

図5 単独皮下投与(10mg/kg)の投与後2時間目搾乳群における血清及び乳汁中の濃度
 —: 平均値、 * : 有意差あり (P < 0.05)

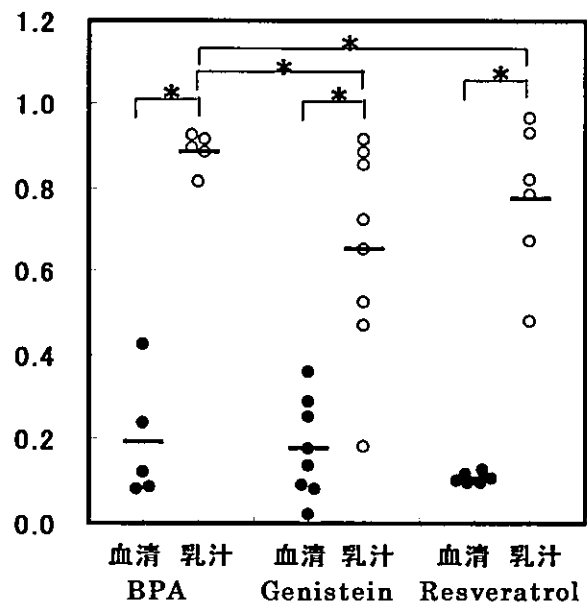


図6 単独皮下投与(10mg/kg)の投与後2時間目搾乳群における
 血清及び乳汁中の遊離体/総量比
 —: 平均値、 * : 有意差あり (P < 0.05)

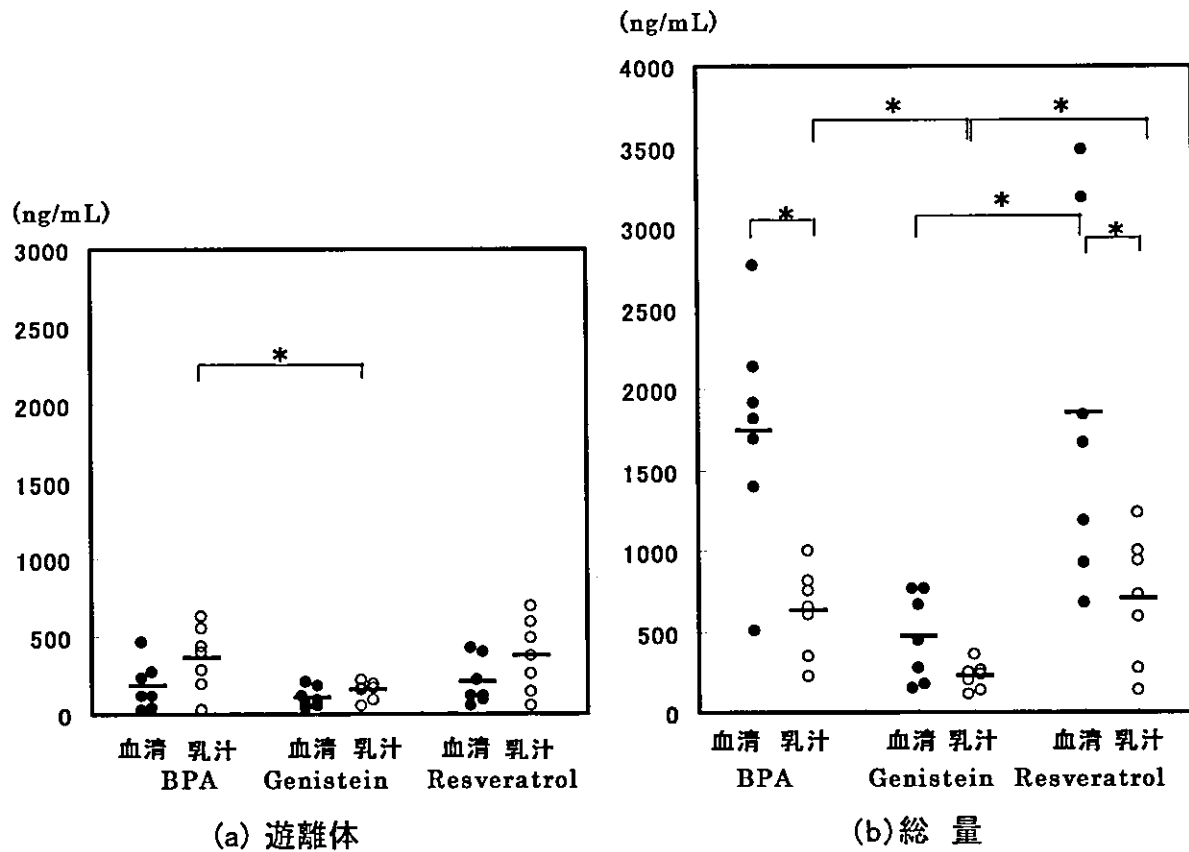


図7 混合皮下投与(各 10mg/kg)の投与後 2 時間目搾乳群における血清及び乳汁中の濃度
 —: 平均値、 * : 有意差あり (P < 0.05)

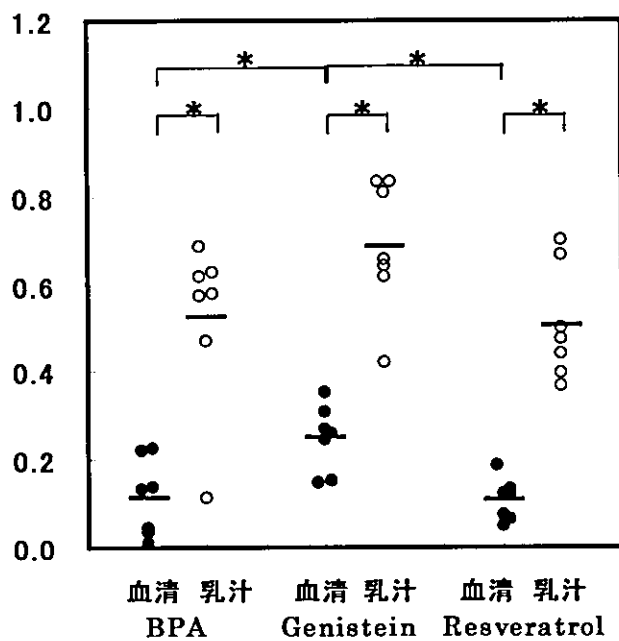


図8 混合皮下投与(各 10mg/kg)の投与後 2 時間目搾乳群における
 血清及び乳汁中の遊離体/総量比
 —: 平均値、 * : 有意差あり (P < 0.05)

