

28日間反復投与試験等に関する調査研究

（OECD テストガイドライン国際共同バリデーションプロジェクト）

子宮重量等を指標とした生体試験

分担研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・部長

研究要旨

内分泌かく乱化学物質（EDCs）の *in vivo* スクリーニング法開発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目的で、子宮重量等を指標とした生体試験を行うことを目的とした基礎的研究を行った。当初の予定では、経済協力開発機構（OECD）が制定する統一プロトコルを用い、ホルモン作用の明らかな5品目について子宮肥大試験を行うこととしていた。しかし、OECD の子宮肥大試験バリデーションの予定が変更となった。すなわち、国際プロトコルの未だかつて設定されていない子宮肥大試験には複数の方式が知られており、そのどれを唯一のものとして制定するかを決定する基礎的学問的情報が不足していることが認識され、日本の国立医薬品食品衛生研究所がリードラボとなってプレバリデーション段階として、3通りのプロトコルを用意し、それに基づいて国際的にエチニールエストラジオールについての用量作用データを持ち寄り、各施設のバリデーションとし、次の段階として6種類の代表的化学物質について、それぞれのプロトコルを用いて検討を進めることとなった。本研究では、3通りのプロトコルの作成に必須な基礎データの収集に必要な種々の実験を行った。

ハーシュバーガー試験については、米国内でのリードラボの選定が大幅におくれ、暫定プロトコルの設定すら行われなかったため、実質的検討が行えず、従って本研究年度中にはごく初期の段階の検討実験を行うに留まった。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質（EDCs）の生体への障害性の発現様式あるいはその発現機構の主なものが、ホルモン受容体を介した作用であるであろうという認識が深まるにつれ、従来のOECD等の化学物質の生物試験法で、そのような作用の物質のスクリーニングおよび評価が十分可能であるか否かの見直しが行われた。その中で、*in vivo* スクリーニング法の一つの候補として子宮肥大試験を国際的協調の中で進めることが決議された。本研究では、それを受け、子宮肥大試験の国際共同バリデーションプロジ

ェクトに参加する目的でその基礎的研究を行った。当初の予定では、OECD が制定する統一プロトコルを用い、ホルモン作用の明らかな5品目について子宮肥大試験を行うこととしていた。しかし、国際プロトコルの未だかつて設定されていない子宮肥大試験には複数の方式が知られており、そのどれを唯一のものとして制定するかを決定する基礎的科学的情報が不足していることが認識されたことにより、プレバリデーション段階として、3通りのプロトコルを用意し、それに基づいて国際的にエチニールエストラジオールについての用量作

用データを持ち寄り、各施設のバリデーションとすることとなった。そして、次の段階として6種類の代表的化学物質について、それぞれのプロトコルを用いて検討を進めることとなった。

この OECD の子宮肥大試験プロジェクトにおいて、当国立医薬品食品衛生研究所毒性部がリードラボとなって、プレバリデーションおよびバリデーションのプロトコル案の作成に携わることとなった。それに伴い、本研究ではその科学的根拠となる基礎データの収集のために子宮肥大試験に関する実験的検討を加えた。

B. 研究方法

離乳直後の未熟雌ラット（21 日齢）あるいは、卵巣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、ゲニステイン、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 ラベリング）、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ル作成に必要な基礎データを収集した。

C. 研究結果

未熟ラットを用いた子宮肥大試験に関する基礎実験：

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日あるいは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。その結果、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（性周期の開始）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かき消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も確認されたが、その検出感度は子宮重量増加のそれよりも悪く、また、投与開始後10日前後まで観察を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。卵巣摘出ラットおよ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日あるいは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。その結果、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週令および6週令の雄SDラットを去勢後7日目より種々の容量のテストステロンプロピオネートおよび一定量のフルタミドを皮下投与し、前立腺腹側葉、性腺凝固腺、球海綿体筋、精巣上体の重量変化を観察した。その結果、テストステロンの容量に相関した上記標的臓器の重量増加と、そのフルタミドによる阻害効果が確認された。また、身体の大きい6週令動物を用いた方が、手技的に扱いが容易で、結果としてホルモン作用の検出感度が良好であることが示された。

