

ば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。

D. 考察

1) ラットおよびマウスを用いた遅延型影響検索のための陽性対照動物の作製

本年度の子宮がんの検索において、1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の DES 新生児期暴露では、発がん性は認められなかったものの、150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群では子宮癌の発生が増加した。高用量群での発がん性が認められなかった原因として、子宮癌の発生母地と考えられる子宮腺の発育分化が DES1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重というエストロゲン大量暴露により子宮腺の低形成という組織分化異常を起こしたことが考えられた。同様の結果は大量のエストロゲン作用物質の新生児期暴露で報告されている (Yoshida et al., 2002)。同群での子宮癌増加の原因として、DES 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群では子宮の発育分化異常は認められなかったこと、持続発情の発現早期化による相対的高エストロゲン状態に対照群より長期間曝されたことが考えられた。同様の結果は octylphenol の新生児期暴露で報告されている (Yoshida et al., 2002)。

今回の検索において、DES 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群では用量依存性に持続発情の早期化が観察されたが子宮癌は増加しなかった。この原因として、子宮癌の発生には一定期間の相対的高エストロゲ

ン状態の持続が必要であるが、同群での持続発情の早期化の程度では子宮癌を増加するには至らなかった可能性が考えられた。すなわち、相対的高エストロゲン状態持続を示す持続発情の早期発現は、子宮癌発生の可能性を示す重要な指標であるが、子宮癌の増加には十分量の持続発情発現期間が必要であると考察した。

2) 投与用量の DES のエストロゲン活性の確認

今回の検索結果より、DES 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の単回皮下投与がエストロゲン作用を有するが、その下の 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重は *in Vivo* においてエストロゲン作用を示さないことを確認した。

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

本年度の放射線照射の実験結果より、卵巣の発育期である幼若期の卵胞数の減少は成熟期と比較して感受性が高く、持続発情の早期発現を誘発することから、子宮内膜腺癌発生を修飾する可能性が示唆された。

4) 総合考察

本年度の子宮癌の結果を加え、遅発型影響の指標と検出時期、その指標を用いて検出可能な投与量を表にまとめた (Table 3)。これらの結果、長期に亘る性周期の観察が遅発型影響を検出するもっとも鋭敏な指標であることが確認された。即時型の影響である androgenization は性成熟前より検出可能であることも確認された。

また、子宮肥大試験でのエストロゲン作用の検出結果と性周期観察による

遅発型影響の検出が同じ用量であることから、DES 新生児期暴露によるラットの遅発型影響はすべて *in vivo* においてエストロゲン作用を有する量において発現する可能性が考えられた。すなわち、エストロゲン作用を示さない量では遅発型影響が生じない可能性を示唆している。しかし、この遅発型影響の発生は視床下部におけるなんらかの変調が引き金になっていると推察されるがその機序には不明な点が多く残されているため、今後の更なる研究が必要である。

E. 結論

本年度までの結果を総合的に考察し、遅発型影響の検出系として Table 4 に記載した実験を提案する。

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・新生仔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 DES を陽性対照物質として生後 24 時間以内の Donryu ラットに単回皮下投与後 12 ヶ月齢まで観察し、遅発性影響の高感受性で且つ利便性の高い検出指標を検討した。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、持続発情を特徴とする性周期異常の発現時期が 1.5 μ g/kg 体重投与群まで用量依存性に観察され、30 週齢で有意に異常が増加したことから、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であると考えられた。即時型の androgenization は 3 週齢までに容易に検出可能であった。また子宮肥大作用を示さない用量では性周期による遅発型影響は検出されなかったことから、エストロゲン活性を有さない低用量では遅発型影響は誘発されない可能性が示唆された。性周期の異常は卵巣の異常、特に卵胞数の減少に密接に関連していると考えられた。

F 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

- ① Yoshida M, Maekawa. A.
- ② Uterine carcinogenesis based on estrogen or metabolite driven pathways in the Donryu rat. Cancer
- ③ Tanaka and H Tsuda
- ④ arcinogenesis and modification of carcinogenesis
- ⑤ Research Signpost,
- ⑥ India
- ⑦ 2005
- ⑧ 135-151

2) 雑誌

- ① Yoshida, M.
- ② A new hypothesis for uterine carcinogenesis: A pathway driven by modulation of estrogen metabolism through cytochrome

- P450 induction in the rat liver.
- ③ Journal of Toxicologic Pathology.
- ④ 19
- ⑤ 57-68
- ⑥ 2006
- ① Yamada, D., Yoshida, M., Williams, NY., Fukami, T., Kikuchi, S., Masuda, M., Murayama, T., Ohta, T., Nakae, D., Maekawa, A., Kitamura, T., Murakami, Y.
- ② Disruption of spermatogenic cell adhesion and male infertility in mice lacking TSLC1/IGSF4, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule.
- ③ Molecular and Cellular Biology,
- ④ 26
- ⑤ 3610-3624
- ⑥ 2006.
- ① Kanoh, A., Seko, A., Ideo, H., Yoshida, M., Nomoto, M., Yonezawa, S., Sakamoto, M., Kannagi, R. and Yamashita, K.
- ② Ectopic expression of N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase 2 in chemotherapy-resistant ovarian adenocarcinomas.
- ③ Glycoconj J.
- ④ 23
- ⑤ 453-460
- ⑥ 2006
- ① Yoshida, M., Watanabe, G., Shirota, M., Maekawa, A., Taya, K., 51, 707-714. Shimomoto T., Yoshida, M., Katusda S, Takahashi M, Uematsu F, Kuniyasu H, Maekawa A, Nakae D
- ② Reduction of primordial follicles caused by maternal treatment with busulfan promotes endometrial adenocarcinoma development in Donryu rats.
- ③ Journal of Reproduction and Development
- ④ 51
- ⑤ 707-714
- ⑥ 2005
- ① Shimomoto T., Yoshida, M., Katusda S, Takahashi M, Uematsu F, Kuniyasu H, Maekawa A, Nakae D
- ⑦ Alpha-smooth muscle actin-positive stromal cells reactive to estrogens surround endometrial glands in rats but not mice
- ⑧ Journal of Toxicologic Pathology
- ⑨ 18
- ⑩ 47-52
- ⑪ 2005
- ① Uematsu, F., Takahashi, M., Yoshida, M., Igarashi, M, Watanabe, N., Suzuki, N., Abe, M., Rusyn, I., Floyd, R., Nakae, D
- ② Distinct patterns of gene expression in hepatocellular carcinomas and adjacent non-cancerous, cirrotic liver tissues

- in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet.
- ③ Cancer Science.
④ 96
⑤ 414-424
⑥ 2005
- ① Yoshida, M., Katashima, S., Ando, J., Tanaka, T., Uematsu, F., Nakae, D. and Maekawa, A.
② Dietary indole-3-carbinol promotes endometrial adenocarcinoma development in rats initiated with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, with induction of cytochrome P450s in the liver and consequent modulation of estrogen metabolism.
③ Carcinogenesis
④ 25
⑤ 2257-2264
⑥ 2004
- ① Katsuda, S., Yoshida, M., Saarinen, N., Smeds, A., Nakae, D., Santti, R. and Maekawa, A.
② Chemopreventive effects of hydroxymatairesinol on uterine carcinogenesis in Donryu rats.
③ Experimental Biology and Medicine
④ 229
⑤ 417-424
⑥ 2004
- ① Yoshida, M., Shimomoto, T., Katashima, S., Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa, A.
② Lack of effect for maternal exposure to low-doses of bisphenol A on development of the female reproductive tract and uterine carcinogenesis in rats.
③ Journal of Reproduction and Development.
④ 50
⑤ 349-367
⑥ 2004
- ① Uematsu, F., Yoshida, M., Takahashi, M., Abe, M., Igarashi, M., Watanabe, N., Maekawa, A., Nake, D.
② α -Naphthylisothiocyanate induces intrahepatic bile duct with greater proliferation in female rats than in males.
③ Journal of Toxicologic Pathology,
④ 17
⑤ 205-210
⑥ 2004
- ① Maekawa, A., Yoshida, M., Katsuda, S. and Imai K.
② Toxicologic/carcinogenic effects of endocrine disrupting chemicals on the female genital organs of rodents.
③ Journal of Toxicologic Pathology,
④ 17
⑤ 59-83
⑥ 2004

