

表 3 植物ホルモンと乳がんの症例一対照研究
Odds Ratios for Breast Cancer Risk
Associated with Intake of Phytoestrogens (Ingram et al., 1997)

| | 尿中排泄量 (nmole/24h) Urine excretion | 対照人数 Control # | 症例人数 Case # | 補正後オッズ比 (95%信頼限界) Adjusted Odds Ratios (95% C.L.) |
|-----------------------------|--------------------------------------|-------------------|----------------|--|
| ダイゼイン*1 Daidzein | ≤600 | 51 | 31 | 1.00 |
| | <600 - ≤900 | 29 | 36 | 0.60 ↓ |
| | <900 - ≤1300 | 29 | 35 | 0.80 ↓ |
| | 1300< | 24 | 32 | 0.47 ↓↓ |
| イクオール*2 Equol | ≤70 | 47 | 35 | 1.00 |
| | <70 - ≤110 | 37 | 37 | 0.45 ↓ |
| | <110 - ≤185 | 35 | 36 | 0.52 ↓ |
| | <185 | 24 | 36 | 0.27 ↓↓ |
| エンテロラクトン*3 Enterolactone | ≤1450 | 51 | 36 | 1.00 |
| | <1450 - ≤3100 | 44 | 36 | 0.91 ↓ |
| | <3100 - ≤5250 | 30 | 36 | 0.65 ↓ |
| | <5250 | 19 | 36 | 0.36 ↓↓ |
| マタイレシノール Matairesinol | ≤17 | 30 | 37 | 1.00 |
| | <17 - ≤30 | 45 | 36 | 2.38 ↑↑ |
| | <30 - ≤42 | 31 | 32 | 1.95 ↑ |
| | <42 | 38 | 39 | 2.18 ↑↑ |

*1 日本人女性の平均は、(Average for Japanese women) : 2580 nmole/24h

*2 日本人女性の平均は、(Average for Japanese women) : 582 nmole/24h

*3 日本人女性の平均は、(Average for Japanese women) : 890 nmole/24h

*1-3 : Adlercreutz et al. (1991)

表 4 若い女性へのイソフラボノイド投与による生理周期への影響
Effects of Isoflavonoids to Menstrual Cycle Length
and Follicular Phase Length of Young Women
Cassidy & Bingham, 1995

| | 生理周期 : day (range) Menstrual Cycle Length | 卵胞期 : day (range) Follicular Phase Length |
|--|--|--|
| イソフラボノイド抱合体45mg投与 : Conjugated isoflavones 45mg 対照 : Control 人数 (n) = 6 | 29.0 (26 - 32) | 17.5 (15 - 21) |
| 遊離イソフラボノイド25mg投与 : Unconjugated isoflavones 25mg 対照 : Control 人数 (n) = 3 | 30.7 (28 - 35) | 19.0 (17 - 23) |
| イソフラボノイドフリー大豆製品投与 : Isoflavone - free Soybean products 対照 : Control 人数 (n) = 5 | 29.0 (25 - 34) | 17.0 (16 - 18) |
| | 29.0 (24 - 35) | 17.0 (15 - 20) |

表 5 大豆摂取の血清脂質への影響

META-ANALYSIS OF EFFECTS OF SOYBEAN INTAKE ON SERUM LIPIDS

29例の臨床試験結果のメタアナリシス

Changes in Serum Cholesterol and LDL Cholesterol Concentrations According to
Quartiles of the Study Group for Initial Cholesterol Concentration (Anderson et al., 1995)

| | 低減平均量 (低減割合) Average Decrease (Decrease Ratio) |
|---|---|
| 大豆たんぱく摂取量 : Soy protein Intake | 47 g |
| 全コレステロール値* Total Cholesterol (Initial range : mg/dL) | |
| 初期値が中程度-やや低い グループ (127.1 - 197.8 mg/dL) | 5.2 mg/dL (3.3% ↓) |
| 初期値がやや高い グループ (201.2 - 255.4 mg/dL) | 10.1 mg/dL (4.4% ↓) |
| 初期値が高い グループ (259.3 - 332.8 mg/dL) | 22.2 mg/dL (7.4% ↓) |
| 初期値が非常に高い グループ (335 mg/dL 以上) | 71.5 mg/dL (19.6% ↓) |
| 低比重リポたんぱくコレステロール* LDL Cholesterol (Initial range : mg/dL) | |
| 初期値が中程度のグループ (127.1 - 197.8 mg/dL) | 7.1 mg/dL (7.7% ↓) |
| 初期値がやや高い グループ (201.2 - 255.4 mg/dL) | 10.7 mg/dL (6.8% ↓) |
| 初期値が高い グループ (259.3 - 332.8 mg/dL) | 18.3 mg/dL (9.8% ↓) |
| 初期値が非常に高い グループ (335 mg/dL 以上) | 68.1 mg/dL (24.0% ↓) |
| トリグリセライド : Triglycerides | 13.3 mg/dL (10.5% ↓) |

*コレステロール値の初期値により4分位毎に分けた

表 6 エストロゲンレセプターへの相対結合活性の比較

Comparative Binding to Estrogen Receptor in MCF-7 Cell

MCF-7ヒト乳がん細胞におけるH3-エストラジオールの取り込みとの競合を測定

| 試験物質 | 相対結合活性試験 *1,2 | | |
|-------------------------|---------------|-----------|------------|
| | - (%) | + (%) | 活性比 |
| エストラジオール : Estradiol | 100 | 100 | 1 |
| ゲニスタイン : Genistein | 0.0093 *2 | 0.095 *2 | 9.5x10-4 |
| ダイゼイン : Deidzein | 0.006 *2 | 0.0202 *2 | 2.0x10-4 |
| クメステロール : Coumestrol | 0.0076 *2 | 0.080 *2 | 8.0x10-4 |
| イクオール : Equol | 0.014 *2 | 0.115 *2 | 1.15x10-3 |
| ビオカニンA : Biochanin A | 0.006 | 0.0022 *2 | 0.2x10-4 |
| フォルモノネチン : Formononetin | 0.0028 *2 | - | - |
| ビスフェノールA : Bisphenol A | 0.006 *1 | 0.01 *1 | 1.0 x 10-4 |
| ノニルフェノール : Nonylphenol | 0.026 *1 | 0.039 *1 | 3.9x10-4 |
| オクチルフェノール : Octylphenol | 0.072 *1 | 0.029 *1 | 2.9x10-4 |

-:ヒト血清無添加、+:ヒト血清添加

*1 Nagelら(1997) Environmental Health Perspective, 105, 70-76

*2 Nagelら(1998) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 217, 300-309

