

Compounds	IC <sub>50</sub> (μM)		IC <sub>50</sub> (α) / IC <sub>50</sub> (β) *
	α	β	
DES	0.016	0.023	0.70
5-α-Dihydrotestosterone	1.0	1.8	0.56
Coumestrol	0.29	0.19	1.5
Equol	0.088	0.070	1.3
Genistein	0.10	0.027	3.7
Daidzein	0.28	0.074	3.8
Glycitein	60	21	2.9
Formononetin	3.8	5.2	0.73
Biochanin A	1.0	1.2	0.83
Ipriflavone	> 100	>100	—
Isoflavone Glycosides**	> 100	>100	—
2,4-Dihydroxybenzophenone	5.0	2.6	1.9
<i>t</i> -Octylphenol	5.8	2.4	2.4
<i>t</i> -Butylphenol	50	25	2.0
Butylparaben	27	50	0.54
Methylparaben	>100	>100	—
Bisphenol A	1.4	0.97	1.4
Resveratrol***	7.6	7.9	0.96
Zeranol	0.017	0.020	0.85
Zearalenone	0.030	0.026	1.2
Raloxifene	0.019	0.026	0.73
4-Hydroxytamoxifen	0.13	0.18	0.72

表 2 : 受容体 (hERα/β) 結合試験の結果 (IC<sub>50</sub>μM).

\* : IC<sub>50</sub> (α) / IC<sub>50</sub> (β); 受容体αIC<sub>50</sub>の受容体βIC<sub>50</sub>に対する比, \*\* : Isoflavone Glycosides: Genistin, Daidzin, Glycitin, Ononin (Formononetin 7-Glycoside), Biochanin A 7-Glycoside.

\*\*\* : 遮光下で調製し、実験したため、trans 体が主成分と推察される。

Compounds	$\alpha$		$\beta$	
	EC <sub>10</sub> ( $\mu$ M)	1/RA*	EC <sub>10</sub> ( $\mu$ M)	1/RA*
E <sub>2</sub>	5.4 x 10 <sup>-4</sup>	1.0	2.2 x 10 <sup>-4</sup>	1.0
Estrone	1.9 x 10 <sup>-3</sup>	3.5	2.5 x 10 <sup>-4</sup>	1.1
DES	5.0 x 10 <sup>-4</sup>	0.93	1.0 x 10 <sup>-4</sup>	0.45
5- $\alpha$ -Dihydrotestosterone	6.6	12000	3.2	15000
Coumestrol	0.12	220	0.012	55
Equol	1.9	3500	0.12	550
Genistein	2.1	3900	0.06	270
Daidzein	>100	>190000	2.8	13000
Glycitein	>100	>190000	>100	>450000
Formononetin	>100	>190000	>100	>450000
Biochanin A	>100	>190000	5.6	25000
Ipriflavone	>100	>190000	>100	>450000
Isoflavone Glycosides**	>100	>190000	>100	>450000
2,4-Dihydroxybenzophenone	19	35000	0.37	1700
<i>t</i> -Octylphenol	7.0	13000	1.1	5000
<i>t</i> -Butylphenol	>100	>190000	5.0	23000
Butylparaben	30	56000	1.1	5000
Methylparaben	>100	>190000	>100	>450000
Bisphenol A	120	220000	18	82000
Resveratrol	>100	>190000	>100	>450000
Zeranol	0.11	200	0.03	140
Zearalenone	50	93000	>100	>450000
Raloxifene	>100	>190000	9.2	42000
4-Hydroxytamoxifen	>100	>190000	>100	>450000

表3 : 酵母 Two-Hybrid 法 (hER $\alpha/\beta$ ) によるエストロゲン様作用の評価. \* : 化学物質の EC<sub>10</sub> / E<sub>2</sub> の EC<sub>10</sub>; 化学物質の EC<sub>10</sub> の E<sub>2</sub> の EC<sub>10</sub> に対する比. \*\* : Isoflavone Glycosides: Genistin, Daidzin, Glycitin, Ononin (Formononetin 7-Glycoside), Biochanin A 7-Glycoside. \*\*\* : 遮光下で調製し、実験したため、*trans* 体が主成分と推察される。

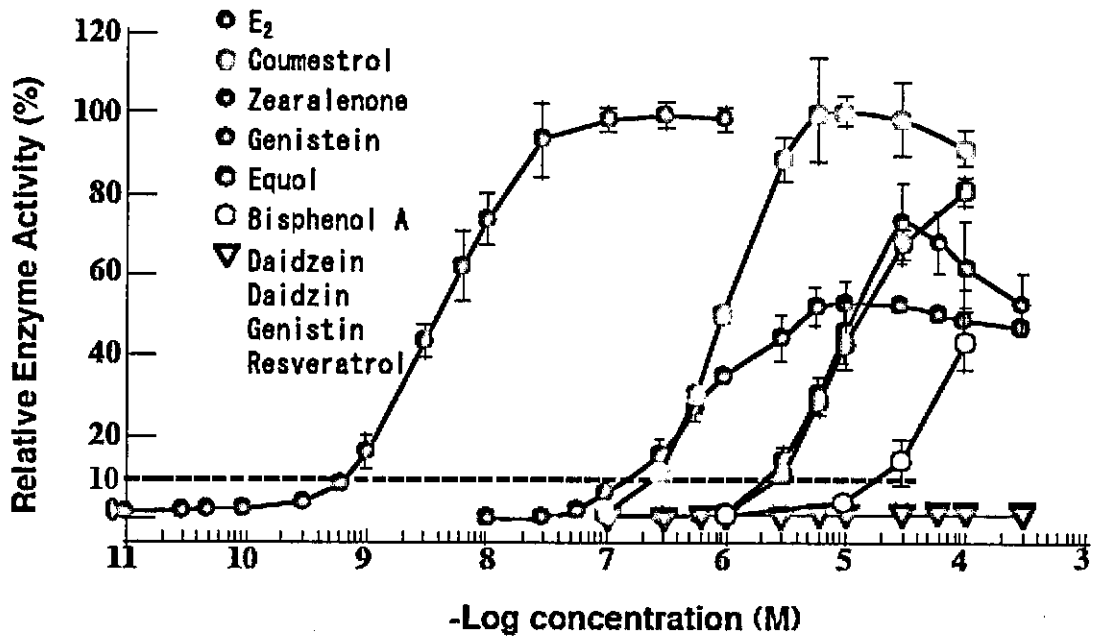


図1：酵母 Two-Hybrid 法 (rER $\alpha$ ) によるエストロゲン様作用の評価；用量反応曲線。  
縦軸は、E<sub>2</sub> 1.0 x 10<sup>-7</sup> M 作用時における酵素活性を 100%としたときの相対活性。

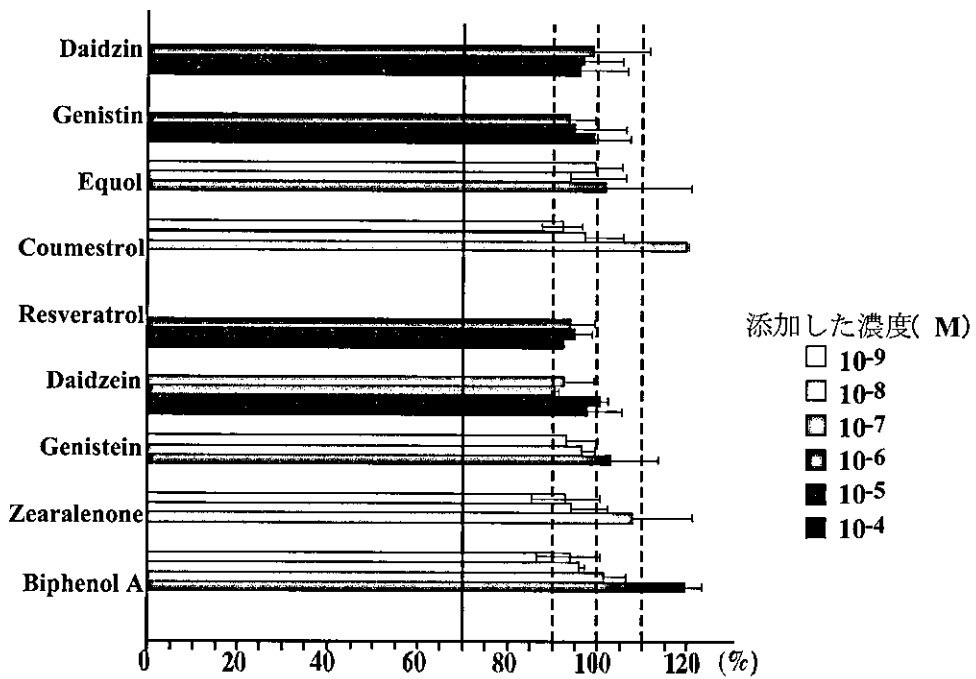


図2. 酵母 Two-Hybrid 法による食品関連化学物質の抗エストロゲン作用の評価  
(1x10<sup>-9</sup> M E<sub>2</sub> 単独作用時の $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生量を 100%とした)

