

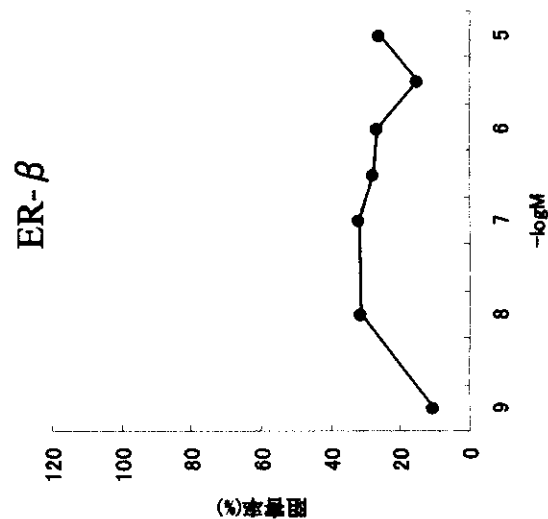
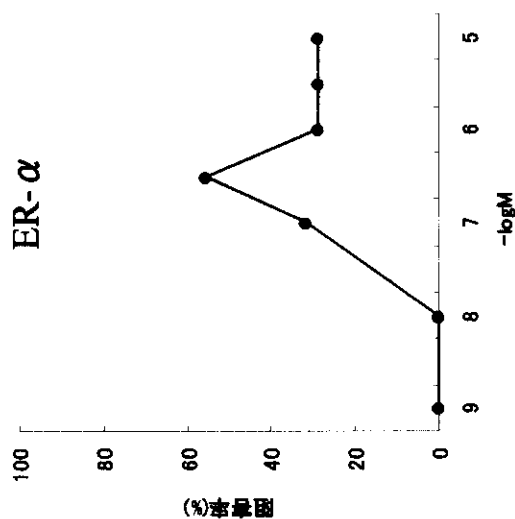


图3-2 Competition binding assay (BBP)

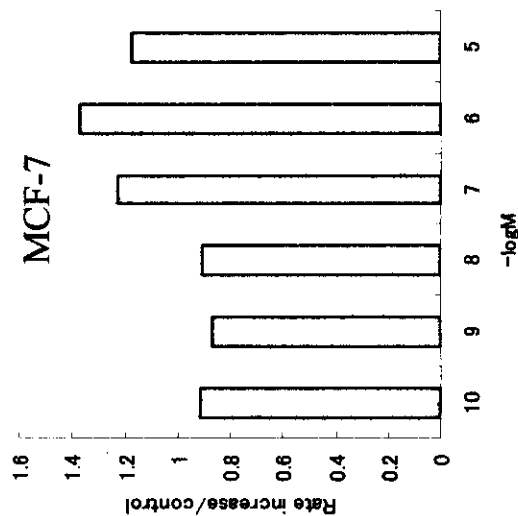
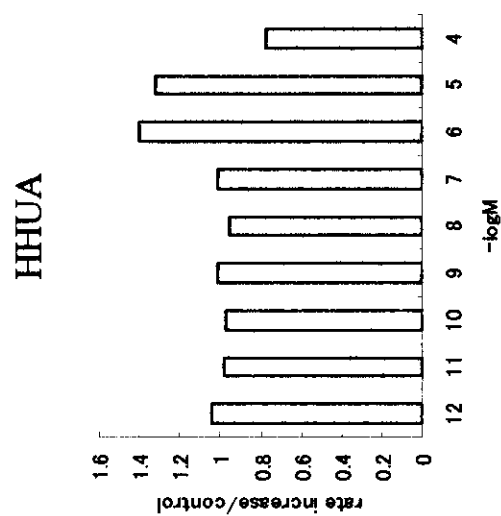


图3-1 E-screen assay (BBP)

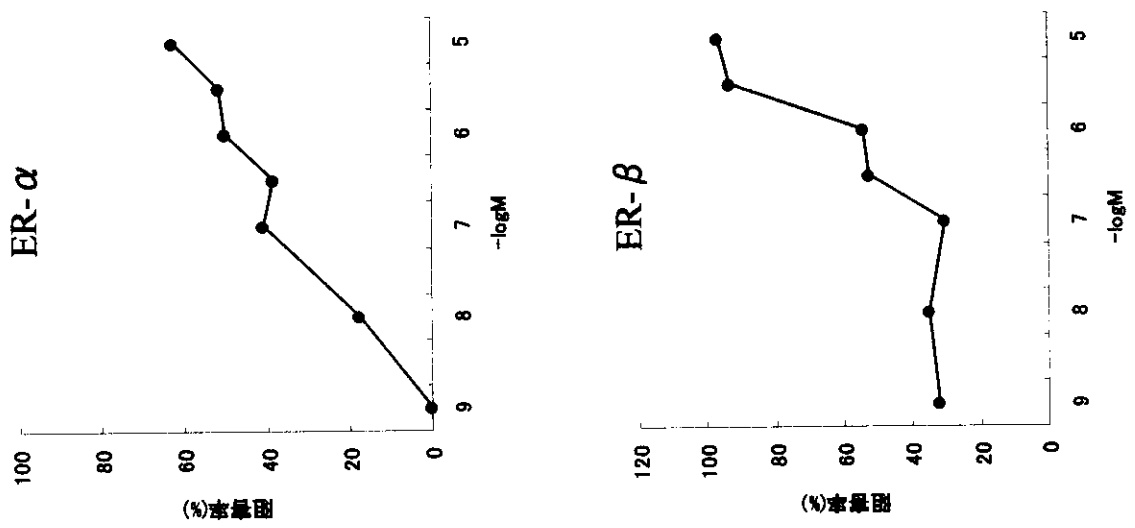


图4-2 Competition binding assay (Bisphenol-A)

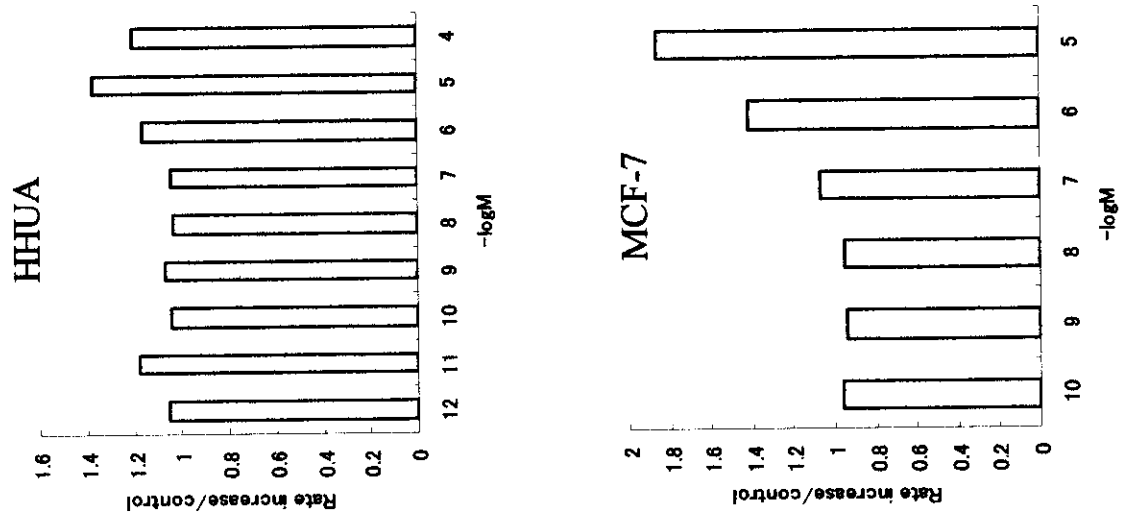


图4-1 E-screen assay (Bisphenol-A)

