

図3 植物エストロゲン、マイコエストロゲン及び女性ホルモンの構造式  
 (a) ゲニステイン, (b) ダイゼイン, (c) ゼアラレノン, (d) ゲニスチン,  
 (e) ダイジン, (f) レスベラトロール, (g) ジヒドロキシゲニステイン  
 (h) DES, (i) 17-β-エストラジオール \* Glu: グルコース

表1 マイコエストロゲン及び植物エストロゲンのエストロゲン様作用

化学物質	EC <sub>10</sub>	相対活性 <sup>a)</sup>	備考
ゼアラレノン	1.7 x 10 <sup>-7</sup>	1/2.1 x 10 <sup>2</sup>	マイコエストロゲン
ゲニステイン	2.7 x 10 <sup>-6</sup>	1/3.3 x 10 <sup>3</sup>	植物エストロゲン
ゲニスチン	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	植物エストロゲン
ダイゼイン	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	植物エストロゲン
ダイジン	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	植物エストロゲン
レスベラトロール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	植物エストロゲン
ジェチルスチルベストール (DES)	8.0 x 10 <sup>-10</sup>	1	女性ホルモン
17-β-エストラジオール (E <sub>2</sub> )	8.2 x 10 <sup>-10</sup>	1	女性ホルモン

a) 相対活性 = E<sub>2</sub> の EC<sub>10</sub> / 被験化学物質の EC<sub>10</sub>

表2 生活関連物質由来の化学物質のエストロゲン様作用 (1)

化学物質	EC <sub>10</sub>	相対活性	備考
ビスフェノール A	2.3 x 10 <sup>-5</sup>	1/2.8 x 10 <sup>4</sup>	ポリカーボネート樹脂原料
ビスフェノール F	1.6 x 10 <sup>-5</sup>	1/2.0 x 10 <sup>4</sup>	樹脂原料
ビスフェノールAグリシジルエーテル(BADGE)	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	ポリカーボネート樹脂原料
テトラプロモビスフェノール A	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	難燃剤
p-メチルフェノール	9.0 x 10 <sup>-4</sup>	1/1.1 x 10 <sup>6</sup>	消毒剤・樹脂添加剤
p-エチルフェノール	2.1 x 10 <sup>-4</sup>	1/2.6 x 10 <sup>5</sup>	界面活性剤・樹脂添加剤
p-t-ブチルフェノール	3.5 x 10 <sup>-5</sup>	1/4.3 x 10 <sup>4</sup>	界面活性剤・樹脂添加剤
p-s-ブチルフェノール	2.0 x 10 <sup>-5</sup>	1/2.4 x 10 <sup>4</sup>	界面活性剤
p-n-ペンチルフェノール	2.5 x 10 <sup>-6</sup>	1/3.0 x 10 <sup>3</sup>	
p-n-ヘキシルフェノール	7.5 x 10 <sup>-6</sup>	1/9.1 x 10 <sup>3</sup>	
p-n-ヘプチルフェノール	3.0 x 10 <sup>-6</sup>	1/3.7 x 10 <sup>3</sup>	
p-n-ノニルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	界面活性剤・樹脂添加剤
p-br-ノニルフェノール	2.4 x 10 <sup>-7</sup>	1/2.9 x 10 <sup>2</sup>	界面活性剤・樹脂添加剤
p-n-オクチルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	界面活性剤・樹脂添加剤
p-n-ドデシルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	界面活性剤・樹脂添加剤
o-メチルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	
o-エチルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	
o-t-ブチルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	
o-フェニルフェノール (OPP)	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	防かび剤
m-t-ブチルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	
フタル酸ジメチル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ジエチル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ジプロピル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ジイソブチル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ジエチルヘキシル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ジイソノニル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ジイソデシル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ベンジルブチル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
17-β-エストラジオール(E <sub>2</sub> )	8.2 x 10 <sup>-10</sup>	1	女性ホルモン

表3 生活関連物質由来の化学物質のエストロゲン様作用 (2)

化学物質	EC <sub>10</sub>	相対活性	備考
メチルパラベン	2.2 x 10 <sup>-4</sup>	1/2.7 x 10 <sup>5</sup>	保存料
エチルパラベン	1.3 x 10 <sup>-4</sup>	1/1.6 x 10 <sup>5</sup>	保存料
プロピルパラベン	1.5 x 10 <sup>-5</sup>	1/1.8 x 10 <sup>4</sup>	保存料
スチレン	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	工業品原料
1,2-cis-ジフェニルシクロブタン	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	スチレン二量体
1,2-trans-ジフェニルシクロブタン	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	スチレン二量体
2,4-ジフェニル-1-ブテン	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	スチレン二量体
1,3-ジフェニルプロパン	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	スチレン二量体
2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	スチレン三量体
1a-フェニル-4a-(1-フェニルエチル 1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン)	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	スチレン三量体
1a-フェニル-4e-(1-フェニルエチル 1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン)	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	スチレン三量体
1e-フェニル-4a-(1-フェニルエチル 1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン)	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	スチレン三量体
1e-フェニル-4e-(1-フェニルエチル 1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン)	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	スチレン三量体
1,3,5-トリフェニルシクロヘキサン	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	スチレン三量体
ビフェニル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	防かび剤
4-ブロモビフェニル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	ポリ臭素化ビフェニル(PBB)
2,4',5-トリブロモビフェニル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	PBB
2,2',4',5,5'-ヘキサブロモビフェニル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	PBB
デカブロモビフェニル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	PBB・難燃剤
ジフェニルエーテル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	熱媒体
4-ブロモジフェニルエーテル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	ポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDE)
デカブロモジフェニルエーテル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	PBDE・難燃剤
ICI 182 780 (fulvestrant)	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	抗女性ホルモン剤
4-ヒドロキシタモキシフェン	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	抗女性ホルモン剤
17-β-エストラジオール(E <sub>2</sub> )	8.2 x 10 <sup>-10</sup>	1	女性ホルモン

