

マウス新生児期の化学物質曝露による生殖器系の発達 および老化に及ぼす影響の研究

大向英夫¹, 太田 亮², 豊泉友康², 宮原 敬³, 永田伴子⁴, 丸茂秀樹⁵, 小野 宏⁶

Effects of neonatal chemical exposure on the development and aging of the reproductive system in mice

Hideo OHMUKAI¹, Ryo OHTA², Tomoyasu TOYOIZUMI², Takashi MIYAHARA³,
Tomoko NAGATA⁴, Hideki MARUMO⁵, Hiroshi ONO⁶

In the previous study, one-lifespan test using rats revealed that neonatal chemical exposure affected the development of female reproductive system and its aging. In order to confirm the reproducibility of the previous findings, another one-lifespan test was performed using mice and the aging process of reproductive function was observed. Neonates of C57BL/6J mouse were submitted to forced oral administration of diethylstilbestrol (DES) at doses of 0 (vehicle), 0.005, 0.05, 0.5 and 5 µg/kg for 5 days after birth. Sexual maturation (vaginal opening of females and preputial separation of males) and estrous cycles of females (at 8 to 54 weeks of age) were examined. The observation of animals was terminated at 117 weeks of age and survival rate were determined.

Body weight of females was significantly higher in groups of 0.05 µg/kg or more as compared to the vehicle control group. Vaginal opening delayed significantly in the group received DES at 5 µg/kg than the vehicle control group. Normal estrous cycles were observed only in few females of 5 µg/kg DES group throughout the study, and in less than 20% of 0.5 µg/kg DES group females on 28 weeks and after. The lower survival rate was observed in the 0.5 and 5 µg/kg group females.

These results demonstrated that early exposure of low doses of DES potentially cause delayed sexual maturation, and compromised reproductive function such as estrous cyclicity in female mice. It is confirmed that disturbance on aging of reproductive system by neonatal chemical exposure occurs in female mice as well as female rats.

緒 言

内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）に関する大きな問題点は、低用量域での変化を有害作用とするか否かである。米国食品医薬品局（FDA）は、ビスフェノール A に関する報告の中から GLP 基準で実施された試験結果のみを信頼できる資料として選別し、それらから、低用量域での影響はないものと判断した¹⁾。しかし、一方で GLP 基準

非対応の実験結果にも科学的に確実なものがあり、それらを見捨てる事は適切ではないという意見も出された²⁾。Myers らは、適切な試験計画に適切な陽性対照群、さらには高感度な試験法を指標に、リスクアセスメントは行われるべきだと主張している。一方で、GLP 基準非対応の実験結果は再現性に乏しく、実験方法も研究機関によって異なるなどの問題点が指摘されている³⁾。このようなことから、内分泌攪乱化学物質の確定試験には、科学的に適切で、再現性の高い評価項目（エンドポイント）が求められている。

われわれは、新生児期に投与したジエチルスチルベストロール（DES）が⁴⁾、Sprague-Dawley 系ラット（SD ラット）の性周期の老化過程に影響

1 試験研究管理部基準毒性試験室

2 毒性部遺伝学研究室

3 毒性部毒性学第 1 研究室

4 毒性部長

5 毒性部病理学研究室

6 秦野研究所研究顧問

響を与える所見をすでに示した⁴⁾。本報告では、DESをC57BL/6J系マウス(B6マウス)の新生児期に投与し、児の発達、成熟および老化に至る段階において生殖器系への影響を検索する「マウス一生涯試験」を試み、「ラット一生涯試験」⁴⁾の所見と比較検討した。

材料と方法

試験には、日本チャールス・リバーから入手した妊娠14日のB6マウスを使用した。B6マウスは、エストロゲンに対して高感受性の近交系であり⁵⁾、遺伝子改変動物の背景系統として多用され、秦野研究所においては子宮肥大試験の背景データが豊富⁶⁾な系統である。入手した妊娠雌マウスは、床敷としてペパークリーン(日本エスエルシー)を入れたTPX樹脂製ケージ(143W×293D×148H mm)に1匹ずつ収容し、温度21～25℃、湿度40～75%、照明12時間(7時～19時点灯)に調節された飼育室で、固型飼料(CE-2, 日本クレア)と水道水を自由摂取させて飼育した。全ての実験操作は、「財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 動物実験に関する指針」に基づいて実施した(承認番号:1070476A および 2070014A)。

