

平成 12 年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の分析及び
動態研究

エポキシ樹脂関連化学物質の妊娠期及び授乳期暴露による次世代への影響

主任研究者 中澤裕之 星薬科大学教授

研究協力者 山崎聖美 国立公衆衛生院

研究要旨

エポキシ樹脂は高分子素材由来製品に多く応用されており、食品用缶の内面コーティングや接着剤等に用いられる。ビスフェノール A ジグリシジルエーテルはエポキシ樹脂であり、水系食品の缶に用いられた場合、加水分解体（BADGE-4OH）としての食品移行が報告されている。この物質に関する内分泌かく乱作用という視点での毒性評価はなされていない。日常、食品を介して摂取する可能性のあるこの物質に関して、生体影響についての研究が必要とされる。従って、BADGE-4OH の次世代影響を検討した。その結果、妊娠 3.5 日より離乳時まで BADGE-4OH を母マウスに投与した場合、雄仔マウスの精巣及び胸腺重量が減少することが明らかになった。従って我が国においても食品中残留基準を設ける等、食品衛生上の対応が必要であると考えられる。

A. 研究目的

近年、我々の身の周りには高分子素材由来製品が多数存在する。その中でエポキシ樹脂は、我々の生活に欠かす事の出来ない物となっている。エポキシ樹脂であるビスフェノール A ジグリシジルエーテル（BADGE）は、缶の内面コーティング、接着剤及び床板塗料等に用いられており、食品用缶に用いられた場合は食品へ移行することが報告されている。また、BADGE はエポキシ環を有するため、水系食品における缶コーティングに用いられた場合には、加水分解体（BADGE-4OH）として存在することが示唆されており、我々が食品を介して微量ながらも確実に摂取し続けていると考えられる。

BADGE は、ビスフェノール A（BPA）とエピクロロヒドリンにより合成される（Fig. 1）。BADGE の原料であるビスフェノール A のエストロジェン活性は、*in vitro* 及び *in vivo* 試験系により調査されており、*in vitro* におけるエストロジェン活性及び低用量暴露による次世代への生殖影響等が報告され、安全性が見直しが必要とされている。一方 BADGE 関連物質においては、EU の Scientific Committee On Food (SCF) が、BADGE、BADGE の塩素付加物及び BADGE 加水分解物の合計量について、食品中の暫定溶出限度を、1 mg/kg とするよう勧告しており、更なる詳細な安全性評価を必要としているが、我が国においては食品衛生上の規制値が設けられていない。加えて、BADGE-4OH に関しては、十分な毒性

評価がなされておらず、詳細な検討が必要であると考えられる。

昨年度、乳癌細胞増殖試験法により、BADGE-40Hのエストロジェン活性を測定したところ、エストロジェンレセプター（ER）を介した乳癌細胞増殖促進作用が認められた（Fig.2）。しかし十分な毒性評価がなされておらず、エストロジェン作用が観察されたBADGE-40Hの生体影響を調査することは重要である。従って近年問題視されている低用量暴露による次世代への影響を、経口摂取させた妊娠マウスを用いて評価した。

B. 研究方法

B・1 試薬・試料

BADGE-40HはFluka社製（> 97%）を用いた。

骨染色：エタノール、水酸化カリウム及びグリセロールは、和光純薬工業社製を使用した。

B・2 マウスの育成と交尾

雌雄ともに8週齢 ddY 系マウスを用いた。温度、湿度及び光（12h light/ 12h dark）は全て一定に調節された状態で飼育した。マウスは一匹ずつケージへ入れ、餌及び水の摂取は自由とし、ストレスを最小限に抑えるため、出来る限り騒音及び観察は控えた。

マウス購入一週間以上は環境への不慣れが考えられるため、交配はそれ以降とした。発情期を迎えていることを確認した雌のケージに、雄を一匹ずつ入れ、翌朝膈腺の確認を行い、雄は雌のケージから取り除いた。膈腺が確認された雌はその日の朝を妊娠0.5日目とし、以後の実験に用いた。

B・3 BADGE-40Hの投与

BADGE-40Hの投与は、粉末飼料への混合

（low dose ; 3.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、high dose ; 50 $\times 10^3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ）により行った。Low doseの濃度設計は、我々の日常暴露を想定したものであり、high doseに関しては、BADGEの原料であるBPAの最大無作用量を参考にしたものである。

マウスへの投与は、妊娠3.5日目から仔の離乳（生後21日目）までとした。実験計画をFig. 3に示す。

B・4 胎仔生殖腺分化に及ぼす影響

マウス胎仔生殖腺の雌雄分化が始まる前までの段階で、BADGE-40H high dose 投与群における生殖腺の形態に及ぼす影響を検討した。妊娠13.5日に胎仔から生殖腺を摘出し、実体顕微鏡を使用して、雌雄生殖腺の観察を行った。

