

ホルモンレセプターを介する内分泌かく乱化学物質の検出系に関する研究

分担研究者 西原 力 大阪大学大学院・薬学研究科・教授

研究要旨

われわれが開発した外因性化学物質のホルモンレセプターを介する遺伝子発現作用の検出系 (酵母 Two-Hybrid 試験) の改良法についてエストロゲンの系を用いて検討し、96 穴マイクロプレート培養と化学発光レポーター遺伝子測定を適用することにより、より簡便化、高感度化を図った。また、S9 による前処理により代謝活性化物質が検出でき、E2 共存によりアンタゴニスト活性も測定できることを示した。

A. 研究目的

われわれは迅速・簡便な内分泌かく乱物質の検出系として、ホルモンレセプターとコアクチベーターのリガンド依存的な相互反応に着目して、酵母 Two-Hybrid 試験を開発した [Nishikawa, J., et al.: New Screening Methods for Chemicals for Hormonal Activities Using Interaction of Nuclear Hormone Receptor with Coactivator. Toxicol. Appl. Pharmacol. 154(1), 76-83 (1999)]。本法を環境モニタリングやメカニズムの研究に活用するためには、より簡便・迅速化、高感度化が有用である。そこで、本法の改良法について検討した。また、代謝活性化物質を検出するための前処理条件、およびアンタゴニスト活性の測定条件についても検討した。

B. 研究方法

高感度化については、化学発光基質を用いて蛍光度測定する方法、簡便化については 96 穴マイクロプレートを用いて酵母の培養から酵素活性の測定までを行える方法を検討した (図 1)。

代謝活性化物質の検出するための S9 前処理条件、E2 共存によるアンタゴニスト活性の測定条件の検討を行った。

C. 研究結果

市販化学発光測定用キットを用いる化学発光法について検討した結果、SD Medium 中の Dextrose 量を 1/10 にすることにより、発光量のプランク値が低下することがわかり、実質上の高感度化が達成された (図 2)。96 穴マイクロプレートで酵母の培養、化学物質との反応、溶菌、活性測定することにより、簡便化ができることがわかった (図 1)。S9 で前処理することにより、代謝活性化物質が検出でき (表 1)、

E2 共存下の活性阻害を測定することによりアンタゴニスト活性が検出できることを明らかにした (図 3)。

D. 考察

MD Medium 中の Dextrose の化学発光に対する影響のメカニズムは不明であるが、自動分注装置を導入すれば更に簡便・迅速化できると考えられる。また、前処理条件を検討すればより false positive-negative の少ない系を開発することができるとわかった。しかし、環境試料に適用するためには、その濃縮・分離・精製法の検討が必要である。

E. 結論

反応・測定・前処理条件を検討することにより、簡便化、高感度化、代謝活性化物質やアンタゴニストの検出が可能であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表(主なもの)

西原: いわゆる環境ホルモンについて、日本放射線技術学会近畿部会雑誌、5, 18-22 (1999)

西原(分担): 内分泌攪乱化学物質問題—私達にできること—、「環境に今何が起きているか」、第 31 回大阪大学開放講座テキスト、p. 61-70、大阪大学 (1999)

西原: 内分泌攪乱化学物質 (環境ホルモン) の影響はどこまでわかっているか—スクリーニング試験—、公衆衛生、63, 681-686 (1999)

Nishikawa, J., et al.: Hormone Disrupters. BIA journal 6, 19-21 (1999)

西原(分担):: 化学物質の環境動態—生分解と生物濃縮—、本間、樽谷(編)、検証「環境ホルモン」、p. 167-180、青木書店、東京 (1999)

西原:: 内分泌攪乱物質問題と化学物質のリスクアセスメント—私たちにできること—、学士会会報、3(824)、75-80 (1999)

西原: 内分泌攪乱化学物質のスクリーニング試験、防菌防黴、27(6)、393-402 (1999)

西原: 環境ホルモン問題「環境ホルモンのバイオアッセイを用いた検出方法」安全工学、38(2)、85-92 (1999)

西原(分担): 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、試験管内 (in vitro) での試験、p. 63-73. オーム社、東京 (1999)

Dateyama, F., et al.: Screening Methods for Endocrine Disruptors Based on the mechanism of Transcriptional Regulation by Nuclear Hormone Receptor. Jpn. J. Toxicol. Environ. Health, 45, P-38 (1999)

2. 学会発表(主なもの)

金山、他: 酵母 Two-Hybrid System を用いた化学物質のエストロゲン様活性の検出、日本内分泌攪乱化学物質学会 (1999)

中室、他: 酵母 Two-Hybrid 法による河川水中エストロゲン活性物質の評価、日本内分泌攪乱化学物質学会 (1999)

白石、ほか: マイクロプレート培養法による簡便な酵母 Two-Hybrid System のエストロゲンアッセイ法の開発、日本内分泌攪乱化学物質学会 (1999)

Nishihara, T.: in vitro Bioassay for Endocrine Disrupting Chemicals, The Princess Churabhorn International Science Congress IV, Bangkok (1999)

Nishikawa, J. et al.: Studies on Mode of Action of Estrogenic Chemicals, The Princess Churabhorn International Science Congress IV, Bangkok (1999)

Nishihara, T., et al.: Estrogenic activity of chemicals determined by yeast two-hybrid assay, 20<sup>th</sup> Annual Meeting of SETAC-US, Philadelphia (1999)

西原: インビトロスクリーニング試験の現状と課題、日本学術会議トキシコロジー研究連絡委員会主催公開シンポジウム (1999)

西原: 外因性内分泌攪乱化学物質のスクリーニング試験、第40回大気環境学会年会総会シンポジウム (1999)

西原: 内分泌攪乱化学物質—スクリーニング試験—、第72回産業衛生学会シンポジウム (1999)

中室、他: 環境水中エストロゲン活性物質の酵母 Two-Hybrid 法による評価、日本薬学会・環境トキシコロジーシンポジウム (1999)

黒木、他: 酵母 Two-Hybrid 法による PCB 及び PCDF-OH タイ代謝物のエストロゲン様物質としての評価、日本薬学会・環境トキシコロジーシンポジウム (1999)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. 実用新案登録  
なし

