

# 新生児マウスにおけるイソフラボンの影響： 生殖器への影響を指標とする考察

山下洵子<sup>\*1</sup>・峯田 司<sup>2</sup>・乗越皓司<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 呉大学看護学部 <sup>2</sup> 上智大学生命科学研究所

## Influence of Early Postnatal Exposure to Isoflavone on the Reproductive Organ in Mice

Junko YAMASHITA<sup>1</sup>, Tsukasa MINETA<sup>2</sup> and Kohshi NORIKOSHI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Nursing, Kure University, Kure 737-0004

<sup>2</sup>Life Science Institute, Sophia University, Tokyo 102-8554

### ABSTRACT

Isoflavones, classified as a phytoestrogen, are known to have estrogen-like effects. Since early postnatal treatment with estrogen induces persistent estrus in mice, we wanted to examine how isoflavones affect mice in this regard. Newborn female mice were injected subcutaneously with either isoflavone, daizein or genistein, or estradiol-17 $\beta$  for 5 consecutive days from the day of birth. When the mice were between 4 and 7 weeks of age, vaginal smears were examined, and the vagina from each mouse was removed for histological study at 7-8 weeks of age. The vaginal smear test revealed that all the estradiol-treated mice had cornifying cells of the vaginal epithelia, indicating persistent estrus. Similar manifestations were observed in some mice treated with isoflavone, especially when the dose was higher than that of estradiol-17 $\beta$ . However, the injection of equimolar isoflavone together with estradiol-17 $\beta$  tended to arrest the harmful effect of estradiol. It seems necessary to establish concrete guidelines regarding intake of isoflavones for pregnant women and babies. *Soy Protein Research, Japan* 4, 97-101, 2001.

Key words : isoflavone, daizein, genistein, persistent estrus, vaginal epithelia

大豆に含まれるイソフラボンはエストロゲン様作用をもつことで知られ、更年期の女性に投与すると、更年期障害の諸症状を軽減すると報告されている<sup>1)</sup>。一方、発育初期、外来性にエストロゲンを取り込んだり、

あるいはいわゆる環境ホルモン（内分泌攪乱物質）に暴露されると生殖異常を起こすことが多種の動物で報告されており、これは、今日、大きな社会的問題となっている。

欧米人に比べ、日本人は植物性食品を多く取る。なかでも大豆とその加工食品の摂取は多く、現代の食生

\*〒 737-0004 呉市阿賀南 2-10-3

活でもかなりの比率を占める。したがって、体内に取り込む環境ホルモン量は、植物性食品由来の方が人工化学物質由来より多い可能性もある。今回、大豆に含まれるイソフラボンを環境ホルモンのひとつとして捉え、その摂取の功罪を考察する。

## 方 法

新生雌マウスが外来性エストロゲンに暴露されると成熟後正常な発情周期が発現せず連続発情となることが報告されている<sup>2)</sup>ので、これを指標としてイソフラボンの効果を検討した。

11匹のICR系統妊娠マウス(日本クレア, 東京)を購入した。室温22.2℃, 湿度60.5%, 明暗11:13(点灯08:30)の部屋で個別にプラスチックケージ(30×20×13cm)に入れ、繁殖用固形飼料(オリエンタル酵母, 東京)と水を自由摂取させた。毎朝、仔の誕生を確認し、誕生24時間以内に雄を取り除き、同腹の雌仔(合計44匹)を任意に分け、5%ジエチルスルフォキシドに溶かしたエストラジオール-17β(Sigma Chemical Co., USA, 以下Eと略記; ポジティブ対照), あるいはイソフラボンとしてダイゼイン(和光純薬, 東京)またはゲニステイン(和光純薬, 東京)をそれぞれ単独あるいはEと一緒に5日間連続で皮下注射した。ネガティブ対照として溶剤のみ20μLを投与した。

