

朝元誠人、外岩戸尚美、曹永晩、白井智之、
トランスジェニックラットを用いた前立腺
および肝発がん研究、第 18 回日本毒性病
理学会、東京、(2002 年 1 月)

曹永晩、朝元誠人、鈴木周五、外岩戸尚美、
高橋智、白井智之、遺伝子プロモーター
/SV40T 抗原発現遺伝子導入ラットにお
けるエストロゲン投与による前立腺癌病変
の検討、第 18 回日本毒性病理学会、東京、
(2002 年 1 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

妊娠期・授乳期におけるノニルフェノール単独およびノニルフェノール・
ビスフェノール A 併用曝露がラット雌性生殖器へ与える影響

研究者 前川昭彦 (財)佐々木研究所 所長

研究要旨

妊娠・授乳期にわたり、低用量および高用量のノニルフェノールを単独、あるいはノニルフェノール・ビスフェノール A を併用して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、発育分化および卵巣機能を含む雌性生殖器系への影響は認められないことが明らかとなった。

A. 研究目的

エストロゲン類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(EDCs)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一致した見解が得られていない。

昨年度までの研究において、環境中に存在しヒトが曝露される可能性のある低用量ビスフェノール A(BPA)の胎仔期および哺育期ラットへの曝露は、雌性生殖器の発育分化に何ら影響を及ぼさず、子宮発癌への修飾作用も示さないことが明らかとなった。しかし対照群を含めた母および仔動物の血清および組織中に BPA が検出され、血清に比較して乳汁中および肝臓中で高い値を示したことから、これらの BPA の由来を

確認するために、ラットの飼育環境中における BPA 濃度を測定した。

さらに、本年度は BPA と同様にエストロゲン様作用を示す EDCs のうち、環境中に広く分布するノニルフェノール(NP)を選び昨年度の BPA と同様の検索を行なった。さらに環境中ではヒトは EDCs に複合曝露する可能性が高いことから、母ラットへ NP と BPA を併用投与することにより、仔の雌性生殖器系へ与える影響についても検索した。

B. 研究方法

1. NP 単独妊娠期・授乳期曝露が子宮発癌を含む雌性生殖器に与える影響
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。NP の投与量として、当研究班におけるその他の実験と相関性をもたせるために指定された 0.1mg/kg を低用量とした。中および高用量群としてそれぞれ 10 および 100mg/kg を設定した。これらの用量

を母動物の妊娠および哺育期の全期間(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の発育分化を性成熟期まで経時的に観察し、卵巢機能を性周期および排卵数により検査した。また、発癌への修飾作用を観察する目的で、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。途中死亡例についても同様に病理検査を行った。

2. 妊娠・授乳期の NP および BPA 同時曝露が仔の雌性生殖器に与える影響

動物は NP 単独実験と同様、Donryu ラットを用いた。投与量は当研究班にて指定された BPA0.05mg/kg と NP0.1mg/kg 併用投与 (BPA0.05 ・ NP0.1mg/kg)を低用量群とした。高用量群として BPA100mg/kg と NP100mg/kg (BPA100 ・ NP100mg/kg)の併用投与群を設定し、さらに高用量の BPA 単独の影響を観察するために、BPA100mg/kg 群を設けた。これらの用量を母動物の妊娠および哺育の全期間(約 6 週間)にわたりオリーブ油に懸濁して強制経口投与した。対照群にはオリーブ油のみを同様に投与した。得られた雌の仔について生殖器系の発育分化を性成熟期まで経時的に観察し、NP の同様に性周期および排卵数にて卵巢機能を検査した。またエストロゲンに対する反応性を検索するために、4 ヶ月齢で一部の動物の卵巢を摘出し、その後エストロゲンを皮下投与して子宮の重

量および被覆上皮の高さについて比較した。

3. 飼育環境中の BPA 濃度

蛇口から直接採取した水道水、ラット自動給水装置のノズルから採取したポリタンク内の水道水およびラットマウス用固形飼料中の BPA 濃度を HPLC 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、動物の取り扱い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

1. NP 単独妊娠期・授乳期曝露が子宮発癌を含む雌性生殖器に与える影響

母動物の体重および妊娠期間・出産仔数・着床数などの繁殖成績について、投与群と対照群の間で差異は観察されなかった。

仔の性成熟前の検索では、体重、子宮重量、子宮腺の形成および膣開口時期について、性成熟後の検索では、12 ヶ月齢時点までの体重および性周期の異常について投与群と対照群の間で有意な差は認められな

かった。特に性周期は膣開口後 2 ヶ月齢まで全ての群で規則正しい 4 日周期が観察された。3-4 ヶ月齢以降は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ず、10 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。また、4 ヶ月齢に測定した排卵数についても全ての群において同様の値であった。