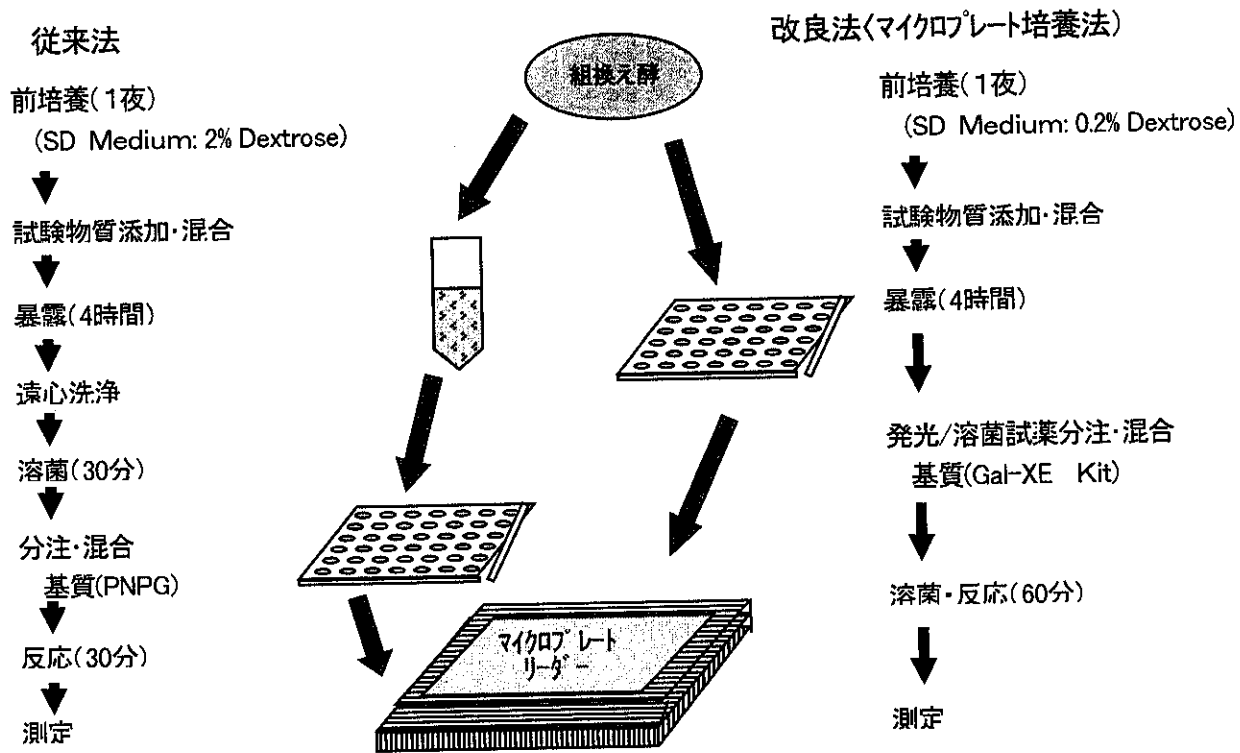


図1 酵母 Two-Hybrid 法の改良法マイクロプレート培養法

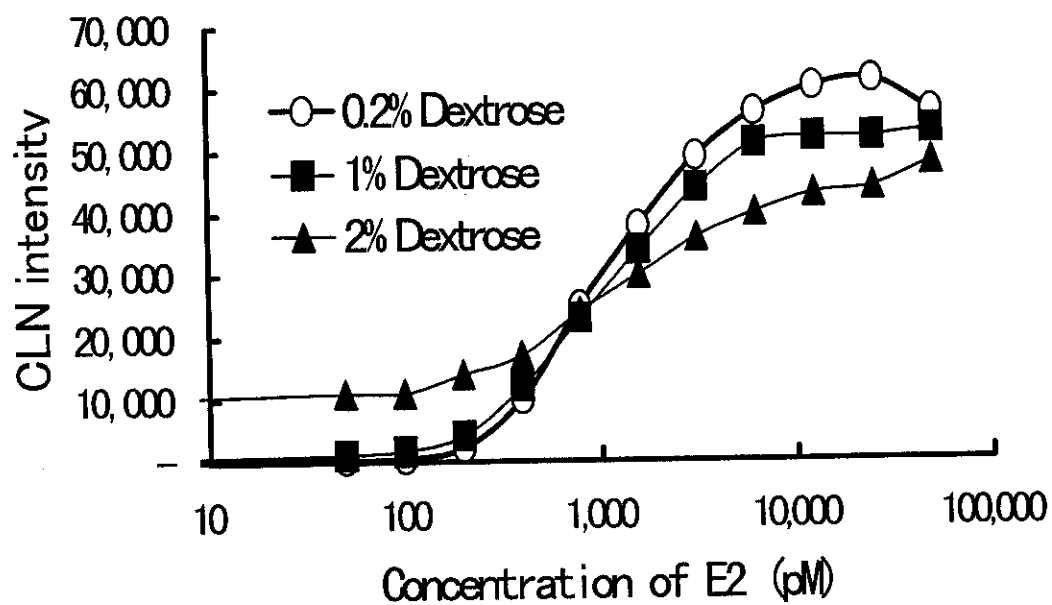


図2 化学発光量に及ぼす SD Medium 中の Dextrose の影響

表 1 S9mix 前処理による代謝活性化物質の検出

Compound	PC10* (M)	
	-S9mix	+S9mix
17-β-Estradiol	5 × E-10	9 × E-10
Genistein	5 × E-07	5 × E-07
Methoxychlor	>3 × E-03	5 × E-06
4-t-Nonylphenol	7 × E-06	2 × E-06
Bisphenol A	2 × E-05	9 × E-06
Di-n-butyl phthalate	>4 × E-03	>3 × E-03
Di-2-ethylhexyl phthalate	>3 × E-03	>3 × E-03
n-Butylbenzyl phthalate	>3 × E-03	3 × E-03
Diocetyl phthalate	>3 × E-03	>3 × E-03

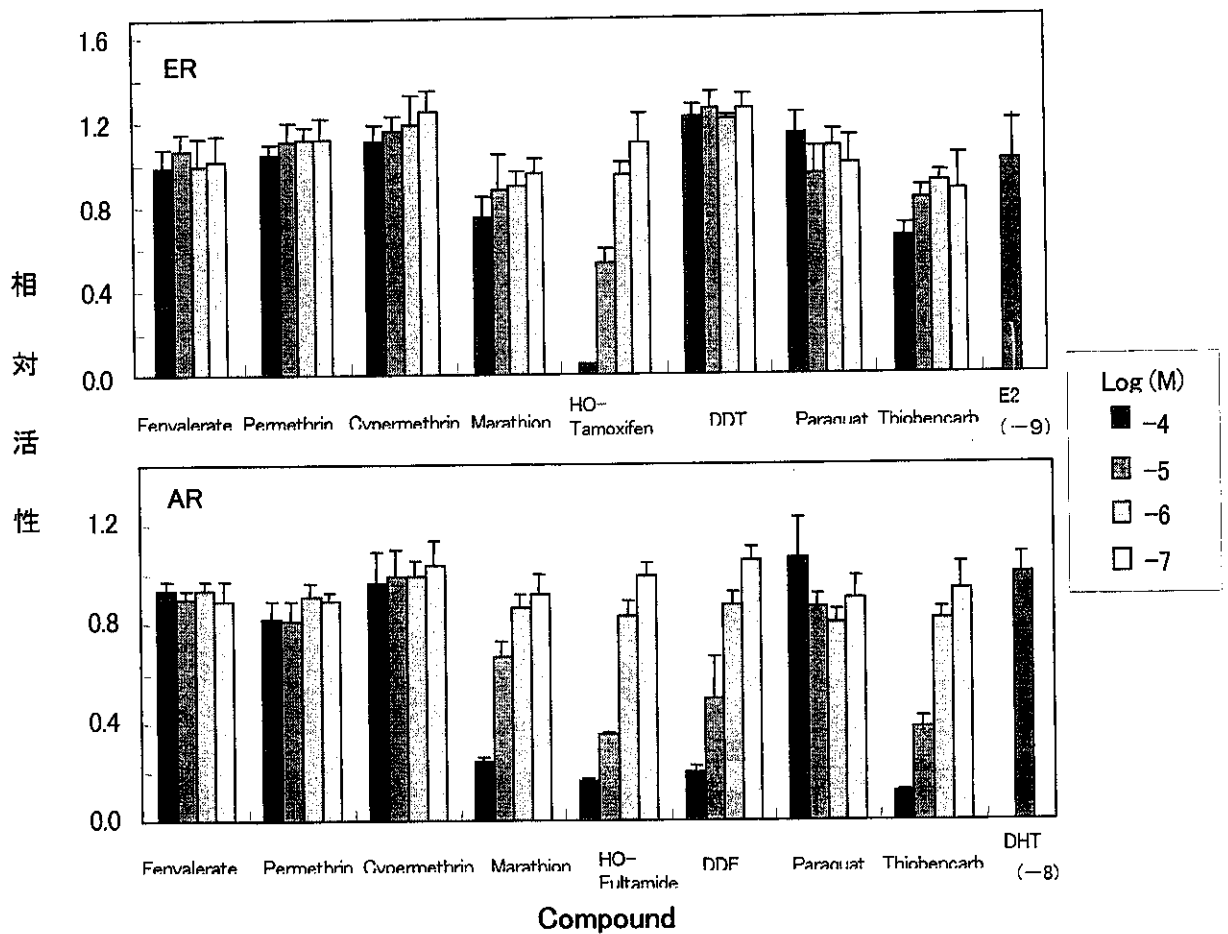


図 3 E2 あるいは DHT 共存によるアンタゴニスト活性物質の検出

内分泌かく乱化学物質のエストロゲン代謝に及ぼす影響と

そのスクリーニング法の開発

分担研究者： 鈴木恵真子、中込まどか（株）イナリサーチ

研究要旨

エストロゲン発がん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(CE)、CEメルカプツール酸および15 $\alpha$ -ヒドロキシエストロゲン(15 $\alpha$ -OHEs)の尿中高感度測定法を免疫化学的手法を用いて確立するとともに、エストロゲン代謝の種差、性差をin vivoおよびin vitroで検討し、エストロゲン発がんに的を絞った内分泌かく乱化学物質のエストロゲン代謝に及ぼす影響のスクリーニングに応用する。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の暴露は複雑でかつ複数の化学物質が関与するため個々の物質を測定して暴露量を算出するのは困難である。本研究は内分泌かく乱化学物質のエストロゲンへの影響をエストロゲンによる発がんに的を絞り、尿中リスクマーカーの検出で全体を捉えようとするものである。今年度は、

1. カテコールエストロゲン(CE)およびCEメルカプツール酸(CE SR)の尿中高感度測定法を用いて、in vivoにおけるエストロゲン代謝を明らかにし、加えて種差、性差を検討する。
  2. 15 $\alpha$ -ヒドロキシエストロゲン(15 $\alpha$ -OHEs)の免疫化学的手法を用いた尿中高感度測定法を確立する。
  3. エストロゲン代謝の性差をラットのin vitro代謝実験で確認する。
- 以上の項目について実施した。

B. 研究方法

1. ラットおよびハムスター尿中CEとCE SRの測定

1) 動物実験

動物は雌のSprague-Dawleyラット(7週齢、IGS)および雄のSyrianハムスター(7週齢)を使用した。17 $\beta$ -エストラジオール(E<sub>2</sub>)、2-ヒドロキシエストロン(2-OHE<sub>1</sub>)または4-OHE<sub>1</sub>(2 or 5 mg/2 mL/kg)はコーン油に懸濁し腹腔内投与した。代謝酵素誘導群はフェノバルビタールにて前処理した。採尿はアスコルビン酸存在下3日間行った。

2) HPLC条件

カラムはInertsil ODS-3 (15 x 0.45

cm i.d.)を、移動相に0.5% NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH3.5)/アセトニトリル/メタノール(70:26:8, v/v or 70:27:5, v/v)を流速1.0 mL/minで用いた。検出器はCoulochem 5100Aを使用し設定電位+150 mVで測定した。