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

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

分担研究者：茶山和敏 静岡大学農学部助教授

### 研究要旨

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、特に、マウスを用いた子宮肥大試験によって同一条件下で植物エストロゲンや環境ホルモン物質のエストロゲン活性を同時に比較した報告は見られない。そこで、本研究では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Diethylstilbestrol (DES) およびBisphenol A (BPA)、代表的な植物エストロゲンであるGenisteinおよびResveratrol、の4種の物質とEstradiol 17 $\beta$  (E2)の生体内におけるエストロゲン活性の比較を行った。10週齢のメスICRマウスの卵巣を除去し、1ヶ月後から、E2、DES、BPA、Resveratrol および Genistein を種々の濃度で3日間皮下投与した。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組織標本を作製し、組織学的比較を行った。その結果、E2 および DES は 100ng/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、100ng/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。BPAの投与では湿重量、乾重量ともに10mg/kg/day 投与群で増加がみられ、乾重量では有意な増加を示した。Resveratrol は湿重量は10mg/kg/day 投与群で有意に増加していた。また、乾重量は2mg 投与群でも有意な増加が見られた。一方、50mg/kg/day 以上の投与では10mg/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50mg/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100mg 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、BPA、Resveratrol および Genistein の3種のうちではResveratrol で子宮重量増加作用が最も高く、Genistein はその作用がもっとも弱いことが判明した。各物質のエストロゲン活性はDES および E2 と比較して非常に弱く、BPA 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。また、子宮重量の増加量に関してもこれらの物質はE2 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 で高濃度投与での子宮重量増加の抑制が見られた。一方、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、前述の実験で子宮重量に影響が出なかった濃度の E2 に、同様の濃度の BPA、Resveratrol、Genistein を組み合わせて投与する実験も行った。子宮重量に影響しない濃度で 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結果、子宮重量、特に乾重量は E2 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。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。以上の結果から、マウスを用いた子宮肥大試験では E2 および DES のエストロゲン活性はほとんど同じであることが判明した。また、BPA、Resveratrol および Genistein のエストロゲン活性は E2 と比較すると非常に弱く、BPA 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、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。さらに、E2 と Resveratrol および Genistein 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。

#### A. 研究目的

Diethylstilbestrol (DES) などの合成エストロゲンやBisphenol A (BPA) などの化学物質が内分泌攪乱化学物質（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、新たな環境汚染として問題視されている。一方、食品としてこれまでに摂取してきた植物由来の成分であるGenistein、Resveratrolなどの植物エストロゲン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 (Constantinou, A. I. *et al.* *Anticancer Res.*, 16, 3293-3298, 1996)。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、同一条件下で複数の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ラットを用いた子宮肥大試験では数多く報告されているが、マウスの子宮肥大試験を用いて比較した報告はまったく見られない。

子宮肥大試験を用いた環境ホルモン物

質のエストロゲン活性の比較に関する世界的な統一基準は経済協力開発機構 (OECD) からバリデーションプロトコールとして提案され、そのプロトコールにしたがって多くの環境ホルモン物質の比較が行われている (Kanno, J. *et al.* Environ. Health Perspect, 109, 785-794, 2001)。OECDのバリデーションプロトコールでは対象動物は通常、ラットを用いることとされている。環境ホルモン物質の生体への影響、特に疾病との関連を実験動物を用いて検討する場合、多くの疾病モデル動物が作出されているマウスを使用する可能性が高い。しかしながら、マウスを用いた子宮肥大試験によって環境ホルモン物質のエストロゲン活性を比較した研究は数種類の環境ホルモン物質で個々に調べられているだけで、多くの環境ホルモン物質のエストロゲン活性をマウスを用いて同一条件下で比較した研究はこれまでまったくないことから、生体内におけるエストロゲン様作用を調べる際の基礎研究として、マウスの子宮肥大試験法を用いてそれらの作用を比較することは今後の環境ホルモンに関する研究においても非常に重要である。

そこで、本研究では疾病モデルマウスを用いた今後の研究と本研究助成の課題である植物エストロゲンと環境ホルモン物質の内分泌攪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、マウスを用いた子宮肥大試験によって、代表的な植物エストロゲンであるGenisteinおよびResveratrol、環境ホルモン物質として最も頻繁に研究されているBPAおよび合成エストロゲンであるDESの計4種の物質に関して生体内におけるエストロゲン活性をEstradiol 17 $\beta$  (E2) と比較した。

## B. 材料および方法

### B-1. マウス

実験には10週齢のメスICRマウスを用いた。マウスは静岡大学農学部の実験動物飼育室で、温度；24 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C、湿度；60 $\pm$ 10%、照明；14時間明期・10時間暗期、飼料及び水；自由摂取の条件下で飼育した。

飼料は食餌中からの環境ホルモン物質の影響を可能な限り少なくするために、環境ホルモン実験用に開発されたマウス・ラット用飼料であるNIH-07PLD (オリエンタル酵母株式会社) を給与し

た。

#### B-2. 環境ホルモン物質の投与

すべてのマウスの卵巣を除去し、1ヶ月後からE2 (SIGMA, USA)、DES (SIGMA, USA)、BPA (SIGMA, USA)、Resveratrol (SIGMA, USA) および Genistein (フジッコ, 日本) をオリーブ油に溶かして3日間皮下投与した。投与量はE2およびDESが0.5、10、100および1000ng/kg/day、BPA、ResveratrolおよびGenisteinは0.5、2、10、50および100mg/kg/dayとし、一匹あたりの投与量が100 $\mu$ lになるように調整して各投与群10匹づつに投与した。

