

植物エストロゲン

【フードファディズム】

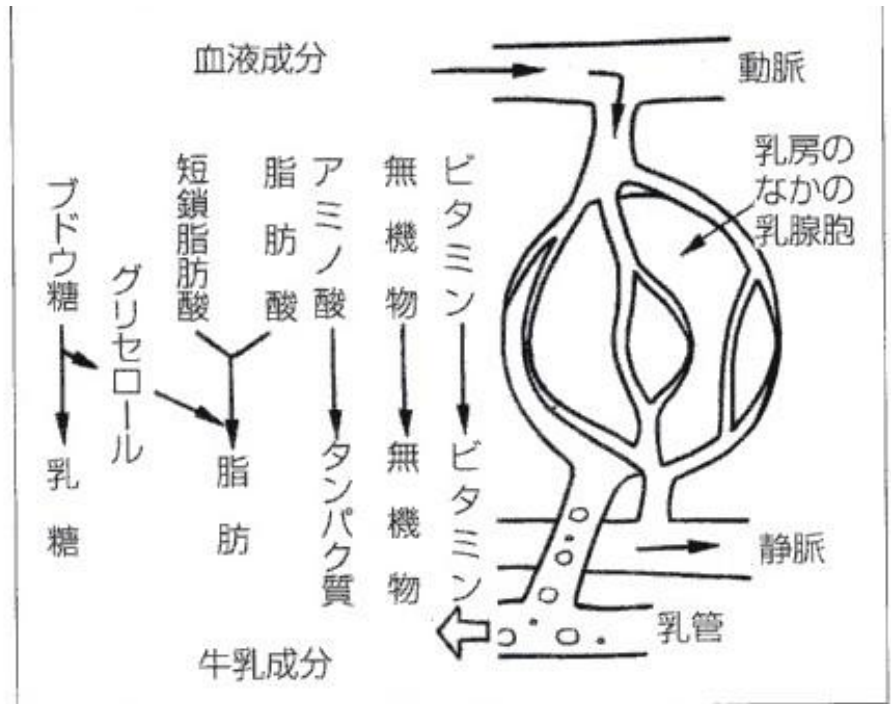
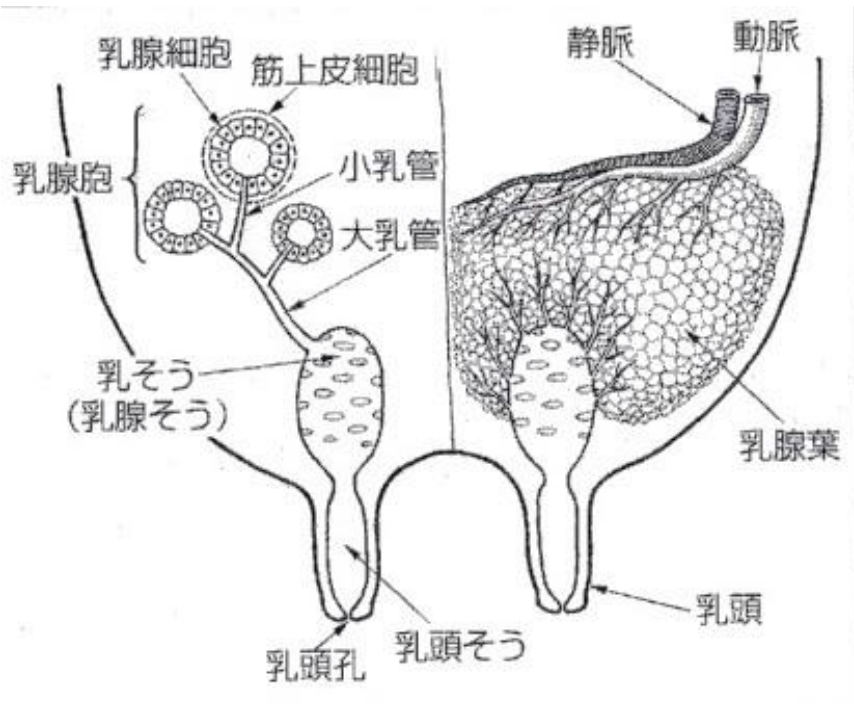
- 科学的な検証をせずに食品を過大・過小評価し、消費者を不安にさせて商品の宣伝に利用すること。

身近な食品を恣意的に中傷することで消費者の関心を強く惹きつけ、“健康本”等を販売するケースなどもある。

- 牛乳有害説：牛乳タンパク質は消化が悪い、牛乳を摂ると骨粗しょう症になる

乳腺の構造と牛乳の合成

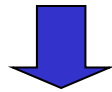
- ・ 乳腺からの乳の分泌は開口分泌ではなく、アポクリン分泌で、細胞から盛り上がった突起ができてちぎれ落ちる分泌であり、細胞質の成分も放出される



乳腺の収縮はオキシトシンが作用する

牛乳中のエストロゲン

- 牛乳中のエストロゲンが子宮腫大や前立腺ガン、乳ガンを促進すると示唆する論文
→報道によって牛乳有害説が広まった。
- 牛乳中のエストロゲンのうち70%が硫酸エストロン(E.S)で、体内ではE.Sから生物活性の高いエストラジオールが生成される。



牛乳摂取による外因的な硫酸エストロンへの曝露が生体に悪影響をもたらす可能性

エストロゲン受容体の機能

標的組織

生理作用

脳

性分化・性行動調節

骨

骨量維持

脂肪組織

脂質・コレステロール代謝調節

性生殖腺

細胞増殖・分化調節

心血管系

血管内皮細胞の保護

免疫系

免疫機能調節

アンドロゲン受容体の機能

標的組織

生理作用

脳

雄性化誘導

骨

骨量維持

脂肪組織

肥満抑制

骨格筋

筋肉増強

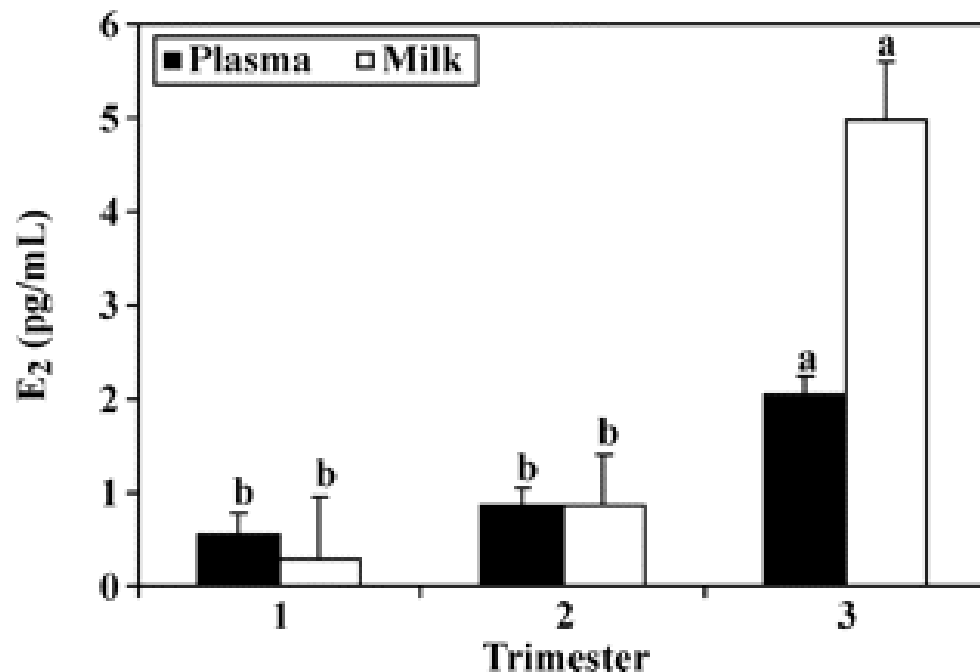
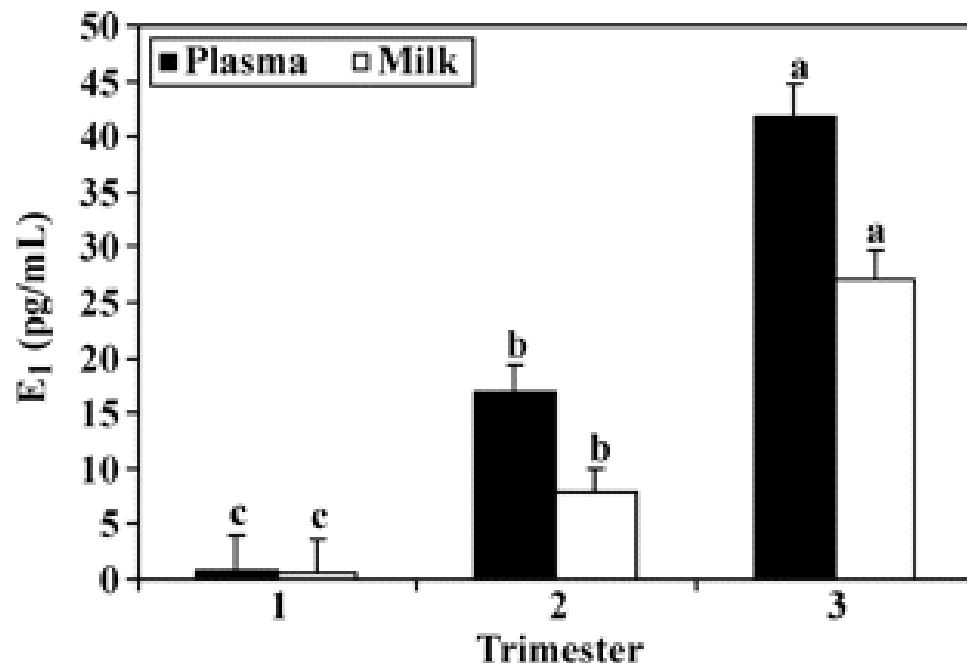
精巣

