

用されているのはエストロゲンでエストラジオール-17 β 、エストロジオールベンゾエイト、合成ゼラノール等である。その他のホルモン剤はエストロゲンとの組み合わせで使われることが多い。

合成ステロイドホルモンのゼラノール、メレンゲステロール、酢酸トレンボロンとそれらの代謝産物は動物やヒト体内に自然では存在しない。これらはヒトへ医薬品として使用されていないので動物のデータしかない。

これらホルモンによる異なった効果や曝露の結果を検討せねばならない。

両報告書の論点を明らかにするためには、以下の事項について検討する必要があると思われる。

(1)自然の状態での飼育された動物にくらべて、性ホルモンを使用した動物組織に代謝物も含めて残留ホルモン量が有意に高いか。

(2)残留性ホルモンおよび代謝物は人の生理的レベルを上回って意味あるものか？

(3)食肉から摂取される残留ホルモンによるヒトの生物学的影響について何を知っているだろうか？

上記の問題に関連する両報告書の見解は以下のとおりである。

EUの報告書において指摘している問題点は以下のとおりである。

1) 残留ホルモン量について

1988年のJECFA報告ではRIA法による値であり、多くの検体で検出限界すれすれの値であった。しかも方法により値のばらつきが大きく、信頼性にかける。JECFAの結論でもエストラジオール、エストロン、プロゲステロン、テストステロンの残留量はすべて高かった。しかし、これらレベルは妊娠 heifer よりは低かった。参考値としてしめされた値はテストステロンでは雄牛の値が、エストラジオールやプロゲステロンは妊娠中の heifer の値が使われた。

妊娠していない動物でエストロゲン値があがる意味は—妊娠が遅い雌牛はもっともホルモンレベルが高くなる。家畜にホルモンを使用することは食肉中にホルモンとして残るのみでなく、尿から排出されるホルモンによって環境が汚染され、水源にも入る可能性がある。

2) ヒトとくに思春期の子ども性のホルモン産生についてガイドラインでは少年の場合、エストラジオールが6 μ g/日、プロゲステロン150 μ g/日、少女のテストステロンは32 μ g/日とされている。1日100gの肉を食べるとする

と、エストラジオール0.5—10ng/日となることになり、それにエストロゲン活性をもつ代謝産物が加わる。経口摂取されたうち、どれだけが体内に取り込まれるかが問題である。エストラジオール、エストロンは10%程度と低いが、硫酸エストロン、エチニル・エストラジオールは60%と高い。以上のことから、思春期前の少年にとって食肉由来のエストラジオールは1日に産生する量の1%以上となる可能性が十分ある。

生理的濃度内での微妙な変化でも、後に働くであろう臓器のホルモン感受性を微妙に変えるという可能性も考えられる。合成ステロイドホルモンに関しても未知の問題がある。

3) ホルモン剤と生体内のホルモンとの関係について

①多くの合成ステロイドホルモンはSHBGへの結合能が低く、血漿中ではフリーの形で生物活性が高い。内因性ステロイドホルモンは98—99%がSHBGに結合している。であるから、血漿中の合成ステロイドホルモンが内因性のものと同濃度あるいは低いとしても、その生物活性ははるかに強い。

②合成ステロイドホルモンは代謝経路が異なるので半減期もさまざまとなる。

③合成ステロイドホルモンは内因性ステロイドホルモンと共通の作用をもつが、すべての面で同じと言うわけではない。以下のJECFAの指摘している点は食肉による残留ホルモンの危険性はほとんどないとする論拠になっている。

4) 食肉からのエストラジオール-17 β 、プロゲステロン、テストステロン、ゼラノール、トレンボロン摂取量はJECFAの決定したADIに比べて非常に低い。

5) 体内で産生されるホルモン量に比べて非常に低濃度である。

6) 食肉中の濃度では変異原性、遺伝毒性にならない。

7) 新しい鋭敏な分析法としている組み換え酵母によるホルモン力価の方法は評価が未定である。

8) 引用文献が不適切、とくに量一反応関係が無視されている。さまざまないわれている変化を起こす量より食肉よりの摂取量ははるかに低い。

9) EUの指摘している発がん性については、疫学的には肉・脂肪摂取とがんの関係は指摘しているのみであって、その中のホルモンとの関係には言及していない。

10) 発生障害に関して低濃度のデータ

はない。外来性ホルモンには閾値がないとする考えも根拠はない。外来性ホルモンの研究は多いがレポートで取り上げられたような問題がある。

E. 結論

天然型ホルモン3種類と合成型ホルモン2種類のADIは1994年にCODEXで決定された。

EUの報告書のように、外来性のホルモンには閾値がないとするとADIそのものも無意味となるが、これらの検討には、低濃度長期曝露の影響について更に検討されねばならないであろう。

特に成長期の小児に関する研究が乏しいため、牛乳からの摂取も含めて検討する課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
分担研究報告書

家畜中のホルモン動態等

藤森 観之助

研究要旨

エストラジオール-17 β のヒト、ウシ、ブタ等の代謝、代謝物及び組織内残留について検討した。

エストロゲン濃度から安全性を評価するとJECFAにおける残留評価に関して検討されている製剤中最もimplant中にEst radiolが高いTORELOR適用後のウシ血漿中の総エストロゲン濃度は最高値でも女性の卵胞期初期の血漿中の生理的総エストロゲン濃度とほぼ同じであり、卵胞期後期、黄体期の総エストロゲン濃度と比較すると1/3-1/10の濃度であった。

A. 研究目的

食肉からの摂取されるホルモンの影響を検討する場合、家畜に投与されたホルモン剤の代謝、代謝物の活性、組織内残留量の推定を行うことが必要である。今回、ホルモン剤としてエストラジオール-17 β を用いてその検討を行う。