#### B-3. 子宮重量の計測および子宮の組織学的比較

各物質の最終投与から24時間後、体重および子宮の湿重量を量り、さらに子宮は子宮頸部および子宮体を切断して内腔液を除去した後の重量を乾重量として計測した。乾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。

#### B-4. エストロゲンと環境ホルモン物質の組み合わせ投与

環境ホルモン物質は体内のエストロゲンと相加的あるいは相乗的に作用する可能性が考えられていることから、DESを除く3種の各物質とエストロゲンの組み合わせ投与試験もあわせて行った。投与は子宮重量に影響しなかったE2:10 $\mu$ gに加えてBPA:2mg, Resveratrol:0.5mg, Genistein:10mgを混合しておこなった。

### C. 結果

#### C-1. 子宮肥大試験によるE2のエストロゲン活性

子宮肥大試験によるE2投与の結果を示す(図1)。E2は湿重量および乾重量ともに100ng/kg/dayの投与で対照群と比較して有意な子宮重量の増加が見られた。そして1000ng/kg/day投与群では子宮重量が非投与群と比較して約3倍に増加した。

#### C-2. 子宮肥大試験によるDESのエストロゲン活性

DESはE2と同様に100ng/kg/day以上

の投与で対照群と比較して有意な子宮重量の増加が見られた。(図2)。

### C-3. E2 と DES のエストロゲン活性の比較

E2 と DES の子宮重量を比較した結果、図3に示すように、子宮重量の増加が見られた濃度や重量の増加率のいずれについても両者は同様のエストロゲン活性を有することが判明した。

### C-4. 子宮肥大試験による BPA のエストロゲン活性

BPA の投与では湿重量は 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、10mg/kg/day 投与群で若干の増加がみられ、50mg/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、E2 ほどの増加効果はなかった。

### C-5. 子宮肥大試験による Resveratrol のエストロゲン活性

子宮の湿重量は Resveratrol の 0.5 mg/kg/day 投与までは増加しなかったが、2 mg/kg/day 群では増加傾向を示し、

10mg/kg/day 投与群では有意に増加していた(図5)。しかし、BPA と同様に E2 ほどの増加効果はなかった。また、乾重量は 2 mg/kg/day および 10mg/kg/day の投与で有意な増加が見られた。一方、50mg/kg/day 以上の投与では 10mg/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。

### C-6. 子宮肥大試験による Genistein のエストロゲン活性

Genistein は 50mg/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 100mg/kg/day 投与群では子宮重量の増加に有意差がなくなった。

### C-7. E2 と BPA、Resveratrol および Genistein のエストロゲン活性の比較

BPA、Resveratrol および Genistein の 3 種類の内分泌かく乱物質と E2 とのエストロゲン活性を比較した結果を図7に示す。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 E2 と比較して非常に弱く、BPA 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、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 E2 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 は高濃度投与での子宮重量増加の抑制が見られた。

#### C-8. 低濃度のエストロゲンと環境ホルモン物質の組み合わせ投与

前述の結果をもとにして、体内のエストロゲンと環境ホルモン物質の相関を調べることを目的として、DES を除く 3 種の各物質とエストロゲンを子宮重量に影響しなかった濃度で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 E2 と Resveratrol の組み合わせで有意な増加が見られ、Genistein でも同様の傾向が生じることが明らかとなった (図 8)。

#### C-9. 子宮の組織学的比較

子宮の組織学的比較を行った結果、各物質の投与によって子宮重量が有意に増

加した投与群で子宮内膜上皮細胞やその他の間質細胞層や筋細胞層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。

#### D. 考察

##### D-1. 子宮肥大試験による E2 および DES のエストロゲン活性

これまでのマウスを用いた子宮肥大試験で、20ng/kg/day の投与では差が見られなかったものの 200ng/kg/day 以上の投与によって子宮重量の有意な増加が観察されたと報告されており (Andriana, D. *et al.*, *Toxic. Sci.*, 56, 332-339, 2000)、本研究の結果も同様の結果を示したことから、過去の実験結果に再現性のあることが明らかになるとともに、本研究の方法に問題がないことが確認された。

人工エストロゲンである DES は E2 よりもエストロゲン活性が高いとされているが、本研究の結果から、マウスを用いた子宮肥大試験ではそのエストロゲン活性が同じであることが示唆された。

##### D-2. 子宮肥大試験による BPA、Resveratrol および Genistein のエストロ

ゲン活性

BPA はラットを用いた子宮肥大試験の結果では 50mg/kg/day の投与によって乾重量が有意に増加し、湿重量も 100mg/kg/day で有意な増加が見られたことが報告されている (Kim, H. S. *et al.* J. Toxic. Sci., 26, 111-118, 2001)。また、過去のマウスを用いた研究では、40mg/kg/day 以上の投与で湿重量の有意な増加が見られた (Andriana, D. *et al.*, Toxic. Sci., 56, 332-339, 2000)。本研究の結果では、50mg/kg/day 以上の投与で子宮重量が有意に増加しており、過去のマウスでの結果と一致するとともに、BPA の子宮に対するエストロゲン活性はマウスとラットでほぼ同じであることが判明した。

未成熟ラットを用いた子宮肥大試験において、Resveratrol は 575 mg/kg/day の投与でも子宮の湿重量および乾重量ともに有意な増加が見られなかったことが報告されている (Freyberger, A. *et al.* Arch. Toxicol., 709-715, 2001)。しかし、本研究では子宮乾重量は 2 mg/kg/day 投与群でも有意な増加が見られた。実験方法やマウスとラットという種の違いがあるも

