

ン様活性は検出されなかった(Setchell et al., 1981)。しかし、乳がん細胞系を含む *in vitro* の培養組織での 4 つの感度検定では、これらのリグナンには刺激性が認められ、その作用は抗エストロゲンのタモキシフェンによって阻害された。抗エストロゲン性は認められなかった(Jordan et al., 1985)。別の研究で、エストラジオールを与える 22 時間前に投与すると、エンテロラクトンはラットの子宮組織においてエストロゲン刺激による RNA 合成を *in vivo* で阻害した(Waters and Knowler, 1982)。使用したエンテロラクトンの濃度は非常に低く、この結果を再現できるかどうかは疑わしい。われわれはエストラジオールなしで MCF-7 乳がん細胞に対するエンテロラクトンの刺激作用を観察したが、刺激性のわずかな、あるいはまったくない濃度のエストラジオールと、わずかに刺激性の濃度のエンテロラクトンを組み合わせると、刺激性も阻害傾向も現われなかった(Mausavi and Adlercreutz, 1992)。エンテロラクトンの濃度は生理的濃度とみなしてもよい $1 \mu\text{mol/l}$ であった。また、エンテロラクトンは MCF-7 細胞で pS2 の発現を刺激したが、enterodiol は刺激しなかった(Mäkelä et al., 1994; Sathyamoorthy et al., 1994)。このように異なる結果の解釈は困難であるが、外因性の弱いエストロゲンの作用は、内因性エストロゲンの数値次第で作動性あるいは拮抗性を示す可能性が示唆されており(Adlercreutz, 1990b, Qhitten and Naftolin, 1991), クメストロールについては実験により確認されている(Whitten and Naftolin, 1991)。

バーボンウィスキー中の植物エストロゲンは、卵巣摘出ラットとおそらくはヒトの女性に対し生物学的作用を持つと思われる(Gavaler et al., 1987, 1991)。主な化合物は β -シトステロールとビオカニン A であると示唆されている。

クメストロールは未成熟の卵巣摘出ラットと無傷ラットで異なる反応を引き起こすことが最近証明され、卵巣エストロゲンがこの植物エストロゲン反応に関与すると結論された。クメストロール自体は未成熟卵巣摘出ラットで完全なエストロゲン様反応を示さなかったが、未成熟無傷ラットでは続いて投与したエストラジオールの活性を高めた(Markaverich et al., 1995)。

ヒトの食物中に高濃度で存在する植物エストロゲンはエストロゲン様活性が比較的低く、ある状況では抗エストロゲン作用を持つと結論される。ヒトでの最終結果は定まっておらず、この作用は器官により異なるものと思われる。

酵素への影響

クメストロール とゲニステインによる 17β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の阻害が観察されている(Mäkelä et al., 1995b)。しかし、この阻害は乳がん細胞の増殖抑制とは相関しなかった(Mäkelä et al., 1994)。この酵素はエストロゲン作

用の標的組織である正常および悪性のヒト乳房と子宮内膜などで発現し、エストラジオールの組織対血漿比を高度に保ち、がん増殖活性を刺激する。別に、ダイゼイン、ゲニス테인、ホルモノネチン、および ビオカニン A による *Pseudomonas testosteroni* の β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の強い抑制がごく最近観察された(Keung, 1995)。ダイゼインは、テストステロン、プレグネノロン、プレグナノロンエストラジオール、エピアンドロステロン、デヒドロエピアンドロステロンの酸化を阻害することが示されたが、このことは脳のステロイド活性および卵巣のステロイド生合成に対して重要な意味を持つ。これらの所見は、 3β -ヒドロキシステロイドの酸化を触媒できる唯一のアルコールデヒドロゲナーゼアイソザイムである(McEvily et al., 1988)、ヒトのミトコンドリア・アルコールデヒドロゲナーゼ I(ADH)を、ゲニス테인、ダイゼイン、ビオカニン A、およびホルモノネチンが強力に抑制するという結果に基づいたものである(Keung, 1993b)。これらのイソフラボノイドの 7-O-glucosyl 誘導体は ADH を抑制しなかったが、アルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH)を強力に抑制した(Keung, 1993b; Keung and Vallee, 1993a)。中国では、これらの作用がアルコール症の治療に利用されている。

ゲニス테인、エクオール、ビオカニン A、ホルモノネチン、ダイゼイン、エンテロラクトン、さらに程度は低いがクメストロールおよび enterodiol は、 5α -還元酵素を抑制することが判明した。エンテロラクトン、ゲニス테인、ビオカニン A、interodiol、さらに程度は低いエクオール 1、ホルモノネチン、ダイゼインおよびクメストロールは、性器皮膚の線維芽細胞の 17β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素を阻害した。これら 2 つの酵素は、それぞれ濃度 $100\mu\text{mol/l}$ のゲニス테인とエンテロラクトンにより、ほぼ 100% 阻害された。これらの植物エストロゲンはまた、前立腺組織ホモジネートの 5α リダクターゼも阻害した(Evans et al., 1995)。それぞれが濃度 $10\mu\text{mol}$ の化合物 7 種を混合すると、ヒト性器皮膚単層の 5α リダクターゼを 77%、 17β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素を 94% 阻害した。この植物エストロゲン混合物による 5α リダクターゼの阻害は、良性前立腺過形成において 5α リダクターゼ阻害に用いられる強力な薬剤 Finasteride の、濃度 $10\mu\text{M}$ による阻害と同規模である。

もっとも豊富な哺乳類リグナンであるエンテロラクトンは、胎盤アロマターゼの中程度の阻害物質で、天然基質 androstenedione とこの酵素に関し競合する(Adlercreutz et al., 1993a)。matairesinol とエンテロラクトンの理論上の中間生成物である 4,4'-dihydroxy エンテロラクトンは、最も強い抑制力を示した。織毛がん細胞系(JEG-3)を用いた他の実験では、エンテロラクトンは細胞培地から細胞へと非常に容易に移行し、アロマターゼを阻害することが示された(Adlercreutz et al.,

1993a)。enterodiol の前駆体である secoisolariciresinol は活性を示さなかった (Gansser and Spiteller, 1995)。食物中に豊富に存在するフラボノイド類は、このアロマトラーゼ酵素の阻害物質でもある (Kellis and Victor, 1984a; Ibrahim and Abul-Hajj, 1990; Campbell and Kurzer, 1993)。ヒトの前脂肪細胞 (preadipocytes) で行った試験では、リグナンによる胎盤アロマトラーゼの阻害度はさまざま、didemethoxymatairesinol(4,4'-エンテロラクトン)が最も強い作用を示した (Campbell and Kurzer, 1993; Wang et al., 1994)。ほとんどのリグナンは弱い阻害物質に過ぎない。しかし、野菜、果物、ベリー類に富んだ食事はこれらの化合物やフラボノイドが豊富であるため、脂肪やがん細胞などで十分な濃度に達して androstenedione から estrone への変換を減少させ、エストロゲン依存性のがんのリスクを低下させる (Henderson et al., 1988)。

