

Figure 1-1 Relative testis weight of rats administered with diethylstilbestrol (DES) for 14 days

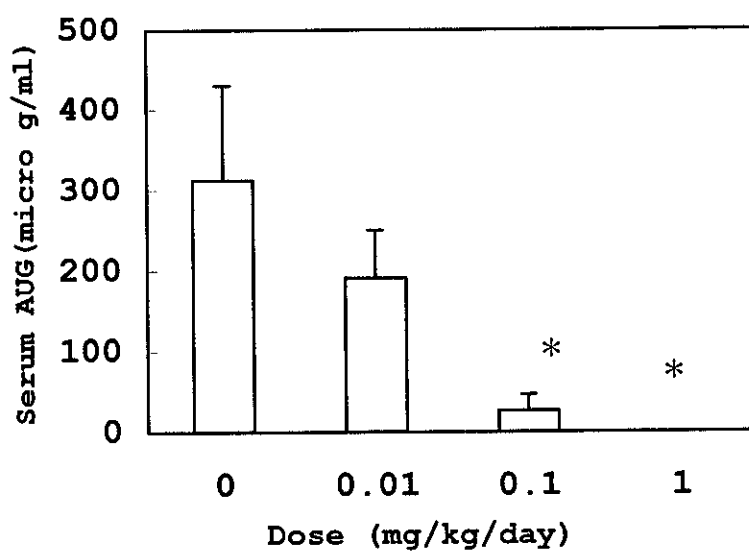


Figure 1-2 Changes in serum AUG levels in male rats administered with diethylstilbestrol (DES) for 14 days

*: Significantly different from the control ($P < 0.05$)

Control



0.01mg/kg/d



0.1mg/kg/d



1mg/kg/d

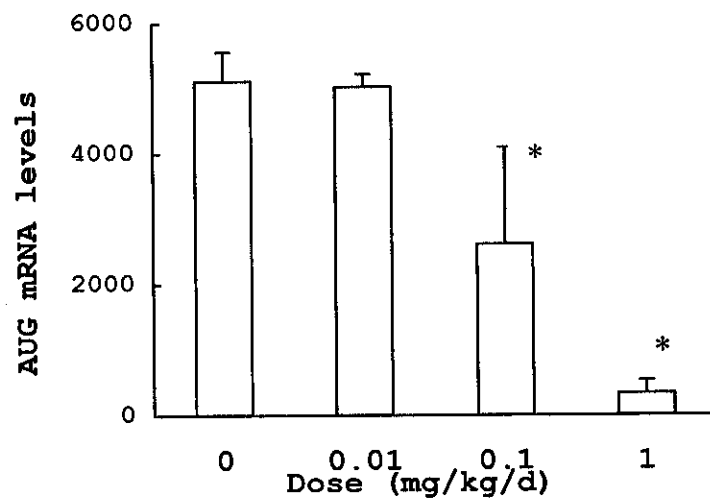


Figure 2 Hepatic AUG coding mRNA levels in rats administered with diethylstilbestrol at doses of 1, 0.1 or 0.01 mg/kg for 14 days

*: Significantly different from the control (0 mg/kg/d)

Table 1 Histopathological findings on testes, hepatic AUG mRNA levels and serum AUG levels of rats administered with DES for 14 days

Group	Animal No.	Histopathological Findings			Liver AUG mRNA Levels	Serum AUG Levels (micro g/ml)
		Degeneration of pachytene spermatocytes	Inhibited spermiation	Retention of elongated spermatids		
Control	1	-	-	-	4933	388
	2	-	-	-	4615	234
	3	-	-	-	4826	607
	4	-	-	-	5603	313
	5	-	-	-	5567	171
0.01mg/kg/d	6	-	-	-	5117	108
	8	-	-	-	4837	188
	9	-	-	-	5247	268
	10	-	-	-	4895	182
	11	+	-	-	2274	36
0.1mg/kg/d	12	±	-	-	3222	27
	13	+	±	±	330	27
	14	±	-	-	2856	25
	15	-	-	-	4358	55
	16	+	±	±	591	15
1mg/kg/d	17	+	±	±	442	18
	18	+	+	+	367	17
	19	+	+	+	115	15
	20	+	++	++	148	19

±;slight, +; moderate, ++; marked

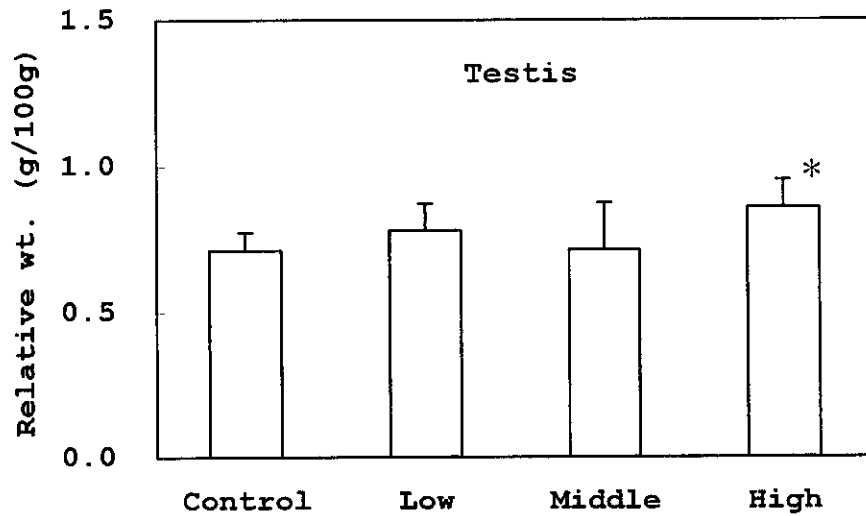


Figure 3-1 Relative testis weight of rats administered with Bisphenol A for 28 days

Animals in each groups were given 40mg(Low dose), 200mg(Middle dose) or 1000mg (High dose) /kg·d of Bisphenol A by gavage. However, general condition of some animals in the High dose group aggravated within first week of dosing period, so the dose of the group was reduced to 600 mg/kg from the 8th to the 28th d of the dosing period.

*: Significantly different from the control(P < 0.05)

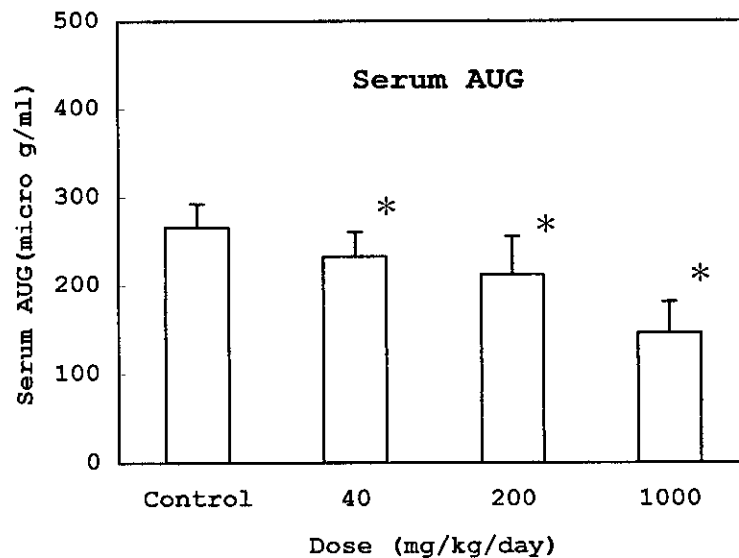


Figure 3-2 Changes in serum AUG levels in male rats administered with Bisphenol A for 28 days

Animals in each groups were given 40mg(Low dose), 200mg(Middle dose) or 1000mg (High dose) /kg·d of Bisphenol A by gavage. However, general condition of some animals in the High dose group aggravated within first week of dosing period, so the dose of the group was reduced to 600 mg/kg from the 8th to the 28th d of the dosing period.

