

自治医科大学保健科学講座 教授

香山不二雄

「 植物由来及び人工内分泌攪乱物質  
の相互作用 」

研究期間：平成 1 1 年 1 月 1 日～平成 1 5 年 1 2 月 3 1 日

## 1. 研究実施の概要

本研究の目的は、植物由来および人工のエストロゲン様物質の生殖器に対する作用機序の差を分子レベルで明らかにすること、また植物エストロゲンおよびエストロゲンで発現遺伝子および抑制遺伝子の検索を行いその生理機能を解析すること、また免疫系細胞、造血系細胞、骨組織に対する影響を調べることで、農家女性の疫学調査を通じて、血中イソフラボンおよび残留有機塩素系農薬およびダイオキシン類の存在量を曝露等の検討を行い、内分泌攪乱物質の人へのリスク評価を行うこととした。

エストロゲン・レセプター (ER)、転写活性での検討では、セリ科の植物に存在するテルペノイドの一種、フェルチニン、ツチガネジンがER- $\alpha$  アゴニスト、ER- $\beta$  パーシャル・アゴニストであることを明らかにした。その機序としては、転写共役因子TRAP20が、これらのリガンドがER- $\beta$  に結合したときに結合阻害が起こっており、その立体構造の変化がこのような特異的な反応性の原因になっていることが推察された。

ラット子宮組織ではmRNA分解を制御するRNA結合タンパクのひとつであるAUF1はエストロゲンによってmRNA安定化制御を受け、そのmRNA蓄積量が増加することを明らかにした。さらに、タンパクレベルでもAUF1は増加することが明らかになったので、ラット子宮組織におけるAUF1の標的mRNAのスクリーニングを行い、2つの候補遺伝子を取得した。シーケンスの結果、取得された遺伝子はABIN2およびpip92/ier2のラットホモログであることが明らかになった。これらの遺伝子cDNAを取得し3'-UTRの配列を検討したところポリ(A)付加シグナル近傍にmRNA分解制御配列に特徴的なAUUUA配列を持つという共通性が見出された。

次に、これらの遺伝子のラット子宮組織での発現を検討した。ABIN2mRNA発現量はエストロゲン処理6時間後から減少し、pip92/ier2mRNAはエストロゲン処理3時間後に一過的にその蓄積量が増加するが、その後急速に減少した。転写阻害剤であるアクチノマイシンDにより転写を阻害すると、これらのmRNAはエストロゲン存在下でも安定であることが分かった。この結果は、エストロゲンによってde novo合成される因子によってmRNAの不安定化が促進されていることを示しており、エストロゲンによって発現量が増加するAUF1の関与を示唆するものと考えられた。

さらに、AUF1タンパクの核-細胞質局在性を検討したところE2依存的に核内のAUF1タンパク量は増加し、細胞質では減少することを見出した。また、細胞質のAUF1タンパクの変動は細胞質のABIN2とIer2mRNA量と相関する事が明らかになった。

以上の結果よりラット子宮組織におけるE2依存的なmRNA蓄積量の一過的な増加はAUF1が関与したmRNA安定化により調節されることが示唆された。このことは従

来より議論されているERを介した転写制御だけでなく、mRNAの分解制御も内分泌かく乱物質に影響されている可能性を示している。

#### <エストロゲンにより子宮での量が上がるRamp2の同定とその解析>

クメステロールおよび17 $\beta$ -エストラジオール投与で子宮での発現量が増強される遺伝子群を、RT-PCRデファレンシャル・ディスプレイ法で検索を行った。いくつかの候補遺伝子の中からアドレノメジュリン・レセプターのサブユニットを形成するRamp2の発現増強が見られた。このことから、エストロゲン投与後に急速に起こる子宮の浮腫化との関連に注目し、アドレノメジュリン投与により、ほぼ同様の組織学的変化を起こすことが明らかとなった。

#### <エストロゲンにより子宮での量が下がるDRE1の同定とその解析>

クメステロールおよび17 $\beta$ -エストラジオール投与で子宮での発現量が抑制される遺伝子は、理化学研究所が系統的に集めているマウスcDNA、DRE1の一部の塩基配列とホモロジーを示した。そこでラットの相同のDRE1であることを示すために、ラットDRE1cDNAの塩基配列を決定した。すると、DNAレベルで95.3%、アミノ酸レベルで99.5%の同一性を示し、ラットDRE1 cDNAにあたることが判明した。ラットDRE1 産生はエストラジオールで抑制され、その変化はICI182,780を前投与すると見られないため、DRE1がERを介して発現抑制を起こしており、その変化は蛋白合成に依存していないことが明らかとなった。

エストロゲンと他の人工・天然化学物質（ディエチルスチルベストロール（DES）、ビスフェノールA、ゲニスタイン）の4種類について、腎臓で産生される造血ホルモンであるエリスロポエチン（EPO）産生に対する抑制作用を、ラットを用いたin vivoの実験系で調べてきた。その4つのうち、エストロゲンとDESには、低気圧暴露やコバルト投与によるEPO産生に対する抑制作用のあることを昨年まで報告してきた。それに加え、脱血による貧血惹起刺激でのEPO産生に対してもエストロゲンとDES抑制作用を持つが、その作用は低気圧やコバルトによるものに比較してやや弱いことが新たに明らかになった。このことより、体内の貯蔵鉄の量がエストロゲンとDESによるEPOの産生抑制メカニズムに重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

#### <疫学調査>

全国5カ所のJA女性部の協力を得て、さまざまなレベルのカドミウム曝露を受けている1408名の農家女性の調査を行った。採取した血液サンプルを用いて、植

物エストロゲンおよび有機塩素系農薬、ダイオキシン類の血中濃度に関して、測定を行い、統計解析を行った。AhRへの結合および転写活性をルシフェラーゼ活性で測定するCALUX assay法を用いて測定の同意の得られた1160名の血中ダイオキシン濃度(PCDD+PCDF分画)を測定した。また、有機塩素系農薬は、年齢と供に上昇する傾向があり、南の地域で高く北に行くほど低くなる傾向があった。しかし、ダイオキシン濃度が高かった地域は北の地域であり、有機塩素系農薬の不純物としての職業曝露および環境曝露からの血中ダイオキシン濃度の上昇はないことが明らかとなった。

疫学調査で得られた血清中のイソフラボン濃度をHPLCクーロアレイ法で、さらに尿中エクオール濃度をTime dissolved fluoro-immunoassay (TD-FIA)で測定した。自記式食事質問票から求めた豆類摂取量とよい相関はみられなかった。これは、生体内で代謝排泄の速いイソフラボン類の血中濃度と過去一ヶ月の摂取量との相関がみられないためと考えられた。一方、尿中および血中エクオール濃度は、豆類摂取量と独立に高い群と低い群との2群にほぼ分けられることが明らかとなった。エクオールはダイゼインが腸内細菌叢により変化を受けることにより産生されるので、食生活や腸内細菌叢の状態を反映するものと考えられた。今後15年間のコホートとして追跡する。

ヒト血清中有機塩素系農薬の検出を試み、地域差、加齢、食習慣などとの関連性を調査した。全国5地区で50歳から70歳代の農村地域主婦を対象に栄養調査を行い計1408名から採血した。血清中環境汚染物質のスクリーニング分析：成人血清を用いスクリーニング分析を行った結果、 $\beta$ -ヘキサクロロシクロヘキサン( $\beta$ -HCH)、ヘキサクロロベンゼン(HCB)、DDTの代謝物であるDDEが頻繁に検出されることが分かった。

血清中塩素系農薬の濃度レベル：

対象とした3地区のほとんどの試料からDDEが検出され、DDEの濃度は加齢と共に増加する傾向が見られた。DDE濃度には地域差はみられず、平均3.3ppbであった。米国での調査では平均18.6ppbの高い値が報告されている。

HCBは3地域とも同レベル(平均1.5ppb)であった。一方、 $\beta$ -HCH濃度には明らかな地域差が見られた。福岡県での調査結果は他の2地域の2倍程度高く、米国での調査結果の9倍近い値が得られた。HCHは我が国の南西部、特に北部九州での散布量が多いことが知られており、HCHの使用量と関連すると考えられる。5地域での食品摂取量には特に差は見られなかった。

今回の研究で得られた成果を総括すると、植物エストロゲンは多様な種類があ

り、分子レベルでの作用機序も、転写レベルおよび転写後レベルでもそれぞれ多様な差異があることが明らかとなった。さらに、グルコシド、アグリコン、グルクロン酸抱合体などの化学形が異なると作用や代謝に大きな違いがあり、化学型を配慮して植物エストロゲンの再評価をする必要がある。植物エストロゲンは種々の臓器に働くことが明らかとなり、他の化学物質と同様に多量に摂取すれば悪影響があることは明白である。

また、ダイオキシン類や有機塩素系農薬などの存在量は植物エストロゲンに比べて数桁低いことが明らかとなった。現実的な生体内存在量での植物エストロゲンと人工の内分泌かく乱物質との相互作用を解析するには、あまりにも多くのパラメーターがあることが明らかとなり、動物実験レベルでの解析は現実的には科学的妥当性がないと判断した。人での今後の解析をどのような方法論で行っていくかが今後の課題である。

また、生物学的半減期の長い内分泌かく乱物質は、微量であっても健康影響への危惧は否定することはないので、今後も長期にわたる健康影響についての追跡調査が必要である。

## 2. 研究構想

本研究のチーム全体の目標として、植物由来の植物エストロゲンおよび人工のエストロゲン様物質との間に、作用機序の差異があるのかどうかをレセプター・レベル、転写活性のレベル、細胞レベル、臓器レベル、個体レベル、集団レベルまで検討を行うこととした。

香山グループでは、それぞれのレベルで検討を行った。レセプター・レベルで池田、荒尾を中心としての生殖器に対する作用機序の差を、ER- $\alpha$ またはER- $\beta$ およびERE-lucを導入した遺伝子レポーター・アッセイ系で種々の植物由来の生理活性物質のスクリーニングを行った。この系で特徴的なテルペノイドを数種類見つけることができたので、その転写因子、転写共役因子に関する解析をさらに進め、Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) としての特徴のある物質を同定することができた。

細胞レベルでは、荒尾がmRNAの安定化不安定化の機序に関する検討を行い、野本がER positiveまたはER negativeの乳ガン細胞株のアポトーシスの作用点の解析を行った。池田は、発現の差異のあるメッセージの検索からRamp2産生亢進を、野本はDRE1産生抑制を見つけ、その生理学的意味を検討した。

臓器レベルでは、堀口がエリスロポイエチンのエストロゲンによる影響について解析し、妊娠時貧血の成立機序に関して洞察を加えた。個人レベルでは、教室員の協力のもと、イソフラボンの体内動態に関して研究を行い、イクオール高産生者と低産生者との分類を行うことができた。

集団レベルでは、教室員全員で、カドミウムの低容量曝露の健康影響調査を行っている集団で、残留有機塩素系農薬およびダイオキシン類の測定を、それぞれ熊本大学の古賀、(株)日吉の協力の下、測定を行うこととし、疫学調査でサンプルが日本全国の広域の調査ができたため、いろいろな人体汚染の情報を集めることができた。

山田チームでは、生体試料中イソフラボン濃度の測定法に関してHPLC-クーロアレイ法の応用を検討した。それを、香山チームにより疫学研究で集めたサンプルを測定したところ、大豆食品摂取量との相関がないことが明らかとなった。そのためイソフラボンの人での薬物動態学的検討を行ったところ、体内半減期が数時間で、週間変動、日内変動が大きく血清レベルの測定は今回の研究目的には意味がないことが明らかとなった。また、大豆類摂取量に独立にイクオール高産生者と低産生者が分かれることが明らかとなり、それは人の血清でも尿でも同様に分類できることが明らかとなった。更に山田チームでは、人工及び植物由来の内分泌かく乱物質の免疫系への影響の検討を行った。

山下チームでは、免疫系への影響を評価し、特にT細胞の選択に影響を起こすことを研究期間を通じて行った。また、平野チームは骨芽細胞系細胞株への影響の評価を行った。

古賀チームは遅れて我々の研究チームに加わったが、卓越した技術で血清試料中の有機塩素系農薬の測定を行った。

当初の研究構想では、イソフラボン測定法を確立し、人での疫学調査を行うと記載していたのみであった。しかし、カドミウムの低容量曝露影響評価の全国調査を行うことになったので、そこで集められた血液サンプルを用いて、血中イソフラボンおよび残留有機塩素系農薬およびダイオキシン類の存在量を曝露等の検討を行うことができたのは幸運であった。このデータは今後の内分泌攪乱物質の人への影響リスク評価を行うときに大きな役に立つと考えられる。

また、疫学調査で行った詳細な栄養調査は、イソフラボン摂取量と骨密度の関係およびビタミンKと骨密度との関係について解析して、論文として現在投稿中である。

疫学調査のデータ解析と論文作成はまだ途上であり、貴重な集団の詳細なデータにより、さらにイソフラボン及びダイオキシン類、有機塩素系農薬に関して論文としてまとめていくことができる。

また、調査集団に関しては、5年毎に、20年後まで追跡調査を行う予定であるので、種々の貴重な研究成果が上げられると考えられる。

### 3. 研究成果

#### 3.1 植物エストロゲンの作用メカニズムの解明（香山グループ）

##### 3.1.1大豆タンパク摂取ラットの肝臓におけるLPS誘導性急性炎症の抑制効果

###### (1) 研究内容及び成果

大豆には daidzin、genistinといったイソフラボン配糖体が大量に含まれており、このようなイソフラボンが骨粗鬆症やガンの抑制といった生理作用を発揮していると予想され、機能性食品として注目されている。一方、大豆原料のミルク(soy formula)が乳幼児に与えられている欧米では、その様な生理活性を含むものを乳幼児に与えることへの問題が論じられている。実際、乳幼児が飲むと考えられるミルクレベルのgenisteinをマウスに投与すると胸腺の萎縮が起こることが報告され、危険性PS誘導性のTNF $\alpha$ 産生量を指標としてgenistein(アグリコン)とgenistin(配糖体)の抗炎症効果を比較検討した。

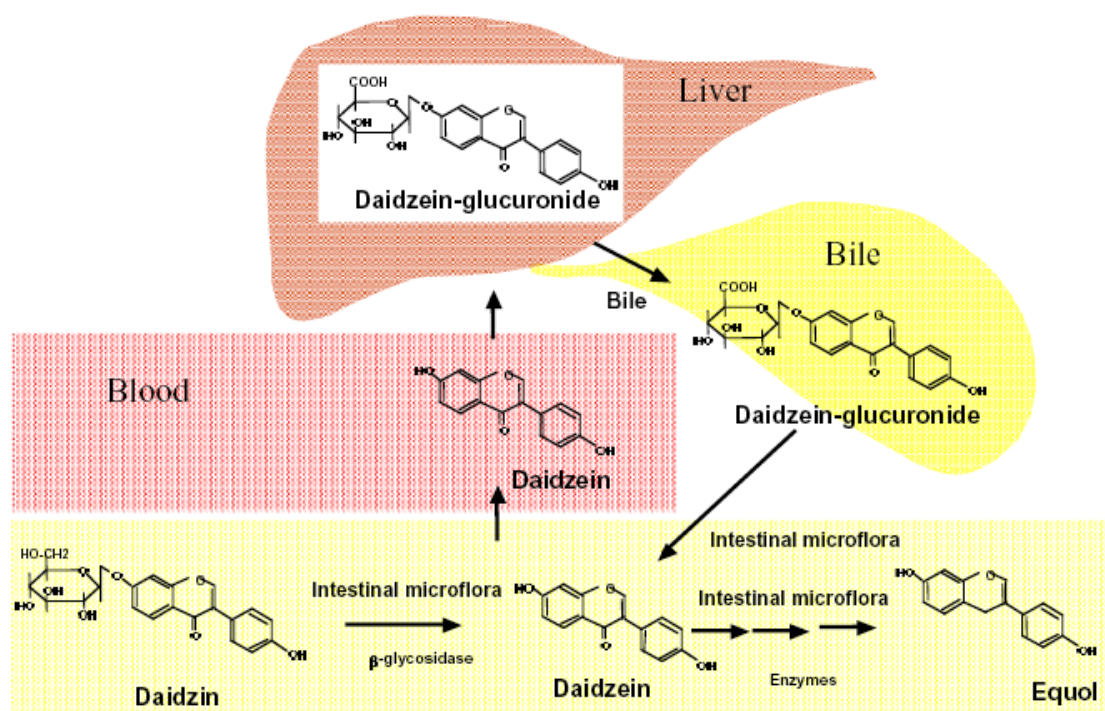


図1 イソフラボンの体内動態

Wister系雄ラットにgenistein(アグリコン)あるいはgenistin(配糖体)を3日間経口投与した後に、LPS(2mg/kg体重)を静脈注射し2時間後に採血し、屠殺した。



胸腺重量の確認、肝組織培養上清および血清中TNF $\alpha$ 量をELISA法で測定した。肝臓でのLPS誘導性TNF $\alpha$ 産生量および血清中TNF $\alpha$ 濃度はgenistein(アグリコン)あるいはgenistin(配糖体)投与群いずれにおいてもコントロール群より有意に低下した。一方、胸腺はgenistein(アグリコン)投与で顕著な萎縮、重量減少が見られたがgenistin(配糖体)投与群ではその様な現象は見られなかった(図2)。

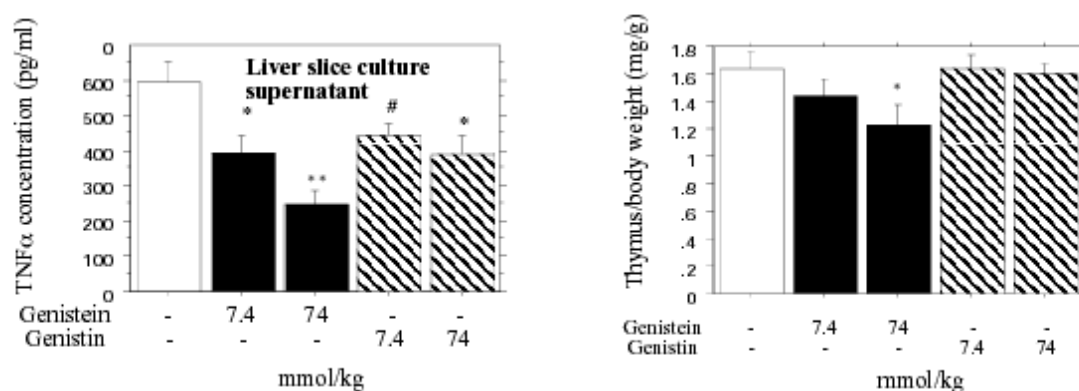


図2 genistein(アグリコン)と genistin(配糖体)の抗炎症作用と、胸腺への影響

## (2) 研究成果の今後期待される効果

これまでに報告された大豆イソフラボンの胸腺への悪影響を示す実験にはgenistein(アグリコン)が用いられた。本研究から大豆に含まれているgenistin(配糖体)にはその様な影響が出ないことが分かった。一方、抗炎症効果についてはgenistein(アグリコン)とgenistin(配糖体)の間で差は見られなかった。本成果は、大豆食品の生理影響評価のためには配糖体型イソフラボンを用いなければならないことを示している。今後soy formulaに関する問題点についてgenistin(配糖体)を用いて再評価する必要があるだろう。

### 3.1.2 豆・野菜・果実中のエストロゲン様作用物質の検索

#### (1) 研究内容及び成果

これまで大豆やアルファルファにエストロゲン様作用が報告されていることから、野菜・果実類で同作用を有する素材を検索する目的で、97種類の豆・野菜・果実類について評価を行った(表)。豆・野菜・果実類の凍結乾燥粉末に20倍量(w/w)のDMSOを添加し1分間激しく攪拌した後、フィルターろ過(0.20mm)したもの

をサンプルとした。エストロゲン応答領域の結合したルシフェラーゼレポーター遺伝子をあらかじめ組み込んだ卵巣癌由来の安定形質転換培養細胞株 (BG1-4ELuc) を用いてルシフェラーゼ活性の測定値からサンプルのエストロゲンレセプター (ER) 依存的な転写活性化能を評価した。活性のあるものについては、さらにER $\alpha$  およびER $\beta$  に対する特異性を検討した。

表 豆・野菜・果実中のエストロゲン様作用物質のスクリーニング結果

|              |         | ER $\alpha$ 活性 |           | ER $\alpha$ 活性 |     | ER $\alpha$ 活性 |
|--------------|---------|----------------|-----------|----------------|-----|----------------|
| いも及び<br>でん粉類 | さつまいも   | ×              | セロリー      | ×              | もやし | ○              |
|              | さといも    | ×              |           | ×              |     | ×              |
|              | じゃがいも   | ×              |           | ○              |     | ×              |
| 豆類           | 小豆      | ×              | タアサイ      | ×              | 野菜類 | らっきょう          |
|              | 大豆      | ○              |           | ×              |     | レタス            |
|              | 黒豆      | ○              |           | ×              |     | サラダ菜           |
| 野菜類          | レンズ豆    | ×              | かいわれだいこん  | ×              |     | れんこん           |
|              | あしたば    | ○              |           | ×              |     | わけぎ            |
|              | アスパラガス  | ×              |           | ×              | 果実類 | アボカド           |
| 野菜類          | いんげんまめ  | ○              | 大根        | ×              |     | いちご            |
|              | 山うど     | ×              |           | ×              |     | うんしゅうみかん       |
|              | 枝豆      | ○              | 大根 (葉)    | ×              | 野菜類 | オレンジ           |
| 野菜類          | 豆苗      | ×              |           | ×              |     | 柿              |
|              | さやえんどう  | ○              |           | ×              |     | キウイフルーツ        |
| 野菜類          | グリーンピース | ×              | たけのこ      | ×              | 果実類 | きんかん           |
|              | おかひじき   | ×              |           | ×              |     | スターフルーツ        |
|              | オクラ     | ×              | たまねぎ      | ×              |     | ざくろ            |
| 野菜類          | かぶ      | ×              |           | ×              | 果実類 | パインアップル        |
|              | かぶ (葉)  | ×              | チンゲンサイ    | ×              |     | バナナ            |
|              | かぼちゃ    | ×              |           | ×              | 野菜類 | パパイア           |
| 野菜類          | カリフラワー  | ×              | つるむらさき    | ×              |     | マンゴー           |
|              | 菊 (花)   | ○              |           | ×              | 果実類 | ペリカンマンゴー       |
|              | キャベツ    | ×              | とうがん      | ×              |     | メキシカンマンゴー      |
| 野菜類          | きゅうり    | ×              |           | ×              | 果実類 | りんご            |
|              | クレソン    | ×              | とうもろこし    | ×              |     | トロピカルフルーツ      |
|              | ごぼう     | ×              | トマト (赤)   | ×              |     | ラ・フランス         |
| 野菜類          | 小松菜     | ×              |           | ×              | その他 | さんしょう          |
|              | 山東菜     | ○              | なす        | ×              |     | ハーブ            |
|              | ししとうがらし | ×              |           | ×              |     | オオバコ           |
| 野菜類          | しそ (青)  | ○              | にがうり      | ×              | その他 | ドクダミ           |
|              | しそ (赤)  | ×              |           | ×              |     | ホップ            |
|              | 春菊      | ×              | にら        | ×              |     |                |
| 野菜類          | せり      | ×              |           | ×              | その他 |                |
|              |         |                |           |                |     |                |
|              |         |                |           |                |     |                |
|              |         |                | 黄にら       | ○              | その他 |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                | にんじん      | ×              | その他 |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                | 金時にんじん    | ×              | その他 |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                | にんにく      | ×              | その他 |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                | にんにく (芽)  | ×              | その他 |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                | のびる       | ×              | その他 |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                | 白菜        | ×              | その他 |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                | パジル       | ×              | その他 |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                | パセリ       | ×              | その他 |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                | ピーマン (青)  | ×              | その他 |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                | ピーマン (赤)  | ×              | その他 |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                | ふき        | ×              | その他 |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                | ブロッコリー    | ×              | その他 |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                | ホースラディッシュ | ×              | その他 |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                | みつば       | ×              | その他 |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                | みょうが      | ×              | その他 |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                | むかご       | ×              | その他 |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |
|              |         |                |           | ×              |     |                |

BG1-4ELuc細胞を用いたアッセイから97種類の豆・野菜・果実類のうち、18種類の植物(大豆、黒豆、あしたば、いんげんまめ、えだまめ、さやえんどう、菊の花、山東菜、青シソ、ターサイ、黄ニラ、モヤシ、アボガド、ザクロ、さんしょう、オオバコ、ドクダミ、ホップ)からエストロゲン活性が確認された。さらにER $\alpha$  およびER $\beta$  依存的な転写活性化能を検討したが、ER $\alpha$  およびER $\beta$  に対して特異的に転写活性化能を示す植物は確認できなかった。(カゴメ・総研との共同研究)

