

High susceptibility of newborn rats to 3-methylphenol.

both sexes at 1,000 mg/kg and of females at 300 mg/kg and in relative kidney weights of females at 1,000 mg/kg (Table 6). However, there was no change in absolute organ weights in any 3-methylphenol-treated group.

On histopathological examination, no dose-related changes were observed in any of the 3-methylphenol-treated groups. At the end of the recovery period, no significant changes in any parameters were observed.

Table 3. Blood chemical findings after dosing period in 18-day study of 3-methylphenol in newborn rats (main study).

Dose (mg/kg)	0	30	100	300
Males				
No. of animals	6	6	6	6
GOT (IU/L)	127 ± 13	121 ± 7	121 ± 11	132 ± 22
GPT (IU/L)	24 ± 4	21 ± 4	21 ± 3	21 ± 3
γ-GTP (IU/L)	0.84 ± 0.24	0.90 ± 0.15	1.07 ± 0.11	1.19 ± 0.15**
Total bilirubin (mg/dL)	0.40 ± 0.03	0.41 ± 0.04	0.41 ± 0.03	0.47 ± 0.02**
Total cholesterol (mg/dL)	74 ± 11	78 ± 9	81 ± 7	85 ± 9
Triglyceride (mg/dL)	29 ± 10	25 ± 6	32 ± 3	28 ± 7
BUN (mg/dL)	13.5 ± 1.8	11.8 ± 2.1	13.0 ± 2.1	17.9 ± 3.6*
Females				
No. of animals	6	6	6	6
GOT (IU/L)	122 ± 15	119 ± 12	131 ± 9	116 ± 10
GPT (IU/L)	16 ± 2	19 ± 4	19 ± 4	17 ± 2
γ-GTP (IU/L)	0.93 ± 0.21	0.85 ± 0.10	0.98 ± 0.26	1.20 ± 0.14
Total bilirubin (mg/dL)	0.41 ± 0.04	0.40 ± 0.03	0.40 ± 0.02	0.45 ± 0.03
Total cholesterol (mg/dL)	77 ± 11	77 ± 10	75 ± 8	78 ± 12
Triglyceride (mg/dL)	24 ± 5	26 ± 2	25 ± 3	23 ± 3
BUN (mg/dL)	13.5 ± 2.3	13.5 ± 2.5	13.2 ± 2.3	14.2 ± 2.8

Data are mean ± SD values.

*: Significantly different from control group ($p < 0.05$), **: Significantly different from control group ($p < 0.01$).

Table 4. Clinical signs and mortality in repeated dose studies of 3-methylphenol in young rats.

Dose (mg/kg)	Dose-finding study (14-day)				Main study		
	125	250	500	1,000	100	300	1,000
Males							
No. of animals	5	5	5	5	7	7	14
No. of dead animals	-	-	-	-	-	-	-
No. of animals with clinical signs	-	-	-	3	-	-	11
Salivation	-	-	-	3	-	-	12
Tremors	-	-	-	1	-	-	1
Prone/lateral position	-	-	-	-	-	-	-
Soiled perigenital fur	-	-	-	-	-	-	-
Females							
No. of animals	5	5	5	5	7	7	14
No. of dead animals	-	-	-	-	-	-	-
No. of animals with clinical signs	-	-	-	-	-	-	8
Salivation	-	-	-	4	-	-	13
Tremors	-	-	-	2	-	-	2
Prone/lateral position	-	-	-	-	-	-	2
Soiled perigenital fur	-	-	-	-	-	-	-

-: No animals with clinical sign.

Table 5. Blood chemical findings after dosing period in repeated dose studies of 3-methylphenol in young rats (main study).

Dose (mg/kg)	0	100	300	1,000
Males				
No. of animals	7	7	7	7
GOT (IU/L)	68.6 ± 4.8	65.4 ± 5.4	62.7 ± 3.2	59.4 ± 5.4**
GPT (IU/L)	24.7 ± 2.9	25.4 ± 3.7	27.0 ± 2.9	28.0 ± 3.7
γ-GTP (IU/L)	0.17 ± 0.24	0.21 ± 0.13	0.60 ± 1.15	0.36 ± 0.23
Total bilirubin (mg/dL)	0.056 ± 0.005	0.049 ± 0.007	0.054 ± 0.010	0.050 ± 0.008
Total cholesterol (mg/dL)	52.7 ± 15.1	58.1 ± 11.8	58.3 ± 5.8	69.0 ± 9.4*
Triglyceride (mg/dL)	43.7 ± 19.8	54.7 ± 22.4	37.6 ± 3.1	50.0 ± 26.9
BUN (mg/dL)	13.89 ± 1.46	14.10 ± 0.85	14.56 ± 1.17	16.23 ± 2.14*
Females				
No. of animals	7	7	7	7
GOT (IU/L)	57.1 ± 4.3	65.9 ± 3.6	62.0 ± 5.7	59.1 ± 3.1
GPT (IU/L)	20.6 ± 2.2	21.4 ± 2.9	18.9 ± 3.1	20.1 ± 4.2
γ-GTP (IU/L)	0.83 ± 0.20	0.90 ± 0.16	1.00 ± 0.29	1.06 ± 0.10
Total bilirubin (mg/dL)	0.053 ± 0.011	0.056 ± 0.011	0.043 ± 0.008	0.054 ± 0.008
Total cholesterol (mg/dL)	63.4 ± 14.0	58.7 ± 10.6	61.4 ± 10.3	78.7 ± 13.7
Triglyceride (mg/dL)	15.4 ± 8.2	11.3 ± 4.8	9.9 ± 1.8	16.1 ± 5.2
BUN (mg/dL)	17.71 ± 1.96	16.63 ± 1.11	17.30 ± 2.14	18.03 ± 2.00

Data are mean ± SD values.

*: Significantly different from control group ($p < 0.05$), **: Significantly different from control group ($p < 0.01$).**Table 6.** Organ weights after dosing period in repeated dose studies of 3-methylphenol in young rats (main study).

Dose (mg/kg)	0	100	300	1,000
Males				
No. of animals	7	7	7	7
Body weight ^{a)} (g)	325.0 ± 23.5	345.6 ± 23.5	335.9 ± 16.7	298.3 ± 31.8
Brain (g)	2.04 ± 0.06 ^{b)} (0.63 ± 0.05 ^{c)}	2.11 ± 0.09 (0.61 ± 0.03)	2.03 ± 0.08 (0.60 ± 0.02)	2.05 ± 0.06 (0.69 ± 0.06*)
Liver (g)	10.55 ± 1.30 (3.24 ± 0.22)	11.28 ± 1.08 (3.26 ± 0.19)	11.29 ± 0.68 (3.36 ± 0.11)	10.94 ± 2.01 (3.65 ± 0.34**)
Kidney (g)	2.65 ± 0.24 (0.82 ± 0.04)	2.82 ± 0.24 (0.82 ± 0.03)	2.78 ± 0.19 (0.83 ± 0.06)	2.61 ± 0.23 (0.88 ± 0.05)
Testis (g)	2.96 ± 0.31 (0.91 ± 0.11)	3.06 ± 0.21 (0.89 ± 0.08)	2.95 ± 0.30 (0.88 ± 0.10)	2.93 ± 0.22 (0.99 ± 0.14)
Females				
No. of animals	7	7	7	7
Body weight (g)	210.1 ± 15.4	207.6 ± 13.0	197.3 ± 19.3	186.4 ± 17.4*
Brain (g)	1.96 ± 0.06 (0.93 ± 0.06)	1.90 ± 0.07 (0.92 ± 0.05)	1.89 ± 0.07 (0.96 ± 0.08)	1.88 ± 0.06 (1.01 ± 0.09)
Liver (g)	6.39 ± 0.68 (3.04 ± 0.17)	6.59 ± 0.56 (3.17 ± 0.08)	6.60 ± 0.67 (3.35 ± 0.13**)	6.51 ± 0.45 (3.50 ± 0.20**)
Kidney (g)	1.66 ± 0.18 (0.79 ± 0.06)	1.73 ± 0.11 (0.84 ± 0.05)	1.65 ± 0.17 (0.84 ± 0.06)	1.72 ± 0.14 (0.92 ± 0.03**)
Ovary (mg)	81.4 ± 13.7 (38.8 ± 6.3)	82.0 ± 14.3 (39.5 ± 6.1)	85.0 ± 14.0 (43.4 ± 8.3)	78.9 ± 13.3 (42.4 ± 6.8)

Data are mean ± SD values.

^{a)}: Body weight after overnight starvation following last dosing, ^{b)}: Absolute weight, ^{c)}: Relative weight (g or mg/100 g body weight).*: Significantly different from control group ($p < 0.05$), **: Significantly different from control group ($p < 0.01$).

High susceptibility of newborn rats to 3-methylphenol.

Based on clinical signs of neurotoxicity with lowering of body weights, the unequivocally toxic level was concluded to be 1,000 mg/kg/day. Increase in relative liver weight without related changes at 300 mg/kg in the main study was not considered as an adverse effect. In the dose-finding study, effects on liver were noted at 500 mg/kg but no dose-related changes were evident at 250 mg/kg, which could not be taken into consideration of the estimation of the NOAEL because of the insufficient dosing period (14 days). Therefore, the NOAEL was concluded to be 300 mg/kg/day.

DISCUSSION

Concerning health of infants exposed to chemicals, our testing project has provided the following benefits. First, detailed examination of physical development and sexual maturation during the early postnatal period provides specific information on chemical toxicity towards newborn animals. Second, because the same experimental conditions, as much as possible, are set between newborn and young rat studies, this facilitates comparisons of toxicity. Furthermore, for toxicity levels, two additional analyses (estimation of unequivocally toxic levels in addition to NOAELs and careful incorporation of the dose-finding study) allow more precise / appropriate comparisons. So far, we have reported three comparative analyses of 4-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol and 3-aminophenol (Koizumi *et al.*, 2001, 2002a, 2002b; Yamamoto *et al.*, 2001; Takano *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2002). As results, the toxicity profiles of these chemicals were similar in both ages, the susceptibility of newborn rats was 2 to 4 times higher than that of young rats, and no effects on physical development, sexual maturation and reflex ontogeny were observed.

In the present study, 3-methylphenol was selected as a fourth chemical. Clinical signs, indications of neurotoxicity to the central nervous system, were observed in both ages but not at the same dose level. Decrease in body weight gain also occurred in both ages but at a 3 times lower dose in newborn animals. In the newborn study, significant decrease in absolute brain weight was also evident at the highest dose, but no abnormalities on histopathology in the brain or in terms of functional development (reflex ontogeny) were observed. Brain weight changes were observed only in the groups showing 10% and more lowering of body weight and were not noted in the dose-finding study. Brain weight might be affected by decrease in body weight gain. As unequivocally toxic levels were clearly judged to be

300 mg/kg/day and 1,000 mg/kg/day for newborn and young studies, respectively, based on neurotoxic effects and decrease in body weight gain, newborn rats were considered to be approx. 3 times more susceptible to this chemical than young rats. NOAELs were concluded to be 30 mg/kg/day and 300 mg/kg/day for newborn and young rats, respectively, indicating a 10 times higher susceptibility in the newborn. However, tremors under contact stimulus were observed in only three males on single days and hypersensitivity on handling was noted only in one male on a single day in the 100 mg/kg newborns. Furthermore, no such toxic clinical signs were noted at 100 mg/kg in the dose-finding study under the same experimental conditions. It appears that the realistic no adverse effect dose for the newborn is slightly lower than 100 mg/kg/day rather than around 30 mg/kg/day. Based on this speculation and equal toxicity at the unequivocally toxic levels, the difference in the sensitivity to 3-methylphenol between newborn and young rats could be considered to be 3- to 4-fold.