ヒトの生体試料でゲニステインを確認する時点で (Adlercreutz et al., 1991c, 1993b, 1995b)、多数のチロシン特異性たんぱく質キナーゼに対するこの植物エストロゲンの抑制作用は良く知られている (Akiyama et al., 1991c; Ogawara et al., 1989; Akiyama and Ogawara, 1991)。以来、多数の異なるタイプの実験でゲニステインをチロシンキナーゼ阻害物質として用いた 150 以上の論文が発表されている。この化合物はチロシンたんぱく質キナーゼに特異的で、ATP に関して競合する阻害物質であり、p40 たんぱく質チロシンキナーゼを除き、サーク (遺伝子) ファミリーに属するものを含むこのグループの既知のたんぱく質キナーゼのほとんどを阻害するようである。最近では標的の抗体を用いて、ゲニステインをマウスの B 細胞前駆体白血病の治療に使用し、効果をあげている (Uckun et al., 1995)。ゲニステインはトポイソメラーゼ I と II 型 (Okura et al., 1988; Markovits et al., 1989; Kondo et al., 1991; Constantinou et al., 1995a)、およびたんぱく質ヒスチジンキナーゼ (Huang et al., 1992) もまた阻害する。たんぱく質チロシンキナーゼ活性は、上皮成長因子 (EGF)、インスリン、インスリン様成長因子 I (IGF-I)、血小板由来成長因子 (PDGF)、および単核食細胞成長因子 (コロニー刺激因子 1, CSG-1) に対する細胞受容体と関連がある。チロシンキナーゼもトポイソメラーゼも、細胞の増殖と転換に重要な役割を果たす。チロシンキナーゼはレトロウイルスサーク遺伝子ファミリーのがん遺伝子産生に関連しており、レトロウイルスの細胞転換能と相関する (Akiyama et al., 1987; Akiyama and Ogawara, 1991; Markovits et al., 1989; Ogawara et al., 1989; Teraoka et al., 1989)。チロシンキナーゼ活性は乳がんのがん遺伝子発現とも関連がある (Le Cam, 1991; Lehtola et al., 1992)。

植物エストロゲンは程度の差はあっても、最も重要なステロイド生合成酵素および細胞の転換と増殖にかかわる多くの重要な酵素を阻害すると結論される。これら

の活性が植物エストロゲンの疾病予防作用の最も基本的な部分を成すものと思われる。

植物エストロゲンと核エストロゲン II 型結合部位

いくつかのイソフラボノイドとリグナンは、ラット子宮のいわゆる核 II 型エストロゲン結合部位に関してエストラジオールと競合する(Adlercreutz et al., 1992a; Markaverich et al., 1995)。われわれがヒトの尿で検出し測定したジフェノール化合物の II 型部位への結合に関して、最も高い親和性を示したのはイソフラボンのダイゼインおよびエクオールであったが、matairesinol、isolariciresinol およびエンテロラクトンなどのリグナンもまた比較的親和性は高かった。以前は、ゲニステインはこれらの部位へは結合しないと考えられていたが、これは明らかに溶解性が低いためであり、最近の発表によれば、ゲニステインとダイゼインはこれらの部位に対しほぼ同等の親和性を示す(Markaverich et al., 1995)。

核 II 型部位は、エストロゲン刺激による成長を調節するゲノムの構成要素であることが示唆されている(Markaverich and Clark, 1979; Markaverich et al., 1981)。著者らはまた、*p*-ヒドロキシフェニル乳酸(MeHPLA)は核 II 型部位に対する内因性リガンドで、生体フラボノイドあるいはチロシン代謝に由来することも示している(Markaverich et al., 1984; Markaverich et al., 1988a)。著者らの示唆によれば、このリガンドと生体フラボノイドのあるものは、これらの部位に結合することで重要な細胞増殖調節物質になるものと思われる(Markaverich et al., 1988b; Markaverich et al., 1992)。これが事実であるなら、植物エストロゲンの抗増殖性および抗エストロゲン作用は、これらの結合部位を介するものと考えられる。

しかし、多数の組織および腫瘍には核 II 型部位が豊富に存在する(Markaverich et al., 1995)が、大変な努力にもかかわらずこのたんぱく質は分離同定されていない。好酸球が子宮の II 型エストロゲン結合部位の源であり、II 型結合部位はペルオキシダーゼであることが示唆された(Lyttle et al., 1984; Lee et al., 1989)。著者らはまた、エストロゲン刺激により化学走性因子が生成され好酸球の流入を引き起こすが、これは抗エストロゲン・タモキシフェンによる治療と、RNA とタンパク質合成の抑制物質により遮断されることも示した(Lee et al., 1989)。好酸球が II 型部位の源であるという説は、これらの部位を主に研究しているグループにより反論されている(Markaverich et al., 1986)。面白いことに、ジエチルstilbestrol (DES)、ゲニステイン、ゼアラレノン、およびゼアラレイノール (zearalanol) は競合し、ラット子宮のペルオキシダーゼを抑制することも分かっている(Shore and Lyttle, 1986)。最近、食物のフラボノイドが甲状腺ペルオキシダーゼを阻害するこ

とが示され(Divi and Doerge, 1996)、II型エストロゲン核結合部位は異なるペルオキシダーゼの混合したものである可能性が示唆された。II型結合部位はチロシンキナーゼ活性との関連が示唆されている(Garai et al., 1992a; Galai and Clark, 1992b, 1994)が、II型部位はその後この酵素活性から切り離された(Densmore et al., 1994)。II型結合部位はMCF-7ヒト乳がん細胞でも認められている(Markaverich et al., 1994)。

生体フラボノイドの核II型エストロゲン結合部位との相互作用、および成長調節の可能性の問題は、これらの部位の分離を待たねばならないようである。いくつかのたんぱく質(酵素)は、エストロゲン受容体より低い親和性で生体フラボノイドを結合しているように思われる。現在、主な候補の1つにペルオキシダーゼ酵素があげられるであろう。エストロゲンを介した細胞の成長と増殖におけるこれらの部位の役割は、部位が確認されるまで解決できない問題である。

