

子宮肥大試験を用いた内分泌かく乱化学物質の複合作用の検討

および OECD 対応等試験法開発部門プロジェクト

Bisphenol A のハーシュバーガー試験系に対する作用の検討

分担研究者 金子豊蔵 国立医薬品食品衛生研究所毒性部

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)と B(a)P あるいは TCDD の相乗作用について 1 群 6 匹、7 群構成）に基づき、より低用量の E2 と、より高用量の B(a)P あるいは TCDD による子宮肥大試験での相乗作用試験が現在実施中である。

エストロゲンレセプター(ER)を介する 17β -estradiol (E2)、Aryl hydrocarbone レセプター(Ahr)を介する TCDD あるいは B(a)P を併用投与し、卵巣摘出(OVX)マウスの子宮肥大を用いて相加あるいは相乗効果を予備試験した。

ハーシュバーガー試験においては、弱いエストロゲン様作用物質である Bisphenol A に関して、去勢雄ラットを用いたハーシュバーガー試験系において U 字型の反応曲線がみられるか否かを確認する。本研究課題については、OECD のハーシュバーガー試験法などに関する対応が遅れたため、実施を一時見合わせていたため、現在本試験の結果がまだ出せていない。ラット去勢 1 週間後より、bisphenol A および Testosterone Propionate を 14 日間反復皮下投与する。現在、予備試験が終了し、標的臓器の重量測定に際して、臓器の固定を行う方法を採用することとした。現在、本試験の準備中である。

A. 研究目的

卵巣摘出動物の子宮肥大に対する影響を、エストロゲンレセプター(ER)を介する化学物質と、Aryl hydrocarbone レセプター(Ahr)を介する化学物質の併用投与により相加あるいは相乗効果を検討する。

ハーシュバーガー試験では、Bisphenol A に関して、去勢雄ラットを用いてテストステロンとの間に U 字型の反応曲線がみられるか否かを確認する。

B.研究方法

1. B(a)P+E2 の子宮肥大作用における複合効果

8 週齢の C57BL/6 マウスを日本エスエルシー（株）より購入し、1 週間の馴化期間後、9 週齢で卵巣を摘出した。術後 1 週間目より B(a)P および E2 投与を開始した。B(a)P は試験開始日と 8 日後に、E2 は 14 日間反復皮下投与した。

投与用量は、(B(a)P、E2 : $\bigcirc \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $\bigcirc \mu\text{g}/\text{kg}$)の標記で示す。1 群 (対照群 0, 0)、2 群 (0, 0.45)、3 群 (0, 0.9)、4 群 (10, 0)、5 群(20, 0)、6 群(5, 0.225)、7 群(10, 0.45)である。容量は B(a)P および E2 各 10ml/kg とし、対照群にも同様に溶媒を反復投与した。投与 11 日目より死亡動物が見られたため、投与容量を E2 は 5ml/kg と半分に下げ、B(a)P の溶媒投与は中止した。溶媒は、B(a)P および E2 ともにコーン油に溶解した。E2 最終投与翌日にエーテル麻酔により屠殺後、子宮および膣を取りだし、子宮については、wet 重量と blotted 重量を測定した。

2. TCDD+E2 の子宮肥大作用における複合効果

8 週齢の C57BL/6 マウスを日本エスエルシー（株）より購入し、1 週間の馴化期間後、9 週齢で卵巣を摘出した。術後 1 週間目より投与を開始した。TCDD は試験開始日のみ、E2 は 14 日間反復皮下投与した。

投与量は、(TCDD、E2 : $\bigcirc \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $\bigcirc \mu\text{g}/\text{kg}$)の標記で示す。1 群 (対照群 0, 0)、2 群 (0, 0.45)、3 群 (0, 0.9)、4 群 (5, 0)、5 群(10, 0)、6 群(2.5, 0.225)、7 群(5, 0.45)である。容量は TCDD および E2 各 10ml/kg としたが、B(a)P+E2 の試験で溶媒が起因と思われる死亡がみられたため、投与 9 日目より E2 の容量を 5ml/kg と半分に下げ、TCDD の溶媒投与は中止した。

溶媒は、TCDD および E2 ともにコーン油に溶解した。E2 最終投与翌日にエーテル麻酔により屠殺後、子宮および膣を取りだし、子宮については、wet 重量と blotted 重量を測定した。