2. 学会発表

吉田 緑、大町 康、放射線照射マウスに観察された卵巣腫瘍の組織学的特性。第 23 回日本毒性病理学会講演要旨集。p. 49、2007 年

吉田 緑、前川昭彦、大町康、島田義也、ラット新生児期の DES 暴露量と雌への遅発型影響の発現時期との関連性。第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会要旨集。S222、2006 年

吉田 緑、渡辺 元、谷本 倫、田谷一善、前川昭彦、Bromocriptine 長期投与によるラット子宮発癌抑制作用。内分泌かく乱化学物質学会第 8 回研究発表会要旨集 p. 55、2005 年

吉田 緑、中江 大、前川昭彦、Indole-3-carbinol による雌ラット肝臓および子宮中の cytochrome P450 酵素の発現パターンについて。第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会要旨集。P. 159、2005 年

吉田 緑。薬物代謝酵素誘導によるホルモン代謝変調をもたらす発がんへの修飾作用。シンポジウム「多臓器を病理する」。第 21 回日本毒性病理学会講演要旨集 P. 40、2005 年

吉田 緑、代田真理子、中江 大、渡辺 元、田谷一善、前川昭彦、Busulfan の胎生期単回暴露による Donryu ラット子宮癌促進作用。内分泌かく乱化学物質学会第 6 回研究発表会要旨集

p. 79、2004 年

吉田 緑、中江 大、前川昭彦 Indol-3-carbinol の cytochrome P450 酵素誘導を介したラット子宮内膜腺癌促進作用。日本癌学会総会、2004 年

吉田 緑、中江 大、前川昭彦 吉田 緑、畑中 豊、三原卓二、前川昭彦、中江 大 ラット子宮内膜癌発生・進展過程におけるエストロゲンレセプターとその関連因子の発現変化。第 138 回日本獣医学会学術集会 講演要旨集 p. 60、2004 年

Yoshida M, Nakae D, Maekawa A. Dietary indole-3-carbinol promotes endometrial adenocarcinoma development in rats by increase of cytochrome P450 activities and modulation of estrogen metabolism in the liver 10th International Congress of Toxicology, Toxicology and Applied Pharmacology, p. 243, 197 (4), 2004

Indol- 3-carbinol の cytochrome P450 酵素誘導を介したラット子宮内膜腺癌促進作用。日本トキシコロジー学学術集会 p. 236 2004 年

Yoshida M, Shimomoto T, Hatanak Y, Mihara T, Maekawa A, Nakae D. Expression profile of estrogen receptor-alpha-related signaling pathways in the developmental of

endometrial adenocarcinomas in
Donryu rats. Joint International
Meeting of the Japanese Society of
Toxicologic Pathology & the
International Federation of
Societies of Toxicologic Pathology;
Co-sponsored by the International
Academy of Toxicologic Pathology.
Program & Abstract p.73, 2004

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

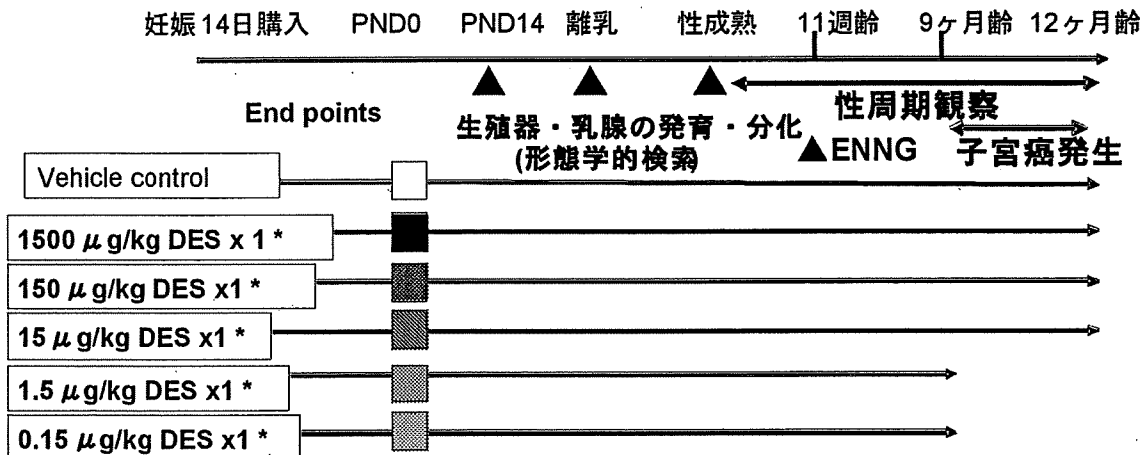
なし

2. 実用新案登録

なし

Fig. 1 遅発型影響検出の検索のための実験デザインラット

動物, Crj:Donryu rat (日本チャールス・リバー社より妊娠日目に購入)



*DES diethylstilbestrol(Sigma), 溶媒はコーン油 投与液量 25µl/rat、
背部皮下投与x1, 生後24時間以内回投与

Table 1 Incidence and multiplicity of uterine proliferative lesions in rats neonatally exposed to DES

Group (number of rats)	No lesions	Atypical hyperplasias			Adenocarcinomas	Total(a)
		Slight	Moderate	Severe		
<i>Incidence</i>						
Control(14)	28.6	28.6	28.6	0	14.2	71.4
DES1500ug/kg (17)	52.9	11.8	11.8	17.6	5.9	47.1
DES150ug/kg (24)	4.2	0	20.8	33.3	41.7	95.8
DES15ug/kg (15)	6.7	20.0	40.0	20.0	13.3	93.7
<i>Multiplicity</i>						
Control	21.0	36.8	31.6	0	10.5	89.0
DES1500ug/kg	50.0	11.1	16.7	16.7	5.5	50.0
DES150ug/kg	2.9	5.9	20.6	35.3	32.4	97.1*
DES15ug/kg	4.8	28.6	42.9	14.3	9.5	95.2

