

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ージョンプロジェクト)

主任研究者 広瀬雅雄 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

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、内分泌かく乱物質の人体影響に関する以下の調査研究事業を行った。

1) 28 日間反復投与毒性試験

化学物質の内分泌系への影響を高感度に検出し得る新しい試験法として提案された“enhanced OECD Test Guideline 407”の有用性を検証する目的で、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、本案を基本としたラット 28 日間反復投与毒性試験を実施した。その結果、臓器重量、血清ホルモンレベル、病理組織学的所見がホルモン作用を検出する有効な指標であり、なかでも腫瘍検査や精子形成サイクルを考慮した精上皮の定量的解析がすぐれた指標になり得ると考えられた。一方、用量設定基準、設定方法、更に感度の良い検査項目の追加や不要な検査項目の削除、など更なる検討が必要であると思われた。また、臓器重量、血清ホルモンレベル、病理組織学的所見がホルモン作用を検出する有効な指標であり、なかでも雌では腫瘍検査、雄では精子形成サイクルを考慮した精上皮の定量的解析がすぐれた指標になり得ると考えられた。一方、用量設定基準、設定方法、測定項目など今後検討を加えるべき課題も残されている。

2) 子宮重量等を指標とした生体試験

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が、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ため、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。

3) 子宮重量等を指標とした生体試験による相加・相乗効果の検討

内分泌かく乱化学物質は、その環境化学物質としての性格上、複合暴露の影響が一つの問題として常に検討対象となってきた。しかし、複合作用に関する研究は in vitro 試験系によるものがほとんどであるとともに、系統立った比較検討がなされたプロジェクトはほとんどない。本研究では、一世代試験を頂点に、子宮肥大試験およびハーシュバーガー試験を用いて、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、その複合作用を検討した。その組み合わせは、それらが結合することが想定される、あるいは知られている核内受容体毎になされた。使用する化学物質の単一ロットの確保、必要なものについては新規合成、あるいは調達に予想を上回る時間を要したため、全体的に実験開始の遅延が生じ、現段階では一部の子宮肥大試験およびハーシュバーガー試験からの preliminary data を得ている段階である。

分担研究者・所属施設及び所属における職名

井上 達・国立医薬品食品衛生研究所毒性部・部長

山崎寛治・(財)化学品検査協会日田研究所・試験研究課長

藤井 治・(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所・取締役所長

菅野 純・国立医薬品食品衛生研究所毒性部・室長

A. 研究目的

最近、工業製品のみならず天然物質など内分泌かく乱化学物質の人体に対する悪影響が世界的に問題となっており、これらの物質のスクリーニングと安全性評価を目的とした種々の試験法の確立が急務とされている。これらの要求に応え、従来の“OECD Test Guideline 407”によるラットの28日間反復投与毒性試験法を基礎として、「雌の性周期観察」「精子検査」「血中ホルモンレベルの測定」等、成熟動物における内分泌系に対する影響を検出するための新しい検査項目が盛り込まれた“enhanced OECD Test Guideline 407”案が提案された。化学物質の内分泌系への影響を高感度に検出し得る新しい試験法として、この試験法の有用性を検証する目的で、“enhanced OECD Test Guideline 407”案を基礎としたラット28日間反復投与毒性試験を実施した。また、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。本研究は、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による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、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ことを受け、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。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、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ものである。このOECDの子宮肥大試験プロジェクトにおいて、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。エンドポイントとして、一世代試験を頂点に、子宮肥大試験およびハーシュバーク試験を用いて、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、その複合作用を検討することを目的とする。

B. 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、Flutamideはコーン油に混じて4、1、0.25、0mg/kg(対照群)、MTもコーン油に混じり80、20、5、0mg/kg体重の用量で強制経口投与した。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ール作成に必要な基礎データを収集した。