*: Significantly different from the control(P < 0.05)

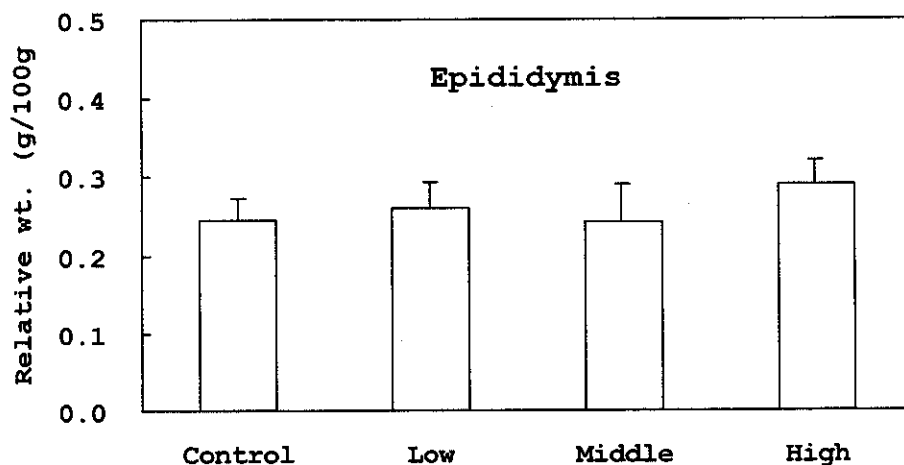


Figure3-3 Relative epididymis weight of rats administered with Bisphenol A for 28 Days

Animals in each groups were given 40mg (Low dose), 200mg (Middle dose) or 1000mg (High dose) /kg·d of Bisphenol A by gavage. However, general condition of some animals in the High dose group aggravated within first week of dosing period, so the dose of the group was reduced to 600 mg/kg from the 8th to the 28th d of the dosing period.

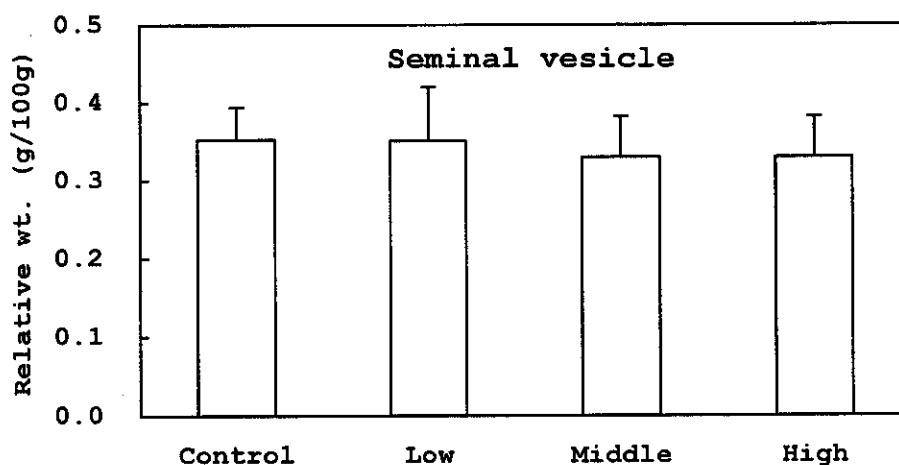


Figure3-4 Relative seminal vesicle weight of rats administered with Bisphenol A for 28 days

Animals in each groups were given 40mg (Low dose), 200mg (Middle dose) or 1000mg (High dose) /kg·d of Bisphenol A by gavage. However, general condition of some animals in the High dose group aggravated within first week of dosing period, so the dose of the group was reduced to 600 mg/kg from the 8th to the 28th d of the dosing period.

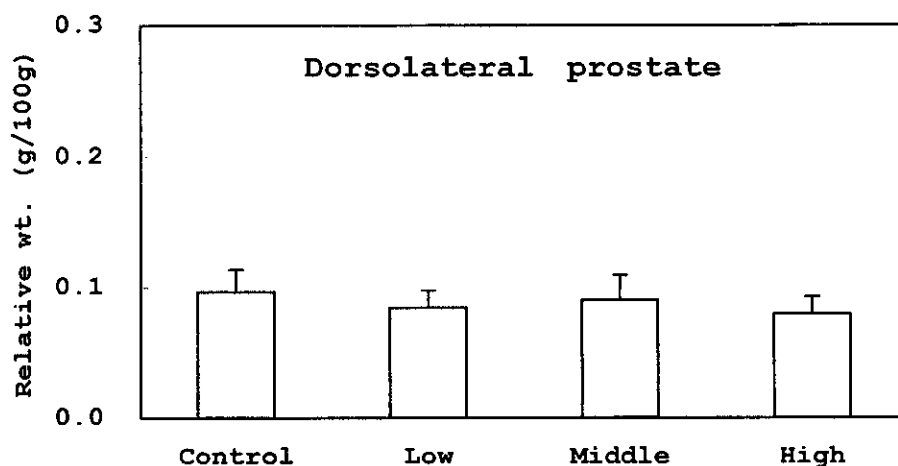


Figure3-5 Relative dorsolateral prostate weight of rats Administered with Bisphenol A for 28 days

Animals in each groups were given 40mg (Low dose), 200mg (Middle dose) or 1000mg (High dose) /kg·d of Bisphenol A by gavage. However, general condition of some animals in the High dose group aggravated within first week of dosing period, so the dose of the group was reduced to 600 mg/kg from the 8th to the 28th d of the dosing period.

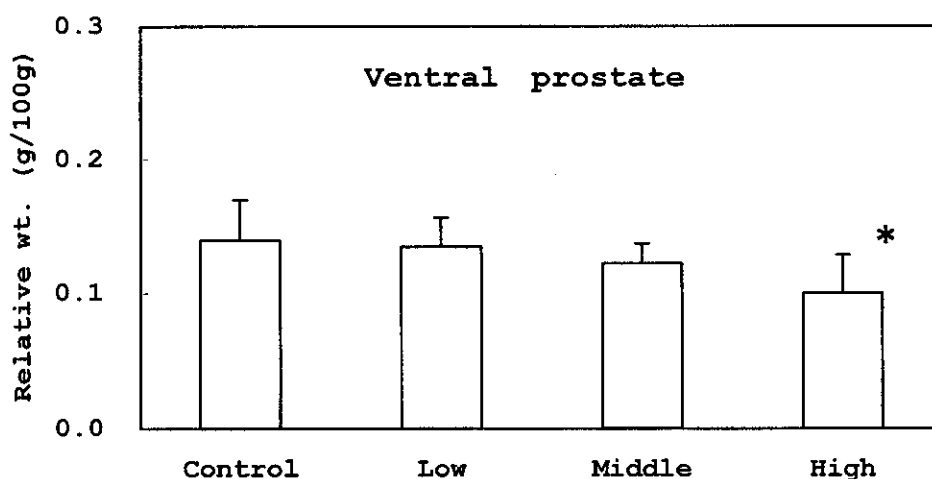


Figure3-6 Relative ventral prostate Weight of rats administered with bisphenol A for 28 days

Animals in each groups were given 40mg (Low dose), 200mg (Middle dose) or 1000mg (High dose) /kg·d of Bisphenol A by gavage. However, general condition of some animals in the High dose group aggravated within first week of dosing period, so the dose of the group was reduced to 600 mg/kg from the 8th to the 28th d of the dosing period.