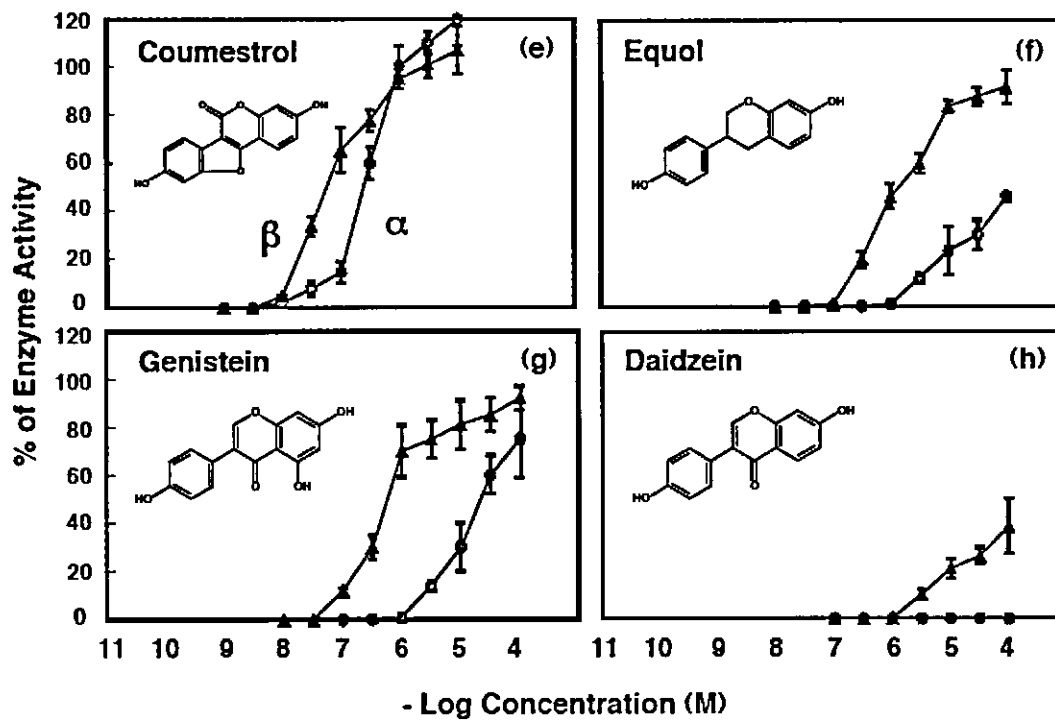
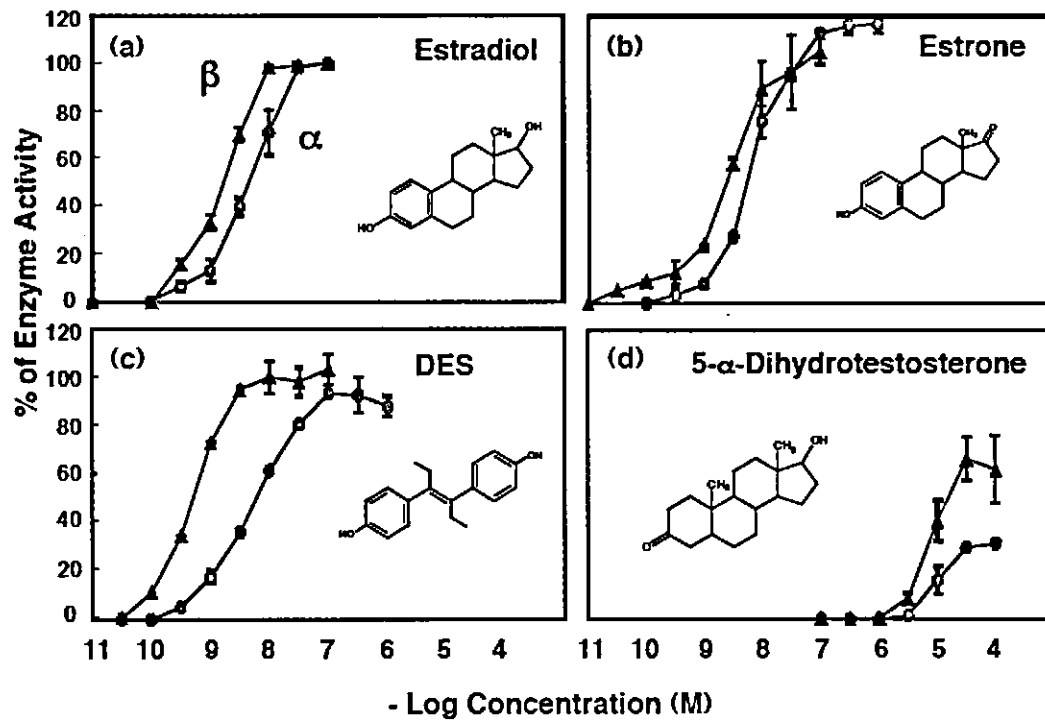


図3A: 酵母 Two-Hybrid 法によるエストロゲン様作用の評価; 用量反応曲線 (a) — (h). 縦軸は、 $E_2$   $1.0 \times 10^{-7}$  M 作用時における酵素活性を 100%としたときの相対活性.

●, α; ▲, β.

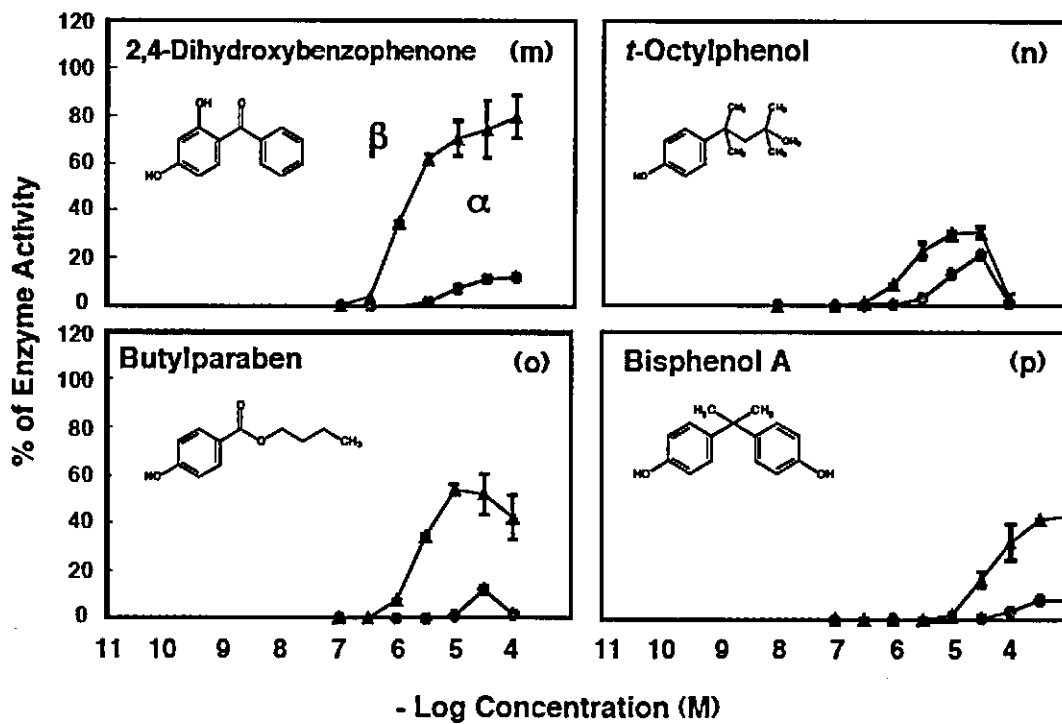
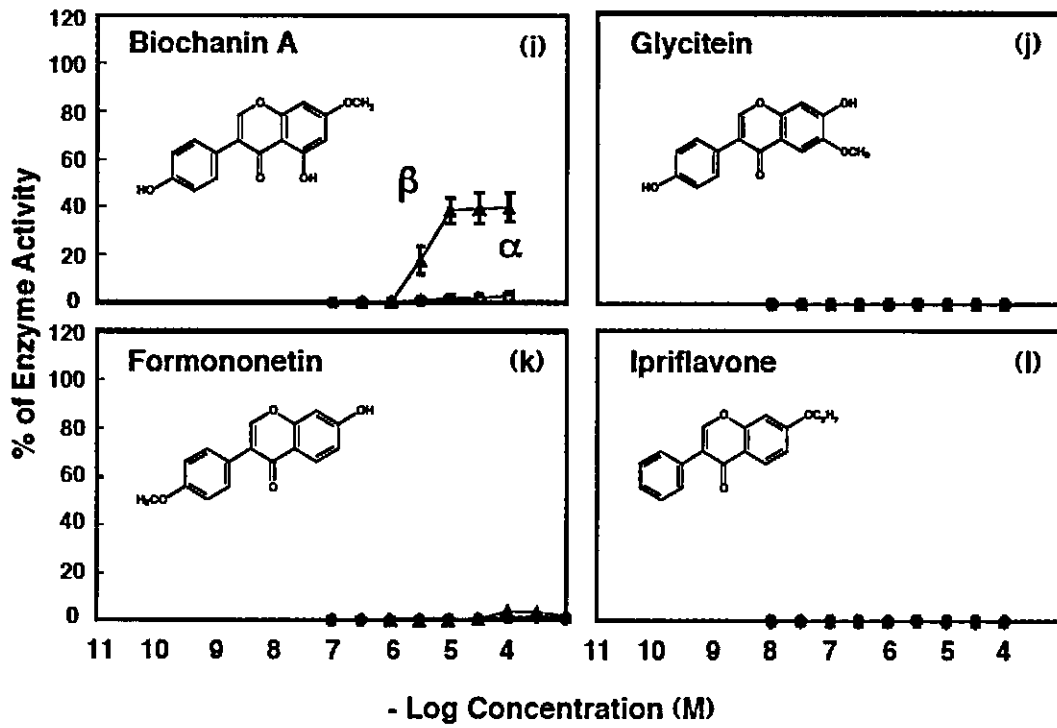


図3B: 酵母 Two-Hybrid 法によるエストロゲン様作用の評価; 用量反応曲線 (i)―(p).

