

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	内分泌かく乱作用が疑われる化合物の実験動物を用いた低用量影響評価法の開発 (研究期間：平成20年度～平成22年度)
主任研究者名	所属：(財)残留農薬研究所毒性部 氏名：青山博昭（研究課題番号：0901）

様々な動物実験に用いられるげっ歯類（ラット等）に給与する飼料には、マメ科植物由来のタンパク成分として、ポリフェノール類（植物エストロゲン）が豊富に含まれている。ポリフェノール類は何らかの機序でラット等の生殖や児動物の発達に影響を及ぼす可能性があるが、その詳細は解明されていない。

本研究では、ポリフェノール類を含まない合成飼料（AIN-93G）を自家調製してラットおよびマウスに給与し、それらの動物がポリフェノール類を豊富に含む通常飼料（MF）を給与した動物と同等の繁殖能力を維持できるか検討した。また、マウスの実験においては、種々の繁殖指標に観察されたAIN-93G飼料給与群とMF飼料給与群との差がポリフェノール類含有の有無によるものか否かを検討するため、AIN-93G飼料に300ppmの濃度で大豆イソフラボンを添加した飼料を給与する群を設けて、同様の繁殖指標を観察した。

一連の実験では、ラットおよびマウスのいずれにおいてもAIN-93G給与群の動物がほぼ正常に繁殖することが観察され、これらの動物を用いた生殖・発生毒性試験がポリフェノール類を除去した条件下で実施可能であることが実証された。一方、AIN-93G飼料に大豆イソフラボンを添加した群の動物に観察された雌離乳児の子宮重量の増加や性成熟の早期化あるいは雄離乳児の性成熟の遅延や性成熟後の精囊および前立腺重量の低下といった変化は、市販のMF飼料を給与した群の動物に観察された変化とほぼ完全に一致した。これらの結果から、ポリフェノール類を豊富に含む通常の市販飼料にはそれらに起因するエストロゲン活性があり、通常の動物実験では、これまで無処置と信じられていた対照群の動物にも、飼料に含まれるポリフェノール類がエストロゲン受容体を介して動物の表現型が変化する程度に影響を及ぼしていることが強く示唆される。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	内分泌かく乱作用が疑われる化合物の実験動物を用いた低用量影響評価法の開発 (研究期間：平成20年度～平成22年度)
主任研究者名	所属：(財)残留農薬研究所毒性部 氏名：青山博昭(研究課題番号：0901)

I 研究の全体計画

1 研究期間 平成21年～22年(2年間)

2 研究目的

毒性試験を含む様々な動物実験に用いられるラットやマウスなどのげっ歯類の実験動物は雑食性であり、それらの動物に給与する基礎飼料には、マメ科植物(ダイズ、アルファルファなど)由来のタンパク成分として、エストロゲン活性を持つポリフェノール類(いわゆる植物エストロゲン)が豊富に含まれる。ポリフェノール類は、単なるタンパク源として摂取した動物に利用されるだけでなく、生理活性物質として何らかの機序でラットやマウスの生殖や児動物の発達に影響を及ぼす可能性があるものの、その詳細は未だ解明されていない。

ポリフェノール類(植物エストロゲン)を豊富に含む飼料は、主としてエストロゲン様作用に基づく内分泌かく乱作用が疑われる様々な化合物の毒性をラットやマウスを用いて調べる実験においても、対照群を含むすべての動物に基礎飼料として給与されている。このため、これまで無処置と考えられてきた対照群の動物にも、給与した飼料に由来するポリフェノール類がエストロゲン受容体を介して何らかの作用を及ぼしていた可能性は否定できない。したがって、このような条件の下に実施された動物実験では、調べた化合物の強いエストロゲン様作用は検出できたとしても、弱いエストロゲン様作用が見落とされたり、これらの化合物の低用量影響を調べる動物実験においては逆に基礎飼料に由来するポリフェノール類のエストロゲン様作用が投与した化合物の低用量影響と誤認されたりしたのではないかと懸念される。我々は、少なくともエストロゲン様作用に基づく内分泌かく乱作用が疑われる化合物の低用量影響を調べる動物実験は、飼料に由来するポリフェノール類(植物エストロゲン)の影響が排除されたことを保証した上で実施されるべきであると考えている。しかし、先に述べた如く、これらの成分は生理活性物質として機能を発揮する可能性があるため、それらを含む飼料を与えた動物には何らかの生殖異常が引き起こされる恐れもあって、現状では迂闊に基礎飼料からポリフェノール類を除去するよう推奨することも困難である。

本研究では、タンパク源として植物エストロゲンを含むマメ科植物の代わりにカゼインを配合した実験動物用飼料を自家調製してラットおよびマウスに給与し、それらの動物が植物エストロゲンを豊富に含む通常飼料を給与した動物と同等の繁殖能力を維持できるか否かを、複数世代にわたって詳細に検討する。本研究でポリフェノール類(植物エストロゲン)を含む飼料を給与しても動物の繁殖に異常が生じないことが確認されれば、内分泌かく乱作用が疑われる化合物の低用量影響を厳密に調べる動物試験法として、植物エストロゲンを除去した飼料を用いる生殖試験法を提案することが可能となる。一方、植物エストロゲンがラットやマウスなどの実験動物の生殖や児動物の発達に何らかの貢献をすることが実証された場合は、可能な限りそれらの詳細を明らかにして、内分泌かく乱作用が疑われる化合物の低用量影響に関する議論の基礎となるデータを提供する。

3 研究内容及び方法等

(1) 研究内容及び方法

1) 研究項目名 1 : 基礎飼料に含まれるポリフェノール類 (植物エストロゲン) がラットの繁殖に及ぼす影響の解析

① 個別課題名ア : 親世代の動物の成長と繁殖能力に関する指標の解析

ブリーダーから購入した若齢の近交系ラット (WKY/NCrj) に, ポリフェノール類 (植物エストロゲン) を含まない合成飼料または通常の飼料を給与して 10 週間育成した後に交配し, F1 世代の児動物を得る。各群の動物数は, 雌雄それぞれ 24 匹とする。この間に, 動物の体重, 体重増加量および摂餌量を測定して, 親動物の成長を観察する。また, 交尾後の親動物について児動物を離乳するまで観察を継続し, 雌雄の動物の交尾率, 妊娠率, 出産率および妊娠期間を算出すると共に, 出産児の数を数える。F1 哺育児を離乳した後の親動物については, 剖検により内部生殖器官 (雄については精巣, 精巣上体, 精囊および前立腺; 雌については卵巣および子宮) を検査し, それらの器官を含む主要な臓器の重量を測定する。また, 子宮を観察して着床数を調べると共に, 雄については精巣上体尾から採取した精子の運動性, 形態および数を評価する。また, 必要があれば精巣における精子頭部数も評価する。

② 個別課題名イ : F1 世代の動物の生後発達, 性成熟および成長後の繁殖能力に関する指標の解析

出生した F1 世代の児動物について, 出生日における生存率および性比と, 哺育 4 日, 7 日, 14 日および 21 日 (離乳日) における生存率を求め, 体重を測定する。離乳児のうち, 原則として各腹雌雄 1 匹ずつを選抜し, F1 世代の親動物として親世代の動物と同様に飼育し, F2 世代の哺育児を得る。この間, 親世代の動物と同様の項目を観察すると共に, 性成熟 (雌においては陰開口日齢と開口時体重, 雄においては陰茎包皮分離完了日齢と完了時体重を観察または測定する) を観察する。F1 世代の親動物として選抜されなかった離乳児については, 離乳後に剖検して肉眼所見を記録する。さらに, 原則として各腹雌雄 1 匹ずつについては, 脳, 胸腺, 脾臓および子宮 (雌のみ) の重量を測定する。F2 世代の児動物については, F1 世代の児動物と同様の項目について, 性成熟が完了するまで観察を継続する。

③ 個別課題名ウ : 生殖器官の病理組織学的観察

F2 世代の児動物 (離乳児) が性成熟を完了した時点で動物実験を終了する。親動物と児動物について, 給与した飼料により重量が異なったり, 何らかの変化がみられたりした生殖器官や主な臓器について, 必要に応じて病理組織学的に検査する。

2) 研究項目名 2 : 基礎飼料に含まれるポリフェノール類 (植物エストロゲン) がマウスの繁殖に及ぼす影響の追加解析と, 低ポリフェノール飼料の有用性の検討

① 個別課題名エ : 親世代の動物の成長と繁殖能力に関する指標の解析

名古屋大学で実施した実験により, C3H/HeN マウスにポリフェノール類 (植物エストロゲン) を含まない合成飼料 (AIN-93G) を給与して繁殖させると, 少なくともコンベンショナル環境 (非 SPF 環境) 下では, 哺育児の過半数が生後 4 日以内に死亡することが示唆された。このような異常が生じた原因として, (1) ポリフェノール類の不足, (2) AIN-93G 飼料と MF 飼料の間で異なるポリフェノール類以外の成分の影響, (3) これらの違いと非 SPF 環境との相互作用, などが推測されたが, 現在のところ, その原因は明らかでない。そこで, 残留農薬研究所においてもブリーダーから近交系マウス (C3H/HeN) を購入し, AIN-93G または通常の飼料 (MF) を給与して 6 週間育成した後に交配して, 得られる F1 世代の児動物の哺育期

間中における生存率を SPF 環境下で確認する。また、AIN-93G に大豆イソフラボンを 300ppm の濃度で添加した群を設け、大豆イソフラボンの添加により哺育児の生存率が改善するか否かを調べる。さらに、AIN-93G のような合成飼料とは違って天然由来成分を原料としながら、ポリフェノール類の含有量が極めて低くなるよう調製された NIH-07PLD 飼料を給与する群と、NIH-07PLD 飼料に大豆イソフラボンを 300ppm の濃度で添加する群も設定して、マウスの繁殖障害と飼料組成との関係を検討する。各群の動物数は、雌雄それぞれ 15 匹とする。実験では、動物の体重、体重増加量および摂餌量を測定して、親動物の成長を観察する。また、交尾後の親動物について児動物を離乳するまで観察を継続し、雌雄の動物の交尾率、妊娠率、出産率および妊娠期間を算出すると共に、出産児の数を数える。F1 哺育児を離乳した後の親動物については、剖検により内部生殖器官（雄については精巣、精巣上体、精囊および前立腺；雌については卵巣および子宮）を検査し、それらの器官を含む主要な臓器の重量を測定する。また、子宮を観察して着床数を調べると共に、雄については精巣上体尾から採取した精子の運動性、形態および数を評価する。また、必要があれば精巣における精子頭部数も評価する。

② 個別課題名オ：F1 世代の動物の生後発達および性成熟に関する指標の解析

出生した F1 世代の児動物について、出生日における生存率および性比と、哺育 4 日、7 日、14 日および 21 日（離乳日）における生存率を求め、体重を測定する。離乳児のうち、原則として各腹雌雄 1 匹ずつを選抜し、性成熟（雌においては膣開口日齢と開口時体重、雄においては陰茎包皮分離完了日齢と完了時体重を観察または測定する）を観察する。F1 世代の親動物として選抜されなかった離乳児については、離乳後に剖検して肉眼所見を記録する。さらに、原則として各腹雌雄 1 匹ずつについては、脳、胸腺、脾臓および子宮（雌のみ）の重量を測定する。

3) 研究項目名 3：基礎飼料に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）がマウスの繁殖に及ぼす影響の解析

① 個別課題名エ：親世代の動物の成長と繁殖能力に関する指標の解析

当初計画：

ブリーダーから購入した若齢の近交系マウス（C3H/HeNS1c）に、ポリフェノール類（植物エストロゲン）を含まない合成飼料または通常の飼料を給与して 6 週間育成した後に交配し、F1 世代の児動物を得る。各群の動物数は、1 試行当り雌雄それぞれ 9 匹とする。この間に、動物の体重、体重増加量、および摂餌量を測定して、親動物の成長を観察する。また、交尾後の親動物について児動物を離乳するまで観察を継続し、雌雄の動物の交尾率、妊娠率、出産率および妊娠期間を算出すると共に、出産児の数を数える。F1 哺育児を離乳した後の親動物については、剖検により内部生殖器官（雄については精巣、精巣上体、精囊および前立腺；雌については卵巣および子宮）を検査し、それらの器官を含む主要な臓器の重量を測定する。また、子宮を観察して着床数を調べると共に、必要に応じて精巣における精子頭部数を評価する。

追加実験 1：

6 週齢の近交系マウス（C3H/HeNS1c）を用いて実験を行った。

【AIN93G 群】ポリフェノール類（植物エストロゲン）を含まない合成飼料（AIN93G 飼料）を雄 9 匹、雌 9 匹に自由摂取させる。

【(AIN93G+イソフラボン) 群】AIN93G 飼料にイソフラボンを添加したものを、雄 9 匹、雌 9 匹に自由摂取させる。

【MF 群】ポリフェノール類を含む通常の繁殖用飼料（MF、オリエンタル酵母(株)）

を雄 9 匹, 雌 9 匹に自由摂取させる。

追加実験 2 :

6 週齢の近交系マウス (C3H/HeNCrj) を用いて実験を行った。

【AIN93G 群】ポリフェノール類 (植物エストロゲン) を含まない合成飼料 (AIN93G 飼料) を雄 15 匹, 雌 15 匹に自由摂取させる。

【MF 群】ポリフェノール類を含む通常の繁殖用飼料 (MF, オリエンタル酵母 (株)) を雄 15 匹, 雌 15 匹に自由摂取させる。

両実験において, 雌雄マウスを 6 週間飼育する。この間に, 動物の体重, 体重増加量, および摂餌量を測定する。この後に交配し, F1 世代の児動物を得る。雌雄の動物の交尾率, 妊娠率, 出産率, 妊娠期間, 出産児数を算出する。F1 児動物を離乳した後の親動物については, 生殖器官 (雄については精巣, 精囊および前立腺; 雌については卵巣および子宮) を検査し, それらの臓器の重量を測定する。子宮については着床数を調べる。

- ② 個別課題名オ : F1 世代の動物の生後発達, 性成熟および成長後の繁殖能力に関する指標の解析

当初計画 :

出生した F1 世代の児動物について, 哺育 0 日, 4 日, 7 日, 14 日および 21 日 (離乳日) における生存率を求め, 体重を測定する。離乳児のうち, 原則として各腹雌雄 1 匹ずつを選抜し, F1 世代の親動物として親世代の動物と同様に飼育し, F2 世代の哺育児を得る。この間, 親世代の動物と同様の項目を観察すると共に, 雌の性成熟 (膺開口日齢と開口時体重を観察または測定する) を観察する。F1 世代の親動物として選抜されなかった離乳児については, 離乳後に剖検して肉眼所見を記録する。さらに, 必要に応じて, 各腹雌雄 1 匹ずつについては, 脳, 胸腺, 脾臓および子宮 (雌のみ) の重量を測定する。F2 世代の児動物については, F1 世代の児動物と同様の項目について, 性成熟が完了するまで観察を継続する。

追加実験 :

出生した F1 世代の児動物について, 哺育 0 日, 4 日, 7 日, 14 日および 21 日 (離乳日) における生存率を求め, 体重を測定する。離乳児のうち, 雌は性成熟 (膺開口日齢と開口時体重を観察または測定する) を観察する。各腹雌雄各腹雌雄 1 匹ずつについては 6 週齢時に, 雄の精巣と精囊の重量, 雌の子宮と卵巣の重量を測定する。

4 倫理面への配慮について

すべての動物実験は, 動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年法律第 105 号), 実験動物の飼養及び保管等に関する基準 (昭和 55 年 3 月 27 日総理府告知第 6 号), 動物実験に関する指針 (日本実験動物学会, 昭和 62 年 5 月 22 日), および近年の動物愛護に係る国際的な規制・動向等を踏まえ, 動物の愛護等の法に準拠して実施する。

II 平成21年度研究成果報告

1 当該年度の研究目標

まず、ポリフェノール類（植物エストロゲン）を含まない飼料の組成を決定して合成飼料を調製し、分析により植物エストロゲンの混入がないことを確認する。ついで、残留農薬研究所では近交系ラット（WKY/NCrj）、名古屋大学では近交系マウス（C3H/HeNCrj）を用いた動物実験を開始し、ラットを用いた実験においてはF1世代の離乳児を得て次世代動物の育成開始まで、マウスを用いた実験においては第1クール（雌雄各9匹/群）の実験でF2世代の離乳児を得るまで動物実験を進め、得られたデータを解析する。

2 平成21年度の主な研究成果

(1) 研究項目ごとの研究成果の概要

1) 研究項目名：基礎飼料に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）がラットの繁殖に及ぼす影響の解析

個別課題名：親世代の動物の成長と繁殖能力に関する指標の解析（担当：青山博昭，北條仁，高橋研，佐藤旭）

ポリフェノール類（植物エストロゲン）を含まない合成飼料（AIN-93G）を自家調製してラットに給与し、それらの動物がポリフェノール類を豊富に含む通常飼料（MF）を給与した動物と同等の繁殖能力を維持できるか否かを検討した。調製したAIN-93G飼料は、分析によりポリフェノール類の混入がないことが確認された。ラットを用いた実験では、AIN-93G飼料を給与した群においてもほぼ十分な数のF1離乳児が得られ、少なくとも植物エストロゲンを除去した飼料を用いた1世代繁殖試験は実施可能なことが示された。しかし、AIN-93G給与群では哺育初期における哺育児の生存率と体重が僅かながら有意に低下し、雄親動物の精囊および前立腺重量が有意に増加した。これらの結果から、通常の動物実験では飼料に含まれるポリフェノール類がエストロゲン受容体を介して何らかの作用を及ぼしていることが示唆された。

個別課題名：F1世代の動物の生後発達、性成熟および成長後の繁殖能力に関する指標の解析（担当：青山博昭，北條仁，高橋研，佐藤旭）

出生したF1哺育児の観察では、上述の如く、AIN-93G給与群では哺育0日における哺育児の生存率がMF給与群より有意に低く、統計学的な有意差を伴わないものの、この傾向は哺育4日にも認められた。また、AIN-93G給与群では哺育児の体重が雌雄とも哺育0日から7日までMF群の値より低く、その差は雄哺育児の哺育7日における値を除いていずれも統計学的に有意であった。さらに、AIN-93G給与群では、MF群と比較して雌離乳児の子宮重量が有意に低く、雌離乳児の膈開口は有意に遅延し、雄離乳児の包皮分離完了は有意に早期化した。これらの結果は、親動物に観察された変化と同様に、MF飼料に含まれるポリフェノール類のエストロゲン受容体を介した作用（エストロゲン様作用または抗エストロゲン作用）によりもたらされたものであることが示唆された。

