

20063800/B

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16年度～18年度

総合研究報告書

<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16年度～18年度 総合研究報告書

<平成21年12月訂正版>

主任研究者 小野 宏

平成19 (2007) 年3月

I. 総合研究報告書	1
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 小野 宏	
(資料) 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及びDESの経胎盤・経母乳暴露試験による晩発影響についての 検討試験 (委託研究)	
【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	
(資料) 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	
(資料) 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	
(資料) 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	
2) 免疫	
(資料) 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	
(資料) 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	
3) 生殖器	
(資料) 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	
(資料) 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	
(資料) 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	
〈内分泌かく乱性確定試験開発支援基礎研究〉	
(資料) 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	
(資料) 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	
(資料) 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	
(資料) 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的解析	
(資料) 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	
【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〉	
(資料) 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	
(資料) 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	
【OECD 対応試験実施・調査研究】	
(資料) 子宮肥大試験及びHershberger試験	
(資料) OECD/WHO 関連等研究ハーモナイゼーション総括	
(資料) 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	
(資料) 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	
(資料) 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	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	55
III. 研究成果の刊行物・別刷	65

I. 総合研究報告書

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)の試験法開発は、先立つ2期6年間に、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「EDCsの健康影響に関する検討会、中間報告追補」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。

本研究課題は、今までの研究を受け、【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推し進めた。スクリーニング試験で優先順位付けられた候補化学物質について実施される内分泌かく乱性の確定には、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。

研究の成果としては、【神経・行動】マウス周産期BisphenolA(BPA)低用量暴露はエストロゲン受容体を介さずに神経機能亢進とアストロサイトの活性化を誘発すること、また遺伝子発現の異常がdopamine及びCholine作動性神経の異常を引き起こすこと、一方、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、ラット周産期エチニールエストラジオール(EE)、ジエチルstilbestロール(DES)、オクチルフェノール(OP)暴露により雌の前腹側室周囲核のER α 陽性細胞が増加すること、が確認された。【免疫系】シェーグレン症候群モデルマウスのBPA或いはダイオキシン(TCDD)周産期暴露によりT細胞分画等の異常及び自己免疫病態の誘発、EEのマウス周産期暴露により胸腺細胞分化の異常及び初期免疫応答能の亢進、が確認された。【生殖器系】雄は肛門一生涯突起周辺組織のヒドロキシプロリン量の減少及び精巣下降関連遺伝子の発現減少が鋭敏な指標となること、雌ラットの周産期BPA或いはDES低用量暴露により早期閉経が、新生児期DES暴露により性周期、受胎率、交尾率、産児数、等への影響が確認された。支援研究では、乳がん細胞のER α 解析研究、有機スズがRXR及びPPARの強力なアゴニストとなること、内分泌系と免疫系のクロストークはSXRを介すること、を見出した。また、マイクロアレイ遺伝子解析が本研究に貢献した。調査研究では、子宮肥大、Hershberger試験に関して一定の性能を有することを確認した。

以上のように、本研究は、EDCs試験系の研究を推進し、「確定試験」として一生涯(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、従来型多世代繁殖試験の指標に限定されない)を確認する「齧歯類一生涯試験法」の開発について、その要素を、実例とともに明示することができた。これにより、一元的プロトコールの完成に向けての基礎が形成された。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における
職名

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

鈴木 勉・星薬科大学 薬学部 薬品毒性学教室、
教授

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

今井 清・財団法人 食品農薬品安全性評価セン
ター 技術総括部、技術総括部長

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

広瀬 明彦・国立医薬品食品衛生研究所 総合評価
研究室、主任研究官

A. 研究目的

本研究班の目的は、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さない化学物質の分界点となる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り、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、特にヒトに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。いままでも研究の結果、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押し進めてきた。

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。その結果、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、思春期暴露を受けた個体に現れる不可逆的な影響を、神経・行動、免疫、内分泌、発がん等を中心に、発生、発達、成熟、老化の一生涯に亘って検討する「齧歯類一生涯試験法」の開発を新概念の導入を以て推進すること、併せて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必要性が明らかとなった。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ととした。

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。

以下、各班員の研究目的を記載する。

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
- (2) I (H16 初回試験) BPA を用いた Cj:CD (SD)

IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験 (委託研究: 委託先: 財団法人 化学物質評価研究機構)、II (確認試験) 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 の経胎盤・経母乳暴露試験による晩発影響についての検討試験 (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)

(3) OECD/EDTA/VMG-Mammalian

菅野 純

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 (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ことを目指した。

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 1 つの可能性として、EDCs のラット経胎盤・経乳汁暴露によって誘導される雌出生仔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「一生涯試験法」の検査項目になり得るかを検討した。

