

20050115JA

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

内分泌かく乱性確定試験法及び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

(H16-化学-一般-001)

平成17年度 (2005)

総括・分担研究報告書

＜平成21年12月訂正版＞

主任研究者 小野 宏

財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所

平成18 (2006) 年3月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

内分泌かく乱性確定試験法及び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
(H16-化学-一般-001)

平成17年度 総括・分担研究報告書
＜平成21年12月訂正版＞

主任研究者 小野 宏

平成18(2006)年3月

目次

I. 総括研究報告書	
内分泌かく乱性確定試験法及び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・	1
小野 宏	
II. 分担研究報告書	
1. 総括補佐及び一生涯試験、OECD バリデーション関連総括・	23
I (H16 初回試験) BPA を用いた Crj:CD(SD)IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験、及びII (確認試験) ラットを用いた BPA の子宮内・経乳汁暴露でみられた晩発影響についての再現性検討 (委託研究)	
菅野 純	
【内分泌かく乱性確定試験開発研究、一生涯試験等】	
〈OECD Conceptual Frame Work Level 5 対応試験開発〉	
1) 神経・行動	
2. Bisphenol A をモデルとした妊娠期及び授乳期暴露による行動影響の評価とその機序解明・	441
鈴木 勉	
3. マウスのオペラント条件付けを用いた内分泌かく乱化学物質の神経系高次機能影響の評価・	445
宮川 宗之	
4. 内分泌かく乱化学物質の脳の性分化への影響に関する研究・	473
今井 清	
2) 免疫	
5. 内分泌かく乱化学物質の免疫異常に及ぼす影響に関する研究・	485
林 良夫	
6. 内分泌かく乱化学物質の免疫系への影響評価・	499
武吉 正博	
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・	507
長尾 哲二	
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・	511
吉田 緑	
9. 内分泌かく乱化学物質の生殖器系の老化に至る過程に対する影響・	529
太田 亮	
〈内分泌かく乱性確定試験開発支援基礎研究〉	
10. 確定試験に関わる発がん性検討：乳腺上皮系の分化形質を指標とした内分泌かく乱物質の発がん影響の検討・	537
長村 義之	
11. 確定試験に関わる各種核内受容体転写活性迅速確認系構築研究・	545
西川 淳一	
12. 確定試験に関わる多分化能修飾メカニズム確認の為の ES 細胞分化増殖影響解析研究・	555
高木 篤也	
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・	559
松島 裕子	
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	563
高木 篤也	
【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	569
松島 裕子	
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	575
吉村 慎介	
【OECD 対応試験実施・調査研究】	
17. 子宮肥大およびHershberger に関する試験	583
小野 宏	
18. OECD/WHO 関連等研究ハーモナイゼーション総括	593
井上 達	
19. 反復投与毒性試験系 (TG407 を含む) への適用に関する調査研究	607
広瀬 明彦	
20. 国内外の子宮肥大試験に関するデータ整理とその問題点の把握及び解決策の検討	617
永井 賢司	
21. 国内外の Hershberger 試験に関するデータ整理とその問題点の把握及び解決策の検討	623
山崎 寛治	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	633
IV. 研究成果の刊行物・別刷	643

I. 総括研究報告書

内分泌かく乱性確定試験法及び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

主任研究者 小野 宏 財団法人 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

内分泌かく乱化学物質(EDCs)の生体影響の研究は、これまでの第1期3年間の研究によって、種々のスクリーニング試験法の開発を基本的に終了し、第2期3年間により確度の高い、各国間協調の可能な「少数の個体レベルスクリーニング系の確立」を進めた。これらの研究成果は、厚生労働省「EDCsの健康影響に関する検討会、中間報告追補」において提案された「試験スキーム」及び、その後の検討会にて承認された拡張スキームに沿って要求される大規模スクリーニングの内の、主に *in vivo* 試験法に関してその科学的根拠及び実務的手順の両面の確立に大きく生かされてきた。それと並行して、試験スキームの完成に向けての「詳細試験(確定試験)」に関わる基礎的な検討を進め、「齧歯類一生涯試験」構想を打ち出し、多世代試験の問題点の整理と必要な改良点を明らかにする試みを展開してきた。

本研究班では、第一に、【内分泌かく乱性確定試験開発研究、一生涯試験等】として、3年間で実用的な「確定試験」を構築することを目指した研究を推し進めている。スクリーニング試験で見出された化学物質について実施される「確定試験」には、従来型の多世代試験が必ずしも最適でないことが内外の研究により示されてきたため、ここでは、本申請班の前身となる第2期研究班における調査研究の結果を踏まえ、既存の多世代試験法の改良のみに止まらず、一個体の受精、発生、発達、成熟、及び老化に亘る一生涯を標的とした有害性評価試験系「齧歯類一生涯試験」を構築することを目指した。これは、経済協力開発機構(OECD)の Conceptual Frame Work Level 5 に対応し、「齧歯類一生涯試験」試験開発研究、及び支援基盤研究の2要素から成る。即ち、確定試験開発研究の推進には、1) 神経・行動への有害影響の検討として、BPA等をモデル物質として妊娠期・授乳期に暴露し出生児のドーパミンおよびセロトニン神経系に及ぼす影響を認知機能(学習・記憶・行動制御)を反映する行動試験によってみること、妊娠期・新生児期に暴露しエストロゲン感受性の神経核、殊に青斑核の発達・分化過程をみること、を検討してきた。2) 免疫系への有害影響の検討として、シェーグレン症候群疾患モデル NFS/sld マウスの新生児に EDCs を暴露した際の自己免疫発症への影響を解析し、また既存の local lymph node assay を修飾し、胎生期・新生児期における EDCs 暴露の影響を解析することにより、免疫反応や免疫異常状態に及ぼす影響を評価する試験法を検討した。3) 生殖器系の発達・老化への影響の検討として、EDCs を周産期に低用量暴露し雄性生殖器の生殖・発生毒性学的変化を鋭敏に且つ早期に捉える試験系を開発することを目指した。EDCs の周産期暴露による雌性生殖器の遅発性障害の発生機序を解明するため、低用量の DES を SD ラット妊娠期あるいは新生児期に投与し、生涯に亘り雌雄の性成熟、性周期、産児数、次世代の生殖能力、性ホルモン量等の指標を観察する実験を実施した。

支援研究には、エストロゲン発がんの標的としての乳腺上皮を対象とした発がん性検討に関わる基礎研究、全ての核内受容体に対する EDCs の影響をスクリーニングするためのハイスループット型アッセイの開発を進め、確定試験の評価に対する判断材料を提供する基礎的研究、及び、確定試験に於いて胎生期の初期暴露による影響が想定された場合のメカニズム情報の提供支援体制として、EDCs の解析の難しい発生初期に於ける影響を胚性幹細胞(ES細胞)を用いて、多分化能に対する影響解析を行った。これらに加えて、高精度遺伝子発現解析技術開発が完了した事を受けて、化学物質による生殖器の発達影響の複雑な作用点を明確にすること、あるいは、一般的に他臓器に

比べて形態学的変化の観察が困難な神経系について、神経行動学的結果の分子生物学的裏付けを試みる研究が含まれ、これらにより確定試験の評価の精度、客観性の向上、及び評価プロセスの迅速化に貢献する。

本研究では、更に、【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】として、OECD 試験ガイドライン化を視野に入れた *in vivo* 内分泌かく乱性試験法の開発及び内分泌かく乱性の科学的評価やメカニズム研究への応用をも目指した(これは、OECD の Conceptual Frame Work Level 3~4 に対応する試験開発から成る)。さらに OECD などでも新たに取り上げる機運にある前立腺の性ホルモン反応性に関わる新しい問題の検討等を支援的に進めた。

また、これらと並行して、【OECD 対応試験実施・調査研究】として、国際的協調の継続として、OECD に代表される国際テストガイドラインに関わる調査研究を実施する。その概要は、個体レベルスクリーニング系の確立課題として、子宮肥大試験、Hershberger 試験、反復投与毒性試験(TG407を含む)を実用段階とする上で最終的に残されている問題点の解決を図った。