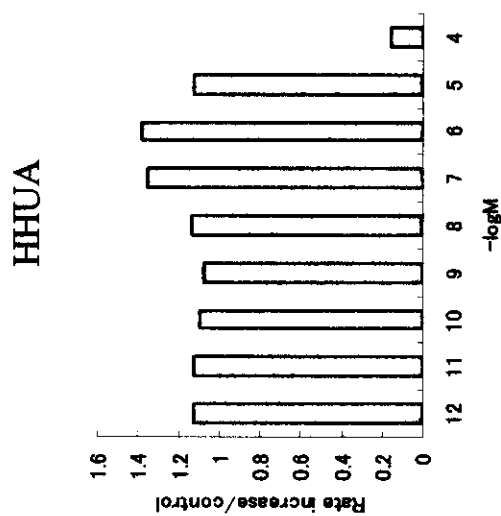


图5-1 E-screen assay (p-Nonylphenol)

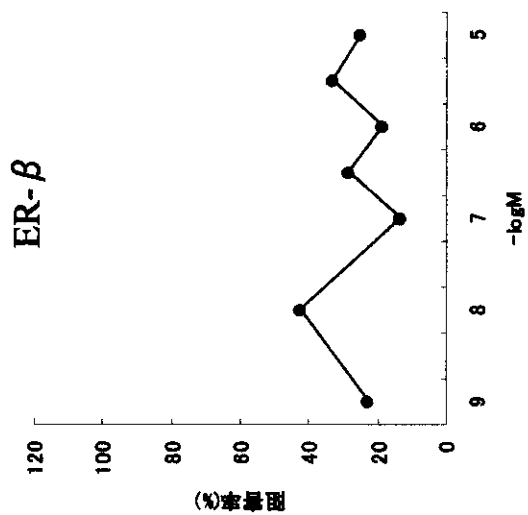
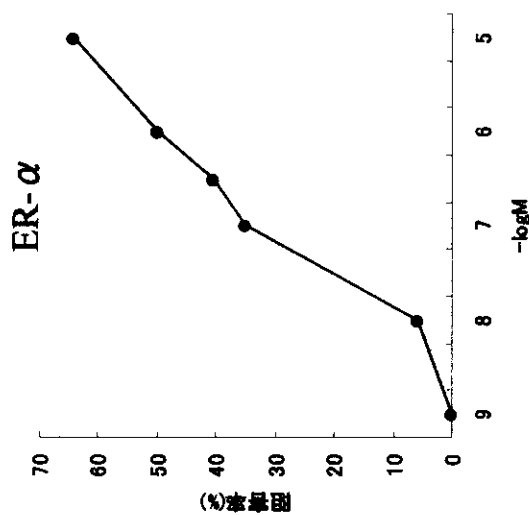


图5-2 Competition binding assay (p-Nonylphenol)

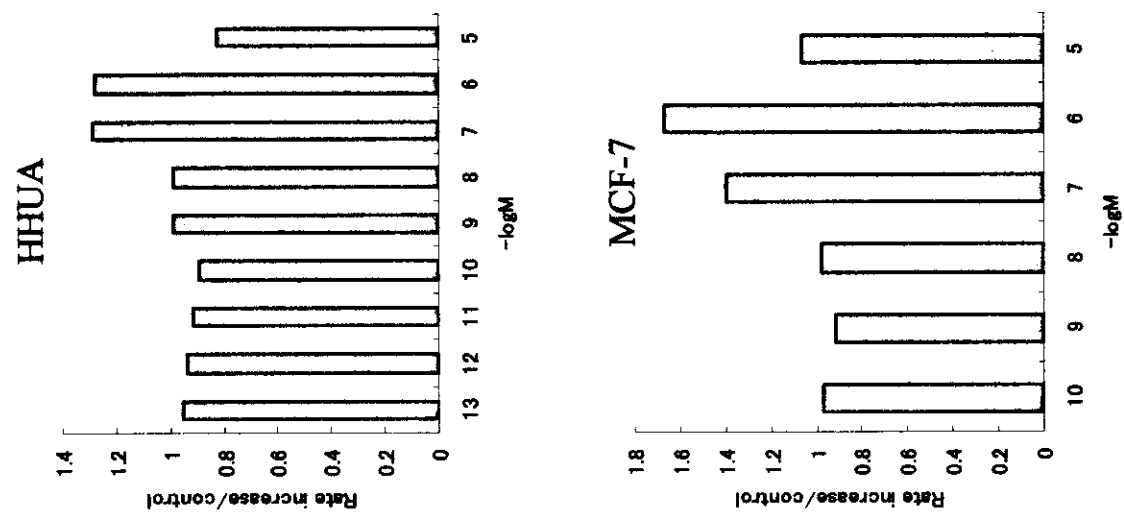


图6-1 E-screen assay (Dizein)

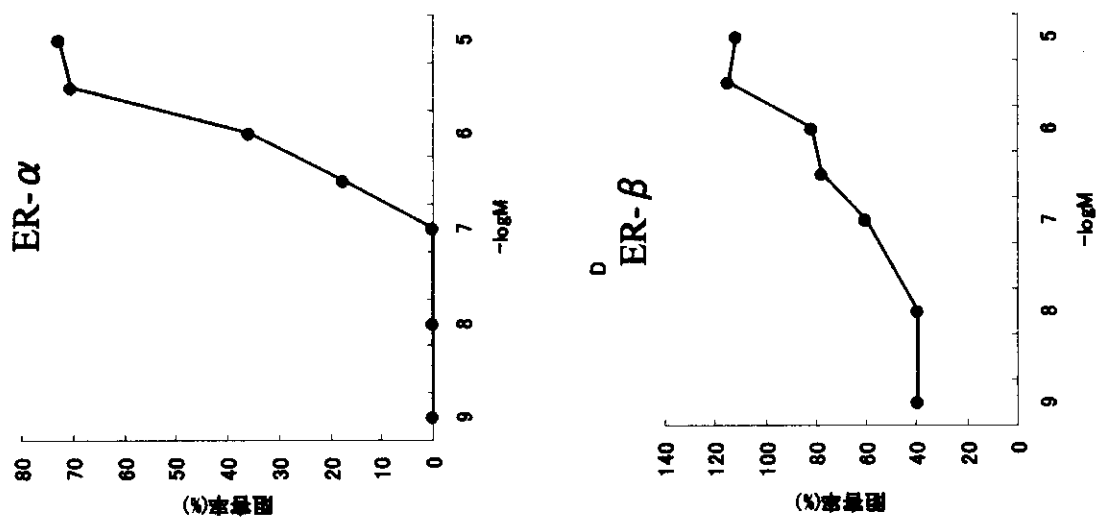


图6-2 Competition binding assay (Dizein)

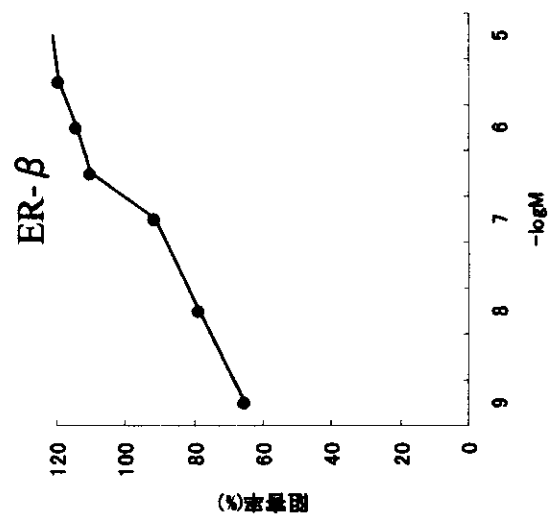
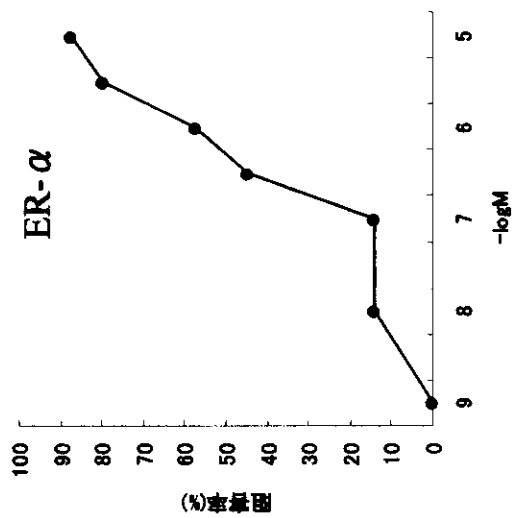


