

を算出して比較した。

### (3) 統計学的処理

子宮重量は Student *t* 検定を用いて統計学的検定を行った。

### (4) 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. 結果

Zol と Zen のエストロゲン活性を、マウスを用いた子宮肥大試験によって比較した結果、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（図1および図2）。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、Zol は平成14年度の本研究で調査した物質も含めた6種類の環境ホルモン物質の中では DES に次ぐ高いエストロゲン活性を示した。また、ER 結合試験を行った結果、Zol はエストロゲンレセプターへの結合活性が Zen よりも強いことが判明した（図3）。また ER $\beta$  への結合親和性は両者に差がなかったが、ER $\alpha$  への結合親和性は Zen より Zol のほうが高いことが明らかとなった（表1）。

## D. 考察

Zol と Zen はこれまで未成熟ラットを用いた子宮肥大試験で比較が行われており、その結果では両者に差はないと報告されていた。しかし、本研究で得られた子宮肥大試験の結果では、Zol が Zen と比較して、エストロゲン活性が少なくとも4倍高いことが明らかとなった。ER 結合試験でも、子宮肥大試験での結果と同様に、Zol が Zen よりも ER との親和

性が高いことが判明したことから、Zol が Zen よりも生体内ではエストロゲン活性が高いと考えられる。これらの結果から、子宮肥大試験では、未成熟動物を使う場合と卵巣除去した成熟動物を使う場合には異なる結果が出る可能性があることも考慮する必要があることが示唆された。また、酵母を用いた ER のレポーター遺伝子発現試験による Zol と Zen のエストロゲン活性の比較では ER $\alpha$  と ER $\beta$  との活性はほとんど変わらなかった。しかし、本研究では ER $\beta$  への結合親和性は両者に差がなかったが、ER $\alpha$  への結合親和性は Zen より Zol のほうが高いことが明らかとなり、ER $\alpha$  の発現が優勢な子宮や卵巣、乳腺などの組織に対しては Zol が強く影響する可能性が考えられた。いずれにしても、Zen や Zol は食肉に残留することが明らかになっていることから、その影響についてさらに詳細な検討が望まれる。

## E. 結論

子宮肥大試験を用いて本研究で検討したすべての環境ホルモン物質のエストロゲン活性は DES>Zol>Zen>Res>BPA>Gen の順となった。しかし、それらのエストロゲン活性は E2 と比較すると 1/5000~1/50 万で、非常に弱いことが判明した。また、Zen とその代謝物質である Zol のエストロゲンレセプターに対する結合親和性を比較した結果、Zol のほうが Zen よりもその活性が高く、また、ER $\alpha$  への親和性が強いことが明らかとなった。

## 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

### A. 研究目的

自己免疫現象とは、抗体またはT細胞が自己の組織や細胞を抗原と認識し反応する現象である。この結果引き起こされるのが自己免疫病であり、種々の全身性あるいは臓器特異的疾患が起きることが知られている難病である。自己免疫病罹患率は女性のほうが圧倒的に高く、自己免疫病の1つである全身性エリテマトーデス（SLE）の罹患率は女性：男性＝10：1である。この原因として、自己免疫疾患の発症や発症後の悪性進展にエストロゲンやプロラクチンなどの雌性ホルモン、特にエストロゲンが関与していることが明らかになっている。エストロゲンは雌の生殖器官の発達や機能維持に最も重要なステロイドホルモンであるが、IFN- $\gamma$ 、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10などのサイトカイン産生の促進やT細胞の増殖と機能の抑制など、免疫機能にも影響を及ぼしていることが判明している。一方、近年の研究で、人工的に製造される化学物質のうち、数%が内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン物質）の疑いがあることが報告されている。そのうち、耐熱プラスチックの原料の一部に使われている Bisphenol A (BPA) は、高温条件下での使用の際の溶出によってヒトに直接暴露されている。これまでの研究で、BPA を含有した飼料を投与されたラットの分娩回数の減少やエストロゲン反応性のヒト乳癌細胞の増殖作用など、BPA がエストロゲン様活性を有する内分

泌攪乱物質であることが明らかになっている。そのため、ヒトを含めた動物、特に雌の繁殖に対する影響が懸念されている。他方、大豆に多く含まれる Isoflavone のひとつである Genistein (Gen) および赤ワインに多く含まれているブドウ由来の物質である Resveratrol (Res) はエストロゲン活性を持つことが知られており、植物エストロゲンとして、更年期障害の緩和や骨粗鬆症の予防などに効果があるサプリメントとしても販売されている。Gen や Res には乳癌や卵巣癌等の癌細胞の繁殖を押さえるという報告もあるが、逆に内分泌系や免疫系に悪影響を与える内分泌攪乱物質としての一面も持つ可能性が考えられている。さらに、カビ由来で家畜の成長促進剤として用いられている Zeranol (Zol) は強いエストロゲン様作用を有することが判明しており、食肉中に残存している Zol 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。

我々は、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 Gen、環境ホルモン物質として最も頻繁に研究されている BPA を自己免疫病モデルマウスに 1 ヶ月齢から 3 ヶ月齢までの 2 ヶ月間投与して、自己免疫病発症開始に対する影響調べるとともに 7 ヶ月齢までの投与群も作成して生存率に対する影響も検討した。その結果、Gen と BPA は自己免疫病の発症開始時期には影響しないものの、生存率を著しく低下させることが判明し、両物質が自己免疫病の悪性進展に影響している可能性が示唆された。

そこで、平成 16 年度の研究として、BPA、

Gen を自己免疫病モデルマウスである MRL-*lpr<sup>cs</sup>*/*lpr<sup>cs</sup>* (MRL-*lpr<sup>cs</sup>*) マウスに 1 ヶ月齢から 4 ヶ月齢までの 3 ヶ月間投与して、自己免疫病の悪性進展に対する影響をより詳細に検討した。さらに、Res および Zol についても同様の検討を行った。

## B. 材料および方法

### 1. 実験動物および飼育条件

実験動物は本大学の飼育室において、兄妹交配により繁殖・維持されている MRL-*lpr<sup>cs</sup>*/*lpr<sup>cs</sup>* マウス (MRL-*lpr<sup>cs</sup>* マウス) を用いて実験を行った。MRL-*lpr<sup>cs</sup>* マウスは第 19 染色体上に *lpr<sup>cs</sup>* 劣性遺伝子を持つ突然変異体で、*Fas* 遺伝子および *Fas* 抗原遺伝子の異常のために、本来胸腺でアポトーシスにより除去されるはずの自己反応性 T 細胞が末梢に現れるという特徴を有する。そして、このような異常が原因となって、全身性リンパ節腫脹や腎炎などの重篤な自己免疫症状が起き、最終的には死に至る。実験に使用したすべてのマウスは温度 24±1°C、湿度 50±10% で、照明は 14 時間明期、10 時間暗期 (6:00 点灯、20:00 消灯) の光周期の環境下で飼育した。

### 2. 飼料

飼料は、投与開始 (1 ヶ月齢) から、内分泌攪乱物質研究用飼料である NIH-07PLD (東京オリエンタル酵母工業株式会社) を、水とともに自由摂取させた。

### 3. 投与実験

各環境ホルモン物質の投与量は、E2、BPA および Gen は平成 15 年度の本研究事業の中で行った結果をもとにして、よ

り影響が高かった投与量を投与した。また、Res は平成 14 年度の研究結果で、Zer は子宮重量法による予備実験で、子宮重量が有意に増加した濃度をもとにして、投与量を決めた。各投与物質はオリーブ油に溶かして背部皮下に投与し、コントロール群にはオリーブ油のみを投与した。各物質の詳細および投与量は以下の通りである。

(1) エストロゲン (陽性コントロール、Estradiol-17 β ; 1,3,5[10]-Estratriene-3,17 β -diol ; E2)

投与量 : 10 μg/kg

(2) Bisphenol A (4,4-Isopropylidenediphenol ; BPA)

投与量 : 3mg/kg

(3) Genistein (4,5,7-Trihydroxyisoflavone ; Gen)

投与量 : 15mg/kg

(4) Zeranol (α-Zearalanol ; Zol)

投与量 : 0.5mg/kg

(5) Resveratrol (3,4,5-trihydroxytrans-stilbene ; Res)

投与量 : 10mg/kg

### 4. 実験方法

#### (1) 投与実験および生存率調査

1 ヶ月齢の MRL-*lpr<sup>cs</sup>* マウスを雄雌に分け、それぞれをさらに Control 群・E2 投与群・BPA 投与群・Gen 投与群に分けた。また、同様に、別の Control 群、Res 投与群および Zol 投与群を作成した。そして、各投与物質を週 2 回 (原則として火曜日と金曜日)、皮下投与した。自己免疫病の悪性進展による死亡が始まる 4 ヶ月齢 (投与開始後 2 ヶ月目) まで 3 ヶ月間投与した後、体重測定、尿中タンパク量と皮膚炎の検査および解剖を行っ

た。

### (2) タンパク尿症の検査

マウスから新鮮な尿検体を採取し、エームス尿検査試験紙(Albustix、三共)を用いて尿中タンパク量の判定を行った。判定は-、±、+、++、+++および++++の6段階に分け、-は陰性、±は0mg/dl以上、+は30mg/dl以上、++は100mg/dl以上、+++は300mg/dl以上、++++は1000mg/dl以上とし、++以上に判定されたマウスをタンパク尿症とした。

### (3) 皮膚炎の検査

皮膚炎の検査は、マウスの鼻、顔、首、背中および左右の耳の炎症を調べた。炎症度の評価は炎症なし、炎症、壊死の3段階に分け、それぞれを0、1および2点として点数化した。