【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

分担研究者らはこれまでに、EDCs の一つである BPA の胎児期及び授乳期慢性暴露により、依存性薬物に対する反応性が著しく亢進すること、また、依存性薬物による精神依存形成時に中枢神経系におけるアストロサイトの活性化が引き起こされることを明らかにしている。

本研究では、BPA が直接的にアストロサイトの活性化を引き起こすか否かについて検討した。ま

た、dopamine 神経機能に及ぼす BPA の胎児期及び授乳期慢性暴露の影響を詳細に検討する目的で、dopamine 神経発達に及ぼす BPA の影響について検討した。更に、BPA の胎児期及び授乳期慢性暴露が dopamine 神経のみならず、他の神経機能変化をも惹起する可能性を考慮し、不安感受性、運動学習機能及び記憶保持能力に対する BPA の影響についても併せて検討した。

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

神経行動毒性・発達神経毒性の評価ではラットを用いることが多いが、内分泌かく乱作用を検討対象として作用メカニズムの検討に解析を進めることを考慮すると、遺伝子改変動物の使用等が可能となるマウスを用いた試験が重要となる。

本研究ではマウスのスケジュール制御オペラント行動 (Schedule-Controlled Operant Behavior: SCOB) を指標とした次世代認知機能影響試験法の確立と、それによる BPA 低濃度暴露影響の評価を目的とした検討を行った。

初年度は、食餌強化による行動測定のための基礎条件の検討 (可能な報酬提示回数や体重制限方法等) とラット用プログラムをマウス用に改変する作業等を行った。

交替型混合スケジュール導入時の基本パラメータ (タイムアウト時間の長さ等) 決定のための測定、マウスの短期記憶保持曲線の測定と薬理的負荷試験、陽性対照物質候補 (メチマゾール) の影響測定等を実施した。

最終年度は、低濃度 BPA 暴露による影響を見るため、妊娠・授乳期に混餌投与を行ない、仔の成長後に行動試験を実施し、学習習得、短期記憶の保持、行動の適切な制御に及ぼす暴露影響を検討した。

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

胎生期、新生児期のラットの脳を経時的に形態学的手法を用いて観察し、性差の認められることが明らかにされている神経核の発達・分化過程を詳細に検討し、数種の内分泌かく乱作用が疑われている物質を用いて脳の性分化への影響を調べた。

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

難治性自己免疫疾患であるシェーグレン症候群疾患モデルとして NFS/sld ミュータントマウスを開発し、その病因・病態解析を実施してきた。NFS/sld マウスは生後 3 日目の胸腺摘出 (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が必発し、涙液・唾液分泌障害を伴うヒト・シェーグレン症候群に極めて類似した病態を呈する。

本研究は新生児期 NFS/sld ミュータントマウスに BPA、TCDD などを投与することによって自己免疫病態の発症が可能か否かについて、さらに TCDD の経胎盤暴露により次世代マウスへ免疫異常に基づく病態誘導がもたらされるか否かについて検討を加えた。

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 の影響は動物の生殖能に対するだけでなく神経系、免疫系に対しても示唆されている。そこで EDCs 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) の有用性を検討した。

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 の胎生期ならびに新生児期にあたる高感受期暴露が、その後のライフサイクルのどの時期に初めて毒性影響として捉えることができるのか、さらにどのような初期障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は重要である。

本研究では、EDCs 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、外生殖器発生・発達、生殖細胞死あるいは配偶子形成などの指標のいずれが EDCs 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

懸念される生体障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。

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

ラット及びマウスの化学物質の内分泌かく乱性、特に遅発型影響の評価上有用な検出指標を確立することを目的とした。

1) Donryu ラットを用いた遅延型影響検索モデルの作製と検出指標の確立

ラットモデルには性周期が規則正しく、なおかつ子宮癌好発系 Donryu ラットを用いた。

2) C57BL/6N マウスを用いた遅延型影響検索モデルの作製と検出指標の確立

DES を生後 24 時間以内の雌動物に単回皮下投与し、遅発型影響を検討した。

3) 性周期を修飾する卵巣の変化について

性周期は卵巣の状態によって大きく変化することから、ラット胎生期・新生児期に busulfan あるいは放射線暴露し卵巣への障害について検索した。

4) 子宮癌発生を修飾する因子について

薬物代謝酵素に焦点を当てて酵素誘導にを介したエストロゲン代謝変調の子宮癌修飾作用について検討した。

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

近年、EDCs 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 EDCs 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、EDCs 確定試験としての齧歯類を用いる一生涯試験の確立を目的として、陽性対照物質 DES 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、行動及び免疫を確認する一生涯試験を実施した。

