

## 令和 4 年度調査研究報告書

水稻関連試料における残留農薬分析値の変動に関する研究  
－ 粳米の均一化における変動要因解析 －  
－ 稲 WCS 残留農薬分析値の変動要因解析 －

試験番号 : IET 20-1005

令和 5 年 7 月  
一般財団法人残留農薬研究所  
化学部

|             |  |
|-------------|--|
| 室名及び担当者     | 化学部残留第1研究室<br>長田 拓也 (研究総括), 土橋 ひかり, 横瀬 千春  |
| 課題名         | 水稲関連試料における残留農薬分析値の変動に関する研究<br>－籾米の均一化における変動要因解析－<br>－稲 WCS 残留農薬分析値の変動要因解析－   |
| 目的          | 水稲関連の実残留試料 (籾米および稲 WCS) を用いた試料均一化～抽出工程に由来する残留農薬の分析値の変動要因の解析結果に基づき, 当該試料に対する分析操作上の課題を整理し, 残留農薬分析技術の向上を図ることを目的とする。   |
| 調査研究期間      | 令和2年4月1日から令和5年3月31日<br>3年計画の3年目 (籾米, 稲 WCS)  |
| 前年度までの結果の概要 | <p>令和2年度は, 茨城圃場で栽培した稲 WCS (箱処理剤: 農薬 A, 農薬 B, 茎葉散布剤: 農薬 C, 農薬 D, 農薬 E) を用いて, 常温粉砕法での均一性, 凍結粉砕法の適用性, 部位別の残留農薬濃度を調査した。</p> <p>粉砕が不十分な粗粉砕試料では, 常温粉砕法および凍結粉砕法とも均一性に問題があることを確認した。微粉砕試料では, いずれの粉砕法においても均一性に問題は認められず, 各農薬の分析値の変動係数 (CV: coefficient of variation) は, 4%以下と良好であったが, 常温粉砕後の試料温度は比較的高温となり, 1~4 mm 程度の試料が混在していた。一方, 凍結粉砕で調製した試料は, 1 mm 程度の微細な試料であり, 粉砕後の試料温度も -20℃以下であったことから, 稲 WCS の調製試料の作製には凍結粉砕法が適切であることを確認した。また, 稲 WCS 植物体を上部, 中間部, 下部に分けた部位別の調査では, 農薬の種類, 施用方法や水分量の違いによって植物体内の残留濃度分布は大きく異なることを確認した。以上の結果より, 稲 WCS の試料調製の均一性が不十分な場合には, 部位別の残留農薬分布, 水分量および粉砕粒度の違いが複合的に作用し, 残留農薬分析値の変動が大きくなることが示唆された。</p> <p>令和3年度は, 茨城圃場で栽培した水稲 (箱処理剤: 農薬 F, 農薬 G, 農薬 A, 茎葉散布剤: 農薬 C, 農薬 D, 農薬 E) の稲わらを用いて, 縮分操作の変動評価, 超遠心粉砕機内の均一性, 凍結粉砕法の適用性, 部位別の残留農薬濃度を調査した。</p> <p>稲わらは乾燥品の飼料であるため, 常温粉砕では超遠心粉砕機を用いる。超遠心粉砕機に供試可能な試料量は約 100 g であるため, 圃場から受領した試料 (5 束, 2 kg 以上) は全量を細断機で 5 cm 程度に細断し,</p> |

|                      |   |
|----------------------|---|
|                      | <p>混和試料から無作為に約 500 g を取り、5 回に分けて粉碎試料を調製する。粉碎機内の同心円上の 3 ヶ所から採取した分析値の CV は 5～7% であった。また、縮分操作による分析値の CV は 2～6% であり、残留農薬の均一性に問題は認められなかったが、粉碎試料の 33% は 1 mm を超える粒度であり、5 mm 程度の試料も散見された。稲 WCS と同様に凍結粉碎で調製した試料は、全体の 97% が 1 mm 未満の微細な試料であり、稲わらについても凍結粉碎法が適切であることを確認した。また、稲わらを上部、中間部、下部に分けた部位別の調査では、水分量に違いは認められなかったが、農薬の種類や施用方法の違いによって植物体内の残留濃度分布は大きく異なることを確認した。以上の結果より、稲わらについても全量一括粉碎が可能で微粉碎試料を調製可能な凍結粉碎が最適な方法であることを確認した。そして、乾燥品の粉末試料は、水分量の高い生鮮品の均一化試料（ジュース状）に比べて流動性が低いので、ミキサー内での均一性に留意し、微粉碎試料を十分に混和してから秤量する必要性が明らかとなった。</p> |
| <p>調査研究方法の概要</p>     | <p>令和 4 年度は、令和 3 年度に調製した籾米の実残留試料を用いて、試料調製工程における分析値の変動要因を調査した。現行標準操作である縮分操作の変動評価、超遠心粉碎機で粉碎した調製試料の均一性を確認し、凍結粉碎法の適用性を調査した。さらに実残留試料を用いて水膨潤操作、抽出溶媒や粉碎粒度の違いが抽出効率に及ぼす影響を調査した。</p> <p>また、茨城圃場で 6 種農薬（箱処理剤：農薬 H、農薬 A、茎葉散布剤：農薬 C、農薬 D、農薬 E）を処理した稲 WCS の実残留試料を経時的に採取し、試料採取時点での植物体の水分量の違いが残留農薬の減衰挙動に及ぼす影響を調査した。</p>   |
| <p>調査研究結果の概要及び考察</p> | <p><b>縮分操作の影響および超遠心粉碎機内の均一性：</b>籾米の現行標準操作は、受領試料の全量（1 kg 以上）から約 500 g を無作為に分取した後、超遠心粉碎機で少量のドライアイス投入しながら粉碎している。超遠心粉碎機に供試可能な試料量は約 500 g であるため、全量を一回で粉碎可能であるが、スクリーンの目開き 2 mm で粉碎した後、さらに目開き 0.75 mm で粉碎したものを分析試料としている。超遠心粉碎機で粉碎後、粉碎機内の同心円上の 6 ヶ所から試料を採取し、各農薬の分析値から算出した CV は、粗粉碎試料で 6～8%、微粉碎試料で 6～10% であり、粉碎粒度の違いによる影響は認められなかった。標準操作で調製した微粉碎試料は、1 mm の篩を全通し、飼料分析基準における分析試料の規定を満たしていた。実残留試料 2 kg から約 500 g を無作為に分取し、4</p>  |

つの縮分試料から求めた CV は 2~6%であり、縮分操作が均一性に及ぼす影響は無かった。粉砕機内の均一性および縮分操作に問題は認められなかったが、稲 WCS や稲わらと同様に全量凍結粉砕の適用性を確認した。なお、農薬 F および農薬 G は定量限界未満、農薬 A は定量限界レベルの検出濃度であったため、解析対象から除外した。

**凍結粉砕法の適用性：** 粳米の作物残留試験における必要採取量は 1 kg 以上である。粳米 1 kg に対して等量のドライアイス添加では、ミキサー壁面にドライアイス層が形成され、層内には未粉砕の粳米が散見された。一方、半量添加では全ての粳米が粉砕されていたことから、ドライアイスの添加量は試料に対して半量添加とした。ミキサーを 90 秒稼働したものを粗粉砕試料、さらに 150 秒稼働したものを微粉砕試料とし、ミキサー内の均一性を評価した。ミキサー内の任意の 6 ヶ所から採取した各農薬の分析値の CV は、粗粉砕で 38~42%、微粉砕で 3~6%であり、粉砕粒度が細くなると均一性は良好であった。凍結微粉砕試料における 1 mm を超える粒度の割合は 18%であり、篩上に残る試料は硬質の米であった。さらにドライアイスを加えて粉砕したが、粉砕粒度は改善されなかった。

