

ついて、抗エストロゲン作用を評価するとともに、エストロゲン受容体への親和性の評価を行う。受容体に対して親和性を有する化学物質が存在した場合、それがアゴニストとして作用するのか、あるいはアンタゴニストとして作用するのかについて検討を行う。

また、エストロゲン受容体には  $\alpha$  と  $\beta$  の 2 種類があることが知られている。しかしながら、この 2 つの受容体の反応性の相違点等についてはまだまだ不明な点が多い。特に受容体  $\beta$  は卵巣、子宮及び前立腺等に特異的に存在しているとの報告もあり、ホルモン依存性の癌の発症に関しても何らかの関連性を持つ可能性が高いと考えられる。そこで、食品関連化学物質を対象としてエストロゲン受容体に対する親和性を  $\alpha$  と  $\beta$  それぞれについて評価し、比較検討を行う。

## B. 研究方法

### B-1. 酵母 Two-hybrid 法による抗エストロゲン作用評価方法

ERLBD - GAL4DBD (Estrogen receptor  $\alpha$  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。

17 $\beta$ -エストラジオール ( $E_2$ ) 存在下にて、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  $\beta$ -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  $\beta$ -ガラクトシダーゼ を算出した。

Miller の式 :

$$U=1000x((OD_{410})-1.75x(OD_{570})) / (t)x[v]x(OD_{595})$$

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)

産生された  $\beta$ -ガラクトシダーゼを  $E_2$  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。各被験化学物質の酵母に対する毒性は、作用前後の  $OD_{595}$  を測定することにより判断した。 $E_2$  単独作用時の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生量を 100% としたとき、70% まで産生量を下げるといったような化学物質を抗エストロゲン作用があると判断した。

### B-2. エストロゲン受容体結合アッセイ

Ligand Screening System - Estrogen

Receptor  $\alpha$  及び  $\beta$  キット (東洋紡) を使用した。化学物質はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解後、希釈緩衝液で 1% DMSO となるように調製した (試料液)。ヒトエストロゲン受容体溶液 (20  $\mu$ l)、試料液 (30  $\mu$ l) 及び  $17\beta$ -エストラジオール溶液 ( $E_2$  溶液) (30  $\mu$ l) とを 96 ウェルの反応プレートにて 4  $^{\circ}$ 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  $17\beta$ -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 (測定プレート) で 4  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ C、20 分間基質反応させた。反応後、OD<sub>450</sub> 及び OD<sub>650</sub> 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 を陽性対照とした。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 ( $\alpha$ ) を求めた。

$$\text{結合阻害度 } (\alpha) = ([B] - [S]) / ([B] - [P])$$

結合阻害度をプロットしたグラフから IC<sub>50</sub> を求め、評価指標とした。

また、測定する化学物質によっては、抗原抗体反応へ影響を及ぼす可能性があるため、グラフから求めた IC<sub>50</sub> 付近の

濃度について、抗原抗体反応への影響評価を行った。方法は化学物質を DMSO に溶解し、希釈用緩衝液で 100 倍に希釈する (試料液)。試料液 50  $\mu$ l/well を測定プレートに分注後、 $E_2$ -HRP 溶液 50  $\mu$ l/well を添加し、4  $^{\circ}$ C、1 時間反応させた。以降の操作は、結合阻害度の測定方法と同じ操作方法を行い、[B] をブランク試験での吸光度、[S] を試料液での吸光度、[A] を  $E_2$  溶液の吸光度として、影響度を算出した。

$$\text{影響度 } (\%) = ([B] - [S]) / ([B] - [A]) \times 100$$

影響度が 20% 以上の場合、抗原抗体反応に対する試料の影響が大きいと考えられるので、受容体に対する結合反応を測定できない可能性がある。そのため、影響度の少ない濃度について、下記の式から IC<sub>50</sub> を算出した。

$$\text{ER}\alpha \text{ (or } \beta \text{) Index} = (1 - \alpha) \times (\text{試料濃度} \times 3/8 - 20 \times \alpha) / \alpha$$

$$\text{IC}_{50} \text{ (nM)} = \text{ER}\alpha \text{ (or } \beta \text{) Index} + 10$$

$\alpha$ : 結合阻害度、3/8: 液量補正量、20: 受容体濃度 (nM)

### B-3. 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. 抗エストロゲン作用評価方法の検討

エストロゲン受容体を介して抗エストロゲン作用を示す 4-Hydroxytamoxifen (4-OH-TX) を用いて、化学物質の抗エストロゲン作用の評価方法の検討を行った。E<sub>2</sub> 存在下で 4-OH-TX を各々 1 x 10<sup>-6</sup>、2 x 10<sup>-6</sup>、3 x 10<sup>-6</sup>、6 x 10<sup>-6</sup> 及び 1 x 10<sup>-5</sup> M 添加し、β-ガラクトシダーゼの産生量を比較した。添加した 4-OH-TX の濃度が高くなるにつれて β-ガラクトシダーゼの産生量が低下し、その抗エストロゲン作用が観測された (図 1)。しかしながら、6 x 10<sup>-6</sup> 及び 1 x 10<sup>-5</sup> M 添加時では、酵母に対する毒性が認められた。1 x 10<sup>-9</sup> M の E<sub>2</sub> 単独作用時の β-ガラクトシダーゼの産生量を 100 とした時、4-Hydroxytamoxifen を 1 x 10<sup>-6</sup>、2 x 10<sup>-6</sup> 及び 3 x 10<sup>-6</sup> M 添加した時の β-ガラクトシダーゼの産生量は、65、50、35 となった。これらのことにより、4-Hydroxytamoxifen を陽性対照として酵母 Two-Hybrid 法による抗エストロゲン作用の評価を行うこととした。

### C-2. 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

Zearalenone、Genistein、Genistin、Daidzein、Daidzin、Equol、Resveratrol、Coumestrol 及び Bisphenol A について、抗エストロ

ゲン作用の評価を行った。昨年度の研究から、酵母 Two-hybrid 法によってアゴニスト作用が既に認められている物質 (Zearalenone、Genistein、Equol、Coumestrol 及び Bisphenol A (図 2)) については、アゴニスト作用を示す濃度よりも 100、10 倍薄い濃度を添加し、アゴニスト作用が認められていない物質については、比較的濃い濃度 (10<sup>-6</sup> ~ 10<sup>-4</sup> M) を添加した。その結果、いずれの化学物質についても測定濃度範囲内において抗エストロゲン作用は認められなかった (図 3)。

### C-3. エストロゲン受容体 (α 及び β) への結合親和性の評価

結果を図 4~7 に示す。

ヒトエストロゲン受容体 (hERα) に対する親和性評価を行った結果、DES > Zearalenone > Equol > Genistein > Daidzein、Coumestrol > Bisphenol A > Resveratrol の順に親和性が認められた。Daidzein は 3 × 10<sup>-7</sup> M 以上の濃度では抗体に対する影響度が強く (20%以上)、また Resveratrol も添加濃度範囲内で IC<sub>50</sub> をグラフより算出することはできなかったため、ERα Index から計算によって IC<sub>50</sub> を算出した。Genistin 及び Daidzin についても抗体に対する影響が強く、測定濃度範囲内において結合親和性は認められなかった。