の、他の環境ホルモン物質では本研究の結果は過去の結果とほぼ同様の結果が得られている。そのため、このような Resveratrol での結果の相違を解明するために、さらに詳細な検討を行う必要があると思われた。

本研究では Genistein は 50mg/kg/day の投与で有意な子宮重量の増加が見られた。未成熟ラットを用いた子宮肥大試験では 20mg/kg/day の投与で子宮乾重量が有意に増加し (Yamazaki, K. *et al.*, Toxicology, 170, 21-30, 2002)、また、未成熟マウスを用いた子宮肥大試験による結果でも 100mg/kg/day の投与で有意な子宮重量の増加が見られ (Jefferson, W. N. *et al.*, J. Chromatography, 777, 179-189, 2002)、本研究とほぼ同様の結果が報告されている。

植物エストロゲンである Resveratrol では 50mg/kg/day 以上の、Genistein では 100mg/kg/day 以上の高濃度投与で子宮重量増加の抑制が見られた。この理由は明らかでないが、植物エストロゲンのエストロゲン作用が他の環境ホルモン物質と異なる機構によって起きている可能性があるとともに、発癌抑制などの作用に

関係している可能性も考えられる。

### D-3. 低濃度のエストロゲンと環境ホルモン物質の組み合わせ投与

子宮重量に影響しなかった低濃度の組み合わせ投与実験の結果、BPA は子宮重量がまったく変化しなかったのに対して、子宮乾重量は E2 と Resveratrol の組み合わせで有意に増加し、Genistein でも同様の傾向が見られた。この結果は植物エストロゲンが他の環境ホルモン物質よりも体内の E2 とより強く相乗的に作用する活性を持つ可能性を示している。これまで、子宮肥大法を用いたこのような低用量の複合作用の検討は行われていなかった。生体における環境ホルモン物質の影響は体内で産生・分泌されているエストロゲンとの複合作用によって生じることから、本研究で得られた組み合わせ投与による相乗作用の結果は今後環境ホルモン物質の生体への影響を検討する上で特に詳細な検討を要することを示唆している。

以上のように、本研究の結果を過去の子宮肥大法の結果と比較したところ、マウスを用いた子宮肥大試験法はラットを

用いた試験と同様に多くの環境ホルモン物質のエストロゲン活性を比較する手段として有効である可能性が示唆された。

本研究の結果を基にしてマウスを用いて種々の内分泌かく乱化学物質の影響をさらに比較することで、より詳細な内分泌かく乱化学物質の研究が進展することを期待する。

### E. 結論

本研究の結果から、以下の3点が明らかとなった。

- 1、マウスを用いた子宮肥大試験では E2 および DES のエストロゲン活性はほとんど同じだった。
- 2、BPA、Resveratrol および Genistein のエストロゲン活性は E2 と比較すると非常に弱く、BPA 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。また、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。
- 3、Resveratrol および Genistein は単独でエストロゲン活性が見られない濃度でも、同様の濃度の E2 と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。

### F. 健康危険情報

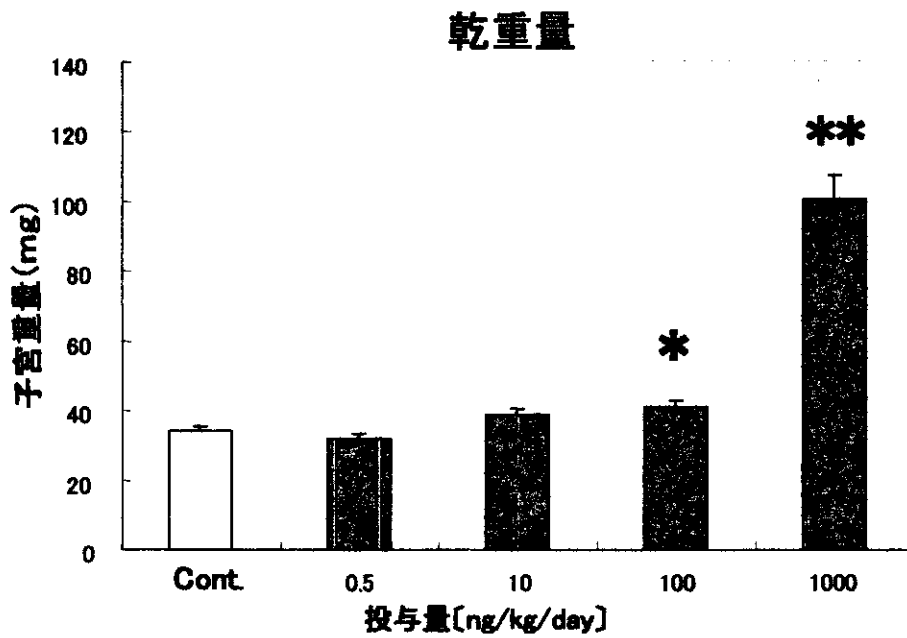
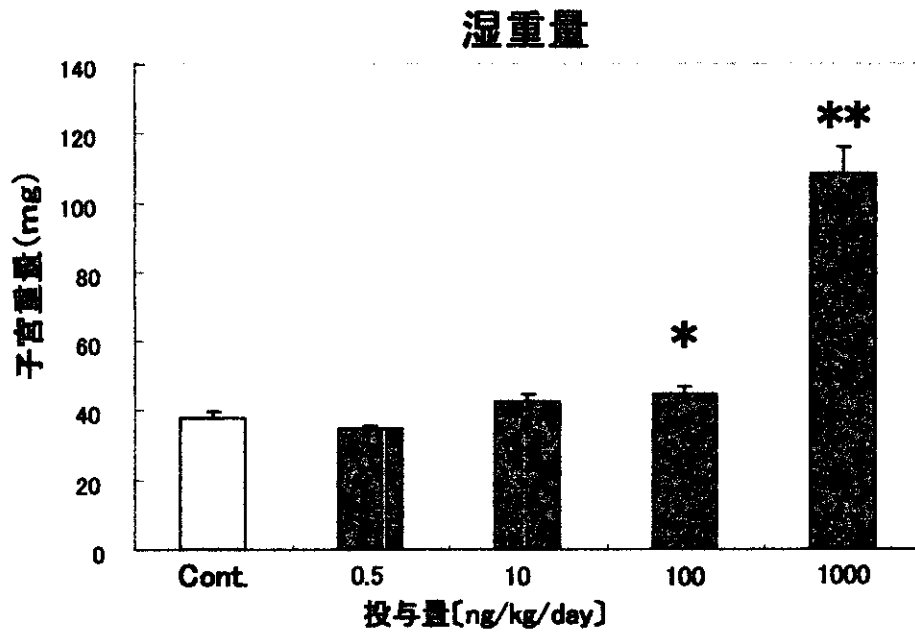
なし