〈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

EDCs の乳腺発がんに及ぼす影響を検討するた

め、ラットを用いた *in vivo* 試験系と、ヒト乳腺腫瘍由来の株化細胞を用いた *in vitro* 試験系による解析を実施した。

1) *In vivo* の試験

ラット EDCs の周産期暴露による乳腺への影響を把握し腫瘍発現の作用機序を確認する。

2) *In vitro* の試験

ヒト乳腺腫瘍由来の株化細胞 (MCF-7) を ER 及び HER2 の発現の有無を指標として大別し、DES 及び BPA の暴露に対する反応性の差に注目し観察した。

さらに、化合物の作用と ER α の関連を乳がん由来株化細胞を用い明らかにするため、MCF-7 について RNAi 法により ER 発現を抑制させ、各種 EDCs の影響を確認した。

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

ホルモン受容体の中でも核内受容体は、EDCs のターゲットとして重要である。核内受容体は 48 種類あり、そのほとんどが生物の発生や分化、恒常性の維持に重要な役割を果たしていると考えられており、これらの核内受容体のいずれに対して化学物質が干渉しても、生物の健康は害される可能性がある。これまで、EDCs のターゲットとしてはエストロゲン受容体 (ER) やアンドロゲン受容体 (AR)、甲状腺ホルモン受容体 (TR) を中心に研究・調査が進められてきたが、化学物質による内分泌かく乱作用という観点からは充分とは言えない。本研究課題では、出来るだけ多くの核内受容体について、簡便、迅速に化学物質の結合を調べられる系を構築し、それを用いて内分泌かく乱作用が疑われる化学物質について網羅的に調査、研究した。

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

EDCs の暴露は、エストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン等のホルモン作用を障害することにより種々の毒性を引き起こすことが知られている。本研究で取り上げる ES 細胞は *in vitro* で神経、心筋、血球等の細胞に分化誘導出来ることから、細

胞分化の解析にもよく用いられている。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る。そこで、エストロゲン等の種々のホルモンの ES 細胞分化への影響を形態及び遺伝子レベルで明らかにし、ES 細胞の *in vitro* 試験系としての有用性を確認し、リスク予測に役立てることを目的に ES 細胞及び ES 細胞の分化により形成される胚様体 (EB) の分化過程で変動する遺伝子の精密なデータベースの構築並びに EB の形態に及ぼす BPA の影響について検討した。

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

EDCs の生殖器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を行うことが本研究の目的である。

本研究では生殖器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。マウスを用い、発達期と成熟期に分けて研究を進め、生殖器発達に伴う遺伝子発現変化の解析、雌について成熟期における性周期変化に伴う生殖器遺伝子発現変化の解析を主として行い、生殖器制御メカニズムを分子レベルで解析した情報を得、基盤情報として本研究班に貢献した。

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

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った。

齧歯類をモデルにした研究で、行動に持続的な影響が生じる暴露時期は、胎児期及び新生児期であることが示されており、この時期は神経幹細胞が増殖・成熟し、ニューロンやグリアなどの神経系細胞を生み出し、神経幹細胞が生体内で特に重要な役割を果たしていることが明らかであることから、本研究では、神経幹細胞を取り上げた。

以上、EDCs が行動影響を示す胎児期、新生児期に標的となる細胞として、その時期の主役である神経幹細胞を取り上げる必要があると考え、本研究を進めた。

【内分泌かく乱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

齧歯類の周産期エストロゲン低用量暴露による雌性生殖器の晩発影響を検出する試験系の開発を目的とする。外来性エストロゲンの新生児期投与の影響が思春期エストロゲン投与により増幅するプロトコールの開発を試み、その際の卵巣、子宮、膣への影響を詳細に検討する方法論の確立を目指した。一方、遺伝子改変マウスを用いることを念頭に、C57BL/6 マウスでの実験を確立し、また、低用量暴露による影響を見るため基礎データとして実験動物飼料中の植物性エストロゲンが動物実験に及ぼす影響を検討した。

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

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

【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

子宮肥大試験；マウスを用いる子宮肥大試験を検証するために、種々の化学物質を用いて、OECD バリデーションプロトコールに準拠し、実施した。更に、餌に含まれる植物エストロゲンが、マウス子宮肥大試験の結果に影響を検討した。

Hershberger 試験；EDCs の試験法構築の基礎資料を提供するために、OECD バリデーション作業

のPhase 3に参加し、ラットを用い実施した。更に、マウスを用いる試験を検証した。

OECD/WHO 関連等研究ハーモナイゼーション

総括

井上 達

経済協力開発機構 OECD と世界保健機構 WHO で進められている試験法の開発や基礎研究の推進の課題と、本邦における EDCs 問題に関する調査・研究とが、スムーズな国際相互協調の下で推進せられるよう、当研究班を通じて必要な情報収集と、本邦からの独自の情報の発信や提案を行うことを目的とした。

