

## 厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)

## 総括研究報告書

主任研究者 今井 清 (食品薬品安全センター 秦野研究所)

## 研究要旨

本研究は、内分泌かく乱化学物質の諸課題の内、試験法の開発を中心とした研究を推進し、経済開発協力機構(OECD) や米国環境防護庁関係機関 (EPA・ED-STAC) から提案されている諸試験法の試行的実施と必要に応じたそれらの改良、ならびに新規試験法の開発等を総合的に推進することを目的として実施された。

研究の1年目にあたる本年度は、1) 試験管内試験法、2) 代謝薬理作用に関する試験法、3) 動物を用いた試験法、4) 健康影響への情報収集の4分野に分けて研究を行った。試験管内試験法に関しては、数種の内分泌かく乱化学物質 (EDCs) のヒト $\alpha$ エストロゲン受容体に対する親和性は、ラットの子宮から得たエストロゲン受容体に対する親和性とほぼ同程度であったが、ヒト $\beta$ エストロゲン受容体は genistein 対し約10倍強い親和性を示すこと、ステロイドホルモン受容体遺伝子に属する NOR-1 遺伝子あるいは膜受容体を介した転写活性の変化を、ラット副腎髄質由来の PC12 細胞に、適切なレポーター遺伝子を結合して導入することにより検出可能なことを明らかにした。代謝薬理作用に関する試験法の検討では、ヒトフェノール硫酸転移酵素分子種 SULT1A1 が、ビスフェノールAの硫酸抱合反応を触媒すること、本酵素の変異型  $^{213}\text{His}$ 、 $^{223}\text{Val}$  では触媒活性が非常に低いことを確認したほか、エストロゲン発癌のリスクマーカーと考えられているカテコールエストロゲンおよびその代謝物の尿試料を用いた同時分析法の開発、実験動物の血液中の各種ホルモンの測定法の改良を行った。

動物を用いた試験法の改良あるいは新しい試験法の開発のための研究では、dibutylphthalate (DBP)を2%含有する飼料を妊娠動物に与えると多くの胚が死亡し、母体の卵巣重量、子宮重量、血中プロゲステロン濃度が低下していること、雄ラット新生児に17 $\beta$ -estradiol, nonylphenol, estradiol benzoate, bisphenol Aを投与すると性的二型核あるいは第3脳室周囲層にある前腹側脳室周囲核の容積が減少し(雄の雌化)、成熟すると交尾行動の異常など生殖機能障害が起こること、マウスの全胚培養胎児に glufosinate (除草剤)を作用させると中枢神経にアポトーシスが起り、前脳、鰓弓の低形成、神経管の開存が起きることを明らかにした。さらに、雄ラット肝で特異的に産生される $\alpha$ 2U-グロブリンの血清中濃度が、DESの投与により用量依存的に減少することが確認された。

一方、EDCsと考えられている14化合物中10物質 (alachlor, aldrin, DDT, permethrin, trifluralin, vinclozolin, DES, PCBs など)が肝発癌に促進的に作用することが明らかとなったが、methoxychlor, atrazine, bisphenol A, 17 $\beta$ -estradiol は、甲状腺発癌に対しては促進効果を示さなかった。さらに、内分泌かく乱化学物質の可能性が疑われている150物質をリストアップしてデータベース化し、内分泌かく乱化学物質を検出するための各試験法を比較検討して、その有用性量的点を整理する作業を開始したほか、3D-QSARによりダイオキシン類の3次元構造を予測し、エストロゲン受容体との結合様式を分子モデルを用いて推測した。また、いわゆる植物由来ホルモンおよび有機すずについて定量的なデータを収集し、人に対するリスク・ベネフィットの検討を行うとともに、内分泌かく乱化学物質に関するエンサイクロペディアの集大成を目標にして、キーワードの選択作業を開始した。本研究により、OECDなどで提案されている内分泌かく乱化学物質検索のための試験法に加えて、生体内で起きる現象をより正確に反映した簡便なスクリーニング法あるいは胎児、新生児を含む実験動物を用いた内分泌かく乱物質の神経系、免疫系および発癌性に対する影響を検討するための新たな試験法の開発が必要であることが確認され、そのための基礎的な情報を得ることが出来た。

分担研究者氏名・所属施設名および所属施設における役職名

井上 達 国立医薬品食品衛生研究所 部長  
安全性生物試験研究センター・毒性部

永井 賢司 三菱化学安全科学研究所 主任研究員  
鹿島研究所・薬理

武吉 正博 (財) 化学品検査協会・化学 副所長  
品安全センター日田研究所

塚田 俊彦 国立がんセンター研究所 室長  
細胞増殖因子研究部・受容体研究室

大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所 部長  
安全性生物試験研究センター・薬理部

小島 幸一 (財)	食品薬品安全センター 秦野研究所・中央試験 管理部	部長
鈴木恵真子 (財)	食品薬品安全センター 秦野研究所・中央試験 管理部	研究員
長尾 哲二 (財)	食品薬品安全センター 秦野研究所・研究部	室長
渡辺 敏明	山形大学医学部衛生教室	助教授
川島 邦夫	国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所・生物試験部	部長
白井 智之	名古屋市立大学医学部第一 病理学教室	教授
広瀬 雅雄	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センタ ー・病理部	部長
長谷川隆一	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センタ ー・総合評価研究室	室長
神沼 二真	国立医薬品食品衛生研究所 化学物質情報部	部長
関沢 純	国立医薬品食品衛生研究所 化学物質情報部	室長
菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センタ ー・毒性部	室長
長村 義之	東海大医学部	副学部長・教授

#### 研究目的：

本研究では、内分泌かく乱化学物質の諸課題の内、試験法の開発を中心とした研究を推進し、ごく近い将来、国際協調下、国内諸機関の協力のもとでこの課題に則した、各種実験が行われる際に、速やかに適切な体制をとってこれに応じることができるような、国内の技術的な基盤を整える立場から、国内のこの領域での専門的試験研究者が分担して、経済開発協力機構 (OECD) や、米国環境防護庁関係機関 (EPA・ED-STAC) から提案されている諸試験法の試行的実施と必要に応じたそれらの改良、ならびに新規試験法の開発等を総合的に推進することに主眼をおいた。すなわち、内分泌機能の障害性を巡って危惧を引き起こ

し内分泌機能の障害性を巡って危惧を引き起こしている諸物質のうち、とくに生活環境化学物質の、ヒトや野生生物に対するホルモン様体内作用の検知のための試験技術分野において、既存の各種試験法の中から、1) 具体的な参照被験物質と重点的検討対象となる化学物質を選定し、それらの結果に基づいて、2) スクリーニング試験、第一段試験、第二段試験、ならびに確定試験などからなる階層的試験法に基づいて試験を実施し、3) その結果の総合評価を2世代試験 (エンドポイント試験) と比較することにより、バッテリー試験系として確立し、それらを基礎に、4) 来るべき国際的共同研究に際して適切な提案と分担研究を推進し、以って、この課題におけるヒトへの影響問題についての国内外に対する生活安全対応研究としての役割を果たすことが主たる目的である。この目的に従って、本年度は、カテゴリ別に、1) 試験管内試験法、2) 代謝薬理作用に関する試験法、3) 動物を用いた試験法の検討を主な研究課題として研究を行う3分野の実験班のほかに、毒性情報、化学物質情報などの担当者を組織構成に加え、更に、特別推進研究課題として、実験的成果と化学物質情報を基盤とした三次元定量的構造活性相関(3D-QSAR)の研究を共同して推進し、研究成果のデータベース化と、社会への還元を目標に、この課題に関する出版物を刊行することを目的とした文献調査班を加えて組織された。

