

平成 10 年度 厚生科学研究補助金（生活安全総合研究事業）

ビスフェノール A、ゲニステイン等の繁殖影響
および体内動態等に関する調査研究

研究報告書

主任研究者

大阪市立大学医学部 第一病理学教室

福島 昭治

分担研究者

国立医薬品食品衛生研究所・大阪支所 生物試験部

川島 邦夫

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 薬理部

大野 泰男

星薬科大学 薬品毒性学教室

鈴木 勉

国立健康・栄養研究所 食品科学部

池上 幸江

東京理科大学 薬学部

武田 健

東京薬科大学薬学部 公衆衛生学教室

別府 正敏

平成10年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
総括研究報告要旨

ビスフェノールA，ゲニステイン等の繁殖影響及び体内動態等に関する調査研究

主任研究者 福島昭治 大阪市立大学医学部教授

研究要旨

現在までに得られた研究成果は次の如くである。1) スチレンモノマーはラット肝発がんを抑制し、ビスフェノールAは肝発がん性に影響を及ぼさないことが強く示唆された。ディルドリンの肝発がん性は無作用量の存在が示唆された（福島）。2) 実験継続中の2世代繁殖毒性試験において、親世代（F0世代）と第一世代（F1世代）の5週までの成績ではビスフェノールAおよびゲニステインによると考えられる変化は認められていない（川島）。3) ラットにおいてビスフェノールAの血漿中濃度は投与量に相関してほぼ線形に増加し、雄の方が雌より高値を示した。また、経口投与で腸管循環が認められた。サルにおいては明瞭な腸管循環は認められなかった（大野）。4) ビスフェノールAの単回投与は自発運動に影響を及ぼさなかったが、28日間経口投与後、ビスフェノールA投与では有意な自発運動の増加が示された（鈴木）。5) 大豆イソフラボンを妊娠、授乳ラットに投与すると胎児数や乳児数の低下がみられ、またその胎児、乳児への移行が認められた（池上）。6) ビスフェノールAの経口投与1時間後には母親血漿中の濃度の1/3が胎児に移行することが明らかとなった。さらに時間が経過しても高い濃度を維持した（武田）。7) ビスフェノールA、ゲニステインはラットの生殖関連行動や生殖機能、および鶏胚の孵化等に影響を及ぼさなかった。しかし、ヒト免疫系培養細胞に対しては両物質ともエトポシド誘導アポトーシスを増強した（別府）。

研究者氏名	所属施設および地位	分担研究の課題
福島 昭治	大阪市立大学医学部教授	スチレン等内分泌かく乱物質の発がん性と閾値に関する調査研究
川島 邦夫	国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所部長	ビスフェノールAおよびゲニステインのラットにおける2世代繁殖毒性試験
大野 泰雄	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 薬理部長	ビスフェノールAのラット及びサルにおける体内動態試験
鈴木 勉	星薬科大学薬品毒性学教室教授	内分泌かく乱物質の行動影響に関する調査研究
池上 幸江	国立健康・栄養研究所 食品科学部部長	ゲニステインの生体影響および体内動態に関する研究
武田 健	東京理科大学薬学部 教授	ビスフェノールA、ゲニステインの胎仔期曝露の雄性生殖機能への影響評価
別府 正敏	東京薬科大学教授	ビスフェノールA、ゲニステイン等の生殖、免疫機能への影響及び代謝に関する研究

A. 研究目的

近年、環境中に存在する内分泌かく乱物質が、野生ならびに海生動物などの生態に影響を与えていることが指摘されている。また、ヒトにおいても精子数の減少や生殖器奇形の発生が増加しており、生殖系を始めとする様々な健康への影響が懸念されている。しかし、環境中の内分泌かく乱物質とそれらとの因果関係は、現在のところ科学的には全く不明である。

そこで、本研究では内分泌かく乱作用が疑われているビスフェノールA、ゲニステイン等の化学物質の生殖機能、生殖器発生異常、体内動態、胎児・乳汁移行、一般および情動行動、免疫および発がん性などに及ぼす影響を解析することを目的とする。

B. 研究方法と結果

1. スチレン等内分泌かく乱物質の発がん性と閾値に関する調査研究（福島）

6週齢のF344雄ラットを用い、diethylnitrosamine (DEN)をイニシエーターとする中期肝発がん性試験法（伊東法）にて、DENによるイニシエーション後にスチレンモノマー、ビスフェノールA、またはディルドリンを投与した。なお、実験開始3週間後に2/3肝部分切除術を施行した。実験期間は8週間である。

その結果、スチレンモノマーの高用量（250および1000 mg/kg）強制経口投与によりラット肝の前がん病変である胎盤型グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST-P)陽性細胞巢の発生が投与用量と相関して抑制された。現在、ヒト曝露量を考慮した低用量域（最低0.0006 mg/kg）での実験を実施中である。ビスフェノールAの高用量（40および160 mg/kg）投与は肝GST-P陽性細胞巢の発生に影響を及ぼさなかった。さらにディルドリンの高用量投与（100 ppm、飼料中）は肝発がん性を発揮したが、低用量（最低0.1

ppm、飼料中）では何ら作用を示さず、無作用量の存在が強く示唆された。

2. ビスフェノールAおよびゲニステインのラットにおける2世代繁殖毒性試験（川島）

0.2, 2, 20 または 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ のビスフェノールA, 200 または 400 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ のゲニステインを雌雄のラットの親世代 (F0) の交配前から第二世代 (F2) の性成熟に到るまで強制経口投与して2世代繁殖試験を実施している。現在ビスフェノールAについてはF0世代の剖検を終了し、第一世代 (F1) への投与を継続中である。

F0世代の一般状態、体重及び摂餌量、器官重量、精子検査結果及び生殖能力にビスフェノールA投与の影響は観察されなかった。雌F0世代の血中トリヨードチロニン (T3) 及びチロキシン (T4) 濃度の低下がビスフェノールA 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群で観察された。F1世代では一般状態、成長、発育分化、反射反応性の獲得、性成熟に達した日齢、行動・学習能及び器官重量にビスフェノールA投与による影響はみられなかった。肛門生殖器間隔 (AGD) が雄の生後14日のビスフェノールA 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群、生後29日の200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群で短縮し、雌の生後4日の200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群、生後7日の2及び20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群で延長した。

ゲニステインについてはF0世代への投与を継続中である。F0世代の一般状態、体重及び摂餌量に対するゲニステイン投与の影響は認められていない。

3. ビスフェノールAのラット及びサルにおける体内動態試験（大野）

^{14}C で標識したビスフェノールA (^{14}C -BPA) を雌雄のラット、妊娠ラット、哺育ラット及び雌雄アカゲザルに経口及び静脈内投与し、血漿中動態、糞尿中排泄、乳汁中排泄および組織分布