DESの投与経路として、前回実施したラット一生涯試験と同様に、強制経口投与を選択した。投与量は、子宮肥大試験で子宮重量増加が有意となる最小有効用量である5 µg/kg/dayを最高用量とし、公比10で減じて0.5, 0.05 および 0.005 µg/kg/dayの4用量を設定した。シグマ・アルドリッチ社(St. Louis, MO)から入手したDESを20 mg秤量し、1 mLのエタノールに溶解後、コーン油を加えて全量を20 mLとした1 mg/mL液を、コーン油で段階希釈して投与液とした。

新生児は、生後1日(分娩日を生後0日とした)に性別および外表奇形の有無を検査し、低体重や外表異常のない雌雄を試験に用いた。投与液量は10 mL/kg体重とし、マイクロシリンジおよび血管内カテーテル(アーガイル[®], PIカテーテルキット, 日本シャーウッド)を応用して作製した新生児用胃管を用いて、生後1日から生後5日まで1日1回投与した。投与した児動物は、生後21日に離乳させ、離乳後は、ペパークリーンを入れたTPX樹脂製ケージ(235H×325D×170H

mm)に5～6匹ずつ収容した。児動物の体重を、生後1～5日目までは毎日測定し、以降10週齢までは週1回、10週齢以降は2週間に1回、26週齢以降は4週間に1回114週齢まで測定した。

性成熟の指標として、雌は生後21日から膣開口を、雄は生後23日から陰茎包皮分離を和田の方法⁷⁾に従い毎日観察した。さらに雌については、各群約24匹ずつ8週齢から54週齢まで2週間おきに毎日、膣垢を採取し、性周期を観察した。膣垢像を発情前期、発情期、発情休止期に分類し、渡辺らの方法⁸⁾に従って性周期の型を分類した。

各群5匹の雄は、15週齢時にペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血し、脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、前立腺腹葉、前立腺背側葉、精嚢、凝固腺の重量を測定した。また、各群雌雄6匹ずつには、20週齢時に 1×10^8 個/匹となる濃度に調製した洗浄ヒツジ赤血球溶液を尾静脈内投与し、投与後5日目に尾静脈より採血して、ヒツジ赤血球に対するIgM抗体価をELISA法⁹⁾により測定した。これらの中間屠殺動物を除き、雌雄とも117週齢まで継続飼育し、生存日数を調べた。

離乳前の児に関するデータは腹単位、離乳以降のデータは個体を標本単位として一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められた場合はDunnnett法による多重比較検定を行った。有意水準は5%および1%とした。得られた結果を、SDラットを用いた一生涯試験の結果⁴⁾と比較検討した。

結果

体重推移：雌雄とも、離乳前から5週齢までの体重にDES投与の影響は認められなかった(結果は示さず)。しかし、その後の雌の体重は0.05 µg/kg以上の投与群で6週から86週において対照群より有意な高値を示し、用量依存的な体重増加が認められた(図1a)。雄の体重は0.05 µg/kg投与群で42週から46週に、5 µg/kg投与群で58週において対照群より有意な高値を示したが、用量依存性はなかった(図1b)。

性成熟：雌の膣開口日(平均±S.D.)は、5 µg/kg投与群(36.0±2.8)で対照群(32.3±1.7)より有意に遅延した(図2a)。雄の陰茎包皮分離時期に、DES投与の影響は認められなかった(図

