

図 1. 動物試験概要

表 1. 母動物群構成

群	用量	濃度	投与量	n
VC	0 μ g/kg/day	0 μ g/mL	5 mL/kg	12
低用量	50 μ g/kg/day	10 μ g/mL	5 mL/kg	12
高用量	50 mg/kg/day	10 mg/mL	5 mL/kg	12

表 2. 母動物出産数

群	出産数	未出産数
VC	6/12	6/12
低用量	5/12	7/12
高用量	6/12	6/12

表 3. 産仔数

群	雄	雌	合計
VC	2.0 \pm 0.89	1.5 \pm 1.04	3.5 \pm 0.84
低用量	3.2 \pm 1.48	1.4 \pm 1.14	4.6 \pm 1.67
高用量	1.7 \pm 0.82	1.5 \pm 1.38	3.2 \pm 1.94

平均 \pm 標準偏差

表 4.1 雄仔獣群構成

Bisphenol A 群	LLNA	DNCB 用量	n
VC	AOO 群	0%/day	4
	0.5%DNCB 群	0.5%/day	4
低用量	AOO 群	0%/day	4
	0.5%DNCB 群	0.5%/day	4
高用量	AOO 群	0%/day	4
	0.5%DNCB 群	0.5%/day	4

表 4.2 雌仔獣群構成

Bisphenol A 群	LLNA	DNCB 用量	n
VC	AOO 群	0%/day	4
	0.5%DNCB 群	0.5%/day	4
低用量	AOO 群	0%/day	0
	0.5%DNCB 群	0.5%/day	3
高用量	AOO 群	0%/day	3
	0.5%DNCB 群	0.5%/day	3

*雌子獣は母動物による食殺、育児放棄による死亡から各群 4 匹確保できず。

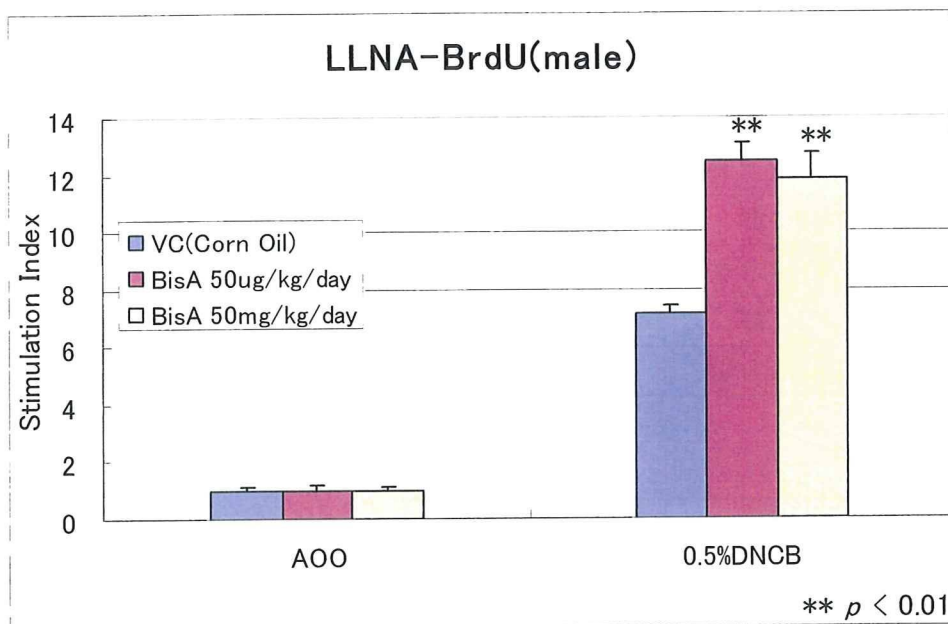


図 3.1 雄仔獣の LLNA-BrdU 法による感作性応答反応性評価(SI 値)

表 5.1 雄仔獣 LLNA-BrdU 個別データ

	Dose (%)	Abs	Mean	SI	Mean (SI)	S.E	
male	VC(Corn Oil)	AOO	0.089	0.125	0.71	1.00	0.15
			0.134		1.06		
			0.173		1.38		
			0.107		0.85		
	0.5%DNCB	0.874	0.897	6.97	7.15	0.24	
		0.927		7.39			
		0.823		6.56			
		0.962		7.67			
	Bis A 50 μ g/kg/day	AOO	0.041	0.085	0.476	1.00	0.22
			0.131		1.537		
			0.083		0.971		
			0.087		1.016		
0.5%DNCB		1.166	1.064	13.66	12.45	0.66	
		1.109		12.99			
		1.075		12.59			
		0.904		10.58			
Bis A 50mg/kg/day	AOO	0.113	0.098	1.15	1.00	0.10	
		0.118		1.20			
		0.085		0.87			
		0.077		0.78			
	0.5%DNCB	0.950	1.168	9.65	11.86	0.87	
		1.345		13.66			
		1.124		11.42			
		1.252		12.71			

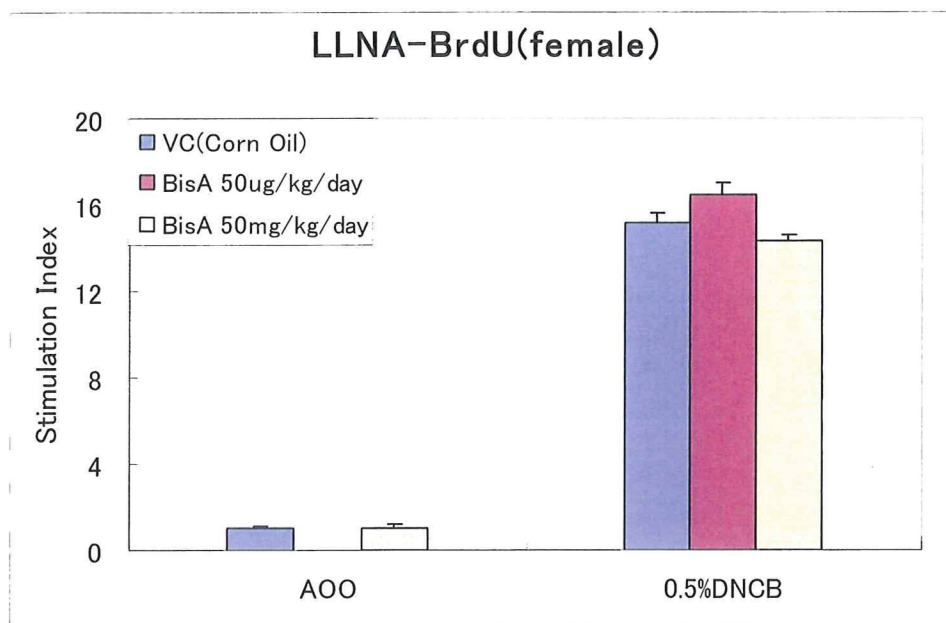


図 3.2 雌仔獣の LLNA-BrdU 法による感作性応答反応性評価(SI 値)