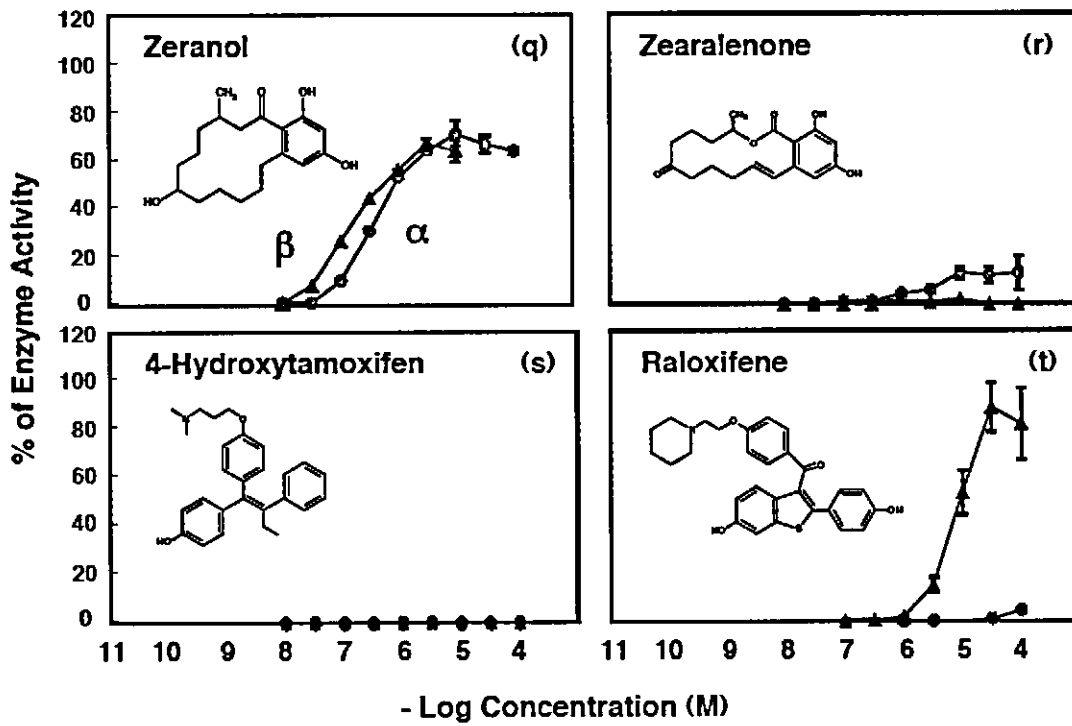
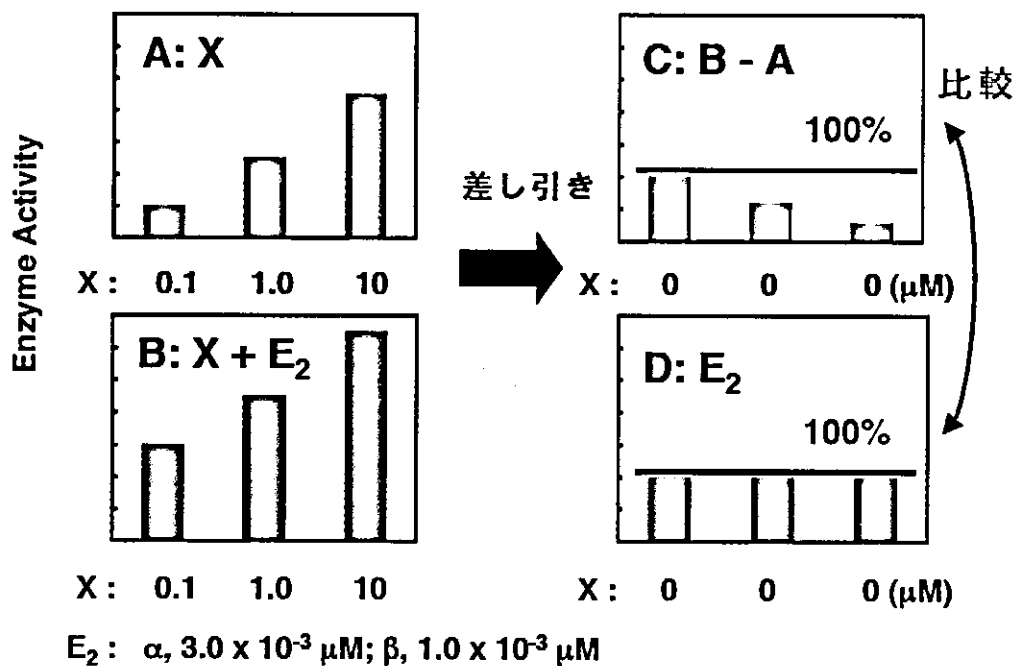


図3C: 酵母 Two-Hybrid 法によるエストロゲン様作用の評価; 用量反応曲線 (a)―(t).



スキーム1：化学物質の E<sub>2</sub> のエストロゲン作用への影響（酵母 Two-Hybrid 法）。

単独でエストロゲン様作用を示しうる化学物質(A)。一定濃度の E<sub>2</sub> (α, 3.0 × 10<sup>-3</sup> μM; β, 3.0 × 10<sup>-3</sup> μM) を共存させたとき、観察される酵素活性は、E<sub>2</sub> のエストロゲン作用に由来する酵素活性分が上昇して観察される (B)。(B)から(A)を差し引くと実際の E<sub>2</sub> のエストロゲン作用に由来する酵素活性が算出される(C)。E<sub>2</sub> 単独で作用させたときの酵素活性(D)を100%として(C)と比較する。

(1)：(C) ≒ (D) のとき、実験濃度において化学物質は、当該濃度の E<sub>2</sub> のエストロゲン作用に影響を示さない、すなわち、化学物質がエストロゲン作用を示す場合は、相加的作用を示すと推察される。E<sub>2</sub> を単独で作用させたときの酵素活性(D)に付随して観察される標準偏差(SD)を求め、100 ± 2SD%を(C) ≒ (D)の範囲とした。

(2)：(C) < (D) のとき、実験濃度において化学物質は、当該濃度の E<sub>2</sub> のエストロゲン作用を減弱すると考えられる。化学物質がエストロゲン作用を示す場合は、パーシャルアゴニスト作用を示すと推察される。化学物質がエストロゲン作用を示さない場合は、純粋な阻害作用を示すと推察される。

(3)：(C) > (D) のとき、実験濃度において化学物質は、当該濃度の E<sub>2</sub> のエストロゲン作用を増強すると考えられる。化学物質がエストロゲン作用を示す場合は、相乗作用を示すと推察される。