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

広瀬 明彦・山崎 寛治

OECD では EDCs を検出するスクリーニング試験法の一つとして、従来の OECD TG 407 に内分泌作用を検出する可能性のある検査項目を加えた改良 TG 407 を開発している。最終段階である Phase 2 の結果を中心に検証し、本試験法の適応について検証した。

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種類いずれのプロトコール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 な方法であることが確認されている。本試験法をガイドラインとして実用段階とする上で最終的に残されている問題点を抽出し、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

国内で実施された試験をもとに、本試験法の問題点の抽出し、その解決法を考慮し、さらに本試験法に関連する情報を収集し、OECD ガイドライン化に寄与することを目的とした。

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

- (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
- (2) I (H16 初回試験) BPA を用いた Cj:CD (SD) IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験 (委託研究: 委託先: 財団法人 化学物質評価研究機構)、II (確認試験) 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 DES の経胎盤・経母乳暴露試験による晩発影響についての検討試験 (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)
- (3) OECD/EDTA/VMG-Mammalian

菅野 純

OECD-VMG mammalian、及び non-mammalian 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、あるいは厚生労働省 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、及び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ための研究補佐を行う。

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、実際の試験への応用の可能性を明らかにするために、(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)。(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) I (H16 初回試験) BPA を用いた Cri:CD (SD) IGS ラットにおける子宮内・経乳汁暴露試験、II (確認試験) 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 DES の経胎盤・経母乳暴露試験による晩発影響についての検討試験（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）

I (H16 初回試験)

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、日野飼育センター）を雌 70 匹、雄 35 匹購入した。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雌を雄ラットと共に夕刻に交配用ケージに移し、2 対 1 の割合

で一晩同居させた。翌朝膣栓及び膣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、各群 10 匹となるように交尾確認日ごとに確認順に各群に母動物とする雌を振り分けた。BPA CAS 登録番号（80-05-7、ロット番号：012D222、純度：>98%、関東化学株式会社）の 0、0.005、0.05、40、400 mg/kg/day（陽性対照群として ethynyl estradiol (EE) 0.05 mg/kg/day 群を設定）の用量を、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。投与用量は投与用量設定試験を基に決定した。投与容量は 5 mL/kg とし、投与量は最新の体重値を基に算出した。

母動物：

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後 21 日目（離乳日）にエーテル麻酔下で安楽致死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。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、出生数（率）を求めた。

出生児：

出生日（0 日齢）に産児数、死産児数、出産生存児数、出産生存児性比、出産生存児外表（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、膣開口日及び剖検日に測定した。

哺育期間中を通して生存児数、死亡児数の検査を行った。

発育分化検査：

① 生後 4 日齢に生存する全出生児について肛門・生殖突起間距離（Anogenital distance; AGD）をデジタル式ノギス（Digimatic Caliper CD-15CP、株式会社ミットヨ、神奈川）を用いて 0.01 mm 単位で測定した。

② 生存する雄離乳児全例について、35 日齢から陰茎亀頭型分類を実施した。

③生存する雌離乳児全例について、21日齢から臆開口を観察した。

生後4日齢に同腹出生児数を10匹（雌雄各々5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10匹に満たない場合には、調整を行わず、片性が5匹に満たない場合には合計の同腹新生児数が10匹となるように調整した。更に、同腹新生児のうち、雌雄各々番号の若い動物から①性周期長期観察群（5匹中2匹）、②生殖能力検査群（5匹中2匹）、③10週齢解剖群（5匹中1匹）の順に振り分け、匹数が少ない場合の優先順位は①、②、③とした。

生殖能力検査群：

児動物の雌雄各2匹腹について生殖能力検査を実施した。児動物の雌雄ラットは13週齢に達した時点で同用量群の雌雄ラットを1対1の割合で14日間を限度として交配させ、交尾所要日数、交尾数（率）、受精数（率）、受胎数（率）を観察した。なお、雌雄ラットの交配に際しては、兄妹交配を避けるように注意した。

臆栓及び臆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。交尾が確認された雌は妊娠20日にエーテル麻酔下で放血し、安楽致死させた後、帝王切開して、子宮は硫化アンモニウムに浸漬して着床痕数を算出した。更に、黄体数、着床数、胚・胎児死亡数（早期、後期吸収胚及び死亡胎児に分類）、生存胎児数、生存胎児性比、生存胎児体重、生存胎児胎盤重量及び生存胎児外表（口腔内を含む）を調べた。

10週齢解剖群：

1匹腹の雌出生児について、8週齢から14日間以上臆垢を採取し、性周期を観察、休止期を呈する動物（約10週齢時）をCO₂+O₂麻酔下で腹部大動脈より採血し、採取した血液から血清を分離し Triiodothyronin (T3)、Thyroxin (T4)、さらにそれらの遊離型であるFT3及びFT4を測定した。その後、放血致死し安楽死させた後、外性器の形態計測学的検査として尿道開口部スリット長、ファラス先端-尿道開口部距離、尿道開口部-臆開口部距離をデジタル式ノギスを用いて0.01mm単位で測定した。

