

## ビスフェノール A、ノニルフェノール、塩化トリブチルスズおよび イソフラボンの複合暴露がマウス産仔の生殖器および生殖能へ及ぼす影響

長澤 裕哉・高橋 健太・杉本 和也・木村 直子・戸津川 清\*

山形大学農学部生物資源学科生物機能調節学分野  
山形県鶴岡市若葉町 1-23 997-8555

2011 年 6 月 14 日 受理

### 要 約

ビスフェノール A (BPA)、ノニルフェノール (NP)、塩化トリブチルスズ (TBTCI) およびイソフラボンは内分泌攪乱化学物質として知られ、これらの単独暴露による生殖への影響は数多く報告されているが、これらを組み合わせた複合暴露による報告は少ない。加えて、この 4 種の内分泌攪乱化学物質はヒト臍帯血中から高濃度に検出されているため、これらが相互に影響し合う可能性が高いと考えられる。本研究では、妊娠中のマウスにおける BPA、NP、TBTCI および、イソフラボンの複合暴露が産仔の生殖器および生殖能へ及ぼす影響について評価した。

マウスに BPA、NP、TBTCI およびイソフラボンを低用量暴露した場合、雌産仔において子宮内膜の肥厚化が起り、高用量暴露した場合、発情期における子宮内膜の増殖が起らない産仔が確認された。また、両投与区で精巣上体管腔内の精子密度が減少した。生殖能において、妊娠中低用量暴露された雌の産仔の次世代の平均胎仔数および死亡胎仔数は有意 ( $p<0.05$ ) に増加した。さらに、妊娠中高用量暴露された雄の産仔の次世代の死亡胎仔数および死亡胎仔の割合は有意に ( $p<0.05$ ) 増加した。本研究の結果より、妊娠期における母マウスへの BPA、NP、TBTCI、およびイソフラボンの継続的複合暴露は、産仔の生殖器および生殖能に影響を及ぼすことが示唆された。

東北畜産学会報 61(1): 1～7. 2011

### 緒 言

ビスフェノール A (BPA)、ノニルフェノール (NP)、塩化トリブチルスズ (TBTCI) およびイソフラボンは内分泌攪乱化学物質として知られている。BPA はプラスチックのポリカーボネートおよびエポキシ樹脂などの原料で、一部の食品用の容器等に使用されており、エストロゲン受容体 (ER) が活性化されてエストロゲン類似作用を示すことが報告されている<sup>10)</sup>。NP は、非イオン性界面活性剤として洗剤、塗料、除草剤および殺虫剤などに利用され、エストロゲン作用が報告されている<sup>25)</sup>。TBTCI は船底塗料用防汚剤として利用されており、トリブチルスズによって巻貝 (*Gastropod mullusks*) の Imposex (雌に雄の生殖器が形

成される現象) を引き起こす物質として知られている。トリブチルスズによる内分泌阻害の影響には、いくつかの海洋生物における組織内のアンドロゲン量の増加およびエストロゲン量の減少から不明瞭な生殖器を発達させる報告がある<sup>8)</sup>。また、大豆をはじめとするマメ科植物には、フィトエストロゲンと呼ばれるエストロゲン様物質が多く含まれていることが知られている。大豆中のフィトエストロゲンは、ゲニステインやダイゼインおよびグリシテイン型などのイソフラボンがあり、植物中では配糖体の形で存在し、主にアグリコン型 (糖が外れた形) で腸管から吸収される<sup>5,18)</sup>。イソフラボンの内分泌攪乱作用が最初に注目を集めたのは、サブローバーを大量に摂取したヒツジに不妊の増加が報告されてからである<sup>4)</sup>。イソフラボンが ER $\alpha$  および  $\beta$  に結合することが明らかとなった<sup>14)</sup>。

内分泌攪乱化学物質はこれまでに数々の研究がなされてきた。しかし、これらの研究の多くが内分泌攪乱化学物質の単独作用に関するものである。複合暴露の研究は、エン

\* 連絡者: 戸津川 清 (とつかわ きよし)  
(山形大学農学部生物資源学科生物機能調節学分野)  
〒 997-8555 山形県鶴岡市若葉町 1-23  
Tel: 0235-28-2848 Fax: 0235-28-2820  
Email: totukawa@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