本研究は、以上の如き試験系の開発の第3期研究を推進するものであり、「確定試験」として一生涯(発生、発達、成熟、老化)の全ての段階に於いて内分泌かく乱作用により懸念される毒性指標(神経・行動、免疫毒性等、多世代繁殖試験の指標に限定されない)を網羅的に確認する「齧歯類一生涯試験法」の開発を行うと共に、OECD 試験法ガイドライン化を視野に入れた内分泌かく乱性試験法(*in vivo*)の開発、バリデーション、OECD で取り上げられている新たな内分泌かく乱性試験法の我が国としての評価を進展させ、内分泌かく乱性の試験評価に関する包括的なガイドラインの開発に的確に貢献するものである。

研究員

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における
職名

太田 亮・財団法人 食品薬品安全センター秦野研
究所 毒性部 毒性学研究室 研究員

菅野 純・国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物
試験研究センター 毒性部 部長

長村 義之・東海大学 医学部 基盤診療学系病理
診断学 副院長、教授

鈴木 勉・星薬科大学 薬品毒性学教室 教授

西川 淳一・阪大大学院 薬学研究科 助教授

宮川 宗之・独立行政法人 労働安全衛生総合研究
所 産業医学総合研究所 企画調整部 研究企画
官

高木 篤也・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 室長

今井 清・財団法人 食品農医薬品安全性評価セン
ター 技術総括部 技術総括部長

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

林 良夫・徳島大大学院 ヘルスバイオサイエンス
研究部 口腔分子動態学分野 教授

吉村 慎介・財団法人 食品薬品安全センター秦野
研究所 毒性部 毒性学研究室 室長

武吉 正博・財団法人 化学物質評価研究機構 日
田事業所 試験第四課 課長

井上 達・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 センター長

長尾 哲二・近畿大学 理工学部 生命科学科 発
生生物学研究室 教授

広瀬 明彦・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 総合評価研究室 主任研究
官

吉田 緑・財団法人 佐々木研究所 病理部 主任

永井 賢司・株式会社 三菱化学安全科学研究所

鹿島研究所 部長

山崎 寛治・財団法人 化学物質評価研究機構 日
田事業所 所長

A. 研究目的

本研究の目的は、ホルモン様生体影響を及ぼす化学物質と、その延長線上で生体障害性を発揮する EDCs のスクリーニング試験等による優先順位設定を経て、最終的にそれらの EDCs としての生体障害性に対する検出確度の高い方法体系を開発することにある。

ここ数年で、各国で急速に開発の機運が高まった試験法の樹立により、内分泌作用を持つ化学物質の試験管内あるいは個体レベルでのさまざまな試験法が開発された。その結果、ホルモン様作用を基礎とした *in vitro* スクリーニング試験法の開発はエストロゲン受容体系についてはほぼ終了したものの、内分泌かく乱性の如何が明らかにされないまま多くの化学物質が店晒し状態になり、社会的危惧に対し未解決の状態となっている。即ち、本研究の問題点は、内分泌かく乱影響を引き起こす化学物質と、内分泌かく乱を引き起こす化学物質の分界点となる方法論が十分に開発されないまま現状に至っている点にあり、EPA 及び OECD 各国機関が緊急の必要性に迫られていることは、現在それらを峻別する確定試験の樹立の可能性を探ることである。国内的にも、科学技術振興調整費（生活者ニーズ対応研究等）が環境影響を中心に、また新エネルギー開発機構（NEDO）等が発生源物質に焦点を当てて研究を進めてきた。しかし、それらの研究の中でヒトを念頭においた生物影響、特にそのヒトへの外挿可能な確定試験の開発研究は乏しく、焦眉の課題として本研究班はスタートした。過去の研究の結果、厚生労働省「試験スキーム」の設定に貢献し、その構成要素となる試験法の開発研究を推し進めてきた。

本研究は、こうした問題を解決するために、緊急な必要性と解決が期待されるところの関連試験系の総合的な確立、即ち「試験スキーム」の諸要素の確立にある。そのために、*in vivo* スクリーニング系である子宮肥大試験、Hershberger 試験の個体レベル実験系の各国間で協調可能な試験法として、殊に国際バリデーションに関わる残された諸問題の解決を引き続き目指し、早期ガイドライン化を視野に入れた内分泌かく乱性試験法 (*in*

vivo) の開発に的確に貢献するものである。一方、確定試験については、従来の毒性評価法に則ったこれまでの 1 世代、経世代生殖毒性試験を中心とする大規模なバイオアッセイでは、多くの陽性候補物質が陰性の結果に終始することが予測されるとの立場に立って、しかも、これらの従来からの試験法では、提起されてきている低用量問題への対応が実質的に困難であるとの判断に立って検討を重ねてきた。即ち、従来の 1 世代、多世代生殖毒性試験を視野に入れつつ、胎生期、新生児期、思春期暴露の成長後の、不可逆的影響を神経・行動、免疫、内分泌、発がんを対象とした「齧歯類一生涯（発生、発達、成熟、老化）試験法」の開発、並びに可能な限りの経世代試験の改良、あるいは必要に応じた新概念の導入を推進すること、併せて確定試験の開発に必要な残されている基盤研究を推進することが必要となっている。また、急速に有効性の明らかになりつつある遺伝子発現解析の技術開発の完成に伴い、試験スキームの精度向上と時間短縮に向けてのその技法の導入、並びにグローバルに推進する OECD のバリデーション試験についても、当研究を通じて問題解決を目指した対応研究を進めている。

これらを推進することにより、試験スキームの全貌が具体化することで、内分泌かく乱性の如何が明らかにされないままの化学物質の店晒し状態による社会的危惧に対する未解決状態の解消が現実的に可能になることが期待される。

B. 研究方法

各班員の研究方法を以下に記載する。

総括補佐及び一生涯試験、OECD バリデーション関連総括

(1) 齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目を調整する際の取り纏め、及び OECD 対応

(2) I (H16 初回試験) BPA を用いた Cj:CD (SD) IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験、及び II (確認試験) ラットを用いた BPA の子宮内・経乳汁暴露でみられた晩発影響についての再現性検討 (委託研究)

(3) OECD/EDTA/VMG-Mammalian

菅野 純

本分担研究者は、(1) 齧歯類一生涯試験の構

策に必要と考えられる各項目を調整する際の取り纏めを行うと共に、実際の試験への応用の可能性を明らかにする為に、(2) Bisphenol A を雌性動物の周産期に低用量暴露した際の性ホルモン系に対する低用量影響に関する動物実験を実施した(委託研究:委託先:財団法人 化学物質評価研究機構)。更に、(3) OECD/EDTA/VMG-Mammalian (the Validation Management Group for Mammalian Testing) における国際協調の場で本研究の紹介を行ってきた経緯に基づいて、その対応を検討した。

(1) 齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目を調整する際の取り纏め、及び OECD 対応神経・行動

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

免疫

- 免疫反応や免疫異常状態に及ぼす影響

内分泌 (生殖器発達・老化等)

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

内分泌かく乱性確定試験開発・支援基礎研究

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

詳細試験 (確定試験)

- 「齧歯類一生涯試験法」の開発の継続と完成

(2) I (H16 初回試験) BPA を用いた Cri:CD (SD) IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験 (委託研究:委託先:財団法人 化学物質評価研究機構)、及び II (確認試験) ラットを用いた BPA の子宮内・経乳汁暴露でみられた晩発影響についての再現性検討 (委託研究:委託先:財団法人 化学物質評価研究機構)

I (H16 初回試験) (本報告内容のうち、病理組織検査結果を除く部分は H16 年度報告と重複するが一貫性を優先し総体を報告する)

10 週齢の Cri:CD (SD) IGS ラット (日本チャールス・リバー株式会社) 雌雄を交配させ、妊娠ラットを各群 10 匹となるように確認日ごとに確認順に各群に母動物とする雌を振り分けた。BPA の 0、0.005、0.05、40、400 mg/kg/day (陽性対照群として ethynyl estradiol (EE) 0.05 mg/kg/day 群を設定) の用量を、妊娠 6 日から分娩後 20 日 (離乳前日) まで毎日強制経口投与した。