1匹腹の雄出生児については10週齢に達した動物を順次CO₂+O₂麻酔下で腹部大動脈より採血し、採取した血液から血清を分離し、T3、T4さらにそれらの遊離型であるFT3及びFT4を測定した。その後、放血致死し安楽死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。

剖検時に脳、下垂体、甲状腺、肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、腹葉前立腺、子宮及び卵巣を採取し、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時間後に重量測定を行った。

性周期長期観察群：

児動物の雌雄各2匹腹の出生児については、遅発性の影響の有無を確認する目的で、7ヶ月齢まで継続して観察を行った。

児動物の雌については、3ヶ月齢以降7ヶ月齢まで臆スメアによる性周期観察を行った。臆スメアは午前9:00から11:00の間に採取した。14日間連続採取後、2週間休止のサイクルを7ヶ月齢まで繰り返し行い、ギムザ染色後、鏡検により発情前期、発情期、発情後期、休止期に区分した。

正常な性周期が認められた個体をnormal (N)、異常な性周期が認められた動物は、persistent diestrus（休止期が5～9日継続）、constant diestrus（休止期が10日以上継続）、persistent estrus（発情期が3～7日継続）、constant estrus（発情期が8日以上継続）及びirregular estrus（何れの分類にも当てはまらない不定期な性周期）に分類した。

7ヶ月齢に達した児動物は14日間以上臆垢を採取し、性周期を観察し、休止期を呈する動物をCO₂+O₂麻酔下で腹部大動脈より採血し、その後、放血致死し安楽死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。なお、休止期を示さない場合には、連続する発情期あるいは連続する発所前期を呈する動物を解剖した。

児動物の雄については7ヶ月齢に達した動物をCO₂+O₂麻酔下で腹部大動脈より採血し、その後、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。

剖検時に脳、下垂体、甲状腺、肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、腹葉前立腺、子宮及び卵巣を採取し、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時間後に重量測定を行った。なお、病理組織

学的検査は雌の生殖器官を中心に実施した。

統計処理は、性周期、母動物 (F0) の出産率、出生児 (F1) の出生児性別比、児動物の交尾率、受胎率及び授精率、その胎児 (F2) の生存胎児性別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。生殖能力検査で上記を除いた項目、体重、各性成熟検査、器官重量については Dunnett による多重比較検定を中心に行った。

II (確認試験)

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。翌朝腔栓及び膀胱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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 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) にエーテル麻酔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、出生児数、出生児性別比、出生児外表 (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、性別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 ヶ月齢解剖群 (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 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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、膺スミアを午前 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 (CE)** 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。

雄出生児はすべて 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 CO_2+O_2 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、出生児の出産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Dunnett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の経胎盤・経母乳暴露試験による晩発影響についての検討試験

BPAと同様な晩発影響が陽性対照物質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、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）を雌70匹、雄30匹購入した。5日間の検疫・馴化機関終了後、健康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。翌朝膣栓及び膣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及び20 ng/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～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

使用動物及びBPAの慢性暴露

実験にはC57BL/6J系雌雄マウスを使用した。BPAの慢性暴露は薬物混入試料法に従い、BPAを胎児期及び授乳期に暴露し（0、2 mg/g of food）、離乳後は通常飼料にて飼育した。また、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。更に、培養細胞を用いた検討では、1日齢のICR系マウス中脳由来初代培養アストロサイト及び神経/グリア共培養細胞を使用した。

培養細胞を用いた検討

生後1日齢のICR系マウスの中脳由来初代培養アストロサイト及び神経/グリア共培養細胞にBPA及びE₂を処置し、アストロサイトの形態変化について免疫染色法に従い検討した。なお、各種性ホルモン受容体拮抗薬をBPAと同時に処置し、拮抗試験を行った。また、BPAの処置が神経及びアストロサイトの機能的な変化を引き起こすか否かについて、Ca²⁺イメージング法に従い検討した。

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

不安感受性に対する影響は明暗試験及び高架式十字迷路試験に従い検討した。更に、運動学習機

能にはrota-rod試験を、記憶保持能力はstep-through試験に従い検討した。

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：

行動測定には雄性C57BL/6Jマウスを使用した。次世代影響の測定では、妊娠マウスを購入し被検物質の暴露を行なうとともに、各腹から1匹の雄性仔を選び、成長後に行動測定を行った。

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。このため、行動測定期間を通じて、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。

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。

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)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。

SCOBの測定手続き：

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。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。