本実験は現在 12 ヶ月齢であり、今後 12 および 15 ヶ月齢の病理検査を行う予定である。

2. 妊娠・授乳期の NP および BPA 同時曝露が仔の雌性生殖器に与える影響

母動物では、妊娠期間中、BPA100mg/kg 群で持続する有意な体重増加抑制が、BPA100・NP100mg/kg 併用投与群で持続性の増加抑制傾向が認められた。BPA0.05・NP0.1mg/kg 併用投与群の体重は対照群と同様の値で推移した。妊娠期間・出産仔数・着床数などの繁殖成績については全投与群と対照群の間で差異は観察されなかったが、BPA100mg/kg 群で哺育中断した個体が 1 例認められた。

仔の性成熟前の検索では、体重、子宮重量、子宮腺の形成および膣開口時期において、成熟後の検索では、4 ヶ月齢現在までの体重および性周期の異常について投与群と対照群の間で有意な差は認められなかった。特に性周期は、膣開口後 2 ヶ月齢まで全ての群で規則正しい 4 日周期が観察された。4 ヶ月齢において対照群を含む各群で 12 例中 1~2 例の動物で持続発情が発現した。また 4 ヶ月齢で各群の排卵数を測定したが、投与による影響は観察されなかった。

現在 4 ヶ月齢であり、今後エストロゲンに対する感受性について検索する予定である。

3. 飼育環境中の BPA 濃度について

測定の結果、水道の蛇口から直接採取した水道水中から BPA は検出されなかったが、自動給水装置から採取した水から平均 2.56ng/ml、固形飼料中から平均 39.88ng/g の BPA が検出された。

D. 考察

1. NP 単独妊娠期・授乳期曝露が子宮発癌を含む雌性生殖器に与える影響

本実験ではいずれの投与群において母動物に投与に関連した異常は観察されず、仔につ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、投与に関連した性周期および排卵数の異常も観察されなかったことから卵巢機能についても変化は認められず、12 ヶ月齢時点では NP の妊娠期・授乳期曝露による雌性生殖器への影響は認められないと考えられた。最終的な影響の有無に関しては、今後実施予定の子宮増殖性病変の病理組織検索後に判定する予定である。

2. 妊娠・授乳期の NP および BPA 同時曝露が仔の雌性生殖器に与える影響

BPA100mg/kg 単独および BPA100・NP100mg/kg 併用投与の高用量群で妊娠期間中に観察された母動物の体重増加抑制あるいは抑制傾向は、持続した変化であることから投与に関連した変化であると考えられ、これらの投与量は母動物に毒性影響を及ぼす可能性が示唆された。BPA100mg/kg 群の 1 例で認められた哺育中断については併用投与の高用量群で同

様の変化は認められていないが、検索例数が少なく、投与の関連性については不明である。

仔について雌性生殖器系の発育分化異常は認められず、体重の変化も対照群と同様であった。また、投与に関連した性周期および排卵数の異常など卵巢機能の変化も観察されなかったことから、4ヶ月齢時点においてBPAおよびNP併用投与の妊娠期・授乳期曝露による雌性生殖器への影響は検出されていない。最終的な評価については、今後実施予定のエストロゲンに対する感受性の検索と併せて、総合的に考察する予定である。

3. 飼育環境中の BPA 濃度について

今回の結果より、ラットの飼育環境中には BPA が存在することが明らかとなり、前年度に行った母動物の乳汁、仔の血清および肝臓中の BPA は環境中から摂取された可能性が考えられた。これらの結果より、母および仔ラットは飼育環境中に存在する BPA に曝露されている可能性が示唆された。

E. 結論

本年度の被験物質として BPA と同様、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 NP を選択し、NP 単独および BPA との併用投与を低用量から高用量まで、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して、仔の雌性生殖器系への影響を検索した。現在単独・併用の両実験とも実験途中であることから最終的な評価はできないものの、現在までのところ NP 単独および BPA と NP 併用投与ともに、

仔動物の成長曲線、卵巢機能、子宮の発育分化段階を含む雌性生殖器への影響は観察されていない。

またラットの飼育環境中である餌および水に BPA が検出されたことから、母あるいは仔は BPA に曝露されている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

(書籍)

Davis,B., Harleman,J.H., Heinrich,M., Maekawa,A., McConnell,R.F., Reznik,G., Tucker,M. Female Genital System. International Classification of Rodent Tumours. The Mouse. (Mohr,U.,ed.) 211-268. Berlin: Springer, 2001.

Rehm,S., Harleman,J.H., Cary,M., Creasy,D., Ettlin,R.A., Eustis,S.L., Foley,G.L., LeNet,J.L., Maekawa,A., Mitsumori,K., McConnell,R.F., Reznik,G., Male Genital System. International Classification of Rodent Tumours. (Mohr,U.,ed.) The Mouse, 163-210. Berlin: Springer, 2001.

