

the carcinogen.)。卵巣摘出もしくは非摘出雌性ラットを DMBA 処置しても、胸部腫瘍の発育と E2 用量との間に明らかな相関はないとの報告がある。ラットを用いた実験では、E2 により DMBA 誘発胸部腫瘍の発生時期が延期したと報告されている。また、ある実験では、活性 MARK カスケードが DMBA 誘発ラット乳腺癌の E2 依存性発育において重要なメカニズムであることが示唆されている。E2 は、NBU でイニシエーションを行った去勢ラットの誘発性肝腫瘍に影響を及ぼさないが、下垂体腫瘍を誘発する可能性があることが示されている。E2 処置は、アザセリンでイニシエーションしたラットの膵臓前腫瘍病変の発育を強く抑制するとの報告がなされている。

- 3) E2 についての動物に対する発がん性評価：エストラジオール-17 β 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。

問題点・今後検討すべき点：E2 のイニシエーション作用の有無を明確にするための実験動物を用いた発がん実験の実施が必要である。

2 研究結果

4) J E C F Aの最近の評価：

1986年の第32回 JECFAにおいて天然ホルモンの17 β -estradiol (E2)は「ADIおよびMRL特定せず」と評価されたが、それから既に12年の歳月が流れており、新たな科学的情報が蓄積されてきたことから、1999年の第52回 JECFAは、このホルモンについて再評価を行い以下のとおりに結論付けられた。

- E2は、実験動物の実験成績およびヒトの疫学的データから十分な発がん性の根拠が示されており、特に、E2の代謝物であるカテコールには遺伝子障害性があるとの報告から、ヒトへの遺伝毒性を介した発がんリスクの懸念が欧州共同体(EC)から出されている。
- しかし、1987年以後の文献およびヒトの疫学的データを収集し、検討した結果、E2は、遺伝毒性の可能性はあるが、ヒトおよび実験動物での内分泌関連臓器での発がんは、ホルモン・リセプターを介した非遺伝毒性的な発がんメカニズムによるものであるとの結論が出された。
- また、牛肉中のE2レベルは、外因性E2が投与されたとしても、適切な休業期間を設ければ、内因性E2の生理的変動の範囲内にあることから、E2投与による牛肉への有害影響は考えにくいとの結論が出された。
- さらに、ヒトでの臨床用量で内分泌学的に何ら異常をおこさない用量(5 μ g/kg)が明確にされていることから、ヒトの臨床用量に比べれば畜産食品中に含まれるこれらのホルモンの量は著しく低く、これらの食品の摂取により消費者に有害な作用を誘発する危険性は殆どないが、E2についてADIを設定し、許容範囲を明確にすることが決定された。
- 例えば、ヒトでの閉経後のestradiol-17 β の臨床用量でヒトに内分泌学的に何ら異常をおこさない量(5 μ g/kg)から安全係数100(個人差10と年齢による感受性の差10)を除いてE2のADI(50ng/kg)を設定している。
- 一方、MRLについては、牛へのこのホルモン投与により、各種組織への残留濃度は生理的変動値を大きく上回ることはなく、検出限界に近い場合もあったと報告されている。
- これらの残留中央値から理論的的最大一日摂取量(TMDI)を算出すると、それはADIの多くても2%に到達せず、安全域が非常に広いことから、標的動物に動物薬適性使用規範に準じてこれらが投与されている限り、MRLを特定する必要はないと結論された。
- ただし、E2の総摂取量については、TMDIなどから計算された「過剰摂取量」を超えないよう考慮すべきであることが勧告された。

問題点：年齢差による感受性の差として安全係数10を使用しているが、性成熟に達した女性に比較し、未成熟な女児ないし閉経を迎えた女性のエストロゲン量が1/10の範囲に入るものとは考えられないことから、安全係数が10で適切か否かについては今後の検討が必要である。

2 エストラジオール-17 β の生殖発生毒性

厚生科学研究「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：寺本昭二（(財) 残留農薬研究所）

1 生殖毒性、催奇形性

エストラジオール-17 β (E2) の生殖毒性は、大規模且つ綿密に設計されたラットの一代生殖試験の中で調べられている。E2（純度 98-100%）を 0、0.05、2.5、10 および 50 ppm の濃度で飼料中に混合し P 世代の雌雄のラットに 7 週齢から開始して 10 週間投与した後に交配し、その後も F1 児を離乳するまでの間妊娠および哺育期間を通して E2 を投与している。F1 世代のラットには、親動物と同じ濃度の E2 を離乳後 11 週間投与している。10 ppm (0.527-0.691 mg/kg/日に相当) 以上の用量で、P 世代の雌雄の動物に強い一般毒性的影響（摂餌量と食餌効率の低下に伴う体重の増加抑制、貧血など）とともに明らかな生殖毒性が認められている。雌では、投与開始後血中の E2 濃度が上昇するために性ホルモンと下垂体ホルモンの濃度が変化し（プロラクチン上昇、プロゲステロンと LH は低下）、卵巣の萎縮や大型卵胞減少、黄体減少、および持続発情による発情周期長の延長が引き起こされる。一方、雄でもホルモン濃度の変化（プロラクチン上昇、テストステロン、LH および FSH は低下）とそれに伴う精巣と副生殖腺の萎縮、精巣の精子細胞数減少、精巣上体精子数の減少（無精子症または乏精子症）と運動性の低下が起きる。従って、これらの動物の交尾能は著しく阻害され、ほとんど交尾できないか交尾したとしても全く妊娠には至らない。精巣の精子細胞数減少は、精祖細胞の障害に基づくものとは異なり E2 の投与を中止すればほぼ回復する。2.5ppm (0.139-0.173 mg/kg/日に相当) の用量でも P 世代の動物に一般毒性的影響が認められ、軽度なホルモン濃度の変化と、発情周期長の延長や着床数の減少が起きるが、交尾率や妊娠率は対照群とほぼ同じである。しかし、得られた F1 児の哺育期間中の体重増加は抑制され、離乳後の F1 動物にも親動物と同様の一般毒性的影響やホルモン濃度の変化がみられるほか、雄の性成熟遅延と精巣上体精子数の減少、雌では性成熟の促進と発情周期長の延長が認められる。

