

は少量 DES 群の他はいずれも対照群に比して有意に重かった。

4. 思春期発来（膣開口）は被験物質投与により早発する傾向にあり、大量・少量 Genistein、Zearalenone、DES、大量 Bisphenol A で有意に早発した。

5. 発情周期は、被験物質投与により 1 周期に要する時間は延長傾向にあり、少量 DES 群以外では有意に延長した。

6. 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る。

7. 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。

8. 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た。

9. マウスへの Genistein、Resveratrol、Bisphenol A、DES の出生前暴露の卵巣への影響は一過性（可逆性）である。

10. 一方、マウスへの Zearalenone の出生前暴露の卵巣への影響は持続する。

11. マウスへの出生前 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。

12. 一方、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。

13. 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。

14. 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。

15. 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。

16. 被験食品関連化学物質のうち Zearalenone のみは卵巣に持続する構造的変化を発来し、不妊が示唆されたが、ラットにおける投与量（少量群）はヒト許容量の 10^3 であった。

F. 参考文献

- 1) Klein KO, Baron J, Colli MJ, McDonnell DP, Cutler GB Jr. Estrogen levels in childhood determined by an ultrasensitive recombinant cell bioassay. *J Clin Invest* 94: 2475-2480, 1994.
- 2) Herbst AL, Anderson D. Clear cell adenocarcinoma of the vagina and cervix secondary to intrauterine exposure to diethylstilbestrol. *Semin Surg Oncol* 6: 343-346, 1990.
- 3) 螺良 愛郎, 裴 仁正, 二階堂 泰資, 佐藤 睦哉. 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. 厚生労働科学研究費補助金, 食品・化学物質安全総合研究事業, 内分泌かく乱物質と大豆等既存食品の発育・癌化及び内分泌かく乱作用の比較 (主任研究者 螺良愛郎) 平成 14 年度総括・分担研究報告書 p. 37-55
- 4) Kanno J, Kato H, Iwata T, Inoue T. Phytoestrogen-low diet for endocrine disruptor studies. *J Agr Food Chem* 50: 3883-3885, 2002.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Kuiper-Goodman T. Uncertainties in the

- risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. *Can J Physiol Pharmacol* 68: 1017-1024, 1990.
- 8) Markey CM, Luque EH, Munoz De Toro M, Sonnenschein C, Soto AM. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod* 65: 1215-1223, 2001.
 - 9) Matthews J, Celius T, Halgren R, Zacharewski T. Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74: 223-234, 2000.
 - 10) Suzuki A, Sugihara A, Uchida K, Sato T, Ohta Y, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T. Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. *Reprod Toxicol* 16: 107-116, 2002.
 - 11) Götz F, Thieme S, Dörner G. Female infertility--effect of perinatal xenoestrogen exposure on reproductive functions in animals and humans. *Folia Histochem Cytobiol* 39 Suppl2: 40-43, 2001.
 - 12) Newbold RR, Banks EP, Bullock B, Jefferson WN. Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer Res* 61: 4325-4328, 2001.
 - 13) Sheffield LG, Welsch CW. Zearanol (β -resorcylic acid lactone), a common residuous component of natural foodstuffs, stimulates developmental growth of the mouse mammary gland. *Cancer Lett* 28: 77-83, 1985.
 - 14) Bern HA, Mills KT, Jones LA. Critical period for neonatal estrogen exposure in occurrence of mammary gland abnormalities in adult mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 172: 239-242, 1983.
 - 15) Strum JM. Nafoxidine administered to newborn female GR mice arrests the development of their mammary glands. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 42: 227-233, 1983.
 - 16) Vom Saal FS, Finch CE. Reproductive senescence: phenomena and mechanisms in mammals and selective vertebrates. In: Knobil E, Neill JD, Ewing LL, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW, editors. *The physiology of reproduction*. New York: Raven, 1988. p. 2351-414.
 - 17) 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.
 - 18) Banerjee S, Bueso-Ramos C, Aggarwal BB. Suppression of 7,12-dimethylbenz (α) anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9. *Cancer Res* 62: 4945-4954, 2002.
 - 19) Russo J, Russo IH. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab Invest* 57: 112-137, 1987.
 - 20) Yang J, Yoshizawa K, Nandi S and 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.
 - 21) 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.
- 22) Schoental R. Trichothecenes, zearalenone, and other carcinogenic metabolites of Fusarium and related microfungi. Adv Cancer Res 45: 217-290, 1985.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) Yoshida H, Fukunishi R, Kato Y, Matsumoto K. Progesterone-stimulated growth of mammary carcinomas induced by 7,12-dimethylbenz (α) anthracene in neonatally androgenized rats. J Natl Cancer Inst 65: 823-828, 1980.
- 26) 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.
- in female Sprague-Dawley rats. Cancer Lett 202 (2): 137-145, 2003.
3. 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).
4. 裴 仁正, 四方伸明, 塚 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. 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.
- G. 研究業績
1. 論文発表
1. 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 (4): 349-358, 2003.
2. Sato M, Pei R-J, Yuri T, Danbara N, Nakane Y, Tsubura A. Prepubertal resveratrol exposure accelerates *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary carcinoma

5. Pei Ren-Jeng, 垠 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, 垠 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. 垠 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.

