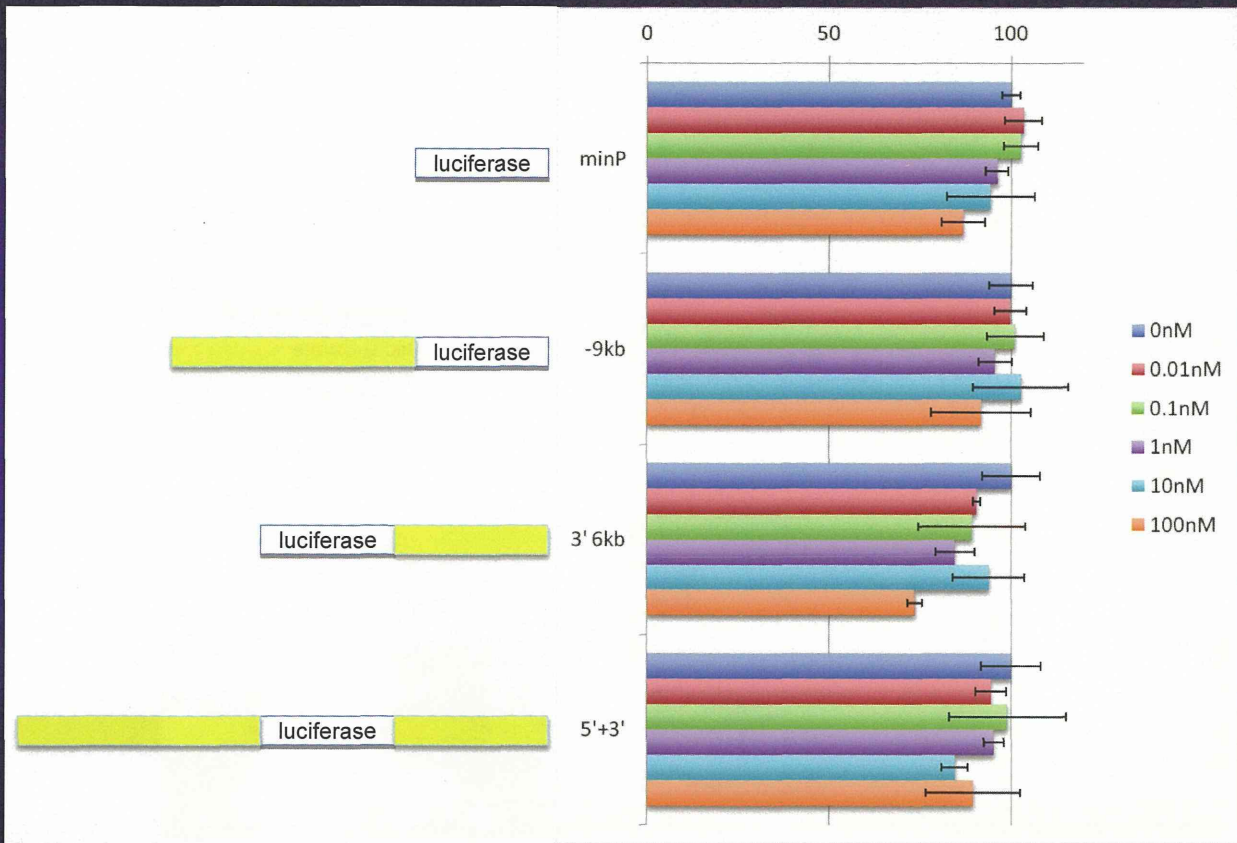
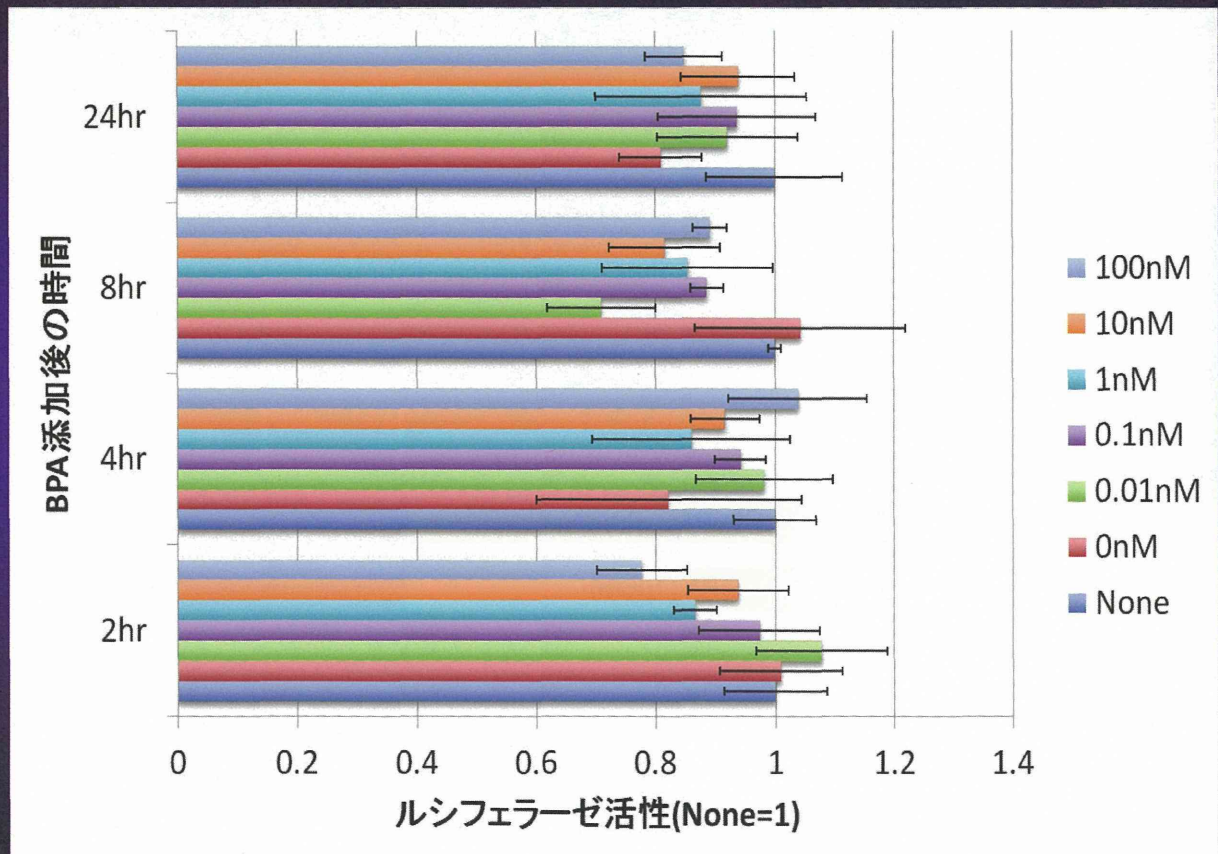


## Cos-7細胞を用いたルシフェラーゼアッセイの結果

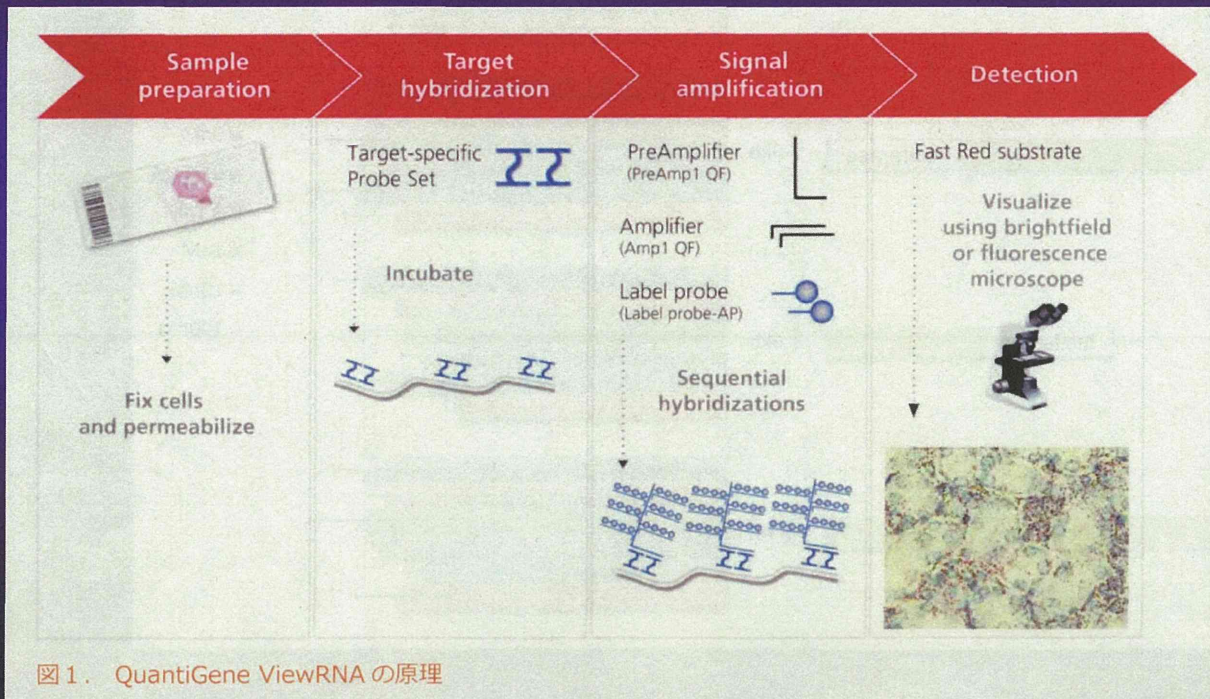


## ES細胞を用いたルシフェラーゼアッセイの結果



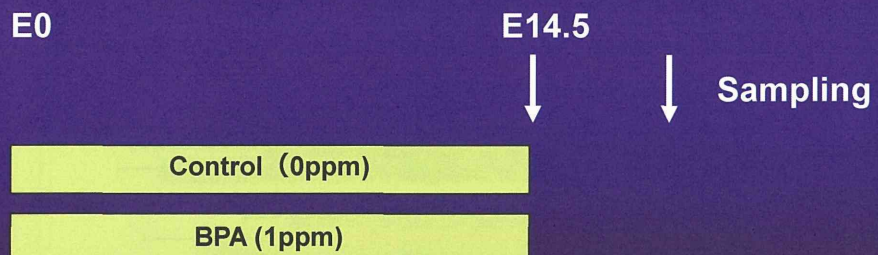
# QuantiGene View RNA ISH Tissue Assay法 (Veritas社)