妊娠動物の全例を自然分娩させ誕生日 (0 日齢) に産児数、死産児数、出産生存児数、出生児性比、出生児外表 (口腔内を含む) の検査を行った。

生後 4 日齢に生存する全出生児について肛門・生殖突起間距離 (Anogenital distance; AGD) を測定した。

生存する雄離乳児全例について、35 日齢から陰茎龟头型分類を実施した。

生存する雌離乳児全例について、21 日齢から膈開口を観察した。

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

①性周期長期観察群

児動物の雌について 3 ヶ月齢以降 7 ヶ月齢まで膈スミアによる性周期観察を行った。膈スミアを 14 日間連続採取後、2 週間休止のサイクルを 7 ヶ月齢まで繰り返し行い、発情前期、発情期、発情後期、休止期に区分した。

正常な性周期が認められた個体を normal (N)、異常な性周期が認められた動物は、persistent diestrus (休止期が 5~9 日継続)、constant diestrus (休止期が 10 日以上継続)、persistent estrus (発情期が 3~7 日継続)、constant estrus (発情期が 8 日以上継続) 及び irregular estrus (何れの分類にも当

てはまらない不規則な性周期)に分類した。

7ヶ月齢に達した児動物は解剖し、脳、下垂体、甲状腺、肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、腹葉前立腺、子宮及び卵巣を採取し、湿重量を測定した。病理組織学的検査は雌の生殖器官を中心に実施した。

②生殖能力検査

児動物の雌雄ラットは13週齢に達した時点で同用量群の雌雄ラットを1対1の割合で14日間を限度として交配させ、交尾所要日数、交尾数(率)、受精数(率)、受胎数(率)を観察した。

妊娠20日にエーテル麻酔下で放血し、安楽致死させた後、帝王切開して、子宮は硫化アンモニウムに浸漬して着床痕数を算出した。更に、黄体数、着床数、胚・胎児死亡数(早期、後期吸収胚及び死亡胎児に分類)、生存胎児数、生存胎児性比、生存胎児体重、生存胎児胎盤重量及び生存胎児外表(口腔内を含む)を調べた。

③10週齢解剖

10週齢に達した動物を順次CO₂+O₂麻酔下で腹部大動脈より採血し、採取した血液から血清を分離した。その後、放血致死し安楽死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。

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

II (確認試験)

H16年度に実施した確認試験として下記のように実施した。現在、7ヶ月齢の性周期検査を実施中であり、12ヶ月齢まで継続して検査をする予定である。

10週齢のCtrl: CD (SD) IGSラット(日本チャールス・リバー株式会社)雌雄を交配し、妊娠ラットを各群に振り分けた。BPAの0、0.5、5、50 µg/kg/dayの用量を、各群10、10、10及び10匹の交尾が確認された雌に対し妊娠6日から分娩後20日(離乳前日)まで毎日強制経口投与した。

妊娠動物の全例を自然分娩させ、出生児については、出生日(0日齢)に産児数、死産児数、出産死亡児数、出産生児数、出産生児性比、出産生児外表(口腔内を含む)の検査を行った。

生後4日齢に同腹出生児数を可能な限り1腹8匹(可能な限り雌6匹、雄2匹)になるよう無作為抽出法を用いて個体数調整を行った。同腹出生児数が8匹に満たない場合には、調整を行わず、また、性比が上記を満たさない場合には合計の同腹新生児数が8匹となるように調整した。更に、雌出生児は、同腹の出生児を単位として解剖1ヶ月前の体重による層別無作為抽出法により偏りがないように3ヶ月齢剖検群(雌2匹)とした。

発育分化検査として、生存する雌離乳児全例について21日齢から膈開口を観察した。また、雄離乳児について、35日齢から陰茎亀頭型分類検査を実施した。

性周期の観察は、膈スミアを14日間連続採取後、2週間休止のサイクルを12ヶ月齢まで繰り返し行い、発情前期、発情期、発情後期、休止期、いずれの分類区分にもあてはまらなかったものをcommon variableとした。また、正常な性周期が認められた個体をnormal (N)、休止期が5~9日継続した個体をpersistent diestrus (PD)、休止期が10日以上継続した個体をconstant diestrus (CD)、発情期が3~7日継続した個体をpersistent estrus (PE)、発情期が8日以上継続した個体をconstant estrus (CD)に分類した。2週間の観察期間の中で休止期の継続と発情期の継続が認められた場合には、発情期の継続を分類として採用した。また、いずれの分類区分にもあてはまらないが、不規則な性周期を示した個体についてはirregular estrusとした。

3ヶ月齢時解剖(雌性のみ)は、脳、肝臓、副腎、腎臓、甲状腺、下垂体、子宮及び卵巣を採取し、湿重量を測定した。甲状腺、下垂体については10%中性緩衝ホルマリン液で固定、約24時間後に測定を行った。

現在、7ヶ月齢の性周期検査を実施中であり、12ヶ月齢まで継続して検査をする予定である。

(3) OECD/EDTA/VMG-Mammalian

国際協調下における試験法開発、ガイドライン化等について、EDTA/VMG-M参加各国との調整、検討を行う。

【内分泌かく乱性確定試験開発研究、一生涯試験等】

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

1) 神経・行動

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

鈴木 勉

ICR 系マウス PND1 の中脳由来初代培養アストロサイトおよび神経/グリア共培養細胞に BPA および E₂ を処置し、アストロサイトの形態変化について、免疫染色を施し検討した。なお、各種性ホルモン受容体拮抗薬を BPA と同時に処置し、拮抗試験を行った。また、BPA の処置が神経およびアストロサイトの機能的な変化を引き起こすか否かについて、Ca²⁺ イメージング法に従い検討した。更に、大脳皮質層形成に及ぼす BPA の影響については、薬物混入飼料法に従い BPA を胎児期に暴露し、胎児脳を用いて免疫組織学的に検討した。

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

宮川 宗之

Schedule-Controlled Operant Behavior (SCOB) の測定では、食餌を報酬とするため、個体別に飼育して給餌量を制限・調整することが必要となる。昨年度の結果に基づき、給餌制限開始前の体重の 85% 体重 (維持目標体重) を維持するよう調整した。飲用水は実験セッション中をのぞき自由摂取とした。

SCOB 測定装置：各種の SCOB に対応した一連の条件付け訓練に必要なプログラムを作成し、これらを用いてチャンバーを制御するとともに、反応を記録した。報酬の呈示を知らせる音刺激は 4500 Hz (75-80 dB に調整、持続 1 秒) を使用した。レバー押し反応には 2900 Hz の短音 (“ピッ” という音：ピップ音) を随伴させた。

SCOB の測定手続き：食餌 (20 mg の粒餌) を報酬とした SCOB 測定のため、給餌量の調整・制限を行い体重が目標値付近で安定した後、レバー押し反応の条件づけ訓練を開始した。

SCOB における反応の指標：各スケジュール下での被験体の反応習得過程と、それに対して化学物質暴露が及ぼす影響を解析するための指標には、主として反応率 (1 分間当りのレバー押し反応頻度) を用いた。また、タイムアウト付交替型混合スケジュールに関しては、FR と DRO で各タイム

アウト後の初発反応の潜時を求め、これらの潜時から両コンポーネントにおける反応切替の正確さを示す指標「Accuracy」と全般的な反応性の指標「Bias」も算出した。

実験デザイン：

実験 1 では、昨年度と同様に、雄 C57BL/6J マウスを 10 週齢で購入し、11 週齢から給餌制限を開始して 13 週齢から SCOB 測定実験に使用した。

タイムアウト付交替型混合スケジュールによる訓練各段階をどの程度実施すれば適切な反応パターンが得られるか、適宜訓練回数を修正し実験を進めるとともに、タイムアウト時の照明 (house light は常時点灯としていたものを、完全な暗転に修正) を FR/DRO と TO の差を強調するよう修正し、その影響を検討した。タイムアウト長を上下させる最終段階では薬理的負荷試験を行なった。