As for the toxicity of 3-methylphenol, much information is available including unpublished data reported in reviews on this chemical or cresols (ATSDR, 1991; EHC, 1995; IRIS, 1997). In a 28-day feeding study (NTP, 1992), F344 rats were given diet containing 3-methylphenol at 0, 300, 1,000, 3,000, 10,000, 30,000 mg/kg diet. Depression of body weight gain, increase in relative liver and kidney weight and uterus atrophy were observed at 30,000 mg/kg diet (about 2,390 mg/kg/day). Increase in relative liver weight was also noted at 10,000 mg/kg diet (866 mg/kg/day). These results are consistent with our present results for young rats. However, clinical signs observed in our young rat study (daily administration by gavage) were not found at any doses in this NTP study, which might be due to the lower blood concentration with dietary application than in our gavage study. In a 90-day study (MBA, 1988), SD rats were administered 3-methylphenol by gavage at 50, 150, 450 mg/kg. In addition to depression of body weight gain at 150 mg/kg and more, a pronounced increase in the incidence of salivation, tremors and urination was observed at 450 mg/kg. In another 90-day study under the same test conditions with more detailed neurotoxic analysis, hypoactivity, rapid labored respiration and excessive salivation were observed sporadically in all treated groups, although few significant changes were found in performance on neurobehavioral test batteries, and no brain weight changes and no gross or histopathological changes in the brain or other nervous tissues (TRL,

1986). These clinical signs observed at lower doses than our young rat study might be due to the longer dosing period, but no information was provided on the incidence or dose-relationship. As for developmental toxicity, no effects on fetuses were observed in rats treated with 3-methylphenol by gavage at 450 mg/kg or less on days 6-15 of gestation (BRRC, 1988a). However, in a 2-generation reproductive toxicity study on rats by gavage (BRRC, 1989), some effects on pup body weights and survival (no details on the incidence and the degree) were evident with 450 mg/kg, which caused severe maternal toxicity including death and various clinical signs. There were occasional body weight changes in lower dose groups, but it is not clear whether these changes were treatment-related.

Some causes of differences in susceptibility of newborn and young rats to 3-methylphenol can be considered, such as specific physiological characteristics and immaturity of the brain-blood barrier and metabolism in the newborn. It is reported that 3-methylphenol is mainly eliminated as glucuronides in urine (Bray *et al.*, 1950). UDP-glucuronyltransferase activity in rat liver is known to be substrate-specific and generally low in neonates, and the activity against phenolic substances, *p*-nitrophenol and 1-naphthol, at birth has been shown to be comparable to adults but nearly 50% lower during the suckling period (exposure period in our newborn study) (Watkins and Klaassen, 1985; Rachmel and Hazelton, 1986). Therefore, the low capacity of glucuronidation might be one of the major causes for higher susceptibility of newborn rats to 3-methylphenol. In the case of humans, hepatic glucuronidation at birth is known to be relatively immature (Gow *et al.*, 2001), and it has been shown that *in vitro* bilirubin glucuronidation activity at birth is much lower than that of mature-phase values (Kawade and Onishi, 1981). These data suggest that human infants may be more susceptible to chemicals that are detoxified by this pathway.

The effects on the central nervous system, leading to death, are a major toxicological outcome characteristic of some phenolic compounds (Koizumi *et al.*, 2001, 2002b); however, the mechanism(s) responsible for eliciting neurotoxicity is unknown. As for hepatotoxicity, several studies on the mechanism and the structure activity relationship, using hepatocytes or liver slices, have been reported for three isomers of methylphenols and some para-alkylphenols (Bolton *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1994, 1995, 1996; Kitagawa, 2001). In these studies, it has been shown that the quinone intermediates are most likely to be the

causative agents for hepatotoxicity, possibly via mitochondrial toxicity, and the hepatotoxicity of alkylphenols depends on the position and the kind of alkyl groups with 4-methylphenol exerting the greatest degree of hepatotoxicity. In the case of 3-methylphenol, the neurotoxicity seems to be the most sensitive endpoint in both newborn and young animals, since only minor increases in relative liver weight have been observed without any histopathological changes.

In conclusion, 3-methylphenol showed the same toxicity profile—that is neurological symptoms and growth inhibition—in both newborn and young rats. However, the susceptibility of the newborn rats was 3 to 4 times higher than that of young rats, consistent with our previous results for three chemicals, 4-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol and 3-aminophenol, which showed 2 to 4 times differences in susceptibility between newborn and young rats.

ACKNOWLEDGMENT

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Office of Chemical Safety, Pharmaceutical and Medical Safety Bureau, Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

REFERENCES

- ATSDR (1991): Toxicological profile for cresols: *o*-cresol, *p*-cresol, *m*-cresol, ed. by Agency for Toxic Substances and Disease Registry, published by US Department of Health & Human Services, Public Health Service.
- Besunder, J.B., Reed, M.D. and Blumer, J.L. (1988): Principles of drug biotransformation in the neonate. A critical evaluation of the pharmacokinetic-pharmacodynamic interface (Part I). *Clin. Pharmacokin.*, **14**, 189-216.
- Bolton, J.L., Valerio, L.G. Jr., and Thompson, J.A. (1992) The enzymatic formation and chemical reactivity of quinone methides correlate with alkylphenol-induced toxicity in rat hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, 816-822.
- Bray, H.G., Thorpe, W.V. and White, K. (1950): Metabolism of derivatives of toluene. *Biochem. J.*, **46**, 275-278.
- BRRC (1988a): Developmental toxicity evaluation of *o*-, *m*-, or *p*-cresol administered by gavage to Sprague Dawley (CD) rats. Export, Pennsylvania, Bushy Run Research Center (Unpublished data submitted to the US Environmental Protec-

High susceptibility of newborn rats to 3-methylphenol.

- tion Agency, Office of Toxic Substances) (Fiche No. OTS0517695), cited in Environmental Health Criteria 168 (1995).
- BRRC (1988b): Developmental toxicity evaluation of *o*-, *m*-, or *p*-cresol administered by gavage to New Zealand white rabbits. Export, Pennsylvania, Bushy Run Research Center (Unpublished data submitted to the US Environmental Protection Agency, Office of Toxic Substances) (Fiche No. OTS0517695), cited in EHC (1996).
- BRRC (1989): Two-generation reproduction study of *m*-cresol (CAS No. 108-39-4) administered by gavage to Sprague Dawley (CD) rats. Export, Pennsylvania, Bushy Run Research Center (Project report 51-634) (Unpublished data submitted to the Chemical Manufacturers Association Cresols Panel, Washington), cited in EHC (1996).
- Chemical Products' Handbook (2002): Chemical Products of 14102 "14102 no Kagakushohin" published by The Chemical Daily Co., Ltd., Tokyo.
- EHC (1995): Cresols, Environmental Health Criteria, 168.
- Faustman, E.M., Silbernagel, S.M., Fenske, R.A., Burbacher, T.M. and Ponce, R.A. (2000): Mechanisms underlying children's susceptibility to environmental toxicants. *Environ. Health Perspect.*, **108** (Suppl. 1), 13-21.
- Gow, P.J., Ghabrial, H., Smallwood, R.A., Morgan, D.J. and Ching, M.S. (2001): Neonatal hepatic drug elimination. *Pharmacol. Toxicol.*, **88**, 3-15.
- IRIS (1997): Integrated Risk Information System. Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.
- Kawade, N. and Onishi, S. (1981): The prenatal and postnatal development of UDP-glucuronyltransferase activity towards bilirubin and the effect of premature birth on this activity in the human liver. *Biochem. J.*, **196**, 257-260.
- Kearns, G.L. and Reed, M.D. (1989): Clinical pharmacokinetics in infants and children. A reappraisal. *Clin. Pharmacokinet.*, **17** (Suppl. 1), 29-67.
- Kitagawa, A. (2001): Effects of cresols (*o*-, *m*-, and *p*-isomers) on the bioenergetic system in isolated rat liver mitochondria. *Drug Chem. Toxicol.*, **24**, 39-47.
- Koizumi, M., Yamamoto, Y., Ito, Y., Takano, M., Enami, T., Kamata, E. and Hasegawa, R. (2001): Comparative study of the toxicity of 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol in newborn and young rats. *J. Toxicol. Sci.*, **26**, 299-311.
- Koizumi, M., Yamamoto, Y., Ito, Y., Takano, M., Enami, T., Kamata, E. and Hasegawa, R. (2002a): Comparative study of the toxicity of 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol in newborn and young rats. *The Toxicologist*, **61**, 152-153.
- Koizumi, M., Nishimura, N., Enami, T., Sunaga, M., Horikawa, H., Kamata, E. and Hasegawa, R. (2002b): Comparative toxicity study of 3-aminophenol in newborn and young rats. *J. Toxicol. Sci.*, **27**, 411-421.
- Mann, H.B. and Whitney, D.R. (1947): On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Stat.*, **18**, 50-60.
- MBA (1988): Subchronic toxicity of *meta*-cresol in Sprague Dawley rats. Bethesda, Maryland, Microbiological Associates (Unpublished data submitted to the US Environmental Protection Agency), cited in EHC (1995).
- Morselli, P.L. (1989): Clinical pharmacology of the perinatal period and early infancy. *Clin. Pharmacokinet.*, **17** (Suppl. 1), 13-28.
- Nishimura, N., Enami, T., Koizumi, M., Kamata, E. and Hasegawa, R. (2002): Repeated dose toxicity of 3-aminophenol in newborn rats and the comparison with that in young rats. Abstracts of the 29th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicology, p.185.
- NTP (1992): Toxicity studies of cresols (CAS nos. 95-48-7, 108-39-4, 106-44-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies), Research Triangle Park, North Carolina, National Toxicology Program.
- Pope, C.N., Chakraborti, T.K., Chapman, M.L., Farrar, J.D. and Arthun, D. (1991): Comparison of *in vivo* cholinesterase inhibition in neonatal and adult rats by three organophosphorothioate insecticides. *Toxicology*, **68**, 51-61.
- Rachmel, A. and Hazelton, G.A. (1986): The inducibility and ontogeny of rat liver UDP-glucuronyltransferase toward furosemide. *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 3777-3782.
- Sakuma, A. (1977): "Statistical Methods in Pharmacometrics I". University of Tokyo Press. Tokyo. (in Japanese)
- Sakuma, A. (1981): "Statistical Methods in Pharmacometrics II" University of Tokyo Press. Tokyo (in Japanese).

- Takano, M., Enami, T., Koizumi, M., Kamata, E. and Hasegawa, R. (2001): Comparative study on toxicological profile and no observed adverse effect level of 4-nitrophenol in newborn and young rats. *J. Toxicol. Sci.*, **26**, 240.
- Thompson, D.C., Perera, K., Fisher, R. and Brendel, K. (1994): Cresol isomers: Comparison of toxic potency in rat liver slices. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **125**, 51-58.
- Thompson, D.C., Perera, K. and London, R. (1995): Quinone methide formation from para isomers of methylphenol (cresol), ethylphenol, and isopropylphenol: Relationship to toxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 55-60.
- Thompson, D.C., Perera, K. and London, R. (1996): Studies on the mechanism of hepatotoxicity of 4-methylphenol (*p*-cresol): Effects of deuterium labeling and ring substitution. *Chem. Biol. Interact.*, **101**, 1-11.
- TRL (1986): Subchronic neurotoxicity study in rats of *ortho*-, *meta*-, and *para*-cresol. Research Triangle Park, North Carolina, Toxicity Research Laboratories (Unpublished data submitted to the US Environmental Protection Agency), cited in EHC (1996).
- Vesselinovitch, S.D., Rao, K.V. and Mihailovich, N. (1979): Neoplastic response of mouse tissues during perinatal age periods and its significance in chemical carcinogenesis. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **51**, 239-250.
- Watkins, J.B. and Klaassen, C.D. (1985): Development of UDP-glucuronosyltransferase activity toward digitoxigenin-monodigitoxoside in neonatal rats. *Drug Metab. Dispos.*, **13**, 186-191.
- Yamamoto, Y., Itoh, Y., Koizumi, M., Kamata, E. and Hasegawa, R. (2001): Comparative study on toxicological profile and no observed adverse effect level of 2,4-dinitrophenol in newborn and young rats. *J. Toxicol. Sci.*, **26**, 240.
- Yamasaki, M., Noguchi, Y., Tanda, M. and Shintani, S. (1981): Statistical methods appropriate for general toxicological studies in rats: Algorithms for multiple comparisons of treatment groups with control. *J. Takeda Res. Lab.*, **40**, 163-187.



Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobenzyl phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate

Makoto Ema*, Emiko Miyawaki, Akihiko Hirose, Eiichi Kamata

Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Received 26 February 2003; received in revised form 26 February 2003; accepted 9 March 2003

Abstract

The objective of this study was to determine the adverse effects of monobenzyl phthalate (MBeP), a major metabolite of butyl benzyl phthalate (BBP), on the development of the reproductive system, and to assess the role of MBeP in the antiandrogenic effects of BBP. Pregnant rats were given MBeP by gavage at 167, 250, or 375 mg/kg on days 15–17 of pregnancy. Fetuses were examined on day 21 of pregnancy. Maternal body weight gain and food consumption were significantly decreased at 167 mg/kg and higher. Fetal weight was significantly decreased at 375 mg/kg. A significant increase in the incidence of undescended testes and decrease in the anogenital distance (AGD) and ratio of AGD to the cube root of body weight was found in male fetuses at 250 mg/kg and higher. The AGD and ratio of AGD to the cube root of body weight of female fetuses in the MBeP-treated groups were comparable to those in the control group. The present data indicate that MBeP produces adverse effects on the development of the reproductive system in male offspring and suggest that MBeP may be responsible for the antiandrogenic effects of BBP.

© 2003 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Monobenzyl phthalate; Butyl benzyl phthalate; Developmental toxicity; Male reproductive system; Anogenital distance; Undescended testes; Antiandrogenic effect; Rat

1. Introduction

A wide range of uses has been found for the various phthalic acid esters (PAEs) and the largest market for these esters is as plasticizing agents for polyvinyl chloride products [1]. The plasticizers are not irreversibly bound in the polymer matrix and, under certain conditions, can migrate from the plastic to the external environment. PAEs have been ubiquitous environmental pollutants because of their widespread manufacture, use, and disposal as well as their high concentration in and ability to migrate from plastics [2,3]. Butyl benzyl phthalate (BBP) is used as a plasticizer in polyvinyl chloride (PVC) for vinyl tiles, food conveyor belts, carpet tiles, artificial leather, traffic cones, and to a limited extent, vinyl gloves, and is also used in some adhesives [4,5]. BBP may be released into the environment during its production and also during incorporation into plastics or adhesives, and PAEs released into the environment can be deposited on or

taken up by crops that are intended for human or livestock consumption, and thereby enter the food supply [4,5]. The most important route of human exposure to BBP is via food. The estimated intake for adults is 2 µg/kg per day; intake values for infants and children are up to three-fold higher [4].

Recently, *in vitro* screening tests revealed that PAEs such as BBP and dibutyl phthalate (DBP) are estrogenic in estrogen-responsive human breast cancer cells [6–9] and in a recombinant yeast screen [9,10]. The possibility of these compounds entering into biologic systems has caused great concern among the public about their reproductive and developmental toxicity. BBP was shown to be developmentally toxic in mice [11] and rats [12–17]. BBP was noted to produce an impairment of development of the male reproductive system in offspring after maternal exposure [18,19]. We showed that maternal exposure to BBP on days 15–17 of pregnancy at 500 mg/kg and higher caused decreased anogenital distance (AGD) and an increased incidence of male fetuses with undescended testes in rats [19]. BBP was metabolized and converted to monobutyl phthalate (MBuP)

* Corresponding author. Tel.: +81-3-3700-9878; fax: +81-3-3707-6950.
E-mail address: ema@nihs.go.jp (M. Ema).

as one of the major metabolites [20–22]. Maternal administration of MBuP also caused a decrease in male AGD and increased incidence of undescended testes when administered at 250 mg/kg and higher during the susceptible period for the adverse effects on development of the male reproductive system [23]. We hypothesized that MBuP is responsible for the induction of the adverse effects of BBP on development of the male reproductive system. Following administration of BBP in rats, monobenzyl phthalate (MBeP) is formed as another one of the major metabolites of BBP [20–22].

This study was conducted to determine the adverse effects of MBeP on development of the reproductive system in offspring following maternal administration during late pregnancy, and to assess the role of MBeP in the adverse effects of BBP on reproductive development.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Wistar rats (Jcl: Wistar, CLEA Japan, Tokyo, Japan) were used throughout this study. Animals were maintained in an air-conditioned room at 23–25 °C with a relative humidity of 50–60% under a controlled 12h:12h light/dark cycle. The rats were reared on a basal diet (F-1; Funabashi Farm, Funabashi, Japan) and tap water ad libitum. Virgin female rats, about 14 weeks of age, were mated overnight with male rats of the same strain from the same supplier. The day when sperm were detected in the vaginal smear was considered to be day 0 of pregnancy. The pregnant rats were distributed on a random basis into four groups of 16 each and housed individually.

2.2. Chemicals and administration

The pregnant rats were given MBeP (100% pure by neutralized titration, Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) by gastric intubation at a dose of 167, 250, or 375 mg/kg on day 15 through day 17 of pregnancy. The dosage levels were determined based on the results of our previous study in which MBeP caused a significant increase in the incidences of postimplantation embryonic loss after administration by gavage on days 13–15 of pregnancy at 500 mg/kg and higher, but not at 375 mg/kg [24]. The days of administration were determined based on the results of our previous study in which BBP given by gastric intubation on days 15–17 of pregnancy caused a significant decrease in the AGD and increase in the incidence of undescended testes in male rat offspring [19]. MBeP was given to rats in aqueous solution as the ammonium salt. The solution of each dose was adjusted to pH 6.8–7.2. The volume of each dose was adjusted to 5 ml/kg of body weight based on daily body weight. The control rats received an equivalent amount of ammonium chloride on days 15 through 17 of pregnancy.

2.3. Observations

Pregnant rats were examined daily for obvious signs of toxicity and their weights and food consumption were recorded daily. The pregnant rats were sacrificed by an ether overdose on day 21 of pregnancy. The peritoneal cavity and the uterus were opened and the numbers of live fetuses and of resorptions and dead fetuses were counted. The live fetuses removed from the uterus were weighed and the AGD (the distance between the anus and the genital tubercle) was measured using calipers. The ratio of AGD to the cube root of body weight was calculated [25]. All live fetuses were fixed in Bouin's solution and sectioned through both kidneys. The intestines were removed from the caudal end of the trunk, and fetuses were sexed by examination of the gonads. Male fetuses were examined for undescended testes. Undescended testes were defined by the criterion that the distance between the bladder neck and the lower pole of the testis was greater than one-third of the distance between the bladder neck and the lower pole of the kidney. The degree of transabdominal testicular ascent was determined by measuring the distance from the bladder neck to the lower pole of the testes using calipers, and the measurements were standardized by defining the distance between the bladder neck and the lower pole of the kidney as 100 U [26].

2.4. Data analysis

The litter was used as the basis for analysis of fetal variables. Analysis of variance and Dunnett's multiple comparison test, the Kruskal–Wallis test and Mann–Whitney test, or Fisher's exact test were used as appropriate. The 0.05 level of probability was used as the criterion for significance.

3. Results

The maternal findings in rats given MBeP on days 15 to 17 of pregnancy are shown in Table 1. No deaths were found in any groups. A reddish-staining of facial fur was observed in one pregnant rat at 375 mg/kg. Significant decreases in the maternal body weight gains on days 15–18 at 167 mg/kg and higher and on days 18–21 at 250 mg/kg and higher were found. Adjusted weight gain, which indicates the net weight gain of maternal rats during pregnancy, was significantly reduced at 250 mg and higher. Food consumption on days 15–18 at 167 mg/kg and higher and on days 18–21 at 250 mg/kg and higher was significantly decreased.

The reproductive and fetal findings are presented in Table 2. No significant difference between the MBeP-treated groups and the control group was found in the number of corpora lutea, implantations, resorptions, and dead fetuses, the incidence of postimplantation loss per litter, or the sex ratio of live fetuses. The weights of male and female fetuses in the 375 mg/kg group were significantly less than those in the control group. The incidence of fetuses with

Table 1
Maternal findings in rats given monobenzyl phthalate (MBeP) on days 15-17 of pregnancy

MBeP (mg/kg)	0 (control)	167	250	375
Number of pregnant rats	16	16	16	16
Number of dead pregnant rats	0	0	0	0
Initial body weight (g) ^a	236 ± 7	237 ± 7	235 ± 10	236 ± 10
Body weight gain during pregnancy (g) ^a				
Days 0-15	42 ± 7	42 ± 5	44 ± 5	43 ± 7
Days 15-18	31 ± 4	24 ± 4*	23 ± 7*	15 ± 12*
Days 18-21	40 ± 4	38 ± 4	34 ± 7*	31 ± 9*
Adjusted weight gain ^b	27 ± 8	21 ± 6	15 ± 11*	9 ± 18*
Food consumption during pregnancy (g) ^a				
Days 0-15	245 ± 19	249 ± 19	246 ± 15	246 ± 21
Days 15-18	54 ± 2	46 ± 4*	40 ± 12*	33 ± 10*
Days 18-21	52 ± 3	48 ± 4	44 ± 6*	39 ± 12*

^a Values are given as the mean ± S.D.

^b Adjusted weight gain refers to maternal weight gain excluding the gravid uterus.

* Significantly different from the control, $P < 0.05$.

Table 2
Reproductive and fetal findings in rats given monobenzyl phthalate (MBeP) on days 15-17 of pregnancy

MBeP (mg/kg)	0 (control)	167	250	375
Number of litters	16	16	16	16
Number of corpora lutea per litter ^a	15.7 ± 1.1	15.1 ± 1.3	15.9 ± 1.2	16.1 ± 1.1
Number of implantations per litter ^a	14.3 ± 2.0	13.5 ± 1.5	15.1 ± 1.2	14.8 ± 1.2
Number of litters totally resorbed	0	0	0	0
Number of resorptions and dead fetuses per litter ^a	1.4 ± 1.1	0.7 ± 0.9	1.1 ± 0.8	1.3 ± 1.9
Percent postimplantation loss per litter ^b	9.7	5.3	8.1	10.9
Number of live fetuses per litter ^a	14.1 ± 1.8	12.8 ± 1.9	13.8 ± 0.8	13.2 ± 1.9
Sex ratio of live fetuses (male/female)	105/101	109/96	107/114	117/94
Body weight of live fetuses (g) ^a				
Male	4.95 ± 0.25	4.95 ± 0.24	4.70 ± 0.30	3.82 ± 0.65*
Female	4.63 ± 0.20	4.58 ± 0.20	4.39 ± 0.24	3.67 ± 0.56*
Number of male fetuses (litters) with undescended testes	2 (2)	1 (1)	21 (12)*	79 (16)*
Degree of transabdominal testicular ascent ^{a,c}	18.9 ± 0.3	18.4 ± 2.3	23.8 ± 7.1*	40.1 ± 8.2*

^a Values are given as the mean ± S.D.

^b (No. of resorptions + no. of dead fetuses)/(no. of implantations) × 100.

^c (Distance between the bladder neck and the lower pole of the testes)/(distance between the lower pole of the kidney and the bladder neck) × 100.

* Significantly different from the control, $P < 0.05$.

undescended testes was significantly increased at 250 mg/kg and higher. The degree of transabdominal testicular ascent in relation to the bladder was also significantly increased at 250 mg/kg and higher.

