

週齢でみられた以上の分化をみた。しかし、動物間での分化に差をみとめ、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. 4b ; 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. 4c ; スコア 3)、あるものは小葉形成をみるものもみた (Fig. 4d ; スコア 4)。乳腺の分化をスコア化して要約すると (Fig. 5)、黄体をみないマウスでは、腺胞への分化をみない低分化な乳腺であったが、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。

C.2 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

C.2.1 発育への影響

思春期前 Zeranol の大量、少量投与群とも体重増加に差はみなかった (Fig. 6)。経過中、無処置群、少量および大量 Zeranol 投与群で各の 2、2 および 1 匹の死亡個体をみたが、Zeranol の毒性による死亡ではなかった。

C.2.2 雌性生殖器への影響

膣開口は 27-42 日齢にみたが、Zeranol の少量 (31.2 ± 0.6 日齢)、大量投与群 (32.2 ± 0.7 日齢) はともに無処置対照群 (36.4 ± 0.6 日齢) に比して膣開口を有意に早発した (Fig. 7)。発情周期は 8 週齢より 4 週間観察したが、無処置群が平均 4.6 日の 1 周期長を有していたのに対し、少量・大量 Zeranol 投与群では発情期の延長に起因する 1 周期長の延長をみた (Table 3)。ちなみに無処置対照群、少量、大量 Zeranol 投与群で発情期の延長は各の 0% (0/22)、59% (13/22)、78% (18/23) にみられ、発情間期の延長は 5% (1/22)、9% (2/22)、9% (2/22)、9% (2/23) に観察された。なお、相対子宮・卵巢重量は、28 日齢 (発癌剤投与時) では群間に差をみなかったが (Table 4)、37 週齢時 (実験終了時) では Zeranol 大量投与群で有意な増加をみた (Table 5)。また、

Zeranol の用量依存性に無排卵性卵巢を示唆する黄体欠如卵巢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。

C.2.3 乳腺発育ならびに乳腺発癌への影響
28 日齢 (発癌剤投与時) の乳腺の発育は、ホール・マウント標本で定性的に評価すると、群間に差はみなかった。従って、均等な発育を呈する乳腺を有するラットに MNU を投与し、 ≥ 1 cm 径の乳腺腫瘍 (組織的にはすべて乳癌であった) を有するラットを適宜屠殺したが、無処置群に比して、Log-rank 試験では有意ではないが、Zeranol 群とりわけ Zeranol 少量群で ≥ 1 cm 乳癌出現の遅延傾向をみた (Fig. 8)。なお、 ≥ 1 cm 乳癌の発生率、組織学的に確認しえた微小乳癌も含めた乳癌多発率や、MNU 投与から ≥ 1 cm 乳癌採取までの期間 (潜伏期) といった指標で比較しても、群間に有意差はみなかった (Table 6)。よって、Zeranol は乳腺発癌には影響がないと結論できる。但し、Zeranol の用量依存的に良性腫瘍 (fibroadenoma) の頻度の増加をみたが、この理由は不明である。

D. 考察

思春期前の雌 CD-1 マウスに Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol、Bisphenol A を 10 mg/kg、DES を 10 μ g/kg 投与し、無処置対照群と発育、エストロゲン標的臓器の機能あるいは形態的变化を比較した。その結果、無処置群に比して発育 (体重増加) には影響はみられなかったが、膣開口の早期発来 (思春期早発) は、Genistein、Zearalenone、Zeranol や DES でみられ、Resveratrol や Bisphenol A にはこの作用はなかった。無排卵性卵巢 (黄体欠如) は、4 週齢では各群の一部のマウスにみとめたが、8 週齢では正常の卵巢形態を呈していたのに対し、Zearalenone 投与動物のみは 8 週齢でも無排卵性卵巢をみる動物をみた。Zeranol のエストロゲン活性は Zearalenone よりも高いが¹²⁾、Zearalenone の卵巢に対

する作用は Zearanol や他の被験化学物質より持続する。なお、発情周期をみると、Zearalenone、Zearanol や DES では発情期の占める期間の延長をみた。平成 15 年度の総括・分担報告書⁹⁾に記載したように、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¹³⁾。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 あるいは少量 Bisphenol A 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。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巣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巣形態を呈していた。一方、大量 Zearalenone 投与群では無排卵性卵巣は 8、12、16 週齢でも頻度は漸減するものの存在した。よって、出生前あるいは思春期前 Zearalenone 暴露の卵巣に対する作用は他の化学物質に比して持続すると結論できる。Genistein、Resveratrol、Bisphenol A や DES による発情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。以上、マウスにエストロゲン様化学物質を出生前あるいは思春期前に投与した場合、膣開口日齢よりみると、Resveratrol や Bisphenol A のエストロゲン作用は弱く、黄体欠如の持続や発情周期よりみると、Zearalenone のエストロゲン作用は他の被験物質に比して強いと結論できる。ヒトにおいて黄体欠如（無排卵性卵巣）は女性不妊の最たる原因と考えられている¹⁴⁾。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¹⁵⁾。我々は出生前投与動物については 16 週齢、思春期前投与動物では 24 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であろう。

Zearalenone や Bisphenol A には乳腺の発育を促進する作用をみる^{10,16)}。マウスへの出生前投与では、Zearalenone や Bisphenol A は、正常卵巣をみる動物に、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作用はみとめなかった。一方、出生前の 10 mg/kg Zearalenone 投与により、無排卵性卵巣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¹⁷⁾。無排卵性卵巣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¹⁸⁾。新生仔期のホルモン処置は無排卵性卵巣を介して乳腺発育を抑制するが¹⁹⁾、出生前 Zearalenone 投与はこの状態を現出したものと考えられる。しかし、出生前あるいは思春期前の 10 mg/kg Zearalenone 投与による乳腺発育への影響は、加齢とともに漸減すると結論できる。

