

発乳癌を減少させる<sup>25)</sup>。一方、出生前（妊娠 15-20 日まで連日）の 0.1 mg/kg Zearalenone 投与は DMBA 誘発乳癌に影響をみない<sup>26)</sup>。我々は、思春期前（15-19 日齢）に連日 0.1 mg/kg あるいは 10 mg/kg Zearalenone を投与し、MNU 誘発乳癌をみたところ、大量投与群で乳腺腫瘍（乳癌）を有意に抑制した<sup>17)</sup>。なお、発癌剤処置時である 28 日齢の乳腺形態は思春期前 Zearalenone 投与により影響をうけていなかった。同様に Zeranol の 0.1 mg/kg あるいは 10 mg/kg の思春期前暴露では MNU 誘発乳癌に影響をみなかった<sup>18)</sup>。Zearalenone や Zeranol の暴露とともに黄体を欠如したラットをみたが、新生仔期に男性ホルモン投与をうけたラットでは黄体を欠如し、持続発情をきたして DMBA 誘発乳癌の抑制をみる<sup>27)</sup>。この場合プロゲステロン処置により乳癌の増加をみることで、今回の Zearalenone や Zeranol による乳癌抑制にはプロゲステロンが関与している可能性がある。マウスでみたと同様に雌性生殖器に対する Zearalenone や Zeranol の影響はつよい。これら化学物質は膣開口を早め、顕著な発情周期のかく乱をみとめ、実験終了時においても用量依存性に無排卵性卵巣をみた。なお、ラットにおける今回の検討では雌性生殖器に腫瘍性変化はみなかった。

#### E. 結論

1. 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。
2. 被験物質は DMSO に溶解し、1 日投与量として Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A は少量（0.5 mg/kg）または大量（10 mg/kg）、DES は少量（0.5 µg/kg）または大量（10 µg/kg）とし、無処置対照群は DMSO のみを投与した。

3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 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。
8. 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。
9. 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 に比して持続した。
10. 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。
11. 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。
12. Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol、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。
13. 被験物質は DMSO に溶解し、1 日投与量として Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol、Bisphenol A は 10 mg/kg、DES は 10 µg/kg とし、無処置対照群は DMSO のみを投与した。
14. 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。

15. 思春期発来（膣開口）は Genistein、Zearalenone、Zeranol、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。

16. 発情周期は、Zearalenone、Zeranol、DES 投与により有意に発情期が延長した。

17. Genistein、Resveratrol、Zeranol、Bisphenol A、DES 投与群では、4 週齢時に無排卵性卵巣をみたが、8 週齢時に降卵巣は正常形態を呈していた。

18. 一方、Zearalenone 投与群では 4、8 週齢時に無排卵性卵巣をみた。

19. いずれのマウスも 24 週齢時では正常卵巣をみた。

20. 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。

21. 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なかった。

22. 天然エストロゲンである Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Zeranol 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。

23. 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。

24. 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 では影響をみななかった。

25. 思春期発来（膣開口）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 では影響をみななかった。

26. 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。

27. 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。

28. 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。

29. 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）にこの作用はみななかった。

30. 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。

31. 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。

32. Zeranol の思春期前投与は乳癌に影響をみななかった。しかし、用量依存性に無排卵性卵巣を惹起した。

#### 参考文献

- 1) Klein KO, Baron J, Colli MJ, McDonnell DP, Cutler GB Jr. Estrogen levels in childhood determined by an ultrasensitive recombinant cell bioassay. *J Clin Invest* 94: 2475-2480, 1994.
- 2) 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).
- 3) Herbst AL, Anderson D. Clear cell adenocarcinoma of the vagina and cervix secondary to intrauterine exposure to

- diethylstilbestrol. *Semin Surg Oncol* 6: 343-346, 1990.
- 4) Kanno J, Kato H, Iwata T, Inoue T. Phytoestrogen-low diet for endocrine disruptor studies. *J Agr Food Chem* 50: 3883-3885, 2002.
  - 5) Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. Genistein and daidzein and their  $\beta$ -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agr Food Chem* 41: 1961-1967, 1993.
  - 6) Juan ME, Vinardell MP, Planas JM. The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *J Nutr* 132: 257-260, 2002.
  - 7) Kuiper-Goodman T. Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. *Can J Physiol Pharmacol* 68: 1017-1024, 1990.
  - 8) Markey CM, Luque EH, Munoz De Toro M, Sonnenschein C, Soto AM. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod* 65: 1215-1223, 2001.
  - 9) Matthews J, Celius T, Halgren R, Zacharewski T. Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74: 223-234, 2000.
  - 10) 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.
  - 11) Nikaido Y, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A. Effects of prepubertal exposure to xenoestrogen on development of estrogen target organs in female CD-1 mice. *In Vivo* (in press).
  - 12) Leffers H, Naesby M, Vendelbo B, Skakkebaek NE, Jorgensen M. Oestrogenic potencies of Zeranol, oestradiol, diethylstilboestrol, Bisphenol-A and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disrupters. *Hum Reprod* 16: 1037-1045, 2001.
  - 13) Götz F, Thieme S, Dörner G. Female infertility--effect of perinatal xenoestrogen exposure on reproductive functions in animals and humans. *Folia Histochem Cytobiol* 39 Suppl2: 40-43, 2001.
  - 14) Newbold RR, Banks EP, Bullock B, Jefferson WN. Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein. *Cancer Res* 61: 4325-4328, 2001.
  - 15) 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.
  - 16) 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 (2): 137-145, 2003.
  - 17) 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.
  - 18) 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 (in press).
- 19) Bern HA, Mills KT, Jones LA. Critical period for neonatal estrogen exposure in occurrence of mammary gland abnormalities in adult mice. Proc Soc Exp Biol Med 172: 239-242, 1983.
- 20) Strum JM. Nafoxidine administered to newborn female GR mice arrests the development of their mammary glands. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 42: 227-233, 1983.
- 21) Vom Saal FS, Finch CE. Reproductive senescence: phenomena and mechanisms in mammals and selective vertebrates. In: Knobil E, Neill JD, Ewing LL, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW, editors. The physiology of reproduction. New York: Raven, 1988. p. 2351-414.
- 22) Russo J, Russo IH. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. Lab Invest 57: 112-137, 1987.
- 23) Yang J, Yoshizawa K, Nandi S and Tsubura A. Protective effects of pregnancy and lactation against *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary carcinomas in female Lewis rats. Carcinogenesis 20: 623-628, 1999.
- 24) Schoental R. Trichothecenes, zearalenone, and other carcinogenic metabolites of *Fusarium* and related microfungi. Adv Cancer Res 45: 217-290, 1985.
- 25) Hilakivi-Clarke L, Onojafe I, Raygada M, Cho E, Skaar T, Russo I, Clarke R. Prepubertal exposure to zearalenone or genistein reduces mammary tumorigenesis. Br J Cancer 80: 1682-1688, 1999.
- 26) Hilakivi-Clarke L, Cho E, Onojafe I, Raygada M, Clarke R. Maternal exposure to genistein during pregnancy increases carcinogen-induced mammary tumorigenesis in female rat offspring. Oncol Rep 6: 1089-1095, 1999.
- 27) Yoshida H, Fukunishi R, Kato Y, Matsumoto K. Progesterone-stimulated growth of mammary carcinomas induced by 7,12-dimethylbenz ( $\alpha$ ) anthracene in neonatally androgenized rats. J Natl Cancer Inst 65: 823-828, 1980.
- F. 研究発表
1. 論文発表
1. 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 (4): 349-358, 2003.
2. 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 (2): 137-145, 2003.
3. 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 (2): 164-170, 2003.
4. 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.
5. 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.
  6. 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).
  7. Nikaido Y, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, Tsubura A. Effects of prepubertal exposure to xenoestrogen on development of estrogen target organs in female CD-1 mice. In *Vivo* (in press).
  8. 裴 仁正, 四方伸明, 垾 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.
  9. 螺良愛郎, 裴 仁正, 二階堂泰資, 佐藤睦哉. 植物由来内分泌かく乱物質のラット周生期暴露による発育・癌化および内分泌かく乱作用の比較. 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 p. 37-55.
  10. 螺良愛郎, 二階堂泰資, 佐藤睦哉. 植物由来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乳腺発癌におよぼす影響. 厚生労働科学研究費補助金, 化学物質リスク研究事業「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 p. 31-52.
  11. 螺良愛郎, 垾 貴司, 二階堂泰資. 天然エストロゲン様化学物質の思春期前暴露によるマウスにおける作用強度の比較とラット乳腺発癌におよぼす影響. 厚生労働科学研究費補助金, 化学物質リスク研究事業「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 16 年度総括・分担報告書 (印刷中).
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), November, 2003. Program and Abstract, p127.
    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, 4 月, 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, 4 月, 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, 4 月, 2003.
    5. Pei Ren-Jeng, 垾 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, 8 月, 2003.
    6. 二階堂泰資, 垾 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, 9 月, 2003.