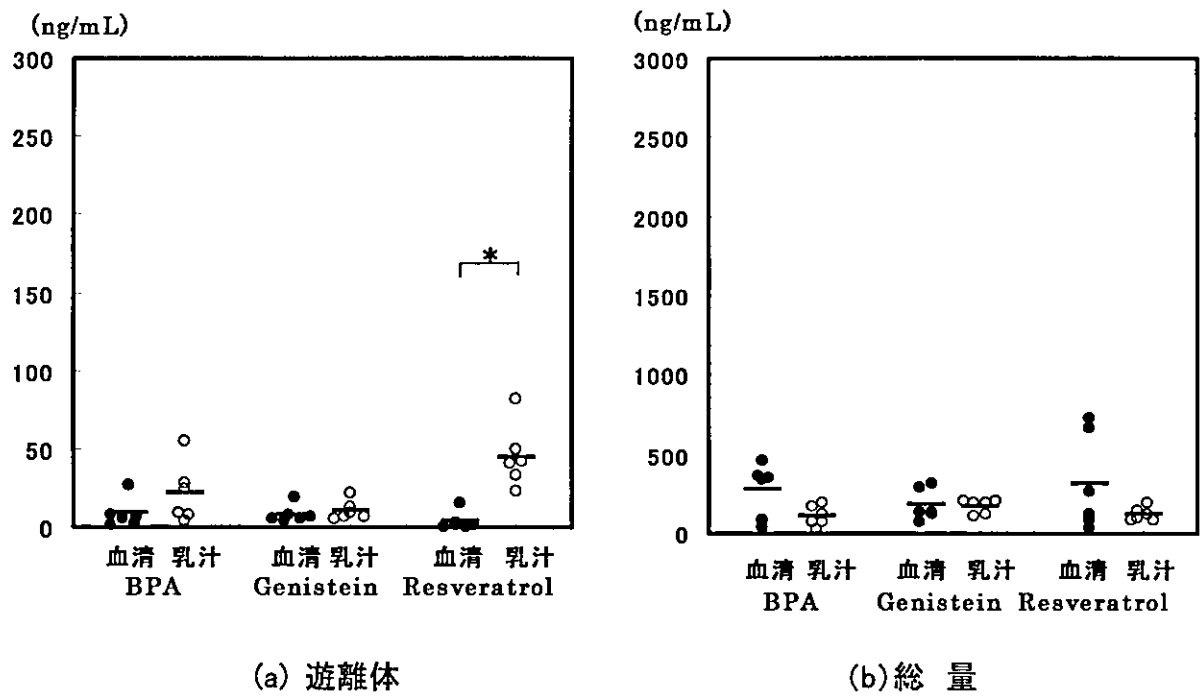


図9 混合経口投与(各 10mg/kg)の投与後 2 時間目搾乳群における血清及び乳汁中の濃度
 —: 平均値、 * : 有意差あり (P < 0.05)

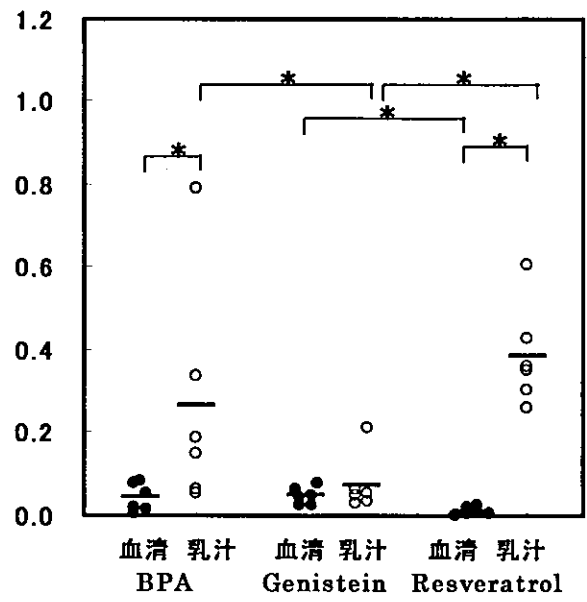


図10 混合経口投与(各 10mg/kg)の投与後 2 時間目搾乳群における血清及び乳汁中の遊離体/総量比
 —: 平均値、 * : 有意差あり (P < 0.05)

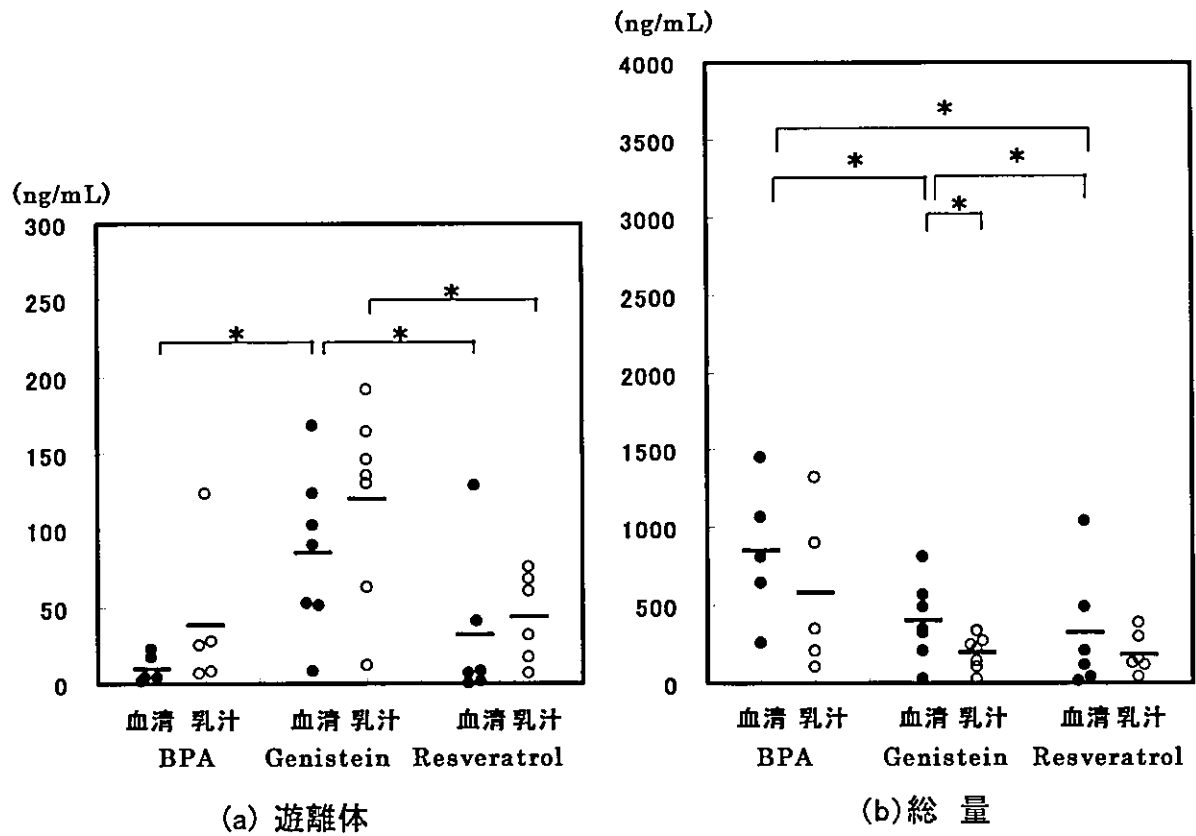


図 11 単独皮下投与(10mg/kg)の投与後 7 時間目搾乳群における血清及び乳汁中の濃度
 —: 平均値、 * : 有意差あり (P < 0.05)

