

図1 HPLC-ECDによる市販マウス血清のクロマトグラム

1:Resveratrol, 2:Daidzein, 3:Glycitein, 4:Genistein, 5:BPA

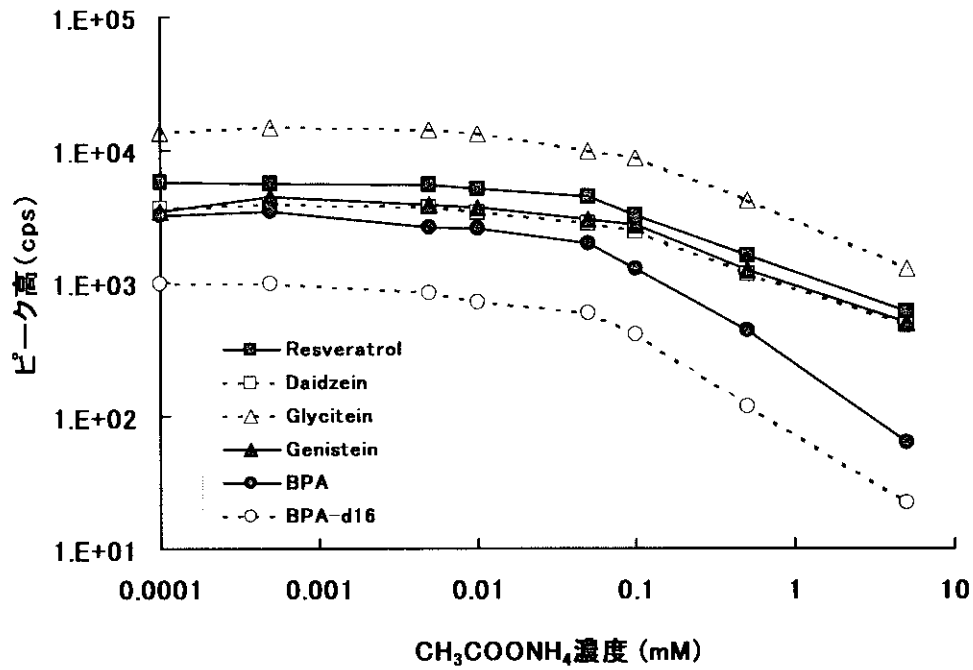


図2 ピーク高(イオン強度)と移動相中酢酸アンモニウム濃度

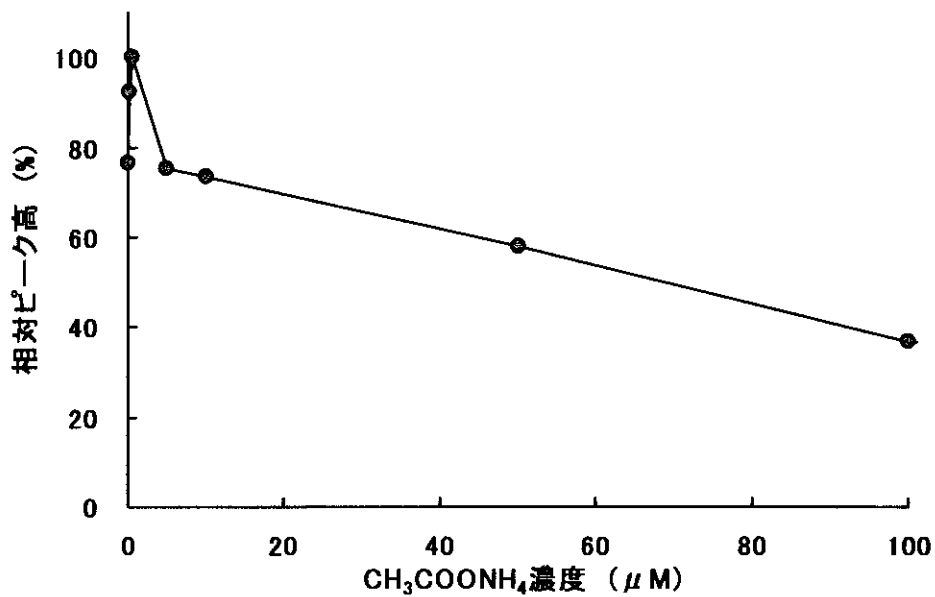


図3 BPAの相対ピーク高と移動相中酢酸アンモニウム濃度

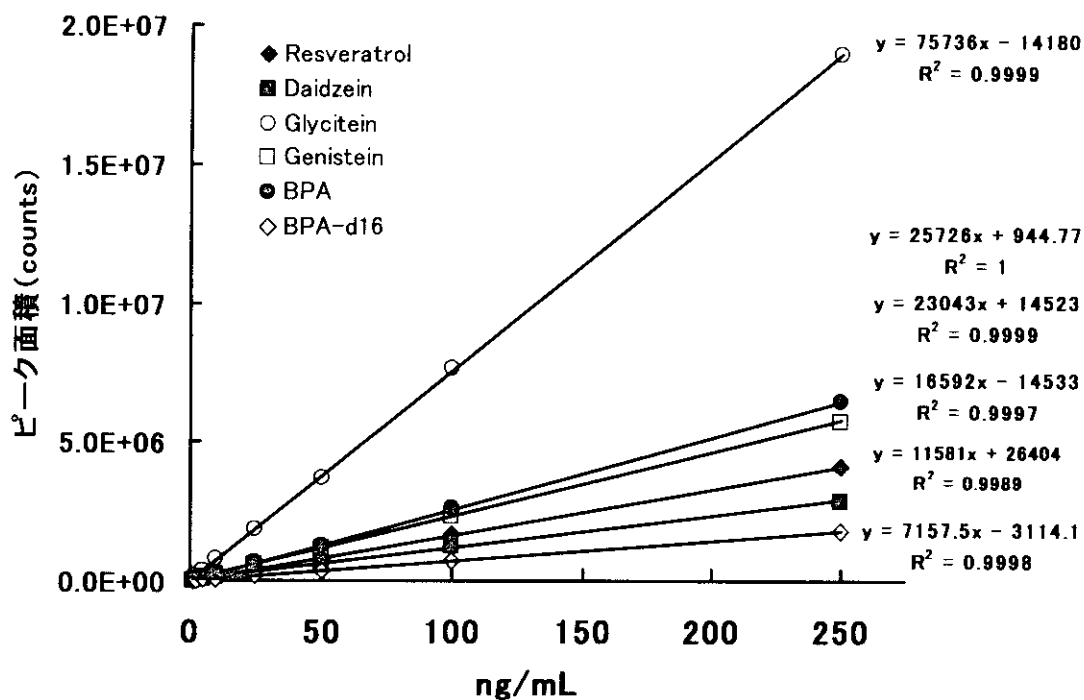


図4 LC/MS/MSによる検量線例

表4 マウス血清における添加回収率

(各20ng/mL添加)	Recovery (%) (n=3)	