7. 垾 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 Zeranol 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, 4 月, 2004.
8. 垾 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. Zeranol 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, 6 月, 2004.
9. 島野直人, 段原直行, 垾 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, 6 月, 2004.
10. 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, 12 月, 2004.
11. 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, 12 月, 2004.
12. 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, 12 月, 2004.
13. 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, 12 月, 2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

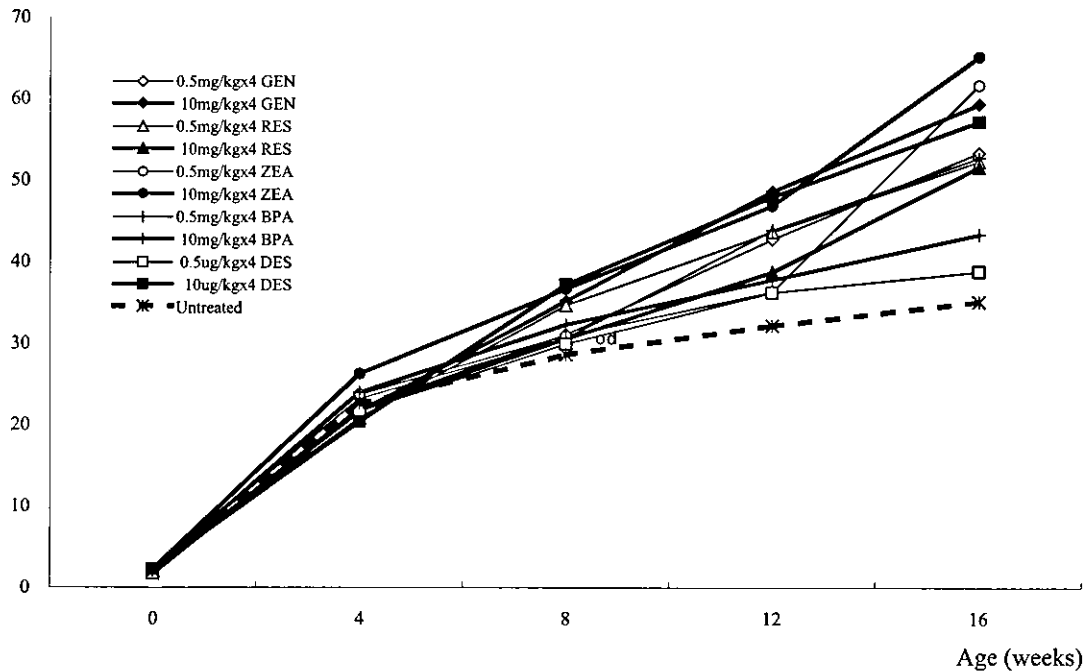


Figure 1. Body weight gain in female CD-1 offspring of mothers administered 4 daily low- or high-dose injections of xenoestrogen, beginning on gestational day 15.

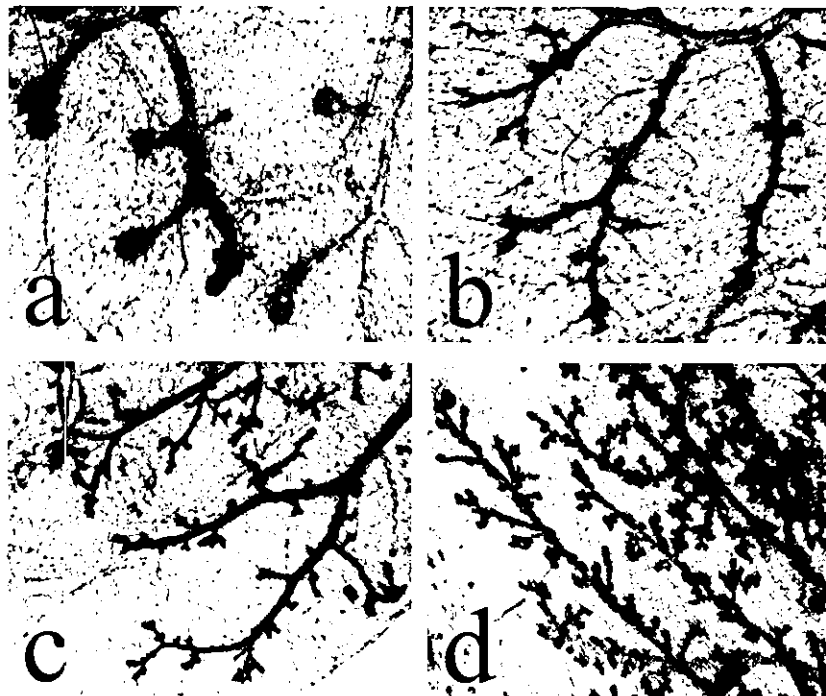


Figure 2. Mammary glands from untreated CD-1 mice. a. Four-week-old mouse. Note terminal end buds at the periphery with lateral bud but no alveolar differentiation (Score 1). b. Twelve-week-old mouse. Note few clusters of alveoli within poorly developed duct (Score 2). c. Twelve-week-old mouse. Note more advanced ductal and alveolar development, compared with b (Score 3). d. Twelve-week-old mouse. Note prominent lobulo-alveolar development (Score 4).