Fig. 1 shows the AGD and AGD per cube root of body weight ratio in male and female fetuses of rats given MBeP on days 15-17 of pregnancy. AGD was significantly reduced at 250 and 375 mg/kg in male offspring. Male AGD at the highest dose was female-like. The AGD of female fetuses in the MBeP-treated groups was comparable to that in the control group. The ratio of AGD to the cube root of body weight of male fetuses in the 250 and 375 mg/kg groups was significantly lower than that in the control group. No significant difference in the AGD per cube root of body weight ratio of female fetuses was detected between the control group and the MBeP-treated groups.

4. Discussion

We previously showed that MBuP, one of the major metabolites of BBP, adversely affected the development of the reproductive system in male offspring when administered on days 15-17 of pregnancy [23], the most susceptible period for the adverse effects on development of the male reproductive system [27]. The present study demonstrated that MBeP, another of the major metabolites of BBP, administered during this period caused a significant decrease in the male AGD and increase in the incidence of undescended testes in a dose-dependent manner.

Adverse effects of MBeP on maternal rats, as evidenced by a significant decrease in the maternal body weight gain and food consumption, were found at all doses. Although no embryoletality was found after treatment with MBeP,

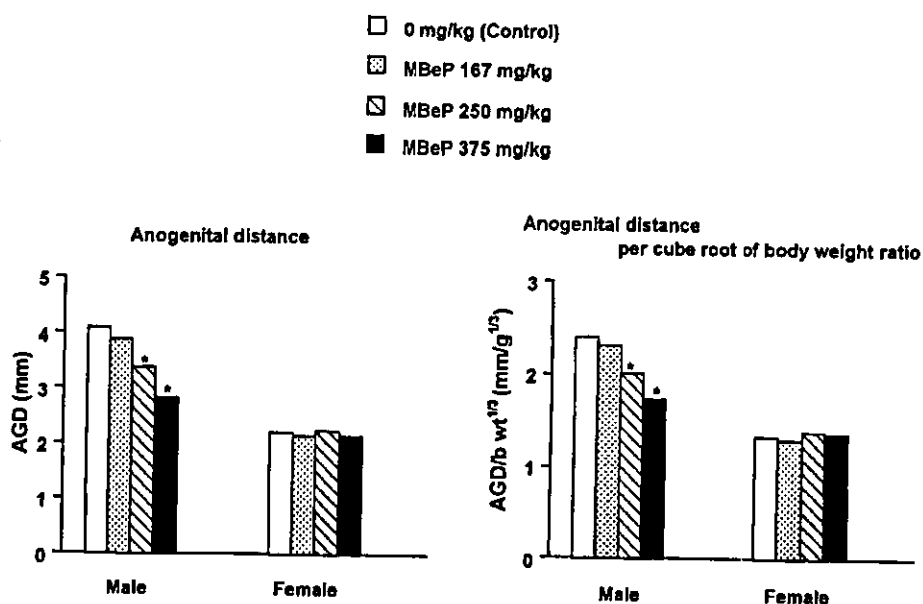


Fig. 1. Anogenital distance (AGD) and AGD per cube root of body weight ratio in male and female fetuses of rats given monobenzyl phthalate (MBeP) on days 15-17 of pregnancy. Values are given as the mean. *Significantly different from the control group, $P < 0.05$.

adverse effects on the growth of offspring, as evidenced by a significantly lower fetal weights, were detected at 375 mg/kg, but not at 250 mg/kg. These findings indicate that MBeP is maternal toxic at 167 mg/kg and is toxic to growth of the embryo/fetus at 375 mg/kg when administered on days 15-17 of pregnancy in rats.

The AGD and ratio of AGD to the cube root of body weight in male fetuses, but not in female fetuses, were significantly decreased at 250 mg/kg and higher. A significantly higher incidence of fetuses with undescended testes was also found at 250 mg/kg and higher following administration of MBeP on days 15-17 of pregnancy. We previously reported that a significant increase in the incidence of malformed fetuses was detected following administration of MBeP on days 7-15 of pregnancy at 313 mg/kg and higher, but not at 250 mg/kg [28]. Thus, the doses that produced impairment of development of the male reproductive system were lower than those that produced malformations in major organs. These findings suggest that the male reproductive system may be more susceptible than other organ systems to MBeP toxicity after maternal exposure and changes in development of the male reproductive system may be a sensitive parameter for toxic effects. This phenomenon was noted after maternal administration of DBP [27,29], BBP [19], and MBuP [23].

BBP administered orally was rapidly metabolized to MBuP and MBeP by pancreatic lipase and esterases in the small intestine [20-22]. These monoesters were absorbed from the gut and excreted in the urine. Although MBuP and MBeP were detected in rat urine, BBP, the parent compound, was never recovered in urine [22]. These phenomena were observed in the biotransformation of other

PAEs and Lake et al. [30] described that any toxic effects of orally ingested PAEs would be governed essentially by the properties of the corresponding monoesters ad/or alcohols rather than by those of the intact diesters.

Following administration of DBP, MBuP is also formed as a major metabolite [31-34]. We previously observed that the phase specificity of teratogenicity and the most frequent types of fetal malformations after administration during major organogenesis induced by MBuP [35] were consistent with those induced by DBP [36] and BBP [14] and that those induced by MBeP [24] were consistent with those induced by BBP [14]. These findings suggested that the teratogenicity of DBP is mediated via MBuP and the teratogenicity of BBP is mediated via MBuP and MBeP. We also previously reported that BBP and MBuP produced a decrease in the male AGD and increase in the incidence of undescended testes in offspring of rats treated during late pregnancy [19,23] and showed here that MBeP had adverse effects on the development of the male reproductive system in a dose-dependent manner. It appears that MBuP and MBeP may participate in the induction of the antiandrogenic effects of BBP. Therefore, both of the major metabolites, MBuP and MBeP, are considered to be responsible for the induction of the developmental toxicity, including the teratogenic and antiandrogenic effects, of BBP.

A decrease in testosterone levels was found in the fetal testis of rats given DBP at 500 mg/kg on days 12-21 of pregnancy; testicular testosterone was 34 and 26% of control on days 18 and 21 of pregnancy, respectively [37]. DBP and MBuP were negative in the competitive binding and transcriptional activation assay with androgen receptor [38]. These findings suggest that the antiandrogenic effects of DBP

are induced by a reduction in fetal T levels and mediated via MBuP, but not mediated directly at the level of the androgen receptor. MBeP and MBuP were reported to have no estrogenic activity in a yeast screen [9], but the effects of MBeP on androgenic receptors and rat fetal T levels are unknown. Further studies are needed to determine the effects of MBeP on the androgenic receptor and fetal rat T levels.

The results of the present study suggest that MBuP may be responsible for the induction of the antiandrogenic effects of BBP and MBeP may also participate, at least in part, in the induction of the antiandrogenic effects of BBP.

In this study, a no observed adverse effect level (NOAEL) for offspring was 250 mg/kg but a NOAEL for dams was not established. The lowest NOAEL for BBP is reported to be 20 mg/kg based on a decrease in body weight of F1 offspring in a two-generation reproductive study in rats [17]. This value is at least 3000-fold higher than the human exposure (adults 2 µg/kg per day, infants and children 6 µg/kg per day [4]). Thus, the risk to the human fetuses and neonates appears to be extremely low. However, the combined risk associated with exposure to DBP should be considered because BBP and DBP have a common active metabolite, MBuP.

Acknowledgments

This study was supported partially by a Grant from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan.

References

- [1] Autian J. Toxicity and health threats of phthalate esters: review of the literature. *Environ Health Perspect* 1973;4:3–26.
- [2] Marx JL. Phthalic acid esters: biological impact uncertain. *Science* 1972;178:46–7.
- [3] Mayer Jr FL, Stalling DL, Johnson JL. Phthalate esters as environmental contaminants. *Nature* 1972;238:411–3.
- [4] Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, Cunningham M, Faustman E, Foster P, et al. NTP Center for the Evaluation of Risk to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of butyl benzyl phthalate. *Reprod Toxicol* 2002;16:453–87.
- [5] IPCS (International Programme on Chemical Safety). Concise International Chemical Assessment Document 17, Butyl benzyl phthalate. Geneva, World Health Organization, 1999.
- [6] Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP. A variety of environmentally persistent chemicals including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect* 1995;103:582–7.
- [7] Sonnenschein C, Soto AM, Fernandez MF, Olea N, Olea-Serrano MF, Ruiz-Lopez MD. Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. *Clin Chem* 1995;41:1888–95.
- [8] Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Olea Serrano F. The E-screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 1995;7(Suppl):113–22.
- [9] Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP. The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ Health Perspect* 1997;105:802–11.
- [10] Coldham NG, Dave M, Sivapathasundaram S, McDonnell DP, Connor C, Sauer MJ. Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environ Health Perspect* 1997;105:734–42.
- [11] Price CJ, Field EA, Marr MC, Myers CB, Morrissey RE. Final report on the developmental toxicity of butyl benzyl phthalate (CAS No. 85-68-7) in CD-1-Swiss mice. NTP Report #90-114; 1990.
- [12] Field EA, Price CJ, Marr MC, Myers CB, Morrissey RE, Schwetz BA. Developmental toxicity evaluation of butyl benzyl phthalate (CAS No. 85-68-7) administered in feed to CD rats on gestational days 6–15. Final study report, NTP/NIES contact No. NO1-ES-9-5255; 1989.
- [13] Ema M, Itami T, Kawasaki H. Teratogenic evaluation of butyl benzyl phthalate in rats by gastric intubation. *Toxicol Lett* 1992;61:1–7.
- [14] Ema M, Itami T, Kawasaki H. Teratogenic phase specificity of butyl benzyl phthalate in rats. *Toxicology* 1993;79:11–9.
- [15] Ema M, Miyawaki E, Kawashima K. Reproductive effects of butyl benzyl phthalate in pregnant and pseudopregnant rats. *Reprod Toxicol* 1998;12:127–32.
- [16] Piersma AH, Verhoef A, te Biesebeek JD, Pieters MN, Slob W. Developmental toxicity of butyl benzyl phthalate in the rat using a multiple dose study design. *Reprod Toxicol* 2000;14:417–25.
- [17] Nagao T, Ohta R, Marumo H, Shindo T, Yoshimura S, Ono H. Effect of butyl benzyl phthalate in Sprague-Dawley rats after gavage administration: a two-generation reproductive study. *Reprod Toxicol* 2000;14:513–32.
- [18] Gray Jr LE, Ostby J, Furr J, Price M, Veeramachaneni DNR, Parks L. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Sci* 2000;58:350–65.
- [19] Ema M, Miyawaki E. Effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given butyl benzyl phthalate during late pregnancy. *Reprod Toxicol* 2002;16:71–6.
- [20] Eigenberg DA, Bozigan HP, Carter DE, Sipes IG. Distribution, excretion, and metabolism of butylbenzyl phthalate in the rat. *J Toxicol Environ Health* 1986;17:445–56.
- [21] Mikuriya H, Ikemoto I, Tanaka A. Urinary metabolites contributing to testicular damage induced by butylbenzyl phthalate. *Jikeikai Med J* 1988;35:403–9.
- [22] Nativelle C, Picard K, Valentin I, Lhuguenot JC, Chagnon MC. Metabolism of *n*-butyl benzyl phthalate in the female Wistar rat. Identification of new metabolites. *Food Chem Toxicol* 1999;37:905–17.
- [23] Ema M, Miyawaki E. Adverse effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given monobutyl phthalate, a metabolite of dibutyl phthalate during late pregnancy. *Reprod Toxicol* 2001;15:189–94.
- [24] Ema M, Harazono A, Miyawaki E, Ogawa Y. Characterization of developmental toxicity of mono-*n*-benzyl phthalate in rats. *Reprod Toxicol* 1996;10:365–72.
- [25] Gallavan Jr RH, Holson JF, Stump DG, Knapp JF, Reynolds VL. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod Toxicol* 1999;13:383–90.
- [26] Imajima T, Shono T, Zakaria O, Suita S. Prenatal phthalate causes cryptorchidism postnatally by inducing transabdominal ascent of the testis in fetal rats. *J Pediatr Surg* 1997;32:18–21.
- [27] Ema M, Miyawaki E, Kawashima K. Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-*n*-butyl phthalate during late pregnancy. *Toxicol Lett* 2000;111:271–8.
- [28] Ema M, Harazono A, Miyawaki E, Ogawa Y. Developmental toxicity of mono-*n*-benzyl phthalate, one of the major metabolites of the plasticizer *n*-butyl benzyl phthalate, in rats. *Toxicol Lett* 1996;86:19–25.
- [29] Mylchreest E, Cattley RC, Foster PMD. Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(*n*-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicol Sci* 1998;43:47–60.

