

B. 研究方法

B.1 被験動物

妊娠 14 日齢あるいは哺乳親つき生後 14 日齢の雌 Sprague-Dawley ラットを日本チャールス・リバー（日野飼育センター）より購入し、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 10\%$ 、12 時間照明の環境下で関西医大実験動物共同利用施設にて飼育した。ラットはポリイソペンテン（TPX、日本チャールス・リバー、厚木）ケージで飼育し、床敷として滅菌ストローブマツ細片（ホワイト・フレーク、日本チャールス・リバー）を使用した。また、動物飼料中の植物エストロゲン含量を配慮して、飼料としては内分泌かく乱作用を効果的に抑える NIH-07PLD

（phytoestrogen low diet）（オリエンタル酵母、千葉）を給餌した¹⁾。また、給水瓶はポリカーボネート製でゴム製のストッパーを使用した。以上により実験動物をとりまく周囲の環境から内分泌かく乱作用をもつ化学物質を極力排除した。なお、本研究は関西医科大学動物実験委員会で承認されており、実験にあたっては本学の実験動物指針に則り施行した。

B.2 被験物質

Resveratrol (3, 4', 5-trihydroxy-trans-stilbene) ならびに Zearalenone (6-(10-hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl) β -resorcylic acid-lactone) は Sigma (St. Louis, MO) より購入。各のガスクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーにより純度は $\geq 99.8\%$ ならびに $\geq 99\%$ である。Genistein (4, 5, 7-trihydroxyisoflavone) はフジッコ（神戸）より購入した。純度は高速液体クロマトグラフィー（high pressure liquid chromatography、HPLC）によると $\geq 99\%$ である。各試薬は購入後直ちに暗所 0°C に貯蔵し、使用直前に dimethylsulfoxide (DMSO、ナカライテスク、京都) に溶解し、暗所 4°C

に保存した。

B.3 思春期前植物エストロゲン投与による発育ならびに内分泌かく乱への影響

B.3.1 植物エストロゲンの投与方法ならびに投与量

雌ラット 15-19 日齢にかけて被験物質

(Resveratrol、Zearalenone、Genistein) を連日皮下投与した。動物は 3 群（1 群：無処置対照群；2 群：少量投与群；3 群：大量投与群）に分け（各群 30 匹）、Genistein のみは妊娠 15-19 日の母体に少量ならびに大量を皮下投与し、出生雌乳仔（各 30 匹）を検索に供し、無処置群（26 匹）と比較した。投与量として、Resveratrol は 10 mg/kg/day と 100 mg/kg/day とした。 10 mg/kg/day Resveratrol とはヒトが 1 日赤ワイン 500 グラスを飲む量に匹敵する用量であるが²⁾、この投与量は実験発癌に影響を及ぼすとする既報^{3,4)}に則り設定した。

Zearalenone は 0.1 mg/kg/day と 10 mg/kg/day としたが、 0.1 mg/kg Zearalenone はアメリカ人の 1 日暴露量が $0.02\text{-}0.1 \text{ mg/kg/day}$ という報告に則っている⁵⁾。Genistein は 1.5 mg/kg/day と 30 mg/kg/day をそれぞれ投与したが、 1.5 mg/kg/day はほぼアジア人の 1 日消費量に相当する⁶⁾。

B.3.2 エストロゲン標的臓器の機能・形態的変化の検索方法

膣開口（思春期発来）の有無は 21 日齢で離乳した後毎日観察した。Zearalenone と Genistein 投与動物は 28 日齢時に、Resveratrol 投与動物は 49 日齢にて、各群 6 匹ずつ屠殺し、体重ならびに相対子宮・卵巢重量を比較し、子宮、卵巢は HE 標本にて形態的にも評価した。片側乳腺からホルマリン・マウント標本を作製し、群間の発育を比較し、対側の乳腺はホルマリン固定・パラフィン標本を作製し、HE 染色を行うと

ともに、Genistein 実験に対しては Dako 社の LSAB キットを用い、エストロゲン受容体 α (ER α) 抗体 (6F11、ノボカストラ、ニューキャッスル・アプオン・タイン) と Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体 (PC10、ノボカストラ) の免疫染色を行った。これらの免疫染色にはマイクロウェーブによる抗原賦活を行い⁷⁾、乳管分岐の末梢部に位置し、 $\geq 100 \mu\text{m}$ 径を有する上皮集塊 (terminal end bud、TEB) の陽性細胞数を算出した。方法として異なる 5 個以上の TEB に対し、各標本総計 1000 個以上の乳腺上皮細胞を数え、陽性率を比較した。残余のラットは発癌試験施行のため、発癌剤 (MNU) 処置を施したが、8 週齢から連日 3 週間、膈スミアを採取し、性周期の観察を行った。

B.4 出生前あるいは思春期前 Genistein 投与による乳腺発癌への影響

B.4.1 実験群

以下の 5 群を設定した。

I 群：無処置対照群 (20 匹)

II 群：1.5 mg/kg Genistein を妊娠 15-19 日の母体に連日皮下投与し、出生雌乳仔を実験に供する (24 匹)

III 群：30 mg/kg Genistein を妊娠 15-19 日の母体に連日皮下投与し、出生雌乳仔を実験に供する (24 匹)

IV 群：1.5 mg/kg Genistein を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与 (24 匹)

V 群：30 mg/kg Genistein を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与 (24 匹)

I-V 群の新生仔雌 Sprague-Dawley ラットに対し、生後 28 日齢にて 50 mg/kg MNU を単回腹腔内投与し、乳腺発癌を促した。そして最大乳腺腫瘍の腫瘍径が $\geq 1\text{cm}$ に達した時点で屠殺し、実験は MNU 投与後 22 週にて終了した。なお、全例剖検を行った。

B.4.2 乳癌検索手法

肉眼的に認められた乳腺腫瘍とともに“正常”乳腺組織はすべて 10%ホルマリン固定・パラフィン包埋切片とし、組織学的にみとめうる微小乳腺腫瘍を検出した。なお、乳腺腫瘍の組織分類は Russo ら⁸⁾の既報に則り、乳癌と診断した腫瘍についてのみ解析した。乳腺発癌の指標として、乳癌発生率は $\geq 1\text{cm}$ 乳癌を発症した匹数/全有効匹数とし、乳癌多発率は組織的に確認しえた微小乳癌をも含めた全乳癌個数/全有効匹数とし、潜伏期は MNU 投与後ラットが $\geq 1\text{cm}$ 乳癌を生じて屠殺するまでの日数とした。

B.5 統計処理

体重、相対子宮一卵巣重量、膈開口、腫瘍発生率、腫瘍多発率や潜伏期は、平均 \pm 標準偏差 (誤差) で表現した。性周期は χ^2 検定で行い、腫瘍発生率は Mantel-Cox Logrank 試験を行った。他の試験は正規性、分散を検定後、ANOVA あるいは Kruskal-Wallis で検定し、 < 0.05 の場合 Fisher の PLSD 試験あるいは Bonferroni/Dunn の試験を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

C. 研究結果

C.1 思春期前 Resveratrol 投与による発育や内分泌かく乱への影響

15 日齢 (Resveratrol 連日 5 回投与の初回投与時) から 49 日齢に至る相対体重増加率は群間に差をみなかった (Fig. 1)。また、平均膈開口日齢は無処置対照群 (36.8 日) に対し少量投与群 (36.7 日)、大量投与群 (35.9 日) で、Resveratrol の用量によりやや早発する傾向をみたが、群間有意差はみなかった (Fig. 2)。しかし、49 日齢時では相対子宮一卵巣重量は大量 Resveratrol 投与群で有意に重かった (Table 1)。但し乳腺も含めて組織形態学的に異常はみない。次に乳腺発癌への影響をみるため、49 日齢

に 50 mg/kg MNU 処置をうけたラットの性周期を 8 週齢より 3 週間連日みると、正常の 4-5 日サイクルを呈する個体は Resveratrol 用量依存的に減少したが、いずれのラットも周期性は有していた (Fig. 3)。また、周期の時相の違いをみたところ、Resveratrol の用量依存性に発情期 (estrus) が延長していることが判明した。なお、49 日齢の乳腺の発育は形態的には差はみなかった (発癌実験は現在継続中である)。

C.2 思春期前 Zearalenone 投与による発育や内分泌かく乱への影響

生後 2 週齢 (Zearalenone 投与開始時) より 15 週齢までの体重は Zearalenone 投与により影響をうけない (Fig. 4)。28 日齢時における子宮-卵巣重量にも有意差はなく

