

ビスフェノールAおよびゲニステインのラットにおける 2 世代繁殖毒性試験

分担研究者 川島 邦夫 国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所 生物試験部

研究要旨

ビスフェノールAおよびゲニステインについて、雌雄親動物の受(授)胎能、F1動物の生殖器の形態、生殖機能、ホルモン動態等を調べ、ヒトの健康に対する影響を予測するため、ラットを用いた2世代繁殖試験を実施している。現在、ビスフェノールAについてはF0親動物の剖検、F1児動物の機能検査、学習試験が終了し、F1動物への投与を継続中である。ゲニステインについては、交配前の投与を継続中である。現在までに得たF0世代の成績、F1世代の投与開始後5週までの成績からは、ビスフェノールAおよびゲニステインの影響と考えられる明確な変化は認められていない。

A. 研究目的

内分泌攪乱作用が報告されているビスフェノールAおよびゲニステインについて2世代試験を行い、雌雄親動物の受(授)胎能、F1動物の生殖器の形態、生殖機能、ホルモン動態等を調べる。

B. 研究方法

Crj:CD(SD)IGSのSPFラットを用い、投与経路は強制経口投与とし、ビスフェノールAの投与量はFrederick vom Saalおよび米国MPI researchの成績を参考にして0, 0.2, 2, 20, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ とした。ゲニステインの投与量は17.96 mg (日本人1人の1日当たり摂取量)のイソフラボン中にはゲニステインが287.36 μg 含まれることから、低用量を200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とし、

倍量の400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を高用量とした。

投与期間はF0雄動物では交配前10週間および交尾成立までの交配期間、さらに剖検日の前日までとした。F0雌動物では交配前2週間および交尾成立までの交配期間、さらに剖検日の前日までとした。F1雌雄動物では離乳時(生後22日)から生後約21週齢までとした。

検査項目はF0およびF1世代について一般状態、体重、摂餌量、繁殖能力(性成熟、性周期、交尾率、受胎率、出産率、出生率など)、精子検査(数、運動性、形態)、ホルモン濃度(テストステロン、エストラジオール、プロラクチン、LH、FSH、T3、T4、TSH)および生殖器・性腺の病理組織学的検査を実施する。F1世代について行動観察(オープンフィールド)・学習試験(T型水迷路)を実施する。

C. 研究結果

1. ビスフェノールA

(1) F0世代

i. 一般状態

雌親動物の哺育期間中に0.2 μg 用量群で皮下の結節形成が1例観察された以外、雌雄親動物

[略語]

F0, 親世代; F1, 第一世代(雑種第一代); F2, 第二世代(雑種第二代); SPF, 特定の病原体感染を防止した動物; LH, 黄体形成ホルモン; FSH, 卵胞刺激ホルモン; T3, トリヨードチロニン; T4, チロキシン; TSH, 甲状腺刺激ホルモン

に薬物投与の影響は認められなかった。

ii. 体重変化

雄では20および200 μg 用量群で投与開始後7週から有意ではないが体重低下が認められた。雌では交配前投与期間、妊娠期間および哺育期間を通じ、対照群とほぼ同様の体重増加を示し、薬物投与の影響は認められなかった。

iii. 摂餌量

各用量群の雌雄とも対照群とほぼ同様の摂餌量を示し、薬物投与の影響は認められなかった。

iv. 繁殖データ

各用量群の交尾率、受胎率、出産率、平均着床数、分娩率、妊娠期間、平均分娩児数、性比、分娩時および4日齢時生存率、離乳時生存率の各繁殖指標とも対照群とほぼ同様の値を示し、薬物投与の影響は認められなかった。

v. 精子検査成績

運動精子率が20および200 μg 用量群でやや低値を示したが、精子数、遊泳速度、良好精子の割合、遊泳パターンに薬物投与の影響は認められなかった。精子形態異常として頭部、中片部、尾部の異常が対照群を含む各群に認められ、頭部と尾部が分離した精子の発現率が高かったが、対照群との間に大きな差はみられなかった。

vi. 肉眼的病理所見

雄では前胃の結節が対照群に1例、腎盂の拡張、精巢の脆弱化と膨化が2 μg 用量群にそれぞれ1例、精囊の萎縮が0.2 μg 用量群に1例観察された以外、薬物投与の影響は認められなかった。

