

研究課題名：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：所属機関 関西医科大学病理学第二講座
氏名 螺良 愛郎

1. 研究目的

エストロゲン活性をもつ合成化学物質は内分泌かく乱化学物質として弊害が強調され世間の耳目を集めている。一方、ヒトが太古より食品として摂取している成分のなかには天然エストロゲンが存在するが、むしろ健康増進作用が注目されている。よって、これら化学物質のエストロゲン活性を同一の *in vitro* アッセイ系で測定・比較し、作用強度を同定する。エストロゲン活性をもつ化学物質は機能・形態形成期に作用すると発育・癌化及び内分泌かく乱を来すおそれがある。よって、高エストロゲン活性を有する化学物質を選別し、周周期暴露実験により生体に及ぼす作用を検証する。併せて、我々をとりまく環境中の化学物質（農薬）のエストロゲン活性の検出、ならびに複合作用の有無につき検索する。

2. 研究の進捗状況及び得られている成果

(1) 天然・合成化学物質のエストロゲン活性の比較

酵母 Two-Hybrid 法やエストロゲン受容体結合アッセイによると、内分泌かく乱化学物質として包括されている合成化学物質のエストロゲン活性に比して、天然化学物質のエストロゲン活性は高く、天然化学物質のなかでは mycoestrogen (Zearalenone や Zeranol) に強いエストロゲン活性をみた (表1、図1)。

表1 食品関連化学物質のエストロゲン活性の比較

i. 酵母 Two-hybrid 法 (rER α 導入)
17 β -Estradiol > <u>Zearalenone</u> > Genistein > Bisphenol A
ii. エストロゲン受容体結合アッセイ (ER-ELISA 法)
hER α : DES > <u>Zearalenone</u> > Equol、
Genistein > Coumestrol > Daidzein > <u>Bisphenol A</u>
hER β : DES、 <u>Zearalenone</u> 、Genistein > Equol、
Daidzein > Coumestrol > <u>Bisphenol A</u>

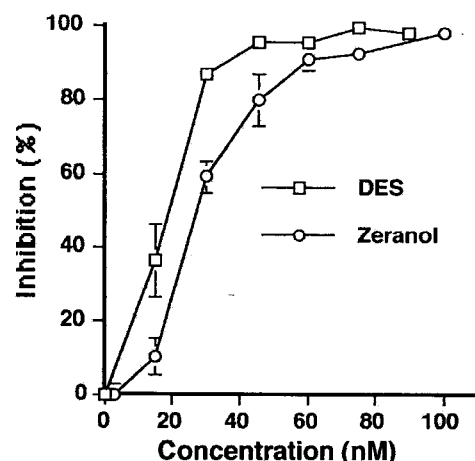


図1 エストロゲン受容体 α 結合試験

(2) マウスを用いた胎仔期暴露実験

Genistein、Resveratrol、Zearalenone、Bisphenol A (0.5 mg/kg、10 mg/kg)、や Diethylstilbestrol (DES) (0.5 µg/kg、10 µg/kg) を妊娠 15-18 日齢の母胎に連日皮下投与して出生雌乳仔を検索した。これら化学物質は体重増加を促進し、膈開口を早発し、Zearalenone では発情期の延長、他は発情間期の延長により、発情周期を延長した。4 週齢時では一部のマウスの卵巣組織に一過性の黄体の欠如をみたが、8 週齢以降では黄体の出現をみたのに対して、Zearalenone 大量投与動物では黄体欠如が 8、12、16 週齢でも持続して認められた (表 2)。Zearalenone の暴露はマウスに不妊が示唆された。

表2 マウスにおける出生前Xenoestrogen投与による黄体欠如の頻度

被験物質	用量	黄体欠如マウスの匹数 (%)			
		4	8	12	16 (週齢)
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 mg/kg x4	5 (83)	0	0	0
	10 mg/kg x4	6 (100)	0	0	0