特長: 1コピーのRNAを検出できる感度



## BPA投与胎児でのMalat-1発現解析プロトコール

動物: 雌C57BL/6マウス  
検体: BPA  
投与量: 0、0.1、1、10ppm  
投与方法: 飲水投与  
投与期間: 妊娠0から14.5日  
サンプリング: 妊娠14.5日  
解析: QuantiGene View法によるin situ hybridization



# 胎生14.5日のマウス胎児頭部におけるMalat-1遺伝子のin situ hybridization結果

Control



BPA 10ppm



## BPA投与胎児でのMalat-1発現解析プロトコール

動物: 雌C57BL/6マウス

検体: BPA

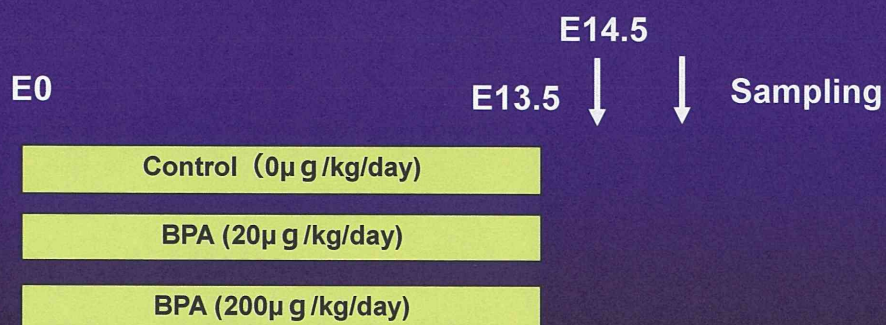
投与量: 0、20、200  $\mu$ g/kg/day

投与方法: 強制経口投与

投与期間: 妊娠0から13.5日

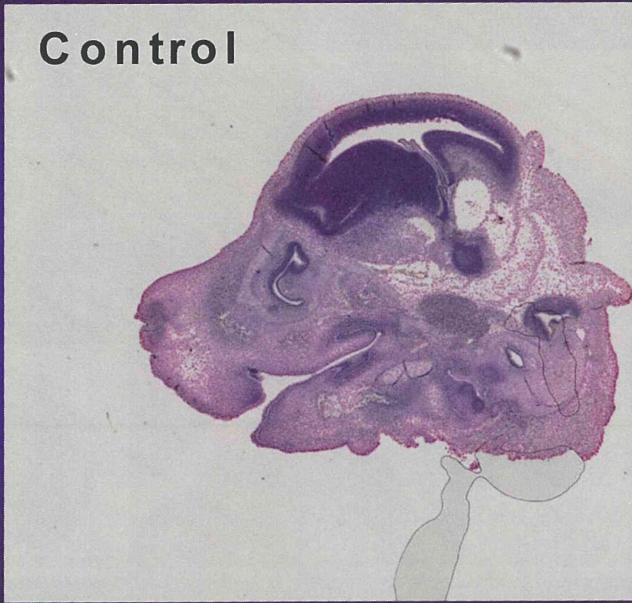
サンプリング: 妊娠14.5日

解析: QuantiGene View法によるin situ hybridization

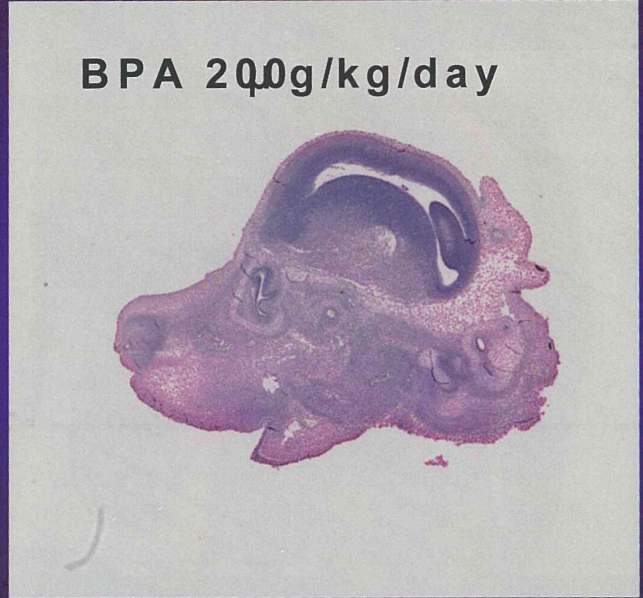


胎生14.5日のマウス胎児頭部におけるMalat-1遺伝子のin situ hybridization結果

Control

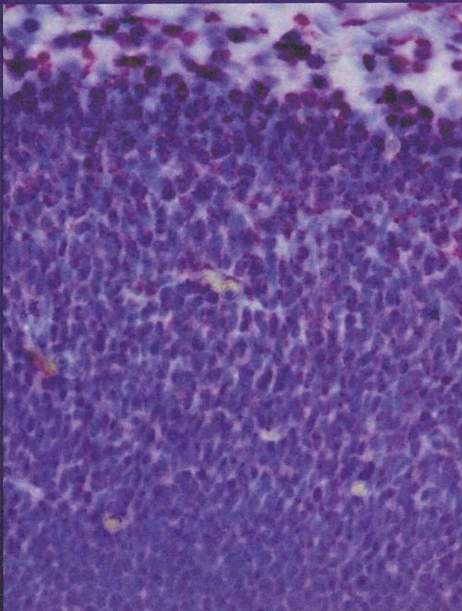


BPA 200g/kg/day

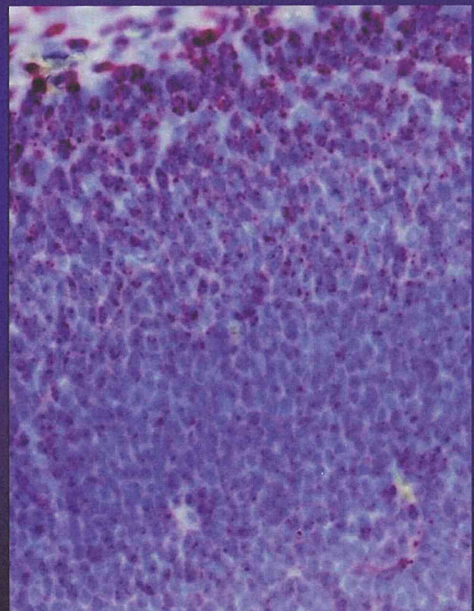


胎生14.5日のマウス胎児頭部におけるMalat-1遺伝子のin situ hybridization結果

Control



BPA 200μg/kg/day



## まとめ

1. CRISPR法によるMalat-1ノックアウトマウス作製を行いキメラマウスを得た。
2. Malat-1ホモ欠失ES細胞を用いた解析からMalat-1はBPAに対し防御的に働いている可能性が示唆された。
3. Malat-1の上流9kb、下流3.6kbを含むレポーターベクターを構築、ES細胞に導入しBPAによる反応性を検討した結果、減少傾向が認められた。
4. 妊娠期にBPAを投与し、胎生14.5日の胎児を対象にMalat-1の*in situ* hybridizationを実施した結果、本条件下では変化は認められなかった。

## 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

化学物質の子どもへの影響評価に関する研究

- 発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、

それに基づく試験スキームの最適化 -

(H23-化学-一般-002)

(平成 25 年度) 分担研究報告書

-げっ歯類一生涯試験の検証-

研究分担者 太田亮 一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 毒性部長  
研究協力者 根倉司、大向英夫、新藤智子 一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

### 研究要旨

視床下部-下垂体-性腺軸の反応性の違いを有する近交系(HAA および LAA)ラットを用いて新生児期 DES 暴露を試みた。両系の新生児に生後 1 日から 5 日までの間、1 日 1 回、0 (対照群)、0.05 あるいは 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  の DES を強制的に経口投与して、雌児の性成熟(膣開口)、体重、性周期、回避学習能力および握力の検査ならびに内分泌系器官の重量測定を実施した。その結果、膣開口時期の早期化および体重推移の上昇が LAA ラットの 0.05  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上の DES 投与群で認められた。遅発性の性周期異常は、HAA および LAA ラットとも 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群で認められた。その他、下垂体および副腎の重量増加が HAA および LAA ラットとも 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群でみられたが、DES 投与による回避学習能および握力への影響は、HAA および LAA ラットとも認められなかった。以上の結果から、新生児期 DES 暴露の影響は性成熟、体重推移、性周期および内分泌系の器官重量にみられ、性成熟および体重への影響は視床下部-下垂体-性腺軸の反応性に依存することが示唆された。

