

Phytoestrogens on Breast Cancer Cells,
第3回日本内分泌攪乱化学物質学会, 横
浜. 2000; 要旨集;320.

6. Arao Y, Kikuchi A, Kayama F
EXPRESSION OF AUF1, A
REGULATOR OF MESSENGER RNA
DEGRADATION, IS CONTROLLED
BY ESTROGEN IN RAT UTERUS.

International Workshop: Hormones
and Endocrine Disrupters in Food and
Water: Possible Impact on Human
Health (デンマーク: コペンハーゲン)

平成12年 5月26日~30日

7. 荒尾行知, 菊池淳美, 香山不二雄
ラット子宮組織におけるエストロゲンに
よる AUF1 遺伝子発現調節

第2回 RNA ミーティング (東京都)

平成12年 7月30日~8月2日

8. 荒尾行知, 菊池淳美, 池田和博, 香
山不二雄

動物子宮組織発達に及ぼす植物エストロ
ゲンの作用発現機序の検討

日本農芸化学会関東支部 2000 年度大会

平成12年 10月21日

9. 岸田光世, 荒尾行知, 菊池淳美, 米
倉政実, 香山不二雄

子宮組織においてエストロゲンによって
発現が調節される RNA 結合タンパクの
解析

日本農芸化学会関東支部 2000 年度大会

平成12年 10月21日

10. Satoshi Nomoto, Fujio Kayama,
Estrogen Causes Cell-Cycle Arrest and

Apoptosis in Breast Cancer Cells
MDA-MB-231

第3回環境ホルモン学会研究発表会 (横
浜市)

平成12年 12月15日~12月16日

11. 香山不二雄, 谷原真一, 濱松晶彦,
勾坂馨, 森千里, 森田昌敏

ヒト脂肪組織中ダイオキシン類と精子形
成への影響

第3回環境ホルモン学会研究発表会 (横
浜市)

平成12年 12月15日~12月16日

12. Kayama F, Hamamatsu A.,
Sakisaka K, Brown D, Clark G, Suzuki
T

APPLICATION OF CALUX
BIOASSAY FOR DIOXINS IN
EPIDEMIOLOGICAL STUDIES

第3回環境ホルモン学会研究発表会 (横
浜市)

平成12年 12月15日~12月16日

13. Arao Y, Kayama F, Kikuchi A,
Estrogen regulates the gene expression
of AUF1 in rat uterus.

第3回環境ホルモン学会研究発表会 (横
浜市)

平成12年 12月15日~12月16日

14. Ikeda K, Arao Y, Kayama F
Ferutinie is an agonist for ER α
antagonist for ER β .

Society of Toxicology (アメリカ合衆
国: サンフランシスコ)

平成13年 3月25日~3月29日

厚生科学研究費補助金（生活安全総合事業）

分担研究報告書

内分泌攪乱物質の免疫機能に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 山崎 聖美 国立公衆衛生院 栄養生化学部 主任研究官

研究要旨

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物のみならず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながることが指摘されている。しかし、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させていると考えられる。そこで、内分泌攪乱物質が免疫機能を低下させるか否か調べる目的で、内分泌攪乱物質を妊娠マウスに投与し、生まれた仔マウスの胸腺細胞の ConA に対する反応性について調べた。その結果、個体間でばらつきがみられたものの、数種の内分泌攪乱物質が胸腺細胞の反応性を低下させる傾向があることがわかった。

A. 研究目的

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物に影響を及ぼすのみならず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながることが指摘されているが、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内

分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させていると考えられる。そこで、内分泌攪乱物質が免疫機能を低下させるか否か調べ、内分泌攪乱物質が免疫機能に及ぼす影響に関してそのメカニズムを解明することを本研究の目的とする。本年度は、内分泌攪乱物質を妊娠マウスに投与し、生まれた仔マウスの胸腺細胞の ConA に対する反応性について調べた。

B. 研究方法

ddY オスマウス（8週齢）と ddY メスマウス（8週齢）を一晩同じケージに入れて交配させ、翌朝別々にし、妊娠0.5日とした。妊娠3.5日目よりフタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジブチル、フタル酸ジエチルを25 mg / kg / dayになるように、また、ノニルフェノールは2.5 mg / kg / dayになるように強制経口投与を行った。コントロールマウスにはコーンオイルを強制経口投与した。また、フタル酸ジシクロヘキシル、オクチルフェノールは、粉末飼料中に0.5, 0.05, 0.005%になるように、ビスフェノールAは、粉末飼料中に0.05, 0.005%になるように混ぜて与えた。この際のコントロールマウスは粉末飼料のみを与えた。各群ともに、仔マウスを出産後、離乳にあたる20.5日目まで親マウスに内分泌攪乱物質の投与を続け、その後は飼料のみを与えた。出生後、4週目、8週目コントロール群、各投与群からマウスを選び、オス・メスともに胸腺を取り出し、メッシュして、 1×10^7 個/ml に調製し、ConA を $5 \mu\text{g/ml}$ になるように添加し、2日間、37度、5%二酸化炭素中で培養し、トリチウム標識チミジンを加えてさらに一晩培養し、ハーベストし、細胞核内とりこまれたトリチウム標識チミジンを液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、細胞内におけるDNA合成能を比較した。

