

上述したように、植物エストロゲンの毒性試験の中には菌類エストロゲンを用いたものもあるが、そのようなエストロゲンは食品中には通常存在しないため本章では取り上げない。他の試験ではクメストロールが高用量で用いられている。Bickoffら(1957)によって始めて分離されたクメストロールは、作用がエストラジオールと酷似する植物エストロゲンであるが、その活性はIshikawa細胞試験(Markiewicz et al., 1993)ではエストラジオールの500分の1である。マウス子宮重量試験(Bickoff et al., 1962)では、活性はエストロンの200分の1であり、これはエストラジオールの2000分の1を意味する。しかしヒツジ子宮サイトゾルエストロゲン受容体結合試験では、クメストロールはエストラジオールの20分の1の親和性を示したに過ぎない(Shutt and Cox, 1972)。ダイゼインは、エストロゲン受容体への親和性がエストラジオールの1000分の1であり(Shutt and Cox, 1972)、Ishikawa細胞試験ではエストロゲン活性がエストラジオールの7700分の1である。ゲニステインは、エストラジオールの110分の1の親和性でエストロゲン受容体と結合する(Shutt and Cox, 1972)が、Ishikawa細胞試験では親和性はエストラジオールの1250分の1である。エクオールは、Ishikawa細胞試験ではエストロゲン活性がエストラジオールの1700分の1であるが、受容体結合試験では親和性はエストラジオールの250分の1であるに過ぎない(Shutt and Cox, 1972)。このように、エストロゲン受容体に対する結合親和性は他試験とは相関しないようであり、少なくとも一部の植物エストロゲンは、クメストロールで最近指摘されたように、完全なエストロゲンではないと考えられる(Markaverich et al., 1995)。ビオカニンAとホルモノネチンは消化管でそれぞれゲニステインとダイゼインに代謝されるため(ダイゼインはエクオールや他のエストロゲン活性が弱い代謝産物にさらに代謝される)、これらの物質が細胞内で代謝されない場合の実際の生物活性についての情報は結合試験やIshikawa細胞試験(Markiewicz et al., 1993)では得ることはできない。

PriceとFenwick(1985)の総説中に、植物エストロゲンの純品を投与後にさまざまな要因を調べた動物試験が報告されている。ヒトの体重で調整した植物エストロゲンの用量は、大豆製品、芽類/もやし類、あるいは植物エストロゲン含有の他食品中でヒトが摂取する量をはるかに超えていた。マウスで子宮肥大を引き起こした最低用量はゲニステインでは1.5gであり、これは60kgの女性がゲニステインを300g/日摂取するのに相当する。マウスではゲニステインを15mg/日で与えると両性で不妊を引き起こしたが、これは60kgの女性ではゲニステインを45g/日摂取するのに相当する。雄ラットで精巣萎縮を引き起こすには、飼料中にゲニステインが0.5%含まれていなければならない(Price and Fenwick, 1985)。したがってこれらの実験で用いられた用量はヒトの健康を論じる場合には当てはまらないと考えら

れる。

植物エストロゲンの毒性／悪影響の可能性が次の3分野で調べられている。それらは、(1) 成人における不妊症、(2) 成長して生殖機能不全に至る、新生児における生殖器官／生殖機能の異常や発達障害、(3) とくに乳がんや子宮内膜がんといったがん増殖の刺激の3分野である。

### 成人における不妊性

哺乳類の生殖に関わる植物エストロゲンについては、いくつかの総説で取り上げられている(Labov, 1977; Price and Fenwich, 1985; Muller et al., 1989)。この分野での最初の(?)総説は Bickoff が書いたものである(1963)。植物エストロゲンは、クローバや他の植物を摂取するウシやヒツジで不妊を引き起こすと考えられる。しかし、砂漠に棲むげっ歯類やアカカンガルー(*Megaleia rufa*)は、繁殖力を上げるために植物エストロゲン活性をもつ植物を必要としている(Laabov, 1977)。クローバ病と呼ばれるヒツジの不妊症(Benetts et al., 1946; Shutt, 1976)は、とくにホルモノネチンという植物エストロゲンを極めて高濃度に含む subterranean clover(地下で結実する地中海沿岸産マメ科のクローバ)を摂取することによって起こる。その活性物質は、ホルモノネチン由来のダイゼインから生成される代謝物質エクオールである。このエクオールがヒツジでは、ヒトと比べてはるかに大量に生成される。クローバ血漿の摂取後、エクオール濃度は  $300\sim 400\ \mu\text{g}/100\text{ml}$  あるいは  $12.4\sim 16.5\ \mu\text{mol}/\text{l}$  に達する。日本人男性でわれわれが認めたエクオールの最高総血漿濃度は  $0.38\ \mu\text{mol}/\text{l}$  であるが、大半のヒトでは  $0.01\ \mu\text{mol}/\text{l}$  以下である。上述したヒトの大豆食餌試験／研究では、比較的大量の大豆製品が与えられたが、ゴナドトロピン(性腺刺激ホルモン)、月経周期の長さ、あるいは血漿ホルモンに対する作用は比較的小さく、女性で不妊を引き起こすほど十分ではないことが明らかであった。Bickoff(1963)は、女性における植物エストロゲンの一つの既知作用について報告している。第二次世界大戦終結間近、オランダの人々は深刻な食糧不足のためチューリップの球根を大量に食していた。チューリップの球根のエストロゲン活性は強く、これを食べた多くの女性は子宮出血と月経周期の異常をはじめとするエストロゲンのアンバランスをきたした。チューリップ球根中のエストロゲンの性質については報告されていなかった。

私の知る限りでは、大豆製品や通常の食品中に現われる植物エストロゲンを大量摂取した後に、植物エストロゲンの血漿濃度を男性で測定した長期研究は報告されていない。一人の日本人男性でわれわれが検出した血漿中の最高総植物エストロゲン値は、 $2\ \mu\text{mol}/\text{l}$  を超えるゲニステインであった。この男性は通常の食事を摂り、

午前中に血漿試料の採取を行っていた。私の知るところでは、日本人男性の間ではとくに受精能に問題はない。健康な男性 10 人を対象とした研究(Gooderham et al., 1996)で、粉末飲料(Altima HP-20, Protein Technologies International, St. Louis)の形で大豆タンパクを与え、1 日にゲニステインを 80.3mg、ダイゼインを 35.6mg、glycitein を 15.1 mg 摂取させた。1 カ月後に GC-MS で測定した平均血漿濃度はゲニステインで  $907 \pm 245$  nmol/l、ダイゼインで  $498 \pm 102$  nmol/l であり、日本人男子の平均値以上であった。長期の研究を同様の用量で行ない、精子数、血漿ホルモン、男性の受精能に関係するその他の指標を測定する必要がある。

大量のクメストロールが他の植物エストロゲンのほかに含まれていて、菜食主義の人が相当量摂取している食物で現在知られているのは、アルファルファや他の芽類だけである。われわれが GC-MS を用いて分析した結果、アルファルファ(の芽)は乾燥重量 100g 中およそ、ホルモノネチンを  $4000 \mu\text{g}$ 、ビオカニン A を  $110 \mu\text{g}$ 、ダイゼインを  $60 \mu\text{g}$ 、secoisolariciresinol を  $32 \mu\text{g}$ 、クメストロールを  $45 \mu\text{g}$  含み、総量はおよそ乾燥重量 100g 中  $4250 \mu\text{g}$  であることが明らかになった。アルファルファはウシでエストロゲン過剰症候群を引き起こすが、*in vivo* では抗エストロゲン作用も認められている(Adler, 1962)。この抗エストロゲン作用はクロロホルムによってクメストロールから分離することができるが、これによりエストロゲン活性が取り除かれることはない。著者は、この抗エストロゲン作用がウシやヒツジの極めて稀な原発性乳がんの一因であろうと述べている。この抗エストロゲン性物質はかつて同定されたことはないということで、われわれはこの物質の研究に取り掛かった。当研究室の菜食主義の女性を調べたところ、一人の尿からクメストロールが検出された。食品中のクメストロールが、たとえ毎日芽類を摂食したとしてもヒトに不妊問題を引き起こすとは考えられない。ヒトでのクメストロールの作用機序は解明されていない。

不妊を引き起こす植物エストロゲンの作用機序が最初に疑われたのは、卵巣に対するゴナドトロピンの直接作用によるものであったが、後に実験によって植物エストロゲンが下垂体で放出因子として作用することが示唆された。他の試験では、クメストロールがゴナドトロピンの放出を遮断することを明らかにしている(Labov, 1977)。上に引用したヒトを対象とした研究は、大豆の植物エストロゲンを大量摂取した後にゴナドトロピンに何らかの影響が起きるとしたら、それは阻害作用であることを示した。これに関して、植物エストロゲンが受精能を上昇させると考えられる作用機序について論じようとは思わない(Labov, 1977)。

要約すると、大豆や他の豆科植物から、あるいは芽類から植物エストロゲンを摂取することが、成長したヒトで不妊を引き起こすという証拠は見出せないというこ

とである。そのような影響を及ぼすには、一定の食品を途方もない量で摂取しなければならない。血漿中の植物エストロゲン濃度が通常の食事をしている日本人での最高測定値を上回らない限り、不妊問題は起こるはずはないと考えられる。

### 豆乳摂取が及ぼす妊娠あるいは新生児への影響

医学専門出版物(Irvine and Fitzpatrick, 1995)や一般向け出版物で、あるいは1995年12月にLittle Rockで開催された第三回国際植物エストロゲン学会(Third International Conference on Phytoestrogens)において、乳児用調整豆乳の有害作用をめぐる激しい論争が展開されている。この問題を客観的に評価する前に、少なくとも4つの重要な要因について考えてみたい。

1. 母乳を代用する牛乳は植物エストロゲンを含むが、これは乳牛の放牧時期あるいは飼料の性質に左右される。冬と夏の両時期にフィンランドの乳牛から得た牛乳試料を分析し、0.97~335nmol/lのイソフラボノイド(ダイゼイン、エクオール、ゲニステイン)をわれわれは検出した。最高値を重量単位に換算すると、およそ85 $\mu$ g/lである。この値は他の国では、たとえばクローバ中の植物エストロゲン含有量が多いオーストラリアでは、一層高くなると思われる。

2. われわれの知る限り、調整豆乳はステロイドエストロゲンを含まない。しかし全牛乳は、われわれの経験によると800~1700pmol/lのエストロン+エストラジオール+エストリオールを含んでいる。牛乳中での(ステロイドエストロゲンの)含有量は、ウシの放牧が始まる春に最高値に達する。ステロイドエストロゲンのおよそ45%を占めるのは、生物活性がゲニステインのおよそ1250倍であるエストラジオールである(Markiewicz et al., 1993)。店から買った牛乳に含まれるステロイドエストロゲンの平均量を算定すると、エストロゲン活性はおよそ200 $\mu$ g/lのゲニステインに相当する。エストロゲンが最高値の試料の生物活性はおよそ300 $\mu$ g/lのゲニステインに相当する。これに植物エストロゲンの含有量—95 $\mu$ g/l—を加えねばならないので、最高で385 $\mu$ g/lの「ゲニステイン当量」に到達する。しかし、フィンランド以外の国々での乳牛によるクローバの大量摂取は、この数値をかなり上昇させることを忘れてはならない。調整豆乳はGC-MSで測定すると、400~4000 $\mu$ g/lのゲニステインとこれより少量のダイゼインを含んでいる(Dwyer et al., 1994)。したがって、通常の牛乳のエストロゲン活性は、活性が最低値の調整豆乳と同範囲にあると思われる。Cruzらの試験(1994)では、調整豆乳で育つ乳児でのゲニステインの平均尿中排泄量は300 $\mu$ g/lであったが、牛乳でははるかに少なくおよそ30 $\mu$

g/l(一数值からの概算)であり、乳汁中のエストロゲンおよび植物エストロゲンの濃度は報告されていない。生後の最初の4カ月間に乳児は調整豆乳を60~130g/日摂取し、これはゲニステインでは240~640 $\mu$ g/日あるいは1日に体重kgあたり150 $\mu$ gを摂取するのに相当する。生体内利用可能なゲニステインは、腸管で分解されたり吸収が低下するため、はるかに少なくなる(20%以下になることが多い)(下記参照)。これが、ゲニステイン摂取を実験動物への経口投与と比較する際に、計算の基準とすべき用量である。ゲニステインの経口による1日最高摂取量は、成長ラットでは45 $\mu$ gでありこれは乳児が大量の調整豆乳から摂取する量に相当し、新生児ラットでは1 $\mu$ g/日以下である。そのような低用量のゲニステインがその他のイソフラボノイドを含む大豆の形でラットに投与される場合は、エストロゲン活性や抗エストロゲン性/作用が観察されることはないと考えられる。ダイゼインの発生量は少なく、その生物活性はゲニステインの1/6ほどである(Markiewicz et al., 1993)。

3. 乳児の腸内細菌は、イソフラボノイド配糖体およびステロイドグルクロン酸抱合物を加水分解しないと考えられる。しかし、男の乳児で4カ月間調べたところ、相当量の大豆イソフラボノイドが吸収されるのが認められ、尿中に排泄されていた(Cruz et al., 1994)。正確な尿採取日の記載がないため、腸管が4カ月間のどの時点で植物エストロゲンを吸収できるようになるのかを判断することはできない。

4. 新生児の肝臓は、とくに早産児の場合は、グルクロニルトランスフェラーゼ酵素活性が低い。そのためステロイドおよび植物エストロゲンの生物活性は、この酵素の活性化が弱い新生児では年長児に比べて高いと考えられる。早産児では、グルクロン酸抱合能は一層低い。肝のグルクロニルトランスフェラーゼ活性が低い捕獲されたチータは、大豆イソフラボノイドに高い感受性を示し静脈閉塞性疾患をきたした(Setchell et al., 1987a)。このこととも関係するが、植物エストロゲン代謝に人種差があるというのは興味深い(Adlercreutz et al., 1994a)。

乳児用調整豆乳をめぐる議論が当初少々混乱していたのは、エストロゲンの刷り込みに影響を与える、抗エストロゲン(Irvine and Fitzpatrick, 1995)作用が問題だと考えられたからである。ヒトを対象とした研究の極々初期には、植物エストロゲンの有益な効果は抗エストロゲン作用によるのではと考えられた(Adlercreutz et al., 1982a; Bannwart et al., 1984a; Setchell and Adlercreutz, 1988)。大部分とはいわないまでも有益な効果の多くは、他の作用機序に関連しているようであった(上記参照)。しかし、植物エストロゲンが発現する作用は、低用量と高用量では異なる。

ラットの新生児期にゲニステインを低用量で与えると成熟後の去勢雌ラットに男性化作用や下垂体感作作用を及ぼさないのに対し、高用量で与えるとその作用はエストロゲンの典型的作用に類似する(Faber and Hughes, 1993)。医薬品としての500~1000 $\mu$ g/日の用量でのみ、性的二相性核(SDN-POA)の量は増加する。低用量は皮下注射による10 $\mu$ g/日であり、これは新生児ラットで上記のように算定した用量の10倍であり、乳児が新生時期に調整豆乳で摂取する量に相当する。さらに、非経口的には活性ははるかに高まり、少なくとも5倍になると考えられる。FaberとHughes(1993)が実験で用いた用量は、結果として乳児が経口で摂取する量の少なくとも50倍となっている。以前に同著者らが去勢した雄ラットで行なった同様の試験(Faber and Hughes, 1991)ではSDN-POAに対する作用を認めてはいないが、新生時期にゲニステイン100 $\mu$ g/日を与えた(皮下注射)雄ラットはGnRH誘導LH放出(性腺刺激ホルモン放出ホルモン誘導黄体形成ホルモン分泌)への反応亢進を示し、高用量ではGnRHに反応してLH分泌が弱まりその量も減少した。しかし、この用量も非常に高用量であり、体重kg当たりで算定すると調整豆乳からの摂取量とは比較しうるものではない。

Hughesら(1995)は、ラット、サル、およびヒト由来の生殖細胞における大豆タンパク植物エストロゲンの作用に関する見解をまとめている。これらの試験は進行中であるため、結果の評価はこれからである。

ラット子宮の発育に対するクメストロールおよびエクオールの作用に関する研究は、新生児期にラット1匹あたり10~100 $\mu$ gを5~10日間皮下注射して行なわれた(Medlock et al., 1995a, b)。これらの実験では、エクオールの作用は子宮におけるエストロゲン作用あるいは抗エストロゲン作用のいずれとも一致しないが、クメストロールではジェチルスチルベストロール(DES)の作用に類似するものの同程度の作用発現には1000倍量を要した)。同様の試験が初期に行なわれており、新生児期のマウスにクメストロールを5日間与えた結果、生殖機能に異常が認められた。クメストロールは非常に少ない用量であっても、影響を及ぼすことが認められた。

過去にもそして現在も引き続き大きな問題であるのは、大部分の試験においてげっ歯類の飼料中にすでに大量の植物エストロゲンが含まれているということである。食餌中の植物エストロゲンの基礎値は影響を及ぼすほど高くはないものの、比較的強力な植物エストロゲンが少量でも加われば、より迅速に陽性反応が現われることになる。最近われわれが得た情報では、この問題に関して米国の研究室でも、とくにげっ歯類の飼料メーカーでも、十分な配慮がなされていないということである。大半の試験では、食餌の正確な成分は記載されるが、飼料中・尿中・血漿中の植物エストロゲン濃度に関する分析は行なわれていない。そのような試験は、げっ歯類

に大豆を含まない飼料を与えてやり直すべきというのが私の見解である。その時まで毒性試験には信頼を置くことはできず、DESの存在下では植物エストロゲンは抗エストロゲン作用を示すのでたとえDESを用いた試験でさえ例外ではない。

われわれは、東京の国立がんセンター研究所(National Cancer Center Research Institute)疫学研究部(Epidemiological Division)のDr. Shaw Watanabeの協力を得て、昔からの日本食を摂取する日本人女性で出産時の母体および臍帯の血漿中、ならびに羊水中の植物エストロゲンの濃度を調査した。植物エストロゲンは臍帯血と母体血漿中での値は同程度に高く、羊水中でも比較的高濃度で検出された。したがって、日本人の胎児はかなりの濃度の植物エストロゲンに暴露している可能性が高い。植物エストロゲンが豊富な食事に関して、日本人で生殖機能異常の発現率が上昇しているという徴候は認められていない。胎便中の植物エストロゲン量が日本人の新生児では極めて高い可能性があり、この分析も間もなく行なう予定である。胎児期における高濃度の植物エストロゲンが、将来女性を乳がんから守ってくれると考えられている。

結論として、イソフラボノイドを含む大豆タンパクは摂取期間がたとえ生後最初の数カ月間であっても、ヒトに生殖あるいはその他の異常を引き起こす可能性があるとの証拠は文献中に見当たらない。げっ歯類の実験で用いられた用量はヒトの乳児が摂取する量より多く、そのうえげっ歯類の大部分の飼料には植物エストロゲンが高濃度で含まれており、そのことは考慮されていないのが普通である。飼料中に高濃度で含まれるため、(雌親の)母乳にも植物エストロゲンが含まれている。

ブラインド検出法に基づいた新生児による摂取量に関する初期の算定法に誤りがあると思われる。したがって、調整豆乳中に含まれるイソフラボノイド濃度を特別な方法を用いて、新生児の摂取量について新たに算定する必要がある。その測定法は絶えず更新されているが、最近大幅に改善された。げっ歯類で生殖器官への影響が現われた多くの試験は、純品を皮下投与して実施されている。現在われわれがもつ知識は限られているため、植物エストロゲンを高濃度に含む調整豆乳は生後最初の4カ月間には避けるべきであるが、低濃度のイソフラボノイドを含む調整豆乳であれば用いてもよいのではと私は考える。ステロイドエストロゲンと植物エストロゲンのどちらも牛乳および母乳に常時含まれているものなので、少量のエストロゲンや植物エストロゲンはヒトの胎児には有害ではなくむしろ成長に有益なものと思われる。

### がん刺激性の可能性

人間の食物中に存在する量の植物エストロゲンが、既存のがんを刺激したり発が

んのイニシエータとなる可能性を示唆する証拠は文献に見当たらない。乳がん、前立腺がん、結腸がんの発生率が低い日本人における高血漿濃度も、大豆摂取はいずれの発生率とも関連していないことを示唆している。しかし、日本人は昔から低脂肪食を摂取しており、内因性エストロゲン値は西欧人より低い傾向にある（上記参照）。西欧式の食事での高濃度の植物エストロゲン摂取とエストロゲンの高血漿濃度が組み合わさることがよくないと考えられる。他方、植物エストロゲンはエストロゲン値が高い場合には抗エストロゲンとして、低い場合にはエストロゲンとして働く傾向にあると思われる。

外因性エストロゲンが乳がんを引き起こすのかという問題は未解決である(Davis et al., 1993; Safe, 1995)。Safe(1985)の報告によると、「研究結果から、食事中あるいは環境中のエストロゲン活性物質と乳がんとのつながりは確立していないと考えられる。」

GC-MS(ガスクロマトグラフィー質量分析法)、GC(ガスクロマトグラフィー)、あるいはHPLC(高速液体クロマトグラフィー)より簡便な方法で血漿値を測定する方法が間もなく開発され、大豆、亜麻仁、あるいは植物エストロゲンを高濃度に含むその他の食品の摂取後に、血漿値を調整することで最大の恩恵が得られ悪影響を回避することが可能になる。当研究室でもそのような方法を間もなく採用することになろう。

## まとめ

1979年にヒト尿中のエストロゲン画分中でリグナンが発見されてから間もなく、ヒトの体液中にはジフェノール基をもつ多くの物質が存在することと、菜食主義者などの集団ではそれらの濃度は高いものの発がんの危険性は低いということが分かってきた。とくに大豆イソフラボノイドゲニステインは、おもにチロシンキナーゼへの阻害作用に関係して数多くの生物活性をもつことから、関心の的となっている。がんを予防する食物として大豆への興味がますます高まっているが、がんや冠動脈疾患を予防すると断言するには証拠は十分ではない。食事に関する他の多くの要因、他の環境要因、社会的地位、および妊娠歴も関わっている。しかし、大豆摂取を有害とする証拠もなく、小児を含む多くの人々によって大豆製品は毎日摂取されているが発がんの危険性は低いのである。最近の実験では、イソフラボンに思春期前に摂取すると乳がんを予防することが示唆されている。植物エストロゲンの毒性を調べるために実施した動物実験は、極めて高用量のあるいは通常人間の食物には発生しない植物エストロゲンを使用したり、動物の飼料は管理不足で実験開始前に植物



エストロゲンを含まないことの確認を怠ったり、あるいはそのいずれかの点で不備が見られた。

リグナンについては、この面白い物質群のほんの表面に触れただけに過ぎない。最近の研究結果によって示された人体中のリグナン濃度は、食物中に同定された 2 つの前駆物質 *matairesinol* および *secoisolariciresinol* の分析結果から予想されるよりもはるかに高い。それらのエストロゲン活性が低いこと、それらは他疾患を予防する線維性食品中に含まれていること、ステロイド生合成酵素へのそれらの阻害作用が最近発見されたことが相俟って、リグナンをがん予防物質の有望な候補に仕立て上げている。しかし、この仮説の検証には多くの研究を必要とする。

植物エストロゲンの研究分野は現在、疑いもなく急激に拡大している。細胞の転換や増殖に関係する多くの事象発生に対するその直接的な作用と、われわれのホルモン系に関わる修飾物質としてのその役割が、がん、冠動脈疾患、および他の慢性疾患に食事が与える影響を研究する上で、植物エストロゲンを最前線に立たせている。

#### 謝辞

1979 年から当研究室で行なわれてきた本研究は、フィンランドの *Medical Research Council of Academy*、ヘルシンキの *Sigrid Juselius Foundation* と *Finnish Cancer Foundations* の各機関の支援によって、後には NIH 助成金 1 R01 CA56289-01 および *Nordic Industrial Foundation* の助成金、最近では NIH 助成金 2 R01 CA56289-04、EC 契約 FAIR-CT95-0894、スウェーデンの *King Gustav Vth and Queen Victoria's Foundation* からの助成金を受けて行われた。