

20063800/A

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18年度 (2006)

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 19 (2007) 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18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19 (2007) 年3月

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的解析・	371
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・	377
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・	383
吉村 慎介	
【OECD 対応試験実施・調査研究】	
17. 子宮肥大試験及び Hershberger 試験・	395
小野 宏	
18. OECD/WHO 関連等研究ハーモナイゼーション総括・	403
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・	409
山崎 寛治	
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・	413
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・	421
山崎 寛治	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ・	425
IV. 研究成果の刊行物・別刷 ・	435

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

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 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、この研究に先立つ2期6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、その研究成果は、厚生労働省「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会、中間報告書追補」において提案された「試験スキーム」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貢献した。さらにそれを受けて、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。

本研究課題では、今までの研究を背景に、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押し進めた。本年度は、候補化学物質について実施される内分泌かく乱性には、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、動物一個体の受精、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 に対応している。神経・行動については、マウス胎生期・授乳期 Bisphenol A（BPA）低用量暴露によりドーパミン神経細胞が発達関連因子の発現異常に伴い発達異常をきたすこと、しかしながらスケジュール制御オペラント行動実験系では認知機能影響は認められないことを明らかにした。ラット周産期 DES、OP 暴露による脳の性分化への影響をエストロゲン受容体 α （ER α ）陽性細胞数を指標に検討した。免疫系では 2,3,7,8-tetra-chloro-dibenzo-p-dioxin（TCDD）周産期暴露がシューグレン症候群モデルマウスの T 細胞活性化の異常、サイトカイン産生の亢進、自己免疫病態を誘導すること、及びエチニルエストラジオール（EE）のマウス経胎盤・経母乳暴露が成獣期において抗原感作によるサイトカイン産生を亢進することが確認された。生殖器系では、雄はマウス胎生期ジエチルスチルベステロール（DES）暴露により精巣下降関連遺伝子発現が減少すること、雌はマウス周産期の BPA 及び DES の低用量暴露による早期閉経が観測されること、雌マウス周産期 DES 暴露により内分泌系臓器形成に影響がみられること、が確認された。支援研究では、EDCs は SXR を活性化し、NF κ B と相互作用し免疫系を抑制することを見出した。また、マイクロアレイ解析が本研究に貢献した。調査研究では、子宮肥大、Hershberger、及び TG407 試験に関するデータを取得、整理し、その OECD 等での問題点の解決策を提示した。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における
職名

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 健康障害予防研究グループ 上席研究員

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

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

鈴木 勉・星薬科大学 薬品毒性学教室 教授

林 良夫・徳島大学大学院 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

武吉 正博・財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 課長

長尾 哲二・近畿大学 理工学部 生命科学科 教授

吉田 緑・独立行政法人 放射線医学総合研究所 放射線安全研究センター 低線量プロジェクトチーム 研究員

太田 亮・財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所 遺伝毒性部 遺伝学研究室 室長

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

西川 淳一・大阪大学大学院 薬学研究科 助教授

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

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

吉村 慎介・財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所 試験部 部長

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

永井 賢司・株式会社 三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所 毒性第2研究部 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内分泌かく乱化学物質 (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、ホルモン作用を引き起こす化学物質と、内分泌かく乱作用を引き起こす化学物質の分界点を得るための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る。EPA 及び OECD 各国機関が緊急の必要性に迫られているのは、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。国内的には、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。今までの研究の結果、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一世代、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ころの立場に立って、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、従来の一世代、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」の開発を、必要に応じた新概念を導入しつつ推進すること、及び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技術の完成に伴い、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る。

これらを推進することにより、試験スキームの全貌を具体化することで、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 菅野 純

OECD-VMG mammalian、及び Non-Animal の両グループのメンバー、WHO/IPCS の Toxicogenomics And The Risk Assessment Of Chemicals For The Protection Of Human Health の運営委員として、厚生労働省・化学物質トキシコゲノミクス研究班の主任研究者として、また、厚生労働省 EDCs 「試験スキーム」の草案作成に関わった経験等により、本申請班の主任研究者を総合的に補佐すると共に、OECD-VMG 対応、遺伝子解析技術のスクリーニング段階及び確定試験段階に対する支援的導入の為の研究補佐を行う。

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、更に、実際の試験への応用の可能性を明らかにする為に、(2) 低用量 BPA あるいは DES をラット経胎盤・経母乳暴露し、雌性児動物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：財団法人 化学物質評価研究機構、財団法人 食品農医薬品安全性評価センター）。(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

○BPA 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) 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）

（本報告内容のうち、6ヶ月以前の部分はH17年度報告の試験IIと重複するが一貫性を優先し総体を改めて報告する）

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、出產生児数、出產生児性比、出產生児外表（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①3ヶ月齢剖検群（雌2匹）、②7ヶ月齢剖検群（雌2匹）、残りのすべてを③12ヶ月齢剖検群（雌2匹、雄2匹）の順に振り分け、匹数が少ない場合の優先順位は③、①、②とした。なお、児動物数の制限により0.5及び5µg/kg群については、7ヶ月齢の剖検は実施しなかった。性周期は①、②、③すべてについて解剖直前まで観測した。

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、膈スメアを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。

剖検時に脳、肝臓、副腎、腎臓、甲状腺、下垂体に加えて雌では子宮、卵巣を、雄では精巣、精巣上体、腹葉前立腺、精囊、肛門挙筋及び球海綿体筋を採取し、湿重量を測定した。

ラットを用いた Diethylstilbestrol の経胎盤・経

母乳暴露による低用量晩発影響の検討（委託研究：委託先：財団法人 食品農医薬品安全性評価センター）

本年度は、BPAと同様な晩発影響が陽性対照物質 Diethylstilbestrol (DES) の暴露によってもみられるかを確認する試験を実施する。受容体結合試験やその他の内分泌かく乱作用に関する情報から DES は BPA の約 2,500~5,000 倍の作用を持つと考えられる。従って、本試験では、20ng/kg/day を高用量とし、以下2及び0.2 ng/kg/day を中用量及び低用量に設定した。

10週齢の CrI: CD (SD) IGSBR ラット（日本チャールス・リバー株式会社）の雌雄を交配させ、DES の 0、0.2、2 及び 20ng/kg/day の用量、投与容量 5mL/kg を、各群 10、10、10 及び 10 匹の交尾が確認された雌に対して妊娠 6 日一分娩後 20 日（離乳前日）まで毎日強制経口投与する。