*:Significantly different from the control (P<0.05)

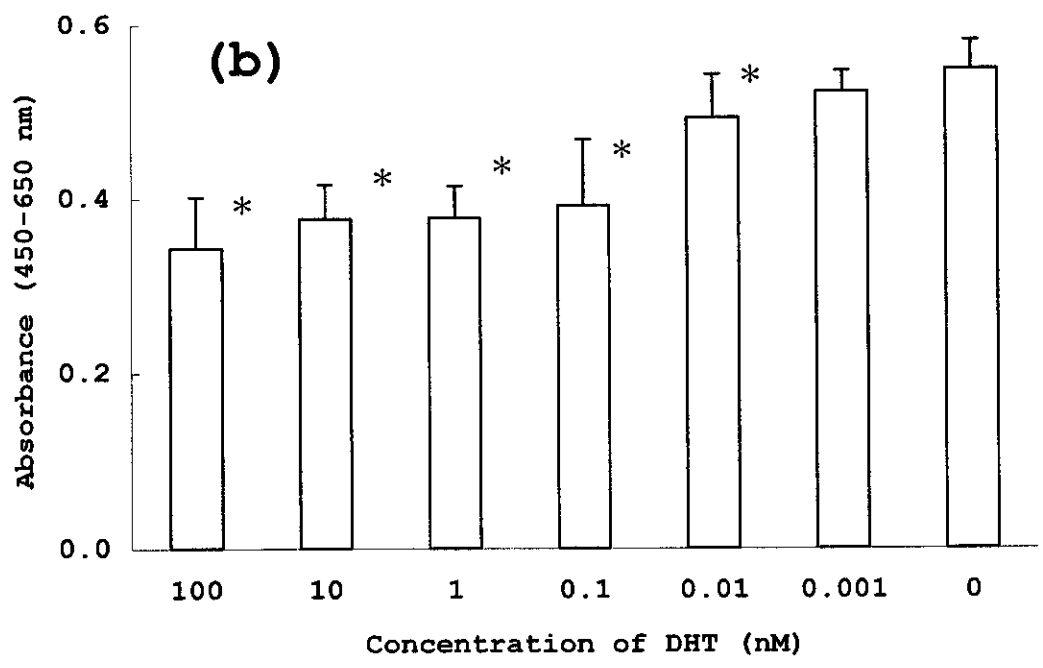
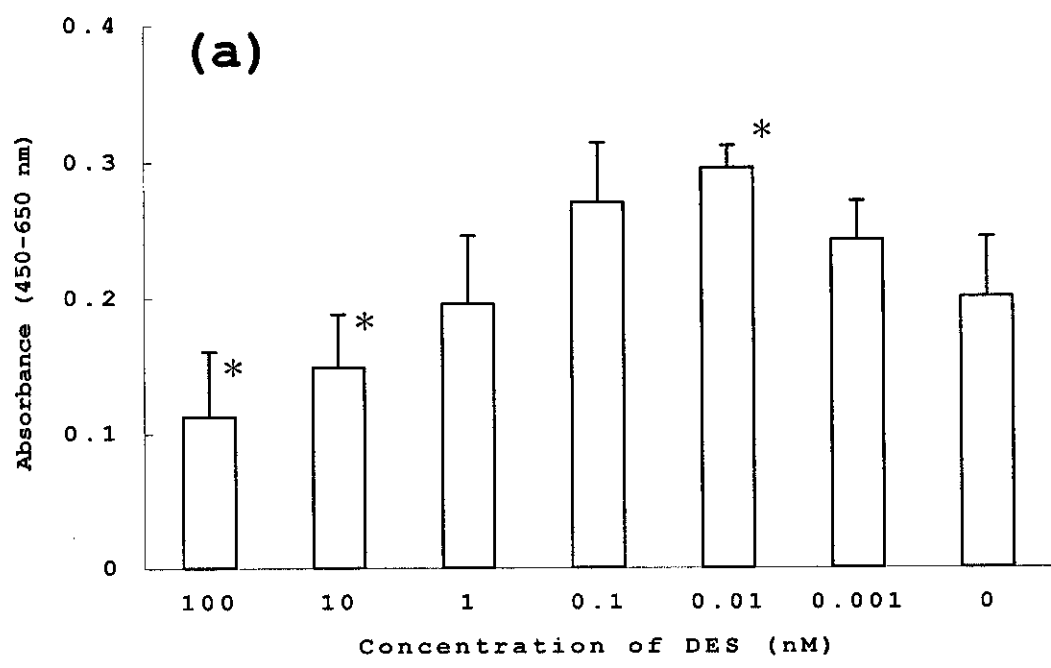


Figure 4 Effects of diethylstilbestrol (a) and dihydrotestosterone (b) on alpha 2u globulin production from A49-SC2 cell line

*: Significantly different from the control (0 nM)

Clustal W(1.4) multiple sequence alignment

3 Sequences Aligned. Alignment Score = 22337
 Gaps Inserted = 4 Conserved Identities = 739

Pairwise Alignment Mode: Slow
 Pairwise Alignment Parameters:

```

5' -AUG (U28152) 451 AAGTTAGCAGTTTGCATTCTGAGGACAATCTTTTGGGGTGGGTTGGGGT 500
5' -AUG (X05614) 1 AATCTTTTGGGGTGGGTTGGGGT 24
5' -AUG 445 AAGTTAGCAGTTTGCATTCTGAGGACAATCTTTTGGGGTGGGTTGGGGT 494
*****

5' -AUG (U28152) 501 TGGGGGCTGTCAGCTTTAGCTTCGGAAGATCCATCCTGATAATCTTTTTA 550
5' -AUG (X05614) 25 TGGGGGCTGTCAGCTT-AGCTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 73
5' -AUG 495 TGGGGGCTGTCAGCTTTAGCTTCGGAAGATCCATCCTGATAATCTTTTTA 544
*****

5' -AUG (U28152) 551 AATAACGATTTATTATTTTTATGCATATGTGACTGAATGAGTGAGTTCAT 600
5' -AUG (X05614) 74 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN- 122
5' -AUG 545 AATAACGATTTATTATTTTTATGCATATGTGACTGAATGAGTGAGTTCAT 594

5' -AUG (U28152) 601 ATGTACCACATGTGTATAGGAGATCACAAGGACCAAAAGAGGGTCATTTTC 650
5' -AUG (X05614) 123 -NGTACCACATGTGTATAGGAGATCACAAGGACCAAAAGAGGGTCATTTTC 171
5' -AUG 595 ATGTACCACATGTGTATAGGAGATCACAAGGACCAAAAGAGGGTCATTTTC 644
*****

5' -AUG (U28152) 651 CTGTGACTGGAGCTAGAGTCAGTTTGAGATGCCATGTGAGTGCGAGGAAT 700
5' -AUG (X05614) 172 CTGTGACTGGAGCTAGAGTCAGTTTGAGATGCCATGTGAGTGCGAGGAAT 221
5' -AUG 645 CTGTGACTGGAGCTAGAGTCAGTTTGAGATGCCATGTGAGTGCGAGGAAT 694
*****

5' -AUG (U28152) 701 TGAACCTGGGTCCTCAGCAAGAAAAGGTTTCAAAGAATCTGACTCCTTCT 750
5' -AUG (X05614) 222 TGAACCTGGGTCCTCAGCAAGAAAAGGTTTCAAAGAATCTGACTCCTTCT 271
5' -AUG 695 TGAACCTGGGTCCTCAGCAAGAAAAGGTTTCAAAGAATCTGACTCCTTCT 744
*****

5' -AUG (U28152) 751 TTCACATCCTTCTGACTTTCTTGGCCCCAGATGTGTGCATGGTACACATG 800
5' -AUG (X05614) 272 TTCACATCCTTCTGACTTTCTTGGCCCCAGATGTGTGCATGGTACACATG 321
5' -AUG 745 TTCACATCCTTCTGACTTTCTTGGCCCCAGATGTGTGCATGGTACACATG 794
*****

5' -AUG (U28152) 801 CAAAACCAATGCTCATAACATGAAATGTGAATGTTTTAAAGAAAACCC 850
5' -AUG (X05614) 322 CAAAACCAATGCTCATAACATGAAATGTGAATGTTTTAAAGAAAACCC 371
5' -AUG 795 CAAAACCAATGCTCATAACATGAAATGTGAATGTTTTAAAGAAAACCC 844
*****

5' -AUG (U28152) 851 AAGTAATTCAGCTTCTTCCACACTCCACTCAAGTCTTGAAGCAAAGATTC 900
5' -AUG (X05614) 372 AAGTAATTCAGCTTCTTCCACACTCCACTCAAGTCTTGAAGCAAAGATTC 421
5' -AUG 845 AAGTAATTCAGCTTCTTCCACACTCCACTCAAGTCTTGAAGCAAAGATTC 894
*****

5' -AUG (U28152) 901 TCTCCATGCTTGACCTCCAGTTCAGTACCCACCCACTCCATTACTGGCTT 950
5' -AUG (X05614) 422 TCTCCATGCTTGACCTCCAGTTCAGTACCCACCCACTCCATTACTGGCTT 471
5' -AUG 895 TCTCCATGCTTGACCTCCAGTTCAGTACCCACCCACTCCATTACTGGCTT 944
*****
    
```