最低投与量の 0.05 ppm (0.003 mg/kg/日に相当) 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るものの、下垂体ホルモンには変化がみられないこと、および F1 世代では測定したすべてのホルモン濃度が対照群と同レベルであることから、ほぼこの用量が血中ホルモン濃度の変化に関する無影響量と考えられる。この用量では、P 世代の雌雄の動物に一般毒性的影響は全く認められず、生殖能力にも異常はみられない。また、胎児期から乳児期、幼児期を経て

性成熟に至るまで一貫して E2 に暴露された F1 世代では、雄の性成熟、精巣や副生殖腺の重量および病理組織学的検査結果、ならびに精子検査の結果に異常は認められない。F1 世代の雌についても、雄と同様に検査したほとんどの指標で問題の無い結果が得られている。これらの雌の性成熟完了日齢に平均値で 1.6 日の短縮がみられるが、完了日齢の幅は対照群の 26-37 日に対して 26-35 日とほぼ同じである。また、発情周期に関しても、68 日間の観察期間中に発情休止期の延べ日数の減少と発情期の延べ日数の増加がみられるが、周期性は全く正常であり平均周期長も 5.0 ± 0.75 日で対照群の 5.2 ± 0.50 日とほぼ同じである。従って、これらの変化については E2 投与との関係は明らかでない。

E2 の催奇形性に関しては、ラットの一代生殖試験の 0.05 ppm 投与群と 2.5 ppm 投与群で F1 児が得られているが、2.5 ppm 投与群で出生時低体重が認められるものの子宮内胚死亡はみられず、奇形の発現もみられない。尿道下裂や停留精巣などの雄の生殖器系の異常は認められないほか、雄の雌性化の検出に用いられる肛門生殖突起間距離も対照群とほぼ同じである。別の小規模な実験では、オスモティックポンプを用いてラットに E2 を 15 または 30 ng/時の用量で妊娠 10-13 日に連続皮下投与し、子宮内胚死亡の増加を認めているが、生存胎児に外表奇形はみられない。一方、妊娠 13-16 日に 40 ng/時（母動物の血中エストラジオール濃度は約 2 倍に上昇する）を同じように皮下投与すると、胎児と胎盤の発育が阻害されるが、子宮内胚死亡はみられず胎児の外表にも先天奇形は認められない。

以上のことから、E2 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的影響とともに強い生殖毒性を引き起こすが、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、明らかな生殖毒性や重度の奇形の発現もみられないと結論される。

2 今後の問題点

E2 の生殖毒性試験と催奇形性試験の報告はまだ少ないので、今後もデータを蓄積していかなければならない。

生殖毒性試験では一般に妊性に関する指標より性成熟や発情周期に関する指標の方が鋭敏とされているので、0.05 ppm 群の F1 雌ラットにみられる性成熟と発情周期の微細な変化について E2 投与に関連するものかどうか、また仮に関連するとすれば毒性学的にどのような意味をもつか明らかにしておかなければならない。

高用量の E2 投与後の性ホルモンと下垂体ホルモン濃度の変化がラットで明らかにされているが、低用量での変化についてさらにデータを蓄積するとともに検出感度を高める工夫も必要である。また、ホルモン濃度の変化と発現する毒性的影響の関係は P 世代、F1 世代ともに性成熟後のラットで明らかにされているが、可能ならば乳児期や幼児期、性成熟期といった発生段階ごとの調査も必要である。

骨組織に対する影響は調べられていない。

胎児の奇形学的検査は外表検査が主体で、内臓奇形と骨格奇形についても詳細な検査が必要である。

引用文献

- (1) Biegel, L.B., Flaws, J.A., Hirshfield, A.N., O'Connor, J.C., Elliott, G.S., Ladics, G.S., Silbergeld, E.K., Van Pelt, C.S., Hurtt, M.E., Cook, J.C. and Frame, S.R. (1998) 90-Day feeding and one-generation reproduction study in Crl:CD BR rats with 17 β -estradiol. *Toxicol. Sci.*, 44, 116-142.
- (2) Biegel, L.B., Cook, J.C., Hurtt, M.E. and O'Connor, J.C. (1998) Effects of 17 β -estradiol on serum hormone concentrations and estrous cycle in female Crl:CD BR rats: Effects on parental and first generation rats. *Toxicol. Sci.*, 44, 143-154.
- (3) Cook, J.C., Johnson, L., O'Connor, J.C., Biegel, L.B., Krams, C.H., Frame, S.R. and Hurtt, M.E. (1998) Effects of dietary 17 β -estradiol exposure on serum hormone concentrations and testicular parameters in male Crl:CD BR rats. *Toxicol. Sci.*, 44, 155-168.
- (4) Bartholomeusz, R.K., Bruce, N.W. and Lynch, A.-M. (1999) Embryo survival, and fetal and placental growth following elevation of maternal estradiol blood concentrations in the rat. *Biol. Reprod.*, 61, 46-50.

3 エストラジオール-17 β の遺伝毒性

厚生科学研究「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：林 真（国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部）

研究課題：エストラジオール-17 β の遺伝毒性

エストラジオール-17 β の遺伝毒性に関しては多くの試験がなされており、陰性、陽性双方の結果が報告されている。また、エストラジオールの安全性に関しては IARC (1999) の優れたレビューがある。IARC の評価を中心に主な試験結果を表に示す。

細菌を用いた復帰変異試験の結果は代謝活性化系の存否に係わらず陰性である。

ほ乳類培養細胞を用いた不定期 DNA 合成試験等による DNA 損傷性に関しては代謝活性化系非存在下で弱陽性との報告もあるが、陰性の報告が複数あり、総合的に見て強い DNA 損傷性はないものと考えられる。

ほ乳類培養細胞を用いた遺伝子突然変異試験に関しても多くの報告があり、ほとんどのものは陰性であるが、チャイニーズハムスター由来細胞株 V79 を用いた *hprt* を標的とした試験 (Rajah and Pentto, 1995)、およびヒトの乳がん細胞 MCF-7 を用いた MTX 抵抗性を指標とした試験系 (Thibodeau et al., 1998) において、それぞれ 10^{-10} 、 10^{-8} M という非常に低濃度で陽性との報告があり、注目される。ただし、V79 細胞を用いた試験の結果は用量相関性が逆転している、観察された実際の変異コロニー数が少ない（詳細なデータは示されていない）など、結果の判定に疑問が残る。また、MTX 抵抗性に関しても、1 用量のみの試験であり、用量反応関係が示されていない、陽性反応も非常に弱く統計学的にも有意となっていない、可逆的な反応である、レセプターを介した反応ではない、等の理由から問題となるような反応では無いと考えられる。

