

厚生労働科学研究費補助金
食品・化学物質安全総合研究事業

内分泌かく乱物質と大豆等既存食品の発育・癌化及び
内分泌かく乱作用の比較

平成14年度 総括・分担研究報告書

- 主任研究者 螺良 愛郎 (関西医科大学病理学第二講座)
分担研究者 堀 伸二郎 (大阪府立公衆衛生研究所食品化学課)
山田 久夫 (関西医科大学解剖学第一講座)
西山 利正 (関西医科大学公衆衛生学講座)
今井 俊介 (奈良県保健環境研究センター)
茶山 和敏 (静岡大学農学部応用生物化学科)

平成15 (2003) 年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 内分泌かく乱物質と大豆等既存食品の発育・癌化及び ----- 1
内分泌かく乱作用の比較
主任研究者 螺良 愛郎 関西医科大学病理学第二講座 教授

II. 分担研究報告

1. 酵母Two-Hybrid法を用いた植物エストロゲン及び ----- 11
生活関連製品に由来する化学物質のエストロゲン様作用の評価
分担研究者 堀 伸二郎 大阪府立公衆衛生研究所 課長
研究協力者 北川 陽子 大阪府立公衆衛生研究所 研究員
高取 聡 大阪府立公衆衛生研究所 研究員
2. 子宮肥大試験を用いた内分泌かく乱化学物質および ----- 21
植物エストロゲンのエストロゲン活性の比較
分担研究者 茶山 和敏 静岡大学農学部 助教授
3. 植物由来内分泌かく乱物質のラット周生期暴露による ----- 37
発育・発癌および内分泌かく乱作用の比較
主任研究者 螺良 愛郎 関西医科大学病理学第二講座 教授
研究協力者 斐 仁正 関西医科大学病理学第二講座 専攻生
二階堂 泰資 関西医科大学病理学第二講座 研究生
佐藤 睦哉 関西医科大学病理学第二講座 研究生
4. 妊娠中に暴露した植物由来エストロゲン様物質の ----- 56
出生子の男性生殖器や中枢神経系に及ぼす影響
分担研究者 山田 久夫 関西医科大学解剖学第一講座 教授
研究協力者 片岡 洋祐 関西医科大学解剖学第一講座 講師
井岡 真基 関西医科大学（博士課程・外科系）大学院生

5. 内分泌かく乱物質の高速液体クロマトグラフ (HPLC)	-----	72
による高感度分析法の確立		
分担研究者	今井 俊介	奈良県保健環境研究センター 所長
協力研究者	北田 善三	同上 食品担当統括主任研究員
	大前 壽子	同上 食品担当主任研究員
6. 輸入果実を使用されている防カビ剤の実際	-----	83
分担研究者	西山 利正	関西医科大学公衆衛生学講座 教授
研究協力者	佐々木 真理	関西医科大学公衆衛生学講座 院生
	神田 靖士	関西医科大学公衆衛生学講座 助手
	福永 健治	関西医科大学公衆衛生学講座 助教授
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	93

総括研究報告書

内分泌かく乱物質と大豆等既存食品の発育・癌化及び内分泌かく乱作用の比較

主任研究者 螺良 愛郎 関西医科大学 病理学第二講座 教授

研究要旨

本年度の研究では、大豆等既存食品に由来する天然内分泌かく乱物質について、食品用器材等に含まれる合成内分泌かく乱物質と発育や内分泌かく乱作用を比較する。また、内分泌かく乱物質は、成体においては可逆的に作用するが、機能・形態形成期では不可逆的に作用して重大な結果を招来するおそれがあることから、植物由来の内分泌かく乱物質に的をしぼり、これら物質の内分泌系ならびに神経系に対する機能ならびに形態的変化を解析した。かつ、発癌に対する影響についても言及する。これら内分泌かく乱物質の母児移行の実態把握は重要である。乳汁中の内分泌かく乱物質の高感度測定法を確立したので提示する。さらに、我々の生活環境中の化学物質として輸入果実にのみ使用が認められている防カビ剤の存在を明らかにした。以下に研究結果の概要を示す。

研究結果の概要

1. 酵母 Two-Hybrid 法を用いた植物エストロゲン及び生活関連製品に由来する化学物質のエストロゲン様作用の評価

酵母 Two-Hybrid 法を用いて、食品関連物質を主とした化学物質のエストロゲン様作用の評価を行った。Estradiol-17 β の 10%作用濃度 (EC₁₀) は、8.2 $\times 10^{-10}$ M であったのに対し、食品関連化学物質として、Genistein、Resveratrol、Daizein 及び Zearalenone 等についてエストロゲン様作用の評価を行ったところ、測定化学物質の中で Zearalenone が最も強い女性ホルモン様作用を示した (EC₁₀ : 1.7 $\times 10^{-7}$ M)。植物エストロゲンの中では、Genistein に作用が認められたが (EC₁₀ : 2.7 $\times 10^{-6}$ M)、構造の類似した Daizein には、作用が認められなかった。なお、Resveratrol の EC₁₀ は >3 $\times 10^{-4}$ であった。Bisphenol A (EC₁₀ : 2.3 $\times 10^{-5}$) をはじめとした合成エストロゲン様化学物質に比し、天然の mycoestrogen である Zearalenone や phytoestrogen である Genistein に強い活性をみた。

2. 子宮肥大試験を用いた内分泌かく乱化学物質および植物エストロゲンのエストロゲン活性の比較

Estradiol-17 β および DES は 100 ng/kg/day の投与でコントロール群と比較して有意な子宮肥大が見られた。Bisphenol A の投与では 10 mg/kg/day 投与群で有意な増加を示した。Resveratrol 2 mg/kg/day 投与群では増大傾向を示した。Genistein は 50 mg/kg/day 投与群で有意な子宮重量の増加が見られた。これら 3 種類の植物性内分泌かく乱物質のエストロゲン活性は DES および Estradiol-17 β と比較して非常に弱く、Bisphenol A で約 1/10 万、Resveratrol で約 1/5 万、Genistein は約 1/50 万以下であることが示唆された。さらに、体内のエストロゲンと環境ホルモン物質の相互作用を調べることを目的として、子宮重量に影響しない植物性内分泌かく乱物質と Estradiol-17 β を組み合わせて投与する実験を行った。

その結果、子宮重量は Estradiol-17 β と Resveratrol の組み合わせで有意な増加が見られ、Genistein でも同様の傾向が起きることが明らかとなった。Estradiol-17 β と植物エストロゲンは単独でエストロゲン活性が見られない濃度でも、組み合わせることによって相乗的にエストロゲン活性が増加することが判明した。

3. 植物由来内分泌かく乱物質のラット周生期暴露による発育・発癌および内分泌かく乱作用の比較

ラットに対して、妊娠 15-19 日、あるいは生後 15-19 日に連日被験物質 (Resveratrol、Zearalenone、Genistein) を皮下投与し、雌乳仔に対して膈開口や性周期をみるとともに、雌性生殖器や乳腺の発育を形態的に比較した。さらに、50 mg/kg N-methyl-N-nitrosourea (MNU) の単回腹腔内投与による Genistein の乳癌発生への影響を比較した。投与量として、Genistein は 1.5 と 30 mg/kg/day、Resveratrol は 10 と 100 mg/kg/day、Zearalenone は 0.1 と 10 mg/kg/day とした。天然エストロゲンは発育期 (Zearalenone、Genistein : 28 日齢、Resveratrol : 49 日齢) の雌ラットの生殖器や乳腺に形態的变化は惹起しなかったが、膈開口や 8 週齢以降の性周期よりみると、機能的に内分泌かく乱作用を呈した。特に Zearalenone に顕著な作用をみた。また、Genistein の出生前期/思春期前期暴露とともに乳癌を抑制したが、思春期前期の少量暴露により有意な抑制をみた。