雌では前胃あるいは腺胃の結節が2 μg 用量群にそれぞれ1例、肝臓の結節が200 μg 用量群を除く各群にそれぞれ1例、肝内側左葉の小

型化が20 μg 用量群に1例、腎盂の拡張が2 μg 用量群にそれぞれ1例、脾臓の腫大が0.2 μg 用量群に1例、脾臓と消化管の癒着が200 μg 用量群に1例、筋の嚢胞および結節が2 μg 用量群に1例、皮下結節が0.2 μg 用量群に1例観察された。

vii. 器官重量

雄で200 μg 用量群の心臓実重量が有意に低下した以外、内分泌器官を含む器官重量に薬物投与の影響は観察されなかった。

viii. 血清ホルモン濃度

雄ではエストラジオール濃度は対照群を含め5pg以下であった。プロラクチン濃度は何れの用量群とも対照群に比較して低く、2 μg 用量群が最も低かった。テストステロン濃度は0.2 μg 用量群で対照群より低く、2 μg 以上の用量群では高かった。FSHでは20 μg 以上の用量群で、LHでは200 μg 用量群でそれぞれ対照群に比較して高値を示した。T3およびT4濃度は20 μg 以上の用量群で対照群より低く、TSH濃度は何れの用量群とも対照群とほぼ同程度であった。これらホルモン濃度の変化に有意差は認められなかった。

雌ではエストラジオール濃度は20 μg 用量群で対照群と同程度であったが、0.2および2 μg 用量群では対照群に比較して高値であり、200 μg 用量群では低値であった。プロラクチン濃度は0.2および20 μg 用量群で対照群に比較して低く、2および200 μg 用量群で高かった。テストステロン濃度は対照群を含め、0.2ng以下であった。FSH濃度は0.2 μg 用量群で対照群より低かったが、2および200 μg 用量群では高かった。LH濃度は何れの用量群とも対照群より低かった。T3濃度は0.2および200 μg 用量群で、T4濃度は20 μg 用量群を除き対照群

より低かった。TSH 濃度は何れの用量群とも対照群とほぼ同程度であった。これらホルモン濃度の変化のうち 200 μ g 用量群の T3 および T4 濃度に有意差が認められた。

(2) F1 世代

i. 一般状態

雄では死亡が分娩時の 0.2 μ g 用量群で 1 例、生後 4 日までの間に 200 μ g 用量群で 3 例、離乳までの間に 20 μ g 用量群で 1 例観察された。尾部先端の外傷と尾部先端の欠損が離乳までの間に対照群で、尾部先端の膨化が離乳までの間に 2 μ g 用量群で、頸部の外傷が離乳までの間に 20 μ g 用量群で、尾部先端の内出血が分娩時の 200 μ g 用量群でそれぞれ 1 例観察された。

雌では死亡が分娩時の 20 および 200 μ g 用量群にそれぞれ 1 例、生後 4 日までの間に 0.2 μ g 用量群を除く各群に 1~3 例観察された。腹部の外傷が分娩時と生後 4 日までの間に 2 μ g 用量群でそれぞれ 1 例観察された。尾部先端と前趾の内出血が分娩時の 200 μ g 用量群で、口唇の膨化が生後 4 日までの間に対照群で、眼球突出が離乳までの間に 20 μ g 用量群でそれぞれ 1 例観察された。

ii. 体重変化

雄で 20 μ g 用量群の生後 14 日齢時と 21 日齢時に有意な低下が認められた以外、薬物投与の影響は認められなかった。

iii. 摂餌量

雄で投与開始後 3 週および 4 週の 20 及び 200 μ g 用量群で有意な低下が認められた以外、薬物投与の影響は観察されなかった。

iv. 性成熟

何れの用量群の包皮腺分離および陰開口の平

均完成日とも、対照群との間に差は認められなかった。

v. 行動観察 (オープンフィールド試験)

各用量群の雌雄とも各試行における立ち上がり回数、区画移動回数、脱糞回数、排尿回数、毛繕い回数に薬物投与の影響は観察されなかった。

vi. 学習試験 (水迷路試験)

