

图-3

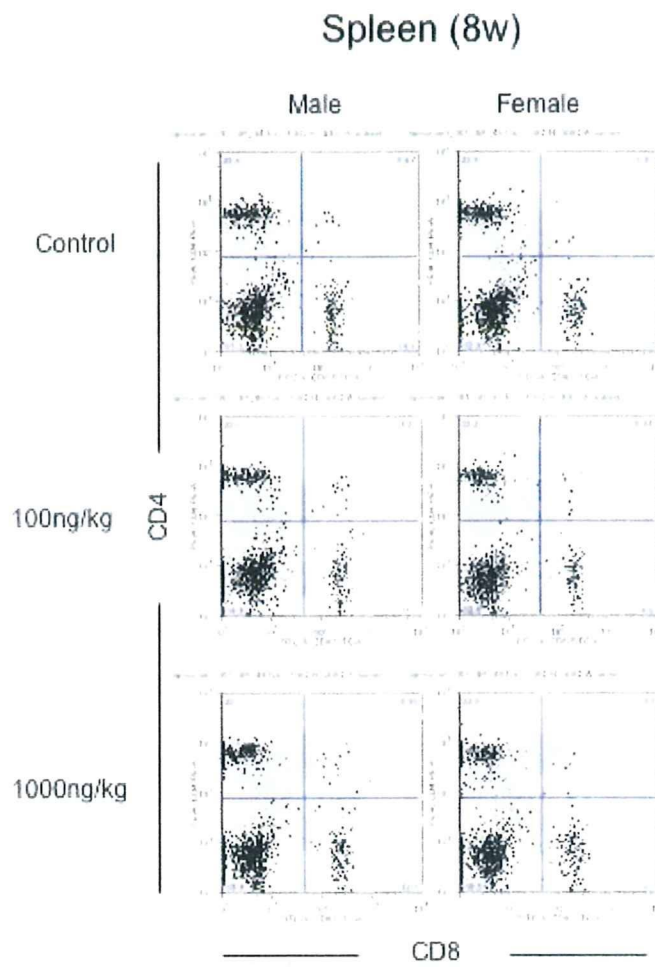
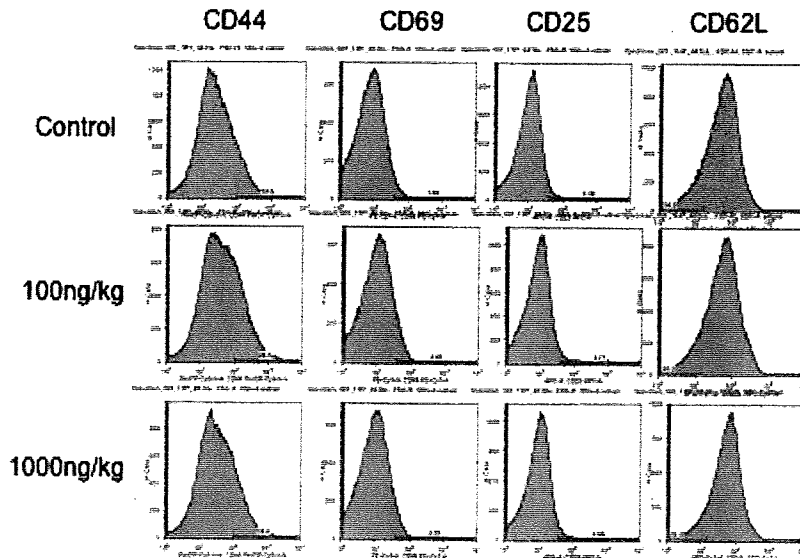


图-4

Thymus (8w)

Male



Female

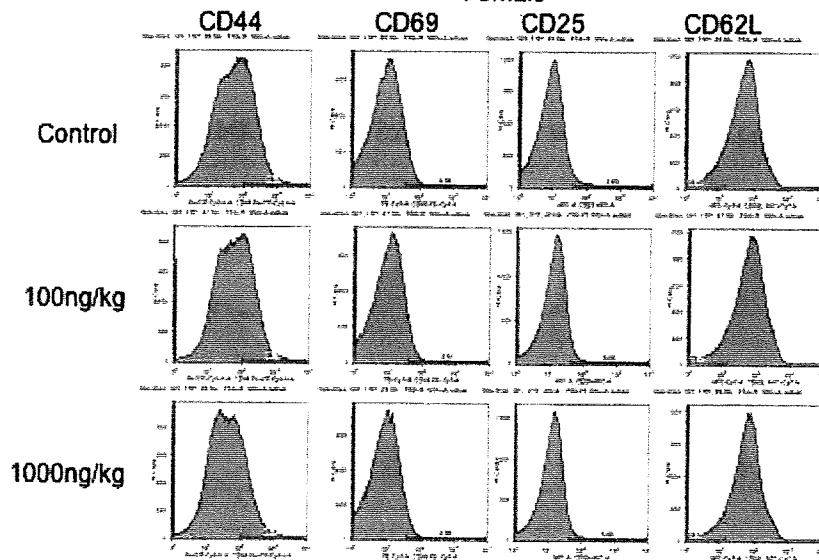
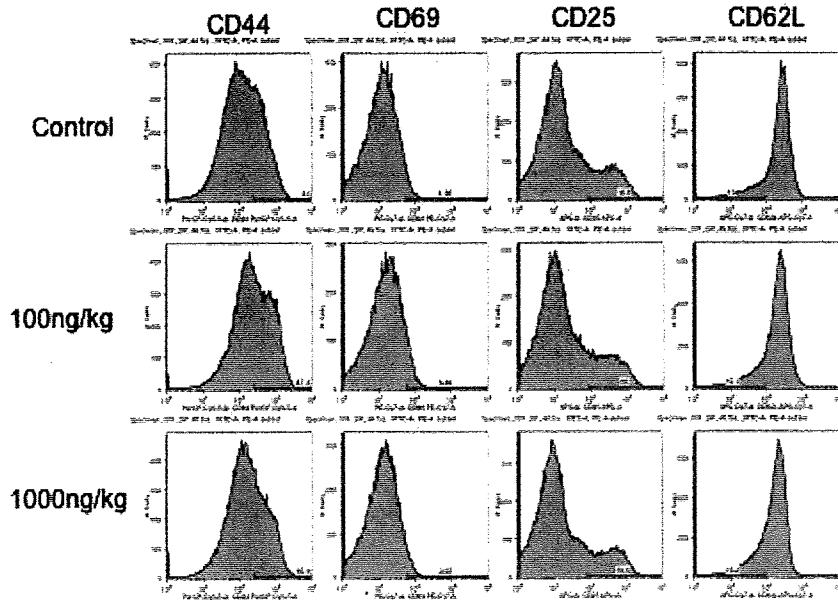