以下、BPA と同等の試験を行う。

(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

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

C57BL/6J マウスの胎児期・授乳期に BPA の 0.2 mg/g diet を混餌投与し、離乳後は通常飼料にて飼育した。また、BPA 暴露胎児脳を用いた検討では、胎生 14 日目の脳サンプルを採取した。

BPA の慢性暴露による dopamine 神経発達関連因子及び choline 作動神経系の遺伝子発現を RT-PCR により、形態を免疫組織学的に検討した。
RT-PCR 法

胎生 14 日齢及び 7~10 週齢のマウス全脳より total RNA を採取し、常法に従い Shh、GDNF、interleukin-1β (IL-1β)、bone morphogenetic protein 9 (BMP-9) mRNA の発現量を検討した。

免疫染色法

側坐核/腹側淡蒼球、腹側被蓋野及び海馬領域を含む凍結脳切片をそれぞれ作成し、tyrosine hydroxylase (TH)、DAT、glial fibrillary acidic protein (GFAP) 及び ChAT に対する特異的抗体を用いて免疫染色法に従い検討した。

行動評価

Choline 作動性神経発達に及ぼす影響として、不安感受性を明暗試験及び高架式十字迷路試験で、運動学習機能を rota-rod 試験で、記憶保持能力を step-through 試験にて検討した。

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響の評価

宮川 宗之

被験動物：交配済 9 週齢雌性 C57BL/6J マウス（日本クレア）70 匹を購入し、1 群 17~18 匹の 4 群に分け、GD 6 から PND22 まで BPA の混餌投与を行った。出生した仔マウスの成長後に行動測定に使用した。出生翌日（PND1）に同腹仔数を 8 匹に調整（可能な範囲で雄 4 匹・雌 4 匹、総出生仔数 8 匹未満の場合はそのまま）した。離乳時（PND22）に、原則として各腹から雄性仔 1 匹をランダムに選び、基礎飼料（オリエンタル酵母 MF）を与えて 12 週齢まで集団飼育（4~5 匹）した（事故等による欠落を考慮して 1 群あたり 14 匹を確保）。行動試験には、最終的に雄性仔を 1 群（各曝露濃度）当たり 12 匹（各腹から 1 匹、計 48 匹）を使用した。すなわち、12 週齢で行動試験に使用する個体を選び、食餌強化によるスケジュール制御オペラント行動（SCOB 行動）測定のため給餌制限と個別飼育を開始した。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が、昨年度までの結果に基づき、給餌制限開始前の体重の 85% 体重（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。給水瓶にはガラス製を使用した。

実験に用いたマウスは、すべて温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の清浄環境下で飼育され、行動測定も同様の環境の飼育施設内別室にて実施された。飼育にはポリカーボネート製ケージを使用した。

BPA 曝露：妊娠マウスを購入し、入荷後、母マウ

スを各群 17~18 匹の 4 群に分け、GD 6 ~PND22 まで BPA の混餌投与を行なった。市販の粉末飼料（オリエンタル酵母 MF）に BPA（和光純薬・測定用標準品・純度 99.6%）を、0 ppm、0.33 ppm、3.3 ppm、33 ppm の濃度で混入し、混入後に市販の固形飼料サイズに成形したものを、それぞれの群に与えた。なお、基礎飼料について BPA の含有濃度測定を実施したところ、0.032 ppm 含有しており、最低用量の約 1/10 であった。サンプル数が少なく参考値である。

SCOB 測定装置：マウスのスケジュール制御オペラント行動（SCOB）の測定には 8 台のマウス用オペラントチャンバー（MED Associates 製）を使用した。パーソナルコンピュータ用の行動実験プログラム作成システム（MED Associates 製）上で、一連の条件付け訓練に必要な（各種の SCOB に対応した）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。各オペラントチャンバー内部の前面パネル中央には、ペレットディスペンサー（粒餌提示装置）に接続された餌皿が設置され、その左右には反応レバーが 1 基ずつ備えられているが、今回は右側のレバーのみを使用した。餌皿と両反応レバーの上部には、cue light が 1 つずつ合計 3 個設置され、反対側の後面パネル上部中央には house light 1 基が設置された。各チャンバーを防音箱（MED Associates 製、換気ファン付でファンから実験中一定レベルのノイズを発生し外部騒音の影響を低減）内に置き、さらに外部からの騒音等を低減するため、全ての装置を動物舎内の専用室に設置して実験を行った。マウス用オペラントチャンバーは幅×奥行×高さが $160 \times 134 \times 127 \text{ mm}$ で cue light は黄色の LED 製、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。タイムアウト中以外のレバー押し反応には 2900 Hz の短音（“ピツ”という音：ピップ音）を随伴させた。

SCOB の測定手続き：食餌を報酬とした 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（給餌制限開始前の体重の 85% 体重）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。訓練は、1 日 1 セッションで週 5 日行い、実験終了まで継続した。SCOB の測定ではレバー

押し反応に随伴させて報酬となる粒餌を提示する(反応の強化)が、反応回数や反応間隔など一定の条件を設定し、その条件を満たした反応のみ強化を行う。この条件を強化スケジュールと呼ぶ。強化スケジュールを、1) 自動反応形成(auto-shaping)スケジュール(7セッション)、2) 定率強化(fixed rate: FR)スケジュール(FR2×2セッション、FR5×1セッション、FR10×10セッション)と順次変更して基礎的な訓練を実施し、その後、タイムアウト付交替型混合定率強化他反応分化強化(alternating mixed FR 10 DRO 10sec with TO)スケジュールを導入した。毎回のセッションは、あらかじめ規定した回数まで報酬が与えられるか規定の時間が経過することで終了とした(規定時間は自動反応形成訓練では60分、他はすべて50分に設定)。なお、報酬にはマウスでは20mgの粒餌(Bio-Serv社製オペラント条件付け用ペレット)を使用した。

