

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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15年度 総括・分担研究報告書

- 主任研究者 ^{ソウラ} 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)
- 松岡 洋一郎 (国立がんセンター研究所)

平成16 (2004) 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の抗エストロゲン様 ----- 17
作用の評価及び植物エストロゲンのエストロゲン受容体 α 及び β に
対する結合親和性の比較
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. 植物由来化学物質の周生期暴露によるマウスにおける ----- 31
作用強度の比較とラット乳腺発癌におよぼす影響
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 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
3. 自己免疫病発症に対する各種内分泌攪乱化学物質の ----- 53
影響に関する研究
分担研究者 茶山 和敏 静岡大学農学部 助教授
4. 内分泌かく乱物質の高感度分析法の確立 (HPLC-ECD及び ----- 71
LC/MS/MSによる血清及び乳汁中のBisphenol A及び植物
エストロゲンの一斉分析法の開発)
分担研究者 今井 俊介 奈良県保健環境研究センター 所長
研究協力者 北田 善三 奈良県保健環境研究センター 統括主任研究員
大前 壽子 奈良県保健環境研究センター 主任研究員
茶山 和敏 静岡大学農学部 助教授

5. 妊娠中に暴露した植物由来エストロゲン様物質が出生仔の 男性生殖器および中枢神経系に及ぼす影響	-----	84
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		
6. 内分泌かく乱物質の細胞内シグナル伝達	-----	94
分担研究者 松岡 洋一郎 国立がんセンター研究所 室長		
7. 農薬のエストロゲン活性評価	-----	99
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 小嶋 美穂子 滋賀県立衛生環境センター 主任主査		
辻 元宏 滋賀県立衛生環境センター 所長		
藪下 尚智 株式会社日吉技術部分析研究課 研究員		
佐々木 真理 関西医科大学公衆衛生学講座 院生		
福永 健治 関西大学工学部生物工学科 助教授		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	107
IV. 研究成果の別刷	-----	108

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

本年度の研究では種々のアッセイ系を用いて大豆等既存食品に含まれる天然化学物質のエストロゲン活性を食品容器等に含まれる合成化学物質と比較した。その結果、天然化学物質にむしろ高いエストロゲン活性をみた。なお、検討した食品関連化学物質に抗エストロゲン活性はみなかった。エストロゲン作用をもつ化学物質は、機能・形態形成期では重大な結果を招来するおそれがある。よって、エストロゲン活性の高い天然化学物質の生理的用量ならびに薬理的用量における発育、内分泌かく乱、あるいは乳癌誘発作用をラットにおける周生期暴露実験でみたところ、膣開口の早発や発情周期の乱れといった機能的変化を呈したが、ヒト暴露量を勘案すると Resveratrol や Zearalenone に憂慮すべき乳腺発癌作用はみなかった。しかし、mycoestrogen である Zearalenone では無排卵性卵巣がみられ、不妊が示唆された。なお、マウスへの Zearalenone の胎仔期暴露でも不妊が示唆された。天然化学物質の神経系への影響についても検討を進めている。食品関連化学物質のマウスにおける体内移行について、血清と乳汁中のエストロゲン活性をもつ遊離体とエストロゲン活性をもたない抱合体に区別して比較検討した。また、性差が存在し、女性に多い自己免疫疾患に対する食品関連化学物質の影響につき、SLE 自然発症 lpr^e マウスを用いて検討したところ、病態に修飾を加える可能性が示唆された。さらに、環境中の化学物質として農薬のエストロゲン、抗エストロゲン活性ならびにその複合作用につき検討した。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 法を用いた食品関連物質の抗エストロゲン作用の評価

酵母 Two-hybrid 法を用いて食品関連化学物質である Zearalenone、genistein、genistin、daidzein、daidzin、resveratrol、coumestrol、equol 及び bisphenol A の抗エストロゲン作用を評価したところ、すべての化学物質に抗エストロゲン作用は認められなかった。

2. エストロゲン受容体結合アッセイ（ER-ELISA）法による食品関連物質のエストロゲン受容体（ α 及び β ）への結合親和性の比較

Ligand Screening System - Estrogen Receptor α 及び β キット（東洋紡）を使用して、Zearalenone、genistein、genistin、daidzein、daidzin、resveratrol、coumestrol、equol 及び bisphenol A のエストロゲン受容体（ α 及び β ）への結合親和性の比較を行ったところ、ヒトエストロゲン受容体 α （hER α ）に対する結合親和性の強さは、DES > zearalenone > equol, genistein > coumestrol, daidzein > bisphenol A > resveratrol であり、ヒトエストロゲン受容体 β （hER β ）に対する結合親和性の強さは、DES, zearalenone, genistein > equol,

daidzein > coumestrol > bisphenol A > resveratrol の順であった。また、測定濃度範囲内において、genitin 及び daidzin には hER α ならびに hER β に対して明白な結合親和性は認められなかった。なお、イソフラボン類である genistein 及び daidzein は、hER β に対する結合親和性が hER α よりも強い傾向であった。

3. 出生前 Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A、DES 暴露による雌マウスの発育ならびにエストロゲン標的臓器への影響

CD-1 マウスの妊娠 15-18 日にかけて Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A は 0.5 mg/kg と 10 mg/kg、DES は 0.5 μ g/kg と 10 μ g/kg を連日皮下投与し、出生雌乳仔を検索したところ、エストロゲン様化学物質の出生前投与は雌マウスの体重増加を促進し、思春期早発をみた。発情周期に周期性はみられたが、Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A や DES 投与動物では発情間期の占める割合が有意に延長し、Zearalenone では発情期の有意の延長をみた。Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A や DES 投与で一過性の黄体欠如をみたが、Zearalenone 投与では持続する黄体欠如をみた。また、Zearalenone や Bisphenol A は、4 週齢では正常な卵巣機能をもつマウスでは乳腺の分化を促進する作用を示し、逆に 8-16 週では大量 Zearalenone 投与により生じた無黄体マウスでは、乳腺分化の抑制がみられた。よって、Genistein、Resveratrol、Bisphenol A や DES 投与は雌性生殖器や乳腺に一過性（可逆性）の変化を惹起したが、Zearalenone は持続する変化をもたらした。

4. Resveratrol と Zearalenone のラット思春期前暴露による乳癌に対する影響

Resveratrol あるいは Zearalenone を 15-19 日齢の雌 Sprague-Dawley ラットに連日皮下投与した後 N-methyl-N-nitrosourea (MNU) により乳腺発癌を促し、 ≥ 1 cm 乳腺腫瘍をみた時点で屠殺した。無処置対照群に比して Resveratrol 大量投与群 (100 mg/kg) では ≥ 1 cm 乳癌発生率、組織的に認めた微小乳癌も含めた全乳癌個数や、乳癌多発率は有意に高率であった。但し、 ≥ 1 cm 乳癌採取までの期間は差をみなかった。なお、Resveratrol 少量投与群 (10 mg/kg) はこれらの指標からは乳癌発生には影響をみなかった。Zearalenone 無処置群に比して大量 (10 mg/kg)・少量 (1 mg/kg) Zearalenone 処置はともに累積乳癌発生率を抑制した。組織学的に確認しえた微小腫瘍も含めたすべての乳腺腫瘍につき解析したところ、乳腺腫瘍は乳癌か線維腺腫のいずれかであったので、全乳腺腫瘍あるいは乳癌に限って群間の比較を行った。その結果、線維腺腫も含めた全乳腺腫瘍あるいは乳癌に限局しても Zearalenone は用量依存的に腫瘍発生を抑制し、Zearalenone 大量投与で有意な抑制をみた。少量投与では有意には至らなかった。なお、腫瘍採取までの期間に差はみなかった。

