

DES は 10^{-10} M, 10^{-11} M, BPA は 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, Thyroid hormone は T3, T4 を各々 30 ng/mL, 40ng/mL 用い、培養中に共存させた。細胞は神経幹細胞として成熟（刺激を受ければニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの神経系 3 系統の細胞全てに分化しうる）しているマウス胎生 14.5 日の胎児終脳から得た。この培養系では、1well 当たり 8000 個の生細胞を播種すると 100 個程度のニューロスフェアが形成される。このニューロスフェア数が安定して得られるよう各種条件を設定してある。今回の検討では、播種する細胞数を 3 段階振り、1well 当たり 4000 個、6000 個、8000 個の生細胞を用いた。

本試験系開発当初は 7 日間培養した後、顕微鏡下同定したニューロスフェアを直接計数していたが、各 well の写真を撮り記録に残すことで客観的な計数が出来るよう手順を変更した。

計数した結果を図 1, 図 2 に示す。図 1 は全ニューロスフェア数、図 2 は 100um 径を超えるニューロスフェア数のグラフである。BPA は 10^{-9} M, 10^{-10} M ではニューロスフェア数を増加させ、 10^{-11} M では減少させた。Thyroid hormone も有意差はつかなかったが、ニューロスフェア数を増加させる傾向を示した。

盛んに自己複製を繰り返す神経幹細胞は同じ培養期間でも径の大きなニューロスフェアを形成すると考えられる。そこで、100um 径を超えるニューロスフェア数を計数したところ、有意差はつかないものの、BPA- 9 M で数が増加する傾向を示し、 10^{-11} M では減少する傾向となった。また、Thyroid hormone

はかなり減少する傾向を示した。我々の検討で Thyroid hormone が神経幹細胞に対し、オリゴデンドロサイト分化誘導作用を示すことが判明している。よって、Thyroid hormone がニューロスフェアの数を増やす一方、径の大きなニューロスフェア形成を阻害したのは、Thyroid hormone が幹細胞の自己複製を阻害し分化を促進する過程で、結果的に前駆細胞の生存率を高め、同時にある程度の増殖を促進し、径の小さなニューロスフェア数を増加させたものと解釈出来る。

D. 考察

本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 の影響を検討し、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。

BPA の影響は画一的ではなく、高濃度では自己複製を促進し、低濃度では阻害する傾向を示した。この作用の重要性の程度、すなわち、胎児成熟神経幹細胞特異的な作用であるのか、神経幹細胞の成熟過程にも影響を及ぼすのかは本年度の検討だけでは不明である。そこで、胎児成熟神経幹細胞に対する作用の確定を目指すとともに、成熟過程への影響も検討する。また、分化能に対する影響も検討を加える必要がある。更には BPA 以外の EDCs についても作用の有無を検討する必要があると考えている。

E. 結論

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実験系を用いた解析で、BPA が影響を及ぼしうる可能性が指摘された。来年度はその作用を確定すべく詳細な解析を行う。さらに BPA 以外の物質についても検討を加え、影響が BPA 固有のものか他の物質でも起こりうるものか調べる必要がある。本試験系では胎児期の神経幹細胞に特化して調べているが、胎児期の化学物質暴露により大人になってからの神経幹細胞の性質に影響が及ぶのか、それによって行動異常のメカニズムを説明づけることができるのかについても、何か知見が得られるよう試験系を開発改良することも本研究の目的を踏まえると必要である。これらの検討を加えることにより、確定試験に関わる神経系形成・発達メカニズムに関する基盤となる知見を提供すべく研究を進める。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

書籍

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

雑誌

Takagi A, Sekita K, Saitoh M and Kanno J: Acute, subchronic and chronic toxicity studies of a synthetic antioxidant,

2,2'-isobutylidenebis(4,6-dimethyl phenol) in rat. The Journal of Toxicological Sciences, 30 (4) 275-285, 2005.

2. 学会発表

Effects of TCDD on mouse embryonic stem cells in culture. A. Takagi and J. KANNO. 45th Annual Meeting of Society of Toxicology, USA, 2006年3月

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、高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、菅野純、第 28 回日本分子生物学会、2005年12月、福岡

Attenuation of 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin-induced cleft palate by dimethyl sulfoxide.

Atsuya Takagi, Makoto Ema and Jun Kanno The 25th International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. Canada, 2005年8月

発生毒性解析のための無血清培地を用いたマウス ES 細胞培養系の検討、高木篤也、菅野純、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、東京、2005年6月

鈴木孝昌、Palanisamy Rajaguru、小原有弘、本間正充、林 真、高木篤也、菅野 純、「GeneChip による遺伝子発現解析を用いてアリストロキア酸による遺伝子傷害の臓器特異性を予測可能か Use of the gene

expression analysis by the GeneChip for a prediction of the target organs in Aristolochic acid-induced genotoxicity in mice.] 第63回日本癌学会学術総会、2004年9月29日～10月1日、福岡

