

令和 5 年度調査研究報告書

ヒトにおける代謝物プロファイル推定試験系の確立

試験番号 : IET 23-1015

令和 6 年 6 月  
一般財団法人残留農薬研究所  
化学部

室名及び担当者	化学部代謝第1研究室 笠神威雄(研究総括), 杉岡大介
課題名	ヒトにおける代謝物プロファイル推定試験系の確立
目的	農薬の開発では、候補化合物の動物での <i>in vivo</i> データ(毒性試験及びラット代謝試験)からヒトに対するリスクを評価し、またヒト及び他動物種の組織や酵素系での <i>in vitro</i> 代謝データが補足的にリスク評価に利用されている。ヒト由来の肝ミクロソームや肝細胞など、ヒト試料による <i>in vitro</i> 代謝実験は汎用の手法であるが、ヒトにおける <i>in vivo</i> での代謝物プロファイルを網羅的に予測することは難しく、また <i>in vitro</i> 代謝だけでは排泄経路の特定には至らない。近年、ヒト肝キメラマウス(ヒト肝細胞を有するキメラマウス)が評価動物として注目されており、既存の動物実験や <i>in vitro</i> 代謝実験では得られないデータを取得できる可能性があると考えられる。本研究は、メトキシクロル代謝をモデル反応として、 <i>in vitro</i> 代謝およびヒト肝キメラマウスでの <i>in vivo</i> 代謝を比較、検証し、ヒトにおける代謝物プロファイル推定試験系の確立を目指すものである。
調査研究期間	令和5年4月1日から令和8年3月31日 3年計画の1年目
前年度までの調査研究結果の概要	初年度につき該当なし。
本年度の調査研究結果の概要	<p>初年度(令和5年度)は、メトキシクロル(MXC)の <i>in vitro</i> 代謝試験系での種差・性差を調査する目的で行った。</p> <p>ヒトを含めた6動物種の雌雄(男女)の肝S9画分を <i>in vitro</i> 代謝反応の酵素源とし、ヒト以外の動物種として、各種毒性試験で汎用のマウス、ラット、イヌ及びウサギに加え、家畜代謝試験での試験動物であるヤギを選択した。代謝物を網羅的に検出するため、両ベンゼン環が<sup>14</sup>Cで均一に標識された[<sup>14</sup>C]MXCを3つの試験区(試験区1:補酵素無添加、試験区2:第1相反応の補酵素NADPHのみを添加、試験区3:第1及び第2相反応の補酵素NADPH、UDPGA及びPAPSを添加)で反応させた。反応後の放射性成分を、フロースルー型放射能検出器を接続した高速液体クロマトグラフ(HPLC)で分析し、さらに質量分析により構造推定を行った。</p> <p>試験区2(第1相反応)では、各動物種においてMXCから段階的に酸化脱メチル化されたMono-OH-MXCとBis-OH-MXCが検出された。その他数種の成分も検出され、O脱メチル化以外の代謝(酸化と脱塩</p>

