

厚生科学研究費補助金
生活安全総合研究事業

内分泌かく乱化学物質の胎児、幼児への影響等に関する研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 白井 智之

平成 13 年 3 月

目 次

I 総括研究報告書

- 内分泌かく乱化学物質の胎児，幼児への影響等に関する研究 1
白井 智之（名古屋市立大学医学部 教授）

II 分担研究報告書

1. 雄生殖器系に及ぼす影響 14
2. ビスフェノール A の妊娠期・授乳期曝露によるラット雌性生殖器への影響 24
前川 昭彦（（財）佐々木研究所 部長）
3. 精巣に及ぼす影響及び発がんに及ぼす影響 28
福島 昭治（大阪市立大学医学部 教授）
4. ゲニステインの胎児および新生児に及ぼす影響 37
池上 幸江（大妻女子大学家政学部 教授）
5. 胎児および新生児の甲状腺に及ぼす影響 41
堤 雅弘（奈良県立医科大学附属がんセンター 講師）
6. Bisphenol A の行動影響に関する研究 43
鈴木 勉（星薬科大学 教授）
7. 神経系に及ぼす影響：脳内モノアミン動態に対する影響 50
船江 良彦（大阪立大学医学部 教授）
8. Bisphenol A が脳・神経系の形成・成熟に及ぼす影響の分子病理学的解析 55
伏木 信次（京都府立医科大学 教授）

III 研究成果の刊行に関する一覧表 59

内分泌かく乱化学物質の胎児、幼児への影響等に関する研究

主任研究者 白井 智之 名古屋市立大学医学部 教授

研究要旨

本研究では内分泌かく乱作用が指摘されている化学物質を妊娠および授乳期の実験動物に投与した場合、その動物の出生児の成長後に生殖障害、学習・精神障害が出現するのか、また、がんの発生が増加するのかなどを *in vivo* の立場から検討を行っている。現在まで得られた研究成果は下記の通りである。

- 1) bisphenol A を妊娠中および授乳期に投与したが、母獣ラットの妊娠期間、出産児数および死産児数のいずれにおいても投与による影響はなく、生まれた児の前立腺にも著変はなく、影響はないものと結論づけた。平成 11 年度で観察された高濃度での精子数の減少は今回観察されなかった。現在 bisphenol A を 0、0.05、7.5、30 および 120 mg/kg/day で投与したラットに前立腺発がん物質である DMAB を 20 週間にわたって投与する発がん実験を実施中である。nonylphenol の前立腺癌発生に対する作用をみる実験についても同様の方法で 0、0.1、10、100 mg/kg の用量で開始した。（白井）。
- 2) bisphenol A 低用量を妊娠中および授乳期ラットに投与し、雌性生殖器への影響ならびに子宮発がんへの修飾作用について検討したが、成長曲線、性周期の変化および雌性生殖器の発育分化、子宮の増殖性病変などいずれにおいても有意な影響はなかった。低用量の bisphenol A の胎児期・哺乳児期曝露は児に対して、発育分化時期を含めた雌性生殖器系および子宮発がんへの修飾作用に何ら影響を及ぼさないことが明らかとなった。（前川）。
- 3) 雌マウスの妊娠 0 日から出生児の離乳までの間、bisphenol A を 0、0.05、50 と 400 mg/kg/day、また nonylphenol を 0、0.05、50 および 200 mg/kg/day の用量で経口投与し、その児動物を 10 週齢まで飼育した。その結果 bisphenol A は前立腺腹葉の重量増加と精巣における精子数の増加を引き起こすことを認めた。また styrene dimer および trimer はラット肝中期発がん性試験法にて肝発がん性を示さないことが判明した。（福島）。
- 4) 妊娠期と授乳期の母親ラットへの genistein の曝露は乳児への生体影響に顕著な差はなく、程度も軽微であった。他方妊娠・授乳期に genistein 曝露をうけた乳児では、成長期の体重増加の抑制がみられた。（池上）。
- 5) 妊娠および授乳期に bisphenol A を 1%、1600 ppm、100 ppm、0.08 ppm の濃度

で投与した雌ラットより生まれた児ラットの発がん感受性について、甲状腺および肺をおもな標的として検索を行った結果、bisphenol A に有意な発がん促進作用、甲状腺機能に対する影響はみられなかった。(堤)。

- 6) 低用量の bisphenol A の妊娠期および授乳期のマウスへの曝露は、methamphetamine 誘発薬理作用を増強することを明らかにした。さらには、bisphenol A の妊娠期および授乳期の曝露により性格や情動や薬物依存などの形成に深く関与する D1 受容体発現の増加に伴いドパミン神経伝達が過剰に亢進することを明らかにした。(鈴木)。
- 7) bisphenol A は、低用量であっても、胎児期・幼児マウス脳のモノアミン神経系(特にドパミン神経系)に作用し、出生後のドパミンの脳内動態・作用に影響を与えている事が明らかとなった。ドパミンの脳内の機能から考えると、これらの動物は、運動、感情や情動発現、脳報酬系に異常をきたしている可能性が考えられた。(船江)。
- 8) bisphenol A がマウス脳神経系の形成ならびに分化・成熟に及ぼす影響を明らかにするために発生期脳および成熟脳を対象に免疫組織染色を実施した。その結果 tyrosine hydroxylase 陽性黒質神経細胞の減少、parvalbumin 陽性大脳皮質神経細胞の減少が見られた。また生後9週齢の時点で、dopamine beta-hydroxylase、estrogen receptor alpha、ER beta の mRNA レベルが、非投与対照群に比し有意に亢進した。(伏木)。

分担研究者

前川 昭彦 (財) 佐々木研究所 部長
福島 昭治 大阪市立大学医学部 教授
池上 幸江 大妻女子大学家政学部 教授
堤 雅弘 奈良県立医科大学附属がんセンター 講師
鈴木 勉 星薬科大学 教授
船江 良彦 大阪立大学医学部 教授
伏木 信次 京都府立医科大学 教授

環境中の内分泌かく乱作用が指摘されている化学物質の胎児期、乳児期曝露が成長後の学習・精神障害、発がん、生殖機能の異常などを発現する可能性がある。そこで、本研究では内分泌かく乱作用が疑われている bisphenol A、nonylphenol、genistein 等の化学物質の生殖機能、学習・精神障害および発がん性などに及ぼす影響を in vivo の立場からラットとマウスを用いて解析することを目的とする。

A. 研究の目的

近年、環境中に存在する内分泌かく乱化学物質が、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、ヒトにおいても女性生殖器、男性生殖器、甲状腺、視床下部・下垂体等への影響が懸念されている。しかし、

B. 研究方法

1. 雄性生殖器系に及ぼす影響(白井)

妊娠確認した雌 F344 ラットに妊娠 0 日から離乳まで bisphenol A を 0、0.05、7.5、30 および 120 mg/kg/day の投与量で毎日強制経口投与した。児動物は生後 22 日に離乳させ、離乳 10 週後に

