

細胞数を計測した。その結果、BPA の 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M 群で軽度ではあるが有意な細胞数の増加が認められた。一方、ATRA 群では細胞数が減少した。

無血清培地を用いた ES 細胞培養系で ATRA 添加培養 4 日後において、形成された EB のサイズは対照群に比較して減少していたが、さらに浮遊培養を続けると、対照群よりサイズが増大した。BPA も同様に 10^{-5} M 群でサイズが増加する傾向が見られた。また、4 日間の浮遊培養後、形成された EB をゼラチンコート dish 上で培養すると神経様細胞の出現増加が ATRA 群及び BPA の 10^{-8} から 10^{-5} の各群で見られた。

D. 考察

これらの結果、この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。

E. 結論

内分泌かく乱化学物質の研究に適した ES 細胞培養用の無血清培地を新規に作製し、レチノイン酸及び BPA の EB のサイズ増加影響、ならびに細胞分化影響を確認した。

G. 研究発表

書籍

高木篤也、ヒト全 MHC 遺伝子導入マウス、ヒト型モデル動物、pp79-82、井上達、野田哲生、野本明男編集、シュプリンガーフェアラーク社、2002。

雑誌

Haraguchi S., Kitajima S., Takagi A., Takeda H., Inoue T. and Saga Y., Transcriptional regulation of *Mespl* and *Mesp2* genes: differential usage of enhancers during

development. *Mechanisms of Development*, 108 59-69, 2001.

学会発表

Assessment of the cleft palate induction by seven PCDD/F congeners in the mouse fetus. Atsuya Takagi, Akihiko Hirose, Yoko Hirabayashi, Toyozo Kaneko, Makoto Ema and Jun Kanno, The 23rd International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. USA, 2003年8月

ES 細胞の遺伝子発現に及ぼす TCDD の影響。高木篤也、五十嵐勝英、菅野純、金子豊蔵、井上達、第 29 回日本トキシコロジー学会学術年会、東京 2002 年 6 月

Effects of TCDD and polychlorinated terphenyls (PCTs) on the development of cleft palate in mouse embryos. Atsuya Takagi, Toyozo Kaneko, Katsuhide Igarashi, Jun Kanno and Tohru Inoue, The 22nd International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Spain, 2002 年 8 月

Effects of TCDD on the gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. TAKAGI, A., MATSUDA, N., KANEKO, T., KANNO, J. and INOUE T., 米国奇形学会, 2002 年 6 月

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

13. 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学的解析

分担研究者 松島裕子 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

研究要旨 内分泌かく乱化学物質の生殖器制御系に対する作用を検討する確定試験系を構築するための基盤支援研究を行う。そのために本研究では生殖器制御メカニズムに関する分子レベルでの解析を行い、基盤情報として整理する。具体的には、マウスを用い、発達期と成熟期に分けて研究を進め、生殖器発達に伴う遺伝子発現変化の解析、雌について成熟期における性周期変化に伴う生殖器遺伝子発現変化の解析を主として行い、生殖器制御メカニズムを分子レベルで解析した情報を得、基盤情報として本研究班に貢献する。本年度は、マウス成獣雌について性周期変化に伴う5種類の臓器（視床下部、下垂体、卵巣、子宮、膣）の遺伝子発現値を網羅的に得、データベース化した。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の生殖器制御系に対する作用を検討する確定試験系を構築するための基盤支援研究を行うことが本研究の目的である。そのために本研究では生殖器制御メカニズムに関する分子レベルでの解析を行い、基盤情報として整理する。具体的には、マウスを用い、発達期と成熟期に分けて研究を進め、生殖器発達に伴う遺伝子発現変化の解析、雌について成熟期における性周期変化に伴う生殖器遺伝子発現変化の解析を主として行い、生殖器制御メカニズムを分子レベルで解析した情報を得、基盤情報として本研究班に貢献する。

B. 研究方法

<各性周期の臓器採取>

C57BL/6 雌 100 匹を 9 週齢で購入し、2 週間の馴化期間を経た後に臓器を採取した。性周期の同定には膣スメア法を用い、マウスを

と殺した後に膣スメアを採り、ギムザ染色して性周期を判定した。卵巣、子宮、膣に加え、視床下部領域、下垂体に加え、血清を採取した。

<マウス組織からの RNA の分離精製>

組織を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社) に浸漬し、RNase を不活化した。4℃、一晚静置した後、RNA 抽出操作まで-80℃にて保存した。RNAlater を除いた後、RNeasy kit (キアゲン社) 添付の RLT buffer を用いて組織破砕液を調製し、DNA 定量用蛍光試薬である Picogreen を用いて、破砕液中の DNA 量を測定した。DNA 量に応じて、Spike RNA cocktail (Bacillus RNA 5 種類の mix) を添加し、TRIzol を用いて粗抽出した液を RNeasy kit を用いて全 RNA 精製した。得た全 RNA の 0.2µg を電気泳動し品質を確認した。

<Genechip 解析>

アフィメトリクス社のプロトコールに従い、全 RNA 4-5 µg を T7 プロモーターの付加した

オリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製した。得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社) を用い、ビオチン化 CTP, UTP を共存させつつ cRNA を合成した。二本鎖 DNA および cRNA 精製にはアフィメトリクス社の GeneChip sample cleanup module キットを用いた。得られた cRNA を 300-500bp となるよう断片化し、ハイブリダイゼーションコントロールを添加し Genechip ターゲット液とした。Genechip は MOE430 2.0 を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンして発現値データを得た。データ解析に際しては、Spike RNA のシグナル値を元に、各遺伝子のシグナル値を DNA 当たりの値、さらにはコピー数に変換した値を用い解析を行った。データ解析に用いたソフトウェアは当部に開発したものを主に用いた。

