

Figure 5 Effect of testosterone propionate injection on relative accessory sex organ weight in Hershberger assay

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

3. 哺乳動物培養細胞を用いた内分泌攪乱化学物質検出系の検討

研究者 塚田 俊彦 国立がんセンター研究所

研究要旨：哺乳動物培養細胞を利用した内分泌攪乱化学物質スクリーニングの試験法を用いて、種々の化学物質および自然界に存在する物質の生物作用を検討した。血管作動性腸管ペプチド遺伝子のプロモーターと PC12 細胞を用いた試験系では、ダイオキシンやオクチルフェノールの生物作用は検出できなかったが、緑茶抽出物に強い生物作用を認めた。

A. 研究目的

昨年度までの研究において、哺乳動物培養細胞 PC12 および Balb3T3 を利用して、膜受容体を介するシグナル伝達系を攪乱する物質のスクリーニングを目的とした検出系 PC12-VG 細胞および 3T3-NL 細胞を作製した。この検出系を用いて、内分泌攪乱化学物質の候補物質および自然界に存在する物質の生物作用を検討し、内分泌攪乱作用の検出を試みる。

B. 研究方法

ベータガラクトシダーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として、血管作動性腸管ペプチド (VIP) 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 PC12-VG、およびルシフェラーゼ遺伝子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 3T3-NL を用いて、2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)、2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF)、および octylphenol (OP) の生物作用を検討した。TCDD および TCDF は toluene を溶媒とし、OP は dimethyl sulfoxide (DMSO) を溶媒とするため、これら溶媒が PC12-VG 細胞

に与える効果とも比較した。さらに、同様の方法により緑茶（煎茶）、紅茶、およびタバコの水抽出物の生物作用を検討した。

ベータガラクトシダーゼ活性は、*o*-nitrophenyl- β , *D*-galactopyranoside を基質とする呈色反応により測定した。ルシフェラーゼ活性は、Promega 社の活性測定用キットを用いて定量した。

C. 研究結果

PC12-VG 細胞を TCDD、TCDF、OP およびこれらの溶媒 toluene、DMSO で 6 時間刺激した。TCDD と TCDF の溶媒 toluene (0.04 および 0.1 v/v %) のみの刺激によりベータガラクトシダーゼ活性が軽度上昇したが、TCDD および TCDF (5 ppb および 50 ppb) を加えても、溶媒単独による刺激と比べて有意なベータガラクトシダーゼ活性の上昇を認めなかった。一方、OP の溶媒 DMSO (1 v/v %) の単独刺激でも、OP (10 μ M および 100 μ M) による刺激でも、ベータガラクトシダーゼ誘導を認めなかった。また、3T3-NL 細胞を用いた検出系でも、ルシフェラーゼ誘導を認めなかった。

緑茶、紅茶およびタバコの水抽出物 (100 mg/ml、摂氏 95 度で 2 分間抽出) の生物作用を、同じく PC12-VG 細胞で検討した結果、

緑茶抽出物にベータガラクトシダーゼ誘導作用を認めた(図1)。このベータガラクトシダーゼ誘導作用は、緑茶抽出物を多量に用いることにより低下した。細胞形態の観察により、この誘導低下現象は多量の緑茶抽出物添加によって細胞死が起きたためであることが判明した。PC12-VG細胞における緑茶成分によるベータガラクトシダーゼ誘導作用の経時変化は、adenylate cyclase 活性化作用を有するアルカロイド forskolin とほぼ同一であった(図2)。

緑茶の水抽出物を Biogel P-30 カラムで分離すると、void volume 部分の分画と小分子量部分の分画の2峰性の活性分布を示した(図3)。小分子量部分に溶出するベータガラクトシダーゼ誘導活性は、本試験系においてほぼ最大刺激となる 10 μ M forskolin による誘導活性に匹敵する強い誘導作用を示した。

次に、これらの活性が、緑茶成分のうち細胞内 cAMP 上昇作用を有することが示唆されているカフェインによるものか否かを検討した。Biogel P-30 カラムで得られた、ベータガラクトシダーゼ誘導作用を有する分画に対するカフェインの効果をみた結果、大分子量および小分子量部分に溶出する分画の両者ともそのベータガラクトシダーゼ活性誘導作用がカフェインにより抑制された(図4)。また、緑茶成分のひとつであり、カフェインと類似作用を有するテオフィリンによっても同様に抑制された。

PC12細胞において、カフェインで抑制されるシグナルとして、アデノシン受容体を介するシグナルが知られているため、PC12-VG細胞をアデノシンで刺激し、これに対するカフェインの影響を検討した。その結果、

アデノシンにより高度にベータガラクトシダーゼ活性が誘導され、この誘導がカフェインによって抑制されることが明らかになった(図5)。緑茶にはカフェインが多量に含まれているため、Biogel P-30 カラムの小分子量分画(図3の分画17-19)にはカフェインが溶出している可能性がある。この分画をベータガラクトシダーゼ誘導活性を有する分画(図3の分画12-14)に加えると、その誘導活性が抑制された。すなわち、緑茶抽出物にはPC12-VG細胞のベータガラクトシダーゼ活性を誘導するアデノシン様作用を有する物質と、これを抑制するカフェイン・テオフィリンが含まれており、これらを分離することによってそれぞれの作用をより容易に検出できる可能性が示された。

D. 考察

PC12-VG細胞および3T3-NL細胞は、主に細胞内 cAMP の上昇を簡便に検出できる試験系であり、膜受容体を介するシグナル伝達のうち、cAMP をセカンドメッセンジャーとするシグナル伝達系の変調を来す物質の検出に利用できると考えられる。内分泌攪乱化学物質の多くが脂溶性物質であり、主に細胞の核内受容体に作用すると推定されるが、一方自然界にはアルカロイドなど膜受容体に作用する物質が多数存在しており、このようなアルカロイドの日常的な摂取も神経・内分泌系に多大な影響を及ぼしているものと推定できる。

本試験系では、PCDD、PCDF、OPの生物作用は検出されなかったが、緑茶成分の中に、PC12-VG細胞で検出できる生物作用を有する物質が存在することが明らかになった。この物質は少なくともカラムクロマ

トグラフィーにおいて、2種類の存在様式を呈し、アデノシンと類似の活性を示した。本物質がアデノシンそのものであるか否かは現時点では明らかではない。

以上より、本研究において特性を検討してきた PC12-VG 細胞を用いた検出系が、環境中の生物作用を有する物質を簡便に検出できることが明らかになった。3T3-NL 細胞は、ルシフェラーゼをレポーターとするためやや測定が煩雑であり、この点に関してさらなる改良が必要である。

E. 結論

培養細胞を用いた試験系 PC12-VG 細胞および 3T3-NL 細胞を作製し、内分泌攪乱化学物質検出への応用を試みた。内分泌攪乱化学物質の候補物質の生物作用を検出することはできなかったが、緑茶成分の中に、カフェインとは異なる物質の細胞刺激活性を検出できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mol Cell Endocrinol 162: 151-156. Early induction of the orphan nuclear receptor NOR-1 during cell death of the human breast

cancer cell line MCF-7. 2000. Takao Ohkubo, Naganari Ohkura, Kouji Maruyama, Kazuki Sasaki, Koichi Nagasaki, Hiroaki Hanzawa, Toshihiko Tsukada, Ken Yamaguchi.