実験 2 では、雄性仔 PND7 で 1 腹 8 匹に調整した。成長後の 13 週齢から給餌制限を開始し、16 週齢から SCOB の測定を行なった。

第 1 段階の訓練 (固定長タイムアウト) におけるタイムアウト時間の違いによる 2 条件 (4 秒とする TO4 条件と 8 秒とする TO8 条件) と、メチマゾール 0.05% 飲水投与の違いによる 3 条件 (投与なし、短期間飲水投与-GD15 から離乳まで一、長期間飲水投与-GD15 から 12 週齢まで一) の組み合わせで、6 条件のグループを設定し、学習訓練に対する影響を検討した。

実験 3 では、妊娠-PND21 まで BPA を 0、0.33、3.3、33 ppm 混餌投与し、各群 12 匹の母ラットから各腹 1 匹の雄性仔を選び、次年度に行動測定に使用する予定である。

内分泌かく乱化学物質の脳の性分化への影響に関する研究

今井 清

性ホルモン様物質を、胎児期あるいは新生児期に暴露すると、性分化に関わる神経核に作用し、性成熟に達した後に性機能に異常を来たすことが知られているが、その機序は十分に解明されていない。

平成 17 年度は、PND1、5、7、10、21 及び 10 週齢の SD ラット雌雄各 4 匹の脳の連続切片を製作し、ER α の免疫染色を施して、性的二型核が存在する視床下部を中心に ER α 陽性細胞の数を計測した。更に、雌雄 PND1-5 に EE を 0.5、5 ある

いは 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下投与した。その後、PND6、10、21 にエーテル麻酔下で安楽死させ剖検し、脳を 10%ホルマリン固定、連続切片を作成し、ER α 染色および TUNEL 染色を施して、それぞれ陽性細胞を計数した。

2) 免疫

内分泌かく乱化学物質の免疫異常に及ぼす影響に関する研究

林 良夫

1) マウスおよび投与方法

NFS/sld マウスは舌下腺粘液細胞に分化異常をきたすミュータントマウスとして樹立され、当施設にて繁殖飼育されている。雌 NFS/sld マウスは PND3 の胸腺摘出を施すことにより 4 週目以降、涙腺・唾液腺に局限する自己免疫病変を発症しヒト・シェーグレン症候群類似の病態を呈する。

NFS/sld マウス PND1~3 に 2,3,7,8-Tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD) を 0.1、1.0、10.0、20.0 ng/head/day 腹腔内投与し、4 週後、8 週後に屠殺剖検し、体重、主要臓器を測定した。

2) 病理組織学的検索

全身諸臓器は 10%中性緩衝ホルマリン固定し、パラフィン包埋、薄切、HE 染色を施した。唾液腺における炎症性病変の組織学的評価は White らの分類に準じた。

3) フローサイトメトリー解析

胸腺および脾臓を摘出し、各種抗体 (CD4、CD8、B220、CD44、CD25、CD45RB、Mel-14; Pharmingen) と反応させた後に 3%パラホルムアルデヒドにて固定し、有機溶媒に浸染したのち細胞自動解析装置 (FACSCanto、BD) にて解析した。

内分泌かく乱化学物質の免疫系への影響評価

武吉 正博

EDCs が動物の免疫系に対する影響評価法として、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。

EE の 1、10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を妊娠 5 日から経母乳で離乳時まで経口投与した。

検査 ;

a) 母動物は、哺育状態を観察し、体重測定を行った。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。

b) 仔動物は、一般状態の観察及び体重測定を行っ

た。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。

LLNA ;

雌仔 12 週齢時に、Th1 または Th2 誘導抗原 (Trimelliticanhydride、TMA) を動物の両耳介に 3 日間連続塗布し、最終感作の約 48 時間後に BrdU を腹腔内投与した後、その約 24 時間後に解剖し、耳介リンパ節を採取した。ELISA 法により採取したリンパ節における BrdU 取り込み量の測定を行った。

胸腺細胞の分化能解析 ;

a) CD4⁺CD8⁺細胞から CD4⁺CD8⁻細胞への分化

雄 PND21 の胸腺の細胞浮遊液を Ionomycinf (IM)、Phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) を添加して 20 時間培養した (Step A)。細胞を回収し、遠心、洗浄を行い、さらに 24 時間 CO₂ インキュベータで培養した (Step B)。

b) CD4⁺CD8⁻細胞から Th1 及び Th2 細胞への分化

Step B 後の細胞を回収し、recombinant mouse IL-2、4、12 を添加して 4 日間 CO₂ インキュベータで培養した (Step D)。

c) フローサイトメトリーによる表面抗原解析

離乳時 (胸腺採取直後の細胞浮遊液) 及び CD4⁺CD8⁻細胞への分化操作後 (Step B 後) の細胞それぞれについて、FITC 標識抗マウス CD4 抗体、PE 標識抗マウス CD8 抗体を加え、フローサイトメーターを用いて細胞の各蛍光強度を測定し、細胞表面の CD4 及び CD8 の発現状態を測定した。1 検体当たり 10⁴ 個の細胞を測定した。

d) 細胞内サイトカイン測定

Step D 後の細胞を回収し、フローサイトメーターを用いて細胞の各蛍光強度を測定し、細胞表面の CD4、細胞内サイトカインの IL-4 又は IL-10 及び IFN- γ の発現状態を測定した。細胞表面に CD4 の発現している細胞を 1 検体当たり 5000 個測定した。

3) 生殖器

内分泌かく乱化学物質の雄性生殖器発達及びその機能に及ぼす影響

長尾 哲二

EDCs の低用量暴露による生殖・発生毒学的変化を、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実験を行った。

①EDCs の外生殖器の形成過程に及ぼす影響について、マウス妊娠 15 日～17 日に連日、数種の EDCs および抗アンドロゲン剤のフルタミド(Flu)あるいはビシクロゾリン (Vcz) を強制的経口投与し、妊娠 18 日に帝王切開により胎児を摘出して、生殖突起から肛門までの距離(Ano-genital distance: AGD)を測定した。次いで抗アンドロゲン剤投与群の雌雄については、トルイジンブルー染色を行って、光学顕微鏡による観察を行った。また、一部の例について、透過型電子顕微鏡による観察を実施した。さらに、一部の胎児については細胞外マトリクス増生の有無を観察した。また、各群の一部の胎児については凍結し、クリオスタットで薄切した。各切片を ABC 法により Type IV Collagen (線維成分)、Fibronectin (接着分子) および Proteoglycan (非線維成分) の免疫染色を行った。なお、Fibronectin および Proteoglycan については現在、観察を実施中である。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) 量及び細胞外マトリクス量を定量した。

②先天性生殖器奇形(尿道下裂、停留精巣等)の誘発については、妊娠 3～20 日にジブチルフラレートを経口的に投与した。また、先天性生殖器奇形誘発に関する時期特異性については、Vcz を妊娠 12 日から 21 日の間、連続して強制的経口投与し、PND1 に観察した

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

吉田 緑

- 1) ラットおよびマウスを用いて EDCs の胎生期・新生児期暴露による遅発性影響検出系確立するため、DES を Donryu ラットに、1500、150、15、1.5、0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で、C57BL/6N マウスには、2、0.2、0.02 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ で生後 24 時間以内に単回皮下投与した。
- 2) 飼育管理方法の改善により C57BL/6N マウスの繁殖・哺育成績が良好となった。
- 3) 第一次卵胞数を減少させる busulfan を子宮癌好発系 Donryu ラットの胎生期暴露し、卵胞数減少が子宮内膜腺癌に及ぼす影響を検索した。

内分泌かく乱化学物質の生殖器系の老化に至る過程に対する影響

太田 亮

EDCs の新生児期暴露影響が、生殖器系のみならず、神経系や免疫系にも及ぶことを考慮し、さらに生殖器系の老化に至る過程に対する影響についても対応可能な試験として、一生涯試験のガイドライン案を作成した。以下に、プロトコールの概略を示す。