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)では、タイムアウト時間を固定し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。

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。

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暴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。

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。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。

薬理的負荷試験：

薬理的負荷試験を実施する場合は、原則として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 セッション終了後に実施することとした。負荷薬物としてはスコポラミン、メタンフェタミン等を使用した。

陽性対照物質による次世代影響の測定：

2 年目に陽性対照として選んだメチマゾールの飲水投与（濃度 0.05%）による次世代影響を測定した。3 条件（投与なし、短期間飲水投与-GD15 から離乳まで、長期間飲水投与-GD15 から 12 週齢まで）を設定し、SCOB 学習訓練に対する影響を検討した。

BPA 暴露：

最終年度に実施した BPA の次世代影響の測定では、母マウスの GD6 から PND22 まで混餌投与を行なった。測定用標準品（純度 99.6%を使用）の BPA を使用した。濃度は、0 ppm、0.33 ppm、3.3 ppm、33 ppm とした。

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

実験 1

生後1、3、5、7、10日目のSprague - Dawley系ラット (CrjCD:SD) 新生児雌雄各4匹の脳の連続切片を作製し、ドーパミン神経の指標としてチロシンヒドロキシラーゼを免疫組織学的手法 (ABC法) により染色して、視床下部の主要神経核における陽性細胞数を計測した。

実験 2

生後1、5、7、10、21日目及び10週齢のSprague - Dawley系ラット (CrjCD:SD) 雌雄各4匹の脳の連続切片を作製し、ER α の免疫染色を施して、性的二型核が存在する視床下部を中心に ER α 陽性細胞の数を計測した。

実験 3

Sprague - Dawley系の妊娠ラット (CrjCD:SD) を自然分娩させて得られた新生児を雌雄それぞれ4群に分け、1群を溶媒対照群とし、他の3群にゴマ油に溶解した Ethinyl Estradiol (EE) をそれぞれ0.5、5あるいは50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で生後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) に各群から雌雄それぞれ4匹を選出し、エーテル麻酔下で安楽死させて剖検し、脳を10%ホルマリンで固定し連続切片を作成し、免疫組織化学的にER α 染色施して陽性細胞を計数した。

実験 4

Sprague - Dawley系の妊娠ラット (CrjCD:SD) を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、上記溶媒に溶解した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p-tert-Octylphenol (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、体重を測定した後、動物をエーテル麻酔下で安楽死させ剖検し、脳を10%ホルマリンで固定し連続切片を作成し、免疫組織化学的に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。さらに、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・唾液腺に局限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) マウス及び投与方法

新生児期雌雄 NFS/sld マウスを使用。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 SPF (specific pathogen-free) 下で繁殖飼育されている。雌 NFS/sld マウスは生後3日目の胸腺摘出を施すことにより4週目以降、涙腺・唾液腺に局限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。NFS/sld マウスの新生児期 (生後0日、1日、2日) にBPA (20 $\mu\text{g}/\text{head}$)、E₂ (20 $\mu\text{g}/\text{head}$)、及びDex (20 $\mu\text{g}/\text{head}$) を皮下投与した後、2週、4週、及び8週後の変化を検討し、それぞれ対照群 (セサミオイルまたはPBS投与) と比較した。次に、新生児期 NFS/sld マウスに対し、生後0日、1日、2日に代表的なダイオキシン類としてTCDD (Cambridge Isotope Lab. Ins.) を各濃度 (0.1、1.0、10.0、20.0 $\text{ng}/\text{head}/\text{day}$) にて腹腔内投与後、4週後、8週後の変化を対照群 (コーンオイル投与) と比較した。さらに、TCDD を各濃度 (100、1000 ng/kg 体重) にて妊娠マウス15日に腹腔内投与後、出生4週後、8週後の次世代マウスの変化

を対照群と比較した。なお、TCDD を用いた動物実験は国立医薬品食品衛生研究所毒性部（菅野純部長）との共同研究のもとで同研究所内特殊実験施設において実施した。

2) 病理組織学的検索

全身諸臓器は臓器重量を測定後、10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、有機溶媒に浸染したのち軟パラフィン包埋後 4 μ m の組織切片を作成してヘマトキシリン・エオジン染色を施した。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実験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血清中の各イムノグロブリン分画を Mouse Ig ELISA Quantitation Kit (Bethyl Laboratories, Inc.) にて検出した。96 穴マイクロプレート (Nunc Inc.) に各イムノグロブリン (IgG1、IgG2a、IgG2b、IgA、IgM) に対する抗体を固相化し、ブロッキングの後、100 倍に希釈した血清を反応させ、洗浄後、HRP 標識の検出抗体を反応させる。o-phenyldiamine (Sigma) を基質として発色させ、490nm における吸光度を検出し、各イムノグロブリン量を定量化した。また、血清中の各種サイトカインの測定を実施した。マウス脾細胞を用い、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 μ g/ml) 及び抗 CD28 抗体 (20 μ g/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。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、上記と同様、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 Cj (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 匹を一晚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、投与期間及び投与経路

