

分担課題:子宮重量を指標とした生体試験

分担研究者 山崎寛治 (財)化学品検査協会化学品安全センター日田研究所・試験研究課長

研究要旨

エストロゲン作用物質である ethynyl estradiol (EE)及び抗エストロゲン作用物質である ZM189154 (ZM)を 19 日齢の幼若雌 Crj: CD® (SD) IGS BR ラットに 3 日間経口または皮下投与し、子宮重量を指標として、これらの作用の検出が可能かどうか、またいずれの投与経路が感度において優れているかを検討した。さらに、卵巣を摘出した成熟ラットを用いて、皮下投与による同様の実験を行った。各々の実験において、無処置対照群、媒体対照群、EE 投与群として 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 $\mu\text{g/kg/day}$ 、ZM 投与群として 0.1、1 mg/kg/day の各群を設け、毎日 1 回 3 日間投与した。なお、ZM 投与群の動物には、EE を陽性対照物質として ZM と同時に投与した。最終投与の約 24 時間後にエーテル麻酔下にて放血安楽死させた。子宮重量測定の際、子宮腔内の内容液を取り除かないままの状態の重量(wet weight)に加え、両子宮角に割を入れ、湿らせたろ紙に子宮腔内の内容液をしみ出させた後の重量(blotted weight)を測定した。幼若雌ラット経口投与、皮下投与、卵巣摘出ラット皮下投与のいずれの実験においても、EE のエストロゲン作用及び ZM の抗エストロゲン作用を検出することができた。また、子宮の絶対重量、相対重量、wet weight、blotted weight のいずれにおいても同様の検出感度が得られた。投与経路については、幼若ラット皮下投与では EE 0.3、経口投与では EE 1 $\mu\text{g/kg/day}$ 以上の群で子宮重量の有意な増加がみられ、前者が後者に比べて EE の作用を高感度に検出した。また、幼若ラットと卵巣摘出ラットの皮下投与では、同様の感度を示した。今回の実験は、強力なエストロゲン作用を持つ物質用いたものであり、投与経路及びどのような動物を使用するかについては、今後さらにより弱い作用を持った物質を用いた validation 作業において検討する必要がある。

A. 研究目的

近年、いくつかの化学物質が生体の内分泌機能を攪乱し、ヒトあるいは野生動物の生活に影響を及ぼす懸念が報告されている。そこで、化学物質をげっ歯類に投与し、子宮重量を指標として、内分泌攪乱作用を短期間に検出する試みがなされてきた。最近、子宮増殖アッセイが in vivo における化学物質のエストロゲンあるいは抗エストロゲン作用を検出するためのスクリーニング手法として提案されている。しかし、これらの検出試験に用いられる動物や化学物質の投与経路などは様々であり、未だ決まった方法は確立されていない。そこで我々は、強いエストロゲン作用を持つ ethynylestradiol (EE)及びエストロゲンの完全アンタゴニストである ZM189154 (ZM)を用い、これら

を春期発動以前の幼若雌ラットに3日間経口または皮下投与し、子宮重量を指標として、これらの物質の持つエストロゲン作用または抗エストロゲン作用の検出が可能かどうか、またいずれの投与経路が感度において優れているかを検討した。さらに、卵巣摘出成熟ラットを用いて、皮下投与による同様の実験を行い、幼若ラットとの検出感度の違いの有無を検討した。

B. 研究方法

試験物質：エストロゲン作用物質として、ethynylestradiol (Schering AG、ベルリン、ドイツ)を、抗エストロゲン作用物質として ZM189154 (AstraZeneca Central Toxicology Laboratory、マクレスフィールド、イギリス)を用いた。媒体には皮

下投与、経口投与ともに、10%エタノールオリーブ油を用いた。エタノールは和光純薬株式会社(大阪)から、オリーブ油は株式会社フジミ製薬所(大阪)から購入した。

動物:いずれの動物も、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 10\%$ 、換気回数 10-15 回/時、明暗サイクル 12 時間明(7:00-19:00)、12 時間暗(19:00-7:00)のバリアシステム環境下で飼育した。

1)幼若雌ラット

妊娠 14 日目の Crj: CD® (SD) IGS BR ラット(日本チャールズリバー株式会社、滋賀)を購入した。自然分娩させ得られた出生児を生後 17 日に離乳し、体重無作為抽出法で群分け後試験に使用した。体重の均一化を考慮し分娩 4 日目に親 1 匹につき出生児数が 8 匹になるように腹児数を調節した。飼料は離乳前は CRF1(オリエンタル酵母株式会社、東京)、離乳後は MF (オリエンタル酵母株式会社、東京)を自由摂取させた。水は離乳前は吸水ビンにより、離乳後は自動給水装置により自由摂取とした。飼育様式は離乳前はポリカーボネートケージによる群飼育、離乳後は金網ケージによる個別飼育とした。投与開始日は群分け 2 日後とした。