エストロゲン受容体 (hERβ) に対す

る結合親和性は、DES、Zearalenone、Genistein > Equol > Daidzein > Coumestrol > Bisphenol A > Resveratrol の順に認められた。受容体 ( $\alpha$ ) と同様に Genistin 及び Daidzin は抗体に対する影響が強く、測定濃度範囲内において結合親和性は認められなかった。hER $\alpha$  及び hER $\beta$  に対する結合親和性のまとめを表2に示す。

#### D. 考察

昨年度の研究より、植物エストロゲン類のアゴニスト作用を示す条件として、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、この仮説を確かめるために新たに Coumestrol と Equol についてもアゴニスト作用を評価した (図 2) (評価方法等は昨年度と同様)。その結果 Coumestrol が Zearalenone と、Equol も Genistein と同程度のアゴニスト作用が認められた。さらに Coumestrol については、E<sub>2</sub> と同程度の $\beta$ -ガラクトシダーゼの産生量が認められた。Coumestrol の構造は平面性が強く、昨年度のアゴニスト作用を示すための条件 (側鎖の平面構造の安定性) を満たしていた。しかしながら、必ずしも平面性が安定しているとは言えない Equol に Genistein と同様のアゴニスト作用が認められたことから、アゴニスト作用を示す条件として2つの条件が新たに考えられた。(1) ケトン基のない Equol の方が

アゴニスト作用が強いことから、Daidzein のケトン基はアゴニスト作用に対してマイナスに働く (2) Genistein もケトン基を分子内に有するが、分子内の水酸基 (4 位) の存在により、ケトン基のマイナスの影響が軽減されている。

hER $\alpha$  に対する結合親和性、酵母 Two-hybrid 法によるエストロゲン様作用及び抗エストロゲン作用をまとめた結果 (表 1)、エストロゲン受容体に対して結合親和性を有する化学物質 (DES、Zearalenone、Equol、Genistein、Daidzein、Coumestrol、BisphenolA 及び Resveratrol) のうち、アゴニストとして作用するのは、(DES、Zearalenone、Equol、Genistein、Coumestrol 及 BisphenolA) であった。結合親和性を有しかつアゴニスト作用が認められない Resveratrol 及び Daidzein はアンタゴニストとして作用を示す可能性が考えられた。しかしながら酵母 Two-hybrid 法の結果からは、アゴニストとして作用するのか、アンタゴニストとして作用するのか明確な結論は導きだすことができなかった。

エストロゲン受容体には hER $\alpha$  だけでなく hER $\beta$  も存在する (Couse, J.F. ら、*Endocrinology*, **138**, 4613, 1997)。hER $\alpha$  は広範囲の組織に分布するのに対し、hER $\beta$  は卵巣、子宮、前立腺、副睾丸、肺、視床下部等の比較的限定された組織に集中していることがわかっている。この2つの受容体は C 末端のリガンド結合

部位及び N 末端の転写活性部位が異なっている。これまでに、Genistein について、ER $\beta$  に対する結合親和性が ER $\alpha$  に比べて数十倍強いとの報告 (Kuiper, G.G.M.ら、*Endocrinology*, **138**, 863, 1997) があるが、イソフラボン類以外の植物エストロゲンやマイコエストロゲン等についての報告はほとんどされていない。今年度は、アンタゴニスト作用を評価した化学物質 (イソフラボン類、Zealenone 等) について評価を行った。

イソフラボン類については配糖体の Daidzin や Genistin に hER $\alpha$  及び hER $\beta$  に対する結合親和性は認められなかった。Daizin は Daidzein、さらに Equol に、Genistin は Genistein 等の化合物に代謝されるが、代謝されるにつれ受容体に対する結合性は増加した。また、配糖体を除く化学物質については、hER $\beta$  に対する親和性が hER $\alpha$  に対するものよりも強い傾向が認められた。なかでも、イソフラボン類である Genistein や Daidzein は hER $\beta$  に対する親和性が hER $\alpha$  に比べて約 5 倍程度強かった。これらの結果から、化学物質のエストロゲン受容体への親和性は必ずしも同じではなく、受容体の種類によって異なる可能性が示唆された。

これまで、大豆等の摂取量が多いアジア人はホルモン依存性癌による死亡率が欧米人と比較して低い理由として、Adlercreutz らは、疫学的研究により食事と疾病との関連性に注目し、伝統的な

食事をとる日本人の尿排出物中のイソフラボン濃度が高濃度であったことから、イソフラボン類は乳癌や前立腺癌のリスクを下げると報告している (Adlercreutz, H. ら、*Am. J. Clin. Nutr.*, **54**, 1093, 1991)。またイソフラボン類の癌のリスク抑制作用としては3つの要因が指摘されている。

(1) エストロゲン受容体を介した作用  
(2) 細胞サイクルに關与するチロシンキナーゼ阻害 (Theodore, F. ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2690, 1993) (3) 抗酸化作用。

今年度は受容体を介した作用について、抗エストロゲン作用を中心に検討を行ったが、イソフラボン類に抗エストロゲン作用は認められず、癌の抑制作用が単に抗エストロゲン作用のみで説明できないことが明らかとなった。

しかしながら、内分泌かく乱作用が疑われている Bisphenol A などの化学物質と比較して、植物エストロゲン (特にイソフラボン類) が hER $\beta$  に対する結合親和性が hER $\alpha$  と比較して選択的に高いこと、また、hER $\beta$  は卵巣や前立腺等の限られた組織に集中して存在していること。この2つの事柄が前述のイソフラボン類が癌のリスクを抑制するという事柄について何らかの關与を及ぼしている可能性が示唆された。

また、ラットエストロゲン受容体 $\alpha$ を導入した酵母 Two-hybrid 法の結果と受容体結合アッセイの結果が一部一致しな

かったが、これらの原因として2つの原因が考えられる。(1) ラットとヒトの受容体の違いによるものである(2) 化学物質が受容体と結合したときに生じる立体構造の変化が  $E_2$  と受容体とのときに生じるものとは異なっている。ラットとヒトとのエストロゲン受容体(子宮由来)のアミノ酸配列の相同性は約88%であるという報告(Koike, S. ら、*Nucleic Acids Reserch*, **15**, 2499, 1987)もあり、来年度はヒトの ER 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 $\alpha$  及び hER $\beta$  に対するエストロゲン様作用の評価を行うことで上記の原因に関しては何らかの考察が得られると考えている。今後、工業製品由来の化学物質について Bisphenol A だけでなく、さらに対象化学物質を増やして、hER $\alpha$  と hER $\beta$  に対する結合性を評価し、hER $\beta$  に対する結合親和性の特異性がイソフラボン類特有のものであるのかということについて調査を行う予定である。

## E. 結論

1. 4-Hydroxytamoxifen を陽性対照として、酵母 Two-hybrid 法により抗エストロゲン作用の評価方法を確立した。
2. Zearalenone、Genistein、Genistin、Daidzein、Daidzin、Equol、Coumestrol、Resveratrol 及び Bisphenol A に抗エスト

ロゲン作用は認められなかった。

3. hER $\alpha$  に対する親和性評価を行った結果、DES > Zearalenone > Equol > Genistein > Daidzein > Coumestrol > Bisphenol A > Resveratrol の順に結合親和性が認められた。また hER $\beta$  に対する親和性は、DES、Zearalenone、Genistein > Equol > Daidzein > Coumestrol > Bisphenol A > Resveratrol の順に結合親和性が認められた。

4. エストロゲン受容体の  $\alpha$  と  $\beta$  の違いにより結合親和性が異なることが示唆された。特にイソフラボン類である Genistein 及び Daidzein は hER $\beta$  に対する結合親和性が hER $\alpha$  に対するものより約5倍強かった。