Biomed Res 21: 263-268. Regulation of the NGFI-B family gene expression by steroid and related hormones in MCF-7 breast cancer cells. 2000. Tetsuji Hosono, Naganari Ohkura, Toshihiko Tsukada, Kouji Maruyama, Ken Yamaguchi.

Dev. Neurosci. 23: 17-24. The orphan nuclear receptor NOR-1 interacts with the homeobox containing protein Six3. 2001. Naganari Ohkura, Takao Ohkubo, Kouji Maruyama, Toshihiko Tsukada, Ken Yamaguchi.

2. 学会発表

第 59 回日本癌学会総会（広島）平成 12 年 10 月 4 日 オーフアンレセプター遺伝子異常と発がん：酵母による機能解析の試み
大倉永也、塚田俊彦、山口 建

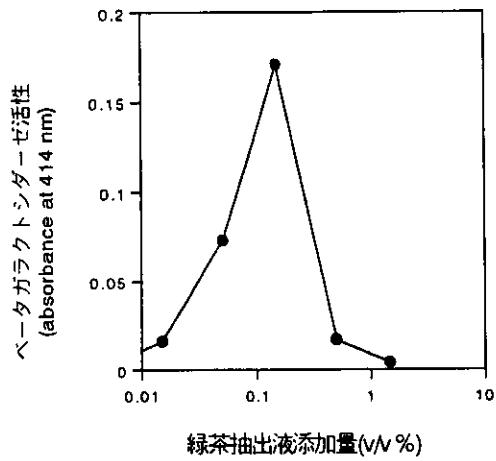


図1. PC12-VG 細胞における緑茶抽出液によるベータガラクトシダーゼ活性の誘導。

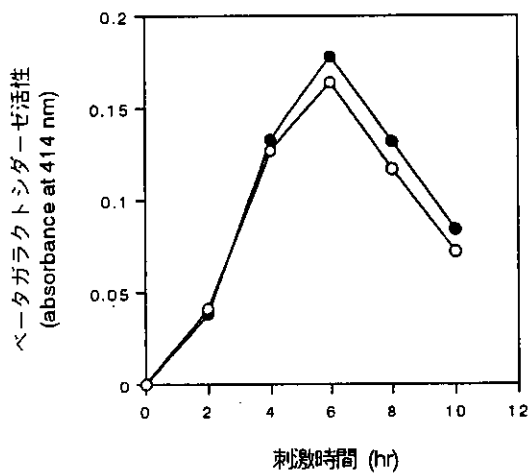


図2. PC12-VG 細胞における緑茶抽出液 (●) および 0.1 μ M forskolin (○) によるベータガラクトシダーゼ活性誘導の時間経過。

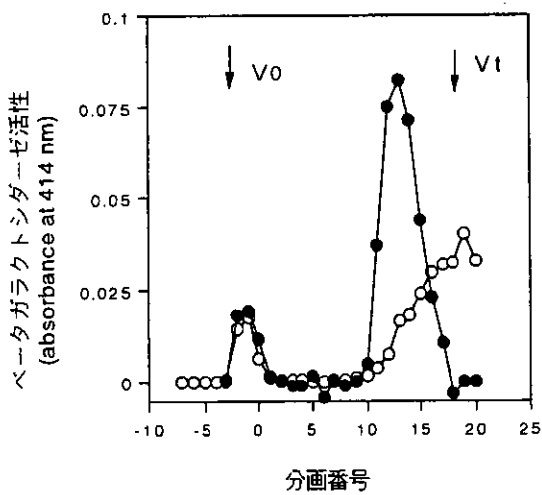


図3. 緑茶抽出物の Biogel P-30 分画のベータガラクトシダーゼ誘導活性 (●) および 260 nm 吸光度 (○)。

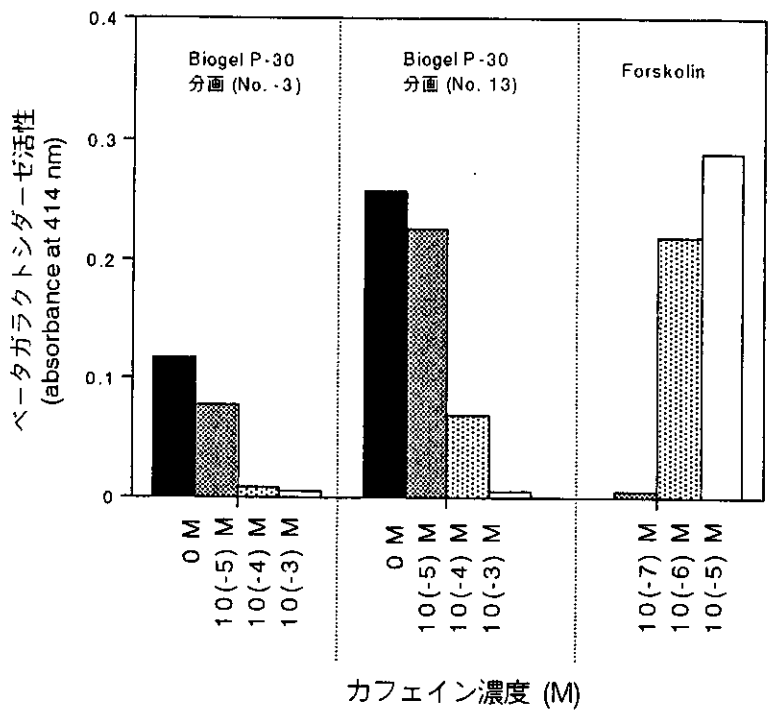


図4. Biogel P-30による緑茶抽出物分画 No. -3 および No. 13 (図3) のPC12-VG細胞におけるベータガラクトシダーゼ誘導活性に対するカフェインの影響。

