

## 2) マウス生殖巣発生期暴露後の超微形態的変化の観察 :

Diethylstilbestrol (DES)、E<sub>2</sub>、ethynyl estradiol (EE)、estradiol benzoate (EB)、tamoxifen (TAM)、clomiphene (CLOM)、atrazine (ATZ) の 100  $\mu$ g/kg 体重 (ATZ のみ 100 mg/kg 体重) あるいは低用量 (2  $\mu$ g/kg 体重) の BPA をそれぞれ妊娠 10~13 日に背部皮下注射して、最終暴露 24 時間後の生殖巣の病理組織学的変化を電子顕微鏡にて観察した。

## 3) 精巣精細管に見られたアポトーシス像の追跡 :

上記 2) の実験において、妊娠 17 日の胎児及び出生児については、発達期精巣精細管に見られるアポトーシスによる過剰細胞死の誘発について経時的検討を加えた。

## 4) 外生殖器の形成過程に及ぼす影響の検討 :

妊娠 15~17 日の連日に数種の EDCs 及び抗アンドロゲン剤の flutamide (Flu) 12.5~100 mg/kg 体重/日あるいはビクロゾリン (Vcz) 25~100 mg/kg 体重/日を強制的に経口投与し、妊娠 18 日に帝王切開により胎児を摘出して、雌雄別に体重を測定後、生殖突起から肛門までの距離 (Ano-genital distance: AGD) を測定した。次いで Flu あるいは Vcz の 100 mg/kg 体重/日投与群の雌雄については、1.25% グルタルアルデヒド及び 2% パラホルムアルデヒド固定したマウス胎児の肛門-生殖突起周辺組織を正中で切り出し、2% 四酸化オスミウムで後固定してエタノール脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。各ブロックから約 1  $\mu$ m の厚切り切片を作製し、トルイジンブルー染色を行って、光学顕微鏡による観察を行った。また、一部の胎児については、超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡による観察を実施した。さらに、一部の胎児については細胞外マトリクス増生の有無を観察するために、4% パラホルムアルデヒド固定されたマウス胎児の肛門-生殖突起周辺組織を正中で切り出し、パラフィン切片とした。また、各群の一部の胎児については凍結し、クリオスタットで薄切した。各切片を ABC 法により Type IV Collagen (線維成分)、Fibronectin (接着分子) 及び Proteoglycan (非線維成分) の免疫染色を行った。次いで同部位における間葉細胞群のヒドロキシプロリン (HP) 量を細胞外マトリクス量としてその定量を、Smithらの方法 (*J. Immunol.*, 153, 1994) に準じて行った。

## 5) 精巣下降不全に関連する遺伝子発現に及ぼす影響の検討 :

妊娠 9~16 日の連日に、DES の 50  $\mu$ g/kg 体重を背部皮下注射した。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 *Ins13*、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。

## 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) ラットを用いた遅延型影響検索モデルの作製と検出指標の確立—Donryu ラットを用いた DES 新生児期暴露による遅延型影響予測指標の検出—

陽性対照物質として DES (Sigma) を選択した。DES は生後 24 時間以内の Donryu 雌ラットに 0.001、0.01、0.1、1.0 及び 10  $\mu$ g/rat (0.15、1.5、15、150 及び 1500  $\mu$ g/kg 体重に相当) を背部皮下に単回投与し、遅延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。投与容量は、25  $\mu$ l/rat に調製した。陰性対照群には溶媒のみを投与した。DES の投与量は、高用量 2 群が文献的に SD 系ラットにおいて視床下部・下垂体・性腺系を直ちに障害する即時型 androgenization と遅延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。1 群あたりの匹数は最終計画殺の動物が 15 から 24 匹残るように割り当てた。

### ①遅延型影響発現の検査項目

- 性成熟に至るまで児の体重測定。
- 膣開口時期の観察。
- 臓器重量。
- PND (postnatal day) 14、PND21、5 週齢及び 7 週齢に 1 群 3~5 匹の動物を用いて生殖器・内分泌系臓器の病理組織学的検索。
- 性周期観察。
- 子宮及び卵巣におけるホルモン受容体の mRNA 解析。5 及び 7 週齢の剖検時に、卵巣、子宮、胸腺及び乳腺の組織の一部を凍結し、RNA を抽出後、ER $\alpha$ 、 $\beta$  などの遺伝子について RT-PCR 法にて解析を行った。
- 子宮癌に対する影響の観察。49 日齢に全例に

N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG) 20 mg/kg を子宮腔内に経膈的に単回投与した。12ヶ月齢(DES1.5及び0.15  $\mu$ g/kg 体重群では佐々木研究所病理部閉鎖のため9ヶ月齢)で生存例を剖検し、子宮癌及び乳癌の発生頻度及び発生病変数を病理形態学的に検索した。

## 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

生後1日目のC57BL/6N雌マウスに、DESの0.02、0.2、2  $\mu$ g/mouseを背部皮下投与し、遅延型影響の発現を観察した。DESはDMSOに溶解し、コーン油にて指定濃度に調製した。投与容量は、20  $\mu$ l/mouseとした。高用量が文献的にマウスの視床下部・下垂体・性腺系を障害し、androgenizationを誘発する量であること採用した。これらの母マウスは、妊娠12日～16日目に日本チャールス・リバー社から入手し、佐々木研究所実験動物施設で出生したものを実験に使用した。妊娠後期のC57BL/6N雌マウスの搬入・飼育に際し、以下の三点についてとくに留意して飼育管理を行った：

- 床敷用チップを多目に入れる
- 輸送時のチップと餌をケージに入れる
- 出産後投与以外は約1週間程度ケージ越しの観察のみ行う

遅延型影響発現の判定には、性周期における検索を指標とし、16週齢まで観察した。

## 3) 卵巣摘出ラットを用いた DES のエストロゲン作用の検出

正常性周期を示すDonryuラット(1群4匹)の卵巣摘出2週間後に、0.15、1.5、15  $\mu$ g/kg体重のDESを単回皮下投与し、24時間後に剖検して子宮重量を測定した。子宮腔内が水腫性の場合、分泌物を排出後の値も測定した。

## 4) 性周期を修飾する卵巣の変化について

### ①busulfan のラット胎生期投与による卵細胞減少が性周期及び子宮癌に与える影響について

妊娠14日目のラットに2.5及び5.0 mg/kgのbusulfanを単回腹腔内投与し得られた雌性児を実験に用いた。対照群には溶媒を投与した。雌性児ラットは11週齢にてN-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG) 20 mg/kg子宮腔内経膈的単回投与による発癌起始操作を行い、15ヶ

月齢まで飼育して子宮の増殖性病変の発生と卵巣の形態を観察し、15ヶ月齢で下垂体、性ステロイド、インヒビンなど関連ホルモンの血中レベルを測定した。動物には子宮内腺癌好発系のDonryu雌ラットを用いた。

### ②幼若期の放射線照射による卵巣への影響が性周期に与える影響について

生後14日目の雌Donryuラットに0.2及び1.0Gyの $\gamma$ 線を単回全身照射し、卵巣の形態学的変化及び性周期の変化を4ヶ月齢まで観察した。 $\gamma$ 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、卵及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同系統ラット及び無処置の対照群と比較した。発育期動物については $\gamma$ 線照射後6時間後(PND14)及び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週齢にそれぞれ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。形態学的検索方法として、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及びtertiary follicleを発育期卵胞(growing follicle)、閉鎖卵胞(atretic follicle)及び黄体(corpus luteum)に分類し。また性周期は膈開口後、4ヶ月まで2週毎に膈スミア像にて性周期を観察した。

### 4) 子宮癌発生を修飾する因子について

Indole-3-carbinol (I3C)は肝臓のcytochrome P450酵素を誘導し、肝臓のエストロゲン代謝に影響を与えると報告されている。雌Donryuラット11週齢でENNGを子宮腔内に投与し、I3Cの500及び2000 ppmを混餌(I3C500及びI3C2000)投与した。陽性対照群はE<sub>2</sub>の1  $\mu$ g/kg及びE<sub>2</sub>の代謝物で発