表 7 食物中の植物エストロゲンの抗がん、および抗心疾患作用

抗がん作用の機作

- ・ 弱いエストロゲン作用
- ・ 抗酸化作用
- ・ チロシンキナーゼ阻害と、転移と浸潤の阻害作用
- ・ 血管腫の阻害

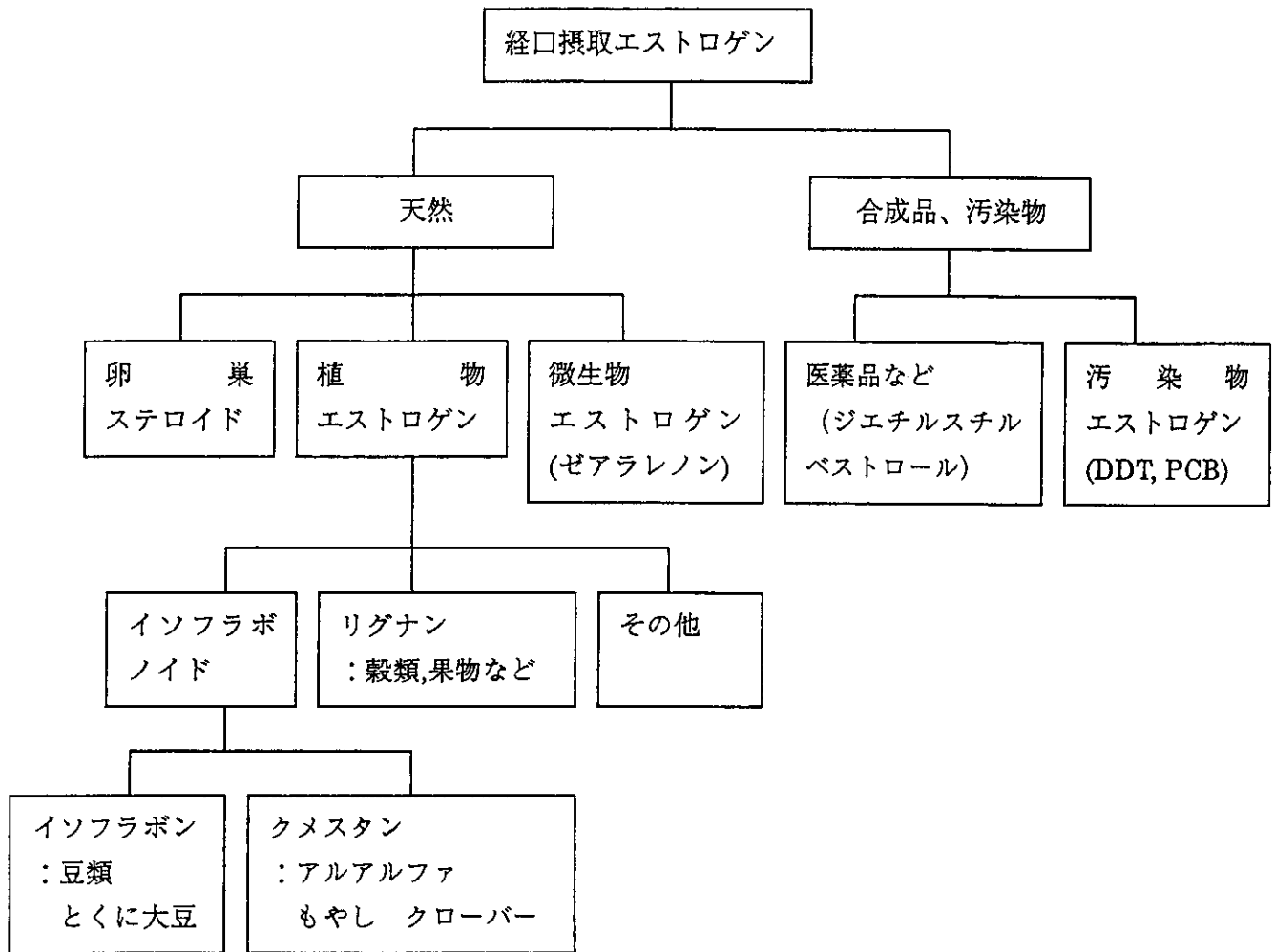
抗心疾患作用の機作

- ・ 弱いエストロゲン作用（血清脂質組成の改善）
- ・ 抗酸化作用（低比重リポたんぱくコレステロールの酸化障害の阻害）
- ・ チロシンキナーゼ阻害（血小板由来成長因子ほかによる動脈硬化過程の阻害、トロンビンによる血小板凝集の阻害など）

表 8 日本人のイソフラボノイドの尿中排泄量の個人差
Adlercreutz et al. Vol. 54: 1093-1100, 1991; Am J Clin Nutr

| Subject, sex, age | Daidzein | Equol | Genistein | Total isoflavonoids |
|-------------------|----------|--------|-----------|---------------------|
| 1 Male 26 year | 3.38 | 9.16 | 7.99 | 20.76 |
| 2 Male 41 year | 5.25 | 6.15 | 15.52 | 27.04 |
| 3 Female 30 year | 1.25 | 3.28 | 1.85 | 6.6 |
| 4 Male 6 year | 2.15 | 0.85 | 3.41 | 6.93 |
| 5 Female 42 year | 2.2 | 0.16 | 3.55 | 7.07 |
| 6 Male 38 year | 1.6 | 0.07 | 4.93 | 6.99 |
| 7 Male 8 year | 3.02 | 0.02 | 4.8 | 8.64 |
| 8 Male 7 year | 3.23 | 0.01 | 5.66 | 8.97 |
| 9 Female 33 year | 3.11 | 0.01 | 4.48 | 8.58 |
| Average | 2.8 | 2.19 | 5.8 | 11.29 |
| (S.D.) | -1.12 | -3.36 | -4.02 | -7.37 |
| Geometric Mean | 2.58 | 0.25 | 4.91 | 9.81 |
| (S.D.) | -1.54 | -15.56 | -1.8 | -1.68 |

図 1 経口摂取エストロゲンの分類 (Murkies ら、1998 より)



植物エストロゲンの文献データベース資料(一部)

分類—臨床:CL, 乳がん:BR, がん:CR, 更年期障害:MN, 生殖・エストロゲン活性:ES,
体内動態・代謝:MT, 摂取量:IN, 植物中存在量:PL, 心臓・血液系・抗酸化作用:HT, 骨粗鬆症:BD, リスク便益:RS, 疫学:EP, 細胞レベル:CE, 分析:AN
対象—ヒト:HM, 幼児:IN, 婦人:WM, 動物:AN, in vitro:VT 文献—レビュー:RV
化合物—genistein: GEN, isoflavonoid: ISO, phytoestrogen: PHY, soybean: SOY, daidzein: D,
equol: EQU, coumestrol: COU, cannabinoid: CAN, formonnetin: FOR

| 番号 | 表題(説明) | 分類 | 対象 | 化合 | 発行年 | 文献 |
|----|--|-----------|----------|-----|------|----|
| 1 | 幼児の食品からのイソフラボン摂取量 | IN | IN | ISO | 1998 | |
| 2 | イソフラボノイドは血清脂肪濃度を変化させな | CL | HM | ISO | 1998 | |
| 3 | 植物エストロゲン—現状の知識 | | | PH | 1998 | RV |
| 4 | がんによるストレス蛋白(アポトシスから防御)生成をゲニスタインが抑制 | CR/ CE | HM AN | GEN | 1998 | |
| 5 | 大豆イソフラボンの恩恵 | RS | HM | ISO | 1998 | |
| 6 | 生薬、植物エストロゲンのリスク便益 | RS | HM | PH | 1998 | |
| 7 | 食品、生薬、香辛料成分のエストロゲン、プロゲステロン受容体結合特性 | ES | HM | PH | 1998 | |
| 8 | 大豆植物エストロゲンによる更年期障害治療 | MN | HM | SOY | 1998 | |
| 9 | 雌ラットの生殖器官への大豆エストロゲンの影響 | ES | AN | SOY | 1998 | |
| 10 | 尿中イコール排出と大豆摂取 | MT | HM | EQU | 1998 | |
| 11 | エストラジオールの細胞取り込みによるヒト血清中のフリーエストラジオールと外因性エストロゲンの定量 | AN | HM | PH | 1998 | |
| 12 | HPLCによる血清、組織、尿中の植物エストロゲンとポリフェノールの分析 | AN | HM | PH | 1998 | |
| 13 | 進化、栄養、腸内細菌とがん予防 | CR | HM | PH | 1998 | RV |
| 15 | ブドウとワイン中のエストロゲン受容体アゴニストポリフェノール、レスベラトロール | PL | PL | PH | 1997 | |
| 16 | 受容体により媒介される毒性 | ES | | PH | 1998 | RV |
| 17 | 植物エストロゲンと乳がん(コメント) | BR | HM | PH | 1998 | |
| 18 | 植物エストロゲンと乳がん(コメント) | BR | HM | PH | 1998 | |
| 19 | 植物エストロゲンと乳がん(コメント) | BR | HM | PH | 1998 | |
| 20 | 植物エストロゲンと乳がん(コメント) | BR | HM | PH | 1998 | |
| 21 | 植物エストロゲンと乳がん(コメント) | BR | HM | PH | 1998 | |
| 22 | 植物エストロゲンと乳がん(コメント) | BR | HM | PH | 1998 | |
| 23 | エストロゲン代替物による更年期障害治療 | MN | HM | PH | 1998 | |
| 24 | 外因性エストロゲンの相対活性の短期インビボ哺乳類試験による定量 | ES | AN | PH | 1998 | |
| 25 | 大豆植物エストロゲン摂取のLow Density Lipoprotein酸化抑制への影響 | HT | AN | SOY | 1998 | |
| 26 | 大豆ベースの幼児食品中の植物エストロゲン、摂取量と生物学的影響の可能性 | IN/ ES | IN | SOY | 1998 | |
| 27 | 環境エストロゲン—現在の知識(レビュー) | ? | ? | PH | 1997 | RV |
| 28 | 雄サルの食餌性冠状動脈硬化の大豆蛋白および植物エストロゲンによる予防 | HT | AN | PH | 1997 | |
| 29 | 乳がん、その病因と関連(植物エストロゲンによる抑止の可能性):レビュー | BR | HM | PH | 1997 | RV |