Figure 5 DNA sequence of cloned 5'-non coding region of alpha 2u globulin gene and alignment with two reported sequences

5' -AUG (U28152)	951	TCTGATTCCAAGTCAGATCCAAAGTTCATCTGGTCCAGATAGCCCTCTT	1000
5' -AUG (X05614)	472	TCTGATTCCAAGTCAGATCCAAAGTTCATCTGGTCCAGATAGCCCTCTT	521
5' -AUG	945	TCTGATTCCAAGTCAGATCCAAAGTTCATCTGGTCCAGATAGCCCTCTT	994

5' -AUG (U28152)	1001	GAACACCCACTGTTTTCTTGAAATATGCTTTGTGAAATGTATTAGTGA	1050
5' -AUG (X05614)	522	GAACACCCACTGTTTTCTTGAAATATGCTTTGTGAAATGTATTAGTGA	571
5' -AUG	995	GAACACCCACTGTTTTCTTGAAATATGCTTTGTGAAATGTATTAGTGA	1044

5' -AUG (U28152)	1051	AAAAAATCAATCCATAGGAGATGAGATTGCCAAGTTGAAAAGGGCAGGA	1100
5' -AUG (X05614)	572	AAAAAATCAATCCATAGGAGATGAGATTGCCAAGTTGAAAAGGGCAGGA	620
5' -AUG	1045	AAAAAATCAATCCATAGGAGATGAGATTGCCAAGTTGAAAAGGGCAGGA	1094
		***** *****	
5' -AUG (U28152)	1101	ACAATCCTTGGCTTCACATCAGTACATGAGAAAACATTCCAAAAAGCCTG	1150
5' -AUG (X05614)	621	ACAATCCTTGGCTTCACATCAGTACATGAGAAAACATTCCAAAAAGCCTG	670
5' -AUG	1095	ACAATCCTTGGCTTCACATCAGTACATGAGAAAACATTCCAAAAAGCCTG	1144

5' -AUG (U28152)	1151	AGGGAAGGAGGCCCATATGAGAAGGAAAAAAAAAACTGGAACCCAGAG	1200
5' -AUG (X05614)	671	AGGGAAGGAGGCCCATATGAGAAGGAAAAAAAAAACTGGAACCCAGAG	720
5' -AUG	1145	AGGGAAGGAGGCCCATATGAGAAGGAAAAAAAAAACTGGAACCCAGAG	1194

5' -AUG (U28152)	1201	AGAGTATAAAGACGAGCAAAGTGCTGAAGGTGGAGTGTGGGCATCATCAG	1250
5' -AUG (X05614)	721	AGAGTATAAAGACGAGCAAAGTGCTGAAGGTGGAGTGTGGGCATCATCAG	770
5' -AUG	1195	AGAGTATAAAGACGAGCAAAGTGCTGAAGGTGGAGTGTGGGCATCATCAG	1244

5' -AUG (U28152)	1251	CAGAGAGAGATTGTCCCAACAGAGAGGCAATTCTATTCCCTACCAACATG	1300
5' -AUG (X05614)	771	CAGAGAG--ATTGTCCCAACAGAGAGGCAATTCTATTCCCTACCAACATG	818
5' -AUG	1245	CAGAGAGAGATTGTCCCAACAGAGAGGCAATTCTATTCCCTACCAACATG	1294
		***** *****	

Figure 5 -Continued.

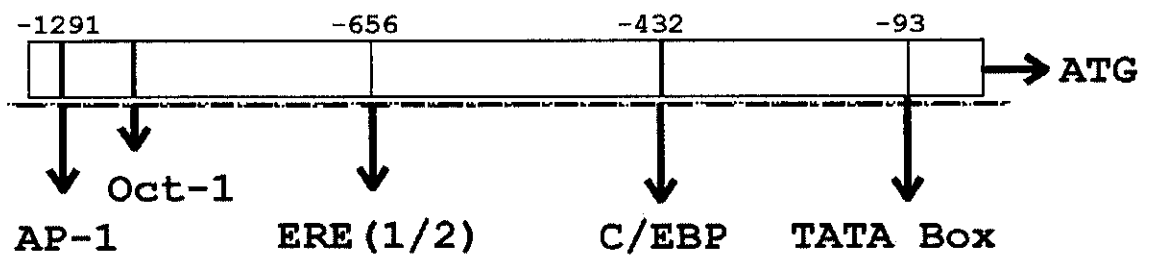


Figure 6 Typical DNA motifs found in 5' non coding region of alpha 2u globulin gene

培養細胞を用いた内分泌かく乱化学物質検出系の検討

分担研究者 塚田 俊彦 国立がんセンター研究部
細胞増殖因子研究部受容体研究室室長

研究要旨

新しい内分泌かく乱化学物質検出系として、Neuron-derived orphan receptor-1 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子につなぎ、これを Balb3T3 細胞に導入して安定した形質転換細胞 (3T3NL 細胞) を作製した。この細胞を用いた検出系では、膜受容体を介するシグナル伝達をかく乱する物質を約3時間で検出することができた。

A. 研究目的

培養細胞を用いて、膜受容体を介するシグナル伝達系をかく乱する物質のスクリーニングに使用可能な、簡便で鋭敏な検出系を開発する。培養細胞として多種類の細胞を用いることができるように、組織非特異的な発現をする遺伝子のプロモーター活性を指標とする系とし、その感度等を検討する。

B. 研究方法

ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として、神経由来オーファン受容体 (Neuron-derived orphan receptor-1, NOR-1) 遺伝子プロモーター活性が検出できる安定した形質転換培養細胞株を作製する。この細胞を用いて、A キナーゼ及び C キナーゼを活性化する物質の NOR-1 プロモーター活性への影響の検討をおこなう。各種刺激による NOR-1 遺伝子発現の変化を調べ、この検出系で検出可能な内分泌かく乱物質の種類を検討する。

(倫理面への配慮)

- 本研究においては、直接ヒト又は動物の生体を対象とする実験は行わない。

C. 研究結果

NOR-1 遺伝子がほとんど全ての組織で発現していること、および検討した多種類の培養細胞のすべてにおいて発現が認められることは既に報告した。また、これまでに A キナーゼや C キナーゼを活性化する物質による刺激で、NOR-1 mRNA が急激に誘導されることがわかっている。本年度はさらに、乳癌培養細胞株 MCF-7 において、種々のステロイ

ドホルモンで刺激実験を行ったが、ほとんど NOR-1 mRNA 量に変化を来さないことがわかった。この遺伝子のプロモーター領域の種々の長さの DNA 断片をルシフェラーゼ遺伝子につなぎ、このキメラ遺伝子を数種類の培養細胞に一過性に導入したところ、約 4000 塩基対の断片が強いルシフェラーゼ活性を発現させた。また、この約 4000 塩基対のプロモーター領域からの転写は、カルシウムイオノフォア A23187 による刺激によって増強されることがわかった。

この約 4000 塩基対の NOR-1 遺伝子プロモーター領域をもつキメラ遺伝子をネオマイシン耐性遺伝子とともに、マウス Balb3T3 細胞に導入し、24 個のネオマイシン耐性クローンを得た。これらのクローンのそれぞれを 1 μ M フォルスコリンで 3 時間の刺激をした後ルシフェラーゼ活性を測定したところ、約半数のクローンでルシフェラーゼ活性が測定可能であった。そのうち、特にルシフェラーゼ活性が高かった 5 クローンについて、1 μ M フォルスコリンによる刺激の前後で比較したところ、全てのクローンでルシフェラーゼ活性の誘導が認められた (図 1)。