粉砕機やミキサー内の均一性調査では、凍結微粉砕試料のほうが超遠心微粉砕試料に比べて CV は良好であったが、1 mm の篩を全通するのは超遠心微粉砕試料であった。また、2 kg の実残留試料を半量に縮分し、縮分試料の 1 つを超遠心粉砕機、もう一方を凍結粉砕で調製して残留農薬を比較したが、両試料の残留農薬濃度に違いは見られなかった。

**抽出条件の違いが残留農薬濃度に及ぼす影響：** 超遠心粉砕機で粉砕した実残留試料を用いて、水膨潤操作が抽出効率に及ぼす影響を確認した。水膨潤操作無しでアセトニトリルのみで抽出した場合、3 農薬の抽出効率は低下し、残留農薬を完全に抽出できなかった。抽出時に水が入っていれば膨潤時間無しでも良好であった。また、ホモジナイズ抽出を省略しても抽出効率に影響は無かった。溶媒種をアセトンやメタノールに変更しても含水抽出は必須であり、膨潤時間の必要性は認められなかった。そして、粳米中の残留農薬分布は農薬によって異なり、粒度が粗い試料では残留農薬を完全に抽出できなかったことから、粒度の細かい分析試料の調製が必要であることが示された。従って、現行の標準操作である受領試料を半量に縮分し、超遠心粉砕機での粉砕が適切であることを確認した。

**稲 WCS 植物体の水分量の違いが減衰挙動に及ぼす影響：** 圃場試験は、

試験地域の慣行時期および方法に準じて実施したが、水深の異なる2つの試験区（乾燥区、湿潤区）で稲 WCS の実残留試料を調製した。そして、最終散布 1, 7, 14 日後に採取し、残留農薬濃度を求めて水分補正前後の減衰挙動を確認した。採取された試料の水分量は、乾燥区で 60～64%、湿潤区で 64～69%であり、水分量の大きな違いは無かった。生鮮状態での残留農薬濃度は、いずれの農薬も速やかに減衰し、乾燥重量当りに補正しても減衰挙動は変わらなかった。本調査は、比較的長い経過日数となる箱処理剤の残留農薬濃度の減衰が不明瞭となることを意図して実施したが、農薬 H および農薬 A は明瞭な減衰傾向を示した。そして、採取期間中の稲 WCS の水分量の変動が 4%程度と小さかったため、乾燥重量当りに補正しても減衰傾向に影響を及ぼさなかった。水分含量の異なる残留試料の調製は、纏まった降雨が必要であり、雨よけの設置や降雨直後に採取する等の試験設計の再考が必要であった。

本研究では、令和 2 年度にも稲 WCS の実残留試料を同一圃場で調製し、残留農薬濃度を求めた。箱処理剤の農薬 A、茎葉散布剤の農薬 C、農薬 D および農薬 E は概ね共通条件で処理したことから、同一経過日数における残留農薬濃度の再現性確認を行った。生鮮状態での残留農薬濃度について有効成分投下量や水分含量で上記 2 成分においては補正すると農薬 C および農薬 E は概ね同程度の残留農薬濃度を示した。一方、農薬 C および農薬 D は生鮮状態での残留農薬濃度が最大で 15 倍の違いが見られ、補正しても残留農薬の再現性は得られなかった。露地栽培では紫外線や降雨による残留農薬の分解や希釈が大きく影響し、稲 WCS では水分含量によっても残留農薬は大きく変動するので、正確な残留傾向を把握するためには乾燥重量当たりの残留農薬濃度に補正する必要があるが、補正しても他の要因によって残留農薬濃度の再現性が見られない場合もあることを確認した。

本調査では水稻関連試料である稲 WCS、稲わらおよび粃米について適切な分析試料の調製方法を確立し、概ね飼料分析基準の規定である 1 mm 未満の粒度試料の調製方法を確立した。稲 WCS や稲わら植物体内の残留農薬分布は農薬によって異なることから、他の大型農産品と同様に圃場で採取された試料の全量を粉砕する方法を確立したことにより、より正確で信頼性の高い分析値の報告が可能となった。粃米のような硬い試料は、常温粉砕法が適切であり、縮分操作が残留農薬に影響を及ぼさないことも確認した。そして、乾燥品である稲わらや粃米につい

|                    |  |
|--------------------|--|
|                    | <p>て、微粉碎試料では含水抽出は必須であるが水膨潤時間やホモジナイザー抽出の必要性は認められず、迅速分析が可能となった。</p> <p>稲 WCS について、採取時点における水分含量の違いが減衰挙動に及ぼす影響について調査したが、水分補正前後で減衰挙動に違いは見られなかった。残留農薬の比較調査においては、水分量や有効成分投下量で補正すると 2 農薬で再現性が確認されたことから、稲 WCS の残留農薬挙動を正しく把握するためには、水分量を調査し、水分補正前後で解析する必要性が示された。</p>  |
| <p>今後の課題及び対応方針</p> | <p>最終年度であるため、記載しない。</p>  |
| <p>成果の公表及び予定</p>   | <p>成果の公表</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>① 粉碎粒度の違いが稲 WCS 試料の残留農薬分析値に及ぼす影響<br/>第 44 回農薬残留分析研究会，土橋 ひかり他，福井，2021</li> <li>② 稲 WCS 植物体の部位別の残留農薬濃度調査と変動要因の解析<br/>第 44 回農薬残留分析研究会，長田 拓也他，福井，2021</li> <li>③ 粳米の残留農薬分析における試料調製と抽出条件に関する検討<br/>第 45 回農薬残留分析研究会，長田 拓也他，高松，2022</li> <li>④ 稲わらの残留農薬分析における試料調製と抽出条件に関する検討<br/>第 45 回農薬残留分析研究会，土橋 ひかり他，高松，2022</li> <li>⑤ 粳米および稲わらの残留農薬分析における試料調製に関する検討<br/>日本農薬学会第 48 回大会，土橋 ひかり他，東京，2023</li> <li>⑥ 作物残留性試験における減衰傾向調査について－残留分析者の立場から－，飯島 和昭他：植物防疫, <b>76</b>, 295-299 (2022)</li> </ul> <p>今後の予定<br/>学会誌に投稿予定</p> |

