

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 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 (関西医科大学公衆衛生学講座)

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 (関西医科大学病理学第二講座)

平成17(2005)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及び ----- 20
生活関連製品に由来する化学物質のエストロゲン様作用の評価
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 大阪府立公衆衛生研究所
高取 聡 大阪府立公衆衛生研究所
2. 天然エストロゲン様化学物質の思春期暴露によるマウスに ----- 34
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 塚 貴司 関西医科大学病理学第二講座 助手
二階堂 泰資 関西医科大学病理学第二講座 研究生
3. 妊娠母体が摂取した植物由来エストロゲン様物質に暴露された ----- 53
暴露された出生仔の中樞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
4. 内分泌かく乱物質の分析（食品関連化学物質の体内移行） ----- 66
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 畿央大学健康科学部 教授
大前 壽子 奈良県保健環境研究センター 総括研究員
茶山 和敏 静岡大学農学部 助教授

| | | |
|---|-------|-----|
| 5. 1: 体内および体外におけるZearalenoneとZeranolのエストロゲン 活性の比較 | ----- | 76 |
| 2: 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 分担研究者 茶山 和敏 静岡大学農学部 助教授 | | |
| 6. 複数農薬共存下におけるエストロゲン様作用の複合影響に関する研究 | ----- | 97 |
| 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 眞鍋 真理 関西医科大学公衆衛生学講座 大学院生 | | |
| 神田 靖士 関西医科大学公衆衛生学講座 講師 | | |
| 堀 伸二郎 関西医科大学公衆衛生学講座 非常勤講師 | | |
| 7. 食品関連化学物質の細胞内シグナル伝達 | ----- | 115 |
| 分担研究者 松岡 洋一郎 関西医科大学病理学第二講座 助教授 | | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 123 |
| IV. 研究成果の別刷 | ----- | 124 |

平成 16 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）
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

前年度の本研究で mycoestrogen である Zearalenone や Zeranone に高いエストロゲン活性をみたため、子宮肥大法ならびにエストロゲンレセプターアッセイ法で活性強度を比較したところ、Zeranone により強い活性をみた。Zeranone を 0.1 mg/kg あるいは 10 mg/kg を思春期前ラットに 15 日齢から連日計 5 回投与したところ、膣開口を早発し、発情期の延長に起因する著明な発情周期のかく乱がみられ、用量依存性に 37 週齢時で無排卵性卵巣をみた。但し、乳腺発癌には影響をみなかった。一方、思春期前マウスに Zearalenone や Zeranone を 15 日齢から連日計 4 回投与すると、ともに膣開口の早発や発情期の延長に起因する発情周期のかく乱がみられた。しかし、いずれも一過性の黄体欠如（無排卵性卵巣）をみたが、Zearalenone 投与動物の方が黄体欠如をみる期間が持続した。よって、マウスでは卵巣に対する作用は Zearalenone がより強い。授乳期のエストロゲン様化学物質は乳汁を介して仔に伝達する。各の 10 mg/kg の Genistein、Resveratrol、あるいは Bisphenol A を授乳期マウスに皮下あるいは経口投与して乳汁あるいは血中への移行をみたところ、Genistein の乳汁移行は Resveratrol や Bisphenol A に比べて、経口投与では高率で、高い抱合体濃度が検出された。これは Genistein の経口摂取による吸収・代謝能の発達が示唆された。なお、Genistein の出生前投与ではラットの中樞神経系に対し機能面での影響はみなかった。Genistein、Resveratrol、Zeranone や Bisphenol A の自己免疫症モデルマウスに対する影響をみたところ、発症開始には影響をみなかったが、発症後の腎炎をはじめとした悪性進展への影響が示唆された。農薬に対してラット下垂体腫瘍細胞である MtT/Se 細胞の増殖活性を指標としてエストロゲン活性をみたところ、有機リン系および防カビ剤に分類される化学物質に活性を検出した。また、2 種の農薬を組み合わせると、エストロゲン活性の増強をみた。但し、この検出法は主として ER α を介する活性を検出している。ER α と β を区別して食品関連化学物質の受容体結合親和性をみると、Genistein をはじめとしたイソフラボン類は ER β に高い結合親和性を有し、酵母 Two-Hybrid 法によりエストロゲン様作用を評価すると、イソフラボン類では β 受容体に強く作用を発揮していた。各の ER α (C1)、ER β (C2、C11)、あるいは ER α/β (C3、C6、C15) 陽性のラット乳癌細胞株を樹立したので、これらの細胞増殖活性を指標として ER α と β を区別したエストロゲン活性の検出が可能となった。

研究結果の概要

1. 酵母 Two-hybrid 法を用いた植物エストロゲン及び生活関連製品に由来する化学物質のエストロゲン様作用の評価

a. hER α または hER β 受容体に対する結合親和性について

α 受容体よりも β 受容体に高い結合親和性 (IC₅₀ で 3 倍以上の差) を有するのは、ゲニステイン、ダイゼイン及びグリシテインに限られたイソフラボン類の特徴であった。

b. hER α または hER β を導入した酵母 Two-Hybrid 法による植物エストロゲン及びアルキルフェノール誘導体のエストロゲン様作用の評価

イソフラボン類（ゲニステイン、イコール、クメステロール、ダイゼイン及びビオカニン A）及びアルキルフェノール誘導体（*p*-アルキルフェノール、パラベン、4-ヒドロキシベンゾフェノン）等のエストロゲン作用を有する外因性の化学物質は、 α 受容体よりも β 受容体に強く作用を発揮することが分かった。

c. 17- β -エストラジオールとの相互作用

E₂存在下、 α 受容体に対してイソフラボン類（ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテイン、イコール及びクメステロール）をそれぞれ作用させたとき、観察されるエストロゲン作用の強度は、E₂を単独で作用させた際の強度にイソフラボン類を単独で作用させた際の強度を加算したものに匹敵した。このことから、イソフラボン類の α 受容体を介したエストロゲン様作用は、相加的に作用すると考えられた。また、 β 受容体に対しても同様に E₂存在下、イソフラボン類をそれぞれ作用させた。イコール（1.0 μ M）作用時に観察されるエストロゲン作用の強度は、相加的作用として予測される作用強度よりも弱かった。このことからイコールは、 β 受容体に対して抗エストロゲンの側面を示すと推察された。その他のイソフラボン類の β 受容体を介したエストロゲン様作用は、相加的に作用すると考えられた。ゼアラレノンに α 受容体及び β 受容体ともに抗エストロゲン作用が認められた。

アルキルフェノール誘導体のエストロゲン様作用は、 α 受容体で相加的作用を示した。 β 受容体では、*t*-オクチルフェノール及びジヒドロキシベンゾフェノンは、エストロゲン作用を示す一方で E₂の作用に対して相加的に作用せず、減弱している（相加的に予測される作用強度よりも弱い）ことが分かった。

2. In vivo および in vitro における Zearalenone と Zeranol のエストロゲン活性の比較

カビ毒由来のエストロゲン様物質である Zearalenone とその代謝物質である Zeranol のエストロゲン活性を子宮肥大法およびエストロゲンレセプターアッセイ法を用いて比較した。その結果、Zeranol は Zearalenone よりもエストロゲンレセプターへの結合活性が強く、また子宮肥大法でも Zearalenone と比べてより低濃度で子宮重量を増加させる作用を有することが判明した。

3. 思春期前 Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol、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