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

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

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

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

H. 知的財産所有権の出願、登録状況
特になし

形成されたNS数

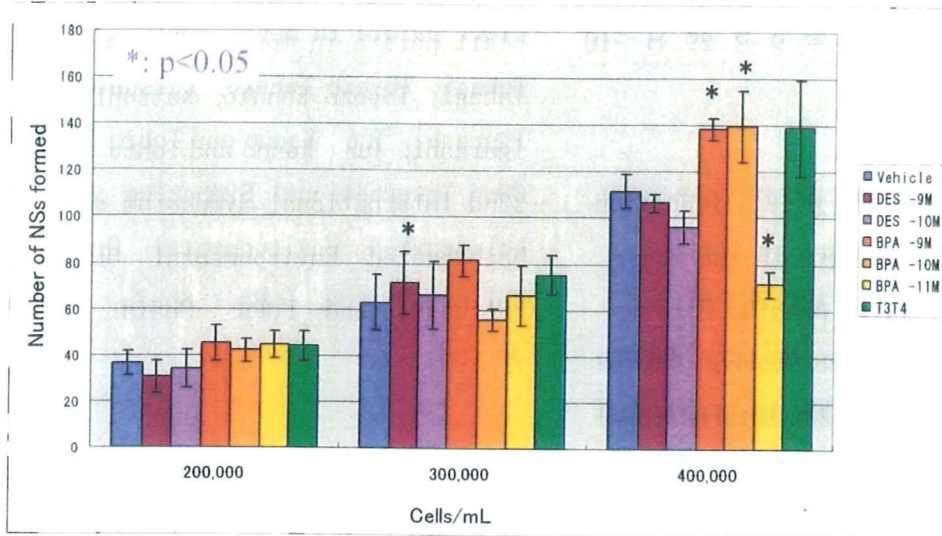
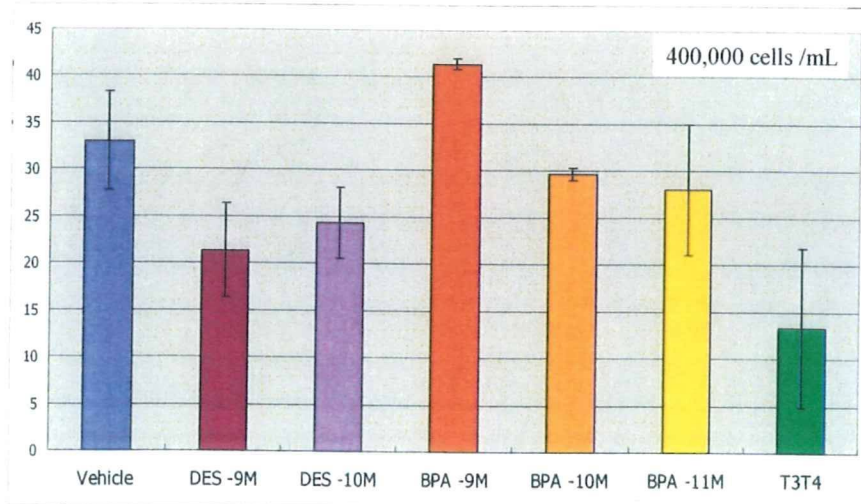


図1: DES, BPA, Thyroid hormone の
胎児成熟神経幹細胞自己複製能に対する影響検討
(全ニューロスフェア数)

100um径を超えるNS数



有意差はつかないが、BPA-9Mでは多く、T3T4では少ない傾向を示した

図2: DES, BPA, Thyroid hormone の
胎児成熟神経幹細胞自己複製能に対する影響検討
(100um 径を超えるニューロスフェア数)

【内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究】

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

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

分担研究者 松島 裕子

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 主任研究官

研究要旨 本研究は低用量暴露の遅発影響を検討する試験系の開発を目的とする。高杉らが、周産期のマウスへのエストロジェン処置が後に膣や子宮頸部の癌の発生を誘発することを見出し、ヒトの母親が妊娠初期に比較的大量の DES を摂取することに対して警鐘を鳴らした結果、それを受け止めた米国では DES daughter が発生しなかったことは有名である。母親が妊娠初期 3 ヶ月に比較的大量の DES に暴露された際に生まれてきた女兒の膣や子宮頸部に 20 歳前後で明細胞癌が発生するこの事象のモデルとして、周産期マウス暴露系が確立している。しかし、DES daughter が薬用量に於ける事象であることもあり、従来の周産期におけるエストロゲン様化学物質の影響を検討した実験の多くが、大量投与による明瞭な影響を対象としており、本班研究で要求される実際のヒトの生活環境から暴露可能な低用量域での研究は少ない。

周産期における比較的低用量暴露の影響を報告したものとして、Newbold らによるマウス生後 1~5 日間 DES 暴露が、離乳時子宮肥大反応に影響を与えた事例がある。今年度の研究として、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 (0.1 μ g/kg 以上) + PND18~20 (10 μ g/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。これらのことから、低用量の内分泌かく乱化学物質の試験には、飼料中の植物性エストロゲン、給水瓶やケージ、床敷きからの BPA 等の影響因子を出来るだけ排除することが望まれる。

A. 研究目的

本研究は低用量暴露の遅発影響を検討する試験系の開発を目的とする。比較的 low 用量暴露の影響を報告したものとして、Newbold らによる CD-1 マウス生後 1~5 日間 DES 暴露が、離乳時子宮肥大反応に影響を与えた事例がある。前年度は、この事例の確認のための追試を行いこれを検証した。これにより、外来性エストロゲンの新生児期投与の影響を、思春期エストロゲン投与により増幅するプロトコールの開発を試み、その際の卵巣、子宮、膣への影響を詳細に検討する方法論の確立を目指す。

今年度は、遺伝子改変マウスを用いることを念頭に置き、C57BL/6 マウスに切り替えるための検討をおこなう。更に、低用量問題のため、飼料中の植物性エストロゲンが試験系に及ぼす影響を検討する。

B. 研究方法

1) Newbold ら追試データの解析

前年度に実施した Newbold ら (Retha R Newbold, et al, Reproductive Toxicology 18 (2004) 399-406) の追試データを詳細に検討した。

動物は、妊娠 14 日目の CD-1 マウス (日本チャールスリバー (株)) を購入し、分娩後、雌性児を 8 匹/母 (1 用量につき雌性仔 24 匹/3 母) となるように無作為に群分けを行い保育させた。

PND1~5 の 5 日間 DES (CAS No. 56-53-1, sigma) の 0 (corn oil), 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μ g/kg を皮下投与した。最終投与 24 時間後 (PND21) に頸椎脱臼にて屠殺し、体重、子宮重量 (Wet 及び Blotted) を測定した。卵

巣、子宮、膣を中性ホルマリンで固定し、パラフィン包埋、HE 染色を施し、病理組織学的検査を行った。

2) C57BL/6 マウスのエストロゲンに対する子宮肥大反応の予備検討

動物は、妊娠 14 日目の C57BL/6Crslc マウス (日本エスエルシー (株)) を購入し、生後すぐに雌性仔を 1 群 4 匹に分け、保育させた。

PND1~5 の 5 日間 DES を 0 (corn oil), 1 あるいは 10 μ g/kg を皮下投与し、更に、PND18~20 の 3 日間 DES を 10 μ g/kg 皮下投与した。最終投与 24 時間後に頸椎脱臼にて屠殺し、体重、子宮重量 (Wet 及び Blotted) を測定した。