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。平成 14 年度の報告書に示す通り⁴⁾、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²⁰⁾。また、平成 15 年度の報告書に示す通り⁵⁾、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²¹⁾。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²²⁾。しかし、今回の検討では Resveratrol 投与により 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 α /PgR 陽性細胞数の増加をみた²¹⁾。大半 (>80%) の MNU 誘発乳癌はホルモン依存性であることより²³⁾、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。しかし、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⁸⁾。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、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。さらに、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きたすが²⁴⁾、7、14、17、20 日齢に各の ≤ 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²⁵⁾。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²⁶⁾。我々は、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²⁷⁾、大量投与群で乳癌を有意に抑制した。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²⁸⁾。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

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。そして、実験終了時においても用量依存性に無排卵性卵巣をみた。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⁹⁾。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²⁹⁾、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。Zearalenone はラットの卵巣に強い変化を惹起したことより、Zearalenone よりエストロゲン活性が高いとされている Zeranol のラットにおよぼす影響につき検討した。Zeranol は卵摘マウスの乳腺発育を促進する³⁰⁾。そこで、Zeranol の思春期前暴露による乳腺発癌実験を施行したところ、乳腺の発育や乳腺発癌には影響はみなかった。Zeranol はハムスターに急性肝毒性を生じ、肝発癌をみる³¹⁾。しかし、ラットにおいては肝に対する影響はみなかった。一方、Zearalenone と同様に、雌性生殖器に対しては、膣開口の早発や著明な発情周期のかく乱をみとめ、実験終了時 (37 週齢) においても Zeranol の用量依存性に不妊を示唆する黄体欠如動物をみた。ラット卵巣は Zearalenone や Zeranol に対しマウス卵巣よりも無排卵性卵巣の存在が永続することより感受性が高いと結論できる。なお、観察期間中、子宮や膈の器質的变化はみなかった。雄マウスへの出生前 Zeranol 暴露により精巣分化の異常をみる³²⁾。よって、雄性動物への Zeranol 暴露も今後検討を要するものと考えられる。

E. 結論

1. 天然エストロゲンとして Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol、合成エストロゲンとして Bisphenol A、DES の作

用強度をマウスの思春期前暴露実験（15-18日齢の雌マウスに連日被験物質を皮下投与）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、Zeranol、Bisphenol Aは10 mg/kg、DESは10 µg/kgとし、無処置対照群はDMSOのみを投与した。

3. 体重増加はいずれの被験化学物質でも影響されず、24週齢では対照群に比して有意差はなかった。

4. 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。

5. 発情周期は、Zearalenone、Zeranol、DES投与により有意に発情期が延長した。

6. Genistein、Resveratrol、Zeranol、Bisphenol A、DES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。

7. Zearalenone投与群では4、8週齢時に無排卵性卵巣をみた。

8. いずれのマウスも24週齢時では正常卵巣をみた。

9. マウスへの思春期前暴露の卵巣への影響は一過性（可逆性）である。

10. しかし、マウスへのZearalenoneの思春期前暴露の卵巣への影響は他の被験物質に比して持続する。

11. マウスへの思春期前のエストロゲン様化学物質投与は乳腺の分化に顕著な影響をみなかった。

12. 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、発情期の延長をみた。

13. Zeranolは用量依存性にラットに無排卵性卵巣を惹起し、37週齢時でもみとめられた。

14. Zeranol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、子宮や膣に器質的变化はみなかった。

15. ZeranolはラットMNU誘発乳癌に影響をみなかった。

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) 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).
- 3) 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.
- 4) 螺良 愛郎, 斐 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
- 5) 螺良 愛郎, 二階堂 泰資, 佐藤 睦哉. 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. 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) 平成15年度総括・分担研究報告書 p. 31-52
- 6) Kanno J, Kato H, Iwata T, Inoue T. Phytoestrogen-low diet for endocrine disruptor studies. *J Agr Food Chem* 50:

- 3883-3885, 2002.
- 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) Kuiper-Goodman T. Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. *Can J Physiol Pharmacol* 68: 1017-1024, 1990.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) Leffers H, Naesby M, Vendelbo B, Skakkebaek NE, Jorgensen M. Oestrogenic potencies of Zeranone, oestradiol, diethylstilboestrol, Bisphenol-A and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disrupters. *Hum Reprod* 16: 1037-1045, 2001.
 - 13) 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: 803-811, 2004.
 - 14) 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.
 - 15) Newbold RR, Banks EP, Bullock B, Jefferson WN. Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer Res* 61: 4325-4328, 2001.
 - 16) Sheffield LG, Welsch CW. Zeranone (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.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) 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.
 - 21) Sato M, Pei R-J, Yuri T, Danbara N, Nakane Y, Tsubura A. Prepubertal

- resveratrol exposure accelerates *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary carcinoma in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett* 202 (2): 137-145, 2003.
- 22) Russo J, Russo IH. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab Invest* 57: 112-137, 1987.
- 23) 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.
- 24) Schoental R. Trichothecenes, zearalenone, and other carcinogenic metabolites of *Fusarium* and related microfungi. *Adv Cancer Res* 45: 217-290, 1985.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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* 47: 164-170, 2003.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) Sheffield LG, Welsch CW. Zeranol (β -resorcylic acid lactone), a common residous component of natural foodstuffs, stimulates developmental growth of the mouse mammary gland. *Cancer Lett* 28: 77-83, 1985.
- 31) Coe JE, Ishak KG, Ward JM, Ross MJ. Tamoxifen prevents induction of hepatic neoplasia by zeranol, an estrogenic food contaminant. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1085-1089, 1992.
- 32) Pérez-Martinez C, Garcia-Iglesias MJ, Ferreras-Estrada MC, Bravo-Moral AM, Espinosa-Alvarez J, Escudero-Diez A. Effects of in-utero exposure to zeranol or diethylstilboestrol on morphological development of the fetal testis in mice. *J Comp Pathol* 114: 407-418, 1996.
- G. 健康危険情報
なし
- H. 研究業績
1. 論文発表
1. 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).
2. Nikaido Y, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A. Effects of prepubertal exposure to xenoestrogen on development of estrogen target organs in female CD-1 mice. *In Vivo* (in press).
3. 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).
4. 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.
 5. 斐 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* 13: 41-46, 2004.
2. 学会発表
1. 塚 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. 塚 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, 塚 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. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
- I. 知的所有権の取得状況
なし