これらのうち特に誘導幅が大きかった 1 クローン (3T3NL 細胞) について 10 μ M フォルスコリンまたは 100 nM 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) による刺激を行い、ルシフェラーゼ活性の時間経過を検討した。その結果、フォルスコリンおよび TPA のいずれによっても、約 3 時間で頂値に達する一過性の酵素活性誘導が認められた (図 2)。誘導幅はフォルスコリンでは約 40 倍と大きかったが、

TPA では約 3 倍であった。このことから、この系は A キナーゼ系を介する刺激に対しては鋭敏に反応するが、C キナーゼ系の刺激に対しては反応が鈍いこと示唆された。

D. 考察

昨年度報告した、PC12 細胞を用いた内分泌かく乱物質検出系 (PC12VG 細胞) では vasoactive intestinal peptide (VIP) 遺伝子のプロモーターにつないだベータガラクトシダーゼをレポーター遺伝子とした。VIP 遺伝子のプロモーターは、副腎髄質細胞由来の PC12 細胞など、特殊な神経内分泌細胞においてのみ高いプロモーター活性を示すため、多くの細胞ではこのプロモーターを使用できなかった。今年度は、用いることができる培養細胞の種類の点で汎用性をもたせるため、ほとんど全ての細胞で内因性に発現しており、種々の刺激に対して転写活性が上昇することが知られている NOR-1 遺伝子プロモーターの利用を試みた。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いたため、ベータガラクトシダーゼと比べて酵素活性の測定手技がやや煩雑となったが、基礎値も十分感度以上になるなどの利点があった。

NOR-1 遺伝子プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子をつないだキメラ遺伝子を安定して発現する細胞株の 1 クローン (3T3NL 細胞) は、フォルスコリンによる刺激に対し、約 3 時間後に基礎値の約 40 倍に至るルシフェラーゼ活性誘導を示した。これは、PC12VG 細胞におけるベータガラクトシダーゼ活性が、同様の刺激後約 6-8 時間で頂値に到達したのと比べて、より迅速な反応であった。一方、TPA による誘導は PC12VG 細胞と同様に反応が低かった。このことより、3T3NL 細胞も PC12VG 細胞と同様に、A キナーゼ系を介するシグナル伝達系に作用する物質の検出には感度の良い検出系と考えられる。また、内因性の NOR-1 mRNA はカルシウムイオノフォア、インスリンや epidermal growth factor などの各種増殖因子、shear stress や磁場などの物理的刺激により増加することが知られており、種々の培養細胞を親細胞とすることにより、様々な生物作用の検出系の作製に利用できると考えられる。

E. 結論

NOR-1 遺伝子プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子につないだキメラ遺伝子を安定して発現する培養細胞 3T3NL 細胞を得た。この細胞は A キナーゼ系を介するシグナル伝達系に作用する物質を迅速に検出する系として適している。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ohkura N, Hosono T, Maruyama K, Tsukada T and Yamaguchi K. The human NGFI-B gene gives rise to two isoforms with different expression profiles. *Biomed Res* 29 (4): 213-218, 1999

Nagasaki K, Maass N, Manabe T, Hanzawa H, Tsukada T and Yamaguchi K. Identification of a novel gene, *LDOC1*, down-regulated in cancer cell lines. *Cancer Lett* 140: 227-234, 1999

Nagasaki K, Manabe T, Hanzawa H, Maass N, Tsukada T, Kikuchi K and Yamaguchi K. Identification of a novel gene, *DAM1*, amplified at chromosome 1p13.3-21 region in human breast cancer cell lines. *Cancer Lett* 140:219-226, 1999

Nagasaki K, Sasaki K, Maass N, Tsukada T, Hanzawa H and Yamaguchi K. Staurosporine enhances cAMP-induced expression of neural-specific gene VGF and tyrosine hydroxylase. *Neurosci Lett* 267: 177-180, 1999

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

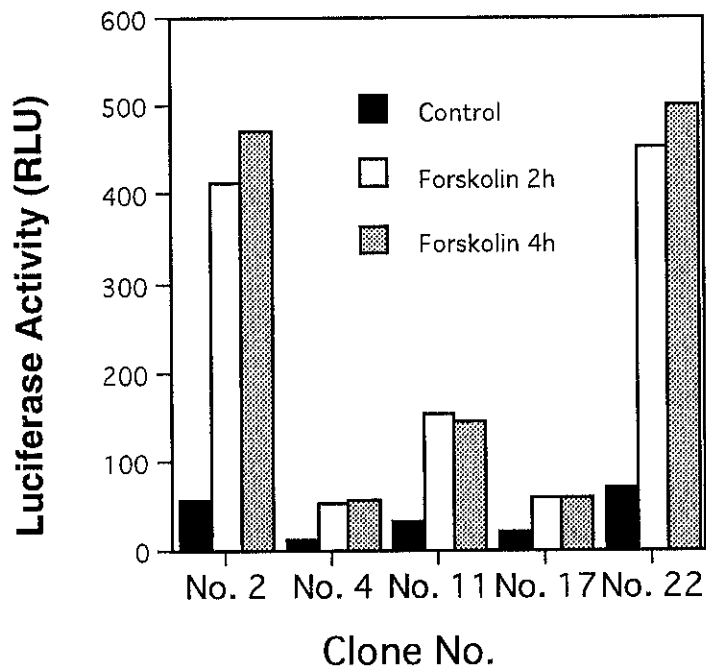


図1. NOR-1遺伝子プロモーター/ルシフェラーゼのキメラ遺伝子を安定導入したBalb3T3細胞の各クローンにおける1 μ M フォルスコリン処理によるルシフェラーゼ活性の誘導。

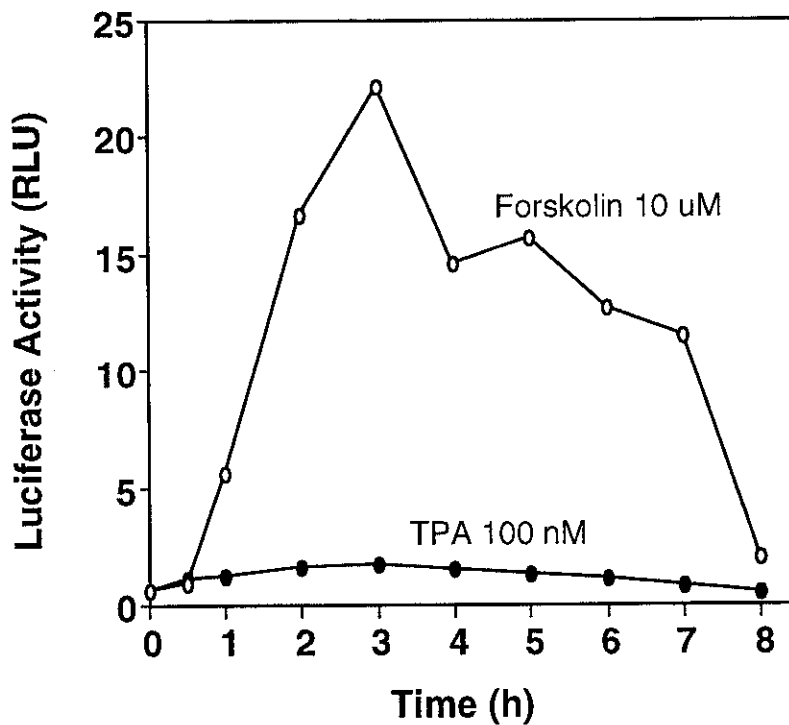


図2. 3T3NL細胞における10 μ Mフォルスコリン又は100 nM TPAによるルシフェラーゼ活性の誘導の時間経過

③ 研究報告書レイアウト

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・部長

研究要旨 ビスフェノール A の抱合系代謝酵素の一種硫酸転移酵素 (SULT) による硫酸抱合反応に主に関与する肝の分子種は熱安定フェノール硫酸転移酵素 (TS-PSULT) 分子種であった。生成した硫酸抱合体のエストロゲン様作用を評価する目的で、MCF-7 細胞を用いるいわゆる E-screen 法による細胞増殖の誘導と、エストロゲン応答遺伝子 pS2 の発現誘導活性を調べたところ、硫酸抱合体のエストロゲン様作用はビスフェノール A に比べ著しく減弱していた。