各実験の群構成を表に示す。

幼若ラット経口投与

実験群	動物数	投与容量 (ml/kg)
無処置対照群	6	0
媒体対照群	6	4
EE 0.01 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	4
EE 0.03 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	4
EE 0.1 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	4
EE 0.3 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	4
EE 1 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	4
EE 3 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	4
EE 10 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	4
ZM 0.1 mg/kg/day + EE 3 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	ZM 2 + EE 2
ZM 1 mg/kg/day + EE 3 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	ZM 2 + EE 2

2)卵巣摘出ラット

5 週齢の Crj: CD® (SD) IGS BR ラット(日本チャールズリバー株式会社、滋賀)を購入した。6 週齢時に卵巣摘出術を施し、術後群分け時まで性周期検査を実施し、性周期が休止期を示していることが確認された動物を 7 週齢で群分けに供した。飼料は MF (オリエンタル酵母株式会社、東京)を、また水は自動給水装置により自由摂取させた。飼育様式は金網ケージによる個別飼育とした。投与開始日は群分け 1 日後とした。

投与: 幼若ラット経口投与、幼若ラット皮下投与、卵巣摘出ラット皮下投与のいずれの実験においても、無処置対照群、媒体対照群、EE 投与群として 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 $\mu\text{g/kg/day}$ 、ZM 投与群として 0.1、1 mg/kg/day の各群を設け、毎日 1 回 3 日間投与した。なお、ZM 投与群の動物には、EE を陽性対照物質として、幼若ラット経口投与実験では 3 $\mu\text{g/kg/day}$ 、幼若ラット皮下投与及び卵巣摘出ラット皮下投与実験では 0.3 $\mu\text{g/kg/day}$ を ZM と同時に投与した。また、各群の動物数は 6 匹とした。なお、経口投与は金属ゾンデによる強制経口投与、皮下投与は注射筒と注射針による頸背部皮下への投与とした。

幼若ラット皮下投与、卵巣摘出ラット皮下投与

実験群	動物数	投与容量 (ml/kg)
無処置対照群	6	0
媒体対照群	6	4
EE 0.01 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	4
EE 0.03 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	4
EE 0.1 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	4
EE 0.3 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	4
EE 1 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	4
EE 3 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	4
EE 10 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	4
ZM 0.1 mg/kg/day + EE 0.3 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	ZM 2 + EE 2
ZM 1 mg/kg/day + EE 0.3 $\mu\text{g/kg/day}$ 群	6	ZM 2 + EE 2

検査項目:投与期間中の体重、摂餌量は毎日測定した。一般状態の観察は毎日行った。最終投与の約 24 時間後にエーテル麻酔下にて両大腿動脈から放血安楽死させた。子宮は、脂肪及び付属組織を丁寧に切り離し、重量測定を行った。この際、子宮腔内の内容液を取り除かないままの状態の重量(wet weight)に加え、両子宮角に割を入れ、湿らせたろ紙に子宮腔内の内容液をしみ出させた後の重量(blotted weight)を測定した。

統計学的処理:試験群の器官重量について、各群の 2 群間で F 検定による等分散検定を行い、5% 有意水準で等分散が認められた場合、Student の t 検定を行った。等分散が認められない場合は Aspin-Welch の t 検定を行った。

C. 研究結果

幼若ラット経口投与:投与期間中の一般状態、体重、摂餌量に異常はみられなかった。群分け日から投与 1 日目にかけて、無処置、媒体対照を含むすべての群で体重の減少がみられた (Fig 1 A)。子宮の絶対重量、相対重量、それぞれの wet weight、blotted weight とも同様の傾向を示した。すなわち、EE 投与群では、1 $\mu\text{g/kg}$ 以上の群で有意な増加がみられた。また、最高用量群 (10 $\mu\text{g/kg}$ 群)でも子宮重量の曲線はプラトーに達せず、子宮重量増加は飽和に至らなかった。ZM 投与群では、0.1mg/kg 群で、同用量の EE のみを投与した EE 3 $\mu\text{g/kg}$ 群と比較して、有意な子宮重量の減少がみられた (Fig. 2, 3)。

