

Final Body and Relative Organ Weight Data (13-week-old)

Level (mg/kg)	No. of Rats	Final Body Weight (g)	Prostate (%)		Testis (%)	Epididymis (%)	Seminal Vesicle (%)
			Ventral	Dorsolateral			
0	10	268.6±22.1	0.13±0.02	0.06±0.01	1.08±0.06	0.29±0.02	0.23±0.04
0.05	10	282.6±22.0	0.12±0.02	0.05±0.01	1.05±0.09	0.28±0.03	0.21±0.04
7.5	10	286.5±21.0	0.13±0.02	0.06±0.01	1.06±0.05	0.29±0.02	0.22±0.05
120	10	278.8±12.9	0.14±0.02	0.06±0.01	1.09±0.04	0.28±0.04	0.25±0.04

Sperm Number, Movement Ability and Morphology Data (13-week-old)

Level (mg/kg)	No. of Rats	Number (x 10 ⁷ /ml)		Movement ability (%)	Morphology abnormality (%)
		Testis	Epididymis		
0	10	2.15 ± 0.41	2.29 ± 0.58	85.8 ± 5.0	0.70 ± 0.54
0.05	9	2.40 ± 0.28	2.20 ± 0.71	82.7 ± 6.6	0.56 ± 0.39
7.5	10	2.44 ± 0.42	2.34 ± 0.60	82.0 ± 6.5	0.25 ± 0.26*
120	10	2.02 ± 0.36	2.15 ± 0.47	83.1 ± 7.6	1.05 ± 0.44

* : P < 0.05 v.s. control group

Influence of Bisphenol A on Pregnancy and Gestation

Level (mg/kg)	No. of Litters	Gestation period (day)	No. of Live Born (mean)	No. of Implantation (mean)	Gestation Index (%) ^{a)}	Fertility Index (%) ^{b)}	Live Birth Index (%) ^{c)}
0	16	22.2	112 (7.0)	119 (7.4)	92.9	87.5	94.1
0.05	16	22.2	110 (7.3)	116 (6.9)	92.9	87.5	94.8
7.5	16	22.1	121 (7.6)	130 (8.1)	100	93.8	93.1
30	9	22.5	65 (7.2)	78 (8.7)	88.9	100.0	83.3
120	17	22.5	109 (7.5)	128 (6.4)	93.3	88.2	85.2

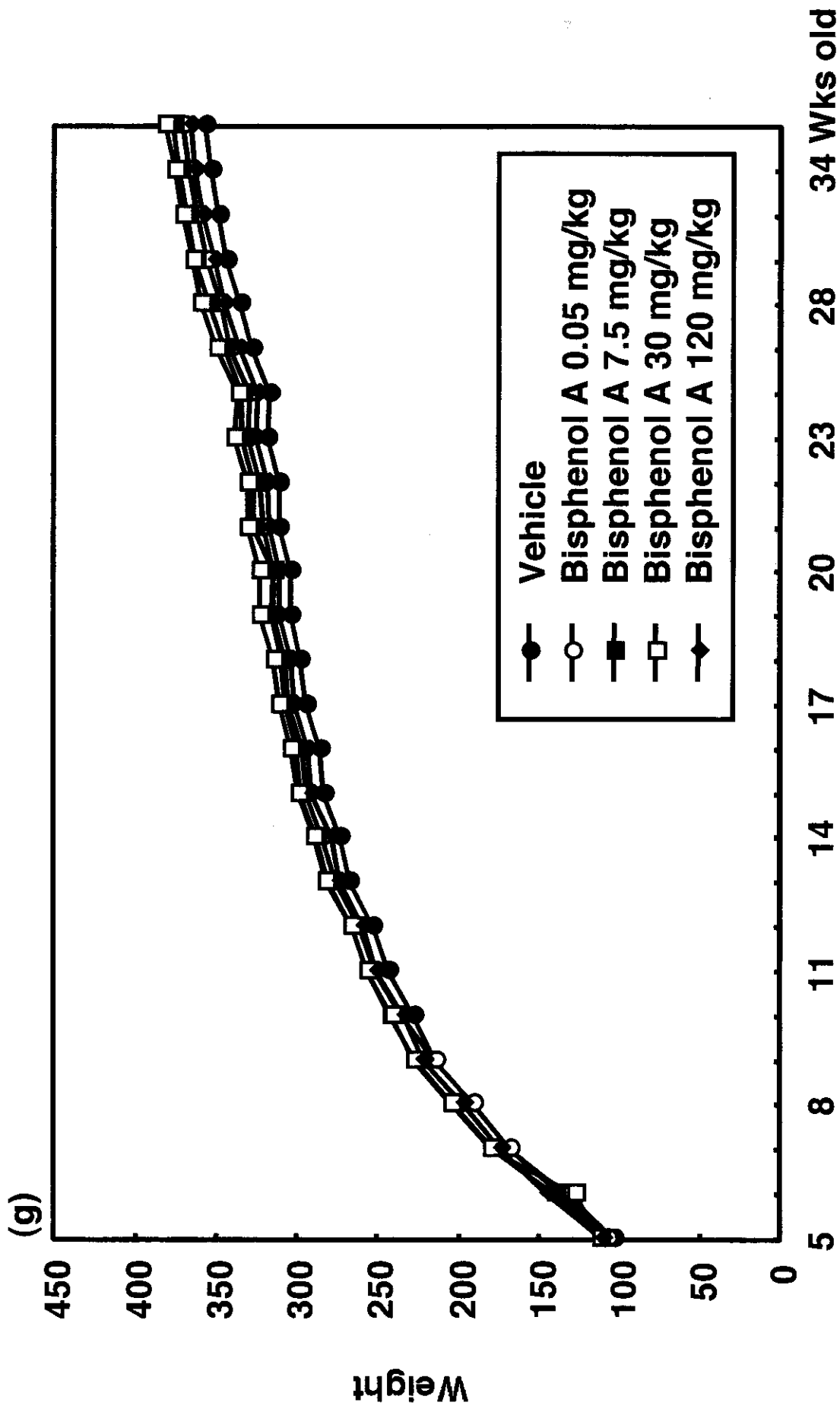
A) Gestation index: 出産率 (%) = 出生児のいる腹数/妊娠動物数 × 100