C. 研究結果

<性周期に伴う遺伝子発現変化>

11 週齢の C57BL/6 マウス雌を 100 匹用意し、解剖後に膣スメアにて性周期を判定し、発情前期、発情期、発情後期、発情間期の 4 周期毎に 5 匹以上ずつサンプルを取得した。得た臓器は、視床下部、下垂体、卵巣、子宮、膣に加え、血清である。血清以外の 5 臓器について、当部で開発した Percellome 手法を適用した網羅的遺伝子発現解析を実施した。1 周期につき各臓器 3 サンプルずつデータを得た。得られたマイクロアレイデータを Percellome 手法により、コピー数データに変

換した。これにより、同じ遺伝子を臓器間で比較することが可能となった。まず、スキャッタープロットを描き、性周期毎の遺伝子発現変化の全体像を検討したところ、視床下部領域は変化に乏しく、下垂体、卵巣は一部の遺伝子に変化が生じており、子宮、膣は多数の遺伝子に比較的大きな発現変化を生じていることが明らかとなった。エストロゲンによって発現が上昇することが報告されているプロゲステロン受容体の発現変化を調べると、膣でその発現が発情前期に上昇していることが確認された。さらに詳細な解析をすべく、クラスター解析を行っている。また、臓器間での各遺伝子の発現変化を調べるために、当部で開発した MF surface ソフトウェアを用いた解析を行っている。

D. 考察

予想外に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。

E. 結論

性周期に伴う遺伝子発現変化を臓器毎にとらえたデータベースを構築することができた。このデータベースは内分泌かく乱化学物質の生体影響を考察する上で、正常な生理的現象に伴って起こる遺伝子発現変化に関する情報を提供する貴重なものである。これは本班の他の研究を推進するために役立つと期待される。

G. 研究発表

1) 論文発表

Yuko Matsuhima, Osayuki Uchida, Minoru Saitoh, Yasushi Kawasaki, Kazuo Isama, Masaaki Kaniwa, Tohru Inoue, Jun kanno, Twenty-eight day repeated dose oral toxicity test of synergist of a pyrethroid insecticide, Bull Natl Inst Health Sci (2003)121, 040-047

2) 学会発表

松島裕子、井上 達、菅野 純；卵巣摘出マウスの子宮肥大試験を用いた農薬 o,p'-DDT と Methoxychlor エストロゲン様作用の検討、第 5 回環境ホルモン学会（広島）、平成 14 年 11 月（2002）

山本雅也、松島裕子、五十嵐勝秀、井上 達、菅野 純；子宮におけるエストロジェン反応遺伝子の発現変化の経時的解析、第 124 回日本薬学会年会（大阪・WTC コスモタワー）、平成 16 年 3 月（2004）

松島裕子、内藤克司、斉藤 実、伊佐間和郎、川崎 靖、関田清司、小川幸男、鹿庭正昭、井上 達、菅野 純；殺菌・保存剤 o-cymen-5-ol(biosol)のラットを用いた 3 ヶ月間混餌投与毒性試験、第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会（大阪）、平成 16 年 7 月（2004）

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

特になし

14. 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

分担研究者 高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究要旨 本研究の目的は、内分泌かく乱化学物質の神経系形成・発達に対する作用を明らかにするための基盤支援研究を行うことである。内分泌かく乱化学物質は神経系、特に行動に対して影響を及ぼすことが報告されており、本研究班でも特に重視されている。一方で、内分泌かく乱化学物質が細胞、分子レベルでいかなる作用を及ぼして神経系形成・発達をかく乱し、行動に影響を及ぼすかについての研究は十分とは言えず、行動影響につながる作用メカニズムを分子レベルで説明することは困難な状況にある。そこで本研究テーマでは、神経系形成・発達において中心的な役割を果たす神経幹細胞を標的に据えた解析を行い、暴露により引き起こされる作用に関する分子レベルの情報を収集し、確定試験開発の基盤研究として役立てる。本年度は、神経幹細胞に対する影響の具体的な試験系として、影響を定量的に検討する系として、1) 神経幹細胞の自己複製能に対する影響の定量系、2) 神経幹細胞の分化能に対する影響の定量系、の開発を行い、1) の系に関し、 17β -estradiol に加え、DES, BPA, NP 等、エストロゲン様作用が報告されている物質の影響を検討した。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の神経系形成・発達に対する作用を明らかにするための基盤支援研究を行うことが本研究の目的である。本研究では、具体的な生体内標的として、神経幹細胞を取り上げる。その理由は、齧歯類をモデルにした研究で、行動に影響が生じる暴露時期は胎児期および新生児期であることが示されていること、この時期は神経幹細胞が増殖、成熟し、ニューロンやグリアなどの神経系細胞を生み出す時期であり、神経幹細胞が生体内で特に重要な役割を果たしているためである。実際、この時期に母親がストレスを受けるとグルココルチコイド等のホルモンの作用を介して神経系の正常な発達が影響を受け、ストレス過敏反応などを始めとする成熟

後の行動影響が現れることが多く報告されている。その際に神経幹細胞が影響を受けており、ストレスを受けると神経幹細胞の増殖が妨げられることも報告されている。すなわち、母親を取り巻く環境の胎児神経幹細胞を標的とした影響が、子の成熟後の行動影響として現れる可能性が指摘されている。