培養細胞を用いた SCE 試験は陰性である。染色体の構造異常誘発性に関して陽性との報告があるが、非常に高用量であり、用量依存性も認められない。しかし、染色体の数的異常誘発性、特に異数性の誘発が認められる。これに伴い、*in vitro* での小核誘発性も報告されており、数的異常に起因すると考えられている動原体を有する小核の誘発性が認められる。

マウスの BALB/c 3T3, C3H 10T1/2, シリアンハムスター胎児細胞等を用いた細胞形質転換試験の結果は陽性であった。ヒト末梢リンパ球培養細胞を用いた SCE 試験、染色体異常試験では陰性であったが、異数性の誘発、微小管の形成阻害、およびそれに起因すると考えられる小核の誘発性が観察されている。

In vivo の試験系において、シリアンハムスター腎臓細胞において DNA 切断

が認められている。しかし、陰性との報告もあり、種差、標的臓器における感受性の差が認められる。

細胞遺伝学的指標に関しては陽性との報告もあるが再現されず、十分にバリデートされた系では陰性の結果となっている。

陽性の結果が得られているのは、マウスの uterine cervix と uterine horn 上皮細胞, cervico-vaginal 上皮細胞, シリアンハムスターの renal cortical 細胞, renal tubular 細胞のみであった。

また、エストロジェンで誘発したシリアンハムスター腎腫瘍細胞で、ミニサテライトの不安定性が観察されたとの報告もあるが、自然発生の腫瘍細胞と比較していない（正常組織と比較）ので、エストロジェンに起因するものかどうか結論付けられない。

以上を要約すれば、遺伝子突然変異誘発性は無いが、あっても非常に弱い；染色体の数的異常誘発性および細胞形質転換作用が認められる；生体内での細胞遺伝学的損傷性に関しては結論付けられない。

これらの結果を総合的に判断すれば、エストラジオール-17 β の遺伝毒性を疑わせるような結果も得られているが、遺伝毒性を評価するための評価系として充分バリデートされた試験においては陰性であり、明確な結論付けは困難であるが、もし遺伝毒性があったとしても強いものではない。

今後、さらにエストラジオール-17 β の遺伝毒性について精査する場合には、非常に低い濃度での *in vitro* 遺伝子突然変異誘発性の再現性、*in vivo* における染色体の数的異常誘発性の確認が先ず行われるべきであろう。

文 献

- (1) Aizu-Yokota, E, K Ichinoseki and Y Sato (1994) Microtubule disruption induced by estradiol in estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cell lines, *Carcinogenesis*, 15, 1875-1879.
- (2) Ashby, J, K. Fletcher, C Williams, J Odum and H Tinwell (1997) Lack of activity of estradiol in rodent bone marrow micronucleus assays, *Mutat. Res.*, 395, 83-88.
- (3) Banduhn, N and G Obe (1985) Mutagenicity of methyl 2-benzimidazolecarbamate, diethylstilbestrol and estradiol: Structural chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, C-mitoses, polyploidies and micronuclei, *Mutat. Res.*, 156, 199-218.
- (4) Banerjee, SK, S Banerjee, SA Li and JJ Li (1994) Induction of chromosome aberrations in Syrian hamster renal cortical cells by various estrogens, *Mutat. Res.*, 311, 191-197.
- (5) Dhillon, VS, IK Dhillon (1995) Genotoxicity evaluation of estradiol, *Mutat. Res.*, 345, 87-95.
- (6) Drevon, C, C Piccoli and R Montesao (1981) Mutagenicity assays of estrogenic hormones in mammalian cells, *Mutat. Res.*, 89, 83-90.
- (7) Eckert, I and H Stopper (1996) Genotoxic effects induced by b-

- oestradiol in vitro, Toxicol. in vitro, 10, 637-642.
- (8) Forsberg, JG (1991) Estrogen effects on chromosome number and sister chromatid exchanges in uterine epithelial cells and kidney cells from neonatal mice, Teratog. Carcinog. Mutag., 11, 135-146.
 - (9) Hajek, RA, NT Van, DA Johnston and LA Jones (1993) in vivo induction of increased DNA ploidy of mouse cervicovaginal epithelium by neonatal estrogen treatment, Biol. Reprod., 49, 908-917.
 - (10) Han, X and JG Liehr (1994) DNA single-strand breaks in kidneys of Syrian hamsters treated with steroidal estrogens: Hormone-induced free radical damage preceding renal malignancy, Carcinogenesis, 15, 997-1000.
 - (11) Hayashi, N, K Hasegawa, A Komine, Y Tanaka, JA McLachlan, JC Barrett and T Tsutsui (1996) Estrogen-induced cell transformation and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells, Mol. Carcinogen., 16, 149-156.
 - (12) Hill, A and S Wolff (1983) Sister chromatid exchanges and cell division delays induced by diethylstilbestrol, estradiol, and estriol in human lymphocytes, Cancer Res., 43, 4114-4118.
 - (13) Hillbertz-Nilsson, K and J-G Forsberg (1985) Estrogen effects on sister chromatid exchanges in mouse uterine cervical and kidney cells, J. Natl Cancer Inst., 75, 575-580.
 - (14) Hodgson, AV, S Ayala-Torres, EB Thompson and J G Liehr (1998)
 - (15) Estrogen-induced microsatellite DNA alterations are associated with Syrian hamster kidney tumorigenesis, Carcinogenesis, 19, 2169-2172.
 - (16) IARC (1999) IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human, vol. 72, Hormonal contraception and post-menopausal hormonal therapy, Lyon, pp399-530.
 - (17) Ingerowski, GH, M Scheutwinkel-Reich and H-J Stan (1981) Mutagenicity studies on veterinary anabolic drugs with the *Salmonella*/microsome test, Mutat. Res., 91, 93-98.
 - (18) Kennedy, AR and RR Wiechselbaum (1981) Effects of 17 β -estradiol on radiation transformation in vitro; inhibition of effects by protease inhibitors, Carcinogenesis, 2, 67-69.
 - (19) Lang, R and U Redmann (1979) Non-mutagenicity of some sex hormones in the Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity test, Mutat. Res., 67, 361-365.
 - (20) Lang, R and R Reimann (1993) Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous steroids. I. Communication: Examination for the induction of gene mutations using the Ames *Salmonella*/microsome test and the HGPRT test in V79 cells, Environ. Mol. Mutagen., 21, 272-304.