H. 知的所有権の取得状況

なし

I. 健康危険情報

なし

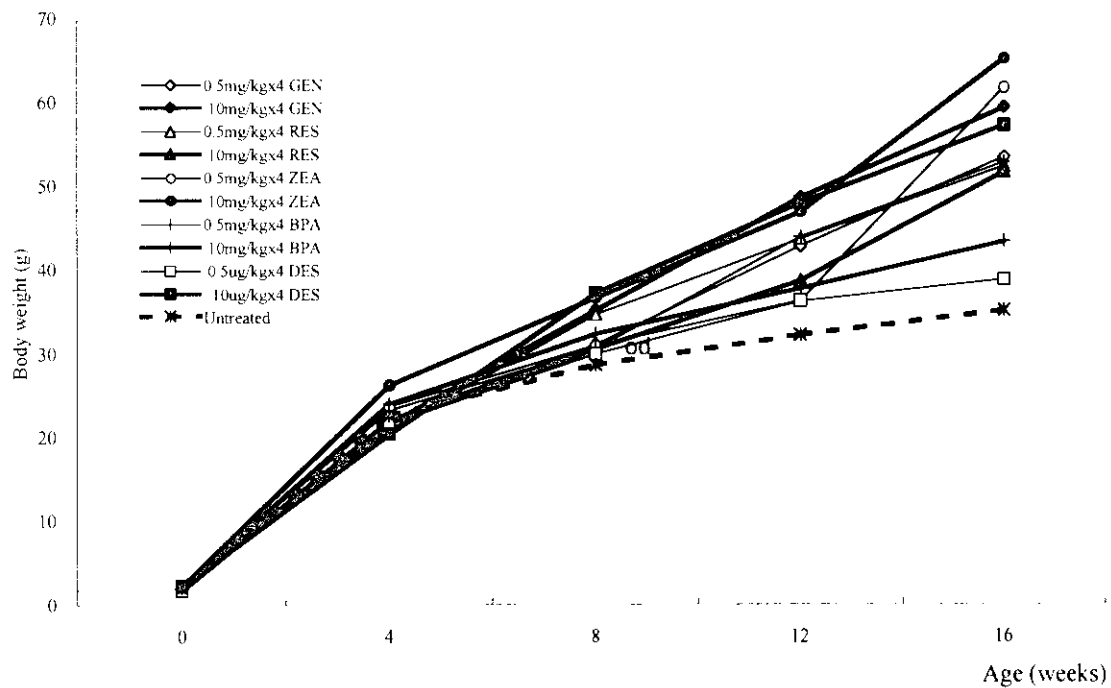


Figure 1. Body weight gain in female CD-1 offspring of mothers administered 4 daily low- or high-dose injections of xenoestrogen, beginning on gestational day 15.

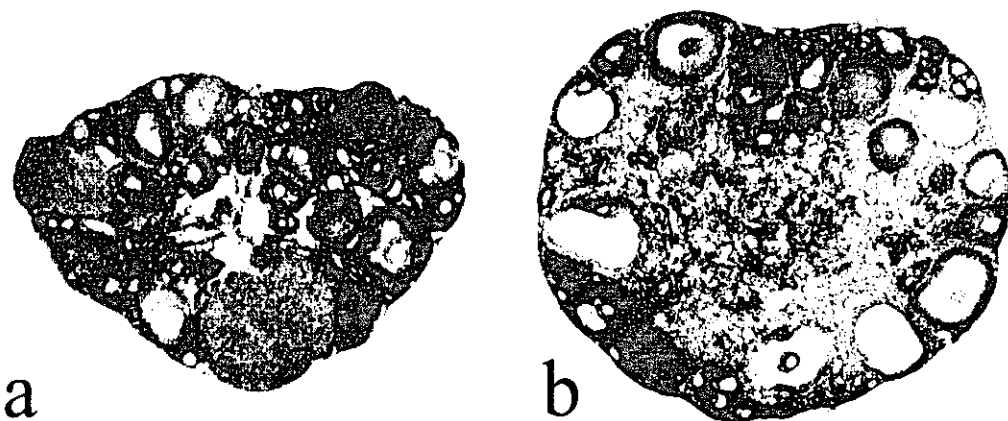


Figure 2. Ovaries from 4-week-old CD-1 mice. a. Mouse exposed prenatally to DMSO vehicle. Note prominent corpora lutea. b. Mouse exposed prenatally to 10 mg/kgx4 zearalenone. Note absence of corpora lutea and interstitial cell hyperplasia.

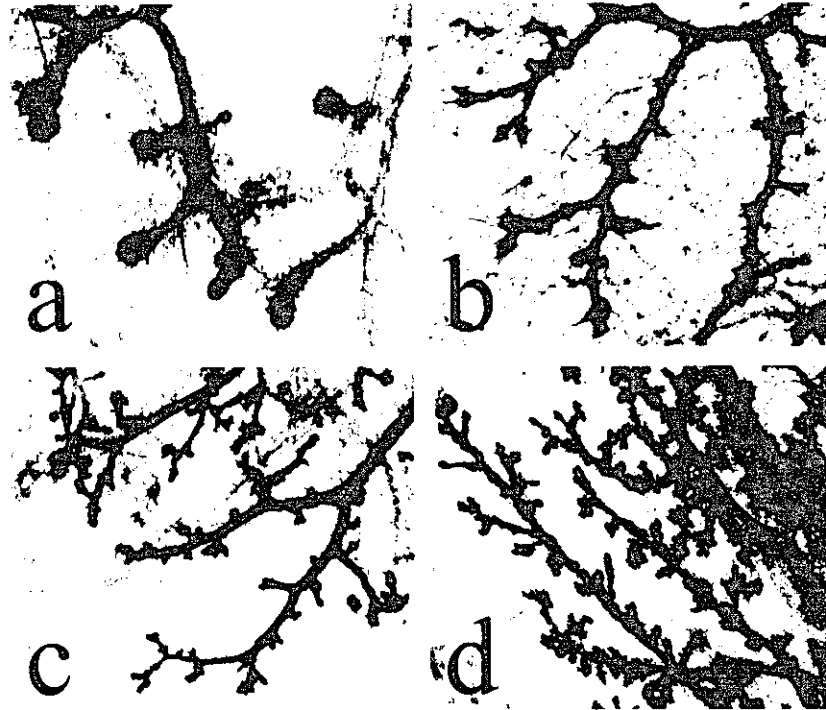


Figure 3. Mammary glands from untreated CD-1 mice. a. Four-week-old mouse. Note terminal end buds at the periphery with lateral bud but no alveolar differentiation (Score 1). b. Twelve-week-old mouse. Note few clusters of alveoli within poorly developed duct (Score 2). c. Twelve-week-old mouse. Note more advanced ductal and alveolar development, compared with b (Score 3). d. Twelve-week-old mouse. Note prominent lobulo-alveolar development (Score 4).

