

環境ホルモンと植物エストロゲン

【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

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。

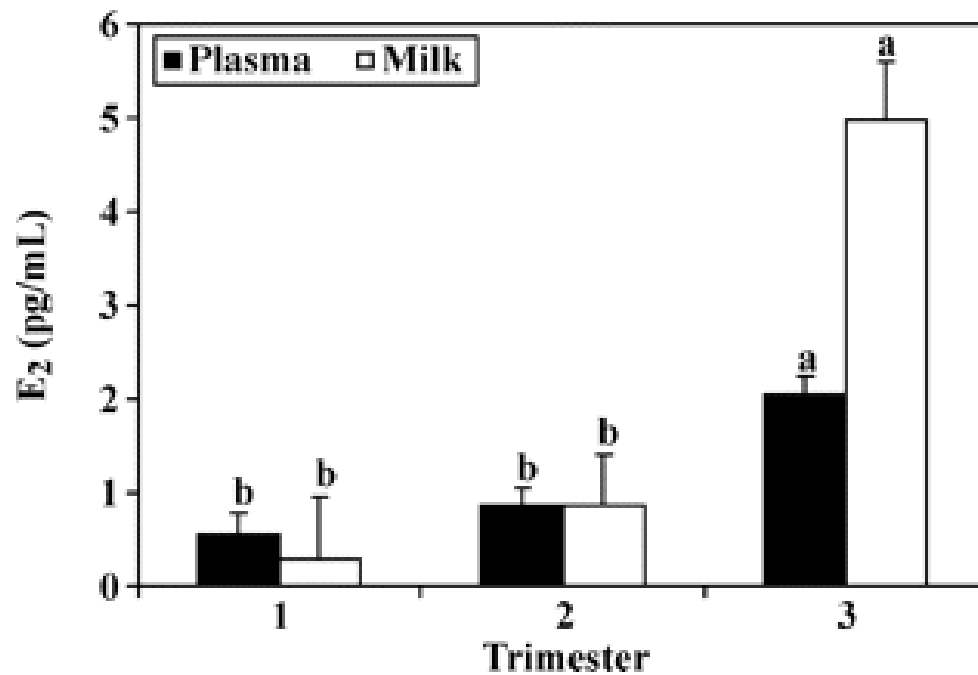
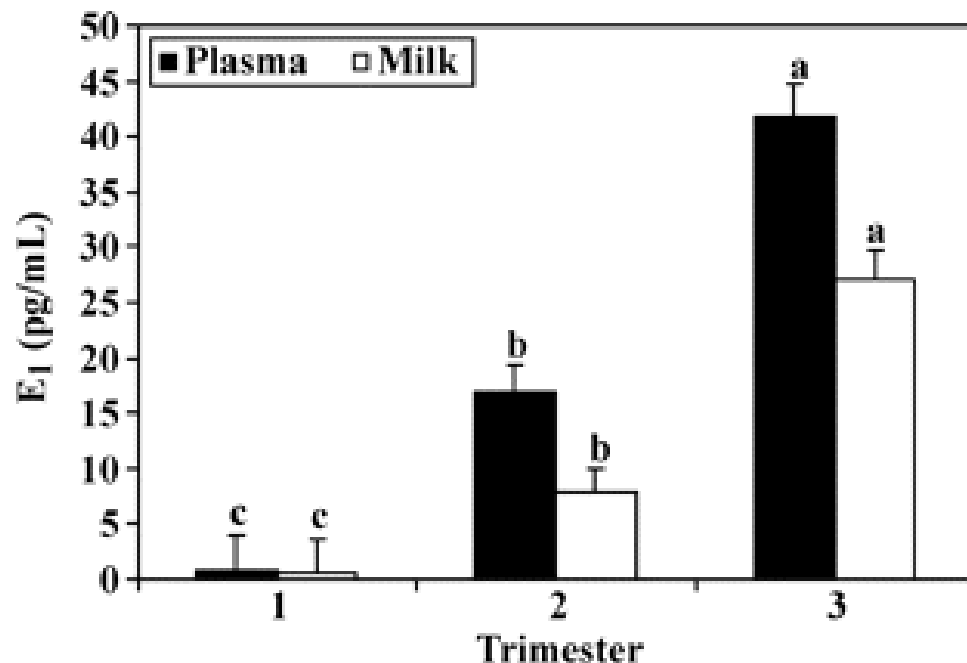


牛乳摂取による外因的な硫酸エストロンへの
曝露が生体に悪影響をもたらす可能性

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

- 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)とエストラジオール(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。

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いわれている
- 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

- ・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）

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

北海道の酪農家：マメ科牧草利用 (放牧とアルファルファ)