### (4) 体重および臓器重量の測定

投与開始2ヶ月目に体重を計測後、各マウスをクロロホルムの過麻酔により屠殺し、腹腔内リンパ節、皮下リンパ節、脾臓、腎臓、卵巣と子宮または精巣を摘出し、各重量を測定した。また、心臓より血液を採取し、血清中の免疫複合体、抗DNA抗体およびIFN- $\gamma$ の測定に用いた。

### (5) 腎臓の組織学的観察

摘出した腎臓は4%パラフォルムアルデヒド溶液で固定した後、H・E染色した腎臓組織標本を作製した。染色した腎臓標本は検鏡して糸球体腎炎の重症度および血管炎の重症度を判定した。一検体につき糸球体は20個、血管は5個を点数評価し、それぞれの点数の平均をその

検体の点数とした。点数評価の基準は以下の通りである。

糸球体腎炎…0：正常。1：糸球体に軽度の細胞増殖が見られるもの。2：糸球体に重度の細胞増殖が見られるもの。3：糸球体に壊死や半月形成が認められるもの。

血管炎…0：正常。1：1、2ヶ所で血管壁あるいは血管周囲の一部で軽度の変化が見られるもの。2：3、4ヶ所で血管壁あるいは血管周囲の一部で顕著な変化が見られるもの。3：5ヶ所以上で血管壁あるいは血管周囲の一部で顕著な変化が見られるもの。さらにリンパ球の浸潤の程度を加味して総合的に0から3まで4段階に数値化し、分類した。

### (6) ELISA法による血清中免疫複合体量の測定

酵素免疫測定法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay；ELISA法)を用いた循環免疫複合体(CIC；circulating immune complex)測定キットを使用して血清中の免疫複合体を測定した。

### (7) ELISA法による血清中抗DNA抗体量の測定

50 $\mu$ g/mlのPOLY-L-LYSINE/PBSを各ウェルに50 $\mu$ l加えて室温で2時間インキュベートした後、10 $\mu$ g/mlのウシ胸腺を各ウェルに50 $\mu$ l加え、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートして固相した。ブロッキング処理後、1%BSA、5mM EDTA/0.05% Tween20/PBSで希釈(IgM測定時は1000倍、IgG測定時は20倍)しておいたマウス血清またはスタンダードを50 $\mu$ lずつ添加して室温で2時間インキュベート

した。そして、二次抗体として、ビオチン化抗マウス Ig (IgM または IgG) 抗体を添加して室温で1時間インキュベートし、その後、HRP-Streptavidin を各ウェルに 100  $\mu$ l 加え、室温で30分間インキュベートした。最後に、o-phenylenediamine + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 発色溶液を各ウェルに 100  $\mu$ l 加えて室温で発色させ、2N 硫酸を各ウェルに 50  $\mu$ l 加えて反応を停止させた後、マイクロプレートリーダー (波長 485nm) を用いて測定した。

#### (7) ELISA 法による血清中 IFN- $\gamma$ 量の測定

血清中 IFN- $\gamma$  量の測定には、IFN- $\gamma$  測定キットである Interferon gamma [(m)IFN  $\gamma$  ], mouse ELISA system (amersham pharmacia biotech) を用いて各マウスの血清中 IFN- $\gamma$  量を測定した。

#### (8) 統計学的処理

体重、臓器重量などの測定値は Student *t* 検定を、IFN- $\gamma$ 、免疫複合体、腎炎の測定値は Mann-whitney *U* 検定を用いて統計学的検定を行った。

#### (9) 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. 結果

1、BPA および Gen 投与による自己免疫病発症および悪性進展への影響

(1) 体重、臓器重量および腹腔内リンパ節と皮下リンパ節の比較

いずれの投与群も、雌雄の体重および雄

の臓器重量への影響は見られなかった (図4および図5)。雌では Gen 投与群におけるリンパ節重量と子宮重量に増加傾向が見られた (図6)。

#### (2) タンパク尿症発症率

重度のタンパク尿症を示す++以上のマウスの割合は、雌では Control 群が 40% だったのに対し、各投与群はいずれも 70%以上の罹患率を示し、各投与によってタンパク尿症が増悪することが示された (図7)。雄では、Gen 投与群が Control 群と比べて罹患率が若干低下していた。

#### (3) 皮膚炎

皮膚炎は個体差が大きく、有意差は見られなかったものの、雄では Control 群と比べて各投与群で皮膚炎の発症程度が高い傾向が見られた (図8)。

#### (4) 腎臓の組織病理学的分析

糸球体腎炎は各投与群で明白な差はなかった (図9)。血管炎は、雌の各投与群でも悪化している傾向が見られた (図10)。

#### (4) 免疫複合体量

雄の E2 投与群が Control 群よりも有意に高かったが、その他の投与群では差が見られなかった (図11)。

#### (5) 抗 DNA 抗体量

IgG 抗 DNA 抗体量はいずれの投与群にも変化が見られなかったが、IgM 抗 DNA 抗体量は、雌 Gen 投与群が Control 群と比べて有意に高かった (図12)。

#### (5) 血中 IFN - $\gamma$ 量

いずれの投与でも、血中 IFN -  $\gamma$  量に影響は見られなかった (図 13)。

### 2、Res および Zol 投与による自己免疫病発症および悪性進展への影響

(1) 体重および臓器重量：各投与群の体重および脾臓重量には有意な差が見られなかった (図 14)。臓器重量の結果は図 14 および図 15 に示した。腎臓重量は雌ではいずれの投与でも差が見られなかったが、雄では Res 投与によって腎臓重量が有意に増加した。また、Res 投与マウスでは、摘出した腎臓の中に、目視で変性していることがわかるものも確認された。リンパ節重量は、Res 投与群では、雄の皮下リンパ節重量が有意に増加し、腹腔内リンパ節は雌雄ともに有意差はないものの顕著に増加していた。また、Zol 投与群では雄の皮下リンパ節重量が増加する傾向が見られたが、その他は対照群と差がなかった。子宮、卵巣および精巣重量は各投与による影響は見られなかった。

(2) タンパク尿症：Res、Zol いずれの投与群でも、投与終了時のタンパク尿症罹患率が雌雄ともに対照群と比較して顕著に高かった (図 16)。特に、雌の Zol 投与群の罹患率は対照群の 2 倍以上の 90% と、非常に高かった。

#### (3) 皮膚炎

雄では Control 群と比べて各投与群で皮膚炎の発症程度が高く、特に Zol 投与群では Control 群と比較して有意な症状の悪化が見られた (図 17)。

#### (4) 腎臓の組織病理学的分析

糸球体腎炎は雌の Res 投与群で有意な低下が見られたが、各投与群で明白な差はなかった (図 18)。血管炎は、いずれの投与群でも Control 群と差が見られなかった (図 19)。

#### (5) 免疫複合体量

雌の Res 投与群が Control 群よりも有意に低かったが、その他の投与群では差が見られなかった (図 20)。

#### (6) 抗 DNA 抗体量

IgG 抗 DNA 抗体量はいずれの投与群にも変化が見られなかったが、IgM 抗 DNA 抗体量は、雄の Zol 投与群が Control 群と比べて有意に高かった (図 21)。

#### (7) 血中 IFN - $\gamma$ 量

いずれの投与でも、血中 IFN -  $\gamma$  量に影響は見られなかった (図 22)。

#### (8) 生存率

投与開始 6 ヶ月目において、各投与群の生存率に有意な差は見られなかったが、雌では両物質の投与群の生存率が低下する傾向が見られた。また、雄の Zol 投与群の死亡開始時期は Control 群よりも 20 日早く、Control 群の最初の死亡日までに 50% のマウスが死亡した (図 23)。

### D. 考察

Gen と BPA の 3 ヶ月間投与試験による結果から、2 ヶ月間投与の結果と同様に、自己免疫病、特に腎炎の悪性進展が両物質の投与によって促進され、その結果、両物質の投与による生存率の低下が起きることが示唆された。また、植物エスト

ロゲン物質である Res は3ヶ月間の投与によって自己免疫病発症および悪性進展を促進する可能性が示唆された。また、Zol は自己免疫病発症および悪性進展には影響しなかったが、自己免疫病で最も重篤な症状である自己免疫性腎炎の発症および悪性進展を促進している可能性が示唆された。Res と Zol については子宮肥大試験で子宮重量を増加させた濃度で投与実験を行った。しかし、BPA と Gen の投与実験の結果では、子宮肥大試験で子宮重量を増加させない低濃度の投与群のほうが、自己免疫病の発症および悪性進展により強い影響が出るということが明らかになっている。そのため、Res と Zol についても低濃度の投与量で投与実験を行う必要があると思われる。

本研究で調べた4種類の環境ホルモン物質のうち、Gen が自己免疫病の発症および悪性進展に最も悪影響を及ぼす可能性が示された。本研究で行った Gen の投与は皮下投与であり、またその投与量も一般のヒトの摂取量と比較するとかなり多い。しかし、日本では欧米に比べて通常の食生活の中で Gen を多く摂取しており、また最近では更年期障害や生理不順の改善等の目的で Gen のサプリメントが一般にも広く出回っている。日本でも近年、自己免疫病の患者数が年々増えており、特にサプリメントとして多量に摂取する Gen がヒトの自己免疫病の発症に影響していないとは断定できないことから、今後、より詳細な検討を行う必要があると思われる。

#### E. 結論

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することが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

学術論文

(1) Takemura H., Sayama K., Zhu B.T., Tsubura A. and Shimoi K.: Comparison of estrogenic activity between Zearalenone and Zeranol. Toxicol, submitted.