を検討した。

雌雄のラットの ^{14}C -BPA 血中濃度は投与量に応じてほぼ線形に増加した。100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 経口投与による生物学的利用能はほぼ 50%であった。また、雄の方が雌より血中濃度が高かった。経口投与では投与後 4 時間以後に再び血中濃度が増加し、腸肝循環があるものと思われた。消失半減期は100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与 2~3 日後で、約15-18時間であった。ビスフェノールAは乳汁中に排泄され、乳汁排泄濃度は投与後 8 時間で最高となり、この時の血漿中濃度の約 1/4であった。

雄サルに ^{14}C -BPA を 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 静脈内および経口投与したときの最高血漿中濃度 (C_{max}) および血漿中濃度・時間曲線下面積 (AUC) では大きな差は無かった。生物学的利用能はほぼ 100%であった。また明瞭な腸肝循環は認められなかった。消失半減期 (投与後 8~48時間) は約15時間であった。さらに、ビスフェノールA は主に尿に排泄された。現在、雌雄を用いた本実験を継続中である。

4. 内分泌かく乱物質の行動影響に関する調査研究 (鈴木)

雄性マウスにベンゾ(a)ピレン、ビスフェノールA、およびフタル酸ジ-n-ブチルを強制経口投与し、一般行動、tilting cage法にて自発運動、Vogel型葛藤試験にて葛藤、step down法にて学習・記憶、およびrota-rod法を用いて運動協調性などに及ぼす影響を検索した。

その結果、ベンゾ(a)ピレン、ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-n-ブチル投与後のマウスの一般行動に変化は認められなかった。自発運動について、ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-n-ブチルの単回経口投与は有意な影響を及ぼさなかったが、ベンゾ(a)ピレンは投与後初期の自発運動量を用量依存的に増加させた。また、28日間の混餌投与後、ビスフェノールA 10 mg/kg 投与群において有意な自発運動の増加

が認められた。さらに、各被験物質は葛藤、学習・記憶および運動協調性に影響を及ぼさないことが判明した。

5. ゲニステインの生体影響および体内動態に関する研究 (池上)

SD系ラットの妊娠期・授乳期にイソフラボンを含む飼料を投与し、胎児・乳児への移行と生体影響を観察した。また、卵巣摘出と正常の雌dy系マウスにゲニステインを 2~4 週間皮下投与し、子宮重量と骨への影響を観察した。

妊娠期・授乳期の母親ラットに投与したイソフラボンは胎児数や乳児数の低下をもたらした。ゲニステインとダイゼインは胎児・乳児に移行したが、それらの乳児の血中濃度は母親の血中濃度の 1/30および 1/10であった。母親の血中甲状腺ホルモン、T3濃度の有意な低下が観察された。さらに、卵巣摘出、正常いずれのマウスもゲニステインの高濃度曝露によって子宮重量の増加がみられた。卵巣摘出マウスで観察される骨粗鬆症はゲニステインの低濃度曝露によって改善することが分かった。

6. ビスフェノールA、ゲニステインの胎仔期曝露の雄性生殖機能への影響評価 (武田)

ウイスター系妊娠ラットにビスフェノールAを経口投与し、胎仔への移行を検索した。また生まれた仔の精巣を摘出し、雄性生殖系に現れる変化を検討した。精巣ライディッヒ細胞の培養系でテストステロン産生試験法を確立し、ビスフェノールA、ゲニステイン、その他化学物質の影響を比較検討した。

その結果、ビスフェノールAは経口投与1時間後には胎仔に相当量移行(母親血漿中濃度の約3分の1)する事が明らかになった。時間の経過とともに母親血漿中のビスフェノールAは著しく低下したが、胎仔組織は高い濃度を維持した。ビスフェノールAはライディッヒ細胞のテストステロン産生には影響を及ぼさなかった。

ゲニステインの妊娠期経口投与により、生後2週間の精巣において黄体形成ホルモンやアンドロゲンなどのホルモン受容体 mRNAの発現が亢進した。

7. ビスフェノールA, ゲニステイン等の生殖、免疫機能への影響及び代謝に関する研究 (別府)

1) 生殖・発生に対する影響はラットと鶏胚を用いた *in vivo* 曝露実験にて検討した。2) 神経系への影響は、ラット脳海馬のスライスを *in vitro* で器官培養し、組織像及び神経活動(電気的活動)への影響を見ることにより検討した。3) 免疫をはじめとする細胞機能に対する影響はヒト免疫系培養細胞(単球系培養細胞 U937, Tリンパ球系培養細胞 Jurkat)を用いた細胞レベルでの *in vitro* 曝露実験にて検討した。4) ヒト体内における代謝を推定するためのアプローチとして、組換え体ヒト薬物代謝酵素(スルホトランスフェラーゼ, グルタチオンSトランスフェラーゼ)を作製し、*in vitro* において被検化学物質の代謝を検討した。

1) ビスフェノールA及びゲニステインは、ラットの生殖関連行動、生殖機能、および鶏胚の孵化及び鶏胚の骨形成、軟骨細胞の増殖能に対し明瞭な影響を示さなかった。2) ラット脳海馬のスライス標本を両化合物存在下で培養すると、ゲニステインは組織をやや増殖させ、また、シナプス活動促進効果を示した。3) 両化合物ともエトポシドで誘導されるアポトーシスを増強する作用を示した。4) 両化合物とも組換え体ヒトスルホトランスフェラーゼにより硫酸抱合代謝を受けることが明らかとなった。一方、組換え体ヒトα型グルタチオンSトランスフェラーゼによって代謝される可能性は示されなかった。

C. 考察

福島はスチレンモノマーが投与用量と相関し

て肝GST-P陽性細胞巢の発生を抑制したことを見出した。このことは高用量のスチレンモノマーは肝発がんを抑制することを強く示唆している。現在、ヒトが曝露されるレベルでの低用量域での作用を詳細に検討中である。また、ビスフェノールAについては対照群と差を認めなかったことから、長期投与によっても肝発がん性には何ら影響を示さないと結論された。今後、スチレンダイマーおよびトリマーの肝発がんに及ぼす影響についても検討する必要がある(福島)。

ビスフェノールA投与により F0の血中 T3及び T4の変動がみられ、また、F1児の AGDの変化が観察された。血中ホルモンの変化については毒性学的意義について更なる検討が必要であり、AGDの変化については生存動物を用いた計測では変動が大きくなる欠点を考慮しなければならない。今後ビスフェノールA投与の影響が否を検討しなければならない。両物質の実験は現在まだ進行中であり、それらの毒性評価を行う十分な実験成績が得られていない(川島)。

ビスフェノールAのラット血中濃度は雄の方が雌より高かった。通常の薬物においては雌よりも雄の方が薬物代謝が高く、薬物の血中濃度は雄の方が低くなる傾向がある。従って、ビスフェノールAが雄に活性の高いP-450分子種で代謝されるのではないことを示しているのかも知れない。また、ラットにおける経口投与で腸管循環によると思われる二相性の血中動態が認められ、明らかにサルのそれとは異なっていた。この点に関しては近々得られる多数のサルを用いた本実験の結果を待って再考察したい(大野)。