#### 研究方法：

##### 1) 試験管内試験法に関する研究：

受容体結合試験法における種々のリガンドに対するエストロジェン、アンドロジェン受容体の特異性を比較するため、市販のヒト $\alpha$ 、 $\beta$ および卵巣あるいは精巣を摘出したSprague-Dawley系ラットの子宮あるいは前立腺から抽出したエストロジェンあるいはアンドロジェン受容体を用いて、 $^3\text{H}$ で標識した $17\beta$ -estradiol, DES, genistein, tamoxifen, progesterone, testosterone, dihydro-testosterone, bisphenol Aを試験管内で反応させて上清中の放射活性を測定することにより、各リガンドの受容体に対する結合性を比較検討した。また、細胞内cAMPの上昇を介して血管作動性腸管遺伝子のプロモーター領域により転写されるベータガラクトシダーゼ遺伝子をリポーター遺伝子として導入したラットの副腎髄質由来のPC12-VG細胞を用いてcAMPの上昇を介した遺伝子発現に対するグルカゴン、TPAおよびヒト胎盤性性腺刺激ホルモンの影響を調べ、さらに、核受容体遺伝子に属するNOR-1遺伝子を介した遺伝子発現に対するインスリン、TPA、磁場の影響をPC12細胞およびCHO細胞により同様に検討した。

##### 2) 代謝薬理作用の試験法に関する研究：

米国人52人、日本人143人について、ヒトのフェノール硫酸転移酵素分子種SULT1A1humの変異型を、PCR-REFP法により調べるとともに $^{35}\text{S}$ -3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate ( $^{35}\text{S}$ -PAPS)をバリウムを用いて沈殿させ、基質の硫酸抱合体と分離するという新たな方法を開発して、これら変異型のbisphenol A

の硫酸抱合能の差異を検討した。さらに、代謝過程で酸素ラジカルを発生させることが知られているカテコールエストロジェン及びその尿中の代謝物の同時定量を目的として、酵素免疫測定法による分析法の開発を行うとともに、ラットでは血中の濃度が低く、阻害物質が存在するため、市販の測定用キットでは正確な値が測定不可能とされているエストロジェンの有機溶媒抽出による微量定量法を検討した。エストロジェン受容体の存在が確認されているヒトの骨肉腫由来の MG-63、SaOS-2、HOS 細胞および正常骨芽細胞を用いて、アルカリホスファターゼ活性を指標にエストロジェンおよびフタル酸誘導体の骨代謝に及ぼす影響を検討した。

### 3) 動物を用いた試験法に関する研究:

既存の 28 間反復投与毒性試験法に血清  $\alpha 2\text{U-globulin}$  (AUG) 測定のを取り込んで、内分泌かく乱化学物質のスクリーニングとして利用しうるか否かを検討するために、雄ラットに DES を 1、10、100 mg/kg/day の用量で 14 日間反復経口投与して血中の AUG の酵素標識免疫抗体法による測定および精巣の病理組織学的検査を行った。また、化学物質に暴露された新生児の視床下部の神経核の構造変化とその後の生殖行動の関連を調べるため、ラットの新生児に内分泌かく乱化学物質として、 $17\beta$ -estradiol, estradiol benzoate, bisphenol A, buthylbenthy phtalate, nonylphenol あるいは tamoxifen を 5 日間皮下投与して、視床下部特に性的二型核(SDN-POA)と全腹側脳室周囲核 (AVPVN-POA) の発達への影響をニューロン数の増減を指標に検討し、マウス胎児の全胚培養法により、環境汚染物質の 1 つである glufosinate (除草剤) を、5、10 および 20  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で作用させて、中枢神経系の形態変化およびアポトーシスの発現の様子を観察した。さらに、フタル酸エステルの一つである dibutyl phthalate (DBP) を 2% 含有する飼料を妊娠動物に与え、胚の死亡率、奇形の有無、母体の卵巣重量、子宮重量および母体の血中のプロゲステロン濃度を測定した。発がん性試験研究として、6 週齢の F344 ラットに diethylnitrosamine を 100 mg/kg 皮下投与し、肝の 2/3 を部分切除した後、14 種の内分泌かく乱化学物質を投与して、肝の胎盤型 Glutathione S transferase 陽性細胞巢を画像処理装置を用いて定量的に解析した。併行して methyl-N-nitrosourea 2000 mg/kg を 1 回皮下投与した卵巣摘出 F-344 ラットに、1000 ppm の sulfadimethoxine (SDM) を混餌投与し、methoxychrol atrazine, bisphenol A,  $17\beta$ -estradiol, SDM を追加投与して甲状腺の腫瘍性病変について形態学的に検討した。

### 4) 健康影響への情報収集:

内分泌かく乱化学物質の可能性が疑われている約 150 物質をリストアップしてデータベース化し、内分泌かく乱化学物質を検出するための各試験法を比較検討したほか、3D-QSAR によりダイオキシン類の 3 次元構造を予測し、エストロジェン受容体との結合様式を分子モデルを用いて推測した。また、いわゆる植物由来ホルモンおよび有機すずについて定量的なデータを収集し、人に対するリスク・

ベネフィットの検討を行った。さらに、エンサイクロペディアの集大成を目的として、国内外の研究者との意見交換を行い、試験法のマニュアル、内分泌に関するキーワードの選択作業を開始した。

### 研究結果:

#### 1) 試験管内試験法に関する研究:

ラットのエストロジェン受容体に対する各種ホルモンの結合能は、 $17\beta$ -estradiol と比較して、estriol は約 1/3、DES は約 1.5 倍であったが、testosterone, dihydrotestosterone, progesterone はきわめて弱い結合能が認められるにすぎなかった。一方、ラットのアンドロジェン受容体に対し、testosterone, dihydrotestosterone はきわめて強い親和性を示し、DES にも弱いながら結合能が認められた。さらに、DES, estriol, tamoxifen, progesterone のエストロジェン受容体に対する親和性は、ラットの子宮から得たエストロジェン受容体に対する親和性とほぼ同程度であったが、ヒト  $\beta$  エストロジェン受容体は、genistein に対して約 10 倍強い親和性を示すことが明らかにされた。ステロイドホルモン受容体遺伝子に属する、NOR-1 遺伝子の転写が、cAMP, TPA 神経栄養因子、インスリンなどによる A キナーゼおよび C キナーゼの活性化により促進され、さらに膜受容体を介した cAMP の上昇による転写活性の変化を、ラット副腎髄質由来の PC12 細胞に  $\beta$  ガラクトシダーゼ遺伝子をレセプター gene として導入することにより検出可能であり、この細胞に性腺刺激ホルモン受容体を強制発現した細胞では、ヒト胎盤性ゴナドトロピンによる cAMP 上昇の検出が可能であった。

#### 2) 代謝薬理の試験法に関する研究:

ヒトフェノール硫酸転移酵素分子種 SULT1A1 が、代謝活性化後 DNA に損傷を与えることが知られているビスフェノール A の硫酸抱合反応を触媒し、その平均的代謝活性は約 95 pmol/min/mg protein と考えられること、触媒活性が非常に低い本酵素の  $^{213}\text{His}$ 、 $^{223}\text{Val}$  が変異型が存在し、野性型に対する  $^{213}\text{His}$  の変異型の比率が日本人では 2.8%、米国人では 17.3% であることが明らかにされた。また、エストロジェン発癌のリスクマーカーと考えられているカテコールエストロジェンおよびその代謝物の同時分析が尿試料を用いて可能となり、ヒトにおける内分泌かく乱化学物質に対する感受性の個体差およびその機序の解明に、有用な情報を提供するものと考えられるが、ヒト正常骨芽細胞及びヒト骨肉腫由来の MG-63 細胞を用いた、エストロジェンの骨代謝に及ぼす影響を検討した結果、培養中に  $17\beta$ -estradiol あるいはフタル酸エステル誘導体を添加しても細胞数および培養液中のアルカリホスファターゼ活性に変化は認められなかった。

#### 3) 動物を用いた試験法に関する研究:

エストロジェン受容との親和性が非常に低いと言われている dibutyl phthalate (DBP) を 2% 含有する飼料を妊娠動物に与えると、母動物の摂餌量の低下および体重の抑