B. 研究方法

エストラジオール-17 β のヒト、ウシ、ブタ等の代謝経路及び代謝物について検討するとともに、組織内残留について文献を基にレビューし検討を行った。

C. 研究結果

1 エストラジオール-17 β の代謝

(1) ヒトでの代謝

エストロゲンの代謝は非妊娠時と妊娠時で若干異なる。非妊娠時ではエストラジオール-17 β (E2-17 β)はいったんエストロン (E1)となり、E1が16位の水酸化を受けて16 α -hydroxy-estroneとなり、次いで17-ketoneが還元されてエストリオール (E3)となる。妊娠時での母体のE3は胎児副腎由来dehydro-epi-androsteroneが胎児・胎盤系で16 α 水酸化され生じた16-hydroxy-dehydro-epi-androsteroneが胎盤で代謝されて出来たE3が主である。E1とE2-17 β 間には相互可逆的変化が自由に行われる (Ryan & Engel, 1953)。E1とE2-17 β の相互転換を行うestradiol-17 β -ol-dehydrogenaseは肝の他に赤血球にも存在する (Jacobsohn et al., 1975)。主代謝経路はE2-17 β からestradiol-17-glucuronide (E2-17G)に至る経路とE1からSteroid 16 α -hydroxy-

seにより16 α -hydroxy-estroneとなり、さらにE3を経てestriol-16Gとなる経路であるが、E2-17 β から直接Estradiol 16 α -monooxygenaseによりE3になる経路もある。エストロゲンは肝において広範な代謝を受ける。ヒト血中に存在するエストロゲンは主としてE1とE2-17 β であり、E1の約90%はC-3に硫酸が抱合 (E1-3S)している。E1-3Sは15 α -hydroxy-estrone-3-sulfate-15-N-acetylglucosaminideなどへ代謝される。E2-17 β の一部は主に17位グルクロナイド抱合体として、一部は遊離体、一部は血清蛋白 (steroid binding β -globulin)などとの結合体として血中に存在する。E1およびE3も一部は蛋白結合体として血中に存在する。E1からエストラジオール-17 α (E2-17 α)への転換は草食動物では一般的であるが、ヒトでは一般には認められない。ヒトにE2-17 α を与えるとグルクロナイド抱合体として排泄される。

(2) ウシでの代謝

文献 (1 : Ivie, G. W. et al., 1986) ウシに14C-Estradiol-17 β を筋肉内投与すると、11日までに尿中に42%排泄し、内訳はE2-17 α が8-18%、E2-17 β グルクロナイドが73-82%、E1が2%、estrone- β グルクロナイドが5-6%であった。糞中には58%排泄し、内訳はE2-17 β として9-13%、E2-17 α として62-67%、E1として12-14%、尿糞中にはE3は同定できていない。

文献 (2 : Hoffmann, G. et al., 1997) 妊娠中のウシの尿糞中の内因性エストロゲンのHPLCで測定した結果では、糞中の主代謝物は遊離のE2-17 α (57%)、

遊離のE2-17 β (32%)、遊離のE1 (11%)であり、抱合体は検出されていない。尿中主代謝物はE1硫酸抱合体、次いでE2-17 α グルクロナイド、E2-17 β グルクロナイドであり、E2-17 α 硫酸抱合体およびE2-17 β 硫酸抱合体は痕跡程度である。

(3) ブタでの代謝

文献 (Bottoms, G.D. et al. 1977) ブタに14C-Estradiol-17 β を経口投与し、0.13 - 4時間以内に採血した静脈血の血漿中放射活性は用量に関係なく、ほとんどが抱合体であり、TLCで検討すると、そのうち82-91%がモノグルクロナイド抱合体で、5-10%がモノ硫酸抱合体であった。モノグルクロナイド抱合体の内訳はE1が76-85%、E2-17 β が10-18%、E3が2-4%であった。モノ硫酸抱合体の内訳はE1が9-27%、E2-17 β が12-55%、E3が33-79%であった。

文献 (Beckmann, D. et al., 1975) 14C-Estroneのミニブタ切片における代謝結果では、雄ではE3-3-mono-glucuronideのみ、雌では他にE2-17 β およびE1の3-mono-glucuronideが認められている。

文献 (Mascheler, I. Et al., 1983) ブタ子宮切片の灌流実験において、E2-17 β はE1に転換後、次いで6 α -hydroxy-estroneおよび7 α -hydroxy-estroneに代謝されることが報告されている。

文献 (Jones-Witters, P. et al. 1975) 雌ブタ (放射活性) エストロゲンをiv注後の尿中主代謝物はE1-monoglucuronideと微量のE2-17 β とE3様物質および2-methoxy-estroneが推定されている。

(4) 脊椎動物における代謝 (in Biochemical Pathways, 1999)

一般に脊椎動物ではE1は4-Androstene-3,17-Dioneから、E2はTestosteroneからのC-19位メチル基の酸化的脱メチルおよびそれに続くA環の芳香環化により生成される。4-Androstene-3,17-DioneからE1に至る芳香環化はNADPHと酸素を要求する数段階からなるモノオキシゲナーゼ反応 (アロマターゼ) からなる。アロマターゼはシトクロムP450の一種であり (CYP-Arom)、様々な組織に存在する。アロマターゼの芳香環化反応の第一段階は19位の水酸化であり、次に19位水酸化メチル基を失い、A環はC-3位水酸基を有する芳香環となる。芳香環化によるエストロゲン合成は雌動物では主に卵巣顆粒膜で行われ、他に副腎皮質、脂肪組織および筋肉、肝臓、脳がある。雄動物では主にエストロゲン合成は肝臓、副腎皮質、

精巣で行われる。妊娠動物の胎盤中ではdehydro-epi-androsterone sulfateから16 α 水酸化、アロマターゼによる芳香環化を経て大量のEstriol-sulfateが生成する。dehydro-epi-androsteroneは胎児副腎皮質および母体循環から供給される。E1とE2間には酸化還元反応による相互可逆的変化が行われる。エストリオールはエストロンから16 α 水酸化および17-ketone還元により生成する。エストロンおよびエストラジオールの2-水酸化によりCatechol-エストロゲンが生成する。この反応は胎盤型アロマターゼにより行われる。ウマは大量のエストロゲンを産生する。妊娠ウマは1日100 mg以上のエストロゲンを分泌する。