一部の動物を屠殺剖検し、精子検査を実施した。また発がん実験では bisphenol A を投与したラットに前立腺発がん物質である 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) を 20 週間にわたって投与した。現在 38 週の時点を経過中であり、22 週間経過観察を行う予定である。nonylphenol の前立腺癌発生に及ぼす影響をみる実験も同様の方法で 0、0.1、10、100 mg/kg の用量で開始した。(倫理面への配慮) 動物実験は動物委員会の承諾を得て、動物愛護に則ったプロトコールに従って行った。

2. 子宮に及ぼす影響 (前川)

食品缶からの最大溶出量(100 ppb)を基とした 1 日当たりの摂取量に相当する 0.006 mg/kg と、その 1000 倍量の 6 mg/kg の bisphenol A を、雌 Donryu ラットの妊娠および哺乳の全期間(約 6 週間)にわたり強制経口投与した。得られた雌の児について生殖器系を中心とする発育分化を観察し、さらに発がん物質を投与後 15 ヶ月齢まで観察して子宮発がんへの修飾作用および内分泌環境の変化を検討した。また、母動物から児への bisphenol A の組織内および血中濃度を測定した。(倫理面への配慮) 動物の取り扱いおよび処置については動物愛護に十分配慮した。

3. 精巣に及ぼす影響および発がんに及ぼす影響 (福島)

胎児期・新生児期に及ぼす影響については、雌マウスの妊娠 0 日から出生児の離乳までの間、bisphenol A を 0、0.05、50 と 400 mg/kg/day、さらに nonylphenol を 0、0.05、50 および 200 mg/kg/day の用量で経口投与した。児動物を 10 週齢まで飼育した。発がん性については、ラット肝中期発がん性試験法(伊東法)を用いて検索した。styrene dimer および trimer を 0.0006、0.006 および 0.6 mg/kg/day の用量で投与し、肝前がん病変である胎盤型 glutathione S-transferase (GST-

P) 陽性細胞巢の発生を検索した。(倫理面への配慮) 動物飼育ならびに処置に関しては、大阪市立大学医学部飼育規定に従って実施している。また、年 1 回動物供養祭を挙行している。

4. ゲニステインの胎児および新生児に及ぼす影響 (池上)

妊娠を確認 5 日目の SD 系ラットを用いた。これまでの研究では主に genistein と daidzein の混合物を用いてきたので、母親の妊娠期、授乳期における genistein 単独経口投与の影響について観察した。実験は 2 回行い、最初の実験では妊娠期と授乳期の暴露の影響を比較した。2 回目の実験では、妊娠・授乳期暴露の乳児の成長後への影響を観察した。(倫理面への配慮) 動物実験では「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(総理府告示第 6 号) を遵守して行った。

5. 胎児および新生児の甲状腺に及ぼす影響 (堤)

Wistar 系雌ラットに 1% の bisphenol A を基礎飼料または大豆除去飼料に混じり 5 週齢より投与を開始し、妊娠、出産、授乳期間を通して投与した。また、低用量の bisphenol A の影響を検索するため bisphenol A を 0.08 ppm、100 ppm、1600 ppm の濃度で基礎飼料に混じり同様の処置を行った。すべての児ラットは基礎飼料にて飼育し、5 週齢より、2000 ppm の N-nitrosobis(2-hydroxypropyl) amine (BHP) を飲料水に混じり 12 週間投与し、BHP 投与開始 20 週後にエーテル麻酔下に屠殺、剖検を行い病理学的検索を行った。(倫理面への配慮) 動物実験は、奈良医大動物実験施設の規定に準拠し、倫理面に配慮して行った。

6. 行動異常に及ぼす影響 (鈴木)

bisphenol A 混入飼料 (0.00003、0.0003 および 0.003 mg/g of food) を ddY 系雄性マウスには交配 2 日前より、雌性マウスには交配日より処置を開始し、分娩後、離乳まで継続して曝露した。離乳後 4 週間以上普通飼料で飼育したマウスを

用いて、1) morphine 誘発自発運動促進作用および抗侵害効果、2) cocaine 誘発報酬効果、3) methamphetamine 誘発報酬効果および自発運動促進作用、4) 脳内 monoamine transporter の変化、5) 脳内 dopamine 受容体の変化について検討した。報酬効果の測定には条件づけ場所嗜好性試験を用い、自発運動量の測定は tilting-cage 法に従って行った。抗侵害効果は tail-flick 法および warm-plate 法を用いて評価した。4)、5) は RT-PCR 法および Western blot 法により検討した。

7. 行動異常ラット脳における p450 誘導とドーパミン (船江)

bisphenol A を親 ddy マウスに混餌で投与し、それら親から出生・授乳した児マウス (6 週齢) を用いて検討を行った。親への bisphenol A 投与量は、0.00003、0.0003、0.003 mg/g of food とした。半脳を用いて、モノアミン神経伝達物質 (ドパミン、ノルエピネフリン、セロトニン) 等の脳内アミンの定量を行った。

さらに半脳を用いて、モノアミン関連タンパク質 (チトクロム P450 2D、チロシン水酸化酵素、ドパミン受容体、モノアミンオキシダーゼ) の mRNA の発現量を定量的 RT-PCR 法で定量した。実験動物の使用に関しては、大阪市立大学医学部実験動物実験施設の倫理規定に基づき、動物への倫理的な配慮をおこなった。

8. 行動異常ラット脳の分子病理学的解析 (伏木)

雄性 ddY マウスには交尾前から、雌性マウスには交尾後から bisphenol A を混餌(0.003 mg/g of food)で与え出生させた児を生後 9 週齢で屠殺し、脳を取り出し試料とした。一部は RNA 抽出後、real time PCR 装置にて mRNA 量を測定した。大脳新皮質ならびに黒質を含む連続切片を作成し、tyrosine hydroxylase (TH) やカルシウム結合蛋白などに対する免疫組織化学を施行した。また、妊娠 10 日目以降に bisphenol A を混じた餌を与えた

群 (0.002 mg/ならびに 8 mg/g of food) を作製し、胎齢 18 日ならびに生後 2、3 週齢で脳を採取し免疫組織染色を施した。(倫理面への配慮) 動物の取り扱いおよび処置については動物愛護に十分配慮した。

C. 研究結果

1. 雄性生殖器系に及ぼす影響 (白井)

bisphenol A 曝露途中屠殺のラットには平成 11 年度で観察された高濃度での精子の数の減少は今回観察されず、また精子形態、精子運動にも異常は認められなかった。発がん実験のラットにおける体重増加には各群間に差は無く、順調に推移している。また妊娠率、出産率、妊娠期間にも bisphenol A 投与による影響はみられなかった。

2. 子宮に及ぼす影響 (前川)

体重および性周期の変化に有意な群間の差は観察されなかった。病理検査では雌性生殖器の発育分化に異常は観察されず、子宮内膜の過形成および内膜腺癌の発生頻度に群間での差異は認められなかった。投与群に観察された子宮癌について低分化型および転移の増加等の悪性度の増加は観察されなかった。母動物の bisphenol A 濃度が 6 mg/kg 群で有意に高い値を示したが、母乳、児の血清および肝臓中の濃度に有意差は認められなかった。しかし、母および児の対照群の全サンプルにも bisphenol A は検出された。

