

163:1481-1490, 2003.

- 10) Arakaki R, Ishimaru N, Saito I, Kobayashi M, Yasui N, Sumida T, Hayashi Y, Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in adoptively transferred mice with autoreactive CD4+ T cell. *Arthritis Rheum.* 48:3603-3609, 2003.
  - 11) Ogawa K, Nagahiro S, Arakaki R, Ishimaru N, Kobayashi M, Hayashi Y. Anti- $\alpha$ -fodrin autoantibodies in Moyamoya disease. *Stroke* 34:244-246, 2003.
  - 12) Katunuma N, Matsunaga Y, Himeno K, Hayashi Y, Insights into the roles of cathepsins in antigen processing and presentation revealed by specific inhibitors. *Biol. Chem.* 384:883-890, 2003.
  - 13) Saegusa K, Ishimaru N, Yanagi K, Arakaki R, Ogawa K, Saito I, Katunuma N, Hayashi Y. Cathepsin S-inhibitor prevents autoantigen presentation and autoimmunity. *J. Clin. Invest.* 110:361-369, 2002.
  - 14) Saegusa K, Ishimaru N, Yanagi K, Mishima K, Arakaki R, Suda T, Saito Y, Hayashi Y, Prevention and induction of autoimmune exocrinopathy is dependent on pathogenic autoantigen cleavage in murine Sjogren's syndrome. *J. Immunol.* 169:1050-1057, 2002.
  - 15) Azuma M, Aota K, Tamatani T, Motegi K, Yamashita T, Ashida Y, Hayashi Y, Sato M, Suppression of tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced matrix metalloproteinase 9 production in human salivary gland acinar cells by cepharanthine occurs via down-regulation of nuclear factor  $\kappa$ B. *Arthritis Rheum.* 46:1585-1594, 2002.
- ## 2. 学会発表 (過去3年間)
- 1) シェーグレン症候群唾液腺におけるRbAp48発現の意義 日本免疫学会総会学術集会記録、34巻 p. 76, 2004.
  - 2) 遺伝性自己免疫疾患の原因遺伝子 AIRE(autoimmune regulator)の機能解析 日本免疫学会総会学術集会記録、34巻 p. 77, 2004.
  - 3) RbAp48遺伝子導入マウスにおけるシェーグレン症候群類似病変の出現 日本免疫学会総会学術集会記録、34巻 p. 78, 2004.
  - 4) シェーグレン症候群患者におけるRbAp48遺伝子の解析 日本病理学会雑誌、93巻1号 p. 234, 2004.
  - 5) シェーグレン症候群患者における自己抗原 $\alpha$ -フオドリン反応性 日本病理学会雑誌、93巻1号 p. 295, 2004.
  - 6) シェーグレン症候群標的臓器におけるRbAp48遺伝子の役割 日本免疫学会総会学術集会記録、33巻 p. 286, 2003.
  - 7) NiCl<sub>2</sub>感作マウス接触性皮膚炎におけるp38経路を介した樹状細胞の役割 日本免疫学会総会学術集会記録、33巻 p. 58, 2003.
  - 8) 関節リウマチ滑膜細胞におけるアポトーシス感受性に関する検討 日本免疫学会総会学術集会記録、33巻 p. 222, 2003.
  - 9) RNAKL刺激樹状細胞移入によるMRL/lprマウス自己免疫性関節炎の病態修飾 日本免疫学会総会学術集会記録、33巻 p. 225, 2003.
  - 10) シェーグレン症候群におけるRbAp48発現とアポトーシス 日本免疫学会総会学術集会記録、33巻 p. 286, 2003.
  - 11) シェーグレン症候群患者末梢Tリンパ球の自己抗原 $\alpha$ -フオドリン反応性の解析 日本免疫学会総会学術集会記録、33巻 p. 285, 2003.

- 12) シェーグレン症候群の涙腺炎に対する抗CD4抗体点眼療法の開発 日本免疫学会総会学術集会記録、33巻 p. 286, 2003.
- 13) シェーグレン症候群患者における自己抗原 $\alpha$ -フォドリン反応性 日本病理学会雑誌、93巻1号 p. 295, 2004.
- 14) シェーグレン症候群の発症におけるエストロジェンの役割 日本病理学会雑誌、92巻1号 p. 167, 2003.
- 15) シェーグレン症候群発症機構に關与するエストロジェン欠乏によるClass II発現調節の解析 日本病理学会雑誌、92巻1号 p. 204, 2003.
- 16) RNAKL刺激樹状細胞移入によるMRL/lprマウス自己免疫性関節炎の病態修飾 日本病理学会雑誌、92巻1号 p. 223, 2003.
- 17) もやもや病患者血清中に認められた $\alpha$ -フォドリンに対する自己抗体に関する検討 日本病理学会雑誌、92巻1号 p. 268, 2003.
- 18) 金属アレルギーにおけるRANKLを介したマウス樹状細胞活性化機構の解析 日本病理学会雑誌、92巻1号 p. 364, 2003.
- 19) シェーグレン症候群発症機構に關するエストロジェン関連因子の同定とその機能解析 日本免疫学会総会学術集会記録、32巻 p. 104, 2002.
- 20) シェーグレン症候群患者血清の $\alpha$ -フォドリンフラグメントに対する反応性の検討 日本免疫学会総会学術集会記録、32巻 p. 113, 2002.
- 21) もやもや病患者血清中に認められた $\alpha$ -フォドリンに対する自己抗体に関する検討 日本免疫学会総会学術集会記録、32巻 p. 114, 2002.
- 22) RNAKL刺激樹状細胞移入MRL/lprマウスにおける自己免疫性関節炎の病態解析 日本免疫学会総会学術集会記録、32巻 p. 293, 2002.
- 23) 慢性関節リウマチ滑膜細胞におけるFas感受性の疾患進行度に関する検討 日本免疫学会総会学術集会記録、32巻 p. 293, 2002.
- 24) アナログペプチドを用いたシェーグレン症候群モデルマウスに対する実験的治療の試み 日本病理学会雑誌、91巻1号 p. 202, 2002.
- 25) エストロジェン欠乏マウスにおけるシェーグレン症候群新規疾患モデル確立の試み 日本病理学会雑誌、91巻1号 p. 202, 2002.
- 26) RNAKL刺激による活性化樹状細胞を用いたMRL/lprマウス関節病変の病態増悪 日本病理学会雑誌、91巻1号 p. 202, 2002.
- 27) シェーグレン症候群モデルマウスから分離した初代培養唾液腺上皮細胞の性状解析 日本病理学会雑誌、91巻1号 p. 221, 2002.
- 28) NiCl<sub>2</sub>感作マウス接触性皮膚炎における樹状細胞の役割 日本病理学会雑誌、91巻1号 p. 221, 2002.