### A. 研究目的

本研究は「化学物質の子どもへの影響評価に関する研究-発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、それに基づく試験スキームの最適化-(H23-化学-一般-002)」の一環として、げっ歯類一生涯試験の検証を目的に実施した。これまでの研究から、ジェチルスチルベストール(DES)を新生児期に強制経口投与したラットあるいはマウスでは、遅発性の性周期異常を誘発することが明らかになったが、その発生時期にはバラツキがみられた。そこで、本研究では視床下部-下垂体-性腺軸(HPG 軸)の反

応性が異なる 2 種の近交系ラットに着目し、一生涯試験を試みた。試験には、Hatano 高および低回避(HAA および LAA)ラットを使用した。Hatano ラットは能動的回避学習試験の成績によって Sprague-Dawley 系から分離されたラット亜系統であるが、LAA ラットと HAA ラットの間には膣開口時期の違いや性周期の型の違いなど、HPG 軸の発達あるいは反応性に関連した違いがある。そこで、両系の新生児に低用量の DES を暴露し、DES の遅発性影響が遺伝的要因に左右されるか否かを検証した。

## B. 研究方法

### 1. 投与物質

ジエチルスチルベストロール(略称:DES、CAS 番号:56-53-1、純度:99.5%、ロット番号:096K1041、入手先:シグマアルドリッチジャパン株式会社)

### 2. 使用動物

HAA/FDSC ラット、LAA/FDSC ラット(入手先:食品薬品安全センター秦野研究所、使用数:妊娠雌 HAA 14 匹、LAA 16 匹、群数:3 群×2 系統)

### 3. 飼育条件

温度 21.0~25.0°C、湿度 40.0~75.0%、明暗サイクル 7 時点灯、19 時消灯の条件下で、床敷としてペーパークリーン(日本エスエルシー社)を入れたラット用繁殖ケージ(350W×400D×180H mm)に収容した。固型 CE-2 (PLD)および水道水(秦野市水道局給水)を自由摂取させた。

### 4. 動物愛護

全ての実験操作は、「一般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」に基づき実施した(動物実験承認番号:1120312A)。

### 5. 投与方法

投与量および群構成は以下の通りで、生後 1 日から 5 日まで 1 日 1 回、マイクロシリンジおよび新生児用胃管を用いて投与物質を強制的に経口投与した。

系統	投与物質	投与量(μg/kg)	投与容量(mL/kg)
HAA	コーン油	0	10
HAA	DES	0.05	10
HAA	DES	0.5	10
LAA	コーン油	0	10
LAA	DES	0.05	10
LAA	DES	0.5	10

### 6. 試験操作・検査・測定

- 1) 哺育児体重:哺育 1~5(毎日)、7、14、21 日に腹ごとの体重を測定した。
- 2) 同腹児数の調整:哺育 1 日に健康な雌を優先して残り、最大でも 10 匹を超えないように調整した。

3) 離乳:哺育 22 日に母動物から雌児のみを離乳させ、以下の検査に供した。

4) 一般状態:毎日 1 回観察した。

5) 体重:3 週齢から 10 週齢時まで毎週 1 回、10 週齢以降は隔週 1 回、24 週齢から 52 週齢までは 4 週間毎に測定した。

6) 性成熟:生後 25 日から膣開口の有無を毎日観察し、完成日に体重を測定した。

7) 性周期:8 週齢から 2 週間間隔で連日 2 週間、膣スメア標本を作製し、37 週齢まで性周期を観察した。

8) 能動的回避学習試験:49 または 50 週齢時に、シヤトルボックス能動的回避反応装置(TK-401L、ユニコム)を用いて回避学習試験を実施した。

9) 握力検査:50 週齢時にラット・マウス用握力測定装置(MK-380CM/R、室町機械)を用いて握力測定を実施した。

10) 剖検:52 週齢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、剖検した。その際、下垂体、副腎および卵巣の重量を測定した。

## C. 研究結果

性成熟の観察(Fig.1)では、0.05 μg/kg 以上を投与した LAA ラットの膣開口時期が同系統の対照群と比較して有意に早まった。HAA ラットでは膣開口の時期に DES 投与の影響は認められなかった。体重測定(Fig.2)では、0.05 および 0.5 μg/kg 群の LAA ラットの体重が同系統の対照群より高値を示したが、HAA ラットの体重推移には、DES 投与の影響はみられなかった。性周期の観察(Fig.3)では、遅発性の性周期異常が HAA ラットおよび LAA ラットとも 0.5 μg/kg 群で認められた。能動的回避学習試験(Fig.4)では、回避学習に系統差は認められたが、DES 投与の影響は認められなかった。握力測定では、両系統とも DES 投与の影響は認められなかった。器官重量の測定(Fig.5)では、下垂体および副腎の重量の有意な増加が、HAA およ

びLAAラットとも0.5 µg/kg群で認められた。その他、卵巣重量の有意な増加がLAAラットの0.05 µg/kg群で認められたが、用量に依存した変化ではなかった。

#### D. 考察・結論

子どもの発達期における化学物質の低用量暴露が、成長後の性周期、体重推移、学習能に及ぼす「遅発影響」を検証するために、0.05または0.5 µg/kgのDESをHAAラットおよびLAAラットの新生児期に強制経口投与した。0.5 µg/kg群のHAAラットおよびLAAラットに遅発性の性周期異常が観察された。以前、新生児期に0.05～5 µg/kgのDESをSDラットに経口投与した一生涯試験においても0.5 µg/kg群の雌ラットに遅発性の性周期異常が観察されていることから、新生児期のDES暴露により誘発される性周期異常は、ラットの遺伝的要因に関係なく発現する変化と推察された。一方、LAAラットの0.05 µg/kg以上の群に体重増加が観察されたが、DESを投与したSDラットやHAAラットでは体重増加が認められていないことから、新生児期DES暴露の体重への影響は、遺伝的要因に左右されるものと推察された。今回の研究では性成熟の観察において、LAAラットにのみDES投与による早熟が認められた。したがって、DES暴露の性成熟への影響も、遺伝的要因に左右されるものと考えられ、HPG軸の発達の違いに依存しているものと推察された。能動的回避学習試験および握力測定では、両系統ともDES投与の影響は認められなかったことから、本研究で用いたDESの用量では、学習能および筋力への影響はないものと考えられる。本研究では、下垂体および副腎の重量の有意な増加が、HAAおよびLAAラットとも0.5 µg/kg群で認められた。以前実施した新生児期にDESを投与したSDラットにおいても下垂体重量の有意な増加が0.05 µg/kg以上、副腎重量の有意な増加が0.5 µg/kg以上の用量で認められていることから、内分泌系の器官重量は、化学物質の低用量影響を評価する上で有用な指標の一つになると考えられた。

#### G. 発表論文、学会発表

##### 2. 学会発表

太田亮, 根倉司, 大向英夫, 新藤智子: Hatano高および低回避雌ラットの性成熟, 性周期および体重推移に及ぼす新生児期ジエチルスチルベストール暴露の影響. 環境ホルモン学会第16回研究会発表会(2013)