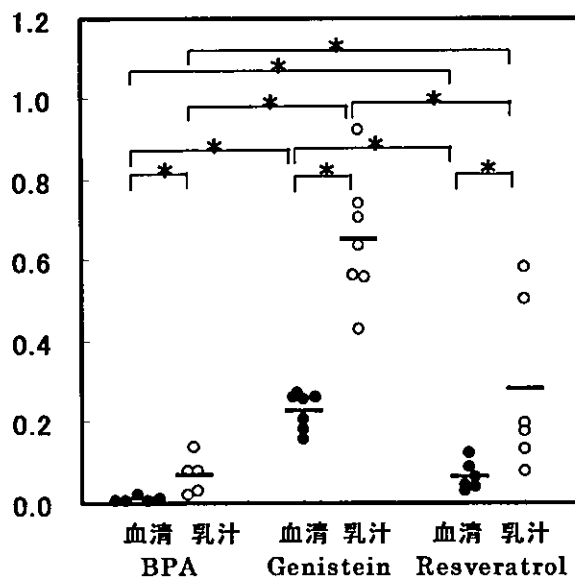
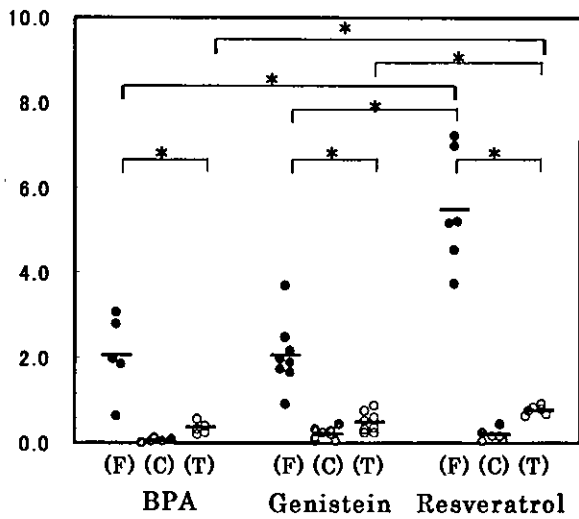
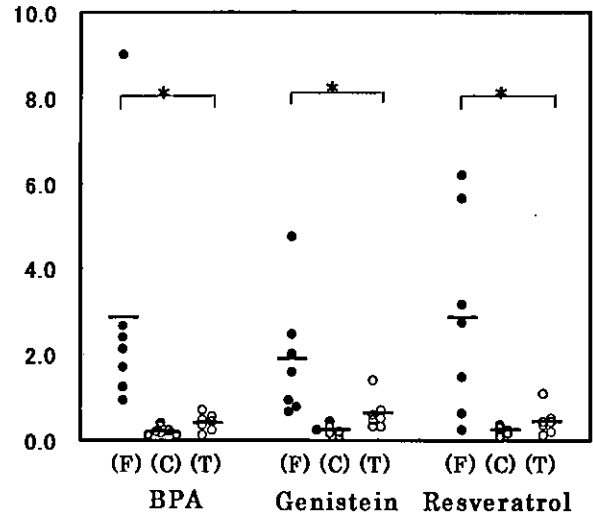


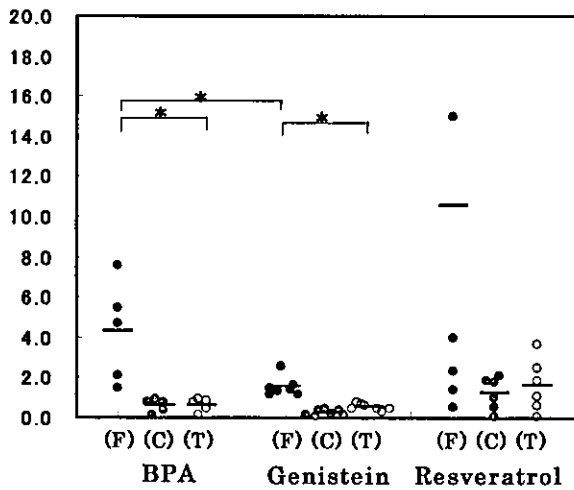
図 12 単独皮下投与(10mg/kg)の投与後 7 時間目搾乳群における
 血清及び乳汁中の遊離体/総量比
 —: 平均値、 * : 有意差あり (P < 0.05)



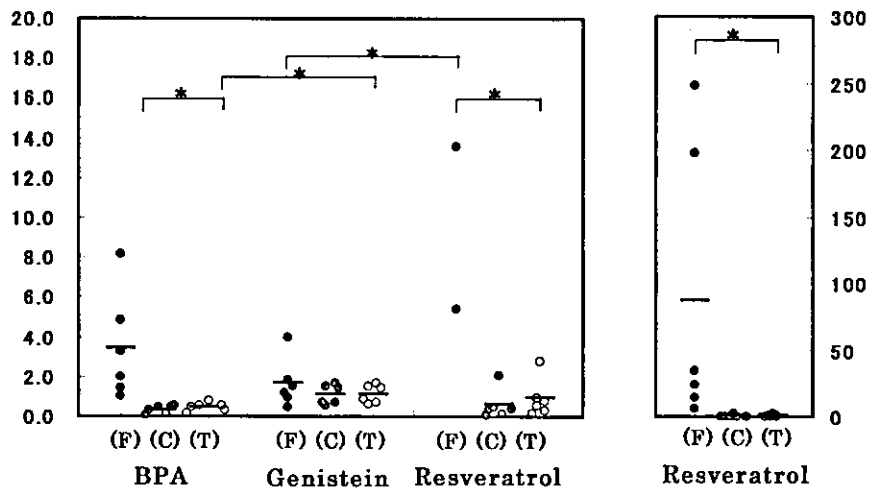
(a) 単独皮下投与の投与後2時間目搾乳群



(b) 混合皮下投与の投与後2時間目搾乳群



(c) 単独皮下投与の投与後7時間目搾乳群



(d) 混合経口投与の投与後2時間目搾乳群

図13 各投与条件における遊離体、抱合体及び総量濃度の乳汁/血清比

(F)：遊離体、(C)：抱合体、(T)：総量

—：平均値、*：有意差あり (P<0.05)

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：螺良愛郎 関西医科大学病理学第二講座教授

研究課題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

研究課題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研究

分担研究担当者：茶山和敏 静岡大学農学部助教授

研究要旨

研究課題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

植物エストロゲンなどの大豆等既存食品成分も含めた内分泌かく乱物質（環境ホルモン物質）の生体への影響に関するこれまでの研究では、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大豆等既存食品成分と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少ない。そこで、本研究では子宮肥大試験を用いて、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（BPA）、代表的な植物エストロゲンであるGenistein（Gen）およびResveratrol（Res）、の4種の物質とEstradiol 17 β （E2）の生体内におけるエストロゲン活性の比較を行った。

10週齢の雌ICRマウスの卵巣を除去し、1ヶ月後から、E2、DES、BPA、ResおよびGenを種々の濃度で3日間皮下投与した。最終投与の24時間後、体重および子宮の湿重量と内腔液除去後の重量を計測した。重量計測後の子宮は組織標本を作製し、組織学的比較を行った。その結果、E2およびDESは100ng/kg/dayの投与でコントロール群と比較して有意な増加が見られ、100ng/kg/dayの投与群では子宮重量がコントロール群と比較して約3倍に増加した。両者の子宮重量の増加作用は湿重量、乾重量ともにほとんど同じだった。BPA投与では湿重量、乾重量ともに10mg/kg/day投与群で増加がみられ、乾重量では有意な増加を示した。Res投与では、湿重量は10mg/kg/day投与群で有意に増加していた。また、乾重量は2mg/kg/day投与群でも有意な増加が見られた。一方、50mg/kg/day以上の投与では10mg/kg/day投与よりも子宮重量の増加が少なく、有意な差もなかった。Genは50mg/kg/day投与群で有意な子宮重量の増加が見られた。また、Resと同様に100mg/kg/day投与群では子宮重量の増加に有意差がなくなった。こ

