

ICRマウスによる難燃剤テトラブロモビスフェノールAの 未成熟動物子宮肥大試験

多田幸恵*, 矢野範男*, 高橋博*, 湯澤勝廣*, 安藤弘*,
久保喜一*, 長澤明道*, 小縣昭夫*, 上村尚**

Immature rodent uterotrophic assay of Tetrabromobisphenol A, a flame retardant, in ICR mice

Yukie TADA*, Norio YANO*, Hiroshi TAKAHASHI*, Katsuhiko YUZAWA*, Hiroshi ANDO*,
Yoshikazu KUBO*, Akemichi NAGASAWA*, Akio OGATA* and Hisashi KAMIMURA**

Keywords : テトラブロモビスフェノールA tetrabromobisphenol A, 難燃剤 flame retardant, 子宮肥大試験 uterotrophic assay, 未成熟げっ歯類 immature rodent, マウス mouse

はじめに

臭素系難燃剤テトラブロモビスフェノールA (Tetrabromobisphenol A [2,2-bis-(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)-propane; TBBPA]) はABS樹脂, エポキシ樹脂, ポリカーボネート樹脂及び接着剤等に難燃剤として用いられ¹⁻³⁾, その構造はエストロゲン作用が問題とされるビスフェノールA (BPA) によく似ている (図1)。

TBBPAのエストロゲン作用に関しては, これまでIn vitroの実験系でエストロゲン活性が認められたとの報告があるが⁴⁻⁶⁾, In vivoでの生殖系への影響は報告されていない。そこで今回我々は, 未成熟マウスを用いて子宮肥大試験を行った。その際投与開始日齢を変え, 卵巣及び子宮の重量, 子宮及び膈の組織学的変化がどのように変動するか病理学的に観察した。

実験方法

1. 被検物質

テトラブロモビスフェノールA標準品 (Lot 205G7207; 純度98.7%以上) は関東化学から購入, ジメチルスルホキシド (以下DMSOとする; Lot TCM7031) は和光純薬から購入, β エストラジオール (以下E2とする; Lot 21K1267) はシグマから購入した。TBBPA及びE2はDMSOに溶解しそれぞれマウスに投与した。

2. 動物

12日齢 (出生日を0日とする) のCrIj:CD1 (ICR) 雌マウスを哺乳親付きで日本チャールスリバー (株) から購入し, クリーンチップ (日本クレア) を敷いたプラスチック製ケージに哺乳親1匹あたり10匹ずつ収容し, 温度 $23\pm 1^\circ\text{C}$, 湿度

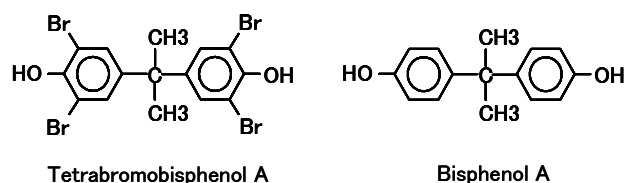


図1. テトラブロモビスフェノールAとビスフェノールAの構造

$55\pm 10\%$, 照明12時間の飼育室で, 基礎飼料CE-2 (日本クレア) 及び水を自由に摂取させ飼育した。実験1, 2とも離乳後は1ケージに5匹ずつ収容した。

3. 投与及び病理検索

実験1は16日齢, 実験2は19日齢でマウスを離乳, 体重測定し, それぞれランダムに各群15匹 (実験1) あるいは各群20匹 (実験2) の5群に分け, 離乳翌日から, DMSOに溶解したTBBPAを投与用量0 (対照群), 5, 50及び500 mg/kg体重, 投与液量1 mL/kg体重で, 1日1回, 3日間, マイクロシリンジを用いて背部皮下投与した。陽性対照としてDMSOに溶解したE2を1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の用量で同様に投与した。投与終了後24時間後にマウスをエーテル軽麻酔下で放血致死させ解剖し, 卵巣, 子宮及び膈を摘出した。卵巣と子宮は重量測定し, 体重100gあたりの相対重量を算出した。摘出した器官は10%中性緩衝ホルマリン液で固定後, 定法に従いHE標本を作製し顕微鏡観察した。子宮の内膜上皮の高さは画像処理解析ソフトウェアWin ROOF (三谷商事株式会社) を用いて測定, 処理した。

4. 統計学的解析

対照群とTBBPA投与群間の差はScheffeの多重比較検定,

* 東京都健康安全研究センター環境保健部生体影響研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター環境保健部