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、株式会社フジミ製作所) を用いた。

投与は妊娠 5 日から EE 1 μ g/kg/day 或いは 10 μ g/kg/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 μ g/kg/day 群及び 10 μ g/kg/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) 検査

a) 母動物

一般状態及び哺育状態は投与開始日から解剖日まで毎日 1 回以上観察した。体重は妊娠 0、5、12 及び 19 日、分娩後 0、4、7、14 及び 21 日に測定した。妊娠動物は全例を自然分娩させ出産率、妊娠期間を求めた。

b) 仔動物

出生日に産仔数、死産仔数、出産死亡仔数、性別の検査を行った。一般状態については離乳日まで毎日 1 回以上観察した。体重は出生日から 1 週

間に1回測定した。

c) 統計学的手法

母動物の体重、妊娠期間については一元配置分散分析を行った。分散分析において有意差が認められた場合は、対照群と各用量群の間において、Dunnett法による検定を行った。母動物の出産率についてはカイ二乗検定で対照群との間の有意差検定を行った。

F1出生仔の出生日から離乳日までの体重は1腹を標本単位として処理した。試験成績の評価に当っては有意水準1%又は5%で対照群との差が認められた場合に有意の変動とした。

6) LLNA

雌仔動物 12 週齢時に同一投与群の仔動物内で体重層別無作為抽出法にて群分けを行い、アセトン/オリーブ油混液(AOO)、Th1誘導抗原(2,4-dinitrochlorobenzene, DNCB)の0.25%、0.5%、1%溶液、またはTh2誘導抗原(Trimellitic anhydride, TMA)の2.5%、5%及び10%を動物の両耳介に25 μ L ずつ3日間連続塗布を行った。最終感作の約48時間後に10 mg/mLの5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を腹腔内投与した後、その約24時間後に解剖し、耳介リンパ節を採取した。ELISA法により採取したリンパ節におけるBrdU取り込み量の測定を行った。

各個体のBrdU測定値の平均値を算出した後、各F0投与群の媒体対照群の平均値を算出した。各個体のBrdU測定値の平均値を同一F0投与群の媒体対照群の平均値で除した数値(Stimulation Index, SI)を算出した後、各用量群の平均SI値及び標準誤差を算出し、各感作抗原のSI値についてF0のEE投与量及び各F1の抗原投与量を要因として二元配置分散分析(Two-way ANOVA)を実施し有意差の有無を検討した。

7) 胸腺細胞の分化能解析

a) 胸腺細胞浮遊液作製

雄仔動物を離乳時に頸椎脱臼で安楽死させた後、胸腺を採取し、非働化した牛胎児血清(FBS、インビトロジェン株式会社)を10%含むRPMI1640培地(インビトロジェン株式会社;以下培地)中に保存した。各個体の胸腺を3 mLの培地中でフロスト付スライドガラス2枚を用い組織をすりつぶし、70#のナイロンメッシュ(Falcon)を通過させ、

細胞浮遊液を作製した。

b) CD4⁺CD8⁺細胞からCD4⁺CD8⁻細胞への分化

細胞浮遊液を培地で 4×10^6 cells/mLに調整した後、24 well培養プレートに2 mL/wellで播種し、終濃度0.2 μ g/mLのIonomycin(IM、和光純薬工業株式会社)、0.2 ng/mLのPhorbol 12-myristate-13-acetate(PMA、Sigma)を添加して20時間、CO₂インキュベータ(37°C、5%CO₂)内で培養した(Step A)。

細胞を回収し、培地で2回遠心、洗浄を行い、2 mLの培地に再浮遊して24 well培養プレートで、さらに24時間、CO₂インキュベータ(37°C、5%CO₂)内で培養した(Step B)。

c) CD4⁺CD8⁻細胞からTh1及びTh2細胞への分化

Step B後の細胞を回収し、培地で再浮遊して細胞数を計測し、 5×10^6 cells/mLに調整した後、24 well培養プレートに1 mL/wellで播種し、最終濃度0.2 μ g/mL IM、3.0 ng/mL PMAを添加して16時間、CO₂インキュベータ(37°C、5%CO₂)内で培養した(Step C)。

