

図36 自己免疫病マウスの血中IFN- $\gamma$ 量に対する Estrogen、Bisphenol AおよびGenisteinの影響(2)

Con:Control Est:Estrogen BPA:Bisphenol A Gen:Genistein

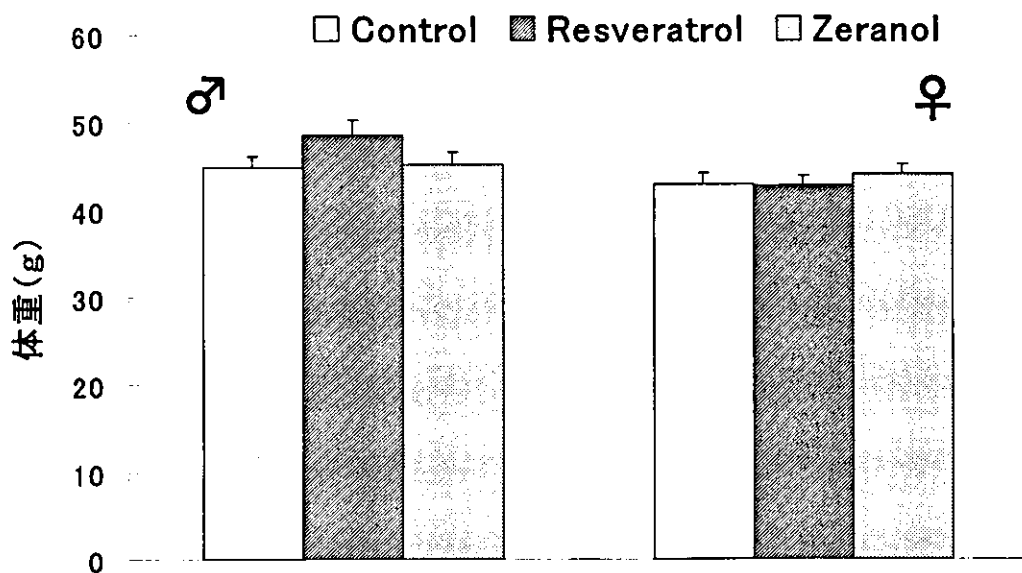
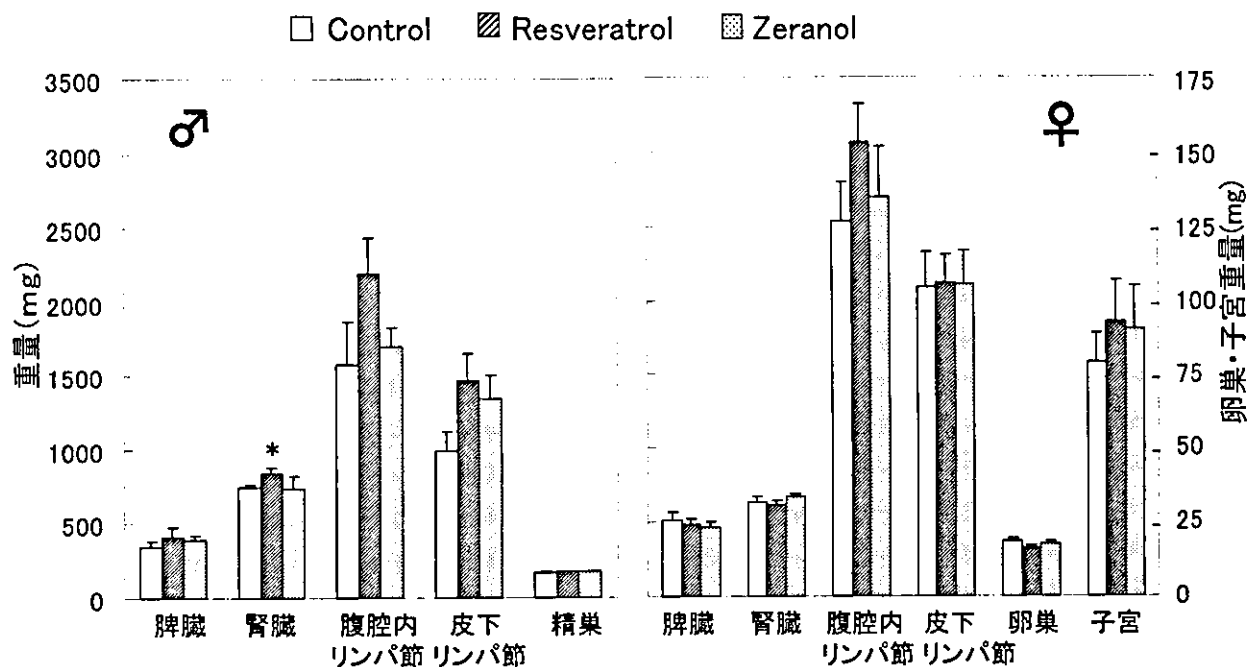
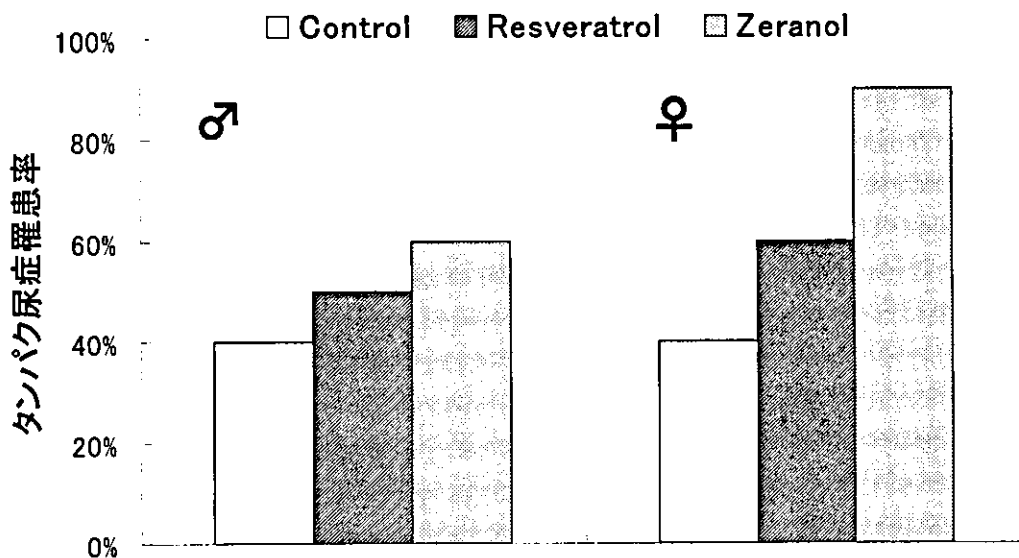


図37 自己免疫病マウスの体重に対する ResveratrolおよびZeranolの影響



**図38 自己免疫病マウスの臓器重量に対するResveratrolおよびZeranolの影響**

\* : Control群に対して有意差あり ( $P < 0.05$ )