图-5

Spleen (8w)

Male



Female

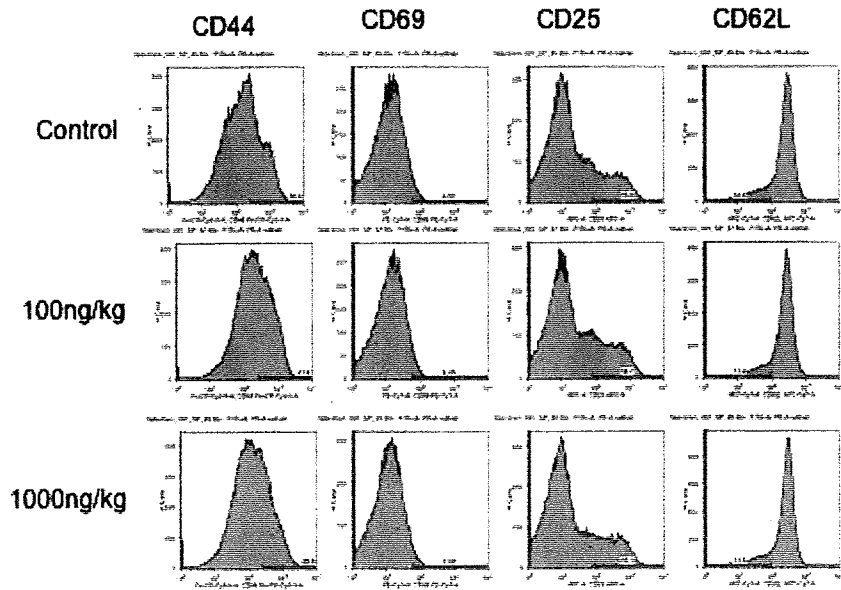
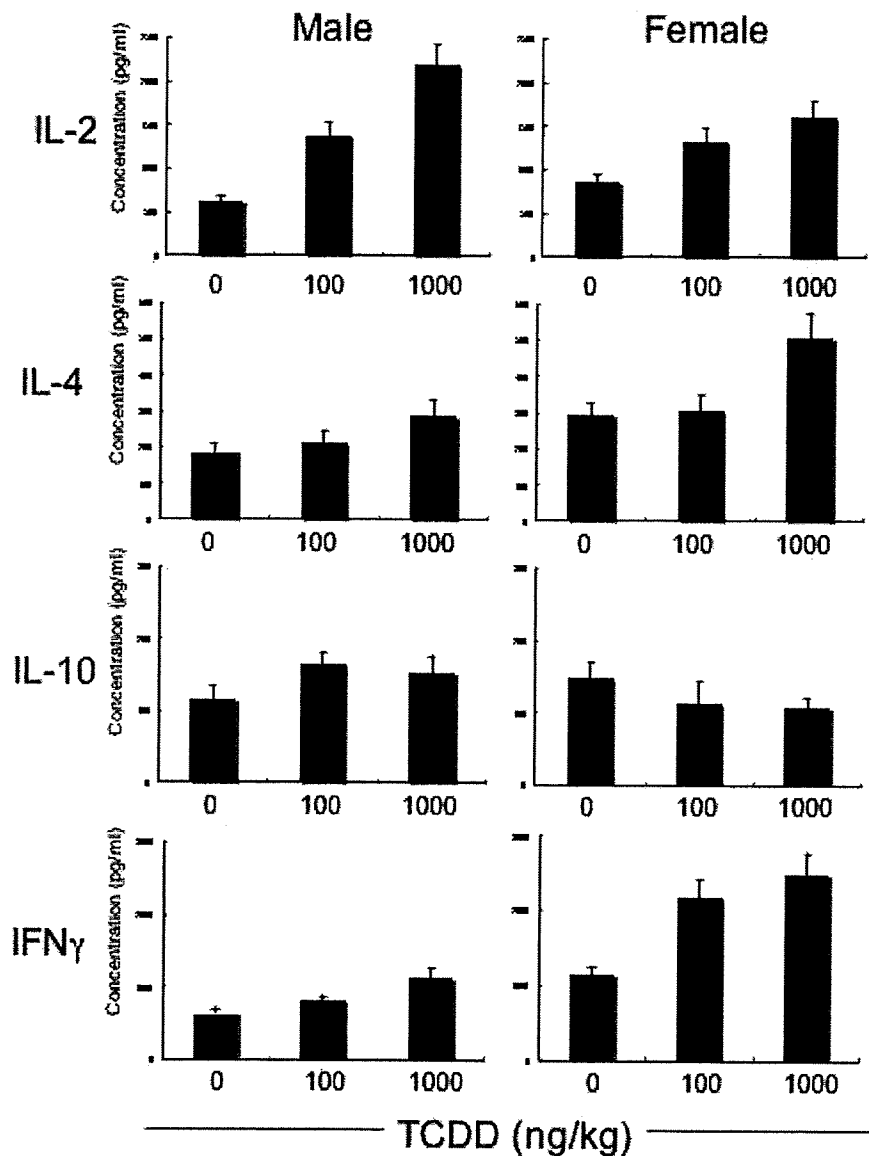


图-6



Splenic T cells were stimulated with anti-CD3 mAb (1 μ g/ml) and anti-CD28 mAb (20 μ g/ml) for 36 hours. Cytokine secretions from the T cells were analyzed by ELISA using the culture supernatants.