鈴木の研究により、ベンゾ(a)ピレンは単回投与によって、またビスフェノールAは混餌による28日間曝露後に再度、投与することによって自発運動量をそれぞれ亢進することが明らかに

された。本研究ではマウスを新規環境に順応させずに実験を行っていることから、初期の自発運動量の増加は新規環境への順応性の低下を意味し、高用量のベンゾ(a)ピレンやビスフェノール A が新規環境への順応性を低下させる可能性が示唆された。

ゲニステインは大量投与により妊娠・出産に影響を与える可能性があり、胎児・乳児に移行することが確認された。今後、日本人におけるゲニステイン摂取実態を考慮しながら、妊娠期・授乳期のゲニステイン曝露の胎児・乳児に与える影響を詳細に検討することが必要である(池上)。

ビスフェノール A は妊娠ラットに経口投与すると、速やかに相当量胎仔に移行することが明らかになった。今後、1週間、1カ月という長時間に渡って胎仔組織のビスフェノール A の濃度変化を調べる必要がある。しかし、ビスフェノール A は今のところ雄性生殖系にはっきりした影響を示していない。一方、ゲニステインはテストステロン合成酵素、ホルモン受容体の発現に影響を与える可能性が示唆されたので、今後この点をさらに詳細に検討する必要がある(武田)。

ビスフェノール A, ゲニステインの影響は、*in vitro* では認められる傾向にあったが、*in vivo* 実験ではほとんど認められなかった。個体レベルでは、代謝的な分解や恒常性維持機構の作用によって影響が軽減されている可能性が考えられる。しかしながら *in vitro* 系における各種の影響はこれら化学物質の持つ潜在的な作用を示しており、ヒトへの影響を評価するためには多面的な知見を集積し、総合的に判断する必要がある(別府)。

D. 結論

現在までに得られた研究成果は次の如くである。

1) スチレンモノマーはラット肝発がんを抑制し、ビスフェノール A は肝発がん性に影響を及ぼさないことが強く示唆された。ディルドリンの肝発がん性に無作用量の存在が示唆された(福島)。

2) 実験継続中の 2 世代繁殖毒性試験において、F0 世代と F1 世代の 5 週までの成績ではビスフェノール A およびゲニステインによると考えられる変化は認められていない(川島)。

3) ラットにおいてビスフェノール A の血漿中濃度は投与量に相関してほぼ線形に増加し、雄の方が雌より高値を示した。また、経口投与で腸管循環が認められた。サルにおいては明瞭な腸管循環は認められなかった(大野)。

4) ビスフェノール A の単回投与は自発運動に影響を及ぼさなかったが、28 日間経口投与後、ビスフェノール投与では有意な自発運動の増加が示された(鈴木)。

5) 大豆イソフラボンを妊娠、授乳ラットに投与すると胎児数や乳児数の低下がみられ、またその胎児、乳児への移行が認められた(池上)。

6) ビスフェノール A の経口投与 1 時間後には母親血漿中の濃度の 1/3 が胎児に移行することが明らかとなった。さらに時間が経過しても高い濃度を維持した(武田)。

7) ビスフェノール A, ゲニステインはラットの生殖関連行動や生殖機能、および鶏胚の孵化等に影響を及ぼさなかった。しかし、ヒト免疫系培養細胞に対しては両物質ともエトポシド誘導アポトーシスを増強した(別府)。

今後、現在、継続して実施中である研究を一刻も早く完成させる必要がある。さらに、ヒトが曝露される低用量域での作用を検討することによって、ヒトへの影響やリスク評価に際しての重要なデータが提供されると考える。

E. 研究発表

1. 論文発表

Kitano, M., Ichihara, T., Matsuda, T., Wanibuchi, H., Tamano, S., Hagiwara, A., Imaoka, S., Funae, Y., Shirai, T. and Fukushima, S. Presence of a threshold for promoting effects of phenobarbital on diethylnitrosamine-induced hepatic foci in the rat. *Carcinogenesis*, 19, 1475-1480, 1998.

福島昭治. 環境因子の発癌リスク—評価と予防への実験病理学的アプローチ— (宿題報告 III)日病会誌 (Proc Jpn Soc Pathol), 第 87 巻, 第 2 号, 55-77, 1998.

Fukushima, S. Low-dose carcinogenicity of a heterocyclic amine, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline: relevance to risk assessment. *Cancer Lett.*, 143, 157-159, 1999.

石見佳子, 池上幸江. 大豆イソフラボンの有効性とリスク. *栄養食糧誌*, 51 巻, 1998.

Ishimi, Y., Miyaura, C., Ohmura, M., Onoe, Y., Sato, T., Uchiyama, Y., Ito, M., Wang, X., Suda, T. and Ikegami S. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology*, 140, 1999.

Yoshida, S., Yamada, H., Sugawara, I. and Takeda, K. Effect of dibromochloropropane (DBCP) on the hormone receptors of the male rat reproductive system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 479-483, 1998.

Watanabe S., Yoshida, S., Shimizu, T. and Takeda, K. Analysis of responsive genes

of murine Leydig cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Health Sci.*, in press.

吉田成一, 田畑真佐子, 武田健. 内分泌攪乱物質の生殖及び生体防御系への影響評価の確立. *化学工業* 49, 607-612, 1998.

哺乳動物細胞を用いた細胞毒性試験「バイオアッセイ水環境のリスク管理」(鈴木基之・内海英雄編) 講談社サイエンティフィック, pp105-115, 1998.

Matsuzawa, S., Suzuki, T., and Misawa, M. Conditioned fear stress induces ethanol-associated place preference in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 341, 127-130, 1998.

Matsuzawa, S., Suzuki, T., Misawa, M. and Nagase, H. Involvement of μ - and δ -opioid receptors in the ethanol-associated place preference in rats exposed to foot shock stress. *Brain Res.*, 803, 169-177, 1998.

F. 知的所得権の取得状況
なし

スチレン等内分泌かく乱物質の発がん性と閾値に関する調査研究

分担研究者 福島昭治 大阪市立大学医学部教授

研究要旨

Styrene monomer, Bisphenol A および Dieldrin のラット肝発がん性に及ぼす影響を検討した。Styrene monomer は高用量経口投与により肝発がん性を示さず、むしろ抑制作用を発揮することが明らかとなった。今後、Styrene monomer のヒト曝露レベルでの検討が必要である。一方、Bisphenol A の高用量投与は肝発がん性を示さなかった。さらに Dieldrin の高用量投与は肝発がん性を発揮したが、低用量では何ら作用を示さず、無作用量の存在が強く示唆された。

A. 研究目的

Styrene, Bisphenol A および Dieldrin の肝発がん性の有無を中期肝発がん性試験法 (伊東法) を用いて検討する。さらに、発がん性のある化学物質についてはその閾値の存在を検討する。