	mean	S.D.
Resveratrol	78.2 ±	7.69
Daidzein	83.3 ±	4.08
Glycitein	81.9 ±	2.68
Genistein	87.9 ±	4.55
BPA	85.8 ±	5.34

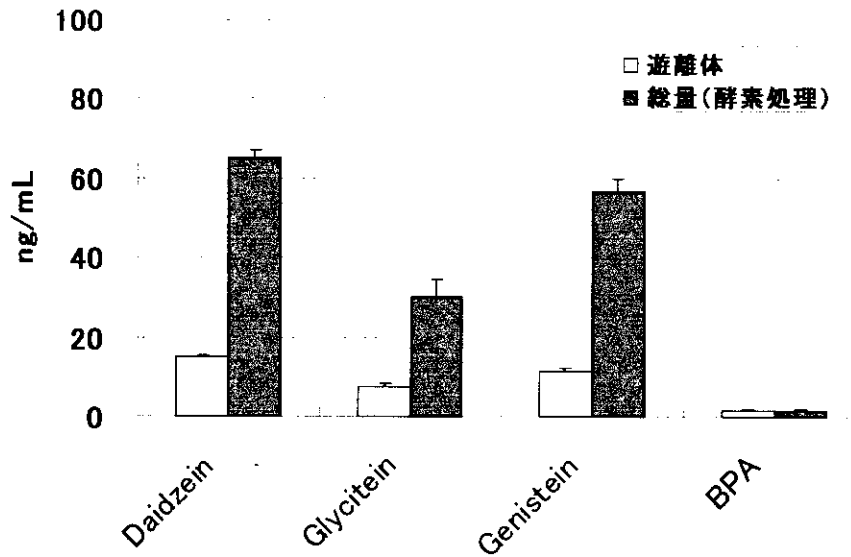


図5 市販マウス血清中イソフラボン及びBPA検出値
(n=3, 平均値±標準偏差)

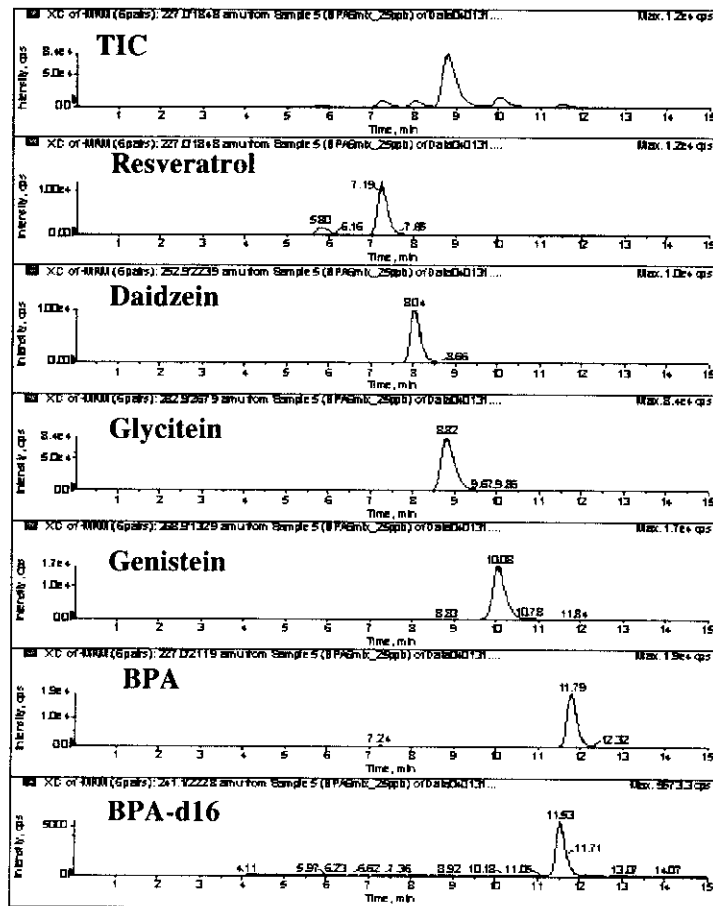
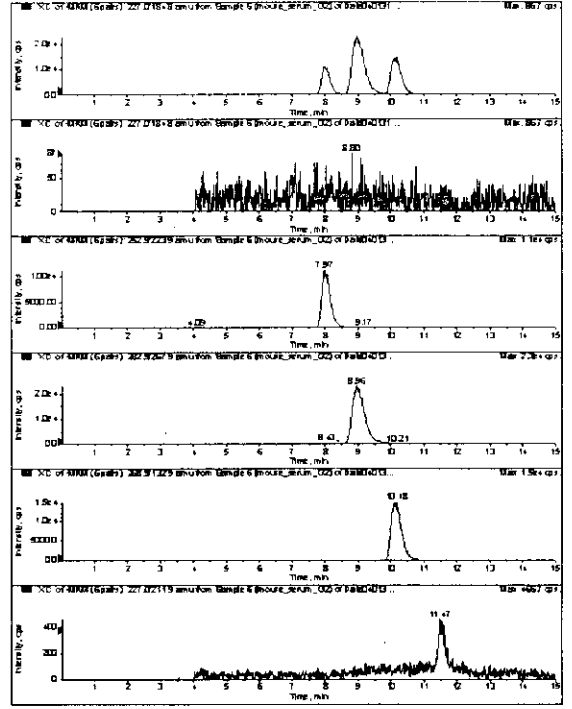
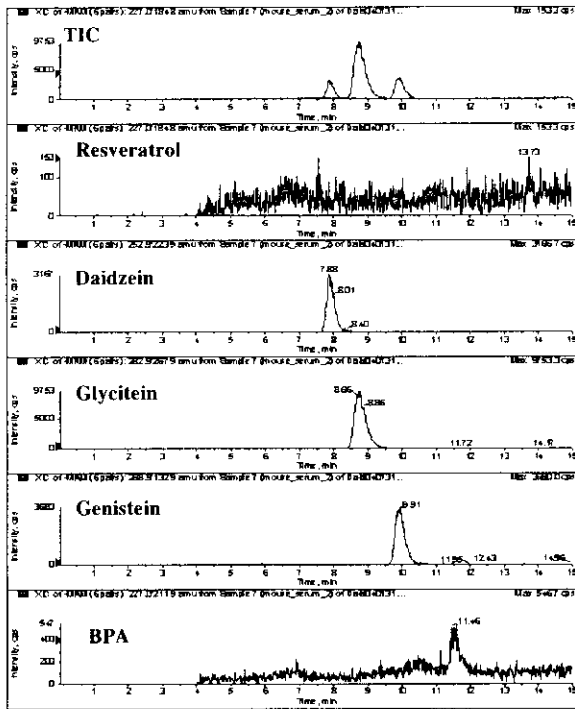