3. 精巣に及ぼす影響および発がんに及ぼす影響 (福島)

bisphenol A 投与により、前立腺腹葉の重量増加と精巣における精子数の増加が 0.05 mg/kg と 50 mg/kg 群で、また、精子運動能の亢進が 0.05mg/kg 群で認められた。nonylphenol については検索中である。肝の GST-P 陽性細胞巢の発生に関して、styrene dimer および styrene trimer 投与群と対照群との間に差を認めなかった。

4. ゲニステインの胎児および新生児に及ぼす影響 (池上)

母親に対する genistein 暴露の影響は、これまでに行ったイソフラボン混合物の場合に比べて弱く、daidzein その他の大豆成分の生体影響の可能性が示唆された。また、妊娠期、授乳期別にみた乳児への生体影響に顕著な差異はみられなかった。他方、母親が妊娠・授乳期に継続して genistein 暴露を受けた乳児では、成長期の体重増加の抑制がみられたが、その他の生体影響はみられなかった。また、統計的には有意ではないが、母親の胎児数の減少や血中甲状腺ホルモン濃度の低下傾向がみられた。

5. 胎児および新生児の甲状腺に及ぼす影響 (堤)

BHP を投与した児ラットには雌雄ともに甲状腺癌、肺癌、食道癌、肝腺腫、胸腺リンパ腫の発生がみられたが、各濃度の bisphenol A の投与、飼料の差異により、これらの腫瘍の発生頻度、動物 1 匹あたりの発生個数に有意な差異はみとめられなかった。甲状腺ホルモン測定の結果、BHP 非投与の児ラット (25 週齢) においては、血中 T3、T4、TSH 値に各群間有意な差はみられず、組織学的にも甲状腺に著変はみられなかった。低用量の bisphenol A 投与によっても、妊娠期間、出生児数など群間に有意差はみられず、外表奇形もみられなかった。

6. 行動異常に及ぼす影響 (鈴木)

低用量の bisphenol A を慢性曝露されたマウスにおいては、morphine 誘発自発運動促進作用および抗侵害効果には有意な変化は認められず、cocaine 誘発報酬効果においても増強傾向は認められるものの有意な差は得られなかった。しかしながら、methamphetamine 誘発報酬効果および自発運動促進作用は 対照群と比較して有意な増強が観察された。一方、脳内における dopamine

transporter および vesicle monoamine transporter の mRNA およびタンパクレベルは 対照群と比較して有意な変化が認められなかったのに対し、脳内の dopamine D₁ 受容体 mRNA レベルで有意な増加が認められた。

7. 行動異常ラット脳における p450 誘導とドーパミン (船江)

本年度作成した低用量 bisphenol A 投与群では、昨年度でみられたような明確な脳内モノアミン量の変動 (ドーパミン量の減少) は見られなかった。チロシン水酸化酵素およびドーパミン D₄ 受容体 mRNA は、昨年度と同様に bisphenol A 投与群で有意に増加、ドーパミン D₂ 受容体 mRNA は減少した。このように、モノアミンに関わるタンパク質の mRNA の発現量には変化が見られた。

8. 行動異常ラット脳の分子病理学的解析 (伏木)

胎齢 10 日目以降 bisphenol A を投与した群より得た児では、黒質の TH 陽性神経細胞数 (8 mg/g of food) が胎齢 18 日、生後 2 週齢で、大脳皮質 PV 陽性神経細胞 (0.002 mg/g/ならびに 8 mg/g of food 群) が生後 21 日齢で有意に減少した。妊娠全期間から授乳期に bisphenol A を投与した群 (0.003 mg/g of food) の雌では、生後 9 週齢で黒質 TH 陽性神経細胞密度が有意に減少した。また生後 9 週齢のこれらの動物 (雌) では、dopamine beta-hydroxylase、ERalpha、ERbeta の mRNA レベルが有意に亢進した。

D. 考察

前回認められた bisphenol A の高濃度曝露群で精子数に減少が認められたのは児ラットの群分けの際偏りがあったことによるものと推察された。現在 bisphenol A 曝露のラットにおける前立腺発がんに対する影響の研究を実行中であり、さらに nonylphenol の研究も継続中である。(白井)。

成長曲線、性周期の変化および雌性生殖器の発育分化、子宮の増殖性病変などいずれの項目においても有意な差異は認められなかったことから、低用量の bisphenol A の胎児期・哺乳児期曝露は児に対して、発育・分化時期を含めた雌性生殖器系および子宮癌への修飾作用に何ら影響を及ぼさないことが明らかとなった。今回の投与量の bisphenol A は母動物の血清中には移行するものの、母動物から児動物へ移行していない可能性が高いと考えられた。(前川)。

親世代への bisphenol A 投与は次世代雄性マウスの前立腺と精巣に影響を及ぼすことが判明した。特にヒト曝露レベルを考慮した ADI レベルにおいてもその影響がみられ、今後、この事実を再確認するとともに Bisphenol A の作用機序を追究する必要がある。また、昨年度報告の styrene monomer を含め、styrene には肝発がん性がないことが判明した。(福島)。

大豆イソフラボンでは genistein のみならず daidzein についても何らかの生体影響の確認が必要であることが示唆された。また、母親が妊娠・授乳期に genistein の曝露を受けた乳児では成長期における生体影響の可能性が示唆された。そこで、成長期における実験動物への生体影響についても検討する必要性が示唆された。(池上)。

大豆除去飼料を投与した雌ラットに TSH 高値、甲状腺腫が誘発されたが、これらの変化に 1% bisphenol A 含有飼料投与が影響を与えることはなく、また、低容量の bisphenol A を基礎食に混じり投与しても、甲状腺に変化はみられないことより、bisphenol A の甲状腺に対する毒性作用は乏しいことが示された。また、これらの雌ラットより生まれた児ラットにおいても、血中甲状腺ホルモン値に著変はみられず、また、甲状腺を含む肺、肝、食道、胸腺の発がんにも、経胎盤的、経乳汁的に投与された bisphenol A には有意な発がん促

進作用のないことが示唆された。(堤)。

以前、当教室において、比較的高用量の bisphenol A 慢性曝露により methamphetamine 誘発数種薬理作用が増強されることを明らかにしている。本研究によって低用量の bisphenol A 慢性曝露によっても、methamphetamine 誘発数種薬理作用が増強することが明らかとなった。また、bisphenol A 慢性曝露マウスにおいては脳内 dopamine D₁ 受容体 mRNA の増加が認められたことから、本研究で得られた methamphetamine 誘発数種薬理作用の増強にこの dopamine D₁ 受容体 mRNA の増加が一部関与していると考えられる。(鈴木)。

低用量の bisphenol A の胎児期・幼児期曝露の 6 週齢児マウスでは、顕著な脳内ドパミン量の変動は見られなかった。しかし、ドパミン動態・作用に関与する様々な蛋白発現量に変動が見られていることから、低用量の bisphenol A 投与(0.0003 mg /g of food)においても、ドパミン動態・作用に変化が見られ、ドパミン系の神経作用になんらかの影響を与えている可能性が考えられた。(船江)。