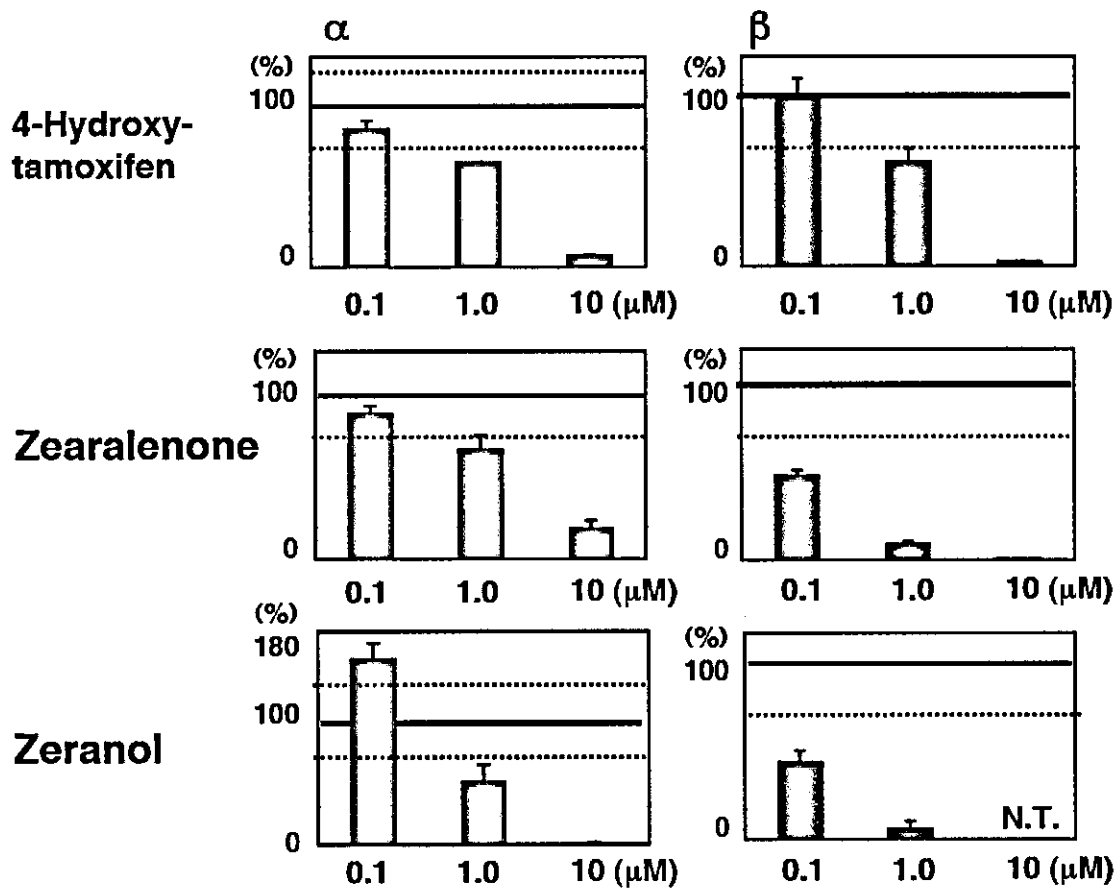


図4A：化学物質の  $E_2$  のエストロゲン作用への影響。

単独でエストロゲン様作用を示しうる化学物質と一定濃度の  $E_2$  ( $\alpha$ ,  $3.0 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ ;  $\beta$ ,  $3.0 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ ) を共存させたとき、観察される酵素活性から化学物質単独で作用させた酵素活性を差し引いた。 $E_2$  単独作用時のエストロゲン作用に由来する酵素活性を100%として実線で示した。 $E_2$  を単独で作用させたときの酵素活性に付随して観察される標準偏差 (SD) を求め、 $100 \pm 2SD\%$  を破線で示した。

N. T. : Not tested, 化学物質単独で作用させた際の酵素活性及び単独で一定濃度で加えた  $E_2$  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、酵素活性の上昇がプラトーになる  $E_2$  ( $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ ) 作用時の酵素活性を越える。この時点で正しく相加的作用を観察することが困難と考えられることから実験結果を示さなかった。



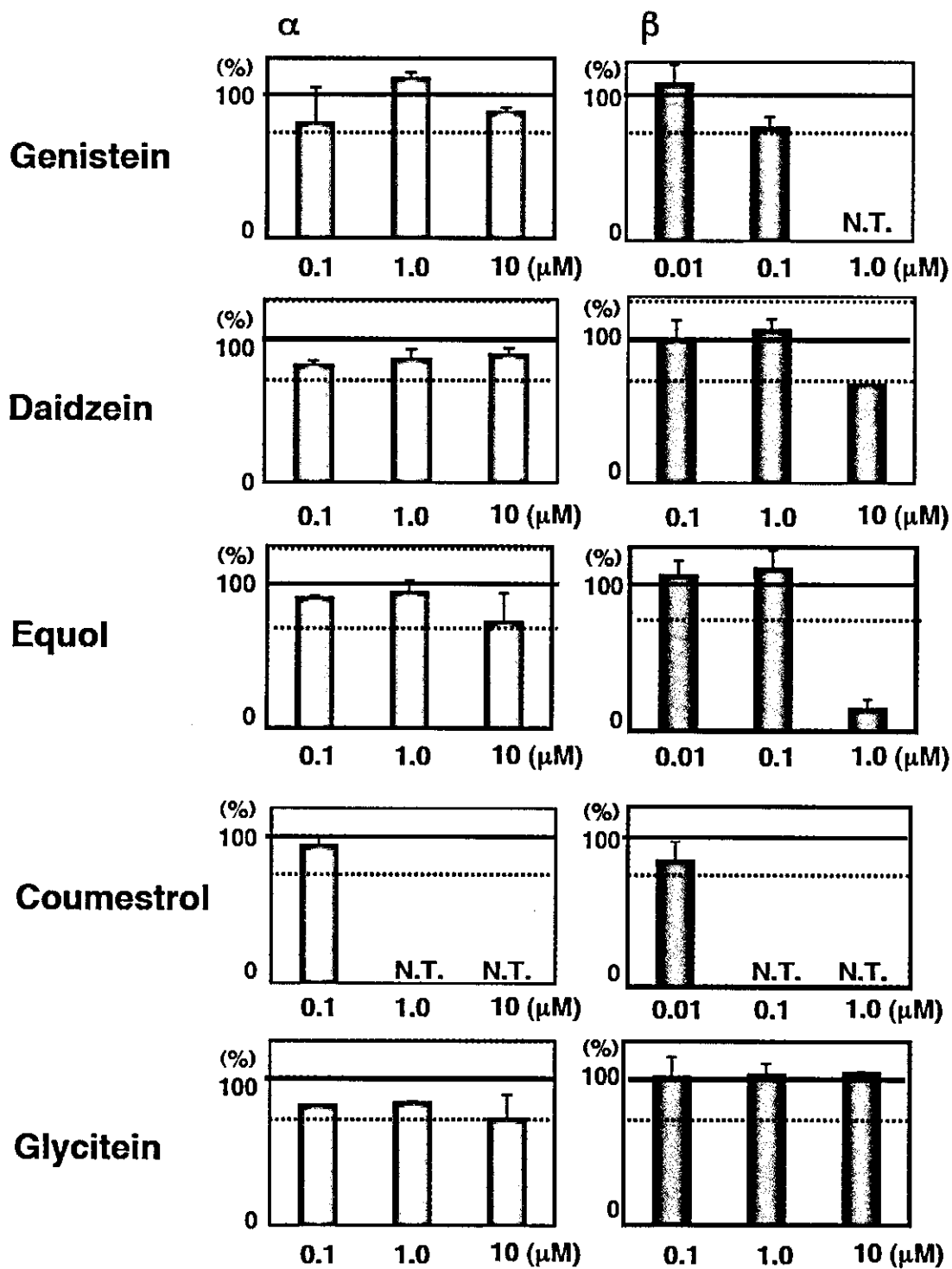


図4B: 化学物質の  $E_2$  のエストロゲン作用への影響.