表 5.2 雌仔獣 LLNA-BrdU 個別データ

	Dose (%)	Abs ₄₉₀	Mean (Abs ₄₉₀)	SI	Mean (SI)	S.E
VC(Corn Oil)	AOO	0.053	0.063	0.84	1.00	0.15
		0.053		0.85		
		0.054		0.86		
		0.091		1.45		
	0.5%DNCB	0.978	0.952	15.58	15.17	0.42
		0.950		15.13		
		1.001		15.95		
		0.878		14.00		
Bis A 50 µg/kg/day	AOO	/	/	/	/	/
		/		/		
		/		/		
		/		/		
	0.5%DNCB	1.070	1.036	17.05	16.51	0.55
		1.072		17.08		
		0.967		15.40		
		/		/		
Bis A 50mg/kg/day	AOO	0.041	0.063	0.65	1.00	0.19
		0.067		1.07		
		0.081		1.29		
		/		/		
	0.5%DNCB	0.906	0.903	14.40	14.35	0.23
		0.926		14.73		
		0.877		13.94		
		/		/		

動物なし

媒体対照群における AOO 群との比から SI 値を算出

3)生殖器

7. 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の発生生物学的解析研究

研究分担者 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

内分泌かく乱化学物質(EDCs)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し、EDCsの有害性の検出可能な新しい評価手法の確立のために、胎児期の精巣下降の制御に関連する遺伝子 mRNA および胎児精巣生殖細胞におけるDNAメチル化酵素遺伝子 Dnmt の発現などについてマウスを用いて調べた。その結果、低用量 Bisphenol A(BPA)の曝露は P450scc mRNA 発現を抑制し、Nonylphenol は SF-1 および P450scc mRNA 発現を有意に抑制した。また Butylbenzylphthalate は P450scc mRNA 発現を抑制した。精巣下降に変化がみられた用量では遺伝子 mRNA 発現が減少したことから、精巣下降の制御に関連する遺伝子群の発現変化は EDCs影響の指標のひとつになり得ると考えられた。また EDCsの胎生期曝露によるエピジェネティックな変異が次世代の不可逆的影響に関与すると考え、DES あるいは Ethynylestradiol を用いた胎児精巣の曝露実験を行った。その結果、DES および EE の胎児期曝露は胎児精巣における Dnmt mRNA の発現パターンに変化を及ぼし、さらにゲノムワイドな DNA メチル化状態の変化が認められたことから、合成エストロゲンの胎児期曝露は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。胎児・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。本研究では生殖機能障害の原因の一つとしての停留精巣(cryptorchidism、精巣下降不全)などヒト先天性泌尿生殖器奇形の内分泌攪乱化学物質(EDCs)を含む環境化学物質の子宮内曝露による誘発の有無についてマウスを実験材料として観察することを目的とした。さらには BPA の低用量曝露影響を検出することが可能な評価手法の確立も併せて検討することも本研究の目的とした。そこで最終年度では、内分泌攪乱性が報告されている

化学物質をマウス胎児の性腺発生あるいは精巣下降の臨界期と考えられる妊娠時期に投与し、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・反応性を調べて閾値の有無を確認するとともに、精巣導帯の発生・発達あるいは上体靱帯の退縮に重要な役割を担う遺伝子群の胎児 testicular mRNA 発現について検討した。さらに、上方靱帯に作用するテストステロンの作用を阻害する抗アンドロゲン作用をもつフルタミドが胎児の精巣下降にどのような影響を及ぼすかを昨年度に引き続き、用量を変えて調べた。次いでヒト曝露量に近い用量の BPA いても用量・反応性の有無について再検討した。

近年、胎生期の EDCs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(継世代影響)を及ぼ

すことを示唆する報告がなされている。DES に子宮内曝露された雄マウスあるいは後世代の精巣における数多くの遺伝子の発現レベルの上昇あるいは低下が報告されている。DES は non-genotoxic (あるいは非変異原) であることが報告されていることから、これら遺伝子発現レベルの上昇・低下にはエピジェネティックな機構の関与が考えられる。そこで本研究では、マウス胎児の雄性生殖細胞における DNA メチル化制御分子として DNA methyl transferases (DNA メチル化酵素) 遺伝子の発現ならびにゲノムワイドな DNA メチル化状態を EDCs が攪乱するか否かを検討した。

B. 研究方法

1. 精巣下降に関する実験

ICR マウスの妊娠 9~17 日(膣栓=妊娠 0 日)の連日に、低用量の BPA の 2~200 μ g/kg 体重、Nonylphenol (NP) 12.5~50 mg/kg 体重、Butylbenzylphthalate (BBP) 25~100 mg/kg 体重あるいは陽性対照として EE 50 μ g/kg 体重を強制的に経口投与して、妊娠 18 日に帝王切開して胎児を摘出した。雄胎児について体重および精巣重量を測定した。左右の腎臓-膀胱間距離(100 U)および精巣-膀胱間距離(The degree of testicular ascent: DTA)を計測して DTA/100 U を求めた。次いで精巣下降の制御に関連する遺伝子群 Insl-3、SF-1 あるいは P450scc について胎児精巣を材料として mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて調べた。さらに Flutamide (Flu) 2.5~5 mg/kg 体重を同様に強制的に経口投与し、胎齢 18 日胎児の精巣を摘出して上記遺伝子群 mRNA 発現について調べた。

2. DNA メチル化制御分子に関する実験

C57BL/6J マウスの妊娠 8~11 日の連日、DES あるいは EE 1.0 μ g/kg 体重を背部皮下注射した。胎齢 13 日の胎児性腺について、

DNA メチル化酵素(Dnmt) 1、3a、3a2、3b ならびに 3L 遺伝子 mRNA の発現を real-time PCR により解析した。また、DNA メチル化レベルを Methylamp Global DNA Methylation Quantification Ultra Kit (Epigentek Inc.)を用いて測定した。さらにバイサルファイトシークエンス法を用いてインプリント遺伝子 H19 プロモーター領域の DNA メチル化パターンの解析を行った。

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(図 1、2)

BPA 投与群: いずれの投与群においても DTA/100 U が増加する傾向がみられた。また Insl-3 mRNA 発現はいずれの投与群においても対照レベルであったが、SF-1 および P450scc mRNA は減少傾向にあった。

NP 投与群: いずれの投与群においても DTA/100 U が増加する傾向にあり、Insl-3 mRNA 発現は投与量に依存して減少した。SF-1 mRNA 発現は 12.5 mg/kg 投与群において有意に減少した。さらに P450scc mRNA 発現は 12.5 mg/kg 以上の投与群において有意に減少した。

BBP 投与群: 50 mg/kg 以上の投与群において DTA/100 U が有意に増加した。Insl-3 および SF-1 mRNA 発現は対照レベルであったが、P450scc mRNA 発現はいずれの投与群においても減少傾向にあった。

Flu 投与群: 5 mg/kg 投与群において DTA/100 U が有意に増加した。Insl-3 mRNA 発現は対照レベルであったが、SF-1 mRNA 発現は 2.5 mg/kg 投与群において有意に減少し、P450scc mRNA 発現はいずれの投与群