B. 研究方法

【実験 1】各群 16 匹の 6 週齢 F344 雄ラットに Diethylnitrosamine (DEN) を 200 mg/kg の用量で 1 回腹腔内に投与し、肝発がんに対するイニシエーション処置を行った。その 2 週間後より Styrene monomer の 250 および 1000 mg/kg/day を、また Bisphenol A の 40 および 160 mg/kg/day を 6 週間 (6 日/週)、胃内投与した。対照群には溶媒であるコーン油、または 0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液を同様に投与した。さらに、各群 8 匹には DEN 無処置で Styrene monomer の 1000 mg/kg/day, Bisphenol A の 160 mg/kg/day 及びそれらの対照群にはそれぞれの溶媒を同様に投与した。なお、実験開

始 3 週間後には、肝細胞の増殖を促進させるために、全動物に 2/3 肝部分切除術を施行した。実験開始 8 週間後にエーテル麻酔下にて屠殺、剖検し、ホルマリン固定後、肝臓の胎盤型 Glutathione S transferase (GST-P) を免疫組織化学的に染色した。さらに前がん病変の指標である GST-P 陽性細胞巢の個数および面積をイメージアナライザーを用いて測定し、それらを定量的に解析した。

【実験 2】実験 1 と同様の方法を用いて Styrene monomer の低用量におけるラット肝発がん性に及ぼす影響を検討した。投与用量は 0.0006, 0.006 および 0.6 mg/kg/day で、胃内投与した。

【実験 3】実験 1 と同様の方法を用いて、Dieldrin の高用量および低用量におけるラット肝発がん性について検討した。投与量はヒト曝露量を考慮し、0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.3, 10, 33 および 100 ppm (飼料中用量) であった。

【実験 4】Dieldrin 低用量域での肝発がん反応を再確認するために、実験 1 と同様の方法を用いて Dieldrin の投与量を 0, 0.15, 0.3, 0.625, 1.25, 2.5 および 5 ppm (飼料中用量) として、再実験した。

[略語]

DEN, diethylnitrosamine

GST-P, 胎盤型 glutathione S transferase

C. 研究結果と考察

【実験1】Styrene monomerでは、体重増加の著明な抑制、軽度な肝臓重量の増加を認めた。肝GST-P陽性細胞巢の個数および面積の低値を1000 mg/kg群で、個数の低値を250mg/kg群で観察した(表1)。

Bisphenol A投与群では、体重増加の抑制がみられた。肝GST-P陽性細胞巢の定量値に関しては対照群と比較して差を認めなかった(表1)。

【実験2】現在、実験開始後、6週目であり、体重増加に関し、対照群と投与群との間に差を全く認めていない。

【実験3】10 ppm以上では対照群と比較し、肝のGST-P陽性細胞巢発生の増加が認められた。低用量の1.0 ppmではGST-P陽性細胞巢定量値の減少傾向を、0.3 ppmでは逆に増加傾向を示した。

【実験4】肝GST-P陽性細胞巢の発生はDieldrinの0.3 ppmを頂点として、逆U字型に増加・減少傾向を示した。

ラット肝の前がん病変のマーカであるGST-P陽性細胞巢の定量的変動を指標として化学物質のラット肝発がん性を予測する本試験法により、Styrene monomerは投与用量と関連したGST-P陽性細胞巢の発生抑制を示した。このことは高用量のStyrene monomerは肝発がんを抑制することを強く示唆している。現在、ヒトが曝露されるレベルでの低用量域での作用を詳細に検討中である。またBisphenol Aについては対照群と差を認めなかったことから、長期投与によっても肝発がん性は示さないと結論された。

さらに、Dieldrinの肝発がん性に関しては、高用量ではGST-P陽性細胞巢の発生を増加させたが、低用量域では無処置対照群と差はなく、Dieldrinの発がん作用には無作用量が存在することが強く示唆された。しかし、GST-P値に対する低用量の反応曲線は統計学的に有意差はな

いものの、逆U字型を示し、低用量反応曲線は一樣ではないことが判明した。

D. 今後の展望

Styrene monomerは高用量とはいえ、ラット肝発がん抑制作用を発揮した。今後、ヒトが曝露されるレベルでの作用を確認するとともに、その作用機序を明らかにする必要がある。

また、Dieldrinの低用量域での肝発がん反応曲線の解析結果は発がん性の実際上の閾値論に基づくリスクマネジメントに大いに貢献すると考えられる。今後、他の化学物質についても低用量域の発がん反応を追究する必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Chen, T., Yamamoto, S., Gen, H., Murai, T., Mori, S., Oohara, T., Makino, S., Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Infrequent involvement of microsatellite instability in urinary bladder carcinomas of the NON/Shi mouse treated with *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Cancer Lett.*, 123, 41-45, 1998.
2. Fukushima, S.: Carcinogenesis, Urinary Tract, Rat. In: *Monographs on Pathology of Laboratory Animals; Urinary System*, Second Edition. (eds.) T.C. Jones, G.C. Hard, U. Mohr., Springer, pp375-381, 1998.
3. Ogawa, K., Iwasaki, S., Esumi, H., Fukushima, S. and Shirai, T.: Modification by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) of 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB)-induced rat pancreatic and intestinal tumorigenesis. *Cancer Lett.*, 124, 31-37, 1998.
4. Hori, T., Wanibuchi, H., Yano, Y., Otani, S., Nishikawa, A., Osugi, H., Kinoshita, H. and Fukushima, S.: Epithelial cell proliferation in the digestive tract induced