がん作用を示す4-hydroxy-estadiol(4HE) 5  $\mu$ g/kg を週2回皮下に投与し、15ヶ月齢まで経時的に観察して子宮発がん性について検索した。

内分泌かく乱化学物質の生殖器系の老化に至る過程に対する影響

太田 亮

EDCs のラット新生児期暴露影響が、生殖器系のみならず、神経系や免疫系にも及ぶことを考慮し、さらに生殖器系の老化に至る過程に対する影響についても対応可能な試験として、一生涯試験のガイドライン案を作成した。以下に、プロトコールの概略を示す。

使用動物：Cj:CD-IGS ラット

群数：4群（生児出産雌として各群10腹以上）

飼料：固型 CE-2（日本クレア）

飲料水：水道水（秦野市水道局給水）

投与物質：DES

媒体：コーン油（和光）

投与経路：強制経口

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

投与量設定理由：子宮肥大試験において、子宮重量に増加をもたらす5  $\mu$ g/kgを最高用量に設定し、子宮重量の増加が起らない0.5  $\mu$ g/kgを中用量、0.05  $\mu$ g/kgを低用量に設定。

投与期間：生後1日～生後5日

観察項目及び観察時期

1. 体重推移：哺育1日から98週齢まで測定
2. 性成熟（膣開口、陰茎包皮分離）：3週齢から7週齢まで観察
3. 性周期：8週齢から52週齢まで観察
4. 交配（交尾率、受胎率）：12、23、34、56、68週齢
5. 分娩、哺育（産児数）：1産から3産まで観察
6. 行動試験（シャトルボックス条件回避学習試験）：24及び48週齢で実施
7. 精子検査（精子数）：26及び52週齢で検査
8. 雄剖検（器官重量）：26、52、101週齢で実施
9. 雌剖検（器官重量）：54及び101週齢で実施
10. 雄の免疫検査（ヒツジ赤血球に対する抗体産生能）：26、52週齢で実施
11. 排卵検査（hCGによる誘起排卵数）：54週齢
12. 生存性：哺育1日から101週齢まで観察

〈内分泌かく乱性確定試験開発支援基礎研究〉  
確定試験に関わる発がん性検討：乳腺上皮系の分化形質を指標とした内分泌かく乱化学物質の発がん影響の検討

長村 義之

1. EDCs の周産期投与によるラット乳腺発現系への影響：

BPA 及び DES の周産期暴露が乳腺の発達や細胞増殖の調節機構に及ぼす影響について検索した。BPA の25 及び250  $\mu$ g/kg (BPA 低及び高用量群/5、6群)、DES の10 及び100  $\mu$ g/kg (DES 低及び高用量群/3、4群) を器官形成期（妊娠12日目）から離乳時（生後3週齢時）まで反復経口投与した。雌性仔ラット(F1)の7週齢時にDMBA 100 mg/kg を単回経口投与し、その後4 及び13週間後に解剖し、乳腺を採取して病理組織学的に検索した。対照群としてF0に溶媒を投与し、F1にDMBA投与なしの無処置仔ラット(1群)とF0に溶媒を投与し、7週齢時にDMBA処置を施した仔ラット(DMBA単独群/2群)を設定した。採材した乳腺は、定法に従い、組織標本作製し、病理組織学的検査及びWhole Mount (WM) 標本による観察を実施した。更にTerminal End Bud (TEB) 及び導管を中心に乳腺上皮細胞の細胞増殖をKi-67の免疫組織学的染色により算出し、さらに、乳腺上皮細胞のアポトーシス(TUNEL法)について検索した。

また、この検討と並行し、乳腺の凍結切片上からLaser Capture Microdissection (LCM)によりTEBの上皮細胞を採取し細胞増殖因子を中心にRT-PCRによる解析を実施した。

2. EDCs による乳癌由来株化細胞への影響：

乳癌由来の株化細胞のうちER 及びHER2発現の有無により区別される以下の細胞を用いてBPA 及びDESに対する用量反応性を確認した。

MCF-7: ER(+), HER2(-)

MDA-MB-231: ER(-), HER2(-)

BT474: ER(+), HER2(+)

SK-BR-3: ER(-), HER2(+)

いずれの細胞もSotoらのE-SCREEN Testに則り、12穴の培養皿を用いて、20,000個の細胞をダルベッコ改変イーグル培養液5%ウシ胎児血清存在下で24時間培養後、活性炭処理した血清5%を含むフェノールレッドフリーの培養液に変え、これにDESの $10^{-11}$ ～ $10^{-7}$ M及びBPAの $10^{-9}$ ～ $10^{-5}$ Mを添

加して6日間培養、MTT法により細胞増殖を観察した。

### 3. RNAiによるER発現抑制におけるEDCsの乳癌由来株化細胞への影響:

#### 1) 乳がん由来株化細胞のER $\alpha$ 発現

(EDCsによるMCF-7及びBT474細胞の影響)

乳癌由来株化細胞のうちER発現の有無による影響を明らかにする為、ヒト乳がん由来株化細胞であるMCF-7:ER(+),HER2(-)及びBT474:ER(+),HER2(+)細胞をDMEM(25U/ml penicillin, 25mgU/ml streptomycin, 10% FBS)にて継代培養を行った後、両細胞共SotoらのE-SCREEN Testに則り12穴の培養皿を用い、20,000個の細胞をダルベッコ改変イーグル培養液5%ウシ胎児血清存在下で24時間培養後、活性炭処理した血清5%を含むフェノールレッドフリーの培養液に変え、これにE<sub>2</sub>、DES及びBPAの10<sup>-10</sup>~10<sup>-6</sup>Mを添加して、6日間培養し、7日目にCell counting Kit-8を用いて細胞数を算出した。さらに両細胞のER $\alpha$ 発現を免疫組織化学(IHC)及びReal time RT-PCRにより検索した。

#### 2) MCF-7のRNAiによるER $\alpha$ 発現抑制

##### ① MCF-7のshRNAによるER $\alpha$ 発現抑制、培養条件及び被験物質の添加

ヒト乳がん由来株化細胞であるMCF-7:ER(+)  
に対するRNAi誘導によるER $\alpha$ 発現抑制はshRNA法(Short hairpin RNAは18~29塩基のdsRNA領域と3~9塩基のloop領域を含む、ヘアピン状に折りたたまれた一本鎖RNAで生体内に発現させると、Dicerによって切断され、siRNAが切り出される為、標的RNAの切断・分解が誘導される)により実施した。MCF-7は、DMEM(25U/ml penicillin, 25mgU/ml streptomycin, 10% FBS)にて継代培養を行った後、リポフェクション法(FuGENE HD, Roche)によりpiGENE PUR U6 ER $\alpha$  (iGENE社)またはEmptyベクターをトランスフェクションすることにより、ER $\alpha$ の発現を抑制した。トランスフェクションの24時間後にピューロマイシンを用いてベクターが導入されなかった細胞を除去した。ピューロマイシン処置後の生存細胞はフェノールレッドフリーのDMEM(25U/ml penicillin, 25mgU/ml streptomycin)に5%活性炭-0.5% dextran T70で処理し10% FBSを添加した培地を使用して24Wellプレートに5 $\times$ 10<sup>4</sup>/wellの条

件で播種した。Vehicle(0.1%DMSO)及び被験物質(E<sub>2</sub>、DES、BPA)は、以下に示す濃度で培地中に添加し、5%CO<sub>2</sub>インキュベータにて4日間の培養を行った。その後、プレートから培養液を取り除き、Cell counting Kit-8(Dojindo)を用いて2時間37°Cでインキュベーション後、450nmで吸光度を測定し、培地中の細胞数を算出した。

E<sub>2</sub>: 10<sup>-10</sup>~10<sup>-6</sup>M

DES: 10<sup>-10</sup>~10<sup>-6</sup>M

BPA: 10<sup>-7</sup>~10<sup>-5</sup>M

##### ② Quantitative RT-PCRによるER $\alpha$ 発現抑制の確認

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

##### ③ 免疫組織化学染色によるER $\alpha$ 発現抑制の確認

添加試験に使用した細胞のER $\alpha$ 発現抑制を確認するため、一部の細胞はチャンバースライドに播種し、1日培養した後20%ホルマリン固定により作製した標本を1次抗体(mouse anti-human ER $\alpha$  DAKO)を室温で1時間反応させ、その後DAKO Envision+ Kitを用い染色した。RNAiによりER $\alpha$ を発現抑制させたMCF-7を作出し、EDCsの作用について確認した。