TH 陽性黒質神経細胞密度が生後 9 週齢という BPA 投与中止後 6 週を経た時点で認められたことから、この変化は不可逆的な胎生期の変化であることが推定されたが、事実、胎生期において黒質 TH 陽性神経細胞数を調べると減少していた。また PV 陽性大脳皮質神経細胞数の減少がみられたことは GABA 作動性 interneuron への bisphenol A の影響を示している。これらの変化がどのようなメカニズムにより現れるのかは不明であるが、生後 9 週齢雌で ERalpha 及び ERbeta mRNA の発現が亢進していたことと、それらの発現部位を勘案すると興味深い。(伏木)。

E. 結論

現在まで得られた結論は次の如くである。

1) 妊娠期及び授乳期の母ラットに0、0.05、7.5、30 および 120 mg/kg/day の投与量で毎日強制経口投与し、間接的に曝露された児動物には精子の異常は起きないことが判明し、さらに母ラットにおける妊娠率、妊娠期間、出産率にも影響ないことが明らかとなった(白井)。

2) bisphenol A をヒトが曝露される可能性のある低用量(6 および 0.006mg/kg)にて雌ラットの妊娠・哺乳期間にわたり強制経口投与して児の雌性生殖系への影響について検討した結果、低用量の bisphenol A 胎児期・新生児期曝露はラットの雌性生殖系へ何ら影響を及ぼさないと結論した。また、これらの用量の bisphenol A は母から児へ移行しない可能性が示唆された。(前川)。

3) bisphenol A の親マウスへの妊娠期、授乳期投与は低用量でも次世代雄性マウスの前立腺と精巣に影響を及ぼすことが明らかとなった。nonylphenol の雄性生殖系への影響については検索中である。また、styrene dimer と styrene trimer はラット肝発がん性を示さないことが結論づけられた。(福島)。

4) SD 系妊娠ラットに妊娠期と授乳期にわけて genistein を飼料とともに摂取させた場合、とくに顕著な乳児への影響はみられず、また妊娠期と授乳期とでの生体影響にも差異はみられなかった。他方、妊娠期から授乳期に genistein を曝露された母親の乳児では、成長期における体重増加に抑制がみられた。また、genistein 曝露をうけた母親では、胎児数の減少と血中甲状腺ホルモン濃度の減少傾向が観察された(池上)。

5) Wistar 系雌ラットに bisphenol A を 1%、1600 ppm、100 ppm、0.08 ppm の濃度で飼料に混じり 5 週齢より投与を開始し、妊娠、出産、授乳期間を通じて投与し、生まれた児ラットに bisphenol A を投与し甲状腺、肺、食道、肝、胸腺発がん感受性について検索した。その結果、bisphenol A を

投与されたラットより生まれた児ラットにおいて、甲状腺機能、発がん感受性に有意な差はみられず、bisphenol A の曝露が次世代ラットの甲状腺、肺、食道、肝、胸腺発がん感受性の亢進および甲状腺機能異常の誘発に関与する可能性は乏しいと考えられる。(堤)。

6) 低用量 bisphenol A 慢性曝露により依存性薬物、特に methamphetamine の依存形成能が増強されることが明らかとなった。また、本研究において作製したマウスは精神依存形成に重要な役割を担う中脳辺縁 dopamine 神経系に変化が生じているものと推察される。(鈴木)。

7) 低用量の bisphenol A 投与においても、脳内ドパミン量に顕著な変化がみられないものの、脳内ドパミン動態・作用に関与する様々な蛋白発現量に変動が見られた。このことから、たとえ低用量であっても、胎児期・幼児期の bisphenol A 曝露が、出生・成長後の児のドパミン系の神経作用になんらかの影響を与えていることが示唆された。ドパミンの脳内の機能から考えると、これらの動物は、運動、感情や情動発現、脳報酬系に異常をきたしている可能性が考えられた。(船江)。

8) 胎齢 10 日目以降 bisphenol A 8 mg/g of food を投与した群では TH 陽性黒質神経細胞数が胎齢 18 日、生後 2 週齢で有意に減少した。また生後 21 日齢雌で大脳皮質 PV 陽性神経細胞数が 0.002 mg/ならびに 8 mg/g of food 群において有意な減少を示した。妊娠全期間から授乳期まで bisphenol A を投与された雌 (0.003 mg/g of food) では、生後 9 週齢で黒質 TH 陽性神経細胞密度が有意に減少した。つまりドーパミン系ならびに GABA 系神経細胞への bisphenol A の影響が示された。また生後 9 週齢雌で、ERalpha 及び ERbeta mRNA 発現が有意に亢進した。(伏木)。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ogawa, K., Kimoto, N., Asamoto, M., Nakanishi, M., Takahashi, S., Shirai, T.: Aberrant expression of p27^{kip1} is associated with malignant transformation of the rat urinary bladder epithelium. *Carcinogenesis*, 21: 117-121, 2000.

Cui, L., Takahashi, S., Tada, M., Kato, K., Yamada, Y., Kohri, K., Shirai, T.: Immunohistochemical detection of carcinogen-DNA adducts in normal human prostate tissues transplanted into the subcutis of athymic nude mice: Results with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) and 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) and relation to cytochrome P450s and *N*-acetyltransferase activity. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 52-58, 2000.

Imaida, K., Ogawa, K., Takahashi, S., Ito, T., Yamaguchi, T., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Tanaka, K., Ito, N., Shirai, T.: Delay of DNA-adduct repair and severe toxicity in xeroderma pigmentosum group A gene (XPA) deficient mice treated with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine (PhIP). *Cancer Lett.*, 150: 63-69, 2000.

Yaono, M., Tamano, S., Mori, T., Kato, K., Imaida, K., Asamoto, M., Shirai, T.: Lobe specific effects of testosterone and estrogen on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced rat prostate carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 150: 33-40, 2000.

Shirai, T., Imaida, K., Ito, N. Prostate. In: M. Nagao, T. Sugimura (eds.), *Food Born Carcinogenesis*, pp. 270-274. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, Ltd, 2000.

Imaida, K., Shirai, T., Ito, N. Degenerative Changes. In: M. Nagao, T. Sugimura (eds.), *Food Born Carcinogenesis*, pp. 275-284. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, Ltd, 2000.

Ito, N., Imaida, K., Asamoto, M., Shirai, T.: Early detection of carcinogenic substances and modifiers in rats. *Mutation Res.*, 462: 209-217, 2000.

Shirai, T., Takahashi, S., Cui, L., Futakuchi, M., Kato, K., Tamano, S., Imaida, K.: Experimental prostate carcinogenesis—rodent models. *Mutation Res.*, 462: 219-226, 2000.

Hirose, M., Yamaguchi, T., Cui, L., Kimoto, N., Futakuchi, M., Kono, T., Nishibe, S., Shirai, T.: Effects of arctiin on PhIP-induced mammary, colon and pancreatic carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats and MeIQx-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Lett.*, 155: 79-88, 2000.