图7-2 Competition binding assay (Genistein)

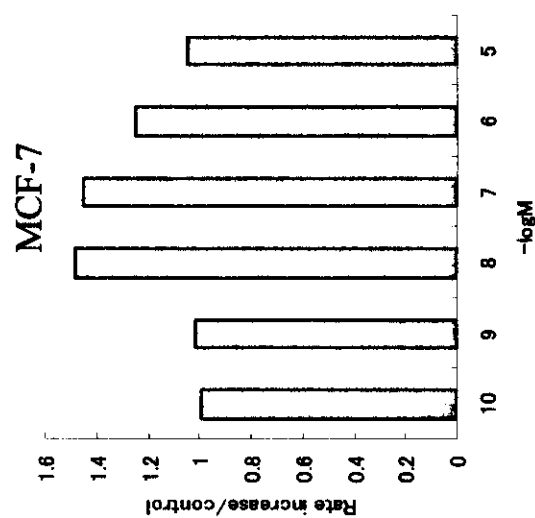
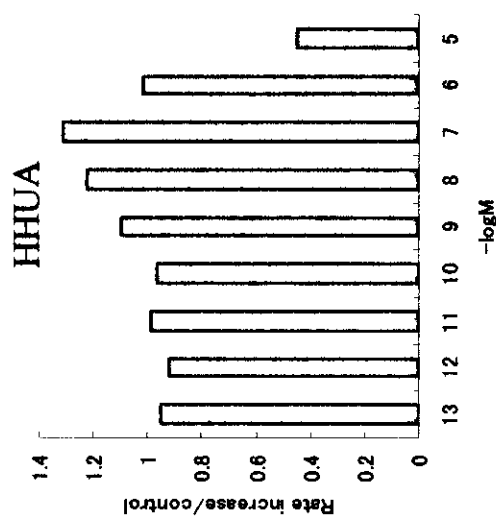


图7-1 E-screen assay (Genistein)

平成 12 年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料(さい帯血等)分析法の開発と
その実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

ヒト乳癌細胞に対する植物エストロゲンの影響

主任研究者	牧野恒久	東海大学
分担研究者	中澤裕之	星薬科大学
研究協力者	山崎聖美	国立公衆衛生院

研究要旨

植物エストロゲンは大豆やもやし、ホップ等に存在する天然由来物質であり、構造がエストラジオールに類似していることから、エストロゲン様物質であるとして注目されている。一方、大豆食品を多く摂取しているアジア人には、乳癌や前立腺癌等のホルモン依存性癌発生率が低いことから、抗エストロゲン様物質であるとも言われているが、詳細な研究はなされていない。そこで、エストロゲン様作用を検出する目的で、ヒト乳癌細胞を用いた細胞増殖試験により、植物エストロゲン及び植物エストロゲンがその他のエストロゲン様物質と共存した条件下での乳癌細胞に対する影響について検討した。

A. 研究目的

植物エストロゲンは大豆やもやし、ホップ等天然に存在し、内分泌かく乱作用が疑われている物質の1つである。構造がエストラジオールに類似していることより、エストロゲン様作用があると言われている。実際、内分泌かく乱作用スクリーニング法の1つである受容体結合試験において、植物エストロゲンである Genistein, Daidzein はエストロゲンレセプター α 及び β に結合能を有する。また、1940年代にオーストラリアで起きたクローバー病は、植物エストロゲンであるクメストロールを含むクローバーを多量に摂取した羊に死

産や奇形が発生したというものであり植物エストロゲンのエストロゲン様作用による結果であると考えられている。一方、大豆食品を多く摂取するアジア人の血中植物エストロゲン濃度は Genistein:158.6ng/mL, Daidzein:82.5 ng/mL と、欧米人に比べ約10倍高い。このことがアジア人において乳癌や前立腺癌等、ホルモン依存性癌発生率が低い要因であると指摘されている。よって、植物エストロゲンにおける抗エストロゲン様作用の可能性も示唆されているが、詳細な研究はなされていない。そこで、植物エストロゲンのエストロゲン・抗エストロゲン様作用を検出す

る目的で、乳癌細胞を用いた細胞増殖試験により、植物エストロゲン単独及び植物エストロゲンがその他のエストロゲン様物質と共存した条件下での乳癌細胞に対する影響について検討した。

B. 研究方法

B・1 試薬

Genistein(生化学用), Daidzein は和光純薬社製を用いた。Fujiflavone P40 はフジッコ株式会社より購入した。Bisphenol A は関東化学社製, ICI 182, 780 は TOCRIS 社製を使用した。試薬の調製に用いた溶媒は蛍光分析用のジメチルスルホオキシドで、同仁化学研究所製を用いた。

B・2 試料調製

Genistein 及び Daidzein は DMSO に溶解して 10^{-1}M とし、アッセイに用いる培養液で希釈することにより、試料溶液を $10^{-10}\sim 10^{-3}\text{M}$ に調製した。Bisphenol A 及び ICI 182, 780 は DMSO に溶解して 10^{-1}M とし、培養液で希釈することにより、それぞれ試料溶液を 10^{-9}M , 10^{-5}M 及び 10^{-5}M , 10^{-4}M に調製した。Fujiflavone P40 は大豆抽出物であり、全体の 40% が総イソフラボン量に相当するため、Genistein・Daidzein 濃度に換算し、DMSO に溶解させ、培養液で希釈することにより、試料溶液を $10^{-10}\sim 10^{-3}\text{M}$ に調製した。各々の試料溶液は細胞増殖試験において添加する際、10 倍希釈される。また、最終 DMSO 濃度は細胞増殖に影響を及ぼさない様、0.1% 以下となるように調製した。

B・3 細胞培養

T47D ヒト乳癌細胞は東京大学・久保田俊一郎先生から供与を受けた。T47D 細胞はエストロゲンレセプター α 及び β を共に発現している。細胞は通常、10% 牛胎児血清, 1% L-glutamine を添加したダルベッコ変法イーグル培地(日水製薬社製)で培養し、5% CO_2 -95% Air, 37°C の条件下で継代培養した。

B・4 細胞増殖試験

- ① サブコンフルエントの細胞をトリプシン処理により剥離する。
- ② 細胞数を測定し、5000cells/100 μL になるようにダルベッコ変法イーグル培地で希釈する。
- ③ 96 穴平底プレート (COSTAR 社製) に②を 100 μL ずつまく。
- ④ 5% CO_2 -95% Air, 37°C にて 24 時間培養し、細胞を底面に付着させる。
- ⑤ ダルベッコ変法イーグル培地を牛胎児血清の代わりに低蛋白質溶液を添加したフェノールレッド不含のダルベッコ改変イーグル培地 (SIGMA 社製) に交換する。
- ⑥ 試料溶液を添加する。
- ⑦ 5% CO_2 -95% Air, 37°C にて 96 時間培養する。
- ⑧ 細胞の増殖は産生 NADH 量を指標とする Cell counting kit (和光純薬社製) により測定する。

