

植物エストロゲンの内分泌攪乱防御ならびに生活習慣病予防作用 に関する実験的研究

池田克巳*・関根由布・町田浩子・家森幸男

京都大学大学院人間環境学研究科

Effect of Isoflavone on DES-induced Cell Proliferation and Genetic Hypertension

Katsumi IKEDA, Yu SEKINE, Hiroko MACHIDA and Yukio YAMORI

Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University, Kyoto 606-8501

ABSTRACT

Genistein (10 μ M) inhibited the cultured MCF7 cell proliferation induced by 500 pM diethylstilbesterol (DES). *In vivo* study using the immature rat uterotrophic assay, genistein attenuated the increase in uterine weights induced by DES (10^{-3} mg/kg/day). Genistein may antagonize the estrogen-agonist action of DES in MCF7 cell and the rat uterus. Eighteen week-old stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP), 33 in total, were divided into 3 groups, 11 in each; ovariectomized SHRSP (Ovx), ovariectomized SHRSP receiving a diet containing 0.067% of daidzin (Dai) and sham operated SHRSP (sham). Tail blood pressure was checked once a week. Soy isoflavone, daidzin, significantly attenuated blood pressure rise in Ovx. Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine was augmented in aortic rings from Dai in comparison with Ovx. Daidzin may attenuate menopausal blood pressure rise, supposedly due to increased nitric oxide production. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 100-104, 2000.

Key words : genistein, daidzin, MCF, SHRSP, hypertension, DES

大豆中のイソフラボンはその30～50%が胚軸に極在し、呈味閾値の差はあるが、不快味を呈することが知られている¹⁾。イソフラボンは女性ホルモンと競合して同じレセプターに結合するが、ホルモンとしての力価はエストロゲンの千分の一であり、弱いエストロゲン作用を示し、女性ホルモンのバランス調節に関与すると考えられている²⁾。また人が大豆を食べた際のイソフラボン血中濃度は、エストロゲンの千倍といわ

れている。このようにイソフラボンには女性ホルモン様作用²⁾、抗酸化性^{3,4)}、抗菌性、発がん抑制⁵⁻⁷⁾、骨密度の低下抑制²⁾などの多彩な生理活性が確認されている。

現在、エストロゲン様作用を持つ人工の化学物質が正常なホルモン作用を攪乱し種々の障害を発生する可能性が報告されているが、その実体に関しては依然不明確である。特に日本では日常生活で欧米諸国と比較して多量にイソフラボンが摂取されていることが判明しており、これら多量に摂取されているイソフラボン

*〒 606-8501 京都市左京区吉田二本松町

の女性ホルモン作用による内分泌攪乱物質への影響に興味もたれる。そこで本研究では内分泌攪乱物質の一つである diethylstilbesterol (DES) へのイソフラボンの影響について検討した。

また一方、女性の冠動脈疾患の病因、病態生理および治療に関する研究は大幅な進歩を遂げ、疫学的研究から閉経後の女性に対するエストロゲン補充療法が冠動脈疾患を減少させる効果があることも明らかにされてきている。世界中で多くの女性が心臓病や骨粗鬆症、また更年期障害のリスクを軽減するためにホルモン療法を受けている反面、エストロゲンは副作用として子宮体がんを誘発するといわれており、その副作用を恐れてホルモン療法を避けている女性がいるのも事実である。このためホルモン療法を選択しない女性にとって大豆イソフラボンの持つエストロゲン作用が適切なホルモン療法の代替療法になる可能性がある。そこで本研究では植物性エストロゲンであるイソフラボンの摂取と閉経期に特有とされる血圧上昇との関連について検討した。

方 法

イソフラボンと DES の作用

MCF 細胞での検討 MCF7 細胞を 24 wells プレートに 2 万 /well 播種後培養し、24 時間後に各種濃度ゲニステイン、ダイゼイン 添加培地に置換した。引き続き培養し、24 時間後各濃度に調整した DES を 10 μ L/well 添加した。培地は 1 mL/well で、置換後はフェノールレッド不含、チャーコール処理済 FBS を含む培地を使用した。6 日後に Cell Counting Kit (同仁) で細胞数を測定した。