4. 妊娠中に暴露した植物由来エストロゲン様物質の出生仔の男性生殖器や中枢神経系に及ぼす影響

Genistein を Sprague-Dawley ラットの皮下に妊娠 16 日目から 24 時間ごとに 5 回、少量 (1.5 mg/kg) および大量 (30 mg/kg) 投与した。65 日齢の出生雄ラットの体重は大量投与群 (平均 250 \pm 10.0g) ではコントロール群 (平均 265 \pm 29.5g) に比べ、低体重傾向であり、精巣重量はコントロール群では左右の計が平均 2.87 \pm 0.11g、少量投与群では 2.64 \pm 0.17g で、少量投与群がコントロール群に比し統計的有意差 ($p=0.0171$) を有して減少していた。また、性的異型核のひとつである青斑核そのものと青斑核付近の副核・亜核ごとのカテコロールアミンニューロンの数を計測した。青斑核とその腹側核を中心とする A6 ニューロン群で、雄では少量投与で増加 (雌化) 傾向、大量投与では逆に減少、雌では減少 (雄化) の傾向をみとめた。青斑核内でも A4 群に属するニューロングループでは雌雄とも暴露群で減少する傾向をみた。Genistein は男性生殖器に作用するとともに脳にも作用を発現する。

5. 内分泌かく乱物質の高速液体クロマトグラフ (HPLC) による高感度分析法の確立

マウスの乳汁 0.1~0.5 g を 50 $^{\circ}$ C 水浴上 3 ml の精製水に溶解した後、超音波を 5 分間照射して均一にした。この溶液を、あらかじめメタノール、精製水それぞれ 5 ml でコンディショニングした ISOLUTE Multimode カートリッジに負荷し、精製水 5 ml、25%メタノール溶液 3 ml で洗浄した後、メタノール 3 ml で溶出した。この溶出液を窒素気流下で溶媒留去した後、HPLC 移動相 1 ml を加えた。次いで、超音波を 5 分間照射した後、0.45 μ m フィルターでろ過し、ろ液に蛍光灯を 2 時間照射し、これを試験溶液とした。HPLC のカラムとして Inertsil ODS-3V を使い、移動相にリン酸-カリウム溶液とメタノールの混合溶液を用いたとき 3 物質 (Bisphenol A、Genistein 及び Resveratrol) が良好に分離できた。また、検出器として ECD を用いたところ他の検出器に比べて大幅に高感度分析が可能になり、標準溶液における検出限界は、50 μ l 注入で 0.2 ng/ml (10 pg) であった。さらに、試験溶液の調製には、ISOLUTE Multimode カートリッジが良好な精製効果を示した。

6. 輸入果実に使用されている防カビ剤の実際

防カビ剤として用いられる OPP (オルトフェニルフェノール)、DP (ジフェニール)、TBZ (チアベンダゾール) の3項目について、市販の輸入柑橘類について外果皮と果肉に分けて逆相高速液体クロマトグラフィーにて定量を行った。DP はすべての検体から検出できなかった。OPP はオレンジ2商品の外果皮から 0.00002 および 0.00004 g/kg、レモン1商品から 0.00005 g/kg 検出したが、その他の商検体からは検出出来なかった。TBZ は外果皮からはオレンジ1商品 (0.00015 g/kg)、グレープフルーツ2商品 (0.00075、0.0005 g/kg) で検出したが、果肉からは検出されなかった。以上の結果から、市販の輸入柑橘類には防カビ剤が使われていることがわかった。

分担研究者

堀 伸二郎 大阪府立公衆衛生研究所
課長
山田 久夫 関西医科大学 教授
西山 利正 関西医科大学 教授
今井 俊介 奈良県保健環境研究
センター 所長
茶山 和敏 静岡大学農学部 助教授

A. 研究目的

1. 酵母 Two-Hybrid 法を用いた植物エストロゲン及び生活関連製品に由来する化学物質のエストロゲン様作用の評価

内分泌かく乱作用を呈する化学物質には環境ホルモンとして世間の耳目を集めている合成化学物質があるとともに、phytoestrogen や mycoestrogen といわれる天然エストロゲンが存在する。しかし、それぞれのエストロゲン活性を比較した報告はない。そこで、酵母 Two-Hybrid 法を用いて、食品関連物質を主とした化学物質のエストロゲン様作用の評価を行い、合成エストロゲンとのエストロゲン活性を比較した。

2. 子宮肥大試験を用いた内分泌かく乱化学物質および植物エストロゲンのエストロゲン活性の比較

これまでの研究で、DES などの合成エストロゲンや Bisphenol A などの化学物質が内分泌かく乱化学物質 (環境ホルモン物質) として生体、特に内分泌器官の機能に悪影響を与えることが報告されている。一方、Genistein、Resveratrol などの植物エストロ

ゲンに関しては、エストロゲン様作用が弱く、環境ホルモン物質とは逆に生殖器官などの発癌抑制等の生体機能の改善作用を有することを示唆する報告も見られる。これまでの植物エストロゲンも含めた環境ホルモン物質の生体に対する影響の研究では、個々の物質をエストロゲンと比較して調べており、同一条件下で植物エストロゲンと環境ホルモン物質の影響を同時に調べた報告は見られない。そこで、植物エストロゲンと環境ホルモン物質の内分泌かく乱作用の比較のための基礎的データを得ることを目的として、子宮肥大試験を用いて、環境ホルモン物質として最も頻繁に研究されている DES および Bisphenol A、代表的な植物エストロゲンである Genistein および Resveratrol、の4種の物質に関してエストロゲン活性の比較を行った。

3. 植物由来内分泌かく乱物質のラット周生期暴露による発育・発癌および内分泌かく乱作用の比較

我々が食品として摂取するもののなかには、Resveratrol、Zearalenone や Genistein といった天然エストロゲンが存在し、日々の集積が予測される。とりわけこれら化学物質は、成体においては可逆的に作用するが、機能・形態形成期では不可逆的に作用して重大な結果を招来するおそれがある。そこで、今回天然の植物エストロゲンに的をしぼり、これら物質の生理的用量ならびに薬理的用量における効果を、ラットにおける周生期暴露実験により検討した。検討項目は発育

への影響、雌性生殖器や乳腺といったエストロゲン標的臓器の形態学的変化ならびに機能的変化についてである。併せて

Genistein については **N-methyl-N-nitrosourea (MNU)** 誘発乳腺発癌モデルを用いて癌化に対する影響を検討した。

4. 妊娠中に暴露した植物由来エストロゲン様物質の出生仔の男性生殖器や中枢神経系に及ぼす影響

内分泌かく乱物質の胎仔期暴露は出生乳仔の生殖器への影響を生じるとともに、脳の形態や機能にも重篤な影響をもたらす危険性が懸念される。ある種の内分泌かく乱物質は脳内の特定の核の容積を変化させたり、脳ニューロンの機能に関する物質を変動させることが報告されている。よって、胎仔期 **Genistein** 暴露による男性生殖器への影響をみるとともに、性的異型核のひとつである青斑核（カテコールアミンの起始核）に着目し、ニューロン数の変化を定量した。

5. 内分泌かく乱物質の高速液体クロマトグラフ (HPLC) による高感度分析法の確立

内分泌かく乱物質は成体においては可逆的に作用するが、機能・形態形成期では不可逆的に作用して重大な結果を招く恐れがある。これら内分泌かく乱物質の乳仔期の母仔移行には乳汁が重要な役割を担っている。そこで、内分泌かく乱作用を有することが知られている **Bisphenol A**、**Genistein** 及び **Resveratrol** の3物質について、乳汁中の存在を確認するべく、高速液体クロマトグラフ (HPLC) による高感度分析法の検討を行った。