においても減少傾向にあった。

2. DNAメチル化酵素遺伝子 mRNA 発現およびゲノムワイドな DNAメチル化状態に及ぼす影響

DESあるいはEEに胎生期曝露された性腺生殖細胞からRNAを抽出しcDNAを合成してreal-time PCRを行った結果、いずれの投与群のいずれのDnmt mRNA発現も増加した。DES投与群ではDnmt 3b mRNAに有意差が認められた。さらに胎齢13日の生殖細胞(前精原細胞)におけるゲノムDNAを用いてゲノムワイドなDNAメチル化レベルを測定したところ、対照群と比較して高メチル化状態であった。また、H19遺伝子プロモーター領域における12箇所のCpG部位のメチル化率(メチル化CpG部位数/全CpGs部位数×100)は、対照群で18.9%であったが、EE投与群では60.2%であり($p < 0.05$)、EEの胎生期曝露はインプリント遺伝子のDNAメチル化パターンを変化させた。

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。

我々はこれまでに、フタル酸エステルをマウス胎児期に曝露すると、雄ではテストステロン合成を抑制し、胎児の精巣下降の制御に関連する遺伝子(*Insl-3*, *Hoxa10* など)に干渉することを明らかにした。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EDCsを含む環境化学物質の胎児期曝露による精巣下降不全(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はライディッヒ細胞で産生され、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。

本研究では、BPAを含め数種の内分泌攪乱性が報告されている化学物質の胎生期曝露による精巣下降不全について検討を加えた。

BPAの低用量曝露影響の有無について再検討した結果、BPA 2~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の妊娠9~17日投与では、いずれの投与群においてもDTA/100 Uが増加する傾向が認められた。*Insl-3* mRNA発現はいずれの投与群においても対照レベルであったが、SF-1およびP450scc mRNAは減少傾向にあった。NP、BBPあるいはFluの胎生期曝露の結果、精巣下降の解剖学的変化が認められた投与群では、SF-1およびP450scc mRNA発現が減少傾向にあったことから、今回適用した化学物質の投与量が胎児の精巣下降に遺伝子レベルで影響を及ぼす可能性が考えられた。また、今回用いた投与量では、精巣下降に関連する遺伝子群に対してBBPは抗アンドロゲン作用、BPA、NP、Fluは抗アンドロゲン作用とエストロゲン様作用の両方を示すことが考えられた。また、胎児体重と精巣重量はBPA投与群においては対照レベルであったことから、精巣

下降と胎児あるいは精巣の発育との間に明らかな関連はないと考えられた。

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。この継世代催奇形効果は、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。

近年、DES のマウス新生児期曝露が Dnmts 発現パターンおよびゲノム DNA のメチル化に変化を及ぼして、これら変化が成熟後の生殖器官の器質的異常を引き起こしたとする報告が示された。本研究においては、胎児精巣には重篤な傷害を引き起こさない(電顕観察結果による。平成 20 年度報告)用量の DES あるいは EE を胎児期に適用した。その結果、胎児精巣 DNA のメチル化レベルに変化が認められ、Dnmts mRNA 発現に影響を及ぼした。さらにインプリント遺伝子の DNA メチル化パターンに変化がみられたことから遺伝子発現に影響を及ぼすことが示唆された。

胎生期の生殖細胞は合成エストロゲンによるエピジェネティックな変化を受けやすい時期(臨界期)にあると考えられるが、合成エストロゲンを含む環境化学物質曝露がどのようなメカニズムで DNA メチル化状態の変化を誘発するのか、さらに誘発された DNA メチル化異常が継世代効果とどのように関連するのかを明らかにする必要がある。

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発現についても検討し、内分泌攪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・効果関係を詳細に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」が、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の一つ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の詳細は定かではないが、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に思われる。したがって今後、合成エストロゲンなど内分泌攪乱化学物質を含む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考ええる。

F. 健康危険情報

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

Nagao T., Yoshimura S. Early embryonic losses in mice induced by diethylstilbestrol. *Cong. Anom.*, 49: 269-273 (2009).

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

長尾哲二: 継世代催奇形効果とエピジェネティクス 第 38 回日本環境変異原学会(静岡)、抄録集 p.88、2009

宮本容子、吉田智子、中村友紀、斉藤義明、長尾哲二: ジエチルスチルベストールのマウス胎盤発生に及ぼす影響 第 49 回日本先天異常学会(鹿児島)、抄録集 p.72、2009

高田尚美、小野田訓子、森千里、長尾哲二: 合成エストロゲンに曝露されたマウス胎児の精巣生殖細胞における DNA メチル化酵素遺伝子の発現 第 49 回日本先天異常学会(鹿児島)、抄録集 p.69、2009

守井見奈、西田瑞穂、藤山総子、宮本容子、駒田到和、長尾哲二: BrdU 胎生期投与による海馬発生および大脳皮質形成に及ぼす影響 第 49 回日本先天異常学会(鹿児島)、抄録集 p.71、2009

宮本容子、吉田智子、中村友紀、斉藤義明、長尾哲二: ジエチルスチルベストール (DES) がマウス胎盤発生に及ぼす影響 第 54 回日本人類遺伝学会(東京)、抄録集 p.192、2009

高田尚美、長尾哲二: 合成エストロゲンに子宮内曝露された雄マウスの生殖細胞における DNA メチル化状態の変化 第 12 回日本内分泌攪乱化学物質学会(東京)、抄録集 p.154、2009

浅井泰子、磯野千晶、駒田到和、長尾哲二: 低用量ビスフェノール A のマウス胎生期投与

により誘発される大脳皮質形成異常 第 12 回日本内分泌攪乱化学物質学会(東京)、抄録集 p.63、2009

駒田到和、藤山総子、長尾哲二、塩田浩平: ニトロソ尿素によって誘発されるマウス小頭症の発症機序 第 48 回日本先天異常学会(東京)、抄録集 p.73、2008

三島裕子、中野紗綾香、斉藤義明、長尾哲二: ブロモデオキシウリジン投与マウスの指列誘導異常発生機序 第 48 回日本先天異常学会(東京)、抄録集 p.86、2008

高田尚美、城山朋佳、長尾哲二: DES 胎生期曝露マウスの性腺における DNA メチル化酵素遺伝子の発現 第 48 回日本先天異常学会(東京)、抄録集 p.84、2008

小野田訓子、長尾哲二、松野義晴、森千里: 合成エストロゲンに曝露されたマウス雄胎児の精巣生殖細胞における DNA メチル化酵素遺伝子の発現 第 37 回日本環境変異原学会(沖縄)、抄録集 p.120、2008

小野田訓子、斉藤義明、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、斉藤義明、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、斉藤義明、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