2) 研究項目名：基礎飼料に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）がマウスの繁殖に及ぼす影響の解析

個別課題名：親世代の動物の成長と繁殖能力に関する指標の解析（担当：堀尾文彦，村井篤嗣，小林美里）

ポリフェノール類（植物エストロゲン）を含まない飼料として、マウス・ラット用の精製飼料として世界的な標準となっているAIN-93G（J. Nutr., 123, 1939-1951(1993)）を選択し、その

調製を行い、実際に分析を行なってポリフェノール類が検出されないことを確認した。したがって、本研究の目的を達成するために最適な飼料を選択することができたものと考えられる。一方、ポリフェノール類を含有する飼料としては、毒性試験や栄養学研究で繁用されている混合型の通常飼料である MF(オリエンタル酵母(株))を選択した。分析の結果、ポリフェノール類を少なくとも 400 ppm 以上含有することが明らかとなった。交尾までのマウスの体重増加量は AIN-93G 摂取群のほうがやや勝っていた。MF 摂取群では、親世代の繁殖能力(交尾率、妊娠率、出産率、妊娠期間、出産児数)は正常な範囲の値であった。また、AIN-93G 摂取群の親世代の繁殖能力は、MF 摂取群とほぼ同等であった。

個別課題名：F1 世代の動物の生後発達、性成熟および成長後の繁殖能力に関する指標の解析
(担当：堀尾文彦，村井篤嗣，小林美里)

上述の如く、親世代の動物の繁殖能力に関しては AIN-93G 群と MF 摂取群はほぼ同等と考えられたが、児の生存率には両群で著明な差が認められた。すなわち、MF 群では出生児の約 94%が離乳まで生存したが、AIN-93G 群では出生児の約 94%が生後 4 日以内に死亡した。現時点では、生存率の低下は親の哺育放棄に起因すると推察している。また、MF 群の母動物が正常に児を哺育できたことは、飼料に含まれるポリフェノール類のエストロゲン様作用(または抗エストロゲン作用)と何らかの関連がある可能性が示唆される。AIN-93G 群では F2 世代を作出するために十分な数の離乳児が得られなかったため、当初の実験計画を変更した。すなわち、今回と同様に親世代の動物に組成の異なる飼料を給与する実験を平成 21 年 12 月から再度開始して、哺育期間中における F1 哺育児の生存率に AIN-93G 群と MF 群の間の著明な差が再現するか否かを確認している。この実験においては、MF 群と AIN-93G 群に加え、AIN-93G に大豆イソフラボン(植物エストロゲン)を添加した飼料を給与する新たな群も加えて実験を行っている。

(2) 全体の研究成果

1) 全体の研究成果の要旨

ポリフェノール類(植物エストロゲン)を含まない合成飼料を自家調製してラットおよびマウスに給与し、それらの動物がポリフェノール類を豊富に含む通常飼料を給与した動物と同等の繁殖能力を維持できるか否かを検討した。調製した合成飼料は、分析によりポリフェノール類の混入がないことが確認された。ラットを用いた実験ではほぼ十分な数の F1 離乳児が得られ、ポリフェノール類を含まない飼料を給与しても 1 世代繁殖試験は実施可能なことが示された。しかし、合成飼料給与群では、哺育児の生存率と体重の低下、離乳児の子宮重量の低下、雌離乳児の性成熟の遅延、雄離乳児の性成熟の早期化および雄親動物の精囊および前立腺重量の増加が観察され、通常の動物実験では飼料に含まれるポリフェノール類がエストロゲン受容体を介して何らかの作用を及ぼしていることが示唆された。一方、C3H マウスを用いた実験では合成飼料給与群で 90%以上の出産児が生後 4 日以内に死亡し、少なくともこの系統のマウスの繁殖には、飼料中のポリフェノール類が必須である可能性が示唆された。

2) 研究成果

2-1) 合成飼料の組成の検討、標準飼料の選定および飼料分析

動物実験開始に先立って、ポリフェノール類(植物エストロゲン)を含まない合成飼料の組成を、今後の内分泌かく乱物質研究における標準飼料とし得ることを考慮して、米国国立栄養研究所(American Institute of Nutrition)が公表したマウスおよびラットを用いた栄養学研究のための標準飼料(AIN-93G)の組成(Table 1)に合わせることにし、オリエンタル酵母株式会社に依頼して必要量の合成飼料を調製した。また、比較対照とする通常飼料を、毒性研

究のための動物実験に広く用いられている実験動物用飼料 MF (オリエンタル酵母株式会社) とし、同社より必要量を購入した。

これらの飼料について含有するポリフェノール類を分析したところ、合成した AIN-93G 飼料には植物エストロゲンの混入がないことを確認できた (Table 2)。一方、同時に購入した通常の MF 飼料には、グリシチン、ゲニスチンおよびダイゼインがそれぞれ 30, 230 および 180ppm の濃度で検出され、通常飼料に含まれる植物エストロゲンの総量は 440ppm であった。したがって、今回の実験で MF 飼料給与群 (以下「MF 群」と記載する) のラットが摂取する総植物エストロゲン量は、体重 300g の動物が 1 日当たり 18g の飼料を摂取すると仮定して算術的に求めた場合、26.4mg/kg 体重/日と見積もられた。

Table 1. AIN-93G 飼料の組成

成分	含量 (%)
ミルクカゼイン	20.0000
L-シスチン	0.3000
コーンスターチ	39.7486
・コーンスターチ	13.2000
シュークロース	10.0000
大豆油	7.0000
セルロースパウダー	5.0000
AIN93G ミネラル	3.5000
AIN93 ビタミン	1.0000
重酒石酸コリン	0.2500
第 3 ブチルヒドロキノン	0.0014
合計	100.0000

Table 2. MF および AIN-93G 飼料に含まれる植物エストロゲン含量の分析結果

分析項目	飼料中の検出濃度 (ppm)	
	MF	AIN-93G
クメステロール	ND	ND
グリシチン	30	ND
グリシテイン	ND	ND
ゲニスチン	230	ND
ゲニス테인	ND	ND
ダイジン	ND	ND
ダイゼイン	180	ND
バイオカニン A	ND	ND
フォルモノネチン	ND	ND

ND: 検出限界値 (10ppm) 以下。

2-2) 基礎飼料に含まれるポリフェノール類 (植物エストロゲン) がラットの繁殖に及ぼす影響の解析 (詳細なデータは、分担研究者報告書を参照されたい)

本課題については動物実験がほぼ予定通り進行し、2010 年 1 月末現在、F1 世代の離乳児の中から選抜した次世代動物を育成途中にある。そこで、この中間報告書では、親動物 (P 世代の雌雄) の成長と繁殖に関する観察結果と、F1 世代の動物の性成熟が完了するまでの期間に

得られた結果を取りまとめて報告する。

雌雄の親動物の体重は、実験期間を通じて AIN-93G 給与群（以下「AIN 群」と記載する）の値が MF 群の値を上回った。また、体重増加量をみると、雄では試験期間を通じて AIN 群の値が MF 群の値より有意に高く、雌においては、交配前育成期間と妊娠期間中の体重増加量は AIN 群の値が MF 群の値を有意に上回り、哺育期間中には有意に下回った。

これらの動物の摂餌量をみると、雄ではいずれの時期においても AIN 群の値が MF 群の値より低く、多くの場合その差は統計学的に有意であった。雌については、交配前育成期間中は両群に有意な差はみられず、妊娠 0 日から 14 日にかけては AIN 群の値が MF 群の値より有意に高く、哺育 0 日から 14 日にかけては逆に AIN 群の値が MF 群の値より有意に低かった。これらの結果は、少なくとも雄に対しては AIN 合成飼料の栄養価が極めて高いことを示唆するものであった。

これらの動物を 10 週間育成した後に交配したところ、正常な発情周期を示した雌の頻度、雌雄の動物の交尾率、受胎率、出産率、妊娠期間、産児数および出産児の性比といった指標には、AIN 群と MF 群の間で統計学的に有意な差は観察されなかった (Table 3)。着床数については AIN 群の値が MF 群の値より有意に高かったが、両群の平均出産児数はほぼ同じであったことから、この差は偶発的な変動と解釈された。したがって、少なくともラットにおいては、ポリフェノール類（植物エストロゲン）を含まない飼料を給与しても、親動物の妊娠および出産に障害は生じないことが示唆された。一方、哺育児生存率については群間に差が認められ、AIN 群における哺育 0 日（出産日）の生存率が MF 群より有意に低く、統計学的な有意性は伴わないものの、哺育 4 日における生存率も MF 群の値よりやや低かった (Table 3)。また、AIN 群では哺育児の体重が雌雄とも哺育 0 日から 7 日まで MF 群の値より低く、その差は雄哺育児の哺育 7 日における値を除いていずれも統計学的に有意であった。哺育 4 日以降における哺育児の生存率には、AIN 群と MF 群の間で有意な差はみられなかった。また、AIN 群における雌雄の哺育児の体重は哺育 14 日ごろまでに MF 群の値とほぼ等しくなり、哺育 21 日（離乳日）における値はむしろ MF 群の値を有意に上回った。

これらの結果から、ポリフェノール類（植物エストロゲン）を含まない飼料（AIN-93G）を給与された雌の哺育能力がやや低下し、出産直後から 1 週間程度の間、哺育児に十分な量の母乳を与えなかった可能性が示唆される。しかし、AIN 群の母動物に観察された哺育能力の僅かな低下がどのような機序で引き起こされたかについては、現在のところ明らかでない。

Table 3. 親世代(P世代)動物の繁殖に関する指標

測定項目／検査項目	試験群 (給与飼料)	
	MF (対照)	AIN-93G
正常発情周期の雌の頻度 (%)	24/24 (100.0)	22/23 (95.7)
雄の交尾率 (%)	24/24 (100.0)	23/23 (100.0)
雌の交尾率 (%)	24/24 (100.0)	23/23 (100.0)
受胎率 (%)	24/24 (100.0)	23/23 (100.0)
出産率 (%)	24/24 (100.0)	23/23 (100.0)
妊娠期間 (日)	22.0±0.0	22.0±0.2
着床数	13.8±0.9	15.2±2.1 ↑
産児数	11.0±2.2	10.9±1.6
性比 (雄児数/総産児数)	0.471	0.491
児の生存率 (哺育0日)	99.3±2.4	95.4±9.5 ↓
児の生存率 (哺育4日)	95.9±5.9	91.3±9.9
児の生存率 (哺育7日)	97.8±6.2	99.5±2.6
児の生存率 (哺育14日)	96.8±6.8	98.4±4.3
児の生存率 (哺育21日)	96.8±6.8	98.4±4.3

群平均値±標準偏差。

↑：統計学的に有意な高値。

↓：統計学的に有意な低値。

F1 児動物を離乳した後、親動物を剖検して生殖器官の重量を測定した。その結果、精巣および精巣上体の絶対重量には群間に差は認められなかったものの、精囊と前立腺の絶対重量は AIN 群の値が MF 群の値を有意に上回り、精囊については体重比に換算してもその差が統計学的に有意であった (Table 4)。また、前立腺についても、体重比で比較しても AIN 群の値は MF 群の値よりやや高かった。これらの結果については、飼料からポリフェノール類を除去したこと (飼料に由来するエストロゲン様作用の低下) との関連が示唆される。一方、雌親動物の卵巣および子宮の重量については、絶対値をみるといずれも AIN 群の値が MF 群の値より高かったものの、体重比に換算するとそれらはほぼ同じであった。したがって、AIN 群にみられた絶対重量の増加は、この群における雌の体重が MF 群の値より有意に高かったことに起因する変動と判断された。

Table 4. 親世代 (P 世代) における雄親動物の生殖器官重量 (mg)

測定項目	試験群 (給与飼料)	
	MF (対照)	AIN-93G
精巣 (絶対重量, mg)	2838±111	2851±120
精巣上体 (絶対重量, mg)	1116±44	1118±42
精囊 (絶対重量, mg)	1756±95	1950±87 ↑
前立腺 (絶対重量, mg)	512±71	568±62 ↑
精巣 (体重比, %)	0.681±0.038	0.659±0.031 ↓
精巣上体 (体重比, %)	0.267±0.013	0.258±0.011 ↓
精囊 (体重比, %)	0.421±0.029	0.451±0.026 ↑
前立腺 (体重比, %)	0.123±0.016	0.131±0.015

群平均値±標準偏差。

↑ : 統計学的に有意な高値。

↓ : 統計学的に有意な低値。

雄動物の精子検査では、精子運動率、精巣上体尾当りの精子数および精巣上体尾の重量で補正した精子数のいずれにも、群間に有意な差は認められなかった。

離乳した F1 哺育児について、脳、脾臓、胸腺および子宮 (雌離乳児のみ) の重量を測定したところ、雌雄のいずれにおいても、AIN 群における脾臓および胸腺の絶対重量と体重比が MF 群の値より有意に高かった (Table 5 および 6)。また、子宮については、AIN 群における絶対重量と体重比の両者が MF 群の値より有意に低かった (Table 6)。これらの変化は、いずれも飼料の組成が異なることに起因した変化と考えられた。また、少なくとも AIN 群の子宮重量が MF 群の値より有意に低かったことについては、MF 飼料に含まれていたポリフェノール類のエストロゲン様作用によることが示唆された。

AIN 群の脳重量にみられた体重比の低下は、この群の離乳児の体重が MF 群の値よりやや高かったことに関連した変動であると考えられた。

次世代 (F1 世代) の親動物として選抜された F1 離乳児の性成熟を観察したところ、AIN 群では雄の性成熟 (包皮分離完了日齢) が有意に早まり、雌の性成熟 (膣開口日齢) は有意に遅延した (Table 7)。これらの結果は、いずれも MF 飼料に含まれているポリフェノール類のエストロゲン様作用に起因した変化と考えられた。

Table 5. F1 雄離乳児の臓器重量

測定項目	試験群（給与飼料）	
	MF（対照）	AIN-93G
体重（g）	60±8	65±7 ↑
脳（絶対重量, mg）	1517±66	1535±56
脾臓（絶対重量, mg）	215±37	264±26 ↑
胸腺（絶対重量, mg）	170±26	204±20 ↑
脳（体重比, %）	2.57±0.27	2.38±0.21 ↓
脾臓（体重比, %）	0.360±0.047	0.409±0.039 ↑
胸腺（体重比, %）	0.284±0.021	0.315±0.022 ↑

群平均値±標準偏差。

↑：統計学的に有意な高値。

↓：統計学的に有意な低値。

Table 6. F1 雌離乳児の臓器重量

測定項目	試験群（給与飼料）	
	MF（対照）	AIN-93G
体重（g）	56±6	60±6
脳（絶対重量, mg）	1466±49	1482±55
脾臓（絶対重量, mg）	197±39	232±22 ↑
胸腺（絶対重量, mg）	170±21	192±24 ↑
子宮（絶対重量, mg）	62.7±12.5	49.8±8.7 ↓
脳（体重比, %）	2.64±0.23	2.50±0.19 ↓
脾臓（体重比, %）	0.350±0.049	0.392±0.047 ↑
胸腺（体重比, %）	0.304±0.027	0.322±0.027 ↑
子宮（体重比, %）	0.1121±0.0204	0.0834±0.0116 ↓

群平均値±標準偏差。

↑：統計学的に有意な高値。

↓：統計学的に有意な低値。

Table 7. F1 離乳児の性成熟

測定項目	試験群（給与飼料）	
	MF（対照）	AIN-93G
雄の包皮分離完了日齢（日）	47.1±1.9	43.4±0.8 ↓
完了時体重（g）	158±9	145±8 ↓
雌の膻開口完了日齢（日）	32.5±2.4	34.0±1.4 ↑
完了時体重（g）	81±11	87±5 ↑

群平均値±標準偏差。

↑：統計学的に有意な高値。

↓：統計学的に有意な低値。

2-3) 基礎飼料に含まれるポリフェノール類 (植物エストロゲン) がマウスの繁殖に及ぼす影響の解析

AIN-93G は, 米国国立栄養研究所が 1993 年に提唱した (J. Nutr., 123, 1939-1951(1993)), 栄養学実験においてラット・マウスの成長と繁殖に好適な飼料である。同様の目的で同研究所が 1976 年に提唱した AIN-76 飼料とともに, 動物実験において国際的に最も繁用されている精製飼料である。カゼインをタンパク源としており, その組成は Table 1 に示した通りである。MF 飼料と AIN-93G 飼料の粗組成を, Table 8 に示す。

Table 8. MF および AIN-93G 飼料の組成

成分	MF	AIN-93G
	含量 (%)	含量 (%)
水分	8.3	9.7
粗タンパク質	23.1	17.4
粗脂肪	4.8	7.1
粗灰分	5.7	2.7
粗繊維	2.7	2.4
可溶性無窒素物	55.4	60.7
合計	100.0	100.0

これら 2 種類の飼料について含有するポリフェノール類を分析した結果, AIN-93G 飼料には植物エストロゲンの混入がないことを確認できた (Table 2 参照)。一方, MF 飼料には, 前述の如く, グリシチン, ゲニスチンおよびダイゼインがそれぞれ 30, 230 および 180ppm の濃度で検出された。したがって, MF 飼料に含まれる植物エストロゲンの総量は 440ppm と計算され, 今回の実験で MF 飼料群の動物が摂取する総植物エストロゲン量は, 体重 25g のマウスが 1 日当たり 2.5g の飼料を摂取すると仮定して算術的に求めた場合, 44mg/kg 体重/日となった。

交配を開始するまでの 6 週間における両群のマウスの体重増加量は, 雌雄ともに, わずかに AIN 群の方が高値であった。

Table 9 に, 妊娠率, 妊娠期間, 出産数および児の性比を示す。妊娠率は, MF 群が 77.8%, AIN 群が 100%であったが, 今回の実験では 1 群当りの親動物数が 9 匹と少ないため, 次回の結果と合わせて群間の差の有無を判断すべきと考えられる。一方, 妊娠期間, 出産した親あたりの出産児数および出生児の性比については, 群間に差は認められなかった。