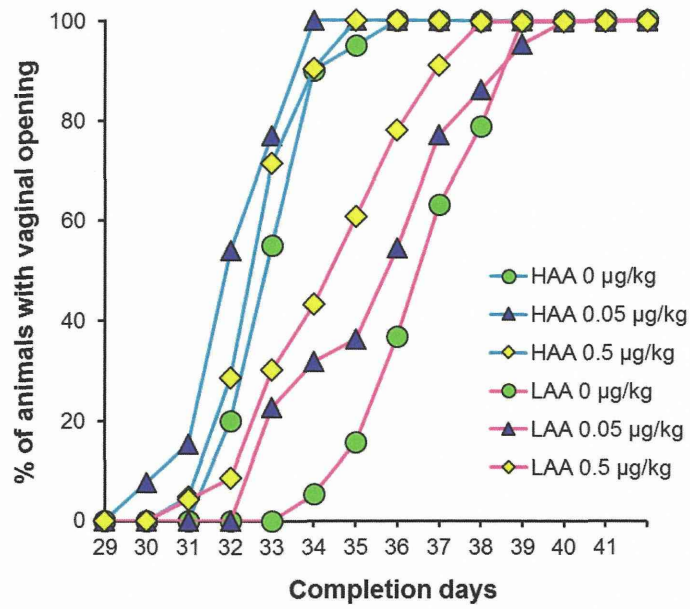


Fig. 1 Effects of neonatal DES exposure on puberty in HAA & LAA rats

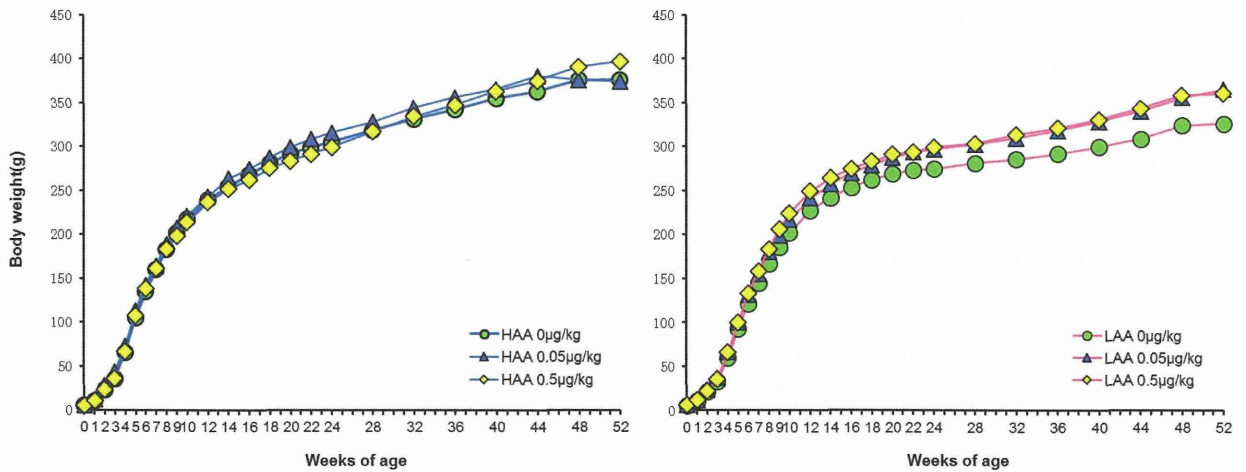


Fig. 2 Effects of neonatal DES exposure on body weight change in HAA & LAA rats

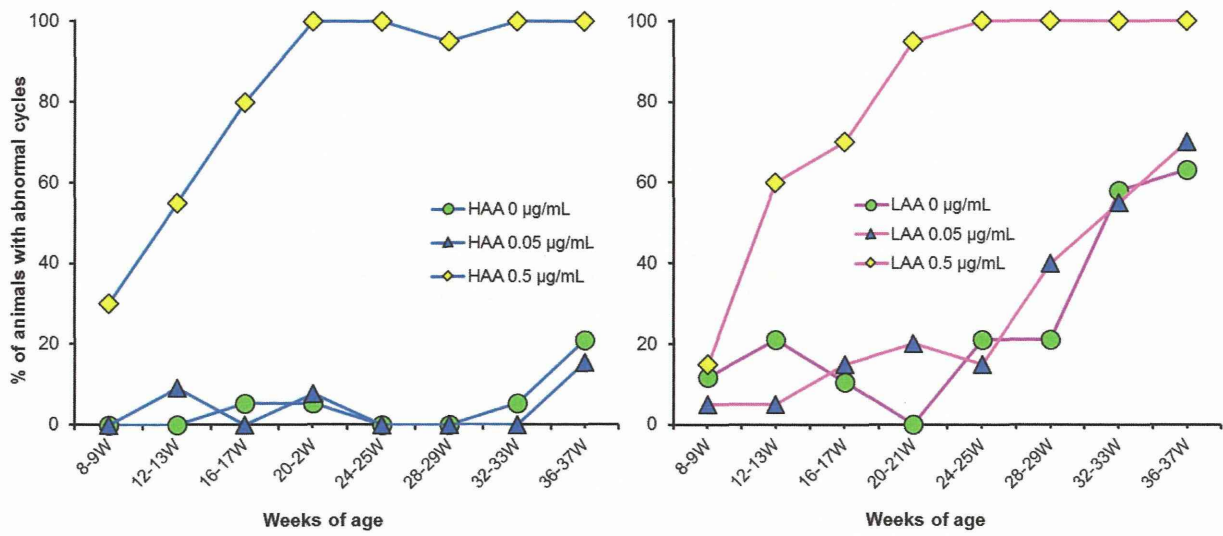


Fig. 3 Effects of neonatal DES exposure on estrous cycle in HAA & LAA rats

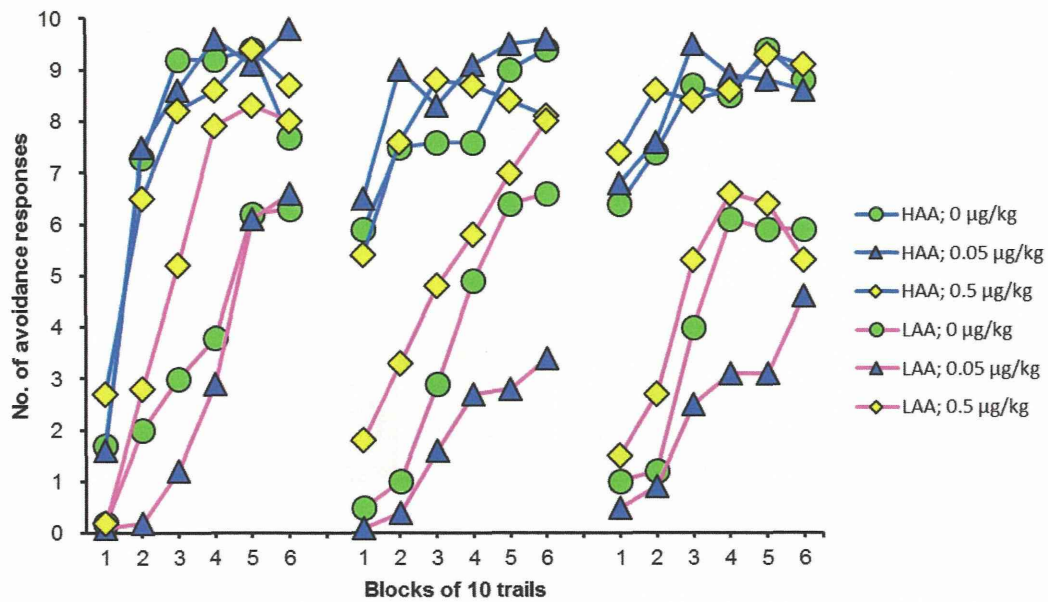
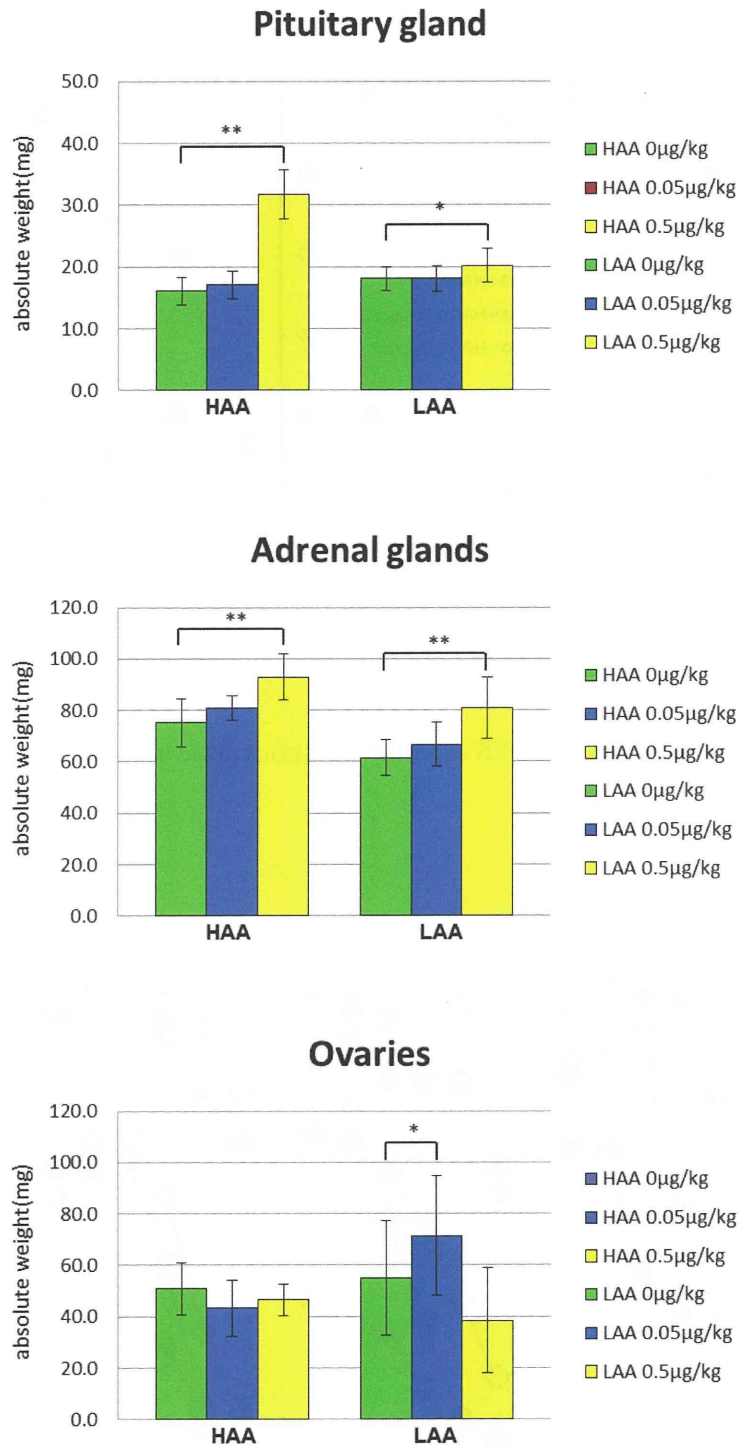