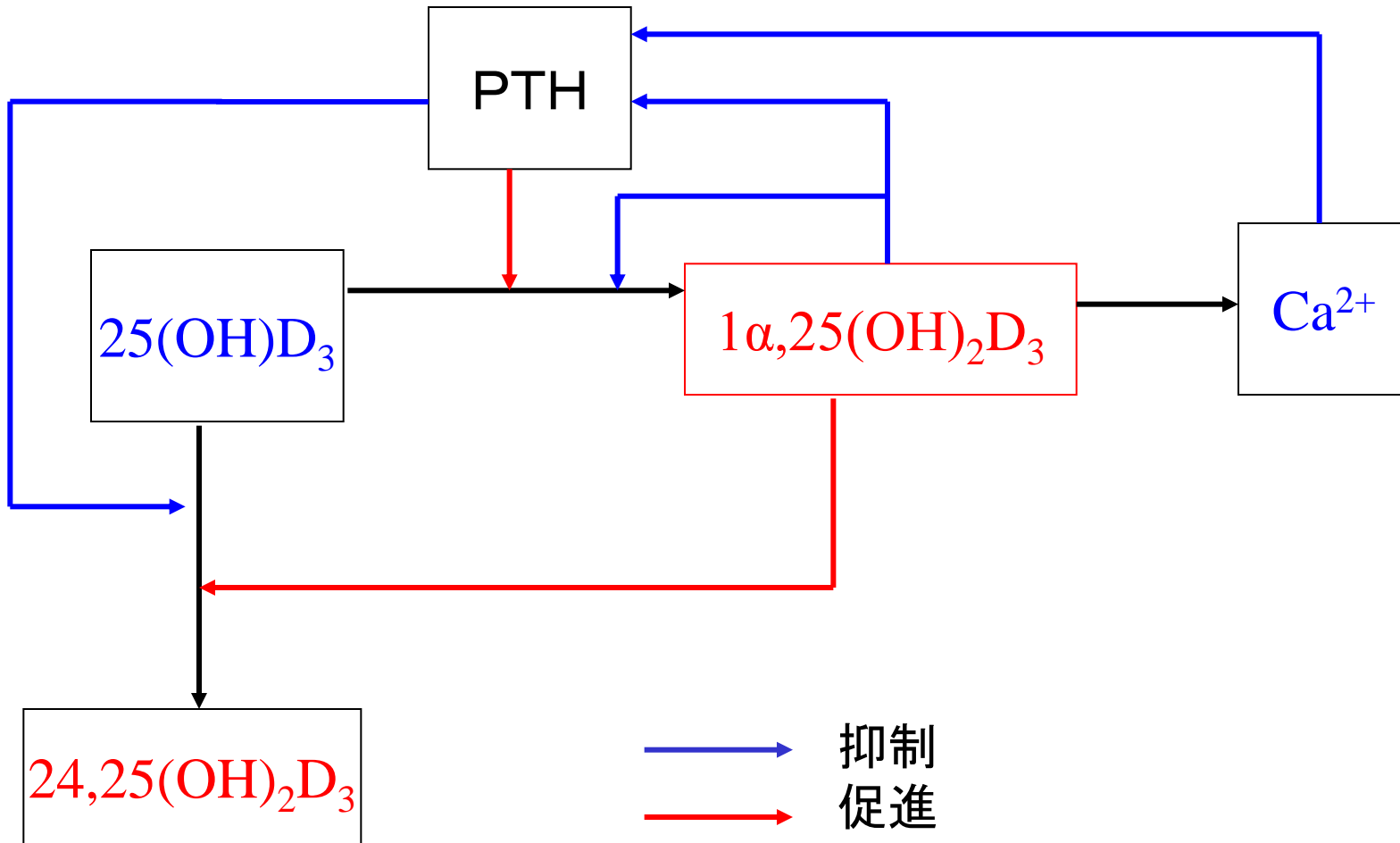
ビタミンD受容体の機能

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

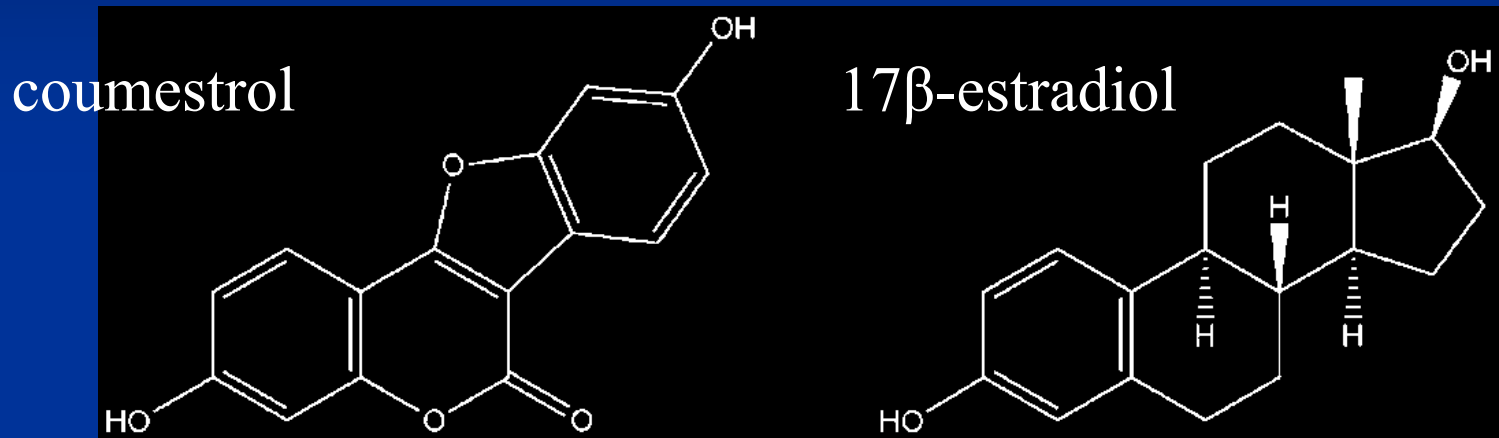
Vitamin D 受容体 (VDR)