メトキシクロールとビスフェノールAの実験動物に対する 低用量暴露における毒性発現に関する不確実性についての研究

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 三森 国敏

研究要旨

ダイエチルスチルベストロール (DES)、メトキシクロールとビスフェノールAの実験動物に対する低用量暴露における次世代への毒性発現に関する不確実性について情報収集した。その結果、DES の経胎盤投与による次世代マウスへの影響については、 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与で次世代に悪影響を及ぼすが、それより下の用量では発現しないことから、DES のような強いエストロゲン作用を有する物質においても閾値の存在が示唆された。methoxychlor の経胎盤投与による次世代ラットへの影響については、投与群すべての次世代動物に生殖器に毒性が発現しており、最低用量の $25\text{mg}/\text{kg}$ より下のどの用量まで次世代への影響が発現するかについてはデータがなく、この毒性についての NOAEL は明らかにされていない。Bisphenol A の経胎盤投与による次世代マウスへの影響については、vom Saal らの実験において次世代への影響が非常に低い投与量においても発現すると報告されたが、それについては再現性がないことが確認された。

A. 研究目的

レセプターを介した内分泌攪乱化学物質 (EDC) のエストロゲン作用により毒性が発現した例としては、合成エストロゲンである ethinylestradiol (EE) や diethylstilbestrol (DES) の報告が今までになされている。これらの物質は、エストロゲンのレセプターと結びつき、増殖シグナルを送り、乳腺腫瘍の増加、子宮ガン、異常発生、あるいは次世代に対する胎児生殖器への有害作用などを起こすことが、既に報告されている。通常の生体内に存在する内因性のエストロゲンは性ホルモン結合グロブリンと結合し不活化されるが、合成エストロゲンとエストロゲン作用を有する環境化学物質はそれと結合しないことから、これらの合成エストロ

ジェンは不活化されないため、これらを妊娠動物に投与すると、胎盤を経由して胎児に影響が発現する。しかし、弱いエストロゲン作用を有する環境化学物質によるこの作用の閾値については、現在あまり明らかにされていない。今年度は、DES、メトキシクロールとビスフェノールAの実験動物に対する低用量暴露における毒性発現に関する不確実性について情報収集した。

B. 研究方法

DES、メトキシクロールとビスフェノールAの実験動物に対する低用量暴露における毒性発現に関する文献を収集し、次世代影響についての影響とその発現閾値について検討した。

C. 研究結果

diethylstilbestrol (DES)経胎盤投与による次世代マウスへの影響：

DES は昔、ヒトの流産防止剤として米国で頻繁に使われており、その使用により、次世代への悪影響が誘発されたことから、現在ヒトにおいては使用されていない。この合成女性ホルモンが次世代マウスにどのような影響を及ぼすかという研究が、1981年 McLachlan らによって行われた。DES を 0.01, 1, 2.5, 5, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で妊娠 9~16 日のマウスに皮下投与し、生まれてきた子供を大人まで飼育した結果、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の雄では精子の異常、精子数の減少、陰萎、精巣腫瘍、不妊などが発現したと報告されている。雌においても卵巣腫瘍、膣の腺癌、子宮の腫瘍などが、次世代が成熟した時点で発現したとの記載がある。しかし、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下では、このような、変化は一切発現していなかったと報告されている。

methoxychlor (有機塩素系殺虫剤) の経胎盤投与による次世代ラットへの影響：

農薬の有機塩素系殺虫剤、methoxychlor を経胎盤投与した場合の次世代ラットへの影響は、1989 年に Gray らによって報告されている。methoxychlor を妊娠 15 日目のラットに、体重 1 kg に対し 0, 25, 100, 200 mg/kg の用量で 1 回経口投与し、その生まれてきた子供を養育し、成熟させると、最低用量である 25mg/kg 以上を与えたラットから生まれた子供では、成長の遅延、精巣の小型化、精子数の減少、下垂体重量の減少などが発現し、この実験結果では、NOAEL は算定できない結果が報告されている。しかし、これについては、最大無作用量は 5 mg/kg であるという別の実験があり、その実験結果から一応 ADI が算定されている。

Bisphenol A の経胎盤投与による次世代マウスへの影響：

Bisphenol A の 90 日の反復投与毒性試験として、投与量を 2,000ppm~40,000ppm としたマウスの混餌投与実験が報告されている。2% (20,000ppm) 群では、肝細胞の障害あるいは骨線維症のようなエストロゲンに関与する毒性変化が発現し、2%以上の投与群においても同じような変化が誘発されたと報告されている。発がん性試験のデータとして、ラットで 1,000ppm と 2,000ppm、マウスでは 1,000ppm と、5,000ppm の濃度で混餌投与した実験がなされており、ラットやマウスに 1,000ppm 以上を投与しても発がん性はみられないことが報告されている。繁殖毒性試験については、用量を 100 ppm~9,000ppm と設定した実験があり、胎児毒性はマウスの 9,000ppm 群にのみ発現したという実験結果から、繁殖毒性はなく、無毒性量 (NOAEL) は 1,000ppm と判定されている。

しかし、1998 年に vom Saal らは、妊娠 11~17 日目のマウスにビスフェノール A の 1,000ppm のさらに、1 万分の一ないし 10 万分の一の用量である 0.02 あるいは 0.002ppm を投与したところ、0.02ppm において精子形成が低減したと報告している(vom Saal et al. 1998)。これは、今までの 1,000ppm より低い用量では毒性は発現しないと考えられていたが、この 1 万分の一の用量においても次世代に影響が発現することを示すものであり、今までの常識を覆すものとして注目を

あびた。しかし、この 0.02ppm より上の用量で、同じ様な変化が生ずるかどうかにについては実験されていないため、この変化が再現性のあるものか否かについての追加実験がなされた。その実験では、投与用量として、0.02 あるいは 0.002ppm 以外に 0.2ppm と 0.0002ppm が追加され、vom Saal らと同様の実験プロトコールで実験を行ったところ、精子の生産量に群間で差は