4週齢から3週間毎日腔スミアを綿棒で取り、顕微鏡下で発情周期の過程を観察した。7~8週齢で殺して腔組織を取り出し、95%エタノールで固定し、5μmの切片を作成してヘマトキシリン-エオシン染色をし、光学顕微鏡観察に供した。

## 結果と考察

スミア検査で判断した発情周期をTable 1に示す。溶剤のみ投与のネガティブ対照群は、1例を除き4~7日の発情周期を繰り返した。E(5μg; 18nmol)単独投与のポジティブ対照群では全例が、常時多数の角質化した細胞のみで構成される連続発情を示した。Eの10倍モルイソフラボン投与群では正常な発情周期を示す個体が少なく、約半数が連続発情を示した。連続発情を示した個体の腔組織の例をFig. 1に示す。ネガティブ対照群の発情期と比べ、上皮細胞層がより肥厚し、より多くの角化細胞で構成されているのが明らかである。上皮細胞層が肥厚した腔では、上皮細胞層の数も多かった(Fig. 2)。しかし、体重と子宮重量は群間で差がみられなかった(Table 2)。

一方、Eとその当モルイソフラボン同時投与群では、E単独投与群に比べ、連続発情を示す個体が少なく(Table 1)、上皮細胞層数も少ない傾向にあった(Fig. 2)。

今回の実験で新生マウス(平均体重:1.3g)に対し

Table 1. The estrous cycle between 4 and 7 weeks of age in mice treated with isoflavone or estradiol-17β at the early postnatal stage

Group	Chemicals	Estrous cycle Incidence			
		Mice treated (n)	Normal (n)	Abnormal (n)	Persistent estrus (n)
C	20 μL of vehicle alone	12	11	1	0
E	18 nmoles of estradiol-17β	6	0	0	6*
D	18 nmoles of daidzein	7	3	3	1
D <sub>10</sub>	180 nmoles of daidzein	9	1	3	5*
G	18 nmoles of genistein	5	2	3	0
G <sub>10</sub>	180 nmoles of genistein	5	0	3	2*
ED	E+D	3	0	2	1
EG	E+G	3	0	2	1
ED <sub>10</sub>	E+D <sub>10</sub>	4	0	1	3
EG <sub>10</sub>	E+G <sub>10</sub>	3	0	2	1

The estrous cycle is shown by the category of : Normal, 4 to 7 day of estrous cycle; Persistent estrus, cornifying cells always observed throughout the period of the examination; Abnormal, the other manifestations (more than 8 days of estrus with 1 to 2 days of intermittent diestrus). \*P<0.05 vs C group but not versus E group by accumulated  $\chi^2$ -test.

