

200/0937

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 13 年度 総括・分担・総合研究報告書

主任研究者 白井 智之

平成 14 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 ----- 15
2. 妊娠期・授乳期におけるノニフェノール単独およびノニフェノール・ビスフェノール A 併用曝露がラット雌性生殖器へ与える影響 ----- 20
前川 昭彦（（財）佐々木研究所 所長）
3. Nonylphenol の胎児・幼児への影響 ----- 25
福島 昭治（大阪市立大学大学院医学研究科 教授）
4. ゲニステインの胎児、新生児に及ぼす影響 ----- 36
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に関する研究 ----- 45
堤 雅弘（奈良県立医科大学腫瘍病理 助教授）
6. Bisphenol A 慢性曝露による神経行動毒性発現と dopamine および serotonin 受容体の可塑的变化：曝露時期の影響 ----- 47
鈴木 勉（星薬科大学 教授）
7. 内分泌攪乱化学物質の胎児・幼児への影響等に関する研究（神経系に及ぼす影響）に関する研究 ----- 56
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 ----- 60
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 ----- 65

IV 総合研究報告書

- 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 ----- 71
白井 智之（名古屋市立大学医学部 教授）

V 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 92

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、その動物の出生仔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た。現在まで得られた研究成果は下記の通りである。

- 1) F344 雌ラットに妊娠 0 日から離乳までの間ビスフェノール A およびノニルフェノールをそれぞれ単独あるいは複合投与しても、性成熟齢 F1 雄動物の生殖器系へ影響を示さず、さらに 60 週間の前立腺発がん性試験においてもビスフェノール A は影響しないことが明らかとなった。（白井）。
- 2) 妊娠・授乳期にわたり母ラットへ低用量および高用量のノニルフェノールを単独あるいはノニルフェノールとビスフェノール A を併用して強制経口投与して仔の雌性生殖器系に対する影響を検討した結果、発育分化を含む雌性生殖器系および卵巣機能へは影響を与えないと考えられた（前川）。
- 3) ノニルフェノールの経胎盤あるいは授乳曝露による新生仔マウスに及ぼす影響を検討した結果、高用量投与群で母動物における妊娠期間の延長傾向、出産仔数、受胎率及び出生率の低下傾向がみられたが、F₁ 雄動物の臨床症状及び生殖器系の形態及び精子機能へのノニルフェノールの影響はみられなかった。ビスフェノール A とノニルフェノールの低用量複合による影響については現在、実験を継続中である。（福島）。
- 4) 大豆イソフラボンはゲニステインのみならず、ダイゼインにも生体影響がみられた。現在のところ、その機構の詳細は不明であり、今後の検討が必要である。しかし、日常的な大豆・大豆加工品の摂取では、とくに内分泌かく乱作用を懸念することはないが、健康食品などを通して、多量摂取は慎重に行うべきである。（池上）。
- 5) Wistar 系雌ラットにノニルフェノールを 2、200、2000ppm の濃度で飼料に混じり 11 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。生まれた仔ラットに BHP を投与し甲状腺、肺、食道、肝、胸腺発癌感受性について検索したが、ノニルフェノールの暴露が次世代ラットの成長や性成熟の障害、甲状

機能異常および肺、甲状腺、食道、肝、胸腺の発癌感受性亢進に関与する可能性は乏しいと結論つけられた（堤）。

- 6) 妊娠期および授乳期におけるビスフェノールAの慢性曝露は、主に脳の発達過程において重要な期間である器官形成期および神経ネットワークの発達に重要な期間である周産期ならびに授乳期において、ドーパミン神経系ならびにセロトニン神経系に不可逆的な変性をもたらし、異常行動ならびに不安神経障害の惹起、さらには依存性薬物の精神依存性を増強させる可能性が示唆された（鈴木）。
- 7) 内分泌かく乱化学物質の中樞神経系への作用機構を解明するために、中樞神経系への作用が知られているビスフェノールAを用いて、ビスフェノールA膜受容体の探索・精製を行った。ラット神経細胞膜画分から精製された蛋白質は、SDS-PAGE 上 53 KDa の蛋白質であった。この蛋白質を大腸菌で発現させ、ビスフェノールAとの結合能を有しているかどうかを調べたところ、結合能を有していることが確認されたので、この膜蛋白質がビスフェノールA受容体であると考えられた（船江）。
- 8) 胎齢 10 日目以降ビスフェノールA 2 $\mu\text{g/g}$ of food、8 $\mu\text{g/g}$ of food を投与した群では TH 陽性黒質神経細胞数が胎齢 18 日で減少傾向を示した。妊娠全期間から授乳期に至るまでビスフェノールAを投与された雌（3 $\mu\text{g/g}$ of food、8 $\mu\text{g/g}$ 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。他方、カルシウム結合蛋白をパラメーターとしてみた GABA 作動性神経細胞には有意な影響がみられなかった。つまり本研究によって、ドーパミン系神経細胞に対するビスフェノールAの影響が明確に示された（伏木）。

分担研究者

前川 昭彦 （財）佐々木研究所 所長
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 奈良県立医科大学腫瘍病理
助教授
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

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、野生ならびに水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。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、ノニフェノール、ゲニスタイン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* の立場から解析することを目的とする。

B. 研究方法

1. 雄性生殖器官系に及ぼす影響（白井）

【実験1】11週齢より交配を開始し、妊娠を確認した雌F344ラットに妊娠0日から離乳までの間、ビスフェノール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。作出されたF1雄動物には5週齢から20週間、DMABを50 mg/kgの投与量で2週間に1回皮下投与した。その後65週齢で屠殺剖検し、DMABによる前立腺発がんに対するビスフェノールAの影響を検索した。

【実験2】実験1と同様に、妊娠動物にノニルフェノールを0, 0.1, 10および100 mg/kg/dayの投与量で毎日強制経口投与した。作出されたF1雄動物には5週齢から20週間、PhIPを100 mg/kgの投与量で1週間に1回強制経口投与した。その後65週齢で屠殺剖検し、PhIPによる前立腺発がんに対するノニルフェノールの影響を検索する。（現在、動物実験継続中である）また、PhIPを投与しない群を設け、性成熟齢である13週齢で屠殺剖検し、ノニルフェノールの雄性生殖器官系への影響について検索した。【実験3】実験1と同様に、妊娠動物に実験1および2で使用した最低用量であるビスフェノールA 0.05 mg/kg/dayおよびノニルフェノール 0.1 mg/kg/dayをそれぞれ単独あるいは複合で毎日強制経口投与した。作出されたF1雄動物は13週齢で屠殺剖検し、精子検査をはじめ、雄性生殖器官系への影響を検索した。（倫理面への配慮）動物実験は本大学の動物委員会の承諾を得て、動物愛護にそったプロトコルに従って行った。