## (2) 研究成果の今後期待される効果

本研究から日常の食生活で摂取される植物中にエストロゲン活性を有するものが多数あることが分かった。植物エストロゲンは人工内分泌かく乱化学物質より体内代謝が早いと考えられているが、エストロゲン活性では人工化合物より強いものが知られている (Coumestrol等)。今後、内分泌かく乱物質問題を考えていく上で食事の影響を考慮して評価していく必要があるだろう。また本研究から見出された植物素材の情報を高齢女性の骨粗鬆症予防食といったような栄養指導へ利用できると期待される。

### 3.1.3 HPLC-coulometric arrayによるヒト血漿中イソフラボン定量法の確立

#### (1) 研究内容及び成果

大豆イソフラボンにはエストロゲン様作用があることが報告されている。そのため日本人のように大豆原料の食品を多く食べる人々に対する環境ホルモンのリスク評価を行う際、大豆イソフラボンの体内量を考慮する必要がある。そこで、本研究ではHPLCクーロアレイ法を用いたヒト血漿中大豆イソフラボンの定量法を確立した (図3)。ヒト血漿にBisphenol Aを内部標準として添加し、 $\beta$ -glucuronidaseを37°Cで3時間処理した後、3倍容のエタノールでイソフラボンを抽出した。抽出液を乾燥させ、沈殿をメタノール/水=1:3に溶解しHPLCに供した。HPLCはphase A(50mM sodium acetate with acetic acid: methanol=80:20)とphase B(50mM sodium acetate with acetic acid: methanol: acetonitrile=40:40:20)による濃度勾配(phase Bを20%から60%)で1ml/minの流速にて行った。結果はCoulArray解析ソフト(ESA Inc.)で解析した。Genistein、daidzeinおよびdaidzeinの代謝物であるequolを同時に測定できる条件を決定し、いずれのイソフラボンについても1-1000 ng/mlの間で定量できる事を確認した。内部標準としてBisphenol Aを用いることによってサンプル間の抽出効率の補正を行い再現性の高い分析が可能となった。

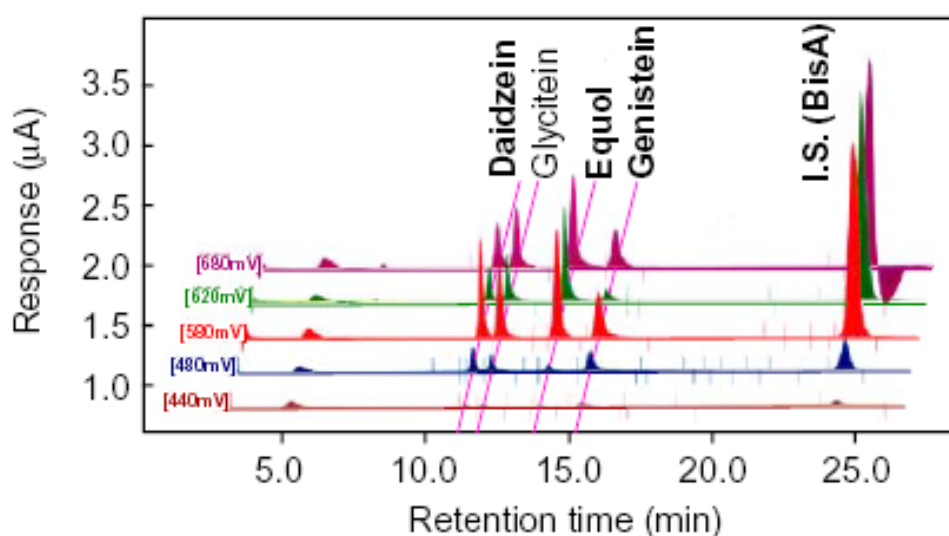


図3 標品のHPLCの結果

## (2) 研究成果の今後期待される効果

この方法を用いて個人の血中イソフラボン量を経時的に測定した結果、血中イソフラボン量は食事に大きく影響されることが分かった。個人の血中イソフラボン濃度は日にちを変えて複数回測定することによって最低値、最高値をみる必要があるかもしれない。また、Daidzeinの代謝物であるequolが血中に見られる人と、見られない人に分類できることが分かった。今後、疫学データから血中Equolの有無が何らかの生理現象と相関することを見出すことができるかもしれない。本定量法を用いることで、体内イソフラボン量を考慮した人工内分泌かく乱化学物質の人体影響の評価が可能になると期待される。

### 3.1.4 ラット子宮組織におけるエストロゲン依存的なmRNA分解制御機構におけるAUF1の役割

#### (1) 研究内容及び成果

エストロゲンの標的組織での生理作用は核内レセプター(ER)を介した転写の直接的な制御によって発現する。一方、近年ではERによる転写を介さないエストロゲンの作用(non-genomic action)が転写同様に起こっていることが知られるようになってきた。しかし、エストロゲンによるnon-genomic actionは細胞内シグナル伝達系を活性化することを指しており、その結果どのような現象が惹起され

るのかは全く分かっていない。本研究ではエストロゲン依存的なmRNA分解制御の分子機構解明を試みることによって、この現象がエストロゲンのnon-genomic actionによって起こることを明らかにした。

AUF1はmRNA分解制御に係わるRNA結合タンパクのひとつである。ラット子宮組織においてAUF1遺伝子発現量がエストロゲンによって増加することを見出した(図5)。また、AUF1mRNA蓄積量の増加はエストロゲン依存的なmRNA安定化によっていることも明らかになった(図6) (Y.Arao et al. Biochem. J. 2002)。

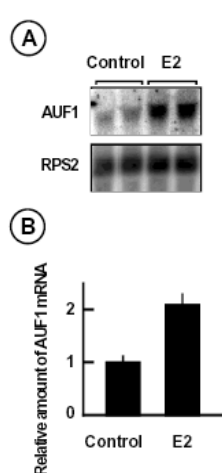


図 5

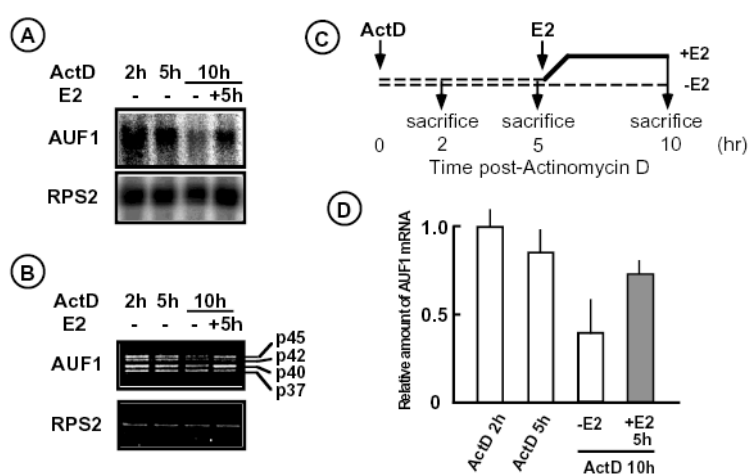


図 6

次に、ラット子宮組織におけるAUF1の標的mRNAのスクリーニングを行い、候補遺伝子を取得した。これらの遺伝子cDNAを取得し3'-UTRの配列を検討したところポリ(A)付加シグナル近傍にmRNA分解制御配列に特徴的なAUUUA配列を持つという共通性が見出された。またこれらのmRNAの3'-UTRはmRNA本体の分解を促進する活性があることをin vitro mRNA分解解析系で明らかにした。さらに、これらの遺伝子のラット子宮組織での発現を検討したところ、エストロゲン処理3時間後をピークとして一過的にmRNA量が増減する初期応答遺伝子であることが分かった。AUF1は核—細胞質間シャトリングタンパクであるため、次にエストロゲン処理に伴うAUF1タンパクの核および細胞質の局在を検討した。その結果、標的mRNAの増減と関連するようにAUF1タンパクの核—細胞質局在が変化することを見出した。そこで、in vitro mRNA分解解析系を用いて核—細胞質間移行能を欠失したAUF1ミュータントの標的mRNA分解制御能を検討したところ、このミュータントの過剰発現により標的mRNAの分解が変化した。

ラット子宮組織におけるエストロゲン依存的なmRNA分解制御は制御因子の核—細胞質局在がエストロゲン依存的に変化することによって起こるnon-genomicな現象であることが初めて明らかになった。（図7）

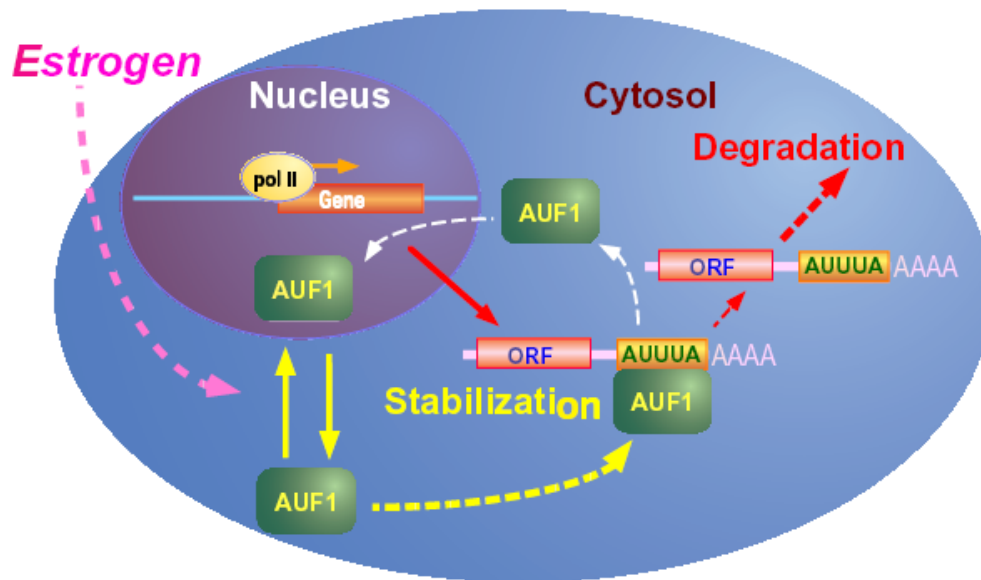


図7 mRNA 分解制御因子の核—細胞質局在をエストロゲンが制御する。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

エストロゲンによるmRNA分解制御は鳥類や両生類で特異的に発現する遺伝子について解析が進んできた。本研究は初めて哺乳動物においてエストロゲン依存的なmRNA分解制御の分子機構を明らかにしたものである。またその制御機構は両生類で報告されている機構とは異なった制御であることも明らかになった。本研究の成果は各種のシグナルによって誘導される初期応答遺伝子群の転写産物(mRNA)分解制御機構の解明にも寄与するものと期待される。

これまでエストロゲンによる遺伝子発現制御は転写段階での制御に焦点があてられ、膨大な研究がなされてきた。本研究は転写後段階での転写産物(mRNA)量の調節機構がエストロゲンのnon-genomic actionによって起こる現象であることを明らかにし、エストロゲンによる遺伝子発現制御が核内から細胞質までの一連の現象であるという新しい概念を示すものである。今後この概念に焦点をあてた研究がなされることを期待する。

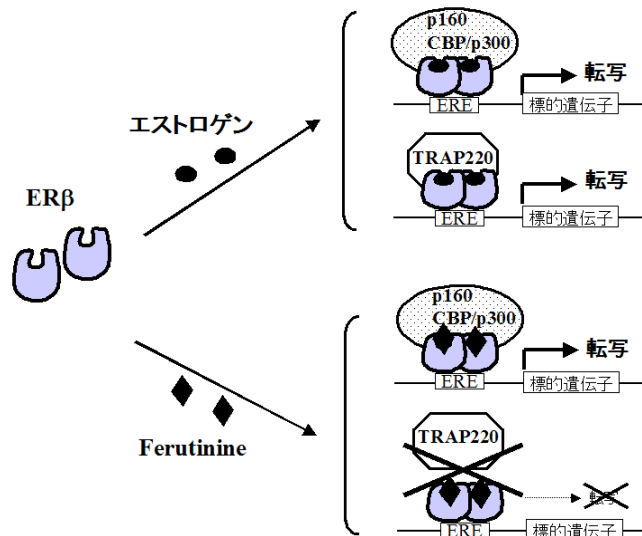
### 3.1.5 新しい植物エストロゲンの探索とその作用機構の解明

#### (1) 研究内容及び成果

植物エストロゲンは女性ホルモンである内在性のエストロゲンと同様に、エストロゲン受容体 ( $ER\alpha$  と  $ER\beta$ ) に結合し、近傍のエストロゲン標的遺伝子の転写を制御することにより内分泌かく乱物質として機能すると考えられている。しかし、それぞれの植物エストロゲンがエストロゲンのどのような作用に影響を及ぼしているのか、またERを介する分子作用メカニズムのどのような機構に影響を及ぼすのかといった点についてはほとんど解明されていない。

そこで、新しい植物エストロゲンの探索とその作用機構の解明を目的に、植物由来生理活性物質について、 $ER\alpha$  または  $ER\beta$  を介して作用するか否かをルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。その結果、テルペノイドに属するFerutinineとTschimganineが $ER\alpha$  と  $ER\beta$  を活性化し、Tschimganidineが $ER\alpha$  のみを活性化することが明らかになった。また、抗エストロゲン活性を同様に検出したところFerutinineのみが $ER\beta$  特異的に抗エストロゲン活性を有していることが明らかになった。このようなFerutinineのERサブタイプ間での転写活性化能の違いはどのような分子機構に基づいているのか明らかにするため、ERのエストロゲン依存性の転写活性化に重要な機能を有している転写共役因子の関与について検討した。転写共役因子には機能的に大きく分けて2つの群が報告されている。1つはp160ファミリー (SRC-1, TIF2, AIB1) とそれに結合するCBP/p300遺伝子を中心とする蛋白複合体で、もう1つはTRAP220を中心とする蛋白複合体である。Ferutinineを用いたルシフェラーゼアッセイにおいてSRC-1, TIF2, AIB1, TRAP220を過剰発現させたところ $ER\beta$  の場合のみTRAP220による転写活性化は起こらないことを明らかにした。さらに、GST-pull downアッセイを用いてERとTRAP220との結合様式を解析したところ、Ferutinineをリガンドとした場合には $ER\beta$  でのみTRAP220との結合が見られなくなった。これらの結果からFerutinineがリガンドとして $ER\beta$  に結合した場合にはTRAP220との相互作用ができなくなるために、アゴニストとしての活性とアンタゴニストとしての活性が混在することが示唆された (図1)。

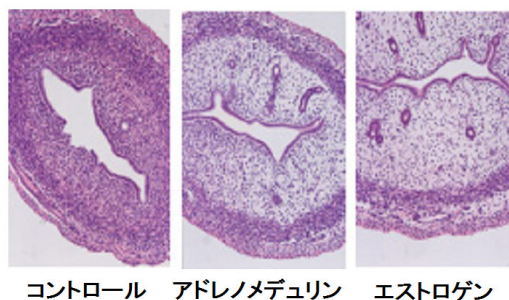
図1 FerutinineをリガンドとしたERβは転写共役因子TRAP220と結合しないことに基づく転写活性化のモデル



また、植物エストロゲンが生体内でどのようなエストロゲン標的遺伝子の発現に影響を及ぼしているのか検討するため、代表的な植物エストロゲンの一つであるクメステロールを未性成熟ラットに投与し、子宮において発現に変動を示す遺伝子を解析した。その結果Ramp2遺伝子がエストロゲンとクメステロールの双方において発現が誘導されることが明らかになった。Ramp2遺伝子にはRamp1, 3のファミリーが存在し、特にRamp2とRmap3はCRLRと複合体を形成して血管拡張作用を有する循環調節ペプチドであるアドレノメデュリンの受容体として作用することが知られている。我々はアドレノメデュリン、Ramp2、Ramp3もエストロゲンおよびクメステロールによって発現が誘導されることを確認した。さらに、未成熟ラットにアドレノメデュリンを投与すると、エストロゲンの効果の約1/2であるが子宮重量が増し、子宮内膜の肥厚が観察された（図2）。これらの結果から子宮においてアドレノメデュリンシグナルはエストロゲンの下流に存在し、エストロゲンの子宮内膜肥大作用を媒介すると考えられた。



図2 アドレノメデュリン、エストロゲンを投与した  
6時間後の未成熟ラット子宮



## (2) 研究成果の今後期待される効果

植物エストロゲンは $ER\alpha$ と $ER\beta$ に結合することによりエストロゲン様または抗エストロゲン様作用を発揮し、内分泌かく乱物質として作用すると考えられる。植物エストロゲンとしてはイソフラボノイド(ゲニスタイン、ダイゼインなど)、クメステロール、レスベラトロールなどが報告されているが、本研究では新たにテルペノイド(Ferutinine、Tschimgine、Tschimganidine)に分類される物質にも植物エストロゲンとしての活性を見いだすことができた。上述のようにエストロゲンには2つの受容体 $ER\alpha$ と $ER\beta$ が存在しており、さらに、抗エストロゲン剤として開発され乳癌の治療目的で使用されているタモキシフェンは子宮に対しては逆にアゴニストとして働き子宮内膜癌の発症率を上げることが問題になっていることから、エストロゲンの組織特異的作用のメカニズムの解明が望まれている。本研究で明らかにされた $ER\alpha$ に対してのみ特異的にアゴニストとして働くTschimganidineや、転写共役因子TRAP220との結合を特異的に阻害することにより $ER\beta$ に対してアゴニストとアンタゴニストの混在した働きを発揮するFerutinineは、このような組織特異的なエストロゲン作用機構の一端を明らかにするものと考えられた。また、これらの植物エストロゲンは临床上望ましい組織特異的作用を発揮するエストロゲン製剤の開発に向けた応用にも利用できると考えられる。さらに、子宮における新たな植物エストロゲンおよびエストロゲンの標的としてアドレノメデュリンシグナルを明らかにできたことは、生殖生理学において新たな展開をもたらすものと期待できる。アドレノメデュリンおよびその受容体は血管壁細胞で多く発現しており、エストロゲンの血管損傷に対する保護効果や動脈硬化の抑制作用においても関与している可能性が示唆される。本研究で得られた成果は、このようなエストロゲンの多彩な作用機構を解明する上での示唆に富むものであ

り、同時に内分泌かく乱物質としての植物エストロゲンの作用機構をその分子レベルで解明する基盤を提供すると考えられる。これらの研究により、植物エストロゲンの作用メカニズムに根ざした内分泌かく乱物質としてのリスク評価が可能となるばかりでなく、さらには食品成分としての植物エストロゲンの有用性をも明らかにすることが可能となり、健康に対する植物エストロゲンの社会的な総合評価へと繋がるものと期待できる。

### 3.1.6 植物エストロゲンの作用機序および発現抑制遺伝子の検索

フラボノイドは癌細胞で数多くの生物学的活性を発していることがわかってきている。エストロゲンはフラボノイドと構造的に似ている。私たちは、エストロゲンの活性がフラボノイドの活性と同様なものかどうか知るために癌細胞におけるエストロゲンの影響を調べた。50 $\mu$ Mの17 $\beta$ -エストラジオールをエストロゲンレセプター (ER)  $\alpha$ を発現していない乳癌の細胞株MDA-MB-231に加えたところ、ゲニスタインやダイゼインで観察されたのと同様の細胞周期の停止が見られた。50 $\mu$ Mのエストラジオール、ゲニスタイン、ダイゼインでその乳癌細胞を処理したときに、アポトーシスが同様のプロフィールで起こった。フローサイトメトリーで調べたところ、エストラジオール処理はG2/Mでの細胞周期の停止とアポトーシスを起こしていることがわかった (Fig. 1)。MDA-MB-231細胞はER $\alpha$ を発現していないので、これらの結果は、ER $\alpha$ に独立した経路を通してエストラジオールが細胞周期停止とアポトーシスを誘導していることを示している。

エストロゲンを未成熟なラットに皮下注射して、子宮においてmRNA量が上昇する遺伝子は比較的に数多く同定されてきており、研究も進んでいるが、mRNA量が下降する遺伝子に関しては最近DNAチップの技術を用いて同定されて来ているが、まだあまり詳しくは研究されていない。そこでディファレンシャルディスプレイ法を用いて子宮におけるmRNAがダウンレギュレーションする遺伝子を2つ単離した。1つは既知のcDNAとはどれともホモロジーがなかったが、もう1つは、マウスの完全長のcDNAの配列決定を行うプロジェクトのcDNAの1つとアミノ酸レベルでほぼ1致した。この事からこの遺伝子をDRE1 (downregulation of mRNA by estrogen) と名付けた。DRE1は、N末側にBTB/POZドメインが存在し、C末側に6回繰り返しのkelchモチーフが存在しており、アクチン結合タンパク質の特徴を有していた。未成熟なラットの雄と雌でのDRE1のmRNA量をノーザンブロットングで調べたところ雄では万遍なくmRNAがあるのに対し、雌では肝臓で殆ど出ていなかった。雄

と雌で共通に肺、心臓、精巣と卵巣でmRNA量が多かった。ノーザンブロッティングで調べたところ、コントロールのRPS2遺伝子は、刺激後0時間–24時間で子宮でのmRNA量に差があまりなかったが、DRE1はエストロゲンの皮下注射による刺激後3時間–12時間で、子宮でのmRNA量にダウンレギュレーションが見られた (Fig. 2)。次にエストロゲンで刺激する前にICI 182780で処理したところ、mRNA量が減少する3時間–12時間の間、その減少が起こらなかった (Fig. 3)。このことから、DRE1のmRNA量の下降はエストロゲンレセプターを介して起きていると考えられる。

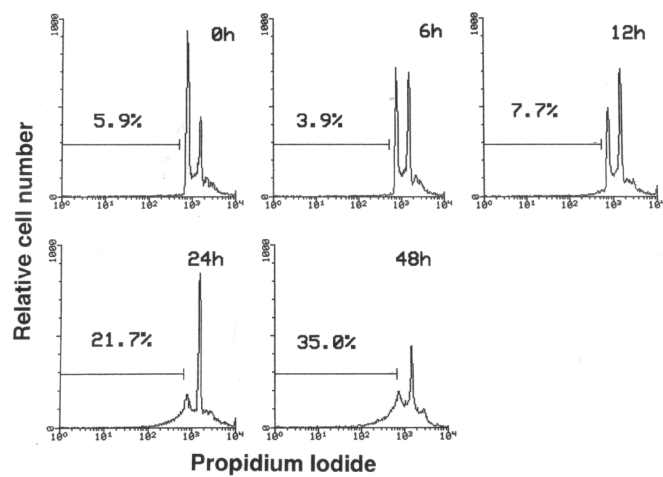


Fig. 1

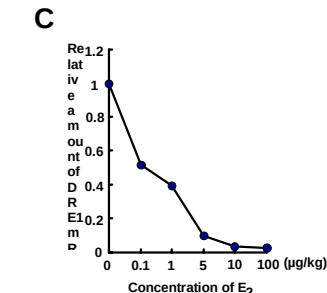
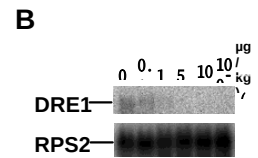
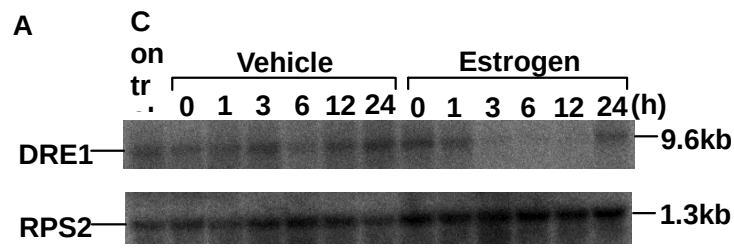