5. 自己免疫病発症に対する各種食品関連化学物質の影響

自己免疫病モデルマウスである MRL-*lpr*^{cs} マウスに子宮重量法で子宮重量を有意に増加させた濃度をもとにして、Genistein、BPA、Estradiol-17 β をオリーブ油に溶かして週 2 回、3 ヶ月間皮下投与した。体重および臓器重量、タンパク尿症、サイトカイン、生存率といった指標よりみると、Genistein は自己免疫病の発症、特に腎炎の悪性進展を促進する可能性が示唆された。Bisphenol A は Estradiol-17 β と同等の発症促進作用を有する可能性が示唆された。その他の自己免疫病発症指標に関する検討を行った後に結論を下す。

6. 食品関連化学物質の体内移行

LC-MS/MSにより、Bisphenol A-d16を10、100mg/kg皮下投与して血清及び乳汁への移行を調べた。血清中では、10mg/kg群で総量が1.8（遊離体0.30） $\mu\text{g/mL}$ 、100mg/kg群で総量が18.4（遊離体1.3） $\mu\text{g/mL}$ 検出された。乳汁中では、10mg/kg群で総量が0.59（遊離体0.52） $\mu\text{g/mL}$ 、100mg/kg群で総量が4.0（遊離体2.0） $\mu\text{g/mL}$ 検出された。遊離体の総量に対する比は、10mg/kg群では血清中7.9~41（平均19）%、乳汁中81~93（平均89）%、100mg/kg群で血清中3.8~8.0（平均6.9）%、乳汁中40~60（平均49）%と、乳汁中の方が血清に比べて遊離体の割合が高く検出され、極性の高い抱合体に比べて脂溶性化合物である遊離体の方が乳汁中に高率に移行することが示唆された。

7. 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雄性生殖器および中枢神経系に及ぼす影響

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、低量（1.5mg/kg）および大量（30mg/kg）投与した。成熟（300日齢）雄ラットの体重と精巣重量を比較したところ、いずれも対照群と有意差はなく、成熟期以降は、体重ならびに雄性生殖器機能へのゲニステインの影響はないものと予想される。56日齢では青斑核とその腹側亜核のA6群全体、またはA4群とA6群双方を含む青斑核のみの総数は、オスでもメスでも投与群で約8割程度に減少し、大量投与群でより強く減少する傾向を有していた。また、小脳の分子層についてみると、ゲニステインの投与群はコントロール群に比して厚みを増していた。

8. 食品関連化学物質の細胞内シグナル伝達

ZeranolのEstrogen受容体（ER） α に対する結合親和性をLigand Screening System（東洋紡、ERA-101）を用いて測定し、DESのそれと比較したところ、DES、Zeranolの IC_{50} はそれぞれ20nM、26nMと測定された。この結果からZeranolはDESと同程度（相対結合親和性-0.77）のER α 結合親和性を有することが明かとなった。また、Estrogen感受性細胞株MCF-7の内在性c-myc遺伝子の発現量変化を指標としてZeranolのエストロゲン活性をEstradiol-17 β と比較したところ、Estradiol-17 β と同等かやや強いと考えられた。

9. 農薬のエストロゲン活性評価

農薬に対して、E-CALUX Assay法によってエストロゲン活性および抗エストロゲン活性を測定した。32農薬中エストロゲン活性がみられた農薬は5種で、有機リン系のトルクロホスメチル、プロチオホス、ダイアジノン、ベンゾイミダゾール系のチアベンダゾール、昆虫成長抑制剤のピリプロキシフェンである。農薬を組み合わせたところ、活性が高くなったものは、ダイアジノンとトルクロホスメチル、ピリプロキシフェンとプロチオホス、OPPとTBZで、OPPには活性がみられなかったが、TBZと組み合わせることによりTBZのみの活性より高くなった。また、抗エストロゲン活性がみられたのは、ベンゾイルウレア系のクロルフルアズロンで、イマザリルとクロルフェナピルにもわずかに抗エストロゲン活性がみられた。但し、エストロゲン活性のみられた農薬の残留値は、エストロゲン活性のみられない濃度であった。

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
松岡洋一郎	国立がんセンター研究所 室長

A. 研究目的

1. 酵母 Two-hybrid 法を用いた食品関連物質の抗エストロゲン作用の評価

平成 14 年度にエストロゲン活性を認めた食品関連物質を主とした化学物質の抗エストロゲン作用の評価を酵母 Two-hybrid 法を用いて行った。

2. エストロゲン受容体結合アッセイ (ER-ELISA) 法による食品関連物質のエストロゲン受容体 (α 及び β) への結合親和性の比較

食品関連物質を主とした化学物質のエストロゲン受容体 (α 及び β) への結合親和性の比較をエストロゲン受容体結合アッセイ (ER-ELISA) 法を用いて行った。

3. 出生前 Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A、DES 暴露による雌マウスの発育ならびにエストロゲン標的臓器への影響

平成 14 年度の本研究の成果として、Genistein、Resveratrol、Zearalenone といった天然化学物質のラットへの周生期暴露実験を行ったところ、膣開口の早発や発情周期の乱れといった機能的な変化が観察され、発情周期の異常からみると、Zearalenone の内分泌かく乱作用は顕著であった。動物実験におけるデータのヒトへの外挿には複数種属の動物における検討が望まれることから、今回マウスにおける Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A、DES の出生前暴露実験を行い、その作用強度を比較した。

4. Resveratrol と Zearalenone のラット思春期前暴露による乳癌に対する影響

エストロゲン標的臓器である乳腺発癌につきラットの N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 誘発モデルを用いて検討したところ、平成 14 年度の本研究による成果として、Genistein の周生期暴露は乳癌を抑制する傾向にあり、特に思春期前の生理的容量 (ほぼアジア人の 1 日消費量相当) の暴露では、有意な抑制をみた。今回は Resveratrol と Zearalenone のラット思春期前暴露による乳癌に対する影響につき検討した。

5. 自己免疫病発症に対する各種食品関連化学物質の影響

自己免疫病とは自己の抗原に対して免疫反応が生じて重篤な障害が引き起こされる膠原病やリウマチなどの疾患で、治療が非常に困難な難病である。自己免疫病は男性に比べて女性の発症率が高く、またその症状も重篤であることが知られており、その原因のひとつとしてエストロゲンが関与していることが報告されている。しかしながら、エストロゲン作用を持つ植物エストロゲンや環境ホルモン物質の自己免疫病発症に対する影響はまったく調べられていない。平成 14 年度に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、子宮重量法を用いて、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りに研究されている BPA および DES の 4 種の化学物質に関して生体内におけるエストロゲン様作用の比較を行った。その結果、E2 および DES は 100ng/kg/day 以上、BPA は 10mg/kg/day 以上、Resveratrol は 10mg/kg/day、Genistein は 50mg/kg/day の投与によって子宮に対してエストロゲン活性を示すことを明らかにした。そこで今回、子宮重量法で子宮重量を有意に増加させた濃度をもとにして、種々の植物エストロゲンおよび環境ホルモン物質の自己免疫病発症に対する影

