

平成11年度厚生科学研究費補助金  
(生活安全総合研究事業)  
研究成果報告書

内分泌かく乱化学物質の胎児，幼児への  
影響等に関する研究  
(H11-生活-019)

主任研究者 白井 智之  
(名古屋市立大学医学部)

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

雄生殖器系に及ぼす影響

分担研究者 白井 智之 名古屋市立大学医学部教授

研究要旨

本研究では内分泌かく乱作用が疑われている女性ホルモン様作用を持つビスフェノール A の雄性生殖器とくに前立腺の形態発生、分化および腫瘍発生に対する影響を感受性の高い胎児・乳児期への影響をみるために、F344 妊娠ラット妊娠 0 日から離乳までビスフェノール A を 0, 7.5 および 120 mg/kg/day の投与量で毎日強制経口投与した。母獣動物の妊娠期間、出産児数および死産児数のいずれにおいても影響はなかった。10 週齢児の精巣の精子数が 120 mg/kg 投与群で有意に低値を示した。精子形態異常の発現および精子運動率に有意な差は認められなかった。前立腺発がん物質と DNA の付加体形成には免疫染色上明らかな変化はなかった。現在、細胞増殖活性とアポトーシスについては検討中である。現在ビスフェノール A の最大投与量を 120mg/kg./day として 5 段階濃度で胎内・授乳期曝露し、前立腺発がんへの影響を 60 週間の DMAB 発がんモデルを用いて検討中である。

A. 研究の目的

近年、環境中に存在する内分泌かく乱化学物質が、野生ならびに海生動物などの生態に影響を与えていることが指摘されている。また、ヒトにおいても女性生殖器、男性生殖器、甲状腺、視床下部・下垂体等への影響が懸念されている。しかし、環境中の内分泌かく乱作用が指摘されている化学物質の胎児期、乳児期曝露により、出生児が成長したのちに、学習・精神障害、発がん、生殖機能の異常などが発現する可能性

がある。本研究では内分泌かく乱作用が疑われている女性ホルモン様作用を持つビスフェノール A の雄性生殖器とくに前立腺の形態発生、分化および腫瘍発生に対する影響を感受性の高い胎児・乳児期のラットに投与して、実験的に追究することにある。

B. 研究方法

2つの実験からなる。1) 11 週齢 F344 ラットを交配させ、交尾を確認した雌動物に妊娠 0 日から離乳までビスフェノール A

を 0, 7.5 および 120 mg/kg/day の投与量で毎日強制経口投与した。分娩時、出生児数を確認し、生後 4 日に 1 腹 8 匹になるように淘汰した。児動物は生後 22 日に離乳させ、離乳 2 日、7 日および 10 週後に屠殺剖検し、生殖器系の器官重量、BrdU 標識率、アポトーシスについて検討するとともに前立腺発がん物質である DMAB と PhIP の前立腺上皮細胞 DNA との付加体形成についても検討した。また 10 週後屠殺時には精子検査も実施した。2) 予備実験の結果を踏まえて長期間の前立腺、精囊に対するビスフェノール A の発がん修飾作用を 60 週間の DMAB 発がんモデルを用いて検討する。ビスフェノール A の投与濃度は 0.006, 7.5, 30 および 120 mg/kg/day とする。

#### (倫理面への配慮)

動物実験は本大学の動物委員会の承諾を得て、動物愛護に則ったプロトコールに従って行った。

### C. 研究結果

妊娠および授乳期間中の母獣動物の体重および飼料摂取量に有意な差は認められなかった。児動物の離乳後の体重変化で有意な差はなかったが、離乳 10 週後の児動物の 7.5 mg/kg 投与群で前立腺背側葉の相対重量が有意な高値を示した。母獣動物の妊娠期間、出産児数および死産児数のいずれにおいても群間に有意な差は認められなかった。精子検査においては、精巢の精子数が 120 mg/kg 投与群で有意に低値を示した。

精子形態異常の発現および精子運動率に有意な差は認められなかった。DMAB および PhIP-DNA 付加体形成については免疫染色上明らかな差はなかった。現在、細胞増殖活性とアポトーシスについては検討中である。

### D. 考察

前立腺など雄性副生殖器には形態学的変化は認めなかったものの、離乳 10 週後の精子検査において精子数の有意な減少があった。最高濃度での変化であるが、追試が必要と考えられる。次年度はビスフェノール A 前処置された動物の前立腺発がん物質への感受性を前立腺の異型過形成および癌の発生を指標とした実験によって追究する。

### E. 結論

F344 ラットの妊娠期及び授乳期にビスフェノール A を投与したところ、妊娠期間、出産児数および死産児数のいずれに対しても影響なく、また出生児においても前立腺には著変は認められなかった。ただし最高濃度では精子数に有意な減少をみとめた。この結果から長期発がん実験にはビスフェノール A の最高濃度は 120mg/kg/day と結論づけた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Iwasaki, S., Kato, K., Mori, T., Takahashi, S., Futakuchi, M., and Shirai, T.: Development of

androgen-independent carcinomas from androgen-dependent preneoplastic lesions in the male accessory sex organs of rats treated with 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl and testosterone propionate. *Jpn. J. Cancer Res.* 90: 23-30, 1999.

