

めた。投与群は以下の通りで、各群 3 匹のラットを用いた。

<試験群>

群番号	性	投与	投与量
第1群	雄	経口	20 $\mu$ g/mL/kg
第2群			100 $\mu$ g/mL/kg
第3群			500 $\mu$ g/mL/kg
第4群	雌		20 $\mu$ g/mL/kg
第5群			100 $\mu$ g/mL/kg
第6群			500 $\mu$ g/mL/kg
第7群	雄	静脈	100 $\mu$ g/mL/kg
第8群			500 $\mu$ g/mL/kg
第9群	雌		100 $\mu$ g/mL/kg
第10群			500 $\mu$ g/mL/kg

<試料採取時間>

経口	血漿	15, 30分, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72時間
静脈	血漿	5, 10, 20, 30分, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72時間

なお、試料は経口投与では投与後 15, 30分, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72時間に、尾静脈よりヘパリン処理したマイクロピペットを用いて血液約 100  $\mu$  L をヘパリン入りマイクロチューブに採取した。静脈内投与の場合は投与後 5, 10, 20, 30分, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72時間に投与部位と反対側の尾静脈から採血し、遠心分離 (8,060 $\times$ g, 室温, 5 min) 後、血漿 20  $\mu$  L をエッペンドルフピペットで分取した。これを 5 mm $\times$ 5 mm のティッシュペーパーに血漿 20

$\mu$  L をしみ込ませ、乾燥させた後、イメージングプレートに 24 時間コンタクトし、バイオイメージアナライザー (BAS 2000) により発光強度 (PSL) を求める。既知の放射能より求めた検量線から各試料中の放射能を得た。

実験. 2 尿、糞中排泄率、体内残存率の測定

$^{14}$ C-BPA 500  $\mu$  g/mL/kg (5.75 MBq/kg) を経口投与した雌雄ラット (それぞれ第 11 群および第 12 群とした。) をステンレス製代謝ケージに収め、168 時間後まで尿、糞を採取し、尿および糞中排泄率を求めた。また、最終試料採取後、ラットをエーテル麻酔死させ、体内残存率を測定した。

なお、尿および糞は分別採取し (採取時間毎にケージを少量の蒸留水で洗浄し、洗浄液は尿と合わせる)、投与後 168 時間にエーテル麻酔死させ、屍体を 0.5 M 水酸化ナトリウム 500 mL とトルエン 50 mL を加え、加熱還流し溶解した。これらの液をシンチレーター (HIONICFLUOR) に混和し液体シンチレーションカウンターにて 2 分間測定した。

実験. 3 組織内放射能濃度の測定

$^{14}$ C-BPA を胃ゾンデで強制経口投与した雌雄ラットを所定時間にエーテル麻酔死させたのち、全身オートラジオグラムを作製し、定量的全身オートラジオグラフィー法により組織内放射能濃度を測定する。なお、試験群は以下の通りで、1 群 3 匹とした。

<試験群>

群番号	性	作製時間
第13群	雄	30分
第14群		24時間
第15群		72時間
第16群	雌	30分
第17群		24時間
第18群		72時間

なお、BPAの投与量はいずれも500 μg/mL/kgで投与放射エネルギーは5.75 MBq/kgで、強制経口投与する。

実験. 4 胎仔および新生仔の放射能濃度の測定

<sup>14</sup>C-BPAを妊娠ラット(妊娠12, 15, 18日)または哺育中ラット(分娩後10日前後)に強制経口投与し、所定時間にエーテル麻酔死させたのち、全身オートラジオグラムを作製し、定量的全身オートラジオグラフィ法により胎仔および新生仔(雌雄各1匹)の組織内放射能濃度を測定した。測定方法は実験2と同じ。

試験群は以下のとおり。

<試験群>

群番号	動物種	作製時間
第19群	妊娠12日目	30分
第20群	雌ラット	24時間
第21群	妊娠15日目	30分
第22群	雌ラット	24時間
第23群	妊娠18日目	30分
第24群	雌ラット	24時間

第25群	哺育中雌	30分
第26群	ラット	24時間

なお、BPAの投与量はいずれも500 μg/mL/kgで投与放射エネルギーは5.75 MBq/kgで、強制経口投与する。

実験. 5 乳汁中放射能濃度の測定

哺育中の動物に<sup>14</sup>C-BPAを胃内に強制投与して乳汁および血液を経時的に採取し、血漿を分取したのち乳汁および血漿中放射能濃度の推移を求め、乳汁中への移行の程度について検討した。なお、<sup>14</sup>C-BPAは500 μg/mL/kg(5.75 MBq/kg)を1群3匹に投与し、血漿および乳汁を0.5, 2, 4, 8, 24, 48時間にわたり採取した。

<試験群>

群番号	性	採取試料
第27群	哺育中雌	血漿/乳汁

なお、BPAの投与量はいずれも500 μg/mL/kgで投与放射エネルギーは5.75 MBq/kgで、強制経口投与する。

なお、乳汁採取に際しては、乳児は母獣1匹につき5匹とし、乳汁採取1時間前に母獣から離し、乳汁採取後再び母獣に戻した。また、乳汁採取にあたり、乳汁採取30分前に0.5 IU/mLのオキシトシン生理食塩水溶液を1mL/kg腹腔内投与した。母獣を軽度エーテル麻酔し、乳頭よりマイクロピペットを用いて100 μLを搾乳した。血漿は尾静脈よりヘパリン処理したマイクロピペットを用いて血液約250 μLをヘパリン入りマイクロチューブに採取し、遠心分離(8,060 G, 室温, 5min)後、血漿100 μLをエッペンドルフピペットで分取した。これに組織溶解剤(SOLUENE-350)を加え、溶解した後、シンチレーター(HIONICFLUOR)10 mL加え、室温で静置下の後、液体シンチレーションカウンター

で2分間測定した。

## B-2 サルにおけるBPAの体内動態の検討

### B-2-1. 被験物質

B-1-1と同様。なお、静脈内投与溶液はリン酸緩衝液に溶解したのち、0.22 μmのフィルターで濾過した後に使用した。

### B-2-2. 試験系および飼育方法

米国テキサス州アリスのHRP, Inc.社より購入した成熟雌雄のカニクイサル (*Macaca fascicularis* (cynomolgus)) を使用した。サルはステンレス製ケージに個別に飼育した。実験開始時の体重は約2.5-4.6 kgであった。飼育室の設定は温度 21 ± 3°C, 湿度 50 ± 20%, 照明 12時間明, 12時間暗のサイクルで換気は1時間当たり10-15回で行った。餌は標準的な市販の飼料 (Teklad Certified Primate Chow #8726C) を自由に摂取させた。水は逆浸透水を紫外線照射したのち0.22 μmのフィルターを通したものを自由に摂取させた。

