した変化であると考えられた。生殖索には暴露物質の影響を示唆する組織学的変化は観察されなかった。

胎児生殖巣及び精巣、新生児精巣の生殖細胞のアポトーシスによる過剰細胞死については、胎児生殖巣の細胞に Tunel 陽性細胞の増加は観察されなかった。しかし、DES、 E_2 、EE、EB、TAM、CLOM 暴露群の新生児の精巣に顕著な Tunel 陽性細胞の増加がみられ、生後の精巣発達期ならびに生殖細胞分裂・増殖期に顕著に観察されることが確認された。ATZ 暴露群、低用量 BPA 暴露群の新生児精巣では、いずれの時期にも Tunel 陽性細胞の増加は観察されなかった。ただし高用量 (100 mg/kg 体重) BPA 暴露では精原細胞にアポトーシスが誘発されることは確認している。正常な精子形成過程において、幹細胞が減少することによって、成熟精子細胞となりうる細胞の 75% もが成人の精巣では失われるといわれており、新生児期、思春期前の発育過程においても精巣では種々の頻度で幹細胞の変性が恒常的に起こるとされている。ラット、マウスにおける形態学的な検討によると、通常、精原細胞において最も多く幹細胞の変性が起こり、この変性はアポトーシスによる細胞死であることが分かっている。また、精巣機能を維持するうえで重要な作用を有するセルトリ細胞やライディッヒ細胞は、アポトーシス細胞死の形態をとらないようである。近年の検討によると、未熟ラット精巣における精巣細胞のアポトーシスはその日齢とともに増加し、ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) のアンタゴニスト投与により高まることから、ゴナドトロピン (とくに卵胞刺激ホルモン FSH) 依存性と考えられる。また FSH、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) 黄体化ホルモン (LH) あるいはテストステロンの投与は、下垂体摘出ラット精巣におけるアポトーシスに対して抑制的に働くことにより、ゴナドトロピンとアンドロゲン (FSH、hCG、テストステロン) は精巣細胞の survival factors として働くと考えられる。このように精巣においては種々のホルモンによるアポトーシス調節機構が存在し、正常及び病的な状態 (胎生期あるいは新生児期における EDCs の暴露を含む) における精子形成過程に深く関わっていると考えられる。以上のことから、胎生期暴露による生殖巣における超微形態的变化及び生後の精巣生殖細胞の過剰アポトーシス誘発が、成熟後の生殖器官の形態的变化の成因の一つと考えられ、これらが EDCs 暴露による adverse な変化であると結論することができた。

対照群の雄胎児の肛門一生殖突起間の組織にお

いては、雌胎児と比較して細胞間質の増加がみられ、同時に細胞外マトリックスの増生が認められた。当該部位の単位重量あたりの HP 量の定量については現在実施中であるが、Flu 暴露群の雄胎児における HP 量が対照群と比較して抑制される傾向がみられた。ヒドロキシプロリン (HP) はヒドロキシリシン(HL)とともにコラーゲンに多い修飾アミノ酸で、リシンとプロリンがプロコラーゲン分子に取り込まれた後に働く酵素により作られる。HP 及びHLは動物細胞のほかのタンパク質にはほとんど存在しないアミノ酸である。HP あるいはHL 量の変化が、ホルモン様作用物質 *hormonally active agents* の胎生期暴露効果に関する鋭敏な指標と考えられている ADG と同様に EDCs の胎生期、新生児期暴露の毒性指標の一つと成り得るかについて今後も検討を継続する予定である。

内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生児期暴露が雌性生殖器に与える影響に関する研究

吉田 緑

1) ラット及びマウスを用いた遅延型影響検索のための陽性対照動物の作製

(1) Donryu ラットを用いた遅延型影響検索のための陽性対照動物の作製

今回の実験結果より、1 あるいは 2 mg/kg 体重の EE の濃度は遅延型影響を誘発するには高すぎることが明らかとなった。本研究班における研究成果の整合性のためにも共通の陽性対照物質を用いることが望ましい。DES 新生児期暴露による結果は実験中のため、投与量の良否については性周期観察の結果を待たなければならないが、ラットマウスともに多くの文献が報告されていることから、DES を陽性対照物質として選択することが望ましいと思われた。

(2) C57BL/6N マウスを用いた遅延型影響検索のための陽性対照動物の作製

今回の実験においてほとんどの仔が死亡した。その原因としては、生後 24 時間以内の投与というストレスも考えられるが、無処置対照群においても全仔が死亡したこと、搬入後の出産までの日数が短い仔マウスの死亡率が高かったこと、さらに繁殖場における分娩後の仔食殺率は、C57BL/6N で 9.4%、ICR で 2.5%であることを勘案すると、この高死亡率の原因は妊娠後期の輸送によるストレスの可能性が大きいと推察された。

今後本系統を使用する場合は、親動物の交配から

出産まで同じ動物室内での実施、あるいは妊娠動物を購入する場合は妊娠中期までの搬入する必要があると思われた。

また、ICR に比較すると出産仔数も少ないことから、新生児暴露を実施する場合、十分量の動物を準備する必要があると思われた。

2) 肝臓のホルモン代謝変調が成熟動物の生殖器へ及ぼす影響とその発現機序について検討

子宮肥大試験の結果より、いずれの量の I3C 投与もラット子宮にエストロゲン及び抗エストロゲン活性を示さないことが明らかとなった。I3C 投与が性周期へ影響を及ぼさないことから、I3C は短期及び長期投与いずれにもエストロゲンあるいは高エストロゲン作用を有するものではないと結論した。

子宮発がん実験の結果、I3C 及び 4HE の長期投与はラット二段階子宮発がんモデルにおいて子宮癌の発生を促進することが明らかとなった。I3C 投与により肝臓の薬物代謝酵素でステロイド代謝に関連すると報告されている CYP1A1, 1A2, 1B1 が誘導され、肝臓中のエストロゲン代謝酵素、とくに 4HE を産生し、4-hydroxylase の活性値が高かったことから、I3C による肝臓中 cytochrome P450 酵素の誘導がエストロゲン代謝を変化、特に子宮がん促進作用を有することが報告されている 4HE の増加が関与している可能性が考えられた。

〈内分泌かく乱性確定試験開発支援基礎研究〉

確定試験に関わる発がん性検討：乳腺上皮系の分化形質を指標とした内分泌かく乱化学物質の発がん影響の検討

長村 義之

代表的な EDCs である BPA や DES の母動物を介しての周産期暴露が、仔動物の乳腺の発達や腫瘍化に及ぼす影響について検討した。今回は DMBA モデルを用い仔ラットの乳腺上皮細胞における細胞増殖の調節機構について TEB を中心に解析した。TEB は上皮細胞の分化・増殖の主要な部位であり、乳腺の化学発がんモデルの標的組織とされている。さらに、そこに内分泌かく乱物質の処置を加えることにより腫瘍化が促進されるか否かを見極めることを重点として検索を進めている。

本実験系において DMBA 投与 4 週間後では、乳腺は対照群を含め基本的に導管を主体とする組織

変化が認められたが、DES 高用量群では明らかに腺房形成が主体であった。この変化は我々が正常雌ラットにE₂の30 μg/kgを筋注した際の組織所見と類似しており、DESの100 μg/kgの周産期暴露が乳腺の組織形態に明らかな影響を及ぼしているものと考えられた。しかし、この時点で腫瘍性病変の形成には群間で明らかな差は見出せなかった。

更に、TEBにおける変化として、ki-67による細胞増殖活性は、BPA投与により用量相関性は明らかでないものの、BPA低用量群でやや高い傾向にあった。また、アポトーシスの発現は、TEBの組織形態を有するBPA低及び高用量群、DES低用量群にやや多い傾向が見られた。これらTEBの変化は、いずれも導管の伸長に関連しているものと考えられるが、さらに同部位のcyclinD1ないしCyclinD1-Cdk4 complex形成等の細胞増殖因子の解析を追加して究明する必要があると考えられる。この点については、TEBの特定の上皮細胞を対象としてLCMを用いてのmRNAレベルの検索も追加検討を進めている。

確定試験に関わる各種核内受容体転写活性迅速確認系構築研究

西川 淳一

CoA-BAPシステムを用いて40種類の化学物質について、多種類の核内受容体への影響を調べた結果、アルキルフェノール類は比較的強くERに作用するなど、他の方法論で得られた結果とある程度の一致が見られ、スクリーニング法として使用可能であると考えられた。しかし、CoA-BAPシステムでは、TBTはRXR α に作用するが、PPAR γ には作用しなかった。逆に、TPTはPPAR γ に作用するが、RXR α には作用しなかった。しかし、レポーター遺伝子試験を行ったところ、TBTとTPTは、いずれもRXR α とPPAR γ の両方の受容体に作用し、CoA-BAPシステムの結果との矛盾が生じた。これは、CoA-BAPシステムが、無細胞系のアッセイ法であり、コアクチベーターとしてTIF2一種類しか用いていないのに対し、レポーター遺伝子試験では培養細胞中に存在する多種類のコアクチベーターのいずれも利用可能であることに起因していると考えられる。この問題を解決するためには、今後、CoA-BAPシステムに使用可能なコアクチベーターの種類を増やし、化学物質選択的な核内受容体への結合を検討する必要がある。