Shirai, T.: Commentary: Oncosis and apoptosis: Two faces of necrosis in a new proposal to clear up the confusion regarding cell death. *Toxicol. Pathol.* 27: 495-496, 1999.

Shirai, T., Cui, L., Takahashi, S., Futakuchi, M., Asamoto, M., Kato, K., and Ito, N.: Carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in the rat prostate and induction of invasive carcinomas by subsequent treatment with testosterone propionate. *Cancer Lett.* 143: 217-221, 1999.

Hirose, M., Takahashi, S., Ogawa, K., Futakuchi, M., Shirai, T., Shibutani, M., Uneyama, C., Toyoda, K., and Iwata, H.: Chemoprevention of heterocyclic amine-induced carcinogenesis by phenolic compounds in rats. *Cancer Lett.* 143: 173-178, 1999.

Hirose, M., Fukushima, S., Imaida, K., Ito, N., and Shirai, T.: Modifying effects of phytic acid and  $\gamma$ -oryzanol on the promotion stage of

rat carcinogenesis. *Anticancer Res.* 19: 3665-3670, 1999.

Hirose, M., Takahashi, S., Ogawa, K., Futakuchi, M., and Shirai, T.: Phenolics: Blocking agents for heterocyclic amine-induced carcinogenesis. *Fd. Chem. Toxic.* 37: 985-992, 1999.

Kawabe, M., Lin, C., Kimoto, N., Sano, M., Hirose, M., Shirai, T.: Modifying effects of propolis on 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)-promotion of rat hepatocarcinogenesis and in a female rat 2-stage carcinogenesis model after multiple carcinogen initiation. *Nutrition and Cancer*, in press.

## 2. 学会発表

澤村文子, 佐野真士, 田中 光, 高橋 智, 二口 充, 白井智之, DMAB ラット前立腺癌発生に対する PhIP による促進作用の検討, 平成 11 年 1 月, 水戸

崔 林, 二口 充, 今井田克己, 佐野真士, 加藤浩司, 白井智之, DMAB 誘発ラット前立腺癌に対する植物由来女性ホルモン活性物質 genistin/genistein および daidzin/daidzein の抑制物質, 平成 11 年 1 月, 水戸

加藤浩司, 高橋 智, 今井田克己, 崔 林, 曹 永晩, 二口 充, 白井智之, 加熱分解

産物 PhIP によるラット前立腺癌の発生と大量テストステロンの促進作用, 平成 11 年 1 月, 水戸

Mitsuru Futakuchi, Koji Kato, Lin Cui, Satoru Takahashi, Satoshi Sugiura, Toshiya Toda and Tomoyuki Shirai, Suppressive effects of dietary genistein and daidzein on rat prostate carcinogenesis, 第 10 回前立腺癌ワークショップ, 平成 11 年 9 月, 東京

加藤浩司, 池田佳久, 朝元誠人, 高橋 智, 今井田克己, 村越倫明, 大嶋俊二, 西野輔翼, 白井智之, DMAB 誘発ラット前立腺癌に対する lycopene および curcumin の用量依存的効果の検討, 平成 11 年 9 月, 広島

加藤俊男, 玉野静光, 二口 充, 萩原昭裕, 朝元誠人, 河部真弓, 広瀬雅雄, 白井智之, DMAB ラット前立腺癌に testosterone と estrogen のによる発癌修飾作用の検討, 平成 11 年 9 月, 広島

朝元誠人, 高橋 智, 池田佳久, 加藤浩司, 崔 林, 外岩戸尚美, 白井智之, PhIP による発癌作用の用量相関性と高脂肪食の影響, 平成 11 年 9 月, 広島

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

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

子宮の及ぼす影響

分担研究者 前川昭彦 (財)佐々木研究所 病理部 部長

研究要旨

低用量の bisphenol A(BPA)を、妊娠・哺乳期間にわたり母ラットに強制経口投与し、仔の雌性生殖器系に対する影響を検討した。その結果、母動物には BPA 投与による影響は観察されず、仔についても、これまでのところ BPA 投与による影響は認められていない。

A. 研究目的

エストロゲン作用を有する内分泌攪乱物質の胎児期および新生児期曝露は生殖器系に非可逆的で重篤な影響を及ぼすことが懸念されている。しかし、diethylstilbestrol (DES) など一部の化学物質については胎児期・新生児期曝露と生殖器系障害との関連が指摘されているものの、多くの内分泌攪乱化学物質についてはまだ殆ど報告されていない。

今回の研究の目的は、内分泌攪乱化学物質のうち、エストロゲン作用を有するために生殖器系への影響が懸念されている化学物質について、環境中に存在してヒトが曝露される可能性のある低用量を胎児期および新生児期ラットに曝露し、雌性生殖器への影響、ならびに子宮発癌への修飾作用について検討することである。

B. 研究方法

被験物質として、bisphenol A(BPA)を用いた。

予備試験として、BPA の Donryu ラットでのエストロゲン作用を確認するため、成熟卵巢摘出動物に BPA を 11 日間にわたり皮下(20～500mg/kg)あるいは経口(20～1,000mg/kg)投与した。また、1～15 日齢の新生児動物に対して 20～1000mg/kg の BPA を隔日の皮下投与を行った。