響を調べた。

6. 食品関連化学物質の体内移行

母親が摂取した Genistein、Resveratrol 等の植物エストロゲンや Bisphenol A が血液及び母乳への程度移行するかを調査することを目的に、血清及び乳汁の HPLC 及び LC-MS/MS を用いた高感度分析法の開発を行い、これら内分泌かく乱物質を投与したマウス血清及び乳汁中の遊離体及び抱合体を含めた総量の濃度を測定し、新生児への暴露量把握の基礎資料を得ることを目的としている。なお、Genistein の主たる暴露源である大豆には Genistein 以外に Daidzein、Glycitein も含まれており、食品中の検出報告もあることから、これらも分析対象に加えて検討した。

7. 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雄性生殖器および中枢神経系に及ぼす影響

妊娠中に摂取した植物由来・食物性エストロゲン様物質の、出生後胎仔の雄性生殖器や中枢神経系に及ぼす影響を検索する目的で以下の実験をおこなった。平成 14 年度には、(1) 65 日齢の体重と雄性生殖器重量についての検索、および(2) 青斑核ニューロン数の探索的実験（計測法の確立と傾向の把握）を終えていたが、今年度は、(1) 300 日齢の体重と雄性生殖器重量の検索、(2) 青斑核ニューロン数の計数（各群 4 例）、(3) 小脳分子層樹状突起の発達の検索、を行った。

8. 食品関連化学物質の細胞内シグナル伝達

ヒト乳がんにおいてがん細胞が Estrogen 非依存的増殖能を獲得する機構の 1 つとして、活性化 MAP キナーゼによるリン酸化を介した Estrogen 受容体の Estrogen 非依存的活性化が考えられている。本研究の目的は、Estrogen 感受性ヒト乳がん細胞株を用いて、食品関連化学物質が Estrogen 様作用を示す濃度を明らかにし、さらに MAP キナーゼの活性化を引き起こすか、またこれらの変化が乳がん細胞の Estrogen 依存的増殖能に

対していかなる影響を及ぼすか明らかにすることである。

9. 農薬のエストロゲン活性評価

現在、わが国では食品衛生法によって農薬 229 種類に残留基準が設定されている。また、環境省がリストアップしている 65 種類の内分泌攪乱作用が疑われる化学物質のうち 6 割以上が農薬である。以上から、本研究では検出頻度の高い農薬について、エストロゲン活性および抗エストロゲン活性を評価することを目的に測定を行った。さらに農薬のラット肝 S9 代謝物についてのエストロゲン活性を評価するため、ビスフェノール A (BPA) を用いて代謝実験系を検討した。

B. 研究方法

1. 酵母 Two-hybrid 法を用いた食品関連物質の抗エストロゲン作用の評価

rER-GAL4DBD (Rat 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。17 β -Estradiol (E₂) の存在下にて、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した被検化学物質を添加し、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した。OD₄₁₀ 及び OD₅₇₀ を測定し、Miller の式に基づき、 β -ガラクトシダーゼ活性を算出した。産生された β -ガラクトシダーゼ活性を E₂ 単独作用時と比較し、化学物質の抗エストロゲン作用を評価した。各被検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. エストロゲン受容体結合アッセイ (ER-ELISA) 法による食品関連物質のエストロ

ゲン受容体 (α 及び β) への結合親和性の比較

測定は、Ligand Screening System - Estrogen Receptor α 及び β キット (東洋紡) を使用した。化学物質は DMSO に溶解後、希釈緩衝液で 1% DMSO となるように調製した。この化学物質溶液、ヒトエストロゲン受容体溶液及び 17 β -エストラジオール溶液とを 96 ウェルの反応プレートにて 4°C、1 時間反応させた。この反応液と西洋ワサビ由来 Peroxidase (HRP) で標識した 17 β -エストラジオール (E_2 -HRP) 溶液を抗エストラジオール抗体固相プレートで 4°C、1 時間反応させた。洗浄液で各ウェルを 3 回洗浄後、洗浄液を完全に除去して 37°C、20 分基質反応させた。反応後、OD₄₅₀ 及び OD₆₅₀ を測定した。1% DMSO 溶液をブランク、ジエチルスチルベストロール (DES) 300 nM を陽性対象とした。結合親和性は、[B] をブランク試験での吸光度、[S] を本試験での吸光度、[P] を陽性対照試験の吸光度として、結合阻害度 (α) = ([B]-[S]) / ([B]-[P]) を求めた。結合阻害度をプロットしたグラフから IC₅₀ を求め、評価指標とした。

3. 出生前 Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A、DES 暴露による雌マウスの発育ならびにエストロゲン標的臓器への影響
CD-1 マウスの妊娠 15-18 日にかけて被験物質 (Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A、DES) を連日 (計 4 回) 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、出生雌乳仔 (各群 24 匹) を実験に供した。投与量として、Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A は 0.5 mg/kg と 10 mg/kg とした。また、DES の投与量は他の被験物質の 1/1000 量 (0.5 μ g/kg と 10 μ g/kg) とした。膈開口 (思春期発来) の有無は 21 日齢で離乳した後毎日観察した。各群 4、8、12、16 週齢時に任意に 6 匹ずつ屠殺し、体重を比較し、子

宮、卵巣、膈は HE 標本にて形態的にも評価した。胸部乳腺からホール・マウント標本を作製し、群間の発育を比較し、腹部乳腺はホルマリン固定・パラフィン標本を作製し、HE 染色を行った。乳腺のホール・マウント標本は以下の 4 段階に分類し、乳腺分化の程度を数値化した。スコア 1: 分化度の低い乳腺で、乳管分岐の末梢部に $\geq 100 \mu$ m 径を有する終末乳腺芽 (terminal end bud; TEB) が存在し、腺胞 (alveolus) 発育をみないもの。スコア 2: 少数の腺胞の発育と疎らに分岐する乳管よりなるもの。スコア 3: スコア 2 に比して腺胞の発育や乳管の分岐の増したもの。スコア 4: 著明な小葉・腺胞系の発育をみるもの、とした。

4. Resveratrol と Zearalenone のラット思春期前暴露による乳癌に対する影響

Resveratrol 実験群は、I 群: 無処置対照群、II 群: 10 mg/kg Resveratrol を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与、III 群: 100 mg/kg Resveratrol を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与の 3 群を設定し、49 日齢にて 50 mg/kg MNU を単回腹腔内投与し、最大乳腺腫瘍の腫瘍径が ≥ 1 cm に達した時点で屠殺し、実験は MNU 投与後 32 週にて終了した。

Zearalenone 実験群は、I 群: 無処置対照群、II 群: 0.1 mg/kg Zearalenone を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与、III 群: 10 mg/kg Zearalenone を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与の 3 群を設定し、28 日齢にて 50 mg/kg MNU を単回腹腔内投与し、実験は MNU 投与後 33 週にて終了した。

5. 自己免疫病発症に対する各種食品関連化学物質の影響

実験には自己免疫病モデルマウスである MRL-*lpr*^{cs} マウスを用いた。被験物質の投与は、自己免疫病発症前の 1 ヶ月齢の MRL-*lpr*^{cs} マウスに子宮重量法で子宮重量を有意に増加させた濃度をもとにして、Genistein を 15 および 50 mg/kg、BPA を 3 および 10 mg/kg、Estradiol-17 β (E) を 10 μ g/kg、

