

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日に残り雄1匹、雌1匹の全腹児が死亡した。母動物の乳腺の発達は不良であった。

その他の母動物では、分娩時及び哺育期間中一般状態、哺育状態に異常はみられず、体重も媒体対照群とほぼ同様な推移を示した。

出生児の性比が、統計的に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、BPA50 µg/kg群26匹であり、すべてのBPA投与群において媒体対照群よりも有意に高い値を示した。

BPA50 µg/kg群の保育不良の母動物No.40の児について出生日（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。

児動物は、3ヶ月齢時より12ヶ月齢まで性周期検査を実施した。性周期異常は4ヶ月齢より観察され、加齢とともに増加する傾向を示した。12ヶ月齢時の性周期検査では、媒体対照群の1/18例でpersistent diestrus、3/18例でconstant diestrus、1/18例でconstant estrus、0.5 µg/kg群の6/23例でpersistent diestrus、1/23例でconstant diestrus、6/23例でpersistent estrus、5/23例でconstant estrus、1/23例でirregular estrus、5 µg/kg群の7/22例でpersistent diestrus、3/22例でconstant diestrus、4/22例でpersistent estrus、5/22例でconstant estrus、1/22例でirregular estrus、50 µg/kg群の2/18例でpersistent diestrus、3/18例でpersistent estrus、9/18例でconstant estrusがみられ、2/18例でirregular estrusがみられた。

統計学的検討では、0.5 µg/kg群で、10ヶ月齢時及び12ヶ月齢時の総異常周期動物数が有意に増加した。persistent estrusまたはconstant estrusを呈した動物の出現頻度は7、8、9、10及び12ヶ月齢時にお

いて媒体対照群に比較して有意に増加した。5 µg/kg群で、6ヶ月齢時及び12ヶ月齢時の総異常周期動物数が有意な発生頻度を示した。persistent estrusまたはconstant estrusを呈した動物は、9及び12ヶ月齢時に有意な発生頻度を示した。50 µg/kg群では、10ヶ月齢時及び12ヶ月齢時において総異常周期動物数が有意な発生頻度を示した。Estrusの異常を示した（persistent estrusまたはconsistent estrusを示した）例数は、7ヶ月以降、50 µg/kg群で有意な増加をほぼ毎月示し、また、12ヶ月齢時には、BPA投与群すべてが有意な増加を示した。

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

陽性対象物質DESを用いての検討を継続中である。

(3) OECD/EDTA/VMG-Mammalian

① EDTA/第5回 VMG-mammalian 会合;

この会議のAgenda Item 10: Level 5 Studies でプレゼンテーションを行った。「確定試験（詳細試験）」に関わる基礎的な検討を進め、「げっ歯類一生涯試験」の構想を打ち出した。従来の毒性評価法に沿ったこれまでの一世代、多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、多くの内分泌かく乱陽性候補物質が陰性の結果に終始することが予想される。しかも、これら従来の試験法では低用量問題への対応が実質的に困難であるとの判断に達し、検討を重ねてきた。「げっ歯類一生涯試験」における低用量問題については、雌の早期持続発情の発現等、エンドポイント明確絞り込むことにより明らかにする。

②第9回内分泌かく乱化学物質の試験及び評価に関する EDTA タスクフォース会合; Hershberger 試験は、Phase3 の結果が公表され、各試験機関の相関性、検出結果は良好であった。

③EDTA/第6回 VMG-mammalian 会合; 厚生労働省による「最新版・内分泌かく乱化学物質のスクリーニング及び試験法案のレポート」を OECD に提出した。子宮肥大試験は、ピアレビューが終了し、ガイドライン案作成終了段階に達し、追加データ等の検討を行った。

【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

BPA の慢性暴露による dopamine 神経発達に及ぼす影響;

BPA を暴露した胎児脳において、dopamine 神経の発達に重要な役割を担う、Shh 及び GDNF mRNA 発現量が著明に減少することを見出した。また、BPA を胎児期及び授乳期に慢性暴露した成体マウスの側坐核において、dopamine 合成酵素である TH 及び dopamine 神経終末のマーカーである DAT 免疫活性の著明な増強が認められた。

更に、BPA の胎児期及び授乳期慢性暴露によるアストロサイトに及ぼす影響について検討した結果、側坐核に隣接し、dopamine 神経伝達に積極的に関与する腹側淡蒼球において、GFAP 陽性アストロサイトの活性化が引き起こされることが明らかとなった。

BPA の慢性暴露による choline 作動性神経発達に及ぼす影響;

BPA の胎児期及び授乳期慢性暴露による、不安感受性、運動学習機能及び記憶保持能力に及ぼす影響をそれぞれ明暗試験、高架式十字迷路試験、rota-rod 試験及び step-through 試験に従い検討した。その結果、不安感受性、運動学習機能に変化は認められなかったものの、記憶保持能力の低下が認められた。記憶保持には、choline 作動性神経が重要な役割を担っている事が知られているため、choline 作動性神経のマーカーである ChAT の特異的抗体を用いて海馬 choline 作動性神経を免疫染色法に従い検討した結果、海馬全域において ChAT 免疫活性の減弱が認められた。さらに、胎児脳を用いて choline 作動性神経の発達に重要な役割を担う IL-1β 及び BMP-9 mRNA 発現量について RT-PCR 法に従い検討した。その結果、IL-1β 及び BMP-9 mRNA 量の著明な減少が認められた。

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

仔の体重への影響：妊娠第2週～第3週では1日に1匹の母マウスが約4gを摂取した。これはBPA量としてみると0.33群～33ppm群で約0.05mg/kg～5mg/kg体重に相当する。今回の実験では、対照群にあたえられた通常試料中に約0.03ppmのBPAが検出されたことを考慮すると、対照群も含めてreference doseの1/10からLOAEL値の1/10の間で実験が行なわれたこととなり、通常の試験で得られたNOAELから所謂低濃度影響として問題となるレベルに相当する範囲となった。母マウスの摂餌量にはBPAの影響は認められなかった。

一方、乳期の仔マウス（雌雄）の体重では、群間に有意差（ $p < 0.001$ ）が認められた。すなわち、BPA曝露量に応じて体重が大きくなる傾向があったが、差は僅かであった。また、離乳後の体重（雄性のみ）にはBPAによる有意な差は認められず、行動試験に使用した雄性仔マウスの体成長には、BPA曝露の影響は認められなかった。

反応形成及び定率強化スケジュールでの習得過程：自動反応形成過程では、曝露群の方が反応率の上昇が早い傾向が示されたが、有意ではなかった。定率強化スケジュールも同様であった。

タイムアウト付交替型混合スケジュールでの訓練過程：SCOBの測定で得られる4つの行動指標（FR反応率、DRO反応率、Accuracy、Bias）について、1block（5session）毎に各被験体の平均値を算出し、訓練進行にともなう各指標の変化をまとめた。訓練第1段階（固定長タイムアウト）から訓練第3段階（変動長タイムアウト上下系列条件）における行動変化（すなわち学習習得過程）にBPAの影響は殆ど認められなかった。固定長タイムアウトでの訓練となる第1段階のFR反応率で交互作用が有意（ $p < 0.05$ ）となったが、群間差が有意となったものはなかった。

セッション内でタイムアウト時間を上下させる訓練第3段階のデータについては、測定の結果得られたAccuracy及びBias値を、各タイムアウト時間に対してプロットし、Delay-Accuracy曲線及びDelay-Bias曲線を求めた。前者は短期記憶の保持曲線に相当するものとなる。最終的に最も短いタイムアウト（4秒）ではAccuracyの値は0.8程度となったが、タイムアウト長に応じた低下を示し、最も長いタイムアウト（20秒）では0.2程度とな