### 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

化学物質の核内受容体への作用を迅速に検出できるシステムを構築し、内分泌かく乱作用が疑われている化学物質について、多種類の核内受容体への影響を検討した。

#### 1) 核内受容体リガンド検出系(CoA-BAPシステム)

ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、RAR $\alpha$ 、RAR $\gamma$ 、TR $\alpha$ 、VDR、RXR $\alpha$ 、RXR $\gamma$ 、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 、PPAR $\delta$ 、LXR $\alpha$ 、LXR $\beta$ 、FXRのリガンド結合領域をGSTとの融合タンパク質として、大腸菌を用いて大量に発現させ、精製した。これを96穴ポリスチレンプレートに固定化し、ここに化学物質とともにコ

アクチベーターTIF2を加えた。もし、化学物質にアゴニスト様活性があれば、核内受容体の構造変化を誘起し、コアクチベーターが結合する。コアクチベーターは、あらかじめバクテリア由来アルカリフォスファターゼ（検出剤）と融合させてあるので、この酵素活性を指標に、化学物質のアゴニスト活性を評価した。

## 2) レポーター遺伝子試験

SXR 発現ベクターとしてヒト由来 SXR を CMV プロモーター下流につないだ pCDGI-hSXR を、NF $\kappa$ B サブユニット p65 発現ベクターとして p65 遺伝子を CMV プロモーター下流につないだ pCMX-p65 を用いた。レポーター遺伝子としては、SXR 認識配列 (XRE) をルシフェラーゼ遺伝子上流につないだ pXRE-luc と NF $\kappa$ B 認識配列を同様につないだ pNF $\kappa$ B-luc を用いた。発現ベクターとレポーター遺伝子を、HepG2 細胞にリン酸カルシウム法で遺伝子導入し、化学物質添加後のルシフェラーゼ活性の値を測定した。

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

高木 篤也

ES 細胞は *in vitro* で神経、心筋、血球等の細胞に分化を誘導することが可能なため、細胞分化の解析に適している。それゆえ、EDCs の解析の難しい発生初期への影響を調べる試験系として有用であると思われた。

1) ES 細胞及びその浮遊培養により形成される胚様体 (EB) の分化への内分泌攪乱化学物質の影響を遺伝子レベルで解析するためには、ES 細胞及び EB の分化過程で変動する遺伝子の正常な発現パターンを明らかにしておく必要がある。そこで、ES 細胞及び EB の分化過程で発現する遺伝子についてマイクロアレイを用いて、経時的に解析を行った。フィーダー細胞上で培養したマウス ES 細胞 (TT2) をトリプシン処理し、細胞培養用 dish 上でさらに 2 時間培養した。この操作によりフィーダー細胞を除去した ES 細胞を LIF を除いた ES 培地で、最初の 2 日間は hanging drop 法 (ES 細胞 800 個/20 $\mu$ l)、次の 5 日間は浮遊培養法にて、計 7 日間培養した。その間に形成される EB の培養開始後 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7 日を採取したものをサンプルとした。ま

た、0 日のサンプルとしては上記フィーダー細胞除去後の ES 細胞 (1 $\times$ 10<sup>6</sup> 個) を用いた。RNA はキアゲン社の RNeasy にて抽出、40,000 以上の遺伝子発現の解析が可能なアフィメトリクス社の Gene Chip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて遺伝子発現解析を行った。また、その解析には定量的比較を正確に行うために、我々の開発した Percellome 手法 (細胞 1 個当たりの mRNA 絶対量を得る遺伝子発現解析手法) を用いた。同じ実験を独立して計 2 回実施した。これにより各タイムポイントのサンプル数を 2 とした。

2) マウス ES (E14-2s) 細胞をゼラチンコート Dish 上で培養後、LIF を除いた ES 培地で、4 日間浮遊培養した。その間に all-trans retinoic acid (ATRA) (5 $\times$ 10<sup>-6</sup>M、または、BPA (10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup>M) を添加し、4 日後に胚様体 (EB) を採取し、細胞数を計測した (n=9)。

## 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として、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。

### 1) 各性周期の臓器採取

C57BL/6 雌 100 匹を 9 週齢で購入し、2 週間の馴化期間を経た後に臓器を採取した。性周期の同定には膣スメア法を用い、マウスを屠殺した後に膣スメアを採り、ギムザ染色して性周期を判定した。卵巣、子宮、膣に加え、視床下部領域、下垂体に加え、血清を採取した。

### 2) 生後発達期の臓器採取

C57BL/6 妊娠 11 日目もしくは 13 日目のマウスを日本エスエルシーより購入し、出産日を生後 1 日目として各臓器を採取した。生後 1 日目、3 日目、5 日目、7 日目、10 日目、16 日目、21 日目、28 日目は卵巣と子宮を、21 日目は他に視床下部、下垂体、膣を採取した。複数匹をプールし、各日齢 3 群のサンプルを得た。

### 3) エストロゲン受容体 $\alpha$ 遺伝子 cDNA ノックインマウス

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

#### 4) マウス組織からの RNA の分離精製

組織を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社) に浸漬し、RNase を不活化した。4°C、一晚静置した後、RNA 抽出操作まで -80°C にて保存した。RNAlater を除いた後、RNeasy kit (キアゲン社) 添付の RLT buffer を用いて組織破碎液を調製し、DNA 定量用蛍光試薬である Picogreen を用いて、破碎液中の DNA 量を測定した。DNA 量に応じて、Spike RNA cocktail (Bacillus RNA 5 種類の mix) を添加し、TRIzol を用いて粗抽出した液を RNeasy kit を用いて全 RNA 精製した。得た全 RNA の 0.2  $\mu$ g を電気泳動し品質を確認した。

#### 5) Genechip 解析

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

確定試験に関わる神経系形成・発達メカニズムに基づいた内分泌かく乱作用点の分子毒性的解析

高木 篤也

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

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

2) マウス胎児神経幹細胞培養 (ニューロスフェア培養) : 分化能定量系

培養により得られたニューロスフェアをランダムに選び、分化誘導物質として、牛胎児血清 (FBS) を 1% 加えた培養培地 (N2/DMEM/F12 前出) にマイクロピペットを用いて移した。培養容器は Nunc 社のチャンバースライド (8well/slide) を用い、ポリ-L-オルニチン及びフィブロネクチンでコーティングし、ニューロスフェア細胞が容器に接着し分化しやすい条件とした。培養期間は 1 週間とし、培養終了後、4%ホルマリン/PBS (-) にて 15 分間固定した後、各細胞系に対するマーカーを用いて免疫染色し、1 ケのニューロスフェアからニューロン (マーカー: MAP2)、アストロサイト (マーカー: GFAP)、オリゴデンドロサイト (マーカー: O4) のどの細胞系が生じたかを測定した。各群 20 ケのニューロスフェアを数え、ニューロンを N、アストロサイトを A、オリゴデンドロサイトを O と略し、3 系統に分化したニューロスフェアは NAO、というように表記し、割合を算出した。

3) マウス胎児神経幹細胞培養 : 分化能定量系

マウス C57BL/6 胎生 11.5 日または 14.5 日目の胎児より、終脳を分離し単細胞化した後、N2/DMEM/F12 (フェノールレッド不含の DMEM/F12 培地にインスリン、プロゲステロン、プトレッシン、アポトランスフェリン、亜セレン酸 Na を添加したもの) に bFGF (10 ng/ml) を添加