Fig. 4 Effects of neonatal DES exposure on avoidance learning in HAA & LAA rats



**Fig. 5** Effects of neonatal DES exposure on weights of pituitary gland, adrenal glands and ovaries in HAA & LAA rats

平成25年度厚生労働科学研究費補助金  
(化学物質リスク研究事業)  
(分担)研究報告書

化学物質の子どもへの影響評価に関する研究  
-げっ歯類一生涯試験の検証-

分担研究者 太田亮、根倉司、大向英夫、新藤智子

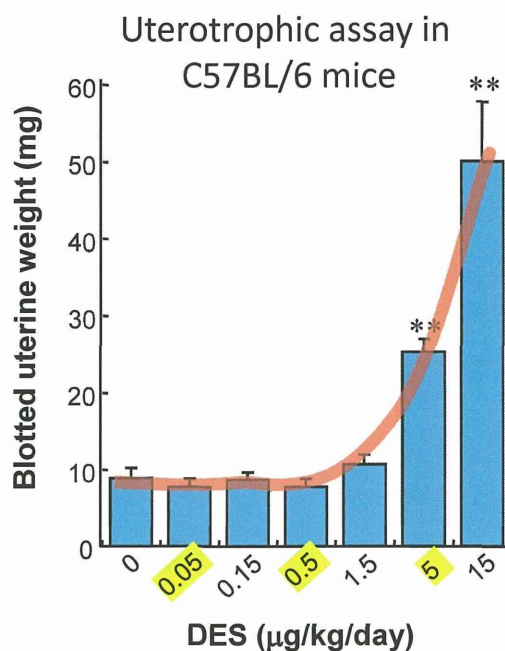
(一財)食品薬品安全センター秦野研究所

## 主な内容

1. 新生児期ジエチルスチルベストロール  
暴露が及ぼす雌動物への影響
2. Hatano高および低回避ラットの特徴
3. Hatanoラットを用いた新生児期DES暴露  
の影響

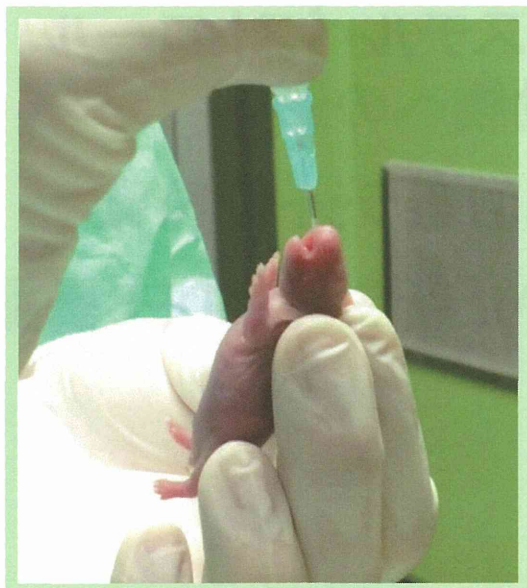
# 新生児期DES暴露実験

- |              |   |
|--------------|---|
| 1) 動物種、系統    | SDラット、C57BL/6マウス                              |
| 2) 投与物質、経路   | DES、強制経口                                      |
| 3) 投与量       | 0.05、0.5、5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ |
| 4) 動物数       | 20 匹以上/群                                      |
| 5) 投与時期      | 生後1日～生後5日                                     |
| 6) End point | 性成熟、性周期、体重など                                  |

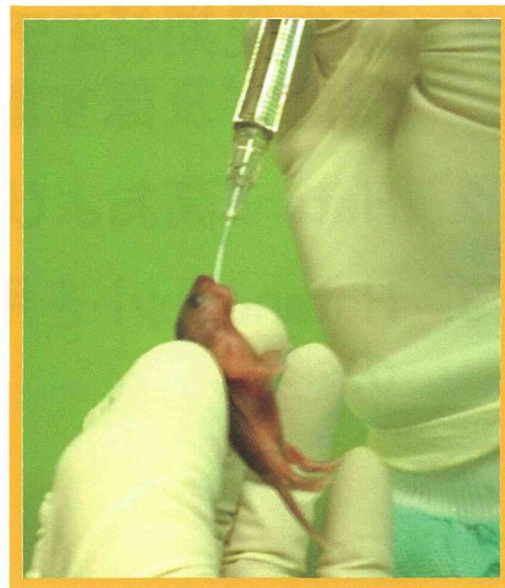


## 新生児期の経口投与

- 利点 ① 親動物の影響を受けにくい。  
 ② 正確な量を投与できる。  
 ③ 児舐めによる影響を受けにくい。



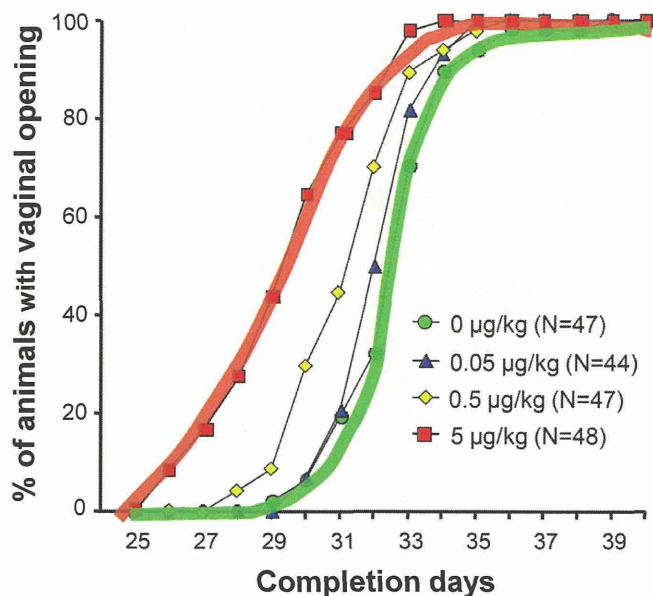
ラット新生児への投与



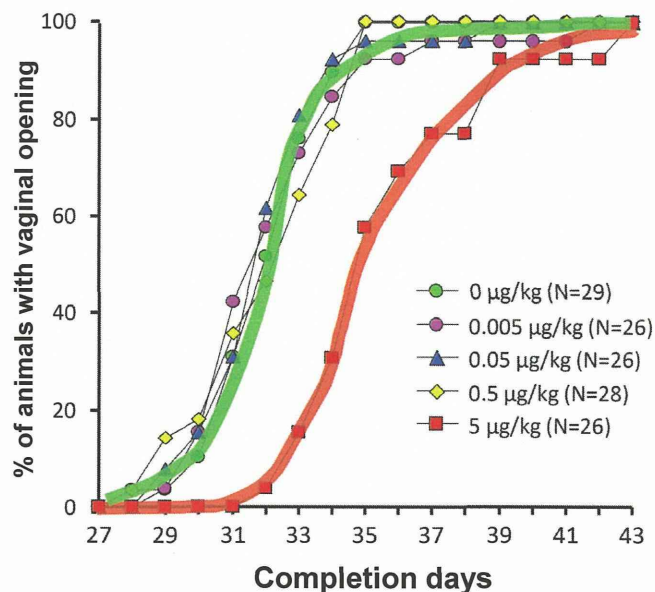
マウス新生児への投与

# 性成熟への影響

Effects of neonatal DES exposure on puberty in **female rats**



Effects of neonatal DES exposure on puberty in **female mice**



## Hatano高および低回避ラット



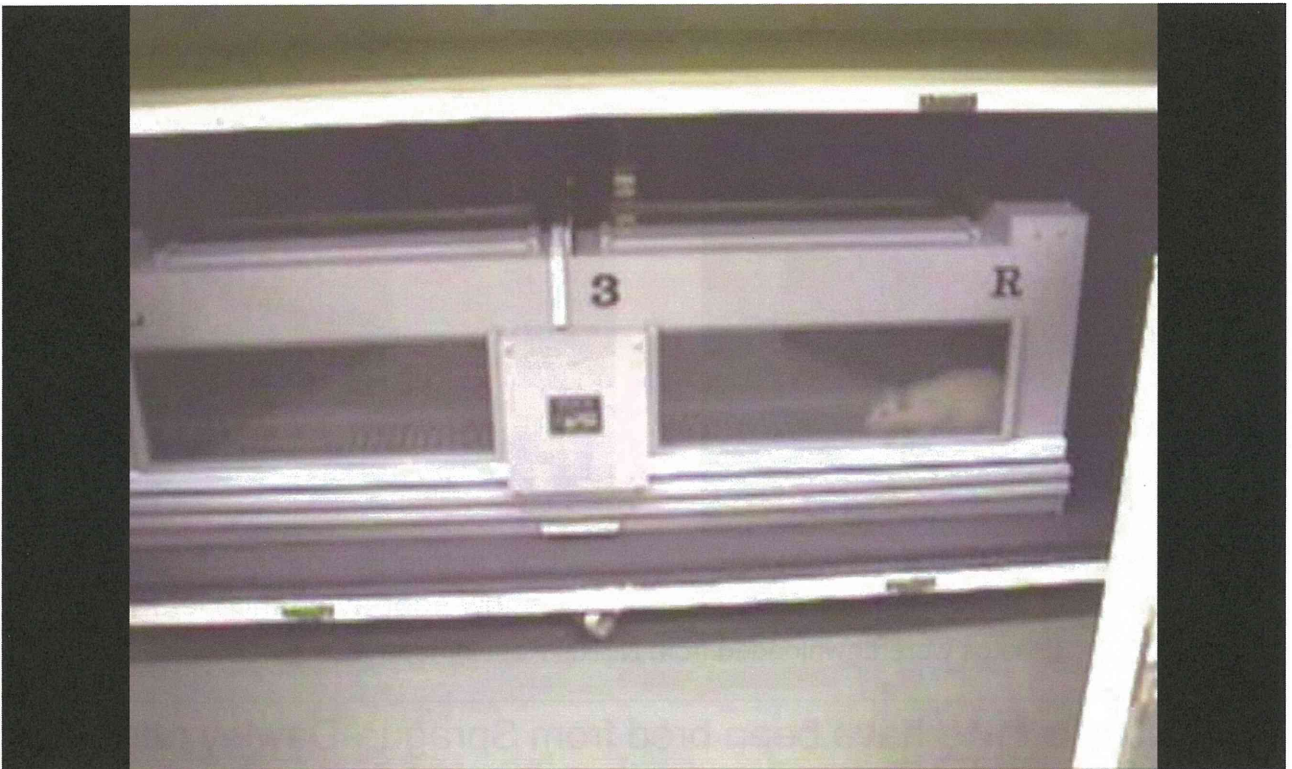
High active avoidance (**HAA**) rats show good avoidance learning.