った。また、Bias値はタイムアウト時間に応じて緩やかな上昇を示すものとなった。

薬理的負荷試験：ドーパミン系に作用する3種類の薬物を投与したが、methamphetamine、quinpirole（D2系アゴニスト）、SKF38393（D1系アゴニスト）いずれにおいても、明確なBPA曝露の影響は認められなかった。

内分泌かく乱化学物質の脳の性分化への影響に関する研究

今井 清

OP 500 mg/kg 投与群では生後6日（最終投与翌日）および生後7日に計4匹が、雌では生後6日から生後18日にかけて計6匹が死亡した。さらに同群雌雄およびDES 1 μ g/kg 投与群の雄で生後6日齢に体重の増加抑制があり、特にOP 500 mg/kg 投与群の雌ではこの傾向が生後21齢まで認められた。なお、生存例では一般状態の異常は観察されなかった。

各群ともに、離乳以降の体重増加、膈開口完了日数に明確な差は認められなかったが、性周期の観察が可能であったOP 500 mg/kg 投与群の1例、DES 1 μ g/kg 投与群3例中3例、0.1 μ g/kg 投与群3例中1例に性周期の延長が認められ、OP投与群では発情期の持続、DES投与群では発情休止期の持続が特徴的であった。

前腹側室周囲核におけるER α 陽性は、DES投与群およびOP 50 mg/kg 投与群では特に雌において離乳期まで持続して細胞密度が高くなる傾向が認められたが、OP 500 mg/kg 投与群の雌ではER α 陽性細胞は逆に減少した。

2) 免疫

内分泌かく乱化学物質の免疫異常に及ぼす影響に関する研究

林 良夫

生後3日目の胸腺摘出（3d-Tx）を施すことにより成立するシェーグレン症候群疾患モデルNFS/sldマウスを用いて妊娠後期にTCDDを投与した後の次世代マウスへ免疫異常が誘導可能か否かを検討した。

1. 体重及び臓器湿重量に対する影響

TCDDの妊娠マウスへの投与による出生後の体重及び臓器湿重量に対する影響について検討を加

えた。体重の変動については、4、8週齢とも雌雄マウスにおいて約5%前後の体重減少率がみられたが、特に性差は見られなかった。臓器湿重量については、100 ng/kg 投与群での8週齢雄マウス胸腺において約20%の重量減少がみられたが、雌マウスでは著変はなかった。脾臓重量への影響は雌雄マウスとも4週群で約10%の減少が見られ、8週齢では雌マウス100 ng/kg 投与群で約25%の重量減少がみられた。その他の臓器では4週齢、8週齢とも各重量減少率は目立たなかった。

2. 免疫担当細胞への影響

TCDDの妊娠マウスへの投与による次世代マウス出生後の免疫担当細胞への影響について明らかにするため、胸腺及び脾臓細胞を分散し、フローサイトメトリーによる解析を実施した。

胸腺：次世代マウス4週齢、8週齢への影響に関しては雌雄マウスとも胸腺内CD4SP/CD8SP(シングルポジティブ)細胞及びDP(ダブルポジティブ)細胞への分化に特に異常は観察されなかった。T細胞活性化マーカー(CD44、CD45RB、CD62L)の動態を観察した結果、雌雄マウスともに8週齢胸腺でCD4陽性T細胞のうちCD44^{high}陽性T細胞の軽度増加が見られた。

脾臓：脾臓におけるCD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞は妊娠マウスTCDD投与による次世代マウスへの影響は殆ど認められなかった。しかし、雌マウスにおいてTCDD100 ng/kg投与によるCD8陽性T細胞の減少が認められた。また、末梢T細胞の活性化機構におけるTCDD投与の次世代マウスへの影響についてT細胞活性化マーカー(CD44、CD45RB、CD62L)の動態解析を実施した。雌雄マウスともに8週齢脾臓ではCD4陽性T細胞のうちCD44^{high}陽性T細胞の軽度増加が見られた。次に、脾臓T細胞のサイトカイン産生能をELISAにて検討した結果、8週齢マウスでは雌雄ともに次世代マウスにおける末梢T細胞のIL-2の産生能が増強され、特に雄マウスで顕著であった。一方、IL-4、IFN- γ 産生能は雌マウスT細胞で著明な産生亢進が認められた。IL-10産生については雌雄マウスともに著変が見られなかった。

3. 病理組織学的変化

全身諸臓器について臓器重量を測定後、有機溶媒に浸染したのち組織切片を作成して病理組織学

的検討を実施した。その結果、唾液腺(顎下腺)、腎臓、肺、肝臓に病理組織学的な変化が認められた。

唾液腺：4週群で雌雄ともにTCDD投与妊娠マウスから生まれた次世代マウス唾液腺(顎下腺、耳下腺)に軽度のリンパ球浸潤が認められた(Whiteらの分類のgrade 1またはgrade 2)。炎症性病変は導管周囲の巣状単核細胞浸潤として観察された。一方、涙腺炎の出現はいずれの実験群でもみられなかった。妊娠マウスへのTCDD投与100 ng/kg、1000 ng/kg群のいずれにおいても次世代マウスに对照群に比較して高度な変化がみられ、雌マウスにより強い変化が認められた。8週群では雌雄マウスともに4週群と比較し顎下腺に高度なリンパ球浸潤性病変(grade 3)が誘導された。

肺：妊娠マウスへのTCDD投与100 ng/kg、1000 ng/kg群ともに肺の細気管支周囲、及び血管周囲にリンパ球浸潤性病変がみられ、雌雄マウスとも高頻度であった。肺の間質性病変は1000 ng/kg投与群でやや高頻度に発生した。

肝臓：TCDD投与群の次世代マウス肝内グリソン鞘細胞周囲に軽度から中等度のリンパ球浸潤病変が観察された。特に8週齢雌マウスの1000 ng/kg投与群で高頻度で肝内胆管炎の発生が認められた。

腎臓：TCDD妊娠時期投与群マウス腎臓の間質を中心に慢性のリンパ球浸潤が軽度認められ、間質性腎炎類似の病理組織像を呈していた。しかし、新生児投与実験でみられた高度な間質性腎病変は今回確認されなかった。

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

1. CBA/JNマウスにEEの1あるいは10 μ g/kg/dayを経胎盤・経母乳暴露した結果、出産数、妊娠期間、産仔数などの生殖毒性学的指標には影響はみられなかった。

2. サイトカイン産生

IFN- γ ; EEを経胎盤・経母乳暴露した母鼠から得られた仔動物をTh1誘導抗原DNCB及びTh2誘導抗原TMAのそれぞれを用いて感作し、同一抗原を用いて惹起した後の所属リンパ節細胞からのサイトカイン産生を比較検討した結果、媒体の

みを投与した場合にはIFN- γ の産生はみられなかったが、DNCB及びTMAそれぞれを用いて感作・惹起を行った場合、120時間後において共に誘導がみられ、特にDNCBを用いて感作・惹起を行った場合にEEの低用量暴露群において対照群及び高用量群と比較して著しい分泌亢進 ($P < 0.05$ 、Bonferroni test)が確認された。

IL-4：同様に仔動物をTh1誘導抗原DNCB及びTh2誘導抗原TMAを用いて感作し、同一抗原を用いて惹起した後の所属リンパ節細胞からのサイトカイン産生を比較検討した結果、媒体及びTh1誘導抗原であるDNCBを用いて感作・惹起を行った場合には誘導はみられなかったが、Th2誘導抗原のTMAを用いて感作・惹起を行った場合、24時間後において全ての群において誘導がみられた。一方、EE暴露による影響はみられなかった。

IL-10：同様に仔動物をTh1誘導抗原DNCB及びTh2誘導抗原TMAそれぞれを用いて感作し、同一抗原を用いて惹起した後の所属リンパ節細胞からのサイトカイン産生を比較検討した結果、媒体のみを投与した場合にはIL-10の産生はみられなかったが、DNCB及びTMAそれぞれを用いて感作・惹起を行った場合には共にIL-10の誘導がみられた。Th2誘導抗原のTMAを用いて感作・惹起を行った場合、誘導の亢進がみられた。一方、EE暴露による明らかな影響はみられなかった。