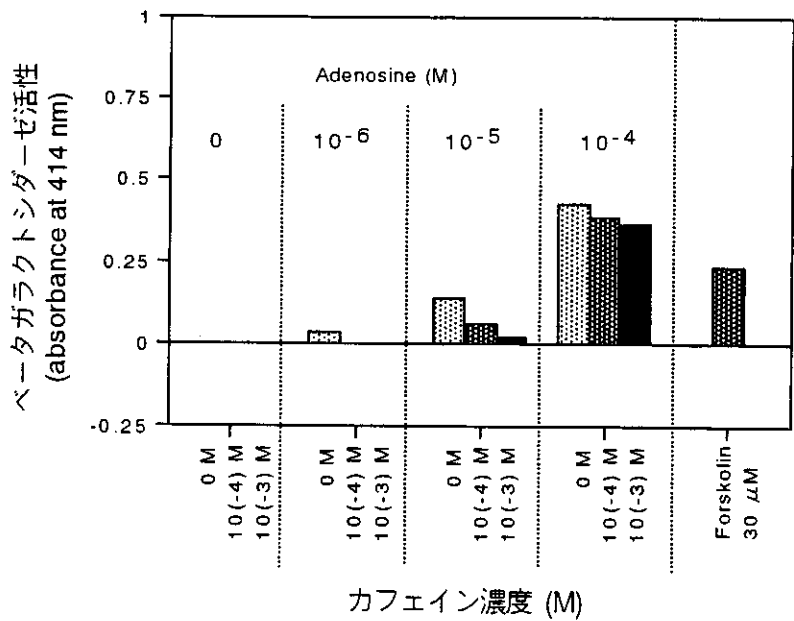


図5. アデノシンによるPC12-VG細胞におけるベータガラクトシダーゼ誘導活性とこれに対するカフェインの影響。

4. ホルモンレセプターを介する内分泌かく乱物質の検出系の検討

西原 力、西川淳一 大阪大学大学院・薬学研究科

研究要旨：われわれが開発した酵母 Two-Hybrid 試験を用いて、500 種類以上の物質についてエストロゲン活性を測定することができた。480 物質のデータを用いてロジスティック回帰分析法により構造活性相関を試みたところ、93%の正答率で予測できた。また、ER 系の代わりに p53 系を用いて評価に必要な活性阻害試験（コントロール系）の開発を試みたところ、ほぼ満足できる系が作成できた。

A. 研究目的

酵母 Two-Hybrid 試験により得た各種化学物質のデータを整理し、構造活性相関を検討する。また、評価のための活性阻害試験（コントロール系）を開発する。

B. 研究方法

- ① 酵母 Two-Hybrid 試験（ER α 系）による 500 種類以上の各種化学物質のエストロゲン様活性測定結果をまとめ、そのデータを基にロジスティック回帰分析法により構造活性相関を試みる。
- ② 酵母 Two-Hybrid System に ER 系の代わりに p53-SV40 largeT 系を組込むことにより酵母 Two-Hybrid System による活性阻害試験（コントロール系）の作成を試みる。

C. 研究結果

- ① 酵母 Two-Hybrid 試験（ER α 系）による 500 種類以上の各種化学物質のエストロゲン活性測定結果をまとめたところ、534 物質中 64 物質が陽性と評価された（表 1）。このうちの 480 物質を用いて、2 次元構造と分子量に基づく 34 種類の記述子についてバイナリ-データを作成し、ロジスティック回帰分析法により評価結果との構造活性相関を試みた。その結果、

変数増減法で陽性あるいは陰性に寄与する 10 種類の記述子が抽出され、予測正答率が 93%と高いモデル式が作成できた（表 2）。図 1 は予測に失敗した化合物であるが、ポジティブ構造とネガティブ構造の両者を含むもの及び水溶解度に問題のあるものが多いことがわかる。

- ② 酵母 Two-Hybrid System による活性阻害試験（コントロール系）の作成を試みたところ、アゴニストだけではなくアンタゴニスト等の評価に利用できる可能性の高い、安定的にガラクトシダーゼを発現する酵母株が得られた（図 2）。

D. 考察

データの整理には 10^{-7} M 17 β -エストラジオールの 10%の活性を示す被験物質の濃度を求め、その値が得られる場合は陽性、試験濃度範囲においてその値が求まらない場合を陰性と評価した。しかし、溶解度や酵母 Two-Hybrid 系に対する影響から高濃度まで評価できない物質も多くあり、予測に失敗した物質（図 1）のいくつかはその可能性がある。この点については、水溶解度や嵩高さに関する記述子の追加や類似化合物のデータの取得などにより、さらに改良の余地がある。

本法による 500 種類以上の化学物質については同一方法で試験評価された最初の例であり、均質なデータであることから、これらのデータは新しい手法での構造活性相関の検討にも有用である。

酵母 Two-Hybrid System において活性阻害を検出する試験（コントロール系）の作成はアゴニスト活性の評価以上にアンタゴニスト活性や複合効果を評価する場合に重要である。今後はその詳細な検出条件の設定や生物・環境試料へのフィージビリティの検討が必要である。

E. 結論

われわれが開発した酵母 Two-Hybrid 試験について検証と改良を行った。その結果、構造活性相関にも、また活性阻害試験（コントロール系）の詳細条件についても検討不十分の部分があるが、ほぼ達成できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Biochem. Biophys. Res. Commun. 277, 209-215 (2000). Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Nuclear Receptor, Similar to an Embryonic Benzoate Receptor BXR. J.Nishikawa, K. Saito, M. Sasaki, Y.Tomigahara, T. Nishihara
- 用水と排水, 42(9), 787-79 (2000). 酵母 Two-Hybrid 法を用いた処理場浸出水のエストロン様活性の測定. 川越保徳、福永 勲、西川淳一、西原 力
- J. Health Sci. 46(4), 282-298 (2000). Estrogenic Activities of 517 Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay. T.Nishihara, J. Nishikawa, T. Kanayama, F. Dakeyama, K. Saito, M. Imagawa, S. Takatori, Y. Kitagawa, S.Hori, .H.Utsumi
- 環境化学, 10(1), 65-72 (2000) 酵母 Two-Hybrid システムによるエストロゲン様活性測定法の簡便化に関する検討. 川越保徳、福永 勲、西川淳一、西原 力
- 環境化学, 10(1), 57-64 (2000). 酵母

Two-Hybrid System による簡便なエストロゲンアッセイ系の開発. 白石不二雄、白石寛明、西川淳一、西原 力、森田昌敏

著書

- 内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法、井上（監修）、1.3 酵母を用いたツートハイブリッド試験、p.20-27、シュプリンガー・フェアラーク東京、2000/9/19、西川淳一、西原 力
- 2. 学会発表（主なもの）
- in Vitro Biossay for Endocrine Disruptors. The ROC-Japanese Symposium on Endocrine Disrupting Chemicals, 台湾、2000/11/11、 T. Nishihara
- 酵母レポータージーン試験、第 6 回環境ホルモン学会講演会、東京、2000/10/24、西原 力
- 内分泌攪乱物質類の in Vitro バイオアッセイ、異分野交流フォーラム 165-170、ハケ岳、2000/3/19、西原 力
- ビタミン D と内分泌攪乱物質、ビタミン D ワークショップ、東京、2000/2/19、西原 力
- 内分泌攪乱物質研究の現状と課題、関西大学ハイテクリサーチセンターシンポジウム 2000/1/21、西原 力