- (21) Li, JJ, A Gonzalez, S Banerjee, SK Banerjee and SA Li (1993) Estrogen carcinogenesis in the hamster kidney: Role of cytotoxicity and cell proliferation, *Environ. Health Perspectives*, 101 (Suppl. 5), 259-264.
- (22) Liehr, JG, RH Purdy, JS Baran, EF Nutting, F Colton, E Randerath and K Randerath (1987) Correlation of aromatic hydroxylation of 11 β -substituted estrogens with morphological transformation in vitro but not with in vivo tumour induction by these hormones, *Cancer Res.*, 47, 2583-2588.
- (23) Morita, T, N Asano, T Awogi, YF Sasaki, S Sato, H Shimada, S Sutou, T Suzuki, A Wakata, T Sofuni and M Hayashi (1997) Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Groups 1, 2A and 2B): The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS·MMS, *Mutat. Res.*, 389, 3-122.
- (24) Pater, A, M Bayatpour and MM Pater (1990) Oncogenic transformation by human papilloma virus type 16 deoxyribonucleic acid in the presence of progesterone or progestins from oral contraceptive, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 162, 1099-1103.
- (25) Rajah TT and JT Pento (1995) The mutagenic potential of antiestrogens at the *hprt* locus in V79 cells, *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 89, 85-92.
- (26) Richold, M (1988) The genotoxicity of trenbolone, a synthetic steroid, *Arch. Toxicol.*, 61, 249-258.
- (27) Sato, Y, Y Sakakibara, T Oda, E Aizu-Yokota and K Ichinoseki (1992) Effect of estradiol and ethinylestradiol on microtubule distribution in Chinese hamster V79 cells, *Chem. Pharm. Bull.*, 40, 182-184.
- (28) Schnizler, R, J Foth, GH Degen and M Metzler (1994) Induction of micronuclei by stilbene-type and steroidal estrogens in Syrian hamster embryo and ovine seminal vesicle cells in vitro, *Mutat. Res.*, 311, 85-93.
- (29) Shelby, MD, RR Tice and KL Witt (1997) 17 β -Estradiol fails to induce micronuclei in the bone marrow cells of rodents, *Mutat. Res.*, 395, 89-90.
- (30) Sina, JF, CL Bean, GR Dysart, VI Taylor and MO Bradley (1983) Evaluation of the alkaline elution/rat hepatocyte assay as a predictor of carcinogenic/ mutagenic potential, *Mutat. Res.*, 113, 357-391.
- (31) Stenchever, MA, JA Jarvis and NK Kreger (1969) Effect of selected estrogens and progestins on human chromosomes in vitro, *Obster. Gynecol.*, 34, 249-252.
- (32) Swenberg, JA (1981) Utilization of the alkaline elution assay as a short-term test for chemical carcinogens. In: Stich, HF and RHC San

- eds., Short-term Tests for Chemical Carcinogens, New York, Springer-Verlag, pp. 48-58.
- (33) Telang, NT, A Suto, GY Wong, MP Osborne and HL Bradlow (1992) Induction by estrogen metabolite 16 α -hydroxyestrone of genotoxic damage and aberrant proliferation in mouse mammary epithelial cells, J. Natl Cancer Inst., 84, 634-638.
- (34) Thibodeau, PA, N Bissonnette, SK Bedard, D Hunting and B Paquette (1998) Induction by estrogens of methotrexate resistance in MCF-7 breast cancer cells, Carcinogenesis, 19, 1545-1552.
- (35) Tsutsui, T, N Suzuki, S Fukuda, M Sato, H Maizumi, JA McLacklan and JC Barrett (1987) 17 β -Estradiol-induced cell transformation and aneuploidy of Syrian hamster embryo cells in culture, Carcinogenesis, 8, 1715-1719.
- (36) Tsutsui, T, N Suzuki, H Maizumi and JC Barrett (1990) Aneuploidy induction I human fibroblasts: Comparison with results in Syrian hamster fibroblasts, Mutat. Res., 240, 241-249.
- (37) Tsutsui, T, S Taguchi, Y Tanaka and C Barrett (1997) 17 β -Estradiol, diethylstilbestrol, tamoxifen, toremifene and ICI 164,384 induce morphological transformation and aneuploidy in cultured Syrian hamster embryo cells, Int. J. Cancer, 70, 188-193.
- (38) Wheeler, WL, LM Cherry, T Downs and TC Hsu (1986) Mitotic inhibition and aneuploidy induction by naturally occurring and synthetic estrogens in Chinese hamster cells in vitro, Mutat. Res., 171, 31-41.
- (39) Yamafuji, K, S Iiyama and K Shinohara (1971) Mode of action of steroid hormones on deoxyribonucleic acid, Enzymology, 40, 259-264.

表 17β-エストロジオールの遺伝毒性

Test system	Result		Dose (LED or HID) ug/ml or mg/kg	Reference
	Without exogenous metabolic system	With exogenous metabolic system		
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA1537, TA1538, TA98, reverse mutation	-	-	2500 ug/plate	Lang & Redman (1979)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA1538, reverse mutation	-	-	500 ug/plate	Ingerowski et al. (1981)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA1537, TA1538, TA98, reverse mutation	-	-	500 ug/plate	Lang & Reimann (1993)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA1537, TA1538, TA98, reverse mutation	-	-	5000ug/plate	Richold (1988)
DNA strand breaks, cross-links or related damage, mouse brain DNA in vitro	(+)	NT	27.2	Yamafuji et al. (1971)
DNA strand breaks, cross-links or related damage, Chinese hamster V79 DNA in vitro	-	-	816	Swenberg (1981)
DNA single-strand breaks, rat hepatocytes in vitro	-	NT	82	Sina et al. (1983)
DNA repair exclusive of unscheduled DNA synthesis, female C57BL mouse mammary epithelial cells in vitro	-	NT	0.2	Telang et al. (1992)
Unscheduled DNA synthesis, Syrian hamster embryo cells in vitro	-	NT	10	Tsutsui et al. (1987)
Gene mutation, Chinese hamster lung V79 cells, hprt locus in vitro	-	-	27.2	Drevon et al. (1981)
Gene mutation, Chinese hamster lung V79 cells, ouabain in vitro	-	-	27.2	Drevon et al. (1981)
Gene mutation, Syrian hamster embryo cells, hprt and Na ⁺ /K ⁺ ATPase loci in vitro	-	NT	10	Tsutsui et al. (1987)
Gene mutation, Chinese hamster lung V79 cells, hprt locus in vitro	+	-	10 ⁻¹⁰ M	Rajah & Pento (1995)
Gene mutation, Mouse lymphoma L5178Y cells, tk locus in vitro	-	-	255, 174ug/ml	Richold (1988)
Gene mutation, human breast cancer MCF-7 cells, MTX ^r in vitro	+	-	10 ⁻⁸ M	Thibodeau et al. (1998)
Sister chromatid exchange, mouse cervical fibroblasts and kidney cells in vitro	-	NT	2.7	Hillbertz-Nilsson & Rorsberg (1985)
Sister chromatid exchange, Syrian hamste embryo cells in vitro	-	NT	10	Tsutsui et al. (1987)
Micronucleus formation, Syrian hamster embryo cells in vitro	+++	NT	2.72	Schnitzler et al. (1994)
Micronucleus formation, Chinese hamster lung V79 cells in vitro	+++	NT	20x10 ⁻⁶ M	Eckert and Stopper (1996)
Micronucleus formation, ovine seminal vesicle cells in vitro	+++	NT	2.72	Schnitzler et al. (1994)
Chromosomal aberration, Syrian hamster embryo cells in vitro	-	NT	10	Tsutsui et al. (1987)
Chromosomal aberration, Syrian hamster embryo cells in vitro	-	NT	8.17	Tsutsui et al. (1987)
Chromosomal aberrations, Chinese hamster lung V79 cells in vitro	+	NT	3x10 ⁻⁵ M	Sato et al (1992)
Aneuploidy, male Chinese hamster DON cells in vitro	+	NT	13.6	Wheeler et al. (1986)

