

容積を持つ神経核(前腹側室周囲核: AVPVN-SDA)が存在することが明らかにされており、雌雄の生殖機能あるいは性行動の差は、これら神経核の雌雄差に依存していると考えられている。これまでにラット生後 1-5 日間に高用量のエストロゲン活性物質を反復皮下投与により、性周期異常の発現に先立ち、新生児期の視床下部前腹側室周囲核に ER $\alpha$  陽性細胞数が持続的に増加することを見出した。

平成 19 年度は、1) 雌雄ラット新生児期に低用量 DES (0.2-20ng/kg) を投与し、前腹側室周囲核における ER $\alpha$  陽性細胞数を形態計測した結果、膣開口完了時期に溶媒対照群と DES 投与群との間に明確な違いはなく、膣開口完了時の体重にも有意な差は認められなかった。また、全群とも生後 20 週齢における性周期に異常は認められなかった。脳、特に視床下部を中心に病理形態学的観察および形態計測を実施中であるが明確な形態学的変化は認められていない。2) 妊娠期・授乳期に DES (0.2-20ng/kg) 投与により、遅発性性周期異常が観察された F1 ラットの脳、特に視床下部を中心に病理形態学的観察および形態計測を実施中であるが明確な形態学的変化は認められていない。

## 2) 免疫

### 周産期化学物質暴露による免疫異常発現メカニズムの解明

林 良夫

シェーグレン症候群は涙腺・唾液腺を中心とする外分泌腺を標的臓器として発症し、ドライアイ・ドライマウスなどの乾燥症状を特徴とする難治性自己免疫疾患である。当分担研究者の研究室では NFS/sld ミュータントマウスを用いてシェーグレン症候群疾患モデルを開発し、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) を施すことにより自己免疫病態を呈することから、EDCs 投与によって 3d-Tx を施すことなく免疫異常の誘導が可能か否かについて検討を加えた。

平成 19 年度は生体内で女性ホルモンが著しく変動する妊娠中に TCDD を暴露し、母体への免疫学的影響及び自己免疫病変の発症との関係を NFS/sld マウスを用い

て検討した結果、妊娠後期に TCDD を投与したマウスは出産、授乳を経た後、6 ヶ月齢に胸腺の分化異常、T 細胞のサイトカイン分泌異常が認められ、唾液腺に激しい炎症性病変が観察された。

### 化学物質の周産期暴露及び in vitro 暴露の初期免疫応答に対する影響評価

武吉 正博

前研究班での研究において EDCs が初期免疫応答能の変調を引き起こす可能性が示唆された。

平成 19 年度は、ヒト単球系細胞株を用いた実験系により抗原提示過程に関わるタンパク質をプロテオミクス技術を用いて網羅的に解析し、化学物質が生体の初期免疫応答能に与える影響を評価するための有効なマーカータンパク質を検索した。その結果、2 種の感作性物質 Dinitrochlorobenzene 及び Eugenol を暴露した実験系におけるプロテオーム解析では、感作性の強度に応じて発現変動を示すタンパク質の数が多くなった。また、既知マーカー膜タンパク質 CD86 は暴露 6h では殆ど検出されず 24h で検出されるのに対して、プロテオーム解析では暴露 6h で最も多くのタンパク質の発現変動がみられた。以上から CD86 の発現に到る過程の感作性に関連するタンパク質が検出された可能性が高い。同定したタンパク質は既知マーカー膜タンパク質 CD86 に比較してより単時間に感度よく感作性物質を検出可能なマーカーであることが示唆された。

## 3) 生殖器

### 胎生期暴露が雄性生殖器に及ぼす影響の発生物学的解析研究

長尾 哲二

EDCs の胎生期暴露が雄性生殖器に及ぼす影響を発生物学的に検討する。

平成 19 年度は、マウス胎児期・新生児期の精巣下降に関連する遺伝子発現、及び胎児・新生児精巣生殖細胞におけるメチル化酵素遺伝子発現について予備的に検討した。その結果、合成エストロゲンの胎生期暴露は、精巣導帯あるいは上方靱帯の発生・発達に重要な役割をもつ Insl-3 及び P450scc 遺伝子発現を著しく抑

制し、また胎児雄性生殖細胞における DNA メチル化制御分子を攪乱することが示唆された。

### 周産期・小児期の化学物質暴露による生殖器系の発達および老化に及ぼす影響の研究

太田 亮

EDCs の影響が、生殖器系の老化のみならず、神経・行動や免疫系においても網羅的に検出可能な方法を考案し、ラット及びマウスを用いた一生涯試験のプロトコル案を作成した。

前研究班における SD ラット新生児に DES を投与し、2 年間観察する試験に引き続き、平成 19 年度は、マウスを用いた試験を開始した。生後 1-21 日の体重の推移は全群変わらなかった。雌の陰開口時期は、5  $\mu$ g/kg/day 投与群において有意に延長した。雄の陰茎包皮分離時期は全群同じであった。現在実験進行中である。

### 化学物質の齧歯類周産期暴露による雌性生殖器等の遅発性障害の研究

松島 裕子

先行研究班において、低用量 BPA (0.5、5、50  $\mu$ g/kg) を SD ラット妊娠期・授乳期投与し、F1 の性周期を検査した結果、6 ヶ月齢において対照群には異常は見られなかったが、50  $\mu$ g/kg では 3/30 が Persistent estrus を呈し、月齢が進むに従い、全ての BPA 投与群で性周期異常がみられた。

平成 19 年度は、委託試験と同様のプロトコルを踏襲し、最初に有意な性周期異常が見られた 6 ヶ月まで継続して視床下部、下垂体、卵巣等の遺伝子発現の解析及び病理組織等を詳細に検査することにより性周期異常が誘導されるメカニズム明らかにする。

分娩時平均出産数、平均雌性児体重とも全群差はなかった。PND21 では、下垂体及び子宮重量は対照群と BPA 投与群に差は見られなかったが、卵巣重量は BPA の 5  $\mu$ g/kg 群で有意に低値であった。PND40 では、下垂体、子宮及び卵巣重量は BPA 投与群と対照群で差は無かった。

現在、生後約 1 ヶ月半を経過し、実験継続中である。

### 【有害性発現分子メカニズムの解明研究】 部門

恒常性維持機構に対する影響の発現機序を分子・遺伝子レベルで解明し、評価試験の基盤を固める

### ES 細胞分化増殖試験系を用いた胎児毒性評価手法の開発研究、及び AhR を介する晩発影響の解析研究

高木 篤也

ES 細胞は *in vitro* で神経、心筋、血球等の細胞に分化誘導出来る事から、細胞分化の解析にもよく用いられている。それゆえ、内分泌かく乱化学物質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。

平成 19 年度は、ES 細胞及び ES 細胞から形成される胚様体(EB)の形成開始後 7 日間の遺伝子発現に対する溶媒の DMSO あるいは BPA の影響を、定量的な比較を正確に行うことが可能な Percellome 法によるマイクロアレイ解析を用いて検索し、それぞれ影響を受ける遺伝子群を同定した。その結果、DMSO は外胚葉、中胚葉、臓側内胚葉マーカーに明らかな影響は及ぼさなかったが、心筋分化マーカーの発現を 0.5 日程度早期化することが明らかとなった。さらに、pathway 解析により TGF-beta 系を活性化していることが示唆された。また、DMSO は ES 細胞培養系で白血球系の分化にも影響する可能性が示唆された。

BPA の ES/EB 系の遺伝子発現に及ぼす影響は、中胚葉、臓側内胚葉マーカーには観られなかったが、アストロサイトのマーカーの GFAP 及び神経幹細胞のマーカーである Nestin の軽度の増加を促した。また、心筋分化マーカーの Mlx2.5 の発現を有意に上昇させた。更に、核内受容体の発現では androgen receptor を有意に上昇させた。培養期間を通して見ると、培養1日目と7日目に多くの遺伝子発現の増加が見られた。

### 新生児化学物質暴露の前立腺影響の解析研究

藤本 成明

前立腺形態形成(新生時期)において

アンドロゲン応答性に発現する PSP94、EAPA2、IgGBPLP、defensin  $\beta$  及び PCP4 は、前立腺発達において重要な役割を果たしている。

平成 19 年度は、これらの遺伝子のうち、PSP94 と EAPA2 の転写プロモーターについて解析した結果、いずれの遺伝子上流域も転写プロモーター活性を持ち、アンドロゲン応答性に ER が強く関与していることが明らかになった。アンドロゲン標的組織での化学物質影響を検索する上で ER の発現の重要性が明らかになった。