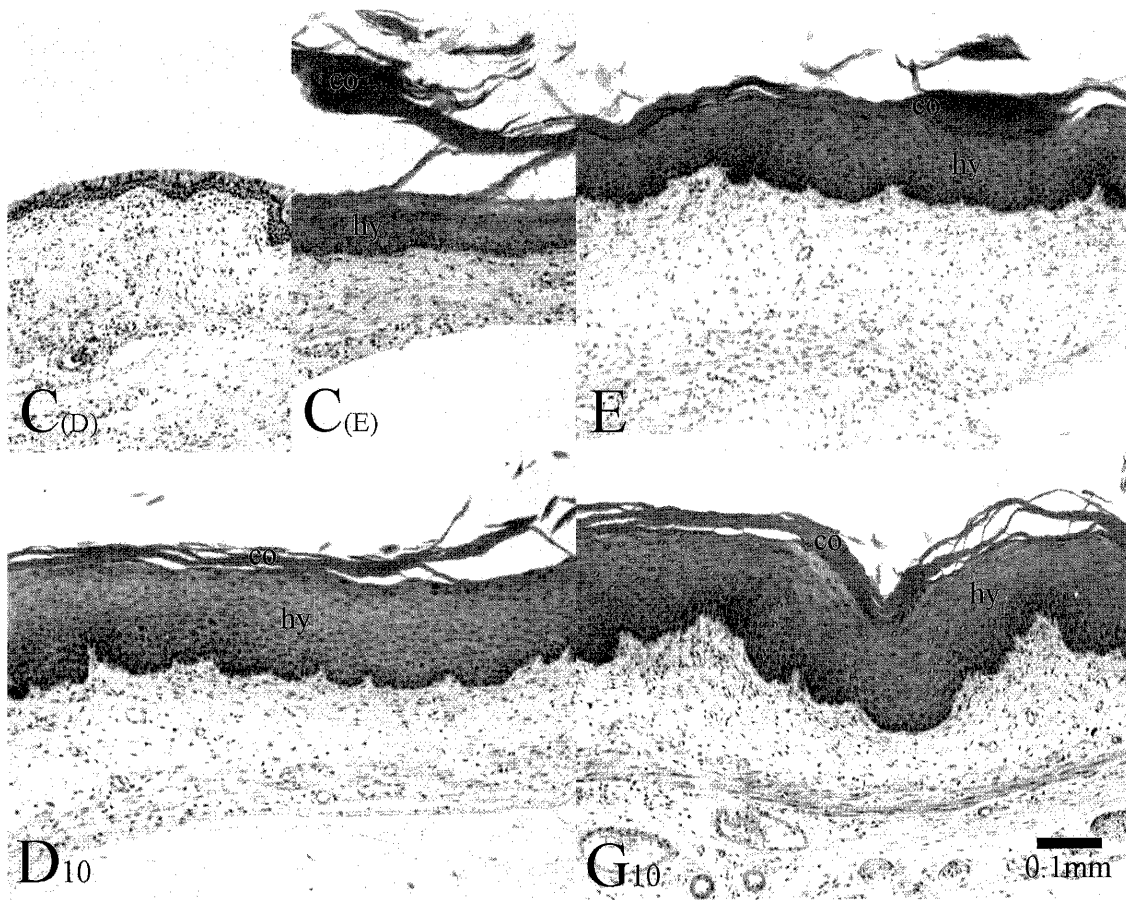


Fig. 1. Histological features of the vaginal epithelia of 2-month-old mice treated with isoflavone or estradiol-17 $\beta$  at the early postnatal stage.

C<sub>(D)</sub>, 20  $\mu$ L of vehicle alone (Distrus); C<sub>(E)</sub>, 20  $\mu$ L of vehicle alone (Estrus); E, 5  $\mu$ g (18 nmoles) of estradiol-17 $\beta$  (Persistent estrus); D10, daizein at a molarity 10 times as high as E; G10, genistein at a molarity 10 times as high as E. co, cornifying cells and hy, hyperplasia of the epithelium.

て異常が出たイソフラボン濃度をヒト新生児（約3,000 g）にそのまま比例換算すると、100 mg 近い量になる。平均的日本人の1日のイソフラボン摂取量を大豆および大豆製品のイソフラボン量<sup>3)</sup>から50～200 mgと推定すると、普通の食事をする限り、イソフラボンにより生殖器に異常が出る可能性はほとんどないと予想される。しかし、内分泌攪乱物質は、一般に、動物の発育の早い段階で極めて微量で内分泌系を攪乱することはよく知られている。今回の実験でも、体重や子宮重量に変化が現れない条件下で、膈上皮細胞が不可逆的变化を起こし生殖異常を起こしうることが明らかにされた。

今日、サプリメントや錠剤のかたちで、個体のこれまでの食歴を超えて、あるいはヒトの歴史上の経験からかけ離れた極めて大量のイソフラボンを体内に取りこむこともありうる。乳児のイソフラボン代謝は成人より相当に遅い<sup>4)</sup>ことを考え合わせると、妊婦や乳幼児が極端に多量のイソフラボンを取り込むのは避ける方がいいだろう。

一方、適量のイソフラボン摂取は、外来性エストロゲンの弊害を軽減する可能性も示唆されたので、妊婦や乳幼児に対し成人とは別に適正なイソフラボンの取り方や量を検討する必要があると考える。