ドスルファン、デイルドリン、トキサフェンおよびクロルデン（いずれも有機塩素系化合物）を単独もしくは2種類を混合して酵母レポーター遺伝子アッセイおよびヒトER結合試験を行った結果、混合物は単独で用いた場合よりも150～1600倍エストロゲン活性が高くなるとの報告が1996年になされている<sup>1)</sup>。しかし、その後これらの相乗効果には一定の知見が得られなかったことから、内分泌攪乱化学物質の複合暴露の影響の報告は少ない。一方、近年トウモロコシ畑で使われるアトラジン、アラクロールおよびシフルトリンなどの9種類の内分泌攪乱物質を両生類に暴露したところ、単独では影響の出ないような低濃度でも複合暴露によって死亡率が高まることなどの報告により複合暴露による影響の評価が再認識されつつある<sup>11)</sup>。加えて、エストロゲン様作用を持つ内分泌攪乱化学物質の複合暴露は、単純な相加および相乗効果以外にも減毒作用効果が指摘されている。したがって、エストロゲン様作用を持つこれら4種の内分泌攪乱化学物質による影響は、単純な相加的あるいは相乗的効果以外の何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。また、本研究で使用したこれら4種の内分泌攪乱化学物質がヒト臍帯血中から高濃度に検出されていることから<sup>2,26,28)</sup>、これらの物質は相互に影響し合っている可能性が高い。さらに、動物の生殖器の発達、性周期、排卵、妊娠および分娩などは全てホルモンによる支配を受けている。特に胎仔期はホルモン感受性が高い時期であるだけでなく、薬物代謝能が低いことも報告されているため、妊娠期間では内分泌攪乱化学物質がより大きな影響を及ぼす可能性がある<sup>15)</sup>。そこで、本研究ではBPA、NP、TBTCIおよびイソフラボンをを用いて妊娠中のマウスへ複合暴露を行い、産仔の生殖器および生殖能への影響について解析した。

## 材料と方法

### 1. 供試動物と4種の内分泌攪乱化学物質暴露の方法

日本エスエルシー株式会社より入手し、自家繁殖した8～12週齢のICR系マウスを母マウスとして用いた。飼育室は遮光し人工照明により、明期：暗期=12時間：12時間（明期：06：00～18：00）とした。室温は24±2℃とし、給水と給餌は自由摂取にした。

母マウス(n=4)を自然交配後、陰栓を確認した日を妊娠日0日とし、0日から分娩日までイソフラボン（長良サイエンス）を生理食塩水で溶解後に1日1回背部皮下注射した。妊娠確認日より5日目からBPA（和光純薬工業）、NP（和光純薬工業）およびTBTCI（和光純薬工業）をコーンオイル（味の素）で溶解後、分娩日まで1日1回背部皮下注射した。マウスは胚発生の過程で妊娠5日目から内胚葉、中胚葉および外胚葉への器官分化が始まる。したがって、

5日目からの皮下注射による内分泌攪乱が生殖器および生殖能への影響が強いと考えた。また、イソフラボンは他の3種の内分泌攪乱化学物質と比較してエストロゲン作用が小さいことから、妊娠日から皮下注射を始め内分泌攪乱を他の3種の内分泌攪乱化学物質による影響と同程度にした。対照区には、溶媒である生理食塩水とコーンオイルをそれぞれ同じ期間で1日1回背部皮下注射した。

投与区は、低用量区と高用量区の2区に分けた。低用量区では、BPAおよびNPをLD50値（BPA：2500mg/kg、NP：1231mg/kg）の1000分の1、イソフラボンを5mg/kg、高用量区ではBPAおよびNPをLD50値の100分の1、イソフラボンを50mg/kg投与した<sup>12)</sup>。イソフラボンの濃度は、マウスに50mg/kg/dayのゲンステインを皮下注射した場合、最大血中濃度は雌で6.8μM、雄で3.8μMとの報告があり、この濃度は大豆調整乳を飲む乳児と同レベルであることを基準とした<sup>7)</sup>。また、TBTCIは一般毒性が高く、LD50値の100分の1の値を背部皮下投与したところマウスの皮膚に炎症が引き起こされたため、低用量区および高用量区ともにLD50値（60mg/kg）の1000分の1投与した。