2. 子宮に及ぼす影響（前川）

動物には子宮癌好発系のドンリュウラットを用いた。ノニルフェノール単独投与群では0、

0.1、10および100 mg/kgを、併用投与群では0、ビスフェノールA 0.05 mg/kg・ノニルフェノール 0.1 mg/kg、ビスフェノールA 100 mg/kg・ノニルフェノール 100 mg/kgを、さらにビスフェノールA単独投与群としてビスフェノールA 100 mg/kgを妊娠および哺育期の全期間にわたり母動物に強制経口投与し、繁殖成績および雌の仔の発育分化を含む雌性生殖器官への影響を経時的に観察した。ノニルフェノール単独群については子宮発癌への修飾作用を、併用投与群ではエストロゲンに対する感受性への検索を加えた。また前年度の実験の続きとして、飼育環境中のビスフェノールA濃度をHPLC法にて測定した。全ての実験は実験動物に対するWHO等の指針に基づき実施され、本実験期間中指針を逸脱する事項は認められなかった。

3. 精巣に及ぼす影響および発がんに関する影響（福島）

妊娠期・授乳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、ノニルフェノールを0、0.05、50および200 mg/kg/dayの用量で連日経口投与した。その後、雄児動物を無処置の状態で13週齢まで飼育した。さらにビスフェノールAとノニルフェノールの低用量、それぞれ0.05 mg/kgの複合を離乳まで連日強制経口投与し、雄児動物を13週齢まで飼育する。（倫理面への配慮）なお、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回動物供養祭を挙げて行っている。

4. ゲニステインの胎児および新生児に及ぼす影響（池上）

実験にはラットとマウスを用いて、飼料からの暴露による胎児、乳児への暴露影響を観

察した。これまでの研究から純度の高いゲニステインでは、生体影響は弱い、イソフラボン混合物では強い影響が観察されたところから、ゲニステインとダイゼインの影響の比較を行った。動物実験は総理府告示に従って倫理的配慮のもとに行った。

5. 胎児および新生児の甲状腺に及ぼす影響（堤）

Wistar 系雌ラットにノニルフェノール（ノニルフェノール）を基礎飼料に 2、200、2000 ppm の濃度で混じり 11 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。仔ラットに 6 週齢より N-nitrosobis(2-hydroxypropyl) amine (BHP) を 2000 ppm の濃度で飲水に混じり 12 週間投与し、甲状腺、肺などの癌の発生について検索した。また、仔の成長、性成熟、甲状腺機能についても検索した。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）

ビスフェノール A (2 mg/g of food) を、妊娠初期、器官形成期、周産期および授乳期にそれぞれ混餌により処置した。なお、すべての期間を普通飼料にて飼育したマウスを対照群とし、各群ともに離乳後 4 週間以上普通飼料で飼育してから以下の検討を行なった。1) ビスフェノール A 曝露マウスにおけるモルヒネ誘発自発運動促進作用を tilting cage 法に従って測定した。2) 曝露マウスにおけるモルヒネおよびメタアンフェタミンの精神依存を条件づけ場所嗜好性試験により評価した。3) 新規環境下における不安状態を脱糞数の数により評価した。4) 曝露マウスにおけるブスピロン誘発抗不安作用を明暗試験に従って測定した。5) 曝露マウスにおけるジアゼパム誘発抗不安作用を Vogel 型コンフリクト装置を用いて検

討した。6) 曝露マウスから得られた側坐核および視床下部領域におけるドーパミンならびにセロトニン受容体作動薬誘発 G-タンパク質活性化作用の検討を行なった。

7. 行動異常ラット脳における p450 誘導とドーパミン（船江）

ラット脳組織から膜画分(P2 画分)の調製を行った。受容体結合実験は、膜画分と 3H 標識ビスフェノール A (3H-ビスフェノール A) を水中にて 90 分間反応させた後遠心分離にて B/F 分離を行い、膜画分に存在する蛋白質に結合した 3H-ビスフェノール A の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。ビスフェノール A 受容体の精製は、ラット 60 匹の脳から P2 画分を調製後、非イオン性界面活性剤で可溶化し、更にイオン交換クロマトののち、ビスフェノール A アフィニティーカラムを用いたクロマトグラフィーを行った。動物実験は、大阪市立大学動物実験委員会において審査承認された実験計画に基づき、動物倫理、動物愛護に配慮した実験動物指針に従い実施した。

8. 行動異常ラット脳の分子病理学的解析（伏木）

妊娠初期から授乳期まで ddY マウスにビスフェノール A を経口投与し生後 6 週齢、9 週齢で脳を得る系と妊娠 10 日目から母マウスにビスフェノール A を経口投与し胎齢 18 日に脳を採取する系を用いた。連続切片に対し、tyrosine hydroxylase (TH) やカルシウム結合蛋白の免疫組織化学を施した。一方 TH、カルシウム結合蛋白、GAP43、dopamine receptor (D1R、D4R、D5R) に関する Western blot を実施した。(倫理面への配慮) 動物の取扱い・処置は、京都府立医科大学実験動物取扱いガイドラインを遵守し、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）

【実験 1】ビスフェノール A 120 mg/kg/day 投与群で母動物の妊娠期間中の体重が有意な増加抑制を示したが、授乳期間中では差は認められなかった。また妊娠期間、出生率などに影響を認めなかった。F1 雄動物の体重変化、生殖器系器官重量、下垂体、甲状腺重量において有意な差は認めなかった。また前立腺における PIN、癌および精囊における異形過形成の発生率は群間に差を認めなかった。【実験 2】ノニルフェノール 100 mg/kg/day 投与群で妊娠期間中の母動物の体重が有意な増加抑制を示し、妊娠期間も 24.0 日間と延長傾向を示した。この変化は F344 ラットである母動物に対するノニルフェノールの毒性変化と考えられた。出生児の数や性比には影響を認めなかった。13 週齢で屠殺した F1 雄動物の体重変化、生殖器系器官重量、精子検査（精子数、精子運動率および異常形態発生率）および精巣の精細管ステージングには有意な差を認めなかった。現在、PhIP を投与した発がん実験は実験第 42 週（47 週齢）を経過中であり、その体重変化には群間に有意な差を認めていない。【実験 3】ノニルフェノール 0.05 mg/kg/day 単独投与群で妊娠期間中の母動物の体重が有意な増加抑制を示したが、人為的影響と推察される 3 例の出産しなかった動物が含まれており、被験物質の影響ではないと考えた。授乳期間中では有意な差を認めなかった。そのほか、妊娠期間、出生児の数や性比には影響を認めなかった。13 週齢で屠殺した F1 雄動物の体重変化、生殖器系器官重量、精子検査（精子数、精子運動率