使用動物：Crj:CD-IGS ラット及び C57BL/6J マウス

群数：4 群 (生児出産雌として各群 10 腹以上)

飼料：固型 CE-2 (日本クレア)

飲料水：水道水 (秦野市水道局給水)

投与物質：DES

媒体：コーン油 (和光)

投与経路：強制経口

投与量：0 (コーン油)、0.05、0.5、5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$

投与量設定理由：子宮肥大試験において、子宮重量の増加を来たす 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を最高用量に設定し、子宮重量の増加が起こらない 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を中用量、0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を低用量に設定。

投与期間：生後 1 日～生後 5 日

観察項目；生存率、体重推移、性成熟 (陰開口、陰茎包皮分離)、性周期 (8 週齢から 2 週間毎に剖検まで)、交配 (12、23、34、45、56 週齢)、交尾率及び受胎率、産児数、行動試験 (24 及び 48 週齢)、剖検 (26、52 及び 104 週齢)、器官重量、精子検査 (26、52 週齢)、免疫学的検査 (26 週齢)、排卵検査 (52 週齢)、腫瘍発生率等を実施する。

〈内分泌かく乱性確定試験開発支援基礎研究〉

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

長村 義之

1. EDCs の周産期投与による、ラット乳腺発現系への影響の検討；ラット妊娠 12 日目～PND21 まで DES の 10、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、BPA の 25、250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を反復経口投与した。雌仔ラットが 7 週齢時に 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を単回経口投与し、4 および 13 週間後に解剖して、乳腺を病理組織学的検査及び Whole Mount (WM) 標本による観察を実施し、更に Terminal End Bud (TEB) および導管を中心に乳腺上皮細胞の細胞増殖を Ki-67 の免疫組織学的染色により算出した。

2. EDCs による乳癌由来株化細胞への影響の検

討；乳癌由来の株化細胞のうち ER および HER2 発現の有無により区別される以下の細胞を用いて BPA 及び DES に対する用量反応性の確認を進めている。

MCF-7: ER (+)、HER2 (-)

MDA-MB-231: ER (-)、HER2 (-)

BT474: ER (+)、HER2 (+)

SK-BR-3: ER (-)、HER2 (+)

いずれの細胞も E-SCREEN Test に則り DES の 10^{-11} ~ 10^{-7} M 及び BPA の 10^{-9} ~ 10^{-5} M を添加して 6 日間培養し、MTT 法を用いて細胞増殖を観察した。

現在、MCF-7、BT474 及び SK-BR-3 を用いた細胞増殖アッセイまでが終了した。

確定試験に関わる各種核内受容体転写活性迅速確認系構築研究

西川 淳一

化学物質の核内受容体への作用を迅速に検出できるシステムを構築し、内分泌かく乱作用が疑われている化学物質について、多種類の核内受容体への影響を検討した。

核内受容体リガンド検出系 (CoA-BAP システム)

核内受容体のリガンド結合領域を GST との融合タンパク質として、大腸菌を用いて大量に発現させ、精製した。これを 96 穴ポリスチレンプレートに固定化し、ここに化学物質とともにコアクチベーターを加えた。もし、化学物質にアゴニスト様活性があれば、核内受容体の構造変化を誘起し、コアクチベーターが結合する。コアクチベーターは、あらかじめアルカリフォスファターゼと融合させてあるので、この酵素活性を指標に、化学物質のアゴニスト活性を評価した。

供試化合物

化合物はすべて DMSO に溶解後、終濃度 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M となるよう添加した。

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

高木 篤也

ES 細胞は *in vitro* で神経、心筋、血球等の細胞に分化誘導出来ることから、細胞分化の解析にもよく用いられている。それゆえ、EDCs の解析の難しい発生初期への影響を調べる試験系として有用であると思われる。

平成 17 年度は、ES 細胞及び EB の分化過程で変動する遺伝子の正常な発現パターンをマイクロアレイを用いて、経時的に解析を行った。

フィーダー細胞上で培養したマウス ES 細胞 (TT2) は、フィーダー細胞と LIF を除去し、最初の 2 日間は hanging drop 法で、次の 5 日間は浮遊培養法で、計 7 日間培養した。その間に形成される EB の培養開始 1~7 日目まで 0.5 日ごとの EB を採取してプールし、サンプルとした。

RNA はキアゲン社の RNeasy にて抽出し、アフィメトリクス社の GeneChip を用いて遺伝子発現解析を行った。また、その解析には定量的比較を正確に行うために、我々の開発した Percellome 手法 (細胞 1 個当たりの mRNA 絶対量を得る遺伝子発現解析手法) を用いた。

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

松島 裕子

EDCs 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し、本研究班に貢献する。

マウス雌について生後発達に伴う卵巣、子宮、視床下部、下垂体、膣の遺伝子発現値をアフィメトリクス社の GeneChip を用いて、経時的かつ網羅的に得、データベース化した。

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的解析

高木 篤也

本研究の目的は、EDCs 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。EDCs 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。

平成 17 年度は、昨年度開発に成功した神経幹細胞に対する影響を定量的に検討する系として、成熟胎児神経幹細胞の自己複製能に対する影響の定量系を用い、DES、BPA 及び Thyroid hormone の作用を検討した。

【内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究】

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

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

松島 裕子

本研究は、低用量 EDCs の齧歯類周産期暴露における雌性生殖器への遅発性影響を検討する試験系の開発を目的とする。

平成 17 年度は、1) 前年度に行った Newbold らの追試のデータを詳細に解析した。2) マウスの系を CD-1 から C57BL/6 に変えて、エストロゲンに対する反応を検証した。3) 飼料中の植物性エストロゲンが多卵性卵胞の発生に及ぼす影響について検討した。C57BL/6Crslc マウスを用いた予備試験において、対照群にも多くの動物に多卵性卵胞の発生がみられたため、雌雄 C57BL/6Crslc を購入し、入荷直後より交配→妊娠→出産→離乳期まで CRF1 あるいは PLD 飼料で飼育し、PND21 の雌性仔の卵巣を採取した。卵巣は、メタカーンで固定し、パラフィン包埋、連続切片を作製し、HE 染色を施し、病理組織学的検査を行った。

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

吉村 慎介

EE 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が、Hershberger 試験では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の遮断を目的に Tamoxifen (TAM) を併用投与した。

1) タモキシフェン (TAM) の Hershberger 試験；

Ctrl:CD (SD) 雄ラットを麻酔下で精巣および精巣上体を摘出し、10 日間 TAM を 1~100 mg/kg の用量で強制経口投与した。これと平行して 0.2 mg/kg のテストステロンプロピオネイト (TP) を毎日皮下投与した。さらに、陽性対照として 3 mg/kg のフルタミド (FLU) を強制経口投与後、TP を皮下投与する群を設けた。最終投与 24 時間後に、前立腺腹葉、精囊+凝固腺、肛門挙筋+球海綿体筋、陰茎亀頭、尿道球腺の重量をホルマリン溶液で固定後に測定した。

2) TAM 併用投与による EE の Hershberger 試験；

EE の Hershberger 試験の投与に先立ち、30 mg/kg の TAM を強制経口投与した。EE の投与量は 0、

10 及び 30 mg/kg とし、TAM を投与しない EE 投与群と比較した。TP は 0.2 mg/kg を皮下投与した。

3) TAM 併用投与による Norgestrel (NG) の Hershberger 試験；

TAM の 3 あるいは 30 mg/kg を経口投与後、NG の 0、30 および 100 mg/kg を経口投与し、TAM を投与しない NG 投与群と比較した。

