

Table 9. Effect of prepubertal resveratrol treatment on MNU-induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats

Resveratrol treatment	No. of rats	No. of rats with carcinomas $\geq$ 1cm (%)	Total no. of carcinomas	Cancer multiplicity*	Cancer latency** (weeks)
Untreated	24	7 (29.2%)	22	0.92 $\pm$ 0.19	31.7 $\pm$ 2.6
10 mg/kg/day x5	24	7 (29.2%)	24	1.00 $\pm$ 0.27	34.3 $\pm$ 2.0
100 mg/kg/day x5	24	14 (58.3%)*	41	1.71 $\pm$ 0.28***	32.6 $\pm$ 1.6

Values represents mean $\pm$ SD.

\*Number of carcinomas (all sizes) per rat.

\*\*Interval between MNU administration to largest mammary tumor reached  $\geq$ 1cm in diameter.

\*\*\* p < 0.05 compared with untreated control.

Table 10. Effect of prepubertal zearalenone treatment on histologically detected mammary tumors and mammary carcinomas induced by MNU in female Sprague-Dawley rats

Zearalenone treatment	No. of rats	Total no. of tumors	Tumors per rat	Total no. of carcinomas	Carcinomas per rat
Untreated	24	84	3.5 $\pm$ 0.4	74	3.1 $\pm$ 0.3
0.1 mg/kg/day x5	24	54	2.3 $\pm$ 0.5	50	2.1 $\pm$ 0.5
10 mg/kg/day x5	24	44	1.8 $\pm$ 0.6*	34	1.4 $\pm$ 0.6*

Values represent mean $\pm$ SE.

\*p < 0.05, compared with untreated control.

Table 11. Effect of prepubertal zearalenone treatment on ovarian structure in female Sprague-Dawley rats administered MNU at 28 days of age and sacrificed at 37 weeks of age

Zearalenone treatment	No. of rats	Rats without corpora lutea (%)	Weight of ovaries (mg)	
			With corpora lutea	Without corpora lutea
Untreated	8	1 (13)	110 ± 12	57
0.1 mg/kg/day x5	17	8 (47)	102 ± 12	79 ± 15
10 mg/kg/day x5	13	9 (69)	89 ± 22	63 ± 6

Values represent mean±SE.

Table 12. Effects of prepubertal zeranol exposure on mammary tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats administered 50 mg/kg MNU at 28 days of age

Treatment	No. of rats	No. of rats with carcinoma ≥1 cm (%)	Total no. of carcinoma	No. of carcinoma per rat	Latency (weeks)	Total no. of fibroadenoma	Other tumors
Untreated	22	18 (82)	33	1.5±0.3	19.3±2.1	1	2 ovarian thecomas, 1 skin squamous cell carcinoma
0.1 mg/kg/day x5	22	14 (64)	50	2.3±0.4	23.7±2.0	6	1 ovarian adenoma, 2 renal mesenchymal tumors
10 mg/kg/day x5	23	16 (70)	34	1.5±0.3	18.6±2.3	13	1 ovarian thecoma

Values are mean±S.E

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担・総合研究報告書

内分泌かく乱物質と大豆等既存食品の発育・癌化および内分泌かく乱作用の比較

主任研究者： 螺良 愛郎 関西医科大学 病理学第二講座 教授

妊娠中に暴露した植物由来エストロゲン様物質が  
出生仔の男性生殖器に及ぼす影響

分担研究者： 山田 久夫 関西医科大学 解剖学第一講座 教授  
研究協力者： 片岡 洋祐 関西医科大学 解剖学第一講座 講師  
井岡 真基 関西医科大学（博士課程・外科系）大学院生

研究要旨

植物由来・食品中エストロゲン様物質であるゲニスタイン Genistein を、妊娠ラットに腹腔内投与し、出生後の胎子が成熟期に達した際の男性生殖器や体重に及ぼす影響を検索することを目的とする。平成 14 年度には、65 日齢(young adult)についての検索をおこない、平成 15 年度には 300 日齢(middle age)についての検索をおこなった。ゲニスタインの投与は、低量 (1.5mg/kg、常食量相当) および大量 (30mg/kg) の 2 群とコントロール群(無摂取)を作成した。

オス 65 日齢の体重および精巣・副生殖器重量を比較したところ、体重は大量投与群 (平均  $250 \pm 10.0$ g) ではコントロール群 (平均  $265 \pm 29.5$ g) に比べ、低体重傾向であったが、低量投与群 (平均  $262 \pm 21.4$ g) ではあまり変化が見られず、統計的に有意差がみとめられなかった。精巣重量は、コントロール群では左右の計が平均  $2.87 \pm 0.11$ g、低量投与群では  $2.64 \pm 0.17$ g、大量投与群では  $2.77 \pm 0.25$ g で、低量投与群がコントロール群に比し統計的有意差 ( $p=0.0171$ ) を有していた。副生殖器重量も、投与群で低重量の傾向を認めたが、用量依存性や統計的有意差はなかった。300 日齢についての検索をおこなったところ、体重と精巣および副生殖器の重量の比較では、体重は大量投与群 (平均  $616 \pm 46.9$ g) で、コントロール群 (平均  $650 \pm 77.1$ g) に比べ、低体重傾向であった。また低量投与群 (平均  $626 \pm 65.4$ g) でも同様であった。精巣重量は大量投与群で左右の計が平均  $3.36 \pm 0.20$ g、低量投与群で平均  $3.48 \pm 0.12$ g、またコントロール群で平均  $3.46 \pm 0.35$ g で統計的有意差はなかった。