C. 研究結果

C・1 T47D 細胞に対する Bisphenol A, Genistein 及び Daidzein の影響

内分泌かく乱作用の疑われている Bisphenol A は 10^{-10}M 及び 10^{-6}M の濃度

において、T47D 細胞の増殖を促進した。この細胞増殖促進作用はエストロゲンレセプターアンタゴニストである ICI 182,780 の 10^{-6} M の濃度で阻害された。また、 10^{-11} ~ 10^{-5} M の Genistein, 10^{-11} ~ 10^{-4} M の Daidzein は T47D 細胞の増殖を促進した。この細胞増殖促進作用は Genistein は 10^{-5} M の ICI 182,780 により、Daidzein は 10^{-6} M の ICI 182,780 により阻害された (Fig. 1, 2)。

C・2 T47D 細胞に対する Fujiflavone P40 の影響

我々が食品より植物エストロゲンを摂取することを想定し、大豆抽出物であり、Genistein, Daidzein, Glycitein 混合物である Fujiflavone P40 の T47D 細胞に対する影響を検討したところ、 10^{-5} M, 10^{-4} M と高濃度では T47D 細胞の増殖を促進する作用が見られたが、 10^{-11} ~ 10^{-6} M の濃度において T47D 細胞の増殖を促進する作用は見られなかった (Fig. 3)。

C・3 Bisphenol A 共存下での T47D 細胞に対する Genistein, Daidzein, Fujiflavone P40 の影響

我々の日常における複合暴露を想定し、Bisphenol A 共存下における植物エストロゲンの T47D 細胞に対する影響を検討した。 10^{-6} M の Bisphenol A による T47D 細胞の増殖を 100%とし、 10^{-11} ~ 10^{-4} M の Genistein 及び Daidzein を共存させたところ、 10^{-11} ~ 10^{-8} M と低濃度の Genistein, Daidzein においては T47D 細胞の増殖を促進する傾向が見られたが、 10^{-7} ~ 10^{-4} M と高濃度においては T47D 細胞の増殖を抑制した (Fig. 4)。

加えて、Bisphenol A 共存下での T47D 細胞に対する Fujiflavone P40 の影響を検討した。 10^{-10} M 及び 10^{-6} M の Bisphenol A による T47D 細胞の増殖を 100%とし、 10^{-11} ~ 10^{-4} M の Fujiflavone P40 を共存させたところ、Fujiflavone P40 は Bisphenol A による T47D 細胞の増殖を抑制する傾向が観察された (Fig. 5)。

D. 考察

植物エストロゲンである Genistein, Daidzein は単独で、T47D ヒト乳癌細胞の増殖を促進した。また、この増殖促進作用はエストロゲンレセプターアンタゴニストである ICI 182,780 により阻害され、エストロゲンレセプターを介した反応であることが示唆された。我々の食品からの摂取に近い、大豆抽出物である Fujiflavone P40 (Genistein+Daidzein+Glycitein の混合系)は T47D 細胞の増殖作用を促進せず、GenisteinあるいはDaidzeinのみで見られた T47D 細胞増殖促進作用の相加あるいは相乗作用はないことが示唆された。また、我々の日常における複合暴露を想定した Bisphenol A 共存下における Genistein, Daidzein は、濃度によって Bisphenol A による T47D 細胞の増殖を促進も抑制も示し、植物エストロゲンが濃度によってエストロゲン様作用あるいは抗エストロゲン様作用と異なった挙動を示すことが示唆された。Bisphenol A 共存下における Fujiflavone P40 は Bisphenol A による T47D 細胞の増殖を抑制する傾向が見ら

れ, Bisphenol A 共存下で植物エストロゲンの混合物は抗エストロゲン様作用を示すことが示唆された.

E. 結論

T47D ヒト乳癌細胞を用いた細胞増殖試験により, 植物エストロゲンのエストロゲン・抗エストロゲン様作用を検討したところ, Genistein, Daidzein は T47D 細胞の増殖を促進し, その作用はエストロゲンレセプターを介した反応であることが示唆された. また, 植物エストロゲンの混合系及び複合暴露において, T47D 細胞の増殖作用に対し, 相加あるいは相乗作用が見られなかった. 更に, 植物エストロゲンの濃度あるいは混合系及び複合暴露において, エストロゲン様作用・抗エストロゲン様作用の両作用が見られたことから, 今後, ヒト健康影響を考える上で, これまでの標準品による評価に加え, 混合系での評価, 作用機所の解明及び更なる詳細な研究が必要であると考ええる.

F. 研究業績

1. EFFECT OF ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS ON LYMPHOCYTE RESPONSES

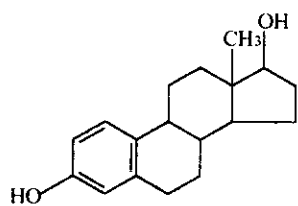
Tomomi Yamazaki, Yumiko Okada,
Yoshiharu Hisamatsu, Shunichiro
Kubota and Fujio Kayama
DIOXIN 2000, Vol. 49 p394-396,
August 2000, Monterey, California,
USA

2. Effect of Xenoestrogens and Phytoestrogens on Breast Cancer Cells

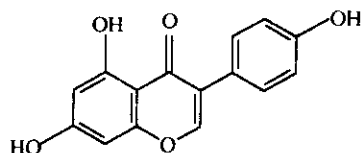
Nao Kobayashi, Akiko Yamaguchi,

Tomomi Yamazaki and Hiroyuki
Nakazawa

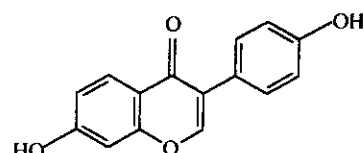
第 3 回日本内分泌攪乱化学物質学
会, p320, December 2000, 横浜



Estradiol
(M.W. 272.39)



Genistein
(M.W. 270.24)



Daidzein
(M.W. 254.24)

Fig.1 T47D細胞に対するGenisteinの影響

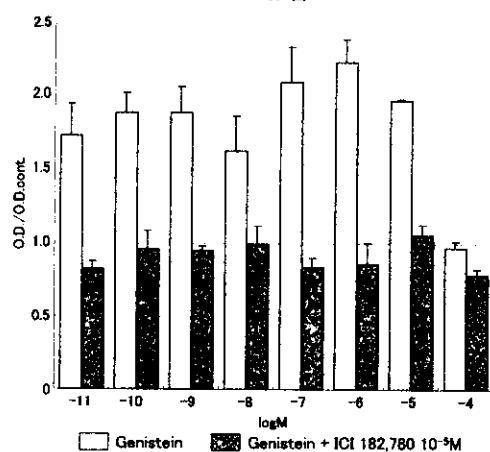


Fig.2 T47D細胞に対するDaidzeinの影響

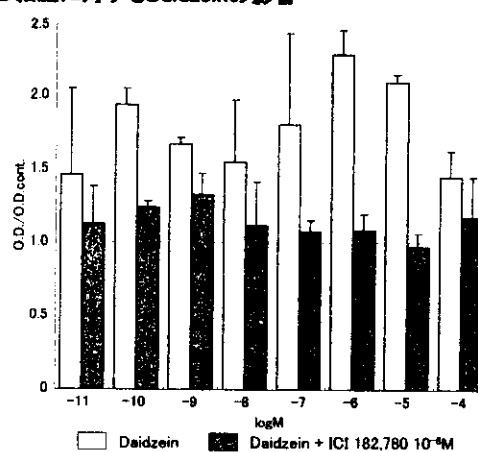


Fig.3 T47D細胞に対するFujiflavone P40の影響

(大豆抽出物 : Daidzein + Genistein + Glycitein)