れら3種類の環境ホルモン物質とエストロゲンとのエストロゲン活性を子宮の乾重量で比較した結果、BPA、ResおよびGenの3種のうちではResで子宮重量増加作用が最も高く、Genはその作用がもっとも弱いことが判明した。各物質のエストロゲン活性はDESおよびE2と比較して非常に弱く、BPAで約1/10万、Resで約1/5万、Genは約1/50万以下であることが示唆された。また、子宮重量の増加量に関してもこれらの物質はE2やDESに比べるとその作用が弱いことが示唆された。さらに、ResとGenで高濃度投与での子宮重量増加の抑制が見られた。一方、体内のエストロゲンと環境ホルモン物質の相互作用を調べることを目的として、前述の実験で子宮重量に影響が出なかった濃度のE2に、同様の濃度のBPA、Res、Genを組み合わせ投与する実験も行った。その結果、子宮重量、特に乾重量はE2とResの組み合わせで有意な増加が見られ、Genでも同様の傾向が起きることが明らかとなった。各投与群の子宮の組織学的比較を行ったところ、各投与群で子宮内膜上皮細胞やその他の細胞の増殖と肥厚が観察されたが、特に群間の相違は見られなかった。さらに、同様の子宮肥大試験をカビ毒由来のエストロゲン様物質であるZearalenone (Zen) とその代謝物質であるZeranol (Zol) の2物質についても行うとともに、両物質についてはエストロゲンレセプター (ER) 結合試験も行ってERへの親和性も比較した。その結果、子宮肥大試験で、ZolはZenと比べてより低濃度で子宮重量を増加させることが判明した。また、ZolとZenの活性をE2と比較するとZolで1/5000、Zenでは1/2万で、調査した環境ホルモン物質の中ではZolが最も高いエストロゲン活性を示した。また、Zolはエストロゲンレセプターへの結合活性がZenよりも強く、またER α への結合親和性がZenより高いことが明らかとなった。

研究課題2：自己免疫病発症に対する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研究

自己免疫病は自己の抗原に対して免疫反応が生じて重篤な障害が引き起こされる膠原病やリウマチなどの疾患で、治療が非常に困難な難病である。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い。そこで、本研究では、エストロゲン作用を有することが明らかになっている内分泌かく乱物質および大豆等既存食品成分の自己免疫病発症に対する影響を調べた。

実験には自己免疫病モデルマウスであるMRL-*lpr*^{fs}マウスを用いた。自己免疫病発症前の1ヶ月齢のMRL-*lpr*^{fs}マウスに子宮重量法で子宮重量を有意に増加させた濃度をもとにして、Genを15および50mg/kg、BPAを3および10mg/kg、E2を10 μ g/kgを雌雄各10匹に週2回2ヶ月間皮下投与した。投与後、体重および尿タンパク質量を測定するとともに、皮下および腹腔内リンパ節、腎臓、脾臓、子宮、卵巣および精巣の重量を測定した。また、血清を採取して、血中免疫複合体量、抗DNA抗体量

および IFN- γ 量を測定した。さらに、生存率を調べるため、各投与群を別に作成して、生後 1 ヶ月目から 6 ヶ月間投与実験を行い、各実験群の投与期間中の生存率を比較した。各投与群の体重および腎臓重量には有意な差が見られなかった。脾臓重量は雄の BPA 投与群で高い傾向が見られた。リンパ節重量は皮下・腹腔内ともに Gen 投与群では対照群と差が見られなかったが、E2 および BPA 3mg/kg 投与群では有意差はなかったものの顕著に増加する傾向が見られ、その傾向は BPA 3mg/kg 投与群のほうがより強かった。タンパク尿症罹患率は雄では BPA3mg/kg 投与群が他の群に比べて顕著に高かった。また、雌では、Gen 15mg/kg 投与群、E2 および BPA 投与群は対照群と比べて罹患率が有意に高かった。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雄 Gen 15mg/kg 投与群で有意に高かった。また、Gen 15mg/kg 投与群では、雌で 60%、雄で 80%に血管炎の進行に伴うと思われる腎臓の組織学的変性が見られた。血中 IFN- γ 量、免疫複合体量ともに、有意な変化が見られた群もあったが、いずれの群も大きな差は見られなかった。また、BPA3mg/kg 投与群と Gen 15mg/kg 投与群を別に作成して 210 日までの生存率を調べた結果、雄の生存率はいずれの投与群も差が見られなかった。雌では死亡開始時期には差が見られなかったが、210 日目までの生存率は対照群が 60%で平均生存日数が 183.2 日だったのに対して、Gen 投与群では生後 159 日目までにすべてのマウスが死亡した（平均生存日数 141.4 日）。また、BPA 投与群は生存率が 40%で平均生存日数が 166.3 日、E2 投与群は 10%で平均生存日数が 158.3 日となり、有意差はないものの生存率および平均生存日数が顕著に低下した。E2 および前述の実験でより悪性度が高かった BPA 3mg/kg 投与群と Gen 15mg/ml 投与群については自己免疫病の悪性進展への影響を調べるために、投与期間を 3 ヶ月間に伸ばして同様の投与実験を行った。その結果、いずれの投与群も腎炎の発症度が Control 群よりも高いことを示唆する結果が得られた。さらに、ブドウや赤ワインに多く含まれる Res およびカビ毒由来のエストロゲン様物質である Zol の自己免疫病発症および悪性進展に対する影響を同様に検討した。その結果、Res と Zol も自己免疫病、特に自己免疫性腎炎の発症および悪性進展を促進している可能性が示唆され、その結果として、雌の両投与群の生存率が低下し、雄の Zol 投与群では自己免疫病による死亡開始が顕著に早まることが判明した。

以上の結果から、エストロゲン活性を有する BPA、Gen、Res および Zol は自己免疫病の発症開始には影響しないが、発症後の悪性進展、特に腎炎の悪性進展を促進し、自己免疫病マウスの生存率を低下させることが明らかとなった。

研究課題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

A. 研究目的

Diethylstilbestrol (DES) などの合成エストロゲンや Bisphenol A (BPA) などの化学物質が内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン物質）として生体、特に内分泌器官の機能に悪影響を与えることが報告され、新たな環境汚染として問題視されている。一方、食品としてこれまでに摂取してきた植物由来の成分である Genistein (Gen)、Resveratrol (Res) などの植物エストロゲンはエストロゲン様作用が弱く、環境ホルモン物質とは逆に生殖器官などの発癌抑制等の生体機能の改善作用を有することを示唆する報告も見られる (Constantinou, A. I. *et al.* *Anticancer Res.*, 16, 3293-3298, 1996)。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、同一条件下で複数の植物エストロゲンと環境ホルモン物質の影響を同時に調べた報告はラットを用いた子宮肥大試験では数多く報告されているが、マウスの子宮肥大試験を用いて比較した報告はまったく見られない。