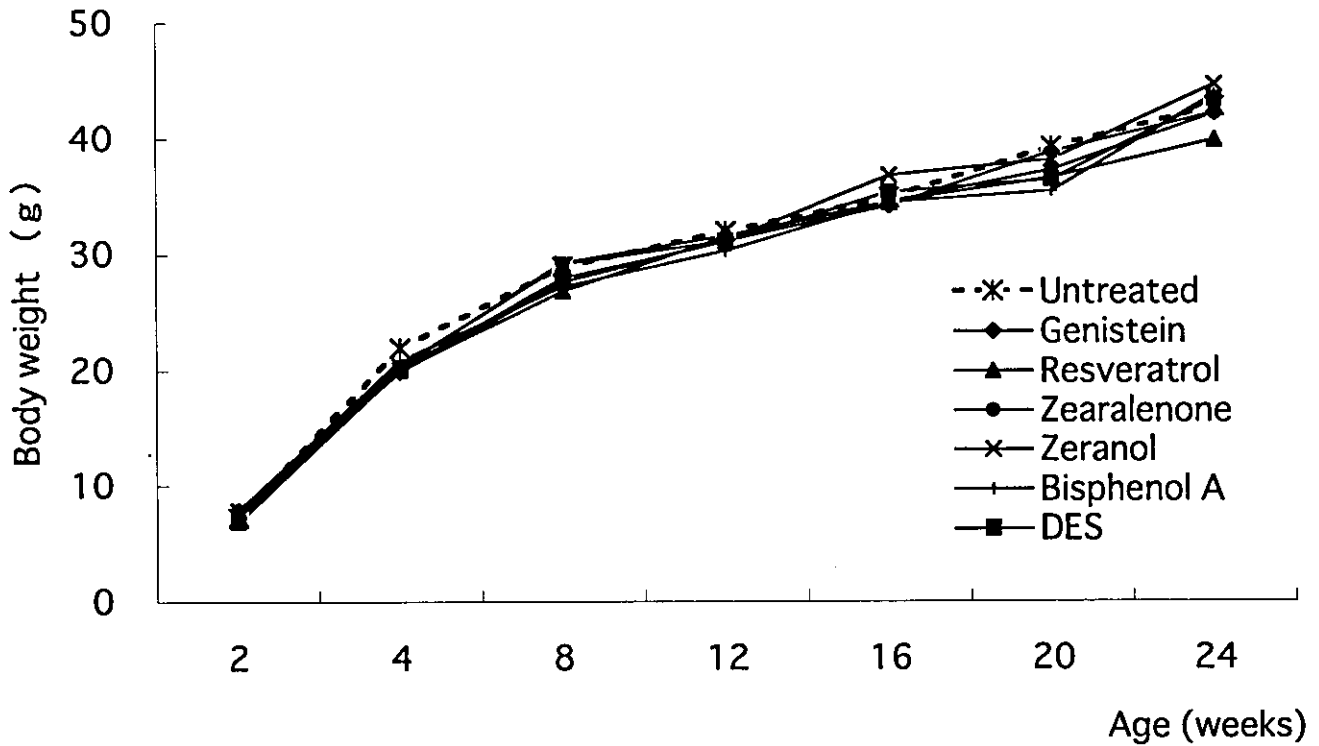


Figure 1. Body weight gain in female CD-1 mice administered 4 daily injections of xenoestrogen beginning at 15 days of age.