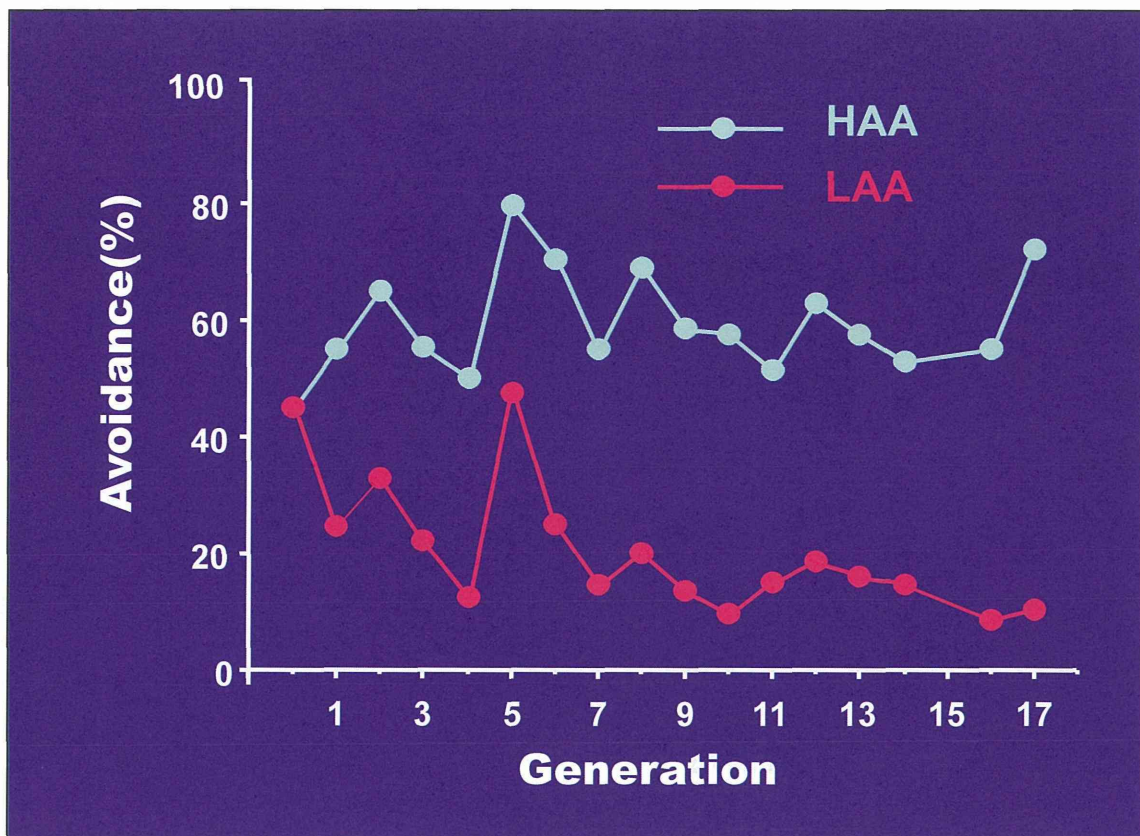
(Photos were downloaded from NBRP-Rat Homepage.)



Low active avoidance (**LAA**) rats show poor avoidance learning.

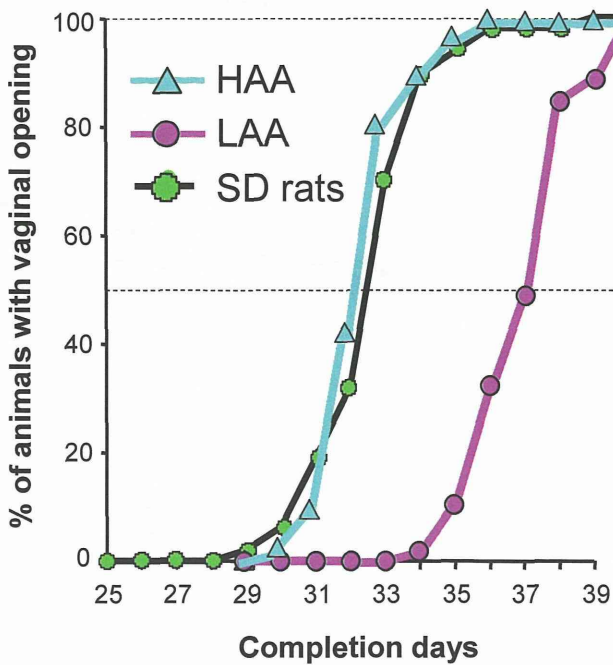
**Hatano rats** have been bred from Sprague-Dawley rats on the basis of their avoidance learning in a shuttle-box task.



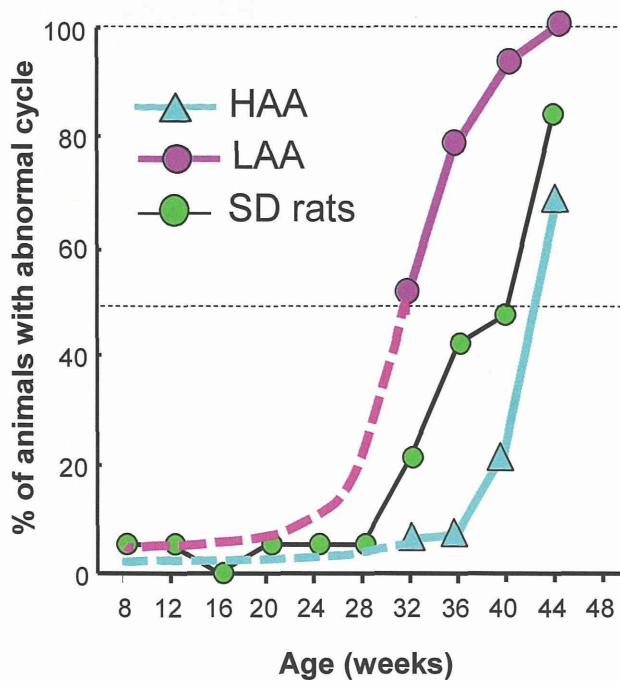


## Hatanoラットの性成熟と性周期

Vaginal opening in Hatano rats



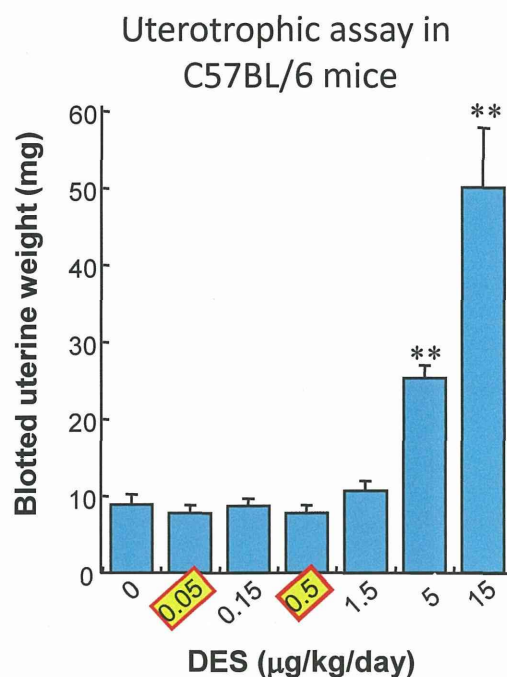
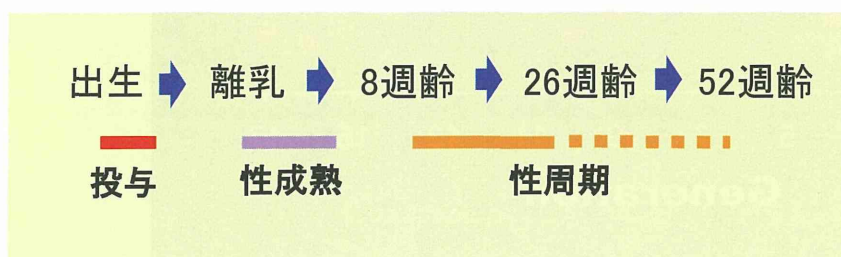
Estrous cycle in Hatano rats





