

50ng/mL BPA 標準溶液に PFB 化試薬を加えて反応後、イソオクタン添加量について検討した。その結果、イソオクタン 1mL の添加が最もよい結果が得られた。またイソオクタンを全く添加しない場合に比べて 430 倍の差が認められた。これは、水相と有機相の界面での平衡状態において、BPA とテトラブチルアンモニウムとのイオンペア生成物がイソオクタン 1mL の添加で最も有機相へ移動しやすくなったものと考えられる。

PFB 化剤の調製における水の影響

PFB 化試薬として使用している 0.1M 硫酸水素テトラブチルアンモニウム及び 0.2M 水酸化ナトリウムの調製には水溶媒を用いている。今回、その水溶媒として、市販の HPLC 用水とイオン交換水及び予め C₁₈ カートリッジ処理した水 (SPE 処理水) をそれぞれ試薬調製に用いて PFB-BPA の分析法を検討した。その結果、SPE 処理水は市販の水及びイオン交換水と比較して約 18 倍の差がみられた。これは、市販の水、及びイオン交換水は処理過程で高分子フィルターを使用しているため、BPA がコンタミネーションしたものと考えられる。従って、以後使用する水は全て SPE 処理した水を用いることとした。

PFB-BPA の検量線及び検出限界

BPA 標準溶液を 0.01~100ng/mL に調製して、PFB 化試薬を加えて生成した PFB-BPA について検量線を作成した。その結果、0.01~100ng/mL に対して良好な相関性 ($r^2=0.998$) が認められ、またそのダイナミックレンジも広範囲であった。また本法の検出限界は 5pg/mL (絶対量として 10 fg) であった。1ng/mL 及び 0.1ng/mL PBA 標準溶液を用いて再現性を検討した結果、それぞれ 4.76、5.42% (n=5) と良好の結果が得られた。

血清の SPE 処理の検討

生体試料としては、ヒト血清を使用した。血清 1mL に 32%ギ酸溶液 1mL を加え、5 分間超音波処理を行った後、C₁₈ カートリッジ (500mg) 及びフロリジルの固相抽出法 (SPE) で試料のクリーンアップを検討し

た。C₁₈ 固相カートリッジは予め、エタノール 15mL 及び水 3mL を用いて処理し、フロリジルは 15%のエチルエーテル/石油エーテル 5mL、メタノール 10mL で処理した。その結果、C₁₈ カートリッジによる SPE 処理後、C₁₈ カラムでろ過したもので最もよい回収率が得られた。次に、SPE 処理での BPA のメタノールによる溶出効果について検討した結果、メタノール量の増加に伴い、BPA の溶出量も増加し 8mL 以上では変化がみられなかった。

添加回収率

ヒト血清及びコントロール血清に 10ng/mL の BPA 標準溶液を添加した結果、BPA のピークは他の成分とよい分離が得られた。また 10ng/mL BPA 添加の回収率を求めた結果、ヒト血清では 98.5% (n=5)、コントロール血清では 100.9% (n=5)、1ng/mL BPA 添加では 101.0% とそれぞれ良好な結果が得られた。なお、ヒト血清及びコントロールの BPA 含量はそれぞれ、0.79、4.46ng/mL であった。

D. 考察

従来から用いられている BPA 及び TMS 化した BPA の定量法について検討を行ったが、検出感度が 20ng/mL 及び 50ng/mL であり、改良すれば感度の上昇が望めるが生体成分中の微量の BPA 測定には難しいと考えられる。

生体成分を分析する場合、GC/MS は非常に有効であるが、バックグラウンドも問題となる。本来、感度の面からでは MS は EI 検出で行った方がよいが、バックグラウンドを考慮に入れて、NCI モードで行った。また、そのためには BPA をハロゲン誘導体化する必要があるため、PFBBr 試薬を用いてその誘導体化を試みた。その結果、PFB-BPA による分析法は、非常に高感度であり、また選択性、再現性にすぐれており、生体成分に BPA 分析法として最適であった。

BPA の PFB 化の反応は単純ではなくて、BPA とイオンペア試薬との反応物が水相/有機相の平衡状態で移動が行われるため、その有機相と水相の量など大きなファクターとなる。今回、有機溶媒としてイソオク

タンを用いて、その BPA イオンペア反応物がイソオクタン添加により抽出効果に大きな影響を与えて、高感度分析が可能になった。

しかし、高感度分析において、バックグラウンドが問題となることが多い。器具や試薬等のコンタミネーションが大きな障害となるが、今回、試薬調製用の水からも BPA が検出され、定量分析に大きな影響を与えた。しかし C₁₈SPE カートリッジを用いることにより、バックグラウンドレベルまで抑制することができた。

本法をヒト血清試料に応用し、その回収率を測定した結果、良好な回収率が得られ、種々の生体試料中の BPA 分析に有効であると考えられる。

E. 結論

BPA の検出方法として、BPA を PFBBR によりアルキル化して、PFBB-BPA に誘導体化した。これを生体成分に対して影響が少ない GC/MS の NCI モードで検出を行った。本法による PFBB-BPA の保持時間は 26.6 分であった。その定量範囲は 0.01~100ng/mL までの広範囲なダイナミックレンジで測定でき ($r^2=0.998$) と良好であった。また、検出限界は 0.005ng/mL (s/n=3) で、繰り返し分析精度は 1 及び 0.1ng/mL で 4.76、5.42% と良好であった。10ng/mL の BPA 標準溶液を添加して、その添加回収率を求めた。その結果、ヒト血清では 98.5% (n=5)、コントロール血清では 100.9% (n=5) と良好な結果が得られた。

F. 研究業績

学会発表

1. Analysis of endocrine disruptors derives from the polymer materials in the biological specimen :Yoshihiro Yoshimura, Kayoko Kato, Koichi Inoue, Isao Yajima, Hiroyuki Nakazawa,

PITTCON 2000, March, 2000, New Orleans, USA

2. 蛍光誘導体化 HPLC による生体試料中ビスフェノール A の分析: 中澤裕之、山本博史、井之上浩一、加藤嘉代子、渡辺卓穂、吉村吉博、黒田直敬、中島憲一郎、牧野恒久、第 2 回日本内分泌攪乱化学物質学会、p20、1999 年、神戸
3. 生活関連物質の E-Screen Assay による評価: 山口晃子、山崎聖美、坂部 貢、中澤裕之、第 2 回日本内分泌攪乱化学物質学会、p69、1999 年、神戸
4. 内分泌攪乱化学物質の分析を取り巻く課題: 中澤裕之、第 25 回環境トキシコロジーシンポジウム・第 3 回衛生薬学フォーラム合同大会、p21、1999 年、愛知
5. 内分泌攪乱化学物質と分析化学: 中澤裕之、第 43 回日本薬学会関東支部大会、p28、1999 年、東京
6. 生体試料中におけるビスフェノール A の高感度分析の開発: 井之上浩一、宮島裕子、加藤嘉代子、吉村吉博、中澤裕之、鈴木 勉、日本分析化学会 第 48 年会、p77、1999 年、神戸
7. 電気化学検出高速液体クロマトグラフィー (ECD/HPLC) によるビスフェノール A の高感度分析: 井之上浩一、佐々木春美、加藤嘉代子、渡辺卓穂、吉村吉博、中澤裕之、本郷敏雄、堀江正一、第 119 年会日本薬学会、p77、1999 年、徳島

平成11年度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

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（臍帯血等）分析法の開発とその実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

ビスフェノールAの高感度HPLC-蛍光および化学発光定量法の開発

主任研究者 牧野 恒久
東海大学医学部
分担研究者 中澤 裕之
星薬科大学
研究協力者 中島憲一郎
黒田 直敬
長崎大学薬学部

研究要旨

血液中のビスフェノールA (BPA) の高感度で高精度な測定法の開発を目的として、フェノール類やアミン類の選択的な蛍光ラベル化試薬である、4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chloride (DIB-Cl)を用いた、HPLC-蛍光および化学発光検出定量法を検討した。その結果、検出下限が HPLC-蛍光法では 0.05 ppb (S/N=3)、過シュウ酸エステル化学発光法では 0.38 ppb (S/N=3)の感度を有する計測法を開発することができた。ウサギの添加血漿を用いて HPLC-蛍光法を検討したところ、回収率 95%前後、定量下限 1 ppb であり、生体試料への適用が可能であることが分かった。