2 代謝物

(1) ヒト

ヒトではE1, E2-17 β , E3の他、2位の水酸化およびメチル化、および6 α , 6 β , 10 β , 16 α , 16 β の水酸化により、2-hydroxy-E2, 2-methoxy-E2, 2-hydroxy-E1, 2-methoxy-E1, 6 α -hydroxy-E3, 7 α -hydroxy-E2, 6 α -hydroxy-E2, 16 α -hydroxy-E1, 16-epi-E3, 16-keto-E2およびestrone-3S, estradiol-17G, estradiol-3S-17G, estriol-16G, E3-3S-16G、他に微量の15 α -hydroxy-E1, 15 α -hydroxy-E2, 18-hydroxy-E1およびこれらエストロゲンの硫酸およびグルクロナイドのモノあるいはジ抱合体など50種類以上の代謝物が認められている。通常ではEstradiol-17 α (E2-17 α)は存在しない。胎児由来として6 α , 6 β , 7 α , 15 α , 16 α -hydroxy-E1, 6 α , 6 β , 7 α -E2, 16 β の水酸化体と15 α -hydroxy-E3 (estetrol)が、妊婦胆汁中にE3-S-16G, E3-16G, E3-3S、他にE3, E1, 2-methoxy-E1, E2-17 β , E2-17 α , 11-dehydro-E2-17 α , 16-epi-E3, 17-epi-E3, 16 α -hydroxy-E1, 16 β -hydroxy-E1, 16-oxo-E2-17 β , 15 α -hydroxy-E1, 15 α -hydroxy-E3が、妊婦尿中に15 β -hydroxy-E1, 15 β -hydroxy-E2が報告されている。(Gurpide et al. 1966)

(2) ウシ

ウシではE1, E2-17 α , E2-17 β の他、E1-S, E1- β G, E2 α -G, E2 β -G, E2 α -SおよびE2 β -Sが報告されている。E3は確認されていない。(Purdy, R.H. et al., 1980)

(3) ブタ

ブタではE1-3-monoG, E2-3-monoG, E3-3-monoG, E1-S, E2-S, E3-S, 6 α -hydroxy-E1, 7 α -hydroxy-E1および2-methoxy-E1が報告されている。

(4) ウマ

ウマでは他にEquilinおよびEquileninが検出されている。(in Biochemical Pathways, 1999)

3. 組織内残留

(1) 生理レベル

1) ヒト

正常月経周期の血漿中総エストロゲンは平均で周期前期で約100 pg/ml、排卵前後で200-1500 pg/ml、黄体期には200-500 pg/mlに達する。(表1: Tagatz, G E, and E. Gurpide, 1973, Vande Wiele & Dyrenfurth, 1973)。一方、妊娠女性の総産生量から推測すると妊娠女性の血漿中総エストロゲン濃度はその2-30倍と思われる(表2: Farber TM, M. Arcos, 1983)。妊娠動物では大量のエストロゲンが産生されることが知られている(Kellie, A.E., 1971)。

2) 投与後の組織内レベル (JECFA D. Arnold, 1999)

1) ウシ

(I) Compudose (23-45 mg estradiol/implant): implant 100日設置後Implant除去前および12時間後の腎脂肪中のE1とE2濃度である。306-307例の対照群の値はEstrone= 6.5 ± 4.8(1.0-38), Estradiol= 3.6 ± 1.7 (1.0-11) pg/gであり、埋め込み100日でもEstroneは2倍程度(8-11pg/g)、Estradiolは4倍程度(12-13pg/g)であった。

(II) Synovex S (20 mg of E2-benzoate+200 mg of progesterone)処理後の組織内分布の中でEstroneの脂肪内最高値はimplant 61日目で48.3 pg/g、Estradiol-17βの脂肪内最高値はimplant 30日目で61.5 pg/gであった。(Progress report: S. Kushinsky & J. Duffy, IBS, Syntex Res. 5, 204, FDA/CVM NADA file 9-576, 1979.)

(III) Synovex H (20 mg of E2-benzoate+200 mg of testosterone)処理後の組織内分布の中でEstroneの脂肪内最高値はimplant 30日目で105 pg/g、Estradiol-17βの脂肪内最高値はimplant 30日目で260 pg/gであった。

(IV) TORELOR (40 mg of estradiol+200 mg of trebolone- acetate) 1999年JECFAにおける残留評価に関して検討されている製剤中最もimplant中にEstradiolが高く、かつ組織内残留濃度が高いTORELOR (40 mg of estradiol+200 mg of trebolone- acetate)における最高値は、第2回implant後30日目に認められ、最高濃度を示す組織はTotal

では肝臓(1172pg/g)、freeでは脂肪(284pg/g)であった。なお血漿、筋肉、脂肪中のEstradiolのほとんどは遊離体であり、肝臓、腎臓中のEstradiolのほとんどは抱合体である。(ILOB report 561a, TNO Washington, 1986, C. J. M. Arts et al., FDA/CVM INAD file 4216, vol. 2, p72) インプラント開始後いずれの時期においても総エストロゲン濃度は妊娠後期のウシの内因性総エストロゲン濃度よりも低値である。

(2) 代謝物の生物活性

(1) カテコールエストロゲン(2-OH-E2)はBPAEC (bovine pulmonary artery endothelial cells) のアポトシスをEC50=0.45 μMで引き起こす: (up-regulated expression of both FAS and Bcl-2.)。2-OH-E2はbreast cancer cell lineでcytotoxic, and antimitotic (antitubulin activity) agentである(Cushman M. et al., 1995)。2-OH-E2はプロゲステロン産生促進作用はE2より弱い。

(2) 2-methoxy estradiol (endogenous metabolite)はBPAEC migration, basic fibroblast growth factorを阻害する(IC50=0.71 μM)。 (Yue TL et al., 1997)。2-methoxy E2-17βはNOS含量の増加に従ってNOの産生を増加し、2-methoxy E2-17βは腫瘍の血管形成を阻害することが報告されている(Tsukamoto et al., 1998)。

D. 考察

エストロゲン濃度から安全性を評価するとJECFAにおける残留評価に関して検討されている製剤中最もimplant中にEstradiolが高いTORELOR適用後のウシ血漿中の総エストロゲン濃度は最高値でも女性の卵胞期初期の血漿中の生理的総エストロゲン濃度とほぼ同じであり、卵胞期後期、黄体期の総エストロゲン濃度と比較すると1/3-1/10の濃度である。

E. 結論

JECFAにおける残留評価では、適正使用されたウシの血漿中エストロゲン濃度は女性の卵胞期初期の血漿中の生理的総エストロゲン濃度とほぼ同じであった。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

平成11年度厚生科学研究報告書

畜水産食品中残留ホルモン
のヒト健康に及ぼす影響に関する研究

主任研究者
北里大学薬学部客員教授
林 裕造

研究組織

分担研究者

研究者名	最終卒業学校・卒業年次・学位及び専攻科目	所属施設及び現在の専門(研究実施場所)	所属施設における職名
林 裕造	東京医科歯科大学大学院・昭和35年卒・医学博士・ 毒性学/病理学	北里大学薬学部	客員教授
三森国敏	大阪府立大・昭和47年卒 ・農学博士・獣医病理学	国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・病理部	室長
菅野 純	東京医科歯科大学大学院・医学研究科、昭和60年修了、医学博士・病理学	国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部	室長
渡邊 昌	慶応義塾大・昭和45年卒 ・医学博士	東京農業大学・応用生物科学部	教授
藤森観之助	北海道大学・昭和38年卒・薬学博士・薬理学	国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部	部長

