# 大豆食品による環境ホルモン毒性の予防と緩和

#### 1. はじめに

近年、「内分泌攪乱物質」あるいは「環境ホルモン」という言葉が大きな社会的関心を集めている。食品と内分泌攪乱物質との関係では、食品容器や食器からの溶出物や残留農薬等の人工的に化学合成された物質の影響についての関心が高いが、日常摂取している食品中に本来含まれている成分にもホルモン様物質があることが分かってきている。このそのような物質の中で近年特に注目されてきているのが植物エストロゲン(Phytoestrongen)と総称されるエストロゲンに化学構造が類似した物質群であり、我々が日常口にする食品でいえば、大豆および、その加工品に多く含まれるイソフラボン類等がこれに属している。

イソフラボン類の作用については、骨粗軽症を改善するといったプラスの効果®と共に女性のホルモンバランスに影響を与えて月経周期を変えるといったマイナスの効果®も報告されており、その有効性と有害性については議論のあるところである。しかしながら、イソフラボン類の多い大豆を常食にしている日本を含む東南アジア地域で、エストロゲンによって増殖が誘導される乳ガンの発生率が、欧米と比較して有意に少ないという疫学的調査結果®から、イソフラボン類がエストロゲンに対するアンタゴニストとして働き、その影響を抑制している可能性が考えられる。

そこで、食事の取り方により内分泌攪乱物質の 生体への影響を抑制できるのではないかと考え、 イソフラボン類に内分泌攪乱物質毒性の予防効果

#### 進 正 志(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)

ならびに緩和効果があるか否かを検討する目的で 本研究を遂行した。

#### 2. 実験方法

# 2.1 動物およびエストロゲン様物質投与プロトコル

今回の研究では、化学合成された内分泌機乱物 質としてはエストロゲン活性を強く示すことが知 られているジエチルスチルベストロール (DES) を、天然の植物性エストロゲンとしては大豆に含 まれるゲニステイン (GE) を用いた。

#### (1) DES 単独投与

ICR マウス (雄、6週齢) に5%エタノール/ コーンオイルに溶解した DES を 1 ng/kg 体重, 10 ng/kg 体重, 100 ng/kg 体重, 1 μg/kg 体重, 10 μg/kg 体重, 100 μg/kg 体重, 1 mg/kg 体重, 10 mg/kg 体 重, 20 mg/kg 体 重, 100 mg/kg 体 重の種々の量で5日ごとに4回皮下投与した。対 照群には溶媒のみを投与した。初回投与から20 日目にエーテル麻酔下に精巣を摘出し、4%パ ラホルムアルデヒド/PBS で固定し、定法に従っ てパラフィン包埋ブロックを作成した。試料の一 部は電顕用試料とするために2.5%グルタールア ルデヒドで固定し、エポン812に包埋した。パラ フィンブロックより5 µm厚の切片を薄切し, シラン処理スライドグラスに拾い、ヘマトキシリ ン/エオシン染色並びに種々の分子組織細胞化学 的検討に用いた。

# (2) ゲニステイン単独投与

ICR マウス (雄, 6週齢) に5% エタノール /

コーンオイルに溶解したゲニステイン1 mg/kg 体重および3 mg/kg 体重を上記(1)と同様の 方法で投与して試料を作成し、種々の検討に用い た。

#### (3) ゲニステイン + DES 投与

ICR マウス(雄、6 週齡)に5%エタノール/ コーンオイルに溶解したゲニステイン1mg + DES100 ng/kg 体重、ゲニステイン1mg + DES 20 mg/kg 体重、ゲニステイン3mg + DES100 ng/kg 体重、ゲニステイン3mg + DES 20 mg/ kg 体重を上記(1)と同様の方法で投与して試 料を作成し、種々の検討に用いた。

#### 2.2 アポトーシス細胞の検出

ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフ ェラーゼ (TdT) よるビオチン 16dUTP の取り 込みにより DNA の二本鎖切断部位を視覚化する TUNEL 法を用いて、アポトーシス細胞を検出し た。トルエン・エタノール系列で脱パラフィンし た組織切片を, プロテナーゼ K (0.1 μg/ml) で 37℃, 15 分間処理を行ったのち、TdT バッファ ーで前処理を行った。続いて、恒温器内で TUNEL 反応液 (1 × TdT buffer, 0.1 mM DTT, 1.5 mM CoCl2, 20 µM dATP, 5 µM biotin-16dUTP, 0.1 unit/µl TdT) と 37℃, 90 分間, 反 応を行った。西洋ワサビベルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ビオチン抗体を用いて、免疫組織 化学的に biotin-16-dUTP の付加された部位を検 出し、ニッケル・コバルト増感 DAB 反応によっ て可視化した。