なく、vom Saal らの成績は再現性がないとの発表がつい最近なされた (Endocrine/Estrogen Letter)。

D. 考察

EDCs の反応様式には、必ずしも直線的な用量反応関係が見られないことが報告されている。たとえば、胎生 13 日に 0, 0.002, 0.02, 0.2, 2, 20, ないし 200 ng/g 体重の DES を雄マウスに投与し、生後 8 ヶ月まで飼育したところ、200 ng/g 群では対照群に比し前立腺重量は有意に減少したが、0.2 ng/g 群では逆に有意に増加したとの成績が報告され (vom Saal ら、1997)、EDCs においては、いわゆる逆 U 字型反応曲線をとることが指摘されている。このことを見出した vom Saal は、0, 2, ないし 20ng/g 体重のビスフェノール A を妊娠 11 から 17 日のマウスに投与し、生後 6 ヶ月まで飼育した雄マウスにおいて 20ng/g 群において精子産生数が減少するような高用量での逆転現象を観察している (vom Saal ら、1998)。こうした現象の背景には、受容体のインターナリゼーションのような一連の受容体原性反応や、各種受容体に対する同一化学物質の重複した反応が生ずることにより、高用量反応から低用量反応への予測が困難になっているとの推察がなされている。これは、従来の毒性反応が直線性であるとの概念を覆すものであり、vom Saal らの実験で得られた逆 U 字パターンの用量反応関係の真偽については現在のところ明らかにされていない。

DES は生理的に女性が持っているエストロゲンの 2 ~ 3 倍強い作用を持っていることが分かっている。DES の経胎盤投与による次世代マウスへの影響については、100 μ g/kg 投与で次世代に悪影響を及ぼすが、それより下の用量では発現しないことから、DES のような強いエストロゲン作用を有する物質においても閾値の存在が示唆される。これは、弱いエストロジ

エン作用を有する環境内分泌攪乱化学物質においてその有害作用に閾値がないとする考え方とは全く正反対の結果であり、その真偽については今後の研究が強く望まれる。

methoxychlor の経胎盤投与による次世代ラットへの影響については、投与群すべての次世代動物に生殖器に毒性が発現しており、最低用量の 25 mg/kg より下のどの用量まで次世代への影響が発現するかについては現在のところ不明である。その閾値を求めるためのさらに低用量の追加実験が必要である。

Bisphenol A の経胎盤投与による次世代マウスへの影響については、vom Saal らの実験において次世代への影響が非常に低い投与量においても発現すると報告されたが、それについては再現性がないことが確認され、これは、弱いエストロゲン作用を有する環境内分泌攪乱化学物質においてその有害作用に閾値がないとする考え方をさらに反駁するものと考えられる。

E. 結論

以上のように、低用量暴露では次世代に明らかな作用は及ぼさないものと今まで考えられてきたが、その推論を覆す実験データもあり、EDC の低用量暴露で毒性変化が誘発されるか否かについては、今後種々の内分泌攪乱作用がある化学物質を用いた追加実験が必要である。近年エストロゲン作用を検出するための *in vitro* 試験が開発されているが、国際的なガイドラインとしては制定されていない。この *in vitro* 試験を用いると微量投与でもエストロゲン作用が検出されるが、従来の *in vivo* 試験では毒性を検出できないというギャップがあることは事実であり、このギャップを埋めていく研究が今後不可欠である。

引用文献：

Endocrine/Estrogen Letter: Study finds no effects from exposure to low doses of bisphenol A. Vol. 4, No. 20, pp. 1-5. 1998.

Gray LE et al.: A dose-response analysis of methoxychlor-induced alterations of reproductive development and function in the rat. Fundam. Appl. Toxicol. 12: 92-108. 1989.

McLachlan JA: Rodent models for peronatal exposure to diethylstilbestrol and their relation to human disease in the male. In: Developmental Effects of Diethylstilbestrol in Pregnancy. Ed. by Herbst AL and Bern HA. Thieme-Stratton, New York, 1981.

vom Saal F.S. et al.: Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 2056-2061. 1997.

vom Saal F.S. et al.: 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.

F. 研究発表

1. 論文発表

三森国敏. 内分泌攪乱作用物質の毒性
日本農薬学会誌 24: 93-94. 1999

2. 学会発表

三森国敏. 内分泌攪乱作用物質の毒性
内分泌攪乱物質と農薬に関するシンポジウム
1998

図1 DESの経胎盤投与による次世代マウスへの影響

(McLachlan : Developmental Effects of DES in Pregnancy, 1981)

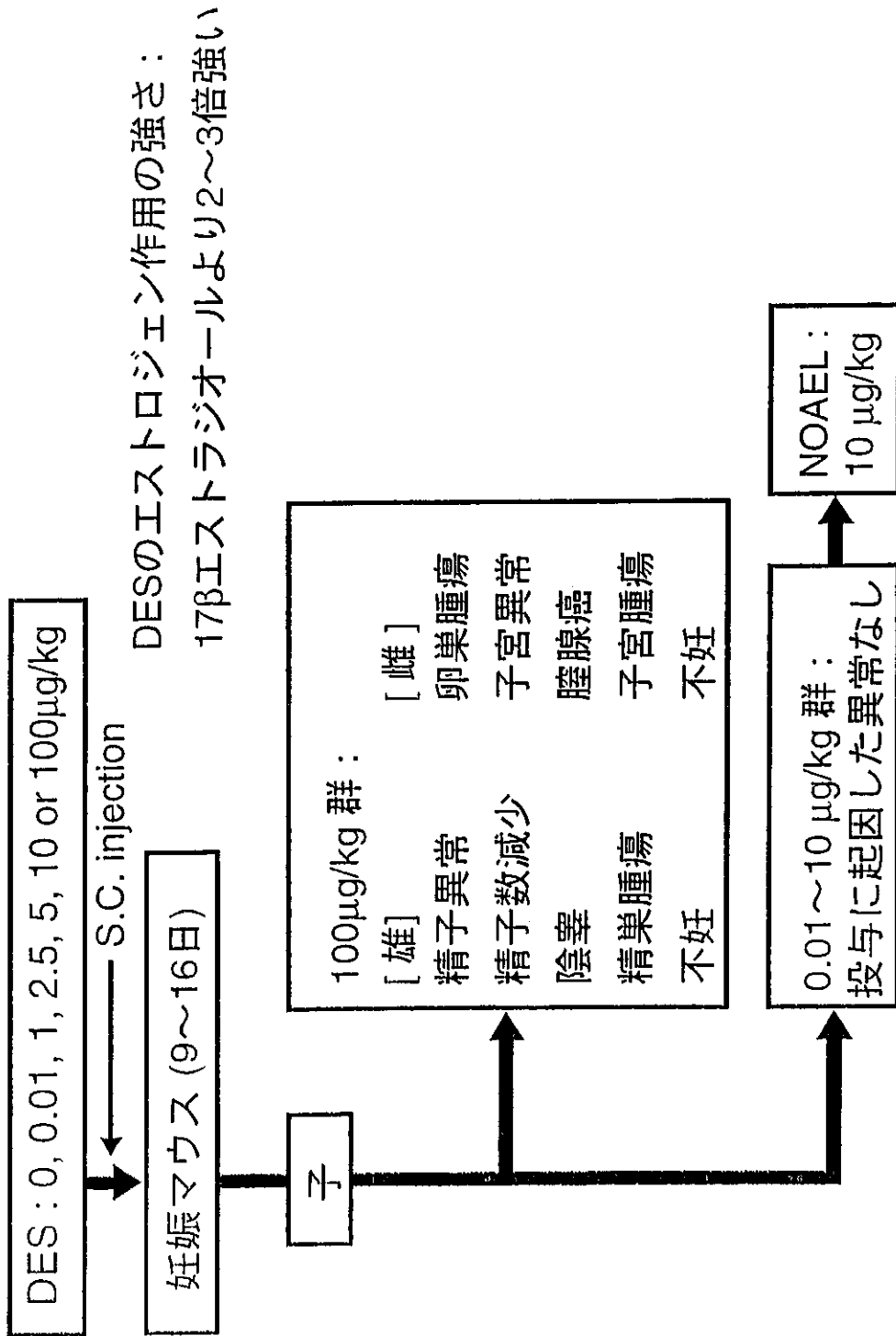


図2 メトキシクロールの経胎盤投与による次世代ラットへの影響

(Gray et al., Fundam. Appl. Toxicol. 12 : 92-108, 1989)

