

ジエチルスチルベステロールとダイオキシンの相乗的子宮肥大作用と
ゲニスタインのハーシュバーガーアッセイに対する影響ならびに
胎児の子宮内位置による内分泌生殖系に対する影響に関する研究

分担研究者 鈴木 勝士 日本獣医畜産大学教授

研究要旨 前年度予備試験的に実施した広瀬班の経費で実施した実験（いずれも子宮肥大試験による相乗効果の有無の確認：エストラジオール(E2)、ジエチルスチルベステロール(DES)、およびゲニスタイン(G)とTCDDの相乗作用について1群6匹、7群構成）に基づき、より高用量のGとTCDDによる子宮肥大試験での相乗作用、G+テストステロン(T)のハーシュバーガー試験におけるU字型用量作用関係の検証、胎児期の子宮内位置の生後発育に及ぼす影響が企画された。試験が現在実施中であり、前年の予備試験について略記する。E2+TCDDでは投与量は（以下カッコ内の表記は、E2、Tの順で単位は $\mu\text{g/kg}$ である）：1群（対照群、0、0）、第2群（0.15、0）、第3群（0.3、0）、第4群（0.075、2.5）、第5群（0.15、5）、第6群（0、5）および第7群（0、10）。DES+TCDDでは投与量は（以下、DES、Tの順で単位は $\mu\text{g/kg}$ ）：1群（対照群、0、0）、第2群（0.1、0）、第3群（0.2、0）、第4群（0.05、2.5）、第5群（0.1、5）、第6群（0、5）および第7群（0、10）。G+TCDDでは投与量は（以下、DES、Tの順で単位は $\mu\text{g/kg}$ ）：1群（対照群、0、0）、第2群（12.5、0）、第3群（25、0）、第4群（6.25、2.5）、第5群（12.5、5）、第6群（0、5）および第7群（0、10）。TCDDは試験開始日1回、他の剤は14日間いずれも皮下投与された。予備試験の全てにおいて、TCDDの単独または併投群で、肝臓の比重量または実重量が増加しており、皮下の経路から吸収されたTCDDは少なくとも肝臓に対しては作用しているように見える。E2、DES、またはDESとの併用によって子宮と膈に明らかな相乗効果は見られなかった。また、今回のエストロゲン類では子宮重量に明確な用量反応相関が認められたのはGのみであった。

A. 研究目的

内分泌かく乱化合物に関するOECDのテストガイドライン策定との関連で、T2Tにおける、エストロゲン作用検出のためのin vivo 短期試験として、子宮肥大試験とハーシュバーガー試験が採用される見込みである。これらは、1960年代にエストロゲンの生物検定法として多用されていたが、ラジオイムノアッセイ等により直接定量できるようになって、その生物検定としての意味が薄れていた。内分泌かく乱化学物質のエストロゲン作用が注目され、再びエストロゲンシテの検定法として浮上してきた。近年の分子生物学の進歩が著しいことに鑑みて、子宮肥大の分子機構に迫る目的と、複数の内分泌かく乱化学物質による相乗作用が生じるのか否かを確かめる目的で、今回の実験が実施された。天然の最も強力なエストロゲン活性を持つエストラジオール(E2)、合成エストロゲンで子宮内暴露により腫瘍を起こすことが知られているジエチルスチルベステロール(DES)、および植物性エストロゲンのゲニスタイン(G)と、Ahレセプター(AhR)を介して生物活性を示す2,3,7,

8-テトラクロロ-p-ダイオキシン(TCDD)との間に子宮肥大に関して相乗作用があるか否かについて昨年度実施した7群構成の低用量実験では、いずれの組み合わせでも複合的な作用は認められなかった。そこで、今回はDESとTCDDについてより高用量の組み合わせで複合作用が認められるか否かについて検討する。

Gに関しては、去勢雄ラットハーシュバーガーアッセイにおいてテストステロン(T)との間にU字型の反応曲線が見られるか否かを確認する。

内分泌かく乱化学物質問題の標的が、胎児、新生児（性未熟期）、成人（性成熟期）、および老年期に亘り、そのおのおのに対して、作用点、作用機序、影響が異なることが示唆されている。性成熟期の影響は、従来の毒性試験プロトコルにより有る程度カバーされていることが考えられる。また、胎児期に関する検討は、催奇形学、発生学の立場から若干の検討が加えられつつある。これに対して、性未熟期（ヒトにおける新生児期、小児期）の検討が立ち後れている事が指摘さ