#### 2.3 アポトーシス関連分子の検索

アポトーシスに関連した分子である, Fas, Fas リガンド (FasL), Bcl-2, Bax についてそれ ぞれに対する特異抗体を用いて, 免疫組織化学的 に検索した。組織切片を, トルエン・エタノール 系列で脱パラフィンしたのち, 内因性ベルオキシ ダーゼ活性および非特異的反応の阻害を行い, 湿

箱内で特異抗体との反応を行った。続いて、特異 抗体に対する HRP 標識二次抗体を用いて特異抗 体を検出し、DAB 反応によってアポトーシス関 連分子の存在部位を可視化した。また、必要に応 じてオートクレーブによる前処理やメチルグリー ンによる対比染色を行った。

#### 2.4 ステロイドホルモン受容体の発現検索

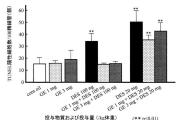
エストロゲン作用を持つとされる内分泌攪乱物質はエスロトゲン受容体を介して作用している可能性があるので、エストロゲン受容体の発現を検索するために、エストロゲン受容体 $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) および $\beta$  (ER  $\beta$ ) について市販の特異抗体を用いて、免疫組織化学的に検索した。

#### 3. 結果と考察

3.1 DES およびゲニステインの精子形成細胞 アポトーシスに対する影響

#### (1) DES 単独投与の影響

これまで、mg/kg 体重レベルの DES 投与によ り精子形成細胞アポトーシスが増加し、20 mg/ kg体重の投与でピークを持つことを報告してい るが、今回、DESの精子形成細胞アポトーシス に対する影響をより詳細に検討するため、1 ng/ kg 体重~100 mg/kg 体重の広い範囲での DES 投与実験を行った。各実験群からの組織切片を terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) 法により染 色し、横断された精細管について精細管あたりの TUNEL 陽性細胞数を計数した。その結果、これ まで知られていた高濃度での TUNEL 陽性細胞 数の増加に加え、低濃度 100 ng/kg 体重の DES 投与でも、TUNEL 陽性細胞が有意に増加してい た (図1、図2a, b, c)。 すなわち DES による アポトーシス誘導作用は100 ng/kg 体重と20 mg/kg 体重の二ヶ所でピークを持つ二峰性を示 すことが明らかとなった。このことは、内分泌攪



(\*\* p<0.01)</li>図1 ゲニステインおよび DES 投与による TUNEL 陽性細胞数の変化

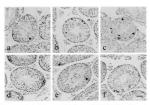


図2 DES およびゲニステイン投与の精子形成細胞アポトーシス に対する影響

(a) 対照群, (b) DES 100 ng/kg 体重投与群, (c) DES 20 mg/kg 体度投与群, (d) 対照群, (e) GE 1mg/kg 体重 +DES 100 ng/kg 体重検技与群, (f) GE 3 mg/kg 体重 +DES 20 mg/kg 体重投与群。スケールは 50 μm。

乱物質の作用が必ずしも濃度依存的でなく、物質 によっては低濃度の暴露によっても影響を受ける 可能性があることを示唆しており、個々の内分泌 攪乱物質の影響について広い濃度範囲で詳細に検 討する必要があることを示している。

#### (2) ゲニステインの影響

ゲニステイン単体の雄性生殖細胞に対する影響 を調べるために、ゲニステインのみを投与したマ ウス精巣でのアポトーシス細胞の頻度を計測した。 日本人の一日あたりのゲニステイン摂取量は約 13.5 mg であり ®、成人男子(18~29才)の平 均体重が約65kg であるので ®、一日のゲニステ イン摂取量は体重1 kg あたり約0.2 mg とな り、5日分では約1 mg/kg 体重に相当する。これより、マウスへのゲニステイン投与量を1 mg/kg 体重およびその3 倍量の3 mg/kg 体重に設定した。TUNEL 染色後、横断された精細管あたりの TUNEL 陽性細胞数を計数し、アポトーシス細胞の頻度を計算した。その結果、TUNEL 陽性細胞数はゲニステイン1 mg/kg 体重および3 mg/kg 体重投与群共にコントロール群との間に有意な差は認められなかった(図1)。この結果より、通常摂取している量およびその数倍のゲニステインを摂取したとしても、少なくとも男性の精子形成能力に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

