

ビスフェノールA, ゲニステイン等の繁殖影響及び体内動態等に関する調査研究

主任研究者 福島昭治 大阪市立大学医学部教授

研究要旨

現在までに得られた研究成果は次の如くである。1) スチレンモノマーはラット肝発がんを抑制し、ビスフェノールAは肝発がん性に影響を及ぼさないことが強く示唆された。ディルドリンの肝発がん性は無作用量の存在が示唆された（福島）。2) 実験継続中の2世代繁殖毒性試験において、親世代 (F0世代) と第一世代 (F1世代) の5週までの成績ではビスフェノールAおよびゲニステインによると考えられる変化は認められていない（川島）。3) ラットにおいてビスフェノールAの血漿中濃度は投与量に相関してほぼ線形に増加し、雄の方が雌より高値を示した。また、経口投与で腸肝循環が認められた。サルにおいては明瞭な腸肝循環は認められなかった（大野）。4) ビスフェノールAの単回投与は自発運動に影響を及ぼさなかったが、28日間経口投与後、ビスフェノールA投与では有意な自発運動の増加が示された（鈴木）。5) 大豆イソフラボンを妊娠、授乳ラットに投与すると胎児数や乳児数の低下がみられ、またその胎児、乳児への移行が認められた（池上）。6) ビスフェノールAの経口投与1時間後には母親血漿中の濃度の1/3が胎児に移行することが明らかとなった。さらに時間が経過しても高い濃度を維持した（武田）。7) ビスフェノールA, ゲニステインはラットの生殖関連行動や生殖機能、および鶏胚の孵化等に影響を及ぼさなかった。しかし、ヒト免疫系培養細胞に対しては両物質ともエトポシド誘導アポトーシスを増強した（別府）。

| 研究者氏名 | 所属施設および地位 | 分担研究の課題 |
|-------|---------------------------------------|---|
| 福島 昭治 | 大阪市立大学医学部教授 | スチレン等内分泌かく乱物質の発がん性と閾値に関する調査研究 |
| 川島 邦夫 | 国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所部長 | 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 |
| 大野 泰雄 | 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 薬理部長 | ビスフェノールAのラット及びサルにおける体内動態試験 |
| 鈴木 勉 | 星薬科大学薬品毒性学教室教授 | 内分泌かく乱物質の行動影響に関する調査研究 |
| 池上 幸江 | 国立健康・栄養研究所 食品科学部部長 | ゲニステインの生体影響および体内動態に関する研究 |
| 武田 健 | 東京理科大学薬学部 教授 | ビスフェノールA, ゲニステインの胎仔期曝露の雄性生殖機能への影響評価 |
| 別府 正敏 | 東京薬科大学教授 | ビスフェノールA, ゲニステイン等の生殖、免疫機能への影響及び代謝に関する研究 |

A. 研究目的

近年、環境中に存在する内分泌かく乱物質が、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、ヒトにおいても精子数の減少や生殖器奇形の発生が増加しており、生殖系を始めとする様々な健康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物質とそれらとの因果関係は、現在のところ科学的には全く不明である。

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、ゲニステイン等の化学物質の生殖機能、生殖器発生異常、体内動態、胎児・乳汁移行、一般および情動行動、免疫および発がん性などに及ぼす影響を解析することを目的とする。

B. 研究方法と結果

1. スチレン等内分泌かく乱物質の発がん性と閾値に関する調査研究 (福島)

6週齢のF344雄ラットを用い、diethylnitrosamine (DEN)をイニシエーターとする中期肝発がん性試験法(伊東法)にて、DENによるイニシエーション後にスチレンモノマー、ビスフェノールA、またはディルドリンを投与した。なお、実験開始3週間後に2/3肝部分切除術を施行した。実験期間は8週間である。

その結果、スチレンモノマーの高用量(250および1000 mg/kg)強制経口投与によりラット肝の前がん病変である胎盤型グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST-P)陽性細胞巢の発生が投与用量と相関して抑制された。現在、ヒト曝露量を考慮した低用量域(最低0.0006 mg/kg)での実験を実施中である。ビスフェノールAの高用量(40および160 mg/kg)投与は肝GST-P陽性細胞巢の発生に影響を及ぼさなかった。さらにディルドリンの高用量投与(100 ppm, 飼料中)は肝発がん性を発揮したが、低用量(最低0.1

ppm, 飼料中)では何ら作用を示さず、無作用量の存在が強く示唆された。

2. 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(川島)

0.2, 2, 20 または 200 μ g/kg/dayのビスフェノールA, 200 または 400 μ g/kg/dayのゲニステインを雌雄のラットの親世代(F0)の交配前から第二世代(F2)の性成熟に到るまで強制経口投与して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世代の剖検を終了し、第一世代(F1)への投与を継続中である。