植物エストロゲンとSHBG

リグナンとイソフラボノイドは肝におけるSHBG合成を刺激するようであり、これによりおそらく性ホルモンの生物学的作用を低下させると思われる(Adlercreutz et al., 1987, 1988b, 1990b, 1992a)(図3)。SHBG上昇の結果、遊離テストステロンの割合(%FT)と遊離エストラジオールの割合(%FE2)が低下し、性ホルモンのアルブミン結合と遊離分画が減少する。その結果このステロイド類の代謝クリアランス率(MCR)が低下し、それらの生物学的活性が低下する。SHBGは細胞表面の受容体に結合し、ホルモンの生体利用能や作用を非常に選択的に、狙いを定めて調節するので、その生物学的役割は以前考えられていた以上に重要であることが分かっている。ごく最近、SHBGはMCF-7ヒト乳がん細胞のエストラジオール活性に対し、負の調節作用を及ぼすことが分かった(Firtnati et al., 1996)。したがって、SHBGを刺激しその数値を上昇させることは、理論的には性ホルモン依存性がんリスクの低下につながる。

フィンランドの女性では、繊維質の総摂取量/kg体重および穀物繊維摂取量/kg体重は、リグナンおよびイソフラボノイドの尿への排泄量と正の相関関係にあった(Adlercreutz et al., 1987, 1988b)。閉経前後のフィンランド女性において、この2群の化合物とエンテロラクトンの尿への排泄が、血漿SHBGとは正の、血漿%FE2および%FTとは負の相関関係を示した(Adlercreutz et al., 1987, 1988b, および未発表所見)。被験者の身体質量の指数/体型指数(BMI)で修正しても、この相関関係は認められた。

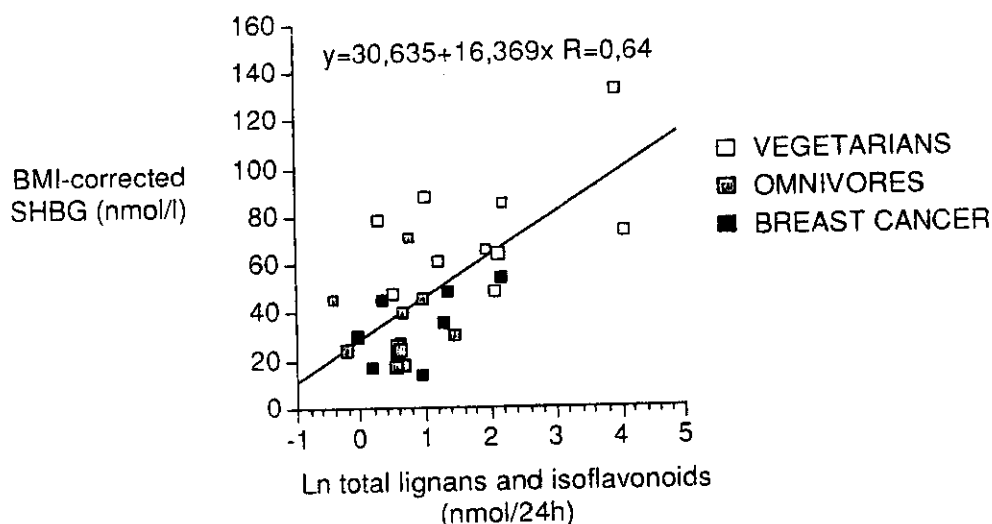
HepG2肝細胞を用いたin vitroの試験によれば、エンテロラクトン(Adlecreutz

et al., 1992a)、ゲニステイン(Mousave and adlercreutz, 1993; Loukovaara et al., 1995d)、およびダイゼインとエクオールは SHBG 合成を刺激した。ダイゼインとエクオールは細胞内外で同様に SHBG を上昇させたが、Loukovaara らが HepG2 細胞を用いた試験(1995d)でゲニステインは SHBG を細胞内でのみ上昇させており、その意味では *in vitro* のエストラジオールの作用と類似していた。SHBG 産生への影響は転写後の数値に表れるものと思われ、おそらく SHBG mRNA を安定させることで起こるもので、エストラジオールの場合に考えられるエストロゲン受容体を介した作用ではないと思われる(Loukovaara et al., 1995b,c,d)。

これらの所見は正常体重の菜食主義者で認められる高い SHBG 値を裏付けるものと思われる(Armstrong et al., 1981; Adlercreutz et al., 1989a, 1988b)。しかし、高濃度の secoisolariciresinol を含む亜麻仁やイソフラボノイドを含有する大豆の摂取後にも、SHBG が上昇しなかった試験もある (Shultz et al., 1991; Phipps et al., 1993; Cassidy et al., 1994; Baird et al., 1995)。これは被験者数が比較的少なかったり、SHBG 値が個人間または各個人で非常にばらつきがある試験があり、わずかな変化の検出が不可能であったことがその理由の一部と思われる。別に、SHBG の平均基礎値が既に比較的高かったことも問題である。実際、われわれの雑食被験者と乳がん被験者の値は、これらの被験女性の平均基礎値より低かった。植物エストロゲンの作用には上限がある可能性もある。一方、菜食主義者の血漿インスリン値は低く、それが植物エストロゲンの摂取と関係なく血漿 SHBG 値を上昇させることも考えられる(Loukovaara et al., 1995a)。さらに、月経周期の影響もあるであろう。未発表の試験で、1日当たり 200~300g のライ麦パンを 12 人の女性に与えたところ、2週間後に SHBG がほとんど有意に上昇した($p < 0.07$)(Adlercreutz, 1990b)。最近、エルサレムの Hadassah Medical Center の Dr. A. Brzezinski との共同研究で、同様の結果が得られた。3ヶ月の治療後の予備結果で、閉経後の女性が大豆と亜麻仁を摂取した結果、SHBG が有意に上昇したことが示唆された($p < 0.01$)。しかし、これらの上昇は大豆や亜麻仁の何か他の成分によるものであった可能性もある。低い SHBG と高いエストロン(Lipworth et al., 1996)、およびおそらくは高いアンドロステンジオンとテストステロンも乳がんのリスクと関連するので、この問題の解決は重要である。

大豆や亜麻仁の食餌試験は、初期 SHBG 値が低い被験者で行う必要がある。そうしてはじめてこれらの化合物の可能な作用を十分に判断できる。基礎値には複数のサンプルが必要で、貯蔵サンプルの SHBG 濃度は経時的に変化するので、サンプルはあまり古くてはならない(Adlercreutz et al., 1989a)。植物エストロゲンの血漿 SHBG への作用は、これらの化合物の疾病予防効果と関連しているものと思われる。