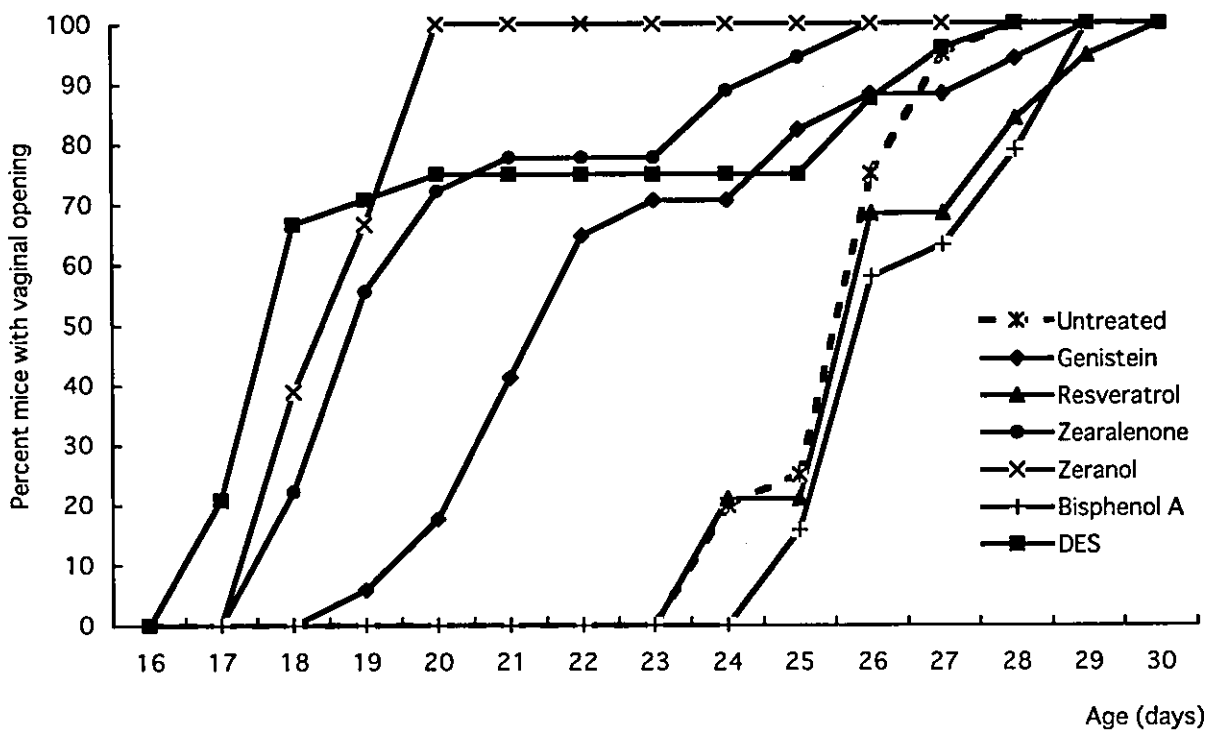


Figure 2. Vaginal opening in xenoestrogen-treated mice and untreated controls. Mice treated prepubertally with Genistein, Zearalenone, Zeranol or DES exhibited earlier vaginal opening.

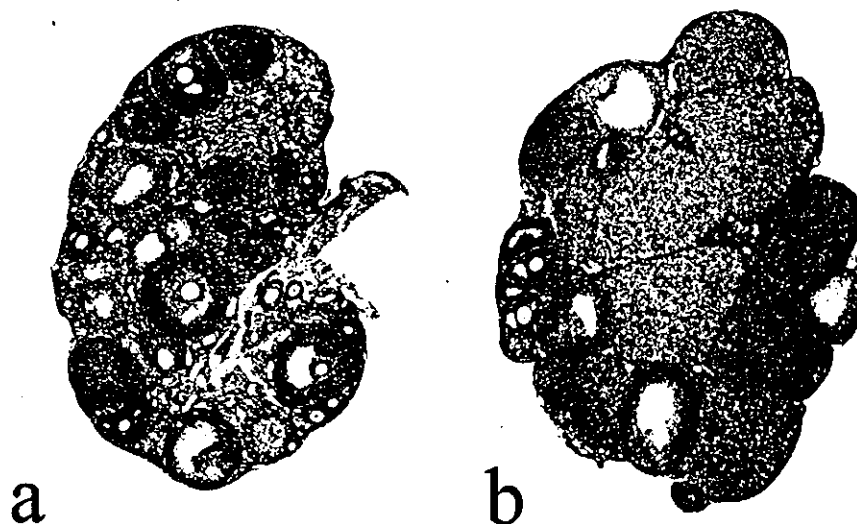


Figure 3. Ovaries from 8-week-old CD-1 mice exposed prepubertally to zearalenone. a. Mouse without corpora lutea. b. Mouse with corpora lutea.

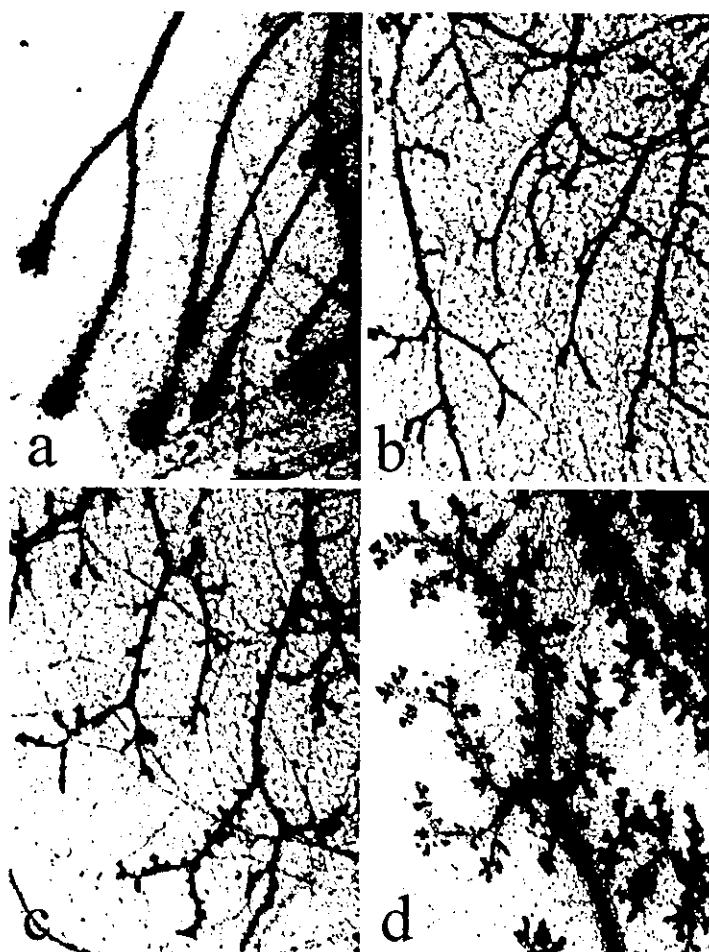


Figure 4. Mammary glands from untreated control mice. a. Note terminal end buds at the periphery and the lack of alveolar differentiation (Score 1). b. Note small number of alveoli within poorly developed duct (Score 2). c. Note more advanced alveolar development, compared with b (Score 3). d. Note prominent lobulo-alveolar development (Score 4).