Fig. 2

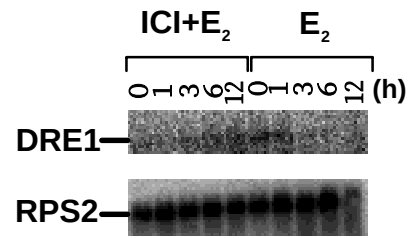


Fig. 3

### 3.1.7 エストロゲンによるエリスロポエチン産生抑制

#### (1) 研究内容及び成果

従来、男性より女性の方が末梢血中赤血球数が若干低いこと、また女性ホルモン分泌が著明に亢進する妊娠期の女性ではしばしば貧血が観察されることなどから、女性ホルモンが造血組織に何らかの影響を及ぼすことが推測される。したがって、エストロゲン ( $E_2$ ) ならび  $E_2$  作用を持つ他の人工・天然化学物質 (ディエチルスチルベストロール (DES)、ビスフェノールA、ジェニスタイン) の4種類について、腎臓で産生される造血ホルモンであるエリスロポエチン (EPO) 産生に対する抑制作用を、ラットを用いた *in vivo* の実験系で調べてた。EPOの産生惹起は、低気圧暴露 (0.65atm)、コバルト投与 (15mg/kg)、脱血 (2ml) によって行った。4つの化学物質のうち、 $E_2$  とDESは量依存性に低気圧暴露、コバルト投与、ならびに脱血のいずれによるエリスロポエチンの産生も抑制した (図1から4)。特に、 $E_2$  はコバルト投与に対して、DESは低気圧暴露に対して強い抑制効果があった。しかし、ビスフェノールAとジェニスタインにはそのような抑制効果は見られなかった。また、腎臓からのEPO mRNAの発現をRNAse protection assayで観察したところ、やはり  $E_2$  とDESには低気圧暴露ならびにコバルト投与による腎臓からのEPO mRNAの発現を抑制した (図5)。

また、 $E_2$  を2ヵ月間投与することによって、 $E_2$  の実際の貧血惹起作用を確認した (表)。その結果、EPOの上昇を伴わない軽度の貧血が惹起された。さらに、2ヵ月間の鉄欠乏食による実際の鉄欠乏性貧血においても、 $E_2$  がそれによって亢進したEPOの産生を抑制することも判明した。以上のことより、女性一般に見られる比較的な末梢血中赤血球数の低値や、妊娠中に観察される「生理的貧血」には、体内での  $E_2$  の産生によるEPO産生の抑制が関与していることが考えられた。

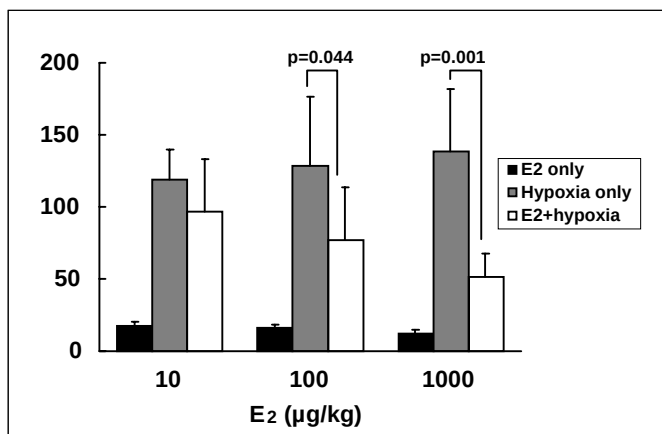


図1.低気圧暴露 (0.65atm、24h) による EPO 産生に対するエストロゲンの抑制効果。

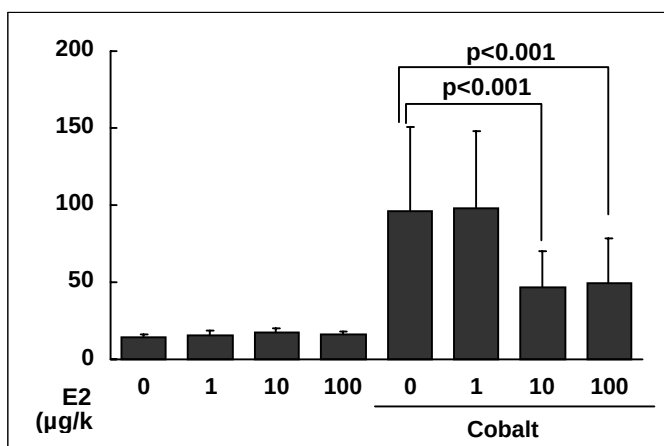


図 2 . コ バ ル ト 投 与  
(15mg/kg、24h) による  
EPO 産生に対するエスト  
ロゲンの抑制効果。

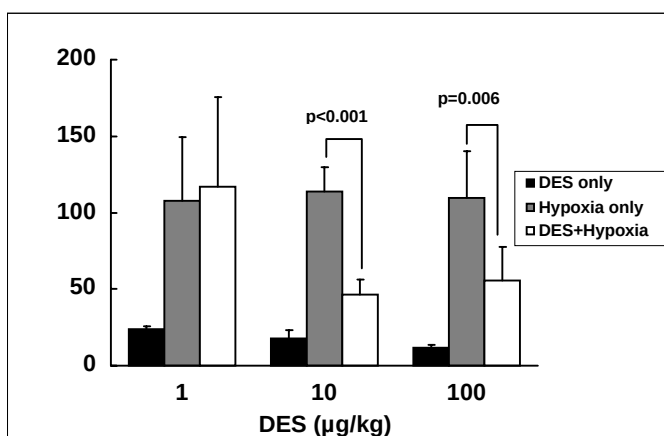


図 3 . 低気圧暴露 (0.65atm、  
24h) による EPO 産生に対  
する DES の抑制効果。

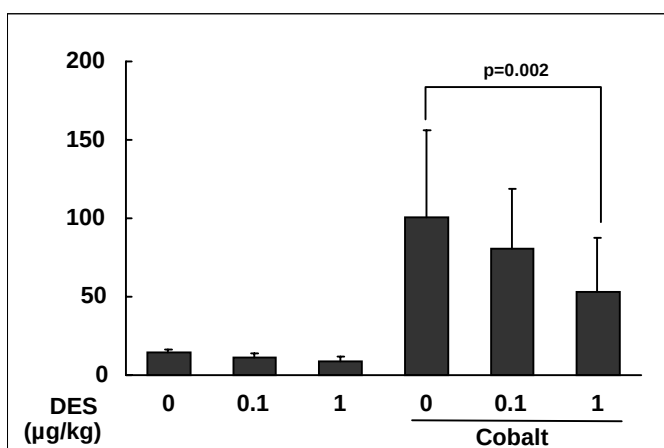


図 4 . コ バ ル ト 投 与  
(15mg/kg、24h) による  
EPO 産生に対する DES の  
抑制効果。

図 5. エストロゲンならびにDESの低気圧暴露 (A) とコバルト投与 (B) によるラット腎臓からのEPO mRNA発現に対する抑制効果 (6h)。

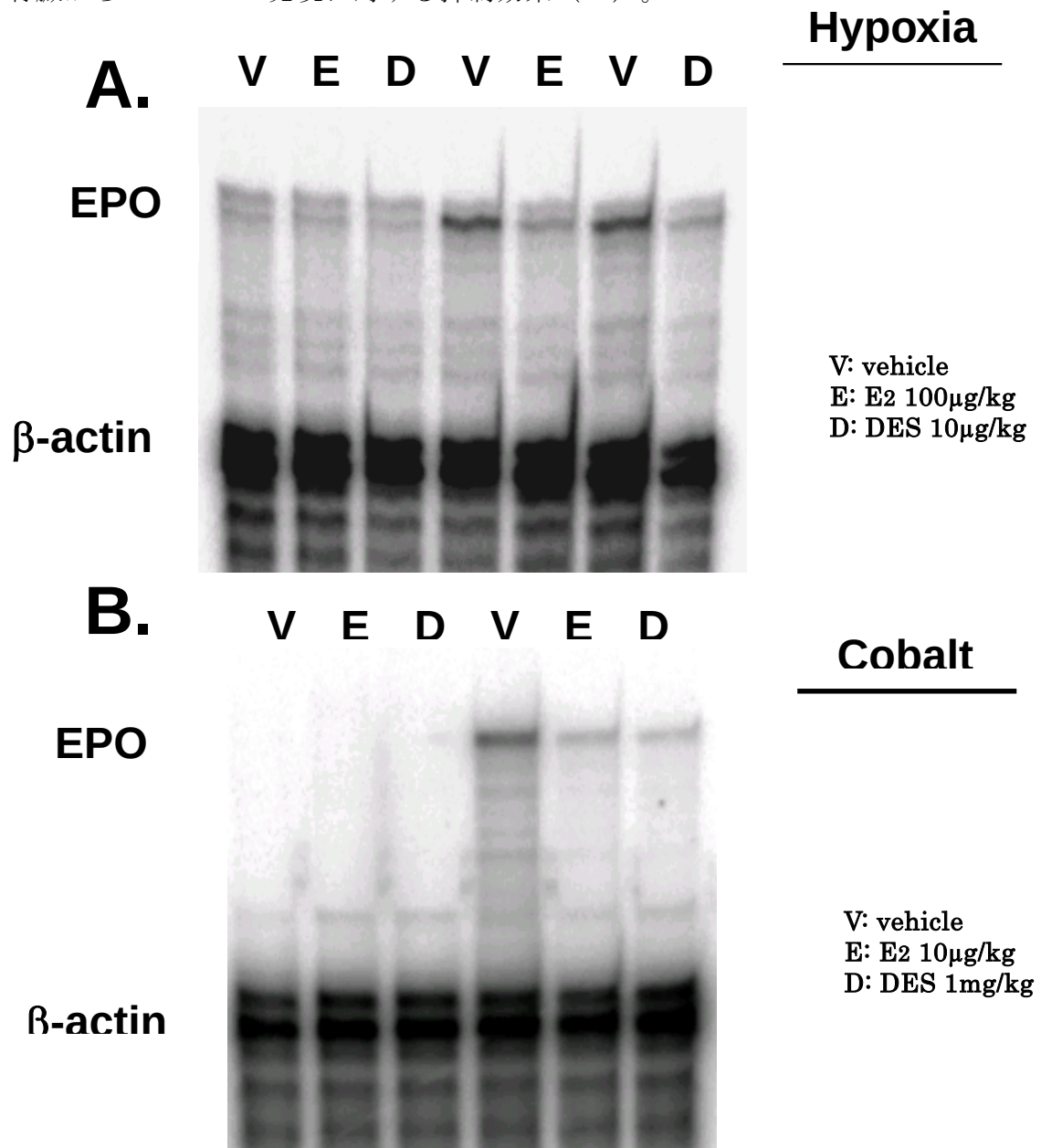


表. ラットにエストロゲンを2ヵ月投与（週に3回、皮下投与）した後の血液学的検査結果。

#### CLEA Rodent Diet CE-2

|                                         | Vehicle (N=8) |      | E <sub>2</sub> .0.1mg/kg (N=9) |      | E <sub>2</sub> .1mg/kg (N=9) |      |
|-----------------------------------------|---------------|------|--------------------------------|------|------------------------------|------|
|                                         | Mean          | SD   | Mean                           | SD   | Mean                         | SD   |
| RBC (10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> ) | 435.2         | 64.3 | 584.0*                         | 46.4 | 340.3*                       | 49.2 |
| Ht (%)                                  | 43.5          | 2.3  | 43.7                           | 1.4  | 36.8*                        | 1.0  |
| Hb (g/dl)                               | 14.9          | 0.5  | 13.9*                          | 0.6  | 12.7*                        | 0.4  |
| MCV (μm <sup>3</sup> )                  | 102.0         | 17.0 | 75.1*                          | 5.1  | 110.1                        | 15.7 |
| MCH (pg)                                | 34.8          | 5.0  | 23.9*                          | 1.9  | 37.9                         | 5.4  |
| MCHC (%)                                | 34.2          | 1.5  | 31.9*                          | 1.0  | 34.4                         | 1.0  |
| plasma Fe (μg/dl)                       | 280.5         | 23.7 | 237.7                          | 39.5 | 349.7*                       | 41.2 |
| TIBC (μg/dl)                            | 519.3         | 27.2 | 584.6*                         | 18.8 | 736.4*                       | 52.1 |
| ferritin (ng/ml)                        | 60.4          | 28.8 | 125.8*                         | 44.9 | 49.4                         | 20.8 |
| plasma Epo (mIU/ml)                     | 13.3          | 4.9  | 10.8                           | 1.8  | 14.9                         | 2.9  |

\*: p<0.05 (compared with PG)

#### Test Diet (Basal)

|                                         | Vehicle (N=8) |      | E <sub>2</sub> .0.1mg/kg (N=8) |      | E <sub>2</sub> .1mg/kg (N=8) |      |
|-----------------------------------------|---------------|------|--------------------------------|------|------------------------------|------|
|                                         | Mean          | SD   | Mean                           | SD   | Mean                         | SD   |
| RBC (10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> ) | 589.1         | 60.5 | 514.5*                         | 65.0 | 513.3*                       | 65.5 |
| Ht (%)                                  | 46.9          | 1.9  | 44.1*                          | 1.6  | 40.8*                        | 1.3  |
| Hb (g/dl)                               | 14.9          | 0.6  | 14.1*                          | 0.5  | 13.1*                        | 0.6  |
| MCV (μm <sup>3</sup> )                  | 80.2          | 7.3  | 86.8                           | 10.0 | 80.5                         | 10.2 |
| MCH (pg)                                | 25.5          | 2.5  | 27.7                           | 2.9  | 25.9                         | 3.1  |
| MCHC (%)                                | 31.8          | 0.6  | 31.9                           | 0.6  | 32.2                         | 0.8  |
| plasma Fe (μg/dl)                       | 322.3         | 37.2 | 348.9                          | 71.3 | 423.8*                       | 63.8 |
| TIBC (μg/dl)                            | 527.3         | 28.9 | 577.4*                         | 42.0 | 667.8*                       | 43.1 |
| ferritin (ng/ml)                        | 97.6          | 43.7 | 96.2                           | 39.1 | 82.1                         | 22.9 |
| plasma Epo (mIU/ml)                     | 15.0          | 2.5  | 19.3                           | 4.8  | 21.2*                        | 5.1  |

\*: p<0.05 (compared with PG group)

#### Test Diet (Low Fe)

|                                         | Vehicle (N=9) |      | E <sub>2</sub> .0.1mg/kg (N=9) |      | E <sub>2</sub> .1mg/kg (N=9) |      |
|-----------------------------------------|---------------|------|--------------------------------|------|------------------------------|------|
|                                         | Mean          | SD   | Mean                           | SD   | Mean                         | SD   |
| RBC (10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> ) | 955.6†        | 89.9 | 813.9*†                        | 70.5 | 680.9*†                      | 49.5 |
| Ht (%)                                  | 46.0          | 1.9  | 46.0                           | 2.0  | 42.0*                        | 2.1  |
| Hb (g/dl)                               | 13.6†         | 0.9  | 14.0                           | 0.8  | 12.9                         | 0.5  |
| MCV (μm <sup>3</sup> )                  | 48.6†         | 5.4  | 57.0*†                         | 6.3  | 61.9*†                       | 4.0  |
| MCH (pg)                                | 14.4†         | 1.9  | 17.3*†                         | 2.2  | 19.0*†                       | 1.6  |
| MCHC (%)                                | 29.6†         | 1.3  | 30.4                           | 1.1  | 30.7                         | 1.5  |
| plasma Fe (μg/dl)                       | 54.0†         | 10.9 | 83.2†                          | 51.7 | 198.6*†                      | 64.1 |
| TIBC (μg/dl)                            | 718.7†        | 31.0 | 751.8†                         | 33.0 | 757.0†                       | 50.1 |
| ferritin (ng/ml)                        | 16.4†         | 8.2  | 17.5†                          | 20.1 | 36.3†                        | 29.1 |
| plasma Epo (mIU/ml)                     | 45.5†         | 13.9 | 51.3†                          | 17.1 | 19.7*                        | 7.0  |

\*: p<0.05 (compared with vehicle group)

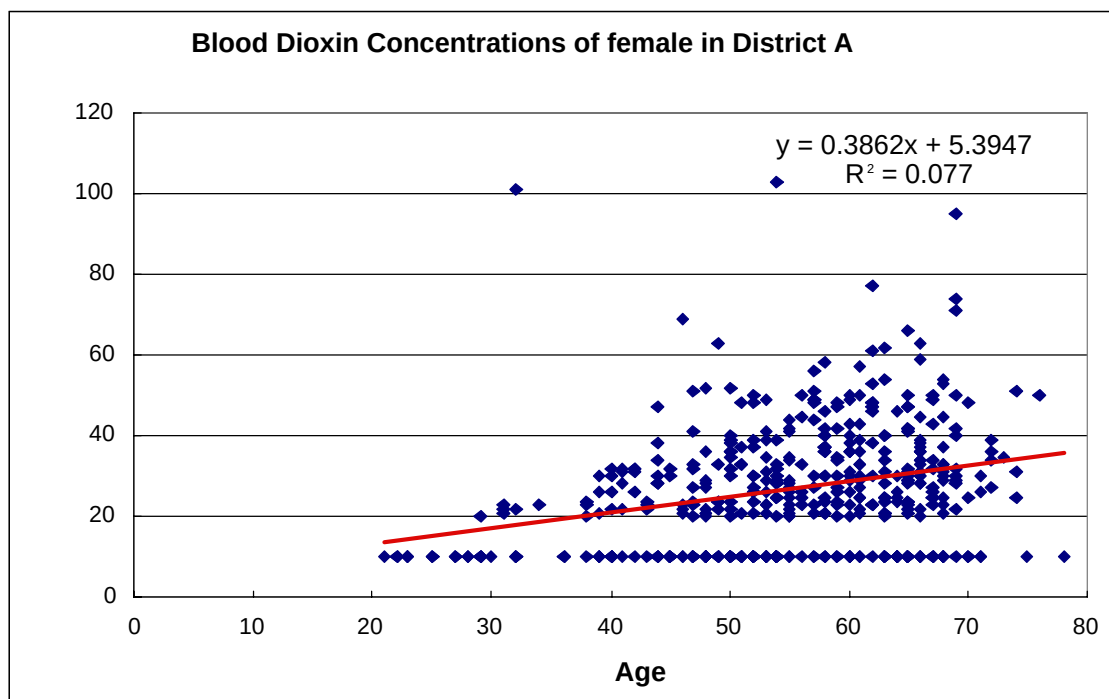
†: p<0.05 (compared with Basal Diet group)

### 3.2 疫学調査（香山グループおよび古賀グループ）

#### (1) 研究内容及び成果

全国5カ所のJA女性部の協力を得て、さまざまなレベルのカドミウム曝露を受けている1408名の農家女性の調査を行った。5地域の中で一番曝露の多かった地域では、FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA)の定める現行の暫定週間摂取耐用量 $7\mu\text{g/kg}$ を越える被験者が5割程度含まれていたが、加齢変化を調整すると、カドミウムによる腎機能の低下および骨密度の低下はなかった。その前提で、イソフラボン等の骨密度などへの影響が評価できることとなった。

採取した血液サンプルを用いて、植物エストロゲンおよび有機塩素系農薬、ダイオキシン類の血中濃度に関して、測定を行い、統計解析を行った。AhRへの結合および転写活性をルシフェラーゼ活性で測定するCALUX assay法を用いて測定の同意の得られた1160名の血中ダイオキシン濃度(PCDD+PCDF分画)を測定した。



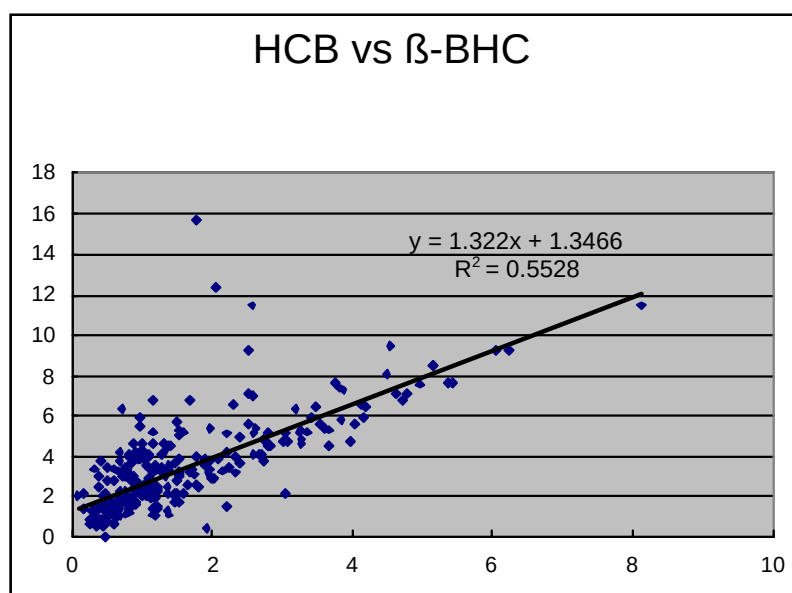
ダイオキシン濃度は、年齢とともに上昇する傾向を示し、魚介類の摂取量と弱い正の相関を示した。また、一地域のみ血中ダイオキシン濃度の高い地域が認められた。

ヒト血清中有機塩素系農薬の検出を試み、地域差、加齢、食習慣などとの関連



性を調査した。全国5地区で50歳から70歳代の農村地域主婦を対象に栄養調査を行い計1408名から採血した。血清中環境汚染物質のスクリーニング分析：成人血清を用いスクリーニング分析を行った結果、 $\beta$ -ヘキサクロロシクロヘキサン（ $\beta$ -HCH）、ヘキサクロロベンゼン（HCB）、DDTの代謝物であるDDEが頻繁に検出されることが分かった。

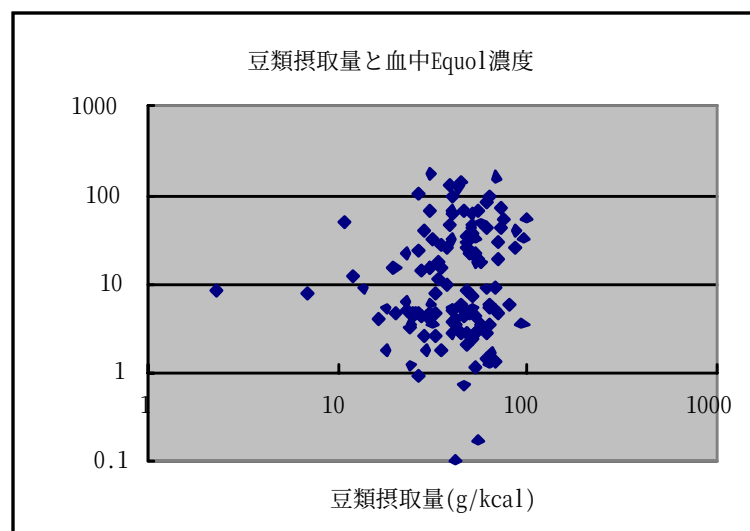
血清中塩素系農薬の濃度レベル：ほとんどの試料からDDEが検出され、DDEの濃度は加齢と共に増加する傾向が見られた。DDE濃度には地域差はみられず、平均3.3ppbであった。米国での調査では平均18.6ppbの高い値が報告されている。HCBは3地域とも同レベル（平均1.5ppb）であった。一方、 $\beta$ -HCH濃度には明らかな地域差が見られた。福岡県での調査結果は他の2地域の2倍程度高く、米国での調査結果の9倍近い値が得られた。HCHは我が国の南西部、特に北部九州での散布量が多いことが知られており、HCHの使用量と関連すると考えられる。また、HCBと $\gamma$ -BHC、 $\beta$ -BHCとは相互に高い相関関係があり、不純物として存在して存在していたために禁止後数十年経ても、残留量にも相関が見られると考えられた。5地域での食品摂取量には特に差は見られなかった。また、有機塩素系農薬は、年齢と共に上昇する傾向があり、南の地域で高く北に行くほど低くなる傾向があった。



しかし、ダイオキシン濃度が高かった地域は北の地域であり、有機塩素系農薬の不純物としての職業曝露および環境曝露からの血中ダイオキシン濃度の上昇はないことが明らかとなった。

疫学調査で得られた血清中のイソフラボン濃度をHPLCクーロアレイ法で、さらに

尿中エクオール濃度をTime dissolved fluoro-immunoassay (TD-FIA)で測定した。自記式食事質問票から求めた豆類摂取量とよい相関はみられなかった。これは、生体内で代謝排泄の速いイソフラボン類の血中濃度と過去一ヶ月の摂取量との相関がみられないためと考えられた。一方、尿中および血中エクオール濃度は、豆類摂取量と独立に高い群と低い群との2群にほぼ分けられることが明らかとなった。エクオールはダイゼインが腸内細菌叢により変化を受けることにより產生されるので、食生活や腸内細菌叢の状態を反映するものと考えられた。今後15年間のコホートとして追跡する。



骨密度および骨代謝マーカーと過去一ヶ月の食事調査から算出されたイソフラボン摂取量との関係を解析した。年齢、運動量、カロリー摂取量等の交絡因子を調整した結果、閉経前では相関が見られなかったが、閉経後では弱い相関が見られた。また、食品では納豆の摂取量の多い被験者に骨密度が有意に維持されることが明らかとなった。

**Table 4.** Adjusted mean values ( $\pm$ SEM) of forearm bone mineral density and bone turnover markers by quartile of isoflavone intake among Japanese pre and postmenopausal women

|                                                   | Menopausal status | Isoflavone consumption (mg/day) <sup>a</sup> |                           |                          |                        | p Model 3 <sup>b</sup> |
|---------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
|                                                   |                   | Lowest (-30.2 mg/day)                        | Second (30.2-42.1 mg/day) | Third (42.1-56.3 mg/day) | Highest (56.3- mg/day) |                        |
| Forearm bone mineral density (g/cm <sup>2</sup> ) | Pre               | 0.481 $\pm$ 0.005                            | 0.486 $\pm$ 0.005         | 0.475 $\pm$ 0.006        | 0.490 $\pm$ 0.008      | 0.34                   |
|                                                   | Post              | 0.390 $\pm$ 0.005                            | 0.388 $\pm$ 0.004         | 0.398 $\pm$ 0.004        | 0.406 $\pm$ 0.005      | 0.06                   |
| Serum BAP (IU/l)                                  | Pre               | 21.9 $\pm$ 0.75                              | 21.9 $\pm$ 0.79           | 21.6 $\pm$ 0.90          | 22.0 $\pm$ 1.10        | 0.98                   |
|                                                   | Post              | 31.4 $\pm$ 0.81                              | 33.6 $\pm$ 0.70           | 32.9 $\pm$ 0.66          | 33.2 $\pm$ 0.75        | 0.18                   |
| Serum osteocalcin (ng/ml)                         | Pre               | 6.37 $\pm$ 0.21                              | 6.11 $\pm$ 0.22           | 5.95 $\pm$ 0.26          | 5.70 $\pm$ 0.31        | 0.44                   |
|                                                   | Post              | 9.86 $\pm$ 0.25                              | 9.71 $\pm$ 0.21           | 9.67 $\pm$ 0.20          | 9.33 $\pm$ 0.23        | 0.50                   |
| Urinary NTX (nmol/mmol Cr)                        | Pre               | 38.2 $\pm$ 1.82                              | 40.7 $\pm$ 1.91           | 36.4 $\pm$ 2.18          | 36.1 $\pm$ 2.67        | 0.40                   |
|                                                   | Post              | 67.7 $\pm$ 2.26                              | 69.1 $\pm$ 1.95           | 66.9 $\pm$ 1.82          | 64.5 $\pm$ 2.08        | 0.50                   |
| Urinary DPD (nmol/mmol Cr)                        | Pre               | 6.35 $\pm$ 0.22                              | 6.61 $\pm$ 0.23           | 6.00 $\pm$ 0.27          | 6.10 $\pm$ 0.33        | 0.36                   |
|                                                   | Post              | 7.55 $\pm$ 0.33                              | 8.09 $\pm$ 0.28           | 7.81 $\pm$ 0.26          | 7.85 $\pm$ 0.30        | 0.61                   |

<sup>a</sup> Quartiles based on energy-adjusted isoflavone intake. The mean isoflavone intakes were 21.0, 36.1, 48.5, and 74.3 mg/day in quartiles 1, 2, 3, and 4, respectively.