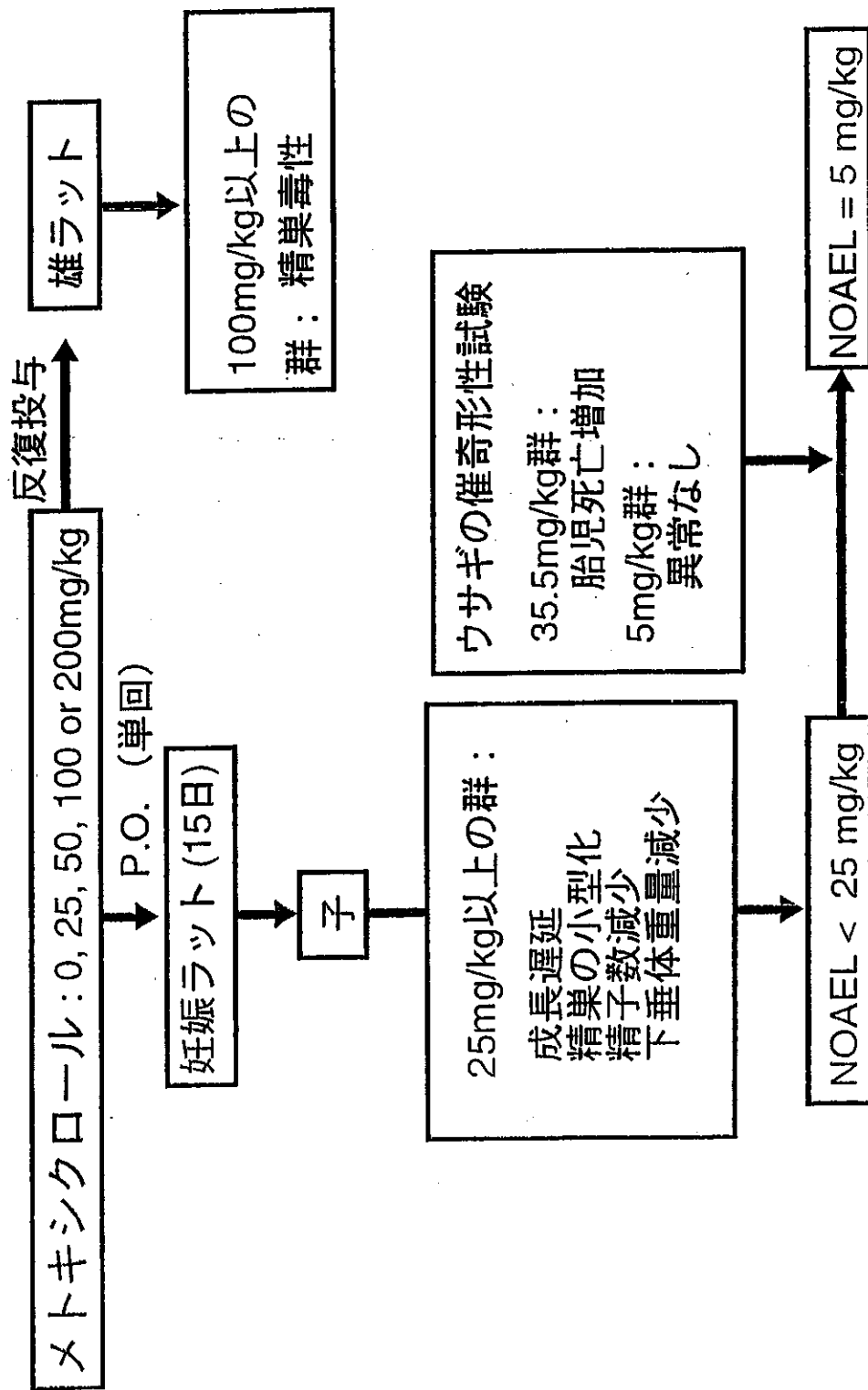
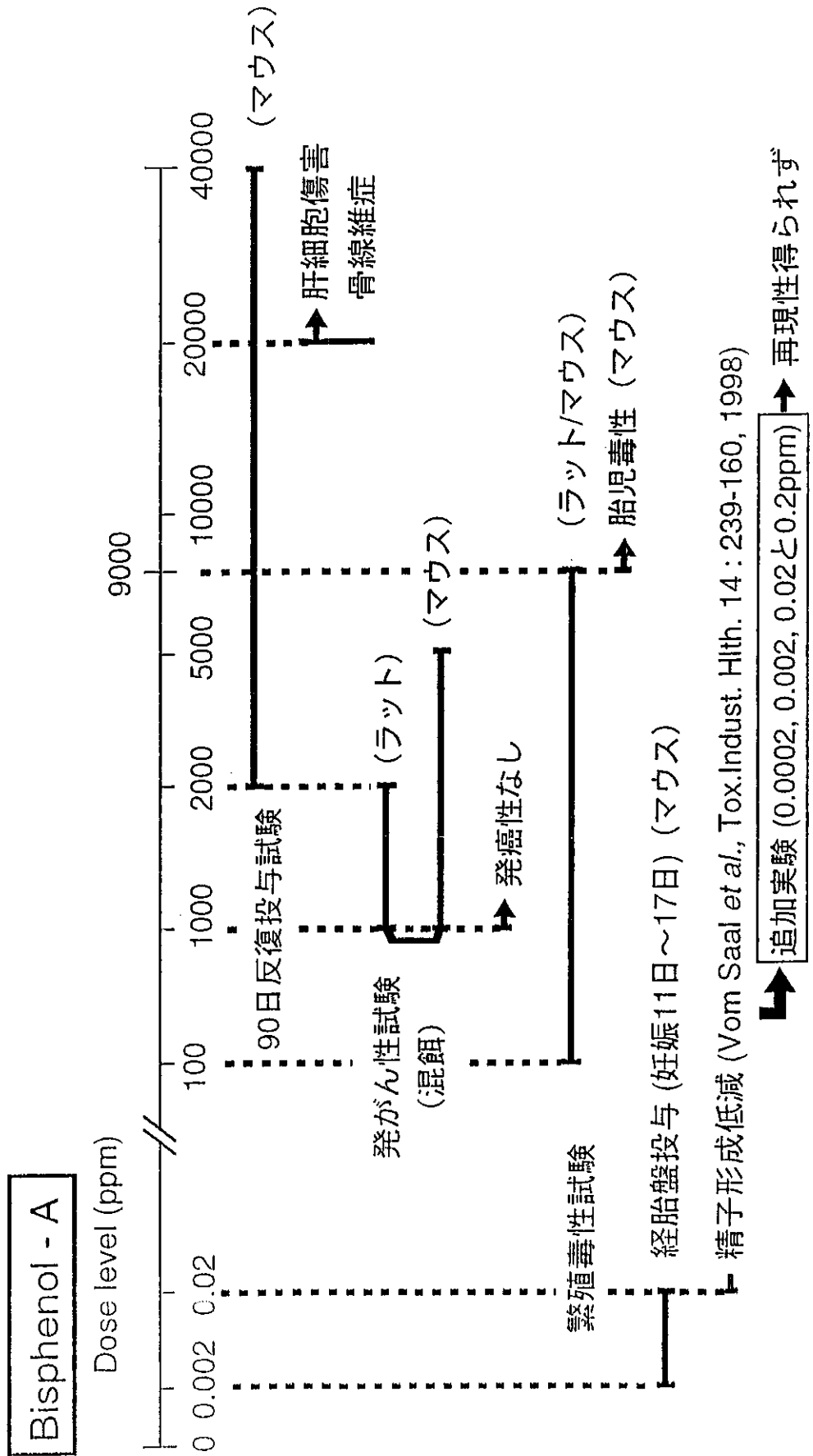