### 神経系形成・発達メカニズムに基づいた高感受性集団に対する化学物質脳神経系影響の分子毒性学的解析

五十嵐 勝秀

神経系が正常に発達するためには神経幹細胞の分化が適切に制御される必要がある。神経幹細胞の成熟には DNA メチル化が関与していることから、DNA メチル化制御機構を網羅的な観点から解析することにより、神経系恒常性維持機構が未発達な小児など高感受性集団への化学物質影響解析の突破口となる知見を得る。

平成 19 年度は、DNA メチル化に関するデータベース構築を開始した。マウス胎生 11.5 日及び 14.5 日の終脳から取得したゲノム DNA のメチル化状況を、メチル化 DNA の分離精製法とマイクロアレイを組み合わせた ChIP on Chip 法により網羅的に解析した。その結果、すでに知られている GFAP、S100b などのアストロサイト細胞特異的遺伝子のプロモーター領域のメチル化が胎生 11.5 日の方が高いという陽性コントロールデータが得られたのに加え、メチル化状況が異なる他の多数の領域が明らかになった。

### AhR の生理機能と炎症応答・小児期個体における役割

藤井 義明

AhR 欠失マウスでは、生後 11 週を過ぎると殆どすべてのマウスに盲腸癌を発症し、大腸の DSS (dextran sodium sulfate) 投与による大腸炎やリポ多糖類 (LPS) 投与による腹膜炎に対し易炎症性であることから、AhR の大腸癌抑制と抗炎症作用の分子メカニズムについて検討した。

平成 19 年度は、AhR 欠失マウス及び野性型マウスの腸組織及びマクロファージや T 細胞などを用いて遺伝子発現の変化や形態学的変化などについて DNA-マイクロアレイ法、RT-PCR 法、抗体染色法及び生化学的・分子生物学的方法を用いて総合的に解析し、AhR 欠失と正常マウスの組織、細胞を比較した。その結果、大腸組織において、AhR 欠失マウスでは癌の発生がまだ検出されない生後 6 週においても  $\beta$ -カテニン蛋白の高い発現が認められた。一方、 $\beta$ -カテニンの mRNA の発現は野性型マウスと比較して殆ど変わらないことから、 $\beta$ -カテニンのタンパク質の蓄積はタンパク質の安定化によることが示唆された。これらのことから、AhR は  $\beta$ -カテニンの分解と関わっていることが明らかになり、AhR が大腸、特に盲腸において癌抑制因子として働いていることが分かった。更に、AhR がリガンド依存的に ER $\alpha$ 、ER $\beta$  及び AR のユビキチン化に働き、続くプロテアソームによる分解に関与していることが明らかになった。

### CYP 遺伝子発現を制御する SXR、CAR、AhR 等の薬物受容体と免疫系制御因子 NF $\kappa$ B の相互作用の分子解明

西川 淳一

微生物感染やアレルギーにより免疫系が活性化された状態と平常時との化学物質の体内動態の違いを明らかにすることを目的に研究を行っている。

平成 19 年度は、細菌感染のモデルとしてリポ多糖類 (LPS) を投与したマウス及び卵白アルブミンで I 型アレルギーを惹起したマウスを用い、薬物代謝酵素の誘導を調べた。その結果、薬物代謝酵素の誘導は LPS を投与したマウスで顕著に抑制されたが、アレルギーマウスでは正常に薬物代謝酵素の誘導が見られたことより、免疫系活性化経路の違いによって薬物代謝酵素誘導への影響が異なり、化学物質の体内動態に差異が生じることを示唆している。

### 【小児など高感受性集団の評価に関する国際動向調査研究】部門

OECD、WHO 等の国際機関における動向と同調するため国際的な動向を調査し評

価スキームの確立に資する。

## 形態形成期への影響を中心とした研究動向に関する OECD/WHO 関連等ハーモナイゼーション総括 井上 達

本研究は、経済開発協力機構 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、本邦における内分泌かく乱化学物質問題に関する調査・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、必要な情報収集を行い、また、本邦としての独自の情報の発信や提案を行うことを目的としている。

平成 19 年度は、欧州委員会(EC)、世界保健機構化学用品安全計画 WHO/IPCS、経済開発協力機構 OECD (環境・健康・安全性部門)などを中心に、それらから報告されている EDC 研究活動の現状をまとめた。米国の内分泌かく乱研究諸組織の中では、昨年末から今年に掛けて、NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences)によって、BPA に関する 2 つの評価会議、すなわち CERHR (Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction)による専門家パネル会議と、NIEHS のスポンサーによる研究者グループによるワークショップとがそれぞれ開催された。両者を通じて注目される深刻な点は、BPA の殆どの作用を懐疑的にまとめている CERHR の報告が、胎児期や小児発達期の低用量 BPA 暴露の、後年の神経行動へ影響を採用している点であり、この点で両者の見解が一致していることである。これは、小野班でも重視してきた研究であり、OECD などでも取り上げられる可能性が高い。

## POPs を中心とした有害性評価手法における高感受性集団対応に関する国際動向調査研究

### 広瀬 明彦

本研究は、POPs を中心とした化学物質暴露における高感受性集団に対応した有害性評価手法研究の国際動向調査を行うことにより、今後のリスクアセスメント手法開発研究のための情報収集を目的としている。

平成 19 年度は、第 27 回ハロゲン化有

機環境汚染物質と POPs に関する国際シンポジウムに参加し、POPs を中心とした化学物質暴露に対して脆弱な集団に関しての特有な有害性発現メカニズムや高感度の新評価手法の開発に関する研究、あるいはリスクアセスメントに関する最新の国際動向を調査した。

## D. 考察

本研究の特色は、先行実施された「厚生労働省内分泌かく乱化学物質試験スキーム」の策定、受容体原性毒性に基づくと理解される低用量影響の確認、「確定試験」としての「齧歯類一生涯試験法」の開発、受容体原性毒性メカニズム研究、催奇形性メカニズム研究の成果と方法の一部を継承し、また、平成 17 年度より実施された「化学物質による子どもへの健康影響に関する研究—恒常性維持機構発達の過渡特性に立脚したリスク評価研究—(H17-化学-一般-001)」の成果を最大限に利用し、当記目的達成のために、特に受容体原性毒性に関わる分子生物学的検討を通しての研究を実施し、統合する点にある。

本研究班は、先行研究班の構成の一部を継承しつつ、【総括、総合評価スキーム開発研究及び低用量影響研究】を取り纏め部門として、以下、【恒常性維持メカニズムの揺らぎに着目した新評価手法開発研究】、【有害性発現分子メカニズムの解明研究】、【小児など高感受性集団の評価に関する国際動向調査研究】の 3 部門を置き研究を開始した。

【恒常性維持メカニズムの揺らぎに着目した新評価手法開発研究】では、神経系・免疫系・内分泌系の高次調節率の変動による化学物質の有害性評を評価するための手法を確立する。

神経・行動試験系については、神経障害性に関して必ずしも明確な器質的障害は誘導されないことが想定されたため、本研究班では、高次行動異常を当面の焦点として、齧歯類胎生期・新生児期暴露が認知機能、場面適応性や報酬効果に及ぼす影響を検査する行動試験の導入を進めた。免疫系に関しては、有害性指標として自己免疫疾患モデル(人に於いて性差が著しいことで知られるシェーグレン病のモデル)の改良、初期免疫応答特に抗原提示過程に係わるタン

パク質の同定、により化学物質による自己免疫及び初期免疫応答能の修飾を解析した。

内分泌系に関しては、生殖機能に関わる従来の指標に加えて、齧歯類周産期の EDCs 暴露により早発閉経、内分泌系腫瘍発生率の増加等、成熟後の遅発性影響の解析を行った。本研究により、一生涯（発生、発達、成熟、老化）の全ての段階に於ける内分泌かく乱作用を考慮する必要が示されたと同時に、この方向性に沿って引き続き網羅的な確認を加えつつ研究を進めることで、クロストーク問題、低用量問題等に的確に対応可能な確定試験を確立することが出来る見通しが立ったと考える。