F0世代の一般状態、体重及び摂餌量、器官重量、精子検査結果及び生殖能力にビスフェノールA投与の影響は観察されなかった。雌F0世代の血中トリヨードチロニン(T3)及びチロキシン(T4)濃度の低下がビスフェノールA 200 μ g/kg/day 投与群で観察された。F1世代では一般状態、成長、発育分化、反射反応性の獲得、性成熟に達した日齢、行動・学習能及び器官重量にビスフェノールA投与による影響はみられなかった。肛門生殖器間隔(AGD)が雄の生後14日のビスフェノールA 0.2 μ g/kg/day 投与群、生後29日の200 μ g/kg/day 投与群で短縮し、雌の生後4日の200 μ g/kg/day 投与群、生後7日の2及び20 μ g/kg/day 投与群で延長した。

ゲニステインについてはF0世代への投与を継続中である。F0世代の一般状態、体重及び摂餌量に対するゲニステイン投与の影響は認められていない。

3. ビスフェノールAのラット及びサルにおける体内動態試験(大野)

14 Cで標識したビスフェノールA (14 C-BPA)を雌雄のラット、妊娠ラット、哺育ラット及び雌雄アカゲザルに経口及び静脈内投与し、血漿中動態、糞尿中排泄、乳汁中排泄および組織分布

を検討した。

雌雄のラットの ^{14}C -BPA 血中濃度は投与量に応じてほぼ線形に増加した。100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 経口投与による生物学的利用能はほぼ 50%であった。また、雄の方が雌より血中濃度が高かった。経口投与では投与後 4 時間以後に再び血中濃度が増加し、腸肝循環があるものと思われた。消失半減期は100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与 2~3 日後で、約15-18時間であった。ビスフェノールAは乳汁中に排泄され、乳汁排泄濃度は投与後 8 時間で最高となり、この時の血漿中濃度の約 1/4であった。

雄サルに ^{14}C -BPA を 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 静脈内および経口投与したときの最高血漿中濃度 (Cmax) および血漿中濃度・時間曲線下面積 (AUC) では大きな差は無かった。生物学的利用能はほぼ 100%であった。また明瞭な腸肝循環は認められなかった。消失半減期 (投与後 8~48時間) は約15時間であった。さらに、ビスフェノールAは主に尿に排泄された。現在、雌雄を用いた本実験を継続中である。

4. 内分泌かく乱物質の行動影響に関する調査研究 (鈴木)

雄性マウスにベンゾ(a)ピレン、ビスフェノールA、およびフタル酸ジ-n-ブチルを強制経口投与し、一般行動、tilting cage法にて自発運動、Vogel型葛藤試験にて葛藤、step down法にて学習・記憶、およびrota-rod法を用いて運動協調性などに及ぼす影響を検索した。

その結果、ベンゾ(a)ピレン、ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-n-ブチル投与後のマウスの一般行動に変化は認められなかった。自発運動について、ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-n-ブチルの単回経口投与は有意な影響を及ぼさなかったが、ベンゾ(a)ピレンは投与後初期の自発運動量を用量依存的に増加させた。また、28日間の混餌投与後、ビスフェノールA 10 mg/kg投与群において有意な自発運動の増加

が認められた。さらに、各被験物質は葛藤、学習・記憶および運動協調性に影響を及ぼさないことが判明した。

5. ゲニステインの生体影響および体内動態に関する研究 (池上)

SD系ラットの妊娠期・授乳期にイソフラボンを含む飼料を投与し、胎児・乳児への移行と生体影響を観察した。また、卵巣摘出と正常の雌dy系マウスにゲニステインを 2~4 週間皮下投与し、子宮重量と骨への影響を観察した。

妊娠期・授乳期の母親ラットに投与したイソフラボンは胎児数や乳児数の低下をもたらした。ゲニステインとダイゼインは胎児・乳児に移行したが、それらの乳児の血中濃度は母親の血中濃度の 1/30および 1/10であった。母親の血中甲状腺ホルモン、T3濃度の有意な低下が観察された。さらに、卵巣摘出、正常いずれのマウスもゲニステインの高濃度曝露によって子宮重量の増加がみられた。卵巣摘出マウスで観察される骨粗鬆症はゲニステインの低濃度曝露によって改善することが分かった。

6. ビスフェノールA、ゲニステインの胎仔期曝露の雄性生殖機能への影響評価 (武田)

ウイスター系妊娠ラットにビスフェノールAを経口投与し、胎仔への移行を検索した。また生まれた仔の精巣を摘出し、雄性生殖系に現れる変化を検討した。精巣ライディッヒ細胞の培養系でテストステロン産生試験法を確立し、ビスフェノールA、ゲニステイン、その他化学物質の影響を比較検討した。