(雑誌)

Yoshida,M., Katsuda,S., Takenaka,A., Watanabe,G., Taya,K., Maekawa,A. . Effects of neonatal exposure to a high-dose *p-tert-octylphenol* on the male reproductive tract in rats. Toxicol. Lett., 121:21-33, 2001.

Yoshida,M., Katsuda,S., Maekawa,A. Effects of endocrine disrupting

chemicals with estrogenic activity on the female reproductive system in rats. J. Toxicol. Pathol., 14:83-86, 2001.

Takahashi, M., Nishimura, S., Miyajima, K., Sasahara, K., Yoshida, M., Ando, J., Maekawa, A. Time-dependent promotion activity of 17 β -estradiol on uterine carcinogenesis in mice initiated with N-ethyl-N-nitrosourea. Cancer Lett., 165:123-130, 2001.

Watanabe, T., Adno-Lu, J., Imai, S., Takano, S., Takahashi, M., Maekawa, A. Spontaneous tumors in the uterus, testis and other organs of F1 hybrids between Donryu and F344 rats. J. Toxicol. Pathol., 14:99-104, 2001.

Katsuda, S., Yoshida, M., Kuroda, H., Ando, J., Takahashi, M., Kurokawa, Y., Watanabe, G., Taya, K., Maekawa, A. Uterine adenocarcinoma in N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-treated rats with high-dose exposure to *p-tert-octylphenol* during adult food. Jpn. J. Cancer Res., 93:1-9, 2002.

Shimomoto, T., Yoshida, M., Takahashi, M., Maekawa, A. Sebaceous gland metaplasia in a mammary fibroadenoma developing in a female Donryu rat. J. Toxicol. Pathol., 15:in press, 2002.

Yoshida, M., Takenaka, A., Katsuda, S.,

Kurokawa, Y., Maekawa, A. Neonatal exposure to *p-tert-octylphenol* causes abnormal expression of estrogen receptor α and subsequent alteration of cell proliferating activity in the developing rat uteri. Toxicol. Pathol., 30: in press, 2002.

2. 学会発表

吉田緑、勝田真一、渡辺元、田谷一善、前川昭彦：胎仔期および授乳期の低用量 bisphenol A 曝露がラット雌性生殖系に及ぼす影響、第 28 回トキシコロジー学会学術年会、2001 年 6 月、東京。

Yoshida, M., Katsuda, S., Takahashi, M., Shimomoto, T., Watanabe, G., Taya, K., Maekawa, A.: Effect of in utero and lactational exposure to low-dose bisphenol A on rat uterine carcinogenesis. 環境ホルモン学会第 4 回研究発表会、2001 年 12 月、つくば。

吉田緑、勝田真一、谷本倫、高橋正一、下元貴澄、田谷一善、中江大、黒川雄二、前川昭彦：新生仔期オクチルフェノール曝露時間の長さがラット子宮発がんに与える影響、第 18 回日本毒性病理学会、2002 年 1 月、東京。

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

Nonylphenol の胎児・幼児への影響

分担研究者 福島 昭治 大阪市立大学大学院医学研究科教授

研究要旨：Nonylphenol の経胎盤あるいは授乳曝露による新生児マウスに及ぼす影響を検討した。200mg/kg 投与群で妊娠期間の延長傾向、出産児数、受胎率及び出生率の低値傾向がみられたが、性比には差が認められなかった。また、F₁ 雄動物の臨床症状及び生殖器系の形態及び精子機能への Nonylphenol の影響はみられなかった。

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ンドロゲン作用を有し、男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曝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、授乳期曝露による次世代における男性生殖器系への影響を実験動物を用いて検討する。

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、4-nonylphenol (Nonylphenol) を 0、0.05、50 および 200 mg/kg/day の用量で連日強制経口投与した。母動物は各 9 群匹ずつとした。溶媒としてコーンオイルを用い、投与量は 10 ml/kg である。なお、脳ドーパミン等の測定のため母動物には離乳後さらに被験物質を 3 週間投与し、分娩 21 日後に F₁ 動物を離乳した。その後 F₁ 雄動物は無処置で飼育し、離乳後 10 週（13

週齢)で屠殺剖検し、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。F₁雌動物は脳ドーパミン等の測定のため離乳後3週(6週齢)で屠殺、剖検した。

【実験2】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、無処置対照群、Bisphenol A 0.05 mg/kg, Nonylphenol 0.05 mg/kg および Bisphenol A 0.05 mg/kg と Nonylphenol 0.05 mg/kg の複合の4群を設け、被験物質を連日強制経口投与した。

C. 研究結果

【実験1】

<母動物>

1. 臨床症状

全ての動物に特記すべき臨床症状を認めなかった。

交尾確認動物のうち着床痕のない非妊娠動物を0, 0.05 と 50 mg/kg 群で各1例、200 mg/kg 群で3例に認めた。また誤投与による死亡を0 mg/kg 群の1例に認めた。