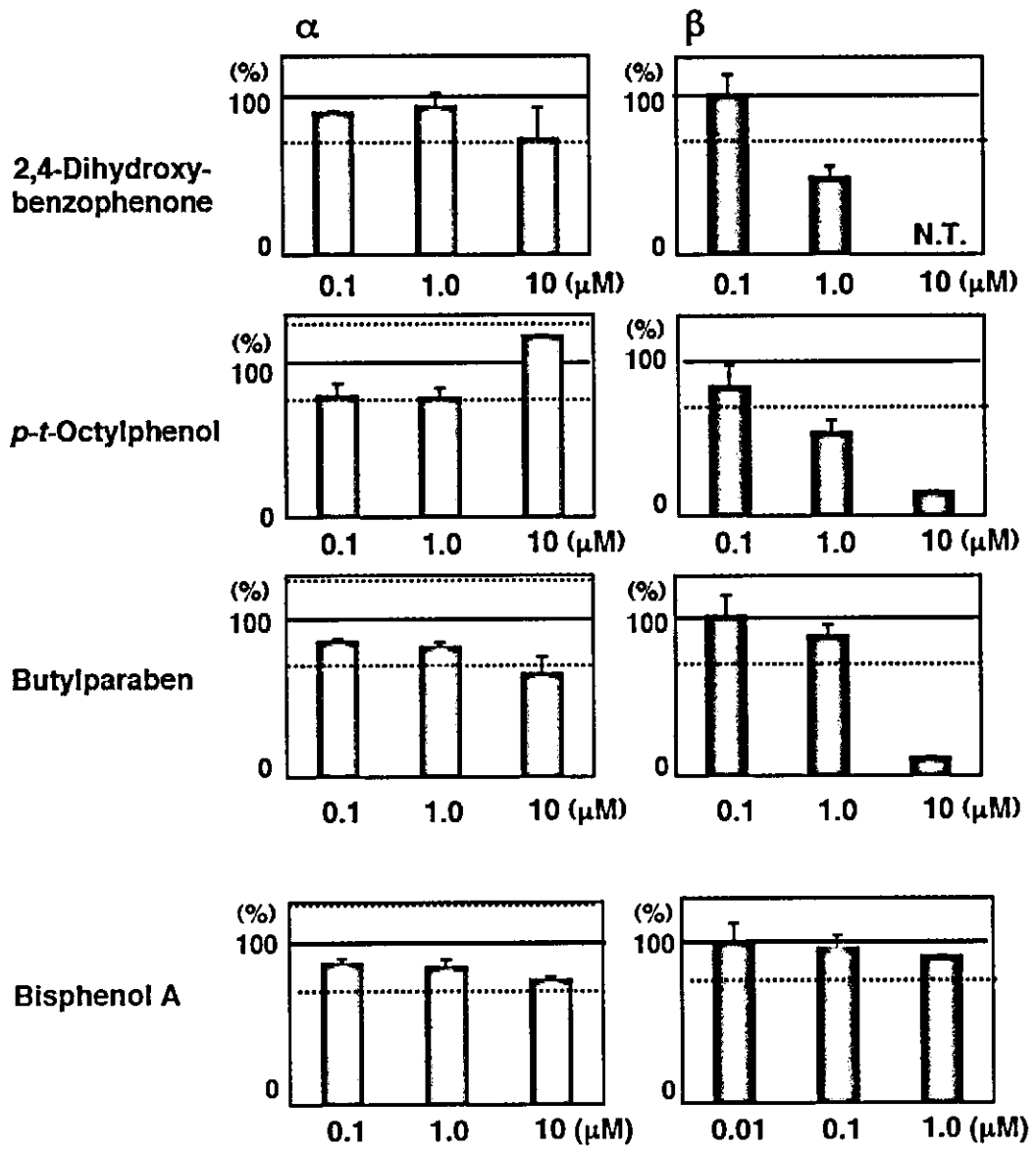


図4C：化学物質の  $E_2$  のエストロゲン作用への影響。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
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

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  
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	垺 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
	裴 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

研究要旨

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 µg/kg と 10 µg/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 µg/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、膺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。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。

## A. 研究目的

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<sup>1,2)</sup>。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、膣淡明細胞癌の発生が知られている<sup>3)</sup>。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。これら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。

## B. 研究方法

### B.1 被験動物

妊娠14日齢あるいは哺乳親つき生後14日齢の雌のCD-1 (ICR) マウスならびにSprague-Dawley ラットをそれぞれ日本チャールス・リバーより購入し、関西医大実験動物共同利用施設にて室温22±2℃、湿度60±10%、12時間照明の環境下で飼育した。動物はポリイソペンテン (TPX、日本

チャールス・リバー、厚木) ケージで飼育し、床敷として滅菌ストローブマツ細片 (ホワイト・フレーク、日本チャールス・リバー) を使用した。また、動物飼料中の植物エストロゲン含量を配慮して、飼料としては内分泌かく乱作用を効果的に抑えるNIH-07PLD (phytoestrogen low diet) (オリエンタル酵母、千葉) を給餌した<sup>4)</sup>。また、給水瓶はポリカーボネート製で、ゴム製のストッパーを使用した。以上により実験動物をとりまく周囲の環境から内分泌かく乱作用をもつ化学物質を極力排除した。なお、本研究は関西医科大学動物実験委員会で承認されており、実験にあたっては本学の実験動物指針に則り施行した。

### B.2 被験物質

Genistein (4, 5, 7-trihydroxyisoflavone) はフジッコ (神戸)、Zeranol (6-6,10-dihydroxyundecyl-β-resorcylic acid lactone) は和光純薬 (大阪)、Resveratrol (3, 4', 5-trihydroxy-trans-stilbene)、Zearalenone (6-(10-hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl)β-resorcylic acid-lactone)、Bisphenol A (4, 4'-isopropylidenediphenol) とDiethylstilbestrol (DES ; (E)-3, 4-bis(4-hydroxyphenyl)-3-hexene) はSigma (St. Louis, MO) より購入した。各の純度は≥99%である。各試薬は購入後直ちに暗所0℃に貯蔵し、使用直前にDimethylsulfoxide (DMSO ; ナカライテスク、京都) に溶解し、暗所4℃に保存した。

### B.3 出生前 Genistein、Resveratrol、

Zearalenone、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

B.3.1 化学物質の投与方法ならびに投与量  
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) に溶解して連日 (計 4 回) 皮下投与した。動物は 3 群 (無処置対照群; 少量投与群; 大量投与群) に分け、出生雌乳仔 (各群 24 匹) を実験に供した。投与量として、Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A は 0.5 mg/kg と 10 mg/kg とした。Genistein のアジア人の 1 日消費量はほぼ 1.5 mg/kg/day であり<sup>5)</sup>、赤ワインの摂取量から換算すると Resveratrol のヒト 1 日の平均摂取量は ~0.02 mg/kg である<sup>6)</sup>。Zearalenone のアメリカ人の 1 日暴露量は 0.02-0.1 mg/kg/day と報告されており<sup>7)</sup>、Bisphenol A のヒトの 1 日暴露量は 0.025-0.25 mg/kg とされている<sup>8)</sup>。また、DES の投与量は他の被験物質の 1/1000 量 (0.5 µg/kg と 10 µg/kg) としたが、これは DES のエストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ ) に対する結合能が Genistein に比して 1000 倍強力なことによる<sup>9)</sup>。よって、いずれの少量投与量もヒトが 1 日に摂取する用量とは大きく逸脱していない。

#### B.3.2 エストロゲン標的臓器の機能・形態的变化の検索方法

膣開口 (思春期発来) の有無は 21 日齢で離乳した後毎日観察した。各群 4、8、12、16 週齢時に任意に 6 匹ずつ屠殺し、体重を比較し、子宮、卵巣、膣、腹部乳腺は HE 標本にて形態的にも評価した。胸部乳腺からホール・マウント標本を作製した。乳腺のホール・マウント標本は以下の 4 段階に分類し、乳腺分化の程度を数値化した。スコア 1: 分化度の低い乳腺で、乳管分岐の末梢部に  $\geq 100 \mu\text{m}$  径を有する終末乳腺芽 (terminal end bud; TEB) が存在し、腺胞 (alveolus) 発育をみないもの。スコア 2: 少数の腺胞の発育と疎らに分岐する乳管よりなるもの。スコア 3: スコア 2 に比して腺胞の発育や乳管の分岐の増したもの。スコア 4: 著明な小葉・腺胞系の発育をみるもの、とした。

#### B.4 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

B.4.1 化学物質の投与方法ならびに投与量  
雌 CD-1 マウスに対し、15-18 日齢にかけて被験物質 (Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol、Bisphenol A、DES) を DMSO に溶解して連日 (計 4 回) 皮下投与した。動物は無処置対照群と各被験物質投与群に分け、投与量は Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol、Bisphenol A は 10 mg/kg とした。よって、投与量はヒトが 1 日に摂取する用量のほぼ 5-500 倍である。なお、DES の投与量は 10 µg/kg とした。

#### B.4.2 エストロゲン標的臓器の機能・形態的变化の検索方法

膣開口 (思春期発来) の有無は 16 日齢より毎日観察した。また、5、9、21 週齢から 3 週間連日膣スメアを採取し、発情周期を記録した。さらに、各群毎月体重を測定するとともに、4、8、24 週齢時に任意に 6 匹ずつ屠殺し、子宮、卵巣、膣ならびに一側腰部乳腺はホルマリン固定・パラフィン標本を作製し、HE 染色標本にて形態的にも評価した。他側腰部乳腺からはホール・マウント標本を作製し、群間の発育を比較した。乳腺のホール・マウント標本は B.3.2 と同じく 4 段階に分類し、乳腺分化の程度を数値化した。

#### B.5 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

##### B.5.1 Genistein 実験群

以下の 5 群を設定した。

1 群: 無処置対照群 (26 匹)

2 群: 1.5 mg/kg Genistein を妊娠 15-19 日の母体に連日皮下投与し、出生雌乳仔を実験に供する (30 匹)

3 群：30 mg/kg Genistein を妊娠 15-19 日の母体に連日皮下投与し、出生雌乳仔を実験に供する（30 匹）

4 群：1.5 mg/kg Genistein を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与（30 匹）

5 群：30 mg/kg Genistein を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与（30 匹）

1-5 群の新生仔雌 Sprague-Dawley ラットに対し、生後 28 日齢にて各群任意の 6 匹を屠殺し、発育を比較し、残りに対して 50 mg/kg MNU を単回腹腔内投与し、乳腺発癌を促した。そして最大乳腺腫瘍の腫瘍径が $\geq 1$ cm に達した時点で屠殺し、実験は MNU 投与後 22 週にて終了した。なお、28 日齢の正常乳腺に対して、ホール・マウント標本と HE 標本を作製するとともに、Dako 社の LSAB キットを用い、エストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 抗体 (6F11、ノボカストラ、ニューキャッスル・アブオン・タイン) とプロゲステロン受容体 (PgR) 抗体 (PR10A9、イムノテック、マルセイユ) の免疫染色を行った。これらの免疫染色にはマイクロウェーブによる抗原賦活を行い、各標本総計 1000 個以上の乳腺上皮細胞を数え、陽性率を比較した。

#### B.5.2 Resveratrol 実験群

以下の 3 群を設定した。

1 群：無処置対照群（30 匹）

2 群：10 mg/kg Resveratrol を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与（30 匹）