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。しかし、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が十分に明かにされてはいない。また、生成した代謝物のエストロゲン様作用も十分に評価されていない。今年度の本研究では、ビスフェノール A の抱合系代謝酵素の一種硫酸転移酵素 (SULT) による硫酸抱合反応に主に関与する肝 SULT 分子種を明らかにすると共に、生成した硫酸抱合体のエストロゲン様作用を評価する目的で、MCF-7 細胞を用いるいわゆる E-screen 法による細胞増殖の誘導と、エストロゲン応答遺伝子 pS2 の発現誘導活性を調べた。

B. 研究方法

B-1. ビスフェノール A の SULT 活性の測定

[³⁵S]PAPS を硫酸基供与体と、バリウム沈殿法で未反応の [³⁵S]PAPS を沈殿させ、ビスフェノール A 硫酸抱合体と分離することにより活性を測定した。

また、逆相 C₁₈ カラムを用いた HPLC 法により生成したビスフェノール A 硫酸抱合体の量を測定する方法も用いた。

B-2. ヒト肝サイトゾールにおけるビスフェノール A SULT 分子種の同定

ヒト肝サイトゾールに存在する SULT のうち、どの分子種がビスフェノール A の硫酸抱合反応に寄与しているのかにつき、熱安定フェノール SULT (TS-PSULT) 分子種の特異的阻害剤であるケルセチン、または、TS-PSULT 分子種以外の SULT の典型的基質をヒト肝サイトゾールによるビスフェノール A の硫酸抱合反応系に共存させ、ビスフェノール A 硫酸抱合体の生成阻害をバリウム沈殿法 (ケルセチン) または、HPLC 法 (ケルセチン以外の阻害剤の場合) で測定した。

B-3 ビスフェノール A 硫酸抱合体の合成

ビスフェノール A と三酸化硫黄ピリジンを

ベンゼン中で 2 時間加熱し、冷却後水酸化カリウムを加えた。ビスフェノール A 硫酸抱合体をビスフェノール A およびビスフェノール A の二硫酸エステルなどの混合物から分離するため、溶媒抽出を行った。

B-4. ヒト乳癌由来細胞 MCF-7 を用いた細胞増殖誘導によるエストロゲン様作用の *in vitro* 試験系 (いわゆる E-screen assay)

MCF-7 細胞は 10% FCS-RPMI1640 培地で継代した。96 穴プレートにウエルあたり 8000 細胞の MCF-7 を播種し、24 時間培養後、5% charcoal-dextran 処理した FCS (CD-FCS-RPMI1640PR(-) 培地 (フェノールレッドを含まないもの) に置換し、24 時間培養した。ビスフェノール A、ビスフェノール硫酸抱合体及び 17β-エストラジオールを同培地に溶解して添加した。144 時間培養後 PBS(-) で洗浄し、風乾させ、0.4% クリスタルバイオレットで染色し、細胞増殖を比較した。

B-5. MCF-7 細胞におけるエストロゲン応答遺伝子 pS2 の発現誘導の測定

MCF-7 細胞を 10 cm ディッシュに 20 万個播種し、48 時間培養後、10% CD-FCS-RPMI1640 (フェノールレッド(-)) に置換して、2 時間後にビスフェノール A、ビスフェノール硫酸抱合体、エストラジオールのいずれかを添加した。24 時間培養後 total RNA を抽出し、reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) を行った。PS2 遺伝子の相対発現レベルを G3PDH の発現レベルと相対比として比較した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いられたヒト肝サイトゾールは Gentest Cooperation で調製され、日本国内で、第一化学薬品により販売されている Human liver S9 を 105,000 xg、1 時間超遠心して調製した。本商品は 12 人の欧米人由来の肝の S9 が混合され、"mixed liver S9" として販売されているものである。検体提供者又は、代託者より同意を得るなどの倫理的配慮が十分なされた上で採取された検体に由来する

ものであり、また、本検体を使用するにあたり、国立医薬品食品衛生研究所の倫理委員会の承認を得た上で、本研究は遂行されている。

C. 研究結果

C-1. ヒト肝サイトゾールにおけるビスフェノールASULT分子種の同定

TS-PSULTの特異的阻害剤であるケルセチンは、それ自身ヒト肝サイトゾールと硫酸基供与体である ^{35}S PAPSの存在下、硫酸抱合を受けない。そこで、バリウム沈殿法によるビスフェノールAの硫酸抱合の測定系にケルセチンを共存させ、硫酸抱合反応の阻害の程度を検討した。その結果、昨年度までの本研究で調製法が確立された大腸菌内発現ST1A3 (TS-PSULTの一分子種) およびヒト肝サイトゾールのビスフェノールAの硫酸抱合活性は、ケルセチン濃度依存的に阻害された(図1)。ケルセチンにより、TS-PSULT以外のSULTが阻害されないと考えられている $10\ \mu\text{M}$ の濃度で、約70%の阻害率で、ヒト肝のビスフェノールA硫酸抱合活性が阻害された。さらに、ヒト肝サイトゾールに存在することが知られている主要な分子種(TS-PSULTの他、熱不安定(TL)-PSULT、hydroxysteroid SULT (HS-SULT)、estrogen SULT (E-SULT))につき、それらの典型的基質により、ビスフェノールAの硫酸転移酵素活性が阻害されるか否かを検討した。その結果、ヒト肝サイトゾールのビスフェノールA硫酸転移酵素活性は、TS-PSULTの典型的基質p-ニトロフェノールにより $1\ \mu\text{M}$ 以上で濃度依存的に阻害され、特に $8\ \mu\text{M}$ 以上では90%以上の阻害が認められた。それに対し、HS-SULTの基質デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)も $1.25\ \mu\text{M}$ 以上で阻害が認められたが、 $2.5\ \mu\text{M}$ - $20\ \text{mM}$ まで、阻害率は35-50%にとどまった(図2a, b)。

また、TL-PSULTの基質であるドパミンや、E-SULTの基質であるエストロンでは顕著な阻害は認められなかった。

C-2. ビスフェノールA硫酸抱合体のMCF-7細胞増殖誘導活性

内在性のエストロゲンの除去処理をしたCD-FCSを加えた培養液中では、MCF-7細胞の増殖能は非常に低い。その培養液に、エストロゲン様作用を有する物質を加えることにより惹起される細胞増殖誘導をもって、エストロゲン様作用の検定系として用いられているのがいわゆるE-screenである。我々は、MCF-7の細胞増殖を、細胞をクリスタルバイオレットで染色し、その染色強度によって定量化した。本試験を用いて、ビスフェノールA硫酸抱合体のMCF-7細胞の増殖誘導能を、ビスフェノールAと比較検討したところ、図3に示すように、ビスフェノールAが、明らかにMCF-7細胞の増殖活性を惹起する $3\ \text{nM}$ 、 $30\ \text{nM}$ 、 $100\ \text{nM}$ で、硫酸抱合体は全く細胞増殖誘導能を示さなかった。

C-3. ビスフェノールA硫酸抱合体のMCF-7細胞におけるエストロゲン応答遺伝子pS2の発現誘導活性

CD-FCS添加の培養液中2時間培養後、RT-PCR法で測定したpS2 mRNAの発現量は、正常のFCSを加えた培養液の場合に比べて約40%低下した。このような条件下で

CD-FCS添加培養液中に被検物質被存在下のpS2遺伝子の発現のビスフェノールAおよびビスフェノールA硫酸抱合体による誘導能を調べた。その結果、図4に示すように、MCF-7の細胞増殖誘導実験と同様に、ビスフェノールA硫酸抱合体では、pS2遺伝子の発現誘導は認められなかった。