- by space restriction and water-immersion stress. *Cancer Lett.*, 125, 141-148, 1998.
5. Takada, N., Yano, Y., Otori, K., Otani, S., Nomura, S., Kitamura, Y. and Fukushima, S.: Expression and localization of ornithine decarboxylase in reversible papillomatosis induced by uracil in rat bladder. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89, 377-384, 1998.
 6. Yamachika, T., Nakanishi, H., Inada, K., Tsukamoto, T., Shimizu, N., Kobayashi, K., Fukushima, S. and Tatematsu, M.: *N*-Methyl-*N*-nitrosourea concentration - dependent, rather than total intake - dependent, induction of adenocarcinomas in the glandular stomach of BALB/c mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89, 385-391, 1998.
 7. Lee, C.C.R., Masuda, C., Yamamoto, S., Wanibuchi, H., Ikemoto, S., Sugimura, K., Nakatani, T., Wada, S., Kishimoto, T., and Fukushima, S.: Assessment of cell cycle-related elements p53, p21WAF1/Cipl, cyclin D1 and PCNA in a mixed transitional cell carcinoma and adenocarcinoma of the renal pelvis: a case report. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 28, 227-232, 1998.
 8. Mori, S., Murai, T., Hosono, M., Yamashita, H., Oohara, T., Makino, S., Doteuchi, M. and Fukushima, S.: F344/Shi rats bearing type b catalase-1 locus are sensitive to sodium L-ascorbate promotion of two-stage urinary bladder carcinogenesis. *Teratoge. Carcinoge. Mutage.*, 18, 27-33, 1998.
 9. Fukushima, S., Hori, T. and Takada, N.: The inhibitory effects of organosulfur compounds on chemical carcinogenesis of rats. In: *Cancer and Nutrition*. (eds.) K.N. Prasad and W.C. Cole, IOS Press, pp157-165, 1998.
 10. Yamamoto, S., Tatematsu, M., Yamamoto, M., Fukami, H. and Fukushima, S.: Clonal analysis of urothelial carcinomas in C3H/HeN \times BALB/c chimeric mice treated with *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Carcinogenesis*, 19, 855-860, 1998.
 11. Yoshida, K., Inoue, Y., Kuroda, K., Chen, T., Wanibuchi, H., Fukushima, S. and Endo, G.: Urinary excretion of arsenic metabolites after long-term oral administration of various arsenic compounds to rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, 54, 179-192, 1998.
 12. Kitano, M., Ichihara, T., Matsuda, T., Wanibuchi, H., Tamano, S., Hagiwara, A., Imaoka, S., Funae, Y., Shirai, T. and Fukushima, S.: Presence of a threshold for promoting effects of phenobarbital on diethylnitrosamine-induced hepatic foci in the rat. *Carcinogenesis*, 19, 1475-1480, 1998.
 13. Chen, T., Yamamoto, S., Kitano, M., Murai, T., Wanibuchi, H., Matsukuma, S., Nakatsuru, Y., Ishikawa, T. and Fukushima, S.: Possible rare involvement of α -Methylguanine formation as a significant mutational factor in mouse urinary bladder carcinogenesis models. *Teratoge. Carcinoge. Mutage.*, 18, 101-110, 1998.
 14. Ozaki, K., Sukata, T., Yamamoto, S., Uwagawa, S., Seki, T., Kawasaki, H., Yoshitake, A., Wanibuchi, H., Koide, A., Mori, Y. and Fukushima, S.: High susceptibility of p53 (+/-) knockout mice in *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine urinary bladder carcinogenesis and lack of frequent mutation in residual allele. *Cancer Res.*, 58, 3806-3811, 1998.
 15. Otori, K., Konishi, M., Sugiyama, K.,

- Hasebe, T., Shimoda, T., Kikuchi-Yanoshita, R., Mukai, K., Fukushima, S., Miyaki, M. and Esumi, H. : Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue. *Cancer*, 83, 896-900, 1998.
16. Li, W., Wanibuchi, H., Salim, E. I., Yamamoto, S., Yoshida, K., Endo, G. and Fukushima, S. : Promotion of NCI-Black-Reiter male rat bladder carcinogenesis by dimethylarsinic acid an organic arsenic compound. *Cancer Lett.*, 134, 29-36, 1998.
17. Fukushima, S., Wanibuchi, H. and Yamamoto, S. : Urinary bladder cancer. In: *Carcinogenicity*. (eds.) Kitchin, K. T., Marcel Dekker, Inc., pp.627-652, 1999.
18. Chen, T.-X., Wanibuchi, H., Murai, T., Kitano, M., Yamamoto, S. and Fukushima, S. : Promotion by sodium L-ascorbate in rat two-stage urinary bladder carcinogenesis is dependent on the interval of administration. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 16-22, 1999.
19. Ichihara, T., Wanibuchi, H., Lee, C.C.R., Nakajima, K., Yano, Y., Taniyama, T., Otani, S., Shimizu, Y. and Fukushima, S. : Lack of inhibitory effects of the Ju-myb protein on development of glutathione S-transferase placental form-positive foci in the male F344 rat liver. *J. Toxicol. Sci.*, 24, 27-31, 1999.
20. Romanenko, A., Lee, C.C.R. Yamamoto, S., Hori, T., Wanibuchi, H., Zaparin, W., Vinnichenko, W., Vozianov, A. and Fukushima, S. : Urinary bladder lesions after the chernobyl accident: immunohistochemical assessment of p53, proliferating cell nuclear antigen, cyclin D1 and p21WAF1/Cip1. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 144-153, 1999.
21. Yamamoto, S., Min, W., Lee, C.C.R., Salim, E. I., Wanibuchi, H., Sukata, T. and Fukushima, S. : Enhancement of urinary bladder carcinogenesis in nullizygous *p53*-deficient mice by *N*-butyl - *N* - (4 - hydroxybutyl)nitrosamine. *Cancer Lett.*, 135, 137-144, 1999.
22. Morimura, K., Yamamoto, S., Murai, T., Mori, S., Chen, T., Wanibuchi, H. and Fukushima, S. : LOH and mutational analysis of *p53* alleles in mouse urinary bladder carcinomas induced by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Carcinogenesis*, 20, 715-718, 1999.
23. Hagiwara, A., Murai, T., Yoshio, H., Goshima, H., Mori, S., Takashima, A., Shirai, T. and Fukushima, S. : Hepatocarcinogenic activity of *N*-butyl - *N* - (4 - hydroxybutyl) nitrosamine in rats is not modified by sodium L-ascorbate. *Terato. Carcino. Mut.*, 19, 33-42, 1999.
24. Lee, C.C.R. and Fukushima, S. : Alterations in cyclin D1, p53, and the cell cycle related elements: Implications for distinct genetic pathways of urinary bladder carcinogenesis. *Urol. Oncol.*, 4, 58-72, 1999.
25. Morimura, K., Salim, E. I., Yamamoto, S., Wanibuchi, H. and Fukushima, S. : Dose-dependent induction of aberrant crypt foci in the colons but no neoplastic lesions in the livers of heterozygous *p53*-deficient mice treated with low dose 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline. *Cancer Lett.*, 138, 81-85, 1999.
26. Youssef, E.M., Wanibuchi, H., Mori, S., Salim, E. I., Hayashi, S. and Fukushima, S. : Elevation of urinary enzyme levels in rat

bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 20, 1247-1252, 1999.

27. Fukushima, S., Murai, T.: Calculi, precipitates and microcrystalluria associated with irritation and cell proliferation as a mechanism of urinary bladder carcinogenesis in rats and mice. In: *Species Differences in Thyroid, Kidney and Urinary Bladder Carcinogenesis* (IARC scientific publications. No. 147), in press.

28. Yamamoto, S., Romanenko, A., Wei, M., Masuda, C., Zaparin, W., Vinnichenko, W., Vozianov, A., Lee, C.C.R., Morimura, K., Wanibuchi, H., Tada, M. and Fukushima, S.: Specific *p53* gene mutations in urinary bladder epithelium after the Chernobyl accident. *Cancer Res.*, in press.

29. Wei, M., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Li, W. and Fukushima, S.: Urinary bladder carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats. *Carcinogenesis*, in press.