および異常形態発生率）および精巣の精細管ステージングにおいて有意な差を認めなかった。また、屠殺時の血清中テストステロン濃度にも群間に差を認めなかった。現在、精巣の精細管ステージングおよび生殖器系器官の H.E. 標本による病理組織学的検査実施中である。

2. 子宮に及ぼす影響（前川）

併用投与の高用量群で妊娠中の母動物の体重が増加抑制を示したが、繁殖成績にはノニルフェノール単独および併用投与とも対照群と同様の結果を示した。仔については子宮重量、子宮腺の形成、膣開口時期など雌性生殖器の発育分化、性周期、排卵数において、対照群と投与群の間に有意な差異は観察されなかった。両実験とも 14 年 3 月現在実験継続中である。飼育環境中では水道の蛇口から直接採取した水道水中からビスフェノール A は検出されなかったが、自動給水装置中の水および固形飼料中からビスフェノール A が検出された。

3. 精巣に及ぼす影響および発がんに及ぼす影響（福島）

200 mg/kg 投与群で妊娠期間の延長傾向、出産児数、受胎率及び出生率の低下などが認められた。雄児動物では異常症状は認められなかった。精子検査では 200 mg/kg 投与群で形態異常として non-head な精子が多くみられたが、その他には異常はなかった。現在、ビスフェノール A とノニルフェノールの複合投与による実験を継続中である。

4. ゲニステインの胎児および新生児に及ぼす影響（池上）

母親ラットに対する暴露では、ゲニステインに比べてダイゼインの影響が強いことが示された。とくに母親と乳児での体重増加の抑制

がみられた。他方、成長期マウスに対するゲニステインとダイゼインの暴露では、両者に差なく体重増加の抑制がみられ、とくに雄が強い影響を受けた。

5. 胎児および新生児の甲状腺に及ぼす影響（堤）

本実験条件下では、ノニルフェノールは母ラットの妊娠期間や出産胎仔数や出生仔の体重などに影響を与えなかった。仔ラットの成長や性成熟に影響はみられなかった。26 週齢の仔ラットの甲状腺には組織学的に明らかな変化はみいだされなかった。BHP を投与した仔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、ノニルフェノール投与による、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。

6. 行動異常に及ぼす影響（鈴木）

1) ビスフェノールAの器官形成期および授乳期曝露により、モルヒネ誘発自発運動促進作用は著しく増強された。2) ビスフェノールAの器官形成期および授乳期曝露により、モルヒネならびにメタアンフェタミン誘発報酬効果は著明に増強された。3) ビスフェノールAの器官形成期および授乳期曝露群では、新規環境下における脱糞数の有意な増加が認められた。4) ビスフェノールAの周産期ならびに授乳期曝露群ではブスピロン誘発抗不安作用が有意に減弱した。5) ビスフェノールAの器官形成期および授乳期曝露により、ジアゼパム誘発抗不安作用は有意に減弱された。6) ビスフェノールAの器官形成期曝露マウスから得られた側坐核あるいは視床下部領域の膜標本において、ドーパミンあるいはセロトニン受容体作動薬誘発 G-タンパク質活性化作用の有意な増強が認められた。一方、周産期およ

び授乳期曝露群の視床下部領域では、セロトニン受容体作動薬誘発 G-タンパク質活性化作用の有意な減弱が認められた。

7. 行動異常ラット脳における p450 誘導とドーパミン（船江）

ビスフェノールARの脳での局在：脳を大脳、中脳、小脳、視床下部、海馬、線条体、橋、視床、延髄の 9 部位に分割し、各部位 P2 画分でのビスフェノールA結合能を指標に、ビスフェノールA受容体 (BPAR) の局在を調べた。全部位でビスフェノールA結合活性はほぼ同程度であり、BPAR は様々な部位に発現していると考えられた。また、この BPAR は、ビスフェノールAだけでなく甲状腺ホルモンとの結合活性も有することが確認された。

BPAR の精製：P2 画分を出発試料とし BPAR 精製を開始した。Sucrose monolaurate は効率よく膜を可溶化し、またビスフェノールAとの結合活性も失わなかった。DE52 を用いたイオン交換クロマトグラフィーの後、ビスフェノールAをリガンドとしたアフィニティークラムを合成し用いた。ビスフェノールAアフィニティークラムから溶出された蛋白質は、SDS-PAGE で 53 KDa と 38 KDa の 2 本のバンドを示し、両バンドを切り出し N-末端アミノ酸配列を決定した。得られた情報をもとに、53 KDa の蛋白質の cDNA をクローニングし大腸菌で発現させたところ、このリコンビナント蛋白質は、ビスフェノールAとの結合活性を有していることが確認された。

8. 行動異常ラット脳の分子病理学的解析（伏木）

胎齢 10 日から 8 日間ビスフェノールAを投与された胎仔脳では TH 陽性黒質神経細胞数が減少傾向を示した。妊娠全期間より授乳期までビスフェノールAを投与した群 (3 $\mu\text{g/g}$

ならびに 8 $\mu\text{g/g}$ of food) の雌では、生後 9 週齢で TH 陽性黒質神経細胞密度が非投与群雌に比し有意な減少を示した。一方、大脳皮質などでの calbindinD28k、calretinin、parvalbumin 陽性神経細胞数は、ビスフェノール A 投与による影響を受けなかった。全脳に対する Western blot では、TH、calbindinD28k、calretinin、parvalbumin、D1R、D4R、D5R、GAP43 いずれにおいてもビスフェノール A 投与群と非投与群との間で有意差をみとめなかった。

D. 考察

前年度の報告でビスフェノール A もしくはノニルフェノール単独曝露は F1 雄動物の性成熟齢 (13 週齢) での生殖器系に対して影響を示さないことを述べたが、今回、60 週間の DMAB 発がんモデルを用いてビスフェノール A は前立腺発がんに対して影響を及ぼさないことが示された。ノニルフェノールの前立腺発がんに及ぼす影響については現在動物実験継続中である。さらに、ビスフェノール A およびノニルフェノールの低用量複合投与においても 13 週齢 F1 雄動物の生殖器系に対する影響はないことが示された (白井)。

本年度の両実験ではノニルフェノール単独高用量群で投与に関連した母動物の体重増加抑制が観察されたものの、繁殖成績には投与に関連した異常は観察されなかった。仔では体重、雌性生殖器系の発育分化、卵巣機能に投与による影響は検出されなかった。しかし現在実験途中であり、影響の判定は子宮増殖性病変あるいはエストロゲンに対する感受性への検索後に総合的に行う予定である。また、母および仔ラットは飼育環境に含まれるビスフェノール A に曝露されている可能性が示