6. 輸入果実に使用されている防カビ剤の実態

防カビ剤は毒性が高いことで危険性が指摘されている。柑橘類では **TBZ** (チアベンダゾール)、**OPP** (オルトフェニルフェノール) が果物の表面に塗布されている。ポストハーベスト農薬で輸入物に多く使われているが、国内産では使用は禁止されており、輸入品に限って認められている。いずれも

発癌性が疑われているが、通常の摂取状況では問題になることはない。**OPP** については環境ホルモン作用が指摘されている。しかし、発癌性については極端な設定条件の動物実験結果をもとに報告され、通常の摂取状況、方法には全く則していないといっても過言ではなく、環境ホルモン作用については疑われるのみで、実際に検討されたことはない。そこで、市販輸入柑橘類を購入し、表皮、果肉に分別後 **OPP** の定量を行い残留性を測定する。また洗浄による除去効果についても確認を行う。また **OPP** の他汎用されている防カビ剤についても測定を行う。毒性に関しては全く問題はないであろうが、実験データとして残留値が全く問題ないレベルであると押さえておくことは重要であり、科学的根拠を示す意義は大きいと考える。

B. 研究方法

1. 酵母 Two-Hybrid 法を用いた植物エストロゲン及び生活関連製品に由来する化学物質のエストロゲン様作用の評価

ER-GAL4DBD (Estrogen receptor α -**GAL4 DNA binding domain fusion protein**) と **TIF2-GAL4AD** (**TIF2-GAL4 activation domain fusion protein**) とを発現させた酵母を用いた。前培養した酵母を **SD** 培地で希釈し、酵母懸濁液とした。これに **DMSO** に溶解した被験化学物質を添加し、インキュベーションを行った (**30°C**、**4 時間**)。Z-buffer で2回洗浄後、**OD₅₉₅** を測定した。**Zymolyase** で細胞壁を分解し (**37°C**、**15 分**)、**o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside** を加え **30°C**、**30 分** インキュベーションを行った。**OD₄₁₀** 及び **OD₅₇₀** を測定し、**Miller** の式に基づき、生成した **β -ガラクトシダーゼ** 活性を算出した。この酵素活性を被験化学物質のエストロゲン様作用の指標とした。各被験化学物質の酵母に対する毒性は、作用前後の **OD₅₉₅** を測定することにより判断した。

2. 子宮肥大試験を用いた内分泌かく乱化学物質および植物エストロゲンのエストロ

ゲン活性の比較

実験には 10 週齢のメス ICR マウスを用いた。すべてのマウスの卵巣を除去し、1 ヶ月後から Genistein、Resveratrol、Bisphenol A、DES および Estradiol-17 β をオリーブ油に溶かして各投与群 10 匹づつに 3 日間皮下投与した。投与量は Estradiol-17 β および DES を 0.5、10、100 および 1000 ng/kg/day、Genistein、Resveratrol および Bisphenol A を 0.5、2、10 および 50 および 100 mg/kg/day とした。最終投与の 24 時間後、体重および子宮の湿重量と内腔液除去後の重量を計測した。重量計測後の子宮は固定・包埋して組織標本を作製し、組織学的比較を行った。また、上述の実験で子宮重量に影響が出なかった濃度の Estradiol-17 β に、同様の濃度の Genistein、Resveratrol、Bisphenol A を組み合わせて投与する実験も行った。投与は Estradiol-17 β (10 ng/kg/day) に加えて、Bisphenol A (2 mg/kg/day)、Resveratrol (0.5 mg/kg/day)、Genistein (10 mg/kg/day) をそれぞれ混合添加して行った。

3. 植物由来内分泌かく乱物質のラット周生期暴露による発育・発癌および内分泌かく乱作用の比較

Sprague-Dawley ラットに対して、妊娠 15-19 日、あるいは生後 15-19 日に連日被験物質を皮下投与し、雌乳仔に対して膈開口、性周期をみるとともに、雌性生殖器や乳腺の発育を形態的に比較した。さらに、50 mg/kg N-methyl-N-nitrosourea (MNU) の単回腹腔内投与による乳癌発生への影響を比較した。今回検討した天然エストロゲンは phytoestrogen として Resveratrol と Genistein、mycoestrogen として Zearalenone をとりあげた。投与量として、Resveratrol は 10 と 100 mg/kg/day としたが、Resveratrol 10 mg/kg/day は赤ワイン 1 グラスの 500 倍量と高値ではあるが、この容量は Resveratrol 実験の既報にのっとり設定した。また、Zearalenone は 0.1 と 10 mg/kg/day としたが、Zearalenone 0.1 mg/kg/day はアメリカ人の 1 日暴露が 0.02-0.1 mg/kg/day という報告に

のっとなっている。なお、Genistein は 1.5 と 30 mg/kg/day としたが、Genistein 1.5 mg/kg/day は、ほぼアジア人の 1 日消費量に相当する。食餌中に混入する xenoestrogen を最小にすべく、動物は NIH-07PLD (オリエンタル酵母) で飼育した。

4. 妊娠中に暴露した植物由来エストロゲン様物質の出生仔の男性生殖器や中枢神経系に及ぼす影響

植物由来エストロゲン様物質のひとつである Genistein を妊娠ラット (Sprague-Dawley) の皮下に妊娠 15 日目から 24 時間ごとに 5 回、少量 (1.5 mg/kg) および大量 (30 mg/kg) 投与し、出生後の仔ラット (雌雄) を用いて以下の 2 つの観察をおこなった。

① 体重および男性生殖器重量
成熟 (65 日齢) 雄ラットの体重と精巣および副生殖器の重量を比較した。

② 脳の性差に関して

いくつかの内分泌かく乱因子は脳内で性差のある神経核 (性的異型核; SDN) の大きさに影響を与えると考えられている。性的異型核のうち中脳下部から橋上部の背側に位置する神経核である青班核は神経細胞の数でも容積でも雌の方が雄より大きいと報告されている。また青班核はカテコールアミンニューロンの起始核のひとつ (A4 群 および A6 群の一部) であるが、最近、脳内カテコールアミン含量への内分泌かく乱因子の影響が懸念されている。そこで、56 日齢の雌雄 Genistein 暴露ラットを組織固定し、その脳標本を用いてカテコールアミンニューロンを免疫組織化学的に染色し、青班核そのものと青班核付近の副核・亜核ごとのカテコールアミンニューロンの数を計測した。

5. 内分泌かく乱物質の高速液体クロマトグラフ (HPLC) による高感度分析法の確立

① HPLC の条件

HPLC ; 島津製作所製 LC-6A、電気化学検出器 (ECD) ; 医理化社製 E-502、カラム ;

Inertsil ODS-3V (4.6×150 mm)、カラム温度 ; 40°C、流速 ; 0.8 ml/min、移動相 ; 0.025 M リン酸-カリウム溶液-メタノール

(52 : 48)、Applied Voltage ; +850 mV vs Ag/AgCl

②試験溶液の調製

マウスの乳汁 0.1~0.5 g を 50°C 水浴上 3 ml の精製水に溶解した後、超音波を 5 分間照射して均一にした。この溶液を、あらかじめメタノール、精製水それぞれ 5 ml でコンディショニングした ISOLUTE Multimode カートリッジに負荷し、精製水 5 ml、25% メタノール溶液 3 ml で洗浄した後、メタノール 3 ml で溶出した。この溶出液を窒素気流下で溶媒留去した後、HPLC 移動相 1 ml を加えた。次いで、超音波を 5 分間照射した後、0.45 μm フィルターでろ過し、ろ液に蛍光灯を 2 時間照射し、これを試験溶液とした。