A. 研究目的

ビスフェノールA (BPA)は、ポリカーボネート樹脂、エポキシ樹脂の原材料として広く使用されているが、内分泌かく乱作用が疑われている。BPA はポリカーボネート製の容器、包装品、歯科のシーラント剤、缶詰内部の保護膜などから、飲料水や食物などを經由して極微量の生体に取り込まれることが考えられる。内分泌かく乱作用は、

動物実験の結果、極微量の BPA (25 nM, 6 ppb)でも発現するため、その作用や人体曝露量あるいは体内動態を明らかにするには、血液などの生体試料中の BPA を高感度に測定する方法が不可欠となる。本研究では、研究協力者らが開発した、フェノール類やアミン類に選択的な蛍光ラベル化試薬、DIB-Cl を用いて BPA を蛍光ラベル化後、HPLC-蛍光あるいは化学発光検出する方法

を検討した。また、プラスチックなどに由来する BPA などの微量の化学物質が生活環境中にも多く存在し、高いバックグラウンド値に反映するため、これらのバックグラウンドを排除するための検討を行う必要がある。そこで、固相抽出によるクリーンアップを試みた。

B. 研究方法

定量方法 今回、DIB-BPA 誘導体の定量には蛍光検出と化学発光検出の 2 つのシステムを検討した。

1) HPLC-蛍光定量法

BPA のアセトニトリル溶液 200 μL に 1.5 % トリエチルアミンを含む、15 mM の DIB-C1 アセトニトリル溶液 200 μL を加え、室温、10 分間反応させた。これに、溶離液 400 μL を加え、室温 30 min 放置後、HPLC に注入した。分離カラムに YMC 製 YMC-Pack Pro C18 (250x4.6 mm I.D., 5 μm)、溶離液はアセトニトリル/H₂O/MeOH=60:6:34, v/v/v) を用い、島津 LC10Adv ポンプで 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ の速度で送液した。試料は 5 μL を注入し、島津 RF-10AXL 検出器により、励起波長 340 nm、蛍光波長 470 nm で検出した。

2) HPLC-過シュウ酸エステル化学発光検出法

BPA のアセトニトリル溶液 100 μL に 10 mM の DIB-C1 アセトニトリル溶液 10 μL および 30% トリエチルアミンのアセトニトリル溶液 5 μL を加え、室温 20 min 反応させた。得られた溶液を ODS カートリッジに負

荷し、70%アセトニトリル水溶液 5 mL で洗浄後、300 μL のアセトニトリルで溶出し、得られた溶液を HPLC に注入した。分離カラムはダイソー製の Daisopack-SP-120-5-ODS (250x4.6 mm I.D., 5 μm)、溶離液にはアセトニトリル/40 mM Imidazole-HNO₃ buffer (pH 7.0)=83:17(v/v) を使用し、島津 LC10Adv ポンプにより、1 mL/min で送液した。試料は 5 μL を注入した。ポストカラム化学発光試薬は 0.6 mM TDPO と 25 mM 過酸化水素のアセトニトリル混合溶液を使用し、LC10Adv ポンプを用いて、1.0 μL の速度で送液した。

C. 研究結果

HPLC-蛍光定量法 標準溶液を用いて得られたクロマトグラム上で、DIB-BPA ピークの保持時間は約 16 min であり、試薬の妨害ピークの影響は見られなかった。検量線を作成したところ、0.1~50 ppb の濃度範囲でピーク面積および高さとの間に良好な直線関係 ($r \geq 0.999$) が得られた。検出下限は 0.05 ppb (S/N=3) と非常に高感度であった。また、くり返し測定の精度は 10 ppb および 50 ppb でピーク面積、高さともに RSD が約 5% と良好な結果を得た。

実試料への適用性を調べる目的でウサギ血漿に添加した BPA の測定を試みた。血漿 1 mL を除タンパク後、固相抽出 (Waters Oasis HLB) により BPA を抽出する clean-up を行い、バックグラウンドの減少を図った。抽出液は窒素気流下、乾固し、アセトニト

リルに再溶解して蛍光ラベル化に付した。過剰量の未反応試薬は Sep-pak C18 カートリッジを通じて除去し、ろ液を HPLC に注入した。BPA を 1 および 10 ppb, ウサギ血漿に添加した場合の回収率はいずれも 4 回の測定で平均 95%前後であり (RSD<5%), 検出下限も 1 ppb と良好な結果を得た。

HPLC-化学発光定量法 標準溶液を用いて得られたクロマトグラムで、DIB-BPA のピーク保持時間は約 48 min であった。過シュウ酸エステル化学発光反応により得られる試薬ブランク由来のピークが DIB-BPA の分離を妨害したため、固相抽出による未反応試薬の除去を検討した。その結果、ODS カートリッジ (ODS-A, 50 μ m, 100 mg, Daiso) を用いた場合、先の操作法に記載した条件で抽出すると、最も効果的に試薬を除去することができた。ここでの、clean-up 操作を行った場合の DIB-BPA の回収率は約 60% であった。

標準溶液を用いて検量線を作成したところ、0.56~22.7 ppb の範囲で良好な直線性 ($r=0.996$) が得られ、 $S/N=3$ における検出下限は 0.38 ppb であった。

本法を市販のポリカーボネート製ほ乳びんから溶出する BPA の定量に適用した。ほ乳びんに 95°C のお湯 100 μ l を加え、同温度で 30 min 恒温室に放置後、溶出した BPA を定量した。検討した 2 種類のほ乳びんから、0.53 および 0.74 ppb の BPA が検出さ

れた。なお、2 度目の溶出操作では検出されなかったものの、検出下限値以下であった。

D. 考察

蛍光ラベル化試薬、DIB-Cl を用いて BPA を蛍光誘導体に導いた後、カラム分離し、蛍光あるいは過シュウ酸エステル化学発光検出する BPA の HPLC 定量法を検討した。いずれの方法も非常に高感度であり、特に蛍光検出法では 0.05 ppb を検出することができた。蛍光検出法を用いて、ウサギ血漿中の BPA 定量を検討した結果、感度も十分であり、この方法がヒト血漿の定量に十分応用できることが示唆されたことで、現在、ヒト血漿試料中の BPA 定量に取り組んでいる。一方、化学発光検出法は蛍光法に及ばないものの、0.38 ppb が検出可能であり、ほ乳びんから溶出する BPA の検出に利用することが可能であった。ただし、試薬由来の妨害ピークを除去することが必要であり、これはまた、感度の低下を来すことになった。そこで、カラムスイッチング法などを取り入れ、より効率的なバックグラウンド除去方法の検討が必要である。同時に、分析時間の短縮のため、分離時間を再検討することも考慮したい。

E. 結論

BPA の高感度 HPLC-蛍光および化学発光検出定量法を開発した。それぞれ、0.05, 0.38 ppb の BPA が検出可能であり、基礎検討の結果、ヒト血漿など生体試料中の微量

BPA の定量に適用できる可能性が示された。現在、clean-up 法の再検討や、カラムスイッチング法の導入、マイクロカラムの使用などの検討を行っているが、良好な結果が得られており、実試料への適用を十分図ることが出来るものと考え。

F. 研究業績

学会発表

1. 孫艶, 和田光弘, 黒田直敬, 中嶋弥穂子, 高橋正克, 中島憲一郎: HPLC-過シュウ酸エステル化学発光検出によるほ乳びん中ビスフェノールAの定量, 第16回日本薬学会九州支部大会, 2B-11, 1999, 長崎.
2. 中島憲一郎, 孫艶, オサマ・アルデハシ, 和田光弘, 黒田直敬, 中澤裕之, 牧野恒久: 生体試料中のビスフェノールAの高感度分析法の開発に関する基礎研究, 第10回日本臨床化学会九州支部総会, 9, 2000, 福岡.
3. 孫艶, Al-Dirbashi Osama, 和田光弘, 黒田直敬, 中島憲一郎, 中澤裕之, 牧野恒久: カラムスイッチングを利用するビスフェノールAのセミマイクロHPLC蛍光計測, 日本薬学会第120年会, 31[PF]10-03, 2000, 岐阜.