<sup>b</sup> Based on analysis of covariance (ANCOVA) across the quartiles of isoflavone intake.

## (2) 研究成果の今後期待される効果

これまで、この調査のような農家女性の全国調査は行われてなく、カドミウムの様々な曝露レベルの集団を調査された研究もない。また、有機塩素系農薬、ダイオキシン類CALUXアッセイによる測定なども、千名以上の被験者で行われた調査は、国内ではないので、非常に今後のリスク評価に資する研究と考えられる。また、この研究の被験者をコホートとして追跡するので、カドミウムを含めてその他の内分泌かく乱化学物質の影響評価を長期的展望で続けていく必要がある。

## 3.3 イソフラボンの定量法をクローレイ法とGC/MS法との双方で解析検討(山田グループ)

### 3.3.1 生体試料中のイソフラボン定量法の確立

#### (1) 研究内容及び成果

大豆イソフラボンは、エストロゲン様活性を有することからphytoestrogenと呼ばれ、種々の生理作用を発現することが報告されている。一方、イソフラボンはエストロゲン受容体との競合を通じて内在性エストロゲンの活性を抑制することから、内分泌攪乱物質の活性を抑制することが期待されている。これらのエストロゲン活性を有する化合物の生体調節機能を解明するためには、生体中の存在量を知ることが重要となる。本研究では、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と

クーロアレイ型電気化学検出器を組み合わせた大豆イソフラボン検出系の構築を試みた。

まず、HPLC分析条件の設定を行い、ODSカラムを用いた大豆イソフラボンアグリコンの検出および検出シグナルの電圧依存性について検討し、抗酸化機能の高い化合物はより低い電圧で最高のシグナルを与えることを明らかにした (Wu et al., 2003)。ここで得られた分析条件を用いて香山研究室より提供されたヒト血清試料中のイソフラボンアグリコンの定量を試みたが、アグリコンの検出感度が不足したこと、アグリコンと同一の保持時間を有する挟雑物質が存在しており8種の測定電圧の活用のみでは十分な精度で分別定量することが困難であることが明らかとなった。検出感度および存在量の問題は血清試料のグルクロニダーゼ処理による配糖体と遊離イソフラボンの同時定量を行うことにより解決されたが、分別定量の問題については未解決であり、多様な成分を含むヒト試料においては質量スペクトルなどのより分離能の高い手法を導入すべきであると考えられた。

表 1 クーロアレイを用いたイソフラボンアグリコンおよび配糖体の同時定量

|             | Retention time<br>(min) | Peak area<br>(mC/%RSD) | Peak height<br>(nA/%RSD) | Peak potential<br>(mV) |
|-------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| Daidzin     | 11.1                    | 5.84/4.2               | 243.0/4.8                | 600                    |
| Glycitin    | 12.8                    | 9.86/5.2               | 383.1/4.8                | 600                    |
| Genistin    | 21.3                    | 5.29/8.7               | 160.5/4.8                | 600                    |
| Daidzein    | 33.7                    | 6.00/5.2               | 312.0/6.1                | 600                    |
| Glycitein   | 34.8                    | 5.56/2.8               | 273.7/3.6                | 600                    |
| Genistein   | 38.6                    | 5.48/11.4              | 236.6/10.0               | 600                    |
| Equol       | 37.0                    | 14.93/9.0              | 867.4/7.7                | 600                    |
| Bisphenol A | 43.1                    | 10.08/7.2              | 595.1/8.1                | 600                    |

各試料とも 25  $\mu$ g を分析に供した (n=10)。

しかし、クーロアレイは動物実験や細胞実験で得られた試料中のイソフラボンの定量には高い有効性を示した (Yasuda et al., 2003, 2004)。表1に示したように、主要な大豆イソフラボンアグリコンとその代謝物だけでなく、配糖体を同時に定量することが可能である。内分泌攪乱物質の一つであるbisphenol Aも同一の分析条件で検出することが可能であり、大豆イソフラボン検出の標準物質として利用することとした。

表2に、daidzein (Dai)、genistein (Gen) およびbisphenol Aを各40 mg含む混合物をSprague-Dawley系雄ラットに胃内投与し、0、6、12、24時間後に屠殺して臓器分布を調べた結果を示した。血清あるいは組織ホモジネートからエタノール抽出によりこれらの化合物を回収し、ODSカラムを用いて分画した。表2はグルク

ロニダーゼ処理により、アグリコンと抱合体の同時定量を行った結果を示しているが、脂肪組織ではこれらの化合物は検出されず、血清、肝臓、腎臓および腸間膜リンパ節ではDai、Gen、bisphenol Aが投与後6～24時間後に検出されることが明らかとなった。また、胸腺、脾臓、睾丸、副睾丸、貯精囊および前立腺では、6および12時間後にDaiおよびGenのレベルが上昇したが、これらの臓器ではbisphenol Aがほとんど検出されず、副睾丸においてのみ6および12時間後に検出された。イソフラボンの主要な代謝物であるequolは、血清、肝臓、腎臓および腸間膜リンパ節で検出された。また、これらの化合物は、血清では主として抱合体として存在するが、各種組織では遊離体として多く存在することも明らかとなった。これらの結果は、イソフラボンの輸送および代謝に組織特異性が存在すること、組織により生理活性の発現が異なることを示唆している。

表2 経口投与したイソフラボンおよびビスフェノールの組織分布の時間依存性

| Tissues               | Compound    | Concentration (tissues) |          |           |          |
|-----------------------|-------------|-------------------------|----------|-----------|----------|
|                       |             | 0 h                     | 6 h      | 12 h      | 24 h     |
| Serum<br>(ng/ml)      | Genistein   | ND                      | 1118±355 | 1011±723  | 503±278  |
|                       | Daidzein    | ND                      | 1143±455 | 751±446   | 490±150  |
|                       | Equol       | 126±34                  | 64±23    | 64±25     | 136±95   |
|                       | Bisphenol A | ND                      | 355±146  | 517±231   | 493±151  |
| Liver<br>(ng/g)       | Genistein   | ND                      | 866±552  | 824±490   | 336±112  |
|                       | Daidzein    | ND                      | 608±328  | 515±276   | 318±71   |
|                       | Equol       | 312±61                  | 133±41   | 157±46    | 259±170  |
|                       | Bisphenol A | ND                      | 2263±773 | 4431±2206 | 2293±825 |
| Kidney<br>(ng/g)      | Genistein   | ND                      | 1044±424 | 744±356   | 395±146  |
|                       | Daidzein    | ND                      | 1871±752 | 1020±462  | 759±172  |
|                       | Equol       | 100±18                  | ND       | ND        | 114±55   |
|                       | Bisphenol A | ND                      | 206±64   | 374±193   | 262±57   |
| MLN<br>(ng/g)         | Genistein   | ND                      | 673±321  | 405±139   | 235±82   |
|                       | Daidzein    | ND                      | 444±205  | 228±77    | 218±163  |
|                       | Equol       | ND                      | ND       | ND        | 108±75   |
|                       | Bisphenol A | ND                      | 1049±573 | 1006±473  | 663±491  |
| Thymus<br>(ng/g)      | Genistein   | ND                      | 274±28   | 247±77    | 181±36   |
|                       | Daidzein    | ND                      | 195±47   | 231±97    | 90±5     |
|                       | Equol       | ND                      | ND       | ND        | ND       |
|                       | Bisphenol A | ND                      | ND       | ND        | ND       |
| Spleen<br>(ng/g)      | Genistein   | ND                      | 210±29   | 202±51    | 162±28   |
|                       | Daidzein    | ND                      | 143±24   | 113±29    | 93±10    |
|                       | Equol       | ND                      | ND       | ND        | ND       |
|                       | Bisphenol A | ND                      | ND       | 113±128   | ND       |
| Testicle<br>(ng/g)    | Genistein   | 227±58                  | 343±83   | 327±58    | 264±60   |
|                       | Daidzein    | 89±4                    | 198±45   | 172±40    | 134±11   |
|                       | Equol       | ND                      | ND       | ND        | ND       |
|                       | Bisphenol A | ND                      | ND       | ND        | ND       |
| Epididymis<br>(ng/g)  | Genistein   | 249±47                  | 469±117  | 428±125   | 257±70   |
|                       | Daidzein    | ND                      | 299±85   | 234±100   | 117±24   |
|                       | Equol       | ND                      | ND       | ND        | ND       |
|                       | Bisphenol A | ND                      | 101±43   | 97±43     | ND       |
| Spermatheca<br>(ng/g) | Genistein   | ND                      | 306±103  | 242±48    | 184±27   |
|                       | Daidzein    | ND                      | 252±149  | 113±25    | 112±50   |
|                       | Equol       | ND                      | ND       | ND        | ND       |
|                       | Bisphenol A | ND                      | ND       | ND        | ND       |
| Prostate<br>(ng/g)    | Genistein   | ND                      | 273±129  | 219±39    | 176±16   |
|                       | Daidzein    | ND                      | 213±117  | 125±27    | 175±95   |
|                       | Equol       | ND                      | ND       | ND        | ND       |
|                       | Bisphenol A | ND                      | ND       | ND        | ND       |

平均値±SD (n=4)。ND; not detected.

細胞培養実験においては、培養液中に添加したイソフラボンアグリコンがヒト肝臓HepG3細胞に速やかに取り込まれ、抱合化されたイソフラボンが培養液中に分泌されることを見出している。現在、抱合体の同定を行っているが、この結果はイソフラボン抱合体の標準物質の調製が可能であることを示すとともに、本実験系がアグリコンの取り込み、抱合化、抱合体の分泌機構の解明に利用可能であることを示している。

### 3.3.2 内分泌攪乱物質のエストロゲン活性の測定と乳癌細胞株の増殖に及ぼす影響

#### (1) 研究内容及び成果

大豆イソフラボンおよび内分泌攪乱物質のエストロゲン活性は内在性のエストロゲンより微弱であるため、その活性発現機構を解析するためにはより高感度なエストロゲン活性検出系の構築が必要であった。本研究では、食品成分である大豆イソフラボンの生理活性発現機構を解析することが目的であるため、ヒト乳癌細胞株MCF-7細胞を用いたエストロゲン活性検定系の改良を行った (Han et al., 2000, 2001; 山田ら, 2000)。血清中の内在性エストロゲンの除去には活性炭処理が有効であるが、市販の活性炭処理仔ウシ血清はMCF-7細胞に対して毒性を示したため、当研究室で調製した活性炭処理ウシ胎児血清を使用することとした。また、pH指示薬であるフェノールレッドはエストロゲン活性を有するので、培地から除去することとした。

この実験系を用いて各種内分泌攪乱物質のエストロゲン活性を測定するとともに、酵素抗体法を用いてヒトエストロゲン受容体への結合能を比較した (Han et al., 2002a; 山田ら, 2001)。表3に、最高のMCF-7細胞増殖促進活性を示した濃度 (Optimal conc.) と $17\beta$ -estradiol (E2) とエストロゲン受容体 (ER) の結合を50%阻害した濃度 (IC50) を示したが、両者の間に正の相関が存在することが明らかとなった。しかし、若干の例外も存在したことから、環境ホルモンのエストロゲン活性発現にはERとの結合が重要であるが、そのみに依存するものではないことが示唆された。

表 3 各種内分泌攪乱物質のエストロゲン受容体結合活性およびエストロゲン活性の比較

| Group           | Compounds            | Binding activity | Estrogenic activity |      |
|-----------------|----------------------|------------------|---------------------|------|
|                 |                      | IC50             | Optimal conc.       | Fold |
| Pharmaceuticals | 17 -Estradiol        |                  | 0.1 nM              | 2.2  |
|                 | Diethylstilbestrol   | 0.4 nM           | 10 nM               | 3.5  |
|                 | 17 -Ethinylestradiol | 50 nM            | 10 nM               | 2.6  |
|                 | Tamoxifen            | 30 nM            | 100 nM              | 1.4  |
|                 | Mestranol            | 40 nM            | 1000 nM             | 1.4  |
|                 | Clomiphene           | 100 nM           | 10 nM               | 1.2  |
| Coumestan       | Coumestrol           | 40 nM            | 100 nM              | 2.0  |
| Isoflavones     | Daidzein             | 100 nM           | 10 nM               | 2.0  |
|                 | Genistein            | 50 nM            | 1000 nM             | 1.9  |
|                 | Formononetin         | 10 mM            | 10 mM               | 1.9  |
|                 | Biochanin A          | 10 mM            | 100 mM              | 1.3  |
| Isoflavan       | Equol                | 1 mM             | 1000 mM             | 1.4  |
| Flavanone       | Naringenin           | 0.3 mM           | 10 mM               | 2.6  |
| Chalcone        | Phloretin            | 7 mM             | 1000 mM             | 2.0  |
| Flavones        | Luteolin             | 500 nM           | 1 nM                | 2.2  |
|                 | Chrysin              | 50 nM            | 100 mM              | 1.5  |
|                 | Apigenin             | 1 mM             | 10 mM               | 2.6  |
|                 | Flavone              | 0.3 mM           | 1 mM                | 1.7  |
| Flavonols       | Kaempferol           | 50 mM            | 10 mM               | 2.3  |
|                 | Quercetin            | 50 mM            | 1 nM                | 2.0  |
| Alkylphenols    | 4-Nonylphenol        | 900 nM           | 10 nM               | 2.1  |
|                 | 4-Octylphenol        | 9 mM             | 1 mM                | 2.6  |
|                 | 4-Ethylphenol        | 800 mM           | 100 mM              | 1.1  |
| Plasticizers    | Bisphenol A          | 50 mM            | 10 nM               | 2.1  |
|                 | BEHA                 | 80 mM            | 1 mM                | 2.3  |
| Herbicides      | Cyanazine            | 9 mM             | 1 mM                | 2.6  |
|                 | 2,4-Dichlorophenol   | 300 mM           | 10 mM               | 1.6  |
| Others          | DHBP                 | 50 mM            | 10 mM               | 2.3  |

BEHA; Bis(2-ethylhexyl)adipate、DHBP; 4-dihydroxybiphenol。

表4に、大豆イソフラボンを含む代表的フラボノイドと内分泌攪乱物質の相互作用について検討した結果を示した。これらのフラボノイドはそれ自身より高いER結合能を有する物質のエストロゲン活性発現には影響しないが、それ自身よりERとの結合能が低い化合物の活性発現を抑制することが明らかとなった。この結果は、ERへの結合が環境ホルモン活性の発現において重要な役割を演じていることを示唆している。興味深いことは、大豆イソフラボンと内分泌攪乱物質を同時に添加した場合、MCF-7細胞に対して強い致死毒性が発現したことであり、これらの化合物の複合的な投与により制癌活性が発現する可能性が示された。



表 4 各種内分泌攪乱物質とフラボノイドの複合作用

|             | Relative cell number (%) |                     |                      |                     |                    |
|-------------|--------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|--------------------|
|             | None                     | Daidzein<br>(10 nM) | Genistein<br>(10 nM) | Quercetin<br>(1 nM) | Luteolin<br>(1 nM) |
| 10 nM DES   | 350±23                   | 340±10              | 338±8                | 338±11              | 340±10             |
| 10 nM EE    | 260±10                   | 200±7               | 175±6                | 255±10              | 220±10             |
| 100 nM Tam  | 140±10                   | 138±4               | 120±11               | 140±9               | 137±12             |
| 1000 nM Mes | 140±9                    | 125±7               | 95±7                 | 110±9               | 100±5              |
| 10 nM Clo   | 120±9                    | 85±7                | 64±7                 | 110±9               | 100±5              |
| 10 nM NP    | 210±10                   | 56±10               | 48±3                 | 150±11              | 63±8               |
| 1000 nM OP  | 260±10                   | 67±6                | 55±9                 | 120±13              | 63±8               |
| 1 nM DHBP   | 230±9                    | 63±8                | 40±7                 | 195±8               | 85±5               |
| 10 nM BA    | 210±8                    | 60±5                | 55±8                 | 200±10              | 70±10              |

平均値±SD (n=5)。DES; diethylstilbestrol、EE; 17 $\alpha$ -ethynylestradiol、Tam; tamoxifen、MES; mestranol、Clo; clomiphene、NP; 4-nonylphenol、OP; 4-octylphenol、DHBP; 4-dihydroxybiphenol、BA; bisphenol A。

そこで、MCF-7細胞の増殖調節機構についてさらなる検討を行った。MCF-7細胞の培養には活性炭処理ウシ胎児血清を用いているが、われわれは活性炭処理によりステロイドホルモンだけでなく、インシュリンなどのタンパク性増殖因子の一部が除去されることを見出している。したがって、本実験系を用いてMCF-7細胞のタンパク性増殖因子要求性も検討することが可能である。表5はこれらの増殖因子の増殖促進効果を検討した結果を示しているが、E2と同様にインシュリンおよび上皮細胞増殖因子（EGF）がMCF-7細胞の増殖を濃度依存的に促進することが明らかである。

表 5 乳癌細胞株の増殖に及ぼす各種増殖因子の影響

| Conc. | Cell density (x 10 <sup>4</sup> cells/well) |                        |                        |
|-------|---------------------------------------------|------------------------|------------------------|
|       | Estradiol (mM)                              | Insulin (mg/ml)        | EGF (mg/ml)            |
| 0     | 8.1±0.9 <sup>a</sup>                        | 8.7±0.8 <sup>a</sup>   | 10.5±1.5 <sup>a</sup>  |
| 0.001 | NT                                          | NT                     | 13.2±2.3 <sup>ab</sup> |
| 0.01  | 14.0±0.6 <sup>b</sup>                       | 16.7±1.5 <sup>b</sup>  | 14.8±1.2 <sup>bc</sup> |
| 0.1   | 18.2±1.0 <sup>b</sup>                       | 18.0±0.9 <sup>bc</sup> | 15.8±1.8 <sup>bd</sup> |
| 1.0   | 15.0±0.9 <sup>b</sup>                       | 17.2±0.8 <sup>bc</sup> | 18.0±1.8 <sup>d</sup>  |
| 10.0  | NT                                          | 18.8±1.4 <sup>c</sup>  | NT                     |

平均値±SD、異なる文字間で有意差あり (n=3、Fisher's PLSD、p<0.05)。EGF; epidermal growth factor、NT; not tested。

つぎに、これらの増殖因子の増殖促進機構を明らかにするため、各種キナーゼ阻害剤の影響について検討した。表6はMEKキナーゼ阻害剤であるPD98059とJNK阻害剤であるSP600125の影響を示したものであるが、いずれの阻害剤もE2誘導性の

細胞増殖を濃度依存的に阻害することが明らかとなった。表7はp38阻害剤であるSB203580とPI3キナーゼ阻害剤であるwortomanninの影響を示したものであるが、wortomanninはE2誘導性の細胞増殖を濃度依存的に阻害するが、SB203580は影響しないことが示唆された。インシュリンおよびEGF誘導性の増殖においても同様の結果が得られており、これらの増殖因子は同様のシグナル伝達経路を介して増殖刺激を伝達することが示唆された。また、MCF-7細胞をE2結合ウシ血清アルブミンで処理することによりE2処理と同様に増殖促進効果が認められたことから、E2の増殖促進刺激は細胞膜表面に発現したERによっても伝達されることが明らかとなった。

表 6 エストラジオール誘導性乳癌細胞増殖に及ぼすキナーゼ阻害剤の効果 (1)

| Inhibitor<br>(nM) | conc. | Cell density (x 10 <sup>4</sup> cells/well) |          |                          |          |
|-------------------|-------|---------------------------------------------|----------|--------------------------|----------|
|                   |       | PD98059 (MEK inhibitor)                     |          | SP600125 (JNK inhibitor) |          |
|                   |       | E2 (-)                                      | E2 (+)   | E2 (-)                   | E2 (+)   |
| 0                 |       | 10.2±1.6                                    | 19.2±1.2 | 9.5±0.5                  | 17.2±0.8 |
| 1                 |       | 10.8±2.3                                    | 18.0±1.5 | 10.5±0.5                 | 11.5±1.5 |
| 5                 |       | 10.5±0.9                                    | 14.8±1.5 | 9.2±1.0                  | 8.8±1.9  |
| 10                |       | 10.7±0.8                                    | 12.7±2.5 | 9.0±1.3                  | 7.3±0.6  |
| 50                |       | 7.7±0.8                                     | 11.8±0.6 | 3.8±1.0                  | 6.0±0.5  |

平均値±SD (n=3)。

表 7 エストラジオール誘導性乳癌細胞増殖に及ぼすキナーゼ阻害剤の効果 (2)

| Inhibitor<br>(nM) | conc. | Cell density (x 10 <sup>4</sup> cells/well) |          |                               |          |
|-------------------|-------|---------------------------------------------|----------|-------------------------------|----------|
|                   |       | SB203580 (p38 inhibitor)                    |          | Wortomannin (PI3-K inhibitor) |          |
|                   |       | E2 (-)                                      | E2 (+)   | E2 (-)                        | E2 (+)   |
| 0                 |       | 13.0±0.5                                    | 21.8±1.0 | 9.8±1.8                       | 16.7±1.4 |
| 1                 |       | 11.7±1.8                                    | 21.8±1.9 | 10.2±1.8                      | 15.2±1.0 |
| 10                |       | 12.2±0.8                                    | 21.3±1.8 | 10.0±2.2                      | 12.0±0.5 |
| 100               |       | 12.3±0.8                                    | 21.5±0.0 | 9.0±1.3                       | 8.7±1.3  |
| 1000              |       | 12.3±1.0                                    | 21.2±1.8 | 7.5±1.3                       | 5.8±0.3  |