Kato, K., Takahashi, S., Cui, L., Toda, T., Suzuki, S., Futakuchi, M., Sugiura, S., Shirai, T.: Suppressing effects of dietary genistin and daidzin on rat prostate carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 786-791, 2000.

Akaza, H., Tsukamoto, S., Morita, T., Yamauchi, A., Onozawa, M., Shimazui, T., Ideyama, Y., Shirai, T.: Promoting effects of antiandrogenic agents on rat ventral prostate carcinogenesis induced by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB). *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 3: 115-119, 2000.

Cohen, S. M., Shirai, T., Steineck, G.: Epidemiology and etiology of premalignant and malignant urothelial changes. *Scand J. Urol. Nephrol.*, Suppl. 205: 105-115, 2000.

Kawabe, M., Cui, L., Kimoto, N., Sano, M., Hirose, M., Shirai, T.: Modifying effects of propolis on MeIQx promotion of rat hepatocarcinogenesis and in a female rat two-stage carcinogenesis model after multiple carcinogen initiation. *Nutrition and Cancer*, 37: 179-186, 2000.

Hokaiwado, N., Asamoto, M., Cho, Y.-M., Imaida, K., Shirai, T.: Frequent c-Ha-*ras* gene mutations in rat

- mammary carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Cancer Lett.*, 163: 187-190, 2001.
- Imaida, K., Tamano, S., Kato, K., Ikeda, Y., Asamoto, M., Takahashi, S., Nir, Z., Murakoshi, M., Nishino, H., Shirai, T.: Lack of chemopreventive effects of lycopene and curcumin on experimental rat prostate carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 22: 467-472, 2001.
- Nagaoka, T., Takegawa, K., Takeuchi, M., and Maekawa, A.: Effects of reproduction on spontaneous development of endometrial adenocarcinomas and mammary tumors in Donryu rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 91:375-382, 2000.
- Katsuda, S., Yoshida, M., Isagawa, S., Asagawa, Y., Kuroda, H., Watanabe, T., Ando, J., Takahashi, M. and Maekawa, A.: Dose- and treatment duration-related effects of p-tert-octylphenol on female rats. *Reprod. Toxicol.* 14:119-126, 2000.
- Yoshida, M., Katsuda, S., Ando, J., Kuroda, H., Takahashi, M. and Maekawa, A.: Subcutaneous treatment of p-tert-octylphenol exerts estrogenic activity on the female reproductive tract in normal cycling rats of two different strains. *Toxicol. Lett.* 116:89-101, 2000.
- Katsuda, K., Yoshida, M., Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa, A.: Irreversible effects of neonatal exposure to p-tert-octylphenol on the reproductive tract in female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 165:217-226, 2000.
- Aso, S., Anai, M., Noda, S., Imatanaka, N., Yamasaki, K. and Maekawa, A.: Twenty-eight-day repeated-dose toxicity studies for detection of weak endocrine disrupting effects of nonylphenol and atrazine in female rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 13:13-20, 2000.
- 長谷川隆一、小泉睦子、広瀬明彦、前川昭彦: アルキルフェノールのエストロゲン様作用と生殖器系への影響〔総説〕、日本食品化学学会誌、7:1-9, 2000
- Takahashi, M., Iizuka, S., Watanabe, T., Yoshida, M., Ando, J., Wakabayashi, K. and Maekawa, A.: Possible mechanisms underlying mammary carcinogenesis in female Wistar rats by nitrofurazone. *Cancer Lett.* 156:177-184, 2000.
- Yamasaki, K., Sawaki, M., Noda, S., Muroi, T. and Maekawa, A.: Immature rat uterotrophic assay of diethylstilbestrol, ethinyl estradiol and atrazine. *J. Toxicol. Pathol.* 13:145-150, 2000.
- Yoshida, M., Katsuda, S., Takenaka, A., Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa, A.: Effects of neonatal exposure to a high-dose p-tert-octylphenol on the male reproductive tract in rats. *Toxicol. Lett.* in press, 2001.
- Yoshida, M., Katsuda, S. and Maekawa, A.: Effects of endocrine disrupting chemicals with estrogenic activity on the female reproductive system in rats. *J. Toxicol. Pathol.* in press, 2001.
- Takahashi, M., Nishimura, S., Sasahara, K., Yoshida, M., Ando, J. and Maekawa, A.: Time-dependent promotion activity of 17 β -estradiol on uterine carcinogenesis in CD-1 mice treated with N-ethyl-N-nitrosourea. *Cancer Lett.* in press, 2001
- Sukata, T., Ozaki, K., Uwagawa, S., Seki, T., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Okuno, Y., Fukushima, S.: Organ-specific, carcinogen-induced increases in cell proliferation in p53-deficient Mice., *Cancer Res.* 60: 74-79, 2000.
- Yamamoto, S., Tada, M., Lee, C.C.R., Masuda, C., Wanibuchi, H., Yoshimura, R., Wada, S., Yamamoto, K., Kishimoto, T., Fukushima, S.: p53 status in multiple human urothelial cancers: assessment for clonality by the yeast p53 functional assay in combination with p53 immunohistochemistry., *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 181-189, 2000.

Taniyama, T., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Yano, Y., Otani, S., Nishizawa, Y., Morii, H., Fukushima, S.: Chemopreventive effect of 24R,25-dihydroxyvitamin D3 in N,N'-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis., *Carcinogenesis* 21: 173-178, 2000.

Salim, E.I., Wanibuchi, H., Morimura, K., Kim, S., Yano, Y., Yamamoto, S., Fukushima, S.: Inhibitory effects of 1,3-diaminopropane, an ornithine decarboxylase inhibitor, on rat two-stage urinary bladder carcinogenesis initiated by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine., *Carcinogenesis* 21: 195-203, 2000.

Li, W., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Wei, M., Yamamoto, S., Nishino, H., Fukushima, S.: Inhibition by ginseng of 1,2-dimethylhydrazine induction of aberrant crypt foci in the rat colon., *Nutrition and Cancer* 36: 66-73, 2000.

Takaba, K., Saeki, K., Suzuki, K., Wanibuchi, H., Fukushima, S.: Significant overexpression of metallothionein and cyclin D1 and apoptosis in the early process of rat urinary bladder carcinogenesis induced by treatment with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine or sodium L-ascorbate., *Carcinogenesis* 21: 691-700, 2000.

Romanenko, A., Morimura, K., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Kinoshita, A., Kaneko, M., Vozianov, A., Fukushima, S.: Increased oxidative stress with gene alteration in urinary bladder urothelium after the chernobyl accident., *Int. J. Cancer* 86: 790-798, 2000.

Morikawa, T., Wanibuchi, H., Morimura, K., Ogawa, M., Fukushima, S.: Promotion of skin carcinogenesis by dimethylarsinic acid in keratin (K6) / ODC transgenic mice., *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 579-581, 2000.

Kitano, M., Wanibuchi, H., Kikuzaki, H., Nakatani, N., Imaoka, S., Funae, Y., Hayashi, S., Fukushima, S. :

Chemopreventive effects of Coumapherine from pepper on the initiation stage of chemical hepatocarcinogenesis in the rat., *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 674-680, 2000.