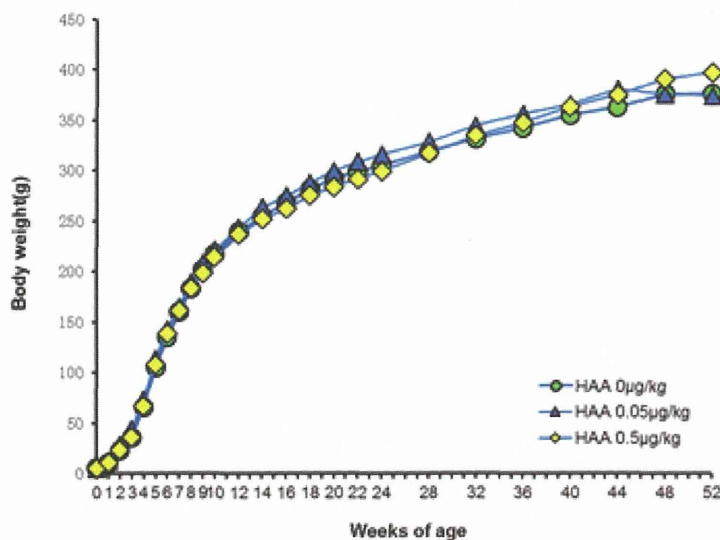
# 新生児期DES暴露実験

- 1) 動物種、系統 **HAAラット、LAAラット**
- 2) 投与物質、経路 DES、強制経口
- 3) 投与量 **0.05、0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$**
- 4) 動物数 20 匹以上/群
- 5) 投与時期 生後1日～生後5日
- 6) End point 性成熟、性周期、体重など

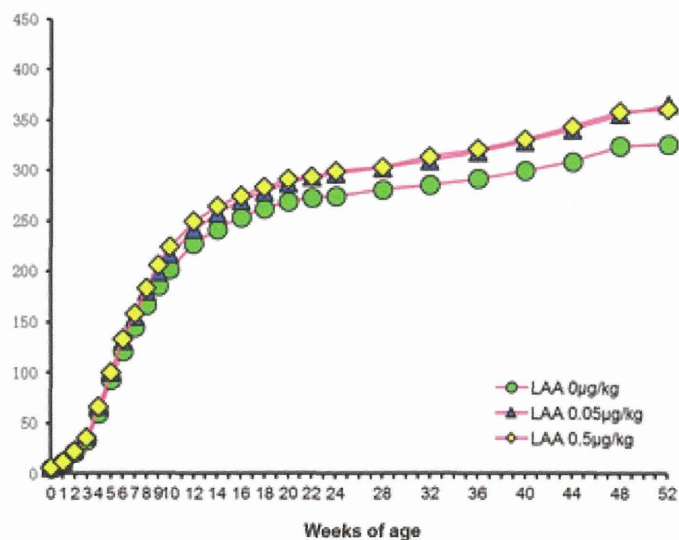


## 体重への影響

Effects of neonatal DES exposure on body weight in **HAA rats**

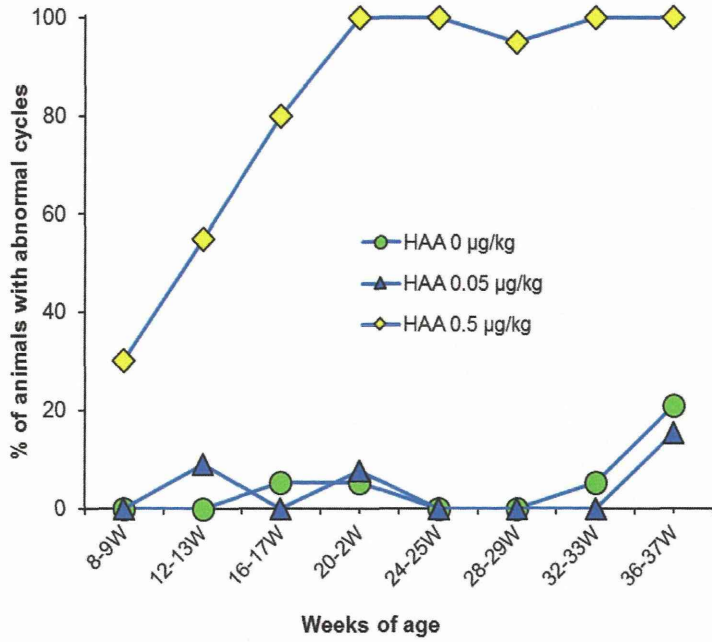


Effects of neonatal DES exposure on body weight in **LAA rats**

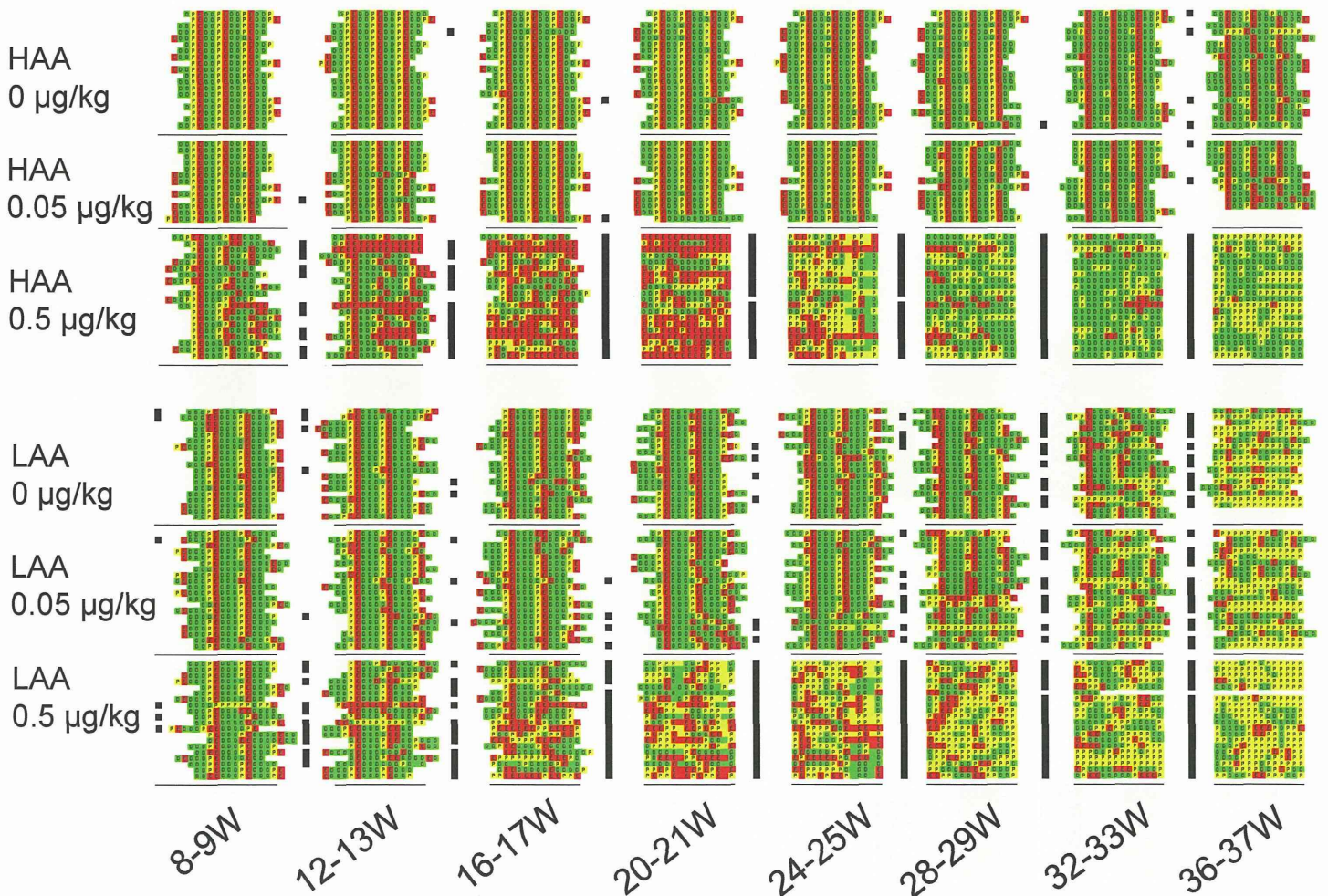
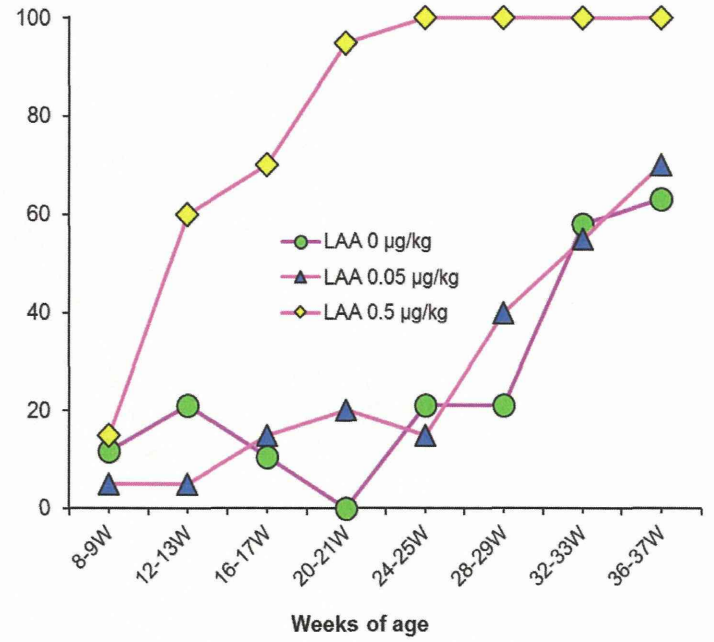