平均値±SD (n=3)。

### 3.3.3 内分泌攪乱物質の免疫調節機能

#### (1) 研究内容及び成果

大豆イソフラボン、エストロゲン代替作用を有するとともに、抗エストロゲン、制癌、免疫調節、骨密度調節、脂質代謝調節などの多彩な生理活性を発現することが報告されている。本研究では、内分泌攪乱物質の免疫調節機能についても検討を行い、DaiおよびGenが低濃度領域ではマウス脾臓リンパ球のIgE産生を抑制し、高濃度領域では促進すること、IgM産生はDaiが促進傾向を示すのに対し、Genは抑制傾向を示すことなどを明らかにした (Han et al., 2002b; 山田ら, 2002)。

表8 イソフラボンの IFN- $\gamma$ 産生抑制効果の発現に及ぼす接着細胞の影響

|           | Adherent cells | IFN- g (ng/ml) |                 |                  |                  |
|-----------|----------------|----------------|-----------------|------------------|------------------|
|           |                | 6 h            | 12 h            | 24 h             | 72 h             |
| None      | +              | ND             | 0.9 $\pm$ 0.2   | 1.8 $\pm$ 0.2    | 3.0 $\pm$ 0.6    |
| Estradiol | +              | ND             | 0.7 $\pm$ 0.2   | 1.3 $\pm$ 0.6    | 1.1 $\pm$ 0.2**  |
| Genistein | +              | ND             | 0.5 $\pm$ 0.0** | 0.7 $\pm$ 0.0*** | 0.8 $\pm$ 0.2**  |
| Daidzein  | +              | ND             | 0.6 $\pm$ 0.2   | 1.2 $\pm$ 0.1**  | 1.2 $\pm$ 0.3*   |
| None      | -              | ND             | ND              | 5.2 $\pm$ 1.0    | 12.7 $\pm$ 0.3   |
| Estradiol | -              | ND             | ND              | 3.8 $\pm$ 0.6    | 11.2 $\pm$ 1.0   |
| Genistein | -              | ND             | ND              | 3.5 $\pm$ 0.6    | 10.5 $\pm$ 0.0** |
| Daidzein  | -              | ND             | ND              | 4.6 $\pm$ 0.4    | 12.3 $\pm$ 0.8   |

平均値 $\pm$ SD (n=3、Student's *t* 検定、\**p*<0.05、\*\**p*<0.01、\*\*\**p*<0.001)。

このクラス特異的抗体産生調節機構を明らかにするため、サイトカイン産生に及ぼす大豆イソフラボンの影響について検討した(Nakaya et al., 2004)。まず、マウス脾臓細胞をE2、DaiもしくはGenを添加した培地中で培養し、lipopolysaccharide存在下でのインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) および腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 産生に及ぼす影響について検討した。その結果、マウス脾臓細胞のTNF- $\gamma$  産生にはE2、GenおよびDaiの影響は認められないが、IFN- $\gamma$  産生はE2、GenおよびDaiにより濃度依存的に抑制されることが明らかとなった。マウス脾臓細胞中にはマクロファージなどの接着細胞が存在しており抗原提示細胞として機能するとともに、サイトカイン産生を間接的に制御している可能性がある。そこで、マウス脾臓細胞からリンパ球と接着細胞を分離し、それぞれの細胞のIFN- $\gamma$  産生に及ぼすphytoestrogenの影響について検討した。その結果、大豆イソフラボンのIFN- $\gamma$  産生抑制効果は接着細胞が共存する場合にのみ発現することが明らかとなった(表8)。接着細胞のみを培養した場合にはIFN- $\gamma$  産生そのものが認められないことから、培養上清中のIFN- $\gamma$  はリンパ球由来のものであり、接着細胞がE2、GenおよびDaiのIFN- $\gamma$  産生抑制効果の発現に関与することが示唆された。

表9 イソフラボンの IFN- $\gamma$ 産生抑制効果の発現に及ぼす細胞間相互作用の影響

|           | IFN- g (ng/ml)  |                  |                    |
|-----------|-----------------|------------------|--------------------|
|           | Mixed culture   | Separate culture | Lymphocyte culture |
| None      | 4.2 $\pm$ 0.4   | 8.9 $\pm$ 0.4    | 7.8 $\pm$ 0.2      |
| Estradiol | 2.9 $\pm$ 0.6*  | 8.8 $\pm$ 0.3    | 7.7 $\pm$ 0.3      |
| Genistein | 2.3 $\pm$ 0.3** | 9.0 $\pm$ 0.5    | 7.2 $\pm$ 0.1      |

平均値 $\pm$ SD (n=3、Student's *t* 検定、\**p*<0.05、\*\**p*<0.01)。

このリンパ球と接着細胞の細胞間相互作用が、液性因子および細胞接触のいずれに起因するかを検討するため、カルチャーチャンバーを用いて両者の直接的接触を避けて共培養した。この条件下では、混合培養系で認められたE2およびGenのIFN- $\gamma$ 産生抑制効果が認められず、リンパ球と接着細胞の直接的接触が大豆イソフラボンのIFN- $\gamma$ 産生抑制効果の発現に不可欠であることが確認された。これらの結果は、E2および大豆イソフラボンが接着細胞とリンパ球の接触が関与する機構を通じてリンパ球のサイトカイン産生および抗体産生を制御していることを示唆している。脾臓細胞をE2結合ウシ血清アルブミンで処理した場合でも同様な効果が発現することも明らかとなっており、膜表面に存在するERの生理的意義について今後の検討が必要である。

### 3.4 内分泌かく乱物質の免疫系への影響（山下グループ）

#### (1) 研究内容及び成果

我々の身の周りに存在する種々の化学物質（環境ホルモン）が内分泌攪乱作用を有し、生体に様々な悪影響を及ぼす可能性が報告されている。それらの物質の作用は今日まで、生殖系、内分泌系を中心に精力的に解析されてきている。一方、環境ホルモンが免疫・アレルギー反応にも何らかの作用を及ぼすのではないかと考えられているが、実際の証拠はあまり多く報告されていない。我々は環境ホルモンとして、接触する機会が多いと考えられるdiethyl stilbesterol (DES), 4,4'-isopropylidene diphenol (BPA), bis(2-ethylhexyl) phthalate (EHP) 及びp-nonylphenol (NP)を用いて、マウスの免疫反応に対する作用をin vitro及びin vivo で解析した。

#### 3.4.1 脾細胞の増殖反応に対する環境ホルモンの作用

BALB/cマウスの脾細胞 ( $10^6$ /ml) を環境ホルモン ( $10^{-7}$ M) 及びConcanavalin A (Con A, 5  $\mu$ g/ml)あるいはLipopolysaccharide (LPS, 5 $\mu$ g/ml)と共に3-5日間培養し、最後の1日を0.5mCiの $^3$ H-thymidineでラベルし、 $^3$ H-thymidineの取り込みにより増殖反応を測定した。

マウスの脾細胞をDES, BPA, EHP 及びNP等の環境ホルモンと共に3-5日間培養すると、脾細胞の増殖反応が亢進した。また、環境ホルモンはCon A やLPSで誘導される増殖反応を更に増強させた。この増強作用は $10^{-6}$ - $10^{-9}$ Mの濃度で見られたが、 $10^{-7}$ Mで最も著明であった。環境ホルモンはT細胞、B細胞両方の増殖反応を亢進させた (Table 1)。

Table 1. Endocrine disrupters (EDs) stimulate both T cell and B cell responses

| Reagents | [ <sup>3</sup> H]-thymidine uptake of spleen cells (cpm) treated with |                |              |
|----------|-----------------------------------------------------------------------|----------------|--------------|
|          | C                                                                     | Anti-Thy-1 + C | Anti-Ig + C  |
| (-)      | 185 ± 19                                                              | 439 ± 4        | 194 ± 80     |
| Con A    | 11938 ± 758                                                           | 292 ± 222      | 11614 ± 313  |
| + DES    | 15993 ± 75*                                                           | 1178 ± 282*    | 15780 ± 440* |
| + BPA    | 18576 ± 323*                                                          | 2216 ± 92*     | 9570 ± 227   |
| + EHP    | 14376 ± 231*                                                          | 1908 ± 74*     | 12999 ± 365* |
| + NP     | 16114 ± 753*                                                          | 561 ± 306      | 12566 ± 486* |
| LPS      | 3222 ± 218                                                            | 1321 ± 182     | 810 ± 83     |
| + DES    | 4574 ± 687*                                                           | 3711 ± 299*    | 1081 ± 523   |
| + BPA    | 5407 ± 169*                                                           | 5114 ± 138*    | 725 ± 20     |
| + EHP    | 5605 ± 199*                                                           | 3389 ± 25*     | 1843 ± 422   |
| + NP     | 5015 ± 299*                                                           | 2494 ± 96*     | 1143 ± 209   |

Spleen cells were treated with anti-Thy-1 or anti-Ig antibody with complement(C) at 37°C for 1 hour. After washing, viable spleen cells (10<sup>6</sup>/ml) were precultured with each ED (10<sup>-7</sup>M) for 3 days, stimulated with Con A or LPS (5 mg/ml) for 3 days, labeled with [<sup>3</sup>H]-thymidine during the last day, and the radioactivities incorporated by spleen cells were determined.

\*indicates significantly enhanced from ED(-) group (P< 0.05).

### 3. 4. 2 脾細胞のサイトカイン産生、抗体産生に対する環境ホルモンの作用

マウスの胸腺細胞 (5x10<sup>6</sup>/ml) をマイトマイシン C で処理した自己の脾細胞 (抗原提示細胞, 2x10<sup>6</sup>/ml) と共に環境ホルモンの存在下で 7 日間培養し、回収された T 細胞 (5x10<sup>5</sup>/ml) をマイトマイシン C 処理した同系の脾細胞 (5x10<sup>5</sup>/ml) と共に Con A (5μg/ml) 存在下あるいは非存在下で 3 日間培養し、最後の 1 日を [<sup>3</sup>H]-thymidine でラベルし、[<sup>3</sup>H]-thymidine の取り込みにより T 細胞の増殖反応を測定した (Syngeneic mixed lymphocyte reaction: MLR)。

マウスの脾細胞 (5x10<sup>6</sup>/ml) を Con A の存在下及び非存在下で環境ホルモンで 1 日刺激し、培養上清中のサイトカイン (Interferon-γ: IFN-γ) を ELISA で測定した。

マウスの脾細胞 (5x10<sup>5</sup>/ml) を LPS の存在下及び非存在下で環境ホルモンと共に 7 日間培養し、培養上清中の総免疫グロブリン量を ELISA で測定した。

環境ホルモンはT細胞からのIL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ 等のサイトカイン産生、B細胞からの抗体産生も増強させた。この増強作用はCon A, LPS等のマイトゲンが存在下でも同様であった (Table 2)。

Table 2. Effect of endocrine disrupters (EDs) on cytokine and antibody productions by spleen cells

| Reagents | IFN- $\gamma$ (ng/ml)@                       |                   | Total IgG (ng/ml) #                          |                 |
|----------|----------------------------------------------|-------------------|----------------------------------------------|-----------------|
|          | produced by spleen cells stimulated with (-) | Con A             | produced by spleen cells stimulated with (-) | LPS             |
| (-)      | 5200 $\pm$ 190                               | 36000 $\pm$ 190   | 220 $\pm$ 2                                  | 920 $\pm$ 38    |
| DES      | 53000 $\pm$ 1520*                            | 70000 $\pm$ 2000* | 580 $\pm$ 15*                                | 1040 $\pm$ 59   |
| BPA      | 66000 $\pm$ 1180*                            | 87000 $\pm$ 410*  | 680 $\pm$ 25*                                | 1800 $\pm$ 45*  |
| EHP      | 60000 $\pm$ 130*                             | 86000 $\pm$ 450*  | 720 $\pm$ 86*                                | 1840 $\pm$ 102* |
| NP       | 42000 $\pm$ 1700*                            | 60000 $\pm$ 2430* | 640 $\pm$ 26*                                | 1520 $\pm$ 116* |

@BALB/c spleen cells ( $5 \times 10^6$ /ml) were precultured with each ED ( $10^{-7}$ M) for 3 days, stimulated with Con A (5 mg/ml) for 2 days, and cytokines in the culture supernatants were assayed by ELISA.

#BALB/c spleen cells ( $5 \times 10^5$ /ml) were precultured with each ED ( $10^{-7}$ M) for 3 days, stimulated with LPS (5 mg/ml) for 4 days, and the amounts of total IgG in the culture supernatants were assayed by ELISA.

\*indicates significantly enhanced from ED(-) group ( $P < 0.05$ ).

Table 3. Effect of endocrine disrupters(EDs) on the proliferative responses of murine thymocytes

| Thymocytes       |             | [ $^3$ H]-thymidine uptake of thymocytes (cpm) |                      |
|------------------|-------------|------------------------------------------------|----------------------|
| precultured with |             | Spleen cells                                   | Spleen cells + Con A |
| (-)              |             | 83 $\pm$ 5                                     | 119 $\pm$ 4          |
| DES              | $10^{-6}$ M | 278 $\pm$ 18*                                  | 1305 $\pm$ 312*      |
|                  | $10^{-7}$ M | 2211 $\pm$ 129*                                | 6472 $\pm$ 1243*     |
|                  | $10^{-8}$ M | 234 $\pm$ 31*                                  | 629 $\pm$ 87*        |
|                  | $10^{-9}$ M | 244 $\pm$ 6*                                   | 423 $\pm$ 60*        |
| BPA              | $10^{-6}$ M | 796 $\pm$ 31*                                  | 954 $\pm$ 174*       |
|                  | $10^{-7}$ M | 2961 $\pm$ 288*                                | 10698 $\pm$ 63*      |
|                  | $10^{-8}$ M | 316 $\pm$ 82*                                  | 3916 $\pm$ 110*      |
|                  | $10^{-9}$ M | 686 $\pm$ 180*                                 | 1799 $\pm$ 343*      |
| EHP              | $10^{-7}$ M | 5302 $\pm$ 400*                                | 10023 $\pm$ 295*     |

Thymocytes( $5 \times 10^6$ /ml) were cultured with mitomycin C(MMC)-treated syngeneic spleen cells( $10^6$ /ml) and several concentrations of each ED for 7 days. The

recovered thymocytes( $5 \times 10^5/\text{ml}$ ) were restimulated with MMC-treated syngeneic spleen cells( $5 \times 10^5/\text{ml}$ ) or spleen cells and Con A (5 mg/ml) for 3 days, labeled with [ $^3\text{H}$ ]-thymidine during the last day, harvested, and the radioactivities incorporated by thymocytes were counted.

\* indicates significantly enhanced from ED(-) group ( $P < 0.05$ ).

### 3. 4. 3 胸腺細胞の増殖反応に対する環境ホルモンの作用

マウスの脾細胞 ( $5 \times 10^6/\text{ml}$ ) を Con A の存在下及び非存在下で環境ホルモンで 1 日刺激し、培養上清中のサイトカイン (Interferon- $\gamma$  : IFN- $\gamma$ ) を ELISA で測定した。

マウスの胸腺細胞を環境ホルモンと共に培養すると、胸腺細胞の増殖反応が亢進した。しかしその反応はあまり強くなかったので、Syngeneic MLR の系を用いて、環境ホルモンの作用を検討した。すなわち、マウスの胸腺細胞を自己の脾細胞 (抗原提示細胞) の存在下で環境ホルモンと共に 7 日間培養し、得られた T 細胞を同系マウスの脾細胞で 2 次刺激を行い、T 細胞の反応性を測定した。この実験系は T 細胞の自己抗原認識のモデルと考えられている。この系を用いると、環境ホルモンで前培養する事により、T 細胞の反応性が著明に亢進した (Table 3)。また、この T 細胞は IL-3, IFN- $\gamma$  等のサイトカインを著明に産生した。

Table 4. Effect of endocrine disrupters (EDs) on cytokine production by macrophages

| Reagents | IL-1a (ng/ml)                           |           | TNF-a (ng/ml) |            |
|----------|-----------------------------------------|-----------|---------------|------------|
|          | produced by macrophages stimulated with |           |               |            |
|          | (-)                                     | LPS       | (-)           | LPS        |
| (-)      | 30 ± 5                                  | 38 ± 4    | 20 ± 1        | 240 ± 40   |
| DES      | 518 ± 54*                               | 390 ± 20* | 58 ± 2*       | 198 ± 30   |
| BPA      | 200 ± 5*                                | 138 ± 6*  | 141 ± 29*     | 515 ± 142* |
| EHP      | 325 ± 18*                               | 235 ± 18* | 240 ± 1*      | 570 ± 35*  |
| NP       | 480 ± 35*                               | 355 ± 23* | 146 ± 3*      | 550 ± 25*  |

Thioglycolate-induced peritoneal macrophages ( $5 \times 10^5/\text{ml}$ ) were precultured with each ED ( $10^{-7}\text{M}$ ) for 2 days, stimulated with LPS (5 mg/ml) for 1 more day, and the amounts of IL-1a and TNF-a in the culture supernatants were assayed by ELISA and L929 bioassay, respectively. \*indicates significantly enhanced from ED(-) group ( $P < 0.05$ ).

Table 5. Effect of endocrine disrupters(EDs) on antigen-presenting activity of macrophages

| Macrophages treated with | [ <sup>3</sup> H]-thymidine uptake of T cells (cpm) | Production of IL-2 (ng/ml) |
|--------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------|
| (-)                      | 4593 ± 218                                          | 160 ± 15                   |
| DES                      | 39659 ± 3422*                                       | 900 ± 9*                   |
| BPA                      | 36984 ± 3290*                                       | 1050 ± 27*                 |
| EHP                      | 39412 ± 1445*                                       | 1250 ± 43*                 |
| NP                       | 42353 ± 410*                                        | 550 ± 4*                   |
| T cells alone            | 1020 ± 349                                          | 85 ± 4                     |
| Macrophages alone        | 1678 ± 94                                           | 110 ± 2                    |

For the assay of proliferative response, peritoneal exudate macrophages( $10^5$ /ml) were cultured with each ED( $10^{-7}$ M) for 1 day, mixed with nylon column-purified T cells( $10^6$ /ml), cultured with anti-CD3 antibody(1 mg/ml) for 3 more days, labeled with [<sup>3</sup>H]-thymidine during the last day, harvested, and the radioactivities incorporated by T cells were determined. For the assay of IL-2 production, peritoneal exudate macrophages( $2 \times 10^5$ /ml) were cultured with each ED( $10^{-7}$ M) for 1 day, mixed with nylon column-purified T cells( $2 \times 10^6$ /ml), cultured with anti-CD3 antibody(1mg/ml) for 1 more day, and IL-2 in the culture supernatant was determined by ELISA.

\*indicates significantly enhanced from ED(-) group( $P < 0.05$ ).

Table 6. Effect of endocrine disrupters(EDs) on antibody production in vivo

| Treatment of mice | Antibody titer (dilution of serum) |           |                   |            |
|-------------------|------------------------------------|-----------|-------------------|------------|
|                   | Exp I<br>Primary                   | Secondary | Exp II<br>Primary | Secondary  |
| (-)               | 64 ± 10                            | 111 ± 26  | 90 ± 29           | 388 ± 199  |
| BPA               | 111 ± 47*                          | 208 ± 48* | 104 ± 19          | 891 ± 129* |
| EHP               | 111 ± 83                           | 181 ± 93  | 84 ± 28           | 588 ± 136  |
| NP                | 84 ± 35                            | 137 ± 44  | 104 ± 19          | 548 ± 228  |

BALB/c(Exp I) or C57BL/6(Exp II) mice were administered with each ED for 2 weeks, and immunized with OVA in alum(Exp I) or Collagen in complete Freund adjuvant(Exp II) twice at 2 and 5 weeks. The sera were harvested 3 weeks after the primary immunization and 1 week after the secondary immunization, and the antibodies in the sera were detected by an ELISA. The results are expressed as mean ± standard error of antibody titer(dilution of sera) in 5 mice of each group.

\* significantly enhanced from ED(-) mice.



#### 3.4.4 マクロファージのサイトカイン産生に対する環境ホルモンの作用

Thioglycolate medium を腹腔内投与したマウスの腹腔浸出細胞（マクロファージ,  $5 \times 10^5/\text{ml}$ ）をLPSの存在下及び非存在下で環境ホルモンで1日刺激し、得られた培養上清中のサイトカインをELISA及びL929細胞を用いたBioassayで測定した。Thioglycolate medium を腹腔内投与したマウスの腹腔浸出細胞（マクロファージ,  $10^5/\text{ml}$ ）を環境ホルモンで1日刺激し、ナイロンカラムで精製したT細胞( $10^6/\text{ml}$ )を加え、抗CD3抗体( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )で3日間刺激し、T細胞の増殖反応を $^3\text{H}$ -thymidineの取り込みで、interleukin(IL)-2の産生をELISAで測定した。

マウスのマクロファージを環境ホルモンと共に培養すると、IL-1、tumor necrosis factor(TNF)等のサイトカイン産生が増強された。また、環境ホルモンはLPS刺激で誘導されるサイトカインの産生も更に増強した(Table 4)。環境ホルモンで処理したマクロファージの表面抗原では、抗原提示に必要な分子であるCD86の発現が増強（10%から20%）していた。更に、環境ホルモンで処理したマクロファージをT細胞と混合し、抗原で刺激するとT細胞の増殖反応が増強していた（抗原提示能の増強）(Table 5)。

#### 3.4.5 In vivoでの抗体産生に対する環境ホルモンの作用

##### (1) 研究内容及び成果

マウスに環境ホルモンを $10^{-5}\text{M}$ 飲水により2から6週間投与し、Ovalbumin(OVA,  $100\mu\text{g}$ )又はChicken collagen( $100\mu\text{g}$ )で免疫後の血中抗体価をELISAで測定した。環境ホルモンを $10^{-5}\text{M}$ (2-4mg/l)飲水によりマウスに2から6週間投与した。マウスは1日に約5ml飲水した。このように処置したマウスでは、体重の増加、脾細胞数、胸腺細胞数、血中抗体量で差異が認められなかった。また、脾細胞をin vitroで培養しても増殖反応に差異は認められなかった。しかし、胸腺細胞を培養すると、環境ホルモンを投与したマウスでは、増殖反応が亢進していた。マウスをOVAあるいはCollagenで免疫し、血中抗体価を調べると、環境ホルモンを投与したマウスでは、抗体価の増強が見られた(Table 6)。

##### (2) 研究成果の今後期待される効果

DES, BPA, EHP, NP等の環境ホルモンを投与すると、in vitro, in vivoでマウ

スのリンパ球、マクロファージを刺激し、増殖反応、サイトカイン産生、抗体産生を亢進する事が明らかになった。これらの事実は環境ホルモンがヒトの免疫系にも作用し、アレルギーや自己免疫疾患の発症に何らかの作用を及ぼす可能生があることが示唆された。

### 3.5 植物エストロゲンの骨芽細胞に対する影響評価（平野グループ）

#### (1) 研究内容及び成果

骨は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収により恒常性が保持されている。骨密度は様々なサイトカインやホルモンにより調節されており、この調節が崩れることより、骨粗鬆症などの骨疾患を引き起こす。閉経後の血清中エストロジェンの低下は骨密度の低下を引き起こすことより、エストロジェンが、骨密度の保持に重要な役割を持つホルモンの1つであることが知られている。現在、骨粗鬆症の治療の1つとして、エストラジオールの投与がなされているが、その一方で、閉経後のエストラジオールの長期投与により、乳ガンや子宮ガンに罹患するリスクも高くなる。日本の女性が西欧の女性に比べ、骨粗鬆症の罹患率が低いのは、日本では日常的に植物性エストロジェンを含有する豆製品を摂取することが、1つの原因であると言われている。従って、植物性エストロジェンが骨形成に深く関わっていると考えられる。そこで、植物性エストロジェンを含めたエストロジェン活性と有する様々な内分泌攪乱物質が、骨代謝に及ぼす影響について、(a) 骨芽細胞による骨形成 と (b) 破骨細胞による骨吸収 の両側面から調べた。それぞれの研究内容と成果について、以下に示した。

