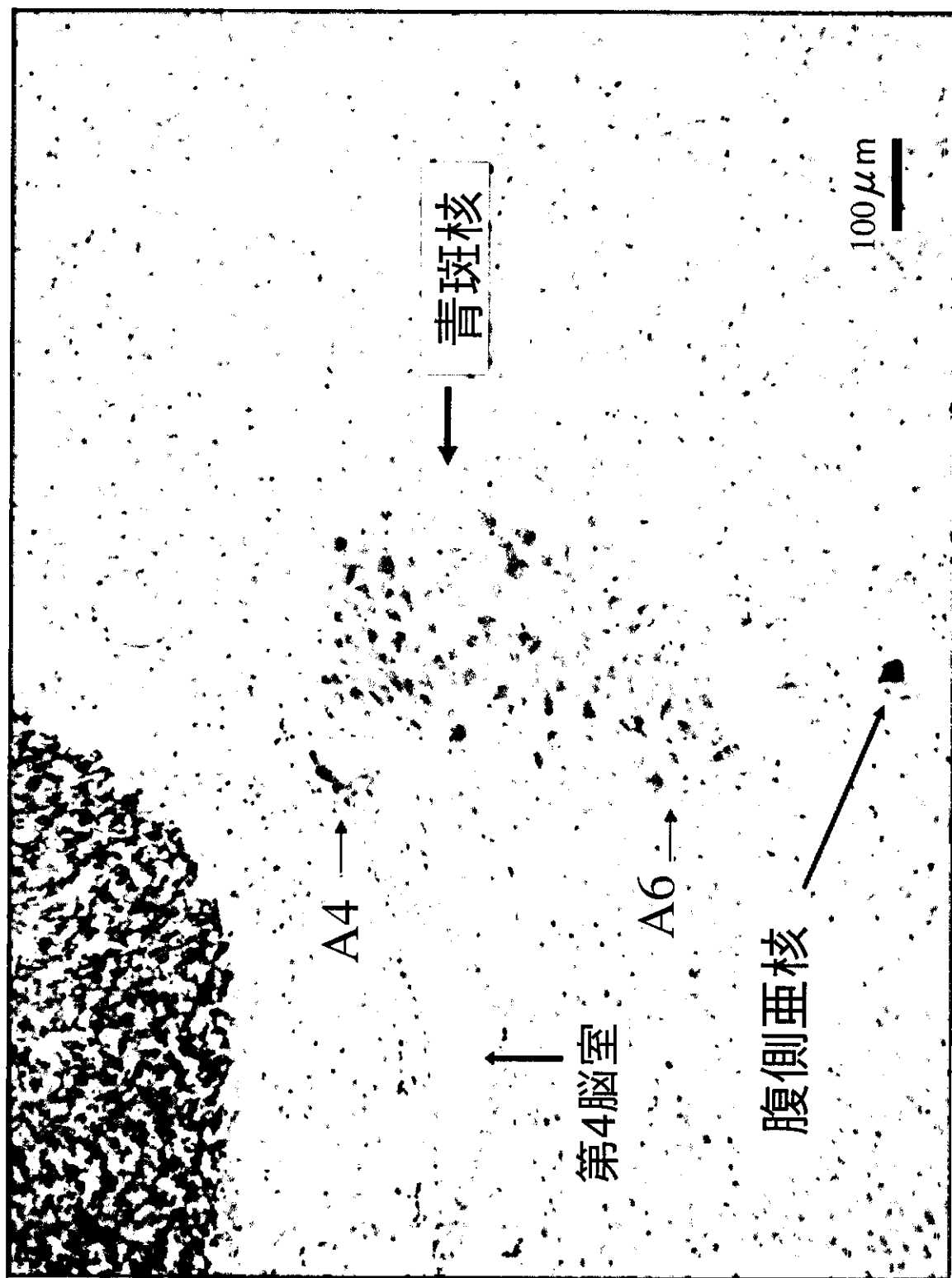
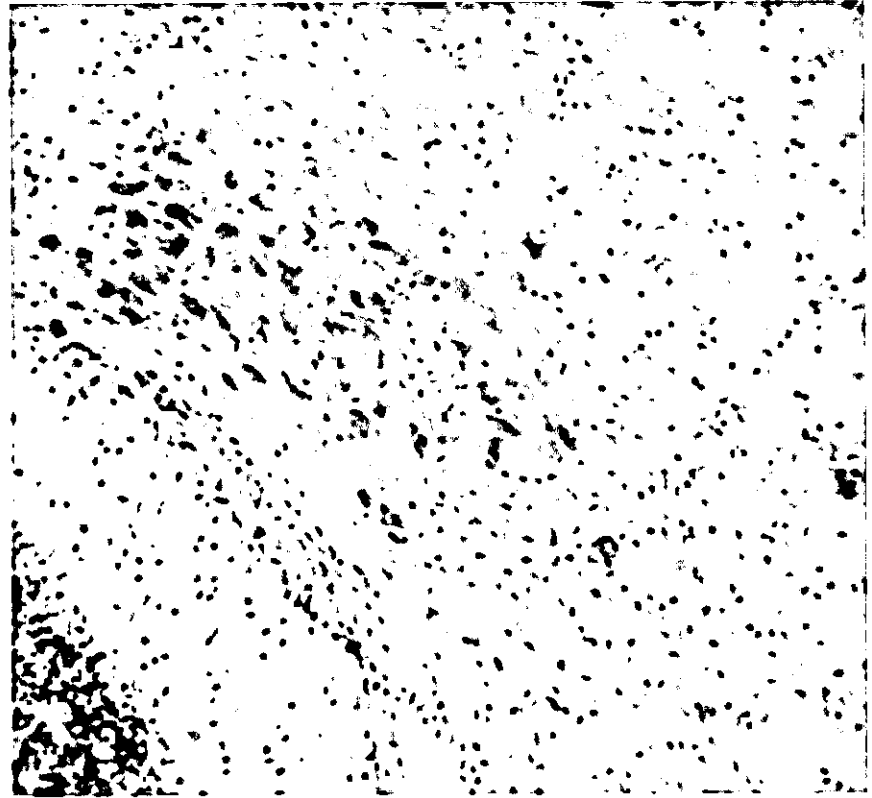


図表1 Tyrosine Hydroxylaseに対する抗体を用いた免疫染色と
Hematoxylin対比染色（コントロール群の前頭断標本）

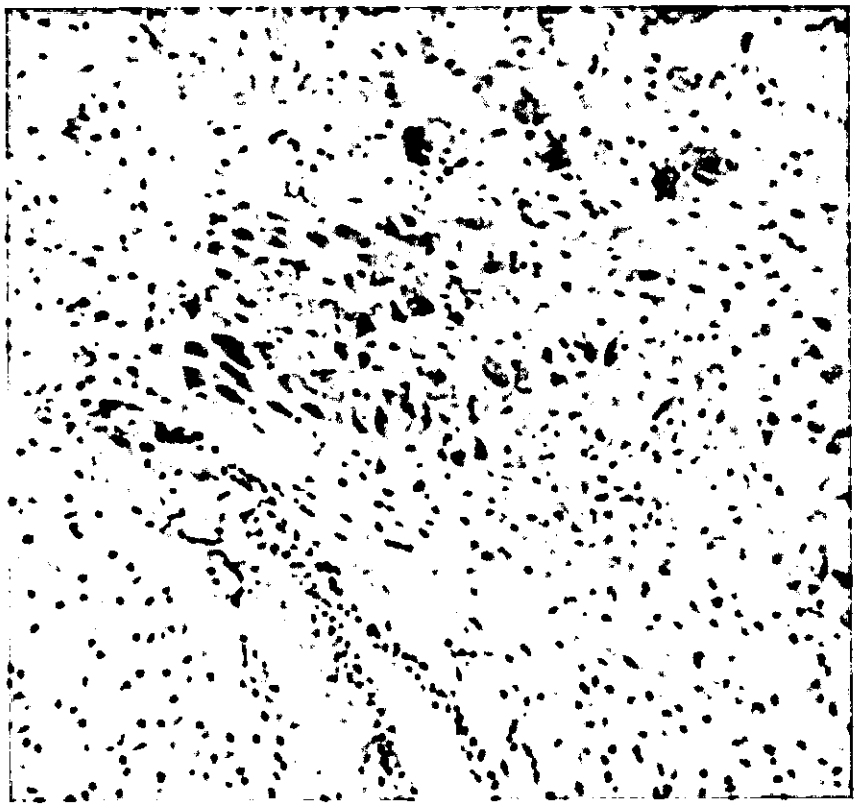


図表2 56日齡オスの染色結果(青斑核)