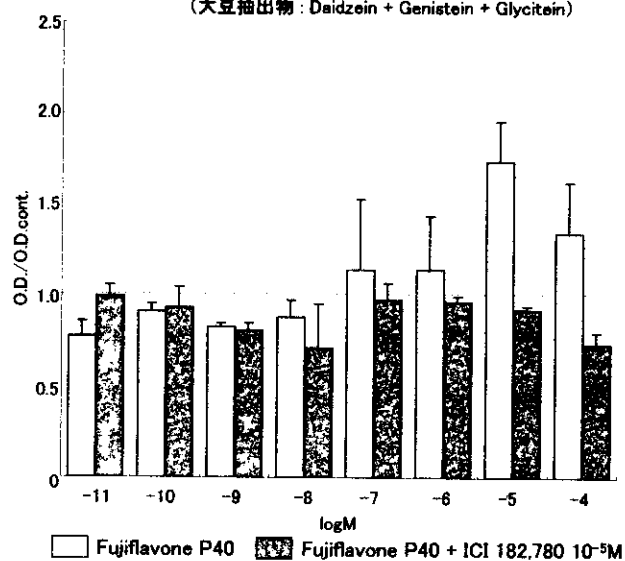


Fig.4 Bisphenol A 10^{-6} M共存下でのT47D細胞に対する植物エストロゲンの影響

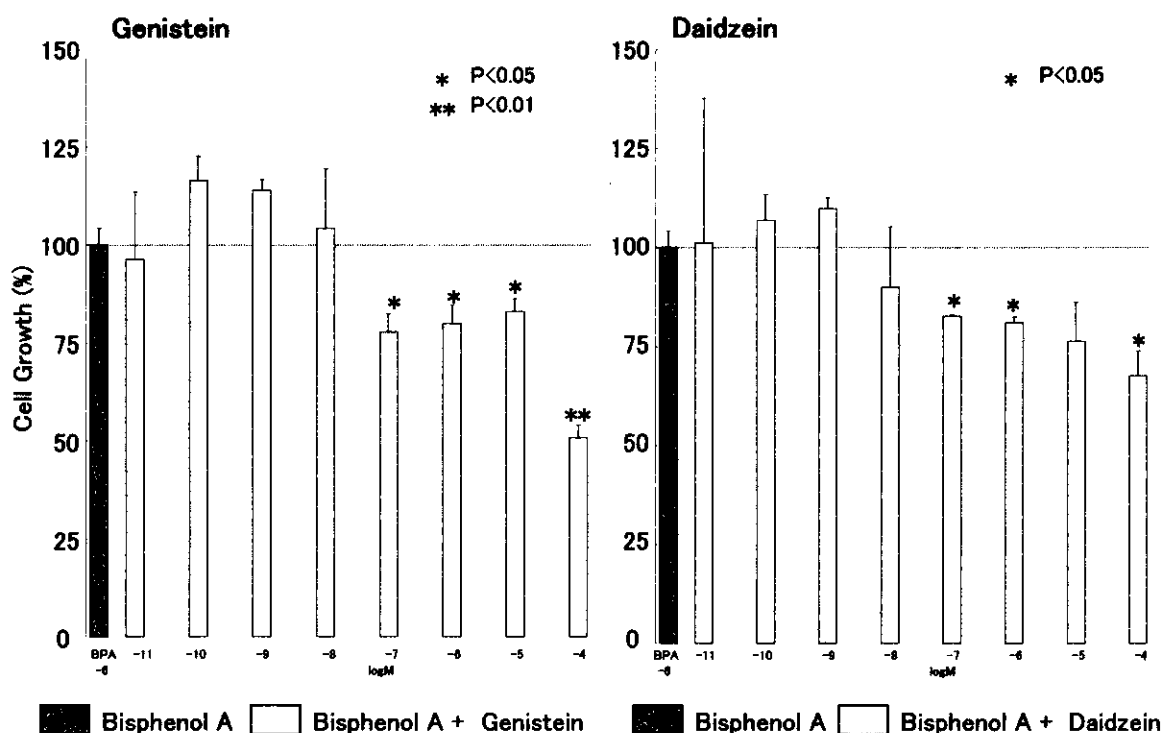
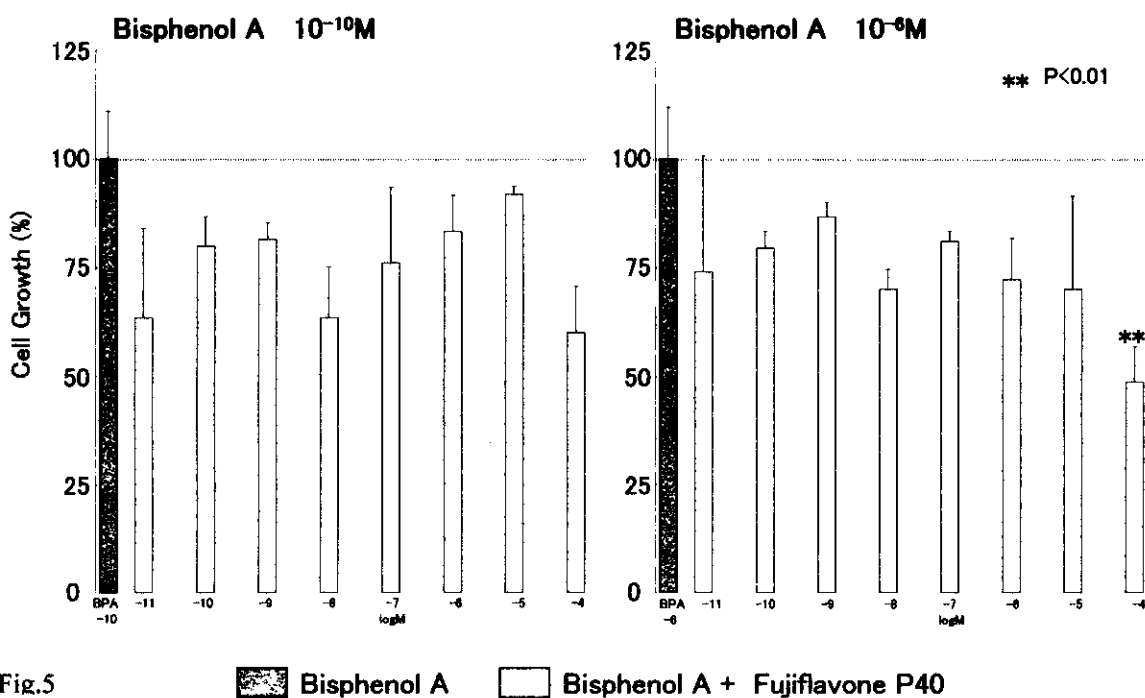


Fig.5 Fujiflavone P40 + Bisphenol Aの場合のT47D細胞への影響

(大豆抽出物: Daidzein + Genistein + Glycitein)



平成12年度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

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（さい帯血等）分析法の開発と
その実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

