

図1 フローサイトメトリーによる CD86 の発現確認

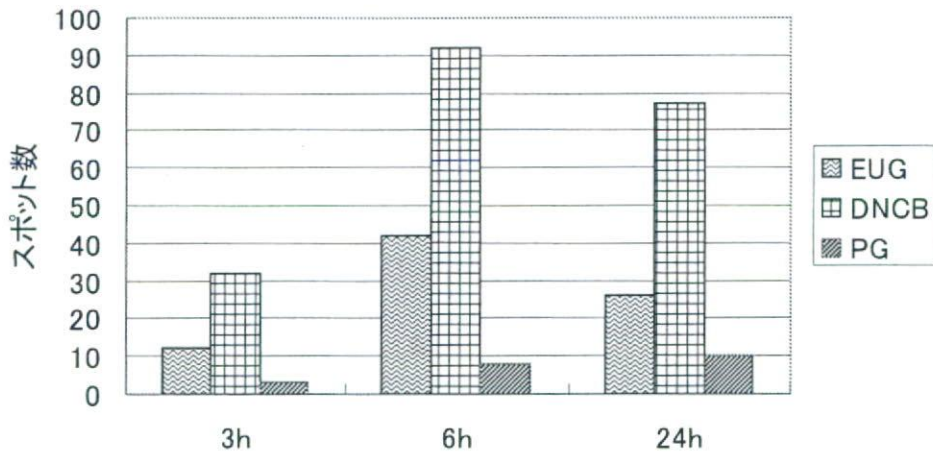


図2 化合物添加（高用量）による変動スポット数

表1 化合物添加による変動スポット数の一覧

			3h	6h	24h
EUG	低用量	増加	4	4	0
		減少	19	2	2
		計	23	6	2
	高用量	増加	4	16	12
		減少	8	26	14
		計	12	42	26
DNCB	低用量	増加	10	7	1
		減少	9	1	3
		計	19	8	4
	高用量	増加	7	45	17
		減少	25	47	60
		計	32	92	77
PG	低用量	増加	0	0	2
		減少	1	3	8
		計	1	3	10
	高用量	増加	1	0	3
		減少	2	8	7
		計	3	8	10

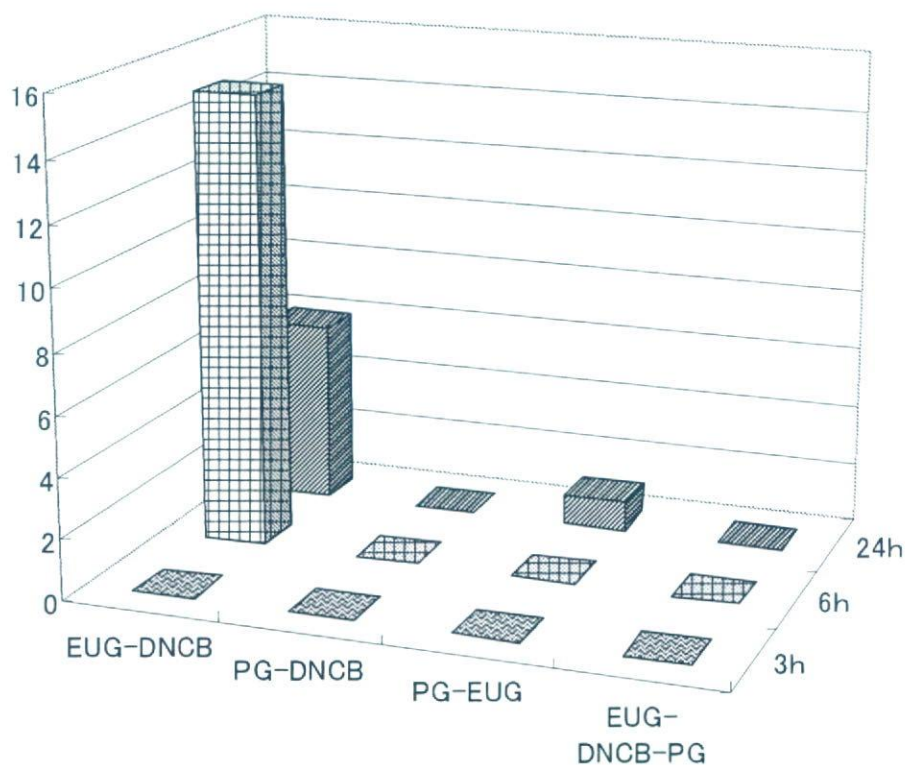


図3 各化合物添加により共通して増加したスポット数

表3 各化合物添加により共通して減少したスポット数の一覧

	3h	6h	24h
EUG-DNCB	2	13	9
PG-DNCB	0	1	0
PG-EUG	0	0	0
EUG-DNCB-PG	0	0	0

表4 各化合物添加により共通して減少したスポット数の一覧

マーカー候補	Function	Subcellular Location / Tissue Specificity
タンパク質-A	Molecular chaperone. Has ATPase activity.	Cytoplasm. Melanosome
タンパク質-B	May play a role in nucleosome assembly by neutralizing basic proteins	Nucleus
タンパク質-C	It induces chromatin decondensation by binding to histone H1. It is thought to play a role in pre-rRNA transcription and ribosome assembly.	Nucleus
タンパク質-D	Rate limiting enzyme in the de novo synthesis of guanine nucleotides and therefore is involved in the regulation of cell growth.	IMP typeII predominates over type I in the tumor.
タンパク質-E	Binds two calcium ions per molecule	
タンパク質-F	Acts as a regulatory subunit of the 26 proteasome which is involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins.	