幼若ラット皮下投与:投与期間中の一般状態、体重、摂餌量に異常はみられなかった。群分け日から投与 1 日目にかけて、無処置、媒体対照を含むすべての群で体重の減少がみられた (Fig. 1 A)。子宮の絶対重量、相対重量、それぞれの wet weight、blotted weight とも同様の傾向を示した。すなわち、EE 投与群では、0.3 $\mu\text{g/kg}$ 以上の群で有意な増加がみられた。また、wet weight では 3 $\mu\text{g/kg}$ 以上の群、blotted weight では 1 $\mu\text{g/kg}$ 以上の群で、子宮重量増加曲線は傾きを減じ、EE 投与に対する子宮重量増加反応は飽和状態に達したことが示唆された。ZM 投与群では、0.1 mg/kg 群で、同用量の EE のみを投与した EE 0.3 $\mu\text{g/kg}$ 群と比較して、有意な子宮重量の減少がみられた (Fig. 4, 5)。

卵巣摘出ラット皮下投与:投与期間中の一般状態に異常はみられなかった。体重の増加抑制傾向及び摂餌量の減少傾向が EE の投与量の増加とともに顕著にみられた (Fig. 1 A, B)。子宮の絶対重量、相対重量、それぞれの wet weight、blotted weight とも、同様の傾向を示した。すなわち、EE 投与群では、0.3 $\mu\text{g/kg}$ 以上の群で有意な増加がみられた。また、wet weight では 3 $\mu\text{g/kg}$ 以上の群、blotted weight では 1 $\mu\text{g/kg}$ 以上の群で、子宮重量増加曲線は傾きを減じ、EE 投与に対する子宮重量増加反応は飽和状態に達したことが示唆された。ZM 投与群では、0.1 mg/kg 群で、同用量の EE のみを投与した EE 0.3 $\mu\text{g/kg}$ 群と比較して、有意な子宮重量の減少がみられた (Fig. 6, 7)。

D. 考察

EE 及び ZM を幼若雌 Crj: CD® (SD) IGS BR ラットに 3 日間経口または皮下投与し、子宮重量を指標として、エストロゲン作用または抗エストロゲン作用の検出が可能かどうか、またいずれの投与経路が感度において優れているかを検討した。さらに、卵巣摘出ラットを用いて、皮下投与による同様の実験を行った。幼若雌ラット経口投与、皮下投与、卵巣摘出ラット皮下投与のいずれの実験においても、EE のエストロゲン作用及び ZM の抗エストロゲン作用を検出することができた。

しかし、幼若ラット経口投与と皮下投与を比較した場合、絶対重量、相対重量、wet weight、blotted weight すべてにおいて、皮下投与では EE 0.3 µg/kg 以上の群で有意な子宮重量増加がみられたのに対し、経口投与における子宮重量増加は EE 1 µg/kg 以上の群でみられ、また高用量の 10 µg/kg 群でも子宮重量の曲線はプラトーに達しなかったことから、皮下投与の方が経口投与よりも高感度に EE のエストロゲン作用を検出できると考えられる。EE と同様に、17β-estradiol、estradiol benzoate においても、皮下投与が経口投与よりも高感度にその作用が子宮増殖アッセイにおいて検出されたとする報告がある。一方、methoxychlor のように、経口投与の方が皮下投与に比べてより低い用量でエストロゲン作用が検出されるような物質も存在する。本物質は哺乳動物において生殖毒性を引き起こすことが知られており、またその代謝物がエストロゲン活性を持つことが示されている。一方、幼若ラット皮下投与及び卵巣摘出ラット皮下投与間では感度の差は認められなかった。今回の子宮重量測定では、wet weight 及び blotted weight を測定した。blotted weight は、子宮内に貯留する水様液を除いた重量である。今回のいずれの実験においても、wet weight 及び blotted weight の間に感度の差はみられなかった。子宮内の水様液の貯留はエストロゲン作用に特異的な所見であり、投与後約 6 時間でピークに達するとされているが感度は低いといわれている。我々の実験においても、wet weight と blotted weight の差がみられ始めた、すなわち、子宮内への水様液の貯留がみられ始めたのは有意な子宮重量増加がみられた用量よりも高い用量からであった (Fig. 2-7)。今後我々がスクリーニングを行っていくであろう化学物質は、今回用いた EE ほど強力なエストロゲン作

用を持っているとは考えにくく、したがって子宮内の水様液の貯留も、少なくとも最終投与 24 時間後の解剖では観察されにくいと考えられる。

卵巣摘出ラットにおいて、EE の用量に依存して体重の増加抑制がみられた。今回の実験では、子宮の絶対及び相対重量のいずれにおいても EE 0.3 µg/kg 以上の群で有意な増加が同様にみられたが、用量依存性の体重増加抑制がみられた場合、絶対重量に差がみられなくとも相対重量に差がみられる場合がある可能性があり、相対重量も重要なエンドポイントとなると考えられる。