された (前川)。

ノニルフェノール 200 mg/kg 投与群で認められた non-head な精子はアーチファクトと考えられ、精子数や運動率には異常が認められなかったことから、ノニルフェノール投与による影響はないと解釈された (福島)。

これまで、エストロゲンレセプターへの親和性からゲニステインの内分泌かく乱作用が注目されていたが、ダイゼインにも影響が見られ、ラットではゲニステインより強いことが示された。生体影響には種差や性差も見られ、その機構や代謝物を含めて更なる研究が必要である (池上)。

本実験条件下においてノニルフェノールは、ラットの妊娠、出産に影響を与えることはなく、甲状腺機能に対しても毒性はみられないことが示された。また、これらの雌ラットより生まれた仔ラットにおいても、明らかな甲状腺機能異常をきたす作用はないと考えられる。甲状腺を含む肺、肝、食道、胸腺の発癌には、経胎盤的、経乳汁的に投与されたノニルフェノールが有意な発癌修飾作用を示すことはなく、ノニルフェノールの曝露が次世代ラットの甲状腺、肺、食道、肝、胸腺発癌感受性の亢進に関与する可能性は乏しいことが示された (堤)。

妊娠期、特に器官形成期ならびに授乳期におけるビスフェノール A の慢性曝露が、ドーパミン神経系の機能亢進を誘導し、一般行動異常やモルヒネおよびメタアンフェタミンによる精神依存形成の増強を引き起こしている可能性が示唆された。一方、妊娠期ならびに授乳期におけるビスフェノール A の慢性曝露により不安神経障害が惹起され、その原因の一部には視床下部領域における 5-HT₁ 受容体の機能低下が関与している可能性が示唆され

た。また、不安神経障害を引き起こす不可逆的な神経変性の発現は、周産期ならびに授乳期におけるビスフェノールAの慢性曝露が特に原因となる可能性が示唆された（鈴木）。

これまで内分泌かく乱化学物質が作用する受容体としては、核内受容体であるエストロゲン受容体(ER)が報告されており、内分泌かく乱化学物質の生殖系への影響は、ER への結合がその作用機序である事が明らかになっている。しかし、内分泌かく乱化学物質は、中枢神経系にも影響を与え行動異常や知能低下をもたらすことが知られており、ER 結合とは異なる作用機序であることが考えられている。今回、我々が精製したビスフェノールARは、膜画分に存在し、ビスフェノールAだけでなく甲状腺ホルモンも BPAR に結合することから、内分泌かく乱化学物質の中枢神経系への作用は、この BPAR を介した甲状腺ホルモン作用のかく乱によって生じている可能性が考えられた（船江）。

TH 陽性黒質神経細胞の減少がビスフェノールA投与中止後 6 週経過時点で認められたことから、この変化は胎生期に由来することが推定されたが、胎仔脳黒質 TH 陽性神経細胞数を調べると減少傾向を示した。一方、全脳を対象とした Western blot でビスフェノールA投与群と非投与対照群間で TH 発現量に差を認めなかった。定量的解析により黒質以外の領域ではビスフェノールA投与による TH 陽性神経細胞の減少を認めなかったことを併せ考えると、全脳での TH 発現量に差が見出されなかったのは矛盾しないように思える（伏木）。

E. 結論

現在まで得られた結論は次の如くである。

1) F344 雌ラットに妊娠 0 日から離乳までの間ビスフェノール A およびノニルフェノールをそれぞれ単独あるいは複合投与しても、性成熟齢 F1 雄動物の生殖系へ影響を示さず、さらに 60 週間の前立腺発がん性試験においてもビスフェノール A は影響しないことが明らかとなった。（白井）。

2) 妊娠・授乳期にわたり母ラットへ低用量および高用量のノニルフェノールを単独あるいはノニルフェノールとビスフェノールAを併用して強制経口投与して仔の雌性生殖系に対する影響を検討した結果、現在実験中であるものの、発育分化を含む雌性生殖系および卵巣機能へは影響を与えないと考えられた。しかし子宮増殖性病変あるいはエストロゲンに対する感受性への検索後に総合的な結論を出す予定である。また、母および仔ラットは環境中のビスフェノールAに曝露されている可能性が示された。（前川）。

3) ノニルフェノールの経胎盤あるいは授乳曝露による新生児マウスに及ぼす影響を検討した。高用量投与群で母動物における妊娠期間の延長傾向、出産児数、受胎率及び出生率の低下傾向がみられたが、雄仔動物の臨床症状及び生殖系の形態及び精子機能へのノニルフェノールの影響はみられなかった。ビスフェノールAとノニルフェノールの低用量複合による影響については現在、実験を継続中である。（福島）。

4) 大豆イソフラボンはゲニステインのみならず、ダイゼインにも生体影響がみられた。現在のところ、その機構の詳細は不明であり、今後の検討が必要である。しかし、日常的な大豆・大豆加工品の摂取では、とくに内分泌

かく乱作用を懸念することはないが、健康食品などを通して、多量摂取は慎重に行うべきである。(池上)。

5) Wistar系雌ラットにノニルフェノールを2、200、2000ppmの濃度で飼料に混じり11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。生まれた仔ラットにBHPを投与し甲状腺、肺、食道、肝、胸腺発癌感受性について検索した。その結果、ノニルフェノールを投与されたラットより生まれた仔ラットにおいて、甲状腺機能、発癌感受性に有意な差はみられず、ノニルフェノールの暴露が次世代ラットの成長や性成熟の障害、甲状腺機能異常および肺、甲状腺、食道、肝、胸腺の発癌感受性亢進に關与する可能性は乏しいと考えられる。(堤)。

6) 本年度の研究成果より、妊娠期および授乳期におけるビスフェノールAの慢性曝露は、主に脳の発達過程において重要な期間である器官形成期および神経ネットワークの発達に重要な期間である周産期ならびに授乳期において、ドーパミン神経系ならびにセロトニン神経系に不可逆的な変性をもたらし、異常行動ならびに不安神経障害の惹起、さらには依存性薬物の精神依存性を増強させる可能性が示唆された。(鈴木)。

7) 内分泌かく乱化学物質の中枢神経系への作用機構を解明するために、中枢神経系への作用が知られているビスフェノールAを用いて、ビスフェノールA膜受容体(BPAR)の探索・精製を行った。ラット神経細胞膜画分から精製された蛋白質は、SDS-PAGE上53KDaの蛋白質であった。この蛋白質を大腸菌で発現させ、ビスフェノールAとの結合能を有しているかどうかを調べたところ、結合能を有していることが確認されたので、この膜蛋白質

がビスフェノールA受容体であると考えられた。(船江)。

8) 妊娠全期間から授乳期に至るまでビスフェノールAを投与された雌では、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。他方、カルシウム結合蛋白をパラメーターとしてみたGABA作動性神経細胞には有意な影響がみられなかった。つまり本研究によって、ドーパミン系神経細胞に対するビスフェノールAの影響が明確に示された(伏木)。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Asai, I., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N., Shirai, T.: Lack of tumor promoting effects of carrageenan on 1,2-dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in male F344 rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 14: 37-43, 2001.