子宮肥大試験を用いた環境ホルモン物質のエストロゲン活性の比較に関する世界的な統一基準は経済協力開発機構 (OECD) からバリデーションプロトコールとして提案され、そのプロトコールにしたがって多くの環境ホルモン物質の比較が行われている (Kanno, J. *et al.* *Environ. Health Perspect.*, 109, 785-

794, 2001)。OECD のバリデーションプロトコールでは対象動物は通常、ラットを用いることとされている。環境ホルモン物質の生体への影響、特に疾病との関連を実験動物を用いて検討する場合、多くの疾病モデル動物が作出されているマウスを使用する可能性が高い。しかしながら、マウスを用いた子宮肥大試験によって環境ホルモン物質のエストロゲン活性を比較した研究は数種類の環境ホルモン物質で個々に調べられているだけで、多くの環境ホルモン物質のエストロゲン活性をマウスを用いて同一条件下で比較した研究はこれまでまったくないことから、生体内におけるエストロゲン様作用を調べる際の基礎研究として、マウスの子宮肥大試験法を用いてそれらの作用を比較することは今後の環境ホルモンに関する研究においても非常に重要である。

そこで、本研究では疾病モデルマウスを用いた今後の研究と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得心す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、代表的な植物エストロゲンである Gen および Res、環境ホルモン物質として最も頻繁に研究されている BPA および合成エストロゲンである DES の計 4 種の物質に関して生体内におけるエストロゲン活性を Estradiol 17 β (E2) と比較した。また、カビ毒由来の天然エストロゲン様物質である Zearalenone (Zen) とその代謝物質である Zeranol (Zol) についても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結合試験を用いて比較した。

B. 材料および方法

B-1. マウス

実験には 10 週齢の雌 ICR マウスを用いた。マウスは静岡大学農学部の実験動物飼育室で、温度； 24 ± 1 °C、湿度； $60 \pm 10\%$ 、照明；14 時間明期・10 時間暗期、飼料及び水；自由摂取の条件下で飼育した。

飼料は食餌中からの環境ホルモン物質の影響を可能な限り少なくするために、環境ホルモン実験用に開発されたマウス・ラット用飼料である NIH-07PLD（オリエンタル酵母株式会社）を給与した。

B-2. 環境ホルモン物質の投与

すべてのマウスの卵巣を除去し、1 ヶ月後から E2 (SIGMA, USA)、DES (SIGMA, USA)、BPA (SIGMA, USA)、Res (SIGMA, USA)、Gen (フジッコ, 日本)、Zen (SIGMA, USA) および Zol (和光純薬, 日本) をオリーブ油に溶かして 3 日間皮下投与した。投与量は E2 および DES が 0.5、10、100 および 1000ng/kg/day、BPA、Res、Gen、Zen および Zol は 0.5、2、10、50 および 100mg/kg/day とし、一匹あたりの投与量が $100 \mu\text{l}$ になるように調整して各投与群 10 匹ずつに投与した。

B-3. 子宮重量の計測および子宮の組織学的比較

各物質の最終投与から 24 時間後、体重および子宮の湿重量を量り、さらに子宮は子宮頸部および子宮体を切断して内腔液を除去した後の重量を乾重量として計測した。乾重量計測後の子宮は固定・包埋して組織標本を作製し、組織学的比

較を行った。

B-4. エストロゲンと環境ホルモン物質の組み合わせ投与

環境ホルモン物質は体内のエストロゲンと相加的あるいは相乗的に作用する可能性が考えられていることから、DES を除く 3 種の各物質とエストロゲンの組み合わせ投与試験もあわせて行った。投与は子宮重量に影響しなかった E2： $10 \mu\text{g}$ に加えて BPA：2mg, Res：0.5mg, Gen：10mg を混合しておこなった。

B-5. エストロゲンレセプター (ER) 結合試験

Zen および Zol 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 α または ER β と [^3H] E2 を一定量添加した溶液中に、E2、Zen あるいは Zol を 100nM から $100 \mu\text{M}$ 含む反応液を添加して室温で 2 時間反応させた。その後、ER 結合 [^3H] E2 をヒドロキシアパタイトにより遊離 [^3H] E2 と分離し、放射活性を測定し、その結果から Zen および Zol の ER α または ER β との結合親和性を算出して比較した。

C. 結果

C-1. 子宮肥大試験による E2 のエストロゲン活性

子宮肥大試験による E2 投与の結果を示す (図 1)。E2 は湿重量および乾重量ともに 100ng/kg/day の投与で対照群と比較して有意な子宮重量の増加が見られた。そして 1000 ng/kg/day 投与群では子宮重量が非投与群と比較して約 3 倍に増加した。

C-2. 子宮肥大試験による DES のエ

ストロゲン活性

DES は E2 と同様に 100ng/kg/day 以上の投与で対照群と比較して有意な子宮重量の増加が見られた。(図 2)。

C-3. E2 と DES のエストロゲン活性の比較

E2 と DES の子宮重量を比較した結果、図 3 に示すように、子宮重量の増加が見られた濃度や重量の増加率のいずれについても両者は同様のエストロゲン活性を有することが判明した。

C-4. 子宮肥大試験による BPA のエストロゲン活性

BPA の投与では湿重量は 2 mg/kg/day 投与まではコントロール群と差が見られなかったが、10mg/kg/day 投与群で若干の増加がみられ、50mg/kg/day 以上の投与では約 1.2~1.3 倍と有意に増加していた(図 4)。しかし、E2 ほどの増加効果はなかった。

C-5. 子宮肥大試験による Res のエストロゲン活性

子宮の湿重量は Res の 0.5 mg/kg/day 投与までは増加しなかったが、2 mg/kg/day 群では増加傾向を示し、10mg/kg/day 投与群では有意に増加していた(図 5)。しかし、BPA と同様に E2 ほどの増加効果はなかった。また、乾重量は 2 mg/kg/day および 10mg/kg/day の投与で有意な増加が見られた。一方、50mg/kg/day 以上の投与では 10mg/kg/day 投与よりも子宮重量の増加が少なく、有意な差もなかった。

C-6. 子宮肥大試験による Gen のエ

ストロゲン活性

Gen は 50mg/kg/day 投与群で有意な子宮重量の増加が見られた(図 6)。また、Res と同様に 100mg/kg/day 投与群では子宮重量の増加に有意差がなくなった。

C-7. E2 と BPA、Res および Gen のエストロゲン活性の比較

BPA、Res および Gen の 3 種類の内分泌かく乱物質と E2 とのエストロゲン活性を比較した結果を図 7 に示す。子宮の乾重量で比較した結果、

各物質のエストロゲン活性は DES および E2 と比較して非常に弱く、BPA で約 1/10 万、Res で約 1/5 万、Gen は約 1/50 万以下であることが示唆され、3 種のうちでは Res が最も高く、Gen はその作用がもっとも弱いことが判明した。また、子宮重量の増加量に関してもこれらの物質は E2 や DES に比べるとその作用が弱いことが示唆された。さらに、Res と Gen は高濃度投与での子宮重量増加の抑制が見られた。

C-8. 低濃度のエストロゲンと環境ホルモン物質の組み合わせ投与

前述の結果をもとにして、体内のエストロゲンと環境ホルモン物質の相関を調べることを目的として、DES を除く 3 種の各物質とエストロゲンを子宮重量に影響しなかった濃度で組み合わせ投与する実験を行った。その結果、子宮重量、特に乾重量は E2 と Res の組み合わせで有意な増加が見られ、Gen でも同様の傾向が生じることが明らかとなった(図 8)。