本研究において、有機スズ化合物はPPAR γ とRXRのリガンドとして、脂肪細胞の分化に影響を及ぼすことが明らかになった。現在、PPAR γ やRXRのリガンドは生活習慣病改善薬として開発中であり、その中の一部は既にII型糖尿病改善薬として臨床応用されている。しかし、これらの薬剤は同時に深刻な副作用も報告されており、医師の管理下、慎重な投与が義務付けられている。一方、環境中に放出された化学物質は、このような管理を受けず、ヒトを含む野生生物に常時、摂取される危険性を有しており、この事による健康影響が危惧される。

有機スズ化合物のRXR及びPPAR γ への活性は、非常に低濃度(10 nM)から認められ、これまでに知られているアロマトーゼへの阻害濃度1 μMと較べても、100倍程度低い。有機スズ化合物の内分泌かく乱作用としては、海産性巻貝類のインポセックス誘導が有名であり、この作用も非常に低濃度で起こることが知られている。我々は、別の研究で、海産性巻貝類にRXRに非常に似た遺伝子が存在することを確認しており、このような低用量作用が核内受容体を介している事が推察される。

確定試験に関わる多分化能修飾メカニズム確認の為のES細胞分化増殖影響解析研究

高木 篤也

改良無血清培地を用いたES細胞は少なくとも従来使用してきた培地と同様に分化誘導物質のATRAに対する反応性を保持しており、またBPAのEBのサイズならびに分化への影響を検出することができたため、この系が発生毒性物質の影響解析に利用できることが期待された。

確定試験に関わる生殖器制御メカニズムに基づいた内分泌かく乱作用点の分子毒性的解析

松島 裕子

視床下部で発現が変動する遺伝子の数が少ない結果となったが、その理由として、今回用いた視床下部は、特定の神経核を対象にするのではなく、視床下部領域全体を対象としたため、そのごく一部で発現変動が見られても全体としては希釈され変化として検出出来なかった可能性が考えられる。よって、視床下部領域については神経核を絞った解析が必要である。他の臓器では性周期に伴う発現変動をとらえることが出来ている。子宮や膣な

ど、エストロゲンに対して大きく反応する臓器では周期毎の発現変動も大きかった。特に膣ではプロゲステロン受容体の発現が発情前期で上昇していることが確認され、本研究で得たデータが妥当なものであることが示されていると考えられる。

確定試験に関わる神経系形成・発達メカニズムに基づいた内分泌かく乱作用点の分子毒性学的解析
高木 篤也

本年度は、神経幹細胞に対する化学物質の影響を定量的に検討する系として、ニューロスフェア培養系を基本に、自己複製能、分化能を測定する系の開発に注力し、各々の系を完成することに成功した。エストロゲン様作用物質のいくつかについて、自己複製能に対する影響を予備的に検討した結果、これらの物質が自己複製能を阻害する影響を及ぼす可能性が示唆された。一方で、BPAの影響は今回検討した条件では軽度に留まった。今後、これらエストロゲン様作用物質の影響に関し、確定的データを得る必要がある。また、エストロゲン様作用物質以外のホルモン様物質についてもデータを得る必要がある。

【内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究】

〈OECD Conceptual Frame Work Level 3~4 対応試験開発〉

Pubertal assay の改良としての外来性エストロゲン刺激による卵巣機能等の修飾の高感度検出試験系開発

松島 裕子

CD-1 マウス PND1~5 (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上) + PND18~20 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) において子宮重量が減少し、PND1~5 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) による多卵性卵胞、PND1~5 と PND18~20 との複合効果による子宮内膜 reserve cell hyperplasia が観察された。

追試の結果として、周産期エストロゲン投与により遅発性の変化として、子宮においてエストロゲンに対する反応が鈍くなることが再確認された。

子宮腺の減少、子宮筋層の菲薄化については今後定量的検討を加える。

比較的低用量のDESの新生児期暴露が、性成熟過程の雌性生殖器のエストロゲン感受性に変化を及ぼし、器質的反応性にも影響を及ぼすことが示されたことから、長期観察による機能障害や発がん事象の検討、投与経路の適正化、マウスの系

統の変更 (C57BL/6)、投与化合物の追加変更などを考慮することで、確定試験への対応が可能と成るものと期待される。

前立腺等雄性生殖器系におけるアンドロゲン系影響のエストロゲン等複合シグナルによる修飾の研究

吉村 慎介

EE+TP の投与による Hershberger 試験で、前立腺及び亀頭に絶対重量の有意な低値がみられた。しかし、EE の 1 mg/kg 以上の群では明らかな体重増加抑制があり、相対重量では有意差がみられないかあるいは逆に高値を示した。このことから、EE は、Hershberger 試験では抗アンドロゲン作用を示さないと思われる。

抗エストロゲン作用を有する TAM の前処理で、EE 100 mg/kg 群に絶対及び相対重量の有意な低値がみられたが、この群の体重抑制は著しく、投与開始時よりも体重が低下したことから、この結果が EE の抗アンドロゲン作用によるものか否か明らかではなかった。TAM を併用した EE の 30 mg/kg では 100 mg/kg ほど顕著な体重抑制はなかったが、EE 0 mg/kg 群 (対照群) に比較して、前立腺等に重量の有意な低下はなかった。

以上のように、TAM の併用投与でも Hershberger 試験で EE に抗アンドロゲン作用はみられず、さらに高用量の TAM 併用の必要性が示唆された。しかし、TAM の投与によっても体重増加抑制が認められていることから、EE を上回る投与量を設定するのは困難であると思われる。

【OECD 対応試験実施・調査研究】

子宮肥大および Hershberger に関する試験

小野 宏

OP について、マウス子宮肥大試験を実施した結果、100 mg/kg 投与群 (7 日間反復投与) で子宮重量の有意な増加がみられたが、ラットにおいては 25 mg/kg (14 日間反復投与) で子宮重量の増加が報告されている。投与期間の違いはあるが、OP のエストロゲン活性については、ラットの方がやや感度が高いように思われた。今回の試験結果から、OP に抗エストロゲン活性はないものと推察される。

DHBP の単独投与群では、経口、皮下の両方で子宮重量が増加した。類縁物質のラット子宮肥大試験においても、子宮重量の増加が報告されてい

ることから、DHPB にはエストロゲン活性があると考えられる。今回はさらに、EE との併用投与群で、子宮重量が低下したことから、DHPB には抗エストロゲン活性も有すると推察される。

Hershberger 試験のバリデーション作業では、肛門挙筋・球海綿体筋、前立腺及び精嚢が比較的感度が高く、亀頭及び尿道球腺は感度が低いことが示唆されたが、肛門挙筋・球海綿体筋については、一部の陰性物質においても有意な変化がみられたことから、解剖時の手技について、再度、確認が必要と思われた。なお、本データについては、既に OECD 事務局に送付済みで、今後、各施設で実施された試験結果が集計され、公表される予定である。

Flutamide の皮下投与による Hershberger 試験では、いずれの器官とも用量に依存して低下し、Flutamide の経口投与での抗アンドロゲン活性と同程度の反応が皮下投与でも確認された。この結果から、Flutamide をアンドロゲンアンタゴニストのとして陽性対照に用いる場合には、経口、皮下のいずれの投与方法においても用いることが可能と判断された。

OECD/WHO 関連等ハーモナイゼーション総括 井上 達

内分泌かく乱化学物質問題について解決すべき課題として残されているもの、また、解決されるべきものとして新たに明らかになったものについて、まず低用量問題を巡る高感受性問題は、ヒトの受精を人為的に抑制する用量での影響が、通常の実験動物での試験法では感知できないという結果として、多くの毒性試験の根本的な改良が求められる。

次に、マイクロアレイゲノム解析による今後の内分泌かく乱のメカニズムの解明を研究する手法でも、用量相関などの課題を含む低用量問題が関連しており、今後のリスクアセスメントの問題にもつながっていく。今後も、引き続き、国際的な視野に立ち、科学的認識に基づいた研究交流、科学的情報の行政への反響等を継続してゆくことの重要性が確認された。

反復投与毒性試験系 (TG407 を含む) への適用に関する調査研究

広瀬 明彦

現行の神経発達毒性試験は、発生毒性試験にア

ーウィン法などの行動薬理試験や病理組織学試験を組み合わせることにより編成されており、投与期間も発生毒性試験に準じており脳発達障害の臨界期は考慮されていない。また、行動試験に重点がおかれているが試験結果に及ぼす要因が多いことを考えると新たなエンドポイント (例えば神経生化学的観察) が必要となる可能性は高い。臨床報告から、PCB、メチル水銀などの環境化学物質の妊娠期暴露、アルコール、タバコなど嗜好品や一部の医薬品といった妊娠期の服用が、IQ 低下、ADHD、自閉症などの脳発達障害の発症に関与することが示唆されており、現在、動物実験における確認が実施されている。