(a), Atypical hyperplasias + adenocarcinomas

*, Significantly difference from control value, Fischer exact test

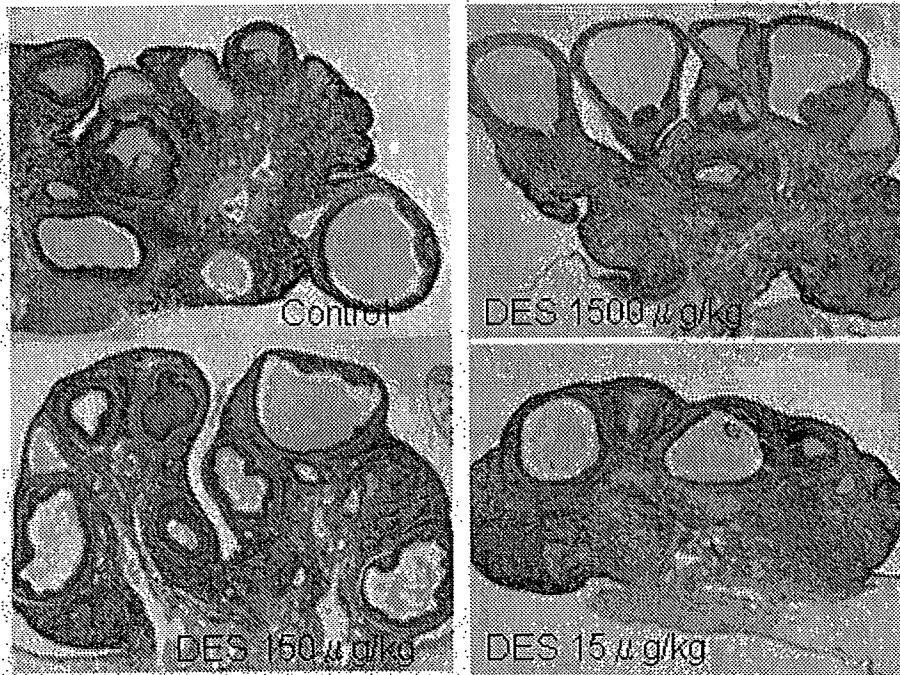


Fig.2 Histopathology of the ovary at 12 months of age

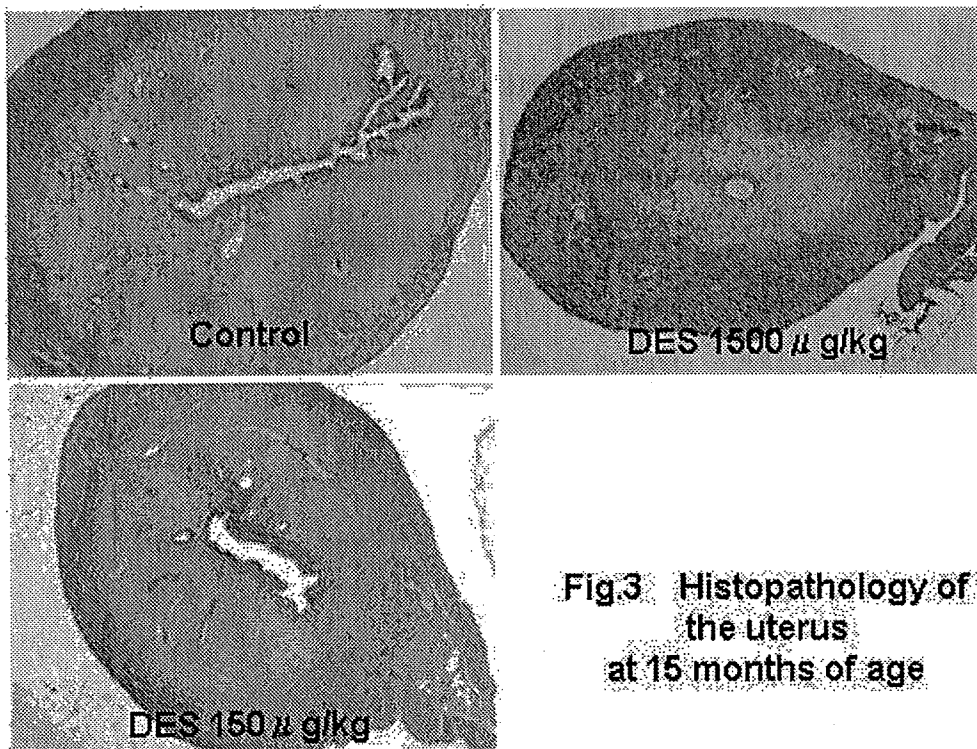


Fig.3 Histopathology of the uterus at 15 months of age

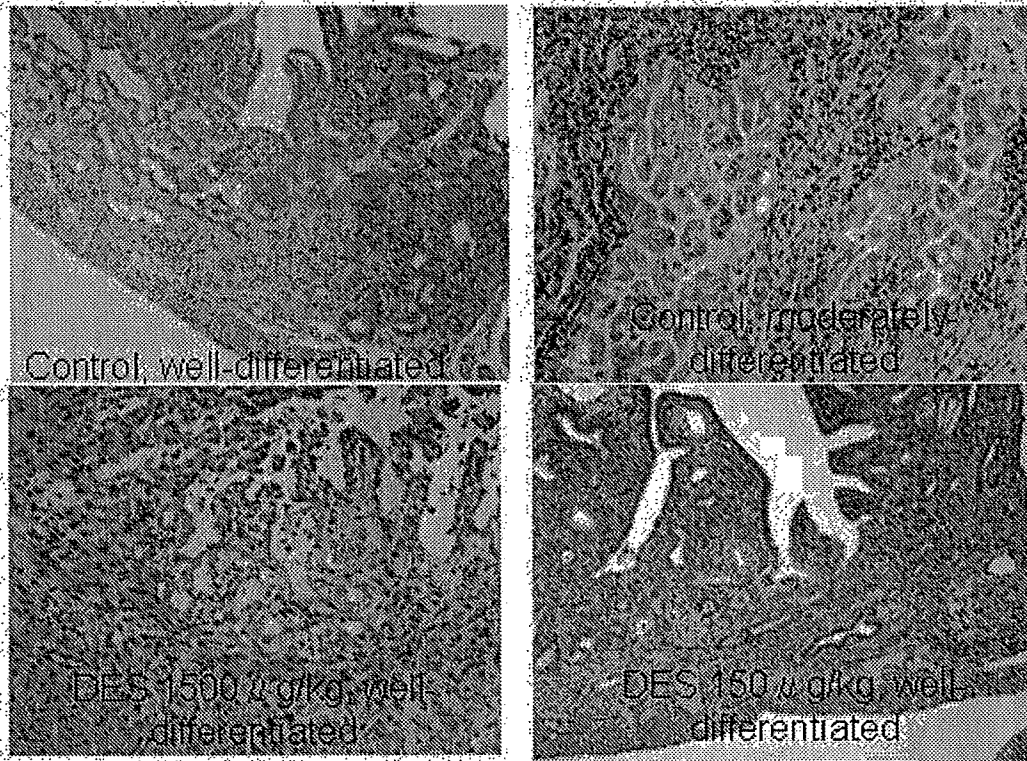


Fig.4 Histopathology of the uterine adenocarcinomas at 12 months of age

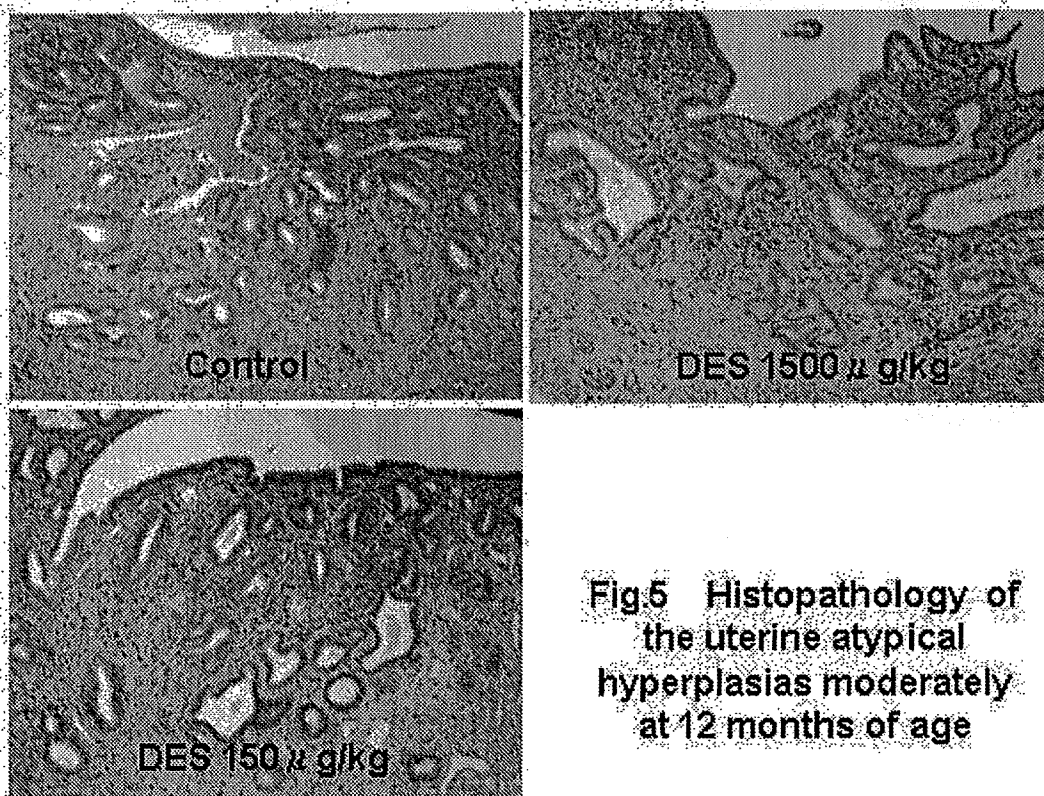
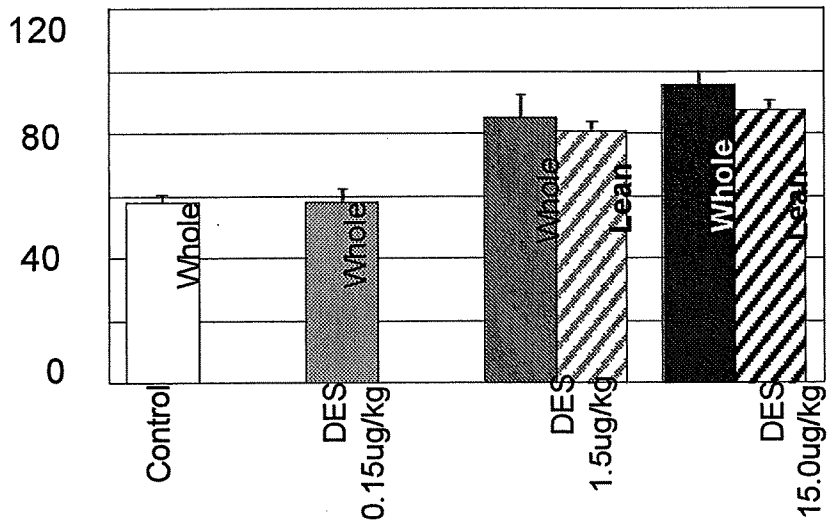