6. 輸入果実に使用されている防カビ剤の実際

市販の輸入柑橘類について防カビ剤の残留量実態を把握するため、大阪市内および京都市内のスーパーマーケットで購入したレモン (3 商品)、オレンジ (3 商品)、グレープフルーツ (2 商品) の 3 種、8 商品を対象とした。防カビ剤として用いられる OPP (オルトフェニルフェノール)、DP (ジフェニール)、TBZ (チアベンダゾール) の 3 項目について、外果皮と果肉に分けて、逆相高速液体クロマトグラフィーにて定量を行った。

C. 研究結果及び考察

1. 酵母 Two-Hybrid 法を用いた植物エストロゲン及び生活関連製品に由来する化学物質のエストロゲン様作用の評価

酵母に Estradiol-17β を作用させると 1.0×10^{-10} M 付近から β-ガラクトシダーゼ活性が認められ、 1.0×10^{-7} M でプラトーに達した。 1.0×10^{-7} M 作用時の β-ガラクトシダーゼ活性を 100% としたとき、Estradiol-17β の 10% 作用濃度 (EC₁₀) は、 8.2×10^{-10} M であった。

食品関連化学物質として、Genistein、Resveratrol、Daizein 及び Zearalenone 等についてエストロゲン様作用の評価を行った。測定化学物質の中で Zearalenone が最も強い女性ホルモン様作用を示した (EC₁₀ : 1.7×10^{-7} M)。植物エストロゲンの中では、Genistein に作用が認められたが (EC₁₀ : 2.7×10^{-6} M)、構造の類似した Daizein には、作用が認められなかった。これまでに多岐にわたる化学物質について評価を行い、Bisphenol A、paraben、及び *p*-alkylphenol 等にエストロゲン様作用があることを明らかにした。これらに共通する構造上の特徴は、1) フェノール性水酸基を有する、2) その水酸基に対して *p* 位に疎水性の置換基を有するということであり、これがエストロゲン様作用を示すうえで、一つの鍵になっていると考えられた。しかしながら、Genistein 及び Daizein が、5 位の水酸基の有無のみで、作用に大きな違いが認められたため、エストロゲン様作用を示す条件は、上記の条件を満たすといった単純な構図ではない可能性が示唆された。Zearalenone、Genistein、Daizein、Resveratrol の構造と Estradiol-17β 及びアンタゴニストである ICI 182 780 等の構造と比較すると、類似している部分が多く、このことから、部分的構造の違いによりこれら化合物がアゴニストとアンタゴニストに分かれる可能性が示唆された。

2. 子宮肥大試験を用いた内分泌かく乱化学物質および植物エストロゲンのエストロゲン活性の比較

Estradiol-17β および DES は 100 ng/kg/day の投与でコントロール群と比較して有意な増加が見られ、100 ng/kg/day の投与群では子宮重量がコントロール群と比較して約 3 倍に増加した。両者の子宮重量の増加作用は湿重量、乾重量ともにほとんど同じだった。Bisphenol A の投与では湿重量、乾重量ともに 2 mg/kg/day 投与まではコントロール群と差が見られなかったが、10 mg/kg/day 投与群で若干の増加がみられ、乾重量では有意な増加を示した。また、50 mg/kg/day

以上の投与では約 1.2~1.3 倍と有意に増加していた。しかし、Estradiol-17 β ほどの増加効果はなかった。Resveratrol は湿重量は 0.5 mg/kg/day までは増加しなかったが、2 mg/kg/day 投与群では増加傾向を示し、10 mg/kg/day 投与群では有意に増加していた。しかし、BPA と同様に Estradiol-17 β ほどの増加効果はなかった。また、乾重量は 2 mg 投与群でも有意な増加が見られた。一方、50 mg/kg/day 以上の投与では 10 mg/kg/day 投与よりも子宮重量の増加が少なく、有意な差もなかった。Genistein は 50 mg/kg/day 投与群で有意な子宮重量の増加が見られた。また、Resveratrol と同様に 100 mg/kg/day 投与群では子宮重量の増加に有意差がなくなった。これら 3 種類の内分泌かく乱物質とエストロゲンとのエストロゲン活性を子宮の乾重量で比較した結果、各物質のエストロゲン活性は DES および Estradiol-17 β と比較して非常に弱く、Bisphenol A で約 1/10 万、Resveratrol で約 1/5 万、Genistein は約 1/50 万以下であることが示唆された。Bisphenol A、Resveratrol および Genistein の 3 種のうちでは Resveratrol が最も高く、Genistein はその作用がもっとも弱いことが判明した。また、子宮重量の増加量に関してもこれらの物質は Estradiol-17 β や DES に比べるとその作用が弱いことが示唆された。さらに、Resveratrol と Genistein で Low dose effect と思われる高濃度投与での子宮重量増加の抑制が見られた。さらに、体内のエストロゲンと環境ホルモン物質の相互作用を調べることを目的として、子宮重量に影響しない DES を除く 3 種の各物質とエストロゲンを組み合わせて投与する実験を行った。その結果、子宮重量、特に乾重量は Estradiol-17 β と Resveratrol の組み合わせで有意な増加が見られ、Genistein でも同様の傾向が起きることが明らかとなった。また、各投与群の子宮の組織学的比較を行ったところ、各投与群で子宮内膜上皮細胞やその他の細胞の増殖と肥厚が観察されたが、特に群間の相違は見られなかった。

3. 植物由来内分泌かく乱物質のラット周生期暴露による発育・発癌および内分泌かく乱作用の比較

① Resveratrol

Resveratrol の思春期前期投与により容量依存的に膣開口は早まる傾向にあるが対照と有意差はなく、49 日齢における相対子宮・卵巢重量は大量投与群で重い、組織学的に卵巢・子宮・膣ならびに乳腺の発育に著変はない。かつ、Resveratrol 暴露による相対体重増加率にも差をみない。唯一、正常な性周期をもつ個体数は Resveratrol 投与群で容量依存的に減少し、発情期の延長をみたが、全例周期性を有していた。

② Zearalenone

Zearalenone の思春期前期投与は用量依存性に膣開口の早発をみとめ、対照群では 96% に正常の 4-5 日の性周期をみたが、少/大量 Zearalenone 投与群とも正常性周期をみる個体は 13% に減少し、他は持続発情あるいは持続発情間期を呈した。しかし、28 日齢時における卵巢・子宮や乳腺発育に及ぼす形態的变化はみとめなかった。

③ Genistein

生後 28 日では出生前期/思春期前期 Genistein 処置ラットの相対子宮・卵巢重量はいずれも軽い傾向にあったが、組織学的には著変はみなかった。また、この時期乳腺の発育も対照と差をみない。なお、思春期前期大量 Genistein 投与群で膣開口は有意に早期にみとめ、思春期前期投与群に発情期の延長をみたが、他の群では対照群と差はみなかった。そこで、未だ群間で形態的に乳腺の発育に差をみない 28 日齢に発癌剤 (MNU) を処置し最大腫瘍径が 1 cm になった時点で屠殺したところ、Genistein 投与群はいずれも、非投与群に比して乳癌発生率の低下をみとめ、特に思春期前少量投与群では有意な抑制をみた。

以上、Genistein、Resveratrol、Zearalenone といった天然エストロゲンの周生期暴露は発育期の雌ラットの生殖器や乳腺に形態的变化は惹起しなかったが、膣開口や発育後

の性周期よりみると、機能的に内分泌かく乱作用を呈し、Zearalenone に強い作用をみた。Genistein の思春期前期暴露による乳癌の抑制は Genistein による乳腺分化の促進による terminal end bud (TEB) の減少とされている。また、Genistein の出生前期暴露は乳癌を促進するという報告もみる。今回の結果は、少量投与群（生理的用量）においても、出生前期／思春期前期暴露ともに乳癌を抑制したことは注目される。なお、この乳癌抑制作用は Genistein による乳腺の分化促進ではなく、TEB の細胞形質ならびに増殖活性の低下と考えられる。