#### H. 知的財産所有權の出願・登録状況

- 1) 特願平9-104873・林 良夫「 $\alpha$ -フォドリンまたは $\alpha$ -フォドリン断片蛋白を含む製剤」  
林 良夫、武田国雄；平成9年4月22日
- 2) Patent Number. 6,121,057 Hayashi Y, Hiromu Sugino: 「Methods of Detecting Antibodies to  $\alpha$ -fodrin and Fragments Thereof in Diagnosing Sjogrens」 Yoshio Hayashi September 19, 2000
- 3) 特願 2003-123959・林 良夫「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」  
林 良夫、興和株式会社；平成15年4月28日
- 4) Patent Number. US6,703,021 B2 Hayashi Y, Hiromu Sugino: 「Composition containing  $\alpha$ -fodrin or  $\alpha$ -fodrin fragment protein」

## 6. 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

分担研究者 武吉正博 財団法人 化学物質評価研究機構 課長

**研究要旨** CBA/JNマウスに10  $\mu$ g/kg/day及び50  $\mu$ g/kg/dayの用量でEthinylestradiol (EE)を経胎盤・経乳汁曝露した結果、50  $\mu$ g/kg投与群では産子は得られず、10  $\mu$ 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。離乳時に親動物及び仔動物の胸腺を採取し、胸腺細胞のSubpopulationについてFlowcytometerを用いて解析した。その結果、親動物及び仔動物ともに対照群との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。

### A 研究目的

内分泌かく乱化学物質の影響は動物の生殖能に対するものではなく神経系、免疫系に対する影響も示唆されている。そこで化学物質の動物の免疫系に対する影響評価法としてのマウス局所リンパ節増殖試験 (Local Lymph Node Assay, LLNA) の有用性を検討する。

### B 研究方法

#### 1) 交配

CBA/JN Crj (日本チャールスリバー株式会社)を雄9週齢、雌7週齢で購入し、5日以上検疫を行った後、雄1匹、雌2匹を一晚同居させ交配させた。交尾確認はプラグが確認できた雌について交尾が成立したものとみなし、その日を妊娠0日とした。

#### 2) 被験物質、投与期間および投与経路

Ethinyl estradiol (EE, Lot No. KSN3933、純度99.0%、和光純薬工業株式会社)を用い、媒体としてオリーブ油(Lot No. 0320TM、株式会社フヂミ製作所)を用いた。

投与は妊娠5日からEE 10、50  $\mu$ g/kg/dayを母動物に経口投与し、媒体対照群 (VC) としてオリーブ油を投与する群を設けた。各群の母動物数はVC群 8匹、10  $\mu$ g/kg/day群、及び50  $\mu$ g/kg/day群は各10匹とし、投与は毎日午前中に、解剖前日まで行った。

#### 3) 解剖

母動物及び仔動物は分娩後21日にジエチルエーテルによる麻酔下で安楽死させた後、剖検を行った。

#### 4) 検査

##### a) 母動物

一般状態および哺育状態は投与開始日から解剖日まで毎日1回以上観察した。体重は母動物はP0、5、8、14、17、20日、分娩後0、4、7、14、21(解剖日)日に測定した。妊娠動物は全例を自然分娩させ出産率、妊娠期間を求めた。解剖時には胸腺及び脾臓を摘出し、重量を測定した。また、子宮については摘出後切開して硫酸アンモニウムに浸漬後着床痕数計測した。

##### b) 仔動物

出生日に産仔数、死産仔数、出産死亡仔数、性別の検査を行った。一般状態については解剖日まで毎日1回以上観察した。体重は出生日、生後7、14、21(解剖日)日に測定した。剖検時には胸腺及び脾臓を摘出し、重量を測定した。

##### c) 統計学的手法

母動物の体重、妊娠期間についてはBartlett法による検定を行い、5%有意水準で等分散が認められた場合、一元配置分散分析を行った。分散分析において有意差が認められた場合は、対照群と各用量群の間において、Dunnett法による検定を行った。等分散が認められない場合はKruskal-Wallisの順位和検定法で全群の有意性を検定した後Dunnettの多重比較検定法で対照群との間の有意差検定を行った。母動物の出産率

についてはカイ二乗検定で対照群との間の有意差検定を行った。

F1出生仔の出生日から離乳日までの体重は1腹を標本単位として処理した。試験成績の評価に当っては有意水準1%又は5%で対照群との差が認められた場合に有意の変動とした。

#### 胸腺細胞のPopulation解析

解剖時に胸腺を採取し、RPMI1640基礎培地中に保存した。各個体の胸腺を10 mLのPBS(1%BSA、0.1%NaN<sub>3</sub>含、以下同じ)中でフロスト付スライドガラス2枚を用い組織をすりつぶし、細胞浮遊液を作製した。細胞浮遊液は70#のナイロンメッシュを通過させた後、細胞数を計測し、PBS(1%BSA、0.1%NaN<sub>3</sub>含、以下同じ)で $2 \times 10^7$  cells/mLに調整した後、100  $\mu$ Lをマイクロチューブに入れ、FITC標識抗ラットCD4抗体及びPE標識抗ラットCD8抗体を10  $\mu$ Lづつ加え4°C、1 h反応させた。反応終了後、PBS、1 mLを加え攪拌後、遠心、上清を除去する操作を3回繰り返すことによって洗浄を行い、測定直前に70#ナイロンメッシュを通した後、Flowcytometer (EPICS-XL, BECKMAN-COULTER)を用いて細胞表面のCD4及びCD8の発現状態を計測した。

### C 研究結果

#### 1. 母動物

媒体対照群、10  $\mu$ g/kg/day群、50  $\mu$ g/kg/day群の交尾確認動物はそれぞれ8、10、10匹であった。妊娠期間中及び哺育期間中を通していずれの投与群においても一般状態に異常はみられなかった。

媒体対照群、10  $\mu$ g/kg/day群、50  $\mu$ g/kg/day群で分娩した動物はそれぞれ7匹、5匹、0匹であった。

体重は10  $\mu$ g/kg/day群で妊娠14日、50  $\mu$ g/kg/day群で妊娠14、17、20日に媒体対照群と比較して有意な低値がみられた。哺育期間中には媒体対照群との間に有意差はみられなかった。