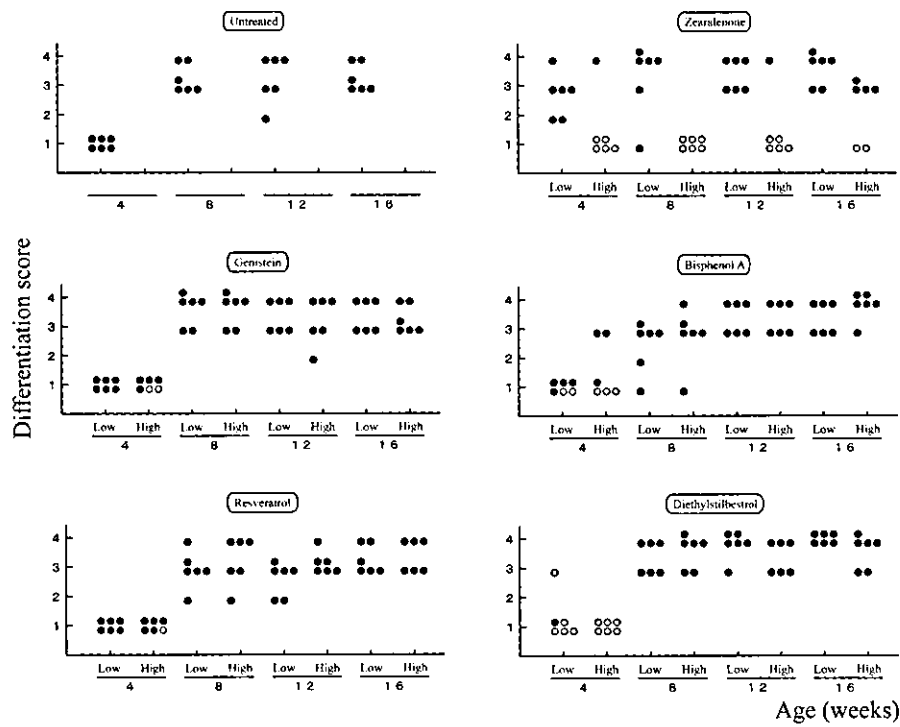


Figure 3. Degree of mammary gland development in female CD-1 offspring of mothers administered 4 daily injections of xenoestrogen, beginning gestational day 15. (●, mouse with corpora lutea; ○, mouse without corpora lutea)



Figure 4. Mammary gland from a 16-week-old zearalenone-treated CD-1 mouse without corpora lutea. a. Note dilated beaded mammary ducts without alveolus. b. Dilated duct contains eosinophilic substance.



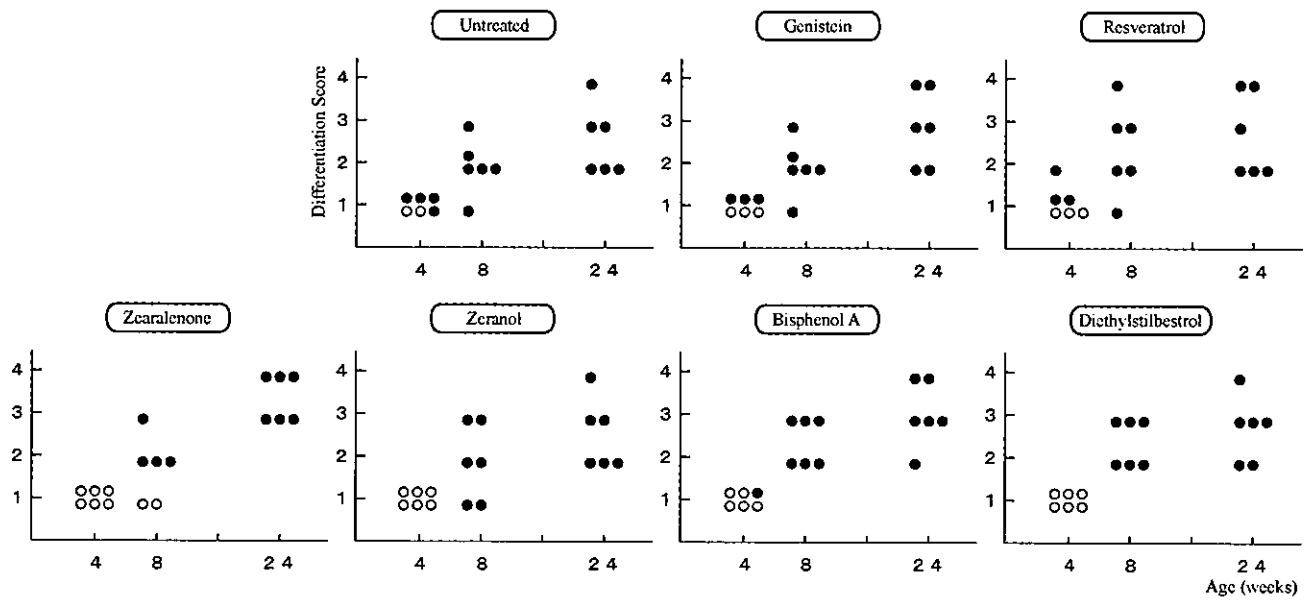


Figure 5. Degree of mammary gland development in female CD-1 mice administered 4 daily injections of xenoestrogen beginning at 15 days of age (●, mouse with corpora lutea; ○, mouse without corpora lutea).