4. 妊娠中に暴露した植物由来エストロゲン様物質の出生仔の男性生殖器や中枢神経系に及ぼす影響

①体重および男性生殖器重量について
体重は大量投与群（平均 $250 \pm 10.0\text{g}$ ）ではコントロール群（平均 $265 \pm 29.5\text{g}$ ）に比べ、低体重傾向であったが、少量投与群（平均 $262 \pm 21.4\text{g}$ ）ではあまり変化が見られず、統計的に有意差がみとめられなかった。精巣重量は、コントロール群では左右の計が平均 $2.87 \pm 0.11\text{g}$ 、少量投与群では $2.64 \pm 0.17\text{g}$ 、大量投与群では $2.77 \pm 0.25\text{g}$ で、少量投与群がコントロール群に比し統計的有意差 ($p=0.0171$) を有していた。副生殖器重量も、投与群で低重量の傾向を認めたが、用量依存性や統計的有意差はなかった。

Genistein は男性生殖器にも影響をおよぼす。

②脳の性差に関して

青斑核のニューロン数は、青斑核とその腹側核を中心とする A6 ニューロン群では、雄では少量投与で増加傾向、大量投与では逆に減少、雌では減少の傾向をみとめた。青斑核内でも A4 群に属するニューロングループでは暴露により減少する傾向をみた。もうひとつの性的異型核である内側視束前野の容積を比較した既報論文では、妊娠母胎への Genistein 投与は性差発現に統計的有意差を持って影響することはないものの、雄の神経核容積を雌化させる傾向を持ち、しかもこれが少量と大量投与群間で逆転現

象を示すとされているので、この報告はある意味ではわれわれの結果を裏付けていると言える。これまでの内分泌かく乱因子の影響を観る研究が神経核の容積のみで計測されていたので、カテコールアミンニューロンの数を計測するのは意義深いと考える。

5. 内分泌かく乱物質の高速液体クロマトグラフ (HPLC) による高感度分析法の確立

HPLC のカラムとして Inertsil ODS-3V を用い、移動相にリン酸-カリウム溶液とメタノールの混合溶液を用いたとき被験 3 物質が良好に分離できた。また、検出器として ECD を用いたところ他の検出器に比べて大幅に高感度分析が可能になり、標準溶液における検出限界は、50 μl 注入で 0.2 ng/ml (10pg) であった。さらに、試験溶液の調製には、ISOLUTE Multimode カートリッジが良好な精製効果を示した。マウスの乳汁に標準品を 100 ppb 濃度添加したところ、Bisphenol A 及び Genistein では 70% 以上の、Resveratrol では 60% 以上の回収率が得られた。今回測定対象とした 3 物質がいずれもフェノール性の水酸基を有することから、ECD を用いた HPLC による高感度分析法を試みた。その結果、カラムは逆相分配系の中でも Inertsil ODS-3V による分離がもっとも良好であった。また、乳汁の前処理として各種固相抽出を試みたが、逆相分配系とイオン交換系を組み合わせた ISOLUTE Multimode を用いたとき、比較的良好な分離が得られた。しかし、Resveratrol が操作中に光を受けて直ちに trans 体から cis 体への立体異性化を起こし、その変化の割合が標準品と試料とで異なり分析に支障を来すため、一定時間強制的に光を照射し cis 体に変換した後分析する方法を採用した。

6. 輸入果実に使用されている防カビ剤の実際

DP はすべての検体から検出できなかった。OPP はオレンジ 2 商品の外果皮から 0.00002 および 0.00004 g/kg 、レモン 1 商品から 0.00005 g/kg 検出したが、その他の商検体

からは検出出来なかった。TBZ は外果皮からはオレンジ 1 商品 (0.00015 g/kg)、グレープフルーツ 2 商品 (0.00075、0.0005 g/kg) で検出したが、果肉からは検出されなかった。外果皮と果肉の分別定量を行った。外果皮と果肉は通常の可食部、すなわち皮をむいて残った部分を果肉とした。果肉にはいずれの防カビ剤も残留しないことがわかった。外果皮については、最外皮 (着色している部分) とその内側の白い部分に分別したが、レモン、オレンジについては最外皮にのみ OPP が残留することが分かった。TBZ はグレープフルーツで最外皮のみならずその内側の白い部分にも約 20% 程度が分布していることが分かった。これはグレープフルーツの最外皮が比較的薄く、浸透性が高いためと予想できる。オレンジについては最外皮のみから検出できた。OPP を対象に中性洗剤による洗浄効果を検討した。洗浄は中性洗剤水溶液に浸漬し、食器洗浄用スポンジでブラッシングした。その結果、市販品のレモンおよびオレンジの OPP は検出限界以下にであった。冷水浸漬 (1 時間) による洗浄効果はほとんど認められなかったが、温水浸漬 (約 80 度、1 時間) では、約 40% の減少が確認できた。以上の結果から、市販の輸入柑橘類には防カビ剤が使われていることがわかった。直ちに発癌に関与するような量ではないであろうが、環境ホルモン様作用の発現に寄与する可能性は今回の実態把握のみでは言及できない。

D. 結論

1. 酵母 Two-Hybrid 法を用いた植物エストロゲン及び生活関連製品に由来する化学物質のエストロゲン様作用の評価

酵母 Two-Hybrid 法によるエストロゲン様作用の評価の結果、Bisphenol A

(polycarbonate material/ $EC_{10} : 2.3 \times 10^{-5}$) や Parabene (preservative/methylparabene, $EC_{10} : 2.2 \times 10^{-4}$; ethylparabene, $EC_{10} : 1.3 \times 10^{-4}$; propylparaben, $EC_{10} : 1.5 \times 10^{-5}$) といった合

成化学物質に比して、天然エストロゲンである Genistein (phytoestrogen/ $EC_{10} : 2.7 \times 10^{-6}$) や Zearalenone (mycoestrogen/ $EC_{10} : 1.7 \times 10^{-7}$) により強い活性を示すことが明らかとなった。とりわけ Zearalenone が最も強い女性ホルモン様作用を示したことは、Zearalenone による穀物汚染の実態把握は重要である。内分泌かく乱物質の化学構造と化学的特性の関連の検討に着手する。

2. 子宮肥大試験を用いた内分泌かく乱化学物質および植物エストロゲンのエストロゲン活性の比較

マウスを用いた子宮肥大試験では Estradiol-17 β と DES のエストロゲン活性はほとんど同じであり、Bisphenol A、Resveratrol および Genistein のエストロゲン活性は Estradiol-17 β と比較すると非常に弱く、3 種のうちでは Resveratrol が最も高いエストロゲン活性を有することが明らかとなった。また、エストロゲンと植物エストロゲンは単独でエストロゲン活性が見られない濃度でも、組み合わせることによって相乗的にエストロゲン活性が増加することが判明した。以上、子宮肥大試験では天然エストロゲンである Resveratrol が合成エストロゲン様化学物質である Bisphenol A より強いエストロゲン活性を示すことが明らかとなった。

3. 植物由来内分泌かく乱物質のラット周生期暴露による発育・発癌および内分泌かく乱作用の比較

Resveratrol、Zearalenone、Genistein といった天然エストロゲンのラット周生期暴露は、7 週齢以前にはエストロゲン標的臓器 (子宮、卵巣や乳腺) に形態的变化を惹起しなかったが、8 週齢以後の性周期からみると、内分泌かく乱作用を発現した。特に Zearalenone の内分泌かく乱作用は強力であることが示唆された。Genistein の出生前あるいは思春期前投与ではいずれも乳癌を抑制する傾向にあった。特に思春期前の短期生理的用量 (アジア人の 1 日摂取相当量) の投与では有意な抑制をみたことは、この