コントロール群



大量投与群

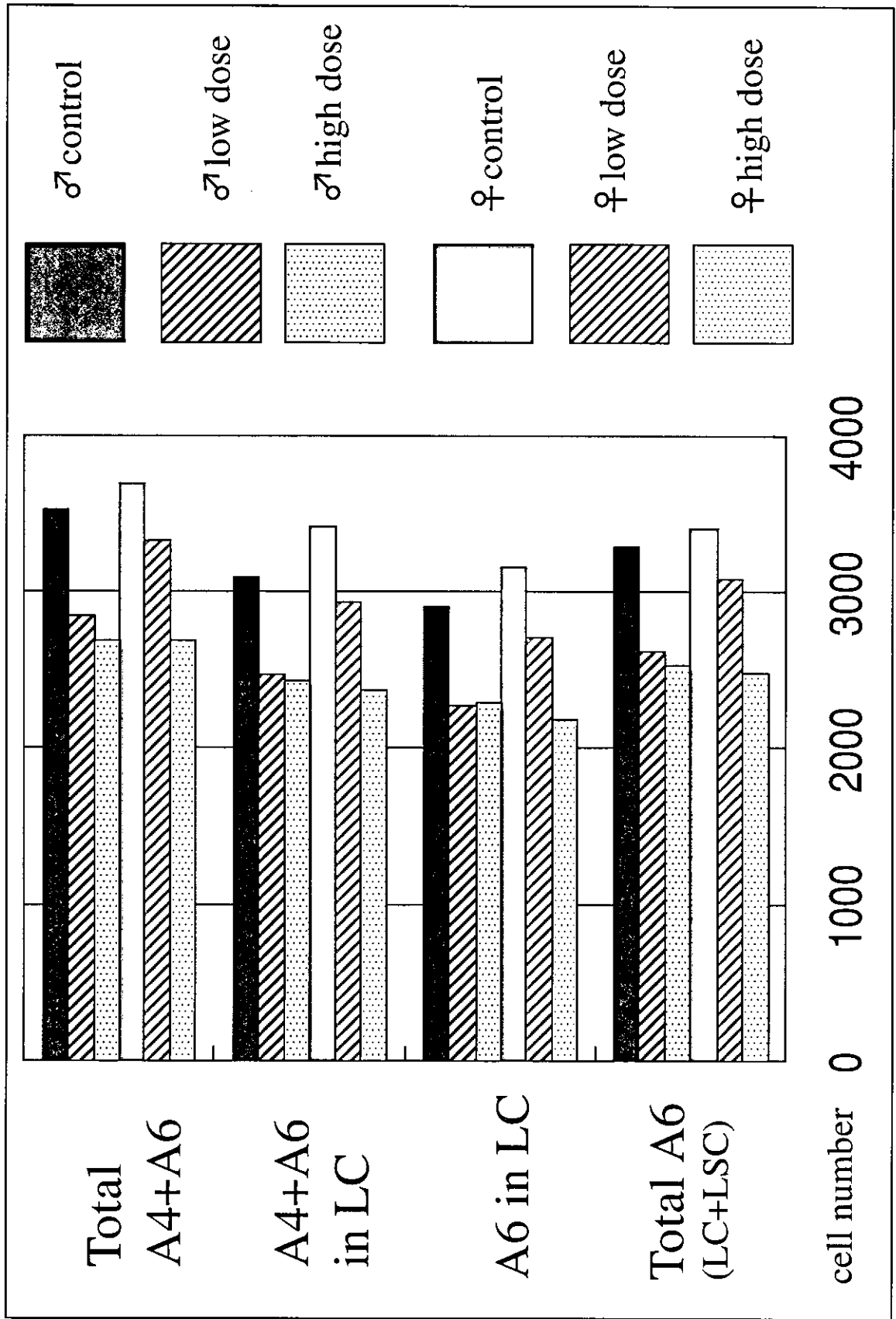


図表3

青斑核とその各亜核における（TH抗体・免疫染色陽性の）
カテコールアミンニューロン数（雌雄各6例の平均）

	56日齢								
	オス				メス				
	コントロール	低量投与	大量投与	コントロール	低量投与	大量投与	コントロール	低量投与	大量投与
全体A4+A6	3525	2800	2658	3701	3328	2784			
<u>LCのA4+A6</u>	3088	2451	2409	3417	2934	2445			
LCのA6	2906	2275	2248	3159	2708	2289			
<u>A6全体</u>	3292	2617	2508	3404	3077	2609			
LCのA4	180	176	147	258	226	183			

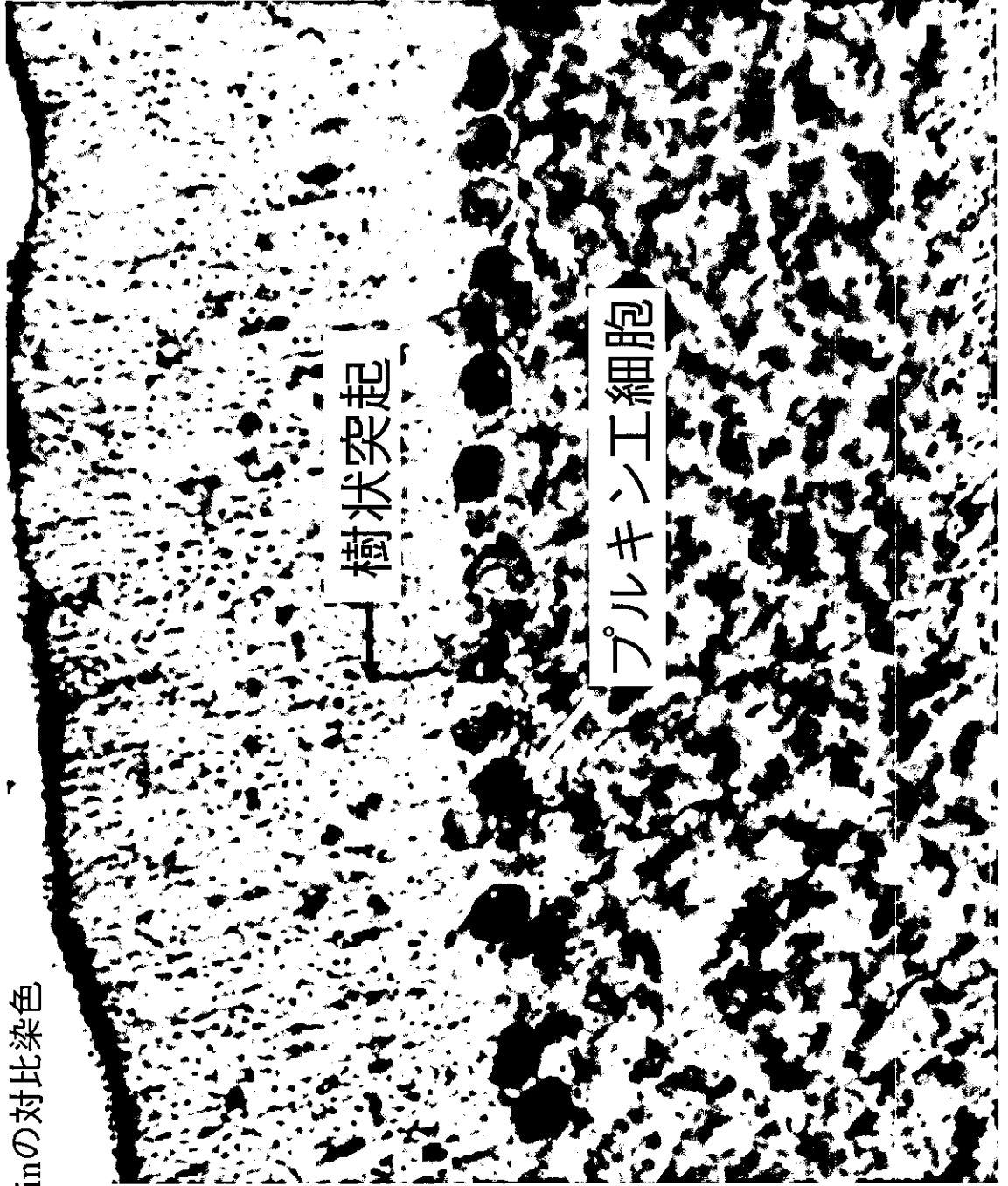
図表4 青斑核(LC)とその各亜核(およびA4・A6群の)カテコール
 ルアミンニューロン数 (雌雄各6例の平均)