## 令和 4 年度調査研究報告書

農薬等の毒性に関する基礎的研究：  
毒性試験に用いる実験動物の遺伝学的基盤の整備  
甲状腺影響を適切に評価するための遺伝学的・栄養学的基盤情報の整備

試験番号：IET 12-0031/21-1015/22-1015

令和 5 年 3 月  
一般財団法人残留農薬研究所  
毒性部

|  |  |
|--|--|
| 部・室名<br>及び<br>担当者名   | 毒性部生殖・発生毒性研究室：青山博昭(課題1研究総括), 高橋研(課題2研究総括), 佐藤旭, 遠藤直子, 西岡康, 浦川千鶴, 北條仁<br>毒性部病理研究室：高橋尚史, 加藤由隆, 小山彩<br>毒性部短期毒性研究室：田島均, 小坂忠司   |
| 課題名  | 毒性試験に用いる実験動物の遺伝学的基盤の整備   |
| 目的   | 本研究は, 毒性実験を実施するに当って極めて重要であるにも拘らず見落とされることの多い項目として実験動物の遺伝学的な特性に注目して, これらが毒性実験の結果に及ぼす影響を詳細に検討するとともに, 得られた成果を毒性実験の精度向上を目的とした基盤情報として整備することにより, 毒性学への貢献を目的とするものである。  |
| 【課題1-1】表皮水疱症ラット BL (原因遺伝子 <i>Col17a1</i> ) の解析 (IET 12-0031) |  |
| 調査研究<br>期 間  | 令和2年4月1日から令和5年3月31日<br>3年計画の3年目  |
| 前年度までの<br>結果の<br>概要  | 前年度までに, CrI:CD(SD)ラットの集団から発見された表皮水疱症の原因遺伝子は <i>Col17a1</i> であり, 変異は311番目のアミノ酸に相当する部位の一塩基重複 (c.932dup) であることを明らかにした。また, 雌雄合計 283 匹の CrI:CD(SD)ラットについてアレル特異的 PCR 法を実施し, 同コロニーには本変異を有する個体が約4%存在していることを確認した。   |
| 調査研究方法<br>の概要  | 本年度は, <i>Col17a1</i> の一塩基重複 (c.932dup) による接合部型表皮水疱症の病理発生を詳細に検索した。 <i>Col17a1</i> については, 表皮水疱症の原因遺伝子であるのみならず, 加齢に伴う白髪や脱毛等への関連が示唆されており, KO マウス等を用いて生後の解析が進められている。一方で, それらの研究ではホモ型にのみ焦点が当てられており, ヘテロ型における詳細な検討はなされておらず, また胎生期に遡って皮膚異常の発生過程を調べた報告もない。そこで, 本研究では BL ラットの妊娠 13, 16, および 20 日齢の胚または胎児用いて, 遺伝子型ごとに病理組織学検査を実施した。また, 得られた胚・胎児より total RNA を抽出して RNA-seq 解析を実施し, 日齢または遺伝子型ごとに mRNA 発現を比較することで, 病態発現に関わる遺伝子群を探索した。 |
| 調査研究結果<br>の概要<br>及び考察<br>試験条件及び<br>具体的データ                    | ヘテロ型の雌雄を交配し, 妊娠 13, 16 および 20 日齢に雌親を帝王切開して, 胚または胎児を摘出した (2腹/日齢)。得られた胚・胎児の遺伝子型は, 組織から抽出したゲノム DNA をダイレクトシーケンス解析することによって決定した。結果を Table 1 に示す。胚および胎児の外表検査では, いずれの遺伝子型の胚・胎児においても明らかな異常は観察されなかった。  |

Table 1. 各日齢における各遺伝子型の胚・胎児数

| 妊娠日齢  | 遺伝子型 |      |       |
|-------|------|------|-------|
|       | +/+  | bl/+ | bl/bl |
| 13 日齢 | 5    | 4    | 4     |
| 16 日齢 | 9    | 9    | 3     |
| 20 日齢 | 5    | 4    | 4     |

そこで、各遺伝子型および日齢から 3 例ずつ標本を選抜して、前顎断面について組織学的検査を実施した。その結果、妊娠 13 および 16 日齢ではヘテロ型およびホモ型個体ともに著変はみられなかったものの、妊娠 20 日齢のホモ型個体の 1 例では表皮下の水疱が認められ (Figure 1), 水疱は出生直前の比較的発育が進んだ段階から形成されることが示唆された。抗 Collagen XVII 抗体を用いた免疫染色では、妊娠 20 日齢の野生型個体において、表皮・舌・口蓋の基底細胞, エナメル芽細胞, および角膜上皮細胞に陽性像が検出された。また、妊娠 13 および 16 日齢の野生型個体についても同部位に陽性像がみられたものの、その染色強度は若齢であるほど弱かったことから、COL17A1 は胎生期の発生段階に比例してその発現を増加させることが示唆された。

一方、ヘテロ型個体では、野生型個体と同様の部位に陽性像が検出されたものの、その染色強度はいずれの日齢においても野生型個体と比較して減弱していた。これまでにヘテロ個体で水疱形成などの皮膚異常を発症した経験はなく、ヒトにおいても本遺伝子の変異をヘテロに持つ患者で皮膚異常を示す報告はない。タンパク量の定量解析のような何らかの裏付けが必要とされるものの、bl 変異の表現型は COL17A1 の有無に依存し、その発現量には左右されない可能性が示唆された。

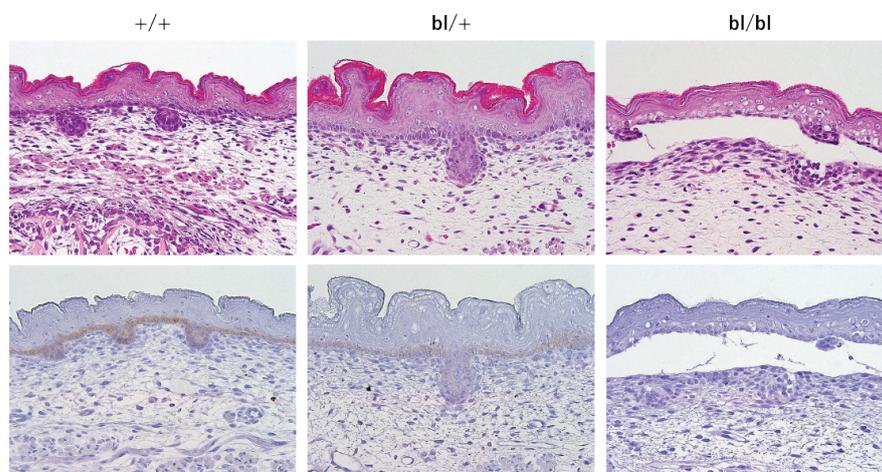


Figure 1. 20 日齢における頭部皮膚組織像 (上段は H&amp;E 染色, 下段は抗 Collagen XVII 染色)

最後に、個体ごとに抽出した total RNA を日齢および遺伝子型ごとに 3 例ずつをプールしたサンプルを使用して、RNA-seq を実施した。まず、Figure 2 に示す 16 個の表皮水疱症関連遺伝子について、同日齢の異なる遺伝子型同士で発現量を比較した（例：*bl/+* vs *+/+* は、ヘテロ型の値を野生型の値で除したものを表す）ところ、ホモ型個体の *Col17a1* の発現量は予想通りいずれの日齢においても野生型個体と比較して減少していた (*bl/bl* vs *+/+*)。一方、注目した *Col17a1* 変異による接合部型表皮水疱症 (Junctional EB) に関連する遺伝子群については、他の表皮水疱症関連遺伝子と比較して発現量が 2 倍以上に増加もしくは減少した遺伝子が数多く存在していた。これらの結果から、リアルタイム PCR やウエスタンブロットなどで実際の mRNA 量やタンパク量を確認する必要があるものの、表皮基底膜を構成するタンパク質の 1 つである *Col17a1* の変異がその他の基底膜構成タンパク質の発現にも影響を及ぼしていることが示唆された。