①行動試験の限界；

胎生期暴露に対し出生後の行動を評価することは、評価するまでの間に様々な因子加味される弱点がある。行動観察室の背景音、照度、時間などの環境条件も行動試験の結果に大きく影響を与える要因である。自閉症に特徴的な「物や行為への固執、言葉の遅れ、社会性の発達欠如」などを実験動物の行動観察のみから検出するには限界がある。自閉症の動物疾患モデルといわれている胎生期バルプロ酸暴露動物を用いて、常法のオープンフィールド試験を実施すると多動性を示すことが報告されている。また、放射状迷路試験、高架式十時迷路、Rich Environmental Conditions 下において、すくみ (恐怖) や新規性への順応能力が検討されているが、スクリーニング試験への導入には時間を要すると思われる。行動試験のみに依存しない評価方法、あるいは行動試験をサポートできる新たな評価法の開発が必要ではないかと考えられる。

②脳発達障害発現の臨界期の存在；

バルプロ酸やサリドマイド誘発性の自閉症例は、母親が自分の妊娠を自覚する時期以前 (催奇形性の臨界期前) の服用によって発現している。即ち、女性が妊娠を自覚する前後に自閉症発現の臨界期が存在する可能性がある。しかし、現行の発達神経毒性試験では、発生毒性学に基づいた化学物質の暴露期間に設定される連続投与となる。その結果、妊娠維持や出産に重点がおかれ投与用量が下がり、さらに複数の発生段階から発現する毒性を評価することから、ある臨界期に単回投与で十分検出できる脳発達障害を正しく評価していない可能性も考えられる。

脳発達障害を検出するための試験では、これま

での発生毒性試験とは異なる投与期間を考える必要がある。

国内外の子宮肥大試験に関するデータ整理とその問題点の把握及び解決策の検討

永井 賢司

本年度は子宮肥大試験における antagonist 評価に関連したデータを収集し、考察した。in vitro スクリーニング試験である reporter gene assay では antagonist 活性の評価は困難であり、子宮肥大試験の中で実施することが必要と考えられた。また、agonist 活性は認められずに antagonist 活性のみが認められる例や、低・中用量で認められた antagonist 活性が高用量では認められない例もあることから、単一用量では antagonist 活性を見落とす可能性があり、agonist 活性評価と同様、複数群を設定する必要があると考えられた。その他、ガイドライン化する上での留意点として、対照群の子宮重量と使用する飼料、用量設定ならびに群構成について纏めた。

国内外の Hershberger 試験に関するデータ整理とその問題点の把握及び解決策の検討

山崎 寛治

国内における Hershberger 試験に関しては、OECD Validation phase3 に3機関（食品薬品安全センター、日本バイオアッセイセンター、化学物質評価研究機構）が参加し、すでに試験は終了している。今後はデータの取りまとめ、OECD への提出の手順が進むものと考えられる。一方、海外での動向については今回試験開発の中心であるドイツでの情報収集を行った。ドイツでは BASF と Bayer の2機関が Phase3 に参加し、平成16年早々に試験を実施する予定である。また、欧州では内分泌かく乱物質検出系の試験を含め、各毒性試験を組み合わせて化学物質に対する安全性の試験を見直すという REACH が話題になっていた。平成16年度において当試験のガイドライン化に関する論文はみられなかった。

E. 結論

本研究において、包括的対応体系の確率に向けて、胎児期、新生児にあたる周産期暴露が成熟後に不可逆的に影響することや、従来の多世代繁殖毒性試験の限界を認識しつつ、その改良を含む確定試験法の開発を進め、種々の毒性指標を明らか

にした。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

小野 宏: OECD 試験法ガイドラインにおける刺激性/腐食性試験の状況. フレグランス・ジャーナル, 2月号, pp. 22-29 (2005)

Ono, H., Saito, Y., Imai, K., Kato, M.: Subcellular distribution of di-(2-ethylhexyl)phthalate in rat testis. Journal of Toxicological Sciences, 29: 113-124 (2004)

Ohshima, Y., Yokota, S., Kasama, K., Ono, H.: Comparative studies on levels of proteins, bacterial endotoxins and nucleic acids in hyaluronan preparations used to treat osteoarthritis of the knee. — Could residual proteins and bacterial endotoxins relate to complications? — Japanese Pharmacology and Toxicology (薬理と治療), 32: 655-662 (2004)

Ohara, N., Matsuoka, C., Nagata, T., Kanazawa, Y., Inada, H., Horiuchi, S., Saegusa, K., Ono, H.: Topical reactions against intracutaneous injection of three hyaluronan products, Artz, Synvisc and Durolane in guinea pig. Japanese Pharmacology and Toxicology (薬理と治療), 32: 663-677 (2004)

Ono, H.: Validation studies in Japan: A report. Alternatives to Laboratory Animals, 32 Suppl. 1: 631-634 (2004)

小野 宏: 急性毒性試験法ガイドラインの改定とその意義. Journal of Toxicological Sciences, 28: app. 53-62 (2003)

Kusakabe, H., Yamakage, K., Wakuri, S., Sasaki, K., Nakagawa, Y., Watanabe, M., Hayashi, M., Sofuni, T., Ono, H., Tanaka, N.: Relevance of chemical structure and cytotoxicity to the induction of chromosome aberrations based on the testing results of 98 high production volume industrial chemicals. Mutation Research, 517: 187-198 (2002)

小野 宏：循環器毒性—心臓と血管の毒性学—
日本トキシコロジー学会教育委員会 編, 「トキシコロジー」, 朝倉書店, 東京 (2002) pp.229-239.

Nagao, T., Saito, Y., Usumi, K., Yoshimura, S.,
Ono, H.: Low-dose bisphenol A does not affect
reproductive organs in estrogen-sensitive C57BL/6N
mice exposed at the sexually mature, juvenile or
embryonic stage. *Reproduction Toxicology*, 16:
112-121 (2002)

2. 学会発表

Kuwagata, M., Ogawa, T., Muneoka, KT, Ono, H.,
Shioda, S.: Heterogenous sensitivity of the
embryonic system to the genotoxic agent BrdU in
mice. 44th Annual Meeting of the Society of
Toxicology, 2005年3月 (New Orleans)

小野 宏: OECD ガイドラインにおける動物福祉.
第33回日本環境変異原学会 - 第18回日本動物
実験代替法学会合同大会. 2004年12月 (長崎)

小野 宏: 単回投与毒性試験の原理と代替法の現
状. 第17回日本動物実験代替法学会大会.
2003年11月 (相模原)

小野 宏: 動物実験代替法の国際動向. 急性毒性
試験法の変更. 第16回日本動物実験代替法学会
大会. 2002年12月 (東京)

Ono, H.: The new look of the test method validation.
4th World Congress on Alternatives and Animal Use
in the Life Sciences. 2002年8月 (New Orleans)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 発明の名称: 遺伝子の絶対発現量測定方法
(出願中)
発明者: 菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小
野敦、井上達、長尾 拓
出願日: 2003年9月9日
出願番号: 特願2003-317031
出願人: 菅野純、国立医薬品食品衛生研究所

2. 発明の名称: 高次元データを塊に分割する
装置
発明者: 松本伸哉、菅野 純、相崎健一、
迎亮

出願日: 2004年7月27日

出願番号: 特願2004-219285

出願人: 国立医薬品食品衛生研究所長

3. 発明の名称: 核内受容体リガンド検出剤、組
換えタンパク質、発現用遺伝子、組換えベク
ター、形質転換体、核内受容体リガンド検出
方法、及び、核内受容体リガンド検出キット
発明者: 西川淳一
出願番号: 特願2003-166686
出願人: 財団法人大阪産業振興機構

4. 発明の名称: α -フォドリンまたは α -フ
ォドリン断片蛋白を含む製剤
発明者: 林 良夫
出願番号: 特願平9-104873
出願人: 林 良夫、武田国雄; 平成9年4月
22日

5. Patent Number. 6,121,057 Hayashi Y, Hiromu
Sugino: 「Methods of Detecting Antibodies to α -
fodrin and Fragments Thereof in Diagnosing
Sjogrens'」 Yoshio Hayashi September 19,
2000

6. 発明の名称: 自己免疫疾患の予防・治療
剤及びそのスクリーニング方法
発明者: 林 良夫
出願番号: 特願2003-123959
出願人: 林 良夫、興和株式会社; 平成15
年4月28日

7. Patent Number. US6,703,021 B2 Hayashi Y,
Hiromu Sugino: 「Composition containing α -
fodrin or α -fodrin fragment protein」 Yoshio
Hayashi March 9, 2004