平成11年度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

環境中ホルモン様物質の胎児・胎盤特異的遺伝子発現への影響に関する研究

分担研究者 塩田 邦郎

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究要旨

妊娠母体に取り込まれた環境物質は、まずはじめに胎盤を構成する胎児由来細胞である栄養膜細胞に作用すると考えられる。核内受容体およびオーファン受容体を介した環境中ホルモン様物質の内分泌かく乱作用機序を解析する基礎を確立する目的で、胎盤における核内受容体の発現様式とその機能を解析した。核内受容体の異常な活性化が胎盤形成に及ぼす影響を見るために、まず、すでにその核内受容体が胎盤で発現していることが報告されているレチノイン酸(RA)の、*in vivo* および *in vitro* での影響を解析したところ、RA投与によって栄養膜巨細胞の分化が促進された一方で、海綿状栄養膜細胞の分化阻害が確認された。この結果は、RA受容体を活性化あるいは不活性化する環境物質が妊娠母体に取り込まれた場合に、胎盤形成に異常が現れる可能性を示唆する。以上の結果に加え、ベンゾピレンやダイオキシンの生体内受容体であるとされる AhR の、培養栄養膜幹細胞における発現を、RT-PCRにより解析すると同時に、その cDNA のクローニングを行い、報告にない新規の AhR アイソフォームを同定した。

A. 研究目的

環境物質は核内受容体と呼ばれる一群の分子を介して作用している可能性が示唆されている。環境物質によって引き起こされる核内受容体およびオーファン受容体の異常な活性化・不活性化が、発生途上の胎児・胎盤に重大な影響を及ぼすことが容易に予想される。胎盤の大部分を構成する栄養膜細胞は、妊娠期間を通じて、母体側体液に直接さらされる唯一の胎児由来細胞である。したがって、その意味では、環境物質が胎児・胎盤機能へ及ぼす影響を解析するためには、まず栄養膜細胞における核内受容体およびオーファン受容体の発現様式、およびその機能を詳しく知る必要がある。また、胎盤(栄養膜細胞)に

おける環境物質の代謝機能についてもほとんど知見が無く、研究の必要性が唱えられている。本研究の第一の目的は、核内受容体およびオーファン受容体の、胎盤における発現様式とその機能を解析し、これら受容体を介した環境中ホルモン様物質の内分泌かく乱作用機序を解析する基礎を確立することにある(塩田)。第二に、ビスフェノールAおよびニルフェノールの代謝酵素を特定し、これらの環境中ホルモン様物質を解毒する能力がどの程度存在しているかを評価することを目的とする(横田)。

B. 研究方法

① すでにその核内受容体が胎盤で発現し

ていることが報告されているレチノイン酸(RA)の、株化栄養膜幹細胞(TS細胞)の分化に及ぼす影響を見る目的で、TS細胞を1 μ MのRA存在下で培養し、FACS解析およびNorthern hybridization解析を行った。

② in vivoでの栄養膜細胞の分化に対するRAの影響を解析する目的で、25オグ/g body weightのRAを、妊娠雌マウスに妊娠6.5日および7.5日に腹腔内注射し、8.5日に栄養膜細胞の分化マーカーである、PL-1および4311遺伝子をプローブとして用いたin situ hybridization解析を行った。

③ 核内受容体の一つで、ベンゾピレンやダイオキシンの生体内受容体であるとされるAhRの、TS細胞における発現を、RT-PCRにより解析した。

④ ③で得られたPCR産物を精製し、ICR系統由来AhRcDNAのクローニングを行った。

C. 研究結果

① RA存在下ではDNA含量の高い細胞がより多くをしめることが明らかになった。海綿栄養膜細胞特異的遺伝子である4311およびCea4の発現はRA添加により減少していた。

② RAの腹腔内投与により、PL-1陽性細胞の数が明らかに増加した。一方4311陽性細胞の数はRA処理群で減少していた(図1)。

③ AhRの発現は、TS細胞の分化に伴い一過的に上昇するパターンを示した。

④ マウスAhR遺伝子にはC57BL/6タイプとDBAタイプの2種類が報告されているが、今回ICR系統由来TS細胞から単離されたAhR遺伝子は、これら両タイプの特徴的配列を合わせ持つ、第3のタイプであった(図2)。

D. 考察

RAは、in vitroにおいてTS細胞の栄養膜巨細胞への分化を促進するとともに、海綿栄養膜細胞への分化に対しては抑制的に作用した。in vivoでも、RA処理による栄養膜巨細胞数の増加と海綿栄養膜細胞数の減少が観察され、前者の分化には促進的に、後者の分化には抑制的にRAが作用することを示唆する結果が得られた。これらの結果は、RA受容体に結合しそれを活性化あるいは不活性化物質が妊娠初期の母体に進入した場合、胎盤の形成や機能に影響を及ぼす可能性があることを示唆する。

AhRの発現パターンは、海綿栄養膜細胞の分化・生存に必須な遺伝子であるMash2の発現パターンと類似しており、AhRが栄養膜細胞の分化過程において何らかの機能を果たしている可能性を示唆する。今後、ベンゾピレン存在下でTS細胞を培養し、その分化に及ぼす影響を解析したい。

E. 結論

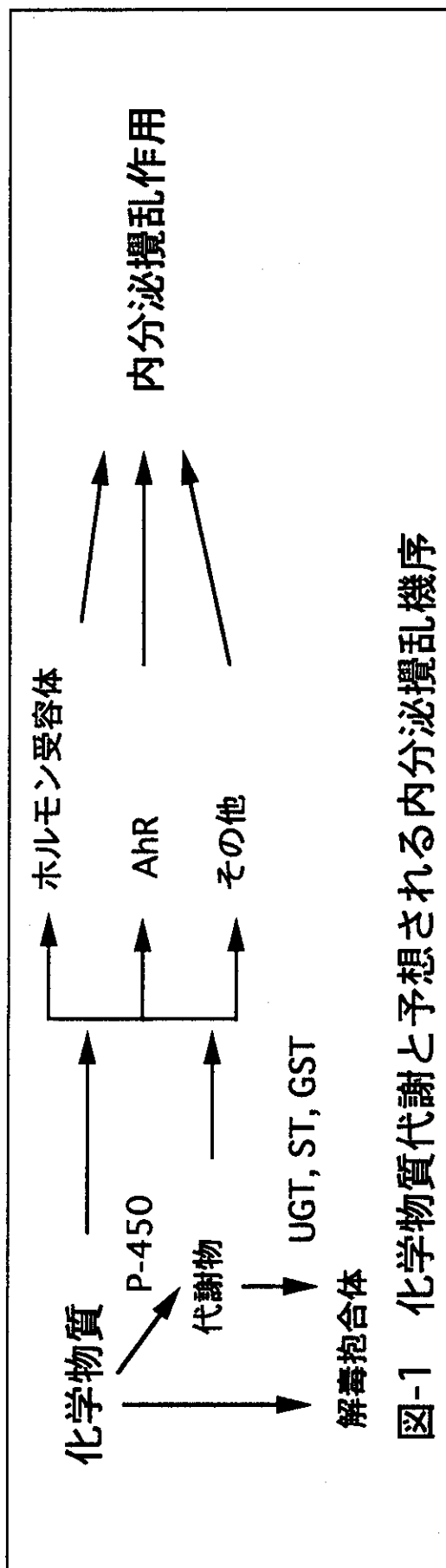
① レチノイン酸は、in vivoおよびin vitroの両方において栄養膜細胞の分化に大きな影響を及ぼした。これは、環境物質が胎盤の形成と機能に異常を及ぼす可能性を示唆する。