	<p>化水素化)も推察された。これらの生成量は動物種間で差が認められた。生体内代謝に近い試験区 3 では、各動物種から Mono-OH-MXC と Bis-OH-MXC のグルクロン酸抱合体と推定される成分が主要な代謝物として検出された。また、Mono-OH-MXC が酸化されたグルクロン酸抱合体が検出された。さらにヒトでは、Bis-OH-MXC 由来の 2 種の硫酸抱合体と Mono-OH-MXC の硫酸抱合体が推定されたことから、ヒトではMXC の代謝にグルクロン酸抱合と硫酸抱合の両者が寄与していることが示唆された。ヒトでの定性的・定量的な代謝物プロファイルに性差は認められなかった。</p> <p>以上のことから、第 2 相までの反応を考慮すると、ヒトでの in vivo における代謝物プロファイルは他の動物種とは定性的、定量的に差異があることが示唆された。</p>
今後の試験方針	<p>令和 5 年度の in vitro 代謝実験で、マウス、ラット及びヒトでの代謝物プロファイルに差異が認められ、ヒトにおいては第 2 相反応までの代謝でグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体が推定された。これら抱合体が生体 (in vivo) ではどのような経路で排泄されるのかは、in vitro 代謝実験では特定できない。ラットの vivo 代謝において、胆汁中に Bis-OH-MXC 及び Mono-OH-MXC 等のグルクロン酸抱合体が主要な代謝物として検出されている。これら抱合体は胆汁排泄後、腸内細菌での脱抱合化されたアグリコン (Bis-OH-MXC 及び Mono-OH-MXC 等) として糞中に検出されているが、これらアグリコンが再吸収されることも考えられる。従って、ヒトでの MXC の毒性発現を考える上で排泄経路の特定は重要である。また、イヌ、ウサギ及びヤギを含め、in vitro 代謝で生成した代謝物について、構造推定に至っていないものが多く、MXC の in vitro での代謝物プロファイルをより明確にすることも課題として残っている。</p> <p>そこで令和 6 年度は、</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>(1) 無処置マウス及びヒト肝キメラマウスによる in vivo 代謝実験 (尿及び糞中代謝物プロファイルの比較・検討)</li> <li>(2) In vitro 代謝実験の継続 (特に構造推定に至らなかった成分について検討)</li> </ol> <p>以下の 2 課題について実験を進める予定である。</p>
成果の公表	<ol style="list-style-type: none"> <li>(1) 主な誌上発表 なし</li> <li>(2) 主な口頭発表 (学会等) なし</li> </ol>

## [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 所属及び職名
笠神 威雄	研究総括 メトキシクロルの in vitro 代謝	農薬の動物/作物代謝及び 環境中動態に関する研究	化学部代謝第1・第2研 究室長
杉岡 大介	メトキシクロルの in vivo 代謝	同上	化 学部代謝第1研究室主 任研究員

## 令和 5 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 6 年 3 月  
一般財団法人残留農薬研究所  
毒性部

部・室名 及 び 担 当 者 名	毒性部生殖・発生毒性研究室：北條仁(課題1研究総括)，高橋研(課題2研究総括)，青山博昭，佐藤旭，遠藤直子，西岡康，浦川千鶴 毒性部病理研究室：高橋尚史，加藤由隆，小山彩 毒性部短期毒性研究室：小坂忠司，田島均
課 題 名	【課題1】 毒性試験に用いる実験動物の遺伝学的基盤の整備（ラット/マウスの遺伝学的基盤の整備）： アウトブレット動物に保持される突然変異遺伝子およびステロイドホルモンに対する感受性を修飾する遺伝子群の解析 【課題2】 毒性試験に用いる実験動物の遺伝学的基盤の整備（ウサギの遺伝学的基盤の整備）： ウサギの系統差に着目した背景データの蓄積
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】アウトブレットラットの集団より発見された突然変異遺伝子の解析（IET 12-0031）
調 査 研 究 期 間	令和5年4月1日から令和8年3月31日 3年計画の1年目
前 年 度 ま で の 結 果 の 概 要	毒性試験の基準系統の一つである CrI:CD(SD)ラットの集団から発見された表皮水疱症誘発突然変異 <i>bl</i> ( <i>blister</i> ) については，その本態が <i>Col17a1</i> 遺伝子の 311 番目のアミノ酸に相当する部位に生じた一塩基重複 ( <i>c.932dup</i> ) であることや，当該変異が集団中に比較的高頻度に含まれていることなどを明らかにした。また，更なる病態解明を目的として RNA-seq 解析を実施した結果，変異をホモ型に持つ個体では，胎齢 (13, 16 および 20 日齢) によらず特に接合部型表皮水疱症に関与する遺伝子群に偏って mRNA 発現の変動がみられることが示唆された。一方，同じく基準系統の一つとして用いられる BrIHan:WIST@Jcl (GALAS)ラットの集団より発見された <i>ak</i> ( <i>absent kidney</i> ) については，本変異によって引き起こされる腎欠損などの奇形が浸透度の極めて低い顕性形質である（極稀にヘテロ型でも腎奇形を発現する）ことや，原因となる突然変異がラット第7染色体上のおよそ 20 Mb の領域に含まれること等を明らかにした。さらに，本候補領域内に存在し，