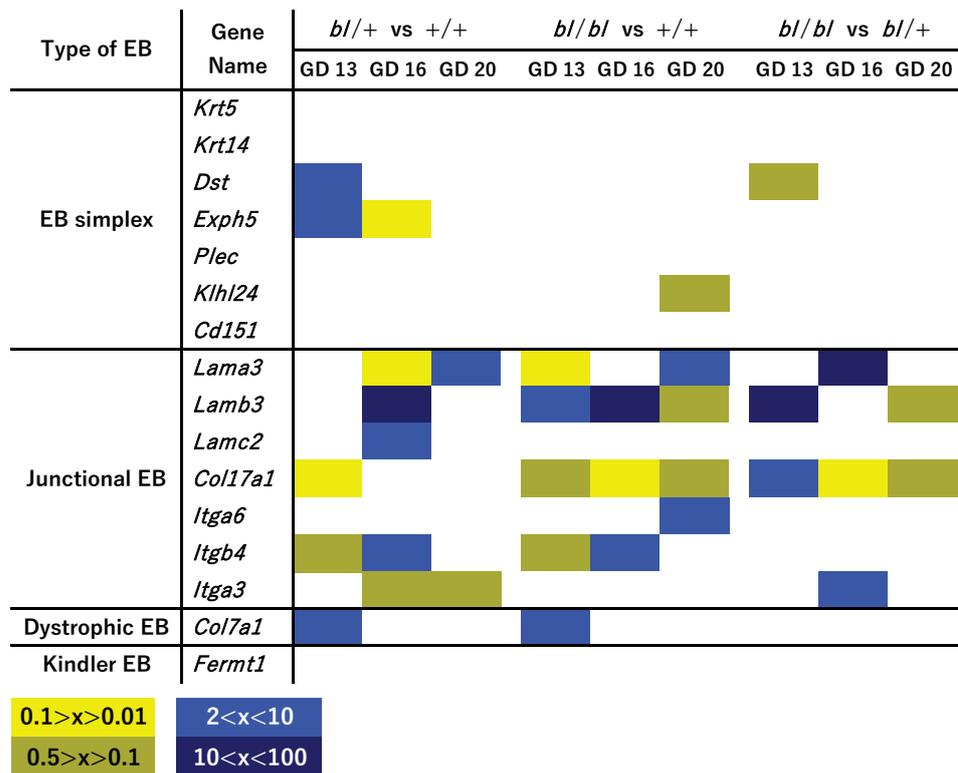


Figure 2. 表皮水疱症に関連する mRNA 発現量の比較

今後の課題  
及び対応方針

ヘテロ個体でも Collagen XVII の発現強度が減弱していたこと、またホモ型・ヘテロ型のいずれの遺伝子型を持つ場合にもその他の接合部型表皮水疱症関連遺伝子が発動していたことを証明するためには、mRNA およびタンパク量の定量解析が必要である。引き続き検証が必要であるものの、これらの結果は表皮水疱症の早期治療の必要性などを議論するうえで重要なデータ

|  |   |
|--|---|
|  | になり得る。  |
| 成果の公表予定  | データがまとまり次第，日本毒性病理学会，もしくは関連学会にて発表予定  |
| 【課題 1-2】マウスを用いたエストロゲンに対する子宮の応答性に及ぼす遺伝要因の解析 (IET 12-0031) |   |
| 調査研究期間   | 令和2年4月1日から令和5年3月31日<br>3年計画の3年目   |
| 前年度までの結果の概要  | これまでの実験では， <i>Aqp12</i> 遺伝子型の違いにより，前期及び後期発情期（発情前期の翌日及び翌々日）の子宮重量に明瞭な差がみられたものの，いずれの遺伝子型のマウスにおいても前期発情期の子宮重量には比較的大きな変動が観察された。そこで，腔后像の判定が正しかったことを確認する目的で，これらのマウスの血中エストロゲン（E2）濃度及び血中プロゲステロン（P）濃度を確認した。その結果，いずれの遺伝子型のマウスにおいても血中 E2 濃度はほぼ一定であったことが確認された。また，変動は大きかったものの，血中 P 濃度にも群間で差は認められなかったことから，前期発情期の個体が正しく選抜されていたことが確認された。したがって，前年度に観察された前期発情期における各遺伝子型個体の平均子宮重量の差は，エストロゲンに対する子宮の感受性の差を反映したものであることが示唆された。 |
| 調査研究方法の概要  | ゲノムデータベース（National Library of Medicine, NIH）によれば，少なくともマウスの卵巣及び精巣では弱いながらも <i>Aqp12</i> mRNA の発現が認められるとされている。そこで，今年度は，卵巣及び精巣における <i>Aqp12</i> タンパクの局在を免疫染色により確認することとした。さらに，子宮については未だ発現の報告がないものの，性周期特異的な発現の可能性を考慮して，同様の解析を実施することとした。   |
| 調査研究結果の概要及び考察試験条件及び具体的データ                                | 各遺伝子型の雌（+/+, ki/ki, ki/+, -/+, 及び-/）から採取した卵巣及び子宮と KI 及びノックアウトホモ（ki/ki, -/-）雄から採取した精巣をホルマリン固定し，パラフィン切片を作製して，市販の抗 <i>Aqp12</i> 抗体を用いて免疫染色を実施した。しかし，染色条件を変えつつ適切な染色条件を探ってはいるものの，未だ陽性結果を得るに至っていない。   |
| 今後の課題及び対応方針  | 今回の実験に使用した抗体（Rabbit anti-Aquaporin 12 polyclonal antibody, GeneTex）は，供給者のデータシートを見る限り，マウスの <i>Aqp12</i> に対して特異性を有し，ホルマリン固定後のパラフィン切片に適用可能とされている。しかし，免疫染色の陽性例として示されている腎の染色態度は曖昧であり，NIH のデータベースには腎における発現も報  |

|   |  |
|---|--|
|   | 告されていない。今後は、より信頼性の高い抗体を用いた免疫染色を試みると共に、これらの臓器における mRNA の発現を確認する必要があると考えられる。   |
| 成 果 の<br>公 表 予 定                                | データがまとまり次第、日本先天異常学会、日本毒性学会等、関連学会にて発表予定   |
| <b>【課題 2】人工授精を行ったウサギの背景データの採取 (IET 21-1015)</b> |  |
| 調 査 研 究<br>期 間                                  | 令和 3 年 4 月 1 日～令和 6 年 3 月 31 日<br>3 年計画の 2 年目  |
| 前年度までの<br>結 果 の<br>概 要                          | 前年度までに、これまで使用経験のないニュージーランド白色種 (Kbl:NZW) ウサギの背景データを採取するため、動物生産場で自然交配による交尾が確認された Kbl:NZW 雌ウサギ 24 匹を妊娠 1 日もしくは妊娠 2 日の時点で動物飼育施設に導入して、発生毒性試験評価項目に関する基礎データを採取した。その結果、生産場で自然交配させた Kbl:NZW の雌ウサギの妊娠率が当研究所で人工授精を行なった日本白色種のものと比較して低いことが明らかになった。また、投与期間前半の体重増加量および摂餌量の低下が顕著であり、流産した雌の数も Kbl:NZW ではやや高率であった。   |
| 調査研究方法<br>の 概 要                                 | <p>前年度の実験で明らかとなった Kbl:NZW 雌ウサギの低妊娠率や妊娠前半期における体重低下に関与し得る要因として、日本白色種においても自然交配の妊娠率は人工授精のそれと比較して著しく低率であること、および雌ウサギには輸送によって偽妊娠が引き起こされる場合があることが知られていることから、妊娠早期の雌動物に輸送ストレスが妊娠状態に大きな影響を及ぼした可能性が推測された。そこで、本年度は Kbl:NZW の雌雄を当研究所に導入して人工授精を行ない、妊娠率が改善するか否かを検討した。また、OECD TG414 に従って、発生毒性試験評価項目に関する基礎データを採取した。</p> <p>雄の Kbl:NZW を 23 週齢で 4 匹購入し、人工授精用の種雄として馴致し、繁殖用として維持した。雌は同系統の動物 24 匹を 14 週齢で購入し、検疫と馴化の後に 16 週齢で交配に用いた。雄は 9 箇月齢で交配に用いた。交配は人工授精法により行った。雄の精液は 1 回あたり 0.1~0.8 mL を温感射精法により採取し、1 日当たり 2 匹の雄をそれぞれ 2~3 回射精させて精液をプールし、生理食塩水で 10 倍に希釈した後、希釈精液 0.5 mL を専用のガラスピペットで雌の膈内に注入した。精液を注入した雌には hCG (25 単位) を耳静脈より注入して排卵を誘起した。人工授精を行った日を妊娠 0 日として雌に妊娠 6 日から 28 日まで体重 1 kg 当たり 5 mL の 0.5%CMC 水溶液を投与した。妊娠 0 日、6 日、9 日、12 日、15 日、18 日、21 日、24 日、27 日およ</p> |