5. Bisphenol A などの化学物質と比較して、植物エストロゲンといわれている化学物質(特にイソフラボン類)が hER $\beta$  に対する結合親和性が hER $\alpha$  と比較して選択的に高いこと。また、hER $\beta$  は卵巣や前立腺等の組織に集中して存在していること。この2つの結果からイソフラボン類が乳癌等のリスクを下げることについて何らかの関与を及ぼしている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の取得状況

なし

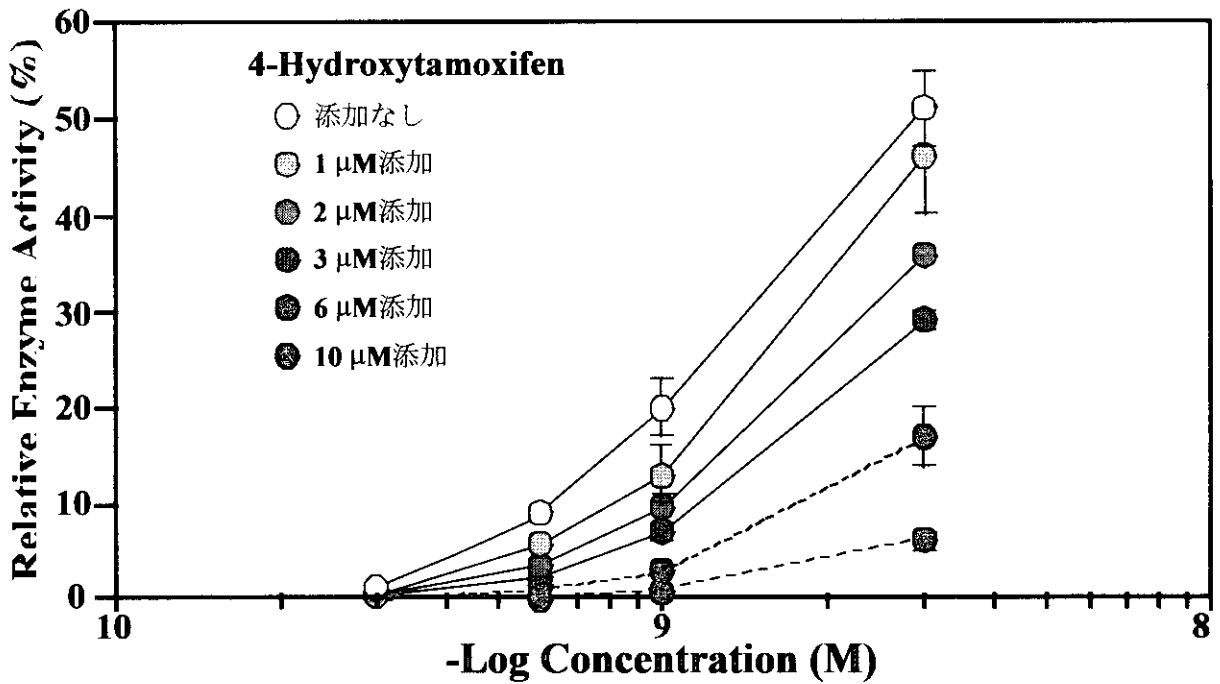


図1. 酵母 Two-hybrid 法による 4-Hydroxytamoxifen の抗エストロゲン作用の評価  
(点線：4-Hydroxytamoxifen による酵母に対する毒性が認められた)