D. 考察

D-1. ヒト肝サイトゾール画分のSULTのうち、TS-PSULTの特異的阻害剤ケルセチンや、その典型的基質p-ニトロフェノールがビスフェノールAの硫酸抱合活性をそれぞれ約70%、約90%阻害した。それ以外のヒト肝硫酸転移酵素分子種の典型的基質すなわちDHEA(HS-HSST)、ドパミン(TL-PSULT)、エストロン(E-SULT)の中で、DHEAでのみ約50%程度の阻害がみられた。これらのことより、ヒト肝で、ビスフェノールAの硫酸抱合には、TS-PSULT(ST1A3)の関与が最も大きいことが示唆された。

D-2. エストロゲン様作用の*in vitro*検定系の一つ、MCF-7による増殖誘導活性は、ビスフェノールAの硫酸抱合体では、ビスフェノールAに比べ、明らかに減弱していることが示された。また、内在性エストロゲン濃度を低くした培養系において、ビスフェノールAはエストロゲン応答性遺伝子pS2 mRNAの発現レベルを、濃度 $1\ \mu\text{M}$ 以上、2時間の作用で2倍以上に上昇させた。これらを総合して、ビスフェノールAの硫酸抱合反応は、ビスフェノールAのエストロゲン作用に関わる細胞応答性を減弱させる反応であることが強く示唆された。

E. 結論

E-1. ヒト肝サイトゾールのビスフェノールAの硫酸抱合反応には、TS-PSULT(肝においては主要分子種ST1A3)が最も大きく関与している。

E-2. ビスフェノールAの硫酸抱合反応は、エストロゲン様作用をMCF-7細胞を用いた検定系による結果から判断すると、本作用を減弱させる役割を果たすと考えられた。本研究で得られたデータはビスフェノールAに対するリスク評価において有用な手がかりを与えると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shiraga, T., Hata, T., Yamazoe, Y., and Ohno, Y., Iwasaki, K.: N-sulpho conjugation of amines by human cytosolic hydroxysteroid sulphotransferase. *Xenobiotica*, 29, 341-347, 1999.
- 2) 大野泰雄: 代替法を組み込んだ眼刺激性評価ガイドランスについて、*フレグランスジャーナル* 7, 21-26, 1999
- 3) Nakazawa, K., Inoue, K., Ohno, Y., Block and unblock by imipramine of c lone and mutated P2X2 receptor/channel expressed in *Xenopus oocytes*. *Neuroscience Letters* 264, 93-96, 1999.
- 4) Nakazawa, K., Ohno, Y., Neighboring glycine residues are essential for P2X2 receptor/channel function, *Eur. J. Pharmacol.* 370, R5-R6, 1999.
- 5) 大野泰雄, 毒性学の現状と種差について、*化学物質の安全性をいかにして見極め*

るか。可塑剤インフォーメーション、12、9-13、1999

6) 大野泰雄、安全な臨床試験の実施および効率的な医薬品開発のための非臨床試験実施タイミング、J. Toxicol. Sci, 24, app.109-117, 1999.

7) Nakazawa, K., Ohno, Y., Block by 5-hydroxytryptamine and apomorphine of recombinant human neuronal nicotinic receptors, Eur. J. Pharmacol. 374, 293-299, 1999.

8) Nakazawa, K., Ohno, Y., 5-hydroxytryptamine inhibits P2X2 receptor channel pore mutants. Cellular and Molecular Neurobiology, 19, 665-669, 1999.

9) Saitoh, M., Umemura, T., -- Inoue, T., Ohno, Y., Sofuni, T., Kurokawa, Y., Tsuda, M. Toxicity study of a rubber antioxidant, mixture of 2-mercaptomethylbenzimidazoles, by repeated oral administration to rats. Food and Chemical Toxicology, 37, 777-787, 1999.

10) Shiraga, T., Niwa, T., Teramura, Y., Kagayama, A., Tsutsui, M., Ohno, Y., Iwasaki, K.: Oxidative metabolism of tacrolimus and its metabolite by human cytochrome P450 3A subfamily. Xenobio. Metabol. And Disp. 14, 277-285, 1999.

11) Ozawa, S., Shimizu, M., Katoh, T., Miyajima, A., Ohno, Y., Matsumoto, Y., Fukuoka, M., Tang Yong-Ming, Lang, N.P., Kadlubar, F.F., Sulfating-activity and stability of cDNA-expressed allozymes of human phenol sulfotransferase, ST1A3*1 (213Arg) and ST1A3*2 (213His), both of which exist in Japanese as well as Caucasians. J. Biochem. 126, 271-277, 1999.

12) Usami, M., Tabata, H., Ohno, Y., Effects of glutathion depletion on selenite- and selenate-induced embryotoxicity in cultured rat embryos. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis, 19, 257-266, 1999.

13) Hirabayashi N., Matsuki, Y., Suzuki E., Usami M., Ohno, Y., Shimada, K., Toxicokinetic study of fadrozole, a non-steroidal aromatase inhibitor, in chicken eggs by the injection into the air sac. Japan. Poultry Sci. 36, 382-387, 1999.

14) 酒見和枝、宇佐見誠、紅林秀雄、大野泰雄、亜塩酸ナトリウム(NaClO₂)のラットを用いた経口投与による催奇形性試験. Bull. Natil. Health Sci. 117, 99-103, 1999

15) Ohno, Y.: Harmonization of the timing of non-clinical tests in relation to the conduct of clinical trials. J. Controlled Release 62, 57-63, 1999.

16) Sakemi, K., Usami, M., Mitsunaga, K., Ohno, Y., Tsuda, M.: Comparative toxicokinetic study of rubber antioxidants, 2-mercaptobenzimidazole and 2-mercaptomethylbenzimidazole, by single oral administration in rats. J. Toxicol. Sci. 24, 399-405, 1999.

17) Nishikimi, H., Kansaku, N., Saito, N., Usami, M., Ohno, Y., Shimada, K. : Sex differentiation and mRNA expression of P450c17, P450arom and AMH in gonads of the chicken. Molecular reproduction and development 55, 20-30, 1999.

2. 学会発表

1) 小澤正吾、加藤貴彦、稲富久人、松本哲朗、大野泰雄 ヒトフェノール硫酸転移酵素、アリルアミン N-アセチル転移酵素の遺伝子多型と尿路上皮癌感受性 第26回日本トキシコロジー学会学術年会 (札幌) 平成11年7月21日-23日 第26回日本トキシコロジー学会学術年会 要旨集 232頁 1999年

2) 小澤正吾、清水万紀子、松本宜明、福岡正道、加藤貴彦、大野泰雄 ヒト組織フェノール硫酸転移酵素の遺伝子多型と多型分子種の性質 第14回日本薬物動態学会年会 (浜松) 平成11年10月19日-21日 薬物動態・14巻 S96-S97 1999年