Fig.5 Histopathology of the uterine atypical hyperplasias moderately at 12 months of age



F i . 6 Relative Uterine Weights (uterine wt(mg)/BW(g)x10)

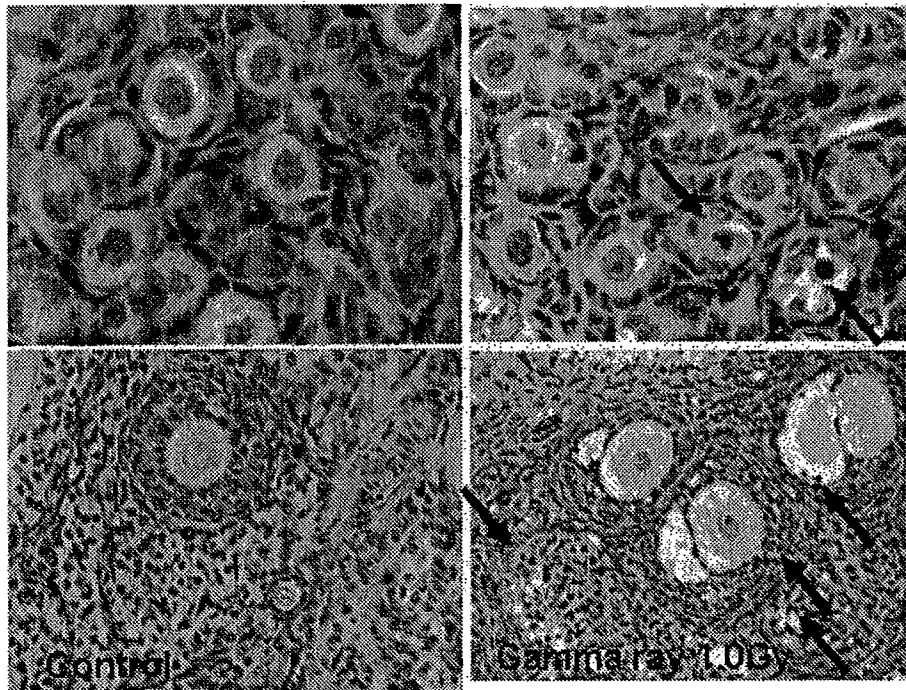


Fig.7 Histopathology of the ovary after 6 hours after irradiation at PND14

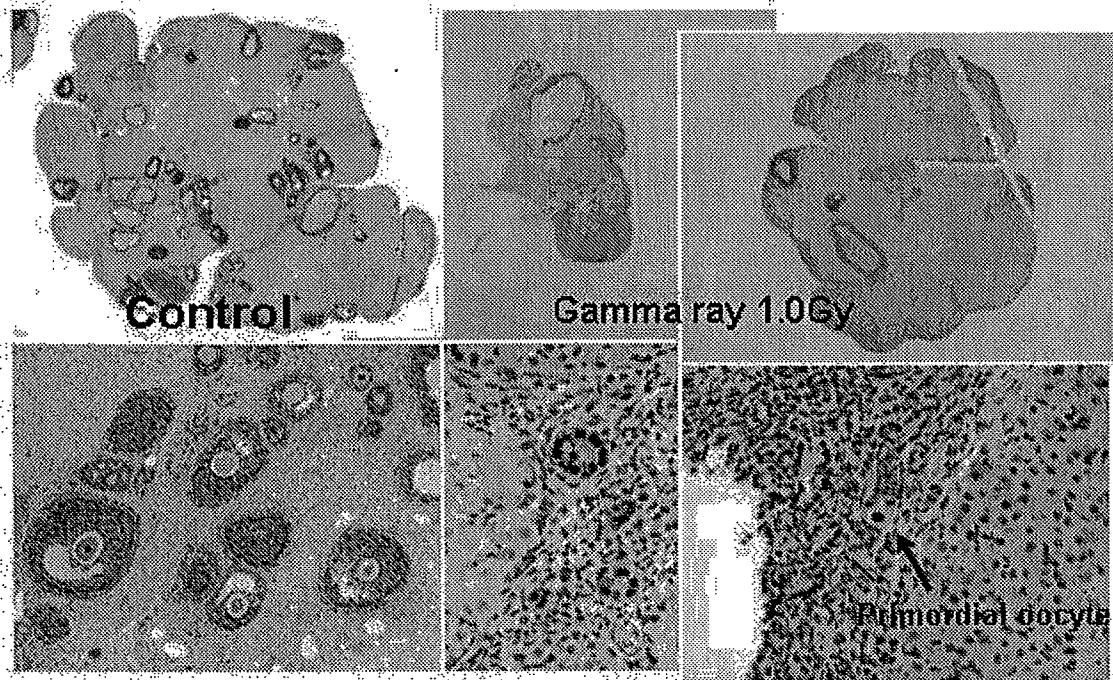


Fig.8 Histopathology of the ovary after 9 weeks after irradiation at PND14

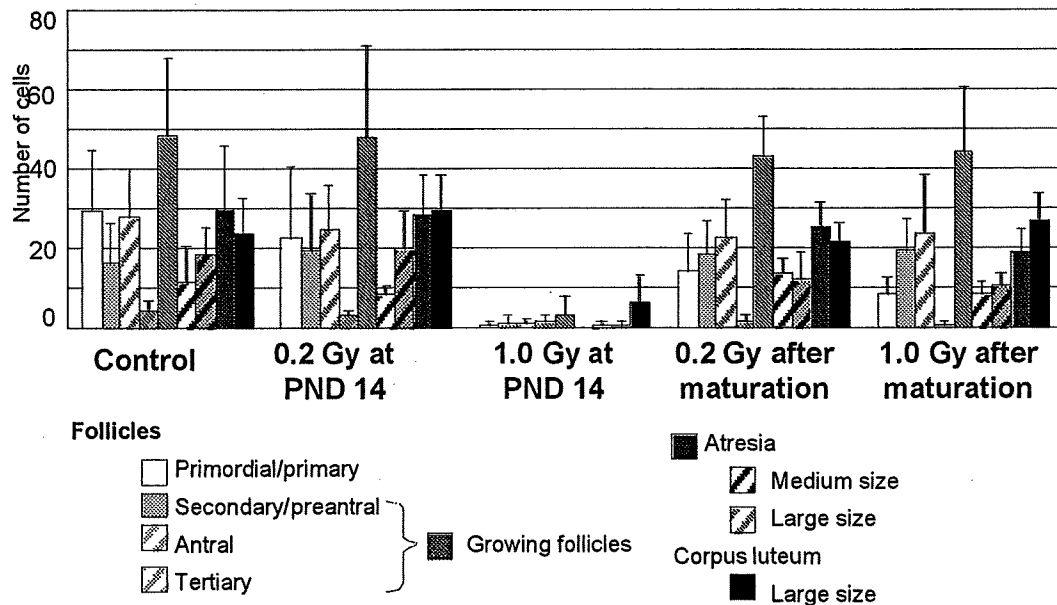
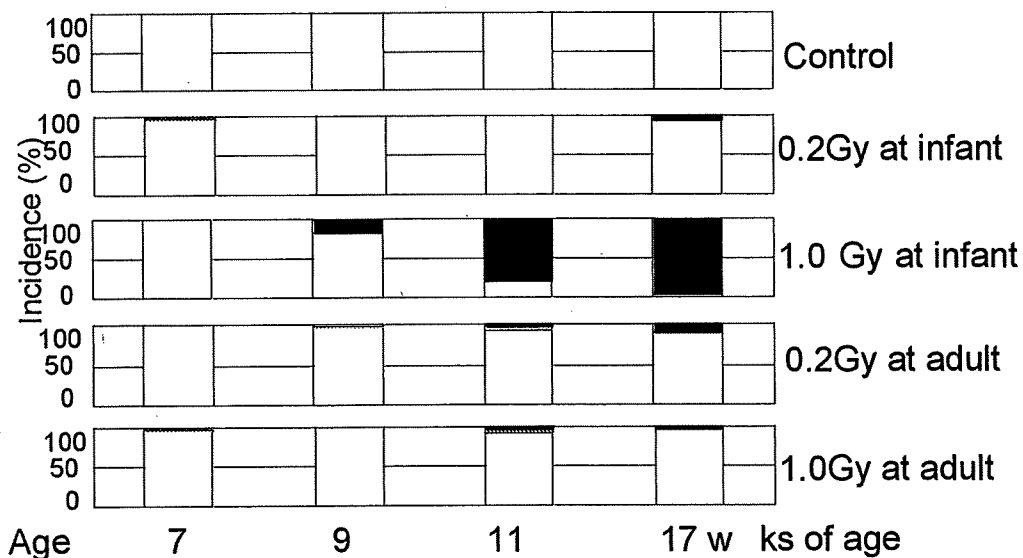


Figure 9 Number of follicles and corpora lutea in infant- and adult-irradiated rats at 11 wks of age



□, Regular cycling; ▨, Abnormal cycling except persistent estrus(PE); ■, PE

Fig.10 Estrous cyclicity of rats irradiated at PND14 (infant) and 10 weeks of age (adult)

Table 3 Endpoints

Endpoint	Age of detection	Detectable dose (ug/kg)
<i>Prepuberty</i>		
Ovarian weight	3 wks of age	150
Ovarian morphology	3wks of age	
Uterine morphology	5 wks of age	150
Vaginal morphology	PND14	150
<i>After maturation</i>		
Ovarian weight	5 wks of age	150
Estrous cyclicity	30 wks of age	1.5
Uterine carcinogenicity	15 months of age	150
Uterotrophic assay		1.5

Table 4

ラットにおける遅発影響検出モデル

系統: Crj:Donryu
陽性対照物質: DES
投与量: 0.15?g/kg
投与経路・回数: 皮下・単回
投与時期: 生後24時間以内

**Endpoint: 持続発情の早期出現性周期観察
観察期間: 10ヶ月齢40週間)**

9. 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

分担研究者 太田 亮

研究協力者 宮原 敬、又吉 健、大向 英夫、小野 宏

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

研究要旨

げっ歯類を用いる一生涯試験の確立を目的として、Diethylstilbestrol (DES) を用いた新生児投与によるラットの一生涯試験を実施した。一生涯試験では、生殖器系のみならず行動および免疫も網羅して検査する方法を考案し、発達、成熟、老化に至る全ての段階において検査を試みた。その結果、16 週齢以降の性周期観察、23 週齢からの交配検査、2 産目の産児数、26 週齢時の雄の免疫検査、54 週齢時の雌の内分泌器官重量に変化が観察され、内分泌かく乱化学物質を確定する上で、一生涯試験が有効であることが示された。

A. 研究目的

近年、内分泌かく乱化学物質の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が示唆され、ほ乳類を用いる内分泌かく乱化学物質の確定試験として、一世代あるいは多世代繁殖試験に代わる試験系の確立が急務となっている。そこで、内分泌かく乱化学物質確定試験としてのげっ歯類を用いる一生涯試験の確立を目的として、本研究では陽性対照物質をラットの新生児期に投与し、発達、成熟、老化に至る全ての段階において、生殖、行動および免疫を確認する一生涯試験を実施した。

B. 研究方法