C-9. 子宮の組織学的比較

子宮の組織学的比較を行った結果、各物質の投与によって子宮重量が有意に増加した投与群で子宮内膜上皮細胞やその他の間質細胞層や筋細胞層の増殖と肥厚が観察されたが、特に群間の相違は見られなかった。

C-10. 子宮肥大試験による Zen および Zol のエストロゲン活性の比較

Zol と Zen のエストロゲン活性を、マウスを用いた子宮肥大試験によって比較した結果、Zol は Zen と比べてより低濃度で子宮重量を増加させる作用を有することが判明した (図 9 および図 10)。Zol と Zen の活性を E2 と比較すると Zol で 1/5000、Zen では 1/2 万で、Zol は本研究で調査した 6 種類の環境ホルモン物質の中では DES に次ぐ高いエストロゲン活性を示した。

C-10. ER 結合試験による Zen および Zol のエストロゲン活性の比較

Zen および Zol 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。その結果、Zol はエストロゲンレセプターへの結合活性が Zen よりも強いことが判明した (図 11)。また ER β への結合親和性は両者に差がなかったが、ER α への結合親和性は Zen より Zol のほうが高いことが明らかとなった (表 1)。

D. 考察

D-1. 子宮肥大試験による E2 および DES のエストロゲン活性

これまでのマウスを用いた子宮肥大試験で、20ng/kg/day の投与では差が見られなかったものの 200ng/kg/day 以上の投与によって子宮重量の有意な増加が観

察されたと報告されており (Andriana, D. *et al.*, Toxic. Sci., 56, 332-339, 2000)、本研究の結果も同様の結果を示したことから、過去の実験結果に再現性のあることが明らかになるとともに、本研究の方法に問題がないことが確認された。

人工エストロゲンである DES は E2 よりもエストロゲン活性が高いとされているが、本研究の結果から、マウスを用いた子宮肥大試験ではそのエストロゲン活性が同じであることが示唆された。

D-2. 子宮肥大試験による BPA、Res および Gen のエストロゲン活性

BPA はラットを用いた子宮肥大試験の結果では 50mg/kg/day の投与によって乾重量が有意に増加し、湿重量も 100mg/kg/day で有意な増加が見られたことが報告されている (Kim, H. S. *et al.* J. Toxic. Sci., 26, 111-118, 2001)。また、過去のマウスを用いた研究では、40mg/kg/day 以上の投与で湿重量の有意な増加が見られた (Andriana, D. *et al.*, Toxic. Sci., 56, 332-339, 2000)。本研究の結果では、50mg/kg/day 以上の投与で子宮重量が有意に増加しており、過去のマウスでの結果と一致するとともに、BPA の子宮に対するエストロゲン活性はマウスとラットでほぼ同じであることが判明した。

未成熟ラットを用いた子宮肥大試験において、Res は 575 mg/kg/day の投与でも子宮の湿重量および乾重量ともに有意な増加が見られなかったことが報告されている (Freyberger, A. *et al.* Arch. Toxicol., 709-715, 2001)。しかし、本研究では子宮乾重量は 2 mg/kg/day 投与

群でも有意な増加が見られた。実験方法やマウスとラットという種の違いがあるものの、他の環境ホルモン物質では本研究の結果は過去の結果とほぼ同様の結果が得られている。そのため、このような Res での結果の相違を解明するために、さらに詳細な検討を行う必要があると思われた。

本研究では Gen は 50mg/kg/day の投与で有意な子宮重量の増加が見られた。未成熟ラットを用いた子宮肥大試験では 20mg/kg/day の投与で子宮乾重量が有意に増加し (Yamazaki, K. *et al.*, *Toxicology*, 170, 21-30, 2002)、また、未成熟マウスを用いた子宮肥大試験による結果でも 100mg/kg/day の投与で有意な子宮重量の増加が見られ (Jefferson, W. N. *et al.*, *J. Chromatography*, 777, 179-189, 2002)、本研究とほぼ同様の結果が報告されている。

植物エストロゲンである Res では 50mg/kg/day 以上の、Gen では 100mg/kg/day 以上の高濃度投与で子宮重量増加の抑制が見られた。この理由は明らかでないが、植物エストロゲンのエストロゲン作用が他の環境ホルモン物質と異なる機構によって起きている可能性があるとともに、発癌抑制などの作用に関係している可能性も考えられる。

D-3. 低濃度のエストロゲンと環境ホルモン物質の組み合わせ投与

子宮重量に影響しなかった低濃度の組み合わせ投与実験の結果、BPA は子宮重量がまったく変化しなかったのに対して、子宮乾重量は E2 と Res の組み合わせで有意に増加し、Gen でも同様の傾向が見られた。この結果は植物エストロゲンが

他の環境ホルモン物質よりも体内の E2 とより強く相乗的に作用する活性を持つ可能性を示している。これまで、子宮肥大法を用いたこのような低用量の複合作用の検討は行われていなかった。生体における環境ホルモン物質の影響は体内で産生・分泌されているエストロゲンとの複合作用によって生じることから、本研究で得られた組み合わせ投与による相乗作用の結果は今後環境ホルモン物質の生体への影響を検討する上で特に詳細な検討を要することを示唆している。

以上のように、本研究の結果を過去の子宮肥大法の結果と比較したところ、マウスを用いた子宮肥大試験法はラットを用いた試験と同様に多くの環境ホルモン物質のエストロゲン活性を比較する手段として有効である可能性が示唆された。

本研究の結果を基にしてマウスを用いて種々の内分泌かく乱化学物質の影響をさらに比較することで、より詳細な内分泌かく乱化学物質の研究が進展することを期待する。

D-4. 体内および体外における Zen と Zol のエストロゲン活性の比較

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

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

E. 結論

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だった。BPA、Res および Gen のエストロゲン活性は E2 と比較すると非常に弱く、BPA で約 1/10 万、Res で約 1/5 万、Gen は約 1/50 万以下であることが示唆された。また、Res および Gen は単独でエストロゲン活性が見られない濃度でも、同様の濃度の E2 と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。さらに、子宮肥大試験を用いて Zol と Zen のエストロゲン活性を調べた結果、E2 と比較すると、それぞれの活性は、Zol では 1/5000、Zen では 1/2 万で、子宮肥大試験を用いて本研究で検討したすべての環境ホルモン物質のエストロゲン活性は DES>Zol>Zen>Res>BPA>Gen の順となった。

また、Zen とその代謝物質である Zol のエストロゲンレセプターに対する結合親和性を比較した結果、Zol のほうが Zen よりもその活性が高く、また、ER α への親和性が強いことが明らかとなった。

研究課題2：自己免疫病発症に対する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研究

A. 研究目的

自己免疫現象とは、抗体またはT細胞が自己の組織や細胞を抗原と認識し反応する現象である。この結果引き起こされるのが自己免疫病であり、種々の全身性あるいは臓器特異的疾患が起きることが知られている難病である。自己免疫病罹患率は女性のほうが圧倒的に高く、自己免疫病の1つである全身性エリテマトーデス（SLE）の罹患率は女性：男性＝10：1である。この原因として、自己免疫疾患の発症や発症後の悪性進展にエストロゲンやプロラクチンなどの雌性ホルモン、特にエストロゲンが関与していることが明らかになっている。エストロゲンは雌の生殖器官の発達や機能維持に最も重要なステロイドホルモンであるが、IFN- γ 、IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10などのサイトカイン産生の促進やT細胞の増殖と機能の抑制など、免疫機能にも影響を及ぼしていることが判明している。

一方、近年の研究で、人工的に製造される化学物質のうち、数%が内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン物質）の疑いがあることが報告されている。そのうち、耐熱プラスチックの原料の一部に使われているBPAは、高温条件下での使用の際の溶出によってヒトに直接暴露されている。これまでの研究で、BPAを含有した飼料を投与されたラットの分娩回数の減少やエストロゲン反応性のヒト乳癌細胞の増殖作用など、BPAがエストロゲン様活性を有する内分泌攪乱物質であること

が明らかになっている。そのため、ヒトを含めた動物、特に雌の繁殖に対する影響が懸念されている。

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

そこで、本研究では、研究課題2として、E2、BPA、Gen、ResおよびZolを自己免疫病モデルマウスに1ヶ月齢から2ヶ月間または3ヶ月間投与して、自己免疫病の発症開始あるいは発症後の悪性進展に対する影響を詳細に検討した。

B. 材料および方法

1. 実験動物および飼育条件

実験動物は本大学の飼育室において、兄妹交配により繁殖・維持されているMRL-*lpr^{fs}*/*lpr^{fs}*マウス（MRL-*lpr^{fs}*マウス）を用いて実験を行った。MRL-*lpr^{fs}*マウスは第19染色体上に*lpr^{fs}*劣性遺伝子を持つ突然変異体で、*Fas*遺伝子および*Fas*抗原遺伝子の異常のために、本来

胸腺でアポトーシスにより除去されるはずの自己反応性 T 細胞が末梢に現れるという特徴を有する。そして、このような異常が原因となって、全身性リンパ節腫脹や腎炎などの重篤な自己免疫症状が起き、最終的には死に至る。実験に使用したすべてのマウスは温度 24±1℃、湿度 50±10%で、照明は 14 時間明期、10 時間暗期 (6:00 点灯、20:00 消灯) の光周期の環境下で飼育した。

2、飼料

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

3、投与実験

各環境ホルモン物質の投与量は、E2、BPA および Gen は平成 15 年度の本研究事業の中で行った結果をもとにして、より影響が高かった投与量を投与した。また、Res は平成 14 年度の研究結果で、Zol は子宮肥大試験による実験結果で、子宮重量が有意に増加した濃度をもとにして、投与量を決めた。各投与物質はオリーブ油に溶かして背部皮下に投与し、コントロール群にはオリーブ油のみを投与した。各物質の詳細および投与量は以下の通りである。

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

投与量 : 10 μ g/kg

(2) Bisphenol A (4,4-Isopropyl-Idenediphenol ; BPA)

投与量 : 3mg/kg および 10mg/kg

(3) Genistein (4,5,7-Trihydroxy-

isoflavone ; Gen)

投与量 : 15mg/kg および 50mg/kg

(4) Zeranol (α -Zearalanol ; Zol)

投与量 : 0.5mg/kg

(5) Resveratrol (3,4,5-trihydroxy-trans-stilbene ; Res)

投与量 : 10mg/kg

4、実験方法

(1) 投与実験および生存率調査

1 ヶ月齢の MRL-*lpr*^{fg} マウスを雄雌に分け、それぞれをさらに Control 群・E2 投与群・BPA 投与群・Gen 投与群に分けた。また、同様に、別の Control 群、Res 投与群および Zol 投与群を作成した。そして、各投与物質を週 2 回 (原則として火曜日と金曜日)、皮下投与した。自己免疫病の発症が始まる 3 ヶ月齢 (投与開始後 2 ヶ月目) まで、あるいは悪性進展による死亡が始まる 4 ヶ月齢まで 3 ヶ月間投与した。2 ヶ月間投与実験の雄は各投与群とも 15 匹ずつ、雌は 12 匹ずつのマウスを、3 ヶ月間投与実験では各投与群とも雌雄 10 匹ずつのマウスを用いて投与を行った。投与実験終了後、体重測定、尿中タンパク量と皮膚炎の検査および解剖を行った。生存率は各投与群ともに 1 ヶ月齢の雌雄 10 匹のマウスを用いて 7 ヶ月齢 (210 日齢) まで同様の投与実験を行い、それまでの生存率を調べた。

(2) タンパク尿症の検査

マウスから新鮮な尿検体を採取し、エームス尿検査試験紙 (Albustix、三共) を用いて尿中タンパク量の判定を行った。判定は -、±、+、++、+++ および++++の 6 段階に分け、- は陰性、±

は 0mg/dl 以上、+は 30mg/dl 以上、++は 100mg/dl 以上、+++は 300mg/dl 以上、++++は 1000mg/dl 以上とし、++以上に判定されたマウスをタンパク尿症とした。

(3) 皮膚炎の検査

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

(4) 体重および臓器重量の測定

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

(5) 腎臓の組織学的観察

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

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

血管炎…0：正常。1：1、2 ヶ所で血

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

(6) ELISA 法による血清中免疫複合体量の測定

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

(7) ELISA 法による血清中抗 DNA 抗体量の測定

50 μ g/ml の POLY-L-LYSINE/PBS を各ウェルに 50 μ l 加えて室温で 2 時間インキュベートした後、10 μ g/ml のウシ胸腺を各ウェルに 50 μ l 加え、37°C で一晚インキュベートして固相した。ブロッキング処理後、1% BSA, 5 mM EDTA/0.05% Tween20/PBS で希釈 (IgM 測定時は 1000 倍、IgG 測定時は 20 倍) しておいたマウス血清またはスタンダードを 50 μ l ずつ添加して室温で 2 時間インキュベートした。そして、二次抗体として、ビオチン化抗マウス Ig (IgM または IgG) 抗体を添加して室温で 1 時間インキュベートし、その後、HRP-Streptavidin を各ウェルに 100 μ l 加え、室温で 30 分間インキュベートした。最後に、o-phenylenediamine + H₂O₂ 発色溶液を各ウェルに 100 μ l 加えて室温で発色させ、2N 硫酸を各ウェルに 50 μ l 加えて反応

を停止させた後、マイクロプレートリーダー（波長 485nm）を用いて測定した。

(8)ELISA 法による血清中 IFN- γ 量の測定

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

(9)統計学的処理

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

(10)倫理面への配慮

マウスを用いた実験は静岡大学農学部動物実験に関する指針（平成 2 年 2 月 15 日制定）に基づいて適切に行った。

C. 結果

1、2ヶ月間の E2、BPA および Gen 投与による自己免疫病発症開始への影響

(1)体重、臓器重量および腹腔内リンパ節と皮下リンパ節の比較

雌雄ともに、体重、生殖器官に差は見られなかった（図 12、図 13）。また、脾臓、腎臓の重量にも差は見られなかったが、BPA (3mg/kg) 投与群におけるリンパ節重量は雌雄ともに増加傾向が見られ、雄の BPA (3mg/kg) 投与群における皮下リンパ節重量は有意に増加していた（図 14）。

(2)タンパク尿症発症率

重度のタンパク尿症を示す++以上のマウスの割合は、雌では Control 群が 25% だったのに対し、E2 投与群と BPA (3mg/kg) 投与群では 64%、BPA (10mg/kg) 投与群と Gen (50mg/kg) 投与群では 50%と増加していた。また、Gen (15mg/kg) 投与群では 10%で、減少傾向していた。雄では、Control 群が 27% に対し、BPA 投与群で 3mg/kg が 47%、10mg/kg で 10%と、低濃度では増加、高濃度では減少していた（図 15）。

(3)皮膚炎

皮膚炎は個体差が大きく、有意差は見られなかったものの、雄では Control 群と比べて E2 投与群で皮膚炎の発症程度が顕著に高かった。雌では E2 投与マウスは皮膚炎がまったく見られず、Gen (50mg/kg) 投与群は Control 群と比べて発症程度が高い傾向が見られた（図 16）。

(4)腎臓の組織病理学的分析

糸球体腎炎は雄の BPA (3mg/kg) 投与群で有意な軽減が見られたが、その他では明白な差はなかった（図 17）。血管炎は、雄の Gen (15mg/kg) 投与群で有意に悪化、雌の Gen (15mg/kg) 投与群でも悪化の傾向が見られた（図 18）。また、腎変性を調べた結果、腎変性の罹患率は雌雄ともに Gen (15mg/kg) 投与群で明らかに高かった（図 19）。しかし、雌 Gen (50mg/kg) 投与群では腎変性がまったく見られず、雄でも Gen (50mg/kg) 投与群でも 20%と非常に低い罹患率であった。

(5)免疫複合体量

雄では明白な差はなかったが、雌では

Gen (3 mg/kg) 投与群で有意に減少した (図 20)。

(6) 抗 DNA 抗体量

血中 IgG 抗 DNA 抗体量は、雌の BPA (10mg/kg) 投与群および Gen (50mg/kg) 投与群では Control 群と比較して有意に低下していた (図 21)。雌雄ともその他の投与群に差は見られなかった (図 21、図 22)。血中 IgM 抗 DNA 抗体量は、雄の Gen (50mg/kg) 投与群のみ有意に上昇していた (図 23、図 24)。

(7) 血中 IFN - γ 量

雌の Gen (15mg/kg) 投与群と、雄の E2 投与群で有意な減少が見られた (図 25)。

(8) 生存率

血清学的指標および腎炎発症において悪性進展が顕著だった BPA (3mg/kg) 投与群と Gen (15mg/kg) 投与群については新たに投与群を作成して、生存率を調べた。その結果、雄はいずれの投与群でも生存率に差が見られなかった。しかし、雌では 210 日目の生存率が Control 群では 60% だったのに対し、E2 投与群は 10%、BPA (3mg/kg) 投与群は 40% で、Gen (15mg/kg) 投与群では 159 日目にすべてのマウスが死亡し、生存率の有意な低下が見られた (図 26)。また、生後 210 日目までの平均生存日数は、Control 群では 183 日だったが、BPA (3mg/kg) 投与群では 166 日、E2 投与群では 158 日、Gen (15mg/kg) 投与群では 141 日と、各投与群とも Control 群と比較して平均生存日数が短かった。

2、3ヶ月間の E2、BPA および Gen 投与による自己免疫病発症および悪性進展への影響

(1) 体重、臓器重量および腹腔内リンパ節と皮下リンパ節の比較

いずれの投与群も、雌雄の体重および雄の臓器重量への影響は見られなかった (図 27 および図 28)。雌では Gen 投与群におけるリンパ節重量と子宮重量に増加傾向が見られた (図 29)。

(2) タンパク尿症発症率

重度のタンパク尿症を示す ++ 以上のマウスの割合は、雌では Control 群が 40% だったのに対し、各投与群はいずれも 70% 以上の罹患率を示し、各投与によってタンパク尿症が増悪することが示された (図 30)。雄では、Control 群に高い罹患率をみたが、Gen 投与群では Control 群と比べて罹患率が若干低下していた。

(3) 皮膚炎

皮膚炎は個体差が大きく、有意差は見られなかったものの、雄では Control 群と比べて各投与群で皮膚炎の発症程度が高い傾向が見られた (図 31)。

(4) 腎臓の組織病理学的分析

糸球体腎炎は各投与群で明白な差はなかった (図 32)。血管炎は、雌の各投与群でも悪化している傾向が見られた (図 33)。

(5) 免疫複合体量

雄の E2 投与群が Control 群よりも有意に高かったが、その他の投与群では差が見られなかった (図 34)。

(6) 抗 DNA 抗体量

IgG 抗 DNA 抗体量はいずれの投与群にも変化が見られなかったが、IgM 抗 DNA 抗体量は、雌 Gen 投与群が Control 群と比べて有意に高かった (図 35)。

(7) 血中 IFN - γ 量

いずれの投与でも、血中 IFN - γ 量に影響は見られなかった (図 36)。

3、3ヶ月間の Res および Zol 投与による自己免疫病発症および悪性進展への影響

(1) 体重および臓器重量

各投与群の体重および脾臓重量には有意な差が見られなかった (図 37)。臓器重量の結果は図 38 に示した。各投与群の脾臓重量には有意な差が見られなかった。腎臓重量は雌ではいずれの投与でも差が見られなかったが、雄では Res 投与によって腎臓重量が有意に増加した。また、Res 投与マウスでは、摘出した腎臓の中に、目視で変性していることがわかるものも確認された。リンパ節重量は、Res 投与群では、雄の皮下リンパ節重量が有意に増加し、腹腔内リンパ節は雌雄ともに有意差はないものの顕著に増加していた。また、Zol 投与群では雄の皮下リンパ節重量が増加する傾向が見られたが、その他は対照群と差がなかった。子宮、卵巣および精巣重量は各投与による影響は見られなかった。

(2) タンパク尿症

Res、Zol いずれの投与群でも、投与終了時のタンパク尿症罹患率が雄雌ともに対照群と比較して顕著に高かった (図

39)。特に、雌の Zol 投与群の罹患率は対照群の 2 倍以上の 90%と、非常に高かった。

(3) 皮膚炎

雄では、Control 群は低値であったが、Control 群と比べて各投与群で皮膚炎の発症程度が高く、特に Zol 投与群では Control 群と比較して有意な症状の悪化が見られた (図 40)。

(4) 腎臓の組織病理学的分析

糸球体腎炎は雌の Res 投与群で有意な低下が見られたが、各投与群で明白な差はなかった (図 41)。血管炎は、いずれの投与群でも Control 群と差が見られなかった (図 42)。

(5) 免疫複合体量

雌の Res 投与群が Control 群よりも有意に低かったが、その他の投与群では差が見られなかった (図 43)。

(6) 抗 DNA 抗体量

IgG 抗 DNA 抗体量はいずれの投与群にも変化が見られなかったが、IgM 抗 DNA 抗体量は、雄の Zol 投与群が Control 群と比べて有意に高かった (図 44)。

(7) 血中 IFN - γ 量

いずれの投与でも、血中 IFN - γ 量に影響は見られなかった (図 45)。

(8) 生存率

投与開始 6ヶ月目において、各投与群の生存率に有意な差は見られなかったが、雌では両物質の投与群の生存率が低下する傾向が見られた。また、雄の Zol 投与