れる。

そこで、ラットの生後 0～30 日までの間の内分泌機能を、その関係諸臓器の形態変化との関連性で把握することを目的とする。特に、ヒトと違い、多胎であるラットの、胎内雌雄配置の影響の有無を考慮することを、今回の検討に加える。

B. 研究方法

1. DES+TCDD の子宮肥大作用における複合効果

6 週齢の Crj:CD ラットを日本チャールスリバー社より入手し、卵巣摘出後、7 週齢で試験を開始する。実験は 1 群 6 匹の 7 群で実施する。TCDD は試験開始日と 7 日後に、DES は 14 日間皮下投与する。投与量は以下の通りである（以下カッコ内の表記は、DES、TCDD の順で単位は $\mu\text{g}/\text{kg}$ である）：1 群（対照群、0、0）、第 2 群（0.5、0）、第 3 群（1.0、0）、第 4 群（0.25、2.5）、第 5 群（0.5、5）、第 6 群（0、5）および第 7 群（0、10）。DES 最終投与翌日に、エーテル麻酔下で腹大動脈より採血し、肝臓、子宮および膣重量を測定する。子宮および膣については病理組織学的検査を実施する。

2. G+T のハーシュバーガー試験における U 字型反応曲線

6 週齢の Crj:CD ラットを日本チャールスリバー社より入手し、精巣摘出後、7 週齢で試験を開始する。実験は 1 群 6 匹の 7 群で実施する。G および T とともに試験開始日より毎日 1 回 14 日間皮下投与する。投与量は以下の通りである（以下カッコ内の表記は、G、T の順で単位は $\mu\text{g}/\text{kg}$ である）：1 群（対照群、0、0.5）、第 2 群（6.25、0.5）、第 3 群（9、0.5）、第 4 群（12.5、0.5）、第 5 群（18、0.5）、第 6 群（25、0.5）および第 7 群（36、0.5）。G 最終投与翌日に、エーテル麻酔下で腹大動脈より採血し、肝臓、精巣上体、精囊、凝固腺および前立腺を測定する。副生殖器については病理組織学的検査を実施する。以上、1 と 2 の実験は（財）動物繁殖研究所にて実施する。

3. 新生児期の内分泌機能を中心とした発達生理に対するラット胎児の子宮内位置の影響

分娩直前の妊娠ラットより、胎内配置を記録しつつ帝王切開し、仮親に育てさせ、生後 0～30 日の間、経時的に血中ホルモン値および諸臓器（内分泌臓器を中心に）の重量および形態学的検討を行う（免疫染色を含む）。動物の飼育ならびに解剖については、食葉センターで実施し、血中ホルモンの測定について動物繁殖研究所にて実施する。

（倫理面への配慮）

TCDD の取り扱いに関し、環境汚染を防止するためにヘパフィルター付きの陰圧チェンバー内で実験し、動物を含む TCDD 汚染物については安全な焼却法が開発されるまで、凍結保存する。

C. 研究結果

上記の 3 研究課題については、OECD との対応が決まらず、実施を一時見合わせていたため、現在実施しているところであり、まだ結果が出ていない。前年度広瀬班の経費で実施していた実験が上記 3 実験の予備実験に相当するため、その内容について、略記する。いずれも子宮肥大試験による相乗効果の有無の確認のために実施されたものであり、E2、DES、および G と TCDD の相乗作用について 1 群 6 匹、7 群構成で実施された。TCDD は試験開始日 1 回、他の剤は 14 日間いずれも皮下投与された。

1. E2+TCDD

投与量は以下の通りである（以下カッコ内の表記は、E2、T の順で単位は $\mu\text{g}/\text{kg}$ である）：1 群（対照群、0、0）、第 2 群（0.15、0）、第 3 群（0.3、0）、第 4 群（0.075、2.5）、第 5 群（0.15、5）、第 6 群（0、5）および第 7 群（0、10）。いずれの群でも一般症状の変化および死亡はなく、体重にも群間差はなかった。肝比重量の増加が 4、5、6、7 群で肝実重量の増加が 7 群で認められた。子宮と膣の相対重量が 2 および 3 群で、同実重量の増加が 3 群で認められた。子宮内膜と膣上皮の関連した組織学的変化が 3 群で認められた。