その結果、ビスフェノールAは経口投与1時間後には胎仔に相当量移行 (母親血漿中濃度の約 3分の1) する事が明らかになった。時間の経過とともに母親血漿中のビスフェノールAは著しく低下したが、胎仔組織は高い濃度を維持した。ビスフェノールAはライディッヒ細胞のテストステロン産生には影響を及ぼさなかった。

ゲニステインの妊娠期経口投与により、生後2週の精巣において黄体形成ホルモンやアンドロゲンなどのホルモン受容体 mRNAの発現が亢進した。

7. ビスフェノールA, ゲニステイン等の生殖, 免疫機能への影響及び代謝に関する研究 (別府)

1) 生殖・発生に対する影響はラットと鶏胚を用いた *in vivo* 曝露実験にて検討した。2) 神経系への影響は、ラット脳海馬のスライスを *in vitro* で器官培養し、組織像及び神経活動 (電氣的活動) への影響を見ることにより検討した。3) 免疫をはじめとする細胞機能に対する影響はヒト免疫系培養細胞 (単球系培養細胞 U937, Tリンパ球系培養細胞 Jurkat) を用いた細胞レベルでの *in vitro* 曝露実験にて検討した。4) ヒト体内における代謝を推定するためのアプローチとして、組換え体ヒト薬物代謝酵素 (スルホトランスフェラーゼ, グルタチオンSトランスフェラーゼ) を作製し、*in vitro* において被検化学物質の代謝を検討した。

1) ビスフェノールA及びゲニステインは、ラットの生殖関連行動, 生殖機能, および鶏胚の孵化及び鶏胚の骨形成, 軟骨細胞の増殖能に対し明瞭な影響を示さなかった。2) ラット脳海馬のスライス標本を両化合物存在下で培養すると、ゲニステインは組織をやや増殖させ、また、シナプス活動促進効果を示した。3) 両化合物ともエトポシドで誘導されるアポトーシスを増強する作用を示した。4) 両化合物とも組換え体ヒトスルホトランスフェラーゼにより硫酸抱合代謝を受けることが明らかとなった。一方、組換え体ヒト α 型グルタチオンSトランスフェラーゼによって代謝される可能性は示されなかった。

C. 考察

福島はスチレンモノマーが投与用量と相関し

て肝GST-P陽性細胞巢の発生を抑制したことを見出した。このことは高用量のスチレンモノマーは肝発がんを抑制することを強く示唆している。現在、ヒトが曝露されるレベルでの低用量域での作用を詳細に検討中である。また、ビスフェノールAについては対照群と差を認めなかったことから、長期投与によっても肝発がん性には何ら影響を示さないと結論された。今後、スチレンダイマーおよびトリマーの肝発がんに及ぼす影響についても検討する必要がある (福島)。

ビスフェノールA投与により F0の血中 T3及び T4の変動がみられ、また、F1児の AGDの変化が観察された。血中ホルモンの変化については毒性学的意義について更なる検討が必要であり、AGDの変化については生存動物を用いた計測では変動が大きくなる欠点を考慮しなければならない。今後ビスフェノールA投与の影響が否を検討しなければならない。両物質の実験は現在まだ進行中であり、それらの毒性評価を行う十分な実験成績が得られていない (川島)。

ビスフェノールAのラット血中濃度は雄の方が雌より高かった。通常の薬物においては雌よりも雄の方が薬物代謝が高く、薬物の血中濃度は雄の方が低くなる傾向がある。従って、ビスフェノールAが雄に活性の高いP-450分子種で代謝されるのではないことを示しているのかも知れない。また、ラットにおける経口投与で腸管循環によると思われる二相性の血中動態が認められ、明らかにサルとは異なっていた。この点に関しては近々得られる多数のサルを用いた本実験の結果を待って再考察したい (大野)。

鈴木の研究により、ベンゾ(a)ピレンは単回投与によって、またビスフェノールAは混餌による28日間曝露後に再度、投与することによって自発運動量をそれぞれ亢進することが明らかに

された。本研究ではマウスを新規環境に順応させずに実験を行っていることから、初期の自発運動量の増加は新規環境への順応性の低下を意味し、高用量のベンゾ(a)ピレンやビスフェノールAが新規環境への順応性を低下させる可能性が示唆された。

ゲニステインは大量投与により妊娠・出産に影響を与える可能性があり、胎児・乳児に移行することが確認された。今後、日本人におけるゲニステイン摂取実態を考慮しながら、妊娠期・授乳期のゲニステイン曝露の胎児・乳児に与える影響を詳細に検討することが必要である(池上)。

ビスフェノールAは妊娠ラットに経口投与すると、速やかに相当量胎仔に移行することが明らかになった。今後、1週間、1カ月という長時間に渡って胎仔組織のビスフェノールAの濃度変化を調べる必要がある。しかし、ビスフェノールAは今のところ雄性生殖系にはっきりした影響を示していない。一方、ゲニステインはテストステロン合成酵素、ホルモン受容体の発現に影響を与える可能性が示唆されたので、今後この点をさらに詳細に検討する必要がある(武田)。