制があり、多くの胚が死亡し、母体の卵巣重量、子宮重量、血中プロゲステロン濃度が低下しているが、黄体数、着床数、着床前胚死亡率には影響が認められないこと、雄ラット新生児に estoradiol benzoate (EB), bisphenol (BA) を投与すると性的二型核あるいは第3脳室周囲層にある前腹側脳室周囲核の容積が減少し(雄の雌化)、成熟すると交尾行動の異常など生殖機能障害が起こり、同様の所見は estradiol, nonylphenol を雄ラット新生児に投与しても観察されることが明らかにされた。さらに、マウス培養胚に環境汚染物質の1つであるグルホシネート(除草剤)を作用させると中枢神経および神経管の上皮細胞層にアポトーシスが起り、前脳、鰓弓の低形成、神経管の開存が起きることを確認した。また、雄ラット肝で特異的に産生される $\alpha$ 2U-グロブリン(AUG)の血清中濃度に対する合成エストロゲンDESの影響を検討した結果、血清中のAUGが用量依存的に減少することが明らかにされ、新たな試験法の開発に有用な情報を提供するきわめて重要な研究結果であった。一方、内分泌かく乱化学物質の発癌への影響を検討した結果、ラット中期肝発癌性試験法によりEDCsと考えられている14化合物について肝発癌への影響を調べ、10物質(alachlor, aldrin, DDT, permethrin, trifluralin, vinclozolin, DES, PCBsなど)が陽性であったが、DHPNを投与した卵巣摘出したラットにSDMを混餌投与し、内分泌かく乱化学物質と考えられているmethoxychrol, atrazine, bisphenol A, 17 $\beta$ -estradiol, SDMを付加的に投与した結果、SDM投与群で甲状腺重量が有意に増加したが、その他の物質では陰性であった。

健康影響への情報収集：内分泌かく乱化学物質の可能性が疑われている150物質をリストアップしてデータベース化し、内分泌かく乱化学物質を検出するための各試験法を比較検討して、その有用性量的点を整理する作業を開始し特にbisphenol Aについてはvom Saalら(1998)の報告を除けば、50 mg/kg/dayがLOAELと考えられるが、人への外挿のためには、作用メカニズムを含め早急に解決しなければ成らない問題点が依然として存在することが確認されたほか、3D-QSARによりダイオキシン類の3次構造を予測し、エストロゲン受容体との結合様式を分子モデルを用いて推測した。さらに、いわゆる植物由来ホルモンおよび有機すずについて、定量的なデータを収集し、人に対するリスク・ベネフィットの検討を行うとともに、試験法のマニュアル内分泌に関する用語集を盛り込んだエンサイクロペディアの集大成を目標にして、国内外の研究者との意見交換の結果に基づいてキーワードの選択を行った。

## 考察

本年度実施した本研究は、大別して4分野の研究によって構成されていたが、第1分野の「試験管内試験法に関する研究」では、性ホルモンのような核内に存在する受容体を介した反応だけでなく、性腺刺激ホルモンのような膜受容体を介したcAMPの上昇による転写活性化を検出する

新たな試験系の樹立出来る可能性が示唆された。「代謝薬理作用の試験法の開発に関する研究」においては、エストロゲン代謝過程で発生する活性酸素の発生状況を、尿中の代謝物を分析することにより類推する新たな分析法が開発されたほか、bisphenol Aのようなフェノール化合物の硫酸抱合酵素に幾つかの変異型が存在することが明らかにされた。一方、「動物を用いた試験法に関する研究」では、ホルモン活性のきわめて低いフタル酸エステルを妊娠動物に投与すると、胎児の発育障害が惹起される事が明らかにされたほか、新生児にエストロゲンを投与すると性の分化、性行動の発達に関与すると考えられている神経核が、雄型から雌型に変化し、成熟後の性行動に影響を与えること、全胚培養した胎児に、環境汚染物質の1つであるglufosinateを作用させると、神経細胞のアポトーシスにより脳の発達が阻害されること、中期肝発癌性試験法により内分泌かく乱化学物質と考えられている14物質中10物質に肝発癌促進作用がみとめられることが明らかにされた。

現在、経済開発協力機構(OECD)や米国環境防護庁関係機関(EPA・ED-STAC)から提案されている、内分泌かく乱化学物質に関する試験管内試験法は、主にホルモン受容体と化学物質(リガンド)との結合能を指標にした試験法であり、動物を用いた試験法は、主としてエストロゲンの標的臓器である子宮、あるいはアンドロゲンの標的臓器である雄性副生殖器(主として前立腺)への影響およびこれらに関連したホルモンの変動を指標にした試験法である。しかしながら、現在提案されている内分泌かく乱物質に対する試験管内スクリーニング試験法は、必ずしもその結果が、動物体内で起きる反応を正確に反映したものではないと考えられている。また、本研究での動物実験の結果から、多くの内因性エストロゲンあるいは内分泌かく乱化学物質と考えられている一部の化学物質は、その標的臓器と考えられていた内分泌系臓器・組織だけでなく、神経系臓器・組織にも影響を与え、さらに胎児あるいは新生児の発育過程においてもこれらの臓器・組織に作用し、加えて発癌過程にも影響を及ぼす可能性が示唆された。従って、今年度の研究結果は、OECDなどで提案されている内分泌かく乱化学物質検索のための試験法に加えて、生体で起こる現象をより正確に反映したHigh-throughput法などの試験管内での簡便なスクリーニング法あるいは神経毒性、発癌性に加えて内分泌かく乱化学物質により影響される可能性が考えられている、免疫系への作用を検討する新たな試験法の開発が必要であることを示唆する所見であり、この研究によりそのための基礎的な成績をえることが出来たと考えられる。また、化学構造と内分泌かく乱作用との構造相関あるいはエストロゲン受容体との結合様式を分子モデルを用いて明らかにする研究の一環として、3D-QSARによりダイオキシン類の3次構造を予測することが出来たが、これらの研究は、内分泌かく乱化学物質のスクリーニング試験を実施する前段階でその作用及び機序を予測する上で重要な情報を提供しうる有効な手段であり、そのためには更なる情報の収集が必要で

ある。また、内分泌かく乱作用に関する様々な研究成果をデータベース化することは、内分泌かく乱に関する情報を公開して社会へ還元するための有効な手段であり、これらの研究成果をもとに出版が予定されている、試験法マニュアルの編集、エンサイクロペディアの集大成により、世界各国が同じ水準で内分泌かく乱化学物質に関する研究を遂行することが出来るものと期待される。

## 結論

本研究は、内分泌かく乱化学物質の諸課題の内、試験法の開発を中心とした研究を推進し、経済開発協力機構(OECD) や米国環境防護庁関係機関(EPA・ED-STAC)から提案されている諸試験法の試行的実施と必要に応じたそれらの改良ならびに新規試験法の開発等を総合的に推進することを目的として、研究の1年目にあたる本年度は、1) 試験管内試験法に関する研究、2) 代謝薬理作用に関する試験法に関する研究、3) 動物を用いた試験法に関する研究、4) 健康影響への情報収集の4分野に分けて研究を行った。その結果、本研究により、OECDなどで提案されている内分泌かく乱化学物質検索のための試験法に加えて、生体内で起きる現象をより正確に反映した簡便なスクリーニング法あるいは胎児、新生児を含む実験動物を用いた内分泌かく乱化学物質の神経系、免疫系および発癌性に対する影響を検討するための新たな試験法の開発が必要であることが確認され、そのための基礎的な情報を得ることが出来た。

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

*in vitro* スクリーニング手法のバリデーション研究

分担研究者 永井 賢司 三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

研究要旨：

性ホルモン受容体結合試験法のバリデーションとして、エストロゲン受容体(ER)とアンドロゲン受容体(AR)を用いた試験系の特異性評価ならびに種差の検討を実施した。ER は AR に比べて高い特異性を示した。種差に関しては、検討したいずれの化合物もヒト ER $\alpha$ 、ラット ER に対して同程度の結合親和性を示した。ヒト ER $\beta$  に対しては結合親和性が異なる例があり、genistein では約 10 倍高い結合親和性を示した。

A. 研究目的

化学物質の内分泌かく乱作用を検出するスクリーニング法の満たすべき条件として感度・特異性・安価・迅速および簡便性があり、この点で *in vitro* 試験法が有利である。本研究においては、EDSTAC より提案されている手法のうち受容体結合試験法のバリデーションを実施する。なお、本研究によって得られる試験成績は、種々の内分泌かく乱化学物質の potential の最も基本的な指標であることから、本研究班の各分担研究に対して基礎的データを提供しうると考えられる。

B 研究方法

当研究所ではこれまでラット子宮より調製したエストロゲン受容体 (ER) および前立腺より調製したのアンドロゲン受容体 (AR) を用い、アゴニストならびに内分泌かく乱作用が疑われる物質の結合親和性を評価してきた。本研究においては、以下に示すように試験系の特異性評価および種差の検討を実施した。