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

II. 分担研究報告書

1. 総括補佐及び一生涯試験、OECD バリデーション関連総括
(Bisphenol A を用いた Cj:CD(SD)IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験（委託研究）)

分担研究者 菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 部長

研究要旨

従来の多世代繁殖毒性試験の限界を認識し、その改良を含む試験法開発を進めている。具体的には一生涯（発生、発達、成熟、老化）の全ての段階に於いて内分泌かく乱作用により懸念される毒性指標（神経・行動、免疫毒性等、高次生命系及びその成熟に対する障害に焦点を当てた、従来の多世代繁殖試験の指標に限定されない一連の指標）を網羅的に確認する「齧歯類一生涯試験法」の開発を行う。この詳細試験は、厚生労働省の内分泌かく乱化学物質・試験スキームに則り、内分泌かく乱性を検討する必要がある数十万種の対象化合物について、ホルモン活性に焦点を置いたスクリーニング手法の開発と確立と詳細試験に資する優先リストの作成を進めることと並行して実施するものである。この一環として Bisphenol A のラット経胎盤・経母乳暴露試験を実施した。その結果、7 ヶ月齢時には媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々4/16、13/19、9/19、13/24、12/17 例が性周期異常を示し BPA 0.005 mg/kg 群及び BPA 400 mg/kg 群は統計学的に有意な増加であったことから、低用量 BPA のラット経胎盤・経母乳暴露により pre-middle age に性周期異常が誘発された可能性が示された。

A. 研究目的

厚生労働省内分泌かく乱性化学物質の健康影響に関する検討会に於いて策定された試験スキーム（スクリーニング試験系及び詳細試験）に則り、ホルモン様生体影響を及ぼす化学物質と、その延長線上で生体障害性を発揮する化学物質（内分泌かく乱化学物質）のスクリーニング試験等による優先順位設定を経て、最終的にそれらの内分泌かく乱化学物質としての生体障害性に対する検出確度の高い確定試験法を開発する。

その一環として、未だ確立されていない低用量域の内分泌かく乱化学物質の生体影響を評価する検出指標、試験方法の1つの可能性として、内分泌かく乱性化学物質のラット子宮内・経乳汁暴露によって誘導される雌出生仔の遅発性の性周期異常に焦点を当て、これが低用量の内分泌かく乱影響が次世代に及ぼす影響を検出する検査項目になり得るかを検討する。

B. 研究方法

内分泌かく乱化学物質による生体影響の検討は、従来、生殖毒性にその焦点が置かれてきた。しかし、

低用量問題や遅発影響の検討が進むにつれ、内分泌かく乱化学物質の有害作用は、個体の発生、成長、成熟、老化に関わる広範なものであることが示唆されることとなった。

ホルモン様生体影響を及ぼす化学物質と、その延長線上で生体障害性を発揮する化学物質（内分泌かく乱化学物質）のスクリーニング試験等による優先順位設定を経て、最終的にそれらの内分泌かく乱化学物質としての生体障害性に対する検出確度の高い方法体系を開発することに重点を置き、内分泌かく乱性確定試験開発詳細試験（確定試験）としての「齧歯類一生涯試験法」を提案した。

「試験スキーム」のスクリーニングに於いて形成された化学物質優先順位リストの上位化合物について実施される「確定試験」には、従来型の多世代試験が必ずしも最適でないことが内外の研究により示されてきたため、本申請班の前身となる第2期研究班において種々の調査研究を実施してきた。その結果、ここでは既存の多世代試験法の改良のみに止まらず、一個体の受精、発生、発達、成熟、及び老化に渡る一生涯を標的とした有害性評価試験系「齧歯類一生涯試験」を構築することを目指す。これは、

経済開発協力機構 (OECD) の Conceptual Frame Work Level 5 に対応し、「齧歯類一生涯試験」試験開発研究及び支援基盤研究の2要素から成る。

本分担研究者は総括補佐として齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目を(1)下記の如く調整する際の取り纏めを行うと共に、実際の試験への応用の可能性を明らかにする為に、(2) Bisphenol A (BPA) を雌性動物の周産期に低用量暴露した際の性ホルモン系に対する低用量影響に関する動物実験を実施した(委託研究:委託先:財団法人 化学物質評価研究機構)。

(1) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項、及び OECD 対応

神経・行動

- Bisphenol A 妊娠期・授乳期暴露による行動影響の評価と機序
- マウス・オペラント条件付けによる神経系高次機能影響の評価
- 脳の性分化への影響

免疫

- 免疫反応や免疫異常状態に及ぼす影響

内分泌 (生殖器官発達・老化等)

- 雄性生殖器官発達及びその機能に及ぼす影響
- 胎生期・新生児期暴露が雌性生殖器官に与える影響
- 生殖器系の老化に至る過程に対する影響

内分泌かく乱性確定試験開発・支援基礎研究

- 確定試験に関わる発がん性検討:乳腺上皮系
- 確定試験に関わる核内受容体転写活性等迅速確認系構築
- 多分化能修飾メカニズムとしての ES 細胞分化増殖影響解析
- 生殖器制御メカニズムに基づいた内分泌かく乱作用点解析
- 神経系形成・発達メカニズムに基づいた内分泌かく乱作用点

詳細試験 (確定試験)

- 「齧歯類一生涯試験法」の開発の継続と完成の各項目について、各研究分担者等との調整を行った。

(2) BPA を用いた Crj:CD(SD)IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験 (委託研究:委託先:

財団法人 化学物質評価研究機構)

10 週齢の Crj: CD (SD) IGS ラット (日本チャールス・リバー株式会社、日野飼育センター) の雌 70 匹、雄 35 匹を購入した。5 日間の検疫、馴化期間終了後、健常である事が確認された雌を雄ラットと共に夕刻に交配用ケージに移し、2 対 1 の割合で一晩同居させた。翌朝膣栓及び膣垢中の精子の存在をもって交尾が成立したものとみなし、その日を妊娠 0 日と定め、各群 10 匹となるように交尾確認日ごとに確認順に各群に振り分けた。BPA (CAS 登録番号 80-05-7、ロット番号: 012D222、純度: >98%、関東化学株式会社) の 0、0.005、0.05、40、400 mg/kg/day (陽性対照群として ethynyl estradiol (EE) 0.05 mg/kg/day 群を設定) の用量を、妊娠 6 日から分娩後 20 日 (離乳前日) まで毎日強制経口投与した。なお、媒体はオリーブオイルを使用した。投与用量は投与用量設定試験を基に決定した。投与容量は 5 mL/kg とし、投与量は最新の体重値を基に算出した。

母動物:

全例について、妊娠 0 日から哺育状態も含めて分娩後 21 日 (出生児の離乳日) まで毎日 1 回以上観察した。体重は妊娠 0、6、14、17 及び 20 日、分娩後 0、4、7、14 及び 21 日 (出生児の離乳日) に測定した。妊娠動物の全例を自然分娩させ妊娠期間、出産数を求めた。分娩日を分娩 0 日とした。交尾が確認された全動物は分娩後 21 日目 (離乳日) にエーテル麻酔下で安楽致死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。子宮は切開して硫化アンモニウムに浸漬後着床痕数を算出し、出生数 (率) を求めた。

出生児:

出生日 (0 日齢) に産児数、死産児数、出産生存児数、出產生児性比、出產生児外表 (口腔内を含む) の検査を行った。一般状態については剖検日まで毎日 1 回以上観察した。体重は 0、4、7、14 及び 21 日齢 (出生児の離乳日)、以降週 1 回に加え、包皮分離日、膣開口日及び剖検日に測定した。

哺育期間中を通して生存児数、死亡児数の検査を行った。

発育分化検査:

- ① 生後 4 日齢に生存する全出生児について肛門・

生殖突起間距離 (Anogenital distance; AGD) をデジタル式ノギス (Digimatic Caliper CD-15CP、株式会社ミットヨ、神奈川) を用いて 0.01 mm 単位で測定した。

②生存する雄離乳児全例について、35 日齢から陰茎亀頭型分類を実施した。

③生存する雌離乳児全例について、21 日齢から膣開口を観察した。

生後 4 日齢に同腹出生児数を 10 匹 (雌雄各々 5 匹) になるよう無作為抽出法を用いて個体数調整を行った。同腹出生児数が 10 匹に満たない場合には、調整を行わず、片性が 5 匹に満たない場合には合計の同腹新生児数が 10 匹となるように調整した。更に、同腹新生児のうち、雌雄各々番号の若い動物から①性周期長期観察群 (5 匹中 2 匹)、②生殖能力検査群 (5 匹中 2 匹)、③10 週齢解剖群 (5 匹中 1 匹) の順に振り分け、匹数が少ない場合の優先順位は①、②、③とした。