以上、内分泌かく乱化学物質が行動影響を示す胎児期、新生児期に標的となる細胞として、その時期の主役である神経幹細胞を取り上げる必要があると考え、本研究を進める。

B. 研究方法

＜マウス胎児神経幹細胞培養（ニューロスフェア培養）：自己複製能定量系＞

マウス C57BL/6 妊娠 11.5 日または 14.5 日

目の胎児より、終脳を分離し単細胞化した後、培養系に移す。培養培地 (N2/DMEM/F12 (フェノールレッド不含の DMEM/F12 培地(シグマ社製品を主に使用)にインスリン、プロゲステロン、プトレッシン、アポトランスフェリン、亜セレン酸 Na を添加したもの)) には bFGF (10ng/ml) および EGF (25 ng/ml) を添加したものを、96well plate (コーニング社低接着 plate) 1well 当たり 4000 個/100uL の密度から生細胞を播種する。7日間培養し、単細胞から形成される細胞増殖塊 (ニューロスフェア) の数を数え、播種細胞数に対してプロットした。

<マウス胎児神経幹細胞培養 (ニューロスフェア培養) : 分化能定量系>

培養により得られたニューロスフェアをランダムに選び、分化誘導物質として、牛胎児血清 (FBS) を 1% 加えた培養培地 (N2/DMEM/F12 前出) にマイクロピペットを用いて移した。培養容器は Nunc 社のチャンバースライド (8well/slide) を用い、ポリ-L-オルニチンおよびフィブロネクチンでコーティングし、ニューロスフェア細胞が容器に接着し分化しやすい条件とした。培養期間は 1 週間とし、培養終了後、4%ホルマリン/PBS(-)にて 15 分間固定した後、各細胞系に対するマーカーを用いて免疫染色し、1 ヶのニューロスフェアからニューロン (マーカー: MAP2)、アストロサイト (マーカー: GFAP)、オリゴデンドロサイト (マーカー: O4) のどの細胞系が生じたかを測定した。各群 20 ヶのニューロスフェアを数え、ニューロンを N、アストロサイトを A、オリゴデンドロサイトを O と略し、3 系統に分化したニューロスフェアは NAO、というように表記し、割合を算出した。

<免疫染色>

チャンバースライドから培地を除き、4%ホルマリン/PBS(-)にて 15 分間固定し、一次抗体 (マウス抗 nestin, マウス抗 MAP2, ラット抗 GFAP、マウス抗 O4)、二次抗体 (FITC ラベル抗マウス IgG, Texas Red ラベル抗ラット IgG, AMCA ラベル抗マウス IgM) を用い、蛍光免疫染色した。

C. 研究結果

1) 神経幹細胞影響試験系の開発

神経幹細胞の特性は、神経系細胞への多分化能と、それを保持したまま増殖する自己複製能の大きく 2 種類に分けられる。そこで、本研究ではこの 2 種類の特性に対する化学物質の影響を定量的に検討可能な試験系の開発を行った。

1) - 1 : 自己複製能に対する影響を検討する系としては、神経幹細胞が、無血清培地中、bFGF, EGF を共存させつつ浮遊培養すると、単一細胞から分裂を繰り返すことにより、顕微鏡下容易に計数可能な細胞凝集塊 (ニューロスフェア) を形成することを利用した、ニューロスフェア培養系を基本とした。化学物質の影響を、培養開始時に播種した生細胞数当たりのニューロスフェア数として定量化を試みた。そのために 96well plate を利用することとし、マウス胎生 14.5 日の胎児終脳から得た細胞を用いて播種細胞数の検討を行い、1well 当たり 4000 個の生細胞を播種することで 50 個程度のニューロスフェアが形成される系として安定した培養が行えるよう各種条件を設定した。

1) - 2 : 分化能に対する影響を検討する系としては、神経幹細胞が未分化状態を維持し

て形成するニューロスフェアを、付着条件に移し血清で刺激すると神経系の各細胞系譜に分化することを利用して系の構築を行った。ニューロスフェアはおよそ 1000 個の細胞からなる凝集塊であるが、もともと単一細胞に由来するため、1 個のニューロスフェアが付着後に分化する細胞系譜はもともとの単一細胞が有していた分化能力を反映すると考えられている。よって、化学物質をニューロスフェア形成時に添加することで、神経幹細胞がその分化能にどのような影響を受けたかを調べることができる。神経系細胞系譜マーカーとしては、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの各々に対し、MAP2, GFAP, O4 を選び、各々に対する抗体を用いた免疫染色を行うことで陽性度を判定した。各種条件検討を行い、結果的に血清 1%, 8well スライドチャンバー1well あたり投入するニューロスフェア数は 20 ヶとすることで、分化能に対する影響を定量的に検討することが可能な系として完成した。

2) エストロジェン様作用物質の影響解析

開発した実験系を用い、エストロジェン様作用物質の影響検討を開始した。本年度は数種類のエストロジェン様作用物質を対象に、予備的データを得ることを目的に進めた。対象とした物質は、17-beta estradiol (E2) に加え、DES, BPA, NP である。E2 および DES は 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} M で、BPA および NP は 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M で検討した。用いた実験系は自己複製に対する影響の定量系とし、培養開始から終了まで化学物質を存在させた。その結果、エストロジェン様作用物質は基本的に自己複製を阻害する傾向を示したが、BPA はこの濃

度域では影響は軽度に留まった。

D. 考察

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。エストロジェ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、これらエストロジェ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、エストロジェン様作用物質以外のホルモン様物質に関してもデータを得る必要がある。

E. 結論

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実験系の開発に成功したので、次年度以降各種化学物質の影響を測定し、確定試験に関わる神経系形成・発達メカニズムに関する知見を提供すべく研究を進めていく。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

高木篤也、ヒト全 MHC 遺伝子導入マウス、ヒト型モデル動物、pp79-82、井上達、野田哲生、野本明男編集、シュプリンガーフェアラーク社、2002.

2) 雑誌

Haraguchi S., Kitajima S., Takagi A., Takeda H., Inoue T. and Saga Y., Mechanisms of Development,

108 59-69, 2001.

2.学会発表

Assessment of the cleft palate induction by seven PCDD/F congeners in the mouse fetus.