**【有害性発現分子メカニズムの解明研究】**では、恒常性維持機構に対する影響の発現機序を分子・遺伝子レベルで解明し、評価試験の基礎を固める

胎生期初期影響のメカニズム情報提供支援体制としての胚性幹細胞（ES 細胞）の *in vitro* での多分化能に対する影響解析研究として ES 細胞及び胚様体の BPA 影響遺伝子を同定、マウス新生児期前立腺のアンドロゲン応答性とエストロゲン受容体の交絡解析、マウス神経幹細胞のアストロサイト遺伝子プロモーターの脱メチル化、AhR の大腸ガン抑制及び抗炎症作用を確認した。免疫系活性化による薬物代謝酵素誘導の抑制を確認した。

**【小児など高感受性集団の評価に関する国際動向調査研究】**では、経済開発協力機構 OECD、世界保健機構 WHO 等の国際機関に於ける動向と同調するため、OECD と WHO で進められている試験法の開発や基礎研究情報収集及び POP を中心とした化学物質暴露における高感受性集団に対応した応有害性評価手法研究の国際動向調査を行うことより評価スキームの確立に資する

本研究により最先端の分子生命科学の成果と、新評価法開発の成果から高感受性集団に対する有害性評価のための総合的大綱の策定が見込まれる。

少子高齢化が進み、次世代の担い手の確保と、クオリティ・オブ・ライフ（QOL）の向上、社会保障上の負担軽減の一助として、子どもと老人からなる高感受性集団の保護の重要性の認識が今後更に増すものと考えられる。他方、高度先進工業化

による新規高性能マテリアルの開発と実用化は、多種少量生産化合物による国民の暴露の機会を増加させると考えられる。暴露事故の未然防止は産業経済活動の健全成長に大きく貢献するものであるが、特に低用量問題を含む高感受性集団への配慮は厚生労働のみならず経済の重要課題となる。本研究の目標とする 高感受性有害性総合評価大綱の策定は、暴露を受ける側と暴露する物質の側の両者の多様化という近未来特性に照らし、国民の安全性確保及び経済活動の健全な発展に大きく貢献すると期待される。

## E. 結論

最先端分子生命科学研究及び評価法開発の成果から、高感受性有害性総合的大綱の策定の方向性と基盤が形成され、本研究の継続が今後の国民の安全性確保及び経済活動の健全な発展に貢献するものと期待される。

## F. 健康危険情報

研究対象としているホルモン様作動性化学物質のうち、低用量の Bisphenol A (BPA) において、妊娠母ラットに対する周産期経口暴露（妊娠 6 日目～離乳（生後 20 日目）まで）が、雌性児動物の成長後に遅発影響としての有害性を発揮することが示唆された。（**グレード B 情報**）

## G. 研究発表

### 論文発表

Mariko Shirota, Yoshiaki Saito, Kiyoshi Imai, Shinji Horiuchi, Shinsuke Yoshimura, Masako Sato, Tesuji Nagao, Hiroshi Ono, Masanobu Katoh. Influence of di-(2-ethylhexyl)phthalate on fetal testicular development by oral administration of pregnant rats. J Toxicol Sci.30., 175-194,2005

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

無し

### 2. 実用新案登録

無し

### 3. その他

無し

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

II. 分担研究報告書

1. 総括補佐、総合評価スキーム開発研究及び低用量影響研究

研究分担者 菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 部長

**研究要旨**

先行する2つの研究班、即ち、【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）】及び【内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）の胎児・新生児暴露によるリスク予測に関する総合研究（H16-化学-一般-003）】の成果を基盤とし、それらの構成の一部を継承しつつ、【総括、総合評価スキーム開発研究及び低用量影響研究】を取り纏め部門として、以下、目的に沿って3部門を置く。第1の【恒常性維持メカニズムの揺らぎに着目した新評価手法開発研究】は、恒常性維持機構の内容に沿い、更に「神経・行動」、「免疫」、「生殖器」の3要素について、先行研究班の成果である一個体の受精、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」の強化拡大を図る。第二の【有害性発現分子メカニズムの解明研究】では、平行して実施中の「化学物質による子どもへの健康影響に関する研究」の基礎研究とは重複しない実質的研究課題、及び評価法開発を前提とした研究課題を推進する。第三の【小児など高感受性集団の評価に関する国際動向調査研究】においては、子ども健康問題を中心としたOECD/WHO 関連及び、PCB やダイオキシンなど、いわゆる POPs を中心とした国際動向調査研究を推進する。

低用量影響研究については、従来の多世代繁殖毒性試験の限界を認識し、その改良を含む「齧歯類一生涯試験法」の開発を進めるにあたり、Bisphenol A (BPA)に引き続き Diethylstilbestrol (DES)の低用量試験を実施した。この詳細試験は、厚生労働省の内分泌かく乱化学物質・試験スキームに則り、内分泌かく乱性を検討する必要がある数十万種の対象化合物について、ホルモン活性に焦点を置いたスクリーニング手法の開発と確立、及び詳細試験に資する優先リストの作成を進めることと並行して実施するものである。

**A. 研究目的**

厚生労働省の内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会に於いて策定された試験スキーム（スクリーニング試験系及び詳細試験）に

則り、ホルモン様生体影響を及ぼす化学物質と、その延長線上で生体障害性を発揮する化学物質（内分泌かく乱化学物質；EDCs）のスクリーニング試験等による優先順位設定を経て、最終的

にそれらの EDCs としての生体障害性に対する検出確度の高い確定試験法を開発する。

その一環として、未だ確立されていない低用量域の EDCs の生体影響を評価する検出指標、試験方法のひとつの可能性として、EDCs のラット子宮内・経乳汁暴露によって誘導される雌出生児の遅発性の性周期異常に焦点を当て、これが低用量影響を検出する検査項目になり得るかを検討する。

## B. 研究方法

EDCs による生体影響の検討は、従来、生殖毒性にその焦点が置かれてきた。しかし、低用量問題や遅発影響の検討が進むにつれ、EDCs の有害作用は、個体の発生、成長、成熟、老化に関わる広範なものであることが示唆されることとなった。

ホルモン様生体影響を及ぼす化学物質と、その延長線上で生体障害性を発揮する化学物質のスクリーニング試験等による優先順位設定を経て、最終的にそれらの EDCs としての生体障害性に対する検出確度の高い方法体系を開発することに重点を置き、内分泌かく乱性確定試験開発詳細試験（確定試験）としての「齧歯類一生涯試験法」を提案した。

「試験スキーム」のスクリーニングに於いて形成された化学物質優先順位リストの上位化合物について実施される「確定試験」には、従来型の多世代試験が必ずしも最適でないことが内外の研究により示されてきたため、本申請班の前身となる研究班に於いて種々の調査研究を実施してきた。その結果、ここでは既存の多世代試験法の改良のみに止まらず、一個体の発生、発達、成熟、及び老化に亘る一生涯を標的とした有害性評価試験系「齧歯類一生涯試験」を構築することを目指す。これは、OECD の Conceptual Frame Work Level 5 に対応し、「齧歯類一生涯試験」試験開発研究及び支援基盤研究の 2 要素か

ら成る。

本分担研究者は、(1) 齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目を調整する際の取り纏めを行うと共に、実際の試験への応用の可能性を明らかにする為に、既に実施し、低用量影響データを得ている BPA に引き続き、(2) 低用量 DES を経胎盤・経母乳暴露した際の性ホルモン系に対する低用量影響を検討するため、ラットを用いた動物実験を委託研究として平成 18 年度は財団法人食品農医薬品安全性評価センターに於いて、平成 19 年度はバイオラボ株式会社に於いて実施する。

### (1) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項

【恒常性維持メカニズムの揺らぎに着目した新評価手法開発研究】

#### 1) 神経・行動

- 胎児期及び授乳期の BPA 暴露による中枢神経系の発達に及ぼす影響
- 発達神経毒性評価のため次世代認知機能影響を中心とした行動試験法の高度化に関する研究
- 新生児脳の性分化への化学物質高感受性影響に関する研究

#### 2) 免疫

- 周産期化学物質暴露による免疫異常発現メカニズムの解明
- 周産期による免疫系への影響評価

#### 3) 生殖器

- 胎生期暴露が雄性生殖器に及ぼす影響の発生生物学的解析研究
- 周産期・小児期の化学物質暴露による生殖器系の発達および老化に及ぼす影響の研究
- 化学物質のマウス周産期暴露による雌性生殖器等に遅発性障害の研究