(Table 3)、組織学的にも著変をみない。なお、この時期乳腺の発育にも変化はみなかった。しかし、Zearalenone 大量投与群では無処置対照群に比して有意に膣開口の早発がみられた (Fig. 5)。また、性周期は全ての対照ラットが正常 4-5 日サイクルであったのに対し Zearalenone 投与群では顕著な異常を呈し、少量、大量投与群ともに、持続発情や持続発情間期といった周期性のみられない個体を高率にみとめ (Fig. 6)、Zearalenone 投与では用量依存性に発情期の延長をみた (Fig. 7)。なお、発癌試験は現在継続中である。

C.3 出生前・思春期前 Genistein 投与による発育や内分泌かく乱への影響

出生前 Genistein 投与は無処置対照ラットに比して低体重で、逆に思春期前 Genistein 投与は体重増加を促進した (Fig. 8)。体重は 28 日齢においても同様の傾向をみたが、この時点での Genistein 処置ラットの相対子宮-卵巣重量はいずれも無処置対照ラットに比して軽い傾向にあった (Table 4)。

なお、膣開口は思春期前大量 Genistein 投与群のみ有意に早発した (Fig. 9)。性周期についてみると、無処置対照ラットは全て正常の 4-5 日周期を呈したのに対し、Genistein を投与した各群の >80% は正常周期を呈しており、周期の短縮や延長をみた個体もあったが、周期性のない個体はみなかった (Fig. 10)。周期の内訳をみると、思春期前 Genistein 投与ラットでは大量投与群、少量投与群いずれも発情期の延長をみた (Table 5)。

C.4 出生前・思春期前 Genistein 投与による乳腺への影響

28 日齢時の乳腺をホール・マウント標本で比較したところ、乳腺の発育は群間に差をみず、Genistein 処置の如何に関わらず乳腺の辺縁部には等しく TEB 構造をみた。ラット乳腺発癌は TEB より始まると考えられている。それ故、TEB の細胞形質ならびに細胞動態解析は重要である。無処置対照ラットの TEB に比し、Genistein 投与ラットの TEB では ER α 陽性細胞数の有意な低下と PCNA 標識率の有意な減少をみた (Table 6)。

C.5 出生前・思春期前 Genistein 投与による MNU 誘発乳腺発癌への影響

28 日齢における 50 mg/kg MNU の単回腹腔内投与による Genistein 乳腺発癌に対する影響を検討した。実験は MNU 投与後 22 週 (26 週齢時) に終了したが、経過中 Genistein の出生前大量投与群ならびに思春期前大量投与群の各 1 匹が体重減少をきたして死亡したので、この 2 匹は実験から除外した。また、乳腺腫瘍として組織学的に、微小な腺腫をみたが (1 群 : 1 個、3 群 : 1 個、5 群 : 2 個)、腺癌と診断したもののみデータ解析を行った。その結果、乳癌発生率 (≥ 1 cm 乳癌保有匹数 / 有効匹数) は無

処置群に比して Genistein 処置群はいずれも低い傾向にあった (Fig. 11)。このうち思春期前少量 Genistein 投与群 (4 群) では有意な減少をみたが、他の Genistein 処置群では統計学的に有意な減少には至らなかった (Table 7)。乳癌多発率 (1 匹当たりの乳癌個数) は、特に思春期前 Genistein 投与群で低い傾向にあったが、無処置対照ラットに比して有意には至らなかった。なお、腫瘍潜伏期 (MNU 投与から最大乳腺腫瘍径が $\geq 1\text{cm}$ になるまでの期間) は Genistein 投与ラットで僅かに延長をみたが統計的に有意差はみなかった。

D. 考察

Resveratrol は天然に存在する植物性化学物質で、ブドウの外皮に濃縮して存在し、赤ワインにも豊富にみとめられる³⁹⁾。Resveratrol はファイトアレキシンとして作用し、植物を病原体感染から防御すると考えられているが、Resveratrol は ER と結合し、エストロゲン作用を示すことから、植物エストロゲンに含まれている¹⁰⁾。事実、Resveratrol のスチルベン構造はエストラジオールや DES と類似する⁹⁾。思春期前のエストラジオール、DES やテストステロン投与は膣開口の早発を来すのみならず、膣スメアの周期性をかく乱する¹¹⁾。未熟ラットを用いた子宮重量アッセイによると 120 mg/kg Resveratrol を皮下あるいは経口的に 3 日間連日投与してもエストロゲン活性は検出できず¹²⁾、575 mg/kg を 3 日間連日皮下投与してもエストロゲン活性はないとの報告もある¹³⁾。1000 $\mu\text{g/day}$ Resveratrol の離乳期ラットへの 6 日間連日投与でも体重増加やエストロゲン標的雌性生殖器への影響はないかあっても微弱と考えられる¹⁴⁾。他方、成熟ラットへの 7 日間の Resveratrol の飲水投与 (100 $\mu\text{M}/10\%$ エタノール) による体重減少や卵巣重量増加、性周期のかく

乱が示されているが¹⁵⁾、20 mg/kg Resveratrol を 28 日間連日成熟ラットに経口投与しても、体重をはじめ目立った毒性はないとの報告もみる²⁾。今回の思春期前 Resveratrol 投与では、体重増加には影響はなく、49 日齢での大量投与群において相対子宮-卵巣重量の増加をみたが、組織的には著変はなく、性周期をみると Resveratrol の用量依存的に発情期の延長をみたが、全例に周期性をみた。

Zearalenone は穀物に寄生するフサリウムの産生するカビ毒で、汚染された穀物を介してヒトに摂取される。Zearalenone はエストロゲン活性を有するため、家畜の成長促進に使用され、食肉を介してもヒトに混入する可能性がある。新生仔 (3-5 日齢) のマウスやラットに Zearalenone を投与すると膣開口の早発をみとめ、やがて持続発情をきたし、卵巣は拡張した卵胞のみからなり、黄体の新生をみない (無排卵性不妊)^{16,17)}。新生仔 (出生から連日 5 回) マウスに 1 μg という微量の Zearalenone を皮下投与しても 8 ヶ月齢で 74% に黄体の欠落をみる¹⁸⁾。今回の 10 mg/kg/day Zearalenone 投与では有意に思春期早発をみた。なお、28 日齢では子宮、卵巣に著変はみとめなかったが、8 週齢以降の性周期の著明な変動は Zearalenone の強い内分泌かく乱作用を示し、黄体の欠如を示唆するものと思われる。

Genistein は大豆に含まれる主要な植物エストロゲンで、エストラジオールと構造が類似し、ER を介する作用の他に、トポイソメラーゼ II を阻害したり、血管新生を抑制したり、抗酸化作用を示したり、細胞分化を促すといった多彩な作用を持つ。Genistein の体重への影響として出生前投与では体重減少をきたし、思春期前投与では変化なしとの報告をみる^{19,20)}。今回の実験では、出生前投与により体重減少をきたし、

思春期前投与では逆に体重増加をみた。既報²¹⁾と同様、28週齢の相対子宮-卵巣重量は Genistein 投与により減少していたが、組織学的には著変はみなかった。思春期前に大量の Genistein を投与されたラットでは思春期早発をみたが、他の実験群では対照と差がなく、性周期に対する Genistein 投与の影響は、>80%のラットに影響をみなかった。但し、思春期前投与では大量・少量投与群ともに発情期の延長をみた。一方、出生前投与群では発情期の延長はみなかった。以上、3つの植物由来化学物質を比較すると、内分泌かく乱作用は Zearalenone が強く、Resveratrol がひとの生理的用量を上回る量を投与していることを考慮すると、次に Genistein が続き、Resveratrol は最弱と考えられた。

7, 12-dimethylbenz (α) anthracene

(DMBA) や MNU によるラット誘発乳癌モデルにおいて、Genistein を出生直後²²⁾あるいは思春期前^{20, 23)}に投与すると乳癌が抑えられる。一方、妊娠後期の母体に与えると出生雌乳仔の乳癌を増悪さすとの報告をみる^{19, 24)}。ラット誘発乳癌において発癌剤の感受性は発癌剤投与時の乳腺の分化状態に依存する²⁵⁾。すなわち、発癌剤の標的とされる未熟な TEB 構造が、分化した腺胞芽 (alveolar bud) に分化すれば、おのずと乳腺発癌は抑制される。かつ、発癌剤投与時の性周期の時相も発癌に影響を及ぼす^{26, 27)}。ヒトにおいて乳癌発癌の起始過程は思春期発来後に生ずるとは限らないが、通常のラット乳腺発癌実験において、発癌剤は思春期発来後の50日齢に処置されている。以上の事象をふまえ、代謝を要しない直接発癌剤である MNU を、未だ乳腺の発育が均一な思春期発来前 (28日齢) に施行し、周生期 Genistein 暴露の乳腺発癌に及ぼす影響を検討したところ、思春期前 Genistein 投与にとどまらず、出生前