オリーブ油に溶かして雌雄各 10 匹に週 2 回（原則として火曜日と金曜日）、3 ヶ月間皮下投与した。投与後、体重および尿タンパク質量を測定した。その後、屠殺して採血するとともに、皮下および腹腔内リンパ節、腎臓および脾臓の重量を測定した。また、メスは子宮重量も測定した。血液は遠心分離して血清を採取し、血中サイトカイン量を測定した。さらに、生存率を調べるため、Genistein を 15mg/kg、BPA を 3mg/kg、Estradiol-17 β (E2) を 10 μ g/kg 投与する群を別に作成して、生後 1 ヶ月目から 6 ヶ月間投与実験を行い、各実験群の投与期間中の生存率を比較した。

6. 食品関連化学物質の体内移行

①装置及び測定条件

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 \times 250mm)、カラム温度：40 $^{\circ}$ C、流速：0.8mL/min、移動相：0.025M リン酸一カリウム溶液/メタノール (52：48)、Applied Voltage；+850mV vs Ag/AgCl、注入量：50 μ L LC-MS/MS：Waters 製 HPLC 2695/Applied Biosystems 製 API3000 MSD、カラム：Inertsil ODS-3 (2.1 \times 150mm)、カラム温度：40 $^{\circ}$ C、流速：0.2mL/min、移動相：5 μ M 酢酸アンモニウム含有メタノール（メタノール濃度 45~95%のグラジエント溶出）、注入量：10 μ L、イオン化条件：ESI Negative Mode、測定イオン (m/z) Q1/Q3：Resveratrol; 227/185、Daidzein; 253/224、Glycitein; 283/268、Genistein; 269/133、Bisphenol A; 227/212、(Bisphenol A-d16; 241/223)

②マウスへの内分泌かく乱物質の投与
交配して交尾を確認されたマウスについて、分娩翌日に仔の数を 6 匹に揃え、哺乳 10 日目に母マウスと子マウスを離乳した。離乳 5 時間目にオリーブ油に溶解した種々の濃度の被験物質を皮下に投与し、投与 2 時間後（離乳 7 時間目）に麻醉及びオキシトシン注射して乳汁を採取し、投与 2 時間 40

分後（離乳 7 時間 40 分目）に屠殺して血液を採取した。得られた血清及び乳汁は直ちに -20 $^{\circ}$ C 以下で凍結保存し、これを投与群とした。また、オリーブ油のみを注射したものをコントロール群とした。なお、実験中の飼料は NIH-07 PLD（オリエンタル酵母製）を給与した。

③試験溶液の調製

i. 血清の前処理

遊離体だけを測定する場合は、血清 125 μ L に酢酸緩衝液 (pH5) 125 μ L、メタノール 1mL を加えて攪拌後、遠心分離した。上澄液 1mL を分取後、メタノール濃度が 20% 以下になるように水で希釈し、ISOLUTE Multimode カートリッジで精製後、濃縮または希釈し、メタノール濃度を 50% とした。また、抱合体を含めた総量を測定する場合は、血清 125 μ L に酢酸緩衝液 100 μ L と β -グルクロニダーゼ/サルファターゼ酵素溶液 (Sigma 製) 25 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C 1hr インキュベートし、放冷後メタノール 1mL を加え、以下遊離体と同様に操作した。

ii. 乳汁の前処理

遊離体だけを測定する場合は、乳汁 250 μ L に酢酸緩衝液 (pH5) 250 μ L、メタノール 2mL を加えて攪拌後、遠心分離した。上澄液 2mL を分取後、メタノール濃度が 20% 以下になるよう水で希釈し、ISOLUTE Multimode カートリッジで精製後、濃縮または希釈し、メタノール濃度を 50% とした。また、抱合体を含めた総量を測定する場合は、乳汁 250 μ L に酢酸緩衝液 225 μ L と β -グルクロニダーゼ/サルファターゼ酵素溶液 25 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C 1hr インキュベートし、放冷後メタノール 2mL を加え、以下遊離体と同様に操作した。

7. 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雄性生殖器および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ゲニスタイン 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、低量 (1.5mg/kg) および大量 (30mg/kg) 投与し、出生後の仔ラット (雌雄) を用いて体重、雄性生殖器重量、青斑核カテコールアミンニューロン数、小脳分子層の厚さの計測をおこなった。なお飼育器および飼料は内分泌かく乱因子フリーのものを用いた。

8. 食品関連化学物質の細胞内シグナル伝達

① Estrogen 受容体 α 結合試験

Zeranol の Estrogen 受容体 (ER) α に対する結合親和性は Ligand Screening System (東洋紡、ERA-101) を用いて測定した。まず、既知濃度の ER α 20 μ l、未標識 17 β -estradiol (リガンド) 30 μ l と 3-100nM Zeranol 30 μ l の混合液を 4 $^{\circ}$ C、1 時間反応させ、次いで混合液 50 μ l とペルオキシダーゼ標識 17 β -estradiol 50 μ l を抗 17 β -estradiol 抗体固相化ウェル内で 4 $^{\circ}$ C、1 時間反応させ、混合液中に含まれる遊離 17 β -estradiol 量を酵素免疫競合法により測定した。陽性対照として 15-300nM Diethylstilbestrol (DES) を用いた。下記の式により結合阻害度を算出後、阻害曲線を作成し、阻害曲線より IC₅₀ を求めた。

結合阻害度 = (吸光度 BL - 吸光度 S) / (吸光度 BL - 吸光度 A)

吸光度 BL : DES 0nM の吸光度平均値

吸光度 S : 各試料の吸光度平均値

吸光度 A : DES 300nM の吸光度平均値

② 遺伝子発現の解析

Estrogen 感受性細胞株 MCF-7 の内在性 c-myc 遺伝子の発現量変化を指標として用いた。c-myc 遺伝子は Estrogen 応答配列非依存的に発現調節を受ける遺伝子の 1 つである。MCF-7 細胞を血清非存在下で 3 日間培養した後 10⁻¹³-10⁻⁷ M の 17 β -estradiol および Zeranol を添加し、2 時間後に mRNA を回収して c-myc 遺伝子の発現量を RT-PCR 法にて解析した。遺伝子発現の変化は被験物質非存在下での c-myc mRNA/ β -actin mRNA 比に対する相対値として表現した。

9. 農薬のエストロゲン活性評価

米国 XDS 社が開発し、(株) 日吉とライセンス契約を締結している E-CALUX Assay 法によってエストロゲン活性および抗エストロゲン活性を測定した。本法はヒト卵胞がん細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、エストロゲンとエストロゲンレセプターとの結合をルシフェラーゼ活性により検出するものである。エストロゲン活性には、17 β -エストラジオール (E2)、抗エストロゲン活性にはタモキシフェンを標準として用いた。測定農薬は、ピレスロイド農薬 8 種 (エトフェンプロックス、シフルトリン、シシペルメトリン、フェンバレレート、フェンプロパトリン、フルシトリネート、フルバリネート、ペルメトリン)、有機塩素系農薬 3 種 (キャプタン、ジクロフルアニド、ジコホール)、有機リン系農薬 7 種 (アセフェート、クロルピリホス、ダイアジノン、トルクロホスメチル、プロチオホス、マラチオン、メタミドホス)、その他 14 種 (OPP、TBZ、イマザリル、クロルフェナピル、クロルフルアズロン、ジフェニール、テブフェンピラド、トリフルミゾール、ハルフェンプロックス、ビテルタノール、ピリプロキシフェン、フルフェノクスロン、プロシミドン、ルフェヌロン) の計 32 種類である。暴露の最終最大濃度は 10⁻⁴M である。S9 代謝実験として、ビスフェノール A (BPA) を用いて S9 代謝実験の検討を行った。オリエンタル酵母社製エームステスト用 S9/コファクター A セットを用い、BPA の分解確認には HPLC を用いた。カラムは Wakosil 5C18 4.6mm \times 150mm を用い、移動相は 60%メタノール、流速 0.8ml/min、検出器は UV230nm である。

