

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14年度～16年度 総合研究報告書

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・総合研究報告

- 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・総合研究報告

1. 酵母Two-Hybrid法を用いた植物エストロゲン及び ----- 28  
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周生期暴露によるマウスにおける ----- 48  
作用強度の比較とラットにおける内分泌かく乱や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 垾 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  
斐 仁正 関西医科大学病理学第二講座 研究生  
佐藤 睦哉 関西医科大学病理学第二講座 研究生
3. 妊娠中に暴露した植物由来エストロゲン様物質が出生仔の ----- 80  
男性生殖器に及ぼす影響
4. 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 ----- 88  
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

5. Bisphenol A及び植物エストロゲンの高感度分析法の開発と 食品関連化学物質の体内移行調査	-----	103
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		
6. 1: 体内および体外における内分泌かく乱物質と大豆等既存食品 成分のエストロゲン活性の比較	-----	123
2: 自己免疫病発症に対する内分泌かく乱物質および大豆等既存食品 成分の影響に関する比較		
分担研究者 茶山 和敏 静岡大学農学部 助教授		
7. 我が国において日常遭遇する農薬における環境ホルモンの検討	-----	164
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		
小嶋 美穂子 関西医科大学公衆衛生学講座 研究員		
福永 健治 関西医科大学公衆衛生学講座 非常勤講師		
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		
8. 食品関連化学物質の細胞内シグナル伝達	-----	204
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	-----	216
IV. 研究成果の別刷	-----	218

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・総合研究報告書

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

種々のアッセイ系を用いて大豆等既存食品に含まれる天然化学物質のエストロゲン活性を食品容器等に含まれる合成化学物質と比較した。その結果、天然化学物質とりわけ mycoestrogen である Zearalenone や Zeranol に高いエストロゲン活性をみた。なお、検討した食品関連化学物質に抗エストロゲン活性はみななかった。エストロゲン作用をもつ化学物質は、機能・形態形成期では重大な結果を招来するおそれがある。よって、エストロゲン活性の高い天然化学物質の発育、内分泌かく乱、あるいは乳癌誘発作用をマウスやラットにおける周生期暴露実験でみたところ、雌性生殖器に膣開口の早発や発情周期の乱れといった機能的変化を呈したが、Zearalenone や Zeranol では無排卵性卵巣がみられ、不妊が示唆された。なお、ヒト暴露量を勘案すると Genistein、Resveratrol、Zearalenone や Zeranol に乳腺発癌促進作用はなく、Genistein の出生前暴露は神経系には機能的影響はなく、雄性生殖器にも影響はみない。食品関連化学物質のマウスにおける母仔移行について検討したところ、Genistein の乳汁中の総量は経口投与の方が皮下投与に比して高かったが、遊離体の割合は低く、経口摂取における吸収・代謝機能の発達が窺われた。また、自己免疫病自然発症 *lpr*<sup>cs</sup> マウスを用いて食品関連化学物質の影響につき検討したところ、病態進展に修飾を加える可能性が示唆された。さらに、E-CALUX 法ならびに MtT/Se ラット下垂体腫瘍細胞株の細胞増殖を指標としたアッセイ法により、環境中の化学物質として 32 農薬中 5 種にエストロゲン活性を検出し、活性のみられた農薬を組み合わせると単独の場合より活性の上昇をみるものがあつた。MtT/Se によるアッセイ法では主として ER $\alpha$  を介する活性が検出される。しかし、Genistein をはじめとしたイソフラボン類では ER $\beta$  に強い結合親和性をみとめ ER $\beta$  を介して強く作用を発揮する。ER $\alpha$  と  $\beta$  を区別した活性検出系が必要である。この目的のため、C1 (ER $\alpha$  陽性)、C2・C12 (ER $\beta$  陽性)、あるいは C3・C6・C15 (ER $\alpha$ / $\beta$  陽性) といったラット乳癌細胞株を樹立したので、ER $\alpha$  と  $\beta$  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およ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. rER $\alpha$  を導入した酵母 Two-Hybrid 法による植物エストロゲン及び生活関連製品由来化学物質のエストロゲン様作用の評価

ゲニステイン、イコール、クメステロール、ゼアラレノン及びアルキルフェノール誘導体 (*p*-アルキルフェノール、ビスフェノール A、パラベン、ベンゾフェノン誘導体を含む) にエストロゲン様作用が認められた。アルキルフェノール誘導体については、水酸基に対して置換基をパラ位に有するものにエストロゲン様作用が認められた。一方、置換基をオルト位やメタ位に有する化学物質に作用は、認められなかった。これらのことから、エス

トロゲン様作用を示す化学物質の構造上の特徴として、フェノール性水酸基を有し、かつ水酸基に対してパラ位に置換基を有することが重要であることが分かった。

b. rER $\alpha$ を導入した酵母 Two-Hybrid 法による植物エストロゲンの抗エストロゲン様作用の評価

4-ヒドロキシタモキシフェンを陽性対照として酵母 Two-Hybrid 法を用いて植物エストロゲン及びアルキルフェノール誘導体の抗エストロゲン作用を評価した。アゴニスト作用が認められている物質（ゼアラレノン、ゲニステイン、イコール、クメステロール及びビスフェノール A）については、アゴニスト作用を示す 1/100 及び 1/10 の濃度で評価した。アゴニスト作用が認められていない物質については、比較的濃い濃度（1-100  $\mu$ M）で評価した。いずれの化学物質についても測定濃度範囲内において抗エストロゲン作用は認められなかった。

c. hER $\alpha$ または hER $\beta$ 受容体に対する結合親和性について

$\alpha$ 受容体よりも $\beta$ 受容体に高い結合親和性（IC<sub>50</sub>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の限られたイソフラボン類の特徴であった。