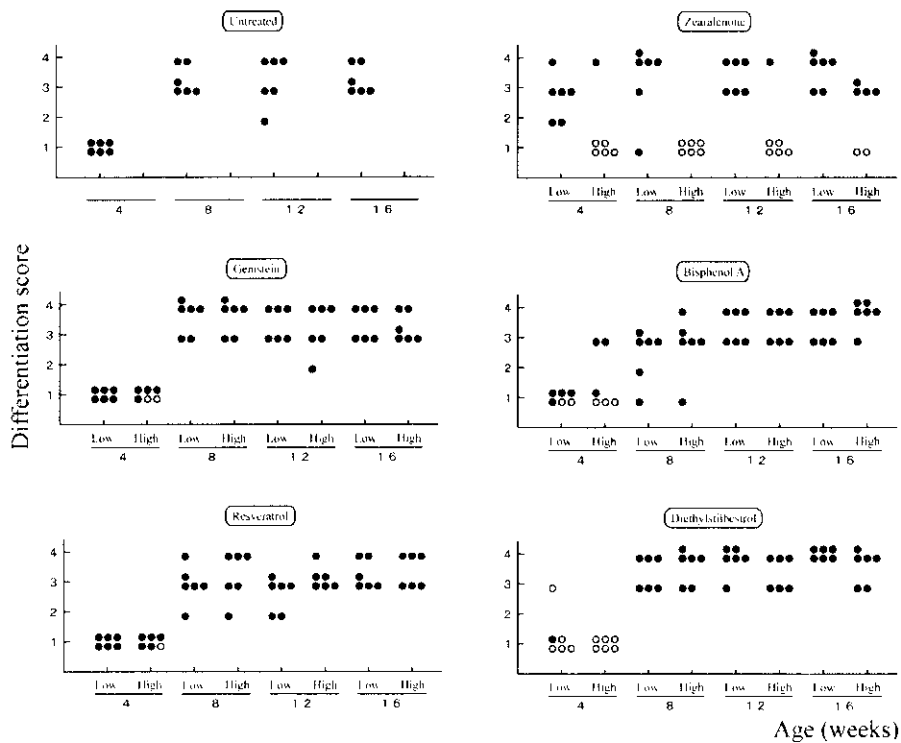


Figure 4. Degree of mammary gland development in female CD-1 offspring of mothers administered 4 daily injections of xenoestrogen, beginning gestational day 15. (●, mouse with corpora lutea; ○, mouse without corpora lutea)



Figure 5. Mammary gland from a 4-week-old zearalenone-treated CD-1 mouse with intact ovary. a. Note terminal end buds at the periphery with advanced alveolar differentiation (compare with Figure 3a). b. Alveoli exhibit secretory activity.



Figure 6. Mammary gland from a 16-week-old zearalenone-treated CD-1 mouse without corpora lutea. a. Note dilated beaded mammary ducts without alveolus. b. Dilated duct contains eosinophilic substance.

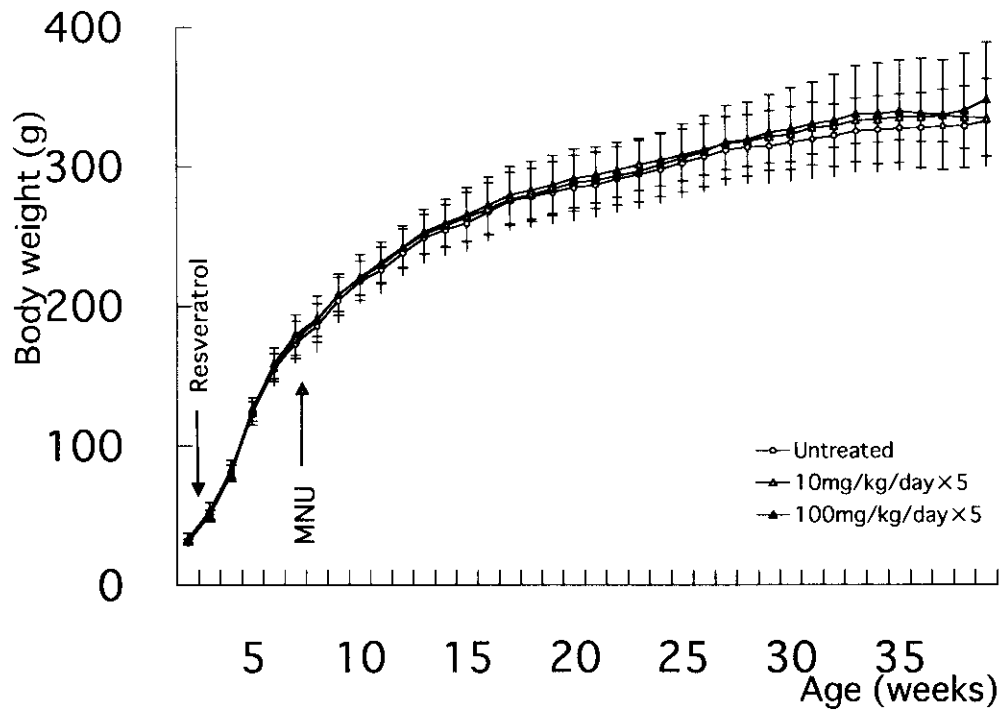


Fig. 7 Body weight changes in prepubertal (15 to 19 days of age) resveratrol-treated or untreated, and at day 49 MNU administered female Sprague-Dawley rats. Values represents mean \pm SD.