したがって、重量で判定する限り、少なくとも妊娠中の常食量のゲニスタイン摂取が次世代男性の成熟期以降の生殖器機能へ与える影響はないものと言える。

## A. 研究目的

エストロゲン様作用を有する環境中の化学物質（いわゆる環境ホルモン）が、生体のホルモン-受容体間の作用を修飾し、長期にわたって影響を与えることが近年問題となっている。われわれがよく食品摂取する大豆等の穀類もエストロゲン様作用のある物質を含有することが知られているので、この植物由来・食品中エストロゲン様物質を妊娠中に摂取した時の、出生後胎仔の内分泌機能に及ぼす影響（内分泌かく乱作用）を検索する必要がある。そこで、本研究の分担項目として、内分泌機能の表現系としての男性生殖器系に対する、植物由来・食物性エストロゲン様物質のひとつであるゲニスタイン Genistein の妊娠中摂取（胎仔期暴露）の影響について、体重及び組織重量を指標に検索する。

## B. 研究方法

ゲニスタイン Genistein を DMSO に溶解し、妊娠ラット (Sprague Dawley) の腹腔内に妊娠 15 日目から 24 時間ごとに 5 回、低量 (1.5mg/kg = 常食量相当) または大量 (30mg/kg) 投与した。コントロール群として、Genistein の溶解に用いる DMSO をゲニスタイン投与群と同用量になるよう投与した。出生後の雄仔ラットのうち同一母胎由来のものは 2 例以内となるように選び、以下の実験をおこなった。

65 日齢 (young adult) に達した雄ラットおよび 300 日齢 (middle age) に達した雄ラットを安楽死させ、体重を計測、その後脱血のち精巣および副生殖器を丁寧に取り出してそれらの重量を比較した。

なお、ラット飼育期間の関係上、平成 14 年度には 65 日齢の検索を、平成 15 年度には 300 日齢の検索をおこなった。

動物実験に関しては、所属大学の動物実験の指針に従い、審査を受けている。また、飼育のためのケージ・給水ビンなどは、環境ホルモンフリーのものを用い、飼料はオリエンタル酵母工業社製の豆類混入のない NIH07PLD を用いた。

## C. 研究結果

65日齢雄ラットの体重と精巣および副生殖器の重量の結果は、図表1に示している。また、それらをまとめたものが図表2である。すなわち、体重は大量投与群（平均 $250 \pm 10.0$ g）ではコントロール群（平均 $265 \pm 29.5$ g）に比べ、低体重傾向であったが、低量投与群（平均 $262 \pm 21.4$ g）ではあまり変化が見られず、統計的に有意差がみとめられなかった。精巣重量は、コントロール群では左右の計が平均 $2.87 \pm 0.11$ g、低量投与群では $2.64 \pm 0.17$ g、大量投与群では $2.77 \pm 0.25$ gで、低量投与群がコントロール群に比し統計的有意差（ $p=0.0171$ ）を有していた。副生殖器重量も、投与群で低重量の傾向を認めたが、用量依存性や統計的有意差はなかった。

300日齢雄ラットの体重と精巣および副生殖器の重量の結果は、図表3に示している。また、それらをまとめたものが図表4である。すなわち、体重は大量投与群（平均 $616 \pm 46.9$ g）で、コントロール群（平均 $650 \pm 77.1$ g）に比べ、低体重傾向であったが統計的有意差はなかった。また低量投与群（平均 $626 \pm 65.4$ g）でも同様であった。精巣重量は大量投与群で左右の計が平均 $3.36 \pm 0.20$ g、低量投与群で平均 $3.48 \pm 0.12$ g、またコントロール群で平均 $3.46 \pm 0.35$ gで統計的有意差はなかった。

## D. 考察

母体摂取のGenisteinの仔ラット体重への影響をみた既報の論文(1)でも、出生直後から飼料として与えた場合の影響を観た論文(2)でも、ともに低体重傾向を認めているので、それらはわれわれの結果を裏付けていると考える。無摂取をコントロールとした場合、統計的有意差は認められないものの体重への影響は少ないながらも存在する可能性があることになる。しかし、65日齢の無摂取群と低量投与群間、300日齢の常食量と大量投与群間では、まったく差がない。すなわち、体重への影響は極めて少ない、と言う事ができる。

男性生殖器に対するGenisteinの影響はこれまでに報告はないが、いわゆる内分泌かく乱物質については2-3の報告があり、ラットでBisphenolの影響には有意差がなかったとする論文(3)、母体にBisphenol A、EthinylestradiolやDiethylstilbestrolを投与したところ仔マウスの男性生殖器重量が低値であったとする報告(4,5)がある。

われわれの所見では、母体摂取のGenisteinにより65日齢の仔ラット男性生殖器では、低量投与群の精巣重量がコントロール群に比しわずかながら統計的有意差（ $p=0.0171$ ）を有していた以外、大量投与群・低量投与群ともに精巣も副生殖器も低重量傾向がみとめられたものの、それらの間に統計的有意差は認められなかった。300日齢の所見でも、精巣および副生殖器の重量は大量投与群・低量投与群ともに低重量傾向がみとめられたものの、統計的有意差

は全く見られなかった。またそれらの値に容量依存性は認められず、体重あたりの組織重量について注目すると、ほとんど変化がみとめられなかった。

これらを総合し、低量群の投与量は常食量相当であることも考え合わせると、成熟期以降の男性生殖器機能へのゲニスタインの影響は全くないものと予想される。

#### (引用文献)

- 1) Levy et al, Proc Soc Exp Biol Med 208: 60-66, 1995
- 2) Lephart et al, NeuroReport 12: 3451-3455, 2001
- 3) Kubo et al, Neurosci Lett 304: 73-76, 2001
- 4) 田中ら, 日本内分泌攪乱化学物質学会 第 5 回研究発表会 (広島) 要旨集 p. 309, 2002
- 5) 荒井ら, 日本内分泌攪乱化学物質学会 第 5 回研究発表会 (広島) 要旨集 p. 306, 2002