- [30] Lake BG, Phillips JC, Linnell JC, Gangolli SD. The in vitro hydrolysis of some phthalate diesters by hepatic and intestinal preparations from various species. *Toxicol Appl Pharmacol* 1977;39:239–48.
- [31] Albro PW, Moore B. Identification of the metabolites of simple phthalate diesters in rat urine. *J Chromatogr* 1974;94:209–18.
- [32] Williams DT, Blanchfield BJ. The retention, distribution, excretion, and metabolism of dibutyl phthalate-7-14C in the rat. *J Agric Food Chem* 1975;23:854–8.
- [33] Tanaka A, Matsumoto A, Yamaha T. Biochemical studies on phthalic esters. III. Metabolism of dibutyl phthalate (DBP) in animals. *Toxicology* 1978;9:109–23.
- [34] Saillenfait AM, Payan JP, Fabry JP, Beydon D, Langonne I, Gallissot F, Sabate JP. Assessment of the developmental toxicity, metabolism, and placental transfer of di-*n*-butyl phthalate administered to pregnant rats. *Toxicol Sci* 1998;45:212–24.
- [35] Ema M, Kurasaka R, Harazono A, Amano H, Ogawa Y. Phase specificity of developmental toxicity after oral administration of mono-*n*-butyl phthalate in rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 1996;31:170–6.
- [36] Ema M, Amano H, Ogawa Y. Characterization of the developmental toxicity of di-*n*-butyl phthalate in rats. *Toxicology* 1994;86:163–74.
- [37] Mylchreest E, Sar M, Wallace DG, Foster PMD. Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed di(*n*-butyl) phthalate. *Reprod Toxicol* 2002;16:19–28.
- [38] Gray Jr LE, Ostby JS, Mylchreest E, Foster PMD, Kelce WR. Dibutyl phthalate (DBP) induces antiandrogenic but not estrogenic in vivo effects in LE hooded rats. *Toxicol Sci* 1998;42(1):176.

ビスフェノールAの内分泌かく乱作用のヒトへの健康影響評価

(2002年12月16日受付)

(2003年2月17日受理)

広瀬明彦^{a)}、江馬 真^{a)}、鎌田栄一^{a)}、小泉睦子^{b)}、長谷川隆一^{b)}

a) 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 総合評価研究室

b) 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部

Human Health Risk Assessment for the Endocrine Disruption Effects of Bisphenol A

(Received December 16, 2002)

(Accepted February 17, 2003)

Akihiko Hirose^{a)}, Makoto Ema^{a)}, Eiichi Kamata^{a)}, Mutsuko Koizumi^{b)}, Ryuichi Hasegawa^{b)}

a) Division of Risk Assessment, Biological Research Safety Center, National Institute of Health Sciences

b) Division of Medical Safety Sciences, National Institute of Health Sciences

Abstract

Bisphenol A has been identified as an endocrine disruptor, showing estrogenic activities. Several research groups have reported that the estrogenic activities were evoked at the dose levels of the $\mu\text{g}/\text{kg}$ order in rodents. However, these low dose effects could not be reproduced at other laboratories. Regarding the low dose effects of endocrine disruptors including bisphenol A, the US National Toxicology Program and the International Program on Chemical Safety held professional meetings in succession and stated the necessity of further research for scientific assessment of the human health risk. In this article, the properties of endocrine disrupting toxicities of bisphenol A are reviewed, and the reported experimental dose levels are compared to the assumed human exposure levels.

The almost relative estrogenic activities *in vitro* of bisphenol A are about 3 or 4 orders of magnitude less than estradiol or diethylstilbestrol. The responses are induced at a range of concentration between 10^{-7}M and 10^{-5}M . The uterotropical effects in immature or ovariectomized rodents were reported to be above approximately 10 mg/kg/day. A decrease of daily sperm production in adult SD rats was detected at more than 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. But the extent of the effect was almost the same up to 200 mg/kg, indicating no dose-dependent effects. Other male reproductive organ toxicities in rodents after birth were reported at doses of more than 10 mg/kg/day.

Many studies on the developmental toxicity by parental low dose exposure have recently been conducted. The most sensitive endpoint was an increased prostate weight in the next generation by 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of bisphenol A treatment between pregnancy period day 11 and 17, which was reported by vom Saal et al. (1998). The effect was reproduced in a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of bisphenol A treatment study reported by Gupta(2000), and also supported by molecular-pathological researches and neurobehavioral examinations at the sub mg/kg order of dose treatment. In more expanded dose range studies and multi generational studies, however, no reproductive organ toxicities were detected at doses of less than 50 mg/kg/day.

In rats, almost all absorbed bisphenol A in the body is conjugated with glucuronic acid. About 10 to 30 % of total absorption is excreted to urine, and the rest is excreted to faeces by biliary excretion. The bioavailability via oral exposure is about one order lower than that via subcutaneous or intravenous injection, but elimination half life via oral exposure is about one order longer (between 20 and 40 hours) owing to enterohepatic circulation. Information about the metabolism information of bisphenol A in human is limited, but the major metabolite is considered to be glucuronide.

The total intake of bisphenol A in the general population is estimated from the several reports, in which total intake via food contamination or elimination levels in human urine were reported. The ordinary intake is thought to be roughly 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, and even the maximum level is considered to be lower than 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$. It is noteworthy that the temporary high dose intake of a few $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ is possible as the worst case scenario. Comparing to these human exposure levels with the representation of low dose effects by bisphenol A, the margin of safety is relatively small. However, because these low dose effects were not reproducible and the toxicological meaning in humans is obscure, it is difficult to use these low dose incidences for quantitative risk assessment. Recently, the Scientific Committee on Food in the European Commission reassessed the food risk of bisphenol A, and set the provisional tolerable daily intake

連絡先: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 広瀬明彦

Corresponding author: Akihiko Hirose, 1-18-1 Kaniyoga, Stagaya-ku, Tokyo 158-8501, JAPAN
Division of Risk Assessment, National Institute of Health Sciences

(TDI) as 10 µg/kg/day. The provisional TDI was calculated from the no adverse effect level as 50 mg/kg/day derived from a three generation study of rats, which detected no low dose reproductive toxicity. But the uncertainty factor for unresolved low dose effects by the limited database was used for the TDI derivation. Further investigation and research is necessary to resolve the uncertainties about the low dose and significance of the reported effects for human.

Keywords : ビスフェノールA、内分泌かく乱作用、リスクアセスメント
existing food additive, antioxidant, γ-oryzanol, ECD-HPLC, UV-HPLC

はじめに

近年、数多くの農薬やプラスチック樹脂原料などの環境汚染化学物質に対して内分泌かく乱作用が疑われており、それらの生態系やヒト健康への影響に対して注目が集まっている。その中でもビスフェノールA (BPA: Bisphenol A) は、極低用量 (µg/kg オーダー) で実験動物に対して影響のあることが報告されて以来、健康影響に対して最も活発に議論・研究が行われている物質の一つである。BPAはこれを原料としたポリカーボネート、エポキシおよびポリスチレン樹脂等から高温処置等で容易に溶出されるという性質から、これらの樹脂を使用した際の食品等への溶出や金属製の缶のエポキシコーティングからの溶出により直接ヒトに暴露される可能性が高く、健康に対する影響が懸念される物質の一つである。一般毒性に関しては、米国の環境保護局 (EPA: Environmental Protection Agency) の Integrated Risk Information System (IRIS) プログラムにおいて1993年に評価がなされており、米国国家毒性計画 (NTP: National Toxicology Program) (1982) の報告に基づき、ラットへの2年間の混餌投与試験における1000 ppm (50 mg/kg/dayに相当) 群での体重増加抑制を最小毒性量 (LOAEL: lowest observed adverse effect level) と位置づけ、この値をもとに、種差と個体差および無毒性量 (NOAEL: no observed adverse effect level) の代用として最小毒性量を使用したことによる不確実係数にそれぞれ10を適用し、総合的な不確実係数: 1000 (=10×10×10) で割った値: 50 µg/kg/dayをヒトの経口摂取に対する Reference Dose (RD: 耐容1日摂取量 (TDI: tolerable daily intake) とほぼ同義) として設定している。(尚、食品添加物などの場合は、「不確実係数」および「耐容1日摂取量」に相当する語として、「安全係数」および「許容1日摂取量」という言葉が使われる。しかし、意図的に加える食品添加物とは違い、不作為に混入する汚染化学物質に対しては、「不確実係数」および「耐容1日摂取量」の方を用いる。)

しかし、近年報告されている内分泌系への影響は、このRDよりも低い用量で現れることが報告されているが、これらの影響を否定する報告もなされ、内分泌かく乱物質の低用量問題としての論議が引き起こされた。この件に関して、2000年米国NTPで議論され、2001年8月の最終報告書には、低用量域で認められる陽性と陰性の両結果共に科学的に妥当であるという報告が行われた。また、2002年には、IPCS (International Program on Chemical Safety) から刊行された "Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors" (IPCS, 2002) では、ヒトへの影響を評価するには

現状の知見だけでは不十分で、今後作用発現メカニズムの解明を含むさらなる研究の必要性が提唱された。本稿では、このような議論の基となったBPAの内分泌かく乱作用に関する文献情報等をまとめると共に、現状のヒト暴露レベルとの比較を行い、低用量問題を含めたヒトへの健康影響の可能性について考察した。

1 *in vitro*系におけるエストロゲン様活性

*in vitro*系で行われた最初の実験報告は、酵母の培養液中に存在するヒト乳腺がん由来の細胞 (MCF-7) のプロゲステロン受容体を誘導する物質の検索過程において、培養容器のポリカーボネートから溶出するBPAが同定されると共に、エストロゲン受容体と結合部位を競合することが明らかにされたというものである (Krishnanら, 1993)。その後様々な系を用いて検証が行われており、表1にはエストロゲンレセプターとの親和性や、MCF-7の細胞増殖活性、エストロゲンレセプターの活性化によって誘導される遺伝子産物の産生量、レポーター遺伝子を使用したエストロゲンレセプターの活性化能などに関して、陽性対照に対する相対活性をまとめた。その結果、エストラジオールあるいはエストロンに対する相対的な活性の強さは、1,000~100,000分の1の範囲で、ほとんどの報告は、数千から1万分の1の間に集中していた。また、実験条件が同一でないので一概には言えないが、試験管内では概ね 10^{-7} ~ 10^{-8} M (10^{-7} M = 22.9 ng/ml) のBPA濃度範囲から反応が現れるようである。これらことから、レセプターレベルの反応に関しては、BPAはエストラジオールの3~4桁低い活性を持つことが推測される。また、ラット、マウスあるいはヒト由来レセプターを用いた系で得られる値に大きな違いが認められないことより、レセプターとBPAとの分子レベルでの反応においては、ラット・マウスとヒトにおいて大きな感受性の違いは存在しないと考えられる。