表1. テトラブロモビスフェノールAを3日間背部皮下投与したマウスの最終体重及び器官重量

	TBBPA用量 (mg/kg体重)				E2 (陽性対照)
	0 (DMSO)	5.0	50.0	500.0	1 µg/kg体重
実験1 (生後17-19日に投与)					
試験動物数	15	15	15	15	15
最終体重 (g)	12.0±0.9 ^a	11.9±1.1	11.9±0.8	11.8±1.3	11.9±0.9
実重量 (mg)					
卵巣	3.7±1.0	3.3±0.9	3.3±0.9	3.1±0.9	2.7±0.7*
子宮	17.9±3.6	18.7±6.1	16.2±3.0	17.0±6.8	44.6±8.6*
相対重量 (mg/100g 体重)					
卵巣	30.8±8.6	27.7±5.8	27.6±7.1	26.5±6.4	22.5±5.5*
子宮	148.6±25.3	155.9±39.9	135.9±21.4	141.1±43.8	372.3±56.5*
実験2 (生後20-22日に投与)					
試験動物数	20	20	20	20	20
最終体重 (g)	15.3±1.2	15.3±1.5	15.1±1.3	15.3±1.5	15.7±1.4
実重量 (mg)					
卵巣	3.7±0.8	3.9±1.0	3.9±0.8	3.9±0.8	3.8±0.9
子宮	35.0±17.7	43.6±23.8	39.4±34.7	40.3±19.5	129.0±31.6*
相対重量 (mg/100g 体重)					
卵巣	24.0±5.0	25.9±6.6	25.9±5.2	25.5±5.7	24.4±5.5
子宮	224.8±98.3	278.2±136.6	253.2±191.1	258.5±110.4	823.7±189.9*

a: 数値は平均値±標準偏差

* 対照群との比較で有意差有り (t検定; p<0.05)

対照群と陽性対照群 (E2) 間の差はStudentのt検定を用いて解析した⁷⁾. 有意水準はいずれも5%とした.

実験結果

1. 一般症状, 体重及び器官重量

試験期間中, 動物の死亡及び投与に関連した一般症状の変化は見られなかった. 実験1 (生後17-19日に投与) 及び実験2 (生後20-22日に投与) の最終体重と器官重量を表1に示した. また対照群マウスを100とした最終体重, 卵巣及び子宮実重量の重量比を図2に示した. 実験1では, TBBPA投与群の卵巣重量が対照群と比較しやや低い傾向を示したが, 統計学的に有意な差ではなかった. 実験2では, TBBPA投与群の卵巣及び子宮重量が対照群と比較しやや高い傾向を示したが, 統計学的に有意な差ではなかった.

対照群と陽性対照群E2との比較では, 実験1で卵巣重量の低下及び子宮重量の増加が, 実験2で子宮重量の増加が, 有意に認められた.

2. 病理検索

実験1及び実験2の子宮と膣の組織観察結果を表2に示した. 実験1で膣粘膜上皮の肥厚が低濃度, 中濃度及び高濃度群に, それぞれ2例, 1例及び2例みられ, 対照群にはみられなかったが, これらの発現は統計学的に有意な差ではなかった. 実験2で, 子宮内膜上皮の高さが, 対照群と比較し高濃度群でやや高い値を示したが, 統計学的に有意な差ではなかった. 膣の角質化は, 実験1では対照群投与群とも発現がみられず, 実験2では対照群と投与群で同程度の発現頻度であった.