#### E. 結論

- 1) Genistein の母体摂取により、統計的有意差はないものの、仔ラットは低体重傾向を示す。
- 2) Genistein の母体摂取により、仔ラットの男性生殖器 (精巣と副生殖器) は、低体重傾向を示すものの大きな統計的有意差はない。
- 3) Genistein が母体摂取された仔ラットの男性生殖器 (精巣と副生殖器) 重量は、体重あたりに換算すると、コントロールと比べても大量群と低量群と比べてもまったく差がない。
- 4) 低量群の投与量が常食量相当であることを考えると、生殖器の重量変化で見る限り、母体摂取された Genistein は、男性生殖器の発達には影響しない。

#### F. 研究発表

##### 論文

食品中・植物由来エストロゲン様物質の母体摂取が仔ラットの男性生殖器系に及ぼす影響

井岡 真基、片岡 洋佑、山田 久夫

医学のあゆみ (投稿中)

#### G. 知的所有権の取得状況

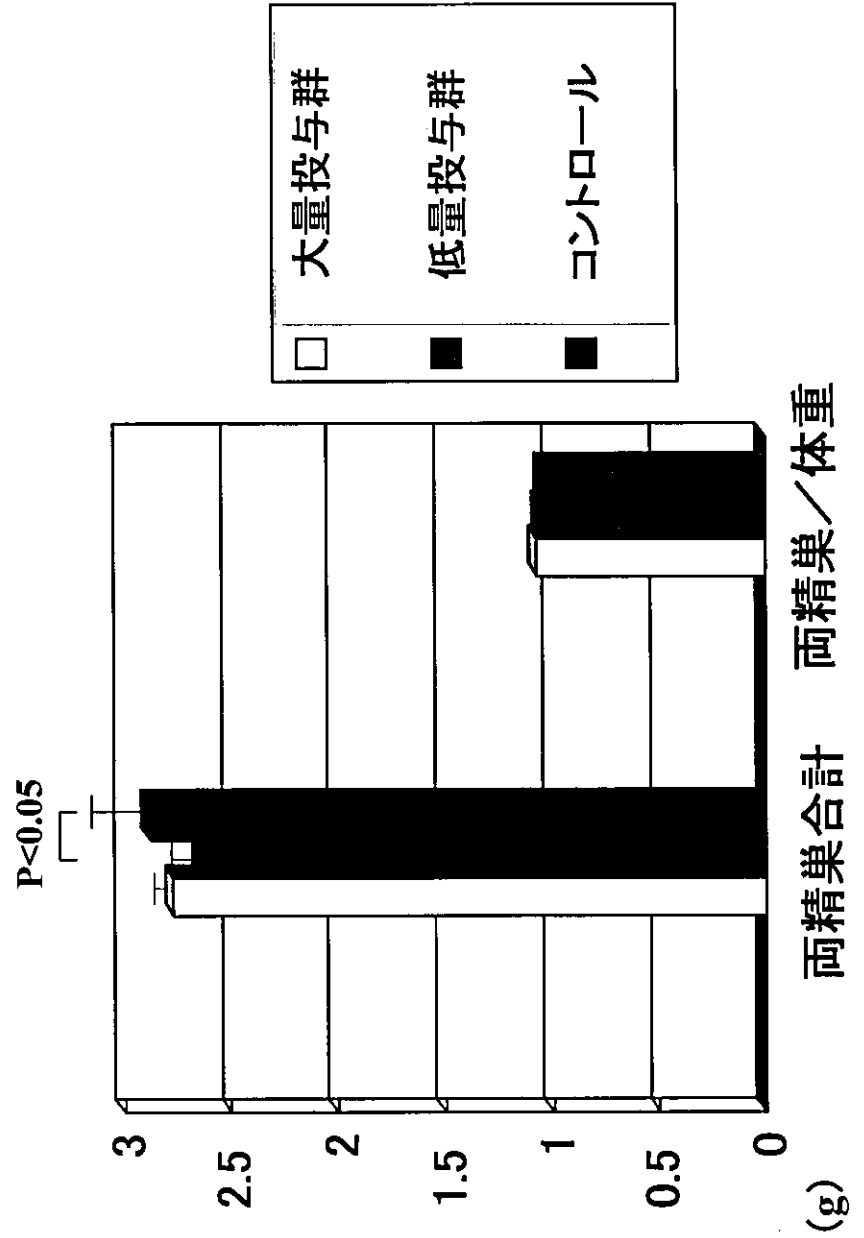
該当なし

図表1 体重と精巣重量および副生殖器重量 65日齡オス

		体重(g)	左精巣(g)	右精巣(g)	左右計A	副生殖器(g)	A/体重×100
大量投与群	a	240	1.40	1.45	2.85	2.25	1.05
	b	245	1.26	1.32	2.58	2.60	1.08
	c	245	1.30	1.35	2.65	2.28	1.20
	d	265	1.56	1.61	3.17	2.51	1.01
	e	255	1.31	1.27	2.58	2.44	1.00
低量投与群	a	280	1.38	1.43	2.81	2.50	1.06
	b	265	1.40	1.41	2.81	2.70	0.87
	c	290	1.23	1.28	2.51	2.56	1.06
	d	260	1.36	1.39	2.75	2.14	1.00
	e	250	1.27	1.24	2.51	2.22	1.07
コントロール	f	230	1.22	1.23	2.45	2.15	1.24
	a	215	1.30	1.36	2.66	2.14	1.15
	b	255	1.43	1.51	2.94	2.34	1.05
	c	275	1.41	1.48	2.89	2.33	1.04
	d	285	1.46	1.51	2.97	2.96	1.11
	e	260	1.45	1.43	2.88	2.53	0.67
f	300	1.45	1.45	2.00	3.11	1.19	

図表2【65日齢】

	体重 平均 (g)	精巢左右合計 平均 (g)	副生殖器 平均 (g)	両精巣／体重 平均(g)
大量投与群	250.0	2.766	2.416	1.068
低量投与群	262.5	2.640	2.378	1.050
コントロール群	265.0	2.873	2.568	1.035