**G. 研究発表**

なし

**H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）**

なし



**図1 マウスを用いた子宮肥大試験による Estradiol-17 $\beta$  のエストロゲン活性**

\*, \*\* : Control群に対して有意差あり( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )

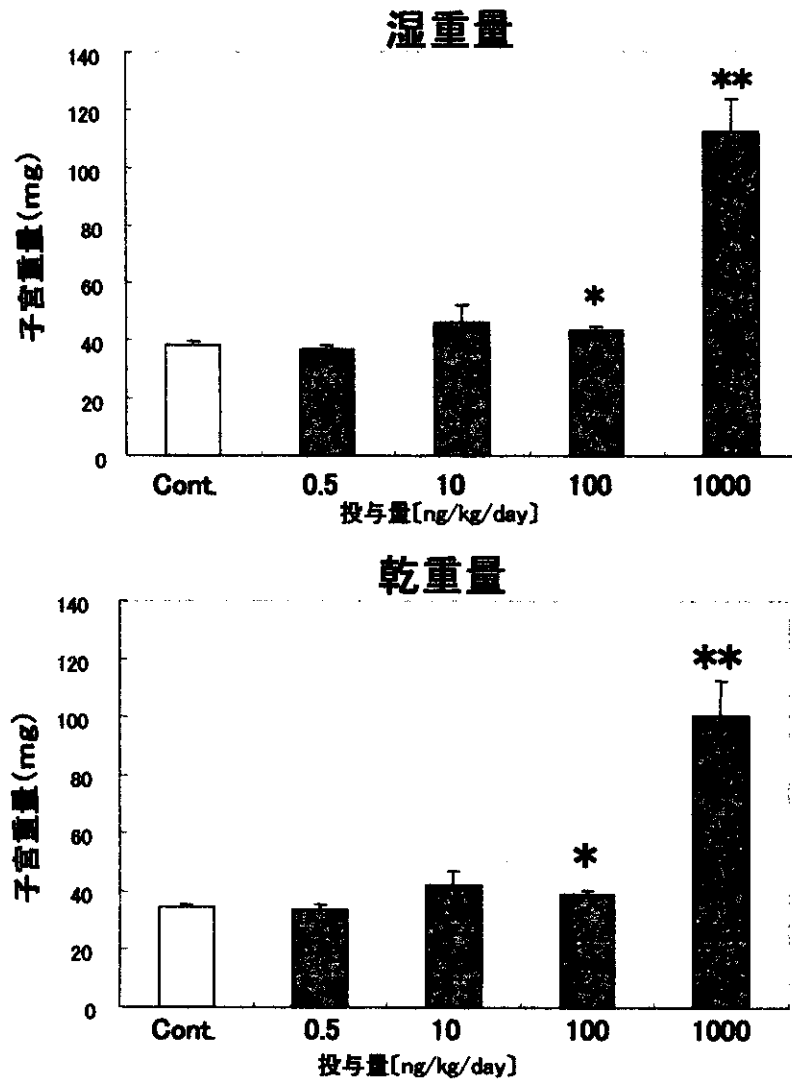
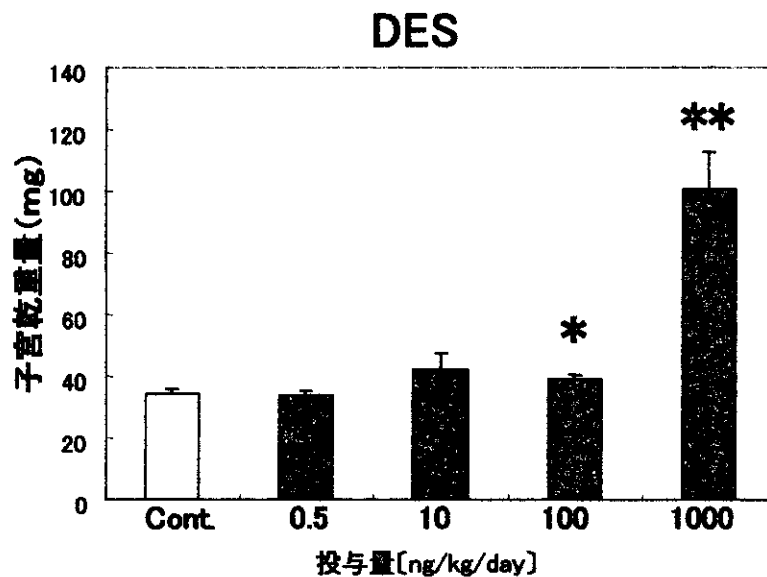
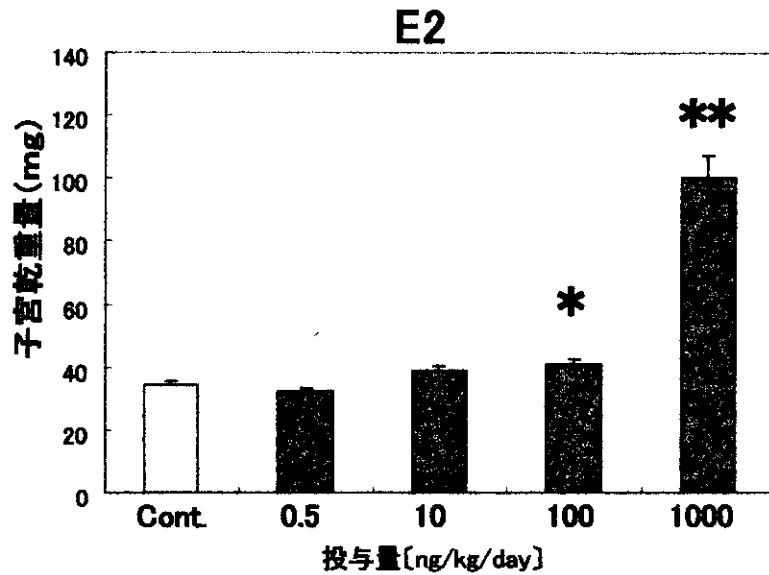