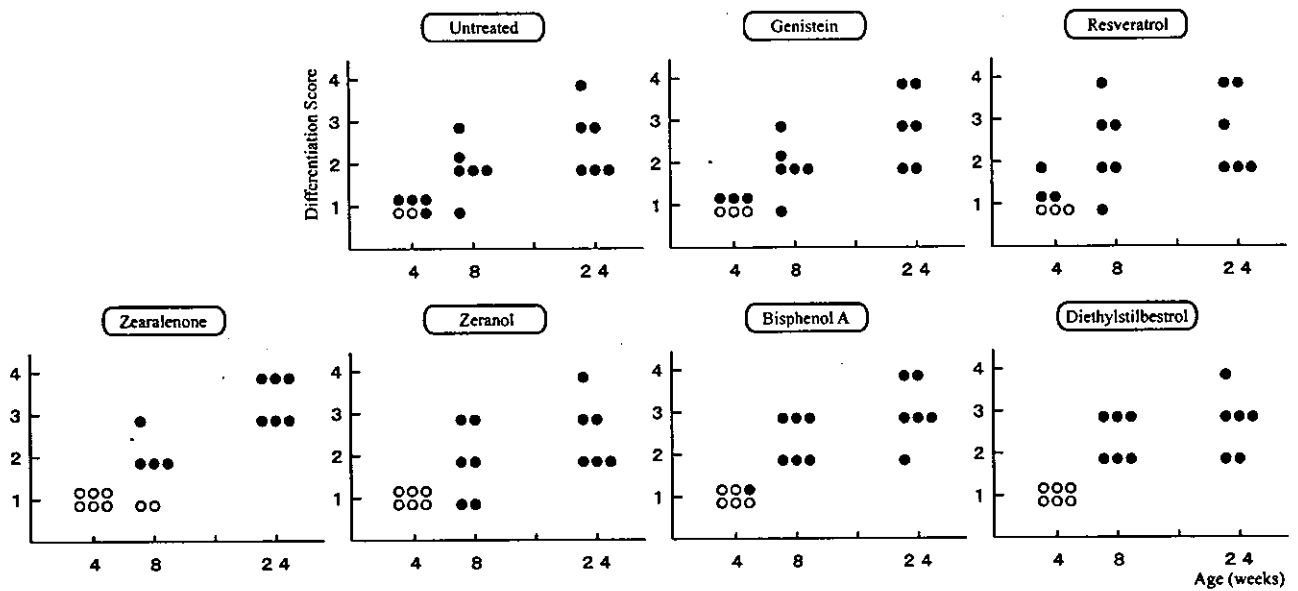


Figure 5. Degree of mammary gland development in female CD-1 mice administered 4 daily injections of xenoestrogen beginning at 15 days of age (●, mouse with corpora lutea; ○, mouse without corpora lutea).

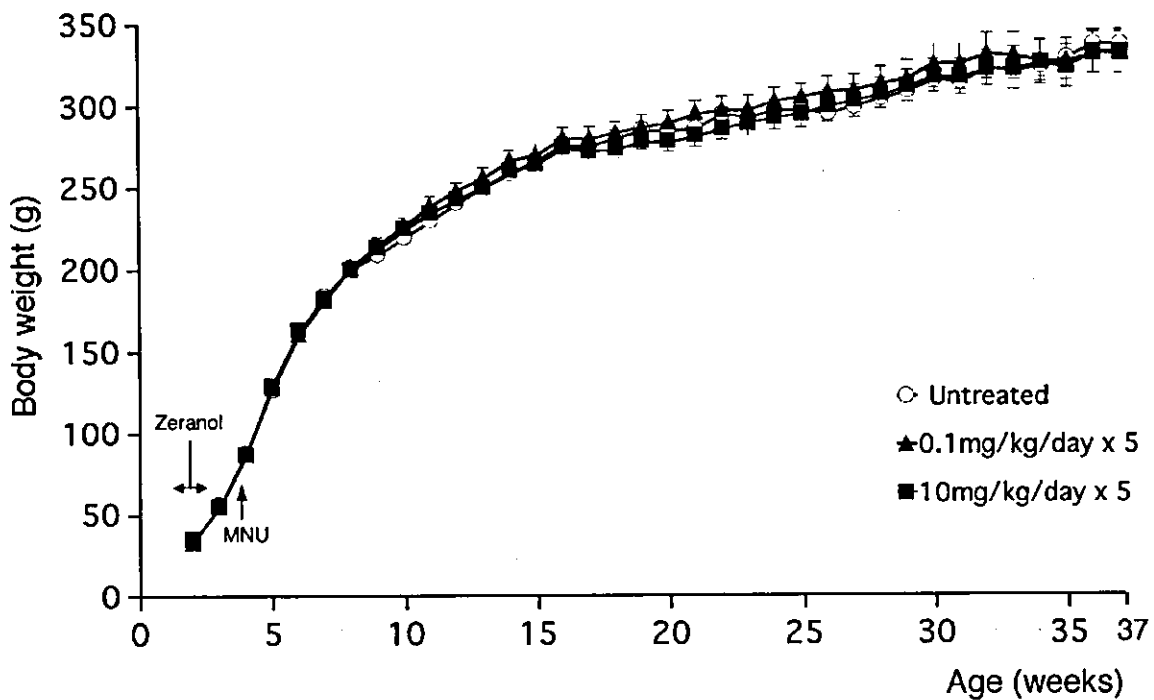


Figure 6. Body weight gain in female Sprague-Dawley rats treated daily with 0.1 or 10 mg/kg zeranol or vehicle from 15 to 19 days of age and administered 50 mg/kg MNU at 28 days of age. Differences between zeranol-untreated and zeranol-treated groups were not significant.