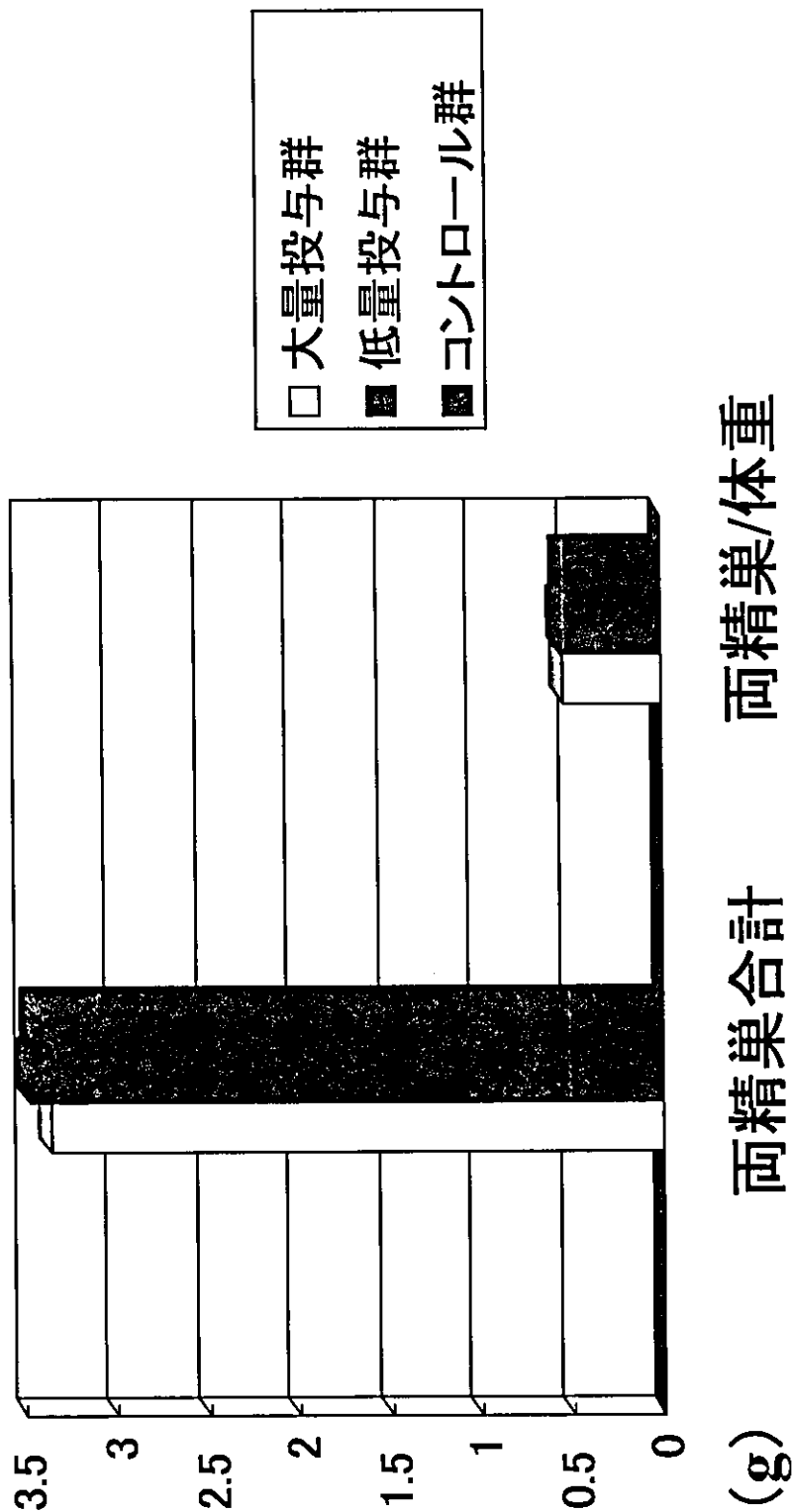


図表3 体重と精巣重量および副生殖器重量300日齢オス

		体重(g)	左精巣(g)	右精巣(g)	左右計A	副生殖器(g)	A/体重×100
大量投与群	a	638	1.61	1.60	3.21	9.29	0.50
	b	655	1.79	1.74	3.53	8.50	0.54
	c	600	1.61	1.50	3.11	7.73	0.52
	d	659	1.72	1.69	3.41	8.74	0.52
	e	533	1.63	1.64	3.27	7.66	0.61
	f	613	1.79	1.83	3.62	9.15	0.59
低量投与群	a	650	1.73	1.76	3.49	8.93	0.54
	b	705	1.72	1.76	3.48	9.32	0.49
	c	662	1.62	1.67	3.29	10.48	0.50
	d	638	1.87	1.80	3.67	9.66	0.58
	e	522	1.73	1.76	3.49	8.43	0.67
	f	578	1.78	1.70	3.48	7.41	0.60
コントロール	a	730	1.78	1.87	3.65	10.11	0.50
	b	648	1.86	1.83	3.69	9.45	0.57
	c	720	1.80	1.88	3.68	9.52	0.51
	d	600	1.91	0.95	2.86	8.85	0.48
	e	550	1.70	1.74	3.44	8.67	0.63

図表4 【300日齢】

	体重 平均 (g)	精巢左右合計 平均 (g)	副生殖器 平均 (g)	両精巢/体重 平均(g)
大量投与群	616.3	3.358	8.512	0.547
低量投与群	625.8	3.483	9.038	0.562
コントロール群	649.6	3.464	9.320	0.537