2. 体重

200 mg/kg 群で妊娠7日に対照群と比較して有意な高値を、逆に18

日には有意な低値を認めた。授乳期間中および離乳後では200 mg/kg 群で有意な高値もしくはその傾向を認めた。その他の群では妊娠および授乳期間を通して有意な差を認めなかった。

3. 分娩状況 (Tables 1-1, 1-2)

200 mg/kg 投与群において妊娠期間の延長傾向、出産児数、受胎率および出生率の低値傾向を認めた。妊娠率および生後4日の性比では対照群と比較して投与群に差を認めなかった。

4. 病理学的検査

1)肉眼的検査

全ての動物において何らの変化も観察されなかった。

2)最終体重および脳重量

最終体重および脳重量とも対照群と比較して投与群に有意な差を認めなかった。

<F₁ 動物>

1. 臨床症状

実験期間中に第3群の同一腹のF₁雄動物2例がいずれも低体重を示し、死亡した。しかし剖検時の肉眼病理学的検査では著変を認めなかった。それ以外の動物においても肉眼的に異常所見は認められなかった。

2. 体重 (Fig.1)

雌の200 mg/kg 投与群で実験開

始時の体重が対照群と比較して有意に低値を認めたが、雄では実験期間中、対照群と比較して投与群に有意な差を認めなかった。

3. 病理学的検査

1) 肉眼的検査

全ての動物において何らの変化も観察されなかった。

2) 最終体重および器官重量 (Tables 2-1, 2-2 and 3)

雄では最終体重および脳、精巣および精巣上体重量において対照群と比較して投与群に有意な差を認めなかった。

雌では最終体重および脳重量において対照群と比較して投与群に有意な差を認めなかった。

3) 精子検査 (Table 4)

精巣、精巣上体の精子数および精子運動率は対照群と比較して投与群に有意な差を認めなかった。精子形態異常発生率では 200 mg/kg 群で有意な高値を認めた。形態異常として non-head な精子が多く認められた。

4. 脳内モノアミン量の定量

母動物において脳ドーパミン、ノルエピネフリン及びセロトニンの変動はみられなかった。F₁ 雌動物ではドーパミンの増加がみられ、50 と 200 mg/kg 投与群では有意に増加した。しかし、ノルエピネフリンとセロト

ニンの変動はみられなかった。

【実験 2】現在、実験を実施中である。

D. 考察

実験 1 において Nonylphenol の 200 mg/kg 投与群で妊娠 18 日に対照群と比較して体重は有意な低値を示し、授乳期間では逆に有意な高値を示した。また、分娩状況においては、200 mg/kg 群で妊娠期間の延長傾向、出産児数、受胎率および出生率の低値傾向がみられたが、生後 4 日の F₁ 動物の性比および妊娠率では対照群と比較して投与群に差を認めなかった。このため、この変化は Nonylphenol の母動物に対する毒性変化であり、内分泌かく乱作用ではないと判断した。

また精子検査においては、精巣および精巣上体の精子数、精子運動率は対照群と比較して投与群に差を認めなかったが、精子形態異常発生率が 200 mg/kg 群で対照群と比較して有意な高値を示した。これはアーチファクトと考えられる non-head の発生が多く、精子数や運動率においては異常が認められなかったことから、Nonylphenol 投与による影響はないと判断した。

さらに F₁ 雌動物の脳ドーパミン量の増加がみられたが、モノアミン分

解ならびに合成酵素の mRNA に変動がみられないと思われることから（データ未記載）、その意義については今後の検討を要する。

以上の結果より、Nonylphenol を妊娠および授乳期間中に投与することによって、経胎盤および乳汁を介して曝露された F₁ 雄動物においては臨床症状および生殖器系の形態および精子機能への影響はないと考えられた。

E. 結論

Nonylphenol の経胎盤あるいは授乳曝露による新生児マウスに及ぼす影響を検討した。高用量投与群で母動物における妊娠期間の延長傾向、出産児数、受胎率及び出生率の低下傾向がみられたが、F₁ 雄動物の臨床症状及び生殖器系の形態及び精子機能への Nonylphenol の影響はみられなかった。Bisphenol A と Nonylphenol の低用量複合による影響については現在、実験を継続中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Masuda, C., Wanibuchi, H., Otori, K., Wei, M., Yamamoto, S., Hiroi, T., Imaoka, S., Funae, Y. and 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.

2) Vijayaraghavan, M., Wanibuchi, H., Karim, R., Yamamoto, S., Masuda, C., Nakae, D., Konishi, Y. and Fukushima, S.: Dimethylarsinic acid induces 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in the kidney of NCI-Black-Reiter rats. *Cancer Lett.*, 165, 11-17, 2001.