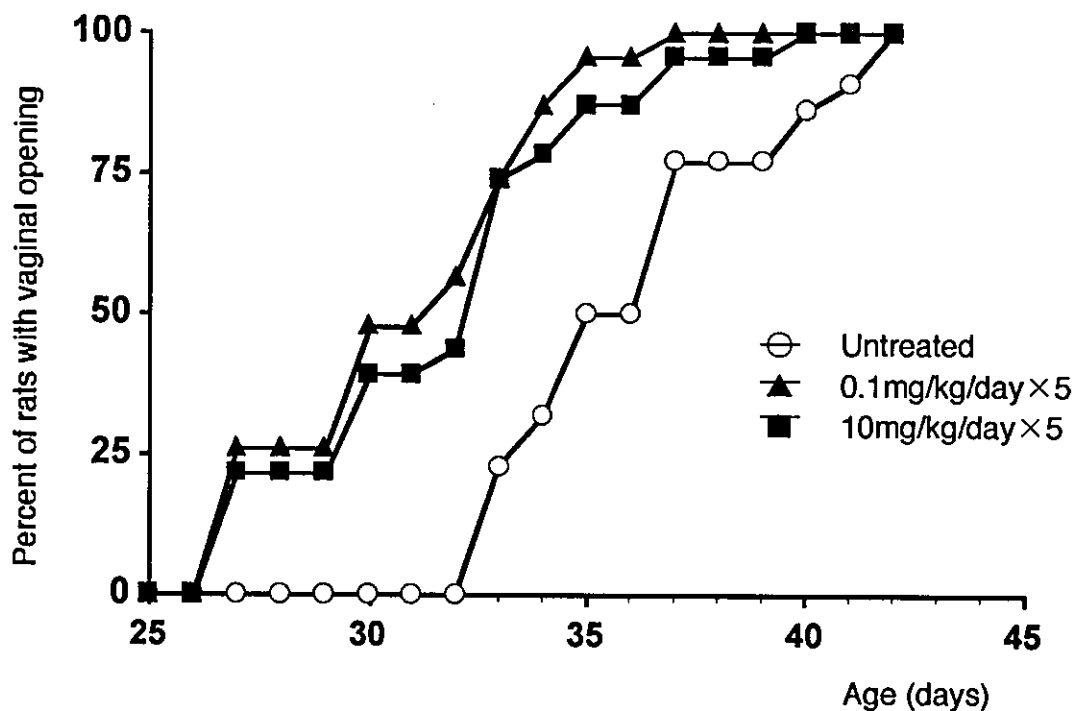


Figure 7. Vaginal opening in female Sprague-Dawley rats after prepubertal zeranol treatment. Zeranol-treated groups showed earlier vaginal opening than untreated controls ($p < 0.01$, respectively).

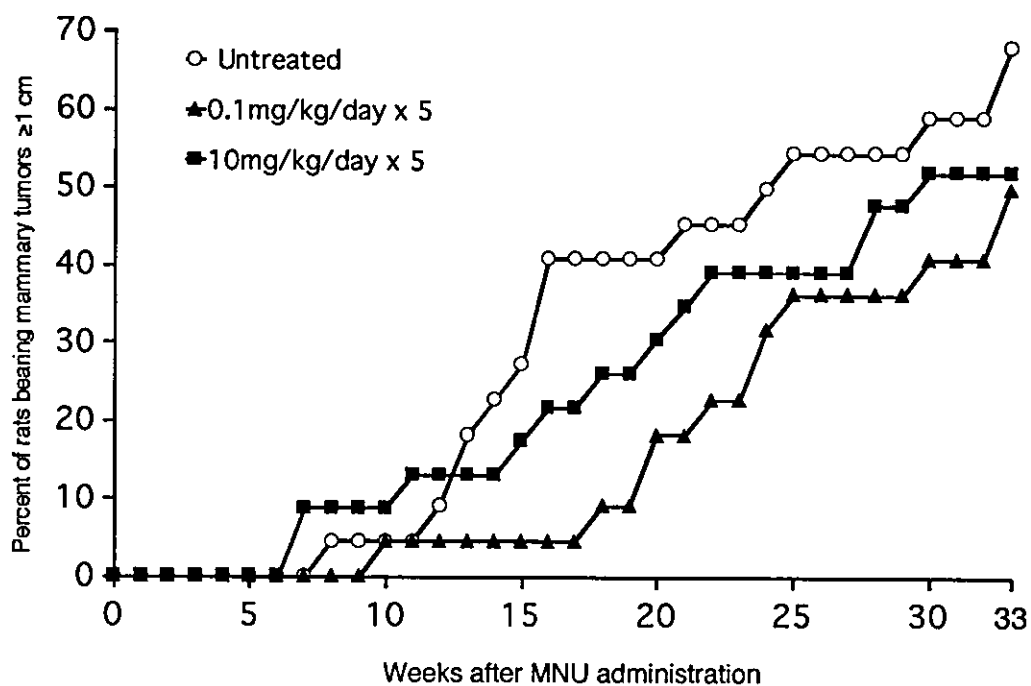


Figure 8. Effects of prepubertal zeranol exposure on cumulative incidence of MNU-induced mammary tumors ≥ 1 cm in female Sprague-Dawley rats.

Table 1. Mean age at vaginal opening in female CD-1 mice exposed to xenoestrogen (4 daily injections, beginning at 15 days of age)

Test chemical	Dose	Vaginal opening (days)
Untreated	-	25.9 ± 0.3
Genistein	10 mg/kg x4	22.8 ± 0.7*
Resveratrol	10 mg/kg x4	26.4 ± 0.4
Zearalenone	10 mg/kg x4	20.3 ± 0.6*
Zeranol	10 mg/kg x4	18.9 ± 0.2*
Bisphenol A	10 mg/kg x4	26.8 ± 0.3
Diethylstilbestrol	10 µg/kg x4	20.1 ± 0.8*

Values represent mean ± SE.

Each group consists of 17-24 mice.

*p<0.01, compared with untreated controls.

