

増加するが、やがて減少するなど、それぞれ個々の遺伝子に特異的な発現パターンが見られることを明らかにした。

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学的解析

松島 裕子

マウス雌について生後発達に伴う卵巣、子宮の遺伝子発現値を経時的かつ網羅的に得、データベース化した。その結果、卵巣機能に関わる遺伝子で ER β と同様の発現パターンを示すものが多いことが判明した。

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学的解析

高木 篤也

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化学物質の影響を定量的に検討する系を用い、BPA の胎児成熟神経幹細胞の自己複製能への影響を主に検討した結果、BPA が胎児成熟神経幹細胞に影響を及ぼすことを明らかにした。また、オリゴデンドロサイト分化誘導作用を有することが判明している Thyroid hormone を本試験系に作用させると、確かにニューロスフェア形成に影響することを確認した。

【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

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結果、子宮の絶対及び相対重量が PND1~5 (DES 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上) + PND18~20 (DES 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) で有意な減少がみられた。病理組織学的検査では、PND1~5 の DES 影響によると考えられる多卵性卵胞及び子宮腺の減少、PND1~5 と PND18~20 との複合効果によると考えられる子宮内膜 reserve cell hyperplasia がみられた。

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結果、C57BL/6 がこの試験系に使用可能であることが示

された。

3) 飼料中の植物性エストロゲンが多卵性卵胞の発生に少なからず関与していることが示された。

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) を併用投与したが、明らかな抗アンドロゲン作用は見られず、Norgestrel および Methyltestosterone による器官重量増加も、TAM 併用投与により抑制されなかった。

【OECD 対応試験実施・調査研究】

子宮肥大及び Hershberger 試験に関する研究

小野 宏

卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験により、benzo[a]pyrene のエストロゲン作用および抗エストロゲン作用を検討した。その結果、benzo[a]pyrene は、子宮肥大反応は見られなかったが、EE の子宮肥大反応を抑制した。

ICR マウスおよび C57BL/6J マウスを用いて、Hershberger 試験を実施した結果、アンドロゲン活性の試験系において、全ての臓器が、TP に反応した。一方、抗アンドロゲン活性の試験系では、FLU に反応した器官は、ICR は精囊と陰茎龟头のみ、C57BL/6J は全ての器官が反応した。

OECD/WHO 関連等研究ハーモナイゼーション総括

井上 達

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。

内分泌かく乱化学物質問題は、1) 化学物質がヒトを含む哺乳綱動物の内分泌系に影響を与える可能性への疑問 (メカニズム)、2) 動物実験で影響の見られない低用量での影響への疑問 (低用量特異性)、3) 実環境中での暴露実態への疑問 (暴露評価) が当初から投げかけられていた疑問であった。グローバル・アセスメントの編纂過程で 1500 件を超える報告を検討する中で明らかにな

ったことは、世界の事例の中では、これらのいずれかの条件が崩れた時に、ヒトを含む様々な生物に内分泌かく乱現象が現実起こっているという事実であった。そして、全ゲノム解読の終了とともに、ヒト以外の他の種に惹起され得る事象は、種を超えた危惧を持つべきであろうという生物学的蓋然性のもとに、EDCs 問題を既知の事象として、それらに対応した研究施策を図らなければならないであろう、という認識であった。

しかしながら、この認識は、未検討のまま論理が展開されており、臨界点暴露情報、開発途上国における暴露実態、相乗・相加効果の如何、などの基礎とともに、リスク評価の展望などがまったく検討から除外されている。平成17年、1年間の研究の進展を見ると、それらが少しずつ埋まってきたようである。

反復投与毒性試験系への適用に関する調査研究 広瀬 明彦

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検討した。

内分泌かく乱作用を検出できる有効なエンドポイントとして、以下の項目が enhanced TG-407 のガイドラインに取り入れられることとなった。

- 1) 雄生殖器 (精巣、精巣上体、前立腺腹葉、背腹葉、精嚢腺 (凝固線を含む)) の器官重量 (絶対値) および相対重量
- 2) 雌生殖器 (卵巣、子宮) の器官重量および相対重量
- 3) 下垂体の病理組織検査
- 4) 甲状腺の重量および病理組織学検査 (重量測定は採取時のアーティファクトによる影響が大きいため付加的な推奨)
- 5) 雌雄生殖器の病理組織学検査 (子宮頸部、膣、性周期における評価)
- 6) 雌雄の乳腺組織の病理組織学検査
- 7) もし被験物質が甲状腺毒性をもつあるいは病理所見において甲状腺への影響が観察された場合は、解剖時におけるサンプリング、分析法に関する問題が解決されていれば、保管してある血液を用いて T4 濃度および TSH 活性の検査を実施することが適切であろう。

各群の動物数を片性5匹から10匹に増やすかどうかは、さらなる検討が必要となる。特に感受性や検出力の強化は、試験全体の優先度といった背景の中で評価されなければならない。評価する化学物質の生産量の違いやヒトへの暴露レベルの違いも考慮されるべきである。最終的な決断には、技術の向上や上述したような雌生殖器官の性周期によるステージ分けといった可能性や訓練、技術の改良によって、現在のエンドポイントの検出力をあげるための代替法もまた考慮されるであろう。

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

Peer Review Report 報告で問題とされた中で特に重要と考えられる以下の5点について検討を加えた。

Negative control に関しては、最近実施された子宮肥大試験で陰性であった化合物を *in vitro* スクリーニング試験成績と比較し、報告例のあるものに関しては、生殖発生毒性試験成績について確認した。子宮肥大試験で陰性であった化合物は、ER への結合性および転写活性は認められないか、あっても非常に弱いものであった。また、生殖発生毒性試験において estrogen 様活性の良い指標となる膣開口の延長は認められなかったことから、子宮肥大試験における negative control となり得ると考えられた。代謝活性化される化合物に関しては、benzophenone を取り上げ、評価した。

