

### 3.2 毒性学のパラダイムシフト

低用量問題に取り組む中で、たくさんの事柄が明らかになってきた。ここで課題となった「性の可塑性」なども、多分に生命存続のための生物に備わった知恵であった。それが裏目に出た形でこの問題は発生している。その中には、様々の生命におしなべて影響の及んでいる事象が見いだされたが、他方、十分な生物学的蓋然性を持ちながらも齧歯類-霊長目-ヒトへの外挿性の明らかに否定されている事象もある。本稿で取り上げた齧歯類の性的二型核の変化などもこれに属し、霊長目での方法論は、また異なったものとなることを意味している。けだし蓋然性の蓋然性たる所以である。そうした中にあってもホメオステシスの範囲内でのリスク、薬理と“毒理”のcontinuumに重なった生体障害の可能性は、毒性学の方法論の新たな段階を期するパラダイムシフトといえよう。低用量問題に関するノースカロライナ会議が従来の試験法そのものに疑問を投げかけることになったのは、こうした背景があつたのことと考えている。

### 3.3 トキシコジノミクス<sup>3)</sup>

先にホメオステシスの陰に隠れていて表面的には“見えない”現象を見いだすことが新しい課題となることにふれた。これに役割を果たすものと期待される手法として、マイクロアレイやDNAチップによる遺伝子の大量発現技術の試行的普及が進んでいる。それらの“ゲノム発現情報とリンクして包括的に把握される”比較的大容量の分子生物学的情報は、-omicsの接尾語を付してジノミクス、プロテオミクス、メタボノミクスなどと呼称される新しい生物学領域を形成しつつある。これらのトキシコロジーへの適用がトキシコジノミクスである<sup>34)</sup>。例えばDNA障害を伴った発がん物質の低用量域での閾値現象が、p53欠失動物では、無閾値性に観察され、通常動物でのそれは、修復に関与することが明らかになりつつある。このような通常観察されない静止変化や閾値現象は、トキシコジノミクスによって、“見えてくる”，可視化される。多次元的でネットワーク状の相互作用・拮抗関係にある様々のモメントの堪えざる平衡調節も可視化される、そういったことが期待される。これを通じていま明らかにされようとしている低用量問題は、今少し論理的な構成をもった現象として理解されるようになるものと思われる。

低用量問題は、内分泌攪乱物質問題を契機として、ヒトと外界との相互関係を探る本質的な生物学の課題の一つになろうとしている。

## 文 献

- 1) Nagel SC *et al.*, Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA)

- assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol, *Environ Health Perspect*, 105, 70-76 (1997).
- 2) Cagen SZ *et al.*, *Toxicol Sci.*, 50, 36-44 (1999).
  - 3) Inoue T., Toxicogenomics-a new paradigm of toxicology. In, T.Inoue, WD.Pennie (eds.), *Toxicogenomics*. Springer, Tokyo, Berlin 2003, pp.3-11.
  - 4) 米国NTPでは、「一般的に毒性試験で用いる用量よりも低い用量」として問題提起を行った (<http://nipserv.niehs.nih.gov/htdocs/liason/FinalRptLowDoseFR.html>).
  - 5) WHO/International Programme on Chemical Safety; Eds, D.Damstra, S.Barlow, A.Bergman, R.Kavlock, G.van der Kraak., *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors*. World Health Organization, 2002, pp.180. (<http://www.ehp.niehs.nih.gov/who/>).
  - 6) National Research Council, *Hormonally Active Agents in the Environment*. National Academy Press, Washinton, D.D., 1999, pp.430.
  - 7) 井上達, 五十嵐勝秀, 関澤純, 内分泌かく乱物質の作用機序からみたヒトへの健康障害, *日医会誌*, 127, 197-201 (2002).
  - 8) Honma S *et al.*, Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction, *Reprod Toxicol*, 16, 117-122 (2002).
  - 9) Palanza P *et al.*, Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice, *Environ Health Perspect*, 110, Suppl.3, 415-422 (2002).
  - 10) Schonfelder G *et al.*, In utero exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina, *Neoplasia*, 4, 98-102 (2002).
  - 11) Schonfelder G *et al.*, Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit, *Environ Health Perspect*, 110, A703-707 (2002).
  - 12) Tinwell H *et al.*, Normal sexual development of two strains of rat exposed in utero to low doses of bisphenol A., *Toxicol Sci.*, 68, 339-348 (2002).
  - 13) Wetherill YB *et al.*, The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells, *Mol Cancer Ther*, 1, 515-524 (2002).
  - 14) Ashby J., Testing for endocrine disruption post-EDSTAC: extrapolation of low dose rodent effects to humans, *Toxicol Lett*, 120, 233-242 (2001).
  - 15) Markey CM *et al.*, In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland, *Bio Reprod*, 65, 1215-1223 (2001).
  - 16) Markey CM *et al.*, The mouse uterotrophic assay: a reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A, *Environ Health Perspect*, 109, 55-60 (2001).
  - 17) Gupta C., Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals, *Proc Soc Exptl Biol Med.*, 224, 61-68 (2000).
  - 18) Elswick BA *et al.*, Effect of different sampling designs on outcome of endocrine

### 3. ヒト全 MHC 遺伝子導入マウス

#### — 染色体導入法によるヒト型モデル —

高木篤也・北嶋聡・相賀裕美子

#### 3. 1. はじめに

ヒトの腫瘍・組織をマウスに生着させるために、免疫機能の欠損したヌードマウス<sup>[1]</sup>やSCIDマウス<sup>[2]</sup>がよく用いられているが、これらのマウスでは免疫機能の一部が欠けているため、免疫療法などの研究への利用は限界がある。この問題を解決するため、近年、異種移植の拒絶の原因となるヒトタンパク質をコードする遺伝子をあらかじめマウスに導入することにより、ヒトタンパク質をマウスが拒絶しないようにする方法が試みられている<sup>[3]</sup>。異種移植の拒絶の原因として、糖鎖、自然抗体、補体など種々の因子があるが、それらのなかで重要なもののひとつに、主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex, MHC)がコードするMHC分子がある<sup>[4]</sup>。なお、ヒトのMHC分子はヒト白血球抗原(human leukocyte antigen, HLA)とよばれる。MHC分子は同種移植や異種移植における細胞性免疫反応に関与しており<sup>[5]</sup>、その機能として、抗原ペプチドを結合し、T細胞に認識させることが知られている<sup>[6]</sup>。

そこで、この免疫反応に重要な役割をはたすヒトHLAをマウスに導入することにより、少なくともマウスとヒトのMHC分子の相違に起因する異種移植の細胞性免疫による拒絶反応を軽減させることが期待される。しかし、HLA遺伝子はその数がきわめて多いことが知られている。HLA遺伝子はクラスII遺伝子とクラスIII遺伝子に大別され、さらに、両遺伝子の中間に位置する補体系遺伝子であるクラスIII遺伝子が存在する。クラスI遺伝子として、HLA-A遺伝子、HLA-B遺伝子、HLA-C遺伝子、HLA-E遺伝子、HLA-F遺伝子、および、HLA-G遺伝子が、クラスII遺伝子として、HLA-DR遺伝子、HLA-DP遺伝子、HLA-DQ遺伝子などが存在する<sup>[7]</sup>(図3・1)。

これまで個々のHLA遺伝子を導入したトランスジェニックマウスはすでに作成されているが<sup>[8,9]</sup>、多数のHLA遺伝子を、その遺伝子制御領域までを含めてすべてマウスに導入するのは、多大の時間と労力を要するためこれまで作成されていない。そこで、ここでは、新しく開発されたマイクロセル法を用いて<sup>[10]</sup>、全HLA遺伝子が存在するHLA遺伝子座を導入したマウスを作成したので紹介する。

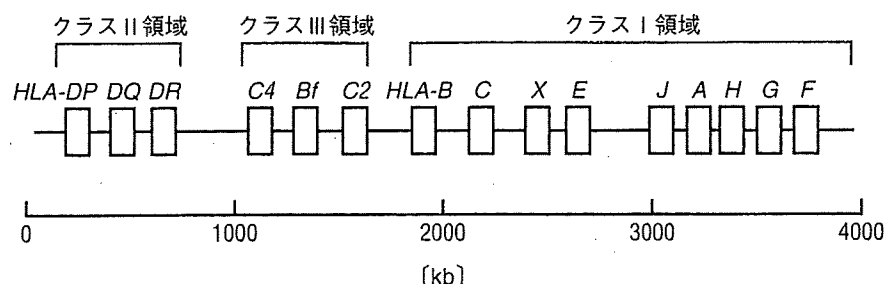


図3・1 ヒトHLA遺伝子領域に存在する遺伝子群。Bf: 補体B因子遺伝子, C2: 補体第2因子遺伝子, C4: 補体第4因子遺伝子。

### 3. 2. 方法および結果

目的のHLA遺伝子座はヒト6番染色体短腕(6p21.3)に存在する。まず、ヒト6番染色体を1本だけもつようなマウスA9細胞の単離を行った。これには、正常ヒト細胞とマウスA9細胞をポリエチレングリコール法により細胞融合させ、ヒト-マウス融合細胞を作成し、さらに、コルセミドおよびサイトカラシンB処理により染色体を含むマイクロセルを単離した。このマイクロセルを再びマウスA9細胞と融合することにより、ヒト染色体を保持する多数の細胞クローンが得られた。ついで、この細胞よりDNAを抽出し、HLA遺伝子座をもつヒト6番染色体が存在する細胞をPCR法にてスクリーニングした。対象となるHLA遺伝子座(6p21.3)を含むヒト6番染色体の同定のために使用したマーカー遺伝子としては、ヒト6番染色体短腕に存在するエンドセリン-1遺伝子、プロラクチン遺伝子、TNF- $\alpha$ 遺伝子、および、グアニル酸シクラーゼアクチベーター-1遺伝子と、長腕に存在する5'-ヌクレオチダーゼ遺伝子、インスリン様成長因子2受容体遺伝子を用いた(図3・2)。その結果、ヒト6番染色体短腕のみを有するクローンを得ることができた。さらに、染色体の状態を蛍光*in situ*ハイブリダイゼーションにより確認した結果、1クローンがヒト6番染色体短腕のみを独立に保持する良好なクローンであった(図3・3)。