内分泌かく乱化学物質の影響が、生殖器系の老化のみならず、神経系や免疫系にも及ぶことを考慮し、ラットを用いた一生涯試験のプロトコル案を作成した。以下に、その概略を示す。

使用動物：Cr1:CD(SD)ラット

群数：4 群（新生児を各群雌雄各 40 匹以上）

飼料：固型 CE-2（日本クレア（株））

飲料水：水道水（秦野市水道局給水）

投与物質：Diethylstilbestrol (DES)

媒体：コーン油

投与経路：強制経口投与

投与量：0（コーン油）、0.05、0.5、5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$

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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を高用量に設定し、子宮重量の増加が起こらない 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を中用量、0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を低用量に設定した。

投与期間：生後 1 日～生後 5 日

観察項目および観察時期

1. 体重推移：哺育 1 日～ 98 週齢まで測定
2. 性成熟（膣開口、陰茎包皮分離）；
3 週齢～7 週齢まで観察
3. 性周期：8 週齢～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～3 産まで観察
6. 行動試験（シヤトルボックス条件回避学習
試験）：24 および 48 週齢で実施

7. 精子検査 (精子数) : 26 および 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 および 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～101 週齢まで観察

C. 研究結果

体重推移 : 哺育 1 日～10 週齢までの体重推移には、DES 投与の影響は認められなかった (Fig. 1)。しかし、雌の高用量群において 46 週齢以降の体重推移が対照群より高値で推移する傾向がみられた (Fig. 2)。

性成熟 : DES 投与の影響は腔開口時期の早期化として高用量群の雌にはみられたが、雄の陰茎包皮分離時期に DES 投与の影響はみられなかった (Fig. 3)。

性周期 : 高用量群の動物では、8 週齢時から正常な性周期を示す例は認められず、中用量群の動物でも、16 週齢以降に正常な性周期を示す動物の割合が減少した (Fig. 4)。性周期の型を分類すると、8 週齢時に高用量群でみられた異常の型は主に連続発情であったのに対し、中用量群でみられた異常の型は不規則周期や無発情などであった (Fig. 5)。

交尾率および受胎率 (Table 1) : 12 週齢の交配では、高用量群の雌の受胎率が 0 %であった。23 週齢の交配では、中用量群の雌で受胎率が低下し、低用量群の雌で交尾率が低下した。雄では、いずれの時期の交配においても、DES 投与の影響は認められなかった。

分娩・哺育 (Table 2) : 初回分娩では高用量で産児が得られなかった以外に DES 投与の影響は認められなかった。2 産目では中用量群の産児数が減少し、低用量群の妊娠日数が延長した。

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 (Fig. 6)、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 (Fig. 7)。また、試行反応数にも群間の差はなかった。

精子検査および雄の生殖器重量 : 26 週齢および 52 週齢ともに、精子数および生殖器の重量に DES 投与の影響を示唆する変化は認められなかった (Table 3)。

雌の器官重量 (Fig. 8) : 54 週齢の雌では、下垂体重量が全ての DES 投与群で有意に増加し、副腎重量が高および中用量群、甲状腺重量が高用量群で有意に増加した。卵巣重量は、高および中用量群で有意に低下した。

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 DES 投与の影響は認められなかった (Fig. 9)。