(a) 骨形成 ---内分泌攪乱物質が骨芽細胞の分化、及び石灰化に与える影響---

#### [目的]

今まで、植物性エストロジェンが骨形成を促進することは報告されているが、人工の内分泌攪乱物質が骨形成に与える影響については、報告されていない。そこで本実験では、環境中でエストロジェン様作用を持つことが知られている人工の内分泌攪乱物質や植物性エストロジェンが、骨形成にどのように影響を与えるかを、骨芽細胞の分化の指標として用いられるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、及び石灰化により増加するカルシウム (Ca) とリン (P) の濃度を調べることで検討した。

## [方法]

骨芽細胞様細胞であり、エストロゲンレセプター (ER)  $\alpha$  及び  $\beta$  を発現していることが知られているMC3T3-E1細胞を用いて、培養液に人工の内分泌攪乱物質または植物性エストロゲンを添加し培養後、ALP活性、及びCaとPの濃度を測定した。人工の内分泌攪乱物質としてp-ノニルフェノール (NP)、ビスフェノールA (BPA)、及びフタル酸エステル (DEHP)、及び植物性エストロゲンとして、ダイゼイン、ジェニステイン及びクメストロールを用いた。

## [結果]

Fig. 1 に、MC3T3-E1細胞を人工の内分泌攪乱物質または植物性エストロゲンを添加し培養したときのALP活性の変化を示した。人工の内分泌攪乱物質において、NP (Fig. 1E) とDEHP (Fig. 1F) 添加ではALP活性に変化は見られなかったが、BPAによっては濃度依存的にALPの活性が増加し、 $10^{-6}$ M添加では約1.6倍に増加した (Fig. 1D)。一方、植物性エストロゲンによってもALPの活性は増加したが、植物性エストロゲンの場合は高濃度 ( $10^{-7}$ M $\sim 10^{-5}$ M) で添加したときのみ、ALPの活性の増加が見られた (Figs. 1A-C)。Fig. 2 と 3 に、人工の内分泌攪乱物質または植物性エストロゲンの存在下で培養した細胞における、CaとPの濃度をそれぞれ示した。NP (Fig. 2E) とDEHP (Fig. 2F) を添加した場合には、Ca濃度の増加は見られなかったが、 $10^{-6}$ MのBPA添加によりCa濃度は約4倍に増加した (Fig. 2D)。また、植物性エストロゲンを $10^{-6}$ M添加することによっても、Ca濃度は約4倍に増加した (Figs. 2A-C)。細胞のP濃度もCa濃度の変化と同様の変化を示した (Fig. 3)。以上の結果より、植物エストロゲンのみならず、人工の内分泌攪乱物質の1つであるBPAによっても、ALP活性、及びCaとP濃度が増加したことより、一部の人工内分泌攪乱物質も骨芽細胞の分化を促進し、石灰化を引き起こす作用を持つことが明らかとなった。ヒト乳ガン細胞であるMCF-7の細胞増殖実験により、今回用いた人工の内分泌攪乱物質の中では、BPAが最もエストロゲン様作用が強いことが示された。このことが人工の内分泌攪乱物質中で、BPAにのみ骨形成の促進作用が見られた原因の1つであると推測される。本実験によって、一部の人工の内分泌攪乱物質や植物性エストロゲンによっても、骨形成の促進作用があることを明らかにした。

(b) 骨吸収 ---植物性エストロジェンが破骨細胞の分化に及ぼす影響---

**[目的]**

エストラジオールが骨代謝に及ぼす影響の1つとして、骨吸収を抑制することが知られている。一方、植物性エストロジェンに関しては、骨形成を促進する報告はあるが、骨吸収に与える影響はあまり知られていない。そこで、植物性エストロジェンの1つであり、エストロジェン活性の高いクメストロールが、破骨細胞への分化と骨吸収にどのように影響を与えるか調べることを目的として、実験を行った。マウスマクロファージ系の細胞であるRAW264.7細胞は、Mouse Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)存在下で、破骨細胞の特徴である酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP)陽性の多核細胞に分化することが知られている。そこで、破骨細胞への分化及び骨吸収の影響を調べる今回の実験に適した細胞であると考えられたため、RAW264.7細胞を用いて、実験を行った。

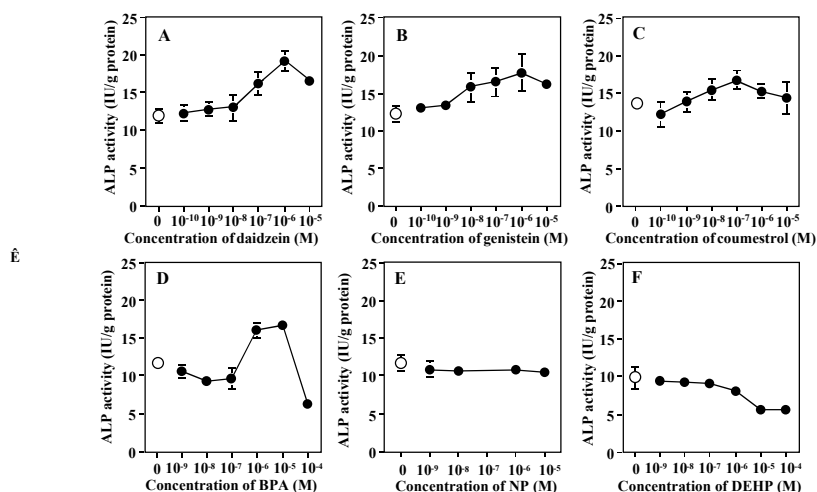
**[方法]**

マウスマクロファージ系の細胞であるRAW264.7細胞に、ER- $\alpha$ を遺伝子導入し、G418耐性のクローンを取りだし、今回の実験に用いた。ER- $\alpha$ を遺伝子導入したRAW264.7細胞を、100 ng/mlのRANKL存在下で、クメストロールを添加し、10% dextran-coated-charcoal-stripped fetal bovine serum (CD-FBS)含有phenol red-free  $\alpha$ -MEM中で培養した。7日間培養後、固定し、TRAP染色、TRAP活性の測定、及び破骨細胞の分化により誘導されることが知られているタンパク質 (TRAP, cathepsin K, matrix metalloproteinase-9 (MMP9), calcitonin receptor (CTR)) のmRNAレベルをRT-PCRにて調べた。また、同条件下で、細胞をリン酸カルシウムのコートされたOsteologic Multitest Slide (BD Bioscience)上で10日間培養し、骨吸収を調べ、吸収された骨吸収窩の面積をNIHイメージを用いて定量した。

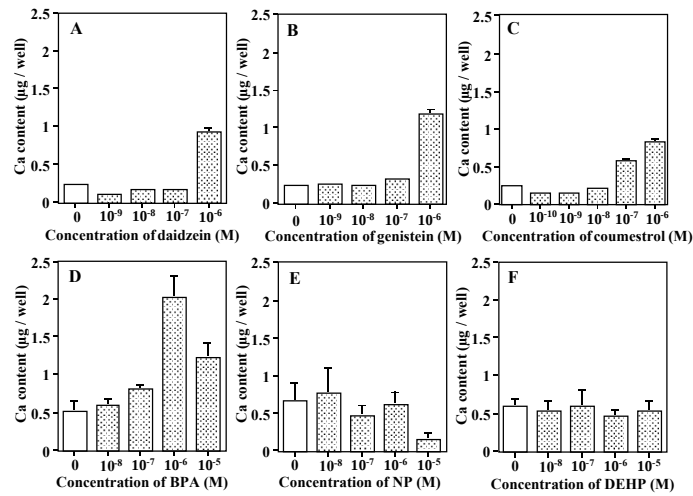
**[結果]**

Fig. 4にTRAP染色の結果を示した。RANKLの添加により、TRAP染色陽性の巨大な多核細胞が増加したが (Fig. 4C)、クメストロールにより、濃度依存的に、巨大な多核細胞の形成は抑えられ (Figs. 4D-G)、10 $\mu$ Mのクメストロールにより、ほとんどの細胞が単核細胞の状態で存在した (Fig. 4G)。クメストロール (10 $\mu$ M) 単独添加では、TRAP染色には影響を与えなかった (Fig. 4B)。RANKLにより増加したTRAP活性は、クメストロールによって濃度依存的に減少した (Fig. 5)。また、RAW264.7細胞をRANKL存在下で培養した後のリン酸カルシウムの吸収窩と、吸収窩の面積をNIH イメージで定量した結果を、それぞれFig. 6 とFig. 7に示した。RANKL添加

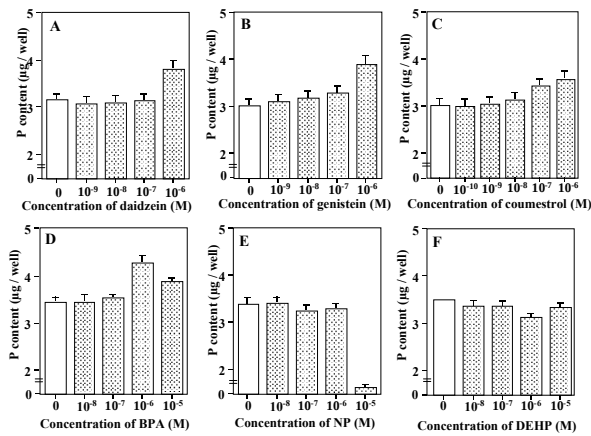
によりリン酸カルシウムの吸収窩は増加したが (Fig. 6B)、この吸収はクメストロールにより濃度依存的に抑えられた (Fig. 6C-E)。吸収窩面積の定量の結果によっても、同様にクメストロールにより、骨吸収が抑えられる結果が得られた (Fig. 7)。次に、破骨細胞の分化に関わるタンパク質の発現量をRT-PCRで調べた結果を、Fig. 8に示した。RANKL添加により、これらの破骨細胞の分化に関わるタンパク質の遺伝子発現量は増加した。10 $\mu$ Mのクメストロール添加により、TRAPとCathepsin Kの発現量は変化なかったが、骨吸収に深く関与することが知られているCTRとMMP9の発現量は減少した。CTRとMMP9は破骨細胞への分化の後期の段階で発現量が変化することが報告されており、クメストロールが、RAW264.7細胞から破骨細胞へ分化する後期の段階で分化を抑制することが示唆された。これらのことより、植物性エストロジェンの1つであるクメストロールが破骨細胞への分化を抑制し、骨吸収を抑制する活性を持つことが示唆された。



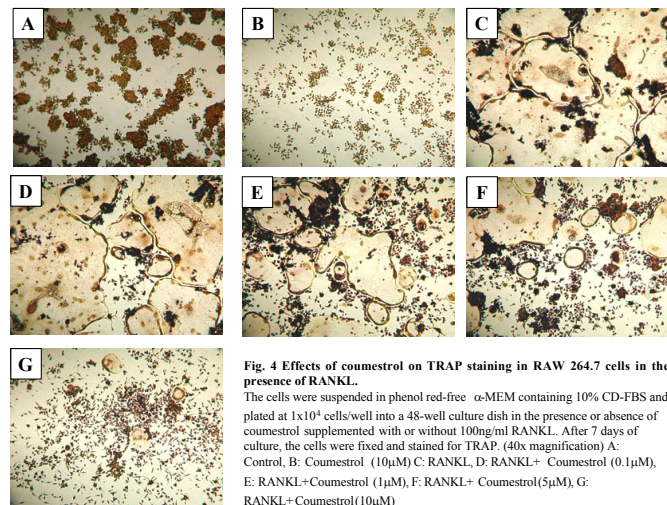
**Fig. 1** Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on ALP activity in MC3T3-E1 cells. The cells were suspended in phenol red-free  $\alpha$ -MEM containing 5% CD-FBS and plated at  $1.5 \times 10^4$  cells/well into a 24-well culture dish. After 3 days, the medium was replaced with fresh phenol red-free  $\alpha$ -MEM containing 5% CD-FBS in the presence (closed circle) or absence (open circle) of phytoestrogens (daidzein (A), genistein (B), coumestrol (C)) and environmental estrogens (BPA (D), NP (E), DEHP (F)). After 10 days of culture, the ALP activity and protein concentration were measured.



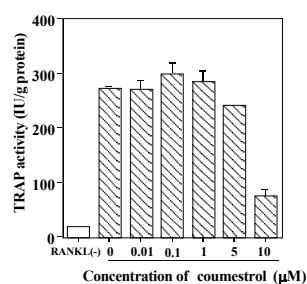
**Fig. 2** Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on Ca contents in MC3T3-E1 cells. The cells were plated at  $1.5 \times 10^4$  cells/well into a 24-well culture dish. After 3 days, the medium was replaced with phenol red-free  $\alpha$ -MEM containing 5% CD-FBS and the cells were further cultured with or without phytoestrogens (daidzein (A), genistein (B), coumestrol (C)) and environmental estrogens (BPA (D), NP (E), DEHP (F)). After 15 days of culture, the cellular concentration of Ca was measured by ICP-AES.



**Fig. 3** Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on P contents in MC3T3-E1 cells. See legend to Fig. 2.

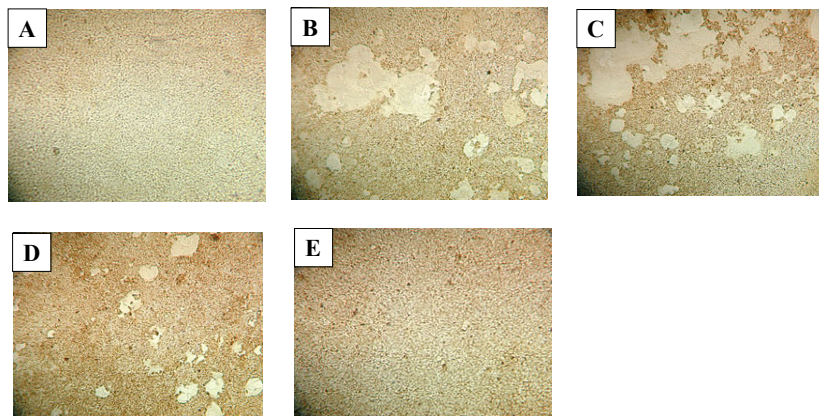


**Fig. 4** Effects of coumestrol on TRAP staining in RAW 264.7 cells in the presence of RANKL. The cells were suspended in phenol red-free  $\alpha$ -MEM containing 10% CD-FBS and plated at  $1 \times 10^4$  cells/well into a 48-well culture dish in the presence or absence of coumestrol supplemented with or without 100 ng/ml RANKL. After 7 days of culture, the cells were fixed and stained for TRAP. (40x magnification) A: Control, B: Coumestrol (10 µM) C: RANKL, D: RANKL + Coumestrol (0.1 µM), E: RANKL + Coumestrol (1 µM), F: RANKL + Coumestrol (5 µM), G: RANKL + Coumestrol (10 µM)

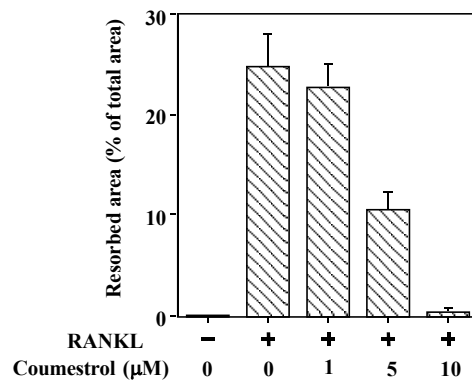


**Fig. 5 Effects of coumestrol on the TRAP activity in RAW 264.7cells.**

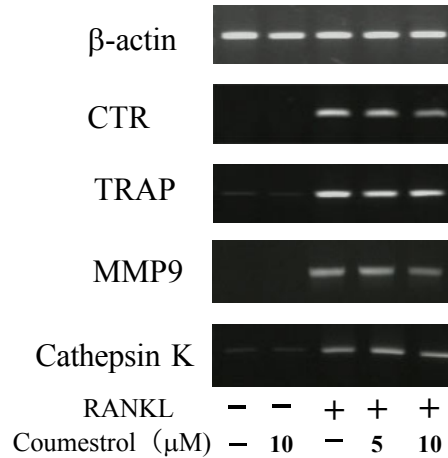
The cells were suspended in phenol red-free  $\alpha$ -MEM containing 10% CD-FBS and plated at  $2 \times 10^4$  cells/well into a 48-well culture dish in the presence or absence of coumestrol supplemented with (hatched column) or without (open column) 100ng/ml RANKL. After 7 days of culture, TRAP activity and protein concentration were measured. Values represent the means  $\pm$  SD.



**Fig. 6 Effects of coumestrol on resorbed pits in RAW 264.7 cells differentiated by RANKL.** The cells were suspended in phenol red-free  $\alpha$ -MEM containing 10% CD-FBS and plated at  $1 \times 10^4$  cells/well on an Osteologic Multitest Slide (BD Bioscience) in the presence or absence of coumestrol supplemented with or without RANKL (100 ng/ml). After 10 days of culture, the slide was washed in a solution of 6% NaClO to remove cells. A:Control, B:RANKL, C:RANKL+ Coumestrol (1 $\mu$ M), D: RANKL+ Coumestrol (5 $\mu$ M), E: RANKL+ Coumestrol (10 $\mu$ M)



**Fig. 7 Effects of coumestrol on pit forming activity of RAW 264.7 cells differentiated by RANKL.** The cells were suspended in phenol red-free  $\alpha$ -MEM containing 10% CD-FBS and plated at  $1 \times 10^4$  cells/well plated on an Osteologic Multitest Slide and cultured in the presence or absence of coumestrol supplemented with or without RANKL (100 ng/ml). After 10 days of culture, the slide was washed in a solution of 6% NaClO to remove cells. The resorbed areas on the slide were analyzed by NIH image. Values represent the means  $\pm$  SD.



**Fig. 8 Effects of coumestrol on the expression of mRNA levels of osteoclastic marker proteins in RAW 264.7 cells in the presence of RANKL.** The cells were suspended in phenol red-free  $\alpha$ -MEM containing 10% CD-FBS and the cells were plated at  $1 \times 10^5$  cells/well into a 6-well culture dish in the presence or absence of coumestrol (5, 10  $\mu$ M) supplemented with or without RANKL (100 ng/ml). After 7 days of culture, total RNA was extracted using TRIZOL. mRNA levels of osteoclastic marker proteins were analyzed by RT-PCR.



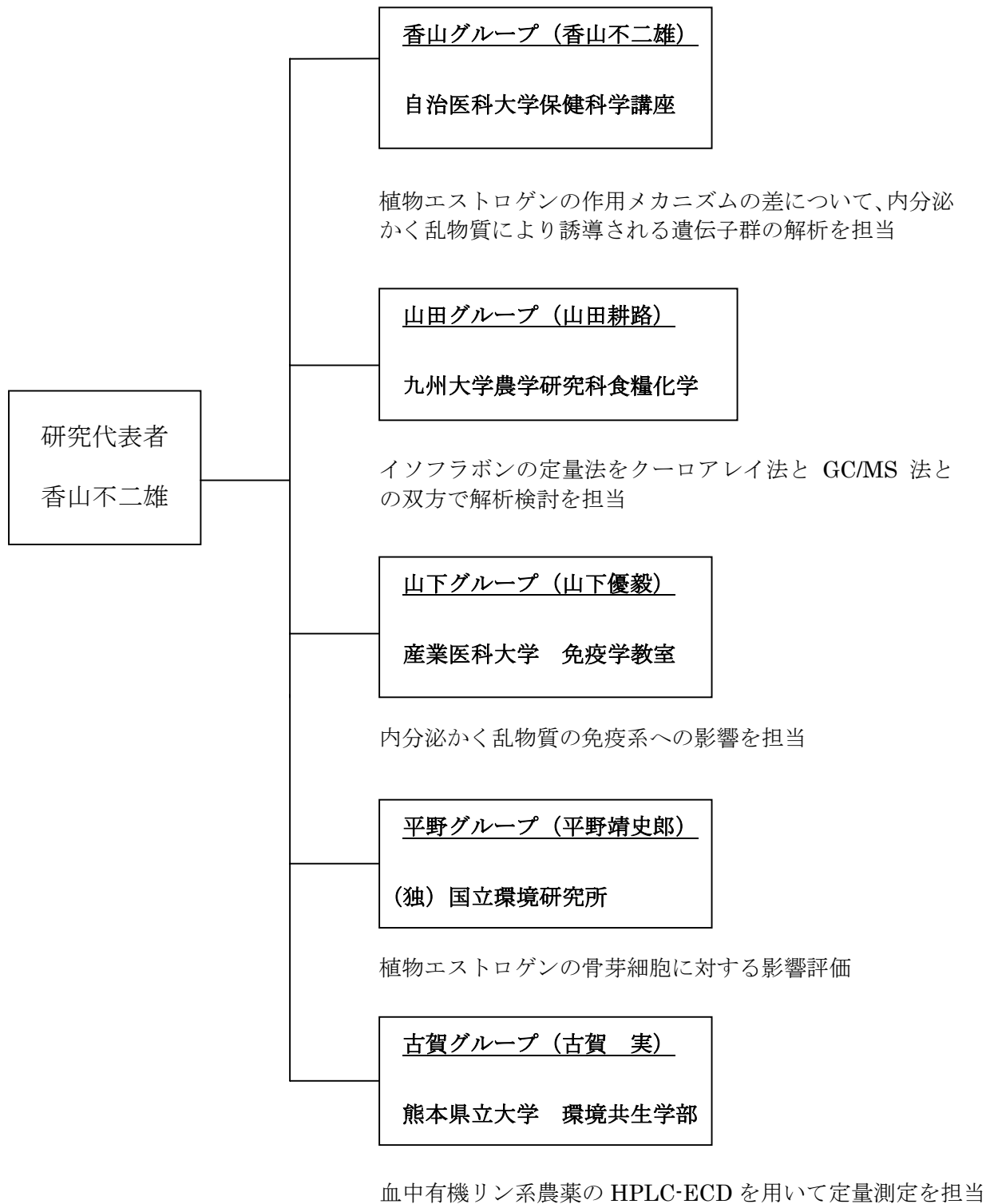
## (2) 研究成果の今後期待される効果

### 骨代謝に与える影響 ---骨形成と骨吸収の両側面からのまとめ---

以上示したように、骨芽細胞による骨形成、及び破骨細胞による骨吸収の両側面から、内分泌攪乱物質が骨形成に与える影響を調べた。その結果、植物性エストロジェンと人工の内分泌攪乱物質は、エストロジェン作用によって、骨形成を促進し、植物性エストロジェンの1つであるクメストロールは破骨細胞による骨吸収を抑えることが、明らかとなった。破骨細胞の骨吸収を抑える機構については、今後さらに研究が必要ではあるが、クメストロールを中心とした植物性エストロジェンが、エストロジェン減少による骨量減少を抑える効果を持つことが、明らかとなった。

#### 4. 研究実施体制

##### (1) 体制



(2) メンバー表

(2) 研究参加者

研究グループ名：香山グループ

| 氏名    | 所属                              | 役職         | 担当する研究項目             | 参加時期         | 備考          |
|-------|---------------------------------|------------|----------------------|--------------|-------------|
| 香山不二雄 | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・毒性学部門 | 教授         | 研究統括、疫学調査            | H11.1～H15.12 |             |
| 堀口 兵剛 | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・毒性学部門 | 助教授        | エリスロポイエチン<br>疫学調査    | H11.6～H15.12 |             |
| 野本 聡  | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・毒性学部門 | 講師         | エストロジェン応答<br>遺伝子検索   | H11.8～H15.12 |             |
| 荒尾 行知 | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・毒性学部門 | 助手         | RNA 安定化機構解析          | H11.5～H15.12 |             |
| 池田 和博 | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・毒性学部門 | 研究員        | エストロジェン応答<br>遺伝子機能解析 | H12.4～H13.9  | CREST 研究員   |
| 趙 建宏  | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・毒性学部門 | 大学院生(博士課程) | RNA 安定化機構解析          | H13.4～H15.12 | CREST アルバイト |
| 高橋 和枝 | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・毒性学部門 | 研究補助員      | 事務、経理全般              | H11.2～H12.1  | CREST 研究補助員 |
| 栃木菜穂子 | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・毒性学部門 | 研究補助員      | 事務、経理全般              | H11.4～H15.12 | CREST 研究補助員 |

|        |                                 |            |                  |              |                       |
|--------|---------------------------------|------------|------------------|--------------|-----------------------|
| 菊池 淳美  | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・毒性学部門 | 研究補助員      | 免疫応答の修飾機構解析      | H11.4～H15.12 | CREST 研究補助員           |
| 小熊 悦子  | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・毒性学部門 | 技術員        | エリスロポイエチン疫学調査    | H11.9～H15.12 | H13.7 から<br>CREST 技術員 |
| 大塚 広子  | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・毒性学部門 | 技術員        | エストロジェン応答遺伝子機能解析 | H13.4～H14.3  |                       |
| 岸田 光世  | 茨城大学 農学部                        | 大学院生(修士課程) | RNA 安定化機構解析      | H13.4～H14.3  |                       |
| 池田 陽子  | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・毒性学部門 | 栄養士        | 栄養調査、疫学調査        | H13.4～H15.12 |                       |
| 久保田 絵美 | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・毒性学部門 | 管理栄養士      | 栄養調査、疫学調査        | H13.4～H14.2  |                       |
| 孫 素菊   | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・毒性学部門 | アルバイト      | 遺伝子多型解析          | H15.2～H15.12 | CREST アルバイト           |
| 金森 奈美子 | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・毒性学部門 | 技術員        | エストロジェン応答遺伝子機能解析 | H15.6～H15.12 | CREST 技術員             |