各用量群の雌雄とも各試行におけるゴール到達時間、誤り回数に薬物投与の影響は認められなかった。

vii. 肛門生殖器間隔

雄では生後 14 日齢時の 0.2 μ g 用量群で、29 日齢時の 200 μ g 用量群で有意な短縮が認められた。雌では生後 4 日齢時の 200 μ g 用量群で有意な短縮が、7 日齢時の 2 および 20 μ g 用量群で有意な延長が認められた。

viii. 反射反応性

何れの用量群の雌雄においても、正向反射、背地走性反射、空中立直り反射の完成日とも、対照群との間に差は認められなかった。

ix. 発育分化

何れの用量群の雌雄においても、耳介開展、切歯萌出、眼瞼開裂、精巣下降の完成日とも対照群との間に差は認められなかった。

x. 器官重量

雄では 20 μ g 用量群で腎臓実重量の有意な低下、20 および 200 μ g 用量群で肺実重量有意な低下が認められた以外、薬物投与の影響は認められなかった。

雌では 0.2 μ g 用量群で脾臓の相対重量の有

意な増加が認められた以外、薬物投与の影響は認められなかった。

2. ゲニステイン

(1) F0 世代

i. 一般状態

雄親動物に背部の外傷および痂皮形成がそれぞれ1例観察された以外、雌雄親動物に薬物投与の影響は認められなかった。

ii. 体重変化

雌雄とも対照群とほぼ同様の体重増加を示し、薬物投与の影響は認められなかった。

iii. 摂餌量

雌雄とも対照群とほぼ同様の摂餌量を示し、薬物投与の影響は認められなかった。

D. 考察

1. ビスフェノールA

ビスフェノールAの投与によりF0世代では0.2 μ g用量群で精囊の萎縮が1例観察された。雄のテストステロン濃度は0.2 μ g用量群で有意ではないが低下が認められた。精囊の分化、発育、機能はテストステロンに依存しており、精巣からのテストステロン分泌の状態に影響される。テストステロンの合成、代謝あるいは利用が障害された場合、重量減少が惹起される。0.2 μ g用量群ではテストステロン濃度の低値傾向が認められており、精囊重量低下との関連が示唆される。しかし、前立腺、精巣重量には変化はなく、精子形成能にも影響がないことから、ビスフェノールA投与の影響とは言い難い。この点に関しては、F1およびF2世代の成績を勘案して判断すべきと考える。

雄のエストラジオール濃度および雌のテストステロン濃度は、対照群を含めそれぞれ5 pg以下、0.2 ng以下であったが、ホルモン濃度は測

定キットの種類、ロットによって変動することから、更に検討する必要があると考える。

雌のT3およびT4濃度は200 μ g用量群で有意に低下した。肛門生殖器間距離は一定した傾向は無いが、雄で短縮が、雌では延長が見られた。肛門生殖器間隔は、性分化異常の簡便な指標であるが、生存動物を用いた計測では、変動が大きくなる欠点があることを考慮した評価が必要と考える。現時点までの成績からは、ビスフェノールAによると考えられる明確な影響は得られていない。

2. ゲニステイン

ゲニステインは飼料中にも存在する。今回は飼料から除去せず、ヒトの摂取量の下限と上限に相当すると考えられる200 μ g/kgと400 μ g/kgを飼料中のゲニステインに上積みした場合の影響として評価した。現在までに得たF0世代の成績では一般状態、体重変化、摂餌量にゲニステイン投与による影響は認められていない。今後実施される繁殖試験、精子検査、血清ホルモン濃度測定の成績を勘案して、F0世代に対するゲニステインの影響を評価すべきと考える。

E. 今後の展望

ビスフェノールAについてはF0親動物の剖検、F1児動物の反射反応性、学習試験、発育分化に関する成績を、ゲニステインについては、入手が遅れたため、交配前の投与期間中の成績のみを報告した。

今後ビスフェノールAのF1世代における育成成績、繁殖成績、哺育成績、F2世代における発育分化、反射反応性検査成績などを得ることにより、今回認められた変化がビスフェノールA投与による変化であるか否かの判断が可能になるものとする。ゲニステインについてはF0、F1、F2世代における全ての成績を得ることによ

り、ゲニステイン投与による影響が発現するか
否かを判断出来るものとする。