Genistein 投与においても乳癌の抑制傾向をみとめ、とりわけ 1.5 mg/kg (生理的用量) の思春期前投与では乳癌の有意な抑制をみた。

今回 MNU を投与した 28日齢は、被験ラットすべてが思春期発来前で、ホール・マウント標本でみる乳腺の辺縁部に TEB を等しく認め、Genistein 投与による乳腺の分化は無処置対照と比較して差を認めなかった。ところが、発癌剤の標的とされる TEB の細胞形質や増殖動態をみると、Genistein 投与により有意の ER α 陽性細胞数の減少と PCNA 標識率の低下が観察された。ヒトや動物で、妊娠 (経産) は乳癌を抑制することが知られている。我々はこの機構を解明すべく、ラットモデルを用いて解析したところ、経産マウスの正常乳腺は未産のそれに比して、ER α 陽性細胞数の減少と細胞増殖活性の低下をみた⁷⁾。ラット誘発乳癌の大半 (>80%) はホルモン依存性であることから、今回の乳癌抑制の機序として、ホルモン依存性乳癌の前駆細胞たる ER α 陽性細胞の減少と細胞増殖率の低下が ≥ 1 cm 乳癌を抑えた結論できる。大豆や大豆製品をよく摂取するアジア人女性は、西洋諸国に成人してから移住しても、乳癌の発生は低率にとどまる²⁸⁾。疫学的あるいは今回の実験からも、出生前あるいは思春期前の短期間、アジア人の摂取する生理的用量あるいはその 20 倍量の Genistein を摂取すると、乳癌の増悪はなく、乳癌の抑制に寄与すると考えられ、特に思春期前の生理的用量の Genistein 摂取は有効と考える。

E. 結論

1. 天然エストロゲンとして Resveratrol、Zearalenone、Genistein の発育ならびに内分泌かく乱作用につきラットを用いて検討した。
2. 1日投与量として Resveratrol は赤ワイ

ンに換算して 500 グラスならびにその 10 倍量、Zearalenone はアメリカ人の 1 日最大暴露量ならびにその 100 倍量、Genistein はアジア人の 1 日消費量ならびにその 20 倍量とした。

3. 体重は投与量の如何に関わらず、Genistein の出生前投与で減少し、思春期前投与で増加したが、Resveratrol、Zearalenone では影響をみななかった。

4. 思春期発来（膻開口）は Zearalenone 大量群と Genistein 思春期前大量投与群で早発したが、Resveratrol では影響をみななかった。

5. 相対子宮-卵巣重量は Resveratrol（49 日齢）で増加、Genistein（28 日齢）で減少をみたが、Zearalenone（28 日齢）では変化なく、いずれにおいても組織的な異常はみとめなかった。

6. 性周期は Resveratrol と Genistein の思春期前投与では発情期の延長をみたが、全例周期性は呈していた。一方、Zearalenone 投与ラットでは少量・大量投与群とも持続発情や持続発情間期といった顕著な異常をみた。

7. 以上より、3つの被験物質について、投与量をヒトの暴露量を勘案して比較すると、内分泌かく乱作用の強度は Zearalenone > Genistein > Resveratrol と考えられる。

8. Genistein の周生期暴露は乳癌を抑制する傾向にある。特に思春期前の生理的用量の投与では有意な抑制をみた。

9. Genistein の乳癌抑制機構は、正常乳腺における癌化の標的部位 (TEB) における ER α 陽性細胞数の減少と細胞増殖率の低下による。

F. 参考文献

1) Kanno J, Kato H, Iwata T, Inoue T. Phytoestrogen-low diet for endocrine disruptor studies. *J Agr Food Chem* 50:

3883-3885, 2002.

- 2) Juan ME, Vinardell MP, Planas JM. The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *J Nutr* 132: 257-260, 2002.
- 3) Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220, 1997.
- 4) Bhat KP, Lantvit D, Christov K, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models. *Cancer Res* 61: 7456-7463, 2001.
- 5) Kuiper-Goodman T. Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. *Can J Physiol Pharmacol* 68: 1017-1024, 1990.
- 6) Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. Genistein and daidzein and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agr Food Chem* 41: 1961-1967, 1993.
- 7) Yang J, Yoshizawa K, Nandi S, Tsubura A. Protective effects of pregnancy and lactation against N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinomas in female Lewis rats. *Carcinogenesis* 20: 623-628, 1999.
- 8) Russo J, Russo IH, Rogers AE, van Zwieten MJ, Gusterson B. Tumours of the mammary gland. In *Pathology of Tumours in Laboratory Animals*. Vol. 1, Tumours of the rat, No. 99, VS Turusov, U Mohr (eds). Lyon, IARC Scientific Publ, 1990, pp47-

- 78.
- 9) Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14138-14143, 1997.
 - 10) Clarke R, Hilakivi-Clarke L, Cho E, James MR, Leonessa F. Estrogens, phytoestrogens, and breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 401: 63-85, 1996.
 - 11) Nass TE, Matt DW, Judd HL, Lu JK. Prepubertal treatment with estrogen or testosterone precipitates the loss of regular estrous cyclicity and normal gonadotropin secretion in adult female rats. *Biol Reprod* 31: 723-731, 1984.
 - 12) Ashby J, Tinwell H, Pennie W, Brooks AN, Lefevre PA, Beresford N, Sumpter JP. Partial and weak oestrogenicity of the red wine constituent resveratrol: consideration of its superagonist activity in MCF-7 cells and its suggested cardiovascular protective effects. *J Appl Toxicol* 19: 39-45, 1999.
 - 13) Freyberger A, Hartmann E, Hildebrand H, Krotlinger F. Differential response of immature rat uterine tissue to ethinylestradiol and the red wine constituent resveratrol. *Arch Toxicol* 74: 709-715, 2001.
 - 14) Turner RT, Evans GL, Zhang M, Maran A, Sibonga JD. Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats? *Endocrinology* 140: 50-54, 1990.
 - 15) Henry LA, Witt DM. Resveratrol: phytoestrogen effects on reproductive physiology and behavior in female rats. *Horm Behav* 41: 220-228, 2002.
 - 16) Kumagai S, Shimizu T. Neonatal exposure to zearalenone causes persistent anovulatory estrus in the rat. *Arch Toxicol* 50: 279-286, 1982.
 - 17) Ito Y, Ohtsubo K. Effects of neonatal administration of zearalenone on the reproductive physiology of female mice. *J Vet Med Sci* 56: 1155-1159, 1994.
 - 18) Williams BA, Mills KT, Burroughs CD, Bern HA. Reproductive alterations in female C57BL/Crgl mice exposed neonatally to zearalenone, an estrogenic mycotoxin. *Cancer Lett* 46: 225-230, 1989.
 - 19) Hilakivi-Clarke L, Cho E, Onojafe I, Raygada M, Clarke R. Maternal exposure to genistein during pregnancy increases carcinogen-induced mammary tumorigenesis in female rat offspring. *Oncol Rep* 6: 1089-1095, 1999.
 - 20) Hilakivi-Clarke L, Onojafe I, Raygada M, Cho E, Skaar T, Russo I, Clarke R. Prepubertal exposure to zearalenone or genistein reduces mammary tumorigenesis. *Br J Cancer* 80: 1682-1688, 1999.
 - 21) Awoniyi CA, Roberts D, Veeramachaneni DN, Hurst BS, Tucker KE, Schlaff WD. Reproductive sequelae in female rats after in utero and neonatal exposure to the phytoestrogen genistein. *Fertil Steril* 70: 440-447, 1998.
 - 22) Lamartiniere CA, Moore JB, Brown NM, Thompson R, Hardin MJ, Barnes S. Genistein suppresses mammary cancer in rats. *Carcinogenesis* 16: 2833-2840, 1995.
 - 23) Murrill WB, Brown NM, Zhang JX, Manzollillo PA, Barnes S, Lamartiniere CA. Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats. *Carcinogenesis* 17: 1451-1457, 1996.
 - 24) Yang J, Nakagawa H, Tsuta K, Tsubura A. Influence of perinatal genistein exposure

on the development of MNU-induced mammary carcinoma in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett* 149: 171-179, 2000.

- 25) Russo J, Russo IH. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab Invest* 57: 112-137, 1987.
- 26) Ratko TA, Beattie CW. Estrous cycle modification of rat mammary tumor induction by a single dose of N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Res* 45: 3042-3047, 1985
- 27) Anderson CH, Hussain RA, Han MC, Beattie CW. Estrous cycle dependence of nitrosomethylurea (NMU)-induced preneoplastic lesions in rat mammary gland. *Cancer Lett* 56: 77-84, 1991.
- 28) Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, Wu-Williams AH, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Rosenthal JF, et al. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst* 85: 1819-1827, 1993.