Table 9. 親世代の動物の妊娠率, 妊娠期間, 出産数および児の性比

測定項目	試験群 (給与飼料)	
	MF	AIN-93G
妊娠率 (%) (括弧内は個体数)	77.8 (7/9)	100.0 (9/9)
妊娠期間 (日)	19.0	19.4
出産児数 (匹/親)	8.1	6.7
性比 (雄児数/総産児数)	0.41	0.50

果から, C3H/HeN マウスは雌雄ともに AIN 飼料に対して適応性が高く, この飼料を摂取した雌雄の成長は MF 飼料群のそれに匹敵するものであることが明らかとなった。したがって, AIN 飼料の選択は, 本研究の目的にかなったものと判断した。

親世代の繁殖能力については、妊娠率、妊娠期間、出産数および出生児の性比といった指標に群間で有意な差は認められず、少なくとも妊娠の成立と維持および出産には飼料成分の差に起因する変化は生じないことが示された。

哺育期間中における F1 哺育児の生存率を、Table 10 に示す。MF 群では、哺育児の出生から哺育 1 日目までの生存率は 98.2%、哺育 1 日から 4 日までの間の生存率は 96.4% と良好であった。この群では、出生から哺育 4 日までの生存率が約 94% となり、以後哺育 21 日（離乳日）まで哺育児の死亡は観察されなかった。離乳児の合計は、7 腹に由来する 54 匹であった。

一方、AIN 群では、哺育 1 日の生存率（出生から生後 1 日目まで）が 55.0% と著明に低く、哺育 1 日から 4 日までの生存率は、12.1% とさらに低下した。このため、出生から哺育 4 日までの生存率は約 6% と極めて低い値であった。哺育 21 日（離乳）まで生存した児哺育児は、1 腹由来の 4 匹のみであった。

今回の実験では、AIN 群で F1 世代の親動物として育成するために十分な数の離乳児が得られなかった（生存している児は 1 腹由来の 4 匹のみ）ため、当初の実験計画を変更して、F1 哺育児の離乳後に実験を終了することとした。親世代の動物は 21 週齢で屠殺・解剖し、生殖器官（雄については精巣、精囊および前立腺；雌については卵巣および子宮）を検査した後にそれらの臓器の重量を測定した。子宮については、着床数を調べた。

Table 10. 哺育期間中における F1 哺育児の生存率

測定項目／検査項目	試験群（給与飼料）	
	MF	AIN-93G
出産児数（匹/親）	8.1	6.7
性比（雄児数／総産児数）	0.41	0.50
児の生存率（哺育 0 日）	98.2	55.0 ↓
児の生存率（哺育 4 日）	96.4	12.1 ↓
児の生存率（哺育 7 日）	100.0	100.0
児の生存率（哺育 14 日）	100.0	100.0
児の生存率（哺育 21 日）	100.0	100.0

↓：統計学的に有意な低値。

上述の如く、マウスの実験においては MF 群における親動物の繁殖と児動物の生後発達に何ら異常はみられなかったものの、AIN 群における F1 哺育児の生存率が著しく低下するという予期せぬ結果が得られた。我々は、マウスでは MF 飼料に豊富に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）が何らかの機序で母動物に作用し、哺育行動を調節していることを示唆するものと考えている。すなわち、AIN 飼料はポリフェノール類（植物エストロゲン）を含んでいないため、母動物の正常な哺育行動が阻害された結果、哺育児の生存率が著しく低下したと推定している。そこで、この仮説を検証するため、当初の予定を変更して、追加試験に着手した。

追加試験では、その目的を（1）今回の実験結果（AIN 群における F1 哺育児の生存率の著しい低下）の再現性を確認すること、および（2）AIN 飼料に植物エストロゲンを添加することにより、F1 哺育児の生存率が改善されるかを証明すること、の 2 点とした。また、この目的に沿って、以下の 3 実験群を設定した。

【MF 群】 MF 飼料を前回の実験と同様に給与する群。

【AIN93G 群】 AIN 飼料を前回の実験と同様に給与する群。

【AIN93G+イソフラボン群】 AIN 飼料に大豆イソフラボン（植物エストロゲン）を 300ppm 添加した飼料を給与する群（イソフラボン濃度は、MF 飼料に存在するイソフラボン濃度にほぼ匹敵する）。

平成 21 年 12 月に 3 群構成で新たな追加実験を開始し、現在に至っている。また、この実験の結果は、平成 22 年 3 月末までに得られる予定である。

（3）考察及び結論

飼料に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）がラットおよびマウスの繁殖に及ぼす影響を検討したところ、今年度の研究成果として、以下の点が明らかとなった。

ラットにおいては、AIN 群における雌の F1 離乳児の子宮重量が MF 群の値より有意に低く、膣開口が有意に遅延した。このことは、MF 群の F1 雌離乳児の子宮重量が AIN 群の値より有意に高く、膣開口が有意に早期化したと言い換えることができる。これらの変化（子宮重量の増加および膣開口の早期化）は、いずれもがエストロゲンの投与によって引き起こされる典型的な変化であること、および AIN 飼料にはポリフェノール類（植物エストロゲン）が含まれていないが MF 飼料にはこの成分が豊富に含まれていることから、飼料に含まれるポリフェノール類のエストロゲン様作用を反映したものと考えられた。換言すれば、これまで通常の動物実験で無処置と信じられてきた対照群の動物には、給与された飼料に由来するポリフェノール類のエストロゲン様作用に基づく変化が現れていた可能性が高いにもかかわらず、それらの実験では比較のための適切な対照群（外来性エストロゲン様作用物質の摂取を完全に遮断された動物群）が設定されていなかったため、ほとんどの研究者がその存在に気づかなかったものと推測される。

さらに、ラットにおいては、AIN 群の雄親動物の精囊および前立腺の重量が MF 群の値より有意に高く、雄の F1 離乳児の性成熟（包皮分離）が有意に早期化した。雄ラットにエストロゲン様作用物質を投与すると、生殖器官の重量低下や性成熟の遅延が誘発されることが指摘されていることを考慮すると、今回の実験で観察されたこれらの変化は、MF 飼料を給与された雄動物にはエストロゲン様作用が及んだものの、AIN 飼料を給与された雄動物は飼料に由来するポリフェノール類のエストロゲン様作用から解放されたために顕在化したものと解釈される。

AIN 群の動物では、哺育初期における F1 哺育児の生存率がラットおよびマウスのいずれの動物種においても有意に低下し、特にマウスの実験では、十分な数の F1 世代を得られないために実験を終了せざるを得ないほど顕著な影響が認められた。また、これらの動物を観察する限り、哺育児生存率の低下は、母動物の哺育行動が不十分であったり、哺育放棄する個体の頻度が高くなったりしたために引き起こされたものと推察された。しかし、これらの異常がポリフェノール類（植物エストロゲン）の摂取が遮断されたことに起因するのか、あるいは通常飼料（MF）に含まれるポリフェノール類以外の何らかの成分が不足したために生じたものであるかは、現時点で不明である。そこで、マウスを用いた研究においては計画の一部を変更し、AIN 群と MF 群の他に AIN 飼料に大豆イソフラボン（大豆由来のポリフェノール類）を添加した群を加えた 3 群構成の実験を追加して、哺育児生存率の低下が飼料からポリフェノール類を除去したことにより生じたものであるか否かを確認している。

以上の結果から、ラットを用いた実験においては、通常飼料給与群と比較した場合に哺育児生存率の僅かな低下や性成熟日齢の早期化または遅延が認められるものの、少なくともポリフェノール類（植物エストロゲン）の摂取をほぼ完全に遮断しても 1 世代繁殖毒性試験は実施可能であることが実証された。一方、マウスを用いた実験については、少なくとも C3H マウスを用いてこのような実験条件（植物エストロゲンの摂取を遮断した実験系）で繁殖毒性試験を実施することは不可能であることが示唆された。次年度は、ラットの実験を継続して F1 世代の動物の繁殖能

力を観察すると共に、マウスの AIN 群でみられた哺育児生存率の著しい低下に着目した上で研究計画を一部追加して、(1) 母親の哺育放棄を含む哺育不全はポリフェノール類の欠乏によるものか否か、(2) もしもポリフェノール類の欠乏により哺育不全が引き起こされるのであれば、それはエストロゲン受容体を介した作用か否か、および (3) そのような異常が C3H 系統に特有のものであるかマウス一般の性質であるか、を明らかにする必要があると考えられる。

Ⅲ 平成 22 年度研究成果報告

1 当該年度の具体的目標

ラットを用いた研究（基礎飼料に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）がラットの繁殖に及ぼす影響の解析）はほぼ当初の計画通りに進行しているので、F1 動物の飼育を継続して繁殖させ、F2 哺育児の成長と性成熟を観察する。また、動物実験終了後は、ポリフェノール類（植物エストロゲン）摂取の有無によると思われる変化のみられた生殖器官を病理組織学的に検査する。

マウスを用いた研究（基礎飼料に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）がマウスの繁殖に及ぼす影響の解析）においては、ポリフェノール類の摂取を遮断することにより、十分な数の F1 世代を得られないために実験を終了せざるを得ないほど顕著な影響が認められた。また、これらの動物を観察する限り、哺育児生存率の低下は、母動物の哺育行動が不十分であったり、哺育放棄する個体の頻度が高くなったりしたために引き起こされたものと推察された。しかし、これらの異常がポリフェノール類（植物エストロゲン）の摂取が遮断されたことに起因するのか、あるいは通常飼料（MF）に含まれるポリフェノール類以外の何らかの成分が不足したために生じたものであるかを明らかにするには、今後の追加実験が必要である。そこで、研究計画の一部を変更して、AIN 群と MF 群の他に AIN 飼料に大豆イソフラボン（大豆由来のポリフェノール類）を添加した群を加えた 3 群構成の実験を追加して、哺育児生存率の低下が飼料からポリフェノール類を除去したことにより生じたものであるか否かを確認している。平成 21 年度はさらに研究を進め、このような現象（ポリフェノール類の摂取を遮断すると母動物の哺育能力が著しく低下する現象）が他系統のマウスにも出現するものか否かを検証すると共に、その作用機序を検討する。

2 平成 22 年度の主な研究成果

(1) 研究項目ごとの研究成果の概要

1) 研究項目名：基礎飼料に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）がラットの繁殖に及ぼす影響の解析

個別研究課題名：ラットを用いた研究における F1 世代の動物の生後発達、性成熟および成長後の繁殖能力に関する指標の解析（担当：青山博昭，北條仁，高橋研，佐藤旭）

前年度は F1 世代の動物の性成熟まで観察が進んだので、引き続きこれらの動物を育成し、親世代の動物と同様に交配して、F2 世代の児動物を得た。さらに、得られた F2 世代の児動物（孫世代）の性成熟を観察した。その結果、F1 世代においても親世代と同様に AIN-93G 給与群における雌雄の交尾率および雌の妊娠率と出産率に異常はみられなかったことから、植物エストロゲンを除去した飼料を用いても 2 世代繁殖試験を実施することが可能であることが実証された。一方、AIN-93G 給与群と MF 給与群の間で種々の繁殖指標を比較すると、F1 世代においても親世代と同様の差が観察された。すなわち、AIN-93G 給与群では雌動物の着床数がいずれの世代でも MF 給与群より有意に多く、F1 世代では出産児数も有意に増加した。また、AIN-93G 給与群における F1 雄親動物の前立腺と精囊・凝固腺の重量は MF 群の値より有意に高く、F2 雄離乳児の性成熟も有意に早期化した。さらに、F2 雌離乳児では AIN-93G 給与群の子宮重量が MF 給与群の値より有意に低く、性成熟もやや遅延した。ラットを用いた実験で MF 給与群と AIN-93G 給与群との間で 2 世代にわたって共通して観察されたこれらの差は、いずれも典型的なエストロゲン様作用物質を投与した動物と無処置の動物との間にみられる差と一致することから、恐らく MF 飼料が含有するポリフェノール類に由来するエストロゲン活性により引き起こされたものであると考えられる。また、通常の動物実験では、これまで無処置と信じられていた対照群の動物にも、市販飼料に含まれるポリフェノール類がエストロゲン受容体を介して動物の表現型が変化する程度に影響を及ぼしていることが示唆される。

個別研究課題名：生殖器官の病理組織学的観察（担当：中島信明，吉田敏則，高橋尚史）

F1 雄親動物の前立腺を病理学的に検査したところ，肉眼所見として側部に顆粒状の変化が観察された。組織学的検査では，AIN 群の全例で腺腔内に脱落した上皮細胞や変性した好中球を主体とした炎症性細胞が充満している像が確認され，前立腺炎と診断された。雌の卵巣については，F1 雌親動物を対象に病理組織学的検査を実施したが，いずれの動物にも異常は認められなかった。雌離乳児の子宮についても，F1 離乳児の子宮を病理組織学的に検査したが，いずれの群においても，粘膜上皮細胞，子宮腺，間質細胞等に著変は認められなかった。

2) 研究項目名：基礎飼料に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）がマウスの繁殖に及ぼす影響の追加解析と，低ポリフェノール飼料の有用性の検討

個別研究課題名：親世代の動物の成長と繁殖能力に関する指標の解析（担当：青山博昭，北條仁，高橋研，佐藤旭，浦川千鶴）

前年度（平成 21 年度）に名古屋大学で実施した実験により，C3H/HeN マウスにポリフェノール類（植物エストロゲン）を含まない合成飼料（AIN-93G）を給与して繁殖させると，少なくともコンベンショナル環境（非 SPF 環境）下では，哺育児の過半数が生後 4 日以内に死亡することが示唆された。このような異常が生じた原因として，(1) ポリフェノール類の不足，(2) AIN-93G 飼料と MF 飼料の間で異なるポリフェノール類以外の成分の影響，(3) これらの違いと非 SPF 環境との相互作用，などが推測されたが，現在のところその原因を明らかにすることはできなかった。そこで，残留農薬研究所においてもブリーダーから近交系マウス（C3H/HeN）を購入し，SPF 環境下で同様の実験を実施して得られるデータを名古屋大学のデータと比較した。

実験では，ブリーダー（日本チャールスリバー）から購入した近交系マウス（C3H/HeN）を，SPF 環境下で AIN-93G 飼料（AIN 群）または AIN-93G に大豆イソフラボンを 300ppm の濃度で添加した飼料（ISO 群）を給与して 6 週間育成した後に交配し，自然分娩させて F1 児を得た。さらに，これらの F1 哺育児の哺育期間中における生存率，離乳後の性成熟および成熟後の生殖器官を観察した。また，同時に通常の MF 飼料を給与する群（MF 群）も設定して，得られたデータを比較した。

その結果，雌雄の動物の交尾率，妊娠率，出産率，妊娠期間，着床数および出産児数といった指標には，AIN 群，ISO 群および MF 群の間で有意な差は観察されなかった。

個別研究課題名：F1 世代の動物の生後発達および性成熟に関する指標の解析（担当：青山博昭，北條仁，高橋研，佐藤旭，浦川千鶴）

AIN 群における哺育児の生存率はやや低く，すべての哺育児が死亡した腹が，哺育 0 日と哺育 7 日に 1 腹ずつ観察された。ISO 群における哺育児の生存率も AIN 群とほぼ同じであり，哺育 7 日までに 2 腹ですべての哺育児が死亡した。一方，MF 群では哺育児の生存率がこれらの群より高く，統計学的な有意差を伴わないものの，それらの値はいずれの時期においても AIN 群および ISO 群の値を上回った。AIN 群と ISO 群における哺育児生存率がいずれもやや低く，哺育児生存率に関しては 2 種類の大豆イソフラボン（ゲニステインとダイゼイン）を添加した効果が認められなかったことから，これらの結果は，MF 飼料に含まれていた大豆イソフラボン以外の何らかの栄養成分か，あるいは MF 飼料に含まれていたゲニステインおよびダイゼイン以外の植物エストロゲンが，哺育児の生存性を高めることを示唆するものと思われる。しかし，AIN 群においても哺育 0 日における新生児の生存率は 80%を越えており，哺育児の離乳率も約 80%であったことから，少なくとも SPF 環境下であれば，植物エストロゲンの影響を除去した

条件でマウスを用いた生殖・発生毒性試験が実施可能であると判断された。

AIN 群と ISO 群の間で F1 離乳児の性成熟を比較すると、イソフラボンを追加することにより雄の性成熟はやや遅延し、雌の性成熟は有意に早期化することが明らかとなった。また、MF 群においても F1 雄離乳児の性成熟が AIN 群と比較して有意に遅延し、F1 雌離乳児の膣開口日齢は AIN 群とほぼ同じだったものの、膣開口時の体重が AIN 群より有意に低かった。

雌離乳児を 6 週齢で、雄離乳児を 8 週齢でそれぞれ剖検して生殖器官の重量を測定した結果、ISO 群では雄の精囊・凝固腺および前立腺の重量が AIN 群より有意に低く、雌の子宮重量が AIN 群より有意に高かった。また、体重が大きく異なるために直接の比較がやや困難なものの、精囊・凝固腺と子宮の重量については、MF 群にも ISO 群と同様の傾向が認められた。

今回の実験で F1 個体の性成熟や生殖器官重量に観察された AIN 群と ISO 群の間の差は、AIN 群と MF 群の間の差にほぼ一致するものであったばかりでなく、ラットの実験で AIN 群と MF 群との間に観察された差とも良く一致した。したがって、ポリフェノール類（植物エストロゲン）を豊富に含む通常の市販飼料にはそれらに起因するエストロゲン活性があり、通常の動物実験では、これまで無処置と信じられていた対照群の動物にも、市販飼料に含まれるポリフェノール類がエストロゲン受容体を介して動物の表現型が変化する程度に影響を及ぼしていることが示唆される。

3) 研究項目名：基礎飼料に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）がマウスの繁殖に及ぼす影響の追加解析と、低ポリフェノール飼料の有用性の検討