d. hER $\alpha$ または hER $\beta$ 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、 $\alpha$ 受容体よりも $\beta$ 受容体に強く作用を発揮する事が分かった。

e. 17- $\beta$ -エストラジオールとの相互作用

E<sub>2</sub>存在下、 $\alpha$ 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、E<sub>2</sub>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 $\alpha$ 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、 $\beta$ 受容体に対しても同様に E<sub>2</sub>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  $\mu$ 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、 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\alpha$ 受容体及び $\beta$ 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、 $\alpha$ 受容体で相加的作用を示した。 $\beta$ 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 E<sub>2</sub>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 における各種内分泌かく乱化学物質のエストロゲン活性の比較  
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、代表的な植物エストロゲンである Genistein および Resveratrol の4種の物質と Estradiol-17 $\beta$  (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、マウスを用いた子宮肥大試験では E2 および DES のエストロゲン活性はほとんど同じであることが判明した。また、Bisphenol A、

Resveratrol および Genistein のエストロゲン活性は E2 と比較すると非常に弱く、Bisphenol A で約 1/10 万、Resveratrol で約 1/5 万、Genistein は約 1/50 万以下であることが示唆された。さらに、E2 と Resveratrol および Genistein 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。また、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、子宮肥大試験で、Zeranol は 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。また、Zeranol と Zearalenone の活性を E2 と比較すると Zeranol で 1/5000、Zearalenone では 1/2 万で、調査した環境ホルモン物質の中では最も高いエストロゲン活性を示した。また、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いことが明らかとなった。

### 3. 出生前あるいは思春期前 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、Diethylstilbestrol (DES) のマウス出生前あるいは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。出生前暴露として、Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A を 0.5 mg/kg あるいは 10 mg/kg を、DES は 0.1 mg/kg と 10 mg/kg を各の妊娠 15-18 日の母体に連日計 4 回皮下投与し、各の雌出生仔につき無処置対照群と比較した。思春期前暴露として、10 mg/kg の Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol あるいは 10 mg/kg の DES を 15-18 日齢の雌マウスに連日計 4 回皮下投与した。その結果、体重増加は出生前投与では促進をみたが、思春期前投与では差はなく、膣開口はいずれの被験物質でも早発したが、出生前の大量・少量 Resveratrol と少量 Bisphenol A、あるいは思春期前 Resveratrol と Bisphenol A 投与では対照群と差はみなかった。発情期の延長で特徴づけられる発情周期のかく乱は Zearalenone や Zeranol 暴露で顕著にみられ、Zearalenone は、加齢とともに漸減はみるものの、他の被験物質に比して無排卵性卵巣が持続した。なお、8 週齢あるいはそれ以降、これら無排卵性卵巣をみる成熟マウスの乳腺は拡張した乳管のみからなり腺胞への分化をみない。

### 4. 出生前あるいは思春期前 Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol 投与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

ラットに対して Genistein (0.5 mg/kg あるいは 30 mg/kg) の出生前 (妊娠 15-19 日齢の母体に連日計 5 回) あるいは思春期前暴露 (15-19 日齢にかけて連日計 5 回)、Resveratrol (10 mg/kg あるいは 100 mg/kg)、Zearalenone (0.1 mg/kg あるいは 10 mg/kg)、Zeranol (0.1 mg/kg あるいは 10 mg/kg) の思春期前暴露を行い、発育や内分泌かく乱をみるとともに、50 mg/kg *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) の腹腔内投与により、乳腺発癌を比較した。乳癌は Genistein の思春期前少量投与、Zearalenone の思春期前大量投与で有意に抑制され、Resveratrol の思春期前大量投与群で有意な促進をみたが、この他の群では対照群と差はみなかった。なお、Resveratrol の大量投与とは 1 日投与量として赤ワイン 5000 杯に相当し、その 1/10 量で乳癌促進作用をみないことから、これら天然エストロゲンの周生期暴露では乳癌増悪作用はないと結論できる。但し、Zearalenone や Zeranol 投与群で、37 週齢時 (実験終了時) に用量依存性に無排卵性卵巣を有する個体をみた。Zearalenone の少量投与群とはアメリカ人

の1日暴露量に相当する量である。よって、マウスの結果とも総合して、検討した化学物質のなかでヒトの暴露量を勘案すると乳腺発癌に憂慮すべき影響はみななかったが、ZearalenoneあるいはZeranolの周生期暴露は不妊（無排卵性卵巣）を惹起するおそれがあることが示唆された。

5. 妊娠中に暴露した植物由来エストロゲン様物質が出生仔の男性生殖器におよぼす影響  
Genisteinを妊娠母体に投与し、出生オス仔ラット（65日および300日齢）の体重・精巣と副生殖器の重量を検討したところ、低量（0.5 mg/kg×5、常食量相当）投与においても大量（30 mg/kg×5）投与においても、体重は低下傾向にあったが、精巣と副生殖器重量はほとんど影響を受けていなかった。

6. 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およぼす影響

Genisteinを妊娠母体に投与し、出生仔ラット（56日齢）の性差があるとされる青斑核とその付近の（A4群A6群）カテコールアミンニューロン総数を計数、小脳の分子層（プルキンエニューロンの樹状突起の長さを反映）や顆粒層の厚さを計測したところ、常食量相当の摂取が無摂取コントロールに比べて、オスでもメスでもカテコールアミンニューロン数の減少をきたし、大量投与では更に減少し、メスでの総数がオスの総数に近づいていた。また、分子層厚は投与群で分厚さを増していたが、分子層／顆粒層比はほとんど変化せず、機能面での影響は小さいと予想された。