協力研究者

氏名	所属等
寺本昭二	(財) 残留農薬研究所 水海道研究所・毒性部副部長
渡辺民朗	岩手県立大学社会福祉学部・教授
宮崎 奉之	東京都立衛生研究所・乳肉衛生科長
佐藤 章夫	山梨医科大学・教授
伊藤 明弘	広島大学原爆放射能医学研究所・教授
林 真	国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部長
若林 敬二	国立がんセンター・癌予防研究部長
鈴木隆	国立医薬品食品衛生研究所・食品部第二室長

経理事務 担当者	(フリガナ) 氏名	モリヤマ ノリコ 森山 紀子	連絡先 所属施設 TEL・FAX E-mail	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター・毒性部 TEL:03-3700-9639・FAX:03-3700-9647 E-mail: morinori@nihs.go.jp
-------------	--------------	-------------------	----------------------------------	---

序

この報告書は平成11年度厚生科学研究により実施された畜水産食品中残留ホルモンのヒト健康に及ぼす影響に関する研究についてとりまとめたものです。

ホルモン剤は主に肥育牛に対して、肥育効率の向上や肉質の改善を目的として古くから用いられてきたものです。

牛に肥育を目的としてホルモン剤を投与することは、我が国では食糧不足が深刻であった昭和30年頃から、肥育の向上の一環として研究されてきましたが、消費者の指向に合わせて、現在ではほとんど使用されていません。

しかしながら、米国、豪州等では、現在においても、多くの食肉牛、特に去勢牛に対してホルモン剤が投与されている状況にあります。

このため、我が国では、合成型ホルモン剤にFAO/WHO合同食品規格委員会の国際的基準値が設定されたことを受けて、平成7年に、「ゼラノール」と「トレンボロンアセテート」に対して、科学的知見に基づき、食肉中の残留基準値の設定を行っています。

これに対して、欧州では、1980年に消費者団体から提出されたホルモン剤の発がん性に係る疑義から、ホルモン剤を使用した食肉の安全性について検討されましたが、科学的評価の出ないまま、EU領域内でのホルモン剤の使用及び使用した牛肉の輸入が禁止されました。

この後、上述のように1995年7月にFAO/WHO合同食品規格委員会は、合成型ホルモン剤2つの残留基準を設定し、天然型ホルモン剤3つについては基準値の設定は必要なしとする国際基準を採択しました。

1996年1月、米国はEUの輸入禁止措置がSPS協定等に不整合であるとして、WTOに提訴し、1998年1月、WTO上級紛争処理委員会は、EUに対し、1999年5月までにSPS協定との整合性を確保するよう勧告しました。

欧州委員会はEUのホルモン剤使用牛肉の輸入禁止制度の取扱いについて科学的根拠を確立するため、「公衆衛生関連獣医科学委員会」に対し、1999年4月までに意見を提出するよう求め、同年5月、EU科学委員会は、米国が使用しているホルモン剤の1種類に発がん性がある旨報告し、EUは、この報告を基に米国産牛肉の輸入禁止の継続を宣言しました。

本研究は、この畜産動物に使用されるホルモン剤に対するEUのレポートについて評価を行うとともに、これまでのホルモン剤に対する評価や畜産食品中のホルモンのヒトに与える影響について考察を行ったものです。

本研究に携わった専門家の方々のご苦勞に感謝申し上げますとともに、この報告書が広く有効に活用されることを心から願っております。

厚生省医薬局
食品保健部監視安全課

目 次

- I 総括 担当：林 裕造
- 1 課題の背景
 - 2 研究の目的と方法
 - 3 研究成果の概要
 - 4 考察と結論
- II 研究成果
- 1 エストラジオール-17 β の健康リスク評価 担当：三森 国敏
 - 2 エストラジオール-17 β の生殖発生毒性 担当：寺本 昭二
 - 3 エストラジオール-17 β の遺伝毒性 担当：林 真
 - 4 エストラジオール-17 β の DNA 障害 担当：若林 敬二
 - 5 エストラジオール-17 β の生体影響メカニズム 担当：菅野 純、
伊藤 明弘
 - 6 エストラジオール-17 β の体内動態 担当：藤森観之助、
渡辺民朗
 - 7 食品中のホルモン濃度に関する最近の知見 担当：宮崎 奉之、
鈴木 隆
 - 8 EU報告書等の問題点 担当：渡邊 昌

参考資料

- ・日本人の食生活と健康—とくに肉と牛乳をめぐって 佐藤 章夫
- ・ Sugimura, T., Nagao, M., Wakabayashi, K.: How we should deal with unavoidable exposure of man to environmental mutagens : cooked food mutagen discovery, facts and lessons for cancer prevention. Mutation Research 447:15-25, 2000

研究「畜産食品中残留ホルモンのヒト健康に及ぼす影響に関する研究」

I 総 括

担当：林 裕 造

1. 課題の背景

エストラジオール等の天然型性ホルモン剤は、50年来、米国及びオーストラリアにおいて牛などの家畜に肥育促進の目的で使用されている。1981年にFAO/WHO合同食品添加物専門家委員会（JECFA）は第25回会合において食肉生産でのホルモン剤使用について論議し、食肉生産の目的に沿って適切な使用が行われている限り、食肉の摂取を通じて体内に取り込まれるエストラジオール-17βによる健康への懸念はないと報告している。この結論は適切な規範に従ってエストラジオール-17βを投与した家畜の肉の摂取によって取り込まれるエストラジオール-17βの量が人体内において生産されるエストラジオール-17βの量にくらべてはるかに低いという知見に基づいている。

次いでJECFAは1988年の第32回会合において肥育促進に用いられる3種のステロイド剤、エストラジオール-17β、プロゲステロン及びテストステロンについて安全性評価を実施し、これらのステロイド剤はいずれも家畜における適正使用規範（Good Animal Husbandary Practice）に従って用いられる限り、家畜に投与されたものが食肉を通じて人体に対する健康影響はないと判断された。