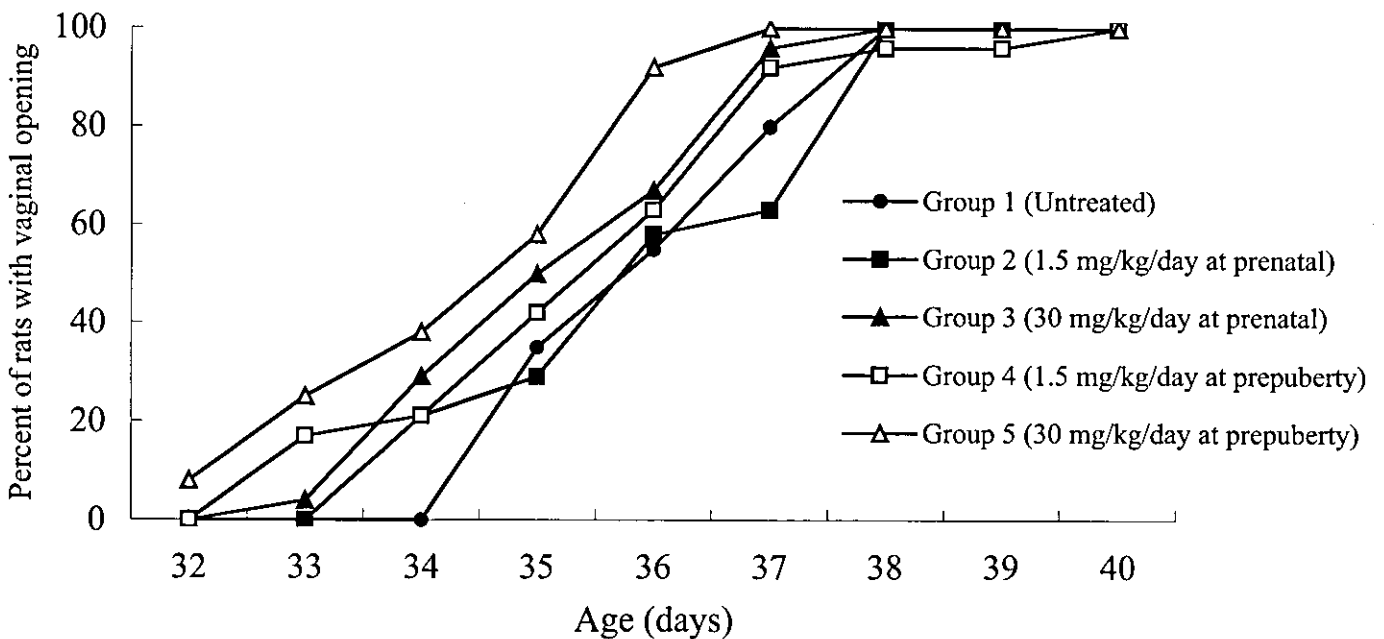


Figure 6. Vaginal opening in relation to genistein treatment

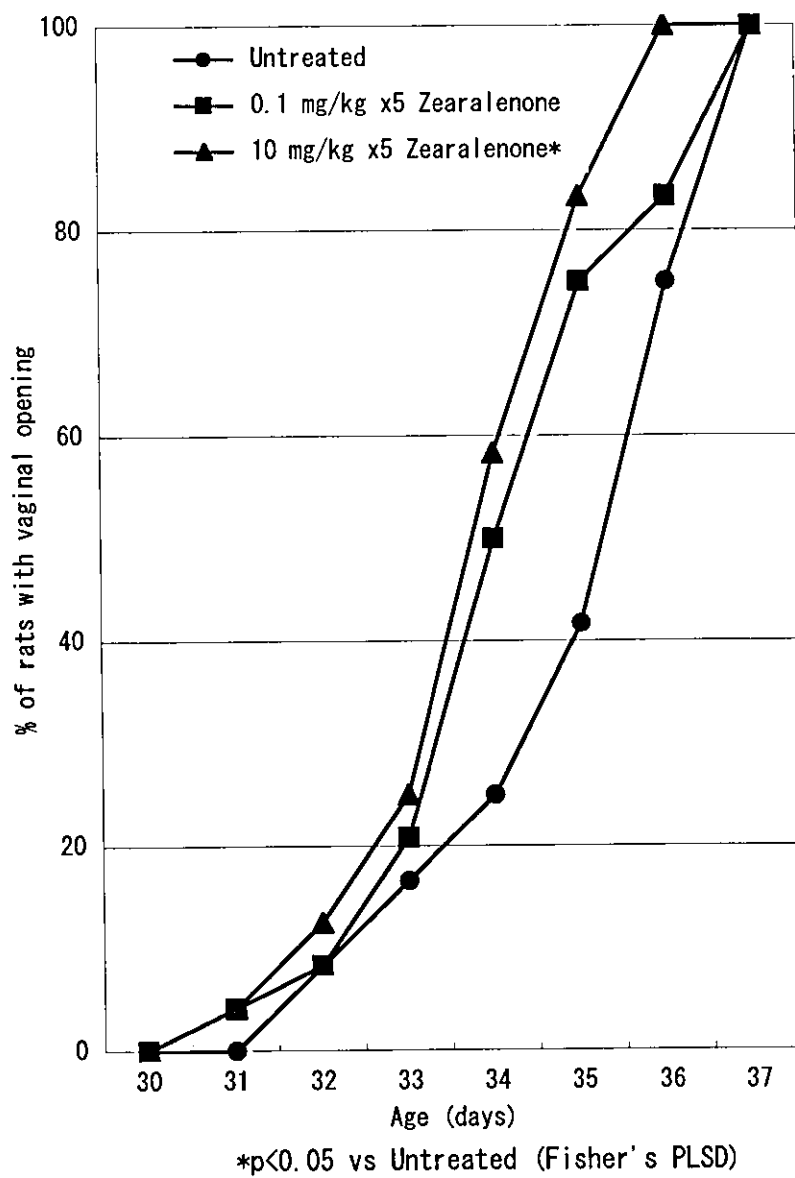
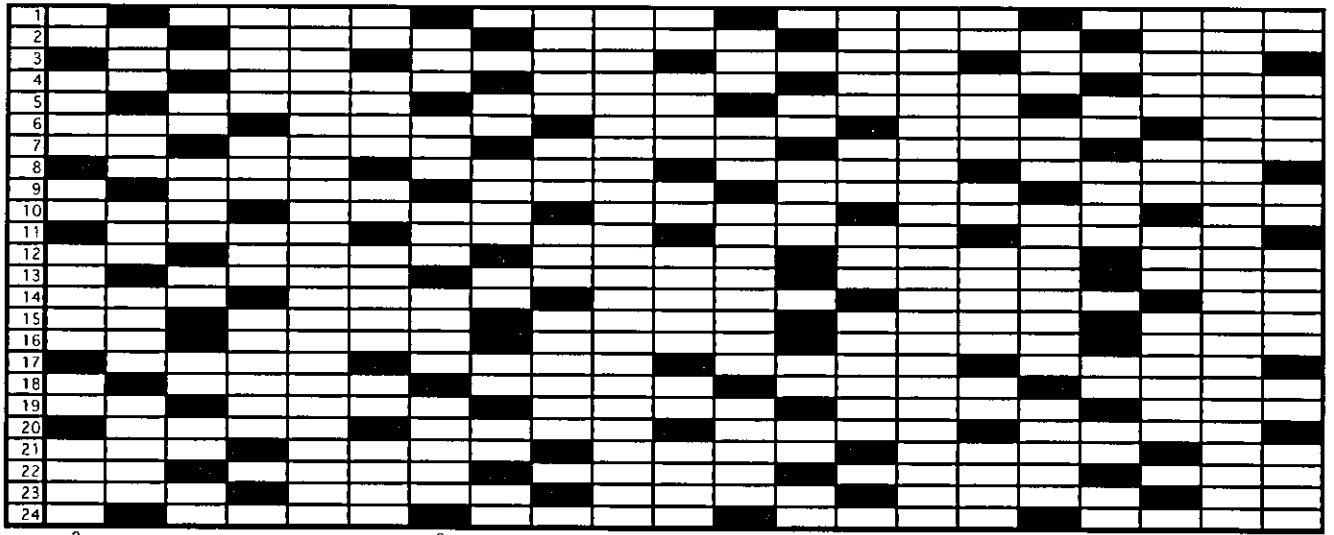