Atsuya Takagi, Akihiko Hirose, Yoko Hirabayashi, Toyozo Kaneko, Makoto Ema and Jun Kanno, The 23rd International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. USA, 2003年8月

ES細胞の遺伝子発現に及ぼすTCDDの影響。
高木篤也、五十嵐勝秀、菅野純、金子豊蔵、井上達、第29回日本トキシコロジー学会学術年会、東京2002年6月

Effects of TCDD and polychlorinated terphenyls (PCTs) on the development of cleft palate in mouse

embryos. Atsuya Takagi, Toyozo Kaneko, Katsuhide Igarashi, Jun Kanno and Tohru Inoue, The 22nd International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Spain, 2002年8月

Effects of TCDD on the gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. TAKAGI, A., MATSUDA, N., KANEKO, T., KANNO, J. and INOUE T., 米国奇形学会, 2002年6月

H. 知的財産所有権の出願、登録状況
特になし

【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〉

15. 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

分担研究者 松島 裕子

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 主任研究官

研究要旨 本研究は低用量暴露の遅発影響を検討する試験系の開発を目的とする。高杉らが、周産期のマウスへのエストロゲン処置が後に膣や子宮頸部の癌の発生を誘発することを見出し、ヒトの母親が妊娠初期に比較的大量の DES を摂取することに対して警鐘を鳴らした結果、それを受け止めた米国では DES daughter が発生しなかったことは有名である。母親が妊娠初期 3 ヶ月に比較的大量の DES に暴露された際に生まれてきた女兒の膣や子宮頸部に 20 歳前後で明細胞癌が発生する事象のモデルとして、周産期マウス暴露系が確立している。

しかし、DES daughter 自体が薬用量に於ける事象であることもあり、従来の周産期におけるエストロゲン様化学物質の影響を検討した実験の多くが、大量投与による明瞭な影響を対象としており、本班研究で要求される実際のヒトの生活環境から暴露可能量な低用量域での研究は少ない。

周産期における比較的低用量暴露の影響を報告したものとして、Newbold らによるマウス生後 1~5 日間 DES 暴露が、離乳時子宮肥大反応に影響を与えた事例がある。今回我々は、本研究の目的の第一段階として、この事例の確認のための追試を行った。すなわち、CD-1 マウス PND(postnatal day)1~5 に DES を 0(corn oil)、0.001、0.01、0.1、1、10 μ g/kg 反復皮下投与した。次いで、PND18~20 の 3 日間 DES を 0(corn oil)、1、10 μ g/kg 皮下投与し、最終投与 24 時間後の子宮重量を測定した (いわゆる未成熟マウス子宮肥大試験)。その結果、PND1~5 (0.1 μ g/kg 以上)+PND18~20 (10 μ g/kg) で、離乳時子宮肥大反応への影響が観測された。病理組織学的検査では、PND1~5 (10 μ g/kg) の影響としての多卵性卵胞、PND1~5 と PND18~20 における暴露の複合影響としての子宮内膜上皮の reserve cell hyperplasia 等の変化がみられた。

A. 研究目的

本研究は低用量暴露の遅発影響を検討する試験系の開発を目的とする。比較的低用量暴露の影響を報告したものとして、Newbold らによるマウス生後 1~5 日間 DES 暴露が、離乳時

子宮肥大反応に影響を与えた事例がある。本研究の本年度の目的は、この事例の確認のための追試を行いこれを検証することにある。これにより、外来性エストロゲンの新生児期投与の影響を、思春期エストロゲン投与により増幅するプ

ロトコールの開発を試み、その際の卵巣、子宮、膣への影響を詳細に検討する方法論の確立を目指す。

B. 研究方法

Newboldら (Retha R Newbold, et al, *Developmental exposure to DES alters uterine response to estrogens in prepubescent mice; low versus high dose effects*, *Reproductive Toxicology* 18 (2004) 399-406) は、CD-1 新生児マウス 1~5 日目に DES を 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 μ g/kg 皮下投与後、PND17~19 に更に、DES を 10 μ g/kg 皮下投与し、最終投与 24 時間後の子宮重量を測定した結果、子宮肥大反応が低用量の 0.01 では対照群に比し有意に増加したが、10 μ g/kg 以上の群では顕著に低下したと報告している。

今回我々は、Newbold らの追試を下記の方法で行った。

動物は、妊娠 14 日目の CD-1 マウス (日本チャールスリバー (株)) を 25 腹購入した。分娩後、雄雌各々にプールし、雌性児を 8 匹/母 (1 用量につき雌性仔 24 匹/3 母) となるように無作為に群わけを行い保育させた。

PND1~5 の 5 日間 DES (CASNo. 56-53-1, sigma) を 0 (corn oil), 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μ g/kg 背部に皮下投与した。PND18 の時点で、1 用量 24 匹を体重層別無作為抽出法により 3 群に群分けし、更に、PND18~20 の 3 日間 DES を 0 (corn oil), 1, 10 μ g/kg 皮下投与した。最終投与後 (PND20) に離乳し、更に 4 匹/ケージに分けた。

投与容量は、各々 PND1~5 には 10ml/kg、PND18~20 には 5ml/kg とした。

試験は、温度 24 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度 55 \pm 5%、換気回

数 18 回/時 (オールフレッシュ)、照明 12 時間に設定されたバリア方式の動物室で実験し、飼料 (CRF1) および水道水を自由に摂取させた。

最終投与 24 時間後 (PND21) に頸椎脱臼にて屠殺し、体重、子宮重量 (Wet 及び Blotted) を測定した。卵巣、子宮、膣を中性ホルマリンで固定し、パラフィン包埋、HE 染色を施し、病理組織学的検査を行った。

(倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは、頸椎脱臼法などの苦痛の少ない方法を用いるといった、実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行った。

C. 研究結果

体重 ; 解剖日 (PND21) の体重に対する DES 投与の影響はみられなかった。

子宮重量 ; PND1~5 (0~10 μ g/kg) + PND18~20 (0 及び 1 μ g/kg) の各群の子宮の相対重量は、対照群に対して有意な変化は示さなかった。これに対し、PND1~5 (0.1 μ g/kg 以上) + PND18~20 (10 μ g/kg) では、子宮の絶対及び相対重量に有意な減少がみられた。

病理組織学的検査 (部分解析) ; PND1~5 (10 μ g/kg) + PND18~20 (0, 1, 10 μ g/kg) で多卵性卵胞 (4/7, 3/7, 4/8) が見られた。PND1~5 (1, 10 μ g/kg) + PND18~20 (10 μ g/kg) で severe な子宮内膜 stratification (8/8, 8/8)、PND1~5 (10 μ g/kg) + PND18~20 (1 μ g/kg) で slight な同病変が (2/7) に見られた。

D. 考察

CD-1 マウス PND1~5 (0.1 μ g/kg 以上) + PND18~20 (10 μ g/kg) において子宮重量が減少し、PND1~5 (10 μ g/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ジェ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。

E. 結論

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。更に、周産期エストロゲン暴露により、子宮及び卵巣に器質的变化を及ぼすことが確認された。

G. 研究発表

1) 論文発表

Yuko Matsuhima, Osayuki Uchida, Minoru Saitoh, Yasushi Kawasaki, Kazuo Isama, Masaaki Kaniwa, Tohru Inoue, Jun kanno, Twenty-eight day repeated dose oral toxicity test of synergist of a pyrethroid insecticide, Bull Natl Inst Health Sci (2003)121, 040-047

2) 学会発表

松島裕子、井上 達、菅野 純；卵巣摘出マウスの子宮肥大試験を用いた農薬 o, p'-DDT と Methoxychlor エストロゲン様作用の検討、第 5 回環境ホルモン学会 (広島)、平成 14 年 11 月 (2002)

山本雅也、松島裕子、五十嵐勝秀、井上 達、菅野 純；子宮におけるエストロジェン反応遺伝子の発現変化の経時的解析、第 124 回日本薬学会年会 (大阪・WTC コスモタワー)、平成 16 年 3 月 (2004)

松島裕子、内藤克司、斉藤 実、伊佐間和郎、川崎 靖、関田清司、小川幸男、鹿庭正昭、井上 達、菅野 純；殺菌・保存剤 o-cymen-5-ol (biosol) のラットを用いた 3 ヶ月間混餌投与毒性試験、第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会 (大阪)、平成 16 年 7 月 (2004)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

16. 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

分担研究者 吉村慎介 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 毒性学研究 室長

研究要旨 Ethynyl estradiol (EE)は *in vitro* でアンドロゲン受容体アンタゴニストであることが示されている。しかし、Hershberger 試験を実施したところ、明らかな抗アンドロゲン作用は認められなかった。そこで、EE の有するエストロゲン作用を遮断することを目的に Tamoxifen (TAM)を併用投与する Hershberger 試験を実施したが、明らかな抗アンドロゲン作用は見出せなかった。

A. 研究目的

アンドロゲンあるいは抗アンドロゲン物質に対する Hershberger 試験は、*in vitro* における情報を必ずしも反映しないことが判明しつつある。これは、アンドロゲン受容体に影響を及ぼす濃度において、無視できない程度のエストロゲン受容体活性化が同時に起こっている可能性があるためと考えられる。本研究では、*in vitro* から予測されるアンドロゲンあるいは抗アンドロゲン反応が *in vivo* の前立腺において観察されない状況における *in vivo* におけるシグナル伝達のクロストークを検討する。

B. 研究方法

1) EE の Hershberger 試験

5 週齢で購入した雄ラット（系統：Crj:CD(SD)IGS）を 1 週間予備飼育後、麻酔下で精巣および精巣上体を摘出した。さらに 1 週間後から 10 日間、コーン油に溶解した EE を 0（陰性対照）、0.001、0.01、0.1、1 および 10 mg/kg の用量で強制経口投与したのち 0.2 mg/kg のテストステロンプロピオネイト(TP)を皮下投与した。さらに、溶媒対照としてコーン油のみを強制経口および皮下投与する群、陽性対照として Flutamide (FLU)を強制経口投与後、TP を皮下投与する群を設けた。毎日、

一般状態の観察、体重および摂餌量の測定を行い、10 日間の投与翌日に麻酔下放血屠殺して剖検し、前立腺腹葉、精囊+凝固腺、肛門挙筋+球海綿体筋、亀頭、尿道球腺の重量を 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液で固定後に測定した。体重、摂餌量、器官重量については陰性対照群と各 EE 投与群との間は多重比較を行い、FLU 投与群との間には t-検定を実施した。

2) TAM 併用投与による EE の Hershberger 試験

前述の EE の Hershberger 試験における毎日の投与に先立ち、1 および 3 mg/kg の TAM を強制経口投与、あるいは 3 mg/kg の TAM を皮下投与した。1 mg/kg の TAM 経口投与では EE の投与量は 0（対照群）、1 および 10 mg/kg とし、3 mg/kg の TAM 経口投与では EE の投与量は 0（対照群）、10 および 100 mg/kg とした。また、3 mg/kg の TAM 皮下投与試験では 0（対照群）、0.1、1、10 および 30 mg/kg とした。溶媒対照群および陽性対照群は設けなかったが、TAM および EE を投与しない群（溶媒を投与）、TAM の併用投与をしない EE 30 mg/kg 群を設け、その他は 1) の Hershberger 試験と同様の方法で実施した。

(倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは、頸椎脱臼法などの苦痛の少ない方法を用いるといった、食薬センターの実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行った。

C. 研究結果

1) EE の Hershberger 試験

(1) 一般状態観察、体重および摂餌量測定

一般状態に異常はなかったが、EE 1 および 10 mg/kg 群の体重および摂餌量は陰性対照群より有意な低値を示した。FLU 投与群に変化はなかった。

(2) 器官重量の測定 (Table 1-1, 1-2)

解剖時の体重は、EE 1 および 10 mg/kg 群で有意な低値を示した。前立腺腹葉は EE 1 および 10 mg/kg 群の絶対重量が陰性対照群より有意な低値を示したが、相対重量に有意な差はなかった。精嚢+凝固腺の絶対重量に有意な変化はなかったが、EE 1 mg/kg 群の相対重量が陰性対照群より有意な高値を示した。陰茎亀頭では EE 1 および 10 mg/kg 群の絶対重量が陰性対照群より有意な低値を示し、一方、同群の相対重量は陰性対照群より有意な高値を示した。肛門挙筋+球海綿体筋および尿道球腺の絶対および相対重量に有意な変化はなかった。FLU 投与群では測定したすべての器官で絶対および相対重量の有意な低値がみられた

2) TAM 併用投与による EE の Hershberger 試験

(1) 一般状態観察、体重および摂餌量測定

一般状態に顕著な変化はなかった。3 mg/kg の TAM 強制経口投与では、EE 100 mg/kg 群

の体重は投与開始時より低下し、摂餌量は EE 0 mg/kg 群より有意な低値を示した。その他の EE 群は、EE 0 mg/kg 群と同様の値を示した。3 mg/kg の TAM 皮下投与併用試験では、EE 10 mg/kg および最高用量 30 mg/kg で摂餌量が散発的に対照群より有意な低値を示したが、体重に有意な差はみられなかった。

(2) 器官重量の測定 (Table 2-1~3-2)

解剖時の体重は、3 mg/kg の TAM 強制経口投与では EE 100 mg/kg で EE 0 mg/kg 群より有意な低値を示した。また、EE 100 mg/kg 群では、前立腺腹葉、精嚢+凝固腺、肛門挙筋+球海綿体筋の絶対および相対重量、亀頭の絶対重量が有意な低値を示した。しかし、その他の EE 群では、TAM 1 mg/kg を併用した EE 10 mg/kg 群の肛門挙筋+球海綿体筋の絶対重量が有意な低値を示したほかに変化はなかった。

3 mg/kg の TAM 皮下投与併用試験では、解剖時体重、測定した各器官の絶対および相対重量は対照群との間に有意な差を示さなかった。

D. 考察

EE および TP の投与による Hershberger 試験で、前立腺およ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 群に絶対およ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た。

E. 結論

EEのHershberger試験で抗アンドロゲン作用はみられず、抗エストロゲン物質のTAMを併用投与しても結果はほぼ同様であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

2) 雑誌

Yoshimura, S., Yamaguchi, H., Konno, K., Ohsawa, N., Noguchi, S., Chisaka, A.: Hypospadias and incomplete preputial separation in male rats induced by prenatal exposure to an anti-androgen, flutamide. J. Toxicol. Pathol. 17: 113-118 (2004)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

【OECD 対応試験実施・調査研究】

17. 子宮肥大および Hershberger 試験に関する研究

分担研究者 小野 宏 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 常務理事・研究顧問

研究要旨：OECD バリデーションプロトコルに従い、エストロゲン様作用の疑われる化学物質について、卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験を実施した。Hershberger 試験に関しては、OECD バリデーション作業のフェーズ 3 に参加し、コード化された化学物質を精巣摘出ラットに投与して、Hershberger 試験を実施した。また、Hershberger 試験の陽性対照として経口投与で用いられている Flutamide について、皮下投与による抗アンドロゲン効果を追試し、同物質は皮下投与でも有効であることを確認した。

A. 研究目的

A.1. 昨年度までの研究に引き続き、マウスを用いた子宮肥大試験の検証を行った。試験はいずれも OECD バリデーションプロトコルに従い、エストロゲン作用が疑われる化学物質を用いて、卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験を実施した。

A.2. Hershberger 試験に関しては、国際協力のもと、内分泌かく乱化学物質の試験法構築の基礎となる資料を提供することを目的として、OECD バリデーション作業のフェーズ 3 に参加し、コード化された化学物質による Hershberger 試験を実施した。

A.3. 陽性対照として経口投与で用いられている Flutamide について、皮下投与による抗アンドロゲン効果を Hershberger 試験により検証した。

B. 研究方法

B.1. 卵巣摘出した C57BL/6J 系マウスに 2,2'-dihydrobenzophenone (DHBP) を経口投与あるいは皮下投与して、エストロゲン活性あるいは抗

エストロゲン活性を有するか否かを調べた。エストロゲン活性を検出する試験系では、30~1000 mg/kg の DHBP を単独投与した群および陽性対照としてエチニルエストラジオール (EE 投与群) を設け、抗エストロゲン活性を検出する試験系では、30~1000 mg/kg の DHBP と 0.6 μ g/kg の EE を併用投与した群を設けた。投与期間は 7 日間とし、最終投与の 24 時間後に致死させ、子宮重量を測定した。

B.2. 卵巣摘出した C57BL/6J 系マウスに、octylphenol (OP) を皮下投与して、エストロゲン活性あるいは抗エストロゲン活性を調べ、ラットでの試験結果と比較した。エストロゲン活性を検出する試験系では、3~100 mg/kg の OP を単独投与した群および EE 投与群を設け、抗エストロゲン活性を検出する試験系では、3~100 mg/kg の OP と 0.6 μ g/kg の EE を併用投与した群を設けた。投与期間は 7 日間とし、最終投与の 24 時間後に致死させ、子宮重量を測定した。