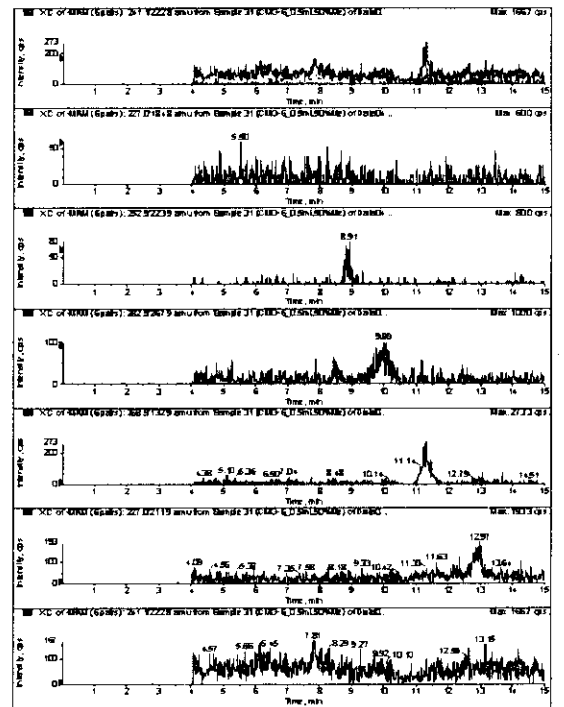
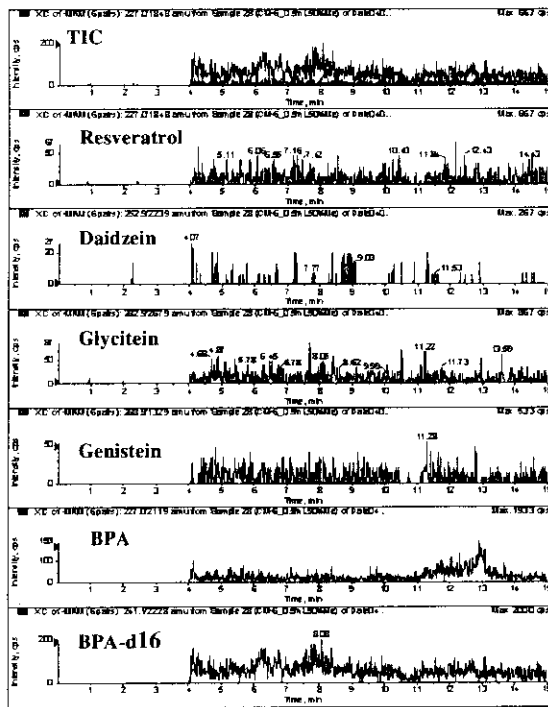
図6 LC/MS/MSによる標準液のクロマトグラム (各25ng/mL)



遊離体

酵素処理後(総量)

図7 LC/MS/MSによる市販マウス血清のクロマトグラム



遊離体

酵素処理後(総量)

図8 LC/MS/MSによるコントロール群マウス乳汁のクロマトグラム

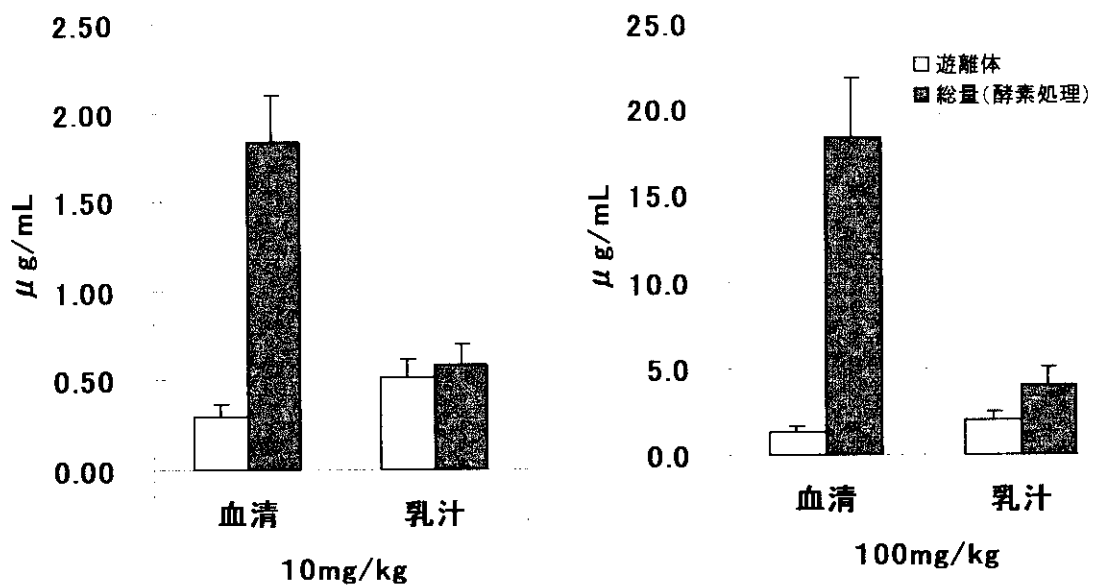


図9 BPA-d16の皮下投与における血清中濃度と乳汁中濃度

(n=5, 平均値±標準誤差、投与2時間後搾乳、2時間40分後採血)