**図39 自己免疫病マウスのタンパク尿症に対するResveratrolおよびZeranolの影響**

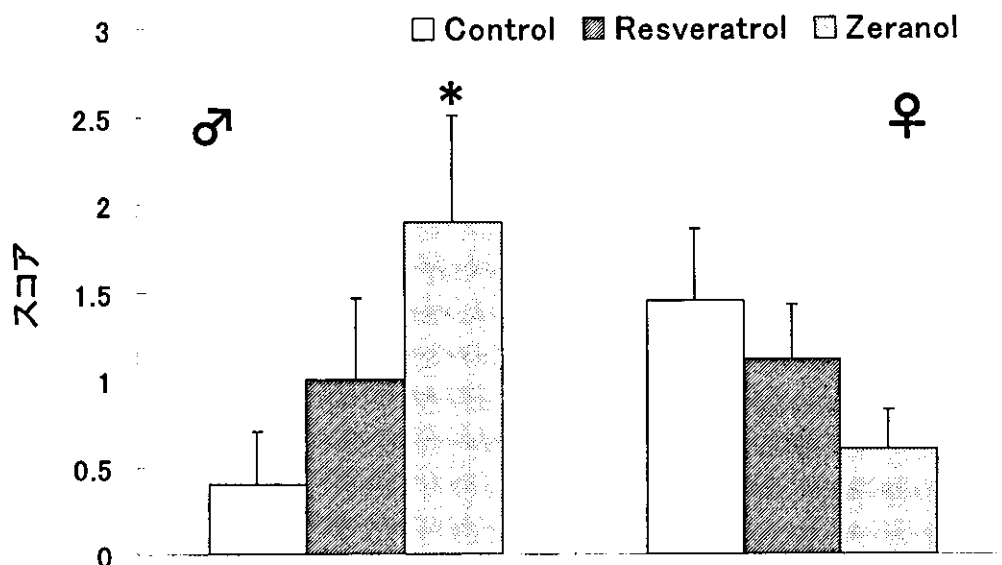


図40 自己免疫病マウスの皮膚炎に対する ResveratrolおよびZeranolの影響

\* : Control群に対して有意差あり( $P < 0.05$ )

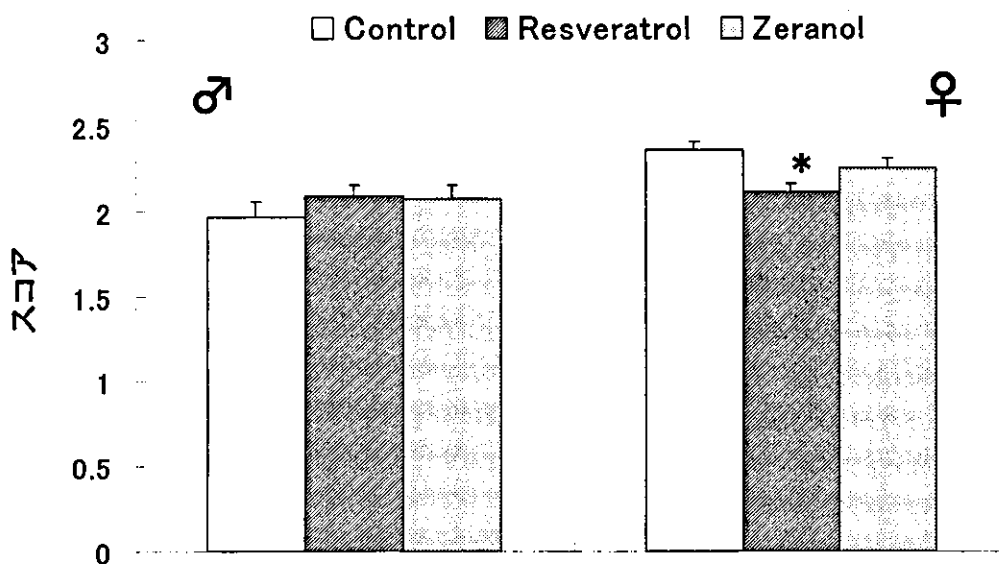


図41 自己免疫病マウスの糸球体腎炎発症に対する ResveratrolおよびZeranolの影響

\* : Control群に対して有意差あり( $P < 0.05$ )