内分泌かく乱化学物質の生体影響における
子宮内膜症の発生と増殖のメカニズムに関する研究

分担研究者 牧野恒久 東海大学
研究協力者 岩崎克彦 東海大学
和泉俊一郎 東海大学
村松俊成 東海大学

研究要旨

内分泌かく乱化学物質と考えられているフタル酸ジブチル（Dibutyl Phthalate- d_4 ）、フタル酸ジシクロヘキシル（Dicyclohexyl Phthalate- d_4 ）、フタル酸ジエチル（Diethyl Phthalate- d_4 ）、ノニルフェノール（p-n-Nonylphenol）およびビスフェノール A（Bisphenol A）を用いてヒト子宮体癌細胞（*RINKE* *GENE BANK*:HHUA 細胞）の増殖性を *in vitro* で検討した。フタル酸類およびノニルフェノールはいずれも $10^{-13} \sim 10^{-5}$ M の低濃度から高濃度で 1.1 ~ 1.4 倍の細胞増殖を示した。ビスフェノール A では 10^{-6} M で 1.5 倍の急峻な細胞増殖を示し 10^{-10} M と合わせて二峰性の強い増殖性を認めた。そこで *in vitro* のビスフェノール A の濃度を考慮して、妊娠マウスの皮下にビスフェノール A を投与し胎児発育を検討した。ビスフェノール A 投与群の出生マウスの体重は 1.29 ± 0.06 g (n=23) の結果であり、コントロール群の 1.29 ± 0.06 g (n=31) と比較して統計学的有意差は認めなかった。また種々の化学物質や薬物類を細胞外にトランスポートする P - 糖タンパクを欠損させたノックアウトマウスを用いて同様にビスフェノール A を投与したが、出生マウスの体重は 1.28 ± 0.06 g (n=26) の結果で他の 2 群との違いはなかった。出生 2 ~ 3 ヶ月の未妊娠の雌マウスに同様にビスフェノール A を投与し、後に腹腔内所見を観察したが明らかな子宮の肥大や子宮内膜症の所見は得られなかった。

A. 研究目的

近年、さまざまな化学物質によりヒト体内の内分泌環境がかく乱されて

いることが懸念されている。特に妊娠初期の女性がこれらの化学物質に暴露された場合の胎児の発育に関する

胎児健康影響や、若年女性における子宮内膜症や子宮内膜増殖症の増加傾向が、実は内分泌かく乱化学物質による生殖器の早熟化に起因する可能性が考えられつつある。今回われわれは、フタル酸ジブチル (Dibutyl Phthalate- d_4)、フタル酸ジシクロヘキシル (Dicyclohexyl Phthalate- d_4)、フタル酸ジエチル (Diethyl Phthalate- d_4)、ノニルフェノール (p-n-Nonylphenol) およびビスフェノール A (Bisphenol A) などの化学物質を用いてエストロゲンレセプターを有するヒト子宮体癌細胞 (*RINKEN GENE BANK*:HHUA 細胞) における細胞増殖性を *in vitro* で検討した。ついで *in vitro* の結果を踏まえ、ビスフェノール A の濃度を設定し、妊娠初期のマウスに皮下投与し胎児発育への影響について、出生マウスの体重をコントロール群と比較検討した。次に出生後 2~3 ヶ月経過の未妊娠の雌マウスに同様にビスフェノール A を皮下投与し、子宮の発育状況や腹腔内の子宮内膜症所見の有無について検討した。胎盤の合胞体栄養細胞層、絨毛上皮に多く存在する P-糖タンパクは主に化学物質や他の薬物を細胞外へ排出する働きを有する。この P-糖タンパクをコードする multidrug resistance (mdr1a/1b) ジーンを欠損させたノックアウトマウスについても同様にビスフェノール A を投与し、さらに RT-PCR による解析を行った。

B. 研究方法

B.1 細胞増殖のアッセイとして汎用されるヒト乳癌細胞 (MCF-7) を用いた E-SCREEN アッセイの代わりに、ヒト子宮体癌細胞を用いた (E-SCREEN アッセイ変法)。使用したヒト子宮体癌細胞はセルナンバー RCB0658、 17β -エストラジオールレセプターを有する HHUA 細胞である。細胞培養はフェノールレッド添加 5%不活化 FBS 加 DMES を使用し、細胞剥離には 0.05%トリプシンに 0.53mM EDTA を使用。ただし、本アッセイをするにあたりエストロゲン様作用を考慮してフェノールレッドフリーの DMES を利用した。血清はヒト血清を 56℃、30 分で不活化後、チャコールデキストランにて内因性ステロイドホルモンを取り除き DMEM に添加した。HHUA 細胞を血球計算版にて細胞数が 6000 (± 1000) cell / well となるように調整し 96 穴プレートに撒き、37℃ 5%CO₂ で 24 時間培養。その後培養液を吸引し各種濃度に調製した被験化学物質を含むアッセイ用 DMEM に交換後、再び 37℃ 5%CO₂ で 5 日間培養し、セルカウンティングキット (Wako Pure Chemical Industries 社製) を用いて呈色反応を行い 450nm の測定波長にて吸光度分析を行った。

B.2 妊娠 2.5 日から 5.5 日のマウスの皮下にビスフェノール A 0.3 mg/kg/day を 5 日間連続投与し (Becton Dickson 社製ガラスインジェクションを使用)、分娩直後の出生マウス体重を測定し胎児発育状態を、コントロー

ル群（妊娠マウス4匹、出生マウス31匹）、ビスフェノールA投与群（妊娠マウス3匹、出生マウス23匹）およびノックアウトマウス（+ビスフェノールA投与）群（妊娠マウス3匹、出生マウス26匹）について検討した。マウスの飼育室は温度24℃湿度25%で、12時間-12時間・昼夜の光調節を行い、飼育ケージはプラスチック製が使用された。また生後2~3ヶ月経過の未妊娠雌マウスに上記と同様でビスフェノールAを投与し子宮の発育状況や子宮内膜症所見について腹腔内を観察した。また今回はRT-PCRにてコントロール群、ビスフェノールA投与群およびノックアウトマウス群のmdr1遺伝子について検討した。プライマーは以下のように設定した。

mdr1a : Forward プライマー : 5'-GGAGAGATCCTCACCAAG -3'

Reverse プライマー : 5'-GCTCTGGGCATACATGGT -3'

mdr1b : Forward プライマー : 5'-GCTGGTTTTGATGGTGGT -3'

Reverse プライマー : 5'-GCCAAATGTGAAGCCCTG -3'

C. 研究結果

本研究に用いたヒト子宮体癌細胞（HHUA細胞）で、17β-エストラジオールの各濃度における細胞増殖をまず顕微鏡下で確認。well内のコロニー形成が十分で均一である事を確認し分析を開始した。コントロールと比較して $10^{-12} \sim 10^{-7}$ Mで細胞増殖は著明となり増殖性は1.1~1.2倍であった。つ

ぎに被験物質として用いたフタル酸ジブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチルヘキシル、ノニルフェノールおよびビスフェノールAにおけるそれぞれの細胞増殖性は、フタル酸ジブチルでは $10^{-12} \sim 10^{-7}$ Mの濃度で1.1~1.2倍、フタル酸ジシクロヘキシルでは $10^{-13} \sim 10^{-5}$ Mの濃度で1.2~1.4倍、フタル酸ジエチルヘキシルでは $10^{-13} \sim 10^{-5}$ Mの濃度で1.1~1.3倍(図1)、ノニルフェノールでは $10^{-12} \sim 10^{-5}$ Mの濃度で1.1~1.3倍およびビスフェノールAでは $10^{-13} \sim 10^{-6}$ Mの濃度で1.1~1.5倍の細胞増殖性を認めた。またビスフェノールAについては 10^{-6} Mで急峻な細胞の増殖を認め、以後ゆっくり下降し再度 10^{-10} Mで細胞増殖がみられる二峰性のパターンを示した(図2)。