Table 2. Estrous cycle alteration in female CD-1 mice exposed to xenoestrogen (4 daily injections, beginning at 15 days of age)

Chemical	Dose	Age 5-8		9-12		21-24 (weeks)	
		One cycle length	Day spent in estrus	One cycle length	Day spent in estrus	One cycle length	Day spent in estrus
Untreated	-	5.4 ± 0.3	1.0 ± 0.0	5.9 ± 0.4	1.0 ± 0.1	6.0 ± 0.4	1.1 ± 0.1
Genistein	10 mg/kg x4	5.2 ± 0.3	1.1 ± 0.0	6.0 ± 0.3	1.2 ± 0.1	6.3 ± 0.3	1.1 ± 0.1
Resveratrol	10 mg/kg x4	6.0 ± 0.3	1.0 ± 0.0	5.7 ± 0.2	1.0 ± 0.1	6.1 ± 0.4	1.2 ± 0.1
Zearalenone	10 mg/kg x4	4.8 ± 0.4	2.8 ± 0.4**	6.5 ± 0.4	2.9 ± 0.3**	6.7 ± 0.4	2.9 ± 0.4**
Zeranol	10 mg/kg x4	5.8 ± 0.3	3.2 ± 0.4**	6.8 ± 0.5	2.0 ± 0.2**	6.2 ± 0.5	1.2 ± 0.1
Bisphenol A	10 mg/kg x4	5.7 ± 0.3	1.1 ± 0.0	5.3 ± 0.2	1.0 ± 0.0	5.2 ± 0.2	1.0 ± 0.0
Diethylstilbestrol	10 µg/kg x4	6.1 ± 0.3	1.9 ± 0.2*	6.1 ± 0.3	2.1 ± 0.2**	6.0 ± 0.2	1.7 ± 0.2*

Values represent mean ± SE (days) of ≥6 mice.
*p<0.05, **p<0.01 compared with untreated controls.

Table 3. Estrous cycle in prepubertal zeranol-treated and -untreated female Sprague-Dawley rats administered MNU at 28 days of age.

Zeranol treatment	One cycle length (days)	% of time spent in each phase of cycle			
		Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
Untreated	4.6±0.2	25.6±1.6	31.2±1.3	25.6±2.4	17.0±1.9
0.1 mg/kg/day x5	5.3±0.2	10.6±1.5*	56.6±2.5**	18.4±2.2*	14.0±2.0
10 mg/kg/day x5	5.9±0.4**	11.4±1.5**	56.2±2.4**	18.1±2.1*	13.8±2.1

Examined from 8 weeks of age for 4 weeks. Values are mean±S.E. *p value<0.05 and **<0.01 compared with untreated group.

Table 4. Effect of prepubertal zeranol treatment on body weight and relative uterine-ovarian weight in female Sprague-Dawley rats at 28 days of age.

Zeranol treatment	No. of rats	Body weight (g)	Relative uterine-ovarian weight (mg/100g B.W.)
Untreated	6	88.1±1.9	267.5±29.9
0.1 mg/kg/day x5	6	84.2±2.0	258.2±23.7
10 mg/kg/day x5	6	84.9±2.1	232.6±26.1

Values are mean±S.E; *p value <0.05 compared with untreated group.

Table 5. Effect of prepubertal zeranol treatment on body weight and relative uterine-ovarian weight in female Sprague-Dawley rats at 37 weeks of age.

Zeranol treatment	No. of rats	Body weight (g)	Relative uterine-ovarian weight (mg/100 g B.W.)
Untreated	8	336.0±8.2	291.7±27.7
0.1 mg/kg/day x5	12	330.3±13.6	294.9±24.4
10 mg/kg/day x5	10	328.5±14.5	340.7±27.8*

Values are mean±S.E; *p value <0.05 compared with untreated group.

Table 6. Effects of prepubertal zeranol exposure on mammary tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats administered 50 mg/kg MNU at 28 days of age

Treatment	No. of rats	No. of rats with carcinoma ≥ 1 cm (%)	Total no. of carcinoma	No. of carcinoma per rat	Latency (weeks)	Total no. of fibroadenoma	Other tumors
Untreated	22	18 (82)	33	1.5 \pm 0.3	19.3 \pm 2.1	1	2 ovarian thecomas, 1 skin squamous cell carcinoma
0.1 mg/kg/day x5	22	14 (64)	50	2.3 \pm 0.4	23.7 \pm 2.0	6	1 ovarian adenoma, 2 renal mesenchymal tumors
10 mg/kg/day x5	23	16 (70)	34	1.5 \pm 0.3	18.6 \pm 2.3	13	1 ovarian thecoma

Values are mean \pm S.E

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）

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

分担研究報告書

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

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・食品中のエストロゲン様物質であるゲニスタイン Genistein を、妊娠ラットに腹腔内投与し、出生後成熟した胎仔の中樞神経系に及ぼす影響を検索することを目的とする。ゲニスタインの妊娠母体への投与は、低量 (1.5mg/kg、常食量相当) および大量 (30mg/kg) およびコントロール群(無摂取)を作成した。出生後の胎仔を 56 日間飼育し、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。

脳の性的異型核(メスのほうがオスより容積が大きい)のひとつである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。多大の時間のかかる実験のため、14 年度の準備実験にて計数方法を確立、各実験条件群 6 例ずつになるよう本年は残る 2-3 例の計数をおこなった。各条件群内各例の値にばらつきのないことを確認し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有意に減少し、大量投与群でより強く減少し、オスでコントロールの 8 割程度に、メスでは約 7 割程度にまで減少し性差がほとんどなくなっていた。

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ニューロンの樹状突起の長さを変化させるとされている。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(15-16 年度)。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たが、分子層/顆粒層比では有意差を認めなかった。

以上の結果、低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ことも考え合わせると、ゲニスタインの母体摂取に神経質になる必要はないかもしれないが、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。

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・食品中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中樞神経系・性的異型核（SDN）のカテコールアミンニューロン数、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 の母体妊娠中摂取（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）の容積に影響を与えられられている。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斑核はメスの容積がオスより大きい、と報告されている。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、青斑付近の亜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、その結果プルキンエニューロン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う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り、今回の研究項目に加えた。