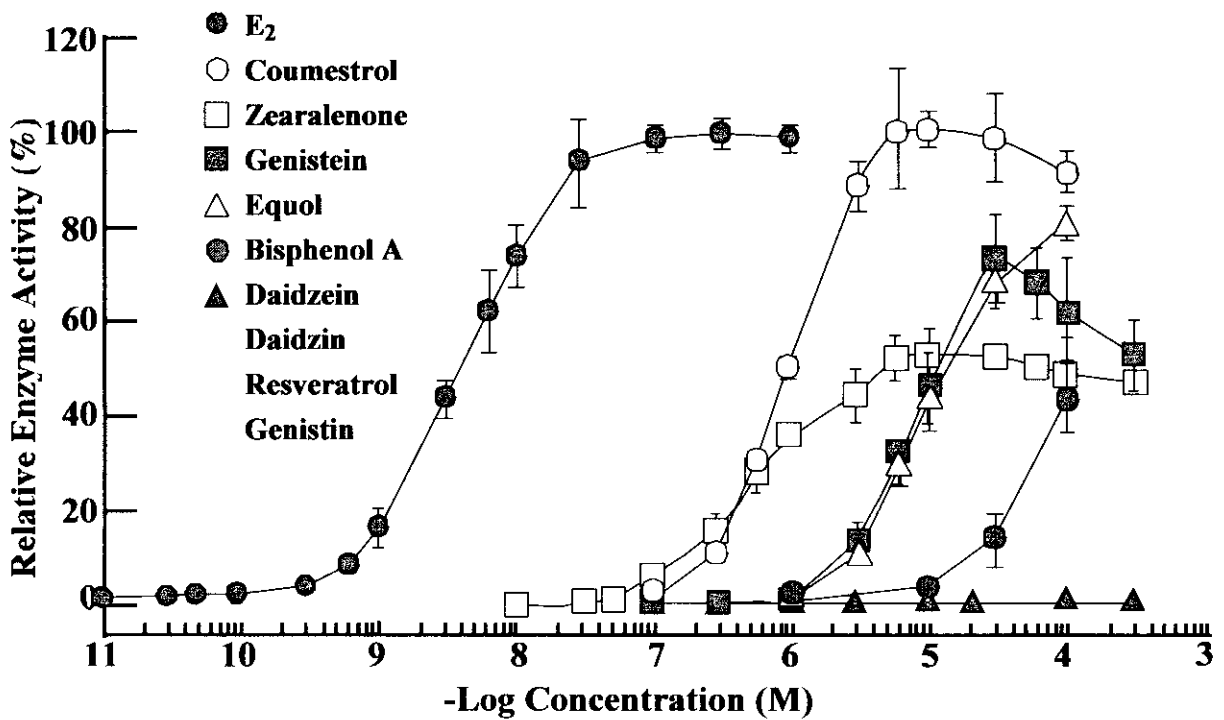


図2. 酵母 Two-hybrid 法による食品関連化学物質のエストロゲン様作用の評価



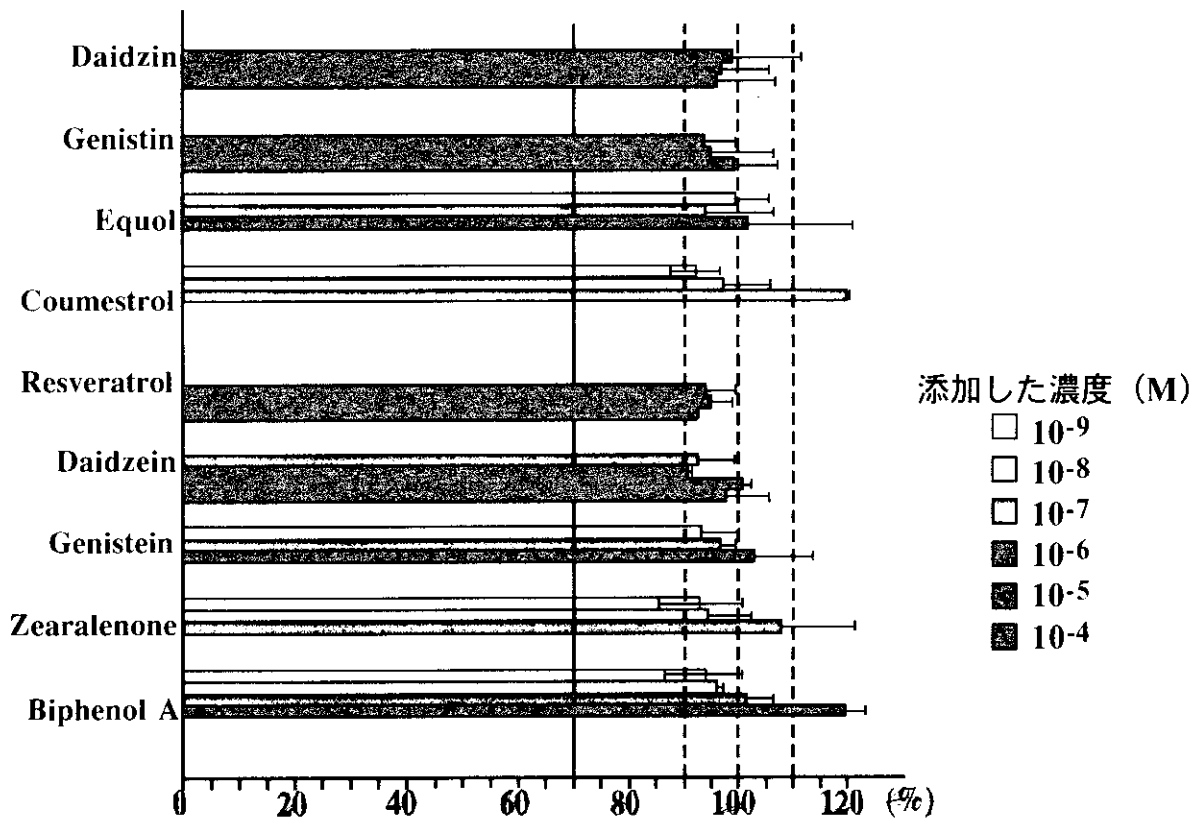


図3. 酵母 Two-Hybrid 法による食品関連化学物質の抗エストロゲン作用の評価 (10<sup>-9</sup> M E<sub>2</sub> 単独作用時のβ-ガラクトシダーゼ産生量を 100%とした)

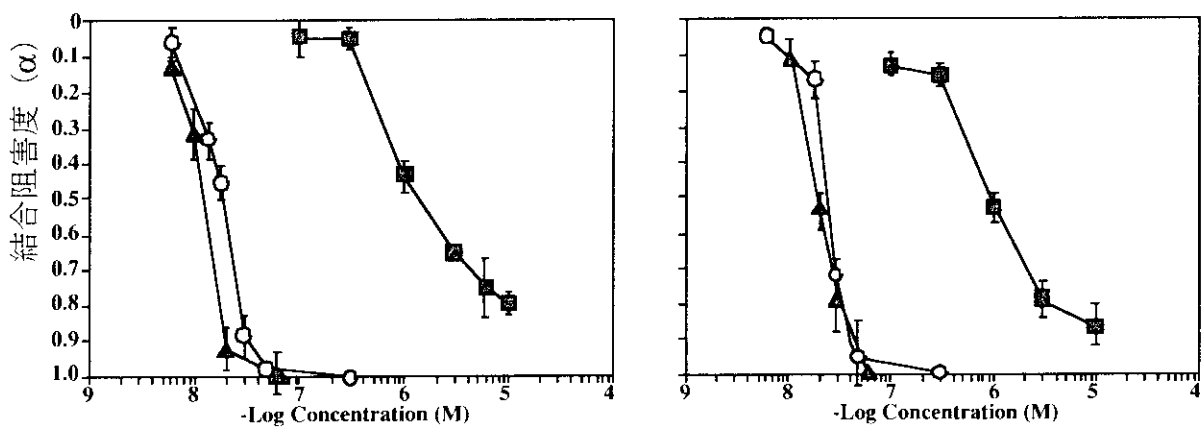


図4. エストロゲン受容体結合アッセイによる hERα と hERβ への結合親和性の比較 (1)

(左側: hERα, 右側: hERβ)

○ ; DES, ▲ ; 4-Hydroxytamoxifen, ■ ; Bisphenol A

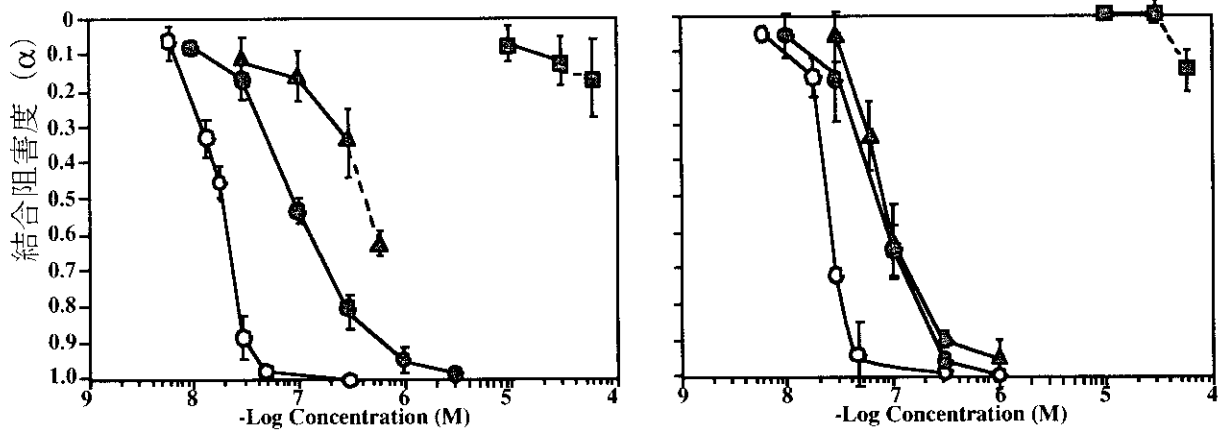


図 5. エストロゲン受容体結合アッセイによる hER $\alpha$  と hER $\beta$  への結合親和性の比較  
(2)

(左側: hER $\alpha$ , 右側: hER $\beta$ )

○ ; DES, ■ ; Daidzin ▲ ; Daidzein ● ; Equol

(点線 : 化学物質の抗体への影響が大きかったことを示す)