排卵検査 : hCG 誘発の排卵数には、DES 投与の影響を示唆する変化は認められず、高用量群の動物においても排卵が確認された。

生存曲線 : 高用量群の雌で生存日数は短縮したが、雄の生存率に DES 投与の影響はみられなかった (Fig. 10)。

D-E. 考察・結論

以上の結果から、DES は子宮肥大試験で陽性反応を示す用量で雌の性成熟を早めるだけでなく、さらに低い用量でも雌の老化過程における性周期、受胎率、交尾率あるいは産児数に影響を与える可能性が示された。また、

それらの変化は視床下部-下垂体系の内分泌攪乱作用に起因したものと推定され、卵巣機能への直接的な影響ではないと考えられた。これらのことから、一生涯試験は内分泌攪乱化学物質を確定する上で有効な手段と考えられる。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

2) 学会発表

太田 亮、宮原 敬、又吉 健、大向英夫、小野 宏：新生児の低用量 DES 暴露が及ぼす加齢雌ラットの生殖系への長期的影響。環境ホルモン学会第9回研究発表会（要旨集 p.174、2006）

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

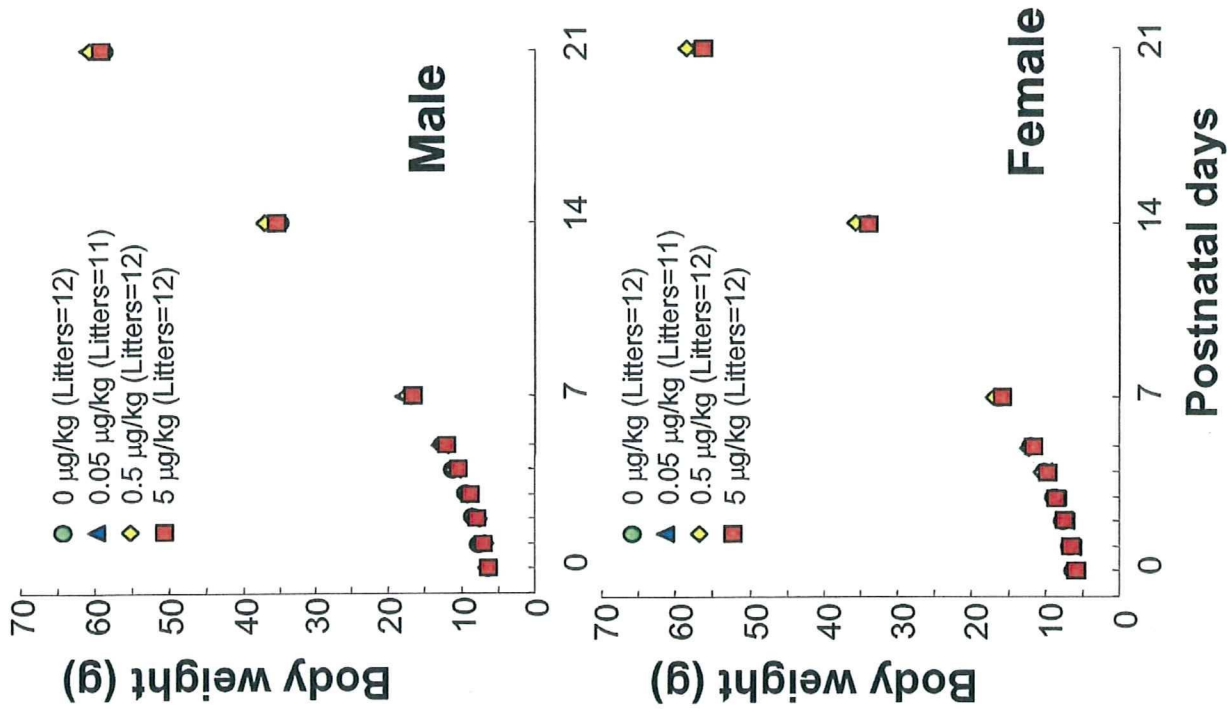
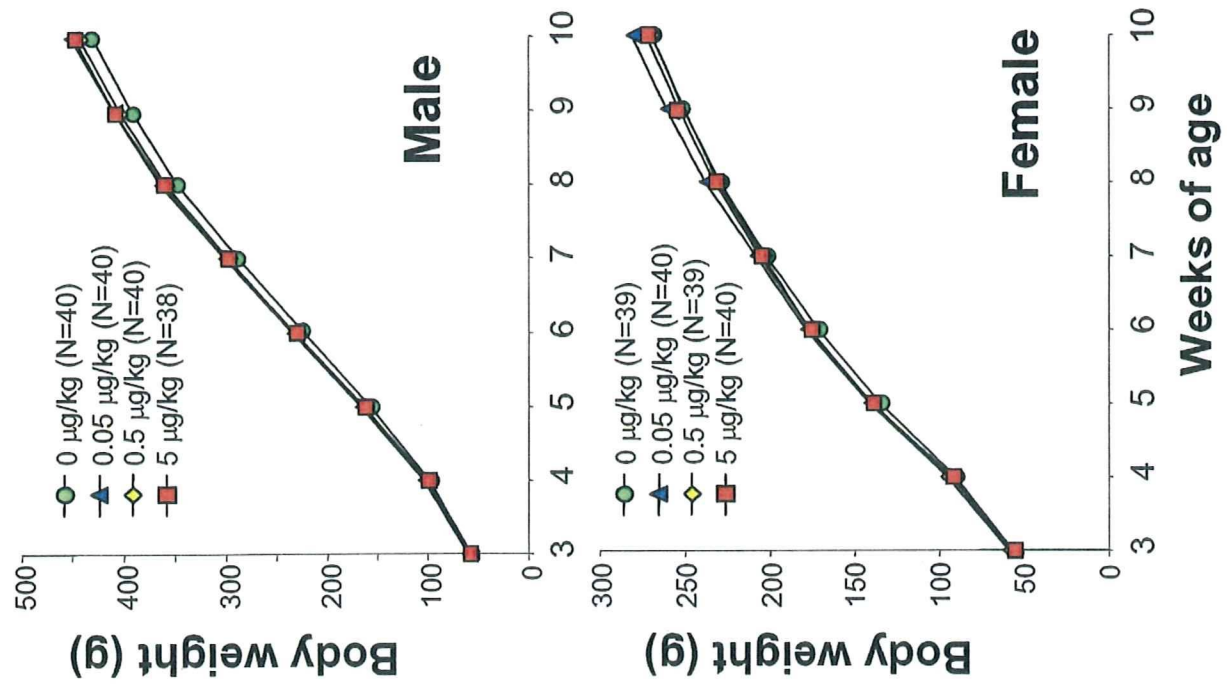


Fig.1 Body weight change (0 to 10 weeks of age) in rats following neonatal exposure to DES