一連のSCOB条件付け学習訓練の初めの段階となる自動反応形成スケジュールでは、セッション中、被験動物がレバーを押す反応を自発した場合には、“ピー”という報酬提示を予告する刺激音に引き続いて粒餌が餌皿上に一つ供された。セッション中100秒間反応が生じない場合は、レバー上部に設けられたcue lightが20秒間点滅し、その後予告音に続いて粒餌が与えられた。セッション中house lightは常時消灯とした。合計100回反応が生じるか100個の粒餌が提示された時点で、規定の時間経過をまたずにセッション終了とした。

定率強化スケジュールによるセッションでは、FR率にしたがって粒餌が与えられた。すなわち、FR2では2回の反応毎に、FR5では5回の反応毎に、FR10では10回の反応毎に、報酬が提示された。合計100個の粒餌が提示されるか、50分経過した時点でセッション終了とした。

タイムアウト付交替型混合スケジュールは、定率強化(FR)と他反応分化強化(Differential Reinforcement of Other Behavior: DRO)の2種類のコンポーネントスケジュールとタイムアウト(TO)を含む。このスケジュールでは、10回の反応完了時に報酬が与えられる定率強化(FR10)と10秒間無反応で待機することで報酬が与えられる他反応分化強化(DRO 10s)の2種類のコンポーネントスケジュールを、遅延時間となるタイムアウト(TO)を挟んで報酬提示(強化)毎に交替

させた。タイムアウトの長さであるが、訓練の第1段階(固定長タイムアウト条件・TO 8s)では、タイムアウト時間を8秒に固定し25セッションの訓練・測定を実施した。第2段階(上昇系列タイムアウト条件・TOA)では、4秒、8秒、12秒、16秒、20秒と、セッション内でタイムアウト時間を徐々に延長し、40セッションの訓練・測定を実施した。第3段階(上下系列タイムアウト条件・TOC)では、4秒から20秒の間で、タイムアウト時間をセッション内で上下させ、50セッションの訓練・測定を実施した。その後、薬理的負荷試験としてmethamphetamine、SKF38393、quinpirole投与による影響の測定を行った。

毎回の実験セッションでは、初めにFRコンポーネントがスタートし、左右の反応レバー及び餌皿上部のcue lightが点灯する。この状態で被験体が反応レバーを10回押すと、粒餌1粒が餌皿上に与えられる(報酬の提示・強化)。その後はタイムアウトとなって、cue lightは消灯し暗転する。規定の長さのタイムアウト後、DROコンポーネントとなり、左右の反応レバー及び餌皿上部のcue lightが再び点灯する。DROでは、10秒間無反応で経過すれば自動的に粒餌が与えられるが、反応があった場合にはタイマーがリセットされ、さらに10秒間の無反応が要求される。報酬提示後は再び暗転しタイムアウトとなる。タイムアウト終了後は、再びFRが始まる。なお、タイムアウト中に反応が生じた場合には、タイムアウト時間がリセットされ、規定長のタイムアウトがその時点から計り直されることとなる。タイムアウト中の反応にはピップ音を随伴させなかった。

このようにFRであるかDROであるかを示す弁別刺激が提示されない(どちらも同様にcue lightが点灯)ため、スケジュール制御オペラント条件づけの用語では混合スケジュールという分類となる。ただし、FRかDROを示す弁別刺激は提示されないものの、両スケジュールが強化毎に交代する(交替型)ので、どちらのコンポーネントスケジュールにしたがって前回報酬が与えられたかが手がかりとなり、これにしたがって被験体は適切な反応パターンを選択することが可能である。一種の遅延交替反応課題となり、遅延時間となるタイムアウト時間を変化させることで、短期記憶過程の測定に使用可能と考えられる。このスケジュールでは、FR-TO-DRO-TO-を1サイクルと

して合計51サイクル102回の報酬提示が行われるか、50分間経過した時点でセッションを終了した。

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曝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え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。すなわち、FRではコンポーネント開始から10秒以内に反応があれば「HIT」とし、なければ「MISS」としてカウントし、「HIT」となる確率（P [HIT]）を計算した。DROではコンポーネント開始から10秒経過する前に反応があった場合に「FA（false alarm）」とし、無反応で10秒経過すれば「CR（correct rejection）」とカウントして、「FA」となる確率（P [FA]）を計算した。その後、次式によって、「Accuracy」と「Bias」を求めた。

$$\text{Accuracy} = P [\text{HIT}] - P [\text{FA}]$$

$$\text{Bias} = P [\text{HIT}] + P [\text{FA}] - 1$$

両指標とも、-1から+1の範囲で変化する。両指標の計算は、被験体が反応を停止したり時間制限によりセッションが終了したりした場合以外は、各セッション最初の1サイクルを除き、原則として合計50サイクルの測定結果に基づいて行った。変動タイムアウト条件ではタイムアウト時間を5段階の長さで変化させたので、TO長毎に10回のFRとDROでの初発反応潜時が得られた。

ラットの場合もマウスの場合も、条件づけ訓練の進行によって、FRでは各タイムアウト終了後数秒以内に高頻度でレバーを押す反応を示すようになり、またDROでは殆どレバー押し反応を抑制し10秒間待機するようになり、それぞれ高率で「HIT」あるいは「CR」に分類される反応パターンが得られるようになることを、前年までの研究で明らかにしている。このAccuracyは、FRとDROそれぞれに適応したパターンで適切な反応が生じたかどうかを示すものとなる。セッション内でタイムアウト時間を変化させ、タイムアウト時間に

対してAccuracyをプロットすると、遅延時間（タイムアウト長）と反応切替えの正確さの関係を示す曲線（Delay-Accuracy Curve）が得られる。被験体には、タイムアウトを挟んで適切に反応パターンを交替させること、すなわち遅延時間後に前回と異なる反応パターンを選択することが求められており、遅延時間の間は前回FRであったかDROであったか（あるいは次にどちらの反応パターンを選択すれば良いか）を記憶しておくことが求められる。したがって、タイムアウト長に対してAccuracyをプロットした曲線は、一種の短期記憶の保持曲線と考えられるものとなる。一方、BiasはFRとDROを通じて、各タイムアウト終了後10秒以内にレバー押し反応が生じた割合に対応するもので、「反応性」の全般的な指標となり、反応の適切な制御・抑制に対する影響を評価するための指標となる。