各群各時期に6匹を屠殺

(3) ラットを用いた新生仔期暴露実験

Genistein (1.5 mg/kg、30 mg/kg)、Resveratrol (10 mg/kg、100 mg/kg)、Zearalenone (0.1 mg/kg、10 mg/kg) を15-19日齢にかけて、連日計5回皮下投与したところ、体重増加に顕著な差はみとめず、膣開口は早発する傾向にあり、Genistein や Resveratrol では発情周期に周期性をみたが、Zearalenone では持続発情あるいは持続発情間期を呈し、投与用量依存性に無排卵性卵巣をみた (表3)。乳腺発癌は Genistein、Zearalenone (図2) ではむしろ抑制傾向にあり、Resveratrol 少量群では差をみとめず、これら高エストロゲン活性をもつ化学物質に乳癌増悪作用はないといえる。しかし、Zearalenone の暴露はラットに不妊が示唆された。

表3 ラットにおける思春期前Zearalenone投与、28日齢MNU処置による37週齢時の卵巣への影響

Zearalenone	ラット匹数	黄体欠如ラット(%)	卵巣重量 (mg)	
			黄体あり	黄体なし
Untreated	8	1 (13)	110 ± 12	57
0.1 mg/kg/day x5	17	8 (47)	102 ± 12	79 ± 15
10 mg/kg/day x5	13	9 (69)	89 ± 22	63 ± 6

平均±SEで表記

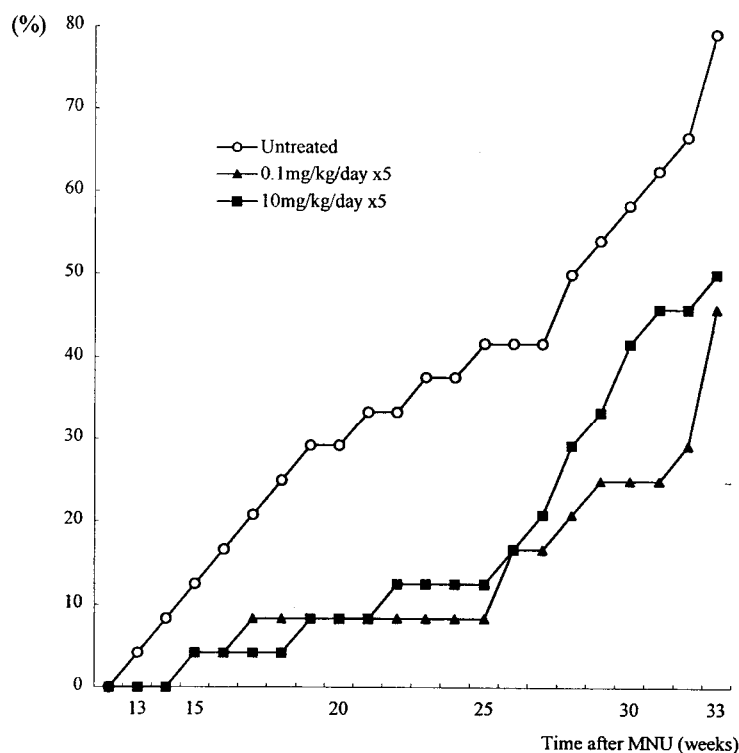


図2 ラットにおける思春期前 Zearalenone 投与による MNU 誘発乳癌 (≥1cm) 発生率への影響

(4) 農薬のエストロゲン活性評価

E-CALUX¹により、32種の農薬(表4)中、有機リン系のトルクロホスメチル、プロチオホス、ダイアジノン、ベンゾイミダゾール系のチアベンダゾール(TBZ)、昆虫成長抑制剤のピリプロキシフェンの5種にエストロゲン活性をみた。ただし、エストロゲン活性をみた農薬の濃度は、残留農薬分析値を勘案すると、環境中ではエストロゲン活性を発揮しない範囲である。