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

胎齢17日、18日及び生後1日に摘出したいずれの精巣においても、DES投与群における*Insl3* mRNA発現は有意に減少した。日齢間に発現の差はみられなかった。*SF-1*については、DES投与群の胎齢18日の発現が有意に減少したが、胎齢17日及び生後1日には、対照群と有意差は認められなかった。*P450*については、*Insl3*と同様、いずれの日齢においても投与群の発現は有意に減少した。

胎齢18日胎児の精巣について、DESの用量・反応関係の有無を調べた結果、*Insl3* mRNA発現は用量に依存して減少する傾向がみられた。生後7週において観察した精巣下降不全についても、用量に依存して本異常を呈する個体は増加したが、対照群及び6.25 $\mu\text{g/kg}$ 群では観察されなかった。

尚、胎齢17日、18日あるいは生後1日の精巣摘出時の肉眼観察では、50 $\mu\text{g/kg}$ 群のいずれの日齢においても、精巣下降不全を示す個体が観察されたが、25 $\mu\text{g/kg}$ 以下の投与群では摘出時には観察されなかった。

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の検出指標の検出—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—

最高用量群である1500 $\mu\text{g/kg}$ 体重群では対照群と比較し増殖性病変の頻度・病変数ともに有意差は認められなかった。DES150 $\mu\text{g/kg}$ 体重群では子宮内膜腺癌の発生頻度は、有意差はないが増加傾向を示し、異型性過形成と腺癌を併せた増殖性病変数は対照群と比較し有意に増加した。DES15 $\mu\text{g/kg}$ 体重群では異型性過形成あるいは腺癌の頻度及び異型性過形成と腺癌を併せた増殖性病変数は対照群と比較し有意差は認められなかった。観察された子宮内膜腺癌の悪性度に群間の差異は観察されなかった。

9ヶ月齢で剖検した1.5及び0.15 $\mu\text{g/kg}$ 群では子宮内膜異型性過形成は少なく子宮内膜腺癌の発生は認められなかった。

DES1500 $\mu\text{g/kg}$ 体重群では対照群を含む150 $\mu\text{g/kg}$ 体重以下の群とは質的に異なる子宮の形態像を呈した。すなわち、子宮の萎縮が顕著で、子宮腺の形成が殆ど観察されず、内膜は扁平上皮化生を示す個体が多く認められた。

12ヶ月齢の卵巣は大部分の動物において、対照群を含むいずれの群においても黄体がなく閉鎖卵胞が存在する萎縮性的変化が認められ、対照群を含むDES各群の卵巣萎縮の形態像に質的な差は認められなかった。

2) 投与用量のDESのエストロゲン活性の確認

DES1.5 $\mu\text{g/kg}$ 体重群以上で子宮が有意に増加した。

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

γ 線照射による卵巣への明らかな影響は、1.0Gyを性成熟前である14日齢で照射した動物に認め

られた。14 日齢照射動物では照射 6 時間後においてすでに卵細胞及び大部分の顆粒膜細胞にアポトーシスが観察された。照射 9 週後の 11 週齢では、1.0Gy 性成熟前照射群の卵巣の重量は対照群より有意に小さく、肉眼的にも明らかに小さかった。性成熟前の 0.2Gy、成熟後の 0.2、1.0Gy 照射群では肉眼的及び組織学的に異常は認められなかった。形態計測解析においても、性成熟前 1.0Gy 照射群では卵胞及び黄体数ともに対照と比較し明らかに減少していた。とくに卵胞については、原始卵胞から発育卵胞の枯渇が著しかったが、大型のグラーフ卵胞についてはごく僅かではあるが認められた。0.2Gy 性成熟前及び成熟後照射動物の卵巣には形態計測において異常は認められなかった。成熟後 1.0Gy 照射動物は肉眼的及び質的な病理組織学的検査では異常は観察されなかったが、形態計測により原始卵胞及び一次卵胞の低値傾向が認められた。

17 週齢までの性周期の結果は、いずれの群も膈開口後の 7 週齢では大部分の動物が規則正しい 4 日性周期を示した。ところが 9 週齢より 1.0Gy 性成熟前照射群においては発情期/発情前期が 3 日以上持続する持続発情を示す個体が出現し、時間とともに急激に増加して 17 週齢ではほぼ全例が持続発情を呈した。一方、その他の群の性周期は 17 週齢に至るまで対照群との間に有意差はなく、いずれも規則正しい 4 日周期性を有していた。

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

SD ラット PND1~5 に DES を強制経口投与し、101 週齢まで観察した。

体重推移：雌の高用量群において 46 週齢以降の体重が対照群より高値で推移する傾向が認められた。

交尾率及び受胎率：雌では交尾率や受胎率の低下が中及び低用量群で認められたが、雄では影響は認められなかった。

行動試験：24 週齢時には、低用量群の雄の回避率がやや低値で推移したが、48 週齢時には、回避率に DES 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。また、総反応数にも群間の差は認められなかった。

精子検査及び雄の生殖器重量：DES の影響は

認められなかった。

雌の器官重量：54 週齢の雌の剖検では、下垂体重量が全ての DES 投与群で有意に増加し、副腎重量が高及び中用量群、甲状腺重量が高用量群のみで有意に増加した。また卵巣重量は、高及び中用量群で有意に低下した。

排卵検査：hCG 誘発の排卵数には、DES の影響はみられなかった。

免疫検査：26 週齢では血中の抗 SRBC-IgM が全ての DES 投与群で有意に低下したが、52 週齢では認められなかった。

生存曲線：高用量群の雌においてのみ生存日数が短縮した。

〈内分泌かく乱性確定試験開発支援基礎研究〉

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

長村 義之

1) 乳がん由来株化細胞の ER α 発現 (EDCs による MCF-7 および BT474 細胞の影響)

MCF-7、BT474 細胞に各種条件で EDCs (E2、DES、BPA) を添加し、4 日間培養の後に細胞数を測定したところ、MCF-7 における E2 添加では 10⁻⁸M、DES 添加では 10⁻¹⁰M および 10⁻⁸M、BPA 添加では 10⁻⁸M および 10⁻⁶M において、Vehicle と比較し細胞数の有意な増加が認められた。一方、BT474 ではいずれの EDCs 投与群においても Vehicle と比較し有意な増殖は認められなかった。

また、MCF-7 および BT474 の ER α の発現量を Quantitative RT-PCR、免疫組織化学染色を用い解析したところ、ER α の mRNA 発現量は MCF-7 が有意に高値を示し、免疫染色性でも MCF-7 において明らかに強い染色性を示した。

2) shRNA 導入による ER α 発現抑制された MCF-7 細胞の EDCs の影響

BPA を含む化合物の細胞増殖応答と ER α の関与を検討するため、shRNA による RNAi 誘導により ER α 発現抑制した MCF-7 またはコントロールとして、Empty ベクターをトランスフェクションした MCF-7 細胞を用いて E2、DES 及び BPA を種々の濃度で 4 日間培養し、細胞増殖について確認した。その結果、MCF-7 に Empty ベクターをトランスフェクションした E2 添加群では Vehicle と比べ、

10^{-10} M、 10^{-8} M および 10^{-6} M のいずれの濃度においても、有意な増加が認められ、特に 10^{-8} M において明らかな高値を示した。DES 添加群では 10^{-10} M、 10^{-8} M および 10^{-6} M のいずれの濃度においても増加傾向が見られ、特に 10^{-8} M において、顕著な増加を示した。BPA 添加群についても 10^{-7} M、 10^{-6} M、 10^{-5} M で有意な増殖が認められ、特に 10^{-5} M において、顕著な増殖が認められた。一方、shRNA により ER α 発現抑制した MCF-7 細胞では、いずれの化合物についても、すべての濃度で EDCs による細胞数の増加は認められなかった。また、ER α 発現抑制を確認するため Quantitative RT-PCR および免疫組織化学染色では、Empty ベクターをトランスフェクションした細胞に対し、明らかな ER α 発現抑制が確認された。