### (3) DESのアポトーシス誘導作用に対する ゲニステインの抑制効果

DES のアポトーシス誘導作用に対するゲニステインの影響を調べるためにゲニステインと DES の同時投与を行った。前記実験結果よりゲニステインの投与量は1 mg/kg 体重および3 mg/kg 体重とし、DES 投与量はアポトーシス誘導作用のピークである100 ng/kg 体重および20 mg/kg 体重とした。パラフィン切片を用いて TUNEL 染色を行い、精細管あたりの TUNEL 陽性細胞数を計測した。その結果、DES 単独投与の場合と比較して GE 1 mg + DES 100 ng/kg 体

重投与群および GE 3 mg + DES 100 ng/kg 体重 投与群では TUNEL 陽性細胞数に増加は見られ ず、対照群に対する有意差も認められなかった (図1, 図2d, e)。 一方, GE 1 mg + DES 20 mg/kg 体重および GE 3 mg + DES 20 mg/kg 体重投与群では、DES単独投与の場合ほどの TUNEL 陽性細胞数の増加は見られなかったが、 対照群と比較すれば有意に増加していた (図1. 図 2d, f)。このことから、ゲニスタインは低濃 度 DES による精子形成細胞アポトーシス誘導作 用に対して抑制効果を持つこと、また、高濃度 DES によるアポトーシス誘導作用に対しても不 十分ながら抑制している可能性があることが示唆 された。通常環境中に存在する内分泌攪乱物質の 量は、ppbのレベルであることが多いので、大豆 成分の摂取によって微量で作用するエストロゲン 様物質の影響を緩和することが出来る可能性が示 唆された。

## 3.2 電子顕微鏡観察によるアポトーシス細胞 の同定

アボトーシスは本来電子顕微鏡観察により形態的に定義された細胞死の過程であるので<sup>37</sup>、本実験で観察された精子形成細胞死がアボトーシスであるかを形態的に確認するために電顕観察を行った。電顕観察による精子形成細胞でのアボトーシス像は、クロマチンの凝集が著明だけれども細胞質部分には変化を認めないearly stage、細胞内小器官が集積しクロマチンが凝集した核部分と対峙しているような形態を示す intermediate stage.





図3 精子形成細胞アポトーシスの電顕像 (a) intermediate to late stage, (b) late stage。スケールは2μm。

核ならびに細胞質が電子密度の高い小さな凝集院 として分断化されネクローシスに類似した形態を 示す late stage があると報告されているが<sup>80</sup>,今 回の実験でも同様のアポトーシス像が認められた (図3)。

#### 3.3 アポトーシス関連因子の発現

DESによって誘導される精子形成細胞アポト ーシスの分子機構を解析するために、Fas. FasL および Bcl-2. Bax について免疫組織化学的にそ の発現を検索した。対照群のマウス精巣ではFas はライディッヒ細胞に FasL はセルトリ細胞に発 現していた (図 4a, c)。また、低濃度 DES 投与 群およびゲニステイン投与群ではFasおよび FasL の発現は対照群と同様であったが、高濃度 の DES 投与群では精子形成細胞に Fas の発現が 見られた (図4b)。 生殖細胞での Fas の発現は虚 血・再灌流精巣でも報告されており、Fas 系は精 巣が急性の重大な障害を受けたときに凍やかに多 数の配偶子を除去するための機構として働いてい ると考えられているが<sup>9)</sup>、高濃度 DES によって 引き起こされる生殖細胞死の場合も、同様の機構 が働くことが示唆された。

Bcl-2 はすべての実験群で精母細胞や精子細胞 に発現が見られ、実験群間に著明な差は見られな かった(図 5a, b, c)。

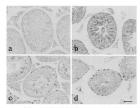


図 4 DES 投与による精子形成細胞での Fas および FasL の発現 (a) Fas. 対照群, (b) Fas. DES 20 mg/kg 体重投与群, (c) FasL、対照群, (d) FasL, DES 20 mg/kg 体重投与群。スケール は 50 μm。