C. 研究結果

結果は Stimulation Index(SI)すなわち、ConA を添加しなかった場合に比べて何倍活性化されたかを指標にして示す。1個体につき、ConA を添加しなかった胸腺細胞及び ConA を添加した胸腺細胞各々3サンプルずつ測定した。

出生後4週目のコーンオイル投与コントロール群のSIは、オス13.1 (n=4)、メス12.0 (n=4)、フタル酸ブチルベンジル投与群のSIは、メス4.1 (n=3)、フタル酸ジブチル投与群のSIは、メス6.5 (n=3)、フタル酸ジエチル投与群のSIは、オス11.0 (n=3)、メス13.2 (n=3)、ノニルフェノール投与群のSIは、メス4.4 (n=3)、粉末飼料投与コントロール群のSIは、オス13.8 (n=4)、メス19.1 (n=4)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.5%)のSIは、オス10.3 (n=3)、メス8.5 (n=3)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.05%)のSIは、オス18.6 (n=3)、メス6.5 (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.05%)のSIは、オス9.9 (n=3)、メス7.1 (n=3)、ビスフェノールA投与群(0.005%)のSIは、オス5.1 (n=3)、メス6.5 (n=3)であった。

出生後8週目のコーンオイル投与コントロール群のSIは、オス13.8 (n=4)、メス15.7 (n=4)、フタル酸ブチルベンジル投与群のSIは、オス11.7 (n=3)、メス8.8 (n=3)、フタル酸ジブチル投

与群の SI は、オス 6.8 (n=3)、メス 12.0 (n=3)、フタル酸ジエチル投与群の SI は、オス 15.1 (n=3)、メス 13.2 (n=3)、ノニルフェノール投与群の SI は、オス 8.7 (n=3)、メス 7.1 (n=3)、粉末飼料投与コントロール群の SI は、オス 15.5 (n=4)、メス 16.2 (n=4)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.5%)の SI は、オス 8.6 (n=3)、メス 6.5 (n=3)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.05%)の SI は、オス 7.8 (n=3)、メス 5.5 (n=3)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.005%)の SI は、オス 6.2 (n=3)、メス 14.8 (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.5%)の SI は、オス 9.4 (n=3)、メス 3.7 (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.05%)の SI は、オス 10.7 (n=3)、メス 18.5 (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.005%)の SI は、オス 11.0 (n=3)、メス 17.1 (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.05%)の SI は、オス 9.4 (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.005%)の SI は、オス 13.7 (n=3)、メス 13.5 (n=3)であった。

D. 考察

本研究においては、個体を免疫機能以外の側面からも内分泌攪乱物質を評価する目的で ddY マウスを用いて検討を行った。免疫機能のみを検討する場合は、ddY マウスが最適とはいえないが、それでも、本研究に用いた内分泌攪乱物質のうち、フタル酸ジエチル以

外の物質が多少なりとも胸腺細胞の反応性の低下の傾向を示したことは、ヒトへ影響を及ぼしている可能性があるものと思われる。本研究の結果、同じマウスから生まれた子供でも、個体によりばらつきが大きかったが、免疫機能の研究に適した他系統のマウスを用いることにより、よりばらつきの少ない結果が得られると思われる。しかし、ddY マウスへのある種の内分泌攪乱物質投与により生まれた子供のなかに、免疫機能の低下を示す個体が出現したという結果が得られたことから、次世代への影響という点も含め、さらなる詳細な検討が必要であると考えられる。

E. 結論

妊娠マウスへのフタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、ノニルフェノール、オクチルフェノール、ビスフェノール A 投与により、生まれた子供のうち、胸腺細胞のマイトージェンに対する反応性が低下した個体が現れた。また、投与量が減少すると反応性の低下する個体数が減少することが明らかになった。また、フタル酸ジエチルにはこの作用は見られなかった。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. Yamazaki. T. , Okada. Y. , Hisamatsu. Y. , Kubota. S. , and

Kayama. F. ,Effects of endocrine disrupting chemicals on lymphocyte responses, DIOXIN 2000, California, 2000.

2. 山口晃子、中澤裕之、山崎聖美. 容器・包装関連物質のエストロジェン作用かく乱の生化学的分析. 日本食品衛生学会第八十回学術講演会, 郡山. 2000;要旨集 47.

3. 山口晃子、中澤裕之、山崎聖美. 食品衛生関連化学物質の E-SCREEN Assay による評価. 日本食品化学学会第 6 回総会・学術大会, 東京. 2000;要旨集 31.

4. 山口晃子、山崎聖美、坂部貢、中澤裕之. 生活関連化学物質の E-Screen Assay による評価. 日本薬学会第 120 年会, 岐阜. 2000;要旨集 4;187.

5. Kobayashi. N. , Yamaguchi.A. , Yamazaki. T. , and Nakazawa.H. , Effect of Xenoestrogens and Phytoestrogens on Breast Cancer Cells, 第 3 回日本内分泌攪乱化学物質学会, 横浜. 2000; 要旨集;320 .