投与量は以下の通りである（以下カッコ内の表記は、DES、T の順で単位は $\mu\text{g}/\text{kg}$ である）：1 群（対照群、0、0）、第2群（0.1、0）、第3群（0.2、0）、第4群（0.05、2.5）、第5群（0.1、5）、第6群（0、5）および第7群（0、10）。いずれの群でも一般症状の変化および死亡はなく、体重にも群間差はなかった。肝比重量の増加が5、6、7群で肝実重量の増加が7群で認められた。子宮と膣については、重量、組織学的所見に影響は見られなかった。

3. G+TCDD

投与量は以下の通りである（以下カッコ内の表記は、DES、T の順で単位は $\mu\text{g}/\text{kg}$ である）：1 群（対照群、0、0）、第2群（12.5、0）、第3群（25、0）、第4群（6.25、2.5）、第5群（12.5、5）、第6群（0、5）および第7群（0、10）。3 群で被験物質に起因するとは考えられない死亡が1例生じたが、他にいずれの群でも一般症状の変化および死亡はなく、体重にも群間差はなかった。肝実重量と比重量の増加が4、5、6、7群で認められた。子宮の実重量と相対重量の増加が1、2、3、4、5群で認められ、Gの用量との間に用量相関関係を示すとともに、組織学的に子宮内膜の肥厚が認められた。

D. 考察

予備試験の全てにおいて、TCDD の単独または併投群で、肝臓の比重量または実重量が増加しており、皮下の経路から吸収された TCDD は少なくとも肝臓に対しては作用しているように見える。E2、DES、または DES との併用によって子宮と膣に明らかな相乗効果は見られなかった。TCDD の子宮に対する作用が明確に見られなかった理由の一つに投与経路が関与している可能性があると考えられた。子宮の Ah レセプターに関して、卵巣摘出後の消長を調べる必要があるかもしれない。

今回のエストロゲン類では子宮重量に明確な用量反応相関が認められたのは G のみであった。E2 及び DES に関しては、単独で他段階の用量を用いて SD 系ラットでの反応性を確認する必要があると考えられた。

E. 結論

予備試験の全てにおいて、TCDD の単独または併投群で、肝臓の比重量または実重量が増加しており、皮下の経路から吸収された TCDD は少なくとも肝臓に対しては作用しているように見える。E2、DES、または DES との併用によって子宮と膣に明らかな相乗効果は見られなかった。また、今回のエストロゲン類では子宮重量に明確な用量反応相関が認められたのは G のみであった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki H, Fukaya S, Saito K, and Suzuki K (2000) Mapping of a locus on rat chromosome 11 responsible for osteochondrodysplasia (ocd). Mammalian Genome (in submission)
2. Akimoto T, Suzuki H, Arai Y, Nakama K and Suzuki K (2000) A locus responsible for dominant hairless gene (Ht) is located on rat chromosome 10. Experimental Animal (accepted)
3. 鈴木勝士(1999) エストロンの初期鶏胚の発生に及ぼす影響、内分泌かく乱化学物質学会ニュースレター、4: 2-3.
4. Suzuki H, Kokado M, Saito K, Kunieda T and Suzuki K (1999) A locus responsible for hypogonadism (hgn) Mammalian Genome 10(11):1106-1107.
5. 板垣昌志、阿部省吾、阿部栄、酒井淳一、鈴木勝士(1999) 乳牛の潜在性乳房炎と乳頭口異常の関連、日本獣医師会雑誌 52(9) 561-564.
6. 鈴木勝士(1999)環境ホルモンと獣医師の役割、アニマリタリアン、vol.9:1.