### B-2-3. 試験デザイン

#### 実験. 1 予備試験

雄のサルに100 μg/kg (1 mL/kg, 1.15 MBq/mL) をプラスチック製シリンジを用いて、一匹ずつの別々のサルに単回経口あるいは静脈内投与した。しかし、投与液を濾過した際に吸着が起こり、実際の投与量は経口投与では84 μg/kg 静脈内投与では83 μg/kgであった。投与前及び経口投与後0.25~168時間に、静脈内投与では0.083~168時間まで大腿静脈 (静脈内投与後0.083時間のみ上腕静脈) よりヘパリン含有試験管に、それぞれ1 mLずつ、合計12回採血した。これを遠心し得られた血漿0.1 mLを10 mLのシンチレーター (ReadyGel, Beckman) に混和し、放射活性を測定した。また、尿、糞、及びケージ洗浄液を毎日採取し、秤量後尿及び洗浄

液はその200 μLについて放射活性を測定した。糞は2倍量の精製水と混和・ホモジナイズし、その200mgを分析した。これを乾燥したのち燃焼させ、生成した<sup>14</sup>C-CO<sub>2</sub>をCarbo-Sorb (Packard)に吸収させ、その放射活性を測定した (Permafluor E, Packard)。

#### 採血時間

投与経路	投与前	投与後 (時間)
経口	0*	1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 168
静脈	0*	0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 168

\* : During the pretreatment period, a control sample (1 mL blood) will be collected from each animal and the plasma will be pooled to be used for determination of background levels.

#### 糞尿の採取時間

検体	採取時間	
	投与前	投与後 (時間)
糞	24時間*	0-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144 and 144-168 時間
尿	24時間*	0-12, 12-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144 and 144-168 時間
ケージ洗浄液	24時間*	0-12, 12-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144 and 144-168 時間

\* : During the pretreatment period, a sample will be collected to be used for background level determination.

#### 実験. 2 本試験

同じ用量を雌雄3匹ずつのサルに実験. 1と同じ用量を経口投与及び静脈内投

与した。なお、6匹のサルに静脈内に単回投与した。その後、15日の洗浄期間後に同じサルを用いて、経口投与試験を行うこととした。但し、尿中に有意な放射活性が排出される時は更に洗浄期間を延長することとした。採血スケジュールは以下のとおり。その他は実験1と同じ。

#### 1回目投与（経口投与）

群	経路	投与前	投与後(時間)
1	静脈	0*	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 168

#### 2回目投与（経口投与）

群	経路	投与前	投与後(時間)
1	経口	0*	0.25, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 168

\*: During the pretreatment period, a control sample (1 mL blood) will be collected from each animal and the plasma will be pooled to be used for determination of background levels.

### C. 研究結果

#### C-1. ラットにおけるBPAの体内動態

##### C-1-1. BPAの血中動態

経口及び静脈内投与後BPAは投与経路にかかわらず汚染レベルに近い用量から投与量に依存して血中濃度が増加した。また、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おもわれた。雌雄差については雄の方が血中濃度が高かった。100 µg/kg投与2~3日後の消失半減期は約15-18時間であった。生物学的利用能は100 µg/kgの時は雄が54.6%、雌で47.6%であり、500 µg/kgの

時は雄が31.9%、雌で69.5%であった。

##### C-1-2. BPAの乳汁中排泄

BPAは乳汁中に排泄される。排泄濃度は投与後8時間で最高になり、その後低下していく。また、最高濃度時の乳汁排泄濃度は血漿中濃度の約1/4であった。

##### C-1-3. BPAの体内分布

現在、試験実施中であり、結果はまだ得られていない。

#### C-2. サルにおけるBPAの体内動態

##### C-2-1. BPAの血中動態

2匹の雄サルを用いた経口及び静脈内投与後の血中動態の結果を比較するとCmaxはそれぞれ238と220と余り差がなかった。また、AUCにも差が少なく、生物学的利用能は98.7%と投与したもののほとんどが吸収されているものと思われた。また、ラットでは著明に認められた腸肝循環がサルでは明確ではなかった。また、血漿中の半減期は静脈内投与後6時間までの計算では約3時間、8から48時間までの計算では約15時間であった。

なお、一群3匹の雌雄のサルを用いた本試験結果はまだ得られていない。

##### C-2-1. BPAの排泄

上記の雄サルを用いた試験において尿、糞中へのBPAの排泄を調べたところ、BPAは主に尿中に排泄され、経口投与24時間以内に投与した放射活性の53%が尿中より回収された。また、この間の糞からの回収率は投与量の0.29%と少ないことから、ケージ洗浄液から得られた14.12%の放射活性のほとんどは尿に由来するものと思われる。これを合わせると、24時間までの尿中排泄率は約69%と推定された。なお、投与後1週間の全回収率は79.9%であった。静

脈内投与の場合もほぼ同様であり、投与 24 時間以内に約 79%が尿中に排泄されたと推定される。また、投与後 1 週間で 87.6%が糞尿中に排泄された。

#### D. 考察

暴露レベルに近い用量を含む BPA を雌雄の F344 ラットに経口投与(20, 100, 500  $\mu$  g/kg), 或いは静脈内投与(100, 500  $\mu$  g/kg)したとき、血漿中の BPA 当量は投与量にほぼ線形に増加した。また、BPA の生物学的利用能は 100  $\mu$  g/kg 投与時で約 50%であった。一方、雄の方が雌より血中濃度が高かった。通常の薬物においては、雌よりも雄の方が薬物代謝活性が高く、血中濃度は低くなる傾向がある。今回の結果は、BPA 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が、今のところ、精製した分子種での結果は得られておらず、その理由については明確ではない。また、経口投与では腸管循環によると思われる二相性の血漿中動態が認められた。即ち、ラットにおいては経口投与された BPA は肝臓により代謝を受け、抱合体となった後、速やかに胆汁中に排泄されるが、その一部は腸内で分解され、また、消化管より再吸収を受けるものと思われた。一方、雄サルに BPA を 100  $\mu$  g/kg 静脈内投与と経口投与したときの  $C_{max}$  および AUC に差は少なく、生物学的利用能はほぼ 100%であった。これはサルでは明瞭な腸肝循環は認められなかったこと、また、投与した BPA の大部分が尿中に排泄されたことから、サルでは経口投与された BPA が肝臓で代謝を受けても、胆汁中に排泄される量が少ないものと思われた。これについては、近日中にラットにおける尿中および糞中

排泄量に関するデータが得られる予定であること、また、より多数のサルを用いた試験の結果が得られる予定であることから、その後に再度考察すべき事項である。更に、100  $\mu$  g/kg 投与後急速に低下するが、ラットでは投与後 2~3 日後の消失半減期は約 15-18 時間であり、サルでは投与 8 時間から 48 時間の間の消失半減期は約 15 時間であった。両者で大きな差は認められなかった。血中の BPA 当量の内、未変化体がどの程度あるかについては今後検討する予定である。

