

食品類中のエストロゲン活性の調査

永洞 真一郎 阿賀 裕英 芥川 智子 沼辺 明博 村田 清康 坂田 康一

要 約

内分泌かく乱物質（いわゆる環境ホルモン）は、生体内の内分泌系、特に性ホルモンの作用をかく乱するとされている。その中で特に女性ホルモン（エストロゲン）活性を示す物質が、生物のオスをメス化する可能性が指摘されている。一方、食品中には女性ホルモンと同様の働きをする物質の存在が知られており、機能的食品として重要視されている。こうした食品が廃棄され環境中に排出された場合、生態系に対して何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。このことから、水環境への混入の可能性が高い液体状の食品（ジュース、調味料等）12種類のエストロゲン活性を酵母Two-Hybrid法を用いて測定した。その結果、フルーツジュース類や酒類、液状調味料はエストロゲン活性を示さず、みそ汁上澄み液のみが弱いながらもエストロゲン活性を示した。これは、みその原料である大豆に含まれるダイゼインやゲニスタインによるものと推察された。

Key words: 内分泌かく乱物質、エストロゲン活性、酵母Two-Hybrid法

1 はじめに

1997年ころから、化学物質による生物への影響、特に性ホルモンのかく乱が指摘され、「環境ホルモン」として関心が集まっている。その中でも、あたかも女性ホルモン（エストロゲン）であるかのように働き、生物のオスをメス化する化学物質の存在が懸念されている¹⁾³⁾。その中で、大豆などの植物体には図1に示すようなエストロゲン活性を有する物質（ダイゼイン、ゲニスタイン、クメストロールなどの植物エストロゲンと呼ばれる物質）が含まれており、こうした植物の過剰摂取などによりウシやヒツジが不妊症を発症する生物例も報告されている⁴⁾。一方、女性ホルモンの働きを有するとされる食品類が、女性らしさを保つといった理由から機能的食品として注目されている。こうした食品類が環境中に排出された場合、その食品に含まれるエストロゲン活性が生態系に対して何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。また、一般家庭から排出される下水は水洗あるいは汲み取りによって処理されるものの、雑排水などは直接河川へ排出されてしまう可能性もある。このことから、水環境への混入の可能性が高いと考えられる液体状の食品類（飲料、調味料等）のエストロゲン活性を測定し、河川などの水質調査における基礎的知見を得ることを試みた。