このクローンからマウスES細胞(TT2F細胞)への染色体導入は、前述のマイクロセル法を用いて同様に行った<sup>10)</sup>。なお、得られたES細胞の段階で、HLA-A遺伝子、HLA-E遺伝子、HLA-F遺伝子、および、HLA-G遺伝子がmRNAレベルで発現していることを、RT-PCR法を用いて確認している。

キメラマウスの作成は、ES細胞と8細胞期の卵との凝集法で行った<sup>11)</sup>。すなわち、MCHマウスから得た8細胞期の卵を酸性タイロイド処理して透明帯を除去し、ES細胞と一晚培養することにより得られた胚盤胞を、偽妊娠MCHマウスの子宮に戻した。のべ800個の胚盤胞を移植した結果、比較的ES細胞の寄与率の高い(30~50%)、1匹の雌キメラマウスを得ることができた。このキメラマウスは、外見上は正常であり、さらに、このキメラマウスを正常な雄と交配して仔マウスを正常に出産させることができた。しかし、残念ながら、導入した遺伝子が伝達した仔マウスを得るには至らなかった。なお、得られたキメラマウスにおけるHLA遺伝子mRNAの発現については、末梢血白血

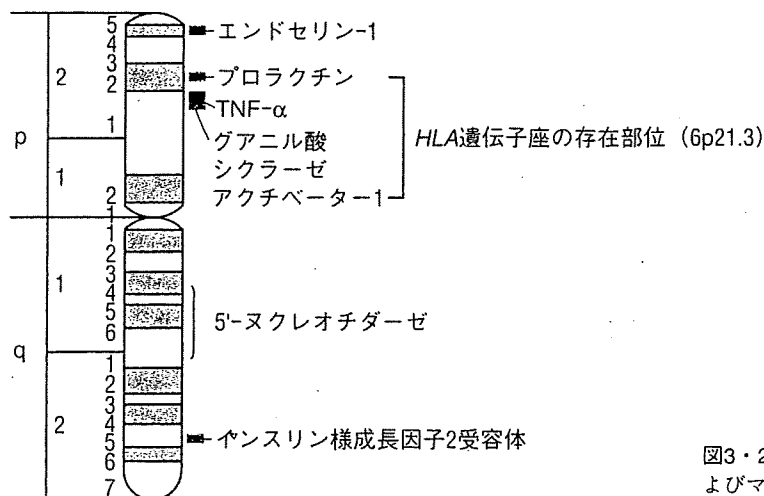


図3・2 ヒト6番染色体におけるHLA遺伝子およびマーカーとして用いた遺伝子の位置。

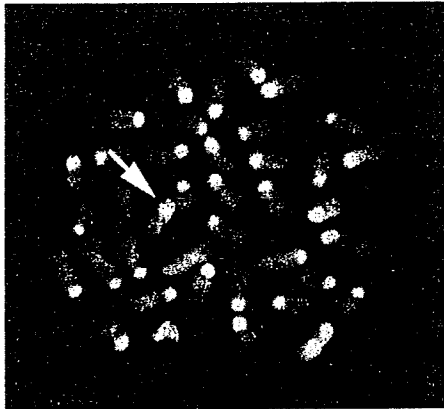


図3・3 ヒト6番染色体断片が導入されたES細胞の蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション解析.

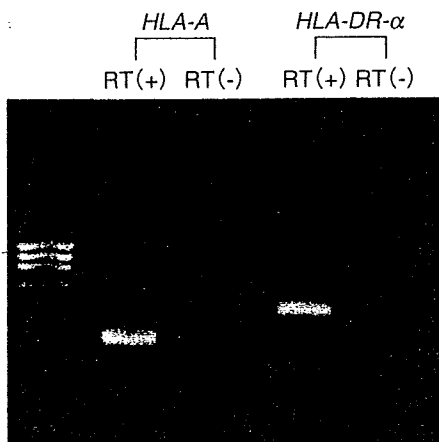


図3・4 ヒト6番染色体断片が導入されたキメラマウスの末梢血白血球におけるHLA遺伝子発現のRT-PCR法による解析. RT:逆転写酵素.

球のRNAを対象に、クラスI遺伝子に属するHLA-A遺伝子、および、クラスII遺伝子に属するHLA-DR遺伝子をRT-PCR法により検出した結果、それぞれ発現が確認された(図3・4)。さらに、HLAのタンパク質レベルの発現については、脾臓細胞を対象に、抗HLA-ABC抗体を用いたFACSにより解析した結果、発現が確認された。以上、導入したHLA遺伝子がキメラマウスの生体内で発現していることを確認することができた。

ヒト6番染色体をもつキメラマウスの骨髄細胞の機能解析、ならびに、次世代伝達によらないHLA遺伝子導入マウスの維持・拡大を目的に、ヒト全HLA遺伝子導入キメラマウスの骨髄移植を行った。種々の条件を検討した結果、ES細胞(TT2F細胞)と同じ系統のC57BL/CBA F1マウスをレシピエントとして用い、X線を全身に照射後、キメラマウス大腿骨から得た骨髄細胞を尾静脈より移植することにより良好な結果が得られた。すなわち、キメラマウスの骨髄移植の約4週間後に、骨髄移植されたC57BL/CBA F1マウスの脾臓細胞におけるHLAクラスI分子およびHLAクラスII分子の発現を、FACS解析により確認することができた。

これらの結果、マウスに導入されたHLA遺伝子は正常な発現を示し、また、その骨髄をほかのマウスに移植しても、一定期間はHLA遺伝子が保持されることが示唆された。このことから、次世代伝達以外の方法でHLA遺伝子導入マウスを維持・拡張できる道筋が示され、今後、種々の免疫実験への利用が期待される。

### 3. 3. おわりに

以上、ヒトの細胞・組織のマウスへの移植に対する移植片拒絶免疫反応の軽減および解析のためのモデルマウスとして、全HLA遺伝子導入マウスの作成を行った。マイクロセル法によりヒト6番染色体断片を導入したマウスES細胞を用いることにより、種々のHLAを発現するキメラマウスを、効率は低いものの作成することができ、当初の目的はいちおう達成することができた。一方、このキメラマウスではHLA遺伝子座をもつヒト染色体を次世代に伝達することができなかった。この原因として、用いたES細胞が操作の過程で次世代伝達的能力を失ったことが考えられるが、ほかの可能性として、ヒト6番染色体上に次世代伝達を阻害する遺伝子が存在することが考えられる。ヒト6番染色体は約180 Mbあり、今回、用いた短腕のみのものでも90 Mbもある。そこで、次の目標として、HLA遺伝子座(約4 Mb)に限定された領域の染色体断片のみをCre-loxP系を利用した新規染色体転座法によりES細胞へ導入し、これから作成したキメラマウスで染色体の次世代伝達をさせるべく研究を進めている。ひとたび、この次世代伝達が可能なマウスが樹立されれば、繁殖はもとより、HLA遺伝子以外の種々の拒絶に関与するヒト遺伝子を導入したトランスジェニックマウスやノックインマウス、あるいは、マウス本来のMHC遺伝子を欠失したノックアウトマウスなどと交配することにより、簡便により異種移植性にすぐれたマウスを作成することが期待される。