学会発表

(1) 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、環境ホルモン学会第7回研究発表会

(2) 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、環境ホルモン学会第7回研究発表会

(3) 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、環境ホルモン学会第7回研究発表会

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

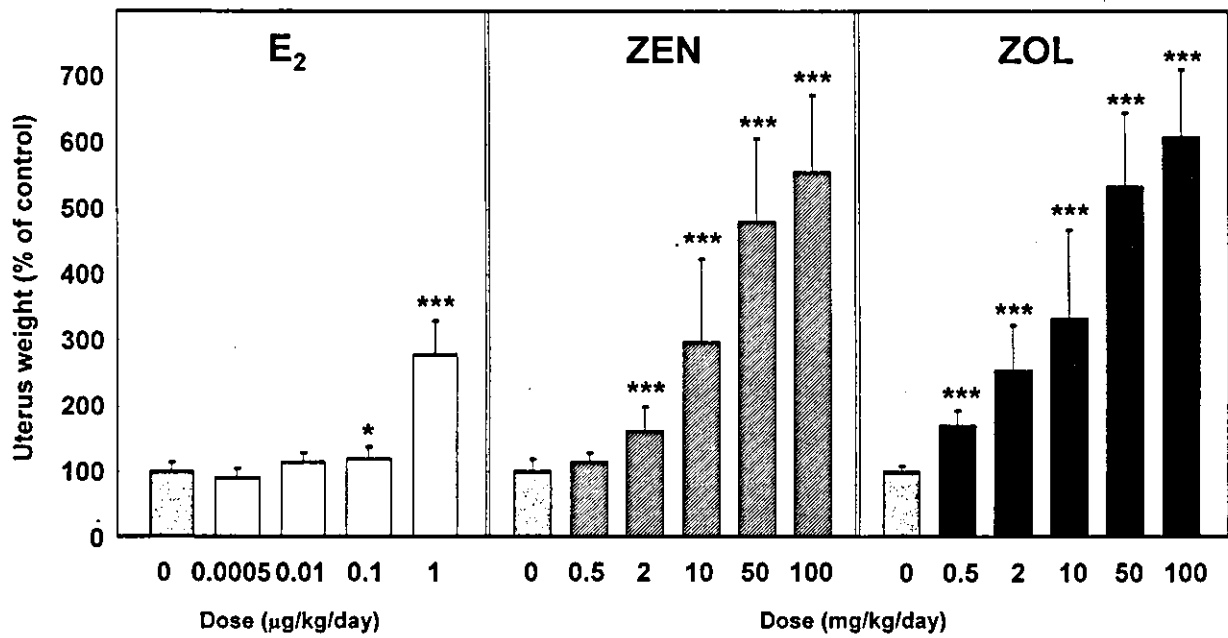


図1 子宮肥大試験によるEstrogen、Zearalenoneおよび Zeranoneのエストロゲン活性の比較(子宮湿重量)

\*, \*\*, \*\*\* : control群に対して有意差あり(\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )

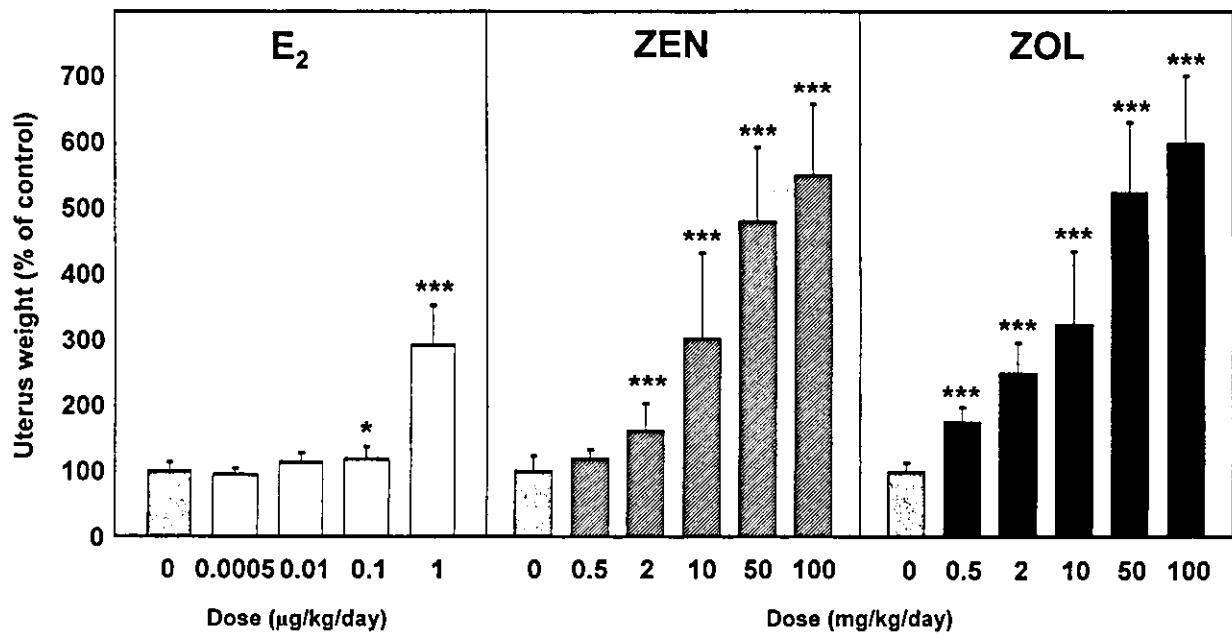


図2 子宮肥大試験によるEstrogen、Zearalenoneおよび Zeranoneのエストロゲン活性の比較(子宮乾重量)

\*, \*\*, \*\*\* : control群に対して有意差あり(\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )



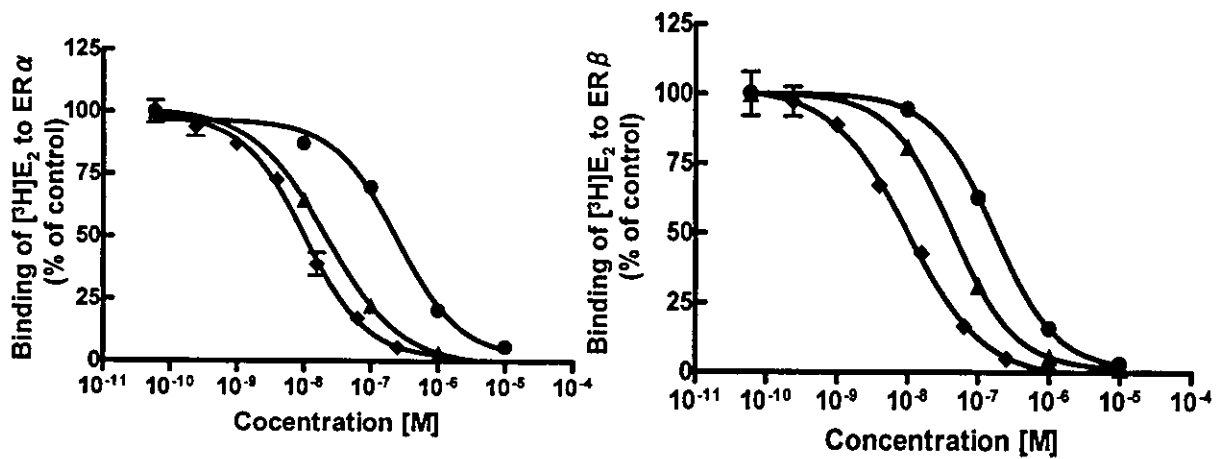


図3 エストロゲンレセプター結合試験による Estrogen、Zearalenone および Zeranol のエストロゲン活性の比較

表1 エストロゲンレセプター結合試験による Estrogen、Zearalenone および Zeranol のエストロゲン活性の比較

Compound	IC <sub>50</sub> (M)		RBA	
	ER $\alpha$	ER $\beta$	ER $\alpha$	ER $\beta$
zearalenone	$2.40 \times 10^{-7}$	$1.66 \times 10^{-7}$	4.3	6.0
zeranol	$2.18 \times 10^{-8}$	$4.28 \times 10^{-8}$	48	23
17 $\beta$ -estradiol	$1.04 \times 10^{-8}$	$1.00 \times 10^{-8}$	100	100

RBA : レセプター結合活性 (IC<sub>50</sub>の結果から、E<sub>2</sub>の結合活性を100として算出)