図表5 小脳

メスラット(大量投与群)前頭断標本

抗Calbindin 抗体を用いた免疫染色とHematoxylinの対比染色



分子層

顆粒層

200 μm

図表6 56日齡ラット小脳での計測結果

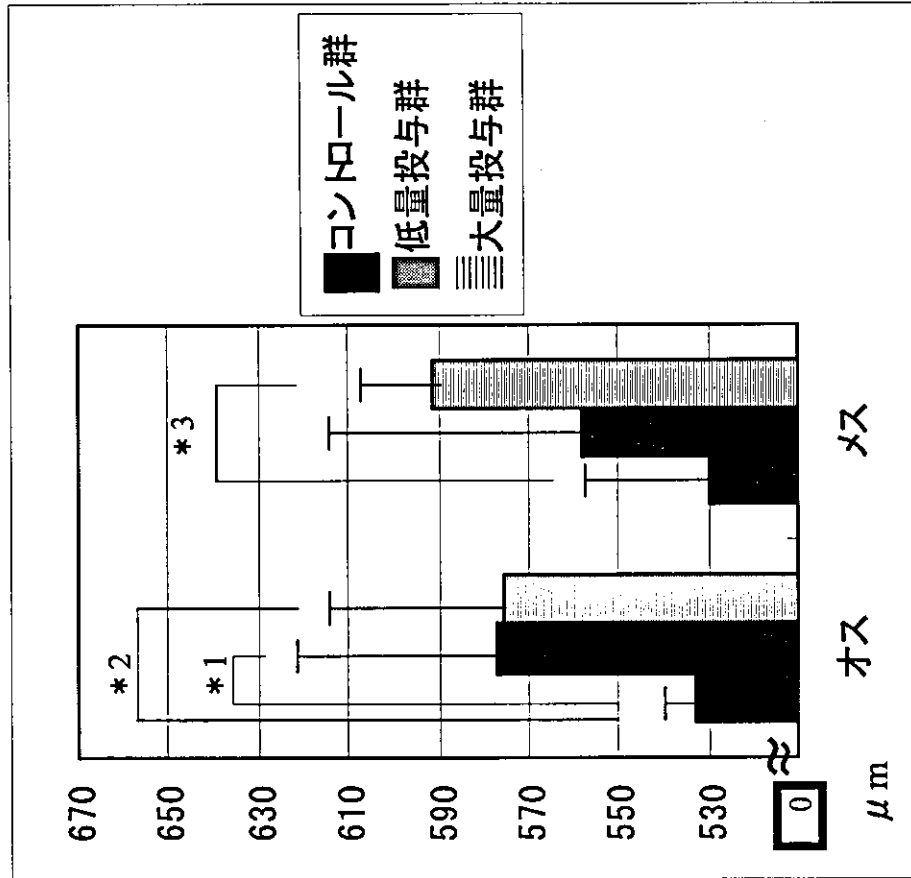
大量投与群♂	顆粒層μm	分子層μm	分子層／顆粒層の比	大量投与群♀	顆粒層μm	分子層μm	分子層／顆粒層の比
a	418	600	1.48	a	408	595	1.48
b	395	585	1.48	b	407	565	1.40
c	333	535	1.63	c	420	577	1.38
d	380	530	1.45	d	378	602	1.65
e	363	580	1.67	e	443	597	1.40
f	397	623	1.58	f	388	610	1.60
低量投与群♂	顆粒層μm	分子層μm	分子層／顆粒層の比	低量投与群♀	顆粒層μm	分子層μm	分子層／顆粒層の比
a	325	530	1.65	a	367	578	1.62
b	373	555	1.50	b	370	533	1.45
c	363	592	1.65	c	337	642	1.92
d	387	528	1.38	d	392	512	1.33
e	437	632	1.47	e	335	560	1.75
f	362	625	1.77	f	322	525	1.65
コントロール♂	顆粒層μm	分子層μm	分子層／顆粒層の比	コントロール♀	顆粒層μm	分子層μm	分子層／顆粒層の比
a	313	547	1.78	a	343	530	1.55
b	352	527	1.57	b	308	497	1.65
c	413	553	1.43	c	347	523	1.57
d	375	513	1.42	d	345	542	1.63
e	320	528	1.77	e	372	515	1.40
f	413	528	1.30	f	372	573	1.57

図表7 56日齡ラット小脳の計測結果のまとめ(表)

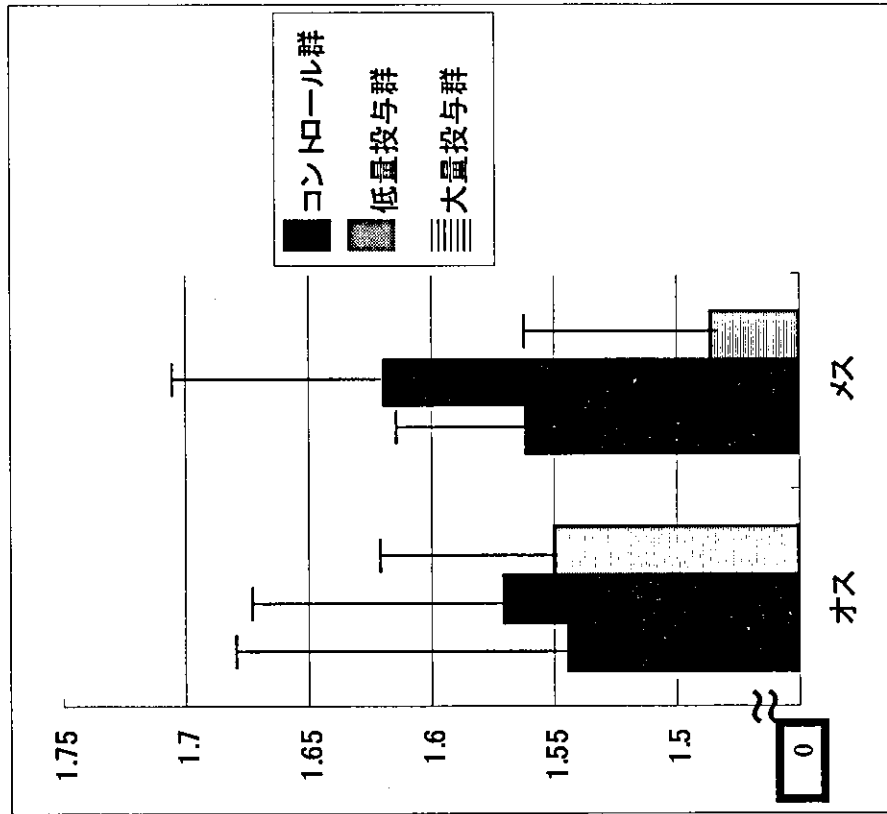
		分子層(μm)	分子層/顆粒層
オス	コントロール群	532.8	1.46
	低量投与群	576.9	1.54
	大量投与群	575.6	1.51
メス	コントロール群	530.0	1.52
	低量投与群	558.3	1.58
	大量投与群	590.8	1.45

