

体 65)、1400 ng/mL (遊離体 1100) 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 (10.7~19.1%) より乳汁 (65.1~88.7%) で高い傾向が見られた。

ii) 3 種混合皮下投与においては、若干の値変化が見られ、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。

iii) 混合経口投与においては、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、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 において乳汁中の抱合体が他の 2 物質より高く、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。

iv) 単独皮下投与の 7 時間目搾乳群での Bisphenol A、Genistein 及び Resveratrol では、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) 検出され、投与後 2 時間目の搾乳群での検出値と比較すると、Bisphenol A 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 Bisphenol A 及び Resveratrol に比べて大きく、有意な差が見られた。Genistein では 2 時間目の値が他の 2 物質に比べて低いことから吸収が緩慢であることが示唆された。

v) 全体の結果より、Bisphenol A、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、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分かる。胃腸管内における抱合体の分解と遊離体の再吸収が知られていることから、体内作用には、抱合体の寄与も考えられる。

また、イソフラボンの摂取量は 27.75 mg/day 及び 35 mg/day 程度と報告されており、加えて、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。Bisphenol A については、成人の暴露量は 1 µg/kg/day を超えないと報告されていることから、今回の投与量の 1/10000 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 Bisphenol A の乳汁移行による影響はないと考えられる。

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

a. 体重および臓器重量

各投与群の体重には有意な差が見られなかった。腎臓および脾臓重量はオスの Resveratrol 投与群で顕著に高かった。リンパ節重量はオス E2 投与群、雌雄 Resveratrol 投与群および雌雄 Genistein 投与群で顕著に増加していた。Bisphenol A および Zeranol 投与群はいずれの臓器重量も変化が見られなかった。

b. タンパク尿症

タンパク尿症罹患率はオスでは Zeranol 投与群が、メスではすべての投与群が対照群と比較して顕著に高かった。

c. 腎炎発症

糸球体腎炎の発症は各投与群で差が見られなかったが、腎臓血管炎の発症はオス Genistein 15mg/ml 投与マウスで有意に高かった。

d. 皮膚炎

オスではすべての投与群で皮膚炎が悪化していた。メスでは Bisphenol A と Genistein 投与群で悪化し、Zeranol 投与群は改善が見られた。

e. 血清学的検査

免疫複合体量はオス E2 投与群で有意な上昇が見られ、メス Resveratrol 投与群では有意に低下していた。また、抗 DNA 抗体量を調べた結果、IgM 抗体量はメス Genistein およびオス Zeranol 投与群で、IgG 抗体量はメス Resveratrol 投与群で有意な上昇が見られた。

f. 生存率

Genistein および Bisphenol A の生存率は対照群と比較して顕著に低下した。

9. 輸入果実に使用されている防カビ剤の実際

DP はオレンジ、レモンおよびグレープフルーツいずれからも検出されなかった。OPP はグレープフルーツから検出されなかった。また、オレンジ、レモンそれぞれ一検体から OPP、TBZ 両方が検出された。市販の柑橘類からは基準値（残留量）以下ではあるが無視できないレベルで防かび剤が検出された。

また、果肉にはいずれの防カビ剤も残留しないことが分かった。外果皮には、最外皮（着色している部分）とその内側の白い部分に分別したが、レモン、オレンジの最外皮にのみ OPP が残留することが分かった。TBZ はグレープフルーツで最外皮のみならずその内側の白い部分にも約 20% 程度が分布していることが分かった。これはグレープフルーツの最外皮が比較的薄く、浸透性が高いためと予想できる。オレンジは最外皮のみから検出できた。

ついで OPP を対象に中性洗剤による洗浄効果を検討した。洗浄は中性洗剤水溶液に浸漬し、食器洗浄用スポンジでブラッシングした。その結果、市販品のレモンおよびオレンジの OPP は検出限界以下にであった。冷水浸漬（1 時間）による洗浄効果はほとんど認められなかった（99% 以上残存）。一方、温水浸漬（約 80 度、1 時間）では、約 40% の減少が確認できた。

10. E-CALUX Assay を用いた農薬のエストロゲン活性評価

a. エストロゲン活性

エストロゲン活性の最大活性値を 100% とした時、10% の作用を示す濃度（ EC_{10} ）は、 $3.2 \times 10^{-12} M$ であった。エストロゲン活性がみられた農薬は、トルクロホスメチル、プ

ロチオホス、ダイアジノン、TBZ、ピリプロキシフェンで、 EC_{10} は、それぞれ、 $7.7 \times 10^{-6} M$ 、 $3.3 \times 10^{-6} M$ 、 $4.6 \times 10^{-5} M$ 、 $2.2 \times 10^{-6} M$ 、 $2.9 \times 10^{-6} M$ であった。さらに、活性のみられた農薬について、今まで複数検出されたものを 2 種類組み合わせで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。

b. 抗エストロゲン活性

クロルフルアズロン、イマザリル、クロルフェナピルに抗エストロゲン活性がみられた。

c. S9 代謝

BPA を用いて S9 代謝実験の検討を行い、代謝系を確立した。BPA は代謝前後のエストロゲン活性に変化はなかった。ペルメトリンは活性がなかったが、代謝後活性がみられ、TBZ、OPP は代謝後、低くなった。 EC_{10} は、それぞれ、 $4.9 \times 10^{-5} M$ 、 $2.8 \times 10^{-5} M$ 、 $1.4 \times 10^{-5} M$ であった。抗エストロゲン活性のみられた S9 代謝物はなかった。

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

プロチオホス、ピリプロキシフェンの検出限界濃度は、単独で添加するとそれぞれ $1 \times 10^{-6} M$ 、そしてこれらの混合物では $1 \times 10^{-7} M$ となった。ダイアジノンの検出限界濃度は単独で添加した場合 $1 \times 10^{-5} M$ 、トリクロホスメチルは $1 \times 10^{-6} M$ 、そしてこれらの混合物では $1 \times 10^{-7} M$ となった。防かび剤の TBZ と OPP は、ともに単独で $1 \times 10^{-5} M$ 、混合して添加すると $1 \times 10^{-7} M$ であった。これらの結果、単独で添加した場合よりも混合して添加することによりエストロゲン様活性が増強されることが確認された。