BPA の体内分布に関する検討はラットで行っており、これについても近日中に結果が得られる予定である。

BPA は乳汁中に排泄され、排泄濃度は投与後 8 時間で最高になり、この時の乳汁排泄濃度は血漿中濃度の約 1/4 であった。

ラットにおいては暴露レベルに近い低用量においても、血漿中濃度は投与量に応じてほぼ線形に増加する。また、ラットでは腸肝循環が著しく生物学的利用能も 50%程度と低いが、サルでは腸肝循環はそれほど有意ではなく、生物学的利用能も約 100%と高い。投与後しばらく経過した後の排泄半減期はラットとサルでほぼ同じで、15-18 時間であった。乳汁中に排泄される BPA の濃度は血漿中の約 1/4 の濃度である。今後、ラットでの体内分布、糞尿中排泄、比較的多数のサルを用いた血中動態および排泄に関する結果が得られる予定である。

#### E. 今後の展望

サルとラットの両者におけるビスフェノール A の体内動態についての研究を更に進める。

内分泌かく乱物質の行動影響に関する調査研究

分担研究者 鈴木 勉 星薬科大学薬品毒性学教室教授

研究要旨

ベンゾ(a)ピレン、ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-n-ブチルの単回経口投与では一般行動、運動協調性、学習・記憶および葛藤には有意な影響を及ぼさなかった。しかし、ベンゾ(a)ピレンは投与初期における自発運動量を有意に増加した。また、混餌による 28 日間の投与後、ビスフェノールA投与群において有意な自発運動の増加が認められた。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質の行動影響に関する研究はこれまでほとんど行われていない。そこで、本研究では一般行動、自発運動、葛藤、学習・記憶および運動協調性に及ぼすベンゾ(a)ピレン、ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-n-ブチルの影響を検討した。自発運動は生体の異変や異常を敏感に反映することから、種々の薬物や化学物質の生体、特に中枢に及ぼす影響を検討する際の一次評価法として広く用いられている。そこで、本研究では数種内分泌かく乱物質の 28 日間投与による自発運動に及ぼす影響も合わせて検討した。

B. 研究方法

実験には実験開始時 20~22 g の ddY 系雄性マウス（東京実験動物）を用いた。また、ベンゾ(a)ピレン（和光純薬工業）、ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-n-ブチル（関東化学）を使用し、これらの溶媒としてコーン油（和光純薬工業）を使用した。これをマウスに 0.01 ml/g の容量で経口投与した。慢性投与は混餌法に従い、各被験物質を 0.03 および 0.1 mg/g of food に調製し、28 日間摂取させて慢性的な暴露を行った。

1. 一般行動に及ぼす影響

各被験物質（3 および 10 mg/kg, p.o.）投与後 30, 60 および 90 分後に行動観察を行った。

2. 自発運動に及ぼす影響

各被験物質（3 および 10 mg/kg, p.o.）を投与し、3 時間に亘り自発運動量を測定した。自発運動量は tilting cage 法に従って測定した。被験物質を投与したマウスをバケツ型ケージに 1 匹ずつ入れ、マウスの移所行動に伴うケージの傾きをマイクロスイッチで感知し、このカウントを運動量とした。各被験物質の単回経口投与、28 日間処置および 28 日間処置後に経口投与した群をそれぞれ設け、自発運動量を 10 分間隔で 3 時間にわたり連続的に測定した。

3. 葛藤に及ぼす影響

抗コンフリクト作用の測定には 18×12×10 cm の vogel 型コンフリクト装置（小原医科産業）を使用した。電気刺激はマウスが drinking tube を 20 回なめるごとに 1 回与えるように設定した。電流は 0.35 mA、通電時間は 200 msec とした。マウスを 3 日間飼育した後 24 時間絶水し、装置内にマウスを入れて電気刺激を与えずに 10 分間自由に水を飲ませた。その後 3 日間自由摂餌条件で飼育し、再度 24 時間絶水させたマウスを装置内に入れ、電気刺激を与える条件で 10 分

間テストを行い、マウスが受けた電気刺激の回数を測定した。

#### 4. 学習・記憶に及ぼす影響

学習・記憶実験には step down 法を用いた。前面が透明なボックス (9×15×35 cm) の床面をステンレス製グリッドにして通電 (0.4 mA) させ、ゴム栓 (4.5×4.5 cm) を置きその上にマウスを乗せる。床に降りると感電するのでゴム栓上に留まることを試験前日に 10 分間学習させ、被験物質投与後 0, 30, 60 および 120 分に 3 分間マウスをゴム栓上に乗せ、床に降りたそれぞれのマウスを記録し、失敗したマウスの匹数と時間の関係を調べた。

#### 5. 運動協調性に及ぼす影響

運動協調性は rota-rod 法により評価した。回転棒上にマウスが 5 分間乗れるように訓練した後、被験物質を投与し、再び回転棒上に乗せ、被験物質に運動協調障害作用があると、マウスは回転棒の速さについていけずに回転棒から落ちるので、これを運動協調性障害と判断し、被験物質投与後 30, 60 および 90 分に何秒間回転棒に乗っていられるかを 5 分間測定した。

各試験結果を平均値および標準誤差で示し、統計解析は Student's-t test あるいは Mann-Whitney の U 検定で評価した。なお、有意水準は  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  とした。

### C. 実験結果

#### 1. 一般行動に及ぼす影響

各被験物質投与後 30, 60 および 90 分に行動観察を行ったが、被験物質投与前後の比較において、何ら有意な変化は認められなかった。

#### 2. 自発運動に及ぼす影響

ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-n-ブチルの 3 および 10 mg/kg の経口投与により、自発運動量は対照群と比較し有意な変化は認められなかった。しかし、ベンゾ(a)ピレンは対照群と

比較し、投与後 60 分間の自発運動量が用量依存的に増加し、10 mg/kg では有意な増加を示した。次に、各被験物質を混餌により 28 日間処置して自発運動を測定したが、対照群と比較して有意な変化は認められなかった。そこで、これらの慢性処置マウスに各被験物質の 3 および 10 mg/kg を経口投与して自発運動を測定したところ、ベンゾ(a)ピレン およびフタル酸ジ-n-ブチルでは有意な変化は認められなかったが、ビスフェノールA 10 mg/kg では投与後 30 分間の自発運動量が有意に増加した。

#### 3. 葛藤に及ぼす影響

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 3 および 10 mg/kg の抗コンフリクト作用を検討したが、対照群と比べ有意な影響は見られなかった。

#### 4. 学習・記憶に及ぼす影響

Step down 法による学習課題試験を行い、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 3 および 10 mg/kg 投与後 120 分の失敗率について経時的な検討を行ったが、対照群に比べ何ら有意な変化は認められなかった。

#### 5. 運動協調性に及ぼす影響

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 3 および 10 mg/kg は運動協調性に何ら影響を及ぼさなかった。

### D. 考察

ベンゾ(a)ピレン、ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-n-ブチルは単回投与で一般行動、葛藤、学習・記憶、運動協調性に何ら影響を及ぼさなかった。したがって、少なくとも本研究で用いた用量では行動的に影響は受けないと考えられる。一方、ベンゾ(a)ピレンは投与後 60 分間の自発運動量を対照群に対して用量依存的に増加させた。対照群のマウスは約 30 分で新規環境に順応するが、ベンゾ(a)ピレン投与群では新規環