なお、この研究は、医薬品機構井上プロジェクト「ヒト型モデル」(主任研究者 井上達)に基づく鳥取大学医学部の押村光雄教授との共同研究である。

#### 参考文献

1. Sttyaswaroop PG, Zaino RJ, Mortel R (1983) Human endometrial adenocarcinoma transplanted into nude growth regulation by estradiol. *Science* 219: 58-60
2. McGune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL (1988) The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241: 1632-1639
3. Koike C, Isobe K, Nakashima I, Okada H, Hayashi S, Yokoyama I, Takagi H (1996) Establishment of a human DAF/HRF20 double transgenic mouse line is not sufficient to suppress hyperacute rejection. *Surg. Today* 26: 993-998
4. 萩原政夫, 辻公美 (1998) 異種移植概説. 日本医学館, 東京
5. Hagihara M, Shimura T, Takebe K, Munkhbat B, Sato T, Tsuchida F, Sato K, Tsuji K (1996) Xenogeneic iso-skin graft and mixed lymphocyte reaction studies using HLA-DP transgenic mice. *Transpl. Immunol.* 4: 220-226
6. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature* 329: 506-512
7. 松本満 (1999) ノックアウトマウスを用いたMHC領域内non-HLA遺伝子機能の解析. *生化学* 71: 323-332
8. Sireci G, Dieli F, Sano CD, Salerno A (1999) Different role of human HLA-DR and -DQ molecules in xenogeneic transplantation using transgenic mice. *Transplantaion* 68: 317-319
9. Ando Y, Beck Y, Tomikawa S, Eriguchi M, Muto T, Takiguchi M (1999) Cell-mediated graft rejection observed in two lines of human histocompatibility leukocyte antigen class I transgenic mice. *Transplantation* 68: 904-908
10. Tomizuka K, Yoshida H, Uejima H, Kugoh H, Sato K, Ohguma A, Hayasaka M, Hanaoka K, Oshimura M, Ishida I (1997) Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice. *Nat. Genet.* 16: 133-142
11. 田川陽一, 浅野雅秀, 岩倉洋一郎 (1995) 遺伝子ノックアウトマウスの作製法—簡易で効率的な集合キメラ(サンドイッチ法)を用いて. *細胞工学* 14: 946-955

# 雜誌

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

小野 宏

**Abstract** : Changes of the testing guidelines for irritation and corrosion potentials of chemicals on skin and eye in the OECD Testing Guidelines are described and the present status is depicted. The original 1981 guidelines of both skin and eye irritation/corrosion were based on the methods of Draize to use live animals, and were soon subjected to revisions from the viewpoint of animal welfare. The skin irritation/corrosion test guideline (TG404) was provisionally revised in 1992 to include structure-activity relation (SAR) analyses and in vitro tests for predicting and avoiding in vivo testing of chemicals with severe irritant and corrosive potentials. The revision of the eye irritation/corrosion test guideline (TG405) was adopted in 1987 in which reduction of the number of animals required and considerable changes in testing procedures were made, as well as inclusion of the preliminary design for avoiding corrosive outcome in animals such as SAR and in vitro tests, though no such methods were then available that had been validated and internationally accepted. Tier testing strategy was introduced in both the skin and eye irritation/corrosion tests and adopted in the next revision in 2002. Meanwhile in vitro methods for predicting skin corrosivity were developed and accepted after successful validation. Testing procedures of these in vitro corrosivity tests are depicted in this paper.

**Key words** : irritation tests, corrosion tests, skin, eye, alternatives

## 1. はじめに

OECD化学物質試験法ガイドライン(集)は、1981年にまとめられた。その第4部「健康への影響Health effects」の試験が毒性試験に相当するもので、大部分が動物実験である。試験法は科

“The skin and eye irritation/corrosion tests in the OECD Test Guidelines: past and present.”

Hiroshi Ono (Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, 財団法人食品薬品安全センター-秦野研究所-257-8523 神奈川県秦野市落合729-5)

1962年東北大学医学部卒、1967年大学院医学専攻科卒、医学博士。内科医師、東北大学薬理学助教授を経て、1975年財団法人食品薬品安全センター職員。1989年から秦野研究所長。同年から財団常務理事を兼ねる。1990年からOECD試験法ガイドライン計画の調整員会議に継続して参加。日本薬理学会、日本トキシコロジー学会、日本動物実験代替法学会で評議員を務める。



学技術の進歩に対応して行く主旨で、定期的な見直しが行われているが、1983年から見直しの規準として動物福祉の観点からの検討も行うこととされ、これら動物試験はすべてそのような見直しを迫られたが、試験法改定に向けて特に努力が傾けられたのは、急性毒性試験と皮膚および眼の刺激性／腐食性試験であった。ここでは、皮膚刺激性／腐食性試験および眼刺激性／腐食性試験のガイドラインの現況について述べる。

## 2. 歴史的な刺激性／腐食性試験の問題点

OECD試験法ガイドライン(TG)の皮膚刺激性試験(TG 404)および眼刺激性／腐食性試験(TG 405)が準拠した原法は、いずれも米国FDAにおいてDraizeの開発した方法<sup>1)</sup>によっており、当時から広く行われていたものである<sup>2)</sup>。



## 2-1. 従来の皮膚刺激性／腐食性試験

OECDガイドラインTG 404の1981年版の方法はあらかし次のようである。動物はウサギ，原則として3匹を用い，毛を刈った背部皮膚の6 cm<sup>2</sup>程度の面積に被験物質（溶液）を塗布し，4時間接触させる。4時間後被験物質を除去してから，1時間後，24時間後，48時間後および72時間後に皮膚の状態を観察し，一定の基準にしたがって皮膚の変化を採点，評価する。皮膚変化の評価基準は，基本的にDraizeの定めたものによっており，被験物質適用部位の皮膚の発赤（充血），膨隆（浮腫），痂皮（滲出），潰瘍といった変化を，1度にしたがって採点するものである。このような変化は，炎症の所見であり，通例疼痛を伴うものであるが，疼痛を評価する方法はない。なお，腐食性とは不可逆性の皮膚変化を起こすこと（14日間観察する）を言い，表皮，真皮の壊死，潰瘍，出血，痂皮（血性の）を生じるものであるが，14日目には創傷の治癒が進み，瘢痕，変色，脱毛などが観察されることもある。

1992年に改定されたTG404では，動物数は最終的には同じ3匹であるが，初め1匹，その結果を見て2匹，と2段階で試験することとし，1段目の試験で強い反応が観察されれば，それ以上の試験は行わず，苦痛を味わう動物数を最少に止め

る配慮がなされた。

この改定は，腐食性や強い刺激性の反応は極力避けるような方針が支配している。試験の前提としての被験物質の特性を事前によく調査することが求められ，腐食性があると推定されたものは試験に及ばないという判断も加えられている。強酸性あるいは強アルカリ性の物質は，試験を行わない。1981年の原法でも，溶液のpHが2以下のものや11.5以上のものは試験から除外されることとなっていた。

1992年の改定では，*in vitro*試験の結果を参考にするという前提条件が示された。これには，どのような*in vitro*試験かは記載されておらず，「有用性の検証（validation）を受けた，公的な（formal）」試験法とだけ書いてある。当時，刺激性試験の*in vitro*代替法でvalidationを通ったものはまだなく，どの国の行政でも規制に取り入れたものはなかった。また，被験物質の構造活性関係（Structure-Activity Relation；SAR）を調べることが要求されているが，その当時刺激性・腐食性を判断できるようなデータベースは存在していなかった。これらは，希望的に記載されたに過ぎなかった。これらの試験法の要点を，現行のものと合わせて表1にまとめた。

表1 皮膚刺激性／腐食性 OECDガイドラインTG404の改定の経過

| 試験の前提                                                                                        | 動物                                  | 適用                                                 | 観察                   | 期間                    | 評価                         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------------|
| 1981年制定<br>被験物質：同定，純度，性状，溶解性，融点・沸点，<br>除外：pH 2 ≧，11.5 ≦                                      | 白色ウサギ*<br>少なくとも3匹                   | 皮膚（部位の指定なし）6 cm <sup>2</sup> に投与，ガーゼで被覆，4時間後除去     | 除去後30～60分，24，48，72時間 | 可逆性の確認に必要な期間          | Draizeによる採点法               |
| 1992年改定<br>SAR，既存の毒性試験資料を調査し，腐食性のものは除外，pH 2 ≧，11.5 ≦のものは除外（予備能考慮） <i>in vitro</i> 試験を参考に     | 白色ウサギ*<br>3匹（初め1匹，2匹で確認。1匹のみのこともある） | 躯幹背部剪毛した皮膚6 cm <sup>2</sup> に投与，ガーゼ被覆4時間または3パッチ法** | 除去後60分，24，48，72時間    | 可逆性の確認に必要な期間          | Draizeによる採点法<br>病理組織学検査もよい |
| 2002年改定<br>段階試験方策に従う：SAR，既存の毒性試験資料を調査，腐食性のものは除外，強酸性，強アルカリ性のものは除外， <i>in vitro</i> 試験で腐食性物質除外 | 白色ウサギ*<br>3匹（初め1匹，2匹で確認。1匹のみのこともある） | 躯幹背部剪毛した皮膚6 cm <sup>2</sup> に投与，ガーゼ被覆4時間または3パッチ法** | 除去後60分，24，48，72時間    | 可逆性の確認に必要な期間<br>通常14日 | Draizeによる採点法<br>病理組織学検査もよい |

\* 数種の哺乳動物可

\*\* 3枚のガーゼパッチで被験物質を適用し，1枚目は3分後に除去，2枚目は1時間後，3枚目は4時間後に除去。3枚目で刺激性が認められなければ，次の2匹での試験に進む。