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 ER 発現と p53 遺伝子変異

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（腺癌）より乳癌細胞株 7 株（C1、C2、C3、C6、C11、C15、C17）を樹立した。RT-PCR 法による ER 遺伝子発現の解析では、ER 陰性（C17）、ER α のみ陽性（C1）、ER β のみ陽性（C2、C11）、ER α 、 β 陽性（C3、C6、C15）の各細胞株が得られた。一方、細胞増殖ならびにアポトーシス関連分子群と ER 発現との間には明らかな相関は認められなかった。

DNA 傷害等細胞内傷害によるアポトーシス誘導に中心的役割を担う p53 の遺伝子変異について解析した。全株について RT-PCR で全長 p53 遺伝子が増幅され、大きな欠失等は存在しなかった。また、PCR 産物の塩基配列を解析した結果 C11 のコドン 246 に 1 塩基変異が検出された。この変異は、ゲノム DNA の塩基配列解析により確認された。さらに、導入ヒト H-ras 遺伝子には全株で変異が認められたのに対して、ラット H-ras 遺伝子には変異が見られなかったことは興味深い。

b. genistein、daidzein の細胞増殖活性への影響

ゲニステイン、ダイゼイン（0-10 μ M）添加 24 時間後での細胞増殖活性への影響を C3（ER α 、 β 陽性）、C11（ER β 陽性）を用いて測定した。被験物質 5 μ M まで各々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 μ M 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。

c. DNA マイクロアレイ解析

ER β 陽性 C11 細胞を用い genistein 添加後の遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイにより解析した。10 μ M genistein 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 412 個、低下 329 個の 741 遺伝子で、全体の 3.6%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）、cyclinG（1/2.2 倍）が含まれており、現在 RT-PCR 法による確認作業中である。

d. Zeranol の ER α 結合親和性

DES は 15 nM、30 nM、45 nM でそれぞれ 36.3 \pm 10.1%、87.2 \pm 1.3%、95.6 \pm 0.9%の 17 β -estradiol に対する ER α 結合阻害活性が認められた。阻害曲線より IC₅₀は 20 nM と測定された。Zeranol は 15 nM、30 nM、45 nM、100 nM でそれぞれ 10.7 \pm 5.0%、59.3 \pm 4.2%、80.0 \pm 6.8%、98.0 \pm 1.0%の結合阻害活性が認められ、IC₅₀は 26 nM であった。この結果から Zeranol の ER α に対する相対結合親和性（DES の IC₅₀/Zeranol の IC₅₀）は 0.77 と計算された。

e. Zeranol の遺伝子発現への影響

pS2 遺伝子発現に対しては 17 β -estradiol、Zeranol とも 10⁻¹²M でそれぞれ 1.24 倍、1.48 倍の最大誘導活性を示した。一方 c-myc 遺伝子発現に対しては、17 β -estradiol は 10⁻¹³-10⁻¹⁰M の範囲で濃度依存的に c-myc 遺伝子発現を上昇させ、10⁻¹⁰M でほぼ最大値（1.49 倍）に達した。Zeranol も 10⁻¹³-10⁻⁹M の範囲で濃度依存的に遺伝子発現を上昇させ、10⁻⁹M で最大 1.80 倍上昇させた。ところが、10⁻⁸M で 1.31 倍、10⁻⁷M では 1.09 倍とより高濃度域では濃度依存的に c-myc 遺伝子の発現上昇が減弱した。

D. 結論

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. イソフラボン類及びアルキルフェノール誘導体のエストロゲン様作用の強度
イソフラボン類（ゲニステイン、イコール及びクメステロール）のエストロゲン様作用の強度は、アルキルフェノール誘導体に認められる強度よりも強い。エストロゲン

様作用の強度と日常的摂取量を考慮すると汚染物としての微量のアルキルフェノール誘導体の摂取のエストロゲン作用系への影響は食品として摂取するイソフラボン類の作用に隠れる可能性がある。

b. イソフラボン類とアルキルフェノール誘導体のエストロゲン作用

単独作用時におけるイソフラボン類及びアルキルフェノール誘導体のエストロゲン様作用は、 α 受容体よりも β 受容体に強く認められた。また、 E_2 のエストロゲン作用に対する影響を受容体間で比較したとき、相加的に予測されるエストロゲン作用よりも観察されるエストロゲン作用が減弱される現象は、 β 受容体で認められた。これらのことから β 受容体は、 α 受容体よりもイソフラボン類及びアルキルフェノール誘導体等の外因性の化学物質に対する影響を受けやすいと考えられる。 α 受容体及び β 受容体間での発現量に差がない臓器では、 β 受容体を介した作用がより低濃度で発揮されると予測することになる。このように受容体間での作用傾向にイソフラボン類とアルキルフェノール誘導体との間に大きな差はない。このことから、エストロゲン受容体を介した作用に伴う生体影響に限定すると生体内への取り込む量と個々の化学物質の作用の強度が、これら化学物質の生体影響を考えると最も大きな要素であるといえる。ただし、PCBの水酸化体のように蓄積性があるものや他の内分泌系への影響を有するアルキルフェノール誘導体はこのような考察はあてはまらない。

日本人は、大豆食品等を介して1日におよそ20 mgのイソフラボン類を摂取している。エストロゲン受容体を介した作用に限定した場合、アルキルフェノール類よりも強い作用を有するイソフラボン類を多量に摂取している現状で極微量の非意図的なアルキルフェノール類の摂取によるエストロゲン受容体を介した生体影響は、無視できると思われる。