精子形成

外性器

雄性化誘導

- 乳牛の妊娠期間中の血漿・乳中エストロゲン(Pape-Zembitoら、2008)
- 妊娠後期の牛乳中に含まれるエストロン(E1)とエストジオール(E2)の量は、思春期前の女性が体内で合成する量の**0.02%に過ぎない**。



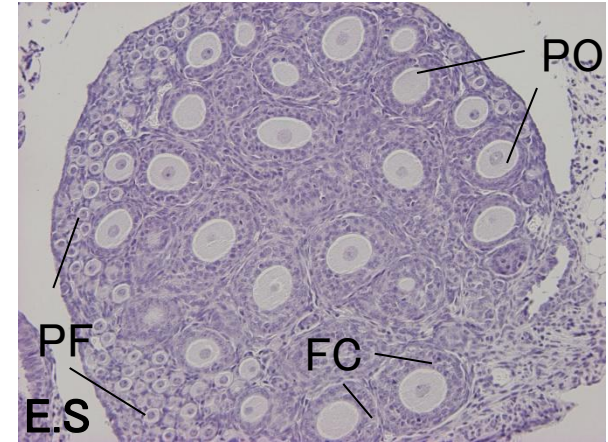
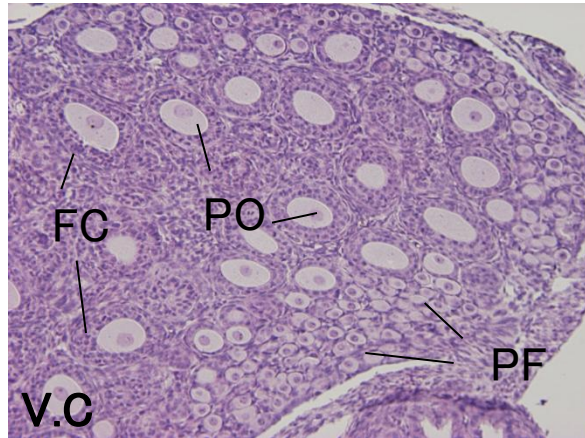
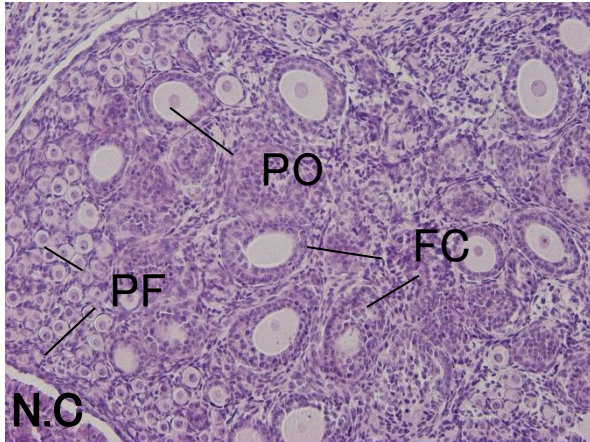
エストロゲンの影響

- 子宮内でエストロゲン様の作用を示す内分泌かく乱物質に曝露した胎仔や新生仔における発生・発達の異常

実験の目的 妊娠マウスへの硫酸エストロン投与が新生仔の精巣・子宮・卵巣・乳腺に影響を及ぼすかを調べる。

- 本実験では、硫酸エストロン投与量は、ヒトが1日に1リットルの牛乳を飲んだ場合を想定した(牛乳中の硫酸エストロン濃度は約380pg/ml、Satoら)。日本人女性の牛乳摂取量が120ml程度であることを考えると、多量の硫酸エストロンを投与している。

卵巢のH.E染色



Values represent mean \pm SEM.

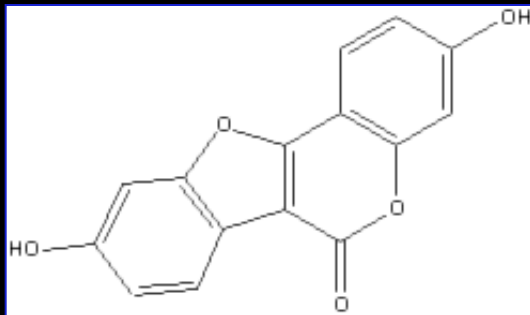
	N.C群	V.C群	E.S群
原始卵胞 (%)	78.83 \pm 0.66	77.35 \pm 0.47	77.40 \pm 0.50
一次卵胞 (%)	6.89 \pm 0.43	7.01 \pm 0.33	7.05 \pm 0.39
二次卵胞 (%)	14.29 \pm 0.62	15.63 \pm 0.54	15.55 \pm 0.51

交配後16.5日目まで母体に体重1kgにつき2mlを強制経口投与：硫酸エストロン (3.8ng/ml) を投与・E.S群

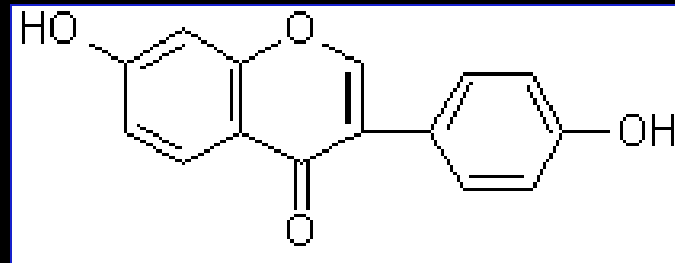
植物ホルモン(植物エストロゲン)

- ・環境ホルモンとしてはとりあげられていないが、植物由来のエストロゲン様物質であり、約20種類がみいだされている
- ・植物ホルモンのなかではアルファアルファなどに含まれるクメステロールがエストロゲン作用がもっとも強いとされている
- ・家畜では繁殖機能の阻害など、以前から悪影響が問題にされていた

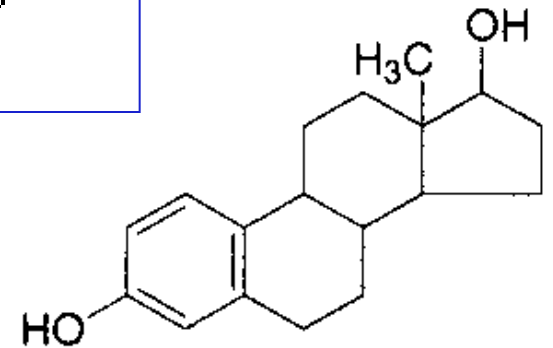
植物エストロゲン



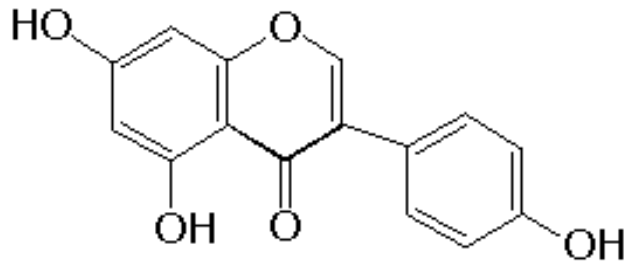
クメステロール



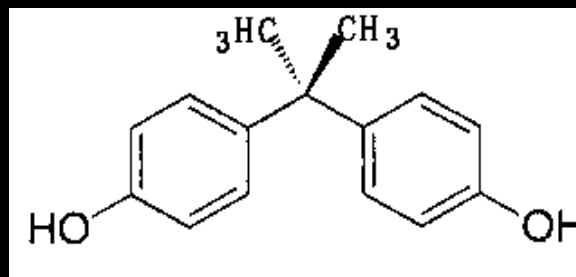
ダイゼイン



エストラジオール-17β



ゲニステイン



ビスフェノールA

植物エストロゲン

- 構造と機能がエストロゲンに類似しているため、ガン、心臓病、骨粗鬆症などの予防に効果があると考えられ、最近20年間で研究が進展している
- 女性では植物エストロゲンをホルモン補充療法やエストロゲン補充療法の代替として利用可能とも考えられているが、結果はまだ明確でなく(利点と危険性の両面)、作用機序などもまだ解明されていない

植物エストロゲン

- ・植物エストロゲンは2種類のエストロゲン受容体($ER\alpha$ と $ER\beta$)に結合し、 17β -エストラジオール(E_2)より弱い結合性を示し、 $ER\alpha$ より $ER\beta$ に強い結合親和性を示す
- ・植物エストロゲンはステロイドホルモンの代謝や作用、ERの構造、遺伝子の転写、酵素の産生などに影響を及ぼす

植物エストロゲンとガン、心臓病

- ・植物エストロゲンによるガン抑制の仮説：
DNAイソメラーゼの抑制、腫瘍起因性
血管形成抑制、ガン細胞系分化誘導抑
制、アポトーシス誘導抑制
- ・植物エストロゲンと低コレステロール血
症：胆汁酸の分泌増加、肝細胞による低
密度リポタンパク除去の増加、甲状腺機
能向上（抗酸化剤としての役割）