薬理的負荷試験：タイムアウト付交替型混合スケジュール第3段階の訓練50セッション終了後、薬理的負荷試験を実施した。負荷薬物としては、ドーパミン系に作用する3種類の薬物、methamphetamine、quinpirole（D2アゴニスト）、SKF38393（D1アゴニスト）を使用した。負荷試験開始に先立ち生理食塩水投与（i.p.）を毎日のSCOB測定開始前に行ない、投与手技に順化させた後、週1回から2回の頻度で薬物負荷による測定を実施した。他の日は生理食塩水を投与した。投与はすべて腹腔内投与とし、行動測定開始の20～30分前に実施した。当該薬物に関する測定期間中、生理食塩水投与で得られた値の中から、各用量での薬物投与の直前（通常前日）に得られた測定値をベースラインとした。数回の生理食塩水投与で得られた測定値を個体毎に平均して各個体のベースラインとし、FR反応率とDRO反応率についてはベースラインに対するパーセント値を、またAccuracyとBiasについてはベースラインからの差の値を、それぞれ求めて、各薬物の量-影響曲線を描いた。

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

性ホルモン様物質を、ラット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。

Sprague - Dawley 系の妊娠ラット (CrjCD:SD) を購入し、自然分娩させて得られた新生児を、雌雄それぞれ 6 群に分け、雌雄ともに第 1 群は溶媒対照群として 10% の Dimethyl Sulfoxide (DMSO) を含むコーン油を、第 2 群及び第 3 群には、溶媒に溶解した DES を 0.1 あるいは 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の割合で、第 4 群及び第 5 群には同溶媒に溶解した OP を 50 あるいは 500 mg/kg の割合で生後 1 日 (分娩終了を確認した日を生後 0 日とした) から 5 日間 1 日 1 回皮下投与した。その後投与を中止して生後 6 日目 (投与終了翌日)、10 日目 (投与終了 5 日後)、21 日目 (投与終了 16 日後) に各群から原則として雌雄各 4 匹を選出し、体重を測定した、動物をエーテル麻酔下で安楽死させ剖検し、脳をホルマリンで固定し連続切片を作成し、ER α 染色を施して、前腹側室周囲核における ER α 陽性細胞の密度を観察した。更に、各群から雌の新生児 3 匹 (ただし OP 500 mg/kg 群では死亡例が認められたため 1 匹のみ) を選出して、離乳後も継続して飼育し膈開口を指標として性成熟までの日数を確認し、生後 7 週齢から性成熟後膈垢を採集して性周期の観察を行った。なお、参考として雌雄各 3 匹について同様の観察を行う無処置対照群を設定した (第 6 群)。

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

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 (3d-Tx) を施すことにより 4 週目以降、涙腺・唾液腺に限局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。

1. NFS/sld マウス妊娠 15 日に 2,3,7,8-Tetrachloro dibenzo-p-dioxin (TCDD, Cambridge Isotope Lab. Ins.) を 100、1000 ng/kg BW 腹腔内投与し、仔マウス 4 週後、8 週後に体重を測定し、屠殺剖検後、全身臓器を測定した。

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

各群における全てのマウスから胸腺及び脾臓を摘出し、ホモジナイズ、溶血、洗浄後各種抗体 (CD4、CD8、B220、CD44、CD25、CD45RB、CD62L; 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。

4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

実験マウスにおける末梢 T 細胞の interleukin (IL)-2、IL-4、IL-10、interferon (IFN)- γ など各種サイトカイン産生能の測定を実施した。TCDD 投与マウスの脾細胞を用い、磁気ビーズ (Dynal) と抗 B220 抗体、抗 CD11b 及び抗 CD11c 抗体 (eBiosciences) にて T 細胞を調整 (90% < CD3 陽性 T 細胞) した。96 穴培養プレートに抗 CD3 抗体 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 及び抗 CD28 抗体 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を固相化後、 1×10^5 個の T 細胞を 36 時間培養した。培養上清中の各種サイトカイン (IL-2、IL-4、IL-10、IFN γ) の濃度を ELISA にて定量化した。即ち、96 穴マイクロタイタープレートに各抗サイトカイン抗体を固相化後、1% 子牛血清アルブミン (BSA) でブロッキングし、希釈した培養上清 ($\times 5$) 及び標準サイトカインを加え反応させた。洗浄後、ビオチン標識各サイトカイン抗体を添加反応させ、ストレプトアビジン標識ホースラディッシュペルオキシダーゼを加えた後、基質として o-phenyldiamine を用い発色させ、マイクロプレートリーダー (BioRad) にて 490nm における吸光度を検出した。

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

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。

1. 交配

CBA/JN Crj (日本チャールスリバー株式会社)

を雄11週齢、雌7週齢で購入し、5日以上検疫を行った後、雄1匹、雌2匹を一晩同居させ交配させた。交尾確認はプラグが確認できた雌について交尾が成立したものとみなし、その日を妊娠0日とした。

2. 被験物質、投与期間および投与経路

Ethinyl estradiol (EE, Lot No. KSN3933、純度99.0%、和光純薬工業株式会社)を用い、媒体としてオリーブ油 (Lot No. 032OTM、株式会社フヂミ製作所)を用いた。

投与は妊娠5日からEE 1、10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を母動物に経口投与し、媒体対照群 (VC) としてオリーブ油を投与する群を設けた。各群の母動物数はVC群 35匹、1及び10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群は各50匹とし、投与は毎日午前中に、離乳日 (分娩21日)まで行った。

3. 離乳

仔動物は分娩後21日に離乳を行った。

4. 抗原感作—誘導後の所属リンパ節細胞のサイトカイン分泌様式の検討

感作：動物の側腹部をハサミで除毛し、媒体または各感作抗原を除毛した両側腹に50 μl ずつ投与した。感作処置は初回感作の5日後に再度、同様の処置を行った。

惹起：最終感作の5日後から同一の被験物質をマウスの両耳介の背側に25 μl ずつ3日間連続塗布を行った。

リンパ採材：動物から耳介リンパ節を採取した。

5. 細胞の調製とサイトカインの測定

採取したリンパ節をRPMIに分散後、 $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、24ウェルプレートに2mlずつ分注した。

細胞はIL-4についてはConA (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)添加条件下、IFN- γ とIL-10はConA非添加の条件でCO₂インキュベータ内で培養し、24h、72h、120h後に0.5mlずつ培養上清を採取し、測定時まで-20°Cで保存した。