厚生科学研究費補助金（生活安全総合事業）

分担研究報告書

内分泌攪乱物質の免疫機能に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 香山 不二雄 自治医科大学 保健科学講座 教授

研究要旨

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物のみならず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながる事が指摘されている。しかし、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させていると考えられる。そこで、内分泌攪乱物質が免疫機能を低下させるか否か調べる目的で、Tリンパ球細胞株である Jurkat 細胞に内分泌攪乱物質を投与した時の細胞内カルシウムイオン濃度変化を測定した。その結果、ビスフェノール A、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジブチル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジシクロヘキシル、ノニルフェノール、エストラジオールは、細胞内カルシウムイオン濃度を変化させたが、フタル酸ジエチルでは全く変化がみられなかった。

A. 研究目的

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物に影響を及ぼすのみならず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながる事が指摘されているが、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させていると考えられる。そこで、内分泌攪乱物質が免疫機能を低下させるか否か調べ、内分泌攪乱物質が免疫機能に及ぼす影響に関してそのメカニズムを解明することを本研究の目的とする。本年度は、Tリンパ球細胞株であるJurkat細胞に内分泌攪乱物質を投与した時の細胞内カルシウムイオン濃度変化を測定した。

B. 研究方法

Jurkat細胞を 1×10^7 個/mlに調製し、Fura-2 AM($1 \mu\text{M}$)と30分間インキュベーションして細胞内に取り込ませ、PBSで洗浄後、ビスフェノール A、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジブチル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチルヘキシル、ノニルフェノール、エストラジオールを投与して、細胞内カルシウム

イオン濃度の変化を、蛍光光度計（日本分光）を用いて測定を行い2波長測定ソフトを用いて解析を行った。

C. 研究結果

ビスフェノール A、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジブチル、フタル酸ジエチルでは、 10^{-5}M では細胞内カルシウムイオン濃度に変化はみられなかったが、 10^{-4}M では変化がみられた。フタル酸ジシクロヘキシル、ノニルフェノールでは 10^{-5}M で変化がみられた。また、エストラジオールは 10^{-3}M で変化がみられたが、フタル酸ジエチルでは 10^{-3}M でも全く変化がみられなかった。

D. 考察

昨年度までの研究結果で、*in vitro*においてJurkat細胞の反応性を低下させたビスフェノール A、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチルヘキシル、ノニルフェノール、エストラジオールについては、これら化学物質の投与によりJurkat細胞内のカルシウムイオン濃度に変化が見られたのに対し、Jurkat細胞の反応性に影響を及ぼさなかったフタル酸ジエチルは、カルシウムイオン濃度を変化させなかったことから、Jurkat細胞の反応性の低下には細胞内カルシウムイオン濃度の変化が伴っているものと推測

される。また、この細胞内カルシウムイオン濃度の変化がエストラジオールレセプターを介したものであるか否か等、さらなる研究が必要であると考え

E. 結論

ビスフェノール A、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジブチル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジシクロヘキシル、ノニルフェノール、エストラジオールは、細胞内カルシウムイオン濃度を変化させたが、フタル酸ジエチルでは全く変化がみられなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Horiguchi H, Kayama F, Oguma E, William G. Willmore, Pavel Hradecky, and H. Franklin Bunn:

Cadmium and platinum suppression of erythropoietin production in cell culture: clinical implications. Blood 96(12): 3743-3747, 96(12), 2000:

2. To H, Kikuchi A, Tsuruoka S, Sugimoto K, Fujimura A, Higuchi S, Kayama F, Hara K, Matsuno K, and Kobayashi E:

Time-dependnt Nephrotoxicity Associated with Daily Administration of Cisplatin in Mice. J.Pharm. Pharmacol. 52: 1499-1504, 2000:

3. 香山不二雄：産業医活動に必要な環境ホルモンの知識について。第 27 回和歌山県産業保健講習会誌 別紙：1-3,2000

香山不二雄：環境ホルモン問題と健康問題。小児科 41：68-75,2000

4. 香山不二雄：内分泌攪乱物質による健康問題—DES 子宮内曝露の教訓から—。産婦人科の実際 49 (8)：1039-1044,2000

2. 学会発表

1. Arao Y, Kikuchi A, Kayama F
EXPRESSION OF AUF1, A
REGURATOR OF MESSENGER RNA
DEGRADATION, IS CONTROLLED
BY ESTROGEN IN RAT UTERUS.

International Workshop: Hormones
and Endocrine Disrupters in Food and
Water:

Possible Impact on Human Health (デ
ンマーク：コペンハーゲン)

平成 12 年 5 月 26 日～30 日

2. 荒尾行知, 菊池淳美, 香山不二雄
ラット子宮組織におけるエストロゲンに
よる AUF1 遺伝子発現調節

第 2 回 RNA ミーティング (東京都)

平成 12 年 7 月 30 日～8 月 2 日

3. 荒尾行知, 菊池淳美, 池田和博, 香山
不二雄

動物子宮組織発達に及ぼす植物エストロ
ゲンの作用発現機序の検討

日本農芸化学会関東支部 2000 年度大会

平成 12 年 10 月 21 日

4. 岸田光世, 荒尾行知, 菊池淳美, 米倉政実, 香山不二雄

子宮組織においてエストロゲンによって発現が調節される RNA 結合タンパクの解析

日本農芸化学会関東支部 2000 年度大会

平成 12 年 10 月 21 日

5. Satoshi Nomoto, Fujio Kayama, Estrogen Causes Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Breast Cancer Cells MDA-MB-231