B) Fertility index: 受胎率 (%) = 妊娠動物数/交尾動物数 × 100

C) Live Birth index: 出生率 (%) = 出生生児数/着床数 × 100

Distribution of Stage of Seminiferous Epithelium Rats Exposed by Transplacental and Lactational Treatment of Bisphenol A

Sex	Group No.	Bsp phenol A (mg/kg)	No. of Examined	Stage			
				I ~ VI	VII ~ VIII	IX ~ XI	XII ~ XIX
Male	1	0	10	49.9 ± 3.6	19.4 ± 4.2	8.3 ± 2.8	22.5 ± 3.1
	2	0.05	10	51.2 ± 4.5	20.1 ± 3.2	8.6 ± 3.3	20.0 ± 3.4
	3	7.5	10	51.7 ± 4.8	18.8 ± 5.3	7.7 ± 2.6	21.9 ± 3.3
	4	120	10	51.3 ± 2.5	19.6 ± 2.2	9.1 ± 1.8	20.2 ± 2.2



Body Weights of Offsprings after Weaning (Group 1-5)

ビスフェノール A の妊娠期・授乳期曝露によるラット雌性生殖器への影響

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

低用量のビスフェノール A を妊娠・授乳期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結果、発育分化を含む雌性生殖器系への影響および子宮発癌への修飾作用は認められないと結論した。

A. 研究目的

エストロゲン作用を有する物質の胎児期および新生児期大量曝露は生殖器系に発癌だけでなく非可逆的で重篤な障害をもたらすことが報告されていることから、エストロゲン作用を有する内分泌攪乱化学物質についても同様の影響が懸念されている。しかし、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の内分泌攪乱化学物質の胎児期・哺乳児期曝露による生殖器に及ぼす影響についてはヒトへのリスク評価として重要であるにもかかわらず、さまざまな報告がなされているものの一致した見解が得られていない。

今回の研究は、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ビスフェノール A(BPA)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哺乳児期ラットに曝露し、発育分化を含む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を目的とした。

B. 研究方法

動物には規則正しい 4 日性周期を示し、且つ子宮癌好発系の 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 0.5%CMC 溶液に懸濁して強制経口投与した。対照群には 0.5%CMC 溶液のみを同様に投与した。得られた雌の仔については生殖器を含む発育分化を観察した。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した。また、比較のため陽性対照として成熟動物にエストロゲン作用を示す量(20mg/kg 皮下投与)の BPA 新生児期曝露群を設けた。9 および 12 ヶ月齢において一部の動物を解剖して子宮病変発生に至る途中経過を観察した。途中死亡例についても同様に病理検査を行った。

母動物から仔への BPA の移行を確認するために、0、0.006、6mg/kg 群について母動物の血清(離乳時)および母乳(仔の生後 10 日)、仔の血清および肝臓(生後 10、21 および 28 日)中の BPA 濃度を LC/MS 法にて測定した。

本実験は「動物の保護及び管理に関する

法律(昭和 48 年 10 月 1 日、法律第 105)』並びに「実験動物の飼育及び保管等に関する基準(昭和 53 年 3 月 27 日、総理府告示第 6 号)」の主旨および WHO(World Health Organization:世界保健機構)の医学研究顧問委員会の勧告に基づき CIOMS(The Council for International Organization of Medical Sciences:国際医科学関係組織協議会)が発表した「動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則(International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals)」に沿って実施した。本実験期間中、動物の飼育に関してこれらの指針を逸脱するような事項は認められなかった。