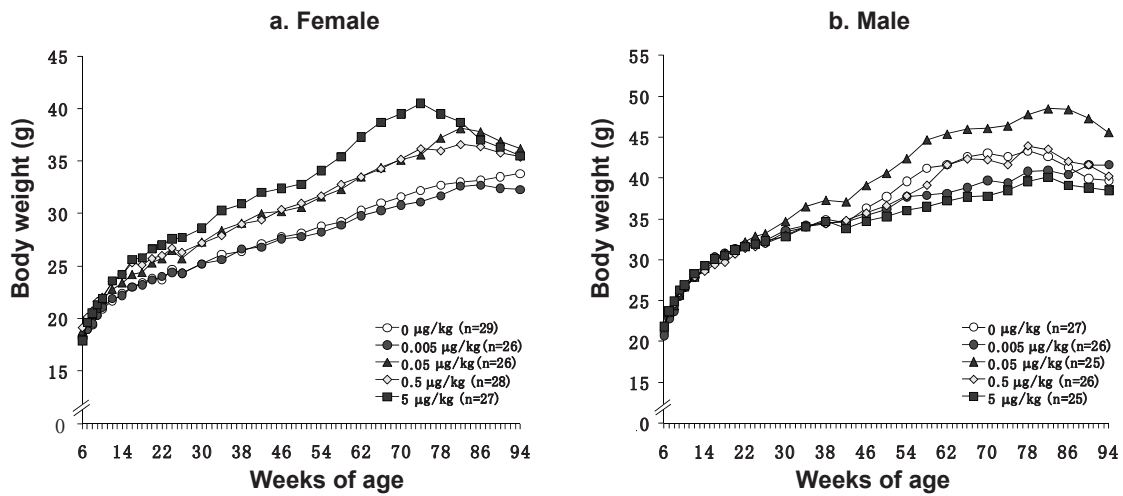


図1 新生児期に DES を投与した B6 マウスの体重推移

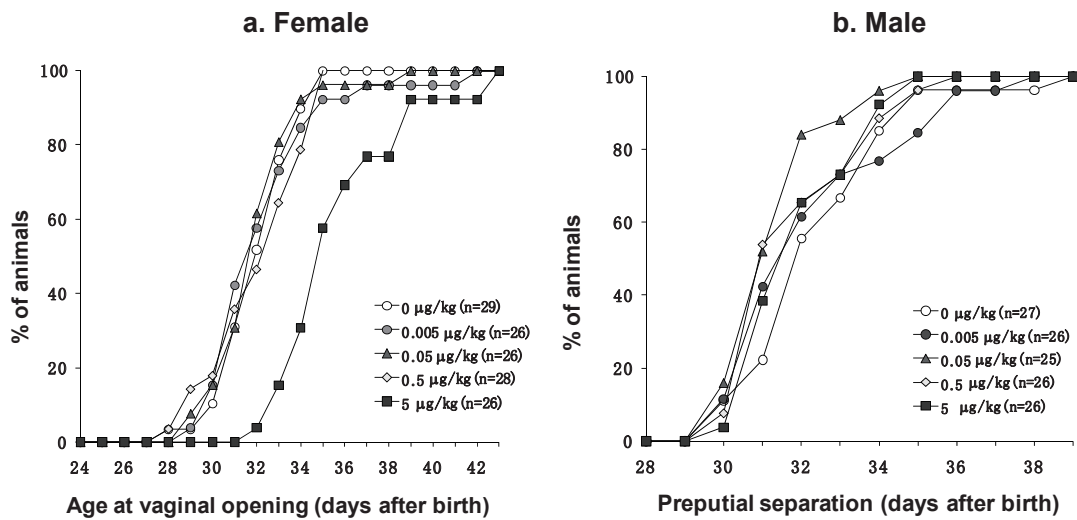


図2 新生児期に DES を投与した B6 マウスの腔開口日と陰茎包皮分離日

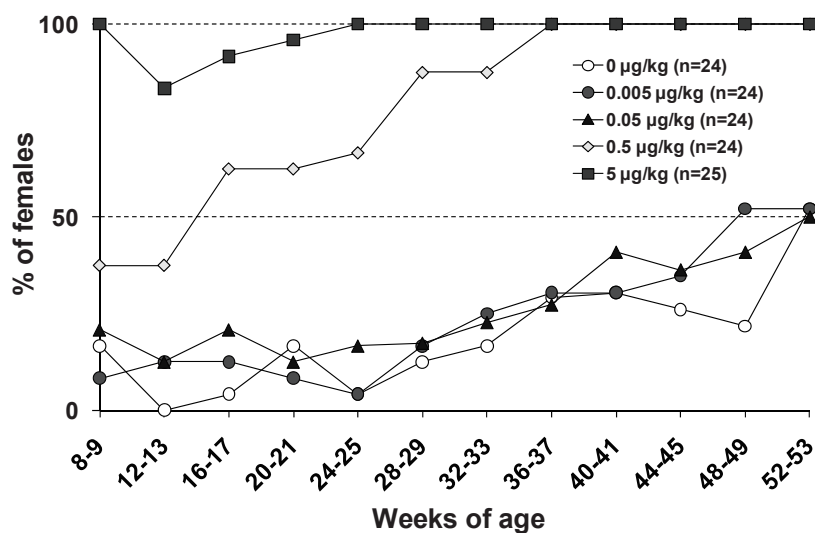


図3 新生児期に DES を投与した雌の B6 マウスにみられた異常性周期の推移