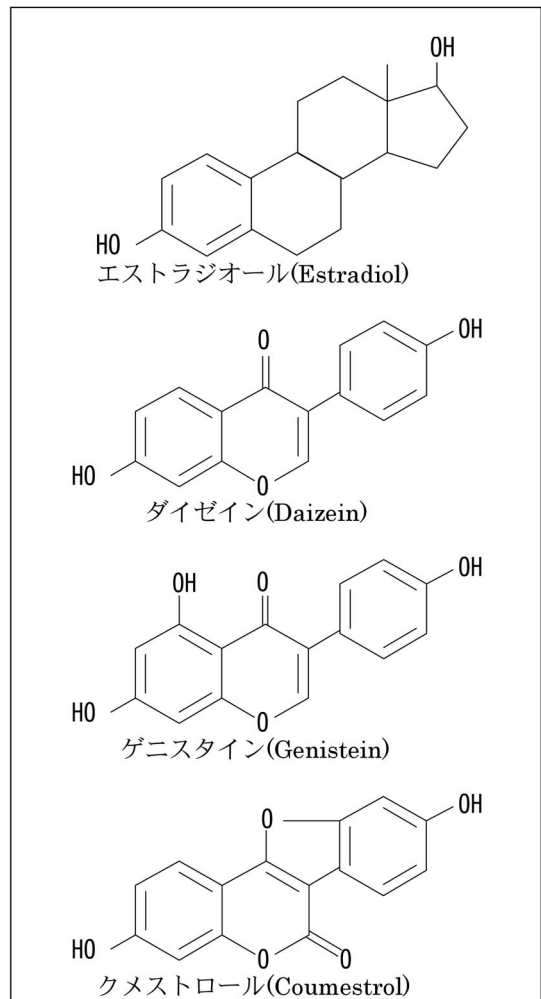


図1 エストラジオールと主な植物エストロゲンの構造

2 方法

2.1 試料の選定と前処理

事前に国内外の文献から、エストロゲン活性物質が含まれる食品に関する報告例の検索を行った。その結果、エストロゲン活性を有する食品としてザクロ⁵⁾、ワイン⁶⁾、大豆製品⁷⁾が報告されていた。特に大豆製品にはダイゼイン、ゲニスタインといった物質が含まれており、これらの物質はエストロゲン活性を有するとされている。これらの検索結果から、フルーツジュース6種（オレンジ、アップル、グレープフルーツ、グレープ、プルーン、ザクロ）、酒類3種（赤ワイン、白ワイン、ビール）、大豆関連3種（しょうゆ、みそ汁上澄み、豆腐浸漬液）の合計12種類を選定した。これらの原材料名などを表1に示す。この表からわかるとおり、フルーツジュースはすべて濃縮果汁還元（プルーンジュースのみ乾燥果実還元）の100%タイプである。ザクロジュースは水で3倍に希釈して飲用するよう記してあったため、Milli-Q水で3倍に希釈して試験に供した。なお、オレンジ、グレープフルーツ、プルーンの各ジュースは遠心分離法によって沈殿を除去してから試験に供した。ワイ

表1 試料の原材料名その他

サンプル名	原材料名その他
オレンジジュース(濃縮還元)	オレンジ, 香料
アップルジュース(濃縮還元)	りんご, 香料, 酸化防止剤(ビタミンC)
グレープフルーツジュース(濃縮還元)	グレープフルーツ, 香料
グレープジュース(濃縮還元)	ぶどう, 香料
プルーンジュース(濃縮還元)	プルーン
ザクロジュース(濃縮還元)	ザクロ, ザクロ種子エキス
赤ワイン	アルコール分14%未満 酸化防止剤(亜硫酸塩)
白ワイン	アルコール分14%未満 酸化防止剤(亜硫酸塩)
ビール	ホップ, 米, コーンスターチ アルコール分約5%
しょうゆ	脱脂加工大豆(遺伝子組換えでない), 大豆(遺伝子組換えでない), 小麦, 食塩, アルコール
みそ汁上澄液	米みそ(大豆: 遺伝子組換えでない)わかめ, かつおエキス, 発酵調整剤(エタノール), 調味料(アミノ酸, 核酸)
豆腐浸漬液	丸大豆, 塩化マグネシウム含有物(にがり)

ンは赤、白ともにフルーツジュースを添加したタイプをそのまま用いた。ビール（生）も一般的なものをそのまま用いた。みそ汁は生味噌タイプの即席みそ汁（わかめ）の素に、Milli-Q水を指定量（160ml、室温）を添加してよく攪拌した後、遠心分離法を用いて沈殿物を除去し、Whatman社製ガラスフィルターGF/D（保持粒径 $2.7\mu\text{m}$ ）を用いてろ過してから試験に供した。豆腐浸漬液は、絹ごし豆腐の浸漬してある淡黄色透明の溶液を、Whatman社製ガラスフィルターGF/Dを用いてろ過してから試験に供した。

2.2 固相抽出および溶出

各試料は、固相抽出法を用いてエストロゲン活性物質を抽出した。この操作の流れを図2に示す。固相抽出材にはGL Science社製GL Pak Aquasis PLS-3を用いた。溶出溶媒はジクロロメタンを用い、溶出後 N_2 パージによってジクロロメタンを留去した後、酢酸エチルに溶解してからりん酸バッファ（ $\text{pH}=9.1$ ）を加えて水溶性色素などを抽出除去し、酢酸エチル相を分取した。この酢酸エチル相を N_2 パージによって乾固した後ただちにジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解して実験試料とした。

2.3 酵母Two-Hybrid法

酵母菌は大阪大学の西原らによって開発された、ヒトエストロゲンレセプター α を導入した菌株を用いた⁸⁾。エストロゲン活性の検出は、この酵母菌がエストロゲン活性物質の存在下において産生する β ガラクトシダーゼの活性を、発光強度として測定する簡便法を用いた⁹⁾。