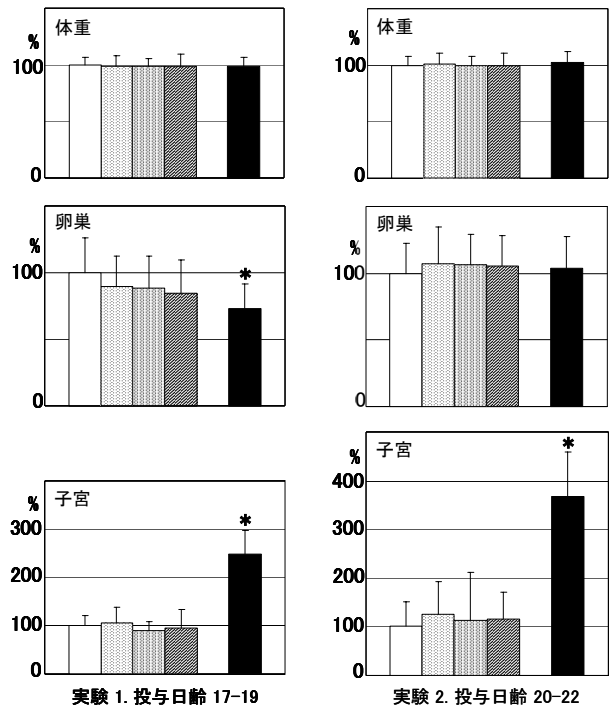


図2. TBBPAを生後17-19日あるいは生後20-22日に投与したマウスの体重, 卵巣及び子宮実重量の重量比

考 察

TBBPAはエストロゲン様活性が問題とされるBPAに臭素が4つ結合した構造をしている (図1). AshbyらはBPAを皮下投与した未成熟ラットで子宮重量の増加及び膣開口が早期にみられたことを報告した⁸⁾. またSteinmetzらは卵巣摘出ラットで⁹⁾, Papaconstantinouらは卵巣摘出マウスで¹⁰⁾

表2. テトラブロモビスフェノールAを3日間背部皮下投与したマウスの組織所見

	TBBPA用量 (mg/kg体重)				2 (陽性対照) 1 µg/kg体重
	0 (DMSO)	5.0	50.0	500.0	
実験1 (生後17-19日に投与)					
試験動物数	15	15	15	15	15
子宮 内膜上皮の高さ (µm)	17.6±1.2 ^a	16.8±1.0	17.3±1.2	16.6±1.3	28.8±3.9*
膣 上皮の肥厚 (5層以上)	0 ^b	2	1	2	15
角質化	0	0	0	0	15
実験2 (生後20-22日に投与)					
試験動物数	20	20	20	20	20
子宮 内膜上皮の高さ (µm)	18.2±2.6 ^a	17.6±2.8	18.3±2.6	19.5±4.2	29.9±3.8*
膣 上皮の肥厚 (5層以上)	16 ^b	15	16	16	20
角質化	12	12	11	14	20

a: 数値は平均値±標準偏差

b: 数値は組織変化を示した匹数

* 対照群との比較で有意差有り (t検定; p<0.05)

BPAによる子宮重量の増加を報告している。一方、BPAによる子宮重量の変化は認められないとの報告もある¹¹⁻¹³⁾。最近Olsenらはヒトの乳がん細胞MCF-7を用いた実験系で、TBBPAにエストロゲン様活性が認められたとの報告をした⁴⁾。またMeertsらはT47D乳がん細胞を用いた実験で⁵⁾、SamuelsenらはMCF-7を用いた実験で⁶⁾、TBBPAに弱いエストロゲン活性が認められることを報告した。今回我々は生後17日齢(実験1)、あるいは20日齢(実験2)のICRマウスにTBBPAを皮下投与し子宮肥大試験を行った。実験1ではTBBPA投与群で子宮重量の増加は認められず、実験2では投与群で子宮重量の軽度な増加が認められたが統計学的に有意な差ではなかった。組織学的検索においても、エストロゲン活性を有する物質を投与した際に認められる子宮内膜上皮の高さの増加、子宮間質の浮腫性変化、膣内膜上皮の肥厚及び膣の角質化等の変化が、実験1及び実験2の投与群マウスに観察されなかった。今回の実験条件下でTBBPAの子宮肥大作用を認めることはできなかった。

子宮肥大試験は子宮の増殖がエストロゲンによって制御されていることを利用した試験法で、評価のエンドポイントには、子宮重量のほか、子宮及び膣の病理組織学的変化(子宮内膜上皮の増生、膣の角質化等)が用いられる¹⁴⁻¹⁶⁾。子宮肥大試験には未成熟動物を用いる方法と、卵巣摘出動物を用いる方法があり、KangらはSDラットの未成熟動物と卵巣摘出動物を用いて子宮肥大試験を行い、未成熟動物を用いた実験系の方が高感度にエストロゲン成分を検出することを報告した¹⁷⁾。思春期前の幼若動物では内因性のエストロゲンであるE2の血中濃度が低く保たれ、子宮は外因性のエストロゲンに対して用量依存的に肥大する。永井らはラットによる子宮肥大試験で投与開始日齢18日と21日とを比較し、子宮重量の増加は21日齢の方が反応性が高いと報告している¹⁴⁾。マウスによる子宮肥大試験では投与開始日