	<p>かつ他系統に報告のない特異的な変異として <i>Lrp1</i> 遺伝子内に 12 bp のインフレーム欠失 (<i>p.Ser171_Cys174del</i>) を検出した。しかし、未だ腎奇形発生との関連を決定付けるだけの十分な証拠は得られていない。</p>																																																																																									
<p>調査研究方法の概要</p>	<p><b><u>bl</u>変異</b>          本年度は、接合部型表皮水疱症に関与する <i>Lama3</i>, <i>Lamb3</i>, <i>Lamc2</i>, <i>Col17a1</i>, <i>Itga6</i>, <i>Itgb4</i> および <i>Itga3</i> の 7 遺伝子に注目して、RNA-seq によって得られた解析結果を検証することとした。これらの 7 遺伝子を対象に、胎齢 (13, 16 および 20 日齢) および遺伝子型 (+/+, +/bl および bl/bl) ごとに各 3 例の total RNA を用いてリアルタイム PCR による定量比較を実施した。</p> <p><b><u>ak</u>変異</b>  <i>Lrp1</i> 遺伝子に検出したインフレーム欠失が表現型に関連し得るものか検証するため、腎臓形成の時期を中心に RNA-seq 解析を実施して遺伝子発現に変化がないか調べることにした。ヘテロ型同士の交配を行ない、胎齢 11.5, 13.5 および 15.5 日の各時点で帝王切開によって胚を摘出し、個体ごとに RNA later に浸漬して低温保存した。また、遺伝子診断用に各個体から羊膜を採取して保存した。遺伝子診断は <i>Lrp1</i> 遺伝子のインフレーム欠失を標的とする PCR 法に基づいて行った。</p>																																																																																									
<p>調査研究結果の概要及び考察試験条件及び具体的なデータ</p>	<p><b><u>bl</u>変異</b>  <i>Col17a1</i> の一塩基重複 (c.932dup) に随伴する他の遺伝子群の発現変動について検索すべく、個体ごとに抽出した total RNA を用いてリアルタイム PCR を実施した。その結果、RNA-seq 解析の結果と同じく、ホモ型個体の <i>Col17a1</i> の発現量は、いずれの胎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 +/+)。しかし、その他の 6 遺伝子については、ほとんどの比較において発現量の変動は 0.5~2 倍の範囲に留まっており、RNA-seq 解析の結果は再現されなかった (下図)。</p> <table border="1" data-bbox="432 1529 1402 1827"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Gene Name</th> <th colspan="3">bl/+ vs +/+</th> <th colspan="3">bl/bl vs +/+</th> <th colspan="3">bl/bl vs bl/+</th> </tr> <tr> <th>GD 13</th> <th>GD 16</th> <th>GD 20</th> <th>GD 13</th> <th>GD 16</th> <th>GD 20</th> <th>GD 13</th> <th>GD 16</th> <th>GD 20</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Lama3</i></td> <td></td> <td></td> <td style="background-color: #0056b3; color: white;">0.1 &gt; x &gt; 0.01</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td style="background-color: #808000; color: white;">0.5 &gt; x &gt; 0.1</td> </tr> <tr> <td><i>Lamb3</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>Lamc2</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>Col17a1</i></td> <td></td> <td style="background-color: #808000; color: white;">2 &lt; x &lt; 10</td> <td style="background-color: #808000; color: white;">10 &lt; x &lt; 100</td> <td style="background-color: #808000; color: white;">2 &lt; x &lt; 10</td> <td style="background-color: #808000; color: white;">10 &lt; x &lt; 100</td> <td style="background-color: #808000; color: white;">2 &lt; x &lt; 10</td> <td></td> <td></td> <td style="background-color: #808000; color: white;">2 &lt; x &lt; 10</td> </tr> <tr> <td><i>Itga6</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>Itgb4</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>Itga3</i></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;"> <span style="background-color: #0056b3; color: white; padding: 2px;">0.1 &gt; x &gt; 0.01</span>      <span style="background-color: #808000; color: white; padding: 2px;">2 &lt; x &lt; 10</span>  <span style="background-color: #808000; color: white; padding: 2px;">0.5 &gt; x &gt; 0.1</span>      <span style="background-color: #0056b3; color: white; padding: 2px;">10 &lt; x &lt; 100</span> </p>	Gene Name	bl/+ vs +/+			bl/bl vs +/+			bl/bl vs bl/+			GD 13	GD 16	GD 20	GD 13	GD 16	GD 20	GD 13	GD 16	GD 20	<i>Lama3</i>			0.1 > x > 0.01						0.5 > x > 0.1	<i>Lamb3</i>										<i>Lamc2</i>										<i>Col17a1</i>		2 < x < 10	10 < x < 100	2 < x < 10	10 < x < 100	2 < x < 10			2 < x < 10	<i>Itga6</i>										<i>Itgb4</i>										<i>Itga3</i>									
Gene Name	bl/+ vs +/+			bl/bl vs +/+			bl/bl vs bl/+																																																																																			
	GD 13	GD 16	GD 20	GD 13	GD 16	GD 20	GD 13	GD 16	GD 20																																																																																	
<i>Lama3</i>			0.1 > x > 0.01						0.5 > x > 0.1																																																																																	
<i>Lamb3</i>																																																																																										
<i>Lamc2</i>																																																																																										
<i>Col17a1</i>		2 < x < 10	10 < x < 100	2 < x < 10	10 < x < 100	2 < x < 10			2 < x < 10																																																																																	
<i>Itga6</i>																																																																																										
<i>Itgb4</i>																																																																																										
<i>Itga3</i>																																																																																										