3 群：100 mg/kg Resveratrol を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与（30 匹）

全例週 1 回体重を測定し、各群任意の 6 匹は 49 日齢時に屠殺し、胸部乳腺に対して、ホール・マウント標本を作製し、腰部乳腺は HE 標本を作製するとともに、Dako 社の LSAB キットを用い、エストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 抗体 (6F11、ノボカストラ、ニューキャッスル・アブオン・タイン) とプロゲステロン受容体 (PgR) 抗体 (PR10A9、イムノテック、マルセイユ) の免疫染色を行った。これらの免疫染色にはマイクロウ

ェーブによる抗原賦活を行い、各標本総計 1000 個以上の乳腺上皮細胞を数え、陽性率を比較した。さらに、49 日齢にて各群 24 匹に対して 50 mg/kg MNU を単回腹腔内投与し、最大乳腺腫瘍の腫瘍径が $\geq 1$ cm に達した時点で屠殺し、実験は MNU 投与後 32 週にて終了した。

#### B.5.3 Zearalenone 実験群

以下の 3 群を設定した。

1 群：無処置対照群（30 匹）

2 群：0.1 mg/kg Zearalenone を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与（30 匹）

3 群：10 mg/kg Zearalenone を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与（30 匹）

全例週 1 回体重を測定し、各群 6 匹は生後 28 日齢にて屠殺し、腹部乳腺を採取してホール・マウント標本を作製し、乳腺の発育を比較した。残りの動物（各群 24 匹）は 28 日齢にて 50 mg/kg MNU を単回腹腔内投与し、乳腺発癌を促した。そして最大乳腺腫瘍の腫瘍径が $\geq 1$ cm に達した時点で屠殺し、実験は MNU 投与後 33 週にて終了した。

#### B.5.4 Zeranol 実験群

1 群：無処置対照群（30 匹）

2 群：0.1 mg/kg Zeranol を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与（30 匹）

3 群：10 mg/kg Zeranol を 15-19 日齢の雌乳仔に連日皮下投与（30 匹）

全例週 1 回体重を測定し、各群任意の 6 匹は生後 28 日齢にて屠殺し、腰部乳腺を採取してホール・マウント標本を作製し、乳腺の発育を比較した。残りの動物（各群 24 匹）は 28 日齢にて 50 mg/kg MNU を単回腹腔内投与し、乳腺発癌を促した。そして最大乳腺腫瘍の腫瘍径が $\geq 1$ cm に達した時点で屠殺し、実験は MNU 投与後 33 週にて終了した。

#### B.5.5 検索手法

発育は体重増加曲線より比較し、雌性生殖器への影響に対しては、膣開口日齢を同定し、発情周期をモニターし、子宮・卵巣重

量は屠殺ラットにつき適宜計測し、すべての屠殺動物に対して卵巣、子宮、膣の組織学的検索を行った。肉眼的に認めた乳腺腫瘍とともに“正常”乳腺組織はすべて10%ホルマリン固定・パラフィン包埋切片とし、組織学的にみとめうる微小乳腺腫瘍を検出した。なお、乳腺腫瘍は乳癌とその他の腫瘍を区別して解析した。乳腺発癌の指標として、乳癌発生率は $\geq 1\text{cm}$ 乳癌を発症した匹数/全有効匹数とし、乳癌多発率は組織的に確認しえた微小乳癌をも含めた全乳癌個数/全有効匹数とし、潜伏期はMNU投与後ラットが $\geq 1\text{cm}$ 乳癌を生じて屠殺するまでの日数とした。なお、良性乳腺腫瘍や乳腺以外の臓器より発生した腫瘍についても群間の比較を行った。

## B.6 統計処理

体重、膣開口、発情周期、ホルモンレセプター陽性数、乳腺発育、腫瘍発生率、腫瘍多発率や潜伏期は、平均 $\pm$ 標準偏差(誤差)で表現した。累積腫瘍発生率はMantel-Cox Logrank試験で行った。他の試験は正規性、分散を検定後、ANOVAあるいはKruskal-Wallisで検定し、 $<0.05$ の場合FisherのPLSD試験あるいはBonferroni/Dunnの試験を行った。いずれの場合も $p < 0.05$ を有意とした。

## C. 研究結果

### C.1 出生前エストロゲン様化学物質暴露による雌マウスの発育やエストロゲン標的臓器への影響

#### C.1.1 発育への影響

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、16週齢において少量DES群の他はすべて無処置対照群に比して有意に体重は重かった(Fig. 1)。

#### C.1.2 内分泌かく乱への影響

エストロゲン様化学物質は膣開口を促進し(Table 1)、Genistein、Zearalenone、DESならびに大量Bisphenol A投与群では無処

置対照群に比して有意な思春期早発をみた。無処置対照群の発情周期は規則的な $5.2 \pm 0.1$ 日周期を呈し、そのうち発情期(estrus)が18.7%、発情間期(diestrus)が24.2%を占める(Table 2)。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。

#### C.1.3 雌性生殖器の形態変化への影響

卵巣の組織像をみると、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(Table 3)。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。これらのうち、あるものは卵巣の間質細胞の過形成がみられ、子宮内膜腺の扁平上皮化生もみた。子宮内膜腺の変化は他の被験化学物質ではみとめず、膣上皮の異常はいずれの化学物質でも認めなかった。

#### C.1.4 乳腺発育への影響

無処置対照乳腺についてみると、4週齢では乳管の末端にTEBをみたが、腺胞の分化はみなかった(Fig. 2a; スコア1)。8週齢にいたると腺胞が出現し、12週、16週齢では8週齢でみられた以上の分化はみとめず、むしろ動物間での分化に差をみた。ある動物では分化の程度は低く、少数の腺胞と未発達な乳管をみとめ(Fig. 2b; スコア2)、別の動物では腺胞や乳管の発育増加をみとめ(Fig. 2c; スコア3)、あるものは小葉形成をみるものもみた(Fig. 2d; スコア4)。乳腺の分化をスコア化して要約すると(Fig. 3)、無処置対照乳腺は4週齢

時すべてスコア 1 を呈していたが、正常卵巣（黄体をもつ）を有する少量ならびに大量 Zearalenone 投与マウス、ならびに大量 Bisphenol A 投与マウスの一部（2/3）のマウスでは、乳腺発育の促進がみられ、分泌能をもつ腺胞の出現もみとめた。しかし、8 週齢以降の乳腺の発育程度は無処置対照群と同等であった。一方、この時期大量 Zearalenone 投与により黄体をみないマウスでは、腺胞への分化をみとめず、好酸性の物質を入れた拡張した乳管のみからなる低分化な乳腺をみた（Fig. 4）。よって、Zearalenone や Bisphenol A は、4 週齢では正常な卵巣機能をもつマウスでは乳腺の分化を促進する作用を示し、逆に 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。

## C.2 思春期前エストロゲン様化学物質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

### C.2.1 発育への影響

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、24 週齢において無処置対照群に比して差は認めなかった。

### C.2.2 雌性生殖器への機能的な影響

エストロゲン様化学物質のなかで、Genistein、Zearalenone、Zeranol、DES は無処置対照群に比して膣開口を促進し、有意な思春期早発をみた。これら化学物質により 3-7 日の膣開口の早期発来をみた（Table 4）。但し、Resveratrol や Bisphenol A にはこの作用はみなかった。無処置対照群の発情周期は規則性を呈し、そのうち発情期が 16.9-18.5% を占める（Table 5）。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。

### C.2.3 雌性生殖器への器質的な影響

卵巣の組織像をみると、4 週齢時では黄体

の欠如を、無処置動物（2/6）とともに、Genistein（3/6）、Resveratrol（3/6）、Zearalenone（6/6）、Zeranol（6/6）、Bisphenol A（5/6）、DES（6/6）投与動物にみた。しかし、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巣をみた。なお、多卵性卵胞（polyovular follicle）はいずれの群のいずれの週齢でも認めなかった。また、子宮内膜腺の変化や、膣上皮の異常はいずれの化学物質でも認めなかった。

### C.2.4 乳腺発育への影響

無処置対照乳腺についてみると、4 週齢では乳管の末端に TEB をみたが、腺胞の分化はみなかった（スコア 1）。8 週齢にいたると腺胞が出現し、24 週齢では 8 週齢でみられた以上の分化をみた。しかし、動物間での分化に差をみとめ、ある動物では分化の程度は低く、少数の腺胞と未発達な乳管をみとめ（スコア 2）、別の動物では腺胞や乳管の発育増加をみとめ（スコア 3）、あるものは小葉形成をみるものもみた（スコア 4）。乳腺の分化をスコア化して要約すると（Fig. 5）、黄体をみないマウスでは、腺胞への分化をみない低分化な乳腺であったが、被験化学物質は 4、8、24 週齢時ではマウス乳腺の分化には顕著な影響を示さなかった。

## C.3 周生期天然エストロゲン暴露によるラットの発育や内分泌かく乱への影響

### C.3.1 出生前・思春期前 Genistein 暴露による影響

出生前 Genistein 投与は無処置対照ラットに比して低体重で、逆に思春期前 Genistein 投与は体重増加を促進した。体重は 28 日齢においても同様の傾向をみたが、この時点での Genistein 処置ラットの相対子宮・卵巣重量はいずれも無処置対照ラットに比