生殖能力検査群：

児動物の雌雄各 2 匹/腹について生殖能力検査を実施した。児動物の雌雄ラットは 13 週齢に達した時点で同用量群の雌雄ラットを 1 対 1 の割合で 14 日間を限度として交配させ、交尾所要日数、交尾数 (率)、受精数 (率)、受胎数 (率) を観察した。なお、雌雄ラットの交配に際しては、兄妹交配を避けるように注意した。

膣栓及び膣垢中の精子の存在をもって交尾が成立したものとみなし、その日を妊娠 0 日と定めた。交尾が確認された雌は妊娠 20 日にエーテル麻酔下で放血し、安楽致死させた後、帝王切開して、子宮は硫化アンモニウムに浸漬して着床痕数を算出した。更に、黄体数、着床数、胚・胎児死亡数 (早期、後期吸収胚及び死亡胎児に分類)、生存胎児数、生存胎児性比、生存胎児体重、生存胎児胎盤重量及び生存胎児外表 (口腔内を含む) を調べた。

10 週齢解剖群：

1 匹/腹の雌出生児について、8 週齢から 14 日間以上膣垢を採取し、性周期を観察、休止期を呈する動物 (約 10 週齢時) を CO₂+O₂ 麻酔下で腹部大動脈より採血し、採取した血液から血清を分離し Triiodothyronin (T3)、Thyroxin (T4)、さらにそれらの遊離型である FT3 及び FT4 を測定した。その後、放血致死し安楽死させた後、外性器の形態計測

学的検査として尿道開口部スリット長、ファラス先端-尿道開口部距離、尿道開口部-膣開口部距離をデジタル式ノギスを用いて 0.01mm 単位で測定した。

1 匹/腹の雄出生児については 10 週齢に達した動物を順次 CO₂+O₂ 麻酔下で腹部大動脈より採血し、採取した血液から血清を分離し、T3、T4 さらにそれらの遊離型である FT3 及び FT4 を測定した。その後、放血致死し安楽死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。

剖検時に脳、下垂体、甲状腺、肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、腹葉前立腺、子宮及び卵巣を採取し、湿重量を測定した。甲状腺、下垂体については 10%中性緩衝ホルマリン液で固定、約 24 時間後に重量測定を行った。

性周期長期観察群：

児動物の雌雄各 2 匹/腹の出生児については、遅発性の影響の有無を確認する目的で、7 ヶ月齢まで継続して観察を行った。

児動物の雌については、3 ヶ月齢以降 7 ヶ月齢まで膣スメアによる性周期観察を行った。膣スメアは午前 9:00 から午前 11:00 の間に採取した。14 日間連続採取後、2 週間休止のサイクルを 7 ヶ月齢まで繰り返し行い、ギムザ染色後、鏡検により発情前期、発情期、発情後期、休止期に区分した。

正常な性周期が認められた個体を normal (N)、異常な性周期が認められた動物は、persistent diestrus (休止期が 5-9 日継続)、constant diestrus (休止期が 10 日以上継続)、persistent estrus (発情期が 3-7 日継続)、constant estrus (発情期が 8 日以上継続) 及び irregular estrus (何れの分類にも当てはまらない不定期な性周期) に分類した。

7 ヶ月齢に達した児動物は 14 日間以上膣垢を採取し、性周期を観察し、休止期を呈する動物を CO₂+O₂ 麻酔下で腹部大動脈より採血し、その後、放血致死し安楽死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。なお、休止期を示さない場合には、連続する発情期あるいは連続する発所前期を呈する動物を解剖した。児動物の雄については 7 ヶ月齢に達した動物を CO₂+O₂ 麻酔下で腹部大動脈より採血し、その後、放血し安楽死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。剖検時に脳、下垂体、甲状腺、肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、腹葉前立腺、子宮及び卵巣を採取し、湿重量を測定した。甲状腺、下垂体については 10%中性緩衝ホルマリン液で固

定、約24時間後に重量測定を行った。

現在、7ヶ月齢の剖検で採取した児動物雌の下垂体、卵巣、子宮、膣及び肉眼的病変部について、病理組織学的検査を実施中である。

C. 研究結果

(1) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項、及び OECD 対応

神経・行動に関しては、Bisphenol A 妊娠期・授乳期暴露をモデルとし、dopamine 及び serotonin (5-HT)神経系に着目した行動影響の評価と機序、マウス・オペラント条件付けによる神経系高次機能影響の評価及び脳の性分化への影響解析を実施することになった。

免疫系に関しては、自己免疫発症に関わるモデルの改良、Local Lymph Node Assay を用いた免疫機能の修飾影響の解析を実施することとなった。

内分泌系に関しては、従前の生殖毒性に限定せず、中枢を含む性分化への影響、生殖関連臓器の形成、発達、機能、及びその加齢変化に対する影響を視野に入れた研究を実施することとなった。

詳細試験については、神経・内分泌・免疫ネットワークの発生・発達・成熟・老化を考慮した「齧歯類一生涯試験法」の開発を推進することとなった。

(2) BPA を用いた Crj:CD(SD)IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験 (委託研究：委託先：財団法人 化学物質評価研究機構)

母動物；

一般状態及び体重の推移 (Fig. 1、Tables 1-1、Addendum 1-1)

媒体対照群の1例 (No.3) が不妊であった。その他の母動物については、妊娠期間中、一般状態に異常はみられず、媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群、EE 群の妊娠動物数は9/10、10/10、10/10、10/10、10/10、10/10 匹であった。

母動物の体重推移は、媒体対照と比較し BPA 400 mg/kg 群及び EE 群において妊娠 14 日目～哺育期間を通じて有意に低値であった。

哺育拒否及び哺育拒否動物の剖検所見 (Tables 2、10-1、Addenda 2、10-1)

媒体対照群の1例 (No.5) は雄6匹、雌9匹 (うち雌1匹は死産) を分娩したが、生後2日目までに全腹児の死亡が確認された。この母動物は腹児のす

べてが死亡した時点でエーテル麻酔下で放血し、安楽死させ剖検した。その結果、乳腺の発達不良及び胸腺の萎縮が認められた。

BPA 400 mg/kg 群の1例 (No.47) は雌雄各7匹を分娩したが、哺育拒否により生後3日目に雌雄各1匹、4日目までに全腹児の死亡が確認された。この母動物は腹児のすべてが死亡した時点でエーテル麻酔下で放血し、安楽死させた。剖検所見にて、乳腺の発達不良、胸腺の萎縮、前胃の境界縁の隆起、及び盲腸の拡張が認められた。

その他の母動物には、分娩及び哺育に異常を認めなかった。

剖検所見 (Table 10-1、Addendum 10-1)

媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40 mg/kg 群、EE 群には異常所見はみられなかった。BPA 400 mg/kg 群では、前胃の境界縁の隆起が9/9例に、盲腸の拡張が8/9例にみられた。

出生児；

着床痕数、産児数、死産児数、出産生存児数、出産生児性比、出産生児外表検査、授乳期の生児数及び死亡児数、一般状態及び体重の推移 (Figs. 2、3、Tables 1-2、1-3、1-4、2、3、Addenda 1-2、1-3、1-4、1-5、1-6、2、3)

外表検査及び一般状態は、媒体対照群を含む何れの群にも異常はみられなかった。

着床痕数、産児数及び出産生存児数は、媒体対照群に比し BPA 0.005 mg/kg 群で有意に低値であった。

この他、死産児数、出産生児性比、哺育期間中の生存児数及び死亡児数は、媒体対照群と BPA 群及び EE 群との間に差はみられなかった。

BPA 0.05 mg/kg 群の雌児1例が、同腹新生児数調整 (生後4日目) の翌日に食殺された。

出生から離乳までの体重は、媒体対照群に比し雌雄 BPA 0.005 mg/kg 群で、出産0日目及び生後4日目に有意な高値がみられた。EE 群は、雄では生後14日目及び21日目に、雌では生後14日目に有意な低値がみられた。

児動物の雄では、生後4週齢から試験終了時34週齢 (7ヶ月齢) までの体重は、媒体対照群に比し BPA 0.005 mg/kg 群で生後4週齢目に有意な高値が、15週齢以降は有意な低値がみられた。BPA 0.05 mg/kg 群では生後12週齢以降有意な低値がみられ

た。BPA 40 mg/kg 群では、生後 14 週齢目、26 週齢目及び 28 週齢以降有意な低値がみられた。BPA 400 mg/kg 群では生後 6 週齢以降、EE 群では生後 4 週齢以降有意な低値がみられた。

児動物の雌では、BPA 400 mg/kg 群で生後 4 週齢目のみ、EE 群では生後 4 週齢及び 5 週齢目に有意な低値がみられた。それ以外は媒体対照群と BPA 群及び EE 群はほぼ同様な推移を示した。

発育分化検査：

①肛門・生殖突起間距離 (Tables 4-1、4-2 Addenda 4-1、4-2、4-3、4-4、4-5、4-6)