Fig. 8 Representative thoracic mammary whole-mounts of 49-day-old female Sprague-Dawley rats. a) Untreated control; b) 10 mg/kg/day \times 5 resveratrol; c) 100 mg/kg/day \times 5 resveratrol. All glands have terminal end buds (TEBs) at the periphery, with lateral bud formation. No developmental changes were observed at this time point.

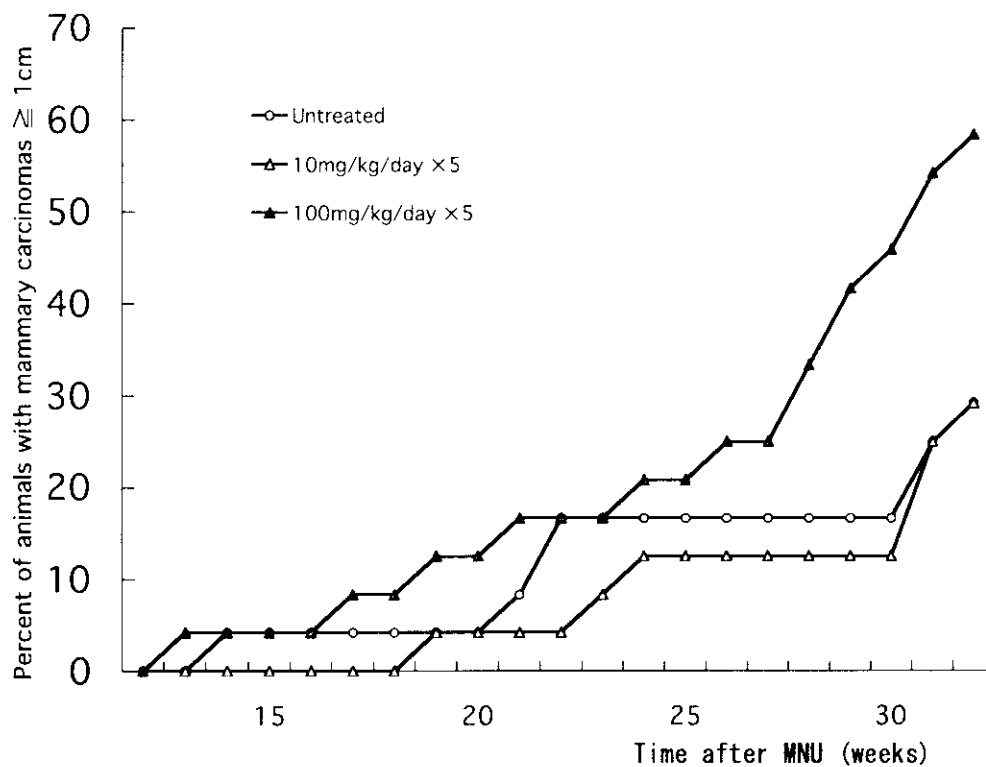


Fig. 9 Effect of prepubertal resveratrol exposure on cumulative incidence of MNU-induced mammary tumor ≥ 1 cm in female Sprage-Dawley rats.

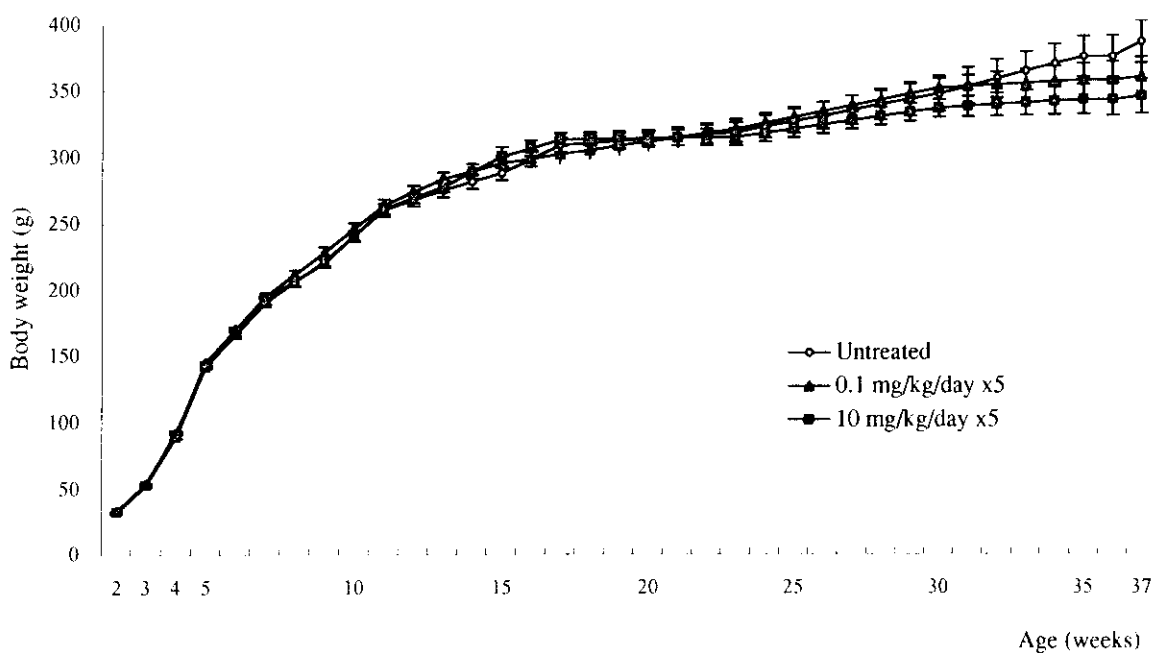


Figure 10. Body weight changes in female Sprague-Dawley rats treated daily from 15 days of age for 5 times with 0.1 or 10 mg/kg zearalenone or without zearalenone (untreated) and injected with 50 mg/kg MNU at 28 days of age. Values represents mean \pm SE.