3) C57BL/6 マウスにおける CRF1 と PLD 飼料による多卵性卵胞の発生の比較

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、5 週齢の雌雄 C57BL/6Crslc (日本エスエルシー (株)) を購入し、入荷直後より交配までの 3 週間 CRF1 あるいは PLD 飼料で飼育した。更に交配後、プラグが確認された雌は妊娠期間及び授乳期間中引き続き CRF1 あるいは PLD 飼料を与えた。仔は雌雄併せて 8 匹/母となるように調整した。雌性仔は、PND21 に卵巣を採取し、メタカーンで固定し、パラフィン包埋した。ロータリーマイクロームにて連続切片を作製し、HE 染色を施し、病理組織学的検査を行った。

C. 研究結果

1) 追試データの解析

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

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

病理組織学的検査；

①**多卵性卵胞の発生**は、PND1~5 に DES を 0.001 μ g/kg 以上の投与により有意に増加した。

②**子宮内膜 reserve cell hyperplasia の発生**は、PND1~5 (1, 10 μ g/kg) +PND18~20 (10 μ g/kg) でみられた。

③**子宮腺の数の減少**は、PND1~5 に DES を 1 μ g/kg 以上の投与により減少した。

2) C57BL/6 マウスのエストロゲンに対する子宮肥大反応の予備検討

CD-1 マウスと同様に、PND1~5 に DES を投与した群では、離乳時の子宮肥大反応が減少した。

3) C57BL/6 マウスにおける CRF1 と PLD 飼料による多卵性卵胞の発生の比較

出生児の母親の体重は CRF1 が 27.5 ± 0.8 g、PLD が 27.0 ± 1.1 g で、ほぼ同じであった。

総出産数、雄性仔、雌性仔の数は、CRF1 が 8.7 ± 1.1 、 4.6 ± 1.0 、 4.0 ± 1.4 、PLD が 8.3 ± 1.4 、 4.3 ± 1.7 、 3.7 ± 1.5 であり、ほぼ同じであった。しかし、雄性仔及び雌性仔の平均体重は、CRF1 が 1.36 ± 0.12 、 1.32 ± 0.12 、PLD の方が $1.21 \pm 0.11^{**}$ 、 $1.14 \pm 0.11^{**}$ と、PLD の方

が有意に低値であった。

マウス個体当たりの多卵性卵胞の発生数は、CRF1(n=11)が 10.09 ± 4.6 個(3~16)、PLD (n=15) $6.07 \pm 3.3^*$ (0~13) と、PLD の方が有意に少ない発生数であった。

D. 考察

1) 子宮重量の減少は、Newbold らは PND1~5 (10 μ g/kg 以上) +PND17~19 (10 μ g/kg) の高用量群でのみ観察されると記載しているが、我々の実験では PND1~5 (0.1 μ g/kg 以上) の、より低用量の群からみられた。

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の増加及び子宮腺の減少、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 が確認された。周産期暴露に対し、もっとも高度な指標は多卵性卵胞の発生数であった。

2) エストロゲンに対する子宮の反応は性、CD-1 と C57BL/6 ともに同等であり、C57BL/6 がこの試験系に使用可能であることが示された。

3) CRF1 で飼育した CD-1 マウスの対照群にはみられなかった多卵性卵胞が、C57BL/6 マウスの対照群の全例にみられた。。

Newbold ら(Biol Reprod 2002)は、Genistein を PND1~5 の wildCD-1 と wildC57BL/6 マウスに投与した結果、C57BL/6 マウスの方が多卵性卵胞の発生が増加したと報告していることは、我々の実験と。一方、ER β KO マウスへの投与では、発生が顕著に減少したとの報告しており、その発生は ER β を介することが示唆された。これらのことから、

多卵性卵胞の発生には飼料中の植物性エストロゲン(Genistein、Genistin、Daizein、Daizin等)の影響が考えられたため PLD を交配以前より与える実験を行った結果、多卵性卵胞の発生は、CRF1(n=11)が 10.09 ± 4.6 個、PLD (n=15) $6.07 \pm 3.3^*$ と有意に発生が減少した。しかし、この発生が 0%とならないのは、飼料中のまだ不明のエストロゲンの存在、給水瓶やケージ、床敷きからの Bisphenol A 等のエストロゲンの影響が考えられるため、特に低用量の内分泌かく乱化学物質の試験にはこれらの影響因子を出来るだけ排除することが望まれる。

E. 結論

比較的低用量の DES の新生児期暴露が、性成熟過程の雌性生殖器のエストロゲン感受性に変化を及ぼすことに加え、器質的にも影響を及ぼすことが示されたことから、長期観察による機能障害や発がん事象の検出の可能性、投与経路の適正化、マウスの系統の変更 (C57BL/6) 等を検討することで、確定試験への対応が可能と成るものと期待される。

F. 健康危惧情報

無し

G. 研究発表

1) 論文発表

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

2) 学会発表

松島裕子、菅野 純；マウス周産期の低用量 DES 暴露が遅発性に雌性生殖器に及ぼす影響の検討、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会 (東京)、平成 16 年 6 月 (2005)

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、飼料中植物性エストロゲ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 (東京)、平成 16 年 6 月 (2005)

小川幸男、関田清司、北嶋 聡、松島裕子、山本雅也、斉藤 実、児玉幸夫、井上 達、菅野 純、ガルシニア抽出物の安全性に関する研究、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会 (東京)、平成 16 年 6 月 (2005)

菅野 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、環境ホルモン評価法の進歩と情報の蓄積、環境ホルモン学会第 15 回公演会、-平成 17 年 6 月 2 日 (2005)、

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

松島裕子、内田雄幸、斉藤 実、伊佐間 和郎、鹿庭正昭、井上 達、菅野 純、」ピレ

スロイド系殺虫剤の共力剤
2,3,3,3,2',3',3'3'-Octachlorodipropyl

ether (S-421)のラットを用いた急性毒性および28日間反復経口投与毒性試験、第41回全国衛生化学技術協議会年回平成16年11月、(2004)

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

Ⅱ. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

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

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

研究要旨 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作用も、TAM 併用投与により抑制されなかった。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1) TAM の Hershberger 試験

5 週齢で購入した Cr1:CD(SD) 雄ラットを 1 週間予備飼育後、麻酔下で精巣および精巣上体を摘出した。さらに 1 週間後から 10 日間、コーン油に溶解した TAM を 0 (陰性対照)、1、3、10、30 および 100 mg/kg の用量で毎日強制経口投与したのち 0.2 mg/kg のテストステロンプロピオネイト (TP) を毎日皮下投与した。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。毎日、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定を行い、10 日間の投与翌日に麻酔下放血屠殺して剖検し、前立腺腹葉、精囊+凝固腺、肛門挙筋+球海綿体筋、陰茎亀頭、尿道球腺の重量を 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリ

ン溶液で固定後に測定した。体重、摂餌量、器官重量については陰性対照群と各 TAM 投与群との間は多重比較を行い、陰性対照群と FLU 投与群との間には t-検定を実施した。

2) TAM 併用投与による EE の Hershberger 試験

EE の Hershberger 試験における毎日の投与に先立ち、30 mg/kg の TAM を強制経口投与した。EE の投与量は 0、10 および 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。陽性対照群は設けなかったが、TAM および EE を投与しない群 (溶媒を投与) を設け、その他は 1) の Hershberger 試験と同様の方法で実施した。

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

TAM の 3 および 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。TP は投与せず、その他は 1) の Hershberger 試験と同様の方法で実施した。

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。TP は投与せず、その他は 1) の Hershberger 試験と

同様の方法で実施した。

なお本研究は食品薬品安全センター秦野研究所「実験動物の管理基準」および「動物実験に関する指針」に従って実施した。

C. 研究結果

1) TAM の Hershberger 試験

(1) 一般状態観察、体重および摂餌量測定

一般状態に異常はなかったが、すべての TAM 投与群 (1 mg/kg 以上) の体重および摂餌量は陰性対照群より有意な低値を示し、100 mg/kg 群では第 7 週以降は体重が減少した。FLU 投与群に変化はなかった。

(2) 器官重量の測定 (Table 1-1, 1-2)

解剖時の体重は、すべての TAM 投与群で有意な低値を示した。前立腺腹葉は絶対重量および相対重量に有意な差はなかった。精囊+凝固腺の絶対重量は 1 mg/kg 群で、相対重量は 1、3 および 30 mg/kg 群で有意な高値を示した。肛門挙筋+球海綿体筋は、100 mg/kg 群で絶対重量の有意な低値を示したが、相対重量に有意な差はなかった。陰茎亀頭では絶対重量に有意な差はなかったが、相対重量は 100 mg/kg 群に有意な高値がみられた。尿道球腺では、100 mg/kg 群の絶対重量に有意な低値がみられたが、相対重量に有意な変化はなかった。FLU 投与群では測定したすべての器官で絶対および相対重量の有意な低値がみられた。

2) TAM 併用投与による EE の Hershberger 試験

(1) 一般状態観察、体重および摂餌量測定

一般状態に顕著な変化はなかった。体重は EE 投与により低値を示し、10 および 30 mg/kg 投与群で有意差を示した。TAM 併用群では、TAM 投与により体重増加抑制がみられ、EE 投与群では EE 0 mg/kg 群との間に有意な差は認められなかった。摂餌量についても同様であったが、TAM を併用した EE 30 mg/kg 群では EE 0 mg/kg 群より有意な低値がみられた。

(2) 器官重量の測定 (Table 2-1, 2-2)

解剖時の体重は、TAM を併用しない EE 10 および 30 mg/kg 群で有意な低値を示したが、TAM 併用群では有意差はみられなかった。前立腺腹葉では、EE 30 mg/kg 群の絶対重量に有意な低値がみられたが、TAM 併用群では絶対および相対重量に低下傾向がみられたものの、有意差は認められなかった。肛門挙筋+球海綿体筋でも EE 投与群に絶対重量の有意な低値がみられたが、TAM 併用群に有意な変化はなかった。精囊+凝固腺、陰茎亀頭および尿道球腺のいずれも EE 投与群の相対重量に有意な高値がみられたが、用量依存性はなく、絶対重量に有意差は認められなかった。TAM 併用群に有意な変化はなかった。

3) TAM 併用投与による NG の Hershberger 試験

(1) 一般状態観察、体重および摂餌量測定

一般状態に顕著な変化はなかった。TAM 投与により体重増加は抑制されたが、NG 投与による体重増加への影響はみられなかった。

(2) 器官重量の測定 (Table 3-1, 3-2)

NG 100 mg/kg 群では尿道球腺を除く各器官の絶対および相対重量が有意な高値を示し、30 mg/kg 群でも陰茎亀頭の絶対重量が有意な高値を示した。TAM 3 および 30 mg/kg の併用群でも同様の結果がみられ、その重量増加傾向は TAM により抑制されなかった。

4) TAM 併用投与による MT の Hershberger 試験

(1) 一般状態観察、体重および摂餌量測定

一般状態に顕著な変化はなかった。TAM 投与により体重増加は抑制された。MT 30 mg/kg 投与群では摂餌量の有意な高値を示す投与日があったが、MT 投与による体重増加への有意な影響はみられなかった。

(2) 器官重量の測定 (Table 4-1, 4-2)

MT 30 mg/kg 群では測定した各器官の絶

対および相対重量が有意な高値を示し、MT 10 mg/kg 群でも、精嚢+凝固腺、陰茎亀頭および尿道球腺が有意な高値を示した。TAM 30 mg/kg の併用投与でも MT 30 mg/kg 群の測定した各器官の絶対および相対重量に有意な高値があり、MT 10 mg/kg 群でも有意な高値がみられ、重量増加傾向は TAM により抑制されなかった。

D. 考察

TAM および TP の投与による Hershberger 試験で、精嚢+凝固腺重量が増加したが用量依存性はなく、TAM に抗アンドロゲン作用はみられないと判断される。試験 2)~4) の TAM のみを投与した群の試験結果からは、アンドロゲン作用も認められないと考えられる。

EE は *in vitro* の試験結果から抗アンドロゲン作用を示すことが予想され、器官重量の低下が期待されたが、EE のエストロゲン作用を遮断するために TAM を併用投与しても有意な低下は認められなかった。

NG および MT は *in vitro* でアンドロゲン受容体アゴニストであることが示されており、Hershberger 試験でもアンドロゲン作用が確認されたが、同時にエストロゲン作用を有している。TAM の併用投与により、エストロゲン作用が遮断され、器官重量の増加が軽減される可能性もあると推察されたが、試験 3) および 4) では、TAM の併用投与による影響はみられなかった。

以上のように、TAM の併用投与でも Hershberger 試験で EE に抗アンドロゲン作用はみられず、NG および MT による器官重量増加は抑制されなかった。しかし、TAM の投与によって体重増加抑制が認められることから、より高用量を設定するのは困難であると思われた。