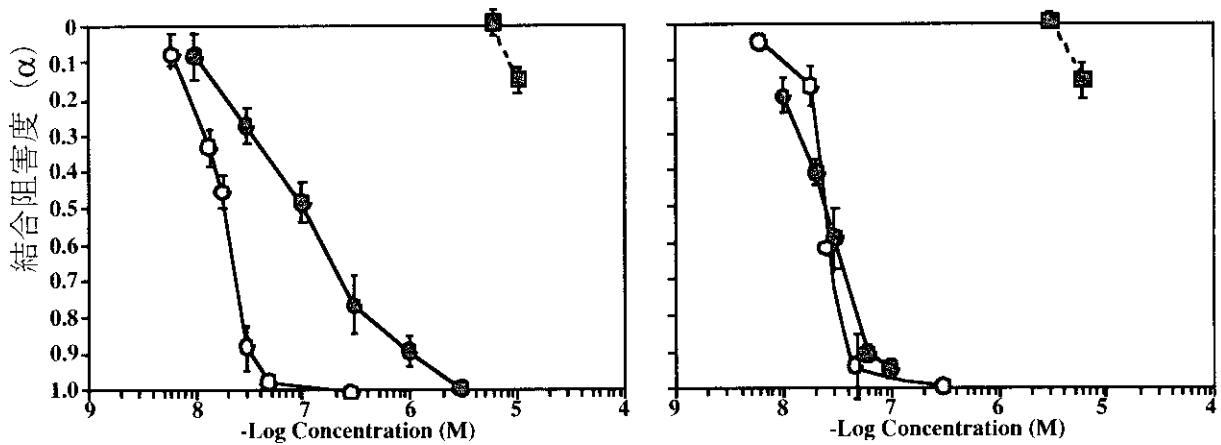


図 6. エストロゲン受容体結合アッセイによる hER $\alpha$  と hER $\beta$  への結合親和性の比較  
(3)

(左側: hER $\alpha$ , 右側: hER $\beta$ )

○ ; DES, ■ ; Genistin ● ; Genistein

(点線 : 化学物質の抗体への影響が大きかったことを示す)

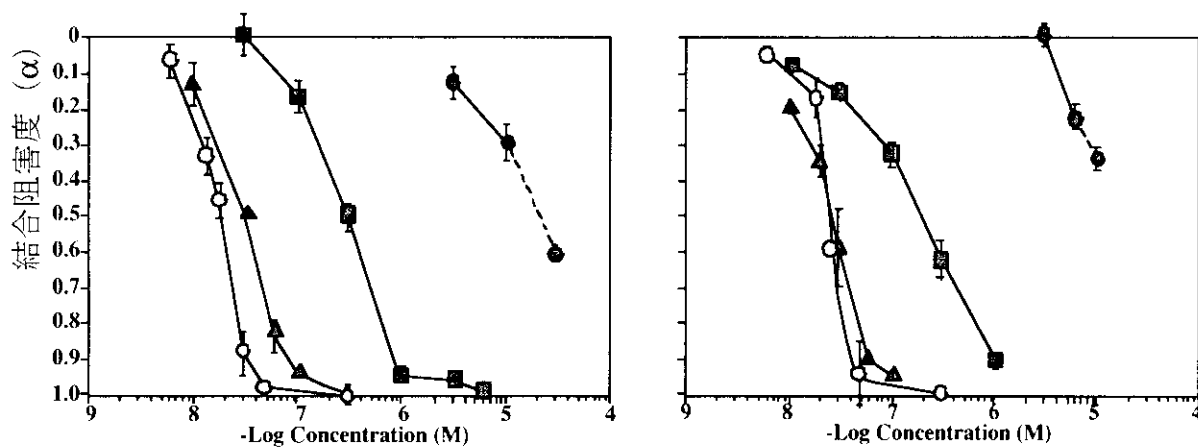


図7. エストロゲン受容体結合アッセイによる hER $\alpha$  と hER $\beta$  への結合親和性の比較  
(4)

(左側: hER $\alpha$ , 右側: hER $\beta$ )

○ ; DES, ■ ; Coumestrol, ▲ ; Zearalenone, ● ; Resveratrol

(点線 : 化学物質の抗体への影響が大きかったことを示す)

表 1 エストロゲン受容体  $\alpha$  に対する結合親和性評価（エストロゲン受容体結合アッセイ）とアゴニスト作用、アンタゴニスト作用（酵母 Two-hybrid 法）の比較

	Binding assay (hER $\alpha$ )	Yeast two-hybrid assay (rER $\alpha$ )	
	IC <sub>50</sub> (M)	EC <sub>10</sub> (M) <sup>a)</sup>	IC <sub>30</sub> (M) <sup>b)</sup>
<b>DES</b>	<b>1.6 × 10<sup>-8</sup></b>	<b>1.5 × 10<sup>-8</sup></b>	-
<b>Zearalenone</b>	<b>3.0 × 10<sup>-8</sup></b>	<b>1.7 × 10<sup>-7</sup></b>	<b>&gt; 1.0 × 10<sup>-7</sup></b>
<b>Equol</b>	<b>8.8 × 10<sup>-8</sup></b>	<b>2.6 × 10<sup>-6</sup></b>	<b>&gt; 1.0 × 10<sup>-6</sup></b>
<b>Genistein</b>	<b>1.0 × 10<sup>-7</sup></b>	<b>2.7 × 10<sup>-6</sup></b>	<b>&gt; 1.0 × 10<sup>-6</sup></b>
<b>Daidzein</b>	<b>2.8 × 10<sup>-7</sup></b>	<b>&gt; 3.0 × 10<sup>-4</sup></b>	<b>&gt; 1.0 × 10<sup>-4</sup></b>
<b>Coumestrol</b>	<b>2.9 × 10<sup>-7</sup> <sup>c)</sup></b>	<b>2.4 × 10<sup>-7</sup></b>	<b>&gt; 1.0 × 10<sup>-7</sup></b>
<b>Bisphenol A</b>	<b>1.4 × 10<sup>-6</sup></b>	<b>2.3 × 10<sup>-5</sup></b>	<b>&gt; 1.0 × 10<sup>-5</sup></b>
<b>Resveratrol</b>	<b>7.6 × 10<sup>-6</sup> <sup>c)</sup></b>	<b>&gt; 3.0 × 10<sup>-4</sup></b>	<b>&gt; 1.0 × 10<sup>-4</sup></b>
<b>Genistin</b>	<b>&gt; 1.0 × 10<sup>-5</sup></b>	<b>&gt; 3.0 × 10<sup>-4</sup></b>	<b>&gt; 1.0 × 10<sup>-4</sup></b>
<b>Daidzin</b>	<b>&gt; 1.0 × 10<sup>-5</sup></b>	<b>&gt; 3.0 × 10<sup>-4</sup></b>	<b>&gt; 1.0 × 10<sup>-4</sup></b>
<b>4-Hydroxytamoxifen</b>	<b>1.2 × 10<sup>-8</sup></b>	<b>&gt; 3.0 × 10<sup>-4</sup></b>	<b>8.0 × 10<sup>-7</sup></b>

a : E<sub>2</sub> 1.0 × 10<sup>-6</sup> M 作用時の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生量を 100%としたときの 10% の作用を示す濃度

b : E<sub>2</sub> 1.0 × 10<sup>-9</sup> M 作用時の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生量を 100%としたときの 70% の作用を示す濃度

c : ER $\alpha$  Index からの計算値による

ER $\alpha$  Index = (1 -  $\alpha$ ) × (試料濃度 × 3/8 - 20 ×  $\alpha$ ) /  $\alpha$  ( $\alpha$ : 結合阻害度)