【有害性発現分子メカニズムの解明研究】

- ES 細胞分化増殖試験系を用いた胎児毒性評価手法の開発研究、及び AhR を介する晩発影響の解析研究
- 新生児化学物質暴露の前立腺影響の解析研究
- 神経系形成・発達メカニズムに基づいた高感受性集団に対する化学物質脳神経系影響の分子毒性的解析

- AhR の生理機能とその周産期小児期個体における役割
- 齧歯類前立腺を用いた化学物質の新生児暴露の作用

【小児など高感受性集団の評価に関する国際動向調査研究】

- 子ども健康問題を中心とした OECD/WHO 関連等ハーモナイゼーション総括
- POPs を中心とした有害性評価手法に於ける高感受性集団対応に関する国際動向調査研究

(2) ラットを用いた BPA 及び Deihylstilbestrol の経胎盤・経母乳暴露による晩発影響についての検討試験 (委託研究: 委託先: バイオラボ株式会社)

先行、平成 16 年度の研究において、Bisphenol A(BPA)の 5、50 $\mu$ g/kg/day 及び 40、400 mg/kg/day をラット妊娠 6 日から分娩後 20 日まで母ラットに経口投与し、低用量及び大量投与時の出生児に於ける遅発性性周期異常の誘導について検討した結果、7 ヶ月齢時に於ける性周期検査で異常周期を示す動物が BPA 0、0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 1/16、11/19、8/19、11/24、11/17 匹に観察され、大量投与時のみならず、低濃度 BPA の妊娠期・授乳期投与によっても pre-middle age に於ける性周期異常が誘導される可能性が示された。

平成 17 年度は、更に、試験の再現性を検討することを目的とし、0.5、5、50  $\mu$ g/kg/day の用量で BPA をラットの妊娠期から授乳期にかけて投与し、得られた雌出生児の性周期を最長 12 ヶ月齢まで継続して検査した(委託研究: 委託先: (財)化学物質評価研究機構)。その結果、低濃度 BPA の妊娠期・授乳期投与によって pre-middle age に於ける性周期異常が誘導されることが確認された。

平成 18 年度は、BPA と同様な晩発影響が陽性対象の DES の暴露によっても認められるかを検証する試験を行った。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、20 ng/kg/day を高用量とし、以下 2 ng/kg/day を中用量、及び 0.2 ng/kg/day を低用量に設定した(委託研究: 委託先: (財)食品農医薬品安全性評価センター)。この再現性を確認するために、同様の実験を平成 19 年度はバイオラボ株式会社に委託した。

## 1. 被験物質

Diethylstilbestrol (CAS No. 56-53-1、MP Biomedicals 製造、Lot No. 4336E、純度 100.72%、分子量 268.35) は白色の粉末であり、使用時まで被験物質保管庫(室温)に保存した。被験物質はオリーブ油(和光純薬工業株式会社)に溶解し、0.04、0.4 ng/mL および 4 mg/mL の投与液を調製した。調製器具および保存容器はガラス製のものを用いた。投与液は用時調製とした。

## 2. 使用動物および飼育条件

供試動物として、生後 10 週齢の Crl: CD(SD)系 SPF 雄ラット 30 匹と同系統の雌ラット 70 匹を 2007 年 1 月 24 日に日本チャールス・リバー株式会社から購入した。動物は 5 日間検疫・馴化飼育した後、11 週齢から交配に用い、交尾成立雌 40 匹を試験に使用した。検疫・馴化期間中は動物搬入日および馴化期間終了日に体重を測定し、毎日 1 回一般状態を観察したが、異常動物は認められなかった。

試験に用いた動物の妊娠 0 日の体重範囲は、239~281 g であった。

動物は、環境調節の基準値が温度 23 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C(実測値: 22.2~23.7 $^{\circ}$ C)、湿度 55 $\pm$ 20%RH(実測値: 32.9~76%RH)、換気回数 1 時間 12 回以上、空気差圧 30 Pa 以上、照明 12 時間(午前 7 時点灯、午後 7 時消灯)のバリアシシステムの飼育室で飼育し、前面・床ステンレス網目アルミ製飼育ケージに個別に収容した。飼育ケージは隔週 1 回、



給餌器は週 1 回取り換えた。妊娠 18 日以降離乳時まで動物はポリカーボネート製エコンケージに巣作り材料(サンフレーク)を入れ飼育した。エコンケージは、哺育 7 および 14 日に取り換えた。

放射線滅菌固型飼料(MF、オリエンタル酵母工業)を自由に摂取させた。また、水道水を自動給水ノズルから自由に摂取させた。

### 3. 交配・群分け・個体識別

交配は、11 週齢の雄と、腔垢像による性周期観察により翌日発情期になることが予想される 11 週齢の雌を 1 対 1 でケージに終夜同居させた。翌朝腔垢中に精子が認められた場合を交尾成立とし、その日を妊娠 0 日とした。

交尾成立雌動物の群分けは、交尾成立日毎に妊娠 0 日の体重を基準にして安全性試験システム(LATOX-F/V5)を用いて行い、同一妊娠日動物が同一群に偏らないよう 1 群あたり 10 匹になるように振り分けた。

母動物の識別は、耳介に群番号および群内番号を入墨すると共に個体別飼育ケージに動物標識番号(Animal ID No.)を付すことにより行った。ただし、群分け前までは仮動物番号をケージに付すことにより管理した。F1 動物の個体識別は、4 日目に匹数調整後、毛生ままでの間は四肢入墨法、毛生から離乳までは尾に油性インクで動物番号を記し、識別した。以後は耳介に母動物と同じ群番号および群内番号を入墨するとともに個体別飼育ケージに ID カードを付して識別した。

### 4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

先に実施した BPA の子宮内・経乳汁暴露による出生児の晩発影響を調査する試験(投与用量: BPA 0.5、5 および 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )において、全ての BPA 投与群で遅発性の性周期異常がみられた。本試験の目的は、BPA と同様な晩発影響が DES の低用量暴露によってもみられるかを確

認することである。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。したがって、これらの情報を基に本試験では 20  $\text{ng}/\text{kg}/\text{day}$  を高用量とし、以下 2 および 0.2  $\text{ng}/\text{kg}/\text{day}$  を中および低用量に設定した。

母動物(F0)への被験物質の投与経路は、BPA 投与における試験を参考にヒトへの暴露経路として、最も可能性が高いと考えられる経口投与とした。投与容量は、体重 100 g 当たり 0.5 mL とし、最新の体重に基づいて算出した投与量を金属製ゾンデおよびガラス製シリンジを用いて毎日 1 回強制投与した。対照群には媒体(オリーブ油)のみを同様に投与した。妊娠 6 日から哺育 20 日(分娩完了日を哺育 0 日とする)まで毎日、母動物(F0)に投与した。

投与液の調製方法は、まず被験物質 2.00 mg を正確に秤量し、メスシリンダーに移し、オリーブ油を適量入れ 15 分間超音波処理をして溶解させた後、100 mL に定容し希釈用原液とした。この液を 5,000 倍希釈し、4  $\text{ng}/\text{mL}$ (0.0000004 w/v%)液を調製し、さらに段階希釈して、0.4 および 0.04  $\text{ng}/\text{mL}$ (0.00000004 および 0.000000004 w/v%)液を調製した。調製器具および保存容器はガラス製のものを用いた。投与液は用時調製とした。

## 5. 観察、測定および検査

### 5.1. 母動物(F0)の観察

#### 5.1.1. 一般状態の観察

妊娠および哺育期間中、毎日少なくとも 1 回(投与期間中は投与前、投与後を含む 2 回)行い、異常および死亡の有無を記録した。

#### 5.1.2. 体重

妊娠 0、6、14、17 および 20 日、哺育期間中は哺育 0、4、7、14 および 21 日(離乳時)に電子天秤(メトラー・トレド)を用いて体重測定を行い、記録した。また、自然分娩の認められなかった動物(動物番号 2309)については、妊

娠27日に相当する解剖日にも体重測定を行った。

### 5.1.3. 自然分娩時の観察

交尾成立動物は全て自然分娩させた。自然分娩時に分娩状態を観察して異常の有無を記録し、妊娠期間(哺育0日の年月日から妊娠0日の年月日を減じた日数)および出産率[(生児出産雌数 / 妊娠雌数) × 100]を算出した。出生児を哺育21日(分娩完了日 = 哺育0日)まで哺育させ、この間の哺育状態を観察した。哺育21日の剖検時に着床痕数を観察して、分娩率[(出産児数 / 着床痕数) × 100]を算出した。