B・5 胎仔骨形成に対する影響

エストロジェン様作用の疑われる化学物質であるフタル酸エステル類は、妊娠親マウスへの投与により、生まれてくる仔に骨格異常を引き起こすという報告がある。従って、フタル酸エステル類と同様にエストロジェン作用を有するBADGE-40Hを、妊娠マウスに投与（low dose、high dose）した場合の胎児骨形成に及ぼす影響を、骨染色標本により検討した。

妊娠3.5日よりBADGE-40Hを含んだ粉末飼料を経口投与し、仔が産まれてくる直前の18.5日目に親マウスより胎仔を取り出した。コントロールとして通常の粉末飼料を与えた。胎児を95%のエタノールで固定し、1週間以上浸漬し、剥皮、内臓摘出後、1%水酸化カリウム水溶液に一昼夜浸漬して胎児を軟化させた。その後、胎児をアリザリン色素液（0.1mgアリザリン / L 1% KOH）へ一昼夜浸漬し、さらに、MaII液（20%グリセリン 200

ml+1 %水酸化カリウム 800 ml) へ一昼夜浸漬した。その後 50%、80 %、100 %グリセリン水溶液にそれぞれ一昼夜ずつ浸漬し、80 %浸漬後に、シャーレに入れ、胎児を浮かせて、骨の形態及び配列等を観察した。

B・6 仔の体重及び諸臓器重量測定

出生時、及び離乳時における仔マウス体重を測定した。加えて、離乳時においては脾臓、胸腺、子宮、及び左右精巣重量を測定した。

C. 研究結果

C・1 マウス胎仔生殖腺分化に対する影響

マウスの場合、形態的に性腺の原基が認められるのは胎齢 10.5 日前後である。この時期の生殖隆起には、形態上明確な雌雄差が認められない。胎齢 12.5 日頃になると生殖隆起の構造に性差が認められるようになる。雄性生殖隆起内部には短軸方向に数本の精巣索と呼ばれる管状構造が形成される。精巣索の内部には始原生殖細胞が集まっており、それらを将来セルトリ細胞になる体細胞が取り囲んでいる。精巣索の外側の間質細胞からはライディッヒ細胞が分化する。一方、この時期の雌性生殖隆起の表面には上皮様細胞の分化は観察されず、内部には多数の斑点状の構造が認められる (Fig. 4)。通常、精巣索と斑点状の構造は実体顕微鏡による観察で識別できるため、これらの構造の出現により雌雄の判別が可能となる。

high dose BADGE-40H 投与群仔マウスは 11 匹 (雄 5 匹、雌 6 匹) であったが、この時点での死産及び外皮の奇形は観察されなかった。実体顕微鏡により生殖腺の観察を行ったところ、構造上の異常は認められなかった (Fig. 5)。

C・2 骨形成に対する影響

コントロール群の胎仔 12 匹、BADGE-40H low dose 投与群の胎仔 11 匹、BADGE-40H high dose 投与群の胎仔 16 匹を観察したが、母親の胎内から取り出した時点での死産や外皮奇形は、いずれの群においても見られなかった。また、骨標本についても、いずれの群においても奇形は認められなかった (Fig. 6)。

C・3 出生時及び離乳時における体重変化

コントロール群 5 匹の母マウスからは 1 匹あたり平均 8.4 匹、low dose 群 4 匹からは平均 8.3 匹、そして high dose 群 3 匹からは平均 12 匹の仔が生まれた。しかし、high dose 群の親のうち 1 匹は、離乳直後に死亡し、その仔は生後 2 週過ぎあたりから体重が減少し、生後 3 週の時点においても片目が開眼していない仔が見られたため、対象から除外し、high dose 群は、雌の親マウス 2 匹、仔 24 匹として実験を行った。生まれた仔の雌雄割合を Table 1 に示す。

出生時における体重は、各群間で有意な差は認められなかった。しかし、離乳時において雌雄別に体重を測定したところ、雌に関してはコントロールと比較し有意な体重変化は観察されなかったのに対し、雄は low dose 及び high dose 投与群それぞれコントロールと比較し、有意な体重減少が認められた (Fig. 7)。

C・4 離乳時における諸臓器重量測定

妊娠期及び授乳期に母親を通して BADGE-40H に暴露された仔マウスの胸腺、脾臓、子宮及び左右精巣の重量を、離乳時 (生後 21 日目) に測定した (Fig. 8、9)。離乳時において、各群間で平均体重にわずかに差が見られたため、これらの臓器は、その重量の各々の体重に対する割合で示した。雌に関し

ては、胸腺、脾臓及び子宮重量は、コントロールとほぼ同様であった。しかし雄に関しては、胸腺及び左右精巣において low dose 及び high dose 投与群ともにコントロールと比較し有意な重量の減少が観察された。