次に、ビスフェノールAの妊娠初期マウスへの皮下投与における出生マウス体重の検討では(表1)、コントロール群の出生マウス計31匹の体重は、1.2~1.4 g (1.29 ± 0.06 g)の結果であった。ビスフェノールA投与群では、出生マウス計23匹の体重は、1.2~1.4 g (1.29 ± 0.06 g)。ノックアウトマウスでのビスフェノールA投与群では、出生マウス計26匹の体重は、1.2~1.4 g (1.28 ± 0.06 g)の結果で、3群間での出生マウスの体重に明らかな差は見られなかった。出生2~3ヶ月経過の未妊娠雌マウスにビスフェノールAを同様に投与した結果は子宮長10~12 mmで、ビスフェノールA未投与群の雌マウスと比較し

ても明らかな子宮の肥大を認めなかった(図3)。また腹腔内に明らかな子宮内膜症の所見を認めることはできなかった。

mdr1a / 1b m-RNA のプライマーを用いてコントロール群、ビスフェノールA投与群およびノックアウトマウス群について RT-PCR を行った結果、コントロール群とビスフェノールA投与群では、mdr1a で 428bp に mdr1b で 537bp に明らかなバンドの出現を認めたが、ノックアウトマウスではバンドの出現はなかった(図4)。

D. 考 察

ビスフェノールAは 10^{-6} Mと 10^{-10} Mの濃度で強い細胞増殖を認めた。今回はヒト子宮体癌細胞を用いて各化学物質濃度との関係を検討したが、以前われわれはヒト乳癌細胞(MCF-7)を用いて同様にビスフェノールAについて検討した。しかしMCF-7は 10^{-5} Mの濃度より濃度依存的に徐々に細胞の増殖を認めたものの、特定の濃度に細胞増殖を認めることはなかった。すなわちビスフェノールAの濃度の影響は、ヒト子宮体癌細胞と乳がん細胞では異なった感受性を示すことが示唆された。ビスフェノールAを 10^{-6} Mに適応するように調製し *in vivo*での実験を計画した。すなわち妊娠マウスの皮下にビスフェノールA 0.3 mg/kg/dayを5日間投与し、胎児の発育状態を知る目的で出生マウスの体重をコントロール群と比較検討したが両者には有意な体重差を認めることはで

きなかった。一方同様量のビスフェノールAを未妊娠マウスに投与し、腹腔内を観察したが子宮の肥大や子宮内膜症の明らかな所見を得る事は出来なかった。*in vivo*におけるビスフェノールAに関する研究として、堤らはマウスの初期受精卵にごく微量のビスフェノールAを投与した結果、投与マウスの成長がコントロール群より促進していたというデータを発表(2000年11月23日、日本不妊学会)。またSteinmetzらの研究では、ラットに0.3 mg/kg/day量のビスフェノールAを3日間静脈内投与した結果子宮や膈上皮の細胞に増殖性変化を認めたと報告している(Endocrinology, 139: 2741-2747, 1998)。しかし今回われわれの観察では上記と同様な結果は得られなかった。

薬物や他の化学物質をトランスポートするジーンを欠損させたノックアウトマウスでは、一般にコントロール群と比べて薬剤感受性が強く出現することが考えられ、ビスフェノールA投与の影響を受けやすい事が予想されたが、出生マウスの体重に明らかな違いはなかった。

E. 結 論

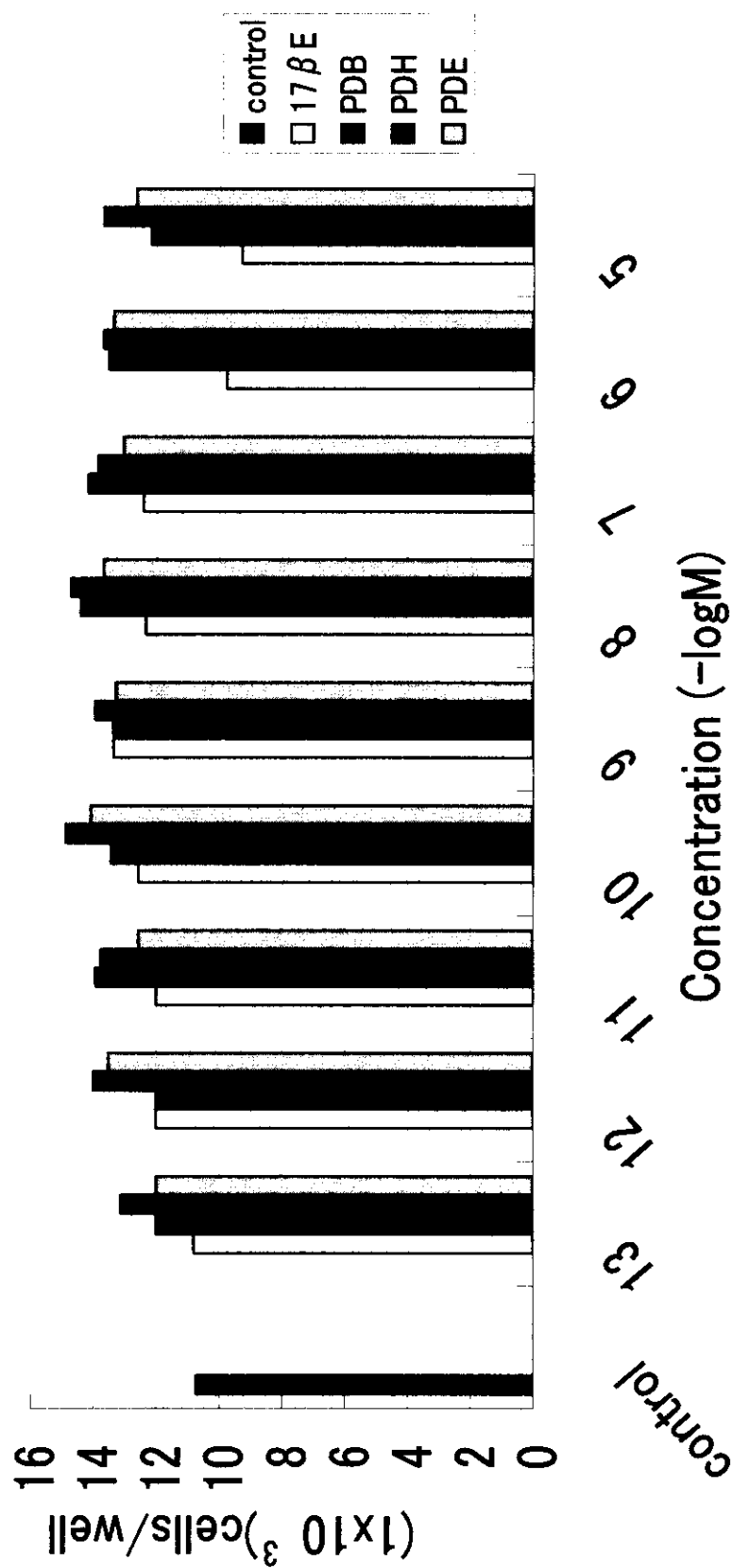
ヒト子宮体癌細胞を用いてE-SCREENアッセイ変法を行った。フタル酸類とノニルフェノールはほぼ濃度依存的に細胞の増減を示し、1.1~1.4倍の増殖性を認めた。ビスフェノールAは 10^{-6} Mと 10^{-10} Mの濃度で強い二峰性の細胞増殖を認めた。はじめに

行った *in vitro* の細胞増殖の結果をもとにビスフェノールAの投与量を調製し、妊娠初期マウスに投与し胎児発育を検討したが、ビスフェノールA投与群とコントロール群およびノックアウトマウス群とで出生マウスの体重に有意差を認めなかった。未妊娠マウスへのビスフェノールA投与でも明らかな子宮の肥大や子宮内膜症の所見は確認されなかった。