厚生労働科学研究費補助金<平成 15 年度継続事業> (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・癌化および内分泌かく乱作用の比較

主任研究者： 螺良 愛郎 関西医科大学 病理学第二講座 教授

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

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チン 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することを目的とする。平成 14 年度には、(1) 65 日齢の体重と男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、15 年度には、(1) 300 日齢の体重と男性生殖器重量についての検索、(2) 青斑核ニューロン数の計数 (各群 4 例、次年度に各群 6 例へ)、(3) 小脳分子層樹状突起の発達の検索、をおこなった。

14 年度終了時にはオス 65 日齢の体重および精巣・副生殖器重量は、大きな変化が認められなかったが、今回は 300 日齢(中高年期)について各群 6 例の検索をおこなった。体重と精巣および副生殖器の重量の比較では、体重は大量投与群 (平均 616 ± 46.9 g) で、コントロール群 (平均 650 ± 77.1 g) に比べ、低体重傾向であった。また低量投与群 (平均 626 ± 65.4 g) でも同様であった。精巣重量は大量投与群で左右の計が平均 3.36 ± 0.20 g、低量投与群で平均 3.48 ± 0.12 g、またコントロール群で平均 3.46 ± 0.35 g で統計的有意差はなかった。したがって重量でみるかぎり、成熟期以降は、男性生殖器機能へのゲニスチンの影響はないものと予想される。

一方、5 6 日齢の雌雄の仔ラットを組織固定し、その脳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。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。

また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。多くの他の研究にあわせ、本研究でも分子層の厚さで計測した。分子層の厚さは $400 \sim 600 \mu$ であり、ゲニスチ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。しかし今回、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が重要であると考えられるので、各群 6 例ずつ・各例 6 箇所ずつ分子層の厚さと分子層/顆粒層比を計測し比較検討したところ分子層の厚さではコントロール群と投与群に統計的有意差を認めなかったが、分子層/顆粒層比では有意差を認めなかった。

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、生体のホルモン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）、および小脳のプルキンエ細胞樹状突起の長さに注目し、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、青班付近の垂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。

また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。エストロゲン様物質である Bisphenol A、Octylphenol などは樹状突起発達を促進させ

るといふ報告もあれば影響を与えないという報告もあり見解は一致していない。ゲニスタイン Genistein についてはまだ報告されていないため研究をおこなう意義がある。

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 3 つの実験をおこなった。

成熟 (300 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。

5 6 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、その脳組織から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・垂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。

また小脳については 5 6 日齢になった雌雄の仔ラットを上記と同様に組織固定し、18 μ の厚さの浮遊切片を得たのち、カルビンディンに対する抗体で免疫染色した。樹状突起の長さを反映する分子層の厚さを計測した。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。

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。

C. 研究結果

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の結果は、図表 1 に示している。すなわち、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の比較では、体重は大量投与群（平均 616 ± 46.9 g）で、コントロール群（平均 650 ± 77.1 g）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 ± 65.4 g）でも同様であった。精巣重量は大量投与群で左右の計が平均 3.36 ± 0.20 g、低量投与群で平均 3.48 ± 0.12 g、またコントロール群で平均 3.46 ± 0.35 g で統計的有意差はなかった。

56 日齢になった雌雄の仔ラット各例の青斑核・各亜核（A4 群と A6 群）のカテコールアミンニューロン数（各 4 例の平均値）は、図表 2 に示している。またグラフに示したのが図表 3 である。青斑核とその付近のカテコールアミンニューロン総数は、日齢や投与量にかかわらず雌雄ともに減少していた。とくに青斑核 A6 ニューロン群では、Genistein 暴露によりメスのニューロン数は減少（オス化）するが、オスの正常値を超えてオス暴露群の数値に近づく。一方、大量投与群オスではカテコールアミンニューロン総数が、56 日齢で強い減少を呈していた。

小脳のプルキンエ細胞の樹状突起を抗カルビンディン抗体で免疫染色した染色結果の 1 例を図表 4 に示した。各群 6 例、1 例につき 6 ケ所を計測し平均をとって統計処理をおこ

なった。グラフに表わしたものが図表 5 である。分子層の厚さでは投与群で厚くなる傾向がみられたが、オスで大量投与群とコントロール群で統計的有意差（ $p < 0.025$ ）を認め、低量投与群とコントロール群でも有意差（ $p < 0.05$ ）を認めた。メスでは大量投与群とコントロール群で統計的有意差（ $p < 0.025$ ）を認めた。

しかしながら分子層／顆粒層比ではいずれも有意差を認めなかった。

D. 考察

300 日齢でも 65 日齢と同様に低体重傾向であったことは、母体摂取の Genistein の仔ラット体重への影響をみた既報の論文(1)や、出生直後から飼料として与えた場合の影響を観た論文(2)で、ともに低体重傾向を認めていることと矛盾しないが、統計的有意差は認められず体重への影響はほとんどないと考えられる。

男性生殖器に対する Genistein の影響は検索されていないが、ラットで Bisphenol の影響には有意差がなかったとする論文(3)、母体に Bisphenol A、Ethinylestradiol や Diethylstilbestrol を投与したところ仔マウスの男性生殖器重量が低値であったとする報告(4,5)がある。今回のわれわれの 300 日齢の所見では、母体摂取の Genistein により仔ラットの精巣および副生殖器の重量は大量投与群・低量投与群ともに低重量傾向がみとめられた。またその値に容量依存性は認められず、体重あたりの組織重量もほとんど変化がみとめられなかった。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統計的有意差（ $p = 0.0171$ ）を有していたものの、これらを総合すると、成熟期以降は、男性生殖器機能へのゲニスタインの影響は全