3) 尿中CE、CE SRの定量

尿試料の一定量はフィルターろ過後、50 mMリン酸緩衝液(pH7.3)で希釈し、固定化抗体カラムに通導した。50 mMリン酸緩衝液(0.001%アスコルビン酸含有)で洗浄後、95%メタノール(0.001%アスコルビン酸含有)で溶出した。溶出液を減圧下37℃にて乾固し、2)の条件で測定した。検量線は50 mMリン酸緩衝液(0.25%アスコルビン酸含有)にCE(2-OHE<sub>2</sub>、4-OHE<sub>2</sub>、2-OHE<sub>1</sub>、4-OHE<sub>1</sub>)およびCE SR(2-OHE<sub>1</sub> 1SR、2-OHE<sub>1</sub> 4SR、4-OHE<sub>1</sub> 2SR)を各々1~15 ng添加後、固定化抗体カラムに通導し同様に処理して作成した。

2. 15 $\alpha$ -OHEsの尿中高感度測定法の確立

1) 固定化抗体カラムの調製

15 $\alpha$ -OHEs(エストロール:E<sub>4</sub>、15 $\alpha$ -OHE<sub>2</sub>、15 $\alpha$ -OHE<sub>1</sub>)に対する各抗血清をプロテインAカラムで精製、凍結乾燥した。得られたIgGは50 mMリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解してアフィゲル10と反応した。3種のゲルのアフィニティとキャパシティを確認した後、最適な混合比とゲル量のカラムを調製した。

2) HPLC条件

移動相は0.5% NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH3.5)/アセトニトリル(80:20, v/v)を用いた。検出器の設定電位+650 mVで測定した。その他は1. 2)と同条

件で行った。

3) バリデーション  
バリデーション用の標準試料は、50 mM リン酸緩衝液 (pH7.3) に E<sub>4</sub>、15 $\alpha$ -OHE<sub>2</sub>、15 $\alpha$ -OHE<sub>1</sub> を各々 1.25 ~ 50 ng 添加し調製した。これを 1) で作製した固定化抗体カラム (ゲル: 0.2 mL) に通導し精製水で洗浄後、95% メタノールで溶出した。溶出液を減圧下 37°C で乾固、2) の条件で測定し、回収率と変動係数から測定値の真度と精度を求めた。

### 3. ラット肝臓の S9 を用いた in vitro 代謝実験

#### 1) ラット肝 S9 の調製

雌雄の Sprague-Dawley ラット (7 週齢、IGS) の肝臓を用い、常法に従って S9 を調製した。

#### 2) HPLC 条件

カラムは Inertsil ODS-3 (15 x 0.45 cm i.d.) を、移動相に 0.5% NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH3.5)/アセトニトリル/メタノール (70:25:5, v/v と 60:40:0, v/v) のグラジエントシステムを流速 1.0 mL/min で用いた。UV 検出器を用い、波長 285 nm で測定した。

#### 3) in vitro 代謝実験

E<sub>2</sub> (100~300  $\mu$ M) に雌あるいは雄ラットの S9mix を加えて全量 1 mL とした。これを 37°C で 15 または 30 min インキュベートした。氷冷下反応を停止後 20% ZnSO<sub>4</sub> (0.1 mL)、飽和 Ba(OH)<sub>2</sub> (0.1 mL) およびメタノール (1.3 mL) を順次加えながらよく攪拌し、遠心 (3000 rpm, 15 min) 後の上清を 2) の条件で測定した。同様に処理し作成した検量線を用いて、時間あたりに生成した代謝物の量を算出した。

(倫理面への配慮)

実験に使用する動物数は最小限にし、ストレスや疼痛を伴う操作はできるだけ避けて実験を実施した。

## C. 研究結果

### 1. ラットおよびハムスター尿中 CE と CE SR の測定

本測定法の真度および精度は Table 1 に示した通り良好であった。Fig. 1-A) には標準試料のクロマトグラムを示した。まず、E<sub>2</sub>、5 mg/kg を投与した雌ラット尿中の CE と CE SR の測定結果を Table 2 に、フェノバルビタール処理し、代謝酵素を誘導後 E<sub>2</sub> を投与し比較した結果を Table 3 に、また E<sub>2</sub> 投与後の雌ラット尿の典型的なクロマトグラムを Fig. 1-B) に示した。その

結果、2 種の CE SR が検出され、2-OHE<sub>1</sub> 1SR の方が 2-OHE<sub>1</sub> 4SR よりレベルは数倍高かった。しかし 4-OHE<sub>1</sub> 2SR など 4 位水酸化体は同条件では検出されなかった。また、フェノバルビタール処理による各物質の有意なレベルの変動は確認されなかった。次に、2-OHE<sub>1</sub> または 4-OHE<sub>1</sub> を 2 mg/kg、雌ラットに投与した。尿中の CE と CE SR の測定結果をフェノバルビタール酵素誘導を行った場合と比較して Table 4 または 5 に、投与後得られた雌ラット尿の典型的なクロマトグラムを Fig. 2 に示した。2-OHE<sub>1</sub> 投与についてはフェノバルビタール処理により 2-OHE<sub>1</sub> 4SR の有意な上昇が見られた。また、同量を投与した 2-OHE<sub>1</sub> と 4-OHE<sub>1</sub> の尿中レベルの比較から両者の消失あるいは変換レベルに大きな差があることが明らかとなった。一方、雄ハムスター (n=2) に E<sub>2</sub> を 5 mg/kg 投与した時の 2-OHE<sub>1</sub> 1SR、2-OHE<sub>1</sub> 4SR、4-OHE<sub>1</sub> 2SR、2-OHE<sub>1</sub> および 4-OHE<sub>1</sub> の尿中レベルは、362、31.9、179、528、および 92.7 ng/kg であり、4-OHE<sub>1</sub> を 5 mg/kg 投与した時の 4-OHE<sub>1</sub> 2SR、4-OHE<sub>2</sub> および 4-OHE<sub>1</sub> の尿中レベルは、323、39.4 および 2189 ng/kg であった。ハムスターではラットと異なり 4 位水酸化体が確認された。

### 2. 15 $\alpha$ -OHEs の尿中高感度測定法の確立

調製したカラムを用いた測定法のバリデーション結果を Table 6 に示した。その結果から、今後の測定に用いるために十分な真度と精度が得られた。

### 3. ラット肝臓の S9 を用いた in vitro 代謝実験

雌雄ラット肝臓の S9 を用いた E<sub>2</sub> の各代謝物を測定した結果を Fig. 3 に示した。主生成物は雌雄ともに 2-OHE<sub>2</sub> であるが、雌の方が活性は高く、また、反応時間は 15 min の方が雌雄ともに高いことから、2-OHE<sub>2</sub> は反応時間の経過に伴いさらに酸化されていくことが明らかとなった。4-OHE<sub>1</sub> は雌ではほとんど検出されなかったが、雄では検出された。しかし、代謝物パターンや酵素活性に大きな雌雄差は確認できなかった。

## D. 考察

今回ラットの in vivo 試験に雌ラットを用いたが、予備試験の結果から雄は尿中の CE 排泄が少なく、特に現状では CE SR の変動を定量することは難しいと判

断したからである。雌ラットの結果からフェノバルビタールの誘導では E<sub>2</sub> の代謝物である CE および CE SR に変動は見られなかったため、今後他の誘導物質による代謝への影響を確認し、内分泌かく乱化学物質のスクリーニングへの応用の可能性を検討する必要がある。

ハムスターはエストロゲン発がんのモデル動物として古くから知られているが、今回特に発がんに関与すると考えられる、4-OHE<sub>1</sub> 2SR がハムスター尿中から検出されたことは大変興味深い。さらに今回ラットの尿中から 4-OHE<sub>1</sub> は検出されなかったが、2-OHE<sub>1</sub> と 4-OHE<sub>1</sub> を投与した結果から、4-OHE<sub>1</sub> の方が 2-OHE<sub>1</sub> より生体内ではかなり速く代謝、変換されて行くことが推察された。従って、E<sub>2</sub> をラットに投与した場合、生体内で 4 位水酸化体が生成されないのではなく、生成後さらに代謝されていく速度が速いため捕らえることが出来ない可能性が示唆された。

尿中の CE SR レベルは当初予想したよりも低レベルであった。濃度が低くなると体液中の夾雑物の妨害も大きくなる。雄ラットを含めたより低濃度の生体試料測定への応用のためには、さらに特異性やアフィニティの高いカラムの開発を行わなければならない。そこで、もう一つのリスクマーカーとして、15 $\alpha$ -OHEs の尿中測定法の開発を行った。固定化抗体カラムは、ゲルと反応させる IgG 量やカラムに使用するゲルの量を細かく検討すると、非常に特異性の高いクリーンアップ用カラムを作製することが出来る。今回のバリデーションの結果からほぼ尿試料測定に利用できると考えている。今後、15 $\alpha$ -OHEs のリスクマーカーとしての可能性と、ホルモンはそのバランスについても重要であると考えられるので、CE と 15 $\alpha$ -OHEs とのバランスの変化を調べるためにこのカラムは有用である。

予備的な in vivo 試験の結果からラットの E<sub>2</sub> 代謝には雌雄差があると判断された。そこで今まで代謝レベルが殆ど調べられていない 15 $\alpha$ -OHEs に注目し、雌雄ラット肝臓の S9 を用いた in vitro 代謝を検討したが、予想に反し肝臓においてはあまり大きな代謝パターンの雌雄

差は見られなかった。

#### E. 結論

ラットおよびハムスターの尿中から CE および CE SR を安定して検出できる測定法が確立し、これらのエストロゲン発がんのリスクマーカーとしての可能性を確認することが出来た。今後、15 $\alpha$ -OHEs も併せ、そのレベルの変動が内分泌かく乱化学物質の影響を反映できるか否か検討を加える。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Suzuki, E., Nakagomi, M., Hashimoto, M., Agui, M., Iida, S., Konno, K., Hara, Y., Kurihara, H., Matsuki, Y., Imai, K., Ono, H.: Preparation of Specific Antisera to 15 $\alpha$ -Hydroxyestrogens. *Steroids*, **64** (8): 551-557 (1999).

