

「内分泌かく乱物質」
平成10年度採択研究代表者

香山 不二雄

(自治医科大学医学部 教授)

「植物由来および人工の内分泌かく乱物質の相互作用」

1. 研究実施の概要

化学物質の中には、生物の内分泌系をかく乱することにより生殖、内分泌、免疫、神経系に重大な悪影響を与える化学物質があることが明らかとなってきた。哺乳類以外の野生生物では、因果関係は明らかでない例がいくつか報告されているが、まだ人では内分泌かく乱化学物質の健康影響は明らかになっていない。内分泌かく乱化学物質の人の健康および生態系へのリスク評価をすることは現時点の急務である。

しかし、人工化学物質以外でも生物は自然界に存在するホルモン様物質（植物エストロゲン）を長年摂取してきた。植物エストロゲンは1930年代に発見され、大豆、ナツメヤシなどの食品に多く含まれ、生殖器癌や骨粗鬆症のリスクを下げる効果があるのではないかと利点に焦点を当てて研究がされてきた。生物の進化の過程で植物エストロゲンには適応しており、何らかの生理的な役割を果たしているのかも知れない。

しかし、クローバーに多いクメステロールを大量に食べた羊が不妊になった例から、植物エストロゲンも大量に食べれば、哺乳類の生殖機能に障害を与えうることが示されている。米国ではOTC薬品としてイソフラボン50mg/dayの多量な服用が行われており、米国FDAが健康影響に関して検討が行われている。特に日本人は、欧米人に比較して、歴史的に大豆食品摂取量が多く、食品からの内分泌かく乱化学物質摂取の影響評価をするときに大きな修飾因子となり、植物エストロゲンの影響評価および相互作用の研究を不可欠である。

以上のような背景から、我々は、大豆食品に多いゲネスティン、ダイゼインおよびクメステロールなどを免疫担当細胞、骨芽細胞、乳癌細胞等の培養細胞に添加して、その反応の差から、作用メカニズムの差の検討を行い、内分泌かく乱物質の影響評価を行う方法論を検討している。

2. 研究実施内容

研究目的：植物エストロゲンと人工の内分泌かく乱化学物質との作用メカニズムがどのように違うのか、また内分泌かく乱物質と植物エストロゲンが同時に存

在すると相加効果があるのか阻害効果があるのか、免疫担当細胞、骨組織、子宮など内分泌かく乱物質の影響を受け易いと考えられる組織で検討する。

研究方法： 食物中のエストロゲン様物質の検索、生体試料(血液、尿、脂肪組織)の定量法の開発を高速液体クロマトグラフィーおよびクーロメトリク解析を用いて行う。 胎児期の両物質群への曝露が免疫細胞の正常な機能に影響を与えるのかどうか、脾臓リンパ球のマイトジェン刺激による増殖反応に対する影響を解析する。 生後または成長後に骨組織での骨代謝バランスにどのような影響があるのか、骨芽細胞由来の細胞株MC3T3-E1のTNF刺激によるインターロイキン6産生に対する影響について、両物質群間の差の検討を行う。 エストロゲン等により特異的にラット子宮で発現が変化するRNA結合蛋白AUF1/hnRNP Dの遺伝子について、反応の違いを検討する。 ゲネスチンがMCF-7細胞にアポトーシスを誘導する事が報告されていたので、ゲネスチンによりアポトーシスを惹起する乳癌細胞株の作用メカニズムの解明をおこなう。

結果および結論： ダイゼイン、ゲネスチンなど植物エストロゲンの複数の混合物を精度よく測定できるようになった。 生体試料中の多種類の植物エストロゲンが同時に正確に測れるように測定条件の改善を行っている段階である。 これを用いて人の植物エストロゲンの生体内存在量を評価し、植物エストロゲンの果たす内分泌かく乱作用のリスク評価を行う予定である。 脾臓細胞のコンカナバリンA刺激で誘導された細胞増殖が、 10^{-6} から 10^{-7} MのDES、ビスフェノールA、オクチルフェノール、およびクメステロール、ゲネスチンを添加することにより2倍から3倍増強される現象が見出された。 現在はT細胞系の増殖刺激の増大が考えられるが、さらに詳細な作用機序の解明を行っている。 骨芽細胞系細胞株MC3T3-E1は、ゲネスチンおよびダイゼイン 10^{-6} から 10^{-7} Mで添加することにより、骨形成の指標であるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の増加がみられ、クメステロールでは 10^{-7} から 10^{-8} MでALP活性の増加が見られた。 また、MC3T3-E1細胞をTNF刺激を行うとIL-6産生を誘導するが、エストラジオール 10^{-8} から 10^{-9} M加える事でIL-6産生量が抑制される。 また、ダイゼイン、ゲネスチン 10^{-6} M、クメステロール 10^{-7} M添加でIL-6産生量が抑制された。 エストラジオール濃度と比べ高い濃度ではあるが、植物エストロゲンも骨形成を増加させ、骨吸収を増強するサイトカイン産生を抑制する事が明らかとなった。 ラットにエストロゲンを投与する事により、ラット子宮でRNA結合蛋白AUF1/hnRNP DのmRNAの量の変化、アイソフォーム・パターンの変化が見られた。

この蛋白は、エストロゲンにより誘導された遺伝子の半減期を制御し、形質発現を制御しているのではないかと考えられている。 植物エストロゲンでもAUF1/hnRNP Dの変化について詳しく検討を加えている。 エストロゲン・レセ

プター 欠損の人乳癌細胞株に、ゲネスチン100 μ M添加して培養すると、アポプ
トーシスを誘導した。タイロシン・カイネース・インピヒター活性のないダイゼイ
ンでも同様にアポプトーシスを誘導した事から、この現象はエストロジェン・レセ
プター を介するメカニズムではなく、タイロシン・カイネース・インピヒター活
性とも関与しない事が明らかとなった。

また、生殖器官または免疫器官由来培養細胞に代表的内分泌かく乱化学物質を暴
露させ、sub-traction PCR 法、differential display 法を用いて発現に差のある遺伝子を
検索し、バイオマーカーとして既知または未知の蛋白の検索を行っている。また植
物エストロジェンがエストロジェン・レセプターへの結合が競合的であるのか阻害
的であるのか、また結合後のシグナル伝達系が違うのか、またはそれぞれで違った
遺伝子発現がおこっているのか明らかでない。 遺伝子発現にどのような変化があ
るのかを検討している。

3．主な研究成果の発表（論文発表）

無し