WKY での検討 20 日齢雌性 Wistar Kyoto rat (WKY) 36 匹を 6 群に分け、ゲニステイン (10 mg/kg/day)、DES (10^{-3} or 10^{-4} mg/kg/day)、ゲニステイン+DES (10 mg/kg/day + 10^{-3} or 10^{-4} mg/kg/day) および無処置とした。3 日間皮下投与を行い、4 日目にネブタール麻酔後、子宮を摘出し重量測定を行った。

イソフラボンの SHRSP の高血圧への影響

実験動物および飼育 実験動物として 18 週齢雌性 SHRSP ラットを SHR 等疾患モデル共同利用研究会より分与を受け実験に用いた。飼育は室温 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12 時間明サイクルに管理された動物実験室内で行った。ラットは飼料の違いにより、疑似手術-コントロール飼料 (Sham) 群、卵巣摘出-コントロール飼料 (Ovx) 群、卵巣摘出-ダイジン投与 (Dai) 群に分けた。1 週間の予備飼育後、疑似手術あるいは卵巣

摘出手術を施し、手術後各群に応じた食餌を与えた。卵巣摘出群のラットはネブタール麻酔下にて、背側正中より縦皮切を加え、卵巣を摘出した。27 週齢時に代謝ケージ内で 24 時間飼育した。32 週齢まで飼育した後、屠殺解剖して各臓器重量を測定した。

体重、血圧測定 ラットの体重、血圧、心拍数を定期的に測定した。血圧測定は非観血法で行い、ラットをあらかじめ保温箱 (約 38°C) の中で 10 分間加温し、尾動脈測定装置 (UR-10000, ウエダ, 東京) を用いて測定した。

血管弛緩反応 摘出大動脈輪状標本を用いて内皮由来血管弛緩反応について検討した。血管は胸部大動脈を用い、シクロオキシゲナーゼ存在下、PGF 2α 収縮下に一酸化窒素 (NO) 作動物質としてアセチルコリン (Ach) およびニトロプルシドナトリウム (SNP) を各々加え、内皮由来弛緩反応を検討した。

尿分析 尿中の NO 濃度は NO $_2$ /NO $_3$ Assay Kit-C ((株) 同仁化学研究所) を用いて Griess 法にて定量し、尿量で補正して 24 時間当たりの NO 排泄量とした。

統計処理

すべての統計解析は Macintosh の StatView J-4.11 を用いた。また各群間のデータの分散分析を行い、Fisher の PLSD により有意差検定を行った。測定値は危険率 5% をもって有意とした。生存分析は JMP の Kaplan-Maier 法で行った。

結 果

イソフラボンと DES の作用

MCF 細胞を用いたゲニステイン 5 および 10 μ M 存在下での DES による細胞増殖作用は抑制的であった (Fig. 1A)。20 日齢雌性 WKY を用いた 10^{-3} mg/kg/day DES による子宮重量増加は 10 mg/kg/day ゲニステイン存在下で抑制的作用を示した (Fig. 1B)。

イソフラボンの SHRSP の高血圧への影響

38 週齢で屠殺解剖し、脳・心・腎・子宮重量を測定した結果を Table 1 に示した。卵巣摘出手術を施した 3 群ではいずれも Sham 群に比べて有意な子宮の萎縮が認められた。Dai 群においても脳・心・腎重量が Ovx 群に比べ統計学的に有意ではなかったものの低い傾向がみられた。

血圧の変化に関しても、体重と同様に Ovx 群において卵巣摘出による有意な血圧上昇が認められたがダイジンの投与により、その上昇が抑制された (Fig. 2)。実験終了時 (38 週齢) の生存率は Ovx 群で 45% であったのに対し、Dai 群では 73%、Sham 群では 100% であった。