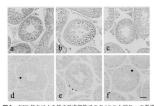


図5 DES 技学による椅子形成網胞での Bel-2 および Bax の発現 (a) Bel-2 対照準 (b) Bel-2 DES 10の jg/kg 体重技学等。 (c) Bel-2 GE 1mg/kg 体重・DES 100 ng/kg 体重技学等。 (d) Bax, 対照等。 (e) Bax, DES 100 ng/kg 体重技学等。 (f) Bax, GE 1mg/kg 体重サBE 100 ng/kg 体重技学等。 スケールは50 μ

Bax もすべての実験群で精母細胞や精子細胞に発現が見られ、その殆どの細胞で細胞質の一部分に限局して存在していた。しかし、一部に細胞全体が強陽性に染まる細胞が見られ、TUNEL陽性細胞が多い実験群でこのBax強陽性細胞も増加していた(図5d, e, f)。ミラー切片を用いてTUNEL染色とBaxの免疫染色を行い検討したところ、TUNEL陽性細胞とBax強陽性細胞は高い割合で一致しており(図6)、生殖細胞のアポトーシス誘導にBaxの発現変化が密接な関わりを持っていることが示唆された。

以上の結果より、アポトーシスの誘導機構としては高濃度のDESではFas/Fasリガンド系と Bcl-2/Bax系が、低濃度の場合はBcl-2/Bax系が 働いている可能性が考えられた。また、ゲニステ インの同時投与により、低濃度DESによるアポ トーシス誘導作用が阻害されたことから、ゲニス テインは何らかのメカニズムによりBaxの発現

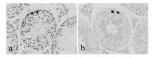


図6 TUNEL 陽性細胞と Bax 陽性細胞の一致 DES 100 ng/kg 体重投与群からのミラー切片を用いて TUNEL 染色 (a) と Bax の免疫組織化学染色 (b) を行った。両者の陽性細胞はかなりの割合で一致していた。

に影響を及ぼし、アポトーシス誘導作用に対して 抑制作用を示している可能性が示唆された。

#### 3.4 エストロゲン受容体の発現

今回用いた DES のようなエストロゲン作用を 有する内分泌攪乱物質の精巣への直接的影響を解 析する上で、作用点としてその受容体であるエス トロゲン受容体を介したものであるか否かを検討 する必要があると考え、エストロゲン受容体の発 現動態を免疫染色により検討した。

市販抗体を用いて、ER  $\alpha$ の免疫染色を行った ところ、ER  $\alpha$ はライディッヒ細胞の核に発現が 認められ、実験群間で発現パターンに差は認めら れなかった(データ末掲載)。このため、ER  $\alpha$ が内分泌攪乱物質によるアポトーシス誘導に関与 している可能性は低いと考えられる。

ER β についても解析を試みたが、使用した数 種の市販抗体では特異的な染色が得られず、アポ トーシス誘導に関与しているか否かは明らかにで きなかった。今後とも検討を継続していく必要が あると考えている。

#### 4. おわりに

食品中に本来含まれる有効成分によって内分泌 提乱物質の生体への影響を抑制できる可能性があ るか否かを探る目的で本研究を遂行した。

精子形成細胞死に及ぼすDESの影響を詳細に検討するために、広範囲の濃度のDES 投与実験を行った結果、高濃度での精子形成細胞アポトーシス誘導作用に加えて、環境ホルモンとしての作用濃度と考えられるkg体重あたりngのレベルでもアポトーシス誘導作用を持つことが示された。この低濃度でのアポトーシス誘導作用はゲニステインの同時投与により抑制することができ、大豆関連食品の摂取により、ある種の内分泌攪乱物質による生殖能力の低下を防止できる可能性が示された。また、環境ホルモンによる生殖細胞死誘導れた。また、環境ホルモンによる生殖細胞死誘導

の分子機構を検討するとともに、ゲニステインに よる抑制効果の作用機序を解析するため、Fas. FasL および Bcl-2. Bax の発現に関して免疫組織 化学的に検討した結果, Fas は mg/kg 体重を越 すような高濃度 DES 投与の場合のような劇的な 精巣障害時に、積極的に配偶子を死滅させ、排除 するための機構として働いていることが示唆され た。一方、Bax は低濃度 DES 投与による細胞死 誘導時にもアポトーシス細胞に強発現していたこ とから、内分泌攪乱物質による生殖細胞死誘導に 普遍的に関与している可能性が示唆された。また. ゲニステインは Bax の発現に影響を与えること により、DES によるアポトーシス誘導作用に対 して抑制効果を示している可能性が示唆された。 このようなエストロゲン作用を持つ内分泌攪乱物 質の影響がエストロゲン受容体を介するものなの か否かは重要な問題であるが、今回の実験では特 定することができなかったため今後の検討が必要 である。

最後に、本研究を遂行するにあたり、貴重な研 究助成を賜りました浦上食品・食文化振興財団お よび関係各位に心より感謝いたしますと共に、貴 財団の益々のご発展をお祈り申し上げます。

#### 参考文献

1) Kurzer MS, Xu X. Dietary phytoestrogens. Annu Rev

Nutr. 1997; 17: 353-381.