この判断に加えて、肥育促進の目的で投与されたこれらホルモン剤の家畜体内における残留レベルを測定することが困難なことに配慮して、JECFA委員会ではエストラジオール-17β、プロゲステロン及びテストステロンにADIとMRLを設定する必要性はないとの結論を下した。

第32回のJECFA会合では、更に、異種性成長促進物質（Xenobiotic growth promoters）としてトレンボロンアセテート（TBA）とゼラノールについての評価を実施し、TBAに0-0.01 μg/kg体重/dayの暫定ADI、ゼラノールに0-0.5 μg/kg体重/dayのADIを設定している。

一方、ヨーロッパ各国では従来より家畜の肥育促進にホルモン剤は使用されていなかったが、1989年1月にECはホルモン活性をもつ薬剤を肥育促進の目的で家畜に投与することを禁止した。

その結果、エストラジオール-17β、プロゲステロン、テストステロン、TBA、ゼラノール、メレンゲステロールは家畜に投与することも、更にはそれらの薬剤を投与された家畜の肉を第三国から輸入することも禁止された。

禁止の理由は、ECが衛生上の規制措置として肥育促進の目的に使用したホルモン剤の食肉中あるいは食肉製品の残留による人の健康に及ぼすリスクの許容範囲を0もしくは0加算としたためである。

1995年1月に衛生植物検疫措置の適用に関する協定（SPS協定）及び世界貿易機関（WTO）の関連協定が発効の段階になり、ECによる禁止措置はEU・米国間における深刻な貿易問題となった。

国際的には、食品の国際規格を設定しているFAO/WHO合同食品企画委員会（CODEX委員会）は1996年にJECFA勧告に沿って家畜の肥育促進を目的としたホルモン剤の使用を認め、天然型ホルモン（エストラジオール-17β、プロゲステロン、テストステロン）についてはADI及びMRLを設定不要とした。

JECFAは1999年2月の第52回会合において新しい科学的情報に基づいて、エストラジオール-17β、プロゲステロン及びテストステロンについて再評価を行ない、これらホルモンの畜産食品中に含まれる量が著しく低いことから、これらの食品の摂取による人の健康リスクはほとんどない事を再確認した。その際、ADIは人での臨床用量をもとに設定され（エストラジオール-17β：0.05 μg/kg体重/day、プロゲステロン：30 μg/kg体重/day、テストステロン：2 μg/kg体重/day）、食肉中の残留は多い例でもADIの数%程度にとどまり、安全域が広いことから、家畜への投与が適切使用規範に準じて実施されるという条件でMRLは設定不要とされた。

JECFAの再評価と並行してEUでは公衆衛生問題に関する獣医学対策科学委員会（SCVPH）が1999年4月に会議を開催し、エストラジオール-17β、プロゲステロン等6種のホルモン剤の安全性について発がん性、遺伝毒性、生殖発生毒性、神経毒性、免疫毒性等の観点から検討し、結論として、これらホルモン剤を使用した家畜の食肉には安全性に問題があり、ADIは設定できないと述べ、特にエストラジオール-17βについては発がんリスクが示唆されたとしている。

SCVPHの報告書は国際的に大きな関心を招いたが、特にカナダでは農林水産大臣がSCVPHの見解とその報告に引用されているデータの解釈についての調査を家畜製品委員会（VPC）の分科会に依頼した。

VPC分科会はSCVPHの報告書を慎重に調査し、この報告書が問題を広汎に扱ってはいるものの、すべての分野について十分な包括的議論を進めている訳ではなく、特定の選ばれた事項について結論を導びいている点を指摘している。VPC分科会は、更に、ホルモン剤を投与した家畜の食肉の摂取によるリスクが従来考えられていたよりも高いというSCVPHの結論を支持する科学的根拠はないと述べている。

家畜の肥育促進を目的とするホルモン剤使用についての議論は、CODEX委員会等において更に続けられると予想されるが、一方、この問題が科学的立場での議論の対象ではないとする意見もある。

我が国ではこの問題についてCODEX委員会に準じた対応がとられているが、同時に、牛肉中の天然ホルモンの残留実態調査が厚生科学研究により進められており、平成10年度の厚生科学研究の報告では国産牛肉60検体、輸入牛肉（米国産、オーストラリア産）40検体についての天然ホルモンの残留値はいずれも生理変動範囲におさまっているとされている。

従って、我が国における国産及び輸入牛肉中の天然ホルモンによる健康影響については現実的な問題はないと思われるが、米国等からの畜産食品の輸入量が多い現状を考えると、我が国が独自に畜産食品を介するホルモン摂取によるヒト健康への影響を科学的に評価することは、畜産食品の安全性を確保し、且つ、消費者の不安を解消するための必要な対応とみなされる。

2. 研究の目的と方法

以上の背景を踏まえ、本研究は家畜の肥育促進を目的としたホルモン剤の使用に関するCODEX委員会とEU科学委員会による議論についてその論点を整理し、議論の根拠となっている科学的知見を再検討して畜産食品中に残留するホルモン剤の摂取によるヒト健康への影響を評価する目的で実施された。研究方法は以下の通りである。

- 1) 家畜の肥育促進を目的とするホルモン剤として、現在、エストラジオール-17 β 、プロゲステロン、テストステロン、TBA、ゼラノール及びメレンゲステロールが使用されているが、本研究ではそれらの中で既存の知見が最も多く、且つヒトへの健康影響について特に重視されているエストラジオール-17 β を調査対象とした。
- 2) エストラジオール-17 β によるヒト健康への影響については、発がん性、生殖・発生毒性及び遺伝毒性が重視されているため、本研究ではこれら三事項及び毒性発現の背景となっている作用メカニズムならびに体内動態に関する科学的知見を中心に調査を進めた。
- 3) CODEX委員会とEU科学委員会の間で議論の対象となっているエストラジオール-17 β の暴露評価に関連して、エストラジオール-17 β の家畜食品中の残留量及びその測定法について調査した。
- 4) 上記事項についての研究・調査は分担研究者ならびに協力研究者がそれぞれの専門性に沿って個別的に実施し、その後、各成果を基礎に全員で本研究の主題である“畜産食品中残留ホルモンのヒト健康に及ぼす影響”について総括的討議を行った。

なお、本研究の全体討論の中で、主題とは多少離れるが、リスクアセスメントの最終段階において考慮すべき問題点として、日本人の食生活あるいは食習慣の特徴ならびに発がんの多要因影響が話題となり、その論点を本報告書の参考資料に添付した。