境に順応するまでの時間が約 60 分であった。一般的に、マウスを新規環境に入れると探索行動を示し、自発運動量は増加するため、30 分間ケージに順応させた後、被験物質を投与して自発運動量を評価する。しかし、本研究では動物の新規環境に対する順応に及ぼす内分泌かく乱物質の影響も合わせて検討する目的で、内分泌かく乱物質投与後直ちに測定を開始した。したがって、ベンゾ(a)ピレンは単回投与により、新規環境への順応を低下させ、投与初期の運動量を増加させたと考えられる。しかしながら、28 日間処置後では、対照群との間に有意差は見られなかった。これはベンゾ(a)ピレンの長期投与により、耐性が形成されたためと考えられる。また、興味深いことにビスフェノールAを 28 日間処置し、その後の経口投与による初期の自発運動量は有意に増加した。この原因として、ビスフェノールAの単回投与では変化が見られなかったことを考慮すると、蓄積効果や慢性暴露によって感受性亢進が引き起こされた可能性が考えられる。また、この結果からベンゾ(a)ピレン単回投与の場合と同様に、ビスフェノールAが新規環境への馴化を抑制する可能性が示唆された。

の機序を検討していく必要があると考えられる。

#### E. 結論

本研究により、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は慢性暴露後に初期の自発運動量をそれぞれ亢進することを明らかにした。これらの結果から、高用量のベンゾ(a)ピレンやビスフェノールAの暴露は新規環境への馴化を抑制する作用があると考えられる。

#### F. 今後の展望

妊娠期および授乳期にベンゾ(a)ピレンやビスフェノールAを暴露し、発達過程におけるこれらの効果およびそ



ゲニステインの生体影響および体内動態に関する研究

分担研究者 池上幸江 国立健康・栄養研究所 食品科学部部長

研究協力者 石見佳子 国立健康・栄養研究所 食品科学部主任研究官

研究協力者 中嶋洋子 聖徳大学生生活文化学部教授

**研究要旨**

大豆イソフラボンを妊娠、妊娠・授乳ラットの飼料に混合して投与すると、胎児数や乳児数の低下がみられ、また胎児、乳児への移行がみられたが、投与量は日本人の摂取量の 10 倍量に当たると思われる。

他方、骨粗鬆症モデル(OVX) マウスでゲニステインの皮下投与によって骨密度の改善の見られる量は、明らかなエストロゲン作用の見られる量の 1/10 であった。OVX マウスや正常マウスでもゲニステインの大量投与では子宮、肝臓、脾臓重量の増加が観察された。

**A. 研究の目的**

従来より、欧米人に比べて日本人ではある種の癌や心疾患、骨粗鬆症の罹患率が低いことが注目されてきた。その理由の一つとして大豆加工食品の摂取の関与が挙げられている。近年、とくに大豆イソフラボンが骨代謝に関係している可能性が示されている。しかし、反面では大豆イソフラボンは、植物性エストロゲンといわれ、大量摂取では内分泌攪乱作用のあることが危惧されている。すなわち、大豆イソフラボンには有効性があるとともに、リスクの可能性も存在する。

そこで、本研究ではとくに内分泌攪乱作用が強く表れる可能性の高い妊娠期、乳児への影響および骨粗鬆症モデル動物を用いて骨密度改善の有効性と子宮重量に対するリスクを検討した。

**[略語]**

OVX, 卵巣摘出手術; Gen, ゲニステイン; Dz, ダイゼイン; E2, 17  $\beta$ -エストラジオール

**B. 研究方法**

1. 妊娠 5 日目の SD 系ラットに、ゲニステイン(Gen)とダイゼイン(Dz)の混合物を飼料 0, 250, 500 mg/Kg の濃度としてそれぞれ投与し、出産直前に解剖した。
2. 妊娠 5 日目の SD 系ラットに 1 と同様に、イソフラボン混合物 0, 500, 1000 mg/Kg の飼料を投与し、出産後は各親に対する乳児数を 10 匹に制限し、引き続き同じ飼料を投与して授乳させた。
3. 8 週齢雌性 ddy マウスに卵巣摘出手術を施し(OVX), Gen 0.1~0.7 mg/day, 17  $\beta$ -エストラジオール(E2)0.01  $\mu$ g/day を 2~4 週間皮下投与した。
4. OVX マウスに 2~5 mg/day の Gen あるいは 0.1  $\mu$ g/day の E2 を 2 週間皮下投与した。
5. 8 週齢雌性正常 ddy マウスに 0.5~5 mg/day の Gen あるいは 0.1  $\mu$ g/day の E2 を 2 週間皮下投与した。

**C. 研究結果**

1. イソフラボンを含む飼料を投与された妊娠

ラットでは、胎児数の減少、胎児の体重低下が見られた。胎盤、胎児からはイソフラボンの投与量と関連した Gen と Dz が検出され、胎児へのイソフラボンの移行が認められた。

2. イソフラボンを妊娠期、授乳期を通して投与した場合もイソフラボン高投与群では、出産数の減少が見られたが、イソフラボン固有の影響かは検討が必要である。Gen, Dz の母乳中への移行が観察され、また乳児の血中からも Gen と Dz が検出された。しかし、その濃度は Gen では母親の 1/30, Dz では 1/10 に過ぎなかった。

さらに、母親の血中 T3 の有意な低下が見られたが、乳児では影響はみられなかった。

4. OVX により子宮重量は有意に低下するが、0.7 mg/day の Gen の投与では影響がなかった。一方、0.01  $\mu$ g/day の E2 の投与では sham 群のレベルまで回復した。他方、OVX によって低下した骨密度は 0.7 mg/day の Gen によって回復し、肝臓、脾臓重量への影響はなかった。この時の血中 Gen 濃度は 1 の親の血中濃度に匹敵するものであった。

4. OVX マウスに 2 mg/day の Gen を投与すると、子宮重量がわずかに増加し、5 mg/day では著しく増加した。これは 0.1  $\mu$ g/day の E2 に相当する影響であった。2~5 mg の Gen によって肝臓、脾臓重量が増加した。

5. 正常マウスの子宮重量は 5 mg/day の Gen の投与によって増加し、これは 0.1  $\mu$ g/day の E2 に相当した。また、肝臓、脾臓重量の増加も認められた。

#### D. 考察

本研究結果は、妊娠期・授乳期における Gen と Dz の大量摂取は妊娠・出産への影響と胎児、乳児へのこれら化合物の移行を示している。しかし、その投与量はかなり多量であり、日本人の血中濃度からみて通常の摂取量の 10 倍に当

たるが、今後詳細な検討が必要である。

他方、骨粗鬆症モデルマウスでは骨密度の改善が見られる投与量はエストロゲン様作用の見られる量の 1/10 であった。

最近、E2 のレセプターには  $\alpha$  と  $\beta$  があり、Gen は  $\beta$  に親和性が高く、両方に高い親和性を持つ E2 とは異なることが報告されている。また、臓器によって分布に違いがあり、Gen の作用機序はこの点から検討する必要がある。