C. 結果

本試験では投与に関連した臨床症状は観察されなかった。体重は生後直後から最終解剖を行った 15 ヶ月齢まで一貫して同様の値で推移し、全ての群間において有意な差は認められなかった。

性周期は、4 ヶ月齢まで全ての群で規則正しい 4 日周期として観察された。5 ヶ月齢以降、全ての群で持続発情を示す動物が観察されるようになり、以降その頻度は増加したが群間の差異は認められなかった。11 ヶ月齢で対照群を含む全ての群で全例が持続発情を示した。

病理検査において性成熟期までの子宮および卵巣など雌性生殖器の発育分化に異常は観察されず、9 および 12 ヶ月齢の途中計画殺においても投与群の雌性生殖器の病理所見は対照群と同様であった。15 ヶ月齢にて全生存例を検査したが、子宮、卵巣等の生殖器を始め肝臓、腎臓などの主要臓

器の重量および病理所見に群間の差は認められず、子宮内膜腺癌を含む子宮の増殖性病変にも群間の差異は認められなかった。またいずれの群においても、観察された子宮癌は分化型で遠隔転移もなく、その発生頻度は同系統ラットを用いたこれまでの発癌実験データの範囲内であった。途中死亡例についても BPA 投与に関連する変化は認められなかった。

血清および組織内 BPA 濃度については、母動物の 0.006mg/kg 群の血清中濃度は対照群と同様であったが、6mg/kg では有意に高い値を示したが、母乳中の濃度には有意な差は観察されなかった。仔の血清および肝臓中の濃度について投与時期および群間での有意な差異は認められなかった。しかし、母および仔の対照群の全サンプルに BPA が検出され、母乳および肝臓中の値は血清と比較し、高い傾向が認められた。

D. 考察

本試験ではいずれの投与群においても、雌性生殖器の発育分化の異常は認められず、体重の変化も対照群と同様であった。また、性周期の変化、各検査時期における子宮および卵巣重量についても対照群と投与群は同様の値を示した。これらの仔について発癌剤を子宮腔内に投与した結果、子宮内膜の過形成と内膜腺癌の増殖性病変の発生頻度に有意な差異は認められず、悪性度の増加も観察されなかった。以上の結果から、低用量の BPA の胎児期・哺乳児期曝露は発育分化を含めた雌性生殖器系および子宮発癌に対し何ら修飾作用を及ぼさないと結論した。

6mg/kg 群で有意に増加した母動物の血

中 BPA 濃度は投与による影響と考えられたが、母動物の乳汁中および仔動物の血清あるいは肝臓中に差が観察されなかったことから、今回の投与量は母動物から仔動物へ移行していない可能性が高いと考えられた。しかし、対照群にも BPA が検出されたこと、および全群で乳汁あるいは肝臓中の BPA 濃度が血中と比較し高い傾向が観察された。この原因については不明であるが、ケージ、餌、飲料水などを介しての BPA の摂取を考慮する必要があると考えられた。

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 BPA をヒトが曝露される可能性のある低用量(6 および 0.006mg/kg)にて、子宮癌好発系である雌 Donryu ラットの妊娠・哺乳期間にわたり強制経口投与することにより、仔の雌性生殖器系への影響について検討した。その結果、仔動物の成長曲線、性周期、発育分化段階を含む雌性生殖器への影響および子宮発癌修飾作用は観察されなかった。また、これらの用量の BPA は母から仔へ移行しない可能性が示唆された。以上の結果より、低用量の BPA 胎児期・哺乳児期曝露はラットの雌性生殖器系へ何ら影響を及ぼさないと結論した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nagaoka,T., Takegawa,K., Takeuchi,M., and Maekawa,A.: Effects of reproduction on spontaneous development of endometrial adenocarcinomas and mammary tumors in Donryu rats.

Jpn.J.Cancer Res. 91:375-382, 2000.

Katsuda,S., Yoshida,M., Isagawa,S., Asagawa,Y., Kuroda,H., Watanabe,T., Ando,J., Takahashi,M. and Maekawa,A.:Dose- and treatment duration-related effects of p-tert-octylphenol on female rats. *Reprod. Toxicol.* 14:119-126, 2000.

Yoshida,M., Katsuda,S., Ando,J., Kuroda,H., Takahashi,M and Maekawa,A. Subcutaneous treatment of p-tert-octylphenol exerts estrogenic activity on the female reproductive tract in normal cycling rats of two different strains. *Toxicol. Lett.* 116:89-101, 2000.

Katsuda,K., Yoshida,M., Watanabe,G., Taya,K. and Maekawa,A.:Irreversible effects of neonatal exposure to p-tert-octylphenol on the reproductive tract in female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 165:217-226, 2000.