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担・総合研究報告書

内分泌かく乱物質と大豆等既存食品の発育・癌化および内分泌かく乱作用の比較

主任研究者： 螺良 愛郎 関西医科大学 病理学第二講座 教授

妊娠母体が摂取した植物由来エストロゲン様物質に暴露された  
出生仔の中枢神経系に及ぼす影響

分担研究者： 山田 久夫 関西医科大学 解剖学第一講座 教授

研究協力者： 片岡 洋祐 関西医科大学 解剖学第一講座 講師

井岡 真基 関西医科大学（博士課程・外科系）大学院生

研究要旨

植物由来・食品中のエストロゲン様物質であるゲニスタイン Genistein を、妊娠ラットに腹腔内投与し、出生後成熟した胎仔の中枢神経系に及ぼす影響を検索することを目的とする。ゲニスタインの妊娠母体への投与は、低量（1.5mg/kg、常食量相当）および大量（30mg/kg）およびコントロール群（無摂取）を作成した。出生後の胎仔を 56 日間飼育し、組織固定した脳標本（切片）を、チロシンヒドロキシラーゼあるいはカルビンディンに対する抗体をもちいた免疫組織化学法にて、それぞれカテコールアミンニューロンあるいはプルキンエニューロンを染色した。

脳の性的異型核（メスのほうがオスより容積が大きい）のひとつである青斑核そのものと青斑核付近の副核・亜核ごとのカテコールアミンニューロンの数を計数した。多大の時間のかかる実験のため、14 年度の準備実験にて計数方法を確立、15・16 年度に各実験条件群 6 例ずつの計数をおこなった。各条件群内各例の値にばらつきのないことを確認し計数値の平均値をとったところ、青斑核とその腹側亜核の A6 群全体、または A4 群と A6 群双方を含む青斑核のみの総数は、オスでもメスでも投与群で有意に減少し、大量投与群でより強く減少し、オスでコントロールの 8 割程度に、メスでは約 7 割程度にまで減少し性差がほとんどなくなっていた。

またいくつかの内分泌かく乱因子は、小脳のシナプス形成に影響しプルキンエニューロンの樹状突起の長さを変化させるとされている。それらの研究にあわせ、本研究でも分子層の厚さで計測した（15-16 年度）。各実験条件群 6 例ずつ計測したところ、分子層の厚さは 500~600  $\mu$  であり、ゲニスタインの投与群はコントロール群に比し分厚いという結果が得られた。しかし、顆粒層の厚さも変化することが新たに判明した。小脳の機能から考えて、分子層と顆粒層の比を検討することが重要であると考えられるので、各群 6 例ずつ・各例 6 箇所ずつ分子層の厚さと分子層／顆粒層比を計測し比較検討したところ分子層の厚さではコントロール群と投与群に統計的有意差を認めしたが、分子層／顆粒層比では有意差を認めなかった。

以上の結果、低量投与が常食量相当であることや、小脳での結果から機能面にはあまり影響しないであろうことも考え合わせると、ゲニスタインの母体摂取に神経質になる必要はないかもしれないが、実験生物学的には、無摂取群に対して摂取群は影響を受けていると言わざるを得ない。

## A. 研究目的

エストロゲン様作用を有する環境中の化学物質（いわゆる環境ホルモン）が、生体のホルモン-受容体間の作用を修飾し、長期にわたって影響を与えることが近年問題となっている。大豆等の穀類もエストロゲン様作用のある物質を含有することが知られているので、この植物由来・食品中エストロゲン様物質を妊娠中に摂取した時の、出生後胎仔の内分泌機能に及ぼす影響（内分泌かく乱作用）を検索する必要がある。そこで、本研究の分担項目として、内分泌機能の表現系としての中樞神経系・性的異型核（SDN）のカテコールアミンニューロン数、および小脳のプルキンエ細胞樹状突起の長さに注目し、植物由来・食品中エストロゲン様物質のひとつであるゲニスタイン Genistein の母体妊娠中摂取（胎仔期暴露）の影響について検索する。

なお、いくつかの内分泌かく乱因子は脳内で性差のある神経核（性的異型核＝SDN）の容積に影響を与えられている。性的異型核のうち間脳・視束前野内側核は、細胞数でも容積でもオスの方がメスより大きく、一方、中脳下部から橋上部の背側に位置する青班核はメスの容積がオスより大きい、と報告されている。青班核はカテコールアミンニューロンの起始核のひとつ（A4 群および A6 群の一部）であり、最近、脳内カテコールアミン含量への内分泌かく乱因子の影響が懸念されはじめているが、青班付近の亜核ごとのカテコールアミン含有ニュー

ロン数への影響を観察する研究は始めてである。

またいくつかの内分泌かく乱因子は、小脳のシナプス形成に影響、その結果プルキンエニューロンの樹状突起の長さを変化させるとされている。エストロゲン様物質である Bisphenol A、Octylphenol などは樹状突起発達を促進させるという報告もあれば影響を与えないという報告もあり見解は一致していない。ゲニスタイン Genistein についてはまだ報告されていないため研究をおこなう意義があり、今回の研究項目に加えた。

## B. 研究方法

ゲニスタイン Genistein を DMSO に溶解し、妊娠ラット (Sprague Dawley) の腹腔内に妊娠 15 日目から 24 時間ごとに 5 回、低量 (1.5mg/kg = 常食量相当) または大量 (30mg/kg) 投与した。コントロール群として、Genistein の溶解に用いる DMSO をゲニスタイン投与群と同用量になるよう投与した。出生後の雌雄仔ラットのうち同一母胎由来のものは 2 例以内となるように選び、以下の実験をおこなった。

5 6 日齢まで飼育した雌雄の仔ラットを組織固定 (ホルムアルデヒド系緩衝固定剤を血管灌流) し、その脳組織からクリオスタットを用いて 18  $\mu$  の厚さの浮遊切片を得、チロシンヒドロキシラーゼ (TH) に対する抗体にてカテコールアミンニューロンを免疫組織化学的に染色し、青斑核そのものと青斑核付近の副核・亜核ごと (青斑核外の A4 群も含めた全体総数、青斑核の A4 群 + A6 群、青斑核内の A6 群のみ、青斑核とその腹側亜核の A6 群全体、青斑核内の A4 群) のカテコールアミンニューロンの数を (全切片のうち奇数枚目のみを計測にもちいる方法で) 計数した。14 年度には準備実験をおこなって計数方法を確立し、15-16 年度に、各年度各実験条件群 3 例 (計 6 例) ずつの計数をおこなった。