D. 考察

胎仔 13.5 日では、生殖腺の形態に関して、low dose 及び high dose 投与による変化は観察されなかった。昨年度、乳癌細胞増殖試験法によりエストロゲン活性が認められた BADGE-40H は、フィードバック機構が働いていない雌仔マウスに対し、子宮重量を増加するものと思われたが、low dose 及び high dose 投与群においてその様な結果は観察されなかった。しかし、離乳期における雄仔マウス精巣重量は、両投与群で有意に減少した。

生殖腺の形成過程における核内レセプター機能は明瞭になっていない。しかし、生殖腺細胞に関して、セルトリ細胞及び生殖細胞では ER が、ライディッヒ細胞においては ER 、ともに発現していることが明らかとなっている。マウスでは、卵巣機能の成熟過程は出生後に始まるために、胎生期には雌であっても胎仔自身がエストロゲンを産生することはない。しかし雄胎仔では精巣機能の成熟過程はすでに胎生期に進行しており、アンドロゲンの産生が可能となっている。従って体外からのエストロゲンに対する雌雄における感受性の違いや、胎生期の精巣機能成熟過程で、変化が起こることは推測可能である。従って、エストロゲン活性が示唆されている BADGE-40H による、生殖腺の形成過程での影響を、遺伝子レベルで解析することが必要となるだろう。また、BADGE-40H 投与にける精巣重量の減少が、一時的なもので

あるか、不可逆的な変化であるのかは、ヒトへの影響を考える上で重要な問題であり、更なる研究が必要である。

E. 結論

BADGE-40H に関する毒性評価は、遺伝毒性が報告されているが、それ以外は全くなく、低用量暴露による次世代影響を含め、詳細な研究が必要である。本研究により、BADGE-40H 投与により、次世代に精巣重量及び胸腺重量の減少として影響があらわれることが明らかになった。粉末飼料への混合による BADGE-40H 摂取であったため、親及び胎仔又は仔における組織、血中移行に関する詳細は不明である。従って、生体に影響を及ぼす濃度レベルを解明する目的で、血中への移行及び代謝に関する研究を行っていく事が必要不可欠となる。また、妊娠期及び授乳期暴露による次世代への影響という視点から、ヒトへの暴露レベル実態解明の必要性も示唆された。これらの実験を行った上で、我が国においても食品中残留基準を設ける等、食品衛生上の対応の必要性が示唆された。

参考文献

- 1) Summerfield W, Goodson A, Cooper I, 1998, Survey of bisphenol a diglycidyl ether (BADGE) in canned foods. Food Additives and Contaminants, 15, 818-830
- 2) A. Theobald, C. Simoneau, P. Roncari, A. Roncari and E. Anklam, 1999, Monitoring of Bisphenol-A-Diglycidyl-Ether (BADGE) in Canned Milk Products and Vegetable Oils. Deutsche

- Lebensmittel-Rundschau, 95, 362-365
- 3) Maurus Biedermann and Konrad Grob, 1998, Food contamination from epoxy resins and organosols used as can coatings: analysis by gradient NPLC. Food Additives and Contaminants **15**, 609-618
 - 4) John E. Biles, Kevin D. White, Timothy P. McNeal, and Timothy H. Begley, 1999, Determination of the Diglycidyl Ether of Bisphenol A and Its Derivatives in Canned Foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **47**, 1965-1969
 - 5) L. Hammarling, H. Gustavsson, K. Svensson and A. Oskarsson, 2000, Migration of bisphenol-A diglycidyl ether (BADGE) and its reaction products in canned foods. Food Additives and Contaminants, **17**, 937-943
 - 6) Susanna Suarez, Rosa Ana Sueiro, Joaquin Garrido, 2000, Genotoxicity of the coating lacquer on food cans, bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), its hydrolysis products and a chlorohydrin of BADGE. Mutation Research, **470**, 221-228

学会発表

EFFECT OF ENDOCRINE
DISRUPTING CHEMICALS ON LYMPHOCYTE
RESPONSES

Tomomi Yamazaki, Yumiko Okada, Yoshiharu Hisamatsu, Shunichiro Kubota and Fujio Kayama

DIOXIN 2000, Vol. 49 p394-396, August 2000,

Monterey, California, USA

日本食品化学学会第六回総会・学術大会
(2000)「食品衛生関連化学物質の E-SCREEN
Assay による評価」; 山口晃子、中澤裕之(星
薬科大学) 山崎聖美(国立公衆衛生院)
日本食品衛生学会第八十回学術講演会
(2000)「容器・包装関連物質のエストロジ
エン作用かく乱の生化学的分析」; 山口晃子、
中澤裕之(星薬科大学) 山崎聖美(国立公
衆衛生院)