本試験では、規則正しい 4 日性周期を示し、子宮癌好発系でありその発生に相対的エストロゲン高値が関与している Donryu ラットを用いた。BPA の投与量として、食品缶からの最大溶出量(100ppb)を基とした 1 日当たりの摂取量 0.006mg/kg と、その 1000 倍量の 6mg/kg(ほぼ製品中の最大含有量に相当)を選び、母動物の妊娠および哺乳の全期間(約 6 週間)にわたり強制経口投与した。得られた雌の仔については発育・分化を観察し、11 週齢にて発癌剤を子宮腔内に単回投与して 15 ヶ月齢まで経時的に検査し、子宮癌を含む種々雌性生殖器病変の発生状況および内分泌環境の

変化を検討する。また、比較のため陽性対照としてエストロゲンおよび大量の BPA の新生児期曝露(皮下投与)群を設けた。

### C. 結果

予備試験の結果、BPA の大量曝露した成熟卵巣摘出ラットにおいて子宮重量の増加あるいは膣スメアの estrus conversion が観察された (経口投与 : 1000mg/kg/day 以上、皮下投与 : 20mg/kg/day 以上)。新生児期大量曝露では膣スメアの持続発情、生殖器の異常などが観察された (生後 1 ~ 15 日 500mg/kg/day 以上)。

本試験では、いずれの投与群も母動物には投与に関連した臨床症状、体重変化および病理学的異常は認められず、産仔数、生存仔数、仔の性比および妊娠期間も対照群と同様であった。

仔については、外生殖器の発育、膣開口時期および成熟までの成長曲線などに異常は認められず、5 ヶ月齢の現在まで、体重変化および性周期に異常は認められていない。陽性対照のエストロゲンおよび大量の BPA 新生児期曝露動物では、膣開口時期の早期化、持続発情の出現などが観察された。

### D. 考察

予備試験の結果、BPA の大量曝露は成熟卵巣摘出ラットに対し明らかなエストロゲン作用を示し、新生児期大量曝露では estrogenization の所見が観察された。

本試験では、いずれの投与群も母動物には投与に関連した異常を認めらなかったことから BPA の投与は繁殖能を含め、母動

物に何らの影響も与えないと考えられた。

仔については、外表検査において外生殖器に何ら発育・分化の異常が認められず、その後の成長においても 5 ヶ月齢の現在まで、体重変化および性周期に全く異常が認められないことから、今までのところ、低用量 BPA の経口投与は仔動物においても重篤な影響を及ぼしていないと考えられた。陽性対照のエストロゲンおよび大量の BPA 新生児期曝露動物では、estrogenization の所見が観察された。

現在 BPA の仔動物への移行の有無について検査中であり、かつ本試験は平成 13 年 1 月まで飼育・観察を継続する予定である。

### E. 結論

エストロゲン様作用を有する代表的な内分泌攪乱化学物質である bisphenol A(BPA)の大量皮下投与は、卵巣摘出あるいは新生児期雌 Donryu の生殖器にエストロゲン作用を示した。ヒトが曝露される可能性のある低用量 (6 および 0.006mg/kg) を、妊娠・哺乳期間にわたり母ラットに強制経口投与し、仔の雌性生殖器系に対する影響について検討した結果、母動物には繁殖成績を含め BPA 投与による影響は観察されなかった。仔については、これまでのところ外生殖器の発育・分化および成長曲線に投与の影響は認められず、成熟後の性周期および体重の変化についても、何ら影響は認められていない。一方、陽性対照として設けたエストロゲンおよび大量の BPA を新生児期に投与した動物では、膣開口の早期化、持続発情などの estrogenization の所見が観察された。本

実験は平成 12 年 3 月現在進行中であり、引き続き BPA の子宮癌を含む各種雌性生殖器官病変の発生に及ぼす影響について検討する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Maekawa, A. et al. Uterine carcinogenesis by chemicals/hormones in rodents (review). *J. Toxicol. Pathol.*, 12:1-12, (1999).

Katsuda, S., Maekawa, A. et al. Estrogen receptor mRNA in uteri of normal estrous cycling and ovariectomized rats by in situ hybridization. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 221:207-214 (1999).

Kitamura, T., Maekawa, A. et al. Transplacental administration of diethylstilbestrol (DES) causes lesions in female reproductive organs of Donryu rats, including endometrial neoplasia. *Cancer Lett.*, 141:219-228(1999).

Tanoguchi, Maekawa, A. et al. K-Ras point mutations in spontaneously occurring endometrial adenocarcinomas in the Donryu rat. *Tohoku J. Exp. Med.*, 189:87-93 (1999).

Katsuda, S., Maekawa, A. et al. Dose and treatment duration-related effects of p-tert-octylphenol on female rats. *Reprod. Toxicol.*, 14:(2000), in press.

Nagaoka, T., Maekawa, A. et al., Effects of reproduction on spontaneous development of

endometrial adenocarcinomas and mammary tumors in Donryu rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91:(2000), in press.