妊娠期間は媒体対照群と10  $\mu$ g/kg/day群との

間に有意差はみられなかった(Fig. 1)。

産仔数は50  $\mu$ g/kg/day群の雌および雄、その合計匹数で媒体対照群と比較して有意な低値がみられた(Fig. 2)。

着床痕数は50  $\mu$ g/kg/day群で媒体対照群と比較して有意な低値がみられた(Fig. 3)。

解剖時に10  $\mu$ g/kg/day群の1匹において子宮内水溶物がみられた。

#### b) 仔動物

いずれの群も出生時の出生仔外表に異常はみられなかった。

保育期間を通していずれの群も一般状態に異常はみられなかった。

体重は哺育期間中には媒体対照群との間に有意差はみられなかった。

離乳時の親動物及び仔動物の胸腺及び、脾臓重量、胸腺細胞のSubpopulationの比率に明白な変化はみられなかった。

### D. 考察

CBA/JNマウスに10  $\mu$ g/kg/day及び50  $\mu$ g/kg/dayの用量でEthinylestradiol (EE)を経胎盤・経乳汁曝露した結果、50  $\mu$ g/kg投与群では産子は得られず、10  $\mu$ 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。

### E. 結論

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。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Takeyoshi M, Noda S, Yamasaki K. Differences in responsiveness of mouse strain against p-benzoquinone as assessed by non-radioisotopic murine local lymph node assay. *Exp Anim.* 2004, 53(2):171-3.

Takeyoshi M, Noda S, Yamazaki S, Kakishima H, Yamasaki K, Kimber I. Assessment of the skin

sensitization potency of eugenol and its dimers using a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J Appl Toxicol.* 2004, 24(1):77-81.

Takeyoshi M, Sawaki M, Yamasaki K, Kimber I. Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with alpha-hexylcinnamic aldehyde as an example. *Toxicology.* 2003, 191(2-3):259-63.

Takeyoshi M, Kuga N, Yamasaki K. Development of a high-performance reporter plasmid for detection of chemicals with androgenic activity. *Arch Toxicol.* 2003, 77(5):274-9.

Takeyoshi M, Sawaki M, Noda S, Muroi T, Yamasaki K. Effect of gonadotropin-releasing hormone antagonist on ovarian and uterine weights in immature female rats. *Reprod*

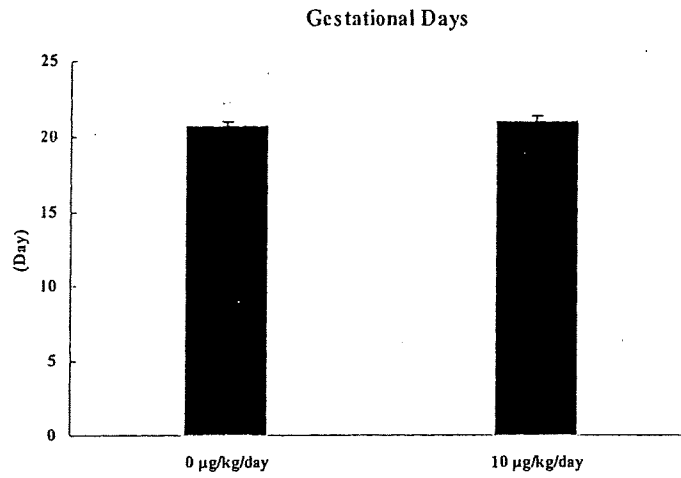
*Toxicol.* 2002, 16(4):367-9.

Takeyoshi M, Yamasaki K, Sawaki M, Nakai M, Noda S, Takatsuki M. The efficacy of endocrine disruptor screening tests in detecting anti-estrogenic effects downstream of receptor-ligand interactions. *Toxicol Lett.* 2002, 126(2):91-8.

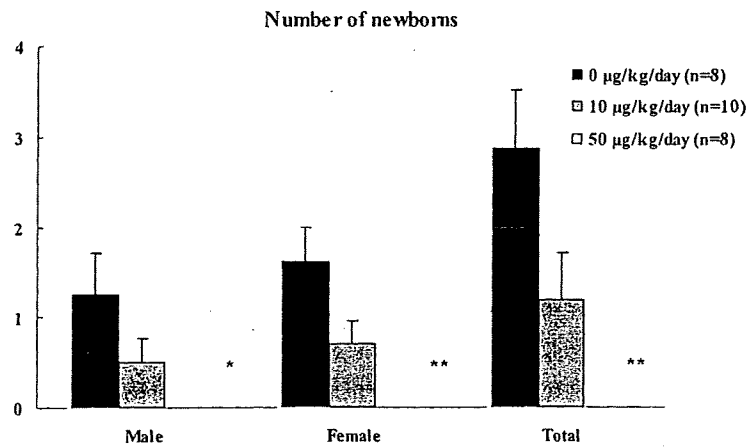
Takeyoshi M, Yamasaki K, Yakabe Y, Takatsuki M, Kimber I. Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol Lett.* 2001, 119(3):203-8.

#### H. 知的財産所有権の出願・登録状況

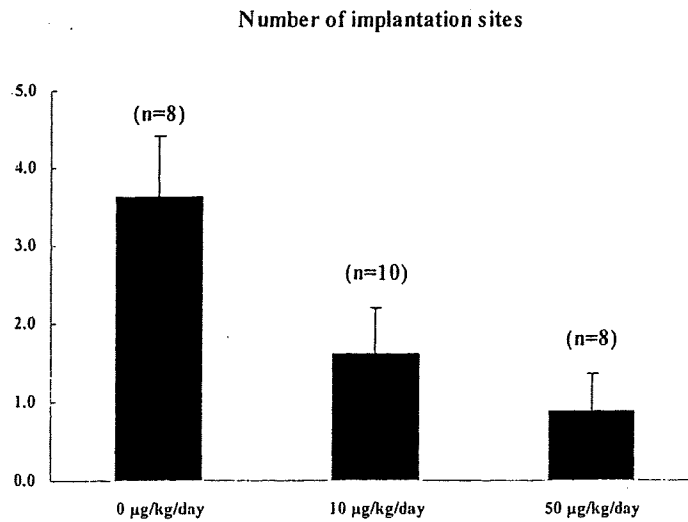
無し。



**Fig 1 Gestation days in F0 females**



**Fig. 2 Number of newborns in each treatment group**



**Fig. 3 Number of implantation sites in each treatment group**

Table 1 Relative organ weight in F0 females

Dose	n	Body weight (g)		Relative Organ weight (g/100g)			
				Thymus		Spleen	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
VC	5	28.2	0.9	0.084	0.012	0.283	0.014
10 µg/Kg/day	2	28.1	0.1	0.087	0.032	0.263	0.002

Table 2 Relative organ weight in F1 females

Dose	n	Body weight (g)		Relative Organ weight (g/100g)			
				Thymus		Spleen	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
VC	9	9.87	0.47	0.685	0.015	0.347	0.019
10 µg/Kg/day	3	9.71	0.28	0.702	0.011	0.325	0.011