Masuda, C., Wanibuchi, H., Otori, K., Wei, M., Yamamoto, S., Hiroi, T., Imaoka, S., Funae, Y., Fukushima, S.: Presence of a no-observed effect level for enhancing effects of development of the α -isomer of benzene hexachloride (α -BHC) on diethylnitrosamine-initiated hepatic foci in rats., *Cancer Lett.* 163: 179-185, 2001.

Y. Ishimi, N.Arai, X.Wang, J.Wu, K. Umegaki, C.Miyaura and S.Ikegami : Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 274:697-701, 2000

Takashima Y., Tsutsumi M., Sasaki Y., Tsujiuchi T., Kusuoka O., Konishi Y. Lack of bisphenol A in maternal rats or treatment on response of their offspring to N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine. *J.Toxicol. Pathol.* 13, 2001 in press.

Narita. M, Aoki. T and Suzuki. T Molecular evidence for the involvement of NR2B subunit containing N-methyl-D-aspartate receptors in the development of morphine-induced place preference. *Neuroscience* vol. 101 No. 3, pp.601-606, 2000

成田 年、青木 健、鈴木 勉 モルヒネ依存およびその報酬効果の形成機序—NMDA 受容体サブユニットの関与— *日薬理誌* 117, 13-19, 2001
成田 年、鈴木 勉 モルヒネ依存の分子機構 *脳の科学* 22, pp.417-425, 2000

成田 年、尾崎 覚、鈴木 勉 精神依存と耐性の分子機構：オピオイドを中心に *脳* 21 vol.4 No.1, pp.9-18, 2001

- Narita. M, Funada. M and Suzuki. T Regulations of opioid dependence by opioid receptor types. *Pharmacology and Therapeutics* 89, pp.1-15, 2000
- Hashizume T., Imaoka S., Hiroi T., Terauchi Y., Fujii T., Miyazaki H., Kamataki T., Funae Y.: cDNA cloning and expression of a novel cytochrome P450 (cyp4f12) from human small intestine., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 1135-41, 2001.
- Imaoka S., Yoneda Y., Sugimoto T., Hiroi T., Yamamoto K., Nakatani T., Funae Y.: CYP4B1 is a possible risk factor for bladder cancer in humans., *Biochem. Biophys. Res., Commun.* 277: 776-80, 2000.
- Nakamoto T., Hase I., Imaoka S., Hiroi T., Oda Y., Asada A., Funae Y.: Quantitative RT-PCR for CYP3A4 mRNA in human peripheral lymphocytes: induction of CYP3A4 in lymphocytes and in liver by rifampicin., *Pharmacogenetics* 10:571-5, 2000.
- Hase I., Imaoka S., Oda Y., Hiroi T., Nakamoto T., Asada A., Funae Y.: Area under the plasma concentration-time curve of inorganic fluoride following sevoflurane anesthesia correlates with CYP2E1 mRNA level in mononuclear cells., *Anesthesiology* 92:1661-6, 2000.
- Shiga K, Fushiki S. Proliferative capacity persists most tenaciously in the murine proximal rostral migratory stream. *Acta Histochem Cytochem* 33: 275-9, 2000.
- Tsutsumi Y, Fushiki S. Comparison of cell kinetics between the boundary and the interboundary areas during hindbrain segmentation in the chick embryo. *Acta Histochem Cytochem* 33: 141-7, 2000.
- Morimoto S, Sasaki S, Miki S, Kawa T, Nakamura K, Itoh H, Nakata T, Takeda K, Nakagawa M, Fushiki S. Nitric oxide is an excitatory modulator in the rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Hypertens* 13: 1125-34, 2000.
- Saiwaki T, Shiga K, Fukuyama R, Tsutsumi Y, Fushiki S. A unique junctional palindromic sequence in mitochondrial DNA from a patient with progressive external ophthalmoplegia. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 53: 333-5, 2000.
- Fukuyama R, Mizuno T, Mori S, Yanagisawa K, Nakajima K, Fushiki S. Age-dependent decline in the apolipoprotein E level in cerebrospinal fluid from control subjects and its increase in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *Eur Neurol* 43: 161-9, 2000.
- Kitaya K, Yasuda J, Yagi I, Tada Y, Fushiki S, Honjo H. IL-15 expression at human endometrium and decidua. *Biol Reprod* 63:683-7, 2000.
- Tomiyasu K, Oda Y, Nomura M, Satoh E, Fushiki S, Imanishi J, Kondo M, Mazda O. Direct intracardiac transfer of beta-adrenergic receptor gene augments cardiac output in cardiomyopathic hamsters *Gene Ther* 7: 2087-93, 2000.
- Fukuyama R, Mizuno T, Mori S, Nakajima K, Fushiki S, Yanagisawa K. Age-dependent change in the levels of Abeta40 and Abeta42 in cerebrospinal fluid from control subjects, and a decrease in the ratio of Abeta2 to Abeta40 level in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients. *Eur Neurol* 43: 155-60, 2000.
- Tamai M, Okajima S, Fushiki S, Hirasawa Y. Quantitative analysis of neural distribution in human coracoacromial ligaments. *Clin Orthop* 373:125-34, 2000.
- Fukuyama R, Ohta M, Ohta K, Saiwaki T, Fushiki S, Awaya A. A synthesized pyrimidine compound, MS-818, promotes walking function recovery from crush injury of the sciatic nerve through its indirect stimulation of Schwann cells. *Restor Neurol Neurosci* 17: 9-16, 2000.

Wei YP, Kita M, Shinmura K, Yan XQ, Fukuyama R, Fushiki S, Imanishi J. Expression of IFN-gamma in cerebrovascular endothelial cells from aged mice. *J Interferon Cytokine Res* 20:403-9, 2000.

Arai Y, Kubo T, Fushiki S, Mazda O, Nakai H, Iwaki Y, Imanishi J, Hirasawa Y. Gene delivery to human chondrocytes by an adeno associated virus vector. *J Rheumatol* 27: 979-82, 2000.

Inaba M, Fushiki S, Yaoi T, Iwata T, Kamoi K, Okihara K, Ukimura O, Kawauchi A, Miyashita H, Kojima M, Miki T. Changes in extracellular matrix components of bladder detrusor in relation to bladder hypertrophy and compliance in patients with benign prostatic hyperplasia. *Acta Histochem Cytochem* 33: 131-9, 2000.

Matsushita H, Takeuchi Y, Kosaka K, Fushiki S, Kawata M, Sawada T. Changes in nitric oxide synthase-containing neurons in the brain of thiamine-deficient mice. *Acta Histochemica Cytochem* 33: 67-72, 2000.

佐々木征行、橋本俊顕、島田司巳、飯沼一字、伏木信次、高野知行、岡 次、近藤郁子、三池輝久、アンケートによる片側巨脳症全国調査. *脳と発達* 32: 255-60, 2000.