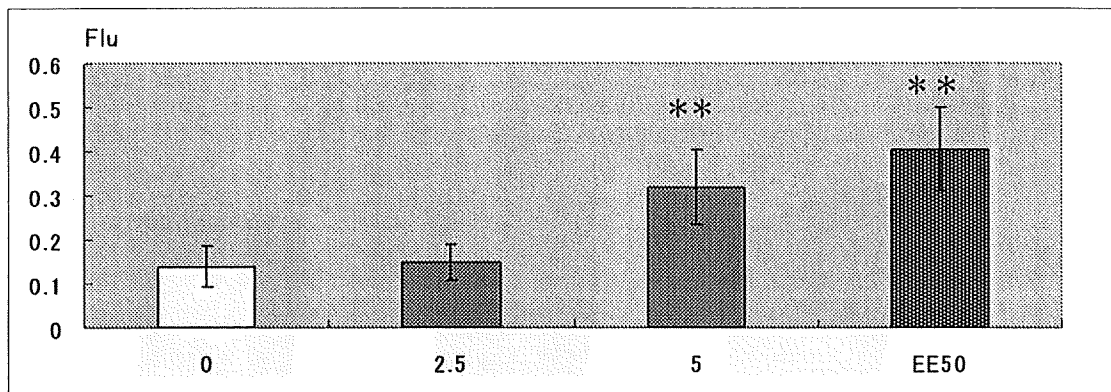
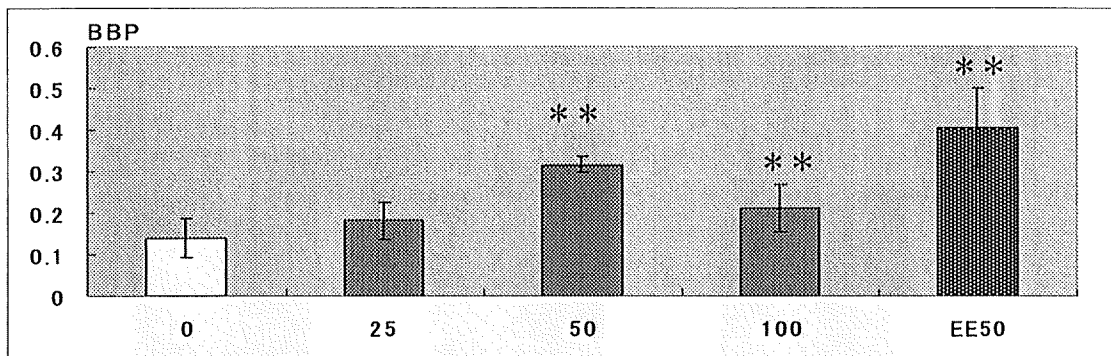
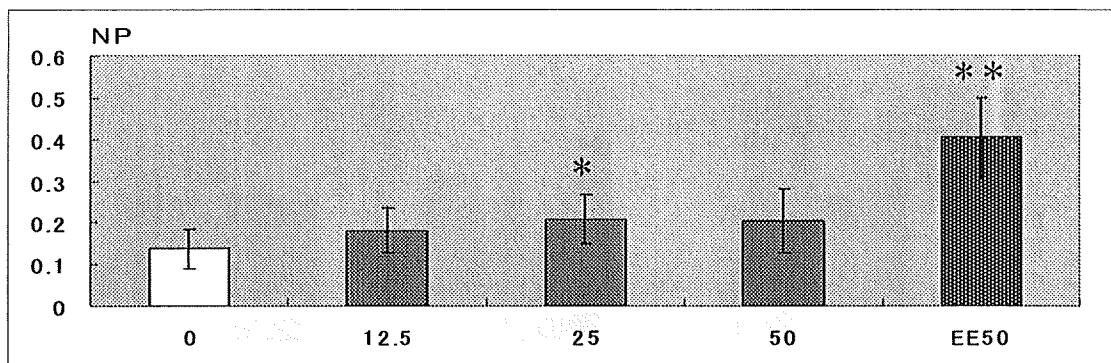
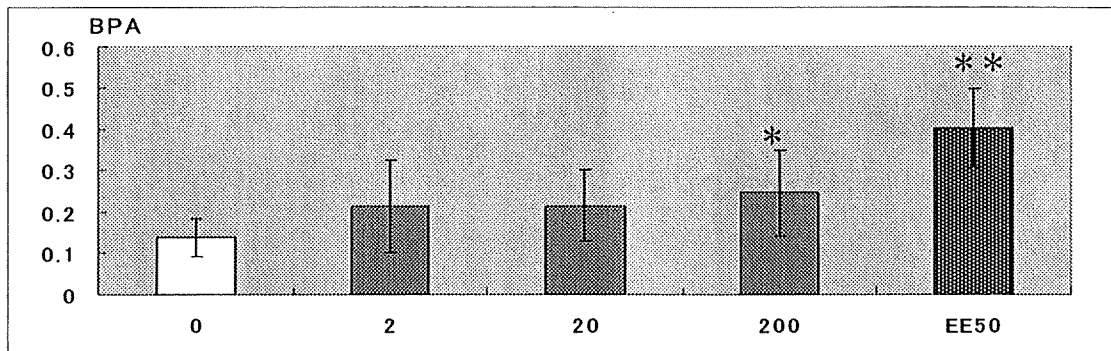