B.3. バリデーション試験の被験物質には、OECD

から提供されたコード化された化学物質を使用し、動物は、精巣摘出した SD 系ラットを使用した。コード化された化学物質は、いずれも添付された資料に従ってコーン油に溶解または懸濁し、強制的に経口投与した。アンタゴニスト活性を検出する試験系では、テストステロンプロピオネイト (TP) を 0.2 mg/kg の用量で併用皮下投与した。投与期間は OECD のプロトコル案に準じて 10 日間とした。最終投与の 24 時間後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、前立腺腹葉、精囊 (凝固腺を含む)、肛門挙筋・球海綿体筋、亀頭、尿道球腺および肝臓の重量を測定した。

B.4. 経口投与で抗アンドロゲン作用を示すことが知られている Flutamide を、精巣摘出した SD 系ラットに 1 および 3 mg/kg の用量で皮下投与し、さらに TP を 0.4 mg/kg の用量で併用投与した。投与期間は 10 日間とし、最終投与の 24 時間後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、前立腺腹葉、精囊 (凝固腺を含む)、肛門挙筋・球海綿体筋、亀頭および尿道球腺の重量を測定した。

(鈴に面への配慮)

使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用しないしは、頸椎脱臼法などの苦痛の少ない方法を用いるといった、食薬センターの実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行った。

C. 研究結果

C.1. DHP のマウス子宮肥大試験を実施した結果、エストロゲン活性を検出する試験系では、1000 mg/kg の DHP を経口投与した群、300 mg/kg 以上の DHP を皮下投与した群において、それぞれ子宮重量が有意に増加した (Figs. 1, 2)。また、抗エストロゲン活性を検出する試験系では、

300 mg/kg 以上の DHP を皮下投与した群において子宮重量が有意に低下した (Fig. 3)。

C.2. OP の皮下投与によるマウス子宮肥大試験を実施した結果、エストロゲン活性を検出する試験系では、100 mg/kg 投与群で子宮重量が溶媒対照群より有意に増加した (Fig. 4)。抗エストロゲン活性を検出する試験系では、OP 投与群と溶媒対照群の間に子宮重量の有意な差は認められなかった。

C.3. Hershberger 試験の OECD バリデーション作業 (フェーズ 3) には、各国から計 9 施設の参加があった。コード化された物質は、アンドロゲン活性の試験系では 4 物質、抗アンドロゲン活性の試験系では 6 物質あり、それぞれの試験系に溶媒対照群および陽性対照群を設けた。その結果、アンドロゲン活性の試験系では、肛門挙筋・球海綿体筋が最も感度の高い傾向にあり、前立腺、精囊、亀頭および尿道球腺の感度は、ほぼ同程度であった (Fig. 5)。一方、抗アンドロゲン活性の試験系では、精囊が最も感度が高く、前立腺および肛門挙筋・球海綿体筋がそれに次ぎ、亀頭および尿道球腺の感度は低い傾向にあった (Fig. 6)。なお、肛門挙筋・球海綿体筋については、一部の陰性対照物質でも有意な変化がみられた。

C.4. Flutamide の皮下投与による Hershberger 試験では、いずれの器官とも Flutamide の用量に依存して低下し、Flutamide の皮下投与での抗アンドロゲン作用が確認された。各器官における Flutamide のアンタゴニストとしての最小有効量は、前立腺、精囊ならびに肛門挙筋・球海綿体筋では 1 mg/kg、亀頭および尿道球腺では 3 mg/kg であった。

D. 考察・結論

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 で子宮重量の増加が報告されている（ただし、14 日間反復投与）。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。なお、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、DHBP 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、DHBP 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、前立腺および精嚢が比較的感度が高く、亀頭およ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法においても用いることが可能と判断された。

G. 研究発表

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)

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)

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)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

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

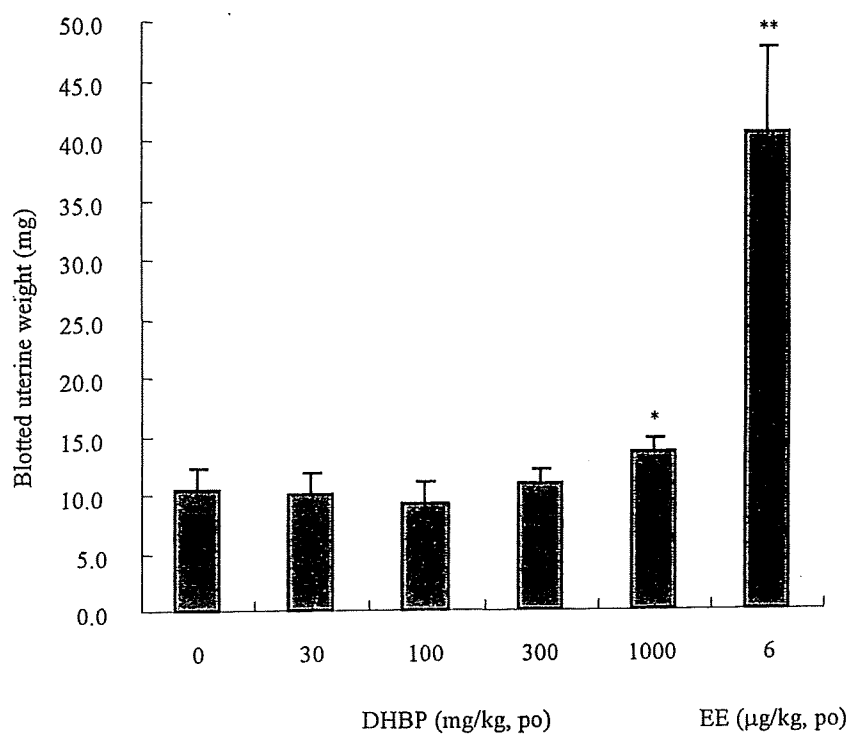


Fig. 1 Uterotrophic assay of DHPB for estrogenic activity detection in ovariectomized C57BL/6J mice