2. 学会発表

1. 榊田周佳, 鱒渕英機, 山本晋史, 今岡進, 船江良彦, 須方督夫, 福島昭治, 「ラット肝中期発癌性試験法(伊東法)を用いた α -benzene hexachloride (α -BHC)の発癌修飾作用の検討」第57回日本癌学会総会(横浜)1998
2. 西川隆之, 鱒渕英機, 森村圭一朗, 魏民, 榊田周佳, 北野光昭, 須方督夫, 福島昭治, 「ラット肝中期発癌試験(伊東法)を用いたdieldrinの発癌修飾作用」第58回日本癌学会総会(広島)1999(発表予定)

表1. stylen monomerおよびbisphenolAのラット肝GST-P陽性細胞巢の発生に及ぼす影響

群	処置		用量 (mg/kg)	有効動物数	GST-P陽性細胞巢	
	DEN	被験物質			数/cm ²	面積(mm ²)/cm ²
1	+	コーン油	0	16	6.02 ± 1.60	0.42 ± 0.17
2	+	styrene M.	250	15	3.32 ± 2.06**	0.37 ± 0.42
3	+	styrene M.	1000	16	1.53 ± 0.89**	0.10 ± 0.08**
4	+	0.5% CMC	0	15	5.48 ± 1.99	0.43 ± 0.17
5	+	bisphenolA	40	15	4.86 ± 2.40	0.39 ± 0.18
6	+	bisphenolA	160	13	5.20 ± 1.65	0.42 ± 0.14
7	-	コーン油	0	8	0	0
8	-	styrene M.	1000	6	0	0
9	-	0.5% CMC	0	8	0	0
10	-	bisphenolA	160	8	0	0

** P< 0.01 (第1群と比較)

平成 10 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告要旨

ビスフェノールAおよびゲニステインのラットにおける 2 世代繁殖毒性試験

分担研究者 川島 邦夫 国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所 生物試験部

研究要旨

ビスフェノールAおよびゲニステインについて、雌雄親動物の受（授）胎能、F1 動物の生殖器の形態、生殖機能、ホルモン動態等を調べ、ヒトの健康に対する影響を予測するため、ラットを用いた 2 世代繁殖試験を実施している。現在、ビスフェノールAについては F0 親動物の剖検、F1 児動物の機能検査、学習試験が終了し、F1 動物への投与を継続中である。ゲニステインについては、交配前の投与を継続中である。現在までに得た F0 世代の成績、F1 世代の投与開始後 5 週までの成績からは、ビスフェノールAおよびゲニステインの影響と考えられる明確な変化は認められていない。

A. 研究目的

内分泌攪乱作用が報告されているビスフェノール A およびゲニステインについて 2 世代試験を行い、雌雄親動物の受（授）胎能、F1 動物の生殖器の形態、生殖機能、ホルモン動態等を調べる。

B. 研究方法

Crj:CD(SD)IGS の SPF ラットを用い、投与経路は強制経口投与とし、ビスフェノールAの投与量は Frederick vom Saal および米国 MPI research の成績を参考にして 0, 0.2, 2, 20, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ とした。ゲニステインの投与量は 17.96 mg（日本人 1 人の 1 日当たり摂取量）のイソフラボン中にはゲニステインが 287.36 μg 含まれることから、低用量を 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とし、

倍量の 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を高用量とした。

投与期間は F0 雄動物では交配前 10 週間および交尾成立までの交配期間、さらに剖検日の前日までとした。F0 雌動物では交配前 2 週間および交尾成立までの交配期間、さらに剖検日の前日までとした。F1 雌雄動物では離乳時（生後 22 日）から生後約 21 週齢までとした。

検査項目は F0 および F1 世代について一般状態、体重、摂餌量、繁殖能力（性成熟、性周期、交尾率、受胎率、出産率、出生率など）、精子検査（数、運動性、形態）、ホルモン濃度（テストステロン、エストラジオール、プロラクチン、LH、FSH、T3、T4、TSH）および生殖器・性腺の病理組織学的検査を実施する。F1 世代について行動観察（オープンフィールド）・学習試験（T 型水迷路）を実施する。

C. 研究結果

1. ビスフェノール A

(1) F0 世代

i. 一般状態

雌親動物の哺育期間中に 0.2 μg 用量群で皮下の結節形成が 1 例観察された以外、雌雄親動物

[略語]

F0, 親世代; F1, 第一世代（雑種第一代）; F2, 第二世代（雑種第二代）; SPF, 特定の病原体感染を防止した動物; LH, 黄体形成ホルモン; FSH, 卵巣刺激ホルモン; T3, トリヨードチロニン; T4, チロキシン; TSH, 甲状腺刺激ホルモン

に薬物投与の影響は認められなかった。

ii. 体重変化

雄では20および200 μg 用量群で投与開始後7週から有意ではないが体重低下が認められた。雌では交配前投与期間、妊娠期間および哺育期間を通じ、対照群とほぼ同様の体重増加を示し、薬物投与の影響は認められなかった。

iii. 摂餌量

各用量群の雌雄とも対照群とほぼ同様の摂餌量を示し、薬物投与の影響は認められなかった。

iv. 繁殖データ

各用量群の交尾率、受胎率、出産率、平均着床数、分娩率、妊娠期間、平均分娩児数、性比、分娩時および4日齢時生存率、離乳時生存率の各繁殖指標とも対照群とほぼ同様の値を示し、薬物投与の影響は認められなかった。

v. 精子検査成績

運動精子率が20および200 μg 用量群でやや低値を示したが、精子数、遊泳速度、良好精子の割合、遊泳パターンに薬物投与の影響は認められなかった。精子形態異常として頭部、中片部、尾部の異常が対照群を含む各群に認められ、頭部と尾部が分離した精子の発現率が高かったが、対照群との間に大きな差はみられなかった。

vi. 肉眼的病理所見

雄では前胃の結節が対照群に1例、腎盂の拡張、精巢の脆弱化と膨化が2 μg 用量群にそれぞれ1例、精囊の萎縮が0.2 μg 用量群に1例観察された以外、薬物投与の影響は認められなかった。

雌では前胃あるいは腺胃の結節が2 μg 用量群にそれぞれ1例、肝臓の結節が200 μg 用量群を除く各群にそれぞれ1例、肝内側左葉の小

型化が20 μg 用量群に1例、腎盂の拡張が2 μg 用量群にそれぞれ1例、脾臓の腫大が0.2 μg 用量群に1例、脾臓と消化管の癒着が200 μg に1例、筋の嚢胞および結節が2 μg 用量群に1例、皮下結節が0.2 μg 用量群に1例観察された。

vii. 器官重量

雄で200 μg 用量群の心臓実重量が有意に低下した以外、内分泌器官を含む器官重量に薬物投与の影響は観察されなかった。

viii. 血清ホルモン濃度

雄ではエストラジオール濃度は対照群を含め5pg以下であった。プロラクチン濃度は何れの用量群とも対照群に比較して低く、2 μg 用量群が最も低かった。テストステロン濃度は0.2 μg 用量群で対照群より低く、2 μg 以上の用量群では高かった。FSHでは20 μg 以上の用量群で、LHでは200 μg 用量群でそれぞれ対照群に比較して高値を示した。T3およびT4濃度は20 μg 以上の用量群で対照群より低く、TSH濃度は何れの用量群とも対照群とほぼ同程度であった。これらホルモン濃度の変化に有意差は認められなかった。