時期に大豆食品の摂取が推奨される。

4. 妊娠中に暴露した植物由来エストロゲン様物質の出生仔の男性生殖器や中枢神経系に及ぼす影響

Genistein 出生前投与では、雌性生殖器のみならず、雄性生殖器にも作用が及ぶ。また、青斑核のカテコールアミンニューロン数に変化をみたことは、神経系への影響が示唆される。合成内分泌かく乱物質の比較的濃度を脳の発生や発達段階に作用させると、脳ニューロンやグリア機能に関与する物質を変動させたり、脳内の特定の核の容積に影響を示す。Genistein という植物由来の天然エストロゲンの胎児期暴露で脳かく乱作用をみたことは妊娠時の食生活に示唆を与えるものと考えられる。

5. 内分泌かく乱物質の高速液体クロマトグラフ (HPLC) による高感度分析法の確立

乳児の栄養源には母乳、牛乳、豆乳があるが、植物エストロゲンをはじめとした内分泌かく乱物質の乳児への移行はこれら物質を介する。よって、乳汁をはじめとした内分泌かく乱物質の濃度を計測することは移行程度を知る上で必須である。この目的のため、高速液体クロマトグラフ (HPLC) による高感度分析法を確立したので、直ちに実態把握に着手しうる状況下にある。併せて血中濃度との対比にも着手する。

6. 輸入果実に使用されている防カビ剤の実態

輸入果実の全被験商品からではないが、防カビ剤として使用が許可されているフェノール系化合物であるオルトフェニルフェノール (OPP) を検出した。果肉には存在しないが、外果皮に残留することが判明した。温水浸漬により OPP の溶出をみたことは、調理法によってはヒトが摂取する可能性のあることを示唆している。フェノール系化合物は内分泌かく乱作用を示すものが多いので、速やかに OPP の内分泌かく乱作用の有無の同定に着手したい。

E. 健康危険情報
特記事項なし。

F. 研究発表
論文発表

1. Takatori, S., Kitagawa, Y., Oda, H., Miwa, G., Nishikawa, J., Nishihara, T., Nakazawa, H. and Hori, S. Estrogenicity of Metabolites of Benzophenone Derivatives Examined by a Yeast Two-Hybrid Assay. J. Health Sci., in press.
2. Kitagawa, Y., Takatori, S., Oda, H., Nishikawa, J., Nishihara, T., Nakazawa, H. and Hori, S. Detection of Thyroid Hormone Receptor-Binding Activities of Chemicals Using a Yeast Two-Hybrid Assay. J. Health Sci., in press.

学会発表

1. 佐藤睦哉, 裴 仁正, 二階堂泰資, 仙崎英人, 四方伸明, 中根恭司, 螺良愛郎. (2003) 新生仔期 Resveratrol 暴露の Sprague-Dawley 雌ラットにおよぼす影響. 第 92 回日本病理学会, 福岡.
2. 二階堂泰資, 裴 仁正, 佐藤睦哉, 仙崎英人, 螺良愛郎. (2003) 内分泌攪乱物質の母体曝露による ICR 雌乳仔マウスにみられる影響. 第 92 回日本病理学会, 福岡.
3. 裴 仁正, 佐藤睦哉, 二階堂泰資, 仙崎英人, 四方伸明, 螺良愛郎. (2003) Perinatal genistein exposure on MNU-induced mammary tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats. 第 92 回日本病理学会, 福岡.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

内分泌かく乱物質と大豆等既存食品の発育・癌化及び内分泌かく乱作用の比較

酵母 Two-Hybrid 法を用いた植物エストロゲン及び
生活関連製品に由来する化学物質のエストロゲン様作用の評価

分担研究者：堀 伸二郎

大阪府立公衆衛生研究所 課長

研究協力者：北川 陽子、高取 聡

大阪府立公衆衛生研究所 研究員

研究要旨

酵母 Two-Hybrid 法を用いて、ダイゼイン、ゲニステイン、レスベラトロール等の植物エストロゲン及びビスフェノール A、フタル酸エステル等の生活関連製品由来の化学物質についてエストロゲン様作用を評価した。マイコエストロゲンのゼアラレノン、植物エストロゲンのゲニステインにエストロゲン様作用が認められた。この作用は、17- β -エストラジオールの各々1/200 及び 1/3000 の強さであった。ダイゼイン、レスベラトロール、ゲニスチン及びダイジンにエストロゲン様作用は認められなかった。

A. 研究目的

我々が食品として摂取する植物成分の中には、内分泌系に影響を及ぼすものがあり、その主な作用がエストロゲン様作用であることから植物エストロゲンと呼ばれている。日本人は大豆製品等からのイソフラボンの摂取量が多いことから欧米人と比較して、乳癌や前立腺癌の発症率が有意に低く、植物エストロゲンは予防医学の面から注目されてきた。しかしながら一方では、これら化学物質の内分泌かく乱作用が懸念されており、特に乳

幼児に対しては、大豆製品等からのイソフラボン摂取を問題視する傾向もある。また、我々が日常使用している生活関連製品（樹脂製容器及び包装等）からは、原料、添加剤、触媒等として使用されているビスフェノール A、フタル酸エステル類、ノニルフェノール等の内分泌かく乱作用の疑われている化学物質が溶出し、食品を介してこれらの化学物質を摂取している可能性が指摘されている。このような背景から、化学物質について内分泌かく乱作用という新たな観点からの安全性評価が求められている。

我々は、酵母 Two-Hybrid 法を用いて、植物エストロゲン及び生活関連製品由来の化学物質（被験物質：ゲニステイン、レスベラトロール、ビスフェノール A 及びフタル酸エステル類他）のエストロゲン様作用について評価を行った。

B. 研究方法

B-1. エストロゲンアッセイ

ERLBD - GAL4DBD (Estrogen receptor α ligand binding domain - GAL4 DNA binding domain fusion protein) と TIF2 - GAL4AD (TIF2 - GAL4 activation domain fusion protein) を各々発現させた酵母を前培養した。これを $OD_{595} = 0.15$ 前後に SD 培地で希釈し、酵母懸濁液とした。DMSO に溶解した被験化学物質を添加し、30 °C で 4 時間インキュベーションを行った。インキュベーション後、酵母を冷 Z-buffer で 2 回洗浄し、 OD_{595} を測定した。1 mg/ml となるように Zymolyase を加え、37 °C で 15 分間インキュベーションを行った。0.67 mg/ml となるように *o*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside を加え、30 °C で 30 分間インキュベーションを行った。 OD_{410} 及び OD_{570} を測定し、下記の Miller の式に従って、生成した β -galactosidase を算出した。

Miller の式：

$$U = 1000 \times \frac{[OD_{410}] - 1.75 \times [OD_{570}]}{([t] \times [v] \times [OD_{595}])}$$

U: 酵素活性, t: 反応時間 (分) ,
v: アッセイに使用した酵母懸濁液量(ml)

B-2. 倫理面への配慮

本研究で使用した化学物質については、実験後の回収を徹底し、環境中への排出がなされないように努めた。

C. 研究結果

C-1. 17- β -エストラジオール (E_2)

酵母に E_2 を 4 時間作用させた。3.0 x 10⁻¹⁰ M 付近から β -galactosidase の活性が認められ、1.0 x 10⁻⁷ M で最大値に達した。1.0 x 10⁻⁷ M 作用時の β -galactosidase の活性値を 100% とした時の 10% の作用を示す濃度 (EC_{10}) は、8.2 x 10⁻¹⁰ M であった (図 1)。

C-2. 植物エストロゲン及びマイコエストロゲン

ゲニステインにエストロゲン様作用が認められた (図 2)。ゲニステインの EC_{10} は、2.7 x 10⁻⁶ M であった。ゲニステインの配糖体であるゲニスチン、ダイゼイン及びその配糖体であるダイジンには作用は認められなかった。