本研究は山形大学動物実験委員会の承認（承認番号21-096：マウスを用いた環境ホルモン投与による影響評価）を得て、山形大学動物実験規定に従い実施した。

### 2. 生殖器への影響評価法

産仔は6週齢で開腹し、子宮および精巣上体をパラフィン切片標本として組織学的に評価した。雌産仔は妊馬血清性腺刺激ホルモン（PMSG和光純薬：5IU/匹）を腹腔内注射した48時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG和光純薬：5IU/匹）を投与し性周期を同期化させた後、膣垢検査により発情期を判定し、発情期の子宮を試料として用いた。精巣上体は精巣上体頭部（n=6）を、子宮は子宮角（n=6）を採取した。子宮および精巣上体は、プアン固定液（ピクリン酸：ホルムアルデヒド：酢酸=15：5：1）で2時間固定した後に70～100%エタノールで脱水し、キシレンで透徹した。その後キシレン・パラフィン混合液、パラフィンのみを2回それぞれ1時間ごと浸しパラフィン包埋を行い、大型回転式マイクローム（RV-240、大和光機工業株式会社）を用いて切片を作製した後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。標本観察は、光学顕微鏡（OLYMPUS BX51）により観察し、Digital Microscopy Cameraにより画像を撮影した。

### 3. 生殖能の評価法

6週齢の雌雄産仔（それぞれn=12）は無処理の異性のマウスと交配し、妊娠確認後17日目に、胎仔数および死

亡胎仔数を計測した。また、交配後2週間以内に妊娠確認ができなかった場合は、解剖し子宮の状態を確認した。観察結果により、妊娠率、平均胎仔数、死亡胎仔数および死亡胎仔数の割合を算出した。妊娠率のデータは $\chi^2$ 乗検定を行い、他のデータは一元配置分散分析を行った後に、Fisherの最小有意差法で検定し、平均値 $\pm$ 標準偏差を示した。 $p < 0.05$ のとき有意と判定した。

## 結果

### 1. 妊娠中に暴露した産仔の生殖器に対する影響

子宮において対照区で発情期の子宮内膜の増殖が確認さ

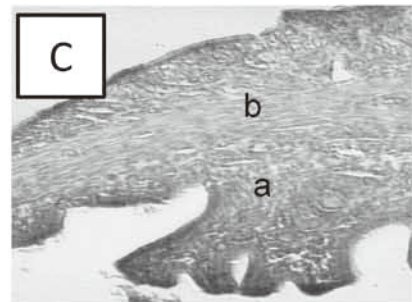
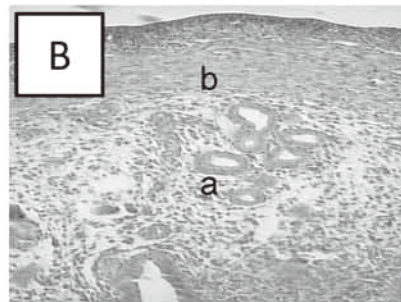
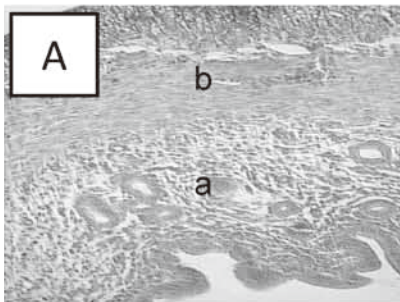


図1. 妊娠中に4種の内分泌攪乱化学物質を複合暴露したマウス産仔の子宮内膜  
(A) 対照区 (B) 低用量区 (C) 高用量区  
a: 子宮内膜 b: 子宮筋層