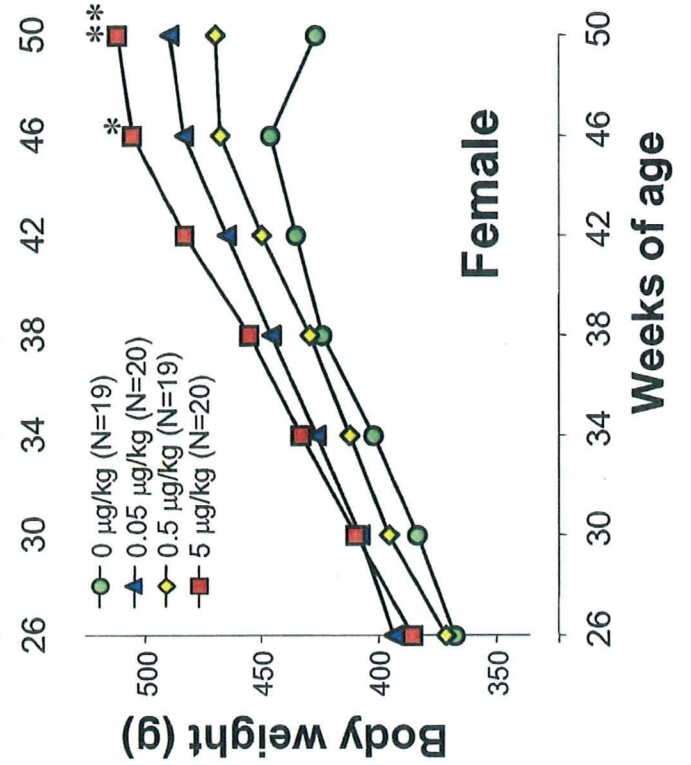
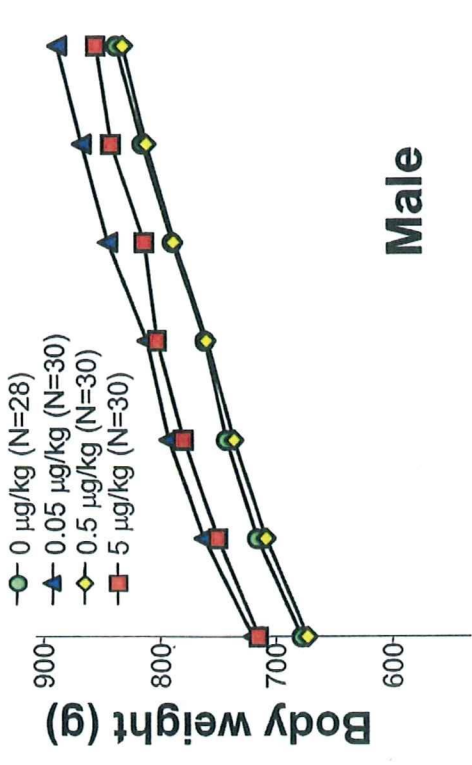
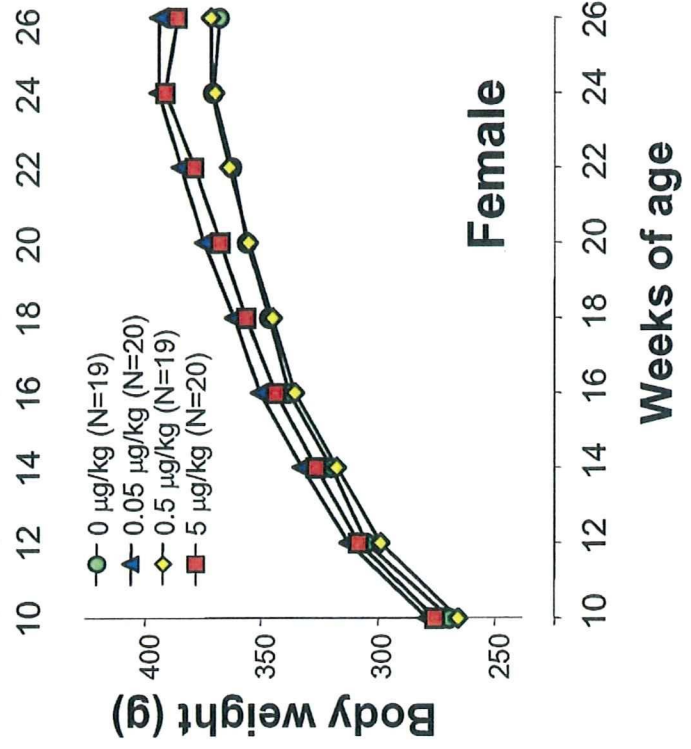
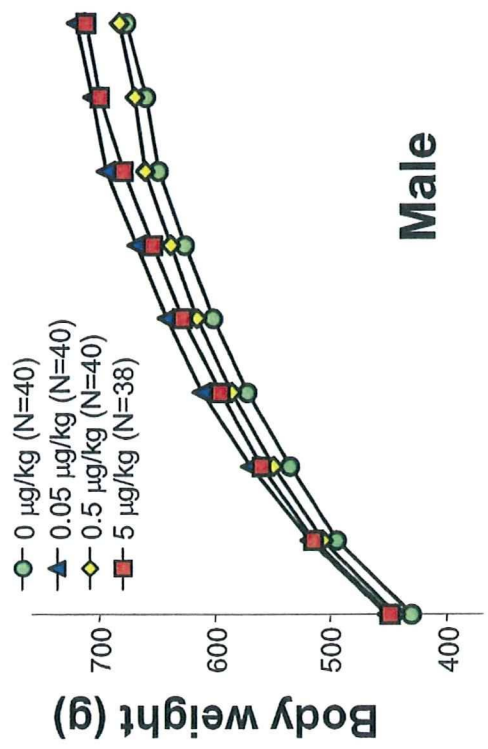


Fig.2 Body weight change (10 to 50 weeks of age) in rats following neonatal exposure to DES

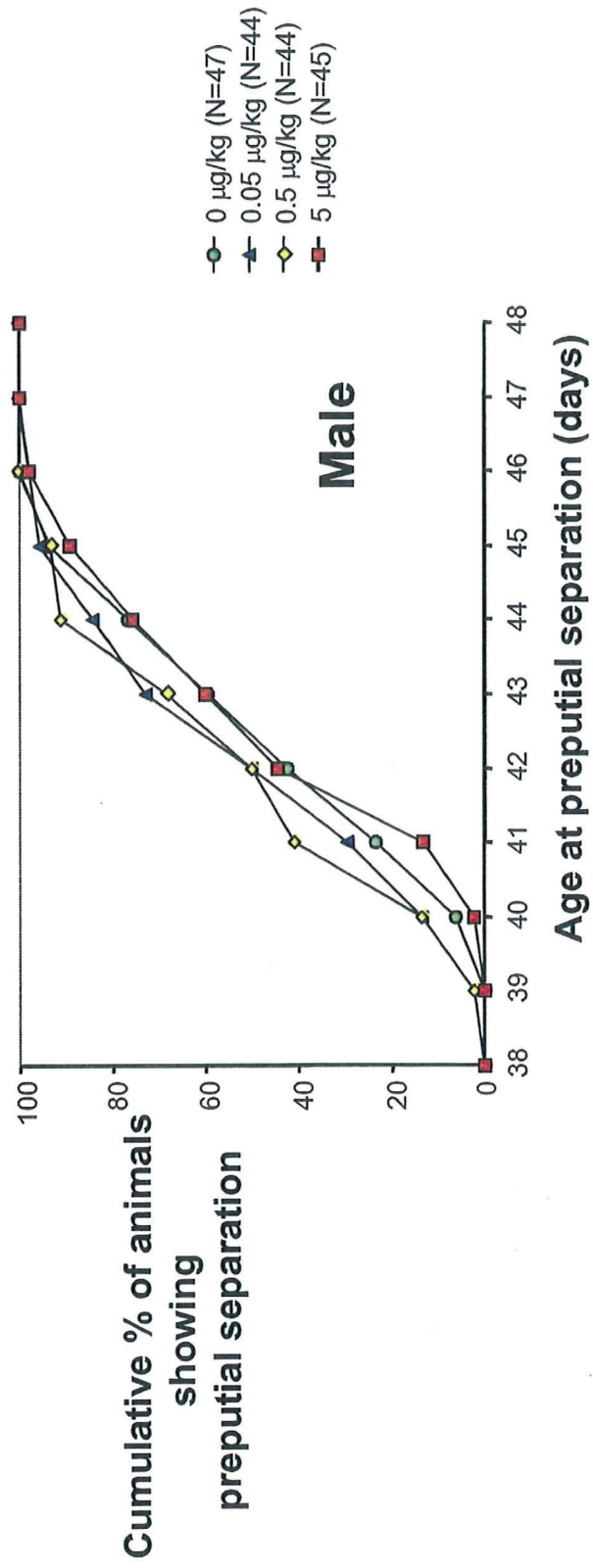
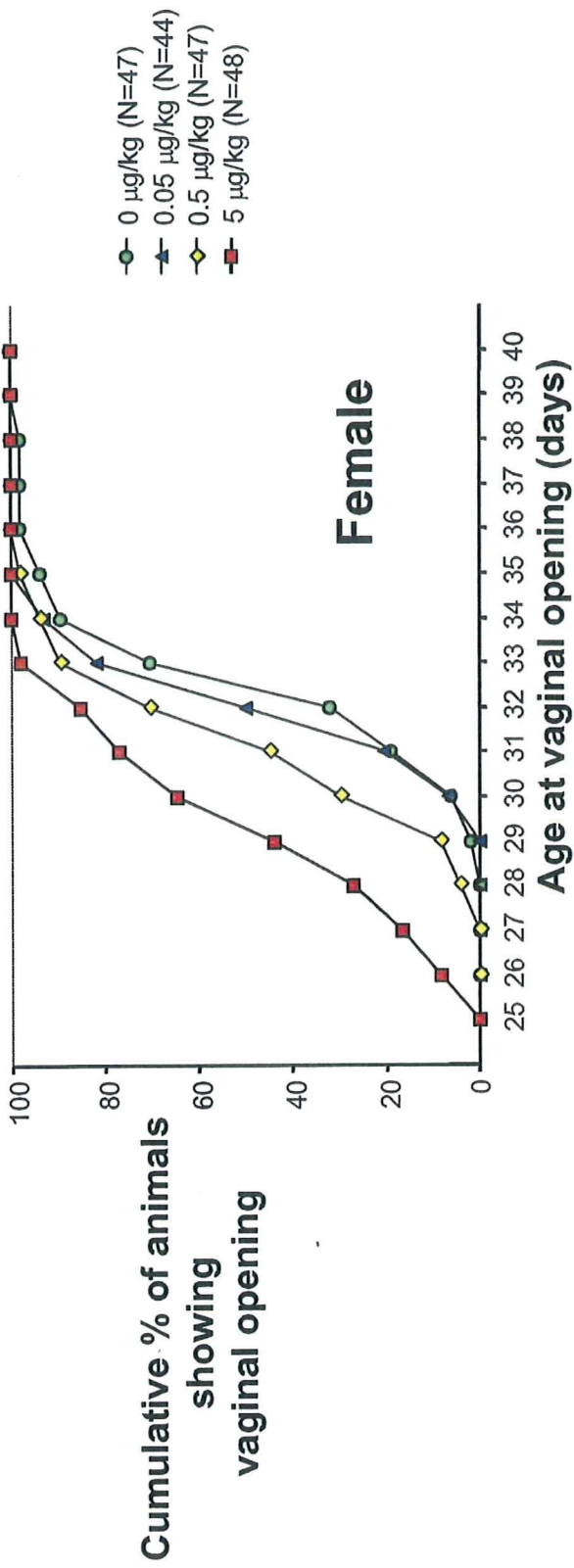