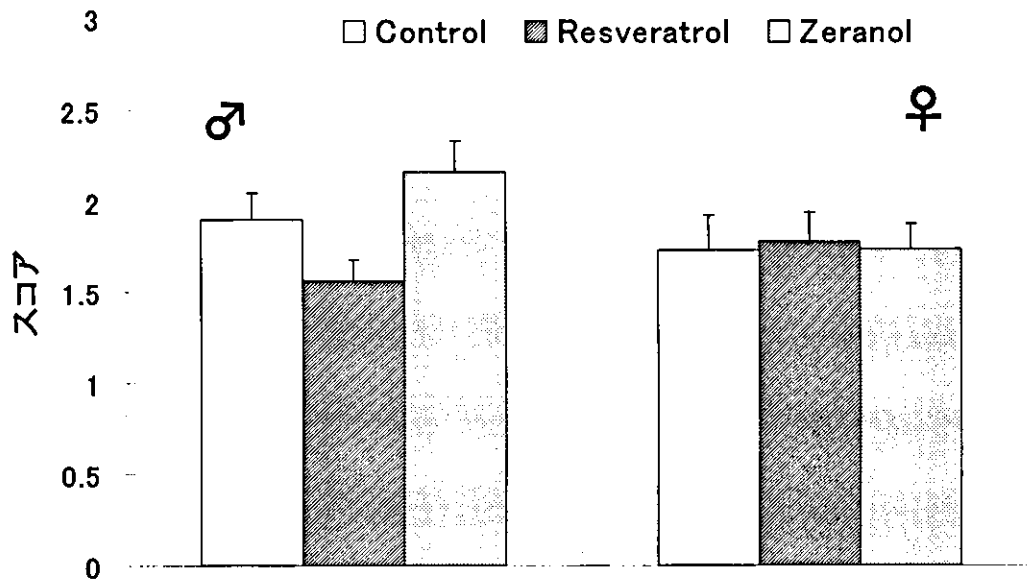


図42 自己免疫病マウスの腎臓血管炎に対するResveratrolおよびZeranolの影響

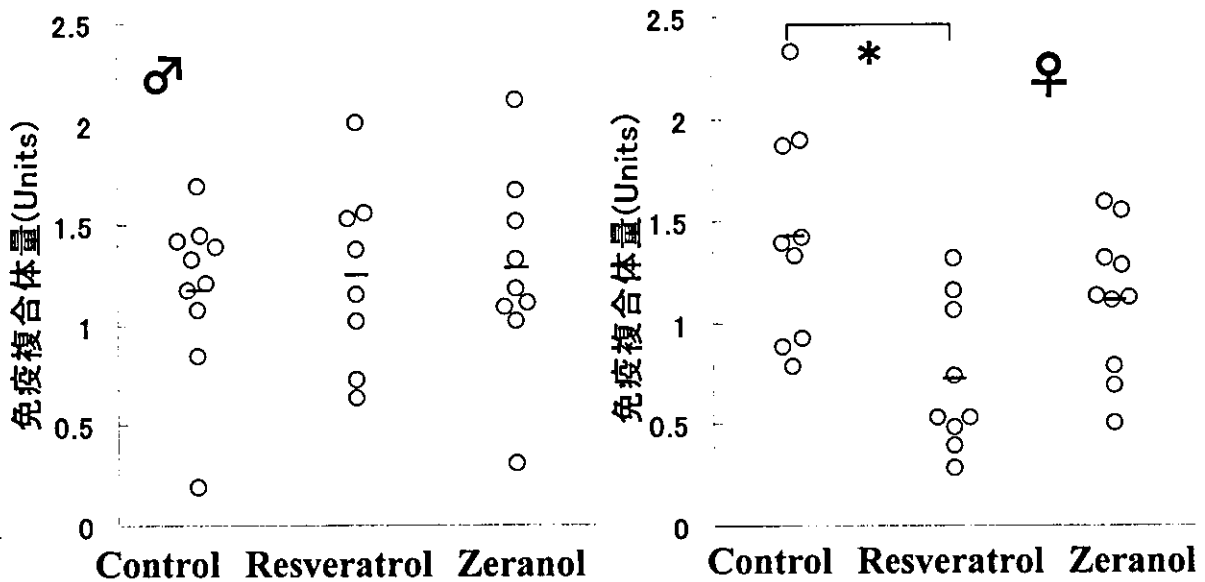


図43 自己免疫病マウスの血中免疫複合体量に対するResveratrolおよびZeranolの影響

\* : Control群に対して有意差あり( $P < 0.05$ )

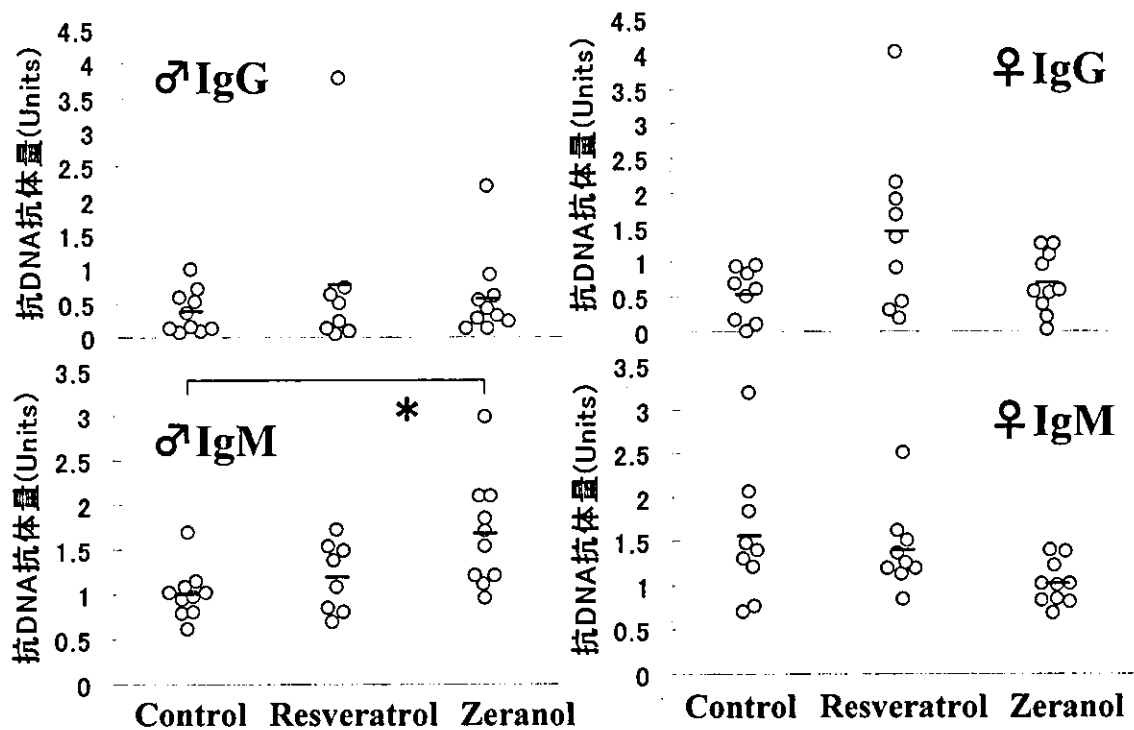


図44 自己免疫病マウスの血中抗DNA抗体量  
に対するResveratrolおよびZeranolの影響

\* : Control群に対して有意差あり ( $P < 0.05$ )

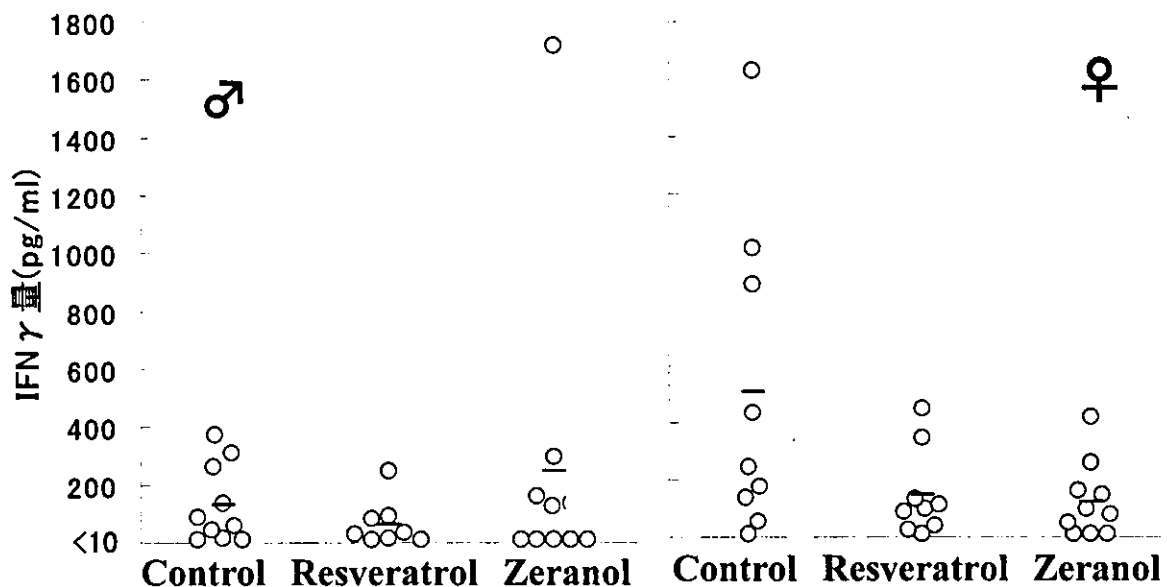
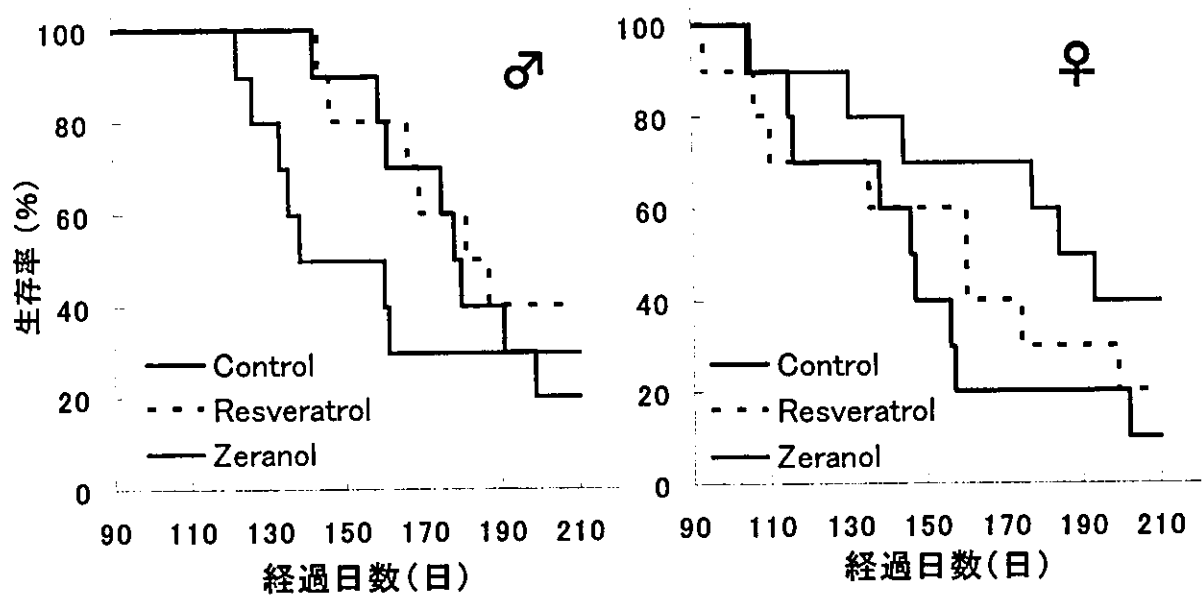