表2 各化合物添加により共通して増加したスポット数の一覧

	3h	6h	24h
EUG-DNCB	0	15	6
PG-DNCB	0	0	0
PG-EUG	0	0	1
EUG-DNCB-PG	0	0	0

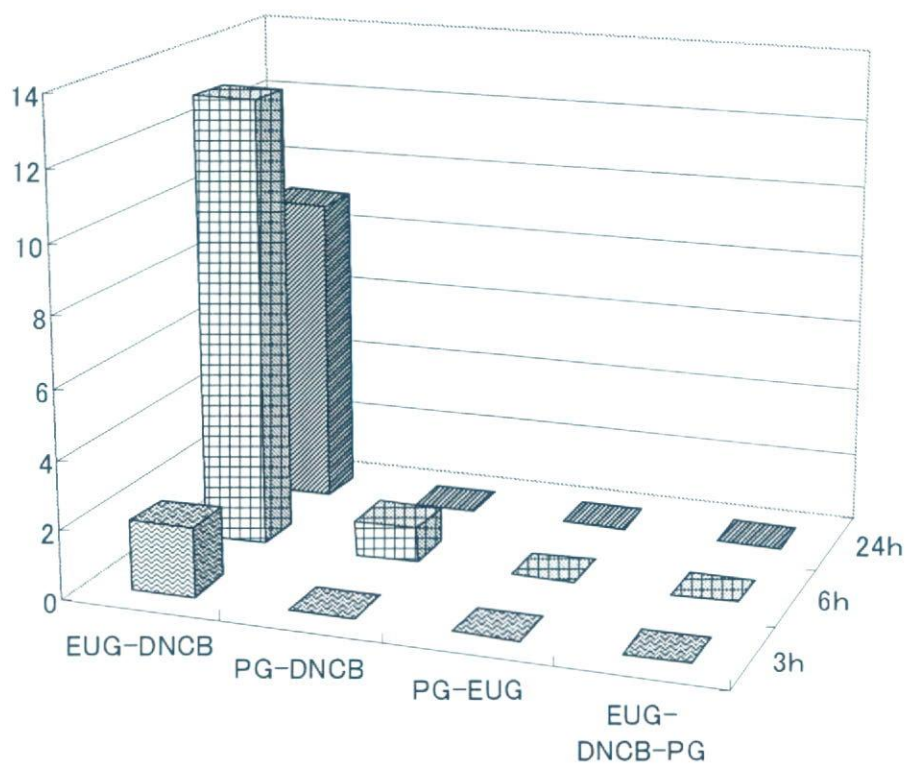


図4 各化合物添加により共通して増加したスポット数

タンパク質-A

(EUG、DNCB 添加 6、24 時間後に共通して発現量が減少したタンパク質)

表 5 タンパク質-A (高用量) 各暴露時間での発現量データ

	3hr		6hr		24hr	
	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test
EUG	0.50	0.0031	0.34	0.00022	0.40	0.006
DNCB	0.81	0.36	0.31	0.00011	0.28	0.0026
PG	1.08	0.45	0.89	0.23	0.88	0.15

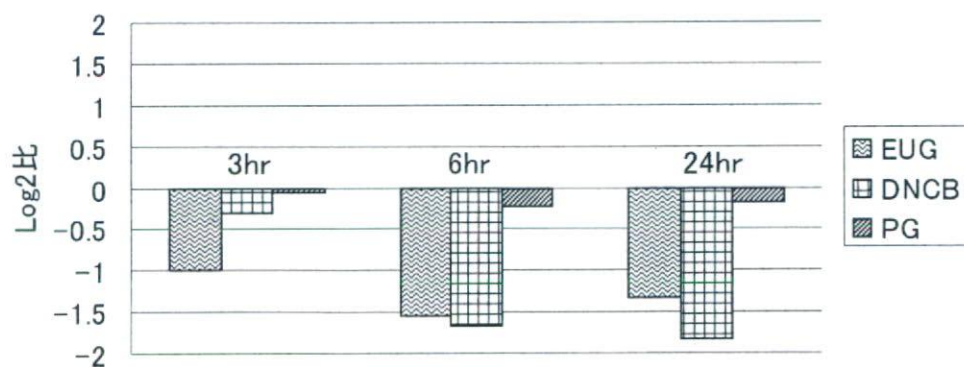


図 5 タンパク質-A (高用量) 各暴露時間での発現量
各暴露時間での媒体対照に対する Log2 比

タンパク質-B

(EUG、DNCB 添加 6、24 時間後に共通して発現量が減少したタンパク質)

表 6 タンパク質-B (高用量) 各暴露時間での発現量データ

	3hr		6hr		24hr	
	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test
EUG	0.57	0.035	0.45	0.01	0.38	0.043
DNCB	1.49	0.82	0.35	0.0066	0.45	0.046
PG	0.95	0.92	0.85	0.1	0.88	0.044

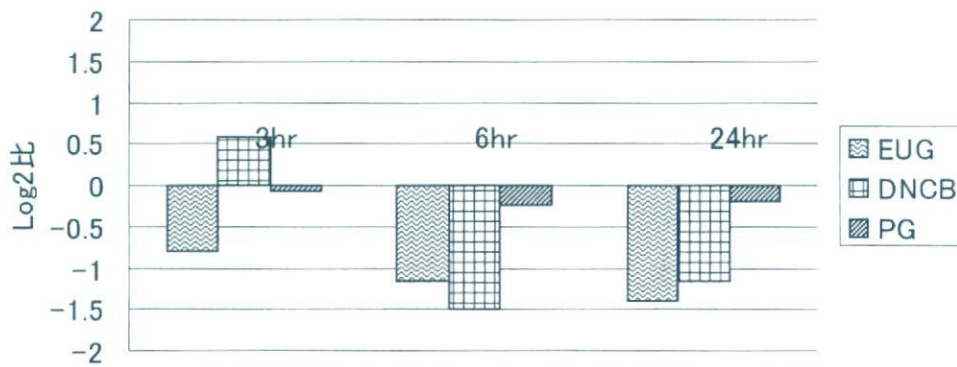


図 6 タンパク質-B (高用量) 各暴露時間での発現量
各暴露時間での媒体対照に対する Log2 比

タンパク質-C

(EUG、DNCB 添加 24 時間後に共通して発現量が減少したタンパク質)

表 7 タンパク質-C (高用量) 各暴露時間での発現量データ

	3hr		6hr		24hr	
	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test
EUG	0.79	0.091	0.78	0.37	0.40	0.011
DNCB	0.75	0.041	0.28	0.00027	0.21	4.20E-05
PG	1.04	0.64	0.97	0.72	0.80	0.14