3. BisphenolA+Testosterone Propionate のハーシュバーガー試験系に対する作用の検討

5 週齢の Crj:CD ラット(IGS)を日本チャールスリバーより購入し、1 週間の馴化期間後、精巣を摘出し、術後 1 週間目より投与を開始する。実験は、1 群 6 匹の 7 群で実施する。ビスフェノール A および Testosterone Propionate とともに試験開始日より 1 日 1 回、14 日間反復皮下投与する。投与用量は (BisphenolA, Testosterone Propionate, $\bigcirc\text{mg}/\text{kg}$ 、 $\bigcirc\text{mg}/\text{kg}$) の標記で示した。1 群 (0, 0.5)、2 群 (12.5, 0.5)、3 群 (17.5, 0.5)、4 群 (25, 0.5)、5 群 (35, 0.5)、6 群 (50, 0.5)、および 7 群 (70, 0.5) とする。予備試験ではさらに、8 群 intact(0, 0)および 9 群 castration (対照群 0, 0) のサテライト群を置いた。投与容量は BisphenolA および Testosterone Propionate 各 0.1ml/100gB.W とする。最終投与翌日にエーテル麻酔

下で屠殺し、臓器を一括して固定後、精囊、前立腺腹側葉、球海綿体筋+肛門挙筋、精巢上体を分離し重量を測定する。これにより、本手法を食品薬品安全センターのデータと比較検討する。

C. 研究結果

上記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。前年度の広瀬班の経費で実施していた実験がその予備試験に相当するため、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についての確認のために実施されたものである。

1. B(a)P+E2 の子宮肥大作用における複合効果

投与期間中死亡がみられた。投与 11 日目 2 群: B(a)+E2 (0, 0.45) 1 匹、投与 12 日目 1 群: (0, 0) 1 匹、4 群: (10, 0) 1 匹、投与 14 日目 4 群: (10, 0) 1 匹、6 群: (5, 0.225) 1 匹と何れも投与直後に全身が弛緩し、対照群にも死亡がみられた。死亡動物の肉眼所見は、投与部位の皮下および腹腔内にコーン油が充満していた。

生存動物について、体重の変化は群間による差はなかった。

子宮絶対重量は、B(a)P 投与群は、対照群と変わらなかった。E2 投与群は、0.45 および 0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群とも対照群に比し有意な増加を示したが、投与群間ではあまり差がなかった。B(a)P と E2 併用群は、E2 0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 単独投与群と同じ増加を示し、B(a)P による影響はみられなかった (Fig 1)。

2. TCDD+E2 の子宮肥大作用における複合効果

何れの群でも一般状態の変化および死亡はみられなかった。

子宮絶対重量は、TCDD 投与群は、対照群と変わらなかった。E2 投与群は、0.45 および 0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群とも対照群に比し有意な増加を示したが、投与群間ではあまり差がなかった。TCDD と E2 併用群は、TCDD 高用量群では E2 の効果を阻害したが、低用量群では変化はみられなかった (Fig 2)。

3. ハーシュバーガー予備試験では、体重は、精巢摘出 3 日目より有意な増加抑制がみられ、投与終了時まで継続して抑制した。前立腺、球海綿体筋+肛門挙筋。精囊の重量ともに、8 群の精巢摘出し、Testosterone Propionate を投与していない群に比し、何れも投与した群および 7 群の intact 群では重量増加がみられたが、BisphenolA による影響は顕著にみられなかった。本試験は、現在準備中である。

D. 考察

子宮肥大試験は、投与期間中、対照群にも死亡動物がみられ溶媒に起因するものと考えられた。

B(a)P および TCDD は共に AhR を介するが、E2 による子宮肥大に対する影響は、

TCDD は阻害傾向、B(a)P は無影響であった。

ハーシュバーガー予備試験において、未固定での重量測定は各臓器ともにばらつきが大きく、固定後の測定法が有用と結論された。本試験では、採取した臓器をホルマリン固定した後、拡大鏡下でのトリミングを行い、臓器重量を測定することによりこの問題は解決できるものと思われる。

E. 今年度の計画

子宮肥大試験は、前年度は、B(a)P+E2 は E2 の高用量および低用量群共に B(a)P による影響がみられなかったため、今年度は、E2 の用量を抑え、B(a)P については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検討する。

更に、TCDD+E2 についても、同様に E2 の用量を抑え、TCDD については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検討する。各試験とも溶媒の容量を 1/4 に下げる。

2000 年 3 月中に決定する予定である子宮肥大試験の prevalidation の第 2 段階をようやくスタートし、ハーシュバーガー試験の prevalidation においてもプロトコールに沿った試験を OECD の決議に従って試行する。更に、必要に応じてそれらのプロトコールの改良等に必要な基礎的データの改善を行う。

F. 研究発表

1.論文発表

Ohno Y, Kaneko T, Inoue T, Morikawa Y, Yoshida T, Fujii A, Masuda M, Ohono T, Hayashi M, Momma J, Uchiyama T, Chiba K, Ikeda N, Imanishi Y, Itagaki H, Kakishima H, Kasai Y, Kurishita A, Kojima H, Matsukawa K, Nakamura T, Ohkoshi K, Okumura H, Saijo K, Sakamoto K, Suzuki T, Takano K, Tani N, Usami M, Watanabe R, : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients 1)Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. Toxicology in Vitro, 13, 73-98(1999)