各サイトカインの測定は市販ELISAキット (OptEIA ELISA kit, BD Biosciences)を用いて行った。

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・発生毒性学的変化を、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。

1) EDCsの外生殖器の形成過程に及ぼす影響を検討するため、ICRマウスの妊娠9日 (腔栓=妊娠0日) ~16日にDESの50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を反復皮下投与した。胎齢17日、18日、あるいは養母哺育により得られたPND1に精巣を摘出した。

次いで、精巣導帯の発生に関与するinsulin-like peptide 3 (*Ins3*)、精巣の発生・発達関連遺伝子である*SF-1*あるいは*P450*遺伝子の転写量解析を行った。すなわち精巣から抽出した全RNA中に含まれているこれら遺伝子のmRNAの相補的DNA (cDNA)を増幅合成し、アガロース電気泳動に供した。ハウスキーピング遺伝子として β アクチンmRNAについても同様に解析し、得られたそれぞれのcDNAに相当するバンドの濃さ (OD値)からそれぞれの遺伝子mRNA発現量の相対値を求めた。

2) 用量・反応関係を検討するため、DESの6.25~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重を妊娠9~16日に反復皮下注射し、胎齢18日に精巣を摘出して、同様に*Ins3*mRNAについて調べた。一部の胎児については、養母哺育して、生後7週に精巣下降の有無を確認するため剖検した。

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) ラットを用いたDES新生児期暴露による遅発型影響予測指標の検出 —Donryuラットを用いた遅発型影響の発現と子宮発がんとの関連性—

前年度と同様、DESを新生児期暴露の陽性対照とし、生後24時間以内のDonryu雌ラット新生児に0.001、0.01、0.1、1.0および10 $\mu\text{g}/\text{rat}$ (0.15、1.5、15、150および1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重に相当)を背部皮下に単回投与し、遅発型影響の発現の有無を観察した。DESは少量をdimethyl-sulphoxide

(DMSO)に溶解し、コーン油で希釈し指定濃度に調製した。投与液量は、25 μ l/rat になるよう調製した。陰性対照群には溶媒のみを投与した。

DES の投与量は、高用量 2 群が文献的に SD 系ラットにおいて視床下部・下垂体・性腺系を直ちに障害する即時型 androgenization と遅発型影響を誘発する量であると報告されていることから採用した。

子宮癌発生に対する影響を観察する目的で、10 週齢で N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG) 20 mg/kg を子宮腔内に経膈的に単回投与した。12 ヶ月齢 (0.15 および 1.5 μ g/kg 体重群は 9 ヶ月齢) で生存例を剖検し、子宮癌の発生頻度および発生病変数を病理形態学的に検索した。

2) 投与用量の DES のエストロゲン活性の確認

1) の実験で用いた DES 各投与量のエストロゲン活性を確認するために、正常性周期を示す 3 ヶ月齢の Donryu ラットの卵巣を摘出し、その 2 週間後に新生児に投与した用量と同用量の DES (0.15、1.5、15、150 および 1500 μ g/kg 体重) を 1 群 4 匹のラットに単回皮下投与して 24 時間後に剖検し、子宮重量を測定した。

3) 性成熟前の卵細胞数減少がラットの性周期に及ぼす影響

① 実験デザイン

1 群 4 匹の生後 14 日目の雌 Donryu ラットに 0.2 および 1.0 Gy の γ 線を単回全身照射し、卵巣の形態学的変化および性周期の変化を 4 ヶ月齢まで観察した。 γ 線は卵細胞を傷害する代表であることから選択した。照射時期である 14 日齢は卵巣において発育段階の卵胞が形成される時期であり、子宮では腺上皮形成開始時期であることから、卵および子宮に対する影響が容易に検出できることを期待してこの時期を選択した。成熟後の照射による卵巣への影響と比較するために 10 週齢にて同線量を全身照射したの同系統ラットおよび無処置の対照群 (それぞれ 1 群 4 匹) と比較した。発育期動物については γ 線照射後 6 時間後 (PND14) および 9 週間後 (11 週齢)、成熟期照射動物については照射 1 週間後である 11 週齢に 1 群 4 匹の動物を剖検し卵巣の変化について形態学的に検索した。

② 形態学的検索方法

卵細胞の確認は通常の HE 染色では観察しにく

いことから proliferating cell nuclear activity (PCNA) 抗体を用いた免疫組織化学染色を施して半定量的に解析した。剖検後 10% 中性緩衝ホルマリン液に固定した卵巣は最大横断面で切り出しパラフィンに包埋し薄切して HE 染色と連続切片から PCNA 染色を行い、最大横断面に存在する卵巣構成細胞数を測定した。卵胞は以下のように分類した：原始・一次卵胞 (primordial and primary follicles)、発育期卵胞 (growing follicle) として、二次卵胞 (secondary follicles)、preantral、antral follicles および tertiary follicle を発育期卵胞 (growing follicle)、閉鎖卵胞 (atretic follicle) および黄体 (corpus luteum) に分類して卵細胞および卵巣の変化を観察した。

③ 性周期の観察

性周期は膈開口後、4 ヶ月まで 2 週毎に膈スミア像にて性周期を観察した。

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：Cj:CD-IGS ラット

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 μ g/kg/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 μ g/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 μ g/kg を中用量、0.05 μ g/kg を低用量に設定。

投与期間：生後 1 日～生後 5 日

観察項目及び観察時期

1. 体重推移：哺育 1 日から 98 週齢まで測定

2. 性成熟 (膈開口、陰茎包皮分離)：3 週齢から 7 週齢まで観察

3. 性周期：8 週齢から 52 週齢まで観察

4. 交配 (交尾率、受胎率) : 12、23、34、56、68 週齢
5. 分娩、哺育 (産児数) : 1 産から 3 産まで観察
6. 行動試験 (シャトルボックス条件回避学習試験) : 24 及び 48 週齢で実施
7. 精子検査 (精子数) : 26 及び 52 週齢で検査
8. 雄剖検 (器官重量) : 26、52、101 週齢で実施
9. 雌剖検 (器官重量) : 54 及び 101 週齢で実施
10. 雄の免疫検査 (ヒツジ赤血球に対する抗体産生能) : 26、52 週齢で実施
11. 排卵検査 (hCG による誘起排卵数) : 54 週齢
12. 生存性 : 哺育 1 日から 101 週齢まで観察