1. 特異性の評価

1.1 ERとの結合親和性評価

(1)ER標本の調製

雌性SD系ラットに卵巢摘出手術を施し、7

日間以上飼育した後に子宮を摘出した。子宮を細切し、10倍量の緩衝液を加え、ホモジナイズした。ホモジネートを 200,000 x g で 30 分間遠心して得られる上清(細胞質画分)を ER 標本として用いた。

(2)ER結合試験

標識リガンドとして [ $^3$ H]estradiol を用いた。一定量の ER 標本 と標識リガンドを、各種濃度の試験物質存在下 4℃、16 時間反応させた。反応終了後、反応液に dextran-coated charcoal (DCC) を添加し、15 分間混合して遊離している標識リガンドを DCC に吸着させ、2,000rpm で 15 分間遠心し DCC を除去した。上清中の放射活性(標識リガンドの結合量)を液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、全結合とした。なお、標識リガンドの ER 標本への非特異的結合の影響を除くため、大過剰の非標識リガンド存在下で標識リガンドの結合量(非特異的結合)を求め、全結合と非特異的結合の差を特異的結合とした。

試験物質非存在下の特異的結合に対する各種濃度の試験物質存在下の特異的結合の割合(%)を求めた。なお、特異的結合に 50% 以上の抑制が認められた場合には、IC $_{50}$  を算出した。

(3)試験物質

estriol, DES, genistein, tamoxifen,

progesterone, testosterone,  
dihydrotestosterone, bisphenol A

## 1.2 ARとの結合親和性評価

### (1)AR標本の調製

雄ラットに精巣摘出手術を施し、24時間後に前立腺腹葉を摘出した。前立腺腹葉は細切り、5倍量の緩衝液を加え、ホモジナイズする。以後の操作は 1.1(1)項に準じて実施した。

### (2)AR結合試験

標識リガンドとして [ $^3\text{H}$ ]testosteroneを用いる。方法は1.1(2)項に準じた。

### (3)試験物質

testosterone, dihydrotestosterone, DES, bisphenol A

## 2. 種差の検討

rHuman estrogen receptor  $\alpha$ および $\beta$  (PanVera社製)を購入し、受容体結合試験系を確立した。その後、1.1(3)項より適当な物質を選択して結合親和性を評価し、ラット受容体との差異ならびに $\alpha$ 、 $\beta$ 間の差異について検討した。

## C. 研究結果

### 1) 特異性の検討

ラットERを用いた特異性の検討結果、17 $\beta$ -estradiol (IC $_{50}$ :  $1.1 \times 10^{-9}$  M)と比較してestriolの効力は約1/3、DESは約1.5倍であった。testosterone, dihydrotestosteroneでは $1.0 \times 10^{-5}$  Mから特異的結合の抑制が認められたが、 $1.0 \times 10^{-4}$  Mでも50%以上の抑制は認められなかった。progesteroneでは $1.0 \times 10^{-4}$  Mでもまったく影響が認められなかった。

ラットARを用いた検討において、testosterone, dihydrotestosteroneのIC $_{50}$ はそれぞれ $1.1 \times 10^{-9}$  M、 $5.6 \times 10^{-10}$  Mであった。DESでは $3.0 \times 10^{-6}$  Mから影響が認められ、IC $_{50}$ は $6.9 \times 10^{-5}$  Mであった。また、エストロゲン活性が疑われているbisphenol AはARへの結合に対するIC $_{50}$ が $5.1 \times 10^{-6}$  MとERでのIC $_{50}$  ( $5.5 \times 10^{-6}$

M) とほとんど差のない結果であった。予備的検討では、estradiol, progesteroneについてもARに対して高い結合親和性が認められた。

### 2) 種差の検討

ラットERとヒトERについて比較した。ヒトERについては $\alpha$ 、 $\beta$ の差異についても検討した。DES, estriol, genistein, tamoxifen, progesteroneについて検討した結果、ラットERとヒトER $\alpha$ はほぼ同様の結果であった。genisteinはヒトER $\beta$ に対して約10倍高い親和性を示した。

## D 考察

本研究によって得られる試験成績は、種々の内分泌かく乱化学物質の potential の最も基本的な指標であることから、本研究班の各分担研究に対して基礎的データを提供しうると考えられる。

## E 結論

ER は AR に比べて高い特異性を示した。種差に関しては、検討したいずれの化合物もヒト ER $\alpha$ 、ラット ER に対して同程度の結合親和性を示した。

## F. 研究発表

### 1 論文発表

Shinya Uchida, Shizuo Yamada, Kenji Nagai, Yoshiharu Deguchi and Ryohei Kimura: Brain pharmacokinetics and in vivo receptor binding of 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonists, Life Sciences, Vol.61, No.21, 2083-2090, 1997

### 2 学会発表

内分泌攪乱作用の検出のための in vitro 試験法-受容体結合試験を中心として-

In vitro 発生毒性研究会（1998年11月，  
大阪）



厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告

新規 *in vivo* スクリーニング法開発のための研究

－  $\alpha_{2u}$ -globulin の生体内動態と Endocrine disrupter screening 法への応用－

分担研究者 武吉 正博 財団法人 化学品検査協会 化学品安全センター日田研究所

研究要旨：

Sandwich ELISA 法によるラット血清中の  $\alpha_{2u}$ -globulin (AUG) の測定方法を開発し、その endocrine disrupter screening 法への応用の可能性について検討した。今回開発した測定法は添加回収率、再現性共に良好であり、diethylstilbestrol (DES) を正常雄ラットに投与した際の血清 AUG 濃度の変動を観察した結果、DES 投与群で著しい減少が観察され、病理組織学的に精巣の萎縮性変化を認めなかった動物においても明らかな血清 AUG の低下が認められた。このことから、血清 AUG の測定は正常動物に対する estrogenic chemical の影響を鋭敏に検出できるものと推察される。

#### A. 研究目的

ELISA 法によるラット血清中の  $\alpha_{2u}$ -globulin (AUG) の測定方法を開発し、その Endocrine Disrupter (EDs) screening 法への応用の可能性について検討する。

cellulose カラムに添加した。カラムを洗浄後、同緩衝液に NaCl を 0.05M の gradient をかけて吸着した蛋白を溶出し最初の溶出ピークを採取、更に Sephacryl 100HR カラムを通し、AUG を精製した。

#### B. 研究方法

##### 1. Sandwich ELISA 法による $\alpha_{2u}$ -Globulin (AUG) 測定法の開発

##### AUG の精製

雄 SD ラット (10 週齢) に Decaline を 200 mg/kg の用量で 5 日間投与し、投与 4 日後、5 日後の尿を pool した後、12000 rpm、10 分遠心分離し上清を採取した。上清に硫酸アンモニウムを 50% 飽和となるように加え (globulin 分画)、4℃、overnight mixing した後、12000 rpm、10 分遠心分離し、沈澱を回収した。沈澱を 0.01M リン酸 Na 緩衝液 (pH 6.1) に溶解、同緩衝液で平衡化した Sephadex G25 カラムに添加し蛋白分画を採取し、同緩衝液で平衡化した DEAE

ウサギ polyclonal 抗 AUG 血清 (IgG 分画) の作製

AUG を Freund's Complete Adjuvant と混合乳化し、NZW 雄ウサギに蛋白量として 100  $\mu$ g/animal の用量で、週 1 回、計 3 回免疫し、最終免疫の 2 週間後に得られた血清を採取した。抗血清には 1 ml あたり 0.18 g の硫酸ナトリウムを加え、室温で 1 時間攪拌後、12000 rpm、10 分遠心して得た沈澱を 17.5 mM リン酸 Na 緩衝液 (pH 6.3) に溶解し、同緩衝液で平衡化した PD-10 (Sephadex G25) カラムに添加して蛋白分画を採取した。次いで得られた蛋白分画を同緩衝液で平衡化した DEAE cellulose カラムに添加し、カラムを素通りする蛋白分画を