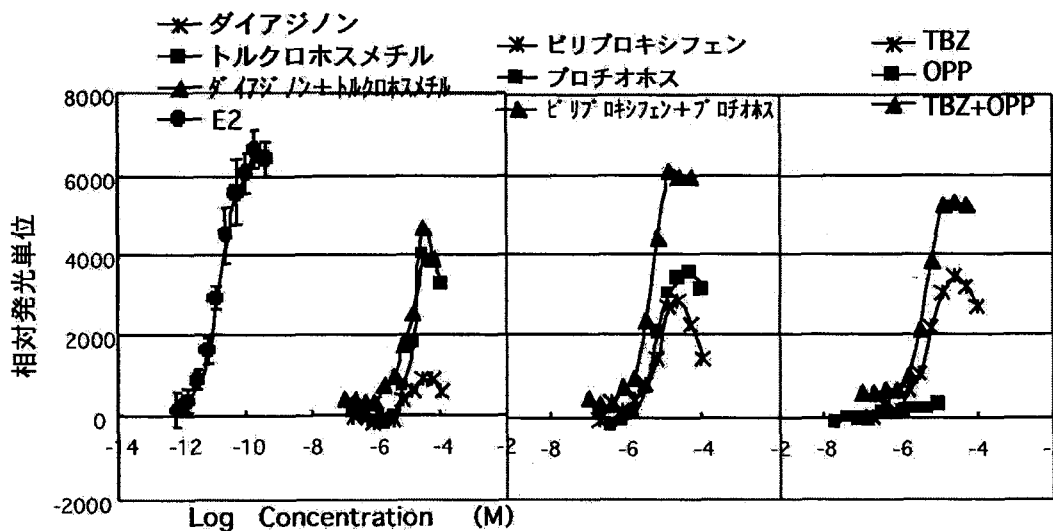
また、エストロゲン活性のみられた農薬を2種組み合わせたり、エストロゲン活性をみない農薬と組み合わせたとこ、単独の場合よりエストロゲン活性が上昇した(図3)。

表4 測定農薬の分類と分子量

No	農薬名	分類	分子量
1	OPP	o-phenylphenol 殺菌剤	170.2
* 2	TBZ	thiabendazole ベンゾイミダゾール系殺菌剤	201.3
3	アセフェート	acephate 有機リン系殺虫剤	183.2
4	イマザリル	imazalil イミダゾール系殺菌剤	297.2
5	エトフェンプロック	ethofenprox ピレスロイド系殺虫剤	376.5
6	キャプタン	captan 有機塩素系殺菌剤	300.6
7	クロルピリホス	chlorpyrifos 有機リン系殺虫剤	350.6
8	クロルフェナピル	chlorfenapyr 殺虫剤	407.6
9	クロルフルアズロン	chlorfluazuron ベンゾイルウレア系殺虫剤	540.7
10	ジクロフルアニド	dichlofluanid 有機塩素系殺菌剤	333.2
11	ジコホール	dicofol 有機塩素系殺虫剤	370.5
12	ジフェニール	diphenyl ビフェニル系殺菌剤	154.2
13	シフルトリン	cyfluthrin ピレスロイド系殺虫剤	434.3
14	シベルメトリン	cypermethrin ピレスロイド系殺虫剤	416.3
* 15	ダイアジノン	diazinon 有機リン系殺虫剤	304.4
16	テブフェンピラド	tebufenpyrad ピラゾール系殺虫剤	333.9
17	トリフルミゾール	triflumizole イミダゾール系殺菌剤	345.8
* 18	トルクロホスメチル	tolclofos-methyl 有機リン系殺菌剤	301.1
19	ハルフェンプロック	halfenprox ベンジルエーテル系殺虫剤	477.4
20	ビテルタノール	bitertanol トリアノール系殺菌剤	337.4
* 21	ピリプロキシフェン	pyriproxyfen 昆虫成長抑制剤	321.4
22	フェンバレレート	fenvalerate ピレスロイド系殺虫剤	419.9
23	フェンプロバトリン	fenpropathrin ピレスロイド系殺虫剤	349.4
24	フルシトリネート	flucythrinate ピレスロイド系殺虫剤	451.5
25	フルバリネート	fluralinate ピレスロイド系殺虫剤	502.9
26	フルフェノクスロン	flufenoxuron ベンゾイルウレア系殺虫剤	488.8
27	プロシミドン	procymidone ジカルボキシイミド系殺菌剤	284.2
* 28	プロチオホス	prothiofos 有機リン系殺虫剤	345.2
29	ペルメトリン	permethrin ピレスロイド系殺虫剤	391.3
30	マラチオン	malathion 有機リン系殺虫剤	330.4
31	メタミドホス	methamidophos 有機リン系殺虫剤	141.1
32	ルフェヌロン	lufenuron 殺虫剤	511.2