Aso,S., Anai,M., Noda,S., Imatanaka,N., Yamasaki,K. and Maekawa,A.: Twenty-eight-day repeated-dose toxicity studies for detection of weak endocrine disrupting effects of nonylphenol and atrazine in female rats. *J.Toxicol.Pathol.*, 13:13-20, 2000.

長谷川隆一、小泉睦子、広瀬明彦、前川昭彦:アルキルフェノールのエストロゲン様作用と生殖器系への影響〔総説〕、日本食

品化学学会誌、7:1-9,2000

Takahashi,M., Iizuka,S., Watanabe,T., Yoshida,M., Ando,J., Wakabayashi, K. and Maekawa,A.: Possible mechanisms underlying mammary carcinogenesis in female Wistar rats by nitrofurazone. *Cancer Lett.* 156:177-184, 2000.

Yamasaki,K., Sawaki,M., Noda,S., Muroi,T. and Maekawa,A.: Immature rat uterotrophic assay of diethylstilbestrol, ethinyl estradiol and atrazine. *J.Toxicol.Pathol.* 13:145-150, 2000.

Yoshida,M., Katsuda,S., Takenaka,A., Watanabe,G., Taya,K. and Maekawa,A.: Effects of neonatal exposure to a high-dose p-tert-octylphenol on the male reproductive tract in rats. *Toxicol. Lett.* in press, 2001.

Yoshida,M., Katsuda, S. and Maekawa,A.: Effects of endocrine disrupting chemicals with estrogenic activity on the female reproductive system in rats. *J Toxicol Pathol.* in press, 2001.

Takahashi, M., Nishimura, S., Sasahara, K., Yoshida, M., Ando J. and Maekawa, A.: Time-dependent promotion activity of 17β -estradiol on uterine carcinogenesis in CD-1 mice treated with N-ethyl-N-nitrosourea. *Cancer Lett.* in press, 2001.

2. 学会発表

Yoshida,M., Katsuda, S., Watanabe,G., Taya,K. and Maekawa A.: Lasting effects of neonatal exposure to p-tert octylphenol on the reproductive tract in female and male rats. The 2nd Congress of Asian Society of Toxicology, 2000, August, Cheju, Korea.

高橋正一、吉田緑、安藤進、前川昭彦: ENNG 誘発マウス子宮発癌におよぼすタモキシフェンの検討、第 59 回日本癌学会総会、2000 年 10 月、横浜。

勝田真一、吉田緑、安藤進、高橋正一、前川昭彦: 高用量 p-tert octylphenol の成熟期または新生仔期曝露によるラット子宮内膜腺癌修飾作用、第 59 回日本癌学会総会、2000 年 10 月、横浜。

吉田緑、竹中亜希子、勝田真一、前川昭彦: ラットの発育期子宮内膜におけるエストロゲンレセプターの発現および細胞増殖活性に与える新生仔期オクチルフェノール大量曝露の影響について、第 17 回日本毒性病理学会、2001 年 1 月、兵庫。

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：Bisphenol A の妊娠期、授乳期暴露は低用量レベルでも次世代雄性マウスの前立腺と精巣に影響を及ぼした。Nonylphenol については現在、実験継続中である。Styrene dimer と Styrene trimer はラット肝発がん性を示さないことが判明した。

A. 研究目的

内分泌かく乱作用が指摘されている物質（内分泌かく乱物質）がヒトの健康影響、特に男性生殖器系に及ぼす影響について確たる因果関係を示す報告はみられない。一方、内分泌かく乱物質は実験動物においてエストロゲン作用あるいは抗アルドロン作用を有し、雄性生殖器系の異常を惹起する可能性がある。また、一般に化学物質の胎児期暴露が生殖器系の異常に強く関与していることが指摘されている。そこで、本研究では内分泌かく乱物質の妊娠期、授乳期暴露による次世代における雄性生殖器系への影響を実験動物を用いて検討する。

また、内分泌かく乱物質とヒト発がんの因果関係が指摘されている。そこで、内分泌かく乱物質の発がん

に及ぼす影響の基礎的データを蓄積することを意図し、実験動物で化学物質の発がん標的性が多くみられる肝臓における内分泌かく乱物質の発がん影響を検討する。

さらに、内分泌かく乱物質の実験動物を用いた生体影響へのデータの多くは、高用量域での研究が主体である。そこで、本研究ではヒトが暴露されるレベルでの低用量を考慮して研究を進める。

B. 研究方法

【実験 1】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、肉眼的検査を実施し、精巣および精巣上体における精子検索をおこなった。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い、病理組織学的に検索した。

【実験2】実験1と同様の方法を用いて、Nonylphenolの胎児期、新生児期に及ぼす影響を検討した。Nonylphenolの投与量は0.05、50および200mg/kg/dayで、実験1と同じ時期に連日強制経口投与した。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。