3. 研究成果の概要

1) エストラジオール-17 β の発がん性

エストラジオール-17 β の発がん性については、医療目的の使用に伴う乳がん、子宮内膜がん、卵巣がんのリスクの上昇等、ヒトの疫学的データから十分な証拠があり、動物実験においても長期間投与による発がん性陽性の十分な証拠があるとみなされており、この点については国際的な合意が得られている。

一方、エストラジオール-17 β の発がんメカニズムについては、代謝物であるカテコールに遺伝子障害性があるとの報告から、EU科学委員会はエストラジオール-17 β にはヒトに対して遺伝子障害性を介する発がん性の懸念があるとの見解を述べ、CODEX委員会の結論と対立している。

JECFA (1999) では、1987年以降の文献及びヒトでの疫学的知見に基づいて、エストラジオール-17 β は遺伝子毒性の可能性はあるが、ヒト及び実験動物でみられている内分泌関連器官での発がん性はホルモンレセプタ

一を介した非遺伝子障害性のメカニズムによるものであるとの結論が提出されている。なお、食肉残留ホルモン濃度の条件でヒトに発がんがみられたとする報告はない。

2) エストラジオール-17 β の生殖・発生毒性

エストラジオール-17 β の生殖毒性はラットを用いた大規模な一世代生殖試験によって検討されている。この試験では、エストラジオール-17 β を0、0.05、2.5、10及び50ppmの濃度で飼料に混入しP世代の雌雄ラットに7週齢から開始して10週間投与した後に交配し、その後にF1児を離乳するまでの間妊娠及び哺乳期間を通じてエストラジオール-17 β を投与し、F1世代のラットにも親動物と同じ濃度のエストラジオール-17 β が離乳後11週間投与されている。

その結果、10ppm (0.527~0.691mg/kg/日)以上の用量でP世代の雌雄の動物に摂餌量と食餌効率の低下に伴う体重増加抑制、貧血などの一般毒性的影響と共に明らかな生殖毒性が認められている。一方、最低用量の0.05ppm (0.003mg/kg/日、300ng/kg/日)では、P世代雌のプロゲステロン濃度と雄のテストステロン濃度に対照群と比較して低値がみられているが、下垂体ホルモンには変化がなく、F1世代については、測定したすべてのホルモン濃度が対照群と同じレベルの値を示している。従って、この用量が血中ホルモン濃度の変化を指標した際の無影響量と考えられる。なお、この用量ではP世代の雌雄動物に一般毒性的影響はみられず、生殖能力にも異常はみられていない。

エストラジオール-17 β の催奇形性に関する知見として、ラットの一世代生殖試験の2.5ppm投与群において、出生時低体重が認められているが、子宮内胚死亡はみられず、奇形の発現や雄の生殖器系の異常(尿道下裂、停滞精巣)もなく、雄の肛門生殖突起間距離も対照群とほぼ同じ値を示している。

以上のデータから、エストラジオール-17 β はラットにおいて、性ホルモンと下垂体ホルモンの血中濃度を明らかに変化させる用量で一般毒性影響と共に生殖毒性影響を引き起こすが、血中ホルモン濃度をほとんど変化させない用量では一般毒性的影響はみられず、明らかな生殖毒性を示さないと結論される。

3) エストラジオール-17 β の遺伝毒性

多くの試験がなされているが、現状の知見では明確な結論が得られていない面が残されている。In vitro試験系では、微生物を用いる復帰変異試験及び培養細胞を用いるSCE試験はすべて陰性である。ほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変

異試験についても、ほとんどの結果は陰性で、一部の陽性結果を示す報告に関しても判定に疑問が残されている。染色体の数的異常誘発性及び細胞形質転換作用については陽性の結果が得られている。一方、in vivo試験系では、細胞遺伝学的指標に関して判定に疑問を残しつつも陽性とする報告もあるが、げっ歯類を用いる小核試験のように方法的に確立した試験では陰性であった。これらの結果を総合的に判断すると、エストラジオール-

17βについては、遺伝毒性を疑わせられるような結果も報告されているが、現時点において遺伝毒性の評価系として確立している試験では、ほとんどが陰性結果であり、仮に遺伝毒性があるとしても強いものではない。エストラジオール-17βの遺伝毒性に関し、今後優先して検討されるべき課題として、極めて低い濃度でのin vitro遺伝子突然変異誘発性及び in vivoにおける染色体の数的異常誘発性がある。

4) エストラジオール-17βによるDNA障害

ほ乳類培養細胞を用いた不定期DNA合成試験において、代謝活性化系の非存在下で弱陽性結果の報告があるが、陰性の報告もあるので総合的にみてエストラジオール-17βには強いDNA障害性はないと考えられる。

一方、エストラジオール-17β (E2) は代謝活性を受けてE2-2, 3-キノン及びE2-3, 4-キノンに転換され、これから生ずるカテコールキノンがDNAと反応して付加体を形成するとの知見がある。

その他、エストラジオール-17βを大量に投与した雄ハムスターの腎組織において、8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-dG) の生成量が増加したとの報告がある。

5) 食肉中の残留ホルモン濃度に関する知見

牛から生産される食肉中の天然型ホルモン濃度は牛の品種、年齢、部位、性及び性周期等の要因により変動する。測定法/分析法も人為的な変動要因に数えられる。

(1) 牛組織中のエストラジオール-17β及びエストロン濃度

32回 (1988) 及び52回 (1999) JECFAでの報告を中心にホルモン剤を使用しない牛についての組織内ホルモン濃度を調査した結果、エストラジオール-17β及びエストロンの濃度はいずれも雌雄、去勢、未去勢、妊娠、未妊娠等の条件により著しく変動する事実が確認された。(宮崎・鈴木分担報告書Ⅱ-7参照)

(2) 国内産及び輸入牛肉中のエストラジオール-17βの濃度

国内産牛肉と外国産牛肉 (米国及びオーストラリア) についてエストラジオール-17βの濃度を測定した所、濃度範囲については両者間に差はみられなかったが (国内産: $1 > \sim 12.8 \text{pg/g}$ 、外国産: $1 > \sim 10.0 \text{pg/g}$)、平均値についてみると外国産 (米国: $3.33 \pm 2.83 \text{pg/g}$) は国内産 ($1.15 \pm 1.87 \text{pg/g}$) に比べて3倍の値を示した。米国及びオーストラリアでは、肥育目的にホルモン剤が使用されており、我が国では、ホルモン剤の使用実態はないが、一方、測定試料の採取に当たり、国内産については種、性等が考慮されているが、外国産については試料の情報が得られていない。従って測定値についての両者間の差異をホルモン剤使用の有無に帰するには無理がある。なお、今回の測定値とJECFA及びFDAの報告での値との間には特に大きな相違はないと判断される。