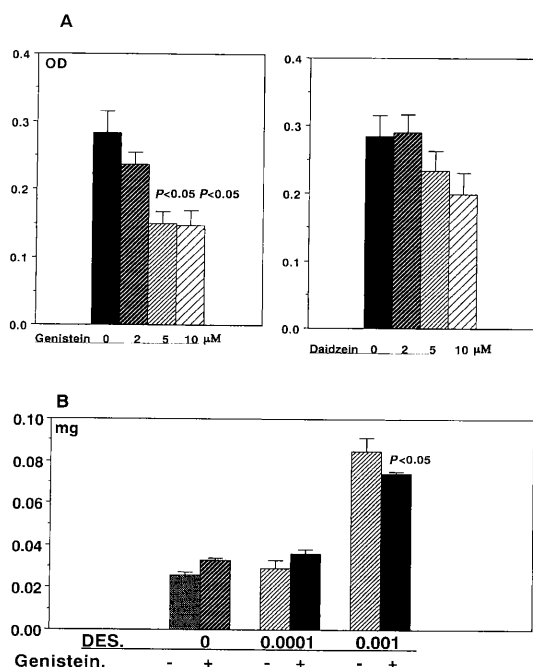


Fig. 1. A, Effects of genistein and daidzein on MCF7 cell growth induced by 500 pM diethylstilbestrol (DES). Columns and vertical bars represent mean $\pm$ SE from 5 to 7 experiments. B, Effect of genistein on DES-induced increase in uterine weight in 20-day-old Wistar Kyoto rats. Columns and vertical bars represent mean $\pm$ SE (n=6).

た。

PGF2 α 収縮下, アセチルコリンを加え, 内皮依存性弛緩反応 (EDR) を検討した結果を Fig. 3 に示した。Ovx 群で濃度依存性に弛緩反応の低下が認められたが, ダイジンや大豆たん白質の投与により反応低下が有意に抑制されていた。次に PGF2 α 収縮下, SNP を加え, 内皮非依存性弛緩反応を検討したが内皮非依存性弛緩反応の低下は認められなかった (Fig. 3)。

尿中 NO 量の測定結果は Sham 群の値を 100% とする

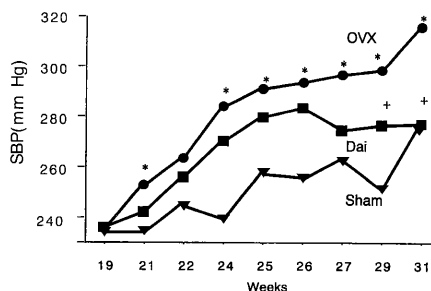


Fig. 2. Effect of daidzin on blood pressure in ovariectomized SHRSP given a diet containing 0.067% daidzin (Dai). * ; $P < 0.05$ versus ovariectomized SHRSP (Ovx) ; + ; $P < 0.05$ versus sham operated SHRSP (Sham).

と, OvX 群では 65% 減少していたのに対し, Dai 群では 12% 上昇しており, OvX 群と Dai 群間に有意差 ($P < 0.05$) が認められた。

考 察

本研究において, ゲニステイン存在下において DES による培養 MCF 細胞増殖, ラット子宮重量増加の抑制傾向が観察された。蛍光偏光法によるエストロゲンレセプターへの競合的結合能は 17 β エストラジオール (E2) と比して約千分の一であった。また DES のエストロゲンレセプターへの相対的親和性は, E2 を 100 としたとき 390 と強力であることが示されている。イソフラボンは女性ホルモンと競合して同じレセプターに結合するが, ホルモンとしての力価はエストロゲンの千分の一であり, 作用が弱いために, 女性ホルモンレベルが高いときには抗エストロゲンの, 逆に女性ホルモンレベルが低い時には, エストロゲン作用を補うことにより, 女性ホルモンのバランスを調節するとの