図3 弱いエストロゲン作用を有するEDDCの微量投与により
 実験動物の生殖系に毒性発現するか？



大豆成分の内分泌かく乱機構に関する研究

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 西川 秋佳
(研究協力者) 同上 池田 尚子
同上 今沢 孝喜

研究要旨

大豆イソフラボン類には甲状腺発がんを促進するものが含まれるとの報告があり、ラットに過剰の大豆含有飼料を与えると甲状腺濾胞上皮の肥大、過形成を経て腫瘍が誘発されるが、それが植物性エストロジェンの作用に基づくものか、あるいはそれ以外の作用によるものかは明らかにされていない。

そのメカニズム解明の一環として大豆過剰摂取あるいはヨード欠乏による甲状腺および下垂体のホルモン動態ならびに病理組織学的変化について検討した。大豆単独投与では甲状腺の形態学的変化は下垂体に比べて軽度であり、しかも T4 は増加傾向にあることから、下垂体上位への直接反応である可能性が示された。大豆成分の過剰摂取による甲状腺刺激作用のメカニズムはヨード欠乏の場合とは異なる可能性があるが、植物性エストロジェン作用との関連は不明のままであり、さらに追究する必要がある。

A. 研究目的

環境中には多数の合成あるいは天然のホルモン活性物質が存在し、これら物質の生殖器に対する毒性作用については近年解析が進んできたが、発がん修飾作用については未知の部分が多い。たとえば、エストロジェンはラットの子宮内膜やハムスターの腎臓に発がん性を示すが、乳腺に対しては発がんの促進または抑制という相反する結果も得られている。植物性エストロジェンのホルモン活性は弱いですが、疫学的にその摂取とヒト乳がん、前立腺がんの発生には負の相関があり、さらに実験的に乳腺発がんを抑制させる結果も報告されており、ヒトがんの予防物質として重要視されている。しかし、大豆イソフラボン類には甲状腺発がんを促進するものが含まれるとの報告もある。すなわち、ラットに過剰の大豆含有飼料を与えると甲状腺濾胞上皮の肥大、過形成を経て腫瘍が誘発されるが、それが植物性エストロジェンの作用に基づくものか、

あるいはそれ以外の作用によるものかは明らかにされていない。今回、そのメカニズム解明の一環として大豆過剰摂取あるいはヨード欠乏による甲状腺および下垂体のホルモン動態ならびに病理組織学的変化について検討した。

B. 研究方法

動物は各群 5 匹の 4 週齢 F344 雌ラットを用いた。群構成は (Fig. 1)、食餌中 20% グルテン単独投与を第 I 群 (対照群) とし、そのヨード欠乏を第 II 群、20% 脱脂大豆単独投与を第 III 群とし、そのヨード欠乏を第 IV 群とした。実験開始 10 週後に、エーテル麻酔下で採血後、剖検した。甲状腺および下垂体を重量測定後、定法により光顕的および電顕的に検索した。

C. 研究結果

Fig. 2 に示すように、甲状腺の重量は第 I 群と比較し、他の群では有意に増加し、下垂体の重量は第 III、IV 群において有意に増加した。

血清 T4 は第Ⅱ、Ⅳ群で有意に低下したが、第Ⅲ群では増加傾向を示した。一方、血清 TSH は第Ⅲ群と、特に第Ⅳ群で著しく増加した。光顕的に、第Ⅳ群では甲状腺濾胞上皮細胞の過形成、コロイドの消失が認められたが、下垂体には著変がなかった。電顕的観察では、投与群の甲状腺濾胞上皮細胞において粗面小胞体 (rER) の拡張、分泌顆粒 (EG) の減少、ミトコンドリアの増加、細胞質の blebbing などが第Ⅳ群、Ⅱ群、Ⅲ群の順の強さで観察された。下垂体前葉細胞においては、rER の発達と拡張、EG の減少が第Ⅳ群、Ⅲ群、Ⅱ群の順で認められた。

D. 考察

以上より、大豆の過剰摂取はラット甲状腺増殖の刺激となり、ヨード欠乏と組み合わせられた場合、顕著な相乗効果を示すことが確かめられた。ホルモン動態を考慮するとヨード欠乏による甲状腺の肥大は、下垂体・甲状腺系のネガティブ・フィードバック機構を介する反応であり、大豆過剰摂取が加わると相乗的に増強されることが明らかとなった。しかし、大豆単独投与では甲状腺の形態学的変化は下垂体に比べて軽度であり、しかも T4 は増加傾向にあることから、下垂体上位への直接反応である可能性が示された。

このように、大豆成分の過剰摂取による甲状腺刺激作用のメカニズムはヨード欠乏の場合とは異なる可能性があるが、植物性エストロゲン作用との関連は不明のままであり、さらに追究する必要がある。ヨード欠乏とは異なるメカニズムが想定される他の甲状腺発がん促進要因との相乗効果の有無についての検討も必要と考えられる。また、低用量でも同様な作用を示すかどうかを確認する必要がある。現在、多段階の用量による実験を行い、用量反応関係について検討中である。さらに、甲状腺腫瘍は、肝臓、膀胱などの腫瘍と同様にラットで誘発されやすい腫瘍の一つであることから、今回観察された

変化がヒトに対してどの程度当てはまるものかどうかについて、将来的にはその感受性の種差を定量的に把握する必要がある。以上述べた点が、大豆成分によるラット甲状腺刺激作用を評価する上での不確実性要因と考えられる主なものであるが、研究の進展により次第にその内容が定量化されていくものと期待される。