G. 研究発表

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.

H. 知的所有権の取得状況

なし

I. 健康危険情報

なし

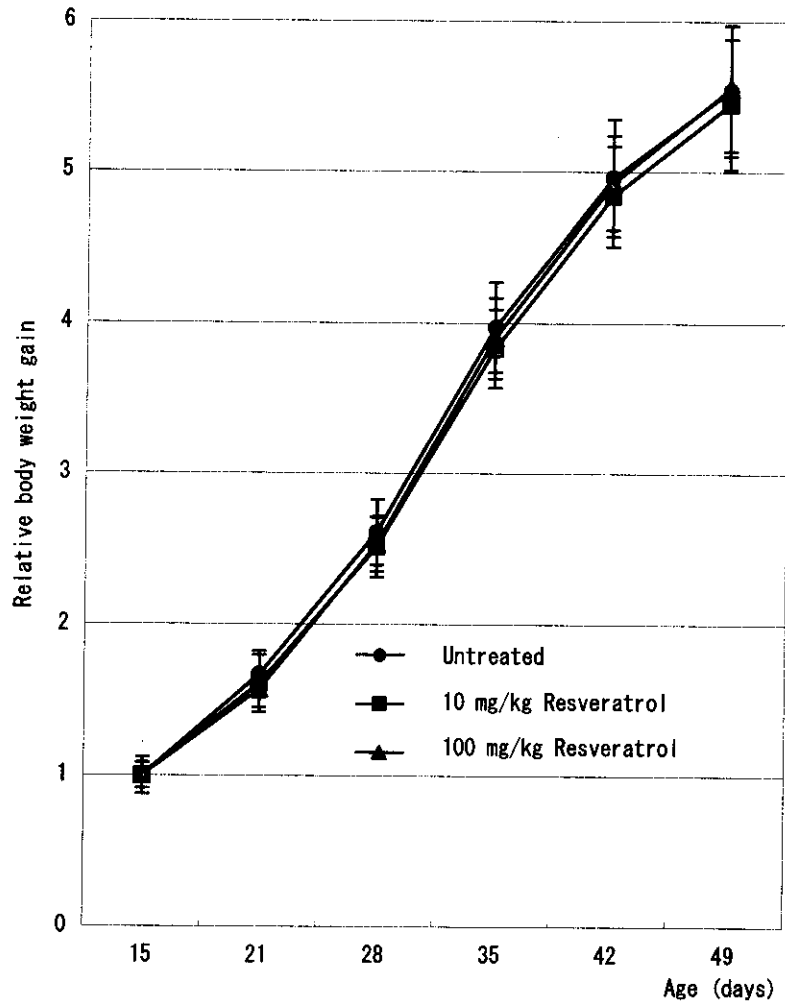


Fig. 1 Relative body weight gains in prepubertal resveratrol-treated or -untreated female Sprague-Dawley rats

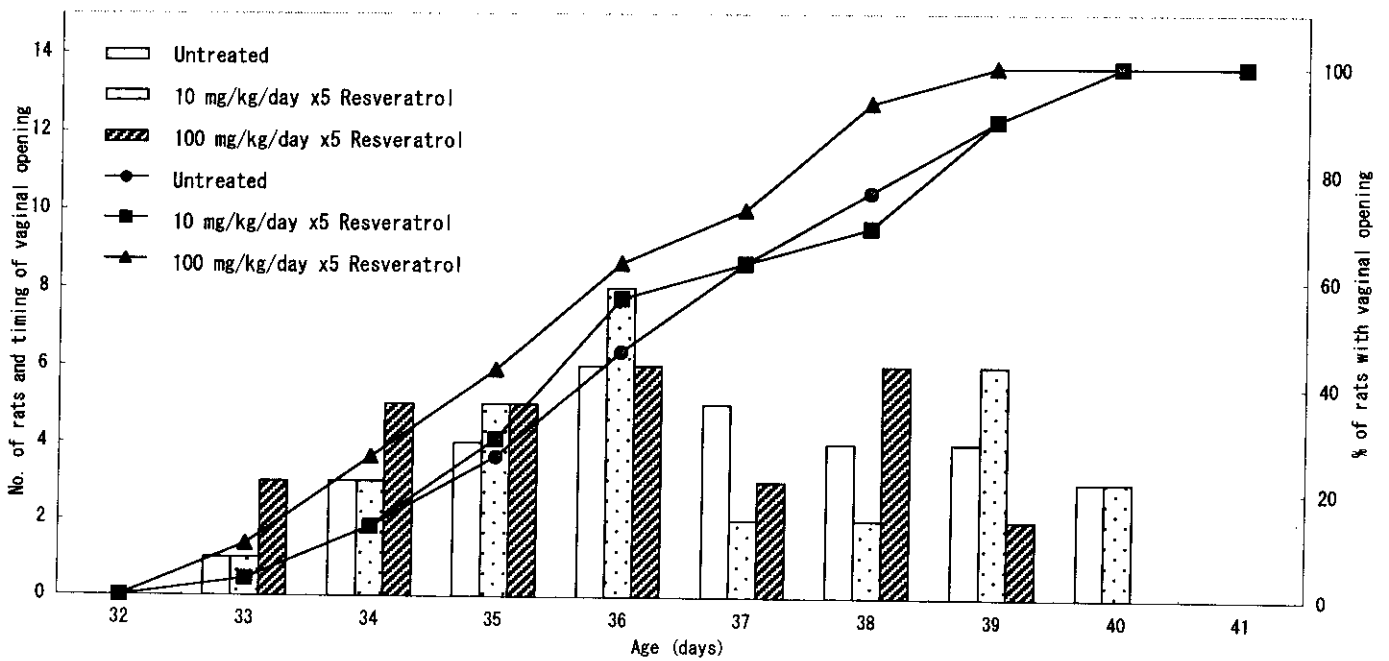


Fig. 2 Vaginal opening in relation to resveratrol treatment

Table 1 Effect of prepubertal resveratrol treatment on body weight and relative uterine-ovarian weight in female Sprague-Dawley rats at 49 days of age

Group	Resveratrol treatment	Body weight (g)	Relative uterine-ovarian weight (% BW)
1	Untreated	184±8	0.29±0.03
2	10mg/kg/day x5	176±19	0.32±0.05
3	100mg/kg/day x5	178±20	0.37±0.08*

Each group consists of 6 rats

Values represents mean±SD

* p < 0.05 compared with group 1 (Fisher's PLSD)

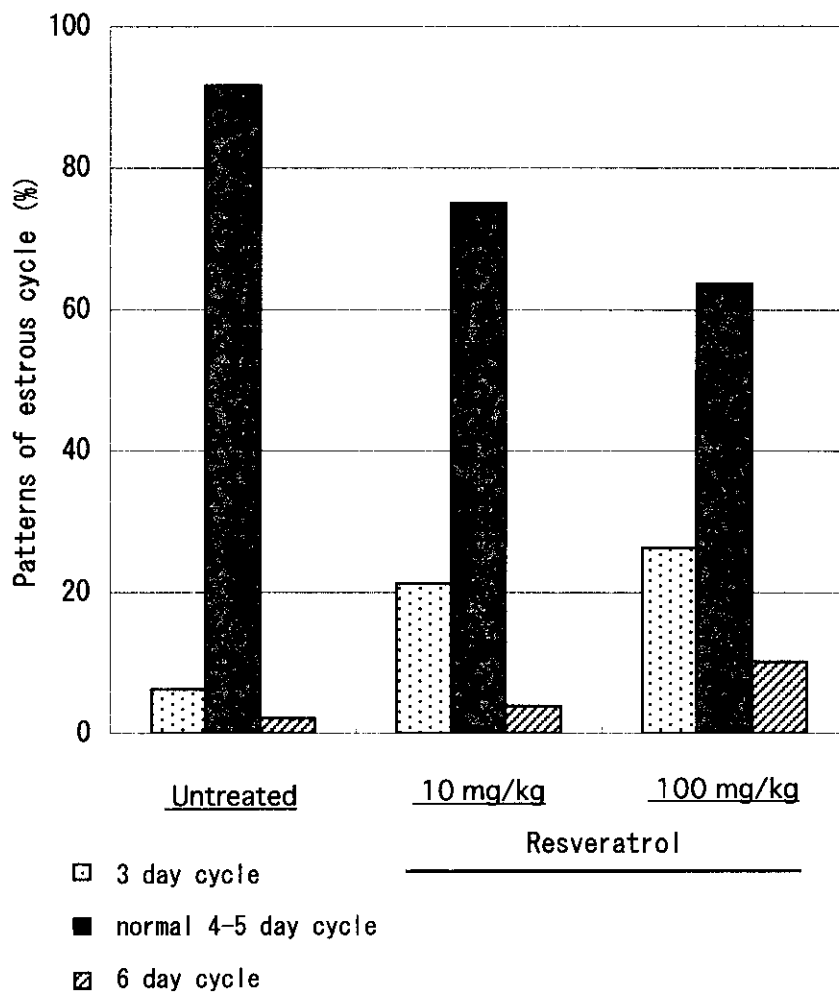


Fig. 3 Patterns of estrous cycle in relation to resveratrol treatment

Table 2 Percent of time spent in each phase of estrous cycle in female Sprague-Dawley rats treated with resveratrol at prepuberty