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

発明の名称：補体成分C3含有組成物

特許出願人：国立衛生試験所長

代理人：川上宣男

特許出願番号：平成8年特許願 第212169

起案日：平成11年10月28日

発明人：宇佐見 誠、酒見 和枝、大野 泰雄

作成上の留意事項について

1. 日本工業規格A列4番の用紙を使用して下さい。
2. 文字の大きさは、11ポイントでお願いいたします。

図1. 熱安定性フェノール硫酸転移酵素 (ST1A3)、
ヒト肝サイトゾールのビスフェノールA硫酸抱合活性の
ケルセチンによる阻害

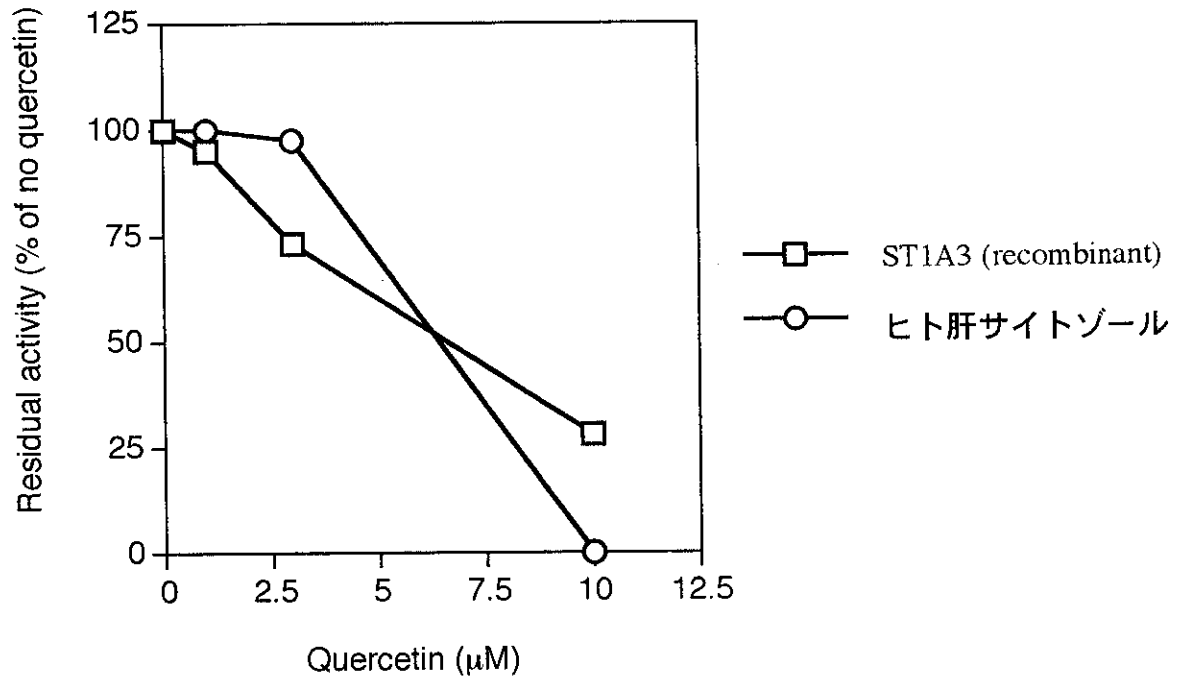


図2. ヒト肝サイトゾールによるビスフェノールAの硫酸抱合活性に対する種々の硫酸転移酵素分子種の典型的基質による阻害

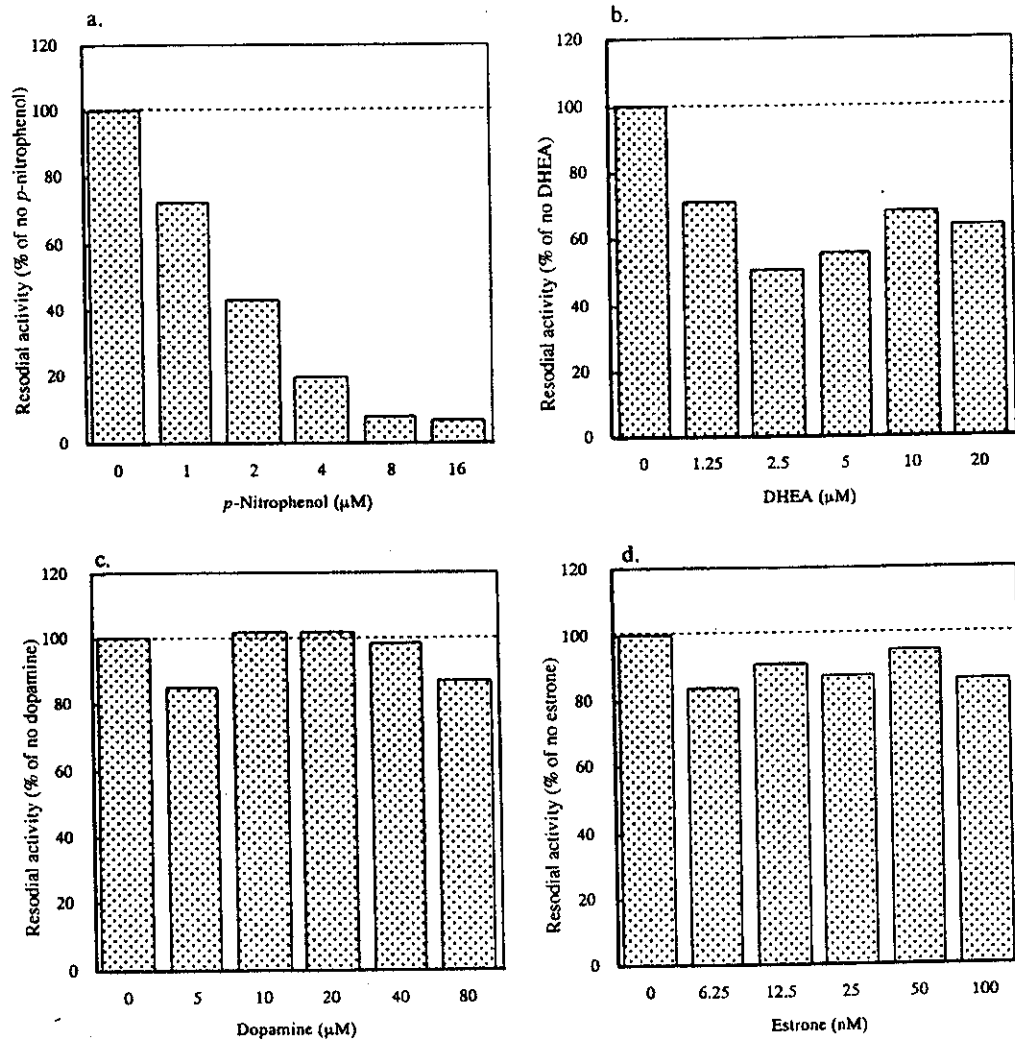
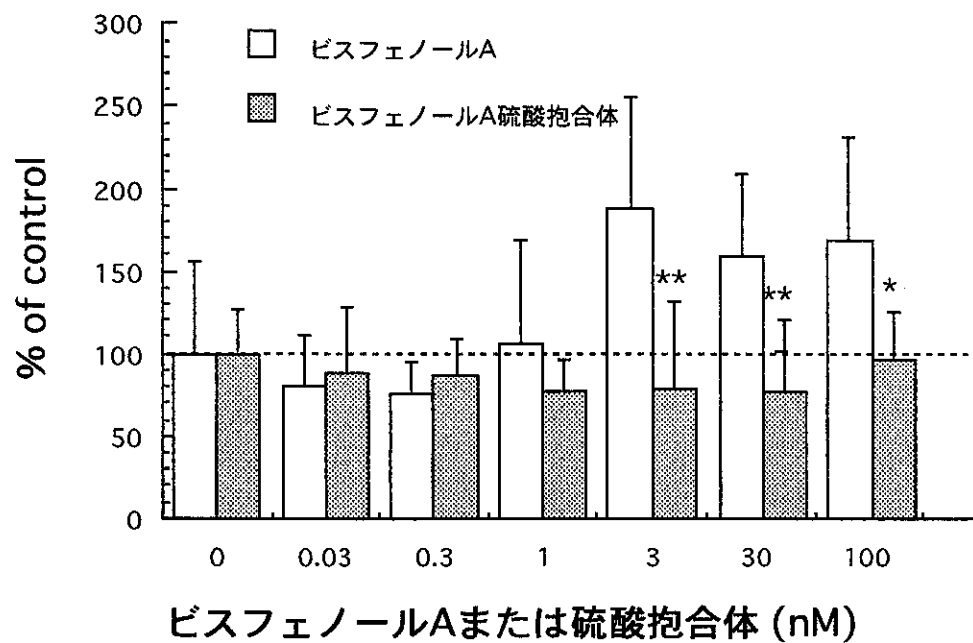


図3. ビスフェノールAおよび硫酸抱合体によるMCF-7細胞の増殖誘導活性



データは、6 ウェルの細胞の染色強度の平均と、標準偏差を表すバーをもって表示されている。*および**は当該濃度におけるビスフェノールAと硫酸抱合体との差の有意差をt-検定により、検定した結果を表す。
*: $p < 0.01$, **: $p < 0.001$

図4. ビスフェノールAおよび硫酸抱合体によるMCF-7細胞のエストロゲン応答遺伝子pS2の発現誘導活性