2. 学会発表

1. 高須正規、高橋純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2000)マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位(第2報)、子情報通信学会、ME とバイオサイバネティックス研究会
2. 斉藤賢一、雑賀寿和、鈴木浩悦、鈴木勝士、横山修一(1999)マイクロ波照射がウサギおよびサルのおよぼす影響、電気学会計測研究会 IM99-66 p39-42
3. 高橋純子、高須正規、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士、横山修一(1999)EI および ddY マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発反応(ABR)の解析、電気学会計測研究会 IM99-65 p.33-37
4. 斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士、内堀雅隆、横山修一、辻 隆之(1999)先天性癲癇モデル動物(EI Mouse)の睡眠時脳波における加齢に伴う変化、第 31 回成長談話会大会(抄録 p22)
5. 高須正規、高橋純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)EI および ddY マウスの脳硬膜上からの短潜時聴覚脳幹誘発反応(ABR)の解析、第 127 回日本獣医学会
6. 深谷幸代、鈴木浩悦、高橋純子、丸ひろみ、井出雅子、新井豊、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)骨軟骨形成不全症(ocd/ ocd)ラットの原因遺伝子は第 11 染色体上に存在し D11Mgh3 と連鎖している、第 127 回日本獣医学会
7. 醍醐久美、鈴木浩悦、中宮英次郎、八木未央、岡田美香、新井豊、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)ラット精巣形成不全症病因遺伝子の探索: hgn 遺伝子の雌表現型におよぼす影響の評価、第 127 回日本獣医学会
8. 太田千春、徳力剛、高須正規、平林美紀、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)腎低形成症の腎不全状態の基礎的評価、第 127 回日本獣医学会
9. 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、新井豊、八木未央、竹中基郎(1999)鶏胚でのエストロンによる発生かく乱とエストロゲンレセプター mRNA の発現、第 127 回日本獣医学会
10. 鈴木浩悦、中宮英次郎、醍醐久美、岡田美香、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士(1999)ラット精巣形成不全症病因遺伝子の探索:連鎖するマーカーの整列化とマウス 11 番染色体上での位置の推定、第 127 回日本獣医学会
11. 尼崎肇、鷹栖雅峰、岩間良子、小川実幸、日比佐知子、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)マウス口蓋ヒダ形成過程におけるテネイシンと NCAM の発現分布、第 127 回日本獣医学会
12. Saito, K., H. Suzuki and K. Suzuki (1999) Adverse developmental effects of low intensity radio frequency radiation at 428MHz on chick embryo. 2nd joint international symposium of Congenital Anomalies in Korea. (10/ 1~10/ 2: chunchon)
13. 鈴木浩悦、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士(1999)ラット精巣形成不全症病因遺伝子の探索、日本アンドロロジー学会
14. 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、竹中基郎、八木未央(1999)鶏胚でのエストロゲンレセプター mRNA の発現とエストロンによる発生かく乱、第 39 回日本先天異常学会
15. 斉藤賢一、醍醐久美、横山修一、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)直流磁場照射のマウス胎子におよぼす影響、第 39 回日本先天異常学会
16. 小川実幸、尼崎肇、鷹栖雅峰、岩間良子、日比佐知子、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999) マウス口蓋ヒダ形成過程にみられる上皮細胞の増殖とアポトーシス、第 2 回日本組織工学会
17. 鈴木浩悦、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士(1999)ラットの第 10 染色体上に存在する精巣形成不全症病因遺伝子の探索: 高度に連鎖するマーカーの検索とマウス第 11 染色体上での位置の推定、第 46 回日本実験動物学会

18. 中宮英次郎、鈴木浩悦、醍醐久美、八木美央、平林美紀、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)ラット 10 番染色体上に存在する精巣形成不全症病因遺伝子の探索：病因遺伝子周辺のマップ作成、第 126 回日本獣医学会
19. 松倉克仁、鷺巣 誠、倉繁裕美、尼崎 肇、中條真二郎、清水一政、浦川紀元、鈴木勝士(1999)犬糸状虫感染犬の肺動脈病変形成に対するアンギオテンシン変換酵素阻害薬およびアンギオテンシン・受容体拮抗薬の効果、第 126 回日本獣医学会
20. 岩間良子、小川実幸、日比佐知子、尼崎 肇、鷹栖雅峰、福島正則、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)マウス口蓋ヒダ形成過程における上皮プラコード領域での上皮細胞の増殖と移動、第 126 回日本獣医学会
21. 高橋純子、高須正規、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)マウスの脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位、ME とバイオサイバネティクス研究会、信学技報 Technical Report of IEICE, MEB98-126