第 3 回環境ホルモン学会研究発表会 (横浜市)

平成 12 年 12 月 15 日~12 月 16 日

6. 香山不二雄, 谷原真一, 濱松晶彦, 勾坂馨, 森千里, 森田昌敏

ヒト脂肪組織中ダイオキシン類と精子形成への影響

第 3 回環境ホルモン学会研究発表会 (横浜市)

平成 12 年 12 月 15 日~12 月 16 日

7. Kayama F, Hamamatsu A., Sakisaka K, Brown D, Clark G, Suzuki T

APPLICATION OF CALUX BIOASSAY FOR DIOXINS IN EPIDEMIOLOGICAL STUDIES

第 3 回環境ホルモン学会研究発表会 (横浜市)

平成 12 年 12 月 15 日~12 月 16 日

8. Arao Y, Kayama F, Kikuchi A, Estrogen regulates the gene expression

of AUF1 in rat uterus.

第 3 回環境ホルモン学会研究発表会 (横浜市)

平成 12 年 12 月 15 日~12 月 16 日

9. Ikeda K, Arao Y, Kayama F Ferutinin is an agonist for ER α antagonist for ER β .

Society of Toxicology (アメリカ合衆国: サンフランシスコ)

平成 13 年 3 月 25 日~3 月 29 日

厚生科学研究費補助金（生活安全総合事業）

分担研究報告書

内分泌攪乱物質の免疫機能に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 久松 由東 国立公衆衛生院 地域環境衛生学部 室長

研究要旨

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物のみならず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながるものが指摘されている。しかし、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させていると考えられる。そこで、内分泌攪乱物質が免疫機能を低下させるか否か調べる目的で、内分泌攪乱物質を妊娠マウスに投与し、生まれた仔マウスの胸腺細胞、脾臓細胞のリンパ球サブセットを FACS を用いて解析した。

A. 研究目的

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物に影響を及ぼすのみならず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながるものが指摘されているが、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内分泌系は免疫系と密接に関係しており、

内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させていると考えられる。そこで、内分泌攪乱物質が免疫機能を低下させるか否か調べ、内分泌攪乱物質が免疫機能に及ぼす影響に関してそのメカニズムを解明することを本研究の目的とする。本年度は、内分泌攪乱物質を妊娠マウスに投与し、生まれた仔マウスの胸腺細胞、脾臓細胞のリンパ球サブセットを FACS を用いて解析した。

B. 研究方法

ddY オスマウス（8週齢）と ddY メスマウス（8週齢）を一晩同じケージに入れて交配させ、翌朝別々にし、妊娠0.5日とした。妊娠3.5日目よりフタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジブチル、フタル酸ジエチルを 25 mg / kg / day になるように、また、ノニルフェノールは 2.5 mg / kg / day になるように強制経口投与を行った。コントロールマウスにはコーンオイルを強制経口投与した。また、フタル酸ジシクロヘキシル、オクチルフェノールは、粉末飼料中に 0.5, 0.05, 0.005% になるように、ビスフェノール A は、粉末飼料中に 0.05, 0.005% になるように混ぜて与えた。この際のコントロールマウスは粉末飼料のみを与えた。各群ともに、仔マウスを出産後、離乳にあたる 20.5 日目まで親マウスに内分泌攪乱物質の投与を続け、その後は飼料のみを与えた。出生後、4週目、8週目にコントロール群、各投与群からマウスを選び、オス・メスともに脾臓と胸腺を取り出し、メッシュして、脾臓細胞については溶血後、FITC 標識抗マウス CD3 抗体、PE 標識抗マウス CD19 抗体、FITC 標識抗マウス CD4 抗体、PE 標識抗マウス CD8 抗体で染色、胸腺細胞については FITC 標識抗マウス CD4 抗体、PE 標識抗マウス CD8 抗体で染色し、PBS にて洗浄後、

FACS にて解析した。

C. 研究結果

1. 脾臓細胞の解析

出生後4週目のコーンオイル投与コントロール群の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 33.9%、CD19 陽性 66.1% (n=4)、メス CD3 陽性 33.3%、CD19 陽性 66.7%(n=4)、フタル酸ブチルベンジル投与群の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 42.2%、CD19 陽性 57.8% (n=3)、メス CD3 陽性 27.4%、CD19 陽性 72.6% (n=3)、フタル酸ジブチル投与群の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 42.2%、CD19 陽性 57.8% (n=3)、メス CD3 陽性 44.1%、CD19 陽性 55.9% (n=3)、ノニルフェノール投与群の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 50.9%、CD19 陽性 49.1% (n=3)、メス CD3 陽性 42.2%、CD19 陽性 57.8% (n=3)、粉末飼料投与コントロール群の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 30.8%、CD19 陽性 69.2% (n=4)、メス CD3 陽性 23.9%、CD19 陽性 76.1% (n=4)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.5%)の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 33.7%、CD19 陽性 66.3% (n=3)、メス CD3 陽性 14.9%、CD19 陽性 85.1% (n=3)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.05%)の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 49.7%、CD19 陽性 50.3% (n=3)、メス CD3 陽性 32.2%、CD19 陽性 67.8% (n=3)、オクチルフェノール投与群