Table 3 Relative organ weight in F1 males

Dose	n	Body weight (g)		Relative Organ weight (g/100g)			
				Thymus		Spleen	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
VC	8	9.84	0.25	0.683	0.022	0.372	0.018
10 µg/Kg/day	4	10.21	0.26	0.675	0.018	0.389	0.006

Table 4 Subpopulation of thymocyte in F0 females

Dose	n	Thymocyte Population (%)							
		CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>		CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>		CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>		CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
VC	5	1.94	0.68	2.64	0.60	2.69	0.53	92.73	1.52
10 µg/Kg/day	2	1.54	0.42	2.18	0.17	9.95	7.64	86.34	8.22

Table 5 Subpopulation of thymocyte in F1 females

Dose	n	Thymocyte Population (%)							
		CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>		CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>		CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>		CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
VC	9	0.74	0.05	1.90	0.13	2.79	0.41	94.57	0.49
10 µg/Kg/day	3	0.94	0.15	1.95	0.11	3.14	0.42	93.97	0.58

Table 6 Subpopulation of thymocyte in F1 males

Dose	n	Thymocyte Population (%)							
		CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>		CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>		CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>		CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
VC	8	0.85	0.12	1.72	0.14	3.42	0.90	94.01	0.91
10 µg/Kg/day	4	0.73	0.02	1.93	0.06	3.66	1.79	93.68	1.85

### 3) 生殖器

#### 7. 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

分担研究者 長尾 哲二 近畿大学理工学部 生命科学・発生生物 教授

**研究要旨：**生殖細胞形成、排卵、受精、卵割、着床、胎盤形成、胎児器官形成、組織発生、出生、発達・発育、性成熟、生殖、老化、死に至るすべての生命現象において、内分泌かく乱化学物質の低用量曝露により予想される内分泌学的毒性変化を含む生殖・発生毒性学的変化を、鋭敏に且つ早期に捉えることができる試験系を確立するための毒性指標をラットあるいはマウスを用いて網羅的に検討した。特に雄性生殖器発達に関する毒性指標として生殖巣にみられる内分泌かく乱化学物質の早期影響に重点をおいた。そのために、マウスの系統による内分泌かく乱化学物質感受性の差、生殖巣発生過程にみられる超微形態的变化と生後の生殖器発達過程にみられる生殖細胞の過剰細胞死、胎生期曝露による精巣下降不全あるいは尿道下裂など先天性生殖器奇形の誘発について検討した。その結果、胎生期エストロゲン曝露では、精巣重量および組織形態などの指標では、C57BL は ICR より高感受性であったが、低用量 Bisphenol A には高感受性を示さなかった。生殖巣発生に及ぼす影響では、内分泌かく乱化学物質の曝露により、精細管間質細胞中の脂肪滴増加とグリコーゲン顆粒の集簇がみられた。また、生後の精巣中生殖細胞に誘発された過剰細胞死についても確認された。先天奇形に関しては、精巣下降不全あるいは尿道下裂が合成ホルモン剤あるいはフタレートエステルの胎生期曝露により確認されたが、低用量 Bisphenol A 曝露ではみられなかった。今年度検討した上記毒性指標に関しては、多くの内分泌かく乱化学物質の胎生期曝露によりその有効性が確認できたが、Bisphenol A の低用量曝露では、これら指標の鋭敏性・確実性は確認できなかった。内分泌かく乱化学物質に曝露された雄胎児の肛門-生殖突起周辺組織における細胞外マトリックス増生およびヒドロキシプロリン量は抑制される傾向がみられたことから、今後検討を重ねることにより肛門-生殖突起間距離と同様、鋭敏な指標になると思われる。

#### A. 研究目的

個体の一生涯で起こる生命現象を標的

とした有害性評価試験系を構築することを目的とした。特に胎生期ならびに新生



児期にあたる高感受期（いわゆるウインドウ期）に焦点を当てて、これらの時期の内分泌かく乱化学物質の曝露が、曝露後間もない時期の生殖巣あるいは初期発生・発達段階にある精巣に生じたと予測される傷害は、その後のライフサイクルのいかなる時期に初めて毒性として捉えることができるのか、あるいは晩発的な障害としてのみ捉えることができるのか、さらにどのような初期傷害が性成熟後にみられる生殖機能障害と関連するのかについて検討することは重要である。すなわち本研究では、内分泌かく乱化学物質の環境レベルに近い低用量における毒性影響の検出を考慮しつつ、先天性生殖器奇形、生殖細胞死、配偶子形成あるいはステロイド合成などの指標のいずれが内分泌かく乱化学物質の adverse effects を検出する雄性生殖毒性指標として適切であるかを検討し、内分泌かく乱作用により懸念される生体傷害を網羅的に確認する一生涯試験の確立に貢献することを目的とした。

## B. 研究方法

生殖細胞形成、排卵、受精、卵割、着床、胎盤形成、胎児器官形成、組織発生、出生、発達・発育、性成熟、生殖、老化、死に至るすべての生命現象において、内分泌かく乱化学物質の低用量曝露により予想される内分泌学的毒性変化を含む生殖・発生毒性学的変化を、鋭敏に且つ早期に捉えることができる試験系を確立するための毒性指標を網羅的に検討した。そのために、分担研究者らのこれまでの生殖・発生毒性研究からその毒性指標と

しての鋭敏性・確実性が認められたものについて、一生涯試験法のなかでの有効性を確認するため、まず以下の実験を行った。ICR マウスおよび C57BL マウスはいずれも日本クレア株式会社より 8 週齢にて購入し、入荷後 1 週間の検疫・馴化の後、異常のないものを実験に使用した。飼育環境などについては既報と同様にした。実験は以下の①～④について実施した。①マウス系統の内分泌かく乱化学物質に対する感受性の差異を検討した。17 $\beta$ -estradiol(E<sub>2</sub>)に対して高感受性系統である C57BL/6 マウスと低感受性系統である ICR マウスを用いて、低用量 Bisphenol A (BPA, 2~200  $\mu$ g/kg 体重)、ゲニステイン(GEN, 50~100 mg/kg 体重)あるいは E<sub>2</sub>(0.1-2  $\mu$ g/kg 体重)の妊娠 9-13 日（膣腔観察日＝妊娠 0 日と規定）曝露実験を行い、自然分娩により雄新生児を得て、生後の精巣発達に及ぼす影響の有無を、精巣、精巣上体、精囊のそれぞれの重量を指標に 7 週齢にて調べた。②マウスの生殖巣発生期（妊娠 10~13 日）に、Diethylstilbestrol(DES)、E<sub>2</sub>、Ethinyl estradiol(EE)、Estradiol benzoate(EB)、Tamoxifen(TAM)、Clomiphene(CLOM)、Atrazine(ATZ)（いずれも Sigma Chem. 製）の 100  $\mu$ g/kg 体重（ATZ のみ 100 mg/kg 体重）あるいは低用量（2  $\mu$ g/kg 体重）の Bisphenol A(BPA)をそれぞれコーン油に懸濁して背部皮下注射して、最終曝露 24 時間後の生殖巣の病理組織学的変化を電子顕微鏡にて確認し、次いで妊娠 17 日の胎児および出生児については、発達期精巣精細管にみられるアポトーシスによる過剰細胞死の誘発について経日的検