ゼアラレノン及びその代謝物の一つであるゼラノールのエストロゲン受容体を介した作用については、アゴニスト作用とアンタゴニスト作用の双方が認められた。これらによる内分泌かく乱作用は、多様で複雑であると考えられる。

c. イソフラボン類の健康増進作用

イソフラボン類の健康増進作用のうちの乳がん予防効果については、イソフラボン類に4-ヒドロキシタモキシフェンのような明確な抗エストロゲン作用が認められないため、受容体に対する作用のみで結論づけることは困難である。受容体を介した作用では、 β 受容体に対して単独でエストロゲン様作用を有するイコールが E_2 と共存するときに相加的に予測されるエストロゲン作用よりも減弱したことは興味深い。受容体との結合様式を結晶解析した報告ではゲニステインは、乳房で抗エストロゲン作用を示す4-ヒドロキシタモキシフェン及びラロキシフェンと同様に転写抑制型のコンフォメーションを示すことが示されている。イソフラボン類には、受容体に対する直接作用以外、すなわち、性ホルモン結合グロブリンの増産、チロシンキナーゼ阻害作用及び抗酸化作用があるため、総合的に解釈する必要がある。

前立腺については、 β 受容体の発現量が多いことが報告されていることから前立腺は、外因性の化学物質が有するエストロゲン作用に感受性が高い臓器の一つと考えられる。イソフラボン類の摂取が多い地域で前立腺がんの発症率が低い理由にゲニステイン等のエストロゲン様作用を加味することは合理的であるといえる。骨についても β 受容体の発現量が多く、イソフラボン類の閉経後骨粗鬆症に対する有効性も β 受容体を介したエストロゲン様作用に起因すると考えることは合理的である。作用が強く安全に食品から摂取できるイソフラボン類は、これら β 受容体を介した健康増進作用を期待するうえで有望であると考えられる。

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

本研究で検討した環境ホルモン物質のエストロゲン活性は Zeranone > Zearalenone > Resveratrol > Bisphenol A > Genistein 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。

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

天然エストロゲンとして Genistein、Resveratrol、Zearalenone、合成エストロゲンとして Bisphenol A、DES の作用強度をマウスの出生前暴露実験（妊娠 15-18 日の母体に連日被験物質を皮下投与し、出生雌を検討）で比較したところ、体重はいずれの化学物質も投与量の如何に関わらず増加傾向にあり、16 週齢では少量 DES 群の他はいずれも対照群に比して有意に重かった。思春期発来（膣開口）は被験物質投与により早発する傾向にあり、大量・少量 Genistein、Zearalenone、DES、大量 Bisphenol A で有意に早発した。発情周期をみると、被験物質投与により 1 周期に要する時間は延長傾向にあり、少量 DES 群以外では有意に延長した。発情周期の延長は Genistein、Resveratrol、Bisphenol A、DES では発情間期の延長に起因し、Zearalenone では発情期の延長による。Genistein、Resveratrol の大量投与群、Bisphenol A、DES の大量、少量投与群では、4 週齢時に無排卵性卵巣をみたが、8 週齢時以降卵巣は正常形態を呈していた。一方、Zearalenone の大量投与群では 4、8、12、16 週齢時に無排卵性卵巣をみた。よって、マウスへの Zearalenone の出生前暴露の卵巣への影響は Genistein、Resveratrol、Bisphenol A、DES に比して持

続する。マウスへの出生前 Zearalenone や Bisphenol A 投与は正常卵巣を有する個体の乳腺の分化を（4 週齢時に）促進した。一方、8 週齢以降では、Zearalenone は無排卵性卵巣（高エストロゲン、低プロゲステロン環境）を介して乳腺の分化を抑制した。

Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranone、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）で比較したところ、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。思春期発来（膣開口）は Genistein、Zearalenone、Zeranone、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。発情周期は、Zearalenone、Zeranone、DES 投与により有意に発情期が延長した。Genistein、Resveratrol、Zeranone、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。一方、Zearalenone 投与群では 4、8 週齢時に無排卵性卵巣をみた。いずれのマウスも 24 週齢時では正常卵巣をみた。マウスへの思春期前エストロゲン様化学物質暴露の卵巣への影響は可逆性であるが、Zearalenone の影響は他の被験物質に比して持続する。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。

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

天然エストロゲンである Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranone の発育ならびに内分泌かく乱作用につきラットを用いて検討した。1 日投与量として Genistein はアジア人の 1 日消費量ならびにその 20 倍量、Resveratrol は赤ワインに換算して 500 グラスならびにその 10 倍量、Zearalenone

はアメリカ人の1日最大暴露量ならびにその100倍量とした。体重は投与量の如何に関わらず、Genisteinの出生前投与で減少し、思春期前投与で増加したが、Resveratrol、Zearalenone、Zeranolでは影響をみなかった。

思春期発来(陰開口)はGenistein思春期前大量投与群、Zearalenone大量群とZeranol少量・大量群で早発したが、Resveratrolでは影響をみなかった。発情周期はGenisteinとResveratrolの思春期前投与では発情期の延長をみたが、全例周期性は呈していた。一方、ZearalenoneやZeranol投与ラットでは少量・大量投与群とも持続発情や持続発情間期といった顕著な異常をみた。以上より、4つの被験物質について、ヒトの暴露量を勘案してラットにおける内分泌かく乱作用の強度を比較すると、Zearalenone = Zeranol > Genistein > Resveratrolと考えられる。

Genisteinの周生期暴露は乳癌を抑制する傾向にある。特に思春期前の生理的用量の投与では有意な抑制をみた。Resveratrolのラットへの思春期前大量暴露(100 mg/kg)ではMNU誘発乳癌を促進したが、少量暴露(10 mg/kg)にこの作用はみなかった。Resveratrolの1日大量暴露量は赤ワインに換算して5000グラス量であり、その1/10量に乳癌促進作用がないことは、ヒトの通常摂取量では乳癌促進作用はないものと結論できる。Zearalenoneのラットへの思春期前大量投与は乳癌を抑制した。しかし、Zearalenoneは用量依存性に無排卵性卵巣を惹起した。Zeranolの思春期前投与は乳癌に影響をみなかった。しかし、用量依存性に無排卵性卵巣を惹起した。