Nakagomi, M., Iida, S., Hara, Y., Matsuki, Y., Nambara, T., Suzuki, E.: Preparation of Specific Antiserum to 15 $\alpha$ -Hydroxyestrogen 15-N-acetylglucosaminides. *Steroids*, **64** (7): 491-496 (1999).

Nakagomi, M., Yamada, K., Matsuki, Y., Kurihara, H., Suzuki, E.: Enzyme Immunoassay for the Measurement of 17 $\alpha$ -Estradiol 17-N-acetylglucosaminide in Rabbit Urine. *Steroids*, **64** (5): 301-307 (1999).

##### 2. 学会発表

中込まどか, 鈴木恵真子: カテコールエストロゲンとその抱合体の分析法の開発.

日本薬学会 119 年会, Vol 4, p. 92 (1999).

鈴木恵真子, 中込まどか, 橋本光宣, 安居院 学, 飯田さやか, 原 康夫, 今野和則, 栗原博之, 松木容彦, 今井 清, 小野 宏: 15 $\alpha$ -ヒドロキシエストロゲンの特異抗血清の調製.

日本薬学会 119 年会, Vol 4, p. 93 (1999).

Table 1 Accuracy and precision of the clean-up procedure for CE and CE SR

	Spiked (ng)	Assayed Mean $\pm$ SD (ng)	CV (%)	Recovery (%)
2-OHE <sub>1</sub> 1SR	1.00	0.944 $\pm$ 0.087	9.17	94.4
	2.00	2.01 $\pm$ 0.13	6.43	101
	5.00	5.28 $\pm$ 0.16	2.96	106
	10.0	10.8 $\pm$ 0.65	6.02	108
	15.0	15.1 $\pm$ 0.87	5.75	101
2-OHE <sub>1</sub> 4SR	1.00	1.16 $\pm$ 0.04	3.73	117
	2.00	2.10 $\pm$ 0.08	3.88	105
	5.00	5.01 $\pm$ 0.21	4.12	100
	10.0	9.80 $\pm$ 0.33	3.40	98.0
	15.0	13.1 $\pm$ 1.30	9.93	87.3
2-OHE <sub>2</sub>	1.00	0.992 $\pm$ 0.071	7.12	99.2
	2.00	1.95 $\pm$ 0.04	2.04	97.5
	5.00	4.87 $\pm$ 0.29	5.88	97.5
	10.0	10.3 $\pm$ 0.26	2.55	103
	15.0	14.5 $\pm$ 0.83	5.72	96.5
2-OHE <sub>1</sub>	1.00	1.07 $\pm$ 0.07	6.26	107
	2.00	2.04 $\pm$ 0.10	4.70	102
	5.00	5.17 $\pm$ 0.24	4.62	103
	10.0	10.2 $\pm$ 0.27	2.62	102
	15.0	14.7 $\pm$ 0.86	5.85	97.9
4-OHE <sub>1</sub>	1.00	0.890 $\pm$ 0.076	8.54	89.0
	2.00	1.98 $\pm$ 0.08	4.07	99.1
	5.00	5.21 $\pm$ 0.20	3.92	104
	10.0	10.5 $\pm$ 0.25	2.41	105
	15.0	15.2 $\pm$ 0.97	6.36	101
4-OHE <sub>1</sub> 2SR	2.00	1.68 $\pm$ 0.08	4.80	84.1
	5.00	5.07 $\pm$ 0.24	4.75	101
	10.0	10.9 $\pm$ 0.46	4.26	109
	15.0	15.3 $\pm$ 1.07	7.02	102
4-OHE <sub>2</sub>	2.00	1.81 $\pm$ 0.03	1.91	90.7
	5.00	4.88 $\pm$ 0.27	5.49	97.7
	10.0	10.5 $\pm$ 0.27	2.61	105
	15.0	14.4 $\pm$ 1.16	8.01	96.1

N=5



Table 2 Urinary excretion of CE and CE SR in female rats treated E<sub>2</sub> (5 mg/kg)

Estrogen metabolite	Urinary excretion (µg/kg)	
	Mean ± SD	
2-OHE <sub>1</sub> 1SR	2.75 ± 1.14	
2-OHE <sub>1</sub> 4SR	0.60 ± 0.22	
2-OHE <sub>2</sub>	1.15 ± 0.85	
2-OHE <sub>1</sub>	14.24 ± 4.41	

N=6

Table 3 Urinary excretion of CE and CE SR in female rats treated E<sub>2</sub> (5 mg/kg) with or without treatment by Phenobarbital

Estrogen metabolite	Urinary excretion (µg/kg)	
	Non-induced	Induced (Phenobarbital)
	Mean ± SD	Mean ± SD
2-OHE <sub>1</sub> 1SR	3.19 ± 0.90	2.64 ± 1.66
2-OHE <sub>1</sub> 4SR	0.55 ± 0.24	0.42 ± 0.39
2-OHE <sub>2</sub>	0.72 ± 0.42	1.10 ± 0.29
2-OHE <sub>1</sub>	16.42 ± 11.54	21.17 ± 5.84

N=4

Table 4 Urinary excretion of CE and CE SR in female rats treated 2-OHE<sub>1</sub> (2 mg/kg) with or without treatment by Phenobarbital

Estrogen metabolite	Urinary excretion (µg/kg)	
	Non-induced	Induced (Phenobarbital)
	Mean ± SD	Mean ± SD
2-OHE <sub>1</sub> 1SR	2.59 ± 0.75	2.59 ± 0.65
2-OHE <sub>1</sub> 4SR	0.32 ± 0.07	0.61* ± 0.24
2-OHE <sub>2</sub>	1.69 ± 0.33	1.24 ± 0.62
2-OHE <sub>1</sub>	22.86 ± 1.57	15.82** ± 3.79

N=5

\*P<0.05; \*\*P<0.01

Table 5 Urinary excretion of CE and CE SR in female rats treated 4-OHE<sub>1</sub> (2 mg/kg) with or without treatment by Phenobarbital

Estrogen metabolite	Urinary excretion (µg/kg)	
	Non-induced	Induced (Phenobarbital)
	Mean ± SD	Mean ± SD
4-OHE <sub>1</sub> 2SR	0.35 ± 0.06	0.33 ± 0.08
4-OHE <sub>2</sub>	0.94 ± 0.46	0.49 ± 0.18
4-OHE <sub>1</sub>	2.21 ± 0.52	1.82 ± 0.85

N=5

Table 6 Accuracy and precision of the clean-up procedure for 15 $\alpha$ -OHEs

	Spiked (ng)	Assayed Mean $\pm$ SD (ng)	CV (%)	Recovery (%)
E <sub>4</sub>	1.25	1.45 $\pm$ 0.0692	4.78	116
	2.50	2.65 $\pm$ 0.121	4.58	106
	5.00	5.15 $\pm$ 0.146	2.84	103
	12.5	13.0 $\pm$ 0.486	3.75	104
	25.0	26.0 $\pm$ 0.729	2.81	104
	50.0	50.7 $\pm$ 1.80	3.56	101
15 $\alpha$ -OHE <sub>2</sub>	1.25	1.03 $\pm$ 0.220	21.4	82.2
	2.50	2.33 $\pm$ 0.272	11.6	93.4
	5.00	5.00 $\pm$ 0.233	4.67	99.9
	12.5	13.1 $\pm$ 0.593	4.51	105
	25.0	26.9 $\pm$ 1.09	4.06	108
	50.0	52.1 $\pm$ 2.25	4.31	104
15 $\alpha$ -OHE <sub>1</sub>	1.25	1.32 $\pm$ 0.252	19.1	106
	2.50	2.59 $\pm$ 0.290	11.2	104
	5.00	5.06 $\pm$ 0.217	4.29	101
	12.5	12.8 $\pm$ 0.532	4.15	102
	25.0	26.3 $\pm$ 0.956	3.63	105