② AhRの発現、栄養膜細胞の分化に伴って変化した。したがって、AhRも栄養膜細胞の分化過程に何らかの役割を果たしている可能性がある。

研究業績

① 学会発表

巖 軍麗・小田真由美・田中 智・塩田邦郎(東京大学・農学生命科学)栄養膜細胞幹細胞(TS細胞)におけるAhR発現の解析。第92回日本繁殖生物学会



1. BPA は生体内で 5-OH-BPA に酸化された。
1966年 Knaak et al *Toxicol Appl Pharmacol*
 2. BPA は 5-OH-BPA、その後 BP-Quinone となり DNA と結合する。
1995年 Atkinson et al *Biochim Biophys Res Commun*
 3. BPA はUGT2B1 により グルクロン酸抱合される。
1999年 Yokota et al *Biochem J*
 4. BPA はラット肝灌流により80%以上がグルクロン酸抱合された。
1999年 井上ら 環境ホルモン学会
 5. BPA の88%はラット糞中に抱合体として排泄されていた。
1999年 根本ら 環境ホルモン学会
 6. BPA 投与後、ラット血漿中の90%がグルクロン酸抱合体であった。
1999年 都田ら 環境ホルモン学会
- 図-2 ビスフェノール A の代謝に関する現在までの報告