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

Hershberger 試験ガイドライン化のための最終的な試験である Validation phase 3 試験を国内3機関 (食品薬品安全センター、日本バイオアッセイセンター、化学物質評価研究機構) で実施した。各機関のデータはすでに OECD に送付した。日本の結果としては、各機関における計測した器官の反応性に本質的な差はなく、再現性は良好であった。なお、ガイドライン化の貢献を目的として、日本で実施した phase 3 のデータを国際学会で発表し、雑誌への投稿を行った。また、各国で実施した phase 1 をまとめ、論文にする方向で進行している。

D. 考察

【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」を構築することを旨とした研究を強力に推し進めている。「試験スキーム」のスクリーニングに於いて形成された化学物質優先順位リストの上位化合物について実施される「確定試験」には、従来型の多世代試験が必ずしも最適でないことが内外の研究により示されてきた。このため、本研究では、既存の多世代試験法の改良のみに止まらず、一個体の受精、発生、発達、成熟、及び老化に渡る一生涯を標的とした有害性評価試験系「齧歯類一生涯試験」を構築することを旨としている。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」は試験開発研究及び支援基盤研究の2要素から成る。

神経・行動試験系においては、神経障害性に関して必ずしも明確な器質的障害は誘導されないことが想定されるため、本研究班では、高次行動異常を当面の焦点に、胎生期・新生児期暴露が認知機能、場面適応性や報酬効果に及ぼす影響の確認実験系の導入を進めている。免疫系に関しては、有害性指標として自己免疫疾患モデル（人に於いて性差が著しいことで知られるシェーグレン病のモデル）の改良、あるいはIV型免疫応答のモデルである Local Lymph Node Assay の改良形を用いて、化学物質による自己免疫及び獲得免疫機能の修飾の影響を当面の対象として解析している。内分泌系に関しては、生殖機能に関わる従来の指標に加えて、早発閉経等のモデルの一つとしての成熟後の機能異常の発生を中心とした解析をさらに推進している。

本研究により遅発性の性周期異常等の低用量域における誘導が示されたことから一生涯（発生、発達、成熟、老化）の全ての段階に於ける内分泌かく乱作用を考慮する必要が改めて示されたと考ええる。

懸念される毒性指標として、神経・行動、免疫毒性等、従来の多世代繁殖試験の指標に限定されない一連の指標を設定し、引き続き網羅的に確認しつつ、受容体原性毒性の立場を踏まえた試験スキームに則り、クロストーク問題、低用量問題等に的確に対応可能な体制を確立すべく、研究開発を更に進めている。

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、問題となる化合物が標的とし得る各種の核内受容体 AR、ER α/β 、GR、MR、RAR $\alpha/\beta/\gamma$ 、PR、PXR、RXR、TR α/β 、及びVDR系との相互作用を迅速に検討し確定試験の評価に対する迅速な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提供支援体制として、胚性幹細胞（ES細胞）の*in vitro*での多分化能に対する影響解析、即ち、神経、心筋、血球等の細胞への分化誘導能から、EDCsの解析の難しい発生初期に於ける影響に関する分子毒性学的基礎研究を支援的に実施している。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、一般的に多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、確定試験の殊に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している。

【内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究】（これは、OECDの Conceptual Frame Work Level 3~4 に対応する試験開発から成る）として、*in vivo* スクリーニング試験を着実に推し進め、より精度の高い化学物質優先順位リストの作成に貢献すると同時に、化学物質による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目指すものである。

【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。これまでの研究により、子宮肥大試験のガイドライン化について、5th Meeting of Validation Management Group for Mammalian Testing (VMG-Mammalian) (4-5 April 2006) (Washington DC, USA) に報告することとなった。

更に、Hershberger 試験及び反復投与毒性試験についても、内分泌かく乱性の試験評価に関する上で最終的に残されている問題点の解決をはかり包括的なガイドラインの開発に的確に貢献する。更にOECDなどで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る。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1) 論文発表

Shirota, M., Saito, Y., Imai, K., Horiuchi, S., Yoshimura, S., Sato, M., Nagao, T., Ono, H., Katoh, M.: Influence of di-(2-ethylhexyl) phthalate on fetal development by oral administration to pregnant rats. *Journal of Toxicological Sciences*, 30: 175-194 (2005)

小野 宏: OECD ガイドラインにおける動物福祉。環境変異原研究, 27: 133-137 (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)

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

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

2) 学会発表

Kuwagata, M., Ogawa, T., Muneoka, K.T., 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 発明の名称: 遺伝子の絶対発現量測定方法 (出願中)

発明者: 菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野敦、井上達、長尾 拓

出願日: 2003年9月9日

出願番号: 特願2003-317031

出願人: 菅野純、国立医薬品食品衛生研究所

2. 発明の名称: 高次元データを塊に分割する装置

発明者: 松本伸哉、菅野 純、相崎健一、迎亮

出願日: 2004年7月27日

出願番号: 特願2004-219285

出願人: 国立医薬品食品衛生研究所長

3. 発明の名称: 核内受容体リガンド検出剤、組換えタンパク質、発現用遺伝子、組換えベクター、形質転換体、核内受容体リガンド検出方法、及び、核内受容体リガンド検出キット

発明者: 西川淳一

出願番号: 特願2003-166686

出願人: 財団法人大阪産業振興機構

4. 発明の名称: 自己免疫疾患の予防・治療剤及びそのスクリーニング方法

発明者: 林 良夫

出願日: 平成15年4月28日

出願番号: 特願2003-123959

出願人: 林 良夫、興和株式会社

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

6. レポータープラスミド

(出願中)