Group	Resveratrol treatment	% of time spent in each phase of cycle			
		Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
1	Untreated	19.8±5.4	26.2±4.0	32.9±7.1	21.0±7.0
2	10mg/kg/day	16.7±6.1	33.1±6.4	30.2±7.3	20.0±8.3
3	100mg/kg/day	13.3±5.4	38.5±7.4	27.4±7.2	20.8±11.3

Each group consist of 24 rats
 Examined during 8 to 11week of age
 Values represents mean ± S.D.

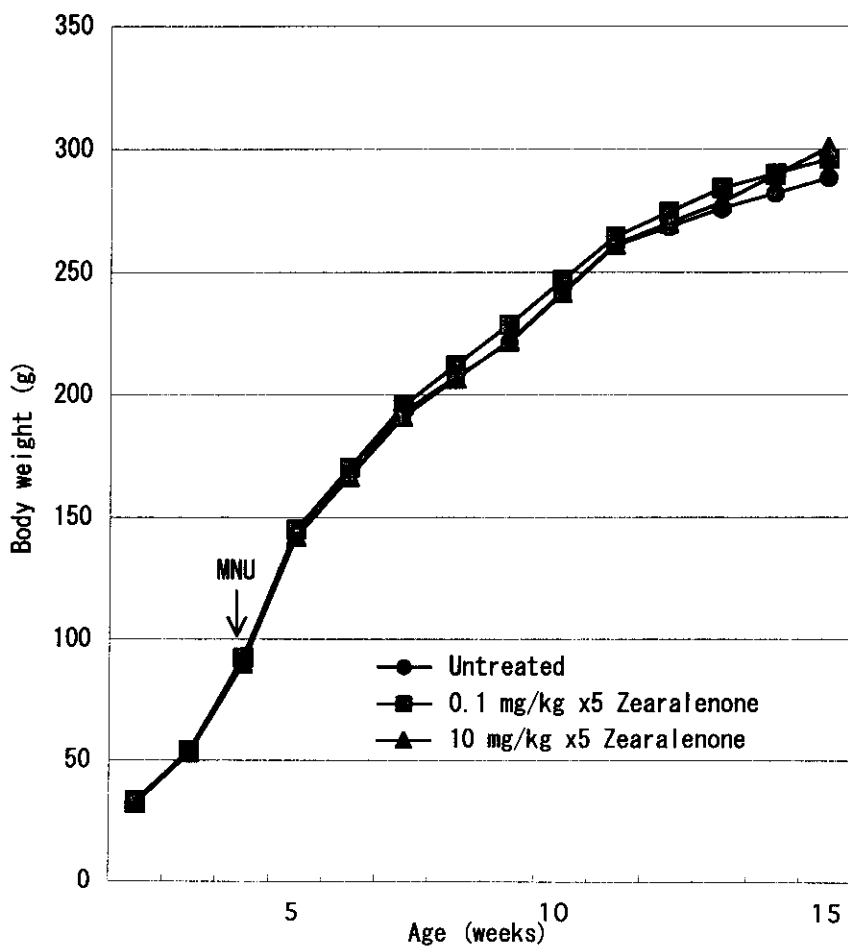


Fig. 4 Body weight gains in prepubertal zearalenone-treated or -untreated and at day 28 of MNU-administered female Sprague-Dawley rats

Table 3 Effect of prepubertal zearalenone treatment on body weight and relative uterine-ovarian weight in female Sprague-Dawley rats at 28 days of age

Group	Zearalenone treatment	Body weight (g)	Uterine-ovarian weight (mg)
1	Untreated	150.3 ± 10.8	347 ± 74
2	0.1 mg/kg/day x5	142.1 ± 7.4	285 ± 126
3	10 mg/kg/day x5	135.7 ± 13.3	323 ± 80

Each group consist of 6 rats
 Values represents mean ± SD

N.S. (Fisher's PLSD)