Test system	Result		Dose (LED or HID) ug/ml or mg/kg	Reference
	Without exogenous metabolic system	With exogenous metabolic system		
Aneuploidy, Syrian hamster embryo cells in vitro	+	NT	10	Tsutsui et al. (1987, 1990)
Aneuploidy, Syrian hamster embryo cells in vitro	+	NT	0.82	Tsutsui et al. (1997)
Cell transformation, BALB/c3T3 embryo-derived mouse fibroblasts	+	NT	5.5	Liehr et al. (1987a)
Cell transformation, C3H 10T1/2 mouse cells	+	NT	0.27	Kennedy & Weichselbaum (1981)
Cell transformation, Syrian hamster embryo cells	+	NT	3	Tsutsui et al. (1987)
Cell transformation, Syrian hamster embryo cells	NT	+	3	Hayashi et al. (1996)
Cell transformation, Syrian hamster embryo cells	+	NT	2.72	Tsutsui et al. (1997)
Cell transformation, female C57BL mouse mammary epithelial cells	-	NT	0.2	Telang et al. (1992)
Cell transformation, primary baby rat kidney + HPV16 + ras	-	NT	0.27	Pater et al. (1990)
Sister chromatid exchange, human lymphocytes in vitro	-	NT	13.6	Hill & Wolff (1983)
Sister chromatid exchange, human lymphocytes in vitro	-	-	27.2	Banduhn & Obe (1985)
Micronucleus formation, human lymphocytes in vitro	+	NT	1.3	Banduhn & Obe (1985)
Chromosomal aberration, human lymphocytes in vitro	-	NT	100	Stenchever et al. (1969)
Chromosomal aberration, human lymphocytes in vitro	-	-	27.2	Banduhn & Obe (1985)
Aneuploidy, human lymphocytes in vitro	(+)	NT	13.6	Banduhn & Obe (1985)
Aneuploidy, human foreskin JHU-1 fibroblasts in vitro	+	NT	20	Tsutsui et al. (1990)
Microtubule disruption, human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells, MTXr in vitro	+	+	50 uM	Aizu-Yokota et al. (1994)
DNA strand breaks, cross-links or related damage, male Syrian hamster kidney and liver in vivo	(+)		22.5 mg impxl, 2wk	Han & Liehr (1994)
DNA strand breaks, cross-links or related damage, male Syrian hamster kidney in vivo	+		250 mg/d impxl, 7d	Han & Liehr (1994)
DNA strand breaks, cross-links or related damage, male Syrian hamster liver in vivo	-		250 mg/d impxl, 7d	Han & Liehr (1994)
DNA strand breaks, cross-links or related damage, male Syrian hamster kidney and liver in vivo	-		150 ipxl	Han & Liehr (1994)
Sister chromatid exchange, female NMRI mouse uterine cervix and uterine horn epithelial cells in vivo	+		5 ug scxl	Forsberg (1991)
Sister chromatid exchange, female NMRI kidney cells in vivo	-		5 ug scxl	Forsberg (1991)
Chromosomal aberrations, male Syrian hamster renal cortical cells in vivo	+		125 ug/d impxl, 5 ml	Banerjee et al. (1994)
Chromosomal aberrations, Rat bone marrow and spermatogonia in vivo	-		100mg/kg	Richold (1988)

Test system	Result		Dose* (LED or HID) ug/ml or mg/kg	Reference
	Without exogenous metabolic system	With exogenous metabolic system		
Micronucleus formation, B6C3F1 mouse and F344 rat bone marrow, <i>in vivo</i>	-	-	1250 mg/kg	Shelby et al. (1997)
Micronucleus formation, CBA mouse bone marrow, <i>in vivo</i>	-	-	0.02 mg/kg	Ashby et al. (1997)
Micronucleus formation, AP rat bone marrow, <i>in vivo</i>	-	-	150 mg/kg	Ashby et al. (1997)
Micronucleus formation, BDF1 & CD-1 mouse peripheral blood, <i>in vivo</i>	-	-	2000mg/kg	Morita et al. (1997)
Micronucleus formation, Swiss albino mouse bone marrow, <i>in vivo</i>	+	+	0.1mg/kg	Dhillon & Dhillon (1995)
Microsatellite instability, Syrian hamster, estrogen induced kidney tumor cells,	+	+	25 mg, impx2, 6mo	Hodgson et al. (1998)
Aneuploidy, female NMRI mouse uterine cervix and uterine horn epithelial cells <i>in vivo</i>	-	-	5 ug scx1	Forsberg (1991)
Aneuploidy, female NMRI mouse kidney cells <i>in vivo</i>	-	-	5 ug scx1	Forsberg (1991)
Aneuploidy, male Syrian hamster renal tubular cells <i>in vivo</i>	+	+	20 mg impx1, 3.5 mo	Li et al. (1993)
Increase in nuclear DNA content (aneuploidy), female BALB/c mouse cervicovaginal epithelium <i>in vivo</i>	+	+	25 ug scx5	Hajek et al. (1993)