個別研究課題名：親世代の動物の成長と繁殖能力に関する指標の解析（担当：堀尾文彦，村井篤嗣，小林美里）

実験 1 においては、MF 飼料を分析の結果、ポリフェノール類は少なくとも 700 ppm 以上含有されていることが明らかとなった。交尾までのマウスの体重増加は AIN93G 群のほうがやや大きかった。MF 群では、親世代の繁殖能力（交尾率，妊娠率，出産率，妊娠期間，出産児数）は正常な範囲の値であった。そして、AIN93G 群と（AIN93G+イソフラボン）群の親世代の繁殖能力は MF 群と同等であった。

個別研究課題名：F1 世代の児動物の生後発達，性成熟に関する指標の解析（担当：堀尾文彦，村井篤嗣，小林美里）

実験 1 においては、生後 7 日までの児動物の生存率が MF 群で約 40%という低い値であり、さらに AIN-93G 群では 6%，（AIN-93G+イソフラボン）群では 0%であった。このような低値は前年度の実験においては見られていない。これらの低値をもたらした原因として、親動物の飼育環境に問題があると考え、飼育環境の改善を加えて実験 2 を行なうこととした。その結果、実験 2 においては生後 7 日までの児動物の生存率は MF 群が 94%，AIN-93G 群が 67%であり、正常な範囲内であった。この結果より、植物エストロゲンを含まない精製飼料である AIN-93G を摂取した場合にもマウスの正常な繁殖能が維持されており、飼料中の微量な植物エストロゲンの繁殖能への影響を正確に評価できる実験系が確立できたと考えられた。さらに、MF 群に比べて AIN-93G 群での生存率がわずかに低下する傾向があることについては、AIN-93G 群が植物エストロゲンを含有しないために引き起こされていることを推測させる興味ある結果であった。

(2) 全体の研究成果

1) 全体の研究成果の要旨

ポリフェノール類（植物エストロゲン）を含まない合成飼料（AIN-93G）を自家調製してラットおよびマウスに給与し、それらの動物がポリフェノール類を豊富に含む通常飼料（MF）を給与した動物と同等の繁殖能力を維持できるか否かを検討した。また、マウスの実験においては、種々の繁殖指標に観察された AIN-93G 飼料給与群と MF 飼料給与群との差がポリフェノール類含有の有無によるものか否かを検討するため、AIN-93G 飼料に 300ppm の濃度で大豆イソフラボンを添加した飼料を給与する群を設けて、同様の繁殖指標を観察した。

今年度の実験では、F1 世代のラットおよび親世代のマウスのいずれにおいても AIN-93G 給与群の動物がほぼ正常に繁殖することが観察され、これらの動物を用いた生殖・発生毒性試験がポリフェノール類を除去した条件下で実施可能であることが実証された。一方、AIN-93G 飼料に大豆イソフラボンを添加した群の動物に観察された雌離乳児の子宮重量の増加や性成熟の早期化あるいは雄離乳児の性成熟の遅延や性成熟後の精囊および前立腺重量の低下といった変化は、市販の MF 飼料を給与した群の動物に観察された変化とほぼ完全に一致した。これらの結果から、ポリフェノール類（植物エストロゲン）を豊富に含む通常の市販飼料にはそれらに起因するエストロゲン活性があり、通常の動物実験では、これまで無処置と信じられていた対照群の動物にも、飼料に含まれるポリフェノール類がエストロゲン受容体を介して動物の表現型が変化する程度に影響を及ぼしていることが強く示唆される。

2) 研究成果

2-1) 基礎飼料に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）がラットの繁殖に及ぼす影響の解析（詳細なデータは、分担研究者報告書を参照されたい）

F1 世代の動物には親世代と異なるバッチの飼料を給与したため、これらの飼料が含有するポリフェノール類を分析した。分析の結果、新たに調製した AIN-93G 飼料には定量限界値（10ppm）を僅かに上まわる（11ppm）ダイジンの混入が認められたが、ほぼ無視し得る範囲の濃度であると判断した（Table 11）。一方、同時に購入した通常の MF 飼料には、グリシチン、ゲニスチン、ダイジンおよびダイゼインがそれぞれ 42, 359, 287 および 50ppm の濃度で検出され、通常飼料に含まれる植物エストロゲンの総量は 738ppm であった。したがって、今回の実験で MF 飼料給与群（以下「MF 群」と記載する）のラットが摂取する総植物エストロゲン量は、体重 300g の動物が 1 日当たり 18g の飼料を摂取すると仮定して算術的に求めた場合、44.3mg/kg 体重/日と見積もられた。

Table 11. MF および AIN-93G 飼料に含まれる植物エストロゲン含量の分析結果

分析項目	飼料中の検出濃度 (ppm)	
	MF	AIN-93G
クメステロール	ND	ND
グリシチン	42	ND
グリシテイン	ND	ND
ゲニスチン	359	ND
ゲニス테인	ND	ND
ダイジン	287	11
ダイゼイン	50	ND
バイオカニン A	ND	ND
フォルモノネチン	ND	ND

ND：検出限界値（10ppm）以下。

雌雄の親動物の体重は、親世代同様にほぼ F1 世代を通じて AIN 群の値が MF 群の値を上回った。

これらの動物の摂餌量をみると、雄では投与初期には AIN 群の値が MF 群の値より低く、中期には逆に AIN 群の値が MF 群の値を上回ったが、世代を通じて一貫した傾向はみられなかった。雌については、交配前育成期間の後期から妊娠期間にかけて AIN 群の値が MF 群の値より有意に高かった。

これらの動物を 10 週間育成した後に交配したところ、雌雄の動物の交尾率、受胎率、出産率、妊娠期間および出産児の性比といった指標には、AIN 群と MF 群の間で統計学的に有意な差は観察されなかった (Table 12)。しかし、親世代と同様に AIN 群の着床数が MF 群の値より有意に高く、F1 世代では産児数も MF 群より有意に多かった。これらの結果は、少なくともラットにおいては、飼料からポリフェノール類（植物エストロゲン）を除去すると、繁殖能力がやや向上することを示唆するものと考えられる。

Table 12. F1 世代動物の繁殖に関する指標

測定項目／検査項目	試験群（給与飼料）	
	MF（対照）	AIN-93G
雄の交尾率 (%)	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)
雌の交尾率 (%)	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)
受胎率 (%)	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)
出産率 (%)	24/24 (100.0)	24/24 (100.0)
妊娠期間 (日)	22.0±0.2	22.0±0.2
着床数	12.3±0.8	15.4±2.2 ↑
産児数	9.6±1.5	12.3±2.0 ↑
性比 (雄児数／総産児数)	0.450	0.463

群平均値±標準偏差。

↑：統計学的に有意な高値。

F1 親動物を剖検して生殖器官の重量を測定したところ、AIN 群の精嚢と前立腺の絶対重量と体重比のいずれもが MF 群の値を有意に上回った (Table 13)。これらの結果については、飼料からポリフェノール類を除去したこと（飼料に由来するエストロゲン様作用の低下）と

の関連が示唆される。一方、雌親動物については、卵巢重量は絶対値をみると AIN 群の値が MF 群の値より高かったものの、体重比に換算するとそれらはほぼ同じであった (Table 14)。しかし、AIN 群の子宮重量は絶対値でも MF 群の値をやや下回り、体重比には有意な低値が観察された (Table 14)。この変化は、飼料から植物エストロゲンを除去したことによるものと考えられる。

Table 13. F1 世代における雄親動物の生殖器官重量 (mg)

測定項目	試験群 (給与飼料)	
	MF (対照)	AIN-93G
精巣 (絶対重量, mg)	2744 ± 169	2764 ± 131
精巣上体 (絶対重量, mg)	1024 ± 48	1007 ± 45
精嚢 (絶対重量, mg)	1570 ± 85	1828 ± 107 ↑
前立腺 (絶対重量, mg)	446 ± 67	563 ± 106 ↑
精巣 (体重比, %)	0.737 ± 0.049	0.673 ± 0.031 ↓
精巣上体 (体重比, %)	0.275 ± 0.014	0.245 ± 0.010 ↓
精嚢 (体重比, %)	0.422 ± 0.028	0.445 ± 0.023 ↑
前立腺 (体重比, %)	0.120 ± 0.018	0.137 ± 0.026 ↑

群平均値 ± 標準偏差。

↑ : 統計学的に有意な高値。

↓ : 統計学的に有意な低値。

Table 14. F1 世代における雌親動物の生殖器官重量 (mg)

測定項目	試験群 (給与飼料)	
	MF (対照)	AIN-93G
卵巢 (絶対重量, mg)	103.8 ± 8.7	112.9 ± 9.0 ↑
子宮 (絶対重量, mg)	492 ± 84	459 ± 96
卵巢 (体重比, %)	0.0417 ± 0.0039	0.0426 ± 0.0032
子宮 (体重比, %)	0.197 ± 0.030	0.173 ± 0.032 ↓

群平均値 ± 標準偏差。

↑ : 統計学的に有意な高値。

↓ : 統計学的に有意な低値。

雄動物の精子検査では、精子運動率、精巣上体尾当りの精子数および精巣上体尾の重量で補正した精子数のいずれにも群間に有意な差は認められなかった。

F1 哺育児の生存率については、いずれの時期においても AIN 群の値が MF 群の値をやや下回ったものの、群間で統計学的に有意な差はみられなかった (Table 15)。

Table 15. F2 哺育児の生存率

測定項目／検査項目	試験群（給与飼料）	
	MF（対照）	AIN-93G
児の生存率（哺育0日）	98.6±3.7	96.5±11.4
児の生存率（哺育4日）	98.0±4.0	93.5±10.8
児の生存率（哺育7日）	98.4±4.2	94.8±14.2
児の生存率（哺育14日）	95.3±8.9	92.7±22.4
児の生存率（哺育21日）	95.3±8.9	91.7±22.6

群平均値±標準偏差。

F2 哺育児の発育状況をみると、AIN 群では哺育児の体重が雌雄とも哺育0日から4日までの間はMF 群の値より低く、哺育7日にMF 群の値とほぼ等しくなった後、哺育14日以降はむしろMF 群の値を有意に上回った。

F2 離乳児では、AIN 群における脾臓の絶対重量と体重比が雌雄のいずれにおいてもMF 群の値より有意に高かった（Table 16 および 17）。また、子宮については、AIN 群における絶対重量と体重比のいずれもがMF 群の値より有意に低かった（Table 17）。

Table 16. F2 雄離乳児の臓器重量

測定項目	試験群（給与飼料）	
	MF（対照）	AIN-93G
体重（g）	55±8	61±7 ↑
脳（絶対重量，mg）	1480±69	1492±66
脾臓（絶対重量，mg）	161±26	240±41 ↑
胸腺（絶対重量，mg）	144±26	165±24 ↑
脳（体重比，%）	2.72±0.34	2.47±0.25 ↓
脾臓（体重比，%）	0.292±0.033	0.396±0.079 ↑
胸腺（体重比，%）	0.260±0.026	0.271±0.024

群平均値±標準偏差。

↑：統計学的に有意な高値。

↓：統計学的に有意な低値。

Table 17. F2 雌離乳児の臓器重量

測定項目	試験群（給与飼料）	
	MF（対照）	AIN-93G
体重（g）	53±7	59±5 ↑
脳（絶対重量, mg）	1446±52	1453±57
脾臓（絶対重量, mg）	158±23	229±40 ↑
胸腺（絶対重量, mg）	150±24	170±23 ↑
子宮（絶対重量, mg）	56.6±9.0	50.4±9.2 ↓
脳（体重比, %）	2.77±0.29	2.48±0.14 ↓
脾臓（体重比, %）	0.301±0.033	0.392±0.081 ↑
胸腺（体重比, %）	0.283±0.020	0.288±0.027
子宮（体重比, %）	0.1085±0.0191	0.0857±0.0152 ↓

群平均値±標準偏差。

↑：統計学的に有意な高値。

↓：統計学的に有意な低値。

F2 雌離乳児の性成熟を観察したところ、AIN 群では雄の性成熟（包皮分離完了日齢）が有意に早まり、雌の性成熟（膣開口日齢）はやや遅延した (Table 18)。これらの結果は、いずれも MF 飼料に含まれているポリフェノール類のエストロゲン様作用に起因した変化と考えられた。

Table 18. F2 雌離乳児の性成熟

測定項目	試験群（給与飼料）	
	MF（対照）	AIN-93G
雄の包皮分離完了日齢（日）	44.9±1.3	43.6±1.7 ↓
完了時体重（g）	153±6	145±8 ↓
雌の膣開口完了日齢（日）	31.7±2.1	32.8±1.8
完了時体重（g）	78±10	83±8

群平均値±標準偏差。↓：統計学的に有意な低値。

動物実験を終了した後、重量に変動がみられた F1 雄親動物の前立腺を病理学的に検査したところ、肉眼所見として側部に顆粒状の変化が観察された。組織学的検査では、AIN 群の全例で腺腔内に脱落した上皮細胞や変性した好中球を主体とした炎症性細胞が充満している像が確認され、前立腺炎と診断された。この炎症は、間質にリンパ球やマクロファージを主体とする炎症性細胞の浸潤が認められる通常の前立腺炎とはやや異なり、間質に炎症性細胞の浸潤を伴わないものであった。一方、絶対重量が増加した雌の卵巣については、F1 雌親動物を対象に病理組織学的検査を実施したが、原始卵胞の数や性状に群間で明らかな差は認められず、二次卵胞やグラーフ卵胞、黄体形成にも異常は認められなかった。

群間で重量に有意な差が観察された雌離乳児の子宮については、F1 雌離乳児を対象として病理組織学的検査を実施した。しかし、いずれの群においても、粘膜上皮細胞、子宮腺、間質細胞等に著変は認められなかった。さらに、細胞増殖活性を比較するために抗 PCNA 抗体を用いて免疫組織学的検査を行ったところ、子宮粘膜上皮の PCNA 陽性細胞数には群間で差は検出されなかったものの、子宮粘膜固有層では AIN 給与群における PCNA 陽性細胞

胞数が MF 群の値より有意に高かった。

2-2) 基礎飼料に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）がマウスの繁殖に及ぼす影響の追加解析と、低ポリフェノール飼料の有用性の検討（詳細なデータは、分担研究者報告書を参照されたい）

実験開始に先立って、動物に給与する 3 種類の飼料が含有するポリフェノール類を分析したところ、AIN-93G 飼料には定量限界値（10ppm）を上まわるような量の植物エストロゲン混入が認められなかった。また、AIN-93G 飼料にクルードの大豆イソフラボンを添加した飼料では、ゲニステインとダイゼインがそれぞれ 199ppm および 186ppm 検出された（Table 19）。今回の実験では、イソフラボン添加飼料の総植物エストロゲン濃度は 385ppm と目標濃度の 300ppm を上回ったが、飼料供給会社より、含量が 0.1%以下の微量成分については、この程度の誤差は十分に許容範囲内にあるとの説明を得た。一方、同時に購入した通常の MF 飼料にはゲニステインとダイゼインがそれぞれ 385 および 311ppm の濃度で検出され、この飼料に含まれる植物エストロゲンの総量は 696ppm であった。

これらの分析結果から、イソフラボン添加飼料給与群（以下「ISO 群」と記載する）と MF 飼料給与群（MF 群）のマウスが摂取する総植物エストロゲン量は、体重 30g の動物が 1 日当たり 3.8g の飼料を摂取すると仮定して算術的に求めた場合、それぞれ 48.8 および 88.2mg/kg 体重/日と見積もられた。しかし、ゲニステインを除くゲニステイン、ダイゼインおよびダイゼインのエストロゲン活性は極めて低いと考えられることから、今回の実験で用いた飼料の持つ実質的なエストロゲン活性は、イソフラボン添加飼料>MF 飼料>AIN-93G 飼料の順であったと推測される。

今回の実験では、植物エストロゲンの含有量が比較的低い原料を用いて調製した NIH-07PLD 飼料と、これにクルードの大豆イソフラボンを 300ppm の濃度で添加した飼料も調製して、マウスの繁殖に及ぼすこれらの飼料の影響の評価も試みた。しかし、これらの飼料を給与した雌マウスの約半数が哺育 7 日から哺育 14 日の間に死亡し、評価に足るデータを得ることができなかったため、この報告書ではそれらの動物に関するデータを割愛する。

Table 19. MF および AIN-93G およびイソフラボン添加 AIN-93G 飼料に含まれる植物エストロゲン含量の分析結果

分析項目	飼料中の検出濃度 (ppm)		
	イソフラボン添加		
	AIN-93G	AIN-93G	MF
クメステロール	ND	ND	ND
グリシチン	ND	ND	ND
グリシテイン	ND	ND	ND
ゲニステイン	ND	ND	385
ゲニステイン	ND	199	ND
ダイゼイン	ND	ND	311
ダイゼイン	ND	186	ND
バイオカニン A	ND	ND	ND
フォルモノネチン	ND	ND	ND

ND：検出限界値（10ppm）以下。

ISO 群における雄親動物の体重は、実験期間を通じて AIN 群の値よりやや低かったが、いずれに時期において両群間に統計学的に有意な差は観察されなかった。一方、MF 群の雄の体重には実験開始後 1 週間で AIN 群と比較して統計学的に有意な低値が認められるようになり、この差は実験期間を通じて観察された。

今回の実験では、雌親動物の体重についてもほぼ同様の傾向が観察された。すなわち、AIN 群と ISO 群の雌の体重は実験期間を通じてほぼ同じであり、MF 群では実験開始後 2 週目から妊娠 7 日までの間の体重が AIN 群より有意に低かった。

雄の摂餌量は、実験第 1 週における ISO 群の値が AIN 群の値より僅かながら有意に高かったことを除き、いずれの時期においても群間に有意な差は認められなかった。雌では、交配前育成期間の後期（実験第 5 週から第 6 週）と妊娠期間中における ISO 群と MF 群の摂餌量が AIN 群より有意に高かった。しかし、哺育期間中逆にこれらの群も摂餌量が AIN 群の値よりやや低く、MF 群の哺育 15-21 日の値は AIN 群の値より統計学的に有意に低かった。

これらの動物を 6 週間育成した後に交配したところ、雌の受胎率、出産率、妊娠期間、着床数、産児数および出産児の性比といった指標には、群間で統計学的に有意な差は観察されなかった (Table 20)。したがって、いずれの飼料を給与されたマウスも正常に繁殖することが明らかとなった。