〈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 の乳腺に対する影響を確認するため、ラット及び乳がん由来株化細胞を用いて検索した。

EDCs による乳がん由来細胞 MCF-7 の ER α を介した作用を明らかにするため、RNAi により ER 発現を抑制した細胞の増殖能について観察した。

1) 乳がん由来株化細胞の ER α 発現 ;

ヒト乳がん由来株化細胞である MCF-7 ; ER (+)HER2 (-) 及び BT474 ; ER (+)HER2 (+) 細胞を DMEM (25U/ml penicillin、25 mgU/ml streptomycin、10% FBS) にて継代培養を行った後、両細胞共 Soto らの E-SCREEN Test に則り、12 穴の培養皿を用いて、2 万個の細胞をダルベッコ改良イーグル培養液 5% ウシ胎児血清存在下で 24 時間培養後、活性炭処理した血清 5% を含むフェノールレッドフリーの培養液に変え、これに E2、DES 及び BPA の 10⁻¹⁰~10⁻⁶ M を添加し 6 日間培養、7 日目に Cell counting Kit-8 を用いて細胞数を算出した。さらに、両細胞の ER α 発現を免疫組織化学 (IHC) 及び Real time RT-PCR により検索した。

2) MCF-7 の shRNA による ER α 発現抑制 ;

a) MCF-7 の shRNA による ER α 発現抑制、培養条件及び被験物質の添加

ヒト乳がん由来株化細胞である MCF-7 : ER (+) に対する RNAi 誘導による ER α 発現抑制は shRNA 法 (Short hairpin RNA は、18~29 塩基の dsRNA 領域と 3~9 塩基の loop 領域を含む、ヘアピン状

に折り畳まれた一本鎖 RNA で、生体内に発現させると Dicer によって切断され、siRNA が切り出されるため、標的 RNA の切断・分解が誘導される) により実施した。

MCF-7 は、DMEM (25U/ml penicillin、25 mgU/ml streptomycin、10% FBS) にて、継代培養を行った後、リポフェクション法 (FuGENE HD, Roche) により piGENE PUR U6 ER α (iGENE 社) または Empty ベクターをトランスフェクションすることにより ER α の発現を抑制した。トランスフェクションの 24 時間後にピューロマイシンを用いてベクターが導入されなかった細胞を除去した。ピューロマイシン処置後の生存細胞は、フェノールレッドフリーの DMEM (25U/ml penicillin、25 mgU/ml streptomycin) に 5% 活性炭-0.5% dextran T70 で処理し、10% FBS を添加した培地を使用して 24 Well プレートに 5 \times 10⁴/well の条件で播種した。Vehicle (0.1% DMSO) 及び被験物質 (E2、DES、BPA) は、以下に示す濃度で培地中に添加し、5% CO₂ インキュベーターにて、4 日間の培養を行った。その後、プレートから培養液を取り除き、Cell counting Kit-8 (Dojindo) を用いて 2 時間 37°C でインキュベーション後、450nm で吸光度を測定し、培地中の細胞数を算出した。

E2: 10⁻¹⁰~10⁻⁶ M

DES: 10⁻¹⁰~10⁻⁶ M

BPA: 10⁻⁷~10⁻⁵ M

b) Quantitative RT-PCR による ER α 発現抑制の確認

被験物質添加後に回収した細胞から SV Total RNA Isolation System (Promega) を用いて Total RNA を抽出し、QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用い 2g の Total RNA を逆転写した。100ng cDNA、SYBR GREEN Master Mix (Roche) 10l、プライマー (ER α) 0.2l で Opticon 2 (Bio Rad) を用いて行った。また、ER α mRNA 発現レベルは相対定量で行い、 β -actin により補正した。

c) 免疫組織化学染色による ER α 発現抑制の確認

添加試験に使用した細胞の ER α 発現抑制を確認するため、一部の細胞はチャンバースライドに播種し、1 日培養した後 20% ホルマリン固定により作製した標本を 1 次抗体 (mouse anti-human ER α DAKO) を室温、1 時間反応させ、その後 DAKO Envision+ Kit を用いて染色した。

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。H18年度は、引き続き、核内受容体の一種で外来異物の受容体である SXR について検討した

細胞培養

肝腫瘍細胞 HepG2 は、American Type Culture Collection より購入し、10%FBS を添加した EMEM 中、37°C、5% CO₂ の条件で培養した。遺伝子導入 24 時間前に、細胞を 96 穴細胞培養プレートに移した。

レポーター遺伝子試験

SXR 発現ベクターとしてヒト由来 SXR を CMV プロモーター下流につないだ pCDG1-hSXR を、NF κ B サブユニット p65 発現ベクターとして p65 遺伝子を CMV プロモーター下流につないだ pCMX-p65 を用いた。レポーター遺伝子としては、SXR 認識配列 (XRE; Xenobiotic Response Element) をルシフェラーゼ遺伝子上流につないだ pXRE-luc と NF κ B 認識配列を同様につないだ pNF κ B-luc を用いた。発現ベクターとレポーター遺伝子を、HepG2 細胞にリン酸カルシウム法で遺伝子導入し、化学物質添加後のルシフェラーゼ活性の値を測定した。また、遺伝子導入効率を補正するために、内部標準として β -galactosidase を発現するプラスミドも同時に遺伝子導入し、活性を測定した。

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を誘導することが可能なため、細胞分化の解析に適している。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た。

ES 細胞及びその浮遊培養により形成される胚様体 (EB) の分化への、EDCs の影響を遺伝子レ

ベルで解析するためには、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明らかにしておく必要がある。そこで、ES 細胞及び EB の分化過程で発現する遺伝子について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) をトリプシン処理し、細胞培養用 dish 上でさらに 2 時間培養した。この操作によりフィーダー細胞を除去した ES 細胞を LIF を除いた ES 培地で、最初の 2 日間は hanging drop 法 (ES 細胞 800 個/20 μ l)、次の 5 日間は浮遊培養法にて、計 7 日間培養した。その間に形成される EB の培養開始後、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、及び 7 日のものを採取しサンプルとした。また、0 日のサンプルとしては上記フィーダー細胞除去後の ES 細胞 (1×10^6 個) を用いた。RNA はキアゲン社の RNeasy にて抽出、40,000 以上の遺伝子発現の解析が可能なアフィメトリクス社の Gene Chip Mouse Genome 430 2.0 Array 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、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。同じ実験を独立して計 2 回実施した。これにより各タイムポイントのサンプル数を 2 とした。