Fig.3 Puberty in rats following neonatal exposure to DES

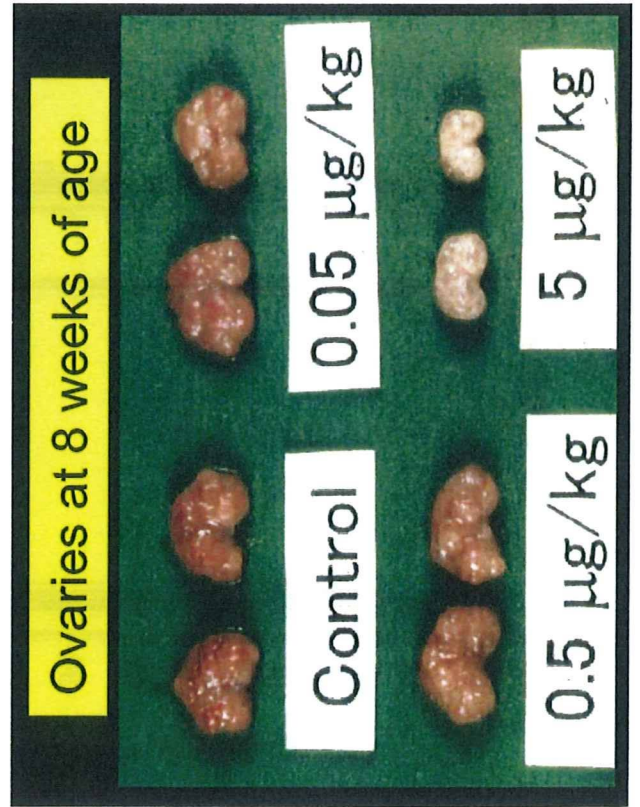
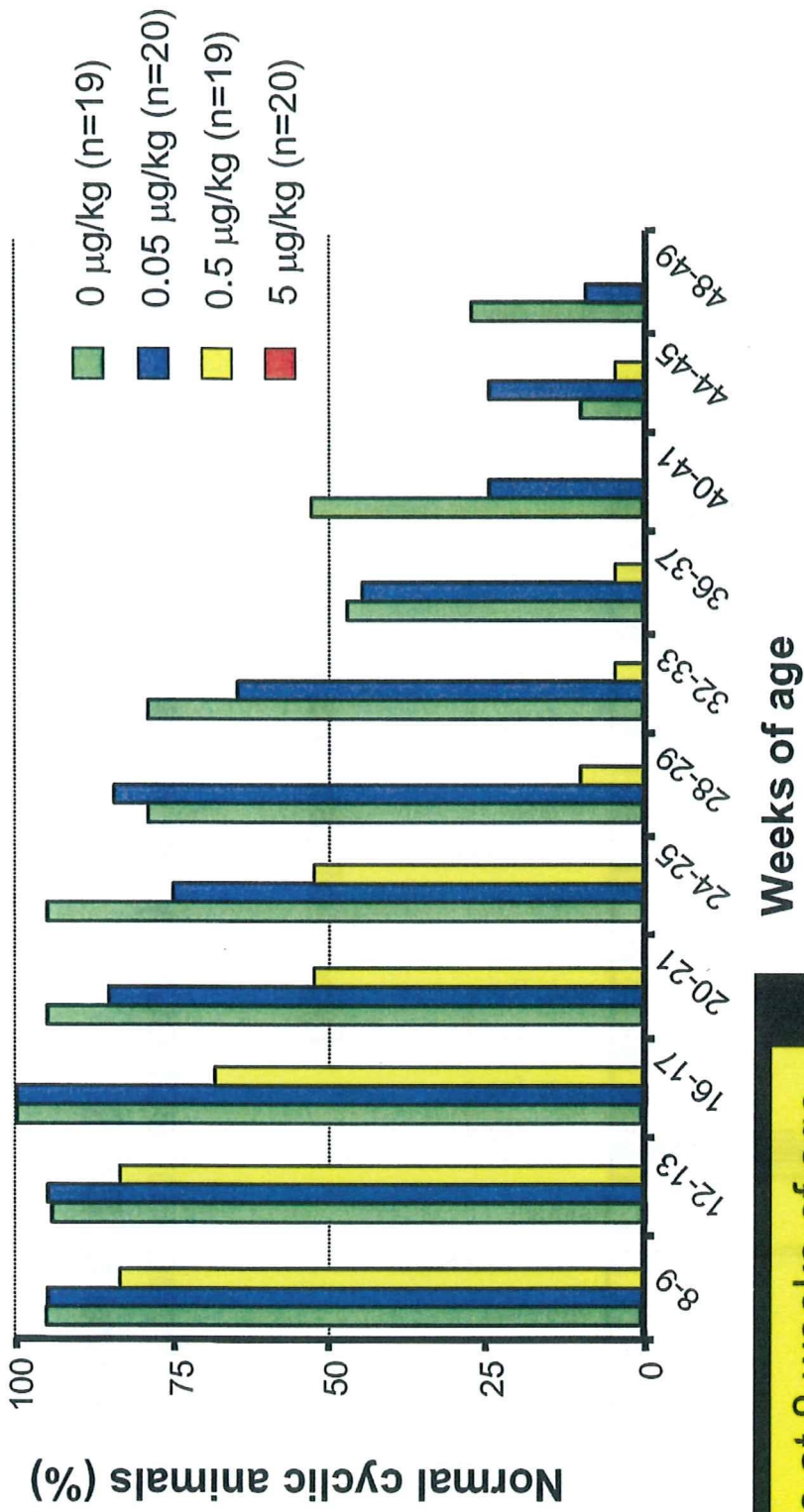


Fig.4 Progress of cyclic rats following neonatal exposure to DES