IgG fraction として採取した。

#### Affinity 精製抗 AUG 抗体の作製

AUG を定法に従って 5mg/ml の用量で Cyanogen bromide-activated Sepharose 4B (CNBr4B, Pharmacia BT) に固相化し Affinity 担体を作製した。作製した AUG-Sepharose にウサギ抗血清を添加し室温で 1 時間反応させた後、PBS で洗浄し結合しなかった蛋白を洗い流した。カラムに吸着した抗体は 0.5 M NaCl 含有 Glycine hydrochloride buffer (pH 2.4) で溶出した。なお、溶出した抗体は 3 M Tris hydrochloride (pH 7.4) で直ちに中和し変性を防いだ。

#### 酵素標識抗 AUG 抗体の作製

Horseshoe peroxidase (HRP) 10 mg を 0.2 ml の 1.25% glutaraldehyde 含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解した後、室温で一晩攪拌した。反応液を生理食塩液で平衡化した Sephadex G25 に添加し活性化 HRP を得た。活性化 HRP 1 ml に 5 mg の IgG を加え、更に 0.1 ml の 1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) を加えた後、4℃で 24 時間反応させた。0.2 M lysine 溶液 0.1 ml を加えた後、PBS (pH 7.2) に対して 4℃、一夜透析を行い、酵素標識抗体を作製した。

#### Sandwich ELISA 法によるラット血清 AUG の測定

##### 抗体固相化プレートの作製

Affinity 精製抗 AUG 抗体を 50mM 炭酸緩衝液 (pH 9.6) を用いて 5 $\mu$ g/ml に調製した後、ポリスチレン製 ELISA プレート (Immulon 200, Greiner) の well 内に 100 $\mu$ l を加え 4℃、一夜放置した。プレートは 25%BlockAce で

ブロッキングを行った後、使用した。

##### 血清 AUG の測定

血清は 0.5% Tween 20 含有 Tris buffered saline (TBS-Tween, pH 7.2) で 1000 倍に希釈した後、抗体固相化プレートに添加し、室温で 1 時間反応させた。TBS-Tween でプレートを 3 回洗浄した後、TBS-Tween で希釈した酵素標識抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。TBS-Tween でプレートを 3 回洗浄した後、*o*-phenylenediamine、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を基質として発色させた。1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて反応を停止した後、SpectraMAX™ (Molecular Devices Inc.) を用い、650 nm を参照波長として 490 nm の吸光度を測定し、既知の抗原を反応させた際の標準曲線から血清中 AUG 濃度を推定した。

#### 2. Diethylstilbestrol (DES) 投与が雄ラット血清 AUG 濃度に及ぼす影響

##### 使用動物：

動物は日本チャールス・リバー株式会社 (日野飼育センター、〒529-1633 滋賀県蒲生郡日野町下駒月 735) で生産された Crj: CD (SD) IGS ラット (SPF) を購入し、検疫・馴化した後、一般状態が良好なものを使用した。実験期間中、動物は温度 23 $\pm$ 2℃、相対湿度 55 $\pm$ 10%、換気回数 10~15 回/時間、明暗サイクル 12 時間間隔 (7 時点灯-19 時消灯) に設定した飼育室内でステンレス製金網床ケージ (165 W\_300 D\_150 H mm、トキワ科学器械株式会社) に個別飼育した。

##### 被験物質の調製及び投与

Diethylstilbestrol (DES, SIGMA CHEMICAL COMPANY) を購入し、olive oil

を媒体として 1、10、100mg/kg/day の用量で 14 日間反復強制経口投与を行った。なお、1mg/kg/day は 8 日目以降、投与量を 0.1 mg/kg/day に変更した。

#### 血清の採取

尾静脈から約 1 ml 採血し、3000 rpm、10 分遠心分離し血清を採取した。なお、採血は DES 投与開始 1 日前、投与 1、3、7、10、14 日後に行った。

#### 病理組織学的検査

全例の精巣についてブアン液にて固定した後、パラフィン包埋薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施して光学顕微鏡的に検査を行った。

### C. 研究結果

#### 1 Sandwich ELISA 法による $\alpha_{2u}$ -Globulin (AUG) 測定法の開発

ウサギ抗 AUG polyclonal 抗体を用いて Sandwich ELISA 法による AUG 測定法の開発を試みた結果、測定範囲は、10~250ng/ml であった。添加回収率は 98.3 %、同時再現性は CV=4.53~13.15%、日差再現性は CV=6.24%であり良好な結果が得られた。

本法を用いて無処置の Crj:CD(SD)IGS 雄 Rat について 5 週齢から 20 週齢までの血清 AUG 濃度の推移を観察した結果、血清 AUG は 5 週齢では検出されず、6 週齢から急激に上昇し、8 週齢以後 20 週齢まではほぼ一定の値で推移した。なお、雌では血清希釈倍率による吸光度の変化がみられないことから、雌ラット血清中には AUG が含まれないことが確認された。

#### 2 Diethylstilbestrol(DES)投与が雄ラット血清 AUG 濃度に及ぼす影響

いずれの DES 投与群においても媒体対照群と比較して投与 3 日後から AUG 値の著しい低下が観察され、10、100mg/kg/day の用量群では投与 7 日後以降、血清 AUG level は検出限界以下となった。投与終了時に採取した精巣について病理組織学的検査を行った結果、媒体対照群では異常は認められなかったが、1 mg/kg/day 投与群では 5 例中 4 例に軽度から中等度のパキテン期精母細胞の変性

(Degeneration of pachytene spermatocytes) が認められ、10 mg/kg/day 投与群では全例に中等度のパキテン期精母細胞の変性及び伸長精子細胞の停滞 (Retention of elongated spermatids) 並びに精子細胞の精細管からの離脱抑制 (Inhibited spermiation)、5 例中 4 例に伸長精子細胞の減少 (Decreased elongated spermatids) が認められた。また、100 mg/kg/day 投与群では全例に中等度のパキテン期精母細胞の変性及び精子細胞の滞留が認められ、1/5 例には重度の精細管の萎縮 (Atrophy of seminiferous tubules) 及び Leydig 細胞の過形成 (Leydig cell hyperplasia) が認められた。

### D. 考察

Sandwich ELISA 法によるラット血清中の AUG の測定方法を開発し、その Endocrine Disrupter screening 法への応用の可能性について検討した。今回開発したウサギ抗 AUG polyclonal 抗体を用いた Sandwich ELISA 法は添加回収率は 98.3 %、同時再現性は C.V.=4.53~13.15%、日差再現性は C.V.=6.24%と良好な結果が得られた。本法を用いて無処置の

Crj:CD(SD)IGS 雄 Rat について 5 週齢から 20 週齢までの血清 AUG 濃度の推移を観察した結果、血清 AUG は 5 週齢では検出されず、6 週齢から急激に上昇し、8 週齢以後 20 週齢までほぼ一定の値で推移した。また、雌では血清希釈倍率による吸光度の変化がみられなかった。AUG は雌ラット及び幼若雄ラットでは発現せず(Kulkarni, A.B.ら, 1985)、肝臓での AUG 生合成は生後 9-12 週齢で Peak に達する(Sippel, A.E.ら, 1975)と報告されていることから、正常雌ラット及び雄ラットの血清 AUG level の測定結果は既報と一致するものと思われる。したがって、本法はラット血清中の AUG 測定法として有用と思われる。

次いで Endocrine Disrupter screening 法への応用の可能性について検討するため、本法を用いて Endocrine disrupter 研究に繁用されている DES を雄正常ラットに投与した際の血清中の AUG 濃度の変動を観察した。その結果、DES 投与群では投与 3 日後までは明白な変化はみられないものの、投与 5 日後以降各投与群とも血清 AUG 濃度は著しく低下し、10 mg/kg/day 以上の群では投与 7 日後以降は検出限界以下となった。同時に行った精巣の病理組織学的検査の結果では DES 投与群では用量依存的に精巣の萎縮性変化が認められた。1 mg/kg/day 投与群では 5 例中 4 例に軽度から中等度のパキテン期精母細胞の変性が認められたのみであったが、いずれの動物にも著しい血清 AUG の低下がみられ、病理組織学的に異常を認めなかった 1 例に関しても血清 AUG の明らかな低下が認められていることから、血清 AUG の測定は正常動物に対する Estrogenic chemical の影響を鋭敏に検出できるものと推察される。