E. 結論

EE の Hershberger 試験で抗アンドロゲン

作用はみられず、抗エストロゲン物質の TAM を併用投与しても結果はほぼ同様であった。また、NG および MT による器官重量増加は、TAM 併用投与により抑制されなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

雑誌

Yoshimura, S., Yamaguchi, H., Konno, K., Ohsawa, N., Noguchi, S., Chisaka, A.: Observation of preputial separation is a useful tool for evaluating endocrine active chemicals. *J. Toxicol. Pathol.* 18: 141-157 (2005)

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

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

無し

Table 1-1
Hershberger assay of tamoxifen in rats

Absolute organ weight

Group (mg/kg)	Final body weight (g)	Ventral prostate (mg)	Seminal v. & Coagulating gl. (mg)	Levator ani & BC muscle (mg)	Glans penis (mg)	Cowper's gl. (mg)
TAM 0 & TP 0.2 (Negative control)	293.7 ± 21.7 (6)	109.9 ± 17.0 (6)	250.2 ± 31.4 (6)	505.7 ± 23.1 (6)	65.4 ± 3.0 (6)	33.4 ± 4.0 (6)
TAM 1 & TP 0.2	257.6 ** ± 13.5 (6)	103.3 ± 26.3 (6)	333.1 * ± 49.3 (6)	487.3 ± 60.0 (6)	63.7 ± 1.9 (6)	28.8 ± 6.4 (6)
TAM 3 & TP 0.2	254.2 ** ± 18.1 (6)	116.4 ± 10.8 (6)	313.9 ± 70.0 (6)	463.6 ± 47.5 (6)	61.9 ± 3.2 (6)	30.1 ± 11.5 (6)
TAM 10 & TP 0.2	247.9 ** ± 10.6 (6)	94.3 ± 15.2 (6)	268.5 ± 41.5 (6)	465.9 ± 67.6 (6)	62.4 ± 3.9 (6)	28.1 ± 2.2 (6)
TAM 30 & TP 0.2	243.7 ** ± 15.3 (6)	97.1 ± 18.2 (6)	286.2 ± 36.7 (6)	442.4 ± 49.5 (6)	62.6 ± 3.1 (6)	28.0 ± 4.2 (6)
TAM 100 & TP 0.2	218.1 ** ± 11.5 (6)	86.4 ± 11.7 (6)	224.8 ± 34.0 (6)	359.7 ** ± 50.5 (6)	62.7 ± 3.2 (6)	21.3 ** ± 4.1 (6)
FLU 3 & TP 0.2 (Positive control)	284.3 ± 18.2 (6)	35.7 ## ± 6.7 (6)	46.0 ## ± 4.7 (6)	252.4 ## ± 26.5 (6)	46.7 ## ± 3.4 (6)	9.9 ## ± 2.1 (6)

BC muscle, bulbocavernous muscle

Value, Mean ± S.D.; (), Number of animals measured

*, **, Significantly different from negative control (*, p<0.05; **, p<0.01)

##, Significantly different from negative control (##, p<0.01)

Table 1-2
Hershberger assay of tamoxifen in rats

Relative organ weight

Group (mg/kg)	Final body weight (g)	Ventral prostate (mg/g)	Seminal v. & Coagulating gl. (mg/g)	Levator ani & BC muscle (mg/g)	Glans penis (mg/g)	Cowper's gl. (mg/g)
TAM 0 & TP 0.2 (Negative control)	293.7 ± 21.7 (6)	0.375 ± 0.059 (6)	0.856 ± 0.124 (6)	1.728 ± 0.120 (6)	0.224 ± 0.020 (6)	0.114 ± 0.011 (6)
TAM 1 & TP 0.2	257.6 ** ± 13.5 (6)	0.399 ± 0.087 (6)	1.289 ** ± 0.146 (6)	1.891 ± 0.192 (6)	0.248 ± 0.013 (6)	0.111 ± 0.020 (6)
TAM 3 & TP 0.2	254.2 ** ± 18.1 (6)	0.458 ± 0.038 (6)	1.234 ** ± 0.256 (6)	1.825 ± 0.148 (6)	0.245 ± 0.022 (6)	0.118 ± 0.041 (6)
TAM 10 & TP 0.2	247.9 ** ± 10.6 (6)	0.379 ± 0.047 (6)	1.080 ± 0.131 (6)	1.876 ± 0.239 (6)	0.252 ± 0.021 (6)	0.113 ± 0.010 (6)
TAM 30 & TP 0.2	243.7 ** ± 15.3 (6)	0.398 ± 0.065 (6)	1.177 * ± 0.164 (6)	1.815 ± 0.152 (6)	0.258 * ± 0.024 (6)	0.115 ± 0.019 (6)
TAM 100 & TP 0.2	218.1 ** ± 11.5 (6)	0.397 ± 0.061 (6)	1.035 ± 0.177 (6)	1.646 ± 0.177 (6)	0.288 ** ± 0.013 (6)	0.098 ± 0.022 (6)
FLU 3 & TP 0.2 (Positive control)	284.3 ± 18.2 (6)	0.125 ## ± 0.019 (6)	0.163 ## ± 0.022 (6)	0.893 ## ± 0.131 (6)	0.165 ## ± 0.021 (6)	0.035 ## ± 0.008 (6)

BC muscle, bulbocavernous muscle

Value, Mean ± S.D.; (), Number of animals measured

*, **, Significantly different from negative control (*, p<0.05; **, p<0.01)

##, Significantly different from negative control (##, p<0.01)

Table 2-1
Hershberger assay of ethynylestradiol in rats

Absolute organ weight (mg)