# 性周期への影響

Effects of neonatal DES exposure on estrous cycle in **female HAA rats**

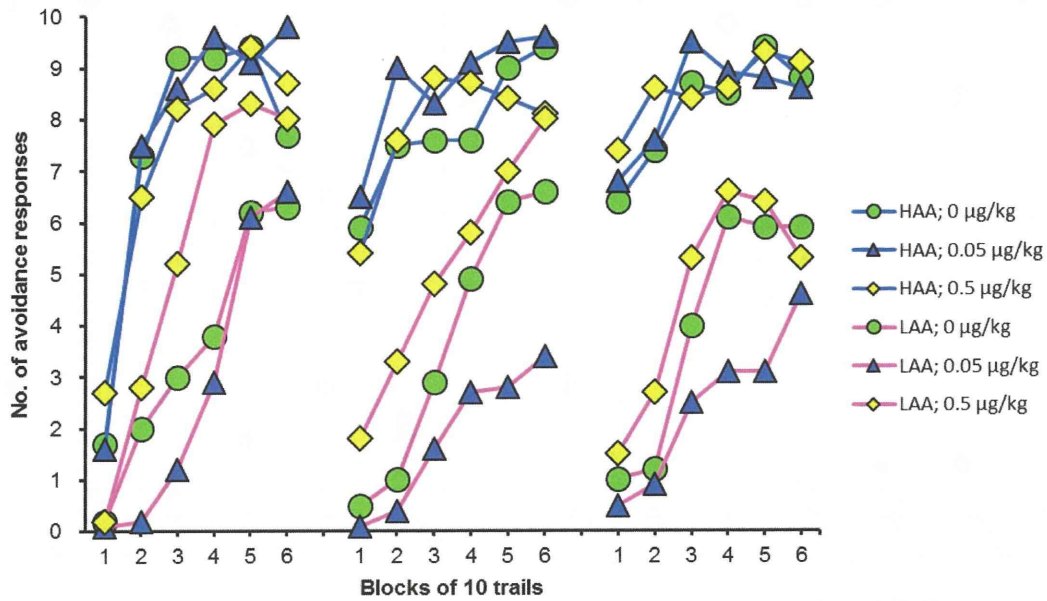


Effects of neonatal DES exposure on estrous cycle in **female LAA rats**



# 回避学習への影響

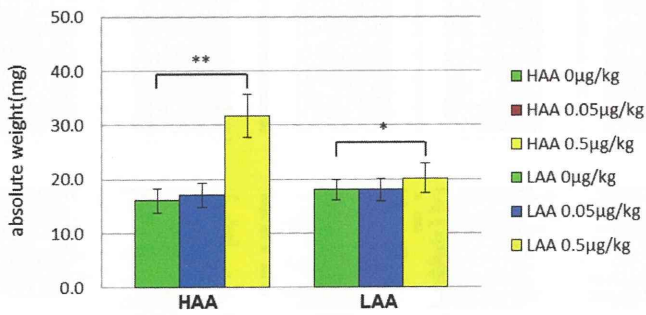
Effects of neonatal DES exposure on Shuttle-box avoidance learning in HAA & LAA rats



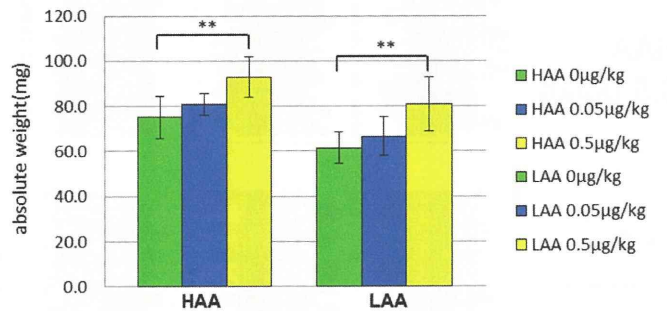
# 器官重量への影響

Effects of neonatal DES exposure on organ weight in HAA & LAA rats

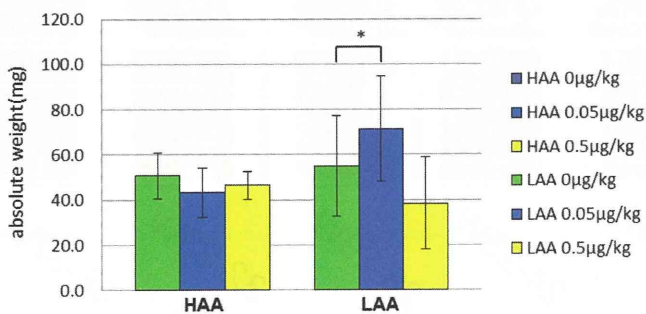
Pituitary gland

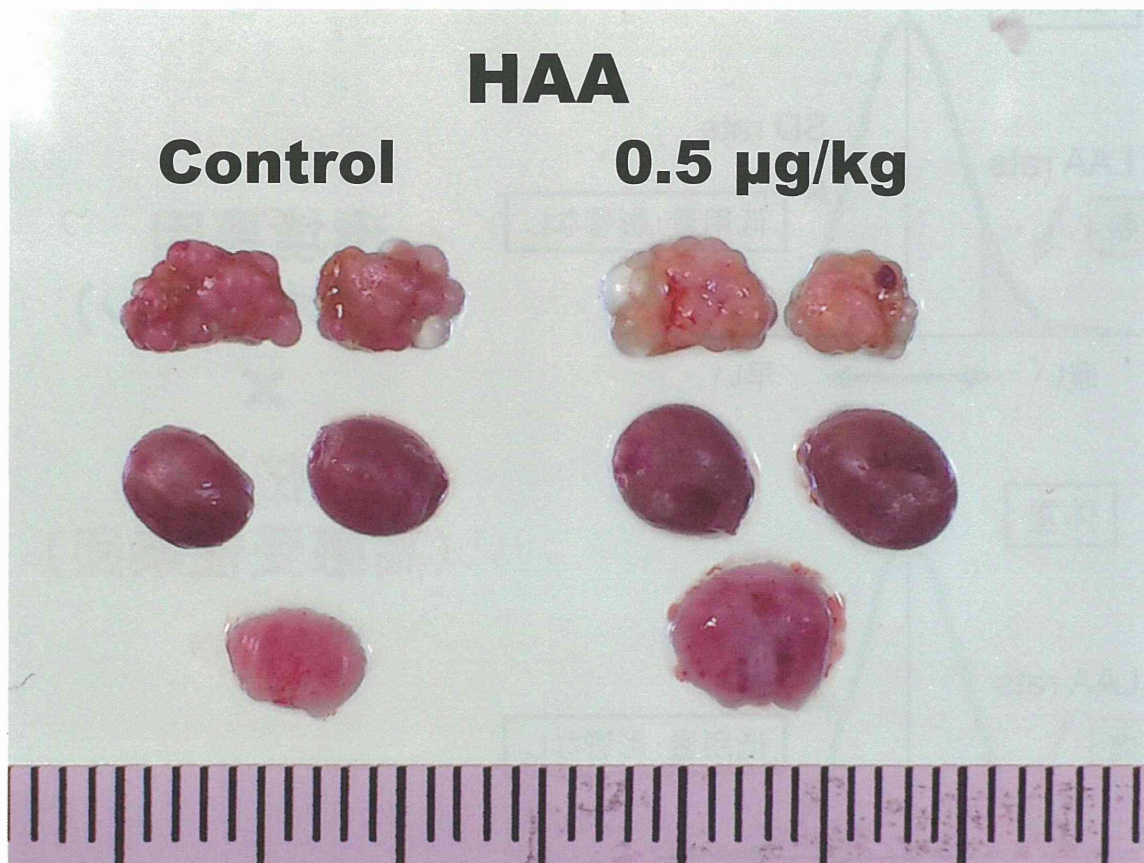


Adrenal glands



Ovaries





## 新生児期DES暴露実験における低用量影響

用量 (µg/kg)	HAA rats			LAA rats			SD rats			C57BL/6 mice			
	0.05	0.5	5	0.05	0.5	5	0.05	0.5	5	0.005	0.05	0.5	5
<b>性成熟</b>													
膣開口の早熟/遅延	—	—		△	△		—	—	△	—	—	—	▽
<b>体重</b>													
肥満	—	—		△	△		—	—	—	—	△	△	△
<b>性周期</b>													
連続発情	—	—		—	—		—	—	●	—	—	—	●
遅発性の性周期異常	—	◇		—	◇		—	◇	—	—	—	◇	—
<b>器官重量 (52W)</b>													
下垂体	—	△		—	△		—	△	△				
副腎	—	△		—	△		—	△	△				

■ : 低用量域