した培地を用い、ポリ-L-オルニチン及びフィブロネクチンでコーティングした培養皿にて培養する。胎生 11.5 日由来細胞は 96well plate に  $1 \times 10^4$  個 /well/200 uL 播き、胎生 14.5 日由来細胞は  $4 \times 10^6$  個 /dish/6mL を 9cm 径 dish に播いた。胎生 14.5 日由来細胞は bFGF 補充及び培地交換を行いつつ 4 日間培養し、神経幹細胞を増殖させたのち、機械的に培養皿から分離し、96well plate に  $1 \times 10^4$  個 /well/200uL 播いた。LIF 10 ng/mL 存在下、BPA を濃度を振って添加し、4 日後 4%ホルマリン/PBS(-)にて15分間固定した後、抗GFAP抗体及びIRDye800CWラベルされた抗rabbit IgG抗体を用いて免疫染色した。同時にDNAをSYTO60で染色し、Odysseyを用いて蛍光量を測定し、DNA当たりのGFAP発現量として定量化した。

#### 4) 免疫染色

チャンバースライドにて培養した細胞を 4%ホルマリン/PBS(-)にて15分間固定し、一次抗体(マウス抗MAP2、ラット抗GFAP)、二次抗体(FITCラベル抗マウスIgG、Cy3ラベル抗ラットIgG)を用い、蛍光免疫染色した。DNAはHoechst33342を用いて染色した。

### 【内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究】

#### 〈OECD Conceptual Frame Work Level 3~4 対応試験開発〉

#### Pubertal assay の改良としての外来性エストロゲン刺激による卵巣機能等の修飾の高感度検出試験系開発

松島 裕子

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

##### 1) Newbold ら追試及びデータの解析：

Newbold ら (Retha R Newbold, et al, Reproductive Toxicology 18 (2004) 399-406) の追試データを詳細に検討した。

動物は、妊娠 14 日目の CD-1 マウス (日本チャールスリバー (株)) を購入し、分娩後、雌性児を 8 匹/母 (1 用量につき雌性児 24 匹/3 母) となるように無作為に群分けを行い保育させた。

PND1~5 の 5 日間 DES (CAS No. 56-53-1, sigma) の 0 (corn oil)、0.001、0.01、0.1、1、10  $\mu$

g/kg を皮下投与した。最終投与 24 時間後 (PND21) に頸椎脱臼にて屠殺し、体重、子宮重量 (Wet 及び Blotted) を測定した。卵巣、子宮、膈を中性ホルマリンで固定し、パラフィン包埋、HE 染色を施し、病理組織学的検査を行った。

##### 2) C57BL/6 マウスのエストロゲンに対する子宮肥大反応の予備検討：

動物は、妊娠 14 日目の C57BL/6Crslc マウス (日本エスエルシー (株)) を購入し、生後すぐに雌性児を 1 群 4 匹に分け、保育させた。

PND1~5 の 5 日間 DES の 0 (corn oil)、1 あるいは 10  $\mu$ g/kg を皮下投与し、更に、PND18~20 の 3 日間 DES を 10  $\mu$ g/kg 皮下投与した。最終投与 24 時間後に頸椎脱臼にて屠殺し、体重、子宮重量 (Wet 及び Blotted) を測定した。

##### 3) 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する：

5 週齢の雌雄 C57BL/6Crslc (日本エスエルシー (株)) を購入し、入荷直後より交配までの 3 週間 CRF1 あるいは PLD (phytoestrogen low diet) 飼料で飼育した。更に交配後、プラグが確認された雌は妊娠期間及び授乳期間中引き続き CRF1 あるいは PLD 飼料を与えた。給水は水道水、給水瓶はポリカーボネート瓶・シリコン給水蓋、ケージはポリカーボネートケージ、チップは三協ラボソフトチップを用いた。出生時に、仔の体重、総出産数、性比を記録し、仔は雌雄併せて 8 匹/母となるように調整した。雌性児は、PND21 に卵巣を採取し、メタカーンで固定・パラフィン包埋・連続切片を作製・HE 染色を施し、病理組織学的検査を行った。

雄性児は、PND 30 に体重、精巣、精巣上体の重量を測定した。

##### 4) 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を検討する：

妊娠 14 日目の C57BL/6CrSlc マウス (日本エスエルシー (株)) を購入し、入荷後すぐに飼料；PLD、給水；蒸留水・ガラス瓶・シリコン給水蓋、ケージ；アルミケージ、床敷き；三協ラボソフトチップで飼育した。

分娩後、雌性児を 3 あるいは 4 匹/母に分け保育させた。

PND1~5 の 5 日間 DES の 10  $\mu$ g/kg を母動物に

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

#### 前立腺等雄性生殖器系におけるアンドロゲン系影響のエストロゲン等複合シグナルによる修飾の研究

吉村 慎介

これまでEEは*in vitro*でアンドロゲン受容体アンタゴニストであることが示されているが、Hershberger試験では明らかな抗アンドロゲン作用は認められず、むしろアンドロゲン作用がみられた。

5週齢Crl:CD(SD)雄ラットを1週間予備飼育後、麻酔下で精巣及び精巣上体を摘出した。さらに1週間後から10日間、コーン油に溶解した被験物質を毎日強制経口投与したのち、抗アンドロゲン作用検出のためのHershberger試験には、全例に0.2 mg/kgのTestosterone propionate (TP)を毎日皮下投与した。アンドロゲン作用検出のためには、TPは投与しなかった。一部の試験では抗アンドロゲン作用の陽性対照として、Flutamide (FLU)を用いた。毎日、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を行い、10日間の投与翌日に麻酔下放血屠殺して剖検し、肝臓重量(平成18年度)を測定したほか、前立腺腹葉、精囊+凝固腺、肛門挙筋+球海綿体筋、陰茎龟头及び尿道球腺の重量を0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液で固定後に測定した。体重、摂餌量、器官重量については溶媒対照群と被験物質各用量群との間で多重比較を行った。2群間の比較のためにはt検定を実施した。

抗エストロゲン剤のTAMあるいはICI併用投与による影響をみるため、Hershberger試験における毎日の投与に先立ち、TAMあるいはICIを投与した。投与経路は、TAMは強制経口あるいは皮下投与、ICIは皮下投与とした。TAMの投与量は、1、3あるいは30 mg/kg、ICIの投与量は3 mg/kgとした。

#### 【OECD対応試験実施・調査研究】

#### 子宮肥大試験及びHershberger試験

小野 宏

##### 1) 子宮肥大試験

① 卵巣摘出したC57BL/6J系マウスに2,2'-ジヒドロベンゾフェノン(30~1000 mg/kg/day)、オクチルフェノール(3~100 mg/kg/day)あるいはベンツピレン(10~300 mg/kg/day)を単独あるいはエチニルエストラジオール(EE)の併用投与を行って、生体内においてエストロゲン作用あるいは抗エストロゲン作用を示すか否かを調べた。

② 基礎飼料(CE-2)または植物エストロゲン含量を軽減した飼料(PLD)を与えた卵巣摘出マウスに、EEあるいはEEとタモキシフェンを併用投与し、7日間の投与期間終了後に子宮の重量を測定した。

##### 2) Hershberger試験

① バリデーション作業のために、OECDからコード化されて提供された被験物質を、精巣摘出したSD系ラットに強制経口投与し、10日間の投与期間終了後に、前立腺腹葉、精囊(凝固腺を含む)、肛門挙筋・球海綿体筋、龟头、尿道球腺及び肝臓の重量を測定した。

② 経口投与で抗アンドロゲン作用を示すことが知られているフルタミドを、精巣摘出したSD系ラットに1及び3 mg/kgの用量で皮下投与し、テストステロンプロピオネイト(TP)を0.4 mg/kgの用量で併用投与した。投与期間は10日間とし、最終投与の24時間後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、前立腺腹葉、精囊(凝固腺を含む)、肛門挙筋・球海綿体筋、龟头及び尿道球腺の重量を測定した。

③ 精巣摘出したICRマウス及びC57BL/6JマウスにTPあるいはフルタミドを投与し、マウスのTPあるいはフルタミドに対する感受性を調べた。投与期間はOECDのプロトコル案に従って10日間とし、最終投与の24時間後に前立腺腹葉、精囊(凝固腺を含む)、肛門挙筋・球海綿体筋、陰茎龟头、尿道球腺及び肝臓の重量を測定した。