B. 研究方法

ゲニスタイン Genistein を DMSO に溶解し、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 = 常食量相当) または大量 (30mg/kg) 投与した。コントロール群として、Genistein の溶解に用いる DMSO をゲニスタイン投与群と同用量になるよう投与した。出生後の雌雄仔ラット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、以下の実験をおこなった。

5 6 日齢まで飼育し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、青斑核そのものと青斑核付近の副核・亜核ごと (青斑核外の A4 群も含めた全体総数、青斑核の A4 群 + A6 群、青斑核内の A6 群のみ、青斑核とその腹側亜核

の A6 群全体、青斑核内の A4 群) 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) 計数した。14 年度には準備実験をおこなって計数方法を確立し、15 年度に、各年度各実験条件群 3-4 例ずつの計数をおこなったので、各群 6 例となるよう本年は各群の残る例数を計数した。

また小脳については、同様の方法で得られた組織標本を、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。さらに顆粒層の厚さとの比較もおこなった。(15-16 年度)

なお、動物実験に関しては、動物愛護につとめるよう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

青斑核付近の位置関係を示す典型的な標本を図表 1 に、計数のための標本のうち代表的な顕微鏡写真を図表 2 に示している。56 日齢・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 6 例の平均値) の結果を示したのが図表 3 で、それをグラフに示したのが図表 4 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、約 3 千~3 千数百で、投与量にかかわらず雌雄ともに減少傾向を示していた。14 年度の結果から、A4 群は個体差が大きく検索には向かないことが判明したため、A4・A6 両群を含む青斑核でのカテコールアミンニューロン数 (LC の A4+A6) と、青斑核の腹側亜核を含む A6 群全体のカテコールアミンニューロン数 (A6 全体) を中心に検討した (図表 3 では太文字で示している)。双方の値とも雌雄の低量投与群で有意 (オス $p=0.033$ 、メス $p=0.048$) に減少していた。すなわちメスではニューロン数がオス化し、オスのコントロール群の数を超えて減少していた。大量投与群では雌雄ともさらに減少し (オス $p=0.023$ 、メス $p=0.035$)、オスでコントロールの 8 割程度、メスで 7 割程度となり、雌雄差はほとんどなくなっていた。

一方、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標本の 1 例を図表 5 に示した。各群 6 例、1 例につき 6 ケ所を計測した平均値を図表 6 に、それらをまとめた表を図表 7 に示し、統計処理をおこなった結果をグラフに表わしたものが図表 8 である。分子層の厚さは 500~600 μm であり、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

中枢神経系の性的異型核のうち、他のひとつである内側視束前野の容積を比較した既報論文(1, 3, 4)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、今回対象とした青斑核に関しては、Genistein 投与の報告はない。Bisphenol A や Diethylstilbestrol, Resveratrol の影響についての報告(2, 5)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はこれらの研究と矛盾しない。Genistein 投与に関するわれわれの所見では、当該領域のカテコールアミンニューロン総数が投与量に応じて減少しているため、無摂取を対照として考える限り、実験生物学的には影響あり、と言わざるを得ない。しかし有史以来、われわれ動物にとってこのような完全無摂取は考えられない状態であり、おそらくは常食量相当の摂取では影響がないと考えている。

(例えば、われわれの動物施設における通常環境で、かつ一般的な餌で飼育した例では、本実験のコントロール群と低量と伊予郡の中間の値を示す。) なお、カテコールアミンニューロン数の減少がどのような機能変化を生体に与えるかについては現在のところ不明である。

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の *in vivo* および

in vitro の実験にて Bisphenol A、Octylphenol で促進されたという報告(6)、Diethylstilbestrol、Nonylphenol および Octylphenol では影響がなく、Bisphenol A で阻害されたという *in vitro* 実験の報告(7)があるが、われわれの実験は *in vivo* であり、報告(6)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 および Dibutylphthalate が小脳顆粒層の分化を阻害するという *in vitro* での報告(8)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。小脳の機能を考えると分子層と顆粒層の比率が重要で、今回の結果は特に常食量相当で雌雄差が少なく、小脳機能に雌雄差が少ないことも考え合わせると、Genistein 投与により形態的には変化をもたらすものの機能的にはほとんど影響ないと考えている。

青斑核カテコールアミンニューロン数と小脳皮質各層の厚さの結果から考えて、Genistein という物質そのものは、中枢神経発達に影響を与える物質である。しかし上述のように、実際の常食量では、Genistein の摂取に神経質になる必要はないものと考えられる。それより重要なことは、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ことである。今回のような研究は時間を要するため、3年間の研究期間ではそのような実験を行い、結果を出すことが不可能であった。厚生労働省が新たな取り組みをおこなうことを願いたい。

(引用文献)

- 1) Levy et al, Proc Soc Exp Biol Med 208: 60-66, 1995
- 2) Kubo et al, Neurosci Lett 304: 73-76, 2001
- 3) Faber et al., Biol Reprod 45: 649-653, 1991
- 4) Faber et al., Reprod Toxicol 7: 35-39, 1993
- 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. 277, 2002
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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、性的異型核のひとつである青斑核(とくにA6群)のカテコールアミン・ニューロン数は、オス、メスともに減少し、性差が消失する傾向があった。
- 2) 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。
- 3) 上記2つの実験結果から考えて Genistein

と言う物質そのものは、中枢神経発達に影響を与える物質である。しかし考察で述べたように、実際の常食量では、Genistein の摂取に神経質になる必要はないものと考えられる。それより重要なことは、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ことである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

第31回日本神経内分泌学会

(2004年10月10日、弘前)にて学会発表

「植物由来エストロゲン様物質の胎児期暴露が中枢神経系に及ぼす影響」 井岡真基、片岡洋祐、山田久夫

抄録：日本内分泌学会雑誌 80(2) : p. 365

H. 知的所有権の取得状況

該当なし