- 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

材料と方法

6. 5dpc

16. 5dpc

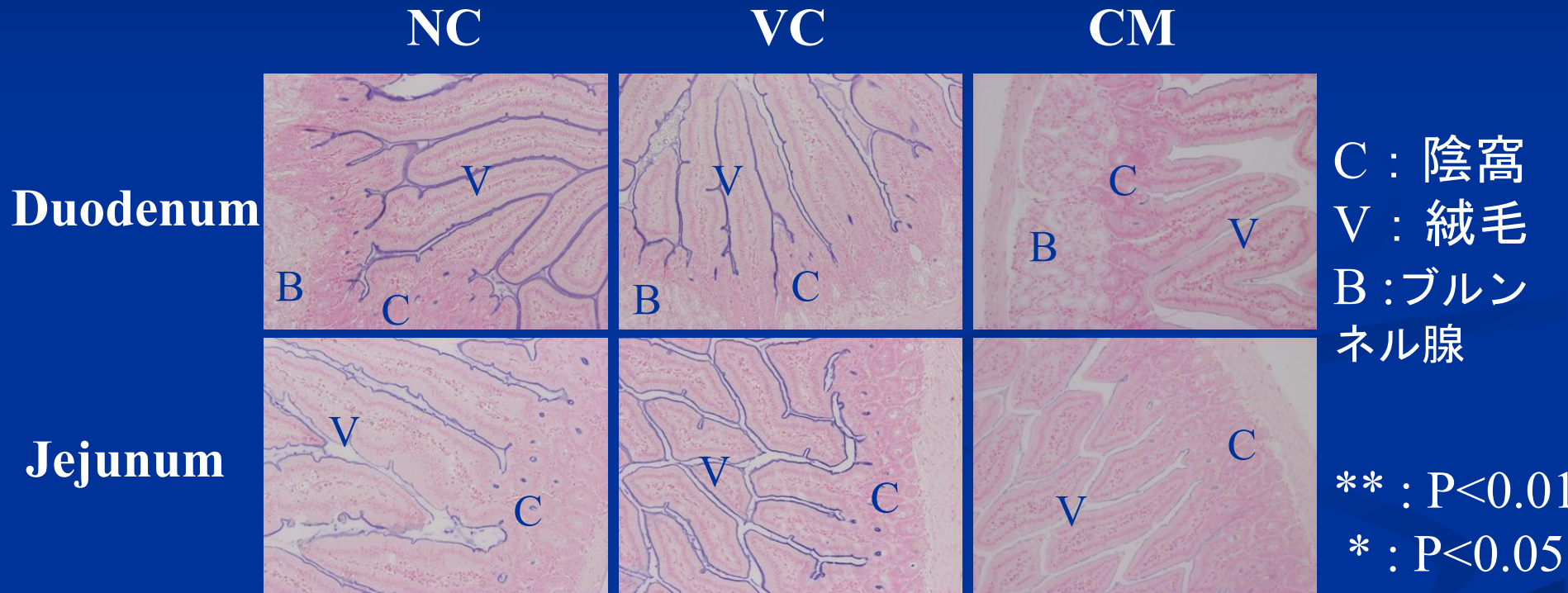
1dap

CM投与

出産 サンプルング

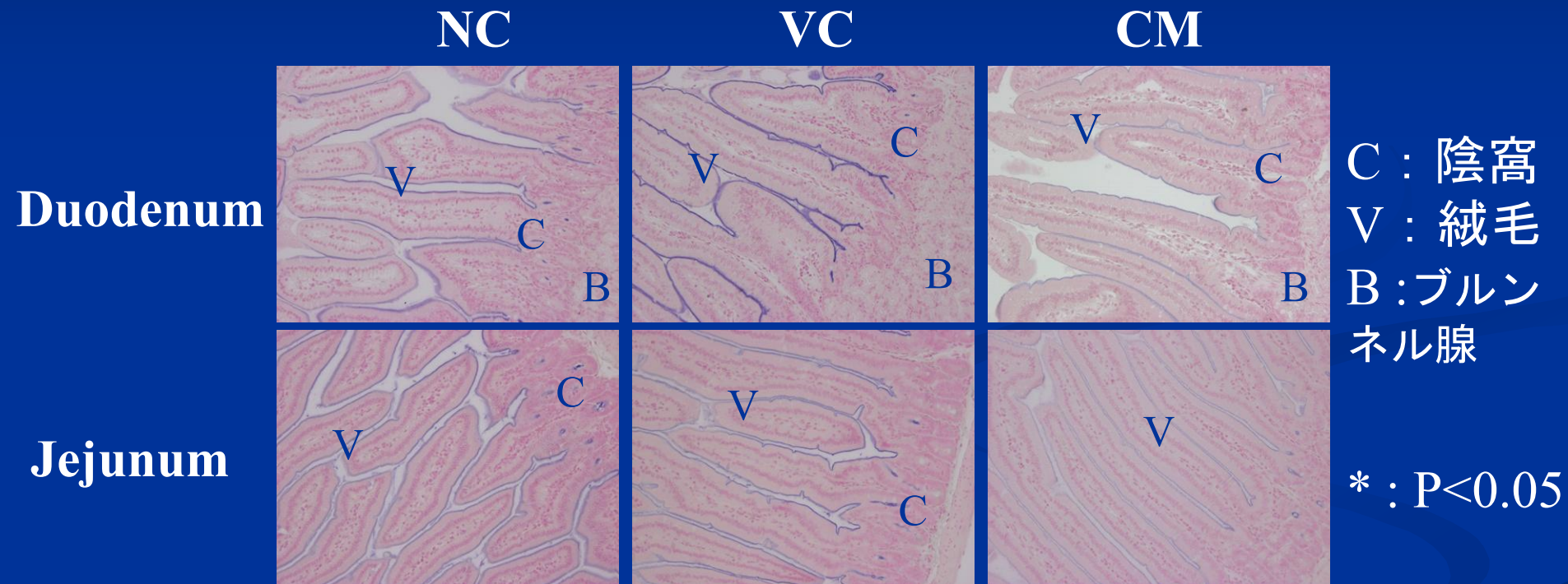
- ICR系マウス
 - 200 μ g/kg/day
 - 十二指腸、空腸、腎臓、血液
- VDR – 酵素抗体染色、半定量的RT-PCR (十二指腸、空腸、腎臓)
 - ALP – 酵素染色、半定量的RT-PCR (十二指腸、空腸)
 - カルシウム輸送関連因子 : calbindin D-9k、ECaC1, 2
 - 半定量的RT-PCR (十二指腸、空腸、腎臓)
 - エストロゲン誘導遺伝子 : c-fos、VEGF
 - 半定量的RT-PCR (十二指腸、空腸)
 - 血清中カルシウムイオン (Ca)、無機リンイオン (P) 測定

IALP (17.5 dpc 十二指腸、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	$0.69 \pm 0.23^{*}$

IALP (1 dap十二指腸、空腸)



* : $P < 0.05$

Organ	NC	VC	CM
Duodenum	0.62 ± 0.35	0.44 ± 0.14	$0.25 \pm 0.13^*$
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 (17.5 dpc十二指腸、空腸)

Organ	Genes	NC	VC	CM
Duodenum	<i>c-fos</i>	0.75 ± 0.14	0.68 ± 0.17	$0.40 \pm 0.12^{**}$
	<i>VEGF</i>	0.41 ± 0.09	0.34 ± 0.07	$0.22 \pm 0.04^{**}$
	<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	$0.39 \pm 0.11^{*}$
	<i>VEGF</i>	0.61 ± 0.20	0.64 ± 0.22	$0.30 \pm 0.09^{*}$
	<i>ERα</i>	0.38 ± 0.15	0.34 ± 0.11	0.29 ± 0.07