(0.5%)の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 32.5%、CD19 陽性 67.5% (n=3)、メス CD3 陽性 40.5%、CD19 陽性 59.5% (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.05%)の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 49.5%、CD19 陽性 50.5% (n=3)、メス CD3 陽性 36.1%、CD19 陽性 63.9% (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.05%)の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 20.1%、CD19 陽性 79.9% (n=3)、メス CD3 陽性 25.0%、CD19 陽性 75.0% (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.005%)の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 39.3%、CD19 陽性 60.7% (n=3)、メス CD3 陽性 33.9%、CD19 陽性 66.1% (n=3)であった。

出生後 8 週目のコーンオイル投与コントロール群の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 40.5%、CD19 陽性 59.5% (n=4)、メス CD3 陽性 44.7%、CD19 陽性 55.3% (n=4)、フタル酸ブチルベンジル投与群の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 39.3%、CD19 陽性 60.7% (n=3)、メス CD3 陽性 42.6%、CD19 陽性 57.4% (n=3)、フタル酸ジブチル投与群の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 41.1%、CD19 陽性 58.9% (n=3)、メス CD3 陽性 45.9%、CD19 陽性 54.1% (n=3)、フタル酸ジエチル投与群の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 39.3%、CD19 陽性 60.7% (n=3)、メス CD3 陽性 40.8%、CD19 陽性 59.2% (n=3)、ノニルフェノール投与群の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 36.1%、CD19

陽性 63.9% (n=3)、メス CD3 陽性 44.3%、CD19 陽性 55.7% (n=3)、粉末飼料投与コントロール群の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 44.0%、CD19 陽性 56.0% (n=4)、メス CD3 陽性 38.8%、CD19 陽性 61.2% (n=4)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.5%)の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 34.6%、CD19 陽性 65.4% (n=3)、メス CD3 陽性 37.9%、CD19 陽性 62.1% (n=3)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.05%)の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 35.6%、CD19 陽性 64.4% (n=3)、メス CD3 陽性 45.4%、CD19 陽性 54.6% (n=3)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.005%)の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 47.0%、CD19 陽性 53.0% (n=3)、メス CD3 陽性 34.6%、CD19 陽性 65.4% (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.5%)の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 58.4%、CD19 陽性 41.6% (n=3)、メス CD3 陽性 45.1%、CD19 陽性 54.9% (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.05%)の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 41.3%、CD19 陽性 58.7% (n=3)、メス CD3 陽性 37.6%、CD19 陽性 62.4% (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.005%)の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 42.7%、CD19 陽性 57.3% (n=3)、メス CD3 陽性 38.7%、CD19 陽性 61.3% (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.05%)の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 47.0%、CD19 陽性 53.0% (n=3)、

ビスフェノール A 投与群(0.005%)の脾臓細胞は、オス CD3 陽性 44.0%、CD19 陽性 56.0% (n=3)、メス CD3 陽性 39.6%、CD19 陽性 60.4% (n=3)であった。

出生後 4 週目のコーンオイル投与コントロール群の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 17.3%、CD8 陽性 46.5% (n=4)、メス CD4 陽性 13.0%、CD8 陽性 20.4%(n=4)、フタル酸ブチルベンジル投与群の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 9.3%、CD8 陽性 32.9% (n=3)、メス CD4 陽性 14.7%、CD8 陽性 29.4% (n=3)、フタル酸ジブチル投与群の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 10.6%、CD8 陽性 42.4% (n=3)、メス CD4 陽性 14.7%、CD8 陽性 29.4% (n=3)、ノニルフェノール投与群の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 12.9%、CD8 陽性 38.0% (n=3)、メス CD4 陽性 14.5%、CD8 陽性 24.3% (n=3)、粉末飼料投与コントロール群の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 16.6%、CD8 陽性 28.2% (n=4)、メス CD4 陽性 15.1%、CD8 陽性 22.9% (n=4)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.5%)の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 8.8%、CD8 陽性 25.0% (n=3)、メス CD4 陽性 3.0%、CD8 陽性 11.9% (n=3)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.05%)の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 12.4%、CD8 陽性 35.1% (n=3)、メス CD4 陽性 8.2%、CD8 陽性 24.0% (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.5%)の脾臓細胞は、オス CD4

陽性 9.0%、CD8 陽性 23.6% (n=3)、メス CD4 陽性 10.5%、CD8 陽性 30.0% (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.05%)の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 12.6%、CD8 陽性 36.9% (n=3)、メス CD4 陽性 7.7%、CD8 陽性 28.4% (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.05%)の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 5.1%、CD8 陽性 15.5% (n=3)、メス CD4 陽性 6.4%、CD8 陽性 18.7% (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.005%)の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 9.7%、CD8 陽性 29.6% (n=3)、メス CD4 陽性 7.7%、CD8 陽性 26.2% (n=3)であった。