7. Bisphenol A および植物エストロゲンの高感度分析法の開発と食品関連化学物質の体内移行調査

高速液体クロマトグラフィー電気化学検出器（HPLC-ECD）及びLC/MS/MSを用いたBisphenol A及び植物エストロゲンの高感度で簡便な一斉分析法を開発した。

また、この分析法を用いてBisphenol A、Genistein及びResveratrol 10 mg/kgを授乳マウスに単独あるいは3種混合して皮下及び経口で投与し、これら物質の血液と乳汁への移行を調べた。

単独投与の2時間目の搾乳群においては、単独皮下投与では、乳汁中総量及び遊離体濃度（平均値）は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は他の2物質に比べて低い値であった。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種混合皮下投与では、若干の値の変化が見られ、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。単独皮下投与の7時間目搾乳群においては、2時間目搾乳群に比べて、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。

混合経口投与においては、Bisphenol A、Genistein及びResveratrolの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）であった。遊離体では、皮下投与より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

乳汁中抱合体濃度は皮下投与より大きく、経口摂取における吸収・代謝機能が発達していることが示唆された。

#### 8. 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 と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。

#### 9. 輸入果実に使用されている防カビ剤の実際

我が国における農作物に使用する農薬は地方衛生研究所などで日常検査し、食品としての安全性を確認している。これら農薬の検出基準は現段階では農薬としてのヒトへの急性毒性を中心とした基準であり、環境ホルモンとしてのエストロゲン活性に対する基準は特に決定していない。この研究では平成 14 年度に輸入果実に使用されている防カビ剤で環境ホルモン様作用の知られているオルトフェニルフェノール (OPP) の検出を行い、輸入果実に付着する防カビ剤の内分泌攪乱作用について検討した。

#### 10. E-CALUX Assay を用いた農薬のエストロゲン活性評価

平成 15 年度は検出頻度の高い農薬のエストロゲン活性および抗エストロゲン活性をヒト卵巣ガン細胞のエストロゲンレセプター (ER) を用いた高感度エストロゲン活性測定法である E-CALUX Assay で評価した。被検農薬は滋賀県内で過去に、検出された (ピレスロイド系農薬 8 種、有機塩素系農薬 3 種、有機リン系農薬 7 種、その他 14 種) 計 32 種類であり、うち 5 種類の農薬にエストロゲン活性がみられた。また、活性のみられた農薬を組み合わせるとエストロゲン活性を測定したところ単独の場合より活性が高くなった。

#### 11. 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

平成 16 年度は平成 15 年度に我々が証明した複数の農薬存在下におけるエストロゲン活性複合作用についてさらに詳細な検討を加えるため、ラット下垂体腫瘍由来の細胞である MtT/Se 細胞を用いた細胞増殖試験によるエストロゲン活性測定系を確立し、複数農薬におけるエストロゲン活性の増強作用を検討した。MtT/Se 細胞を用いたエストロゲン活性測定系でも E-CALUX Assay と同様に、平成 15 年度にエストロゲン活性が証明されたそれぞれの農薬にエストロゲン活性が検出された。さらに、エストロゲン様作用をもつ農薬で農作物中に存在する検出頻度の高い 2 種類を組み合わせると、エストロゲン活性のさらなる増強が確認された。

これらの結果より、内分泌攪乱物質は複合して生体に取り込まれることにより、エストロゲン活性が増強することが証明された。今後、複数の内分泌攪乱物質の複合効果による活性の増強を研究する必要がある。

我々が口にする食品 (果物や野菜) には農薬が使用されることが多い。今回、農作物によく使用される有機リン系及び防カビ剤を用いてエストロゲン活性を細胞増殖活性を指標



として検討した。結果、それぞれの農薬にエストロゲン活性が検出された。さらに、エストロゲン様作用をもつ農薬で農作物中に存在する検出頻度の高い2種類を組み合わせると、エストロゲン活性のさらなる増強が確認された。

## 1 2. エストロゲン様物質の作用測定のための培養細胞系の樹立とその作用機構の解析ならびにエストロゲン感受性ヒト乳癌細胞の内在性遺伝子発現を指標としたエストロゲン活性測定系の樹立

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 $\alpha$ のみ陽性(C1)、ER $\beta$ のみ陽性(C2、C11)、ER $\alpha$ 、 $\beta$ 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  $\mu$ M)添加24時間後での細胞増殖活性への影響をC3(ER $\alpha$ 、 $\beta$ 陽性)、C11(ER $\beta$ 陽性)を用いて測定すると、被験物質5  $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\beta$ 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  $\mu$ 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。エストロゲン受容体 $\alpha$ 結合試験とエストロゲン感受性細胞株MCF-7の内在性遺伝子c-myc、pS2の発現量変化を指標としてカビエストロゲンZearalenoneの代謝産物Zeranol( $\alpha$ -Zearalanol)のエストロゲン様作用を測定した。Zeranolにはエストロゲン受容体 $\alpha$ 結合親和性、遺伝子発現誘導能とも17 $\beta$ -estradiolとほぼ同程度の活性が認められた。

### 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

### エストロゲンおよ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

我々が食品として摂取する植物成分の中には、内分泌系に影響を及ぼすものがあり、その主な作用がエストロゲン受容体に対する結合親和性とエストロゲン様作用であることから植物エストロゲンと呼ばれている。日本人は大豆製品等からのイソフラボン類の摂取量が多いことから欧米人と比較して、乳がんや前立腺がんの発症率が有意に低く、植物エストロゲンは予防医学の面から注目されてきた。しかしながら一方では、これら化学物質の内分泌かく乱作用が懸念されており、特に乳幼児に対しては、大豆製品等からのイソフラボン摂取を問題視する傾向もある。また、我々が日常使用している