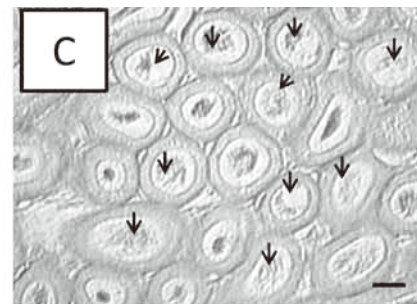
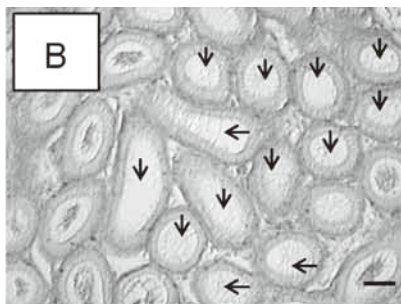
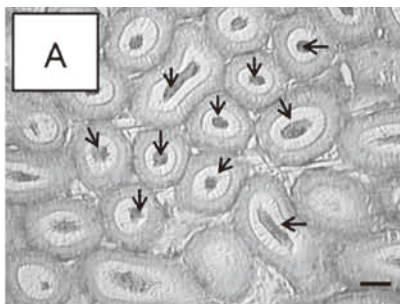


図2. 妊娠中に4種の内分泌攪乱化学物質を複合暴露したマウス産仔の精巣上体  
(A) 対照区 (B) 低用量区 (C) 高用量区 Bars=100 $\mu$ m  
矢印: 精巣上体管の管腔中の精子

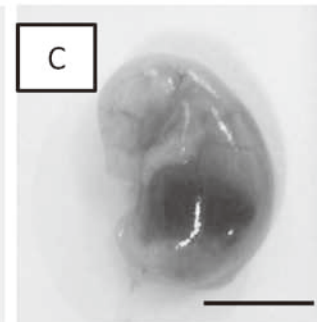
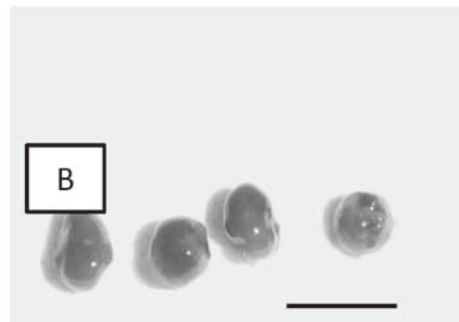
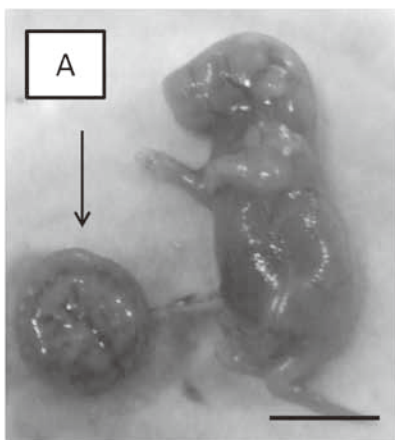


図3. 妊娠中に4種の内分泌攪乱化学物質を複合暴露したマウス産仔の妊娠17日目における正常胎仔および死亡胎仔  
A. 妊娠17日目の正常胎仔 (矢印: 胎盤)  
B. 発生初期に发育停止した胎仔  
C. 発生後期に发育停止した胎仔 Bars=1cm

れた(図1. A)。しかし、低用量区では対照区と比較して子宮内膜がさらに肥厚化した。高用量区では子宮全体の大きさが対照区および低用量区と比較して小さく、発情期の子宮内膜の増殖を確認することができなかった(図1. B,C)。一方、精巣上体は精子に運動能を与え精子を蓄積する場であり、対照区では精巣上体管がぎっしりと密集し、管腔内に密集した精子が確認された(図2. A)。低用量区および高用量区では対照区と比較して管腔内の精子密度が減少したが(図2. B,C)、両投与区の精子密度に大きな違いは見られなかった。