G. 知的所有権の取得状況

なし

表1 480物質の分類結果

Factor	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9
Structure	non Benzene								
Number	148	65	14	19	120	19	13	21	51
Positive	1	38	10	4	53	0	0	2	12

Factor	X10	X11	X12	X13	X14	X15	X16	X17	X18
Structure									
Number	13	6	14	81	13	120	49	28	12
Positive	6	2	2	14	7	31	22	14	8

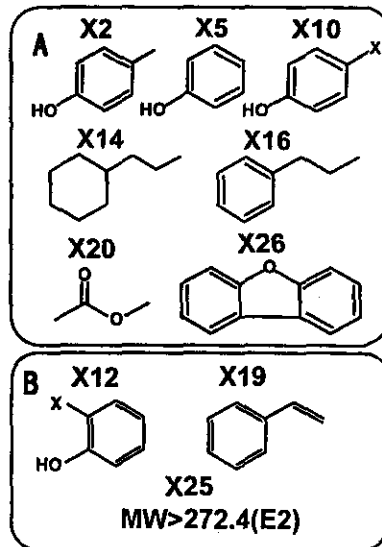
Factor	X19	X20	X21	X22	X23	X24	X25	X26	X27
Structure			s	P		MW≤108.2 (Creosol)	MW>272.4 (Estradiol)		
Number	28	65	54	27	34	44	154	13	8
Positive	5	8	1	0	2	1	10	7	3

Factor	X28	X29	X30	X31	X32	X33	X34
Structure			C-OH C-OH	C-OH	N-C	N	
Number	17	7	56	167	132	154	63
Positive	10	3	21	55	0	0	0

表2 ロジスティック回帰分析の結果

Variable Name	β	Wald	Probability Value
X2	2.34	10.29	0.001
X5	2.78	8.65	0.003
X10	3.15	9.00	0.003
X12	-2.12	4.38	0.036
X14	4.38	10.43	0.001
X16	1.15	3.68	0.055
X19	-1.01	1.99	0.159
X20	2.66	9.02	0.003
X25	-1.18	3.94	0.047
X26	2.92	10.47	0.001
Constant	-4.95	46.97	0.000

Input Data	Prediction Data		Correct Answer(%)
	0	1	
Y 0(Negative)	403	18	95.7
Y 1(Positive)	15	44	74.6
TOTAL			93.1



パネルA: ポジティブ変数

パネルB: ネガティブ変数

図1 予測失敗例

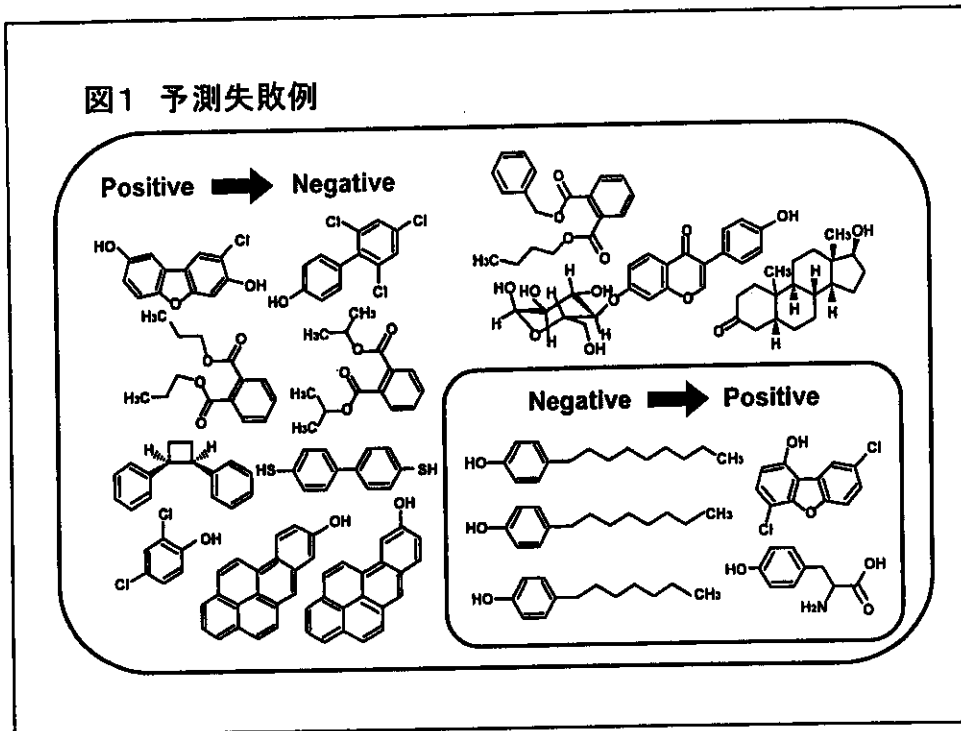
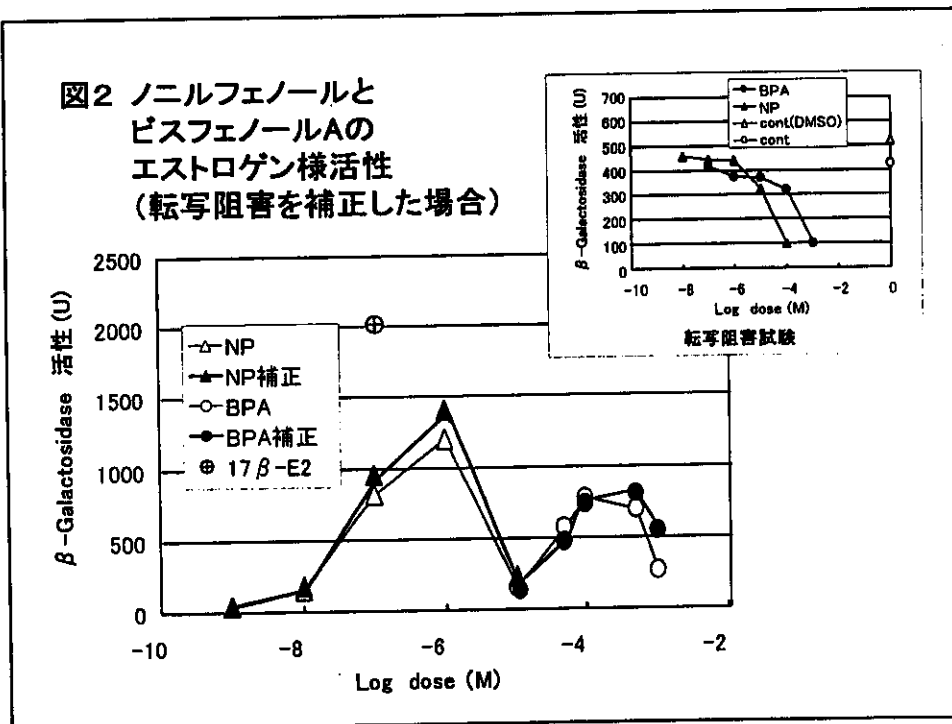