肝における AUG 遺伝子の発現調節機構は未だ解明されておらず、今後の研究により Estrogenic chemical 投与による血清 AUG level 減少のメカニズムを明らかにし、AUG 測定の意義を明確にする必要があるが、古くから本蛋白質が Estrogen 投与により影響を受けることが知られており、本蛋白質は通常行われる毒性試験の中で測定し、評価することが可能であるため、本法の開発は Endocrine Disrupter の新規 *in vivo* screening 法として期待できるものと思われる。

## E. 結論

Sandwich ELISA 法によるラット血清中の  $\alpha 2u$ -globulin (AUG)の測定方法は、添加回収率、再現性共に良好であり、正常動物に対する Estrogenic chemical の影響を鋭敏に検出できるものと推察される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

### 2. 学会発表

穴井俊二、武吉正博、飯田憲二、Sandwich ELISA 法による  $\alpha 2u$ -Globulin 測定系の検討、第 32 回実験動物技術者協会総会(仙台)、1998

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告

培養細胞を用いた内分泌かく乱物質検出系の検討

分担研究者 塚田俊彦 国立がんセンター研究所 細胞増殖因子研究部

研究要旨：

血管作動性腸管ペプチド遺伝子のプロモーターにより転写されるベータガラクトシダーゼ遺伝子をラット副腎髄質由来の細胞に導入し、安定した形質転換細胞株 PCVG を得た。この細胞を用いると、cAMP、TPA、変動磁場などの生物学的影響を簡便に検出できた。また、核受容体型転写因子 NOR-1 の遺伝子プロモーターも、様々な刺激に反応して転写を促進することがわかり、化学物質の生物作用の検出に利用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

哺乳動物の培養細胞を用いて、いわゆる内分泌かく乱化学物質の生物学的活性を検出する系を考案する。特に、膜受容体を介し、細胞内キナーゼ類を活性化するシグナル伝達系をかく乱する物質の、簡便で感度の良い検出系をつくることを目的とする。

B. 研究方法

ホルモン等の刺激により転写誘導ないし抑制を受ける遺伝子のプロモーター領域にレポーター遺伝子をつなぎ、これを培養細胞に導入し、安定した形質転換細胞を作製する。この細胞を各種化学物質で刺激し、導入遺伝子の発現をレポーター遺伝子産物の酵素活性測定により検出する。本年度は、ラット副腎髄質由来の神経内分泌細胞 PC12 に、血管作動性腸管ペプチド (vasoactive intestinal peptide, VIP) 遺伝子のプロモーター領域により転写されるベータ・ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) を導入した安定形質転換細胞 PC12-VG 細胞を用いて、種々の刺激に対する遺伝子発現の変化を検討した。

VIP 遺伝子は PC12 細胞などの神経内分泌

細胞に限局して発現するため、他の種類の細胞における化学物質の影響をみるのには不適であることが予測される。VIP とは異なり、ほとんど全ての細胞で発現し、かつ、ホルモン等により発現誘導が見られる遺伝子のプロモーターを用い、様々な細胞において発現の変化が検出できる系を作製する。また、内分泌かく乱化学物質およびその候補物質による刺激実験を行い、検出系の特性を検討する。

C. 研究結果および考察

内因性 adenylylase を活性化するアルカロイド forskolin で PC12-VG 細胞を刺激すると、約 6 時間後にベータ・ガラクトシダーゼ活性が頂値に達し、その後低下する。これまでの検討では、細胞を 6 時間刺激後、ONPG を基質とする 1 時間の測定で、forskolin の最小濃度 100 nM (40 ng/ml) により有意に酵素活性が上昇した。また本来 PC12 細胞に内在する pituitary adenylylase-activating peptide (PACAP) 受容体を介して、PACAP、VIP、Glucagon 等による cAMP 上昇が検出でき、VIP の最小濃度 30 nM により有意な酵素活性の上昇がみ

られた。この PC12-VG 細胞に、さらに性腺刺激ホルモン受容体を強制発現させた細胞では、ヒト胎盤性ゴナドトロピンによる cAMP 上昇が検出できた。また、protein kinase C を活性化させる 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を、一定濃度の forskolin の存在下で加えると、TPA の用量に依存的にベータ・ガラクトシダーゼ活性が上昇する。この方法によると、最小濃度 10 nM (6 ng/ml) の TPA により有意な酵素活性の上昇を認めることができた。

一方、ヒト神経芽細胞腫の培養株 NB-OK-1 を用いた細胞分化誘導作用の検出系により、放線菌が産生するアルカロイド staurosporine が神経突起形成作用を有することが明らかにされた。この検出系では神経突起崩出に数日を要し、その定量も困難であるが、PC12-VG 細胞を用いて staurosporine の作用をみると、数時間の刺激でその効果を定量的に検出することができた。staurosporine によって細胞内 cAMP の上昇は起こらないため、この場合の PC12-VG 細胞の staurosporine に対する反応機序は不明である。

PC12-VG 細胞は培養液の pH の変化などに対しても敏感に反応するため、注意深い対照試験が必要であるが、作用機序不明の生理活性物質の検出にも利用できると思われる。この細胞はすでに低周波変動磁場の生物作用の研究にも応用され、低周波磁場が培養細胞に生物反応を誘発することを証明できた。このように、PC12-VG 細胞は細胞内 cAMP の上昇のみならず、作用機構不詳の生物学的活性をもつ物質や物理的刺激の影響を検出することが明らかになった。

最近我々は核受容体型の構造を有する転写

因子 neuron-derived orphan receptor (NOR-1) を同定し、その遺伝子の転写活性を検討した。この遺伝子は PC12 細胞を含め多くの細胞で発現しており、cyclic AMP、TPA、神経栄養因子、インスリン等の種々の細胞内情報伝達系を介するシグナルにより急速に発現が誘導される。また、チャイニーズハムスター卵巣由来の培養細胞 (CHO 細胞) において極低周波変動磁場の NOR-1 遺伝子発現に与える影響について調べたところ、50 ヘルツ・400 ミリテスラーの変動磁場が NOR-1 遺伝子発現を一過性に誘導することが明らかになった。また、この NOR-1 遺伝子は乳癌細胞 MCF-7 細胞においてはレチノイン酸によっても発現が誘導された。

#### D. 結論

血管作動性腸管ペプチド遺伝子のプロモーターにより転写されるベータガラクトシダーゼ遺伝子をラット副腎髄質由来の細胞に導入した形質転換細胞株 PCVG を用いて、cAMP、TPA、変動磁場などの生物学的影響を簡便に検出できた。また、核受容体型転写因子 NOR-1 の遺伝子プロモーターも、様々な刺激に反応して転写を促進することがわかり、化学物質の生物作用の検出に利用できる可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ohkura N, Hosono T, Maruyama K, Tsukada T and Yamaguchi K. An isoform of Nurr1 functions as a negative inhibitor of the NGFI-B family signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1444, 69-79, 1999.

Ohkura N, Ito M, Tsukada T, Sasaki K, Yamaguchi K and Miki K. Alternative splicing generates isoforms of human neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) mRNA. *Gene* 211: 79-85, 1998

Miyakoshi J, Tsukada T, Tachiiri S, Bandoh S, Yamaguchi K and Takebe H. Enhanced NOR-1 gene expression by exposure of Chinese hamster cells to high-density 50 Hz magnetic fields. *Mol Cell Biochem* 181: 191-195, 1998

## 2 学会発表

Regulation of expression of NOR-1, one of the Nur77/NGFI-B family members. Naganari Ohkura, Tetsuji Hosono, Kouji Maruyama, Toshihiko Tsukada, and Ken Yamaguchi. (Growth Factor Division, National Cancer Center Research Institute, Tokyo) 1998 年 3 月 31 日 Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology Incline Village, Nevada, USA.