発明者: 武吉 正博

出願日: 2001年9月11日

出願番号：特願2001-274877

出願人：財団法人化学物質評価研究機構

7. 化学物質の感作性強度の評価方法

(出願中)

発明者：武吉 正博

出願日：2004年8月6日

出願番号：特願2004-230151

出願人：財団法人化学物質評価研究機構

8. 被検化学物質の感作性強度の評価方法

(出願中)

発明者：武吉 正博

出願日：2003年9月25日

出願番号：特願2003-333984

出願人：財団法人化学物質評価研究機構

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

II. 分担研究報告書

1. 総括補佐及び一生涯試験、OECD バリデーション関連総括

（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）

分担研究者 菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 部長

研究要旨

従来の多世代繁殖毒性試験の限界を認識し、その改良を含む試験法開発を進めている。具体的には一生涯（発生、発達、成熟、老化）の全ての段階に於いて内分泌かく乱作用により懸念される毒性指標（神経・行動、免疫毒性等、高次生命系及びその成熟に対する障害に焦点を当てた、従来の多世代繁殖試験の指標に限定されない一連の指標）を網羅的に確認する「齧歯類一生涯試験法」の開発を行う。この詳細試験は、厚生労働省の内分泌かく乱化学物質・試験スキームに則り、内分泌かく乱性を検討する必要がある数十万種の対象化合物について、ホルモン活性に焦点を置いたスクリーニング手法の開発と確立と詳細試験に資する優先リストの作成を進めることと並行して実施するものである。また、国際的な協調の可能性についても検討を加える。この一環として平成 16 年度の結果を確認する目的で Bisphenol A (BPA) の低用量試験を実施した。

A. 研究目的

厚生労働省 EDCs の健康影響に関する検討会に於いて策定された試験スキーム（スクリーニング試験系及び詳細試験）に則り、ホルモン様生体影響を及ぼす化学物質と、その延長線上で生体障害性を発揮する化学物質（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確定試験法を開発する。

その一環として、未だ確立されていない低用量域の EDCs の生体影響を評価する検出指標、試験方法の 1 つの可能性として、EDCs のラット子宮内・経乳汁暴露によって誘導される雌出生児の遅発性の性周期異常に焦点を当て、これが低用量影響を検出する検査項目になり得るかを検討する。

B. 研究方法

EDCs による生体影響の検討は、従来、生殖毒性にその焦点が置かれてきた。しかし、低用量問題や遅発影響の検討が進むにつれ、EDCs の有害作用は、個体の発生、成長、成熟、老化に関わる広範なものであることが示唆されることとなった。

ホルモン様生体影響を及ぼす化学物質と、その延長線上で生体障害性を発揮する化学物質（内分泌か

く乱化学物質）のスクリーニング試験等による優先順位設定を経て、最終的にそれらの 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重点を置き、内分泌かく乱性確定試験開発詳細試験（確定試験）としての「齧歯類一生涯試験法」を提案した。

「試験スキーム」のスクリーニングに於いて形成された化学物質優先順位リストの上位化合物について実施される「確定試験」には、従来型の多世代試験が必ずしも最適でないことが内外の研究により示されてきたため、本申請班の前身となる第 2 期研究班において種々の調査研究を実施してきた。その結果、ここでは既存の多世代試験法の改良のみに止まらず、一個体の受精、発生、発達、成熟、及び老化に渡る一生涯を標的とした有害性評価試験系「齧歯類一生涯試験」を構築することを目指す。これは、経済開発協力機構（OECD）の Conceptual Frame Work Level 5 に対応し、「齧歯類一生涯試験」試験開発研究及び支援基盤研究の 2 要素から成る。

本分担研究者は、（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）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：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) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項

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の各項目について、各研究分担者等との調整を継続した。

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

母動物：

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

出生児：

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

哺育期間中を通して生存児数、死亡児数の検査を行った。

発育分化検査：

①生後 4 日齢に生存する全出生児について肛門・生殖突起間距離 (Anogenital distance; AGD) をデジタル式ノギス (Digimatic Caliper CD-15CP、株式会社ミットヨ、神奈川) を用いて 0.01 mm 単位で測定した。

②生存する雄離乳児全例について、35 日齢から陰茎亀頭型分類を実施した。

③生存する雌離乳児全例について、21 日齢から膣開口を観察した。

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

生殖能力検査群：

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

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

10 週齢解剖群：

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

後、放血致死し安楽死させた後、外性器の形態計測学的検査として尿道開口部スリット長、ファラス先端-尿道開口部距離、尿道開口部-膣開口部距離をデジタル式ノギスを用いて 0.01mm 単位で測定した。

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

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

性周期長期観察群：

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

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

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

7 ヶ月齢に達した児動物は 14 日間以上膣垢を採取し、性周期を観察し、休止期を呈する動物を CO₂+O₂ 麻酔下で腹部大動脈より採血し、その後、放血致死し安楽死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。なお、休止期を示さない場合には、連続する発情期あるいは連続する発所前期を呈する動物を解剖した。

児動物の雄については 7 ヶ月齢に達した動物を CO₂+O₂ 麻酔下で腹部大動脈より採血し、その後、放血し安楽致死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。

剖検時に脳、下垂体、甲状腺、肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上部、精嚢、腹葉前立腺、子宮及び卵巣

を採取し、湿重量を測定した。甲状腺、下垂体については 10%中性緩衝ホルマリン液で固定、約 24 時間後に重量測定を行った。なお、病理組織学的検査は雌の生殖器官を中心に実施した。