Group (mg/kg)	Final body weight (g)	Ventral prostate (mg)	Seminal v. & Coagulating gl. (mg)	Levator ani & BC muscle (mg)	Glans penis (mg)	Cowper's gl. (mg)
TAM 0 & EE 0 & TP 0.2	272.4 ± 18.3 (6)	99.1 ± 7.2 (6)	272.9 ± 20.8 (6)	477.0 ± 51.0 (6)	59.6 ± 3.6 (6)	23.4 ± 2.2 (6)
TAM 0 & EE 10 & TP 0.2	206.5 ** ± 17.0 (6)	87.4 ± 11.7 (6)	296.6 ± 46.4 (6)	377.2 ** ± 56.0 (6)	59.3 ± 2.6 (6)	31.0 ± 7.6 (6)
TAM 0 & EE 30 & TP 0.2	221.9 ** ± 15.5 (6)	78.6 ** ± 10.4 (6)	269.7 ± 29.3 (6)	377.3 ** ± 46.8 (6)	55.9 ± 4.0 (6)	24.5 ± 4.4 (6)
TAM 30 & EE 0 & TP 0.2	234.7 ± 16.0 (6)	101.0 ± 28.0 (6)	268.7 ± 56.9 (6)	415.4 ± 45.9 (6)	62.9 ± 4.2 (6)	29.0 ± 4.3 (6)
TAM 30 & EE 10 & TP 0.2	235.7 ± 7.3 (6)	92.3 ± 14.6 (6)	239.0 ± 43.9 (6)	414.1 ± 37.2 (6)	62.3 ± 5.4 (6)	27.3 ± 6.6 (6)
TAM 30 & EE 30 & TP 0.2	224.2 ± 18.3 (6)	73.2 ± 15.3 (6)	208.6 ± 67.8 (6)	366.7 ± 48.2 (6)	59.7 ± 3.1 (6)	22.9 ± 1.3 (6)

BC muscle, bulbocavernous muscle

Value, Mean ± S.D.; (), Number of animals measured

, Significantly different from EE 0 mg/kg group 1 (, p<0.01)

Table 2-2
Hershberger assay of ethynylestradiol in rats

Relative organ weight (mg/g)

Group (mg/kg)	Final body weight (g)	Ventral prostate (mg/g)	Seminal v. & Coagulating gl. (mg/g)	Levator ani & BC muscle (mg/g)	Glans penis (mg/g)	Cowper's gl. (mg/g)
TAM 0 & EE 0 & TP 0.2	272.4 ± 18.3 (6)	0.365 ± 0.039 (6)	1.007 ± 0.121 (6)	1.755 ± 0.202 (6)	0.220 ± 0.021 (6)	0.086 ± 0.011 (6)
TAM 0 & EE 10 & TP 0.2	206.5 ** ± 17.0 (6)	0.429 ± 0.088 (6)	1.445 ** ± 0.252 (6)	1.824 ± 0.210 (6)	0.289 ** ± 0.028 (6)	0.151 ** ± 0.038 (6)
TAM 0 & EE 30 & TP 0.2	221.9 ** ± 15.5 (6)	0.355 ± 0.045 (6)	1.221 ± 0.172 (6)	1.702 ± 0.200 (6)	0.252 * ± 0.010 (6)	0.110 * ± 0.013 (6)
TAM 30 & EE 0 & TP 0.2	234.7 ± 16.0 (6)	0.437 ± 0.151 (6)	1.156 ± 0.304 (6)	1.780 ± 0.274 (6)	0.268 ± 0.017 (6)	0.125 ± 0.026 (6)
TAM 30 & EE 10 & TP 0.2	235.7 ± 7.3 (6)	0.390 ± 0.054 (6)	1.015 ± 0.187 (6)	1.754 ± 0.111 (6)	0.264 ± 0.022 (6)	0.116 ± 0.026 (6)
TAM 30 & EE 30 & TP 0.2	224.2 ± 18.3 (6)	0.330 ± 0.080 (6)	0.927 ± 0.273 (6)	1.638 ± 0.195 (6)	0.268 ± 0.023 (6)	0.103 ± 0.011 (6)

BC muscle, bulbocavernous muscle

Value, Mean ± S.D.; (), Number of animals measured

*, **, Significantly different from EE 0 mg/kg group 1 (*<0.05; **, p<0.01)

Table 3-1
Hershberger assay of norgestrel in rats
Absolute organ weight (mg)

Group (mg/kg)	Final body weight (g)	Ventral prostate (mg)	Seminal v. & Coagulating gl. (mg)	Levator ani & BC muscle (mg)	Glans penis (mg)	Cowper's gl. (mg)
TAM 0 & NG 0	283.5 ± 10.3 (6)	20.9 ± 3.2 (6)	32.2 ± 7.7 (6)	201.8 ± 27.6 (6)	38.9 ± 1.5 (6)	9.1 ± 4.1 (6)
TAM 0 & NG 30	277.6 ± 5.0 (6)	37.0 ± 5.4 (6)	42.8 ± 6.8 (6)	236.1 ± 27.3 (6)	43.8 * ± 2.9 (6)	7.3 ± 1.2 (6)
TAM 0 & NG 100	274.2 ± 14.5 (6)	89.0 ** ± 35.5 (6)	153.7 ** ± 76.3 (6)	448.0 ** ± 106.4 (6)	53.2 ** ± 5.1 (6)	15.6 ± 6.0 (6)
TAM 3 & NG 0	248.3 ± 7.1 (6)	21.5 ± 4.7 (6)	33.7 ± 7.3 (6)	168.9 ± 26.1 (6)	37.7 ± 2.9 (6)	6.9 ± 1.9 (6)
TAM 3 & NG 30	254.6 ± 11.4 (6)	41.6 ** ± 10.3 (6)	53.1 ** ± 9.8 (6)	254.0 ** ± 49.7 (6)	45.5 * ± 5.6 (6)	9.9 * ± 2.3 (6)
TAM 30 & NG 0	239.3 ± 7.8 (6)	21.7 ± 2.4 (6)	34.8 ± 9.5 (6)	180.0 ± 10.5 (6)	41.0 ± 3.7 (6)	7.1 ± 1.0 (6)
TAM 30 & NG 30	244.7 ± 8.2 (6)	44.0 ± 13.9 (6)	47.1 ± 6.6 (6)	228.9 ± 81.4 (6)	43.6 ± 3.8 (6)	8.4 ± 2.5 (6)
TAM 30 & NG 100	239.3 ± 17.8 (6)	70.7 ** ± 8.9 (6)	181.4 ** ± 74.2 (6)	381.2 ** ± 97.6 (6)	57.4 ** ± 5.9 (6)	12.7 ** ± 2.9 (6)

BC muscle, bulbocavernosus muscle
Value, Mean ± S.D.; (), Number of animals measured
*, **, Significantly different from NG 0 mg/kg group 1 (*, p<0.05; **, p<0.01)

Table 3-2
Hershberger assay of norgestrel in rats
Relative organ weight (mg/g)