NGFI-B family における isoform の役割  
大倉永也、塚田俊彦、丸山宏二、細野哲司、山口 建 (国立がんセンター研究所細胞増殖因子研究部) 1998 年 9 月 30 日 第 57 回日本癌学会総会 (横浜)

乳がん細胞 MCF-7 における NOR-1 及び Nurr1 標的遺伝子の探索、丸山宏二、長崎光一、塚田俊彦、細野哲司、大倉永也、佐々木一樹、山口 建 (国立がんセンター研究所細胞増殖因子研究部) 1998 年 9 月 30 日 第 57 回日本癌学会総会 (横浜)

乳がん細胞 MCF-7 における NGFI-B subfamily 遺伝子の dexamethasone による発現調節、細野哲司、塚田俊彦、丸山宏二、大倉永也、佐々木一樹、山口 建 (国立がんセンター研究所細胞増殖因子研究部) 1998 年 9 月 30 日 第 57 回日本癌学会総会 (横浜)

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌攪乱作用を修飾するヒト代謝活性化系及び不活性化系導入・発現細胞の開発

分担研究者 大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部

研究要旨：

ヒトフェノール硫酸転移酵素分子種、SULT1A1hum によるビスフェノール A の代謝能を調べた。日本人で、本酵素の 213Arg/His 多型が認められた（遺伝子型頻度：Arg, 83%、His, 17%）。異種細胞内発現酵素を用いたとき、Arg 型、His 型酵素のビスフェノール A の硫酸抱合能は nmol 酵素分子当たり顕著な差異はなく、どちらの遺伝子型のヒトでも本代謝経路の欠損など注意すべき問題は出現しなかった。

A. 研究目的

内分泌攪乱物質（EDC）の作用の修飾に種々の薬物代謝酵素が関与している多くの例が知られている。第 I 相、第 II 相薬物代謝酵素による解毒代謝はもちろん、代謝活性化も EDC の作用の修飾と考えられる。ヒトにおいて、これらの経路にどのような薬物代謝酵素が関与するのかは十分に明かにされていない。また、ある物質の代謝活性化過程は、DNA やタンパクなど生体高分子と、活性化体との共有結合体を形成することを意味することが多いが、その過程と、EDC としての作用との関連性も必ずしも明確ではない。本研究において、以上の点を明らかにするために、EDC 応答性を有する細胞を含み、種々の細胞内にヒト薬物代謝酵素を cDNA の導入等の方法で発現させる。これらの系を用いて EDC の代謝に関与し、作用を修飾するヒト薬物代謝酵素を明らかにする。また、EDC 応答性の細胞を用いた場合、EDC の作用により、どのような遺伝子の発現に変化が起きるかにつき調べ、代謝活性化が EDC の作用機構の一端であるかどうかを評価する。

B. 研究方法

1. SULT1A1hum の野生型（213Arg, 223Met）および異型（213His, 223Val）をコードする遺伝子型の判定

健常日本人群（143名、男性79名、女性64名）の末梢血液5mlより分離した白血球より、ゲノムDNAをフェノール・クロロホルム法にて抽出した。また、52名の米国人の肝は、Cooperative Human Tissue Network を通じ、または手術材料として得られた正常組織を用い、白血球と同様な方法でゲノム DNA を抽出した。このようにして得た DNA を、遺伝子型判定のための試料とした。SULT1A1hum 遺伝子の遺伝子型は polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)法を用いた。ヒトは SULT1A1hum と極めて相同性の高い遺伝子（少なくとも SULT1A2 および 1A3）を有している。これら相同性の高い遺伝子のうち、SULT1A1hum のみを特異的に増幅するために本遺伝子に特異的なイントロンプライマー（5'-GGTTGAGGAGTTGGCTCTGC-3'）を上流側に、下流側プライマーとしては（5'-ATGAACTCCTGGGGACGGT-3'）を用いた。その後、213Arg/Met の判定のため、制限酵素 *Hae*II を、223Met/Val の判定のため、制



限酵素 *Nla*III を用いた。

## 2. 野生型、及び 213His 異型酵素をコードする cDNA の単離

野生型、213His 異型酵素をコードする cDNA を単離するため、213Arg、213His 両方の遺伝子を有する複数の米国人肝組織を 2-1 の方法により選択した。米国人の肝組織より guanidine isothiocyanate 法、および oligo(dT)カラムを用いて poly(A)+RNA を抽出した。さらに、逆転写酵素を用いて cDNA 画分を得、SULT1A1hum に特異的な配列を含む上流側プライマー

(5'-GGAATTCAGGAACATGGAGCTGAT CCA-3')および下流側プライマー(5'-ACGAATTCTGAACTCCTGGGCTCAAA-3')を用いて PCR 増幅を行って cDNA を単離した。

3. SULT1A1hum の大腸菌内発現系の構築: 報告者らは、ヒトの本酵素遺伝子がコードするアミノ酸と全く同一の配列を有するタンパクを大腸菌内で合成させるため、Invitrogen 社の TrcHisB および cDNA を *Nco*I、および *Eco*RI で処理し、cDNA とベクターとを連結することとした。そのため、2-2 の様にして得た cDNA の 5'-末端の配列に *Nco*I 部位を導入するため、cDNA を鋳型として(5'-ACCATGGAGCTGATCCAGGACA-3')および(5'-GGAATTC AAGCTTCGAACTCCTGGGCTCCAAA-3')というプライマーを用いて PCR 増幅した。その後、ベクター、cDNA を *Nco*I および *Eco*RI 処理し、両者を連結した。このようにして得た cDNA の塩基配列を自動シーケンサ (Applied Biosystems Model 373A) を用いて決定し、既に報告されている SULT1A1hum cDNA の配列と比較した。作成した大腸菌内発現ベクターを  $\text{CaCl}_2$  法により大腸菌 Top10 に導入し、isopropylthiogalactopyranoside でタンパクの発現を誘導した。発現タンパクを DEAE-Sepharose 6B (Pharmacia Biotech)

カラムを用いて部分精製し、酵素活性測定(p-ニトロフェニルスルフェートを硫酸基供与体、2-ナフトールを硫酸基受容基質とした比色定量法)、ならびに Western blot 法で、活性画分を検出して集めた。Western blot 法による検出のための抗体には、SULT1A1hum 特異的な 12 アミノ酸残基のオリゴペプチド (KVHPEPGTWDSF) 抗原をウサギに免疫することにより作成したポリクローン抗体を用いた。発色は、アマシャム社製 ECL™を用いて行いタンパクバンドの強度をデンシトメトリーで定量した。野生型、及び異型酵素の硫酸抱合能を酵素分子の絶対量当たりで比較するために、本発現系において用いた pTrcHisB ベクターがコードする 6 つのヒスチジンが連続する領域を含む 46 アミノ酸残基を野生型酵素分子種の N-末端に融合させたタンパクも発現させた。この融合タンパクは連続するヒスチジン残基とニッケルカラムとの親和性を利用して、ニッケルカラムアフィニティークロマトグラフィーによりほぼ電気泳動的に純粋なタンパクとして精製することができた。純粋なタンパクの量を測定し、今回の研究で EDC の代謝活性の測定に用いた酵素液中の酵素タンパクの含量を Western blot 法で求めることが可能となった。

## 4. 硫酸転移酵素活性の測定

本研究においては種々の EDC および関連物質の硫酸転移酵素活性を測定しなければならない。そこで、基質によって異なった条件設定が必要な高速液体クロマトグラフィーのような方法を用いずに本酵素活性を測定できるバリウム沈殿法を採用した。本方法は、バリウムイオンの存在下では、脂溶性化合物の硫酸抱合体に比し、PAPS が著しく溶解度が低いことを利用するものであり、硫酸転移酵素活性を測定するための信頼できる方法の一つとして広く用いられている。ただし、本方法はアイソトープ化合物、すなわち<sup>35</sup>S]PAPS を硫酸基供与体として用いなければならない