IARC (1999)を一部改変, 追加

*結果が陽性の場合には最小有効用量(LED)を, 結果が陰性の場合には最大無作用量(HID)を示す

**動原体を持つ小核が41-73%出現している

4 エストラジオール-17 β のDNA障害

厚生科学研究
「畜産食品中残留ホルモンの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：若林敬二(国立がんセンター研究所 がん予防研究部)

1 エストラジオール-17 β によるDNA付加体形成について

Cavalieri et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 10937-10942 (1999) Estradiol (E2)はP-450により代謝されて2-OHE2及び4-OHE2になる。これが更に代謝活性化等をうけて、E2-2,3-quinone, E2-3,4-quinoneに変換される。これらカテコールキノンがDNAと反応して、付加体を形成するが、2,3-quinoneより生成される付加体(dAやdGと結合する)は安定であり、3,4-quinoneより生成する付加体(4-OHE2-1(a,b)-N7Gua)は不安定でdepurinateする。このために生じたapurinic siteがmutationを引き起こし、細胞のがん性変化を誘発すると考えられる。

本論文では、この不安定なN7Gua adductをcatechol estrogen-3,4-quinone又は4-OHE2をP-450やパーオキシゲナーゼ等により活性化させてDNAと反応させ、in vitroで4-OHE2-1(a,b)-N7Guaが生成されることを確認した。又、SDラットの乳腺にE2-3,4-quinone及び4-OHE2を投与して、生体内においてもN7Gua adductが生成していることを明らかにした。

・Cao et al., Chem. Res. Toxicol., 11, 917-924 (1998)

参考文献

- (1)Cavalieri, E. L., Stack, D. E., Devanesan, P. D., Todorovic, R., Dwivedy, I., Higginbotham, S., Johansson, S. L., Patil, K. D., Gross, M. L., Gooden, J. K., Ramanathan, R., Cerny, R. L. and Rogan, E. G., Molecular origin of cancer: Catechol estrogen-3, 4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10937-10942(1997).
- (2)Roy, D. and Liehr, J. G., Estrogen, DNA damage and mutations. *Mutat. Res.*, **424**, 107-115 (1999).
- (3)Yu, F. L., Zheng, W. Y., Wang, M. Y., Bender, W., Cheerva, A. and Miller, J., The effect of 17 β -estradiol-DNA adducts on the replication of exon #5 of the human suppressor gene p53. *FEBS Letters*, **454**, 7-10 (1999).
- (4)Jankowiak, R., Zamzow, D., Stack, D. E., Todorovic, R., Cavalieri, E. L. and Small, G. J., Spectral characterization of fluorescently labeled catechol estrogen 3,4-quinone-derived N7 guanine adducts and their

identification in rat mammary gland tissue. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1339-1345 (1998).

- (5) Cao, K., Devanesan, P.D., Ramanathan, R., Gross, M.L., Rogan, E.G. and Cavalieri, E.L., Covalent binding of catechol estrogens to glutathione catalyzed by horseradish peroxidase, lactoperoxidase, or rat liver microsomes. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 917-924 (1998).

2 エストラジオール-17 β による 8-OH-dG 生成について

- Han et al., *Cancer Res.*, 54, 5515-5517 (1994)

エストラジオールを雄シリアンハムスターに投与すると、腎臓に腫瘍が誘発される。そこで、50 mg/kg のエストラジオールをハムスターに投与すると、4 時間後に腎臓の 8-OH-dG 生成量はコントロールの 2 倍になった。肝臓においては、100 mg/kg のエストラジオールを投与した場合に 1-2 時間後にコントロールの 4 倍になることがわかった。更に、25 mg のエストラジオールを含むミニポンプを皮下に挿入して、3 日間化合物をハムスターに投与した際には、腎臓中の 8-OH-dG 量がコントロールに比較して 50% 上昇することがわかった。

参考文献

- (6) Mobley, J.A., Bhat, A.S. and Brueggemeier R.W., Measurement of oxidative DNA damage by catechol estrogens and analogues in vitro. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 270-277 (1999).
- (7) Han, X. and Liehr, J.G., Microsome-mediated 8-hydroxylation of guanine bases of DNA by steroid estrogens: correlation of DNA damage by free radicals with metabolic activation to quinones. *Carcinogenesis*, 16, 2571-2574 (1995).
- (8) Han, X. and Liehr, J.G., 8-Hydroxylation of guanine bases in kidney and liver DNA of hamsters treated with estradiol: Role of free radicals in estrogen-induced carcinogenesis. *Cancer Res.*, 54, 5515-5517 (1994).

3 補遺 1. MeIQx 投与量と DNA 付加体生成、8-OHG 生成、GST-P-positive foci 及び肝発がん性との相関性

MeIQx の発がん性が認められた濃度 (400 ppm) とその濃度の 1/10 (40 ppm) ~ 1/1,000 (0.4 ppm) 量の MeIQx を餌に混ぜて F344 雄ラットに 1 週間投与した。ラットの肝臓より DNA を分離し、生成した DNA 付加体を 32P-ポストラベル法で調べた。0.4, 4, 40 及び 400 ppm MeIQx 投与による DNA 付加体生成量は、各々、 10^7 nucleotide 当たり 0.04, 0.28, 3.36 及び 39.0 であった。MeIQx-DNA 付加体は発がん濃度の 1/1,000 量の投与によっても

認められ、DNA 付加体と MeIQx 投与量との間には直線関係があることがわかった(1)。さらに、Turteltaub 等は accelerator mass spectrometry を用い 0.4 ppm よりもさらに 4000 倍の低濃度の MeIQx 投与によっても、マウス及びラットの肝臓に DNA 付加体が生成することを報告している(2, 3)。このことは、MeIQx による DNA 付加体生成には閾値がなく、たとえ低濃度の曝露でもヒト体内の DNA に付加体が生成することを示唆するものである。事実、ヒトの組織の DNA 中に MeIQx-DNA 付加体が検出されている(4, 5)。