3) 子宮重量等を指標とした生体試験による相加・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、および一世代繁殖試験法を用い、複合投与による影響を検討する。前3者は、単体2用量、複合2用量および対照群の7群構成であり、後者の一世代試験は単体1用量、複合1用量および対照群の4群構成で行った。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(子宮肥大試験および一世代試験)、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、結合するであろう受容体毎に estradiol, bisphenol A, genistein, diethylstilbestrol, butylbenzylphthalate, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 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。

C. 研究結果

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

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なかった。従って、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(但し、今回の Flutamide の試験においては、Flutamide の作用が雄に対して顕著であり、雌に対してはほとんど影響を与えなかったことから、雌におけるホルモン関連作用の一般的な検出感度に関しては十分な評価はできなかった)。

2) 子宮重量等を指標とした生体試験

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、組織学的に卵巢における黄体発現(性周期の開始)と一致しており、卵巢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。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、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) 子宮重量等を指標とした生体試験による相加・相乗効果の検討

現在、一部の子宮肥大試験、およ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る。限定的な判断であるが、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。

D. 考察

1) 28 日間反復投与毒性試験

今回の試験結果においては、以上の検査項目が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、今回の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の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得られるものと思われる。

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) 子宮重量等を指標とした生体試験による相加・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、網羅的になおかつ、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の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。

E. 結論

本研究における化学物質の内分泌系への影響を高感度に検出し得る新しい試験法“enhanced OECD Test Guideline 407”案に基づくラット 28 日間反復投与毒性試験では、通常の TG 407 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。また、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。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ついては、すべての実験で用いる化合物のロットの統一を含め、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、すで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。

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

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から- 有機合成化学協会誌57(1) H11年1月

菅野 純 内分泌かく乱化学物質の生物影響 フォルマシア35 H11年3月

2. 学会発表

豊田和宏、渋谷淳、田村啓、糀谷高敏、畝山千香子、広瀬雅雄 ラット28日間反復投与試験法"OECD Guideline 407 enhanced"確立のための Flutamideを用いた予備的検討 第26回日本トキシコロジー学会発表予定

Atsushi Ono, Masaya Yamamoto, AtsuyTakagi, 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)の検出の為に新しい試み。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

菅野 純 エンドクリン問題の最近の動向。ポリオ

レフィン等衛生協議会安全性セミナー H10年3月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から- 第169回有機合成化学協会懇談会 H10年7月

菅野 純 内分泌かく乱化学物質について 平成10年度化工誌ニュース委員会第1回研究会 H10年10月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から-学術情報センター軽井沢公開ワークショップ パネルディスカッション H10年10月

宮城恵理、松島裕子、平林容子、井上 達、菅野 純 内分泌かく乱化学物質(Xenoestrogen)高感度検出系としての卵巣摘出マウスのエストロゲン反応性の経時変化 第15回日本疾患モデル学会 H10年11月

菅野 純 動物の生態と内分泌攪乱物質(環境ホルモン)についてパネルディスカッション 第25回環境保全・公害防止研究発表会 H10年11月

菅野 純、Kyung-Sun Kang、武木田薫、宮城恵理、斉藤 実、松島裕子、山本雅也、平林容子、金子豊蔵、井上 達 内分泌かく乱化学物質における in vitro試験系の in vivo試験に対する代替性 第12回日本動物実験代替法学会 H10年11月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について 第9回安科研学術講演会 H10年12月

菅野 純、山本雅也、松島裕子、西岡暢彦、宮城恵理、Byung-Il Yoon 内分泌かく乱物質の短期 in vivo試験系について 日本内分泌攪乱化学物質学会第1回研究会 H10年12月

小野 敦、山本雅也、高木篤也、菅野 純、井上 達 Molecular mechanism of endocrine disrupting chemicals (EDCs)(Celebrating the 10th Anniversary of the AACR Special Conferences in Cancer Research) H11年1月

菅野 純 内分泌かく乱化学物質について 第26回建築物環境衛生管理全国大会 H11年1月