討を加えた。同時に精細管中の生殖細胞構成 testis cellular composition についても観察した。③内分泌かく乱化学物質の外生殖器の形成過程に及ぼす影響について、妊娠 15 および 16 日に上記内分泌かく乱化学物質および陽性対照として抗アンドロゲン剤のフルタミド(Flu)を皮下注射し、妊娠 17、18 日に帝王切開により胎児を摘出して、妊娠 18 日摘出胎児については生殖突起から肛門までの距離 (Anogenital distance: AGD)を測定し、妊娠 17 日摘出胎児については外生殖器のパラフィン包埋切片を作成し、H.E.およびマッソントリクローム染色を行い、組織観察あるいは免疫組織化学による細胞外マトリックス増生の有無を観察し、次いで同部位における間葉細胞群のヒドロキシプロリン(HP)量を細胞外マトリックス量としてその定量を試みた。さらに④先天性生殖器奇形 (尿道下裂 hypospadias、停留精巣 cryptorchidism 等) の誘発については、妊娠 15-17 日に上記内分泌かく乱化学物質を連続投与し、妊娠末期に帝王切開により胎児を摘出して観察した。ジブチルフタレート(DBP, 250 mg/kg 体重)およびブチルベンジルフタレート(BBP, 500 mg/kg 体重)を陽性対照とした。

なお、いずれの実験においても使用した動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼など苦痛の少ない方法を用いた。

### C. 研究結果

①マウス系統の内分泌かく乱化学物質に対する感受性の差異の検討では、E<sub>2</sub> の胎生期曝露により C57BL/6 の精巣重量は

ICR に比較して低用量域(0.1 μg/kg 体重)から有意に低値を示した(ICR では 1 μg/kg 体重から有意に低値)。しかし GEN あるいは低用量 BPA の曝露では、生後の精巣、精巣上体および精囊のそれぞれの重量はいずれのマウス系統も対照レベルであった。E<sub>2</sub> あるいは GEN 曝露では、成熟後の精巣に組織学的変化 (精細管萎縮、生殖細胞減少など) がいずれのマウス系統にも観察された。②マウス生殖巣発生期における内分泌かく乱化学物質の曝露では、最終投与 24 時間後の観察により、合成ホルモン剤投与群において間質細胞の細胞質に多数の脂肪滴が観察され、さらにグリコーゲン顆粒の集簇も確認された。しかし生殖索には胎生期曝露による傷害を示唆する毒性学的変化は、セルトリ細胞および生殖細胞のいずれにも観察されなかった。CLOM 曝露群、低用量 BPA 曝露群の胎児生殖巣には、毒性学的変化は観察されなかった。胎児生殖巣および精巣、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の観察では、いずれの内分泌かく乱化学物質の胎生期曝露においても胎児生殖巣および精巣の細胞に Tunel 陽性細胞の増加は観察されなかった。しかし、DES、E<sub>2</sub>、EE、EB、TAM、CLOM 曝露群の生後 9、14 および 28 日の新生児の精巣には顕著な Tunel 陽性細胞の増加が観察された。ATZ 曝露群、低用量 BPA 曝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。③内分泌かく乱化学物質の外生殖器の形成過程に及ぼす影響については、DES、E<sub>2</sub>、EE、EB あるいは Flu の胎生期曝露により雄の末

期胎児の AGD が対照群と比較して有意に短縮した。曝露群の雄胎児の肛門-生殖突起間周辺の組織において、細胞間質の減少がみられ、同時に細胞外マトリックスの減少が認められた。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 曝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。④先天性生殖器奇形の誘発に関しては、DBP あるいは BBP 曝露群において精巣下降不全の頻度が有意に上昇したが、その他の曝露群には尿道下裂など外生殖器奇形の有意な増加はみられなかった。

#### D. 考察

エストロゲン高感受性マウス系統の C57BL/6 を用いて E<sub>2</sub> の胎生期曝露後、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<sub>2</sub> 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 μg/kg 体重) を同様に曝露した結果、C57BL/6 マウスに BPA の毒性変化はみられなかった。また、GEN の曝露では、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<sub>2</sub> 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効果においても確認している(長尾、2002)。

DES、E<sub>2</sub>、EE、EB、TAM あるいは ATZ のマウス胎生期曝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。生殖索には曝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。

胎児生殖巣および精巣、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<sub>2</sub>、EE、EB、TAM、CLOM 曝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 曝露群、低用量 BPA 曝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 曝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、正常および病的な状態（胎生期あるいは新生児期における内分泌かく乱化学物質の曝露を含む）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、胎生期曝露による生殖巣における超微形態的变化およ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、これらが内分泌かく乱化学物質曝露による 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-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 曝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 および 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 の胎生期曝露効果に関する鋭敏な指標と考えられている ADG と同様に内分泌かく乱化学物質の胎生期、新生児期曝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。

## E. 結論

従来の毒性評価法に則ったこれまでの一世代、多世代生殖・発生毒性試験を中心とする大規模なバイオアッセイ(OECD TG415、416、421、422)では、多くの内分泌かく乱性に関して陽性候補物質が陰性の結果に収支することが大いに予測されるが、本研究は個体の一生涯の殆どすべての事象において発現が予想される多様な生殖・発生毒性に焦点を当てているため、本研究で検討する毒性指標の中から鋭敏な指標が確認できれば、本研究は一生涯を標的とした有害性評価試験系の構築に寄与できると思われる。とくにフルタミド胎生期曝露により肛門-生殖突起周辺組織における細胞外マトリックス増生、ヒドロキシプロリン量は抑制される傾向がみられたことから、今後検討を重

ねることにより AGD と同様、鋭敏な指標になると思われた。

## G.研究発表 (過去 3 年間)

### 1. 論文発表

#### 1) 書籍

Nagao T., Kagawa N., Nakagomi M., Fujikawa K. Increased incidence of malformations in the offspring of male mice prenatally exposed to synthetic estrogens. In: *Advances in Male Mediated Developmental Toxicity.* (Robaire B. and Holes BF. eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp.211-217(2003).

#### 2) 雑誌

Nagao T., Wada K., Kuwagata M., Nakagomi M., Watanabe C., Yoshimura S., Saito Y., Usumi K., Kanno J. Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reprod. Toxicol.*, **18**: 109-120 (2004).