IC<sub>50</sub> (nM) = ER $\alpha$  Index + 10

表2 エストロゲン受容体結合アッセイによる食品関連化学物質の hER $\alpha$  及び hER $\beta$  に対する結合親和性の比較

	hER $\alpha$		hER $\beta$	
	IC <sub>50</sub> (M)	RBA**	IC <sub>50</sub> (M)	RBA**
DES	1.6 × 10 <sup>-8</sup>	1	2.3 × 10 <sup>-8</sup>	1
Zearalenone	3.0 × 10 <sup>-8</sup>	0.53	2.6 × 10 <sup>-8</sup>	0.88
Equol	8.8 × 10 <sup>-8</sup>	0.18	7.0 × 10 <sup>-8</sup>	0.33
Genistein	1.0 × 10 <sup>-7</sup>	0.16	2.7 × 10 <sup>-8</sup>	0.85
Daidzein	2.8 × 10 <sup>-7*</sup>	0.06	7.4 × 10 <sup>-8</sup>	0.31
Coumestrol	2.9 × 10 <sup>-7</sup>	0.06	1.9 × 10 <sup>-7</sup>	0.12
Bisphenol A	1.4 × 10 <sup>-6</sup>	0.01	9.0 × 10 <sup>-7</sup>	0.03
Resveratrol	7.6 × 10 <sup>-6*</sup>	0.002	7.9 × 10 <sup>-6*</sup>	0.003
Genistin	> 10 <sup>-5</sup>	-	> 10 <sup>-5</sup>	-
Daidzin	> 10 <sup>-5</sup>	-	> 10 <sup>-5</sup>	-

\* : ER $\alpha$  (又は ER $\beta$ ) Index からの計算値による

ER $\alpha$  (又は ER $\beta$ ) Index = (1 -  $\alpha$ ) × (試料濃度 × 3/8 - 20 ×  $\alpha$ ) /  $\alpha$  ( $\alpha$ : 結合阻害度)

IC<sub>50</sub> (nM) = ER $\alpha$  (又は ER $\beta$ ) Index + 10

\*\* : 相対結合親和性

相対結合親和性 = DES の IC<sub>50</sub> / 試料の IC<sub>50</sub>

平成 15 年度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

植物由来化学物質の周生期暴露によるマウスにおける作用強度の比較と  
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

研究要旨

天然に存在するエストロゲン様化学物質（Genistein、Resveratrol、Zearalenone）のマウス出生前暴露による発育への影響やエストロゲン標的臓器における作用強度を、エストロゲン作用を有する合成化学物質（Bisphenol A、DES）と比較した。方法として、Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A は少量（0.5 mg/kg）と大量（10 mg/kg）、DES は少量（0.5 µg/kg）と大量（10 µg/kg）を妊娠 15-18 日の母体に連日計 4 回皮下投与し、各の無処置対照群と雌出生仔につき比較した。その結果、体重増加はいずれの被験化学物質の投与においても促進傾向にあり、16 週齢時では少量 DES 投与群の他は無処置群に比して有意に体重は重かった。いずれの被験化学物質でも膈開口は早発する傾向がみられ、生後 9-11 週の発情周期をみると、1 周期に要する時間の延長がみられ、この延長は 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 の少量・大量投与群では 4 週齢時に無排卵性卵巣をみたが、8 週齢時以降は正常の卵巣形態を呈していた。一方、Zearalenone の大量投与群では、4、8、12、16 週齢時にわたって無排卵性卵巣をみた。乳腺の発育は Zearalenone や Bisphenol A 投与により、4 週齢時で正常卵巣を有する個体では促進をみた。一方、Zearalenone 投与により無排卵性卵巣をみた個体では、8、12、16 週齢時で乳腺の発育抑制をみた。よって、Genistein、Resveratrol、Bisphenol A、DES の卵巣や乳腺における作用は一過性であるが、Zearalenone の作用は持続すると結論できる。Resveratrol と Zearalenone の思春期前暴露（15-19 日齢にかけて連日計 5 回）による乳腺発癌に対する影響をラット N-methyl-N-nitrosourea（MNU）誘発モデルを用いて検討した。投与量は Resveratrol の少量（10 mg/kg）と大量（100 mg/kg）、Zearalenone の少量（0.1 mg/kg）と大量（10 mg/kg）とに設定したところ、乳癌は Resveratrol の大量投与群で有意な促進がみられたが、Zearalenone の大量投与群で有意な抑制をみた。但し、Resveratrol の大量投与群とは 1 日投与量として赤ワイン 5000 グラスに相当し、その 1/10 量で乳癌促進作用はみなかった。一方、Zearalenone 大量投与群で乳癌の有意な抑制をみたが、37 週齢時に大量・少量投与群とも用量依存性に無排卵性卵巣を有する個体を有意にみた。Zearalenone の少量投与群とはアメリカ人の 1 日暴露量に相当する量である。よって、マウスの結果とも総合して、検討した化学物質のなかでヒトの暴露量を勘案すると乳腺発癌に憂慮すべき影響はみなかったが、Zearalenone の周生期暴露は不妊（無排卵性卵巣）を惹起するおそれがあることが示唆された。

## A. 研究目的

我々が食品として摂取するもののなかには、**Genistein**、**Resveratrol**、**Zearalenone** といった天然エストロゲンが存在し、食品容器などには **Bisphenol A** といったエストロゲン様作用を示す合成化学物質が使用され、食品中に混入する可能性がある。これら化学物質は、成体においては可逆的に作用するが、体内エストロゲンが未だ低値な機能・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<sup>1)</sup>。なお、歴史的には流産防止の目的で使用されていた合成エストロゲンである **Diethylstilbestrol (DES)** を服用していた妊婦から出生した女兒の雌性生殖器に、機能・形態的異常の出現や、腫瘍明細胞癌の発生が知られている<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>、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。これら化学物質の発癌性への影響も重要な課題である。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<sup>3)</sup>。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。

## B. 研究方法

### B.1 被験動物

妊娠 14 日齢の CD-1 (ICR) マウスと哺乳親つき生後 14 日齢の雌 **Sprague-Dawley** ラットを日本チャールス・リバー（ともに厚木飼育センター）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。動物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<sup>4)</sup>。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

**Genistein** (4, 5, 7-trihydroxyisoflavone) はフジッコ (神戸) より購入し、**Resveratrol** (3, 4', 5-trihydroxy-trans-stilbene)、**Zearalenone** (6-(10-hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl) $\beta$ -resorcylic acid-lactone)、**Bisphenol A** (4, 4'-isopropylidenediphenol) と **Diethylstilbestrol (DES ; (E)-3, 4-bis(4-hydroxyphenyl)-3-hexene)** は **Sigma (St. Louis, MO)** より購入した。各の純度は  $\geq 99\%$  である。各試薬は購入後直ちに暗所  $0^{\circ}\text{C}$  に貯蔵し、使用前に **dimethylsulfoxide (DMSO ; ナカライテスク、京都)** に溶解し、暗所  $4^{\circ}\text{C}$  に保存した。

### B.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

B.3.1 化学物質の投与方法ならびに投与量  
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。Genistein のアジア人の 1 日消費量はほぼ 1.5 mg/kg/day であり<sup>5)</sup>、赤ワインの摂取量から換算すると Resveratrol のヒト 1 日の平均摂取量は ~0.02 mg/kg である<sup>6)</sup>。Zearalenone のアメリカ人の 1 日暴露量は 0.02-0.1 mg/kg/day と報告されており<sup>7)</sup>、Bisphenol A のヒトの 1 日暴露量は 0.025-0.25 mg/kg とされている<sup>8)</sup>。また、DES の投与量は他の被験物質の 1/1000 量 (0.5 µg/kg と 10 µg/kg) としたが、これは DES のエストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ ) に対する結合能が Genistein に比して 1000 倍強力なことによる<sup>9)</sup>。よって、いずれの少量投与量もヒトが 1 日に摂取する用量とは大きく逸脱していない。