図3 3群(雑食者、菜食主義者、乳がん患者)の若い女性における尿中のリグナンおよびイソフラボノイドの総量と、性ホルモン結合グロブリン(SHBG)との相関関係(フィンランドの試験)。SHBG 検定の結果は、別々にプールした3群の血液試料から、夏と冬の2サンプルを分析して得たものである。尿の植物エストロゲン値(エンテロラクトン、enterodiol、ダイゼイン、エクオール、*O*-desmethylangolensin の総量)は、夏冬2回の72時間採取尿での平均値をあらわす。



植物エストロゲンと月経周期

上述したように、地下で結実する地中海沿岸産マメ科のクローバを食べた羊に、無排卵性発情と不妊を特徴とするクローバ病と呼ばれる不妊症候群が現れた。クローバのホルモノネチンから比較的エストロゲン性のエクオールが羊の血漿中に高濃度に生成され、この合併症を引き起こす(Nilsson et al., 1967; Lindnerm 1976; Shutt, 1976; Price and Fenwidk,m 1985)。ゲニステインとクメストロールは視床下部および下垂体受容体と結合し(Mathieson and Kitts, 1980)、高濃度のエクオールはこれらの受容体を変質させると思われる(Tang and Adams, 1978)。この結果受容体の感受性が低下し、フィードバックにより生理的濃度でエストラジールを調節する。この状況は新生仔の発情化の後にげっ歯類に起こる、連結発情症候群に類似している。

ヒトの場合、ダイゼインやゲニステインの濃度と比べるとエクオールの血漿濃度は大豆を食べた後でも比較的低く(Adlercreutz et al., 1994a)、91名の閉経後の女性で1日当たり165mgのイソフラボンは、臍細胞診断に対し低いエストロゲン様

作用を示したに過ぎなかった(Baird et al., 1995)。羊では、植物エストロゲン性アルファルファやクローバの摂取により、血漿黄体形成ホルモン(LH)濃度が上昇する(Bindon et al., 1982; Hettel and Kitts, 1983/1984)。閉経後の被験者では、1日当たり 165mg のイソフラボノイド摂取後にゴナドトロピンへの影響は見られなかった(Baird et al., 1995)。しかし、閉経前の女性では、日当たり 45mg の抱合 isoflavone の摂取で LH と卵胞刺激ホルモン(FSH)が有意に減少し(Cassidy et al., 1995)、さらに卵胞期がわずかに有意に延長したため、プロゲステロンのピーク時がわずかに遅れた。この試験では、イソフラボノイドを含まない大豆食でも、血漿 LH は低下する傾向があった。最近行われた閉経前の女性における別の試験で、血漿 LH に関しては同様の結果が得られたが、加えて血漿中のエストラジオールとプロゲステロンが減少し、月経周期は延長した(Lu et al., 1996)。血漿中の硫酸デヒドロエピアンドロステロン(DHEAS)の減少も認められたが、これは大豆摂取が高く乳がんのリスクの低いアドベンティスト派菜食主義者の女性で、DHEAS 値が上昇したという所見(Persky and van Horn, 1995)と矛盾する。2つの大豆負荷試験(Cassidy et al., 1995; Lu et al., 1996)の結果は、血漿 LH への作用とプロゲステロンの最大値の低下に関して、正常な閉経前女性への日当たり 6mg のエストリオール継続投与中に得られた所見と類似していた(Vahapassi and Adlercreutz, 1985)が、エストリオール試験では、月経周期の長さは影響を受けなかった。平均値の計算のための排卵の確認と月経周期の同時性は、この種の試験では常に大きな問題であり、その正確な方法ははっきり述べられていない(Cassidy et al., 1995)。

われわれは日本の京都郊外の村での食事試験で植物エストロゲンの推定摂取量を計算し、女性で約 19mg のゲニステインと 5mg のダイゼイン、男性では 10mg のゲニステインと 6mg のダイゼインの摂取を認めた(Adlercreutz et al., 1991e)。これらの計算では、GC-MS によって得た大豆製品に対するわれわれ自身の計量結果を用いた。女性に関する数値は上述したヒトの試験で用いた数値よりもかなり低い。編集者への手紙で Messina(1995b)は、われわれの被験者の摂取量はもっと高く、日当たり約 50mg のイソフラボノイドであると計算している。Glycitein を含めたかどうかは分からない。正確な計算方法は知られておらず、唯一の方法は日本の食事をホモジナイズして分析し、植物エストロゲンの総摂取量を計算することであると思われるので、われわれは現在この方法をとっている。

リグナンの豊富な亜麻仁も、黄体期を延長し、黄体期プロゲステロンまたはエストラジオールのレベルに有意な影響を与えずに、黄体期のプロゲステロン対エストラジオール比を有意に上昇させて月経周期を変化させる(Phipps et al., 1993)。日当たり 10g の亜麻仁の摂取中には無排卵性周期はなかったが、対照期間/摂取前には

36周期のうち3周期は無排卵性であった。初期卵胞期の血漿エストロン、エストラジオール、DHEAS、プロラクチン、SHBGは影響を受けなかった。平均卵胞期テストロン値は低下したが、初期の値は変わらなかった。ラットに日当たり1.5~3.0mgのsecoisolariciresinol deglucosideまたは食事中10%の亜麻仁、あるいはタモキシフェンを投与したところ、周期が延長し、無/非周期性月経をもたらし、周期パターンに有意な変化を引き起こした(Orcheson et al., 1993)。

動物、特に羊における植物エストロゲンの生理的、病理学的作用については、Mullerら(1989)、PriceとFenwick(1985)、SetchellとSdlercreutz(1988)によりさらに詳細に議論されている。大豆と全粒製品および種子類の月経周期への影響については、更なる調査の必要がある。しかし、既に得られている結果によればこれらの影響は比較的小さく、受精能にはおそらく影響がないことが示唆される。

血管内皮細胞、脈管形成、腫瘍侵襲に対する植物エストロゲンの作用

ゲニステインを含有する尿抽出物と合成ゲニステインは、bFGFで刺激した内皮細胞(ウシの脳由来の毛細管内皮細胞)の増殖を抑制する。ゲニステインはまた副腎皮質(ACE)や大動脈(BAE)由来の脈管内皮細胞の増殖も抑制した(Fotsis et al., 1993)。bFGFで刺激した細胞では、25 μ Mを超えるとゲニステインは細胞死を引き起こしたが、濃度が低いと抑制作用は可逆的になった(Fotsis et al., 1995a)。ゼラチンコーティングの有無にかかわらず、基質に関する結果は同じであった。ゲニステインは200 μ Mまでは鎮静期細胞に作用しなかった(Fotsis et al., 1993)。これらのデータはゲニステインの標的が増殖している細胞に限られ、鎮静期の非分裂細胞には作用しないことを明確に示すものである。