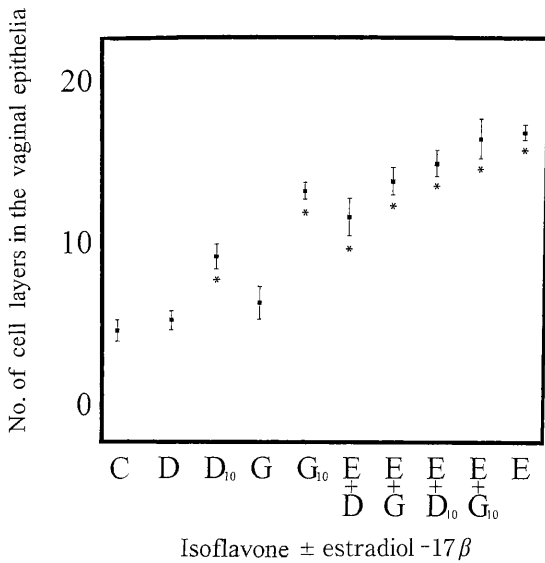


Table 2. The body weight and the uterus weight of female mice treated with isoflavone or estradiol-17β at the early postnatal stage

Group	Uterus weight (mg)	Body weight (g)
	mean ± SD (n)	mean ± SD (n)
C	128 ± 63 (8)	31.8 ± 3.2 (8)
E	111 ± 33 (4)	31.2 ± 2.5 (4)
D	134 ± 68 (7)	29.5 ± 1.5 (7)
D <sub>10</sub>	107 ± 32 (9)	29.0 ± 1.3 (9)
G	108 ± 20 (5)	33.1 ± 5.5 (5)
G <sub>10</sub>	143 ± 49 (5)	33.5 ± 1.0 (5)

Group names follow Table 1.

Fig. 2. Number of cell layers of the vaginal epithelia of 2-month-old mice (the same mice as in Fig. 1). The serial section was performed in each vaginal sample. Number of cell layers was randomly counted at five points of each stained sample. Each value represents mean ± SD. \*Statistically different from the vehicle-treated controls.

## 要 約

大豆摂取をいわゆる環境ホルモン（内分泌攪乱物質）を体内に取り入れることとして捉え、その功罪を考察した。出生直後の雌マウスにエストラジオール-17β (E), あるいはイソフラボンとしてダイゼインまたはゲニステインを、それぞれ単独であるいはEと一緒に5日間連続で皮下注射したところ、E (5 μg; 18 nmol) 単独投与群では全例が、その10倍モルイソフラボン投与群では約半数例が、膣スミア検査で連続発情像を示した。これらの膣組織像は、溶剤のみ投与した対照群が示した発情期像と比べ、上皮細胞層がより肥厚しより多数の角化細胞を呈した。一方、Eとその当モルイソフラボン同時投与群では、正常の性周期を示す例も発現し、溶剤のみ投与群と変わらない組織像を示す例もあった。以上から、新生児が大量のイソフラボンに暴露されると生殖異常を起こす可能性があること、一方、イソフラボンが適量共存すると外来性エストロゲンの弊害を防ぐ可能性があることが示唆された。成人とは別に、妊婦や乳幼児に対し適正なイソフラボン摂取量を検討する必要がある、と考える。

## 文 献

- Clarkson TB, Anthony MS, Williams JK, Honoré EK and Cline JM (1998): The potential of soybean phytoestrogens for postmenopausal hormone replacement therapy. *Proc Soc Exp Biol Med*, **217**, 365-368.
- Takasugi N, Bern HA and DeOme KB (1962): Persistent vaginal cornification in mice. *Science*, **138**, 438-439.

- 3) Kimira M, Arai Y, Shimoi K and Watanabe S (1998): Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. *J Epidemiol*, **8**, 168-175.
- 4) Setchell KDR, Zimmer-Nechemias L, Cai J and

Heubi JE (1997): Exposure of infants to phytoestrogens from soy-based infant formula. *Lancet*, **350**, 23-27.