AGD 及び AGD 体重補正值は、雌雄とも媒体対照群と BPA 群及び EE 群との間に差は認められなかった。一方、AGD 測定日の体重は、媒体対照群に比し、雌雄 BPA 0.005 mg/kg 群で有意な高値がみられた。

②陰茎亀頭型分類 (Table 4-3、Addenda 4-7、4-8)

包皮分離日齢は、媒体対照群と BPA 群との間に差は認められなかった。一方、EE 群では有意な遅延がみられた。包皮分離日の体重は、媒体対照群と BPA 群及び EE 群との間に差はみられなかった。

③膣開口検査 (Table 4-4、Addendum 4-9)

膣開口日齢は、媒体対照群と BPA 群及び EE 群との間に差は認められなかった。一方、膣開口日の体重は、媒体対照群に比し BPA 群では差は認められなかったが、EE 群では有意な低値がみられた。

生殖能力検査群：

生殖能力検査 (Tables 1-5、5-1、5-2、Addenda 1-7、5-1、5-2)

何れの項目についても、媒体対照群と BPA 群及び EE 群との間に差は認められなかった。

10 週齢解剖群：

雌外性器形態計測学的検査 (Table 6、Addendum 6)

尿道開口部スリット長、ファラス先端-尿道開口部間距離及び尿道開口部-膣開口部間距離は、媒体対照群と BPA 群との間に差はみられなかった。一方、EE 群では尿道開口部スリット長及びファラス先端-尿道開口部間距離は有意な延長がみられ、尿道開口部-膣開口部間距離が有意に短縮し、形態異常が認められた。

(参考：血清 T3、T4、FT3 及び FT4 測定 (Tables 7-1、7-2、Addenda 7-1、7-2；生データ不在のため、参考データ)

何れの項目についても、雌雄とも媒体対照群と BPA 群との間に差は認められなかった。一方、雌 EE 群では、FT3 が有意に高値であった。)

器官重量 (Tables 9-1、9-2、9-3、9-4、Addenda 9-1、9-2、9-3、9-4)

児動物の雄では、媒体対照群に比し BPA 0.05 mg/kg 群の精巣の絶対重量、BPA 40 mg/kg 群の肝臓の相対重量が有意に低値であった。これ以外では、絶対及び相対重量ともに媒体対照群と BPA 群及び EE 群との間に差はみられなかった。

児動物の雌では、絶対及び相対重量ともに媒体対照群と BPA 群及び EE 群との間に差はみられなかった。

剖検所見 (Tables 10-2、10-3、Addenda 10-2、10-3)

児動物の雄では、腎盂拡張が媒体対照群で 1/7 例、BPA 0.05 mg/kg 群で 1/10 例、BPA 40 mg/kg 群で 2/9 例にみられた。

児動物の雌では、腎盂拡張が BPA 400 mg/kg 群で 1/9 例にみられた。Cleft phallus が EE 群で 7/9 例にみられた。

性周期長期観察群：

性周期検査 (Tables 8-1、8-2、Addenda 8-1、8-2、8-3、8-4、8-5、8-6)

3 ヶ月齢時においては、媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 0/16、2/20、2/19、3/24、3/18 例が性周期異常を示した (媒体対照群では異常はみられなかった)。4 ヶ月齢時には媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 6/16、3/20、2/19、5/24、5/18 例が性周期異常を示した。5 ヶ月齢時には媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 3/16、8/19、4/19、7/24、12/17 例が性周期異常を示した。6 ヶ月齢時には媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 6/16、10/19、7/19、7/24、8/17 例が性周期異常を示した。7 ヶ月齢時には媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 4/16、13/19、9/19、13/24、12/17 例が性周期異常を示した。なお、性周期異常を示す動物数は、BPA 0.005 mg/kg 群では 7 ヶ月齢に、BPA 400 mg/kg 群では 5 ヶ月齢と 7 ヶ月齢において統計学的に有意に増加し

た。EE 群では、3 ヶ月齢時に 8/22 例が性周期異常を呈し、5 ヶ月齢以降には有意な増加を示した。7 ヶ月齢時に estrus の異常を示した (persistent estrus または consistent estrus を示した) 例数は、媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群、および EE 群で各々 1/16、8/19、2/19、3/24、7/17、10/22 であり、媒体対照群に対して BPA 0.005 群、BPA400 群および EE 群で有意な増加を示した。

器官重量 (Tables 9-5、9-6、9-7、9-8、Addenda 9-5、9-6、9-7、9-8)

児動物の雄では、BPA 0.005 mg/kg 群において、脳の相対重量が高値、肝臓及び精嚢の絶対重量が低値であった。BPA 0.05 mg/kg 群において、肝臓の絶対及び相対重量が低値を示し、脳、腎臓、精嚢及び腹葉前立腺の絶対重量が低値であった。BPA 40 mg/kg 群において、脳の絶対重量が低値であった。BPA 400 mg/kg 群において、脳の絶対重量が低値、相対重量が高値を示し、甲状腺、肝臓及び腎臓の絶対重量が低値であった。EE 群において、脳、下垂体、肝臓、腎臓、精巣、精巣上体、精嚢及び腹葉前立腺の絶対重量が低値であった。

児動物の雌では、BPA 40 mg/kg 群において、甲状腺の絶対重量及び相対重量が低値であった。BPA 400 mg/kg 群において、甲状腺の絶対重量が低値であった。EE 群において子宮の絶対及び相対重量が低値であった。

剖検所見 (Table 10-4、10-5、Addenda 10-4、10-5)

児動物の雄では、媒体対照群で肝臓に白色部 (white region) 1/18 例、腎盂拡張が 1/18 例にみられた。BPA 0.005 mg/kg 群では腎盂拡張 1/27 例、精巣の萎縮が 1/27 例にみられた。BPA 0.05 群では腎盂拡張が 1/29 にみられた。BPA 40mg/kg 群では腎盂拡張が 1/22 例にみられた。BPA 400 mg/kg 群では、腎盂拡張が 1/17 例、下垂体の暗赤色部 (dark reddish region) が 1/17 例にみられた。EE 群では精巣の萎縮が 1/22 例、精巣の透明化を伴う軟化 (transparent softening) が 1/22 例にみられた。

児動物の雌では、媒体対照群で子宮腔内に液貯留が 5/16 例にみられた。BPA 0.005 mg/kg 群で子宮に結節が 1/19 例、膣に結節が 1/19 例、脳室の拡張が 1/19 例にみられた。BPA 0.05 mg/kg 群では、子宮腔内に液貯留が 1/19 例、皮下に結節が 1/19 例、下垂体に暗赤色部 (dark reddish region) が 1/19 例にみら

れた。BPA 40 mg/kg 群では、子宮腔内に液貯留が 2/24 例、子宮に結節が 1/24 例、膣に結節が 1/24 例、下垂体の暗赤色部 (dark reddish region) が 1/24 例、腎盂拡張が 2/24 例、輸卵管嚢胞が 1/24 例にみられた。BPA 400 mg/kg 群では、子宮腔内に液貯留が 2/17 例、腎盂拡張 1/17 例、膀胱内結石 1/17 例、卵巣の出血が 1/17 例にみられた。EE 群では、Cleft phallus が 15/22 例、外性器腫脹が 2/22 例にみられた。

途中死亡動物剖検所見 (Tables 10-4、10-5、Addenda 10-4、10-5)

児動物の雄では、BPA 0.005 mg/kg 群の 1 例 (No.148) で 4 ヶ月齢時に左腹部の膨大がみられ、切迫屠殺したところ、腎臓に腫瘤 (10.0 cm×8.0 cm×7.0 cm) を認めた。BPA 400 mg/kg 群の 1 例 (No.320) が、22 週齢目に死亡しているのが確認された。この動物の胸腔内には血様胸水がみられた。更に、心臓、肺臓及び気管大動脈を包み込む白色の腫瘤がみられ、胸腺腫が疑われた。

児動物の雌では、媒体対照群 1 例 (No.536) が 13 週齢目に死亡したが、剖検は実施しなかった。BPA 0.005 mg/kg 群の 1 例 (No.562) において、5 ヶ月齢 (25 週齢) 時に左腹部の皮下に結節 (φ30 mm) があり切迫屠殺した。BPA 400 mg/kg 群の 1 例 (No.693) において、4 ヶ月齢時に左腹部の膨大がみられ切迫屠殺したところ、腎臓に結節 (9.0 cm×6.0 cm×5.0 cm)、肺臓に結節 (φ2~4 mm) がみられた。

現在、7 ヶ月齢の剖検で採取した児動物雌の下垂体、卵巣、子宮、膣及び肉眼的病変部について、病理組織学的検査を実施中である。

D. 考察

(1) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項、及び OECD 対応

この中で、神経障害性に関しては、必ずしも明確な器質的障害は誘導されないことが想定される。本研究班では、高次行動異常を当面の焦点に、胎生期・新生児期暴露が認知機能、場面適応性や報酬効果に及ぼす影響の確認実験系の導入を進める。免疫系に関しては、有害性指標として自己免疫疾患モデル (人に於いて性差が著しいことで知られるシェーグレン病のモデル)、あるいは IV 型免疫応答のモデルである Local Lymph Node Assay の改良形を用いて、化学物質による自己免疫及び獲得免疫機能の修飾の影