4) TAM 併用投与による Methyltestosterone (MT) の Hershberger 試験；

TAM の 30 mg/kg を経口投与後、MT の 0、10 および 30 mg/kg を経口投与し、TAM を投与しない MT 投与群と比較した。

【OECD 対応試験実施・調査研究】

子宮肥大および Hershberger に関する試験

小野 宏

マウスの子宮肥大試験では、OECD バリデーションプロトコールに従い、エストロゲン活性を検出する試験系では、10~300 mg/kg/day の benzo[a]pyrene を単独投与した。抗エストロゲン活性を検出する試験系では、10~300 mg/kg/day の benzo[a]pyrene と 0.6 µg/kg/day の EE を併用投与した。投与期間は 7 日間とし、最終投与の 24 時間後に安楽致死させ、子宮重量を測定した。

マウスの Hershberger 試験では、精巣摘出した ICR マウスおよび C57BL/6J マウスにテストステロンプロピオネイト (TP) あるいはフルタミド (FLU) を投与し、マウスの TP あるいは FLU に対する感受性を調べた。アンドロゲン活性の試験系では 0.1~1 mg/kg/day の TP を単独皮下投与し、抗アンドロゲン活性の試験系では 0.3~10 mg/kg/day の FLU を経口投与し、同時に 0.2 mg/kg/day の TP を皮下投与した。投与期間は OECD のプロトコール案に従って 10 日間とした。最終投与の 24 時間後に頸椎脱臼により安楽致死させ、前立腺腹葉、精囊 (凝固腺を含む)、肛門挙筋・球海綿体筋、陰茎亀頭、尿道球腺および肝臓の重量を測定した。

OECD/WHO 関連等研究ハーモナイゼーション総括

井上 達

国内外の会議及び学会へ出席し、それらの専門家との意見交換及び情報収集を行い、得られた成果の研究発表、雑誌による報告を通して、最新の情報を紹介している。

平成 17 年度中に開催された経済協力開発機構

OECD と世界保健機構 WHO 関連の国際会議を中心に、そこで報告された資料を整理した。

反復投与毒性試験系 (TG407 を含む) への適用に関する調査研究

広瀬 明彦

平成 17 年度は、5th Meeting of the Validation Management Group for Mammalian Testing (4-5 April 2006) で検討される予定の Phase 2 validation をとりまとめたレポートについて、このプロジェクトで得られた成果の要点の整理と今後に向けた方策についての考察を行った。

国内外の子宮肥大試験に関するデータ整理とその問題点の把握及び解決策の検討

永井 賢司

子宮肥大試験については、これまで膨大な報告がなされているが、試験に用いる動物種、週齢、投与経路等、試験条件が様々である。しかし、OECD Validation Study で用いられた protocol はこれらの報告等を詳細に検討して作成されており、過去に実施された試験データは OECD Validation Study の protocol に十分反映されていると考えられる。

平成 17 年度は、Peer Review Panel の報告で問題とされた中で、特に重要と考えられる点について検討を加えた。

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

山崎 寛治

国内で日本の各機関（食品薬品安全センター、日本バイオアッセイセンター、化学物質評価研究機構）で実施した phase3 の結果をまとめ本試験法の問題点を抽出した。日本でのデータについては学会発表、雑誌への公表を行った。また、OECD の動向について調査した。一方では、本試験法に関する文献調査を実施し、本試験の情報を収集した。

(倫理面への配慮)

下記のように、各施設による倫理規定に従い適切に動物実験がなされている。

星薬科大学は平成元年 1 1 月 2 2 日制定「星薬科大学動物実験指針」、さらに「星薬科大学動物センター使用規定 (平成 1 6 年 1 1 月 5 日施行)」

に従って動物に対する倫理面を十分に考慮してすべての実験を行った。

独立行政法人 産業医学総合研究所は、「独立行政法人産業医学総合研究所動物実験に関する指針」に従って実施された。

財団法人 食品農医薬品安全性評価センターは、財団法人 食品農医薬品安全性評価センターの「動物実験倫理委員会規定」、「実験動物の管理基準 (2003 年 4 月 1 日改正)」および「動物実験に関する指針 (2003 年 4 月版)」に従い実験した。

徳島大は、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として徳島大学実験動物委員会および国立医薬品食品衛生研究所において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。

財団法人 化学物質評価研究機構は、当機構実験倫理審査委員会の制定する実験倫理審査委員会規程 (平成 17 年 4 月制定) に従い、研究倫理委員会の厳格な審査、管理のもとに「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の使用及び保管等に関する基準」を遵守し適正に試験を実地した。

近畿大は、近畿大学理工学部「動物実験に関する指針」に準拠して行い、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。

佐々木研は、「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 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。

国立医薬品食品衛生研究所は、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験倫理委員会の制定する国立医薬品食品衛生研究所・動物実験に関する指針 (平成 9 年 7 月版) に従い実験を行っている。

その他各所属研究機関で定められた倫理規定を遵守して研究を遂行する。

C. 研究結果

各班員の研究結果の概要を以下に記載する。

総括補佐及び一生涯試験、OECD バリデーション 関連総括

(1) 齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目を調整する際の取り纏め、及び OECD 対応

(2) I (H16 初回試験) BPA を用いた Crl:CD(SD)IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験、及び II (確認試験) ラットを用いた BPA の子宮内・経乳汁暴露でみられた晩発影響についての再現性検討 (委託研究)

(3) OECD/EDTA/VMG-Mammalian
菅野 純

(1) 齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目を調整する際の取り纏め、及び OECD 対応

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

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

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

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

(2) I (H16 初回試験) BPA を用いた Crl:CD(SD)IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験、及び II (確認試験) ラットを用いた BPA の子宮内・経乳汁暴露でみられた晩発影響についての再現性検討 (委託研究：委託先：財団法人 化学物質評価研究機構)

詳細については、分担研究者 菅野 純の分担報告書を参照。

I (H16 初回試験)

(本報告内容のうち、病理組織検査結果を除く部分は H16 年度報告と重複するが一貫性を優先し総体を報告する)

【概要】 Bisphenol A (BPA) 0、0.005、0.05、40、400 mg/kg/day (陽性対照群として ethynyl estradiol (EE) 0.05 mg/kg 群を設定) を SD (IGS) ラットの妊娠6日から分娩後20日まで母ラットに経口投与し、BPA 低用量域及び高用量域暴露時の出生児における cleft phallus の誘導、生後4日目の肛門・生殖突起間距離の測定、生後21日目以降の膈開口の観察、生後35日目以降の陰茎亀頭型の観察、10週齢時の雌外性器の形態計測学的検査、13週齢時の生殖能力検査、10週齢及び7ヶ月齢時の器官重量測定、さらに3ヶ月齢から7ヶ月齢時における性周期観察を行った。その結果、いずれの BPA 投与群においても cleft phallus の出現はみられず、種々の検査においても異常はみられなかったが、性周期異常を示す動物数は、BPA 0.005 mg/kg 群では7ヶ月齢に、BPA 400 mg/kg 群では5ヶ月齢と7ヶ月齢において統計学的に有意に増加した。

母動物；

一般状態及び体重の推移

媒体対照群の1例 (No.3) が不妊であった。この他の母動物については、妊娠期間中、一般状態に異常はみられなかった。

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

哺育拒否及び哺育拒否動物の剖検所見

媒体対照群の1例 (No.5) は雄6匹、雌9匹 (うち雌1匹は死産) を分娩したが、生後2日目までに全腹児の死亡が確認された。剖検の結果、乳腺の発達不良及び胸腺の萎縮が認められた。

BPA 400 mg/kg 群の1例 (No.47) は雌雄各7匹を分娩したが、哺育拒否により生後3日目に雌雄各1匹、4日目までに全腹児の死亡が確認された。剖検所見にて、乳腺の発達不良、胸腺の萎縮、前胃の境界縁の隆起、及び盲腸の拡張が認められた。

その他の母動物には、分娩及び哺育に異常を認めなかった。

剖検所見

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

拡張が 8/9 例にみられた。

出生児；

性周期検査

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

EE 群では、3ヶ月齢時及び5ヶ月齢以降、有意な性周期異常を示した。

病理組織学的に、性周期異常に矛盾しない所見を得た。

II (確認試験)

H16 年度に実施した試験の確認試験として実施し、下記のような結果が得られた。現在、7ヶ月齢の性周期検査を実施中であり、12ヶ月齢まで継続して検査をする予定である。