F. 研究業績

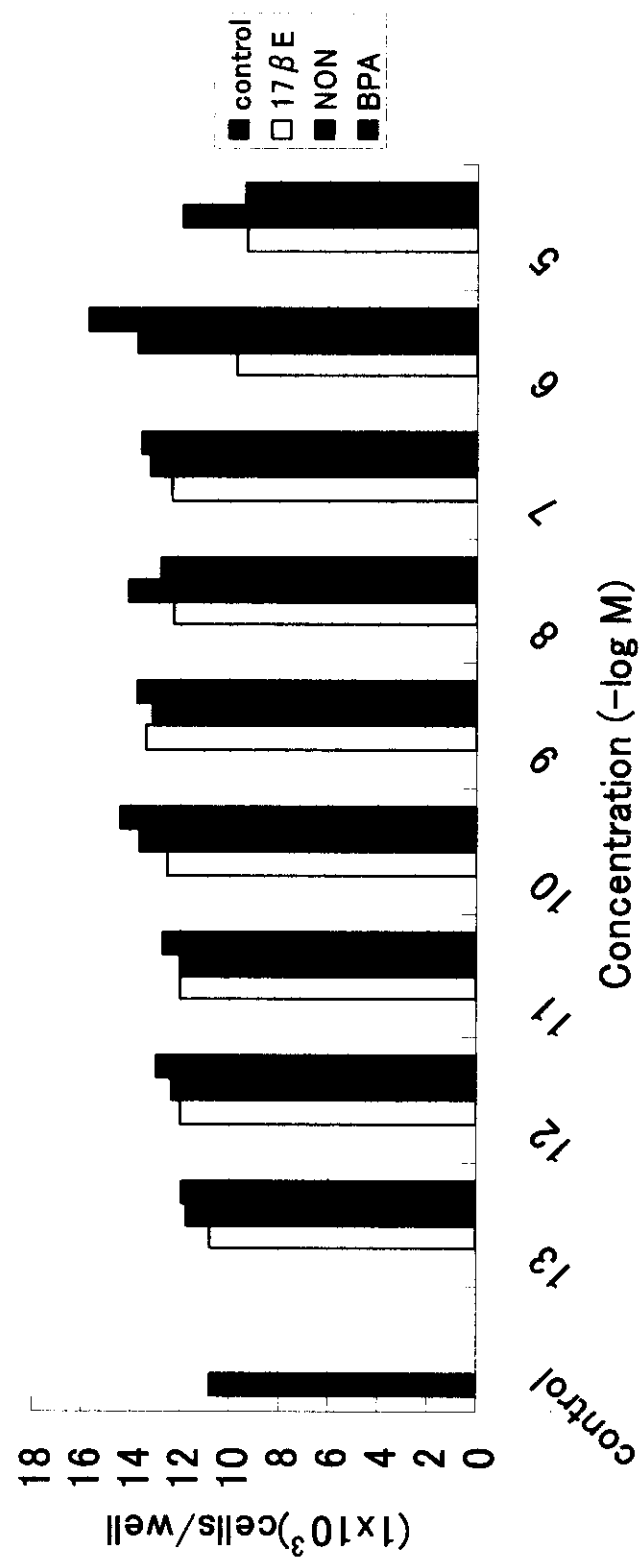
該当なし

図1. 化学物質濃度とHHUA細胞の増殖



17βE : 17β - estradiol, PDB : Dibutyl phthalate, PDH : Dicyclohexyl phthalate, PDE : Diethyl phthalate

図2. 化学物質濃度とHHUA細胞の増殖



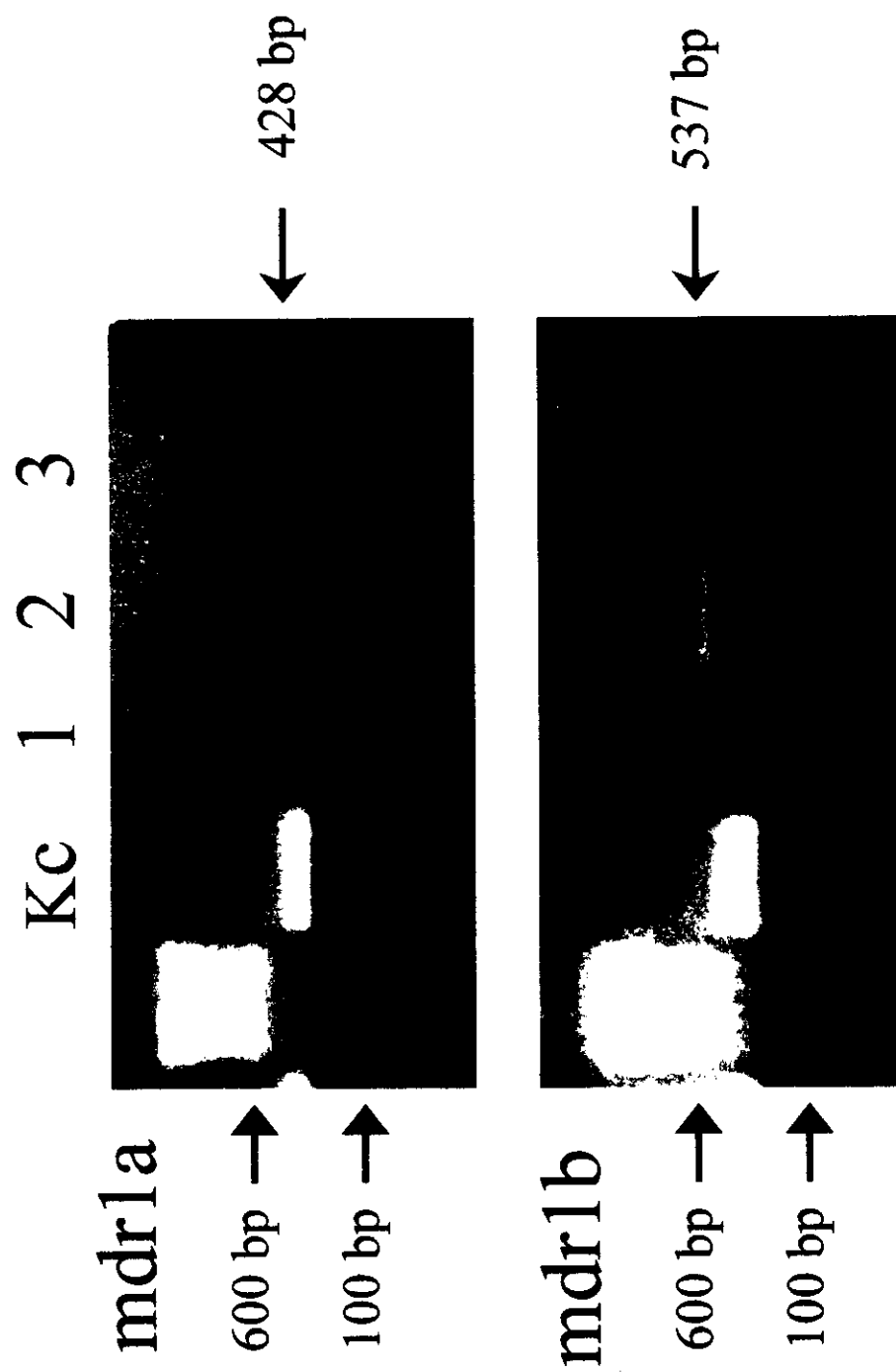
17βE : 17β-estradiol, NON : Nonylphenol, BSA : Bisphenol A

図3 マウス双角子宮



上記の $\longleftrightarrow$ は 10mm - 12mm
の長さであった。

図4 RT-PCRの解析



Kc: Kitコントロール、1: ノックアウトマウス、2: コントロールマウス、
3: ビスフェノールA 投与マウス