Table 20. 雌親動物の繁殖に関する指標

検査項目	試験群		
	AIN	AIN+ISO	MF
受胎率 (%)	14/14 (100)	15/15 (100)	15/15 (100)
出産率 (%)	13/14 (92.9)	15/15 (100)	14/15 (93.3)
妊娠期間 (日) ^a	19.1±0.4	19.3±0.5	19.4±0.5
着床数 ^a	8.5±1.1	8.9±1.3	8.4±1.9
産児数 ^a	6.0±2.0	5.8±2.2	5.7±2.3
性比 ^b	0.512	0.465	0.529

a : 群平均値±標準偏差。

b : 雄出産児数/総出産児数

親動物を剖検して生殖器官の重量を測定したところ、雄では MF 群の精巣上体重量が AIN 群の値より有意に高かったが、その他の臓器には群間で有意な差は認められなかった。また、この群では雄の体重が他の群より低かったため、MF 群では体重比で見ると前立腺を除くすべての生殖器官の重量が AIN 群より有意に高かった。

雌の卵巣および子宮重量には、群間で有意な差はみられなかった。

雄動物の精子検査では、精子運動率、精巣上体尾当りの精子数および精巣上体尾の重量で補正した精子数のいずれにも群間に有意な差は認められなかった。

AIN 群における哺育児の生存率はやや低く、哺育 0 日（出産時）80.1%、哺育 7 日で 66.5%であった (Table 21)。この群では、すべての哺育児が死亡した腹が、哺育 0 日と哺育 7 日に 1 腹ずつ観察された。ISO 群における哺育児の生存率も AIN 群とほぼ同じであり、出産日にすべての哺育児が死亡した腹はなかったものの、哺育 7 日までに 2 腹ですべての哺育児が死亡した。MF 群では、統計学的な有意差を伴わないものの、いずれの時期においても哺育児の生存率が AIN 群および ISO 群の値を上回った。

Table 21. F1 哺育児の生存率 (%)

哺育日齢	試験群		
	AIN	AIN+ISO	MF
哺育 0 日	80.1±29.2	85.1±19.4	88.8±26.9
哺育 7 日	81.4±30.3	77.1±35.0	93.8±13.3
哺育 14 日	79.9±30.9	75.3±35.5	92.8±15.3
哺育 21 日	79.9±30.9	75.3±35.5	91.9±16.1

群平均値±標準偏差。

哺育 0 日における哺育児生存率

= 生存出産児数/総出産児数×100。

哺育 7, 14 および 21 日の哺育児生存率

= 哺育 7, 14 および 21 日における生存児数/哺育 0 日における生存児数×100。

AIN 群と ISO 群における F1 哺育児の体重は、雌雄とも哺育期間を通じてほぼ同じであった。MF では、哺育 0 日における哺育児の体重が雌雄とも AIN 群の値を上回り、雌では AIN 群との差が統計学的に有意であった。しかし、哺育 14 日以降の哺育児の体重は、雌雄とも AIN 群の値より有意に低かった。

F1 離乳児の性成熟を観察したところ、ISO 群と MF 群では雄の性成熟がやや遅延し、MF 群の包皮分離完了日齢と ISO 群の包皮分離完了時における体重には、それぞれ AIN 群の値との間で統計学的に有意な差が認められた (Table 22)。一方、これらの群では雌の性成熟が早期化する傾向が明らかであり、ISO 群では膣開口日齢と膣開口部における体重の両者が、MF 群では膣開口時における体重が、それぞれ AIN 群の値より有意に低かった。これらの結果は、いずれも飼料に含まれている大豆イソフラボン類のエストロゲン様作用に起因した変化と考えられた。

Table 22. F1 離乳児の性成熟

観察項目	試験群		
	AIN	AIN+ISO	MF
雄の包皮分離完了日 齢 (日)	30.7±1.4	32.0±1.9	32.5±2.3 ↑
完了時体重 (g)	18.9±1.1	19.9±1.2 ↑	18.2±0.9
雌の膣開口完了日齢 (日)	26.3±2.3	23.7±1.7 ↓	26.7±3.4
完了時体重 (g)	14.9±1.4	13.7±1.4 ↓	13.2±1.6 ↓

群平均値±標準偏差。

↑ : 統計学的に有意な高値。

↓ : 統計学的に有意な低値。

雌雄の F1 離乳児では、雄は 8 週齢、雌は 6 週齢で屠殺して剖検し、生殖器官の重量を測定した。その結果、雄では ISO 群と MF 群における精囊の重量がいずれも AIN 群の値を下回り、絶対重量で見ると AIN 群との差はいずれも統計学的に有意であった (Table 23)。これらの群では、前立腺の重量にも低値が観察され、ISO 群では AIN 群との差が絶対重量と体重比の両方で統計学的に有意であった。

雌の子宮については、ISO 群と MF 群の値がいずれも AIN 群の値を上回り、ISO 群では

絶対重量と体重比のいずれもがAIN群の値より有意に高かった (Table 24)。

Table 23. F1 雄離乳児の生殖器官重量 (mg, 8 週齢時)

測定項目	試験群		
	AIN	AIN+ISO	MF
精巣 (絶対値)	134±6	137±11	133±7
精巣上体 (絶対値)	43.6±3.3	43.2±3.3	41.9±3.2
精囊 (絶対値)	220±15	209±16 ↓	196±26 ↓
前立腺 (絶対値)	13.7±2.4	11.8±2.2 ↓	13.0±2.9
精巣 (体重比)	0.503±0.031	0.520±0.042	0.546±0.028 ↑
精巣上体 (体重比)	0.163±0.016	0.163±0.013	0.172±0.013
精囊 (体重比)	0.823±0.054	0.789±0.065	0.801±0.071
前立腺 (体重比)	0.0514±0.0091	0.0445±0.0077 ↓	0.0533±0.0119

群平均値±標準偏差。

↑ : 統計学的に有意な高値。

↓ : 統計学的に有意な低値。

Table 24. F1 雌離乳児の生殖器官重量 (mg, 6 週齢時)

測定項目	試験群		
	AIN	AIN+ISO	MF
卵巢 (絶対値)	9.0±1.7	8.6±1.1	8.8±2.0
子宮 (絶対値)	66.4±14.5	77.4±10.3 ↑	68.6±12.1
卵巢 (体重比)	0.0418±0.0091	0.0405±0.0039	0.0432±0.0067
子宮 (体重比)	0.309±0.066	0.365±0.054 ↑	0.341±0.052

群平均値±標準偏差。 ↑ : 統計学的に有意な高値。

2-3) 基礎飼料に含まれるポリフェノール類 (植物エストロゲン) がマウスの繁殖に及ぼす影響の解析

6 週齢の近交系マウス (C3H/HeNS1c) を用いて以下の 2 回の実験を行った。

実験 1

【AIN93G 群】ポリフェノール類 (植物エストロゲン) を含まない合成飼料 (AIN93G 飼料) を雄 9 匹, 雌 9 匹に自由摂取させる。

【(AIN93G+イソフラボン) 群】AIN93G 飼料にイソフラボンを添加したものを, 雄 9 匹, 雌 9 匹に自由摂取させる。

【MF 群】ポリフェノール類を含む通常の繁殖用飼料 (MF, オリエンタル酵母 (株)) を雄 9 匹, 雌 9 匹に自由摂取させる。

実験 2

【AIN93G 群】ポリフェノール類 (植物エストロゲン) を含まない合成飼料 (AIN93G 飼料) を雄 9 匹, 雌 9 匹に自由摂取させる。

【MF 群】ポリフェノール類を含む通常の繁殖用飼料 (MF, オリエンタル酵母 (株)) を雄 9 匹, 雌 9 匹に自由摂取させる。

得られた結果は, 以下の通りである。

実験 1

MF 群, AIN-93G 群, (AIN-93G+イソフラボン) 群の各飼料中の植物エストロゲン含量を Table 25 に示した。

Table 25. MF, AIN-93G, (AIN93G+イソフラボン) 飼料に含まれる植物エストロゲン含量の分析結果

分析項目	飼料中の検出濃度 (ppm)		
	MF	AINAIN-93G	AIN93G+イソフラボン
クメステロール	ND	ND	ND
グリシチン	42	ND	ND
グリシテイン	ND	ND	20
ゲニスチン	359	ND	ND
ゲニステイン	ND	ND	150
ダイジン	287	ND	ND
ダイゼイン	40	ND	110
バイオカニン A	ND	ND	ND
フォルモノネチン	ND	ND	ND

ND：検出限界値（10ppm）以下。

交尾を行うまでの 6 週間の両群のマウスの体重増加は、雌雄ともに、わずかに AIN93G 群のほうが高値であった。AIN-93G 群と (AIN-93G+イソフラボン) 群との間では差はなかった。

Table 26 に、妊娠率、妊娠期間、出産数を示した。各パラメータにおいて、3 群間で差は見られなかった。

Table 26. 親世代の妊娠率、妊娠期間、出産数、児の雌雄比

測	試験群		
	MF	AINAIN-93G	AIN-93G+イソフラボン
妊娠率 (%) (括弧内は個体数)	88.9%	90.0%	100%
妊娠期間 (日)	19.7	19.4	20.0
出産児数 (匹/親)	5.4	6.0	5.9

実験 2

MF 群と AIN-93G 群の 2 群で行ったが、両群の親の交尾までの体重増加、妊娠率、妊娠期間、出産数の結果は実験 1 と全く同様であった。

実験 1

F1 児動物の生後 7 日目までの生存率は、MF 群で 42%、AIN-93G 群で 6%、(AIN93G+イソフラボン) 群で 0% であり、児動物の観察データを得るには至らなかった。これら 3 群での生存率の低い理由が親動物の飼育環境にあると考え、飼育環境に改善を加えて、再度、飼育実験を行うこととした。具体的な改善点は、床敷き（木質チップ）の増量、ケージの天井の遮光、飼育ケージ下の消音用ゴムマットの整備などである。

実験 2

F1 児動物の生後 7 日目までの生存率は、MF 群が 94%、AIN-93G 群が 72% であった (Table

27)。本実験においては十分な数の F1 児動物が離乳まで生存したので、生後の体重増加、雌の性成熟（膣開口）について測定した。離乳時の児の個体数は MF 群では雄 44 匹、雌 34 匹であった。AIN93G 群は雄 19 匹、雌 20 匹であった。

雄の体重は、4 日齢、7 日齢では MF 群の方が大きいですが、14 日齢および 21 日齢では AIN93G 群の方が大きくなった。離乳後 14 日目以降の両群の体重は同等となった。雄の屠殺時(8 週齢)の体重は両群で差がなく、体重あたりの精巣重量および精嚢重量も両群で差は観察されなかった。

雌の体重についても、4 日齢、7 日齢では MF 群のほうが大きいですが、14 日齢および 21 日齢では AIN93G 群の方が大きくなった。離乳後 14 日目以降の両群の体重は同等となった。メスの膣開口に要する生後の日数は、MF 群が 26.0 ± 3.2 日、AIN93G 群が 24.9 ± 2.9 日であり、両群で差がなかった。雌の屠殺時(6 週齢)の体重は両群で差がなく、体重あたりの卵巣重量および子宮重量も両群で差は観察されなかった。

Table 27 F1 世代の児の離乳時までの生存率

測定項目／検査項目	試験群（給与飼料）	
	MF	AIN-93G
出産児数（匹／親）	6.1	5.3
性比（雄児数／総産児数）	0.59	0.48
児の生存率（哺育 0 日）	96.2	89.4
児の生存率（哺育 0-4 日）	97.8	80.0
児の生存率（哺育 4-7 日）	100.0	100.0
児の生存率（哺育 7-14 日）	100.0	100.0
児の生存率（哺育 14-21 日）	100.0	100.0

3) 考察及び結論

ポリフェノール類（植物エストロゲン）を含まない合成飼料（AIN-93G）を自家調製してラットおよびマウスに給与し、それらの動物がポリフェノール類を豊富に含む通常飼料（MF）を給与した動物と同等の繁殖能力を維持できるか否かを検討した。また、マウスの実験においては、種々の繁殖指標に観察された AIN-93G 飼料給与群と MF 飼料給与群との差がポリフェノール類含有の有無によるものか否かを検討するため、AIN-93G 飼料に 300ppm の濃度で大豆イソフラボンを添加した飼料を給与する群を設けて、同様の繁殖指標を観察した。いずれの実験においても、分析により、調製した AIN-93G 飼料にはポリフェノール類の混入がほとんどないことが確認された。

ラットを用いた実験では、ポリフェノール類を含まない飼料として自家調製した AIN 飼料を給与された群（AIN 群）で、雌雄の F1 親動物の体重がいずれも MF 飼料を給与された群（MF 群）の動物より有意に高かった。また、雄では AIN 群の摂餌量が MF 群の値よりやや低かった。これらの結果から、AIN 飼料の栄養価が極めて高いことが示唆される。

F1 世代の親動物の繁殖能力を観察すると、親世代と同様に AIN 群においても交尾から妊娠を経て出産に至るまでの期間に異常は何も認められず、哺育児の生存率が MF 群と比較してやや低かったとはいえ、いずれの世代でも 90%以上の児が離乳できた。これらの結果は、飼料に由来するポリフェノール類（植物エストロゲン）の影響を除去した条件でも 2 世代繁殖毒性試験が十分に実施可能なことを実証するものと考えられる。

一方、AIN 群と MF 給与群の間で種々の繁殖指標を比較すると、F1 世代でも AIN 群では雌

動物の着床数が MF 給与群の値を有意に上回り、出産児数も有意に増加した。また、AIN 群における F1 雄親動物の前立腺と精囊・凝固腺の重量が MF 群の値より有意に高く、F2 雄離乳児の性成熟も有意に早期化した。さらに、F2 雌離乳児では AIN 群の子宮重量が MF 群の値より有意に低く、性成熟にも遅延が認められた。MF 群と AIN 群との間で観察されたこれらの差は、いずれも典型的なエストロゲン様作用物質を投与した動物と無処置の動物との間にみられる差と一致する。したがって、これらの結果は、AIN 群の動物が飼料に含まれるポリフェノール類のエストロゲン様作用から解放されたことにより引き起こされたものであると解釈される。

マウスを用いた実験においても、AIN 群の雌雄の親動物の体重が、いずれも MF 群の動物より有意に高かった。また、雌では AIN 群の摂餌量が MF 群の値よりやや低かったことから、AIN 飼料の栄養価が極めて高いことが示唆される。一方、AIN にイソフラボンを添加した群 (ISO 群) では、時として雌の摂餌量が AIN 群の値をやや上回ったものの、いずれの時期においても雌雄の体重は AIN 群の値とほぼ同じであった。これらの結果から、AIN 飼料の高栄養性は大豆イソフラボン添加の有無とは無関係であることが示唆される。

親動物の繁殖能力を観察すると、AIN 群においても交尾から妊娠を経て出産に至るまでの期間に異常は何も認められず、雌の受胎率、出産率、妊娠期間、着床数、産児数および出産児の性比といった指標には、MF 群との間に有意な差は何も見られなかった。また、AIN に大豆イソフラボンを添加した群におけるこれらの指標にも意味のある変化は何も認められなかった。これらの結果は、マウスにおいても飼料に由来するポリフェノール類 (植物エストロゲン) の影響を除去した条件で繁殖毒性試験が十分に実施可能なことを実証するものと考えられる。

今回の実験では、AIN 群と ISO 群における哺育児生存率がいずれも MF 群の値よりやや低く、哺育児生存率に関しては AIN-93G 飼料に 2 種類の大豆イソフラボン (ゲニステインとダイゼイン) を添加した効果はまったく認められなかった。これらの結果は、MF 飼料に含まれていた大豆イソフラボン以外の何らかの栄養成分か、あるいは MF 飼料に含まれていたゲニステインおよびダイゼイン以外の植物エストロゲンが、哺育児の生存性を高めることを示唆するものと思われる。しかし、AIN 群においても哺育 0 日における新生児の生存率は 80% を越えており、哺育児の離乳率も約 80% であったことから、少なくとも SPF 環境下であれば、植物エストロゲンの影響を除去した条件下にマウスを用いた生殖・発生毒性試験を実施することが可能であると判断された。

AIN 群と ISO 群の間で F1 離乳児の性成熟を比較すると、イソフラボンを添加することにより雄の性成熟はやや遅延し、雌の性成熟は有意に早期化することが明らかとなった。また、MF 群においても F1 雄離乳児の性成熟が AIN 群と比較して有意に遅延し、F1 雌離乳児の腔開口日齢は AIN 群とほぼ同じだったものの、腔開口時の体重が AIN 群より有意に低かった。動物に給与した飼料の分析では、総イソフラボン含量は MF 群の値が ISO 群の値を上回ったものの、ISO 群ではイソフラボンの中でもエストロゲン活性が最も高いゲニステインの含量が極めて高かったことから、飼料の総エストロゲン活性は ISO 飼料が MF 飼料を上回るものと考えられた。これらの結果と、F1 離乳児の性成熟が MF 群で僅かに変化し、ISO 群ではそれらがより明確になったことを合わせて考えると、ISO 群と MF 群で観察された雄離乳児の性成熟の遅延と雌離乳児の性成熟の早期化は、いずれも給与した飼料が持つエストロゲン活性の強さを反映した変化であると考えられる。

雌離乳児を 6 週齢で、雄離乳児を 8 週齢でそれぞれ剖検して生殖器官の重量を測定した結果、ISO 群では雄の精囊・凝固腺および前立腺の重量が AIN 群より有意に低く、雌の子宮重量が AIN 群より有意に高かった。また、これらの臓器の重量については、MF 群にも ISO

群と同様の傾向が認められた。したがって、生殖器官の重量にみられた変化についても、飼料が持つエストロゲン活性の強さを反映したものと解釈される。

昨年度に名古屋大学で実施したマウスの実験においては、AIN 群における哺育児の生存率が著しく低下し、少なくとも C3H/HeNS1c マウスにポリフェノール類を除去した飼料を給与してコンベンショナル環境下で飼育すると、繁殖能力が低下する可能性が示唆された。そこで、同じ条件で追試験を実施したところ、MF 群においても F1 児動物の生存率は予期していた数値よりも明らかに低い値となり、AIN-93G 群と ISO 群ではこの値がさらに低下した。このため、この実験系では F1 児動物の生後発達、性成熟および生殖器官重量を 3 群で比較することができなかった。この低い生存率の理由については、親動物が分娩後に児動物を哺育するための環境が不十分ではないかと推察した。そこで、ケージ内の床敷き（木質チップ）を増量して親の営巣を促す、ケージ天井の半分を遮蔽して親の営巣を促す、ケージ移動の際の消音をするためにケージ下にゴムマットを敷く、などの飼育環境の改善を行って、さらに実験 2 を行うこととした。また、用いるマウスのブリーダーを変更し、残留農薬研究所が用いた系統と同じ C3H/HeNCrj マウスとした。