☒-7

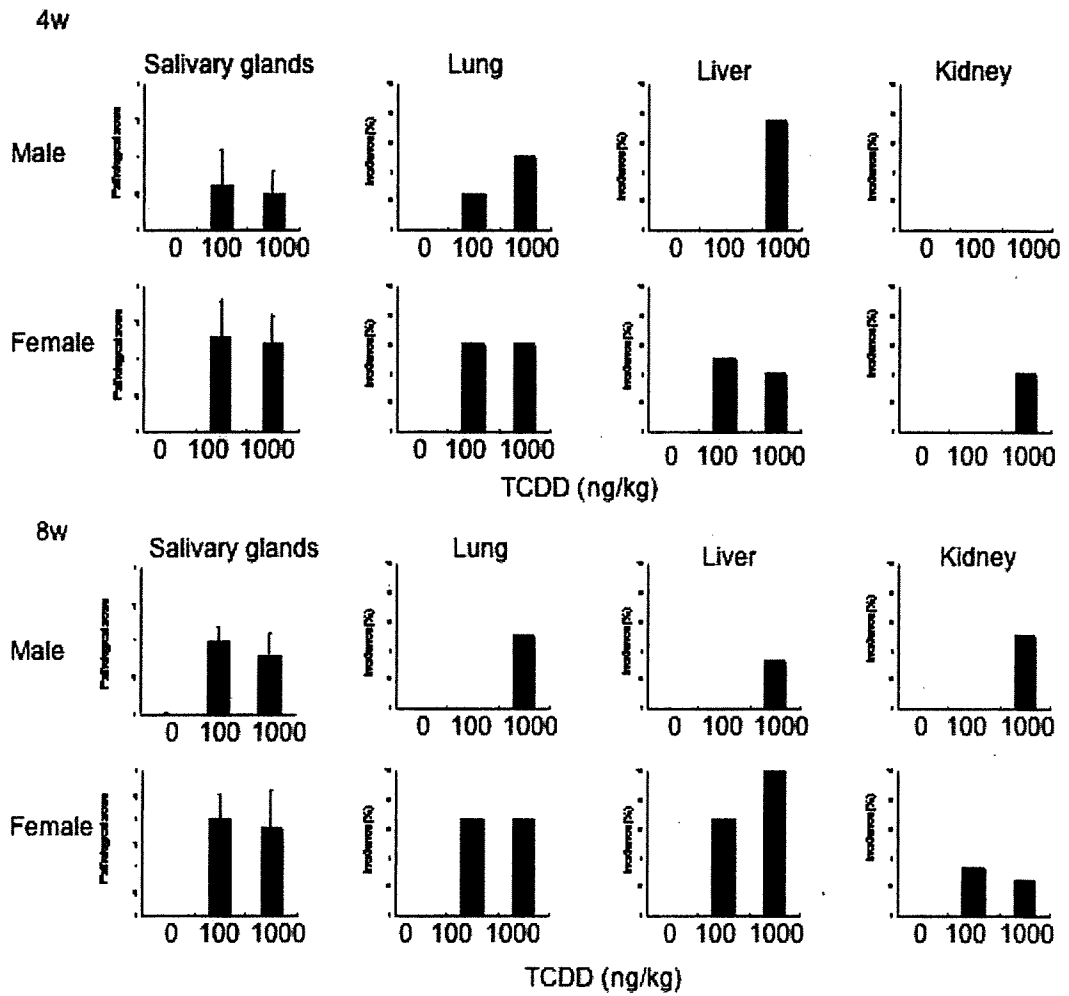
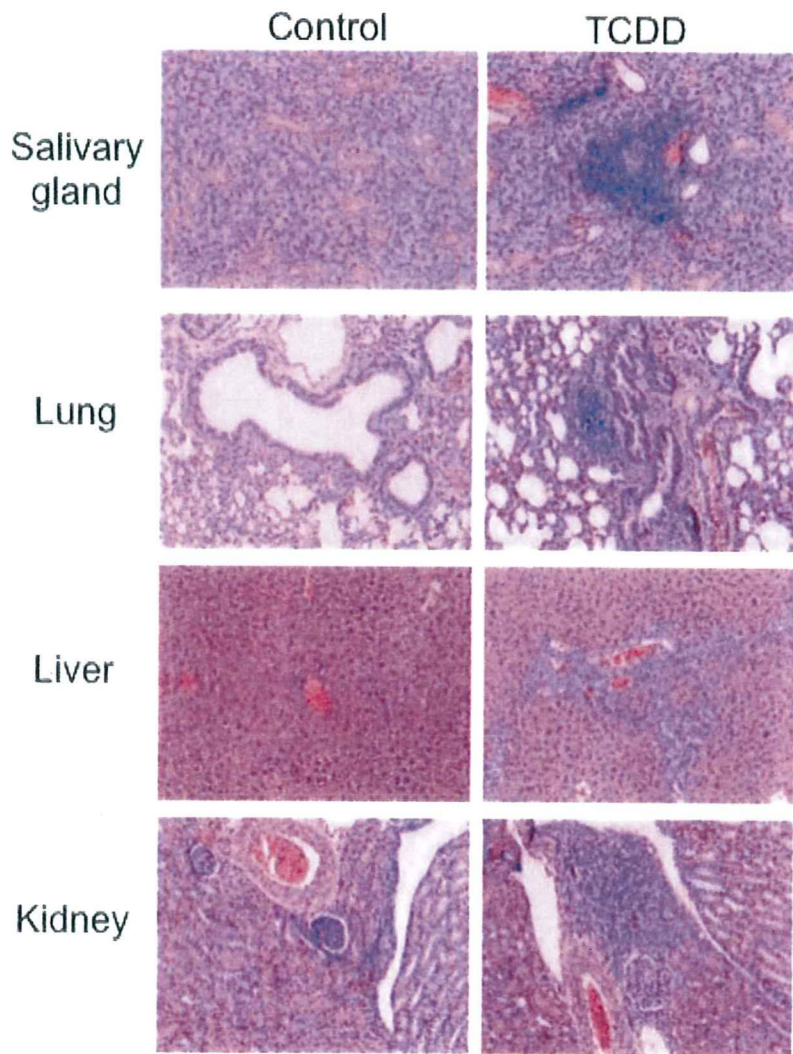