Watanabe C., Kuwagata M., Yoshimura S., Azegami J., Kojima K., Ono H., Nagao T. An improved technique for repeated gavage administration to rat neonates. *Cong. Anom.*, **43**: 177-179 (2003).

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. *Reprod. Toxicol.*, **16**: 123-130 (2002).

Nagao T., Yoshimura S., Totsuka Y., Wakabayashi K. Maternal and developmental toxicity in mice by aminophenylnorharman, formed from norharman and aniline. *Human & Exp. Toxicol.*, **21**: 147-151 (2002).

### 2. 学会発表

Nagao T.: Biological effects of diethylstilbestrol-Transgenerational effect of endocrine disrupting chemicals- 国際毒理学学会シンポジウム (神戸) 抄録集 p.91、2004

長尾 哲二: ジエチルスチルベステロールの生体影響 内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム 性腺軸 (視床下部-下垂体-性腺) の発育と異常 (葉山)、抄録集 pp. 41-45、2003

Kuwagata M., Muneoka K., Takigawa M., Nagao T., Ono H.: Dopaminergic and serotonergic neurotransmitters in adulthood in prenatal 5-bromo-2'-deoxyuridine. 14th Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience. *Int. J. Dev. Neurosci.* **19**: 723 (Sydney) 2002.

渡辺 千朗、桑形 麻樹子、長尾 哲二、吉村 慎介、畔上 二郎、小島 幸一: 生後 1 日からのラット強制経口投与法の検討 日本実験動物技術者協会関東支部第 27 回懇話会 (東京) 2002

長尾 哲二: シンポジウム「化学物質に関するリスク評価の最近の話題」ジエチ

ルスチルベステロールの生体影響 第 42  
回日本先天異常学会 (浜松)、抄録集 p.76、  
2002.

桑形 麻樹子、宗岡 克政、渡辺 千朗、  
長尾 哲二：ジエチルスチルベステロー  
ルのラット新生児期投与による中枢神経  
系への影響 第 42 回日本先天異常学会  
(浜松)、抄録集 p.166、2002.

#### **H. 知的財産所有権の出願、登録状況**

特許取得および実用新案登録はない。

## 8. 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

分担研究者 吉田 緑 財団法人 佐々木研究所 主任研究員

### 研究要旨

ラットおよびマウスを用いて内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生児期暴露による遅延型影響検索のための陽性対照動物の作製を試みた。その結果、至適な用量および投与期間を決定できなかったが、陽性対照物質としては diethylstilbestrol (DES) が適切であると考えた。C57BL/6N マウスは繁殖・哺育成績が良好でないため環境等に十分な配慮が必要であると結論した。また、indole-3-carbinol (I3C) を用いて肝薬物代謝酵素誘導による肝のホルモン代謝変調が成熟動物の生殖器へ及ぼす影響を検索したところ、I3C は肝臓中 cytochrome P450 酵素の誘導によるエストロゲン代謝変調を介してラットの子宮癌発生を促進することが明らかとなった。

### A. 研究目的

内分泌攪乱化学物質の胎生期・新生児期暴露への影響が成熟動物と明らかに異なる点として、視床下部・下垂体・性腺系制御機構の異常、直接的な標的臓器の発育・分化異常など不可逆性の影響が挙げられる。これらの影響の多くは、出生直後あるいは性成熟前など、曝露後比較的短期間で検出されることが多い。一方、あまり知られていない胎生期・新生児期曝露影響として、遅延型の影響が挙げられる。この遅延型影響は主として雌ラットおよびマウスで報告されており、特徴として性成熟前における影響は明らかでなく、性成熟後における卵巣機能の早期低下など、影響の発現までにかかなりの時間を要する。この遅延型の影響は、視床下部・下垂体・性腺系のなんらかの異常が引き金になっていると考えられるが、発生機序あるいは雄に対する影響について明らかではない。しかし、動物実験データを基にヒトへの化学物質の内分泌攪乱性を考慮した場合、性成熟期までの短期観察期間では検出できないことから、遅延型の影響の存在は極めて重要と考える。

近年、直接ホルモン作用を持たない化学物質が肝臓の薬物代謝酵素誘導を介してステロイドホルモン代謝を変調する可能性が報告されている。これらの物質の経胎盤曝露による肝代謝酵素誘導も報告されており、直接ホルモン様作用を持たないこのような物質の肝臓のステロイド代謝変調を介した次世代の生殖器への影響が懸念される。

本研究は、上述の遅延型の影響および肝臓におけるホルモン代謝変調が次世代の生殖器へ及ぼす影響について解明することを目的として実施するものである。遅延型影響について

は(1)発生機序解明(2)遅延型影響を確実に簡単に検出す指標の確立(3)雄における遅延型影響の有無の検索について検索する。また、肝臓におけるホルモン代謝変調が次世代の生殖器へ及ぼす影響について、(1)まず成熟動物における肝臓のホルモン代謝変調が生殖器へ及ぼす影響とその発現機序について検討後、(2)新生児期における肝臓のホルモン代謝変調が生殖器へ及ぼす影響とその発現機序について検討する。

平成16年度は、遅延型影響の機序解明のための第一段階として、ラットおよ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、および成熟動物における肝臓のホルモン代謝変調が生殖器へ及ぼす影響とその発現機序について検討した。

### B. 研究方法

1) ラットおよ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 (Fig. 1)

新生児期曝露の陽性対照として ethynyl estradiol (EE, Sigma) と diethylstilbestrol (DES, Sigma) の2種のエストロゲンを選択した。EE は生後1~5日齢の Donryu 雌ラットに1あるいは2mg/kg を背部皮下に反復投与し、DES は生後24時間以内に0.1~10 $\mu$ g/rat を背部皮下に単回投与し、遅延型影響の発現の有無を観察した。EE および DES は少量を dimethylsulphoxide (DMSO) に溶解し、コーン油で希釈し指定濃度に調製した。投与液量は、25 $\mu$ l/rat になるよう調製した。

EE の投与群として、EE 2mg/kgBW を生後

1から5日齢あるいは1から3日齢まで投与した(PND1-5 EE 2mg あるいは PND1-3 EE 2mg)群、EE 1mg/kgBWを生後1から5日齢あるいは1から3日齢まで投与した(PND1-5 EE 1mg あるいは PND1-3 EE 1mg)群の4群を設け、無処置対照群と比較した。DESは10  $\mu$ g/rat、1  $\mu$ g/rat、および0.1  $\mu$ g/kg群の3群を設定した。EEおよびDESの投与量は、それぞれの高用量が文献的に視床下部・下垂体・性腺系を障害し、androgenizationを誘発する量であること採用した。