確定試験に関わる各種核内受容体転写活性迅速確認系構築研究

西川 淳一

核内受容体のリガンド依存的な転写活性化の分子機構に基づき、簡便に化学物質の核内受容体への作用を検出できるシステムを構築した。開発したシステムを用い、内分泌かく乱作用が疑われている化学物質について、多種類の核内受容体への影響を検討した。

様々な化学物質の SXR への作用；

内分泌かく乱作用が疑われる、Bisphthalate、Dibutyl phthalate、Dieldrin、Fenvalerate、Methoxychlor について、SXR の転写能を活性化するかについて検討した。HepG2 に SXR を強制発現させ、外来異物応答配列をルシフェラーゼ遺伝子上流につないだレポーター遺伝子を用いて用量依存的な転写活性化を調べた。その結果、全ての化学物質が、濃度依存的な転写活性化を示し SXR に作用する事が確かめられた。

SXR による NF κ B 活性の抑制；

HepG2 を用いて、内因性の SXR の活性について検討した。SXR を導入していない細胞では Rifampicin 濃度依存的な転写の活性化はほとんど起こらず、HepG2 には機能ある SXR がほとんど発現していないことが推察された。

次に、HepG2 に NF κ B のサブユニットである p65 を発現させ、そこに同時に SXR も発現させた

時の NF κ B を介する転写活性を調べた。その結果、Rifampicin の濃度依存的に NF κ B 活性の低下が観察され、さらにこの活性阻害は SXR を細胞に導入した時にのみ起こった。このことは、SXR が何らかの方法で NF κ B の活性を抑制していることを示唆している。

NF κ B による SXR 活性の抑制；

SXR と NF κ B の関係をさらに明らかにする目的で、NF κ B の大量発現が SXR の活性にどう影響するか調べた。NF κ B サブユニットの p65 は、NF κ B 応答配列を上流につないだルシフェラーゼ遺伝子の活性を顕著に増加させる。一方、TNF α は、細胞膜上に存在する受容体を介して I κ B を不活性化して、NF κ B を核内に移行させることが知られている。HepG2 細胞においても、内因性の NF κ B は I κ B によって抑制されており、TNF α の添加は I κ B の抑制を解除し、NF κ B の活性を約 3 倍増加させた。しかし、p65 を強制発現させると、TNF α 依存的な転写の活性化は観察されなくなる。これは、I κ B に結合していない NF κ B が細胞内に大量に存在するようになるためと考えられる。この条件で、SXR のリガンド依存的な転写の活性化を観察した。その結果、p65 用量依存的に SXR の活性が抑制された。これらの結果は、SXR と NF κ B は相互にその転写活性化能を抑制する関係にあることを示唆している。

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

高木 篤也

ES 細胞及び EB の分化過程で発現する遺伝子を経時的にマイクロアレイにより解析した。その結果、多くの遺伝子発現の変動が見られ、その中で核内受容体遺伝子 ER (エストロゲン受容体) α 、 β 、ERR (エストロゲン関連受容体) α 、 β 、 γ 、PR (プロゲステロン受容体)、AR (アンドロゲン受容体)、TR (甲状腺ホルモン受容体) α 、 β 、VDR (ビタミン D 受容体)、PPAR (ペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体) α 、 δ 、 γ 、RAR (レチノイン酸受容体) α 、 β 、 γ 、RXR (レチノイド X 受容体) α 、 β 、 γ は、ES 細胞及び EB において、それぞれ特有の発現パターンを示した。

内胚葉のマーカー AFP (alpha feto protein)、TT

(transthyretin)、心臓のマーカーである NKX2.5、cardiac actin、中胚葉マーカーである brachyury BMP4、外胚葉のマーカーである FGF5 等について解析したところ、内胚葉のマーカーは EB の 5 日前後から、中胚葉マーカーについては EB の 2 日前後から、心筋のマーカーは EB の 4.5 日前後から増加するなど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

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) 妊娠維持不良について

ER α KI mouse の妊孕性検討過程で、本マウス雌が妊娠維持不良を示すことが判明した。明らかな不良を示す時期及び胎児が死亡する時期を特定するため、妊娠 7.5 日目から 12.5 日目まで経時的に開腹し観察したところ、妊娠 9.5 日目から肉眼的に胎児発育不良が認められ、妊娠 10.5 日目に大部分の胎児死亡が、妊娠 12.5 日目に全例死亡が確認された。発育不良の時期と胎盤発達の時期が重なることから、同時期の胎盤組織切片を検討したところ、妊娠 10.5 日目の胎盤において、ラビリンス構造発達不全が認められた。

2) 網羅的遺伝子発現解析

ER α KI mouse 雌の妊娠維持不良メカニズム検討のために、妊娠 10.5 日目の子宮及び胎盤について、Percllome 手法を用い網羅的遺伝子発現解析を実施した。野生型と比較したところ、発現変化は胎盤よりも子宮に於いて大きかった。発現変化の生理的意義を考慮するにあたり、性周期に伴う遺伝子発現変化データベースを随時参照した。組織切片解析により胎盤ラビリンス構造発達不全が疑われたため、その過程に関与しうる遺伝子群として血管新生制御遺伝子群に注目した。その結果、性周期に伴い発現変動する血管新生制御遺伝子として、Adrenomedullin (ADM)、Cyr61、VEGF-A が選択された。ER α KI マウスにおけるこれらの発現を調べたところ、ADM が子宮、胎盤共に低下傾向、Cyr61 は胎盤で低下傾向にあることが分かった。ADM、Cyr61 共にノックアウトマウスにおいて胎盤不全による妊娠維持不良が報告されていることから、これらの発現変化がエストロゲン受

容体 α cDNA ノックインマウスにおける妊娠維持不良に関与していることが示唆された。

次に、ER α KI 子宮での発現変化に注目し解析したところ、発現上昇遺伝子群として Ovgp1 (Oviductal glycoprotein1)、Ptgs2 (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2)、Clca3 (Chloride channel calcium activated 3)、Itgp1 (Immunoresponsive gene 1) の 4 ケに加え、Immunoglobulin 遺伝子群が選択された。

Ovgp1、Ptgs2、Clca3、Itgp1 はいずれも性周期において発現変動を示す遺伝子であり、発情期もしくは発情後期に発現ピークを有していた。また、*in silico* プロモーター解析の結果、これらのプロモーターにはエストロゲン受容体の結合部位やプロゲステロン受容体結合部位が存在し、これらの発現が実際にホルモン制御を受けていることが示唆された。

Immunoglobulin 遺伝子群には性周期における大きな変動は認められず、ER α KI 子宮に於けるこれらの発現上昇は子宮への B 細胞浸潤を示唆しているものと考えられた。

発現低下遺伝子群としては、prolactin like protein family が選択された。そのゲノム上の位置を調べたところ、13 番染色体にクラスター状に存在しており、これらの発現が共通のエンハンサーの支配下にあることが示唆された。

さらに、性周期データベースから子宮で発現変動を示す遺伝子の中に Prominin1 があり、そのピークは発情期であった。ER α KI 子宮ではこの Prominin1 の発現は約半分に低下していた。Prominin1 は血液幹細胞、神経幹細胞等、幹細胞膜表面に発現することが報告されていることから、Prominin1 の発現は子宮での増殖性細胞数を反映している可能性があると考え、この結果からは、ER α KI 子宮が十分な増殖応答を示すことができないため、妊娠維持不良となっている可能性が示唆された。