出生後 8 週目のコーンオイル投与コントロール群の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 11.8%、CD8 陽性 26.4% (n=4)、メス CD4 陽性 15.0%、CD8 陽性 31.6% (n=4)、フタル酸ブチルベンジル投与群の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 17.4%、CD8 陽性 20.5% (n=3)、メス CD4 陽性 12.1%、CD8 陽性 30.5% (n=3)、フタル酸ジブチル投与群の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 13.7%、CD8 陽性 27.4% (n=3)、メス CD4 陽性 13.6%、CD8 陽性 32.4% (n=3)、フタル酸ジエチル投与群の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 9.9%、CD8 陽性 29.4% (n=3)、メス CD4 陽性 7.3%、CD8 陽性 33.6% (n=3)、ノニルフェノール投与群の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 7.8%、CD8 陽性 28.3% (n=3)、メス CD4 陽性 9.9%、CD8 陽

性 34.4% (n=3)、粉末飼料投与コントロール群の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 12.7%、CD8 陽性 21.7% (n=4)、メス CD4 陽性 9.7%、CD8 陽性 29.1% (n=4)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.5%)の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 7.3%、CD8 陽性 27.4% (n=3)、メス CD4 陽性 9.0%、CD8 陽性 29.0% (n=3)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.05%)の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 6.2%、CD8 陽性 29.5% (n=3)、メス CD4 陽性 10.6%、CD8 陽性 34.9% (n=3)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.005%)の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 9.2%、CD8 陽性 37.8% (n=3)、メス CD4 陽性 8.6%、CD8 陽性 26.0% (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.5%)の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 11.7%、CD8 陽性 46.7% (n=3)、メス CD4 陽性 12.4%、CD8 陽性 32.7% (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.05%)の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 5.8%、CD8 陽性 35.0% (n=3)、メス CD4 陽性 10.7%、CD8 陽性 27.0% (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.005%)の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 4.3%、CD8 陽性 38.4% (n=3)、メス CD4 陽性 9.2%、CD8 陽性 29.6% (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.05%)の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 10.2%、CD8 陽性 36.9% (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.005%)の脾臓細胞は、オス CD4 陽性 6.3%、CD8

陽性 37.7% (n=3)、メス 6.3%、CD8 陽性 33.4% (n=3)であった。

2. 胸腺細胞の解析

胸腺細胞の解析結果を CD8 シングルポジティブ、CD4CD8 ダブルポジティブ、CD4CD8 ダブルネガティブ、CD4 シングルポジティブの順に述べる。

出生後4週目のコーンオイル投与コントロール群の胸腺細胞は、オス 1.0%、27.0%、3.5%、69.0% (n=4)、メス 1.0%、27.5%、4.5%、67.0% (n=4)、フタル酸ブチルベンジル投与群の胸腺細胞は、オス 3.3%、31.3%、27.0%、38.0% (n=3)、メス 2.3%、27.7%、17.0%、53.3% (n=3)、フタル酸ジブチル投与群の胸腺細胞は、オス 2.3%、24.3%、21.7%、52.7% (n=3)、メス 2.0%、23.0%、14.0%、62.0% (n=3)、ノニルフェノール投与群の胸腺細胞は、オス 3.3%、28.3%、18.3%、50.0% (n=3)、メス 2.7%、32.0%、13.7%、51.3% (n=3)、粉末飼料投与コントロール群の胸腺細胞は、オス 3.0%、19.5%、13.0%、64.0% (n=4)、メス 2.0%、25.0%、15.0%、58.0% (n=4)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.5%)の胸腺細胞は、オス 2.7%、23.3%、17.7%、55.7% (n=3)、メス 2.7%、17.0%、37.3%、43.0% (n=3)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.05%)の胸腺細胞は、オス 7.3%、10.3%、11.7%、71.7% (n=3)、メス 6.7%、14.3%、22.0%、57.0% (n=3)、

オクチルフェノール投与群(0.5%)の胸腺細胞は、オス 3.7%、31.0%、20.0%、45.7% (n=3)、メス 5.3%、26.0%、16.7%、52.0% (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.05%)の胸腺細胞は、オス 4.0%、18.0%、11.0%、67.0% (n=3)、メス 3.3%、26.0%、11.7%、59.3% (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.05%)の胸腺細胞は、オス 2.7%、39.3%、11.7%、46.3% (n=3)、メス 2.3%、28.3%、14.7%、54.7% (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.005%)の胸腺細胞は、オス 2.0%、66.7%、4.3%、27.0% (n=3)、メス 2.0%、39.0%、10.7%、48.7% (n=3)であった。

出生後 8 週目のコーンオイル投与コントロール群の胸腺細胞は、オス 4.0%、31.5%、23.5%、36.0% (n=4)、メス 5.0%、16.0%、31.0%、48.0% (n=4)、フタル酸ブチルベンジル投与群の胸腺細胞は、オス 3.7%、49.7%、20.3%、26.3% (n=3)、メス 2.3%、24.0%、23.7%、50.0% (n=3)、フタル酸ジブチル投与群の胸腺細胞は、オス 3.3%、49.7%、14.0%、32.0% (n=3)、メス 3.3%、25.0%、18.7%、53.0% (n=3)、フタル酸ジエチル投与群の胸腺細胞は、オス 4.3%、33.0%、16.7%、46.0% (n=3)、メス 2.3%、30.0%、23.7%、44.0% (n=3)、ノニルフェノール投与群の胸腺細胞は、オス 5.3%、32.3%、22.7%、39.7% (n=3)、メス 2.0%、25.0%、22.3%、50.7% (n=3)、粉末飼料投与コントロール群の胸腺細胞は、