図表8 56日齡ラット小脳の計測結果のまとめ(グラフ)

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

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

内分泌かく乱物質の分析（食品関連化学物質の体内移行）

分担研究者	今井俊介	奈良県保健環境研究センター所長
協力研究者	北田善三	畿央大学健康科学部教授
協力研究者	大前壽子	奈良県保健環境研究センター総括研究員
協力研究者	茶山和敏	静岡大学農学部助教授

研究要旨

Bisphenol A (BPA) 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、遊離体及び、抱合体を含めた総量を LC/MS/MS による分析法により測定した。

投与後2時間目搾乳群で、単独皮下投与群では、BPA、Genistein及びResveratrolの乳汁中総量及び遊離体濃度の平均値は各々590 ng/mL（遊離体520）、96 ng/mL（遊離体65）、1,400 ng/mL（遊離体1,100）であり、3種混合経口投与では、各々110 ng/mL（遊離体21）、170 ng/mL（遊離体10）、120 ng/mL（遊離体45）であった。血清中濃度と比較すると、乳汁中にはいずれの投与物質も抱合体よりも遊離体の方が移行しやすいことが示唆された。また、混合投与では、若干の値変動が見られ、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。経口投与では、各物質ともに血中遊離体濃度が皮下投与に比べて1/8以下と低く、遊離体の存在比率も小さくなり、腸管からの吸収率が低く且つ肝臓における初回通過効果が大いことが示唆された。一方、マウスではGenisteinの経口摂取における吸収・代謝機能が発達していることが示唆された。

BPA、Genistein 及び Resveratrol においては、グルクロン酸抱合等による代謝は早いですが、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ことが明らかになった。腸内細菌等による抱合体の分解と遊離体の再吸収が言われていることから、新生児や乳児における体内作用には、抱合体の影響も考えられ、今後さらに検討する必要があると思われる。

A. 研究目的

新生児期は代謝能力が低く、内分泌かく乱物質の影響が成人に比べて大きく、かつ不可逆的に作用し重大な結果を招く恐れがあることから、経乳汁暴露について関心が寄せられている。BPAと大豆イソフラボンは、高用量経口投与により乳汁を介して次世代に移行することが報告

されている (Snyder R.W. et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 168, 225-234, 2000)、(大野ら、平成10年度厚生科学研究報告書)、(池上ら、平成10年度厚生科学研究報告書)が、乳汁移行についての詳細な報告はほとんど見られない。そこで我々は、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乳児の暴露量及

び生体影響の基礎資料を得ることを目的として、授乳マウスに投与した Resveratrol、Genistein等の植物エストロゲンやBPAの血液及び乳汁移行を調査した。一方、これら物質はフェノール性水酸基を有しており、生体内で主にグルクロン酸抱合体に代謝されて活性を失うが、腸内細菌等により抱合体が加水分解を受け遊離体に変化する可能性も有り、暴露量や生体影響把握については代謝物濃度についても測定する必要があると考えられる。そこで、昨年度までに遊離体に加え、代謝物を含めた総量について測定する高感度分析法の開発を行い、今年度はその分析法を用いて投与した物質の挙動について物質及び投与法の違いから比較した。

B. 研究方法

B-1 マウスへのBPA、Genistein及び Resveratrolの投与

マウスはddY系のメスを用いた。静岡大学農学部の実験動物飼育室で、温度； $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度； $60 \pm 10\%$ 、照明；14時間明期・10時間暗期、飼料及び水；自由摂取の条件下で飼育し、また、飼育ケージはアルミ製、給水瓶はガラス製のものを使用した。交尾確認後のマウスには環境ホルモン実験用飼料であるオリエンタル酵母社製 NIH-07PLDを給与し、また、ケージにはアイソレーションキャップを被せて環境中のBPA汚染を防止した。

交配して交尾が確認されたマウスについて、分娩翌日に仔の数を6匹に揃え、哺乳10日目に母マウスと子マウスを離乳した。そして離乳直後(0時間目)または5時間目にオリーブオイルに溶解した BPA-d16、Genistein及びResveratrolを、10mg/kgの投与量で単独あるいは3種混合して皮下あるいは経口投与した。投与後2時間または7時間目(ともに離乳7時間

目)にソムノペンチル麻酔及びオキシトシンを注射して乳汁を採取し、離乳7時間40分目にクロロホルム過剰麻酔によって屠殺し、心臓穿刺により血液を採取した。得られた血清及び乳汁は直ちにマイナス 20°C 以下で凍結保存し、分析時に室温で解凍した。

B-2 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 Multi-mode 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て測定した。詳細な分析条件は、平成15年度報告に準じた。

B-3 統計処理

測定値は個体差が大きく見られ、正規性が棄却される群も見られたため、有意差の検定は、マン・ホイットニのU検定により行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

昨年度、BPA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、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。

C-1 単独皮下投与（投与後 2 時間目搾乳群）について

昨年度の BPA の結果も考慮すると、単独皮下投与群 (n=5~8) では BPA、Genistein 及び Resveratrol の血清中総量及び遊離体濃度の平均値は各々 1,800 ng/mL (遊離体 300)、220 ng/mL (遊離体 34)、1,800 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)、1,400 ng/mL (遊離体 1,100) であった (図 1)。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 (図 2)、遊離体の乳汁/血清比は、BPA 2.06、Genistein 2.07、Resveratrol 5.46、そして総量の乳汁/血清比は、BPA 0.34、Genistein 0.48、Resveratrol 0.75 であった (図 9-(a))。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 BPA に比べて約 2 倍と高い傾向が見られた。

C-2 混合皮下投与（投与後 2 時間目搾乳群）について

3 種混合皮下投与群 (n=7) では、BPA、Genistein 及び Resveratrol の血清中総量及び遊離体濃度は各々 1,700 ng/mL (遊離体 180)、460 ng/mL (遊離体 110)、1,900 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 (図 3)、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 (図 4)。単独投与と比較すると、BPA 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 と低くなるなど、若干の値変動が見られ、混合投与における代謝酵素誘導等の相互作用の可能性が考えられた。一方、遊離体及び総量の乳汁/血清比については、単独投与のものと同程度であった (図 9-(b))。

C-3 混合経口投与（投与後 2 時間目搾乳群）について

3 種混合経口投与群 (n=6) では、BPA、Genistein 及び Resveratrol の血清中総量及び遊離体濃度は各々 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) と皮下投与と同様に遊離体濃度は血清中より乳汁中で高い傾向を示した (図 5)。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 (図 6)。また混合皮下投与と比較すると遊離体濃度は 3 物質とも 1/8 以下の低い値となり、経口投与にでは皮下投与に比べて抱合体の割合が大きくなり、腸管からの吸収率が低く、且つ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 においては抱

合体濃度が血清中では皮下投与時の 1/2 であったが、乳汁中ではむしろ高濃度で、BPA 及び Resveratrol の検出値に比べても有意に高かった。

C-4 単独皮下投与（投与後 7 時間目搾乳群）について

投与後 7 時間目搾乳群 (n=5~7) での BPA、Genistein 及び Resveratrol では、血清中総量及び遊離体濃度は各々 850 ng/mL (遊離体 9.6)、390ng/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) であった (図 7)。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、BPA 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、乳汁中の遊離体の総量に対する割合も BPA 及び Resveratrol に比べて大きく、有意な差が見られた (図 8)。Genistein では 2 時間目の値が低いことから他の 2 物質に比べて吸収が緩慢であることが示唆された。

D. 考察

昨年度報告したように、試料採取及び分析時における BPA のコンタミネーションをゼロにすることが難しいため、BPA については BPA-d16 を皮下投与して血液及び乳汁への移行を調査した。