## 2-2. 従来の眼刺激性/腐食性試験

OECD TG405の1981年版の原法では、ウサギ6匹を用い、一方の眼（結膜嚢）に被験物質を適用し、3匹については4秒後に洗浄、他の3匹については30秒後に洗浄するという方法であった。観察は、洗浄後1, 24, 48, 72時間後に行い、前眼部の部分（結膜、角膜、虹彩）ごとに変化を採点する。この採点法もDraizeに倣ったものである。観察には拡大鏡やスリットランプなど様々な道具を利用することが勧められており、角膜の表面の損傷にはfluorescein染色法を利用することも勧められている。腐食性の観察は、変化の不可逆性について行われる。その観察期間は21日までとされていた。

1試験に動物を6匹用いるのは、当時の多くの試験法の取っていた方法であって、反応の個体差を越えるために必要と考えられていた数である。規制によっては、曝露の方法を変えつつ計18匹のウサギを使用するというものもあった。被験物質の曝露時間が4秒とか30秒とか、極めて短時間であったことが注目される。Draizeの原法はこの通り短時間の接触後洗浄を行うことを基本としていた。これは、事故で薬液が眼に入ったときの影響を調べるためには有用な方法であり、救急処

置として洗浄の効果を確かめることができる。しかし、4秒という短い時間は技術的に統一し難い問題がある。この短時間洗浄を採用した試験法は当時でもOECDだけで、他は洗浄の規定を設けないうか、1~2分後に洗浄とした規定が多い<sup>2)</sup>。

TG405の1987年の改定では、被験物質の事前調査を精細に行い、腐食性を思わせる情報があれば、試験から除外する規定となった。SARを調べること、*in vitro*試験法を参考にすることも記載された。使用する動物（ウサギ）は3匹、しかも初め1匹、後で2匹の2段階試験となった。結膜嚢内投与直後の洗浄は行わず、24時間後（「必要に応じ」）が原則となった。問題があれば、適用30秒後に洗浄するという別法が記載されていた。これらの試験法の要点を、現行のものと合わせて表2にまとめた。

## 3. 代替法の開発と評価の問題点

上記のような動物実験は、動物に苦痛を与えるということで反対の声が強く、実験者も心安らかではないので、代替法の開発が盛んに試みられた。その過程で、Draizeの方法に対する技術的な批判も起こったが、必ずしも当を得た批判ではなかったと思う。代替法は動物福祉の観点から求められ

表2 眼刺激性/腐食性 OECDガイドラインTG405の改定の経過

| 試験の前提                                                                                           | 動物                                          | 適用                                                           | 観察                       | 期間                                      | 評価                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|
| 1981年制定<br>被験物質：同定、純度、性状、溶解性、融点・沸点、<br>除外：pH 2 ≥, 11.5 ≤                                        | 白色ウサギ*<br>曝露時間を変えて<br>3匹ずつ、計6匹              | 0.1mL (100mg以下)結膜嚢内投与<br>3匹は4秒後洗浄；<br>3匹は30秒後洗浄              | 洗浄後60分、24、<br>48、72時間*** | 可逆性の確認に必要な期間<br>所見なければ72時間、<br>あれば21日まで | Draizeによる採点法               |
| 1987年改定<br>SAR、既存の毒性試験資料を調査し、腐食性のもは除外、pH 2 ≥, 11.5 ≤のもは除外（緩衝能を考慮） <i>in vitro</i> 試験を参考に        | 白色ウサギ*<br>3匹（初め1匹、<br>2匹で確認。1匹<br>のみのこともある） | 0.1mL (100mg以下)結膜嚢内投与<br>**、24時間後（必要に応じ）洗浄；<br>または、適用30秒後に洗浄 | 洗浄後60分、24、<br>48、72時間*** | 可逆性の確認に必要な期間<br>所見なければ72時間、<br>あれば21日まで | Draizeによる採点法<br>病理組織学検査もよい |
| 2002年改定<br>段階試験方針に従う：SAR、既存の毒性試験資料を調査、皮膚毒性試験で腐食性のもは除外、強酸性、強アルカリ性のもは除外、 <i>in vitro</i> 試験で腐食性除外 | 白色ウサギ*<br>3匹（初め1匹、<br>2匹で確認。1匹<br>のみのこともある） | 0.1mL (100mg以下)結膜嚢内投与<br>**、24時間後（必要に応じ）洗浄                   | 洗浄後60分、24、<br>48、72時間*** | 可逆性の確認に必要な期間<br>所見なければ72時間、<br>あれば21日まで | Draizeによる採点法<br>病理組織学検査もよい |

\* 数種の哺乳動物可

\*\* 麻酔剤を用いることもある

\*\*\* 拡大鏡、スリットランプ等を用いる。24時間目の観察にはfluoresceinを用いてもよい

たものであり、動物試験が不十分だから取り替えるというものではなかった。

### 3-1. 代替法の開発（どのような方法が考えられるか）

刺激性／腐食性試験は、多くの毒性試験がそうであるように、被験物質が、ある用量で毒性（ここでは局所刺激性）を発揮することを確認する種類の試験である。毒性試験の最終的な目的は毒性を発揮しない用量を推定することであるが、それは毒性の観察によって明らかになるのである。動物にそのような変化を起こさせる代わりに、それと同等の変化が利用できればよい。これまで次のように、多種多様な方法が考えられてきた。

- ・培養細胞を用いる方法：株化細胞（BALB/c 3T3, HeLa など）または初代培養細胞（SIRC など）を用い、色素または標識物質の取り込みによる細胞機能または細胞の生死の判定（Neutral red (NR) uptake, <sup>51</sup>Cr release など）、細胞の代謝機能への影響の観察（タンパク合成, <sup>3</sup>H-uridine uptake など）を行うもの。
- ・摘出器官を用いる方法：摘出眼球（ウシ, ウサギ, ラット, ニワトリ）、摘出角膜（ウシ, ウサギ）を用い、角膜厚の計測、電気抵抗の測定、角膜混濁などの観察を行う。
- ・他の生体組織を用いる方法：鶏胚漿尿膜（Chorio-allantoic membrane of the hen's egg）における血管系の変化：HET-CAM 試験。赤血球（ウシ, ウサギ, ヒト）を用いる溶血性または成分変化。ヒト志願者を対象とする皮膚パッチテスト。

これらは、皮膚と眼のいずれかの代替法を目指すものであるが、細胞毒性試験など目的が区別されていないものも多い。眼刺激性／腐食性試験の「代替」として皮膚試験を考えている場合もある。皮膚と眼（結膜、角膜など）とは生物学的に同等ではないが、物理的機序によって損傷を与えるものでは共通しているとは言える。

### 3-2. 代替法の有用性の検証（validation）

代替試験法には、その対象となる既存試験法と同等の効用があることを証明しなければならない。それには、その試験法の検出する結果が、問

題とする毒性を反映したものであることが望ましく、原試験法の結果とよい相関性を示すことが求められる。試験法は、その毒性検出の感度および特異性において十分であることが求められる。試験法の感度が不十分であると毒性があるのに毒性がないという偽陰性の結果を出すことになり、特異性が不十分であると毒性がないのに毒性があるという偽陽性の結果を多く出す恐れがある。新しい試験法は、（規制に用いられる試験であるため、また国際的に通用するため）標準的な技術水準の試験機関で容易に実施することが可能で、試験結果の再現性が確保されることが必要である。試験法は再現性がよく、試験条件の少々の変動によって結果が大きな影響を受けない頑健なもので、試験者、試験機関の間で結果に大きな差が生じないものであることが要求される。さらに、特殊な（高価な）装置、器具、製品を必要とするものでないことが望ましい。

こうした代替試験法の有用性を検証するために、validationの手順が検討されてきた<sup>3)</sup>。OECDでは1990年にvalidationの基準に関するモノグラフが出版されているが、その後行われたECVAM（欧州代替法バリデーションセンター）やICCVAM（米国省庁間代替法バリデーション調整委員会）の検討を経て、1996年（Solna）と2002年（Stockholm）にvalidationの手順と判定基準に関する会議を開いている。これらの検討の結果は現在OECD文書としてまとめられつつある<sup>4)</sup>。

## 4. 皮膚刺激性／腐食性試験法の暫定的改定（現在のガイドラインTG404, 405）

OECDの代替試験法のvalidationについてのSolnaでの会議において、皮膚および眼の刺激性／腐食性試験の完全な代替法が成立するまでの改定として、段階的な試験の手順が提案され、これが2002年にTG404およびTG405の改定ガイドラインとして採択された。

これらは、最終的にウサギ3匹（まず1匹、次いで2匹）を用いる確認試験を行うが、それに至るまでに、(1) 既存の資料の調査、(2) 構造活性関係（SAR）の検討、(3) pHの計測、(4) 既存の毒性試験特に経皮毒性試験の成績、(5) *In*