統計処理は、性周期、母動物 (F0) の出産率、出生児 (F1) の出生児性比、児動物の交尾率、受胎率及び授精率、その胎児 (F2) の生存胎児性比についてはカイ二乗検定 (ただし、いずれかの周辺度数が 10 以下なら Fisher の直接確率検定) で媒体対照群との間の有意差検定を行った。生殖能力検査で上記を除いた項目、体重、各性成熟検査、器官重量については Dunnett による多重比較検定を中心に行った。

II (確認試験)

H16 年度に実施した試験の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 Crl: CD (SD) IGS ラット(日本チャールス・リバー株式会社、日野飼育センター)雌 50 匹、雄 50 匹を購入した。5 日間の検疫、馴化期間終了後、健常である事が確認されたすべての雌と雄ラットを 1 対 1 で夕刻に交配用ケージに移し一晩同居させた。翌朝陰栓及び陰垢中の精子の存在をもって交尾が成立したものとみなし、その日を妊娠 0 日と定めた。交尾確認日ごとに確認順に各群に振り分けた。BPA (純度: >98%、関東化学株式会社、ロット番号: 012D222) の 0、0.5、5、50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 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。なお、媒体はオリーブオイルを使用した。投与量は最新の体重値を基に算出した。投与容量は 5 mL/kg とした。

一般状態を母動物の全例について、妊娠 0 日から哺育状態も含めて分娩後 21 日 (出生児の離乳日)まで毎日 1 回以上観察した。体重は妊娠 0、6、14、17 及び 20 日、分娩後 0、4、7、14 及び 21 日 (出生児の離乳日) に測定した。妊娠動物の全例を自然分娩させ、妊娠期間、出産数を求めた。分娩日を分娩 0 日とした。交尾が確認された全動物は分娩 21 日 (離乳日) にエーテル麻酔下で安楽致死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行い、子宮、卵巣の重量を測定した。子宮は切開して硫化アンモニウムに浸漬後着

床痕数を算出した。

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

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。

哺育期間中を通して生児数、死亡児数の検査を行った。

発育分化検査として、生存する雌離乳児全例について 21 日齢から陰開口を観察した。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。なお、陰茎亀頭型分類検査では、亀頭が U の型を呈した日を包皮分離完了日とした。

性周期の観察は、膣スメアを AM 9:00 から 11:00 の間に採取して実施した。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、ギムザ染色後に鏡検して発情前期、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、不定期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、発情前期に CO_2+O_2 麻酔下で放血し安楽致死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。性周期異常により発情前期を示さない動物は、発情期、発情後期あるいは休止期が継続している時期で解剖した。剖検時に脳、肝臓、

副腎、腎臓、甲状腺、下垂体、子宮、卵巣を測定した。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。

(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。

C. 研究結果

(1) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項

神経・行動に関しては、BPA 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・免疫・内分泌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 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：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)

母動物；

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

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ず、媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群、EE 群の妊娠動物数は9/10、10/10、10/10、

10/10、10/10、10/10 匹であった。

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

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

媒体対照群の1例 (No.5) は雄6匹、雌9匹 (うち雌1匹は死産) を分娩したが、生後2日目までに全腹児の死亡が確認された。この母動物は腹児のすべてが死亡した時点でエーテル麻酔下で放血し、安楽死させ剖検した。その結果、乳腺の発達不良及び胸腺の萎縮が認められた。

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

その他の母動物には、分娩及び哺育に異常を認めなかった。

剖検所見 (I-Table 10-1、I-Addendum 10-1)

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

出生児；

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

外表検査及び一般状態は、媒体対照群を含む何れの群にも異常はみられなかった。

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

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

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

出生から離乳までの体重は、媒体対照群に比し雌

雄 BPA 0.005 mg/kg 群で、出産 0 日目及び生後 4 日目に有意な高値がみられた。EE 群は、雄では生後 14 日目及び 21 日目に、雌では生後 14 日目に有意な低値がみられた。

児動物の雄では、生後 4 週齢から試験終了時 34 週齢 (7 ヶ月齢) までの体重は、媒体対照群に比し BPA 0.005 mg/kg 群で生後 4 週齢目に有意な高値が、15 週齢以降は有意な低値がみられた。BPA 0.05 mg/kg 群では生後 12 週齢以降有意な低値がみられた。BPA 40 mg/kg 群では、生後 14 週齢目、26 週齢目及び 28 週齢以降有意な低値がみられた。BPA 400 mg/kg 群では生後 6 週齢以降、EE 群では生後 4 週齢以降有意な低値がみられた。

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

発育分化検査；

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

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

②陰茎亀頭型分類 (I-Table 4-3、I-Addenda 4-7、4-8)

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

③膣開口検査 (I-Table 4-4、I-Addendum 4-9)

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

生殖能力検査群；

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

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

10 週齢解剖群；

雌外性器形態計測学的検査 (I-Table 6、I-Addendum 6)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

性周期長期観察群；

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

3 ヶ月齢時においては、媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 0/16、2/20、2/19、3/24、3/18 例が性周期異常を示した (媒体対照群では異常は認められなかった)。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。7 ヶ月齢時に estrus の異常を示した (persistent estrus または consistent estrus を示した) 例数は、媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群、および EE 群で各々1/16、8/19、2/19、3/24、7/17、10/22 であり、媒体対照群に対して BPA 0.005 群、BPA 400 群および EE 群で有意な増加を示した。