3) Seike N., Wanibuchi, H., Morimura, K., Nishikawa, T., Kishida, H., Nakae, D., Hirata, K. and Fukushima, S.: Lack of promoting effect due to oral administration of dimethylarsinic acid on rat lung carcinogenesis initiated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Cancer Lett.*, 175, 113-119, 2002.

2. 学会発表

1) Nishikawa, T., Ogawa, M., Kanako, M., Seike, N., Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Promoting effects of an organic arsenicals, dimethylarsinic acid and related compounds in rat liver carcinogenesis. 92nd Annual Meeting, American Association for Cancer Research, March 24-28, New Orleans, LA, U.S.A., 2001 (AACR proceedings, vol.42, March 2001, 1252, p.110)

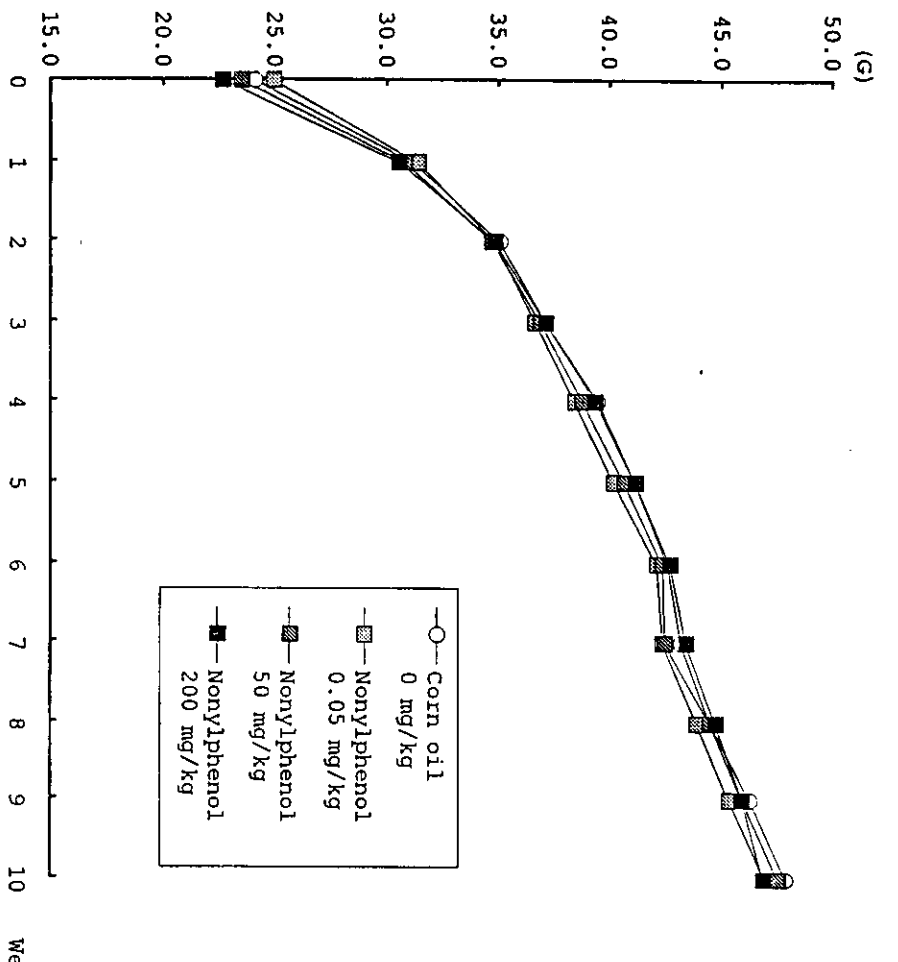
2) Fukushima, S., Wanibuchi, H., Wei,

M., Salim, E.I., Nishikawa, T. and Morokawa, T.: Carcinogenicity of dimethylarsinic acid and related compounds in animals. Annual Meeting, International Conference on Environmental Toxicology of Metals and Metalloids –Environmental Chemistry, Toxicology and Health, July 1-5, South Molle Island, Australia. 2001 (Program, p.23)

3) Fukushima, S., Wanibuchi, H., Wei, M., Salim, E.I. and Morimura, K.: Carcinogenicity of dimethylarsinic acid, an inorganic arsenic metabolite in rodents. 18th European Congress of Pathology, September 8-13, Berlin, Germany, 2001 (Final Program, P-124, p.44)