*in vitro* 試験, を経て, それらの成績で腐食性や明らかな刺激性が推定されるものについては, その段階で試験を中断し, 動物試験に及ばないとするものである。眼刺激性/腐食性試験の場合は, 先に行われた皮膚刺激性/腐食性試験の成績も考慮に入れる。動物試験も, まず1匹について試験を行い, 腐食性または刺激性が観察されれば, そこで試験を終了し, 次の2匹の試験は行わない, という慎重な規定となっている。動物試験の方法は, 以前の1987年または1992年のものと(動物数以外は)同じである。

既存の資料の調査に当たっては, その資料の科学的確実性 (weight of the evidence) によって試験に採用するかどうかを判断すべきである。SARないしQSAR (定量的構造活性関係) については, その有用性が検証され, 承認されたものによることとされているが, そうしたものはまだ存在しない。特に刺激性/腐食性のSARは, OECDにおける(Q) SAR専門部会でも, ECVAMのvalidationでも, 課題になっていない。pHの基準は, 以前のガイドラインと同様, pH 2以下の酸性, 11.5以上のアルカリ性物質(溶液)を除外する。しかし, 緩衝能を考慮して, 腐食性でなさそうだと判断されれば, 試験を進めてよい。*In vitro* 試験法は, 有用性が検証され, 承認されたものとされている。最近皮膚腐食性に関する*in vitro* 試験法が承認採択されてきた。したがって, TG404, TG405の実施に当たってはそれらの試験を先に行うことになる。それを次に述べる。

## 5. 採用されつつある代替試験法

現在, 皮膚腐食性を評価する*in vitro* 試験2法がOECDガイドラインに採用されており, さらに第3の方法が提案されている。これらはいずれもこの目的のために開発された製品で, 商標つきで商業的に提供されている。代替法承認検討の過程では, 公的な規制で特定の商品の使用を規定することには問題があるという議論があったが, 高度の技術によって製作され, 周到な品質管理が行われ, 正規の有効性検証試験を通ったものとなると, 具体的な製品を記載するしかなく, これらのガイドラインには製品名が記載されている。ただ

し, それらと同等の品質のものであれば, 使用できる建前である。

### 5-1. 腐食性試験の代替法(1): TER法(TG 430)

経皮電気抵抗試験Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER) は, ラットの摘出皮膚を用いて, 電気抵抗の低下によって表皮組織の損傷を検出する方法である。測定条件の標準化が重要で, 個々の測定装置と実験施設の条件ごとに判定値の設定を確認する必要があるが, 装置はさほど複雑なものではなく, 実験者の手製も可能と思われる。

動物はWistar系のラットで28~30日齢のものを用いる。これは成熟発毛の始まる前の休止期の皮膚を用いるため, 日齢の条件を守ることは重要とされている。動物は22日齢のとき躯幹背部と側腹部を短く毛刈りし, 抗生物質(SM, PC, CP, amphotericinなど)を含む液に浸漬洗浄し, 2~3日後に再度薬液浸漬洗浄して, 3日以内に使用する。このとき, 表皮角質は除毛から回復しているはずである。動物を人道的方法で屠殺し, 背部皮膚を剥離し, 余分の脂肪組織を注意して除去する。この皮膚から約20mm径の円盤を打抜く。1匹から10~15枚の円盤が採取できる。これは使用まで暫時保存できる。

TERの測定に用いる装置は, 図1に示すようなもので, 内径10mm, 長さ95mmのPTFE (polytetrafluoroethylene) 製の円筒(内筒)と, 内径16mm, 長さ95mmの外筒(PTFE製)から成る。内筒の下端には皮膚円盤を表皮を内側にし取り付け, 輪ゴムで固定するようにしてある(ここから液漏れや電流漏れがないようにワセリンで絶縁する)。外筒内に154mMの硫酸マグネシウム(MgSO<sub>4</sub>)溶液を入れ, 皮膚円盤を取り付けた内筒にも同じ154mM MgSO<sub>4</sub>を150μL入れて外筒内に挿入し, 内筒内, 外筒内にそれぞれ電極を挿入して, 両液間のすなわち皮膚円盤の電気抵抗を低圧用交流抵抗計(databridge)を用いて測定する。(交流を用いるのは直流では溶液の電気分解が起きるからである。)最初の電気抵抗は10kΩ以上になるはずで, それより低い場合は皮膚円盤に傷があると考え, その標本は捨てる。

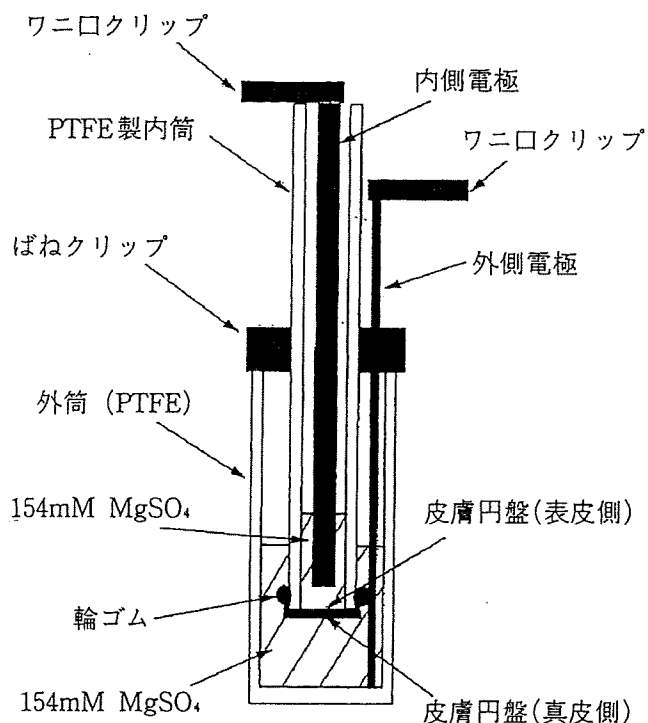


図1 TER測定装置

実験では常に陽性対照（10M塩酸）と陰性対照（蒸留水）を置いて測定し、装置と皮膚試料との状態を確認する。両対照液と被験物質とにそれぞれ3枚の皮膚円盤を使用する。被験物質は液体の場合はそのまま150  $\mu$ Lを内筒に入れて皮膚円盤に表皮側から作用させる。被験物質が固体の場合はできるだけ細粉化してから皮膚試料の表面に一樣に被覆し、150  $\mu$ Lの脱イオン水を加えて静かに振盪して溶解する。30℃程度に加温してもよいが、溶解しなければそのまま接触させる。被験物質（液）は24時間皮膚試料と接触させ、その後流水で洗浄除去し、TERの測定に移る。

内筒の皮膚試料の表面をいったん70%エタノールで洗うとよいとされている。エタノールは数秒で捨て、154mM MgSO<sub>4</sub> 3 mLを入れて外筒（MgSO<sub>4</sub>液が入っている）の中にセットする。交流抵抗計の電極をそれぞれ液内に挿入して測定する。測定値が20k $\Omega$ より高い場合は、被験物質が表皮表面に残留している可能性が考えられるので、内筒を静かに振ってからMgSO<sub>4</sub>液を交換してみる。腐食作用によって表皮の損傷が起これば、電気抵抗は低下し、5 k $\Omega$ 以下になる。（この5 k $\Omega$ のカットオフ値は、装置によって変

動する可能性があるので、標準の対照物質で校正しておく必要がある。このガイドラインの基となった実験では、電気抵抗は腐食物質処理前は常に10k $\Omega$ 以上、処理すると3 k $\Omega$ 以下になった。腐食性がなく、刺激性のみの物質ではTERを低下させることはなかった、という。）

腐食性がなくても、洗剤などでは脱脂作用によって皮膚の脂質が奪われると電気抵抗が低下する。TERが5 k $\Omega$ 以下に低下しても肉眼的に傷害が確認できない場合は、色素結合検査を行う。これには、sulforhodamine Bという色素を10%水溶液として用いる。この色素液150  $\mu$ Lを内筒に入れ皮膚円盤の表皮面に接触させると、表皮の欠損（＝腐食）があれば速やかに浸透して組織と結合する。2時間接触させてから、室温で10秒間流水で洗浄した後、8 mLの脱イオン水を入れた20mLガラスバイアル中で5分間振盪洗浄する。それを5 mLの30% sodium dodecylsulfate (SDS) 中に入れ、60℃で一晩置く。孵置後溶液を21℃で8分間遠心し、上清を30% SDSで5倍に希釈して、565nmの吸光度を測定する。これによって液中のSB量を求め、TERの低下が組織欠損（＝腐食性）によるものか否かを判断する。

## 5-2. 腐食性試験の代替法（2）：培養ヒト皮膚モデル法（TG 431）

この方法は、TG430のTERと同じ経過でvalidationに付された後にガイドラインとして提案された。培養ヒト皮膚モデルとは、ヒト皮膚細胞（keratinocytes）を三次元培養技術によって生体皮膚のように層状構造を作るように増殖させたものである。この試験系を用いて腐食性物質と非腐食性物質を鑑別することができ、腐食性の強弱も区別できる。しかし皮膚刺激性の情報は得られない。またGHS分類における腐食性物質の分類（強度によってABCに分類）には対応していない。培養皮膚モデルは、自作のものも許されるが、容易な技術ではないし、その性能・品質についての証明（同一施設における経時的再現性と施設間再現性）が必要であり、実際には商業的に提供される製品を使用することになる。そのような製品としては“EpiDerm™”があげられている。