ゼアラレノンにエストロゲン様作用が認められた (図 2)。ゼアラレノンの EC_{10}

は、 $1.7 \times 10^{-7} \text{ M}$ であった (表 1)。

C-3. フェノール類

ビスフェノール A、ビスフェノール F、*p*-アルキルフェノール (メチル、エチル、*t*-ブチル、*s*-ブチル、*n*-ブチル、*n*-ペンチル、*n*-ヘキシル、*n*-ヘプチル、及び *br*-ノニル) にエストロゲン様作用が認められた。しかしながら、*o*-アルキルフェノール (メチル、エチル、*t*-ブチル、フェニル) 及び *m*-アルキルフェノール (*t*-ブチル) に作用は認められなかった。それぞれの EC_{10} を表 2 に示す。

C-4. パラベン類

パラベン (メチル、エチル、プロピル) に、エストロゲン様作用が認められた。それぞれの EC_{10} を表 3 に示す。

C-5. その他の化学物質

スチレン、スチレン 2 量体及びスチレン 3 量体にエストロゲン様作用は認められなかった。

ビフェニル、ジフェニルエーテル及びそれらの臭素化物にエストロゲン様作用は認められなかった (表 3)。

D. 考察

これまでに、エストロゲン様作用を示

すうえで、フェノール性水酸基の重要性が指摘されている。植物エストロゲン、マイコエストロゲン、生活関連製品 (樹脂製容器及び包装等) に由来する化学物質について、エストロゲン様作用の評価を行った結果、ゲニステイン、ゼアラレノン、フェノール類、パラベン類にエストロゲン様作用が認められた。

アルキルフェノール類については、水酸基に対して置換基をパラ位に有するものにエストロゲン様作用が認められ、置換基をオルト位やメタ位に有する化学物質には、作用は認められなかった。これらのことから、エストロゲン様作用を示す化学物質の構造上の特徴として、フェノール性水酸基を有し、かつ、水酸基に対してパラ位に置換基を有することが重要であることが確認された。

フタル酸エステル類に、エストロゲン様作用は認められなかった。フタル酸エステル類は分子内にフェノール性水酸基を有していない。このため、作用を示さなかったものと考えられた。

植物エストロゲンでは、ゲニステインのみが、エストロゲン様作用を示し、ダイゼイン及び配糖体に作用は認められなかった。配糖体については、グルコースが結合しており、かさ高い構造となるために作用が認められないと考えられる。ダイゼインは、ゲニステインと構造が類似しており、4 位の水酸基の有無のみが構造上の違いである。このことから、ダ

イゼインについてもエストロゲン様作用を示す可能性が考えられたが、今回の測定濃度範囲内では、作用は認められなかった。ゲニステインとダイゼインは、分子内に2つのフェノールを有し、合成女性ホルモンであるジェチルスチルベストロール(DES, 3,4-bis(*p*-hydroxyphenyl)-3-hexene)と構造が類似している。DESの特徴は、フェノールで挟まれたヘキセンの3-4位の2重結合のために両側のフェノールが平面構造をとっていることである。ゲニステインは、4位の水酸基を有することにより、分子内で酸素原子と水素結合を生じていると推測され、DESのような平面構造をとりやすくなっている可能性が考えられた。よって、よりDESに近い構造をもつゲニステインに作用が認められ、ダイゼインは、平面構造がゲニステインほど安定しないため、作用に大きな差が生じたと考えられた。ゲニステインの代謝物であるジヒドロキシゲニステインは、7-8位の2重結合の有無のみで、ゲニステインと構造が類似している。しかしながら、ゲニステインと比較して作用は非常に弱いものであるという報告がある(Nishihara, T. ら、*J. Health Sci.*, 46, 282, 2000)。この場合についてもゲニステインは、7-8位の2重結合の存在により、ジヒドロキシゲニステインと比較して、平面構造をとりやすくなっており、ジヒドロキシゲニステインは、ゲニステインほどは平面構造が安定しないため作

用に差が生じたと考えられた(図3)。

ゼアラレノン(6-(10-hydroxy-6-oxo-*trans*-1-undecenyl)- β -resorcylic acid lactone)は、ゲニステインと部分構造が類似している。これによりエストロゲン様作用が認められたと推察される(図3)。

これらのことから、植物エストロゲン等の化学物質については、エストロゲン様作用を示す条件として、フェノール性水酸基をもち、水酸基に対してパラ位に置換基を有することに加えて、側鎖の平面構造の安定性が関与している可能性が示唆された。

これまでに植物エストロゲンに関するエストロゲン活性の報告例として、 $[^3\text{H}]$ エストラジオールを用いたレセプター結合試験及び遺伝子発現試験がある(Morito, K. ら、*Biol. Pharm. Bull.*, 24, 351, 2001)。この中で、エストロゲンレセプター α (ER α)に関しては、ゲニステインがもっとも強いレセプター結合能及び遺伝子発現能を示したと報告されている。また、ダイゼインのレセプター結合能及び遺伝子発現能は、ゲニステインに比べて弱く、配糖体(ゲニスチン、ダイジン)は、ダイジンの遺伝子発現能を除いて、作用は認められないと報告されている。本研究においてER α に関しては、ほぼ同様の結果を示し、今回の結果を支持できるものと考えられた。また、ER α 及びER β のどちらにも高い親和性を示

す E_2 とは異なり、ゲニステインは、 $ER\beta$ により強い親和性をもつことが示されており、 $ER\alpha$ と $ER\beta$ で化学構造によって結合特性が異なることが推察されている。

ゲニステインが結合した $ER\beta$ のX線結晶解析の報告(Pike A. C. W. ら、*The EMBO J.*, 18, 4608, 1999)によって、 $ER\beta$ のリガンド結合部位に対して、ゲニステインの14位の炭素に結合する水酸基が E_2 のA環の水酸基と同じ働きをしていると報告されている。 $ER\alpha$ と $ER\beta$ では、ゲニステインと相互作用をするERのリガンド結合部位のアミノ酸残基が一部異なることが明らかになっているので、作用点に相違点が生じる可能性がある。本研究において、ゲニステインの場合、2位または14位の炭素に結合している水酸基どちらでも E_2 のA環の水酸基と同じ働きをして可能性が考えられた。しかしながら、ゼアラレノンで作用が認められたことにより、ゲニステインの14位ではなく、2位の炭素に結合する水酸基が $ER\alpha$ と相互作用をしている可能性が示唆された。

レスベラトロール(3,4',5-stilbenetriol)は、3位の水酸基に対してパラ位に置換基を有しておらず、このことが作用を示さなかった原因と考えられた。しかしながら、 $ER\beta$ と作用させた場合、4'位の水酸基が $ER\beta$ と相互作用をもち、エストロゲン様作用が認められる可能性も考

えられる(図3)。

今回、評価を行った植物エストロゲンは、大豆やモヤシ、ホップ等天然に存在する。大豆製品を多く摂取するアジア人の植物エストロゲンの血中濃度は、欧米人に比べて約10倍高いと報告され、このことが、アジア人が乳癌や前立腺癌等のホルモン依存性の癌発生率が低い要因であると指摘されている。しかしながら、健康食や離乳食等として大豆製品が人気を集めていることから、ホルモン作用に敏感な胎児や幼児の内分泌系の発達に対する影響は無視できない大きな課題となっている。よって、植物エストロゲンに関しては、エストロゲン様作用のみならず、抗エストロゲン作用についても評価を行うことは重要である。今後は抗エストロゲン作用及び植物エストロゲンとビスフェノールA等の人工的内分泌かく乱化学物質との相互作用についても検討を行っていく予定である。