くないものと予想される。

一方、中枢神経系の性的異型核のひとつ内側視束前野の容積を比較した既報論文(1,6,7)では、妊娠母胎や出生直後仔ラットへの **Genistein** 投与はメスの神経核容積を増大(オス化)させるが、オスの神経核容積は統計的有意差のない程度に低下(低量投与群が大量投与群に比しより大きな変化)する傾向をもつ。一方、青斑核に関しては、**Bisphenol A**, **Diethylstilbestrol**, **Resveratrol** の影響についての報告(3,8)では、オスで容積増・メスで容積減が起こり、雌雄差が消失するか逆転するとされているが、**Genistein** の影響を観察したわれわれの研究では性差が消失する傾向にある点でこれらの研究と矛盾しない。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、280日齢でも計測をおこなう。

内分泌かく乱因子と小脳のプルキンエ細胞の樹状突起の長さについては **Bisphenol A**、**Octylphenol** で促進されたという報告(10)(*in vivo*、*in vitro*)、**Nonylphenol**、**Octylphenol**、**Diethylstilbestrol** では影響がなく、**Bisphenol A** で阻害されたという報告(11)(*in vitro*)があるが、われわれの実験は *in vivo* であり、報告(10)と同様の結果が得られた。また今回顆粒層にも変化が認められたが、**Nonylphenol**、**Bisphenol A**、**Dibutylphthalate** が小脳顆粒層の分化を阻害するという報告(12)(*in vitro*)もあり、小脳での内分泌かく乱因子の影響を観察する場合、顆粒層もパラメーターとして用いるべきと考えられた。

(引用文献)

- 1) Levy et al, Proc Soc Exp Biol Med 208: 60-66,1995
- 2) Lephart et al, NeuroReport 12: 3451-3455, 2001
- 3) Kubo et al, Neurosci Lett 304: 73-76, 2001
- 4) 田中ら, 日本内分泌攪乱化学物質学会第5回研究発表会(広島)要旨集 p.309, 2002
- 5) 荒井ら, 日本内分泌攪乱化学物質学会第5回研究発表会(広島)要旨集 p.306, 2002
- 6) Faber et al., Biol Reprod 45: 649-653, 1991
- 7) Faber et al., Reprod Toxicol 7: 35-39, 1993
- 8) 荒井ら, 日本内分泌攪乱化学物質学会第5回研究発表会(広島)要旨集 p.277, 2002
- 9) 久保ら, 日本内分泌攪乱化学物質学会第6回研究発表会(仙台)要旨集 p.393, 2003
- 10) 坂本ら, 日本内分泌攪乱化学物質学会第5回研究発表会(広島)要旨集 p.280, 2002
- 11) 木村ら, 日本内分泌攪乱化学物質学会第5回研究発表会(広島)要旨集 p.291, 2002
- 12) 永田ら, 日本内分泌攪乱化学物質学会第6回研究発表会(仙台)要旨集 p.354, 2003

E. 結論

- 1) **Genistein** の母体摂取により、統計的有意差はないものの、仔ラットは低体重傾向を示す。
- 2) **Genistein** の母体摂取により、仔ラットの男性生殖器（精巣と副生殖器）は、低重量傾向を示すものの統計的有意差がなく、影響は受けないと予想される。
- 3) **Genistein** の母体摂取により、性的異型核のひとつである青班核（とくに A6 群）のカテコールアミン・ニューロン数は、オス、メスともに減少傾向にあり、性差が消失する傾向があった。
- 4) **Genistein** の母体摂取により、小脳のプルキンエ細胞樹状突起の長さ（分子層の厚さ）は有意に促進したが、分子層／顆粒層比では有意差はなかった。
- 5) 本研究は方法論的に莫大な労力と時間を要することから本年の結果だけでは単純に結論を導けないものの、**Genistein** はエストロゲン作用を持ち、胎児期の暴露は少ないながらも影響を受けるが、通常の経口摂取量で考えると、いわゆる内分泌かく乱作用は少ないのではないかと推定される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

第 30 回日本神経内分泌学会

（2003 年 9 月 12 日、横浜）にて研究発表。

「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」井岡真基、片岡洋祐、山田久夫
抄録；*Brain-Pituitary* 2003 第 30 回日本神経内分泌学会講演要旨集 p.37

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図表1

胎仔期Genistein暴露ラット（300日齢オス）の体重、精巣重量と副生殖器の
 個別一覧

	体重(g)	左精巣(g)	右精巣(g)	左右計A	副生殖器(g)	A/体重×100
大量投与群						
a	638	1.61	1.6	3.21	9.29	0.5
b	655	1.79	1.74	3.53	8.5	0.54
c	600	1.61	1.5	3.11	7.73	0.52
d	659	1.72	1.69	3.41	8.74	0.52
e	533	1.63	1.64	3.27	7.66	0.61
f	613	1.79	1.83	3.62	9.15	0.59
低量投与群						
a	650	1.73	1.76	3.49	8.93	0.54
b	705	1.72	1.76	3.48	9.32	0.49
c	662	1.62	1.67	3.29	10.48	0.5
d	638	1.87	1.8	3.67	9.66	0.58
e	522	1.73	1.76	3.49	8.43	0.67
f	578	1.78	1.7	3.48	7.41	0.6
コントロール群						
a	730	1.78	1.87	3.65	10.11	0.5
b	648	1.86	1.83	3.69	9.45	0.57
c	720	1.8	1.88	3.68	9.52	0.51
d	600	1.91	0.95	2.86	8.85	0.48
e	550	1.7	1.74	3.44	8.67	0.63