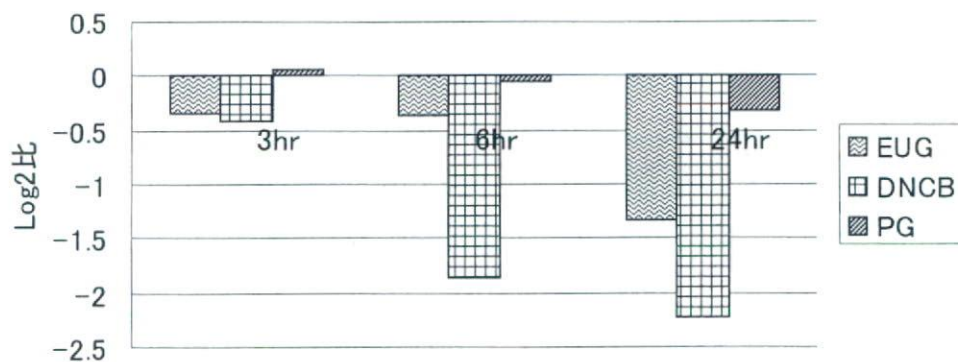


図 7 タンパク質-C (高用量) 各暴露時間での発現量
各暴露時間での媒体対照に対する Log2 比

タンパク質-D

(EUG、DNCB 添加 24 時間後に共通して発現量が減少したタンパク質)

表 8 タンパク質-D (高用量) 各暴露時間での発現量データ

	3hr		6hr		24hr	
	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test
EUG	0.72	0.0056	0.46	0.00026	0.36	0.0015
DNCB	0.65	0.016	0.41	0.00012	0.31	2.40E-06
PG	1.08	0.21	1.01	0.75	1.07	0.21

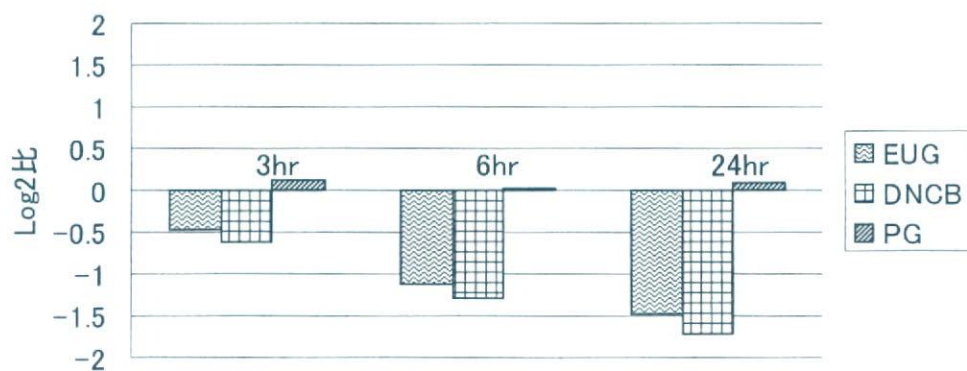


図 8 タンパク質-D (高用量) 各暴露時間での発現量
各暴露時間での媒体対照に対する Log2 比

タンパク質-E

(EUG、DNCB 添加 6 時間後に共通して発現量が上昇したタンパク質)

表 9 タンパク質-E (高用量) 各暴露時間での発現量データ

	3hr		6hr		24hr	
	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test
EUG	1.52	0.018	2.34	0.0013	1.10	0.25
DNCB	1.55	0.012	2.03	0.019	1.23	0.11
PG	0.53	0.0016	0.78	0.12	0.90	0.10

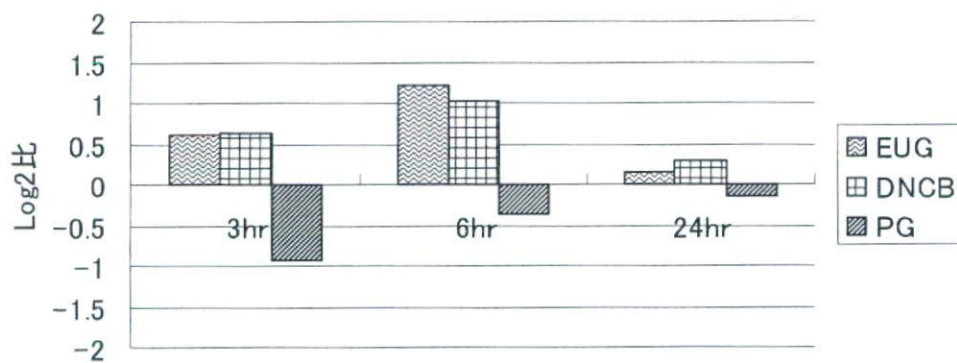


図 9 タンパク質-E (高用量) 各暴露時間での発現量
各暴露時間での媒体対照に対する Log2 比

タンパク質-F

(EUG、DNCB 添加 6 時間後に共通して発現量が上昇したタンパク質)

表 10 タンパク質-F (高用量) 各暴露時間での発現量データ

	3hr		6hr		24hr	
	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test	Av. Ratio	T-test
EUG	1.51	0.0006	2.77	2.20E-05	1.35	0.014
DNCB	1.44	0.011	3.25	0.00022	1.65	0.00077
PG	0.70	0.048	0.71	0.055	1.07	0.57