妊娠期間中、母動物の一般状態、体重推移に異常はみられなかった。

分娩時及び哺育期間においては、下記に示すような異常が認められた。

① 母動物分娩後死亡；

分娩日の検査において、0.5 µg/kg 群の母動物 No.13 が妊娠 22 日目に分娩開始した。しかし、雄出生児 2 匹、雌出生児 6 匹を娩出後、死亡している事を確認した。出生児には外部異常は認められなかったが、胎盤が付着した状態であり哺育形跡は認められなかった。母動物の剖検では腺胃粘膜に陥凹と副腎の腫大が認められた。

5 µg/kg 群の母動物 No.23 が妊娠 22 日目に雄出生児 7 匹（うち死産 1 匹）、雌出生児 9 匹を娩出

した。分娩後、母動物の一般状態の悪化がみられ児の哺育を行わず、雄 3 匹、雌 5 匹が死亡した。分娩後 3 日に母動物も死亡したため、腹児をすべて殺処分した。母動物の乳腺の発達は不良であった。

② 母妊娠期死亡；

0.5 µg/kg 群の母動物 No.17 が妊娠 22 日目の分娩前に死亡しているのが確認された。剖検では、副腎の腫大に加えて肺及び気管に異常が認められた。

③ 哺育拒否；

0.5 µg/kg 群の母動物 No.19 が妊娠 22 日目に雄出生児 3 匹、雌出生児 9 匹を娩出したが、児の胎盤処理、哺育を行わず、分娩 2 日後に全腹児の死亡が確認された。母動物の乳腺の発達は不良であった。

0.5 µg/kg 群の母動物 No.20 が妊娠 22 日目に雄出生児 5 匹（うち死産 2 匹）、雌出生児 6 匹（うち死産 2 匹）、及び性別不明死産 2 匹を娩出した。分娩日から哺育状態が悪く、分娩日翌日に全腹児の死亡が確認された。母動物の乳腺の発達は不良であった。

5 µg/kg 群の母動物 No.27 が妊娠 22 日目に雄出生児 9 匹（うち死産 5 匹）、雌出生児 6 匹（うち死産 4 匹）を娩出した。児の胎盤処理、哺育を行わず、分娩後 4 日に全腹児の死亡が確認された。母動物の乳腺の発達は不良であった。

50 µg/kg 群の母動物 No.35 が妊娠 22 日目に雄出生児 11 匹（うち死産 1 匹）、雌出生児 7 匹を娩出した。児の胎盤処理、哺育を行わず、分娩後 4 日目に全腹児の死亡が確認された。母動物の乳腺の発達は不良であった。

④ 哺育不良

50 µg/kg 群の母動物 No.40 が妊娠 22 日目に雄出生時 10 匹（うち死産 4 匹）、雌出生児 8 匹（うち死産 1 匹）を娩出した。分娩後 2 日まで、哺育不良状態を示し、雄 4 匹、雌 3 匹が死亡したが、その後、雄 2 匹、雌 4 匹は正常に成長した。

⑤ 児死亡；

5 µg/kg 群の母動物 No.26 が妊娠 22 日目に雄出生児 6 匹、雌出生児 9 匹を娩出したが、分娩 4 日に雄 5 匹、雌 8 匹が死亡し 7 日に残り雄 1 匹、雌 1 匹の全腹児が死亡した。母動物の乳腺の発達は不良であった。

その他の母動物では、分娩時及び哺育期間中一般状態、哺育状態に異常はみられず、体重も媒体

対照群とほぼ同様な推移を示した。

出生児の性比が、統計学的に 0.5 µg/kg 群、雄の比率が媒体対照群との比較において有意な低値を示した。しかし、性比 1 : 1 からの偏倚としては有意ではなかった。

出産から離乳時までの総死亡児数は媒体対照群 9 匹、BPA0.5 µg/kg 群 27 匹、BPA5 µg/kg 群 30 匹、BPA50µg/kg 群 26 匹であり、すべての BPA 投与群において媒体対照群よりも有意に高い値を示した。

BPA50 µg/kg 群の保育不良の母動物 No.40 の児について誕生日 (0 日齢) の外表検査において、雄 1 例で右前肢の内出血、雌 1 例で頸部から腹部の出血がみられた。

哺育拒否・哺育不良を免れた児動物はすべて、哺育期間中、一般状態に異常はみられず、いずれの BPA 投与群においても媒体対照群とほぼ同様な体重推移を示した。

3 ヶ月齢時の性周期検査では、50 µg/kg 群の 1/30 例で persistent diestrus がみられた。その他の動物に、異常はみられなかった。

4 ヶ月齢時の性周期検査では、媒体対照群では異常周期を示す動物はみられなかった。0.5 µg/kg 群の 1/23 例で constant estrus、5 µg/kg 群の 2/22 例で constant diestrus がみられた。50 µg/kg 群では異常周期を示す動物はみられなかった。

5 ヶ月齢時の性周期検査では、媒体対照群の 1/31 例で persistent diestrus、2/31 例で constant diestrus、0.5 µg/kg 群の 1/23 例で persistent diestrus、1/23 例で constant diestrus、1/23 例で persistent estrus、5 µg/kg 群の 1/22 例で persistent diestrus、50 µg/kg 群の 1/30 例で persistent diestrus がみられた。

6 ヶ月齢時の性周期検査では、媒体対照群において異常性周期を示す個体はみられなかった。0.5 µg/kg 群の 1/23 例で persistent diestrus、1/23 例で constant estrus、5 µg/kg 群の 4/22 例で persistent diestrus、1/22 例で constant diestrus、1/22 例で persistent estrus、1/22 例で constant estrus、50 µg/kg 群の 3/30 例で constant estrus がみられた。

(3) EDTA/VMG-Mammalian

子宮肥大試験の次のテーマとして、「一生涯試験」に類する「確定試験」の国際協調下での開発を掲げる点について、US - EPA との調整に入った。

【内分泌かく乱性確定試験開発研究、一生涯試験等】

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

1) 神経・行動

BisphenolA をモデルとした妊娠期及び授乳期暴露による行動影響の評価とその機序解明

鈴木 勉

1. 初代培養アストロサイトおよび神経/グリア共培養細胞に極めて低用量の BPA を処置することにより、アストロサイトの形態変化が引き起こされ、さらには、dopamine 誘発 Ca²⁺ 応答の亢進が認められた。この様な BPA の処置によるアストロサイトの活性化は、estrogen 受容体拮抗薬である ICI182,780、estrogen 受容体作動薬/拮抗薬である tamoxifen、progesterone 受容体拮抗薬である mifepristone および androgen 受容体拮抗薬である flutamide をそれぞれ BPA と同時に処置しても何ら影響を受けなかった。さらに、E₂ の処置ではアストロサイトの形態変化は認められなかった。

2. BPA の胎児期慢性暴露による大脳皮質神経細胞の局在変化について検討したところ、通常では神経細胞が常在しない内層において、神経細胞のマーカーである TuJ1 の陽性細胞が認められた。一方、大脳皮質層形成における神経細胞の移動には放射状グリアが重要な役割を担っており、神経細胞は放射状グリアに沿う形で内層を経由し、皮質表層へ移動することが知られている。そこで次に、BPA の胎児期慢性暴露による放射状グリアの形態変化について検討した。その結果、control 群においては放射状グリアのマーカーである RC2 の陽性細胞が脳室層の脳室側に並んで存在し、表層へ長い線維を伸長させる形態を有するのに対し、BPA 胎児期慢性暴露動物においては、線維状構造の形態異常が認められた。

マウスのオペラント条件づけを用いた内分泌かく乱化学物質の神経系高次機能影響の評価

宮川 宗之

マウスを使用してタイムアウト付交替型混合スケジュールを用いた SCOB の測定を行い、タイムアウト時間を変化させて短期記憶の保持曲線の相当する Delay-Accuracy 曲線を求めるまでマウスを訓練することが可能なことを示した。今回の測定方法は標準的なプロトコールとして使用可能と考えられ、次年度に実施予定の BPA の影響評価のための測定手続きを確立した。しかし、陽性対照物質の候補として用いたメチマゾールについては、