#### OECD/WHO 関連等研究ハーモナイゼーション総括

井上 達

平成16年度~平成18年度の3年間に開催された経済協力開発機構OECDと世界保健機構



WHO/IPCS 及び欧州会議 EU や米国環境防護庁 EPA その他種々の国際学会 (SOT、EUROTOX、SETAC 等) における EDCs 問題に関する取り組みを調査対象とし、それらにおける動向をヒト健康影響、野生動物影響、作用メカニズム及び実験動物モデル、暴露及びリスクの各範疇から情報を整理し、結果を本研究班の内外に発信することとした。

#### 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

日本が積極的に参加してきた EDTA/VMG-mammalian (ヴァリデーションマネジメントグループ/動物試験) 会合の結果をもとに、さらに公表されている結果を加えながら総合的に解析し、本試験の適応について検討した。また、内部データを公表し有用性についても検討した。

#### 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、これまで膨大な報告がなされているが、試験に用いる動物種、週齢、投与経路等、試験条件が様々である。しかし、OECD Validation Study で用いられた protocol はこれらの報告等を詳細に検討して作成されており、過去に実施された試験データは OECD Validation Study の protocol に十分反映されていると考えられる。この protocol に準じて実施された試験データを整理することにより、本試験法がガイドラインとして実用段階とする上での問題点を抽出し、その解決策を検討した。

#### 国内外の Hershberger 試験に関するデータ整理とその問題点の把握及び解決策の検討

山崎 寛治

2006 年の第 5 回、2007 年の第 6 回 VMG-Mammalian 会合において公表された、Hershberger 試験ガイドライン化のための最終的な試験である Validation phase 3 試験の結果を始め、OECD の動向について調査した。一方では、本試験法に関する文献調査を実施し、本試験の情報を収集した。

(倫理面への配慮)

各施設の倫理規定に従い適切に動物実験を実施する。

星薬科大学は平成元年 11 月 22 日制定「星薬科大学動物実験指針」、さらに「星薬科大学動物センター使用規定 (平成 16 年 11 月 5 日施行)」に従って動物に対する倫理面を十分に考慮してすべての実験を行った。

独立行政法人 労働安全衛生総合研究所・産業医学総合研究所は、「独立行政法人 労働安全衛生総合研究所・産業医学総合研究所動物実験に関する指針」に従って実施された。

財団法人 食品農医薬品安全性評価センターは、当センターの「動物実験倫理委員会規定」、「実験動物の管理基準 (2003 年 4 月 1 日改正)」及び「動物実験に関する指針 (2003 年 4 月版)」に従い実験した。

徳島大学は、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として徳島大学実験動物委員会において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。

財団法人 化学物質評価研究機構は、当機構実験倫理審査委員会の制定する実験倫理審査委員会規程 (平成 17 年 4 月制定) に従い、研究倫理委員会の厳重な審査、管理のもとに「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の使用及び保管等に関する基準」を遵守し適正に試験を実地した。

近畿大学は、近畿大学理工学部「動物実験に関する指針」に準拠して行い、使用した動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼など苦痛の少ない方法を用いた。

国立医薬品食品衛生研究所は、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本方針に従い実験を行っている。ダイオキシン類の実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

その他各所属研究機関で定められた倫理規定を遵守して研究を遂行する。

#### C. 研究結果

各班員の研究結果の概要を以下に記載する。

総括補佐及び一生涯試験、OECD バリデーション

## 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 Crl: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 食品農薬安全性評価センター)

(3) OECD/EDTA/VMG-Mammalian

## 菅野 純

(1) 齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目を調整する際の取り纏め、及び OECD 対応

神経・行動に関しては、BPA の妊娠期・授乳期暴露をモデルとし、dopamine 及び serotonin (5-HT) 神経系に着目した行動影響の評価と機序、マウス・オペラント条件付けによる神経系高次機能影響の評価及び脳の性分化への影響解析を実施することになった。

免疫系に関しては、自己免疫病態の発症に関わるモデルの改良、Local Lymph Node Assay を用いた免疫機能の修飾影響の解析を実施することとなった。

内分泌系に関しては、従前の生殖毒性に限定せず、中枢を含む性分化への影響、生殖関連臓器の形成、発達、機能、及びその加齢変化に対する影響を視野に入れた研究を実施することとなった。

詳細試験については、神経・内分泌・免疫ネットワークの発生・発達・成熟・老化を考慮した「齧歯類一生涯試験法」の開発を推進することとなった。

(2) I (H16 初回試験) BPA を用いた Crl: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)

## I (H16 初回試験)

母動物;

一般状態及び体重の推移

媒体対照群の 1 例 (No.3) が不妊であった。この他の母動物については、妊娠期間中、一般状態に異常はみられず、媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群、EE 群の妊娠動物数は 9/10、10/10、10/10、10/10、10/10、10/10 匹であった。

母動物の体重推移は、媒体対照と比較し BPA 400 mg/kg 群及び EE 群において妊娠 14 日目〜哺育期間を通じて有意に低値であった。

哺育拒否及び哺育拒否動物の剖検所見

媒体対照群の 1 例 (No.5) は雄 6 匹、雌 9 匹 (うち雌 1 匹は死産) を分娩したが、生後 2 日目までに全腹児の死亡が確認された。この母動物は腹児のすべてが死亡した時点でエーテル麻酔下で放血し、安楽死させ剖検した。その結果、乳腺の発達不良及び胸腺の萎縮が認められた。

BPA 400 mg/kg 群の 1 例 (No.47) は雌雄各 7 匹を分娩したが、哺育拒否により生後 3 日目に雌雄各 1 匹、4 日目までに全腹児の死亡が確認された。この母動物は腹児のすべてが死亡した時点でエーテル麻酔下で放血し、安楽死させた。剖検所見にて、乳腺の発達不良、胸腺の萎縮、前胃の境界縁の隆起、及び盲腸の拡張が認められた。

その他の母動物には、分娩及び哺育に異常を認めなかった。

剖検所見

媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40 mg/kg 群、EE 群には異常所見はみられなかった。BPA 400 mg/kg 群では、前胃の境界縁の隆起が 9/9 例に、盲腸の拡張が 8/9 例にみられた。

出生児;

着床痕数、産児数、死産児数、出産生存児数、出産生児性比、出産生児外表検査、授乳期の生児数及び死亡児数、一般状態及び体重の推移

外表検査及び一般状態は、媒体対照群を含む何れの群にも異常はみられなかった。

着床痕数、産児数及び出産生存児数は、媒体対照群に比し BPA 0.005 mg/kg 群で有意に低値であった。

この他、死産児数、出産生児性比、哺育期間中の生存児数及び死亡児数は、媒体対照群と BPA 群及び EE 群との間に差はみられなかった。

BPA 0.05 mg/kg 群の雌児 1 例が、同腹新生児数調整（生後 4 日目）の翌日に食殺された。

出生から離乳までの体重は、媒体対照群に比し雌雄 BPA 0.005 mg/kg 群で、出産 0 日目及び生後 4 日目に有意な高値がみられた。EE 群は、雄では生後 14 日目及び 21 日目に、雌では生後 14 日目に有意な低値がみられた。

児動物の雄では、生後 4 週齢から試験終了時 34 週齢（7 ヶ月齢）までの体重は、媒体対照群に比し BPA 0.005 mg/kg 群で生後 4 週齢目に有意な高値が、15 週齢以降は有意な低値がみられた。BPA 0.05 mg/kg 群では生後 12 週齢以降有意な低値がみられた。BPA 40 mg/kg 群では、生後 14 週齢目、26 週齢目及び 28 週齢以降有意な低値がみられた。BPA 400 mg/kg 群では生後 6 週齢以降、EE 群では生後 4 週齢以降有意な低値がみられた。

児動物の雌では、BPA 400 mg/kg 群で生後 4 週齢目のみ、EE 群では生後 4 週齢及び 5 週齢目に有意な低値がみられた。それ以外は媒体対照群と BPA 群及び EE 群はほぼ同様な推移を示した。

#### 発育分化検査；

##### ①肛門・生殖突起間距離

AGD 及び AGD 体重補正值は、雌雄とも媒体対照群と BPA 群及び EE 群との間に差は認められなかった。一方、AGD 測定日の体重は、媒体対照群に比し、雌雄 BPA 0.005 mg/kg 群で有意な高値がみられた。