Thamavit, W., Pratoomtone, P., Kongtim, S., Shirai, T., Ito, N.: Inhibition by vitamin E of cholangiocarcinoma induction due to combined nitrite and aminopyrine. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2: 69-70, 2001.

Kimoto, N., Hirose, M., Futakuchi, M., Iwata, T., Kasai, M., Shirai, T.: Site-dependent modulating effects of conjugated fatty acids from safflower oil in a rat two-stage carcinogenesis model in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett.*, 168: 15-21, 2001.

Hirose, M., Hoshiya, T., Mizoguchi, Y., Nakamura, A., Akagi, K., Shirai, T.: Green tea catechins

enhance tumor development in the colon without effects in the lung or thyroid after pretreatment with 1,2-dimethylhydrazine or 2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine in male F344 rats. *Cancer Lett.*, 168: 23-29, 2001.

Hagiwara, A., Takesada, Y., Tanaka, H., Tamano, S., Hirose, M., Ito, N., Shirai, T.: Dose-dependent induction of glandular stomach preneoplastic and neoplastic lesions in male F344 rats treated with catechol chronically. *Toxicol. Pathol.*, 29: 180-186, 2001.

Imaida, K., Sano, M., Tamano, S., Asamoto, M., Ogawa, K., Futakuchi, M., Shirai, T.: Organ dependent enhancement of rat 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) carcinogenesis by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP): positive effects on the intestine but not the prostate. *Carcinogenesis*, 22: 1295-1299, 2001.

Asamoto, M., Hokaiwado, N., Cho, Y.-M., Ikeda, Y., Takahashi, S., Shirai, T.: Metastasizing neuroblastomas from taste buds in rat transgenic for the simian virus 40 large T antigen under control of the probasin gene promoter. *Toxic. Pathol.*, 29: 363-368, 2001.

Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N., Shirai, T.: Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett.*, 171: 17-25, 2001.

Mori, T., Imaida, K., Tamano, S., Sano, M., Takahashi, S., Asamoto, M., Takeshita, M., Ueda, H., Shirai, T.: Beef tallow, but not perilla or corn oil, promotion of rat prostate and intestinal carcinogenesis by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 1026-1033, 2001.

朝元誠人, 白井智之: 前立腺発癌への食餌要因の影響. *腎泌予防医誌*, 9: 22-25, 2001.

白井智之 内分泌かく乱物質研究の最前線. In: (社)日本化学会 (ed.) 季刊 化学総説, Vol. 50, pp. 15-31. 東京: 学会出版センター, 2001.

Davis, B., Harleman, J.H., Heinrich, M., Maekawa, A., McConnell, R.F., Reznik, G., Tucker, M. Female Genital System. *International Classification of Rodent Tumors. The Mouse.* (Mohr, U., ed.) 211-268. Berlin: Springer, 2001.

Rehm, S., Harleman, J.H., Cary, M., Creasy, D., Ettlin, R.A., Eustis, S.L., Foley, G.L., LeNet, J.L., Maekawa, A., Mitsumori, K., McConnell, R.F., Reznik, G., Male Genital System. *International Classification of Rodent Tumours. The Mouse.* (Mohr, U., ed.) 163-210. Berlin: Springer, 2001.

Yoshida, M., Katsuda, S., Takenaka, A., Watanabe, G., Taya, K., Maekawa, A. Effects of neonatal exposure to a high-dose *p-tert*-octylphenol on the male reproductive tract in rats. *Toxicol. Lett.*, 121: 21-33, 2001.

Yoshida, M., Katsuda, S., Maekawa, A. Effects of endocrine disrupting chemicals with estrogenic activity on the female reproductive system in rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 14: 83-86, 2001.

Takahashi, M., Nishimura, S., Miyajima, K., Sasahara, K., Yoshida, M., Ando, J., Maekawa, A. Time-dependent promotion activity of 17 β -estradiol on uterine carcinogenesis in mice initiated with N-ethyl-N-nitrosourea. *Cancer Lett.*, 165: 123-130, 2001.

Watanabe, T., Adno-Lu, J., Imai, S., Takano, S., Takahashi, M., Maekawa, A., Spontaneous tumors in the uterus, testis and other organs of F1 hybrids between Donryu and F344 rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 14: 99-104, 2001.

- Katsuda, S., Yoshida, M., Kuroda, H., Ando, J., Takahashi, M., Kurokawa, Y., Watanabe, G., Taya, K., Maekawa, A. Uterine adenocarcinoma in N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-treated rats with high-dose exposure to *p*-tert-octylphenol during adult food. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93:1-9, 2002.
- Shimomoto, T., Yoshida, M., Takahashi, M., Maekawa, A. Sebaceous gland metaplasia in a mammary fibroadenoma developing in a female Donryu rat. *J. Toxicol. Pathol.*, 15: in press, 2002.
- Yoshida, M., Takenaka, A., Katsuda, S., Kurokawa, Y., Maekawa, A. Neonatal exposure to *p*-tert-octylphenol causes abnormal expression of estrogen receptor α and subsequent alteration of cell proliferating activity in the developing rat uteri. *Toxicol. Pathol.*, 30: in press, 2002.
- Masuda, C., Wanibuchi, H., Otori, K., Wei, M., Yamamoto, S., Hiroi, T., Imaoka, S., Funae, Y. and 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.
- Vijayaraghavan, M., Wanibuchi, H., Karim, R., Yamamoto, S., Masuda, C., Nakae, D., Konishi, Y. and Fukushima, S. : Dimethylarsinic acid induces 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in the kidney of NCI-Black-Reiter rats. *Cancer Lett.*, 165, 11-17, 2001.
- Seike, N., Wanibuchi, H., Morimura, K., Nishikawa, T., Kishida, H., Nakae, D., Hirata, K. and Fukushima, S. : Lack of promoting effect due to oral administration of dimethylarsinic acid on rat lung carcinogenesis initiated with *N*-bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine. *Cancer Lett.*, 175, 113-119, 2002.
- 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, 87-98, 2001.
- Suzuki T, Kishimoto Y, Ozaki S and Narita M: Mechanism of opioid dependence and interaction between opioid receptors. *Eur J Pain* 5, 63-65, 2001
- Narita M, Mizuo, Shibasaki M, Narita M and Suzuki T: Up-regulation of the Gq/11_ protein and protein kinase C during the development of sensitization to morphine-induced hyperlocomotion. *Neuroscience*, In press
- Narita M, Soma M, Tamaki H, Narita M and Suzuki T: Intensification of the development of ethanol dependence in mice lacking dopamine D₃ receptor. *Neurosci Lett*, In press
- 成田 年、瀧本 淳、相馬 仁、矢島義識、水尾圭祐、黒木由夫、鈴木 勉: Morphine 誘発自発運動促進作用に対する逆耐性形成時の μ -opioid 受容体機能変化 日神精薬理誌 21, 55-61, 2001
- 成田 年、鈴木 勉: オピオイド受容体と薬物依存 -モルヒネ依存の分子機構- 別冊・医学のあゆみ, 7 回膜貫通型受容体研究の新展開 -ポストゲノム時代の受容体研究のゆくえ, 199-205, 2001
- Hashizume T, Imaoka S, Mise M, Terauchi Y, Fujii T, Miyazaki H, Kamataki T, Funae Y. : Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 298-304, 2002.
- Minamiyama Y, Imaoka S, Takemura S, Okada S, Inoue M, Funae Y. : Escape from tolerance of organic nitrate by induction of cytochrome P450. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1498-1508, 2001
- Hiroi T, Kishimoto W, Chow T, Imaoka S, Igarashi T, Funae Y. : Progesterone oxidation by cytochrome P450 2D isoforms in the brain.