植物エストロゲンと骨粗鬆症

- ・イソフラボンが多い食事は骨を保護する効果があるという仮説:

尿中Ca損失防止

骨芽細胞への有益な効果

骨吸収を抑制するカルシトニン分泌への影響

植物エストロゲン

- マメ科牧草に多い
 - アルファルファ--クメストロール
 - 赤クローバー--イソフラボン類
- 牛と羊の繁殖性に悪影響を及ぼす
 - 不妊(排卵率や受胎率の低下)
- 牛のCa代謝に及ぼす影響は不明
 - クメストロールのエストロゲン作用が強い

植物エストロゲンによる家畜への影響 (クローバー病)

- クローバ摂取羊の子宮頸管分泌液：
 - タンパク、酸溶解性糖タンパクが多く、アルカリフォスファターゼなどが少ない
- クローバ摂取羊の子宮頸管
 - エストロゲン作用がやや強い
- クローバとアルファルファを摂取した卵巣摘出羊：子宮頸管粘液量と子宮重量を増加させるような強いエストロゲン作用

北海道の酪農家 (アルファルファ栽培農家)



- 平均乳量:10,000kg
(泌乳牛:50頭、牧草地30ha)

北海道の放牧農家 (メドウフェスク・白クローバ栽培)



植物エストロゲンの影響

核内受容体を介した情報伝達(マイナス面だけでなく、プラス面も期待される)

1. 性ホルモン(エストロゲン、アンドロゲン)受容体への影響
2. 活性型ビタミンD ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)受容体への影響

骨代謝

骨組織:カルシウムの貯蔵器官としての役割



1. 骨形成細胞である骨芽細胞と骨吸収細胞である破骨細胞による調節
2. 骨芽細胞の分化に関与する転写因子や破骨細胞の分化に関与するサイトカインなどが認められている

血中Ca濃度の調節因子

1. 副甲状腺ホルモン(PTH)
2. 活性型ビタミンD ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)
3. カルシトニン(CT)
4. その他の因子(成長ホルモン、エストロゲン、アンドロゲン、副腎皮質ホルモン、甲状腺ホルモンなど)

骨吸収とエストロゲン（閉経後）

エストロゲン受容体：骨芽細胞と破骨細胞



卵巣機能低下によるエストロゲン不足



骨吸収が骨形成より優位となり、負のCa代謝（骨吸収サイトカインの産生過剰）

P T Hの生理作用（副甲状腺）

血中Ca ↑、血中Pi ↓

尿中P排泄 ↑

腎尿細管からのCa吸収 ↑（尿中Ca ↓）

破骨細胞と骨芽細胞数 ↑、骨吸収 ↑

腎の活性型ビタミンD生成 ↑

Caの消化管からの吸収 ↑

標的組織のCaの細胞内移行 ↑

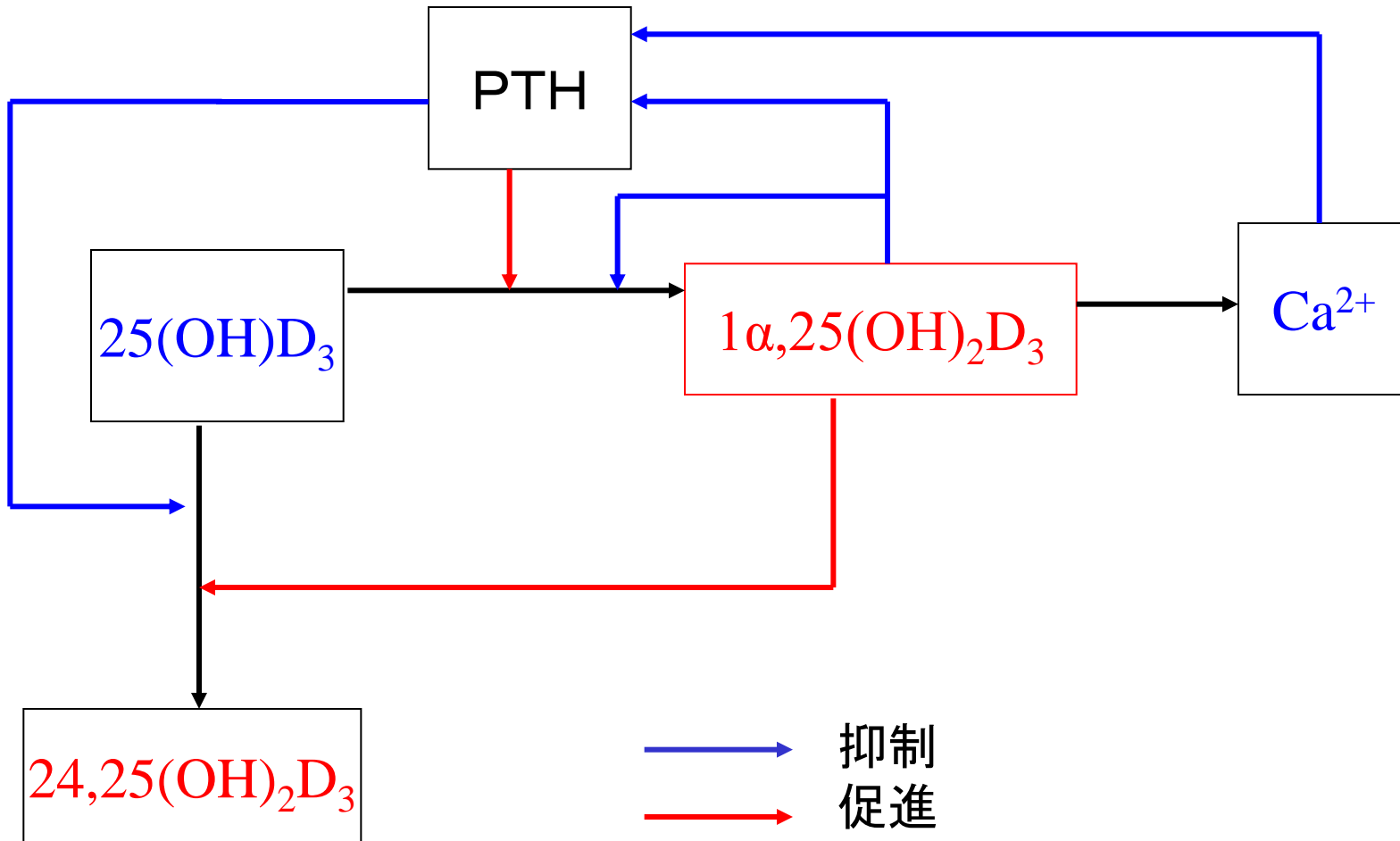
ビタミンD受容体の機能

標的組織	生理作用
皮膚	増殖抑制・分化誘導
腎臓	ビタミンD代謝調節・Ca 再吸収促進
小腸	Ca吸収促進
副甲状腺	副甲状腺ホルモン産生制御
骨	破骨細胞分化誘導
免疫細胞	単球分化誘導

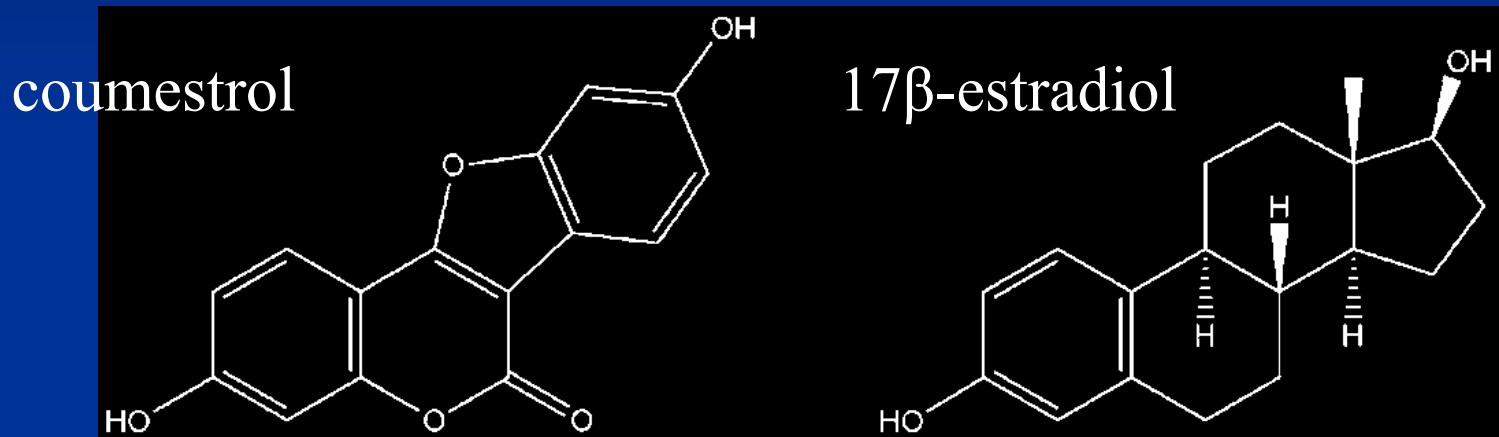
Vitamin D 受容体 (VDR)

