

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

薬理学的影響に関するスクリーニング法の開発研究

分担研究者 小島 幸一（財）食品薬品安全センター 秦野研究所・中央試験管理部

研究要旨：

ラット血清中のホルモン濃度を測定するためのヒト用市販キットの有用性を検討し、かつコントロールデータを収集した。エストラジオールは現時点では、測定法に問題が多いと考えられた。性成熟期開始時期として、膣開口時期に関する背景データを収集し、これのスクリーニングへの利用の可能性を検討した。エストロゲン受容体を持つ細胞の一例として培養骨芽細胞の培養系での内分泌かく乱化学物質等の影響の検出系を検討した。

A. 研究目的

ラット血清中のホルモン濃度を測定するためのヒト用市販キットの有用性を検討する。我々の確立・検討してきた検査・検出法を利用するとともに、新たな方法の確立も視野に入れ、*in vivo* および *in vitro* の両面から、内分泌かく乱物質等の薬理学的影響を明らかにする検出系の確立に努める。

B 研究方法

1. ラット血清中ホルモン測定法の確認：ラット血清中のホルモン濃度を測定するために、測定条件の検討およびその有用性の確認を行い、一部については、コントロールデータの収集を行った。本年度は、トリヨードサイロニン (T3)、サイロキシン (T4)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、黄体形成ホルモン (LH)、プロラクチン (PRL)、テストステロン (TS)、エストラジオール (E2) 8 種の市販キットについて検討した。

2. Crj:CD(SD) 系 雌 ラ ッ ト 及 び Crj:CD(SD)IGS 系雌ラットの性成熟に至る

生殖学的値の比較：Crj:CD(SD)系雌ラット及び Crj:CD(SD)IGS 系雌ラットを、それぞれ同系統の雄ラットと交配させ、得られた妊娠動物を自然分娩させた。出生児は、出生日を 0 日齢として、原則として各母動物に雌雄あわせて 8 匹を哺育させた。生後 22 日に離乳し、雌ラットの性成熟開始の指標である膣開口の有無を 28 日齢から毎日観察した。膣の開口が認められた動物は、その日齢を記録し、体重を測定した。

3. 細胞を用いた系による骨代謝：96 穴マイクロタイタープレートに、ヒト骨肉腫由来骨芽細胞 (MG-63、SaOS-2、HOS) 及び正常骨芽細胞を蒔き ($10^4/\text{well}$)、化学物質 (本年度はフタル酸誘導体をモデル物質として主に検討、BBp, DHp, DpeP, DBP, DproP, DEHA, DEP, DCHP) を加えた培地 (フェノールレッドを含まない α MEM+10% FCS) で、2 日ないし 4 日培養し、ALP 活性 (blue-phos キット) 及び細胞数 (WST-1 法) を測定した。ALP 活性は 620 nm、細胞数は 450 nm の吸光度で表し、同一のプレートで行った化学物質無添加の対照群と比較

した。

C. 研究結果

1. ラット血清中ホルモン測定法の確認：ラット用の測定キットを用いた TSH、FSH、LH 及び PRL の測定には、特に問題はなかった。一方、ヒト用のキットを用いた T3、T4、TS および E2 ではいずれの項目においても、添加回収率はほぼ良好であった。しかし一方、T3、T4 及び TS で良好な希釈直線性が得られたのに対して、E2 では得られなかつた。さらに、E2 の測定値のレベルは、文献値の約 10 倍以上と高いものとなつた。この ELISA で性周期に伴う E2 の変化を調べたところ、発情前期に最も値が高くなり、発情期や発情後期では低くなつたことから、生体内での E2 レベルの変化は捉えられるものの、測定上の問題は残つた。E2 を除く 7 種のホルモンを、未処置の Crj:CD(SD)IGS [T3 と T4 は Crj:CD(SD)] で測定した結果、採血時期と時間、採血方法等もホルモンの測定値に重要な影響を与える因子である事が分かつた。

2. Crj:CD(SD) 系 雌 ラ ッ ト 及 び Crj:CD(SD)IGS 系雌ラットの性成熟に至る生殖学的値の比較： 膨の開口が認められた動物について、その日齢と体重を測定した結果、Crj:CD(SD) 系ラットの脣開口は 32 日齢から 41 日齢の間に認められたのに対し、Crj:CD(SD)IGS 系ラットの脣開口はそれよりやや早い 29 日齢から 40 日齢の間に認められた。平均 (\pm 標準誤差) 脣開口日齢を両系の間で比較すると、Crj:CD(SD) 系ラットは 35.4 (\pm 0.2) であるのに対して、Crj:CD(SD)IGS 系ラットは 33.3 (\pm 0.3) と有意に低かつた。しかし、脣開口日における体重については、両者で有意差は認められなかつた。今回は、背景データを得るために観