Endocrinology. 142, 3901-3908,2001

Yano H, Tsutsumi M, Fukura M, Chen WB, Shimanaka K, Tsuchishima M, Takase S, Imaoka S, Funae Y. : Study of cytochrome P450E1 mRNA level of mononuclear cells in patients with alcoholic liver disease. Alcohol Clin. Exp. Res. 25, 2S-6S,2001

Imaoka S, Hayashi K, Hiroi T, Yabusaki Y, Kamataki T, Funae Y. : A transgenic mouse expressing human CYP4B1 in the liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 284, 757-762, 2001

Imaoka S, Yoneda Y, Sugimoto T, Ikemoto S, Hiroi T, Yamamoto K, Nakatani T, Funae Y. : Androgen regulation of CYP4B1 responsible for mutagenic activation of bladder carcinogens in the rat bladder: detection of CYP4B1 mRNA by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. Cancer Lett. 166, 119-123,2001

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, 1135-1141, 2001

Toba H, Fukuyama R, Sasaki M, Shiga K, Ishibashi S, Fushiki S. A Japanese patient with cerebrotendinous xanthomatosis has different mutations within two functional domains of *CYP27*. Clin Genet 61, 77-78, 2002

Hinoue A, Fushiki S, Nishimura Y, Shiota K. In utero exposure to brief hyperthermia interferes with the production and migration of neocortical neurons and induces apoptotic neuronal death in the fetal mouse brain. Brain Res Dev Brain Res, 132, 59-67, 2001

Cui FD, Kishida T, Ohashi S, Asada H, Yasutomi K, Satoh E, Kubo T, Fushiki S, Imanishi J, Mazda O. Highly efficient gene transfer into murine liver achieved by intravenous administration of naked

Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vectors. Gene Ther, 8, 1508-1513, 2001

Akita K, Fushiki S, Fujimoto T, Inoue M, Oguri K, Okayama M, Yamashina I, Nakada H. Developmental expression of a unique carbohydrate antigen, Tn antigen, in mouse central nervous tissue. J Neurosci Res, 65, 595-603, 2001

Shiraishi J, Tatsumi T, Keira N, Akashi K, Mano A, Yamanaka S, Matoba S, Asayama J, Yaoi T, Fushiki S, Fliss H, Nakagawa M. Important role of energy-dependent mitochondrial pathways in cultured rat cardiac myocyte apoptosis. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 281, H1637-H1647, 2001

Fukuyama R, Izumoto T, Fushiki S. The cerebrospinal fluid level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia. Eur Neurol, 46, 35-38, 2001

Kitaya K, Yasuda J, Fushiki S, Honjo H. Localization of interferon regulatory factor (IRF)-1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. Fertil Steril, 75, 992-996, 2001

Kanemura Y, Mori K, Sakakibara S, Fujikawa H, Hayashi H, Nakano A, Matsumoto T, Tamura K, Imai T, Ohnishi T, Fushiki S, Nakamura Y, Yamasaki M, Okano H, Arita N. Musashi 1, an evolutionarily conserved neural RNA-binding protein, is a versatile marker of human glioma cells in determining their cellular origin, malignancy, and proliferative activity. Differentiation, 68, 141-152, 2001

Nishizawa Y, Goto HG, Tanigaki Y, Fushiki S, Nishizawa Y. Induction of apoptosis in an androgen-dependent mouse mammary carcinoma cell line by methylcobalamin. Anticancer Res, 21, 1107-1110, 2001

Akita K, Fushiki S, Fujimoto T, Munesue S, Inoue

M, Oguri K, Okayama M, Yamashina I, Nakada H. Identification of the core protein carrying the Tn antigen in mouse brain: specific expression on syndecan-3. *Cell Struct Funct*, 26, 271-278, 2001

伏木信次. 脳形成障害の分子病態, 小児の脳神経, 26, 95-101, 2001

2. 学会発表

竹下文隆、小川久美子、朝元誠人、高橋智、鈴木周五、杉浦諭、白井智之、PhIP 誘発ラット大腸および乳腺腫瘍発生に対する caffeine の臓器特異性修飾作用の機序、第 60 回日本癌学会総会、2001 年 9 月、横浜。

曹永晩、高橋智、池田佳久、稲熊真悟、小川久美子、今井田克己、白井智之、ラットにおける PhIP 経胎盤・経乳汁曝露による前立腺及び大腸発がんリスクに対する影響、第 60 回日本癌学会総会、2001 年 9 月、横浜。

朝元誠人、外岩戸尚美、今井田克己、小川久美子、二口充、彦坂敦也、竹下文隆、白井智之、肝細胞間連絡能低下を示すコネクシン 32 ドミナントネガティブ変異トランスジェニックラットの肝発癌高感受性、第 60 回日本癌学会総会、2001 年 9 月、横浜。

二口充、朝元誠人、今井田克己、高橋智、彦坂敦也、曹永晩、加藤俊男、白井智之、PhIP ラット前立腺癌における PIN から Carcinoma への進展に関わる因子の追究、第 60 回日本癌学会総会、2001 年 9 月、横浜。