培養皮膚モデルは、多層化したケラチノサイトが生きて機能しており、上部では角化細胞となり、表面は角質層に覆われていて、全体が間質層に支えられている。角質層は障壁機能を果たすに十分な脂質組成を有するべきで、被験物質が容易に通過するようなものはよい標本ではない。その機能は、1% Triton Xのような細胞毒性指標物質を作用させるときに細胞の生存性（下記MTT法による）が50%低下するのに要する時間（ET<sub>50</sub>）で測定できる。EpiDerm™ではET<sub>50</sub>は2時間以上である。標本は細菌やマイコプラズマの汚染があつてはならない、とされている。

被験物質の処理群（曝露時間）ごとに2枚の標本を使用して試験する。液体の物質では皮膚標本の表面を一様に覆うように、十分量（最低25 μL/cm<sup>2</sup>）の液を適用する。被験物質が固体の場合は、可能ならば磨砕して細粉化して適用し、水で湿して標本表面とよく接触するようにする。曝露時間は3分および1時間が基準で、その他適当に採択する。曝露が終了した標本は表面を生理食塩液で（組織損傷が起こらないように注意して）洗浄する。この処理が適切であったことを確認するために、陽性対照物質（氷酢酸または8N水酸化カリウムがよい）および陰性対照（生理食塩液または水）に試験を同時に行う。処理後の標本について細胞の生存率を測定する。

細胞の生存性はMTT（3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium）を用いる生体染色法によって検査する。MTTは細胞のミトコンドリ

アによって代謝されて変色する生体染色剤であり、細胞が代謝機能を失うとこの変化が起こらず、死細胞の比率の増大に伴って色素の産生は低下するのである。被験物質処理後の皮膚モデル組織を0.3～1 mg/mLのMTT液に3時間浸した後、代謝されて生じるblue formazanをisopropanolを用いて組織から抽出し、540nmおよび595nmの吸光度を測定する。

陰性対照の吸光度を100%として相対的な吸光度の変化によって評価する。

- ・ 3分曝露標本の生存率が50%未満、あるいは50%以上であっても1時間曝露の生存率が15%未満であれば、被験物質は腐食性と判断され、
- ・ 3分曝露の生存率が50%以上であり、1時間曝露の生存率が15%以上であるとき、被験物質は非腐食性と判断される。

### 5-3. 腐食性試験の代替法（3）：In Vitro膜障壁試験法 In Vitro Membrane Barrier Test (TG435)

これは“Corrositex®”として開発された試験材料で、皮膚刺激性／腐食性試験の段階検査法（TG404）に利用できるものとしてガイドラインに提案された。すでに米国においてvalidationを完了している。この試験は、ケラチンやコラーゲンのようなタンパクを成分としたゲル状の膜で、生体皮膚と同じと思われる機序で腐食物質の作用を受け、破壊されて腐食物質の降下が起こることを膜の下部に位置するpH指示薬の変色によつ

## 植物性スクワラン オリーブスクワラン

皮膚にやさしい・さっぱり感・相溶性親和性良

安定性良・無色・無臭・透明油

IWASE  
COSFA  
<http://www.cosfa.co.jp>

輸入発売元 岩瀬コスファ株式会社

大阪：Tel.06-6231-3456 東京：Tel.03-6202-2345

て検出するという原理で設計されている。

試験に用いる障壁膜は、タンパク成分を水中ゲルの形で均等に含む一様な厚さの膜で、酸、アルカリなどの腐食性物質の作用を受けて、腐食性物質のGHS分類の基準に合うような時間で破壊を受けるように、材料の密度と厚さを加減して作る。そうした条件を満たすことが証明されたのであれば、自作してもよい建前であるが、現実には、商品化されたCorrositex®を利用することになる。膜の破壊を検出する“Chemical Detection System” (CDS) は、pH指示薬であり、クレゾールレッドやメチルオレンジが用いられる。したがって、この試験法で検査することのできる物質は、これらのpH指示薬を変色させる化学的性質を有するものに限られる。


試験は、被験物質、溶媒対象、陰性対照(10%クエン酸、6%プロピオン酸など)、陽性対照(水酸化ナトリウム粒など)を同時に検査し、各4枚の膜を用いることが勧められている。溶液は500 $\mu$ L、粉体は500mgを膜の表面に接触させ、CDSが変色するまでの時間によって腐食性の有

無と強弱の程度を判定する。腐食性の強弱の判定は、GHSの通りで、曝露(接触)時間が3分以内で検出されれば「腐食性1A」、3分を超え1時間以内であれば「腐食性1B」、1時間を超え4時間以内であれば「腐食性1C」である。

#### 参 考 文 献

- 1) Draize, J.H., Woodward, G., Calvery, H.O., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 82, 377~390 (1944)
- 2) ECETOC (European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre): “Eye Irritation Testing” Monograph No.11, Brussels (1988)
- 3) 小野 宏: 動物実験代替法開発過程における評価試験. 特に毒性試験代替法の有用性確認(バリデーション)について. 大野忠夫編著「動物実験代替法マニュアル」共立出版, 東京, p.123~133 (1994)
- 4) OECD: Guidance Document On the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. (draft) OECD Series on Testing and Assessment No.34, Paris (2003)

**レオパールKL・TL・TT** デキストリン脂肪酸エステル

 油性基剤のゲル化剤、増粘剤、乳化安定剤

粉末分散安定剤、感触改良剤

**IWASE  
COSFA**  
  
<http://www.cosfa.co.jp>

製造元 千葉製粉株式会社

販売元 **岩瀬コスファ株式会社**

大阪: Tel.06-6231-3456 東京: Tel.03-6202-2345

## SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF DI-(2-ETHYLHEXYL)PHTHALATE IN RAT TESTIS

Hiroshi ONO<sup>1</sup>, Yoshiaki SAITO<sup>1</sup>, Kiyoshi IMAI<sup>1</sup> and Masanobu KATO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center,  
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan*

<sup>2</sup>*Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
2-1-30 Shiba, Minato-ku, Tokyo 105-0014, Japan*

(Received September 29, 2003; Accepted February 4, 2004)

**ABSTRACT** — Subcellular distribution of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in the testis was studied by single oral administration of [3,4,5,6-<sup>3</sup>H]-phthalic acid di-(2-ethylhexyl) ester (DEHP-<sup>3</sup>H) or phthalic acid di-(2-ethyl[1-<sup>3</sup>H]hexyl) ester (<sup>3</sup>H-DEHP) to 8-week-old male rats. Autoradiographs and electron microscopic autoradiographs were prepared from the testis, liver and kidney at 6 and 24 hr after administration and distribution of radioactive materials in the tissues were observed. In the autoradiographic specimen at 6 hr after administration of DEHP <sup>3</sup>H-labeled at phthalic acid moiety (DEHP-<sup>3</sup>H), many grains were observed in the testis, mainly at the basal area of seminiferous tubules at the stages IX to I of the spermatogenic cycle. Electron microscopic autoradiographs taken at the same time revealed that localization of grains were in the smooth-surfaced endoplasmic reticulum and mitochondria of Sertoli cells. A few grains were also present at the Golgi apparatus and lysosome of Sertoli cells, and at the interfaces between the Sertoli cells or between Sertoli cells and spermatocytes, and in the cytoplasm of spermatocytes. Autoradiographs of the liver revealed grains in the centrilobular hepatocytes, localized at mitochondria, rough-surfaced endoplasmic reticulum and peroxisomes. In the kidney, the radioactivity was localized at the brush border of the tubular cells in the pars recta of proximal tubules. In the 24-hr specimen, the grain density in the seminiferous tubules obviously decreased. On the other hand, by autoradiography with DEHP <sup>3</sup>H-labeled at the alcohol (<sup>3</sup>H-DEHP), only a few grains were observed in autoradiographs of the testes at 6 hr after administration. No grains were noted in autoradiographs of the liver and kidney with <sup>3</sup>H-DEHP. The results showed that the phthalic acid ester was splitted rapidly in the body and only the phthalic acid moiety distributed into the cells.