### 2. 妊娠中に暴露した産仔の生殖能の影響

内分泌攪乱化学物質の投与の有無に関わらず、死亡胎



仔の形態は初期段階で発生を停止した場合、胎仔の原型を留めておらず(図 3. B)、後期段階で発生を停止した場合、正常胎仔(図 3. A)と比較して皮膚の色が白くなり、短軀の外表面奇形が確認された(図 3. C)。無処理の雄マウスと交配させた各投与区の雌産仔では、妊娠 17 日目における低用量区の妊娠率は、対照区と比較して 91.7%に減少し、平均胎仔数および死亡胎仔数が有意 ( $p < 0.05$ ) に増加した(表 1)。各投与区の雄産仔と交配させた無処理の雌マウスでは妊娠 17 日目における低用量区および高用量区の妊娠率は対照区と比較してそれぞれで 91.7 および高用量区で 87.5%に減少し、高用量区では死亡胎仔数および死亡胎仔の割合が有意 ( $p < 0.05$ ) に増加した(表 2)。なお、交配後 2 週間以内に妊娠確認ができなかった雌産仔の低用量区、雄産仔の低用量区および高用量区で子宮の状態を確認したところ、胎児の痕跡が見られなかったため、産仔は妊娠しなかったとみなし妊娠率に反映させた。

## 考 察

妊娠中に 4 種の内分泌攪乱化学物質を複合暴露した産仔の生殖器への影響評価では、子宮および精巣上体において形態的变化が認められた。子宮において、低用量複合暴露した場合、子宮内膜の肥厚化が確認された。BPA および NP をそれぞれ単独暴露したとき、エストロゲン様作用によって子宮内膜が肥厚化することが報告されている<sup>15,26)</sup>。したがって、子宮に低用量複合暴露による相加的な影響は見られず、BPA および NP の単独暴露と同様の影響を示すことが示唆された。また、高用量複合暴露した場合、発情期における子宮内膜の肥厚化が認められないことに関してはいくつかの原因が考えられる。まず、エスト

ロゲン過剰による ER のダウンレギュレーションが考えられた。Wang ら<sup>31)</sup>は、BPA はエストロゲン合成酵素である P450arom の発現を用量依存的にアップレギュレートしたが、運動前野および海馬内の ER $\beta$  の発現をダウンレギュレートすることを報告している。したがって、同様の現象が子宮内の ER で起こっている可能性がある。また、BPA の持つエストロゲン様作用によって引き起こされた子宮内膜の肥厚化は、高用量の暴露になるほど顕著になり、ある濃度でプラトーに達することが報告されており、本研究の結果と矛盾する<sup>27)</sup>。このことから、子宮内膜の肥厚化の報告のない TBTCI およびイソフラボンの複合暴露により、BPA の子宮内膜の肥厚化が抑制されたとも考えられる。この他に、BPA および NP の複合暴露において生殖器重量の減少が抑制あるいは拮抗的に作用する報告がある<sup>3,13)</sup>。本研究においても BPA および NP の複合作用が子宮内膜の肥厚化を抑制した可能と考えられる。高用量における子宮内膜の肥厚化が認められないことに関しては複数の可能性が考えられるため、今後 ER 結合試験などによる詳細な作用機序の解明が必要となる。以上より、4 種の内分泌攪乱化学物質の複合暴露は子宮内膜に影響を及ぼし、その作用は濃度により異なることが示唆された。

本研究で用いた 4 種の内分泌攪乱化学物質をそれぞれ単独で暴露した場合、精巣上体の重量および精子産生の減少が報告されている<sup>13,18,20,24)</sup>。複合暴露による影響を解析した本研究結果は、低用量区および高用量区精巣上体管の精子密度の減少を示した。これは、単独暴露で報告されている内分泌攪乱化学物質の生殖器に対する影響に類似している。そのため、本研究では 4 種の内分泌攪乱化学物質の複合暴露が精巣上体へ悪影響を与えることは示唆されたが、複合暴露による相加のおよび相乗的影響は確認できなかった。

表 1. 無処理の雄産仔と交配した投与区の雌産仔の妊娠率、平均胎仔数、死亡胎仔数および死亡胎仔の割合  
投与濃度 (mg/kg/day)

実験区	処理区				n	妊娠率 (%)	平均胎仔数 <sup>a</sup>	死亡胎仔数 <sup>a</sup>	死亡胎仔の割合 (%) <sup>a</sup>
	BPA	NP	TBTCI	イソフラボン					
対照区	0	0	0	0	12	100.0	15.3 ± 1.8	0.8 ± 1.3	4.9 ± 7.3
低用量区	2.5	1.231	0.06	5	12	91.7	16.6 ± 1.9 *	1.7 ± 1.1 *	10.2 ± 5.9
高用量区	25	12.31	0.06	50	12	100.0	14.1 ± 2.5	1.0 ± 1.0	8.1 ± 10.4