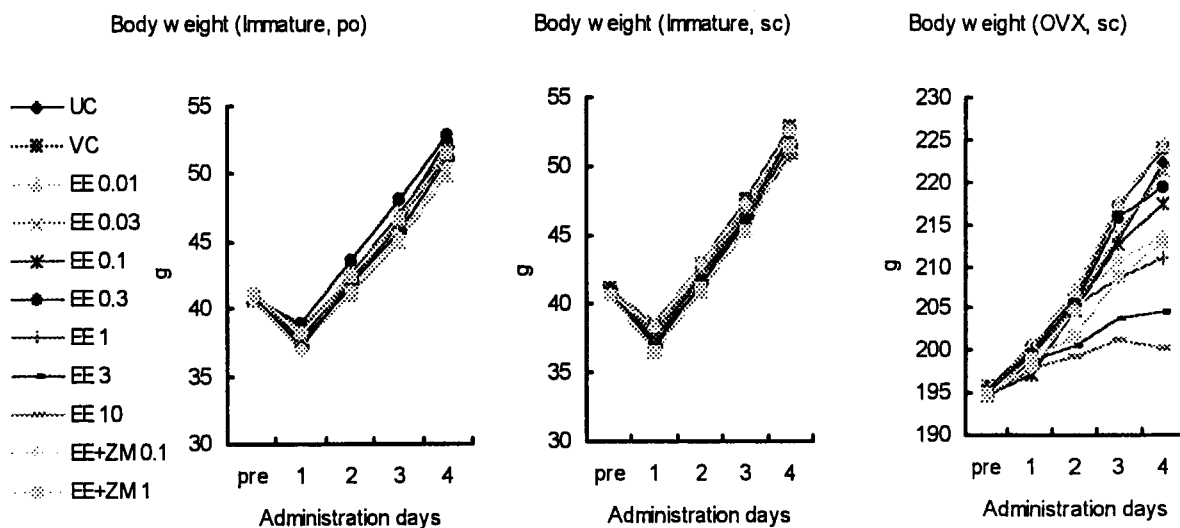
幼若ラットを用いたいずれの実験においても群分け日から投与開始日にかけて体重減少がみられた。これは、離乳から個別飼育という環境の変化によるストレスが原因と考えられる。投与開始日以降は順調に体重増加がみられ、またエストロゲン作用が期待されたとおりを検出可能であったとはいえ、動物の環境への適応が不完全な状態において実験を開始することは好ましいこととはいえない。今後、離乳時のストレスを軽減するような飼育方法について考慮する必要がある。

E. 結論

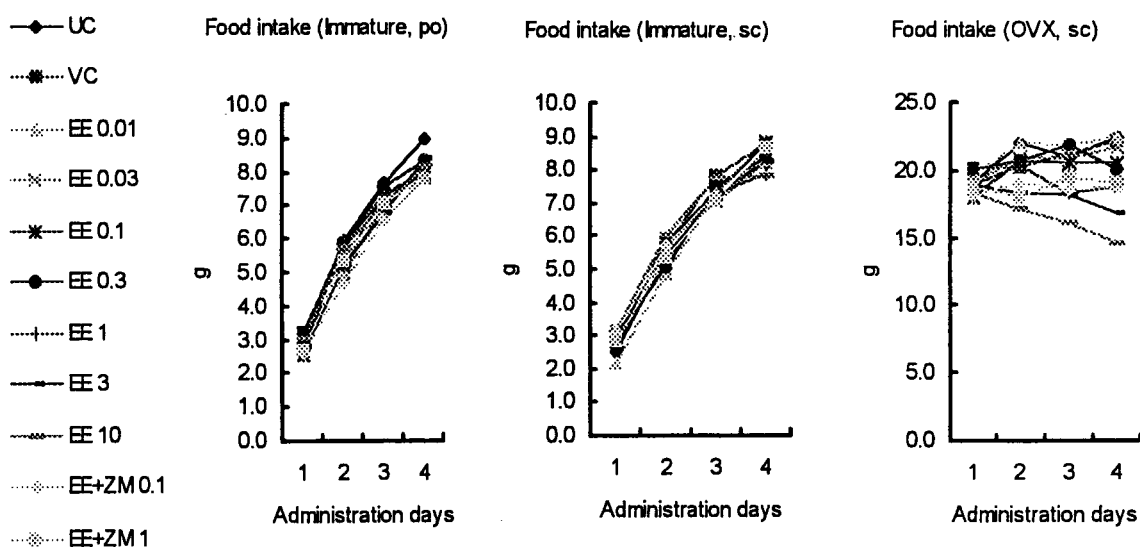
幼若雌ラット経口投与、皮下投与、卵巣摘出ラット皮下投与のいずれの実験においても、EE のエストロゲン作用及び ZM の抗エストロゲン作用を検出することができた。また、子宮の絶対重量、相対重量、それぞれの wet weight、blotted weight のいずれにおいても同様の検出感度が得られた。投与経路については、皮下投与が経口投与に比べて EE の作用を高感度に検出した。ただし、methoxychlor のような経口投与においてより高感度に検出できる化学物質も存在するため、一概に皮下投与が高感度とはいえず、本件は今後の validation 作業においてさらに検討する必要がある。また、幼若ラットと卵巣摘出ラットについては、同様の感度を示したが、今回の実験は強力なエストロゲン作用を持つ物質用いたものであり、より弱い作用を持つ化学物質を用いた validation 作業において今後も検討する必要がある。この他、課題として、幼若ラットを用いる際の群分け後の体重減少を来すようなストレスを軽減する飼育方法の検討が必要と考えられる。