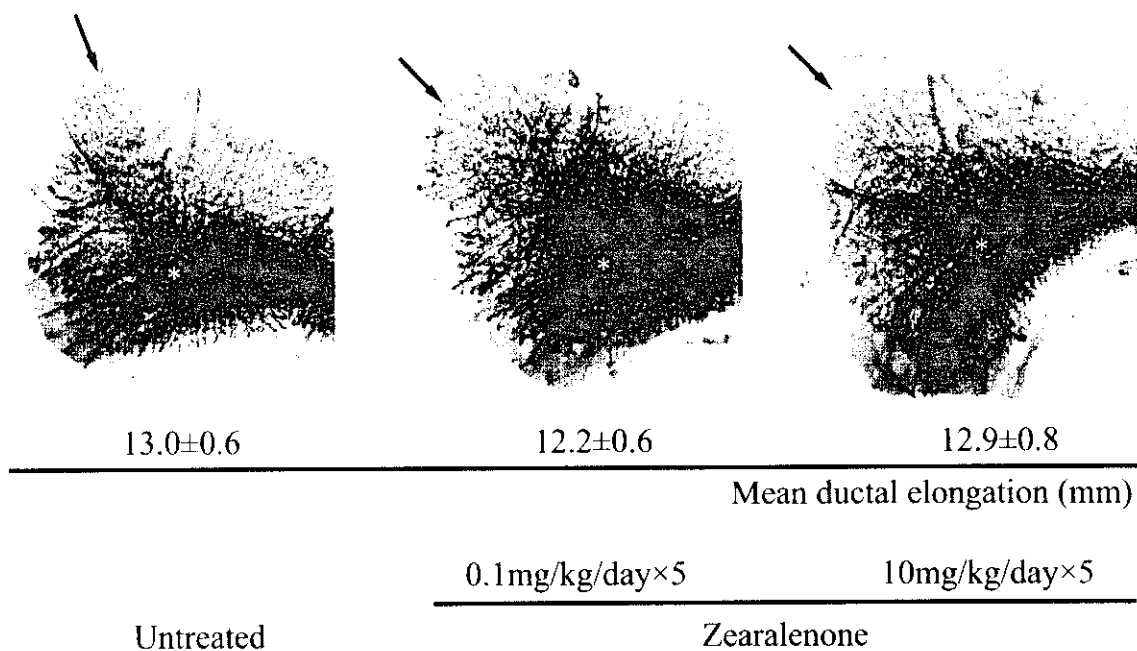


Figure 11. Representative inguinal mammary whole-mounts of 28-day-old female Sprague-Dawley rats, and mean ductal elongation (distance between outermost edge of lymph node [asterisk] and furthest extension of terminal end buds [arrow] beyond node). Each group consist of 6 rats. Values represents mean ± SE.

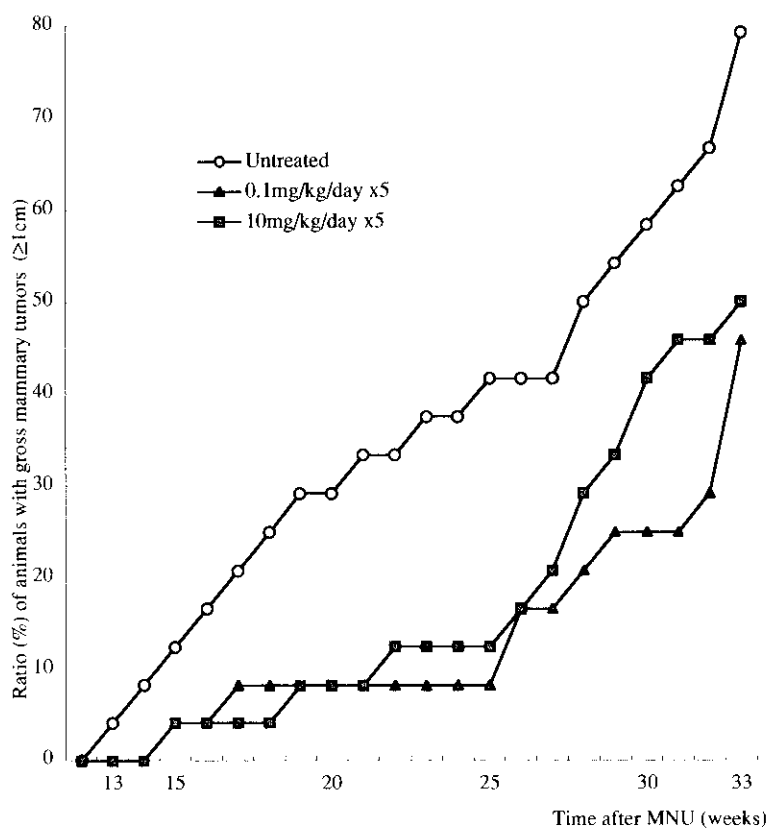


Figure 12. Cumulative incidence of gross mammary tumors (≥1 cm) in female Sprague-Dawley rats treated with 50 mg/kg MNU at 28 days of age.

Table 1. Age at vaginal opening in female offspring of mothers exposed to xenoestrogen (4 daily injections, beginning on gestational day 15).

Test chemical	Dose	Vaginal opening (days)
Untreated	-	26.0 ± 0.2
Genistein	0.5 mg/kg x4	25.0 ± 0.2**
	10 mg/kg x4	25.5 ± 0.2*
Resveratrol	0.5 mg/kg x4	25.7 ± 0.1
	10 mg/kg x4	26.0 ± 0.1
Zearalenone	0.5 mg/kg x4	24.8 ± 0.1**
	10 mg/kg x4	24.4 ± 0.2**
Bisphenol A	0.5 mg/kg x4	25.8 ± 0.2
	10 mg/kg x4	24.8 ± 0.2**
Diethylstilbestrol	0.5 µg/kg x4	24.5 ± 0.1**
	10 µg/kg x4	24.1 ± 0.2**

Values represents mean ± SE.