遅延型影響発現の判定には、性周期における検索を指標とした。また、仔の発育の指標として体重を定期的に測定した。今回実験に用いたラットは、EE群は佐々木研究所実験動物施設で交配・繁殖を行ったもので、DES群は妊娠3日にBreederである日本チャールス・リバー社より購入した。

#### (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

生後1~3日のC57BL/6N雌マウスに、0.02~2  $\mu$ g/mouseのdiethylstilbestrol (DES)を背部皮下投与し、遅延型影響の発現の有無を観察した。DESは少量をDMSOに溶解し、コーン油にて希釈し指定濃度に調製した。投与液量は、20  $\mu$ l/mouseになるよう調製した。

投与群として、DES 2  $\mu$ g/mouse、DES 0.2  $\mu$ g/mouse、DES 0.02  $\mu$ g/mouse群の3群を設定して無処置対照群と比較した。今回投与したDESの一部の投与量は、高用量が文献的にマウスの視床下部・下垂体・性腺系を障害し、androgenizationを誘発する量であること採用した。これらの母マウスは、妊娠後期(妊娠16日~12日)で日本チャールス・リバー社から入手し、佐々木研究所実験動物施設で出生したものを実験に使用した。

遅延型影響発現の判定には、性周期における検索を指標とした。また、仔の体重についても測定した。

#### 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

Indole-3-carbinol (I3C)は肝臓のcytochrome P450 酵素を誘導し、肝臓におけるエストロゲン代謝に影響を与えると報告されており、一方でI3Cの発がん促進あるいは抑制作用の双方が報告されている化合物であることから、本実験の披験物質として選択した。

今回の実験では、まず、I3Cの子宮に対するエストロゲンあるいは抗エストロゲン作用を確認するために、卵巣を摘出した成熟ラットを用いて子宮肥大試験を行なった。

続いて、I3Cの子宮癌に与える影響を検討するために、11週齢でN-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidineを子宮腔内に投与した後、500および2000ppmのI3Cを混餌にて(I3C500 および I3C2000)投与し、17 $\beta$ -estradiol (E2) 1  $\mu$ g/kg およびE2の代謝物でE2より強い発がん作用を示すことが知られている4-hydroxyestradiol (4HE) 5  $\mu$ g/kgを週2回皮下に投与し、15ヶ月齢まで経時的に観察し、対照群と比較した。動物は子宮内膜腺癌好発系のDonryu雌ラットを用いた。

本実験は「動物の保護及び管理に関する基準(昭和53年3月27日、総理府告示第6号)」の主旨およびおおよびWHO(World Health Organization:世界保健機構)の医学研究顧問委員会の勧告に基づきCIOMS(The Council for International Organization of Medical Sciences:国際医科学関係組織協議会)が発表した「動物を用いる生物医学研究のための国際指導(International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals)」に沿って実施した。

## C 結果

### 1) ラットおよ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

PND1-5 EE 2mg、PND1-3 EE 2mg、PND1-5 EE 1mg あるいは PND1-3 EE 1mgのいずれのEE投与群の発育も無処置対照群と同様であった。EEの各投与群の膈開口時期も対照群と同時期であったが、膈開口後の性周期観察において、正常な性周期を示す動物は認められず、EEを投与したすべての動物とも持続発情を示した。

DES群について、1月14日現在、生後3日齢であり、実験が継続中である。出生時体重についてはDES群と対照群の間で有意な差は認められていない。

#### (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

母マウスの入手後3日目より7日目にかけて



て仔マウスが出生した。平均の出産数は $6.5 \pm 1.1$ 匹/腹であった。うまれた仔マウスに、上述の投与量のDESを投与した。しかし、投与群だけでなく、無処置対照群の仔も含め、入手後4日以内に産まれた14/16腹の全仔が死亡した。入手後3および4日目に生まれた仔で特に死亡率が高く(12/13腹全仔死亡、内訳:無処置対照群2/2腹、DES 0.02 $\mu$ g群3/4腹、0.2 $\mu$ g群4/4腹、2 $\mu$ g群3/3腹)、入手5および6日目の全仔の死亡は2/7腹であった。

本実験は継続中であり、1月14日現在、生後2~5日齢に達したばかりであるが、今後発育および性周期を観察する予定である。

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

子宮肥大試験において、いずれのI3C投与群においても子宮重量および子宮被覆上皮の高さは対照群と同様であり、E2投与においても差が認められなかった(Fig. 2)。

子宮発がん実験において、I3C500および2000群、4HE群では、子宮内膜腺癌の発生頻度あるいは個体当りの子宮増殖性病変数が有意に増加した(Table 1)。E2群においても同様の傾向が観察されたが有意な差はなかった。子宮発がん実験においてもI3C投与による性周期への影響は認められなかった(Fig. 3)。肝臓の検索では、I3C投与にCYP1A1, 1A2, 1B1mRNAの発現が増加し(15ヶ月齢)、小葉中心性肝細胞肥大および肥大部の免疫組織化学染色によりCYP1A1, 1A2の誘導が確認された(Fig. 4)。さらに肝臓中のエストロゲン代謝酵素を6から15ヶ月齢まで測定したところ、estradiol 2-および4-hydroxylaseの活性値が高く、特に後者の有意な増加がいくつかの検査時期で認められた(Fig. 6)。

## D. 考察

1)ラットおよ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2mg/kg体重のEEの濃度は遅延型影響を誘発するには、高すぎる事が明らかとなった。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新生児期曝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のではと思われた。

(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、新生児曝露を実施する場合、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およ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は短期およ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および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を産生す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(Fig. 6)。

## E. 結論

ラットおよびマウスを用いた遅延型影響検査のための陽性対照動物の作製については、本年度の検討では至適な用量および投与期間を決定することができなかった。しかし、陽性対照物質としてはDESが適切であると考えられた。また、使用するマウスの系統については今回用いたC57BL/6Nの繁殖および哺育成績が良好でないため、親および仔にストレスの大きい新生児期曝露を際しては環境設定を始め十分な配慮が必要であると結論した。

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肝薬物代謝酵素を誘導するI3Cを用いて検索したところ、I3Cはエストロゲンあるいは高エストロゲン作用はないものの、肝臓中cytochrome P450 酵素の誘導によるエストロゲン代謝変調を介して、ラットの子宮癌発生を促進することが明らかとなった。したがって、さらに親動物における肝薬物代謝酵素誘導が仔のエストロゲン代謝を経胎盤あるいは経授乳を介して変調する可能性について検索する必要があると考えられた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 書籍

なし

#### 2) 雑誌

① Yoshida, M., Katashima, S., Ando, J., Tanaka, T., Uematsu, F., Nakae, D. and Maekawa, A.