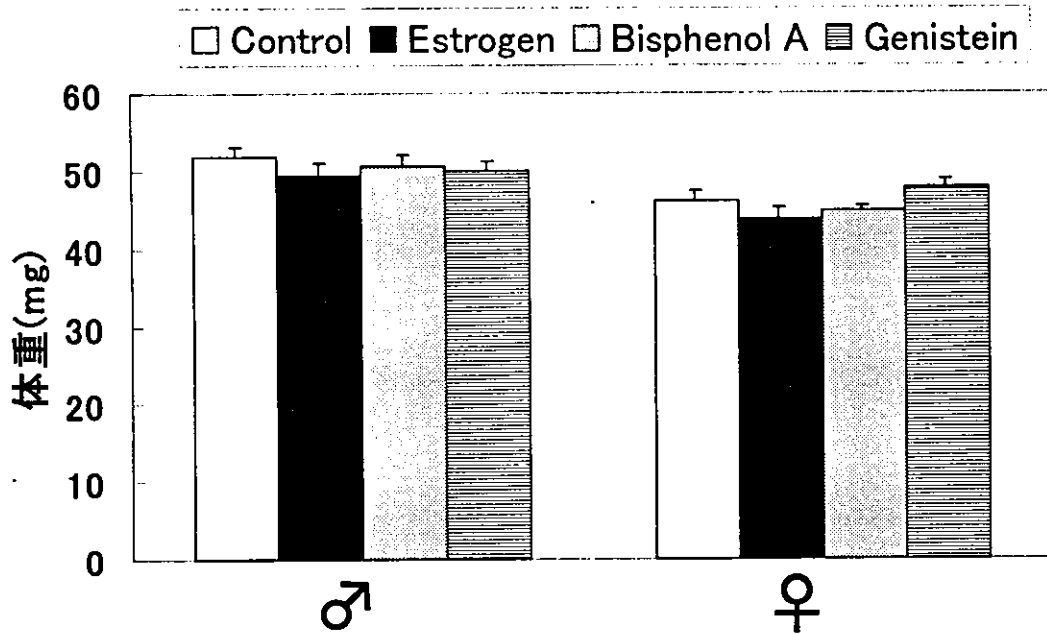


図4 自己免疫病マウスの体重に対する Bisphenol AおよびGenisteinの影響

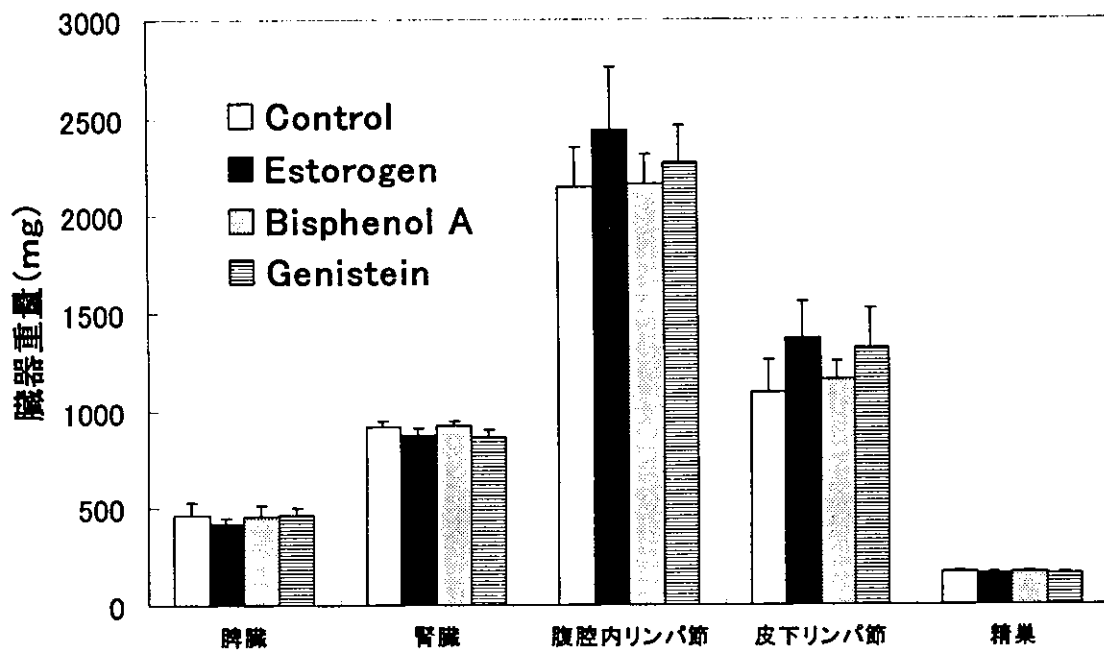


図5 オス自己免疫病マウスの臓器重量に対する Bisphenol AおよびGenisteinの影響

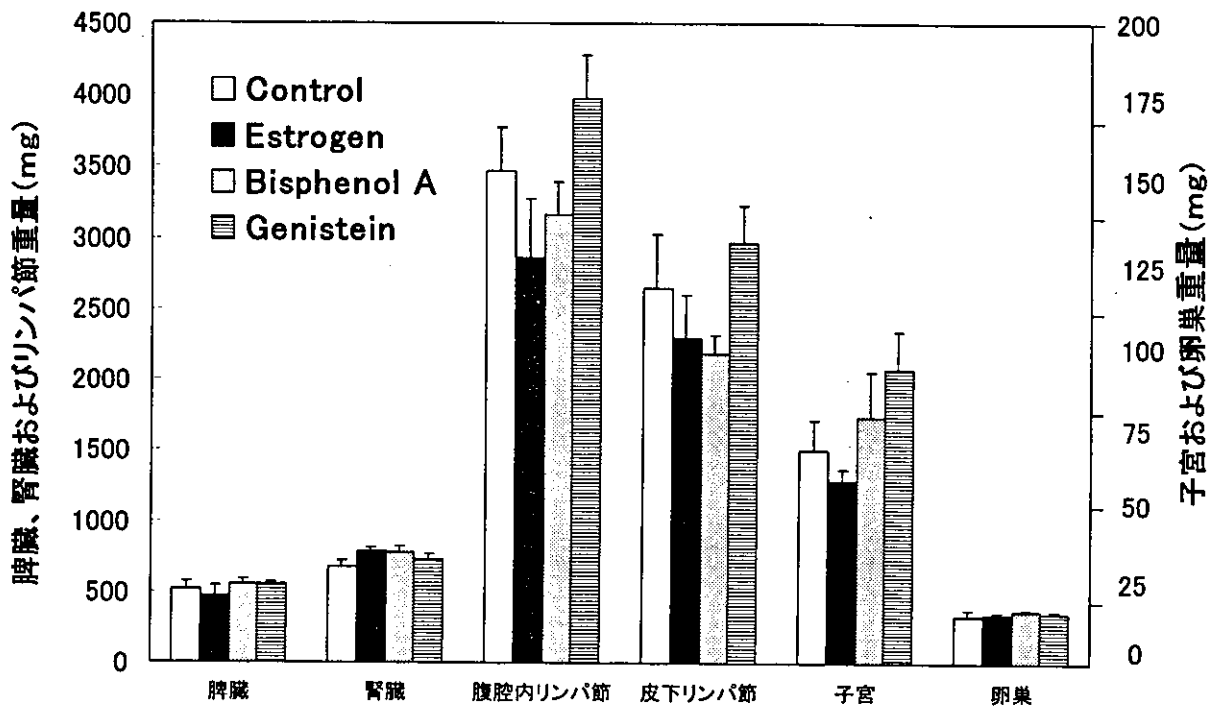


図6 メス自己免疫病マウスの臓器重量に対するBisphenol AおよびGenisteinの影響

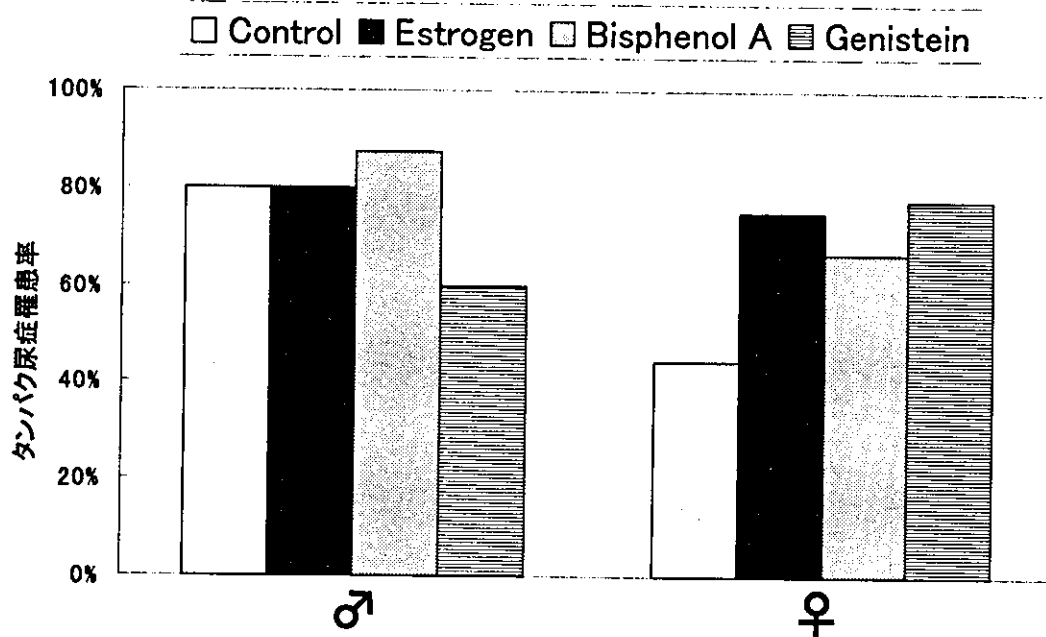


図7 自己免疫病マウスのタンパク尿症発症に対するBisphenol AおよびGenisteinの影響

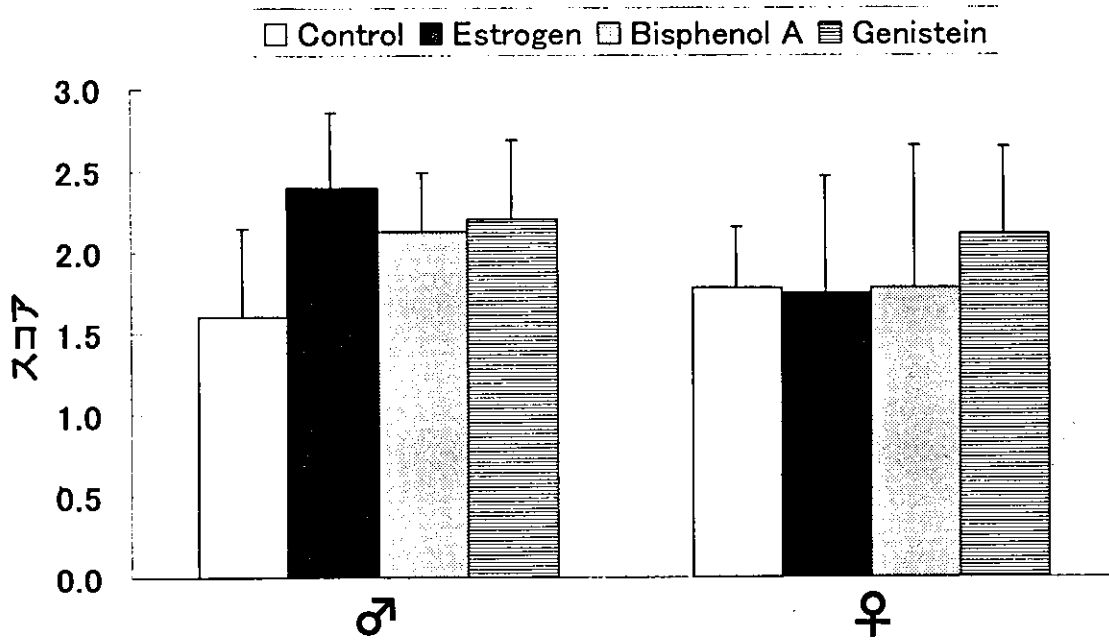


図8 自己免疫病マウスの皮膚炎に対する Bisphenol AおよびGenisteinの影響

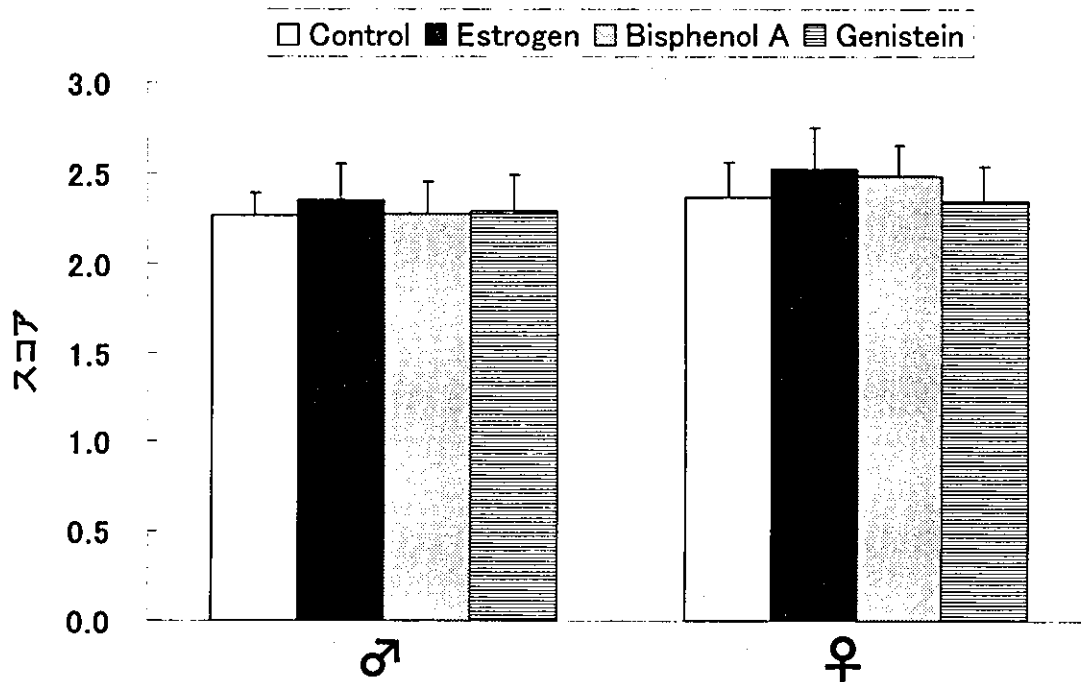


図9 自己免疫病マウスの糸球体腎炎発症に対する Bisphenol AおよびGenisteinの影響

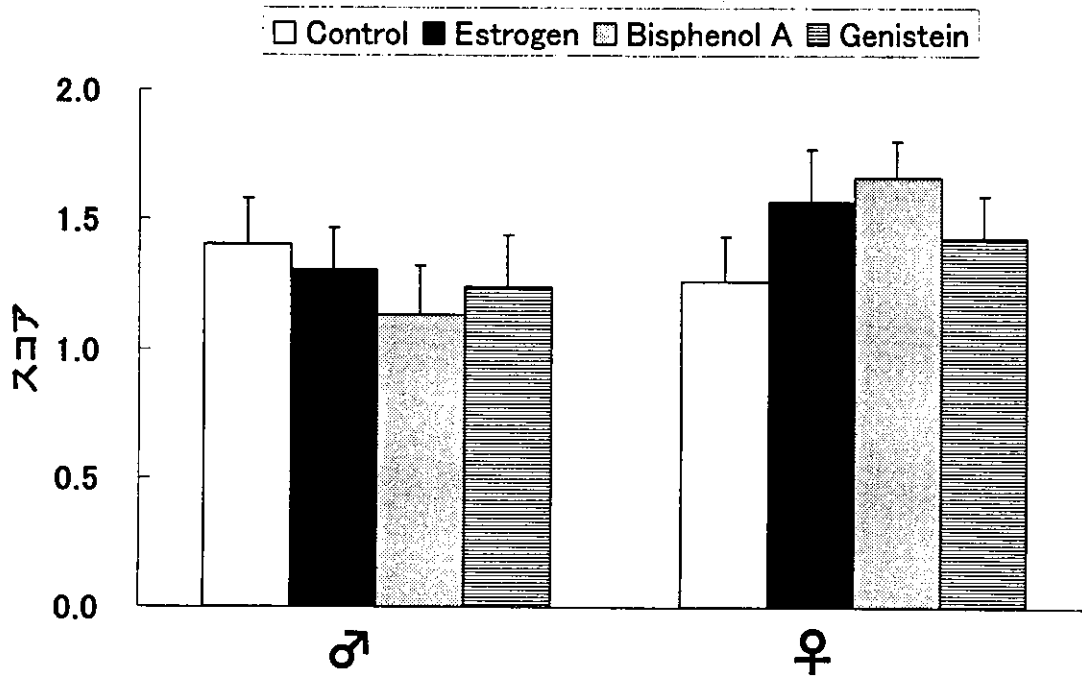


図10 自己免疫病マウスの腎臓血管炎に対するBisphenol AおよびGenisteinの影響

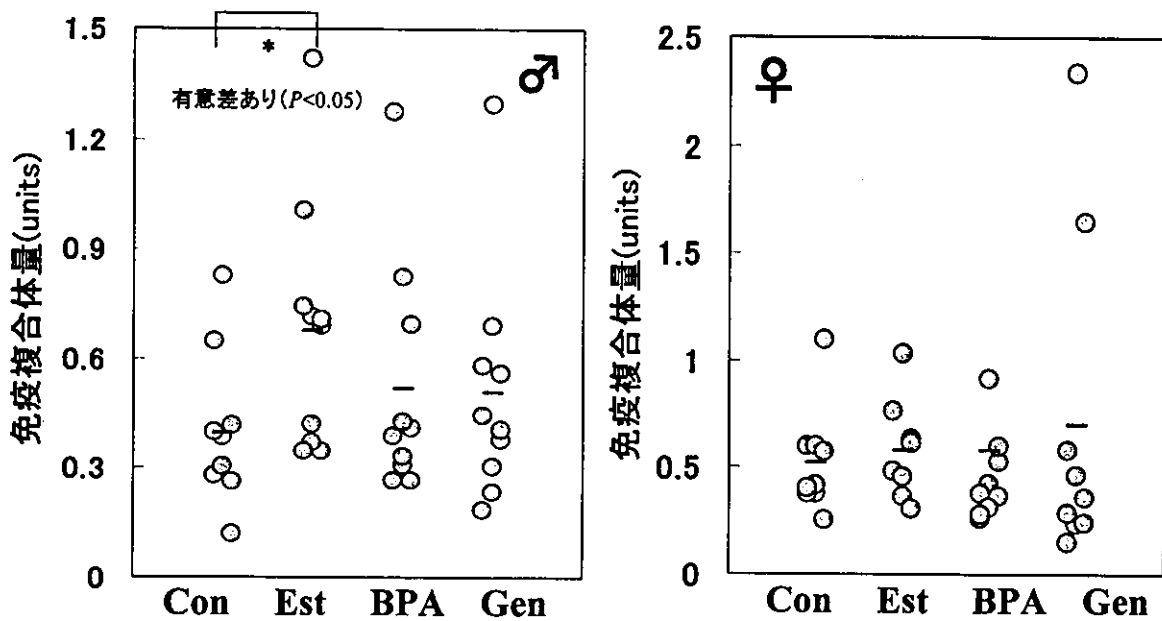


図11 自己免疫病マウスの血中免疫複合体量に対するBisphenol AおよびGenisteinの影響

Con:Control Est:Estrogen BPA:Bisphenol A Gen:Genistein

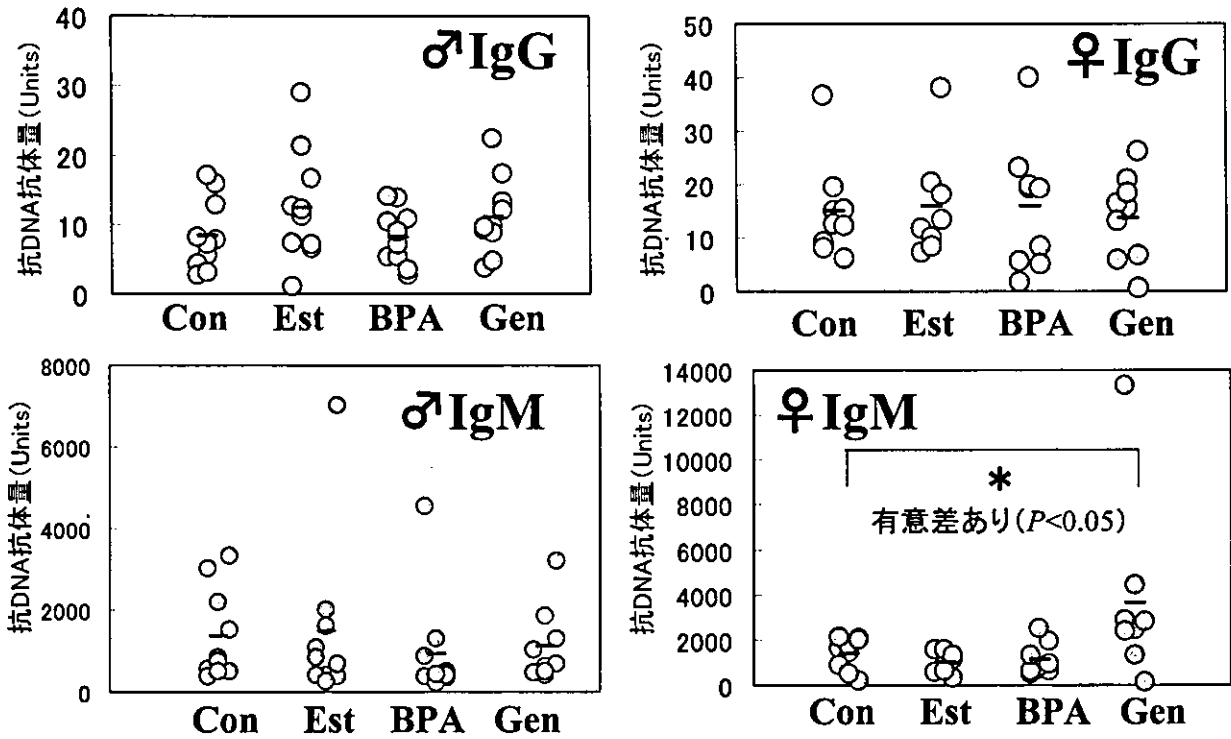


図12 自己免疫病マウスの血中抗DNA抗体量に対するBisphenol AおよびGenisteinの影響