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

生殖器の重量で判定する限り、妊娠中の(少なくとも常食量の)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。

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枢神経系におよぼす影響

実験生物学的には、Genistein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。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、今後更なる詳細な検討が必要である。

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. LC/MS/MSによる分析は、簡略な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る。

b. 単独皮下投与では投与後2時間目でのBisphenol A、Genistein及びResveratrolの乳汁中総量及び遊離体濃度(平均値)は各々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の検出値は他の2成分に比べて低かった。3成分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%)で高い傾向がみられた。3種混合皮下投与においては、若干の値変化がみられ、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。

c. 混合経口投与においては、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、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 において乳汁中の抱合体が他の 2 物質より高く、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。

d. 今回の投与量と検出値から、報告されているヒトの Bisphenol A の暴露量が 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以下であることより乳汁移行による内分泌かく乱の影響はないと考えられる。

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

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。そのため、これらの物質の自己免疫病患者の摂取、特に日本人が多く摂取している Genistein の摂取について詳細に検討する必要があると考えられた。

9. 輸入果実に使用されている防カビ剤の実際

全てにおいて基準値以下での検出であり、直ちにヒトの健康被害を誘発するようなレベルで防カビ剤は輸入柑橘類に含有しないことは確かである。また、これら内分泌攪乱作用の発現に単独で寄与する可能性に言及することは出来ない。

10. E-CALUX Assay を用いた農薬のエストロゲン活性評価

エストロゲン活性、抗エストロゲン活性を有する農薬はあったが、残留農薬検査で検出される濃度では活性はなかった。また、2 種類混合した場合、エストロゲン活性は高くなったが、この場合もかなり高濃度に

おいての活性で、通常の農薬使用では心配のないものであった。また、S9 による代謝生成物の活性を評価した。エストロゲン活性がみられるようになった農薬もあったが、これも通常の農薬使用から考えると、問題のないものであった。農薬が残留基準内で使用されている限り、今回調査した農薬については、内分泌攪乱作用に関して悪影響はないと考える。

1 1. 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

2 種類組み合わせた農薬によるエストロゲン様作用の増強効果を M1T/Se 細胞を用いて確認した。しかし農薬に存在するエストロゲン活性は、人体に影響を及ぼす許容範囲を下回っていた。よって、直ちにヒトへの影響を及ぼすようなレベルで食品に農薬が含有していないことは明らかである。

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

a. ヒト正常型遺伝子トランスジェニックラット 1 個体に発生した乳腺腫瘍より乳癌細胞株 7 株 (C1、C2、C3、C6、C11、C15、C17) を樹立した。ER 遺伝子発現の解析では、ER 陰性 1 株、ER α のみ陽性 1 株、ER β のみ陽性 2 株、ER α 、 β 陽性 3 株であった。
b. ER α 、 β 陽性 C3 細胞と ER β 陽性 C11 細胞に対して 10 μM ゲニステインには弱い増殖抑制を認めたが、10 μM ダイゼインは無効であった。

c. C11 細胞を用い 10 μM genistein 添加後の遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイにより解析すると、添加 72 時間後に 2 倍以上の発現変動を認めた遺伝子は、発現上昇 410 個、低下 327 個の 737 遺伝子で、全体の 3.6% (737/20,500) であった。今後、クラーター解析による変動遺伝子群の分類お

よび RT-PCR 法による確認作業を行う予定である。

d. Zeranol ($IC_{50}=26$ nM) は DES ($IC_{50}=20$ nM) と同程度の ER α 結合親和性 (相対結合親和性=0.77) を有する。