**KEY WORDS:** Phthalic acid ester, Autoradiography, Electron microscopy, Testicular toxicity, Sertoli cells, Rats

### INTRODUCTION

It has been shown that high doses of phthalic acid esters exert testicular toxicity in animals (Calley *et al.*, 1966; Gangolli, 1982). The toxic effect on the testis was similarly observed with a variety of phthalate esters such as di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) (Gray *et al.*, 1977), dibutylphthalate, (Cater *et al.*, 1977) and di-n-pentyl phthalate (Creasy *et al.*, 1987). Among a variety of phthalate esters, DEHP has been investigated most frequently as a representative sub-

stance of phthalic acid esters. The mechanism of the testicular toxicity of phthalates is not yet wholly clear, although the effect on Sertoli cells and damaging blood-testis barrier has been considered (Gray and Butterworth, 1980). We have conducted a series of experiments on testicular toxicity of DEHP in rats, and have clarified that ultrastructural changes were induced in seminiferous tubules at the stages from IX to I of the spermatogenic cycle in 8-week-old Sprague-Dawley rats, 3 to 18 hr after single dose administration of 2800 mg/kg of DEHP (Saitoh *et al.*, 1997). Noteworthy



changes were degeneration of spermatocytes, dilatation of rough-surfaced endoplasmic reticulum, especially those in the vicinity of the tight junction of ectoplasmic specialization of Sertoli cells, and disintegration of the intercellular junction between Sertoli cells. We have also observed that clear structural changes of testes were induced with a single oral dose of 1400 mg/kg, and that the non-toxic dose level of DEHP on testes was 700 mg/kg in mature rats. Furthermore, we have employed a lanthanum trace method to examine the effects of DEHP on Sertoli cell function, especially on the condition of the blood-testis barrier in rats (Saitoh *et al.*, 1997). In this study, lanthanum particles were observed 6 hr after administration at the tight junction between Sertoli cells. The number of particles observed reached its peak from 18 to 24 hr after administration, and then it showed a slight decrease. Therefore, it was concluded that the function of Sertoli cells to maintain the blood-testis barrier was affected by DEHP as early as 6 hr after oral administration, but was recovering by 24 hr. Gray and Gangoli (1986) have reported that oral DEHP is hydrolyzed in the intestine to mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP), which is then absorbed and exerts testicular toxicity. However, they found very limited transfer of radioactivity into the testicular tissue in spite of its testicular toxicity after administration of  $^{14}\text{C}$ -MEHP labeled at 7th position of the side chain (Gray and Gangoli, 1986; Albro *et al.*, 1973). In the present study, two kinds of  $^3\text{H}$ -labeled DEHP, labeled either at the phthalic acid or at the alcohol moiety, were used to elucidate its distribution in the testis by autoradiography, including electron microscopic observation. In addition, subcellular distribution of these labeled compounds in the liver and kidney were studied.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Two kinds of  $^3\text{H}$ -labeled DEHP were purchased from Amersham Biosciences and used for this study. One was labeled at the phthalic acid ring ([3,4,5,6- $^3\text{H}$ ]-phthalic acid di(2-ethylhexyl) ester; specific activity: 1.85 TBq/mmol, hereafter referred to as DEHP- $^3\text{H}$ ) and the other was labeled at the alcohol moiety (phthalic acid di(2-ethyl[1- $^3\text{H}$ ]hexyl)ester; specific activity: 1.22 TBq/mmol, hereafter referred to as  $^3\text{H}$ -DEHP). Toluene was removed from the commercial solutions of each labeled compound with nitrogen stream, and then each compound was suspended in corn oil (Nakalai Tesque). Standard DEHP was pur-

chased from Wako Pure Chemical Industries.

### Animals

Male rats of the Sprague-Dawley strain (Crj: CD, SPF) were purchased at 5 weeks of age from Atsugi Breeding Center, Charles River Japan, Inc., and were kept for three weeks to acclimatize to laboratory condition. The animals were reared in an individual cage sized 235×395×170 mm and kept in a glass-front animal isolator with conditioned air supply of temperature at 24~26°C and relative humidity within 50~65%. The animals were fed with pellet food (CE-2, CLEA Japan Inc.) *ad libitum* and were supplied with tap water. They were allocated to two groups of four animals each in a random fashion on the day before administration.

### Dosage and administration

As we have observed in a preceding study (Saitoh *et al.*, 1997), slight but obvious ultrastructural changes of rat testis with a single oral dose of 1000 mg/kg of DEHP, the dose of DEHP in the present study was determined to be 1000 mg/kg. The dose was adjusted by adding the standard and a radioactive DEHP and the solution volume adjusted to 5 mL/kg, which contained radioactivity of 92.5 MBq. The test solution was prepared as described above and oral administration was performed by gavage.

### Autoradiography

Specimens for autoradiography were collected from each of the two animals in both groups at 6 and 24 hr after administration of radio-labeled DEHP. The chest of the animal was opened by median thoracotomy under pentobarbital anesthesia. A cannula was inserted from the apical part of the left ventricle along the interventricular septum through the aortic outflow tract into the aorta, and was fixed there by ligation around the aorta. Phosphate-buffered saline was infused through the cannula to the body, keeping the perfusion pressure between 700-800 mmH<sub>2</sub>O by adjusting the rotating speed of the infusion pump. Immediately after beginning the infusion, the right atrium was sectioned. When the outflow from the right atrium became very transparent (about one minute after), the flushing solution was switched to a combined fixative solution of 0.1 M phosphate buffered 2% paraformaldehyde and 1.25% glutaraldehyde (pH 7.4). After the fixative solution was perfused for 15 to 20 min, the testes, liver and kidneys were collected from the body. The collected organs were cut and postfixed in 0.1 M phosphate buffered 2% osmium tetroxide.

## Distribution of DEHP in rat testis.

After being dehydrated in serial ethanol solutions of graded concentration, the tissues were embedded in Quetol-651 resin block. Semi-thin sections, about 1  $\mu\text{m}$  thick, were prepared from each block. The sections were dipped into radiographic emulsion Type NTB-2 (Eastman Kodak) and exposure to tissue radioactivity maintained for four or seven days in a dark cabinet at 4°C. After development using Kodak Dektol (Eastman Kodak) and fixation with Fujifix (Fuji Photo Film), each slide was stained with toluidine blue. These autoradiographic slides were examined under a light microscope.

For the testis, grains were counted for every seminiferous tubule in three slides for each sampling time, and progress of grain count with time was examined. For evaluation of accumulation of radioactivity, the mean background grain count and twice standard deviation was reduced from the mean grain count per seminiferous tubule.

Parts of some testes that showed rich grain distribution in seminiferous tubules on the autoradiography were dissected out for ultrastructural observation. Ultrathin sections were made of these parts, placed on a slide glass pretreated with collodion, stained with uranyl acetate and lead citrate, and coated with evaporated carbon. Then the sections were dipped into electron microscope autoradiographic emulsion Type L4 (Ilford), and left exposed to radioactivity for five or eight weeks in a dark cabinet at 4°C. After development using fenidone, a thin layer of collodion coat was stripped off, and the ultrathin section was dried under a grid. Then the slide was observed with an electron microscope (H-7100, Hitachi).

## RESULTS

### Autoradiography by single oral dose of DEHP- $^3\text{H}$

#### 1. Autoradiography under a light microscope

##### 1) Testes

In autoradiography of testes prepared at 6 hr after administration of DEHP- $^3\text{H}$ , a considerable number of grains was observed in seminiferous tubules, mostly at the basal area of seminiferous tubules at the stages from IX to I of the spermatogenic cycle (Photo 1). The mean grain count per seminiferous tubule was 23. The grain count of this area decreased in the 24-hr autoradiographs (Photo 2). The mean grain count per seminiferous tubule was 12. Mean grain counts per seminiferous tubule corresponding to the spermatogenic stage are depicted in Fig. 1, which shows preferential distribution of the grains to stages IX to I of

spermatogenesis at 6 hr after administration, and also shows the change of distribution by time.

##### 2) Liver

In 6-hr autoradiographs of the liver, the distribution of radioactivity was at the background level. However, at 24 hr after administration, the grain count increased in the hepatocytes of the centrilobular area (Photo 3). The number of grains of this area of this period was higher than that in the testis at the peak.

##### 3) Kidneys

In autoradiographs of the kidney at 6 hr after administration, many grains were noted at the brush border of epithelial cells of the straight proximal renal tubules and also at the luminal side of cytoplasm of the cells (Photo 4). However, in 24-hr autoradiographs, the grain count decreased to the background level.

## 2. Electron microscopic autoradiography

### 1) Testes

Observation by electron microscope was conducted specifically on the seminiferous tubules at the stages from IX to I of the spermatogenic cycle. At 6 hr after administration, grains were observed at the smooth-surfaced endoplasmic reticulum and mitochondria of Sertoli cells (Photo 5-A). Grains were also noted at the junctions between neighboring Sertoli cells or between a Sertoli cell and spermatocytes (Photo 5-B). Moreover, small amounts of grains were observed at the Golgi apparatus and lysosome of Sertoli cells, and also in the cytoplasm of spermatocytes. In 24-hr autoradiographs, similar subcellular distribution of grains to 6-hr autoradiographs were observed, showing some decrease of grains in mitochondria and increases in rough-surfaced endoplasmic reticulum of Sertoli cells and in spermatocytes and spermatid. Actual counts of grains are tabulated in Table 1 to show the subcellular distribution of the grain.

### 2) Liver

At 6 hr after administration, a few grains were observed at rough-surfaced endoplasmic reticulum, peroxisome, and mitochondria of the hepatocytes. At 24 hr after administration, grains were observed most frequently at mitochondria, and to a lesser extent at rough-surfaced endoplasmic reticulum and peroxisome (Photo 6).