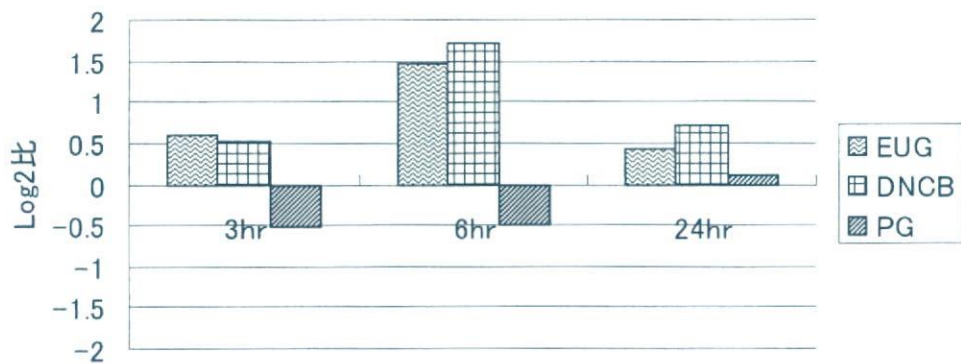


図 10 タンパク質-F (高用量) 各暴露時間での発現量
各暴露時間での媒体対照に対する Log2 比

3) 生殖器

7. 胎生期曝露が雄性生殖器に及ぼす影響の発生生物学的解析研究

分担研究者 長尾 哲二 近畿大学 理工学部 生命科学科 発生生物学研究室 教授

研究要旨

研究要旨: 内分泌かく乱化学物質の胎生期曝露が雄性生殖器に及ぼす影響を発生生物学的に検討するため今年度は胎児期・新生児期の精巣下降に関連する遺伝子および胎児・新生児精巣生殖細胞におけるメチル化酵素遺伝子の発現についてマウスを用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曝露は精巣導帯あるいは上方靭帯の発生・発達に重要な役割をもつ *Insl-3* および *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。

A. 研究目的

高次恒常性維持機構のアンバランス状態にあると考えられる小児を含む高感受性集団に対する有害性の新評価手法の開発研究を行う。小児は化学物質曝露に対して脆弱な集団であるため、有害性の検出可能な新評価手法の確立は緊急性を要する重要課題である。今回、生殖機能障害の原因の一つとしての尿道下裂あるいは停留精巣 (cryptorchidism、精巣下降不全) などヒト先天性生殖器奇形の内分泌かく乱化学物質を含む環境化学物質の子宮内曝露による誘発機構をマウスを実験材料として解析して、成熟後の個体にみられる生殖機能障害と関連して考察することを目的とした。さらには内分泌かく乱化学物質など性ホルモン受容体と結合する化学物質の低用量曝露影響を検出可能な評価手法を確立することも併せて検討することも目的とした。そこで今年度は、合成エストロゲンを含む内分泌かく乱化学物質をマウス胎児の性腺発生/精巣下降の臨界期と考えられる時期に投与し、末期胎児における停留精巣の有無について解剖学的に観察し、用量・反応関係を調べて閾値を求めるとともに、精巣導帯の発生・発達に重要な役割を果たす遺伝子群の胎児 testicular mRNA あるいはタンパク局在について予備的に検討した。さらに、上方靭帯に作用するテストステロンを阻害する抗アンドロゲン作用をもつフルタミド、あるいはテストステロンをジヒドロテストステロンに還元する 5α -reductase を阻害するフィナスチライドが胎児の精巣下降にどのような影響を及ぼすかを

調べた。

また、胎生期の内分泌かく乱化学物質を含む環境化学物質曝露におけるエピジェネティックな変異が、次世代へ不可逆的影響 (Transgenerational effects: 継世代影響) に関与することを示唆する報告が近年なされていることから¹⁻³⁾、マウス胎児あるいは新生児の雄性生殖細胞における DNA メチル化制御分子のひとつとして DNA methyltransferases 遺伝子の発現を検討した。

1) Nagao et al., Male-mediated teratogenesis, Academic Press, 2003.

2) Anway et al., Science 308, 1466-1469, 2005.

3) Crews et al., Proc Natl Acad Sci USA 104, 5942-5946, 2007

B. 研究方法

① 精巣下降に関する実験

ICR マウスの妊娠 9-16 日(腔栓=妊娠 0 日)の連日に、合成エストロゲンの DES あるいはエチニルエストラジオール (17α -Ethinylestradiol: EE) の $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重を背部皮下注射し、胎齢 17 日、18 日および生後 1 日 (養母哺育による) の雄マウスの精巣を摘出した。それらを 4% パラホルムアルデヒド (PFA) にて固定してパラフィン切片を作り、H・E 染色により組織観察を行った。次いで、アンドロゲンレセプター (AR) タンパクおよび *P450scc* タンパクの局在を免疫染色法 (ABC 法) を用いて観察し、精巣発生・発達に関連する遺伝子群 SF-1 (Steroidogenic Factor-1)、*Insl-3* (Insulin-like factor-3) および *P450scc* に

ついて mRNA の発現量を RT-PCR 法を用いて調べた。また、ICR マウスの妊娠 15-17 日の連日に、フルタミド (Flutamide: FLU) あるいはフィナステライド (Finasteride: FIN) の 20 mg/kg 体重を強制的に経口投与し、胎齢 18 日の精巣を摘出して上記遺伝子群について同様に調べた。

② DNA メチル化制御分子に関する実験 (継世代影響に関する実験)

ICR マウスの妊娠 9-16 日の連日、ビスフェノール A (Bisphenol A: BPA) 200 μ g/kg 体重を強制的に経口投与した。また、EE 50 μ g/kg 体重あるいは DES 50 μ g/kg 体重を背部皮下注射した。胎齢 17 日あるいは 18 日に帝王切開にて得られた胎児および養母哺育により得られた新生児から、それぞれ精巣を摘出して 4%PFA で固定後パラフィン切片とし免疫染色法 (ABC 法) を用いて精巣における Dnmt1 あるいは Dnmt3a のタンパク局在を調べた。次いで、胎齢 18 日胎児の精巣については、RT-PCR 法を用いて、Dnmt3a mRNA あるいは Dnmt3b mRNA の発現を比較した。

なお、いずれの実験においても「近畿大学動物実験規程」に準拠して行い、使用した動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼など苦痛の少ない方法を用いた。

C. 研究結果

① 精巣下降への影響

EE 胎生期曝露の影響 (図 1、4)

胎児精巣組織の観察では、EE 投与群に明瞭な構造変化は認められなかったが、生殖細胞の核に染色性の低下が認められた。免疫染色の結果、P450scc タンパクの局在が EE 投与群において減少した。胎齢 17 日、18 日および生後 1 日における精巣の発生・発達に関連する遺伝子群の mRNA の発現については、EE 投与によりいずれの日齢においても *Insl-3* の発現量は著しく減少した。*SF-1* の発現については EE 投与群と対照群に差は認められなかったが、P450scc mRNA は EE 投与群において著しく減少した。