### 2. 学会発表

麻生 直、前川昭彦ら、28 日反復投与によるノニルフェノールおよびアトラジンのラット雌性生殖器官系に対する影響。第 26 回日本トキシコロジー学会、ワークショップ、1999 年 7 月、札幌。

勝田真一、前川昭彦ら、p-tert-Octylphenol の新生仔期曝露による雌ラット生殖器官系への影響。第 26 回日本トキシコロジー学会 (ワークショップ)、1999 年 7 月、札幌。

吉田 緑、前川昭彦ら、p-tert-Octylphenol の新生仔期曝露が雄ラットの生殖器官系に与える影響。第 26 回日本トキシコロジー学会、ワークショップ、1999 年 7 月、札幌。

安藤 進、前川昭彦ら、ENNG によるラット子宮内膜癌の誘発に及ぼす高動物性脂肪食の影響。第 58 回日本癌学会総会、1999 年 9 月、広島。

高橋正一、前川昭彦ら、ENNG 誘発マウス子宮発癌におよぼすエストロゲン及びその代謝ステロイドのプロモーション作用の検討。第 58 回日本癌学会総会、1999 年 9 月、広島。

勝田真一、前川昭彦ら、正常性周期を示すラット及び新生仔期 p-tert-octylphenol 曝露により持続発情を来した雌ラット子宮内膜におけるエストロゲンレセプター  $\alpha$  mRNA



の局在変化。第 16 回日本毒性病理学会、  
2000 年 1 月、岐阜。

吉田 緑、前川昭彦、内分泌攪乱化学物質、  
特にエストロゲン様作用を有する化学物質  
の雌性生殖器への影響。第 16 回日本毒性  
病理学会(シンポジウム)、2000 年 1 月、岐  
阜。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

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

精巣に及ぼす影響及び発がんに及ぼす影響

分担研究者 福島 昭治 大阪市立大学医学部教授

研究要旨：Styrene monomer、Styrene dimer および Styrene trimer の低用量におけるラット肝発がん性に及ぼす影響を検討した。また Bisphenol A の経胎盤あるいは授乳曝露による新生児マウスの精巣に及ぼす影響について検討した。Styrene monomer の低用量経口投与は肝発がんに影響を及ぼさなかった。Styrene dimer、Styrene trimer の肝発がん性については検討中である。また、Bisphenol A の 400mg/kg 経口投与は離乳後の新生児マウス体重の低値をもたらした。現在実験継続中である。

A. 研究目的

ポリスチレン中には Styrene monomer、Styrene dimer および styrene trimer が存在しており内分泌攪乱化学物質であるとの疑いがもたれている。そこで、これらのヒト曝露レベルを考慮した低用量をラットに経口投与し、肝発がんならびにその修飾作用を検討する。さらに精巣および精巣上体の精子数についても検討する。また、ポリカーボネートに存在する Bisphenol A を母マウスに投与し、経胎盤あるいは授乳により曝露された出生児の精巣に対する影響を検討する。

B. 研究方法

【実験 1】6 週齢 F344 雄ラットに、Diethylnitrosamine (DEN) を 200mg/kg の用量で 1 回腹腔内に投与し、肝発癌に対するイニシエーション処置とした。その 2 週間後より被験物質である Styrene monomer をヒト曝露量を考慮し、0.0006, 0.006 および 0.6mg/kg/day の用量で 6 週間（6 日/週）強制経口投与し、実験開始 8 週間後に屠殺剖検した。対照群には同様に DEN を処置した後、同期間に溶媒であるコーンオイルを強制経口投与した。なお、実験開始 3 週間後に、全動物に対し 2/3 肝部分切除術を施行した。肝臓の前がん病変のマーカである胎盤型 glutathione S-transferase

(GST-P)陽性細胞巢を免疫組織学的に染色し、その個数および面積をイメージアナライザーを用いて計測し、それらを定量的に解析した。精巣および精巣上体の精子数測定についても行った。

【実験2】実験1と同様の方法を用いてStyrene dimerおよびStyrene trimerの低用量におけるラット肝発がんに及ぼす影響を検討した。Styrene dimerおよびStyrene trimerはそれぞれ0.0006, 0.006および0.6 mg/kg/dayの用量投与した。また、DENを処置しない群をもうけStyrene dimerおよびStyrene trimerをそれぞれ0.6 mg/kg/dayの用量で投与した。対照群には溶媒であるコーンオイルを強制経口投与した。なお、精巣および精巣上体の精子数測定はDENを処置しない群についておこなった。

【実験3】11週齢のCrj:CD-1(ICR)マウスを交配させ、妊娠を確認した雌動物に妊娠0日から出生児の離乳までの間、bisphenol Aを0, 0.05, 50および400 mg/kg/dayの用量で連日強制経口投与した。分娩22日後に雄児動物を離乳し、各群25匹ずつ確保した。児動物は10週齢時に屠殺剖検し、肉眼的病理学的検査を実施し、精巣および精巣上体

の精子数測定をおこなう。また、その他の生殖器系器官・組織についてホルマリン固定をおこなう。

### C. 研究結果

【実験1】Styrene monomer投与群は体重、肝重量に関し、対照群との間に差を認めなかった。肝GST-P陽性細胞巢の個数および面積はStyrene monomer投与において対照群との間に差を認めなかった(表1)。精巣および精巣上体の精子数についても差を認めなかった(表2)。

【実験2】Styrene dimerおよびStyrene trimer投与群は体重に関し、対照群との間に差を認めなかった。精巣および精巣上体の精子数についても差を認めなかった。現在、肝GST-P陽性細胞巢について検索中である。

【実験3】Bisphenol A投与群において母獣の体重、分娩児数に対照群との間に差を認めなかった。離乳後の児動物の体重は400 mg/kg群で低値を示した。現在、児動物の観察は7週齢を経過中である。