図2 マウスを用いた子宮肥大試験による Diethylstilbestrol のエストロゲン活性

\*, \*\* : Control群に対して有意差あり ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )



**図3 マウスを用いた子宮肥大試験による Estradiol-17 $\beta$  (E2)と Diethylstilbestrol (DES)のエストロゲン活性の比較**

\*, \*\* : Control群に対して有意差あり ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )

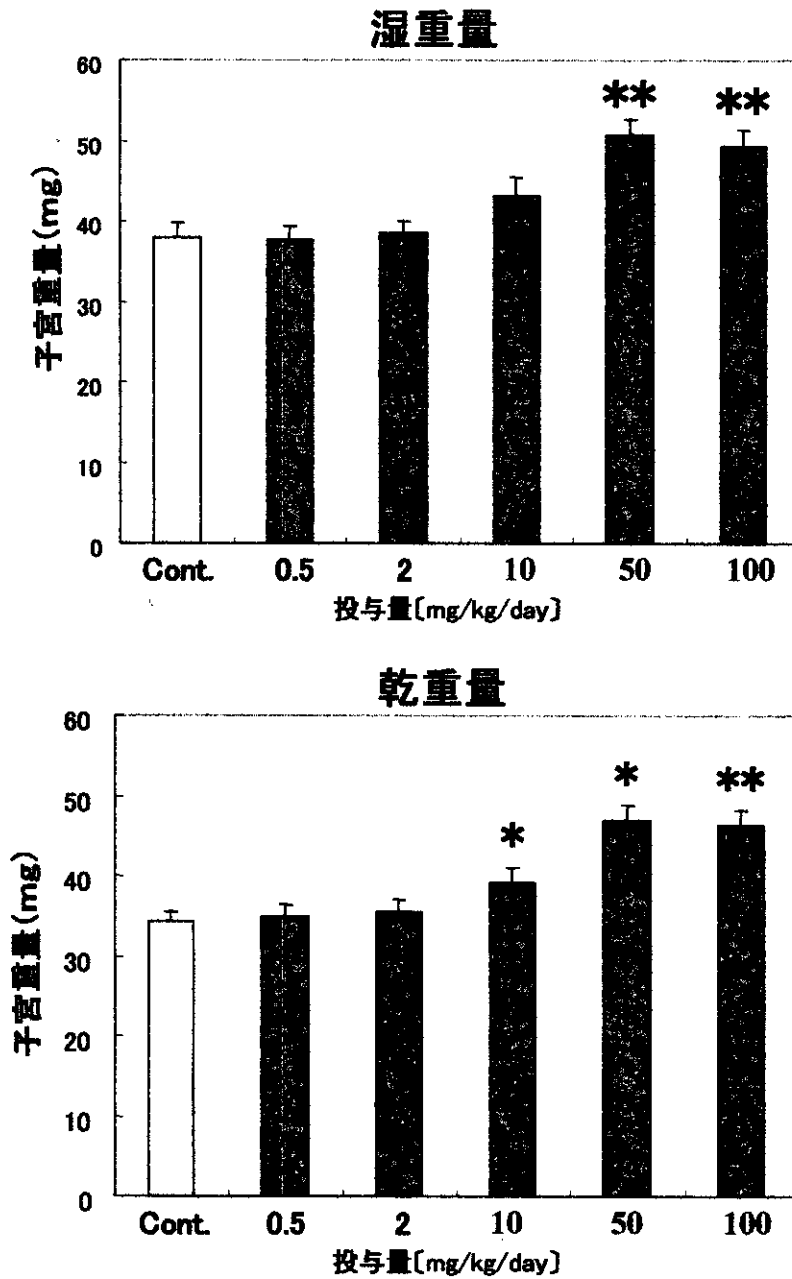
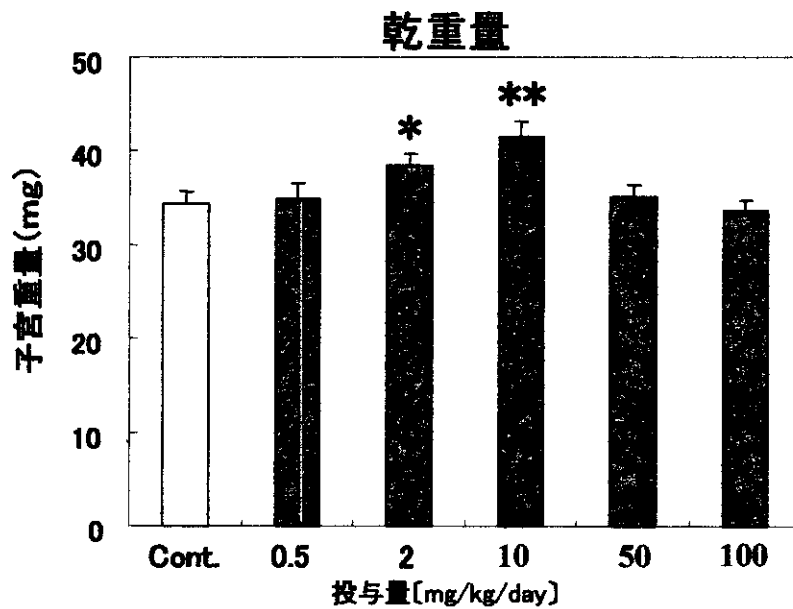
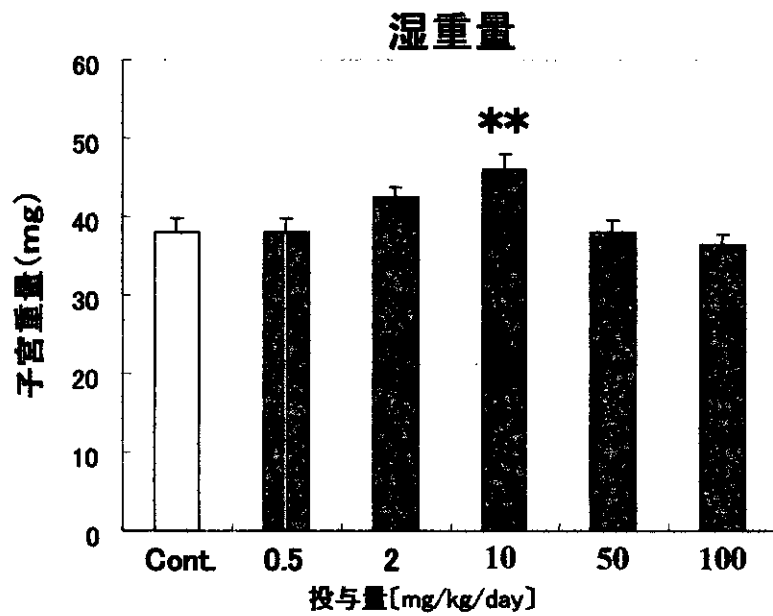