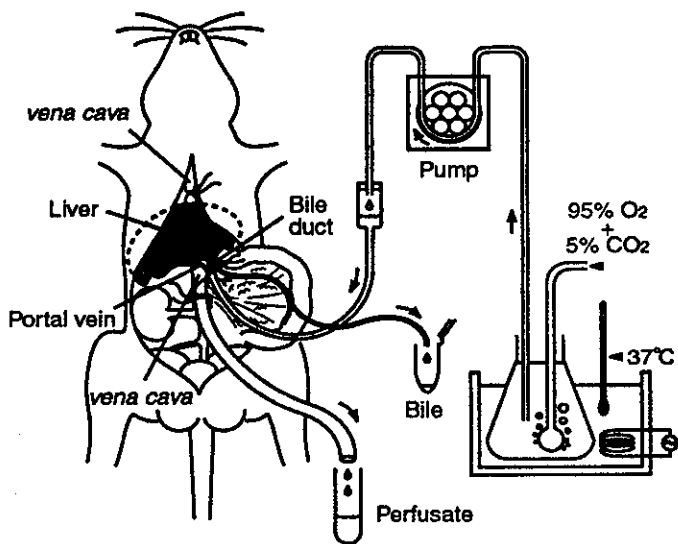


図-3
ビスフェノールA 肝灌流模式図

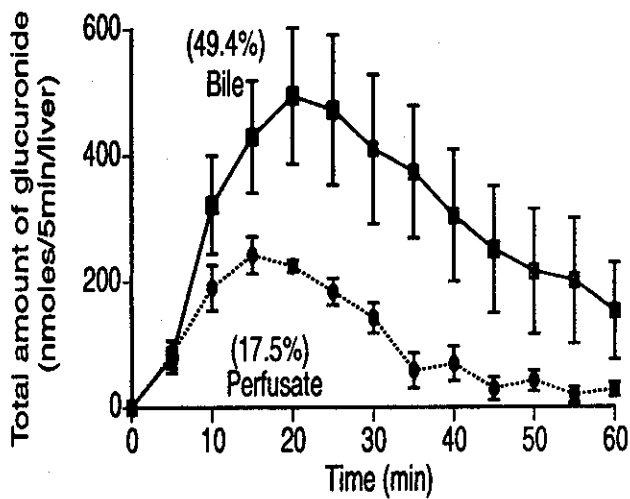


図-4
ビスフェノールAならびに抱合体量の経時的変化

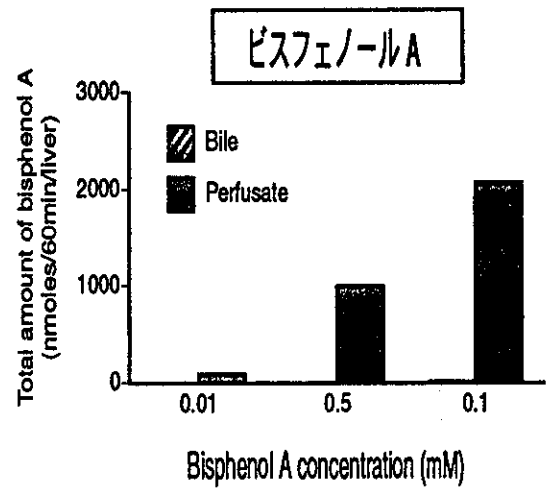


図-5 肝から胆汁・静脈へのビスフェノールAの排出

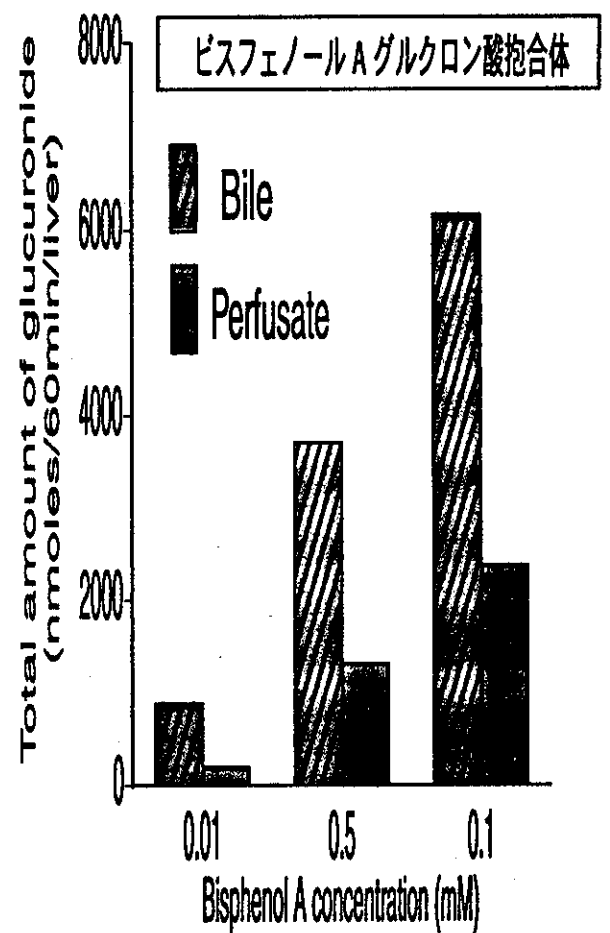


図-6 肝から胆汁・静脈へのビスフェノールA-グルクロン酸抱合体の排出

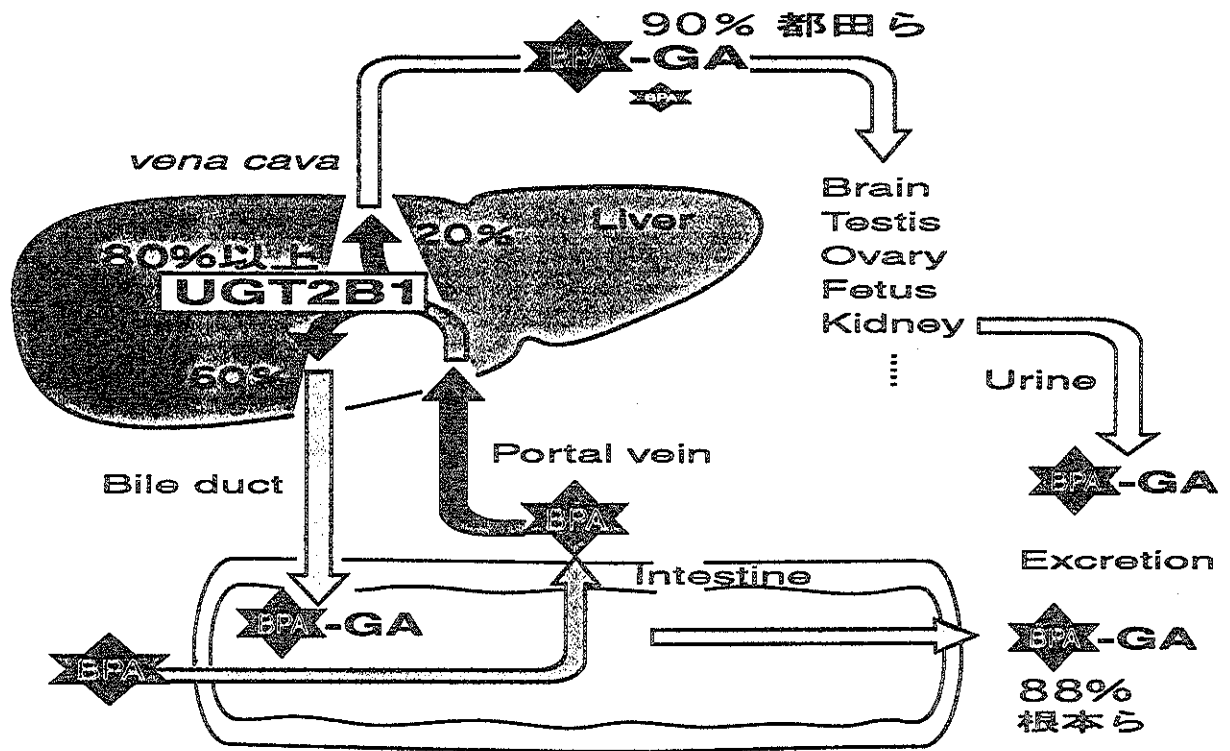


図-7 BPA の代謝模式図 (ラット)

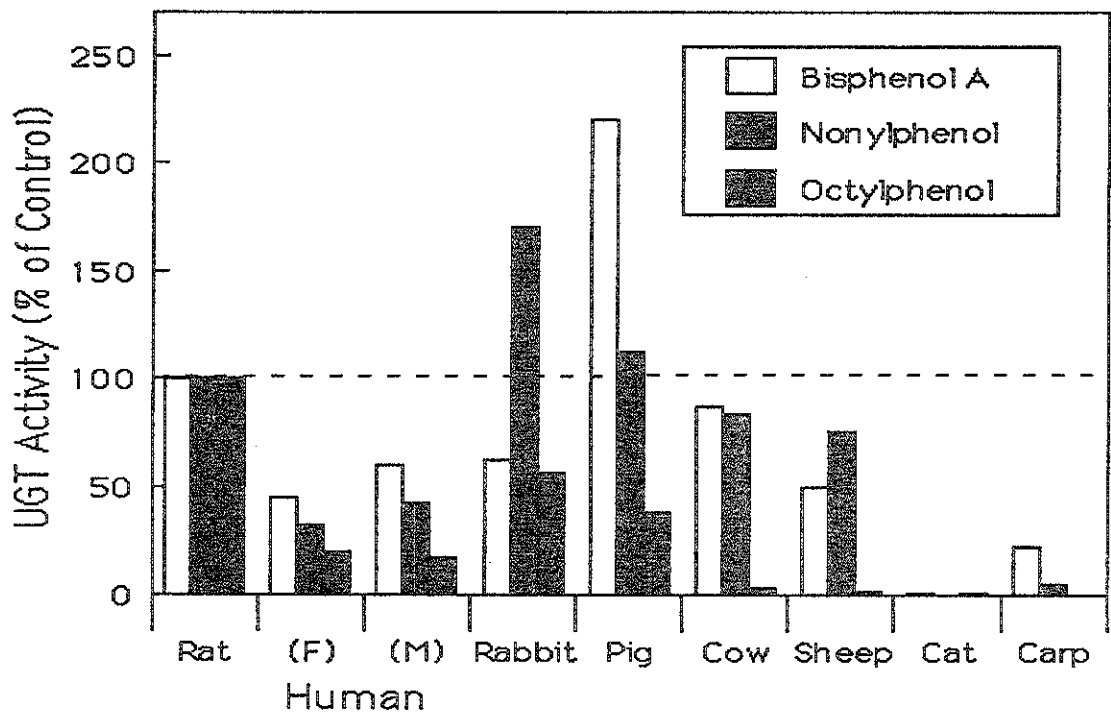


図-8

各種動物肝ミクロゾームによるビスフェノールA、ノニルフェノール、オクチルフェノールのグルクロン酸抱合活性



cDNA Expression Activity

UGT2B4 Prep

UGT2B7 Prep

UGT2B10 Prep Success Slight

UGT2B15

UGT2B17

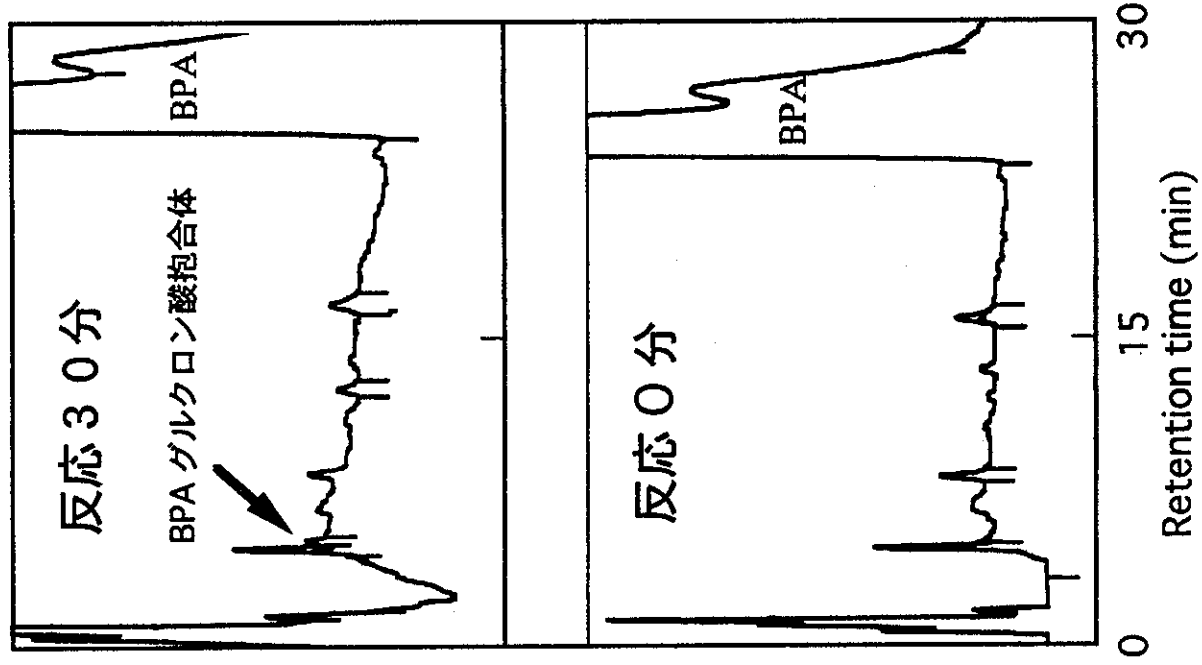


図-10 UGT2B10 での反応

図-9 ヒトUGT2B 分子種特定の進捗現状

平成 11 年度 厚生科学研究費補助金分担研究報告書

内分泌かく乱物質に関する生体試料(さい帯血等)の分析法の開発とその実試料
分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