N=5

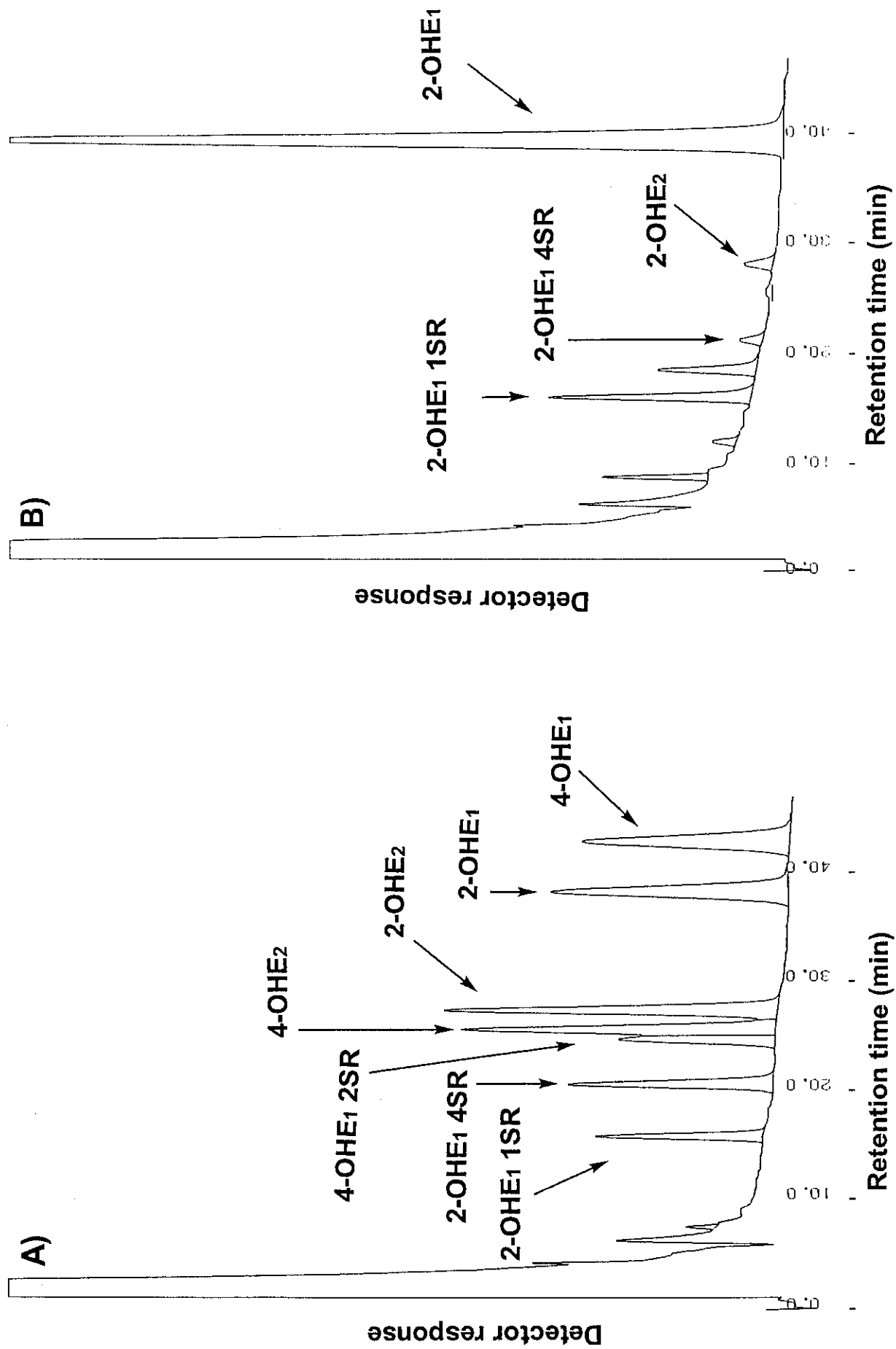


Fig. 1 Typical HPLC chromatograms of CE and CE SR obtained from A) standard sample and B) female rat-urine treated with E2 (5 mg/kg)

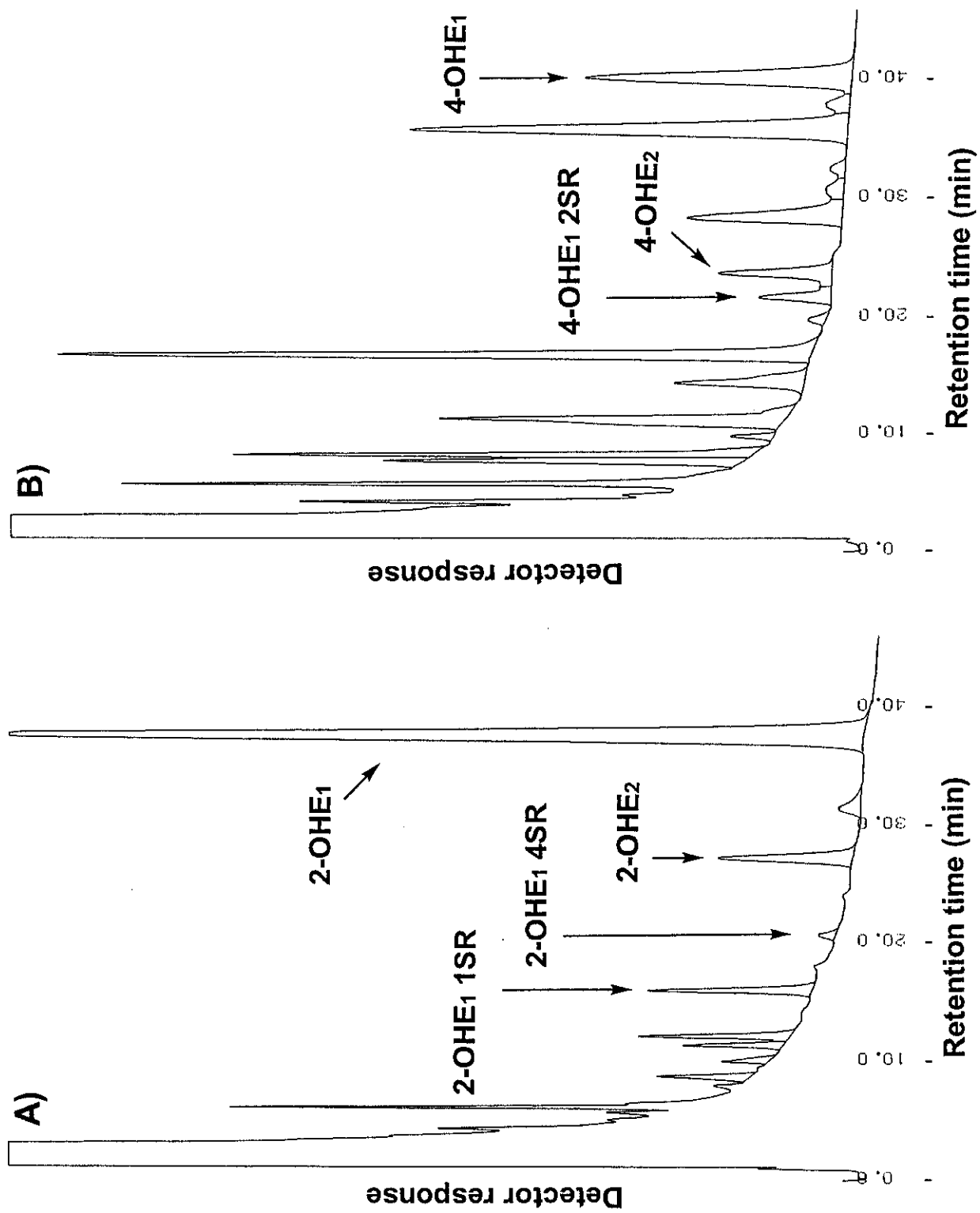


Fig. 2 Typical HPLC chromatograms of female rat-urine treated with A) 2-OHE1 (2 mg/kg) or B) 4-OHE1 (2 mg/kg)