BPA の経口投与の場合、遊離体の血中濃度は、腹腔内及び皮下投与に比べて 1 桁から 2 桁低く (Pottenger L.H. et al., *Toxicol. Sci.*, 54, 3-18, 2000)、授乳中 CD ラットへの経口投与 (100mg/kg) では最大で約 1.5µg/mL の濃度の ¹⁴C-BPA が乳汁中に検出されたとの報告 (Snyder R.W. et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 168, 225-234, 2000) や、経口投与により乳汁中排泄の

最高濃度時に血漿中濃度の約 1/4 であったとの報告 (大野ら、平成 10 年度厚生科学研究報告書) がある。

今回我々のデータも皮下投与と経口投与を比較すると、経口投与においては皮下投与に比べて遊離体濃度は 3 物質とも 1/8 以下、総量濃度も Genistein 以外は約 1/5 の低い値であった。遊離体の割合も血清中で 1.1~4.7%、乳汁中で 7.3~38.5% と、皮下投与の血清中 10.6~24.7%、乳汁中 50.7~68.7% に比べて低く、腸管内における吸収率が低いことと、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 においては抱合体濃度が血清中では皮下投与時の 1/2 であったが、乳汁中では皮下投与時より高濃度で、BPA 及び Resveratrol に比べても有意に高く検出された。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、マウスでは経口摂取における吸収・代謝機能が発達していることが示唆された。一方、Resveratrol は、今回個体差が大きく見られたが、イソフラボンと異なり摂取の機会の少ないことが関与している可能性も考えられるものの、その理由については今後の検討課題である。

以上の結果より、BPA、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経口投与の場合には特に遊離体に比べて非常に高いことが明らかになった。腸内細菌等によ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影響も考えられるが、新生児や乳児における生体影響における影響についての研究報告は見られないことから、今後さらに検討する必要があると思われる。

今回は、10mg/kg の投与で検討したが、

日本人の総イソフラボンの摂取量は27.75mg/day(外海ら、平成10年度厚生科学研究報告書)、35mg/day程度(織田ら、平成11~13年度厚生科学研究総合研究報告書)と報告されており、最近、イソフラボンを高濃度に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、BPAについては、成人の暴露量は1 µg/kg/dayを超えない(Hirose A. et al., *Jpn. J. Food Chem.*, 10, 1-12, 2003)と報告されていることから、今回の投与量の1/10,000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BPA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。しかし、植物エストロゲンであるGenisteinやResveratrolにおいても、遊離体の方が抱合体に比べ、乳汁に移行しやすいという結果や、個体差が大きく見られたことは、代謝の未発達な新生児や乳児への影響を考えるとさらなる検討が必要と思われる。

E. 結論

1)単独皮下投与の投与後 2 時間目搾乳群では、BPA、Genistein 及び Resveratrol の乳汁中総量及び遊離体濃度の平均値は各々590 ng/mL (遊離体 520)、96 ng/mL (遊離体 65)、1,400 ng/mL(遊離体 1,100)であり、Genistein の検出値は他の 2 物質に比べて低かった。3 物質とも遊離体の総量に対する割合は血清より乳汁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 時間目搾乳群に比べて、BPA 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。

2)3 種混合皮下投与においては、若干の値変動が見られ、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。

3)3 種混合経口投与においては、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)であり、混合皮下投与と比較すると、遊離体濃度は 1/8 以下の低い値で、皮下投与に比べて抱合体の割合が大きく、腸管からの吸収率が低く且つ肝臓における初回通過効果が大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、マウスでは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。

4) BPA、Genistein 及び Resveratrol においては、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ことが明らかになった。腸内細菌等によ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いることから、新生児や乳児における体内作用には抱合体の影響も考えられ、今後さらに検討する必要があると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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：大前壽子、北田善三、茶山和敏、螺良愛郎、今井俊介、環境ホルモン学会第7回研究発表会、2004年12月14-15日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

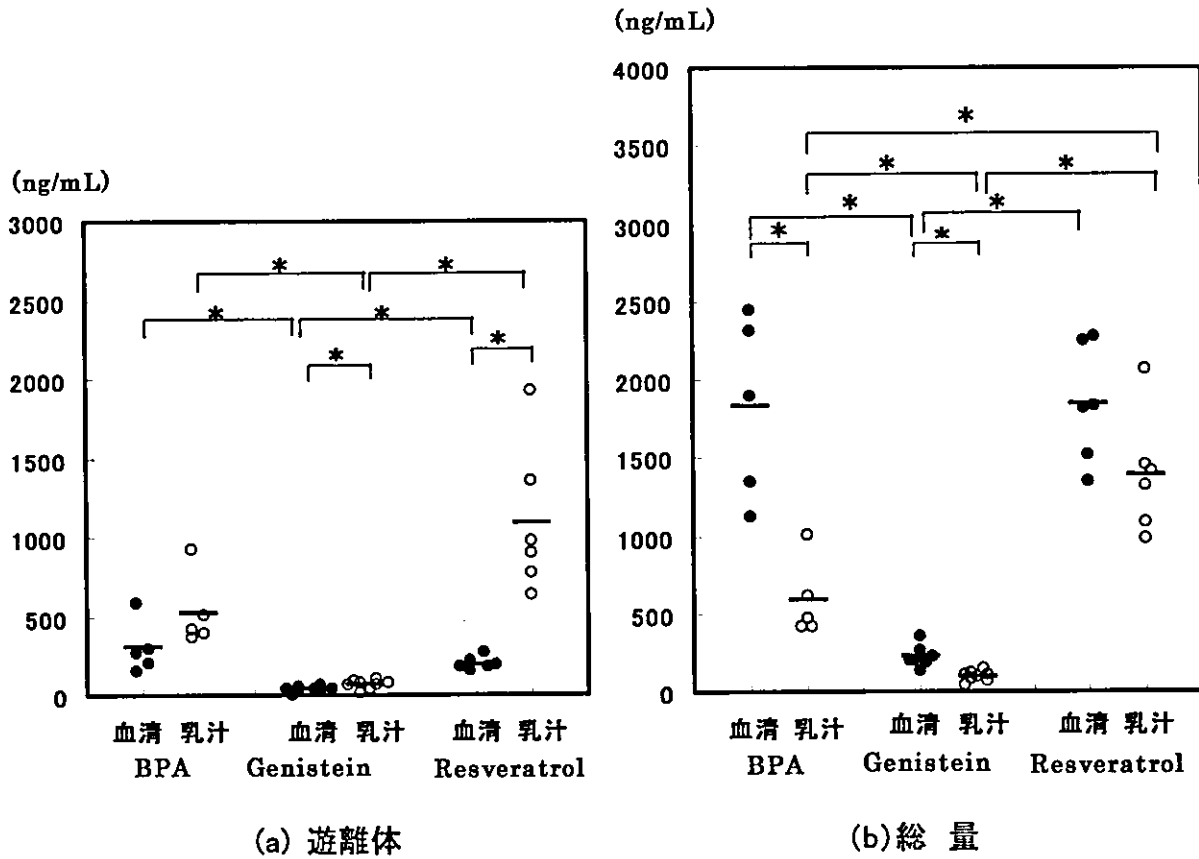


図1 単独皮下投与(10mg/kg)の投与後2時間目搾乳群における血清及び乳汁中の濃度
 —: 平均値、 * : 有意差あり (P < 0.05)