研究グループ名： 山田グループ

| 氏名    | 所属                                             | 役職   | 担当する研究項目              | 参加時期         | 備考 |
|-------|------------------------------------------------|------|-----------------------|--------------|----|
| 山田 耕路 | 九州大学 大学院生物資源環境科学研究科 生物機能科学専攻 生物機能科学大講座 食糧化学研究室 | 教授   | 植物エストロジェンの定量法開発、および定量 | H11.1～H15.12 |    |
| 立花 宏文 | 九州大学 大学院生物資源環境科学研究科 生物機能科学専攻 生物機能科学大講座 食糧化学研究室 | 助教授  | 植物エストロジェンの定量法開発、および定量 | H11.1～H15.12 |    |
| 呉 博聖  | 九州大学 大学院生物資源環境科学研究科 生物機能科学専攻 生物機能科学大講座 食糧化学研究室 | 大学院生 | 植物エストロジェンの定量法開発、および定量 | H13.4～H15.3  |    |

研究グループ名： 山下グループ

| 氏名    | 所属           | 役職 | 担当する研究項目               | 参加時期         | 備考 |
|-------|--------------|----|------------------------|--------------|----|
| 山下 優毅 | 産業医科大学 免疫学教室 | 教授 | 免疫系に対する内分泌攪乱物質の作用機序を解析 | H11.1～H15.12 |    |
| 是木 一也 | 産業医科大学 免疫学教室 | 講師 | 免疫系に対する内分泌攪乱物質の作用機序を解析 | H11.1～H13.3  |    |
| 吉田 安弘 | 産業医科大学 免疫学教室 | 助手 | 免疫系に対する内分泌攪乱物質の作用機序を解析 | H11.1～H15.12 |    |

研究グループ名： 平野グループ

| 氏名                     | 所属                    | 役職                      | 担当する研究項目                             | 参加時期         | 備考                    |
|------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------|
| 平野 靖史郎                 | 国立環境研究所<br>地域環境研究グループ | 主任研究官                   | 内分泌かく乱物資および植物エストロジェンの骨代謝に与える影響に関する研究 | H11.1～H15.12 | H12.6 から<br>CREST 技術員 |
| 菅野さな枝                  | 国立環境研究所<br>地域環境研究グループ | CREST 技術員               | 内分泌かく乱物資および植物エストロジェンの骨代謝に与える影響に関する研究 | H11.1～H15.12 |                       |
| Anuradha<br>Cunningpur | 国立環境研究所<br>地域環境研究グループ | 科学技術特別<br>研究員 (STAフェロー) | 内分泌かく乱物資および植物エストロジェンの骨代謝に与える影響に関する研究 | H11.1～H13.3  |                       |

研究グループ名： 古賀グループ

| 氏名   | 所属                            | 役職 | 担当する研究項目 | 参加時期         | 備考 |
|------|-------------------------------|----|----------|--------------|----|
| 古賀 実 | 熊本県立大学<br>環境共生学部<br>環境分析化学研究室 | 教授 | 血清中農薬の測定 | H14.4～H15.12 |    |

研究グループ名： 澤田石グループ

| 氏名     | 所属                | 役職        | 担当する研究項目 | 参加時期        | 備考 |
|--------|-------------------|-----------|----------|-------------|----|
| 澤田石 一之 | KRI<br>生体分子研究グループ | グループ・リーダー |          | H11.1～H12.3 |    |
| 杉村 厚   | KRI<br>生体分子研究グループ | 主任研究員     |          | H11.1～H12.3 |    |
| 松本 久美  | KRI<br>生体分子研究グループ | 研究員       |          | H11.1～H12.3 |    |

(3) J S Tが雇用し派遣する研究員等

| 氏名     | 現職                              | 派遣先                                 | 担当する研究項目              | 参加時期         | 備考    |
|--------|---------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|--------------|-------|
| 池田和博   | 埼玉医科大学<br>ゲノム医学研究<br>センター<br>助手 | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・<br>毒性学部門 | エストロゲン応答<br>遺伝子機能解析   | H12.4～H13.9  | 研究員   |
| 菊池淳美   | 技術補助員                           | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・<br>毒性学部門 | RNA 安定化機構の解<br>析      | H11.4～H15.12 | 研究補助員 |
| 栃木菜穂子  | 研究補助員                           | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・<br>毒性学部門 | 事務、経理                 | H11.4～H15.12 | 研究補助員 |
| 菅野 さな枝 | 技術員                             | 国立環境研究<br>所 地域環境<br>研究グループ          | 内分泌攪乱物質の骨<br>代謝への影響解析 | H11.4～H15.12 | 技術員   |
| 趙 建宏   | アルバイト                           | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・<br>毒性学部門 | 免疫系への影響機構<br>解析       | H13.4～H15.12 | アルバイト |
| 小熊 悦子  | 技術員                             | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・<br>毒性学部門 | 疫学調査、遺伝子解析            | H13.8～H15.12 | 技術員   |
| 孫 素菊   | アルバイト                           | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・<br>毒性学部門 | 遺伝子多型解析               | H14.2～H15.12 | アルバイト |
| 金森 奈美子 | 技術員                             | 自治医科大学<br>保健科学講座<br>環境免疫学・<br>毒性学部門 | エストロゲン応答<br>遺伝子機能解析   | H15.6～H15.12 | 技術員   |

## 5. 研究期間中の主な活動

### (1) ワークショップ・シンポジウム等

| 年月日       | 名称                               | 場所                  | 参加人数 | 概要                                                                                   |
|-----------|----------------------------------|---------------------|------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| H13.9.7～8 | CREST Dioxin2001サテライトシンポジウム      | ホテルニューオーミ（滋賀県近江八幡市） | 180名 | 9月に韓国で開催された国際シンポジウム「ダイオキシン2001」のサテライト版として実行した。<br>ダイオキシン類の測定分析技術の最先端とその動向について発表があった。 |
| H14.12.6  | シンポジウム 植物エストロジェン—その作用、体内動態と健康影響— | 都道府県会館（東京都千代田区）     | 100名 | Dr. Herman Adlercreutz（ヘルシンキ大学 予防医学研究所所長）を招聘し、植物エストロジェンに関するシンポジウムを行った。               |

### (2) 招聘した研究者等

| 氏名（所属、役職）                                  | 招聘の目的                                                           | 滞在先                       | 滞在期間          |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------|
| 金 一和（中国医科大学 公共衛生学院衛生毒理学講座・助教授）             | ダイオキシン汚染及び内分泌かく乱物質に関する共同研究のために来日し、共同研究を確立した。この招聘で調査測定細目の検討を行った。 | 自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門 | 9泊10日         |
| Herman Adlercreutz（ヘルシンキ大学 予防医学・栄養癌研究所 所長） | 植物エストロジェンと人工の内分泌かく乱物質の生体メカニズムについての意見交換のため。シンポジウム講演を行った。         | 自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門 | 8泊9日（うち機中泊1泊） |



## 6. 主な研究成果物、発表等

### (1)論文発表 (国内 11件、海外 17件)

Sakabe K, Onoe M, Okuma M, Yoshida T, Aikawa H, Kinoue T and, Kayama F : Natural and environmental oestrogens increase expression of SS-A/Ro autoantigen in the salivary gland of ovariectomized immature rats. *Pathophysiology* 6:231-236, 2000

Horiguchi H, Harada A, Oguma E, Sato M, Homma Y, Kayama F, Fukushima M, and Matsushima K

Cadmium-induced acute hepatic injury is exacerbated in human interleukin-8 transgenic mice. *Toxicol Applied Pharmacol.* 163, 231-239, 2000

Arao Y, Kuriyama R, Kayama F and Kato S. A nuclear matrix-associated factor, SAF-B interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D. *Arch Biochem Biophys* 380(2); 228-236, 2000

Simeonova, P.P., Wang, S., Toriuma, W., Matheson, J. Nyseoo, U., Kayama F., Harki D, Ding M., Vallyathan V. and Luster, M.I.: Arsenic mediates cell proliferation and gene expression in the bladder epithelial: association with AP-1 transactivation. *Cancer Res.*, 2000, 60:3445-3453.

Itoh N, Kayama F, Tatsuki J, and Tsukamoto T. Have sperm counts deteriorated over the past 20 years in healthy young Japanese men. - Results from the Sapporo area-  
*Journal of Andrology*, 22(1): 40-44, 2000

To H, Kikuchi A, Tsuruoka S Sugimoto K, Fujimura A, Higuchi S, Kayama F, Hara K, Matsuno K and Kobayashi E. Time-dependent Nephrotoxicity associated with daily administration of cisplatin in mice. *J Pharm Pharmacology* 52:1499-1504, 2000

Horiguchi H, Kayama F, Oguma E, Willmore WG, Hradecky P and Bunn F. Cadmium and platinum suppression of erythropoietin production in cell culture: clinical implication  
*Blood* 96:3743-3747, 2000

D-H. Han, Y. Miyazaki, H. Tachibana and K. Yamada. (2000) Optimization of estrogenic activity detection method using human breast cancer MCF-7 cells. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 44 (3・4), 339-348.

山田耕路, 韓達昊, 宮崎義之, 菅野道廣, 立花宏文. (2000) ヒト乳癌 MCF-7 細胞の増殖に及ぼすイソフラボンの作用. *大豆たん白質研究*, 3, 54-58.

D-H. Han, H. Tachibana and K. Yamada. (2001) Inhibition of environmental estrogen-induced proliferation of human breast carcinoma MCF-7 cells by flavonoids. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Animal*, 37, 275-282.

Hyogo Horiguchi, Etsuko Oguma, Fujio Kayama, Masao Satoh, and Masaaki Fukushima. (2001) Dexamethasone prevents acute cadmium-induced hepatic injury but exacerbates kidney dysfunction in rabbits. *Toxicology and Applied Pharmacology* 174: 225-234.

山田耕路, 韓達昊, 菅野道廣, 立花宏文. (2001) 大豆イソフラボンのエストロゲン活性発現抑制効果. *大豆たん白質研究*, 4, 123-128.

Arao Y, Kikuchi A, Ikeda K, Nomoto S, Horiguchi H, and Kayama F. A+U-rich-element RNA-binding factor 1/heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D gene expression is regulated by oestrogen in the rat uterus. *Biochem. J.*, 361; 25-132, 2002

Nomoto S, Arao Y, Horiguchi H, Ikeda K, Kayama F. Oestrogen causes G2/M arrest and apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231. *Oncol Rep* 2002 Jul-Aug;9(4):773-6

Ikeda K, Arao Y, Otsuka H, Nomoto S, Horiguchi H, Kato S, Kayama F. Terpenoids found in the umbelliferae family act as agonists/antagonists for ER(alpha) and ERbeta: differential transcription activity between ferutinine-liganded ER(alpha) and ERbeta. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Feb 22;291(2):354-60

Mori C, Hamamatsu A, Fukata H, Koh KB, Nakamura N, Takeichi S, Kusakabe T, Saito T, Morita M, Tanihara S, Kayama F, Shiyomi M, Yoshimura J, Sagisaka K. Temporal changes in testis weight during the past 50 years in Japan. *Anat Sci Int* 2002 Jun;77(2):109-16

山田耕路, 韓達昊, 吳博聖, 安田伸, 菅野道廣, 立花宏文. (2002) 大豆イソフラボンおよび環境ホルモンの抗体産生調節作用. *大豆たん白質研究*, 5, 103-107.

Kayama F, Horiguchi H. and Hamamatsu A  
Potential health effects of alkylphenols in Japan.  
*JMAJ* 46 (3); 108-114 2003

Fujio Kayama, Arao Y, Hyogo Horiguchi, and Satoshi Nomoto  
Naturally Occurring and Synthetic Xenoestrogens.  
*Environmental Science*, 9, 1(2002) 051-055

S. Kanno, S. Hirano, and F. Kayama: Effects of 17 $\beta$ -estradiol, Phytoestrogens and Environmental Estrogens on Osteoblastic Differentiation in MC3T3-E1 Cells. *Biomed. Res. Trace Elements*. 13(4), 328-329, 2002.

D-H. Han, M. S. Denison, H. Tachibana and K. Yamada. (2002a) Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66 (7), 1479-1487.

D-H. Han, M.S. Denison, H. Tachibana and K. Yamada. (2002b) Effect of estrogenic compounds on immunoglobulin production by mouse splenocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, 25 (10), 1263-1267.

Yamashita, U., Sugiura, T., Yoshida, Y. and Kuroda, E. : Effect of endocrine disrupters on murine thymocytes in vitro. *Journal of UOEH*, 25:161-170, 2003.

Fujio Kayama, Hyogo Horiguchi, and Akihiko HAMAMATSU  
Potencial Health Effects of Alkylphenols in Japan.  
*Japan Medical Association Journal* Vol.46, No.3, 108-114, March, 2003

Kayama, F., Ikeda K, Arao Y, Otsuka H, Nomoto S, Horiguchi, H. 2003. Mechanisms of action and physiological functions of naturally occurring and man-made xenoestrogens. *J. UOEH* 25 (supp 1): 161-167.

Horiguchi, H., Oguma, E., Sasaki, S., Miyamoto, K., Ikeda, Y., Machida, M., Kayama, F., 2003. Dietary exposure to cadmium at close to the current Provisional Tolerable Weekly Intake does not affect renal function among female Japanese farmers. *Environ. Res.* (in press).

P-S. Wu, S. Yasuda, H. Tachibana and K. Yamada. (2003) Voltage dependency in coulometric analysis of tea polyphenols and isoflavones in foodstuffs. *Food Sci. Technol. Res.*, 9 (2), 180-184.

Yamashita, U., Sugiura, T. and Kuroda, E. : Effect of endocrine disrupters on immune responses in vitro. *J. UOEH*, 24:1-10, 2002.

Yamashita, U., Sugiura T., Yoshida, Y. and Kuroda, E. : Effect of endocrine disrupters on thymocytes in vitro. *J. UOEH*, 25:161-170, 2003.

Yamashita, U., Kuroda, E., Yoshida, Y. and Sugiura, T. : Effect of endocrine disrupters on immune responses in vivo. *J. UOEH*, 25: 365-374, 2003.

S. Yasuda, P-O. Wu, E. Hattori, H. Tachibana and K. Yamada. (2003) Oral administration of soy isoflavones and determination of serum isoflavone levels in Sprague-Dawley rats. *Proceedings of Jap. Assoc. Animal Cell Technol.* 2002. in press.

S. Yasuda, P-S. Wu., E. Hattori, H. Tachibana and K. Yamada. (2004) Simultaneous determination of isoflavones and bisphenol A in rat serum using high performance liquid chromatography coupled with a coulometric array detector. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.

M, Nakaya, M. Yamasaki, Y. Miyazaki, H. Tachibana and K. Yamada. (2004) Estrogenic compounds suppressed interferon-gamma production in mouse splenocytes through direct cell-cell interaction. *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, in press.

(2) 口頭発表（内容が重複しているものは除く。国際学会発表を優先。）

- ① 招待、口頭講演 （国内 27件、海外 4件）
- ② ポスター発表 （国内 24件、海外 17件）
- ③ プレス発表 なし

<平成 11 年>

平成 11 年 10 月 18-20 日

e・hormone1999 ニューオリンズ・米国

*Y. ARAO, A. KIKUCHI, and F. KAYAMA*

Expression of AUF1/hnRNP D, a regulator of mRNA degradation, is controlled by estrogen in rat uterus

平成 11 年 9 月.

D-H. Han, Y. Miyazaki, H. Tachibana, K. Yamada, Growth regulation of human breast cancer MCF-7 cells by phytoestrogens. 8th Asian Congress of Nutrition (Seoul)

19-23 March, 2000

Hyogo Horiguchi, Akihisa Harada, Etsuko Oguma, Masao Sato, Yoshimi Homma, Fujio Kayama, Masaaki Fukushima and Kouji Matsushima. Cadmium induced acute hepatic injury is exacerbated in human interleukin-8 transgenic mice. The 39th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Philadelphia,. (The Toxicologist, 54 (1): 284, 2000)

27 August-1 September, 2000.

Hyogo Horiguchi, Etsuko Oguma, Masao Sato, Fujio Kayama, Masaaki Fukushima. Dexamethasone protects acute cadmium-induced liver injury but exacerbates the kidney injury in rabbits. The 26th International Congress on Occupational Health, Singapore, 発表日は 30 日)

(Scientific Programme and Abstracts, 639, 2000)

平成 11 年 9 月 20 日～21 日

第 6 回免疫毒性研究会 仙台

急性カドミウム中毒におけるデキサメサゾンの肝障害抑制効果と腎機能悪化効果

堀口兵剛（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）小熊悦子（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）佐藤政男（福島県立医科大学 医学部 公衆衛生学）香山不二雄（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）福島匡昭（福島県立医科大学 医学部 公衆衛生学）

（講演要旨集 p39）

平成 11 年 11 月 24～25 日

第 2 回メタロチオネイン研究会 大阪

デキサメサゾンの急性カドミウム中毒に対する肝障害抑制作用におけるメタロチオネインの役割

堀口兵剛（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門） 小熊悦子（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門） 佐藤政男（福島県立医科大学 医学部 公衆衛生学） 香山不二雄（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門） 福島匡昭（福島県立医科大学 医学部 公衆衛生学）  
（講演要旨集 p150）

<平成 12 年>

25-29 March, 2001

Hyogo Horiguchi, Etsuko Oguma, Fujio Kayama. Transient hemoglobinuria Observed in rats exposed to cobalt. The 40th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Francisco, (The Toxicologist, 60 (1): 359, 2001)

平成 12 年 10 月 23 日～24 日

第 10 回日本産業衛生学会産業医・産業看護全国協議会 富山

イタイイタイ病患者ならびにカドミウム腎症患者における骨代謝関連遺伝子多型性

堀口兵剛（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門） 小熊悦子（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門） 香山不二雄（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）、青島恵子（富山医科薬科大学 医学部 公衆衛生学） 加須屋実（富山医科薬科大学 医学部 公衆衛生学）、福島匡昭（福島県立医科大学 医学部 公衆衛生学）

（講演集：108、2000）

平成 12 年 12 月 12 日

環境ホルモン学会 第 3 回研究発表会 横浜市

Terpenes from Umbelliferae family act as phytoestrogen.

Ikeda K, Arao Y, Kayama F

平成 12 年 3 月 31 日

第 120 年会日本日本薬学会、岐阜市

植物性エストロジェンが骨芽細胞の分化及び IL-6 産生に及ぼす影響

菅野さな枝<sup>1, 3</sup>, 小林弥生<sup>1</sup>, 平野靖史郎<sup>1, 3</sup>, 香山不二雄<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup> 国立環境研究所環境健康研究領域、<sup>2</sup> 自治医大保健科学講座、<sup>3</sup>CREST,JST

平成 12 年 3 月 28 日～30 日

第 70 回日本衛生学会総会 大阪

Hep3B cell における重金属のエリスロポエチン産生に対する抑制効果

堀口兵剛（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門） 香山不二雄（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）

（日本衛生学雑誌第 55 巻第 1 号：155、2000）

平成 12 年 4 月 24 日～26 日

第 73 回日本産業衛生学会 北九州

ラットにおける急性コバルト中毒による腎臓出血

堀口兵剛（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門） 香山不二雄（自

治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)  
(産業衛生学雑誌第42巻臨時増刊号: 330、2000)

<平成13年>

March 3-7, 2001

Hanoi, Vietnam

Kayama F, Hamamatsu A, Sagisaka K, Brown D, Clark G, and Nakamura M.  
CALUX assay as screening method of human specimens for dioxin contamination,  
United State-Vietnam Scientific Conference on Health Effect and Environmental  
Effects by Agent Orange/dioxin

18-20 October 2001

New Orleans, USA

Arao Y, Kikuchi A, Kayama F. The effect of phytoestrogens on the rat uterus.  
EHormone 2001, the cutting edge of endocrine disrupter research.

8-12 July, 2001.

Brisbane, Australia

Hyogo Horiguchi, Etsuko Oguma, Fujio Kayama (Jichi Medical School and  
CREST): Suppression of erythropoietin production by estradiol and  
diethylstilbestrol in rats, 9th International Congress of Toxicology.

March, 2001.

San Francisco

Ikeda K, Arao Y, Kayama F: Ferutinine is an agonist for ERa and an  
antagonist for ERb.

40th annual meeting of society of toxicology.

平成13年3月27日

第75回日本衛生学会学術大会 津

香山不二雄(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 堀口兵剛(自治  
医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)

「衛生学における生殖毒性・次世代影響研究」 講演演題「疫学における曝露評価の問題」

平成13年4月27日～30日

第71回日本衛生学会総会 福島

ダイオキシン類測定法 CALUX Assay の疫学への応用

香山不二雄(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 堀口兵剛(自治  
医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 谷原真一(自治医科大学 保健科  
学講座 公衆衛生学部門) David Brown、George Clark

(日本衛生学雑誌第56巻第1号: 254、2001) (口頭)

平成13年8月1日～3日

RNA学会 神戸

ラット子宮組織におけるエストロゲンによる AUF1mRNA 分解制御

荒尾行知(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 菊池淳美(自治医

科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 香山不二雄(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)

平成 13 年 7 月

Sugiura, T., Kuroda, E. and Yamashita, U.: Immunological characterization of metallothionein knockout mouse. 11th International Congress of Immunology Stockholm, Sweden

平成 13 年 7 月

Kuroda, E. and Yamashita, U.: Strain difference of IFN- $\gamma$  production by macrophages in mice. 11th International Congress of Immunology Stockholm, Sweden

平成 13 年 7 月

Yamashita, U. and Kuroda, E.: Role of prostaglandin (PG) in the susceptibility to Leishmania (L.) major infection in BALB/c mice. 11th International Congress of Immunology Stockholm, Sweden

平成 13 年 7 月

Okada, K., Yamashita, U. and Tsuji, S.: The modulation of cytokine production of murine astrocytes by interferon- $\beta$ . 11th International Congress of Immunology Stockholm, Sweden

平成 13 年 12 月 9 日～12 日

日本分子生物学会 横浜

エストロゲンやクメステロールを雌の 3 週令ラットに皮下注射したときに、子宮での発現レベルが下がる遺伝子の同定

野本聡(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)

平成 13 年 12 月 9 日～12 日

日本分子生物学会 横浜

植物エストロゲン ferutinine のエストロゲン受容体サブタイプ選択的なアゴニスト/アンタゴニスト活性

池田和博(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)、荒尾行知(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)、香山不二雄(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)

平成 13 年 12 月 9 日～12 日

日本分子生物学会 横浜

エストロゲンによる AUF1 アイソフォーム群遺伝子発現制御

荒尾行知<sup>1</sup>、菊池淳美<sup>1,3</sup>、岸田光代<sup>1</sup>、栗山麗子<sup>2</sup>、加藤茂明<sup>2,3</sup>、香山不二雄<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>自治医科大学・保健科学、<sup>2</sup> 東京大学・分生研、<sup>3</sup> CREST・科技団)

平成 13 年 12 月 14 日～15 日

環境ホルモン学会(日本内分泌攪乱化学物質学会) 第 4 回研究発表会 つくば

セリ科由来のエストロゲン受容体選択的植物エストロゲン

池田和博(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 荒尾行知(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 大塚広子(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 野本聡(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・

毒性学部門)堀口兵剛(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)加藤茂明(東京大学分子生物学研究所)香山不二雄(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)

平成13年12月14日～15日

環境ホルモン学会(日本内分泌攪乱化学物質学会)第4回研究発表会 つくば  
Yikitomo Arao 1,2, Atsumi Kikuchi 1,2, and Fujio Kayama 1,2; A possibility of differential functions of phytoestrogens on the uterus growth.

平成13年12月14日～15日

環境ホルモン学会(日本内分泌攪乱化学物質学会)第4回研究発表会 つくば  
ラットにおけるエストロゲンならびにジェチルスチルベストロールのエリスロポエチン産生に対する抑制効果

堀口兵剛(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)小熊悦子(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)香山不二雄(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)

(第4回研究発表会要旨集:379、2001)

平成13年5月

不二たん白質研究振興財団成果発表会 大阪

イソフラボンの乳がん細胞増殖抑制作用に関する研究.