DES 胎生期曝露の影響 (図 2、3)

胎齢 17 日、18 日および生後 1 日に摘出したいずれの精巣においても、DES 投与群における *Insl-3* mRNA 発現は対照群と比較すると有意に減少した。日齢間に発現の明瞭な差は認められなかった。*SF-1* については、DES 投与群の胎齢 18 日および生後 1 日の発現が有意に減少したが、胎齢 17 日には、対照群との

間に統計学的有意差は認められなかった。*P450scc* については、*Insl-3* と同様、いずれの日齢においても DES 投与群の発現は有意に減少した。

FLU および FIN 胎生期曝露の影響

FLU および FIN の 20 mg/kg 体重を妊娠 15-17 日に経口投与した胎児の精巣では、精巣下降不全が誘発されず、精巣下降に関連するいずれの遺伝子の mRNA 発現量にも対照群との間に差は認められなかった。

② DNA メチル化酵素遺伝子の発現に及ぼす影響

EE 胎生期曝露の影響

免疫染色の結果、EE 投与群および対照群のいずれにおいても、セルトリ細胞とライディッヒ細胞に Dnmt1 タンパクの局在が認められた。Dnmt3a タンパクについては EE 投与群および対照群のいずれにおいても前精原細胞および精原細胞に強い発現がみられた。また、胎齢 18 日胎児精巣の前精原細胞および精原細胞における Dnmt3a mRNA および Dnmt3b mRNA 発現の OD 値を比較したところ、EE 投与群と対照群との間に明らかな発現量の差は認められなかった。

DES 胎生期曝露の影響

免疫染色の結果、Dnmt1 タンパクの局在には DES 投与の影響は認められず、精細管内側周辺細胞 (前精原細胞および精原細胞) に発現がみられたが、その発現はやや弱くなる傾向を示した。Dnmt1 mRNA は胎齢 18 日胎児精巣において発現低下がみられ、Dnmt3a mRNA は生後 1 日新生児精巣において上昇がみられた。

BPA 胎生期曝露の影響

免疫染色の結果、同時期の精巣には BPA 投与群および対照群のいずれにおいても、セルトリ細胞とライディッヒ細胞に Dnmt1 タンパクの局在が認められた。Dnmt3a タンパクについては BPA 投与群および対照群のいずれにおいても、前精原細胞および精原細胞に強い発現がみられた。また、胎齢 18 日胎児精巣の前精原細胞および精原細胞における Dnmt3a mRNA および Dnmt3b mRNA 発現を比較したところ、BPA 投与群と対照群との間には明らかな発現量の差は認められなかった。

D. 考察

ヒト 出生時にはほとんどの例において両側

の精巣は陰嚢まで下降しているが、片側あるいは両側性に精巣が腹腔内に留まる停留精巣は、満期産成熟児の約 3%、未熟児の約 30%にみられ、1 歳で 2%、思春期でおおよそ 1%に減じるが成人の約 0.3%にみられる先天性生殖器奇形である。思春期を過ぎると精細管の基底膜肥厚や硝子化、精子形成能力の障害を伴うが、それは腹腔内の高温のためと考えられている。

我々のこれまでの研究から、フタル酸エステルをマウス胎児期に暴露すると、雄ではテストステロン合成を抑制し、胎児の精巣下降に関連する遺伝子(*Insl-3*、*Hoxa10* など)に干渉することが明らかになった。発生学的には上方靭帯と精巣導帯により腎臓近位にその位置を保つ生殖原基は、胎児発生の進行とともに、雄ではアンドロゲンにより上方靭帯が退化し、逆に精巣導帯が発達して下方に精巣を引き寄せることにより精巣下降が進む。このように精巣下降の成立機構については組織から分子のレベルまで解析が試みられている。しかし内分泌かく乱化学物質を含む環境化学物質の胎児期曝露による停留精巣誘発に関しては、これまで解剖学的側面からの検討が主になされてきた。近年、合成エストロゲンにより誘発されるマウス停留精巣の分子機構について解明が進んでいる。P450scc はライディヒ細胞で産生され、ステロイドホルモン合成・分解により、テストステロンを産生し、上方靭帯を退縮させて、精巣下降を促す(図 5)。従って、本研究において、P450scc タンパク局在および mRNA が EE あるいは DES 投与によって減少し、その結果、上方靭帯退縮による精巣下降が障害されて停留精巣が誘発されたと考えられる。さらにこれに加えて、胎齢 17 日、18 日および生後 1 日における *Insl-3* mRNA の発現量が EE あるいは DES 投与により著しく減少した。*Insl-3* は精巣導帯に作用して精巣下降を促す作用を有するが、mRNA 発現量が減少したことから、精巣導帯の発達が障害されて停留精巣が誘発されたと考えられる。FLU あるいは FIN の 20 mg/kg 体重の妊娠 15~17 日経口投与の精巣下降への影響については、本研究では明らかにならなかったことから、今後、用量・効果関係の有無について検討することが必要であると思われる。

子宮内で DES などの合成エストロゲンに曝露された雄マウスは、成熟後に精巣の部分

的雌化や精細管萎縮などの生殖器発生障害を示し、これら雄マウスの次世代では先天異常の発生率が上昇するという継世代影響(催奇形効果)がみられることを我々は報告した(Nagao et al., 2003)。この継(経)世代催奇形効果は、生殖細胞に生じた DNA のメチル化などエピジェネティックな変化による遺伝子発現の恒久的変化に起因するのではないかという仮説を我々は提唱している。本研究において DES に子宮内曝露されたマウス精巣では、胎齢末期あるいは新生児期において *Dnmt* mRNA の発現が変化したが、EE あるいは BPA については明らかな変化は観察されなかった。今後、DES、EE あるいは BPA の用量・効果関係について検討するとともに、他の環境化学物質についても検討する必要がある。

