

研究費の名称=厚生科学研究費

研究事業名=生活安全総合研究事業

研究課題名=28 日間反復投与試験等に関する調査研究(H10-生活-504)

国庫補助金精算所要額=229,000,000

研究期間(年度)=1998

主任研究者名=広瀬雅雄(国立医薬品食品衛生研究所)

分担研究者名=井上達(国立医薬品食品衛生研究所)、菅野純(国立医薬品食品衛生研究所)、山崎寛治((財)化学品検査協会化学品安全センター)、藤井治((株)三菱化学安全科学研究所)

研究目的=内分泌かく乱化学物質(EDCs)の in vivo スクリーニング法開発と安全性評価を目的とした国際共同バリデーションプロジェクトに参加することを目的として、1)既知の非ステロイド性抗アンドロゲン作用物質の Flutamide および合成男性ホルモンである Methyltestosterone (MT)を用いたラット 28 日間反復投与毒性試験、2) 子宮重量等を指標とした生体試験を実施した。以って、3)生体試験による相加・相乗効果の検討を行った。

研究方法=1)28 日間反復投与毒性試験:7週齢の Crj:CD (SD) IGS 系ラット雌雄各 80 匹を 1 群 10 匹の各 8 群に分け強制経口投与した。雄は投与回数を 28 回とし最終投与の翌日に全生存動物を屠殺した。雌は膣スメア法にて性周期を観察し、28 回投与の翌日から 4 日の間で発情静止期に相当する日に屠殺或いは性周期の異常を認めた場合は 28 回投与の翌日に屠殺し、いずれも屠殺前日まで投与を継続することとした。主な検査項目として、性周期観察の他、体重、臓器重量、血液、血清生化学、血清ホルモン、精子および病理組織学的検査を行った。2) 子宮重量等を指標とした生体試験:離乳直後の未熟雌ラット(21 日齢)あるいは、卵巢摘出成熟雌ラットあるいはマウスを用い、エストラジオール、ゲニスタイン、ビスフェノール A などの投与に対する子宮重量、細胞増殖(BrdU 標識)、膣開口、膣擦過細胞像等を指標とした変化を観察し子宮肥大試験のプロトコール作成に必要な基礎データを収集した。3)相加・相乗効果の検討:子宮肥大試験は、卵巢摘出成熟雌ラットを用いた 14 日間皮下投与実験法および 21 日齢未熟雌ラットを用いた 3 日間皮下投与実験法、去勢成熟雄ラットを用いた 14 日間皮下投与ハーシュバーガー試験法、及び一世代繁殖試験法を用い複合投与による影響を検討した。検討する物質の組み合わせは、エストロゲン受容体を介するもの同士、エストロゲン受容体を介するものと PPAR 受容体を介すると思われるものの組み合わせ、エストロゲン受容体を介するものとダイオキシン受容体を介するものの組み合わせ(子宮肥大試験及び一世代試験)、エストロゲン受容体を介するものとアンドロゲン受容体を介するものの組み合わせ(ハーシュバーガー試験)とした。これら4種の試験法において、estradiol, bisphenol A, genistein, diethylstilbestrol, butylbenzylphthalate, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin, testosterone, vinclozolin, p,p'-DDE, flutamide.の化合物を適宜組み合わせ、その複合作用を検討した。

結果=1) 28 日間反復投与毒性試験:今回、内分泌かく乱化学物質のスクリーニングと安全性評価を目的とした“enhanced OECD Test Guideline 407”案の有用性を確認する目的で、Flutamide および MTを強制経口投与する28 日間反復投与毒性試験を実施した。その結果、まず Flutamide の投与用量に相関した変化として、雄では、血清中のテストステロンとエストラジオールレベルの上昇が 4mg/kg 投与群で精巣上体重量の減少が 1 および 4mg/kg 投与群で、性嚢(性嚢+凝固腺+背側葉前立腺)重量の減少が 4mg/kg 投与群で、乳腺小葉の萎縮が 1 及び 4mg/kg 投与群で認められた。また、雌では、4mg/kg 投与群で性周期の期間がやや延長する傾向がみられた以外に、Flutamide の投与に関連すると思われる明らかな変化は認められず Flutamide の無影響量は 0.25mg/kg と考えられた。しかし、MT では、雌の全投与群で副腎、下垂体、卵巢の相対重量の減少、多卵胞性卵胞の増加がいずれも有意に認められ無影響量を設定できなかった。今回の試験に採用した検査項目の内、ホルモンに関連した作