Con:Control Est:Estrogen BPA:Bisphenol A Gen:Genistein

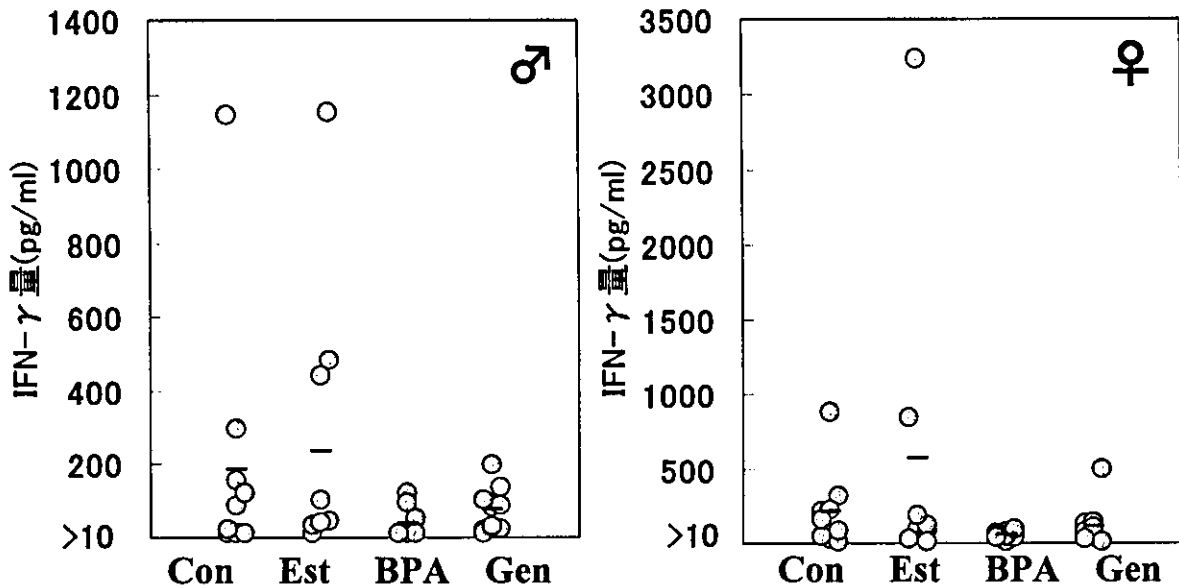


図13 自己免疫病マウスの血中IFN-γ量に対するBisphenol AおよびGenisteinの影響

Con:Control Est:Estrogen BPA:Bisphenol A Gen:Genistein

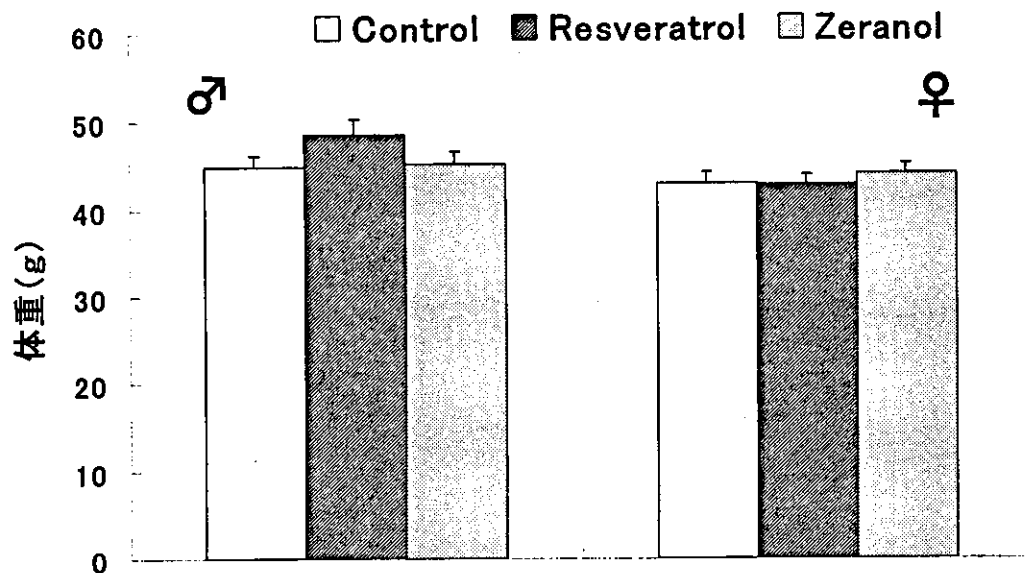


図14 自己免疫病マウスの体重に対する ResveratrolおよびZeranolの影響

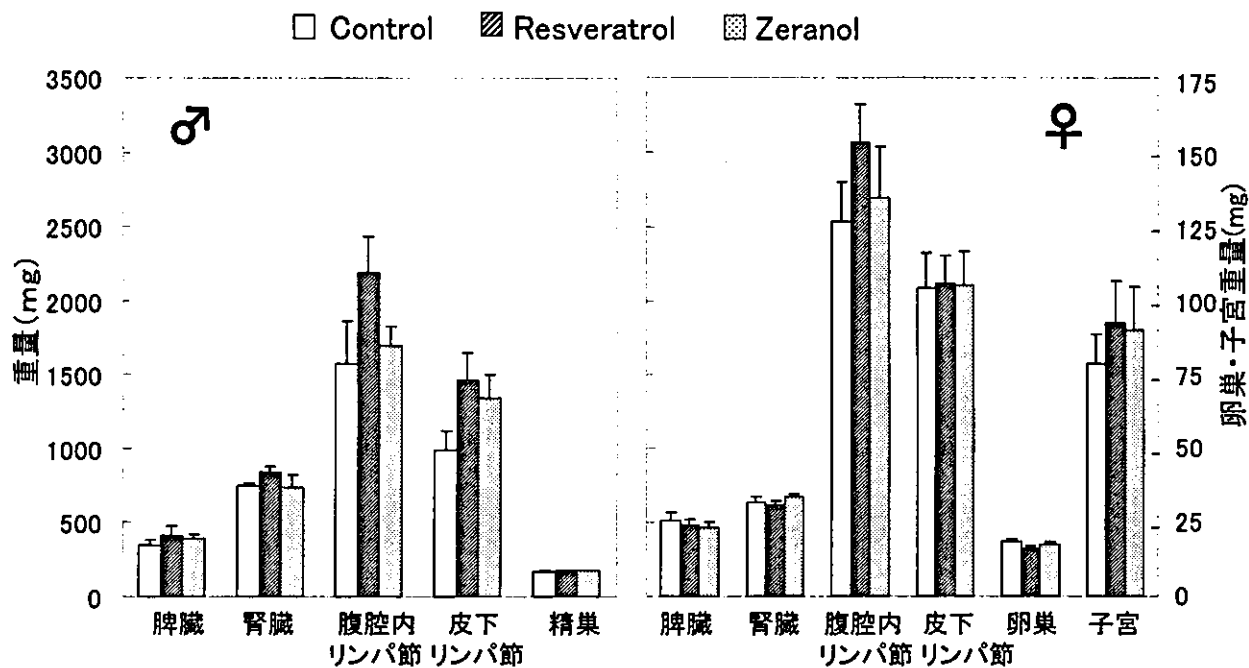


図15 自己免疫病マウスの臓器重量に対する ResveratrolおよびZeranolの影響

\* : Control群に対して有意差あり ( $P < 0.05$ )