自然分娩の認められなかった動物(動物番号2309)については、妊娠27日に病理解剖した。その結果、この動物は着床痕が認められなかったため不妊と判定した。この動物の卵巣および子宮は10 vol%中性緩衝ホルマリン液に固定し、保存した。また、受胎率[(妊娠動物数 / 交尾した雌動物数) × 100]を算出した。

### 5.1.4. 剖検

#### 5.1.4.1. 離乳時動物

哺育21日にエーテル麻酔下で腹部大動脈切断により放血安楽死させ、動物の体表、自然開孔部、体腔および諸器官について観察し、全ての肉眼所見を記録した。

卵巣および子宮を摘出し、重量を測定した。子宮は左右子宮角に割を入れ、内容液をろ紙で吸い出した状態の湿重量(blotted weight)を測定し、記録した。重量測定後、子宮角を切開し、10 vol%硫化アンモニウム水溶液で染色した後、着床痕数を観察し、記録した。

卵巣、子宮および異常部位を10 vol%中性緩衝ホルマリン液に固定し、保存した。その他の器官および屍体は廃棄した。

## 5.2. 出生児(F1)の観察

### 5.2.1. 産児数

生産児数および死産児数を雌雄別に記録し、生存児の性比[雄 / (雄 + 雌) × 100]を算出した。

### 5.2.2. 外表検査

出生日に外表異常の有無を検査した。

### 5.2.3. 生死および一般状態の観察

死亡および喰殺の有無、一般状態を哺育21日まで毎日観察し、出生率[(出産生児数 / 出産児数) × 100]、生後4日生存率[(生後4日生児数 / 出産生児数) × 100]および離乳率[(生後21日生児数 / 生後4日調整後の生児数) × 100]を算出した。

離乳後は毎日1回観察し、異常および死亡の有無を記録した。

### 5.2.4. 児数調整

同腹児は、離乳(哺育21日)まで哺育させた。哺育4日に同腹児数が9匹以上の場合、8匹原則として雌6匹、雄2匹)となるように無作為に調整した。同腹児数が8匹に満たない場合は調整を行わず、片性が上述の匹数に満たない場合は同腹児数の合計が8匹となるようにした。

### 5.2.5. 体重測定

哺育期間中は個体別の体重を哺育0、4、7、14および21日に電子天秤(メトラー・トレド)を用いて測定し、1腹毎に雌雄別平均体重を算出した。

離乳以後は剖検日まで、週1回および陰茎龟头の形態がV型からW型に移行した日あるいは腔開口が認められた日にその個体の体重を測定し、記録した。また、剖検当日に各個体の体重を測定し、記録した。

### 5.2.6. 死産児および死亡児の取り扱い

死産児および哺育期間中の死亡児は、プアン液に固定し、保存した。

### 5.2.7. 児数調整後の振り分け

児数調整後の同腹児のうち、全雄出生児は12ヵ月齢解剖群に振り分けた。生存する雌出生児は、2ヵ月齢時に測定した体重を基に2匹を体重層別無作為抽出法により抽出し、3ヵ月齢解剖群に振り分けた。同様に、6ヵ月齢時の体重を基に7ヵ月齢解剖群を作成し、残り2匹を12ヵ月齢

解剖群とした。ただし、同腹雌出生児が 6 匹に満たない場合、12 ヶ月齢解剖群に 2 匹、3 ヶ月齢解剖群に 2 匹の順で、優先して振り分けた。

#### 5.2.8. 生後発育分化検査

離乳時(哺育 21 日)より、前述の陰茎亀頭の形態変化および腔開口の発現時期を検査した。

#### 5.2.9. 性周期観察

生存する全ての出生児について腔開口翌日から安定した周期が 3 周期連続して確認されるまで腔垢を採取し、発情周期を観察した。

10 週以降、生存する全ての出生児について、2 週間間隔で 2 週間連続して腔垢を採取した。腔垢の採取は 9:00 から 10:53 の間で行った。

性周期は、発情前期、発情期、発情後期、休止期の 4 区分に分類し、さらに normal、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)に分類した。

#### 5.2.10. 血清採取

3、7 および 12 ヶ月齢解剖時に、雌雄各 1 匹/腹の出生児について、エーテル麻酔下で腹大動脈より採血した。採取した血液から血清を分離し、得られた血清を保存した。

#### 5.2.11. 剖検

##### 5.2.11.1. 死亡動物および瀕死動物

離乳後育成期間中の死亡動物(動物番号 2103-1M、2201-1M、2303-2M、2304-2M および 2305-4M)は、体重測定後直ちに解剖した。それが不可能な場合は剖検まで冷蔵庫に保存した。瀕死動物(動物番号 2007-3F および 2201-5F)は、体重測定後、エーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈切断により放血安楽死させ、動物の体表、自然開孔部(Cleft phallus の有無の判定を含む)、体腔および諸器官について観察し、全ての肉眼所見を記録した。異常部位は 10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。屍体およびその他の器官・組織は廃棄した。

#### 5.2.11.2. 3、7 および 12 ヶ月齢解剖動物

3 ヶ月齢解剖動物の雌については、発情前期を呈する動物あるいは翌日発情期になることが予想された動物を解剖した。

血清を採取した動物はエーテル麻酔下にて採血後、その他の動物についてはエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈切断により放血安楽死させ、動物の体表、自然開孔部(Cleft phallus の有無の判定を含む)、体腔および諸器官について観察し、全ての肉眼所見を記録した。

脳(大脳、小脳)、肝臓、腎臓、精巣、精巣、精巣上部、前立腺腹葉、精嚢(凝固腺を含む)、肛門挙筋および球海綿体筋、卵巣、子宮、腔(外性器を含む)、下垂体、甲状腺、副腎および肉眼的病変部を採取し、10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。ただし、精巣および精巣上部は、ホルマリン・酢酸混合液で前固定した後、10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。

脳(大脳、小脳)、肝臓、腎臓、精巣、精巣、精巣上部、前立腺腹葉、精嚢(凝固腺を含む)、肛門挙筋および球海綿体筋、卵巣、子宮、下垂体、甲状腺および副腎については重量を測定し、記録した。ただし、下垂体および甲状腺は 10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定後に測定し、記録した。子宮は左右子宮角に割を入れ、内容液をろ紙で吸い出した状態の湿重量(blotted weight)を測定し、記録した。剖検時の体重を基準にして器官重量・体重比を算出した。重量測定には電子天秤(メトラ・トレード)を用いた。屍体および固定をしないその他の器官・組織は廃棄した。

#### 5.3. データ処理

当該試験の磁気データは、コンピュータ・システム[安全性試験システム(LATOX-F/V5)および病理検査システム]を用いて記録し、処理した。出生児に関する成績は、1 母体当たりの

平均を1標本として集計した。

各測定値および集計値の平均±標準偏差を算出した。なお、不妊動物から得られたデータは、全て集計に含めなかった。

#### 5.4. 統計解析

母動物(F0)の体重、妊娠期間、卵巣および子宮重量、着床痕数、出生児(F1)の産児数、死産児数、出産児数、体重および器官重量については、Bartlett法による検定を行い、5%有意水準で等分散が認められた場合は、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、Dunnnett法を用いて対照群と各投与群間との有意差を検定した。等分散が認められない場合は、Kruskal-Wallisの順位和検定法で全群の有意性を検定した後、Dunnnettの多重比較検定法を用いて対照群と各投与群間の有意差を検定した。

母動物(F0)の出産率、受胎率、出生児(F1)の性比については、Fisherの直接確率検定を用いて対照群と各投与群間の有意差を検定した。

母動物(F0)の出生率、出生児(F1)の外表面異常発生率、生後4日生存率、離乳率、生後発育分化検査値(陰茎亀頭の形態変化、腔開口)については、Kruskal-Wallisの順位和検定法で全群の有意性を検定した後、Dunnnettの多重比較検定法を用いて対照群と各投与群間の有意差を検定した。

有意水準は、5%または1%の両側検定で実施した。

#### (倫理面への配慮)

動物の飼育および動物の取り扱いについては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および当該施設の動物実験に関する指針に従い、適正に実施した。

### C. 研究結果

#### (1) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項

所定の成果を各分担研究者から得て、内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会等への適切な反映を行う。