- 1,25-(OH)₂ビタミンD₃をリガンドとする核内受容体の一つ
- RXR (レチノイドX受容体)とヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子のDRへ結合→遺伝子発現調節
- 標的遺伝子→Ca代謝、骨形成調節に関連する遺伝子

活性型ビタミンD合成の調節



植物エストロゲン（クメステロール）



- 構造的、機能的に内因性のエストロゲンに類似
- マメ科植物に豊富（食物中、家畜の飼料中にも存在）
- エストロゲンレセプター（ER）への相互作用が強い
- 生殖機能への影響
- 骨への影響（破骨細胞分化抑制、骨吸収抑制、骨石灰化の増加）

大豆等のイソフラボン含量

- 大豆(未加工)のイソフラボン含量は乾物あたり1.2-4.2 mg/g、大豆粉などの高タンパク質大豆製品では1.1-1.4mg/g:豆腐などの加工処理によって処理前の6-20%にまで低下
- クローバーとアルファルファ(新芽)のクメステロール含量:乾物あたり5.6mgと0.7mg/g:大豆粉などのクメステロール含量は15-80 μ g/gと低い値

大豆イソフラボンの許容量

- 厚生労働省による大豆イソフラボンの摂取許容量(2006)は $30 \text{ mg/日} = 458\text{--}570 \text{ }\mu\text{g/kg体重/日}$ (日本人)



- クメステロール($200 \text{ }\mu\text{g/kg/day}$)を妊娠ICRマウスに交配後6.5日から16.5日まで連日強制経口投与($200 \text{ }\mu\text{g/kg体重/日}$ は許容量の1/2以下)

目的

妊娠マウス（交配後6.5～16.5日）への
クメステロール投与が、母体のVDR、ALP
を中心としたカルシウム代謝に及ぼす影
響を明らかにする。

* 妊娠マウスのカルシウム代謝 *

- 小腸でのカルシウム吸収増加
- 腎臓でのカルシウムは移出増加
- 骨吸収増加

妊娠期、泌乳期のカルシウム代謝

	<i>Pregnancy</i>	<i>lactation</i>
エストロゲン	<i>high</i> ↑	<i>low</i> ↓
腸管吸収	<i>high</i> ↑	<i>high</i> ↑
腎再吸収	→	<i>high</i> ↑
骨吸収	→	<i>high</i> ↑
骨形成	→	→
Bone turnover	→	<i>high</i> ↑

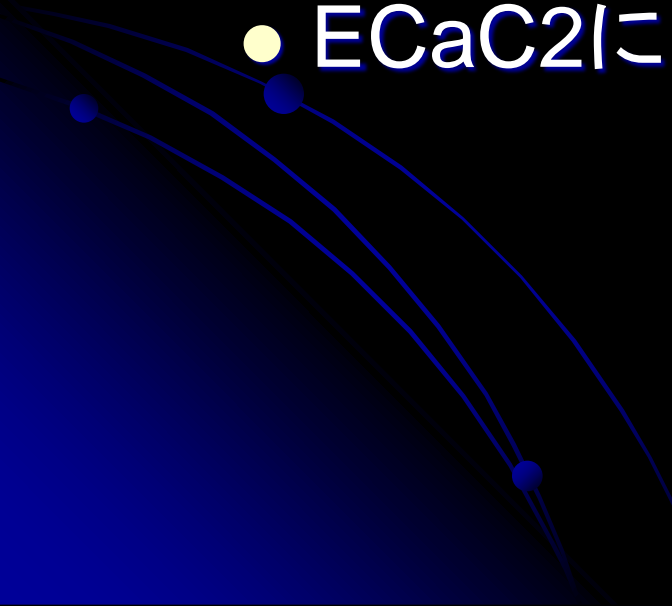


fetus

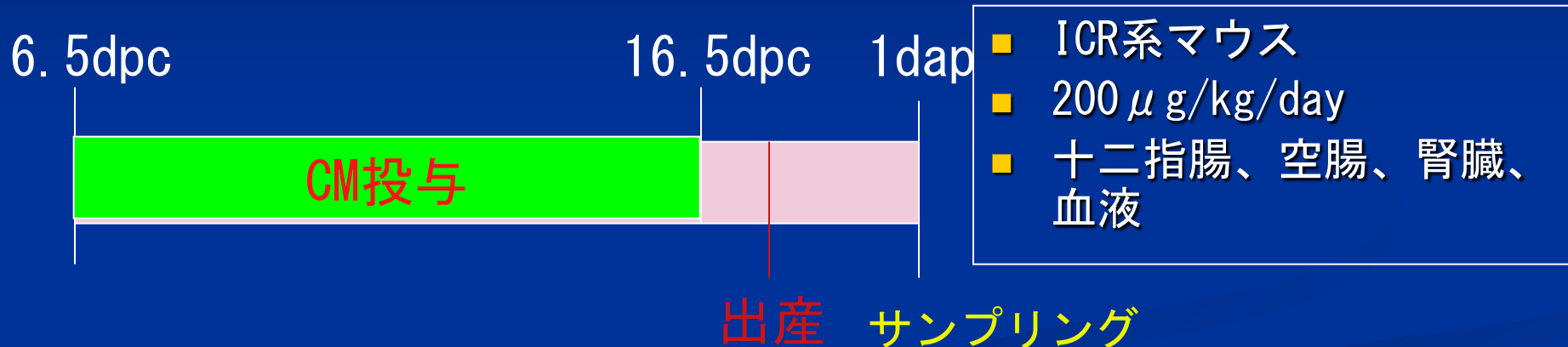


milk

上皮性カルシウムチャンネル (ECaC)とは

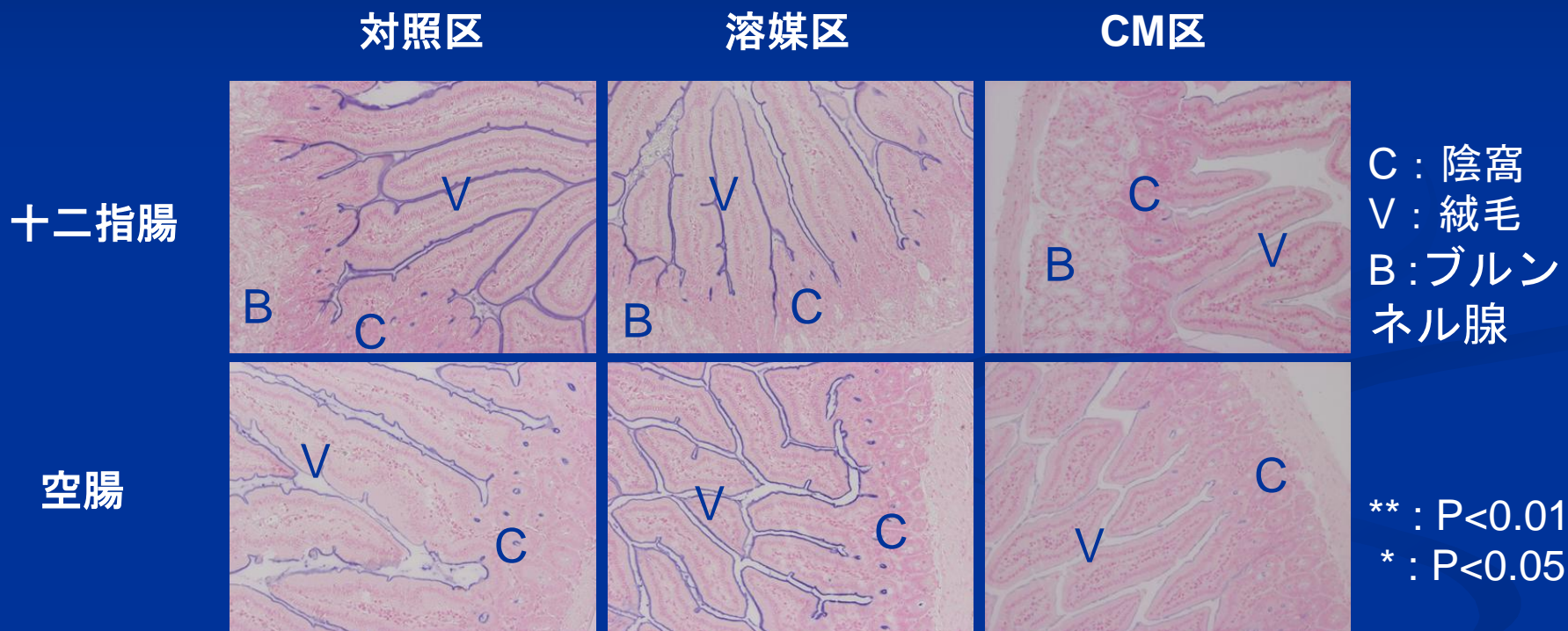
- 6番染色体に局在する15のエキソンから構成される
 - VDRを介してのカルシウム吸収調節作用
 - ECaC1(TRPV5)とECaC2(TRPV6)
 - ECaC2にはエストロゲン応答配列の存在
- 

材料と方法



- VDR - 酵素抗体染色、半定量的RT-PCR (十二指腸、空腸、腎臓)
- ALP - 酵素染色、半定量的RT-PCR (十二指腸、空腸)
- カルシウム輸送関連因子: calbindin D-9k、ECaC1, 2
 - 半定量的RT-PCR (十二指腸、空腸、腎臓)
- エストロゲン誘導遺伝子: c-fos、VEGF
 - 半定量的RT-PCR (十二指腸、空腸)
- 血清中カルシウムイオン (Ca)、無機リンイオン (P) 測定