## A. 研究目的

### 1. 酵母 Two-hybrid 法を用いた植物エス

生活関連製品（樹脂製容器及び包装等）からは、原料、添加剤、触媒等として使用されているビスフェノール A、フタル酸エステル類、ノニルフェノール等の内分泌かく乱作用の疑われている化学物質が溶出し、食品を介してこれらの化学物質を摂取している可能性が指摘されている。このような背景から、化学物質について内分泌かく乱作用という新たな観点からの安全性評価が求められている。

いくつかの評価系でエストロゲン受容体に対する結合親和性とエストロゲン様作用を示す化学物質の範疇にアルキルフェノール誘導体（*p*-アルキルフェノール、ビスフェノール A、パラベン、ベンゾフェノン誘導体を含む）がある。これらは内分泌かく乱作用が疑われる化学物質として注意が喚起されている。その一方、同様にいくつかの評価系でエストロゲン様作用を示すイソフラボン類については、これらの作用がホルモン依存性のがんの発がんリスクの降下、更年期障害の症状の緩和、閉経後の骨粗鬆症の予防につながる等の健康増進作用に関係すると考えられている。イソフラボン類を多く含む食品または栄養補助食品は、健康増進作用を期して積極的に摂取される傾向にある。

エストロゲン受容体には $\alpha$ 受容体と $\beta$ 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有用である。

## 2. In vivo および in vitro における各種内分泌かく乱化学物質のエストロゲン活性の比較

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。そこで、本研究では本研究助成の課題である植物エストロゲンと環境ホルモン物質の内分泌攪乱作用の比較のための基礎的データをを得ることを目的として、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 DES および Bisphenol A、代表的な植物エストロゲンである Genistein および Resveratrol の4種の物質と E2 の生体内におけるエストロゲン活性の比較を行った。また、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。

## 3. 出生前あるいは思春期前 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

我々が食品として摂取するもののなかには、Genistein、Resveratrol、Zearalenone、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。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兒の雌性生殖器に、機能・形態的異常の出現や、膣腺明細胞癌の発生が知られている。そこで、マウスにおける Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol、Bisphenol A、DES の出生前あるいは思春期前暴露実験を行い、その作用強度を比較した。

#### 4. 出生前あるいは思春期前 Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol 投与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

天然のエストロゲン作用をもつ化学物質のラットにおける作用とともに、発癌性への影響も重要な課題である。よって、ラットの雌性生殖器の機能的ならびに器質的変化の有無を同定するとともに、エストロゲン標的臓器である乳腺発癌につき *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) 誘発モデルを用いて Genistein の出生前と思春期前暴露実験、Resveratrol、Zearalenone と Zeranol の思春期前暴露実験を行った。

#### 5. 妊娠中に暴露した植物由来エストロゲン様物質が出生仔の男性生殖器におよぼす影響

植物由来・食品中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、出生後の胎仔が成熟期に達した際の男性生殖器や体重に及ぼす影響を検索した。

#### 6. 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およぼす影響

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した。

#### 7. Bisphenol A および植物エストロゲン

#### の高感度分析法の開発と食品関連化学物質の体内移行調査

Bisphenol A や植物エストロゲンは、日常の暴露により内分泌かく乱作用が懸念される他に、植物エストロゲンにおいてはエストロゲンの作用に関連した各種疾病の予防効果に関心が寄せられている。これらの化合物は生体内では肝臓等で主にグルクロン酸抱合体に代謝されて活性を失うが、さらに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、遊離体とともに、抱合体を含めた総量の濃度を把握する必要がある。また、内分泌かく乱物質の作用は胎児期、新生児期には不可逆的に作用し、重大な影響を及ぼすことが知られており、経乳汁曝露の可能性については十分な検討が必要である。そこで、我々は内分泌かく乱物質作用を動物実験で解明するに当たり、母親から乳児への移行に関する基礎的研究を行うため Bisphenol A 及び植物エストロゲンの高感度一斉分析法を開発した。そしてこの開発した分析法を用いて授乳マウスに投与したこれら物質の遊離体と総量の血液と乳汁への移行について比較検討を行った。なお、用いた植物エストロゲンとしては大豆及び赤ワインに含まれる、Genistein、Daidzein、Glycitein 及び Resveratrol を用いた。

#### 8. 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、Genistein、Bisphenol A、Zeranol および Resveratrol の4種類のエストロゲン作用を有する物質について、自己免疫病発症および悪性進展に対

する影響を調べた。

## 9. 輸入果実に使用されている防カビ剤の実際

食品あるいは容器、包装資材由来で内分泌攪乱活性が確認されているものは一部のフェノール類であり、フェノール類すべてが活性を有するわけではない。しかし、微量でも複数の内分泌攪乱物質を摂取した場合、生体内で代謝され、相乗的に作用し、内分泌攪乱活性がどのように修飾されるかは未知である。また、OPPは環境ホルモンとしての疑いがあるとされ、各種メディアを通して科学的根拠、実証が無いままに市民の食生活に対する不安を煽っている。したがってOPPをはじめとする防カビ剤使用の実体を把握しておくことは、非常に重要である。そこで本研究では、市場に流通する柑橘系果物を対象に実際の使用状況を把握することを目的に調査、分析を行った。

## 10. E-CALUX Assay を用いた農薬のエストロゲン活性評価

現在、わが国では食品衛生法によって農薬229種類に残留基準が設定されている。また、環境省がリストアップしている65種類の内分泌攪乱作用が疑われる化学物質のうち6割以上が農薬である。以上から、本研究では検出頻度の高い農薬について、エストロゲン活性、抗エストロゲン活性を評価した。