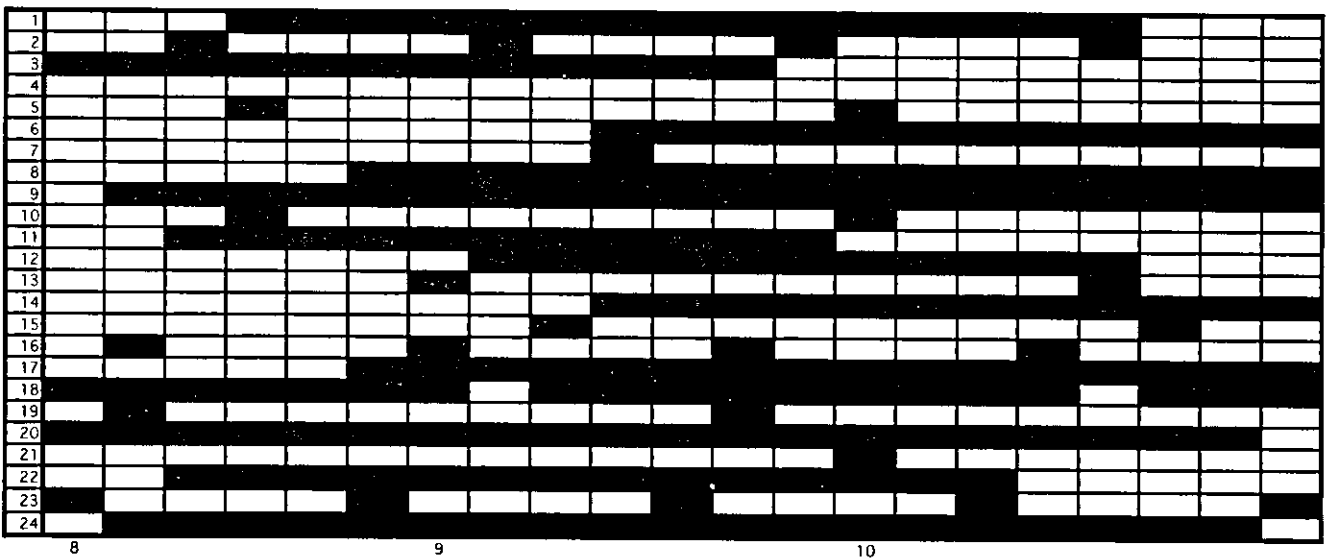
Figure 7. Vaginal opening in relation to zearalenone treatment



Untreated



0.1mg/kg Zearalenone



10mg/kg Zearalenone

Age (weeks)

Figure 8. Daily vaginal cytology smears taken at 8 weeks of age for 3 consecutive weeks from prepubertal zearalenone-treated and -untreated female Sprague-Dawley rats administered MNU at 28 days of age. Each group consists of 24 rats. ( ■ estrus; □ other phase of the cycle)

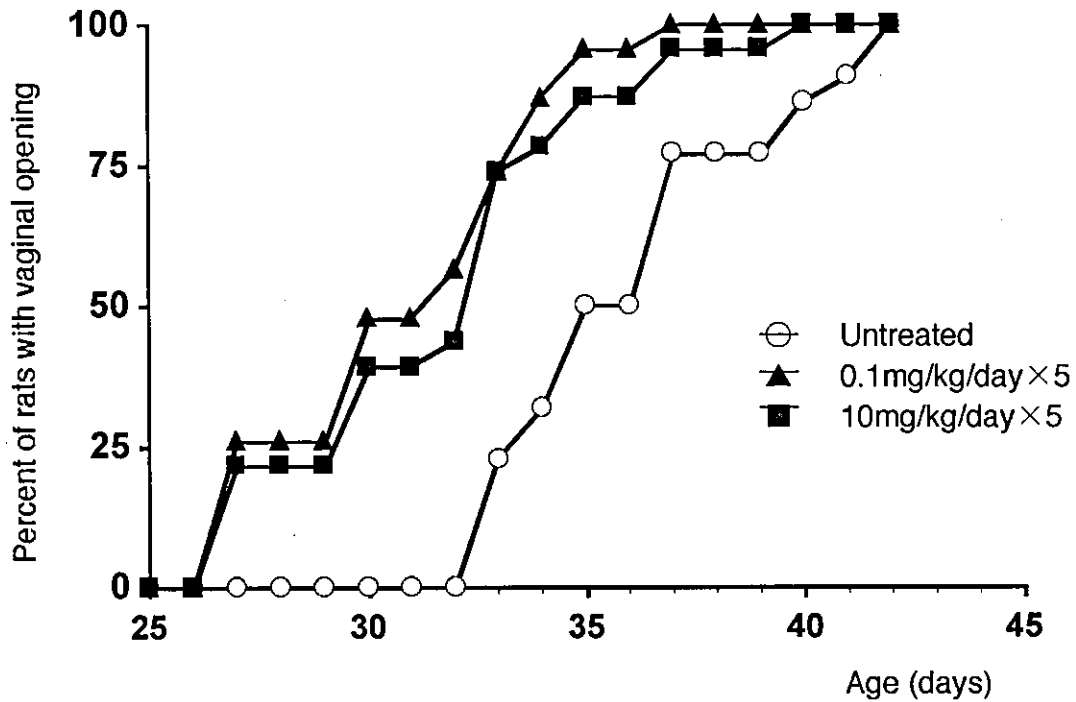


Figure 9. Vaginal opening in female Sprague-Dawley rats after prepubertal zeranol treatment. Zeranol-treated groups showed earlier vaginal opening than untreated controls ( $p < 0.01$ , respectively).