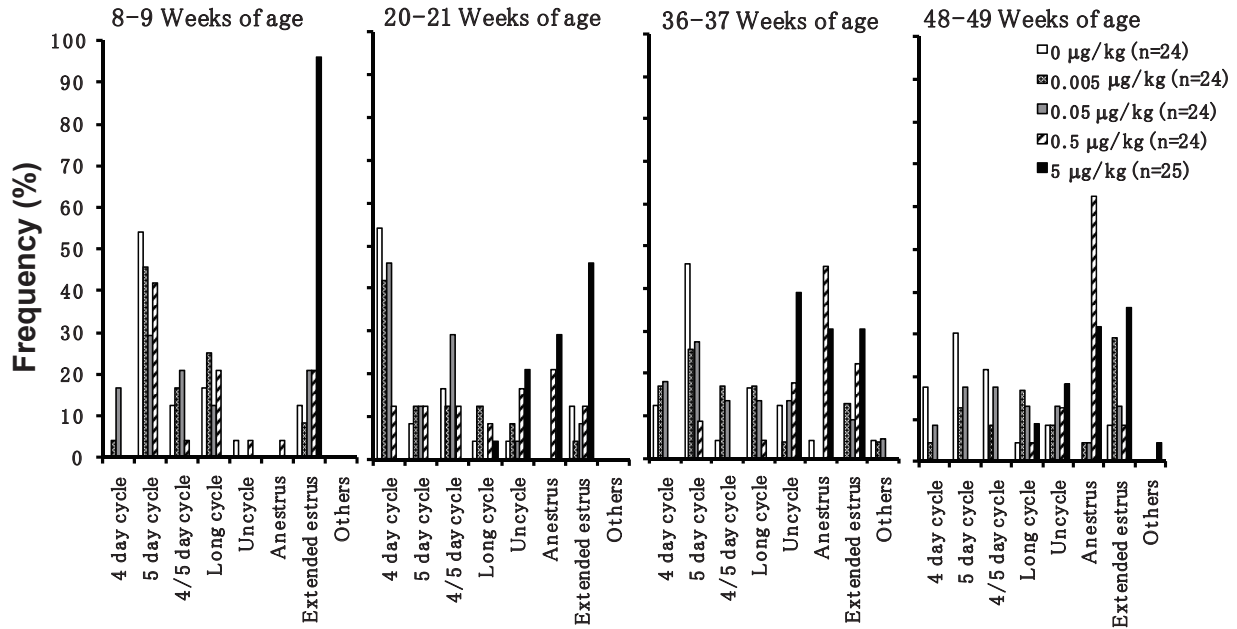


図4 新生児期に DES を投与した雌の B6 マウスにみられた性周期型の推移

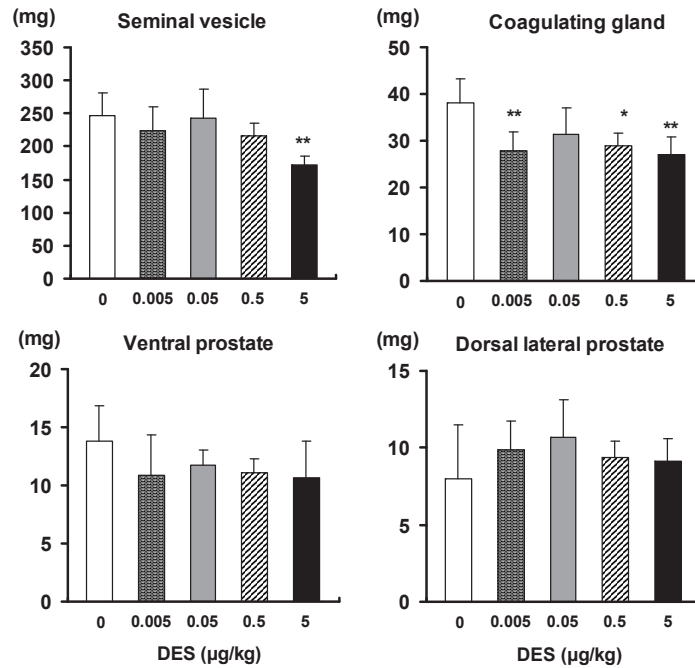


図5 新生児期に DES を投与した雄の B6 マウスの 15 週齢における副生殖器重量

各群5例の平均±標準偏差を表す。

*, ** は対照群と比較して有意差 (5%および1%) があることを示す。

2b). 5 µg/kg 投与群の雌では, 尿道開口部の過剰開裂¹⁰⁾ が 26 例中 2 例に認められた。

性周期: 異常な性周期を示した雌の割合を図 3 に示した。5 µg/kg 投与群では, 観察を開始した 8 週齢から正常な性周期を示す雌はほとんど認め

られなかった。0.5 µg/kg 投与群では, 28 週齢時までに 80%以上, 36 週齢以降は全例が異常性周期となった。0.05 および 0.005 µg/kg 投与群は対照群とほぼ同様に推移し, 異常性周期を示す雌が 28 週齢までは 20%以下, 52 週齢で約半数となった。性周

