

③ 研究報告書

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業） 分担研究報告書

子宮肥大試験法およびHershbergerの試験法の適用に関する研究
ならびに胎児の子宮内位置による内分泌生殖器系に対する影響に関する研究

分担研究者 吉村 慎介、太田 亮、長尾哲二、丸茂秀樹、大原直樹、今井 清

研究要旨

OECD バリデーションプロトコールに従い、0.01 から 10 μ g/kg/day の 17-Ethinyl estradiol(EE) を幼若ラットあるいは卵巣摘出ラットに投与した。その結果、EE による子宮肥大作用の用量依存性が認められ、経口投与した幼若ラットでは 1 μ g/kg/day 以上、皮下投与した幼若および卵巣摘出ラットでは 0.3 μ g/kg/day 以上の EE 投与群で有意な重量増加が示され、さらに、ZM 189.154(ZM) の抗エストロゲン作用についても確認された。更に、ビスフェノール A + testosterone propionate のハーシュバーガー試験に対する作用の検討、胎児期の子宮内位置の生後発育に及ぼす影響の検討を行う。

A. 研究目的

1. 化学物質のエストロゲン様作用を *in vivo* で鋭敏に検出する試験系の確立を目的として、幼若雌あるいは卵巣摘出ラットを用いて、エストロゲンのアゴニストまたはアンタゴニストを投与し、子宮増殖の反応性について検討する。
2. ハーシュバーガー試験法による 2 つの内分泌かく乱候補物質の複合作用を検討した際に示唆されたビスフェノール A による U 字型の反応曲線がみられるか否かを検討する。
3. 内分泌かく乱化学物質の標的が、胎児、新生児（未成熟期）、成人（性成熟期）および老年期に亘りその各々に対して、作用点、作用機序、影響が異なることが示唆されているが、中でも性未熟期の検討が立ち遅れている。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. 試験は、A. 幼若ラット 3 日間経口 (Immature PO)、B. 幼若ラット 3 日間皮下投与 (Immature SC)、C. 卵巣摘出ラット皮下投与の 3 種で構成され、さらに C の試験については 3 日 (OVX 3-day) および 7 日間投与 (OVX 7-day) の 2 種を実施した。

動物は SD 系雌ラット (Crj:CD(SD) IGS、SPF、日本チャールス・リバー株式会社) を購入して使用した。幼若ラットは、生後 14 日齢で購入し、検疫と馴化を兼ねて 5 日間にわたり予備飼育した後、20 日齢から投与を開始した。卵巣摘出ラットは、生後 5 週齢で購入し、検疫と馴化を兼ねて 12 日間にわたり予備飼育した後、卵巣を摘出し、摘出後 8 日目から投与を開始した。

全飼育期間を通じて、温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50～65%、換気回数約 15 回/時、照明 12 時間（7～19 時点灯）に制御された飼育室内で、金属製金網床ケージ（220W × 270D × 190Hmm、日本ケージ）に幼若ラットは 3 匹ずつ、卵巣摘出ラットは 1 匹ずつ収容し、固型飼料 CE-2 および水道水を自由摂取させて飼育した。

各群6匹からなる11群に分け、第1群は、無処置対照群、第2群は溶媒（ゴマ油）対照群とし、第3から9群には、それぞれ0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ のEEを投与した。第10群は0.1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ のZM、第11群は1.0 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ のZMを投与した後、試験Aのこれら両群には3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ のEEを、試験Bおよび試験Cのこれら両群には0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ のEEを投与した。

1日1回、連日投与し、ZMはEEを投与する直前に行った。なお、EEおよびZMは少量の95%エタノールに溶解した後、ゴマ油で希釈して所定の濃度に調製した。ただし、ZMの溶解は、60℃前後に加温して行った。