明確な影響を示すことはできなかった。

内分泌かく乱化学物質の脳の性分化への影響に関する研究

今井 清

新生児期における性機能に関与する神経発達の経過を明らかにする目的で、ER α を免疫組織化学的に染色して経時的に観察した結果、ER α 陽性細胞は、雄に比較すると雌に多く特に内側視索前核から視床下部前腹側室周囲核にかけ多数観察された。雄ではPND 5でその数が最も多く、それ以降日齢が進むにつれて、急速に減少したが、雌では少なくともPND 10までは陽性細胞の減少は認められなかった。このことから視床下部前腹側室周囲核において雄より雌の容積が大きくなる要因の一つとして、雌ではこの部においてER α 陽性細胞が消失せずに長期間保持されていることに起因している可能性が示唆された。また、PND 1~5 EEを皮下投与した結果、雌雄ともに0.5 μ g/kg以上の投与量で内側視索前核のER α 陽性細胞数が増加し、増加の程度は雌においてより著明であった。

2) 免疫

内分泌かく乱化学物質の免疫異常に及ぼす影響に関する研究

林 良夫

PND 3の胸腺摘出(3d-Tx)を施すことにより成立するシェーグレン症候群疾患モデルNFS/sld雌雄マウスを用いて新生児期にEDCsとしてTCDDを投与した結果、投与後4週目からT細胞分画の異常が認められ、4週後および8週後に唾液腺、腎臓、肺、肝臓における炎症性病変の出現が認められた。

内分泌かく乱化学物質の免疫系への影響評価

武吉 正博

CBA/JNマウスにEEの1あるいは10 μ g/kg/dayを経胎盤・経母乳暴露した結果、出産数、妊娠期間、産仔数などの生殖毒性学的指標には影響はみられなかったが、出生仔をTh1誘導抗原(Dinitrochlorobenzene)及びTh2誘導抗原(Trimellitic anhydride)を用いて刺激を行ったところ、10 μ g/kg/day投与群の出生仔において、いずれの抗原に対しても初期応答性の亢進が認められた。また、離乳時の胸腺細胞をPhorbol 12-myristate 13-acetate及びionomycinで刺激した後の分化状

況を解析した結果、対照群と比較して10 μ g/kg/day投与群において、CD4/CD8(+/+)細胞の減少、CD4/CD8(-/-)細胞の増加がみられ、EEの経胎盤・経母乳暴露による胸腺細胞の分化能への影響が示唆された。

3) 生殖器

内分泌かく乱化学物質の雄性生殖器発達及びその機能に及ぼす影響

長尾 哲二

マウスを用いて胎生期暴露による肛門-生殖突起間距離(AGD)の変化、肛門-生殖突起周辺組織における細胞外マトリクス増生およびヒドロキシプロリン量の変化、ラットを用いて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観察し、それらの有用性を検討した結果、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ル酸エステルの胎生期暴露により胎生後期の胎児あるいは新生児に確認されたが、低用量BPA暴露ではみられなかった。EDCsに暴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。

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

吉田 緑

- 1) ラットおよびマウスを用いてEDCsの胎生期・新生児期暴露による遅発性影響検出系確立するため、DESをDonryuラットに、1500、150、15、1.5、0.15 μ g/kg体重の用量で、C57BL/6Nマウスには、2、0.2、0.02 μ g/mouseの用量で生後24時間以内に単回皮下投与した。その結果、ラットでは即時型androgenizationが1500 μ g/kg群で、遅発型影響が約30週齢までに150~1.5 μ g/kg群で観察されたが、0.15 μ g/kg群は対照群と同様の変化を示した。
- 2) 飼育管理方法の改善によりC57BL/6Nマウスの繁殖・哺育成績が良好となったが、マウスでは性周期観察を指標にした明らかな遅発型影響の発現は認められなかった。
- 3) 第一次卵胞数を減少させるbusulfanを子宮癌好発系Donryuラットの胎生期暴露し、卵胞数減少が子宮内膜腺癌に及ぼす影響を検索したところ、子宮内膜腺癌の発生が促進された。Busulfan投与により持続発情の出現が早期化を示し、E/P比が増加傾向を示した。

内分泌かく乱化学物質の生殖器系の老化に至る過程に対する影響

太田 亮

現在、投与開始から約1年が経過したが、これまでのところ上記のプロトコール案に沿って、試験は確実に遂行されている。現在までに得られている結果を以下に示す。

1. 体重推移

DES投与の影響を示唆する体重の変化は認められていない。

2. 性成熟

雌の膣開口時期を観察した結果、DES投与群で有意に短縮した。

雄の陰茎包皮分離時期については、有意差は認められなかった。

3. 性周期

0.5 µg/kg以上の投与群で、性周期の異常が見られた。

4. 交尾率および受胎率

雄については、交尾率および受胎率にDES投与の影響は認められなかった。

雌については、23週齢の交配で、0.5 µg/kg以上の投与群の受胎率が顕著に低下した。

5. 産児数

初回分娩においてはDES投与の影響は認められなかったが、2産目では、0.5 µg/kg投与群の群平均産児数が有意に減少した。

6. 行動試験

24週齢時にシャトルボックスを用いた条件回避学習試験を実施した結果、DESによる影響はみられなかった。

7. 精子検査および器官重量

DESによる影響はみられなかった。

8. 免疫学的検査

25週齢時にヒツジ赤血球 (SRBC) を雄動物に投与して、血中の抗SRBC-IgMおよび抗SRBC-IgGを測定した結果、全てのDES投与群において、免疫抑制を示唆する変化が認められた。

〈内分泌かく乱性確定試験開発支援基礎研究〉

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

長村 義之

EDCsの乳腺への影響を *in vivo* 系で検証するた

め、BPA及びDESを周産期に暴露し、乳腺発がんに及ぼす影響を精査した。その結果、EDCsの周産期投与によるラットDMBA乳腺発がんの腫瘍促進効果は認められなかった。また、DES高用量では誘発腫瘍に組織学的な差が認められたが、これはTEBから腺房に腫瘍の発生領域が変化したために起こりうる変化と考えられた。また、ヒト乳癌由来の株化細胞を用いてEDCsの評価を開始し、MCF-7でBPAの 10^{-7} M及び 10^{-5} Mに細胞増殖作用が認められた。

確定試験に関わる各種核内受容体転写活性迅速確認系構築研究

西川 淳一

核内受容体のリガンド依存的な転写活性化の分子機構に基づき、簡便に化学物質の核内受容体への作用を検出できるシステムを構築した。開発したシステムを用い、内分泌かく乱作用が疑われている化学物質について、多種類の核内受容体への影響を検討した結果、有機スズ化合物が低濃度でRXR (Retinoid X Receptor) 及びPPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) γ に作用することが明らかとなった。さらに詳細に有機スズ化合物のこれらの受容体への作用を解析した結果、有機スズ化合物のRXRとPPAR γ への結合様式は異なる事が明らかとなった。また、TPT (Triphenyltin) がコアクチベーター選択的なPPAR γ アゴニストである事も明らかにした。

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

高木 篤也

ES細胞及びEBの分化過程で発現する遺伝子を経時的にマイクロアレイにより解析した。

EDCsの作用と関連する核内受容体遺伝子は、ES細胞およびEBにおいて、それぞれ特有の発現パターンを示すことが明らかとなった。

EBの分化マーカー遺伝子として知られている内胚葉のマーカーAFP (alpha fetoprotein)、TT (transferrin)、心臓のマーカーであるNKX2.5、cardiac actin、中胚葉マーカーであるbrachyury BMP4、外胚葉のマーカーであるFGF5等について解析したところ、内胚葉のマーカーではEBの3日前後から、中胚葉マーカーについてはEBの2日後前後から、心筋のマーカーはEBの4日前後から、外胚葉マーカーはEBの分化開始直後から