実験 2 において、統計学的な有意差は伴わないものの、MF 群に比べて AIN-93G 群では F1 児動物の生存率が低い傾向が観察された。このことは、MF 飼料中に存在するポリフェノール類（植物エストロゲン）が雌親に作用していることを推測させる結果である。実験 1 では、AIN-93G に MF に含まれる程度のイソフラボンを追加して AIN-93G 群の児動物の生存率の上昇を期待したが、両群の生存率が著しく低かったため、イソフラボンの効果を評価することはできなかった。

実験 2 では、期待されたとおりに MF 群での F1 児動物の生後 7 日目までの生存率が 94% に上昇した。AIN-93G 群での生存率も 72% に上昇した。この結果は、植物エストロゲンを含まない AIN-93G 飼料を摂取した親動物も正常な繁殖が可能であり、児動物の哺育も正常に行われることを示している。児動物の成長に関しては、体重増加の経時的な立ち上がり曲線は MF 群と AIN93G 群において僅かに異なることが雌雄両方において観察されたが、離乳後 14 日目以降は雌雄ともに両群の間に体重の差はなくなった。さらに、雌の生成熟（膣開口）に要する日数も両群で差がなかった。児動物の雄（8 週齢）と雌（6 週齢）の生殖臓器の重量も両群で差のある臓器は観察されなかった。よって、AIN-93G に低用量の様々な植物エストロゲンを追加してマウスの繁殖および児動物の成長・性成熟に及ぼす影響を見ることによって、低用量の植物エストロゲンの作用を正確に評価できると考えられた。

実験 2 において、顕著ではないが、MF 群に比べて AIN-93G 群では F1 児動物の生存率が低い傾向（94% に対して 72%）が観察された。このことは、MF 飼料中に存在する植物エストロゲンが雌親に作用していることを推測させる結果である。実験 1 では、AIN-93G に MF に含まれる程度のイソフラボンを追加して AIN-93G 群の児動物の生存率の上昇を期待したが、両群の生存率が著しく低かったためにイソフラボンの効果を評価することはできなかった。残留農薬研究所において、AIN-93G にイソフラボンを添加した飼料をマウスに与える飼育実験が行われているが、その結果によるとイソフラボン摂取は児動物の生存率には影響を及ぼさない。しかし、MF 飼料に含まれるイソフラボン以外の植物エストロゲンが、児動物の生存率の回復に寄与している可能性は残されている。

今回の実験で F1 個体の性成熟や生殖器官重量に観察された AIN 群と ISO 群の間の差は、程度の差こそあれ AIN 群と MF 群の間の差にほぼ一致するものであったばかりでなく、ラットの試験で AIN 群と MF 群との間に観察された差とも良く一致した。これらの結果から、ポリフェノール類（植物エストロゲン）を豊富に含む通常の市販飼料にはそれらに起因するエストロゲン活性があり、通常の動物実験では、これまで無処置と信じられていた対照群

の動物にも，市販飼料に含まれるポリフェノール類がエストロゲン受容体を介して動物の表現型が変化する程度に影響を及ぼしていることが強く示唆される。

IV 研究期間を通じた全体の研究成果

(1) 研究項目ごとの研究成果の概要

1) 研究項目名：基礎飼料に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）がラットの繁殖に及ぼす影響の解析

個別課題名：親世代の動物の成長と繁殖能力に関する指標の解析（担当：青山博昭，北條仁，高橋研，佐藤旭）

ポリフェノール類（植物エストロゲン）を含まない合成飼料（AIN-93G）を自家調製してラットに給与し、それらの動物がポリフェノール類を豊富に含む通常飼料（MF）を給与した動物と同等の繁殖能力を維持できるか否かを検討した。調製した AIN-93G 飼料は、分析によりポリフェノール類の混入がないことが確認された。ラットを用いた実験では、AIN-93G 飼料を給与した群においてもほぼ十分な数の F1 離乳児が得られ、少なくとも植物エストロゲンを除去した飼料を用いた 1 世代繁殖試験は実施可能なことが示された。しかし、AIN-93G 給与群では哺育初期における哺育児の生存率と体重が僅かながら有意に低下し、雄親動物の精囊および前立腺重量が有意に増加した。これらの結果から、通常の動物実験では飼料に含まれるポリフェノール類がエストロゲン受容体を介して何らかの作用を及ぼしていることが示唆された。

個別課題名：F1 世代の動物の生後発達、性成熟および成長後の繁殖能力に関する指標の解析（担当：青山博昭，北條仁，高橋研，佐藤旭）

出生した F1 哺育児の観察では、上述の如く、AIN-93G 給与群では哺育 0 日における哺育児の生存率が MF 給与群より有意に低く、統計学的な有意差を伴わないものの、この傾向は哺育 4 日にも認められた。また、AIN-93G 給与群では哺育児の体重が雌雄とも哺育 0 日から 7 日まで MF 群の値より低く、その差は雄哺育児の哺育 7 日における値を除いていずれも統計学的に有意であった。さらに、AIN-93G 給与群では、MF 群と比較して雌離乳児の子宮重量が有意に低く、雌離乳児の膈開口は有意に遅延し、雄離乳児の包皮分離完了は有意に早期化した。これらの結果は、親動物に観察された変化と同様に、MF 飼料に含まれるポリフェノール類のエストロゲン受容体を介した作用（エストロゲン様作用または抗エストロゲン作用）によりもたらされたものであることが示唆された。

F1 世代の動物については、親世代の動物と同様に交配して、F2 世代の児動物を得た。さらに、得られた F2 世代の児動物（孫世代）の性成熟を観察した。その結果、F1 世代においても親世代と同様に AIN-93G 給与群における雌雄の交尾率および雌の妊娠率と出産率に異常はみられなかったことから、植物エストロゲンを除去した飼料を用いても 2 世代繁殖試験を実施することが可能であることが実証された。一方、AIN-93G 給与群と MF 給与群の間で種々の繁殖指標を比較すると、F1 世代においても親世代と同様の差が観察された。すなわち、AIN-93G 給与群では雌動物の着床数がいずれの世代でも MF 給与群より有意に多く、F1 世代では出産児数も有意に増加した。また、AIN-93G 給与群における F1 雄親動物の前立腺と精囊・凝固腺の重量は MF 群の値より有意に高く、F2 雄離乳児の性成熟も有意に早期化した。さらに、F2 雌離乳児では AIN-93G 給与群の子宮重量が MF 給与群の値より有意に低く、性成熟もやや遅延した。ラットを用いた実験で MF 給与群と AIN-93G 給与群との間で 2 世代にわたって共通して観察されたこれらの差は、いずれも典型的なエストロゲン様作用物質を投与した動物と無処置の動物との間にみられる差と一致することから、恐らく MF 飼料が含有するポリフェノール類に由来するエストロゲン活性により引き起こされたものであると考えられる。また、通常の動物実験では、これまで無処置と信じられていた対照群の動物にも、市販飼料に含まれるポリフェノール類がエストロゲン受容体を介して動物の表現型が変化する程度に影響を及ぼしていることが示唆される。

個別研究課題名：生殖器官の病理組織学的観察（担当：中島信明，吉田敏則，高橋尚史）

F1 雄親動物の前立腺を病理学的に検査したところ，肉眼所見として側部に顆粒状の変化が観察された。組織学的検査では，AIN 群の全例で腺腔内に脱落した上皮細胞や変性した好中球を主体とした炎症性細胞が充満している像が確認され，前立腺炎と診断された。雌の卵巣については，F1 雌親動物を対象に病理組織学的検査を実施したが，いずれの動物にも異常は認められなかった。雌離乳児の子宮についても，F1 離乳児の子宮を病理組織学的に検査したが，いずれの群においても，粘膜上皮細胞，子宮腺，間質細胞等に著変は認められなかった。

2) 研究項目名：基礎飼料に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）がマウスの繁殖に及ぼす影響の追加解析と，低ポリフェノール飼料の有用性の検討

個別研究課題名：親世代の動物の成長と繁殖能力に関する指標の解析（担当：青山博昭，北條仁，高橋研，佐藤旭，浦川千鶴）

前年度（平成 21 年度）に名古屋大学で実施した実験により，C3H/HeN マウスにポリフェノール類（植物エストロゲン）を含まない合成飼料（AIN-93G）を給与して繁殖させると，少なくともコンベンショナル環境（非 SPF 環境）下では，哺育児の過半数が生後 4 日以内に死亡することが示唆された。このような異常が生じた原因として，(1) ポリフェノール類の不足，(2) AIN-93G 飼料と MF 飼料の間で異なるポリフェノール類以外の成分の影響，(3) これらの違いと非 SPF 環境との相互作用，などが推測されたが，現在のところその原因を明らかにすることはできなかった。そこで，残留農薬研究所においてもブリーダーから近交系マウス（C3H/HeN）を購入し，SPF 環境下で同様の実験を実施して得られるデータを名古屋大学のデータと比較した。

実験では，ブリーダー（日本チャールスリバー）から購入した近交系マウス（C3H/HeN）を，SPF 環境下で AIN-93G 飼料（AIN 群）または AIN-93G に大豆イソフラボンを 300ppm の濃度で添加した飼料（ISO 群）を給与して 6 週間育成した後に交配し，自然分娩させて F1 児を得た。さらに，これらの F1 哺育児の哺育期間中における生存率，離乳後の性成熟および成熟後の生殖器官を観察した。また，同時に通常の MF 飼料を給与する群（MF 群）も設定して，得られたデータを比較した。

その結果，雌雄の動物の交尾率，妊娠率，出産率，妊娠期間，着床数および出産児数といった指標には，AIN 群，ISO 群および MF 群の間で有意な差は観察されなかった。

個別研究課題名：F1 世代の動物の生後発達および性成熟に関する指標の解析（担当：青山博昭，北條仁，高橋研，佐藤旭，浦川千鶴）

AIN 群における哺育児の生存率はやや低く，すべての哺育児が死亡した腹が，哺育 0 日と哺育 7 日に 1 腹ずつ観察された。ISO 群における哺育児の生存率も AIN 群とほぼ同じであり，哺育 7 日までに 2 腹ですべての哺育児が死亡した。一方，MF 群では哺育児の生存率がこれらの群より高く，統計学的な有意差を伴わないものの，それらの値はいずれの時期においても AIN 群および ISO 群の値を上回った。AIN 群と ISO 群における哺育児生存率がいずれもやや低く，哺育児生存率に関しては 2 種類の大豆イソフラボン（ゲニステインとダイゼイン）を添加した効果が認められなかったことから，これらの結果は，MF 飼料に含まれていた大豆イソフラボン以外の何らかの栄養成分か，あるいは MF 飼料に含まれていたゲニステインおよびダイゼイン以外の植物エストロゲンが，哺育児の生存性を高めることを示唆するものと思われる。しかし，AIN 群においても哺育 0 日における新生児の生存率は 80%を越えており，哺育児の離乳率も約 80%であったことから，少なくとも SPF 環境下であれば，植物エストロゲンの影響を除去した条件でマウスを用いた生殖・発生毒性試験が実施可能であると判断された。

AIN 群と ISO 群の間で F1 離乳児の性成熟を比較すると、イソフラボンを添加することにより雄の性成熟はやや遅延し、雌の性成熟は有意に早期化することが明らかとなった。また、MF 群においても F1 雄離乳児の性成熟が AIN 群と比較して有意に遅延し、F1 雌離乳児の膣開口日齢は AIN 群とほぼ同じだったものの、膣開口時の体重が AIN 群より有意に低かった。

雌離乳児を 6 週齢で、雄離乳児を 8 週齢でそれぞれ剖検して生殖器官の重量を測定した結果、ISO 群では雄の精囊・凝固腺および前立腺の重量が AIN 群より有意に低く、雌の子宮重量が AIN 群より有意に高かった。また、体重が大きく異なるために直接の比較がやや困難なものの、精囊・凝固腺と子宮の重量については、MF 群にも ISO 群と同様の傾向が認められた。

今回の実験で F1 個体の性成熟や生殖器官重量に観察された AIN 群と ISO 群の間の差は、AIN 群と MF 群の間の差にほぼ一致するものであったばかりでなく、ラットの実験で AIN 群と MF 群との間に観察された差とも良く一致した。したがって、ポリフェノール類（植物エストロゲン）を豊富に含む通常の市販飼料にはそれらに起因するエストロゲン活性があり、通常の動物実験では、これまで無処置と信じられていた対照群の動物にも、市販飼料に含まれるポリフェノール類がエストロゲン受容体を介して動物の表現型が変化する程度に影響を及ぼしていることが示唆される。

3) 研究項目名：基礎飼料に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）がマウスの繁殖に及ぼす影響の解析

個別課題名：親世代の動物の成長と繁殖能力に関する指標の解析(担当：堀尾文彦，村井篤嗣，小林美里)

ポリフェノール類（植物エストロゲン）を含まない飼料として、マウス・ラット用の精製飼料として世界的な標準となっている AIN-93G (J. Nutr., 123, 1939-1951 (1993)) を選択し、その調製を行い、実際に分析を行なってポリフェノール類が検出されないことを確認した。したがって、本研究の目的を達成するために好適な飼料を選択することができたものと考えられる。一方、ポリフェノール類を含有する飼料としては、毒性試験や栄養学研究で繁用されている混合型の通常飼料である MF(オリエンタル酵母(株))を選択した。分析の結果、ポリフェノール類を少なくとも 400 ppm 以上含有することが明らかとなった。交尾までのマウスの体重増加量は AIN-93G 摂取群のほうがやや勝っていた。MF 摂取群では、親世代の繁殖能力（交尾率，妊娠率，出産率，妊娠期間，出産児数）は正常な範囲の値であった。また、AIN-93G 摂取群の親世代の繁殖能力は、MF 摂取群とほぼ同等であった。

実験 2 において、(AIN-93G+イソフラボン)群の親世代の繁殖能力は MF 群および AIN-93G 群と同等であった。

前年度の実験で AIN 摂取群でほとんど離乳児が得られなかった（後述）ために追加した実験 1 においては、MF 飼料を分析の結果、ポリフェノール類は少なくとも 700 ppm 以上含有されていることが明らかとなった。交尾までのマウスの体重増加は AIN93G 群のほうがやや大きかった。MF 群では、親世代の繁殖能力（交尾率，妊娠率，出産率，妊娠期間，出産児数）は正常な範囲の値であった。そして、AIN93G 群と (AIN93G+イソフラボン) 群の親世代の繁殖能力は MF 群と同等であった。

個別課題名：F1 世代の動物の生後発達，性成熟および成長後の繁殖能力に関する指標の解析(担当：堀尾文彦，村井篤嗣，小林美里)

上述の如く，親世代の動物の繁殖能力に関しては AIN-93G 群と MF 摂取群はほぼ同等と考えられたが，児の生存率には両群で著明な差が認められた。すなわち，MF 群では出生児の約 94% が離乳まで生存したが，AIN-93G 群では出生児の約 94% が生後 4 日以内に死亡した。現時点では，

生存率の低下は親の哺育放棄に起因すると推察している。また、MF 群の母動物が正常に児を哺育できたことは、飼料に含まれるポリフェノール類のエストロゲン様作用（または抗エストロゲン作用）と何らかの関連がある可能性が示唆される。AIN-93G 群では F2 世代を作出するために十分な数の離乳児が得られなかったため、当初の実験計画を変更した。すなわち、今回と同様に親世代の動物に組成の異なる飼料を給与する実験を平成 21 年 12 月から再度開始して、哺育期間中における F1 哺育児の生存率に AIN-93G 群と MF 群の間の著明な差が再現するか否かを確認することとした。この実験においては、MF 群と AIN-93G 群に加え、AIN-93G に大豆イソフラボン（植物エストロゲン）を添加した飼料を給与する新たな群も加えて実験を行った。

追加した実験 1 においては、生後 7 日までの児動物の生存率が MF 群で約 40% という低い値であり、さらに AIN-93G 群では 6%、(AIN-93G+イソフラボン) 群では 0% であった。このような低値は前年度の実験においてはみられていない。これらの低値をもたらした原因として、親動物の飼育環境に問題があると考え、飼育環境の改善を加えて実験 2 を行なうこととした。その結果、実験 2 においては生後 7 日までの児動物の生存率は MF 群が 94%、AIN-93G 群が 67% であり、正常な範囲内であった。この結果より、植物エストロゲンを含まない精製飼料である AIN-93G を摂取した場合にもマウスの正常な繁殖能が維持されており、飼料中の微量な植物エストロゲンの繁殖能への影響を正確に評価できる実験系が確立できたと考えられた。さらに、MF 群に比べて AIN-93G 群での生存率がわずかに低下する傾向があることについては、AIN-93G 群が植物エストロゲンを含有しないために引き起こされていることを推測させる興味ある結果であった。

(2) 全体の研究成果

1) 全体の研究成果の要旨

ポリフェノール類（植物エストロゲン）を含まない合成飼料（AIN-93G）を自家調製してラットおよびマウスに給与し、それらの動物がポリフェノール類を豊富に含む通常飼料（MF）を給与した動物と同等の繁殖能力を維持できるか否かを検討した。また、マウスの実験においては、種々の繁殖指標に観察された AIN-93G 飼料給与群と MF 飼料給与群との差がポリフェノール類含有の有無によるものか否かを検討するため、AIN-93G 飼料に 300ppm の濃度で大豆イソフラボンを添加した飼料を給与する群を設けて、同様の繁殖指標を観察した。