### 11. 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

内分泌かく乱物質がエストロゲン様作用をもち、野性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。更に我々が日常遭遇する1つの農作物から同時に数種類の農薬が検出される。この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可能性は考えられる。平成15年度に野菜

及び果物に付着している可能性のある農薬のエストロゲン活性をE-CALUX assay法を用いて評価した。本年度の研究では、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した。

### 12. エストロゲン様物質の作用測定のための培養細胞系の樹立とその作用機構の解析ならびにエストロゲン感受性ヒト乳癌細胞の内在性遺伝子発現を指標としたエストロゲン活性測定系の樹立

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。したがって、例えば乳癌予防の目的で大豆イソフラボンを大量摂取した場合、副作用としての内分泌かく乱作用やエストロゲン受容体を介する乳癌増殖作用が懸念される。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。殊に、乳腺発癌の実験動物モデルとしてはラットが汎用されていることから、動物実験データとの互換性に鑑みラット乳癌細胞株による実験系樹立を目指す。さらに、エストロゲン感受性ヒト乳癌細胞の内在性遺伝子の発現を指標とするエストロゲン作用の測定系確立も目指す。

## B. 研究方法

### 1. 酵母 Two-hybrid 法を用いた植物エス

## トロゲンおよ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  $\alpha/\beta$ , 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

rER-GAL4DBD (rat estrogen receptor  $\alpha$  - GAL4 DNA binding domain fusion protein) と TIF2-GAL4AD (TIF2-GAL4 activation domain fusion protein) とを発現させた酵母及び hER-GAL4DBD (human estrogen receptor  $\alpha/\beta$  - 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 ( $30^\circ\text{C}$ 、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 ( $37^\circ\text{C}$ 、15 分)、*o*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシドを加え  $30^\circ\text{C}$ 、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、 $\beta$ -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 における各種内分泌かく乱化学物質のエストロゲン活性の比較

子宮肥大試験：10 週齢 ICR マウス雌の卵巣を摘出し、4 週間から、 $E_2$ 、DES、Bisphenol A、Resveratrol、Genistein、Zearalenone および Zeranone を  $0.5\text{ng} - 100 \text{mg/kg/day}$  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。ER 結合試験：Zearalenone および Zeranone 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  $\alpha$  または ER  $\beta$  と [ $^3\text{H}$ ]  $E_2$  および Zearalenone および Zeranone を  $100 \text{nM}$  から  $100 \mu\text{M}$  含む反応液を室温で 2 時間反応させた。その後、ER 結合 [ $^3\text{H}$ ]  $E_2$  をヒドロキシアパタイトにより遊離 [ $^3\text{H}$ ]  $E_2$  と分離し、放射活性を測定し、その結果から Zearalenone および Zeranone の ER  $\alpha$  または ER  $\beta$  との結合活性を算出して比較した。

## 3. 出生前あるいは思春期前 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ゲン標的臓器への影響

CD-1 マウスに対し、妊娠 15-18 日にかけて被験物質 (Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A、DES) を Dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解して  $0.5 \text{mg/kg}$  あるいは  $10 \text{mg/kg}$  を連日 (計 4 回) 皮下投与した。DES の投与量は  $0.5 \mu\text{g/kg}$  と  $10 \mu\text{g/kg}$  とした。思春期前投与としては、15-18 日齢にかけて被験物質 (Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranone、Bisphenol A、DES) を DMSO に溶解して連日 (計 4 回) 皮下投与し、DES の投与量は  $10 \mu\text{g/kg}$  とした。

## 4. 出生前あるいは思春期前 Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranone 投与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

Genistein (0.5 mg/kg あるいは 30 mg/kg) の出生前 (妊娠 15-19 日齢の母体に連日計 5 回) あるいは思春期前暴露 (15-19 日齢にかけて連日計 5 回)、Resveratrol (10 mg/kg あるいは 100 mg/kg)、Zearalenone (0.1 mg/kg あるいは 10 mg/kg)、Zeranol (0.1 mg/kg あるいは 10 mg/kg) の思春期前暴露を行い、発育や内分泌かく乱をみるとともに、50 mg/kg *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) の腹腔内投与により、乳腺発癌を比較した。

## 5. 妊娠中に暴露した植物由来エストロゲン様物質が出生仔の男性生殖器におよぼす影響

平成 14 年度には、65 日齢 (young adult) についての検索をおこない、平成 15 年度には 300 日齢 (middle age) についての検索をおこなった。ゲニスタインの投与は、少量 (1.5mg/kg、常食量相当) および大量 (30mg/kg) の 2 群とコントロール群 (無摂取) を作成した。

## 6. 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およぼす影響

ゲニスタインの妊娠母体への投与は、少量 (1.5 mg/kg、常食量相当) および大量 (30 mg/kg) およびコントロール群 (無摂取) を作成した。出生後の胎仔をゲニスタインフリーの環境で 56 日間飼育し、安楽死後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。

## 7. Bisphenol A および植物エストロゲンの高感度分析法の開発と食品関連化学物質の体内移行調査

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 の 10 mg/kg を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清を得た。なお、分析の前処理に用いる器具類や水については BPA のコンタミネーションの可能性があるので、「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会中間報告書追補」による分析法の指針に基づき特別の処理を行なった。しかし、それでもブランク値を完全に除去できなかったため、マウスに投与する Bisphenol A については d16 体を用いた。

### b. 高感度一斉分析法の開発

分析操作の簡便な高速液体クロマトグラフィーを分離手法に用い、検出器として高感度が得られるアンペロメトリック型電気化学検出器 (ECD) と、感度及び選択性に優れた MS/MS を用いて、試料の前処理条件及び分析条件の検討を行った。