图-8



6. 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

分担研究者 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

研究要旨

CBA/JN マウスに $1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 及び $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の用量で Ethynylestradiol (EE) を経胎盤・経母乳曝露した結果、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。一方、出生仔を Th1 誘導抗原 (Dinitrochlorobenzene、DNCB) 及び Th2 誘導抗原 (Trimelliticanhydride、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サイトカイン産生を比較検討した結果、Th1 誘導サイトカインである $\text{IFN-}\gamma$ は DNCB、TMA 共に誘導がみられた。特に EE の低用量曝露群を DNCB で処理した際に、著しい分泌亢進が認められ、EE の経胎盤・経母乳曝露による Th1/Th2 balance への影響が示唆された。

A 研究目的

内分泌かく乱化学物質の影響は動物の生殖能に対するものではなく神経系、免疫系に対する影響も示唆されている。そこで化学物質の動物の免疫系に対する影響評価法としての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。

B 研究方法

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. 0320TM、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、媒体或いは各感作抗原を除毛した両側腹に $50 \mu\text{l}$ 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 $25 \mu\text{l}$ 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、 1×10^6 /ml に調整し、24 ウェルプレートに 2 ml ずつ分注した。

細胞は IL-4 については ConA (2 μ g/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 0.5 ml 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。

C 研究結果

1. 母動物

媒体対照群、1、10 μ g/kg/day 群で分娩した動物はそれぞれ 16/35 匹、31/50 匹、23/50 匹であり、媒体対照群と比較していずれの群においても出産率、妊娠期間、産仔数は媒体対照群と比較していずれの群においても有意差は認められなかった (表1-3)。

2. 仔動物

いずれの群も出生時の出生仔外表に異常はみられなかった。体重推移に異常はみられなかった。

3. サイトカイン産生

IFN- γ ; EE を経胎盤・経母乳曝露した母獣から得られた仔動物を Th1 誘導抗原 DNCB 及び Th2 誘導抗原 TMA を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 の低用量曝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が、EE 曝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 の誘導がみられたが、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。EE 曝露による明らかな影響はみられなかった。

D. 考察

CBA/JN マウスに 1 及び 10 μ g/kg/day の用量で EE を経胎盤・経母乳曝露した結果、出産数、妊娠期間、産仔数などの生殖毒性学的指標には媒体対照群との間で統計的な有意差は認められず、EE の経胎盤・経母乳曝露による影響はないものと推察された。各群の母動物から生まれた出生仔の免疫機能への影響を検討するため、

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サイトカイン産生を比較検討した結果、Th1誘導サイトカインであるIFN- γ はDNCB、TMA共に誘導がみられたが、特にEEの低用量暴露群をDNCBで処理した際に、著しい分泌亢進が認められた。また、IL-4及びIL-10に関しては媒体或いはTh1誘導抗原であるDNCBを投与した場合には顕著な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が、EE暴露による明らかな影響はみられなかった。

以上の結果から、EEの経胎盤・経母乳暴露によるTh1/Th2 balanceへの影響、特にTh1の誘導が示唆された。

E. 結論

EEを経胎盤・経母乳暴露により、出生仔のTh1/Th2 balanceへの影響、特にTh1の誘導が示唆される。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

Takeyoshi M, Noda S, Yamasaki K. Differences in responsiveness of mouse strain against p-benzoquinone as assessed by non-radioisotopic murine local lymph node assay. *Exp Anim.* 2004, 53(2):171-3.

Takeyoshi M, Noda S, Yamazaki S, Kakishima H, Yamasaki K, Kimber I. Assessment of the skin sensitization potency of eugenol and its dimers using a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J Appl Toxicol.* 2004, 24(1):77-81.

Takeyoshi M, Sawaki M, Yamasaki K,

Kimber I. Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with alpha-hexylcinnamic aldehyde as an example. *Toxicology.* 2003, 191(2-3):259-63.

Takeyoshi M, Kuga N, Yamasaki K. Development of a high-performance reporter plasmid for detection of chemicals with androgenic activity. *Arch Toxicol.* 2003, 77(5):274-9.

Takeyoshi M, Sawaki M, Noda S, Muroi T, Yamasaki K. Effect of gonadotropin-releasing hormone antagonist on ovarian and uterine weights in immature female rats. *Reprod Toxicol.* 2002, 16(4):367-9.

Takeyoshi M, Yamasaki K, Sawaki M, Nakai M, Noda S, Takatsuki M. The efficacy of endocrine disruptor screening tests in detecting anti-estrogenic effects downstream of receptor-ligand interactions. *Toxicol Lett.* 2002, 126(2):91-8.

Takeyoshi M, Yamasaki K, Yakabe Y, Takatsuki M, Kimber I. Development of non-radioisotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol Lett.* 2001, 119(3):203-8.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 環境ホルモン活性測定用プラスミドの開発

出願番号：特許出願2001-274877

公開番号：特許公開2003-79368

2. 化学物質のアレルギー性強度推定法

出願番号：特許出願2003-333984

公開番号：特許公開2005-95080

3. Non-RI LLNA法の感度上昇法

出願番号：特許出願2004-230151

公開番号：特許公開2006-42702

表 1

出産数(匹)		
Doses ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	出産数	未出産数
VC	16	19
1	31	19
10	23	27

表 2

妊娠期間(日)	
Doses ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	
VC	20.44 \pm 0.157
1	20.44 \pm 0.100
10	20.40 \pm 0.163

平均 \pm 標準偏差

表 3

産仔数(匹)			
Doses ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	雄	雌	合計
VC	1.5 \pm 0.26	2.1 \pm 0.30	3.6 \pm 0.35
1	1.5 \pm 0.22	1.9 \pm 0.22	3.5 \pm 0.29
10	1.8 \pm 0.20	2.1 \pm 0.24	3.9 \pm 0.27