Minegishi K, Suzuki S. Kaneko T, Inoue T, and Takahashi A., Metabolic fate of N,N'-Dimonomethylphenyl-p-phenylenediamine in the 2 year feeding test, Jpn J Toxicol Environ Health 44 p.37(1998)

Minegishi K. Suzuki S. Kaneko T, Inoue T, and Takahashi A., Distribution, accumulation and excretion of N,N'-Dimonomethylphenyl-p-phenylenediamine in the 2 year feeding test in rats, Jpn J Toxicol Environ Health, 43(6), 336-347(1997)

2.学会発表

Byung-Il Yoon, yoko Hirabayashi, Yukio Ogawa, Jun Kanno, Tohru Inoue, Toyozo Kaneko, The oscillating recovery in cellularity of the bone marrow and CFU-GMs after intraperitoneal 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) exposure. 19th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, September 12-17, 1999-Venice, Italy

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

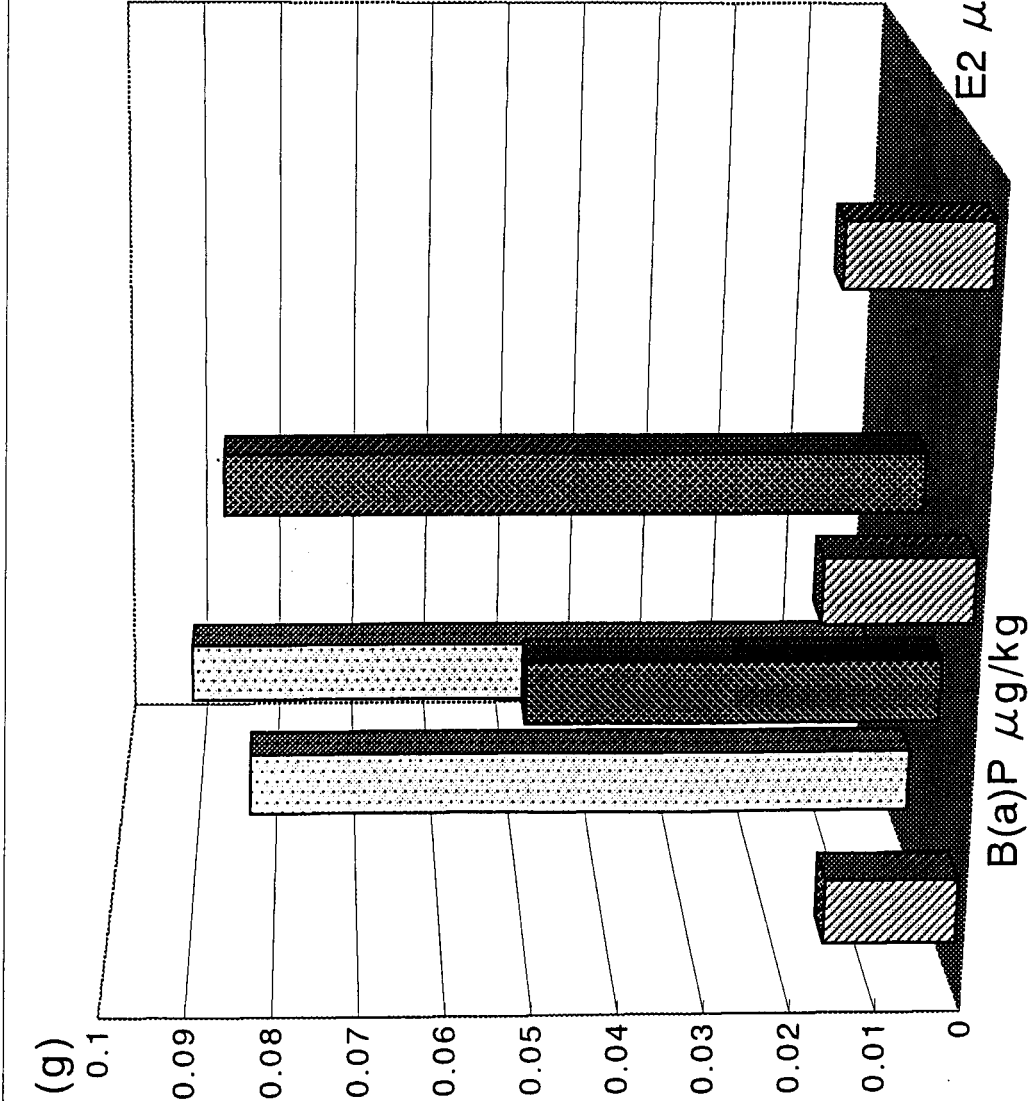


Fig.1 B(a)P+E2:Uterus weight/absolute

群	B(a)P(μg/kg)	E2
①	0	0
②	0	0.45
③	0	0.9
④	10	0
⑤	20	0
⑥	5	0.225
⑦	10	0.45
投与頻度	1回/wk	1回/day