図2 ノニルフェノールとビスフェノールAのエストロゲン様活性 (転写阻害を補正した場合)



5. エストロゲン様化合物のコアクチベータペプチドを利用した高感度検出法
正宗行人 金沢大学薬学部分子細胞薬学講座

研究要旨：リガンドがエストロゲンレセプターへ結合するとコアクチベーターが LXXLL というアミノ酸配列を介して結合する。このことを利用した内分泌かく乱物質のアッセイ法の開発を試みた。本来のホルモンや結合力の強い植物エストロゲンといわれるゲニステインのような化合物は再現性、感度とも良く検出出来ることが分かったが、ビスフェノール A のような内分泌かく乱物質と言われている化合物の検出はあまりよくなかった。これらの物質のエストロゲンレセプターへの結合力が弱いと思われる。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質、いわゆる環境ホルモンはホルモン作用をかく乱し、生殖機能を阻害したり、悪性腫瘍を引き起こすなど生物に悪影響を及ぼす可能性がある。これらの物質の検出法として細胞の増殖や遺伝子発現系を用いる方法とホルモンレセプターへの結合を調べる方法の三通りが使われている。後者の方法では、ホルモンのレセプターへの結合を環境ホルモンが競合的に阻害するのを測定する方法が一般的である。競合実験はその方法からしてどうしても感度が悪い。我々は競合実験でない感度の高い *in vitro* の系が開発出来ないか検討した。

エストロゲンレセプター (ER) にリガンドが結合するとコアクチベーターが結合し遺伝子の転写を活性化する。このコアクチベーターの ER との結合は、LXXLL という配列を持ったペプチドによる。このような配列を持ったペプチドはコアクチベーター内に4個ほどあるがどれが結合に関与しているかは必ずしもはっきりしていない。最近の *in vitro* の研究でどの配列がよく結合するかが分かってきた。我々は ER とコアクチベーター内のペプチドとの結合を利用して環境ホルモンが検出出来ないか検討することにした。この方法は競合実験より感度が高いと考えた。

B. 研究方法

試薬：ペプチド：Biotin-KGHKKKLLQLLTCSDD (SAWADAY Technology 社に作成依頼)。

エストロゲンレセプター：ER α (Estrogen Receptor-alpha, Human recombinant (Panvera); ER β (Estrogen Receptor-beta, Human recombinant (Panvera) 宝酒造より購入)。

方法：N 末端をビオチンで標識したペプチドを合成し、これと ER との結合がリガンド存在下で特異的に起こるかどうかを調べる。検出方法はビオチンに特異的に結合するストレプトアビジンで標識したホースラッディッシュペルオキシダーゼを結合させ、TMB を加え発色させその吸光度を測定する。

アッセイ系の模式図を図1に示す。図2にレセプターの96穴プレートへの固定法を、図3にアッセイ法を記す。

C. 研究結果

結果：図4 (A) に ER α で調べた結果を、(B) に ER β で調べた結果を示す。繰り返し行った結果を見ると ER β の方が安定した結果を与える。この方法で、エストロゲン、DES のほか植物エストロゲンといわれるゲニステインやク

メステロールは再現性良く検出出来た。ビスフェノール A やノニールフェノールは検出されるが再現性はあまり良くなかった。また、ディーゼル排ガス粉じんの主成分であるベンゾピレンの3位の水酸化体が結合することが示唆できた。この物質は競合実験でERに結合することが示唆されており、また、酵母を使った遺伝子発現系でもエストロゲン様作用の確認されている物質である。エストロゲンのアンタゴニストであるタモキシフェンはこの検出系でエストロゲンによるペプチドの結合を阻害することが示唆され、この系でアンタゴニストも検出できることが示唆された。結合しないつもりで対照として用いたテストステロンがわずかに結合するようである。

D. 考察

この方法の特徴と問題点

特徴：1) 環境ホルモンを検出する *in vitro* 系はエストロゲンとERとの結合を競合的に阻害するかどうかでこれまで調べられてきている。我々の方法は結合を発色という方法で検出することが出来る。2) *in vitro* の系でアンタゴニストを検出する系が無かったがこの系を使うと検出可能となる。3) 96穴のプレートを使うので大量の試料を一度に調べることが出来る。4) 放射性同位元素を使用しないので普通の研究室で研究出来る。5) タンパク間の相互作用を調べる系として酵母を使った two hybrid system が広く用いられているが、我々の系を改良すれば *in vitro* でタンパク間の相互作用を調べることが出来るようになり、応用範囲は広い。

問題点：感度高く内分泌かく乱物質が検出出来ることを期待したが必ずしも目的は達成できなかった。この方法でのエストロゲンの検出感度は10 nMで酵

母を用いた系 (1 nM) より悪かった。また、競合実験も比活性の高い放射性エストロゲンを使うとこの法より感度がよい。これらの問題の解決には以下のことを試みる必要がある。1) 反応に使うペプチドをERともっと良く結合する配列にする。我々の使用したペプチドは最近の研究で必ずしも一番よい配列でないことが示唆されている。2) レセプターをプレートに結合させる際にN末端で結合するようにして、リガンド結合部位のあるC末端を邪魔しないようにする。3) プレートの各ウェルに結合させるレセプターの量を増やす。

その他の問題点1) 今のところER α と β の精製市販品を使わないとうまくいかない。我々は昆虫細胞でER α と β を産生させているが量が非常に少ないためと思われる。もっと大量に作らせる系を開発する必要がある。2) アッセイに一晚かかっている(0°C 16時間)がこれは条件検討でもっと短縮時出来ると思われる。