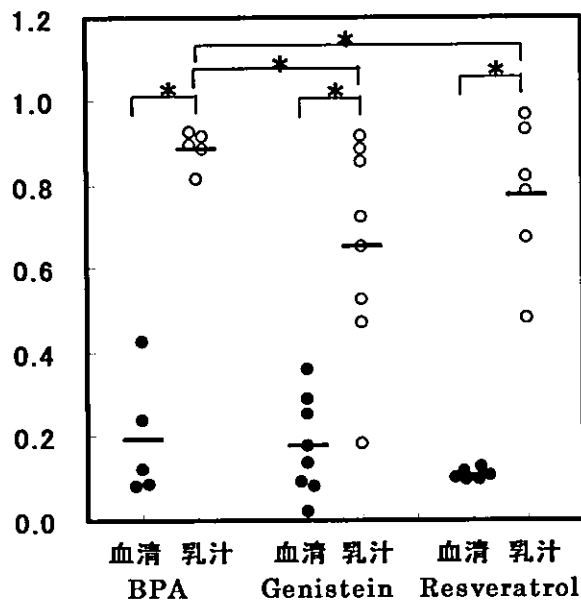


図2 単独皮下投与(10mg/kg)の投与後2時間目搾乳群における血清及び乳汁中の遊離体/総量比
 —: 平均値、 * : 有意差あり (P < 0.05)

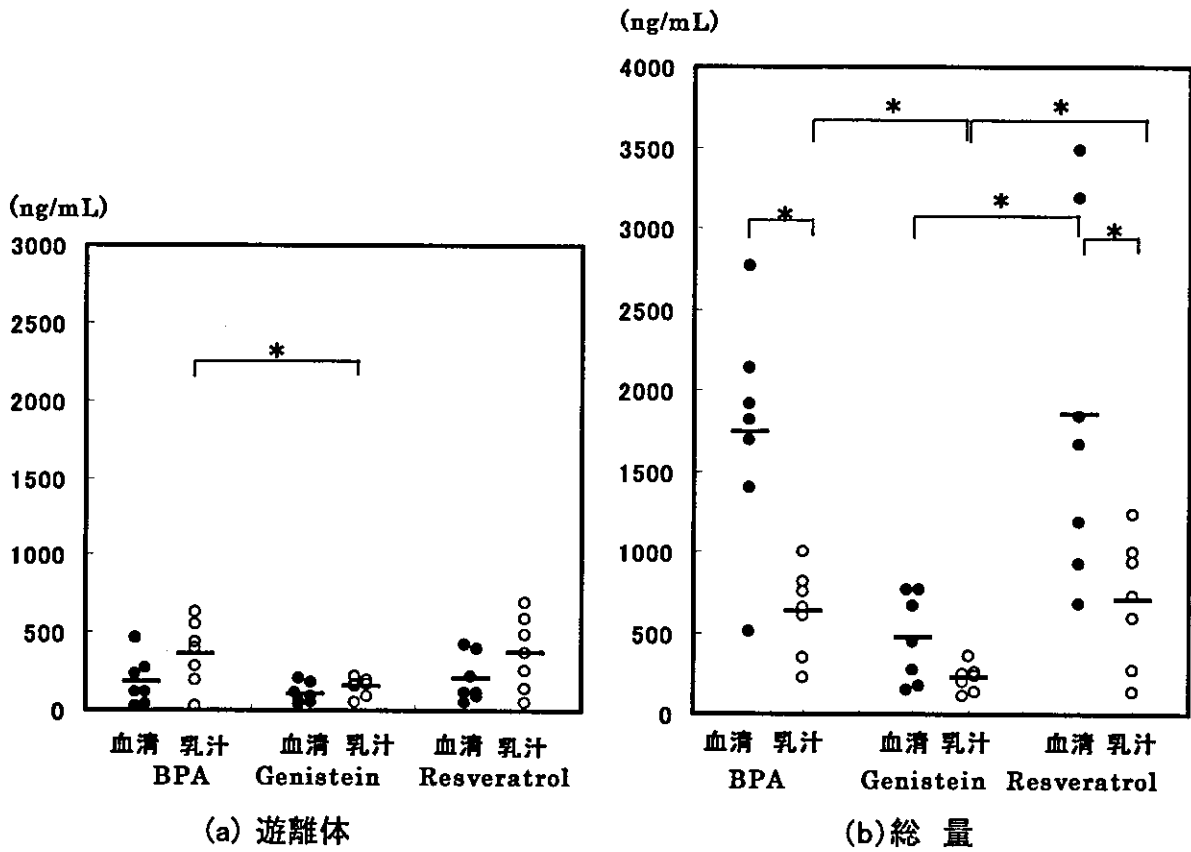


図3 混合皮下投与(各10mg/kg)の投与後2時間目搾乳群における血清及び乳汁中の濃度
—: 平均値、 * : 有意差あり (P < 0.05)

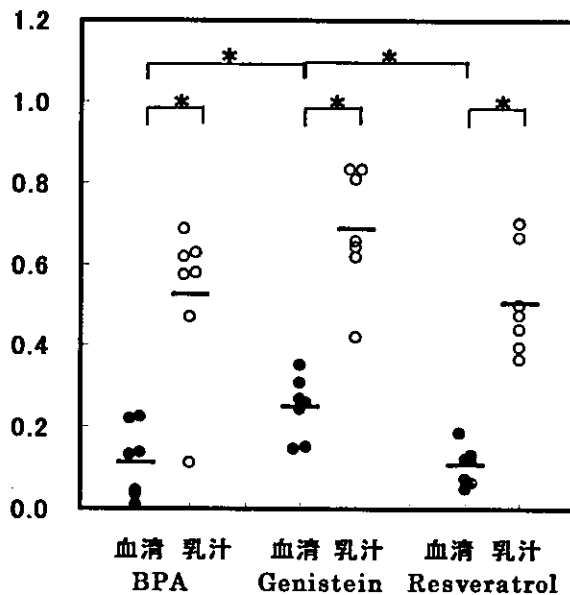


図4 混合皮下投与(各10mg/kg)の投与後2時間目搾乳群における血清及び乳汁中の遊離体/総量比
—: 平均値、 * : 有意差あり (P < 0.05)

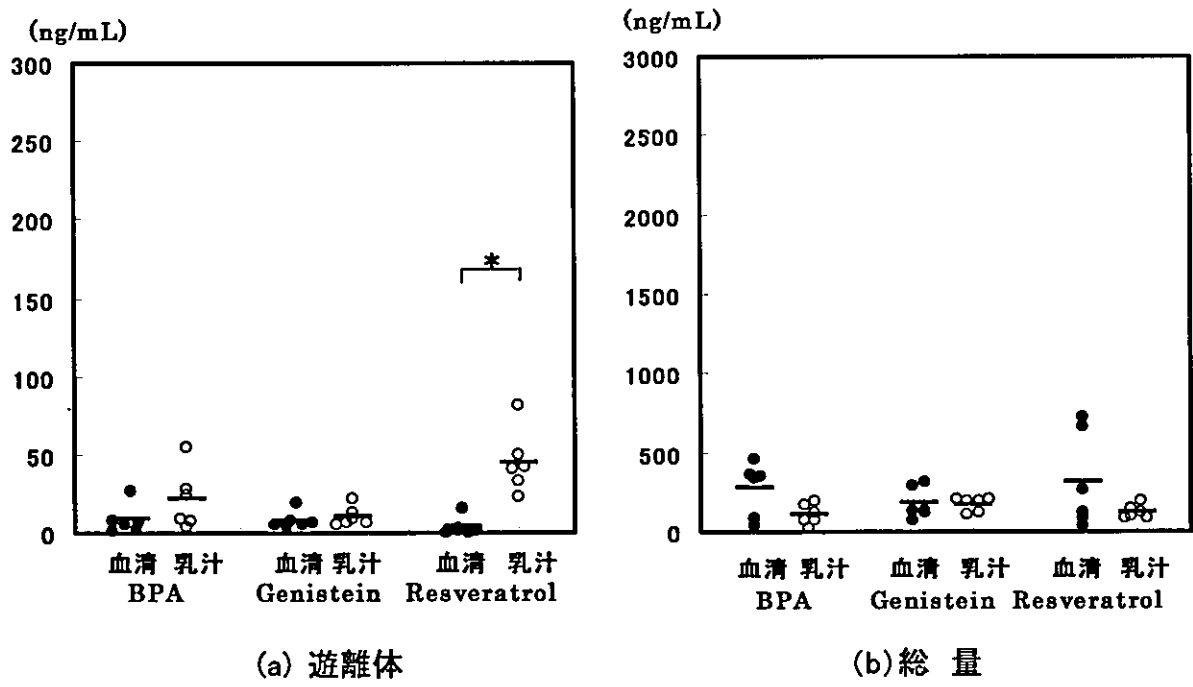


図5 混合経口投与(各10mg/kg)の投与後2時間目搾乳群における血清及び乳汁中の濃度
 —:平均値、 * :有意差あり (P<0.05)