#### (2) ラットを用いたBPA及びDeithylstilbestrolの経胎盤・経母乳暴露による晩発影響についての検討試験

##### 1. 母動物(F0)に及ぼす影響

###### 1.1. 死亡および一般状態

妊娠および哺育期間を通じて対照群を含むいずれの投与群においても死亡、流産動物および全児死亡動物(哺育期間中に全児が死亡した母動物)は認められず、一般状態にも変化は認められなかった。

###### 1.2. 体重

妊娠および哺育期間を通じ、対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められなかった。

###### 1.3. 分娩時観察

妊娠期間、着床痕数、出生児数、死産児数、性比、出産率および分娩率には対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められなかった。また、20 ng/kg群で不妊と判定された動物が1例に観察され、各群の受胎率は90.0~100%の範囲であったが、群間に差は認められなかった。

###### 1.4. 器官重量

卵巣および子宮の重量は、絶対および相対重量ともに対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められなかった。

###### 1.5. 剖検

被験物質投与の影響を示唆する異常所見は、認められなかった。

離乳時剖検では、肺の褐色斑点、脾臓の癒着、肝臓の横隔膜結節および赤色斑点、腎臓の嚢胞、子宮の内腔拡張および小腸の憩室が対照群あるいは被験物質投与各群に単発性あるいは散発性

に認められた。

## 2. 出生児(F1)に及ぼす影響

### 2.1. 外表検査

出生児の外表検査では、外表異常は1例も観察されなかった。

### 2.2. 哺育期間中の生存性および一般状態

出生率、生後4日生存率および離乳率には雌雄ともに対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められなかった。

哺育期間の一般状態の変化として、四肢の痂皮が対照群および2 ng/kg群で、尾部先端の欠損が0.2 ng/kg群で、尾部先端の咬傷および体格の小型化が2 ng/kg群で散見された(一般状態はTableおよびAppendixに示していない)。

### 2.3. 哺育期間中の体重(Table 1-1、1-2)

哺育期間を通じ、雌雄ともに対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められなかった。

### 2.4. 育成期間中の生存性および一般状態

死亡動物が、雄の0.2、2および20 ng/kg群でそれぞれ1(動物番号2103-1M)、1(動物番号2201-1M)および3(動物番号2303-2M、2304-2Mおよび2305-4M)例に認められた。0.2 ng/kg群の1例は、一般状態で後肢の硬結が認められ生後332日に死亡した。2 ng/kg群の1例は、死亡前日まで一般状態の変化は認められず生後335日に死亡した。20 ng/kg群の3例の内1例は後肢の硬結を示し生後323日に、1例は眼の蒼白および眼分泌物を示し生後247日にそれぞれ死亡したが、1例は一般状態の変化は認められず生後286日に死亡した。また、瀕死動物が雌の対照群および2 ng/kg群で各1(動物番号2007-3Fおよび2201-5F)例に認められた。対照群の1例は、削瘦、顔部および泌尿生殖器周囲の被毛の汚れ、耳介の蒼白、体温低下、眼分泌物および自発運動低下が認められ、生後253日に切迫解剖した。

2 ng/kg群の1例は、削瘦、立毛、泌尿生殖器周

囲の被毛の汚れ、体温低下、眼分泌物、自発運動低下および不整呼吸が認められ、生後309日に切迫解剖した。

一般状態の変化として、後肢の硬結が対照群を含む各群で雄では5-13例に、雌では2-5例にそれぞれ観察された。この所見は、雄では5ヵ月齢から、雌では8ヵ月齢から認められ加齢に伴い発生数が増加したが、用量に関連した発生数の増加は認められなかった。その他、雄では後肢の痂皮形成あるいは腫脹、血尿、尾の外傷あるいは痂皮形成、腰部の痂皮形成、眼分泌物、流涎および異常呼吸音が、雌では後肢の痂皮形成あるいは腫脹、胸部あるいは腹部の結節および眼分泌物が、対照群を含む各群に単発性あるいは少数例に観察された。

### 2.5. 育成期間中の体重(Table 2-1、2-2)

雄では、20 ng/kg群で生後35日に対照群と比べ有意に増加したが、その他の測定日では有意な変化は認められず、一過性の変化であった。

雌では、育成期間を通じ、対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められなかった。

### 2.6. 生後発育分化検査(Table 3-1、3-2)

陰茎亀頭の形態変化および腔開口の発現率は、離乳時以降のいずれの観察日においても対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められなかった。

### 2.7. 器官重量(Table 4-1-4-4)

12ヵ月齢解剖時の雄では、0.2、2および20 ng/kg群で肛門挙筋および球海綿体筋の絶対重量が対照群と比べ有意に低下した。その他、0.2 ng/kg群で精囊の絶対重量が有意に低下したが、用量に関連した変化ではなかった。

3、7および12ヵ月齢解剖の雌では、いずれの重量測定器官にも対照群と被験物質投与各群との間に統計学的に有意な差は認められなかった。

### 2.8. 剖検

死亡および瀕死動物 雄の0.2、2および20 ng/kg群でそれぞれ1、1および3例に認められた死亡

動物ならびに雌の対照群および 2 ng/kg 群で各 1 例に認められた瀕死動物では、死因あるいは瀕死に至らせた原因を特定する異常所見は認められなかった。所見として、死亡動物では雄の 0.2 ng/kg 群の 1 例にリンパ節の赤色化、腺胃の黒色斑点、肝臓の肥大および後肢の結節が、2 ng/kg 群の 1 例に肺の赤色化、肝臓の白色斑点および後肢の結節が、20 ng/kg 群の 3 例に心臓の赤色斑点(1/3 例)、脾臓の肥大(1/3 例)、リンパ節の肥大(1/3 例)、胸腺の赤色化(1/3 例)、肺の褐色斑点(1/3 例)、胸水(1/3 例)、胃の赤色斑点(1/3 例)、肝臓の淡色化(1/3 例)、腎臓の赤色斑点(1/3 例)、精巣の赤色斑点(1/3 例)、下垂体の白色斑点(1/3 例)および後肢の結節(1/3 例)が認められた。瀕死動物では雌の対照群の 1 例に心臓の白色斑点、脾臓の肥大、リンパ節の肥大および赤色化、胸腺の萎縮、肺の褐色斑点、胃の黒色斑点、肝臓の肥大および表面粗ざら、唾液腺の萎縮、腎臓の白色斑点および脳の赤色斑点が、2 ng/kg 群で 1 例に全身性の削瘦、胸腺の萎縮、肺の赤色化、卵巣の萎縮、副腎の白色斑点、蝶形骨の肥厚、胸骨および肋骨の結節が認められた。

3 ヶ月齢解剖動物(雌): 被験物質投与の影響と考えられる変化が尿道に認められた。Cleft phallus が 0.2、2 および 20 ng/kg 群でそれぞれ 2、1 および 2 例に認められた。被験物質投与群で認められた他の所見は、病変の種類あるいは発生数から、いずれも被験物質投与とは関連のない所見と判断した。

7 ヶ月齢解剖動物(雌): 被験物質投与の影響を示唆する異常所見は、認められなかった。被験物質投与群で認められた所見は、病変の種類あるいは発生数から、いずれも被験物質投与とは関連のない所見と判断した。

12 ヶ月齢解剖動物(雌雄): 被験物質投与の影響を示唆する異常所見は、雌雄ともに認められなかった。被験物質投与群で認められた所見は、

病変の種類あるいは発生数から、いずれも被験物質投与とは関連のない所見と判断した。

## 2.9. 性周期( Figure 1)

性周期の観察では、5 ヶ月齢までの観察で対照群では異常性周期を示す動物が認められなかったのに対し、被験物質投与群では persistent diestrus あるいは constant diestrus の連続休止期を示す動物が少数例ながら認められた。しかし、その発生数は月齢によって増減し、一定の傾向はみられなかった。Persistent estrus あるいは constant estrus の連続発情期を示す動物については、対照群で persistent estrus を示す動物の発生数が明らかに増加したのが 10 ヶ月齢以降であるのに対し、被験物質投与群では 6 ヶ月齢以降に認められ始め、2 および 20 ng/kg 群で 9 ヶ月齢までその発生数が増加する傾向がみられた。9 ヶ月齢以降は、特に 20 ng/kg 群で連続発情期を示す動物の明らかな発生数の増加が認められた。

本年度の研究は、同様のプロトコールによる DES の性周期に対する遅発性影響を確認する目的で現在解析中である(委託先: バイオラボ株式会社)。

## D. 考察

少子高齢化社会が進む中、子どもと老人が高感受性集団であるとの認識から、それらの保護の重要性の認識が今後更に増すものと考えられる。高感受性集団に対する配慮は厚生労働上のみならず経済上の重要な課題となる。本研究の目標とする高感受性有害性総合評価大綱の策定は、暴露を受ける側と日々生み出される新規物質を含む暴露する側の両面の近未来特性から、要求度の高いものと考えられ、今後の国民の安全性確保及び経済活動の健全な発展にも貢献するものと見込まれる。

## E. 結論

内分泌かく乱化学物質問題の本質的問題であ

る受容体原性毒性メカニズムに基づくと考察されるところの低用量影響が、幾つかのエンドポイントに対して、明確に再現性を以って示されることが改めて確認された。このような影響が確認可能な in vivo 試験系を取り揃え、吟味の上、広範に実施可能な試験プロトコールとして一般化しガイドラインカすることが可能であることを本研究は実例を持って示した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*. 2007, 130:811-23.

Vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA, Eriksen M, Farabollini F, Guillette LJ Jr, Hauser R, Heindel JJ, Ho SM, Hunt PA, Iguchi T, Jobling S, Kanno J, Keri RA, Knudsen KE, Laufer H, LeBlanc GA, Marcus M, McLachlan JA, Myers JP, Nadal A, Newbold RR, Olea N, Prins GS, Richter CA, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM, Talsness CE, Vandenberg JG, Vandenberg LN, Walser-Kuntz DR, Watson CS, Welshons WV, Wetherill Y, Zoeller RT. Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol*. 2007, 24:131-8.

Kato Y, Ikushiro S, Takiguchi R, Haraguchi K, Koga N, Uchida S, Sakaki T, Yamada S, Kanno J, Degawa M. A novel mechanism for polychlorinated biphenyl-induced decrease in serum thyroxine level in rats.

*Drug Metab Dispos*. 2007, 35:1949-55.

Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, Watson CS, Zoeller RT, Belcher SM. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol*. 2007, 24:178-98.

### 2. 学会発表

Jun Kanno, MD, PhD: A Brief Introduction to the WC6 Endocrine Disruptor Session 第6回国際動物実験代替法国際会議(WC6)、2007年8月23日

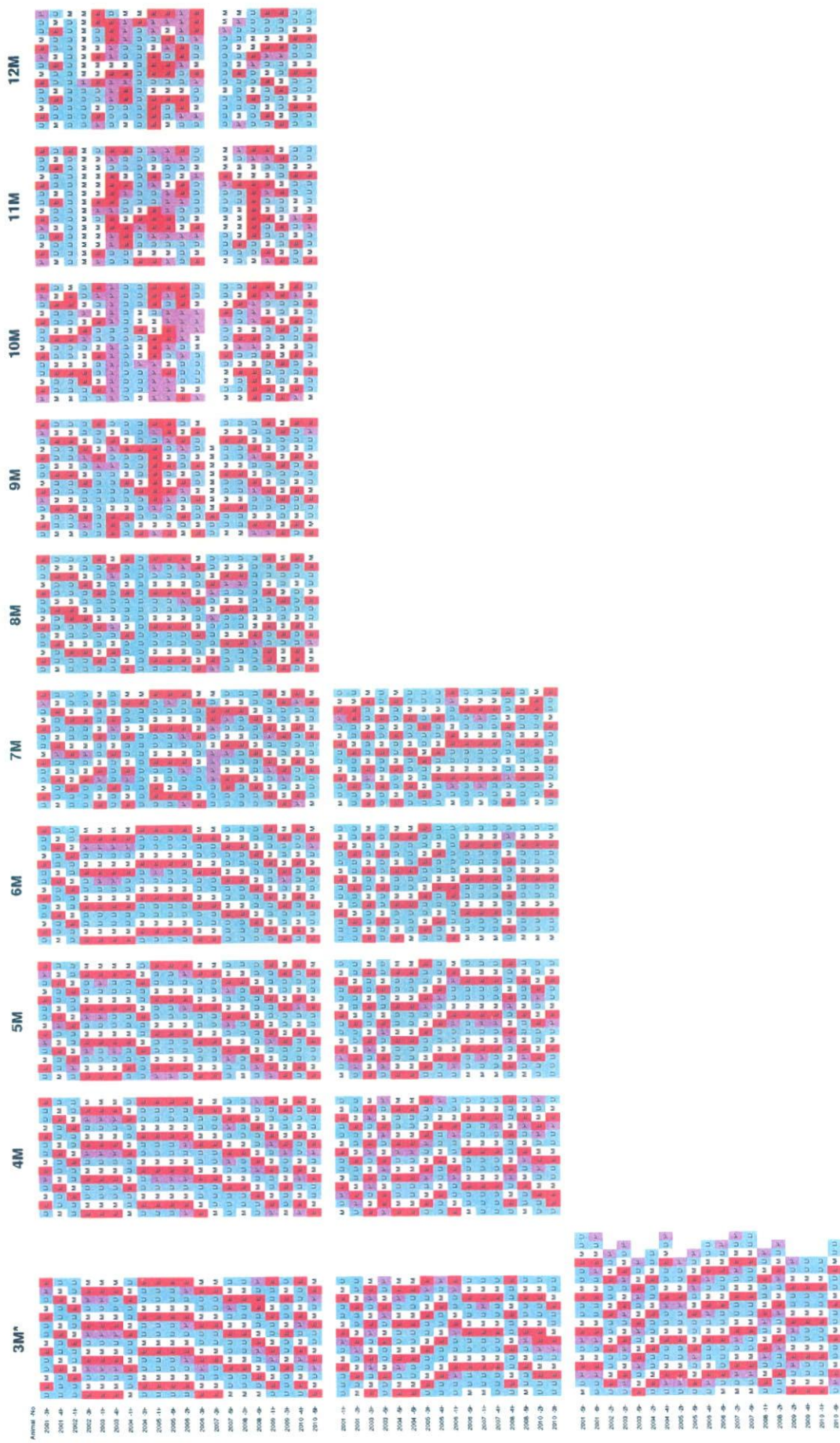
菅野 純: 低用量問題の研究の現状と課題、第10回化学物質の環境リスクに関する国際シンポジウム 2007年12月10日

## G. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

Figure1. Estrus cyclicity in female rats (F1)

Dose : Vehicle control

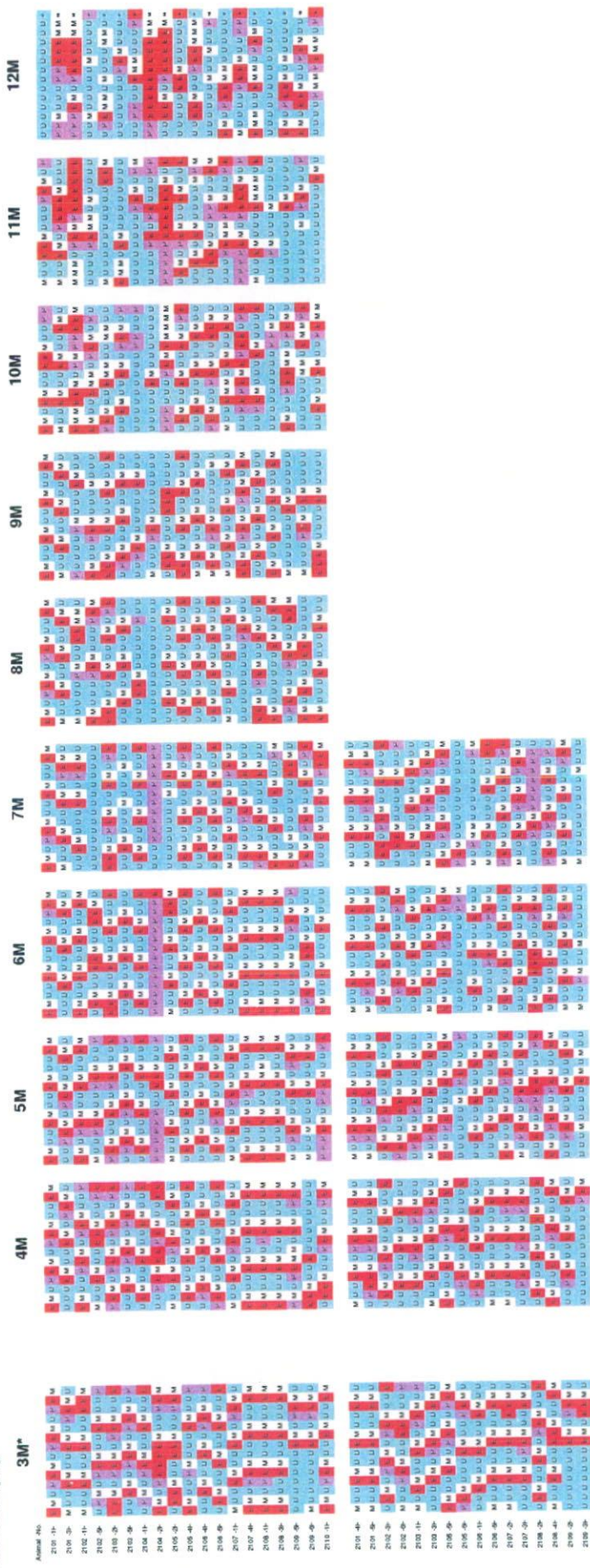


M : Month P : Proestrus:Purple E : Estrus:Red M : Metestrus:White D : Diestrus:Light blue



