

生薬におけるホルモン作用物質の生殖機能への影響

山内兄人

(早稲田大学人間科学学術院神経内分泌研究室)

研究目的

東洋医学で用いられてきた薬は草木、動物、鉱物からつくられた生薬であり、症状にあわせて組み合わせ服用し、からだの回復力を助ける役割を果たすものが多い。そのような生薬の中には動物のエストロゲンと同様の作用を持つ成分を含むものがある。風邪の症状のときに服する葛根湯の主成分である葛根はくずの貯蔵根であり、ダイゼインやゲニステインを含む。それらの物質はエストロゲン作用をもち、植物エストロゲンと呼ばれる。近年性の更年期のサプリメントとして近年商品化されてもいる。

生薬に含まれている植物エストロゲンは吸収されると、からだや脳に働いて生殖機能に影響を与えたり、胎児期の脳の発達に影響を与えたりと考えられる。本研究では植物エストロゲンの脳機能、特に生殖にかかわる機能に対する作用、子宮など生殖器官に対する作用、ラットでは新生時期に生じる脳機能や生殖器官の性分化、発達に対する作用機序についてラットを用いて明らかにしてきた。本研究を開始した2007年から2009年までの実験結果をここにまとめる。

植物エストロゲンの脳機能に対する作用

生殖行動である性行動や母性行動は脳により制御されており、エストロゲンが影響力をもつ。しかし、卵巣除去ラットに多量のゲニステイン、ダイゼイン、クメステロールを投与したが、エストロゲンのように発情状態を誘起することができなかった。出産直後より生じる母性行動は未経産ラットに新生児を与えても生じないが、連日与え続けると生じるようになる。エストロゲンやクメステロールを投与して母性行動の発現を見た結果、未経産ラットはエストロゲンを10日間投与されると早まったが、クメステロールを投与しても影響がなかった(論文2)。このように、成熟雌ラットの生殖機能に植物エストロゲンは強い影響力を持たないという結果が得られている。

脳における生殖機能制御のメカニズムには脳内エストロゲン受容体(ER)の発現制御が重要である。エストロゲンはER発現を抑制する(ダウンレギュレーション)ことで生殖機能の調節をしている。植物エストロゲンの作用の解析に入る前に、ERのダウンレギュレーションについて解析し、脳の部位による違いと、性差のあることも見出

して報告した(論文5)。植物エストロゲンにもERに対するダウンレギュレーションの能力があるか、クメステロールを投与してERの発現を調べた。

卵巣除去ラットにクメステロールを投与し24時間後、排卵に重要な視索前野前腹側脳室周囲核(AVPvN)や弓状核(ARC)、雌性行動に重要な視床下部腹内側核(VMN)のエストロゲン α 受容体(ER α)免疫陽性細胞数を測定した。その結果、AVPvNやVMNではエストロゲンほどではないにしろクメステロールにより免疫陽性細胞数の低下がみられた。一方、ARCではエストロゲンの効果はあったが、クメステロールにはなかった(国際学会10)。このように、植物エストロゲンも脳のエストロゲン受容体発現に部位依存的に影響をもつことが示され、機能にも少なからず影響もつている可能性が示唆された。

植物エストロゲンの子宮への作用

エストロゲンは子宮の粘膜、筋を発達させる作用を持つ。クメステロールやゲニステインが子宮に対してどのように作用するか投与して調べた。また、エストロゲン受容体は α 型(ER α)と β 型(ER β)の二種類のサブタイプが存在し、植物エストロゲンはER α よりER β に対する結合力の強いことから、植物エストロゲンの子宮に対する効果がどちらのERに作用した結果なのか、ER α 作動剤Propyl pyrazole triol (PPT)または、ER β 作動剤であるDiarylpropionitrile (DPN)を投与して影響を見た。

卵巣除去ラットに植物エストロゲンまたはER作動剤を皮下投与し24時間後の子宮の変化を見た結果、1mgクメステロールを投与すると、エストラジオールほどではないが、子宮重量の増加が認められた。ゲニステインは増加傾向が見られたが、統計差がなかった。このように、植物エストロゲン、特にクメステロールは子宮を短時間に発達させる働きを持つことが示された。また0.5, 0mg PPTを投与すると子宮の発達が見られ、1.0mg DPN群でも子宮が多少大きくなったが、統計的な差は見られなかった。したがって、植物エストロゲンによる子宮の肥大は主にER α を介在して子宮に作用していると考えられる(緒方、未発表)。

植物エストロゲンの出生直後の脳への作用

成長過程において正常な生殖能力の獲得は種の保存にとって不可欠である。ラットの脳機能の雌雄差は出生前後のテストステロンが脳に作用して生じさせる。ラットの脳の神経細胞内ではテストステロンはエストラディオールに芳香化されて作用する。すなわち、エストロゲンでラットの脳の雌性化が生じる。したがって、植物エストロゲンが未成熟な脳に作用して、性分化に影響を及ぼす可能性が考えられる。