全例について、飼育期間中毎日一般状態の観察を行ったほか、投与開始日、投与期間中毎日および解剖日に体重を測定した。最終投与24時間後に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させ、卵巣、子宮および腔を摘出した。卵巣および腔を切除して子宮重量(Wet weight)を測定した後、子宮壁の一部を切開して子宮内液を除去し、再度重量(Blotted weight)を測定した。

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

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。Bisphenol AおよびTestosterone Propionate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、bisphenol A、Testosterone Propionate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（12.5、0.5）、第3群（17.5、0.5）、第4群（25、0.5）、第5群（35、0.5）、第6群（50、0.5）、第7群（70、0.5）および第8群（100、0.5）。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。副生殖器官については病理組織学的検査を実施する。

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、食薬センターで実施し、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。

C. 研究結果

上記2、3の研究課題については、OECDとの対応が決まらず、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。今回は、研究課題1について報告する。

1. 体重(Fig. 1)

解剖日体重は、幼若ラットでは溶媒対照群との間に差はなかったが、卵巣摘出ラットでは、3日間投与試験ではEE 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群で有意に低下し、7日間投与試験ではEE 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の投与群で有意に低下した。

子宮重量(Fig. 2)

Blotted weight については、経口投与した幼若ラットではEE 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の投与群で、皮下投与した幼若ラットではそれよりも低いEE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の投与群で溶媒対照群より有意な増加が認められた。皮下投与した卵巣摘出ラットでも、3日間投与試験では幼若ラット皮下投与試験と同様にEE 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の投与群で有意な増加が認められ、7日間投与ではさらに低いEE 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群にも有意差がみられた。

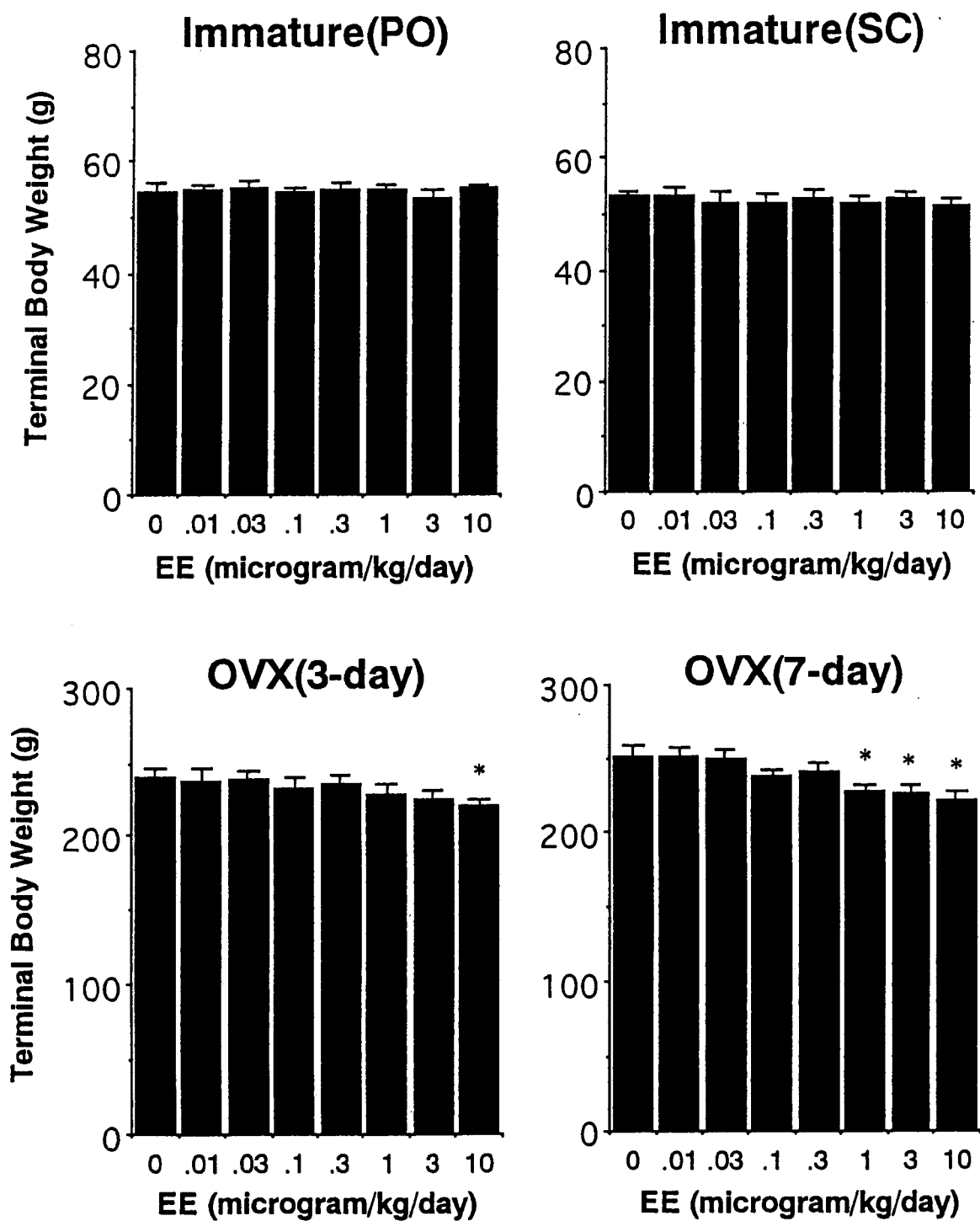
Wet weight でもほぼ同様の結果がみられたが、3日間投与した卵巣摘出ラットでは、Blotted weight よりも高い1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上で有意差を示した。