して軽い傾向にあった。なお、膣開口は思春期前大量 Genistein 投与群のみ有意に早発した (Fig. 6)。発情周期についてみると、無処置対照ラットは全て正常の 4-5 日周期を呈したのに対し、Genistein を投与した各群の >80% は正常周期を呈しており、周期の短縮や延長をみた個体もあったが、周期性のない個体はみなかった。周期の内訳をみると、思春期前 Genistein 投与ラットでは大量投与群、少量投与群いずれも発情期の延長をみた (Table 6)。

C.3.2 思春期前 Resveratrol 投与による影響  
15 日齢 (Resveratrol 連日 5 回投与の初回投与時) から 49 日齢に至る相対体重増加率は群間に差をみなかった。また、平均膣開口日齢は無処置対照群 (36.8 日) に対し少量投与群 (36.7 日)、大量投与群 (35.9 日) で、Resveratrol の用量によりやや早発する傾向をみたが、群間有意差はみなかった。しかし、49 日齢時では相対子宮一卵巣重量は大量 Resveratrol 投与群で有意に重かった。但し、乳腺も含めて組織形態学的に異常はみない。次に発情周期を 8 週齢より 3 週間連日みると、正常の 4-5 日サイクルを呈する個体は Resveratrol 暴露の用量依存的に減少したが、いずれのラットも周期性は有していた。また、周期の時相の違いをみたところ、Resveratrol の用量依存性に発情期が延長していることが判明した。

C.3.3 思春期前 Zearalenone 投与による影響  
生後 2 週齢 (Zearalenone 投与開始時) より 37 週齢 (実験終了時) までの体重は Zearalenone 投与により影響をうけない。28 日齢時における子宮一卵巣重量にも有意差はなく、組織学的にも著変をみない。なお、この時点乳腺の発育にも変化はみなかった。しかし、Zearalenone 大量投与群では無処置対照群に比して有意に膣開口の早発がみられた (Fig. 7)。また、発情周期は全ての対照ラットが正常 4-5 日サイクルであったのに対し Zearalenone 投与群では顕著な異常を呈し、少量、大量投与群ともに、持続発

情や持続発情間期を呈する個体を高率にみとめ、Zearalenone 投与では用量依存性に発情期の延長をみた (Fig. 8)。

C.3.4 思春期前 Zearanol 暴露による影響  
思春期前 Zearanol の大量、少量投与群とも体重増加に差はみなかった。経過中、無処置群、少量および大量 Zearanol 投与群で各の 2、2 および 1 匹の死亡個体をみたが、Zearanol の毒性による死亡ではなかった。膣開口は 27-42 日齢にみたが、Zearanol の少量 ( $31.2 \pm 0.6$  日齢)、大量投与群 ( $32.2 \pm 0.7$  日齢) はともに無処置対照群 ( $36.4 \pm 0.6$  日齢) に比して膣開口を有意に早発した (Fig. 9)。発情周期は 8 週齢より 4 週間観察したが、無処置群が平均 4.6 日の 1 周期長を有していたのに対し、少量・大量 Zearanol 投与群では発情期の延長に起因する 1 周期長の延長をみた (Table 7)。ちなみに無処置対照群、少量、大量 Zearanol 投与群で発情期の延長は各の 0% (0/22)、59% (13/22)、78% (18/23) にみられ、発情間期の延長は 5% (1/22)、9% (2/22)、9% (2/22)、9% (2/23) に観察された。なお、相対子宮一卵巣重量は、28 日齢 (発癌剤投与時) では群間に差をみなかったが、37 週齢時 (実験終了時) では Zearanol 大量投与群で有意な増加をみた。また、Zearanol の用量依存性に無排卵性卵巣を示唆する黄体欠如卵巣を有する個体をみたが、子宮や膣に形態異常はみとめなかった。

C.4 周生期天然エストロゲン暴露による MNU 誘発乳腺発癌への影響

C.4.1 出生前・思春期前 Genistein 投与による影響

28 日齢時の乳腺をホール・マウント標本で比較したところ、乳腺の発育は群間に差をみず、Genistein 処置の如何に関わらず乳腺の辺縁部には等しく TEB 構造をみた。ラット乳腺発癌は TEB より始まると考えられている。それ故、TEB の細胞形質ならびに細胞動態解析は重要である。無処置対

照ラットの TEB に比し、Genistein 投与ラットの TEB では ER $\alpha$  ならびに PgR 陽性細胞数の有意な低下をみた。28 日齢における 50 mg/kg MNU の単回腹腔内投与による Genistein 乳腺発癌に対する影響を検討した。実験は MNU 投与後 22 週 (26 週齢時) に終了したが、経過中 Genistein の出生前大量投与群ならびに思春期前大量投与群の各 1 匹が体重減少をきたして死亡したので、この 2 匹は実験から除外した。また、乳腺腫瘍として組織学的に、微小な腺腫をみたが (1 群 : 1 個、3 群 : 1 個、5 群 : 2 個)、腺癌と診断したもののみデータ解析を行った。その結果、乳癌発生率 ( $\geq 1$ cm 乳癌保有匹数 / 有効匹数) は無処置群に比して Genistein 処置群はいずれも低い傾向にあった (Fig. 10)。このうち思春期前少量 Genistein 投与群 (4 群) では有意な減少をみたが、他の Genistein 処置群では統計的に有意な減少には至らなかった (Table 8)。乳癌多発率 (1 匹当たりの乳癌個数) は、特に思春期前 Genistein 投与群で低い傾向にあったが、無処置対照ラットに比して有意には至らなかった。なお、腫瘍潜伏期 (MNU 投与から最大乳腺腫瘍径が  $\geq 1$ cm になるまでの期間) は Genistein 投与ラットで僅かに延長をみたが統計的に有意差はみなかった。

C.4.2 思春期前 Resveratrol 暴露による影響  
MNU 投与後の体重推移は、群間に差をみなかった。Resveratrol 投与の如何に関わらず、49 日齢の乳腺の発育は形態的には差はみなかった。乳腺形態には群間差はみなかったが、ER・PgR 陽性細胞の比率は、有意差はないものの Resveratrol の投与量依存的に増加する傾向をみた。組織学的に均等な発育を呈する乳腺に対する MNU の影響をみたところ、 $\geq 1$ cm の乳腺腫瘍を有する頻度は大量 Resveratrol 群は無処置群に比して高率であったが、( $p < 0.05$ )、少量 Resveratrol 群は無処置群と差はみなかった (Fig. 11)。組織学的に乳癌と確認しえた

腫瘍に対して  $\geq 1$ cm 乳癌発生率とともに、微小乳癌も含めた全乳癌の乳癌個数、乳癌多発率につき比較した (Table 9)。その結果、無処置対照群に比して Resveratrol 大量投与群では  $\geq 1$ cm 乳癌発生率、組織的に認められた微小乳癌も含めた全乳癌個数や、乳癌多発率は有意に高率であった。但し、 $\geq 1$ cm 乳癌採取までの期間は差をみなかった。なお、Resveratrol 少量投与群はこれらの指標からは乳癌発生には影響をみなかった。乳癌以外の腫瘍として Resveratrol 無処置群に 1 例の白血病、少量 Resveratrol 投与群に 1 例の乳腺線維腺腫、1 例の白血病と 2 例の耳道腺腫瘍、大量投与群に 1 例の乳腺線維腺腫をみたが、これらの腫瘍発生と Resveratrol 処置には相関はみなかった。

C.4.3 思春期前 Zearalenone 暴露による影響  
MNU 投与時における乳腺の発育 (乳管伸長距離 : 乳腺内単径部リンパ節から乳腺の発育端までの距離) には有意差はみなかった。Zearalenone 無処置群では  $\geq 1$ cm 乳腺腫瘍は MNU 投与後 13 週でみとめ、大量、少量 Zearalenone 処置群ではともに MNU 投与後 15 週でみとめた (Fig. 12)。それ以降、Zearalenone 無処置群に比して大量・少量 Zearalenone 処置はともに累積乳癌発生率を抑制した ( $p < 0.05$ )。組織学的に確認しえた微小腫瘍も含めたすべての乳腺腫瘍につき解析したところ、乳腺腫瘍は乳癌か線維腺腫のいずれかであったので、全乳腺腫瘍と乳癌に限った群間の比較を行った (Table 10)。その結果、線維腺腫も含めた全乳腺腫瘍あるいは乳癌に限局しても Zearalenone は用量依存的に腫瘍発生を抑制し、Zearalenone 大量投与で有意な抑制をみたが、少量投与では有意には至らなかった。なお、腫瘍採取までの期間に差はみなかった。Zearalenone の大量、少量投与により、8 週から 10 週齢における発情周期は、持続発情か持続発情間期を呈し、顕著な内分泌かく乱をみとめ、実験終了時 (37 週齢時) の卵巣は Zearalenone の用量依存的に