** : P<0.01

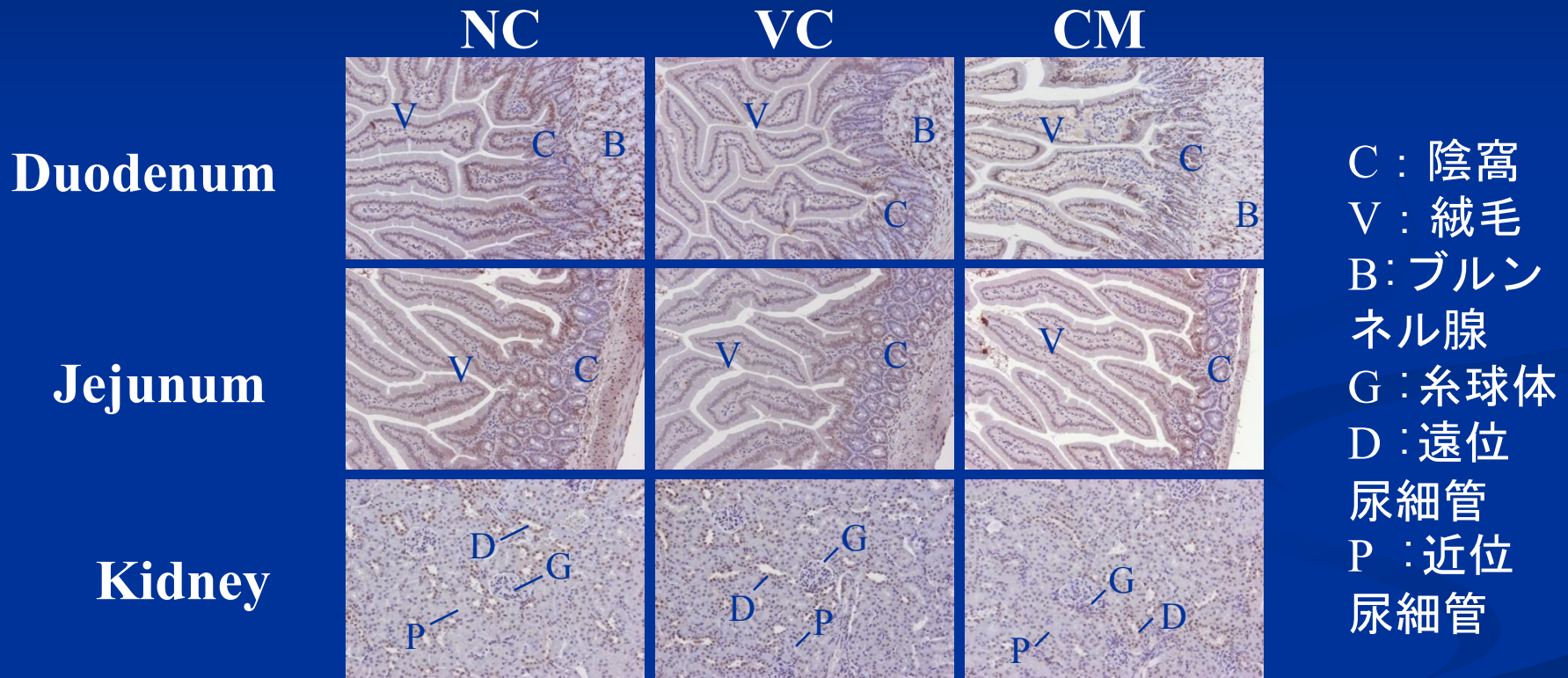
* : P<0.05

エストロゲン誘導遺伝子、ER (1 dap 十二指腸、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

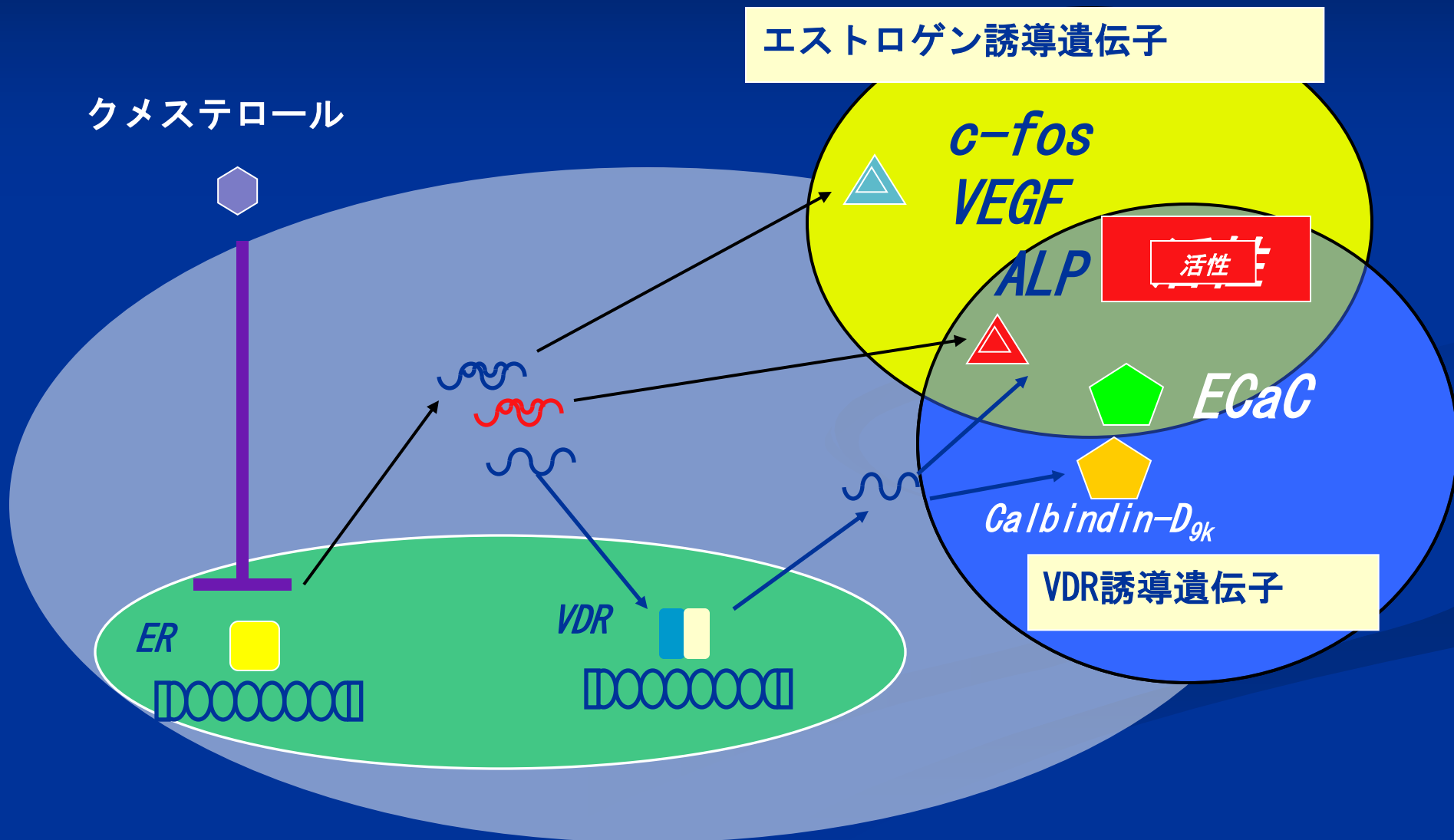
* : P<0.05

VDR (17.5 dpc 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)