Each group consists of 24 mice.

*p<0.05 and **p<0.01, compared with untreated controls.

Table 2. Estrous cycle alteration in female offspring of mothers exposed to xenoestrogen (4 daily injections, beginning on gestational day 15).

Chemical	Dose	One cycle length	Percent of time spent in	
			estrus	diestrus
Untreated	-	5.2 ± 0.1	18.7 ± 0.4	24.2 ± 2.1
Genistein	0.5 mg/kg x4	6.4 ± 0.3**	15.9 ± 0.7	31.0 ± 1.7**
	10 mg/kg x4	7.2 ± 0.4**	14.3 ± 0.8	34.5 ± 1.8**
Resveratrol	0.5 mg/kg x4	6.5 ± 0.2**	14.7 ± 0.9	33.7 ± 2.7**
	10 mg/kg x4	6.1 ± 0.2**	15.1 ± 0.5	29.8 ± 1.7
Zearalenone	0.5 mg/kg x4	7.7 ± 0.3**	29.8 ± 4.7**	29.8 ± 3.0
	10 mg/kg x4	10.9 ± 0.5**	48.4 ± 4.0**	23.4 ± 2.2
Bisphenol A	0.5 mg/kg x4	8.0 ± 0.4**	13.1 ± 0.6	38.9 ± 2.0**
	10 mg/kg x4	8.2 ± 0.3**	13.9 ± 0.4	40.5 ± 1.2**
Diethylstilbestrol	0.5 µg/kg x4	5.5 ± 0.1	17.5 ± 0.7	30.2 ± 2.1*
	10 µg/kg x4	5.8 ± 0.1*	17.5 ± 0.9	37.3 ± 1.7**

Values represents mean ± SE (days).

*p<0.05, **p<0.01 compared with untreated controls.

Table 3. Absence of corpora lutea in female mice treated with xenoestrogen prenatally.

Xenoestrogens	Dose	No. of mice without corpora lutea (%)			
		4	8	12	16 (weeks)
Untreated	-	0	0	0	0
Genistein	0.5 mg/kg x4	0	0	0	0
	10 mg/kg x4	2 (33)	0	0	0
Resveratrol	0.5 mg/kg x4	0	0	0	0
	10 mg/kg x4	1 (17)	0	0	0
Zearalenone	0.5 mg/kg x4	0	0	0	0
	10 mg/kg x4	5 (83)	6 (100)	5 (83)	2 (33)
Bisphenol A	0.5 mg/kg x4	2 (33)	0	0	0
	10 mg/kg x4	3 (50)	0	0	0
Diethylstilbestrol	0.5 µg/kg x4	5 (83)	0	0	0
	10 µg/kg x4	6 (100)	0	0	0

Table 4. Effect of prepubertal resveratrol exposure on percentages of ER- and PgR-positive mammary glandular cells in 49-day-old female Sprague-Dawley rats

Resveratrol treatment	ER-positive (%)	PgR-positive (%)
Untreated	30.8 ± 4.0	37.9 ± 3.8
10 mg/kg/day x5	33.2 ± 3.8	38.7 ± 3.7
100 mg/kg/day x5	34.7 ± 3.8	40.6 ± 1.7

Values represent mean±SD.
Each group consists of 6 rats.

Table 5. Effect of prepubertal resveratrol treatment on MNU-induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats

Resveratrol treatment	No. of rats	No. of rats with carcinomas ≥ 1cm (%)	Total no. of carcinomas	Cancer multiplicity*	Cancer latency** (weeks)
Untreated	24	7 (29.2%)	22	0.92 ± 0.19	31.7 ± 2.6
10 mg/kg/day x5	24	7 (29.2%)	24	1.00 ± 0.27	34.3 ± 2.0
100 mg/kg/day x5	24	14 (58.3%)*	41	1.71 ± 0.28***	32.6 ± 1.6

Values represents mean±SD.

*Number of carcinomas (all sizes) per rat.

**Interval between MNU administration to largest mammary tumor reached ≥1cm in diameter.

*** p < 0.05 compared with untreated control.

Table 6. Effect of prepubertal zearalenone treatment on histologically detected mammary tumors and mammary carcinomas induced by MNU in female Sprague-Dawley rats

Zearalenone treatment	No. of rats	Total no. of tumors	Tumors per rat	Total no. of carcinomas	Carcinomas per rat
Untreated	24	84	3.5 ± 0.4	74	3.1 ± 0.3
0.1 mg/kg/day x5	24	54	2.3 ± 0.5	50	2.1 ± 0.5
10 mg/kg/day x5	24	44	1.8 ± 0.6*	34	1.4 ± 0.6*

Values represent mean±SE.

*p < 0.05, compared with untreated control.

Table 7. Effect of prepubertal zearalenone treatment on ovarian structure in female Sprague-Dawley rats administered MNU at 28 days of age and sacrificed at 37 weeks of age

Zearalenone treatment	No. of rats	Rats without corpora lutea (%)	Weight of ovaries (mg)	
			With corpora lutea	Without corpora lutea
Untreated	8	1 (13)	110 ± 12	57
0.1 mg/kg/day x5	17	8 (47)	102 ± 12	79 ± 15
10 mg/kg/day x5	13	9 (69)	89 ± 22	63 ± 6

Values represent mean±SE.