これらの結果からTable 1に示すED50値が推定された。Blotted weight (Absolute) については、幼若ラット皮下投与の値(0.57 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)は、卵巣摘出皮下3日間投与(0.48 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)あるいは7日間投与(0.31 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)の値とほぼ同様であるが、幼若ラット経口投与の値(1.75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)はそれの約3倍であった。

Wet weight でのED50 値は、いずれの試験においても Blotted weight より高い値を示した。

ZM の作用(Fig. 3)

ZM で前処置した EE 投与群では、ZM を投与しない同用量の EE 群と比較すると、ZM 0.1 および 1.0 mg/kg/day 投与群では、子宮重量(Blotted weight)は低下し、幼若ラット経口投与試験では ZM 1.0 mg/kg/day 群で、他の試験ではいずれの ZM 投与群にも有意な低下がみられた。また、幼若ラット皮下投与および卵巣摘出ラット皮下投与試験では、ZM 1.0 mg/kg/day 投与群の子宮重量は、溶媒対照群とほぼ同程度の値を示した。



*p<0.05 (Williams test)

Fig. 1 Terminal body weight in uterotrophic screening assay

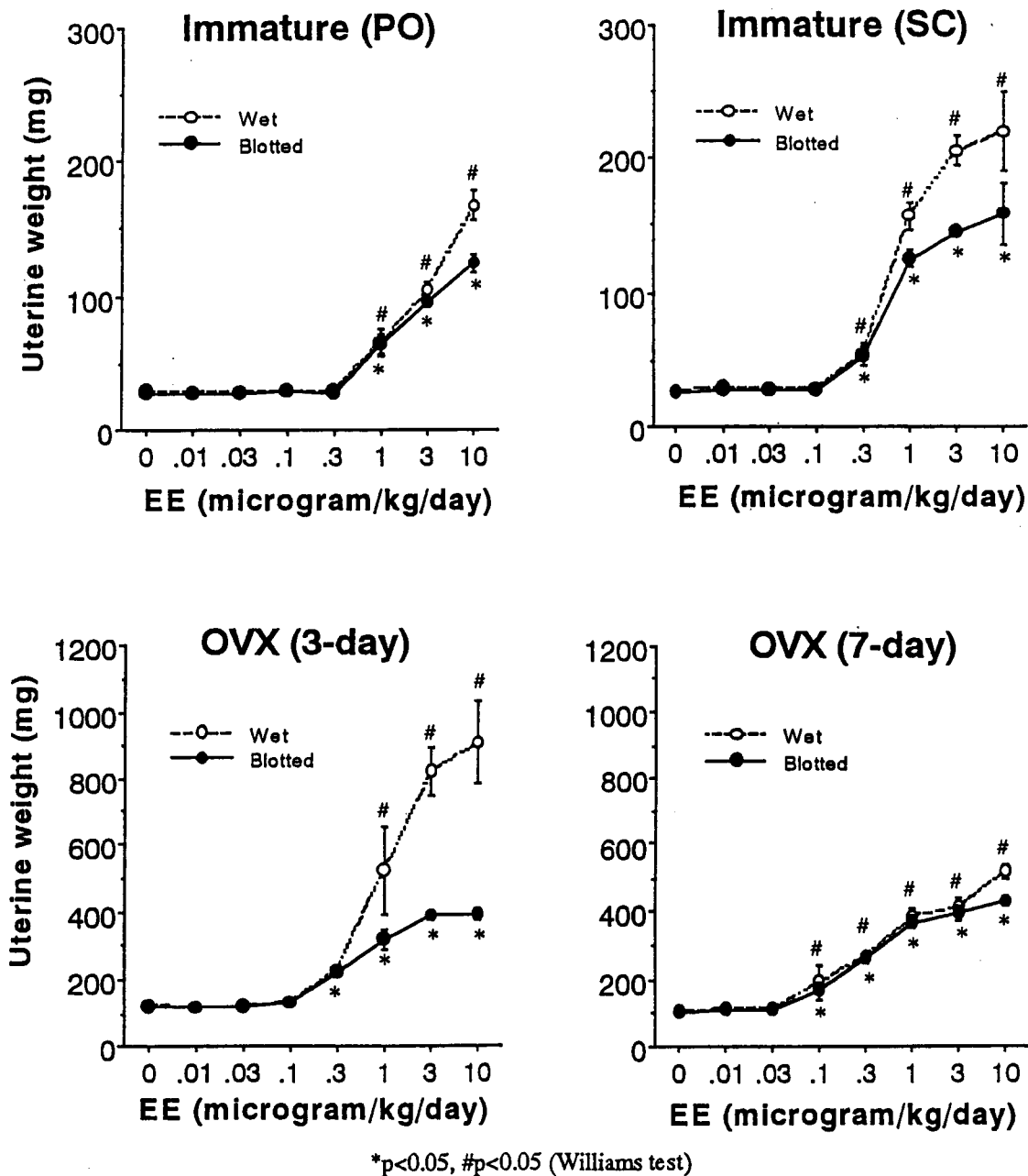
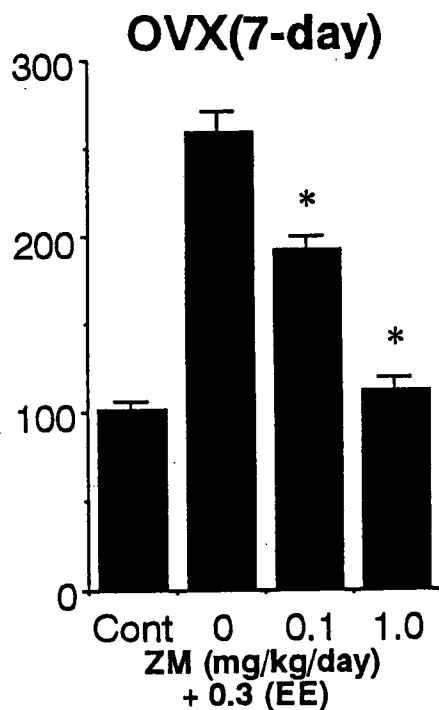
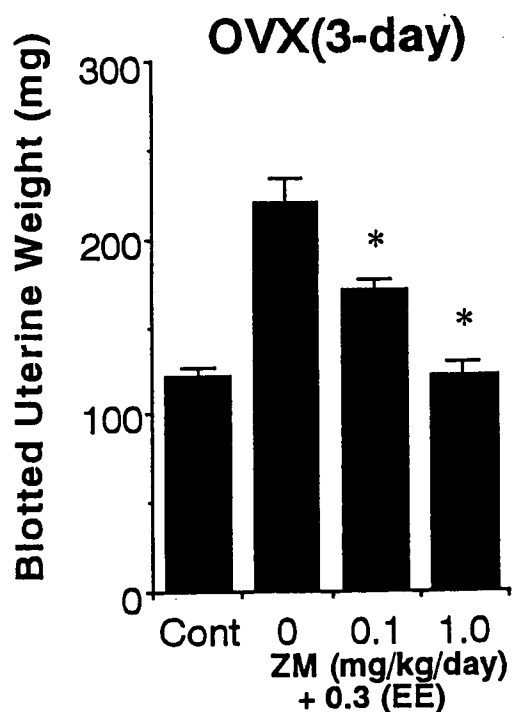
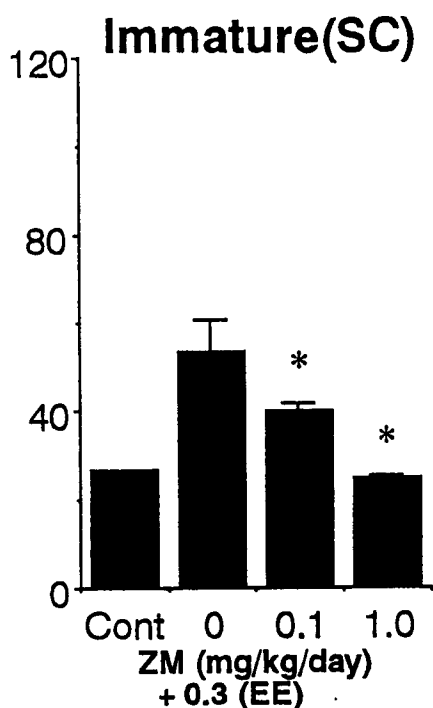