Group (mg/kg)	Final body weight (g)	Ventral prostate (mg/g)	Seminal v. & Coagulating gl. (mg/g)	Levator ani & BC muscle (mg/g)	Glans penis (mg/g)	Cowper's gl. (mg/g)
TAM 0 & NG 0	283.5 ± 10.3 (6)	0.074 ± 0.011 (6)	0.113 ± 0.024 (6)	0.712 ± 0.091 (6)	0.137 ± 0.006 (6)	0.032 ± 0.014 (6)
TAM 0 & NG 30	277.6 ± 5.0 (6)	0.133 ± 0.020 (6)	0.154 ± 0.026 (6)	0.850 ± 0.088 (6)	0.158 ± 0.010 (6)	0.026 ± 0.004 (6)
TAM 0 & NG 100	274.2 ± 14.5 (6)	0.327 ** ± 0.133 (6)	0.573 ** ± 0.311 (6)	1.651 ** ± 0.463 (6)	0.195 ** ± 0.024 (6)	0.057 ± 0.023 (6)
TAM 3 & NG 0	248.3 ± 7.1 (6)	0.086 ± 0.017 (6)	0.136 ± 0.029 (6)	0.679 ± 0.092 (6)	0.152 ± 0.011 (6)	0.028 ± 0.007 (6)
TAM 3 & NG 30	254.6 ± 11.4 (6)	0.163 ** ± 0.041 (6)	0.208 ** ± 0.031 (6)	0.997 ** ± 0.193 (6)	0.179 * ± 0.020 (6)	0.039 * ± 0.009 (6)
TAM 30 & NG 0	239.3 ± 7.8 (6)	0.091 ± 0.010 (6)	0.146 ± 0.044 (6)	0.753 ± 0.048 (6)	0.171 ± 0.016 (6)	0.030 ± 0.004 (6)
TAM 30 & NG 30	244.7 ± 8.2 (6)	0.180 ± 0.059 (6)	0.193 ± 0.030 (6)	0.936 ± 0.335 (6)	0.178 ± 0.015 (6)	0.035 ± 0.010 (6)
TAM 30 & NG 100	239.3 ± 17.8 (6)	0.296 ** ± 0.030 (6)	0.746 ** ± 0.248 (6)	1.584 ** ± 0.335 (6)	0.240 ** ± 0.019 (6)	0.053 ** ± 0.012 (6)

BC muscle, bulbocavernosus muscle
Value, Mean ± S.D.; (), Number of animals measured
*, **, Significantly different from NG 0 mg/kg group 1 (*, p<0.05; **, p<0.01)

Table 4-1
Hershberger assay of methyltestosteron in rats

Absolute organ weight (mg)

Group (mg/kg)	Final body weight (g)	Ventral prostate (mg)	Seminal v. & Coagulating gl. (mg)	Levator ani & BC muscle (mg)	Glans penis (mg)	Cowper's gl. (mg)
TAM 0 & MT 0	268.4 ± 9.7 (6)	21.2 ± 3.5 (6)	27.7 ± 4.5 (6)	184.5 ± 13.2 (6)	40.5 ± 1.9 (6)	6.9 ± 0.8 (6)
TAM 0 & MT 10	274.1 ± 7.2 (6)	52.3 ± 8.7 (6)	56.9 * ± 14.9 (6)	264.4 ± 52.0 (6)	50.8 ** ± 1.0 (6)	16.0 * ± 7.3 (6)
TAM 0 & MT 30	280.4 ± 9.6 (6)	86.9 ** ± 23.9 (6)	95.0 ** ± 33.7 (6)	396.3 ** ± 79.7 (6)	54.2 ** ± 3.3 (6)	17.1 ** ± 7.0 (6)
TAM 30 & MT 0	230.3 ± 9.5 (6)	19.3 ± 4.4 (6)	30.8 ± 2.3 (6)	178.9 ± 30.5 (6)	40.4 ± 2.5 (6)	6.8 ± 1.4 (6)
TAM 30 & MT 10	240.0 ± 11.4 (6)	59.4 ± 17.4 (6)	57.1 ± 11.6 (6)	268.8 ** ± 33.2 (6)	50.2 ** ± 3.6 (6)	13.9 ± 4.9 (6)
TAM 30 & MT 30	236.8 ± 5.2 (6)	91.9 ** ± 28.2 (6)	177.5 ** ± 95.7 (6)	380.9 ** ± 62.9 (6)	55.9 ** ± 6.1 (6)	22.4 ** ± 7.1 (6)

BC muscle, bulbocavernous muscle

Value, Mean ± S.D.; (), Number of animals measured

*, **, Significantly different from MT 0 mg/kg group 1 (*<0.05; **, p<0.01)

Table 4-2
Hershberger assay of methyltestosteron in rats

Relative organ weight (mg/g)

Group (mg/kg)	Final body weight (g)	Ventral prostate (mg/g)	Seminal v. & Coagulating gl. (mg/g)	Levator ani & BC muscle (mg/g)	Glans penis (mg/g)	Cowper's gl. (mg/g)
TAM 0 & MT 0	268.4 ± 9.7 (6)	0.079 ± 0.014 (6)	0.104 ± 0.019 (6)	0.689 ± 0.063 (6)	0.151 ± 0.007 (6)	0.026 ± 0.003 (6)
TAM 0 & MT 10	274.1 ± 7.2 (6)	0.191 ± 0.034 (6)	0.208 * ± 0.056 (6)	0.963 ± 0.176 (6)	0.185 ** ± 0.003 (6)	0.058 * ± 0.025 (6)
TAM 0 & MT 30	280.4 ± 9.6 (6)	0.309 ** ± 0.080 (6)	0.338 ** ± 0.115 (6)	1.410 ** ± 0.258 (6)	0.193 ** ± 0.010 (6)	0.061 * ± 0.024 (6)
TAM 30 & MT 0	230.3 ± 9.5 (6)	0.084 ± 0.020 (6)	0.134 ± 0.014 (6)	0.776 ± 0.129 (6)	0.176 ± 0.015 (6)	0.030 ± 0.007 (6)
TAM 30 & MT 10	240.0 ± 11.4 (6)	0.250 ± 0.077 (6)	0.238 ± 0.049 (6)	1.122 * ± 0.146 (6)	0.210 * ± 0.022 (6)	0.058 ± 0.021 (6)
TAM 30 & MT 30	236.8 ± 5.2 (6)	0.388 ** ± 0.118 (6)	0.752 ** ± 0.413 (6)	1.609 ** ± 0.275 (6)	0.236 ** ± 0.027 (6)	0.095 ** ± 0.031 (6)