図表2

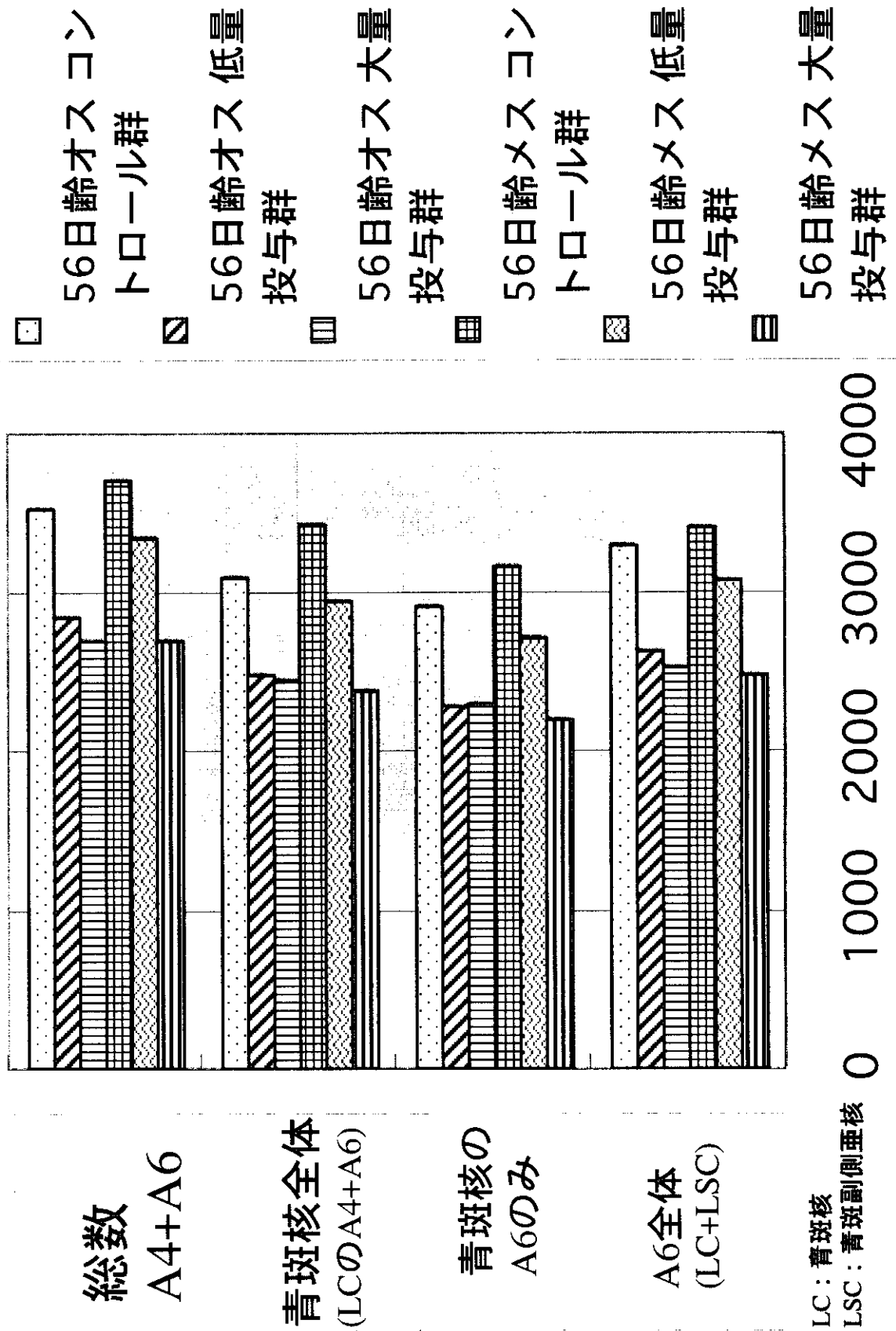
青斑核各亜核における (TH抗体・免疫染色陽性の)
 カテコールアミンニューロン数 (各例4匹の平均値)

	56 日齢							
	オス				メス			
	コントロール群	低量投与群	大量投与群	コントロール群	低量投与群	大量投与群		
全体 A6+A4	3525	2845	2687	3701	3328	2687		
LCのA6+A4	3088	2467	2433	3417	2934	2372		
LCのA6	2908	2272	2289	3159	2708	2189		
A6全体	3293	2620	2526	3404	3077	2478		
LCのA4	180	195	129	258	226	183		
A4全体	232	225	161	297	251	209		