### 3) Kidneys

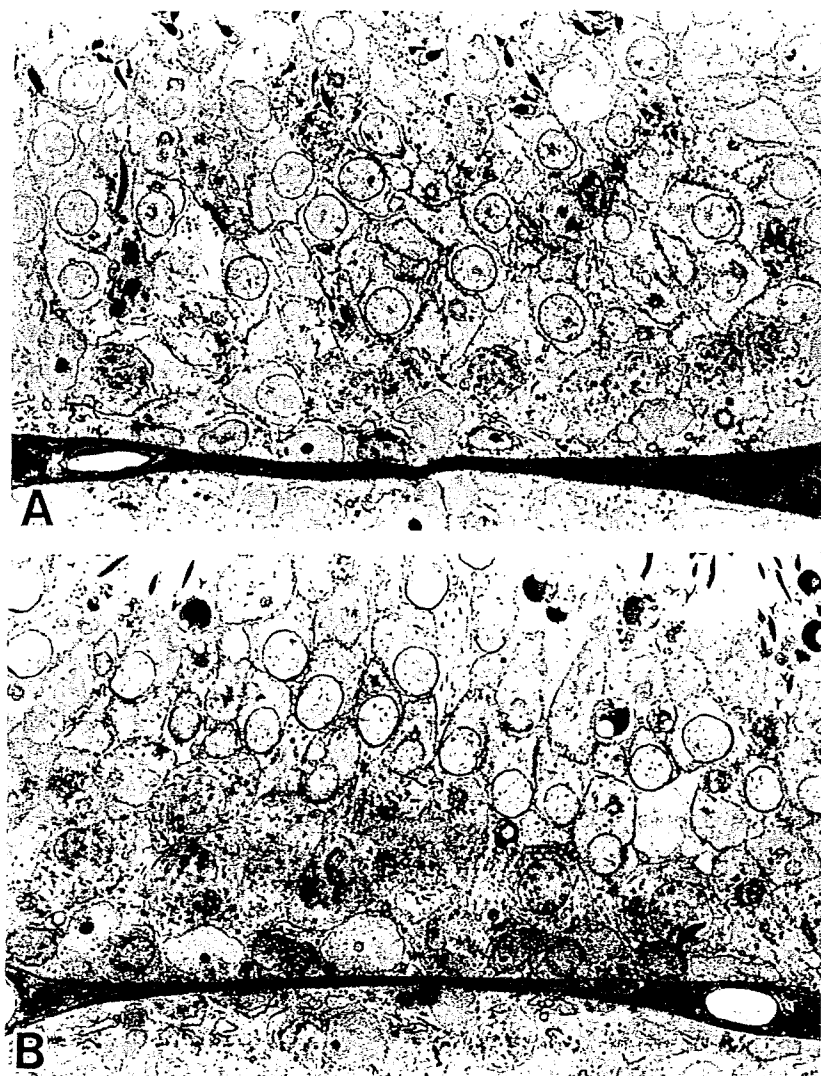
Grains were observed at the brush border of epi-

thelial cells of the straight portion of proximal tubules, and at mitochondria, smooth-surfaced endoplasmic reticulum, peroxisome, and Golgi apparatus in 6-hr autoradiographs (Photo 7). However, in the 24-hr specimens, only a few grains were observed at the brush border, mitochondria, and peroxisome of the epithelial cells.

#### Autoradiography by single oral dose of $^3\text{H}$ -DEHP

##### 1. Autoradiography under light microscopy

In autoradiographs of testes at 6 hr after oral administration of  $^3\text{H}$ -DEHP, the grain count of the testes was only a little higher than the background level. The mean grain count per seminiferous tubule was 6, which is obviously fewer than the count of the corresponding autoradiographs with DEHP- $^3\text{H}$ . No specific distribution of grains to the stage of the spermatogenic

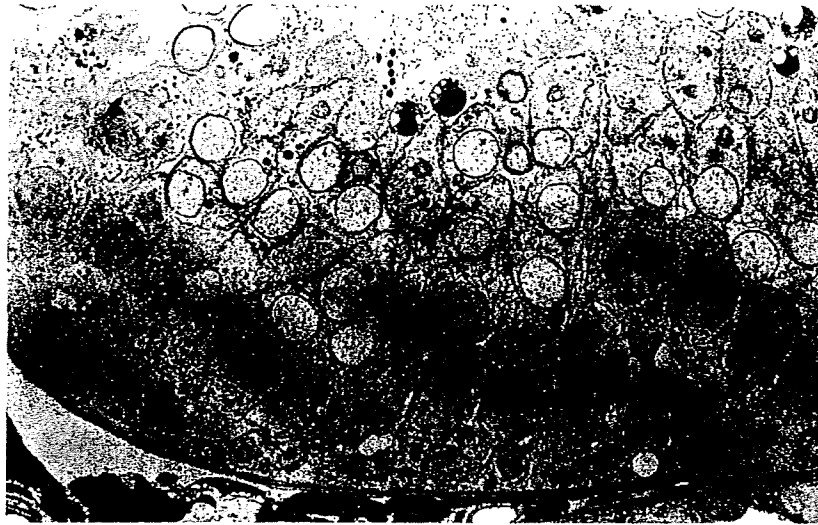


**Photo 1.** Light microscopic autoradiographs from the testis of a rat sacrificed 6 hr after administration of [3,4,5,6- $^3\text{H}$ ]-phthalic acid di(2-ethylhexyl)ester. Accumulation of silver grain is noted at the basal area of seminiferous tubules.

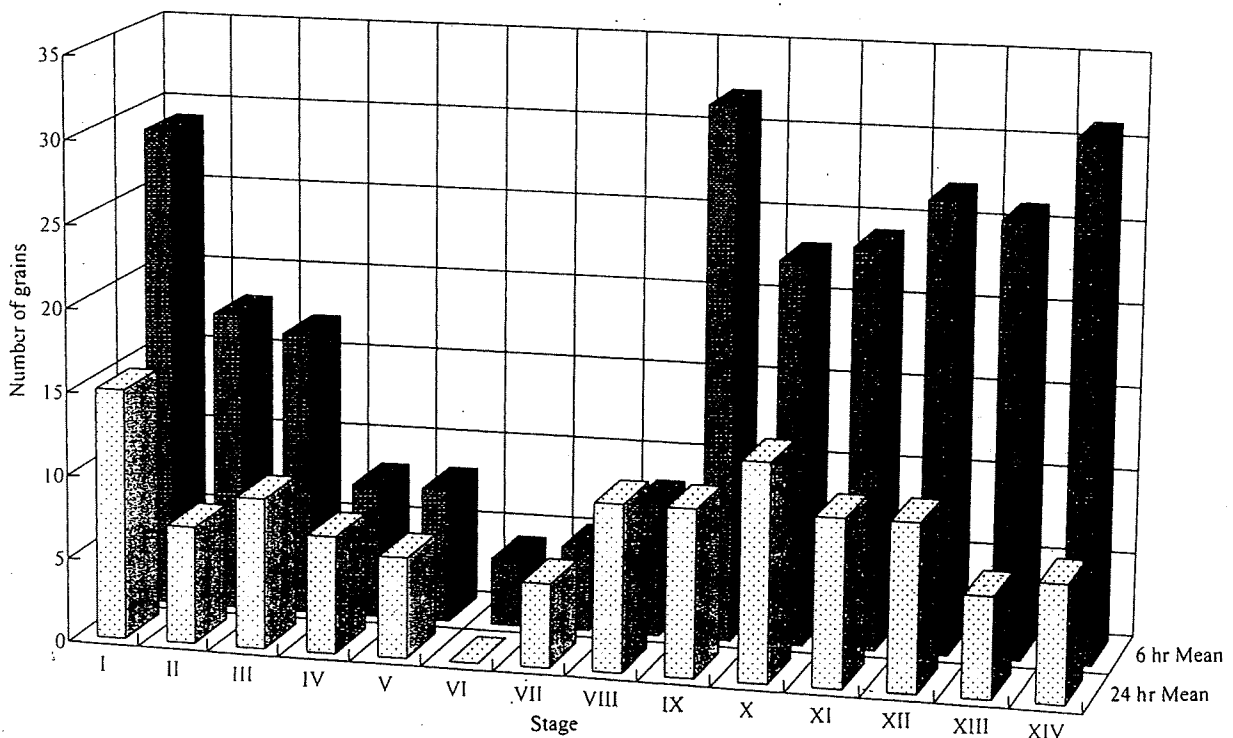
A: Stage I seminiferous tubule,  $\times 800$ .

B: Stage IX seminiferous tubule,  $\times 800$ .

## Distribution of DEHP in rat testis.



**Photo 2.** A light microscopic autoradiograph from the testis of a rat sacrificed 24 hr after administration of [3,4,5,6-<sup>3</sup>H]-phthalic acid di(2-ethylhexyl)ester. A few silver grains are noted at the basal area of a seminiferous tubule at stage IX,  $\times 800$ .



**Fig. 1.** Distribution of radioactivity to seminiferous tubules of the testis of rats 6 and 24 hr after administration of [3,4,5,6-<sup>3</sup>H]-phthalic acid di(2-ethylhexyl)ester. Mean counts of radiosensitized grains per seminiferous tubule on the autoradiographs are shown by the stage of spermatogenesis.