【実験3】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（各群16匹）とした。その2週間後より被験物質であるStyrene dimerおよびStyrene trimerを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。さらに併置対照群として、DEN無処置のStyrene dimerおよびStyrene trimer、0.6mg/kgならびに溶媒投与群（各群8匹）を

設けた。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)陽性細胞巣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検索についても検索した。

C. 研究結果

【実験1】Bisphenol A投与群において、妊娠期間、母動物の体重、分娩児数に対照群との間に差を認めなかった。児動物の体重では、0.05mg/kg投与群で離乳時に減少傾向、10週齢時に有意な減少が認められた（表1）。

臓器重量では前立腺腹葉の絶対ならびに相対重量の増加がBisphenol Aの低用量投与群ほど強くみられ、0.05および50mg/kg投与群では有意な増加であった（表1、2）。

A-G間距離を測定したところ、各群間に差はみられなかった（表3）。精子検査の結果を表4に示す。精巣と精巣上体を合計した精子数に関しては各群間に差は認められないが、精巣における精子数の増加がみられ、特に0.05と50mg/kg投与群に有意

であった。また、培養 5 分後における精子運動能の亢進が 0.05mg/kg 投与群に認められた。精子形態異常には各群間で差はみられなかった。

【実験 2】Nonylphenol 投与群において妊娠期間、分娩児数に对照群との間に差を認められなかった。現在、児動物の経過観察中である。

【実験 3】体重、飼料摂取量および肉眼的病理学検査では、DEN 処置の有無を問わず Styrene dimer および Styrene trimer 投与の影響を認めなかった。

臓器重量において、肝臓、精巣、精巣上体、精囊、前立腺および副腎では DEN 処置の有無を問わず影響は認められなかった。

肝の GST-P 陽性細胞巢の発生個数ならびに面積に関して、Styrene dimer および Styrene trimer 投与群と对照群との間に差を認めなかった (表 5)。

DEN 無処置群における精巣および精巣上体を用いた精子数検査においては Styrene dimer、Styrene trimer 群いずれにおいても精子数に对照群と差を認めなかった。

D. 考察

内分泌系はヒトを含め、様々な動物の生体機能を制御しており、内分泌がかく乱されることにより、生殖

器系が大きく影響を受ける。その影響は内分泌がかく乱を直接受ける世代のみならず、次世代にも及ぶことが推測される。そこで、本研究ではマウスを用い、妊娠期、授乳期暴露による次世代の雄性生殖器系に及ぼす影響を検討した。その結果、

Bisphenol A の 0.05mg/kg、50mg/kg 投与は前立腺腹葉の重量増加をもたらすとともに精子数の増加を惹起した。また、0.05mg/kg 投与では精子運動能の亢進ももたらした。

今回の実験での Bisphenol A の投与量設定根拠として、400mg/kg は、マウスを用いた 2 世代生殖毒性試験の 2500ppm 混餌投与 (437mg/kg/day) において腎臓および肝臓重量の増加、精巣上体および精囊の重量低下が認められていることから設定した。50mg/kg はラットを用いた 1 世代生殖毒性試験およびマウスを用いた 2 世代生殖毒性試験の試験結果から求められた Bisphenol A の生殖毒性での無作用量であることから設定した。さらに 0.05mg/kg/day はこれらのデータに基づいた 1 日許容摂取量 (ADI) であることから設定した。したがって、ADI で出現した機序について、今後、ホルモン作用を中心にさらに追究する必要がある。なお、高用量の 400mg/kg では 0.05、50mg/kg 投与に比較して上記の変化

の増強が弱く出現したのは、高用量投与による Bisphenol A の毒性が発現したための結果と考えられた。

ラット肝の前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の定量的変動を指標として化学物質の肝発がん性、ないし発がんプロモーション作用を検出する本試験法にて、Styrene dimer および Styrene trimer は GST-P 陽性細胞巢の発生に影響を及ぼさなかった。これに反し、Styrene monomer の高用量投与は GST-P 陽性細胞巢の発生を抑制した（昨年度報告）。今後、Styrene の monomer と dimer、trimer の肝発がんに対する差異について追究する必要がある。

E. 展望

親世代への bisphenol A 投与は次世代雄性ラットのの前立腺と精巣に影響を及ぼすことが判明した。特にヒト暴露レベルを考慮した ADI レベルにおいてもその影響がみられ、今後、この事実を再確認するとともに Bisphenol A の作用機序を追究する必要がある。