|  | <p>び 29 日に体重を測定して投与開始以降の各期間における体重増加量を求めた。また、妊娠 0 日、3 日、6 日、9 日、12 日、15 日、18 日、21 日、24 日、27 日および 29 日に餌の給与量と残量を測定して摂餌量を求めた。投与期間中は毎日動物の状態を観察し、流産の有無を確認した。母動物は、妊娠 29 日に帝王切開して、卵巣と子宮の状態を検査した。子宮内に受胎産物が認められる雌は、妊娠子宮の重量を測定し、黄体数および着床数から着床前胚死亡率を求めた。受胎産物が肉眼的に観察されない子宮は、10%硫化アンモニウム水溶液に浸漬して着床部位が染色されるか否かを観察し、妊娠早期における胚死亡の有無（または不妊か否か）を確認した。生存胎児と死亡胚・胎児の数ならびに子宮内の位置を記録し、死亡胚・胎児は、発生上の死亡時期の早い順に着床痕、胎盤遺残および浸軟胎児（死亡胎児を含む）に分類した。生存胎児の性比、体重、外表異常、内臓異常、骨格異常の有無を調べた。将来の遺伝的解析が可能となるように、異常のみられた胎児とその母動物の組織の一部を保存した。</p>  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |    |    |           |      |  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |              |  |  |  |    |    |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |    |    |    |     |     |     |     |     |            |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|----|-----------|------|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|------|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-----|--------------|--|--|--|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|--|--|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| <p>調査研究結果の概要及び考察<br/>試験条件及び<br/>具体的データ</p> | <p>採取した雄の精液性状は、いずれも精子の運動性良好であり、人工授精のためにプールして 10 倍希釈した後の精子濃度は、<math>225\sim 375 \times 10^6/\text{mL}</math>であった。</p> <p>投与期間中の体重、体重増加量および摂餌量を、Table 2 に示す。</p> <p>Table 2.</p> <table border="1" data-bbox="453 1167 1382 1518"> <thead> <tr> <th>妊娠日齢</th> <th>0</th> <th>3</th> <th>6</th> <th>9</th> <th>12</th> <th>15</th> <th>18</th> <th>21</th> <th>24</th> <th>27</th> <th>29</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>体重 (g) 平均</td> <td>3054</td> <td></td> <td>3217</td> <td>3238</td> <td>3287</td> <td>3325</td> <td>3346</td> <td>3404</td> <td>3431</td> <td>3502</td> <td>3557</td> </tr> <tr> <td>標準偏差</td> <td>180</td> <td></td> <td>186</td> <td>177</td> <td>189</td> <td>168</td> <td>187</td> <td>179</td> <td>172</td> <td>171</td> <td>181</td> </tr> <tr> <td>補正体重 (g) 平均</td> <td colspan="10"></td> <td>3175</td> </tr> <tr> <td>標準偏差</td> <td colspan="10"></td> <td>147</td> </tr> <tr> <td>体重増加量 (g) 平均</td> <td colspan="3"></td> <td>21</td> <td>70</td> <td>108</td> <td>129</td> <td>187</td> <td>214</td> <td>285</td> <td>340</td> </tr> <tr> <td>標準偏差</td> <td colspan="3"></td> <td>35</td> <td>47</td> <td>74</td> <td>129</td> <td>109</td> <td>111</td> <td>130</td> <td>155</td> </tr> <tr> <td>摂餌量 (g) 平均</td> <td></td> <td>163</td> <td>172</td> <td>167</td> <td>161</td> <td>132</td> <td>145</td> <td>156</td> <td>135</td> <td>125</td> <td>137</td> </tr> <tr> <td>標準偏差</td> <td></td> <td>17</td> <td>24</td> <td>21</td> <td>22</td> <td>34</td> <td>34</td> <td>26</td> <td>20</td> <td>23</td> <td>15</td> </tr> </tbody> </table> <p>補正体重：妊娠 29 日体重から妊娠子宮重量を差し引いた値。</p> <p>投与期間中の体重、体重増加量および摂餌量を測定したところ、導入後に試験施設において人工授精で交配した今回の Kbl:NZW 雌ウサギは生産所における自然交配後に試験施設に導入した同系統の雌ウサギでみられたような妊娠前半の体重増加量のマイナスの値（体重低下）は認められず、体重増加量は妊娠の経過とともに漸増した。一方、摂餌量に関しては、前回と同様に妊娠 6 日から 15 日まで低下し、その後やや回復してほぼ一定となったが、投与開始前の値まで回復することはなかった。対応する妊娠期間の摂餌量は、いずれも前回より高値であった。流産及び早産は認められなかった。</p> | 妊娠日齢 | 0    | 3    | 6    | 9    | 12   | 15   | 18   | 21   | 24   | 27 | 29 | 体重 (g) 平均 | 3054 |  | 3217 | 3238 | 3287 | 3325 | 3346 | 3404 | 3431 | 3502 | 3557 | 標準偏差 | 180 |  | 186 | 177 | 189 | 168 | 187 | 179 | 172 | 171 | 181 | 補正体重 (g) 平均 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 3175 | 標準偏差 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 147 | 体重増加量 (g) 平均 |  |  |  | 21 | 70 | 108 | 129 | 187 | 214 | 285 | 340 | 標準偏差 |  |  |  | 35 | 47 | 74 | 129 | 109 | 111 | 130 | 155 | 摂餌量 (g) 平均 |  | 163 | 172 | 167 | 161 | 132 | 145 | 156 | 135 | 125 | 137 | 標準偏差 |  | 17 | 24 | 21 | 22 | 34 | 34 | 26 | 20 | 23 | 15 |
| 妊娠日齢                                       | 0   | 3    | 6    | 9    | 12   | 15   | 18   | 21   | 24   | 27   | 29   |    |    |           |      |  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |              |  |  |  |    |    |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |    |    |    |     |     |     |     |     |            |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 体重 (g) 平均                                  | 3054  |      | 3217 | 3238 | 3287 | 3325 | 3346 | 3404 | 3431 | 3502 | 3557 |    |    |           |      |  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |              |  |  |  |    |    |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |    |    |    |     |     |     |     |     |            |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 標準偏差                                       | 180   |      | 186  | 177  | 189  | 168  | 187  | 179  | 172  | 171  | 181  |    |    |           |      |  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |              |  |  |  |    |    |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |    |    |    |     |     |     |     |     |            |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 補正体重 (g) 平均                                |   |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 3175 |    |    |           |      |  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |              |  |  |  |    |    |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |    |    |    |     |     |     |     |     |            |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 標準偏差                                       |   |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 147  |    |    |           |      |  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |              |  |  |  |    |    |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |    |    |    |     |     |     |     |     |            |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 体重増加量 (g) 平均                               |   |      |      | 21   | 70   | 108  | 129  | 187  | 214  | 285  | 340  |    |    |           |      |  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |              |  |  |  |    |    |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |    |    |    |     |     |     |     |     |            |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 標準偏差                                       |   |      |      | 35   | 47   | 74   | 129  | 109  | 111  | 130  | 155  |    |    |           |      |  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |              |  |  |  |    |    |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |    |    |    |     |     |     |     |     |            |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 摂餌量 (g) 平均                                 |   | 163  | 172  | 167  | 161  | 132  | 145  | 156  | 135  | 125  | 137  |    |    |           |      |  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |              |  |  |  |    |    |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |    |    |    |     |     |     |     |     |            |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 標準偏差                                       |   | 17   | 24   | 21   | 22   | 34   | 34   | 26   | 20   | 23   | 15   |    |    |           |      |  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |              |  |  |  |    |    |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |    |    |    |     |     |     |     |     |            |  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