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

本研究により確立された神経幹細胞機能定量系を用い、BPA の神経幹細胞のアストロサイト分化への影響を検討した。

マウス胎生 11.5 日の神経幹細胞はアストロサイト分化誘導因子 LIF (Leukemia inhibitory factor) で刺激してもアストロサイト分化を示さないが、胎生 14.5 日の神経幹細胞は LIF 刺激によりアストロサイト分化を示した。

分化影響を検討するために、マーカータンパク質である GFAP 発現を定量化できる赤外蛍光色素による In-cell western 系を導入した。胎生 11.5 日または 14.5 日の胎児終脳から神経幹細胞を培養し、LIF 存在下、 10^{-13}M ~ 10^{-7}M までの BPA 影響を検討した。BPA は胎生 11.5 日由来神経幹細胞に対しては影響を示さなかったが、胎生 14.5 日由来神経幹細胞に対しては、濃度依存的に GFAP 発現抑制作用を示した。この結果を免疫蛍光染色顕微鏡観察により形態的に検討したところ、BPA ^9M で GFAP 発現細胞数が減少していることが明らかとなった。

【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) 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の検討

出生時の母親の体重 (g、平均 \pm SD) は、CRF1 群 (n=10) が 27.5 ± 0.8 、PLD 群 (n=12) が 27.0 ± 1.1 であり、ほぼ同じであった。

出産数/母、雄性仔、雌性仔の数は、CRF1 群が 8.7 ± 1.1 、 4.6 ± 1.0 、 4.0 ± 1.4 、PLD 群が 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、仔の平均体重 (g) は、CRF1 群が雄性 1.36 ± 0.12 (n=46)、雌性 1.32 ± 0.12 (n=53)、PLD 群が雄性 $1.21\pm 0.11^{**}$ (n=41) ($p<0.01$)、雌性 $1.14\pm 0.11^{**}$ (n=44) ($p<0.01$) と、PLD 群の方が有意に低値であった。

多卵性卵胞の平均発生数 \pm SD は、CRF1 群 (n=11) が 10.09 ± 4.6 、PLD 群 (n=15) $6.07\pm 3.3^*$ ($p<0.05$) と、PLD 群の方が有意に低値であった。

雄性 PND30 の CRF1 群 (n=7)、PLD 群 (n=5) の体重 (g) は 15.3 ± 1.28 、 15.5 ± 1.35 、精巣絶対重量 (mg) は 79.3 ± 15.84 、 $93.6\pm 10.21^*$ ($p<0.05$)、

精巣上体絶対重量 (mg) は 18 ± 3.2 、 $22.6\pm 1.14^{**}$ ($p<0.01$) と PLD 群で雄性生殖器の重量が高値を示した。

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晩発影響の検討

子宮の reserve cell hyperplasia の誘発は、DES、EE 投与群ともに認められなかった。マウス個体当たりの多卵性卵胞の平均発生数 \pm SD は、対照群 4 ± 1.4 (n=7)、周産期投与群 $6.8\pm 3^{**}$ (n=14) と、投与群で有意 ($p<0.01$) に増加した。

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

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

(1) 一般状態観察、体重及び摂餌量測定

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、0.1 及び 1 mg/kg の両投与群で有意差を示した。ICI 併用群では、EE 1 mg/kg 投与群に体重の有意な低値がみられたが、EE 0.1 mg/kg 投与群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。

(2) 器官重量の測定

解剖時の体重は、ICI を併用しない EE 0.1 及び 1 mg/kg 両投与群で有意な低値を示した。ICI 併用群では EE 1 mg/kg 投与群に体重の有意な低値がみられたが、EE 0.1 mg/kg 投与群に有意差はみられなかった。前立腺腹葉では、EE 0.1 mg/kg 投与群の絶対重量に有意な低値がみられたが、EE 1 mg/kg 投与群に有意差はなく、相対重量に有意差はみられなかった。ICI 併用群では前立腺腹葉の絶対及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。精囊+凝固腺では、EE 1 mg/kg 投与群の相対重量に有意な高値がみられたが、ICI 併用群ではむしろやや低下した。陰茎亀頭でも EE 1 mg/kg 投与群の相対重量に有意な高値がみられたが、ICI 併用群では有意な差はみられなかった。肝臓では EE 1 mg/kg 投与群及び ICI を併用投与した EE 1 mg/kg 投与群の相対重量が有意な高値を示した。肛門挙筋+球海綿体筋及び尿道球腺重量に有意な変化はなかった。

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

(1) 一般状態観察、体重及び摂餌量測定

一般状態に顕著な変化はなかった。体重及び摂餌量は EE 10 及び 30 mg/kg 投与群で有意な低値を示し、ICI 併用投与群でも同様であった。ICI を併用投与した EE 10 mg/kg 投与群の 1 例は、試験途中から体重及び摂餌量の急激な減少がみられたことから異常例と判断して試験データから除外した。

(2) 器官重量の測定

解剖時の体重は EE 10 及び 30 mg/kg 両投与群で有意な低値を示し、ICI 併用投与群でも同様であった。前立腺腹葉の絶対重量は EE 30 mg/kg 投与群、ICI を併用投与した EE 10 及び 30 mg/kg 投与群で有意な低値を示したが、相対重量に有意な差はみられなかった。肛門挙筋+球海綿体筋の絶対重量は EE 10 及び 30 mg/kg 投与群、ICI を併用投与した EE 30 mg/kg 投与群で有意な低値を示したが、相対重量に有意な差はみられなかった。陰茎亀頭では EE 30 mg/kg 投与群の絶対重量が有意な低値を、EE 10 mg/kg 投与群の相対重量が有意な高値を示したが、ICI を併用投与した群に有意差はみられなかった。尿道球腺では ICI を併用投与した EE 30 mg/kg 投与群の絶対重量が有意な低値を示したが、相対重量に有意差はみられなかった。肝臓では EE 10 及び 30 mg/kg 投与群の絶対及び相対重量が有意な高値を示し、ICI 併用投与群でも同様であった。精囊+凝固腺重量に有意な差はなかった。

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

(1) 一般状態観察、体重及び摂餌量測定

一般状態に顕著な変化はなく、NG 投与による体重及び摂餌量への影響はみられなかった。

(2) 器官重量の測定

NG 100 mg/kg 投与群では尿道球腺の相対重量及び肝臓の絶対重量を除く各器官の絶対及び相対重量が有意な高値を示したが、30 mg/kg 投与群に有意な変化はなかった。ICI の併用投与群では尿道球腺に有意な増加はみられず、他の副生殖器に有意な高値がみられたが、その程度は ICI を併用投与しない群より軽度であった。ICI の併用投与群では肝臓の絶対及び相対重量に有意な変化はみられなかった。

4) EE のアンドロゲン作用検出のための Hershberger 試験

(1) 一般状態観察、体重及び摂餌量測定

一般状態に顕著な変化はなかった。体重及び摂餌量は EE 1、10 及び 30 mg/kg 投与群で有意な低値を示し、EE 0.1 mg/kg 投与群では摂餌量に有意な低値を示す日がみられた。

(2) 器官重量の測定

解剖時の体重は EE 1、10 及び 30 mg/kg 投与群で有意な低値を示した。前立腺では EE 30 mg/kg 投与群の相対重量が有意な高値を示し、精囊+凝固腺では EE 30 mg/kg 投与群の絶対及び相対重量、EE 10 mg/kg 投与群の相対重量が有意な高値を示した。肛門挙筋+球海綿体筋は EE 1 mg/kg 以上の投与群で絶対重量の有意な低値がみられたが、相対重量に有意差はみられなかった。陰茎亀頭では EE 10 mg/kg 投与群の相対重量が有意な高値を、肝臓では EE 10 及び 30 mg/kg 投与群の相対重量が有意な高値を示した。尿道球腺重量に有意な変化はみられなかった。