E. 結論

精巣下降に関する研究では、精巣下降の病理解剖学的観察による影響評価のみならず、精巣下降の制御に関連する遺伝子群の働きについても検討し、内分泌かく乱化学物質を含む多くの環境化学物質について低用量曝露も含め用量・効果関係も検討することにより、「精巣下降の制御に関連する遺伝子群の発現変動」は、胎児、小児など高感受性集団に対する有害性の検出可能な新評価手法を確立するための鋭敏な指標になると考えられる。また、DNA メチル化酵素遺伝子の発現に及ぼす影響の研究では、化学物質によるゲノム DNA メチル化パターンの変動がどのようなメカニズムで起きるか定かではないが、胎児期のゲノムメチル化パターンの変動は環境化学物質に感受性が高いようである。したがって今後、環境化学物質の生体影響についてもエピジェネティクス研究の展開が必要であると思われる。

F. 健康危惧情報

得られた研究成果に健康危惧に関する情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

Shirota M., Saito Y., Imai K., Horiuchi S.,

Yoshimura S., Sato M., Nagao T., Ono H., Katoh M. Influence of di-(2-ethylhexyl)phthalate on fetal testicular development by oral administration to pregnant rats. *J. Toxicol. Sci.*, **30**: 175-194 (2005).

2. 学会発表

小野田訓子、齊藤義明、長尾哲二: 合成エストロゲンのマウスにおける継世代催奇形効果
第 47 回日本先天異常学会(名古屋)、抄録集 p.66、2007

松田圭子、齊藤義明、長尾哲二: レチノイン酸により誘発されたマウス口蓋裂の成立機構

第 47 回日本先天異常学会(名古屋)、抄録集 p.75、2007

藤山総子、齊藤義明、長尾哲二: ニトロソ尿素胎生期投与がマウス脳の発生および発達・行動に及ぼす影響 第 47 回日本先天異常学会(名古屋)、抄録集 p.80、2007