### D. 考察

ラット肝の前がん病変のマーカーであるGST-P陽性細胞巢の定量的変動を指標として化学物質のラット肝発がん性を予測する本試験法により

ヒトが曝露されるレベルでの Styrene monomer は GST-P 陽性細胞巢の発現に影響を与えなかった。このことから、Styrene monomer の高用量投与は肝発がんを抑制することが強く示唆されたのに反し（平成 10 年度発表）、ヒト曝露レベルを考慮したその低用量投与は肝発がん性に何ら影響を及ぼさないと結論された。また本投与量において精子数に影響が認められなかったことより、Styrene monomer は精子形成能に影響しないことが示された。さらに Styrene dimer および Styrene trimer はいずれにおいても精子数に影響を及ぼさなかった。現在、Styrene dimer および Styrene trimer の肝発がんには及ぼす影響について検索中である。

さらに、Bisphenol A の経胎盤あるいは経授乳曝露における精巣、前立腺およびその他の生殖器系臓器における影響については現在検索中である。

#### E. 展望

Styrene monomer はヒトが曝露されるレベルでは肝発がんには何ら影響を及ぼさないことが明かとなった。今後、ヒトがより曝露されると考えられる Styrene dimer および Styrene trimer の肝発がん作用に

ついて早急に結論を出す必要がある。

また、内分泌攪乱化学物質の胎児期および授乳期曝露による成長期への影響を明かにすることは極めて重要で、本研究において Bisphenol A の作用を明かにすることにより、内分泌攪乱物質のヒトへのリスクアセスメントに対する科学的な情報の一端を与えることができよう。

#### F. 結論

Styrene monomer のラットへの低用量経口投与は肝発がんに影響を及ぼさなかった。Styrene dimer および trimer のそれについては現在検討中である。さらに、Bisphenol A, 400mg/kg の強制経口投与による経胎盤、授乳曝露は離乳後の新生児マウス体重の低値をもたらした。現在、実験継続中である。

#### G. 研究発表

(論文発表)

1. Fukushima, S., Wanibuchi, H., Yamamoto, S.: Urinary bladder cancer. In: Carcinogenicity. (eds.) Kitchin, K.T., Marcel Dekker, Inc., pp.627-652, 1999.
2. Chen, T.-X., Wanibuchi, H., Murai, T., Kitano, M., Yamamoto, S., Fukushima, S.: Promotion by sodium L-ascorbate in rat two-stage urinary bladder carcinogenesis is dependent on the interval of administration., Jpn. J. Cancer Res., 90, 16-22, 1999.
3. Ichihara, T., Wanibuchi, H., Lee,

- C.C.R., Nakajima, K., Yano, Y., Taniyama, T., Otani, S., Shimizu, Y., Fukushima, S.: Lack of inhibitory effects of the Ju-myo protein on development of glutathione S-transferase placental form-positive foci in the male F344 rat liver., *J. Toxicol. Sci.*, 24, 27-31, 1999.
4. Higashi, S., Murai, T., Mori, S., Kamoto, T., Yoshitomi, M., Arakawa, Y., Makino S., Fukushima, S, Yoshida, O., Hiai, H.: Host genes affecting survival period of chemically induced bladder cancer in mice., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 124, 670-676, 1998.
5. Romanenko, A., Lee, C.C.R., Yamamoto, S., Hori, T., Wanibuchi, H., Zaparin, W., Vinnichenko, W., Vozianov, A., Fukushima, S.: Urinary bladder lesions after the chernobyl accident: immunohistochemical assessment of p53, proliferating cell nuclear antigen, cyclin D1 and p21<sup>WAF1/Cip1</sup>., *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 144-153, 1999.
6. Yamamoto, S., Min, W., Lee, C.C.R., Salim, E.I., Wanibuchi, H., Sukata, T., Fukushima, S.: Enhancement of urinary bladder carcinogenesis in nullizygous p53-deficient mice by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine., *Cancer Lett.*, 135, 137-144, 1999.
7. Morimura, K., Yamamoto, S., Murai, T., Mori, S., Chen, T., Wanibuchi, H., Fukushima, S.: LOH and mutational analysis of p53 alleles in mouse urinary bladder carcinomas induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine., *Carcinogenesis*, 20, 715-718, 1999.
8. Hagiwara, A., Murai, T., Yoshino, H., Goshima, H., Mori, S., Takashima, A., Shirai, T., Fukushima, S.: Hepatocarcinogenic activity of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in rats is not modified by sodium L-ascorbate., *Terato. Carcino. Mut.*, 19, 33-42, 1999.
9. Lee, C.C.R., Fukushima, S.: Alterations in cyclin D1, p53, and the cell cycle related elements: Implications for distinct genetic pathways of urinary bladder carcinogenesis., *Urol. Oncol.*, 4, 58-72, 1999.
10. Morimura, K., Salim, E.I., Yamamoto, S., Wanibuchi, H., Fukushima, S.: Dose-dependent induction of aberrant crypt foci in the colons but no neoplastic lesions in the livers of heterozygous p53-deficient mice treated with low dose 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline., *Cancer Lett.*, 138, 81-85, 1999.
11. Youssef, E.M., Wanibuchi, H., Mori, S., Salim, E.I., Hayashi, S., Fukushima, S.: Elevation of urinary enzyme levels in rat bladder carcinogenesis., *Carcinogenesis*, 20, 1247-1252, 1999.
12. Otori, K., Sugiyama, K., Fukushima, S., Esumi, H.: Expression of the cyclin D1 gene in rat colorectal aberrant crypt foci and tumors induced by azoxymethane., *Cancer Lett.*, 140, 99-104, 1999.
13. Ichihara, T., Wanibuchi, H., Taniyama, T., Okai, Y., Yano, Y., Otani, S., Imaoka, S., Funae, Y., Fukushima, S.: Inhibition of liver glutathione S-transferase placental form-positive foci development in the rat hepatocarcinogenesis by *Porphyra tenera* (Asakusa-nori)., *Cancer Lett.*, 141, 211-218, 1999.
14. Yamamoto, S., Romanenko, A., Wei, M., Masuda, C., Zaparin, W., Vinnichenko, W., Vozianov, A., Lee, C.C.R., Morimura, K., Wanibuchi, H.,