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

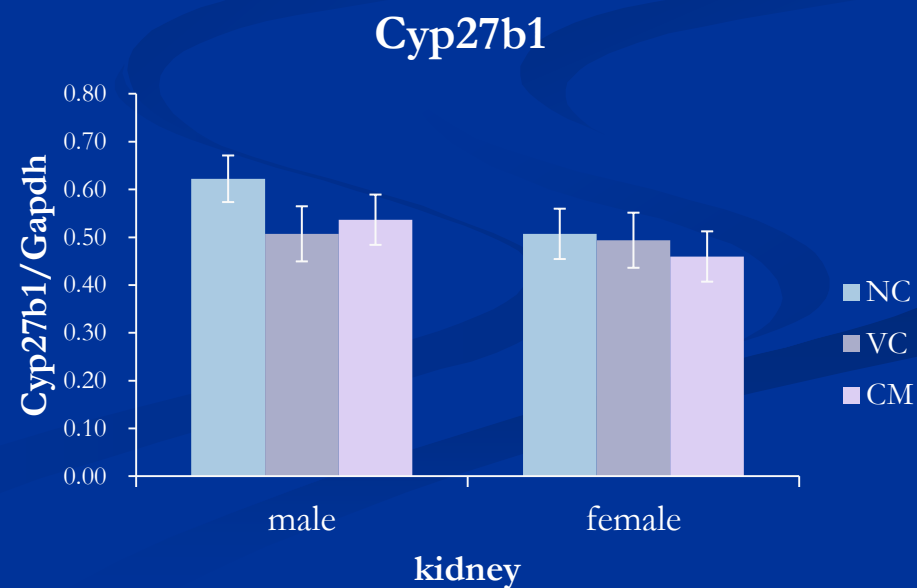
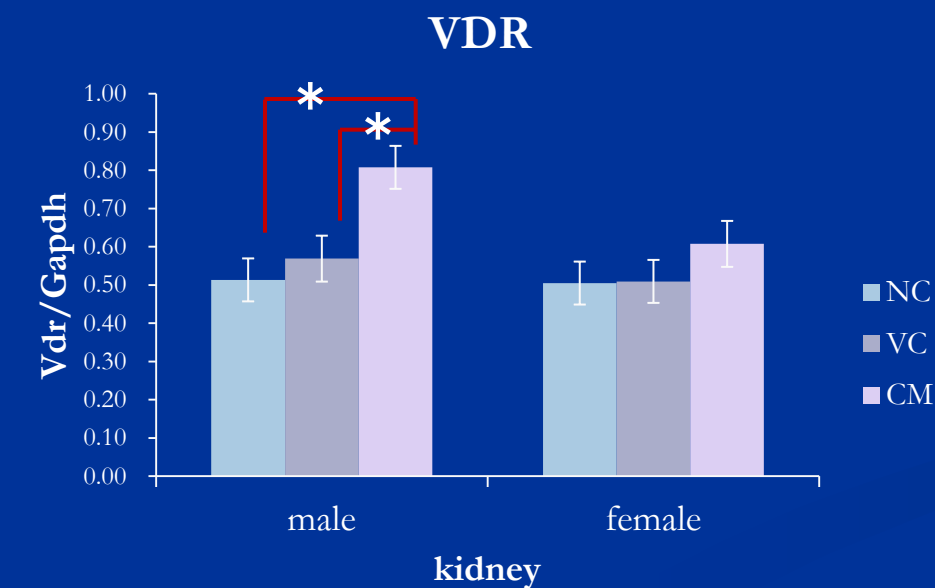
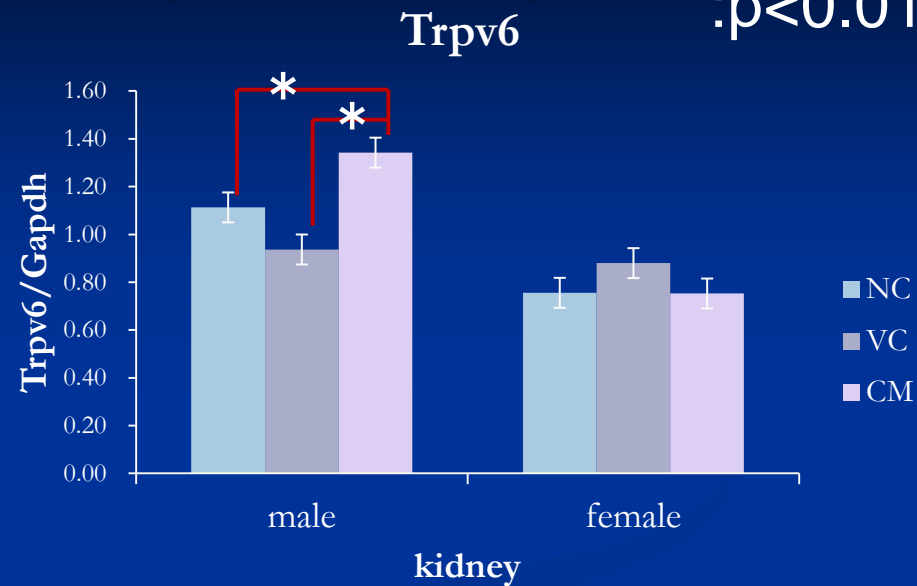
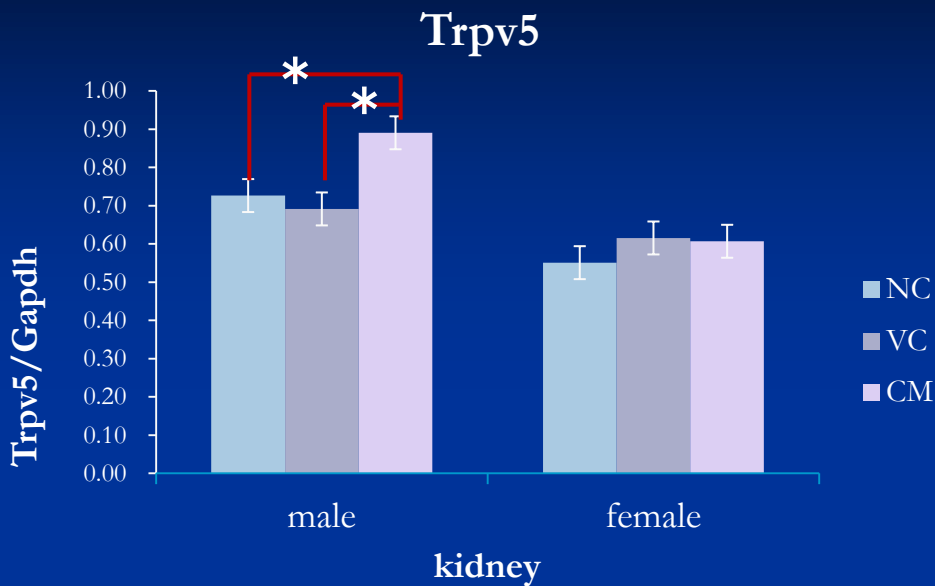