	<p><u><i>ak</i></u> 変異</p> <p><i>Lrp1</i> 遺伝子のインフレーション欠失と腎奇形との関連を調べるべく、腎臓の発生する時期を含む胎齢 11.5, 13.5 および 15.5 日の胚を用いて RNA-seq 解析を計画中である。本年度は、RNA-seq 解析の実施に先立ち、胎齢ごとに 2 腹ずつサンプルを採取して、これらの遺伝子診断を行なった。</p>
今後の課題 及び 対応方針	<p><i>bl</i> 変異については、これまでの成果を公表すべく、Laboratory Investigation 誌に論文を投稿中である。査読の結果、これ以上の追加データの取得が必要なければ、本年度をもって当該変異の解析を終了し、本システムをナショナルバイオリソースセンター「ラット」へ寄託する。<i>ak</i> 変異については、一部の胎齢・遺伝子型について十分なサンプルが得られなかったため、次年度も引き続き妊娠動物の生産と胚採取に取り組み、適宜 RNA-seq 解析を行なう。解析の結果、<i>Lrp1</i> 遺伝子または候補領域内に存在するその他の遺伝子に遺伝子型に応じた発現変動がみられる場合は、引き続きリアルタイム PCR による検証を行なう。また、理化学研究所の協力を仰ぎ、マイクロ CT を利用して腎臓の発生過程を形態学的に解析することも検討する。その他、上記 2 変異以外にも新たな突然変異形質が発見された場合には、それらの分離と原因遺伝子の同定にも可能な限り取り組む。</p>
成果の 公表予定	<p>表皮水疱症ラットの解析結果について、Laboratory Investigation 誌に投稿中。</p>
<p>【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)</p>	
調査研究 期間	<p>令和 5 年 4 月 1 日から令和 8 年 3 月 31 日</p> <p>3 年計画の 1 年目</p>
前年度までの 結果の 概要	<p>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、膈後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。</p>