B(a)P +E2 (○ μg/kg, ○ μg/kg)

⑤ (20, 0)

④ (10, 0)

⑥ (5, 0.225)

E2 μg/kg

B(a)P μg/kg

① (0, 0)

② (0, 0.45)

③ (0, 0.9)

群	TCDD($\mu\text{g/kg}$)	DES
①	0	0
②	0	0.3
③	0	0.6
④	5	0
⑤	10	0
⑥	2.5	0.15
⑦	5	0.3
投与頻度	1 回/2wk	1 回/day

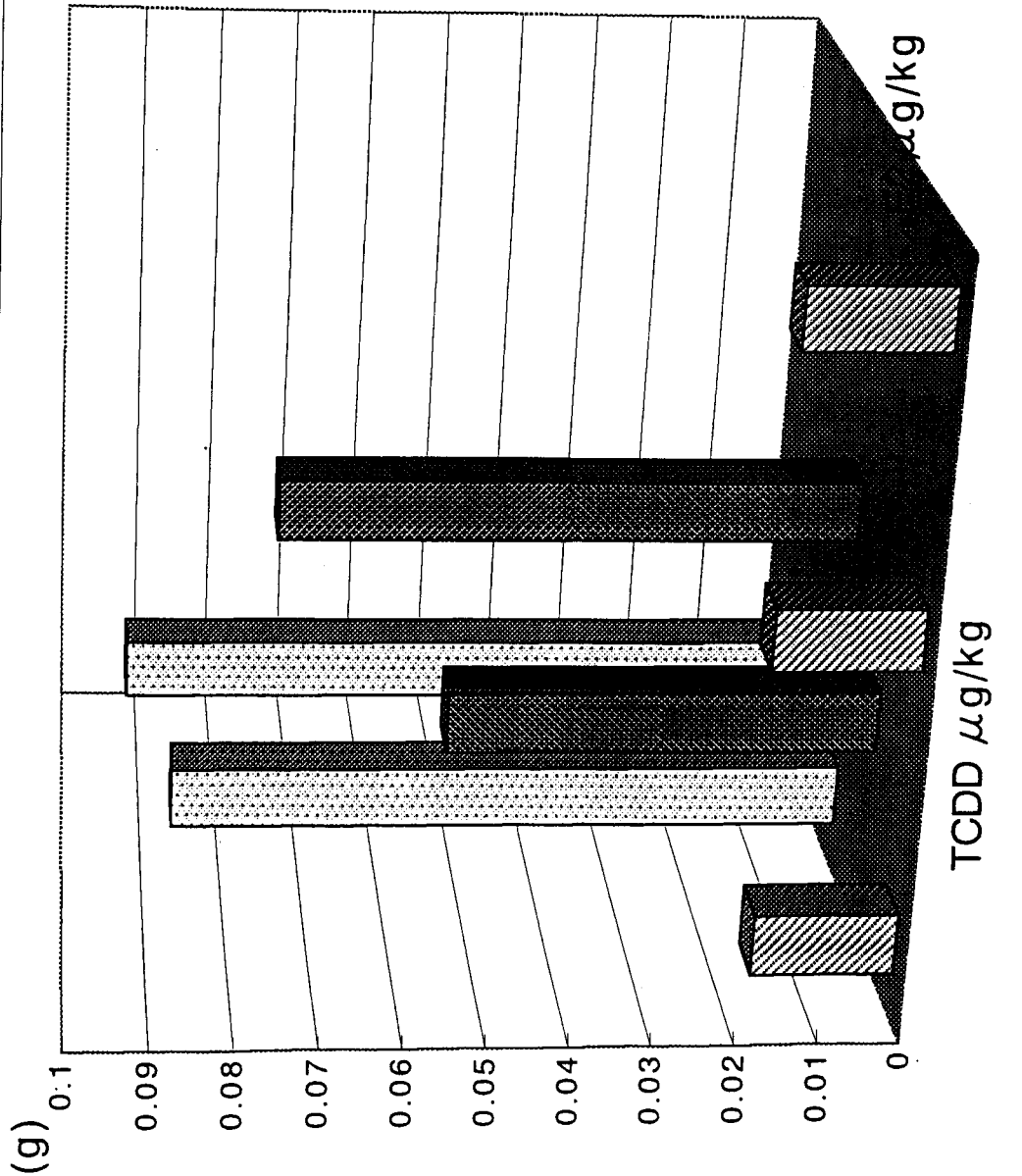


Fig.2 TCDD+E2: Uterus weight/absolute