F. 研究発表

なし



A



B

Figure 1 (A) Mean body weights and (B) Mean food intakes in each study.
 po, oral administration; sc, subcutaneous administration; OVX, ovariectomized.
 Unit of dosed EE and ZM is $\mu\text{g/kg/day}$ and mg/kg/day , respectively.
 UC, Untreated control; VC, Vehicle control.

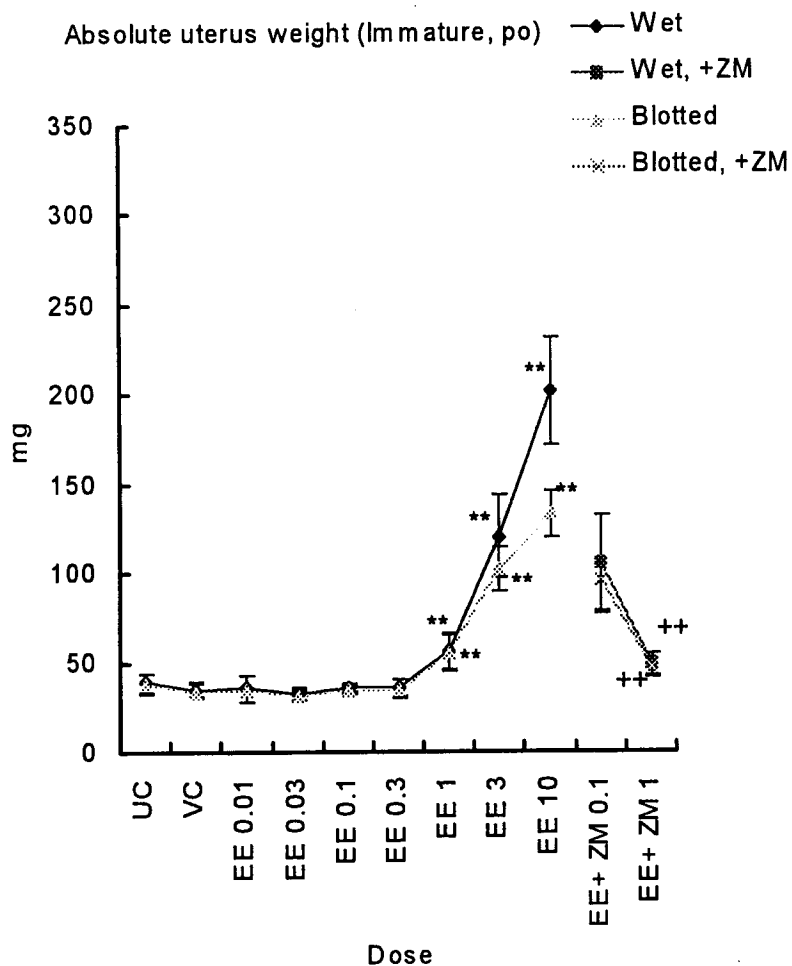


Figure 2 Absolute uterus weight of intact immature rats in oral administration study.

Unit of dosed EE and ZM is $\mu\text{g/kg/day}$ and mg/kg/day , respectively.

UC, Untreated control; VC, Vehicle control.

**, Significantly different from vehicle control ($P < 0.01$, t-test).

++, Significantly different from EE 3 mg/kg group ($P < 0.01$, t-test).