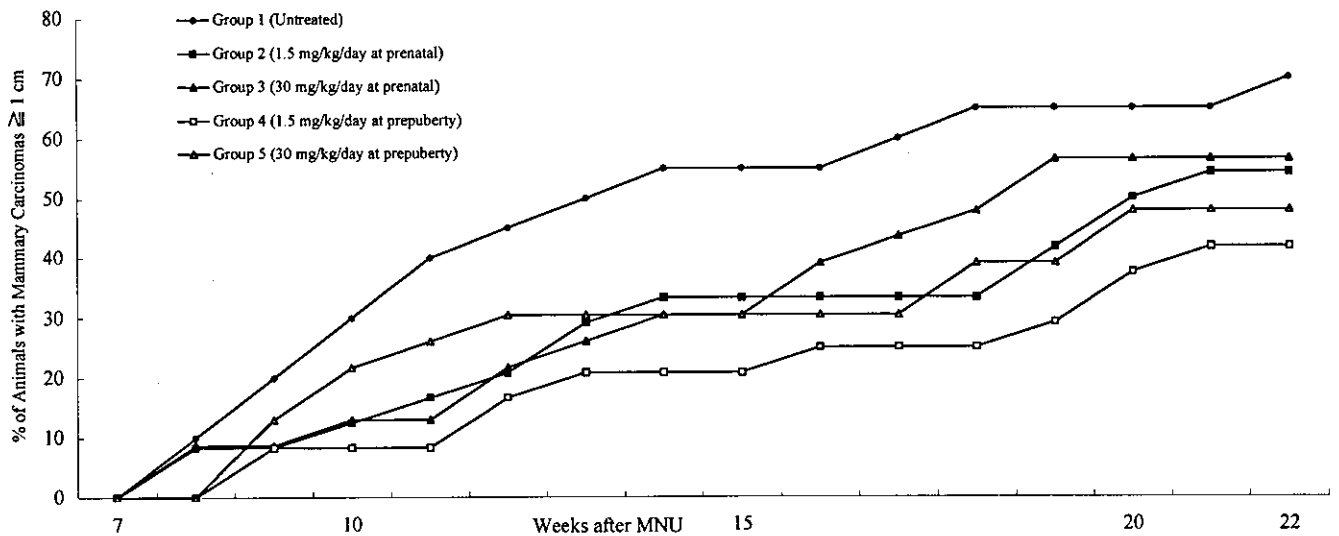


Figure 10. Influence of prenatal and prepubertal genistein treatment on the cumulative incidence of mammary carcinomas  $\geq 1$  cm in female Sprague-Dawley rats induced by MNU

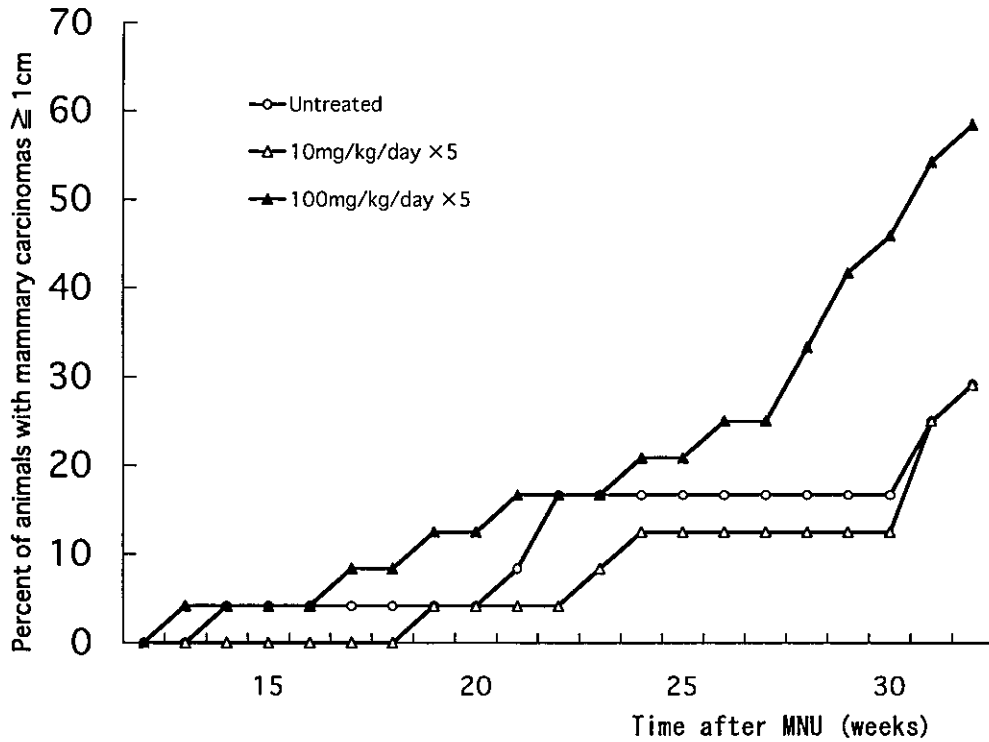


Figure 11. Effect of prepubertal resveratrol exposure on cumulative incidence of MNU-induced mammary tumor  $\geq 1$  cm in female Sprague-Dawley rats.