雌ではエストラジオール濃度は20 μg 用量群で対照群と同程度であったが、0.2および2 μg 用量群では対照群に比較して高値であり、200 μg 用量群では低値であった。プロラクチン濃度は0.2および20 μg 用量群で対照群に比較して低く、2および200 μg 用量群で高かった。テストステロン濃度は対照群を含め、0.2ng以下であった。FSH濃度は0.2 μg 用量群で対照群より低かったが、2および200 μg 用量群では高かった。LH濃度は何れの用量群とも対照群より低かった。T3濃度は0.2および200 μg 用量群で、T4濃度は20 μg 用量群を除き対照群

より低かった。TSH 濃度は何れの用量群とも対照群とほぼ同程度であった。これらホルモン濃度の変化のうち 200 μ g 用量群の T3 および T4 濃度に有意差が認められた。

(2) F1 世代

i. 一般状態

雄では死亡が分娩時の 0.2 μ g 用量群で 1 例、生後 4 日までの間に 200 μ g 用量群で 3 例、離乳までの間に 20 μ g 用量群で 1 例観察された。尾部先端の外傷と尾部先端の欠損が離乳までの間に対照群で、尾部先端の膨化が離乳までの間に 2 μ g 用量群で、頸部の外傷が離乳までの間に 20 μ g 用量群で、尾部先端の内出血が分娩時の 200 μ g 用量群でそれぞれ 1 例観察された。

雌では死亡が分娩時の 20 および 200 μ g 用量群にそれぞれ 1 例、生後 4 日までの間に 0.2 μ g 用量群を除く各群に 1~3 例観察された。腹部の外傷が分娩時と生後 4 日までの間に 2 μ g 用量群でそれぞれ 1 例観察された。尾部先端と前趾の内出血が分娩時の 200 μ g 用量群で、口唇の膨化が生後 4 日までの間に対照群で、眼球突出が離乳までの間に 20 μ g 用量群でそれぞれ 1 例観察された。

ii. 体重変化

雄で 20 μ g 用量群の生後 14 日齢時と 21 日齢時に有意な低下が認められた以外、薬物投与の影響は認められなかった。

iii. 摂餌量

雄で投与開始後 3 週および 4 週の 20 及び 200 μ g 用量群で有意な低下が認められた以外、薬物投与の影響は観察されなかった。

iv. 性成熟

何れの用量群の包皮腺分離および陰開口の平

均完成日とも、対照群との間に差は認められなかった。

v. 行動観察 (オープンフィールド試験)

各用量群の雌雄とも各試行における立ち上がり回数、区画移動回数、脱糞回数、排尿回数、毛繕い回数に薬物投与の影響は観察されなかった。

vi. 学習試験 (水迷路試験)

各用量群の雌雄とも各試行におけるゴール到達時間、誤り回数に薬物投与の影響は認められなかった。

vii. 肛門生殖器間隔

雄では生後 14 日齢時の 0.2 μ g 用量群で、29 日齢時の 200 μ g 用量群で有意な短縮が認められた。雌では生後 4 日齢時の 200 μ g 用量群で有意な短縮が、7 日齢時の 2 および 20 μ g 用量群で有意な延長が認められた。

viii. 反射反応性

何れの用量群の雌雄においても、正向反射、背地走性反射、空中立直り反射の完成日とも、対照群との間に差は認められなかった。

ix. 発育分化

何れの用量群の雌雄においても、耳介開展、切歯萌出、眼瞼開裂、精巣下降の完成日とも対照群との間に差は認められなかった。

x. 器官重量

雄では 20 μ g 用量群で腎臓実重量の有意な低下、20 および 200 μ g 用量群で肺実重量有意な低下が認められた以外、薬物投与の影響は認められなかった。

雌では 0.2 μ g 用量群で脾臓の相対重量の有

意な増加が認められた以外、薬物投与の影響は認められなかった。

2. ゲニステイン

(1) F0 世代

i. 一般状態

雄親動物に背部の外傷および痂皮形成がそれぞれ1例観察された以外、雌雄親動物に薬物投与の影響は認められなかった。

ii. 体重変化

雌雄とも対照群とほぼ同様の体重増加を示し、薬物投与の影響は認められなかった。

iii. 摂餌量

雌雄とも対照群とほぼ同様の摂餌量を示し、薬物投与の影響は認められなかった。

D. 考察

1. ビスフェノールA

ビスフェノールAの投与によりF0世代では0.2 μ g用量群で精囊の萎縮が1例観察された。雄のテストステロン濃度は0.2 μ g用量群で有意ではないが低下が認められた。精囊の分化、発育、機能はテストステロンに依存しており、精巣からのテストステロン分泌の状態に影響される。テストステロンの合成、代謝あるいは利用が障害された場合、重量減少が惹起される。0.2 μ g用量群ではテストステロン濃度の低値傾向が認められており、精囊重量低下との関連が示唆される。しかし、前立腺、精巣重量には変化はなく、精子形成能にも影響がないことから、ビスフェノールA投与の影響とは言い難い。この点に関しては、F1およびF2世代の成績を勘案して判断すべきと考える。

雄のエストラジオール濃度および雌のテストステロン濃度は、対照群を含めそれぞれ5 pg以下、0.2 ng以下であったが、ホルモン濃度は測

定キットの種類、ロットによって変動することがあることから、更に検討する必要があると考える。

雌のT3およびT4濃度は200 μ g用量群で有意に低下した。肛門生殖器間距離は一定した傾向は無いが、雄で短縮が、雌では延長が見られた。肛門生殖器間隔は、性分化異常の簡便な指標であるが、生存動物を用いた計測では、変動が大きくなる欠点があることを考慮した評価が必要と考える。現時点までの成績からは、ビスフェノールAによると考えられる明確な影響は得られていない。

2. ゲニステイン

ゲニステインは飼料中にも存在する。今回は飼料から除去せず、ヒトの摂取量の下限と上限に相当すると考えられる200 μ g/kgと400 μ g/kgを飼料中のゲニステインに上積みした場合の影響として評価した。現在までに得たF0世代の成績では一般状態、体重変化、摂餌量にゲニステイン投与による影響は認められていない。今後実施される繁殖試験、精子検査、血清ホルモン濃度測定の結果を勘案して、F0世代に対するゲニステインの影響を評価すべきと考える。

E. 今後の展望

ビスフェノールAについてはF0親動物の剖検、F1児動物の反射反応性、学習試験、発育分化に関する成績を、ゲニステインについては、入手が遅れたため、交配前の投与期間中の成績のみを報告した。

今後ビスフェノールAのF1世代における育成成績、繁殖成績、哺育成績、F2世代における発育分化、反射反応性検査成績などを得ることにより、今回認められた変化がビスフェノールA投与による変化であるか否かの判断が可能になるものとする。ゲニステインについてはF0、F1、F2世代における全ての成績を得ることによ