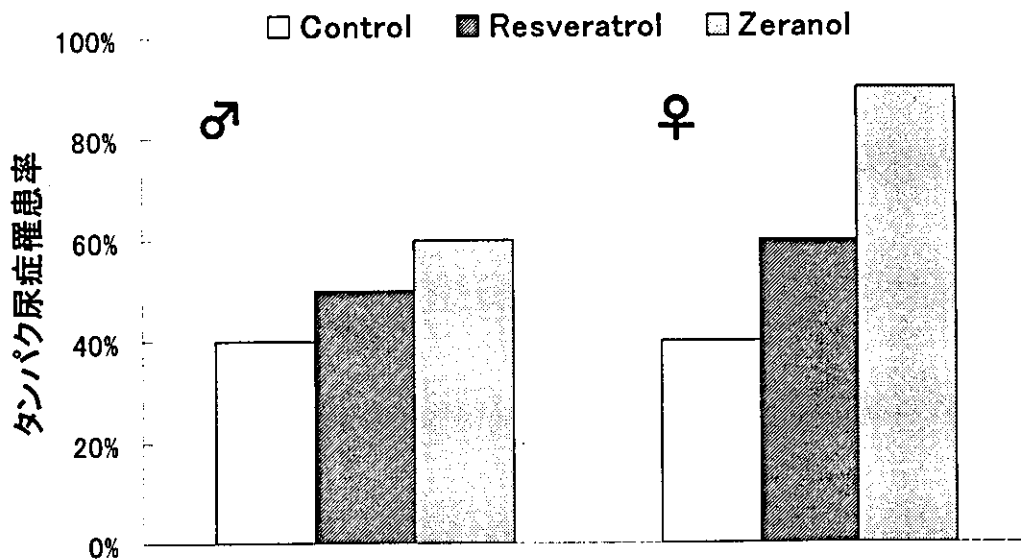


図16 自己免疫病マウスのタンパク尿症に対するResveratrolおよびZeranolの影響

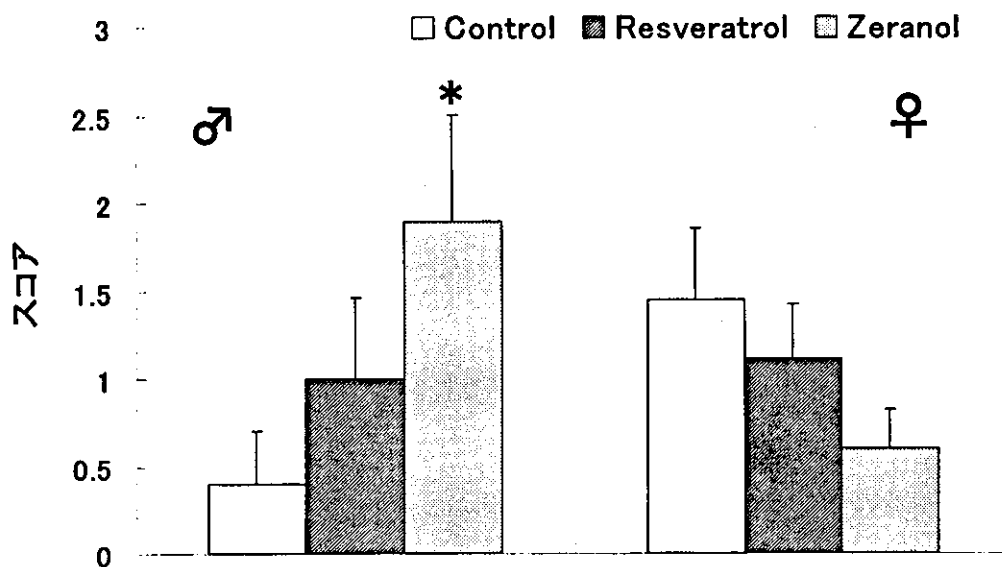


図17 自己免疫病マウスの皮膚炎に対するResveratrolおよびZeranolの影響

\* : Control群に対して有意差あり( $P < 0.05$ )



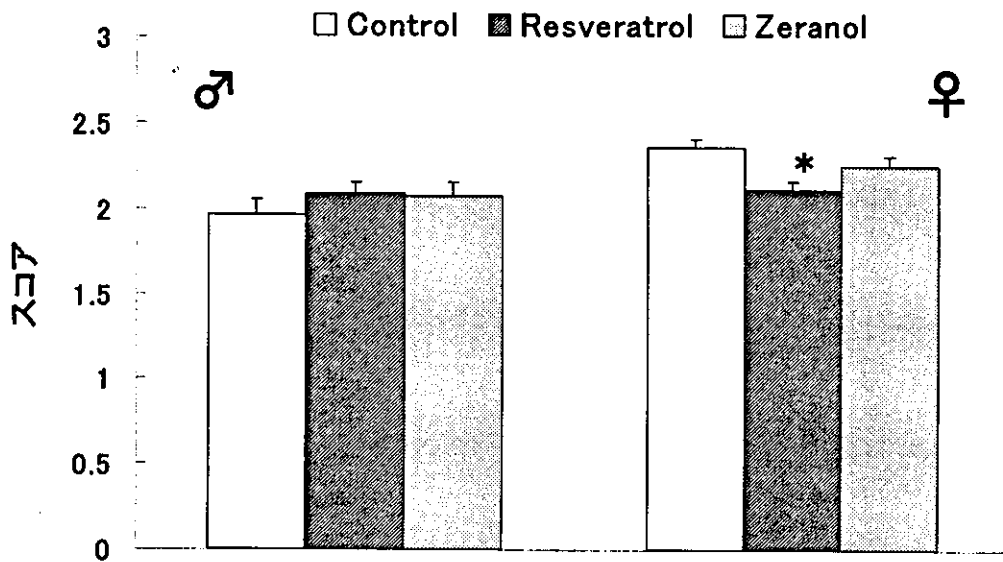


図18 自己免疫病マウスの糸球体腎炎発症に対するResveratrolおよびZeranolの影響

\* : Control群に対して有意差あり( $P < 0.05$ )

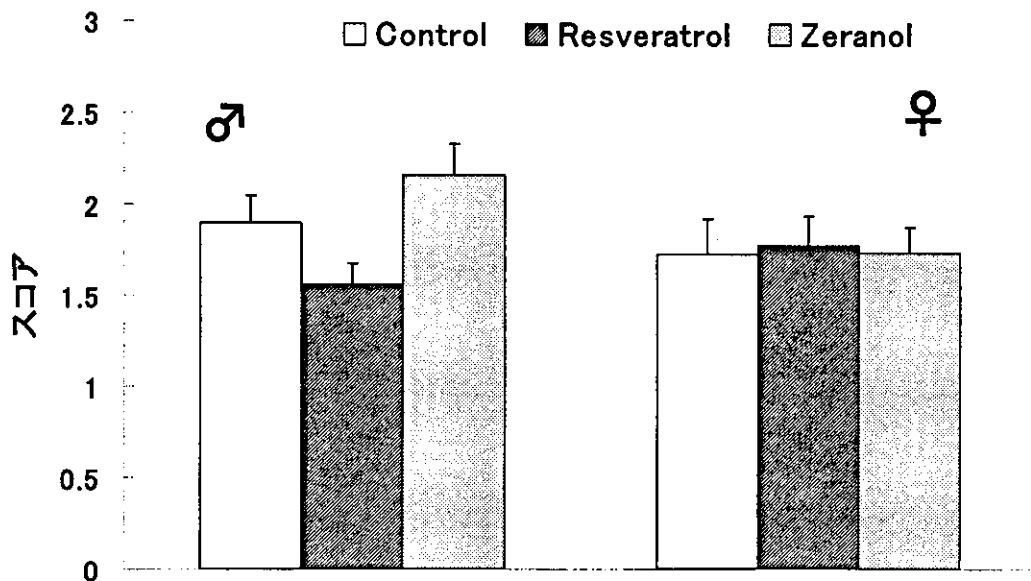


図19 自己免疫病マウスの腎臓血管炎に対するResveratrolおよびZeranolの影響

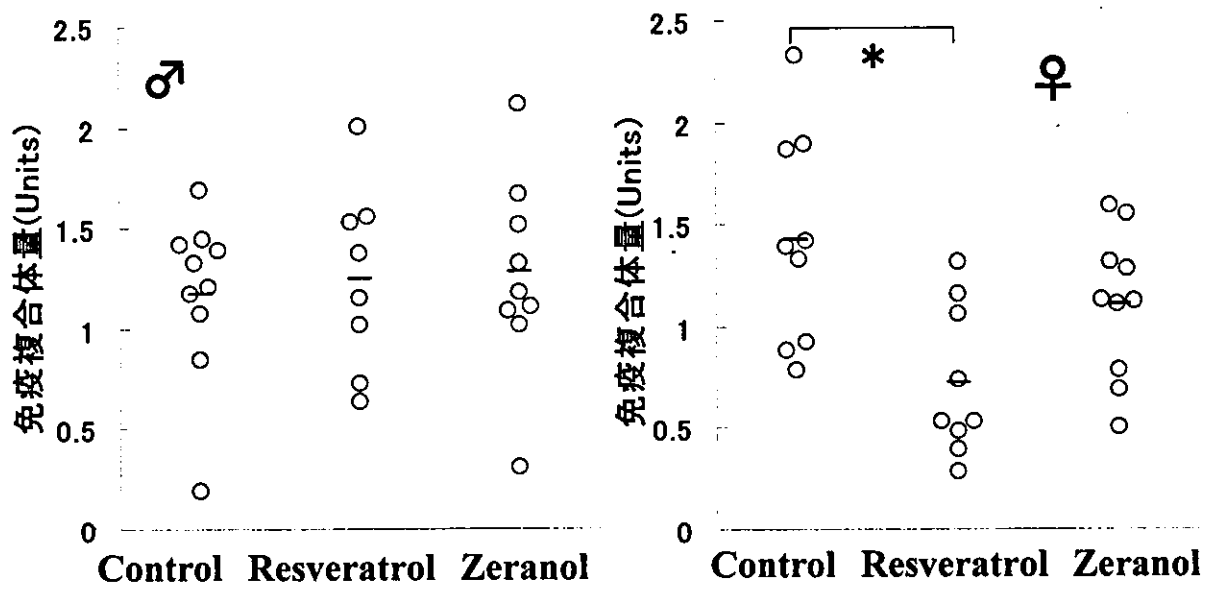


図20 自己免疫病マウスの血中免疫複合体量  
に対するResveratrolおよびZeranolの影響

\* : Control群に対して有意差あり( $P < 0.05$ )