C. 研究結果及び考察

1. 酵母 Two-hybrid 法を用いた食品関連物質の抗エストロゲン作用の評価

Zearalenone、genistein、genistin、daidzein、daidzin、resveratrol、coumestrol、equol 及

び bisphenol A を対象とした。平成 14 年度の研究結果にてアゴニスト作用が認められたもの (zearalenone、genistein、coumestrol、equol 及び bisphenol A) については、アゴニスト作用を示す濃度よりも低い濃度を添加し、アゴニスト作用が認められなかったものについては比較的高い濃度 (1 μ M ~ 100 μ M) を添加して抗エストロゲン作用を評価した。その結果、すべての化学物質について抗エストロゲン作用は認められなかった。酵母 Two-hybrid 法と後述 (2.) のエストロゲン受容体結合アッセイの結果から、明白なエストロゲン受容体への親和性を示した化学物質については、抗エストロゲン作用を示すものは認められず、アゴニストとして作用する可能性が示唆された。

2. エストロゲン受容体結合アッセイ (ER-ELISA) 法による食品関連物質のエストロゲン受容体 (α 及び β) への結合親和性の比較

Zearalenone、genistein、genistin、daidzein、daidzin、resveratrol、coumestrol、equol 及び bisphenol A を対象とした。ヒトエストロゲン受容体 α (hER α) に対する結合親和性の強さは、DES > zearalenone > equol、genistein > coumestrol、daidzein > bisphenol A > resveratrol であった。また、測定濃度範囲内において genitin 及び daidzin に明白な結合親和性は認められなかった。ヒトエストロゲン受容体 β (hER β) に対する結合親和性の強さは、DES、zearalenone、genistein > equol、daidzein > coumestrol > bisphenol A > resveratrol の順であった。hER α の結果と同じく測定濃度範囲内において、genitin 及び daidzin に明白な結合親和性は認められなかった。化学物質の hER α 及び hER β に対する結合親和性は必ずしも同じではなく、特にイソフラボン類である genistein 及び daidzein は、hER β に対する結合親和性が hER α よりも強い傾向であった。大豆等の食品摂取量が多い日本人に乳癌や前立腺癌の発生率が低いことは

以前から指摘されている。hER β は卵巣や前立腺等の組織に比較的密度が高く存在していることから、今回の結果と乳癌等の発生率とに何らかの関連性を有する可能性が示唆された。ラットエストロゲン受容体 α を導入した酵母 Two-hybrid 法の結果では coumestrol が equol より強いアゴニスト作用が認められ、受容体結合アッセイの結果と一致しなかった。これがラットとヒトの受容体の違いによるものであるのかは不明である。次年度は hER を導入した酵母 Two-hybrid 法を用いて同様に食品関連化学物質の hER α 及び hER β に対するエストロゲン様作用の評価を行う。

3. 出生前 Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A、DES 暴露による雌マウスの発育ならびにエストロゲン標的臓器への影響

①発育への影響

エストロゲン様化学物質の出生前投与は雌マウスの体重増加を促進し、16 週齢において少量 DES 群の他はすべて無処置対照群に比して有意に体重は重かった。

②内分泌かく乱への影響

エストロゲン様化学物質は膣開口を促進し、Genistein、Zearalenone、DES ならびに大量 Bisphenol A 投与群では無処置対照群に比して有意な思春期早発をみた。いずれのエストロゲン様化学物質を投与したマウスでも周期性はみられたが、一周期長は少量 DES 投与群の他は有意に延長し、Genistein、Resveratrol、Bisphenol A や DES 投与動物では発情間期の占める割合が有意に延長し、Zearalenone では発情期の有意の延長をみた。

③雌性生殖器の形態変化への影響

卵巣の組織像をみると、4 週齢時では黄体の欠如を、大量 Genistein (2/6)、大量 Resveratrol (1/6)、大量 Zearalenone (5/6)、少量・大量 Bisphenol A (各の 2/6、3/6)、少量・大量 DES (各の 5/6、6/6) 投与動物にみた。しかし、Genistein、Resveratrol、Bisphenol A や DES 投与動物では 8 週齢以降、黄体の出現をすべての動物にみた。一

方、大量 Zearalenone 投与動物では 8、12、16 週齢時でも各の 6/6、5/6、2/6 の動物に黄体欠如をみた。

④乳腺発育への影響

無処置対照乳腺についてみると、4 週齢では乳管の末端に TEB をみだが、腺胞の分化はみなかった（スコア 1）。8 週齢に至ると腺胞が出現し、12 週、16 週齢では 8 週齢でみられた以上の分化はみとめず、むしろ動物間での分化に差をみた。無処置対照乳腺は 4 週齢時すべてスコア 1 を呈していたが、正常卵巢（黄体をもつ）を有する少量ならびに大量 Zearalenone 投与マウス、ならびに大量 Bisphenol A 投与マウスの一部（2/3）のマウスでは、乳腺発育の促進がみられ（スコア \geq 2）、分泌能をもつ腺胞の出現もみとめた。しかし、8 週齢以降の乳腺の発育程度は無処置対照群と同等であった。一方、この時期大量 Zearalenone 投与により黄体をみないマウスでは、腺胞への分化をみとめず、好酸性の物質を入れた拡張した乳管のみからなる低分化な乳腺をみた（スコア 1）。よって、Zearalenone や Bisphenol A は、4 週齢では正常な卵巢機能をもつマウスでは乳腺の分化を促進する作用を示し、逆に 8-16 週では大量 Zearalenone 投与により生じた無黄体マウスでは、乳腺分化の抑制がみられた。

4. Resveratrol と Zearalenone のラット思春期前暴露による乳癌に対する影響

大量 Resveratrol 投与群の \geq 1cm の乳腺腫瘍を有する頻度は無処置群に比して高率であったが、少量 Resveratrol 投与群は無処置群と差はみなかった。組織学的に乳癌と確認しえた腫瘍に対して \geq 1cm 乳癌発生率とともに、微小乳癌も含めた全乳癌の乳癌個数、乳癌多発率につき比較したところ、無処置対照群に比して Resveratrol 大量投与群では \geq 1cm 乳癌発生率、組織的に認めた微小乳癌も含めた全乳癌個数や、乳癌多発率は有意に高率であった。但し、 \geq 1cm 乳癌採取までの期間は差をみなかった。なお、

Resveratrol 少量投与群はこれらの指標からは乳癌発生には影響をみなかった。

Zearalenone 無処置群に比して大量・少量 Zearalenone 処置はともに累積乳癌発生率を抑制した。組織学的に確認しえた微小腫瘍も含めたすべての乳腺腫瘍につき解析したところ、乳腺腫瘍は乳癌か線維腺腫のいずれかであったので、全乳腺腫瘍と乳癌に限った群間の比較を行った。その結果、線維腺腫も含めた全乳腺腫瘍あるいは乳癌に限局しても Zearalenone は用量依存的に腫瘍発生を抑制し、Zearalenone 大量投与で有意な抑制をみだが、少量投与では有意には至らなかった。なお、腫瘍採取までの期間に差はみなかった。