アルカリファスファターゼ活性 (分娩前の十二指腸と空腸)



Organ	NC	VC	CM
Duodenum	0.60 ± 0.14	0.63 ± 0.22	$0.32 \pm 0.10^{**}$
Jejunum	0.94 ± 0.19	0.98 ± 0.20	$0.69 \pm 0.23^*$

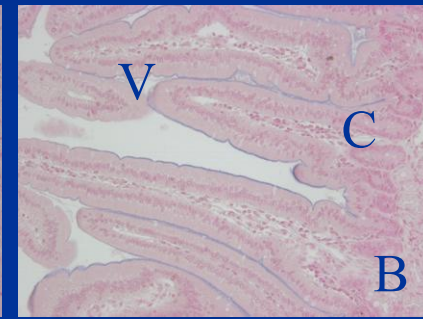
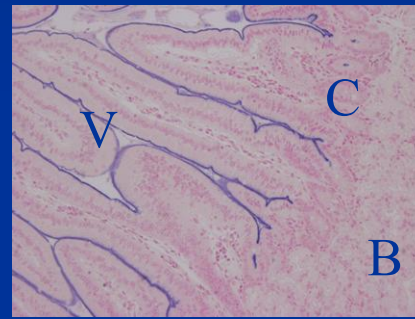
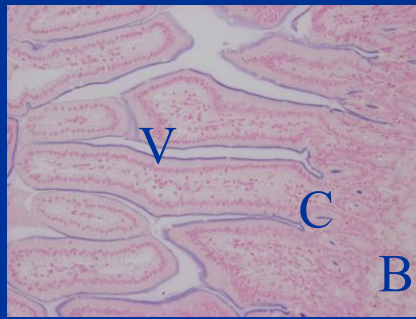
アルカリファスファターゼ活性 (分娩後の十二指腸と空腸)

NC

VC

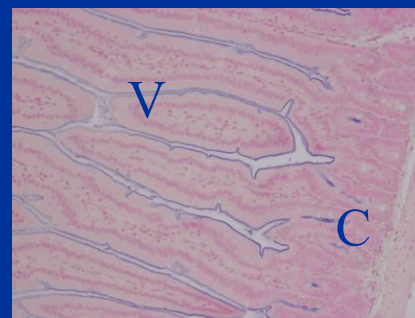
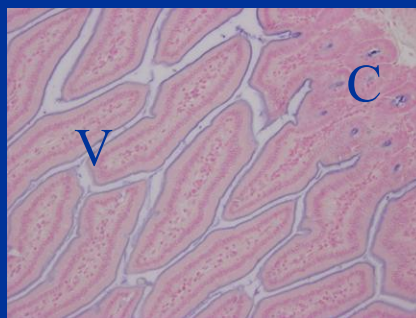
CM

Duodenum



C : 陰窩
V : 絨毛
B : ブルン
ネル腺

Jejunum



* : P<0.05

Organ	NC	VC	CM
Duodenum	0.62 ± 0.35	0.44 ± 0.14	0.25 ± 0.13*
Jejunum	1.74 ± 0.61	2.51 ± 1.19	1.91 ± 0.98

エストロゲン誘導遺伝子、ER (分娩前の十二指腸、空腸)

Organ	Genes	NC	VC	CM
Duodenum	<i>c-fos</i>	0.75 ± 0.14	0.68 ± 0.17	0.40 ± 0.12**
	<i>VEGF</i>	0.41 ± 0.09	0.34 ± 0.07	0.22 ± 0.04**
	<i>ERα</i>	0.33 ± 0.07	0.33 ± 0.11	0.27 ± 0.06
Jejunum	<i>c-fos</i>	0.64 ± 0.29	0.61 ± 0.21	0.39 ± 0.11*
	<i>VEGF</i>	0.61 ± 0.20	0.64 ± 0.22	0.30 ± 0.09*
	<i>ERα</i>	0.38 ± 0.15	0.34 ± 0.11	0.29 ± 0.07

** : P<0.01

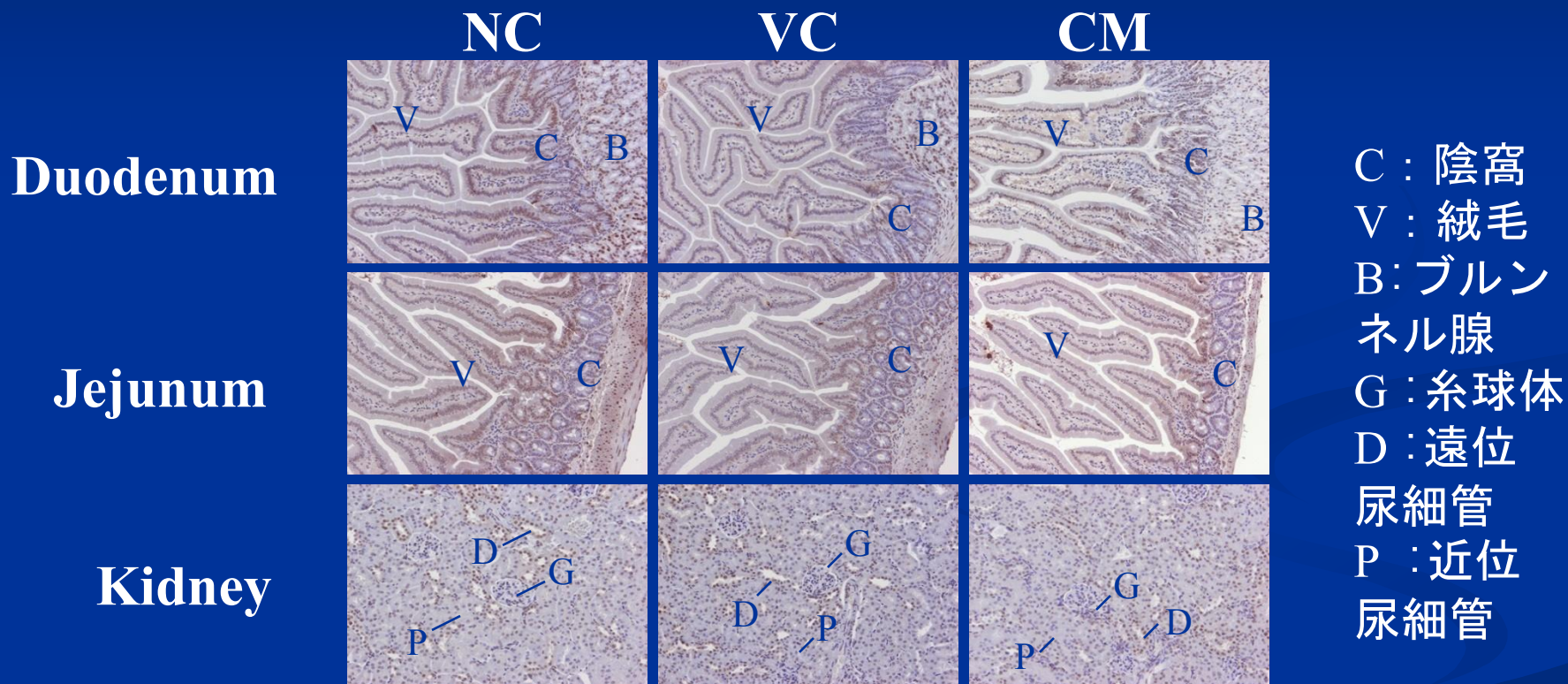
* : P<0.05

エストロゲン誘導遺伝子、ER (分娩後の十二指腸と空腸)

Organ	Genes	NC	VC	CM
Duodenum	<i>c-fos</i>	1.23 ± 0.59	0.88 ± 0.25	0.59 ± 0.15*
	<i>VEGF</i>	0.87 ± 0.50	0.72 ± 0.17	0.44 ± 0.15*
	<i>ERα</i>	0.49 ± 0.39	0.47 ± 0.12	0.31 ± 0.13
Jejunum	<i>c-fos</i>	0.87 ± 0.26	1.12 ± 0.50	0.70 ± 0.31
	<i>VEGF</i>	1.73 ± 0.31	2.22 ± 1.32	1.50 ± 0.71
	<i>ERα</i>	2.52 ± 1.31	2.21 ± 1.89	1.69 ± 0.61

* : P<0.05

VDR (分娩前の十二指腸、空腸、腎臓)



Organ	NC	VC	CM
Duodenum	0.73 ± 0.15	0.69 ± 0.12	0.68 ± 0.17
Jejunum	1.22 ± 0.17	1.34 ± 0.73	1.10 ± 0.19
Kidney	0.52 ± 0.19	0.54 ± 0.18	0.55 ± 0.08

アルカリファスファターゼ活性低下の作用機序 (分娩後：十二指腸、分娩前：十二指腸と空腸)