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、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、同様の解析を計画している。しかし、昨年度までに市販の抗 <i>Aqp12</i> 抗体を用いて至適染色条件の検討を試みているものの、未だ陽性反応の検出には至っていない。
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	本年度は課題 3 に注力するため、課題 1-2 について進捗はなかった。
今後の課題及び対応方針	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】ウサギの系統差に着目した背景データの蓄積 (IET 21-1015)</b>	
調査研究期間	令和 3 年 4 月 1 日～令和 6 年 3 月 31 日 3 年計画の 3 年目
前年度までの結果の概要	これまでの取り組みでは、NZW ウサギの系統特性を把握すべく、生産場で自然交配させた雌ウサギを当研究所へ導入する方法と、導入後に人工授精を行なう方法の 2 種類について、検討を行なってきた。その結果、日本白色種に比べてストレスに対する感受性の高い NZW ウサギは後者の方法が適切であることを明らかにした。また、これらの取り組みによって発生毒性試験 2 試験分の背景対照値を蓄積することができた。
調査研究方法の概要	胎児に遺伝性奇形が出現した場合に交配実験による検証を行なう体制を整備すべく、雄ウサギから採取した精液の凍結保存技術の導入について検討することとした。初めに当研究所で維持する雄動物より精子を採取し、

	それらを一定期間凍結した後に解凍した精子の性状（運動性）を調べる。また、解凍精子を用いて人工授精を行ない、妊娠率と胎児における異常の発生率などを調べる。
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	特に課題3の解析に多くの人員を充てる必要があったことから、課題2の検討については、次年度以降に見送ることとした。
今後の課題 及び 対応方針	これまでの検討では、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も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と考えられるため、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。また、ウサギ精液の凍結保存方法について文献調査を行い、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。
成果の 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

部・室名 及び 担当者名	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、西岡康、浦川千鶴、北條仁、青山博昭 毒性部病理研究室：高橋尚史、小山彩、加藤由隆 毒性部短期毒性研究室：小坂忠司、田島均 化学部残留第2研究室：富山成人、児玉芽吹
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	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影響を及ぼし得る要因を検索する。
【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集団の BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)ラットを用いた比較 (IET 22-1015)	

調査研究 期 間	令和4年4月1日～令和6年3月31日 2年計画の2年目									
前年度までの結果の概要	<p>国内とタイの各生育場から導入した雌雄の Wistar Hannover GALAS ラット (日本クレア株式会社) に、通常の市販飼料である MF 飼料と植物エストロゲンの量を低減させた NIH-07PLD 飼料 (いずれもオリエンタル酵母工業株式会社製) を二世代に亘って与え (表 1.), 拡張一世代試験や Comparative thyroid assay (CTA) のガイドライン・ガイダンス文書に指定される時期に採血と剖検を行い、飼料と生育場の違いが各種指標に及ぼす影響を検討した。前年度は、計画通り、表 2.に挙げた項目のうち、特にインライフ試験で得られるデータの取得に努めた。また、実験の主たる目的からは逸れるものの、以下の3点を明らかにした。すなわち、(1) BrlHan:WIST@Jcl (GALAS) ラットのタイ生育場には、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> 変異の混入が疑われること、(2) 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高いこと、並びに (3) NIH-07PLD 飼料の摂取が生後 21 日齢の児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と考えられること。</p>									
調査研究方法の概要	<p>先に述べた如く、国内 (J) とタイ (T) の各生育場に由来する 2 集団の BrlHan:WIST@Jcl(GALAS)ラットの間で血中甲状腺ホルモン濃度等の指標に差がないか比較を試みた。また、これらのラットに通常の市販飼料である MF 飼料 (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がないかを調べた。本年度は、昨年度に採取した試料を用いて血中甲状腺ホルモン・甲状腺刺激ホルモン濃度の測定、精子検査、病理組織学的検査などに取り組むと共に、得られたデータの統計解析を実施した。試験群の構成と検査項目を、それぞれ表 1.および表 2.に示す。</p> <p>表 1. 試験群の構成</p> <table border="1" data-bbox="416 1666 1353 1883"> <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 (雌雄各 12 匹)</td> <td>MF-J 群 (雌雄各 12 匹)</td> </tr> <tr> <td>タイ生育場</td> <td>NIH-T 群 (雌雄各 12 匹)</td> <td>MF-T 群 (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 (雌雄各 12 匹)	MF-J 群 (雌雄各 12 匹)	タイ生育場	NIH-T 群 (雌雄各 12 匹)	MF-T 群 (雌雄各 12 匹)
生育場	NIH-07PLD 飼料	MF 飼料								
富士山生育場	NIH-J 群 (雌雄各 12 匹)	MF-J 群 (雌雄各 12 匹)								
タイ生育場	NIH-T 群 (雌雄各 12 匹)	MF-T 群 (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 ／F1児	<p>インライフ検査項目 臨床症状, 体重, 体重 増加量, 摂餌量</p> <p>繁殖能力 交尾率</p> <p>病理学的検査項目 剖検, 臓器重量 (脳, 甲状腺, 下垂体, 肝臓, 腎臓, 副腎, 脾臓, 精 巣, 精巣上部, 精嚢・ 凝固腺, 前立腺腹葉お よび前立腺側背葉)</p> <p>その他 血中TH/TSH (8週, 6匹/群; 最終計画殺, 12匹/群)</p>	<p>インライフ検査項目 臨床症状, 体重, 体重 増加量, 摂餌量</p> <p>繁殖能力 交尾率, 受胎率, 出産 率, 発情周期, 同居開 始から交尾成立まで の日数, 妊娠期間, 着 床数</p> <p>病理学的検査項目 剖検, 臓器重量 (脳, 甲状腺, 下垂体, 肝臓, 腎臓, 副腎, 脾臓, 卵 巣および子宮)</p> <p>その他 血中TH/TSH (最終 計画殺, 12匹/群)</p>	<p>全般的検査項目 生存率, 臨床症状, 体 重</p> <p>哺育0日検査項目 性比, 産児数</p> <p>哺育4日検査項目 血中TH/TSH, 剖検, 甲状腺重量 (固定 後)</p> <p>哺育13日検査項目 乳頭数</p> <p>哺育21日検査項目 血中TH/TSH, 剖検, 脳重量, 胸腺重量, 脾 臓重量, 甲状腺重量 (固定後)</p>
F1親動物 ／F2 児	<p>インライフ検査項目 臨床症状, 体重, 体重 増加量, 摂餌量</p> <p>繁殖能力 包皮分離, 交尾率, 精 子検査</p> <p>病理学的検査項目 剖検, 臓器重量 (脳, 甲状腺, 下垂体, 肝臓, 腎臓, 副腎, 脾臓, 精 巣, 精巣上部, 精嚢・ 凝固腺, 前立腺腹葉お よび前立腺側背葉)</p> <p>その他 聴覚性驚愕反応 (24 日齢前後および58日 齢前後), 血中 TH/TSH (最終計画 殺, 12匹/群), 血液 凝固</p>	<p>インライフ検査項目 臨床症状, 体重, 体重 増加量, 補正体重, 摂 餌量</p> <p>繁殖能力 膻開口, 膻開口後初回 発情, 交尾率, 受胎率, 発情周期, 同居開始か ら交尾成立までの日 数, 黄体数, 着床数, 着床前胚死亡率, 妊娠 子宮重量</p> <p>病理学的検査項目 剖検, 臓器重量 (脳, 甲状腺, 下垂体, 肝臓, 腎臓, 副腎, 脾臓およ び卵巣)</p> <p>その他 聴覚性驚愕反応 (24 日齢前後および58日 齢前後), 血中 TH/TSH (最終計画 殺, 12匹/群), 血液 凝固</p>	<p>妊娠20日検査項目 生存胎児数, 胚・胎児 死亡率, 性比, 胎児体 重, 肛門生殖突起間距 離, 血中TH/TSH, 甲 状腺重量 (固定後)</p>
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	<p>実験に使用したMF飼料およびNIH-07PLD飼料の植物エストロゲン濃度は、それぞれ 608 ppm～747 ppm および&lt;10.0 ppm～18.5 ppm であった。これらの飼料を動物に摂取させた結果、内分泌かく乱作用を検出するための各種指標に対し、飼料の違いに起因した大きな影響はみられないことが確認された。例外として、NIH 摂取群の雄には甲状腺の病理組織学的検査でコロイド変性が低頻度ながら観察されたことから、飼料中の植物エストロゲンを過度に排除することは必ずしも実験精度を向上させるものではない可能性が示唆</p>		