ので、フェノール硫酸転移酵素に限り、p-ニトロフェニルсульフェートを硫酸基供与体、2-ナフトールを硫酸基受容基質として反応を行い、硫酸転移反応により生成する p-ニトロフェノールを 405nm の吸光度の増加として捉える方法もある。この方法は 2-ナフトールの硫酸転移酵素活性の測定には極めてよい方法である。ここでは EDC の一つの例として本研究で取り上げたビスフェノール A についてのみ詳しく述べる。反応系は、50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4)、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM dithiothreitol、100 μM ビスフェノール、20 μM [<sup>35</sup>S]PAPS および cDNA の大腸菌内発現酵素液 (陰イオン交換クロマトグラフィーで部分生成したもの、タンパクの終濃度は野生型酵素液 5.6 μg/ml、213His 異型酵素液 110 μg/ml) で構成され、全容量を 100 μl とした。以上の反応系で 37°C、10 分間反応させ、0.1 M Ba(OH)<sub>2</sub> を 20 μl 加えることにより反応を停止し、さらに、0.1 M ZnCl<sub>2</sub>、0.1 M Ba(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> を各 20 μl 加えて未反応の [<sup>35</sup>S]PAPS を約 8,000 x g、6 分間の遠心分離により沈殿させた。溶液の半量にあたる 80 μl を別のチューブに移した。さらに、もう一度同じ濃度の 0.1M Ba(OH)<sub>2</sub>、0.1 M ZnCl<sub>2</sub>、0.1 M Ba(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> を各 20 μl 加え約 8,000 x g、6 分間の遠心分離により未反応の [<sup>35</sup>S]PAPS を完全に沈殿させた。溶液の半量に相当する 70 μl をシンチレーションカクテル (Aquasol) と混合し、<sup>35</sup>S の放射活性を液体シンチレーションカウンタで測定することにより、酵素活性を求めた。このとき、常に、硫酸基受容基質 (この場合はビスフェノール A) を加えない反応液を作成し、そこから得られた <sup>35</sup>S のカウントをバックグラウンドとし、ビスフェノール A を加えた反応液について得られたカウントから差し引いて、基質依存性の硫酸転移酵素活性として求めた。

### C. 研究結果および考察

1. SULT1A1hum 遺伝子に認められる 2 ヲ所の遺伝多型の日本人、米国人における頻度

SULT1A1hum 遺伝子に認められる 2 ヲ所 (213Arg/His 及び 223Met/Val) の遺伝多型の頻度はこれまで米国人においてのみ調べられていたので、今回初めて健常日本人について調べた。表 1 に示す様に、異型である 213His の頻度は米国人に比べてやや低かったが、213Arg/His の遺伝多型は日本人についても認められた。それに対して、223Val 異型接合体を有する日本人は今回調べた集団中には認められなかった。

2. 野生型、213His 異型、および 2 アミノ酸置換異型 (7Ile, 213His)SULT1A1hum の一次構造

複数の米国人肝組織より、今回の発現系を構築するために cDNA を単離した。

野生型酵素と 213His 型異型との間にはコドン 213 にしか差がなかった。213His 型をコードする cDNA および遺伝子の配列がいくつかのヒト組織を用い、複数の研究施設から合計 4 つの文献に報告されている。それらはすべて、コドン 213 を除き、野生型と同じアミノ配列を示していた。このことより、今回報告者が単離した異型酵素はヒトに存在する 213 異型の最も一般的な分子種であると考えられた。コドン 7 の Ile への変異は、それをコードする cDNA を単離してきたヒトのゲノム DNA 上の相当部位の塩基配列の解析ではその変異の存在が確認されず、この 7Ile 変異は、PCR に用いた Taq polymerase による増幅エラーで生じたものが、偶発的にクローニングされたと考えられた。

3. 野生型及び 2 種の異型酵素の大腸菌内発現の確認

野生型、及び 2 種の異型 SULT1A1hum

分子種の大腸菌内発現を 2-ナフトールに対する硫酸転移酵素活性と、Western blot で確認した。タンパクの発現を誘導した大腸菌ホモジネートを用いた実験で、ベクターのみを導入した大腸菌に比べて、(His)<sub>6</sub> の融合タンパクを含め、高い活性を示した。ヒト肝に比べ、最低でも、約 5 倍以上の発現が確認された。

野生型、および 2 種の異型酵素の発現菌のホモジネートを陰イオン交換クロマトグラフィーで部分精製し、酵素活性などの性質の比較に用いた。Western blot 法により、精製 (His)<sub>6</sub> 融合タンパクの抗体認識バンドの強度との比較を行い、野生型、異型酵素の酵素液中での含量を求めた。SULT1A1hum は野生型、異型共にサブユニット分子量約 34,200 であった。他の 2 種の異型酵素に比べ、213His 異型酵素は陰イオン交換クロマトグラフィーの過程であまり比活性が上がらなかったためにタンパク比含量が高くならなかったと考えられた。しかし、213His 異型酵素は、その酵素タンパク比含量が低いにもかかわらず、いくつかの基質を効率良く硫酸抱合した。ある基質に対する酵素活性の差異を、表 4 の数値から酵素分子種間で直接比較することができる。コドン 213 が Arg→His に変異しても、ほとんど表 4 に示した基質の硫酸転移酵素活性に対しては影響が認められなかった。それに対し、コドン 7 が Thr→Ile に変異すると、特にビスフェノール A の硫酸抱合能が低下することが示された。このことから、コドン 7 の Thr は特にビスフェノール A に対する硫酸転移酵素活性の維持に重要なアミノ酸であることが示唆された。

ビスフェノールなど、フェノール構造をもち、代謝活性化により作用を発現する物質の解毒代謝にかかわると想定されたヒトフェノール硫酸転移酵素 SULT1A1hum 及び、その異型分子種の大腸菌内発現系を構築した。今年度は、この発現酵素を用い、EDC の一

つと考えられるビスフェノール A が、本酵素の基質となることを明らかにした。本酵素の活性を脂溶性基質一般に用いることができるバリウム沈殿法で測定できるので、今回構築した発現系と本酵素活性測定法で種々の EDC の解毒代謝に本酵素が関与するかどうかを評価することができると考えられた。

今回、種々の基質に対する活性測定に用いた野生型酵素液の 2-ナフトールに対する活性は約 2,360 nmol/min/mg protein と考えられ、この値は、ヒト肝の酵素活性の約 120 倍に上った。これらのことより、ヒト肝におけるビスフェノール A の平均的代謝活性は約 95 pmol/min/mg protein と考えられ、これは無視してよいほど低い値であるとは決して言えないと考えられた。また、Western blot 法を用いて、野生型、213His 異型酵素の間にビスフェノール A の解毒代謝に差異があるかどうかを厳密に評価したが、有意な差異があるとは認められなかった。この異型酵素の遺伝子型を両方の染色体とも有する日本人は約 2.8% 存在するという結果が得られたが (表 1)、特に問題は生じないと思われた。しかし、213His 異型 (7Thr, 213His) と比較して、2 アミノ酸置換型 (7Ile, 213His) 分子種のビスフェノールに対する硫酸抱合能は著明に低下していた。7Ile はヒト集団に存在する証拠は今のところ得られていないが、コドン 7 の Thr はビスフェノールの硫酸抱合活性を維持するのに重要なアミノ酸の一つであるという蛋白化学的に興味深い結果がえられた。本発現系は酵素含量が高いので、EDC などの化学物質の解毒代謝経路として本酵素が関与するかどうかを評価するために非常に有用ではないかと思われた。フェノール性基質の抱合には本酵素以外にも、UDP-グルクロニル転移酵素が考えられ、ヒト肝ミクロソーム画分を用いて、代謝能を評価することが、ビスフェノール A の解毒代謝を完全に明らかにするためには必要と考え

られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

M. Nakajima, H. Takahashi, M. Sasaki, Y. Kobayashi, T. Awano, D. Irie, K. Sakemi, Y. Ohno, M. Usami, Developmental toxicity of indium chloride by intravenous or oral administration in rats. *Terato. Carcino. Mutage.*, 18, 231-238, 1998.

Y. Ohno, M. Sunouchi, A. Miyajima, Y. Ogawa, T. Umemura, T. Inoue, K. Nagamatsu, Lack of preneoplastic changes and induction of CYP2B11 in the liver of dogs treated with CNP. *Rev. in Toxicology*, 2, 47-51, 1998.

A. Nakajima, Y. Ohno et al, Effects on fetal growth of repeated blood collection for toxicokinetics from pregnant rats, *J. Toxicol. Sci.* 22, 455-459, 1997.

M. Nakajima, Y. Ohno, et al, Rat embryo culture using rabbit serum as a medium for developmental toxicity studies. *J. Appl. Toxicol.*, 17, 185-188, 1997.

2. 学会発表

清水万紀子、松本宜明、福岡正道、大野泰雄、小澤正吾、多型性ヒトフェノール硫酸抱合酵素 (SULT1A1hum) の野生型、異型分子種の内分泌かく乱物質や種々の薬物に対する硫酸抱合活性：日本薬学会第119年会プログラム (1999年徳島)、演題 (30[PV]14-039)、71頁