クメステロール

エストロゲン誘導遺伝子

c-fos
VEGF

ALP

活性

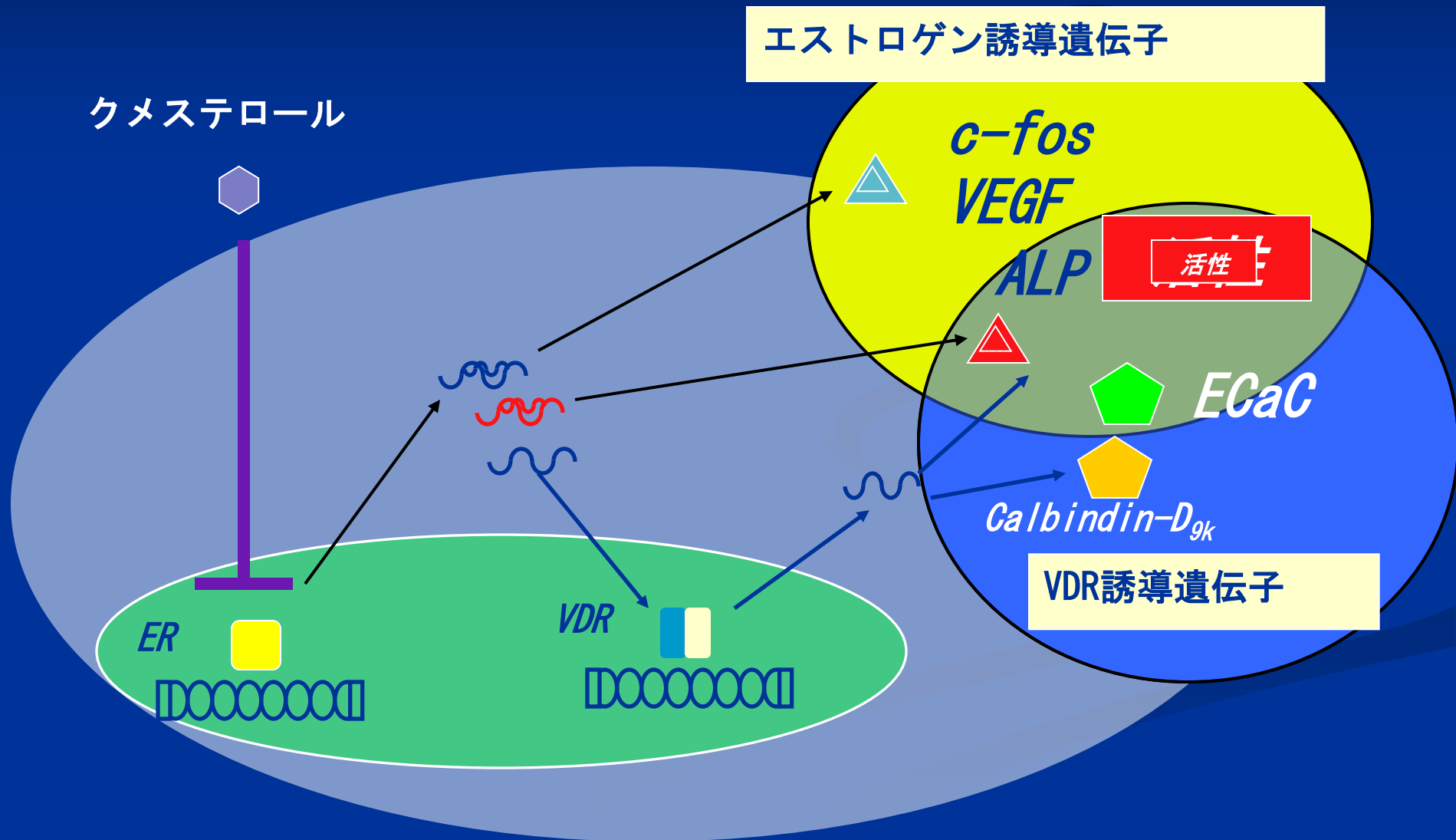
ECaC

Calbindin-D_{9k}

VDR誘導遺伝子

ER

VDR



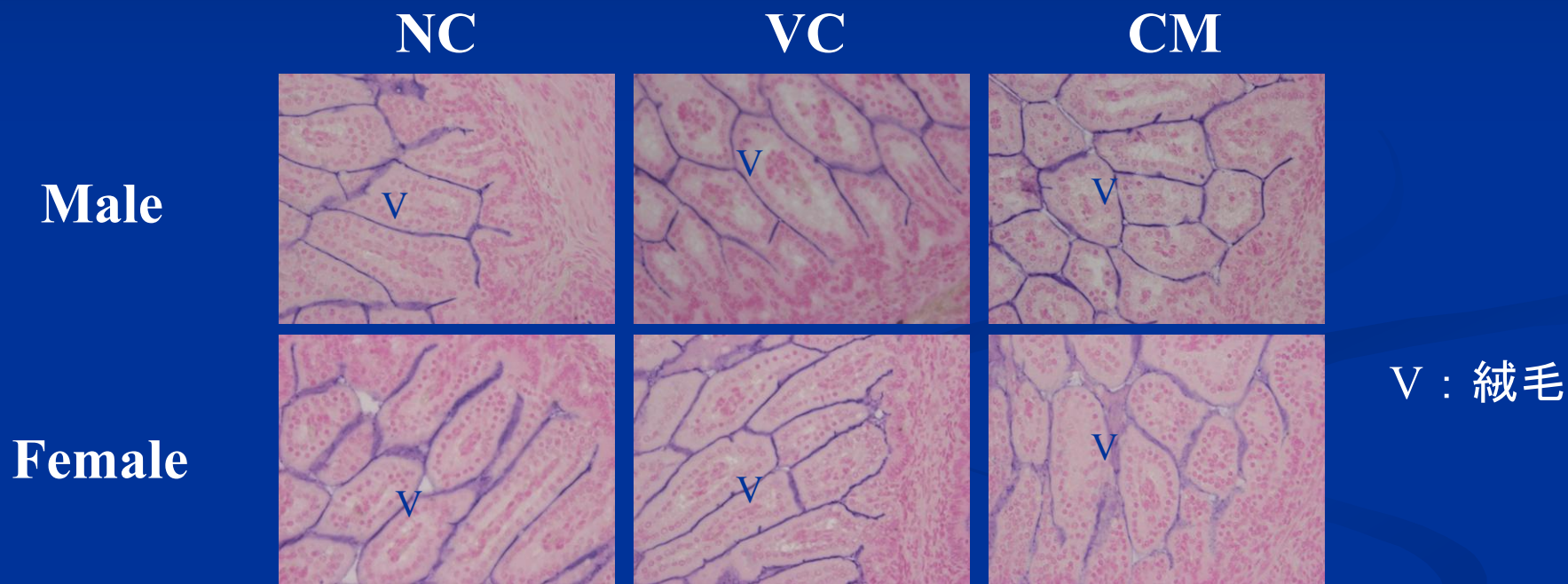
胎児および新生児への影響

1. 胎児および新生児は器官の発達が未熟であり、エストロゲン化合物への感受性が高い
2. 妊娠期には胎盤を通過して胎児に移行する
3. 泌乳期には乳汁を介して新生児に移行する



妊娠期および泌乳期母体の植物エストロゲン曝露
がその児に影響を及ぼす可能性が考えられる

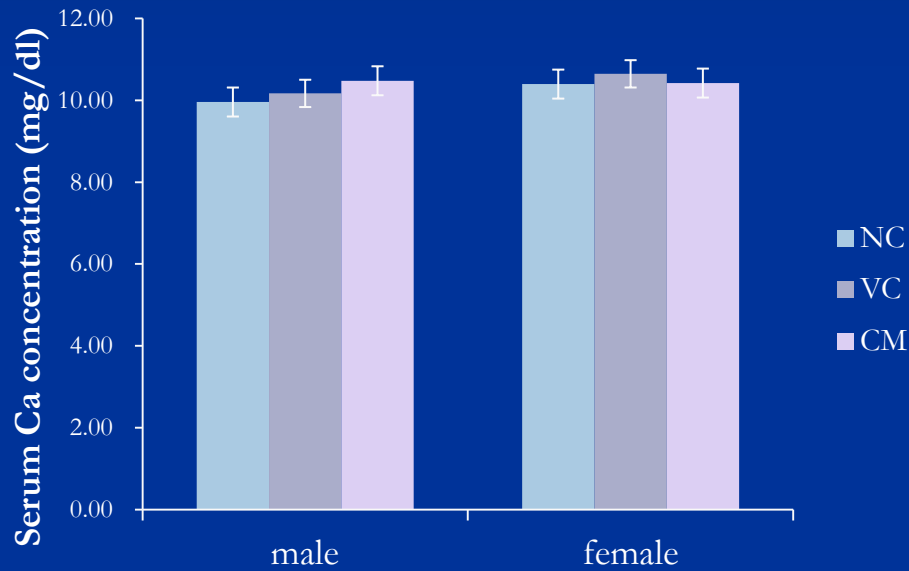
アルカリフォスファターゼ活性 (雌雄胎仔 小腸)