2 未成熟または卵巣摘出雌動物に対する影響

BPAによる最初のエストロゲン作用の報告は、子宮摘出ラットに170 mg/kg/dayを、3日間皮下投与したときに持続性発情が引き起こされたというものである (Dodds & Lawson, 1936)。その後、様々な用量を用いて試験が行われ、子宮重量増加、早期閉経、性周期の乱れ等が0.1~800mg/kgの用量範囲で観察されている。しかし、これらの影響は、表2に示すように同様の用量が投与された場合でも観察されないこともある (表中の括弧書きで示された用量は、有意な影響が現れていないことを示している)。たとえば、未成熟雌Alpk:AP

表 1. BisphenolAのin vitro系におけるエストロゲン様活性

試験系	エンドポイント	エストラジオール等との相対活性比	Ref
MCF-7細胞	細胞増殖活性比	1/1000	Perczら1998
MCF-7細胞	PS2タンパク発現量	1/1800	Perczら1998
MCF-7細胞	エストロゲンレセプターとの結合活性比	1/2000	Samuelsenら2001
ヒトレセプター	エストロゲンレセプターとの結合活性比	1/2500	Bolgerら1998
CDラットレセプター(n)	レポタージーンの活性化比	1/4500*	Yamasakiら2002
卵巣摘出ラット子宮	エストロゲンレセプターとの結合活性比	1/5000	Kimら2001a
F344ラット下垂体前葉細胞	プロラクチンリリース	1/5000~1/1000	Steinmetzら1997
MCF-7細胞	細胞増殖活性比	1/10000	Perczら1998
MCF-7細胞	PS2タンパク発現量	1/10000	Samuelsenら2001
MCF-7細胞	細胞増殖活性比	1/10000	Kimら2001a
マウスレセプター(n)	エストロゲンレセプターとの結合活性比	1/11600	Matthewsら2000
ヒトレセプター(n)	エストロゲンレセプターとの結合活性比	1/12500	Matthewsら2000
SDラットサイトゾル	エストロゲンレセプターとの結合活性比	1/12500	Blairら2000
酵母E-Assay	レポタージーンの活性化比	1/20000	Coldhamら1997
MCF-7細胞	細胞増殖活性比	1/50000	Samuelsenら2001

n:リコンビナントレセプター; *:エストロンとの相対活性比

表 2. BisphenolAの未成熟または卵巣摘出雌動物への影響

動物種	投与用量 mg/kg (括弧内は有意な影響なし)	投与期間	経路	影響	Ref.
未成熟Alpk:APラット	(400), 600, 800	3日間	皮下	腔開口促進	Ashby & Tinwell 1998
未成熟Alpk:APラット	400, 600, 800	3日間	皮下	子宮重量増加	Ashby & Tinwell 1998
未成熟Alpk:APラット	400, 600, 800	3日間	経口	子宮重量増加	Ashby & Tinwell 1998
未成熟CFLPマウス	(3), (33), (330)	3日間	皮下	子宮重量変化なし	Coldhamら1997
未成熟APマウス	(0.0002, 0.0002, 0.002, 0.02, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300)	31日間	皮下	子宮重量変化なし	Tinwellら2000
未成熟LEラット	(100), 200, 400	31日間	皮下	子宮重量増加	Lawsら2000
卵巣摘出DA/Hanラット	(5), (50), 200	3日間	皮下	子宮重量増加	Dielら2000
卵巣摘出Wistarラット	170	3日間	皮下	持続性発情	Dodds & Lawson 1936
未成熟SDラット	(40), 160, 320	3日間	経口	子宮重量増加	Yamasakiら2000
未成熟SDラット	(5, 10, 25, 50, 100, 150)	3日間	皮下	子宮重量変化なし	Gouldら1998
卵巣摘出Wistarラット	(11), (78), 128, 250	7日間	皮下	血清プロラクチン量増加	Goloukovaら2000
卵巣摘出Alpk:AP/SDラット	110	3日間	皮下	子宮重量	Ashbyら2000
卵巣摘出LEラット	100	25日間	経口	性周期の乱れ	Lawsら2000
卵巣摘出SDラット	(1), (5), (10), 50, 100	3日間	皮下	子宮重量増加	Kimら2001a
卵巣摘出B6C3F1マウス	(1*), (10*), 40*, 100*, 400*	4日間	皮下	子宮重量増加	Papaconstantinou ら2000
未成熟SDラット	(2), 20, 200	3日間	皮下	子宮重量増加	Yamasakiら2002
卵巣摘出Wistarラット	11, 78, 128, 250	7日間	皮下	子宮重量増加	Goloukovaら2000
未成熟SDラット	8, 40, 160	3日間	皮下	子宮重量増加	Yamasakiら2000
卵巣摘出SDラット	(0.15), (1.90), (16.9)	3日間	経口	子宮重量変化なし	Rubinら2001
卵巣摘出SDラット	(0.2*)	3日間	皮下**	子宮重量、血清プロラクチン量変化なし	Steinmetzら 1997, 1998
卵巣摘出F344ラット	0.2*	3日間	皮下**	子宮重量増加、血清プロラクチン量増加	Steinmetzら 1997, 1998
産乳直後CD-1マウス	0.1, (0.5), (1), (5), (50), (75), 100	3日間	皮下	子宮重量増加、腔開口促進	Markeyら2001b
卵巣摘出Swissマウス	(0.0008*), (0.008*), 0.08*, 0.8*	単回	皮下	子宮の血管透過性の亢進	Milliganら1998

*:産乳直後のラットの体重は10g、成熟ラットの体重は1200g、成熟マウスの体重は20gとして投与用量を換算した。

ラットを用いた系では、3日間の皮下および経口投与を行った結果、400~800 mg/kg/dayの用量で子宮重量の増加が確認され、600 mg/kg/day以上の高用量で早期臍開口が認められている(Ashby and Tinwellら, 1998)が、未成熟雌SDラットを用いた別の実験では、5~150 mg/kg/dayの用量で3日間経口投与した結果、子宮重量の増加は150 mg/kgでも認められなかった(Gouldら, 1998)。

一方、影響発現の用量依存性については10 mg/kg以上の用量で得られた陽性の結果では、概ね正の用量相関関係が確認されているが、離乳直後のCD-1マウスを使用した実験では、最低用量(0.1 mg/kg)と最高用量(100 mg/kg)でのみ、有意な子宮重量の増加が観察されるという逆U字型の用量反応曲線が、変化の割合は小さいものの認められている(Markeyら, 2001b)。

また、卵巣摘出したSD及びF344ラットを使用した系では、子宮重量増加や血清プロラクチン量の増加反応に関して種差のあることが観察されており、SDラットよりF344ラットの方が感受性の高いことが示されている(Steinmetzら, 1997)。しかし、この感受性の違いはBPAに限定されたものではなく、陽性対照としたエストラジオールに対する感受性の違いも同様に観察されている(Steinmetzら, 1998)。

3 未成熟または成熟雄動物に対する影響

未成熟または成熟雄動物に対する報告は雌ほど多くないが(表3)、10 mg/kg以上で各種生殖器官の重量変化や組織学的な異常が観察されている。しかし、雌での子宮重量増加のような統一的な影響の報告はなく、Alpkラットへの100~200 mg/kg投与で生殖器官重量に変化の認められないケースもある(Asbyら, 2000)。また、投与期間が異なるので、一概に比較することはできないが、高用量(950 mg/kg)での前立腺重量減少(Takahashiら, 2001)に対して、50 mg/kgの未成熟Wistarラットへの投与では、腹側外葉のみであるが前立腺の重量が増加しており(Stokerら, 1999)、投与量の違いにより、

影響の現れ方が異なることを示している。

一方、1日精子生産量の減少が、この後に示す次世代へ影響だけではなく、成熟SDラットにおいても、20 µg/kg以上の投与で観察されることが報告されている。しかし、用量依存性に注目してみると、20 µg/kgで1日精子生産量が有意に約20%減少しているものの、それ以上の用量での減少率も200 mg/kgまで同程度で推移し、明確な用量依存性は認められない(Sakaueら, 2001)。

4 胎児期及び新生児期暴露による実験動物への影響

近年もっとも報告の多い研究は、妊娠期における胎児の器官形成期あるいは、交配前から離乳までの間に、親動物にBPAを投与したときに認められる次世代に対する影響であり、その結果を表4にまとめた。

比較的高用量を投与した試験において、1250 mg/kgまで投与した催奇形性試験では、次世代の体重や外表上に異常が認められていない(NTP, 1985a; NTP, 1986)が、CD-1マウスを用いた2世代試験では427 mg/kg以上で次世代の精巣及び精囊重量の減少と精子数の減少傾向が認められている(NTP 1986)。また、妊娠1-20日に300 mg/kg以上の投与で次世代の雄に肛門生殖突起間距離(AGD: anogenital distance)の短縮が認められているが、体長補正を行うと有意差は消失する(Kimら, 2001)。妊娠6-21日に50 mg/kgを投与したときには、次世代の雌に早期臍開口、雄にAGDの短縮、前立腺重量増加、1日精子生産量の減少が認められている(Fialkowski and Chahoud, 2000; Talsness and Chahoud, 2000)。

ラットの2年間の混餌投与試験(NTP 1982)での最小毒性量:50 mg/kgより低用量で認められる影響に関しては、vom Saalらのグループによる研究で、妊娠11~17日のCF-1マウスに2および20 µg/kgのBPAを投与した場合に、次世代の6ヶ月齢雄の前立腺重量が増加することが認められたのが最も低用量での影響であった(Nagelら, 1997)。この研究の20 µg/kg

表 3. BisphenolAの未成熟または成熟雄動物への影響

動物種	投与用量 mg/kg (括弧内は有意な影響なし)	投与期間	経路	影響	Ref.
未成熟F344ラット	(235), (466), 950	44日間	経口	前立腺重量減少	Takahashi & Oishi 2001
未成熟F344ラット	235, 466, 950	44日間	経口	包皮腺重量減少、後期精細胞の組織崩壊・変性、 輸精管の萎縮	Takahashi & Oishi 2001
未成熟Alpk:AP/SDラット	(100), (150), (200)	20日間	経口	精巣・精巣上体・精囊・前立腺重量に変化なし	Ashby & Lefevre 2000
未成熟Wistarラット	50	11日間	皮下	血清プロラクチン量増加、外側前立腺重量増加	Stokerら1999
未成熟Wistarラット	37	11日間	皮下	輸精管上皮細胞幅の減少	Fisherら1999
未成熟C57BL/6マウス	10, 100	8週間	経口	精細管多核巨細胞の出現	Takaoら1999
成熟C57BL/6Nマウス	(0.002), (0.02), (0.2)	6日間	経口	精巣・精巣上体・精囊重量変化なし、精巣上体尾 精子数変化なし	Nagaoら2002
未成熟C57BL/6Nマウス	(0.002), (0.02), (0.2)	21日間	経口	精巣・精巣上体・精囊重量変化なし、精巣上体尾 精子数変化なし	Nagaoら2002
SDラット	(0.000002), (0.00002), (0.0002), (0.002), 0.02, 0.2, 2, 20, 200	6日間	経口	1日精子生産量減少	Sakaueら2001