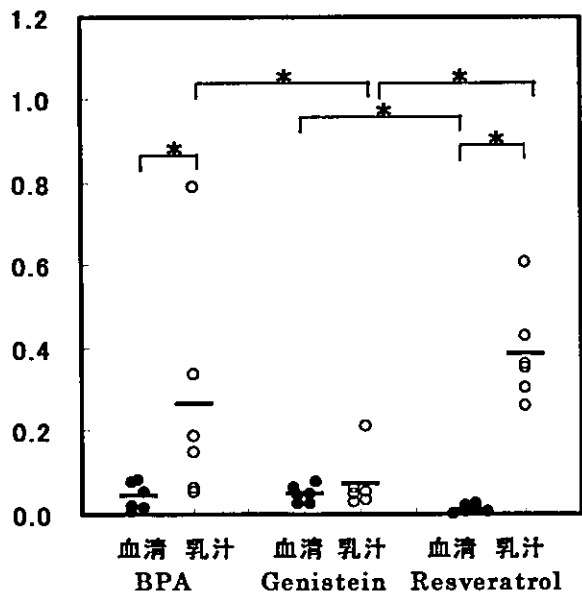


図6 混合経口投与(各10mg/kg)の投与後2時間目搾乳群における
 血清及び乳汁中の遊離体/総量比
 —:平均値、 * :有意差あり (P<0.05)

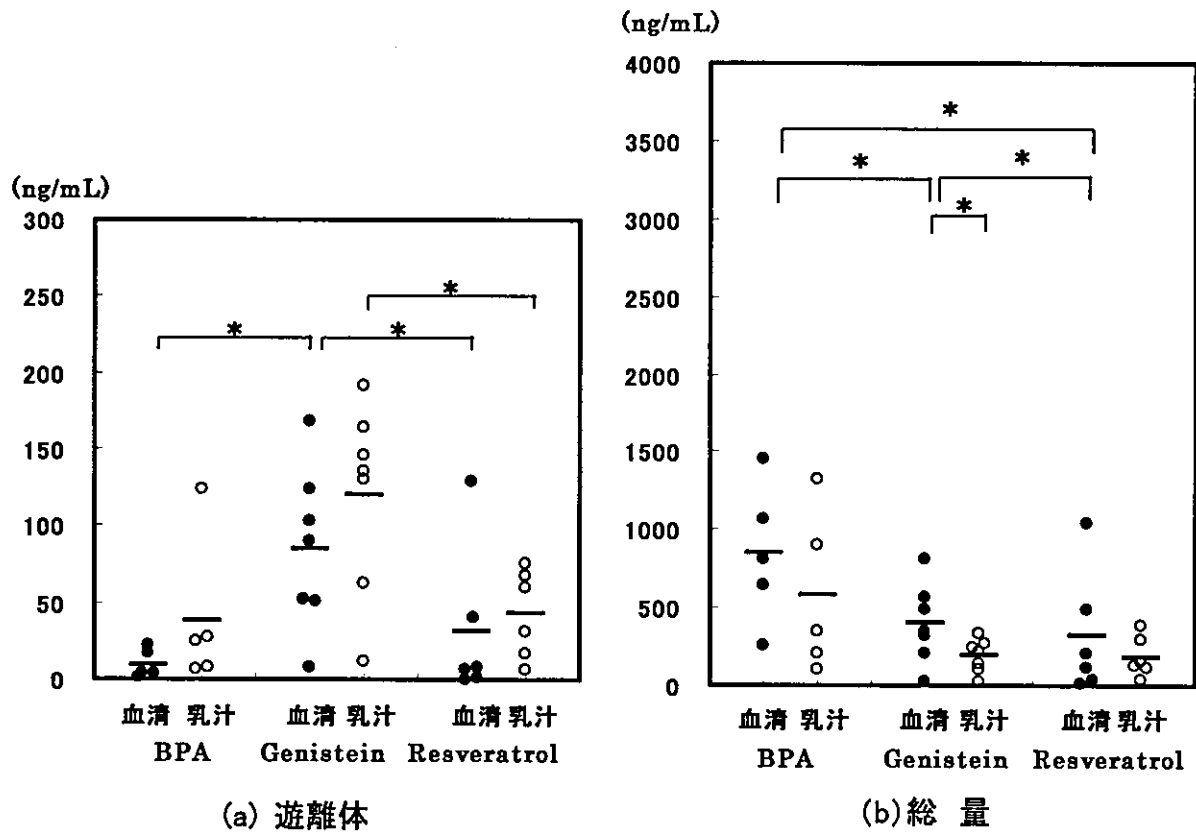


図7 皮下単独投与(10mg/kg)の投与後7時間目搾乳群における血清及び乳汁中の濃度
 —: 平均値、 * : 有意差あり (P < 0.05)

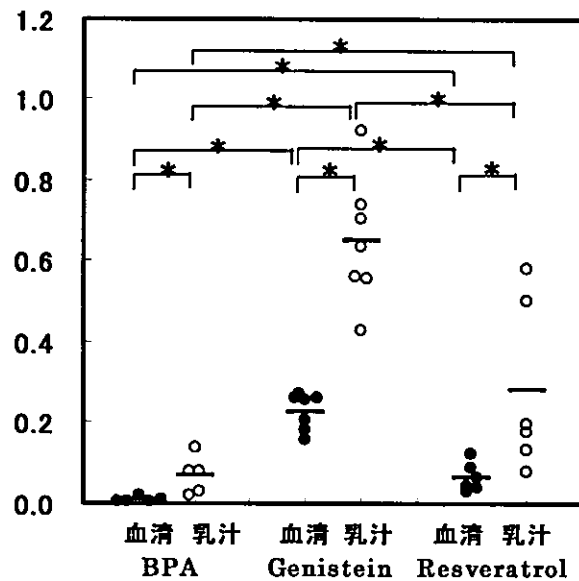
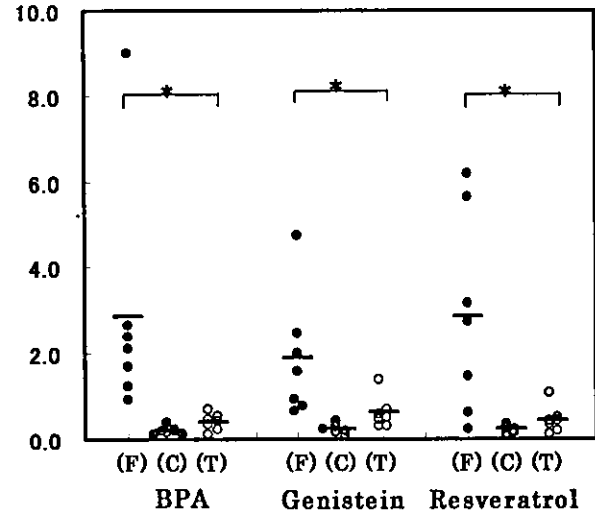
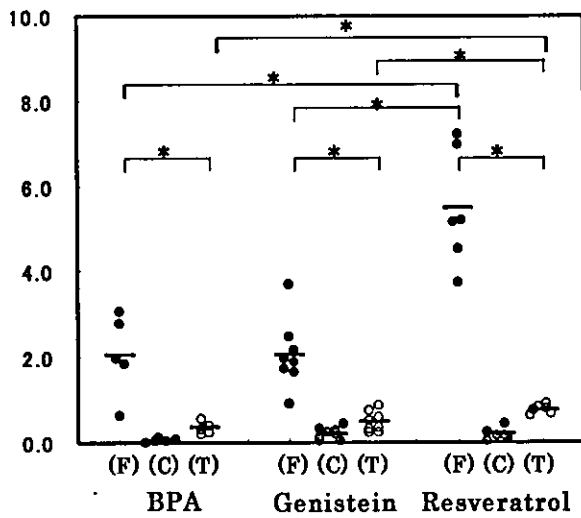
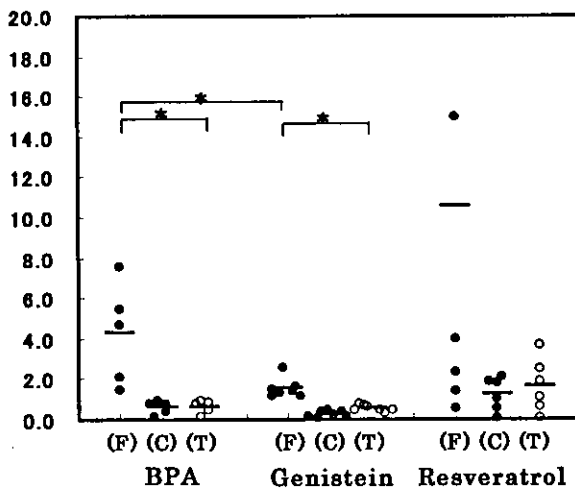