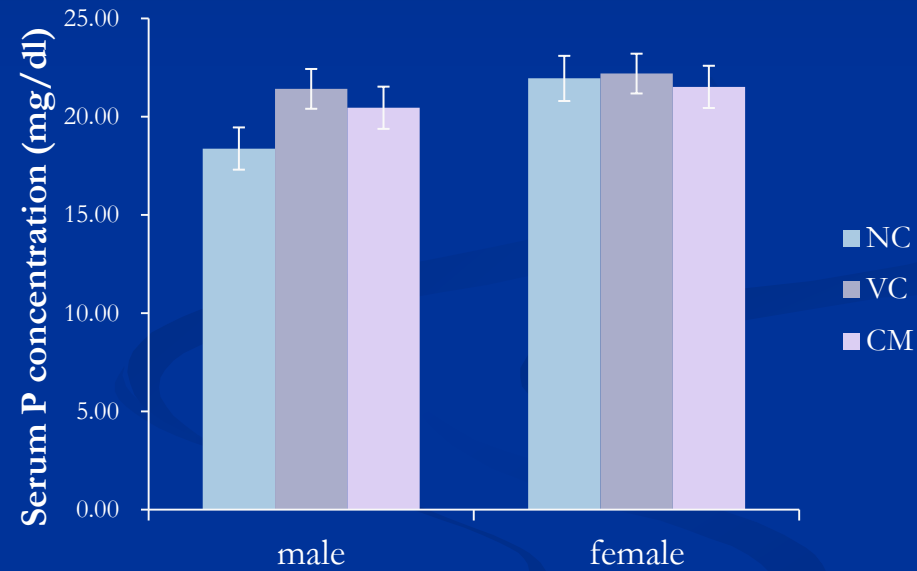
Organ	NC	VC	CM
Male	0.53 ± 0.06	0.45 ± 0.17	0.48 ± 0.16
Female	1.62 ± 0.82	1.12 ± 0.14	0.97 ± 0.23

血清生化學的解析(新生仔)

血清中Ca濃度



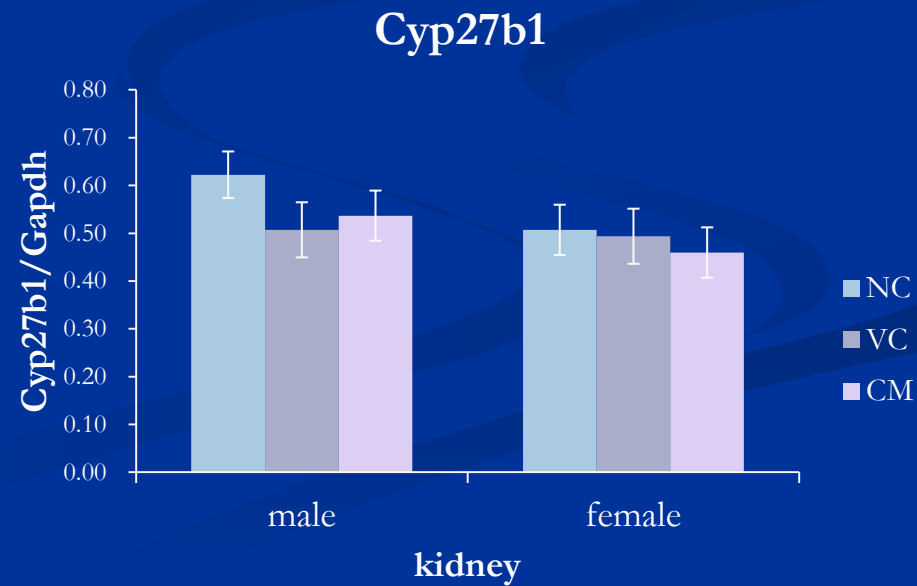
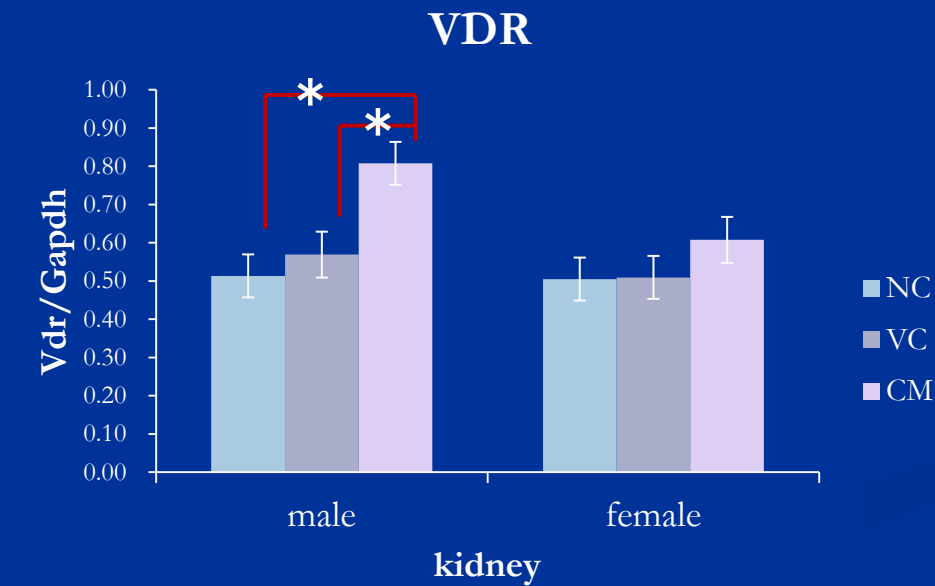
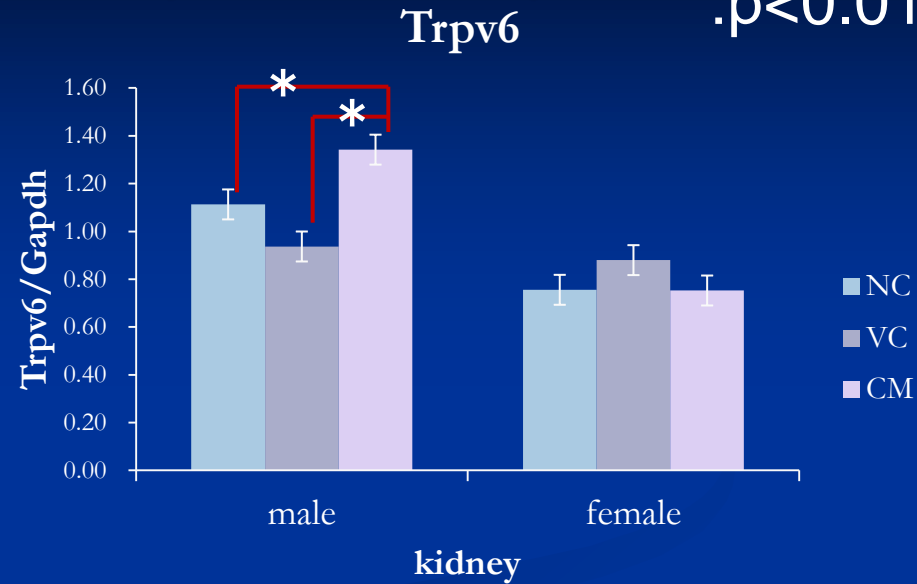
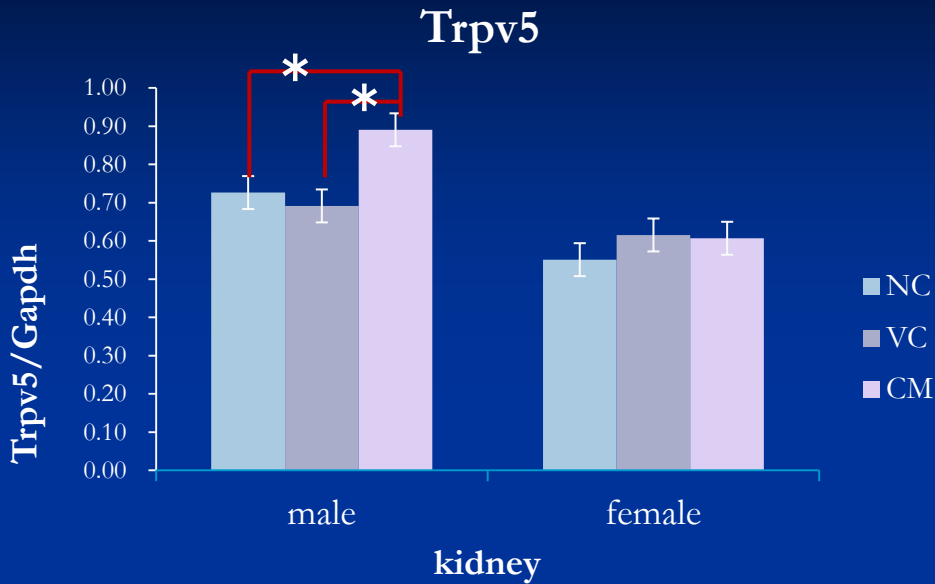
血清中P濃度



分子生物学的解析(新生仔)

*: $p < 0.05$

** : $p < 0.01$



考察～新生仔～

- 分子生物学的解析-雄においてのみ、カルシウム輸送関連因子のmRNA発現量に変化が見られた



妊娠期および泌乳期母体へのクメステロール投与がその新生仔のカルシウム代謝に性特異的な影響を及ぼす可能性が示唆された

材料

- ICR系妊娠マウス4群

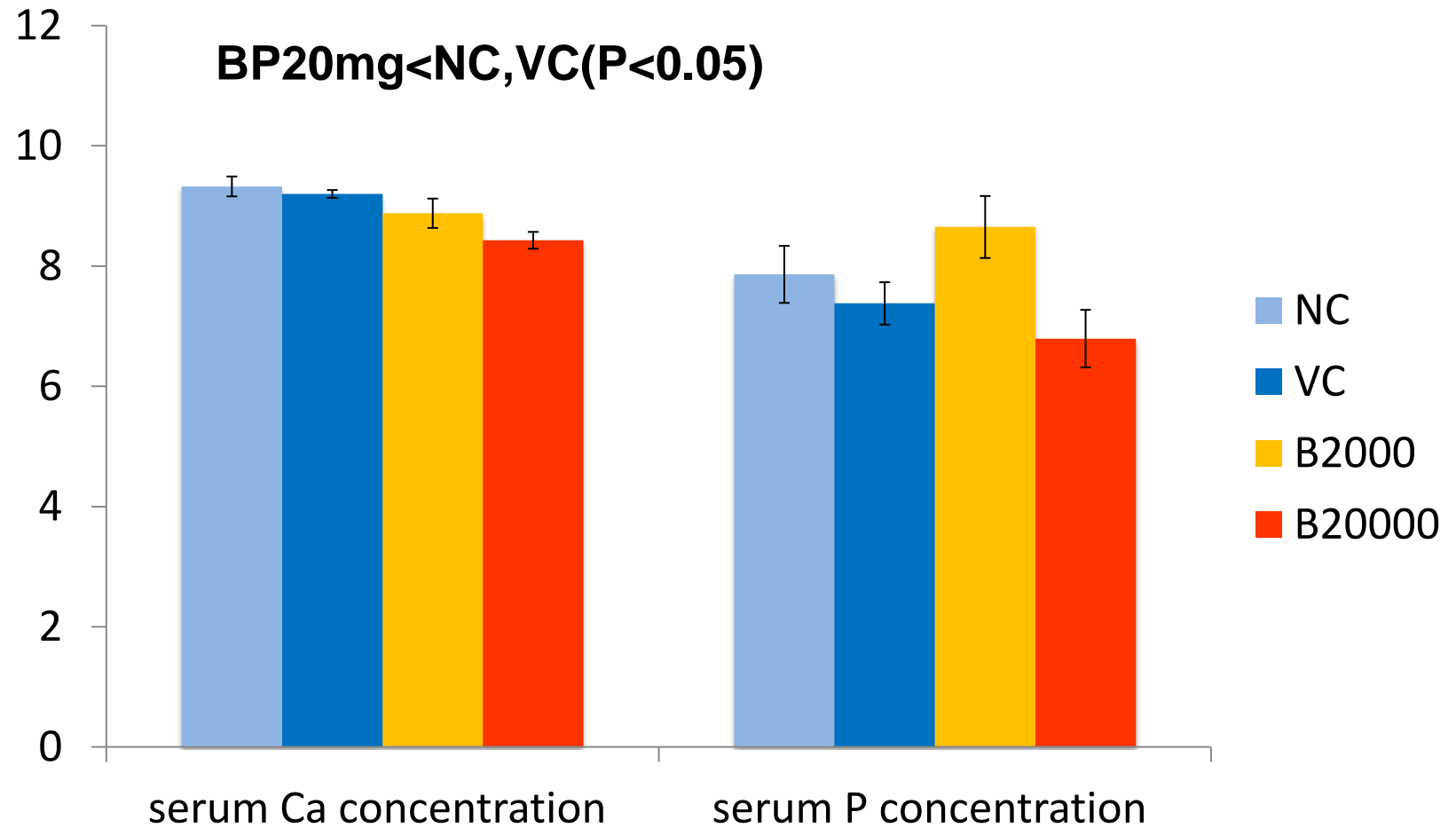


- ✓ Normal Control (NC)群: 無処理
 - ✓ Vehicle Control (VC)群: 溶媒(Ethanol + olive oil)投与
 - ✓ BPA-20 μ g 群: BPA 20 μ g/kg/BW/day(1.75×10^{-5} mol/l)投与
 - ✓ BPA-200 μ g 群: BPA 200 μ g/kg/BW/day(1.75×10^{-4} mol/l)投与
投与量: 体重1kg当たり5ml相当
- BPA-20mg 群とBPA-200mg 群

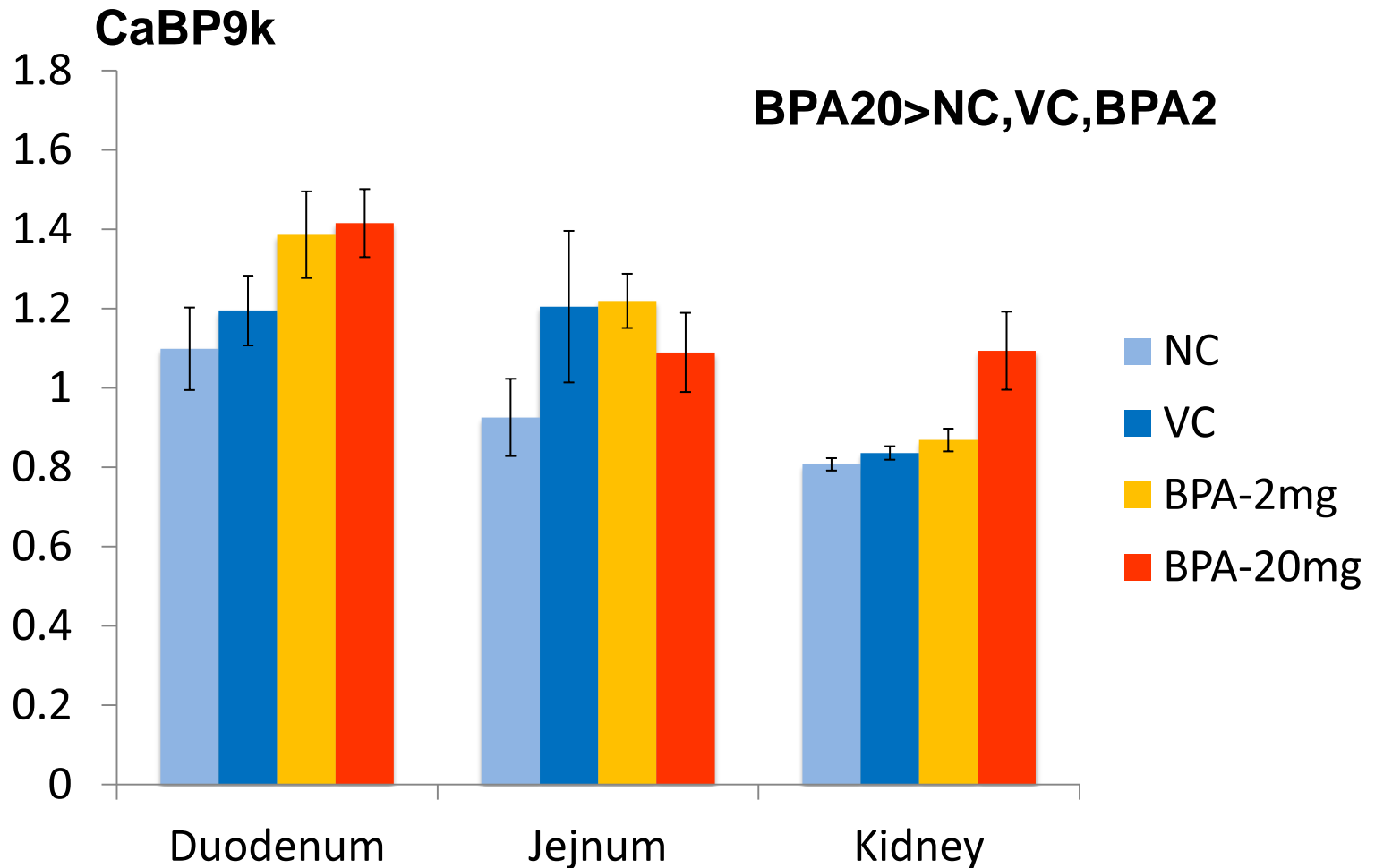
- 採取組織・解析

- ✓ 十二指腸 近位空腸 腎臓 肝臓 大腿骨 血清
- | | | |
|-------------|--------------|--------------|
| 酵素抗体染色(VDR) | 乾燥重量 / 解剖時体重 | カルシウム・無機リン濃度 |
| 半定量的RT-PCR | | |


マウスの血清Ca・Pi(mg/dl)



分子生物学的解析 (經細胞輸送関連)



BPA-20mg投与とCa恒常性

- 血清カルシウム濃度の低下
 - 腎ではCaBP-D9k、CYP27B1発現が増加—
血清カルシウム濃度低下によりCYP27B1の
発現が誘導され、CaBP-D9kの発現が誘導
 - 小腸ではIAP, VDRなどの変化なし
 - 小腸のオクルテイン、JAM-Aの上昇
- 
- 血清Ca濃度低下はBPAがタイト結合の透過性
(傍細胞輸送)を低下させ、Ca吸収を阻害したこ
とが一因

発表論文

- **Kirihata Y, Horiguchi Y, Ueda M, et al** (2011) Effects of coumestrol administration to pregnant and lactating mice on intestinal alkaline phosphatase activity. *Phytotherapy Research* 25:654-658.
- **Otsuka H et al.** (2012) Effects of bisphenol A administration to pregnant mice on serum Ca and intestinal Ca absorption. *Anim. Sci. J.* 83:232-237.
- **Ueda M et al.** (2012) *Anim. Sci. J.* 83:469-473