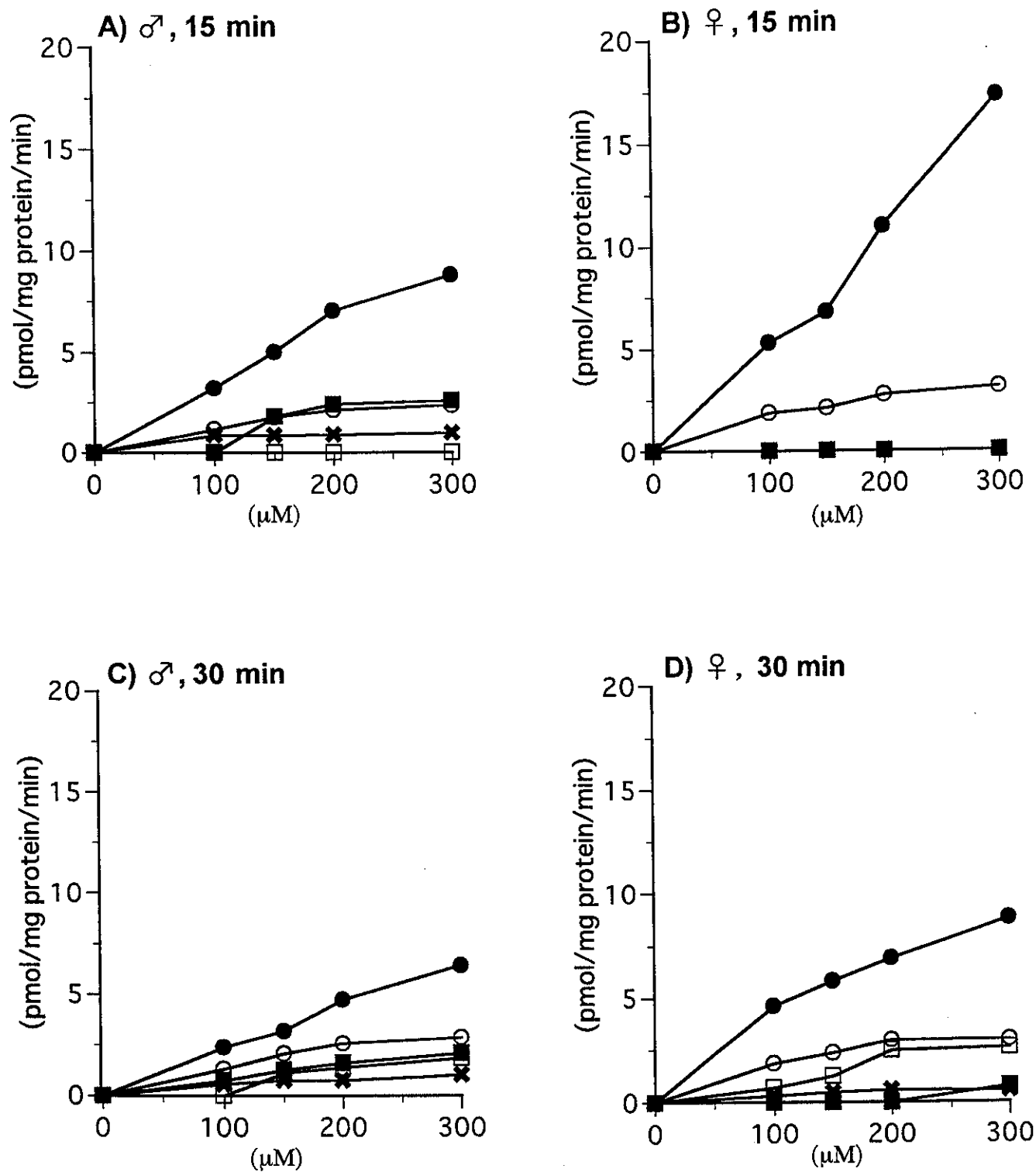


Fig. 3 Metabolites formed after incubation (15 or 30 min) of E<sub>2</sub>(100-300 μM) with male (A, C) and female (B, D) rat-liver S9

○ E<sub>4</sub>      ✱ 15α-OHE<sub>2</sub>      ● 2-OHE<sub>2</sub>      ◻ 2-OHE<sub>1</sub>      ■ 4-OHE<sub>1</sub>

内分泌かく乱化学物質の胎生期および新生児期曝露による  
視床下部神経核の構造変化と生殖異常に関する研究

分担研究者 長尾哲二<sup>1</sup>, 吉村慎介<sup>2</sup>, 斉藤義明<sup>2</sup>  
食品薬品安全センター秦野研究所<sup>1</sup> 生殖生物学研究室,<sup>2</sup> 病理学研究室

研究要旨

内分泌かく乱化学物質の胎生期あるいは新生児期曝露による中枢神経系障害に起因した生殖機能障害のスクリーニングのための一つの指標として、神経細胞集団である視床下部の神経核の構造変化を取りあげた。ラットの脳の性分化臨界期である胎生末期あるいは新生児期初期に内分泌かく乱化学物質を曝露し、視床下部の細胞死(アポトーシス)と神経核、とくに性的二型核および前腹側脳室周囲核の構造変化を観察し、成熟後の生殖機能障害との関連性を明らかにする。その結果、数種の合成エストロゲンでは、視床下部神経細胞群の過剰細胞死が性的二型核の構造に変化を及ぼすことが示唆された。また、新生児期の神経核の構造変化が性行動を含む成熟後の生殖機能障害に関連することが示唆された。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質による胎児あるいは新生児の視床下部神経細胞のアポトーシス過剰誘発および視床前野の性的二型核 SDN-POA ならびに前腹側脳室周囲核 AVPvN-POA の構造変化と、成熟後の性行動を含む生殖機能障害との関連性を明らかにし、ラットの脳の性分化臨界期である胎生末期から新生児期の視床下部神経細胞群のアポトーシス過剰誘発および SDN-POA あるいは AVPvN-POA の構造変化が、内分泌かく乱化学物質の生殖への影響のスクリーニングのための鋭敏な指標の一つになり得るかを結論する。

B. 研究方法

視床下部神経核の構造変化は、一部の合成エストロゲンの新生児期曝露により誘発された移動神経核ニューロンの過剰細胞死(アポトーシス)に起因するという証拠が最近示された。そこで本年度は、新生児期の曝露が後に生殖機能障害を惹起することが確認された数種の内分泌かく乱性を有する化学物質(平成10年度本研究班報告)を用いて、まず性的二型核 SDN-POA における細胞死誘発について検討した。

妊娠ラット(Sprague-Dawley系)を自然分娩させて得た雌雄新生児の生後4日(出生日=生後0日)に内分泌かく乱化学物質を皮下注射(sc, 2μL/g)あるいは強制経口投与(po, 5μL/g)した。

用いた化学物質とその略号(製造元)ならびに投与経路を以下に示した。なお対照群にはコーン油を同様に投与した。

ビスフェノールA: BPA (東京化成) po  
ゲニステイン: GEN (Sigma) , sc

ブチルベンジルフタレート: BBP (東京化成) po  
ノニルフェノール: NP (東京化成) po  
エストラジオール: E<sub>2</sub> (Sigma) sc  
エストリオール: E<sub>3</sub> (Sigma) sc  
エチニルエストラジオール: EE (Sigma) po  
エストラジオールベンゾエート: EB (Sigma) sc  
ジエチルstilbestrol: DES (Sigma) sc  
タモキシフェン: TAM (Sigma) sc

投与24時間後(生後5日)に燐酸緩衝ホルマリンにて灌流固定して脳を摘出し、SDN-POA部位を含む視床下部の細胞死をTUNEL法により観察した。

次いで生後1~5日に上記化学物質を連日投与し、生後21日(離乳児)に燐酸緩衝ホルマリンにて灌流固定して脳を摘出した。視床下部を含む脳組織を凍結して、クリオスタットにて連続切片(約20μm)とし、0.3%クレシルバイオレットで染色した。SDN-POA部位の組織像を3CCDデジタルカメラ(オリンパス HC-300)にてコンピュータに取り込み、画像処理(Photoshop 5.0)によりSDN-POAを識別した後、画像解析ソフト(Mac Scope, Mitani Corp., Japan)を用いてSDN-POAの体積を求めた。

(倫理面への配慮)

使用した動物の屠殺にあたっては、秦野研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した。

C. 研究結果

1. 細胞死

生後5日の対照群雄ラットの視床下部神経核 SDN-POA 部位における細胞死誘発頻度は  $1.16 \pm 0.24\%$  (28/2130 細胞) であった。内分泌かく乱化学物質投与24時間後の SDN-POA 部位における細胞死誘発頻度を Fig. 1 および 2 に示した。DES 投与では 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群の頻度 (2.73%, 28/1062 細胞) が対照群と比較して有意に増加したが、用量に依存した変化ではなかった。NP 投与では 250  $\text{mg}/\text{kg}$  以上の群において誘発頻度は有意に増加し (2.53~5.89%), さらに NP の用量に依存した変化であった。

その他の合成エストロゲンおよび内分泌かく乱化学物質については、 $E_3$  2  $\text{mg}/\text{kg}$  群 (4.0%, 63/1560 細胞) および TAM 40  $\text{mg}/\text{kg}$  群 (2.4%, 24/1017 細胞) において細胞死が有意に増加した。

## 2. 神経核の構造変化

生後4日に TAM あるいは DES を曝露した雄出生児の生後21日の SDN-POA 体積を Fig. 3 に示した。TAM 群では用量に依存して体積は減少したが、DES 群では対照群との間に差はみられなかった。NP 125  $\text{mg}/\text{kg}$  群においては減少傾向がみられた。その他の化学物質による SDN-POA の変化の有無については現在観察中である。

## D. 考察

Gorski ら (1978) はラットの内側視床前野 (medial preoptic area) に雌雄差のある神経核を見出した。これは性的二型核 (sexually dimorphic nucleus of the preoptic area: SDN-POA) と呼ばれる神経核で、雄のこの神経核の体積は雌より大きく、ニューロン数も雌に比べて多い。SDN-POA の機能は十分に解明されていないが、それは雄ラットの性行動を調節するという報告がある (De Jonge *et al.*, 1989)。この神経核の大きさは周生期の精巣から分泌されるアンドロゲンの有無によって決まり、新生児期の雌ラットにアンドロゲンを投与すると神経核は雄とほぼ同じ大きさになる。最近、合成性ホルモンがアポトーシスによるニューロン死を引き起こし、その結果前述したニューロン群の大きさの異なる SDN-POA が生ずる可能性のあることがわかった (Arai *et al.*, 1996; Nagao *et al.*, 1999)。