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

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

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

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

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

児動物の雌では、媒体対照群で子宮腔内に液貯留が 5/16 例にみられた。BPA 0.005 mg/kg 群で子宮に結節が 1/19 例、膣に結節が 1/19 例、脳室の拡張が 1/19 例にみられた。BPA 0.05 mg/kg 群では、子宮腔内に液貯留が 1/19 例、皮下に結節が 1/19 例、下垂体に暗赤色部 (dark reddish region) が 1/19 例にみられた。BPA 40 mg/kg 群では、子宮腔内に液貯留が 2/24 例、子宮に結節が 1/24 例、膣に結節が 1/24 例、下垂体の暗赤色部 (dark reddish region) が 1/24 例、腎盂拡張が 2/24 例、輸卵管嚢胞が 1/24 例にみられた。BPA 400 mg/kg 群では、子宮腔内に液貯留が 2/17 例、腎盂拡張 1/17 例、膀胱内結石 1/17 例、卵巣の出血が 1/17 例にみられた。EE 群では、Cleft phallus が 15/22 例、外生殖器腫脹が 2/22 例にみられた。

病理組織学的所見 (I-Table 11、I-Addendum 11)

児動物の雌の媒体対照群において、卵巣に異常がみられた動物は 8/16 例、うち黄体数の減少 6 例、閉鎖卵胞の増加が 8 例であった (重複あり)。子宮に異常のみられた動物は 4/16 例、うち腺上皮の扁平上皮化生 1 例、子宮内膜上皮の高円柱化 3 例であった。膣に異常がみられた動物は 7/16 例、うち膣上皮の過形成 5 例、粘液分泌が 5 例であった (重複あり)。下垂体に異常がみられた動物は 1/16 例で前葉のびまん性過形成を認めた。

BPA 0.005 mg/kg 群では、卵巣に異常がみられた動物は 12/19 例、うち黄体数の減少 10 例、閉鎖卵胞の増加 11 例、莖膜細胞種が 1 例であった (重複あり)。子宮に異常のみられた動物は 8/19 例、うち子宮腺の嚢胞 1 例、子宮内膜の乳頭状過形成 1 例、子宮腺上皮の高円柱化 1 例、子宮内膜上皮の高円柱化皮が 7 例であった (重複あり)。膣に異常がみられた動物は 10/19 例、うち膣上皮の過形成 9 例、膣上皮の粘液分泌が 1 例にみられた。下垂体に異常がみられた動物は 3/19 例、うち下垂体腺腫 1 例、前葉の局所性過形成が 2 例であった。

BPA 0.05 mg/kg 群では、卵巣に異常がみられた動物は 11/19 例、うち黄体数の減少 9 例、閉鎖卵胞の増加が 11 例であった (重複あり)。子宮に異常のみられた動物は 7/19 例、うち子宮腺上皮の高円柱化 1 例、子宮内膜上皮の高円柱化が 7 例であった (重複あり)。膣に異常がみられた動物は 10/19 例、うち膣上皮の過形成 6 例、膣上皮の粘液分泌が 6 例であった (重複あり)。下垂体に異常がみられた動物は 1/19 例で下垂体の出血がみられた。本群の 1 例 (No.593) にみられた皮下結節は乳腺の線維腺種で

あった。

BPA 40 mg/kg 群では、卵巣に異常がみられた動物は 13/24 例、うち黄体数の減少 11 例、閉鎖卵胞の増加が 13 例であった（重複あり）。剖検所見時の輸卵管嚢胞（No.668）1 例は組織学的には確認されなかった。子宮に異常のみられた動物は 9/24 例、うち子宮腺上皮の扁平上皮化生 2 例、子宮内膜上皮の高円柱化が 9 例であった（重複あり）。膣に異常がみられた動物は 12/24 例、うち膣上皮の過形成 9 例、膣上皮の粘液分泌 6 例、ポリープ 1 例、扁平上皮嚢胞が 1 例であった（重複あり）。下垂体に異常がみられた動物は 1/24 例で下垂体出血であった。BPA 400 mg/kg 群では、卵巣に異常がみられた動物は 11/17 例、うち黄体数の減少 9 例、出血 1 例、閉鎖卵胞の増加が 10 例であった（重複あり）。子宮に異常のみられた動物は 9/17 例、うち子宮腺上皮の扁平上皮化生 2 例、子宮腺上皮の高円柱化 3 例、子宮内膜上皮の高円柱化が 9 例であった（重複あり）。膣に異常がみられた動物は 9/17 例、うち膣上皮の過形成 8 例、膣上皮の粘液分泌が 3 例であった（重複あり）。下垂体は全例に異常はみられなかった。

EE 群では、卵巣に異常がみられた動物は 12/22 例、うち黄体数の減少 11 例、閉鎖卵胞の増加が 12 例であった（重複あり）。子宮に異常のみられた動物は 6/22 例、うち子宮の萎縮 1 例、子宮腺上皮の扁平上皮化生 2 例、子宮内膜上皮の高円柱化が 4 例であった（重複あり）。膣に異常がみられた動物は 19/22 例、うち膣上皮の過形成 10 例、粘液分泌が 14 例であった（重複あり）。下垂体に異常がみられた動物は 1/22 例で前葉のびまん性過形成であった。

途中死亡動物剖検所見 (I-Tables 10-4、10-5、11、I-Addenda 10-4、10-5、11)

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

児動物の雌では、媒体対照群 1 例（No.536）が 13 週齢目に死亡したが、剖検は実施しなかった。BPA 0.005 mg/kg 群の 1 例（No.562）において、5 ヶ月齢（25 週齢）時に左腹部の皮下に結節（φ30 mm）

があり切迫屠殺したところ、病理組織学的に乳腺の腺癌と診断された。BPA 400 mg/kg 群の 1 例（No.693）において、4 ヶ月齢時に左腹部の膨大がみられ切迫屠殺したところ、腎臓に結節（9.0 cm×6.0 cm×5.0 cm）、肺臓に結節（φ2~4 mm）がみられ、病理組織学的に腎芽細胞腫及びその肺転移と診断された。