DHPB, 2,4-dihydroxybenzophenone

EE, ethinylestradiol

*, **, Significant difference from 0 mg/kg group ($p < 0.05$, $p < 0.01$)

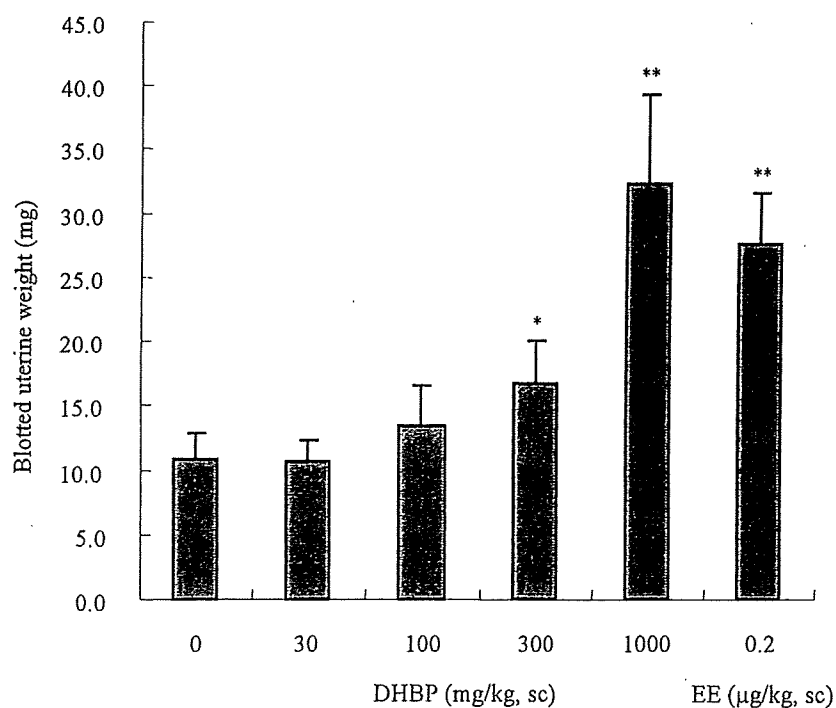


Fig. 2 Uterotrophic assay of DHPB for estrogenic activity detection in ovariectomized C57BL/6J mice

DHPB, 2,4-dihydroxybenzophenone

EE, ethinylestradiol

*, **, Significant difference from 0 mg/kg group ($p < 0.05$, $p < 0.01$)

Bar, S.D.

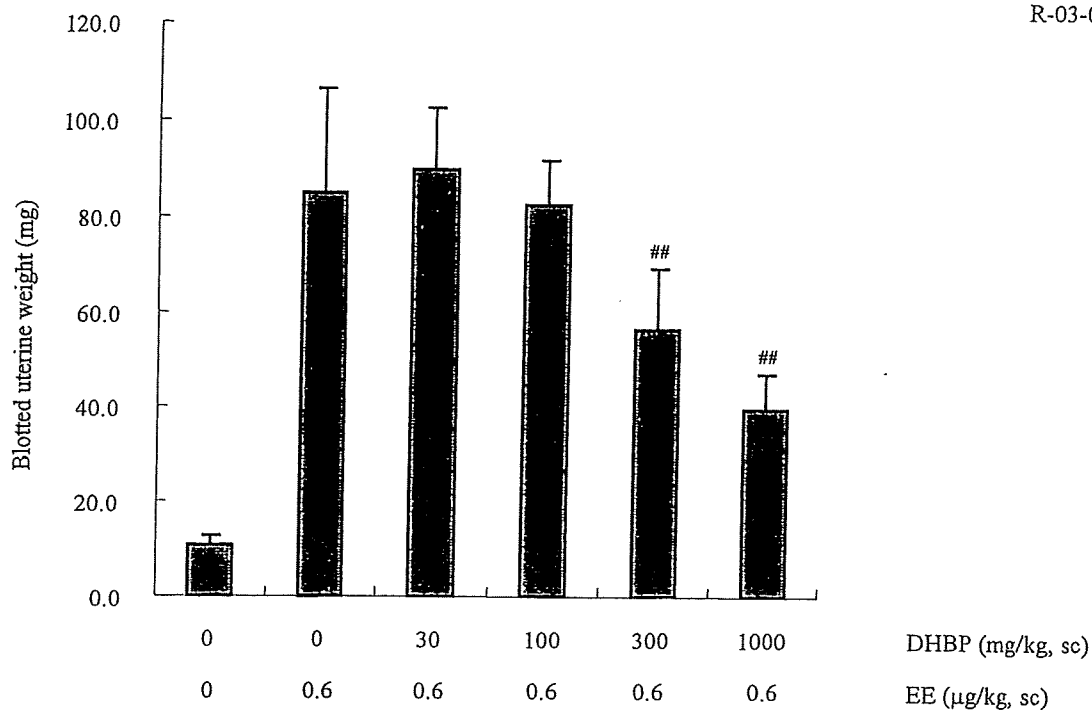


Fig. 3 Uterotrophic assay of DHPB for antiestrogenic activity detection in ovariectomized C57BL/6J mice

DHBP, 2,4-dihydroxybenzophenone

EE, ethinylestradiol

##, Significant difference from 0 mg/kg & EE 0.6 µg/kg group (p<0.01)

Bar, S.D.