細胞を回収し、培地で2回遠心、洗浄を行い、培地で再浮遊して 1×10^6 cells/mLに調整した後、24 well培養プレートに1 mL/wellで播種し、最終濃度50 U/mL recombinant mouse IL-2(和光純薬工業株式会社)、80 U/mL recombinant mouse IL-4(和光純薬工業株式会社)、0.01 ng/mL recombinant mouse IL-12(和光純薬工業株式会社)を添加して4日間、CO₂インキュベータ(37°C、5%CO₂)内で培養した(Step D)。

d) フローサイトメトリーによる表面抗原解析

離乳時(胸腺採取直後の細胞浮遊液)及びCD4⁺CD8⁻細胞への分化操作後(Step B後)の細胞それぞれについて、1.5 mLマイクロチューブに回収し、1%BSA、0.1%NaN₃含むPBSで遠心、洗浄を行い、1%BSA、0.1%NaN₃含PBS 100 μ Lに再浮遊した。FITC標識抗マウスCD4抗体(Beckman Coulter)、PE標識抗マウスCD8抗体(BD Biosciences Pharmingen)をそれぞれ1検体当たり5 μ Lずつ加え、軽く攪拌し、4°Cで1時間反応させた。反応終了後、1%BSA、0.1%NaN₃含PBS 1 mLを加えて攪拌し、1000 rpm、4°C、5分間遠心後、上清を吸引除去する洗浄操作を3回行った。洗浄後、1%BSA、0.1%NaN₃含PBS 1 mLに再浮遊し、測定まで氷中に保存した。測定試料は測定直前に70#メッシュ(FALCON)を通過させた後、フローサイ

トメーター (EPICS XL, Beckman Coulter) を用いて細胞の各蛍光強度を測定し、細胞表面の CD4 及び CD8 の発現状態を測定した。1 検体当たり 10^4 個の細胞を測定した。

e) 細胞内サイトカイン測定

Step D 後の細胞を回収し、培地で 2 回遠心、洗浄を行い、 2×10^6 cells/mL に調整した後、24 well 培養プレートに 1 mL/well で播種し、最終濃度 0.4 μ g/mL IM, 10 ng/mL PMA を添加して 3 時間、CO₂ インキュベータ (37°C、5%CO₂) 内で培養した。細胞内タンパク輸送を阻害するために monensin を添加し、さらに 2 時間、培養した。細胞を 1.5 mL マイクロチューブに回収し、1%BSA、0.1%NaN₃ 含リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で遠心、洗浄を行い、Cytotfix/Cytoperm kit (BD Biosciences Pharmingen) を用いて細胞の固定、膜透過処理を行った。kit 付属の Perm/wash solution 100 μ L に再浮遊後、PE 標識抗マウス IL-4 抗体 (Beckman Coulter) 又は PE 標識抗マウス IL-10 抗体 (Beckman Coulter)、FITC 標識抗マウス IFN- γ 抗体 (Beckman Coulter)、PE-Cy5 標識抗マウス CD4 抗体 (BD Biosciences Pharmingen) をそれぞれ 1 検体当たり 5 μ L ずつ加え、軽く攪拌し、4°C で 1 時間反応させた。反応終了後、1%BSA、0.1%NaN₃ 含 PBS 1 mL を加えて攪拌し、1000 rpm、4°C、5 分間遠心後、上清を吸引除去する洗浄操作を 3 回行った。洗浄後、1%BSA、0.1%NaN₃ 含 PBS 1 mL に再浮遊し、測定まで氷中に保存した。測定試料は測定直前に 70#メッシュ (FALCON) を通過させた後、フローサイトメーター (EPICS XL, Beckman Coulter) を用いて細胞の各蛍光強度を測定し、細胞表面の CD4、細胞内サイトカインの IL-4 又は IL-10 及び IFN- γ の発現状態を測定した。細胞表面に CD4 の発現している細胞を 1 検体当たり 5000 個測定した。

f) 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 μ 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 μ 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。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 mg/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 -70°C で保存する。

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

生殖細胞形成、排卵、受精、卵割、着床、胎盤形成、胎児器官形成、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、EDCs の低用量暴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網羅的に検討した。そのために、分担研究者らのこれまでの生殖・発生毒性試験・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ため、以下の実験を行った。

ICR マウス及び C57BL/6N マウスはいずれも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、異常のないものを実験に使用した。飼育環境などについては既報と同様にした。

1) マウス系統の EDCs に対する感受性の比較：

精巣毒性を指標にした場合、17 β -estradiol (E₂) に対して高感受性系統である C57BL/6N マウスと低感受性系統である ICR マウスを用いて、低用量 BPA (BPA、2~200 μ g/kg 体重)、genistein (GEN、50~100 mg/kg 体重) あるいは E₂ (0.1~2 μ g/kg 体重) の妊娠 9~13 日 (腔栓=妊娠 0 日) 暴露実験を行い、自然分娩により雄新生児を得て、生後の精巣発達に及ぼす影響の有無を、精巣、精巣上体、精囊のそれぞれの重量及び組織変化を毒性指標に 7 週齢にて調べた。