e. MCF-7 の内在性遺伝子 pS2、c-myc への最大発現誘導を示す Zeranol 濃度はそれぞれ 10^{-12} M、 10^{-9} M であった。これらは 17 β -estradiol と同等の値であり、Zeranol が 17 β -estradiol と少なくとも同程度の遺伝子発現誘導活性を有することを示唆している。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Takatori S, Kitagawa Y, Oda H, Miwa G, Nishikawa J, Nishihara T, Nakazawa H, Hori S. Estrogenicity of Metabolites of Benzophenone Derivatives Examined by a Yeast Two-Hybrid Assay. *J Health Sci* 49: 91-98, 2003.
2. 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.
3. 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.
4. 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: 137-145, 2003.
5. 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.
6. 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* 18: 755-762, 2004.
7. Hamaguchi T, Matsuoka Y, Bechberger J, Ohnishi T, Fujita K, Naus CC, Kusunoki M, Tsubura A, Tsuda H. Establishment of an apoptosis-sensitive rat mammary carcinoma cell line with a mutation in the DNA-binding region of p53. *Cancer Lett* (in press).
8. 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).
9. Nikaido Y, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A. Effects of prepubertal exposure to xenoestrogen on development of the estrogen target organs in female CD-1 mice. *In Vivo* (in press).
10. 裴 仁正, 四方伸明, 垵 貴司, 段原直行, 辻田 (久徳) 美樹, 螺良愛郎. 周生期 Genistein 暴露による化学発癌剤誘発ラット乳癌の抑制ならびにその作用機序. *乳癌基礎研* 13: 41-46, 2004.
11. 井岡真基, 片岡洋祐, 山田久夫. 食品中・植物由来エストロゲン様物質の母体摂取が仔ラットの男性生殖器系に及ぼす影響. *医学のあゆみ* (投稿中).
12. 螺良愛郎. 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」平成 14 年度総括・分担報告書。
13. 螺良愛郎. 厚生労働科学研究費補助金, 化学物質リスク研究事業「内分泌かく乱物質と大豆等既存食品の発育・癌化及び内分泌かく乱作用の比較」平成 15 年度総括・分担報告書.
 2. 学会発表
 1. Tsubura A, Nikaido Y, Pei R-J, Yuri T, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M. Prepubertal zearalenone exposure suppresses N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumors in rats. The 24th Cong. Int Assoc Breast Cancer Res, Sacramento, USA, 2003.
 2. 佐藤睦哉, 裴 仁正, 二階堂泰資, 仙崎英人, 四方伸明, 中根恭司, 螺良愛郎. 新生仔期 Resveratrol 暴露の Sprague-Dawley 雌ラットにおよぼす影響. 第 92 回日本病理学会, 福岡, 2003.
 3. 二階堂泰資, 裴 仁正, 佐藤睦哉, 仙崎英人, 螺良愛郎. 内分泌攪乱物質の母体曝露による ICR 雌乳仔マウスにみられる影響. 第 92 回日本病理学会, 福岡, 2003.
 4. 裴 仁正, 佐藤睦哉, 二階堂泰資, 仙崎英人, 四方伸明, 螺良愛郎. Perinatal genistein exposure on MNU-induced mammary tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats. 第 92 回日本病理学会, 福岡, 2003.
 5. Pei Ren-Jeng, 垵 貴司, 段原直行, 四方伸明, 螺良愛郎. 周生期 Genistein 暴露による Sprague-Dawley ラットの発育, 癌化及び内分泌かく乱作用への影響. 第 13 回乳癌基礎研究会, 鳥取, 2003.
 6. 二階堂泰資, 垵 貴司, 段原直行, 四方伸明, 螺良愛郎. 新生仔期 Zearalenone 暴露の Sprague-Dawley 雌ラットにおよぼす影響. 第 62 回日本癌学会, 名古屋, 2003.
 7. 井岡真基, 片岡洋祐, 山田久夫. 植物由来エストロゲン様物質に暴露した妊娠ラットの出生仔の中枢神経におよぼす影響. 第 30 回日本神経内分泌学会, 横浜, 2003.
 8. 小嶋美穂子, 藪下尚智, 西山利正, 佐々木真理, 福永健治, 辻 元宏. E-CALUX Assay による農薬のエストロゲン活性評価. 第 6 回日本内分泌攪乱化学物質学会, 仙台, 2003.
 9. 垵 貴司, 生田明子, 中元 剛, 安原正浩, 吉村智雄, 清塚康彦, 螺良愛郎, 神崎秀陽. 思春期前雌 Sprague-Dawley ラットに対する Zeranone 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, 2004.
 10. 垵 貴司, 段原直行, 辻田 (久徳) 美樹, 二階堂泰資, 島野直人, 上原範久, 清塚康彦, 四方伸明, 螺良愛郎. Zeranone 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, 2004.
 11. 島野直人, 段原直行, 垵 貴司, 辻田 (久徳) 美樹, 二階堂泰資, 螺良愛郎. Indole-3-carbinol の思春期前暴露による MNU 誘発ラット乳癌におよぼす影響. 第 93 回日本病理学会, 札幌, 2004.
 12. 井岡真基, 片岡洋祐, 山田久夫. 植物由来エストロゲン様物質の胎児期曝露が中枢神経におよぼす影響. 第 31 回日本神経内分泌学会, 弘前, 2004.
 13. 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, 2004.
 14. 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,
2004.

15. 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, 2004.
16. 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,
2004.
17. 眞鍋真理, 神田靖士, 小嶋美穂子, 堀
伸二郎, 西山利正. 複数農薬共存農作
物におけるエストロゲン活性エンハン
ス効果. 第7回環境ホルモン学会, 名古屋,
2004.

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

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・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：蝶良 愛郎 関西医科大学 病理学第二講座

酵母 Two-Hybrid 法を用いた植物エストロゲン及び

生活関連製品に由来する化学物質のエストロゲン様作用の評価

分担研究者：堀 伸二郎

大阪府立公衆衛生研究所

研究協力者：北川陽子、高取 聡

大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

食品を介して摂取されうる化学物質（イソフラボン類等の植物エストロゲン及びアルキルフェノール誘導体等の高分子樹脂からの溶出成分）のエストロゲン様作用について受容体結合試験及び酵母 Two-Hybrid 法（rER α 、hER α 及び hER β ）により比較検討した。受容体結合試験でイソフラボン類等及びアルキルフェノール誘導体の多くに α 受容体よりも β 受容体に高い結合親和性を示す傾向が認められた。酵母 Two-Hybrid 法（rER α ）を用いてエストロゲン様作用を示すアルキルフェノール誘導体の構造上の特徴を調べた結果、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。また、酵母 Two-Hybrid 法（rER α ）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結果、抗エストロゲン作用は認められなかった。酵母 Two-Hybrid 法（hER α 及び hER β ）を用いた受容体間での比較では、イソフラボン類及びアルキルフェノール誘導体のエストロゲン様作用を有する化学物質は、 α 受容体よりも β 受容体に強く作用を示す傾向があることが分かった。更に酵母 Two-Hybrid 法（hER α 及び hER β ）を用いてイソフラボン類及びアルキルフェノール誘導体の 17 β -エストラジオールのエストロゲン作用への影響を調べた結果、 β 受容体に対してイコール、2,4-ジヒドロキシベンゾフェノン及び *p*-アルキルフェノールは、エストロゲン様作用を示す濃度範囲において E₂ のエストロゲン作用を減弱することが認められた。総合して、我々が日常的に曝露されうるイソフラボン類等及びアルキルフェノール誘導体は、共にエストロゲン受容体 β に対して強く作用する傾向があると考えられた。

A. 研究目的

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いる (Adlercreutz, H., *et al.*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 54, 1093, 1991)。また、これを支持する報告がある (Kumar, N.B., *et al.*, *Cancer*, 94, 1167, 2002; Morton, M.S., *et al. Prostate*, 32, 122, 1997)。

我々が日常使用している生活関連製品 (樹脂製容器及び包装等) からは、原料、添加剤または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。とりわけ、ビスフェノール A またはノニルフェノールのようなアルキルフェノール誘導体にエストロゲン様作用があることが懸念されている。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。大豆等の食品から意図的に摂取する植物エストロゲンと汚染物として非意図的に摂取されるアルキルフェノール誘導体に認められるエストロゲン様作用について比較検討することは重要である。