## 8. 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*<sup>g</sup> マウスを用いた。自己免疫病発症前の 1 ヶ月齢の MRL-*lpr*<sup>g</sup> 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 $\beta$  (E2) を 10  $\mu$ 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。また、Genistein と Bisphenol A については投与群を別に作成して生後 7 ヶ月までの生存率を調べた。

## 9. 輸入果実に使用されている防カビ剤の実際

### 分析対象試料

市販レモン (8 商品)、オレンジ (8 商品)、グレープフルーツ (4 商品) の 3 種、16 品を対象とした。分析対象とした防カビ剤は、OPP、DP (ジフェニール)、TBZ (チアベンダゾール) である。また、各果実は外果皮と果肉に分けて行った。蛍光検出逆高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用い外部標準法によって定量した。

## 10. E-CALUX Assay を用いた農薬のエストロゲン活性評価

### a. E-CALUX Assay 法

米国 XDS 社が開発し、(株) 日吉とライセンス契約を締結している E-CALUX Assay 法によってエストロゲン活性および抗エストロゲン活性を測定した。本法はヒト卵巣がん細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、エストロゲンと ER との結合をルシフェラーゼ活性により検出するものである。

### b. ラット肝 S9 による代謝方法

Bisphenol A を用いて S9 代謝実験の検討を行った。オリエンタル酵母社製エームステスト用 S9/コファクター A セットを用い、Bisphenol A の代謝確認には HPLC を用いた。

### c. 測定農薬

滋賀県内で過去に、検出された農薬について測定した。測定農薬は、ピレスロイド農薬 8 種、有機塩素系農薬 3 種、有機リン系農薬 7 種、その他 14 種の計 32 種類である。

## 11. 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

ラット下垂体腫瘍由来の細胞である MtT/Se がエストロゲン存在下で分裂・増殖する特

性を利用してエストロゲン活性測定系を確立し、種々の農薬とそれらの混合物を測定し検討を行った。測定農薬として TBZ、OPP、ダイアジノン、トリクロホスメチル、プロチオホス、ピリプロキシフェンを用いた。

## 12. エストロゲン様物質の作用測定のための培養細胞系の樹立とその作用機構の解析ならびにエストロゲン感受性ヒト乳癌細胞の内在性遺伝子発現を指標としたエストロゲン活性測定系の樹立

### a. ラット乳癌細胞株の樹立

ラット乳癌細胞株は 7,12-dimethylbenz[a]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 Hallows らの方法に従い樹立した。方法を略記すると、細切した 1.5 g 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  $\mu$ m、70  $\mu$ m メッシュフィルターにて濾過後、40  $\mu$ m 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  $\alpha$  (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。

ER $\alpha$  forward: 5'-atgacatgacaccttcacaccaaag-3'

reverse: 5'-ggcgtcgattgtcagaattggacc-3'

ER $\beta$  forward: 5'-aggatgtgtcaagtgtggatccagg-3'

reverse: 5'-tgctggagtttaactcacggaacc-3'

GAPDH forward: 5'-ttcaacggcagcagtcgaag-3'

reverse: 5'-catggactgtgtgcatgag-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-disulphophenyl)-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  $1 \times 10^3$  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  $\mu\text{M}$  の genistein、daidzein 存在下で 24 時間培養後、WST-8 溶液 10  $\mu\text{l}$  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、ER $\alpha$  発現陰性 C11 細胞を 10  $\mu\text{M}$  genistein 非存在および存在下 ( $\phi 6$  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。

### e. Estrogen 受容体 $\alpha$ 結合試験

試料 (Zeranol) の Estrogen 受容体 (ER)  $\alpha$  に対する結合親和性は Ligand Screening System (東洋紡、ERA-101) を用いて測定した。まず、既知濃度の ER $\alpha$  20  $\mu\text{l}$ 、未標識 17 $\beta$ -estradiol (リガンド) 30  $\mu\text{l}$  と 3-100 nM Zeranol 30  $\mu\text{l}$  の混合液を 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間反応させる。次いで、混合液 50  $\mu\text{l}$  とペルオキシダーゼ標識 17 $\beta$ -estradiol 50  $\mu\text{l}$  を抗 17 $\beta$ -estradiol 抗体固相化ウェル内で 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間反応させ、混合液中に含まれる遊離 17 $\beta$ -estradiol 量を酵素免疫競合法により測定する。陽性対照として 15-300nM Diethylstilbestrol (DES) を用いた。下記の式により結合阻害度を算出後、阻害曲線を作成し、阻害曲線より IC<sub>50</sub> を求めた。  
結合阻害度 = (吸光度 BL - 吸光度 S) / (吸光度 BL - 吸光度 A)

吸光度 BL : DES 0nM の吸光度平均値

吸光度 S : 各試料の吸光度平均値

吸光度 A : DES 300nM の吸光度平均値

### f. 内在性遺伝子発現を用いたエストロゲン作用の測定

Estrogen 感受性細胞株 MCF-7 の内在性遺伝子 c-myc、pS2 の発現量変化を指標として用いた。pS2 遺伝子は Estrogen 応答配列非依存的に、c-myc 遺伝子は非依存的に発現調節を受ける遺伝子である。MCF-7 細胞を血清非存在下で 3 日間培養した後  $10^{-13}$ - $10^{-7}$  M の 17 $\beta$ -estradiol および Zeranol を添加し、2 時間後に mRNA を回収してそれぞれの遺伝子の発現量を RT-PCR 法にて解析した。遺伝子発現の変化は被験物質非存在下での対象遺伝子の mRNA/ $\beta$ -actin mRNA 比に対する相対値として表した。用いたプライマーは次の通りである。

c-myc forward: 5'-gggctctgctcgcctctctacgttg-3'  
reverse: 5'-gactccgtcgaggagagcagagaat-3'

pS2 forward: 5'-atggccaccatggagaacaa-3'

reverse: 5'-ctaaaattcacactcctctcttctgga-3'