響を当面の対象として解析する。内分泌系に関しては、生殖機能に関わる従来の指標に加えて、早発閉経等のモデルの一つとしての成熟後の機能異常の発生を中心とした解析をさらに推進する。

(2) BPA を用いた Crj:CD(SD)IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験 (委託研究：委託先：財団法人 化学物質評価研究機構)

母動物の妊娠期間から哺育期間において、媒体対照群で1例、BPA 400 mg/kg 群で1例、哺育拒否または哺育不良のため全腹児が死亡した。この2例の母動物の剖検所見において、胸腺の萎縮が共通して観察されていることから、何らかのストレス下にあったことが想像される。また、2例共に乳腺発達不良が認められており、その原因については不明であるが、産児の直接的な死亡原因は十分な授乳が行われなかった事であると考えられる。その他の群には異常は認められなかった。

母動物の体重が、BPA 400 mg/kg 及び EE 群において妊娠 14 日目から哺育期間にかけて有意に低値を示した。BPA 400 mg/kg 群の剖検所見では前胃の境界縁の隆起と盲腸拡張が観察されたが EE 群では変化は認められていない。母動物の体重は産児数によっても影響を受けるが、産児数については EE 群、BPA 400 mg/kg とともに、媒体対照群との間に差は認められなかった。本試験では摂餌量測定を実施していないため、摂食量の低下があったか否かは明らかではないが、BPA 400 mg/kg 群の体重が低値を示した一因には消化管障害の影響が示唆される。EE 群については、エストロゲン作用による体重低下の可能性が考えられる。

着床痕数、産児数及び出産産児数は媒体対照群に比較して BPA 0.005 mg/kg において有意に少ない。これは、媒体対照群の平均産児数が 14.7 ± 0.7 匹に比し、BPA 0.005 mg/kg 群の母動物 No.13、No.14、No.16 及び No.17 の産児数が各々 9 匹、7 匹、5 匹及び 6 匹であることによる。なお、この4例での低値の原因は不明である。

BPA 0.005 mg/kg 群の児動物雌雄の体重が、出産時から離乳期まで有意に高値を示した。これは、胎児数が少ない母動物の産児の体重が高値であったことによる。なお、上記母動物 No.16 及び No.17 の妊娠期間は 23 日であった。一般に齧歯類において胎児数が少ない場合には出産時期が遅れるため、産児の体重が増加することから、この結果は 4 母体にお

いて胎児数が減少したことによると考えられる。

生後 4 週齢以降の児動物の体重推移については、雌雄で異なる結果であった。すなわち、雄では BPA の投与用量によって観察される時期は異なるが、概ね 12 週齢以降に低値を示し、7 ヶ月の解剖に至るまで継続した。雌では、BPA 400mg/kg 群の 4 週齢のみ媒体対照群に比して低値を示したが、それ以降には差は認められなかった。その他の BPA 投与群には影響が認められなかった。EE 群では 4 週齢及び 5 週齢目に有意な低値がみられた。摂餌量測定を実施していないため、同化作用の低下による成長阻害であるのか、摂取カロリーの減少であるかは不明であるが、体重への影響は雌より雄で顕著であると考えられる。

児動物雄の 10 週齢時における器官重量については、BPA 0.05 mg/kg 群の精巣の絶対重量、BPA 40 mg/kg 群の肝臓の絶対及び相対重量が低値であった。雄 7 ヶ月齢の器官重量において BPA 0.005 mg/kg 群で精囊の絶対重量、BPA 0.05 mg/kg 群で精囊及び腹葉前立腺の絶対重量、BPA 400 mg/kg 群で甲状腺の絶対重量が低値を示した。更に BPA により脳、肝臓あるいは腎臓の絶対重量が低値を示す群が散見された。これらの絶対臓器重量の低値傾向は EE 群とほぼ共通していることから、視床下部-下垂体-生殖器等を介した影響、あるいはそれに加えての体重の変化による影響と考えられる。

これらの影響は用量相関性が乏しく、従来の毒性学評価によるならば BPA 固有の影響であるかは明らかではない。しかしながら、核内受容体を介した作用であるならば、少ない分子数でもシグナルを伝えることが可能であり、また、受容体数が有限であることから飽和する現象が考えられるなど一般的な毒性とは異なる用量相関性を示すことが考えられる。

児動物雌の 10 週齢時における器官重量には変化は認められず、雌 7 ヶ月齢の器官重量においては、BPA 40 及び 400 mg/kg 群において甲状腺の絶対重量及び相対重量が低値を示した他には変化が認められなかった。器官重量については、雌動物では雄動物に比較して影響が少ないと考えられる。EE 群の雌においても、器官重量に特徴的な変動は観察されなかった。なお、肉眼所見で EE の影響として Clef phallus が 5/22 例に観察された。

既報の実験として、EE (0、0.5、5、50 µg/kg/day) を SD(IGS)ラット妊娠 6 日から分娩後 20 日まで母

ラットに経口投与し出生児への影響を調べた結果、EE 50 µg/kg 群において 10 週齢時の生殖能力検査では異常を示さないが、雌では外性器の形態異常 (cleft phallus)、pre-middle age である 6 ヶ月齢において性周期異常及び卵胞嚢胞等、ラットの生殖機能の老化過程においてみられる報告があり¹⁾、今回と同様の所見であった。ラットにおいて、通常 (2-3 ヶ月齢) の生殖能力検査で異常を示さないが、その後性周期の異常、無排卵状態に陥る病態は、delayed anovulation syndrome として、テストステロンの新生時期投与などによって引き起こされる事が知られており、生殖機能の老化が早期に現れる結果として生じる事が示唆されている。

今回の実験では、生後 4 日目の肛門・生殖突起間距離の測定、生後 21 日目以降の膣開口の観察、生後 35 日目以降の陰茎亀頭型分類、10 週齢時の雌外性器の形態計測学的検査、13 週齢時の生殖能力検査、10 週齢時の器官重量測定の各項目については BPA 投与に起因する異常は認められなかった。しかしながら、性周期長期観察群における 7 ヶ月齢時の性周期検査では異常周期を示す動物が BPA 0、0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 4/16、13/19、9/19、13/24、12/17 及び 20/22 例観察された。

次に性周期を中心に考察する。本実験でみられた性周期異常が BPA 投与に起因するか否かを考察するため persistent estrus 及び constant estrus を呈した動物の発現状況に注目した。

3、4、5 及び 6 ヶ月齢では媒体対照群と BPA 群との間に persistent estrus 及び constant estrus の発生数に有意な差は認められず、EE 群にも差は認められなかった。7 ヶ月齢においては persistent estrus を示す動物が媒体対照群、BPA 0.005 mg/kg、BPA 0.05 mg/kg、BPA 40 mg/kg、BPA 400 mg/kg 及び EE 群においてそれぞれ 0/16、7/19、2/19、2/24、7/17 及び 8/22 例であり、統計学的に全 BPA 群及び EE 群で有意に増加した。他方、constant estrus を呈する動物は媒体対照群、BPA 0.005 mg/kg、BPA 0.05 mg/kg、BPA 40 mg/kg、BPA 400 mg/kg 及び EE 群においてそれぞれ 1/16、1/19、0/19、1/24、0/17 及び 2/22 例であり、媒体対照群と BPA 群及び EE 群との間に差は認められなかった。BPA 400 mg/kg 群においては 1 例ではあるが 3 ヶ月齢時に性周期の異常 (constant estrus) を示す動物が観察され、4 ヶ月齢時にはその性周期の回復がみられたが、その原因は不明であった。

なお、持続する休止期 (persistent diestrus 及び constant diestrus) が認められる場合、手技的要因により偽妊娠状態に陥った可能性も疑われる。そこで、3 ヶ月齢時の persistent diestrus 及び constant diestrus を呈した動物に注目すると、媒体対照群及び BPA 0.005 mg/kg 群では各々 0/16 例、0/20 例であるのに対し、陽性対照 (EE) 群では 7/22 例にみられており、性周期異常の発現は手技的な要因による可能性は低いと考えられるが、今後の検討課題である。

以上より、今回、低用量 BPA のラット経胎盤・経母乳曝露により pre-middle age に性周期異常が誘発された可能性が示されたと考える。

生殖機能の老化の本態は、未だ解明されていない。子宮内・経乳汁曝露によって引き起こされる性周期異常の原因としては中枢の神経内分泌系の異常や卵巣側、すなわち oocyte reserve の減少等が考えられるが、ヒトにおいては DES daughter と control で oocyte reserve は変わらなかったという報告がある²⁾。いずれにせよ、BPA 及び EE の子宮内・経乳汁曝露により pre-middle age における性周期の異常がみられた原因については不明であり、今後、本実験結果の再現性、他のエストロゲン作用を有する物質による pre-middle age における性周期異常が誘導されるか、さらにはそのメカニズム解析等が必要と考えられる。

上述のごとく、BPA と EE との対比により、その作用には共通性があることから BPA によってみられた性周期異常は主にエストロゲン受容体を介したメカニズムによって引き起こされた可能性が第一に考えられる。BPA はエストラジオールに比較して血清蛋白の影響を受けにくいことが報告されている³⁾。また、BPA は様々な核内受容体とも結合することが知られていることから、BPA 固有の作用が介在している可能性は残っており、今後の検討課題である。

これまでリスク評価のための試験法として考えられてきた多世代繁殖試験や EPA によって提案されている in utero through lactational exposure 案には、遅発性の性周期異常を評価するための観察項目は設定されていない。本実験の結果は、内分泌かく乱化学物質においては長期間にわたる影響に関する評価が必要であることを示していると考えられる。

参考文献

- 1) Sawaki et al. In utero through lactational exposure to

ethinyl estradiol induces cleft phallus and delayed ovarian dysfunction in the offspring. *Toxicol Sci*, 75, 402-11, 2003.