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。

母動物の一般状態及び体重推移

(II-Figure 1、II-Table 1-1、II-Addendum 1-1)

媒体対照群、0.5、5、50 µg/kg 群の交尾確認動物数は、各々10、10、10、10匹であった。

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。

分娩及び哺育期間

(II-Tables 2-1、7-1、II-Addendum 2-1、7-1)

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 日目に雄出生児 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 日に残る雄 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。

出生児の外表、一般状態及び体重推移

(II-Figures 2、3、II-Tables 1-2、1-3、3-1、II-Addenda 1-2~1-4、3-1)

BPA50 µg/kg 群の保育不良の母動物 No.40 の児に

ついて出生日(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。

1 腹当りの児の数を調整する生後 4 日に、雌では、媒体対照群、BPA0.5、5 及び 50 µg/kg 群で各々 51、50、39 (1 匹は生後 7 日目に死亡) 及び 49 匹が生存しており、5、16、3 及び 3 匹を安楽殺に供し、生後 21 日に 46、34、35 及び 46 匹の離乳児を得て後の検査に使用した。雄では、生後 4 日に、媒体対照群、BPA0.5、5 及び 50 µg/kg 群で各々 81、38、53 (1 匹は生後 7 日目に死亡) 及び 64 匹が生存しており、47、24、32 及び 40 匹を安楽殺に供し 34、14、20 及び 24 匹の離乳児を得たが、後の検査には 19、12、14 及び 18 匹を使用した。

離乳以降、媒体対照群の雄 1 例が 33 日齢で死亡した。この動物の一般状態に異常はみられなかった。また、媒体対照群の雌 1 例が自発運動低下、呼吸数減少、体温低下、流涙、紅涙、鼻出血、糞量減少、摂餌不良、白濁尿、横臥位を伴い、323 日齢で死亡した。この他、異常はみられなかった。また、体重推移に異常はみられなかった。

発育分化検査 (臆開口及び陰茎亀頭型分類)

(II-Tables 4-1、4-2、II-Addenda 4-1、4-2)

臆開口検査において、媒体対照群、0.5、5、及び 50 µg/kg 群の平均臆開口日齢は各々 34.1 ± 2.2、33.2 ± 2.3、34.6 ± 2.1、34.3 ± 2.4、平均臆開口日の体重(g) は各々 131.8 ± 15.4、124.3 ± 16.5、139.2 ± 14.7、131.3 ± 21.3 であり、いずれの BPA 投与群においても媒体対照群との間に差はみられなかった。

陰茎亀頭型分類検査において、媒体対照群、0.5、5、50 µg/kg 群の平均包皮分離日齢は各々 40.5 ± 1.1、40.2 ± 1.3、40.7 ± 0.6、41.4 ± 1.6、平均包皮分離日の体重(g) は各々 222.0 ± 20.4、212.1 ± 22.8、224.4 ± 18.2、218.1 ± 19.2 であり、いずれの BPA 投与群においても媒体対照群との間に差はみられなかった。

雌出生児の性周期検査

(II-Tables 5-1、5-2、II-Addenda 5-1~5-5)

臆開口直後から開始した性周期検査では、異常周期を示す動物はみられなかった。

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。

器官重量

(II-Tables 6-1～6-2、II-Addenda 6-1～6-2)

① 母動物

卵巣、子宮重量に有意差は認められなかった。

② 出生児

3 ヶ月齢時の器官重量(雌のみ、媒体対照群 15 例、0.5 µg/kg 群 11 例、5 µg/kg 群 13 例、50 µg/kg 群 16 例)では、50 µg/kg 群で甲状腺の相対重量低値がみられた。

剖検

(II-Tables 7-1～7-2、II-Addenda 7-1～7-2)

① 母動物

離乳日に計画殺を実施したすべての母動物個体に異常は認められなかった。

0.5 µg/kg 群において、哺育拒否のため剖検に供した 2 例の動物では、2 例共に乳腺発達の不良、1 例に腎臓の退色が認められた。妊娠期及び分娩後に死亡した 2 例では、1 例に気管内に白色泡沫、肺の暗赤色化、水腫性変化及び肺断面に泡沫が観察され、1 例では腺胃粘膜に陥凹が認められた。また 2 例共に副腎の腫大が認められた。

5 µg/kg 群において、哺育拒否のため剖検に供した 2 例の動物では、2 例共に乳腺発達の不良が認められた。分娩後に死亡した 1 例では、腺胃粘膜に黒

色変色部 (Blackish region of mucosa) と副腎の腫大が認められた。

50 µg/kg 群において、哺育拒否のため剖検に供した 1 例の動物では、乳腺発達の不良、腎臓の退色及び脾臓の腫大が認められた。

② 出生児

3 ヶ月齢時の剖検 (雌のみ、媒体対照群 15 例、0.5 µg/kg 群 11 例、5 µg/kg 群 13 例、50 µg/kg 群 16 例) では、媒体対照群で腎盂拡張(1/15)及び子宮の結節(1/15)がみられた。0.5 及び 5 µg/kg 群で異常はみられなかった。50 µg/kg 群の 16 例中の 1 例に腎盂拡張による腎臓の腫大及び尿管の拡張が見られた。

33 日齢で死亡した媒体対照群の雄 1 例では、水頭症、腺胃の粘膜黒色部 (Blackish region of mucosa)、精巢の暗赤色化、脾臓の小型化がみられた。