Figure 1. -continued Estrus cyclicity in female rats (F1)

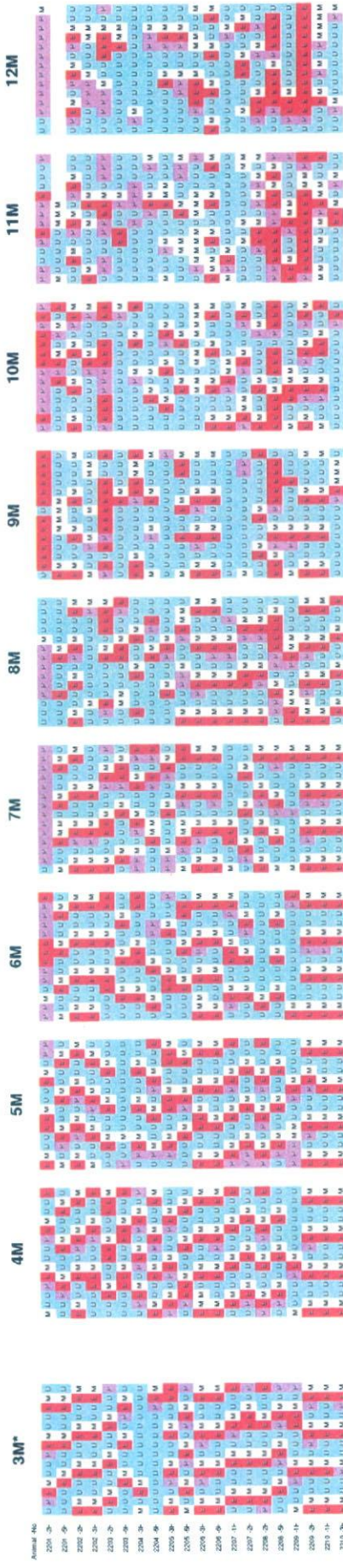
Dose : 0.2ng/kg



M\* : Month      P : Proestrus:Purple      E : Estrus:Red      M : Metestrus:White      D : Diestrus:Light blue

Figure1. -continued Estrus cyclicity in female rats (F1)

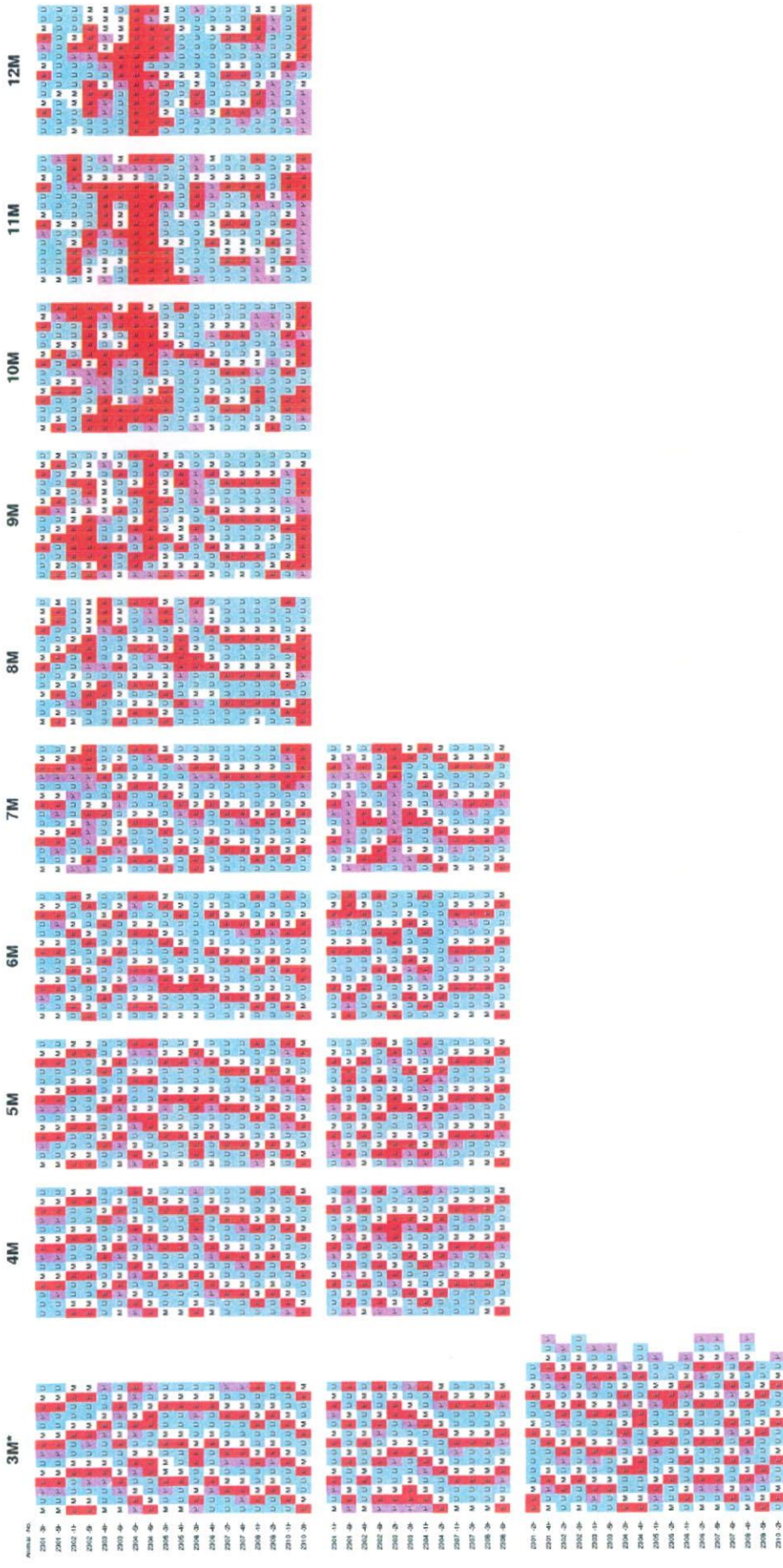
Dose:2mg/kg



M: Month P : Proestrus:Purple E : Estrus:Red M : Metestrus:White D : Diestrus:Light blue

Figure1. -continued Estrus cyclicity in female rats (F1)

Dose:20ng/kg



M\*:Month P : Proestrus:Purple E : Estrus:Red M : Metestrus:White D : Diestrus:Light blue

Table 1-1. Body weight change of male pups(F1) during lactation period

Exp.No. A411(079-399)

Group-No. Dose ng/kg	Days of lactation						Unit:g
	0	4	7	14	21		
00 control	N	10	10	10	10	10	
	Mean S.D.	6.8 0.7	10.6 1.6	18.0 2.3	36.9 3.2	60.4 3.8	
01 DES 0.2	N	10	10	10	10	10	
	Mean S.D.	6.7 0.8	10.8 1.6	18.3 1.7	37.9 2.5	62.2 4.0	
02 DES 2	N	10	10	10	10	10	
	Mean S.D.	6.8 0.5	10.8 1.2	18.5 2.3	39.2 2.4	63.4 4.3	
03 DES 20	N	9	9	9	9	9	
	Mean S.D.	6.7 0.9	10.9 2.3	17.9 2.8	36.1 3.3	61.4 6.0	

DES : Diethylstilbestrol