帝王切開時の観察結果を、Table 3 に示す。

Table 3.

|                   | 人工授精した Kbl:NZW | 自然交配した Kbl:NZW |
|-------------------|----------------|----------------|
| 妊娠した雌の頻度 (%)      | 21/24 (87.5)   | 19/24 (79.2)   |
| 流産・早産した雌の頻度 (%)   | 0/24 ( 0.0)    | 2/24 ( 8.3)    |
| 全胚吸収がみられた雌の頻度 (%) | 4/24 (16.7)    | 2/24 ( 8.3)    |
| 生存胎児が得られた雌の頻度 (%) | 17/24 (70.8)   | 15/24 (62.5)   |
| 黄体数               | 10.3 ± 2.9     | 10.3 ± 1.7     |
| 着床数               | 8.4 ± 3.0      | 9.1 ± 2.3      |
| 着床前胚死亡率 (%)       | 17.9 ± 20.5    | 12.0 ± 11.4    |
| 生存胎児数             | 7.1 ± 3.2      | 8.5 ± 1.8      |
| 胚・胎児死亡率 (%)       | 21.2 ± 29.2    | 5.9 ± 10.1     |
| 胎児体重 (g) 雄        | 37.6 ± 4.9     | 37.1 ± 6.4     |
| 雌                 | 35.9 ± 5.2     | 37.0 ± 5.3     |
| 生存胎児の性比           | 0.543          | 0.496          |

人工授精による交配で、妊娠率は自然交配時の 79.2%から 87.5%まで改善した。また、今回は流産・早産がみられなかったが、全胚吸収がみられた雌の頻度が前回よりも高かったため、生存胎児が得られた雌の頻度の改善は、前回の 15/24 から 17/24 までに留まった。また、着床前胚死亡率および胚・胎児死亡率も前回より高かった。

奇形学的検査で観察された所見とそれらの腹ごとの頻度を、Table 4 に示す。

Table 4.

|                   | 人工授精した<br>Kbl:NZW | 自然交配した<br>Kbl:NZW | Kbl:JW (IET 背景値)<br>最小値-最大値 |
|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|
| 奇形胎児がみられた雌の頻度 (%) | 3/17 ( 17.6)      | 1/15 ( 6.7)       | 0.0-36.4                    |
| 変異胎児がみられた雌の頻度 (%) | 17/17 (100.0)     | 15/15 (100.0)     | 65.2-100.0                  |
| 内臓奇形の平均腹頻度 (%)    | 2.06 ± 6.39       | 0.74 ± 2.87       | 0.00-4.09                   |
| 右肺分葉異常            | 1.47 ± 6.06       | -                 | 0.00-0.52                   |
| 子宮角狭窄             | 0.59 ± 2.43       | -                 | 0.00-0.00                   |
| 動脈幹遺残             | -                 | 0.74 ± 2.87       | 0.00-0.00                   |
| 骨格奇形の平均腹頻度 (%)    | 0.65 ± 2.69       | -                 | 0.00-2.80                   |
| 胸椎半椎              | 0.65 ± 2.69       | -                 | 0.00-0.43                   |
| 内臓変異の平均腹頻度 (%)    | 16.43 ± 15.72     | 6.48 ± 7.62       | 0.50-9.22                   |
| 胸腺頸部残留            | 5.60 ± 11.89      | 5.14 ± 6.79       | 0.50-9.22                   |
| 右肺副葉欠損            | 4.37 ± 7.41       | 1.33 ± 5.16       | 0.00-0.56                   |
| 骨格変異の平均腹頻度 (%)    | 53.80 ± 31.07     | 82.15 ± 20.97     | 18.23-46.37                 |
| 胸骨分節癒合            | 1.47 ± 6.06       | 5.37 ± 11.33      | 0.00-1.96                   |
| 胸骨分節配列異常          | 0.59 ± 2.43       | -                 | 0.00-1.93                   |
| 過剰肋骨              | 52.50 ± 31.21     | 80.67 ± 19.96     | 14.71-42.53                 |
| 腰仙移行椎             | 2.22 ± 5.11       | 5.53 ± 6.60       | 0.00-6.02                   |
| 仙椎前椎骨数 25         | 0.65 ± 2.69       | 0.74 ± 2.87       | 0.00-1.99                   |
| 仙椎前椎骨数 27         | 9.61 ± 24.11      | 21.77 ± 22.46     | 1.58-11.59                  |

外表奇形は、いずれの胎児にも認められなかった。内臓の観察では、1 腹の生存胎児 4 匹中 1 匹に右肺の分葉異常、別の腹の生存胎児 10 匹中 1 匹に子宮角狭窄（いずれも奇形）が観察された。骨格の観察では、1 腹の生存胎児 9 匹中 1 匹に胸椎の半椎（奇形）が観察された。内臓及び骨格の変異として、胸腺頸部残留、右肺副葉欠損、胸骨分節癒合、胸骨分節配列異常、過剰肋骨、腰仙移行椎、仙椎前椎骨数 25 及び仙椎前椎骨数 27 が観察された。これらの変異はいずれも Kbl:JW の胎児にも観察されるものであったが、その頻度には系統間で差がみられた。

今回採取した人工授精による Kbl:NZW における発生毒性試験の評価項目を前回の自然交配による結果と比較すると、まず妊娠率の改善と流産率の低下がみられた。しかし、今回の妊娠率も残留農薬研究所における人工授精法による Kbl:JW の背景対照値より依然として低値であったことから、OECD テストガイドライン 414 に適合した 1 群当たりの妊娠動物数を得るためには、Kbl:JW よりもやや多くの動物を交配させる必要があると考えられた。一方、妊娠期間中における母動物の体重推移には前回見られたような減少相は全く見られず、これらの値は妊娠の経過とともに漸増した。摂餌量に関しては、前回同様に妊娠前半の減少相と後半の回復相が認められたが、個々の値はい