- Tada, M., Fukushima, S.: Specific p53 gene mutations in urinary bladder epithelium after the Chernobyl accident, *Cancer Res.*, 59, 3606-3609, 1999.
15. Oliveira, S.V., de Camargo, J.L.V., Cardoso, P.R., Padovani, C.R., Fukushima, S.: Effects of uracil calculi on cell growth and apoptosis in the BBN-initiated wistar rat urinary bladder mucosa., *Teratogenesis Carcinog. Mutagen.*, 19, 293-303, 1999.
16. Chen, T., Na, Y., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Lee, C.C.R., Fukushima, S.: Loss of heterozygosity in (Lewis×F344)F<sub>1</sub> rat urinary bladder tumors induced with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine followed by dimethylarsinic acid or sodium L-ascorbate., *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 818-823, 1999.
17. Lee, C.C.R., Ichihara, T., Yamamoto, S., Wanibuchi, H., Sugimura, K., Wada, S., Kishimoto, T., Fukushima, S.: Reduced expression of the CDK inhibitor p27<sup>KIP1</sup> in rat two-stage bladder carcinogenesis and its association with expression profiles of p21<sup>WAF1/Cip1</sup> and p53., *Carcinogenesis*, 20, 1697-1708, 1999.
18. Wei, M., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Li, W., Fukushima, S.: Urinary bladder carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats., *Carcinogenesis*, 20, 1873-1876, 1999.
19. Lee, C.C.R., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Hirose, M., Hayashi, Y., Fukushima, S.: Case Report; Molecular cytogenetic identification of *cyclin D1* gene amplification in a renal pelvic tumor attributed to phenacetin abuse., *Pathology International*, 49, 648-652, 1999.
20. Fukushima, S.: Low-dose carcinogenicity of a heterocyclic amine, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline:relevance to risk assessment., *Cancer Lett.*, 143, 157-159, 1999.
21. Salim, E.I., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Morimura, K., Mori, S., Makino, S., Nomura, T., Fukushima, S.: Low-dose-dependent carcinogenic potential of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the immunodeficient (SCID) mouse colon., *Nutrition and Cancer*, 34, 220-228, 1999.
22. Chen, T., Wanibuchi, H., Wei, M., Morimura, K., Yamamoto, S., Hayashi, S., Fukushima, S.: Concentration dependent promoting effects of sodium L-ascorbate with the same total dose in a rat two-stage urinary bladder carcinogenesis., *Cancer Lett.*, 146, 67-71, 1999.
23. Chen, T., Na, Y., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Lee, C.C.R., Fukushima, S.: Differences of promoting activity and loss of heterozygosity between dimethylarsinic acid and sodium L-ascorbate in F<sub>1</sub> rat urinary bladder carcinogenesis. In: *Arsenic exposure and health effects.* (eds.) Chappell, W.R., Abernathy, C.O., Calderon, R.L., pp.263-266, 1999.
24. Hagiwara, A., Miyata, E., Tamano, S., Sano, M., Masuda, C., Funae, Y., Ito, N., Fukushima, S., Shirai T.: Non-carcinogenicity, but dose-related increase in preneoplastic hepatocellular lesions, in a two-year feeding study of phenobarbital sodium in male F344 rats., *Food and Chem. Toxicol.*, 37, 869-879, 1999.
25. Sukata, T., Ozaki, K., Uwagawa, S., Seki, T., Wanibuchi, H., Yamamoto, S.,

Okuno, Y., Fukushima, S.: Organ-specific, carcinogen-induced increases in cell proliferation in *p53*-deficient Mice., *Cancer Res.*, 60, 74-79, 2000.

26. Yamamoto, S., Tada, M., Lee, C.C.R., Masuda, C., Wanibuchi, H., Yoshimura, R., Wada, S., Yamamoto, K., Kishimoto, T., Fukushima, S.: *p53* status in multiple human urothelial cancers: assessment for clonality by the yeast *p53* functional assay in combination with *p53* immunohistochemistry., *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 181-189, 2000.

27. Taniyama, T., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Yano, Y., Otani, S., Nishizawa, Y., Morii, H., Fukushima, S.:

Chemopreventive effect of 24*R*,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in *N,N*-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis., *Carcinogenesis*, 21, 173-178, 2000.