エストロゲン受容体には α 受容体 (ER α) 及び β 受容体 (ER β) の2種類があ

り、これらのリガンドに対する結合親和性及び生体における分布は異なっている (Kuiper, GGJM., *et al.*, *Endocrinology*, 138, 863, 1997)。このことは、ホルモンが各器官に対する多様な調節機能を担ううえでの鍵となっている。我々は、内分泌かく乱作用が疑われる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うるアルキルフェノール誘導体による内分泌かく乱作用に対する懸念について考察するうえで有用である。

B. 研究方法

B-1. 受容体結合試験

Ligand Screening System (Estrogen Receptor α/β , TOYOCO CO., LTD.) を用いた。被検化学物質存在下で E₂ 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 E₂ 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 (IC₅₀) を求めて化

学物質のエストロゲン受容体に対する結合親和性の指標とする。

B-2. 酵母 Two-Hybrid 法

rER-GAL4DBD (rat estrogen receptor α -GAL4 DNA binding domain fusion protein) 及び TIF2-GAL4AD (TIF2-GAL4 activation domain fusion protein) を発現させた酵母ならびに hER-GAL4DBD (human estrogen receptor α/β -GAL4 DNA binding domain fusion protein) 及び TIF2-GAL4AD (TIF2-GAL4 activation domain fusion protein) を発現させた酵母をそれぞれ用いた。前培養した酵母を SD 培地で希釈し、酵母懸濁液とした。DMSO に溶解した被検化学物質を添加し、インキュベーションを行った (30 °C、4 時間)。Z-buffer で 2 回洗浄後、OD₅₉₅ を測定した。ザイモリエースで細胞壁を分解し (37 °C、15 分)、*o*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドを加え 30 °C、30 分インキュベーションを行った。OD₄₁₀ 及び OD₅₇₀ を測定し、Miller の式に基づき、 β -ガラクトシダーゼ活性を算出した。この酵素活性を化学物質のエストロゲン様作用の指標とした。E₂ (0.1 μ M) 作用時の酵素活性を 100% として 10%の酵素活性を示す化学物質濃度を EC₁₀ とした。

B-3. 酵母 Two-Hybrid 法による E₂ との相互作用の評価

EC₅₀ 付近の作用を示す E₂ 存在下 (α 受容体, 3.0 x 10⁻³ μ M ; β 受容体, 1.0 x 10⁻³ μ M)

もしくは非存在下で化学物質を B-2 に示した方法に従って酵母に作用させた。E₂ 存在下で認められる β -ガラクトシダーゼ活性 (A) から非存在下で認められる β -ガラクトシダーゼ活性 (B) を差し引き (C=A-B)、E₂ 単独作用時 (α 受容体, 3.0 x 10⁻³ μ M ; β 受容体, 1.0 x 10⁻³ μ M) に認められる β -ガラクトシダーゼ活性 (D) と比較した。スキーム 1 に詳細を記した。

C. 結果及び考察

C-1. 酵母 Two-Hybrid 法 (rER α) 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様作用を評価した。図 1 に代表的な用量反応曲線を示した。作用の強度は、10% 作用濃度 (EC₁₀) で比較した。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様作用が認められた。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 (表 1 a/b)。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。

C-2. 酵母 Two-Hybrid 法 (rER α) 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 μ 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（図 2）。

C-3. hER α または hER β 受容体に対する結合親和性

ゲニステイン及びダイゼインは、IC₅₀ で比較したとき α 受容体よりも β 受容体に

約 4 倍高い結合親和性を有することが認められた（表 2）。グリシテインでは 3 倍であった。アルキルフェノール誘導体については、IC₅₀ の差は最大 2 倍程度であった。総じてイソフラボン類とアルキルフェノール誘導体の受容体に結合親和性を有するものに α 受容体よりも β 受容体に高い結合親和性を示す傾向が認められた。この傾向は、ゲニステイン、ダイゼイン及びグリシテインに顕著である。

C-4. 酵母 Two-Hybrid 法 (hER α/β) によるイソフラボン類及びアルキルフェノール誘導体のエストロゲン様作用の評価

イソフラボン類とアルキルフェノール誘導体のエストロゲン作用を有するものに α 受容体よりも β 受容体に強いエストロゲン様作用を示す傾向が認められた（表 3 及び図 3 A-C）。E₂、ジヒドロテストステロン (DHT) 及びゼラノール については、エストロゲン様作用の α 受容体と β 受容体との差が数倍程度であった。一方、イソフラボン類及びアルキフェノール類については、この受容体間の差は、5 から数十倍であった。酵母 Two-Hybrid 法で観察されるエストロゲン様作用の α 受容体と β 受容体との差は、受容体に対する結合親和性から予測される差よりも大きい。従って、化学物質が受容体に結合した後、受容体に起きる立体構造の変換とそれに伴う転写共役因子のリクルートの効率で差が開いていると予測される。Kuiper ら

は、hER α 及び ER β に対する化学物質の結合親和性と転写活性化能の比較を行っている (Kuiper, GGJM., *et al.*, *Endocrinology*, 139, 4252, 1998)。イソフラボン類が ER α よりも ER β に高い結合親和性を示した点で本研究と一致するが、転写活性化能で比較した際には、そのような差は認めていない点で異なる。これらについてより確実な知見を得るためには、完全な構造を有する受容体を活用した実験系が必要である。また、同時に受容体の構造変換及び転写共役因子のリクルート過程等のリガンド結合過程から転写活性化に至る各過程について個々に検討する必要があると思われる。

イソフラボン類とアルキルフェノール誘導体が有するエストロゲン作用は、 α 受容体よりも β 受容体に強く発揮されると考えたとき、 β 受容体を多く発現する器官に強く作用することが予測される。また、 α 受容体及び β 受容体間での発現量に差がない臓器では、 β 受容体を介した作用がより低濃度で発揮されると予測される。この点についてイソフラボン類とアルキルフェノール類のエストロゲン受容体を介した作用に差は僅少と思われる。

C-5. 酵母 Two-Hybrid 法 (hER α/β)