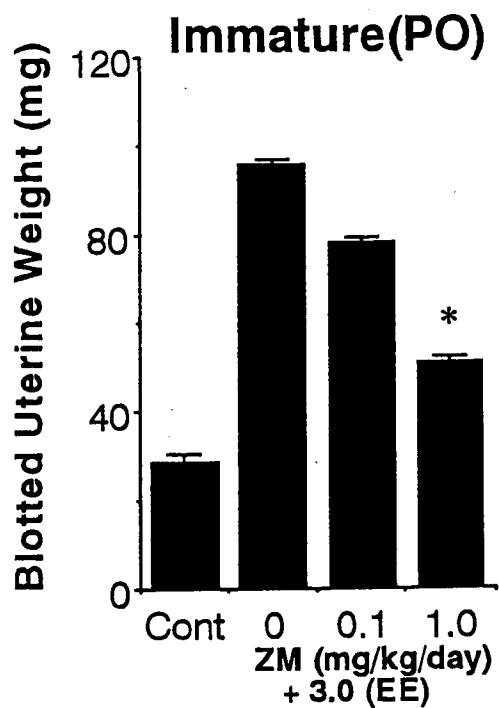


Fig. 2 Uterine weight in uterotrophic screening assay

Table 1 Summary of ED50 (µg/kg/day)

	Uterine weight			
	Wet		Blotted	
	Absolute	Relative	Absolute	Relative
Immature (PO)	3.81	3.24	1.75	1.6
Immature (SC)	0.70	0.69	0.57	0.58
OVX (3-day)	1.00	1.01	0.48	0.52
OVX (7-day)	0.57	0.67	0.31	0.35



* $p < 0.05$ (Williams)

Fig. 3 Effect of ZM 189.154 on uterine weight
in uterotrophic screening assay