本研究において、TAM および NP 曝露された雄出生児の SDN-POA 部位に過剰細胞死が起こり、SDN-POA の体積も減少することが明らかになった。また、DES 曝露では用量に依存した SDN-POA 部位の細胞死の増加はみられず、体積の

明瞭な減少もなかった。これまで TAM および NP の新生児期曝露が、成熟後の雄の性行動 (mount, intromission, ejaculation など) にも影響を及ぼすことを報告した (平成10年度本研究班報告)。これらのことから、ラットの脳の性分化臨界期に生じた SDN-POA 部位の過剰細胞死が神経核の構造変化を惹起し、その結果として成熟後の性行動に変化を生じさせたと推察される。

一方、新生児期の雌ラットにエストロゲンまたはアンドロゲンを投与すると、終板器官の直後の第3脳室周囲層にある前腹側脳室周囲核 (anteroventral periventricular nucleus of the preoptic area: AVPvN-POA) ではアポトーシスが促進され、逆に SDN-POA ではそれが抑制されることが報告され (Davis *et al.*, 1996)、異なったニューロン群の間でエストロゲンに対する遺伝子発現の反応性が異なることが推察される。したがって、内分泌かく乱化学物質の胎生期あるいは新生児期曝露による雌ラットの SDN-POA および AVPvN-POA の構造変化を併せて観察することも、神経核の構造変化が内分泌かく乱化学物質の生殖への影響のスクリーニングのための指標の一つになり得るか結論するためには必須であると考えられる。

## E. 結論

新生児期に適用した合成性ホルモンあるいは内分泌かく乱化学物質がアポトーシスによるニューロン死を引き起こし、その結果ニューロン群の大きさの異なる性的二型核が生ずることが示唆された。

### 1. 研究発表

#### 1. 論文発表

Nagao T, Saito Y, Yoshimura S. Possible mechanism of congenital malformations induced by exposure of mouse preimplantation embryos to mitomycin C. *Teratology*, 2000 *in press*.

Nagao T. Male-mediated developmental toxicity: Enhanced susceptibility to induced teratogenesis in the offspring of male mice treated with ethylnitrosourea. *Cong. Anom.*, 2000 *in press*.

Nagao T, Saito Y, Usumi K, Nakagomi M, Kuwagata M, Yoshimura S, Ono H. Effect of early neonatal exposure to nonylphenol on reproduction in rats.



Human & Exp. Toxicol., 2000 *in press*.

Kuwagata M, Saito Y, Yoshimura S, Nagao T. Reproductive effects of early neonatal exposure to diethylstilbestrol or tamoxifen. Cong. Anom., 2000 *in press*.

Ohta R, Matsumoto A, Sato M, Shirota M, Nagao T, Tohei A, Taya K. Postnatal behavior in hatano high- and low-avoidance rats following prenatal exposure to low dose of methylazoxymethanol. Behav. Physiol., 2000 *in press*.

Nagao T, Saito Y, Usumi K, Kuwagata M, Imai K. Reproductive function in rats exposed neonatally to bisphenol A and estradiol benzoate. Reprod. Toxicol., 1999; 13: 303-311.

Nagao T, Yoshimura S, Saito Y, Imai K. Developmental toxicity of the topoisomerase inhibitor, etoposide, in rabbits after intravenous administration. Teratogen. Carcinogen. Mutagen., 1999; 19: 233-241.

Nagao T. Multigeneration effects of endocrine disrupting chemicals with paternal reference to teratogenesis by paternal exposure to synthetic hormones. Environ. Mutagen. Res., 1999; 21: 267-272.

## 2. 学会発表

長尾哲二： スチレンダイマー・トリマーのラット妊娠期および授乳期経口投与による次世代児への影響，第2回内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム，1999 神戸

長尾哲二，斉藤義明，吉村慎介，桑形麻樹子，中込まどか，今井清，小野宏： ノニルフェノールのラット新生児期曝露による生殖機能障害 日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会，1999 神戸

長尾哲二，吉村慎介，渋谷徹，小野宏： 内分泌攪乱化学物質の精巣毒性と継世代催奇形性 日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会，1999 神戸

長尾哲二： 内分泌攪乱化学物質の生殖、発生に及ぼす影響 環境変異原学会第10回公開シンポジウム 1999 東京

長尾哲二： 精巣毒性を介さない生殖毒性： 化学物質による視床下部神経核の変化と生殖障害 第6回神経行動毒性研究会学術集会講演会 1999 東京

渋谷徹，鹿嶋崇幸，須井哉，原巧，長尾哲二，斉藤義明，戸塚ゆかり，若林敬二： アミノフェニルノルハルマンのマウス始原生殖細胞に対する細胞毒性 第28回日本環境変異原学会 1999 岐阜

渋谷徹，鹿嶋崇幸，須井哉，原巧，斉藤義明，長尾哲二，今井清： 内分泌攪乱化学物質の始原生殖細胞に対する影響 日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会，1999 神戸

桑形麻樹子，斉藤義明，白見憲司，吉村慎介，長尾哲二： 内分泌攪乱化学物質の新生児期投与による生殖機能障害 第39回日本先天異常学会 1999 鹿児島

Shibuya T，Kashima T，Saito Y，Nagao T，Imai K，Ono H. Induction of mutation and apoptosis in mouse primordial germ cells by ENU. Society of Toxicology, 39<sup>th</sup> Annual Meeting, 2000 Philadelphia (U.S.A.)

G. 知的所有権の取得状況

なし

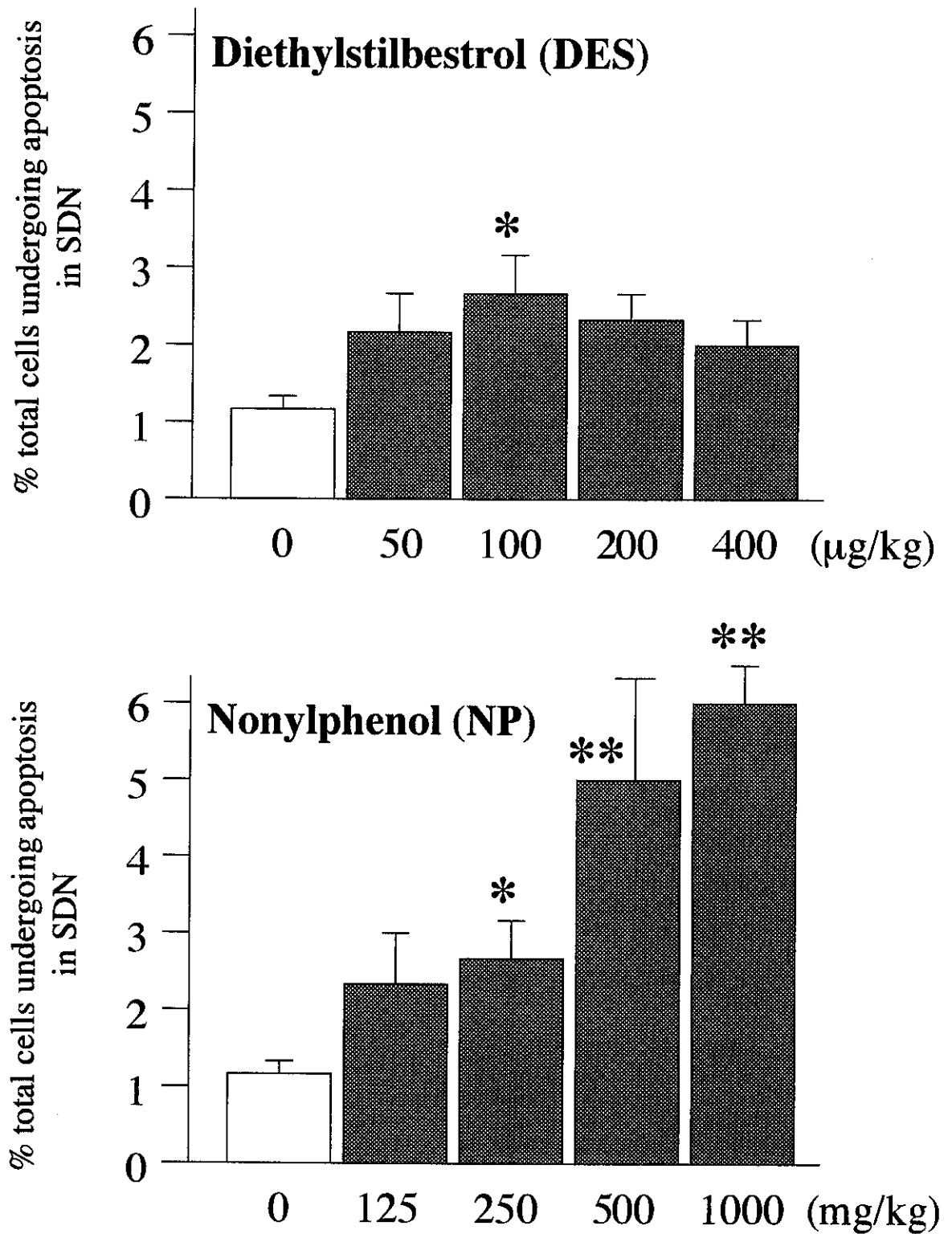


Fig. 1. The incidence of apoptosis in the developing hypothalamus of male rats after exposure to DES or NP on postnatal day 4. Error bars represent standard error of the mean. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

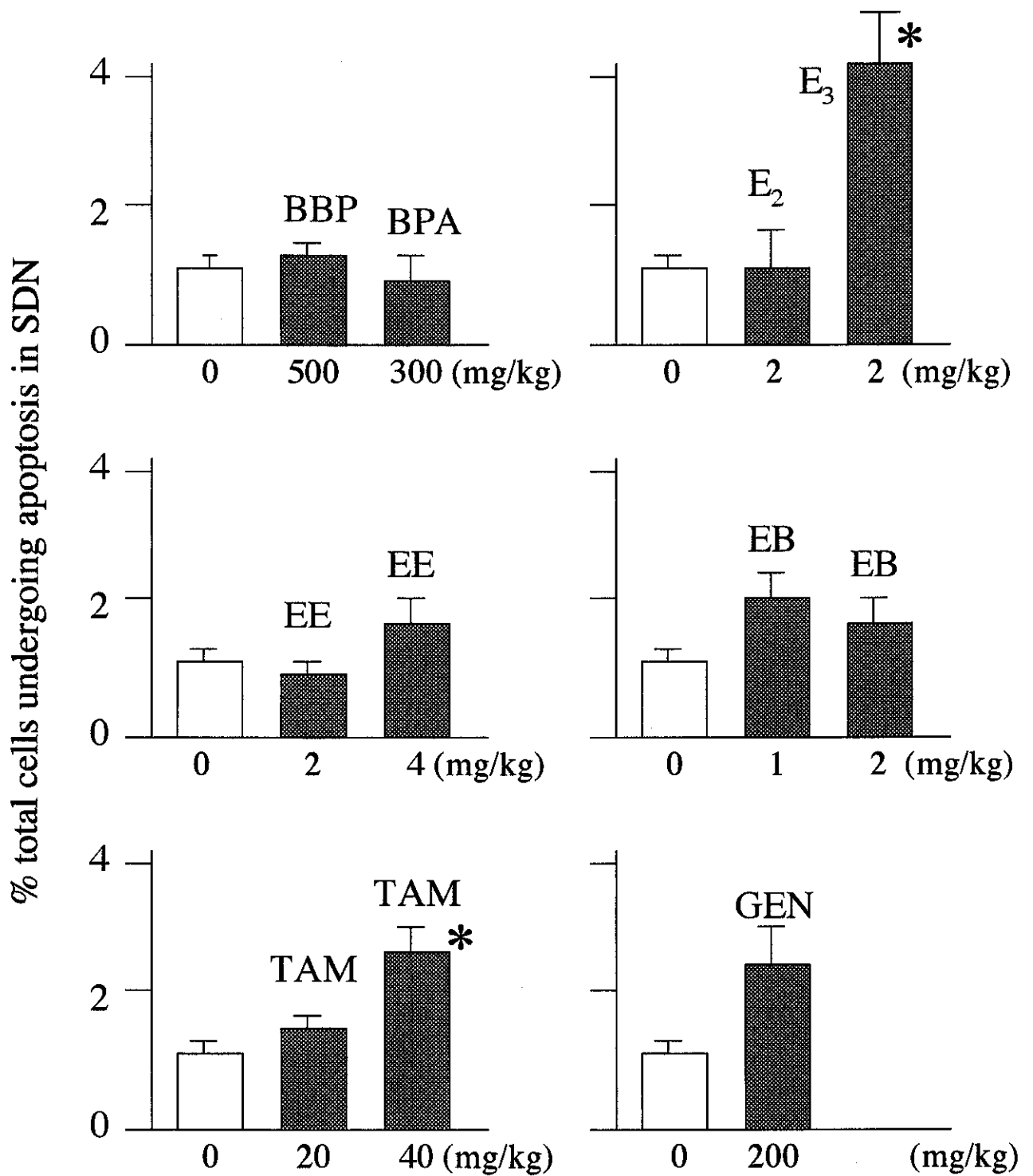


Fig. 2 The incidence of apoptosis in the developing hypothalamus of male rats after exposure to EDCs on postnatal day 4.

Error bars represent standard error of the mean.

Abbreviations: BBP, buthyl benzyl phthalate; BPA, bisphenol A;

E<sub>2</sub>, 17 $\beta$ -estradiol; E<sub>3</sub>, estriol; EE, ethinyl estradiol, EB, estradiol benzoate;

TAM, tamoxifen; GEN, genistein \*  $P < 0.05$

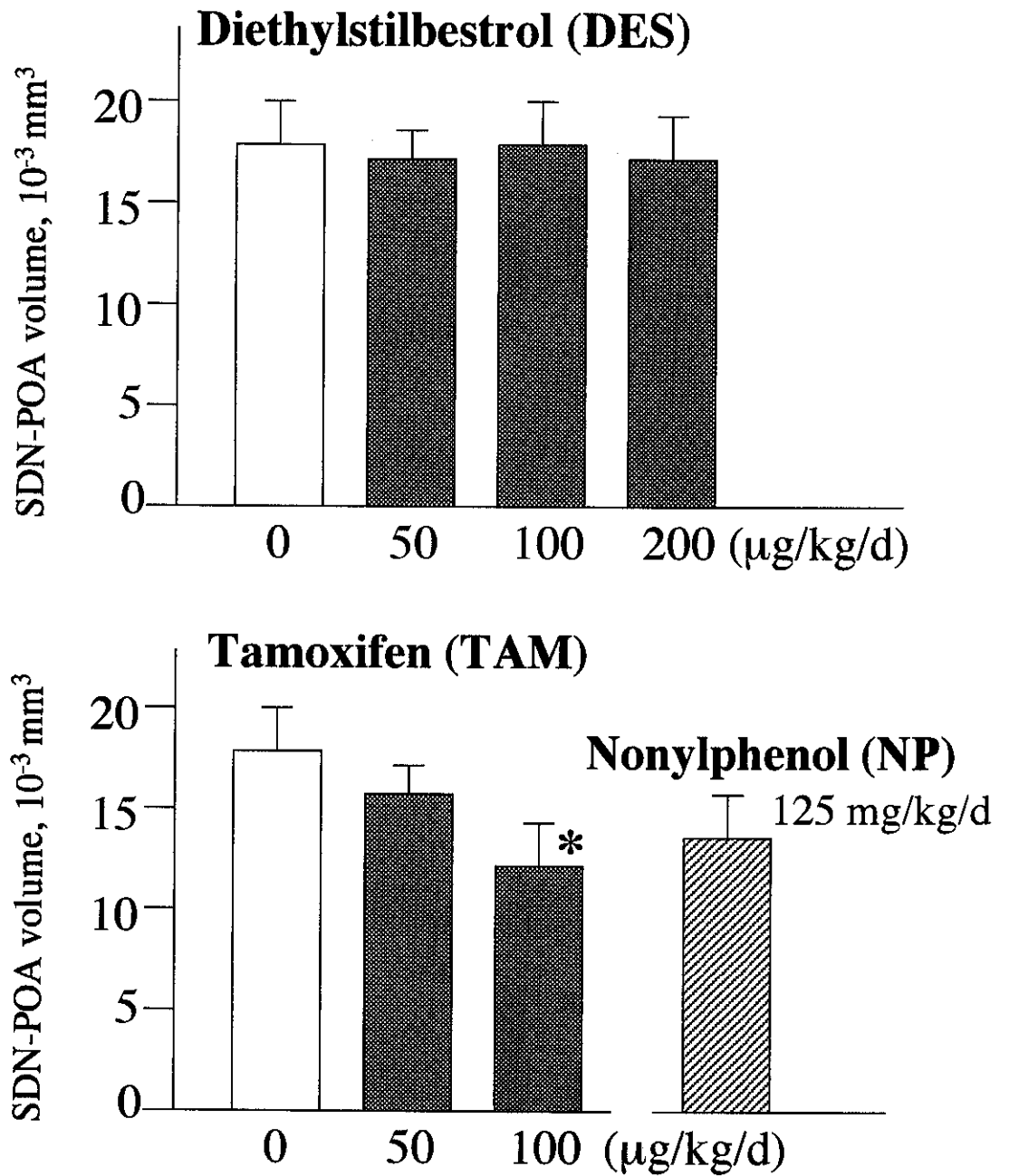


Fig. 3. Mean volumes of the SDN-POA in male weanlings exposed to DES, TAM or NP on postnatal days 1 to 5. Error bars represent standard error of the mean. \*  $P < 0.05$