* E-CALUX でエストロゲン活性が検出された農薬

図3 エストロゲン活性の用量反応曲線



¹ レポーター・遺伝子・アッセイの一種。ヒト卵胞がん細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、エストロゲンレセプターへの結合をルシフェラーゼ活性により測定するもの。

(5) 結論

- 1) 天然化学物質のエストロゲン活性は合成化学物質に比して高い。
- 2) 天然化学物質のなかでも mycoestrogen (Zearalenone、Zeranol) に高いエストロゲン活性をみた。
- 3) phytoestrogen (Genistein、Resveratrol) の周生期暴露ではマウス・ラットにエストロゲン作用を呈するが、エストロゲン標的臓器に持続する器質的变化は示さない。なお、ラットにおける1日最大投与量をヒトに換算すると、Genistein はアジア人の1日摂取量の20倍、Resveratrol は赤ワインの1日消費量の5000倍である。
- 4) 一方、mycoestrogen (Zearalenone) の周生期暴露では無排卵性卵巣をきたすことより、不妊が示唆された。なお、この変化は、ラットではアメリカ人の1日最大Zearalenone 暴露量に相当する量の投与で、マウスではその100倍量で生じた。
- 5) phytoestrogen、mycoestrogen とも乳癌増悪作用はみなかった。

3. 今後の予定

- (1) ヒト ER 導入酵母 Two-Hybrid 法による合成・天然化学物質のエストロゲン活性の再評価。
- (2) マウス新生仔期暴露実験
胎仔期暴露実験において評価した化学物質に Zeranol を加え、実験中である。現在、Zeranol の生殖器に対する非可逆的影響は Zearalenone と同様に存在するという結果を得つつある。
- (3) ラット新生仔期 Zeranol 暴露実験
Zearalenone と同様に内分泌かく乱作用は強いが、乳癌増悪傾向はみられないという結果を得つつある。
- (4) 農薬の代謝産物も含めたエストロゲン活性の評価
S-9 混合系を用いた農薬の代謝産物も含めたエストロゲン活性ならびに複合作用の存在につき検討中である。

その他の検索事項

- (5) エストロゲン様化学物質の乳汁を介する新生仔暴露の評価
液体高速クロマトグラフィー-電気化学検出器 (HPLC-ECD)、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) による分析条件を確立したので、Resveratrol、Genistein、Daidzein、Glycitein の乳汁移行につき測定中である。
- (6) エストロゲン様化学物質の自己免疫病 (全身性エリテマトーデス、SLE) 発症への影響

自己免疫病自然発症 MRL-lpr^{cg} マウスに Genistein、Bisphenol A、17 β -Estradiol を1-3ヶ月齢にかけて皮下投与したところ、これら化学物質は発症開始には影響をみないが、発症後の悪性進展や生存率の低下に関わる可能性が示唆された。他の指標も加味して、

総合的に結論を下す。

(7) エストロゲン様化学物質の神経系への影響

Genistein の胎児期暴露は性的異形核のひとつである青斑核のカテコールアミンニューロン数を雌雄とも減少させ、性差を消失さす傾向にあり、小脳プルキンエ細胞の樹状突起長は伸長傾向にあった。例数を増して統計処理の後に結論を下す。

4. 研究の概要図