E. 研究発表：

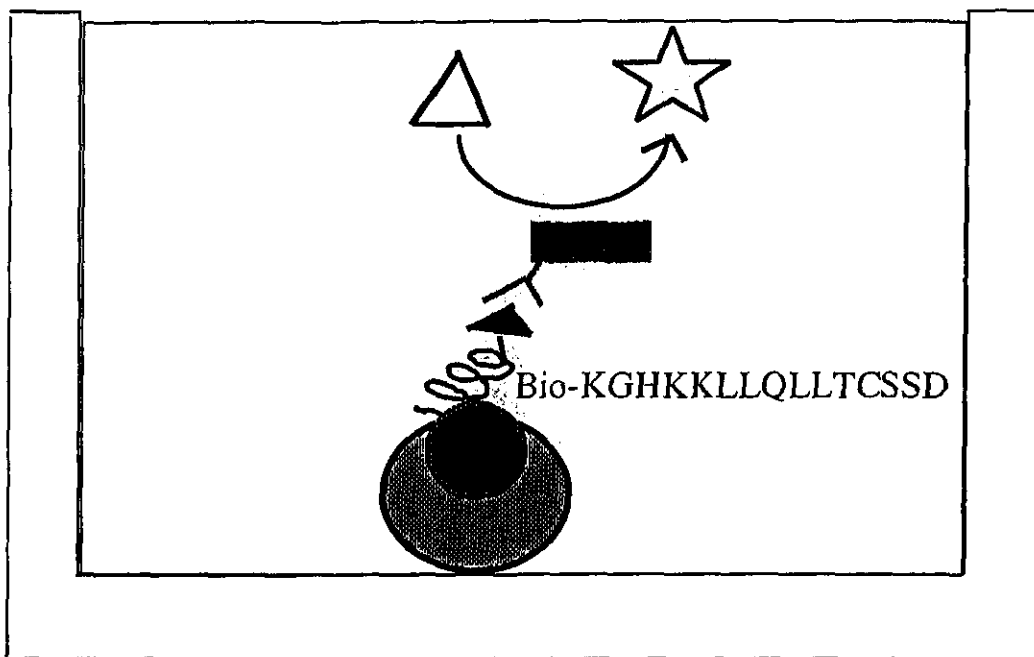
1. 論文発表

Keiko Morito, Toshiharu Hirose, Junei Kinjo, Tomoki Hirakawa, Masafumi Okawa, Toshihiro Nohara, Sumito Ogawa, Sotoshi Inoue, Masami Muramatsu and Yukito Masamune. Interaction of Phytoestrogens with Estrogen receptor α and β . Biol. Pharm. Bull. (in press).

2. 学会発表

広瀬敏治、森戸慶子、木津良一、早川和一、小川純人、村松正實、正宗行人、エストロゲンレセプターに結合する環境物質、日本薬学会第120年会(2000)。

正宗行人、森戸慶子、広瀬敏治、木津良一、早川和一、小川純人、村松正實、ベンゾ[a]ピレン水酸化体のエストロゲンレセプターへの結合- 内分泌攪乱物質の可能性-、第4回公開シンポジウム「未規制大気汚染物質の挙動と毒性- 自動車排気粉じんは環境ホルモンか?-」(2000)



- E2 (エストロゲン様化合物)
- ER
- 🌀 Biotin-LXXLL
- ▬ Streptoavidin HRP
- △ TMB

核内ホルモン受容体による転写は、受容体にリガンドが結合して次にコアクチベーター(ACTR)が結合して転写を活性化させる。

このコアクチベーター内LXXLL配列と受容体がりガンド依存的に結合することを利用してエストロゲン様化合物のスクリーニングを行う。

受容体を固定したプレートにE2(エストロゲン様化合物)とビオチン標識ペプチド(LXXLL)を加え反応させる。次にHRP標識ストレプトアビジンを加え、HRPの基質であるTMBを加え、発色によりエストロゲン様化合物の検出する。

図1 アッセイ法の原理

1 well あたり、レセプター (5 pmol) を 0.1M NaHCO₃(pH 8.4)
100 μl に懸濁し、プレートに加える。(4 °C、一晩放
置)

↓

TKEG buffer で 3 回洗浄

↓

1% BSA を 100 μl 加え、ブロッキング (4 °C、一晩放
置)

試薬

TKEG: 20mM Tris-HCl pH7.4, 100mM KCl, 0.25mM EDTA,
5% Glycerol, 0.5mM DTT, 0.05% Tween20

1% BSA: BSA を 20mM Tris-HCl pH7.4, 100mM KCl, 0.25mM
EDTA, 5% Glycerol で溶解し、1%にする。

図2 レセプターのプレートへの固定

検体 (Ethanol に溶解) とビオチン標識ペプチド (100 ng) を TKEGbuffer に
混合し 100 μ l ずつレセプター結合プレートに加え、4°C、一晩放置

↓

TKEG buffer で 3 回洗浄

↓

TKEG buffer で 4000 倍希釈した HRP 標識ストレプトアビジンを 100 μ l
加え、室温、1 時間放置

↓

TKEG buffer で 3 回洗浄

↓

発色液 (TMB) を 100 μ l 加え、室温、10~30 分放置

↓

1N 硫酸を 50 μ l 加えて反応停止

↓

測定 (OD) 450nm

試薬

HRP 標識ストレプトアビジン (Life Technologies)

3,3',5,5'-TetraMethylBenzidine (TMB) (SIGMA)