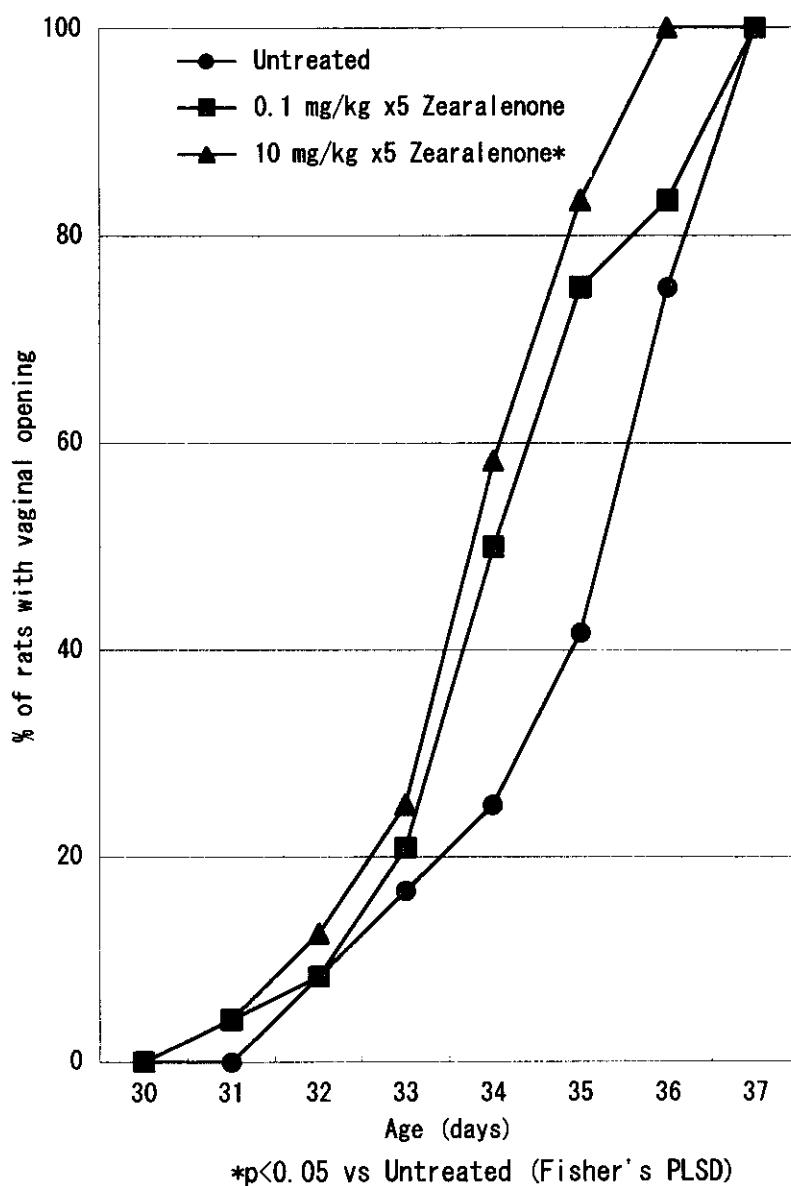


Fig. 5 Vaginal opening in relation to zearalenone treatment

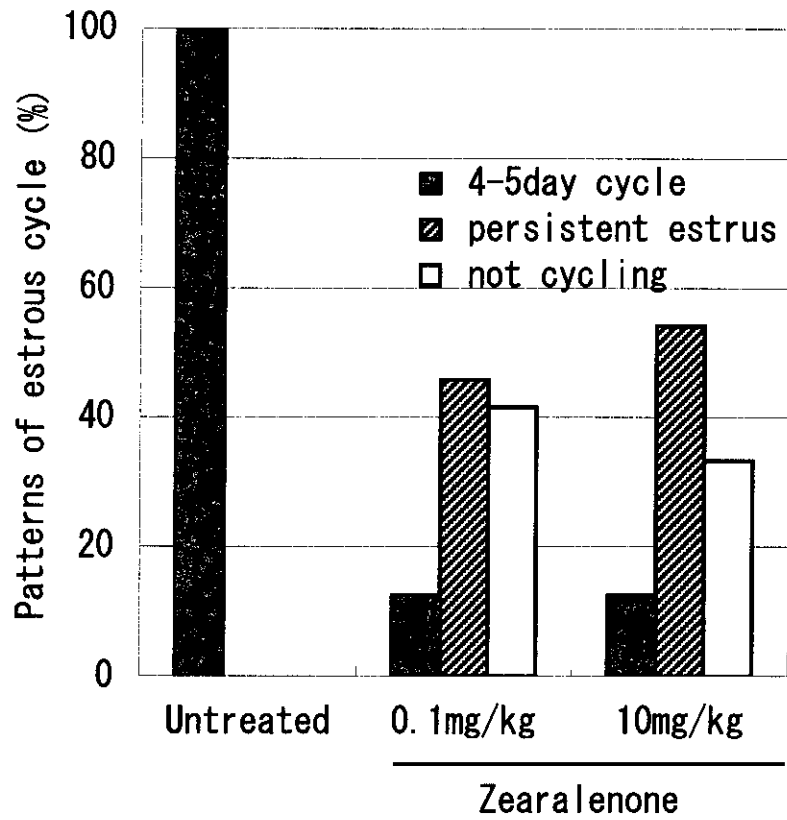
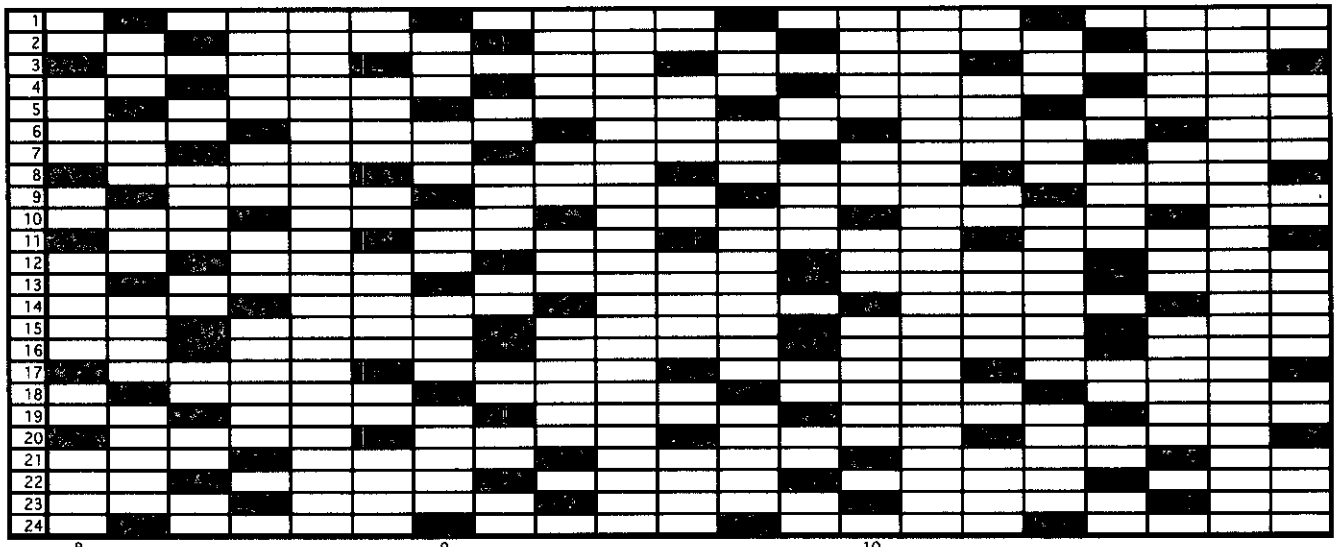
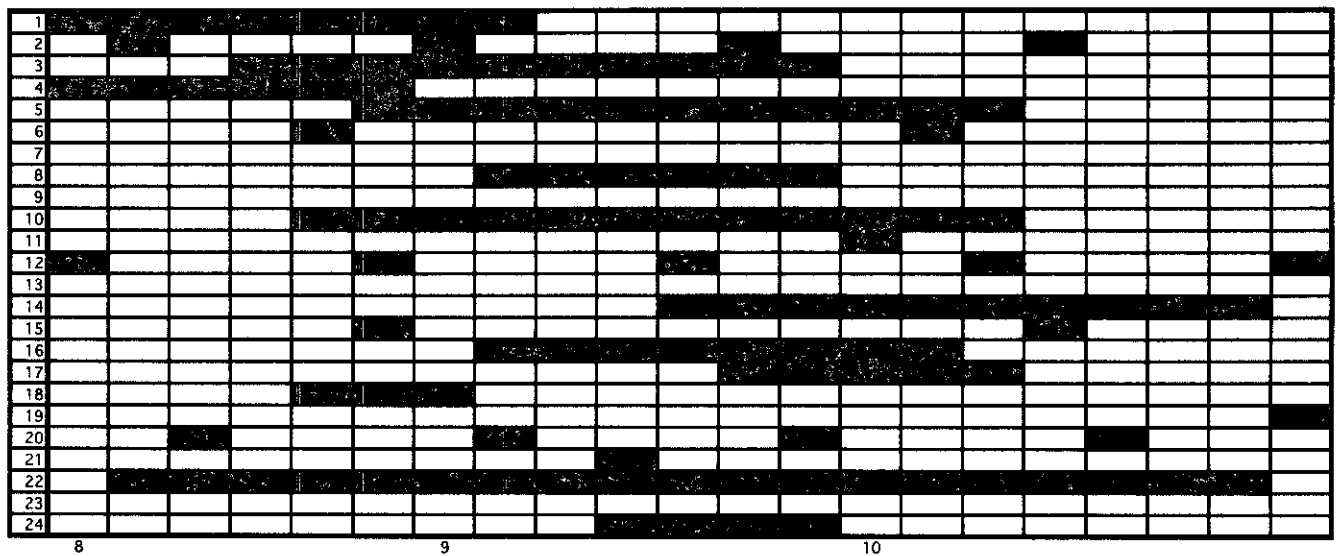


Fig. 6 Patterns of estrous cycle in relation to zearalenone treatment. Persistent estrus: When estrus phase was found in more than 50% of the experimental period.



Untreated



0.1mg/kg Zearalenone



10mg/kg Zearalenone

Age (weeks)

Fig. 7 Daily vaginal cytology smears taken at 8 weeks of age for 3 consecutive weeks from prepubertal zearalenone-treated and -untreated female Sprague-Dawley rats administered MNU at 28 days of age. Each group consists of 24 rats. (■ estrus; □ other phase of the cycle)

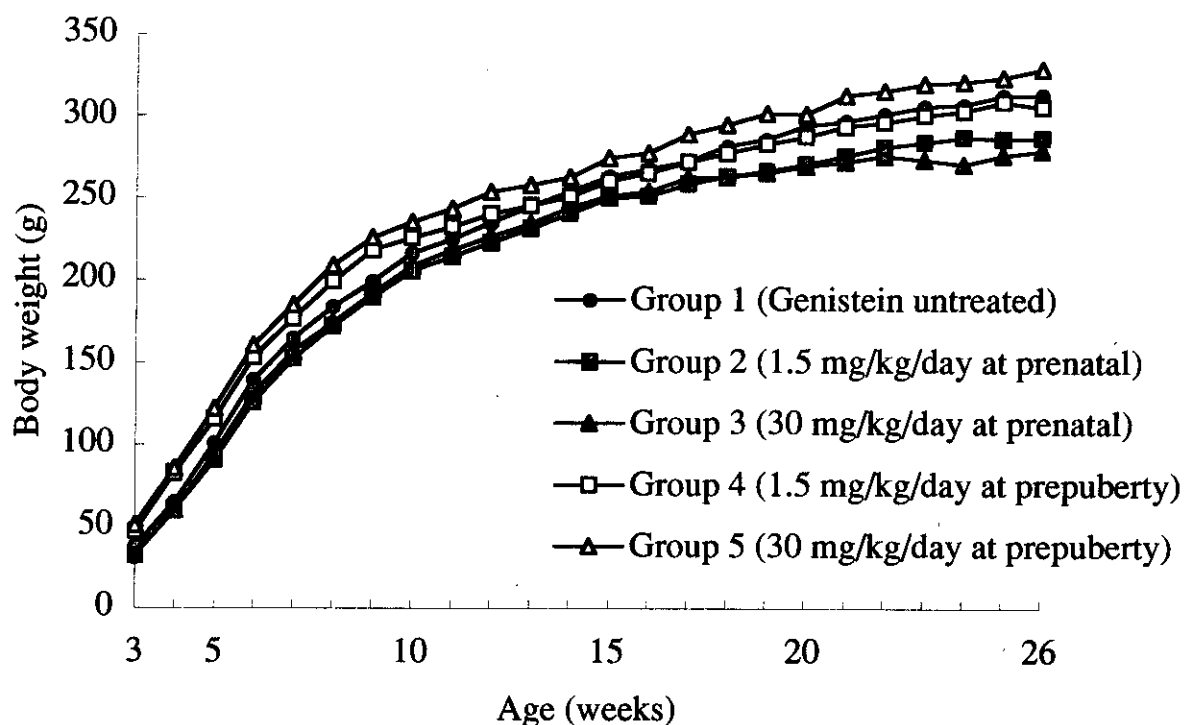


Fig. 8 Body weight changes in prenatal and prepubertal genistein-treated or -untreated and at day 28 of MNU-administered female Sprague-Dawley rats