BPA: ビスフェノールA NP: ノニルフェノール TBTCI: 塩化トリブチルスズ

<sup>a</sup>平均値 ± 標準偏差

\*対照区と比較して有意差 ( $p < 0.05$ ) 有り

表 2. 投与区の雄産仔と交配した無処理の雌産仔の妊娠率、平均胎仔数、死亡胎仔数および死亡胎仔の割合  
投与濃度 (mg/kg/day)

実験区	処理区				n	妊娠率 (%)	平均胎仔数 <sup>a</sup>	死亡胎仔数 <sup>a</sup>	死亡胎仔の割合 (%) <sup>a</sup>
	BPA	NP	TBTCI	イソフラボン					
対照区	0	0	0	0	24	100.0	15.5 ± 1.4	0.8 ± 1.0	4.8 ± 6.2
低用量区	2.5	1.231	0.06	5	24	91.7	15.3 ± 1.8	1.2 ± 1.3	7.4 ± 7.7
高用量区	25	12.31	0.06	50	24	87.5	15.6 ± 1.5	1.5 ± 1.7 *	10.0 ± 12.2 *

BPA: ビスフェノールA NP: ノニルフェノール TBTCI: 塩化トリブチルスズ

<sup>a</sup>平均値 ± 標準偏差

\*対照区と比較して有意差 ( $p < 0.05$ ) 有り

妊娠期に4種の内分泌攪乱化学物質を複合暴露した産仔の生殖能への影響評価では、死亡胎児は正常胎児と比べ皮膚の色が白くなり短躯した外表奇形の胎児が確認された。しかし、この形態的な異常は全ての実験区で見られたことから、複合暴露による特異的な影響であるとは考えられなかった。

無処理の雄マウスと交配した低用量区産仔における平均胎仔数および死亡胎仔数が増加し、また、高用量区雄産仔と交配した無処理の雌マウスにおける死亡胎仔数および死亡胎仔の割合も増加した。雌の生殖能に関する影響としては、BPA および TBTCI の暴露において、死亡胎仔数の増加および死亡胎仔重量の減少、奇形胎児の増加、あるいはイソフラボンの暴露が雌の性周期を攪乱し生殖能が低下することが報告されている<sup>9,14,17,21,33</sup>。本研究における複合暴露においても、これまで単独暴露で報告されている影響と似た傾向が示され、雌の生殖能へ悪影響を与えていることが示唆された。一方雄については、TBTCI およびイソフラボンの持つアンドロゲンを介した攪乱は高用量になるほど雄性生殖器に悪影響を及ぼすことが明らかにされており、<sup>16,23</sup> この作用が高用量暴露した雄産仔で生じたことにより、死亡胎仔数および死亡胎仔の割合が増加した可能性が考えられる。また、本研究において雌雄で影響を及ぼす濃度が異なることについては、性別によってホルモンバランス、各ホルモンに対する感受性および標的器官の差異による影響が大きいと考えられる。以上、4種の内分泌攪乱化学物質の複合暴露は産仔の生殖能へ影響を及ぼすが、産仔の性別および、内分泌攪乱化学物質の投与量によって異なることが示唆された。

一般的に、内分泌攪乱化学物質暴露の影響は特定の濃度で影響が大きく現れ、その濃度以上または以下で影響が小さくなるもしくは現れない「逆U字効果」がみられる<sup>30</sup>。本研究で用いたBPA、NP およびイソフラボンにおいて高濃度よりも低濃度で強い影響が出るということが報告されている<sup>13,29,32</sup>。本研究においても、子宮の形態および各投与区における雌産仔の生殖能は、高用量よりも低用量で内分泌攪乱化学物質による影響が大きいことが判明した。しかし、この結果は、ほぼ同程度の濃度を単独暴露した内分泌攪乱化学物質で報告されている結果とは異なる<sup>13,14</sup>。BPA と NP を複合暴露すると NP は BPA の影響を増強または抑制したり、中立的な作用をしたりすることが報告されている<sup>12</sup>。したがって、本研究の結果は逆U字効果に加え、複合暴露による影響の増強および抑制が関与し、複雑な機構で生殖に影響を及ぼしていることを示唆した。