B.3.2 エストロゲン標的臓器の機能・形態的变化の検索方法

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。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、膣は 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  $\geq 100 \mu\text{m}$  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。

B.4 思春期前 Resveratrol・Zearalenone 暴露による乳腺発癌への影響

雌 Sprague-Dawley ラットの 15-19 日齢にかけて被験物質を連日 (計 5 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、50 mg/kg N-methyl-N-nitrosourea (MNU) の腹腔内投与により乳腺発癌を促した。

B.4.1 Resveratrol 実験群

以下の 3 群を設定した。

I 群: 無処置対照群 (30 匹)

II 群: 10 mg/kg Resveratrol を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与 (30 匹)

III 群: 100 mg/kg Resveratrol を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与 (30 匹)

全例週 1 回体重を測定し、各群任意の 6 匹は 49 日齢時に屠殺し、胸部乳腺に対して、ホール・マウント標本を作製し、腰部乳腺は HE 標本を作製するとともに、Dako 社の LSAB キットを用い、エストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 抗体 (6F11、ノボカストラ、ニューキャッスル・アプオン・タイン) とプロゲステロン受容体 (PgR) 抗体 (PR10A9、イムノテック、マルセイユ) 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、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。さらに、49 日齢にて各群 24 匹に対して 50 mg/kg MNU を単回腹腔内投与し、最大乳腺腫瘍の腫瘍径が  $\geq 1\text{cm}$  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。

B.4.2 Zearalenone 実験群

以下の 3 群を設定した。

I 群: 無処置対照群 (30 匹)



II 群：0.1 mg/kg Zearalenone を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与（30 匹）

III 群：10 mg/kg Zearalenone を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与（30 匹）

全例週 1 回体重を測定し、各群 6 匹は生後 28 日齢にて屠殺し、腹部乳腺を採取してホルマリン・マウント標本を作製し、乳腺の発育を比較した。残りの動物（各群 24 匹）は 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 $\geq 1$ cm に達した時点で屠殺し、実験は MNU 投与後 33 週にて終了した。

#### B.4.3 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、乳腺腫瘍は乳癌とその他の腫瘍を区別して解析した。乳腺発癌の指標として、乳癌発生率は $\geq 1$ cm 乳癌を発症した匹数/全有効匹数とし、乳癌（乳腺腫瘍）多発率は組織的に確認しえた微小乳癌（微小乳腺腫瘍）をも含めた全乳癌（全乳腺腫瘍）個数/全有効匹数とし、潜伏期は MNU 投与後ラットが $\geq 1$ 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、膣開口、発情周期、ホルモンレセプター陽性数、乳腺発育、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。累積腫瘍発生率は Mantel-Cox Logrank 試験で行った。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 の試験を行った。いずれの場合も  $p < 0.05$  を有意とした。

### C. 研究結果

#### C.1 出生前エストロゲン様化学物質暴露に

よる雌マウスの発育やエストロゲン標的臓器への影響

##### C.1.1 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 (Fig. 1)。

##### C.1.2 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 (Table 1)、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。無処置対照群の発情周期は規則的な  $5.2 \pm 0.1$  日周期を呈し、そのうち発情期が 18.7%、発情間期が 24.2% を占める (Table 2)。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。

##### C.1.3 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 (Fig. 2) 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 (Table 3)。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。これらのうち、あるものは卵巣の間質細胞の過形成がみられ、子宮内膜腺の扁平上皮化生もみた。子宮内膜腺の変化は他の被験化学物質ではみとめず、膣上皮の異常はいずれの化学物質でも認めなかった。

##### C.1.4 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 をみたが、腺胞の分

化はみななかった (Fig. 3a ; スコア 1)。8 週齢にいたると腺胞が出現し、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。ある動物では分化の程度は低く、少数の腺胞と未発達な乳管をみとめ (Fig. 3b ; スコア 2)、別の動物では腺胞や乳管の発育増加をみとめ (Fig. 3c ; スコア 3)、あるものは小葉形成をみるものもみた (Fig. 3d ; スコア 4)。乳腺の分化をスコア化して要約すると (Fig. 4)、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、正常卵巣 (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、分泌能をもつ腺胞の出現もみとめた (Fig. 5)。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 (Fig. 6)。よって、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。

## C.2 思春期前 Resveratrol・Zearalenone 暴露による乳腺発癌への影響

### C.2.1 思春期前 Resveratrol 暴露による影響

15 日齢 (Resveratrol 連日 5 回投与の初回投与時) から 49 日齢 (MNU 投与時) に至る体重増加や、その後の体重推移も、群間に差をみななかった (Fig. 7)。Resveratrol 投与の如何に関わらず、49 日齢の乳腺の発育は形態的には差はみななかった (Fig. 8)。乳腺形態には群間差はみななかったが、ER・PgR 陽性細胞の比率は、有意差はないものの Resveratrol の投与量依存的に増加する傾向

をみた (Table 4)。組織学的に均等な発育を呈する乳腺に対する MNU の影響をみたところ、 $\geq 1\text{cm}$  の乳腺腫瘍を有する頻度は大量 Resveratrol 群は無処置群に比して高率であったが、( $p < 0.05$ )、少量 Resveratrol 群は無処置群と差はみななかった (Fig. 9)。組織学的に乳癌と確認しえた腫瘍に対して  $\geq 1\text{cm}$  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 (Table 5)。その結果、無処置対照群に比して Resveratrol 大量投与群では  $\geq 1\text{cm}$  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、 $\geq 1\text{cm}$  乳癌採取までの期間は差をみななかった。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なかった。乳癌以外の腫瘍として Resveratrol 無処置群に 1 例の白血病、少量 Resveratrol 投与群に 1 例の乳腺線維腺腫、1 例の白血病と 2 例の耳道腺腫瘍、大量投与群に 1 例の乳腺線維腺腫をみたが、これらの腫瘍発生と Resveratrol 処置には相関はみななかった。

### C.2.2 思春期前 Zearalenone 暴露による影響

生後 2 週齢 (Zearalenone 投与開始時) や 4 週齢 (MNU 投与時) の体重は群間差をみとめず、以後各群の体重の増加に差をみななかった (Fig. 10)。また、MNU 投与時における乳腺の発育 (乳腺伸長距離 : 腰部リンパ腺から乳腺の発育端までの距離) にも有意差はみななかった (Fig. 11)。Zearalenone 無処置群では  $\geq 1\text{cm}$  乳腺腫瘍は MNU 投与後 13 週でみとめ、大量、少量 Zearalenone 処置群ではともに MNU 投与後 15 週でみとめた (Fig. 12)。それ以降、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 ( $p < 0.05$ )。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 (Table 6)。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。平成 14 年度の総括・分担研究報告書で述べたとおり<sup>3)</sup>、Zearalenone の大量、少量投与により、8 週から 10 週齢における発情周期は、持続発情か持続発情間期を呈し、顕著な内分泌かく乱をみた。実験終了時 (37 週齢時) の卵巢は Zearalenone の用量依存的に無排卵性卵巢 (黄体の欠如) をみとめ (Table 7)、不妊が示唆された。但し、実験終了時における乳腺の発育は、マウスでみたように無排卵性卵巢をもつ動物が必ずしも乳管のみからなる低発育状態ではなかった。