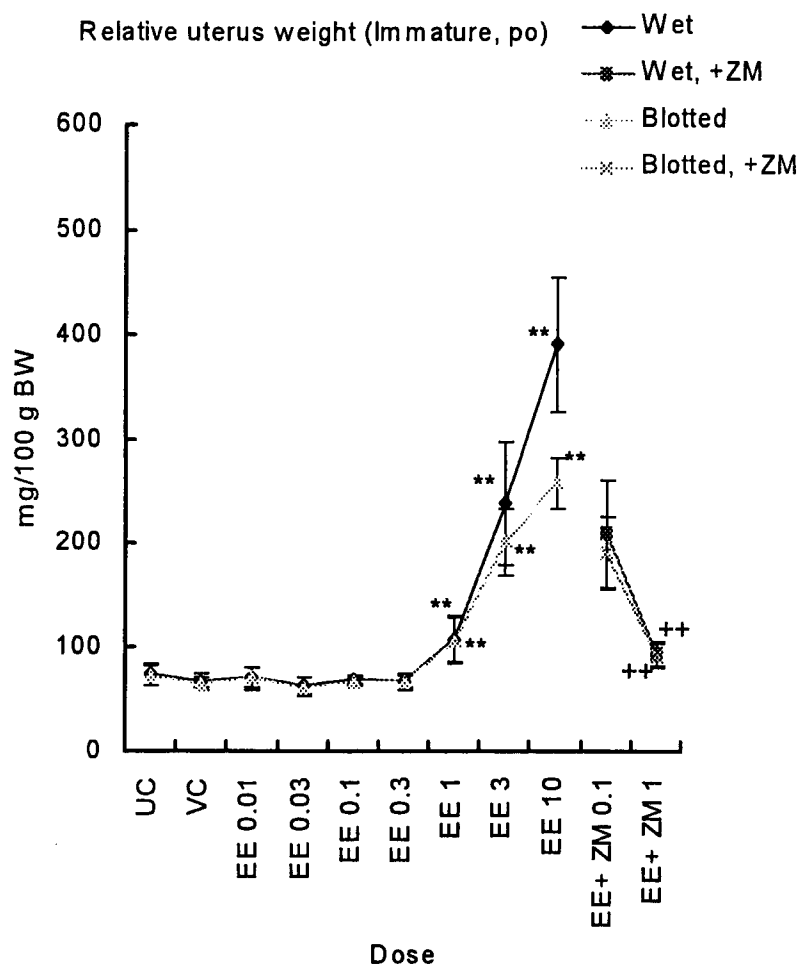


Figure 3 Relative uterus weight of intact immature rats in oral administration study.

Unit of dosed EE and ZM is $\mu\text{g/kg/day}$ and mg/kg/day , respectively.

UC, Untreated control; VC, Vehicle control.

**, Significantly different from vehicle control ($P < 0.01$, t-test).

++, Significantly different from EE 3 mg/kg group ($P < 0.01$, t-test).

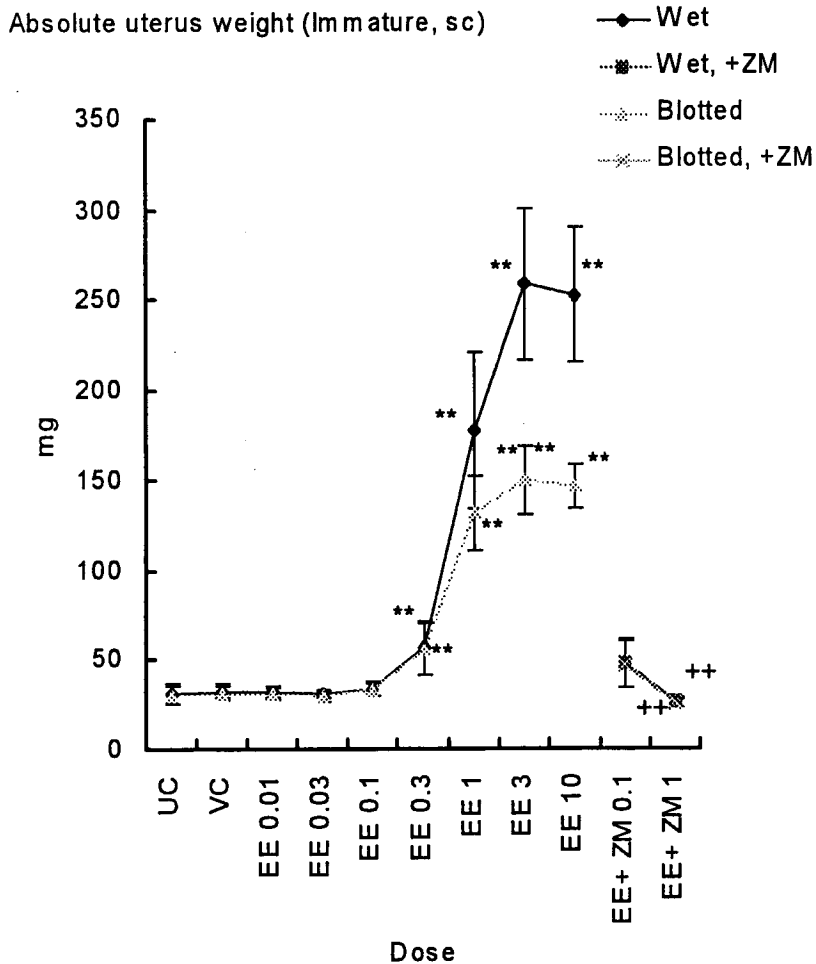


Figure 4 Absolute uterus weight of intact immature rats in subcutaneous administration study.