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

なし

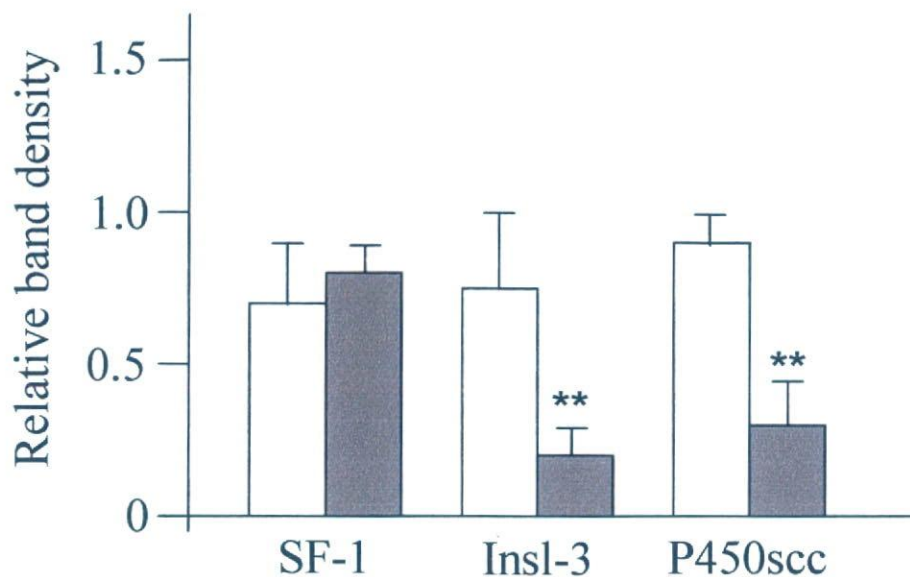


図1. 胎齢18日精巣における各種遺伝子のmRNA

□:対照群 ■:EE投与群 ** $p < 0.01$

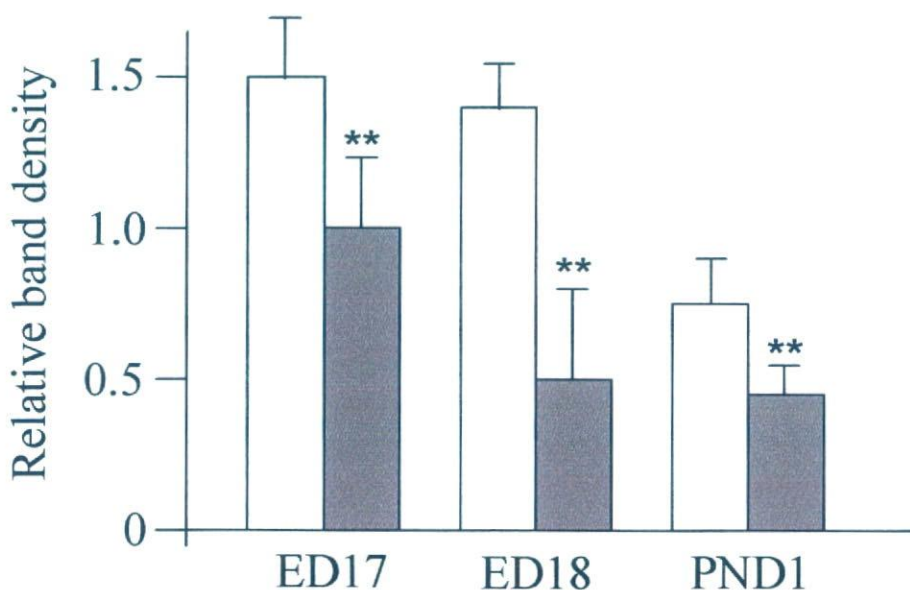


図2. 胎児・新生児精巣におけるInsl-3 mRNA発現

□:対照群 ■:DES投与群 ** $p < 0.01$

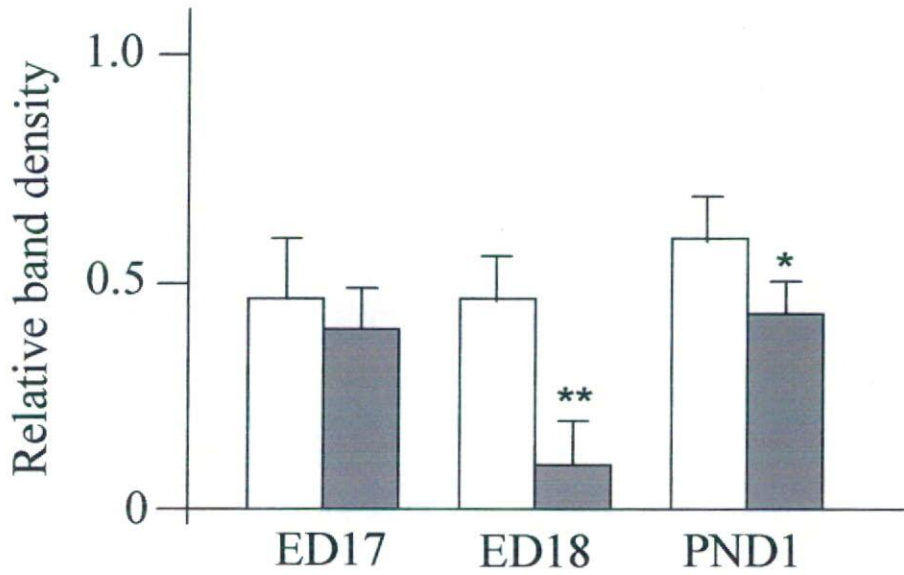


図3 胎児・新生児精巣におけるSF-1 mRNA発現

□:対照群 ■:DES投与群 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

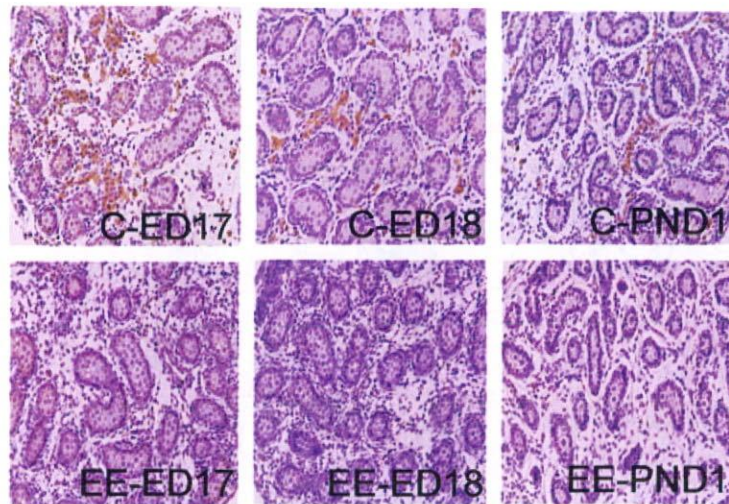


図4 EE子宮内曝露後の胎児・新生児精巣におけるP450sccタンパク発現局在

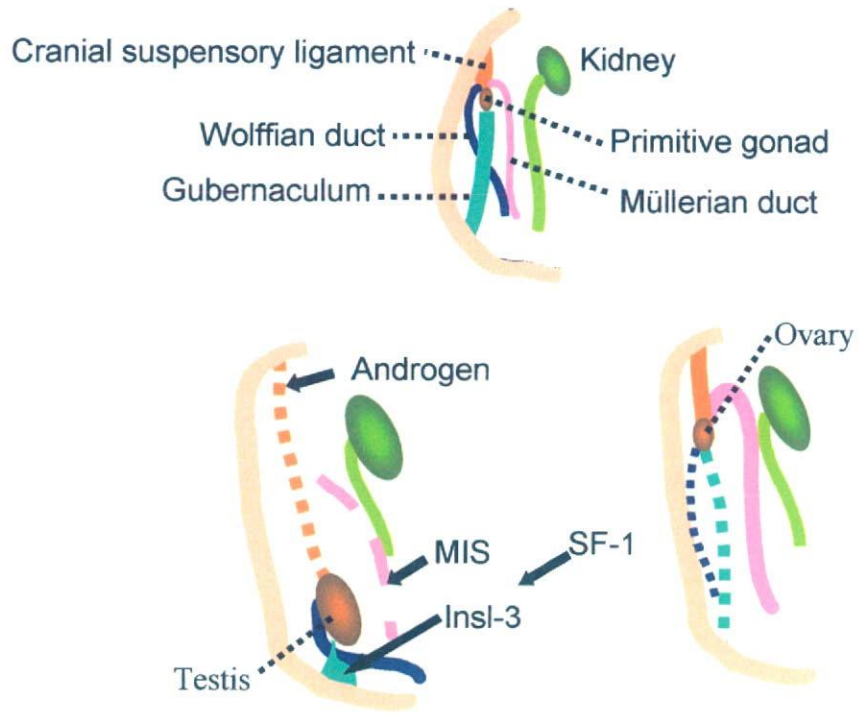


図5 マウスの精巣下降のしくみ

8. 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

研究分担者 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

研究協力者 永田伴子、丸茂秀樹、大向英夫、宮原 敬、小野 宏

財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨

ジエチルスチルベストロール(DES)の新生児投与によるSDラットを用いた一生涯試験を実施した際に、解剖時に得られた器官・組織を用いて、病理学的検索を行った。その結果、SDラットでよく認められる下垂体、副腎および乳腺の腫瘍または過形成が各DES投与群で観察されたが、その発生頻度に対照群との差はなかった。しかしながら、5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ のDESを投与した雌では、他の群に比べて下垂体腫瘍の発生時期が早期化していた。さらに、現在、DESのC57BL/6Jマウスを用いた一生涯試験を開始したところであるが、これまでのところ性成熟観察においてラットとは異なる結果が得られている。

A. 研究目的

化学物質等のヒトへの影響を調べる上で、薬物に対する感受性の高い新生児期に被験物質を投与し、成熟後の変化を確認することは、重要と考えられる。特に、生殖器系に関しては、春期発動、卵巣周期、精子数、更年期などの異常と化学物質暴露との関連が危惧されていることから、より重要と考えられる。そこで、化学物質のスクリーニング試験法の一つとしての、げっ歯類を用いた一生涯試験の確立を目的とし、本研究ではエストロゲン活性を有する化学物質をげっ歯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、生殖器系、さらには行動や免疫系を検索する試験を実施し、情報提供することを目的とした。