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）

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

分担研究報告書

自己免疫病発症に対する各種内分泌攪乱化学物質の影響に関する研究

分担研究担当者：茶山和敏 静岡大学農学部助教授

研究要旨

これまでの研究で、DES などの合成エストロゲンや Bisphenol A (BPA) などの化学物質は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ている。一方、Genistein、Resveratrol などの植物エストロゲンに関しては、エストロゲン様作用が弱く、環境ホルモン物質とは逆に生殖器官などの発癌抑制等の生体機能の改善作用を有することを示唆する報告も見られる。

我々は昨年の本研究助成による研究として、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繁に研究されている BPA および DES の 4 種の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。

一方、自己免疫病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。

そこで本研究では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。

<材料および方法> 実験には自己免疫病モデルマウスである MRL-*lpr*^{+/+} マウスを用いた。自己免疫病発症前の 1 ヶ月齢の MRL-*lpr*^{+/+} 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 50mg/kg、BPA を 3 およ

び 10mg/kg、Estradiol-17 β (E) を 10 μ g/kg を雌雄各 10 匹に週 2 回 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。また、血清を採取して、血中免疫複合体量および IFN- γ 量を測定した。また、生存率を調べるため、各投与群を別に作成して、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。

<結果および考察>

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。

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 の 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。

腎炎発症：糸球体腎炎の発症は各投与群で差が見られなかったが、腎臓血管炎の発症はオス Genistein 15mg/ml 投与マウスで有意に高かった。また、Genistein 15mg/ml 投与群では、メスで 60%、オスで 80%に血管炎の進行に伴うと思われる腎臓の組織学的変性が見られた。

サイトカイン：血中 IFN- γ 量、免疫複合体量ともに、有意な変化が見られた群もあったが、いずれの群も大きな差は見られなかった。

生存率：オスの生存率はいずれの投与群も変化は見られなかった。メスでは死亡開始時期に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、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。

以上の結果から、子宮重量法で子宮の有意な重量増加作用を示した濃度において、環境ホルモン物質は自己免疫病の発症開始には影響しないが、発症後の悪性進展を促進し、その結果、生存率を低下させる可能性が示唆された。また、Genistein は、特に腎炎の発症および悪性進展に悪影響を及ぼすことが明らかとなった。

A. 研究目的

自己免疫現象とは、抗体または T 細胞が自己の組織や細胞を抗原と認識し反応する現象である。この結果引き起こされるのが自己免疫病であり、種々の全身

性あるいは臓器特異的疾患が起きることが知られている難病である。自己免疫病罹患率は女性のほうが圧倒的に高く、自己免疫病の 1 つである全身性エリテマトーデス (SLE) の罹患率は女性：男性＝

10 : 1 である。この原因として、自己免疫疾患の発症や発症後の悪性進展にエストロゲンやプロラクチンなどの雌性ホルモン、特にエストロゲンが関与していることが明らかになっている。エストロゲンは雌の生殖器官の発達や機能維持に最も重要なステロイドホルモンであるが、IFN- γ 、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 などのサイトカイン産生の促進や T 細胞の増殖と機能の抑制など、免疫機能にも影響を及ぼしていることが判明している。一方、近年の研究で、人工的に製造される化学物質のうち、数%が内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン物質）の疑いがあることが報告されている。そのうち、耐熱プラスチックの原料の一部に使われている Bisphenol A (BPA) は、高温条件下での使用の際の溶出によってヒトに直接暴露されている。これまでの研究で、BPA を含有した飼料を投与されたラットの分娩回数の減少やエストロゲン反応性のヒト乳癌細胞の増殖作用など、BPA がエストロゲン様活性を有する内分泌攪乱物質であることが明らかになっている。そのため、ヒトを含めた動物、特に雌の繁殖に対する影響が懸念されている。

他方、大豆に多く含まれる Isoflavone のひとつである Genistein (Gen) はエストロゲン活性を持つことが知られており、植物エストロゲンとして、更年期障害の緩和や骨粗鬆症の予防などに効果があるサプリメントとしても多く販売されている。Gen には乳癌や卵巣癌等の癌細胞の繁殖を押さえるという報告もあるが、逆に内分泌系や免疫系に悪影響を与える内分泌攪乱物質としての危険な一面も持つと考えられている。

本研究では、エストロゲン活性を持つ BPA と Gen を自己免疫病、特に SLE のモデルマウスである MRL-*lpr*^{+/+}/*lpr*^{+/+} (MRL-*lpr*^{+/+}) マウスに投与し、自己免疫病の発症開始時期および発症後の悪性進展に対する影響を検討した。

材料および方法

1、実験動物および飼育条件

実験動物は本大学の飼育室において、兄妹交配により繁殖・維持されている MRL-*lpr*^{+/+}/*lpr*^{+/+} マウス (MRL-*lpr*^{+/+} マウス) を用いて実験を行った。MRL-*lpr*^{+/+} マウスは第 19 染色体上に *lpr*^{+/+} 劣性遺伝子を持つ突然変異体で、*Fas* 遺伝子および *Fas* 抗原遺伝子の異常のために、本来胸腺でアポトーシスにより除去されるはずの自己反応性 T 細胞が末梢に現れるという特徴を有する。そして、このような異常が原因となって、全身性リンパ節腫脹や腎炎などの重篤な自己免疫症状が起き、最終的には死に至る。実験に使用したすべてのマウスは温度 24 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度 50 \pm 10% で、照明は 14 時間明期、10 時間暗期 (6:00 点灯、20:00 消灯) の光周期の環境下で飼育した。

2、飼料

飼料は、投与開始(1 ヶ月齢)から、内分泌攪乱物質研究用飼料である NIH-07PLD (東京オリエンタル酵母工業株式会社) を、水とともに自由摂取させた。

3、投与実験

各環境ホルモン物質の投与量は平成 14 年度の本研究事業の中で行った子宮肥大試験で、子宮重量が有意に増加した

濃度と増加が見られなかった低濃度を基準にした。各物質の投与量は以下の通りである。

(1) エストロゲン

エストロゲンは Estradiol-17 β (1,3,5[10]-Estratriene-3,17 β -diol; E2) を陽性コントロール物質として用い、10ng/kg の濃度になるようにオリーブ油に溶かして各マウスに投与した。