妊娠期および泌乳期母体の植物エストロゲン曝露
がその児に影響を及ぼす可能性が考えられる

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

環境ホルモンとは

環境ホルモン: 外因性内分泌攪乱物質(環境庁、1998年)

「環境中にある本来のホルモンの働きを攪乱する物質」で、極微量で生物学的作用を示す



- ・ダイオキシン、ポリ塩化ビフェニール類など、約70種類が疑われている(2000年11月:わが国で使用禁止の殺虫剤や農薬も多い)
- ・ホルモン用作用(アゴニスト)とホルモン拮抗作用(アンタゴニスト)があり、動物の生殖系を乱す

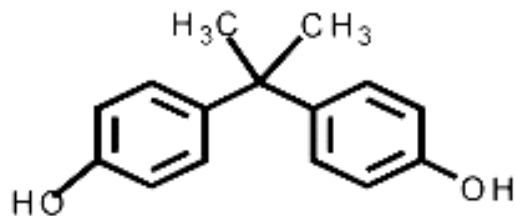
環境ホルモンの特徴

- 化学構造では、ベンゼン環のあることが多い
 : 性ホルモンの類似している
- 分子量が小さく(300以下)、構造が単純
- ベンゼン環があるため、水に溶けにくく、脂溶性のものが多い
- 生分解性(酵素による分解)が低いため、生体内で分解されにくく、形態が維持される

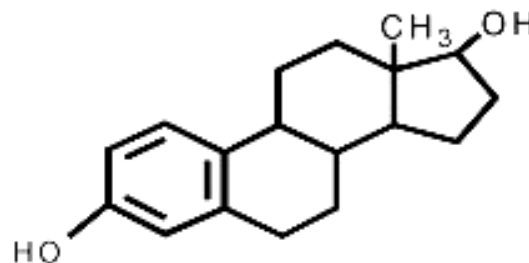
環境ホルモンの作用

- 食物と一緒に摂取されると消化管の粘膜を通過し、血管に入る
- 空気中から肺に入ると、肺の毛細血管に入る
- 肝臓で化学処理されなければ、タンパク質と結合して血流にのって循環し、生体内に入る
- 細胞内の受容体に結合し、ホルモン用作用を示す

Bisphenol A (BPA)とは



bisphenol A



17β estradiol

-
- 歯科用充填剤、輸入ほ乳瓶などに使用
 - 外因性エストロゲン様物質＝エストロゲン受容体(ER)に結合
→ER α への親和性: 内因性エストロゲンの約1/4000
Er β への親和性: 内因性エストロゲンの約1/40
 - ER以外の受容体にも結合(生体異物受容体PXR等)
 - 無毒性量(NOAEL): 5mg/kg/BW/ day
 - 耐容一日摂取量(TDI): 50 μ g/kg/BW/day
→現在食品安全委員会が協議中