##### ②陰茎龟头型分類

包皮分離日齢は、媒体対照群と BPA 群との間に差は認められなかった。一方、EE 群では有意な遅延がみられた。包皮分離日の体重は、媒体対照群と BPA 群及び EE 群との間に差は認められなかった。

##### ③臆開口検査

臆開口日齢は、媒体対照群と BPA 群及び EE 群との間に差は認められなかった。一方、臆開口日の体重は、媒体対照群に比し BPA 群では差は認められなかったが、EE 群では有意な低値がみられた。

#### 生殖能力検査群；

##### 生殖能力検査

何れの項目についても、媒体対照群と BPA 群及

び EE 群との間に差は認められなかった。

#### 10 週齢解剖群；

##### 雌外性器形態計測学的検査

尿道開口部スリット長、ファラス先端-尿道開口部間距離及び尿道開口部一臆開口部間距離は、媒体対照群と BPA 群との間に差は認められなかった。一方、EE 群では尿道開口部スリット長及びファラス先端-尿道開口部間距離は有意な延長がみられ、尿道開口部一臆開口部間距離が有意に短縮し、形態異常が認められた。

血清 T3、T4、FT3 及び FT4 測定（生データ不在のため、参考データ）

何れの項目についても、雌雄とも媒体対照群と BPA 群との間に差は認められなかった。一方、雌 EE 群では、FT3 が有意に高値であった。

##### 器官重量

児動物の雄では、媒体対照群に比し BPA 0.05 mg/kg 群の精巣の絶対重量、BPA 40 mg/kg 群の肝臓の相対重量が有意に低値であった。これ以外では、絶対及び相対重量ともに媒体対照群と BPA 群及び EE 群との間に差は認められなかった。

児動物の雌では、絶対及び相対重量ともに媒体対照群と BPA 群及び EE 群との間に差は認められなかった。

##### 剖検所見

児動物の雄では、腎盂拡張が媒体対照群で 1/7 例、BPA 0.05 mg/kg 群で 1/10 例、BPA 40 mg/kg 群で 2/9 例にみられた。

児動物の雌では、腎盂拡張が BPA 400 mg/kg 群で 1/9 例にみられた。Cleft phallus が EE 群で 7/9 例にみられた。

#### 性周期長期観察群；

##### 性周期検査

3 ヶ月齢時においては、媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 0/16、2/20、2/19、3/24、3/18 例が性周期異常を示した（媒体対照群では異常は認められなかった）。4 ヶ月齢時には媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 6/16、3/20、2/19、5/24、5/18 例が性周期異常を示した。5 ヶ月齢時には媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、

400 mg/kg 群で各々3/16、8/19、4/19、7/24、12/17 例が性周期異常を示した。6 ヶ月齢時には媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々6/16、10/19、7/19、7/24、8/17 例が性周期異常を示した。7 ヶ月齢時には媒体対照群、BPA 0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々4/16、13/19、9/19、13/24、12/17 例が性周期異常を示した。なお、性周期異常を示す動物数は、BPA 0.005 mg/kg 群では7 ヶ月齢に、BPA 400 mg/kg 群では5 ヶ月齢と7 ヶ月齢において統計学的に有意に増加した。

EE 群では、3 ヶ月齢時に8/22 例が性周期異常を呈し、5 ヶ月齢以降には有意な増加を示した。

### 器官重量

児動物の雄では、BPA 0.005 mg/kg 群において、脳の相対重量が高値、肝臓及び精囊の絶対重量が低値であった。BPA 0.05 mg/kg 群において、肝臓の絶対及び相対重量が低値を示し、脳、腎臓、精囊及び腹葉前立腺の絶対重量が低値であった。BPA 40 mg/kg 群において、脳の絶対重量が低値であった。BPA 400 mg/kg 群において、脳の絶対重量が低値、相対重量が高値を示し、甲状腺、肝臓及び腎臓の絶対重量が低値であった。EE 群において、脳、下垂体、肝臓、腎臓、精囊、精囊上体、精囊及び腹葉前立腺の絶対重量が低値であった。

児動物の雌では、BPA 40 mg/kg 群において、甲状腺の絶対重量及び相対重量が低値であった。BPA 400 mg/kg 群において、甲状腺の絶対重量が低値であった。EE 群において子宮の絶対及び相対重量が低値であった。

### 剖検所見

児動物の雄では、媒体対照群で肝臓に白色部 (white region) 1/18 例、腎盂拡張が1/18 例にみられた。BPA 0.005 mg/kg 群では腎盂拡張1/27 例、精囊の萎縮が1/27 例にみられた。BPA 0.05 群では腎盂拡張が1/29 にみられた。BPA 40mg/kg 群では腎盂拡張が1/22 例にみられた。BPA 400 mg/kg 群では、腎盂拡張が1/17 例、下垂体の暗赤色部 (dark reddish region) が1/17 例にみられた。EE 群では精囊の萎縮が1/22 例、精囊の透明化を伴う軟化 (transparent softening) が1/22 例にみられた。

児動物の雌では、媒体対照群で子宮腔内に液貯留が5/16 例にみられた。BPA 0.005 mg/kg 群で子宮に結節が1/19 例、膣に結節が1/19 例、脳室の拡張が1/19 例にみられた。

BPA 0.05 mg/kg 群では、子宮腔内に液貯留が1/19 例、皮下に結節が1/19 例、下垂体に暗赤色部 (dark reddish region) が1/19 例にみられた。BPA 40 mg/kg 群では、子宮腔内に液貯留が2/24 例、子宮に結節が1/24 例、膣に結節が1/24 例、下垂体の暗赤色部 (dark reddish region) が1/24 例、腎盂拡張が2/24 例、輸卵管嚢胞が1/24 例にみられた。BPA 400 mg/kg 群では、子宮腔内に液貯留が2/17 例、腎盂拡張1/17 例、膀胱内結石1/17 例、卵巣の出血が1/17 例にみられた。EE 群では、Cleft phallus が15/22 例、外性器腫脹が2/22 例にみられた。

### 病理組織学的所見

児動物の雌の媒体対照群において、卵巣に異常がみられた動物は8/16 例、うち黄体数の減少6 例、閉鎖卵胞の増加が8 例であった (重複あり)。子宮に異常のみられた動物は4/16 例、うち腺上皮の扁平上皮化生1 例、子宮内膜上皮の高円柱化3 例であった。膣に異常がみられた動物は7/16 例、うち膣上皮の過形成5 例、粘液分泌が5 例であった (重複あり)。下垂体に異常がみられた動物は1/16 例で前葉のびまん性過形成を認めた。

BPA 0.005 mg/kg 群では、卵巣に異常がみられた動物は12/19 例、うち黄体数の減少10 例、閉鎖卵胞の増加11 例、莖膜細胞種が1 例であった (重複あり)。子宮に異常のみられた動物は8/19 例、うち子宮腺の嚢胞1 例、子宮内膜の乳頭状過形成1 例、子宮腺上皮の高円柱化1 例、子宮内膜上皮の高円柱化皮が7 例であった (重複あり)。膣に異常がみられた動物は10/19 例、うち膣上皮の過形成9 例、膣上皮の粘液分泌が1 例にみられた。下垂体に異常がみられた動物は3/19 例、うち下垂体腺腫1 例、前葉の局所性過形成が2 例であった。

BPA 0.05 mg/kg 群では、卵巣に異常がみられた動物は11/19 例、うち黄体数の減少9 例、閉鎖卵胞の増加が11 例であった (重複あり)。子宮に異常のみられた動物は7/19 例、うち子宮腺上皮の高円柱化1 例、子宮内膜上皮の高円柱化が7 例であった (重複あり)。膣に異常がみられた動物は10/19 例、うち膣上皮の過形成6 例、膣上皮の粘液分泌が6 例であった (重複あり)。下垂体に異常がみられた動物は1/19 例で下垂体の出血がみられた。本群の1 例 (No.593) にみられた皮下結節は乳腺の線維腺種であった。