無排卵性卵巣(黄体の欠如)がみられ(Table 11)、不妊が示唆された。但し、実験終了時における乳腺の発育は、マウスでみたように無排卵性卵巣をもつ動物が必ずしも乳管のみからなる低発育状態ではなかった。

C.4.4 思春期前 Zeranone 暴露による影響

28日齢(発癌剤投与時)の乳腺の発育は、ホール・マウント標本で定性的に評価すると、群間に差はみなかった。従って、均等な発育を呈する乳腺を有するラットに MNU を投与し、 $\geq 1\text{cm}$  径の乳腺腫瘍(組織的にはすべて乳癌であった)を有するラットを適宜屠殺したが、無処置群に比して、Log-rank 試験では有意ではないが、Zeranone 群とりわけ Zeranone 少量群で $\geq 1\text{cm}$  乳癌出現の遅延傾向をみた(Fig. 13)。なお、 $\geq 1\text{cm}$  乳癌の発生率、組織学的に確認した微小乳癌も含めた乳癌多発率や、MNU 投与から $\geq 1\text{cm}$  乳癌採取までの期間(潜伏期)といった指標で比較しても、群間に有意差はみなかった(Table 12)。よって、Zeranone は乳腺発癌には影響がないと結論できる。但し、Zeranone の用量依存的に良性腫瘍(fibroadenoma)の頻度の増加をみたが、この理由は不明である。

#### D. 考察

妊娠 CD-1 マウスに Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A を  $0.5\text{ mg/kg}$  あるいは  $10\text{ mg/kg}$  量を投与し、 $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$  あるいは  $10\text{ }\mu\text{g/kg}$  DES 投与群(陽性対照)ならびに無処置群(陰性対照)と雌出生仔につき発育、内分泌かく乱、あるいはエストロゲン標的臓器の形態変化を比較した<sup>10)</sup>。その結果、無処置群に比して Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A や DES では 16 週齢において発育(体重増加)の促進がみられ、Resveratrol の他は DES と同じく、はやい膣開口(思春期早発)をみた。大量・少量 Bisphenol A や DES 投与群とともに、大量の Genistein や Resveratrol 投与群においても、4 週齢時に無排卵性卵

巣を有する動物をみたが、いずれもこの変化は一過性で、8 週齢以降では正常の卵巣形態を呈していた。一方、大量 Zearalenone 投与群では無排卵性卵巣は 8、12、16 週齢でも頻度は漸減するものの存在した。思春期前の雌 CD-1 マウスに Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranone、Bisphenol A を  $10\text{ mg/kg}$ 、DES を  $10\text{ }\mu\text{g/kg}$  投与し、無処置対照群と発育、エストロゲン標的臓器の機能あるいは形態的变化を比較した<sup>11)</sup>。その結果、無処置群に比して発育(体重増加)には影響がみられなかったが、膣開口の早期発来(思春期早発)は、Genistein、Zearalenone、Zeranone や DES でみられ、Resveratrol や Bisphenol A にはこの作用はなかった。無排卵性卵巣(黄体欠如)は、4 週齢では各群の一部のマウスにみとめたが、8 週齢では正常の卵巣形態を呈していたのに対し、Zearalenone 投与動物のみは 8 週齢でも無排卵性卵巣をみる動物をみた。Zeranone のエストロゲン活性は Zearalenone よりも高いが<sup>12)</sup>、Zearalenone の卵巣に対する作用は Zeranone や他の被験化学物質より持続する。なお、発情周期をみると、Zearalenone では出生前・思春期前投与とも、発情期の占める期間の延長をみた。以上、マウスにエストロゲン様化学物質を出生前あるいは思春期前に投与した場合、膣開口日齢よりみると、Resveratrol や Bisphenol A のエストロゲン作用は弱く、黄体欠如の持続や発情周期よりみると、Zearalenone のエストロゲン作用は他の被験物質に比して強いと結論できる。ヒトにおいて黄体欠如(無排卵性卵巣)は女性不妊の最たる原因と考えられている<sup>13)</sup>。1-5 日齢の CD-1 マウスに連日  $1\text{ }\mu\text{g/kg}$  DES あるいは  $10\text{ mg/kg}$  Genistein を投与すると 18 ヶ月齢に至り相当数の個体に子宮内膜腺癌が惹起される<sup>14)</sup>。我々は出生前投与動物については 16 週齢<sup>10)</sup>、思春期前投与動物では 24 週齢<sup>11)</sup>までの短期観察しか行っておらず、この間における癌性変化はみとめていないが、子宮発癌を

も視野に入れた長期観察も必要であろう。

思春期前の Sprague-Dawley ラットに Genistein<sup>15)</sup>、Resveratrol<sup>16)</sup>、Zearalenone<sup>17)</sup>、Zeranol<sup>18)</sup>を投与し、無処置対照群と発育、エストロゲン標的臓器の機能あるいは形態的变化を比較したところ、Genistein (1.5 mg/kg、30 mg/kg 投与とも) のみ発癌剤投与時 (28 日齢) に有意に体重増加の促進をみたが、他の被験物質は体重には影響をみなかった。膣開口は 30 mg/kg Genistein、10 mg/kg Zearalenone、0.1 mg/kg あるいは 10 mg/kg Zeranol 暴露群で有意に早発し、発情周期をみると、Zearalenone、Zeranol の大量・少量暴露群では、主として発情期の延長に起因する顕著な異常をみとめ、いずれも実験終了時 (37 週齢時) では被験物質の暴露用量依存性に不妊を示唆する黄体を欠如した無排卵性卵巣を有するラットをみたが、子宮や膣に形態異常はみとめなかった。マウスの思春期前暴露では 24 週齢において 10 mg/kg Zearalenone 暴露で正常卵巣をみるのに対して、ラットでは 37 週齢時においても 0.1 mg/kg の Zearalenone あるいは Zeranol 暴露で一部の個体に無排卵性卵巣をみることは、ラットの卵巣はマウスの卵巣よりこれら化学物質に対して感受性が高いと結論できる。

出生前あるいは思春期前のマウスにエストロゲン様化学物質を暴露しても、乳腺において正常で腺胞の出現をみる 8 週齢、あるいはそれ以降ではいずれの被験化学物質も乳腺をそれ以上に分化させる効果はみとめなかった<sup>10,11)</sup>。一方、Zearalenone の出生前投与により、無排卵性卵巣を呈したマウスでは 8、12、16 週齢時に、拡張した疎らな乳管のみからなる未発達な乳腺をみた<sup>10)</sup>。新生仔期 BALB/c マウスのエストロゲン投与により、分泌物で充満した拡張状乳管をみる<sup>19)</sup>。新生仔期 GR マウスの抗エストロゲン剤投与によっても、持続発情を発生し、乳管の拡張を呈する<sup>20)</sup>。無排卵性卵巣は持続性の高エストロゲン・低プロゲステロン

状態を惹起し、黄体ホルモンのサージ (大量分泌) を欠く<sup>21)</sup>。新生仔期のホルモン処置は無排卵性卵巣を介して乳腺の発育を抑制するが<sup>20)</sup>、Zearalenone 投与はこの状態を現出したものと考ええる。

エストロゲン作用を呈する食品関連化学物質の発癌への影響の検討は重要な課題である。乳腺はエストロゲン標的臓器であり、MNU 誘発ラット乳腺発癌は恰好のモデルである。周生期 Genistein 暴露の乳腺発癌におよぼす影響を検討したところ、思春期前 Genistein 投与にとどまらず、出生前 Genistein 投与においても乳癌の抑制傾向をみとめ、とりわけ 1.5 mg/kg (生理的用量) の思春期前投与では有意な抑制をみた<sup>15)</sup>。Resveratrol の思春期前投与を行ったところ、100 mg/kg 思春期前投与では MNU 誘発乳癌の発生率や多発率を促進したが、10 mg/kg ではこの作用はみなかった<sup>16)</sup>。発癌剤投与時の乳腺の構造が発癌剤感受性に影響するとされている<sup>22)</sup>。しかし、今回の検討では Genistein や Resveratrol により MNU 投与時の正常乳腺上皮の形態的变化はきたさなかったが、ER $\alpha$ /PgR 陽性細胞数の増減をみた。大半 (>80%) の MNU 誘発乳癌はホルモン依存性であることより<sup>23)</sup>、Genistein や Resveratrol の乳癌抑制/促進機序は乳癌前駆細胞 (ホルモン受容体陽性細胞) の増減によると考えられる。今回、乳癌促進を呈した Resveratrol の 1 日投与量 (100 mg/kg) は、赤ワインに換算するとグラス 5000 杯となる<sup>6)</sup>。この量では膣開口の早発や発情周期に異常をみとめたが、この 1/10 量で乳癌促進効果がないことは、ヒトにとって乳癌促進に要する Resveratrol 量はヒトの摂取限界をはるかに越えた量と考ええる。

Zearalenone を思春期前 (7 日と 14 日齢) に各の 10 mg/kg 投与すると Wistar ラットの自然発生乳腺腫瘍の増加を来すが<sup>24)</sup>、7、14、17、20 日齢に各の  $\leq 2$  mg/kg 量を投与すると Sprague-Dawley ラットの DMBA 誘