図45 自己免疫病マウスの血中IFN- $\gamma$ 量に  
に対するResveratrolおよびZeranolの影響



**図46 自己免疫病マウスの生存率に対する ResveratrolおよびZeranol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

我が国において日常遭遇する農薬における環境ホルモンの検討

分担研究者	西山利正	関西医科大学公衆衛生学講座	教授
研究協力者	眞鍋真理	関西医科大学公衆衛生学講座	大学院生
	小嶋美穂子	関西医科大学公衆衛生学講座	研究員
	福永健治	関西医科大学公衆衛生学講座	非常勤講師
	神田靖士	関西医科大学公衆衛生学講座	講師
	堀伸二郎	関西医科大学公衆衛生学講座	非常勤講師

研究要旨

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

その結果、農薬に存在する環境ホルモン様作用のさらなる検討を行うため我々はラット下垂体腫瘍由来の細胞である MtT/Se 細胞を用いた細胞増殖試験によるエストロゲン様作用測定系を確立した。MtT/Se 細胞の分子機構について検討すると内因性のエストロゲン受容体を持ち mRNA レベルでのエストロゲンレセプター（ER）の発現割合は、ER $\alpha$ （78%）および ER $\beta$ （22%）と ER $\alpha$  優位である結果となった。これより MtT/Se 細胞を用いたエストロゲン様作用の測定系は、主として ER $\alpha$  を介するものであり ER $\alpha$  の活性を検出していると推測した。実際に各種農薬をこの細胞に添加し、農薬のエストロン様作用の測定及び増強効果について検討を行った。検討した農薬は、果物や野菜に通常使用される有機リン系殺虫剤、有機リン系昆虫生育抑制剤、防かび剤に分類される食品

に関連した化学物質であり、測定した全ての農薬にエストロゲン様作用が検出された。さらに、エストロゲン様作用のもつ農薬で農作物中に存在する検出頻度の高い2種類を組み合わせると、エストロゲン様作用のさらなる増強が確認された。

検出頻度の高い農薬のエストロゲン様作用および抗エストロゲン様作用のさらに詳細な検討を行うためヒト卵巣ガン細胞のERを用いた高感度エストロゲン活性測定法であるE-CALUX Assayで評価した。被検農薬は滋賀県内で過去に検出された(ピレスロイド系農薬8種、有機塩素系農薬3種、有機リン系農薬7種、その他14種)計32種類でありうち5種類の農薬にエストロゲン様作用が認められた。また、エストロゲン様作用の認められた農薬を組み合わせるとエストロゲン活性を測定したところ単独の場合より活性が高くなった。

これらの結果より、我々が使用した2種類の細胞を用いて農薬における環境ホルモン作用を検討したところ両方の細胞を用いた測定系でエストロゲン様作用の検出が確認された。また、これらを混合することでエストロゲン様作用が増強することが証明された。複数の内分泌攪乱物質の複合効果による活性の増強作用に関する研究は極めて重要であり、今後も推進すべき課題であると考え

## I. 輸入果実に使用されている防カビ剤の実際

### A. 研究目的

食品あるいは容器、包装資材由来で内分泌攪乱活性が確認されているものは一部のフェノール類であり、フェノール類すべてが活性を有するわけではない。しかし、微量でも複数の内分泌攪乱物質を摂取した場合、生体内で代謝され、相乗的に作用し、内分泌攪乱活性がどのように修飾されるかは未知である。また、OPPは環境ホルモンとしての疑いがあるとされ、書籍、

テレビ番組、インターネットなど各種メディアを通して科学的根拠、実証が無いままに危険視され、市民の食生活に対する不安を煽っている。したがってOPPをはじめとする防カビ剤使用の実体を把握しておくことは、非常に重要である。そこで本研究では、市場に流通する柑橘系果物を対象に実際の使用状況を把握することを目的に調査、分析を行った。

### B. 研究方法

分析対象試料

大阪市、守口市、京都市および京都府



久御山町のスーパーマーケットで購入したレモン (8 商品)、オレンジ (8 商品)、グレープフルーツ (4 商品) の 3 種、16 品を対象とした。OPP (オルトフェニルフェノール)、DP (ジフェニール)、TBZ (チアベンダゾール) の 3 項目について、外果皮と果肉に分けて行った。定量は、蛍光検出逆高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて行った<sup>1,2)</sup>。以下に HPLC に供する分析試料調製法を示す<sup>3,4)</sup>。

試料 20g

+ 酢酸ナトリウム 2g+ 無水硫酸ナトリウム 30g

ブレンダーでホモジネート

↓

+ 酢酸エチル 80ml

密栓をして冷暗所で一晩放置

↓

遠心分離 (200rpm, 5min)

上層を分取①

↓

下層に酢酸エチル 80ml を加え攪拌後、遠心分離 (200rpm, 5min)

上層を分取②

↓

上層①、②を合一して 1-ブタノール

1ml を加え減圧濃縮、HPLC 移動相を加え、全量を 20ml とし、0.45  $\mu$ m フィルターでろ過後 HPLC に供する。

次に HPLC 分析装置および条件を示す。

Pump : CCP  
multi pump (Tosoh)  
Fluorescence detector :  
(Ykogawa)  
Data processor : CR6A  
Chromatopac (Shimadzu)