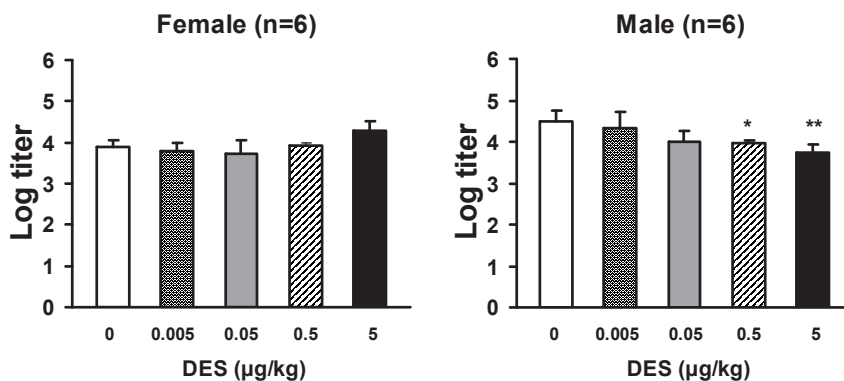


図6 新生児期にDESを投与したB6マウスのIgM抗体産生能

各群6例の平均±標準偏差を表す。

*, **は対照群と比較して有意差(5%および1%)があることを示す。

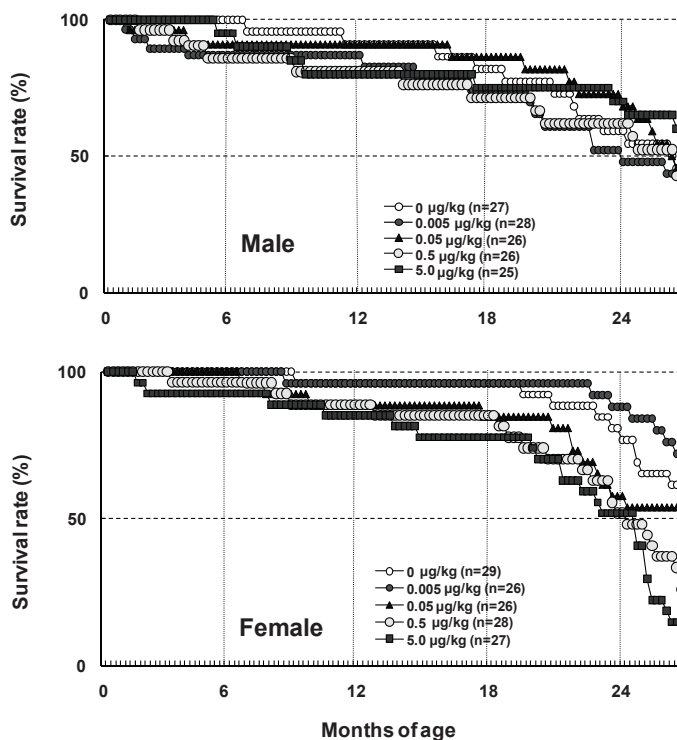


図7 新生児期にDESを投与したB6マウスの生存曲線

期を型別(図4)に見ると、5 µg/kg投与群で早期に認められた性周期異常の型は連続発情であったのに対し、0.5 µg/kg以下の投与群で加齢に伴って増加した異常周期の型は不規則周期や無発情であった。

器官重量: 15週齢に測定した雄の副生殖器重量を図5に示した。精嚢重量が5 µg/kg投与群で対照群と比較して有意に低下したほか、凝固腺重量が0.005, 0.5および5 µg/kg投与群で有意に

低下した。その他の器官重量にDES投与の影響は認められなかった。

免疫学的検査: 20週齢に測定したヒツジ赤血球に対するIgM抗体価を図6に示した。雌では対照群とDES投与群との間に有意差は認められなかったが、雄では用量依存的に低下する傾向があり、0.5 µg/kg以上の投与群で有意差が認められた。

生存曲線: 雌雄の生存曲線を図7に示した。

雄の生存日数に DES 投与の影響は認められなかったが、雌の生存日数は、観察最終日の対照群の生存率が 61.5%であったのに対して、0.5 および 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では、それぞれ 25.9%および 14.8%と、短縮する傾向が認められた。

考 察

B6 マウスを用いた一生涯試験においても、SD ラットを用いた一生涯試験⁴⁾と同様に、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で新生児期の androgenization によると考えられる連続発情が観察されたほか、0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群でも遅発性の性周期異常が認められた。B6 マウスで認められた遅発性の性周期異常の型は、SD ラットで認められた異常の型⁴⁾と同じ不規則周期や無発情を示した。対照群にみられる加齢性変化に似た性周期異常が、新生児期の DES 曝露により誘発されることが、B6 マウスにおいても確認され、遅発性の性周期異常が内分泌攪乱化学物質を確定する上で、高感度で再現性の高い評価項目になると考えられた。

一方、B6 マウスの膣開口時期は 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で遅延し、膣開口時期が 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で早期化した SD ラットの結果⁴⁾とは一致しなかった。したがって、新生児期の化学物質曝露の影響を、視床下部・下垂体・性腺軸の発達を指標として評価する際には、動物種によって結果が異なる可能性を考慮する必要がある。ただし、同群で認められた尿道口の過剰開裂¹⁰⁾については、SD ラットを用いた一生涯試験⁴⁾でも認められていることから、再現性のある評価項目と考えられた。

新生児期の DES 投与による抗体産生能の低下が B6 マウスの雄で用量依存的に認められ、0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で有意差が認められた。ラット一生涯試験⁴⁾においても雄で抗体産生能の低下が認められていることから（未発表）、抗体産生能の検査は、内分泌攪乱化学物質を確定する上で、有用な評価項目の一つとして期待される。

その他、SD ラット一生涯試験⁴⁾では認められなかった新生児期の DES 曝露による体重増加が、B6 マウスの雌で認められた。低用量ビスフェノール A の周産期投与¹¹⁾でも SD ラットの雌で体重増加が報告されており、いずれも雄には認められていない変化であることから、遅発性のアナ