5. 自己免疫病発症に対する各種食品関連化学物質の影響

①体重および臓器重量

各投与群の体重および腎臓重量には有意な差が見られなかった。脾臓重量はオスの BPA 投与群で高い傾向が見られた。リンパ節重量は皮下・腹腔内ともに Genistein 投与群では対照群と差が見られなかったが、E2 および BPA 3mg/kg 投与群では有意差はなかったものの顕著に増加する傾向が見られ、その傾向は BPA 3mg/kg 投与群のほうがより強かった。

②タンパク尿症

タンパク尿症罹患率はオスでは BPA3mg/kg 投与群が他の群に比べて顕著に高かった。また、メスでは、Genistein 15mg/ml、E2 および BPA 投与群は対照群と比べて罹患率が有意に高かった。

③サイトカイン

血中 IFN- γ 量はオスではすべての投与群で低下し、特に E 投与によって有意に低下した。メスでは Genistein 投与群で有意に低下し、E2 投与では高い傾向が見られた。

④生存率

オスの生存率はいずれの投与群も変化が見られなかった。メスでは死亡開始時期は差が見られなかったが、210 日目までの生存

率は対照群が60%で平均生存日数が183.2日だったのに対して、Genistein投与群では生後159日目までにすべてのマウスが死亡した(平均生存日数141.4日)。また、BPA投与群は生存率が40%で平均生存日数が166.3日、E2投与群は10%で平均生存日数が158.3日となり、どちらの投与群も有意差はないものの生存率および平均生存日数が顕著に低下した。

⑤その他の症状

Genistein投与マウスでメス10匹中5匹に明らかな腎臓の組織学的変性が見られた。現在、すべてのマウスでその組織学的検査を行っている。

6. 食品関連化学物質の体内移行

平成14年度に開発したHPLC-ECD法に加え、より特異性の高いLC-MS/MSによる分析法を検討し、分析条件を開発した。検出限界は物質により若干異なるが、

Resveratrol、Daidzein、Glycitein、Genistein、Bisphenol Aの5物質では、血清(0.2mLに定容した場合)で0.6ng/mL以下、乳汁(0.5mLに定容した場合)で1ng/mL以下であった。なお、Bisphenol A-d16の感度は、Bisphenol Aの約1/3であった。血清に20ng/mL濃度添加したときの回収率は、5物質とも75%以上と良好であった。

市販正常マウス血清及びNIH-07PLDで飼育したコントロール群マウス(n=5)の血清及び乳汁の分析を行ったところ、市販マウス血清ではBisphenol Aで総量及び遊離体が約2ng/mL、Daidzeinで総量が65(遊離体15)ng/mL、Glyciteinで総量が30(遊離体7.6)ng/mL、Genisteinで総量が57(遊離体11.3)ng/mL検出された。一方、NIH-07PLDで飼育したマウスの血清及び乳汁では、Genistein等植物エストロゲンは、総量で2.5ng/mL以下(遊離体で1ng/mL以下)であり、Bisphenol Aについては、総量及び遊離体濃度が、痕跡~2.2ng/mLであったが、分析操作ブランクも痕跡~1.7ng/mL検出され、また、総量と遊離体が同程度検出

されていることから、試料採取及び分析操作中のコンタミネーションと考えられた。Bisphenol A-d16を10、100mg/kg皮下投与して血清及び乳汁への移行を調べた結果、n=5の平均値で、血清中では、10mg/kg群で総量が1.8(遊離体0.30)µg/mL、100mg/kg群で総量が18.4(遊離体1.3)µg/mL検出された。乳汁中では、10mg/kg群で総量が0.59(遊離体0.52)µg/mL、100mg/kg群で総量が4.0(遊離体2.0)µg/mL検出された。遊離体の総量に対する比は、10mg/kg群では血清中7.9~41(平均19)%、乳汁中81~93(平均89)%、100mg/kg群で血清中3.8~8.0(平均6.9)%、乳汁中40~60(平均49)%と、乳汁中の方が血清に比べて遊離体の割合が高く検出され、極性の高い抱合体に比べて脂溶性化合物である遊離体の方が乳汁中に高率に移行することが示唆された。

7. 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雄性生殖器および中枢神経系に及ぼす影響

①体重および雄性生殖器重量

成熟(300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。体重は大量投与群(平均616±46.9g)ではコントロール群(平均650±77.1g)に比べ、低体重傾向であったが統計的有意差はなかった。また低量投与群(平均626±65.4g)でも同様であった。また前年結果の65日例と比較しても同様の傾向であった。精巣重量は大量投与群で左右の計が平均3.36±0.20g、低量投与群で平均3.48±0.12g、またコントロール群で平均3.46±0.35gで統計的有意差は全くなかった。前回報告の65日齢では低量投与群がコントロール群に比しわずかながら低重量(p=0.0171)であったが、加齢とともにその差も減少したことになる。副生殖器重量も、投与群で低重量の傾向を認めたが、統計的有意差は認めなかった。すなわちこれらを総合すると、成熟期以降は、雄性生殖器機能へのゲニスタインの影響

響はないものと予想される。

②青斑核カテコールアミンニューロン

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斑核は神経細胞の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。また青斑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。56日齢の雌雄の仔ラットを組織固定し、厚さ18ミクロンの脳幹の浮遊切片を作成する。その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、青斑核そのものと青斑核付近の副核・亜核ごとのカテコールアミンニューロンの数を計数した。なお、A4群（とくに青斑核の外に存在するもの）は、もともと個体差が激しいことが判明したので、パラメーターとしては用いていない。

各群内各例の値にばらつきのないことを確認した後、計数値の平均値をとったところ、青斑核とその腹側亜核のA6群全体、またはA4群とA6群双方を含む青斑核のみの総数は、オスでもメスでも投与群で約8割程度に減少し、大量投与群でより強く減少する傾向を有していた。次年度は各群6例のサンプル数を集めて結論を導くとともに、300日例でも計数をおこなう。

③小脳の分子層

いくつかの内分泌かく乱因子は、小脳のシナプス形成に影響しプルキンエ細胞の樹状突起の長さを変化させるとされている。多くの研究では、小脳の分子層の厚さで測定しているが、本年度はまず、計測法について検討した。固定後の小脳から厚さ18ミクロンの浮遊切片を作成し、カルビンディンに対する抗体で免疫組織化学的に染色し他標本を用いた、断面の選び方については、

頂部や外側部を用いることにより、局面状を呈している小脳小葉の外表面に垂直な断面が得られた。分子層の厚さは450~550 μ であり、ゲニスタインの投与群はコントロール群に比し分厚いという結果が得られたが、顆粒層の厚さも変化することが新たに判明した。小脳の機能から考えて、顆粒層の細胞数のわずかな変動は生体機能にそれほど影響ないものの、分子層と顆粒層の比を検討することも重要であると考えられた。