齢を16日¹⁸⁾、17日¹⁹⁾、20日²⁰⁾、21日²¹⁾、23日²²⁾とした報告がされているが、投与適期を総合的に述べた報告は認められない。今回我々は投与開始日齢を17日と20日で行った。陽性対照群E2の子宮重量は、実験1では対照群の2.5倍であったのに対し、実験2では対照群の3.7倍であった(図2)。永井らによるラットでの結果¹⁴⁾と同様、投与開始日齢が遅い方(20日)が反応性が高かった。しかし実験2(投与開始日齢20日)では、対照群のマウスにも、膣上皮の肥厚が20例中16例、膣の角質化が20例中12例認められ、試験期間中に内因性エストロジオールの分泌が開始されたものと考えられる。今回の結果から、ICRマウス未成熟動物による子宮肥大試験の投与開始日齢は17ないし18日が適当であると思われる。

まとめ

プラスチック難燃剤テトラブロモビスフェノールA (TBBPA)をDMSOに溶解し、0、5、50及び500 mg/kg体重の投与用量で、17日齢(実験1)あるいは20日齢(実験2)のマウスに、1日1回3日間背部皮下投与し、子宮肥大試験を行った。

1. 実験1、2とも、投与群のマウスで子宮重量の有意な増加及び組織学的な変化は認められず、TBBPAの子宮肥大作用は確認されなかった。
2. ICRマウス未成熟動物による子宮肥大試験の投与開始日齢は17ないし18日が適当であると思われる。

文 献

- 1) Bromine Science and Environmental Forum, 2004.
www.bsef.com
- 2) WHO/IPCS: *Environ. Health Criteria*, **172**, 1995, Geneva, Switzerland.
- 3) de Wit, C.A.: *Chemosphere*, **46**, 583-624, 2002.

- 4) Olsen, C.M., Meussen-Elholm, E.T., Samuelsen, M. *et al.*: *Pharmacol. Toxicol.*, **92**, 180-188, 2003.
- 5) Meerts, I.A., Letcher, R.J., Hoving, S. *et al.*: *Environ. Health Perspect.*, **109**, 399-407, 2001.
- 6) Samuelsen, M., Olsen, C., Holme, J.A. *et al.*: *Cell Biol. Toxicol.*, **17**, 139-151, 2001.
- 7) Gad, S.C. and Weil, C.S.: Statistics for toxicologists. In Hayes, A.W. (Ed), *Principles and methods of toxicology*, 3rd edn., 221-274, 1994. Raven Press, New York.
- 8) Ashby, J., Tinwell, H.: *Environ. Health Perspect.*, **106**, 719-720, 1998.
- 9) Steinmetz, R., Mitchner, N.A., Grant, A.: *Endocrinology*, **139**, 2741-2747, 1998.
- 10) Papaconstantinou, A.D., Umbreit, T.H., Fisher, B.R. *et al.*: *Toxicol. Sci.*, **56**, 332-339, 2000.
- 11) Nagao, T., Saito, Y., Usumi, K. *et al.*: *Reprod. Toxicol.* **13**, 303-311, 1999.
- 12) Cagen, S.Z., Waechter, J.M., Dimond, S.S. *et al.*: *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **30**, 130-139, 1999.
- 13) Tinwell, H., Haseman, J., Lefevre, P.A. *et al.*: *Toxicol. Sci.*, **68**, 339-348, 2002.
- 14) 永井賢司: 子宮肥大試験—幼弱ラット法, 井上達監修, 内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法, 65-69, 2000, シュプリンガー・フェアラーク東京KK, 東京
- 15) Owens, W. and Koeter, H.B.: *Environ. Health Perspect.*, **111**, 1527-1529, 2003.
- 16) Kanno, J., Onyon, L., Haseman, J. *et al.*: *Environ. Health Perspect.*, **109**, 785-794, 2001.
- 17) Kang, K.S., Kim, H.S., Ryu, D.Y. *et al.*: *Toxicol. Lett.*, **118**, 109-115, 2000.
- 18) Padilla-Banks, E., Jefferson, W.N. and Newbold, R.R.: *Environ. Health Perspect.*, **109**, 821-826, 2001.
- 19) Breinholt, V., Hossaini, A., Svendsen, G.W. *et al.*: *Food Chem. Toxicol.*, **38**, 555-564, 2000.
- 20) Tinwell, H., Joiner, R., Pate, I. *et al.*: *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **32**, 118-126, 2000.
- 21) Mehmood, Z., Smith, A.G., Tucker, M.J. *et al.*: *Food Chem. Toxicol.*, **38**, 493-501, 2000.
- 22) Markey, C.M., Michaelson, C.L., Veson, E.C. *et al.*: *Environ. Health Perspect.*, **109**, 55-60, 2001.