ボリック作用が疑われる。本研究においては 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で有意な体重増加が認められたことから、体重推移も内分泌攪乱化学物質を確定する上で、重要な評価項目になると考えられた。

15 週齢日に測定した精嚢と凝固腺重量の低下に関しては、同様の変化が SD ラット一生涯試験⁴⁾で認められていないことから、再現性に乏しい変化と考えられるが、マウスに特有の指標になる可能性もあることから、今後、追加の実験が必要と考えられた。

SD ラットを用いた一生涯試験⁴⁾の 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で確認された雌の生存日数の短縮が、B6 マウスの雌においても観察された。したがって、新生児期の DES 曝露は、ラット・マウスを問わず、雌の生存日数を短縮させると考えられ、これらの変化は、生体に及ぼす有害作用と判断できる。

結 論

本研究ではエストロゲン活性を有する DES をマウスの新生児期に投与し、発達から老化に至る段階において、生殖器系および免疫系を検索する試験を実施した結果、雌における性成熟の遅延、遅発性の性周期異常および体重増加、生存日数の短縮、雄における抗体産生能の低下、副生殖器重量の低下などが観察され、内分泌攪乱性を確定する上で、これらの評価項目の有効性を示した。しかし、マウス・ラット間で異なる結果も得られたことから、一生涯試験を実施する際は、適切な陽性対照群を置き、用いる動物種に適した検査項目を選択することが重要であることが示唆された。

謝 辞

本研究は、平成 20 年度厚生労働省厚生労働科学研究費の補助事業（化学物質リスク研究事業、H19-化学-一般-003）により実施した。本研究の試験計画は、国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部菅野純部長の御指導によるものである。研究の実施にあたり、抗体価測定では毒性学第 2 研究室、また病理解剖では病理学研究室、動物飼育管理では動物飼育管理室の協力を得た。

文 献

- 1) FDA: Draft assessment of bisphenol A for use in food contact applications: DRAFT version 08/14/2008.
- 2) Myers JP, vom Saal FS, Akingbemi BT, et al.: Why public health agencies cannot depend on good laboratory practices as a criterion for selecting data: The case of bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* 2009; **117**: 309-315
- 3) Tyl RW: Basic exploratory research versus guideline-compliant studies used for hazard evaluation and risk assessment: Bisphenol A as a case study. *Environ. Health Perspect.* 2009; **117**: 1644-1651
- 4) 太田 亮, 宮原 敬, 又吉 健ら: 内分泌系攪乱性確定試験としてのラット一生涯試験の試み, 秦野研究所年報, 2007; **30**: 17-24
- 5) Spearow JL, Doemeny P, Sera R, et al.: Genetic variation in susceptibility to endocrine disruption by estrogen in mice. *Science.* 1999; **285**: 1259-1261
- 6) 太田 亮, 田面喜之, 宮原 敬ら: マウス子宮肥大試験, 秦野研究所年報, 2004; **27**: 28-35
- 7) 和田和義: AGD測定および包皮分離観察ならびにそれらの問題点. 秦野研究所年報, 2002; **25**: 109-114
- 8) 渡辺千朗, 代田真理子, 長尾哲二: SD系雌ラットの性周期の加齢性変化に関する研究. 秦野研究所年報, 1994; **17**: 37-40
- 9) Temple L, Kawabata TT, Munson AE, et al.: Comparison of ELISA and plaque-forming cell assays for measuring the humoral immune response to SRBC in rats and mice treated with benzo[a]pyrene or cyclophosphamide. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1993; **21**: 412-419
- 10) Sawaki M, Noda S, Muroi T, et al.: In utero through lactational exposure to ethinyl estradiol induces cleft phallus and delayed ovarian dysfunction in the offspring. *Toxicol. Sci.* 2003; **75**: 402-411
- 11) Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, et al.: Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrus cyclicity, and plasma LH levels. *Environ. Health Perspect.* 2001; **109**: 675-680