平均 \pm 標準偏差

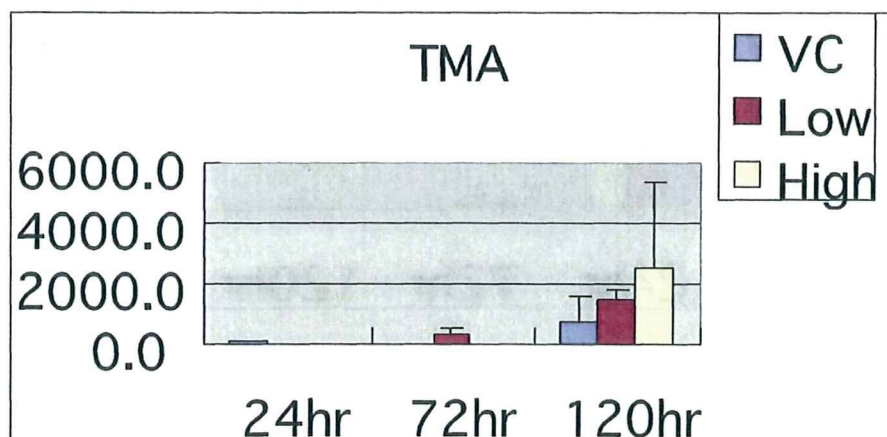
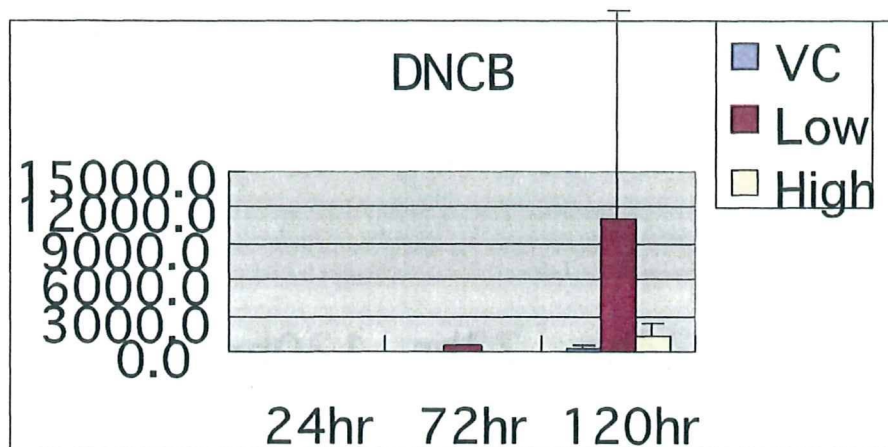
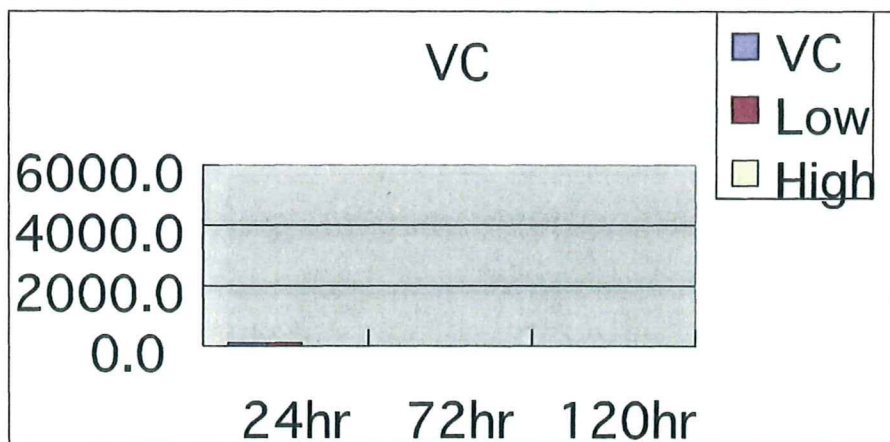


図1 抗原刺激後の所属リンパ節細胞からの IFN- γ 産生 (ConA-)

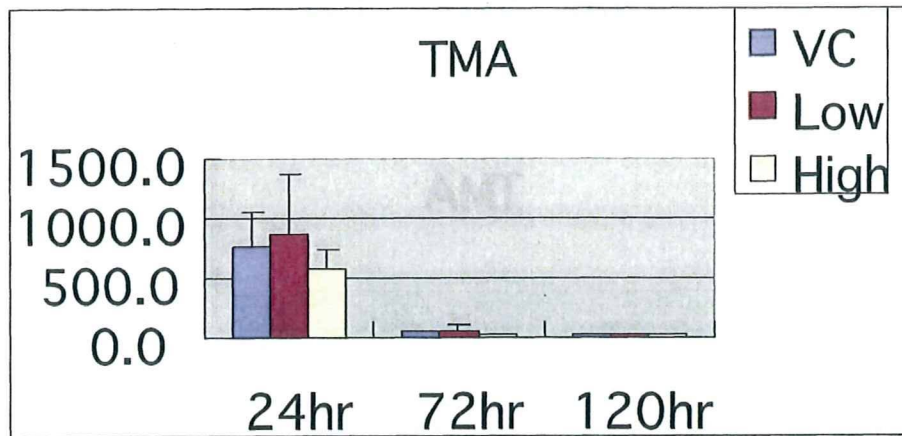
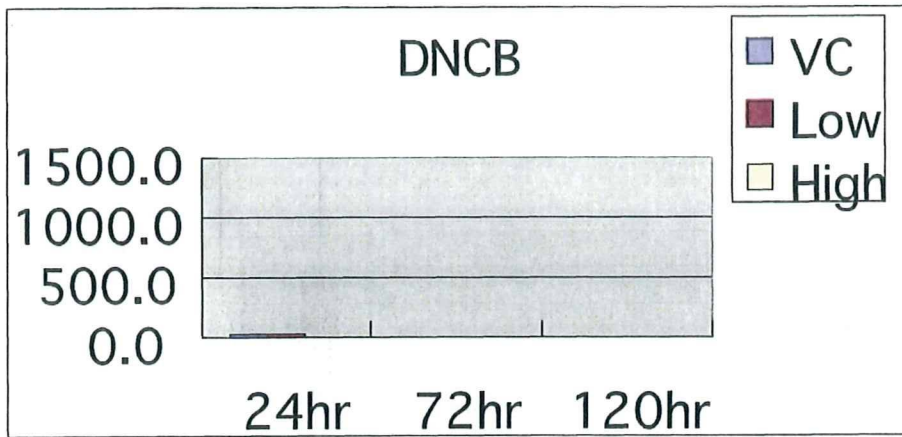
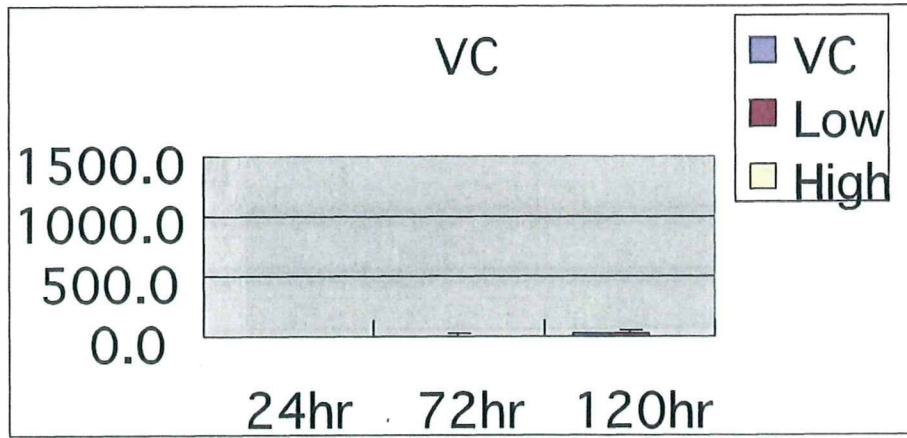