朝元誠人、外岩戸尚美、曹永晩、白井智之、トランスジェニックラットを用いた前立腺および肝発がん研究、第 18 回日本毒性病理学会、2002 年 1 月、東京。

曹永晩、朝元誠人、鈴木周五、外岩戸尚美、高橋智、白井智之、遺伝子プロモーター/SV40T 抗原発現遺伝子導入ラットにおけるエストロゲン投与による前立腺癌病変の検討、第 18 回日本毒性病理学会、2002 年 1 月、東京。

吉田緑、勝田真一、渡辺元、田谷一善、前川昭彦：胎仔期および授乳期の低用量 bisphenol A 曝露がラット雌性生殖器系に及ぼす影響、第 28 回トキシコロジー学会学術年会、2001 年 6 月、東京。

Yoshida,M., Katsuda,S., Takahashi,M., Shimomoto,T., Watanabe,G., Taya,K., Maekawa,A.: Effect of in utero and lactational exposure to low-dose bisphenol A on rat uterine carcinogenesis. 環境ホルモン学会第 4 回研究発表会、2001 年 12 月、つくば。

吉田緑、勝田真一、谷本倫、高橋正一、下元貴澄、田谷一善、中江大、黒川雄二、前川昭彦：新生仔期オクチルフエノール曝露時間の長さがラット子宮発がんに与える影響、第 18 回日本毒性病理学会、2002 年 1 月、東京。

Nishikawa, T., Ogawa, M., Kanako, M., Seike, N., Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Promoting effects of an organic arsenicals, dimethylarsinic acid and related compounds in rat liver carcinogenesis. 92nd Annual Meeting, American Association for Cancer Research, March 24-28, New Orleans, LA, U.S.A., 2001 (AACR proceedings, vol.42, March 2001, 1252, p.110)

Fukushima, S., Wanibuchi, H., Wei, M., Salim, E.I., Nishikawa, T. and Morokawa, T.: Carcinogenicity of dimethylarsinic acid and related compounds in animals. Annual Meeting, International Conference on Environmental Toxicology of Metals and Metalloids -Environmental Chemistry, Toxicology and Health, July 1-5, South Molle Island, Australia. 2001 (Program, p.23)

Fukushima, S., Wanibuchi, H., Wei, M., Salim, E.I. and Morimura, K.: Carcinogenicity of dimethylarsinic acid, an inorganic arsenic metabolite in rodents. 18th European Congress of Pathology, September 8-13, Berlin, Germany, 2001 (Final Program, P-124, p.44)

母親ラットから胎児・乳児期のゲニステイン
暴露の影響：第 55 回日本栄養
食糧学会、平成 13 年 5 月 7 日、京都

G. 知的所有権の取得状況
なし

男性の骨粗鬆症モデルマウスの骨量減少に対
する大豆イソフラボンの効果
第 55 回日本栄養食糧学会、平成 13 年 5 月 7
日、京都

Hormonal effects of soy isoflavones on pregnant
and lacteal rats and their
suckling pups: 17th Int. Congress of Nutrition 2001,
August 27-31, Vienna, Austria

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 に曝露されたマ
ウスの行動変化 第 4 回日本薬理学会年会、
2001 年 3 月、横浜

坂田 守、成田 年、水尾圭祐、鈴木 勉
Bisphenol A 胎児期慢性曝露マウスにおける行
動に及ぼす影響 第 7 回 日本行動薬理研究
会、2001 年 8 月、福島

水尾圭祐、成田 年、坂田 守、鈴木 勉
Bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露による
dopamine 関連行動に及ぼす影響 第 24 回日本
神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会、2001
年 9 月、京都

鈴木 勉、水尾圭祐、坂田 守、成田 年 ビ
スフェノール A の脳神経系への影響 フォー
ラム 2001、2001 年 10 月、金沢

船江良彦、廣井豊子
ビスフェノールの脳内アミンに対する作用（シ
ンポジウム）
第 74 回日本薬理学会年会、2001 年

岡田和嗣、廣井豊子、船江良彦
Bisphenol A の中枢神経系に及ぼす作用
環境ホルモン学会第 4 回研究発表会、2001 年

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

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ビスフェノール A および 4-ノニルフェノール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および発癌物質による前立腺発がんに対する影響を目的とし、感受性の高い胎児・乳児期での影響をみるために、F344 ラットの妊娠期間および授乳期間中に投与した。前年度に報告したビスフェノール A の結果と同様にノニルフェノールも児動物の雄性生殖器系に対する影響はなかった。またビスフェノール A の前立腺発がんに対する影響もなかった。環境中ではこれらの内分泌かく乱化学物質に単独で曝露されているのではなく、複合で曝露されることから、ビスフェノール A およびノニルフェノールの複合投与をしたが、児動物の雄性生殖器系への影響はなかった。

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ビスフェノール A および 4-ノニルフェノール

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

【実験 1】11 週齢より交配を開始し、妊娠を確認した雌 F344 ラットに妊娠 0 日から離乳までの間、ビスフェノール A を 0, 0.05, 7.5, 30 および 120mg/kg/day の投与量で毎日強制経口投与した。作出された F1 雄動物には 5 週齢から 20 週間、DMAB を 50mg/kg の投与量で 2 週間に 1 回皮下投与した。その後 65 週齢で屠殺剖検し、

DMAB による前立腺発がんに対するビスフェノール A の影響を検索した。

【実験 2】実験 1 と同様に、妊娠動物にノニルフェノールを 0, 0.1, 10 および 100mg/kg/day の投与量で毎日強制経口投与した。作出された F1 雄動物には 5 週齢から 20 週間、PhIP を 100mg/kg の投与量で 1 週間に 1 回強制経口投与した。その後 65 週齢で屠殺剖検し、PhIP による前立腺発がんに対するノニルフェノールの影響を検索する。(現在、動物実験継続中である) また、PhIP を投与しない群を設け、性成熟齢である 13 週齢で屠殺剖検し、ノニルフェノールの雄性生殖器系への影響について検索した。

【実験 3】実験 1 と同様に、妊娠動物に実験 1 および 2 で使用した最低用量であるビスフェノール A 0.05mg/kg/day およびノニルフェノール 0.1mg/kg/day をそれぞれ単独あるいは複合で毎日強制経口投与した。作出された F1 雄動物は 13 週齢で屠殺剖検し、精子検査をはじめ、雄性生殖器系への影響を検索した。

(倫理面への配慮)