また小脳については、同様の方法で得られた組織標本を、カルビンディンに対する抗体で免疫染色した。樹状突起の長さを反映する分子層の厚さを計測した。断面の選び方については、頂部や外側部を用いることにより、局面状を呈している小脳小葉の外表面に垂直な断面が得られた。さらに顆粒層の厚さとの比較もおこなった。(15-16 年度)

なお、動物実験に関しては、動物愛護につとめるよう所属大学の動物実験の指針に従い、審査を受けている。また、飼育のためのケージ・給水ビンなどは、環境ホルモンフリーのものを使い、飼料はオリエンタル酵母工業社製の豆類混入のない NIH07PLD を用いた。

### C. 研究結果

青斑核付近の位置関係を示す典型的な標本を図表1に、計数のための標本のうち代表的な顕微鏡写真を図表2に示している。56日齢・雌雄の仔ラット各例の青斑核・各亜核（A4群とA6群）のカテコールアミンニューロン数（各6例の平均値）の結果を示したのが図表3で、それをグラフに示したのが図表4である。青斑核とその付近のカテコールアミンニューロン総数は、約3千～3千数百で、投与量にかかわらず雌雄ともに減少傾向を示していた。14年度の結果から、A4群は個体差が大きく検索には向かないことが判明したため、A4・A6両群を含む青斑核でのカテコールアミンニューロン数（LCのA4+A6）と、青斑核の腹側亜核を含むA6群全体のカテコールアミンニューロン数（A6全体）を中心に検討した（図表3では太文字で示している）。双方の値とも雌雄の低量投与群で有意（オス  $p=0.033$ 、メス  $p=0.048$ ）に減少していた。すなわちメスではニューロン数がオス化し、オスのコントロール群の数を超えて減少していた。大量投与群では雌雄ともさらに減少し（オス  $p=0.023$ 、メス  $p=0.035$ ）、オスでコントロールの8割程度、メスで7割程度となり、雌雄差はほとんどなくなっていた。

一方、小脳のプルキンエ細胞の樹状突起を抗カルビンディン抗体で免疫染色した染色標本の1例を図表5に示した。各群6例、1例につき6ヶ所を計測した平均値を図表6に、それらをまとめた表を図表7に示し、統計処理をおこなった結果をグラフに表わしたものが図表8である。分子層の厚さは500～600 $\mu\text{m}$ であり、投与群で厚くなる傾向がみられたが、オスで大量投与群とコントロール群で統計的有意差（ $p<0.025$ ）を認め、低量投与群とコントロール群でも有意差（ $p<0.05$ ）を認めた。メスでは大量投与群とコントロール群で統計的有意差（ $p<0.025$ ）を認めた。しかしながら分子層／顆粒層比ではいずれも有意差を認めなかった。

#### D. 考察

中枢神経系の性的異型核のうち、他のひとつである内側視束前野の容積を比較した既報論文(1, 3, 4)では、妊娠母胎や出生直後仔ラットへの Genistein 投与はメスの神経核容積を増大(オス化)させるが、オスの神経核容積は統計的有意差のない程度に低下(低量投与群が大量投与群に比しより大きな変化)する傾向をもつ。一方、今回対象とした青斑核に関しては、Genistein 投与の報告はない。Bisphenol A や Diethylstilbestrol, Resveratrol の影響についての報告(2, 5)では、オスで容積増・メスで容積減が起こり、雌雄差が消失するか逆転するとされているが、Genistein の影響を観察したわれわれの研究では性差が消失する傾向にある点ではこれらの研究と矛盾しない。Genistein 投与に関するわれわれの所見では、当該領域のカテコールアミンニューロン総数が投与量に応じて減少しているため、無摂取を対照として考える限り、実験生物学的には影響あり、と言わざるを得ない。しかし有史以来、われわれ動物にとってこのような完全無摂取は考えられない状態であり、おそらくは常食量相当の摂取では影響がないと考えている。(例えば、われわれの施設における通常の飼育環境で一般的な餌で飼育した例では、本実験で得られたコントロール群と低量投与群の中間の値を示す。) なお、カテコールアミンニューロン数の減少がどのような機能変化を生体に与えるかについては現在のところ不明である。

内分泌かく乱因子と小脳のプルキンエ細胞の樹状突起の長さについての *in vivo* および *in vitro* の実験にて Bisphenol A, Octylphenol で促進されたという報告(6)、Diethylstilbestrol, Nonylphenol および Octylphenol では影響がなく、Bisphenol A で阻害されたという *in vitro* 実験の報告(7)があるが、われわれの実験は *in vivo* であり、報告(6)と同様の結果が得られた。また今回顆粒層にも変化が認められたが、Nonylphenol、Bisphenol A および Dibutylphthalate が小脳顆粒層の分化を阻害するという *in vitro* での報告(8)もあり、小脳での内分泌かく乱因子の影響を観察する場合、顆粒層もパラメーターとして用いるべきと考えられた。小脳の機能を考えると分子層と顆粒層の比率が重要で、今回の結果は特に常食量相当で雌雄差が少なく、小脳機能に雌雄差が少ないことも考え合わせると、Genistein 投与により形態的には変化をもたらすものの機能的にはほとんど影響ないと考えている。

青斑核カテコールアミンニューロン数と小脳皮質各層の厚さの結果から考えて、Genistein という物質そのものは、中枢神経発達に影響を与える物質である。しかし上述のように、実際の常食量では、Genistein の摂取に神経質になる必要はないものと考えられる。それより重要なことは、むしろ常食量とかけ離れて少ない(または多い)摂取の場合の身体機能への影響についての詳細な調査をおこなう必要があることである。今回のような研究は時間を要するため、3年間の研究期