内皮細胞の増殖に対するゲニステインの抑制作用を確認した上で、次に脈管形成への影響を調べた。新しい毛細血管形成の前提条件としては、たんぱく分解酵素とその阻害物質の細かく調節された生成により、親血管の基礎粘膜の破壊と(Pepper and Montesano, 1990)、続いて内皮細胞の移動と侵襲が起こる。内皮細胞による細胞外マトリックスのたんぱく分解性変性は脈管形成因子により調節されるが、これがウロキナーゼ型プラスミノゲン活性因子とその生理学的抑制因子であるプラスミノゲン活性因子抑制因子-1の生成を誘発する(Pepper and Montesano, 1990)。ゲニステインはウシ微小血管内皮細胞(BME)で、プラスミノゲン活性因子とプラスミノゲン活性因子抑制因子-1の産生を低下させることが示されている(Fotsis et al., 1993)。さらに、ゲニステインは内皮細胞の傷んで融合した単層において、bFGFの誘発による内皮細胞の移動もまた抑制した。すなわち、ゲニステインは初期の脈管形成にも干渉するのである。

In vivo の脈管形成を模倣する in vitro の実験系でゲニステインの作用を調べた。BME 細胞をコラーゲンゲルの表面に植え付けると、bFGF に曝露してゲルに侵入し、ゲル表面下に毛細管様のチューブを形成する (Montesano and Orci, 1985)。ゲニステインのみでは融合 BME 培養への作用は見られなかったが、bFGF と共に加えると、BME がゲルに侵入し毛細管様構造を形成する能力を抑制した (Fotsis et al., 1993)。計量所見では前半最高濃度が高かった ($150 \mu\text{M}$) が、これは後に不適切な希釈剤へのゲニステインの溶解性が低いことが原因 (M.S. Pepper, 未発表) であると分かった。その後ゲニステインの前半最高濃度 $8 \mu\text{M}$ が得られたが (Fotsis et al., 1995b)、これは内皮細胞への抗増殖作用に対する前半最高濃度 $6 \mu\text{M}$ に相当する (Fotsis et al., 1993)。実際、他の多くの研究でも、ゲニステインの溶解性の低さがその結果に影響を与えた可能性があると考えている。

うさぎ角膜の血管新生モデルを用いて (Rastinejad et al., 1989)、ゲニステインによる in vivo の脈管形成抑制が確認された (Fotsis et al., 1995b)。ゲニステインの抗脈管形成作用機序は、FGF 受容体 (Ullrich and Schlesinger, 1990) などのチロシンキナーゼ類の阻害、または bFGF により活性化した酵素 S6 キナーゼ (Linassier et al., 1990) の阻害を経由したものと思われる。ゲニステインがトポイソメラーゼ I および II を阻害し、脈管形成に影響を与えることも考えられる (Okura et al., 1988; Yamashita et al., 1990)。

結論すると、われわれの研究によればゲニステインは活発に分離していない細胞については無害な化合物であるが、腫瘍および FGF 刺激による内皮細胞の増殖を抑制し、それらの侵襲および関与するたんぱく分解酵素を阻害する。すなわち、脈管形成の初期と後期の両方で抑制するわけである。われわれの最近の研究により、多数の類似化合物が抗脈管形成と抗増殖作用に必要な構造を持つことが判明し、新しい治療薬への道が開かれた (Fotsis et al., 1997)。

植物エストロゲンとインスリン

インスリン受容体チロシンキナーゼはゲニステインにより阻害されるチロシンキナーゼ類に属する (Ogawara et al., 1989)。ラットの脂肪細胞を用い、ゲニステインはインスリン受容体 β -サブユニットの autophosphorylation やチロシンキナーゼ基質のリン酸化に in vitro でも in vivo でも影響を与えないことが分かった (Abler et al., 1992)。しかし、ゲニステインは、インスリン刺激によるグルコースの酸化を、ヒトの体内には存在しないような高濃度で ($90\sim 370 \mu\text{M/l}$) 濃度依存性に抑制した。ゲニステインの溶解性の低さがこれらの結果に影響していると思われるのは、ゲニステインをそのような高濃度に溶解させることはできないからである。したが

って、ゲニステインは高濃度でインスリンへの一定の反応を抑制できるが、これは必ずしもチロシン受容体キナーゼ活性の抑制によるものではない。このことはインスリン刺激性 CSV3-1 細胞で確認された(Wang and Scott, 1993)。

脂肪細胞を用いたその後の研究で、ゲニステインは形質膜に関連したグルコーストランスポーター GLUT4 の数を減少させるのではなく固有活性を低下させることで、グルコースの輸送を抑制することが示唆された(Smith et al., 1993)。インスリンは表皮 Na^+ の再吸収も上昇させ、その活性の多くにチロシンキナーゼが関与する。ゲニステインは A6 細胞に付着した斑の中の活性 Na^+ チャンネルの数を減少させた(Matsumoto et al., 1993)。

一方ゲニステインは、グルコース感受性インスリノーマ細胞系の MIN6 細胞からのインスリンの放出を刺激するが、これはグルコースが刺激性濃度の場合のみである(Ohno et al., 1993)。ゲニステインは細胞に cAMP を蓄積させたが、カルシウム拮抗剤により抑制された。この所見はインスリンの放出と cAMP の蓄積はカルシウムにより調節され、細胞外カルシウムに依存することを示している。この作用はチロシンキナーゼ(Akiyama et al., 1987)、ホスファチジルイノシトール代謝回転(Imoto et al., 1988; Dean et al., 1989; Dhar et al., 1990; Gaudette and Holub, 1990; Hill et al., 1990; Kondo et al., 1991; Makishima et al., 1991)、またはトポイソメラーゼ(Okura et al., 1988; Markovits et al., 1989)の抑制では説明できない。これらはすべてゲニステインに感受性をもつと報告されているが、これらの抑制作用が細胞内カルシウム濃度を上昇させるとは思われなからである。逆説的に、ゲニステインは正常マウスの β 細胞島からのインスリンの放出を上昇させ、同時にこれらの細胞への Ca^+ の流入が減少する。必要とされる濃度は高く(40~370 $\mu\text{mol/l}$)、これらの試験で用いられたゲニステインの溶解性の問題が再び示唆される。チロシンキナーゼを抑制しないダイゼインは、 K^+ と Ca^+ チャンネルに対してはゲニステインよりわずかに効力は劣るが、インスリンの分泌は同じように上昇させた(Jonas et al., 1995)。インスリンを分泌する INS-1 細胞において、ゲニステインはインスリンまたはインスリン様成長因子 I(IGF-1)の抑制作用を阻害したが、ダイゼインにはその作用はなかった。著者らは、この INS-1 細胞でのインスリン放出に対するインスリンと IGF-1 の抑制作用には、チロシンキナーゼが関与しているとの結論に達した(Verspohl et al., 1995)。