*: 離乳直後の体重を10gとして換算した。

表 4. BisphenolAの胎児期及び新生児期暴露による実験動物への影響

動物種	投与用量 mg/kg (括弧内は有意な影響なし)	投与期間	経路	影響	Ref.
CDラット	(160), (320), (640), (1280)	妊娠6-15日	経口	♀:生存率・体重・外表異常なし	NTP 1986
CD-1マウス	(500), (750), (1000), (1250)	妊娠6-15日	経口	♀:生存率・体重・外表異常なし	NTP 1985a
Wistarラット	(600), (800), (1000)	妊娠6-15日	経口	♀:生存率・体重・外表異常なし	高仲ら1991
CD-1マウス	437, 875, 1750	2世代	経口	♂:精巣上体・精囊重量減少、精子数減少傾向(有意差なし)	NTP 1985b
SDラット	(3.2), (32), (320)	妊娠1-20日	経口	♀:脳視索前野の性的二型核体積、腔開口日、性周期、交尾受入行動に変化なし ♂:精巣・精巣上体・前立腺・精囊重量変化なし	Kwonら2000
SDラット	(100), 300, 1000	妊娠1-20日	経口	♂:AGD短縮(ただし体長補正後は有意差なし)	Kimら2001h
SDラット	(0.001), (0.02), (0.3), (5), 50, 500	3世代	経口	♀:腔開口遅延(500のみ)、体重減少 ♂:包皮分離の遅延(500のみ)、体重減少	Tylら2002
SDラット	50	妊娠6-21日	経口	♀:腔開口の早発 ♂:AGD短縮、包皮分離時期の遅延、前立腺重量増加、1日精子生産量減少	Talsness & Chahoud 2000 Fialkowski & Chahoud 2000
Wistarラット	50*	生後2-12日	皮下	♂:精巣重量増加、精巣あたりのセルトリ細胞核体積の増加	Atanassovaら2000
F344ラット	10*, 50*	11日齢より51日間	皮下	♀:血清プロラクチン量増加	Khmranaら2000
SDラット	(0.001), (0.01), (0.1), (1), (11)	妊娠2日~離乳	経口	♀:AGD、性周期、腔開口時期、卵胞数、交尾受入行動に変化なし ♂:AGD、包皮分離時期、精巣・精巣上体・前立腺・精囊重量に変化なし	Welschら2000 Elswickら2000b
Wistarラット	1.5	交配直後~離乳	経口	♀:行動学的な性的二形成の消失(精巣・精巣上体・腹側前立腺・卵巣子宮重量、血清LH・FSH・テストステロン・エストロジオール濃度変化なし)	Kuboら2001
SDラット	(0.1), 1.2	妊娠6日~離乳	経口	♀:性周期の異常、血清LH濃度の減少	Rubinら2001
Wistarラット	(0.001), (0.008), (0.1), (0.775)*	交配前2週間~離乳	経口	♂:精巣重量、1日精子生産量に変化なし	Cagenら1999a
C57BL/6Nマウス	(0.002), (0.02), (0.2)	妊娠11~17日	経口	♂:精巣・精巣上体・精囊重量変化なし、精巣上体尾精子数変化なし	Nagaoら2002
CF-1マウス	(0.0002), (0.002), (0.02), (0.2)	妊娠11~17日	経口	♂:前立腺重量、1日精子生産量に変化なし	Cagenら1999b
SDラット	(0.0002), (0.002), (0.02), (0.2)	2世代	経口	♀:腔開口時期、性周期変化なし ♂:AGD、精巣上体精子数変化なし	Emmら2001
Wistarラット	0.13*	交配前2週間~離乳	経口	♂:精巣重量減少	Sharpeら1996
SDラット	0.1	妊娠6-21日	経口	♀:腔開口の遅延、発情期間の延長 ♂:包皮分離時期の遅延、1日精子生産量減少	Talsness & Chahoud 2000 Fialkowski & Chahoud 2000
CD-1マウス	0.05	妊娠16-18日	経口	♂:前立腺重量増加、AGD延長、精巣上体重量減少	Gupta 2000
SDラット	0.04, 0.4	交配前10日~離乳	経口	♀:探索行動不安反応性減少(♀の雄性化は認められない) ♂:運動量と探索行動の抑制	Faraboliniら1999
CD-1マウス	0.025, 0.25	妊娠9~出生	皮下	♀:乳腺管の間質への移行速度増加、乳腺管、終末乳腺管、乳腺管芽の増加	Markeyら2001a
Wistarラット	0.025, 0.25	妊娠8~23(出生)日	皮下	♂:腹側前立腺の管周囲間質細胞の分化への影響(線維芽細胞性平滑筋比率の増加、管周囲間質におけるAR陽性細胞の減少)	Ramosら2001
CF-1マウス	(0.002), (0.02)	妊娠11~17日	経口	♂:前立腺重量、1日精子生産量に変化なし	Aaashbyら1999
CF-1マウス	(0.002), 0.02	妊娠11~17日	経口	♂:1日精子生産量減少	vom Saalら1998
ICR/Jclマウス	(0.002), 0.02	妊娠11~17日	皮下	♀:腔開口・発情開始時期の促進	Honmaら2002
CF-1マウス	0.0024	妊娠11~17日	経口	♀:発情開始時期の促進	Huwdesheillら1999
ICR/Jclマウス	0.002, 0.02	妊娠11~17日	皮下	♀:AGD延長、性周期の延長	Honmaら2002
CF-1マウス	0.002, 0.02	妊娠11~17日	経口	♂:前立腺重量増加	Nagelら1997

*:飲水投与のため、原書ではこれらの値の約4倍までの範囲で投与量が見積もられているが、ここでは低い方の値を示した。

投与群では約20%の1日精子生産量の減少も認められている(vom Saalら, 1998)。この報告に対し、同様の実験条件での追試試験および、用量範囲や動物数を増やした研究では、0.2~200 µg/kgのBPA投与で前立腺重量や1日精子生産量に変化は認められていない(Asbyら, 1999; Cagenら, 1999b)。しかし、CD-1マウスを用いた研究で、妊娠16-18日に50 µg/kgを投与したときに、次世代の雄に前立腺重量の増加を示すというvom Saalらの報告を支持する結果も報告されている(Gupta, 2000)。また、Wistarラットに交配前2週から離乳まで130 µg/kgのBPAを飲水投与したときに次世代の雄に精巣重量の減少が認められた(Sharpeら, 1996)が、これも用量範囲を広げた(1~775 µg/kg)試験では再現されていない(Cagenら, 1999a)。SDラットを使用した2世代試験(0.2~200 µg/kg)あるいは妊娠2日~離乳(1.1 µg/kg~11 mg/kg)まで投与した試験では、次世代の雌雄共に生殖系への影響は認められていない(Emaら, 2001; Welschら, 2000)。さらに、最近3世代試験(0.001~500 mg/kg)の結果が報告され、F1からF3のすべての世代において雌の早期産開と雄の包皮分離時期の遅延が認められているが、最高用量:500 mg/kgでのみの影響でしかも明らかな体重減少を伴ったものであり、内分泌系への影響というよりは、体重減少という一般毒性による二次的な影響であると考えられている。この試験では50 mg/kgでも体重やその他の臓器重量の減少傾向が認められ、一般毒性における無毒性量として5 mg/kgが求められている(Tylら, 2002)。

その他、細胞あるいは分子レベルの研究では、妊娠8または9日から出生時までマウスまたはラットに25及び250 µg/kgを投与したところ、次世代の雌の乳腺における乳腺管の発達促進(Markeyら, 2001a)や雄の腹側前立腺における管周囲間質におけるアンドロゲンレセプター陽性細胞の減少(Ramosら, 2001)などの組織学的な影響を引き起こすことが報告されている。さらに、次世代の行動学的な解析においては、SDラットへの交配前10日から離乳までの40または400 µg/kg投与で、探索行動等の自立運動の抑制傾向を引き起こすことが報告されている(Welschら, 2000)。この行動学的な影響はWistarラットへの1.5 mg/kg投与においても、行動学的な雌雄差の消失という形で観察されているが、この試験では生殖器官重量や血清ホルモンレベルへの影響は認められていない(Kuboら, 2001)。

以上のように、RfDである50 mg/kgより低用量で行われた実験では、次世代への影響があるという報告(Nagelら, 1997; vom Saalら, 1998; Sharpeら, 1996; Gupta 2000)とないという報告(Asbyら, 1999; Cagenら, 1999 a,b; Welschら, 2000; Elswickら, 2000b; Emaら, 2001; Nagaoら, 2002; Tylら, 2002)が混在している状況であるが、概して、低用量影響があるとしている報告のほとんどは、1ないし2用量で実験が行われており、より広範囲に投与用量を設定し、1用量あたりの動物数を増やした実験では検出できていないようである。このことは、低用量影響の検出に関して統計学的な問題を提示しているようであるが(Elswickら, 2000a)、上述したような詳細な病理組織学的な解析においても細胞あるいは分子

レベルではBPA投与による影響が観察されることも最近相次いで報告されており(Markeyら, 2001a; Ramosら, 2001)、一概に統計学的な問題として解決することはできない。一方、神経行動学的な解析においてもBPAによる低用量影響が示唆されている(Welschら, 2000; Kuboら, 2001)が、げっ歯類における行動観察は、測定環境条件や計測機器あるいは主観に依存する部分が多く、さらに雌動物の場合は性周期により行動パターンが変化するなど、影響評価を一般化することが難しい領域であることを考慮すると、この種の影響に関する定量的な評価は困難であると考えられる。

5 体内動態

10または100 mg/kgの¹⁴C-BPAを経口、腹腔内および皮下に雌雄のF344ラットへ投与した場合、糞中および尿中への排泄量の割合はこれらの投与経路にあまり依存せず、約50~80%が糞中に排泄され、10~30%が尿中に排泄される。雌は雌に比較し、糞中への排泄の割合が高く、尿中への排泄が少ない傾向を示し、代謝過程に性差が認められている。また、雌雄共に、糞中への排泄はほとんどが未変化体として、尿中へは60~80%がグルクロン酸抱合体と検出され、尿中の未変化体および硫酸抱合体の割合は雌雄及び投与経路にかかわらず約10%以下である。一方経口投与の場合の未変化体血中最高濃度は、腹腔内および皮下投与経路に比べ1桁から2桁低く、生物学的利用率(バイオアベラビリティ)も数倍から数百倍小さいものであった(Pottengerら, 2000)。DA/Han雌ラットに10または100 mg/kgを経口投与したところ、未抱合体血中BPA濃度は1時間前後と3~6時間後にほぼ同じ高さのピークを示す2相性の変化(10 mg/kg投与では、31~40 ng/ml、100 mg/kg投与時では134~150 ng/ml)を示したが、48時間後には両投与用量において検出限界(10 ng/ml)以下になり、このときの血中からの消失半減期は約38.5時間であった。10 mg/kgを静注した場合には、投与直後に15 µg/mlに達したが、1時間後には半減し経口投与の場合のような第2のピークは認められず24時間後には検出限界以下になった。AUCの比較に基づく静注投与に対する経口投与のバイオアベラビリティは、10 mg/kgで16.4%、100 mg/kgで5.6%であった。これらのことから経口投与では、低用量では肝臓初回通過効果による急速な消失がおり、肝臓代謝が飽和するような過剰投与においてのみ体内蓄積のおきることが示唆された(Upmeierら, 2000)。また、SDラットに0.1 mg/kgを静注または10 mg/kgを経口投与した実験で、経口投与時のバイオアベラビリティは静注時の5.3%で、最終血中消失半減期は約21時間、血中最高濃度は14.7 ng/ml(0.2時間後)であった(Yooら, 2001)。

妊娠F344ラットに1 g/kgのBPAを経口投与して、体内動態を調べた結果、母動物の血中、肝臓、腎臓の最大濃度は、14.7、171、36 µg/g(20min)であった。6時間後には、各臓器の濃度は最大値の2~5%に減少していた。胎児での最大濃度は、9 µg/g(20min)で、母動物の臓器と同様のパターンで消失していった(Takahashi & Oishi, 2000)。授乳中のCDラットへの経口投与(100 mg/kg)では最大で約1.5 µg/mlの濃度の¹⁴C-BPAが、