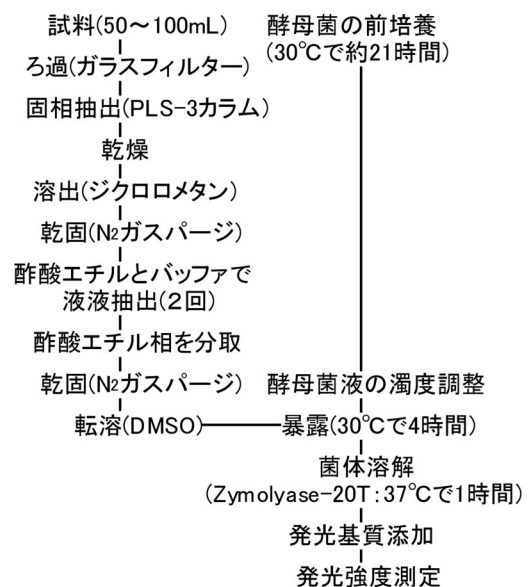


図2 酵母Two-Hybrid法とその前処理の操作手順

3 結果

3.1 酵母Two-Hybrid法によるエストロゲン活性(-S9)

酵母Two-Hybrid法による、-S9における陽性対照物質(ポジティブコントロール)として使用したβエストラジオール(E2)のEC×10(ベースラインに比べて発光強度が10倍になる濃度)はおおよそ100pM~200pMであった。この結果、みそ汁上澄み液のみが発光強度が3倍以上増幅され、陽性と判定された。この応答曲線を図3に示す。この応答曲線から線形近似法によりエストラジオール換算濃度を算出すると2.4ng(E2)/Lであった。

3.2 酵母Two-Hybrid法によるエストロゲン活性(+S9)

酵母Two-Hybrid法による、+S9試験も同様に行った。+S9試験とは、動物体内において有害化学物質の分解をつかさどる肝臓の酵素(チトクロムP450群)を反応させることによって、生体内における代謝生成物の活性を評価する実験系である。この試験における陽性対照物質(ポジティブコントロール)として使用したメトキシクロール(MxC)のEC×10(ベースラインに比べて発光強度が10倍になる濃度)はおおよそ1.7nM~2.4nMであった。各試料の測定の結果、すべての試料において発光強度が3倍を超過せず、陰性と判定された。

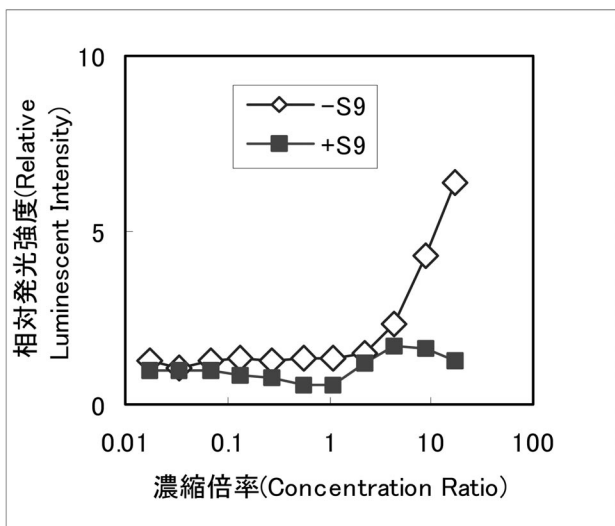


図3 みそ汁上澄み液のエストロゲン活性応答

4 考察とまとめ

植物は動物と違って移動することができない。そのかわりに太陽光を浴びることによって自ら栄養分を合成することができる。また、移動できないために捕食者から逃れることができない。植物がエストロゲン活性物質や、アレロパシー(フィトンチッドとも呼ばれる)と総称される生理活性物質を合成するのは捕食生物に対して悪影響を与えたり、子孫を残させないためであるという説もある^{10,11)}。香山らは、卵巣がん由来の培養細胞を用いて、大豆、黒豆、モヤシ、インゲン、菊の花、山東菜、黄ニラ、青シソ、ターサイ、サンショウ、きぬさや、ザクロ、ホップでエストロゲン活性を確認したと報告している¹³⁾。今回の調査においては、みそ汁上澄み液のみが発光強度を示した。これはみその原料である大豆に含まれるゲニスタインやダイゼインによるものと推察された。検出されたエストロゲン活性が、ゲニスタインのみによるものと仮定すると、ゲニスタインのエストロゲン活性はエストラジオールの約4500分の1であったことから、みそ汁上澄み液のゲニスタイン濃度は10.9μg/Lと推算された。さらにこの結果からみそのゲニスタイン含有量を推算すると99.0ng/g(wet)と求められた。この値は文献値¹²⁾と比較すると0.05%程度であり、わかめや調味料の重量を考慮しても0.1%以下であった。このことはゲニスタインのほとんどがみそ汁の残渣(沈殿する部分)に含まれていることを示唆している。一方、ビールや豆腐浸漬液からはエストロゲン活性は検出されなかった。しかし本報と同一あるいは同等の手法(酵母Two-Hybrid法やYes-Assay法)において豆腐¹⁴⁾そのものはエストロゲン活性を示すとされている。また、国立環境研究所の白石不二雄らは、ビールのエストロゲン活性を酵母Two-Hybrid法によって検出している。本報において採用した固相抽出法は、実際の環境試料に採用しているものであるが食品の場合、色素などの妨害物質が大量に含まれているため、必ずしも今回の抽出条件が最善ではないと考えられる。また、ワインに関してはアルコール含量が高いため、あるいは色素成分の妨害のため固相抽出法によってエストロゲン活性物質が抽出されなかった可能性がある。こうした、食品に含まれるエストロゲン活性物質が水環境に及ぼす影響を報告した例はまだない。今後の詳細な調査研究が必要と思われる。