図4 マウスを用いた子宮肥大試験による Bisphenol Aのエストロゲン活性

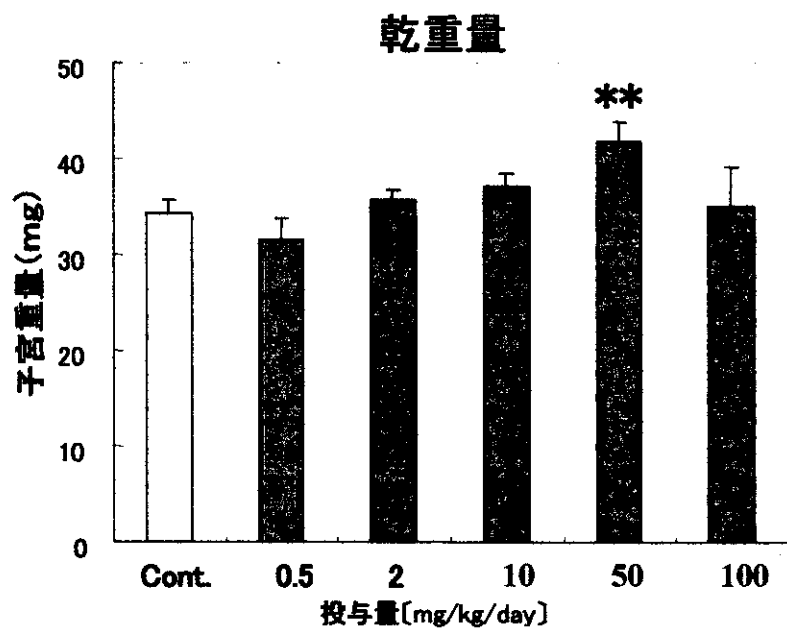
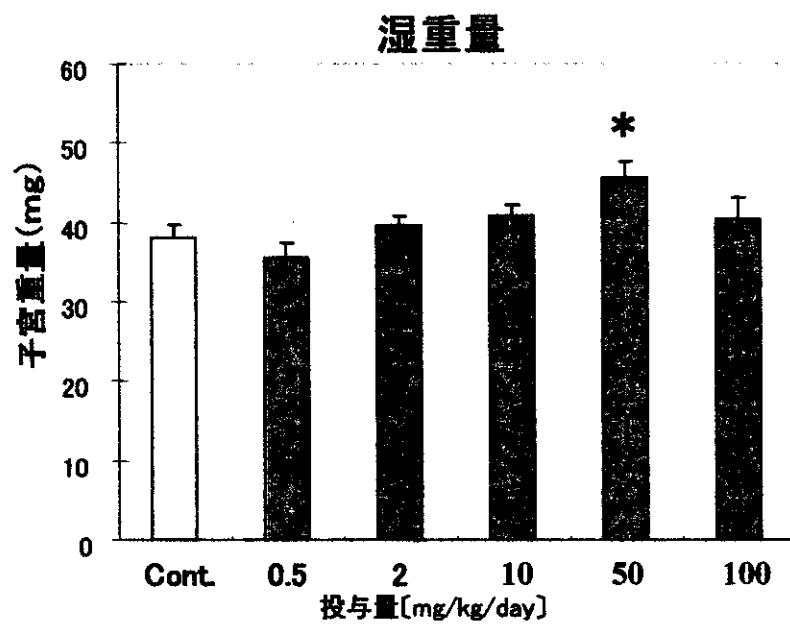
\*, \*\* : Control群に対して有意差あり ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )





**図5 マウスを用いた子宮肥大試験による Resveratrolのエストロゲン活性**

\*, \*\*: Control群に対して有意差あり ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )



**図6 マウスを用いた子宮肥大試験による Genistein のエストロゲン活性**

\*, \*\* : Control群に対して有意差あり ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )

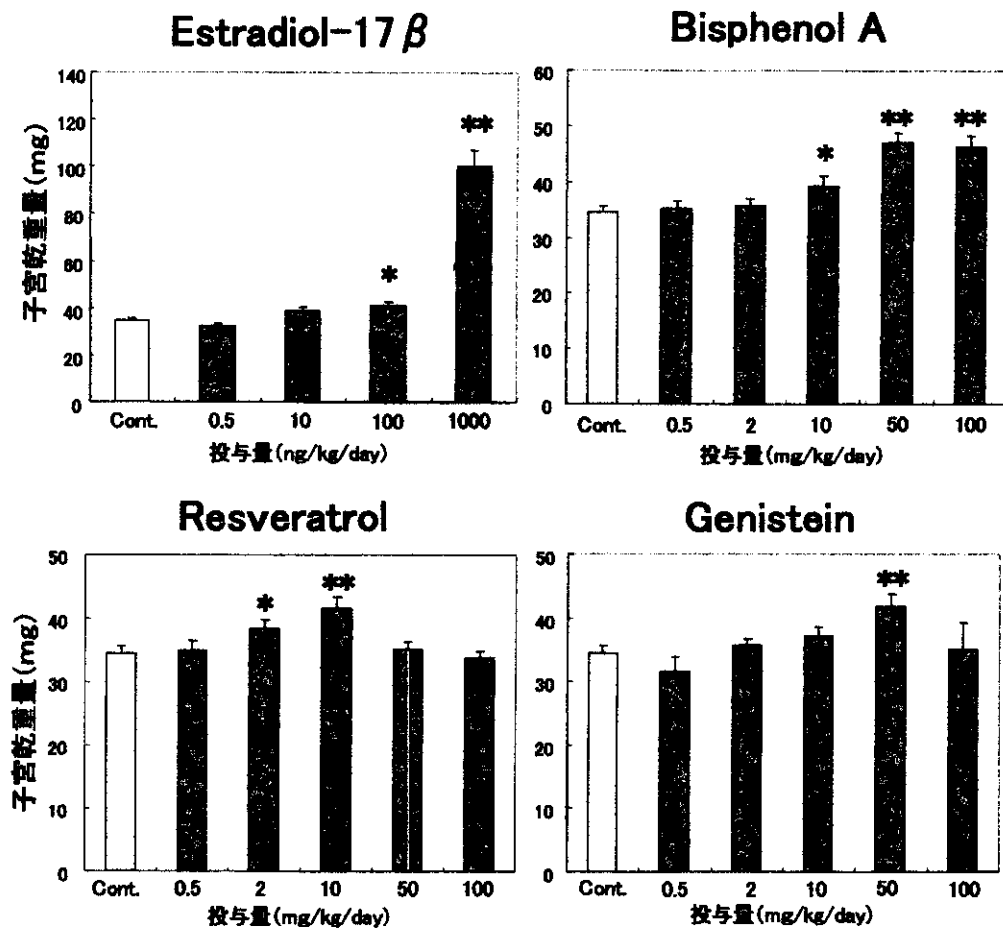


図7 マウスを用いた子宮肥大試験による内分泌攪乱化学物質および植物エストロゲンのエストロゲン活性の比較

\*, \*\*: Control群に対して有意差あり ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )

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

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・癌化  
および内分泌かく乱作用の比較

主任研究者	螺良 愛郎	関西医科大学	病理学第二講座	教授
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

### 研究要旨

植物に存在する天然エストロゲン（Resveratrol、Zearalenone、Genistein）のラット周生期暴露による発育・癌化および内分泌かく乱作用を比較した。方法として、Resveratrol は 10 mg/kg と 100 mg/kg、Zearalenone は 0.1 mg/kg と 10 mg/kg、Genistein は 1.5 mg/kg と 30 mg/kg を思春期前暴露として 15-19 日齢の雌新生仔に連日皮下投与、また、これに加うるに Genistein は出生前暴露として妊娠 15-19 日の母体に連日皮下投与を行い、雌新生仔につき検索し各の無処置対照群と比較した。また、50 mg/kg N-methyl-N-nitrosourea (MNU) を 28 日齢（Zearalenone、Genistein）あるいは 49 日齢（Resveratrol）に処置し、乳腺発癌に対する影響につき検討した。その結果、体重は Genistein 出生前投与群で有意に軽く、思春期前投与群で有意に重く、膻開口は Zearalenone 大量、Genistein 思春期前大量投与群で早く、性周期については Resveratrol と Genistein 投与群では全例周期性をみたが、Zearalenone 群では持続発情あるいは持続発情間期を呈する個体をみとめ、顕著な内分泌かく乱を呈した。なお、周生期（出生前あるいは思春期前）Genistein 投与はいずれも MNU 誘発乳腺発癌に対して抑制傾向を示し、とりわけ少量思春期前投与では有意な抑制をみた。

#### A. 研究目的

食品用器材には内分泌かく乱作用を有する Bisphenol A や Phthalate esters といった合成エストロゲンが使用され、食品中に混入する可能性がある。それとともに、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。