また、Styrene dimer と Styrene trimer はラット肝発がん性を示さないことが結論づけられる。

F. 結論

Bisphenol A の親マウスへの妊

娠期、授乳期投与は ADI レベルでも次世代雄性マウスの前立腺と精巣に影響を及ぼすことが明らかとなった。

また、Styrene dimer と Styrene trimer はラット肝発がん性を示さないことが結論づけられた。

G. 倫理面への配慮

動物の飼育に関しては飼育管理規程を守り、飼育し、また、エーテル麻酔下にて屠殺した。さらに、年 1 回、実施の供養祭にて感謝の意を表した。

H. 研究発表

（論文発表）

1. 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.
2. 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.
3. Taniyama, T., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Yano, Y., Otani, S., Nishizawa, Y., Morii, H., Fukushima, S.: Chemopreventive effect of 24*R*,25-dihydroxyvitamin D3 in *N,N'*-dimethylhydrazine-induced rat colon

- carcinogenesis., *Carcinogenesis* 21: 173-178, 2000.
4. 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.
 5. Fukushima, S., Wanibuchi, H.: Prevention of urinary bladder cancer: The interface between experimental and human studies., *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 1: 15-33, 2000.
 6. Li, W., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Wei, M., Yamamoto, S., Nishino, H., Fukushima, S.: Inhibition by ginseng of 1,2-dimethylhydrazine induction of aberrant crypt foci in the rat colon., *Nutrition and Cancer* 36: 66-73, 2000.
 7. Takaba, K., Saeki, K., Suzuki, K., Wanibuchi, H., Fukushima, S.: Significant overexpression of metallothionein and cyclin D1 and apoptosis in the early process of rat urinary bladder carcinogenesis induced by treatment with *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine or sodium L-ascorbate., *Carcinogenesis* 21: 691-700, 2000.
 8. Tagawa, Y., Iwai, H., Kumazawa, T., Haruyama, K., Ichikawa, K., Fukushima, S.: Atrophy of rat exorbital lacrimal glands induced by atropine., *J. Toxicol. Pathol.* 13: 7-11, 2000.
 9. Romanenko, A., Morimura, K., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Kinoshita, A., Kaneko, M., Vozianov, A., Fukushima, S.: Increased oxidative stress with gene alteration in urinary bladder urothelium after the chernobyl accident., *Int. J. Cancer* 86: 790-798, 2000.
 10. Ohtani, H., Yashiro, M., Onoda, N., Nishioka, N., Kato, Y., Yamamoto, S., Fukushima, S., Hirakawa-Ys Chung, K.: Synchronous multiple primary gastrointestinal cancer exhibits frequent microsatellite instability., *Int. J. Cancer* 86: 678-683, 2000.
 11. Vijayaraghavan, M., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Hakoi, K., Nakae, D., Konishi, Y., Fukushima, S.: Lack of promoting potential of dimethylarsinic acid in the kidney of male NCI-Black reiter rats., *J. Toxicol. Pathol.* 13: 87-91, 2000.
 12. Mori, S., Murai, T., Hosono, M., Oohara, T., Makino, S., Takeda, R., Fukushima, S.: Susceptibility of male WS/Shi rats to melamine but not NaHCO₃ or butylated hydroxyanisole promotion of urinary bladder carcinogenesis., *J. Toxicol. Pathol.* 13: 93-95, 2000.
 13. Morikawa, T., Wanibuchi, H., Morimura, K., Ogawa, M., Fukushima, S.: Promotion of skin carcinogenesis by dimethylarsinic acid in *keratin (K6) / ODC* transgenic mice., *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 579-581, 2000.
 14. Masuda, C., Wanibuchi, H., Sekine, K., Yano, Y., Otani, S., Kishimoto, T., Tsuda, H., Fukushima, S.: Chemopreventive effects of bovine lactoferrin on *N*-Butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced rat bladder carcinogenesis., *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 582-588, 2000.
 15. Kitano, M., Wanibuchi, H., Kikuzaki, H., Nakatani, N., Imaoka, S., Funae, Y.,