② Dietary indole-3-carbinol promotes endometrial adenocarcinoma development in rats initiated with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, with induction of cytochrome P450s in the liver and consequent modulation of estrogen metabolism.

③Carcinogenesis

④25

⑤2257-2264

⑥2004

①Katsuda, S., Yoshida, M., Saarinen, N., Smeds, A., Nakae, D., Santti, R. and Maekawa, A.

②Chemopreventive effects of hydroxymatairesinol on uterine carcinogenesis in Donryu rats.

③Experimental Biology and Medicine

④229

⑤417-424

⑥2004

①Yoshida, M., Shimomoto, T., Katashima, S., Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa, A.

②Lack of effect for maternal exposure to low-doses of bisphenol A on development of the female reproductive tract and uterine carcinogenesis in rats.

③Journal of Reproduction and Development.

④50

⑤349-367

⑥2004

①Yoshida, M., Shimomoto, T., Katashima, S., Shirai, T., Nakae, D., Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa, A.

②Effects of maternal exposure to nonylphenol on growth and development of the female reproductive system and uterine carcinogenesis in rats.

③Journal of Toxicologic Pathology,

④16

⑤259-266.

⑥2003.

①Yoshida, M., Katsuda, S., Tanimoto T., Asai, A., Nakae, D. and Maekawa, A.

②Differential Enhancement by neonatal exposure to p-tert-octylphenol of uterine carcinogenesis in Donryu rats depending on the administration period.

③Toxicologic Pathology,

④31(supplement):

⑤141

⑥2003

①Yoshida, M., Kitani, T., Takenaka, A., Kudoh, K., Katsuda, S., Taya, K., Kurokawa, Y., and Maekawa, A.

②Lack of effects of oxolinic acid on spermatogenesis in young adult and aged Wistar rats.

③Food and Chemical Toxicology

④20

⑤1815-1825

⑥2002

- ①Jin, W., Herath, C.B., Yoshida, M., Arai, K.Y., Saita, E., Zhanquan, S., Ren L., Watanabe, G., Groome, N.P., and Taya, K.  
 ②Inhibin B regulating follicle-stimulating hormone secretion during testicular recrudescence in the male golden hamster.  
 ③Journal of Andrology  
 ④23  
 ⑤845-853  
 ⑥2002.

- ①Yoshida, M., Takenaka, A., Katsuda, S., Kurokawa, Y., and Maekawa, A.  
 ②Neonatal exposure to p-tert-octylphenol causes abnormal expression of estrogen receptor-alpha and subsequent alteration of cell proliferating activity in the developing Donryu rat uterus.  
 ③Toxicologic Pathology  
 ④30  
 ⑤357-364  
 ⑥2002.

- ①Shimomoto, K., Yoshida, M., Takahashi, M. and Maekawa, A.  
 ②Sebaceous gland metaplasia in a mammary fibroadenoma developing in a female Donryu rats.  
 ③Journal of Toxicologic Pathology  
 ④15  
 ⑤73-77  
 ⑥2002.

- ①Katsuda, S., Yoshida, M., Kuroda, H., Takahashi, M., Kurokawa, Y., Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa, A.  
 ② Uterine adenocarcinoma in N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-treated rats with high-dose exposure to p-tert octylphenol during adulthood.  
 ③Japanese Journal of Cancer Research.  
 ④93  
 ⑤117-124  
 ⑥2002.

## 2. 学会発表

吉田 緑、代田真理子、中江 大、渡邊 元、田谷一善、前川昭彦、Busulfan の胎生期単回曝露による Donryu ラット子宮癌促進作用。内分泌かく乱化学物質学会第 6 回研究

発表会要旨集 p.79,2004 年

吉田 緑、中江 大、前川昭彦  
 Indol-3-carbinol の cytochrome P450 酵素誘導を介したラット子宮内膜腺癌促進作用。  
 日本癌学会第\*\*回総会、p. 2004 年

吉田 緑、中江 大、前川昭彦 吉田 緑、畑中 豊、三原卓二、前川昭彦、中江 大  
 ラット子宮内膜癌発生・進展過程におけるエストロゲンレセプター $\alpha$  とその関連因子の発現変化。第 138 回日本獣医学会学術集会 講演要旨集 p.60、2004 年

Yoshida M, Nakae D, Maekawa A. Dietary indole-3-carbinol promotes endometrial adenocarcinoma development in rats by increase of cytochrome P450 activities and modulation of estrogen metabolism in the liver 10<sup>th</sup> International Congress of Toxicology, Toxicology nad Applied Pharmacology, p.243,197 (4), 2004

Indol-3-carbinol の cytochrome P450 酵素誘導を介したラット子宮内膜腺癌促進作用。  
 日本トキシコロジー学術集会 p.236  
 2004 年

Yoshida M., Shimomoto T, Hatanak Y, Mihara T, Maekawa A, Nakae D. Expression profile of estrogen receptor-alpha-related signaling pathways in the developmental of endometrial adenocarcinomas in Donryu rats. Joint International Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology & the International Federation of Societies of Toxicologic Pathology; Co-sponsored by the International Academy of Toxicologic Pathology. Program & Abstract p.73, 2004

Yoshida M., Ando, J., Uematsu, F., Takahashi, M., Watanabe, N., Igarashi, M, Maekawa, A. and Nakae, D. Promotive effects of dietary treatment of high dose indole-3-carbinol on endometrial carcinogenesis initiated with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in female Donryu rats. The 3<sup>rd</sup> International Conference of Food Factors, Programs & Abstracts. p.91,2003\_

吉田緑、渡辺元、田谷一善、前川昭彦、中江大、新生仔期 p-ter-octylphenol 大量曝露が雌ラットの下垂体に与える経時的な影

響。内分泌攪乱化学物質学会第6回研究発表会要旨集,p.120,2003

吉田緑、片嶋紗弓、前川昭彦、中江大、オクチルフェノールのラット新生仔期曝露が卵巣に与える影響。第30回日本トキシコロジー学会学術年会。プログラム・要旨集 p.209,2003年

片嶋紗弓、吉田緑、前川昭彦、鎌田壽彦、渡辺元、田谷一善、中江大。内分泌攪乱化学物質オクチルフェノールのラットへの新生仔期曝露による卵巣への影響。第19回日本毒性病理学会、講演要旨集、p.42,2003年 東京

吉田緑、勝田真一、谷本倫、高橋正一、下元貴澄、田谷一善、中江大、黒川雄二、前川昭彦。新生仔期オクチルフェノール曝露時間の長さがラット子宮発がんに与える影響。第18回日本毒性病理学会、講演要旨集、p.44,2002年 東京

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

- 1.特許取得  
なし
- 2.実用新案登録  
なし