- 2) Sangvai et al. The effect of intrauterine diethylstilbestrol exposure on ovarian reserve screening. *Am J Obstet Gynecol*, 177, 568-572, 1997.
- 3) Nagel et al., The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity. *Proc Soc Exp Biol Med*, 217(3), 300-9, 1998.

E. 結論

(1) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項、及び OECD 対応

一生涯（発生、発達、成熟、老化）の全ての段階に於ける内分泌かく乱作用を考慮する必要が改めて示された。今後、OECD 試験法ガイドライン化を視野に入れた試験法の開発、バリデーション、OECD で取り上げられている新たな内分泌かく乱性試験法の我が国としての評価を進展させる。懸念される毒性指標としては、神経・行動、免疫毒性等、従来の多世代繁殖試験の指標に限定されない一連の指標を設定し、引き続き網羅的に確認する。

受容体原性毒性の立場を踏まえた試験スキームを構築し、クロストーク問題、低用量問題等に的確に対応可能な体制を確立すべく、研究開発を更に進める。

「詳細試験（確定試験）」として一生涯（発生、生育、成熟、老化）の全ての段階において内分泌かく乱作用により懸念される毒性指標を網羅的に確認する「齧歯類一生涯試験法」の開発を行う（支援基礎研究を含む）ことにより、内分泌かく乱性の試験評価に関する包括的なガイドラインの開発に的確に貢献する。

(2) BPA を用いた Crj:CD(SD)IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験（委託研究：委託先：（財）化学物質評価研究機構）

BPA の 0、0.005、0.05、40、400 mg/kg/day を SD(IGS) ラットの妊娠 6 日から分娩後 20 日まで母ラットに経口投与し、出生児への生殖関連事項への影響を中心に検討した。その結果、いずれの BPA 投与群においても肛門・生殖突起間距離、膣開口日齢、陰茎

亀頭包皮分離日齢、10 週齢剖検時所見（器官重量測定を含む）、雌外性器形態計測学的検査及び 13 週齢時に実施した生殖能力検査において異常はみられなかった。しかしながら、7 ヶ月齢時における性周期検査では異常周期を示す動物が BPA 0、0.005、0.05、40、400 mg/kg 群、EE 群で各々 4/16、13/19、9/19、13/24、12/17、20/22 匹に観察され BPA 0.005 mg/kg 群及び BPA 400 mg/kg 群は統計学的に有意な増加であった。また、estrus の異常についても BPA 0.005 mg/kg 群での有意な増加が認められた。この事から陽性対照 EE 群、高用量 BPA 群に加え、低用量 BPA 群においても pre-middle age における性周期異常が誘導されることが示唆された。

現在、ヒトでの BPA の許容摂取量は 0.05 mg/kg/day とされている。しかしながら、本実験結果はそれと同等かそれ以下の投与用量で遅発性の性周期異常の可能性がみられており、実験結果の再現性を確認することが次の最重要課題と考えられる。

以上の結果、内分泌かく乱化学物質暴露においては長期間にわたる性機能への影響に関する評価が必要である事が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi Y, Kitajima S, Inoue T, Kanno J, Saga Y. Differential contribution of Mesp1 and Mesp2 to the epithelialization and rostro-caudal patterning of somites. *Development*, 132, 787-796, 2005

Ishikawa A, Kitajima S, Takahashi Y, Kokubo H, Kanno J, Inoue T, Saga Y. Mouse Nkd1, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling. *Mech Dev*. 2004 Dec;121(12):1443-53.

Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J, Inoue T. Mechanism of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: current review with implication of microarray analyses. *Toxicol Pathol*. 2004 Jul-Aug;32 Suppl 2:12-6.

Fujimoto N, Igarashi K, Kanno J, Honda H, Inoue T. Identification of estrogen-responsive genes in the GH3 cell line by cDNA microarray analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 Jul;91(3):121-9.

Tsuboi I, Morimoto K, Hirabayashi Y, Li GX, Aizawa S, Mori KJ, Kanno J, Inoue T. Senescent B lymphopoiesis is balanced in suppressive homeostasis: decrease in interleukin-7 and transforming growth factor-beta levels in stromal cells of senescence-accelerated mice. *Exp Biol Med* (Maywood). 2004 Jun;229(6):494-502.

Nagao T, Wada K, Kuwagata M, Nakagomi M, Watanabe C, Yoshimura S, Saito Y, Usami K, Kanno J. Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reprod Toxicol*. 2004 Jan-Feb;18(1):109-20.

Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Tsuboi I, Ott T, Kodama Y, Kanno J, Kim DY, Willecke K, Inoue T. Exacerbation of benzene pneumotoxicity in connexin 32 knockout mice: enhanced proliferation of CYP2E1-immunoreactive alveolar epithelial cells. *Toxicology*. 2004 Jan 15;195(1):19-29.

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、中津則之、トキシコゲノミクス、ゲノム研究実験ハンドブック、p329-337 実験医学別冊 2004

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、中津則之 ゲノム毒性学形質非依存型トキシコゲノミクスの導入、細胞工学 Vol.23 No.6、2004、685-693、株式会社秀潤社

菅野 純：医薬品開発におけるわが国のトキシコゲノミクスの取り組み、医薬品開発におけるわが国のトキシコゲノミクスの取り組み、2004年5月、Vol.46、No.6 株式会社じほう

菅野 純：化学物質の毒性 化学と教育 52 巻 5 号『化学物質とリスク評価』 2004 年 302-305 (社) 日本化学会

2. 学会発表

Jun Kanno, Screening/Testing Scheme for Endocrine Disrupting Chemicals, 19th Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP), May 17-18, 2004, Malaysia

Jun Kanno, Endocrine Disrupting Chemicals Researches, Current Topics, 19th Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP), May 17-18, 2004, Malaysia

菅野 純 「前向き」 Toxicogenomics、第 88 次日本法医学会総会、2004 年 6 月 2-4 日、旭川

高橋 雄、北嶋 聡、菅野 純、相賀裕美子、Notch リガンド D113 は Mesp2 の欠損による体節形成と前後パターン形成の異常を回復する」、日本発生生物学会第 37 回大会、2004 年 6 月 4-6 日、名古屋

平林容子、壺井 功、菅野 純、井上 達、「造血管における細胞間ギャップ結合の病理-コネクシン欠失による造血障害と実験白血病高甘感受性について」、第 93 回日本病理学会総会、2004 年 6 月 9-11 日、札幌

J Kanno, K Aisaki, A Ono, N Nakatsu, Y Kodama, K Igarashi , PHENOTYPE-INDEPENDENT TOXICOGENOMICS USING “PERCELLOME” AND “MILLE-FEUILLE” DATA SYSTEM, 第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会 (特別講演)、2004 年 7 月 6-8 日、大阪

中津則之、相崎健一、五十嵐勝秀、小野敦、北嶋聡、児玉幸夫、菅野純、「日内変動遺伝子群プロファイルの解析」 第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会 (口演)、2004 年 7 月 6-8 日、大阪

J Kanno, K Aisaki, A Ono, K Igarashi , TOXICOGENOMICS USING “PERCELLOME” AND “MILLE-FEUILLE” DATA SYSTEM, 10th International Congress of Toxicology, 11-15 July, 2004; Tampere, Finland

鈴木孝昌、Palanisamy Rajaguru、小原有弘、本間正充、林 真、高木篤也、菅野 純、「GeneChip による遺伝子発現解析を用いてアリストロキア酸による遺伝子傷害の臓器特異性を予測可能か Use of the gene expression analysis by the GeneChip for a prediction of the target organs in Aristolochic acid-induced genotoxicity in mice.」第 63 回日本癌学会学術総会、2004 年 9 月 29 日-10 月 1 日、福岡