による E₂ との相互作用の評価
EC₅₀ 付近の作用を示す E₂ 存在下で植物エストロゲンの E₂ の作用への影響を調べた。ゼラノール (1.0 μ M) 作用時には、 α 受容体及び β 受容体の双方対

してエストロゲン作用を示す一方で E₂ の作用に対して相加的に作用せず、減弱していることが認められた。ゼアラレノンについては、 α 受容体及び β 受容体ともに抗エストロゲン作用が認められた (図 4 A)。これは、Kuiper らの報告と一致する (Kuiper, GGJM., *et al.*, *Endocrinology*, 139, 4252, 1998)。

α 受容体を発現している酵母に対し E₂ (3.0 x 10⁻³ μ M) 存在下、イソフラボン類をそれぞれ作用させた (図 4 B)。このとき、観察されるエストロゲン作用の強度は、E₂ を単独で作用させた際の強度にイソフラボン類を単独で作用させた際の強度を加算したものに相当した。このことから、イソフラボン類の α 受容体を介したエストロゲン様作用は、相加的に作用すると考えられた。また、 β 受容体を発現している酵母に対しても同様に E₂ (1.0 x 10⁻³ μ M) 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 μ M) 作用時、観察されるエストロゲン作用の強度は、相加的作用として予測される作用強度よりも弱かった。このことからイコールは、当該濃度で β 受容体に対して抗エストロゲンの側面を示すと推察された。ゲニステインについても同様の傾向が認められた。クメストロールについては、単独で作用させた際の酵素活性が高く、単独での酵素活性に一定濃度で加えた E₂ の酵素活性を足した時点で、酵母 Two-Hybrid 法で観察される酵素活性の上昇が飽和する可能性がある。すな

わち、酵素活性の和が、 E_2 1.0×10^{-7} M 作用時の酵素活性を越えるとき、評価が困難とした。このため、実験できる濃度範囲が限られ、十分に検討はできなかった。その他のイソフラボン類の β 受容体を介したエストロゲン様作用は、およそ相加的に作用すると考えられた。

アルキルフェノール誘導体についても同様の実験を行った（図4C）。これら化学物質のエストロゲン様作用は、 α 受容体で相加的作用を示した。一方、 β 受容体では、*t*-オクチルフェノール及び2,4-ジヒドロキシベンゾフェノンは、エストロゲン作用を示す一方で E_2 の作用に対して相加的に作用せず、減弱していることが分かった。

D. 結論

D-1. イソフラボン類及びアルキルフェノール誘導体のエストロゲン様作用の強度

イソフラボン類（ゲニステイン、イコール及びクメステロール）のエストロゲン様作用の強度は、アルキルフェノール誘導体に認められる強度よりも強い。エストロゲン様作用の強度と日常的摂取量を考慮すると汚染物として微量のアルキルフェノール誘導体を摂取した際のエストロゲン作用系への影響は小さく、食品として多量に摂取するイソフラボン類の作用に隠れる可能性がある。次に個々の作用様式について検討する必要がある。

D-2. イソフラボン類及びアルキルフェノール誘導体のエストロゲン様作用

単独作用時におけるイソフラボン類及びアルキルフェノール誘導体のエストロゲン様作用は、 α 受容体よりも β 受容体に強く認められた。また、 E_2 のエストロゲン作用に対する影響を受容体間で比較したとき、相加的に予測されるエストロゲン作用よりも観察されるエストロゲン作用が減弱される現象が β 受容体で認められた。これらのことから β 受容体は、 α 受容体よりもイソフラボン類及びアルキルフェノール誘導体等の外因性の化学物質に対する影響を受けやすいと考えられる。すなわち、受容体間での作用傾向にイソフラボン類とアルキルフェノール誘導体との間に差は僅少であると思われる。このことから、エストロゲン受容体を介した作用に伴う生体影響に限定すると生体内への取り込む量と個々の化学物質の作用の強度が、これら化学物質の生体影響を考えるうえで最も大きな要素であるといえる。

日本人は、食餌を介して多量のイソフラボン類を摂取している（Nakamura, Y., *et al.*, *J. AOAC Int.*, **83**, 635, 2000; Arai, Y., *et al.*, *J. Nutr.*, **130**, 2243, 2000）。その量は、Nakamura らの報告で 27.8 mg/day、Arai らの報告では、47.2 mg/day である。エストロゲン受容体を介した作用に限定した場合、アルキルフェノール類よりも強い作用を有するイソ

フラボン類を多量に摂取している現状で極微量の非意図的なアルキルフェノール類の摂取によるエストロゲン受容体を介した生体影響は、わずかであると推察される。

D-3. イソフラボン類の健康増進作用

イソフラボン類の健康増進作用のうちの乳がん予防効果については、イソフラボン類に 4-ヒドロキシタモキシフェンのような抗エストロゲン作用が認められないため、受容体に対する作用のみで結論づけることは困難である。受容体を介した作用では、 β 受容体に対して単独でエストロゲン様作用を有するイコールが E_2 と共存するときに加法的に予測されるエストロゲン作用よりも減弱したことは興味深い。受容体との結合様式を結晶解析した報告ではゲニステインは、乳房で抗エストロゲン作用を示す 4-ヒドロキシタモキシフェン及びラロキシフェンと同様に転写抑制型のコンフォメーションを示すことが示されている (Pike, A. C., *et al.*, *EMBO J.*, 18, 4608, 1999)。

イソフラボン類には、受容体に対する直接作用以外、すなわち、性ホルモン結合グロブリン (SHBG) の増産 (Mousavi, Y. and Adelercreutz, H., *Steroids*, 58, 301, 1993)、チロシンキナーゼ阻害作用 (Fotsis, T., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 2690, 1993) 及び抗酸化作用 (Wei, H., *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 208, 124, 1995) があるため、乳