Column : Inert  
Sil ODS80A (250  $\times$  4.6mm) (GL  
Sciences)  
Mobile phase :  
AcCN:H<sub>2</sub>O=7:3 (TFA, pH2.4)  
Flow rate : 1.0  
ml/min  
Temperature : Ambient  
Detection :  $\lambda$   
Ex=270nm,  $\lambda$  Em=330nm

### C. 結果

移動相を酸性にしないと TBZ の蛍光発光強度が低いいためトリフルオロ酢酸を添加し、pH を 2.4 に調整して用いた。その後の検討で、カラム内径が 2.1mm、充填剤粒子径 3  $\mu$ m のセミマイクロカラムを用い、移動相の水を 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH3.0 に変更するこ

とで検出限界を上記条件の約1/10にすることが可能であった。

上記条件で測定した標準品のクロマトグラム、オレンジおよびレモンを分析したクロマトグラムを図1および2に示す。

次にレモン(8商品)、オレンジ(8商品)、グレープフルーツ(4商品)の3種、16品を分析した結果を表1および2に示す。表1からわかる通り、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表3に示した基準値(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。

#### D. 考察

##### 1. 試料調製の問題点と分析対象部分について

柑橘類は有機酸、糖類を多量に含有するため、果実全体を分析対象とした場合、抽出操作時に酢酸エチル層へ相当量の有機酸、糖類が混入する。添加回収試験を行ったところ、定量分析に負に影響することが判明した。とくに検出限界付近では定量的検出が不可能に近く、分析精度に影響があると判断せざるを得なかった。また、試料の

固相抽出などによる前処理は有機酸、糖分の除去を可能とするが、煩雑な操作が必要であるためルーチン分析には不適切と考える。そこで果実を外果皮および果肉に分別して、定量したところ果肉にはOPP、TBZともに検出されなかったため、果肉を除いた部分、すなわち外果皮を試料とするのが適当と判断して定量分析を行った。

##### 2. 外果皮と果肉の分別定量

前述のように外果皮を除去し、残った部分を果肉としたとき、果肉にはいずれの防かび剤も残留しないことが判明した。外果皮と果肉は通常の可食部、すなわち皮をむいて残った部分を果肉とした。果肉にはいずれの防かび剤も残留しないことがわかった。外果皮については、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、オレンジについては最外皮にのみ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。オレンジについては最外皮のみから検出できた。

##### 3. 洗浄による防かび剤の除去効果

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）。これは、製造、加工条件によっては、マーマレードや果皮を用いた菓子類などに防カビ剤が混入することを示すものである。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。これは、直接柑橘類の果皮を摂取しなくても、紅茶にスライスレモンを入れたりすることで摂取することを示している。

以上の結果から、直ちに発癌に関与するような量の防カビ剤が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が、実際にこのように基準値以下ではあるが、防カビ剤が使用されていることから他に摂取している内分泌攪乱物質の影響をどのように修飾するかについては未知であり安全であるとは言えない。

#### E. 結論

輸入果実の全被験商品からではないが、防カビ剤として使用が許可されているフェノール系化合物であるオ

ルトフェニルフェノール（OPP）を検出した。果肉には存在しないが、外果皮に残留することが判明した。これは、外果皮を材料とする食品からOPPを摂取する可能性を示している。また、温水浸漬によりOPPの溶出をみたことは、調理法によってはヒトが摂取する可能性のあることを示している。フェノール系化合物は内分泌かく乱作用を示すものが多いので、速やかにOPPの内分泌かく乱作用の同定、さらに他の内分泌攪乱物質の影響を修飾する可能性について検討する予定である。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## II. 複数農薬共存下におけるエストロゲン様作用の複合影響に関する研究

### A. 研究目的

MtT/Se 細胞を用いてエストロゲンの存在下で細胞が増殖する特性を用いたエストロゲン活性の測定法は過去に報告されている<sup>5)</sup>。今回我々は、MtT/Se 細胞の増殖能を指標としてエストロゲン活性を測定する系を確立した。内分泌かく乱物質がエストロゲン様作用をもち、野性生物やヒトの生態系に影響を及ぼすという報告は多数ある<sup>6-7)</sup>。しかし、複合したエストロゲン様物質の存在によって内分泌かく乱作用が相乗作用についての報告はない。前回我々は、E-CALUX assay 法を用いて複数の農薬存在下におけるエストロゲン様作用増強作用について報告した<sup>8-9)</sup>。今回の研究では、農作物中に複数共存する農薬のエストロゲン様作用の増強を細胞増殖活性を指標として測定し、その増強効果の有無を検討することを目的とした。

### B. 研究方法

#### 材料

#### B.1 細胞

ラット下垂体腫瘍由来細胞株、MtT/Se は理研バイオソースセンターより供与された。

#### B.1-2 被験物質

ダイアジノン (0,0-diethyl,0-2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl phosphorothioate)、トリクロホスメチル (0-2,6-dichloro-p-tolyl0,0-dimethyl, phosphorothioate)、ピリプロキシフェン (4-phenoxyphenyl (RS)-2-(2-pyridyloxy) propyl ether) , プロチオホス ( (RS)-0,2,4-dichlorophenyl 0-ethyl S-propyl phosphorodithioate) , チアベンダゾール : TBZ(2-(thiazol-4-yl)benzimidazole)、オルトフェニルフェノール : OPP(o-phenylphenol (1,1'-Biphenyl-2-ol) 2-Biphenylol 2-Hydroxybiphenyl)は標準試薬(残留農薬試験用:和光純薬)、17β-Estradiol (生化学用:和光純薬)を用いた。タモキシフェン (trans-4-(1-(4-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl)-2-phenyl-1-butenyl)phenol:Sigma)を用いた。

#### 方法

#### B.2 細胞培養

細胞の継代用には 2.5% fetal bovine serum (FBS:Sigma)、10% horse serum (HS:Sigma)、10,000units/ml (Sigma)、10mg/ml の streptomycin (Sigma) に基本培地である Ham F12 と ダルベッコ改変イーグル液体培地/Ham F-12

培地(フェノールレッド添加)を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。細胞増殖試験用には、フェノールレッド除去した基本培地にチャコールデキストラン処理をしたFBS および HS を 10%加え同様に60-80%の増殖率となるように37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。また、実験に使用したディッシュ、プレート、ピペット等の器具は Nunc 社製を使用した。

### B. 3 RNA 抽出とRT PCR

RNAはTrizol reagent (Invitrogen) を用いて抽出し定量化した後、1 µg の TotalRNA はランダムプライマーと逆転写酵素 (Reverta Ace:東洋紡) を用いて42°C, 1時間でcDNAを合成した。0.5 µg のcDNAをテンプレートとし特異的プライマー ER-α(5'-AATTCTGACAATCGACGCCAG3', 5'-GTGCTTCAACATTCTCCCTCC-3'), ER-β(5'-TTCCCGGCAGCACCAGTAAC-3', 5'-TCCCTCTTGCGTTTGGACTA-3')を用いて増幅した。PCR反応は94°C 4分、94°C 30秒、61°C 30秒、72°C 1分、30サイクルで行った。PCR反応は i-Cycler (Bio-Rad)で行った。