本研究開始時には、ゲニステインやダイゼイン、クメステロールを出生直後の雌ラットに投与すると排卵周期は消失し、雌特有の性行動であるロードーシスの発現が低下するという結果をていた (Kouki et al, 2003, 2005)。その後赤ぶどうに含まれるレスベラトロールを投与した結果、性行動に関しては影響がなかったが、排卵周期は多少の異状をきたした (未発表)。このように植物エストロゲンは物質により作用の強弱はあるがラットの脳を雌性化している。また、クメステロールやゲニステインは膣の開口も早めることが示され、末梢生殖器官の発達にも影響を持つことが明らかとなった。

最終年度には、植物エストロゲンの効果がER α 、ER β どちらに作用することで生じるのか調べるため、PPTまたはDNPを出生5日目の新生雌ラットに投与して影響を見た。その結果、出生5日目に100 μ gPPTを一回投与された雌ラットは性周期が不規則になり、ロードーシスの低下が見られた。一方、250 μ gDNP投与では性周期が一部不規則になったが、ロードーシスの低下は見られなかった。この結果は植物エストロゲンのロードーシスの雌性化は主としてER α を介して行われていると考えられ、性周期の機能に関してER α が主として関わるが、ER β も関係していることが示された。一方、膣の開口はPPTにより早まったが、DNPでは全く影響がなく、植物エストロゲンによる膣の発達はER α を介していることが明らかになった (金谷、未発表)。

【研究成果 業績】

原著論文

1. Kouki T, Yamanouchi K: Postnatal development of septal projections to the midbrain central gray in female rats: Tract-tracing analysis with DiI. *Neurosci Lett*, 411 (1) : 37-42 (2007)
2. Sakai M, Yamanouchi K: Effects of estrogen, androgen or phytoestrogen on retrieving and licking behaviors in nulliparous and male rats. *Zool Sci*, 24 (4) : 894-898 (2007)
3. Kanno K, Shima S, Ishida Y, Yamanouchi K : Ipsilateral and contralateral serotonergic projections from dorsal and median raphe nuclei to the forebrain in rats: Immunofluorescence quantitative analysis. *Neurosci Res*, 61 (2) : 207-218 (2008)
4. Wada S, Yamada S, Yamanouchi K: Additive inhibition of lordosis by simultaneous treatments with GABA_A and GABA_B receptor agonists, muscimol and baclofen, in female rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 90 (4) : 590-593 (2008)
5. Yamada S, Noguchi D, Ito H, Yamanouchi K: Sex and regional differences in decrease of estrogen receptor α -immunoreactive cells by estrogen in rat hypothalamus and midbrain. *Neurosci. Letter*, 463 (2) : 135-139 (2009)

国際学会

6. Kakeyama M, Endo T, Yamanouchi K, Tohyama C: Maternal exposure to a low dose dioxin affects the paired associative learning behavior of offspring of Long-Evans rats. 28th Int. Symp. On Halogenated Persistent Organic Pollutants (DIOXIN2007). Sept. Tokyo, 2007
7. Yamada, S, Yamanouchi K: Effect of lateral septum lesions on expression of estrogen receptor α in the rat brain. US/Japan neurosteroid symposium, Sep. 8-11, 2008, Gifu, Japan
8. Ito H, Yamada S, Noguchi D, Yamanouchi K: Sex and regional differences in number of estrogen receptor α immunoreactive cells in the rat brain Society for Behavioral Neuroendocrinology 12th Annual meeting, Groningen, the Netherland, July 7-10, 2008 Abstract p.98
9. Yamada Y, Yamanouchi K: Lateral septum regulates expression of estrogen receptor alpha in midbrain central gray of female rats. Society for Behavioral Neuroendocrinology 12th Annual meeting, Groningen, the Netherland, July 7-10, 2008 Abstract p.98
10. Sugitani M, Yamanouchi K: Decrease of number of estrogen receptor α -immunoreactive neural cells by a phytoestrogen in female rat hypothalamus Society for Behavioral Neuroendocrinology 12th Annual meeting, Groningen, the Netherland, July 7-10, 2008 Abstract p.98
11. Ito H, Yamanouchi K: Sex difference of p-chlorophenylalanine-sensitivity in serotonin-immunoreactive cells in rat raphe nuclei. 16th International Congress Comparative Endocrinology June 22-26, Hong-Kong, 2009, Abstract p.159.
12. Shimizu H, Yamanouchi K: Effect of mesencephalic raphe nuclei lesions on anovulation caused by over exercise stress in female rats, 16th International Congress Comparative Endocrinology June 22-26, Hong-Kong, 2009, Abstract p.158.