【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

1) 試験開始前の膺スミア観察で、発情期像あるいは発情前期像を呈した個体は、剖検時の肉眼的観察で卵巣の残存は確認されなかった。それら個体の子宮重量は、同時期に実施した子宮肥大試験の溶媒対照群の子宮重量より明らかに高値を示し、その値は 0.2 μ g/kg の EE を皮下投与した陽性対照群の値に匹敵するものもあった。卵巣摘出動物を用いる子宮肥大試験では、試験開始前の膺スミア観察が重要であることが確認された。

2) 投与期間中の体重推移には、CE-2 群と PLD 群の間で明らかな差はみられなかった。CE-2 群の子宮重量は、いずれの用量においても PLD 群に比べて高値を示し、標準偏差が大きくなる傾向にあった。餌に含まれる植物エストロゲンは、マウス子宮肥大試験の結果に弱い影響を及ぼす可能性が示唆されたが、検出感度には影響しない程度の変化であると判断された。

3) 抗エストロゲン作用の陽性対照に使用される Tamoxifen については、幼若ラットより卵巣摘出

マウスの方がより明確に抗エストロゲン作用を検出したが、いずれも用量依存性の乏しい変化であった。

OECD/WHO 関連等研究ハーモナイゼーション総括

井上 達

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。他方、野生生物における暴露状況とヒトにおける暴露経路は異なりヒトにおける内分泌かく乱化学物質の蓋然性は限定的であることも明らかになってきた。

ウェイブリッジ会議以降10年を迎えた本研究の最終段階にあたり必要なことがらは、フィンランドにおける欧州委員会の「ワークショップやNIEHSにおけるBPAに関するワークショップで明らかになった認識の到達点に即して、ヒト影響メカニズム研究、適切な試験法の開発、などの諸点から、OECDやWHOにおける連携のもとで引き続き国際協力を進めてゆくことである。

反復投与毒性試験系 (TG107を含む) への適用に関する調査研究

山崎 寛治

OECDでレベル3として検討されている改良TG407の適用について検討した。現在までOECDガイドライン化を目的とした試験についてはPhase 1、2が実施され、終了している。最終段階であるPhase 2の結果が2006年の第5回VMG-mammalian会合で公表された。会議では一部の弱いエストロゲン物質、あるいはアンドロゲン物質で作用が検出されなかったことから、内分泌作用を検出するスクリーニング試験としては不十分であるとの意見が出された。しかし、改良TG407が一般毒性試験であること、Phase 1、2に

おいて強いエストロゲン物質、アンドロゲン物質、甲状腺作用物質の影響が検出されていることなどを考慮し、VMGとしては現行のOECDガイドラインであるTG407を改良TG407に変える方向で考えると結論になった。現在、Phase 1、2の成績をもとにしたピアレビューが進行中であり、次回のVMG会議でその結果が公表される予定である。

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、すでにOECD Validation Studyが終了し、用いられた4種類いずれのprotocolも弱いエストロゲン様作用を検出することができ、その再現性、検出感度、試験機関間での再現性等、満足できる試験法であり、さらに動物種、飼育条件、溶媒等の諸条件の幅を許容しうるrobustな方法である。本研究では、これまでにOECD Validation Study後に実施された試験データを収集・整理し、negative controlに関する情報、代謝活性化される化合物に関する情報、estrogen antagonist評価への有用性、群構成、positive、negativeの判断基準及び試験の成立条件について検討を加えてきた。本年度は、2007年1月に開催されたOECD/EDTA第6回VMG-mammalian会合の議論について、これまで検討してきた知見を基に考察し、得られた知見をOECDガイドライン案の骨子に付加する形でガイドライン案として纏めた。

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

OECD VMG会議でバリデーションプログラムの最終であるブラインド物質を使用したPhase 3が公表された。結果としては、ブラインド物質を使用した試験においても、各機関間での相関性は良好であり、さらには物質の検出系としてもHershberger試験は有用であるとされた。また、文献調査ではPhase 1の結果が論文化され、Phase 2試験の結果も論文化途中である。尚、現時点において、本試験のPhase 1からPhase 3の結果をもとにピアレビューが実施されており、次回のVMG会合までには終了すると思われる。

D. 考察

本研究は、【内分泌かく乱性確定試験開発研究、一生涯試験等】では、実用的な「確定試験」を構築することを目指した研究を推し進めてきた。「試験スキーム」のスクリーニングに於いて生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）。

神経・行動試験系については、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たため、本研究班では、高次行動異常を当面の焦点として、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を検査する行動試験の導入を進めた。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を解析した。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、早発閉経等の成熟後の機能異常を中心に解析を行った。

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示されたと同時に、この方向性に沿って引き続き網羅的な確認を加えつつ研究を進めることで、クロストーク問題、低用量問題等に的確に対応可能な確定試験を確立することが出来る見通しが立ったと考える。

これを支える支援基盤研究としては、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研究、問題となる化合物が標的とし得る核内受容体 AR、ER α/β 、GR、MR、RAR $\alpha/\beta/\gamma$ 、PR、PXR、RXR、TR α/β 、及び VDR 系との相互作用に対する迅速な判断材料を提供する研究、及び胎生期初期影響のメカニズム

情報提供支援体制としての胚性幹細胞（ES 細胞）の *in vitro* での多分化能に対する影響解析研究、高精度遺伝子発現解析技術による生殖器の発達影響の複雑な作用点を明確にする研究、神経行動学的結果の分子生物学的裏付けを進めた。これらにより確定試験の評価の精度と客観性の向上が図られた。

【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】（これは、OECD の Conceptual Frame Work Level 3~4 に対応する試験開発から成る）では、*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した。

【OECD 対応試験実施・調査研究】では、国際的協調の継続として、OECD に代表される国際的な場において、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図り包括的なガイドラインの開発に貢献した。

E. 結論

包括的対応体系の確立、胎児期、新生児期の周産期暴露が、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の方向性を種々の新しい毒性指標とともに明らかにした。

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 testicular development by oral administration to pregnant rats. *Journal of Toxicological Sciences*, (2005) 30, pp.175-194.

Ono, H., Saito, Y., Imai, K., Kato, M.: Subcellular distribution of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rat testis. *Journal of Toxicological Sciences*, (2004) 29: 113-124

Watanabe, C., Kuwagata, M., Yoshimura, S., Azegami, J., Kojima, K., Ono, H., Nagao, T. : An improved technique for repeated gavage administration to rat neonates. Congenital Anomalies, (2003) 43: 177-179

2) 学会発表

太田 亮、宮原 敬、又吉 健、大向英夫、小野 宏：新生児期の低用量DES暴露が及ぼす加齢雌ラットの生殖系への長期的影響。日本内分泌攪乱化学物質学会第9回研究発表会。2006年11月（東京）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

（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）、及びラットを用いた Diethylstilbestrol (DES) 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）

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。この一環として Bisphenol A (BPA) に引き続き Diethylstilbestrol (DES) の低用量試験を実施した。

平成 16 年度の研究において、BPA の高用量のみならず、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。平成 17 年度の研究では、その再現性を確認するため、0、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 12 ヶ月齢まで観測した。その結果、0.5 µg/kg 群では、persistent estrus を呈する動物の出現頻度は 12 ヶ月齢時、constant estrus を呈する動物の出現頻度は 7 ヶ月齢から 11 ヶ月齢時において媒体対照群に比較して有意に増加した。5 µg/kg 群では、persistent estrus を呈する動物の出現頻度は 12 ヶ月齢時、constant estrus を呈する動物の出現頻度は 7 ヶ月齢、10 ヶ月齢において媒体対照群に比較して有意に増加した。50 µg/kg 群では、persistent estrus を呈する動物数は 12 ヶ月齢時、constant estrus を呈する動物の出現頻度は 6、7、8、9、10 及び 12 ヶ月齢時で有意に増加した。