一方、F344 雄ラットに 0.05, 0.2, 0.8, 3.2, 12.5, 50 及び 200 ppm MeIQx を含む飼料を 1 週間投与した後、肝臓中の 8-OHG レベルを調べた。その結果、8-OHG は用量依存的に増加することがわかった。そのレベルはコントロールが 10^5 dG 当たり 0.24 であるのに対し、0.05, 0.2, 0.8, 3.2, 12.5, 50, 200 ppm 投与群では、各々、 10^5 dG 当たり 0.25, 0.31, 0.56, 1.01, 2.43, 3.49, 10.84 であった(6)。

次に、0.001~100 ppm MeIQx を含む飼料を 21 日齢雄 F344 に 16 週間投与し、肝臓の GST-P-positive foci の生成を調べた。その結果、10 及び 100 ppm MeIQx の投与では GST-P-positive foci の生成増加が認められたのに対し、0.001~1 ppm の濃度ではその上昇は認められなかった(7)。

さらに、100, 200 及び 400 ppm MeIQx を F344 雄ラットに 56 週間投与し、その肝発がん性を検討した。その結果、HCC の発生率は 100, 200 及び 400 ppm で各々 0, 45 及び 94 % であった。尚、100 ppm 投与群の adenoma の発生率は 17% であった(8)。

以上のごとく、種々の濃度の MeIQx を投与すると、肝臓における DNA 付加体及び 8-OHG 生成は用量依存的に増加した。一方、MeIQx 投与量と GST-P-positive foci 発生及び肝発がん性との間には直線的な相関性は無いことがわかった。

参考文献

- (1) Yamashita K., Adachi M., Kato S., Nakagama H., Ochiai M., Wakabayashi K., Sato S., Nagao M. and Sugimura T. (1990) DNA adducts formed by 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in rat liver: dose-response on chronic administration. *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 470-476.
- (2) Turteltaub KW, Felton JS, Gledhill BL, Vogel JS, Southon JR, Caffee MW, Finkel RC, Nelson DE, Proctor ID, Davis JC. (1990) Accelerator mass spectrometry in biomedical dosimetry: relationship between low-level exposure and covalent binding of heterocyclic amine carcinogens to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**, 5288-5292.
- (3) Frantz CE, Bangert C, Fultz E, Mayer KM, Vogel JS, Turteltaub KW. (1995) Dose-response studies of MeIQx in rat liver and liver DNA at low doses. *Carcinogenesis*, **16**, 367-373.
- (4) Totsuka Y, Fukutome K, Takahashi M, Takahashi S, Tada A, Sugimura T, Wakabayashi K (1996) Presence of N²-(deoxyguanosin-8-yl)-2-

- amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]-quinoxaline (dG-C8-MeIQx) in human tissues. *Carcinogenesis*, **5**, 1029-1034.
- (5) Mauthe RJ, Dingley KH, Leveson SH, Freeman SP, Turesky RJ, Garner RC, Turteltaub KW. (1999) Comparison of DNA-adduct and tissue-available dose levels of MeIQx in human and rodent colon following administration of a very low dose. *Int J Cancer*. **80**, 539-545.
- (6) Kato T, Hasegawa R, Nakae D, Hirose M, Yaono M, Cui L, Kobayashi Y, Konishi Y, Ito N, Shirai T. (1996) Dose-dependent induction of 8-hydroxyguanine and preneoplastic foci in rat liver by a food-derived carcinogen, 2-amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-*f*]quinoxaline, at low dose levels. *Jpn J Cancer Res.*, **87**, 127-133.
- (7) Fukushima S, (1999) Low-dose carcinogenicity of a heterocyclic amine, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline: relevance to risk assessment., *Cancer Lett.*, **143**, 157-159.
- (8) Kushida H, Wakabayashi K, Sato H, Katami M, Kurosaka R, Nagao M. (1994) Dose-response study of MeIQx carcinogenicity in F344 male rats. *Cancer Lett.*, **83**, 31-35.

5 エストラジオール-17 β の生体影響メカニズム

厚生科学研究「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：菅野純（国立医薬品食品衛生研究所）
研究協力者：伊藤明弘（広島大学原爆放射能医学研究所）

1. はじめに

エストロゲンの生物学的影響は、便宜上、生理的作用と有害効果の二つに大別して考えることが出来る。エストラジオール-17 β (E₂) の胎児期及び出生前後での生理的作用としては、性の分化、脳の発達、性腺機能の決定など器官形成とそれらの機能発現に重要な役割を演じていることが挙げられる。これらの機構を発現するためには、母胎、胎児、性腺、副腎、脳などで合成されるステロイドが 10⁻¹²g/ml 前後の濃度で機能を発揮すると考えられる。これは、E₂ 依存性培養細胞を用いた研究において 10⁻¹²~10⁻⁹g/ml の範囲で細胞増殖活性を示すことから支持される。これに対し、従来の毒性評価法により検出されている有害効果は、本報告書全体の科学的知見の中に詳述されている発がん性、遺伝毒性、生殖毒性、催奇形性などに当たるが、これらの効果は、E₂ の血中濃度がほぼ 10⁻⁹g/ml 以上で認められている。

2. エストラジオール-17 β (E₂) の代謝と作用発現

エストラジオール-17 β (E₂) は 18 個の carbon を有し、ヒトや多くの哺乳類に対し最も強力な天然型エストロゲンである。卵胞より分泌され、細胞の分化、増殖に影響し、エストロゲン受容体 α (ER α)、 β (ER β) と結合して、その効果を示すことが知られている。これら受容体蛋白は $\alpha\alpha$ 或いは $\beta\beta$ ($\alpha\beta$ も少なくとも試験管内では形成される) の 2 量体を形成し、その乖離係数は 0.1~1.0nM にある。芳香性 A-環と 3-OH がリガンド結合活性をもち、受容体の活性化を行う最も重要な部位である。E₂ の代謝産物の多くは ER α との結合能を大幅に減弱しているが、2-OH-E₂、4-OH-E₂ 体は E₂ に比べてそれぞれ 100 と 150% の ER α との結合能を有している。

薬理代謝：牛に E₂ を投与する場合、estradiol benzoate として耳の皮下部分に投与する。これらは体内で直ちに E₂ に変換され、内因性 E₂ と区別出来なくなる。血中 E₂ の増加に伴い、下垂体より成長ホルモン(GH)の分泌が増加する。体内での代謝物として、筋肉内でその多くは 17 α -E₂ として、或いは E₁ として存在する。脂肪組織内でもほぼ同様の結果が得られている。肝、腎での代謝産物が最も多く、それらは 17 α -E₂、17 α -E₂ グルクロナイド、E₂、E₁ などである。ヒトの体内で見いだされている 2-OH、4-OH、16 α -OH-E₂ などは牛との共通代謝産物と考えられているが、未だに定量的データは報告されていない。