確定試験に関わる生殖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

EDCs の生殖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として、本研究では生殖制御メカニズムに関する分子レベルでの解析を行い、基盤情報として整理する。

1) エストロゲン受容体 α 遺伝子 cDNA ノックインマウス (ER α KI マウス)

本マウスは、エストロゲン受容体 α の全長型 cDNA を同遺伝子座の exon1 (開始コドンを含む) にノックインしたマウスである。ホモ型の雌を野生型雄と交配させると妊娠 12 日目には胎児が全例死亡することが判明している。適宜、妊娠マウスを作製し、以下の実験に供した。

2) マウス組織からの RNA の分離精製

ER α KI マウス妊娠 10 日目の子宮、胎盤を採取し、すみやかに RNAlater (Ambion 社) に浸漬し、

RNase を不活化した。4°C、一晚以上静置した後、実体顕微鏡下、脂肪組織、卵管などの不要組織を除去した。RNeasy kit (キアゲン社) 添付の RLT buffer を用いて組織破碎液を調製し、DNA 定量用蛍光試薬である Picogreen を用いて、破碎液中の DNA 量を測定した。DNA 量に応じて、Spike RNA cocktail (Bacillus RNA 5 種類の mix) を添加し (Spike factor=0.02 (神経組織は 0.01))、TRIzol を用いて粗抽出した液を RNeasy kit を用いて全 RNA 精製した。得た全 RNA の 0.1 µg を電気泳動し品質を確認した。

3) GeneChip 解析

アフィメトリクス社のプロトコールに従い、全 RNA 4~5 µg を T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製した。得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社) を用い、ビオチン化 CTP、UTP を共存させつつ cRNA を合成した。全て増幅回数は 1 回とした。二本鎖 DNA 及び cRNA 精製にはアフィメトリクス社の GeneChip sample cleanup module キットを用いた。得られた cRNA を 300~500bp となるよう断片化し、ハイブリダイゼーションコントロールを添加し Genechip ターゲット液とした。Genechip は MOE430 2.0 を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンして発現値データを得た。データ解析に際しては、Spike RNA のシグナル値を元に各遺伝子のシグナル値を DNA 当たりの値、さらにはコピー数に変換した値を用い解析 (Perccellome 解析) を行った。データ解析に用いたソフトウェアは当部にて開発したものを主に用いた。

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

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。一方、EDCs が細胞、

分子レベルでいかなる作用を及ぼして神経系形成・発達をかく乱し、行動に影響を及ぼすかについては不明な点が多い。

1) マウス胎児神経幹細胞培養 (ニューロスフェア培養) : 自己複製能定量系

マウス C57BL/6 胎生 11.5 日または 14.5 日目の胎児より、終脳を分離し単細胞化した後、培養系に移す。培養培地 (N2/DMEM/F12 (フェノールレッド不含の DMEM/F12 培地にインスリン、プロゲステロン、プトレッシン、アポトランスフェリン、亜セレン酸 Na を添加したもの) には bFGF (10 ng/ml) 及び EGF (25 ng/ml) を添加したものを用い、96 well plate (コーニング社低接着 plate) 1well 当たり 4000 個/100 µL の密度から生細胞を播種する。7 日間培養し、単細胞から形成される細胞増殖塊 (ニューロスフェア) の数を数え、播種細胞数に対する比を得た。

2) マウス胎児神経幹細胞培養 (ニューロスフェア培養) : 分化能定量系

マウス C57BL/6 胎生 11.5 日または 14.5 日目の胎児より、終脳を分離し単細胞化した後、N2/DMEM/F12 (フェノールレッド不含の DMEM/F12 培地にインスリン、プロゲステロン、プトレッシン、アポトランスフェリン、亜セレン酸 Na を添加したもの) に bFGF (10 ng/ml) を添加した培地を用い、ポリ-L-オルニチン及びフィブロネクチンでコーティングした培養皿にて培養する。胎生 11.5 日由来細胞は 96 well plate に 1×10^4 個/well/200 uL 播き、胎生 14.5 日由来細胞は 4×10^6 個/dish/6 mL を 9 cm 径 dish に播いた。胎生 14.5 日由来細胞は bFGF 補充及び培地交換を行いつつ 4 日間培養し、神経幹細胞を増殖させたのち、機械的に培養皿から分離し、96well plate に 1×10^4 個/well/200 uL 播いた。LIF 10 ng/mL 存在下、BPA を濃度を振って添加し、4 日後に 4%ホルマリン/PBS (-) にて 15 分間固定した後、抗 GFAP 抗体及び IRDye800CW ラベルされた抗 rabbit IgG 抗体を用いて免疫染色した。同時に DNA を SYTO60 で染色し、Odyssey を用いて蛍光量を測定し、DNA 当たりの GFAP 発現量として定量化した。

3) 免疫染色

チャンバースライドにて培養した細胞を 4%ホルマリン/PBS (-) にて 15 分間固定し、一次抗体(マ

ウス抗MAP2、ラット抗GFAP)、二次抗体 (FITC ラベル抗マウス IgG、Cy3 ラベル抗ラット IgG) を用い、蛍光免疫染色した。DNA は Hoechst33342 を用いて染色した。

【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 のマウス周産期暴露による雌性生殖器等の遅発性影響を検討する試験系の開発を目的とする。

1) 実験動物飼料中の植物性エストロゲンが動物に及ぼす影響；

C57BL/6Crslc マウス交配3週間前から妊娠期間を通し離乳時まで、基礎飼料 CRF1 あるいは PLD (phytoestrogen low diet : オリエンタル酵母 (株)) で飼育し、飼料中の植物性エストロゲンの経胎盤・経母乳による多卵性卵胞の発生と、出産・性比・出生時体重等、仔動物への影響を検討した。給水は水道水、給水瓶はポリカーボネート瓶・シリコン給水蓋、ケージはポリカーボネートケージ、チップは三協ラボソフトチップを用いた。