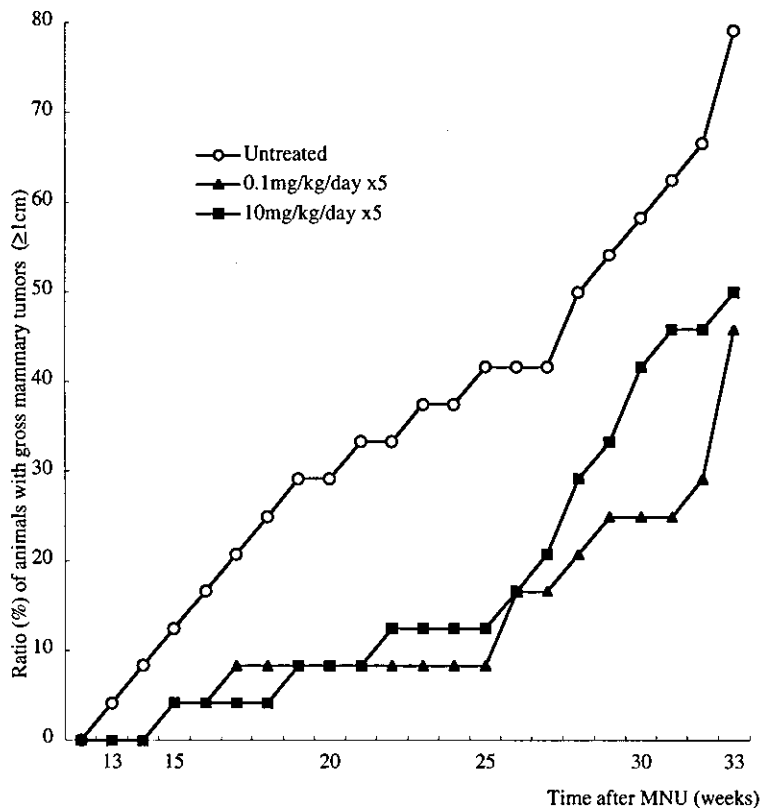


Figure 12. Effect of prepubertal zearalenone exposure on cumulative incidence of gross mammary tumors ( $\geq 1$  cm) in female Sprague-Dawley rats treated with 50 mg/kg MNU at 28 days of age.

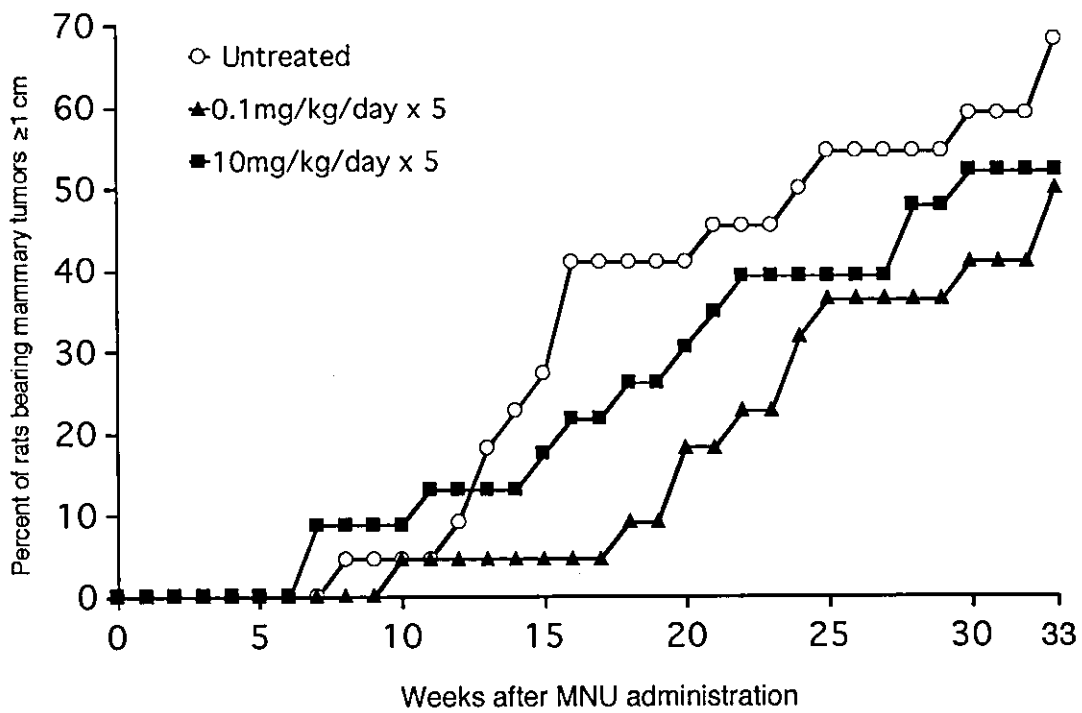


Figure 13. Effects of prepubertal zeranol exposure on cumulative incidence of MNU-induced mammary tumors  $\geq 1$  cm in female Sprague-Dawley rats.

Table 1. Age at vaginal opening in female offspring of mothers exposed to xenoestrogen (4 daily injections, beginning on gestational day 15).

Test chemical	Dose	Vaginal opening (days)
Untreated	-	26.0 ± 0.2
Genistein	0.5 mg/kg x4	25.0 ± 0.2**
	10 mg/kg x4	25.5 ± 0.2*
Resveratrol	0.5 mg/kg x4	25.7 ± 0.1
	10 mg/kg x4	26.0 ± 0.1
Zearalenone	0.5 mg/kg x4	24.8 ± 0.1**
	10 mg/kg x4	24.4 ± 0.2**
Bisphenol A	0.5 mg/kg x4	25.8 ± 0.2
	10 mg/kg x4	24.8 ± 0.2**
Diethylstilbestrol	0.5 µg/kg x4	24.5 ± 0.1**
	10 µg/kg x4	24.1 ± 0.2**

Values represents mean ± SE.

Each group consists of 24 mice.

\*p<0.05 and \*\*p<0.01, compared with untreated controls.

Table 2. Estrous cycle alteration in female offspring of mothers exposed to xenoestrogen (4 daily injections, beginning on gestational day 15).

Chemical	Dose	One cycle length	Percent of time spent in	
			estrus	diestrus
Untreated	-	5.2 ± 0.1	18.7 ± 0.4	24.2 ± 2.1
Genistein	0.5 mg/kg x4	6.4 ± 0.3**	15.9 ± 0.7	31.0 ± 1.7**
	10 mg/kg x4	7.2 ± 0.4**	14.3 ± 0.8	34.5 ± 1.8**
Resveratrol	0.5 mg/kg x4	6.5 ± 0.2**	14.7 ± 0.9	33.7 ± 2.7**
	10 mg/kg x4	6.1 ± 0.2**	15.1 ± 0.5	29.8 ± 1.7
Zearalenone	0.5 mg/kg x4	7.7 ± 0.3**	29.8 ± 4.7**	29.8 ± 3.0
	10 mg/kg x4	10.9 ± 0.5**	48.4 ± 4.0**	23.4 ± 2.2
Bisphenol A	0.5 mg/kg x4	8.0 ± 0.4**	13.1 ± 0.6	38.9 ± 2.0**
	10 mg/kg x4	8.2 ± 0.3**	13.9 ± 0.4	40.5 ± 1.2**
Diethylstilbestrol	0.5 µg/kg x4	5.5 ± 0.1	17.5 ± 0.7	30.2 ± 2.1*
	10 µg/kg x4	5.8 ± 0.1*	17.5 ± 0.9	37.3 ± 1.7**

Values represents mean ± SE (days).