インスリンの放出とグルコース酸化の抑制に対する作用に高濃度が必要とされることは、試験した植物エストロゲンがヒトのグルコース代謝回転やインスリン活性に対し、良くも悪くも影響を与える可能性の少ないことを示唆している。使用したゲニステインの溶解性の問題は、将来詳細に考察されなければならない。

植物エストロゲンと免疫系

多くの植物リグナンには、抗ウイルス、殺菌、静真菌作用が認められている(Rao, 1978; Markkanen et al., 1981; Ayres and Loike, 1990)。これらの活性が植物以外で役に立つかどうかは分かっていないが、リグナンは病原菌から身体を、少なくともその濃度が高いと思われる胃腸管を保護するのに重要な働きをする可能性がある(Adlercreutz et al., 1995b)。最近、matairesinol にメチル基を1つ加えた構造を持つリグナンの arctigenin(図1)は、免疫修飾作用をもつことがわかった(Eich et al., 1996)。この化合物はヒト免疫不全ウイルス1型インテグラーゼを阻害することが示された。Matairesinol も arctigenin も、ヒト白血病 HL-60 細胞の増殖に強い抑制作用を示したことは特筆に価する。計測した量のライ麦リグナンの摂取後に、哺乳類リグナンであるエンテロラクトンと enterodiol が約 10~20 倍も体液中に認められたので(未発表所見)、arctigenin はもう一つの前駆体の可能性がある(Nose et al., 1992)。われわれは現在人間のさまざまな食物の中でこの化合物を調査中である。

ゲニステインはネズミのマクロファージで一酸化窒素(NO)産生を抑制するが、これは免疫応答への調節作用を示唆する(Krol et al., 1995)。さらにゲニステインは、CD₂₈ 単クローン抗体に刺激されたヒト T 細胞の増殖を抑制するので、強力な免疫抑制物質である(Atluru and Gudapaty, 1993a; Atluru et al., 1993b)。さらにゲニステインはインターロイキン 2、インターロイキン受容体発現およびロイコトリエン B の生成を抑制することが示された(4)。

利用可能な証拠によれば、植物エストロゲンがヒトの体内で活性を示すのは、その免疫修飾作用と細菌、真菌、およびウイルスへの直接の毒性??作用による可能性が示唆される。これは特に胃腸管で起こると考えられ、今後の研究対象となることは確実である。

その他の植物エストロゲン作用

細胞に見られる数々の事象にはチロシンのリン酸化が関与し、ゲニステインはチロシンキナーゼに特異的な抑制因子である(他の多数のチロシンキナーゼには特異性は低い)ので、数多くの生化学的事象へのゲニステインの作用に関する文献は豊富である。これらの活性はすべて別の検討目標になると思われる。ほとんどの試験でゲニステインの濃度はかなり高く、事実、この化合物の実際の溶解度より高い場合もあった。この化合物がジメチルスルホキシド(dimethylsulfoxide:DMSO)に溶解している場合、作用の認められなかった所見で後に修正されたものもある。100 μ M を超えた濃度のゲニステインによる試験がヒトの健康にとって妥当であるか否かは問題であり、100 μ M 以下でも溶解性の問題が妨げになったものと思われる。

文献が非常に豊富であるので、植物エストロゲンとヒトの疾病との関連を考察するにあたり、過去に触れていない植物エストロゲンの他の作用に関しこれらの試験のいくつかを含めることにする。

リグナンとイソフラボノイドの疫学

われわれは、2群の乳がん患者を含む男女のさまざまな食事群におけるリグナンとイソフラボノイドの尿への排泄に関し、全所見を要約して最近発表した(Adlercreutz et al., 1995a)。調査した被験者で、過去3ヶ月間に抗生物質による治療を受けたものはいなかった。抗生物質は特にリグナンの代謝に影響するので、これは重要である。

リグナンに関しては、ボストンに住む座禅式長寿法(延命学、macrobiotic)の被験者が最高値を示し、次がボストンとヘルシンキに住む他の菜食主義者であった。西欧社会に住む被験者でリグナンの最低値を示したのは乳がん群とボストンの雑食女性群であった。しかし、最近ハワイに移住したアジア人女性ではさらに低く、日本人の男女が低い数値を示したが、イソフラボノイドの値は非常に高かった。ハワイへの最近の移住者のイソフラボノイド値は、西欧の雑食群のものと類似しており、彼らの食事から大豆製品が急速に姿を消していることを示している。彼らは全粒パンを食べないので、尿中のリグナンとイソフラボノイドの値は非常に低いが、食事は依然として低脂肪で、それが乳がんの予防になっている部分もあると思われる。血漿および尿のエストロゲン値も低いが、糞便への排泄量は多く(Goldin et al., 1986; Adlercreutz et al., 1994b)、明らかに腸肝循環の遮断によるものである(Adlercreutz et al., 1994b)。

日本とフィンランド男性の尿および血漿中の植物エストロゲン測定で、日本人は尿のゲニステイン値は低かったが、血漿中の遊離リグナンと硫酸抱合されたリグナンの値がフィンランド人と同様に高かった。しかし、エンテロラクトンのグルクロン酸抱合物の値は有意に低かった($p < 0.001$)(日本男性30名、フィンランド男性30名における未発表所見)。したがって、日本人男性はフィンランド人男性より、生物学的に活性のある分画にジフェノール化合物が多い。エストロン硫酸塩は生物学的に活性のある estron の前駆体および「貯蔵形態」で、スルファターゼで活性化されるが、血漿中に高濃度に存在する植物エストロゲン硫酸塩も同様に潜在的に生物学的活性があると考えられる(Adlercreutz et al., 1993b,c, 1994a)。残念なことに、アメリカ人男性での検定は行われていない。