Table 1. Organ weights in rats given daidzin

	Units	Brain	Heart	Kidney	Uterus
Sham	g	1.78 $\pm$ 0.06*	0.98 $\pm$ 0.10*	1.54 $\pm$ 0.18*	0.35 $\pm$ 0.18*
	%BW	0.93 $\pm$ 0.05*	0.52 $\pm$ 0.04*	0.80 $\pm$ 0.07*	0.18 $\pm$ 0.08*
Ovx	g	2.18 $\pm$ 0.29	1.34 $\pm$ 0.07	1.74 $\pm$ 0.04	0.10 $\pm$ 0.01
	%BW	1.43 $\pm$ 0.38	0.67 $\pm$ 0.01	0.96 $\pm$ 0.15	0.05 $\pm$ 0.01
Ovx + Dai	g	2.20 $\pm$ 0.46	1.13 $\pm$ 0.12	1.64 $\pm$ 0.09	0.12 $\pm$ 0.04
	%BW	1.30 $\pm$ 0.38	0.63 $\pm$ 0.10	0.81 $\pm$ 0.06	0.07 $\pm$ 0.02

Each value is mean $\pm$ SD. %BW shows the organ weight per 100 g body weight.

* $P < 0.05$ compared with Ovx group.

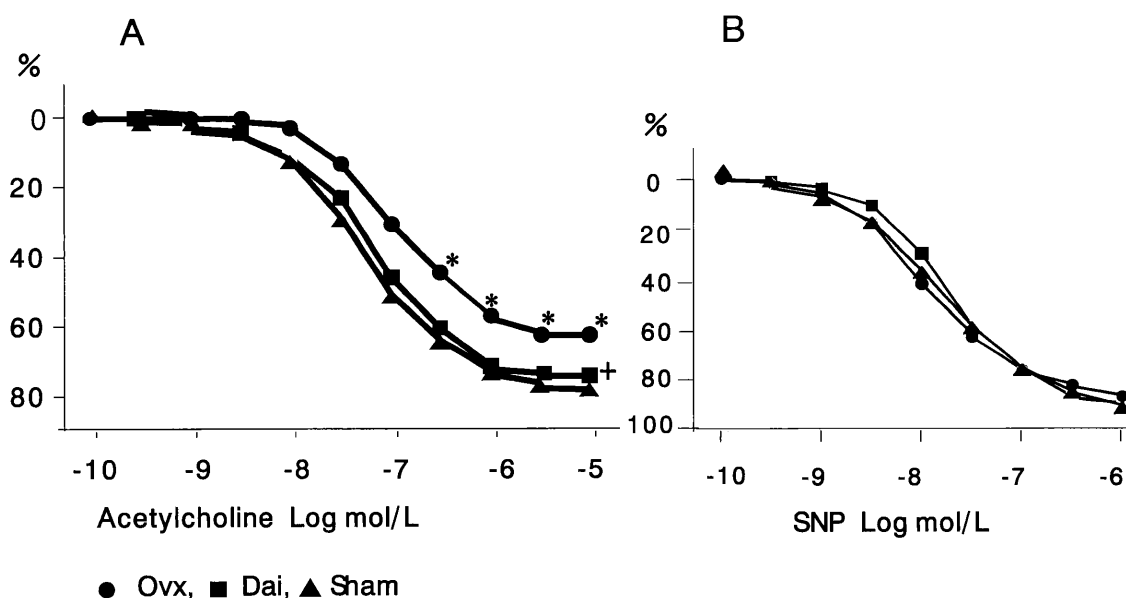


Fig. 3. A, Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in aortic rings from ovariectomized SHRSP given 0.067% daidzin (Dai). Points represent mean from 4-6 experiments. B, Endothelium-independent relaxation to acetylcholine in aortic rings from Dai. Points represent mean from 4-6 experiments. * ; $P < 0.05$ versus ovariectomized SHRSP (Ovx): + ; $P < 0.05$ versus sham operated SHRSP (Sham).