ヒトの体内では C-1, C-2, C-3, C-4, C-6, C-7, C-11, C-14, C-15, C-16, C-18 の carbon を含んだ部位で酸化反応が起こる。血中や尿中で最も多く

見いだされるのは2-水酸化代謝産物である。肝はエストロゲン代謝の中心臓器であり、P4501A2、P4503A3、P4503A4 などにより 2- α 、16- α の水酸化が行われる。4-水酸化物は、少量しか代謝されないが、E₂バランスの重要な役割を占めている。肉や肉製品にかかわる E₁、エストラジオール-17 β の吸収、分解、排泄に関する情報は全く示されていない。2mg 経口投与された 17 β -E₂ の 20%は吸収され、血中半減期は2~16 時間とされている。

3. E₂の細胞内動態とそのメカニズム

(1) 受容体を介するシステム

ジェンセン、ジャコブソンらにより 1960 年代に発表されたトリチウム標識 E₂ の子宮内膜でのオートラジオグラフィによって標的細胞における E₂ の局在性が検出され、その所見が、ER 受容体研究の幕開けとなった。その後、ER の存在をめぐって、下垂体、肝、乳腺、子宮などで生化学的、形態学的研究が発表され、細胞質内あるいは核内受容体として認識されるようになった。このように、従来より知られていたペプチドホルモンなどの細胞膜受容体と異なった存在様式が示されたが、それはステロイドホルモンが脂溶性であるため細胞膜のリン脂質を介して容易に膜を通過する事からも支持されている。現在では核内受容体の分子構造の決定と cloning が行われ、その遺伝子配列も明らかにされている。その結果、E₂ 受容体は他のステロイドホルモンである progesterone, glucocorticoid hormone などの受容体と共通の DNA 結合ドメインを有し、生物学的結合部位が各ホルモン特有の遺伝子構造を有することも明らかとされた。

図 1. 核受容体スーパーファミリーのドメイン構造

A/B	C	D	E	F
-----	---	---	---	---

受容体スーパーファミリーの分子構造は、アミノ酸配列の相関性と機能から6つのドメイン (A-F) に区分される (図 1)。A/B domain は各々ステロイドホルモンのアミノ酸配列が最も異なる部位で、転写活性化 (AF-1) や細胞特異的効果の発現にあずかる。C domain は塩基配列を認識し、標的遺伝子への特異的な結合にあずかり、受容体の 2 量体形式反応にも関与する。D domain は蝶番 (hinge) 構造をとり、高次構造の変換部位となる。甲状腺ホルモン受容体 (TR) やレチノイン酸受容体 (RAR, RXR) では転写抑制にもあづかる。E/F domain はリガンドとの結合、2 量体の形成 (homo-dimer)、転写制御 (AF-2)、そして核内移行と多機能性領域を構成する。受容体はホルモン分子の 100 倍の大きさを有することも明らかとなった。

(2) 受容体を介さない影響

先に触れた如く、ステロイドホルモンはステロイド環を骨格の中心にもち、水溶性ペプチドホルモンと異なって、脂溶性である。血中にあるのは、その多くは serum globulin binding protein (SGBP) 及びアルブミンと結合した状態

で存在し、10%以下が free の estrogen として存在することが明らかにされている。その標的臓器は、脳、肝などの主要臓器、ほとんどの内分泌系臓器、あるいは皮膚などであるが、その全貌は未だ明らかにされていない。(1) で述べた受容体を介したシグナル伝達は、ホルモン作用発現の機序としては、充分説明可能であるが、E₂の有する細胞障害性、変異原性など生体に対する有害影響のメカニズムについては十分な説明されていない。E₂やその水酸化代謝物による DNA adduct の形成、Free radical の発生などは受容体を介さず、直接細胞構成生体分子との結合によりもたらされると考えられる。

以前は DES と異なり E₂自身の genotoxicity や mutagenicity は推測の域を出ていなかった。しかし、近年の多くの分子生物学的手法の導入により、例えば腫瘍化の一つの指標である microsatellite instability、更には水酸化 E₂による乳腺での DNA 付加体の形成、細胞質内微小管の変性の誘導、DNA の single strand 切断などの現象が明らかとなり、少数の動物実験のデータと併せ考えると、現在では E₂がイニシエーション及びプロモーションの両面の作用を有していると考えられる。

4. 受容体の分子生物学

ジェンセンとゴルスキーは、受容体の存在が示唆された 10 年後に始めて実験的に受容体の構造を明らかにした。その最初のもは、17 β -estradiol に対する受容体であり、続いてテストステロン、プロゲステロン、グルコ・コルチコイド、甲状腺ホルモン、ビタミン D、レチノイドなどであり、これらは核内受容体のファミリーを構成していた。続いて、これらの核受容体の生理的制御を行う co-regulators (共役因子群) の存在が明らかとなった。

遺伝子操作手技の発達に伴い、ステロイドレセプター・スーパーファミリー遺伝子に対する改変導入実験が行われ、受容体欠失動物による機能解析が行われるに至った。最初にエストロゲン受容体欠失マウスが作製されたとき、エストロゲン受容体は、エストロゲン標的組織において広く分布してその生物活性の first messenger の役割を果たす唯一の分子であるとして認識されていたため、ホモ欠失個体は生まれてこないものと予想されていた。しかし、予想に反し、成獣にまで生育するホモ欠失個体が得られた (不妊ではあるが)。1996 年に至り、複数の研究室より第二の ER 受容体の存在が示され、その結果、古典的 ER が ER α 、新規の ER が ER β と呼ばれることとなった。

ER α は約 9 つのエクソンから成る約 6.3kb の転写産物であり、マウスの場合 599 個のアミノ酸配列よりなる 66kDa の分子量を有する。

ヒト、ラットではややアミノ酸数が異なっている。マウスでは chr#10 に存在し、ヒトでは chr#6 に存在する。これら ER α は多くの組織や細胞で変異株がみられており、腫瘍組織では突然変異種も観察されている。

一方、ER β は 485 のアミノ酸より成り、約 54kDa の分子量を有するもので ER α よりやや小さい構造を示している。その差は N-末の部位のアミノ酸構造がやや小さくなっていることによる。ER α 欠失マウス、ER β 欠失マウスおよび ER α ER β 重複欠失マウスが作出されている。