G. 知的所有権の取得状況
なし

Male



Female

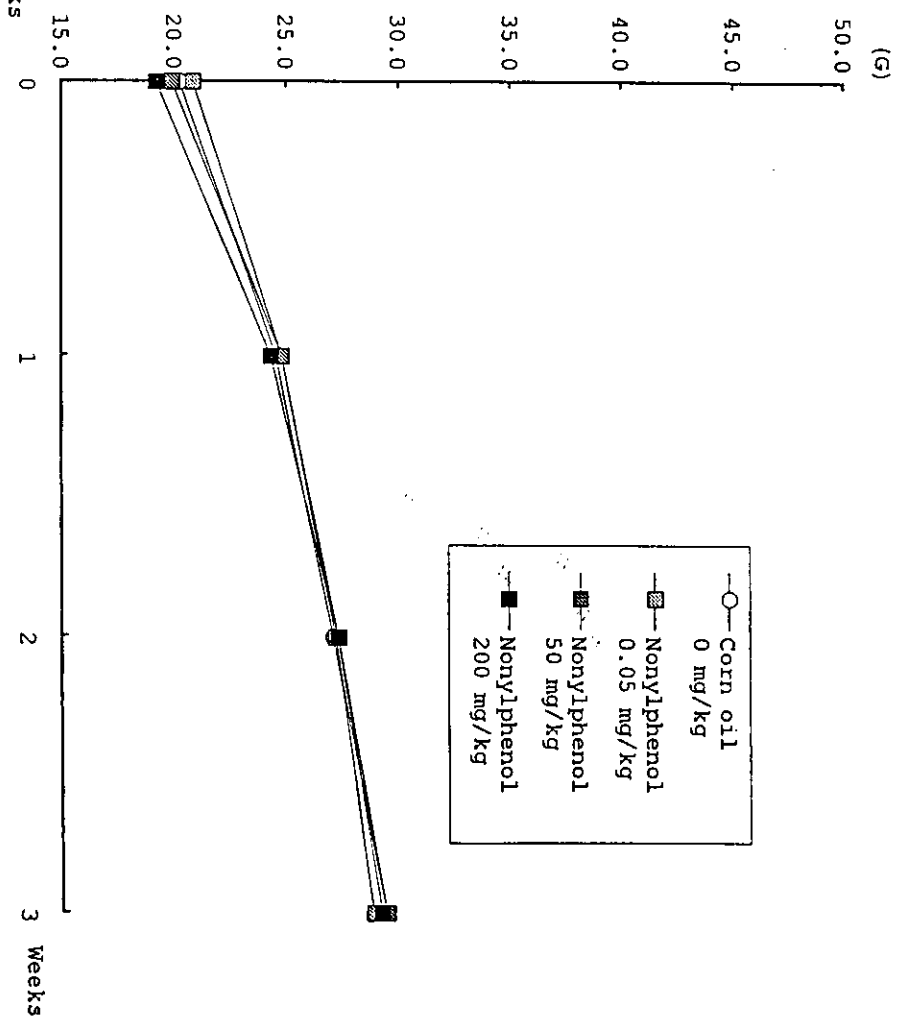


Fig. 1 Body weight curve of offspring : after weaning

Table 1-1 Childbirth Observation of Mice

Group	Dose (mg/kg)	No. of Corputations	No. of Litter	Gestation Period (Day)				
				Average	18	19	20	21
1	0	9	7	19.0	0	7	0	0
2	0.05	9	8	18.9	1	7	0	0
3	50	9	8	18.9	1	7	0	0
4	200	9	6	19.3	1	2	3	0

Group	Dose (mg/kg)	Abnormal Pregnancy Condition	No. of Litter Size	No. of		No. of Still Born (%)
				Live Born		
1	0	0	83	83		0
			11.9 ± 2.1	11.9 ± 2.1		(0)
2	0.05	0	90	90		0
			11.3 ± 3.7	11.3 ± 3.7		(0)
3	50	0	97	97		0
			12.1 ± 2.2	12.1 ± 2.2		(0)
4	200	0	48	47		1
			7.8 ± 4.7	7.8 ± 4.7		(2.1)

Table 1-2 Childbirth Observation of Mice

Group	Dose (mg/kg)	Gestation Index (%)	Fertility Index (%)	Live Birth Index (%)	Sex Ratio (Male/Total) ON PND 4
1	0	100.0	87.5	95.0 ± 8.5	0.56 ± 0.17
2	0.05	100.0	88.9	93.5 ± 5.0	0.48 ± 0.06
3	50	100.0	88.9	92.2 ± 4.4	0.49 ± 0.18
4	200	100.0	66.7	69.1 ± 21.8	0.52 ± 0.24

Gestation Index(%) ; (No. of litters / No. of pregnancy) X 100
 Fertility Index(%) ; (No. of pregnancy / No. of corpulations) X 100
 Live Birth Index(%) ; (No. of litter Size / No. of implantations) X 100

Table 2-1 Final Body and Organ Weight Data Of F₁ Male Mice

Sex	Group No.	Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice Examined	Final Body Weight (g)	Brain(g)	Testes(g)	Epididymis(g)
Male	1	Corn oil	0	10	48.2 ± 5.4	0.50 ± 0.02	0.27 ± 0.03	0.10 ± 0.01
	2	Nonylphenol	0.05	10	46.6 ± 4.7	0.50 ± 0.02 (n=9)	0.28 ± 0.04 (n=9)	0.10 ± 0.01
	3	Nonylphenol	50	10	49.5 ± 3.7	0.51 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.10 ± 0.01
	4	Nonylphenol	200	10	48.4 ± 5.0	0.52 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.10 ± 0.01

Values are mean ± S.D.