本年度は前 2 年度のデータを詳細に見直し、その有意性を検討するとともに、その一般化を図る目的で、エストロゲン活性にして相当量の DES について検討を実施した。少なくとも BPA の 50 µg/kg 群では遅発性の性周期異常は再現性のある変化であることが確認された。

更に、経済開発協力機構 (OECD) の第 9 回内分泌かく乱化学物質の試験及び評価に関する EDTA タスクフォース会合、及び第 5 回第 6 回ヴァリデーションマネジメントグループ/動物試験会合に参加し、国際協調の場に於いて、リードカントリーとして内分泌かく乱化学物質に関する試験法の開発のガイドライン作成に取り組んだ。

A. 研究目的

厚生労働省の内分泌かく乱化学物質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（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

のひとつの可能性として、EDCs のラット経胎盤・経母乳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。

更に、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、ガイドライン化に参加し、日本からの独自の情報の発信や提案を行い、国際協調体制を確保する。

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精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す。これは、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) BPA、及び DES を雌性動物の新生児期に低用量暴露した際の性ホルモン系に対する低用量影響を検討した（委託研究：委託先：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）。さらに、(3) OECD/EDTA 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

- ・ BPA 及び DES 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) 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）、及びラットを用いた Diethylstilbestrol (DES) 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）

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）

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 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。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）にエーテル麻醉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。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、腔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、性比が上記を満たす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。

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日齢から腔開口を観察した。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、腔スミアを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。

雌出生児はすべて12ヶ月齢で剖検に供した。雌出生児は、上記①、②、③において発情前期にCO₂+O₂

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。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。

統計処理は、母動物の出産率、出生児の出產生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。体重、各性成熟検査、器官重量についてはDunnnettによる多重比較検定を行った。なお、性周期については、イェーツ補正カイ二乗検定、Fisherの直接確率検定を行った。

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

BPAと同様な晩発影響が陽性対照物質Diethylstilbestrol(DES)の暴露によっても観測さ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、20 ng/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)雌70匹、雄30匹を購入した。5日間の検疫・馴化機関終了後、健常であることが確認された雌を雄ラットと共に夕刻に交配ケージに移し、1対1の割合で一晩同居させた。翌朝腔栓及び腔垢中の精子の存在をもって交尾が成立したものと見なし、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。

DESの0、0.2、2、20 ng/kg/dayの用量、投与容量5 mL/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-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、当該参加各国との調整、検討を行う。下記は、参加日程。

① EDTA/第5回VMG-mammalian(ヴァリデーションマネジメントグループ/動物試験)会合(2006年4月4-5日 於ワシントンDC、米国); 議題として、子宮肥大試験のガイドライン化、

Hershberger 試験をサポートするデータの提示、反復投与試験・改良 TG407 のガイドライン化案、甲状腺ホルモンかく乱物質アッセイ法等、について討議する。

②第9回内分泌かく乱化学物質の試験及び評価に関する EDTA タスクフォース会合（2006年4月26-27日 於：スウェーデン）；議題として、陰性物質に対する子宮肥大試験、去勢動物あるいは未成熟動物を用いた Hershberger 試験の検討、改良 TG407、確定試験(Level 5 studies)、甲状腺ホルモンかく乱物質アッセイ法、カエル変態試験の有用性、魚類を用いた内分泌かく乱試験法、無脊椎動物を用いた試験の有用性、ER 親和性レポーター遺伝子アッセイ等を討議する。

③ EDTA/第6回 VMG- mammalian (ヴァリデーションマネジメントグループ/動物試験) 会合（2007年1月17-18日 於：スロベニア、リュブリャナ）；議題として、子宮肥大試験のガイドライン化への追加データ（マウスの有用性等）、飼料中及び床敷きの植物性エストロゲンが子宮肥大に及ぼす影響、去勢あるいは未成熟動物を用いた Hershberger 試験の有用性、確定試験、改良 TG407 の病理組織学的検査法等について議論する。

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) 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）、及びラットを用いた Diethylstilbestrol (DES) 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）

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）

平成 17 年度に設定した実験について結果を検討した。

母動物の一般状態及び体重推移

(Figure 1, Table 1-1, 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

(Tables 2-1, 7-1, 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 母妊娠期間死亡；

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不良であった。

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

④ 哺育不良

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

⑤ 児死亡 ;

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

その他の母動物では、分娩時及び哺育期間中一般状態、哺育状態に異常はみられず、体重も媒体対照群とほぼ同様な推移を示した。

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

出産から離乳時までの総死亡児数は媒体対照群 9 匹、BPA 0.5 µg/kg 群 27 匹、BPA 5 µg/kg 群 30 匹、BPA 50 µg/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

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

BPA 50 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、BPA 0.5、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、BPA 0.5、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 (陰開口及び陰茎亀頭型分類)

(Tables 4-1、4-2、Addenda 4-1、4-2)

陰開口検査において、媒体対照群、0.5、5、及び 50 µg/kg 群の平均陰開口日齢は各々 34.1 ± 2.2 、 33.2 ± 2.3 、 34.6 ± 2.1 、 34.3 ± 2.4 、平均陰開口日体重(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

(Tables 5-1、5-2、Addenda 5-1~5-11)

陰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。

7 ヶ月齢時の性周期検査では、媒体対照群の 3/31 例で persistent diestrus、1/31 例で constant diestrus、1/31 例で persistent estrus、0.5 µg/kg 群の 1/23 例で persistent diestrus、1/23 例で persistent estrus、及び 4/23 例で constant estrus、5 µg/kg 群の 1/22 例で persistent diestrus、2/22 例で constant diestrus、1/22 例で persistent estrus、2/22 例で constant estrus、50 µg/kg 群の 2/30 例で persistent diestrus、6/30 例で constant estrus、1/30 例で irregular estrus みられた。

8 ヶ月齢時の性周期検査では、媒体対照群の 3/19 例で persistent diestrus、2/19 例で constant diestrus、1/19 例で persistent estrus、1/19 例で constant estrus、1/19 例で irregular estrus、0.5 µg/kg 群の 1/23 例で persistent diestrus、2/23 例で persistent estrus、7/23 例で constant estrus、5 µg/kg 群の 2/22 例で persistent diestrus、5/22 例で constant diestrus、2/22 例で constant estrus、50 µg/kg 群の 1/18 例で persistent diestrus、1/18 例で constant diestrus、2/18 例で persistent estrus、8/18 例で constant estrus がみられた。

9 ヶ月齢時の性周期検査では、媒体対照群の 3/19 例で persistent diestrus、5/19 例で constant diestrus、1/19 例で persistent estrus、0.5 µg/kg 群の 1/23 例で constant diestrus、4/23 例で persistent estrus、8/23 例で constant estrus、5 µg/kg 群の 2/22 例で persistent diestrus、2/22 例で constant diestrus、5/22 例で persistent estrus、2/22 例で constant estrus、50 µg/kg 群の 5/18 例で persistent diestrus、1/18 例で constant diestrus、2/18 例で persistent estrus、4/18 例で constant estrus がみられた。

10 ヶ月齢時の性周期検査では、媒体対照群の 1/19 例で persistent diestrus、4/19 例で constant diestrus、1/19 例で persistent estrus、0.5 µg/kg 群の 5/23 例で persistent diestrus、1/23 例で persistent estrus、10/23 例で constant estrus、5 µg/kg 群の 1/22 例で persistent diestrus、5/22 例で constant diestrus、1/22 例で persistent estrus、3/22 例で constant estrus、50 µg/kg 群の 1/18 例で persistent diestrus、1/18 例で constant diestrus、3/18 例で persistent estrus、9/18 例で constant estrus がみられた。

11 ヶ月齢時の性周期検査では、媒体対照群の 3/18 例で persistent diestrus、4/18 例で constant diestrus、1/18 例で persistent estrus、2/18 例で constant estrus、0.5 µg/kg 群の 3/23 例で persistent diestrus、3/23 例で constant diestrus、2/23 例で persistent estrus、8/23 例で constant estrus、1/23 例で irregular estrus、5 µg/kg 群の 2/22 例で persistent diestrus、6/22 例で constant diestrus、3/22 例で persistent estrus、6/22 例で constant estrus、50 µg/kg 群の 2/18 例で constant diestrus、4/18 例で persistent estrus、6/18 例で constant estrus、2/18 例で irregular estrus

がみられた。

12 ヶ月齢時の性周期検査では、媒体対照群の 1/18 例で persistent diestrus、3/18 例で constant diestrus、1/18 例で constant estrus、0.5 µg/kg 群の 6/23 例で persistent diestrus、1/23 例で constant diestrus、6/23 例で persistent estrus、5/23 例で constant estrus、1/23 例で irregular estrus、5 µg/kg 群の 7/22 例で persistent diestrus、3/22 例で constant diestrus、4/22 例で persistent estrus、5/22 例で constant estrus、1/22 例で irregular estrus、50 µg/kg 群の 2/18 例で persistent diestrus、3/18 例で persistent estrus、9/18 例で constant estrus がみられ、2/18 例で irregular estrus がみられた。

統計学的検討では、0.5 µg/kg 群で、10 ヶ月齢時及び 12 ヶ月齢時の総異常周期動物数が有意に増加した。persistent estrus または constant estrus を呈した動物の出現頻度は 7、8、9、10 及び 12 ヶ月齢時において媒体対照群に比較して有意に増加した。5 µg/kg 群で、6 ヶ月齢時及び 12 ヶ月齢時の総異常周期動物数が有意な発生頻度を示した。persistent estrus または constant estrus を呈した動物は、9 及び 12 ヶ月齢時に有意な発生頻度を示した。50 µg/kg 群では、10 ヶ月齢時及び 12 ヶ月齢時において総異常周期動物数が有意な発生頻度を示した。Estrus の異常を示した (persistent estrus または consistent estrus を示した) 例数は、7 ヶ月以降、50 µg/kg 群で有意な増加をほぼ毎月示し、また、12 ヶ月齢時には、BPA 投与群すべてが有意な増加を示した。

器官重量

(Tables 6-1-6-5、Addenda 6-1-6-5)

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。

7 ヶ月齢時の器官重量(雌のみ、媒体対照群 12 例、50 µg/kg 群 12 例)では、50 µg/kg 群で脳の絶対重量低値、肝臓及び腎臓の相対重量低値がみられた。

12 ヶ月齢時の雄の器官重量(媒体対照群 19 例、0.5 µg/kg 群 12 例、5 µg/kg 群 14 例、50 µg/kg 群 18 例)では、0.5 µg/kg 群で腎臓の絶対重量の低値、5 µg/kg 群で精巣の絶対重量高値がみられた。50 µg/kg 群の絶対重量及び全ての BPA 投与群の相対重量で媒体対照群との間に差はみられなかった。

12 ヶ月齢時の雌の器官重量(媒体対照群 18 例、0.5 µg/kg 群 23 例、5 µg/kg 群 22 例、50 µg/kg 群 18 例)では、いずれの BPA 投与群においても絶対及び相対重量とも媒体対照群との間に差はみられなかった。

剖検

(Tables 7-1～7-4、Addenda 7-1～7-4)

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、水腫性変化及び肺剖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。

7 ヶ月齢時の剖検 (雌のみ、媒体対照群 12 例、50 µg/kg 群 12 例) では、媒体対照群で皮下組織の腫瘤(1/12)がみられた。50 µg/kg 群で卵巣の小型化(3/12)、胸骨の変形(1/12)がみられた。

12 ヶ月齢時における雄の剖検 (媒体対照群 19 例、0.5 µg/kg 群 12 例、5 µg/kg 群 14 例、50 µg/kg 群 18 例) では、媒体対照群で腎臓の結石と腎盂拡張(1/19)、精巣の腫大と精巣上体の白色病変 (Whitish region、1/19)、外耳の肥厚(2/19)、後肢の胼胝(2/19)がみられた。0.5 µg/kg 群で異常はみられなかった。5 µg/kg 群では、腎臓の嚢胞(1/14)、腎盂拡張(2/14)、後肢の胼胝(1/14)、50 µg/kg 群で腎臓の結石(2/18)、嚢胞(1/18)、腎盂拡張(1/18)、精巣上体の白色部(1/18)、大脳の皮質の部分欠損(1/18)、副腎の暗赤色部(1/18)、腫大(1/18)、後肢の胼胝(1/18)がみられた。

12 ヶ月齢時における雌の剖検 (媒体対照群 19 例、0.5 µg/kg 群 23 例、5 µg/kg 群 22 例、50 µg/kg 群 18 例) では、媒体対照群で卵巣の嚢胞(1/18)、小型化(4/18)、子宮のポリープ(1/18)、膣の嚢胞(1/18)、下垂体の黒色部(1/18)、腫大(2/18)、後肢の胼胝(2/18)、乳腺の乳汁分泌(4/18)或いは発達乳腺(3/18)がみられた。0.5 µg/kg 群では、肺の右肺中葉の無気肺(1/23)、

卵巣の嚢胞(2/23)、小型化(6/23)、子宮の嚢胞(1/23)、下垂体の黒色部 (Blackish region、1/23)、暗赤色部 (Dark reddish region、1/23)、腫大(2/23)、結節(2/23)、甲状腺の腫大(1/23)、後肢の胼胝(2/23)、乳腺の乳汁分泌(14/23)及び発達(1/23)がみられた。5 µg/kg 群で肺の暗赤色部 (Dark reddish region、1/22)、前胃壁の水腫様変化(1/22)、粘膜陥凹部(1/22)、卵巣の嚢胞(1/22)、小型化(3/22)、子宮のポリープ(1/22)、下垂体の腫大(2/22)、結節(4/22)、後肢の胼胝(2/22)、皮下組織の腫瘤(1/22)、乳腺の乳汁分泌(2/22)及び発達(6/22)がみられた。50 µg/kg 群で卵巣の小型化(4/18)、下垂体の黒色部(1/18)、腫大(1/18)、後肢の胼胝(2/18)、皮下腫瘤(1/18)、乳腺の乳汁分泌(5/18)がみられた。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)、精巣の暗赤色化、脾臓の小型化がみられた。また、323 日齢で死亡した媒体対照群雌の 1 例では、下垂体の結節、乳腺の発達がみられた。

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

陽性対象物質 DES を用いて検討を継続中である。

(3) OECD/EDTA/ VMG-Mammalian

① EDTA/第 5 回 VMG- mammalian (ヴァリデー ションマネジメントグループ/動物試験) 会合;

●この会議の Agenda Item 10: Level 5 Studies でプレゼンテーションを行った。

「確定試験 (詳細試験)」に関わる基礎的な検討を進め、「げっ歯類一生涯試験」の構想を打ち出した。従来の毒性評価法に沿ったこれまでの 1 世代、多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、多くの内分泌かく乱陽性候補物質が陰性の結果に終始することが予想される。しかも、これら従来の試験法では、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達検討してきた。「げっ歯類一生涯試験」における低用量問題については、雌マウスの早期持続発情の発現等、エンドポイント明確絞り込むことにより明らかとする。

●TG407 は Phase 1、2 の結果が公表され、強いエストロゲン物質、アンドロゲン物質、甲状腺作用物質の影響が検出され改良 TG407 の方向に変える結論となった。

②第 9 回内分泌かく乱化学物質の試験及び評価に関する EDTA タスクフォース会合; Hershberger 試験は、Phase3 の結果が公表され、各試験機関の相関性、検出結果は良好であった。

③EDTA/第 6 回 VMG- mammalian (ヴァリデー ションマネジメントグループ/動物試験) 会合;