図 1. EDCs胎生期投与後の末期胎児における DTA/100 U

*P<0.05、**P<0.01

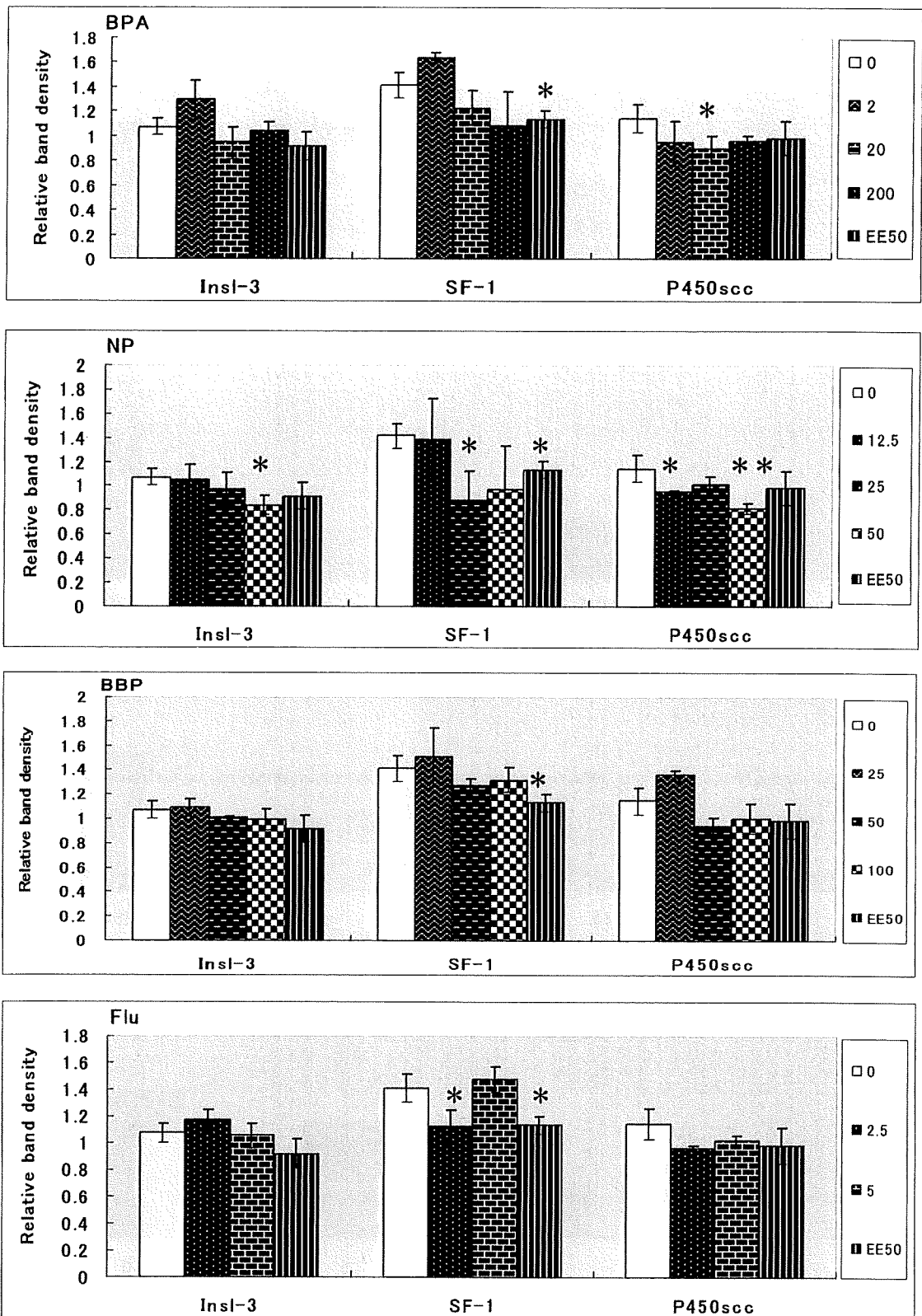


図2. BPA、NP、BBPあるいはFlu投与後の精巣下降制御遺伝子群 mRNA 発現

*P < 0.05、**P < 0.01

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 毒性部 室長
研究協力者 大向英夫 財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所
研究協力者 豊泉友康 財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所
研究協力者 小野 宏 財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨

Diethylstilbestrol (DES) の新生児投与による C57BL/6J マウスを用いた一生涯試験を実施し, Sprague-Dawley ラットを用いた一生涯試験の結果と比較した。マウス一生涯試験においても, 遅発性の性周期異常や抗体産生能の低下, 生存日数の短縮といったラット一生涯試験と類似の変化が観察され, 異種動物において DES の内分泌攪乱作用が再現された。しかし, マウス一生涯試験では, 性成熟の遅延や体重増加などラット一生涯試験とは異なる DES 投与の影響も観察された。

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, 生殖器系の発達と老化に関しては, 春機発動, 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, より重要である。そこで, 本研究ではエストロゲン活性を有する化学物質をマウス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, 化学物質の内分泌攪乱性を確定する試験法として期待されている「げっ歯類を用いた一生涯試験」の確立のための情報提供を目的とした。

B. 研究方法

Diethylstilbestrol (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 日間, 1 日 1 回強制経口投与し, 以下の検査を行った。

【体重推移】生後 1 日から 74 週齢まで体重を測定し, 体重推移を観察した。

【性成熟】雌は膣開口, 雄は陰茎包皮分離を指標にして各完成日を調べた。

【性周期】8 週齢から 54 週齢まで膣スミアを採取し, 性周期を観察した。

【器官重量】15 週齢時に雄を解剖し, 生殖器系を含む各器官の重量を測定した。

【免疫検査】20 週齢時にヒツジ赤血球に対する抗体産生能を検査した。

【生存率】生後 1 日から 110 週齢まで生死および一般状態を観察し, 生存日数を調べた。

全ての実験操作は, 「財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 動物実験に関する指針」に基づいて実施した。

C. 研究結果

体重推移は, 生後 1 日から 10 週齢まで DES 投与の影響は認められなかったが, 10 週齢以降の雌の体重が 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で対照群と比較して有意な高値を示した (Fig. 1)。

膣開口時期は、5 µg/kg 投与群で対照群より有意に遅延したが、包皮分離時期には DES 投与の影響は認められなかった(Fig. 2).

性周期観察では、5 µg/kg 投与群の全動物が観察初期から連続発情を示し、0.5 µg/kg 投与群の 80%以上の動物が 28 週齢までに遅発性の異常周期を示した(Fig. 3).

15 週齢時の雄の器官重量測定では、凝固腺が 0.005, 0.5 および 5 µg/kg 投与群、精嚢が 5 µg/kg 投与群で対照群より有意に低下した(Fig. 4).

ヒツジ赤血球に対する IgM 抗体産生能は、雄で用量依存的に低下する傾向がみられ、0.5 µg/kg 以上の投与群で有意差が認められたが、雌では対照群と DES 投与群との間に有意差は認められなかった(Fig. 5).

生存率は、雌の 0.05 µg/kg 以上の投与群において生存日数が短縮する傾向がみられた(Fig. 6).

D-E. 考察及び結論

マウスを用いた一生涯試験においても、ラット一生涯試験と同様、5 µg/kg 投与群で androgenization によると考えられる連続発情がみられた他、0.5 µg/kg 投与群で遅発性の性周期異常も観察されたことから、DES 投与による内分泌攪乱作用が異種動物においても再現されることが明らかとなった。

ラット一生涯試験で確認された DES 投与による抗体産生能の低下がマウスにおいても認められたことから、DES 投与による内分泌攪乱作用は、免疫機能にも及ぶものと推定される。

さらに、DES 投与群の雌マウスにおいては、対照群より生存日数が短縮する傾向があり、死亡例には下垂体腫瘍がみられた。ラット一生涯試験においても、5 µg/kg 投与群の雌の生存日数が対照群に比べて短縮し、下垂体腫瘍発現の早期化が認められている。

一方、ラット一生涯試験では認められなかった DES 投与による体重増加が、マウスを用いた実験で明らかとなったことから、脂肪代謝に及ぼす内分泌攪乱作用が、ラット-マウス間で違う可能性が示唆された。また、DES 投与により膣開口時期がラットでは早まり、マウスでは遅延したことから、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。

本研究ではエストロゲン活性を有する DES をマウス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た結果、雌における遅発性の体重増加、性成熟の遅延、遅発性の性周期異常、雄における抗体産生能の低下、副生殖器重量の低下などが観察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ryo OHTA, Mariko SHIROTA, Yukiko KANAZAWA, Tomoko SHINDO, Mami FURUYA, Takayuki SEKI, Hiroshi ONO, Kohichi KOJIMA, Sayaka ASAI, Gen WATANABE, Kazuyoshi TAYA: Effects of Transmaternal Exposure to Genistein in Hatano High- and Low-Avoidance Rats, *Exp Anim.* 58:471-479 (2009)

2. 学会発表

大向英夫, 太田亮, 宮原敬, 豊泉友康, 丸茂秀樹, 小野宏: 新生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, 環境ホルモン学会 第 12 回研究発表会要旨集, P155 (2009)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