D. 考察

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。

E. 結論

本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ー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ールを制定するのは時期尚早であること、どの様なプロトコールが考えられ、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。また、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kawasaki Y, Umemura T, Saito M, Momma J, Matsushima Y, Sekiguchi H, Matsumoto M, Sakemi K, Isama K, Inoue T, Kurokawa Y, Tsuda M: Toxicity study of a rubber antioxidant, 2-mercaptobenzimidazole, by repeated oral administration to rats. *Toxicol Sci*, 1998, Feb;23(1):53-68
- Hirabayashi Y, Matsumura T, Matsuda M, Kuramoto K, Motoyoshi K, Yoshida K, Sasaki H, Inoue T : Cell kinetics of hemopoietic colony-forming units in spleen (CFU-S) in young and old mice. *Mech Ageing Dev*, 1998, Apr 1;101(3):221-231
- Sai K, Kai S, Umemura T, Tanimura A, Hasegawa R, Inoue T, Kurokawa Y: Protective effects of green tea on hepatotoxicity, oxidative DNA damage and cell proliferation in the rat liver induced by repeated oral administration of 2-nitropropane, *Food Chem Toxicol*, 1998, Dec;36(12):1043-1051
- Sai K, Upham BL, Kang KS, Hasegawa R, Inoue T, Trosko JE: Inhibitory effect of pentachlorophenol on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells in vitro. *Cancer Lett*, 1998, Aug 14;130(1-2):9-17
- Mitsumori K, Imazawa T, Onodera H, Takahashi M, Kitajima S, Inoue T, Kurokawa Y: Ultrastructural changes in motor endplates of the lumbrical muscles of rats induced by a microsomal Ca²⁺ ATPase inhibitor, 2,5-di(tert-butyl)-1,4-hydroquinone. *Arch Toxicol*, 1998, 72(2):115-118
- Trosko JE, and Inoue T: Oxidative stress, signal transduction, and intercellular communication in radiation carcinogenesis, *Stem Cells*, 1997, 15 (suppl2), 59-67.
- Sasaki H, Matsuda M, Lu Y, Ikuta K, Matuyama S, Hirabayashi Y, Mitsui H, Matsumura T, Muramatsu M, Tsukada T, Aizawa S, and Inoue T.: A fraction unresponsive to growth inhibition by TGF- β among the high-proliferative potential progenitor cells in bone marrow of p53-deficient mice. *Leukemia*, 1997, 11, 239-244.
- Nishimura Y, Hirabayashi Y, Matuszaki Y, Musette P, Ishii A, Nakauchi H, Inoue T, and Yonehara S.: *In vivo* analysis of Fas antigen-mediated apoptosis: Effects of agonistic anti-mouse Fas monoclonal antibody on thymus, spleen, and liver. *Int Immunol*, 1997, 19, 307-316.
- Yoshida K, Inoue T, Nojima K, Hirabayashi Y, and Sado T. : Calorie restriction reduces the incidence of myeloid leukemia induced by a single whole-body radiation in C3H/He mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94, 2615-2619.

Inoue T, Cronkite EP, Hirabayashi Y, Bullis JE, Mitsui H, Umemura T.: Lifetime treatment of mice with azidothymidine (AZT) produces myelodysplasia. Leukemia, 1997, 11 (Suppl 3), 123-127.

Inoue T, Hirabayashi Y, Matsuda M, Furuta Y, Aizawa S, Sasaki H.: Model of MDS-like myelodysplasia that transforms into single lineage-hemopoietic malignancies upon transplantation—implication for pediatric myelodysplastic syndrome—. Intnt'l J Ped Hematl/Oncol., 1997, 4:221-230.

Hanzawa C, Kobayashi K, Hirabayashi Y, Inoue T, Aizawa S, Adachi K: Hair follicle dermal papilla cell lines from p53-knockout mice. J Dermatol Sci, 1997, 15, 59-63.

Hirabayashi Y, Matsuda M, Matumura T, Mitsui H, Sasaki H, Tukada T, Aizawa S, Yoshida K and Inoue T: The p53-deficient hemopoietic stem cells: their resistance to radiation-apoptosis, but lasted transiently. Leukemia, 1997, 11 Suppl 3, 489-492.

菅野 純、相賀 裕美子、井上 達 化学物質の生物毒性試験 —内分泌障害性を中心に— 組織培養工学 24 H10年7月

2. 学会発表

Atsushi Ono, Masaya Yamamoto, Atsuya Takagi, Jun Kanno, and Tohru Inoue. Molecular mechanism of endocrine disrupting chemicals (EDCs) (Celebrating the 10th Anniversary of the AACR Special Conferences in Cancer Research) H11

井上達、菅野純 内分泌障害性化学物質 (endocrine disruptors) の検出の為の新しい試み。第14回日本毒性病理学会 H10年2月

井上 達、菅野 純 内分泌攪乱物質とは何か。内分泌攪乱物質をめぐる生活と食の安全についての国際シンポジウム H10年6月

井上 達、菅野 純 エンドクリン問題の最近の動向 ポリ衛協会報 3 H10年8月