Unit of dosed EE and ZM is $\mu\text{g/kg/day}$ and mg/kg/day , respectively.

UC, Untreated control; VC, Vehicle control.

**, Significantly different from vehicle control ($P < 0.01$, t-test).

++, Significantly different from EE 3 mg/kg group ($P < 0.01$, t-test).

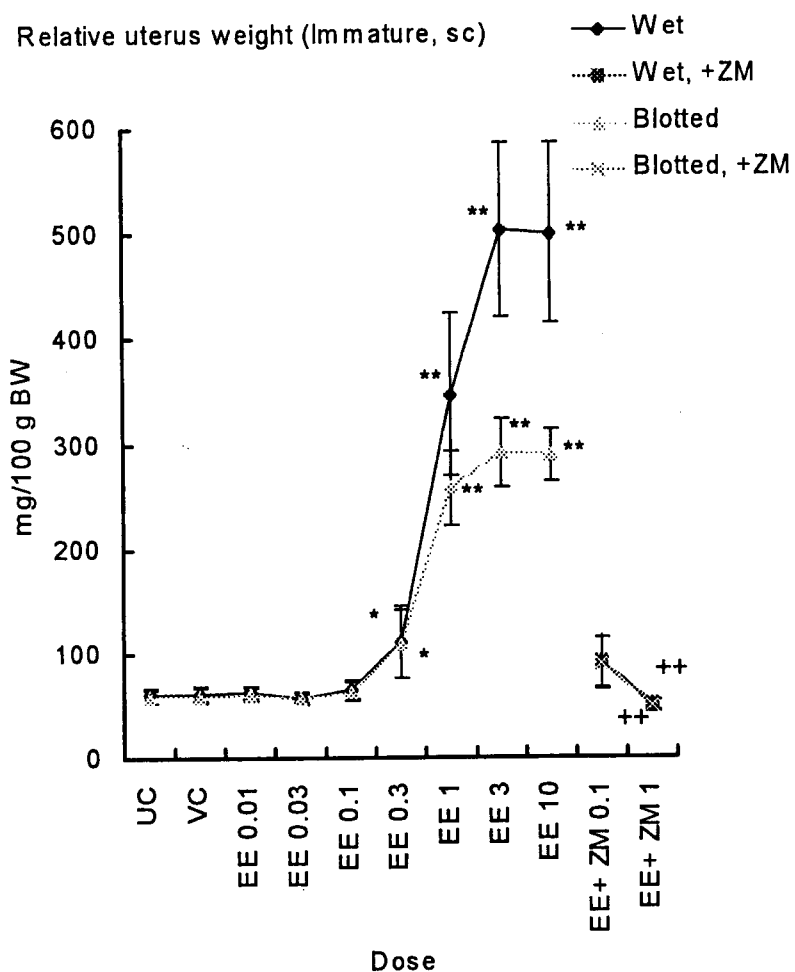


Figure 5 Relative uterus weight of intact immature rats in subcutaneous administration study.

Unit of dosed EE and ZM is $\mu\text{g/kg/day}$ and mg/kg/day , respectively.

UC, Untreated control; VC, Vehicle control.

*, Significantly different from vehicle control ($P < 0.05$, t-test).

**, Significantly different from vehicle control ($P < 0.01$, t-test).

++, Significantly different from EE 3 mg/kg group ($P < 0.01$, t-test).