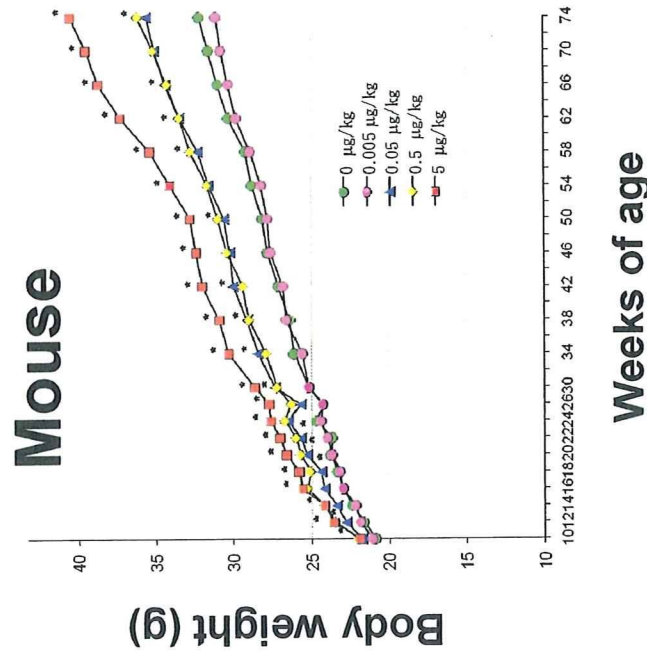
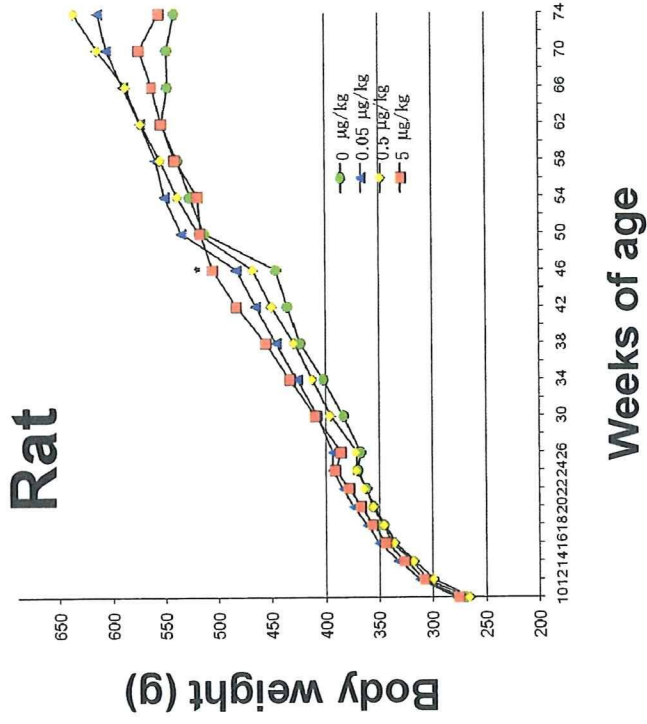