がんの予防効果に対しては総合的に解釈する必要がある。

イソフラボン類の摂取が、前立腺がんのリスクを低下させると考えられている。また、骨粗鬆症の改善についても有効であると考えられている (Baird, D. D., *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 80, 1685, 1995; Brezezinski, A., *et al.*, *Menopause*, 4, 89, 1997; Fujita, T. and Fukase, M., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 200, 149, 1992)。 β 受容体の発現量が多い前立腺と骨細胞に対する健康増進作用 (前立腺がん及び骨粗鬆症の予防) には、イソフラボン類の β 受容体を介したエストロゲン様作用に起因すると考えることは合理的である。大豆に多く含まれる、ゲニステイン、ダイゼイン及びグリシテインは β 受容体に強いエストロゲン作用を示す。閉経後骨粗鬆症に対して、 β 受容体に強いエストロゲン作用を有するイソフラボン類で不足するエストロゲン作用を補うことは、イソフラボンのエストロゲン様作用の有効活用例として考えられる。作用が強く安全に食品から摂取できるイソフラボン類は、これら β 受容体を介した健康増進作用を期待するうえで有効であると思われる。

現在、乳がん及び前立腺がんの増加が認められ、また、女性の閉経後の寿命も延びた。このため、治療もしくは健康維持のために体内のエストロゲン活性を適切に調節することの重要性が高まっている。天然のエストロゲンでは受容体選択

的に作用することが期待できないため、過剰のエストロゲン作用が標的器官以外に出る可能性がある。これを受けて α または β 受容体に選択的にアゴニストまたはアンタゴニスト作用を発揮する選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) の研究が進んでいる (Azuma, K. and Inoue, S., *Clin. Calcium*, 14, 12, 2004)。今回、イソフラボン類及びアルキルフェノール誘導体のエストロゲン作用は、 α 受容体よりも β 受容体に強く発揮されることを示唆した。すなわち、これら化学物質に SERM に近い機能を求めることが出来る可能性がある。そのうちイソフラボン類は、大豆等の食品から安全に摂取できる。これらのエストロゲン受容体を介した作用の特性を理解することは、イソフラボン類を含む食品による疾病予防効果を正しく理解し、食生活への適用を効率的に普及させることに役立つ。このためには、今後、人間の日常的摂取量を反映した動物実験が必要である。本研究データは、受容体結合試験と酵母 Two-Hybrid 法の化学物質の作用点が明確な方法から得たものである。今後、イソフラボン類を含むエストロゲン受容体を介した作用を有する化学物質の動物実験を行うための基礎データとして活用できる。

E. 学会及び論文報告

学会

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

論文

1 : Takatori, S., Kitagawa, Y., Oda, H., Miwa, G., Nishikawa, J., Nishihara, T., Nakazawa, H., Hori, S., "Estrogenicity of Metabolites of Benzophenone Derivatives Examined by a Yeast Two-Hybrid Assay", *J. Health Sci.* 2003, 49, 91-98.

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Compounds	EC ₁₀ (μM)	1/RA*
E ₂	8.2 × 10 ⁻⁴	1.00
DES	8.0 × 10 ⁻⁴	0.98
Genistein	2.7	3300
Genistin	>300	>370000
Daidzein	>300	>370000
Daidzin	>300	>370000
Resveratrol	>300	>370000
Zearalenone	0.17	210
Bisphenol A	23	28000
Bisphenol F	16	20000
BADGE	>300	>370000
Tetrabromobisphenol A	>300	>370000
Benzophenone	>300	>370000
2,4-Dihydroxybenzophenone	0.65	790
2,3,4-Trihydroxybenzophenone	6.8	8300
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone	>300	>370000
<i>p</i> -Methylphenol	900	1100000
<i>p</i> -Ethylphenol	210	260000
<i>p-t</i> -Butylphenol	35	43000
<i>p-s</i> -Butylphenol	20	24000
<i>p-n</i> -Pentylphenol	2.5	3000
<i>p-n</i> -Hexylphenol	7.5	9100
<i>p-n</i> -Heptylphenol	3.0	3700
<i>p-n</i> -Nonylphenol	>300	>370000
<i>p-br</i> -Nonylphenol	0.24	290
<i>o-t</i> -Butylphenol	>300	>370000
<i>m-t</i> -Butylphenol	>300	>370000

表 1 a : 酵母 Two-Hybrid 法 (rERα) によるエストロゲン様作用の評価。

* : 化学物質の EC₁₀/E₂ の EC₁₀; 化学物質の EC₁₀ の E₂ の EC₁₀ に対する比。

Compounds	EC ₁₀ (μM)	1/RA*
E ₂	8.2 x10 ⁻⁴	1.00
Dimethylphthalate	>300	>370000
Diethylphthalate	>300	>370000
Dipropylphthalate	>300	>370000
Diethylhexylphthalate	>300	>370000
Diisononylphthalate	>300	>370000
Benzylbutylphthalate	>300	>370000
Methylparaben	220	270000
Ethylparaben	130	160000
Propylparaben	15	18000
Styrene	>300	>370000
Styrene Dimers [#]	>300	>370000
Styrene Trimers ^{##}	>300	>370000
Biphenyl	>300	>370000
4-Bromobiphenyl	>300	>370000
2,4',5-Tribromobiphenyl	>300	>370000
2,2',4,4',5,5'-Hexabromobiphenyl	>300	>370000
Decabromobiphenyl	>300	>370000
Diphenylether	>300	>370000
4-Bromodiphenylether	>300	>370000
Decabromodiphenylether	>300	>370000
ICI182780	>300	>370000
4-Hydroxytamoxifen	>300	>370000

表 1b : 酵母 Two-Hybrid 法 (rERα) によるエストロゲン様作用の評価.

* : 化学物質の EC₁₀/E₂ の EC₁₀; 化学物質の EC₁₀ の E₂ の EC₁₀ に対する比.

#: 1,2-Diphenylcyclobutanes, 2,4-Diphenyl-1-butene, 1,3-Diphenylpropane

##: 2,4,6-Triphenyl-1-hexene, 1,3,5-Triphenylcyclohexane, 1-Phenyl-4-(phenylethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalenes.