

記録でも明らかだったように、大豆群では 40%、小麦群では 25%と両群で顕著であったことは驚きではない。膾成熟度指数に変化はなかった。しかし、試験終了時に群間で症状に関して有意差が認められなかったことは、両群ともに量的相違はあるものの大豆粉が与えられたことで説明がつくであろう。白小麦粉に含まれる植物エストロゲンの量は非常に少なく、リグナンが極少量含まれるだけである(表 1)。膾スミアに対する作用に関する結果は、閉経後女性で行なった別の研究から得られた結果とも一致しており、その研究では 1 カ月間の大豆製品摂取後にわずかな影響が現われ、植物エストロゲンの尿中濃度が 105 倍に上昇している(Baird et al., 1995)。

エルサレムの Hadassah 医療センターの Dr. A. Brzezinski との共同研究が進行中であり、この研究では閉経後女性に大豆と全粒(穀物)を含んだ食物を与えたところ、更年期症状の改善が認められた。

骨粗しょう症に関して、ラットと女性双方で非常に興味深い結果が得られた。ラットでは、高用量(3.2 または 10mg/日)ではなく低用量(1mg/日)のゲニステインが、抱合 equine エストロゲン(5  $\mu$ g/日)と同等に卵巣摘出ラットで骨質量を維持することが明らかになった(Anderson et al., 1995a)。同分野での別の研究によると、ゲニステイン 10mg を含む 10g の大豆タンパクを 1 日 2 回摂取すると、閉経前後の女性でエストロゲン減少症状が軽減され( $p < 0.004$  対プラセボ)、ボーダーライン上ではあるものの有意な影響が全身症状( $p < 0.07$ )および睡眠の質( $p < 0.1$ )で認められた。LDL コレステロールは減少( $p < 0.01$ )したが、HDL コレステロールとトリグリセリドはこの治療法では変化しなかった。血清アルカリ(性)ホスファターゼが減少( $p < 0.03$ )したことで、骨への影響が考えられた。クメストロールが、実験系で、骨吸収を抑制すると同時に骨ミネラル化を促進させることが最近認められている(Tsutsumi, 1995)。

結論的には、女性たちは、エストラジオールやエストリオール含有の合成薬、あるいは妊馬尿より抽出した equine エストロゲンさえも用いないで、自然食品によって更年期症状を治療することに大きな興味をもっているということである。乳がん治療を受けた女性では更年期症状の治療は特に問題となる。症状を軽減することに加えて、摂取する食品は冠動脈疾患や骨粗しょう症に対する保護作用を有するものでなければならない。中国と日本では、更年期症状は比較的まれであり(Lock, 1991; Tang, 1994)、股関節部骨折の発生率も米国やヨーロッパよりも低い(WHO Study Group, 1994)。日本人女性の大腿骨頸部の骨質量は少ないのに、股関節部骨折の発生率は非常に低い。その理由は、大腿骨頸部の長さが短いことと、大腿骨の角度がわずかではあるが小さいことによるとと思われる(Nakamura et al., 1994)。骨

粗しょう症は今では日本社会の深刻な問題であり、その発症は閉経後早期からすでに始まっている(Tsunenari et al., 1995)。このことは、伝統的な食事が欧風化され、イソフラボノイドを豊富に含む食品が少なくなったためと考えられる。

### 植物エストロゲンの毒性の可能性

他章では植物エストロゲンに関わる毒性問題が取り扱われているため、本章では人の健康に、また人の食品中に十分量で発生して生物活性をもつ物質に関して論じていきたい。表6に、*in vitro*でのヒト子宮内膜がん細胞(Ishikawa細胞)における種々の植物エストロゲンの相対的エストロゲン作用を示す(Markiewicz et al., 1993)。エンテロラクトンと *enterodiol* の調査はまだ行なっていないが、種々のエストロゲン感受性細胞を含む他の3種の試験系で *enterolacton* のエストロゲン活性は非常に低く(Welshons et al., 1987)、*estradiol* の10万~100万分の1、エクオールのおよそ1000分の1である。*enterodiol* のエストロゲン活性は一層弱い。したがって、リグナンの毒性や有害性の可能性はそのエストロゲン活性によることはありえないと思われる。

表6 Ishikawa細胞アルカリ(性)ホスファターゼ分析を用いたイソフラボノイドのエストロゲン活性

Estradiol	100
Estrone	10
Coumestrol	0.2
Genistein	0.08
Equol	0.06
Daidzein	0.013
Biochanin A	<0.006
Formononetin	<0.0006

Source: Markiewicz et al., 1993.

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するには、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; Müller 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  $12.4\sim 16.5\ \mu\text{mol/l}$  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  $0.38\ \mu\text{mol/l}$  であるが、大半のヒトでは  $0.01\ \mu\text{mol/l}$  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、 $2\ \mu\text{mol/l}$  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  $\mu\text{g}$ /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  $\mu\text{g}$ /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  $\mu\text{g}$ /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  $\mu\text{g}$ 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エ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係して、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を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）。西歐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る。

## 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、イソフラボンは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 Jusélius 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。

## 18章 TCDD とその関連物質の抗エストロゲン活性

### [緒言]

ポリ塩化ジベンゾ-p-ダイオキシン(polychlorinated dibenzo-p-dioxins; PCDDs)とポリ塩化ジベンゾフラン(polychlorinated dibenzofurans; PCDFs)は、化学物質の合成過程や燃焼過程で生成される。PCDDs と PCDFs は化学的にもまた温度に対しても安定であることより、環境中に持続的に存在し続ける。そしてそれらは魚類、野生動物、ヒトの脂肪組織、血清、母乳などで検出されている。PCDDs には 75 の同族体、PCDFs には 135 の同族体があり、その中でも 2,3,7,8-塩化ジベンゾ-p-ジオキシン(TCDD)が最も毒性が強い(Fig. 1)。

TCDD とその関連物質による生化学的反応あるいは毒性としては、免疫抑制効果、肝臓毒性、ポルフィリン症、発癌性、抗癌作用、生殖や発育への影響、腫瘍発育促進効果、神経毒性、塩素ざ瘡などの皮膚疾患、内分泌攪乱作用などがある。例えばげっ歯類の乳腺腫瘍に対する TCDD の抑制効果として Table 1 のようなものが報告されている。

TCDD は、細胞内に存在する Ah レセプター(arylhydrocarbon receptor)にまず最初に結合すると考えられている。Ah レセプターの分子量は動物の種によって異なり、マウスでは系によっても異なる。このレセプターはベーシック ヘリックス・ループ・ヘリックスの構造をしたドメインと PAS ドメインを持ち、DNA や他のタンパク質とも結合できる。TCDD は Ah レセプターと結合後 heat shock protein 90 (HSP90) の働きにより核内へ移行し、Ah receptor nuclear translocator (Arnt) と二量体を形成した後 CYP1A1 遺伝子の 5' 上流の xenobiotic responsive element (XRE)と名づけられた DNA 配列の部位に結合し、転写を活性化する。

### [抗エストロゲン作用を有する Ah レセプターアゴニスト]

TCDD は plasminogen activator inhibitor-2、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、interleukin-1 $\beta$  mRNA を誘導する作用を有し、血中甲状腺ホルモン濃度を減少させ、エストロゲン、EGF、グルココルチコイドなどのレセプターへの結合能に対しては抑制的に働く。また TCDD は、ステロイドホルモン代謝の促進あるいは抑制を起こし、発育障害や生殖毒性に関連している可能性がある。そして乳腺腫瘍 (Table 1) と子宮腫瘍に対しては抑制的に作用する。

比較的毒性の弱い何種類かの TCDD のアナログにおいて、乳がんの治療薬として臨床応用の可能性が検討されている。そのアナログの一つである 6-methyl-1,3,8-trichlorodibenzofuran (MCDF)は、動物実験では乳腺腫瘍に対して有効であることが報告されている。Indole-3-carbinol (I3C) (Fig. 1)もまた Ah レセプターに結合し、Ah レセプターアゴニストとして作用する。このような乳腺腫瘍抑制効果は、Ah レセプターを介して作用している可能性が高い。TCDD は、E<sub>2</sub> 投与による子宮重量増加を抑制し、細胞質内と核内のエストロゲンレセプター(ER)およびプロゲステロンレセプター(PR)の量を減少させることが報告されている。Figure 2 は、25 日令のメス SD ラットの子宮における細胞質内と核内の ER、PR それぞれに対する

TCDD と MCDF の影響を示している。MCDF は TCDD よりも子宮に対しては抗エストロゲン作用は弱い。

### [ヒト乳癌細胞に対する Ah レセプターアゴニストの抗エストロゲン作用]

TCDD は、ヒト乳癌細胞、MCF-7 細胞、T47-D 細胞に対してエストロゲンや成長因子による細胞増殖促進作用を有意に抑制する。Ah レセプターアゴニストである MCDF もまた TCDD と同様に前述のような作用を有するが、その作用は TCDD よりも弱い。最近、アルキルジベンゾフラン、ベンゾクマリン誘導体、I3C、ICZ などにおいてもこの作用が検討されている。

### [Ah レセプターアゴニストの抗エストロゲン作用のメカニズム]

3つのメカニズムが推測されている。

#### (1) 酸化代謝の促進説

TCDD 投与により arylhydrocarbon hydroxylase (AHH) と ethoxyresorufin o-deethylase (EROD) 活性が誘導されるが、これは E2 hydroxylase 活性の上昇と関連しているとの報告がある。しかし、この説ではすべてを説明することができない。

(2) Ah レセプターを介するエストロゲンレセプターのダウンレギュレーション説  
TCDD によりエストロゲンレセプターの量が減少するのは、レセプターの代謝回転 (turnover) が促進されることとレセプターの補充が抑制されることが関連していると考えられている。しかし、抗エストロゲン作用をこれだけで完全に説明できない。

#### (3) Ah レセプターを介した E2 誘導遺伝子発現の抑制説

エストロゲンにより誘導される遺伝子 pS2 と cathepsin D は乳癌細胞に認められ、TCDD により有意に抑制されることが報告されている。これらの抑制は転写レベルで起こり、DNA 結合の転写因子の抑制、転写の初期段階での抑制などが推測されている。そして、これらの抑制作用は XRE-like motif (GCGCGTGCCC) が重要な役割を果たしていると推測されている。

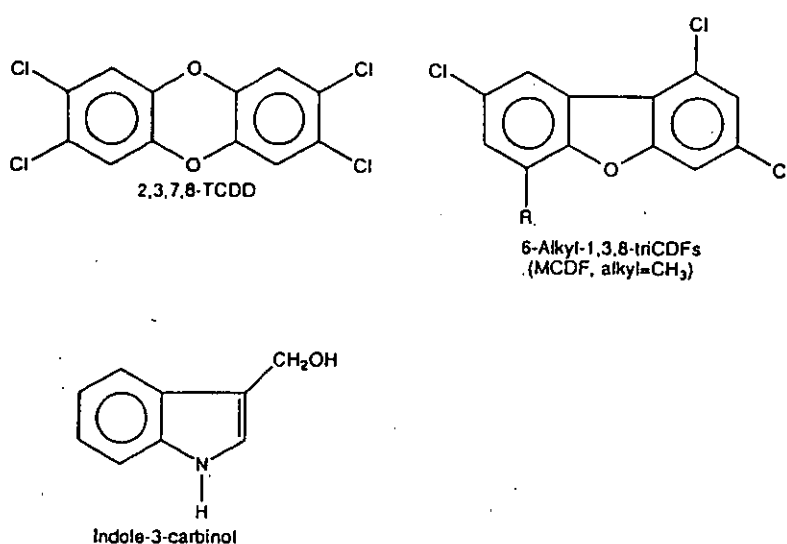
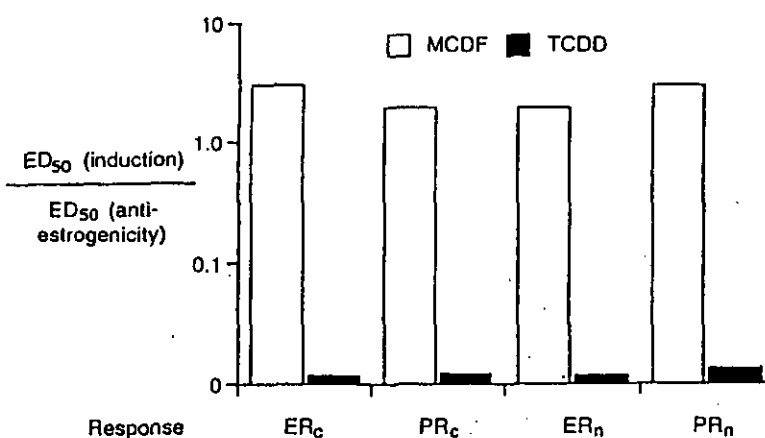


Figure 1 Structures of Ah receptor agonists that exhibit antiestrogenic activity.

**Table 1** Inhibition of Mammary Tumor Growth by TCDD in Rodent Models

Animal species	Rodent model	Effects
Sprague-Dawley rat	Spontaneous tumor formation	TCDD (0.1, 0.01, and 0.001 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) inhibited spontaneous tumor formation (53, 27, and 20% inhibition, respectively)
Sprague-Dawley rat	DEN initiation, TCDD promotion	No tumor observed in animals treated with TCDD ( $2 \times 0.125 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day} \times 30$ ) vs. 36% (4/11) in controls
Sprague-Dawley rat	DMBA initiation, TCDD inhibitor	TCDD ( $3 \times 10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$ ) total inhibition of tumor growth (decreased tumor volumes to < control levels)
B6C2F1 mice	MCF-7 cell solid tumor xenografts plus E2	Inhibition of tumor growth by TCDD (2-8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )



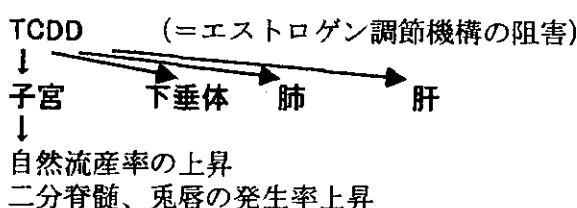
**Figure 2** Comparative ED<sub>50</sub> (induction) / ED<sub>50</sub> (antiestrogenicity) ratios for MCDF (□) and TCDD (■). The dose-response studies and ED<sub>50</sub> values were determined in 25-day-old female Sprague-Dawley rats as described. (From Astroff and Safe, 1988.)

## TCDD と子宮機能

2,3,7,8-Tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD) はハロゲン化芳香族炭水化物の一種で、潜在的環境毒物に大きく関連している。TCDD は 2,4,5-trichlorophenol の生成過程で生じ、土壌中や食物連鎖中にも検出されている。特に工業生産過程での accident や軍事的使用の過程でヒトが暴露される。TCDD の暴露は一時的に塩素性の挫創をもたらすほか、最近の研究で生殖機能へ及ぼす影響に多大な関心が寄せられている。

生殖機能へ及ぼす影響—動物実験において TCDD は自然流産率の上昇をもたらすことが確認されている。胎児毒性も認められており、甲状腺機能低形成、皮下浮腫、発育遅延として特徴づけられている。ヒトにおいては評価が困難ながら主にエストロゲンの代謝経路を崩壊させることが判明している。実際ハイレベルの TCDD に暴露された特定の地域で自然流産率の上昇や二分脊椎、兔唇の発生率上昇を報告するレポートがある。TCDD が生殖器官に影響を与えることが明らかになったのは長期間 TCDD を摂食した rat において子宮、下垂体、肺での年齢に相関した tumor の数が減少したとする研究結果による。肝臓も加えいづれもエストロゲン調節機構を介することがわかっている。

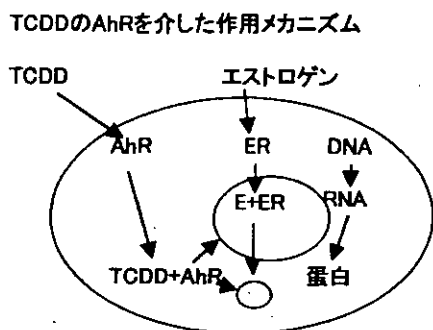
### TCDDがヒト生殖器官へ及ぼす影響



抗エストロゲン作用としての TCDD—エストロゲンは子宮、下垂体、肝臓の癌を誘起する。一方 TCDD を摂食したラットはそれらの癌誘発作用を低下させる。これは TCDD が抗エストロゲン作用を有することを示唆している。また動物実験で estradiol 誘導性である子宮重量の増加は TCDD により阻害され、estradiol の循環レベルと TCDD の関連性から TCDD の抗エストロゲン作用は estradiol と同じ薬物動態的パラメータを示し、抑制作用に関し、同じ作用機序を有することが示唆されている。さらにヒトにおける肺がん細胞の cell line や肝細胞の cell line に対しても TCDD は抗エストロゲン作用を有する。

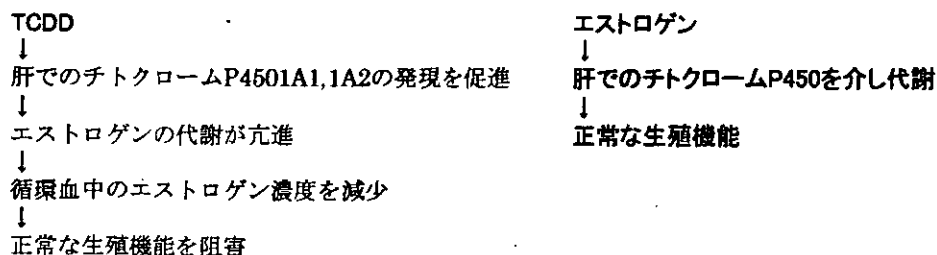
Ah レセプター—他のステロイドホルモンと同様、TCDD は細胞内レセプターに結合し、核内に移動した後標的細胞内の転写を変化させる。TCDD に対するレセプターは AhR と名づけられている。また核から分離されたリガンド—受容体複合体にはさらに第三の蛋白である ARNT ないし AhR 核転移蛋白 nuclear translocator protein も見出されている。チトクローム P450、Cyp1A1、Cyp1A2 等複数の遺伝子が AhR によって制御されている。TCDD が生殖機能毒性にかかわる最大の論点はエストロゲン応答性との関連性がいかんにして生ずるかという点である。いくつかの構造活性研究によると AhR の TCDD 様同種物質に対する親和性はそれらが抗エストロゲン作用を顕在化させる能力と相関している。AhR での作用は子宮や肺癌細胞の cell lines 内での TCDD の作用の影響下にあることを示唆している。他の cell line を用いた研究からも AhR が TCDD の抗エストロゲン作用発現に不可欠であることがわか

っている。TCDDが抗エストロゲン作用を有する説明として、TCDDはそのレセプターへの結合があることや核転写タンパクを伴う複合体の構造変化をTCDDの作用の際に伴うことがあげられる。growth factorやそのレセプターも子宮組織がestradiolに应答する上で必要不可欠な中間物質としてとらえられている。これに対しTCDDはestradiolの組織への作用をgrowth factorの作用発現を抑制することで阻害している。その他TCDDは子宮に対するこれら直接作用のほか、下垂体や卵巣機能を介する間接的作用も有するとされている。



エストロゲン代謝とTCDD—estradiolは主として肝におけるチトクロームP450を介し代謝を受ける。TCDDはこのうちチトクロームP4501A1,1A2の発現を促進する作用がある。TCDDの生殖毒性に関する最初の理論はTCDDが肝におけるエストロゲンの代謝を亢進させるという説である。その結果循環血中のエストロゲン濃度が減少し、あるいは特定の部位におけるその濃度も減少し、最終的に正常な生殖機能を妨げる機序があげられている。さらに細胞レベルで見るとエストロゲンレセプターへ結合できるエストロゲンの減少はエストロゲンレセプターすべてのdownregulationを必要とせずにエストロゲンレセプターへの結合の減少や占有核内レセプターの減少が生じる理由となりえる。その他TCDDはラット肝ミクロソーム内ではestradiolの2-hydroxylation活性を4倍増加させることによりestradiol代謝を亢進させる、さらに培養MCF-7細胞中でもestradiol代謝を亢進させることがわかっている。しかしながら、この経路でのestradiol代謝の亢進が生理学的な観点でエストロゲン応答器官にも当てはまるか否かは不明である。また現段階ではチトクロームP450がヒトの子宮内膜細胞中に存在するか否かも不明であり、TCDDがチトクロームP450をマウスの内膜基質細胞で発現誘導しても培養MCF-7細胞中で生じた現象がヒト子宮でのエストロゲン代謝に同じ作用をするか否か不明である。

#### エストロゲン代謝とTCDD





TCDD 毒性のもとでのエストロゲンレセプター機能の役割—エストロゲン応答性細胞の cell line 上での研究結果からは TCDD 処理した細胞の反応性より ER の役割が示唆されている。その結果 ER は TCDD-AhR 複合体の形成にとって必ずしも必要でないが ER は生物学的作用発現に必須であることが示されている。

TCDD とエストロゲンレセプターの転写—AhR と ER がどのように関連し合い TCDD が抗エストロゲン作用を発揮するようになるかについては完全には解明されていない。一つの考えとして子宮上での TCDD の効果は子宮上のエストロゲンレセプターの構造を変化させることで生じるとする理論がある。通常 estradiol は子宮上のエストロゲンレセプターレベルを上昇させる。TCDD はこの estradiol の効果を阻害し、子宮発育重量の抑制が生じる。この結果は TCDD に見られる抗エストロゲン作用がエストロゲンレセプターの downregulation によるものであることを示唆している。別の研究によると AhR レセプターに結合した TCDD は ER の転写を妨げると考えられている。

TCDD と ER タンパクレベル—TCDD にて ER を前処理し、核内での ER 複合体の変化を見た研究や MCF-7 細胞を使用し電気泳動にて ER との結合率を観察した結果より、TCDD の核内での作用は ER の転写を介するものでなく、ER のレベルを posttranslation の機構によって downregulate すると考えられている。

TCDD と growth factor—TCDD が子宮の発育を阻害する別の作用機序として growth factor とそのレセプターを介したルートもあげられる。子宮細胞は複数のリガンドを発現させるがその一つに EGF や TGF- $\alpha$  がある。EGF はエストロゲンが EGFR やリガンドの upregulation を介し子宮重量を増やす経路内で重要な介在機能を果たしている。TCDD は EGFR の downregulation を起こすことで estradiol の作用を阻害する。この EGFR レベル低下は EGFR の m-RNA も低下し、EGF との親和性に変化は見られない。また TGF- $\alpha$  の分泌亢進も認められている。

TCDD の子宮外での作用—TCDD は視床下部の子宮へのホルモン調節機序に影響を与える。去勢雌雄ラットに対しエストロゲンやプロゲステロンを投与しても LH や FSH に影響は生じないが、胎児雄ラットを TCDD で暴露した後同様の手順を行うと LH の分泌を認める。これはラット下垂体のエストロゲン投与下での雌性化を示し、TCDD に中枢神経系の正常分化阻害作用・エストロゲン作用があることを示している。さらに TCDD は下垂体の androgen からの feedback 能力変化をももたらす。TCDD 暴露雄ラットは androgen 欠乏状態となり、代償的な下垂体での GnRH レセプターや LH の増加を認めなくなる。

20030115

厚生労働科学研究費補助金  
(厚生労働科学特別研究事業)

# 医薬品の環境影響評価法に関する研究

(H15—特別—039)

平成15年度 総括研究報告書

## II

主任研究者

井 上 達

平成16(2004)年3月

厚生労働科学研究費補助金

(厚生労働科学特別研究事業)

# 医薬品の環境影響評価法に関する研究

(H15-特別-039)

平成15年度 総括研究報告書

## II

主任研究者

井 上 達

平成16 (2004) 年 3 月

# 資料 — II