Table 2-2

Organ to Body Weight Ratio data of F₁ Male Mice (G/100G bw)

Sex	Group No.	Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mice Examined	Brain (g)	Testes (g)	Epididymis (g)
Male	1	Corn oil	0	10	1.05 ± 0.12	0.56 ± 0.07	0.21 ± 0.03
	2	Nonylphenol	0.05	9	1.07 ± 0.11	0.60 ± 0.08	0.21 ± 0.02
	3	Nonylphenol	50	10	1.03 ± 0.06	0.53 ± 0.07	0.20 ± 0.02
	4	Nonylphenol	200	10	1.09 ± 0.13	0.55 ± 0.10	0.21 ± 0.02

Values are mean ± S.D.

Table 3 Final Body and Organ Weight Data of F₁ Female Mice (3 Weeks old)

Sex	Group No.	Treatment	Dose (mg/kg)	No. of Examined	Final Body Weight	Brain	
						Absolute(g)	Relative(%)
Female	5	Corn oil	0	20	29.5 ± 1.8	0.49 ± 0.02	1.65 ± 0.11
	6	Nonylphenol	0.05	20	29.2 ± 2.5	0.49 ± 0.02	1.67 ± 0.11
	7	Nonylphenol	50	20	29.4 ± 1.8	0.49 ± 0.02	1.66 ± 0.12
	8	Nonylphenol	200	20	28.9 ± 1.5	0.49 ± 0.03	1.71 ± 0.12

Values are mean ± S.D.

Table 4 Sperm Number, Movement Ability and Morphology Data of F₁ Male Mice

Group No.	Treatment	Dose (mg/kg)	No. of Animals	Number (×10 ⁷ /ml)		Movement Ability		Morphology	
				Testes	Epididymis	5 minutes (%)	Abnormality (%)		
1	Corn oil	0	10	0.31 ± 0.09	0.45 ± 0.15	89.6 ± 8.4	1.44 ± 0.88 (n=9) a		
2	Nonylphenol	0.05	10	0.31 ± 0.11	0.41 ± 0.08	82.9 ± 10.1	1.22 ± 0.97 (n=9) a		
3	Nonylphenol	50	10	0.28 ± 0.08	0.41 ± 0.11	83.0 ± 12.0	3.40 ± 2.45 (n=7) a		
4	Nonylphenol	200	10	0.28 ± 0.07	0.43 ± 0.14	90.1 ± 7.1	5.05 ± 2.20 (n=8) b**		

a : Not examined due to no sperm

a : Not examined due to no sperm.

b : Not examined due to no sperm or artifact.

** : Significantly different from control group at P<0.01.

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

協力研究者 石見 佳子 国立健康・栄養研究所 室長

研究要旨 大豆イソフラボンとくに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、また、近年ではゲニステインの有効性に対する関心も高く、摂取量や摂取時期による安全性の検討が必要である。

我々は、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し、母親のみならず乳児にも一定の影響が観察された。この影響は大豆イソフラボン混合物の方がゲニステイン単独投与より強く、ゲニステイン以外のイソフラボンであるダイゼインの影響が示唆された。そこで、本年はゲニステインとダイゼインの生体影響を比較した。妊娠・授乳ラットへの投与では、ダイゼインの生体影響が強く、成長期マウスでは両者の影響は同等であったが、雄において体重増加抑制と胸腺重量の低下が強くみとめられた。

この結果より、動物種や性による生体影響の差異と、ダイゼインの方がゲニステインより生体影響が強い可能性が示唆された。

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可能性が推測されている。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作用をもち、内分泌かく乱作用

の可能性も懸念されている。日本人は多量の大豆あるいは大豆加工品を摂取しており、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、その有効性と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である。

B. 研究方法

実験は2種類行ない、はじめの実験では、SD系妊娠ラットを用いて妊娠期・授乳期におけるゲニステインとダイゼイン暴露の影響を観察した。飼料に0.05%の大豆イソフラボンを混合して、離乳前まで投与した。出産後は子どもの数は雌雄同数の10匹とし、経時的に雌雄1匹ずつ解剖し、臓器重量と骨重量を測定した。親子ともに血清中の甲状腺ホルモン濃度を測定した。

2番目の実験では、5週齢のddyマウスの雌雄を用い、飼料中のゲニステインとダイゼインは0.08%としてマウスに投与した。飼育は4週間行い、体重と臓器重量、骨指標と血清脂質を測定した。