5 参考文献

- 1) 化学物質安全情報研究会編「環境ホルモンの問題とその対策」オーム社(1999)
- 2) 社団法人日本水環境学会関西支部編「アプローチ環境

- ホルモン～その基礎と水環境における最前線～」技報堂出版 (2003)
- 3) 西川洋三「環境ホルモン～人心を「攪乱」した物質～」日本評論社 (2003)
 - 4) C.L.Hughes Jr., Phytochemical mimicry of reproductive hormones and modulation of herbivore fertility by phytoestrogens. *Environmental Health Perspectives* 78 171-174 (1988)
 - 5) N.M.A.Moneam, A.S.El Sharaky and M.M. Badreldin;, Oestrogen content of pomegranate seeds. *Journal of Chromatography* 438 438-442 (1988)
 - 6) C.M.Klinge, K.E.Risinger, M.B.Watts, V.Beck, R. Eder and A.Jungbauer;., Estrogenic Activity in White and Red Wine Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 1850-1857 (2003)
 - 7) Y.Nakamura, S.Tsuji and Y.Tonogai;, Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. *Journal of AOAC International* 83 635-650 (2000)
 - 8) J.Nishikawa, K.Saito, J.Goto. F.Dakeyama, M. Matsuo and T.Nishihara;, New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicology and Applied Pharmacology* 154 76-83 (1999)
 - 9) 白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 西原力, 森田昌敏;, 酵母Two-Hybrid Systemによる簡便なエストロゲンアッセイ系の開発 *環境化学* 10 57-64 (2000)
 - 10) B.P.トーキン, 神山恵三「植物の不思議な力=フィトンチッド: 微生物を殺す樹木の謎を探る」講談社ブルーバックス (1983)
 - 11) 畑中顯和「みどりの香り」中公新書 (1988)
 - 12) K.Toyomura and S.Kono;, Soybeans, soy foods, isoflavones and risk of colorectal cancer: a review of experimental and epidemiological data. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 3 125-132 (2002)
 - 13) 香山不二雄, 荒尾行知, 池田和博;, 植物エストロゲンの作用機序とベネフィット評価 *環境ホルモン学会ニュースレター* Vol.6 No.3 (2003)
 - 14) T.Takamura-Enya, J.Ishihara, S.Tahara, S.Goto, Y.Totsuka, T.Sugimura, K.Wakabayashi;, Analysis of estrogenic activity of foodstuffs and cigarette smoke condensates using a yeast estrogen

screen method. *Food and Chemical Toxicology* 41 543-550 (2003)

The investigation on the estrogenic activities in foodstuffs.

**Shinichiro NAGAHORA, Hirohide AGA,
Tomoko AKUTAGAWA,
Akihiro NUMABE,
Kiyoyasu MURATA and Koichi SAKATA**

Abstract

Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs), so called environmental hormones, are suspected to induce the abnormality to human and wildlife by disturbing the endocrine function, especially sex hormone system. Estrogenic active chemicals were suspected to feminize the male organisms. Meanwhile, the foods containing estrogenic substances are regarded as valuable to keep feminine and to reduce post menopausal diseases. The possibility of causing some effects for the ecosystem is considered when these foods are disposed, and discharged into the water environment. We investigated the estrogenic activity in foodstuffs, juices and drinks by Yeast Two-Hybrid system. Only the supernatant fluid of miso-soup showed estrogenicity. The source of estrogenicity was considered daizein and genistein. But assuming that estrogenicity caused by only genistein, the content of genistein was too low compared with literature. This showed that almost of estrogenic substances was contained in the precipitation part.