図8 皮下単独投与(10mg/kg)の投与後7時間目搾乳群における
 血清及び乳汁中の遊離体/総量比
 —: 平均値、 * : 有意差あり (P < 0.05)

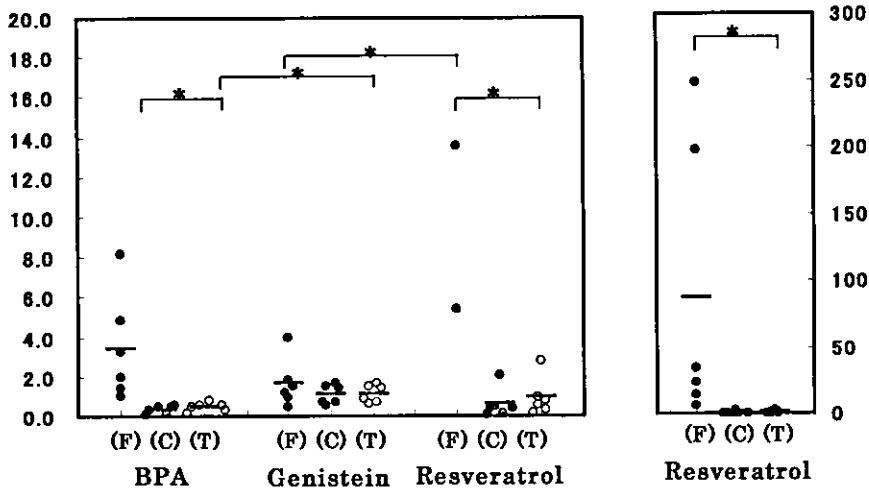


(a) 皮下単独投与の投与後2時間目搾乳群

(b) 皮下混合投与の投与後2時間目搾乳群



(c) 皮下単独投与の投与後7時間目搾乳群



(d) 経口混合投与の投与後2時間目搾乳群

図9 各投与条件における遊離体、抱合体及び総量濃度の乳汁／血清比

(F)：遊離体、 (C)：抱合体、 (T)：総量

—：平均値、 *：有意差あり (P<0.05)

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・癌化及び内分泌かく乱作用の比較

主任研究者：螺良愛郎 関西医科大学病理学第二講座教授

分担研究報告書

研究課題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

研究課題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

分担研究担当者：茶山和敏 静岡大学農学部助教授

研究要旨

平成14年度に、マウスを用いた子宮肥大試験によって、同一条件下で、Diethylstilbestrol (DES)、Bisphenol A (BPA)、Genistein (Gen) および Resveratrol (Res) の4種の物質と Estradiol-17 β (E2) の生体内におけるエストロゲン活性の比較を行った。その結果、E2 および DES のエストロゲン活性はほとんど同じで、また、BPA、Res および Gen のエストロゲン活性は E2 と比較すると非常に弱く、BPA で約1/10万、Res で約1/5万、Gen は約1/50万以下であることが示唆された。さらに、E2 と Res および Gen は単独でエストロゲン活性が見られない濃度でも、組み合わせることによって相乗的にエストロゲン活性が増加することが判明した。そこで、平成16年度では、研究課題1として、カビ毒由来のエストロゲン様物質である Zearalenone (Zen) とその代謝物質である Zeranol (Zol) 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結合試験を用いて比較した。その結果、子宮肥大試験で、Zol は Zen 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。Zol と Zen の活性を E2 と比較すると Zol で1/5000、Zen では1/2万で、調査した環境ホルモン物質の中では Zol が最も高いエストロゲン活性を示した。また、Zol はエストロゲンレセプターへの結合活性が Zen よりも強く、ER α への結合親和性が Zen より高いことが明らかとなった。

一方、平成15年度の研究として、エストロゲンがその発症に関与していることが知られている自己免疫病の発症および悪性進展に対する環境ホルモン物質の影響を調べることを目的として、植物由来のエストロゲン様物質で大豆に多く含まれる Gen とエストロゲン様作用を有する環境ホルモン物質として最も頻繁に研究されている BPA の自己免疫病の発症および悪性進展に対する影響を調べた。その結果、両物質が自己免疫病の発症開始には影響しないものの、悪性進展に影響し

て、生存率を低下させることを明らかにした。そこで、平成 16 年度の研究課題 2 として、Gen と BPA に加えて、ブドウや赤ワインに多く含まれる Res およびカビ毒由来のエストロゲン様物質である Zer 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 BPA、Gen、Res および Zol 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し、自己免疫病マウスの生存率を低下させることが明らかとなった。

研究課題 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

A. 研究目的

これまでの植物エストロゲンも含めた環境ホルモン物質の生体に対する影響の研究では、個々の物質をエストロゲンと比較して調べており、特に、マウスを用いた子宮肥大試験によって同一条件下で植物エストロゲンや環境ホルモン物質のエストロゲン活性を同時に比較した報告は見られなかった。平成 14 年度に、マウスを用いた子宮肥大試験によって、同一条件下で、環境ホルモン物質として最も頻繁に研究されている Diethylstilbestrol (DES) および Bisphenol A (BPA)、代表的な植物エストロゲンである Genistein (Gen) および Resveratrol (Res) の 4 種の物質と Estradiol-17 β (E₂) の生体内におけるエストロゲン活性の比較を行った。その結果、E₂ および DES のエストロゲン活性はほとんど同じで、また、BPA、Res および Gen のエストロゲン活性は E₂ と比較すると非常に弱く、BPA で約 1/10 万、Res で約 1/5 万、Gen は約 1/50 万以下であることを明らかにした。さらに、E₂ と Res および Gen は単独でエストロ

ゲン活性が見られない濃度でも、組み合わせることによって相乗的にエストロゲン活性が増加することが判明した。そこで、平成 16 年度では、研究課題 1 として、カビ毒由来の天然エストロゲン様物質である Zearalenone (Zen) とその代謝物質である Zeranol (Zol) 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結合試験を用いて比較した。

B. 材料および方法

(1) 子宮肥大試験

10 週齢 ICR マウス雌の卵巣を摘出し、摘出 4 週間後から、E₂、Zen および Zol を 0.5ng-100mg/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。

(2) エストロゲンレセプター (ER) 結合試験

Zen および Zol については ER 結合試験によるエストロゲン活性の比較も行った。ヒト ER α または ER β と [³H]E₂ および Zen および Zol を 100nM から 100 μ M 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 Zen および Zol の ER α または ER β との結合活性