エストロゲン様化学物質である Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol、Bisphenol A や Diethylstilbestrol (DES) のマウス思春期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比較した。方法として、Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol、Bisphenol A は 10 mg/kg、DES は 10 μ g/kg を 15-18 日齢の雌 CD-1 マウスに連日計 4 回皮下投与し、24 週齢に至るまで無処置対照群と比較した。その結果、体重増加（発育）はいずれの被験化学物質の投与においても差をみななかったが、膣開口は Genistein、Zearalenone、Zeranol、DES で早発し、Resveratrol や Bisphenol A にはこの作用はなかった。Zearalenone、Zeranol、DES では発情期の延長を特徴とする発情周期のかく乱がみられ、8 週齢では Zearalenone のみに無排卵性卵巣をもつ個体がみられたが、24 週齢では全例正常卵巣をみた。よって、Zearalenone の内分泌かく乱作用は他の被験物質よりも強く、Resveratrol や Bisphenol A は弱い。

4. 思春期前 Zeranol 暴露による雌ラットの発育やエストロゲン標的臓器の比較ならびに乳腺発癌への影響

Zeranol によるラット思春期前暴露実験を行った。方法は、生後 15-19 日齢の雌 Sprague-Dawley ラットに 0.1 mg/kg あるいは 10 mg/kg Zeranol を連日計 5 回皮下投与し、28 日齢にて 50 mg/kg *N*-methyl-*N*-nitrosourea を腹腔内投与し、乳腺発癌を促した。その結果、Zeranol は乳腺発癌には影響をおよぼさなかったが、発情期の延長に起因する著明な発情周期のかく乱をみとめ、37 週齢でも用量依存性に無排卵性卵巣を見た。マウスに比してラットでは不妊を示唆する所見の持続をより長期にみたことより、Zeranol に対する感受性はラットに高い。

5. 妊娠母体が摂取した植物由来エストロゲン様物質に暴露された出生仔の中樞神経系に及ぼす影響

ゲニスタイン Genistein を、妊娠ラットに少量 (1.5 mg/kg、常食量相当) および大量 (30 mg/kg) 皮下投与し、出生後成熟した胎仔の中樞神経系に及ぼす影響を対照群と比較した。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減少傾向を示し、大量投与群でより強く減少する傾向を有していた。また、大量投与群では性差がほとんどなくなっていた。小脳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たと、分子層/顆粒層比では有意差を認めなかった。以上より、実験生物学的には、無摂取群に対して摂取群は影響を受けていると言わざるを得ない。しかし、少量投与が常食量相当であることや、小脳での結果から機能面にはあまり影響しないであろう。

6. 食品関連化学物質の乳汁への移行

Bisphenol A 及び植物エストロゲンの Genistein、Resveratrol を授乳マウスに 10 mg/kg を単独あるいは 3 種混合して皮下及び経口で単回投与し、投与物質の血液と乳汁移行について昨年度開発した LC/MS/MS による分析法により測定した。遊離体に加え、グルクロン酸及び硫酸抱合体を含めた総量についても測定した。

単独皮下投与の投与後 2 時間目搾乳群で、Bisphenol A、Genistein 及び Resveratrol の乳汁中総量及び遊離体濃度 (平均値) が各々 590 ng/mL (遊離体 520)、96 ng/mL (遊離体 65)、1400 ng/mL (遊離体 1100) であり、Genistein の検出値は他の 2 物質に比べて低かった。3 物質とも総量及び抱合体濃度は乳汁より血清で高く、逆に遊離体濃度は血清より乳汁で高い傾向を示した。また、遊離体の総量に対する割合も血清 (10.7~19.1%) より乳汁 (65.1~88.7%) で高い傾向を示した。3 種混合皮下投与群においては、3 物質とも若干の値変化を示し、相互作用が考えられたが単独投与と同程度の検出値であった。

単独皮下投与の 7 時間目搾乳群においては、2 時間目搾乳群と比較すると、Bisphenol A 及び Resveratrol では乳汁及び血清中の遊離体濃度が減少したが Genistein ではむしろ高くなり、他の 2 物質に比べて吸収が緩慢であることが示唆された。

3 種混合経口投与においては 2 時間目搾乳群で、Bisphenol A、Genistein 及び Resveratrol の乳汁中総量及び遊離体濃度が各々 110 ng/mL (遊離体 21)、170 ng/mL (遊離体 10)、120 ng/mL (遊離体 45) であり、これを混合皮下投与と比較すると、3 物質とも遊離体濃度は 1/8

以下の低い値で、遊離体の割合も血清中で 1.1~4.7%、そして乳汁中で 7.3~38.5%と皮下投与に比べて抱合体の割合が大きく、低い吸収率と肝臓における初回通過効果の大きいことが示唆された。また、Genistein においては乳汁中の抱合体が他の 2 物質より高く、経口摂取における吸収・代謝機能が発達していることが考えられた。

7. 自己免疫病発症に対する各種内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究

植物由来のエストロゲン様物質で大豆に多く含まれる Genistein およびブドウや赤ワインに多く含まれる Resveratrol、環境ホルモン物質として最も頻繁に研究されている Bisphenol A およびカビ毒由来のエストロゲン様物質である Zeranol の自己免疫病発症および悪性進展に対する影響を検討した。自己免疫病モデルマウスに各環境ホルモン物質を投与した結果、エストロゲン活性を有する環境ホルモン物質である Bisphenol A、Genistein、Resveratrol および Zeranol 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、特に腎炎の悪性進展を促進することが示唆された。

8. ラット下垂体腫瘍細胞株 MtT/Se の細胞増殖を指標としたエストロゲン活性測定系の確立と応用

ラットの下垂体腫瘍由来細胞である MtT/S 細胞を用いて細胞増殖を指標とするエストロゲン活性を測定する系を確立した。この MtT/Se 細胞のエストロゲンレセプター (ER) の発現割合を検討するため RT-PCR で mRNA レベルでの ER α 及び ER β の発現を確認すると、その両方を発現していた。次に real time PCR で半定量することで ER α 及び ER β の発現比を求めると ER α の方が ER β より優位であるという結果となった。これより、MtT/Se 細胞を用いたエストロゲン活性の測定法は、主として ER α を介するものであり ER α 型の活性を検出していると推測することが出来た。MtT/Se 細胞に 17 β エストラジオールを 1×10^{-12} から 1×10^{-6} M の範囲で添加するとエストロゲン無添加群との間に有意なエストロゲン活性が検出された。そこで、我々は農作物中に複数共存する農薬のエストロゲン活性のエンハンス効果を MtT/Se を用いて細胞増殖を指標として検討を行った。検討した農薬は、果物や野菜に通常使用される有機リン系及び防カビ剤に分類される食品に関連した化学物質である。その結果、測定した農薬にエストロゲン活性が検出された。エストロゲン様作用のもつ農薬は、我々が日常遭遇する 1 つの農作物から同時に検出されることより、農作物中に存在する検出頻度の高い 2 種類を組み合わせで検討したところ、エストロゲン活性のさらなる増強が確認された。さらに標準物質である 17 β エストラジオールと比較して各種農薬の検出限界濃度は $1/10^5$ から $1/10^7$ の活性を示した。これより農薬に存在するエストロゲン活性の人体に対する影響は極めて低いことが推測することができる。今後このような複数農薬の混合によるエストロゲン活性増強効果がおこる物質の組み合わせを検討し農薬における環境ホルモン作用の検討を続けていく必要がある。

9. エストロゲン作用測定のための培養細胞系の樹立と作用機構の解析

ヒト正常型遺伝子トランスジェニックラット 1 個体に発生した乳腺腫瘍より乳癌細胞株 7 株 (C1、C2、C3、C6、C11、C15、C17) を樹立した。Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によるエストロゲン受容体 (ER) 遺伝子発現の解析では、ER 陰性 (C17)、ER α のみ陽性 (C1)、ER β のみ陽性 (C2、C11)、ER α 、 β 陽性 (C3、C6、C15) の各細胞株であることが判明した。ゲニステインおよびダイゼイン (0-10 μ M) 添加 24 時

間後での細胞増殖活性への影響を C3 (ER α 、 β 陽性)、C11 (ER β 陽性) を用いて測定すると、被験物質 5 μ M まで各れの細胞においても明らかな抑制効果は認めなかったが、10 μ M 添加で非添加対照群に比較してゲニステイン添加時 C3 86%、C11 81%、ダイゼイン添加時 C3 92%、C11 95%の増殖活性であった。ER β 陽性 C11 細胞株を用いゲニステイン添加後の遺伝子発現変動を DNA アレイにより解析した。10 μ M ゲニステイン添加 72 時間後に 2 倍以上の発現変動を認めた遺伝子は、発現上昇 410 個、低下 327 個の 737 遺伝子で、全体の 3.6% (737/20,500) であった。発現上昇群には IL-3 (3.5 倍)、IGF-2 binding protein 3 (2.3 倍)、tumor necrosis factor receptor superfamily 12 (2.2 倍)、発現低下群には apoptosis inhibitor 2 (1/2.5 倍)、cyclin G (1/2.2 倍) が含まれており、今後 RT-PCR 法により確認する予定である。

| | |
|--------|---------------------|
| 分担研究者 | |
| 堀 伸二郎 | 関西医科大学公衆衛生学講座 非常勤講師 |
| 山田 久夫 | 関西医科大学解剖学第一講座 教授 |
| 西山 利正 | 関西医科大学公衆衛生学講座 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 | 静岡大学農学部応用生物化学科 助教授 |
| 松岡 洋一郎 | 関西医科大学病理学第二講座 助教授 |

く乱作用に対する懸念について考察するうえで有用である。

2. In vivo および in vitro における Zearalenone と Zeranone のエストロゲン活性の比較

カビ由来のマイコトキシン的一种である Zearalenone と、その生体内での代謝物質で、家畜の成長促進剤として用いられている Zeranone は強いエストロゲン様作用を有することが判明している。そして、食肉中に残存している Zeranone をヒトが摂取していることから、内分泌機能への影響が懸念されている。平成 14 年度の本研究で、子宮肥大法を用いた同一条件で、Genistein、Resveratrol および Bisphenol A のエストロゲン活性を調べた結果、それらの物質は弱いながらエストロゲン活性を有することが明らかとなった。Zearalenone と Zeranone についてもエストロゲン活性に関する報告は見られるが、両者のエストロゲン活性を同時かつ詳細に検討した報告は見られない。そこで、本研究ではこの 2 つの物質のエストロゲン活性をエストロゲンレセプター (ER) 結合試験法および子宮肥大法によって詳細に比較した。

3. 思春期前 Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranone、Bisphenol A、DES 暴露による雌マウスの発育ならびにエストロ

A. 研究目的

1. 酵母 Two-hybrid 法を用いた植物エストロゲン及び生活関連製品に由来する化学物質のエストロゲン様作用の評価

エストロゲン受容体には α 受容体と β 受容体の 2 種類があり、これらのリガンドに対する結合親和性及び生体における分布は異なっている。このことは、ホルモンが各器官に対する多様な調節機能を担ううえでの鍵となっている。我々は、内分泌かく乱作用が疑われるアルキルフェノール誘導体とイソフラボン類との各受容体に対する結合親和性とエストロゲン様作用を調べた。得られた情報は、イソフラボン類の健康増進作用の機構の解明と日常生活で暴露されうるアルキルフェノール誘導体による内分泌か

ゲン標的臓器への影響

Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A、DES は体内エストロゲンが未だ低値な機能・形態形成期では、不可逆的に作用するおそれがあるため、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比較した。

4. 思春期前 Zearanol 暴露による雌ラットの発育やエストロゲン標的臓器の比較ならびに乳腺発癌への影響

Zearalenone の内分泌かく乱作用は顕著であったため、その代謝産物である Zearanol のラットにおける思春期前暴露による雌性生殖器官や乳癌に対する影響につき検討した。

5. 妊娠母体が摂取した植物由来エストロゲン様物質に暴露された出生仔の中樞神経系に及ぼす影響

妊娠中に摂取した植物由来・食品中エストロゲン様物質である Genistein の、中樞神経系に及ぼす影響を検索した。

6. 食品関連化学物質の乳汁への移行

乳腺細胞における乳汁産生機能に対する内分泌かく乱物質の影響や母親から乳児への移行に関しての基礎的研究を行った。

7. 自己免疫病発症に対する各種内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究

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かった。そこで、平成15年度の研究として、日本人が食品から最も多く摂取している植物エストロゲン物質である Genistein、環境ホルモン物質として最も頻繁に研究されている Bisphenol A を自己免

疫病モデルマウスに投与して、自己免疫病発症に対する影響を調べた。その結果、Genistein と Bisphenol A は自己免疫病の発症開始時期には影響しないものの、悪性進展に影響して生存率を著しく低下させることを明らかにした。

そこで、平成16年度では、自己免疫病の悪性進展がより顕著な4ヶ月齢まで Genistein と Bisphenol A を投与して、その悪性進展に対する影響を詳細に検討した。さらに、カビ由来のエストロゲン様物質で、家畜のホルモン剤として用いられている Zearanol と赤ワインに多く含まれている植物エストロゲン物質である Resveratrol の2種類の物質に関して、自己免疫病発症に対する影響を同様の方法で調べた。

8. ラット下垂体腫瘍細胞株 MtT/Se の細胞増殖を指標としたエストロゲン活性測定系の確立と応用

MtT/Se 細胞を用いてエストロゲンの存在下で細胞が増殖する特性を用いたエストロゲン活性の測定法は過去に報告されている。今回我々は、MtT/Se 細胞の増殖能を指標としてエストロゲン活性を定量的に測定する系を確立した。MtT/Se 細胞を用いた内分泌かく乱物質の測定系は内分泌かく乱物質がエストロゲン様作用をもち、野生生物やヒトの生態系に影響を及ぼすという報告は多数ある。しかし、複合したエストロゲン様物質の存在によって内分泌かく乱作用が増強されるエンハンス効果についての報告はない。平成15年度に我々は、E-CALUX assay 法を用いて複数の農薬存在下におけるエストロゲン作用増強効果について報告した。今回、農作物中に複数共存する農薬のエストロゲン活性のエンハンス効果を細胞増殖活性を指標として測定し、その増強効果の有無を検討することを目的とした。

9. エストロゲン作用測定のための培養細胞系の樹立と作用機構の解析

本邦女性の乳癌死亡率は近年急激に上昇しており、食生活の欧米化との関連が指摘されている。他方、アジア諸国における大豆の高摂取量と乳癌低発症率の相関が注目され、大豆に含まれるエストロゲン様物質であるイソフラボンによる乳癌の予防効果が期待されている。これら疫学的研究の結果は、食品中に含まれる天然ならびに合成エストロゲン様物質が乳癌発生の促進あるいは抑制に関与する可能性を示唆している。また、食品中のエストロゲン様物質には内分泌かく乱作用も懸念されている。本研究の目的は、食品中のエストロゲン様物質の作用を測定するための培養細胞系を樹立し、その作用機構を解析することである。

B. 研究方法

1. 酵母 Two-hybrid 法を用いた植物エストロゲン及び生活関連製品に由来する化学物質のエストロゲン様作用の評価

a. 受容体結合試験

Ligand Screening System (Estrogen Receptor α/β , TOYOBO CO., LTD.) を用いた。被検化学物質存在下で E_2 とエストロゲン受容体をインキュベートする (反応液)。反応液の一部を抜き取り、抗エストラジオール抗体を固定したプレート上でペルオキシダーゼ標識エストラジオールとインキュベートする。反応液中で被検化学物質が E_2 のエストロゲン受容体への結合を妨げることによって遊離したエストラジオールが増加し、これによってペルオキシダーゼ標識エストラジオールの抗エストラジオール抗体固定プレート上への保持が妨げられる。本実験系で 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を求めて化学物質のエストロゲン受容体に対する結合親和性の指標とする。

b. 酵母 Two-Hybrid 法

hER-GAL4DBD (human estrogen receptor α/β -GAL4 DNA binding domain fusion protein) と TIF2-GAL4AD (TIF2-GAL4 activation domain fusion protein) 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。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、 OD_{595} を測定した。ザイモリエースで細胞壁を分解し (37°C 、15 分)、*o*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドを加え 30°C 、30 分インキュベーションを行った。 OD_{410} 及び OD_{570} 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。この酵素活性を化学物質のエストロゲン様作用の指標とした。 E_2 ($0.1 \mu\text{M}$) 作用時の酵素活性を 100% として 10% の酵素活性を示す化学物質濃度を EC_{10} とした。

2. In vivo および in vitro における Zearalenone と Zeranol のエストロゲン活性の比較

a. ER 結合試験

ヒト ER α または ER β と [^3H]E2 および Zearalenone および Zeranol を 100 nM から 100 μM 含む反応液を室温で 2 時間反応させた。その後、ER 結合 [^3H]E2 をヒドロキシアパタイトにより遊離 [^3H]E2 と分離し、放射活性を測定し、その結果から Zearalenone および Zeranol の ER α または ER β との結合活性を算出して比較した。

b. 子宮肥大試験

10 週齢 ICR マウス雌の卵巣を摘出し、4 週後から Zearalenone および Zeranol を 0.5–100 mg/kg/day を 3 日間連続皮下投与した。最終投与の 24 時間後子宮を摘出し、子宮重量を計測した。

3. 思春期前 Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol、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

雌 CD-1 マウスに対し、15–18 日齢にかけて被験物質 (Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol、Bisphenol A、DES) を Dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解して

連日（計4回）皮下投与した。動物は無処置対照群と各被験物質投与群に分け、実験に供した。投与量として、Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol、Bisphenol Aは10 mg/kgとし、DESの投与量は他の被験物質の1/1000量（10 µg/kg）とした。陰開口（思春期発来）の有無は16日齢より毎日観察した。また、5、9、21週齢から3週間連日膈スメアを採取し、発情周期を記録した。さらに、各群毎週体重を測定するとともに、4、8、24週齢時に任意に6匹ずつ屠殺し、子宮、卵巣、膈ならびに一側腰部乳腺はホルマリン固定・パラフィン標本を作製し、HE染色標本にて形態的にも評価した。他側腰部乳腺からはホール・マウント標本を作製し、群間の発育を比較した。乳腺のホール・マウント標本は4段階に分類し、乳腺分化の程度を数値化した。

4. 思春期前 Zeranol 暴露による雌ラットの発育やエストロゲン標的臓器の比較ならびに乳腺発癌への影響

雌 Sprague-Dawley ラットに対し、15-19日齢にかけて Zeranol を DMSO に溶解して連日（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 Zeranol 投与群；3群：大量 Zeranol 投与群）に分け、28日齢に 50 mg/kg *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) を腹腔内投与することにより乳腺発癌を促した。全例週1回体重を測定し、各群任意の6匹は生後28日齢にて屠殺し、腰部乳腺を採取してホール・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 ≥ 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。

5. 妊娠母体が摂取した植物由来エストロゲン様物質に暴露された出生仔の中樞神経系に及ぼす影響

植物由来・食品中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16日目から24時間ごとに5回、少量(1.5 mg/kg = 常食量相当) および大量 (30 mg/kg) 投与し、出生後の仔ラット (雌雄) を56日間飼育して以下の実験をおこなった。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。組織固定した脳標本(切片)を、チロシンヒドロキシラーゼあるいはカルビンディンに対する抗体をもちいた免疫組織化学法にて、それぞれカテコールアミンニューロンあるいはプルキンエニューロンを染色した。

6. 食品関連化学物質の乳汁への移行

a. マウスへの Bisphenol A、Genistein 及び Resveratrol の投与

授乳中の ddY マウスを用い、離乳0時間または5時間目にオリーブオイルに溶解した Bisphenol A (d16 体)、Genistein 及び Resveratrol を、10 mg/kg の投与量で単独あるいは混合して皮下あるいは経口投与し、投与後2時間または7時間目（ともに離乳7時間目）に乳汁を採取し、乳汁採取直後に心臓穿刺により血液を採取し、血清を得た。

b. マウス血清及び乳汁の測定

遊離体の測定には、試料 125 µL (乳汁の場合は 250 µL) に酢酸緩衝液 (pH5) を同量加え、メタノールで除蛋白処理し、遠心分離した上清を水で希釈して逆相系にイオン交換を混合した ISOLUTE Multimode 固相抽出カートリッジにより精製した。溶出液のメタノールを窒素気流下で濃縮した後、50%メタノール溶液で定容とし、LC/MS/MS の ESI ネガティブモードで定量した。また、抱合体を含めた総量の測定には、試料に酢酸緩衝液 (pH5) 及び β -グルクロニダーゼ/サルファターゼ溶液を加えて 37°C、1時間酵素分解した後、メタノールによる除蛋白以降は遊離体の分析と同様の操作を行っ

で測定した。詳細な分析条件は、平成 15 年度報告に準じた。

7. 自己免疫病発症に対する各種内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究

実験には自己免疫病モデルマウスである MRL-*lpr*^g マウスを用いた。自己免疫病発症前の 1 ヶ月齢の MRL-*lpr*^g マウスに、子宮重量法での結果をもとにして、Genistein を 15 mg/kg、Bisphenol A を 3 mg/kg、Zeranol を 0.5 mg/kg、Resveratrol を 10 mg/kg、Estradiol-17 β (E2) 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。投与終了後、体重および尿タンパク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、また、メスでは卵巣および子宮重量を、オスでは精巣重量も測定した。腎臓は腎炎の発症度を分析するために、組織標本を作製して糸球体腎炎と腎臓血管炎の発症度を調べた。さらに、血中の抗 DNA 抗体および免疫複合体量を測定した。

8. ラット下垂体腫瘍細胞株 MtT/Se の細胞増殖を指標としたエストロゲン活性測定系の確立と応用

a. 細胞培養

ラット下垂体腫瘍由来細胞株、MtT/Se は理研バイオソースセンターから供与された。細胞の継代用には 2.5% Fetal Bovine serum (FBS:Sigma)、25mg/liter ペニシリンストレプトマイシン、10% Horse serum (Sigma) に基本培地である Ham F12 とダルベッコ改変イーグル液体培地/Ham F-12 培地 (フェノールレッド添加) を用いて、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。細胞増殖測定用には、フェノールレッド除去した基本培地にチャコールデキストラン処理をした FBS を 10%、Horse serum 10% を加え同様に 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。

b. 試薬

ダイアジノン、トリクロホスメチル、ピロプロキシフェン、プロチオホス、オルトフェニルフェノール (OPP)、チアベンダゾール (TBZ) は標準試薬 (残留農薬試験用: 和光純薬)、17 β エストラジオール (生化学用: 和光純薬) を用いた。

c. 細胞増殖試験

細胞増殖能を測定するために WST-1 試薬 (和光純薬) を用いた。40 mg の WST-1 を 11 ml の PBS に溶解し、使用する直前に滅菌水に溶解した 10 ml 1-Methoxy PMS1 を混合して WST-1 試薬として用いた。96 穴マイクロプレート (Nunc) に 2 x 10⁴ cell/ml に調整した細胞懸濁液を 100 μ l/well ずつ入れ、1 x 10⁻¹⁰ から 1 x 10⁻⁵ M の終濃度となる測定農薬を加え 37°C、5%CO₂・95%air インキュベーター内で 3 日間培養した。その後、WST-1 試薬を 10 ml/well ずつ加え、37°C、5% CO₂ 2 時間 incubate した後、マイクロプレートリーダー (BioRad) で、主波長 450 nm、副波長 650 nm の吸光度を測定した。

d. RNA 抽出と RT PCR

RNA は Trizol reagent (Invitrogen) を用いて抽出し定量化した後、1 μ g の Total RNA は ランダムプライマーと逆転写酵素 (Revertra Ace: 東洋紡) を用いて 42°C、1 時間で cDNA を合成した。0.5 μ g の cDNA をテンプレートとし特異的プライマー ER- α (5'-AATTCTGACAATCGACGCCAG3', 5'-GTGCTTCAACATTCTCCCTCC-3'), ER- β (5'-TTCCCGGCAGCACCAGTAAC-3', 5'-TCCCTCTTTGCGTTTGGACTA-3') を用いて増幅した。PCR 反応は 94°C 4 分、94°C 30 秒、61°C 30 秒、72°C 1 分、30 サイクルで行った。PCR 反応は i-Cycler (Bio-Rad) で行った。

e. Real-Time PCR

Real-Time PCR は、DyNAmo HS SYBR Green qPCR kit (MJ Research) を用いて製品情報に基づいて行った。DNA テンプレート 10 ng と上記記載の ER- α と ER- β それぞれのプライマー 5 pmol を用いた。PCR 反応は 95°C 15 分、

95°C 10 秒、61°C 20秒、72°C 20秒を40サイクル行いOpticon2 (MJ Research) を用いて解析を行った。また、定量化するため内部標準としてG3PDHを用いた。

9. エストロゲン作用測定のための培養細胞系の樹立と作用機構の解析

a. ラット乳癌細胞株の樹立

ラット乳癌細胞株は7,12-dimethylbenz[α]anthracene 投与によりヒト正常型遺伝子トランスジェニックラット1個体に発生した腫瘍より Hallowes らの方法に従い樹立した。方法を略記すると、細切した1.5g 腫瘍組織を0.2%コラゲナーゼ、0.1%ヒアルロニダーゼ、5%牛胎児血清含有199 メディウム中で37°C、2時間処理した。分離細胞塊を500 μm、70 μm メッシュフィルターにて濾過後、40 μm フィルターにて残った細胞を再浮遊し、培養皿に2時間接着させた。非接着上皮細胞を採取、培養し、2回の限界希釈により単コロニー由来の細胞株7株 (C1、C2、C3、C6、C11、C15、C17) を樹立した。

b. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

全 RNA からの 1st. strand cDNA 合成は ReverTra Ace α (東洋紡、大阪) を用いて行った。増幅は KOD plus (東洋紡、大阪) により、デネイチャー95°C、15 秒、アニーリング 60°C、30 秒、伸長 68°C、1 分、サイクル数 30 回の条件にて施行した。用いたプライマーは次の通りである。

ERα forward:5'-atgacatgacccttcacacaaag-3'

reverse:5'-ggcgtcgattgtcagaattggacc-3'

ERβ forward:5'-aggaatggtcaagtgtgatccagg-3'

reverse:5'-tgctggagtttaactcacggaacc-3'

GAPDH forward:5'-ttcaacggcacagtcagg-3'

reverse:5'-catggactgtggtcatgag-3'

c. 細胞増殖活性の測定

細胞増殖活性は 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST-8) reduction assay kit (和光

純薬工業、大阪) を用いて測定した。対数増殖期にある細胞 1×10^3 個を 96 穴マイクロタイタープレート各ウェルに播種し 24 時間前培養する。0-10 mM のゲニステイン、ダイゼイン存在下で 24 時間培養後、WST-8 溶液 10 ml を添加し 2 時間呈色反応を行い、マイクロプレートリーダーにて波長 450nm の吸光度を測定する。

d. DNA マイクロアレイ

遺伝子発現の網羅的解析は、ERα発現陰性 C11 細胞を 10 μM ゲニステイン非存在および存在下 (φ6 cmディッシュ各3枚) で72時間培養後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN、CA) にて精製した全 RNA を鋳型として cRNA を合成し、アジレント社製ラットオリゴヌクレオチドアレイ (約 20,500 遺伝子搭載) を用いて行った。

なお、以上すべての動物実験は各施設の動物実験委員会で承認されており、実験にあたっては各施設の実験動物指針に則り施行した。

C. 研究結果及び考察

1. 酵母 Two-hybrid 法を用いた植物エストロゲン及び生活関連製品に由来する化学物質のエストロゲン様作用の評価

a. hERαまたは hERβ受容体に対する結合親和性

ゲニステインは、IC₅₀ で比較したときα受容体よりもβ受容体に約5倍高い結合親和性を有することが認められた。また、ダイゼインは、α受容体よりもβ受容体に約4倍高い結合親和性を有することが認められた。グリシテインでは3倍であった。イコール、クメステロール、フォルモノネチン及びビオカニン A には、そのような傾向は認められなかった。DES を含むアルキルフェノール誘導体については、IC₅₀ の差は最大2倍程度であった。α受容体よりもβ受容体に高い結合親和性を有するのは、ゲニステイン、ダイゼイン及びグリシテインの限られたイソフラボン類の特徴であると考えられ

る。

b. hER α または hER β を導入した酵母 Two-Hybrid 法による植物エストロゲン及びアルキルフェノール誘導体のエストロゲン様作用の評価

植物エストロゲンとアルキルフェノール誘導体のエストロゲン作用を有するものに総じて α 受容体よりも β 受容体に強いエストロゲン様作用が認められた。E₂、ジヒドロテストステロン (DHT) 及びゼラノールについては、エストロゲン様作用の α 受容体と β 受容体との差が数倍程度であった。イソフラボン類及びアルキフェノール類については、この受容体間の差は、5倍から数十倍であった。外因性の化学物質が有するエストロゲン作用は、 α 受容体よりも β 受容体に強く発揮されると考えられる。すなわち、 α 受容体及び β 受容体間での発現量に差がない臓器では、 β 受容体を介した作用がより低濃度で発揮されると予測される。この点についてイソフラボン類とアルキルフェノール類に差はないと考えられる。

このエストロゲン様作用の α 受容体と β 受容体との差は、受容体に対する結合親和性から予測される差よりも大きい。従って、化学物質が受容体に結合した後、受容体に起きる立体構造の変換とそれに伴う転写共役因子のリクルートの効率で差が開いていると予測される。これについてより確実な知見を得るためには、インタクトな受容体を活用した実験系が必要である。

c. hER α または hER β を導入した酵母 Two-Hybrid 法による E₂ との相互作用の評価
およそ EC₅₀ 付近の作用を示す E₂ 存在下で植物エストロゲンの E₂ の作用への影響を調べた。E₂ (0.003 μ M) 存在下、 α 受容体に対してイソフラボン類 (ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテイン、イコール及びクメストロール; 0.1~10 μ M) をそれぞれ作用させた。このとき、観察されるエストロゲン作用の強度は、E₂ を単独で作用させた際の強度にイソフラボン類を単独で作用

させた際の強度を加算したものに匹敵した。このことから、イソフラボン類の α 受容体を介したエストロゲン様作用は、相加的に作用すると考えられた。

β 受容体に対しても同様に E₂ (0.001 μ M) 存在下、イソフラボン類をそれぞれ作用させた。イコール (1.0 μ M) 作用時、観察されるエストロゲン作用の強度は、相加的な作用として予測される作用強度よりも弱かった。このことからイコールは、当該濃度で β 受容体に対して抗エストロゲンの側面を示すと推察された。その他のイソフラボン類の β 受容体を介したエストロゲン様作用は、およそ相加的に作用すると考えられた。

ゼラノール (1.0 μ M) 作用時については、 α 受容体及び β 受容体の双方に対してエストロゲン作用を示す一方で E₂ の作用に対して相加的に作用せず、減弱していることが認められた。ゼアラレノンについては、 α 受容体及び β 受容体ともに抗エストロゲン作用が認められた。

アルキルフェノール誘導体 (ビスフェノール A、ジヒドロキシベンゾフェノン、*t*-オクチルフェノール及びブチルパラベン) についても同様の実験を行った。これら化学物質のエストロゲン様作用は、 α 受容体で相加的な作用を示した。一方、 β 受容体では、*t*-オクチルフェノール及びジヒドロキシベンゾフェノンは、エストロゲン作用を示す一方で E₂ の作用に対して相加的に作用せず、減弱していることが分かった。

2. In vivo および in vitro における Zearalenone と Zeranone のエストロゲン活性の比較

ER 結合試験において、Zeranone は ER α 、 β いずれに対しても Zearalenone に比べ、より高い結合阻害活性を示した。また、子宮肥大試験において、Zeranone は 0.5 mg/kg、Zearalenone は 2 mg/kg 投与によって有意に子宮重量の増加を認めた。以上の結果から、

Zeranol は *in vitro*、*in vivo* 共に Zearalenone よりも強いエストロゲン活性を有することが示唆された。

3. 思春期前 Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol、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、Zearalenone、Zeranol、DES は無処置対照群に比して膣開口を促進し、有意な思春期早発をみたが、Resveratrol や Bisphenol A にはこの作用はみなかった。無処置対照群とともに、Genistein、Resveratrol、Zeranol、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が、Zearalenone 投与動物では、8 週齢時でも 2/6 の動物に黄体欠如をみた。なお、24 週では全例正常の卵巣をみた。また、被験化学物質は 8、24 週齢時ではマウス乳腺の分化には顕著な影響を示さなかった。

4. 思春期前 Zeranol 暴露による雌ラットの発育やエストロゲン標的臓器の比較ならびに乳腺発癌への影響

Zeranol 投与群は膣開口を有意に早発し、発情期の延長に起因する 1 周期長の延長をみた。また、Zeranol の用量依存性に無排卵性卵巣を示唆する黄体欠如卵巣を有する個体をみたが、子宮や膣に形態異常はみとめなかった。また、Zeranol は乳腺発癌には影響はみなかった。

5. 妊娠母体が摂取した植物由来エストロゲン様物質に暴露された出生仔の中樞神経系に及ぼす影響

a. 青斑核カテコールアミンニューロンについて

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 日齢に雌雄の仔ラットについて、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。その結果、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有意に減少し、大量投与群でより強く減少（コントロールの約 8 割程度）していた。また、メスでの減少傾向が強く大量投与群では性差がほとんどなくなっていた。

b. 小脳の分子層について

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ので、それらの研究にあわせ本研究でも分子層の厚さで計測した。各実験条件群 6 例ずつ計測したところ、分子層の厚さは 500～600 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。しかし、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、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したが、分子層／顆粒層比では有意差を認めなかった。

6. 食品関連化学物質の乳汁への移行

昨年度、Bisphenol A について、投与後 2 時間目の搾乳群について単独皮下投与の結果を得ているので、今年度は、Genistein と Resveratrol について投与後 2 時間目の搾乳

群での単独皮下投与、3種混合皮下投与及び3種混合経口投与を行ない血清及び乳汁への移行を調べ、投与方法による違いを検討した。また、3種単独皮下投与の投与後7時間目搾乳群での血清及び乳汁への移行を調べた。

a. 単独皮下投与（投与後2時間目搾乳群）について

昨年度の Bisphenol A の結果も考慮すると、単独皮下投与群（n=5~8）では Bisphenol A、Genistein 及び Resveratrol の血清中総量及び遊離体濃度（平均値）は各々1800 ng/mL（遊離体 300）、218 ng/mL（遊離体 34）、1800 ng/mL（遊離体 200）、そして乳汁中総量及び遊離体濃度は各々590 ng/mL（遊離体 520）、96 ng/mL（遊離体 65）、1400 ng/mL（遊離体 1100）であった。投与した3物質とも遊離体の総量に対する割合は血清（10.7~19.1%）より乳汁（65.1~88.7%）で高い傾向が見られ、遊離体の乳汁/血清比は、Bisphenol A 2.06、Genistein 2.07、Resveratrol 5.46、そして総量の乳汁/血清比は、Bisphenol A 0.34、Genistein 0.48、Resveratrol 0.75 であった。また、Genistein の検出値は他の2物質に比べて全体に10分の1低く、Resveratrol の乳汁中遊離体及び抱合体濃度は Bisphenol A に比べて約2倍と高い傾向が見られた。

b. 混合皮下投与（投与後2時間目後搾乳群）について

3種混合皮下投与（n=7）では、Bisphenol A、Genistein 及び Resveratrol の血清中総量及び遊離体濃度（平均値）は各々1700 ng/mL（遊離体 180）、460 ng/mL（遊離体 110）、1900 ng/mL（遊離体 200）、そして乳汁中総量及び遊離体濃度は各々630 ng/mL（遊離体 360）、220 ng/mL（遊離体 150）、700 ng/mL（遊離体 370）であり、遊離体の総量に対する割合は血清で10.6~24.7%、そして乳汁で50.7~68.7%であった。単独投与と比較すると、Bisphenol A の検出値は同程度であったが、Genistein では単独投与に比べ

て遊離体、総量とも血清及び乳汁中で2倍程度高く検出された。反対に Resveratrol では血清中の各濃度及び乳汁中の抱合体は同程度であったが、乳汁中の遊離体の濃度が約1/3と低く、相互作用が考えられた。

一方、遊離体及び総量の乳汁/血清比は、単独投与のものと同程度であった。

c. 混合経口投与について

3種混合経口投与（n=6）では、Bisphenol A、Genistein 及び Resveratrol の血清中総量及び遊離体濃度（平均値）は各々270 ng/mL（遊離体 8.4）、180 ng/mL（遊離体 7.9）、310 ng/mL（遊離体 3.4）であり、乳汁中総量及び遊離体濃度は各々110 ng/mL（遊離体 21）、170 ng/mL（遊離体 10）、120 ng/mL（遊離体 45）、皮下投与と同様に遊離体濃度は血清中より乳汁中で高く、遊離体の総量に対する割合も血清中で1.1~4.7%、乳汁中で7.3~38.5%と血清に比べて乳汁中では遊離体の割合が高かった。また遊離体濃度は3物質とも1/8以下の低い値となり、経口投与においては皮下投与に比べて抱合体の割合が大きく、低い吸収率と肝臓における初回通過効果の大きいことが示唆された。また、Genistein においては血清中抱合体濃度が皮下投与時の1/2であったが、乳汁中ではむしろ高濃度に検出され、Bisphenol A 及び Resveratrol の検出値に比べて約2倍であった。大豆イソフラボンは通常、マウスの餌の主要成分であり、日常大量に暴露されていることから、マウスでの吸収・代謝機能が発達していることが考えられた。

d. 単独皮下投与（投与後7時間目後搾乳群）について

投与後7時間目搾乳群での Bisphenol A（n=5）、Genistein（n=7）及び Resveratrol（n=6）では、血清中総量及び遊離体濃度（平均値）は各々850 ng/mL（遊離体 9.6）、390 ng/mL（遊離体 85）、320 ng/mL（遊離体 32）であり、乳汁中総量及び遊離体濃度は各々580 ng/mL（遊離体 38）、190 ng/mL（遊離体 120）、190 ng/mL（遊離体 43）検

出された。乳汁では投与後2時間目の搾乳群での検出値と比較すると、Bisphenol A 及び Resveratrol では遊離体濃度が減少したが Genistein ではむしろ高くなり、遊離体の総量に対する割合も Bisphenol A 及び Resveratrol に比べて大きく、有意な差が見られた。Genistein では他の2物質に比べて吸収が緩慢であることが示唆された。

全体の結果より、Bisphenol A、Genistein 及び Resveratrol に関しては、グルクロン酸抱合による代謝は早いものの、体内を循環している代謝物の濃度は遊離体に比べて非常に高い。胃腸管内における抱合体の分解と遊離体の再吸収があることも言われており、体内作用には、抱合体の寄与も考えられる。

また、日本人の総イソフラボンの摂取量は 27.75 mg/day、35 mg/day 程度と報告されており、最近、イソフラボンを高濃度を含む食品やサプリメントが市場に氾濫している状況から、今回の投与量に近い摂取も考えられる。しかし、Bisphenol A については、成人の暴露量は 1 mg/kg/day を超えないと報告されていることから、今回の投与量の 1/10000 であり、抱合体を含めた検出量から考えても、母体が暴露した Bisphenol A の乳汁移行による内分泌かく乱の可能性はないと考えられる。

7. 自己免疫病発症に対する各種内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究

a. 体重および臓器重量

各投与群の体重には有意な差が見られなかった。腎臓および脾臓重量はオスの Resveratrol 投与群で顕著に高かった。リンパ節重量はオス E₂ 投与群、雌雄 Resveratrol 投与群および雌雄 Genistein 投与群で顕著に増加していた。Bisphenol A および Zeranol 投与群はいずれの臓器重量も変化が見られなかった。

タンパク尿症：タンパク尿症罹患率はオスでは Zeranol 投与群が、メスではすべての

投与群が対照群と比較して顕著に高かった。

b. 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 15 mg/ml 投与マウスで有意に高かった。

c. 皮膚炎

オスではすべての投与群で皮膚炎が悪化していた。メスでは Bisphenol A と Genistein 投与群で悪化し、Zeranol 投与群は改善が見られた。

d. 血清学的検査

免疫複合体量はオス E₂ 投与群で有意な上昇が見られ、メス Resveratrol 投与群では有意に低下していた。また、抗 DNA 抗体量は IgM 抗体量はメス Genistein およびオス Zeranol 投与群で、IgG 抗体量はメス Resveratrol 投与群で有意な上昇が見られた。

8. ラット下垂体腫瘍細胞株 MtT/Se の細胞増殖を指標としたエストロゲン活性測定系の確立と応用

MtT/Se細胞を用いてRT-PCRを行いmRNA レベルでのER α 及び β の発現を調べるとER α (344bp) 及びER β (262bp) とともにERの発現を確認することができた。次に、ER α と β に対するプライマーを用いてReal time PCRを行ったところ、ER α ・ β の発現量の割合は75.4 : 24.6となった。さらに、MtT/Se細胞のER α ・ β の発現を確認するため免疫染色した結果、ER α ・ β ともに核及び細胞質共に染まり両方のレセプターが同じ部位に局在していた。MtT/Se細胞に 1×10^{-12} から 1×10^{-6} Mの範囲で17 β エストロジオールを添加すると有意なエストロゲン活性が確認できた。なお、 1×10^{-8} Mの17 β エストロジオールを添加した際のエストロゲン活性は、P値が0.08であり有意傾向があったと推測することができた。次に、MtT/Se細胞を用いた測定系で各種農薬のエストロゲン活性のあった有意差のあった最も低い濃度を検出限界とし比較検討した。

17βエストラジオールの検出限界濃度は 1×10^{-12} M、有機リン系のプロチオホス及びピリプロキシフェンは 1×10^{-6} M、そしてこれらを両方同時に添加した混合物は 1×10^{-7} Mであった。もう一つの有機リン系ダイアジノン 1×10^{-5} M、トリクロホスメチルは 1×10^{-6} M、これらの混合物では 1×10^{-7} Mとなった。防かび剤のOPPとTBZの検出限界濃度は、それぞれ 1×10^{-5} Mであった。これらの混合物では、 1×10^{-7} Mとなり明らかな増強効果が検出された。

9. エストロゲン作用測定のための培養細胞系の樹立と作用機構の解析

a. ラット乳癌細胞株のER発現とp53遺伝子変異

ヒト正常型遺伝子トランスジェニックラット1個体に発生した乳腺腫瘍より乳癌細胞株7株(C1、C2、C3、C6、C11、C15、C17)を樹立した。RT-PCR法によるエストロゲン受容体(ER)遺伝子発現の解析では、ER陰性(C17)、ERαのみ陽性(C1)、ERβのみ陽性(C2、C11)、ERα、β陽性(C3、C6、C15)の各細胞株であることが判明した。一方、細胞増殖ならびにアポトーシス関連分子群とER発現との間には明らかな相関は認められなかった。

DNA傷害等細胞内傷害によるアポトーシス誘導に中心的役割を担うp53の遺伝子変異について解析した。全株についてRT-PCRで全長p53遺伝子が増幅され、大きな欠失等は存在しなかった。また、PCR産物の塩基配列を解析した結果C11のコドン246に1塩基変異が検出された。この変異は、ゲノムDNAの塩基配列解析により確認された。さらに、導入ヒトH-ras遺伝子には全株で変異が認められたのに対して、ラットH-ras遺伝子には変異が見られなかったことは興味深い。

b. ゲニステイン、ダイゼインの細胞増殖活性への影響 ゲニステインおよびダイゼイン (0-10 μM)

添加24時間後での細胞増殖活性への影響をC3(ERα、β陽性)、C11(ERβ陽性)を用いて測定すると、被験物質5 μMまで各々の細胞においても明らかな抑制効果は認めなかったが、10 μM添加で非添加対照群に比較してゲニステイン添加時C3 86%、C11 81%、ダイゼイン添加時C3 92%、C11 95%の増殖活性であった。

c. DNAマイクロアレイ解析

ERβ陽性C11細胞を用いゲニステイン添加後の遺伝子発現変動をDNAマイクロアレイにより解析した。10 μMゲニステイン添加72時間後に2倍以上の発現変動を認めた遺伝子は、発現上昇412個、低下329個の741遺伝子で、全体の3.6%であった。発現上昇群にはIL-3(3.5倍)、IGF-2 binding protein 3(2.3倍)、tumor necrosis factor receptor superfamily 12(2.2倍)、発現低下群にはapoptosis inhibitor 2(1/2.5倍)、cyclin G(1/2.2倍)が含まれており、現在RT-PCR法による確認作業中である。

D. 結論

1. 酵母Two-hybrid法を用いた植物エストロゲン及び生活関連製品に由来する化学物質のエストロゲン様作用の評価

a. イソフラボン類とアルキルフェノール誘導体のエストロゲン作用

単独作用時におけるイソフラボン類及びアルキルフェノール誘導体のエストロゲン様作用は、α受容体よりもβ受容体に強く認められた。また、E₂のエストロゲン作用に対する影響を受容体間で比較したとき、相加的に予測されるエストロゲン作用よりも観察されるエストロゲン作用が減弱される現象は、β受容体で認められた。これらのことからβ受容体は、α受容体よりもイソフラボン類及びアルキルフェノール誘導体等の外因性の化学物質に対する影響を受けやすいと考えられる。すなわち、受容体間での作用傾向にイソフラボン類とアルキルフェノール誘導体との間に差はない。このこと

から、エストロゲン受容体を介した作用に伴う生体影響に限定すると生体内への取り込む量と個々の化学物質の作用の強度が、これら化学物質の生体影響を考えるうえで最も大きな要素であるといえる。

日本人は、大豆食品等を介して1日におよそ20 mgのイソフラボン類を摂取している。エストロゲン受容体を介した作用に限定した場合、アルキルフェノール類よりも強い作用を有するイソフラボン類を多量に摂取している現状で極微量の非意図的なアルキルフェノール類の摂取によるエストロゲン受容体を介した生体影響は、無視できると思われる。

b. イソフラボン類の健康増進作用

イソフラボン類の健康増進作用のうちの乳がん予防効果については、イソフラボン類に4-ヒドロキシタモキシフェンのような明確な抗エストロゲン作用が認められないため、受容体に対する作用のみで結論づけることは困難である。受容体を介した作用では、 β 受容体に対して単独でエストロゲン様作用を有するイコールが E_2 と共存するときに相加的に予測されるエストロゲン作用よりも減弱したことは興味深い。受容体との結合様式を結晶解析した報告ではゲニステインは、乳房で抗エストロゲン作用を示す4-ヒドロキシタモキシフェン及びラロキシフェンと同様に転写抑制型のコンフォメーションを示すことが示されている。イソフラボン類には、受容体に対する直接作用以外、すなわち、性ホルモン結合グロブリンの増産、チロシンキナーゼ阻害作用及び抗酸化作用があるため、乳がんの予防効果に対しては総合的に解釈する必要がある。

β 受容体の発現量が多い前立腺と骨細胞に対する健康増進作用（前立腺がん及び骨粗鬆症の予防）には、イソフラボン類の β 受容体を介したエストロゲン様作用に起因すると考えることは合理的である。閉経後骨粗鬆症に対して、 β 受容体に強いエスト

ロゲン作用を有するイソフラボン類で不足するエストロゲン作用を補うことは、イソフラボンのエストロゲン様作用の有効活用例として考えられる。作用が強く安全に食品から摂取できるイソフラボン類は、これら β 受容体を介した健康増進作用を期待するうえで有望であると考えられる。

2. In vivo および in vitro における Zearalenone と Zeranol のエストロゲン活性の比較

本研究の結果から、Zeranol は Zearalenone よりもエストロゲンレセプターへの結合活性が強く、また子宮肥大法でもより低濃度で子宮重量を増加させる作用を有することが判明し、また他の環境ホルモン物質と比べて非常に高いエストロゲン活性を有していることが明らかとなった。

3. 思春期前 Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol、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、Zeranol、Bisphenol A、DES のマウスの思春期前暴露（15-18日齢の雌マウスに連日被験物質を皮下投与）では、思春期発来（膣開口）は Genistein、Zearalenone、Zeranol、DES で有意に早発したが、Resveratrol や Bisphenol A にはこの作用はなかった。また、Zearalenone の思春期前暴露は他の被験物質に比して無排卵性卵巣が持続した。しかし、いずれのエストロゲン様化学物質投与でも乳腺の分化には顕著な影響をみなかった。

4. 思春期前 Zeranol 暴露による雌ラットの発育やエストロゲン標的臓器の比較ならびに乳腺発癌への影響

Zeranol のラットへの思春期前暴露（0.1, 10 mg/kg）は膣開口を早発し、発情期の延長をみとめ、用量依存性にラットに無排卵性卵巣を惹起したが、MNU 誘発乳癌に影響

をみななかった。

5. 妊娠母体が摂取した植物由来エストロゲン様物質に暴露された出生仔の中樞神経系に及ぼす影響

以上、実験生物学的には、Genistein 無摂取群に対して摂取群は影響を受けていると言わざるを得ない。カテコールアミンニューロン数の現象がどのような機能変化をもたらすかは現在のところ不明である。小脳の分子層／顆粒層比の結果からは機能面にはあまり影響しないであろうと考えられる。低量投与が常食量相当であることも考え合わせると、ゲニスタインの母体摂取にそれほど神経質になる必要はないかもしれない。つまり、有史以来の動物環境を考えると、コントロールと同じ無摂取状態は考えられないので、むしろ常食量とかけ離れて少ない（または多い）摂取の場合の身体機能への影響についての詳細な調査をおこなう必要がある。

6. 食品関連化学物質の乳汁への移行

a. 単独皮下投与群では投与後 2 時間目に搾乳し、搾乳直後に採血して、Bisphenol A、Genistein 及び Resveratrol の乳汁中総量（平均値）が各々 590 ng/mL（遊離体 520）、96 ng/mL（遊離体 65）1400 ng/mL（遊離体 1100）検出され、Genistein の検出値は他の 2 物質に比べて低かった。3 物質とも遊離体の総量に対する割合は血清（10.7～19.1%）より乳汁（65.1～88.7%）で高い傾向が見られた。また 7 時間目搾乳群においては、2 時間目搾乳群と比較すると、Bisphenol A 及び Resveratrol では遊離体濃度が減少したが Genistein ではむしろ高くなり、他の 2 物質に比べて吸収が緩慢であることが示唆された。

b. 3 種混合皮下投与においては、若干の値変化が見られ、相互作用が考えられたものの単独投与と同程度の検出値であった。

c. 混合経口投与においては、混合皮下投

与と比較すると、遊離体濃度は 8 分の 1 以下の低い値で、遊離体の割合も血清中で 1.1～4.7%、乳汁中で 7.3～38.5%と、皮下投与に比べて抱合体の割合が大きく、低い吸収率と肝臓における初回通過効果の大きいことが示唆された。また、Genistein において乳汁中の抱合体が他の 2 物質より高く、経口摂取における吸収・代謝機能が発達していることが考えられた。

7. 自己免疫病発症に対する各種内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究

本研究の結果から、エストロゲン活性を有する環境ホルモン物質である Bisphenol A、Genistein、Resveratrol および Zeranol 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、特に腎炎の悪性進展を促進することが示唆された。そのため、これらの物質の自己免疫病患者の摂取、特に日本人が多く摂取している Genistein の摂取について詳細に検討する必要があると考えられた。

8. ラット下垂体腫瘍細胞株 MtT/Se の細胞増殖を指標としたエストロゲン活性測定系の確立と応用

エストロゲン活性を検出する測定系にエストロゲン受容体と結合する結合試験、エストロゲン受容体を導入したほ乳類動物細胞や酵母をもちいる測定系がある。今回使用したラット下垂体腫瘍細胞 MtT/Se 細胞は、エストロゲン受容体を有し mRNA での ER $\alpha \cdot \beta$ の発現量を比で表すと ER α の方が ER β より優位であった。この細胞を用いたエストロゲン活性の測定法は、主として ER α を介し ER α 型の活性を検出していると推測できる。エストロゲン様作用のもつ農薬は、我々が日常遭遇する 1 つの農作物から同時に検出されることより、農作物中に存在する検出頻度の高い 2 種類を組み合わせてみたところ、有機リン系 2 種類、防かび剤 1 種類の合計 3 種類の農薬の組み合わせ