28. Salim, E.I., Wanibuchi, H., Morimura, K., Kim, S., Yano, Y., Yamamoto, S., Fukushima, S.: Inhibitory effects of 1,3-diaminopropane, an ornithine decarboxylase inhibitor, on rat two-stage urinary bladder carcinogenesis initiated by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine., *Carcinogenesis*, 21, 195-203, 2000.

(学会発表)

1. 榊田周佳、鰐淵英機、市原敏夫、須方督夫、福島昭治：ラット肝中期発癌試験法（伊東法）を用いた $\alpha$ -benzene hexachloride ( $\alpha$ -BHC)の発癌修飾作用の検討。第15回日本毒性病理学会, 1月28-29日, 水戸, 1999 (第15回日本毒性病理学会講

演要旨集 P-39, p.47)

2. 西川隆之、鰐淵英機、森村圭一朗、魏 民、榊田周佳、北野光昭、須方督夫、福島昭治：ラット肝中期発癌試験（伊東法）を用いた dieldrin の発癌修飾作用。第58回日本癌学会総会, 9月28-10月1日, 広島, 1999 (日本癌学会総会記事 1263, p.424)

表1 .styrene monomer のラット肝 GST-P 陽性細胞巢の発生に及ぼす影響

群	処置		用量 (mg/kg)	有効動物数	GST-P 陽性細胞巢	
	DEN	被験物質			数/cm <sup>2</sup>	面積 (mm <sup>2</sup> )/cm <sup>2</sup>
1	+	STYRENE MONOMER	0	16	8.41±2.50	0.74±0.28
2	+	STYRENE MONOMER	0.0006	16	8.35±2.23	0.80±0.30
3	+	STYRENE MONOMER	0.006	16	8.65±2.08	0.67±0.23
4	+	STYRENE MONOMER	0.6	16	9.03±2.60	0.84±0.44

表2 .styrene monomer の精子数に及ぼす影響

群	処置		用量 (mg/kg)	有効動物数	精子数 (×10 <sup>7</sup> /ml)	
	DEN	被験物質			精巢	精巢上体
1	+	STYRENE MONOMER	0	8	2.38±0.31	2.61±0.26
2	+	STYRENE MONOMER	0.0006	8	2.23±0.41	2.54±0.44
3	+	STYRENE MONOMER	0.006	8	2.33±0.22	2.69±0.47
4	+	STYRENE MONOMER	0.6	8	2.10±0.27	2.38±0.17



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

ゲニステインの胎児、新生児に及ぼす影響

分担研究者 池上 幸江 大妻女子大学 教授

**研究要旨** 様々な生活習慣病予防におけるゲニステインの効果が推測されており、最近ではそうした観点から、大豆イソフラボン、あるいはゲニステインが健康食品などの形態でも広く利用される傾向がみられる。しかし、ゲニステインはエストロゲン様作用をもっており、内分泌かく乱作用が懸念されている。日本人は大豆・大豆加工品の摂取量が多く、ゲニステインの摂取量や摂取時期による安全性の検討が必要である。

これまでの我々の研究から、ゲニステインは骨粗鬆症の改善に有効であり、その効果はかならずしもエストロゲンと同じでないことを明らかにしてきた。しかし、母乳を介して乳児に移行すること、また妊娠期や授乳期に母親が過剰にゲニステインを摂取すると、母親の血中甲状腺ホルモン濃度の低下と体重増加の抑制、妊娠への影響の可能性、子どもでは成長抑制、臓器重量への影響、子どもの骨形成の抑制などが観察された。

A. 研究目的

癌、骨粗鬆症、循環器疾患等の生活習慣病に対して、大豆の摂取の有効性が疫学的研究から明らかにされている。有効成分として大豆イソフラボンの効果が推測されている。最近では、大豆イソフラボンの生活習慣病予防の効果を期待して、単に大豆食品としてのみならず、健康食品などの素材としても利用されるようになってきている。しかし、大豆イソフラボン中でもっとも効果があると考えられているゲニステインはエストロゲン様作用をもち、内分泌かく乱作用の可能性も示唆されている。日本人は多量の大豆あるいは大豆加工品を摂取しているところから、その安

全性について詳細な検討が必要である。

そこで、我々はゲニステインを中心として、妊娠ラットを用いて、その内分泌かく乱作用を明らかにし、同時に有効な作用を発現する摂取量と内分泌かく乱作用を示す摂取量と摂取時期について明らかにすることとした。この結果は、日本人の日常の食生活における大豆・大豆加工品の安全で有効な摂取量と摂取時期についての考え方を示す根拠となるものとする。

B. 研究方法

実験には妊娠を確認後5日目のS

D系ラットを用いた。すでに平成10年度において、ゲニステインとダイゼインの当量混合物を用いて、妊娠ラットにおける動態について検討した。今年度は、第一の実験では、ゲニステインとダイゼインの当量混合物（ソイアクト）を飼料中濃度1g/kgとして投与し、妊娠への影響について検討した。第二の実験では、純度の高いゲニステインを飼料中濃度0.5g/kgとして、妊娠期、授乳期に継続して投与し、乳児と成長後の子どもへの影響を観察した。なお、離乳後の子どもは母親のゲニステイン摂取の有無に拘わらず、ゲニステインを含まない正常な飼料を投与した。

なお、本研究では「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」（総理府告示第6号）を遵守し、動物の飼育、解剖時には苦痛を与えないように配慮した。