#### D. 考察

妊娠マウスに Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A を 0.5 mg/kg あるいは 10 mg/kg 量を投与し、0.5 µg/kg あるいは 10 µg/kg DES 投与群 (陽性対照) ならびに無処置群 (陰性対照) と雌出生仔につき発育、内分泌かく乱、あるいはエストロゲン標的臓器の形態変化を比較した。その結果、無処置群に比して Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A や DES では 16 週齢において発育 (体重増加) の促進がみられ、Resveratrol の他は DES と同じく、概してはやい膣開口 (思春期早発) をみた。10 mg/kg の Bisphenol A を出生前に投与すると、30 日齢では 91% のマウスに黄体形成をみないが、41-70 日齢では正常の発情周期を呈し、90 日齢ではすべてのマウスは受胎能を有するに至る<sup>10)</sup>。よって Bisphenol A の作用は一過性の排卵の遅延と考えられる。我々も大量・少量 Bisphenol A や DES 投与群とともに、大量の Genistein や Resveratrol 投与群においても、4 週齢時に無排卵性卵巢を有する動物をみたが、いずれもこの変化は一過性で、8 週齢以降で

は正常の卵巢形態を呈していた。一方、大量 Zearalenone 投与群では無排卵性卵巢は 8、12、16 週齢でも頻度は漸減するものの存在した。よって、Zearalenone の卵巢に対する作用は持続すると結論できる。ヒトにおいて黄体欠如 (無排卵性卵巢) は女性不妊の最たる原因と考えられている<sup>11)</sup>。いずれの被験化学物質も発情周期を延長したが、Genistein、Resveratrol、Bisphenol A や DES による周期の延長は発情間期の延長に起因し、Zearalenone のそれは発情期の延長によっていた。1-5 日齢の CD-1 マウスに連日 1 µg/kg DES あるいは 10 mg/kg Genistein を投与すると 18 ヶ月齢に至り相当数の個体に子宮内膜腺癌が惹起される<sup>12)</sup>。我々は 16 週齢までの短期観察しか行っていないが、子宮発癌をも視野に入れた長期観察も必要と考える。

Bisphenol A や Zearalenone には乳腺の発育を促進する作用をみる<sup>8,13)</sup>。今回の観察でも、Bisphenol A や Zearalenone は、正常卵巢をみる動物に、通常なら未だ TEB をみとめ、腺胞分化をみない 4 週齢時において腺胞形成を惹起せしめたが、Genistein、Resveratrol や DES に乳腺発育促進作用はみなかった。最も、いずれの被験化学物質も正常で腺胞の出現をみる 8 週齢、あるいはそれ以降では乳腺をそれ以上に分化させる効果はみとめなかった。一方、Zearalenone 投与により、無排卵性卵巢を呈したマウスでは 8、12、16 週齢時に、拡張した疎らな乳管のみからなる未発達な乳腺をみた。新生仔期 BALB/c マウスのエストロゲン投与により、分泌物で充満した拡張状乳管をみる<sup>14)</sup>。新生仔期 GR マウスの抗エストロゲン剤投与によっても、持続発情を発生し、乳管の拡張を呈する<sup>15)</sup>。無排卵性卵巢は持続性の高エストロゲン・低プロゲステロン状態を惹起し、黄体ホルモンのサージ (大量分泌) を欠く<sup>16)</sup>。新生仔期のホルモン処置は無排卵性卵巢を介して乳腺発育を抑制するが<sup>15)</sup>、出生前 Zearalenone 投与はこの

状態を現出したものと考える。

エストロゲン作用を呈する食品関連化学物質の発癌への影響の検討は重要な課題である。乳腺はエストロゲン標的臓器であり、MNU 誘発ラット乳腺発癌は恰好のモデルである。昨年度の本研究において、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有意な抑制をみた<sup>3)</sup>。Resveratrol を成獣ラットに経胃的あるいは経口的に投与すると MNU あるいは DMBA 誘発乳癌を抑制する<sup>17,18)</sup>。今回 Resveratrol の思春期前投与を行ったところ、100 mg/kg 思春期前投与では MNU 誘発乳癌の発生率や多発率を促進したが、10 mg/kg ではこの作用はみなかった。発癌剤投与時の乳腺の構造が発癌剤感受性に影響するとされている<sup>19)</sup>。しかし、今回の検討では Resveratrol により MNU 投与時の正常乳腺上皮の形態的变化はきたさなかったが、ER $\alpha$ /PgR 陽性細胞数の増加をみた。大半 (>80%) の MNU 誘発乳癌はホルモン依存性であることより<sup>20,21)</sup>、Resveratrol の乳癌促進機序は乳癌前駆細胞 (ホルモン受容体陽性細胞) の増加によると考えられる。今回、乳癌促進を呈した Resveratrol の 1 日投与量 (100 mg/kg) は、赤ワインに換算するとグラス 5000 杯となる<sup>6)</sup>。この量では膣開口の早発や発情周期に異常をみとめたが<sup>3)</sup>、この 1/10 量で乳癌促進効果がないことは、ヒトにとって乳癌促進に要する Resveratrol 量はヒトの摂取限界をはるかに越えた量と考える。

Zearalenone を思春期前 (7 日と 14 日齢) に各の 10 mg/kg 投与すると Wistar ラットの自然発生乳腺腫瘍の増加を来すが<sup>22)</sup>、7、14、17、20 日齢に各の  $\leq 2$  mg/kg 量を投与すると Sprague-Dawley ラットの DMBA 誘発乳癌を減少させる<sup>23)</sup>。一方、出生前 (妊娠 15-20 日まで連日) の 0.1 mg/kg

Zearalenone 投与は DMBA 誘発乳癌に影響をみない<sup>24)</sup>。今回、思春期前 (15-19 日齢) に連日 0.1 mg/kg あるいは 10 mg/kg Zearalenone を投与し、MNU 誘発乳癌をみたところ、大量、少量投与群ともに乳腺腫瘍 (乳癌) を抑制した。なお、発癌剤処置時である 28 日齢の乳腺形態は思春期前 Zearalenone 投与により影響をうけていなかった。新生仔期に男性ホルモン投与をうけたラットでは黄体を欠如し、持続発情をきたして DMBA 誘発乳癌の抑制をみる<sup>25)</sup>。この場合プロゲステロン処置により乳癌の増加をみることより、今回の Zearalenone による乳癌抑制にプロゲステロンが関与している可能性がある。マウスでみたと同様に雌性生殖器に対する Zearalenone の影響はつよい。Zearalenone は膣開口を早め、8-10 週齢時では顕著な発情周期のかく乱をみた<sup>3)</sup>。そして、実験終了時においても用量依存性に無排卵性卵巢をみた。但し、Zearalenone の少量投与とはヒト許容量の  $10^3$  倍を与えた量である<sup>7)</sup>。マウスにおける新生仔期 Zearalenone 投与により子宮頸膈上皮に腫瘍性変化をみるが<sup>26)</sup>、ラットにおける今回の検討では雌性生殖器に腫瘍性変化はみなかった。

## E. 結論

1. 天然エストロゲンとして Genistein、Resveratrol、Zearalenone、合成エストロゲンとして Bisphenol A、DES の作用強度をマウスの出生前暴露実験 (妊娠 15-18 日の母体に連日被験物質を皮下投与し、出生雌を検討) で比較した。
2. 被験物質は DMSO に溶解し、1 日投与量として Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A は少量 (0.5 mg/kg) または大量 (10 mg/kg)、DES は少量 (0.5  $\mu$ g/kg) または大量 (10  $\mu$ g/kg) とし、無処置対照群は DMSO のみを投与した。
3. 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、16 週齢で