分担項目：環境中のホルモン様物質の胎児・胎盤特異的遺伝子発現への影響

テーマ：内分泌かく乱物質を解毒するヒト UGT 分子種の特異性と母胎・胎盤・胎児での機能

分担研究者：塩田邦郎

(東京大学・大学院農学生命科学研究科。細胞生化学)

研究協力者；横田博

(酪農学園大学・獣医学部獣医生化学教室)

要旨

ビスフェノール A はラット肝臓にある UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT2B1) によってグルクロン酸抱合(解毒)される (H. Yokota ら,1999,*Biochem J.*)。今回、ノニルフェノール・オクチルフェノール・植物由来のエストロジェンについて、ヒトおよび各種動物肝におけるグルクロン酸抱合能について検討した。市販のヒト肝マイクロゾーム及び各種動物肝マイクロゾームを用いて、グルクロン酸抱合反応を行い、逆相 HPLC により反応産物の同定・定量を行った。また、ラット肝灌流法を用いてビスフェノール A の臓機内での代謝を測定した。その結果、①ラット肝臓マイクロゾームにより、ビスフェノール A のみならずノニルフェノール・オクチルフェノール・植物由来エストロジェン (ゲニステイン、ビオカニン A、ダイゼイン) もグルクロン酸抱合された。②ヒト肝臓マイクロゾームにも、これら内分泌かく乱物質のグルクロン酸抱合能が検出された。③ヒト肝における、ビスフェノール A 抱合活性値はラットの 60-50%、ノニルフェノール抱合活性値は 40%前後、オクチルフェノールは 30%前後であった。また、植物由来エストロジェンは 40-10%であった。④ウサギ・豚・牛・ヒツジの肝マイクロゾームにも同様の酵素活性が存在し、ラットと同程度以上の値を示した。⑤薬物のグルクロン酸抱合能が遺伝的に欠損しているネコには、ビオカニン A 以外の活性は検出されなかった。⑥ビスフェノール A はほとんどラット肝臓内でグルクロン酸抱合され、胆汁中に排泄されることが分かった。

以上の結果より、ヒトはじめ多くの動物肝に於いて、ビスフェノール A ・ ノニルフェノール ・ オクチルフェノール ・ 植物由来エストロジェンはグルクロン酸抱合されること。ビスフェノール A は大部分グルクロン酸抱合で胆汁中に排泄されることが分かった。

A. 研究目的

本研究の目的は、ヒト肝において、ビスフェノール A やノニルフェノールをグルクロン酸抱合（解毒）する能力がどの程度存在しているのかを明らかにし、さらに、それを担う UGT 遺伝子をクローニングし、発現することによって分子種を特定し、母胎・胎盤・胎児期の解毒能を評価することである。内分泌かく乱機序を明らかにするためには、これら化学物質が生体内に取り込まれた後、どの様に濃縮され、代謝変換し、解毒排泄されるかを明らかにする事が求められており、そのためには、本研究目的にあるそれぞれの反応を担っている酵素を特定することがもっとも基本的である。このことは内分泌かく乱物質の安全基準濃度範囲を規定する上でも、必須の基礎的知見である。

図 1 に示したように、体内に入った化学物質は、一般に 2 つの反応 (P-450 による酸化と抱合解毒反応) を受け、排泄される。化学物質本体かまたは、この P-450 による酸化代謝物が毒性を発揮 (内分泌攪乱作用など) する。よって、内分泌攪

乱物質の人への影響を評価する上で、化学物質の代謝反応を明らかにする必要がある。現在までのビスフェノール A の代謝については図 2 に示した。昨年、我々はラットではビスフェノール A は UGT2B1 という酵素によりグルクロン酸抱合（解毒）されることを報告した (研究業績)。同年の内分泌攪乱物質学会において、ラット血液中和糞便中にビスフェノール A のグルクロン酸抱合体が検出され、ビスフェノール A は主としてグルクロン酸抱合され解毒されることが明らかとなった。そこで、今年度は、ラットの肝臓にビスフェノール A を灌流し、臓器レベルで解毒反応の有無および能力を測定した。また、ヒト肝ミクロソームにこのような解毒能力が存在するかどうかを調べた。

B. 研究方法

- ① ラット肝臓門脈へビスフェノール A を灌流し、肝臓から胆管や静脈に排泄されるビスフェノール A の代謝物を分析した (図-3)。
- ② 市販ヒト肝臓ミクロソームを用い、各種内分泌かく乱物質のグルクロ

ン酸抱合活性を HPLC 等で測定した。

③ ヒト cDNA から、UGT2B 分子種を複数クローニングした。今後、酵母内で発現し活性測定することにより、担当する分子種を特定する予定である。

C. 研究結果

① ラット肝門脈に注入したビスフェノール A は、ほとんどが胆汁中にグルクロン酸抱合体として排泄され、他の代謝物は検出されなかった

(図-4、6)。一方静脈中にも、グルクロン酸抱合体として排泄されたが、投与量が多い場合にはわずかに未反応のビスフェノール A が検出された(図-5)。② ヒト肝ミクロゾームにも、ビスフェノール A、ノニルフェノール、オクチルフェノールおよび各種植物由来エストロゲンのグルクロン酸抱合活性が検出された(図-8)。

③ ヒト UDP-グルクロン酸転移酵素の分子種 UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10 の cDNA をクローニングできた(図-9)。今のところ、UGT2B10 のみ発現できているが、かすかにビスフェノール A のグルクロン酸抱合活性が検出された(図-10)。

D. 考察および E. 結論

ビスフェノール A はラット生体に侵入後、肝臓でその大半がグルクロン

酸抱合される。ヒトも多種類の内分泌かく乱物質のグルクロン酸抱合(解毒)活性を有するが、動物種によってその活性値は大きな差があった。図-7に示したごとく、内分泌かく乱物質は食品に含まれ、腸管で吸収された後、必ず肝臓を通過し、そこで、UGT2B1によってほとんどがグルクロン酸抱合され、その大半が胆汁中に排泄される。吸収量が 0,01mM を越えるときにはわずかながら未反応のビスフェノール A が静脈中に漏れだし、これが各臓器に分配され、精巣・卵巣・胎児に暴露されることが予測された。ここで示したように、肝臓での解毒能力はその生物の生殖器官および胎児が暴露される化学物質量を決定するので、個々での代謝解毒能力を把握しておくことは、その種への影響を予測・評価する上で重要なファクターになる。

F. 研究業績

① 学会発表

植物エストロゲンをグルクロン酸抱合する UDP-グルクロン酸転移酵素分子種 ○横田 博・牛頭圭介・湯浅 亮
(酪農学園大学・獣医生化学)

第 72 回日本生化学会

② 論文等

Glucuronidation of the Environmental Estrogen Bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the Rat Liver

Yokota,H., Iwano, H., Endo, M., Kobayashi,T.,

Inoue, H., Ikushiro, S. and Yuasa, A.:

Biochem. Journal (1999) 340, 405-409

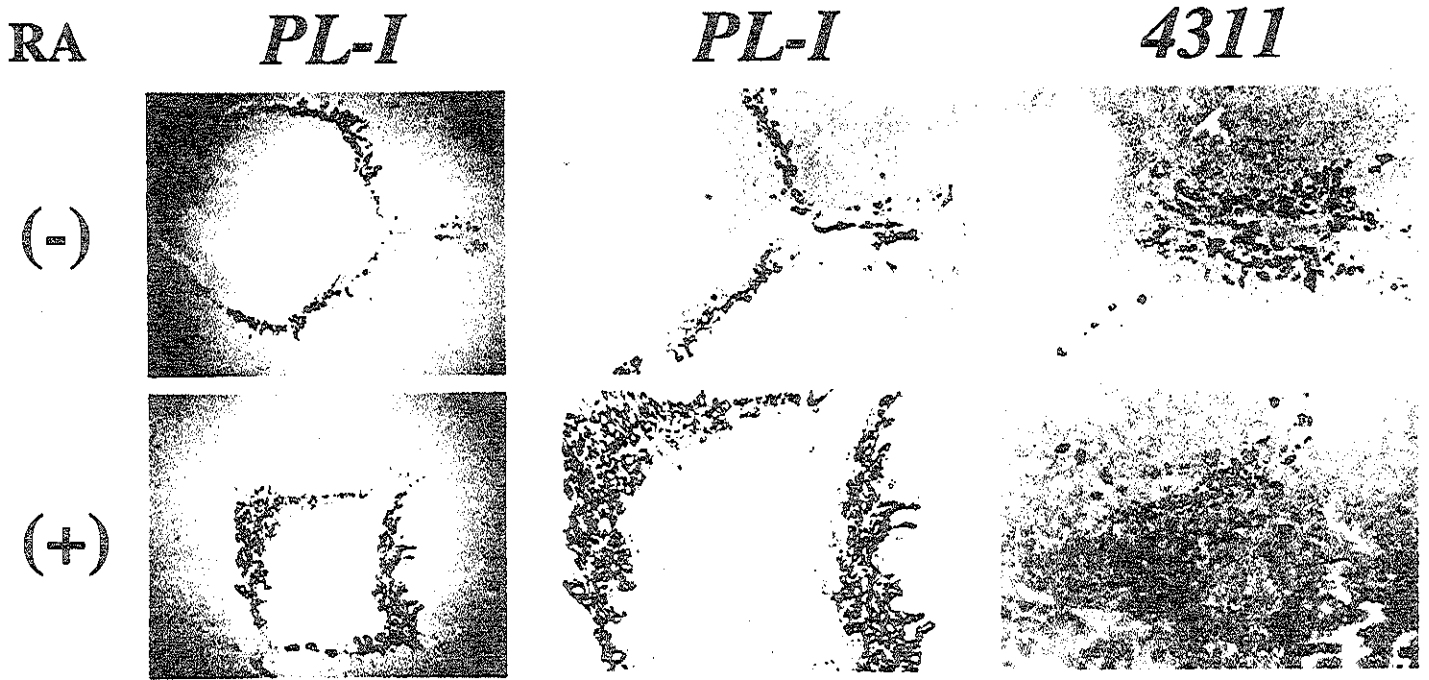


図1 栄養膜細胞の分化に対するレチノイン酸 (RA) の影響
 RA 処理による栄養膜巨細胞 (PL-1 陽性細胞) 数の増加と、
 海綿栄養膜細胞 (4311 陽性細胞) 数の減少が見られた。

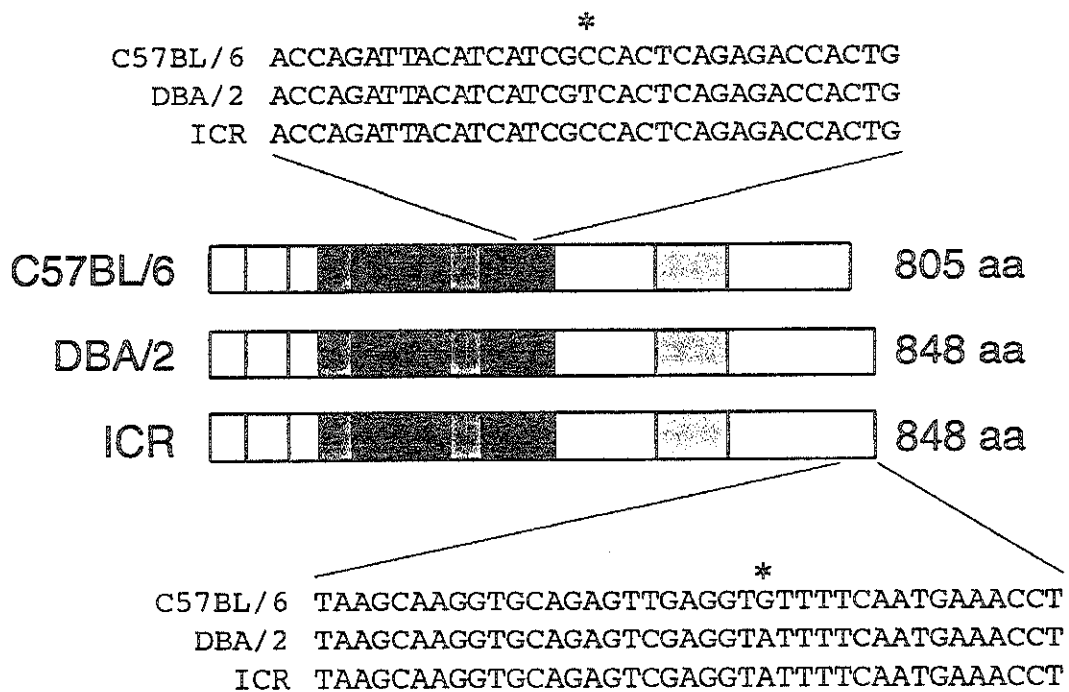


図2 マウス AhR 遺伝子の構造比較
 ICR の AhR 遺伝子は、 C57BL/6 型と DBA/2 型の特徴的配列
 を合わせ持つ中間型の構造を有する。

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（臍帯血等）分析法の開発とその実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

ヒト副腎由来の培養細胞を用いたステロイドホルモン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響

主任研究者： 牧野 恒久
東海大学医学部教授

分担研究者： 中澤 裕之
星薬科大学教授

研究協力者： 中陳 静男
星薬科大学助教授

研究要旨

環境由来の化学物質が内在性のステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) にどのような影響を及ぼすかを解明する目的で、H295R 細胞を用いてステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を評価するアッセイ法の基礎的検討を行い、方法を確率した。このアッセイ法を用い農薬 DDT とその代謝物、ジコホル、クロルデンおよびヘキサクロルベンゼンの影響、各種パラヒドロキシ安息香酸エステル類の影響、および植物エストロゲンであるダイゼイン、ゲニステインおよびそれらの配糖体であるダイジン、ゲニスチンの影響を検討し、コルチゾール産生を抑制するいくつかの化学物質を特定した。この H295R 細胞はヒト副腎皮質由来のステロイドホルモン産生細胞であり、環境由来の化学物質の及ぼす影響を検討することは、ヒトにおけるリスクを評価できるが可能性がある。

A. 研究目的

ステロイドホルモンは個体発生、細胞の増殖・分化、性の分化と行動、神経情報伝達の制御など重要な生理機能に関わっており、生体の恒常性を保つためには必須の作用分子である。近年になりステロイドホルモン生合成に関与する酵素群がクローニングされ、それらの転写調節をはじめとするステロイド合成機序の詳細、およびステロイドホルモンの核内受容体が明らかにされたことからその作用発現機構が分子レベルで明らかにされつつある。

本研究は、環境ホルモンといわれる環境由来の化学物質が生体のステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) にどのような影響を及ぼすかを解明する目的で、ヒト副腎皮質由来のステロイドホルモン産生細胞 (H295R 細胞) を用いて、*in vitro* でその直

接的な影響を検討するものである。この H295R 細胞はヒト由来であり、かつ広範囲にわたるステロイドホルモンの産生能力を保持している。この細胞を用いて直接環境由来の化学物質の及ぼす影響を検討することは、内在性のステロイドホルモン産生に影響を及ぼすと考えられる化学物質を特定することができ、信頼できる結果を迅速に得ることが可能である。さらに本研究を進展させることにより、ステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を細胞レベル、分子レベルで解明することが可能である。

そこで本研究では、はじめに環境由来の化学物質のステロイドホルモン産生に及ぼす影響を評価するアッセイ系の検討を行い、方法を確立した。次に確立したアッセイ系を利用して内分泌かく乱化学物質として知