2. 学会発表

白井智之、実験前立腺癌におけるホルモンの働き、第59回日本癌学会総会、2000年10月、横浜。

葛谷和也、今井田克己、朝元誠人、二口 充、小木曾 正、白井智之、内因性性ホルモンの肝発がんにおよぼす作用：ラット肝中期発がん性試験法における雌雄ラット性腺摘出の影響、2000年10月、横浜。

朝元誠人、外岩戸尚美、曹 永晩、高橋 智、二

口 充、今井田克己、白井智之、前立腺癌トランスジェニックラットモデルーテストステロン投与および去勢の影響、2000年10月、横浜。

朝元誠人、外岩戸尚美、高橋 智、曹 永晩、池田佳久、今井田克己、白井智之、前立腺癌トランスジェニックラットモデルーテストステロン投与および去勢の影響、第16回日本毒性病理学会、2000年1月、岐阜。

加藤浩司、今井田克己、二口 充、小木曾 正、崔 林、加藤俊男、白井智之、DMAB ラット前立腺発がんにおける testosterone と estrogen による発がん修飾作用の検討：用量効果、第16回日本毒性病理学会、2000年1月、岐阜。

葛谷和也、朝元誠人、二口 充、今井田克己、杉浦 諭、小川久美子、白井智之、イソフラボンを豊富に含む大豆胚芽熱水抽出物の多臓器発がん修飾効果、第17回日本毒性病理学会、2001年1月、淡路。

吉野裕子、河部真弓、市原敏夫、宮下嘉代子、佐野真士、萩原昭裕、今井田克己、白井智之、ビスフェノール A の妊娠期・授乳期曝露による児の雄性生殖器への影響、第17回日本毒性病理学会、2001年1月、淡路。

Yoshida, M., Katsuda, S., Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa A.: Lasting effects of neonatal exposure to p-tert octylphenol on the reproductive tract in female and male rats. The 2nd Congress of Asian Society of Toxicology, 2000, August, Cheju, Korea.

高橋正一、吉田緑、安藤進、前川昭彦: ENNG 誘発マウス子宮発がんにおよぼすタモキシフェンの

検討、第 59 回日本癌学会総会、2000 年 10 月、横浜。

勝田真一、吉田緑、安藤進、高橋正一、前川昭彦:高用量 p-tert octylphenol の成熟期または新生児期曝露によるラット子宮内膜腺癌修飾作用、第 59 回日本癌学会総会、2000 年 10 月、横浜。

吉田緑、竹中亜希子、勝田真一、前川昭彦:ラットの発育期子宮内膜におけるエストロゲンレセプターの発現および細胞増殖活性に与える新生児期オクチルフェノール大量曝露の影響について、第 17 回日本毒性病理学会、2001 年 1 月、兵庫。

福島昭治、がん原因子のリスク評価、第 59 回日本癌学会総会、2000 年 10 月、横浜。

須方督夫、尾崎圭介、宇和川賢、小川元女、西川隆之、鰐淵英機、奥野泰由、福島昭治、環境発がん物質 DDT の低濃度域における肝発がん性の検討、第 59 回日本癌学会総会、2000 年 10 月、横浜。

石見佳子、荒井直子、梅垣敬三、王新祥、呉堅、宮浦千里、武田明治、池上幸江、卵巣摘出骨粗鬆症モデル動物における大豆イソフラボン大量投与の生体影響、第 45 回日本栄養食糧学会、2000 年 5 月、松山

東泉裕子、中嶋洋子、石見佳子、池上幸江、母親ラットからの胎児・乳児へのイソフラボン移行とその生体影響、第 45 回日本栄養食糧学会、2000 年 5 月、松山。

鈴木 勉、水尾 圭祐、成田 年、妊娠期および授乳期にビスフェノール A に暴露されたマウス

の行動変化、第 74 回日本薬理学会年会、2001 年 3 月、横浜市。

松江 良彦、廣井豊子、ビスフェノールの脳内アミンに対する作用、第 74 回日本薬理学会年会シンポジウム、2001 年 3 月、横浜。

伏木信次、脳神経系の形成・成熟に及ぼすビスフェノール A の影響に関する病理学的解析、シンポジウム「内分泌かく乱化学物質の中樞神経系への影響」、第 74 回日本薬理学会年会、2001 年 3 月、横浜市。

H. 知的所有権の取得状況

なし

雄生殖器系に及ぼす影響

分担研究者 白井 智之 名古屋市立大学医学部教授

研究要旨

本研究では内分泌かく乱作用が疑われている女性ホルモン様作用を持つ bisphenol A の雄性生殖器とくに前立腺の形態発生、分化および腫瘍発生に対する影響をみることを目的とし、感受性の高い胎児・乳児期での影響をみるために、F344 ラットの妊娠中および授乳期に投与した。母獣動物の妊娠期間、出産児数および死産児数のいずれにおいても bisphenol A による影響はなく、生まれた児の前立腺にも著変はなく、影響はないものと結論づけた。平成 11 年度で観察された高濃度での精子数の減少は今回観察されなかった。現在 bisphenol A を 0、0.05、7.5、30 および 120 mg/kg/day で投与したラットに前立腺発がん物質である DMAB を生後 5 週令から 20 週間にわたって投与する発がん実験を実施中で、65 週令で実験終了の予定である。nonylphenol の前立腺癌発生に対する作用をみる実験についても同様の方法で 0、0.1、10、100 mg/kg の用量で開始したところである。

A. 研究の目的

近年、環境中に存在する内分泌かく乱化学物質が、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、ヒトにおいても女性生殖器、男性生殖器、甲状腺、視床下部・下垂体等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作用が指摘されている化学物質の胎児期、乳児期曝露により、出生児が成長したのちに、学習・精神障害、発がん、生殖機能の異常などが発現する可能性がある。本研究では内分泌かく乱作用が疑われている女性ホルモン様作用を持つ bisphenol A の雄性生殖器とくに前

立腺の形態発生、分化および腫瘍発生に対する影響を感受性の高い胎児・乳児期のラットに投与して、実験的に追究することにある。

B. 研究方法

妊娠を確認した雌 F344 ラットに妊娠 0 日から離乳まで bisphenol AA を 0、0.05、7.5、30 および 120 mg/kg/day の投与量で毎日強制経口投与した。児動物は生後 22 日に離乳させ、離乳 10 週後に一部の動物を屠殺剖検し、精子検査を実施した。また発がん実験では bisphenol A を投与したラットに前立腺発がん物質の DMAB を 5 週令から 20 週間にわたって投与し

た。現在 38 週の時点を経過中であり、あと 22 週間経過観察を行う予定である。nonylphenol の実験も同様の方法で 0、0.1、10、100 mg/kg の用量で開始した。

(倫理面への配慮)

動物愛護に則ったプロトコールに従って行った。

C. 研究結果

妊娠および授乳期間中の母獣動物の体重および飼料摂取量に有意な差は認められなかった。児動物の離乳後の体重変化で有意な差はなかった。母獣動物の妊娠期間、出産児数および死産児数のいずれにおいても bisphenol A による影響は観察されなかった。bisphenol A 曝露途中屠殺のラットには平成 11 年度で観察された高濃度での精子数の減少は今回観察されず、また精子形態、精子運動にも異常は認められなかった。発がん実験では DMAB の投与によって体重減少が観察された。発がん実験のラットにおける体重増加には各群間に差は無く、順調に推移している。