#### E. 結論

Gen 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。また、非妊娠動物ではエストロゲン様作用が見られた。しかし、骨密度の改善など Gen には有効性もあり、日本人におけるリスクについては、詳細かつ慎重に検討する必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

① 石見佳子, 池上幸江: 大豆イソフラボンの有効性とリスク. 日本栄養食糧学会誌, 51, 294-298 (1998)

② Y. Ishimi, S. Ikegami et al: Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology*, 140, 1893-1900 (1999)

**研究要旨**

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）することが明らかになった。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はライディッチ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(LH)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。

研究協力者：田畑真佐子  
東京理科大学薬学部助手

**A. 研究目的**

ビスフェノールA, ゲニステインの胎仔期暴露のラット雄性生殖系への影響を明らかにすることを目的とした。特にテストステロン産生、性ホルモン代謝や作用に関わる遺伝子の発現変動に注目した。

**B. 研究方法**

妊娠ラット（ウイスター系）にビスフェノールAを経口投与し、胎仔への移行を調べた。ビスフェノールAの定量はGC/MSで行った。胎仔全組織を塩酸酸性メタノール中でホモジナイズした後遠心分離し、ビスフェノールAを抽出し

た。抽出液をn-hexaneで脱脂後、上清を除いた溶液に0.01N HClでメタノール含量を約15%になるように希釈し、固相カートリッジ GL-Pak PLS-2 で濃縮した。固相に吸着したビスフェノールAをメタノールで溶出し、溶媒を留去後、無水酢酸-ピリジンによりアセチル誘導体化した。その溶液を塩酸酸性下でトルエン抽出し、濃縮乾固した後、用時内部標準物質（d10-フルオランテン）を加えGC/MS-SIMで分析をした。母親ラット血漿については塩酸酸性として固相抽出し、上記に準じて分析した。

生まれた仔の精巣を摘出し、雄性生殖系に現れる変化を組織学的にまた生化学的に検討した。*in vitro*培養系で精巣ライディッチ細胞のテストステロン産生系を確立し、ビスフェノールA, ゲニステイン, その他化合物の影響を検討した。性ホルモン合成酵素及びホルモン受容体 mRNA の発現を RT-PCR 及びプリズムシークエンスディテクターで測定した。ゲニステイン妊娠期摂取の胎仔への影響の実験は国立健康・栄養研究所池上幸江部長との共同研究で行ったもので、妊娠5日目からゲニステインを含むイソフラボン飼料（イソフラボン 500 mg/kg diet, 及び

**[略語]**

LH, 黄体形成ホルモン; GC/MS, ガスクロマトグラフ/質量分析法; GC/MS-SIM, ガスクロマトグラフ/質量分析法-選択イオン検出; RT-PCR, 逆転写-複製連鎖反応; 3 $\beta$ -HSD, 3 $\beta$ -ヒドロキシルステロイド脱水素酵素 $\Delta^5$ - $\Delta^4$ 異性化酵素

1,000 mg/kg diet) で飼育された生後2週の子の精巣を供与して戴き、組織学的検討と性ホルモン合成酵素及びホルモン受容体 mRNA の発現の検討を行った。

### C. 研究結果及び考察

#### 1. ビスフェノールAの胎仔への移行

妊娠19日齢のラットにビスフェノールA (10 mg/kg 体重) を経口投与した結果、1時間後母親ラット血漿中では約33 ppb、胎仔では約12 ppbのビスフェノールAが認められた。母親ラット血漿中のビスフェノールAは時間の経過とともに著しく低下したが、胎仔では余り変化せず、24時間後でも9 ppb存在した。母親のエストロゲンは血液—胎盤関門をほとんど通過しないとされているが、かなりの量のビスフェノールAが胎仔に移行したことは、この関門通過においてエストロゲンとは異なる性質を有することが示唆された。また一旦胎仔に移行したビスフェノールAはなかなかクリアランスされないことが示唆された。なお妊娠12日齢のラットにもビスフェノールAを投与する実験を行い、1時間後には妊娠19日齢と同じように胎仔に移行することを確認している。

#### 2. ビスフェノールAの胎仔雄性生殖系への影響 (解析中)

妊娠期 (12日齢から7日間) にビスフェノールA (2  $\mu$ g/kg 体重) を経口投与したラット仔の雄性生殖機能への影響を検討中である。即ち、1日精子産生能、組織学的検討、性ホルモン合成酵素及びホルモン受容体 mRNA の発現を検討中である。

#### 3. ビスフェノールAの *in vitro* 精巣培養細胞系への影響

*in vitro* の精巣ライディッチ細胞テストステロン産生アッセイ系を確立し、ビスフェノールAの影響を検討した。ビスフェノールAはテス

トステロンの産生には影響を与えなかった。この実験系では発がんプロモーターのオカダ酸が低濃度でテストステロンの産生を抑制することが明らかになった。

#### 4. ゲニステイン妊娠期摂取の児雄性生殖系への影響

ゲニステイン (イソフラボン 500 mg/kg diet) の妊娠期投与により、生後2週の子の精巣においてLH やアンドロゲンなどホルモン受容体 mRNA の発現が2~4倍亢進することが明らかになった。生化学的解析と並行して組織学的検討を行っているが、出生間もない精巣ではコントロールにもアポトーシス細胞が観察されるなど、被験試薬の影響についてははっきりした結論を出すにはもう少し時間をかける必要がある。(国立健康・栄養研究所池上幸江部長との共同研究である)

#### 5. ゲニステインの *in vitro* 精巣培養細胞系への影響

ゲニステインは *in vitro* 精巣ライディッチ細胞培養系でテストステロン合成酵素3 $\beta$ -HSDの発現を抑制した。ゲニステインは $\beta$ 型のエストロゲンレセプターを刺激したり、チロシンキナーゼを阻害するなど多様な活性を持つことが予想され、雄性生殖系に対する影響も単純ではなさそうである。今後この点を詳細に検討していきたい。

### E. 今後の展望

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ヶ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は認められていない。現在、妊娠期に低濃度ビスフェノールA連続1週間経口投与した児の精巣ホルモン代謝系への影響を解析していると