一般に、内分泌環境のかく乱は発がんの重要なリスク因子となりうるが、外来性内分泌かく乱物質と呼ばれるもののうちで発がん性の証明されている物質は少数にすぎない。その理由の一つは、性ホルモンとして女性ホルモンまたは男性ホルモンのアゴニストとして働く場合がある一方、アンタゴニストとして作用する場合もあり、その作用機構が複雑であるからである。もう一つの理由として、ホルモン様作用そのものではなくても、肝臓等における内因性ホルモンの代謝、特にその解毒過程に影響する物質もみかけ上は内分泌かく乱物質として作用するため、内分泌かく乱物質と呼ばれるものの中にはメカニズムの異なる全く異質な物質が含まれうるということが挙げられる。さらに、被験物質の発がん性を低用量でも確実に検出し得る高感度の *in vivo* 実験系がこれまでなかったこともその他の大きな理由と考えられる。しかし近年、種々のトランスジェニック動物を用いた高感度発がん検出モデルが開発されており、特に問題となる低用量域での影響を明らかにできる可能性がでてきている。植物性エストロゲンによる増殖関連遺伝子や細胞周期関連遺伝子の調節制御に関する分子生物学的研究も盛んになってきており、メカニズムの理解不足に由来する不確実性の究明に貢献できるものと期待されている。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori, H., Tanakamaru, Z. and Nishikawa, A.: Effects of protocatechuic acid, S-methylmethanethiosulfonate or 5-hydroxy-4-(2-phenyl-(E)-ethenyl)-2(5H)-furanone (KYN-54) on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary carcinogenesis in mice. *Cancer Lett.* (in press)
- 2) Nishikawa, A., Furukawa, F., Lee, I.-S., Kasahara, K., Tanakamaru, Z., Nakamura, H., Miyauchi, M., Kinae, N. and Hirose, M.: Promoting effects of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) on rat glandular stomach carcinogenesis initiated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res.* (in press)
- 3) Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K., Tanakamaru, Z., Miyauchi, M., Nakamura, H., Ikeda, T., Imazawa, T. and Hirose, M.: Failure of phenethyl isothiocyanate to inhibit hamster tumorigenesis induced by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine when given during the post-initiation phase. *Cancer Lett.* (in press)
- 4) Ikezaki, S., Nishikawa, A., Furukawa, F., Tanakamaru, Z., Mori, H. and Hirose, M.: Influence of long-term administration of 24R, 25-dihydroxyvitamin D₃, a vitamin D₃ derivative, in rats. *J. Toxicol. Sci.* (in press)
- 5) Chung, F.-L., Nath, R.G., Nagao, M., Nishikawa, A., Zhou, G.-D., Randerath, K.: Endogenous formation and significance of 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts. *Mutat. Res.* (in press)
- 6) Furukawa, F., Nishikawa, A., Kasahara, K., Lee, I.-S., Wakabayashi, K., Takahashi, M. and Hirose, M.: Inhibition by β -carotene of upper respiratory tumorigenesis in hamsters receiving diethylnitrosamine followed by cigarette smoke exposure. *J. Jpn. Cancer Res.* 90: 154-161, 1999.
- 7) Kasahara, K., Nishikawa, A., Furukawa, F., Ikezaki, S., Tanakamaru, Z., Takagi, H., Ikeda, T., Imazawa, T., Takahashi, M.: Suppressive effects of josamycin on the development of altered liver cell foci and chronic nephropathy in a carcinogenicity study. *Fd. Chem. Toxic.* 37: 61-67, 1999.
- 8) Wang, X., Suzuki, T., Itoh, T., Honma, M., Nishikawa, A., Furukawa, F., Takahashi, M., Hayashi, M., Kato, T., Sofuni, T.: Specific mutational spectrum of dimethylnitrosamine in the lacI transgene of Big Blue C57BL/6 mice. *Mutagenesis* 13: 625-630, 1998.
- 9) Furukawa, F., Nishikawa, A., Imazawa, T., Kasahara, K., Takahashi, M.: Enhancing effects of quinacrine on development of hepatopancreatic lesions in N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-treated hamsters. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 131-136, 1998.
- 10) Yamazaki, Furukawa, F., Nishikawa, A., Takahashi, M., Oka, S.: Histochemical study on enzyme stereoselectivity for esterase in hamster normal pancreas and pancreatic tubular adenocarcinoma. *Biotech. Histochem.* 73: 23-31, 1998.
- 11) Hori, T., Wanibuchi, H., Yano, Y., Otani, S., Nishikawa, A., Osugi, H., Kinoshita, H., Fukushima, S.: Epithelial cell

proliferation in the digestive tract induced by space restriction and water-immersion stress. *Cancer Lett.* 125: 141-148, 1998.

- 12) Mori, H., Nishikawa, A.: Naturally occurring organosulfur compounds as potential anticarcinogens.

In: Ioannides, C. ed. *Nutrition and Chemical Toxicology*. John Wiley & Sons, Sussex, 285-299, 1998.

- 13) Nishikawa, A., Tanakamaru, Z., Furukawa, F., Lee, I.-S., Kasahara, K., Ikezaki, S., Takahashi, M.: Chemopreventive activity of oltipraz against induction of glandular stomach carcinogenesis in rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* 19: 365-368, 1998.

2. 学会発表

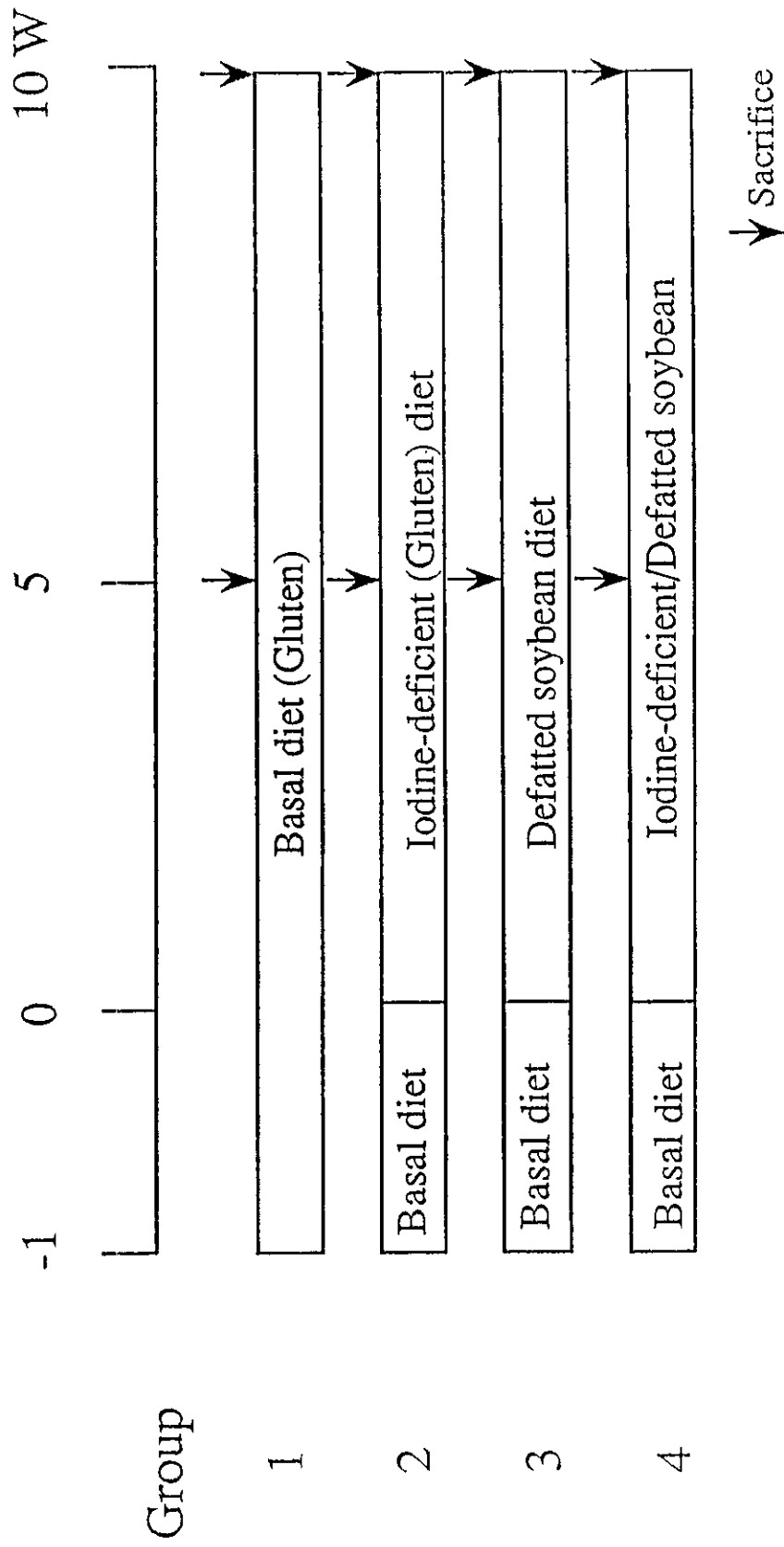
- 1) Takahashi, M., Furukawa, F., Nishikawa, A., Wakabayashi, K.: Dose-dependent inhibition of β -carotene of upper respiratory tumorigenesis in hamsters receiving diethylnitrosamine followed by cigarette smoke exposure. 4th AACR/JCA Joint Conference "Molecular Biology of Cancer: Implication for Prevention and Therapy", 1998.
- 2) 古川文夫, 西川秋佳, 笠原健一郎, 北浦敬介, 内田浩二, 泉啓介, 高橋道人: 老齡 LEC ラットおよび F344 ラットの脂質過酸化生成物の免疫組織化学的検討. 第 14 回日本毒性病理学会, 1998.
- 3) 笠原健一郎, 古川文夫, 西川秋佳, 李仁善, 高橋道人: p53 ノックアウトマウスの MNNG 投与による発がん性の検討. 第 14 回日本毒性病理学会, 1998.
- 4) 今沢孝喜, 三森国敏, 小野寺博志, 竹川潔,

西川秋佳, 池田尚子, 高橋道人: Thiram の長期反復投与ラットに発現した神経毒性変化の超微形態学的解析. 第 14 回日本毒性病理学会, 1998.