報告²⁾があるが、本結果はこの報告を支持するように考えられ、ゲニステインが女性ホルモン作用を示す内分泌攪乱物質との共存下で競合作用を示す可能性が示唆される。

また本研究では、ヒトの更年期のモデルとして卵巣摘出 SHRSP ラットを用い、エストロゲン分泌減少に伴う血圧上昇にダイジンが抑制的効果を持つことを明らかにした。血管の反応性を検討したところアセチルコリンによる血管内皮依存性弛緩反応が同様に増加しており、イソフラボンがエストロゲンと同様に内皮依存性血管弛緩反応に対し改善作用を示すことが明らかになった。一方、内皮非依存性血管弛緩反応に関しては各群間に有意差は認められず、イソフラボンは血管内皮細胞を介して NO の産生を促進し血管を拡張する作

用を有している可能性が示唆された。NO は血管拡張作用を有しており、内皮由来弛緩因子の一つであると考えられており、大動脈等の大血管での NO 作用は、プロスタサイクリンや内皮由来過分極因子といった他の内皮由来活性物質の作用よりも強力とされている。尿中 NO 量を検討した結果、Dai 群において NO 産生量の増加が認められた。これは Dai 群における EDR の改善作用が NO 産生増加に基づくことを支持している。また、Dai 群における血圧上昇抑制は結果として脳卒中を抑制し、延命効果が示された。これらの結果は人において閉経後における生活習慣病危険因子増加抑制作用にイソフラボンが利用できる可能性を示唆するものと考えられる。今後さらにイソフラボンの多彩な生理的性質について検討が必要であると考えられる。

要 約

我々はイソフラボンの摂取が生体に与える影響について検討を重ねているが、本研究では閉経期における血圧上昇との関連、および内分泌攪乱物質に対する作用について検討した。1) 培養細胞を用いたゲニステイン存在下における diethylstilbestrol (DES) による MCF 細胞増殖は抑制的であった。また 20 日齢雌性 Wistar Kyoto rat (WKY) を用いた DES による子宮重量増加作用はゲニステイン同時投与により抑制的であった。2) 18 週齢雌性 Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats (SHRSP) を用い、疑似手術-コントロール飼料 (Sham) 群、卵巣摘出-コントロール飼料 (Ovx) 群、卵巣

摘出-ダイジン投与 (Dai) 群に分け、疑似手術あるいは卵巢摘出手術を施し、手術後各群に応じた食餌を与えた。卵巢摘出前と摘出後 2 週目における収縮期血圧の変化は、Ovx 群で上昇が認められた (卵巢摘出前 235.0 ± 3.8 , 卵巢摘出後 263.3 ± 10.6 mm Hg ($n=11$, $P<0.05$)). 一方, Dai 群 (卵巢摘出前 236.0 ± 17.6 , 卵巢摘出後 239.3 ± 23.8 mm Hg ($n=11$)) と卵巢摘出による昇圧が抑制され, Dai 群では Ovx 群に比べて内皮由来血管弛緩反応が増加していた。

文 献

- 1) Wong W (1996): Early feeding and regulation of cholesterol metabolism. In : *Long-Term Consequences of Early Feeding*. Boulton, J. ed., Lippincott-Raven Publishers, pp. 123-128.
- 2) Tham D, Gardner C and Haskell W (1998) : Potential health benefits of dietary phytoestrogens: A review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 2223-2235.
- 3) Cai Q and Wei H (1996): Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. *Nutr Cancer*, **25**, 1-7.
- 4) Wei H, Cai Q and Rahn RO (1996) : Inhibition of UV light- and Fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. *Carcinogenesis*, **17**, 73-77.
- 5) Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, Yoshida M, Matsumoto K, Nishino H and Aoike A (1993) : Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer Res*, **53**, 1328-1331.
- 6) Jing YK, Nakaya K and Han R (1993) : Differentiation of promyelocytic leukemia cells HL-60 induced by daidzein *in vitro* and *in vivo*. *Anticancer Res*, **13**, 1049-1054.
- 7) Knight D and Eden J (1996) : A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet Gynecol*, **87**, 897-904.