D. 考察

昨年の子備試験で認められた高濃度 bisphenol A の曝露群で精子数減少は本年度発がん性試験に付随して行った研究では認められず、昨年に認められた精子異常は児ラットの群分けの際偏りがあったことによるものと推察された。現在発がん実験を継続中であり、あと 5 ヶ月で終了の予定である。nonylphenol の実験はあと一年必要である。

E. 結論

妊娠期及び授乳期の母ラットに 0、0.05、7.5、30 および 120 mg/kg/day の投与量で毎日 bisphenol A を強制経口投与し、間接的に曝露された児動物には精子の異常は起きないことが判明し、さらに母ラットにおける妊娠率、妊娠期間、出産率にも影響ないことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ogawa, K., Kimoto, N., Asamoto, M., Nakanishi, M., Takahashi, S., Shirai, T.: Aberrant expression of p27^{kip1} is associated with malignant transformation of the rat urinary bladder epithelium. *Carcinogenesis*, 21: 117-121, 2000.

Cui, L., Takahashi, S., Tada, M., Kato, K., Yamada, Y., Kohri, K., Shirai, T.: Immunohistochemical detection of carcinogen-DNA adducts in normal human prostate tissues transplanted into the subcutis of athymic nude mice: Results with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) and relation to cytochrome P450s and N-acetyltransferase activity. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 52-58, 2000.

Imaida, K., Ogawa, K., Takahashi, S., Ito, T., Yamaguchi, T., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Tanaka, K., Ito, N., Shirai, T.: Delay of DNA-adduct repair and severe toxicity in xeroderma pigmentosum group A gene (XPA) deficient mice treated with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo

[4,5-*b*] pyridine (PhIP). *Cancer Lett.*, 150: 63-69, 2000.

Yaono, M., Tamano, S., Mori, T., Kato, K., Imaida, K., Asamoto, M., Shirai, T.: Lobe specific effects of testosterone and estrogen on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced rat prostate carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 150: 33-40, 2000.

Shirai, T., Imaida, K., Ito, N. Prostate. In: M. Nagao, T. Sugimura (eds.), *Food Born Carcinogenesis*, pp. 270-274. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, Ltd, 2000.

Imaida, K., Shirai, T., Ito, N. Degenerative Changes. In: M. Nagao, T. Sugimura (eds.), *Food Born Carcinogenesis*, pp. 275-284. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, Ltd, 2000.

Ito, N., Imaida, K., Asamoto, M., Shirai, T.: Early detection of carcinogenic substances and modifiers in rats. *Mutation Res.*, 462: 209-217, 2000.

Shirai, T., Takahashi, S., Cui, L., Futakuchi, M., Kato, K., Tamano, S., Imaida, K.: Experimental prostate carcinogenesis—rodent models. *Mutation Res.*, 462: 219-226, 2000.

Hirose, M., Yamaguchi, T., Cui, L., Kimoto, N., Futakuchi, M., Kono, T., Nishibe, S., Shirai, T.: Effects of arctiin on PhIP-induced mammary, colon and pancreatic carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats and MeIQx-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Lett.*, 155: 79-88, 2000.

Kato, K., Takahashi, S., Cui, L., Toda, T., Suzuki, S., Futakuchi, M., Sugiura, S., Shirai, T.:

Suppressive effects of dietary genistin and daidzin on rat prostate carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 786-791, 2000.

Akaza, H., Tsukamoto, S., Morita, T., Yamauchi, A., Onozawa, M., Shimazui, T., Ideyama, Y., Shirai, T.: Promoting effects of antiandrogenic agents on rat ventral prostate carcinogenesis induced by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB). *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 3: 115-119, 2000.

Cohen, S. M., Shirai, T., Steineck, G.: Epidemiology and etiology of premalignant and malignant urothelial changes. *Scand J. Urol. Nephrol., Suppl.* 205: 105-115, 2000.

Kawabe, M., Cui, L., Kimoto, N., Sano, M., Hirose, M., Shirai, T.: Modifying effects of propolis on MeIQx promotion of rat hepatocarcinogenesis and in a female rat two-stage carcinogenesis model after multiple carcinogen initiation. *Nutrition and Cancer*, 37: 179-186, 2000.

Hokaiwado, N., Asamoto, M., Cho, Y.-M., Imaida, K., Shirai, T.: Frequent *c-Ha-ras* gene mutations in rat mammary carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Cancer Lett.*, 163: 187-190, 2001.

Imaida, K., Tamano, S., Kato, K., Ikeda, Y., Asamoto, M., Takahashi, S., Nir, Z., Murakoshi, M., Nishino, H., Shirai, T.: Lack of chemopreventive effects of lycopene and curcumin on experimental rat prostate carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 22: 467-472, 2001.

2. 学会発表

白井智之、実験前立腺癌におけるホルモンの働き、第59回日本癌学会総会、2000年10月、横

浜。

葛谷和也、今井田克己、朝元誠人、二口 充、
小木曾 正、白井智之、内因性性ホルモンの肝
発がんに及ぼす作用：ラット肝中期発癌性試験
法における雌雄ラット性腺摘出の影響、2000 年
10 月、横浜。

朝元誠人、外岩戸尚美、曹 永晩、高橋 智、
二口 充、今井田克己、白井智之、前立腺癌ト
ランスジェニックラットモデルーテストステロ
ン投与および去勢の影響、2000 年 10 月、横浜。

朝元誠人、外岩戸尚美、高橋 智、曹 永晩、
池田佳久、今井田克己、白井智之、前立腺癌ト
ランスジェニックラットモデルーテストステロ
ン投与および去勢の影響、第 16 回日本毒性病
理学会、2000 年 1 月、岐阜。

加藤浩司、今井田克己、二口 充、小木曾 正、
崔 林、加藤俊男、白井智之、DMAB ラット前
立腺発癌における testosterone と estrogen による
発癌修飾作用の検討：用量効果、第 16 回日本
毒性病理学会、2000 年 1 月、岐阜。

葛谷和也、朝元誠人、二口 充、今井田克己、
杉浦 諭、小川久美子、白井智之、イソフラボ
ンを豊富に含む大豆胚芽熱水抽出物の多臓器発
癌修飾効果、第 17 回日本毒性病理学会、2001
年 1 月、淡路。

吉野裕子、河部真弓、市原敏夫、宮下嘉代子、
佐野真士、萩原昭裕、今井田克己、白井智之、
ビスフェノール A の妊娠期・授乳期曝露による

児の雄性生殖器への影響、第 17 回日本毒性病
理学会、2001 年 1 月、淡路。

H. 知的所有権の取得状況
なし



animals: F344 female rats and male rats, male offsprings

- ↓ mating
- ▨ Bisphenol A in 0.5 % CMC, ig, at 0.05, 7.5, 30, 120 mg/kg/day
- ▨ DMAB 50 mg/kg bw biweekly sc

Experimental Design