ころであり、その結果を待つて総合的に判断したい。

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していきたい。

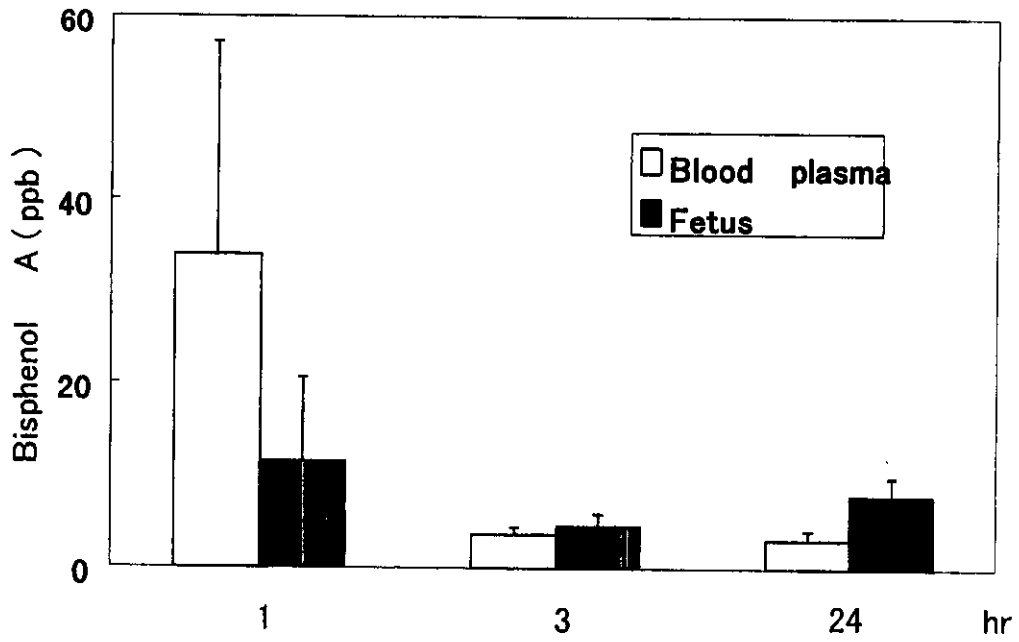
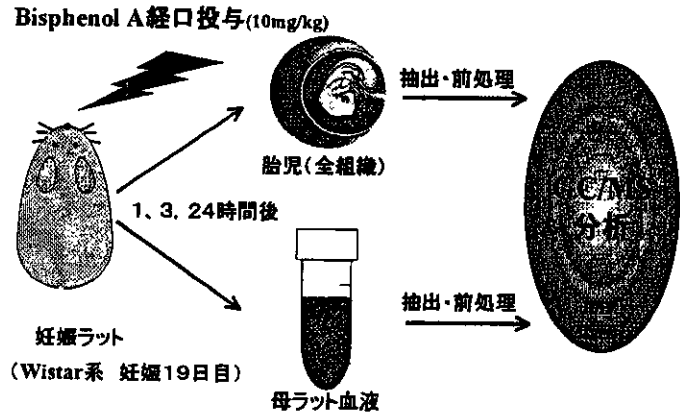


図1 妊娠期経口投与したビスフェノールAの胎児(胎仔)への移行 (n=5~7)

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

分担研究者 別府正敏 東京薬科大学教授

**研究要旨**

ビスフェノールA, ゲニステインについて, ①ラットの生殖関連行動, 生殖機能に対する影響を皮下投与により調べたところ, 明瞭な影響は認められなかった. ②鶏胚の孵化及び鶏胚の骨形成, 軟骨細胞の活性に対する影響を胚への直接注入により調べたところ, 明瞭な影響は認められなかった. ③ラット脳海馬の器官培養標本を両化合物存在下培養すると, ゲニステインは組織をやや増殖させ, また, わずかながらシナプス活動を促進する効果を示した. ④ヒト単球系培養細胞 U937 及びヒト T リンパ球系培養細胞 Jurkat への影響を *in vitro* で調べたところ, 両化合物とも両細胞のアポトーシスを増強する作用を示した. ⑤ヒトスルホトランスフェラーゼによる硫酸抱合代謝の可能性を組替え体ヒト酵素を用いて検討したところ, 両化合物とも容易に硫酸抱合を受けることが明らかとなった. ⑥ヒトグルタチオントランスフェラーゼによる代謝分解の可能性を組換え体π型ヒト酵素を用いて検討したところ, 両化合物とも本酵素によって代謝される可能性は低いことがわかった.

**A. 研究目的**

内分泌かく乱作用があると疑われているビスフェノールA, ゲニステインなどの物質について, ヒトの生殖, 発生, 神経系, 免疫系に対する影響や生体内動態に関する手がかりを得るため, 各種の *in vivo* または *in vitro* 実験系を用いて検討した.

**B. 研究方法**

1. 生殖・発生に対する影響評価はラット, 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, ラット脳の海馬のスライスを *in vitro* で器官培養し, 組織像及び神経

活動（電気的活動）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単球系培養細胞(U937)やヒト T リンパ球系培養細胞(Jurkat), エストロゲン依存性ヒト培養乳ガン細胞(MCF-7)等を用いた細胞レベルでの *in vitro* 曝露実験にて検討した.

4. ヒト体内における動態を *in vitro* 実験から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）, 組換え体ヒトステロイドホルモン合成酵素（アロマターゼ）を作製し, *in vitro* においてこれら化学物質との相互作用, 代謝を検討した.

**[略語]**

GST, グルタチオン S トランスフェラーゼ

図 1 : Gen, ゲニステイン; BPA, ビスフェノール A

図 3 : C60, フラーレン

**C. 研究結果及び考察**

1. 生殖・発生に対する影響

1) ラットの生殖関連行動及び生殖機能に対する影響

生後8週齢のWistar系正常雌雄ラットの背部皮下にビスフェノールAまたはゲニステインを1日2回、13日間投与し(0.3, 1.0, 3.0, 10.0 mg/kg), 投与終了後、生後10週齢の正常雄または雌ラットと同居させ、交尾行動、妊娠率等を膣栓、膣内精子有無により検査した。妊娠の成立に関して、投与群の雌雄はコントロール群とほとんど差が無かった。また、Wistar系妊娠ラットに対し、妊娠1日目より分娩1日前まで同様に両化合物を投与し、帝王切開後、胎児数、胎児体重、流産痕、奇形発生を観察したが、コントロール群とは差が認められなかった。以上の結果から、両化合物とも用いた用量ではラットの妊娠の成立、胎児の発育、奇形発生、流産発生に著明な影響は及ぼさないとと思われる。

## 2) 鶏胚の発生に対する影響

産卵後2日目の鶏卵の卵黄中央部に25 nmol ~ 5  $\mu$  mol のビスフェノールA(約0.1~20 mg/Kg)またはゲニステイン(約0.1~20 mg/Kg)を注入し、孵化率、孵化時の形態を調べたがコントロール群と差は認められなかった。また、同様な措置後、孵卵8日後(受精10日後)の鶏胚を取り出し、体重及び大腿骨のCa, Mg, リン酸の量を調べたがコントロール群と差はなかった。さらに、この鶏胚の軟骨細胞の*in vitro*での増殖能を検討したが、コントロールとの差はなかった。以上の結果から、両化合物は用いた用量では鶏胚の発生に著明な影響を及ぼさないとと思われる。しかしながら、受精卵形成に対する影響については、別途検討を要する。

## 2. 脳組織の*in vitro*培養系に対する影響

生後5~7日のラットの脳の海馬を摘出し、そのスライス標本を10 nM, 1  $\mu$  MのビスフェノールA及びゲニステイン存在下培養し、一週間後の組織像を光学顕微鏡で観察したところ、ゲニ