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

1) 妊娠・授乳ラットへの大豆イソフラボン暴露の影響

平成12年度の研究結果では、大豆イソフラボン混合物を用いた場合の生体影響はゲニステイン単独投与の場合に比べて強いことが分かった。そこで、本年度はゲニステインとダイゼインの比較検討を行った。

図1には、飼育期間中の母親と誕生後の仔ラットの体重変化を示した。いずれもゲニステインではコントロールと差が小さいが、ダイゼインでは明らかな体重増加の抑制が見られた。

表1には親ラットの体重と臓器重

量を示した。親ラットでは肝臓重量の増加、胸腺重量の低下が大豆イソフラボン群で認められ、とくにダイゼインでの影響が顕著であった。

他方、仔ラットの臓器の相対重量には生殖器も含めて有意な影響は見られなかった。また、大腿骨湿重量と乾燥重量についても有意な影響は見られなかった（表2）。

大豆イソフラボン混合物を用いた先行研究では、親ラットの血中甲状腺ホルモン濃度と仔ラットの甲状腺刺激ホルモン濃度の上昇を観察したが、表3、4に示すとおり、親、仔ラットともにT3、T4、TSHに対して有意な影響は見られなかった。

2) 成長期マウスに対する大豆イソフラボン暴露の影響

図2に示すとおり、成長期マウスにおいても雌雄に関わらず、体重増加の抑制が見られた。ラットの場合に比べて、ゲニステインとダイゼインの影響には差が見られなかった。表5、6には、体重増加量と飼料摂取量の関連を示した。ゲニステインとダイゼインの群では、飼料摂取量への影響は見られず、体重増加の抑制があるため、飼料効率でみると大豆イソフラボンは抑制が認められるが有意な影響は雄性マウスのみであった。

臓器重量に対する影響では、雄性マウスでは、胸腺の有意な低下が見られたが、雌性マウスでは有意ではなかった。その他の生殖器も含めた臓器には影響がなかった。

大腿骨の骨密度、骨塩量、面積に対する影響は図3、4に示した。雄性マウスではいずれのイソフラボンもこれらの指標に対して有意な増加が

見られた。しかし、雌性マウスではこうした影響はまったくなく、雌雄の違いが顕著であった。

D. 考察

内分泌かく乱作用を持つ物質として、日本人が日常的に摂取している大豆イソフラボンの量は20mgに及ぶと試算されている。大豆イソフラボンにはアグリコンとしては3種があり、この内ゲニステインがエストロゲンのレセプターへの親和性からとくに問題とされてきた。しかし、他方ではフィトエストロゲンとしてのゲニステインは、癌や心疾患に対する予防効果も注目され、日本人の健康への関与も示唆されている。

これまでの研究から、我々はゲニステインの骨に対する有効性を明らかにし、卵巣摘出マウスを用いて骨への効果は内分泌かく乱作用を示すレベルの1/10で有効であることを示した。

他方、妊娠・授乳期のラットへの暴露によって、母乳中へのゲニステイン、ダイゼインの移行と甲状腺ホルモンへの影響、仔ラットの生体影響について検討した。その結果、生体影響は見られるものの、仔ラットへの影響はきわめて弱いものであることを確認した。

今年度ではゲニステインとダイゼインの生体影響の比較を妊娠・授乳ラットと成長期マウスについて行った。その結果、ラットでは、ダイゼインの親ラットの体重増加の抑制が強いことを確認し、成長期マウスでは雌雄を問わず、体重増加の抑制が見られた。また、親ラットでは肝臓重量の増加と胸腺重量の低下を、マ

ウスの胸腺重量の低下がみられた。また、マウスでは雄性での影響が強く、雌性では弱いことも確認した。

これらの結果より、大豆イソフラボンとしては、ゲニステインのみならず、ダイゼインにも注目する必要性が確認された。ダイゼインは大腸内や生体内でイコールに代謝され、イコールの生体影響も強いことが示唆されているので、今後ダイゼインも含めて検討することが必要である。

他方、ラットとマウスでは生体影響に違いが見られ、またマウスでは雌雄での影響の違いが見られた。その点で人において、性差を考慮した検討が必要である。マウスの結果から、単にエストロゲン作用のみならず、アンドロゲン作用との関連についても注目する必要があると思われる。

また、胸腺重量への影響から免疫機能への影響についての検討が必要と思われる。

E. 結論

妊娠・授乳ラットと成長期マウスにゲニステインとダイゼインを含む飼料を投与した結果、ラットではダイゼインの生体影響が強く、マウスではダイゼイントとゲニステインの生体影響に差は見られなかった。

親ラットでは体重増加の抑制、肝臓重量の増加、胸腺重量の低下が見られた。仔ラットでも体重増加の抑制が見られたが、その他の影響はなかった。

マウスでは体重増加の抑制があり雄性マウスのみ胸腺重量の低下や大腿骨量の増加が見られた。