材料

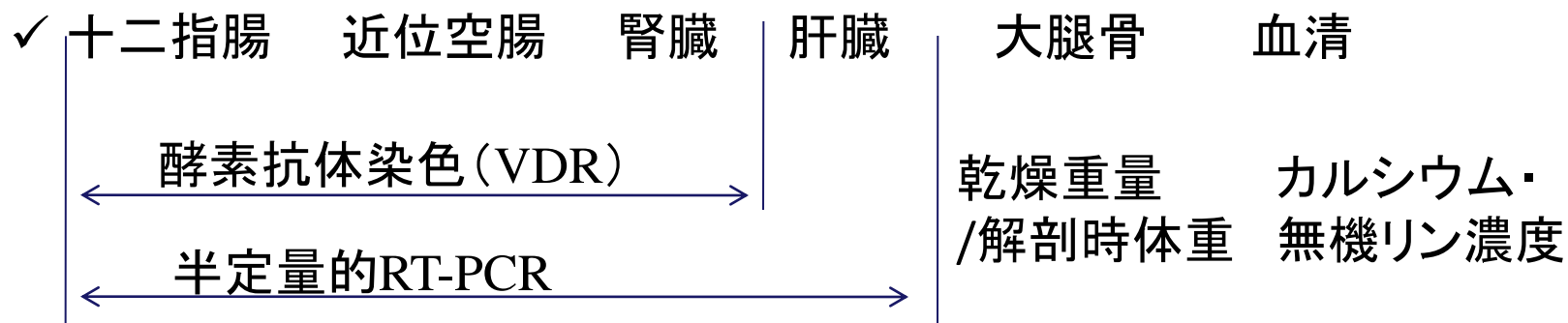
- ICR系妊娠マウス4群



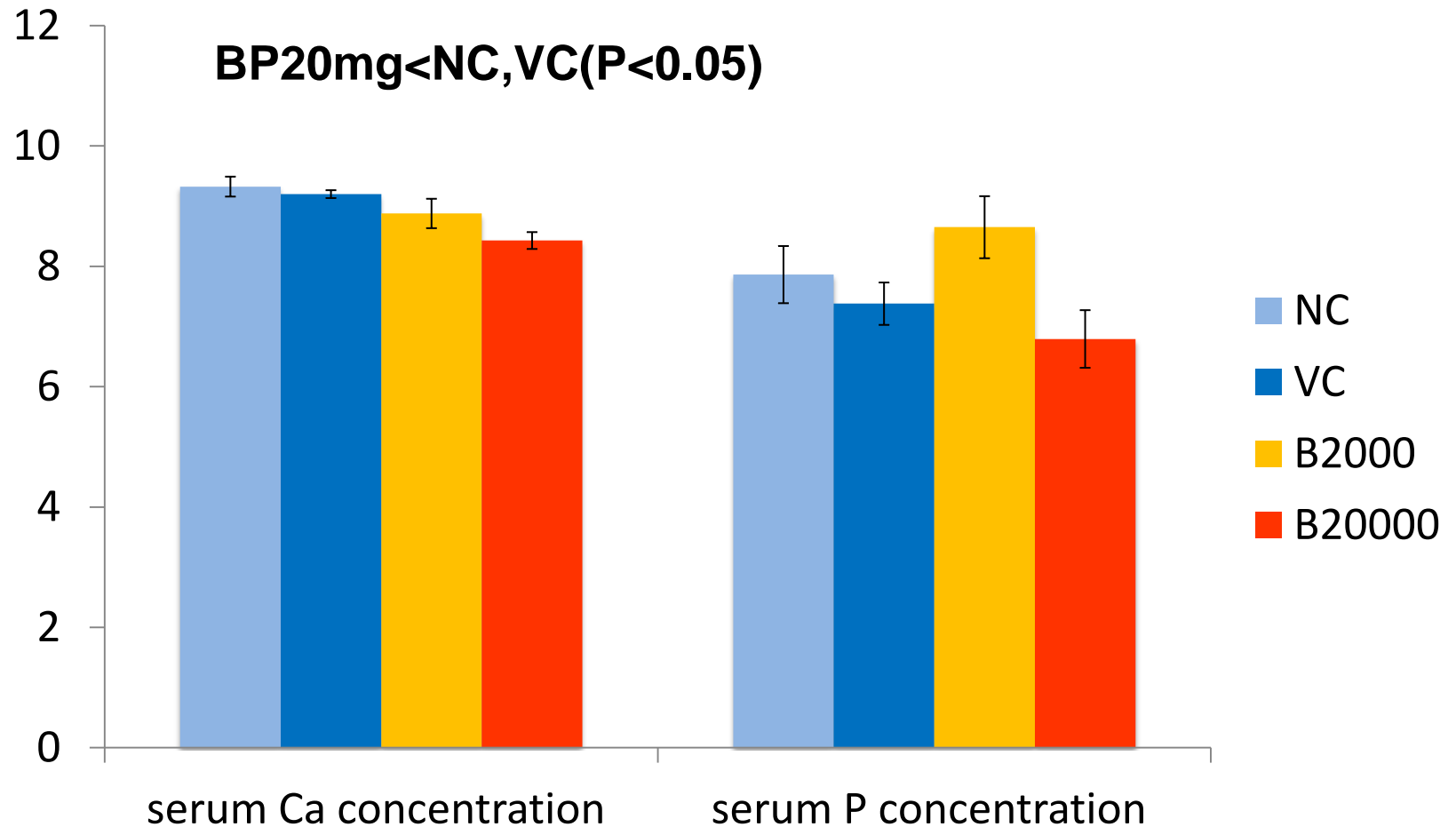
- ✓ Normal Control (NC)群: 無処理
 - ✓ Vehicle Control (VC)群: 溶媒(Ethanol+olive oil)投与
 - ✓ BPA-20 μ g 群: BPA 20 μ g/kg/BW/day(1.75×10^{-5} mol/l)投与
 - ✓ BPA-200 μ g 群: BPA 200 μ g/kg/BW/day(1.75×10^{-4} mol/l)投与
- 投与量: 体重1kg当たり5ml相当