- Hayashi, S., Fukushima, S. :
Chemopreventive effects of Coumapherine from pepper on the initiation stage of chemical hepatocarcinogenesis in the rat., *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 674-680, 2000.
16. Vijayaraghavan, M., Wanibuchi, H., Takada, N., Yano, Y., Otani, S., Yamamoto, S., Fukushima, S.: Inhibitory effects of S-methylcysteine and cysteine on the promoting potential of sodium phenobarbital on rat liver carcinogenesis., *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 780-785, 2000.
17. Kitano, M., Wanibuchi, H., Morimura, K., Sukata, T., Shizusawa, M., Fukushima, S.: Morphological changes in silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) related to proliferative activity in glutathione S-transferase placental form (GST-P) positive foci of rat liver., *J. Toxicol. Pathol.* 13: 261-264, 2000.
18. Murai, T., Mori, S., Hosono, M., Iwakura, Y., Oohara, T., Makino, S., Takeda, R., Koide, A., Mori, Y., Wanibuchi, H., Fukushima, S.: Differences among three sister strains of NON/Shi mice in sensitivity to urinary tract carcinogenesis by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine., *J. Toxicol. Pathol.* 13: 225-229, 2000.
19. Takeuchi, S., Nakanishi, H., Yoshida, K., Yamamoto, S., Tonoki, H., Tsukamoto, T., Fukushima, S., Moriuchi, T., Kurita, K., Tatematsu, M.: Isolation of differentiated squamous and undifferentiated spindle carcinoma cell lines with differing metastatic potential from a 4-nitroquinoline N-oxide-induced tongue carcinoma in a F344 rat., *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 1211-1221, 2000.
20. Wei, M., Wanibucchi, H., Yamamoto, S., Iwai, S., Morimura, K., Nomura, T., Takayama, R., Fukushima, S.: Chemopreventive effects of S-methylcysteine on rat hepatocarcinogenesis induced by concurrent administration of sodium nitrite and morpholine., *Cancer Lett.* 161: 97-103, 2000.
21. Murai, T., Mori, S., Hosono, M., Iwakura, Y., Takashima, A., Oohara, T., Makino, S., takeda, R., Fukushima, S.: Induction of hepatocellular carcinoma with high metastatic potential in WS/Shi rats: discovery of an inbred strain highly susceptible to the liver carcinogen *N*-nitrosomorpholine., *Oncology Res.* 12: 121-126, 2000.
22. Masuda, C., Wanibuchi, H., Otori, K., Wei, M., Yamamoto, S., Hiroi, T., Imaoka, S., Funae, Y., Fukushima, S.: Presence of a no-observed effect level for enhancing effects of development of the α -isomer of benzene hexachloride (α -BHC) on diethylnitrosamine-initiated hepatic foci in rats., *Cancer Lett.* 163: 179-185, 2001.
- (学会発表)
1. 福島昭治：がん原因子のリスク評価．第 59 回日本癌学会総会，10 月 4-6 日，横浜，2000（日本癌学会総会記事 1024, p.24）
2. 須方督夫、尾崎圭介、宇和川賢、小川元女、西川隆之、鰐淵英機、奥野泰由、福島昭治：環境発癌物質 DDT の低濃度域における肝発癌性の検討．第 59 回日本癌学会総会，10 月 4-6 日，横浜，2000（日本癌学会総会記事 2287, p.281）

Table 1
Final Body Weights and Organ Weights in Offspring (Male)

Sex	Group	Dose	No. of rat	Final B.W.	Testes	Epididymis	Ventral Prostate
	No.	mg/kg	Examined				
Male	1	0	25	49.40 ± 3.77	0.2560 ± 0.0288	0.1015 ± 0.0138	0.0277 ± 0.0061 a
	2	0.05	25	46.96 ± 4.18*	0.2602 ± 0.0371	0.1001 ± 0.0090	0.0375 ± 0.0132**b
	3	50	25	48.02 ± 4.89	0.2660 ± 0.0330	0.1027 ± 0.0136	0.0334 ± 0.0079**
	4	400	25	47.83 ± 5.95	0.2502 ± 0.0336	0.1008 ± 0.0127	0.0309 ± 0.0120

Values are g, mean ± S.D.

* ; P < 0.05, ** ; P < 0.01

a ; 23 animals, b ; 24 animals

Table 2
Relative Organ Weights in Offspring (Male)

Sex	Group	Dose	No. of rat	Testes	Epididymis	Ventral Prostate
	No.	mg/kg	Examined			
Male	1	0	25	0.5199 ± 0.0601	0.2060 ± 0.0278	0.0557 ± 0.0110 a
	2	0.05	25	0.5576 ± 0.0870	0.2143 ± 0.0221	0.0795 ± 0.0248**b
	3	50	25	0.5590 ± 0.0875	0.2153 ± 0.0323	0.0699 ± 0.0168**
	4	400	25	0.5270 ± 0.0712	0.2118 ± 0.0230	0.0649 ± 0.0249

Values are g/100g body weight, mean ± S.D.

** ; P < 0.01

a ; 23 animals, b ; 24 animals

Table 3

A-G Distance in Offspring (Male)

Group No.	Dose mg/kg	No. of Animals	A-G Distance mm
1	0	5	22.36 ± 0.95
2	0.05	5	21.46 ± 1.11
3	50	5	21.66 ± 0.45
4	400	5	21.48 ± 0.82

Table 4

Number, Movement Ability and Morphology Data of Sperm in Offspring

Group No.	Dose mg/kg	No. of Animals	Total	Number (× 10 ⁷ /ml)		Movement Ability		Morphology	
				Testis	Epididymis	5 Minutes (%)	Abnormality (%)		
1	0	5	0.8646 ± 0.1771	0.3558 ± 0.0498	0.5088 ± 0.2121	73.8 ± 8.8	1.20 ± 1.79		
2	0.05	5	0.8744 ± 0.1996	0.4412 ± 0.0747*	0.4332 ± 0.1748	85.3 ± 5.9#	1.60 ± 0.89		
3	50	5	1.1724 ± 0.5439	0.5520 ± 0.1544*	0.6204 ± 0.4018	83.1 ± 7.2	1.80 ± 1.48		
4	400	5	0.9024 ± 0.1422	0.4368 ± 0.0429	0.4656 ± 0.1259	76.3 ± 13.9	1.20 ± 1.10		

Value are mean ± S.D.