図2 抗原刺激後の所属リンパ節細胞からのIL-4産生 (ConA+)

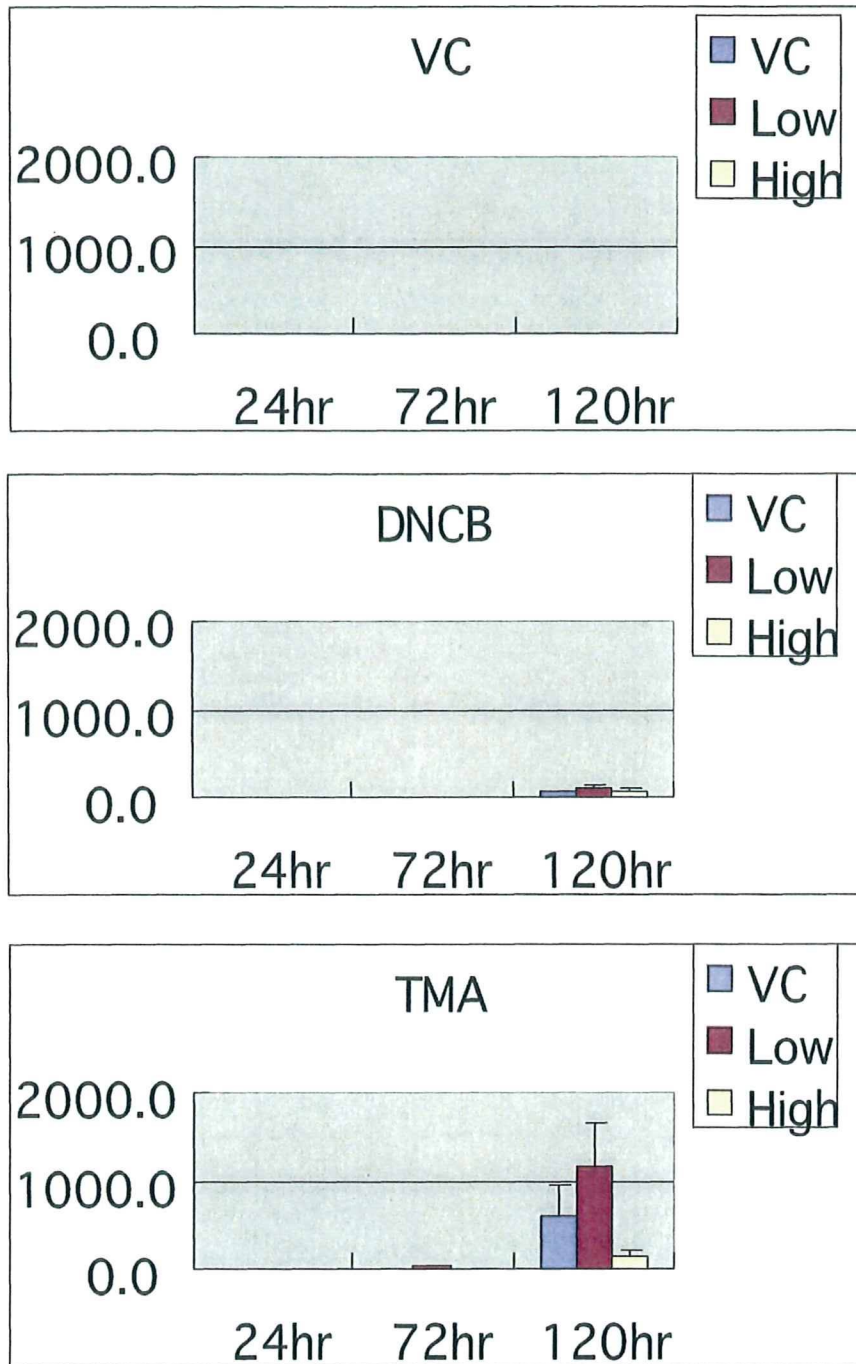


図3 抗原刺激後の所属リンパ節細胞からのIL-10産生 (ConA-)

3) 生殖器

7. 内分泌かく乱化学物質の雄性生殖器発達及びその機能に及ぼす影響

分担研究者 長尾 哲二 近畿大学工学部・生命科学 教授
共同研究者 斉藤 義明 (財)食品薬品安全センター
白見 憲司 (財)食品薬品安全センター

研究要旨

生殖細胞形成、排卵、受精、卵割、着床、胎盤形成、器官形成、性分化、組織発生、出生、発達・発育、性成熟、生殖、老化、死に至るすべての生命事象において、内分泌かく乱化学物質の低用量曝露により予想される内分泌学的毒性変化を含む生殖・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ラットあるいはマウスを用いて網羅的に検討することを目的とした。最終年度はマウスを用いて合成エストロゲンの精巣下降に及ぼす影響について胎児期および新生児期の変化を中心に検討した。その結果、精巣導帯の発生に關与する *Insl3*、精巣発生・発達に關与する *Ad4BP/SF-1* および *P-450* の発現が合成エストロゲンの胎児期曝露により影響されることが明らかになった。このことから胎児精巣におけるこれら遺伝子の発現は精巣下降不全あるいは精巣発生・発達障害の鋭敏な指標になり得ると考えられた。