オス 4.0%、28.0%、23.0%、44.0% (n=4)、メス 5.5%、24.5%、35.0%、35.0% (n=4)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.5%)の胸腺細胞は、オス 4.3%、27.0%、19.0%、49.7% (n=3)、メス 4.0%、20.3%、37.0%、38.7% (n=3)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.05%)の胸腺細胞は、オス 6.0%、37.0%、19.3%、37.7% (n=3)、メス 4.0%、40.0%、15.0%、41.0% (n=3)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.005%)の胸腺細胞は、オス 6.3%、33.7%、17.3%、42.7% (n=3)、メス 5.3%、50.0%、14.0%、30.7% (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.5%)の胸腺細胞は、オス 6.0%、28.0%、19.0%、47.0% (n=3)、メス 4.3%、33.7%、20.7%、41.7% (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.05%)の胸腺細胞は、オス 6.0%、36.7%、19.3%、37.3% (n=3)、メス 4.0%、37.0%、18.7%、40.3% (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.005%)の胸腺細胞は、オス 4.0%、34.7%、17.3%、44.0% (n=3)、メス 5.0%、41.7%、14.0%、39.7% (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.05%)の胸腺細胞は、オス 4.0%、23.0%、17.0%、56.0% (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.005%)の胸腺細胞は、オス 4.7%、38.3%、16.7%、40.3% (n=3)、メス 4.3%、41.7%、16.3%、37.7% (n=3)であった。

D. 考察

本研究では、個体を免疫機能以外の側面からも内分泌攪乱物質を評価する目的で ddY マウスを用いて検討を行った。同じマウスから生まれた子供でも、個体によりばらつきが大きかったが、それでも、胸腺細胞に関しては CD4 シングルポジティブ細胞が全体的に減少する傾向があり、免疫機能の研究に適した他系統のマウスを用いることにより、よりばらつきの少ない結果が得られると思われる。しかし、ddY マウスへの内分泌攪乱物質投与により生まれた子供のなかに、このような傾向が認められたことから、次世代への影響という点も含め、さらなる詳細な検討が必要であると考えられる。

E. 結論

内分泌攪乱物質投与により生まれた仔マウスの脾臓細胞のリンパ球サブセットを解析した結果、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジブチル、ノニルフェノールについては CD3 陽性細胞の割合が増加し、CD19 陽性細胞の割合が減少する傾向があったが、ビスフェノール A、オクチルフェノールでは、CD3 陽性細胞の割合が減少し、CD19 陽性細胞の割合が増加した。この傾向は投与量の増加とともに現れた。また、フタル酸ジシクロヘキシル、オクチルフェノール、ビスフェノール A、フタ

ル酸ジエチル、ノニルフェノールでは、CD4 陽性細胞の割合が減少した。さらに胸腺細胞について解析を行った結果、CD4 シングルポジティブ細胞の割合が減少する傾向が認められた。

F. 研究発表

論文発表

1. Ishii S., Y. Hisamatsu, K. Inazu, M. Kadoi, K. Aika, (2000) Ambient measurement of nitrotriphenylene formation by atmospheric reaction, *Environ. Sci. Technol.*, 34, 1893-1899.
2. Ishii S., Y. Hisamatsu, K. Inazu, T. Kobayashi, K. Aika, (2000) Mutagenic nitrated benzo[a]-pyrene derivatives in the reaction product of benzo[a]pyrene in NO₂-air in the presence of O₃ or under photoirradiation, *Chemosphere*, 41, 1809-1819.
3. Inazu K., N. Tsutsumi, K. Aika, Y. Hisamatsu, (2000) SO₂-enhanced nitration of fluoranthene and pyrene adsorbed on particulate matter in the heterogeneous reaction in the presence of NO₂, *Polycycl. Arom. Comp.*, 20, 191-203.

厚生科学研究費補助金（生活安全総合事業）

分担研究報告書

内分泌攪乱物質の免疫機能に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 岡田 由美子 国立公衆衛生院 衛生獣医学部 主任研究官

研究要旨

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物のみならず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながる事が指摘されている。しかし、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させていると考えられる。そこで、内分泌攪乱物質が免疫機能を低下させるか否か調べる目的で、内分泌攪乱物質を妊娠マウスに投与し、生まれた仔マウスの体重、脾臓、胸腺等諸臓器の重量を測定した。

A. 研究目的

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物に影響を及ぼすのみならず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながる事が指摘されているが、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内分泌系は免疫系と密接に関係しており、

内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させていると考えられる。そこで、内分泌攪乱物質が免疫機能を低下させるか否か調べ、内分泌攪乱物質が免疫機能に及ぼす影響に関してそのメカニズムを解明することを本研究の目的とする。本年度は、内分泌攪乱物質を妊娠マウスに投与し、生まれた仔マウスの体重、諸臓器の重量を測定した。