Fig. 1 Body weight of females

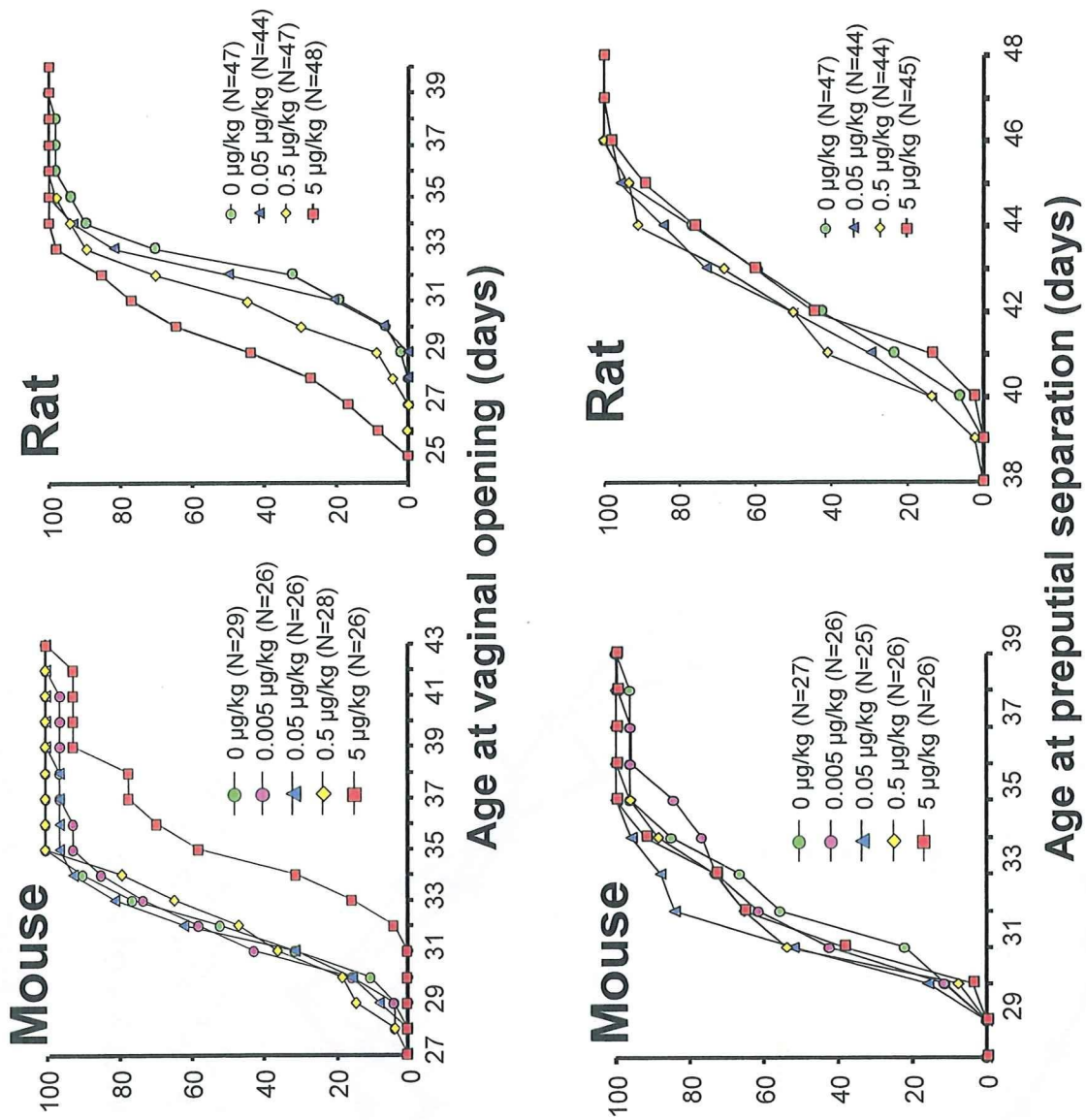


Fig. 2 Puberty of females and males

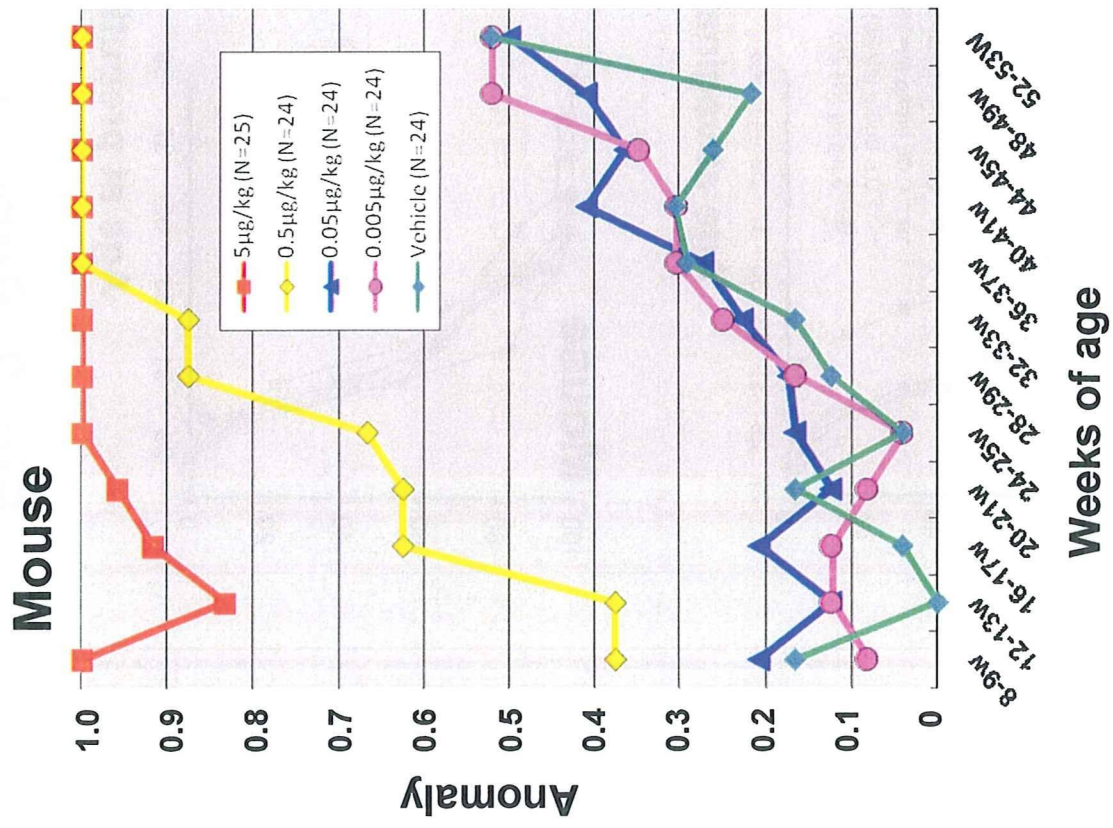
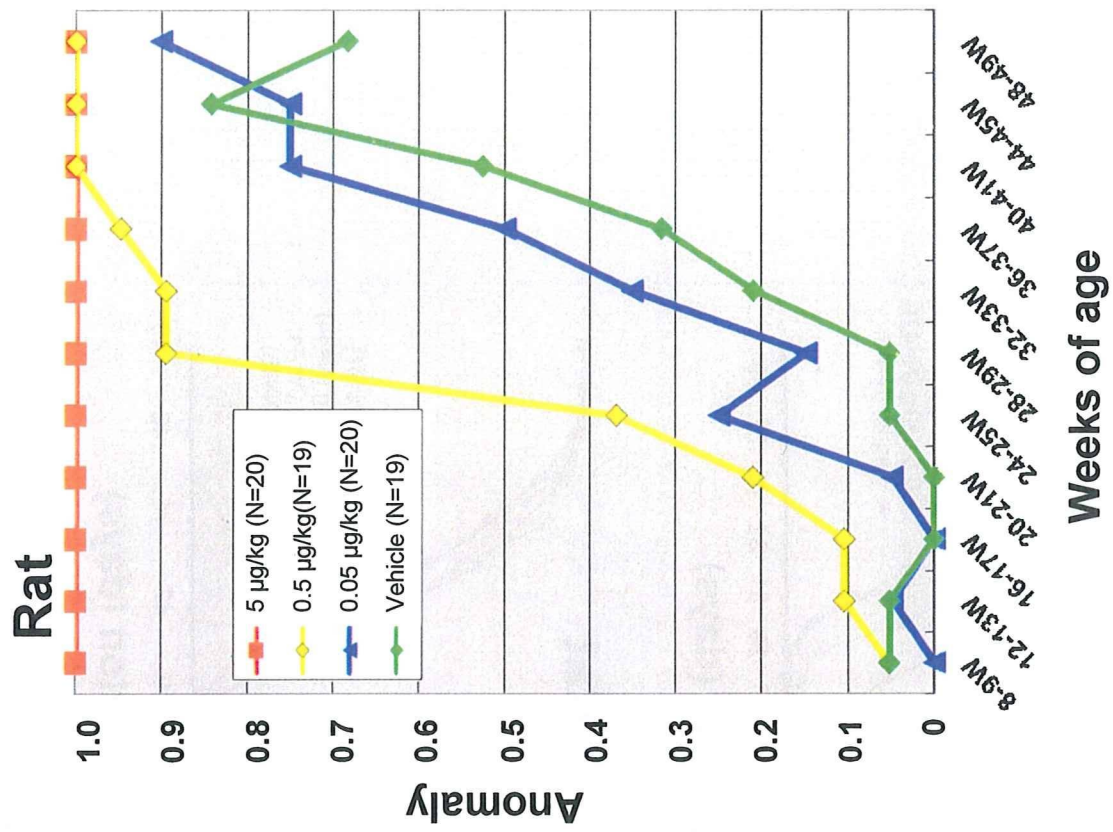
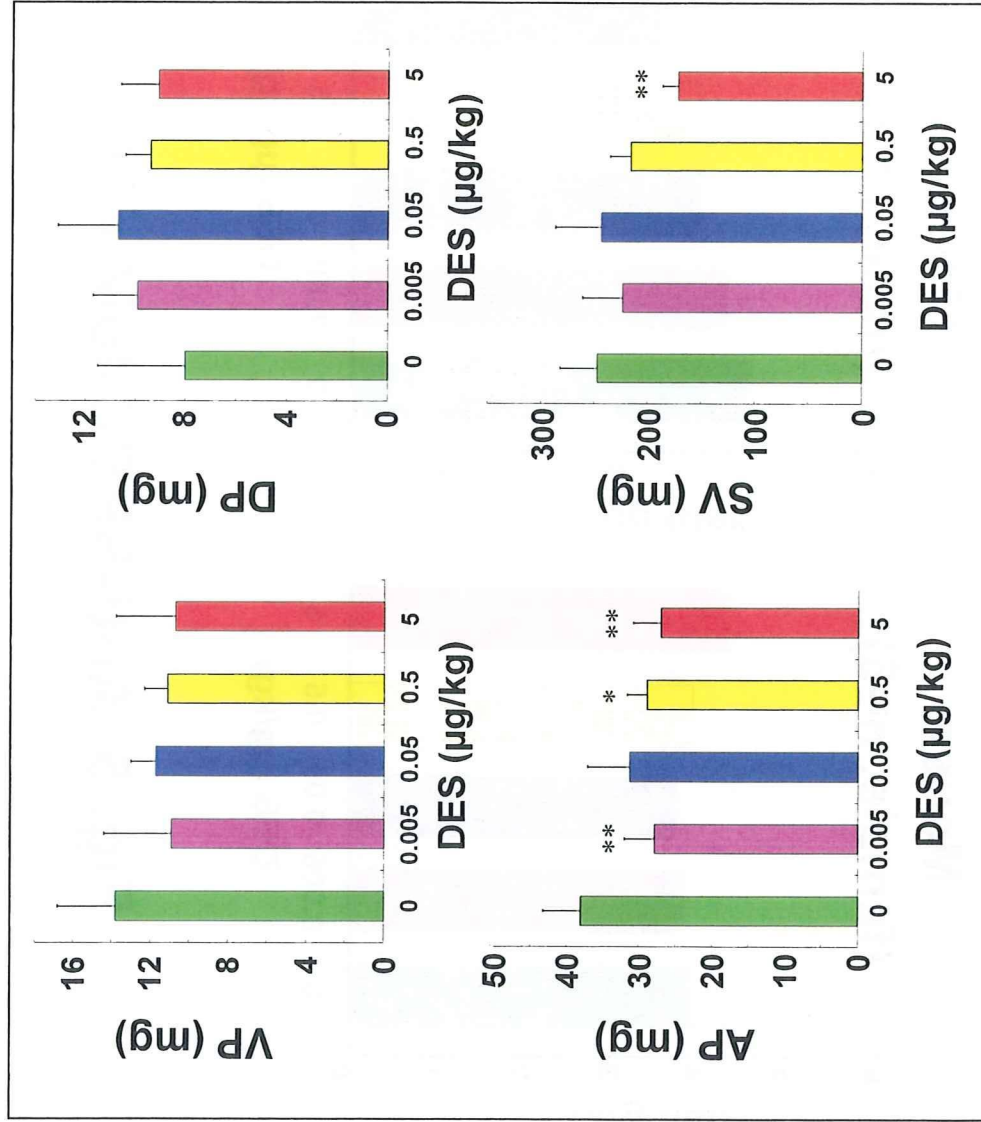