図3 アッセイ手順

ER α

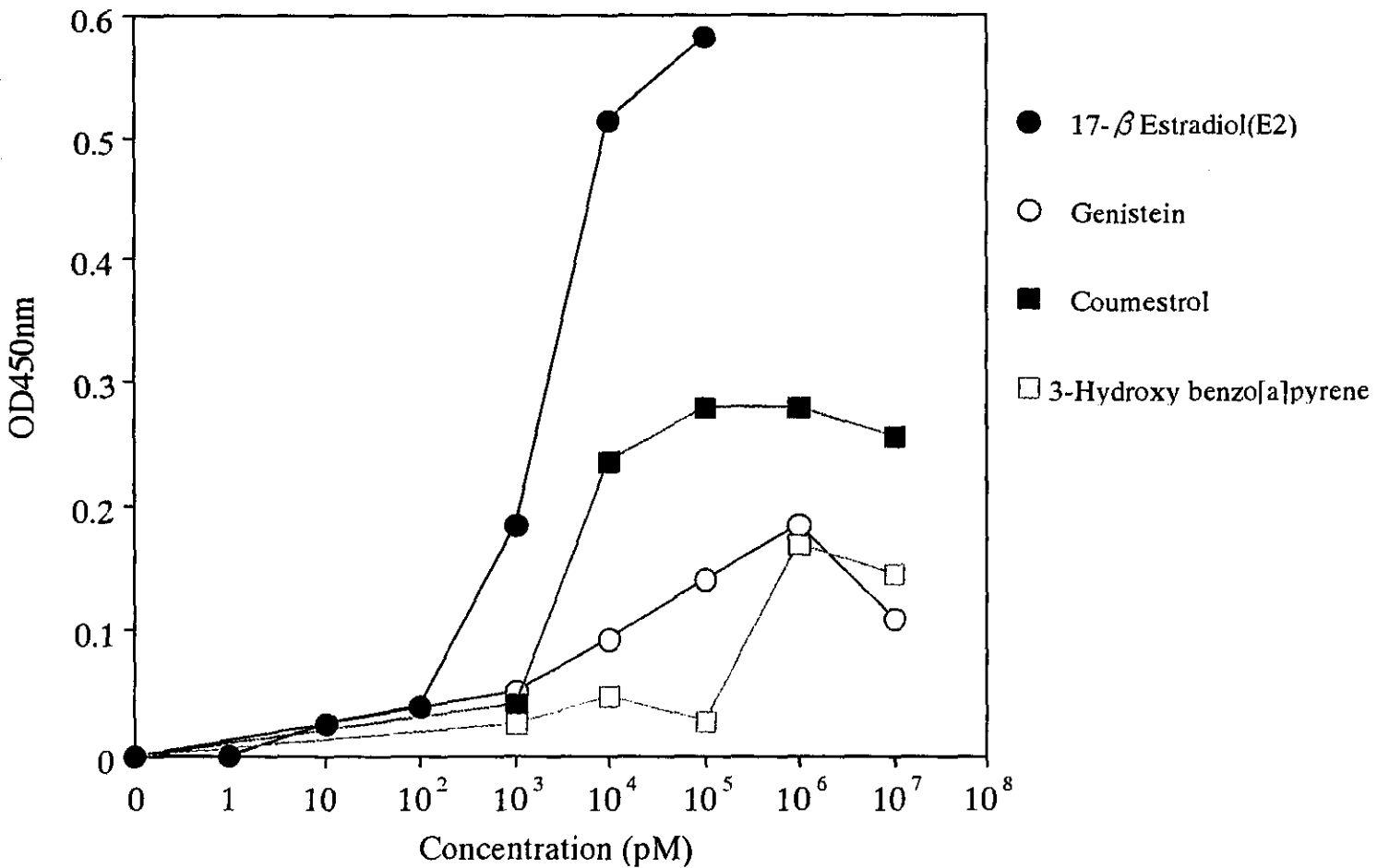
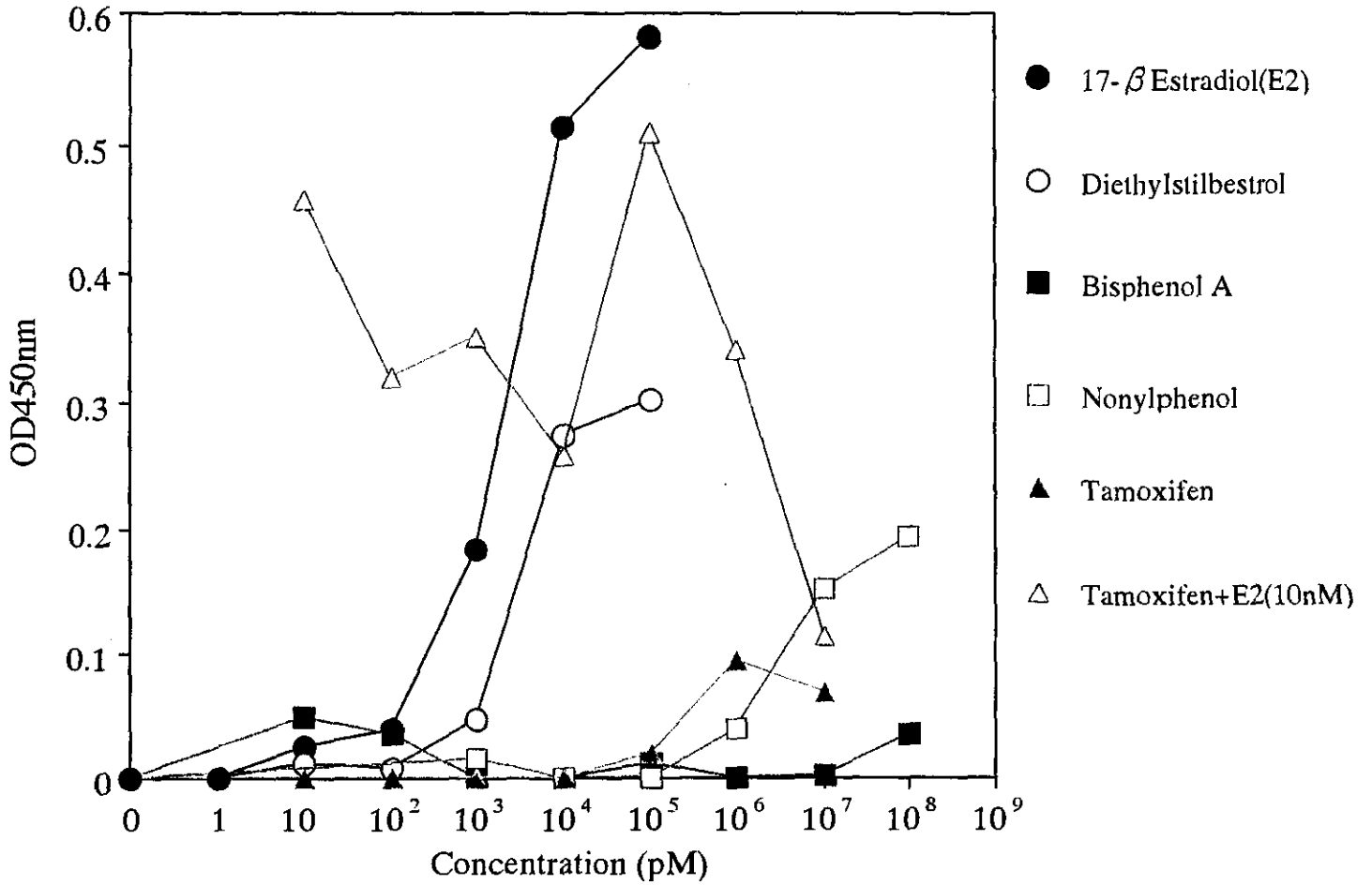