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. 実用新案登録
なし

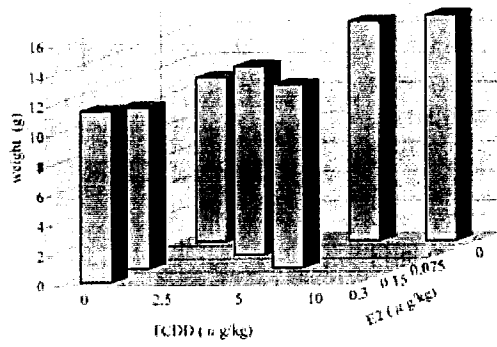


Fig. 1 Liver Weights in Ovariectomized Rats Treated with E2 and TCDD

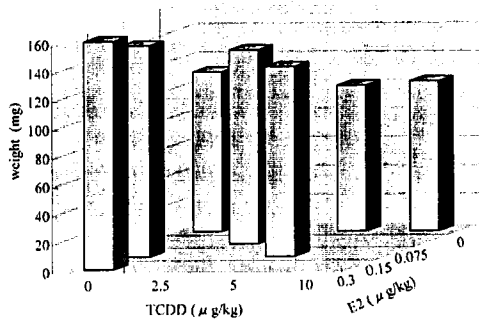


Fig. 2 Uterine Weights in Ovariectomized Rats Treated with E2 and TCDD

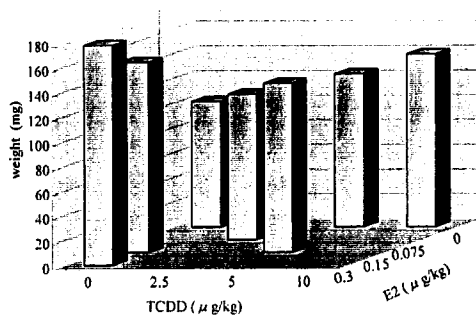


Fig. 3 Vagina Weights in Ovariectomized Rats Treated with E2 and TCDD

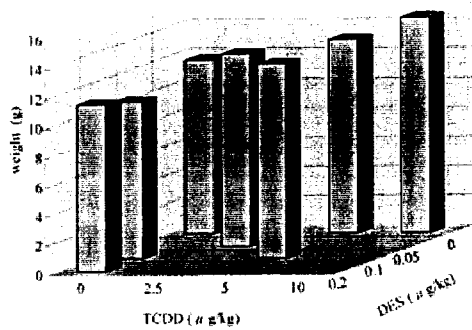


Fig. 1 Liver Weights in Ovariectomized Rats Treated with DES and TCDD

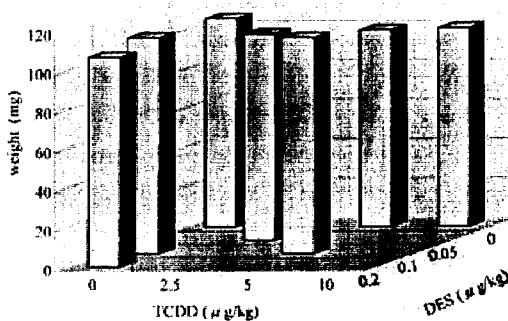


Fig. 2 Uterine Weights in Ovariectomized Rats Treated with DES and TCDD

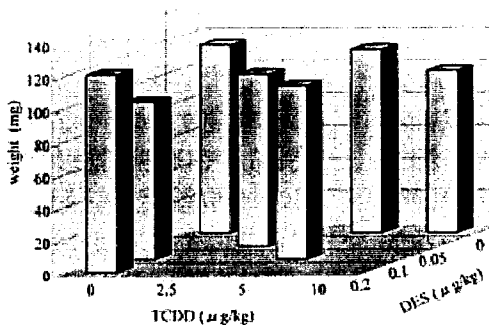


Fig. 3 Vagina Weights in Ovariectomized Rats Treated with DES and TCDD

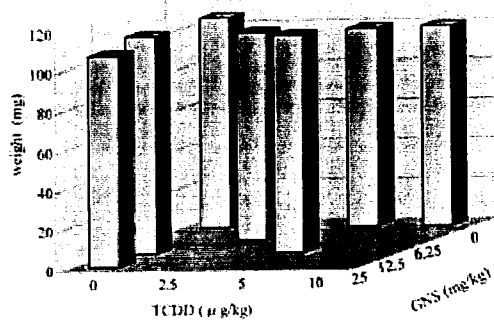


Fig. 2 Uterine Weights in Ovariectomized Rats Treated with GNS and TCDD

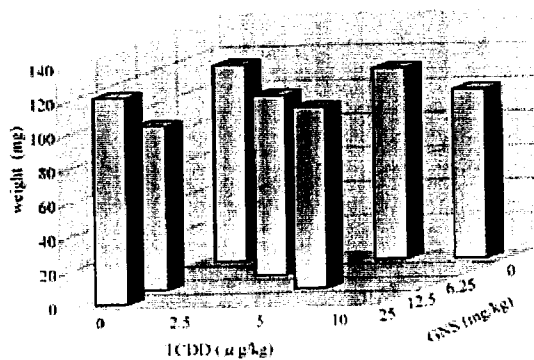


Fig. 3 Vagina Weights in Ovariectomized Rats Treated with GNS and TCDD