Fig. 3 Estrous cycle of females

Mouse (n=5)



Rat (n=8-10)

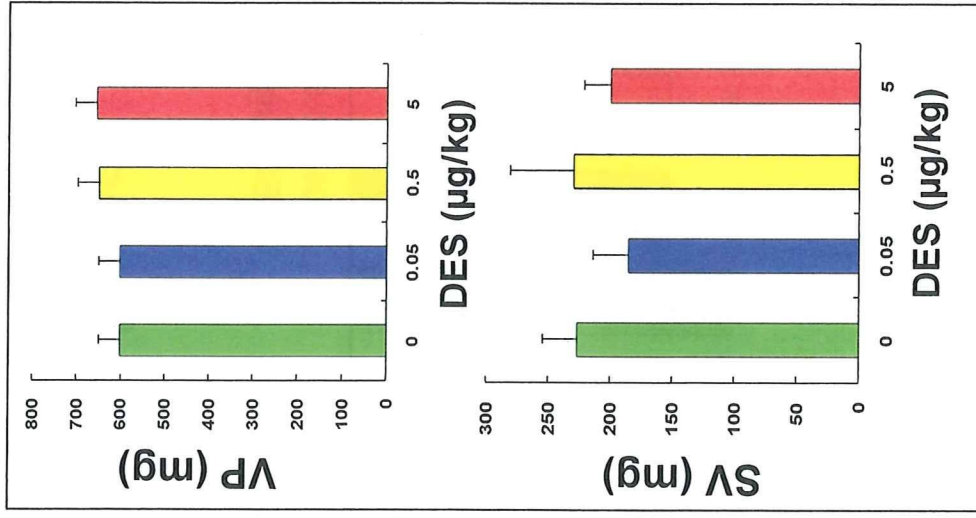


Fig. 4 Organ weights of males

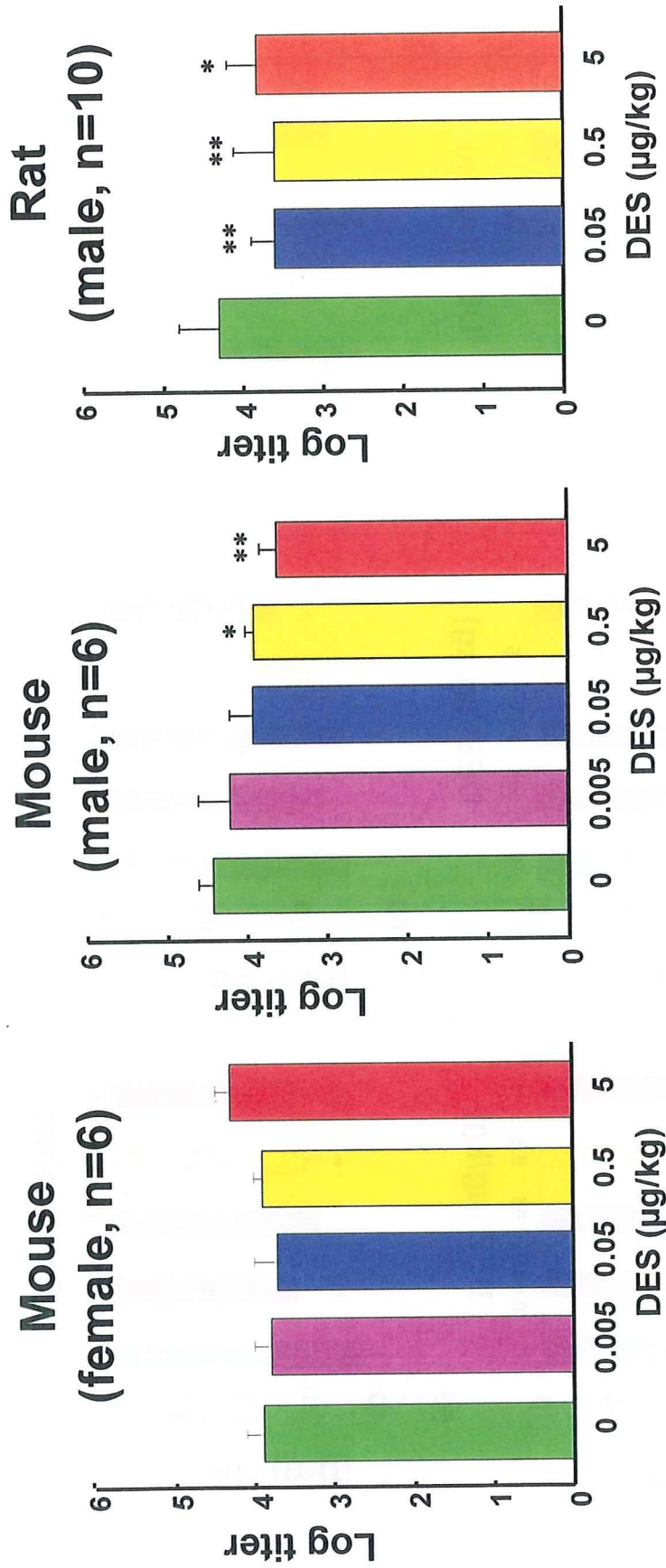


Fig. 5 Anti-SRBC-IgM of females and males