A. 研究目的

本研究は、個体の一生涯で起こる生命事象を標的とした有害性評価試験系を構築することを目的とした。特に胎生期から新生児期にあたる高感受期（いわゆるインドウ期）に焦点を当て、これらの時期の内分泌かく乱化学物質の曝露が、曝露後間もない時期の生殖巣あるいは初期発生・発達の段階の精巣に生じたと予測される傷害は、その後のライフサイクルのいかなる時期に初め毒性影響として捉えることができるのか、あるいは晩（後）発的障害としてのみ捉えることができるのか、さらにはどのような初期傷害が性成熟後にみられる生殖機能障害と関連するののかについて検討することで重要である。すなわち本研究では、内分泌かく乱化学物質の環境レベルに近い低用量における毒性影響の検出を考慮しつつ、先天性生殖器奇形、生殖細胞死あるいは配偶子形成などの指標のいずれが内分泌かく乱化学物質の adverse effects を検出する雄性生殖毒性指標として適切であるかを検討し、内分泌かく乱作用により懸念される生体傷害を網羅的に確認する一

生涯試験の確立に貢献することを目的とした。そこで最終年度は、男児において出生時に最も高率にみられる先天性生殖器奇形の1つである精巣下降不全（停留精巣）cryptorchidism の誘発について、その指標と考えられる精巣導帯の発生について検討した。なお精巣下降不全は近年、全出生男児の1~5%にみられる（Toppari *et al.*, 1996; Pierik *et al.*, 2002）。

B. 研究方法

ICR マウスは日本クレア株式会社より8週齢にて購入し、入荷後1週間の検疫・馴化の後、体重増加および一般状態に異常のない動物を実験に使用した。飼育環境・方法などについては分担研究者らの既報と同様にした。実験方法の概要を以下に示した。

内分泌かく乱化学物質の外生殖器の形成過程に及ぼす影響を検討するため、マウスの妊娠9日（膣栓＝妊娠0日）から16日の連日に、diethylstilbestrol (DES) の50 μ g/kg 体重をコーン油に懸濁して背部皮下に注射した。胎齢17日、18日、あるいは養母哺育により得られた生後1日の新生児から、そ

れぞれ精巣を摘出した。次いで、精巣導帯の発生に関与する insulin-like peptide 3:*Insl3*、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。ハウスキーパー遺伝子として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。

さらに用量・反応関係を検討するため、DES の 6.25~50 μg/kg 体重を妊娠 9~16 日に背部皮下注射し、胎齢 18 日に精巣を摘出して、同様に *Insl3* 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。

なお、いずれの実験においても近畿大学理工学部「動物実験に関する指針」ならびに近畿大学動物実験規定に準拠して行い、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。

C. 研究結果

胎齢 17 日、18 日および生後 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 発現は対照群と比較すると有意に減少した。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 日および生後 1 日には、対照群との間に統計学的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、用量・反応関係の有無を調べた結果、*Insl3* mRNA 発現は DES の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、対照群および 6.25 μ

g/kg 群では観察されなかった。なお、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 μg/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 μg/kg 以下の投与群では摘出時には観察されなかった。

D. 考察

フタル酸エステルをマウス胎児期に曝露すると、雄ではテストステロン合成を抑制し、胎児の精巣下降に関連する遺伝子群 (*Insl3*、*Hoxa-10*、*calcitonin gene related peptide* など) に干渉することが知られている。発生学的には、上方靭帯と精巣導帯により腎臓近位にその位置を保つ生殖原基は、胎児期の発生進行とともに、雄ではアンドロゲンにより上方靭帯が退化し、逆に精巣導帯が発達して下方に精巣を引き寄せることにより精巣下降が進む。このように精巣下降の成立機構については組織から分子レベルまで詳細に解析が試みられている。今回、DES の性腺発生過程に相当する時期の曝露により、胎齢 18 日胎児精巣における *Insl3* mRNA の発現が低下し、用量・反応関係もみられた。さらに成熟後には精巣下降不全個体が用量に依存して確認された。剖検時には判定困難な場合が多い精巣下降不全が、胎児期の精巣の *Insl3* mRNA 発現の程度により予測可能と考えられる。すなわち、雄胎児ライディッヒ細胞における *Insl3* 遺伝子の発現変化は、精巣下降不全(停留精巣)の鋭敏な指標になり得ると思われる。

E. 結論

従来の毒性評価法に則ったこれまでの一世代、多世代生殖・発生毒性試験を中心とする大規模なバイオアッセイ (OECD TG415、416、421、422) では、多くの内分泌かく乱性に関して陽性候補物質が陰性の結果に終始することが大いに予測されるが、本研究は多様な生殖・発生毒性に焦点を当てているため、本研究で検討してきた毒性指標の中から鋭敏な指標が確認で

できれば、本研究は一生涯を標的とした有害性評価試験系の構築に寄与できると思われる。精巣下降の病理解剖学的検索のみならず、精巣下降の制御に関連する遺伝子群について検討し、さらに多くの内分泌かく乱性を有する化学物質について低用量も含め検討を重ねることにより、鋭敏な指標と結論できる。

F.健康危惧情報

得られた研究成果に健康危惧に関する情報はない。

G.研究発表（過去3年間）

1. 論文発表

1) 書籍

Nagao T., Kagawa N., Nakagomi M., Fujikawa K. Increased incidence of malformations in the offspring of male mice prenatally exposed to synthetic estrogens. In: *Advances in Male Mediated Developmental Toxicity.* (Robaire B. and Holes BF. eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp.211-217(2003).

2) 雑誌

Okuda H., Nagao T. Cardiovascular defects induced by prenatal exposure to phenobarbital in rats. *Cong. Anom.*, **46**: 97-104 (2006).

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. *J. Toxicol. Sci.*, **30**: 175-194 (2005).

Kuwagata M., Muneoka KT., Ogawa T., Takigawa M., Nagao T. Locomotor hyperactivity following pregnant exposure to 5-bromo-2'-deoxyuridine: neurochemical and behavioral evidence of dopaminergic and serotonergic alterations. *Toxicol. Lett.*, **152**: 63-71 (2004).