動物実験は本大学の動物委員会の承諾を得て、動物愛護にそったプロトコールに従って行った。

C. 研究結果

【実験 1】ビスフェノール A 120mg/kg/day 投与群で母動物の妊娠期間中の体重が有意な増加抑制を示したが、授乳期間中では差は認められなかった。ま

た妊娠期間、出生率などに影響を認めなかった。F1 雄動物の体重変化、生殖器系器官重量、下垂体、甲状腺重量において有意な差は認めなかった。また前立腺における PIN、癌および精囊における異形過形成の発生率は群間に差を認めなかった。

【実験 2】ノニルフェノール 100mg/kg/day 投与群で妊娠期間中の母動物の体重が有意な増加抑制を示し、妊娠期間も 24.0 日間と延長傾向を示した。この変化は F344 ラットである母動物に対するノニルフェノールの毒性変化と考えられた。出生児の数や性比には影響を認めなかった。13 週齢で屠殺した F1 雄動物の体重変化、生殖器系器官重量、精子検査(精子数、精子運動率および異常形態発生率) および精巣の精細管ステージングには有意な差を認めなかった。現在、PhIP を投与した発がん実験は実験第 42 週(47 週齢)を経過中であり、その体重変化には群間に有意な差を認めていない。

【実験 3】ノニルフェノール 0.05mg/kg/day 単独投与群で妊娠期間中の母動物の体重が有意な増加抑制を示したが、人為的影響と推察される 3 例の出産しなかった動物が含まれており、被験物質の影響ではないと考えた。授乳期間中では有意な差を認めなかった。そのほか、妊娠期間、出生児の数や性比には影響を認めなかった。13 週齢で屠殺した F1 雄動物の体重変化、生殖器系器官重量、精子検査(精子数、精子運動率および異常形態発生率) および精巣の精細管ステージングにおいて有

意な差を認めなかった。また、屠殺時の血清中テストステロン濃度にも群間に差を認めなかった。現在、精巣の精細管ステージおよび生殖器系器官の H.E. 標本による病理組織学的検査実施中である。

D. 考察

前年度の報告でビスフェノール A もしくはノニルフェノール単独曝露は F1 雄動物の性成熟齢（13 週齢）での生殖器系に対して影響を示さないことを述べたが、今回、60 週間の DMAB 発がんモデルを用いてビスフェノール A は前立腺発がんに対して影響を及ぼさないことが示された。ノニルフェノールの前立腺発がんに及ぼす影響については現在動物実験継続中である。さらに、ビスフェノール A およびノニルフェノールの低用量複合投与においても 13 週齢 F1 雄動物の生殖器系に対する影響はないことが示された。

E. 結論

F344 雌ラットに妊娠 0 日から離乳までの間ビスフェノール A およびノニルフェノールをそれぞれ単独あるいは複合投与しても、性成熟齢 F1 雄動物の生殖器系へ影響を示さず、さらに 60 週間の前立腺発がん性試験においてもビスフェノール A は影響し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

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.

Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Asai, I., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N., Shirai, T.: Lack of tumor promoting effects of carrageenan on 1,2-dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in male F344 rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 14: 37-43, 2001.

Thamavit, W., Pratoomtone, P., Kongtim, S., Shirai, T., Ito, N.: Inhibition by vitamin E of cholangiocarcinoma induction due to combined nitrite and aminopyrine. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2: 69-70, 2001.

Kimoto, N., Hirose, M., Futakuchi, M., Iwata, T., Kasai, M., Shirai, T.: Site-dependent modulating effects of conjugated fatty acids from safflower oil in a rat two-stage carcinogenesis model in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett.*, 168: 15-21, 2001.

Hirose, M., Hoshiya, T., Mizoguchi, Y., Nakamura, A., Akagi, K., Shirai, T.: Green tea catechins enhance tumor development in the colon without effects in the lung or thyroid after pretreatment with 1,2-dimethylhydrazine or 2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine in male F344 rats. *Cancer Lett.*, 168: 23-29, 2001.

Hagiwara, A., Takesada, Y., Tanaka, H., Tamano, S., Hirose, M., Ito, N., Shirai, T.: Dose-dependent induction of glandular stomach preneoplastic and neoplastic lesions in

male F344 rats treated with catechol chronically. *Toxicol. Pathol.*, 29: 180-186, 2001.

Imaida, K., Sano, M., Tamano, S., Asamoto, M., Ogawa, K., Futakuchi, M., Shirai, T.: Organ dependent enhancement of rat 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) carcinogenesis by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP): positive effects on the intestine but not the prostate. *Carcinogenesis*, 22: 1295-1299, 2001.

Asamoto, M., Hokaiwado, N., Cho, Y.-M., Ikeda, Y., Takahashi, S., Shirai, T.: Metastasizing neuroblastomas from taste buds in rat transgenic for the simian virus 40 large T antigen under control of the probasin gene promoter. *Toxic. Pathol.*, 29: 363-368, 2001.

Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N., Shirai, T.: Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett.*, 171: 17-25, 2001.

Mori, T., Imaida, K., Tamano, S., Sano, M., Takahashi, S., Asamoto, M., Takeshita, M., Ueda, H., Shirai, T.: Beef tallow, but not perilla or corn oil, promotion of rat prostate and intestinal carcinogenesis by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 1026-1033, 2001.

朝元誠人, 白井智之: 前立腺発癌への食餌要因の影響. 腎臓予防医誌, 9: 22-25, 2001.

白井智之 内分泌かく乱物質研究の最前線. In: (社)日本化学会 (ed.) 季刊 化学総説, Vol. 50, pp. 15-31. 東京: 学会出版センター, 2001.

2. 学会発表

竹下文隆、小川久美子、朝元誠人、高橋智、鈴木周五、杉浦諭、白井智之、PhIP 誘発ラット大腸および乳腺腫瘍発生に対するcaffeine の臓器特異性修飾作用の機序、第 60 回日本癌学会総会、横浜、(2001 年 9 月)

曹永晩、高橋智、池田佳久、稲熊真悟、小川久美子、今井田克己、白井智之、ラットにおける PhIP 経胎盤・経乳汁曝露による前立腺及び大腸発がんリスクに対する影響、第 60 回日本癌学会総会、横浜、(2001 年 9 月)

朝元誠人、外岩戸尚美、今井田克己、小川久美子、二口充、彦坂敦也、竹下文隆、白井智之、肝細胞間連絡能低下を示すコネクシン 32 ドミナントネガティブ変異トランスジェニックラットの肝発癌高感受性、第 60 回日本癌学会総会、横浜、(2001 年 9 月)

二口充、朝元誠人、今井田克己、高橋智、彦坂敦也、曹永晩、加藤俊男、白井智之、PhIP ラット前立腺癌における PIN から Carcinoma への進展に関わる因子の追究、第 60 回日本癌学会総会、横浜、(2001 年 9 月)