8. 食品関連化学物質の細胞内シグナル伝達

①ZeranolのER α 結合親和性

DESは15nM、30nM、45nMでそれぞれ36.3 \pm 10.1%、87.2 \pm 1.3%、95.6 \pm 0.9%の17 β -estradiolに対するER α 結合阻害活性が認められた。阻害曲線よりIC₅₀は20nMと測定された。Zeranolは15nM、30nM、45nM、100nMでそれぞれ10.7 \pm 5.0%、59.3 \pm 4.2%、80.0 \pm 6.8%、98.0 \pm 1.0%の結合阻害活性が認められ、IC₅₀は26nMであった。この結果からZeranolの相対結合親和性（DESのIC₅₀/ZeranolのIC₅₀）は0.77と計算された。

②c-myc遺伝子発現への影響

17 β -estradiolは10⁻¹³-10⁻¹⁰Mの範囲で濃度依存的にc-myc遺伝子発現を上昇させ、10⁻¹⁰Mでほぼ最大値（1.49倍）に達した。Zeranolも10⁻¹³-10⁻⁹Mの範囲で濃度依存的に遺伝子発現を上昇させ、10⁻⁹Mで最大1.80倍上昇させた。ところが、10⁻⁸Mで1.31倍、10⁻⁷Mでは1.09倍とより高濃度域では濃度依存的にc-myc遺伝子の発現上昇が減弱した。試験管内結合阻害実験によりDES、ZeranolのIC₅₀はそれぞれ20nM、26nMと測定された。この結果からZeranolはDESと同程度（相対結合親和性=0.77）のER α 結合親和性を有することが明らかとなった。一方、ZeranolのEstrogen様活性はc-myc遺伝子発現を指標とした場合10⁻¹³-10⁻⁹Mの範囲では17 β -estradiolと同等かやや強いと考えられた。

9. 農薬のエストロゲン活性評価

E-CALUX 法によると、E2 の最大活性値を 100% とした時、10% の作用を示す濃度

(EC_{10}) は、 3.2×10^{-12} M であった。エストロゲン活性がみられた農薬は 5 種で、有機リン系のトルクロホスメチル、プロチオホス、ダイアジノン、ベンゾイミダゾール系のチアベンダゾール、昆虫成長抑制剤のピリプロキシフェンである。 EC_{10} は、それぞれ、 7.7×10^{-6} M、 3.3×10^{-6} M、 4.6×10^{-5} M、 2.2×10^{-6} M、 2.9×10^{-6} M である。また、1 農産物から 2~5 種の農薬が検出されることが多いことから、活性のみられた農薬で、今まで複数検出されたものを組み合わせてエストロゲン活性を測定したところ単独の場合より活性が高くなったものがあった。活性が高くなったものは、ダイアジノンとトルクロホスメチル、ピリプロキシフェンとプロチオホス、OPP と TBZ で、OPP には活性がみられなかったが、TBZ と組み合わせることにより TBZ のみの活性より高くなった。また、抗エストロゲン活性がみられたのは、ベンゾイルウレア系のクロルフルアズロンで、イマザリルとクロルフェナピルにもわずかに抗エストロゲン活性がみられた。

活性のみられた農薬について、残留農薬分析により検出された値と活性のみられた濃度を比較した。農薬検出値をモル濃度に換算すると約 $0.003 \sim 1.74 \times 10^{-4}$ M であった。過去 5 年間における最大検出値と比較したので 1.74×10^{-4} M と TBZ の値は高くなっているが、最近では 1/100~1/50 の値である。エストロゲン活性のみられた農薬の残留値は、約 10^{-6} M 以下で、エストロゲン活性のみられない濃度であった。

S9 代謝物のエストロゲン活性を評価するために、直接セルに S9 を加えて代謝させることを試みたが、セルの分解が考えられたので、あらかじめ代謝させ、S9 を不活性とした後、セルに暴露することにした。不活性化は、98°C、10 分の加熱処理を行

った。S9 の反応温度は 37°C とし、反応時間は 0.5、1、2、4、8、24、48 時間で検討したが、1 時間以降には変化がなかった。余裕をみて反応時間は 2 時間とした。さらに、S9 とコファクターの添加量の検討を行った。S9 量とコファクター量の比を 1 : 0、1 : 1、1 : 2、1 : 4、1 : 9 (通常使用比) とした。BPA の分解量を HPLC で測定したところ、順に 75%、90%、76%、64%、47% であった。分解量の一番多かった 1 : 1 の混合比で S9 代謝を行うことにした。不活性化後、 $0.45 \mu\text{m}$ でろ過したものを直接暴露した。BPA 代謝物のエストロゲン活性は、BPA よりわずかに低いけどほとんど変わらなかった。TBZ 代謝物と親化合物には活性のなかったペルメトリン代謝物および OPP 代謝物に活性がみられた。 EC_{10} は、それぞれ、 2.8×10^{-5} M、 4.9×10^{-5} M、 1.4×10^{-5} M であった。

D. 結論

1. 酵母 Two-hybrid 法を用いた食品関連物質の抗エストロゲン作用の評価

酵母 Two-hybrid 法によると、Zearalenone、genistein、genistin、daidzein、daidzin、resveratrol、coumestrol、equol 及び bisphenol A には抗エストロゲン作用は認められなかった。

2. エストロゲン受容体結合アッセイ (ER-ELISA) 法による食品関連物質のエストロゲン受容体 (α 及び β) への結合親和性の比較

ER-ELISA 法によると、ヒトエストロゲン受容体 α (hER α) に対する結合親和性の強さは、DES > zearalenone > equol, genistein > coumestrol, daidzein > bisphenol A > resveratrol であり、genitin 及び daidzin に明白な結合親和性は認められなかった。ヒトエストロゲン受容体 β (hER β) に対する結合親和性の強さは、DES, zearalenone, genistein > equol, daidzein > coumestrol > bisphenol A >

resveratrol であり、genitin 及び daidzin に明白な結合親和性は認められなかった。なお、イソフラボン類では ER α に比して ER β につよい結合親和性をみた。

3. 出生前 Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A、DES 暴露による雌マウスの発育ならびにエストロゲン標的臓器への影響

Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A、DES をマウスの出生前に暴露したところ、体重はいずれの化学物質も投与量の如何に関わらず増加傾向にあり、思春期発来（膣開口）は早発する傾向にあり、発情周期は延長傾向にあり、発情周期の延長は Genistein、Resveratrol、Bisphenol A、DES では発情間期の延長に起因し、Zearalenone では発情期の延長によっていた。Genistein、Resveratrol の大量投与群、Bisphenol A、DES の大量、少量投与群では、4 週齢時に無排卵性卵巣をみたが、8 週齢時以降卵巣は正常形態を呈していた。一方、Zearalenone の大量投与群では 4、8、12、16 週齢時に無排卵性卵巣をみるものもみた。Zearalenone や Bisphenol A 投与は正常卵巣を有する個体の乳腺の分化を 4 週齢時に促進したが、8 週齢以降では、Zearalenone は無排卵性卵巣（高エストロゲン、低プロゲステロン環境）を介して乳腺の分化を抑制した。

4. Resveratrol と Zearalenone のラット思春期前暴露による乳癌に対する影響

Resveratrol のラットへの思春期前大量暴露（100 mg/kg）では MNU 誘発乳癌を促進したが、少量暴露（10 mg/kg）にこの作用はみなかった。但し、Resveratrol の 1 日大量暴露量は赤ワインに換算して 5000 グラス量であり、その 1/10 量に乳癌促進作用がないことは、ヒトの通常摂取量では乳癌促進作用はないものと結論できる。