BPA 40 mg/kg 群では、卵巣に異常がみられた動物は13/24例、うち黄体数の減少11例、閉鎖卵胞の増加が13例であった(重複あり)。剖検所見時の輸卵管嚢胞(No.668)1例は組織学的には確認されなかった。子宮に異常のみられた動物は9/24例、うち子宮腺上皮の扁平上皮化生2例、子宮内膜上皮の高円柱化が9例であった(重複あり)。膣に異常がみられた動物は12/24例、うち膣上皮の過形成9例、膣上皮の粘液分泌6例、ポリープ1例、扁平上皮嚢胞が1例であった(重複あり)。下垂体に異常がみられた動物は24例で下垂体出血であった。BPA 400 mg/kg 群では、卵巣に異常がみられた動物は11/17例、うち黄体数の減少9例、出血1例、閉鎖卵胞の増加が10例であった(重複あり)。子宮に異常のみられた動物は9/17例、うち子宮腺上皮の扁平上皮化生2例、子宮腺上皮の高円柱化3例、子宮内膜上皮の高円柱化が9例であった(重複あり)。膣に異常がみられた動物は9/17例、うち膣上皮の過形成8例、膣上皮の粘液分泌が3例であった(重複あり)。下垂体は全例に異常はみられなかった。

EE 群では、卵巣に異常がみられた動物は12/22例、うち黄体数の減少11例、閉鎖卵胞の増加が12例であった(重複あり)。子宮に異常のみられた動物は6/22例、うち子宮の萎縮1例、子宮腺上皮の扁平上皮化生2例、子宮内膜上皮の高円柱化が4例であった(重複あり)。膣に異常がみられた動物は19/22例、うち膣上皮の過形成10例、粘液分泌が14例であった(重複あり)。下垂体に異常がみられた動物は1/22例で前葉のびまん性過形成であった。

#### 途中死亡動物剖検所見

児動物の雄では、BPA 0.005 mg/kg 群の1例(No.148)で4ヶ月齢時に左腹部の膨大がみられ、切迫屠殺したところ、腎臓に腫瘤(10.0 cm×8.0 cm×7.0 cm)を認め、病理組織学的に腎芽細胞腫であった。BPA 400 mg/kg 群の1例(No.320)が、22週齢目に死亡しているのが確認された。この動物の胸腔内には血様胸水がみられた。更に、心臓、肺臓及び気管大動脈を包み込む白色の腫瘤がみられ、胸腺腫が疑われた。

児動物の雌では、媒体対照群1例(No.536)が13週齢目に死亡したが、剖検は実施しなかった。BPA 0.005 mg/kg 群の1例(No.562)において、5

ヶ月齢(25週齢)時に左腹部の皮下に結節(φ30 mm)があり切迫屠殺したところ、病理組織学的に乳腺の腺癌と診断された。BPA 400 mg/kg 群の1例(No.693)において、4ヶ月齢時に左腹部の膨大がみられ切迫屠殺したところ、腎臓に結節(9.0 cm×6.0 cm×5.0 cm)、肺臓に結節(φ2~4 mm)がみられ、病理組織学的に腎芽細胞腫及びその肺転移と診断された。

## II (確認試験)

### 母動物の一般状態及び体重推移

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

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、BPA0.5 µg/kg 群27匹、BPA5 µg/kg 群30匹、BPA5 0µg/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。

#### 出生児の外表面、一般状態及び体重推移

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）の外表面検査において、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、BPA0.5、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、BPA0.5、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。その他、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（膈開口及び陰茎亀頭型分類）

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

膈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 がみられた。

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

### ① 母動物

卵巢、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

### ① 母動物

離乳日に計画屠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、水腫性変化及び肺断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瘍 (1/12) がみられた。50 µg/kg 群で卵巢の小型化 (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、媒体対照群で卵巢の嚢胞 (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)、卵巢の嚢胞 (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)、卵巢の嚢胞 (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)、皮下組織の腫瘍 (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、「齧歯類一生涯試験」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。「齧歯類一生涯試験」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とする。

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 (ヴァリデーションマネジメントグループ/動物試験) 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

**BPA 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 のアストロサイトに及ぼす影響

初代培養アストロサイト及び神経/グリア共培養細胞に極めて低用量の BPA を処置することにより、アストロサイトの形態変化が引き起こされ、さらには、dopamine 誘発 Ca<sup>2+</sup> 応答の亢進が認められた。このような BPA の処置によるアストロサイトの活性化は、estrogen 受容体拮抗薬である ICI182,780、estrogen 受容体作動薬/拮抗薬である tamoxifen、progesterone 受容体拮抗薬である mifepristone 及び androgen 受容体拮抗薬である flutamide をそれぞれ BPA と同時に処置しても何ら影響を受けなかった。また、E<sub>2</sub> の処置ではアストロサイトの形態変化は認められなかった。以上のことから、BPA は性ホルモンかく乱作用とは異なった機序により、アストロサイトの活性化を引き起こすことが明らかとなった。さらに、BPA の胎児期及び授乳期慢性暴露によりアストロサイトの活性化を引き起こすか否かについて免疫組織学的に検討した。その結果、BPA の胎児期及び授乳期慢性暴露により、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、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 dopamine 神経発達に及ぼす影響

BPA の慢性暴露による dopamine 神経系の発達異常を詳細に検討する目的で、BPA を慢性暴露した胎生 14 日のマウス全脳より RNA を採取し、RT-PCR 法に従い、dopamine 神経発達関連因子の発現量を検討した。その結果、BPA を暴露された胎児脳において、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。一般的に、脳における dopamine 神経細胞の増殖は胎生 10.5~14 日に最も盛んであるため、dopamine 神経の発達には器官形成期が重要な期間である。したがって、BPA の胎児期及び授乳期慢性暴露により dopamine 神経発達のかく乱が惹起される可能性が示唆された。また、BPA を胎児期及び授乳期に慢性暴露された成

獣マウスの側坐核において、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。以上の結果から、BPA の慢性暴露により、dopamine 神経発達関連因子の発現異常に伴い、dopamine 神経の発達異常が引き起こされる可能性が示唆された。

#### 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が dopamine 神経のみならず、他の神経機能にも影響を及ぼすか否かを検討する目的で、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、BPA の胎児期及び授乳期慢性暴露により、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。海馬における choline 作動性神経は記憶保持に重要な役割を担っていることが知られていることから、本研究では次に、BPA の胎児期及び授乳期慢性暴露による海馬 choline 作動性神経に及ぼす影響について、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免疫染色法に従い検討した。その結果、BPA の胎児期及び授乳期慢性暴露により、海馬全域において ChAT 免疫活性の減弱が認められた。更に、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-1b 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、BPA の暴露により、IL-1b 及び BMP-9 mRNA 量の著明な減少が認められた。以上の結果から、BPA の胎児期及び授乳期慢性暴露により、choline 作動性神経の異常に伴う、記憶保持能力の低下が引き起こされる可能性が示唆された。

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

マウスの SCOB 測定の基本条件について：

マウスを使用した場合の体重統制条件を確立した。また、20 mg の食餌ペレットを使用して、1 時間程のセッション内に 100 回の強化を実施することが可能なことを示した。

交替型混合スケジュールでの訓練：

タイムアウト付交替型混合スケジュールを使用して短期記憶の保持曲線を得る方法はラットを前提に我々が考案したものであるが、実験の結果、マウスも同様のスケジュールで訓練が可能なこと、固定長タイムアウト条件の訓練ではタイムアウト時間を 8 秒とした場合の方がその後の訓練が良好なこと、変動タイムアウト条件での訓練進行がラットよりも緩やかなため確実なパフォーマンスを得るためにやや多めの訓練数を要すること、変動タイムアウト条件で測定された Delay-Accuracy 曲線（短期記憶の保持曲線）はラットと比較してより右下がりのもとなること等が示された。これらを基礎として BPA の低濃度影響を検討する実験を実施した。

陽性対照物質による次世代影響の測定：

SCOB の習得過程、習得後のパフォーマンス、成長後の脳重量ともに、メチルゾールの暴露による明確な影響を見いだすことができなかった。

BPA 低濃度暴露の影響：

自動反応形成過程では、暴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。

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、1 block（5 session）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示している。図に示されたように、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、他に群間差や交互作用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。各図の左側のグラフは第 3 段階 1 週目の結果を、右側のグラフは 10 週目の結果を示している。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。BPA 暴露の影響は認められなかった。