過去の研究でわれわれは、日本人被験者のリグナン排泄が大豆の丸ごと摂取と関

連があることを発見したが(Adlercreutz et al., 1991e)、これは最近の大豆粗挽き粉における secoisolariciresinol の検出とよく一致する(Mazur et al., 1996)。他の大豆製品にはリグナンは見出されなかった。

フィンランドでは、North Karelia に住む被験者はリグナンの排泄が高く、南西部の被験者と比べて乳がん、大腸がん、前立腺がんのリスクが低い(Adlercreutz et al., 1986a)。日本ではこれらのがんのリスクは低い—日本人はわれわれが測定したうちで最も高い血漿イソフラボノイド値を示し、生物学的活性のあるリグナンの値も高い。フィンランド人はそれよりいくらか低く、アメリカ人が最も低い。例外は菜食主義者で、彼らのリグナン値は常に高く、がんのリスクは低い。興味深いことに、オーストラリア女性の尿への植物エストロゲンの排泄は比較的高く(Murkies et al., 1995)、乳がん発生率はカナダのものより低い(Kliwer and Smith, 1995)。

最近の研究によれば、男性の前立腺液の植物エストロゲンレベルはイギリスが一番低く、ポルトガル、北京、香港はそれよりはるかに高い(Griffiths et al., 1996)。イギリスでは前立腺がんの発生率が他の国より高く、われわれはイソフラボノイドに富む大豆製品(Adlercreutz et al., 1991e)やリグナンの豊富な全粒ライ麦パンの消費(Adlercreutz, 1990b)が、前立腺がんを予防していると考えている(後述を参照)。

決して十分とはいえないが手元にある証拠によれば、植物エストロゲンの消費の多い集団では、これらの化合物摂取の少ない西欧集団よりもがんの死亡率および/または発生率が低いことが示唆される。さまざまな被験者の植物エストロゲン測定については、次の章でさらに検討する。

植物エストロゲンとがん

大豆製品のがん予防作用に関しては、大豆の含有する植物エストロゲンによる可能性が示唆されるはるか前から、それを示す多くの証拠があった。これらの試験では、プロテアーゼ抑制物質であるフィチン酸または β -シトステロールが、その活性要素の可能性があるとの意見が出された(Kennedy, 1995)。リグナンとイソフラボノイドが乳がん(Adlercreutz et al., 1982a, 1984, 1986b; Bannwart et al., 1984a; Setchell et al., 1984)、前立腺がん(Adlercreutz 1991e)、または結腸がん(Setchell et al., 1981; Adlercreutz 1984)を予防することが示唆され、この仮説を評価するため多くの研究が行われるようになった(以下参照)。植物エストロゲンとがんとの関係は明確とはいえないが、抗がん作用はただ1つの化合物によるものではなく、フラボノイド、イソフラボノイド、リグナンなど多くのタイプのフェノール化合物による協調作用の可能性が高いという見解が台頭しつつある。さらに、有益な抗がん

作用は、おそらく以前信じられていたようにより強力なエストロゲンの活性の遮断という、エストロゲン受容体を介した抗エストロゲン作用の結果ではなく、さまざまな濃度で見られる他の多数の作用による結果と思われる。植物エストロゲンはホルモンの生成、ゴナドトロピンの放出、多くのステロイド生合成酵素、たんぱく質結合などに影響を与える。さらに、ホルモンの作用機序と代謝に作用し、エストロゲン受容体に結合することなく転写前後の濃度でさまざまな細胞の事象に影響を及ぼす。ステロイドのように(Wehling, 1994)、これらの化合物は多くの非ゲノム作用を持つようである。最近の研究によれば、イソフラボノイドのゲニステイン、ダイゼイン、おそらくはエクオール、そしてリグナンのエンテロラクトンのようないくつかの化合物が到達するそれぞれの血漿濃度が、ヒトの生物学的活性に適合すると思われる。一方、ヒトに見出される化合物で、組織濃度が分かっているものは事実上皆無である。この情報の欠如が、ヒトの健康における植物エストロゲンの役割をわれわれが判断する能力に重大な影響を与えている。

植物エストロゲンと乳がん

植物エストロゲンと乳がんは多くの文献で取り上げられている(Adlercreutz et al., 1986a, 1987, 1990b, 1993d,e, 1995a; Setchell and Adlercreutz, 1988; Messina and Barnes, 1991; Rose, 1992, 1993; Messina et al., 1994a,b, 1995a; Haorylewicz et al., 1995; Griffiths et al., 1996)。乳がんが関与する研究のリストを表3に示し、ここではいくつかの新しい見解と最新の関連研究について論ずる。

2つの大型試験で、さまざまな大豆製品の高度摂取により乳がんが予防されることが示されている(Hirayama, 1986; Lee et al., 1991)。別の研究(Nomura et al., 1987)では妻の食事も夫のものと同様であると想定し、ハワイ在住日本人がん患者の夫の食事を調べた。1群の乳がん患者の夫は、対照女性の夫よりも緑茶(多量のフラボノイドを含有)と海草(ダイゼインを含有すると思われる)の摂取量が少なく(Adlercreutz et al., 1991e)、統計的に有意差はなかったが、大豆製品の摂取も乳がん家族のほうが少ない傾向にあった。乳がん患者の夫のバターと赤身肉の摂取は有意に高かった。第2試験群でも(Nomura et al., 1987)、乳がん患者の夫は同様の傾向があり、通常緑黄色野菜と大豆が含まれる味噌汁の摂取が有意に少なかった。乳がんグループではまた豆腐の摂取が低い傾向もあった。この試験は、その性質と結果から見て植物エストロゲンの作用を確信させるものではない。最近の中国における疫学試験では、多量の大豆たんぱく摂取が乳がんを予防するという仮説は裏付けられなかった(Yuan et al., 1995)。

表3 植物エストロゲンと乳がんに関する諸研究

Compound or study design	Species, cell type, or population	Effect or result	Ref.
Coumestrol, genistein	Mice	Antiestrogenic effects in uterus	Foiman and Pope, 1966
Genistein, coumestrol	MCF-7 cells	Competition with estradiol	Martin et al., 1978
Genistein, coumestrol	MCF-7 cells	Stimulation of proliferation	Martin et al., 1978
Coumestrol orally	rat mammary tumor model ovariectomized American women	No stimulation of growth	Verdeal et al., 1980
Diet and phytoestrogen excretion	American women	Low urinary excretion in women at higher risk	Adlercreutz et al., 1982a
Diet and phytoestrogen excretion	Finnish and American women	Low urinary excretion in women at higher risk	Adlercreutz et al., 1986b
Diet and phytoestrogen excretion	Chimpanzees in captivity	High urinary excretion	Adlercreutz et al., 1986c
Diet and phytoestrogen excretion	Finnish, American and Japanese women	Low urinary excretion in women at higher risk	Adlercreutz et al., 1987
Equol, enterolactone	MCF-7, T47D cells	Correlation with plasma SHBG	Welshons et al., 1987
Enterolactone (high concentrations)	MCF-7, T47D cells	Stimulation of growth	Welshons et al., 1987
Biochanin A	Hamster embryo cells	Inhibition of growth	Cassady et al., 1988
Diet and phytoestrogen excretion	Finnish women	Inhibition of benzo(a)pyrene metabolism and binding to DNA	Adlercreutz et al., 1988b
Daidzein	ZR-75-1 cells	Lowest urinary excretion in breast cancer	Hirano et al., 1989b
Soybean chips (also heated)	Rat mammary tumor model	Inhibition of tumor growth	Barnes et al., 1990

Compound or study design	Species, cell type, or population	Effect or result	Ref.
Enterolactone, enterodiol, and methylated derivatives	ZR-75-1 cells	Inhibition	Hirano et al., 1990
Diet and phytoestrogen excretion	Japanese women	High excretion associated with low risk	Adlercreutz et al., 1991e
Flaxseed	Rat mammary tumor model	Protective	Serraino and Thompson, 1991
Soy food	Women in Singapore	High intake associated with low risk	Lee et al., 1991
Genistein, biochanin A, daidzein	MCF-7, MDA-468, MCF-7-D40	Inhibition of proliferation	Peterson & Barnes, 1991
Genistein (low dose)	MCF-7 cells	Stimulation of proliferation	Peterson & Barnes, 1991
Heated soybean protein isolate	Rat mammary tumor model	Inhibition of tumor progression	Hawrylewicz et al., 1991
Enterolactone	MCF-7 cells	Inhibition of proliferation at physiological concentrations in the presence of low amounts of estradiol	Mousavi and Adlercreutz, 1992
Enterolactone	MCF-7 cells	Stimulation of proliferation in the absence of estradiol or at high concentrations in the presence of estradiol	Mousavi and Adlercreutz, 1992
Flaxseed	Rat mammary tumor model	Inhibits promotional phase	Serraino and Thompson, 1992a
Flaxseed	American women	Prolongation of luteal phase No effect on plasma estrone, estradiol, DHEAS, prolactin or SHBG	Phipps et al., 1993

Daidzein, equol, enterolactone	MCF-7 cells	Stimulation of pS2 expression; enterodiol inactive	Sathyamoorthy et al., 1994
Genistein	MCF-7 cells	Inhibition of proliferation; G(29/M cell cycle arrest; apoptosis	Pagliacci et al., 1994
Soy milk intake	American women	Decrease in urinary estrogens and plasma LH	Goldin, 1994
Coumestrol, genistein	HeLa cell estrogen receptor gene construct with CAT reporter gene	Increased activity of the reporter gene	Mäkelä et al., 1994
Coumestrol, genistein	MCF-7 cells	pS2 gene expression increased	Mäkelä et al., 1994
Coumestrol, biochanin A, genistein	MCF-7 cells	Stimulation of proliferation	Mäkelä et al., 1994
Coumestrol, genistein	Purified placental 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I	Inhibition	Mäkelä et al., 1994, 1995b
Coumestrol, genistein	MCF-7 cells	No inhibition of conversion of estrone to estradiol	Mäkelä et al., 1994, 1995b
Coumestrol, genistein	T47D cells	Inhibition of conversion of estrone to estradiol; stimulation of proliferation	Mäkelä et al., 1994, 1995b
Genistein	MCF-7/WT, MCF-7/ADR(R) MDA-231	Inhibition of proliferation	Monti and Sinha, 1994
Genistein	BALB/c mammary cancer (410.4), highly metastatic	Inhibition of invasion	Scholar and Toews, 1994
Soy intake	American postmenopausal women	No effect on plasma LH, FSH, or SHBG	Baird et al., 1995
Soy intake	British women	Plasma LH and FSH decrease; prolongation of follicular phase	Cassidy et al., 1995
Genistein	Rat mammary tumor model	Reduced marginally tumor incidence and multiplicity	Constantinou et al., 1995b

Compound or study design	Species, cell type, or population	Effect or result	Ref.
Genistein, daidzein, or their combination	ICR mice	Inhibited sister chromatid exchanges in bone marrow cells and perhaps DNA adduct formation in liver and mammary glands	Giri & Lu, 1995
Daidzein	Rat mammary tumor model	Daidzein reduced multiplicity without affecting incidence	Constantinou et al., 1995b
Genistein (and Kievitone)	MCF-7, T47D, SKBR3	Inhibition of proliferation	Hoffman, 1995
Genistein s.c. postpartum	Rat mammary tumor model	Reduced incidence and multiplicity; lower progesterone; enhancement of maturation	Lamartiniere et al., 1995b
Diet and phytoestrogen	Male chimpanzee	"Western diet" reduces phytoestrogen excretion to a minimum	Musey et al., 1995
Coumestrol	Immature, ovariectomized mice	Sensitizes uterus to subsequent estrogen stimulation; does not stimulate uterine cellular hyperplasia	Markaverich et al., 1995
Secoisolariciresinol diglucosidein diet	Rat mammary tumor model	Smaller tumor volume and decrease in total tumor number	Thompson et al., 1995b

Flaxseed oil with no lignans in diet	Rat mammary tumor model	Smaller tumor volume, but no decrease in total number	Thompson et al., 1995b
Flaxseed 2.5 and 5% in diet	Rat mammary tumor model	Smaller tumor volume and decrease in total tumor number	Thompson et al., 1995b
Genistein or soy protein in diet	Female CD rat	Reduced DNA binding of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in mammary glands	Upadhyaya and El-Bayoumy, 1995
Formononetin s.c. (high dose)	Castrated female BALB/c mice	Mammary gland proliferation	Wang et al., 1995
Soy intake	Chinese women	No effect of soy intake on breast cancer risk	Yuan et al., 1995
Soy in diet	Rat mammary cancer model	Growth inhibition, partly due to low methionine content	Hawrylewicz et al., 1995
Soy intake	American women	Reduction in plasma LH, FSH and progesterone, prolongation of cycle	Lu et al., 1996

^aMainly studies discussing the role of isoflavonoids in breast cancer or using pure isoflavonoids have been included, with some exceptions of special relevance to the problem.