Table 4 Effect of genistein on body weight and relative uterine-ovarian weight in female Sprague-Dawley rats at 28 day of age

Group	Treatment	Body weight (g)	Relative uterine-ovarian weight (mg/100g BW)
1	Untreated	65.5 ± 2.8	239 ± 13
2	1.5 mg/kg/day×5 at prenatal	57.3 ± 1.4*	184 ± 10*
3	30 mg/kg/day×5 at prenatal	59.2 ± 2.3*	163 ± 12**
4	1.5 mg/kg/day×5 at prepuberty	83.8 ± 2.3**	191 ± 14*
5	30 mg/kg/day×5 at prepuberty	82.2 ± 2.5**	213 ± 27

Each group consists of 6 rats. Value represents mean ± SEM
 $p < 0.05^*$ and $p < 0.01^{**}$ versus group 1

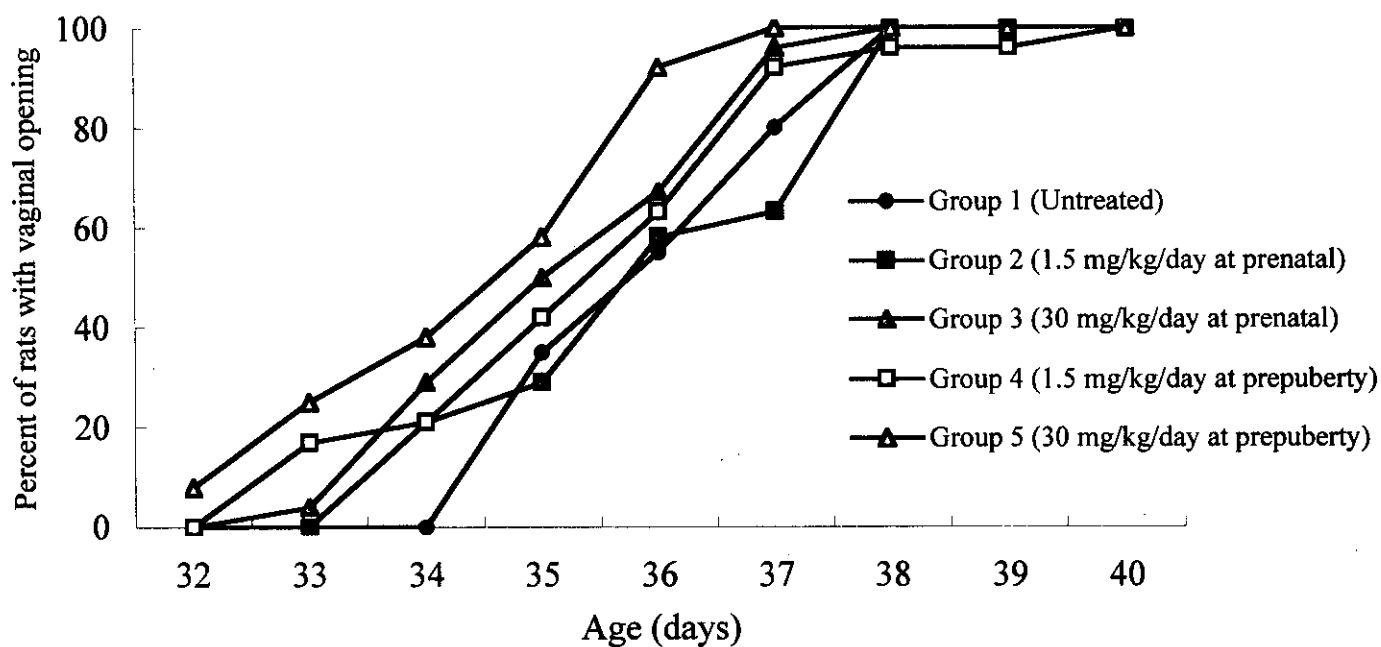


Fig. 9 Vaginal opening in relation to genistein treatment

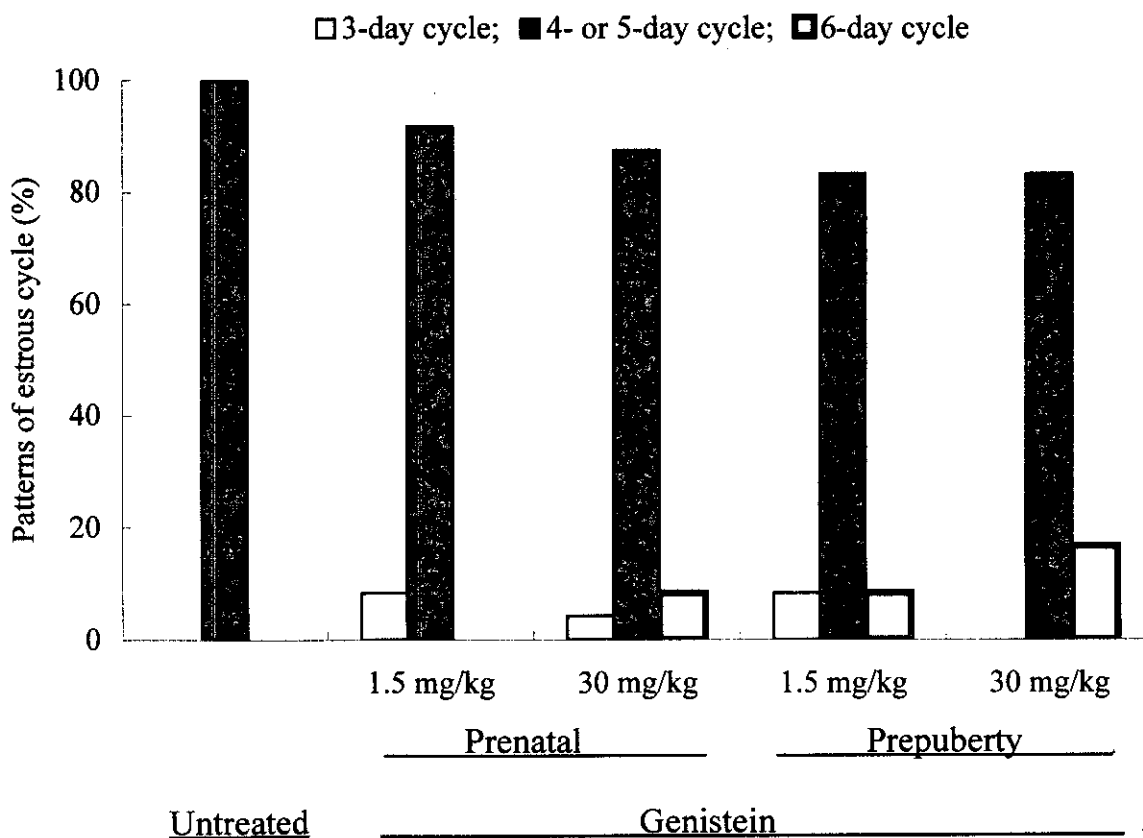


Fig. 10 Patterns of estrous cycle in relation to prenatal and prepubertal genistein treatment

Table 5 Estrous cycle in female Sprague-Dawley rats treated with or without genistein

Group	Treatment	No. of rats	% of time spent in each phase of cycle			
			Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
1	Untreated	20	15.9 ± 1.5	27.1 ± 0.9	16.9 ± 1.4	40.1 ± 1.5
2	1.5 mg/kg/day at prenatal	24	17.5 ± 1.7	27.0 ± 1.0	18.1 ± 0.8	37.4 ± 1.6
3	30 mg/kg/day at prenatal	24	14.1 ± 1.5	29.0 ± 1.1	19.3 ± 1.0	37.6 ± 1.9
4	1.5 mg/kg/day at prepuberty	24	16.6 ± 1.5	32.6 ± 1.2*	18.4 ± 1.5	32.4 ± 1.6*
5	30 mg/kg/day at prepuberty	24	12.7 ± 1.4	36.4 ± 1.1*	19.5 ± 1.5	31.4 ± 1.1*

Examined during 10 to 14 weeks of age.