一連の実験では、ラットおよびマウスのいずれの動物種においても AIN-93G 給与群の動物がほぼ正常に繁殖することが観察され、これらの動物を用いた生殖・発生毒性試験がポリフェノール類を除去した条件下で実施可能であることが実証された。一方、AIN-93G 飼料に大豆イソフラボンを添加した群の動物に観察された雌離乳児の子宮重量の増加や性成熟の早期化あるいは雄離乳児の性成熟の遅延や性成熟後の精囊および前立腺重量の低下といった変化は、市販の MF 飼料を給与した群の動物に観察された変化とほぼ完全に一致した。これらの結果から、ポリフェノール類（植物エストロゲン）を豊富に含む通常市販飼料にはそれらに起因するエストロゲン活性があり、通常動物実験では、これまで無処置と信じられていた対照群の動物にも、飼料に含まれるポリフェノール類がエストロゲン受容体を介して動物の表現型が変化する程度に影響を及ぼしていることが強く示唆される。

2) 研究成果（詳細なデータは、分担研究者報告書を参照されたい）

2-1) 合成飼料の組成の検討、標準飼料の選定および飼料分析

動物実験開始に先立って、ポリフェノール類（植物エストロゲン）を含まない合成飼料の組成を、今後の内分泌かく乱物質研究における標準飼料とし得ることを考慮して、米国国立栄養研究所（American Institute of Nutrition）が公表したマウスおよびラットを用いた栄養学研究のための標準飼料（AIN-93G）の組成に合わせることにし、オリエンタル酵母株式会社

に依頼して必要量の合成飼料を調製した。また、比較対照とする通常飼料を、毒性研究のための動物実験に広く用いられている実験動物用飼料 MF（オリエンタル酵母株式会社）とし、同社より必要量を購入した。

これらの飼料について含有するポリフェノール類を分析したところ、合成した AIN-93G 飼料には植物エストロゲンの混入がないことを確認できた。一方、同時に購入した通常の MF 飼料には、グリシチン、ゲニスチンおよびダイゼインがそれぞれ 30、230 および 180ppm の濃度で検出され、通常飼料に含まれる植物エストロゲンの総量は 440ppm であった。したがって、今回の実験で MF 飼料給与群（以下「MF 群」と記載する）のラットが摂取する総植物エストロゲン量は、体重 300g の動物が 1 日当たり 18g の飼料を摂取すると仮定して算術的に求めた場合、26.4mg/kg 体重/日と見積もられた。

2-2) 基礎飼料に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）がラットの繁殖に及ぼす影響の解析

雌雄の親動物の体重は、実験期間を通じて AIN-93G 給与群（以下「AIN 群」と記載する）の値が MF 群の値を上回った。また、体重増加量をみると、雄では試験期間を通じて AIN 群の値が MF 群の値より有意に高く、雌においては、交配前育成期間と妊娠期間中の体重増加量は AIN 群の値が MF 群の値を有意に上回り、哺育期間中には有意に下回った。

これらの動物の摂餌量をみると、雄ではいずれの時期においても AIN 群の値が MF 群の値より低く、多くの場合その差は統計学的に有意であった（Table 7）。雌については、交配前育成期間中は両群に有意な差はみられず、妊娠 0 日から 14 日にかけては AIN 群の値が MF 群の値より有意に高く、哺育 0 日から 14 日にかけては逆に AIN 群の値が MF 群の値より有意に低かった（Table 8）。これらの結果は、少なくとも雄に対しては AIN 合成飼料の栄養価が極めて高いことを示唆するものであった。

これらの動物を 10 週間育成した後には交配したところ、正常な発情周期を示した雌の頻度、雌雄の動物の交尾率、受胎率、出産率、妊娠期間、産児数および出産児の性比といった指標には、AIN 群と MF 群の間で統計学的に有意な差は観察されなかった。着床数については AIN 群の値が MF 群の値より有意に高かったが、両群の平均出産児数はほぼ同じであったことから、この差は偶発的な変動と解釈された。したがって、少なくともラットにおいては、ポリフェノール類（植物エストロゲン）を含まない飼料を給与しても、親動物の妊娠および出産に障害は生じないことが示唆された。一方、哺育児生存率については群間に差が認められ、AIN 群における哺育 0 日（出産日）の生存率が MF 群より有意に低く、統計学的な有意性は伴わないものの、哺育 4 日における生存率も MF 群の値よりやや低かった。また、AIN 群では哺育児の体重が雌雄とも哺育 0 日から 7 日まで MF 群の値より低く、その差は雄哺育児の哺育 7 日における値を除いていずれも統計学的に有意であった。哺育 4 日以降における哺育児の生存率には、AIN 群と MF 群の間で有意な差はみられなかった。また、AIN 群における雌雄の哺育児の体重は哺育 14 日ごろまでに MF 群の値とほぼ等しくなり、哺育 21 日（離乳日）における値はむしろ MF 群の値を有意に上回った。

これらの結果から、ポリフェノール類（植物エストロゲン）を含まない飼料（AIN-93G）を給与された雌の哺育能力がやや低下し、出産直後から 1 週間程度の間、哺育児に十分な量の母乳を与えなかった可能性が示唆される。しかし、AIN 群の母動物に観察された哺育能力の僅かな低下がどのような機序で引き起こされたかについては、現在のところ明らかでない。

F1 児動物を離乳した後、親動物を剖検して生殖器官の重量を測定した。その結果、精巣および精巣上体の絶対重量には群間に差は認められなかったものの、精囊と前立腺の絶対重量は AIN 群の値が MF 群の値を有意に上回り、精囊については体重比に換算してもその差が

統計学的に有意であった。また、前立腺についても、体重比で比較しても AIN 群の値は MF 群の値よりやや高かった。これらの結果については、飼料からポリフェノール類を除去したこと（飼料に由来するエストロゲン様作用の低下）との関連が示唆される。一方、雌親動物の卵巣および子宮の重量については、絶対値をみるといずれも AIN 群の値が MF 群の値より高かったものの、体重比に換算するとそれらはほぼ同じであった。したがって、AIN 群にみられた絶対重量の増加は、この群における雌の体重が MF 群の値より有意に高かったことに起因する変動と判断された。

雄動物の精子検査では、精子運動率、精巣上体尾当りの精子数および精巣上体尾の重量で補正した精子数のいずれにも、群間に有意な差は認められなかった。

離乳した F1 哺育児について、脳、脾臓、胸腺および子宮（雌離乳児のみ）の重量を測定したところ、雌雄のいずれにおいても、AIN 群における脾臓および胸腺の絶対重量と体重比が MF 群の値より有意に高かった。また、子宮については、AIN 群における絶対重量と体重比の両者が MF 群の値より有意に低かった。これらの変化は、いずれも飼料の組成が異なることに起因した変化と考えられた。また、少なくとも AIN 群の子宮重量が MF 群の値より有意に低かったことについては、MF 飼料に含まれていたポリフェノール類のエストロゲン様作用によることが示唆された。

AIN 群の脳重量にみられた体重比の低下は、この群の離乳児の体重が MF 群の値よりやや高かったことに関連した変動であると考えられた。

次世代（F1 世代）の親動物として選抜された F1 離乳児の性成熟を観察したところ、AIN 群では雄の性成熟（包皮分離完了日齢）が有意に早まり、雌の性成熟（膻開口日齢）は有意に遅延した。これらの結果は、いずれも MF 飼料に含まれているポリフェノール類のエストロゲン様作用に起因した変化と考えられた。

F1 世代の動物には親世代と異なるバッチの飼料を給与したため、これらの飼料が含有するポリフェノール類を分析した。分析の結果、新たに調製した AIN-93G 飼料には定量限界値（10ppm）を僅かに上まわる（11ppm）ダイジンの混入が認められたが、ほぼ無視し得る範囲の濃度であると判断した。一方、同時に購入した通常の MF 飼料には、グリシチン、ゲニスチン、ダイジンおよびダイゼインがそれぞれ 42, 359, 287 および 50ppm の濃度で検出され、通常飼料に含まれる植物エストロゲンの総量は 738ppm であった。したがって、今回の実験で MF 飼料給与群（以下「MF 群」と記載する）のラットが摂取する総植物エストロゲン量は、体重 300g の動物が 1 日当たり 18g の飼料を摂取すると仮定して算術的に求めた場合、44.3mg/kg 体重/日と見積もられた。

雌雄の親動物の体重は、親世代同様にほぼ F1 世代を通じて AIN 群の値が MF 群の値を上回った。

これらの動物の摂餌量をみると、雄では投与初期には AIN 群の値が MF 群の値より低く、中期には逆に AIN 群の値が MF 群の値を上回ったが、世代を通じて一貫した傾向はみられなかった。雌については、交配前育成期間の後期から妊娠期間にかけて AIN 群の値が MF 群の値より有意に高かった。

これらの動物を 10 週間育成した後に交配したところ、雌雄の動物の交尾率、受胎率、出産率、妊娠期間および出産児の性比といった指標には、AIN 群と MF 群の間で統計学的に有意な差は観察されなかった。しかし、親世代と同様に AIN 群の着床数が MF 群の値より有意に高く、F1 世代では産児数も MF 群より有意に多かった。これらの結果は、少なくともラットにおいては、飼料からポリフェノール類（植物エストロゲン）を除去すると、繁殖能力がやや向上することを示唆するものと考えられる。

F1 親動物を剖検して生殖器官の重量を測定したところ、AIN 群の精嚢と前立腺の絶対重量

と体重比のいずれもが MF 群の値を有意に上回った。これらの結果については、飼料からポリフェノール類を除去したこと（飼料に由来するエストロゲン様作用の低下）との関連が示唆される。一方、雌親動物については、卵巢重量は絶対値をみると AIN 群の値が MF 群の値より高かったものの、体重比に換算するとそれらはほぼ同じであった。しかし、AIN 群の子宮重量は絶対値でも MF 群の値をやや下回り、体重比には有意な低値が観察された。この変化は、飼料から植物エストロゲンを除去したことによるものと考えられる。

雄動物の精子検査では、精子運動率、精巣上体尾当りの精子数および精巣上体尾の重量で補正した精子数のいずれにも群間に有意な差は認められなかった。

F1 哺育児の生存率については、いずれの時期においても AIN 群の値が MF 群の値をやや下回ったものの、群間で統計学的に有意な差はみられなかった。

F2 哺育児の発育状況を見ると、AIN 群では哺育児の体重が雌雄とも哺育 0 日から 4 日までの間は MF 群の値より低く、哺育 7 日に MF 群の値とほぼ等しくなった後、哺育 14 日以降はむしろ MF 群の値を有意に上回った。

F2 離乳児では、AIN 群における脾臓の絶対重量と体重比が雌雄のいずれにおいても MF 群の値より有意に高かった。また、子宮については、AIN 群における絶対重量と体重比のいずれもが MF 群の値より有意に低かった。

F2 離乳児の性成熟を観察したところ、AIN 群では雄の性成熟（包皮分離完了日齢）が有意に早まり、雌の性成熟（膣開口日齢）はやや遅延した。これらの結果は、いずれも MF 飼料に含まれているポリフェノール類のエストロゲン様作用に起因した変化と考えられた。

動物実験を終了した後、重量に変動がみられた F1 雄親動物の前立腺を病理学的に検査したところ、肉眼所見として側部に顆粒状の変化が観察された。組織学的検査では、AIN 群の全例で腺腔内に脱落した上皮細胞や変性した好中球を主体とした炎症性細胞が充満している像が確認され、前立腺炎と診断された。この炎症は、間質にリンパ球やマクロファージを主体とする炎症性細胞の浸潤が認められる通常の前立腺炎とはやや異なり、間質に炎症性細胞の浸潤を伴わないものであった。一方、絶対重量が増加した雌の卵巢については、F1 雌親動物を対象に病理組織学的検査を実施したが、原始卵胞の数や性状に群間で明らかな差は認められず、二次卵胞やグラーフ卵胞、黄体形成にも異常は認められなかった。

群間で重量に有意な差が観察された雌離乳児の子宮については、F1 離乳児を対象として病理組織学的検査を実施した。しかし、いずれの群においても、粘膜上皮細胞、子宮腺、間質細胞等に著変は認められなかった。さらに、細胞増殖活性を比較するために抗 PCNA 抗体を用いて免疫組織学的検査を行ったところ、子宮粘膜上皮の PCNA 陽性細胞数には群間で差は検出されなかったものの、子宮粘膜固有層では AIN 給与群における PCNA 陽性細胞数が MF 群の値より有意に高かった。

2-3) 基礎飼料に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）がマウスの繁殖に及ぼす影響の追加解析と、低ポリフェノール飼料の有用性の検討

実験開始に先立って、動物に給与する 3 種類の飼料が含有するポリフェノール類を分析したところ、AIN-93G 飼料には定量限界値（10ppm）を上まわるような量の植物エストロゲン混入が認められなかった。また、AIN-93G 飼料にクルードの大豆イソフラボンを追加した飼料では、ゲニステインとダイゼインがそれぞれ 199ppm および 186ppm 検出された。今回の実験では、イソフラボン添加飼料の総植物エストロゲン濃度は 385ppm と目標濃度の 300ppm を上回ったが、飼料供給会社より、含量が 0.1% 以下の微量成分については、この程度の誤差は十分に許容範囲内にあるとの説明を得た。一方、同時に購入した通常の MF 飼料にはゲニス

チンとダイジンがそれぞれ 385 および 311ppm の濃度で検出され、この飼料に含まれる植物エストロゲンの総量は 696ppm であった。

これらの分析結果から、イソフラボン添加飼料給与群（以下「ISO 群」と記載する）と MF 飼料給与群（MF 群）のマウスが摂取する総植物エストロゲン量は、体重 30g の動物が 1 日当たり 3.8g の飼料を摂取すると仮定して算術的に求めた場合、それぞれ 48.8 および 88.2mg/kg 体重/日と見積もられた。しかし、ゲニステインを除くゲニスチン、ダイジンおよびダイゼインのエストロゲン活性は極めて低いと考えられることから、今回の実験で用いた飼料の持つ実質的なエストロゲン活性は、イソフラボン添加飼料 > MF 飼料 > AIN-93G 飼料の順であったと推測される。

今回の実験では、植物エストロゲンの含有量が比較的低い原料を用いて調製した NIH-07PLD 飼料と、これにクルードの大豆イソフラボンを 300ppm の濃度で添加した飼料も調製して、マウスの繁殖に及ぼすこれらの飼料の影響の評価も試みた。しかし、これらの飼料を給与した雌マウスの約半数が哺育 7 日から哺育 14 日の間に死亡し、評価に足るデータを得ることができなかったため、この報告書ではそれらの動物に関するデータを割愛する。

ISO 群における雄親動物の体重は、実験期間を通じて AIN 群の値よりやや低かったが、いずれに時期において両群間に統計学的に有意な差は観察されなかった。一方、MF 群の雄の体重には実験開始後 1 週間で AIN 群と比較して統計学的に有意な低値が認められるようになり、この差は実験期間を通じて観察された。

今回の実験では、雌親動物の体重についてもほぼ同様の傾向が観察された。すなわち、AIN 群と ISO 群の雌の体重は実験期間を通じてほぼ同じであり、MF 群では実験開始後 2 週目から妊娠 7 日までの間の体重が AIN 群より有意に低かった。

雄の摂餌量は、実験第 1 週における ISO 群の値が AIN 群の値より僅かながら有意に高かったことを除き、いずれの時期においても群間に有意な差は認められなかった。雌では、交配前育成期間の後期（実験第 5 週から第 6 週）と妊娠期間中における ISO 群と MF 群の摂餌量が AIN 群より有意に高かった。しかし、哺育期間中逆にこれらの群も摂餌量が AIN 群の値よりやや低く、MF 群の哺育 15-21 日の値は AIN 群の値より統計学的に有意に低かった。

これらの動物を 6 週間育成した後に交配したところ、雌の受胎率、出産率、妊娠期間、着床数、産児数および出産児の性比といった指標には、群間で統計学的に有意な差は観察されなかった。したがって、いずれの飼料を給与されたマウスも正常に繁殖することが明らかとなった。

親動物を剖検して生殖器官の重量を測定したところ、雄では MF 群の精巣上体重量が AIN 群の値より有意に高かったが、その他の臓器には群間で有意な差は認められなかった。また、この群では雄の体重が他の群より低かったため、MF 群では体重比でみると前立腺を除くすべての生殖器官の重量が AIN 群より有意に高かった。

雌の卵巣および子宮重量には、群間で有意な差はみられなかった。

雄動物の精子検査では、精子運動率、精巣上体尾当りの精子数および精巣上体尾の重量で補正した精子数のいずれにも群間に有意な差は認められなかった。

AIN 群における哺育児の生存率はやや低く、哺育 0 日（出産時）80.1%、哺育 7 日で 66.5% であった。この群では、すべての哺育児が死亡した腹が、哺育 0 日と哺育 7 日に 1 腹ずつ観察された。ISO 群における哺育児の生存率も AIN 群とほぼ同じであり、出産日にすべての哺育児が死亡した腹はなかったものの、哺育 7 日までに 2 腹ですべての哺育児が死亡した。MF 群では、統計学的な有意差を伴わないものの、いずれの時期においても哺育児の生存率が AIN 群および ISO 群の値を上回った。

AIN 群と ISO 群における F1 哺育児の体重は、雌雄とも哺育期間を通じてほぼ同じであっ

た。MF では、哺育 0 日における哺育児の体重が雌雄とも AIN 群の値を上回り、雌では AIN 群との差が統計学的に有意であった。しかし、哺育 14 日以降の哺育児の体重は、雌雄とも AIN 群の値より有意に低かった。

F1 離乳児の性成熟を観察したところ、ISO 群と MF 群では雄の性成熟がやや遅延し、MF 群の包皮分離完了日齢と ISO 群の包皮分離完了時における体重には、それぞれ AIN 群の値との間で統計学的に有意な差が認められた。一方、これらの群では雌の性成熟が早期化する傾向が明らかであり、ISO 群では腔開口日齢と腔開口部における体重の両者が、MF 群では腔開口時における体重が、それぞれ AIN 群の値より有意に低かった。これらの結果は、いずれも飼料に含まれている大豆イソフラボン類のエストロゲン様作用に起因した変化と考えられた。

雌雄の F1 離乳児では、雄は 8 週齢、雌は 6 週齢で屠殺して剖検し、生殖器官の重量を測定した。その結果、雄では ISO 群と MF 群における精囊の重量がいずれも AIN 群の値を下回り、絶対重量で見ると AIN 群との差はいずれも統計学的に有意であった。これらの群では、前立腺の重量にも低値が観察され、ISO 群では AIN 群との差が絶対重量と体重比の両者で統計学的に有意であった。