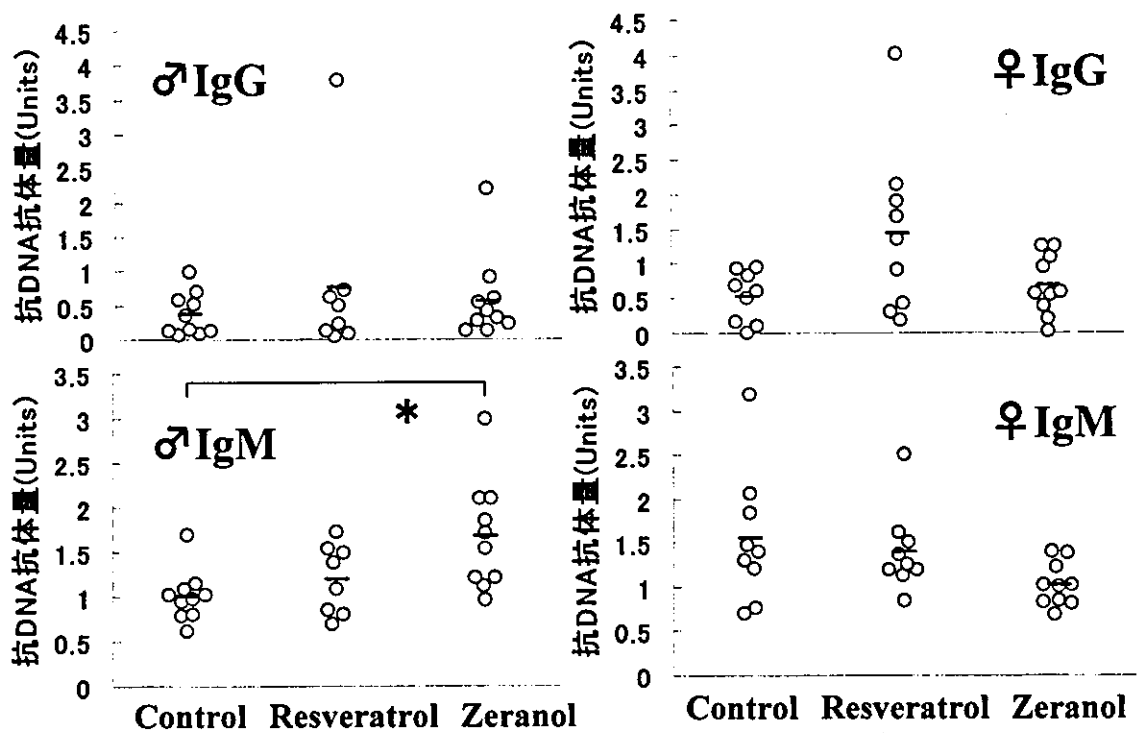


図21 自己免疫病マウスの血中抗DNA抗体量  
に対するResveratrolおよびZeranolの影響

\* : Control群に対して有意差あり( $P < 0.05$ )

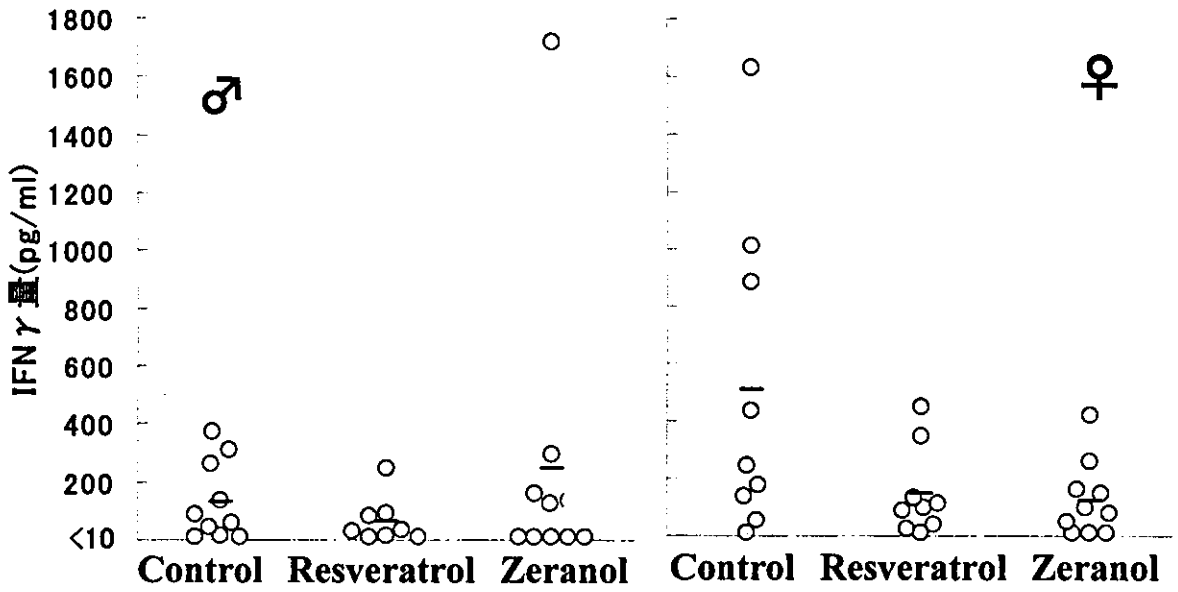


図22 自己免疫病マウスの血中IFN- $\gamma$ 量に対するResveratrolおよびZeranolの影響

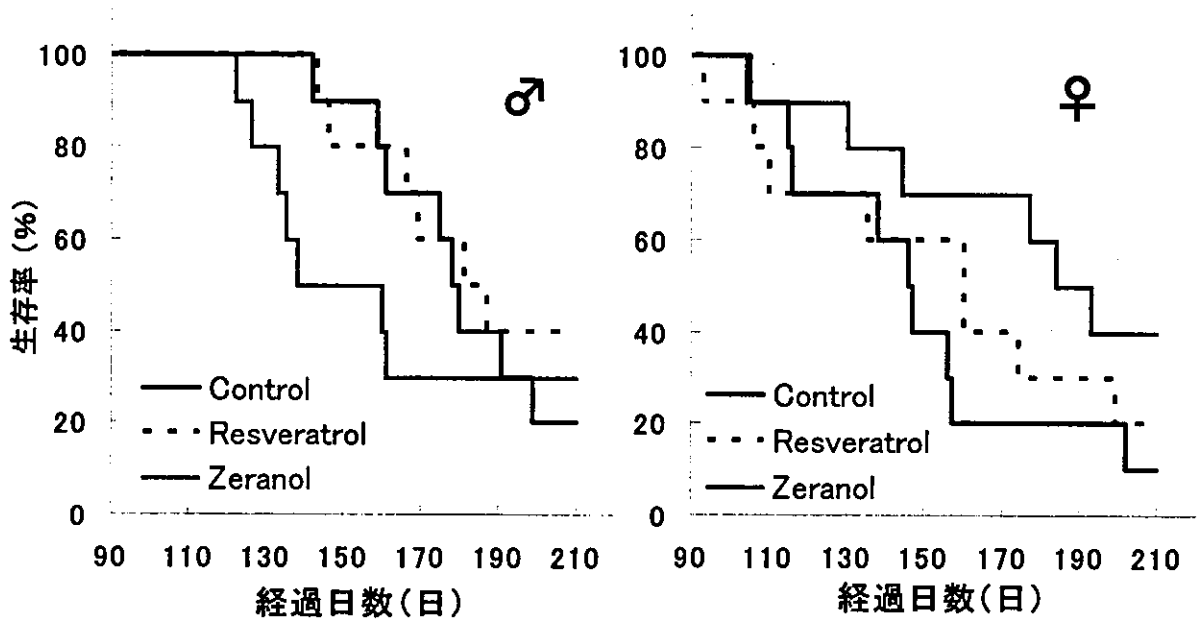


図23 自己免疫病マウスの生存率に対するResveratrolおよびZeranolの影響

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  
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

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

研究要旨

近年、環境中や生物の組織・器官内に存在するエストロゲン様作用を有する化学物質について研究がなされてきた。1998年に環境省は“環境ホルモン戦略計画 SPEED'98(2000年11月版)”にリストアップされている物質の評価について発表した<sup>1)</sup>。しかし、リストアップされた物質はあくまでも優先物質を対象としているおりすべての内分泌かく乱作用の有無について必ずしも明らかにされていない。また、農薬においては厚生労働省より1992年に農作物に農薬が残留しているという残留基準や農薬取り締まり法による農薬安全使用基準については制定されているが農薬の持つエストロゲン様作用についての報告は数少ない。我々は、農薬に存在するエストロゲン様作用を検出し評価するため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。ラットの下垂体腫瘍由来細胞 MtT/Se を用いたエストロゲン活性を測定するにあたり、細胞の分子機構について検討した。MtT/Se 細胞のエストロゲンレセプター (ER) の発現割合を評価するため RT-PCR で mRNA レベルでの ER $\alpha$  及び ER $\beta$  の発現を確認すると、その両方を発現していたことを確認した。次に real time PCR で mRNA レベルでの ER $\alpha$  および ER $\beta$  を半定量することでこれらの発現比を求めると ER $\alpha$  (78%) の方が ER $\beta$  (22%) 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 $\alpha$  を介するものであり ER $\alpha$  型の活性を検出していると推測できた。また、この細胞は内因性のエストロゲン受容体を持ち ER $\alpha$  および ER $\beta$  を発現していることが確認できた。これらの解析をもとに、MtT/Se 細胞に 17 $\beta$  エストラジオールを  $1 \times 10^{-12}$ M から  $1 \times 10^{-6}$ 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に高いエストロゲン活性が検出された。その結果、MtT/Se 細胞がエストロゲン活性の測定系として使用可能であることが確認できた。この測定系を用いて実際に各種農薬を細胞に添加し、農薬のエストロゲン様作用の測定について検討を行った。また、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殺虫剤、昆虫生育抑制剤、防カビ剤に分類される食品に関連した化学物質である。測定した農薬に