られている農薬 DDT とその関連代謝物質、各種パラヒドロキシ安息香酸エステル類、植物エストロゲンおよび合成エストロゲン等の影響を検討した。

B. 研究方法

H295R 細胞は英国エジンバラ大学の J. I. Mason 教授から供与を受けた。細胞は ITS⁺ (1.0%)、Ultrosor G (2.0%) および抗生物質を含有する D-MEM-F12 メジウムを用い 5% CO₂-95% Air の気相中、37 °C の条件下で継代培養した。細胞を実験に使用に当たり細胞をトリプシンで処理後、24 well のプレートにサブカルチャーし、コンフルエント後、ITS⁺ (1.0%)、牛血清アルブミン (0.01%) および抗生物質含有の D-MEM-F12 メジウムに交換した。24 時間後さらにメジウムを交換し、種々の検体のエタノール溶液を添加し (エタノール濃度は 1% 以下)、同時にステロイド合成を誘導するため (Bu)₂cAMP を添加した。一定時間後にメジウム中に分泌されたステロイドをラジオイムノアッセイ (RIA) により測定した。サンプルの細胞毒性を考慮してメジウム中に放出される LDH を測定した。さらに well 中の細胞を洗浄後溶解し、全タンパク質量を測定して、細胞数の指標とした。なお、コルチゾールの測定にはコルチゾール測定 RIA キット (DPC 社製) を用いた。LDH の測定は細胞障害試験用の CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay (Promega 社製) を用いた。well 中の細胞は SDS (1%) NaCl (150mM)、EGTA (5mM) MgCl₂ (0.5 mM)、MnCl₂ (0.5mM)、および PMSF (0.2mM) 含有の Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を用い溶解した後、BCA Protein assay reagent (Pierce 社製) を用いて測定した。

C. 研究結果

ステロイドホルモン産生に及ぼす影響を評価するアッセイ法の検討

H295R 細胞を使用してステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を評価するアッセイ法の基礎的検討を行い、“研究方法” に示した方法を確率した。H295R 細胞の産生するステロイドホルモンについては、産生量の多いコルチゾールを測定す

ることとし、生合成を誘導する cAMP の処理時間と濃度について検討を加えた。その結果、処理時間に依存して 60 時間まで、培地中のコルチゾール産生がほぼ直線的に増加すること、また cAMP 濃度に依存してコルチゾール産生がほぼ直線的に増加することを明らかにした。cAMP の濃度は 1mM を越える濃度になるとコルチゾール産生はほぼ飽和した。以後の実験には、コルチゾール生合成の誘導を行うための cAMP 濃度は 1mM とし、処理時間は 48 時間に設定した。

農薬 DDT とその代謝物等による影響

検体として、*p,p'*-DDT、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDE、*o,p'*-DDT、その代謝物である *o,p'*-DDD、ジコロール、トランス・クロルデン、シス・クロルデン、およびヘキサクロルベンゼンを用いた。検体の濃度は 10 μg/mL (10ppm) を最大濃度として、以下影響の認められない濃度まで各種濃度を設定し、影響を検討した。その結果、*p,p'*-DDT、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDE、*o,p'*-DDT、*o,p'*-DDD、およびジコロールが 1 μg/mL を越え、高濃度になると (Bu)₂cAMP で誘導した H295R 細胞のコルチゾールの産生を抑制することが判明した。10 μg/mL の濃度ではコルチゾール産生が強く抑制され *p,p'*-DDD、*p,p'*-DDE、ではコントロールの 10% 以下であった。これらの検体の細胞に与える傷害の指標として測定した培養上清中の LDH 活性はいずれの濃度においても影響が認められなかったが、ジコロールは細胞に対する毒性が高く、10 μg/mL の濃度において培養上清中の LDH 活性が増加傾向した。トランス・クロルデン、シス・クロルデン及びヘキサクロルベンゼンのコルチゾール産生に及ぼす影響は軽微かあるいはほとんど認められない程度であった。

各種パラヒドロキシ安息香酸エステル類の影響

パラオキシ安息香酸、そのメチルエステル、エチルエステル、プロピルエステル、ブチルエステル、イソプロピルエステル、イソブチルエステル、およびパラジクロルベンゼンを検体として用いた。検体の濃度は 10 μg/mL を最大濃度としてその影響を検討した。その結果、パラオキシ安息香酸

では全く影響が認められないが、そのエステル部分が長くなるにつれて、(Bu)₂cAMPで誘導した H295R 細胞のコルチゾールの産生は抑制され、パラオキシ安息香酸ブチルおよびパラオキシ安息香酸イソブチルはコントロールと比較してコルチゾールの産生が40%に抑制された。しかしこれらの検体は細胞に障害を与え、培養上清中の LDH 活性が増加傾向にあった。その LDH 活性は細胞の総 LDH 活性の 10%であった。またジクロロベンゼンはコルチゾール産生に対して全く影響を及ぼさなかった。

植物エストロゲンおよびジエチルステロイド(DES)等の影響

植物エストロゲンの検体としてダイゼインとゲニステインおよびそれらの7-グリコシドである配糖体、ダイジンとゲニスチンを用いた。また合成エストロゲンとして DES および天然のエストロゲンとしてエストラジオール-17 β を検体として用いた。その結果アグリコンに相当するダイゼインとゲニステインは 2.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を越え高濃度になると H295R 細胞のコルチゾールの産生を抑制することが判明した。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度ではコルチゾール産生が強く抑制された。また、いずれの濃度においても培養上清中の LDH 活性を指標とした細胞障害、および細胞数に影響は認められなかった。それに対して、配糖体であるダイジンとゲニスチンでは全く影響が認められなかった。DES においてもコルチゾール産生に及ぼす影響が高濃度 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) において認められるが、ダイゼインやゲニステインと比較して軽微であった。それに対してエストラジオール-17 β は 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 前後の低濃度においてコルチゾール産生を抑制し、濃度が上昇するにつれ抑制効果は増加するが、高濃度の 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度においても 35%に抑制される程度でその用量反応曲線は緩やかであった。

D. 考察

内分かく乱化学物質の野生動物並びにヒトに対する影響について関心が高まっている中、過去十数年にわたって同定されてきた内分泌かく乱化学物質は環境エストロゲンといわれる物質で、エストロゲン受容

体に低濃度で結合して天然のエストロゲンと同様な作用を示す物質である。したがって、さまざまな環境化学物質と野生動物並びにヒトに及ぼす影響との関連を明らかにするため、それらの化学物質のエストロゲン受容体との結合性あるいはエストロゲン活性を調べることに主眼が置かれてきた。ステロイドホルモンは”key of the life”と称されるように個体発生、細胞の増殖・分化、性の分化と行動、および神経情報伝達の制御など重要な生理機能に関わっている。従って環境由来の化学物質が生体における内在性のステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) に影響を与えることにより野生生物やヒトに重要な生体影響を与えることが懸念される。そこで本研究では環境由来の化学物質が内在性のステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) にどのような影響を及ぼすかを解明する目的で、H295R 細胞を用いてステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を評価するアッセイ法の基礎的検討を行い、その方法を確率した。この H295R 細胞はヒト副腎皮質由来のステロイドホルモン産生細胞であり、この細胞を用いて直接環境由来の化学物質の及ぼす影響を検討することは、ステロイドホルモン産生異常などステロイドホルモン産生に影響を及ぼす化学物質を特定することができ、ヒトにおけるリスク評価が可能となる。

検体としてまず農薬である DDT を用いた。DDT は主成分が *p,p'*-DDT であり、その副産物として *o,p'*-DDT が含まれていた。現在は使用禁止となっているにも関わらずそれらの安定な代謝物である *p,p'*-DDD、*p,p'*-DDE および *o,p'*-DDD 等が野生生物に広く蓄積されているといわれている。さらに殺ダニ剤として現在も使用が許可されているジコホール、工業用クロルデンの主成分であるトランス・クロルデンおよびシス・クロルデン、ヘキサクロルベンゼンを検体として用いたが、ほとんど影響は認められなかった。農薬である *p,p'*-DDT およびその関連化合物は副腎皮質においてステロイド合成に関与する 11 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の阻害剤として臨床に供されているメチラポン開発の発端となった化合物であり、本アッセイ系においても