|                    |   |
|--------------------|---|
|                    | <p>ずれも前回の値をやや上回っており、妊娠期間中の安定的な体重増加に寄与したと考えられた。妊娠期間中の雌動物の体重増加量、摂餌量の安定的な推移と流産率の低下には、人工授精を用いることで交配前に動物を試験施設環境下に十分順化させることが可能となったことにより、交配から妊娠初期の動物に与えるストレスが大幅に軽減されたことが寄与したと考えられた。また、毒性試験において対照群の動物の体重及び摂餌量が安定的に推移することは、これらの指標に対する被験物質投与の影響を鋭敏に検出するための重要な基盤となると考えられた。胎児検査では、前回同様に少数ながら奇形の発生が認められたものの、奇形所見は前回とは異なっていた。変異に関しては、Kbl:JW においても観察されている所見が今回も認められたが、その頻度には前回の結果との間に差がみられた。発生毒性試験の対照群における胎児奇形の発生は、被験物質投与に関連しないことは明らかであるが、そのような自然発生奇形の要因となる遺伝的・環境的因子は試験系の中で被験物質投与群の動物も共有することになる。投与群で発生した奇形が遺伝的変異によるものかどうかを確認する技術は、ウサギにおける発生毒性試験の実施においても必要な基盤であると考えられた。また、自然発生する胎児変異の頻度は今回みられたように系統および試験ごとに変化するので、変異の発生頻度の背景データを系統別に蓄積することの重要性も確認された。</p> |
| <p>今後の課題及び対応方針</p> | <p>胎児の奇形学的検査において2試験ともに低頻度ながら奇形の自然発生が認められ、ウサギにおいてもラットと同様に生産場の動物集団には胎児奇形を誘発する様々な潜性突然変異遺伝子が含まれる可能性が示唆された。ウサギを用いた発生毒性試験において観察される胎児奇形が突然変異遺伝子によって誘発されたものか否かを確認する方法を確立する必要がある。雄ウサギから採取した精液の凍結保存技術の導入とさらに可能であれば解凍した精液を用いた人工授精法による雌動物の妊娠率を検討する。ウサギ精液の凍結保存方法については文献調査を行い、適切な方法が既に報告されていれば導入の可能性を検討する。</p>  |
| <p>成果の公表予定</p>     | <p>データがまとまり次第、日本先天異常学会、日本毒性学会等、関連学会にて発表予定</p>   |

| 部・室名<br>及び<br>担当者名   | <p>毒性部生殖・発生毒性研究室：佐藤旭(課題 3 研究総括), 高橋研, 遠藤直子,<br/>西岡康, 浦川千鶴, 北條仁, 青山博昭</p> <p>毒性部病理研究室：高橋尚史, 加藤由隆, 小山彩</p> <p>毒性部短期毒性研究室：田島均, 小坂忠司</p> <p>化学部残留第 2 研究室：富山成人, 児玉芽吹</p>   |                      |              |       |        |                       |                      |       |                       |                      |
|--|---|----------------------|--------------|-------|--------|-----------------------|----------------------|-------|-----------------------|----------------------|
| 課題名  | 甲状腺影響を適切に評価するための遺伝学的・栄養学的基盤情報の整備  |                      |              |       |        |                       |                      |       |                       |                      |
| 目的   | <p>児の脳発達に及ぼす影響の懸念から, 昨今は化学物質の甲状腺に対する影響<br/>評価がその重要性を一段と増している。本研究は, 動物実験により得られた<br/>データを適切に解釈するために必要な基盤情報として, 実験動物の遺伝的背<br/>景と飼料の栄養成分に着目して, 甲状腺かく乱作用の検出に関連した指標に<br/>影響を及ぼし得る要因を検索する。</p>   |                      |              |       |        |                       |                      |       |                       |                      |
| <p>【課題 3】飼料中に含まれる植物エストロゲンがラットの甲状腺に及ぼす影響の検討：2<br/>集団の BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)ラットを用いた比較 (IET 22-1015)</p> |   |                      |              |       |        |                       |                      |       |                       |                      |
| 調査研究<br>期 間  | <p>令和 4 年 4 月 1 日～令和 6 年 3 月 31 日</p> <p>2 年計画の 1 年目</p>  |                      |              |       |        |                       |                      |       |                       |                      |
| 前年度まで<br>の 結 果 の<br>概 要  | 該当せず  |                      |              |       |        |                       |                      |       |                       |                      |
| 調査研究方<br>法 の 概 要   | <p>本年度は, 先ごろタイにおいても生産を開始した<br/>BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)ラットに注目し, 国内 (J) とタイ (T) の各生<br/>育場に由来する 2 集団の間で血中甲状腺ホルモン濃度等の指標に差がない<br/>か比較を試みた。また, これらのラットに通常の市販飼料である MF 飼料<br/>(MF) と植物エストロゲンの量を低減させた NIH-07PLD 飼料 (NIH) を二<br/>世代に亘って与え, 拡張一世代試験ガイドラインまたは CTA ガイダンス文<br/>書に指定される時期に採血と剖検を行い, 甲状腺影響に関連した指標に影響<br/>がないか調べた。本年度は, 特にインライフ試験の遂行と各種指標のデータ<br/>採取に取り組んだ。試験群の構成と検査項目を, それぞれ表 1.および表 2.<br/>に示す。</p> <p>表 1. 試験群の構成</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>生育場</th> <th>NIH-07PLD 飼料</th> <th>MF 飼料</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>富士山生育場</td> <td>NIH-J 群<br/>(雌雄各 12 匹)</td> <td>MF-J 群<br/>(雌雄各 12 匹)</td> </tr> <tr> <td>タイ生育場</td> <td>NIH-T 群<br/>(雌雄各 12 匹)</td> <td>MF-T 群<br/>(雌雄各 12 匹)</td> </tr> </tbody> </table> | 生育場                  | NIH-07PLD 飼料 | MF 飼料 | 富士山生育場 | NIH-J 群<br>(雌雄各 12 匹) | MF-J 群<br>(雌雄各 12 匹) | タイ生育場 | NIH-T 群<br>(雌雄各 12 匹) | MF-T 群<br>(雌雄各 12 匹) |
| 生育場  | NIH-07PLD 飼料  | MF 飼料                |              |       |        |                       |                      |       |                       |                      |
| 富士山生育場   | NIH-J 群<br>(雌雄各 12 匹)   | MF-J 群<br>(雌雄各 12 匹) |              |       |        |                       |                      |       |                       |                      |
| タイ生育場  | NIH-T 群<br>(雌雄各 12 匹)   | MF-T 群<br>(雌雄各 12 匹) |              |       |        |                       |                      |       |                       |                      |