表 5. BisphenolAの暴露状況

	暴露対象		暴露量	Ref.
	食物由来の累積推定1日摂取量	一般人平均0	FDA推定	0.105 μ g/kg bw/day
FDA推定			0.185 μ g/kg bw/day	Howeら(1998)
成人 (体重60kg)		ワイン、缶詰類	0.11、0.37 μ g/kg bw/day	EC-SCF(2002)
乳幼児 (0~6才)		人乳、缶詰類	0.8~1.6 μ g/kg bw/day	EC-SCF(2002)
陰膳法による平均1日摂取量(実測値)	入院患者(病院食)(体重50kg)		0.023、0.013 μ g/kg bw/day (0.004~0.074)	平成12年度厚生科研費a
血中濃度(非グルクロン酸抱合体)	成人		0.32ng/ml	Inoueら(2000)
	成人		0~0.16ng/ml	Sajikiら(1999)
	成人男性		1.49 \pm 0.11ng/ml	Takeuchiら(2002)
	成人女性		0.64 \pm 0.10ng/ml	Takeuchiら(2002)
	成人		2.04 \pm 0.71ng/ml	科学技術振興調整費(2001)
	不妊症患者		1.76 \pm 1.12ng/ml	科学技術振興調整費(2001)
	臍帯血		2.2 \pm 1.8ng/ml	科学技術振興調整費(2001)
	羊水		1.1 \pm 1.0~8.3 \pm 8.9ng/ml	科学技術振興調整費(2001)
	母胎血		0.46(0.21~0.79)ng/ml	平成12年度厚生科研費b
一般成人の尿中排泄量 (総BPA濃度、含グルクロン酸抱合体)	クレアチニンあたりの尿中濃度		1ng/mg CRN	平成12年度厚生科研費b
	クレアチニンあたりの尿中濃度		6.1 \pm 7.0(1~36)ng/mg CRN	平成11年度厚生科研費b
	48時間総排泄量		8.3 \pm 5.4 μ g/48hr	平成11年度厚生科研費b
	尿中濃度		0.11~0.51ng/ml	Brockら(2001)

ミルク中に検出された。新生児への ^{14}C -BPAの移行も、44(2h)~78(24h) $\mu\text{g}/\text{kg}$ レベルであった(Snyderら, 2000)。

また、上記の子宮重量増加反応に違いの認められるF344とSDラットに2.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のBPAを静注し、両系統での血中消失半減期(約90分)調べたところ、系統による違いは認められなかった(Longら, 2000)。

以上のことから、ラットにおいてBPAは体内でグルクロン酸抱合され10~30%が尿中に排泄されるが、残りの大部分は胆汁排泄により糞中に排泄されることが示される。しかも経口投与の場合は、抱合体胆汁排泄後の腸管内加水分解一再吸収による腸肝循環を受けやすく未変化体血中濃度は静注や皮下投与に比べてかなり低いが、最終的な体内消失半減期は長く20~40時間であると考えられる。また、低用量投与による報告はないものの、高用量経口投与により相当量のBPAが胎盤を通過すると共に、乳汁を介して次世代に移行することも示された。

その他、サルに ^{14}C -BPAを経口100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与した実験において、経口投与時のバイオアベラビリティは静注時の約70%、約80%は尿中に排泄される。また、尿中の約80%、血中の約90%はグルクロン酸抱合体で、体内消失半減期は約10時間であった(Kurebayashiら, 2002)。ラットに比べて、経口当時のバイオアベラビリティは高いようであるが、経口投与時の消失速度は早い傾向であった。

一方、ヒトにおける代謝研究はほとんど報告されていないが、旨旨だけの限られた情報として、ボランティアによる経口摂取後の血中消失半減期は3.5時間であることが報告されている(EC-SCF2002)。また、後述する尿中のBPAを測定した研究結果からは、尿中のBPAはほとんどがグルクロン

酸抱合体として検出され、未変化体はかなり少ないことが判明している(Brockら, 2001)。また、肝臓ミクロソームや初代培養肝細胞を使用したin vitro試験では、げっ歯類と同様にヒトでもグルクロン酸抱合体が主代謝物であり、代謝クリアランスもげっ歯類よりタンパクあたりの速度は遅いものの1桁以上の違いは認められない(EC-SCF2002)。

6 ヒトにおける暴露量状況

ヒトでの暴露状況に関して現在まで知られている情報を表5にまとめた。缶のエポキシコーティングからの溶出やポリカーボネート製食器や乳瓶からの溶出データを基に1日あたりの摂取量に関しては、米国FDAでは約0.1~0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、ECの食品化学会(SCF:Scientific Committee on Food)では、成人:約0.1~0.4、乳幼児:約0.8~1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ と見積もっている。また、これら理論的な暴露量の積算による推定調査の他に暴露対象は限られているが、我が国では病院食の陰膳法による調査が行われており、平均で約0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以下という1日摂取量が求められている(平成12年度厚生科研費a)。

一方、体内暴露量については、血中濃度と尿中排泄量に関していくつかの報告があり、測定方法がそれぞれ異なる上に、測定サンプル数がそれほど多くはないので、直接の比較はできないが、血中では遊離BPAとして約0.1~2.0 ng/mlの濃度が報告されている(Inoueら, 2000;Sajikiら, 1999;Takeuchiら, 2002;科学技術振興調整費2001;平成12年度厚生科研費b)が、その偏差の大きさからみて個人差が大きいと考えられる。また、尿中排泄に関しても、BPAはそのほとんどがグルクロン酸抱合体として尿中に排泄され、その測定

値はグルクロニダーゼ処理後の総BPA量として示されている (Brockら, 2001; 平成11及び12年度厚生科研究費b)。しかし、尿中濃度を示すための分母が報告毎にそれぞれ異なっており、直接の比較が困難である。そこで、1日あたりのクレアチニン排泄量 (14~26 mg/kg/day) や総尿量の正常値 (1~1.5 L/day) を基に、1日あたり体重1 kgあたりのBPA排泄量を試算したところ、約0.01~0.2 µg/kg/dayであると推定された。ヒトでの総摂取量に対する尿中排泄率に関する知見は知られていないが、ラットでは摂取量の10~30%が、サルでは約80%が尿中排泄されることを考慮すると、排泄量から逆算したヒトでの1日摂取量は、排泄量の数倍程度であろうと推定できる。

また、缶詰や缶コーヒー、ほ乳瓶からの溶出データもいくつか報告されており、現在我が国の溶出基準値: 2.5 ppmは十分下回っているものの、最大値で缶詰では600 ppb、缶コーヒーでは200 ppb、ほ乳瓶からの初回溶出量は0.59~0.75 ppbの濃度で検出されている (平成11及び12年度厚生科研究費a; Kawamuraら, 1999; Sunら, 2000)。しかし、これらのデータの食品中への溶出量は銘柄に依存するうえ、ほ乳瓶については初回使用以後その溶出量は減少傾向にあるため、これらの最大値データをもとに摂取量を推定することは、現実的ではないと思われる。それでも、特定の環境においては、µg/kg/dayオーダーでの1日摂取量があり得ることは示唆された。なお、缶コーヒーについては最大値を示した同銘柄の溶出量は、3年後のデータでは4 ppbまで減少しており、その後の缶コーティング技術の改良も行われているようである (平成12年度厚生科研究費a)。

以上のことを総合すると、特殊な環境 (特定銘柄のポリカーボネート製ほ乳瓶や缶飲料からの溶出) で一過性に、数µg/kg/dayで暴露される可能性はあるものの、通常の一般成人の食品経路からのに関しては、0.1 µg/kg/day前後、多くても1 µg/kg/dayを超えないレベルであろうと考えられる。

7 ヒトへの影響について

ヒトへの内分泌かく乱影響を評価するためには、現在のヒトの暴露環境と照らし合わせるとEPAがRIDを算出する際に使用したラットの2年間の混餌投与試験の最小毒性量: 50 mg/kg以下で報告されている影響、特にµg/kgオーダーの低用量で引き起こされる影響が、ヒトで起きるかどうかについて考慮する必要がある。まず低用量での影響の真偽に関しては、すでに述べたように、µg/kgオーダーのBPAの投与により次世代の生殖器官に対する発生異常、特にvom Saalらの研究グループによって報告された前立腺重量増加 (Nagelら, 1997) や1日精子生産量の減少 (vom Saalら, 1998) に関しては、否定的な結果 (Asbyら, 1999; Cagenら, 1999b) と共に追従する結果 (Gupta, 2000) も相次いで報告されており、現状では結論は出ていない。2000年にNTPで内分泌かく乱物質による低用量問題が議論されたが、昨年8月に公開された最終報告書 (U.S. EPA & NTP, 2001) によれば、両者の結果は科学的に妥当なものであるという評価がなされた。つまり、低用量でおきる影響はある条件では起こり得るということ

を示唆しており、陰性あるいは陽性という結果の違いは、おそらく使用した動物の系統差や飼育方法、餌に混在するエストロゲン作用物質 (特に植物エストロゲンや微量に混入したBPA) 量の違いなどの実験条件に左右されていると考えられている。一方、*in vitro*系の解析では、レセプターレベルの反応にはげっ歯類とヒトとの間に種差はほとんどないと考えられるが、ラットにおいてはF344ラットとSDラットにおいて子宮重量増加等の影響発現に関して系統差が示されている。しかし、体内動態学的解析では両系統に大きな違いは認められておらず、BPAによる低用量影響発現には、レセプターとの結合以後、子宮重量増加や前立腺重量増加などのエンドポイントが発現する段階まで間に、未解明の重要なシグナル伝達メカニズムが存在していることを示唆している。従って、BPAによる低用量影響のヒト健康影響に対する評価を行うためには、これら胎児期・新生児期の低用量暴露により発現する影響のメカニズムの解明に加え、前述した実験結果を左右する因子の特定をも明らかにする必要がある。NTPやIPCSの報告書でも、さらなる研究の必要性が提唱されている。

つぎに、現状のヒト暴露レベルとBPAによる低用量影響発現一日摂取量を比較してみると、前述したように、ヒトの一日摂取量が0.1 µg/kg/day前後であり、動物実験で認められた最低の影響発現一日摂取量: 2 µg/kg/dayよりは約20倍近く低いものの、その差はそれほど大きくない。特定のBPAの溶出量の多い食品や食器等を使用するというような特殊な環境では、ヒトでの暴露量が実験動物で影響の現れるレベルを一過性に超える可能性があることが示唆された。一方、直接的な比較は適当ではないかもしれないが、血液などのヒト組織中でのBPA濃度 (数ng/ml) と、*in vitro*での発現濃度 (数十ng/mlオーダー以上) との比率が、上記*in vivo*での状況、つまりヒト摂取量と実験動物における影響発現摂取量との比率と同様の数十倍の開きであることは、BPAのエストロゲンレセプターを介した細胞レベルの影響が発現するリスクと、1日摂取量で比較した影響発現リスクとの間に相関性のあることを示しているかもしれない。

また、乳幼児の場合においては、ECの食品化学会議の報告によって0.8~1.6 µg/kg/dayの暴露量が推定されているが、この値は各種食器や缶からの溶出量を累積したもので、実際の摂取量はこれより低いと考えられる。しかし、同じECの食品化学会議の報告の中の成人の暴露量と比べ、乳幼児の場合は高い傾向にあることを考慮すると、乳幼児に対する実態暴露調査が必要になってくるであろう。さらに、BPAによる低用量影響がヒトで起こりうると仮定しても、現状ではこれらの低用量影響の各毒性指標の毒性学的位置づけもまだ定まっていない。つまり、実験レベルで得られた前立腺重量増加や1日精子生産量の減少という毒性指標が、ヒトに対して有害影響につながるのか、あるいは生理学的な適応反応の範疇にはいるのかどうかについても今後検討する必要があると考えられる。

最近、EC (European Commission) の食品科学会議 (SCF: Science Committee on Food) ではBPAの再評価を行い、暫定耐容