用を検出し得た項目は、生殖器系組織の重量、血中ホルモンレベル、生殖器系組織の病理組織所見及び雌の性周期であった。2) 子宮重量等を指標とした生体試験：①未熟ラットを用いた子宮肥大試験に関する基礎的実験：21 日齢雌ラットに種々の量のエストラジオールを3 日、7 日、14 日間皮下投与し、子宮重量、膣開口、組織像について検討した結果、7 日間以上の投与では、子宮重量増加に用量依存性が認められなくなることが示された。これは、組織学的に卵巣における黄体発現と一致しており、卵巣からのエストロゲン分泌により外来性の微量エストラジオールの作用が消去されたものと解釈された。また膣開口日が用量依存的に早くなることが確認された。しかし、その検出感度は子宮重量増加のそれよりも悪く、投与開始後 10 日前後まで観察する必要があることから、3 日目での子宮重量測定を行う場合には膣開口を見ることに意味がないことが示された。②卵巣摘出ラット及びマウスを用いた子宮肥大試験に関する基礎的試験：卵巣摘出ラットあるいはマウスに3 日、7 日、14 日間、種々の量のエストラジオールを皮下投与し、子宮重量増加、組織像、細胞増殖像(BrdU 標識)、含水量(蛋白量)等の測定を行った結果、感度は長期投与により増加すること、高用量では浮腫が先行するとともに、増殖部位が子宮内膜上皮、子宮腺上皮ついで間質細胞に移ること、低用量では細胞増殖が全体的に徐々に増加すること、未熟ラットを用いた場合よりも子宮重量データのばらつきが少ないこと等が示された。3) 相加・相乗効果の検討：現在一部の子宮肥大試験、及びハーシュバーガー試験の生データを徐々に得ている段階であり試験系の違いにより反応の差異、相加的、相乗的あるいは相殺的な作用が示唆される結果が集積されつつある。

考察=1) 28 日間反復投与毒性試験：本試験結果においては検出感度の良い項目であったといえるが、更に検出感度を上げるためにいくつか考慮すべき事項がある。雄に関しては、本試験でも実施したように、精巣において精子形成サイクルを考慮した精上皮の定量的解析を行うことにより、種々の精上皮に対する影響を詳細に解析することが出来る。雌に関しては、卵巣において種々の成熟段階の卵胞数をカウントする等の定量的解析を行うこと、また、卵巣、子宮及び膣は性周期に連動して特徴的な組織像を示すことから、性周期を考慮した病理組織学的検索を実施することにより、通常の病理組織学的検査では得られない詳細な情報が期待される。2) 子宮重量等を指標とした生体試験：総括的には、未熟ラットを用いた場合、3 日間投与が推奨され、それ以上の長期投与は卵巣機能の開始と重なるため、系の感度が悪くなること、絶対的感度は卵巣摘出成熟動物を用いたほうが 3 倍程度高いこと、但し、後者には手術が必要であること、場所と時間を余計に必要とすることなどの短所があることが確認された。また、子宮肥大には細胞増殖以外に、浮腫が影響すること、そこには作用機序として血管作働性のプロセスが絡む可能性が示唆された。3) 相加・相乗効果の検討：現在までのところ *in vivo* による複合投与の報告を散見するが、組織立って、網羅的なおかつ、受容体別に組み合わせを設定したものは例を見ない。また用量設定の点からも、組み合わせられる物質の双方が飽和濃度以下に設定された実験はほとんどない。本研究の結果が出揃った暁には、複合投与による影響の全容におけるある程度の部分が科学的考察を持って解明されるものと期待される。

結論="enhanced OECD Test Guideline 407" 案に基くラット 28 日間反復投与毒性試験では、通常の TG407 で要求されている尿検査、機能検査などが除外されているが、これらを加えた場合、煩雑さや動物に対するストレスが著しく増加し、実験のコストも膨大なものになる可能性がある。今後これらの点や本研究班における他の被験物質の試験結果等を考慮して、試験法を改良してゆく必要があると思われる。用量設定基準、設定方法など検討を加える課題も残されている。また子宮重量を指標とした生体試験研究にて得られた科学的知見により、OECD での子宮肥大試験のプロトコル制定に対する論議が促進され、結果として現段階で一つのプロトコルを制定するのは時期尚早であること、どの様なプロトコルが考えられ、そのうちのどれがプレバリデーションの対象となるかを決定する上で、大きな科学的役割を果たしたと考えられる。その結果として、日本が OECD 子宮肥大試験のリードラボとなったと考えられる。内分泌かく乱作用が実験的に知られている代表的な化合物について、その複合作用の検討においては、新規合成を待たねばならなかった化合物があったことなどにより計画の開始が遅れたため、結果の全容の解析には時間を要する結果となった。しかしながら preliminary data にも、既に興味深い事象が現れており、今後のデータ集積とその解析が大いに期待されるものである。この結果は、環境化学物質の特性としての内分泌かく乱化学物質の複合作用に関して有用な情報を提供するものと期待される。