(3) ホルモン分析法の現状

牛組織中のエストラジオール-17βの測定法として、従来よりラジオイムノアッセイ (RIA) が用いられてきた。RIAは年々改良が加えられ、感度も向上し、現時点ではRIAによる測定例が最も多い。一方、近年、

内分泌かく乱化学物質の抽出法の研究に伴って、酵母を用いた血漿中のエストラジオール-17 β 測定法(RCBA, Recombinant Yeast Cell Bioassay)が開発された。RCBAはRIAに比べて100倍高い感度をもつと報告されている。RIAとRCBAによるエストラジオール-17 β の測定結果を比較すると、15pg/ml以上の濃度の場合には両者間の相関性は高いが、低濃度領域ではRCBAはRIAにくらべて低い値を示す。このような相違の理由として、1) RIAは低濃度で交差反応があるため、2) 血清中の低濃度の場合、RCBAの反応を妨害する物質が働くため、などの議論が交わされているが、未だ結論は出されていない。この問題の解決には今後の検討を待つ必要がある。

6) CODEX委員会とEU科学委員会との論点

家畜の肥育促進を目的とするホルモン剤の使用に関するCODEX委員会とEU科学委員会との議論は激化しているが、論点は以下の4事項にまとめられる。

(1) 食肉の摂取を介して体内に取り込まれるエストラジオール-17 β の量と人体内で生成される当該ホルモン量との比較：

第32回のJECFA(1988)における評価は、家畜に対するエストラジオール-17 β 剤の使用が適正規範に従って行われている限り、食肉の摂取を介して体内に取り込まれるホルモン量は人体内で生成される量にくらべて著しく低いからホルモン剤使用による安全性に関する懸念はないという考え方に基づいている。一方、EU科学委員会は思春期前の小児におけるエストラジオール-17 β の体内生成量は、JECFAが示している値よりはるかに(1/100程度)低いと見積もられると反論している。

(2) エストラジオール-17 β のヒトに対する無影響量：

更年期後の女性についてコルチコステロイド結合グロブリンの血清中濃度の増加を指標として無影響量が検討され、0.3mg/dayの値が得られている。第52回のJECFAでは、この値をエストラジオール-17 β のNOELとし、これに10の安全係数(不確実係数)を適用してADIを0-50mg/kg bw/dayとしている。JECFAによる上記の見解に対して、EU科学委員会はこの考え方には小児に対する極めて微量のエストラジオール-17 β の影響が全く無視されていると主張している。特に外因性内分泌かく乱化学物質についての研究で問題となりつつあるホルモ・インプリンティングによる影響、即ち、個体の発生・成熟の臨界期におけるホルモン受容体に対する作用がその後の成長や反応性に決定的な役割を果たすであろうという説の可能性を考慮すべきであるとしている。

(3) エストラジオール-17 β のヒトにおける発がん性：

避妊や治療に用いられるエストラジオール-17 β による乳がん、子宮内膜がん、卵巣がん等のホルモン依存性器官における発がんの増加が疫学的に報告されている。

EU科学委員会では、従来は高脂肪摂取によるとみなされている食肉の多量摂取に伴う大腸がんの発生増加をホルモンの影響に結びつけており、この現象は食肉中のエストラジオール-17 β による遺伝子障害の

ためであるとしている。

JECFAでは1987年以降のデータを総括した結果、エストラジオール-17βは遺伝毒性の可能性を持っているが、ヒト及び実験動物にみられる内分泌関連器官における発がんはホルモン受容体を介した非遺伝毒性のメカニズムによるとの結論を提出している。なお、食肉に残留するホルモン濃度でヒトに発がんが起きるとする報告はない。

(4) ホルモン分析法についての問題点：前項の5)、(3) 参照。

4. 考察と結論

1) 考察

ホルモンの生体影響については未解決の面があり、新しい科学技術の導入による最近の研究成果の中には適切な検証を経ていないものも含まれている。このような状況を背景に1999年の52回JECFAでは、エストラジオール-17βのヒトにおける健康リスクの評価について、1988年の32回会合での結論を見直すと共に、1987年以降に得られた所見を根拠の重みづけ (weight of evidence) を考慮してADI (0.05 μg/kg体重/日) を設定し、最終的に家畜に対する使用が適正規範に従って実施されている限り、食肉中に残留したホルモンの摂取がヒトの健康に対して悪影響を及ぼすことはない判断している。

一方、JECFAでの評価及びそれを受けたCODEX委員会の結論に対するEU科学委員会の反論には、検証が不十分な仮説に基づいてつくられた理論がかなり含まれている。このため、カナダ及び英国の家畜製品安全分科会は、1999年10月の報告書において、結論的に「ホルモン剤を投与した家畜由来の食肉の摂取による健康リスクが従来考えられていたよりも高い」とするEU科学委員会の主張を支持する科学的根拠はないと述べている。

ECの関連委員会 (Health A Consumer Protection Directorate general Management of Scientific Committee) は、英国の家畜製品委員会分科会の報告書と関連データを調査し、同報告書にはEU科学委員会が1999年4月に公表した見解の修正を必要とするような知見は含まれていないと述べている。更に、同委員会は意見が相違する最大の理由が科学的知見の解釈に由来し、EC側の主張は新しい科学的知見に基づいたものである事を強調しているが、見方を変えると、検証が不十分な論理に基づいてEC側の見解を正当化しているように受け取れる。

2) 結論と将来課題

研究班では、上記の科学的知見と議論を基礎に家畜の肥育促進を目的とするエストラジオール-17βの使用を慎重に検討し、結論的に、この問題についての日本側の対応としては、CODEX委員会の結論に準じて、家畜における適正使用規範に従って使用するという原則が厳守されるという条件で、家畜へのエストラジオール-17βの使用はヒトに対する健康リスクを増加する要因にはならないという立場を取る方策が妥当であろうとの合意に達した。