BPA-20mg 群とBPA-200mg 群

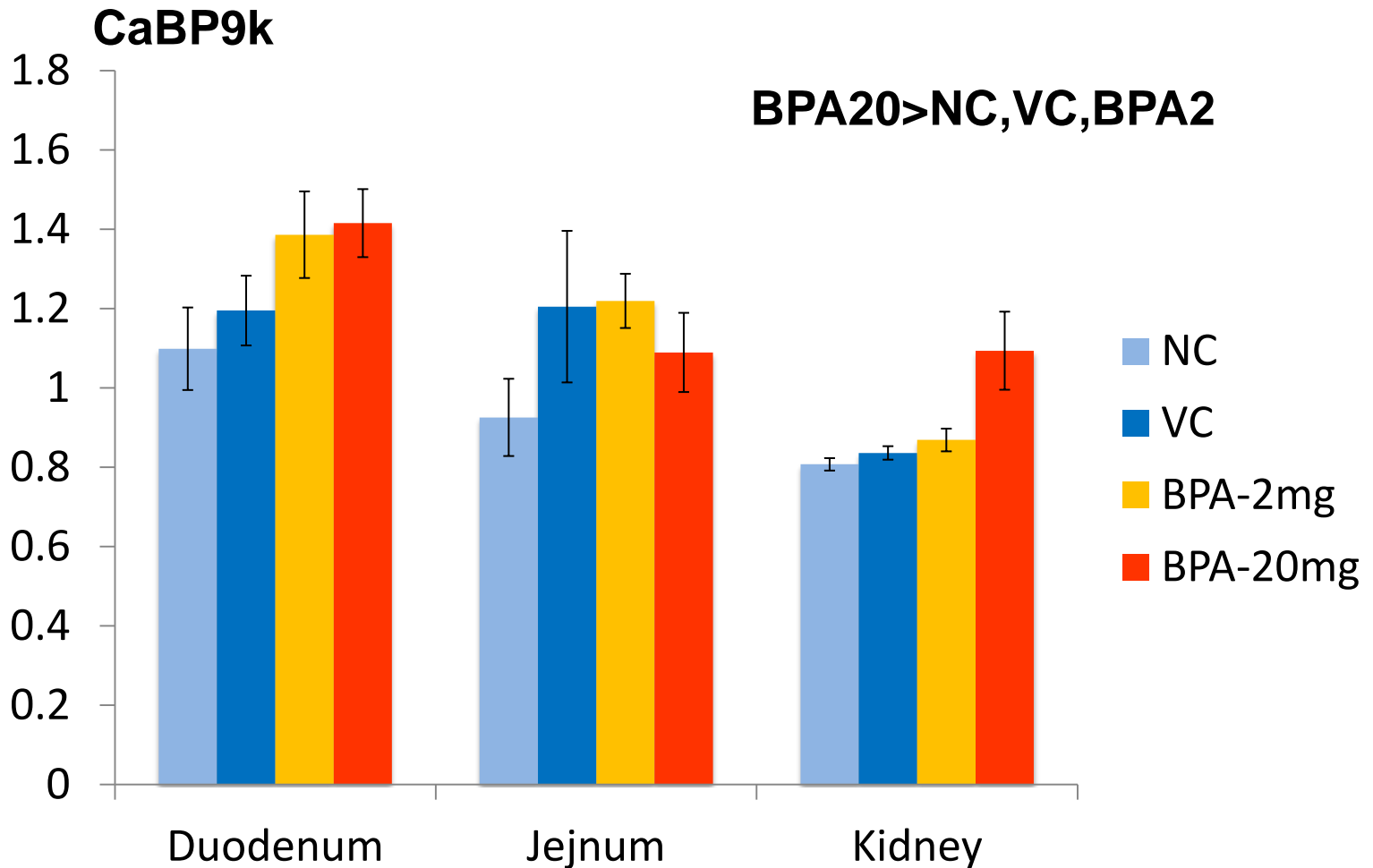
- 採取組織・解析



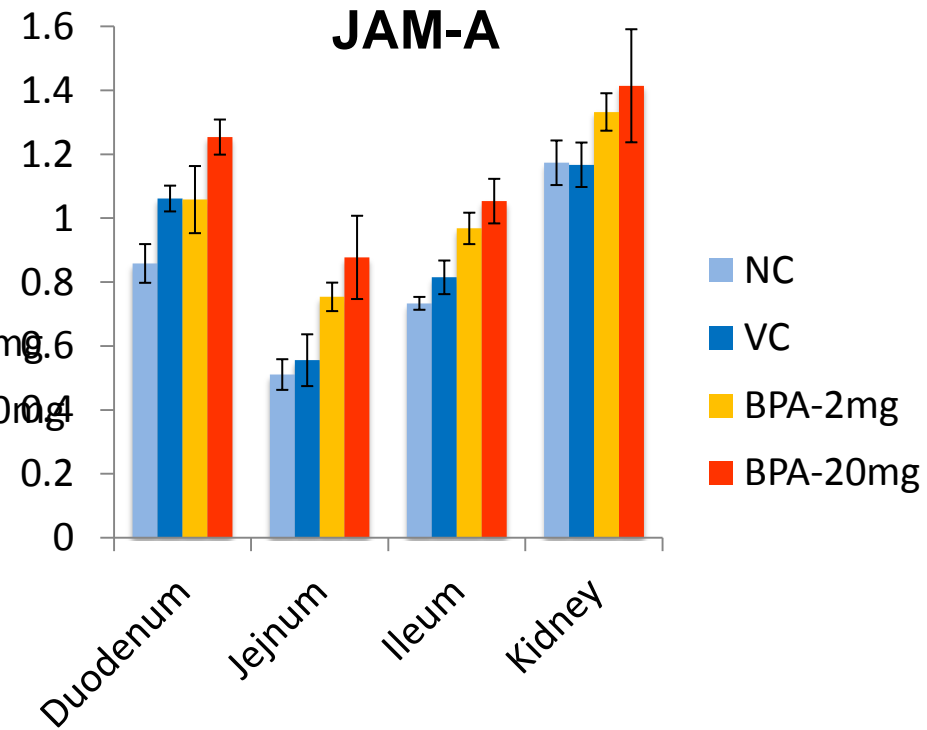
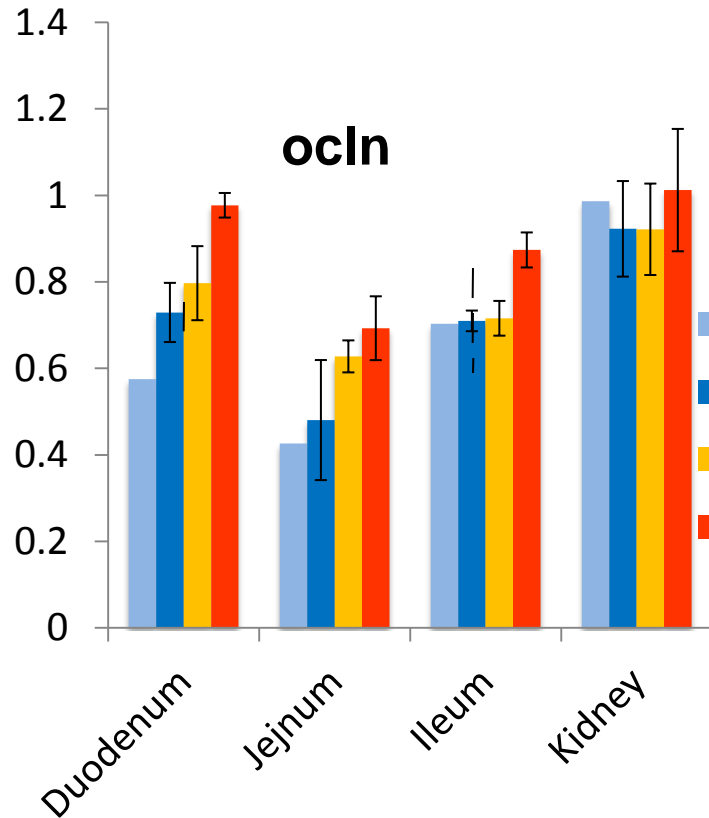
マウスの血清Ca・Pi(mg/dl)




分子生物学的解析(經細胞輸送関連)



分子生物学的解析(傍細胞輸送関連)



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
 - 小腸のオクルティン、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.*