Zearalenone のラットへの思春期前大量投与は乳癌を抑制した。しかし、Zearalenone は用量依存性に無排卵性卵巣を惹起した。

5. 自己免疫病発症に対する各種食品関連化学物質の影響

子宮重量法で子宮の有意な重量増加作用を示した Genistein、BPA、及び Estradiol-17 β の濃度を投与すると、植物エストロゲンである Genistein は自己免疫病の発症、特に腎炎の悪性進展を促進する可能性が示唆された。また、人工化学物質で環境ホルモン物質であるとされている Bisphenol A は Estradiol-17 β と同等の発症促進作用を有する可能性が示唆された。現在、その他の自己免疫病発症指標に関する詳細な検討を行っており、総合的に判断して結論を下す。

6. 食品関連化学物質の体内移行

Bisphenol A を皮下投与して血清及び乳汁への移行を調べた結果、乳汁中の方が血清に比べてエストロゲン活性をもつ遊離体の割合が高く検出され、極性の高い抱合体に比べて脂溶性化合物である遊離体の方が乳汁中に高率に移行することが示唆された。

7. 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雄性生殖器および中枢神経系に及ぼす影響

成熟期以降は、男性生殖器機能へのゲニスタインの胎仔期暴露の影響はないものと予想される。56 日齢における雌雄の胎仔期ゲニスタイン暴露により青斑核とその腹側亜核の A6 群全体、または A4 群と A6 群双方を含む青斑核のみの総数は、オスでもメスでも投与群で約 8 割程度に減少し、大量投与群でより強く減少する傾向を有していた。小脳の分子層の厚さは大量・少量投与群で雌雄ともに増す傾向にあった。

Genistein は性的異型核である青斑核や小脳の神経活動を反映すると考えられるプルキンエ細胞に影響を及ぼしたと考えられるが、例数を増やして結論を下す。

8. 食品関連化学物質の細胞内シグナル伝達

ER α 結合試験の結果、Zeranol の相対結合親和性（DES の IC₅₀/Zeranol の IC₅₀）は 0.77 と計算された。一方、Zeranol の Estrogen 様活性は c-myc 遺伝子発現を指標とした場合 17 β -estradiol と同等かやや強いと考えら

れた。

9. 農薬のエストロゲン活性評価

農薬 32 種中、エストロゲン活性がみられた農薬は 5 種で、有機リン系のトルクロホスメチル、プロチオホス、ダイアジノン、ベンゾイミダゾール系のチアベンダゾール、昆虫成長抑制剤のピリプロキシフェンである。複数の農薬をくみあわせたところ活性が高くなったものは、ダイアジノンとトルクロホスメチル、ピリプロキシフェンとプロチオホス、OPP と TBZ で、OPP には活性がみられなかったが、TBZ と組み合わせることにより TBZ のみの活性より高くなった。但し、活性のみられた農薬について、残留農薬分析により検出された値と活性のみられた濃度を比較したところ、エストロゲン活性のみられない濃度であった。

E. 健康危険情報

特記事項なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 裴 仁正, 四方伸明, 垾 貴司, 段原直行, 辻田 (久徳) 美樹, 螺良愛郎. 周生期 Genistein 暴露による化学発癌剤誘発ラット乳癌の抑制ならびにその作用機序. 乳癌基礎研 (印刷中).
2. Nikaido Y, Yoshizawa K, Pei R-J, Yuri T, Danbara N, Hatano T, Tsubura A. Prepubertal zearalenone exposure suppresses *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis but causes severe endocrine disruption in female Sprague-Dawley rats. *Nutr Cancer* (in press).
3. Pei R-J, Sato M, Yuri T, Danbara N, Nikaido Y, Tsubura A. Effect of prenatal and prepubertal genistein exposure on *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats. *In Vivo* 17: 349-358, 2003.
4. Sato M, Pei R-J, Yuri T, Danbara N,

Nakane Y, Tsubura A. Prepubertal resveratrol exposure accelerates *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary carcinoma in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett* 202: 137-145, 2003.

2. 学会発表

1. Tsubura A, Nikaido Y, Pei R-J, Yuri T, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M. (2003) Prepubertal zearalenone exposure suppresses *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary tumors in rats. The 24th Cong. Int Assoc Breast Cancer Res, Sacramento (USA), Program and Abstract, p127.
2. 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. 日病理会誌 92: 322.
3. 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. 日病理会誌 92: 314.
4. 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. 日病理会誌 92:322.
5. Pei Ren-Jeng, 垾 貴司, 段原直行, 四方伸明, 螺良愛郎. (2003) 周生期 Genistein 暴露による Sprague-Dawley ラットの発育, 癌化及び内分泌かく乱作用への影響. 第 13 回乳癌基礎研究会, 鳥取.
6. 二階堂泰資, 垾 貴司, 段原直行, 四方伸明, 螺良愛郎. (2003) 新生仔期 Zearalenone 暴露の Sprague-Dawley 雌ラ

- ットにおよぼす影響. 第 62 回日本癌学会, 名古屋, 日癌会 62 回総会記 62: 373.
7. 井岡真基, 片岡洋祐, 山田久夫. (2003) 植物由来エストロゲン様物質に暴露した妊娠ラットの出生仔の中樞神経におよぼす影響. 第 30 回日本神経内分泌学会, 横浜, 抄録; **Brain-Pituitary 2003** 第 30 回日本神経内分泌学会講演要旨集 p.37
 8. 小嶋美穂子, 藪下尚智, 西山利正, 佐々木真理, 福永健治, 辻 元宏. (2003) E-CALUX Assay による農薬のエストロゲン活性評価. 第 6 回日本内分泌攪乱化学物質学会, 仙台.
 9. 塚 貴司, 段原直行, 辻田 (久徳) 美樹, 二階堂泰資, 島野直人, 上原範久, 清塚康彦, 四方伸明, 螺良愛郎. (2004) Zeranol の思春期前暴露における雌 Sprague-Dawley ラットにおよぼす影響. 第 93 回日本病理学会, 札幌.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

（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の抗エストロゲン様作用の評価
及び植物エストロゲンのエストロゲン受容体 α 及び β に対する結合親和性の比較

分担研究者：堀 伸二郎

大阪府立公衆衛生研究所

研究協力者：北川 陽子、高取 聡

大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

酵母 Two-Hybrid 法を用いて、食品関連化学物質（Daidzein、Genistein、Resveratrol 等）と Bisphenol A について、抗エストロゲン作用の評価を行った。その結果、いずれの化学物質についても抗エストロゲン作用は認められなかった。また、エストロゲン受容体結合アッセイにより、食品関連化学物質についてエストロゲン受容体（ α 及び β ）に対する結合親和性の比較を行った。エストロゲン受容体 α と比較して β に対する親和性が強いものが多く、なかでもイソフラボン類である Daidzein 及び Genistein は約 5 倍結合親和性が強かった。

A. 研究目的

我々が日常食品として摂取するものの中には、植物エストロゲンと呼ばれる天然エストロゲンが存在し、乳癌や前立腺癌等の予防医学の面から注目されてきた。しかしながら、特に乳幼児に対しての大豆製品等の摂取によるイソフラボン摂取を問題視する傾向もある。

昨年度は、植物エストロゲンとその他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の評価を行った。その

結果、エストロゲン受容体に対してアゴニストに作用する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。また、植物エストロゲン等の化学物質については、アゴニスト作用を示す条件として、上記の条件に加えて、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。

今年度は、昨年度と同様に酵母 Two-hybrid 法を用いて、食品関連化学物質に