	<p>された。また、飼料中の植物エストロゲン含量が 600 ppm 前後に制御されていれば、内分泌かく乱作用の検出に支障を来すような影響もないと考えられた。一方、生育場の違いに関しては、2 集団のラットの間でいくつかの指標に明瞭な差が検出された。これらの結果は、集団間の遺伝的な差を示唆するものであり、元は同一の集団であっても分離後に系統特性が変化し得ることを示した結果であると考えられた。以下に、生育場間で観察された主な差を記す。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 世代を通じた雌雄の体重、体重増加量および摂餌量は、しばしば J 群と比較して T 群で高かった。</li> <li>2. 体重の差に関連すると考えられる変動として、P 雌の着床数と産児数、F1 雌の黄体数、着床数および生存胎児数、ならびに親動物の脳、肝臓、下垂体、副腎、甲状腺といった臓器の絶対重量などが J 群と比較して T 群で高かった。</li> <li>3. 世代、雌雄または日齢を問わず、J 群における血中甲状腺ホルモン濃度が T 群よりも高い傾向がみられ、特に P および F1 雌ならびに胎児、4 日齢児および 21 日齢児で各種ホルモン濃度に統計学的有意差が散見された。</li> </ol>
<p>今後の課題 及 び 対 応 方 針</p>	<p>生育場間で観察された主な差のうち、血中甲状腺ホルモン濃度に観察された差は採取サンプルのうち半数を分析して検出されたものに過ぎない。そのため、これらの差が真に動物集団の特性を反映したものであるか、引き続き残りの半数のサンプルも分析して検証を行なう。また、本年度の実施を計画していた <i>cack</i> 変異の確定 (遺伝子) 診断についても、次年度内の実施を見込む。一方、2 か年に亘る実験で得られたこれらの結果は、化学物質を投与しない条件によるものであることから、今後は PTU 等の陽性対象物質を用いて飼料の違いが毒性発現に及ぼし得る修飾効果についても調べる必要があると考えらる。その他、脳中甲状腺ホルモン濃度の測定や、画像認識 AI を活用したコロイドサイズ測定支援技術の開発といった新たな基盤技術の開発にも積極的に取り組む。</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>

## [令和5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、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研究総括、課題2、課題3	生殖・発生毒性学および家畜解剖学	毒性部 一般毒性担当部長
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 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 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 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 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 研究員
高橋 尚史	課題1、課題3	毒性病理学	病理研究室 主任
小山 彩	課題1、課題3	毒性病理学	病理研究室 主任研究員
加藤 由隆	課題1、課題3	毒性病理学	病理研究室 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 嘱託
田島 均	課題1、課題3	免疫毒性学	短期毒性研究室 研究員
富山 成人	課題3	分析化学	化学部残留第2研究室 室長
児玉 芽吹	課題3	分析化学	化学部残留第2研究室 研究員