雌の子宮については、ISO 群と MF 群の値がいずれも AIN 群の値を上回り、ISO 群では絶対重量と体重比のいずれもが AIN 群の値より有意に高かった。

2-4) 基礎飼料に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）がマウスの繁殖に及ぼす影響の解析

AIN-93G は、米国国立栄養研究所が 1993 年に提唱した (J. Nutr., 123, 1939-1951(1993)), 栄養学実験においてラット・マウスの成長と繁殖に好適な飼料である。同様の目的で同研究所が 1976 年に提唱した AIN-76 飼料とともに、動物実験において国際的に最も繁用されているカゼインをタンパク源とした精製飼料である。

これら 2 種類の飼料について含有するポリフェノール類を分析した結果、AIN-93G 飼料には植物エストロゲンの混入がないことを確認できた。一方、MF 飼料には、前述の如く、グリシチン、ゲニスチンおよびダイゼインがそれぞれ 30, 230 および 180ppm の濃度で検出された。したがって、MF 飼料に含まれる植物エストロゲンの総量は 440ppm と計算され、今回の実験で MF 飼料群の動物が摂取する総植物エストロゲン量は、体重 25g のマウスが 1 日当たり 2.5g の飼料を摂取すると仮定して算術的に求めた場合、44mg/kg 体重/日となった。

交配を開始するまでの 6 週間における両群のマウスの体重増加量は、雌雄ともに、わずかに AIN 群の方が高値であった。

妊娠率は、MF 群が 77.8%、AIN 群が 100%であったが、今回の実験では 1 群当りの親動物数が 9 匹と少ないため、今回の結果と合わせて群間の差の有無を判断すべきと考えられる。一方、妊娠期間、出産した親あたりの出産児数および出生児の性比については、群間に差は認められなかった。

これらの結果から、C3H/HeN マウスは雌雄ともに AIN 飼料に対して適応性が高く、この飼料を摂取した雌雄の成長は MF 飼料群のそれに匹敵するものであることが明らかとなった。したがって、AIN 飼料の選択は、本研究の目的にかなったものと判断した。

親世代の繁殖能力については、妊娠率、妊娠期間、出産数および出生児の性比といった指標に群間で有意な差は認められず、少なくとも妊娠の成立と維持および出産には飼料成分の差に起因する変化は生じないことが示された。

MF 群では、哺育児の出生から哺育 1 日目までの生存率は 98.2%、哺育 1 日から 4 日までの間の生存率は 96.4%と良好であった。この群では、出生から哺育 4 日までの生存率が約 94%

となり、以後哺育 21 日（離乳日）まで哺育児の死亡は観察されなかった。離乳児の合計は、7 腹に由来する 54 匹であった。

一方、AIN 群では、哺育 1 日の生存率（出生から生後 1 日目まで）が 55.0%と著明に低く、哺育 1 日から 4 日までの生存率は、12.1%とさらに低下した。このため、出生から哺育 4 日までの生存率は約 6%と極めて低い値であった。哺育 21 日（離乳）まで生存した児哺育児は、1 腹由来の 4 匹のみであった。

今回の実験では、AIN 群で F1 世代の親動物として育成するために十分な数の離乳児が得られなかった（生存している児は 1 腹由来の 4 匹のみ）ため、当初の実験計画を変更して、F1 哺育児の離乳後に実験を終了することとした。親世代の動物は 21 週齢で屠殺・解剖し、生殖器官（雄については精巣、精嚢および前立腺；雌については卵巣および子宮）を検査した後にそれらの臓器の重量を測定した。子宮については、着床数を調べた。

上述の如く、マウスの実験においては MF 群における親動物の繁殖と児動物の生後発達に何ら異常はみられなかったものの、AIN 群における F1 哺育児の生存率が著しく低下するという予期せぬ結果が得られた。我々は、マウスでは MF 飼料に豊富に含まれるポリフェノール類（植物エストロゲン）が何らかの機序で母動物に作用し、哺育行動を調節していることを示唆するものと考えている。すなわち、AIN 飼料はポリフェノール類（植物エストロゲン）を含んでいないため、母動物の正常な哺育行動が阻害された結果、哺育児の生存率が著しく低下したと推定している。そこで、この仮説を検証するため、当初の予定を変更して、追加試験に着手した。

追加試験では、その目的を（1）今回の実験結果（AIN 群における F1 哺育児の生存率の著しい低下）の再現性を確認すること、および（2）AIN 飼料に植物エストロゲンを添加することにより、F1 哺育児の生存率が改善されるかを証明すること、の 2 点とした。また、この目的に沿って、以下の 3 実験群を設定した。

【MF 群】MF 飼料を前回の実験と同様に給与する群。

【AIN93G 群】AIN 飼料を前回の実験と同様に給与する群。

【AIN93G+イソフラボン群】AIN 飼料に大豆イソフラボン（植物エストロゲン）を 300ppm 添加した飼料を給与する群（イソフラボン濃度は、MF 飼料に存在するイソフラボン濃度にはほぼ匹敵する）。

実験 1

交尾を行うまでの 6 週間の両群のマウスの体重増加は、雌雄ともに、わずかに AIN93G 群のほうが高値であった。AIN-93G 群と（AIN-93G+イソフラボン）群との間では差はなかった。

妊娠率、妊娠期間、出産数といったパラメータにおいて、3 群間で差は見られなかった。

F1 児動物の生後 7 日目までの生存率は、MF 群で 42%、AIN-93G 群で 6%、（AIN93G+イソフラボン）群で 0%であり、児動物の観察データを得るには至らなかった。これら 3 群での生存率の低い理由が親動物の飼育環境にあると考え、飼育環境に改善を加えて、再度、飼育実験を行うこととした。具体的な改善点は、床敷き（木質チップ）の増量、ケージの天井の遮光、飼育ケージ下の消音用ゴムマットの整備などである。

実験 2

MF 群と AIN-93G 群の 2 群で行ったが、両群の親の交尾までの体重増加、妊娠率、妊娠期間、出産数の結果は実験 1 と全く同様であった。

F1 児動物の生後 7 日目までの生存率は、MF 群が 94%、AIN-93G 群が 72%であった（Table 27）。本実験においては十分な数の F1 児動物が離乳まで生存したので、生後の体重増加、雌の性成熟（膈開口）について測定した。離乳時の児の個体数は MF 群では雄 44 匹、雌 34 匹

であった。AIN93G 群は雄 19 匹，雌 20 匹であった。

雄の体重は，4 日齢，7 日齢では MF 群の方が大きい，14 日齢および 21 日齢では AIN93G 群の方が大きくなった。離乳後 14 日目以降の両群の体重は同等となった。雄の屠殺時(8 週齢)の体重は両群で差がなく，体重あたりの精巣重量および精囊重量も両群で差は観察されなかった。

雌の体重についても，4 日齢，7 日齢では MF 群のほうが大きい，14 日齢および 21 日齢では AIN93G 群の方が大きくなった。離乳後 14 日目以降の両群の体重は同等となった。メスの膣開口に要する生後の日数は，MF 群が 26.0 ± 3.2 日，AIN93G 群が 24.9 ± 2.9 日であり，両群で差がなかった。雌の屠殺時(6 週齢)の体重は両群で差がなく，体重あたりの卵巣重量および子宮重量も両群で差は観察されなかった。

3) 考察及び結論

ポリフェノール類(植物エストロゲン)を含まない合成飼料(AIN-93G)を自家調製してラットおよびマウスに給与し，それらの動物がポリフェノール類を豊富に含む通常飼料(MF)を給与した動物と同等の繁殖能力を維持できるか否かを検討した。また，マウスの実験においては，種々の繁殖指標に観察された AIN-93G 飼料給与群と MF 飼料給与群との差がポリフェノール類含有の有無によるものか否かを検討するため，AIN-93G 飼料に 300ppm の濃度で大豆イソフラボンを添加した飼料を給与する群を設けて，同様の繁殖指標を観察した。いずれの実験においても，分析により，調製した AIN-93G 飼料にはポリフェノール類の混入がほとんどないことが確認された。

ラットを用いた実験では，ポリフェノール類を含まない飼料として自家調製した AIN 飼料を給与された群(AIN 群)で，雌雄の親動物の体重がいずれの世代でも MF 飼料を給与された群(MF 群)の動物より有意に高かった。また，雄では AIN 群の摂餌量が MF 群の値よりやや低かった。これらの結果から，AIN 飼料の栄養価が極めて高いことが示唆される。

親動物の繁殖能力を 2 世代にわたって観察すると，AIN 群においても交尾から妊娠を経て出産に至るまでの期間に異常は何も認められず，哺育児の生存率が MF 群と比較してやや低かったとはいえ，いずれの世代でも 90%以上の児が離乳できた。これらの結果は，飼料に由来するポリフェノール類(植物エストロゲン)の影響を除去した条件でも 2 世代繁殖毒性試験が十分に実施可能なことを実証するものと考えられる。

一方，AIN 群と MF 給与群の間で種々の繁殖指標を比較すると，いずれの世代でも AIN 群では雌動物の着床数が MF 給与群の値を有意に上回り，F1 世代では出産児数も有意に増加した。また，AIN 群における雄親動物の前立腺と精囊・凝固腺の重量が MF 群の値より有意に高く，雄離乳児の性成熟も有意に早期化した。さらに，雌離乳児では AIN 群の子宮重量が MF 群の値より有意に低く，性成熟にも遅延が認められた。MF 群と AIN 群との間で観察されたこれらの差は，いずれも典型的なエストロゲン様作用物質を投与した動物と無処置の動物との間にみられる差と一致する。したがって，これらの結果は，AIN 群の動物が飼料に含まれるポリフェノール類のエストロゲン様作用から解放されたことにより引き起こされたものであると解釈される。

マウスを用いた実験においても，AIN 群の雌雄の親動物の体重が，いずれも MF 群の動物より有意に高かった。また，雌では AIN 群の摂餌量が MF 群の値よりやや低かったことから，AIN 飼料の栄養価が極めて高いことが示唆される。一方，AIN にイソフラボンを添加した群(ISO 群)では，時として雌の摂餌量が AIN 群の値をやや上回ったものの，いずれの時期においても雌雄の体重は AIN 群の値とほぼ同じであった。これらの結果から，AIN 飼料の高栄養性は大豆イソフラボン添加の有無とは無関係であることが示唆される。

親動物の繁殖能力を観察すると，AIN 群においても交尾から妊娠を経て出産に至るまでの期間に異常は何も認められず，雌の受胎率，出産率，妊娠期間，着床数，産児数および出産児の性比

といった指標には、MF 群との間に有意な差は何も見られなかった。また、AIN に大豆イソフラボンを添加した群におけるこれらの指標にも意味のある変化は何も認められなかった。これらの結果は、マウスにおいても飼料に由来するポリフェノール類（植物エストロゲン）の影響を除去した条件で繁殖毒性試験が十分に実施可能なことを実証するものと考えられる。

今回の実験では、AIN 群と ISO 群における哺育児生存率がいずれも MF 群の値よりやや低く、哺育児生存率に関しては AIN-93G 飼料に 2 種類の大豆イソフラボン（ゲニステインとダイゼイン）を添加した効果はまったく認められなかった。これらの結果は、MF 飼料に含まれていた大豆イソフラボン以外の何らかの栄養成分か、あるいは MF 飼料に含まれていたゲニステインおよびダイゼイン以外の植物エストロゲンが、哺育児の生存性を高めることを示唆するものと思われる。しかし、AIN 群においても哺育 0 日における新生児の生存率は 80% を越えており、哺育児の離乳率も約 80% であったことから、少なくとも SPF 環境下であれば、植物エストロゲンの影響を除去した条件下にマウスを用いた生殖・発生毒性試験を実施することが可能であると判断された。

AIN 群と ISO 群の間で F1 離乳児の性成熟を比較すると、イソフラボンを添加することにより雄の性成熟はやや遅延し、雌の性成熟は有意に早期化することが明らかとなった。また、MF 群においても F1 雄離乳児の性成熟が AIN 群と比較して有意に遅延し、F1 雌離乳児の膣開口日齢は AIN 群とほぼ同じだったものの、膣開口時の体重が AIN 群より有意に低かった。動物に給与した飼料の分析では、総イソフラボン含量は MF 群の値が ISO 群の値を上回ったものの、ISO 群ではイソフラボンの中でもエストロゲン活性が最も高いゲニステインの含量が極めて高かったことから、飼料の総エストロゲン活性は ISO 飼料が MF 飼料を上回るものと考えられた。これらの結果と、F1 離乳児の性成熟が MF 群で僅かに変化し、ISO 群ではそれらがより明確になったことを合わせて考えると、ISO 群と MF 群で観察された雄離乳児の性成熟の遅延と雌離乳児の性成熟の早期化は、いずれも給与した飼料が持つエストロゲン活性の強さを反映した変化であると考えられる。

雌離乳児を 6 週齢で、雄離乳児を 8 週齢でそれぞれ剖検して生殖器官の重量を測定した結果、ISO 群では雄の精囊・凝固腺および前立腺の重量が AIN 群より有意に低く、雌の子宮重量が AIN 群より有意に高かった。また、これらの臓器の重量については、MF 群にも ISO 群と同様の傾向が認められた。したがって、生殖器官の重量にみられた変化についても、飼料が持つエストロゲン活性の強さを反映したものと解釈される。

昨年度に名古屋大学で実施したマウスの実験においては、AIN 群における哺育児の生存率が著しく低下し、少なくとも C3H/HeNS1c マウスにポリフェノール類を除去した飼料を給与してコンベンショナル環境下で飼育すると、繁殖能力が低下する可能性が示唆された。そこで、同じ条件で追試験を実施したところ、MF 群においても F1 児動物の生存率は予期していた数値よりも明らかに低い値となり、AIN-93G 群と ISO 群ではこの値がさらに低下した。このため、この実験系では F1 児動物の生後発達、性成熟および生殖器官重量を 3 群で比較することができなかった。この低い生存率の理由については、親動物が分娩後に児動物を哺育するための環境が不十分ではないかと推察した。そこで、ケージ内の床敷き（木質チップ）を増量して親の営巣を促す、ケージ天井の半分を遮蔽して親の営巣を促す、ケージ移動の際の消音をするためにケージ下にゴムマットを敷く、などの飼育環境の改善を行って、さらに実験 2 を行うこととした。また、用いるマウスのブリーダーを変更し、残留農薬研究所が用いた系統と同じ C3H/HeNCrj マウスとした。

実験 2 では、期待されたとおりに MF 群での F1 児動物の生後 7 日目までの生存率が 94% に上昇した。AIN-93G 群での生存率も 72% に上昇した。この結果は、植物エストロゲンを含まない AIN-93G 飼料を摂取した親動物も正常な繁殖が可能であり、児動物の哺育も正常に行われることを示している。児動物の成長に関しては、体重増加の経時的な立ち上がり曲線は MF 群と AIN93G 群において僅かに異なることが雌雄両方において観察されたが、離乳後 14 日目以降は雌雄とも

に両群の間に体重の差はなくなった。さらに、雌の生成熟(膣開口)に要する日数も両群で差がなかった。児動物の雄(8週齢)と雌(6週齢)の生殖臓器の重量も両群で差のある臓器は観察されなかった。よって、AIN-93Gに低用量の様々な植物エストロゲンを添加してマウスの繁殖および児動物の成長・性成熟に及ぼす影響を見ることによって、低用量の植物エストロゲンの作用を正確に評価できると考えられた。

実験2において、顕著ではないが、MF群に比べてAIN-93G群ではF1児動物の生存率が低い傾向(94%に対して72%)が観察された。このことは、MF飼料中に存在する植物エストロゲンが雌親に作用していることを推測させる結果である。実験1では、AIN-93GにMFに含まれる程度のイソフラボンを添加してAIN-93G群の児動物の生存率の上昇を期待したが、両群の生存率が著しく低かったためにイソフラボンの効果を評価することはできなかった。残留農薬研究所において、AIN-93Gにイソフラボンを添加した飼料をマウスに与える飼育実験が行われているが、その結果によるとイソフラボン摂取は児動物の生存率には影響を及ぼさない。しかし、MF飼料に含まれるイソフラボン以外の植物エストロゲンが、児動物の生存率の回復に寄与している可能性は残されている。

今回の実験でF1個体の性成熟や生殖器官重量に観察されたAIN群とISO群の間の差は、程度の差こそあれAIN群とMF群の間の差にほぼ一致するものであったばかりでなく、ラットの実験でAIN群とMF群との間に観察された差とも良く一致した。これらの結果から、ポリフェノール類(植物エストロゲン)を豊富に含む通常の市販飼料にはそれらに起因するエストロゲン活性があり、通常の動物実験では、これまで無処置と信じられていた対照群の動物にも、市販飼料に含まれるポリフェノール類がエストロゲン受容体を介して動物の表現型が変化する程度に影響を及ぼしていることが強く示唆される。

3 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト(論文は添付すること)

なし。

4 本研究を基にした学会発表の実績

- 1) 北條仁, 高橋研, 佐藤旭, 荒木雅行, 張替美智子, 蜜谷真弓, 中村達也, 酒井信秋, 逆井幸司, 寺本昭二, 青山博昭. 基礎飼料に含まれる植物エストロゲンがラットの繁殖に及ぼす影響の解析. 第50回日本先天異常学会学術集会(2010.7.8-10, 淡路)
- 2) Hojo H, Takahashi KL, Endo N, Sato A, Araki M, Harigae M, Mitsutani M, Urakawa C, Nakamura T, Sakai N, Sakasai K, Teramoto S, Horio F, Murai A, Kobayashi M, Aoyama H. Estrogenic impacts of a standard rodent chow diet on rat reproduction and development. 50th Society of Toxicology (2011.3.6-10, Washington DC).
- 3) 浦川千鶴, 北條仁, 荒木雅行, 高橋研, 遠藤直子, 佐藤旭, 張替美智子, 蜜谷真弓, 寺本昭二, 青山博昭. 大豆イソフラボン摂取がマウスの繁殖に及ぼす影響. 第51回日本先天異常学会学術集会発表予定.

5 特許及び特許出願の数と概要

なし。

6 その他(各種受賞, プレスリリース, 開発ソフト・データベースの構築等)

なし。

7 今後の問題点等

なし。