察例数を増やしたため、Crj:CD(SD) 系ラットと Crj:CD(SD)IGS 系ラットとの間で性成熟の開始時期に有意な差が認められた。

3. 細胞を用いた系による骨代謝：MG-63 の ALP 活性に及ぼす 17β E (10^{-11} ~ 10^{-5} M) の影響を示した。2 日処理では、 10^{-7} ~ 10^{-5} M で ALP 活性の低下傾向が認められたのに対して、4 日処理では増加が認められた。

フタル酸誘導体の存在下で、MG-63 を 2 日間培養した時の ALP の測定結果、 10^{-9} M の DHP 処理、 10^{-6} および 10^{-5} M の DPeP 処理、 10^{-7} M の DBP 処理で ALP 活性が上昇した。しかし、ALP 活性を抑制する物質も他に見られた。同様に、ヒト骨芽細胞を用いた時の結果、 10^{-6} および 10^{-5} M の DCHP 処理で ALP 活性の上昇が認められたが、低濃度では減少した。また、 17β E による影響は認められなかつた。一方、その他の細胞を用いた系では、現時点では、化学物質の効果に関する確たる結果は得られていない

D. 考察

ホルモン測定のため、市販キットの有効性を検討した。内分泌かく乱化学物質の影響を捉えるために有効と考えられるホルモンのうち、エストラジオールは現時点では問題が多いと考えられた。また、背景データの収集を行つた。

生殖発生毒性試験に用いられるようになつた Crj:CD(SD)IGS 系雌ラットの性成熟開始時期を、従来用いられてきた Crj:CD(SD) 系雌ラットのそれと比較検討した。性成熟開始時期に関する背景データを収集し、これらの動物のスクリーニングへの利用の可能性を検討した。その結果、両系ともに脣開口時期が長期間にわたって分布し、化学物質の生殖機

能かく乱性に関するスクリーニングにおける指標とするためには、膣開口時期の揃った系統をさらに検索する必要があると考えられた。

ヒト培養骨芽細胞に及ぼす 17β E の影響を適切に捉えることがこの評価での重要なポイントとなるが、現時点では十分ではなく、さらに実験条件をつめる必要がある。予備的にフタル酸誘導体の影響を比較検討し、興味ある結果も得られたので、より一層実験条件の確立に努め、内分泌かく乱化学物質等の影響の検討に移りたい。

今回は、背景データを得るために観察例数を増やしたため、Crj:CD(SD) 系ラットと Crj:CD(SD)IGS 系ラットとの間で性成熟の開始時期に有意な差が認められた。しかし、いずれの系も 10 日以上に及ぶ長い期間に亘って膣開口日齢が分布しているため、観察例数の減少は感度の著しい低下に繋がり、有意差の検出は困難になるものと危惧される。また、化学物質の影響を評価するためには、これらの背景データの観察期間よりもさらに長い期間に亘って膣開口の有無を観察する必要も生ずることがあるといえる。従って、膣開口時期を化学物質の生殖機能かく乱性に関するスクリーニングにおける指標とするために

は、こうしたばらつきの大きな動物より、少數例でも性成熟日齢の変動が検出できる、膣開口時期の揃った動物を使用する必要があるものと考えられた。

一方、細胞を用いた骨代謝への影響を検討したが、その結果、特に MG-63 細胞を用いた系では、4 日処理で、細胞数の減少傾向も認められたことから、個々の細胞の機能の亢進が考えられた。しかし、2 日処理の結果との間に相違があること、4 日処理では途中の培地交換による影響を考慮する必要があることなど、再現性の確認も含めて、さらに条件設定のための検討が必要である。

E. 結論

ヒト正常骨芽細胞及びエストロジエン受容体の存在が明らかにされているヒト骨肉腫由来の MG-63 細胞を用いてエストロジエンの骨代謝に及ぼす影響を検討したが、培養中に 17β -エトラジオールあるいはフタル酸エステル誘導体を添加しても細胞数および培養液中のアルカリホスファターゼ活性に変化は認められなかった。