B. 研究方法

B.1 ラットを用いた一生涯試験

ジエチルスチルベストロール(DES)の0(コーン油)、0.05、0.5および5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$

をCrI:CD(SD)ラットの生後1日から5日に強制経口投与し、101週齢まで継続飼育して、体重、性成熟、性周期、交配能力、分娩、行動、免疫検査、排卵検査等を実施した後、病理解剖した。今回は、解剖時に採取した器官・組織について、病理組織学検査を実施した。

B.2 マウスを用いた一生涯試験

ジエチルスチルベストロール(DES)の0(コーン油)、0.005、0.05、0.5および5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ をC57BL/6Jマウスの生後1日から5日に強制経口投与し、体重および性成熟を観察した。

C. 研究結果

C.1 ラットを用いた一生涯試験

101週齢で剖検した動物および途中死亡した動物の腫瘍性病変をTable 1、2に示した。雄では下垂体および副腎の腫瘍または過形成がそれぞれ73~80%および40~60%の動

物に認められたが、対照群と各 DES 投与群との間で発生頻度の差は認められなかった。雌においても下垂体および乳腺の腫瘍または過形成がそれぞれ 85-95%および 53-80%の動物に認められたが、対照群と各 DES 投与群との間で発生頻度の差は認められなかった。しかしながら、死亡動物の腫瘍発生頻度を死亡時期別に集計したところ、5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群の雌では、下垂体腫瘍と皮下腫瘍の発生時期が、他の群に比べて早期化する傾向がみられた (Fig. 1)。

54 週齢で病理解剖し、肉眼的に異常が認められた動物の器官・組織についても、病理組織学検査を実施した結果、0.5 および 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群の雌では、他の群に比べて下垂体および乳腺の腫瘍または過形成の発生頻度が増加した (Fig. 2)。

C.2 マウスを用いた一生涯試験

生後 1-21 日の体重推移は、各投与群とも順調に増加し、DES 投与の影響を示唆する体重の変化は認められなかった。

雌の腔開口時期を観察した結果、5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群の群平均完成日が対照群の値と比較して有意に延長した (Table 3)。雄の陰茎包皮分離時期については、対照群と DES 投与群との間に有意差は認められなかった。

D-E. 考察・結論

ラットを用いた一生涯試験においては、既に 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群の雌の生存日数が短縮することを報告したが、病理組織学検査の結果、DES 投与群の腫瘍性病変の発生頻度は対照群と同程度であった。しかしながら、5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群の雌では、下垂体腫瘍の発生時期が他の群に比べて早期化しており、途中解剖した動物においても、0.5 および 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群の雌で下垂体および乳腺の

腫瘍頻度が増加していたことから、DES の新生児期投与により、雌動物における腫瘍の発生時期が早期化する可能性が示唆された。これらは、以前報告した、視床下部-下垂体-性腺軸の内分泌攪乱作用に起因したものと推定されるが、DES の新生児期投与では雄動物において免疫機能の低下を示唆する変化もみられていることから、雌動物を用いた免疫学検査を追試する必要があると考えられる。

現在進行中のマウスを用いた一生涯試験においては、5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群の雌で腔開口時期の遅延が観察された。ラットを用いた一生涯試験では、5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群の雌で、腔開口時期が早期化することを報告したが、今回の実験から、DES の新生児期投与による性成熟への影響は、動物種によって異なる可能性が示された。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表、学会発表

太田亮、宮原敬、又吉健、大向英夫、小野宏：内分泌攪乱性確定試験としてのラット一生涯試験の試み。秦野研究所年報 30, 17-24 (2007)

2. 学会発表

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

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

無し

Table 1

Summary of neoplastic lesions in female rats neonatally treated with diethylstilbestrol

Dose	0 µg/kg	0.05 µg/kg	0.5 µg/kg	5 µg/kg
(Number of tumor bearing animal)	[20] 20	[20] 20	[20] 19	[20] 19
(Pituitary gland)	[20]	[20]	[20]	[20]
Carcinoma		1		
Adenoma	18	13	14	18
Hyperplasia	1	4	3	1
Total	19	18	17	19
(Mammary gland)	[19]	[20]	[20]	[20]
Adenocarcinoma	1	2	4	3
Adenoma				2
Fibroadenoma	7	10	11	7
Carcinosarcoma				1
Hyperplasia	2	2	1	
Total	10	14	16	13
(Brain)	[20]	[20]	[20]	[20]
Granular cell tumor	1			1
(Heart)	[20]	[20]	[20]	[20]
Metastasis				1
(Lung & Bronchus)	[20]	[20]	[20]	[19]
Metastasis		3	1	1
(Liver)	[20]	[20]	[20]	[20]
Histiocytic sarcoma			1	
Metastasis		1		
(Kidney)	[20]	[20]	[20]	[20]
Metastasis				1
(Spleen)	[20]	[20]	[20]	[20]
Histiocytic sarcoma		1		
(Pancreas)	[19]	[19]	[20]	[17]
Adenoma, islet cell			1	
(Thyroid gland)	[20]	[19]	[18]	[19]
C-cell adenoma	3		2	1
(Parathyroid gland)	[12]	[15]	[13]	[17]
Adenoma	1			1
(Adrenal gland)	[20]	[19]	[20]	[20]
Adenocarcinoma		1		
Adenoma, cortical cell	1	2	3	5
Pheochromocytoma	1			1
(Uterus)	[20]	[20]	[20]	[20]
Polyp, endometrial stromal	1	3	1	
(Vagina)	[20]	[20]	[20]	[20]
Hyperplasia			1	
(Skin/subcutis)	[19]	[20]	[19]	[20]
Fibrosarcoma				1
Hemangioendothelioma		1		
Papilloma, squamous cell		1		
(Hematopoetic system)	[19]	[19]	[20]	[20]
Leukemia, lymphocytic	1	1	2	
Malignant lymphoma	1	1	1	
(Abdominal cavity)			[1]	
Schwannoma, malignant				1
(Auricle)			[1]	
Schwannoma				1

[], number of animal examined.