山田耕路(九州大学 農学部),Dal-Ho Han(九州大学 農学部)菅野道廣(九州大学 農学部)立花宏文(九州大学 農学部)

平成13年10月

第54回 日本寄生虫学会南日本支部大会・第51回 日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会、北九州

BALB/cマウスマクロファージにおけるプロスタグランジン産生増強

黒田 悦史(産業医科大学 免疫学教室)山下 優毅(産業医科大学 免疫学教室)

平成13年10月

第19回 産業医科大学学会総会、北九州

内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)の免疫反応に及ぼす影響

山下 優毅(産業医科大学 免疫学教室)黒田 悦史(産業医科大学 免疫学教室)

平成13年12月

第31回 日本免疫学会総会、大阪

メタロチオネインノックアウトマウス由来マクロファージの機能異常

杉浦 勉、黒田 悦史(産業医科大学 免疫学教室)山下 優毅(産業医科大学 免疫学教室)

平成13年12月

第31回 日本免疫学会総会、大阪

BALB/cマウスマクロファージのSTAT4発現とIFN-g産生能の低下

黒田 悦史(産業医科大学 免疫学教室)鬼頭 知宏、山下 優毅(産業医科大学 免疫学教室)

平成13年12月

第31回 日本免疫学会総会、大阪



マウスアストロサイトのサイトカイン産生に対する interferon- $\gamma$  の効果  
岡田 和将、山下 優毅（産業医科大学 免疫学教室）、辻 貞俊

平成 13 年

第 19 回産業医科大学学会総会 北九州

内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）の免疫反応に及ぼす影響

山下優毅（産業医科大学 免疫学教室）黒田悦史（産業医科大学 免疫学教室）

<平成 14 年>

平成 14 年

第 20 回産業医科大学学会総会 北九州

内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）のマクロファージに対する作用

山下優毅（産業医科大学 免疫学教室）黒田悦史（産業医科大学 免疫学教室）

17-21 March, 2002.

USA

Hyogo Horiguchi, Etsuko Oguma, Fujio Kayama (Jichi Medical School and CREST): Anemia in chronic cadmium intoxication is induced by the destruction of erythropoietin-producing cells in kidneys, The 41th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville.

平成 14 年 3 月 26 日～29 日

第 72 回日本衛生学会総会 津

腎臓尿細管でのエリスロポエチン産生とそれに対する長期カドミウム投与の影響

堀口兵剛（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）、香山不二雄（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）

平成 14 年 4 月 10 日

日本産業衛生学会 特別報告 神戸

産業保健におけるダイオキシン測定に関して

香山不二雄（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）堀口兵剛（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）

平成 14 年 4 月 18 日

第 18 回日本微量元素学会 千葉県木更津市

内分泌攪乱物質が骨形成に与える影響

菅野さな枝（国立環境研究所 環境健康研究領域）平野靖史郎（国立環境研究所 環境健康研究領域）香山不二雄（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）

平成 14 年 7 月 5 日～6 日

第 11 回日本臨床環境医学学会総会 北海道札幌市

重筋無力症自然発症ラット（BUF/Mna）の胸腺腫発育と環境ホルモン

坂部貢（北里研究所病院・臨床環境医学センター）山崎等（東海大学 医学部 病理学）

尾上球子（東海大学 医学部 免疫学）相川浩幸（東海大学 医学部 環境保健学）相

澤好浩（北里大学 医学部 衛生学公衆衛生学）吉田貴彦（旭川医科大学 衛生学）香

山不二雄（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）宮田幹夫（北里研究所病院・臨床環境医学センター）石川哲（北里研究所病院・臨床環境医学センター）

平成 14 年 7 月 15 日～7 月 18 日

RNA 学会 茨城県つくば市

ラット子宮組織における mRNA 分解制御因子 AUF1 の標的 mRNA の検索

荒尾行知 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 菊池淳美 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 池田和博 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 安田重光 (埼玉医科大学 第四内科) 和田誠基 (埼玉医科大学 第四内科) 香山不二雄 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)

平成 14 年 7 月 21 日

栄養食糧学会 発表 札幌

豆類及び野菜にエストロゲン様作用を確認

吉川恵理 (カゴメ(株)), 荒尾行知 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門), 香山不二雄 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)

平成 14 年 8 月 15 日

Dioxin2002 スペイン バルセロナ

REGIONAL DIFFERENCES OF BLOOD DIOXIN AND ORGANOCHLORINE PESTICIDES CONCENTRATIONS OF JAPANESE FEMALE FARMERS.

- APPLICATION OF CALUX ASSAY FOR EPIDEMIOLOGICAL STUDY -

Fujio Kayama (Department of Health Science, Jichi Medical School), Hyogo Horiguchi (Department of Health Science, Jichi Medical School), Etsuko Oguma (Department of Health Science, Jichi Medical School), Junko Fujino (Hiyoshi Corporation), Hisatoshi Yabushita (Hiyoshi Corporation), David Brown (Xenobiotic Detection System International) and George Clark (Xenobiotic Detection System International)

平成 14 年 9 月 19 日

第 9 回日本免疫毒性学会 静岡県谷田

大豆タンパク摂取ラットの肝臓における LPS 誘導性急性炎症の抑制効果

趙建宏 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 大塚広子 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 菊池淳美 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 荒尾行知 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 香山不二雄 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)

平成 14 年 9 月 25 日

International Symposium of UOEH 福岡県北九州市

Mechanisms of action and physiological functions of Naturally Occurring and Man-made Xenoestrogens

Fujio Kayama (Department of Health Science, Jichi Medical School), Yukitomo Arao (Department of Health Science, Jichi Medical School), Hiroyuki Ikeda (Department of Health Science, Jichi Medical School), Satoshi Nomoto (Department of Health Science, Jichi Medical School), Hyogo Horiguchi (Department of Health Science, Jichi Medical School), Etsuko Oguma (Department of Health Science, Jichi Medical School)

平成 14 年 9 月 25 日

International Symposium of UOEH 福岡県北九州市

Role of Metallothionein for Protection against Heavy Metal-induced Cytotoxicity

and Regulation of Immune Responses

Tsutomu Sugiura(Department of Immunology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health),and Uki Yamashita(Department of Immunology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health)

平成 14 年 10 月 26 日

日本職業災害医学会 北九州

環境ホルモンについてーヒト体内の環境ホルモンの存在量と評価

香山不二雄(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)堀口兵剛(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)小熊悦子(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)大塚広子(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)池田陽子(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)宮本佳代子(自治医科大学 栄養部)荒尾行知(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)野本 聡(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)佐々木敏(国立健康・栄養研究所)古賀 実(熊本県立大学 環境共生学部環境分析化学研究室)藪下尚智(日吉株)中村昌文(日吉株)

平成 14 年 11 月 5 日

日中医学会 北京

Dioxin, dioxin-like PCBs and organochlorine pesticides in blood of female farmers in Japan.

Fujio Kayama (Department of Health Science, Jichi Medical School)Hyogo Horiguchi (Department of Health Science, Jichi Medical School) Minoru Koga(Kumamoto Prefectural University) George Clark(Xenobiotic Detection System International)Hisatoshi Yabusita(Hiyoshi Corporation)

平成 14 年 11 月 26 日

環境ホルモン学会 広島県広島市

Dioxin concentrations of breast milk in China and Japan; Comparative analysis both by HRGC-MS and DIPS-CALUX assay

Fujio Kayama (Department of Health Science, Jichi Medical School) Hejin Yi (College of Public Health, China Medical University) Masafumi Nakamura(Hiyoshi Corporation) Hisatoshi Yabusita(Hiyoshi Corporation) Junko Fujino(Hiyoshi Corporation)Hideo Fukatsu(SRL Inc.) Naoki Yamazaki(SRL Inc.) George Clark(Xenobiotic Detection System International)

平成 14 年 11 月 25 日～27 日

環境ホルモン学会 広島県広島市

HPLC-coulometric array によるヒト血漿イソフラボン定量法の確立

荒尾行知(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)大塚広子(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)山田耕路(九州大学大学院生物資源環境科学研究科生物機能科学専攻生物機能科学大講座食糧化学研究室) 香山不二雄(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)

平成 14 年 12 月 6 日

シンポジウム 植物エストロゲン-その作用, 体内動態と健康影響

植物エストロゲンの作用機序の差異

香山不二雄(自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)

平成 14 年 12 月 11 日～12 月 14 日

分子生物学会 神奈川県横浜市

エストロジェンを雌の 3 週令ラットに皮下注射したときに、子宮での mRNA レベルが下がる遺伝子 DRE1 の同定とその解析

野本聡（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）池田和博（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）香山不二雄（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）

平成 14 年 12 月 11 日～12 月 14 日

分子生物学会 神奈川県横浜市

ラット子宮組織における AUF1 の標的 mRNA のエストロゲンによる発現制御

荒尾行知（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）菊池淳美（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）池田和博（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）香山不二雄（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）

<平成 15 年>

平成 15 年 1 月 30 日（金）

農家女性の血中環境ホルモン量の地域比較—残留有機塩素系農薬、ダイオキシン類およびイソフラボンの血中濃度について—

内分泌攪乱化学物質学会 講演会テキスト 10<sup>th</sup> 49-58 (2003)

香山不二雄<sup>1,5</sup>, 堀口兵剛<sup>1,5</sup>, 小熊悦子<sup>1,5</sup>, 大塚広子<sup>1</sup>, 池田陽子<sup>1</sup>, 宮本佳代子<sup>1</sup>, 荒尾行知<sup>1,5</sup>, 野本聡<sup>1,5</sup>, 佐々木敏<sup>2</sup>, 古賀実<sup>3,5</sup>, 藪下尚智<sup>4</sup>, 中村昌文<sup>4</sup>

<sup>1</sup>自治医科大学, <sup>2</sup> 国立健康栄養研究所, <sup>3</sup>熊本県立大学, <sup>4</sup>株式会社 日吉, <sup>5</sup>CREST-JST

平成 15 年 1 月 30 日（金）

環境ホルモンについて ヒト体内の環境ホルモンの存在量と評価

日本職業・災害医学会会誌 第 51 巻 第 3 号

香山不二雄<sup>1,5</sup>, 堀口兵剛<sup>1,5</sup>, 小熊悦子<sup>1,5</sup>, 大塚広子<sup>1</sup>, 池田陽子<sup>1</sup>, 宮本佳代子<sup>1</sup>, 荒尾行知<sup>1,5</sup>, 野本聡<sup>1,5</sup>, 佐々木敏<sup>2</sup>, 古賀実<sup>3,5</sup>, 藪下尚智<sup>4</sup>, 中村昌文<sup>4</sup>

<sup>1</sup>自治医科大学, <sup>2</sup> 国立健康栄養研究所, <sup>3</sup>熊本県立大学, <sup>4</sup>株式会社 日吉, <sup>5</sup>CREST-JST

平成 15 年 2 月 8 日

DHQ ワークショップ 2003 科学的根拠に基づく栄養調査・栄養指導を目指す研究者と栄養指導実務者の集い 東京都文京区

全国 5 地域における農家女性の食生活と健康

池田陽子（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）堀口兵剛（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）小熊悦子（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）佐々木敏（国立健康・栄養研究所）宮本佳代子（自治医科大学 栄養部）町田宗仁（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）香山不二雄（自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門）

平成 15 年 2 月 23 日～28 日

27<sup>th</sup> International Congress on Occupational Health イグアス

The effects of low-dose chronic exposure to cadmium through rice consumption on renal function among female farmers in Japan.

Horiguchi H (Department of Health Science, Jichi Medical School) , Oguma E (Department of Health Science, Jichi Medical School) , Sasaki S (National Insutitute of Health and Nutrition), Miyamoto K (Department of Health Science, Jichi Medical School) , Ikeda Y (Department of Health Science, Jichi Medical School) Machida M (Department of Health Science, Jichi Medical School) , Kayama F (Department of Health Science, Jichi Medical School)

平成 15 年 3 月 11 日

Society of Toxicology ソルトレークシティ

Dietary exposure assessment of cadmium close to the current provisonal tolerable weekly intake and its effects on renal biomarkeres among female farmers in Japan.

Kayama F (Department of Health Science, Jichi Medical School) , Horiguchi H (Department of Health Science, Jichi Medical School) , Oguma E (Department of Health Science, Jichi Medical School) , Sasaki S (National Insutitute of Health and Nutrition), Miyamoto K (Department of Health Science, Jichi Medical School) , Ikeda Y (Department of Health Science, Jichi Medical School) Machida M (Department of Health Science, Jichi Medical School)

平成 15 年 3 月 11 日

Society of Toxicology ソルトレークシティ

Dietary cadmium absorption is accelerated in young woman with low serum ferritin levels among female Japanese fermers.

Horiguchi H (Department of Health Science, Jichi Medical School) , Oguma E (Department of Health Science, Jichi Medical School) , Sasaki S (National Insutitute of Health and Nutrition), Miyamoto K (Department of Health Science, Jichi Medical School) , Ikeda Y (Department of Health Science, Jichi Medical School) Machida M (Department of Health Science, Jichi Medical School) , Kayama F (Department of Health Science, Jichi Medical School)

平成 15 年 3 月 26 日～29 日

第 7 3 回日本衛生学会総会 大分

日本の農家女性における低濃度カドミウム経口暴露の腎機能への影響

堀口兵剛 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 小熊悦子 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 佐々木敏 (国立健康・栄養研究所) 宮本佳代子 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 池田陽子 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 町田宗仁 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 香山不二雄 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)

(日本衛生学雑誌第 5 8 巻第 1 号 : 125、2003) (口頭)

平成 15 年 3 月 27 日

日本衛生学会 大分

日本の農家女性における低濃度カドミウム経口曝露の骨への影響

香山不二雄 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 堀口兵剛 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 小熊悦子 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 佐々木敏 (国立健康・栄養研究所) 宮本佳代子 (自

治医科大学 栄養部) 池田陽子 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 町田宗仁 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)

平成 15 年 3 月 27 日

日本衛生学会 大分

農家女性での消化管からのカドミウム吸収率とその関連因子

堀口兵剛 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 小熊悦子 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 佐々木敏 (国立健康・栄養研究所) 宮本佳代子 (自治医科大学 栄養部) 池田陽子 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 町田宗仁 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門) 香山不二雄 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)

平成 15 年 3 月 27 日～29 日

日本薬学会第 123 年会 長崎県長崎市

植物エストロゲンが破骨細胞の分化に及ぼす影響

菅野さな枝 (国立環境研究所 環境健康研究領域健康指標研究室) 平野靖史郎 (国立環境研究所 環境健康研究領域健康指標研究室) 香山不二雄 (自治医科大学 保健科学講座 環境免疫学・毒性学部門)

平成 15 年 4 月 2 日 2003 年日本農芸化学学会

大豆タンパクラット摂取の肝臓における LPS 誘導性急性炎症の抑制効果

趙建宏 (自治医科大学・医) 荒尾行知 (自治医科大学・医) 菊池淳美 (自治医科大学・医) 香山不二雄 (自治医科大学・医)

平成 15 年 4 月 2 日 2003 年日本農芸化学学会

ラット子宮における AUF1 の標的 mRNA のエストロゲンによる発現制御

荒尾行知 (自治医科大学・医) 菊池淳美 (自治医科大学・医) 香山不二雄 (自治医科大学・医)

平成 15 年 8 月 24 日～29 日 Dioxin2003 (ボストン)

DIOXIN AND ORGANOCHLORINE PESTICIDE CONCENTRATIONS OF BREAST MILK IN CHINA AND JAPAN.

Fujio Kayama<sup>1</sup>, Hyogo Horiguchi<sup>1</sup>, Hejin Yi<sup>2</sup>, Tatsuya Kunisure<sup>3</sup>, Shinsuke Tanabe<sup>3</sup>, Hideo Fukatsu<sup>4</sup>, Naoki Yamazaki<sup>4</sup>, Masafumi Nakamura<sup>5</sup>, Hisatoshi Yabushita<sup>5</sup>, Junko Fujino<sup>5</sup>, George Clark<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Jichi Medical School, Tochigi 329-0498 JAPAN, and CREST/JST, Kawaguchi 332-0012, JAPAN

<sup>2</sup>Dept. Hygienic Toxicology, College of Public Health, China Medical University.

<sup>3</sup>Center for Marine Environmental Studies, Ehime University, Matsuyama 790-8577, Japan

<sup>4</sup>SRL, Inc, 2-41-19 Akemono-cho, Tachikawa-shi Tokyo 190-8567 JAPAN

<sup>5</sup>Hiyoshi Corporation, Omihachiman, Shiga 523-8555 JAPAN

<sup>6</sup>Xenobiotic Detection System International, Inc. (XDS) Durham, NC27704 USA.

平成 15 年 7 月 24 日～25 日

第 14 回日本微量元素学会 (大阪府吹田市)

クメストロール (植物エストロゲン) が破骨細胞の分化に及ぼす影響

菅野さな枝<sup>1, 3</sup>, 小林弥生<sup>1</sup>, 平野靖史郎<sup>1, 3</sup>, 香山不二雄<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup>国立環境研究所環境健康研究領域、<sup>2</sup>自治医大保健科学講座、<sup>3</sup>CREST, JST

平成 15 年 7 月 1 日～6 日

RNA2003 (オーストリア：ウィーン)

The expression of AUF1 binding mRNAs is regulated by oestrogen in the rat uterus.

Yukitomo Arao, Atsumi Kikuchi, and Fujio Kayama

Jichi Medical School, Dept of Health Science, Tochigi, Japan, CREST, JST

平成 15 年 12 月 10 日 ～ 13 日

第 26 回日本分子生物学会年会：兵庫県神戸市

ラットの子宮において DRE1 という仮想的なアクチン結合蛋白質の mRNA のエストロゲンを介した不安定化

野本聡<sup>1</sup>, 池田和博<sup>2</sup>, 趙建宏<sup>1</sup>, 香山不二雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 自治医科大学・保健科学, CREST-JST, <sup>2</sup> 埼玉医大・ゲノム医学研究センター

平成 15 年

第 21 回産業医科大学学会総会 北九州

免疫・アレルギー疾患の発症における環境ホルモンの役割

黒田悦史 (産業医科大学 免疫学教室)、杉浦勉 (産業医科大学 免疫学教室)、吉田安宏 (産業医科大学 免疫学教室)、山下優毅 (産業医科大学 免疫学教室)

(3) 特許出願 (国内 0 件、海外 0 件)

(4) 新聞報道等

#### ① 新聞報道

環境新聞 1578 号 一面 (平成 12 年 12 月 6 日)

「ダイオキシン 簡易分析法が有効に 自治医大と日吉 人体影響解明利用で」

(5) その他特記事項

香山不二雄

内分泌攪乱化学物質問題の現状と人の健康問題

ホルモンと臨床 '99 秋季増刊号 ステロイドホルモン研究の進歩 1999 医学の世界社 佐藤文三、宮地幸隆編 p-pp. 13-20, 1999

香山不二雄

外因性内分泌攪乱化学物質の生体への影響と検査 健康への影響

SRL 宝函 23(2); 70-73, 1999

香山不二雄

環境ホルモン物質の人への影響

安全工学 38(2); 108-112, 1999

香山不二雄  
環境ホルモンの健康影響  
保健婦雑誌 55 (7); 597-603, 1999

香山不二雄  
環境ホルモンの提起したもの  
ドクターサロン 44(1);55-58, 1999

香山不二雄  
産業保健スタッフに必要な環境ホルモンの知識  
健康管理 54(6) 34-37, 1999

香山不二雄  
内分泌かく乱物質はどこまでわかっているかーヒトへの影響  
農林水産業と環境ホルモン  
農林水産技術情報協会編 家の光協会 P-PP. 56-69, 1999

香山不二雄  
化学物質の環境へのリスク 環境中のホルモン様物質  
臨床検査 43(11); 1369-1374, 1999

香山不二雄  
内分泌攪乱化学物質ー生態系への影響、人の健康への影響ー  
環境ホルモンの最新動向 シーエムシー P-PP. 32-42, 1999

伊藤直樹、高木誠次、塚本泰司、田付二郎、香山不二雄  
日本男子の精子異常と環境ホルモン  
内分泌・糖尿病科 8(5):512-518, 1999

香山不二雄  
一般廃棄物燃焼による有害化学物質対策とその削減  
公衆衛生 64(4); 225-28, 2000

香山不二雄  
内分泌攪乱物質（環境ホルモン）  
栄養・健康科学シリーズ 公衆衛生 改訂第3版 田中平三編 P-PP. 303-305, 2000

香山不二雄  
DES の後世代影響  
治療学 34(5) ; 100-102, 2000

香山不二雄  
ダイオキシン  
臨床皮膚科 増刊号 54(5);190-192, 2000

香山不二雄



環境ホルモンのリスク評価 ―in vitro, in vivo assay と疫学調査の重要性―  
リスク学事典 日本リスク研究学会編 出版社 TBS ブルタニカ p-pp 77-79, 2000  
香山不二雄  
特集 内分泌攪乱物質の基礎と臨床  
序論  
最新医学 57(2) 181-182, 2002

香山不二雄  
特集 内分泌攪乱物質の基礎と臨床  
アプローチ  
最新医学 57(2) 183-189, 2002

荒尾行知、池田和博、香山不二雄  
特集 内分泌攪乱物質の基礎と臨床  
植物エストロゲンと人工化学物質  
最新医学 57(2) 197-202, 2002

香山不二雄  
アルキルフェノールのヒトの健康影響  
日本医師会雑誌 127(2) 216-220, 2002

## 7. 結び

当初の目的は、植物エストロゲンと人工の内分泌かく乱物質の相互作用を検討するものであり、少量の環境ホルモンを摂取していても植物エストロゲンを摂取すれば、悪影響を予防できるのではないかという大きな目標を置いた。当初取りかかった種々の植物エストロゲン作用機序の差について、レセプターへの結合、転写活性のレベル、アポトーシスなどの細胞レベルでの差などを検討してきた。その結果、それぞれの植物エストロゲンは、それぞれの段階で個性のある反応性の違い、作用機序の違いを示していることが明らかとなった。植物エストロゲンをレセプターレベルの結合の競合や阻害作用により、植物エストロゲンを評価する単純な評価系の策定は無意味であることも明らかとなった。

動物実験レベルでも、ゲネスタインなどのアグリコンの試薬を皮下投与する場合と大豆主体の飼料による経口投与する場合では、動物の反応性は大きく異なり、欧米の研究者の訴える豆乳から作成されるソイ・フォームラの危険性は過大評価されていると考えられる。植物エストロゲンを抽出してサプリメントおよび薬品として服用する場合は、過剰な悪影響が考えられるが、食品として摂取では、むしろよい影響が期待されることが考えられる。

また、実際のヒトでの植物エストロゲンおよび有機塩素系農薬、ダイオキシン類、カドミウムなどの体内存在量を解析していく過程で、それぞれ個人内変動および個人間変動を示すことが明らかとなった。植物エストロゲンの作用の強さは、体内での存在様式、すなわちアグリコンの状態で働くことを考えると、食品中のアグリコンの含量を正確に測定することが食品中の植物エストロゲン作用を評価する上で重要であると考えられる。

研究代表者としてのプロジェクト運営については、自分の教室のメンバー集めから始めた訳であるので、大変であったが、このプロジェクトに必要なスタッフを集めることができ、それなりの成果を上げることができた。チーム全体にも、さらなる活躍を期待したところであったが、なかなかうまくいかなかった部分もある。科学技術振興機構雇用の研究員の池田和博博士が埼玉医科大学ゲノム研究センターに助手として栄転したことは喜ばしいことであるが、チーム全体としては大きな損失であった。中国からの大学院生の趙建宏氏もこの研究費によるアルバイトのおかげで留学生活を続けることができ、立派な研究者になりつつある。

当初の研究計画以上に、疫学研究の割合が大きくなってきた。このCREST研究費から使われた研究費は疫学研究費の中でそれほど多くはないが、投入したマンパ

ワーと論文作成のために費やしたエネルギーは膨大で、それ以外の部分の論文作成が後回しになったことを大変遺憾に思っている。しかし、カドミウム低容量長期間曝露の問題は、環境ホルモン問題の一部としても大変重要であり、その大切な時期に、その研究に携われたことは社会医学者としての使命を多少なりとも果たせたと誇りに思っている。

寛大に多大なご援助を頂いた科学技術振興機構に深く感謝の意を表明いたします。