ステイン 処置標本においてやや組織の増殖の傾向が見られた。この種の変化は神経栄養因子を適用した場合にもみられるものであり、神経突起の伸張促進やグリア細胞の増殖の可能性が考えられる。そこで、この標本を電位感受性色素で染色して、光学的に電気活動を解析した。その結果、ゲニステイン1  $\mu$  M投与群では有意なシナプス活動促進効果が見られた(図1)。ビスフェノールAでは有意な影響は認められなかった。ゲニステインで認められた作用を有益作用と見るか有害作用と見るかについては、さらに詳細な今後の検討を待つ必要がある。

## 3. ヒト培養細胞の機能に対する影響

### 1) ヒト培養免疫系細胞の機能及び分化、アポトーシスに対する影響

ヒト単球系培養細胞U937及びヒトTリンパ球系培養細胞Jurkatを1 nM~10  $\mu$  MのビスフェノールAまたはゲニステインの存在下、継代培養し、増殖率、生存率、アポトーシス感受性、細胞分化能(U937のみ)、に対する影響を調べた。細胞増殖に対してはゲニステインの最高濃度(10  $\mu$  M)でのみ明らかな抑制効果が認められたが、ビスフェノールAや低濃度ゲニステインでは明らかな影響は認められなかった。細胞生存率にはいずれも影響は認められなかった。アポトーシスに対する影響を、核の断片化またはDNAの断片化で判定したところ、ビスフェノールA、ゲニステインとも、いずれの細胞に対しても明瞭なアポトーシス誘導作用を示さなかった(図2)。

しかし、アポトーシス誘導剤エトポシドで誘導されるアポトーシスに対する両化学物質の影響を調べたところ、ビスフェノールA、ゲニステインともに100 nM以上において、双方の細胞に対し増強効果を示した(図2)。従って、両化合物は弱いアポトーシス誘導活性を持つか、あ



るいは部分的な細胞活性化作用を持ち、他のアポトーシス誘導剤の作用を強めると考えられる。

U937細胞は分化誘導剤ホルボールミリステートアセテートで処理するとマクロファージに分化し接着細胞となる。この細胞分化が100 nM以上のビスフェノールAによって抑制される予備的結果を得ているが、今後、検証が必要である。

また、これら免疫細胞の重要な機能であるサイトカイン産生能や活性酸素などエフェクター分子の産生能に対する影響について検討中である。

#### 2) ヒト培養乳ガン細胞のエストロゲン依存性情報伝達系に対する影響

エストロゲン依存性の細胞増殖を示すヒト乳ガン細胞 MCF-7 を用いて、そのエストロゲン依存性細胞増殖機構を情報伝達の観点から検討した。ビスフェノールA、ゲニステインはエストラジオールより弱いものの、0.1~1  $\mu$ Mの濃度でMCF-7の増殖を促進した。細胞増殖時に変動する情報伝達系分子(転写因子 NF- $\kappa$ B の核移行, p44/42 Map kinase のリン酸化,  $\beta$ -catenin の核移行など)について、両化学物質の影響を検討したが、著明な変化は認められなかった。従って、これらの化合物のMCF-7細胞増殖促進作用にはいずれの情報伝達系も関与していないと考えられる。

#### 4. 組換え体ヒト酵素を用いた *in vitro* 相互作用及び代謝の検討

##### 1) 組換え体ヒトスルホトランスフェラーゼの作製及びそれを用いた代謝の検討

フェノール性化合物を硫酸抱合し排泄へと導くスルホトランスフェラーゼがフェノール性化合物であるビスフェノールA、ゲニステイン、ダイゼイン、ノニルフェノール、オクチルフェノールに対してどの程度硫酸抱合活性を示すか

を、組換え体ヒトスルホトランスフェラーゼ 4分子種 (hP-PST-1, hM-PST, hDHEA-ST, hEST) を作製して検討したところ、いずれの基質も  $\mu$ MレベルのKm値において、hM-PST 以外の組換え体ヒトスルホトランスフェラーゼ分子種の一つまたは複数の分子種により代謝されることが明らかになった。この結果から、ヒトにおいてスルホトランスフェラーゼが、これらの化合物の人体における不活性化に大きな役割を果たしていることが示唆された(図3)。

##### 2) 組換え体ヒトグルタチオン S トランスフェラーゼとの相互作用の検討

解毒酵素の一つであるグルタチオン S トランスフェラーゼ(GST)がビスフェノールAやゲニステインを代謝しうるかどうか組換え体ヒト $\pi$ 型 GST を用いて検討した。両化合物の組換え体ヒト $\pi$ 型 GST に対する結合性を、GST 活性に対する阻害度を測定することにより検討したところ、両者とも組換え体ヒト $\pi$ 型 GST に対する結合活性を示したが、かなり弱い結合であった(図4)。この結果から、ヒト $\pi$ 型 GST はビスフェノールA、ゲニステインの代謝にはほとんど関与しないものと推察される。しかし、 $\pi$ 型以外の基質特異性の異なる GST も存在するので、それらについても今後調べる必要がある。

##### 3) 組換え体ヒトステロイドホルモン合成酵素の作製及びその酵素機能に対する影響

男性ホルモンから女性ホルモンを合成する過程を制御する酵素アロマターゼに対するビスフェノールA、ゲニステイン等の影響を調べるためにヒトアロマターゼ遺伝子をバキュロウイルス系で発現させ、酵素タンパク質を精製した。現在、この精製酵素を用いてこれらの化合物の影響を検討している。

#### D. 今後の展望

本分担研究は異なる実験系から成る独立した複数の課題で構成されており、各研究の進展度はそれぞれ異なっている。いくつかの課題については、確たる結論を下すには1年間の研究期間は短く、今しばらくの検討期間が必要である。これらについてはさらに研究を継続し、充実した結果を得て所期の研究目的を達成したい。

本研究結果は必ずしも最終的に確定したものではないが、あえて全般的な印象を述べると次のようになる。すなわち、ビスフェノールA、ゲニステインの影響は *in vitro* では認められやすいが、*in vivo* では現れにくいように見える。*in vivo* (生体) においては代謝的な分解によってその影響が軽減されたり、他の恒常性維持機構が働くことによって影響が目に見える形では出ないに達しないのであろうと推察される。

しかしながら、内分泌攪乱作用が疑われる各種化合物の作用の解明は、基本的な、あるいは「潜在的」な作用がわかる *in vitro* の研究と、個体における最終的な影響を知るための *in vivo* の研究の両面からの研究が重要であり、今後、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、総合的に判断することが必要であろうと考える。