### B. 4 Real time PCR

Real-Time PCR は、DyNAmo HS SYBR Green qPCR kit (MJ Research) を用

いて製品情報に基づいて行った。DNA テンプレート 10ng と上記記載の ER-α と ER-β それぞれのプライマー5 pmol を用いた。PCR 反応は95°C 15分、95°C 10秒、61°C 20秒、72°C 20秒を40サイクル行い Opticon2 (MJ Research)を用いて解析を行った。また、定量化するため内部標準として G3PDH を用いた。

### B. 5 免疫組織染色

細胞は 8well の chamber slide (parmanox : Nunc) 上に播種した。2日後、4%のパラホルムアルデヒド(和光純薬)を用いて固定した。5%の正常ヤギ血清を用いてブロッキングした後、モノクローナル抗体 (Santa cruz, D-12 1:100), rabbit anti-ERβ (Santa cruz, H-150, 1:100)を一次抗体として用いた。二次抗体として rhodamine-anti-mouse IgG (CHEMICON, 1:400) および FITC-anti-rabbit IgG (CHEMICON, 1:400) を使用した。細胞は共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview :Olympus) を用いて観察した。

### B. 6 細胞増殖試験

細胞増殖能を測定するためにWST-1 試薬 (和光純薬) を用いた。40mgの WST-1を11mlのPBSに溶解し、使用する直前に滅菌水に溶解した10mlの 1-Methoxy PMS1を混合してWST-1試薬

として用いた。96穴マイクロプレート (Nunc) に  $2 \times 10^4$  cell/ml に調整した細胞懸濁液を 100  $\mu$ l/well ずつ入れ、 $1 \times 10^{-10}$  から  $1 \times 10^{-5}$  M の終濃度となる測定農薬を加え 37°C、5% CO<sub>2</sub>・95% air インキュベーター内で 3 日間培養した。その後、WST-1 試薬を 10 ml/well ずつ加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 2 時間 incubate した後、マイクロプレートリーダー (BioRad) で、主波長 450 nm、副波長 650 nm の吸光度を測定した。さらに、MtT/Se 細胞の ER に対するアンタゴニストを測定するためタモキシフェンを用いた。タモキシフェンは、99.9% エタノールで溶解した。細胞への影響を考慮するためさらに DMSO で溶解し  $1 \times 10^{-6}$  から  $1 \times 10^{-13}$  M の濃度で細胞に添加した後、上記と同様に吸光度を測定した。

## B. 7 統計解析

17  $\beta$  エストラジールおよび農薬のエストロゲン様作用の結果は、SPSS の Man-Whitney (Version 12.0) の符号付き順位検定を用いて解析を行った。

## C. 研究結果

### C. 1 細胞の解析

MtT/Se 細胞を用いて RT-PCR を行い mRNA レベルでの ER  $\alpha$  および  $\beta$  の発現を調べると ER  $\alpha$  (344 bp) および ER  $\beta$  (262 bp) とともに ER の発現を確認するこ

とができた (図3)。次に、ER  $\alpha$  および ER  $\beta$  に対するプライマーを用いて Real time PCR を 3 回行った。ER  $\alpha$  のサイクル数は 21.1、21.7、23.3 および ER  $\beta$  は 25.1、25.6、26.2 であった。ER  $\alpha$  および  $\beta$  のサイクル数の平均値の差を算出すると 3.482 となった。これを 100% で換算すると ER  $\alpha$  および  $\beta$  の発現量の平均値は 78 : 22 となった (図4)。さらに、MtT/Se 細胞のタンパク質レベルでの ER  $\alpha$  および  $\beta$  の発現を確認するため免疫染色した。光学顕微鏡で観察できるように ER  $\alpha$  および  $\beta$  とともに核及び細胞質共に染まり両方のレセプターが同じ部位に局在していた (図5)。

### C. 2 MtT/Se 細胞を用いたエストロゲン活性の測定

MtT/Se 細胞に  $1 \times 10^{-12}$  M から  $1 \times 10^{-6}$  M の範囲で 17  $\beta$  エストラジオールを添加すると有意なエストロゲン活性が確認できた。それぞれのエストロゲン活性は  $1 \times 10^{-13}$  M のとき 0.958、 $1 \times 10^{-12}$  M のとき 1.011 (p 値 < 0.05)、 $1 \times 10^{-11}$  M のとき 1x1.084 (p 値 < 0.05)、 $1 \times 10^{-10}$  M のとき 1x1.34 (p 値 < 0.01)、 $10^{-9}$  M のとき 1.249 (p 値 < 0.01)、 $1 \times 10^{-8}$  M のとき 1.122、 $1 \times 10^{-7}$  M のとき 1.1 (p 値 < 0.05)、 $1 \times 10^{-6}$  M のとき 0.7 (p 値 < 0.01) となった (図6)。なお、 $1 \times 10^{-8}$  M の 17  $\beta$  エストラジオールを添加した際のエスト

ロゲン活性は、P値が0.08であった。

### C.3 タモキシフェンを用いた細胞阻害試験

17βエストラジオールをMtT/Seに添加したとき最も細胞増殖を示した濃度 ( $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ) とアンタゴニストであるタモキシフェンを細胞に添加し細胞増殖に及ぼす影響を検討した。タモキシフェンのみを添加すると細胞増殖作用はおこらなかった。化合物は最大増殖を示す濃度とし、タモキシフェンの濃度を変化させると、濃度依存的に細胞増殖の抑制がみられた (図7)。 $1 \times 10^{-8}$ のタモキシフェン添加時に、いずれもほぼ完全に増殖が抑制された (図7)。

これより、これらの化合物によるMtT/Se細胞を指標とした細胞増殖はERを介したエストロゲン作用である。

### C.4 農薬のエストロゲン様作用及びエストロゲン様作用の複合影響

MtT/Se細胞を用いたエストロゲン様作用の測定系を用いて実際に各種農薬を細胞に添加し、農薬のエストロン様作用の測定及び増強効果について検討を行った。このうち、エストロゲン様作用のあった有意差のあった最も低い濃度を検出限界としてまとめた (表4)。17βエストラジオールの検出限界濃度は $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 、有機リン系殺虫剤のプロチオホス及び昆虫生育

抑制剤のピリプロキシフェンは $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、そしてこれらを両方同時に添加した混合物は $1 \times 10^{-7} \text{M}$ であった。もう一つの有機リン系殺虫剤のダイアジノン $1 \times 10^{-5} \text{M}$  およびトリクロホスメチルは $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、これらの混合物では $1 \times 10^{-7} \text{M}$ となった。殺菌剤防かび剤のOPPとTBZの検出限界濃度は、それぞれ $1 \times 10^{-5} \text{M}$ であった。これらの混合物では、 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ となった (表4)。

### D. 考察

エストロゲンは女性の第2次性徴の発現を促すステロイドホルモンであり、エストロゲン受容体と結合する。エストロゲンによって誘発される生物反応は、その標的器官に存在するエストロゲン受容体によって介される。エストロゲン受容体にはERαおよび1996年にKuiperらが名付けたERβがある<sup>10-11)</sup>。この2種類のエストロゲン受容体は器官ごとの局在や発現量、リガンドとの結合能の違いにより異なる働きを示すことが報告されている<sup>12-13)</sup>。内分泌かく乱物質の作用のメカニズムは、本来ホルモンが結合すべきレセプターに環境中の化学物質が結合することによって、正常なホルモンと同じように働く場合と、逆にレセプターを活性化することをできずに正常な働きを阻害することがある。このように内分泌かく乱物質は、細胞膜レ

セプターを介して ER $\alpha$  および ER $\beta$  に結合して本来のホルモンと類似の作用をもたらすため核内レセプターとの関連性が注目されている。さらなるエストロゲン受容体を介したエストロゲン活性の生物学的解明について研究することは今後必要である。

我々は、MtT/Se 細胞のエストロゲン受容体の発現を解明するために RT-PCR を用いた。mRNA レベルでの ER $\alpha$  および ER $\beta$  の発現を確認すると、内因性のエストロゲン受容体を有しているのを確認した。

ラットにおける ER $\alpha$  および ER $\beta$  の局在臓器について Kuiper らの報告によると ER $\alpha$  は精巣、下垂体、子宮、腎臓、副腎を中心にして発現するのに対し、ER $\beta$  は卵巣と前立腺できわめて高い発現を示す<sup>10-11)</sup>。MtT/Se 細胞の mRNA レベルでの ER $\alpha$  および ER $\beta$  の発現量を比で表すと ER $\alpha$  の方が ER $\beta$  より優位であった (ER $\alpha$ :ER $\beta$ =78:22)。この細胞を用いたエストロゲン様活性の測定法は、主として ER $\alpha$  を介し ER $\alpha$  型の活性を検出していると推測した。また、MtT/Se 細胞は下垂体腫瘍由来細胞であることより ER $\alpha$  型優位にエストロゲン受容体を発現しているという Kuiper らの示唆した結果を得られたと推測する。

細胞内におけるエストロゲン受容体のタンパク質の局在性についての

評価を免疫組織染色を用いておこなったところ、ER $\alpha$  および ER $\beta$  は核内と細胞質に局在していた。エストロゲン受容体は核内レセプターとして存在していることが、今回の研究で観察された。

内分泌かく乱作用が疑われる物質について検討をおこなうには、その物質がエストロゲン様作用を有するかどうかを把握することが必要である。過去に報告されてきたエストロゲン活性を検出する測定系にエストロゲンとエストロゲン受容体と結合する受容体結合試験<sup>14)</sup>、エストロゲン受容体とコアクチベーターを酵母に導入した Two-Hybrid 試験<sup>15-16)</sup>、魚類のピトロゲニン (卵黄たんぱくの種類) をバイオマーカーとして測定する方法がある<sup>17)</sup>。受容体結合試験はエストロゲン受容体と一定量の放射物質でラベルした 17 $\beta$  エストラジオールを incubate した後、被験物質と反応させ、遊離してくる放射活性を測定しレセプター結合阻害活性を見る手法である<sup>14)</sup>。この手法において操作は簡便ではあるが、アゴニストとアンタゴニストの区別が不可能なことや化合物が代謝活性をうけて内分泌かく乱作用を起こす場合に偽陰性の結果を出す可能性がある。酵母 Two-Hybrid 法は受容体遺伝子を組み込んだプラスミドと応答領域遺伝子及びレポーター



遺伝子を組み込んだプラスミドを酵母に入れた測定法である<sup>15-16)</sup>。培養することは容易だが酵母には細胞壁があり化学物質の膜透過性が悪いことより、化合物によっては感度が低下することは否定できない。また、化学物質溶液曝露下で飼育したオスの魚が産生するビテロゲニン量を測定したメダカビトロゲニンアッセイ方法は、*in vivo*で使用されている<sup>17)</sup>。

今回の研究で我々は、ラット下垂体腫瘍由来細胞株 MtT/Se を用いて細胞の増殖活性を指標としてエストロゲン様作用を測定する細胞増殖試験をおこなった。また、培養細胞を用いた試験培養細胞系では通常牛胎仔血清あるいはヒト血清を添加するため、すでに血液中に含まれている性ステロイドホルモンなどの存在を考慮する必要がある。われわれはステロイドフリーにするためチャコールデキストラン処理した血清を用いた。

実際に MtT/Se 細胞に  $17\beta$  エストラジオールを添加してみたところ有意に高いエストロゲン活性が確認できた。細胞の最大活性を示したのは  $1 \times 10^{-10} \text{M}$  のとき 1.34 ( $p$  値  $< 0.01$ ) であった。 $1 \times 10^{-6} \text{M}$  のとき 0.7 ( $p$  値  $< 0.01$ ) であった。これは細胞毒性の影響によるものと推測する。また、 $1 \times 10^{-9} \text{M}$  の  $17\beta$  エストラジオールを添加した際のエストロゲン活性は、無添

加群と比較して有意差は検出できなかったが、 $P$  値が 0.08 であることより有意傾向があると推測した。これより  $1 \times 10^{-12} \text{M}$  から  $1 \times 10^{-6} \text{M}$  の範囲でエストロゲン無添加群と比較して有意に高いエストロゲン活性を検出したことより、MtT/Se 細胞をもちいて農薬のエストロゲン様作用を測定する系とした。

今回実験で用いた内分泌かく乱作用が疑われる化学物質として、我々は農薬を選択した。そもそも農薬は、昆虫や細菌、雑菌などの病虫害防除および作物の生理機能の抑制などを目的として農作物に散布される化学合成された物質である<sup>18)</sup>。しかし、農薬は農作物に散布した後に消滅するわけではなく環境中や農作物中に残留する。また、難分解性で脂肪に溶解しやすく体外に排泄されにくいという化学構造を持つダイオキシンや PCB、DDT などがある<sup>18)</sup>。

被験物質として用いたトリクロホスメチル、プロチオホス、ダイアジンは有機リン系殺虫剤、ピリプロキシフェンは昆虫生育抑制剤、OPP および TBZ は殺菌剤および食品添加物として分類される。有機リン系殺虫剤は化合物の中にリンを持つリン酸エステル結合したもので殺虫効力が優れており、農業および害虫コントロールの両方で広く使用される<sup>19)</sup>。多くの有機リ

ン系殺虫剤はエストロゲン活性や抗アンドロゲン活性を持つことも報告されている<sup>20)</sup>。昆虫生育抑制剤は、昆虫が分泌する幼弱ホルモンに似た働きをするため羽化や蛹化および昆虫の体表であるキチン質の形成を阻害する目的で用いられている<sup>21)</sup>。OPPおよびTBZは、農薬のポストハーベスト（収穫後）の果実や野菜の防腐処理剤（防かび剤）としてアメリカやヨーロッパで使用されているがわが国ではポストハーベスト農薬としての使用は原則的に禁止されている。しかし、輸入農作物の増大により食品に付着されている可能性が否定できないことや、腐敗の防止目的で使用することができる食品添加物として取り扱われている<sup>18)</sup>。過去に、1993年から1996年に香川県で販売されている輸入柑橘類を含むポストハーベスト農薬の残留農薬の実態調査についての報告がある<sup>22)</sup>。この報告の中でOPPおよびTBZは、残留農薬の一日摂取許容量以下ではあるが高い頻度で検出されていた。

今回の研究のMtT/Se細胞を用いた測定系では、有機リン系殺虫剤、昆虫生育抑制剤、防かび剤のすべてにエストロゲン様作用が検出された。我々は農薬のエストロゲン様作用が検出された最も低い濃度を検出限界とした。プロチオホス、ピリプロキシフェン、

トリクロホスメチルの検出限界濃度は $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、ダイアジノン、OPP、TBZはそれぞれ $1 \times 10^{-5} \text{M}$ において有意差のあった最も低い濃度でエストロゲン活性を検出した。

また、輸入柑橘類には防かび剤以外の農薬についても検出されていたことが確認されておりさらなる調査が必要である示唆している<sup>22)</sup>。実際、われわれも滋賀県の農薬に1つの農作物中から複数の農薬が検出しており、これらが複合して存在しているのを確認することができた<sup>8-9)</sup>。このような内分泌かく乱物質の複合影響問題に関しては、環境ホルモン戦略計画SPEED'98(2000年11月版)<sup>23)</sup>で混合物暴露による暴露影響を対象にした研究の状況把握についても推進が必要であると述べている。ヒトや野生生物における潜在的影響を評価するためには、複数の化学物質の相加作用および相乗作用についても検討しなければならない。化学物質の複合影響に関しては多くの用語があり、Calbrese<sup>24)</sup>は次のように定義している。“Synergism”(相乗作用)とは、2つの物質の複合影響がそれぞれ単独の影響を合計したものよりも大きい場合を示し、別々に考えられる場合の合計よりも影響が小さい場合を“Antagonism”(相殺作用、拮抗作用)とする。また、2つの物質の影響を足

し合わせたものが単独の影響の合計と等しくなる場合は“Additively”（相加作用）とする。農薬における複合影響の問題は、単独では安全性が確認されている農薬が複数存在した場合に何らかの毒性を誘発させる可能性がある」と定義することができる。我々が摂取する農薬の許容摂取量を下回っていたとしても、多種類の農薬を摂取することによりこれらが複合的に作用して予期しない毒性を発する可能性がある。

これらをふまえて我々の研究では、農作物中に存在する検出頻度の高い2種類を組み合わせた農薬のエストロゲン様作用を測定した。その結果、有機リン系殺虫剤、昆虫生育抑制剤2種類、防かび剤1種類の合計3種類の農薬の組み合わせ全てにエストロゲン様作用が増強された。これらの結果から農薬のエストロゲン様作用は、単独で添加したときと比較して2種類の農薬を同時に複合して添加することによりエストロゲン様作用の増強が明らかとなった。

複合影響による内分泌かく乱物質について過去にさかのぼると Arnold や McLachlan らは 1996 年、物質のエストロゲン活性に相乗効果が認められたと報告した<sup>25)</sup>。ヒトのエストロゲン・レセプターを導入した酵母を用いた測定系で農薬であるエンドサルフ

アンとディルドリンを加えると単独に添加した場合と比較して1,600倍のエストロゲン活性を示した。その他の組み合わせでも、エストロゲン活性の100倍以上増強が確認できたと報告した。しかし、追試をおこなった McLachlan ら自身も再現できず、先の相乗効果が確認できたという報告を取り下げざるを得なくなった<sup>26-27)</sup>。このような経緯から複合影響の問題について現在のところ、相乗効果があったという報告については盛んに議論が交わされているが、実際きわだって相乗効果が確認できたという肯定的な報告はされていない。これより我々は Calbrase の物質の複合影響の定義に従うと農薬に存在するエストロゲン様作用に相乗作用は検出されないが相加作用というにはもう少し検討する必要があると考える。というのは、我々は農薬に含まれるエストロゲン様作用が初めて検出された最小濃度を複合する前の濃度と比較検討したものであるためエストロゲン活性を定量的に検出していないことより増強という言葉を用いるにとどめた。また、過去の複合影響に関する文献は、ER $\beta$ 型が発見されていない時代の報告であった。今回我々は、MtT/Se という細胞の mRNA レベルでの ER $\alpha$  および ER $\beta$  型の発現を検討し、ER $\alpha$  型優位に発現するという細胞を使用すること

で農薬の複合影響によるエストロゲン様作用が増強したという知見を得ることが出来た。

植物エストロゲンという人工の化学物質以外に植物が作り出す天然のエストロゲン様作用をもつ物質が存在している<sup>28)</sup>。代表的な物質として大豆に含まれるイソフラボンなどがあり植物エストロゲンは健康面や細胞に対する抗酸化作用や閉経後女性の骨粗鬆症予防<sup>28-29)</sup>などの好ましい影響を及ぼす物質であると日本では注目されている。このような植物エストロゲンについての研究の解明を追求することは新たな見解を提供しうるものと期待することができる。また、反対に農薬と自然環境に含まれる大豆などの食品を組み合わせることで日常的に複合影響が起こる可能性も否定できない。すなわち、植物エストロゲンと自然界に存在するエストロゲン様作用を持つ物質の生体への懸念を生じる物質が存在する可能性についてさらなる調査が必要だ。

今回の我々の研究では3種類の農薬の組み合わせ全てにエストロゲン活性の増強が確認された。しかし、この農薬の濃度は環境省が定める残留基準値の100倍から1000万倍摂取するとはじめてヒトへの影響が懸念される可能性がある。これより農薬による

エストロゲン様作用の複合効果による増強作用は直ちにヒトへの影響を及ぼす可能性は低いと推測されるという結果を導き出した。しかし、現段階では農薬同士を組み合わせた複合影響について試験するだけでも、莫大な数となり測定不可能である。このことから複合影響に関してのデータは十分でない。今後さらなるヒトや野生生物への曝露の複合による影響を考慮する必要がある。

また、今回実験で用いた細胞の持つ内因性エストロゲン受容体の作用が内分泌かく乱物質に影響を及ぼす可能性についての問題がある。数多くの内分泌かく乱物質が存在すればヒトの持つホルモン作用に変調をきたし生理学的均衡をかく乱すると報告している。この件に関しては、我々も今回の測定系を補う方法としてエストロゲン受容体を持たない細胞にER $\alpha$ およびER $\beta$ を遺伝子導入することで内因性エストロゲン受容体の存在を考慮せずに化学物質がどちらのレセプターに結合するかを検出するレポーター遺伝子アッセイについて検討している。

#### E. 結論

我々はMtT/Se細胞の増殖能を指標としたエストロゲン様作用の測定系を確立した。この細胞を用いた測定系に有機リン系殺虫剤、昆虫生育抑制剤、