$\beta$ -actin forward: 5'-cagggcgtgatgggg-3'

reverse: 5'-ggcatcttctcgcgggttg-3'

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およ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. rER $\alpha$  を導入した酵母 Two-Hybrid 法による植物エストロゲン及び生活関連製品由来化学物質のエストロゲン様作用の評価  
植物エストロゲン及び内分泌かく乱作用が疑われる化学物質 (生活関連製品由来) を中心に選び、これらのエストロゲン作用を評価した。植物エストロゲンとしてゲニステイン、イコール、クメステロール及びゼアラレノンにエストロゲン作用が認められた。生活関連製品に由来する化学物質からは、*p*-アルキルフェノール、ビスフェノール A、パラベン、ベンゾフェノン誘導体に



エストロゲン様作用が認められた。これらはアルキルフェノールを分子内構造に有するため、アルキルフェノール誘導体とされる。エストロゲン様作用を有するアルキルフェノール誘導体の構造上の特徴については、水酸基に対して疎水性置換基をパラ位に有していることが示された。この疎水性置換基をオルト位やメタ位に有する化学物質には、作用は認められなかった。これらことから、エストロゲン様作用を示す化学物質の構造上の特徴として、フェノール性水酸基を有し、かつ、水酸基に対してパラ位に置換基を有することが重要であることが分かった。

b. rER $\alpha$ を導入した酵母 Two-Hybrid 法による植物エストロゲンの抗エストロゲン様作用の評価

4-ヒドロキシタモキシフェンを陽性対照として酵母 Two-Hybrid 法を用いて植物エストロゲン及びアルキルフェノール誘導体の抗エストロゲン作用を評価した。アゴニスト作用が認められている物質（ゼアラレノン、ゲニステイン、イコール、クメステロール及びビスフェノール A）については、アゴニスト作用を示す 1/100 及び 1/10 の濃度で評価した。アゴニスト作用が認められていない物質については、比較的濃い濃度（1-100  $\mu$ M）で評価した。いずれの化学物質についても測定濃度範囲内において抗エストロゲン作用は認められなかった。

c. hER $\alpha$ または hER $\beta$ 受容体に対する結合親和性

ゲニステインは、IC<sub>50</sub>で比較したとき $\alpha$ 受容体よりも $\beta$ 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、 $\alpha$ 受容体よりも $\beta$ 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ピオカニン 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、IC<sub>50</sub>の差は最大2

倍程度であった。 $\alpha$ 受容体よりも $\beta$ 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。

d. hER $\alpha$  または hER $\beta$ 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 $\alpha$ 受容体よりも $\beta$ 受容体に強いエストロゲン様作用が認められた。E<sub>2</sub>、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 $\alpha$ 受容体と $\beta$ 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ル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、 $\alpha$ 受容体よりも $\beta$ 受容体に強く発揮されると考えられる。すなわち、 $\alpha$ 受容体及び $\beta$ 受容体間での発現量に差がない臓器では、 $\beta$ 受容体を介した作用がより低濃度で発揮されると予測することになる。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 $\alpha$ 受容体と $\beta$ 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。

e. hER $\alpha$ または hER $\beta$ を導入した酵母 Two-Hybrid 法による E<sub>2</sub> との相互作用の評価  
およそ EC<sub>50</sub> 付近の作用を示す E<sub>2</sub> 存在下で植物エストロゲンの E<sub>2</sub> の作用への影響を調べた。E<sub>2</sub> (0.003  $\mu$ M) 存在下、 $\alpha$ 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 μM) 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、E<sub>2</sub>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 E<sub>2</sub> (0.001 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。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 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 E<sub>2</sub>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 E<sub>2</sub>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 における各種内分泌かく乱化学物質のエストロゲン活性の比較

マウスを用いた子宮肥大試験では E<sub>2</sub> および DES のエストロゲン活性はほとんど同

じであることが判明した。また、Bisphenol A、Resveratrol および Genistein のエストロゲン活性は E<sub>2</sub> と比較すると非常に弱く、Bisphenol A で約 1/10 万、Resveratrol で約 1/5 万、Genistein は約 1/50 万以下であることが示唆された。さらに、E<sub>2</sub> と Resveratrol および Genistein 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。Zearalenone と Zeranone のエストロゲン活性を子宮肥大試験によって比較した結果、Zeranone は 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、Zeranone と Zearalenone の活性を E<sub>2</sub> と比較すると Zeranone で 1/5000、Zearalenone では 1/2 万で、調査した環境ホルモン物質の中では最も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、Zeranone は Zearalenone よりもエストロゲンレセプターへの結合活性が強いことが判明した。

## 3. 出生前あるいは思春期前 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ゲン標的臓器への影響

エストロゲン様化学物質の出生前投与は雌マウスの体重増加を促進し、膣開口を早発する。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、一周期長は少量 DES 投与群の他は有意に延長し、Genistein、Resveratrol、Bisphenol A や DES 投与動物では発情間期の占める割合が有意に延長し、Zearalenone では発情期の有意の延長をみた。卵巢の組織像をみると、4 週齢時では黄体の欠如を、大量 Genistein (2/6)、大量 Resveratrol (1/6)、大量 Zearalenone (5/6)、少量・大量 Bisphenol A (各の 2/6、3/6)、少量・大量 DES (各の 5/6、6/6) 投与動物にみた。しかし、Genistein、Resveratrol、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