ビスフェノールA、ゲニステインの影響は、*in vitro* では認められる傾向にあったが、*in vivo* 実験ではほとんど認められなかった。個体レベルでは、代謝的な分解や恒常性維持機構の作用によって影響が軽減されている可能性が考えられる。しかしながら *in vitro* 系における各種の影響はこれら化学物質の持つ潜在的な作用を示しており、ヒトへの影響を評価するためには多面的な知見を集積し、総合的に判断する必要がある(別府)。

D. 結論

現在までに得られた研究成果は次の如くである。

1) スチレンモノマーはラット肝発がんを抑制し、ビスフェノールAは肝発がん性に影響を及ぼさないことが強く示唆された。ディルドリンの肝発がん性に無作用量の存在が示唆された(福島)。

2) 実験継続中の2世代繁殖毒性試験において、F0世代とF1世代の5週までの成績ではビスフェノールAおよびゲニステインによると考えられる変化は認められていない(川島)。

3) ラットにおいてビスフェノールAの血漿中濃度は投与量に相関してほぼ線形に増加し、雄の方が雌より高値を示した。また、経口投与で腸管循環が認められた。サルにおいては明瞭な腸管循環は認められなかった(大野)。

4) ビスフェノールAの単回投与は自発運動に影響を及ぼさなかったが、28日間経口投与後、ビスフェノール投与では有意な自発運動の増加が示された(鈴木)。

5) 大豆イソフラボンで妊娠、授乳ラットに投与すると胎児数や乳児数の低下がみられ、またその胎児、乳児への移行が認められた(池上)。

6) ビスフェノールAの経口投与1時間後には母親血漿中の濃度の1/3が胎児に移行することが明らかとなった。さらに時間が経過しても高い濃度を維持した(武田)。

7) ビスフェノールA、ゲニステインはラットの生殖関連行動や生殖機能、および鶏胚の孵化等に影響を及ぼさなかった。しかし、ヒト免疫系培養細胞に対しては両物質ともエトポシド誘導アポトーシスを増強した(別府)。

今後、現在、継続して実施中である研究を一刻も早く完成させる必要がある。さらに、ヒトが曝露される低用量域での作用を検討することによって、ヒトへの影響やリスク評価に際しての重要なデータが提供されると考える。

E. 研究発表

1. 論文発表

Kitano, M., Ichihara, T., Matsuda, T., Wanibuchi, H., Tamano, S., Hagiwara, A., Imaoka, S., Funae, Y., Shirai, T. and Fukushima, S. Presence of a threshold for promoting effects of phenobarbital on diethylnitrosamine-induced hepatic foci in the rat. *Carcinogenesis*, 19, 1475-1480, 1998.

福島昭治. 環境因子の発癌リスク—評価と予防への実験病理学的アプローチ— (宿題報告 III) 日病会誌 (Proc Jpn Soc Pathol), 第 87 巻, 第 2 号, 55-77, 1998.

Fukushima, S. Low-dose carcinogenicity of a heterocyclic amine, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline: relevance to risk assessment. *Cancer Lett.*, 143, 157-159, 1999.

石見佳子, 池上幸江. 大豆イソフラボンの有効性とリスク. *栄養食糧誌*, 51 巻, 1998.

Ishimi, Y., Miyaura, C., Ohmura, M., Onoe, Y., Sato, T., Uchiyama, Y., Ito, M., Wang, X., Suda, T. and Ikegami S. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology*, 140, 1999.

Yoshida, S., Yamada, H., Sugawara, I. and Takeda, K. Effect of dibromochloropropane (DBCP) on the hormone receptors of the male rat reproductive system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 479-483, 1998.

Watanabe S., Yoshida, S., Shimizu, T. and Takeda, K. Analysis of responsive genes

of murine Leydig cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Health Sci.*, in press.

吉田成一, 田畑真佐子, 武田健. 内分泌攪乱物質の生殖及び生体防御系への影響評価の確立. *化学工業* 49, 607-612, 1998.

哺乳動物細胞を用いた細胞毒性試験「バイオアッセイ水環境のリスク管理」(鈴木基之・内海英雄編) 講談社サイエンティフィック. pp105-115, 1998.

Matsuzawa, S., Suzuki, T., and Misawa, M. Conditioned fear stress induces ethanol-associated place preference in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 341, 127-130, 1998.

Matsuzawa, S., Suzuki, T., Misawa, M. and Nagase, H. Involvement of μ - and δ -opioid receptors in the ethanol-associated place preference in rats exposed to foot shock stress. *Brain Res.*, 803, 169-177, 1998.

F. 知的所得権の取得状況
なし