\*p<0.05, \*\*p<0.01 compared with untreated controls.



Table 3. Absence of corpora lutea in female mice treated with xenoestrogen prenatally.

Xenoestrogens	Dose	No. of mice without corpora lutea (%)			
		4	8	12	16 (weeks)
Untreated	-	0	0	0	0
Genistein	0.5 mg/kg x4	0	0	0	0
	10 mg/kg x4	2 (33)	0	0	0
Resveratrol	0.5 mg/kg x4	0	0	0	0
	10 mg/kg x4	1 (17)	0	0	0
Zearalenone	0.5 mg/kg x4	0	0	0	0
	10 mg/kg x4	5 (83)	6 (100)	5 (83)	2 (33)
Bisphenol A	0.5 mg/kg x4	2 (33)	0	0	0
	10 mg/kg x4	3 (50)	0	0	0
Diethylstilbestrol	0.5 µg/kg x4	5 (83)	0	0	0
	10 µg/kg x4	6 (100)	0	0	0

Table 4. Mean age at vaginal opening in female CD-1 mice exposed to xenoestrogen (4 daily injections, beginning at 15 days of age)

Test chemical	Dose	Vaginal opening (days)
Untreated	-	25.9 ± 0.3
Genistein	10 mg/kg x4	22.8 ± 0.7*
Resveratrol	10 mg/kg x4	26.4 ± 0.4
Zearalenone	10 mg/kg x4	20.3 ± 0.6*
Zeranol	10 mg/kg x4	18.9 ± 0.2*
Bisphenol A	10 mg/kg x4	26.8 ± 0.3
Diethylstilbestrol	10 µg/kg x4	20.1 ± 0.8*

Values represent mean ± SE.

Each group consists of 17-24 mice.

\*p<0.01, compared with untreated controls.

Table 5. Estrous cycle alteration in female CD-1 mice exposed to xenoestrogen (4 daily injections, beginning at 15 days of age)

Chemical	Dose	Age 5-8		9-12		21-24 (weeks)	
		One cycle length	Day spent in estrus	One cycle length	Day spent in estrus	One cycle length	Day spent in estrus
Untreated	-	5.4 ± 0.3	1.0 ± 0.0	5.9 ± 0.4	1.0 ± 0.1	6.0 ± 0.4	1.1 ± 0.1
Genistein	10 mg/kg x4	5.2 ± 0.3	1.1 ± 0.0	6.0 ± 0.3	1.2 ± 0.1	6.3 ± 0.3	1.1 ± 0.1
Resveratrol	10 mg/kg x4	6.0 ± 0.3	1.0 ± 0.0	5.7 ± 0.2	1.0 ± 0.1	6.1 ± 0.4	1.2 ± 0.1
Zearalenone	10 mg/kg x4	4.8 ± 0.4	2.8 ± 0.4**	6.5 ± 0.4	2.9 ± 0.3**	6.7 ± 0.4	2.9 ± 0.4**
Zeranol	10 mg/kg x4	5.8 ± 0.3	3.2 ± 0.4**	6.8 ± 0.5	2.0 ± 0.2**	6.2 ± 0.5	1.2 ± 0.1
Bisphenol A	10 mg/kg x4	5.7 ± 0.3	1.1 ± 0.0	5.3 ± 0.2	1.0 ± 0.0	5.2 ± 0.2	1.0 ± 0.0
Diethylstilbestrol	10 µg/kg x4	6.1 ± 0.3	1.9 ± 0.2*	6.1 ± 0.3	2.1 ± 0.2**	6.0 ± 0.2	1.7 ± 0.2*

Values represent mean ± SE (days) of ≥6 mice.

\*p<0.05, \*\*p<0.01 compared with untreated controls.

Table 6. Estrous cycle in female Sprague-Dawley rats treated with or without genistein

Group	Treatment	No. of rats	% of time spent in each phase of cycle			
			Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
1	Untreated	20	15.9 ± 1.5	27.1 ± 0.9	16.9 ± 1.4	40.1 ± 1.5
2	1.5 mg/kg/day at prenatal	24	17.5 ± 1.7	27.0 ± 1.0	18.1 ± 0.8	37.4 ± 1.6
3	30 mg/kg/day at prenatal	24	14.1 ± 1.5	29.0 ± 1.1	19.3 ± 1.0	37.6 ± 1.9
4	1.5 mg/kg/day at prepuberty	24	16.6 ± 1.5	32.6 ± 1.2*	18.4 ± 1.5	32.4 ± 1.6*
5	30 mg/kg/day at prepuberty	24	12.7 ± 1.4	36.4 ± 1.1*	19.5 ± 1.5	31.4 ± 1.1*

Examined during 10 to 14 weeks of age.

Value represents mean ± SEM. \*p value < 0.05 versus group 1.

Table 7. Estrous cycle in prepubertal zeranol-treated and -untreated female Sprague-Dawley rats administered MNU at 28 days of age.

Zeranol treatment	One cycle length (days)	% of time spent in each phase of cycle			
		Proestrus	Estrus	Metestrus	Diestrus
Untreated	4.6±0.2	25.6±1.6	31.2±1.3	25.6±2.4	17.0±1.9
0.1 mg/kg/day x5	5.3±0.2	10.6±1.5*	56.6±2.5**	18.4±2.2*	14.0±2.0
10 mg/kg/day x5	5.9±0.4**	11.4±1.5**	56.2±2.4**	18.1±2.1*	13.8±2.1

Examined from 8 weeks of age for 4 weeks. Values are mean±S.E. \*p value<0.05 and \*\*<0.01 compared with untreated group.

Table 8. Effect of genistein treatment on MNU-induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats

Group	Treatment	No. of rats	No. of rats with carcinomas ≥ 1cm (%)	Total no. of carcinomas	Tumor multiplicity	Tumor latency (days)	
						Range	Mean ± SEM
1	Untreated	20	14 (70)	31	1.6±0.2	85-186	120±8
2	1.5 mg/kg ×5 at prenatal	24	13 (54)	38	1.6±0.3	85-186	136±9
3	30 mg/kg ×5 at prenatal	23	13 (57)	40	1.7±0.4	93-186	133±8
4	1.5 mg/kg ×5 at prepuberty	24	10 (42)*	29	1.2±0.2	98-186	141±10
5	30 mg/kg ×5 at prepuberty	23	11 (48)	31	1.3±0.3	98-186	128±10

Value represents mean ± SEM. \* p < 0.05 versus group 1.