LC：青斑核

図表3

56日齡ラット青斑核各亜核におけるカテコロールアミンニューロン数



図表4

小脳

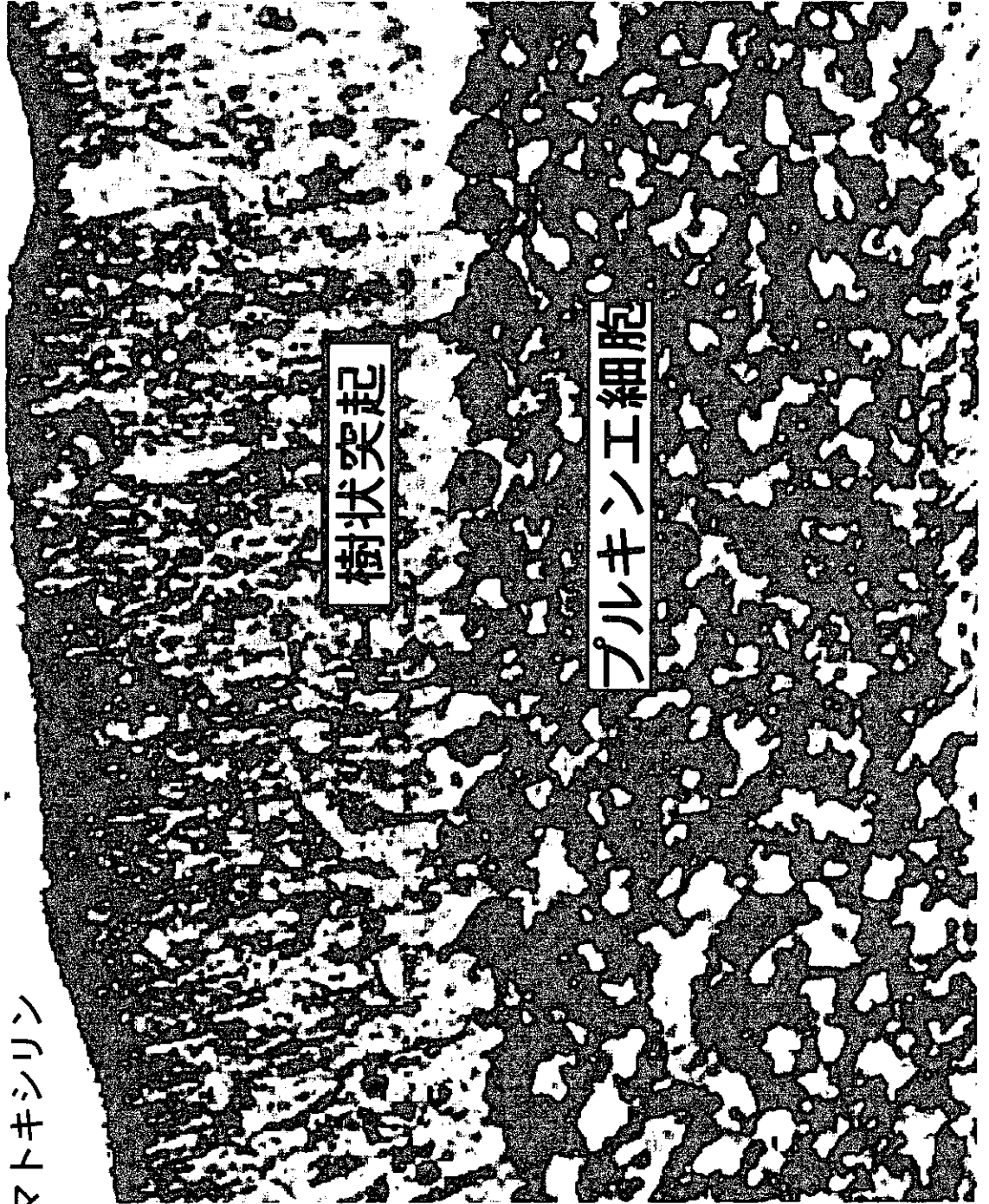
メスラット (大量投与群) 前頭断標本

抗カルビンデイン抗体を用いた免疫染色とヘマトキシリンの対比染色

分子層

顆粒層

200 μ m

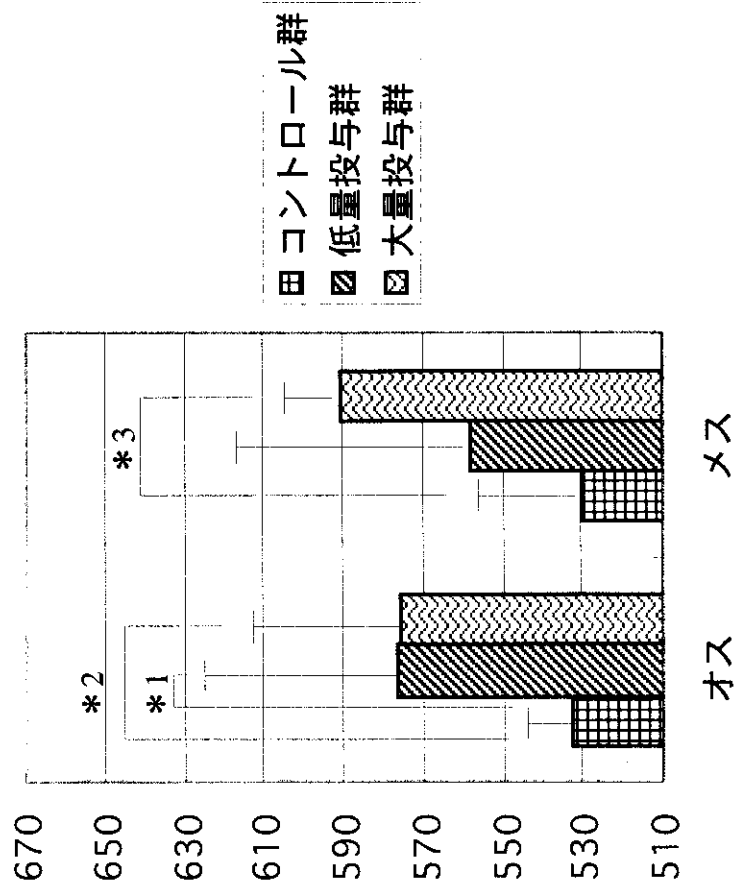


樹状突起

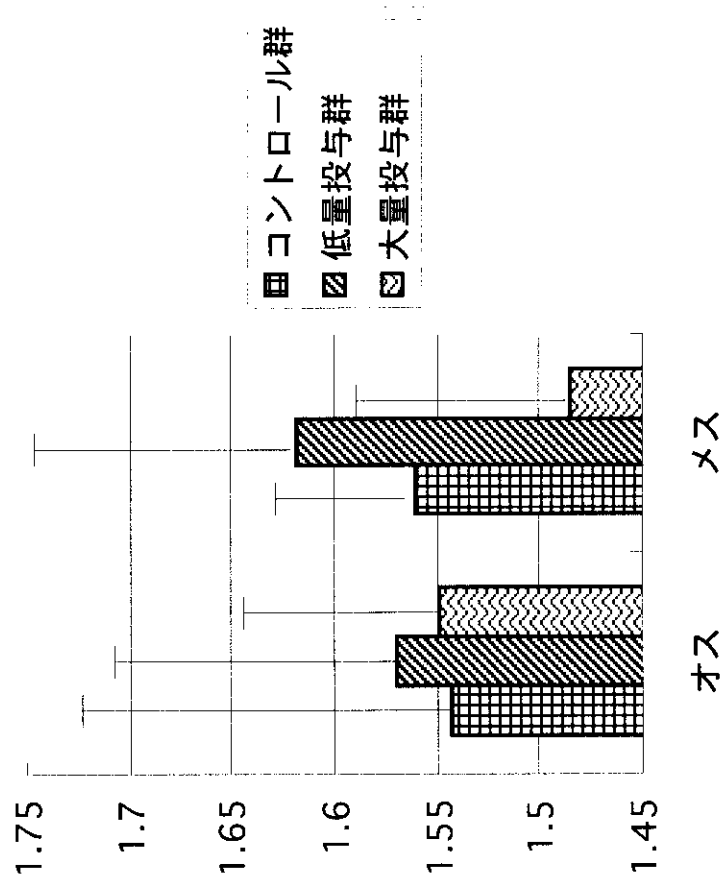
プルキンエ細胞

図表5

分子層の厚さ



分子層／顆粒層の比



t検定 *1 p<0.05

*2 p<0.025

*3 p<0.025

内分泌かく乱物質の細胞内シグナル伝達

分担研究者:松岡洋一郎

国立がんセンター研究所 室長

研究要旨

Estrogen 受容体 α 結合試験と Estrogen 感受性細胞株 MCF-7 の内在性遺伝子 c-myc、pS2 の発現量変化を指標としてカビ Estrogen Zearalenone の代謝産物 Zeranol (α -Zearalanol) のエストロゲン様作用を測定した。Zeranol には Estrogen 受容体 α 結合親和性、遺伝子発現誘導能とも 17β -estradiol とほぼ同程度の活性が認められた。

A. 研究目的

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として、活性化 mitogen-activated protein (MAP) キナーゼや Akt/プロテインキナーゼ B によるリン酸化を介した Estrogen 受容体の Estrogen 非依存的活性化が提唱されている。本研究の目的は、Estrogen 感受性ヒト乳がん細胞株を用いて、内分泌かく乱物質が Estrogen 様作用を示す濃度を明らかにし、さらに MAP キナーゼ、Akt の活性化を引き起こすか、またこれらプロテインキナーゼの活性化が乳がん細胞の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。本年度はまず Estrogen 感受性ヒト乳がん細胞の内在性遺伝子の発現を指標とする Estrogen 作用の測定系を確立する。

B. 材料及び方法

B-1. Estrogen 受容体 α 結合試験

試料(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

17β -estradiol (リガンド) 30 μ l と 3-100nM Zeranol 30 μ l の混合液を 4 $^{\circ}$ C、1時間反応させる。次いで、混合液 50 μ l とペルオキシダーゼ標識 17β -estradiol 50 μ l を抗 17β -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 17β -estradiol 量を酵素免疫競合法により測定する。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 IC_{50} を求めた。

$$\text{結合阻害度} = (\text{吸光度 BL} - \text{吸光度 S}) / (\text{吸光度 BL} - \text{吸光度 A})$$

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

B-2. 遺伝子発現の解析

Estrogen 感受性細胞株 MCF-7 の内在性遺伝子 c-myc、pS2 の発現量変化を指標として用いた。pS2 遺伝子は Estrogen 応答配列非依存的に、c-myc 遺伝子は非依存的に発現調節を受ける遺伝子である。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 17β -estradiol および Zeranol を添加し、2時間後に mRNA を回収してそれぞれの遺伝子の発現量を 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対象遺伝子の mRNA/ β -actin mRNA 比に対する相対値として表した。

C. 結果

C-1. Zeranol 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 17β -estradiol に対する ER α 結合阻害活性が認められた(図1)。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(図1)。この結果から Zeranol の ER α に対する相対結合親和性 (DES の IC₅₀/Zeranol の IC₅₀) は 0.77 と計算された。

C-2. Zeranol の遺伝子発現への影響

pS2 遺伝子発現に対しては 17β -estradiol、Zeranol とも 10^{-12} M でそれぞれ 1.24 倍、1.48 倍の最大誘導活性を示した(図2)。一方 c-myc 遺伝子発現に対しては、 17β -estradiol は 10^{-13} - 10^{-10} M の範囲で濃度依存的に c-myc 遺伝子発現を上昇させ、 10^{-10} M でほぼ最大値(1.49 倍)に達した。Zeranol も 10^{-13} - 10^{-9} M の範囲で濃度依存的に遺伝子発現を上昇させ、 10^{-9} M で最大 1.80 倍上昇させた。ところが、 10^{-8} M で 1.31 倍、 10^{-7} M 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(図2)。

D. 考察

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。また、Zeranol の Estrogen 活性は遺伝子発現を指標とした場合でも 17β -estradiol とほぼ同等との結果であった。

Zeranol は欧州ではすでに使用禁止となっているが、米国では牛の成長促進剤として依然使用されている。Zeranol のエストロゲン作用はすでに知られており、動物実験の結果から 17β -estradiol や DES と同様の臓器標的性を持つことが報告されている。例えば、乳腺組織の増殖促進 (Sheffield and W elsch, Cancer Lett.,28;77,1985)、睾丸での病変形成 (Perez-Martinez ら, J. Comp. Pathol.,114;407,1996)、肝臓腫瘍の形成 (Coe ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,89;1085,1992) 等である。Zeranol の使用が認められている米国での使用基準上限値は筋肉中 2μ g/kg、肝臓中 10μ g/kg で (Leffers ら, Hum. Repro.,16;1037,2001)、これらの値はそれぞれ 6.2nM、31nM に相当する。したがって、牛肉等の経口摂取により体内へ移行する Zeranol は極めて微量と考えられる。しかしながら、これまでヒト血中の Zeranol 濃度を正確に測定した報告はなく、微量測定系の確立が待たれる。

MAP キナーゼおよび Akt 活性化については MCF-7 細胞を用いて 10^{-12} - 10^{-8} M 17β -estradiol 添加後の経時変化を解析し、陽性対象としての至適条件をまず決定する。その後 10^{-12} - 10^{-8} M Zeranol 処理による両プロテインキナーゼリン酸化量の変化と細胞増殖活性への影響を測定する予定である。

E. 結論

1. Zeranol ($IC_{50}=26$ nM) は DES ($IC_{50}=20$ nM) と同程度のER α 結合親和性 (相対結合親和性=0.77) を有する。

2. MCF-7の内在性遺伝子pS2、c-mycへの最大発現誘導を示すZeranol濃度はそれぞれ 10^{-12} M、 10^{-9} Mであった。これらは17 β -estradiolと同等の値であり、Zeranolが17 β -estradiolと少なくとも同程度の遺伝子発現誘導活性を有することを示唆している。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

図 1