以上の結果から、妊娠期の母マウスにBPA、NP、TBTCI およびイソフラボンを継続的に複合暴露すると、産仔の生殖器および生殖能に影響を及ぼし、胎児期に内分泌攪乱化学物質を複合暴露する危険性は非常に高いこと

が示唆された。

## 引用文献

1. Arnold SF, Klotz DM, Collins BM, Vonier PM, Guillette JL Jr, McLachlan JA. Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science*, 272 : 1489-1492. 1996.
2. Barrett JR. Soy and children's health: a formula for trouble. *Environ. Health Perspect.*, 110 : 294-296. 2002.
3. Benjiamin LL Tan, Normadiah M Kassim, Mustafa Ali Mohd. Assessment of pubertal development in juvenile male rats after sub-acute exposure to bisphenol A and nonylphenol. *Toxicol. Lett.*, 143 : 261-270. 2003.
4. Bennetts HW, Underwood EJ, Shier FL. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust. Vet. J.*, 22 : 2-12, 1946.
5. Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. Genistein, dazein and their  $\beta$ -glycoside conjugates : antitumor isoglavones in soybean foods from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem.*, 41 : 1961-1967. 1993.
6. Chapin RE, Delancy J, Wang YF, Lanning L, Davis B, Collins B, Mintz N, Wolf G. The effects of 4-nonylphenol in rats: a multigeneration reproduction study. *Toxicol. Sci.*, 52 : 80-91. 1999.
7. Doerge DR, Twaddle NC, Banks EP, Jefferson WN, Newbold RR. Pharmacokinetic analysis in serum of genestein administered subcutaneously to neonatal mice. *Cancer Lett.*, 8 : 21-27, 2002.
8. Duncan J. The toxicology of molluscicides. The organotin. *Pharmacol. Ther.*, 10 : 407-429. 1980.
9. Ema M, Kurosaka R, Amano H, Ogawa Y. Further evaluation of the developmental toxicity of tributyltin chloride in rats. *Toxicology*, 96 : 195-201. 1995.
10. Gaido KW, Leonardo LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Portier CJ, McDonnell DP. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 143:205-212. 1997.
11. Hayes TB, Case P, Chui S, Chung D, Haeffele C, Haston K, Lee M, Mai VP, Marjuoa Y, Parker J, Tsui M. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environ. Helth. Perspect.*, 114 : 40-50. 2006.