BC muscle, bulbocavernous muscle

Value, Mean ± S.D.; (), Number of animals measured

*, **, Significantly different from MT 0 mg/kg group 1 (*<0.05; **, p<0.01)

【OECD 対応試験実施・調査研究】

17. 子宮肥大および Hershberger 試験に関する研究

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

研究要旨 OECD バリデーションプロトコールに従い、benzo[a]pyrene について、卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験を実施した。その結果、benzo[a]pyrene は、生体内において抗エストロゲン活性を示す可能性が示唆された。Hershberger 試験に関しては、ICR マウスおよび C57BL/6J マウスを用いて OECD バリデーション作業のフェーズ 1 に準拠した試験を実施した。その結果、マウスの Hershberger 試験はラットの試験に比べて感度が低いことが示唆された。

A. 研究目的

卵巣を摘出した C57BL/6J マウスに benzo[a]pyrene を経口あるいは皮下投与して、生体内においてエストロゲン活性あるいは抗エストロゲン活性を示すか否かを検討した。

Hershberger 試験に関しては、ICR マウスと C57BL/6J マウスを使って OECD バリデーション作業のフェーズ 1 に準拠した試験を実施し、マウスを用いる Hershberger 試験の問題点を調べた。

B. 研究方法

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、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。

C. 研究結果

Benzo[a]pyrene のマウス子宮肥大試験では、被験物質を単独投与したいずれの投与群においても、子宮肥大反応は認められなかった (Fig.1A)。一方、EE を併用投与した被験物質投与群においては、被験物質の用量に依存して EE の子宮肥大反応が抑制された (Fig.1B)。

ICR マウスを用いた Hershberger 試験では、アンドロゲン活性の試験系 (Fig.2) において全器官が TP に反応したが、前立腺の反応がやや弱かった。一方、抗アンドロゲン活性の試験系 (Fig.3) において FLU に反応した器官は、精

囊と陰茎亀頭のみであった。

C57BL/6J マウスを用いた Hershberger 試験では、アンドロゲン活性の試験系 (Fig.4) において全ての器官が TP に反応したが、前立腺の反応は他の器官に比べると弱かった。一方、抗アンドロゲン活性の試験系 (Fig.5) においても全ての器官が FLU に反応し、その中では尿道球腺が最も鋭敏に反応した。

D. 考察・結論

Benzo[a]pyrene についてマウス子宮肥大試験を実施した結果、被験物質を単独投与した群では、いずれの投与群においても子宮肥大反応は認められなかったことから、300 mg/kg/day までの benzo [a] pyrene は生体内においてエストロゲン活性を示さないと考えられる。しかしながら、EE を併用投与した被験物質投与群においては、被験物質の用量に依存して EE の子宮肥大反応が抑制されたことから、benzo [a] pyrene は生体内において抗エストロゲン活性を示す可能性が示唆された。

精巣摘出した ICR マウスおよび C57BL/6J マウスを用いて、TP に対する反応性を調べた結果、両系統とも前立腺の反応が悪く、精囊、肛門挙筋・球海綿体筋、亀頭および尿道球腺は比較的高い反応性を示した。しかしながら、これらの結果を以前実施した SD ラットの結果と比較すると、亀頭以外の器官は、SD ラットの感度がマウスよりも高いことが判った (Fig. 6)。

一方、FLU に対する反応性は、ICR マウスで特に低く、亀頭以外の器官は SD ラット > C57BL/6J マウス > ICR マウスの順で感度の差が認められた (Fig. 7)。これらの原因の一つには TP に対する反応性が低いことも影響していると考えられることから、マウスを用いて Hershberger 試験を実施する場合は、併用投与する TP の投与量をラットよりも高めに設定す

る必要があると考えられる。

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)

Kusakabe, H., Yamakage, K., Wakuri, S., Sasaki, K., Nakagawa, Y., Watanabe, M., Hayashi, M., Sofuni, T., Ono, H., Tanaka, N.: Relevance of chemical structure and cytotoxicity to the induction of chromosome aberrations based on the testing results of 98 high production volume industrial chemicals. *Mutation Research*, 517: 187-198 (2002)

Nagao, T., Saito, Y., Usuni, 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, KT, Ono,
H., Shioda, S.: Heterogenous sensitivity of the
embryonic system to the genotoxic agent
BrdU in mice. 44th Annual Meeting of the
Society of Toxicology, 2005 年 3 月 (New
Orleans)

小野 宏 : OECD ガイドラインにおける動物
福祉. 第 33 回日本環境変異原学会 -、第 18
回日本動物実験代替法学会合同大会. 2004
年 12 月 (長崎)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

Fig.1A

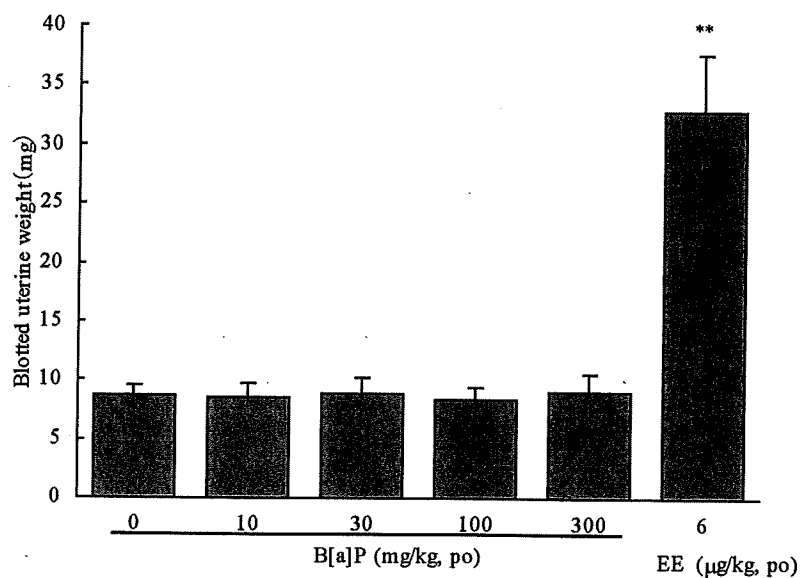


Fig.1B