り、ゲニステイン投与による影響が発現するか否かを判断出来るものとする。

平成10年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告要旨

Bisphenol A のラット及びサルにおける体内動態試験

分担研究者 大野泰雄 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，薬理部長
研究協力者 紅林秀雄 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，薬理部

研究要旨

被検薬物 Bisphenol A (BPA) の標識化合物 [ring-¹⁴C(U)] を合成し、放射性純度 (99%) 及び放射能濃度 (11.5 MBq/mg) の高い化合物が得られた。この標識化合物を含む被検薬物を雌雄の F344 ラットに経口投与 (20, 100, 500 μg/kg)、或いは静脈内投与 (100, 500 μg/kg) し、経時的に採血して血漿中放射能濃度の変化を測定した。その結果、血中濃度は投与量に応じてほぼ線形に増加した。また、BPA の吸収率は 100 μg/kg ではほぼ 50% であった。また、雄の方が雌より血中濃度が高かった。なお、経口投与では腸肝循環が著明に認められ、消失半減期は 100 μg/kg 投与 2～3 日後で約 15-18 時間であった。BPA は乳汁中に排泄され、排泄濃度は投与後 8 時間で最高になり、この時の乳汁排泄濃度は血漿中濃度の約 1/4 であった。

雄サルに BPA を 100 μg/kg 静脈内投与と経口投与したときの C_{max} および AUC に差は少なく、生物学的利用能 bioavailability はほぼ 100% であった。また、明瞭な腸肝循環は認められなかった。消失半減期 (投与後 8-48 時間) は約 15 時間であった。

A. 研究目的

プラスチックから溶出することの示されている BPA は主に *in vitro* の試験系での作用から内分泌攪乱物質としての作用を持つとされており、今までのところ、ヒトを含む動物において、*in vivo* でそのような作用は示されていないが、ヒト内分泌系への作用や神経系への作用が懸念されている。そこで本研究では、BPA が *in vivo* の動物やヒトにおいてもそのような作用を示す可能性について考察するため、BPA の生体内動

態について総合的に検討する。特に、成熟ラット、妊娠ラット及び新生児ラットにおいて定量的オートラジオグラフィを行い内分泌器官及び中枢神経系への微細な分布についての情報を得る。また、ヒトへの外挿に資するためにサルにおける吸収及び血中動態について検討する。

B. 研究方法

B-1 ラットにおける BPA の体内動態の検討

B-1-1. 被験物質

¹⁴C で標識した [ring-¹⁴C(U)]-Bisphenol A (以下 ¹⁴C-BPA) を被験物質として用いる。¹⁴C-BPA は第一化学薬品(株)東海研究所より購入した (純度が 97% 以上, Lot No. : CP-2244, 比放射能: 11.5 MBq/mg, 2.62 GBq/mmol, 性状: エタノール溶液 (濃度: 39.0 MBq/mL), 保存条件: 窒

[略語]

BPA, Bisphenol A; ¹⁴C-BPA, [ring-¹⁴C(U)]-Bisphenol A; AUC, 血漿中濃度・時間曲線下面積; EPA (Environment Protection Agency), 米国環境保護庁; C_{max}, 最高血漿中濃度

素ガス置換, -80°C) . なお, 標準物質として非標識の BPA はナカライテスクで購入したものをを用いた. 投与溶液は所定量の標識被験物質のエタノール溶液を試験管に採取し, 窒素ガスでエタノールを留去した後, 1/15M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加え, 溶解させた.

B-1-2. 試験系および飼育方法

試験動物は雌雄の F344 ラット (10 週令, 雄 200~270 g, 雌 130~190 g), 妊娠 12, 15, 18 日雌性および分娩後 10 日前後の哺育中雌性を日本チャールズ・リバーより購入した. 妊娠および哺育中雌性ラットは 9~10 週齢で交配した妊娠日が既知の未経産の動物を購入した. プラグ確認日を妊娠 0 日とした.

動物は設定温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$ で飼育し, 換気は最低 15 回/h r, 照明は明暗サイクル 12 時間 (6:00~18:00) でオールフレッシュ方式の外気をフィルターを通して常時補給した環境で, 260W×380D×225H(mm)あるいは260W×380D×210H(mm)の飼育ケージで最大 4 匹で飼育した. なお, <排泄試験>ではステンレス製代謝ケージで個別飼育した. また, 哺育中ラットはポリカーボネート製ケージで個別飼育した.

飼料は抗生物質, 化学療法剤または予防薬を含まない市販のげっ歯類用飼料 (MF, オリエンタル酵母工業) を使用し, 自由摂取とする. 水は水道水を動物実験棟では自動給水で, 標識被験物質取扱施設では飲み口付きのポリ容器またはガラス容器で与えた.

B-1-3. 投与量および投与放射エネルギー

米国環境保護庁 (EPA) 勧告による BPA の最大許容摂取量 (0.05 mg/kg/day) および予備検討の結果を考慮して投与用量は経口投与では 20, 100, および $500 \mu\text{g/kg}$ (投与液量は 1 mL/kg , 投与

放射エネルギーはそれぞれ 0.23, 1.15, および 5.75 MBq/kg), 静脈内投与では 100 および $500 \mu\text{g/kg}$ (投与液量は 1 mL/kg , 投与放射エネルギーは 1.15, および 5.75 MBq/kg) と設定した. なお経口投与では胃内に強制投与, 静脈内投与では尾静脈に投与した.

B-1-4. データ処理

試験成績の表示の基準は以下のとおり.

- 1) 試験成績は動物例数の平均値と標準偏差 (SD) で表示する.
- 2) 放射能の検出限界はバックグラウンド値の 2 倍とする.
- 3) 動物例数の半数を越えて検出限界値未満の場合には ND (Not detected) と表示し, 半数以下が検出限界値未満の場合には検出限界未満の数値も含めて計算し, 例数の平均値および標準偏差 (SD) で表示する.
- 4) 放射能濃度は BPA に換算して表示する.

B-1-5. 薬物速度論的パラメーターの算出法

- 1) 血漿中放射能濃度・時間曲線下面積 (AUC) は台形法により指定時間範囲での実測値を用いる.
- 2) 最終の測定時点以降については片対数曲線の消失相を直線回帰して外挿することにより AUC を求める.
- 3) 静脈内投与後の AUC の算出に際し, 時間 $t=0$ における濃度 (C_0) は, 初期の片対数曲線を直線回帰し $t=0$ を代入して求める.
- 4) 消失半減期 ($t_{1/2}$) は指定時間範囲での実測値を用いて最小二乗法により求めた見かけの値として表示する.
- 5) いずれも個別値を用いて算出し, 動物例数の平均値と標準偏差 (SD) で表示する.

実験 1 血漿中放射能濃度の測定

^{14}C -BPA を経口或いは静脈内投与した動物より経時的に採血し, 血漿中放射能濃度の推移を求