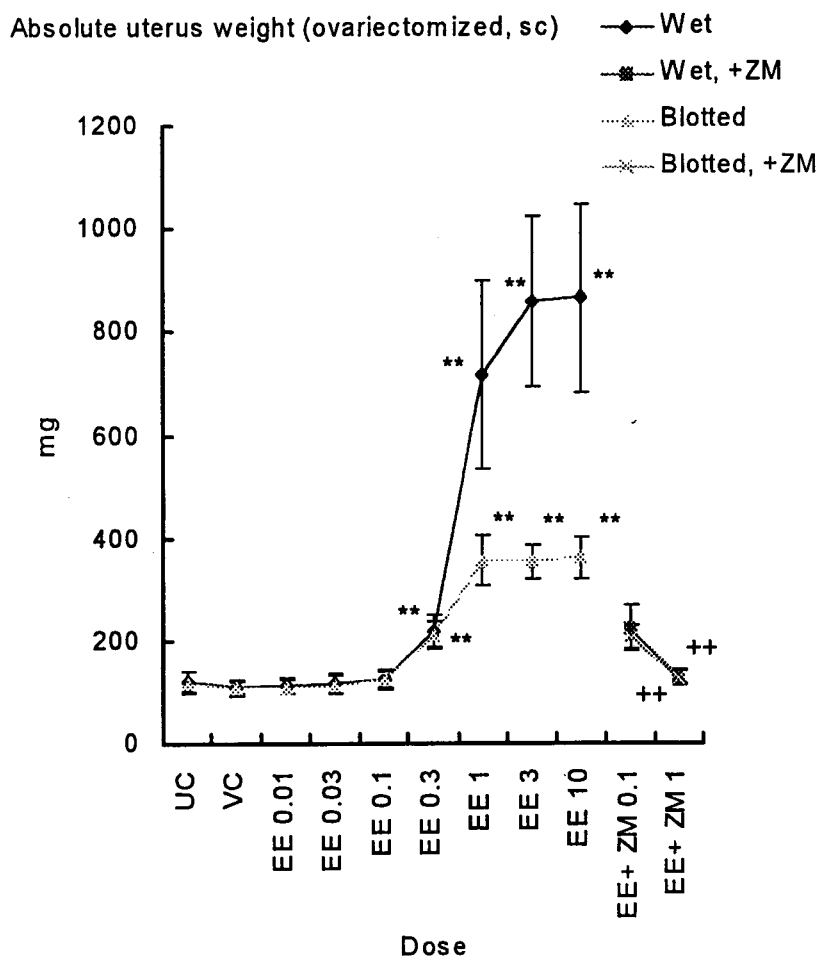


Figure 6 Absolute uterus weight of ovariectomized rats in subcutaneous administration study.

Unit of dosed EE and ZM is $\mu\text{g/kg/day}$ and mg/kg/day , respectively.

UC, Untreated control; VC, Vehicle control.

**, Significantly different from vehicle control ($P < 0.01$, t-test).

++, Significantly different from EE 0.3 mg/kg group ($P < 0.01$, t-test).

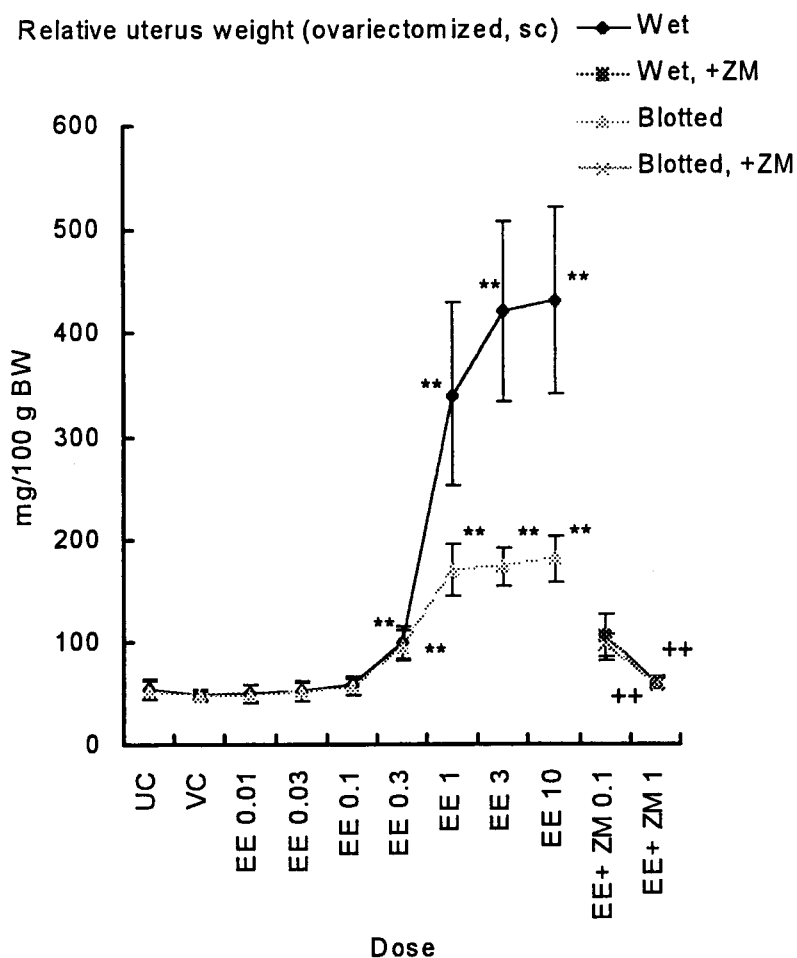


Figure 7 Relative uterus weight of ovariectomized rats in subcutaneous administration study.

Unit of dosed EE and ZM is $\mu\text{g/kg/day}$ and mg/kg/day , respectively.

UC, Untreated control; VC, Vehicle control.

**, Significantly different from vehicle control ($P < 0.01$, t-test).

++, Significantly different from EE 0.3 mg/kg group ($P < 0.01$, t-test).