#### 薬理学的負荷試験：

負荷薬物の急性投与による量-影響曲線を、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) を用いてプロットしてある。BPA 低濃度影響についての実験では、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、明確な暴露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

##### 実験 1

新生児の中樞神経系におけるチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞は、成獣で最も多数のドーパミン作動性神経細胞が集中している黒質では、生後 1 日目においても多数観察されたが、生後 3 日以降急速にその数を増し、黒質の容積も急速に増大した。なお、黒質におけるチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞の数に雌雄差は認められなかった。一方、視床下部においては、雄において生後 1 日目から、視床下部後核に相当すると思われる神経核にチロシンヒドロキシラーゼ陽性の神経細胞が多数観察され、同部のチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞は、生後 3 日目まで同程度観察されたが、生後 5 日目以降は減少した。一方、雌においても生後 1 日から視床下部後核にチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞が観察されたがその数は雄より明らかに少なかった。なお、5 日目以降雌雄間で差は見られなくなった。

SDN-POA に相当する神経核すなわち内側視索前野では、生後 3 日以降明らかにチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞数が増加したが、その数には雌雄差は認められなかった。

##### 実験 2

雌では内側視索前核後部に比較すると、性的二型核の一部である内側視索前核前部から前腹側室周囲核にかけて、はるかに多数の ER $\alpha$  陽性細胞が観察された。また、内側視索前核から前腹側室周

囲核にかけて、雌雄ともに多数の ER $\alpha$  陽性細胞が観察され、雄では生後 5 日齢でその数は最も多く、それ以降日齢が進むにつれて、急速に減少したのに対し、雌では少なくとも生後 10 日目までは陽性細胞の減少は認められなかった。一方、性的二型核の最後部に位置する神経核においては、ER $\alpha$  陽性細胞数は雌雄ともに生後 1 日から 5 日にかけて急速に増加し、その後離乳期までは ER $\alpha$  陽性細胞数はほぼ一定で、その数は雄より雌がやや多くなる傾向にあった。

##### 実験 3

EE 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上の投与により、雌雄とも内側視索前核前部から前腹側室周囲核にかけて、投与終了後 1 日目にはほぼ用量依存的に明らかな ER $\alpha$  陽性細胞数の増加が認められた。さらに、内側視索前核後部においても雌雄いずれも EE 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上の投与群で ER $\alpha$  陽性細胞の軽度の増加が認められた。内側視索前核前部及び前腹側周囲核において、投与後 16 日即ち離乳時でも雌では持続して ER $\alpha$  陽性細胞の増加傾向が認められたが、雄では対照群との間に差は認められなくなった。

##### 実験 4

OP 500  $\text{mg}/\text{kg}$  投与群雄では生後 6 日 (最終投与翌日) 及び生後 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。さらに同群雌雄及び DES 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群の雄で生後 6 日齢に体重の増加抑制が認められ、特に OP 500  $\text{mg}/\text{kg}$  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、膣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  $\text{mg}/\text{kg}$  投与群の 1 例、DES 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群 3 例中 3 例、0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  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 $\alpha$  陽性は、DES 投与群及び OP 50  $\text{mg}/\text{kg}$  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  $\text{mg}/\text{kg}$  投与群の雌では ER $\alpha$  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NFS/sld マウスを用いてEDCsによって免疫異常の誘発が可能であるかについて検討を加えた。

### 1) BPA、E<sub>2</sub>、デキサメサゾン (Dex) の影響

新生児期(生後0日、1日、2日)にBPA(20  $\mu$ g/head)、E<sub>2</sub>(20  $\mu$ g/head)、及びDex(20  $\mu$ g/head)を皮下投与した後、2週後、4週後、8週後の変化を対照群と比較した。体重の変動については、BPA及びE<sub>2</sub>投与により2週目でBPA:85.6%、E<sub>2</sub>:87.8%と約15%の減少を示していたが4、8週目では回復が見られた。Dexの影響は2、4週目とも65.6%と約35%の著明な体重減少がみられたが、8週目では回復していた。臓器湿重量については、胸腺への影響がDexで最も大きく認められ、2週目、4週目で56.3%、76.6%と減少し、8週目では回復が見られた。脾臓重量への影響では子宮重量がBPA投与群で4週目に減少傾向(76.4%)が現れていた。脾臓Thy1陽性T細胞に対するBPAの影響は2週目に35.3%と顕著な減少が見られたが、その後は回復していた。Dexの脾臓T細胞に対する影響は2週目に34.7%と顕著であった。脾臓B220陽性B細胞に対するBPA及びDexの影響が投与2週後にB220陽性B細胞集団がhighとlowの2相性を示すフラクションの出現として観察された。また、投与4週後には脾臓B220陽性B細胞が88.3%とやや減少傾向が見られた。Dexの脾臓B220陽性B細胞に対する影響は2週(68.6%)、4週(58.1%)と顕著に見られたが、8週群では回復していた。胸腺内T細胞のCD4及びCD8分画には顕著な変化が見られなかったが、新生児期Dex投与後2週目のCD4陽性T細胞は71.3%とやや減少が見られた。末梢T細胞のCD4及びCD8分画の変動について検討した結果、新生児期BPA投与後2週目のCD4陽性、及びCD8陽性T細胞に著明な減少が認められた(CD4陽性T細胞:32.4%;CD8陽性T細胞:35.7%)。Dex投与群でも同じく2週後のCD4陽性、及びCD8陽性T細胞に著明な減少が認められている。これらの減少傾向は4週目以降回復がみられ、新生児期投与による影響は2週目ま

での初期段階に末梢T細胞分画の障害として出現する可能性が示唆された。全身諸臓器の病理組織学的検索の結果、4週齢、8週齢において軽度の唾液腺炎(顎下腺)、涙腺炎の出現が認められた。

### 2) 新生児マウスへの TCDD 投与の影響

マウス新生児期(生後0日、1日、2日)にTCDD(0.1 ng/head/day、1.0 ng/head/day、10.0 ng/head/day、20.0 ng/head/day)を腹腔内投与した後、4週、及び8週後の変化を検討した。TCDDの新生児期投与により、特に高濃度投与群(10.0 ng/head、20.0 ng/head)における死亡率が高く、TCDD投与後4週から8週までの間に10.0 ng/head群で約45%、20.0 ng/head群では約75%が死亡した。体重の変動については、4週齢では雌雄マウスとも50~75%の減少率が見られ、8週齢では対照と比較して約30%とやや回復傾向が見られた。臓器湿重量については、20.0 ng/head投与群での雄マウスの副腎、下垂体を除く各臓器重量の著明な減少が認められた。胸腺では雌雄マウスとも4週群で対照群と比較して約70%の重量減少がみられ、8週目では約30%と回復傾向がみられた。脾臓重量への影響は雌雄マウスとも4週群で対照群と比較して約80%の減少が見られたが、8週齢では雄マウスに強い変化が認められ、10.0 ng/head投与群で約150%と異常な重量増加(脾腫)が見られた。

**胸腺:**TCDDの新生児期投与により4週齢では雌雄マウスとも胸腺内CD4SP(シングルポジティブ)細胞及びDP(ダブルポジティブ)細胞への分化が抑制され、逆にCD8SP細胞への分化促進及び集積が観察されたが、雌マウス8週齢では回復傾向がみられた。逆に雄マウス8週齢ではCD8SP細胞がTCDD濃度依存的に顕著な集積増加が認められた。

**脾臓:**脾臓におけるCD4陽性T細胞はTCDDの投与量に伴い減少傾向が認められ、逆にCD8陽性T細胞はTCDD高濃度投与により増加していることが明らかにされた。雌マウスではTCDD投与によるCD4陽性T細胞への影響は認められず、CD8陽性T細胞の増加が認められた。雌雄マウスともに8週齢脾臓ではCD4陽性T細胞の減少、CD8陽性T細胞の増加が高濃度TCDD投与群で目立っていた。一方、雌マウスではCD4、CD8陽性T細胞ともにTCDD暴露による影響は軽度であった。C末梢T細胞のT細胞活性化マーカー(CD44、