- Morabito N, Crisafulli A, Vergara C et al. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized doubleblind placebo-controlled study. J Bone Miner Res. 2002; 17 (10): 1904-1912.
- Cassidy A, Bingham S, Setchell KD. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. Am J Clin Nutr. 1994; 60
   (3): 333-340.
- Dhom G. Epidemiology of hormone-dependent tumors.
  In: Voight KD, Knabbe C (eds) Endocrine-Dependent tumors. Raven Press, New York, 1992; pp 1-42.
- Nakamura Y, Tsuji S, Tonogai Y. Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. J AOAC Int. 2000: 83 (3): 635-650.
- 6) 年齢区分別体位基準値、厚生統計要覧、厚生労働省統計 表データベースシステム (http://www.dbtk.mhlw.go.jp/ toukei/youran/data13/2-03-1.htm).
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972; 26 (4): 239-257.
- Koji T, Wang RA. Male germ cell death in mouse testes. In: Yamada T, Hashimoto Y (eds) Apoptosis: its role and mechanism. Business Center for Academic societies Japan, Tokyo, 1998: pp 85-96.
- 9) Koji T, Hishikawa Y, Ando H, Nakanishi Y, Kobayashi N. Expression of Fas and Fas ligand in normal and ischemia-reperfusion testes: involvement of the Fas system in the induction of germ cell apoptosis in the damaged mouse testis. Biol Reprod. 2001; 64 (3): 946954.

## Preventive Effect of Genistein on Diethylstilbestrol Induced Spermatogenic Cell Apoptosis

Masashi Shin

(Department of Histology and Cell Biology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences)

To understand the effect of diethylstilbestrol (DES) and genistein (GE) on mammalian spermatogenesis, we investigated the effect of wide ranges of DES on spermatogenic cell apoptosis in adult mice testis and whether GE prevents the effect of DES on germ cell apoptosis or not. Mice were subcutaneously administered DES or GE or mixture of GE and DES at various doses every 5 days and killed 20 days after the first injection. The testes were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS and embedded in paraffin. The frequency of germ cell apoptosis was determined by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) staining and shown as the number of TUNEL-positive cells per seminiferous tubule in each experimental group. As a result, in the DES-injected groups, the number of TUNEL positive germ cells was increased and had two peaks at doses of 100 ng/kg body weight (bw) and 20 mg/kg bw. On the other hand, the number of TUNEL positive cells did not increase in 100 ng/kg bw of DES with 1 or 3 mg/kg bw of GE injected groups as compared to control group. It was suggested that GE might prevent germ cell apoptosis induced by low dose of DES. For analyzing the molecular mechanism of germ cell apoptosis induced by DES and preventive effect by GE, the expression of Fas/Fas ligand (FasL) and Bcl-2/Bax were examined by immunohistochemistry. As a result, Fas was expressed in germ cells of high doses of DES injected mice testes, but it was not expressed in germ cells at control and low dose of DES injected groups. These results suggest that the roles of the Fas/FasL system in germ cell apoptosis may be limited to the testis which was damaged critically by severe treatment such as high doses of DES injection and that the Bcl-2/Bax system may be generally implicated in the induction of germ cell apoptosis. Also, we found that the strong expression of Bax in germ cells was tightly associated with TUNEL positive cell in all experimental groups. Since estrogenic compounds are assumed to affect cells through estrogen receptor (ER), we examined their expression immunohistochemically. Though ER a was expressed in Leydig cell nuclei and expression pattern didn't change among experimental groups, ER a seemed to be unrelated to the DES induced germ cell apoptosis. The specific staining of ER  $\beta$  did not detected in mouse testis, therefore it is not clear whether ER  $\beta$  is concerned with germ cell apoptosis induced by DES. In this study, it was suggested that intakes of foods made from soy bean may prevent the reproductive toxicity of some kind and dose of estrogenic endocrine disruptors.