物にみたのに対し、大量 Zearalenone 投与動物では 8、12、16 週齢時でも各の 6/6、5/6、2/6 の動物に黄体欠如をみた。乳腺の発育についてみると、8-16 週では大量 Zearalenone 投与により生じた無黄体マウスでは、乳腺分化の抑制がみられた。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、Genistein、Zearalenone、Zeranol、DES は無処置対照群に比して膣開口を促進したが、Resveratrol や Bisphenol A にはこの作用はみなかった。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。卵巢の組織像をみると 8 週齢以降無処置対照群とともに、Genistein、Resveratrol、Zeranol、Bisphenol A や DES 投与動物では、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が、24 週では全例正常の卵巢をみた。なお、被験化学物質はマウス乳腺の分化には顕著な影響を示さなかった。

#### 4. 出生前あるいは思春期前 Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol 投与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

体重に関せば、無処置対照ラットに比して出生前 Genistein 投与ラットは低体重で、思春期前 Genistein 投与ラットは体重増加を促進した。しかし、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol は体重増加に影響をみなかった。膣開口は、思春期前の大量 Genistein や Zearalenone、思春期前の大量・少量 Zeranol で早発した。また、いずれの被験物質でも発情期の延長をみた。Zearalenone や Zeranol 投与では黄体を欠如したラットをみた。乳腺発癌は思春期前少量 Genistein と思春期前大量 Zearalenone で抑制され、思春期前大量 Resveratrol で促進されたが、これ以外

の群では無処置対照群と差はみなかった。

#### 5. 妊娠中に暴露した植物由来エストロゲン様物質が出生仔の男性生殖器におよぼす影響

オス 65 日齢の体重および精巣・副生殖器重量を比較したところ、体重は大量投与群 (平均  $250 \pm 10.0$  g) ではコントロール群 (平均  $265 \pm 29.5$  g) に比べ、低体重傾向であったが、少量投与群 (平均  $262 \pm 21.4$  g) ではあまり変化が見られず、統計的に有意差がみとめられなかった。精巣重量は、コントロール群では左右の計が平均  $2.87 \pm 0.11$  g、少量投与群では  $2.64 \pm 0.17$  g、大量投与群では  $2.77 \pm 0.25$  g で、少量投与群がコントロール群に比し統計的有意差

( $p=0.0171$ ) を有していた。副生殖器重量も、投与群で低重量の傾向を認めたが、用量依存性や統計的有意差はなかった。300 日齢についての検索をおこなったところ、体重と精巣および副生殖器の重量の比較では、体重は大量投与群 (平均  $616 \pm 46.9$  g) で、コントロール群 (平均  $650 \pm 77.1$  g) に比べ、低体重傾向であった。また少量投与群 (平均  $626 \pm 65.4$  g) でも同様であった。精巣重量は大量投与群で左右の計が平均  $3.36 \pm 0.20$  g、少量投与群で平均  $3.48 \pm 0.12$  g、またコントロール群で平均  $3.46 \pm 0.35$  g で統計的有意差はなかった。

したがって、重量で判定する限り、少なくとも妊娠中の常食量の Genistein 摂取が次世代男性の成熟期以降の生殖器機能へ与える影響はないものと言える。

#### 6. 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およぼす影響

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、15年度と16年度に各実験条件群3例ずつ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た後、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減少し（有意差あり）、大量投与群でより強く減少（コントロールの8割程度）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。ただしこれら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。

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 $\mu$ 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。

## 7. Bisphenol A および植物エストロゲンの高感度分析法の開発と食品関連化学物質の体内移行調査

### a. 分析方法の開発

遊離体の測定には、試料125 $\mu$ L（乳汁の場合は250 $\mu$ L）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分配とイオン交換を組み合わせた ISOLUTE Multimode 固相抽出カートリッジにより精製した。メ

タノールで溶出し、溶出液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試料溶液とした。また、抱合体を含めた総量の測定には、試料125 $\mu$ L（乳汁の場合は250 $\mu$ L）に酢酸緩衝液（pH5）及び $\beta$ -グルクロニダーゼ/サルファターゼ溶液を加えて37 $^{\circ}$ 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。

HPLC/ECDでは、検出限界（S/N=3）は、50 $\mu$ L注入で0.2 ng/ml（10 pg）で、検量線も、0.2 ng/mlから100 ng/mlの範囲で良好な直線性が得られたが、酵素処理後の検体では妨害ピークが出ること及び高感度域ではグラジエント溶出ではベースラインが安定せず、アイソクラチックでは分析時間が長くなることから、グラジエントが可能でより選択性に優れたLC/MS/MSの検討を行った。

LC/MS/MSではESIネガティブモードを用い、カラムにInertsil ODS-3（2.1 $\times$ 150 mm）、移動相に5 $\mu$ M酢酸アンモニウム含有メタノール（メタノール濃度45~95%のグラジエント溶出）により測定した。注入量10 $\mu$ Lで検出限界（S/N=3）は、5物質で血清（0.2 mLに定容した場合）で0.6 ng/mL以下、乳汁（0.5 mLに定容した場合）で1 ng/mL以下であった。なお、Bisphenol A-d16の感度は、Bisphenol Aの約1/3であった。6物質で200 ng/mLまでの広い範囲で直線性が見られた。血清及び乳汁に20 ng/mL濃度添加したときの回収率は、6物質とも70%以上と良好であった。LC/MS/MSでは簡略な前処理操作でも妨害ピークはほとんどなく、高感度でかつ検量線は広い直線域を有しており、体内動態の測定に有用であると考えられた。

### b. 投与実験

i) 単独皮下投与群の投与2時間後では、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