E. 結論

1. 植物エストロゲンのゲニステインにエストロゲン様作用が認められ、その作用は、17- β -エストラジオールの約1/3000であった。ダイゼイン、レスベラトロール、ダイジン及びゲニステインに作用は認められなかった。
2. ゼアラレノンにエストロゲン様作用

が認められ、その作用は、17-β-エスト
ラジオールの約 1/200 であった。

3. ビスフェノール A、パラベン、*p*-ア
ルキルフェノール類にエストロゲン様作
用が認められた。

4. *o*-アルキルフェノール、*m*-アルキル
フェノール、ビフェニル、ポリ臭素化ビ
フェニル、ジフェニルエーテル、ポリ臭
素化ジフェニルエーテル、スチレン、ス
チレン 2 量体及びスチレン 3 量体等の化
学物質にエストロゲン様作用は認められ
なかった。

5. エストロゲン様作用を示すうえで、
フェノール性水酸基を有し、その水酸基
の *p* 位に置換基を有することが重要であ
ることが確認された。さらに、植物エス
トロゲン等の化学物質については、上記
の条件に加えて、側鎖の平面構造の安定
性が作用に影響を及ぼしている可能性が
示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Takatori, S., Kitagawa, Y., Oda, H.,
Miwa, G., Nishikawa, J., Nishihara, T.,
Nakazawa, H., Hori, S., “Estrogenicity of
Metabolites of Benzophenone Derivatives
Examined by a Yeast Two-Hybrid Assay”,

J. Health Sci. (印刷中)

2) Kitagawa, Y., Takatori, S., Oda, H.,
Nishikawa, J., Nishihara, T., Nakazawa, H.,
Hori, S., “Detection of Thyroid Hormone
Receptor-Binding Activities Of Chemicals
Using a Yeast Two-Hybrid Assay”, *J. Health
Sci.* (印刷中)

2. 学会発表

1) 化学物質の抗アンドロジェン様作用
の評価：高取聡、北川陽子、織田肇、西
川淳一、西原力、中澤裕之、堀伸二郎、
第 84 回食品衛生学会、2002 年 11 月、
大阪

2) 酵母 Two-Hybrid 法を用いた化学物
質の抗甲状腺ホルモン作用の評価：北川
陽子、高取聡、織田肇、西川淳一、西原
力、中澤裕之、堀伸二郎、2002 年 11 月、
広島

G. 知的財産権の取得状況

なし

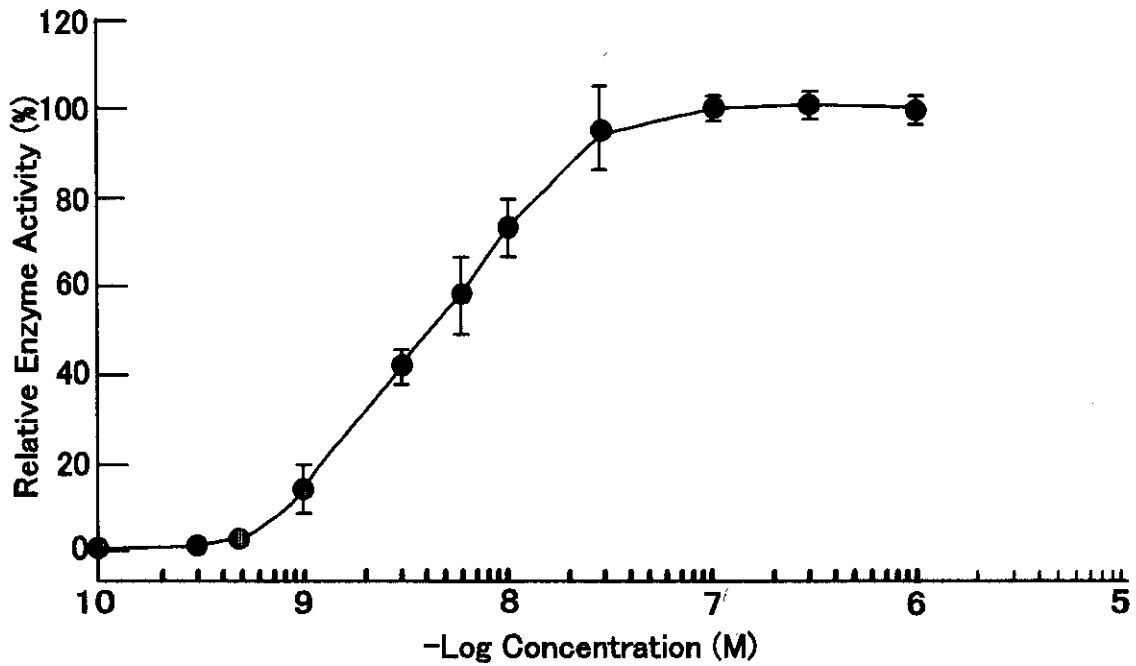


図1 酵母 Two-Hybrid 法における 17-β-エストラジオールの用量反応曲線

* : 1.0×10^{-7} M E_2 作用時の β -galactosidase 活性を
100%としたときの相対活性

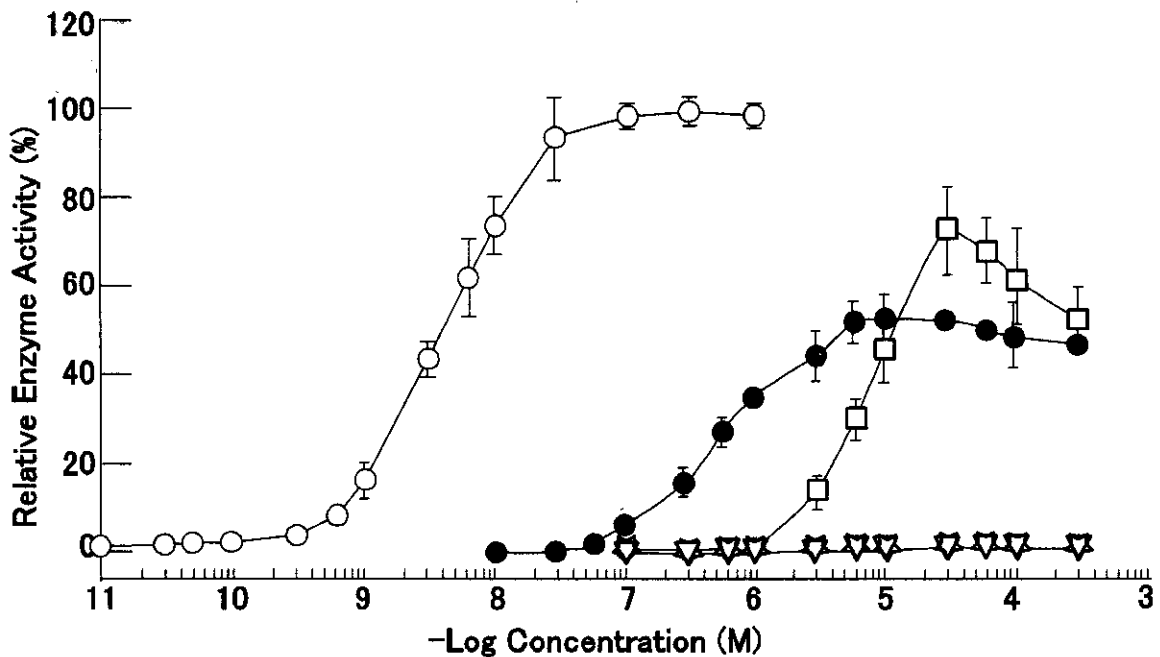


図2 酵母 Two-Hybrid 法におけるエストロゲン様作用の用量反応曲線

E_2 (○)、ゼアラレノン (●)、ゲニステイン (□)、
レスベラトロール (▽)、ダイゼイン (☆)