なお、研究班会議において、この問題への対応に関連する研究課題とし

て、下記事項の検討を可及的速やかに実施すべきであるとの意見が交わされた事を付記する。

- (1) エストラジオール-17 β の高感度分析法の実用化
- (2) 思春期前及び胎児期における低濃度のエストラジオール-17 β の影響
- (3) 思春期前の小児におけるエストラジオール-17 β の産生
- (4) 合成女性ホルモン剤のヒト健康に及ぼす影響

文献

- (1) Evaluation of certain food additives. Twenty-fifth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO, Geneva, 1981.
- (2) Evaluation of certain veterinary drug residues in foods. Twenty-second Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO, Geneva, 1981.
- (3) Fifty-second Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO, Geneva, 1981.
- (4) Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health: Assessment of potential risks to human health from hormone residues in bovine meat and meat products, April 30, 1999.
- (5) Anua-Maria Anderson and Skakkebek N. E. : Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. Europe. J. Endocrinol. 140: 499-485. 1999
- (6) Canada's Veterinary Products Committee sub-group on the SCVPH opinion of 30/04/99. October 1999.
- (7) The UK's Veterinary Products Committee subgroup on the SCVPH opinion of 30/04/99. October 1999.
- (8) EC Health A Consumer Protection Directorate general, Unit B3-Management of scientific documents relating to the SCVPH opinion of 30 April 99 on the potential risks to human health from hormone residues in bovine meat and meat products. May 3, 2000.

II 研究成果

1. エストラジオール-17 β の健康リスク評価

研究「畜産食品中残留ホルモンのヒト健康に及ぼす影響に関する研究」

平成11年度研究報告

分担研究者：三森国敏（国立医薬品食品衛生研究所）

総括要約 (Summary)

動物における発がんデータ

エストラジオール-17 β (E2) を長期間投与した場合の実験動物における発がん性に関しては、発がん性陽性の十分な証拠があるとみなされる。E2の腫瘍に対する修飾作用については、イニシエーターの有無に依存しているが、一般に、E2は子宮、乳腺腫瘍に対してはプロモーター作用を示し、肝腫瘍に対しては抑制作用を示すと結論される。E2がイニシエーション活性を有することを立証する発がん実験の証拠は今までのところない。

厚生科学研究報告書

1 動物における発がんデータ

1) エストラジオール-17 β のみあるいは他の化学物質との併用による発がん性：エストラジオール-17 β (E2) およびそのエステルを以下の投与経路で種々の動物に投与された報告が既になされている。

○経口投与：マウス

○皮下あるいは植込み投与：マウス、ラット、ハムスター、モルモット、サル、ブタ

○腔内投与：ウサギ

○脾臓内投与：マウス

○新生児期暴露：マウス

経口投与では、マウス乳腺ウイヌル (murine mammary tumor) の高度感染の有無にかかわらず、子宮（子宮内膜および頸部）の腺癌および乳腺腫瘍の発生率が増加している。

皮下投与では、マウスでは乳腺、下垂体、子宮、子宮頸部、膺、リンパ球の腫瘍および精巣間細胞腫の発生率が増加している。ラットでは乳腺および下垂体腫瘍の発生率が増加している。エストラジオール・ジプロピオネイト (estradiol dipropionate) の場合にはラットに浸潤性の下垂体腫瘍が増加している。E2 およびテストステロンの併用投与でラットに前立腺癌が増加し、一方、E2の埋植投与では脾臓外分泌の腫瘍が抑制されている。

ハムスターでは、去勢および非去勢雄ならびに卵巣摘出雌に E2 処置すると悪性腎腫瘍が高率に発生したが、非卵巣摘出雌にはこのような変化は認められていない。E2 の去勢雄における腎発がんには、血清の E2 の急激な上昇と強い相関が認められる。モルモットでは、子宮および腹腔内に瀰漫性線維性筋腫様病変が観察されている。ブタでは、卵巣摘出動物にエストラジオールを埋植投与すると、眼球のメラノーマの大きさが、未処置動物に比較して増加している。

E2 とレボノルゲストレル(levonorgestrel)の併用膈内投与では、ウサギの子宮に脱落膜反応および脱落膜肉腫が発生している。

E2 の脾臓内投与では、1 日齢マウスの精巣を脾臓に隣接移植することにより、移植片内に典型的なライディッヒ細胞腫が生じている。

マウス新生児への皮下投与では、後に子宮頸部および膈に前腫瘍性および腫瘍性病変が発生し、乳腺腫瘍の発生率が増加している。マウスを用いた実験では、E2 の新生児期暴露によるアデノーマと扁平上皮癌の早期発生には直接的な関連がないことが明らかにされている。新生児期にジエチルスチルベストロール処置した卵巣摘出マウスでは加齢とともに膈上皮の層状化が持続し、出生後に E2 を埋植投与することによりこの変化は有意に増加している。

- 2) 発がん物質との併用による E2 の発がん性：E2 の発がん性について、N-methyl-N-nitrosourea(MNU)、N-ethyl-N-nitrosourea(ENU)、3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene(3'-Me-DAB)もしくは methylchlanthrene(MCA)を用いたマウス二段階発がんモデル、および MNU、2-acethylaminofluorene(AAF)、diethylnitrosamine(DEN)、7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)、N-nitrosobutylurea(NBU)もしくは azaserine を用いたラット二段階発がんモデルによる検討がなされている。

マウスでは、E2 は MNU による子宮内膜発がんに対して促進作用を示したとの報告がある。血清中の高い E2 レベルと低プロジェステロンレベルの持続がマウスの子宮内膜腺癌に重要であることが示されている。逆に、E2 は 3'-Me-DAB による肝細胞腫瘍および MCA による子宮頸部癌の発育を抑制したと報告されている。

ラットでは、高用量 E2 の単独投与もしくは E2 とプロジェステロンの併用投与により、MNU による乳腺癌の発育が抑制されたとの報告がある。卵巣摘出ラットへの E2 および MNU 併用投与では膈乳頭腫が誘発され、E2 の膈におけるプロモーター作用が示唆されている。部分肝切除、AAF および四塩化炭素処置後に E2 を投与した Solt-Farber モデルラットでは、E2 はラット肝臓にイニシエーション作用を示さないことが報告されている。E2 は DEN によるラット肝発がんにおいてプロモーター作用を示さなかったと報告されている。E2 で前処置することにより、発がん物質の染色体への影響は亢進され、肝細胞の DEN 感受性が増加している (Pretreatment with E2 increased hepatocyte susceptibility towards DEN action probably by enhancing the accessibility of the genome to