間ではそのような実験を行い、結果を出すことが不可能であった。厚生労働省が新たな取り組みをおこなうことを願いたい。

(引用文献)

- 1) Levy et al, Proc Soc Exp Biol Med 208: 60-66, 1995
- 2) Kubo et al, Neurosci Lett 304: 73-76, 2001
- 3) Faber et al., Biol Reprod 45: 649-653, 1991
- 4) Faber et al., Reprod Toxicol 7: 35-39, 1993
- 5) 荒井ら、日本内分泌攪乱化学物質学会第5回研究発表会(広島)要旨集 p. 277, 2002
- 6) 坂本ら、日本内分泌攪乱化学物質学会第5回研究発表会(広島)要旨集 p. 280, 2002
- 7) 木村ら、日本内分泌攪乱化学物質学会第5回研究発表会(広島)要旨集 p. 291, 2002
- 8) 永田ら、日本内分泌攪乱化学物質学会第6回研究発表会(仙台)要旨集 p. 354, 2003

E. 結論

- 1) Genisteinの母体摂取により、性的異型核のひとつである青班核(とくにA6群)のカテコールアミン・ニューロン数は、オス、メスともに減少し、性差が消失する傾向があった。
- 2) Genisteinの母体摂取により、小脳のプルキンエ細胞樹状突起の長さ(分子層の厚さ)は有意に促進したが、分子層/顆粒層比では有意差はなかった。
- 3) 上記2つの実験結果から考えてGenisteinと言う物質そのものは、中枢神経発達に影響を与える物質である。しかし考察で述べたように、実際の常食量では、Genisteinの摂取に神経質になる必要はないものと考えられる。それより重要なことは、むしろ常食量とかけ離れて少ない(または多い)摂取の場合の身体機能への影響についての詳細な調査をおこなう必要があることである。



## F. 研究発表

### 第30回日本神経内分泌学会

(2003年9月12日、横浜)にて学会発表。

「植物由来エストロゲン様物質に暴露した

妊娠ラットの出生仔の中樞神経におよぼす影響」井岡真基、片岡洋祐、山田久夫  
抄録：Brain-Pituitary 2003 第30回日本神経内分泌学会講演要旨集 p.37

### 第31回日本神経内分泌学会

(2004年10月10日、弘前)にて学会発表

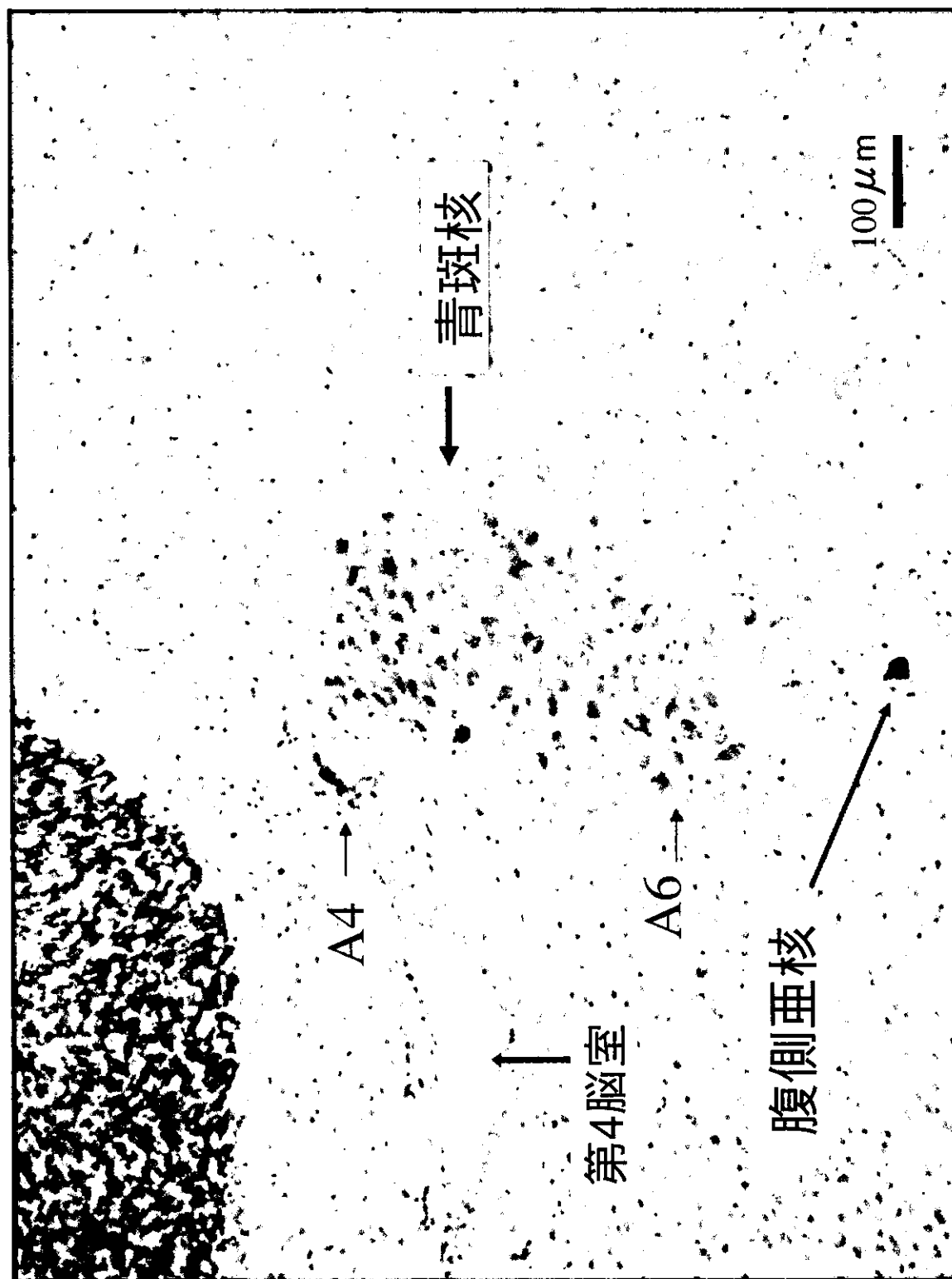
「植物由来エストロゲン様物質の胎児期暴露が中枢神経系に及ぼす影響」井岡真基、片岡洋祐、山田久夫