(2) Bisphenol A (BPA)

BPA は 4,4-Isopropyl-Idenediphenol を用い、3mg/kg および 10mg/kg になるようにオリーブ油に溶かして各マウスに投与した。

(3) Genistein (Gen)

Gen は 4,5,7-Trihydroxyisoflavone を用い、15mg/kg および 50mg/kg になるようにオリーブ油に溶かして各マウスに投与した。

4. 実験方法

(1) 投与実験および生存率調査

1ヶ月齢の MRL-*Ipr^{fl}* マウスを雄雌に分け、それぞれをさらに対象群・E2投与群・BPA投与群・Gen投与群に分けた。そして、対象群にはオリーブ油、BPA群にはBPAを3mg/kgおよび10mg/kg、Gen群にはGenを15mg/kgおよび50mg/kgを、一週間に2回(原則として火曜日と金曜日)、皮下投与した。自己免疫病発症時期の生後3ヶ月齢(投与開始後2ヶ月目)時に以下のように尿中蛋白質と皮膚炎の検査および解剖を行い、また生後210日目(投与開始6ヶ月後)までの生存率を調べた。

(2) タンパク尿症の検査

マウスから新鮮な尿検体を採取し、エームス尿検査試験紙(Albustix、三共)を用いて尿中タンパク量の判定を行った。判定は-、±、+、++、+++および++++の6段階に分け、-は陰性、±は0mg/dl以上、+は30mg/dl以上、++は100mg/dl以上、+++は300mg/dl以上、++++は1000mg/dl以上とし、++以上に判定されたマウスをタンパク尿症とした。

(3) 皮膚炎の検査

皮膚炎の検査は、マウスの鼻、顔、首、背中および左右の耳の炎症を調べた。炎症度の評価は炎症なし、炎症、壊死の3段階に分け、それぞれを0、1および2点として点数化した。

(4) 体重および臓器重量の測定

投与開始2ヶ月目に体重を計測後、各マウスをクロロホルムの過麻酔により屠殺し、腹腔内リンパ節、皮下リンパ節、脾臓、腎臓、卵巣と子宮または精巣を摘出し、各重量を測定した。また、心臓より血液を採取し、血清中の免疫複合体、サイトカイン(IFN- γ)の測定に用いた。

(5) 腎臓の組織学的観察

摘出した腎臓は4%パラフォルムアルデヒド溶液で固定した後、H・E染色した腎臓組織標本を作製した。染色した腎臓標本は検鏡して糸球体腎炎の重症度および血管炎の重症度を判定した。一検体につき糸球体は20個、血管は5個を点数評価し、それぞれの点数の平均をその検体の点数とした。点数評価の基準は以下の通りである。

糸球体腎炎…0:正常。1:糸球体に軽

度の細胞増殖が見られるもの。2：糸球体に重度の細胞増殖が見られるもの。3：糸球体に壊死や半月形成が認められるもの。

血管炎…0：正常。1：1、2ヶ所で血管壁あるいは血管周囲の一部で軽度の変化が見られるもの。2：3、4ヶ所で血管壁あるいは血管周囲の一部で顕著な変化が見られるもの。3：5ヶ所以上で血管壁あるいは血管周囲の一部で顕著な変化が見られるもの。さらにリンパ球の浸潤の程度を加味して総合的に0から3まで4段階に数値化し、分類した。

(6)ELISA 法による血清中免疫複合体量の測定

酵素免疫測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; ELISA 法) を用いた循環免疫複合体 (CIC ; circulating immune complex) 測定キットを使用して血清中の免疫複合体を測定した。

(7)ELISA 法による血清中 IFN- γ 量の測定

血清中 IFN- γ 量の測定には、IFN- γ 測定キットである Interferon gamma [(m)IFN γ], mouse ELISA system (amersham pharmacia biotech) を用いて各マウスの血清中 IFN- γ 量を測定した。

(8)統計学的処理

体重、臓器重量などの測定値は Student *t*-検定を、IFN- γ 、免疫複合体、腎炎の測定値は Mann-whitney *U*-検定を用いて統計学的検定を行った。

(9)倫理面への配慮

マウスを用いた実験は静岡大学農学部動物実験に関する指針 (平成2年2月15日制定) に基づいて適切に行った。

結果

(1)体重、臓器重量および腹腔内リンパ節と皮下リンパ節の比較

雌雄ともに、体重、生殖器官に差は見られなかった (図1、図2)。また、脾臓、腎臓の重量にも差は見られなかったが、BPA (3mg/kg) 投与群におけるリンパ節重量は雌雄ともに増加傾向が見られ、雄の BPA (3mg/kg) 投与群における皮下リンパ節重量は有意に増加していた (図3)。

(2)タンパク尿症発症率

重度のタンパク尿症を示す++以上のマウスの割合は、雌では Control 群が 25% だったのに対し、E2 投与群と BPA (3mg/kg) 投与群では 64%、BPA (10mg/kg) 投与群と Gen (50mg/kg) 投与群では 50% と増加していた。また、Gen (15mg/kg) 投与群では 10% で、減少傾向していた。雄では、Control 群が 27% に対し、BPA 投与群で 3mg/kg が 47%、10mg/kg で 10% と、低濃度では増加、高濃度では減少していた (図4)。

(3)皮膚炎

皮膚炎は個体差が大きく、有意差は見られなかったものの、雄では Control 群と比べて E2 投与群で皮膚炎の発症程度が顕著に高かった。雌では E2 投与マウスは皮膚炎がまったく見られず、Gen (50mg/kg) 投与群は Control 群と比べて発症程度が高い傾向が見られた (図