Value represents mean ± SEM. *p value < 0.05 versus group 1.

Table 6 Effect of prenatal and prepubertal genistein treatment on percentages of ER- and PCNA-positive mammary terminal end bud (TEB) cells in 28-day-old female Sprague-Dawley rats

Group	Genistein treatment	ER-positive (%)	PCNA-labeling (%)
1	Untreated	75.2 ± 1.8	84.3 ± 2.0
2	1.5 mg/kg/day at prenatal	65.4 ± 2.0**	82.8 ± 1.4
3	30 mg/kg/day at prenatal	54.4 ± 2.2**	79.0 ± 2.4*
4	1.5 mg/kg/day at prepuberty	52.3 ± 2.1**	75.2 ± 1.5**
5	30 mg/kg/day at prepuberty	56.2 ± 2.8**	72.3 ± 0.8**

Value represents mean ± SEM. Each group consist of 6 rats.

*p < 0.05 and **p < 0.01 versus group 1.

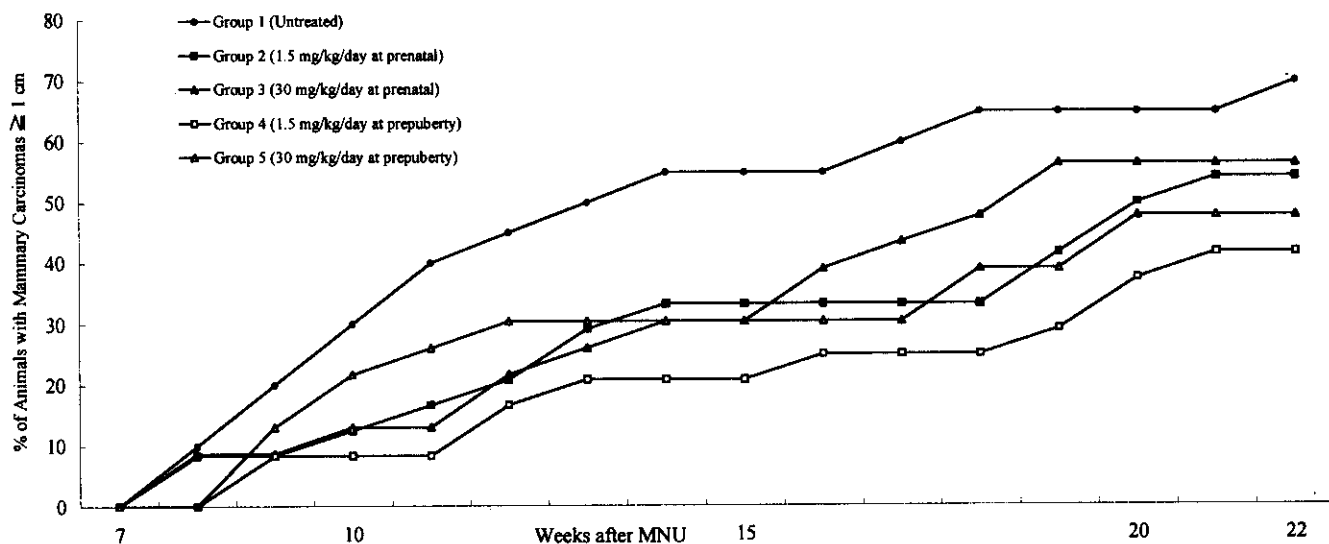


Fig. 11 Influence of prenatal and prepubertal genistein treatment on the cumulative incidence of mammary carcinomas ≥ 1 cm in female Sprague-Dawley rats induced by MNU

Table 7 Effect of genistein treatment on MNU-induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats

Group	Treatment	No. of rats	No. of rats with carcinomas ≥ 1 cm (%)	Total no. of carcinomas	Tumor multiplicity	Tumor latency (days)	
						Range	Mean \pm SEM
1	Untreated	20	14 (70)	31	1.6 ± 0.2	85-186	120 ± 8
2	1.5 mg/kg $\times 5$ at prenatal	24	13 (54)	38	1.6 ± 0.3	85-186	136 ± 9
3	30 mg/kg $\times 5$ at prenatal	23	13 (57)	40	1.7 ± 0.4	93-186	133 ± 8
4	1.5 mg/kg $\times 5$ at prepuberty	24	10 (42)*	29	1.2 ± 0.2	98-186	141 ± 10
5	30 mg/kg $\times 5$ at prepuberty	23	11 (48)	31	1.3 ± 0.3	98-186	128 ± 10

Value represents mean \pm SEM. * $p < 0.05$ versus group 1.

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・癌化および内分泌かく乱作用の比較

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
男性生殖器および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

研究要旨

植物由来・食物性エストロゲン様物質であるゲニスタイン Genistein を、妊娠ラットに腹腔内投与し、出生後の胎仔の男性生殖器や中枢神経系に及ぼす影響を検索した。

胎仔期に Genistein 暴露された雄ラットの成熟後（65日齢）の体重と精巣および副生殖器の重量を比較したところ、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、低量投与群（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 $2.87 \pm 0.11\text{g}$ 、低量投与群では $2.64 \pm 0.17\text{g}$ 、大量投与群では $2.77 \pm 0.25\text{g}$ で、低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。

一方、56日齢になった雌雄の仔ラットの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ところ、青班核とその腹側核を中心とするA6ニューロン群で、オスでは低量投与で増加（メス化）傾向、大量投与では逆に減少、メスでは減少（オス化）の傾向をみとめた。青班核内でもA4群に属する領域ではオス・メスともに暴露群で常に減少する傾向をみとめた。しかしこのような研究は莫大な労力と時間を要することから、本年度は各群1例ずつしか計測できていないので、統計的評価は全く不可能であった。

Genistein はエストロゲン作用を持つものの、いわゆる内分泌かく乱作用は少ないものと思われる。しかし時間と労力のかかる研究であり、かつ統計的に正確な評価をおこなうために、次年度以降も持続した研究が必要である。

A. 研究目的

エストロゲン様作用を有する環境中の化学物質（いわゆる環境ホルモン）が、生体のホルモナー受容体間の作用を修飾し、長期にわたって影響を与えることが近年問題となっている。大豆等の穀類もエストロゲン様作用のある物質を含有することが知られているので、この植物由来・食物性エストロゲン様物質を妊娠中に摂取した時の、出生後胎仔の内分泌機能に及ぼす影響（内分泌かく乱作用）を検索する必要がある。そこで、本研究の分担項目として、内分泌機能の表現系としての男性生殖器と中枢神経系・性的異型核（SDN）に注目し、植物由来・食物性エストロゲン様物質のひとつであるゲニスタイン Genistein の妊娠中摂取（胎仔期暴露）の影響について検索する。

なお、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。性的異型核のうち間脳・視束前野内側核は、細胞数でも容積でもオスの方がメスより大きく、一方、中脳下部から橋上部の背側に位置する青班核は細胞数でも容積でもメスの方がオスより大きい、と報告されている。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）であり、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はじめているが、青班付近の亜核ごとのカテコールアミン含有ニューロン数への影響を観察する研究は始めてである。

B. 研究方法

ゲニスタイン Genistein を妊娠ラット（Sprague Dawley）の腹腔内に妊娠 15 日目から 24 時間ごとに 5 回、低量（1.5mg/kg）および大量（30mg/kg）投与した。コントロール群として、Genistein の溶解に用いる DEMSO を投与群と同用量投与した。出生後の仔ラット（雌雄）のうち同一母胎由来のものは 2 例以内となるように選び、以下の 2 つの実験をおこなった。

成熟（65 日齢）雄ラットを安楽死させ、体重を計測、その後脱血ののち精巣および副生殖器を取り出してそれらの重量を比較した。

56 日齢になった雌雄の仔ラットを組織固定（ホルムアルデヒド系緩衝固定剤を血管灌流）し、その脳組織をクリオスタットを用いて 18 μ の厚さの浮遊切片を得、チロシンヒドロキシラーゼ（TH）に対する抗体に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（全切片のうち奇数枚目のみを計測にもちいる方法で）計測した。

動物実験に関しては、所属大学の動物実験の指針に従い、審査を受けている。また、飼育のためのケージ・給水ビンなどは、環境ホルモンフリーのものを用い、飼料はオリエンタル酵母工業社製の豆類混入のない NIH07PLD を用いた。