- 5) 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 田中丸善洋, 池崎信一郎, 今沢孝喜, 李仁善, 谷所達幸, 木苗直秀, 高橋道人: ラット二段階胃発癌モデルにおける水道水中の変異原性物質 MX の影響. 第 14 回日本毒性病理学会, 1998.
- 6) Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K., Suzuki, T., Hayashi, M., Sofuni, T., Takahashi, M.: Detection of in vivo mutagenicity of MeIQx using lacI transgenic mice. 7th International Conference on Carcinogenic/Mutagenic N-substituted Aryl Compounds, 1998.
- 7) Kasahara, K., Furukawa, F., Nishikawa, A., Tanakamaru, Z., Mori, I., Takahashi, M.: Aberrant crypt foci in the rat colon induced by MeIQx: in comparison with spontaneous focal lesions, 7th International Conference on Carcinogenic/Mutagenic N-substituted Aryl Compounds, 1998.
- 8) 木苗直秀, 谷所達幸, 今村希美, 古郡三千代, 下位香代子, 西川秋佳, 高橋道人: 水道水中の強力な変異原性物質 MX の二段階発がん性, 第 32 回日本水環境学会, 1998.
- 9) 西川秋佳, 古川文夫, 広瀬雅雄, 高橋道人: 胃発がん修飾因子の探索に関する実験的検討, 第 9 回消化器癌発生学会, ラウンドテーブルディスカッション, 1998.
- 10) Koide, A., Fuwa, K., Mori, Y., Furukawa, F., Hirose, M., Nishikawa, A.: Effect of cigarette smoke on mutagenic activation of environmental carcinogens by rodent liver, 3rd International Conference on

- Environmental Mutagens in Human Populations, 1998.
- 11) Furukawa, F., Nishikawa, A., Kasahara, K., Uchida, K., Takahashi, M.: Involvement of lipid peroxidation in spontaneous pancreatitis on WBN/Kob rats, 8th International Association of Pancreatology, 1998.
 - 12) Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K., Imazawa, T., Takahashi, M.: specific inhibition by PEITC of initiation phase of BOP-pancreatic tumorigenesis in the hamster, 8th International Association of Pancreatology, 1998.
 - 13) 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 今沢孝喜, 李仁善, 木苗直秀, 高橋道人, 広瀬雅雄: 変異原性物質 MX によるラット腺胃発癌の促進, 第 57 回日本癌学会総会, 1998.
 - 14) 古川文夫, 西川秋佳, 笠原健一郎, 李仁善, 高橋道人, 広瀬雅雄: ハムスター BOP 膵発癌イニシエーションに対する oltipraz の影響, 第 57 回日本癌学会総会, 1998.
 - 15) 今沢孝喜, 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 池田尚子, 高橋道人, 広瀬雅雄: クチナシ青色素の F344 ラットにおける癌原性試験, 第 57 回日本癌学会総会, 1998.
 - 16) 池田尚子, 今沢孝喜, 西川秋佳, 笠原健一郎, 木村修一, 広瀬雅雄: 大豆食で起こるラット甲状腺腫瘍の発現機序に関する検討, 第 57 回日本癌学会総会, 1998.
 - 17) 笠原健一郎, 西川秋佳, 古川文夫, 李仁善, 今沢孝喜, 高橋道人, 広瀬雅雄: ハムスター BOP 発癌ポストイニシエーションにおける PEITC の影響, 第 57 回日本癌学会総会, 1998.
 - 18) 松永研吾, 西川秋佳, 山田泰広, 川端邦裕, 杉江茂幸, 森秀樹: NNK 誘発マウス肺発癌における S-methylmethane thiosulfonate (MMTS), protocatechuic acid, KYN-54 の修飾作用, 第 57 回日本癌学会総会, 1998.
 - 19) 堀高明, 市原敏夫, 森村圭一郎, 鰐淵英機, 西川秋佳, 福島昭治: ラット食道発癌におけるエタノール摂取の影響, 第 57 回日本癌学会総会, 1998.
 - 20) 李仁善, 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 金秀彦: 生薬 *Selaginella tamariscina* の p53 遺伝子発現, G1 停止および胃粘膜上皮細胞増殖に及ぼす影響, 第 57 回日本癌学会総会, 1998.
 - 21) 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 高橋道人, 広瀬雅雄: BOP 誘発 DNA 障害に対する PEITC の抑制効果, 第 5 回日本がん予防研究会, 1998.
 - 22) 古川文夫, 笠原健一郎, 西川秋佳, 高橋道人, 広瀬雅雄: ハムスター BOP 膵発癌イニシエーション期における PEITC の影響, 第 5 回日本がん予防研究会, 1998.
 - 23) 古川文夫, 西川秋佳, 笠原健一郎, 千原猛, 新保寛, 別府秀彦, 葛谷博磁, 広瀬雅雄: ハムスター BOP 膵発癌に及ぼすキダチアロエの影響, 第 15 回日本毒性病理学会, 1999.
 - 24) 笠原健一郎, 西川秋佳, 古川文夫, 池崎信一郎, 田中丸善洋, 李仁善, 今沢孝喜, 高橋道人, 広瀬雅雄: ジョサマイシンのラットへの 52 週間投与による組織学的変化, 第 15 回日本毒性病理学会, 1999.
 - 25) 今沢孝喜, 池田尚子, 西川秋佳, 笠原健一郎, 木村修一, 広瀬雅雄: 大豆食で惹起されるラット甲状腺および下垂体の超微形態学的変化, 第 15 回日本毒性病理学会, 1999.
 - 26) 高木久宜, 三森国敏, 西川秋佳, 小野寺博志, 古川文夫, 安原加壽雄, 笠原健一郎, 広瀬雅雄: p53 ノックアウト (ヘテロ欠損) CBA マウスにおける N-methyl-N-nitrosourea (MNU) の発癌感受性, 第 15 回日本毒性病理学会, 1999.

- 27) 中村英明, 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 宮内慎, 高橋道人, 広瀬雅雄: 新生児マウス二段階発癌モデルによる PhIP のリスク評価, 第 15 回日本毒性病理学会, 1999.
- 28) 宮内慎, 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 中村英明, 高橋道人, 広瀬雅雄: 新生児マウス二段階発癌モデルによる MeIQx のリスク評価, 第 15 回日本毒性病理学会, 1999.



Species : 4-week-old female F344/DuCrj rat Examination : Hormones (T₃, T₄, TSH)
 Histopathology
 (Heart, Liver, Kidney, Thyroid, Pituitary)
 Body/organ weights
 Food consumption

Fig.1. Experimental design