(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。

D. 考察

(1) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項

神経障害性に関しては、必ずしも明確な器質的障害は誘導されないことが想定される。本研究班では、高次行動異常を当面の焦点に、胎生期・新生児期暴露が認知機能、場面適応性や報酬効果に及ぼす影響の確認実験系の導入を進める。免疫系に関しては、有害性指標として自己免疫疾患モデル (人に於いて性差が著しいことで知られるシェーグレン病のモデル)、あるいは IV 型免疫応答のモデルである Local Lymph Node Assay の改良形を用いて、化学物質による自己免疫及び獲得免疫機能の修飾の影響を当面の対象として解析する。内分泌系に関しては、生殖機能に関わる従来の指標に加えて、早発閉経等のモデルの一つとしての成熟後の機能異常の発生を中心とした解析をさらに推進する。本研究により、一生涯 (発生、発達、成熟、老化) の全ての段階に於ける内分泌かく乱作用を考慮する必要が改めて示されたと考える。

懸念される毒性指標として、神経・行動、免疫毒性等、従来の多世代繁殖試験の指標に限定されない一連の指標を設定し、引き続き網羅的に確認しつつ、受容体原性毒性の立場を踏まえた試験スキームに則り、クロストーク問題、低用量問題等に的確に対応可能な体制を確立すべく、研究開発を更に進める。

これをもって、内分泌かく乱性の試験評価に関する包括的なガイドラインの開発に的確に貢献する。

(2) 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: 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考察する)

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

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

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

BPA 0.005 mg/kg 群の児動物雌雄の体重が、出産時から離乳期まで有意に高値を示した。これは、胎

児数が少ない母動物の産児の体重が高値であったことによる。なお、上記母動物 No.16 及び No.17 の妊娠期間は 23 日であった。一般に齧歯類において胎児数が少ない場合には出産時期が遅れるため、産児の体重が増加することから、この結果は 4 母体において胎児数が減少したことによると考えられる。

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

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

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

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

なかった。なお、肉眼所見で EE の影響として Cleft phallus が 5/22 例に観察された。

既報の実験として、EE (0, 0.5, 5, 50 µg/kg/day) を SD(IGS)ラット妊娠 6 日から分娩後 20 日まで母ラットに経口投与し出生児への影響を調べた結果、EE 50 µg/kg 群において 10 週齢時の生殖能力検査では異常を示さないが、雌では外性器の形態異常 (cleft phallus)、pre-middle age である 6 ヶ月齢において性周期異常及び卵胞嚢胞等、ラットの生殖機能の老化過程においてみられる報告があり¹⁾、今回と同様の所見であった。ラットにおいて、通常 (2-3 ヶ月齢) の生殖能力検査で異常を示さないが、その後性周期の異常、無排卵状態に陥る病態は、delayed anovulation syndrome として、テストステロンの新生時期投与などによって引き起こされる事が知られており、生殖機能の老化が早期に現れる結果として生じる事が示唆されている。

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

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

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

(constant estrus)を示す動物が観察され、4 ヶ月齢時にはその性周期の回復がみられたが、その原因は不明であった。

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

性周期異常と卵巣重量及び病理組織学的検査との関連について検討した。即ち、性周期別に 1) normal cycle group、2) persistent estrus/constant estrus and persistent proestrous group、3) persistent diestrus/constant diestrus group、及び 4) irregular cycle group に分類し卵巣重量、卵巣の黄体数、閉鎖卵胞数との関連性をみた。結果を Table 8-3、Addendum 8-6 に示す。persistent estrus/constant estrus and persistent proestrous group の卵巣重量は、normal cycle group に比し有意に低値であり、顕著な黄体数の減少及び閉鎖卵胞の増加を伴っていた。一方、persistent diestrus /constant diestrus group 及び irregular cycle group の卵巣重量、黄体数及び閉鎖卵胞数は、normal cycle group と差はなかった。このことから、持続発情期を呈する動物では、血中の LH、プロゲステロンが変動している可能性が示唆された。

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

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

上述のごとく、BPA と EE との対比により、その作用には共通性があることから BPA によってみら

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

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

参考文献

- 1) Sawaki et al. In utero through lactational exposure to ethinyl estradiol induces cleft phallus and delayed ovarian dysfunction in the offspring. *Toxicol Sci*, 75, 402-11, 2003.
- 2) Sangvai et al. The effect of intrauterine diethylstilbestrol exposure on ovarian reserve screening. *Am J Obstet Gynecol*, 177, 568-572, 1997.
- 3) Nagel et al., The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity. *Proc Soc Exp Biol Med*, 217(3), 300-9, 1998.

II (確認試験)

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ため、試験終了後に考察を記載する。

E. 結論

これまでリスク評価のための試験法として考えられてきた多世代繁殖試験や、EPA によって提案されている *in utero* through lactational exposure 案には、遅発性の性機能異常を評価するための観察項目は設定されていないが、EDCs 暴露においては長期間に亘る神経、免疫及び内分泌機能への影響に関する評価が必要である可能性が示唆される。引き続き、OECD 試験法ガイドライン化を視野に入れた「齧歯類一生涯試験」に代表される試験法の開発、

バリデーション、OECD で取り上げられている新たな内分泌かく乱性試験法の我が国としての評価を進展させる。

委託試験 I において、BPA の 0、0.005、0.05、40、400 mg/kg/day を SD(IGS)ラットの妊娠 6 日から分娩後 20 日まで母ラットに経口投与し、出生児への生殖関連事項への影響を中心に検討した結果、7 ヶ月齢時における性周期検査において、陽性対照群、高用量 BPA 群に加え、低用量 BPA 群においても pre-middle age における性周期異常が誘導されることが示され、現在委託試験 II において、その確認を行っている。6 ヶ月目の現段階で、BPA 投与による性周期異常発生は、その傾向が伺われるものの、有意な変化としては捉えられていない。今後、12 ヶ月まで観測して結果を考察する予定である。

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

G. 研究発表

1. 論文発表

Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S.

Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 3;103(1):224-9. Epub 2005 Dec 22.

Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Inoue T, Kanno J, Saga Y. Mesp1-nonexpressing cells contribute to the ventricular cardiac conduction system. *Dev Dyn*. 2006 Feb;235(2):395-402.

Takagi A, Sekita K, Saitoh M, Kanno J Acute, subchronic and chronic toxicity studies of a synthetic antioxidant, 2,2'-isobutylidenebis (4,6-dimethylphenol) in rats. *J Toxicol Sci*. 2005 Dec;30(4):275-85.

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

五十嵐勝秀、萱野 純：内分泌攪乱化学物質の神経幹細胞分化に及ぼす影響、生体統御システムと内分泌攪乱、シュープリンガー・フェアラー
ク東京 2005 年 p79-88

2. 学会発表

萱野 純、毒性メカニズム解析を目指した

“Percellome”トキシコゲノミクス、東京大学分子細胞生物学研究所セミナー、2005 年 4 月 12 日、東京

萱野 純、五十嵐勝秀、松島裕子、相崎健一、中津則之、トキシコゲノミクスからのアプローチ、第 15 回環境ホルモン学会講演会、2005 年 6 月 2 日、東京

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, “Per cell” mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR. Gordon Research Conference “Toxicogenomics”, Jun 5-10, 2005, NH, USA

萱野 純、神経幹細胞モデルに於けるエピジェネティック制御機構障害のPercellome トキシコゲノミクス研究、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1-3日、東京

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋 聡、萱野 純、飼料中植物性エストロジェンが内分泌かく乱候補化学物質による遺伝子発現変動に及ぼす影響の Percellome 手法を用いた解析、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1-3 日、東京

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津 則之、相賀裕美子、萱野 純 Gene expression profiling of a gene targeted mouse embryo using the “Percellome” system as a model for molecular developmental toxicity、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1-3 日、東京

小川幸男、関田清司、北嶋 聡、斉藤 実、松島裕子、山本雅也、児玉幸夫、井上達、萱野純、Toxicity study of Garcinia cambogia extract: Testicular toxicity of Hydroxycitric acid in mice、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1-3 日、東

京

中津則之、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、児玉幸夫、萱野 純、Ahr 作動性化学物質の初期遺伝子発現の Percellome 手法を用いた手法、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1-3 日、東京

萱野 純、WHO Children’s Program の概説と本邦での現状と取り組みについて、第 17 回神経行動毒性研究会、2005 年 8 月 5 日、東京

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi Kitajima, Yukio Kodama, Percellome and Mille-Feuille data system for toxicogenomics, 5th World Congress on Alternatives”, August 21-25, 2005, Berlin, Germany

Jun Kanno, Expression Profiling in Mechanistic Toxicology, 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics, August 30 - September 2, 2005, USA

Jun Kanno, Ken-Ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, “Percellome” mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR. 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics, August 30 - September 2, 2005, USA

中津則之、相崎健一、萱野 純、Diethylnitrosamine によるマウス肝遺伝子発現変動解析、第 64 回日本癌学会学術総会、2005 年 9 月 14-16 日、札幌

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋 聡、萱野 純、飼料中の植物エストロジェンがトランスクリプトームに及ぼす影響、環境ホルモン学会第 8 回研究発表会、2005 年 9 月 27-29 日、東京

萱野 純、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋 聡、五十嵐勝秀、雌性マウスにおける視床下部下垂体性腺系の性周期遺伝子発現の Percellome 解析、環境ホルモン学会第 8 回研究発表会、2005 年 9 月 27-29 日、東京

Jun Kanno, Approaches by Basic Biology to Reinforce

the Screening and Testing Strategy for the Endocrine Disruptors, KFDA/NITR International Symposium, Oct 11-12, 2005, Korea

なし

3. その他

国内特許申請中（特願 2003-317031、特願 2004-219285

菅野 純、ナノマテリアルの安全性確認に関する課題、三菱安全化学研究所講演会、2005 年 12 月 1 日、東京

Shinya Matsumoto, Kenichi Aisaki, Jun Kanno, Mass Distiributed Clustering : A New Clustering Algorithm for Repeated Measurements in Gene Expression Data, The 16th International Conference on Genome Informatics, Dec 19-21, Yokohama

中津則之、相崎健一、五十嵐勝秀、児玉幸夫、菅野 純、Diethylnitrosamine 及び N-ethyl-N-nitrosourea によるマウス肝遺伝子発現変動解析、第 28 回日本分子生物学会、2005 年 12 月 7-10 日、福岡

高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、菅野純、マウス口蓋形成過程に発現する遺伝子のマイクロアレイ解析、第 28 回日本分子生物学会、2005 年 12 月 7-10 日、福岡

北嶋 聡、Glenn I. Fishman、富田幸子、井上 達、菅野 純、相賀裕美子、転写因子 *Mesp1* 非発現細胞はマウス刺激伝導系細胞に寄与する、第 28 回日本分子生物学会、2005 年 12 月 7-10 日、福岡

安彦 行人、原口 清輝、高橋 雄、菅野 純、相賀 裕美子、Notch シグナルは Tbx6 依存的に *Mesp2* 発現を活性化する、第 28 回日本分子生物学会、2005 年 12 月 7-10 日、福岡

Shinya Matsumoto, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Mass Distiributed Clustering : A New Clustering Algorithm for Repeated Measurements in Gene Expression Data The 16th International Conference on Genome Informatics Dec 19-21, 2005, Yokohama,

H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録