12. 木村直子, 木村昂, 戸津川清. 妊娠期および授乳期マウスへの大豆由来イソフラボン投与が子孫の発育および生殖能へ及ぼす影響. 日本哺乳動物卵子学会, 25 : 272-278. 2008.
13. Kimura T, Kimura N, Totsukawa K, Effect of compound exposure to bisphenol A and nonylphenol on fetal mice. J. Mamm. Ova. Res., 24 : 35-41. 2007.
14. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. Endocrinology, 139 : 4252-4263. 1998.
15. Lee PC, Lee W. *In vivo* estrogenic action of nonylphenol in immature rats. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 53 : 341-348. 1996.
16. Mcvey MJ, Cooke GM, Curran IH. Increased serum and testicular androgen levels in F1 rats with lifetime exposure to soy isoflavone. Reprod. Toxicol., 18 : 677-685. 2004.
17. Morrissey RE, George JD, Price CJ, Tyl RW, Marr MC, Kimmel CA. The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. Fundam. Appl. Toxicol., 8 : 571-582. 1987.
18. Murphy PA. Phytoestrogen content of processed soybean products. Food Technol., 43 : 60-64. 1982.
19. Nagao T, Yoshimura S, Saito Y, Nakagomi M, Usumi K, Ono H. Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. Reprod. Toxicol., 15 : 399-411. 2001.
20. Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MC, Boechler M, Welshons WV. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative *in vivo* bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. Environ. Health Perspect., 105 : 70-76. 1997.
21. Noda T, Morita S, Yamano T, Shimizu M, Nakamura T, Saitoh M, Yamada A. Teratogenicity study of tri-n butyltin acetate in rats by oral administration. Toxicol Lett., 55 : 109-115. 1991.
22. Ohno S, Nakajima Y, Inoue K, Nakazawa H, Nakajin S. Genistein administration decreases serum corticosterone and testosterone levels in rats. Life Sci., 26 : 733-742. 2003.
23. Omura M, Ogata R, Kubo K, Shimasaki Y, Aou S, Oshima Y, Tanaka A, Hirata M, Hirata, Makita Y, Inoue N. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats. Toxicol. Sci., 64 : 224-232. 2001.
24. Ring JA, Ghabrial H, Ching MS, Smallwood RA, Morgan DJ. Fetal hepatic drug elimination. Pharmacol. Ther., 84 : 429-445. 1999.
25. 櫻井健一, 森千里. ヒト胎児への内分泌攪乱化学物質曝露の状況. 日本臨床., 58 : 2508-2513. 2000.
26. Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C. *p*-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. Environ. Health Perspect., 92 : 167-173. 1991.
27. Steinmetz R, Mitchner NA, Grant A, Allen DL, Bigsby RM, Ben-Jonathan N. The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation, and c-fos gene expression in the female reproductive tract. Endocrinology, 139 : 2741-2747. 1998.
28. Todaka E, Sakurai K, Fukata H, Miyazawa H, Uzuki M, Omori M, Osada H, Ikezaki Y, Tsutsumi O, Iguchi T, Mori C, Fetal exposure to phytoestrogens-the difference in phytoestrogen status between mother and fetus. Environ. Res., 99 : 195-203. 2005.
29. Vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Phalanza P, Thayer KA, Nagel SC, Parmigiani S, Welshons WV. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. Toxicol. Ind. Health, 14 : 239-260. 1998.
30. Vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, Palanza PP, Thayer KA, Nagel SC, Dhar MD, Ganjam VK, Parmigiani S, Welshons WV. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. Natl. Acad. Sci., 94 : 2056-2061. 1997.
31. Wang Y, Xu X, Zhang J, Luo Q, Ye Y. Effects of perinatal exposure to bisphenol-A on expression of estrogen receptor-beta and P450AROM of the brain in male offspring rat. Acta Biophysica Sinica., 25 : 423-429. 2009.
32. Wisniewski AB, Cernetich A, Gearhart JP, Klein SL. Perinatal exposure to genistein alters reproductive development and aggressive behavior in male mice. Physiol. Behav., 15 : 327-334. 2005.
33. 山本勇夫. 有機スズ化合物による魚介類汚染と1日摂取量の推定について. 北海道医学雑誌, 69 : 273-281. 1994.

## **Effects of multiple exposure of bisphenol A, nonylphenol, tributyltin chloride and isoflavone on the reproduct tissues and fertility of mouse offspring**

Yuya Nagasawa, Kenta Takahashi, Kazuya Sugimoto, Naoko Kimura, Kiyoshi Totsukawa

Section of Bioprocess Engineering, Faculty of Agriculture, Yamagata University

1-23 Wakaba-machi, Tsuruoka, Yamagata 997-8555, Japan

Corresponding : K. Totsukawa (Tel : +81 23-528-2848, Fax : +81 23-528-2820, E-mail : totukawa@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp)

Bisphenol A, nonylphenol, tributyltin chloride, isoflavone are endocrine disrupting chemicals (EDCs) which induce reproductive abnormalities. While single exposure studies have been reported, few investigations of the simultaneous administration of several chemicals to animals have been conducted. The purpose of the present study was to estimate the effect of gestational exposure to multiple exposure of these EDCs simultaneously on reproductive function of mouse offspring. Besides, evaluation of reproductive risk was detected compounds exposure in fetal period. These EDCs effected as uterus, cauda epididymal and fertility of mouse offspring. Low-doses treated groups detected remarkable endometrial proliferation than that of control . On the other hand, High-doses treated groups were not detected. All treated groups were decreased density of spermatozoae in cauda epididymal. This study shows that these EDCs can enhance, suppress or be neutral for the effect of the other in combined exposure to these EDCs and bisphenolA, nonylphenol, tributyltin chloride and isoflavone might effect as reproductive function of mouse offspring.

**key words** : bisphenol A, nonylphenol, isoflavone, tributyltin chloride, compound exposure