B. 研究方法

ddY オスマウス（8週齢）と ddY メ

スマウス（8週齢）を一晩同じケージに入れて交配させ、翌朝別々にし、妊娠0.5日とした。妊娠3.5日目よりフタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジブチル、フタル酸ジエチルを25 mg/kg/dayになるように、また、ノニルフェノールは2.5 mg/kg/dayになるように強制経口投与を行った。コントロールマウスにはコーンオイルを強制経口投与した。また、フタル酸ジシクロヘキシル、オクチルフェノールは、粉末飼料中に0.5, 0.05, 0.005%になるように、ビスフェノール A は、粉末飼料中に0.05, 0.005%になるように混ぜて与えた。この際のコントロールマウスは粉末飼料のみを与えた。各群ともに、仔マウスを出産後、離乳にあたる20.5日目まで親マウスに内分泌攪乱物質の投与を続け、その後は飼料のみを与えた。出生後、4週目、8週目、12週目にコントロール群、各投与群からマウスを選び、オス・メスともに体重を測定し、脾臓、胸腺、肝臓の重量を測定し、さらに、オスについては精巣重量を、メスについては子宮重量を測定した。

C. 研究結果

1. 体重測定結果

出生後4週目のコーンオイル投与コントロール群の体重は、オス27.55±2.99g (n=4)、メス

24.42±2.63g(n=4)、フタル酸ブチルベンジル投与群の体重は、オス28.56±1.46g (n=3)、メス24.32±0.56g (n=3)、フタル酸ジブチル投与群の体重は、オス30.44±1.39g (n=3)、メス25.98±0.95g (n=3)、フタル酸ジエチル投与群の体重は、オス25.02±0.44g (n=3)、メス21.91±0.97g (n=3)、ノニルフェノール投与群の体重は、オス25.35±1.06g (n=3)、メス21.86±1.71g (n=3)、粉末飼料投与コントロール群の体重は、オス26.01±3.13g (n=4)、メス22.78±3.94g (n=4)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.5%)の体重は、オス25.91±1.33g (n=3)、メス17.60±1.26g (n=3)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.05%)の体重は、オス19.67±1.24g (n=3)、メス18.56±2.95g (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.5%)の体重は、オス18.50±0.63g (n=3)、メス10.23±2.94g (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.05%)の体重は、オス23.73±0.48g (n=3)、メス25.05±1.46g (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.05%)の体重は、オス24.89±0.81g (n=3)、メス22.49±0.45g (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.005%)の体重は、オス23.22±1.09g (n=3)、メス21.47±1.49g (n=3)であった。

出生後8週目のコーンオイル投与コントロール群の体重は、オス

39.51±1.53g (n=4) 、メス 32.49±2.41g(n=4)、フタル酸ブチルベンジル投与群の体重は、オス 34.03±2.20g (n=3)、メス 29.33±2.42g (n=3)、フタル酸ジブチル投与群の体重は、オス 37.72±0.82g (n=3)、メス 30.89±0.33g (n=3)、フタル酸ジエチル投与群の体重は、オス 39.83±1.29g (n=3)、メス 29.45±3.09g (n=3)、ノニルフェノール投与群の体重は、オス 37.31±1.59g (n=3)、メス 28.35±1.60g (n=3)、粉末飼料投与コントロール群の体重は、オス 38.08±0.44g (n=4)、メス 31.42±1.04g (n=4)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.5%)の体重は、オス 36.42±2.10g (n=3) 、メス 31.58±2.39g (n=3)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.05%)の体重は、オス 35.70±2.36g (n=3) 、メス 30.86±0.86g (n=3)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.005%)の体重は、オス 34.80±3.05g (n=3) 、メス 31.80±1.136g (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.5%)の体重は、オス 33.05±0.88g (n=3)、メス 30.12±2.39g (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.05%)の体重は、オス 36.20±3.59g (n=3)、メス 29.15±1.73g (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.005%)の体重は、オス 38.35±0.96g (n=3)、メス 33.91±1.79g (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.05%)の体重は、オス

39.23±0.21g (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.005%)の体重は、オス 35.96±0.59g (n=3)、メス 31.17±1.29g (n=3)であった。

出生後 12 週目のコーンオイル投与コントロール群の体重は、オス 40.50±2.06g (n=4) 、メス 36.32±2.10g(n=4)、フタル酸ブチルベンジル投与群の体重は、オス 37.98±2.48g (n=3)、メス 33.43±1.81g (n=3)、フタル酸ジブチル投与群の体重は、オス 39.57±3.28g (n=3)、メス 33.17±0.84g (n=3)、フタル酸ジエチル投与群の体重は、オス 38.62±0.22g (n=3)、ノニルフェノール投与群の体重は、オス 37.31±1.59g (n=6)、メス 32.94±2.78g (n=3)、粉末飼料投与コントロール群の体重は、オス 38.74±1.36g (n=4)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.5%)の体重は、オス 35.26±0.58g (n=3)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.05%)の体重は、オス 40.38±1.46g (n=3)、フタル酸ジシクロヘキシル投与群(0.005%)の体重は、オス 39.87±3.32g (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.5%)の体重は、オス 39.35±0.30g (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.05%)の体重は、オス 42.32±3.05g (n=3)、オクチルフェノール投与群(0.005%)の体重は、オス 48.32±6.30g (n=3)、ビスフェノール A 投与群(0.005%)の体重は、オス