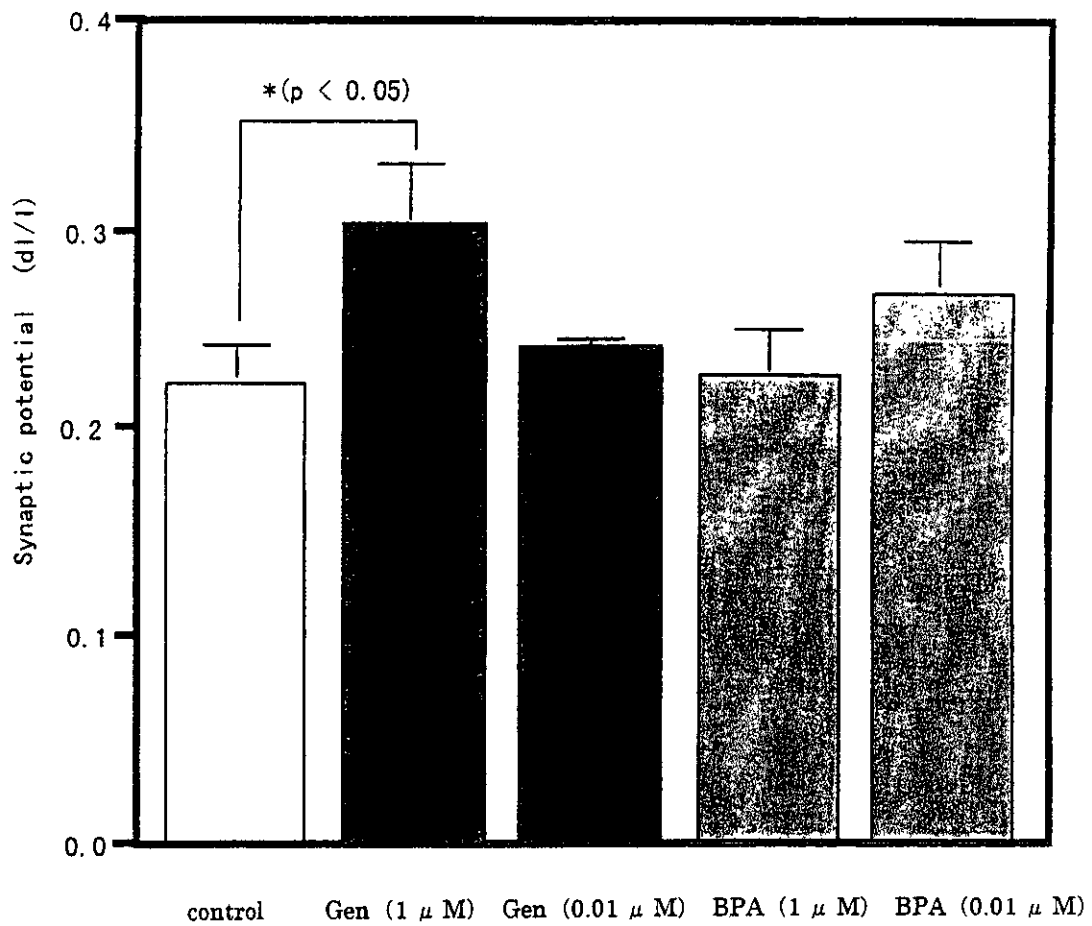


図1 光学的に計測されたラット脳海馬シナプス電位に及ぼす  
ゲニステイン(Gen)とビスフェノール A(BPA)の作用

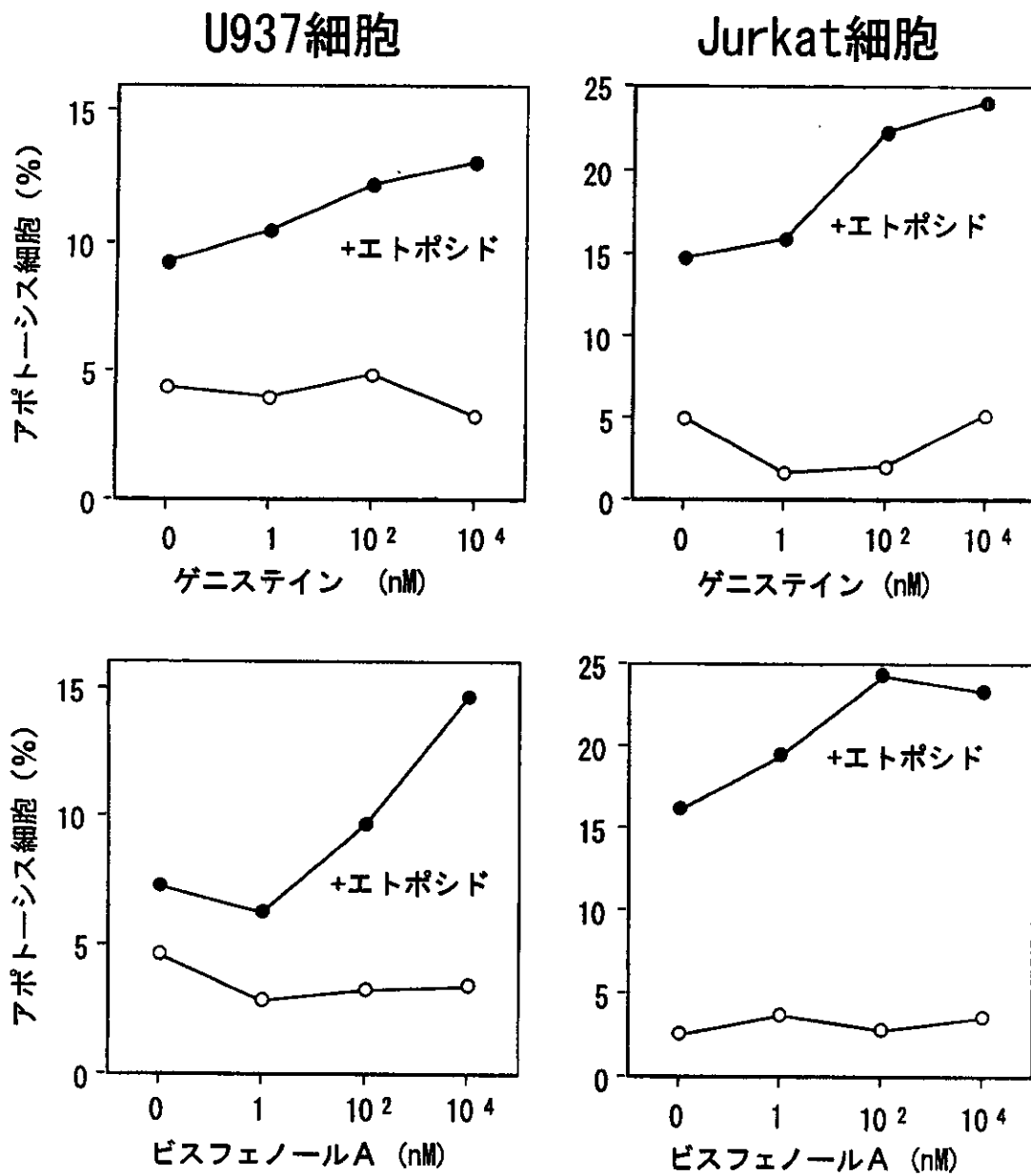


図2 ヒト単球系細胞U937及びヒトTリンパ球系細胞Jurkatのアポトーシスに及ぼすビスフェノールA, ゲニステイン曝露の影響 (曝露期間4日間)