* ; P < 0.05

; 4 animals

Table 5

Induction of GST-P Positive Foci in Rat Livers

DEN	Treatment	Dose mg/kg	No. of Rats Examined	GST-P Positive Foci	
	Test Chemical			No. / cm ²	Area / cm ²
+	Corn oil	0	14	4.081 ± 1.542	0.267 ± 0.144
+	Styrene dimer	0.0006	15	3.557 ± 1.223	0.265 ± 0.139
+	Styrene dimer	0.006	15	3.935 ± 1.651	0.295 ± 0.189
+	Styrene dimer	0.6	16	3.943 ± 1.279	0.258 ± 0.119
+	Styrene trimer	0.0006	16	4.061 ± 1.408	0.296 ± 0.157
+	Styrene trimer	0.006	15	4.237 ± 1.751	0.385 ± 0.282
+	Styrene trimer	0.6	15	3.731 ± 1.549	0.291 ± 0.147
-	Corn oil	0	8	0	0
-	Styrene dimer	0.6	8	0	0
-	Styrene trimer	0.6	8	0	0

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 生活習慣病予防におけるゲニステインの効果が実験的のみならず、疫学的にも確認されており、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ようになっている。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く、また骨代謝への効果は内分泌かく乱作用より低い投与量で発現することを確認した。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、とくに妊娠、母親の血中甲状腺ホルモン濃度の低下と子どもの体重増加の抑制等の影響の可能性が示唆された。

A. 研究目的

ガン、骨粗鬆症、循環器疾患等の生活習慣病に対して、大豆摂取の有効性が疫学的な研究からも明らかにされている。その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11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、ゲニステイン単独の影響を明らかにすることとした。そこで、第1の実験では、純度95%のゲニステインを飼料中濃度0.5g/kgとして、妊娠期と授乳期の影響の違いについて検討した。乳児は経時的に解剖し、最終的には生後22日目に、母親と同時に解剖した。第2の実験では妊娠期と授乳期にゲニステイン暴露を受けた母親の乳児について、成長後の影響を観察した。母親は出産後22日目に解剖し子どもは経時的に解剖しながら最終的には生後75日まで飼育した。いずれの実験でも母親ラットの飼料摂取量はコントロール群と同じになるように飼料を投与した。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。また、いずれの実験でも1匹の母親ラットあたりの乳児数は雌雄同数の10匹とした。

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

これまでの研究では、大豆イソフラボン混合物を妊娠ラットに投与した場合には母親ラットの体重増加の抑制と胎児数の減少が観察された。純度の高いゲニステインによる実験では、妊娠期暴露を受けた母親では出生数の減少傾向がみられたが、統計的には有意ではなかった。また、妊娠期暴露群の母

親ラットでは、授乳終了後の子宮重量がコントロール群に比べて高くなる傾向がみられた。また、母親ラットの血中甲状腺ホルモン濃度はとくにT₄について統計的には有意ではないが、低下傾向が観察された。

他方、仔どもでは、生後5日目において、雄では肝臓、腎臓、脾臓、雌では肝臓、腎臓の重量が重くなる傾向がみられたが、15日目以降ではこうした影響は観察されなかった。また、大腿骨への影響は授乳期間中ではむしろ長くなる傾向がみられ、骨重量、骨密度、ミネラルとカルシウム含量などへの影響はなく、骨形成の阻害は観察されなかった。

以上の結果より、ゲニステインそのものの妊娠、授乳期間中の暴露の影響は一部みられるものの、軽微なものであった。また、妊娠期と授乳期の暴露の違いも顕著ではなかった。しかし、これまでに大豆イソフラボン混合物で観察した胎児数の減少や母親ラットの血中甲状腺ホルモン濃度への影響の可能性はゲニステインでも示唆された。

第2の実験では、とくに仔どもの成長期での影響を観察することを目的とした。母親ラットの体重や臓器重量などへは影響はみられなかった。仔どもの体重では、ゲニステイン暴露群において雌雄とも離乳後に低下する傾向がみられ、雄では生後40日目頃ではコントロール群に対して有意差があった。しかし、生殖器も含めて臓器重量にはとくに影響はみられなかった。また、生後75日目の雌の子宮におけるエストロゲンレセプターのmRNAの発現量を測定したが、ゲニステイン群でやや高くなる乳