出生時に、出産数、性比、仔の体重を記録し、仔は雌雄併せて8匹/母となるように保育させた。雌性仔は、PND 21 に卵巣を採取し、メタカーンで固定・パラフィン包埋・連続切片・HE染色を施し、病理組織学的検査を行った。

雄仔は、PND 30 に体重、精巣、精巣上体の重量を測定した。

2) C57BL/6 マウス新生時期 DES 経母乳暴露による雌性生殖器への遅発影響；

ヒトの通常の暴露経路を想定し、これまでの C57BL/6 マウス新生児 DES 皮下投与を母親への経口投与による経母乳暴露に変え、子宮、卵巣への遅発影響を検討した。妊娠14日目のマウス (日本エスエルシー (株)) を購入し、入荷後すぐに飼料；PLD、給水；蒸留水・ガラス瓶・シリコン給水蓋、ケージ；アルミケージ、床敷き；三協ラボソフトチップで飼育した。分娩後、雌性児を3あ

るいは4匹/母に分け保育させた。

PND1~5の5日間DESの10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を母動物に強制経口投与した。更に、DESあるいはEEの10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ をPND17~20 (4日間) あるいはPND17~23 (7日間) 皮下投与し、最終投与24時間後エーテル麻酔下で屠殺した。子宮はホルマリン固定・パラフィン包埋・薄切・HE染色を施し、病理組織学的に検査した。卵巣はメタカーン固定・パラフィン包埋・連続切片・HE染色を施し、病理組織学的に検索した。

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

これまで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ず、むしろアンドロゲン作用がみられた。

1) EEの抗アンドロゲン作用検出のためのHershberger試験に対するICIの併用効果；

5週齢で購入したCrI:CD (SD) 雄ラットを1週間の馴化期間後、麻酔下で精巣及び精巣上体を摘出した。さらに1週間後から10日間、溶媒 (コーン油) あるいは3 mg/kg のICIを皮下投与後、EEを0、0.1及び1 mg/kg 強制経口投与した。併用して0.2 mg/kg の Testosterone propionate (TP) を毎日皮下投与した。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、陰茎亀頭及び尿道球腺の重量をホルマリン溶液固定後に測定した。

2) 高用量EEの抗アンドロゲン作用検出のためのHershberger試験に対するICIの併用効果；

EEのHershberger試験における毎日の投与に先立ち、3 mg/kg のICIを皮下投与した。EEの投与量は0、10及び30 mg/kg とし、ICI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。その他は1)の試験と同様の方法で実施した。

3) NGのアンドロゲン作用検出のためのHershberger試験に対するICIの併用効果；

ICIの3 mg/kg を皮下投与後、NGの0、30及び

100 mg/kg を経口投与し、ICI 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) EE のアンドロゲン作用検出のための Hershberger 試験；

EE の 0、0.1、1、10 及び 30 mg/kg を経口投与した。ICI 及び 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。

【OECD 対応試験実施・調査研究】

子宮肥大試験及び Hershberger 試験

小野 宏

1) 子宮肥大試験開始前の膣スミア観察で、発情期像あるいは発情前期像を呈し、試験系から除外した卵巣摘出マウスについて子宮重量を測定し、試験に供した動物の子宮重量と比較した。

2) 基礎飼料 (CE-2) または植物エストロゲン含量を低減させた飼料 (PLD) を与えた卵巣摘出マウスに、EE 単独あるいは EE+Tamoxifen を併用 7 日間投与し、子宮重量を測定した。

3) Tamoxifen の抗エストロゲン作用あるいはエストロゲン作用を検討した。卵巣摘出マウスには 7 日間、幼若ラットには 3 日間反復皮下投与し、子宮重量を測定して、抗エストロゲン作用あるいはエストロゲン作用を比較した。

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 18 年度はウェイブリッジ会議以降 10 年に当たり、以上の研究活動の到達点と今後の課題を明らかにするための節目の年となった。その一環として開催された欧州会議 (EU) によるヘルシンキでのウェイブリッジ記念ワークショップと米国立環境保健衛生研究所 (ノースカロライナ) における BPA に関するワークショップでの論点を中心に、諸国際組織や主立った研究団体における諸研究・諸活動の状況を整理した。

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

山崎 寛治

日本が積極的に参加してきた EDTA/VMG-mammalian 会合の結果をもとに、さらに公表されている結果を加えながら総合的に解析し、本試験の適応について検討する。また、内部データを公表し有用性についても検討する。

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。この protocol に準じて実施されてきた試験データを整理することにより、本試験法がガイドラインとして実用段階とする上での問題点を抽出し、その解決策を検討した。

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

2006 年の第 5 回、2007 年の第 6 回 VMG-mammalian 会議で、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 試験の結果について公表された。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 月 22 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 16 年 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 労働安全衛生総合研究所・産業医学総合研究所は、「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、当センターの「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）」及び「動物実験に関する指針（2003年4月版）」に従い実験した。

徳島大学は、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及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。

近畿大学は、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。

国立医薬品食品衛生研究所は、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本方針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) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項、及びOECD対応

(2) 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、及びラットを用いたDiethylstilbestrolの経胎盤・経母乳暴露による低用量晩発影響の検討（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) 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

（本報告内容のうち、6ヶ月以前の部分はH17年度報告の試験IIと重複するが一貫性を優先し総体を改めて報告する）

【概要】平成16年度の研究において、Bisphenol A (BPA)の高用量投与時のみならず、低用量の妊娠期・授乳期投与によってもpre-middle ageにおける性周期異常が誘導される可能性が示唆された。本研究では、ほぼ同様のプロトコールにより、0.5、5、50 µg/kg/dayの用量でBPAをラットの妊娠期から授乳期にかけて投与し、得られた雌出生児の性周期を最長12ヶ月齢まで継続して検査した。その結果、性周期検査において、すくなくともBPA50 µg/kg群では平成16年度の研究において実施した実験の結果と合致する結果が得られたことから、低用量のBPAの妊娠期・授乳期投与によって遅発性の性周期異常が誘発される現象は再現性のある変化であることが確認された。

詳細は、分担研究者 菅野 純の分担報告書を参照。

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