Nagao T., Wada K., Kuwagata M., Nakagomi M., Watanabe C., Yoshimura S., Saito Y., Usumi K.,

Kanno J. Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reprod. Toxicol.*, **18**: 109-120 (2004).

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

2. 学会発表

Nagao T.: Biological effects of diethylstilbestrol -Transgenerational effect of endocrine disrupting chemicals- 国際毒性病理学会シンポジウム（神戸）抄録集 p.91、2004

長尾 哲二：ジェチルスチルベストロールの生体影響 内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム 性腺軸（視床下部-下垂体-性腺）の発育と異常（葉山）、抄録集 pp. 41-45、2003

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

特許取得および実用新案登録はない。

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

分担研究者 吉田 緑

独立法人 放射線医学総合研究所 放射線安全研究センター 研究員

研究要旨

ラットおよびマウスを用いて内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生児期暴露による遅発性影響検出系確立するため、種々の用量(即時型 androgenization 誘発量 1500 μ g/kg 体重から子宮肥大作用を示さない量 0.15 μ g/kg 体重まで)の diethylstilbestrol (DES)を Donryu ラット新生児に単回皮下投与後 12 ヶ月齢まで観察し、高感受性で且つ利便性の高い遅発性影響検出系とその指標を検討した。性成熟までの生殖器の形態観察、臓器重量、性周期観察、子宮発がん性などを検討項目とした。その結果、持続発情の早期発現が 1.5 μ g/kg 体重投与群まで用量依存性に観察され、30 週齢で有意に増加したことから、遅発型影響検出には 8 ヶ月齢以上の性周期観察が最も感度の高い指標と考えられた。またエストロゲン活性を有さない低用量では遅発型影響を誘発されない可能性が示唆された。性周期の異常は卵胞数の減少と密接に関連していた。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生児期暴露影響として遅発型影響が存在することはあまり知られていない。遅延型影響は雌ラットおよびマウスで delayed oovulatory syndrome (DOS) として報告されており、性成熟前から異常が明らかな androgenization とは異なり異常の発現までにかかなりの時間を要することを特徴とする。さらに、ラットでは遅発型影響によって子宮癌の発生が促進することが報告されている。この遅延型の影響は、視床下部・下垂体・性腺系への異常が引き金であると考えられるが、発生機序について明ら

かではない。

動物実験を基にした化学物質による内分泌かく乱性をヒトへ外挿を考慮した場合、短期観察期間では検出できないこの遅発型影響を明らかにすることは極めて重要で、その検出のためには確実に利便性の高い指標が必要である。

本研究は、化学物質の内分泌かく乱性とくに遅発型影響の評価上有用な検出指標を確立するために実施した。

具体的に本年度は、前年度までの遅発型影響研究を継承し、陽性対照物質 DES を種々の用量(即時型 androgenization 誘発量 1500 μ g/kg 体重から子宮肥大作用を示さない量 0.15 μ g/kg

体重まで)で生後 24 時間以内の雌 Donryu ラットに単回皮下投与後 12 ヶ月齢まで観察した。前年度までに性成熟までの生殖器の形態観察、臓器重量、性周期観察などの項目については検討し、本年度はさらに子宮発がん性と DES の用量相関性について検索を追加した。また前年度、統計学的な有意性が確認できなかった低用量 DES の子宮肥大性を指標としたエストロゲン活性についても確認した。また前年度までに終了した性成熟前からの形態学的検索などもあわせて全ての検査項目について総合的に考察した。

また前年度の busulfan を用いたラットの実験結果から卵胞数の変化が性周期や子宮発がんの発生を修飾させることから、遅発型影響を修飾する因子として卵巣の変化を考慮する必要性が示唆された。本年度は卵胞数減少と性周期の変化の関連性を確認するため、性成熟前と成熟後に放射線を照射したラットを用いて卵細胞の減少と性周期の変化を検索した。

B. 研究方法

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 μ g/rat(0.15、1.5、15、150 および 1500 μ g/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 dimethylsulphoxide(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。

実験デザインについて Fig.1 に示した。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) 20mg/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 1.0Gy 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

性周期は膣開口後、4 ヶ月まで 2 週毎に膣スメア像にて性周期を観察した。

(倫理) 本実験は「動物の保護及び管理に関する基準(昭和 53 年 3 月 27 日、総理府告示第 6 号)」の主旨およびおよび WHO (World Health Organization: 世界保健機構) の医学研究顧問委員会の勧告に基づき CIOMS (The Council for International Organization of Medical Sciences: 国際医科学関係組織協議会) が発表した「動物を用いる生物医学研究のための国際指導 (International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals)」に沿って実施した。

C 研究結果

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—

12 ヶ月齢までに認められた子宮の増殖性病変の発生頻度および多発性を Table 1 に、形態像を Figs. 2-5 に示した。

最高用量群である 1500 μ g/kg 体重群では対照群に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。DES 150 μ 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 Fig. 5 と腺癌 Fig. 4 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。DES 15 μ g/kg 体重群では異型性過形成あるいは腺癌の頻度およ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 (Fig. 4)。

9 ヶ月齢で剖検した 1.5 および 0.15 μ 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。

DES 1500 μ g/kg 体重群では対照群を含む 150 μ 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 (Fig. 4)。

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の変化が認められ、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 (Fig. 5)。

2) 投与用量の DES のエストロゲン活性の確認

子宮の腔内の分泌物込み (whole) と削除した子宮重量 (lean) をは Fig. 2 に記載した。DES 1.5 μ g/kg 体重群以上で有意に増加し、DES 0.15 μ g 群の値は対照群と同様の値を示し、有意な差は認められなかった (Fig. 6)。

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 (Figs. 7-9)。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および大部分の顆粒膜細胞にアポトーシスが観察された (Fig. 7)。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 (Fig. 8)。性成熟前の 0.2Gy、成熟後の 0.2、1.0Gy 照射群では肉眼的およ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 照射群では卵胞および黄体数ともに対照と比較し明らかに減少していた (Fig. 9)。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、大型のグループ卵胞についてはごく僅かではあるが認められた。0.2Gy 性成熟前およ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 照射動物は肉眼的およ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およ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を Fig. 10 に記載した。いずれの群も膣開口後の 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