抄録：日本内分泌学会雑誌 80(2) :p.365

## G. 知的所有権の取得状況

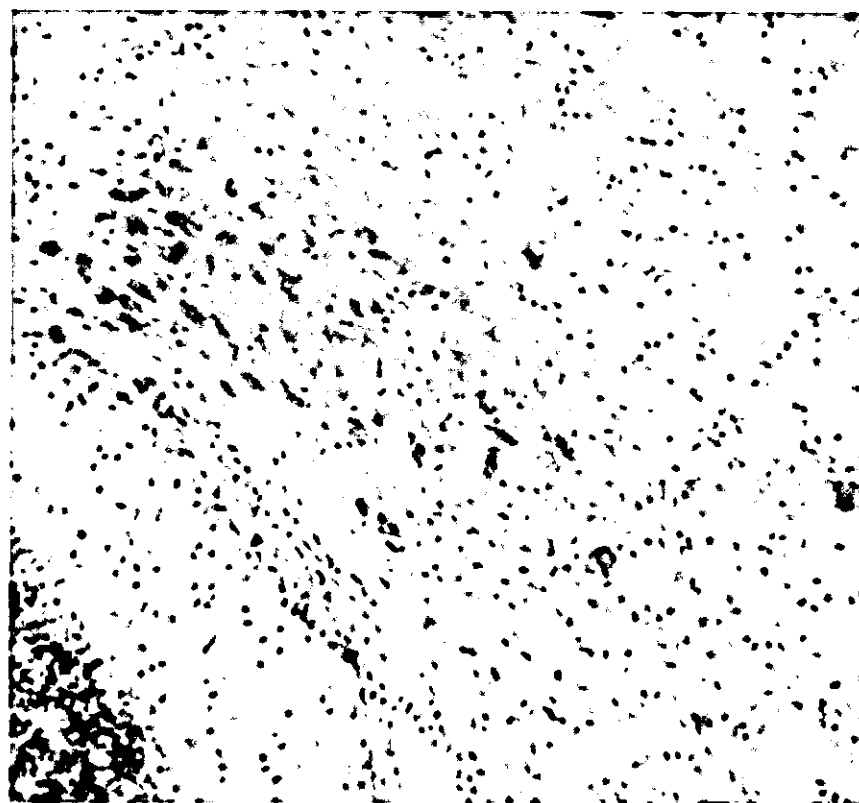
該当なし

図表1 Tyrosine Hydroxylaseに対する抗体を用いた免疫染色と  
Hematoxylin対比染色（コントロール群の前頭断標本）

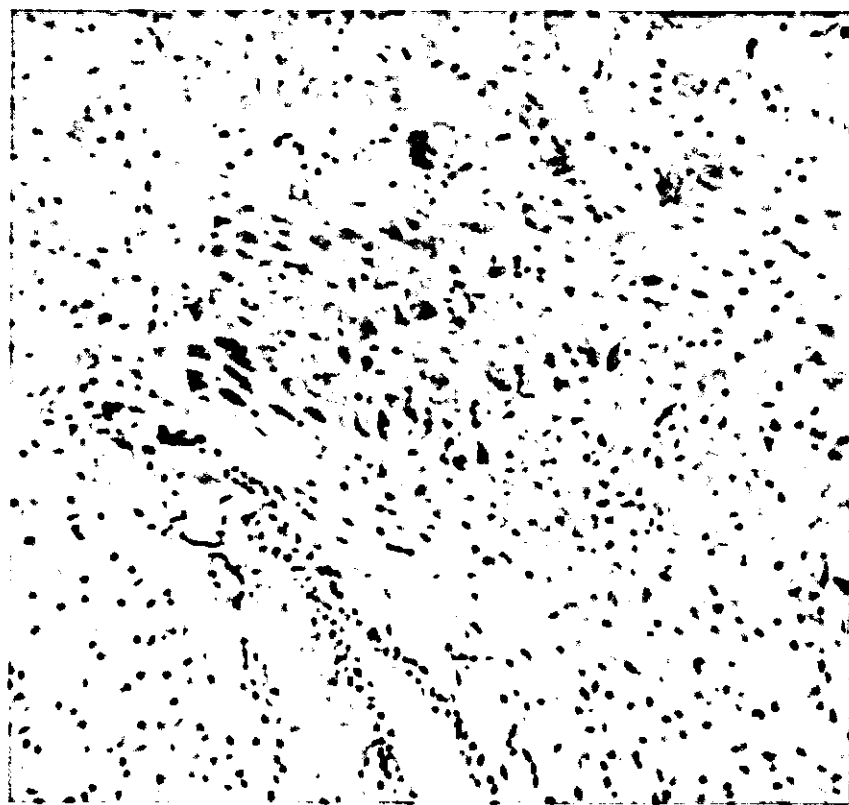


図表2 56日齡オスの染色結果(青斑核)

コントロール群



大量投与群



図表3

青斑核とその各亜核における（TH抗体・免疫染色陽性の）  
 カテコールアミンニューロン数（雌雄各6例の平均）

	56日齢					
	オス			メス		
	コントロール	低量投与	大量投与	コントロール	低量投与	大量投与
全体A4+A6	3525	2800	2658	3701	3328	2784
<u>LCのA4+A6</u>	3088	2451	2409	3417	2934	2445
LCのA6	2906	2275	2248	3159	2708	2289
<u>A6全体</u>	3292	2617	2508	3404	3077	2609
LCのA4	180	176	147	258	226	183