### C. 研究結果

平成10年度の実験では、妊娠期にソイアクトを0.5g/kg含む飼料で飼育した妊娠ラットでは胎児数が低下する傾向がみられた。この実験では、ソイアクトを含む飼料では母親の体重増加が抑制されることがみられた。そこで、今年度の実験では飼料摂取量の影響を除くために、ゲニステインを含まない飼料のコントロール群の飼料摂取量はゲニステイン群と同じになるようにした。また、妊娠数や胎児数は個体差があるため、1群のラット数を10匹として、妊娠への影響を観察した。母親は出産前日に解剖し、胎児数と妊娠の痕跡を確認した。その結果、総妊娠数には両群に差はみられなかったが、胎児数はゲニステイン投与群でコントロ

ール群に比べて約2匹少なかったが個体による変動が大きく、有意な差とはならなかった。

他方、平成10年度では母親の血中甲状腺ホルモン濃度が有意に低下していたので、本実験の母親の血液についても甲状腺ホルモン濃度を測定した結果、ゲニステインは甲状腺ホルモン濃度を低下させることを再確認した。

第二の実験では、妊娠期・授乳期に母親を介してゲニステインを暴露された子どもへの影響を長期的に観察することとした。本実験では、ゲニステインの内分泌かく乱作用を厳密に観察するために、純度の高いゲニステインを用い、さらにコントロール群との飼料摂取量に差がないように飼育した。

高純度のゲニステインでは、ソイアクトを用いたこれまでの実験とは異なり、飼料摂取量にはあまり影響はなかった。しかし、ゲニステイン群の母親の飼料摂取量はコントロール群の母親と差がないようにしたにもかかわらず、成長後の子どもの体重増加が抑制された。また、子どもの骨形成の抑制も観察された。しかし、子どもの雌雄の生殖器官の重量には影響がなかった。

### D. 考察

今年度の実験結果では、平成10年度の結果を再確認することができた。とくに、ソイアクトを投与した母親の血中甲状腺ホルモン濃度が低下することが確認できた。D. Doergeらは、昨年大豆に関する国際シンポジウムにおいて、ゲニステインは甲状腺におけるホルモン合成酵素を

阻害する可能性を示しており、ゲニステインの内分泌かく乱作用の一部が甲状腺ホルモン濃度の低下に起因することが考えられる。

これまでの我々の研究では純度の高いゲニステインを大量に入手することが困難であるために、大豆から精製されたゲニステインとダイゼインの混合物を用いてきた。この混合物を含む飼料では、一般的に母親の飼料摂取量が低下し、そのために母親と胎児、乳児の体重増加が抑制される。今回の混合物を用いた実験では飼料摂取量をコントロール群と同じになるようにしたので、ここで観察された結果は体重差の影響ではなく、大豆イソフラボン混合物の生体影響であると考えられる。

しかし、純度の高いゲニステインによる実験では、飼料摂取量の抑制はほとんどなく、イソフラボン混合物とゲニステイン単独の影響では違いがみられた。この差異の原因については、ダイゼインの影響か、他の不純物の影響かは明らかではない。今後の課題である。

純度の高いゲニステインを用いた長期にわたる子どもへの影響では、体重増加と骨形成の抑制がみられた。すでに我々は骨粗鬆症モデル動物では、ゲニステインは内分泌かく乱作用の出ないレベルで、骨粗鬆症の顕著な改善をみた。子どもにおける骨形成の抑制がどのようなメカニズムによるかは明らかではない。母親を介してゲニステインの暴露を受けた子どもでは、離乳後には正常な飼料を摂取しているにも拘わらず体重増加がコントロール群の子どもより低くなることについても理由は明らかではない。雌雄とも生殖器官の重量への影響は観察されていないの

理由については不明である。しかし、他の内分泌かく乱物質では、成長後に生体影響が観察されており、ゲニステインについても同様の影響が示唆された。ただし、今回の実験では母親へのゲニステインの投与量は人の摂取などに比べるとかなり高く、今後は微量投与による影響も観察する必要がある。

## E. 結論

ゲニステインは胎児期や乳児期に母親を介して暴露されると、妊娠や乳児の成長に一定の影響を与えることが観察された。とくに妊娠への影響、あるいは子どもの体重増加や骨形成の抑制は、何らかの内分泌かく乱作用の結果かもしれない。

今後は、これらの生体影響と摂取量の関係、他の大豆イソフラボン、とくにダイゼインの影響とゲニステインとの相互作用、生体影響のメカニズム、人の摂取量における安全性の確認などが必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) Third International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease, Oct 31-Nov. 3, 1999, Washington, USA  
Title: Transfer of Isoflavones from Mother to Suckling Pups Through Milk in Rats  
Authors: Nakashima, Ishimi, Ikegami Umegaki
- 2) 第45回日本栄養食糧学会  
平成12年5月14日、松山

演題名：卵巣摘出骨粗鬆症モデル動物  
における大豆イソフラボン大量投与の  
生体影響

発表者：石見佳子、荒井直子、梅垣敬  
三、王新祥、吾堅、宮浦千里、武田明  
治、池上幸江

3)第45回日本栄養食糧学会

平成12年5月13日

演題名：母親ラットから胎児・乳児へ  
のイソフラボン移行とその生体影響

発表者：東泉裕子、中嶋洋子、池上幸  
江

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし