

せ全てにエストロゲン活性の増強が確認された。しかし、この農薬の濃度は環境省が定める残留基準値の100倍から1000万倍摂取するとはじめてヒトへの影響が懸念される可能性がある。これより農薬によるエストロゲン活性の複合効果による増強作用は直ちにヒトへの影響を及ぼす可能性は低いと推測される。

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。ER遺伝子発現の解析では、ER陰性1株、ER α のみ陽性1株、ER β のみ陽性2株、ER α 、 β 陽性3株であった。ER α 、 β 陽性C3細胞とER β 陽性C11細胞に対して10 μ Mゲニステインには弱い増殖抑制を認めたが、10 μ Mダイゼインは無効であった。C11細胞を用い10 μ M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すると、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。今後、クラスター解析による変動遺伝子群の分類およびRT-PCR法による確認作業を行う予定である。

E. 健康危険情報
特記事項なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nikaido Y, Yoshizawa K, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A. Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reprod Toxicol* 18 (6): 803-811, 2004.

2. Yuri T, Nikaido Y, Shimano N, Uehara N, Shikata N, Tsubura A. Effects of prepubertal zeranol exposure on estrogen target organs and *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats. *In Vivo* (in press).
 3. Tsubura A, Uehara N, Kiyozuka Y, Shikata N. Dietary factors modifying breast cancer risk and relation to time of intake. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (in press).
 4. Nikaido Y, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A. Effects of prepubertal exposure to xenoestrogen on development of the estrogen target organs in female CD-1 mice. *In Vivo* (in press).
 5. Hamaguchi T, Matsuoka Y, Bechberger J, Ohnishi T, Fujita K, Naus CC, Kusunoki M, Tsubura A, Tsuda H. Establishment of an apoptosis-sensitive rat mammary carcinoma cell line with a mutation in the DNA-binding region of p53. *Cancer Lett* (in press).
 6. 裴 仁正, 四方伸明, 垵 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* 13: 41-46, 2004.
 7. 井岡真基, 片岡洋祐, 山田久夫. 食品中・植物由来エストロゲン様物質の母体摂取が仔ラットの男性生殖器系に及ぼす影響. *医学のあゆみ* (投稿中).
 8. 螺良愛郎. 厚生労働科学研究費補助金, 化学物質リスク研究事業「内分泌かく乱物質と大豆等既存食品の発育・癌化及び内分泌かく乱作用の比較」平成15年度総括・分担報告書.
2. 学会発表
 1. 垵 貴司, 生田明子, 中元 剛, 安原正浩, 吉村智雄, 清塚康彦, 螺良愛郎, 神崎秀陽. 思春期前雌 Sprague-Dawley ラットに対する Zeranol の内分泌かく乱

作用. 第 56 回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 4 月, 2004.

2. 垵 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. 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, 6 月, 2004.
3. 島野直人, 段原直行, 垵 貴司, 辻田 (久徳) 美樹, 二階堂泰資, 螺良愛郎. Indole-3-carbinol の思春期前暴露による MNU 誘発ラット乳癌におよぼす影響. 第 93 回日本病理学会, 札幌, 6 月, 2004.
4. 井岡真基, 片岡洋祐, 山田久夫. 植物由来エストロゲン様物質の胎児期暴露が中枢神経におよぼす影響. 第 31 回日本神経内分泌学会, 弘前, 10 月, 2004.
5. 高取 聡, 北川陽子, 田中之雄, 西川淳一, 西原 力, 螺良愛郎, 西山利正, 堀伸二郎. イソフラボン類とアルキルフェノール誘導体とのエストロゲン様作用の比較. 第 7 回環境ホルモン学会, 名古屋, 12 月, 2004.
6. 大前壽子, 北田善三, 茶山和敏, 螺良愛郎, 今井俊介. LC/MS/MS によるマウス血清、乳汁のビスフェノール A 及び植物エストロゲンの一斉分析法の開発. 第 7 回環境ホルモン学会, 名古屋, 12 月, 2004.
7. 茶山和敏, 螺良愛郎. マウス自己免疫病発症に対するビスフェノール A およびゲニステインの影響. 第 7 回環境ホルモン学会, 名古屋, 12 月, 2004.
8. 竹村ひとみ, 茶山和敏, Bao Ting Zhu, 螺良愛郎, 下位香代子. Zearalenone および Zeranol のエストロゲン様作用の比較. 第 7 回環境ホルモン学会, 名古屋, 12 月, 2004.
9. 眞鍋真理, 神田靖士, 小嶋美穂子, 堀伸二郎, 西山利正. 複数農薬共存農作物におけるエストロゲン活性エンハンス効果. 第 7 回環境ホルモン学会, 名

古屋, 12 月, 2004.

- G. 知的財産権の出願・登録状況なし。

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）

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

主任研究者：螺良 愛郎

関西医科大学病理学第二講座

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

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

研究要旨

イソフラボン類とアルキルフェノール誘導体とのヒトエストロゲン受容体 α 及び β に対する結合親和性とエストロゲン様作用を比較した。これら化学物質群の双方に α 受容体よりも β 受容体に高い結合親和性を示す傾向が認められた。酵母 Two-Hybrid 法を用いて、これら化学物質群のエストロゲン様作用を評価した結果、結合親和性の結果と同じく 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。これら化学物質群の17 β -エストラジオール (E_2) のエストロゲン作用への影響を調べた結果、 β 受容体に対してイコール、2,4-ジヒドロキシベンゾフェノン及び *p*-アルキルフェノールは、エストロゲン様作用を示す濃度範囲において E_2 のエストロゲン作用を減弱することが認められた。

A. 研究目的

エストロゲン受容体には α 受容体 ($ER\alpha$) 及び β 受容体 ($ER\beta$) 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 (Kuiper, GGJM, et al., *Endocrinology*, 138, 863, 1997)。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イソフラボン類とアルキルフェノール誘導体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検討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く乱作用に対する懸念について考察するうえで役立つと期待される。

B. 研究方法

B-1. 受容体結合試験

Ligand Screening System (Estrogen Receptor α/β , TOYOCO 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、抗エストロ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ロ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ロジオールが増加し、これによってペルオキシダーゼ標識エストロジオールの抗エストロ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-2. 酵母 Two-Hybrid 法

hER-GAL4DBD (human estrogen receptor α/β -GAL4 DNA binding domain fusion protein) 及び 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 μ 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。

B-3. 酵母 Two-Hybrid 法による E_2 との相互作用の評価

EC_{50} 付近の作用を示す E_2 存在下 (α 受容体, 3.0×10^{-3} μ M ; β 受容体, 1.0×10^{-3} μ M) もしくは非存在下で化学物質を B-2 に示した方法に従って酵母に作用させた。 E_2 存在下で認められる β -ガラクトシダーゼ活性 (A) から非存在下で認められる β -ガラクトシダーゼ活性 (B) を差し引き ($C=A-B$)、 E_2 単独作用時 (α 受容体, 3.0×10^{-3} μ M ; β 受容体, 1.0×10^{-3} μ M) に認められる β -ガラクトシダーゼ活性 (D) と比較した。スキーム 1 に詳細を記した。

C. 結果及び考察

C-1. hER α または hER β 受容体に対する結合親和性

ゲニステイン及びダイゼインは、 IC_{50} で比較したとき 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 (表 1)。グリシテインでは 3 倍であった。アルキルフェノール誘導体については、 IC_{50} の差は最大 2 倍程度であった。総じてイソフラボン類とアルキルフェノール誘導体の受容体に結合親和性を有するものに α 受容体よりも β 受容体が高い結合親和性を示す傾向が認められた。この傾向は、ゲニステイン、ダイゼイン及びグリシテインに顕著である。

C-2. 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の評価

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を有するものに α 受容

体よりもβ受容体に強いエストロゲン様作用を示す傾向が認められた(表2及び図1A-C)。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。一方、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から数十倍であった。酵母 Two-Hybrid 法で観察される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。Kuiper らは、hERα 及び hERβ に対する化学物質の結合親和性と転写活性化能の比較を行っている(Kuiper, GGJM., et al., *Endocrinology*, 139, 4252, 1998)。イソフラボン類が ERα よりも ERβ に高い結合親和性を示した点で本研究と一致するが、転写活性化能で比較した際には、そのような差は認めていない点で異なる。これらについてより確実な知見を得るためには、完全な構造を有する受容体を活用した実験系が必要である。また、同時に受容体の構造変換及び転写共役因子のリクルート過程等のリガンド結合過程から転写活性化に至る各過程について個々に検討する必要があると思われる。

イソフラボン類とアルキフェノール誘導体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たとき、β受容体を多く発現する器官に強く作用することが予測される。また、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フェノール類のエストロゲン受容体を介した作用に差は僅少と思われる。

C-3. 酵母 Two-Hybrid 法による E₂ との相互作用の評価

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。ゼラノール (1.0 μM) 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(図2A)。これは、Kuiper らの報告と一致する(Kuiper, GGJM., et al., *Endocrinology*, 139, 4252, 1998)。

α受容体を発現している酵母に対し E₂ (3.0 × 10⁻³ μM) 存在下、イソフラボン類をそれぞれ作用させた(図2B)。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相当した。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受容体を発現している酵母に対しても同様に E₂ (1.0 × 10⁻³ μM) 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 μM) 作用時、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、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。ゲニステインについても同様の傾向が認められた。クメストロールについては、単独で作用させた際の酵素活性が高く、単独での酵素活性に一定濃度で加えた E_2 の酵素活性を足した時点で、酵母 Two-Hybrid 法で観察される酵素活性の上昇が飽和する可能性がある。すなわち、酵素活性の和が、 E_2 1.0×10^{-7} M 作用時の酵素活性を越えるとき、評価が困難とした。このため、実験できる濃度範囲に限られ、十分に検討はできなかった。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。

アルキルフェノール誘導体についても同様の実験を行った (図 2C)。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 2,4-ジヒドロキシベンゾフェノン、エストロゲン作用を示す一方で E_2 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。

D. 結論

D-1. 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

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、 E_2 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が 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僅少であると思われる。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、食餌を介して多量のイソフラボン類を摂取している (Nakamura, Y., et al., *J. AOAC Int.*, 83, 635, 2000; Arai, Y., et al., *J. Nutr.*, 130, 2243, 2000)。その量は、Nakamura らの報告で 27.8 mg/day、Arai らの報告では、47.2 mg/day である。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、わずかであると推察される。

D-2. 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 (Pike, A. C., *et al.*, *EMBO J.*, 18, 4608, 1999)。

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 (SHBG) の増産 (Mousavi, Y. and Adelercreutz, H., *Steroids*, 58, 301, 1993)、チロシンキナーゼ阻害作用 (Fotsis, T., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 2690, 1993) 及び抗酸化作用 (Wei, H., *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 208, 124, 1995) 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。

イソフラボン類の摂取が、前立腺がんのリスクを低下させると考えられている。また、骨粗鬆症の改善についても有効であると考えられている (Baird, D.D., *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80, 1685, 1995; Brezezinski, A., *et al.*, *Menopause*, 4, 89, 1997; Fujita, T. and Fukase, M., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 200, 149, 1992)。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。大豆に多く含まれる、ゲニステイン、ダイゼイン及びグリシテインはβ受容体に強いエストロゲン作用を示す。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効であると思われる。

食品から安全に摂取できるイソフラボン類のエストロゲン受容体を介した作用の特性を理解することは、イソフラボン類を含む食品による疾病予防効果を正しく理解し、食生活への適用を効率的に普及させることに役立つ。このためには、今後、ヒトの日常的摂取量を反映した動物実験が必要である。本研究データは、受容体結合試験と酵母 Two-Hybrid 法の化学物質の作用点が明確な方法から得たものである。今後、イソフラボン類を含むエストロゲン受容体を介した作用を有する化学物質の動物実験を行うための基礎データとして活用できる。

E. 健康危険情報

なし

F. 学会及び論文報告

学会発表

1: 「イソフラボン類とアルキルフェノール誘導体とのエストロゲン様作用の比較」; 高取 聡, 北川陽子, 田中之雄, 西川淳一, 西原力, 螺良愛郎, 西山利正, 堀 伸二郎; 第7回環境ホルモン学会研究報告会; 2004年12月、名古屋

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Compounds	IC ₅₀ (μM)		IC ₅₀ (α) / IC ₅₀ (β) *
	α	β	
DES	0.016	0.023	0.70
5-α-Dihydrotestosterone	1.0	1.8	0.56
Coumestrol	0.29	0.19	1.5
Equol	0.088	0.070	1.3
Genistein	0.10	0.027	3.7
Daidzein	0.28	0.074	3.8
Glycitein	60	21	2.9
Formononetin	3.8	5.2	0.73
Biochanin A	1.0	1.2	0.83
Ipriflavone	> 100	>100	—
Isoflavone Glycosides**	> 100	>100	—
2,4-Dihydroxybenzophenone	5.0	2.6	1.9
<i>t</i> -Octylphenol	5.8	2.4	2.4
<i>t</i> -Butylphenol	50	25	2.0
Butylparaben	27	50	0.54
Methylparaben	>100	>100	—
Bisphenol A	1.4	0.97	1.4
Resveratrol***	7.6	7.9	0.96
Zeranol	0.017	0.020	0.85
Zearalenone	0.030	0.026	1.2
Raloxifene	0.019	0.026	0.73
4-Hydroxytamoxifen	0.13	0.18	0.72

表 1 : 受容体結合試験の結果 (IC₅₀μM).

* : IC₅₀ (α) / IC₅₀ (β); 受容体αIC₅₀の受容体βIC₅₀に対する比, ** : Isoflavone Glycosides: Genistin, Daidzin, Glycitin, Ononin (Formononetin 7-Glycoside), Biochanin A 7-Glycoside.

*** : 遮光下で調製及び実験したため、*trans* 体が主成分と推察される。

Compounds	α		β	
	EC ₁₀ (μ M)	1/RA*	EC ₁₀ (μ M)	1/RA*
E ₂	5.4 x 10 ⁻⁴	1.0	2.2 x 10 ⁻⁴	1.0
Estrone	1.9 x 10 ⁻³	3.5	2.5 x 10 ⁻⁴	1.1
DES	5.0 x 10 ⁻⁴	0.93	1.0 x 10 ⁻⁴	0.45
5- α -Dihydrotestosterone	6.6	12000	3.2	15000
Coumestrol	0.12	220	0.012	55
Equol	1.9	3500	0.12	550
Genistein	2.1	3900	0.06	270
Daidzein	>100	>190000	2.8	13000
Glycitein	>100	>190000	>100	>450000
Formononetin	>100	>190000	>100	>450000
Biochanin A	>100	>190000	5.6	25000
Ipriflavone	>100	>190000	>100	>450000
Isoflavone Glycosides**	>100	>190000	>100	>450000
2,4-Dihydroxybenzophenone	19	35000	0.37	1700
<i>t</i> -Octylphenol	7.0	13000	1.1	5000
<i>t</i> -Butylphenol	>100	>190000	5.0	23000
Butylparaben	30	56000	1.1	5000
Methyparaben	>100	>190000	>100	>450000
Bisphenol A	120	220000	18	82000
Resveratrol	>100	>190000	>100	>450000
Zeranol	0.11	200	0.03	140
Zearalenone	50	93000	>100	>450000
Raloxifene	>100	>190000	9.2	42000
4-Hydroxytamoxifen	>100	>190000	>100	>450000

表2 : 酵母 Two-Hybrid 法によるエストロゲン様作用の評価.

* : 化学物質の EC₁₀/E₂ の EC₁₀; 化学物質の EC₁₀ の E₂ の EC₁₀ に対する比. ** : Isoflavone Glycosides: Genistin, Daidzin, Glycitin, Ononin (Formononetin 7-Glycoside), Biochanin A 7-Glycoside. *** : 遮光下で調製及び実験したため、*trans* 体が主成分と推察される。

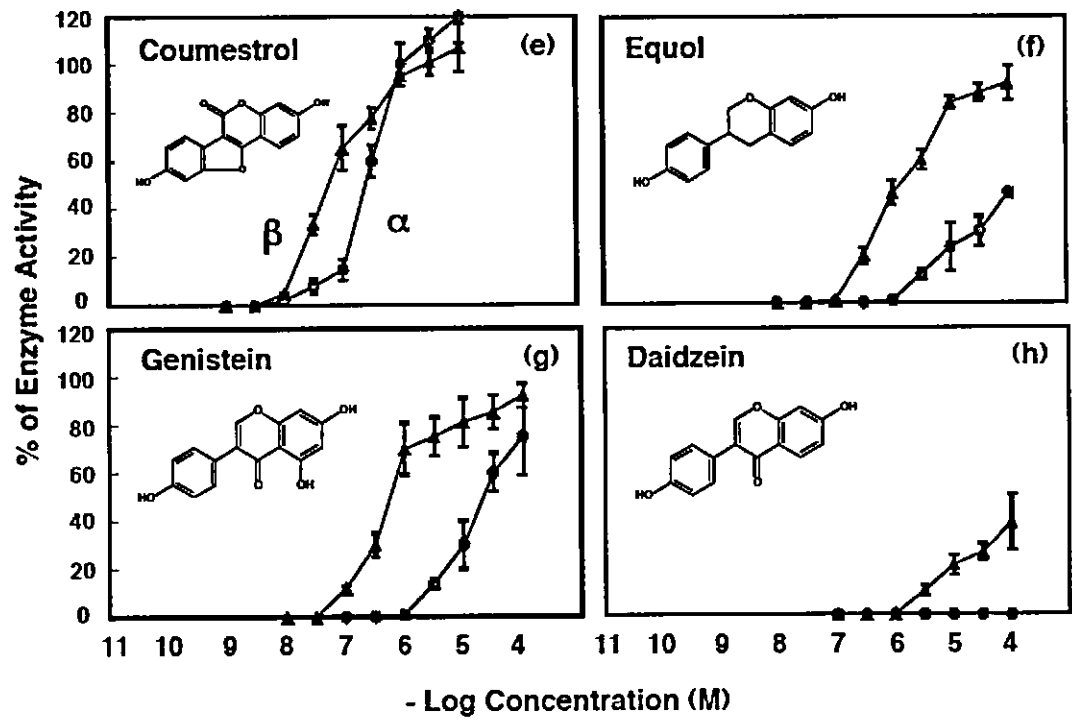
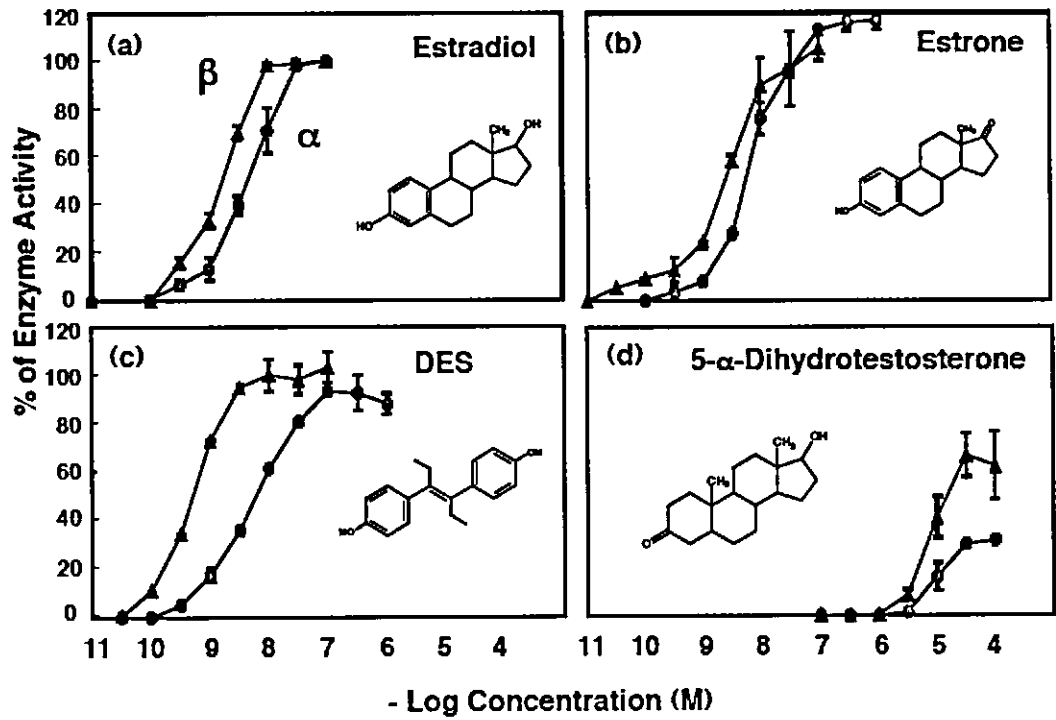


図 1A: 酵母 Two-Hybrid 法によるエストロゲン様作用の評価; 用量反応曲線 (a) — (h). 縦軸は、E₂ 1.0 × 10⁻⁷ M 作用時における酵素活性を 100% としたときの相対活性。
●, α; ▲, β.

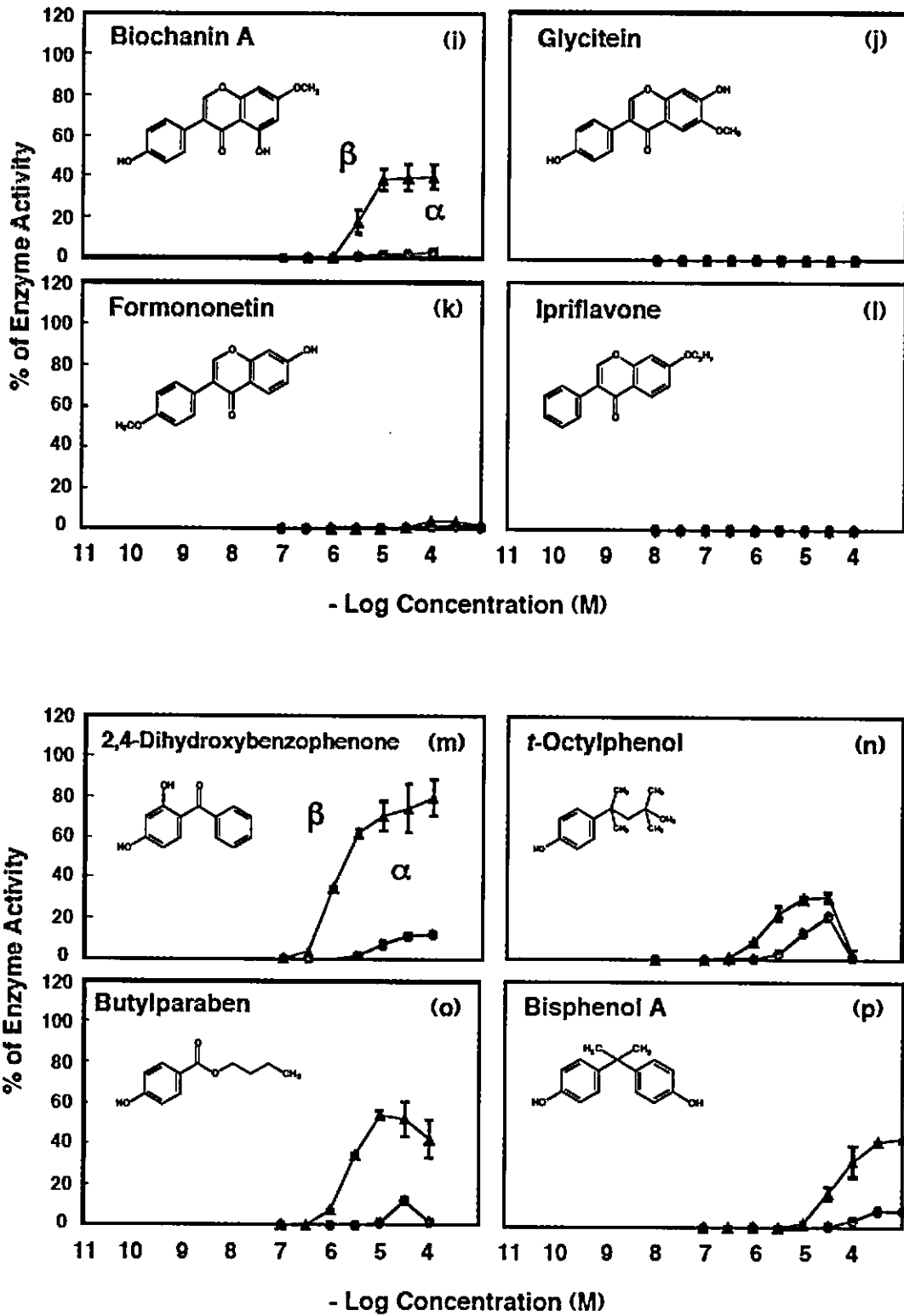


図 1B: 酵母 Two-Hybrid 法によるエストロゲン様作用の評価; 用量反応曲線 (i) — (p).

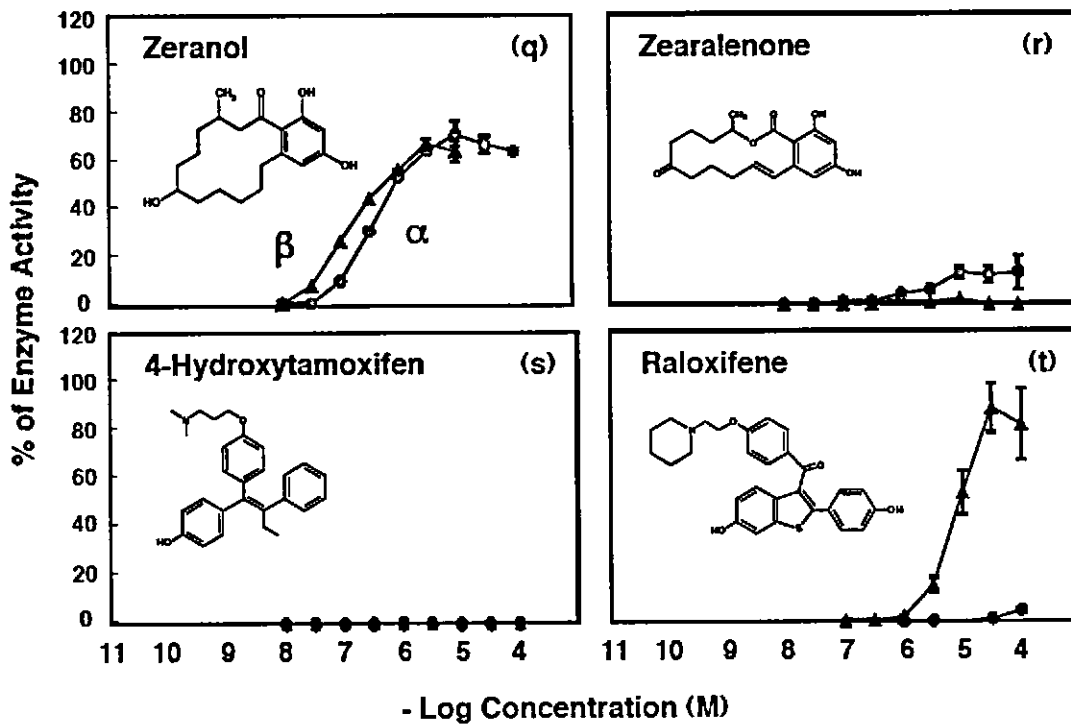
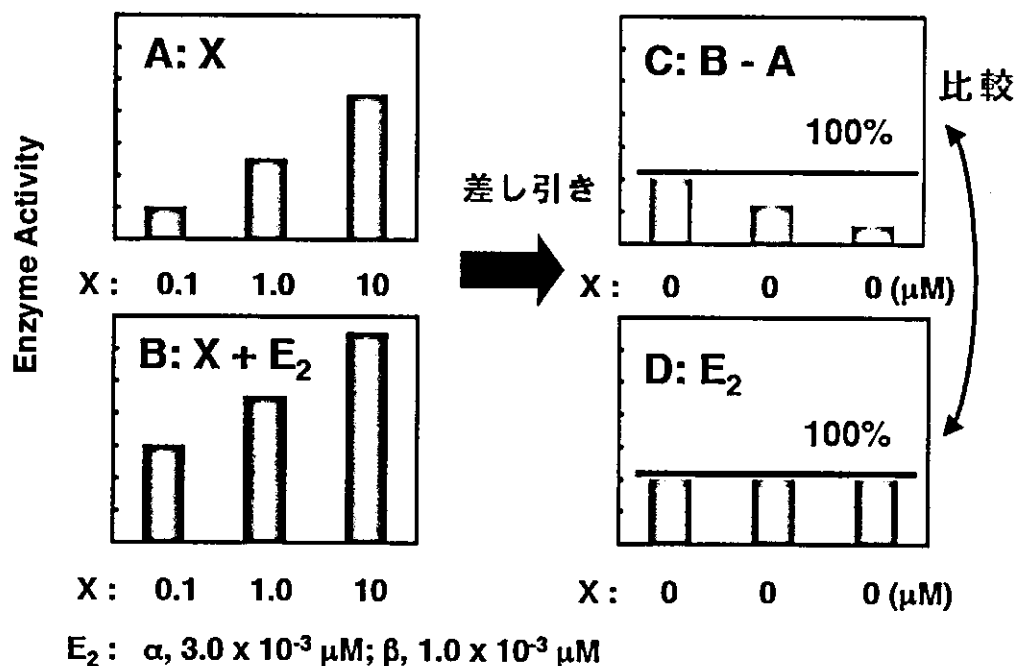


図 1C: 酵母 Two-Hybrid 法によるエストロゲン様作用の評価; 用量反応曲線 (q) — (t).



スキーム1：化学物質の E₂ のエストロゲン作用への影響（酵母 Two-Hybrid 法）。

単独でエストロゲン様作用を示しうる化学物質(A)。一定濃度の E₂ (α, 3.0 × 10⁻³ μM; β, 3.0 × 10⁻³ μM) を共存させたとき、観察される酵素活性は、E₂ のエストロゲン作用に由来する酵素活性分が上昇して観察される (B)。(B)から(A)を差し引くと実際の E₂ のエストロゲン作用に由来する酵素活性が算出される(C)。E₂ 単独で作用させたときの酵素活性(D)を100%として(C)と比較する。

(1) : (C) ≒ (D) のとき、実験濃度において化学物質は、当該濃度の E₂ のエストロゲン作用に影響を示さない、すなわち、化学物質がエストロゲン作用を示す場合は、相加的作用を示すと推察される。E₂ を単独で作用させたときの酵素活性(D)に付随して観察される標準偏差(SD)を求め、100 ± 2SD%を(C) ≒ (D)の範囲とした。

(2) : (C) < (D) のとき、実験濃度において化学物質は、当該濃度の E₂ のエストロゲン作用を減弱すると考えられる。化学物質がエストロゲン作用を示す場合は、パーシャルアゴニスト作用を示すと推察される。化学物質がエストロゲン作用を示さない場合は、純粋な阻害作用を示すと推察される。

(3) : (C) > (D) のとき、実験濃度において化学物質は、当該濃度の E₂ のエストロゲン作用を増強すると考えられる。化学物質がエストロゲン作用を示す場合は、相乗作用を示すと推察される。

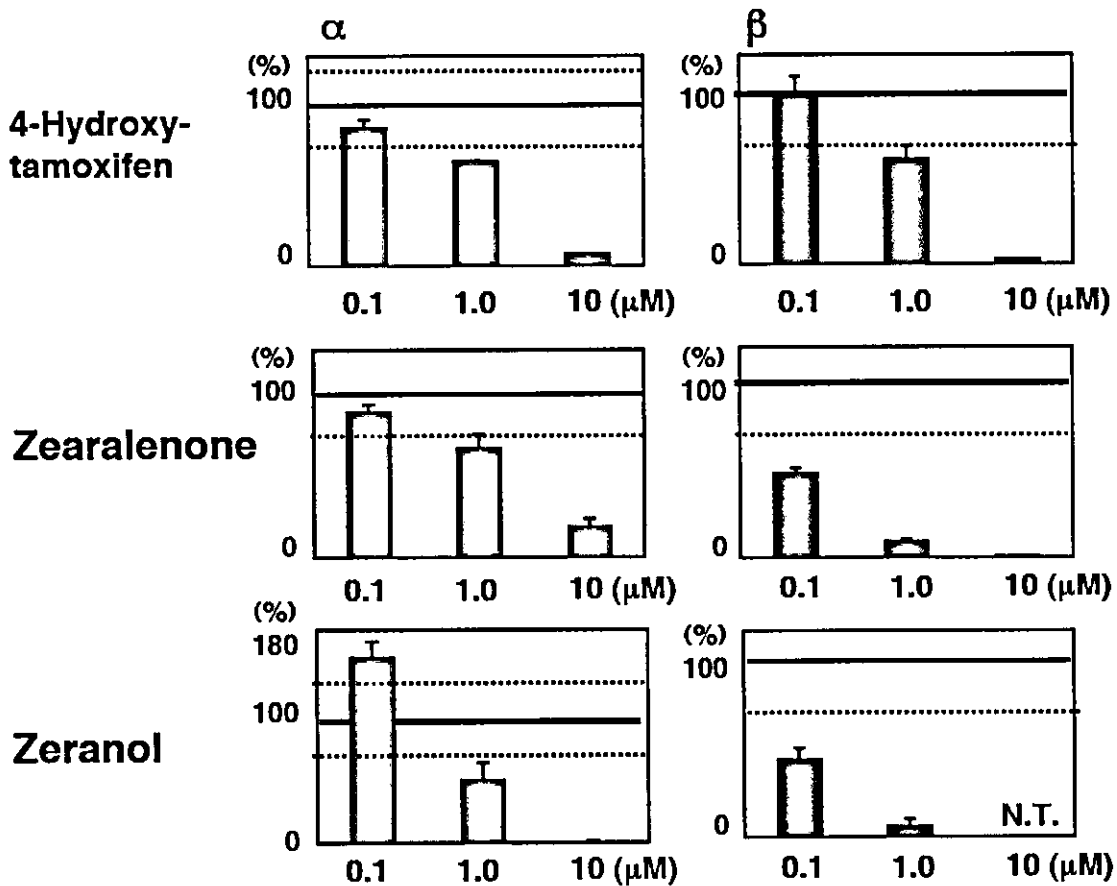


図 2A : 化学物質の E_2 のエストロゲン作用への影響.

単独でエストロゲン様作用を示しうる化学物質と一定濃度の E_2 (α , $3.0 \times 10^{-3} \mu\text{M}$; β , $3.0 \times 10^{-3} \mu\text{M}$) を共存させたとき、観察される酵素活性から化学物質単独で作用させた酵素活性を差し引いた。 E_2 単独作用時のエストロゲン作用に由来する酵素活性を 100%として実線で示した。 E_2 を単独で作用させたときの酵素活性に付随して観察される標準偏差 (SD) を求め、 $100 \pm 2\text{SD}\%$ を破線で示した。

N. T. : Not tested, 化学物質単独で作用させた際の酵素活性及び単独で一定濃度で加えた E_2 の酵素活性を足した時点で、酵母 Two-Hybrid 法で観察される酵素活性の上昇が飽和する可能性がある。すなわち、酵素活性の上昇がプラトーになる E_2 ($1.0 \times 10^{-7}\text{M}$) 作用時の酵素活性を越える。この時点で正しく相加的作用を観察することが困難と考えられることから実験結果を示さなかった。

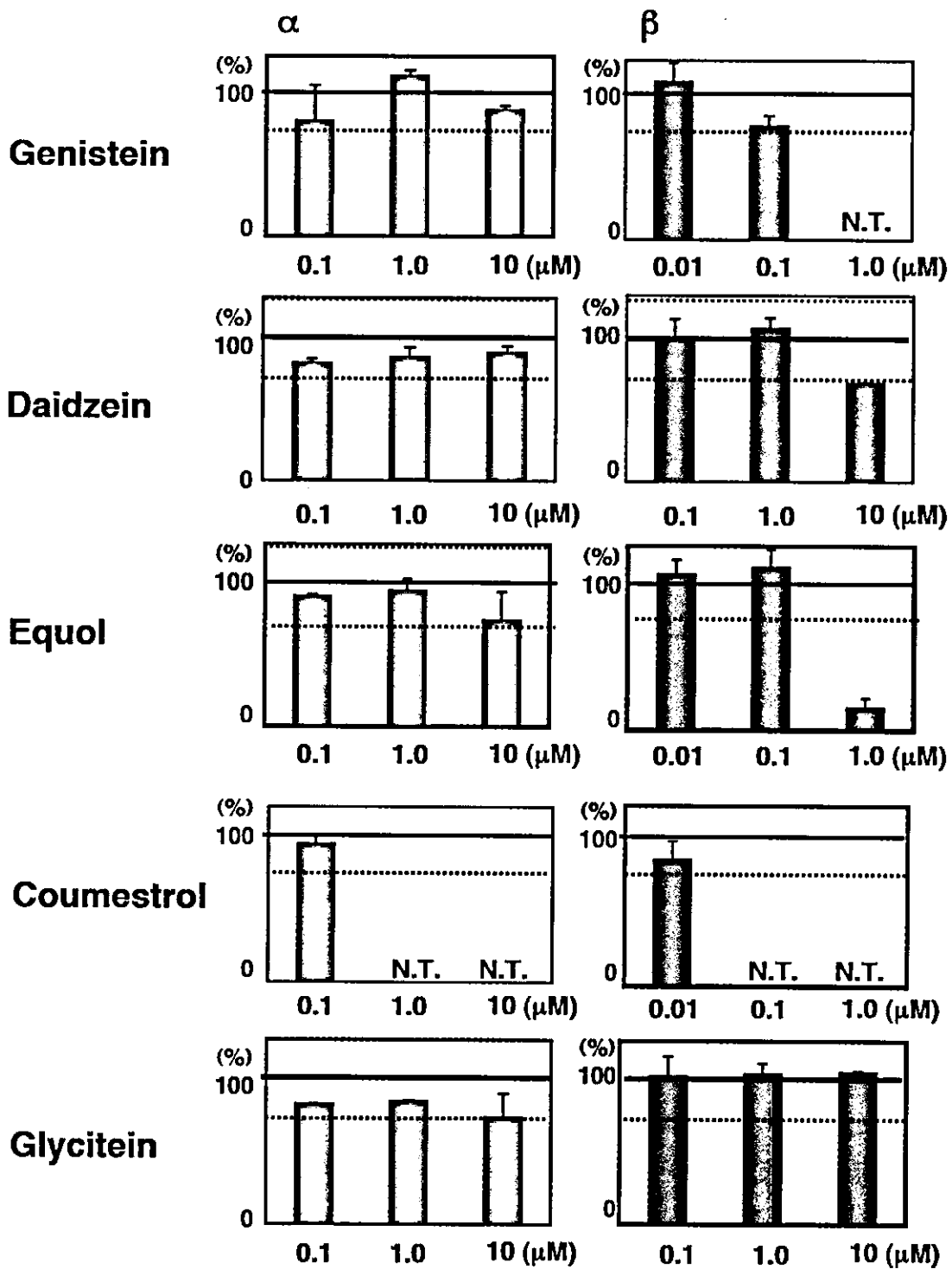


図2B：化学物質の E₂ のエストロゲン作用への影響.

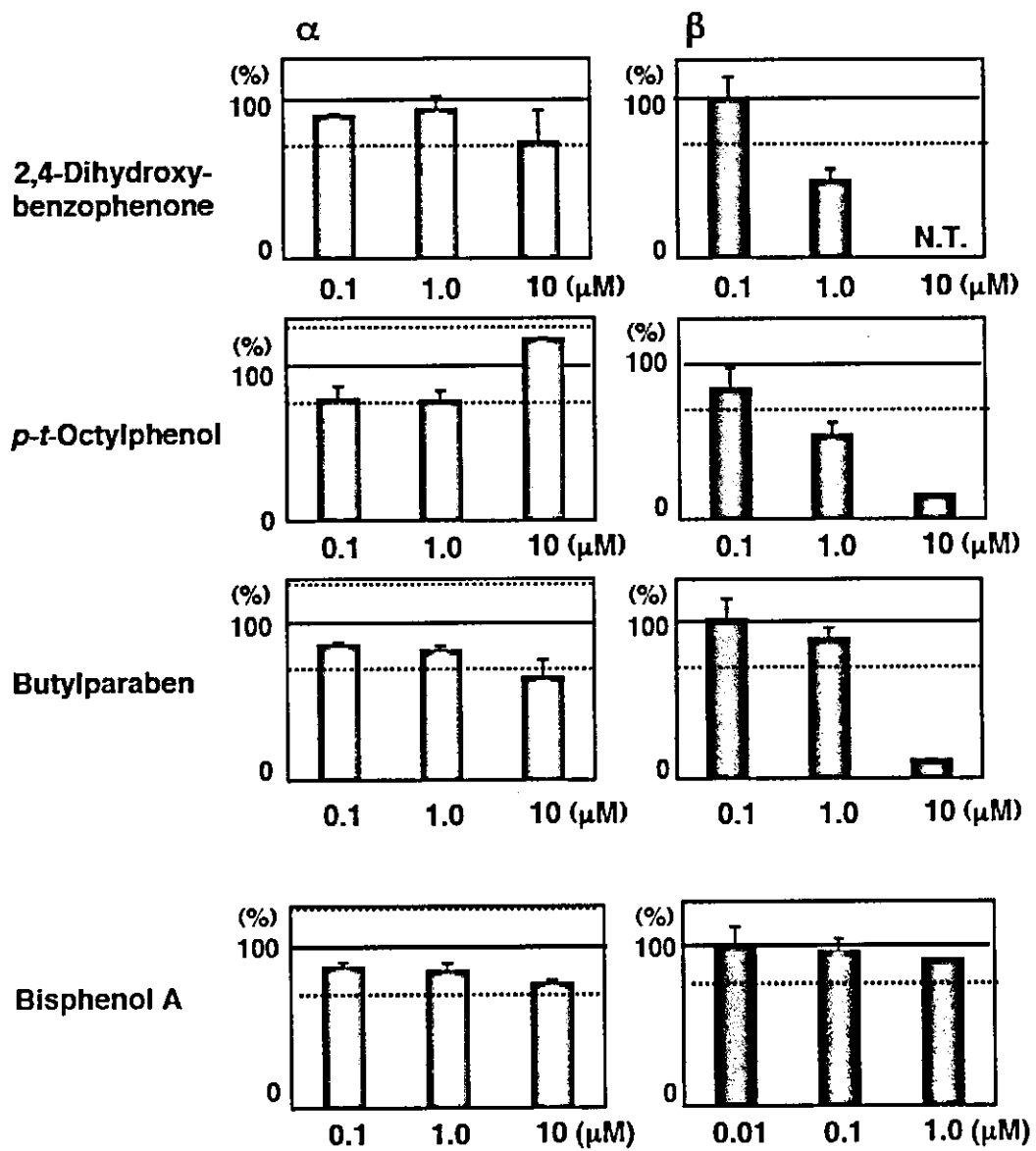


図 2C : 化学物質の E₂ のエストロゲン作用への影響.

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）
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

天然エストロゲン様化学物質の思春期前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 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

研究要旨

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 µg/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。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。

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 や Zeranol 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^{1,2)}。

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児の雌性生殖器に、機能・形態的異常の出現や、膣淡明細胞癌の発生が知られている³⁾。平成 14・15 年度の本研究として^{4,5)}、Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A、DES 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 4、8、12、16 週齢時に屠殺して比較した。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膣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 週齢時で乳腺の分化の抑制をみた。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 の作用はより持続すると結論できる。また、Genistein、Resveratrol、Zearalenone といった天然化学物質のラットへの思春期前暴露実験を行った。方法は 15-19 日齢にかけて連日計 5 回、投与量は Genistein の少量 (1.5 mg/kg) と大量 (30 mg/kg)、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) とに設定して皮下投与し、*N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) の腹腔内投与による乳腺発癌試験も併せて行った。その結果、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。乳腺発癌は、Genistein、Resveratrol、Zearalenone ともヒトの摂取量 (暴露量) を勘案すると、増悪作用はない。今年度はマウスにおける Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol、Bisphenol A、DES の思春期前暴露実験を行い、その作用強度を比較するとともに、Zeranol のラットにおける思春期前暴露による雌性生殖器や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

生後 14 日齢の雌の CD-1 (ICR) マウスと Sprague-Dawley ラット (ともに哺乳親つき) を日本チャールス・リバー (それぞれ厚木ならびに日野飼育センター) より購入し、関西医大実験動物共同利用施設にて室温 22±2°C、湿度 60±10%、12 時間照明の環境下で飼育した。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 (ホワイテ・フレック、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⁶⁾。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)、Zeranol (6-6,10-dihydroxyundecyl-β-resorcylic acid lactone) は和光純薬 (大阪) より購入し、Resveratrol

(3, 4', 5-trihydroxy-trans-stilbene)、Zearalenone (6-(10-hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl) β -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°C に貯蔵し、使用直前に dimethylsulfoxide

(DMSO ; ナカライテスク、京都) に溶解し、暗所 4°C に保存した。

B.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

B.3.1 化学物質の投与方法ならびに投与量
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 とした。Genistein のアジア人の 1 日消費量はほぼ 1.5 mg/kg/day であり⁷⁾、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⁸⁾。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⁹⁾、Bisphenol A のヒトの 1 日暴露量は 0.025-0.25 mg/kg とされている¹⁰⁾。また、DES の投与量は他の被験物質の 1/1000 量 (10 μ g/kg) としたが、これは DES のエストロゲン受容体 α (ER α) に対する結合能が Genistein に比して 1000 倍強力なことによる¹¹⁾。よって、投与量はヒトが 1 日に摂取する用量のほぼ 5-500 倍である。

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 16 日齢よ

り毎日観察した。また、5、9、21 週齢から 3 週間連日膣スメアを採取し、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、膣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 ≥ 100 μ 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 : 少数の腺胞の発育よりなるもの。スコア 3 : スコア 2 に比して腺胞の発育の増したもの。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 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。

B.4.1 実験群

1 群 : 無処置対照群 (30 匹)

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

3 群 : 10 mg/kg Zeranol 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 $\geq 1\text{cm}$ 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.4.2 発育ならびにエストロゲン標的臓器検索法

発育は体重増加曲線より比較し、雌性生殖器への影響に対しては、膣開口日齢を同定し、発情周期は8週齢から4週間モニターし、子宮・卵巣重量は4週齢(MNU投与時)と37週齢(実験終了時)屠殺ラットにつき計測し、すべての屠殺動物に対して卵巣、子宮、膣の組織学的検索を行った。

B.4.3 乳癌検索手法

肉眼的に認め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 $\geq 1\text{cm}$ 乳癌を発症した匹数/全有効匹数とし、乳癌多発率は組織的に確認しえた微小乳癌(微小乳腺腫瘍)をも含めた全乳癌個数/全有効匹数とし、潜伏期はMNU投与後ラットが $\geq 1\text{cm}$ 乳癌を生じて屠殺するまでの日数とした。なお、良性乳腺腫瘍や乳腺以外の臓器より発生した腫瘍についても群間の比較を行った。

B.5 統計処理

体重、膣開口、発情周期、腫瘍発生率、腫瘍多発率や潜伏期は、平均±標準誤差で表現した。膣開口や累積腫瘍発生率はMantel-Cox Log-rank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 思春期前エストロゲン様化学物質暴露

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

C.1.1 発育への影響

エストロゲン様化学物質の思春期前投与は雌マウスの体重増加に影響はおよぼさず、24週齢において無処置対照群に比して差は認めなかった(Fig. 1)。

C.1.2 雌性生殖器への機能的な影響

エストロゲン様化学物質のなかで、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(Fig. 2)。これら化学物質により3-7日の膣開口の早期発来をみた(Table 1)。但し、ResveratrolやBisphenol Aにはこの作用はみなかった。無処置対照群の発情周期は規則性を呈し、そのうち発情期が16.9-18.5%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、Zearalenone、ZeranolやDESでは無処置対照群に比して発情期の有意の延長をみた。

C.1.3 雌性生殖器への器質的な影響

卵巣の組織像をみると、4週齢時では黄体の欠如を、無処置動物(2/6)とともに、Genistein(3/6)、Resveratrol(3/6)、Zearalenone(6/6)、Zeranol(6/6)、Bisphenol A(5/6)、DES(6/6)投与動物にみた。しかし、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。一方、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(Fig. 3)、24週では全例正常の卵巣をみた。

なお、多卵性卵胞(polyovular follicle)はいずれの群のいずれの週齢でも認めなかった。また、子宮内膜腺の変化や、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、腺胞の分化はみなかった(Fig. 4a; スコア1)。8週齢にいたると腺胞が出現し、24週齢では8