| 表 2. 検査項目一覧                                   |  |   |  |
|---|--|---|--|
|   | 雄親動物   | 雌親動物  | 児  |
| P親動物<br>／F1児                                  | <p>インライフ検査項目<br/>臨床症状, 体重, 体重<br/>増加量, 摂餌量</p> <p>繁殖能力<br/>交尾率</p> <p>病理学的検査項目<br/>剖検, 臓器重量 (脳,<br/>甲状腺, 下垂体, 肝臓,<br/>腎臓, 副腎, 脾臓, 精<br/>巣, 精巣上部, 精嚢・<br/>凝固腺, 前立腺腹葉お<br/>よび前立腺側背葉)</p> <p>その他<br/>血中TH/TSH (8週,<br/>6匹/群; 最終計画殺,<br/>12匹/群)</p>  | <p>インライフ検査項目<br/>臨床症状, 体重, 体重<br/>増加量, 摂餌量</p> <p>繁殖能力<br/>交尾率, 受胎率, 出産<br/>率, 発情周期, 同居開<br/>始から交尾成立まで<br/>の日数, 妊娠期間, 着<br/>床数</p> <p>病理学的検査項目<br/>剖検, 臓器重量 (脳,<br/>甲状腺, 下垂体, 肝臓,<br/>腎臓, 副腎, 脾臓, 卵<br/>巣および子宮)</p> <p>その他<br/>血中TH/TSH (最終<br/>計画殺, 12匹/群)</p>   | <p>全般的検査項目<br/>生存率, 臨床症状, 体<br/>重</p> <p>哺育0日検査項目<br/>性比, 産児数</p> <p>哺育4日検査項目<br/>血中TH/TSH, 剖検,<br/>甲状腺重量 (固定<br/>後)</p> <p>哺育13日検査項目<br/>乳頭数</p> <p>哺育21日検査項目<br/>血中TH/TSH, 剖検,<br/>脳重量, 胸腺重量, 脾<br/>臓重量, 甲状腺重量<br/>(固定後)</p> |
| F1親動物<br>／F2<br>児                             | <p>インライフ検査項目<br/>臨床症状, 体重, 体重<br/>増加量, 摂餌量</p> <p>繁殖能力<br/>包皮分離, 交尾率, 精<br/>子検査</p> <p>病理学的検査項目<br/>剖検, 臓器重量 (脳,<br/>甲状腺, 下垂体, 肝臓,<br/>腎臓, 副腎, 脾臓, 精<br/>巣, 精巣上部, 精嚢・<br/>凝固腺, 前立腺腹葉お<br/>よび前立腺側背葉)</p> <p>その他<br/>聴覚性驚愕反応 (24<br/>日齢前後および58日<br/>齢前後), 血中<br/>TH/TSH (最終計画<br/>殺, 12匹/群), 血液<br/>凝固</p> | <p>インライフ検査項目<br/>臨床症状, 体重, 体重<br/>増加量, 補正体重, 摂<br/>餌量</p> <p>繁殖能力<br/>膻開口, 膻開口後初回<br/>発情, 交尾率, 受胎率,<br/>発情周期, 同居開始か<br/>ら交尾成立までの日<br/>数, 黄体数, 着床数,<br/>着床前胚死亡率, 妊娠<br/>子宮重量</p> <p>病理学的検査項目<br/>剖検, 臓器重量 (脳,<br/>甲状腺, 下垂体, 肝臓,<br/>腎臓, 副腎, 脾臓およ<br/>び卵巣)</p> <p>その他<br/>聴覚性驚愕反応 (24<br/>日齢前後および58日<br/>齢前後), 血中<br/>TH/TSH (最終計画<br/>殺, 12匹/群), 血液<br/>凝固</p> | <p>妊娠20日検査項目<br/>生存胎児数, 胚・胎児<br/>死亡率, 性比, 胎児体<br/>重, 肛門生殖突起間距<br/>離, 血中TH/TSH, 甲<br/>状腺重量 (固定後)</p>  |
| 調査研究結<br>果の概要<br>及び考察<br>試験条件及<br>び具体的デ<br>ータ | <p>本年度は、表 2.に挙げた項目のうち、一部の項目 (固定後の甲状腺重量, 血中 TH/TSH, 精子検査など) を除き、ほぼ計画通りにデータを取得することができた。現在、これらのデータについて統計解析を実施中である。一方、本年度の取り組みによって、動物の遺伝的背景や飼料成分の差が甲状腺かく乱作用の検出以外にもいくつかの指標に影響を及ぼし得ることが明らかとなった。一点目として、BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)ラットのタイ生育場コロニー (T) には、有害な突然変異として国内の生育場から排除した <i>cack</i> 変異が依然として混</p>              |   |  |

|                         |   |
|-------------------------|---|
|                         | <p>入している可能性が明らかとなった。本突然変異のホモ型個体は、通常の毒性試験で投与を開始する 4~5 週齢において臨床的な異常な症状を示さないものの、10 週齢以降に後肢麻痺や異常呼吸音などの症状を発症する。そのため、国内集団より本突然変異を排除するまでは、様々な毒性試験の中で頻繁に発症動物が出現した。本年度の検討では、NIH-T 群にこれらの症状を持つ動物が P および F1 世代で 1 例ずつ出現したことから、タイ産動物を使用する場合にも同様の懸念が持たれる。二点目として、国内生育場には腎腫大の原因となる新たな突然変異が混入している可能性が明らかにされた。この異常は、国内生育場より導入した 24 組の雌雄を交配したうちの 2 組から出現したものであり、出現頻度が比較的高いことから、集団内で既に変異が拡散していることが疑われる。引き続き、生産業者とも緊密に連携を取りながら腎腫大の発生について監視を継続していきたい。三点目として、NIH-07PLD 飼料の摂取が生後 21 日齢の子動物に眼球腫大を引き起こす可能性を見出すとともに、この現象が植物エストロゲンの摂取量の低下に起因することを示唆するデータを得た。NIH-J 群と NIH-T 群には共通して眼球腫大を発症する個体が散見されたこと、およびこの異常は血液凝固能の低下に起因することが予想されたことから、F1 親動物を対象にプロトロンビン時間 (PT) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を調べた。その結果、NIH 摂取群における雄の PT および APTT はいずれも MF 摂取群と比較して延長していることが示唆された (統計未実施)。また、これらの観察結果は、ゲニステインが卵巣摘出ラットにおいて血液凝固に関連する遺伝子群の発現を増加させるとの報告に良く一致しており、植物エストロゲンの摂取量低下が眼球腫大を引き起こす要因であることが示唆された。</p> |
| <p>今後の課題<br/>及び対応方針</p> | <p>次年度は、取得済みデータの統計解析および未取得のデータ採取に努め、動物の遺伝背景や飼料成分の差が甲状腺かく乱作用の検出に及ぼす影響の有無について検索する。また、本年度の実験により明らかになった上記 3 点についても、引き続き検討を進める。</p>  |
| <p>成果の<br/>公表予定</p>     | <p>データがまとまり次第、日本先天異常学会、日本毒性学会等、関連学会にて発表予定</p>   |

## [令和4年度の研究体制]

| ①研究者名 | ②分担する研究項目       | ③現在の専門            | ④所属および職名            |
|-------|-----------------|-------------------|---------------------|
| 青山 博昭 | 課題1研究総括、課題2、課題3 | 生殖・発生毒性学および動物遺伝学  | 理事 研究部門担当           |
| 北條 仁  | 課題1、課題2、課題3     | 生殖・発生毒性学および家畜解剖学  | 毒性部<br>副部長          |
| 高橋 研  | 課題2研究総括、課題1、課題3 | 生殖・発生毒性学および実験動物医学 | 生殖・発生毒性研究室<br>室長    |
| 遠藤 直子 | 課題1、課題2、課題3     | 生殖・発生毒性学および薬学     | 生殖・発生毒性研究室<br>主任    |
| 佐藤 旭  | 課題3研究総括、課題1、課題2 | 生殖・発生毒性学および動物遺伝学  | 生殖・発生毒性研究室<br>主任    |
| 浦川 千鶴 | 課題1、課題2、課題3     | 生殖・発生毒性学および栄養学    | 生殖・発生毒性研究室<br>主任研究員 |
| 西岡 康  | 課題1、課題2、課題3     | 生殖・発生毒性学および薬理学    | 生殖・発生毒性研究室<br>研究員   |
| 高橋 尚史 | 課題1             | 毒性病理学             | 病理研究室<br>主任         |
| 小山 彩  | 課題1             | 毒性病理学             | 病理研究室<br>主任研究員      |
| 加藤 由隆 | 課題1             | 毒性病理学             | 病理研究室<br>研究員        |
| 田島 均  | 課題1、課題3         | 免疫毒性学             | 短期毒性研究室<br>研究員      |
| 小坂 忠司 | 課題1、課題3         | 免疫毒性学             | 短期毒性研究室<br>嘱託       |
| 富山 成人 | 課題3             | 分析化学              | 化学部残留第2研究室<br>室長    |
| 児玉 芽吹 | 課題3             | 分析化学              | 化学部残留第2研究室<br>研究員   |