図 4(A) ER α とのタンパク質間相互作用

ER β

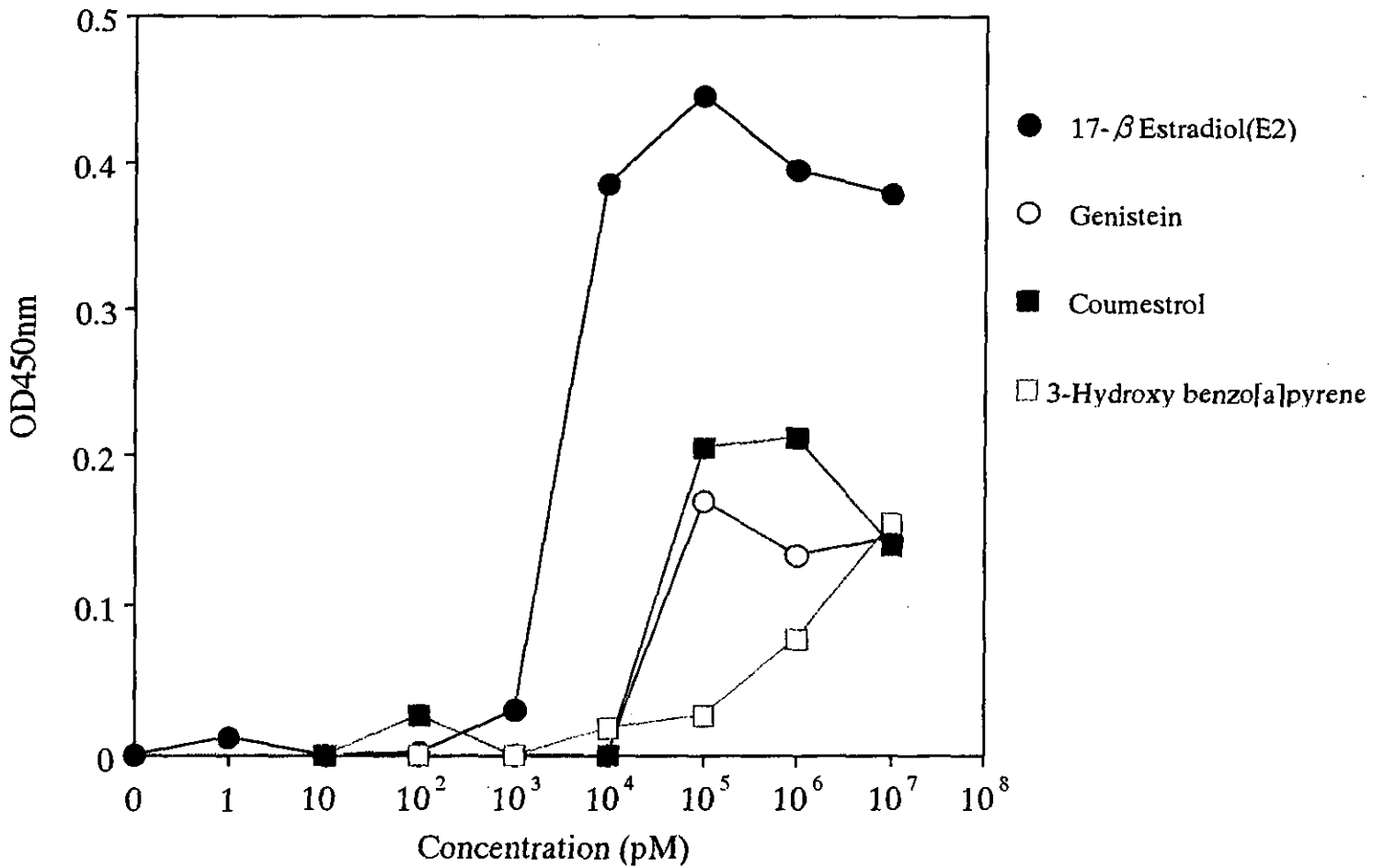
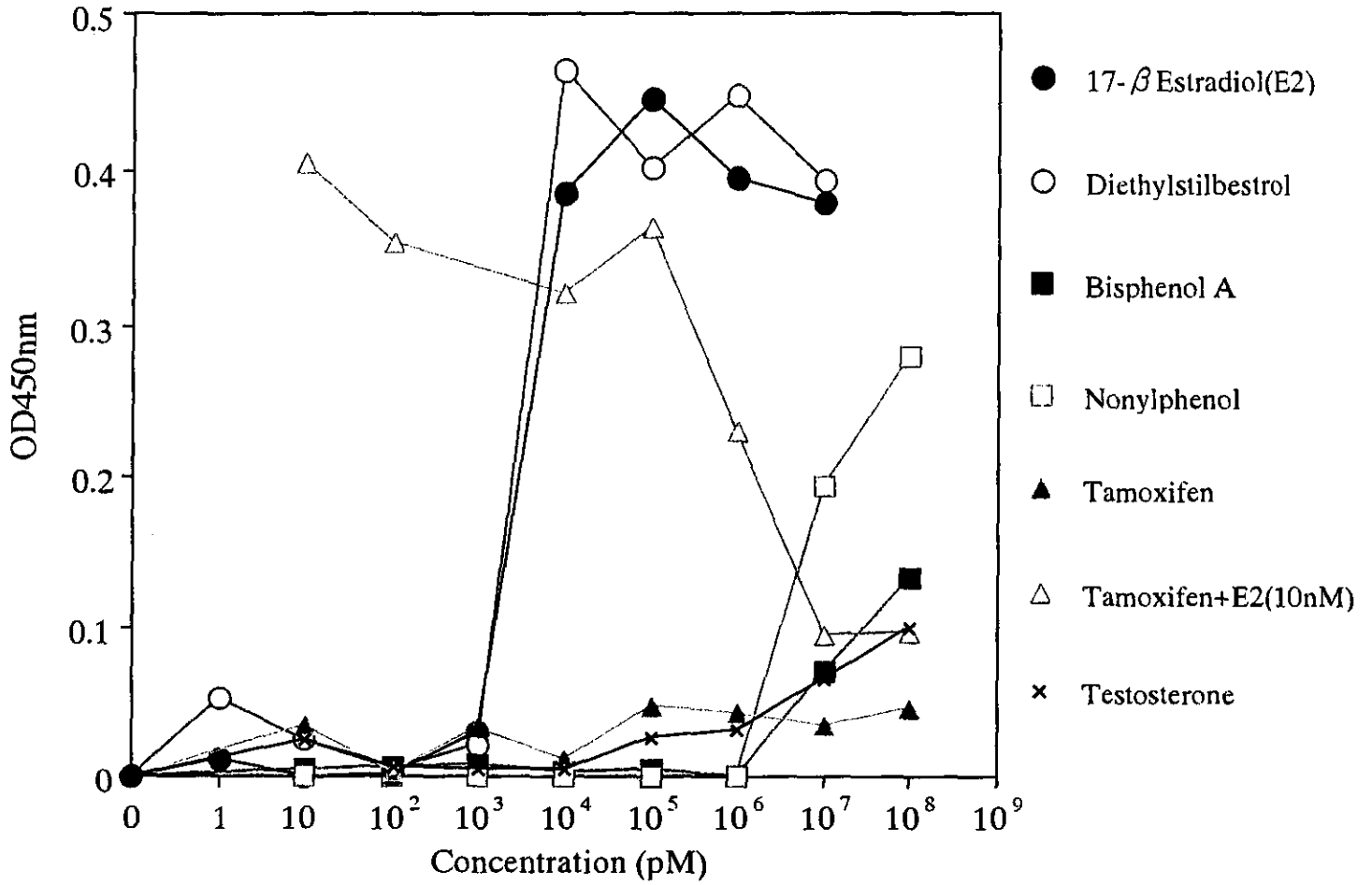


図 4(B) ER β とのタンパク質間相互作用

6. 内分泌かく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

研究者 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨：ビスフェノールA (BPA) の o -カテコールへの変換活性はヒト肝ミクロソームでは、認められなかった。 o -フェニルフェノール (OPP) は、MCF-7 細胞による E-screen アッセイで、エストロゲン様作用を示した。ヒト肝チトクロム P450 (CYP) 1A2 により OPP から生じる細胞毒性物質フェニルヒドロキノン (PHQ) は OPP と同程度のエストロゲン様作用を示した。

A. 研究目的

一つのフェニル環に2つ以上の水酸基を o -位または p -位に有する物質は、酸素ラジカルを発生させることにより DNA 鎖に損傷を与える。このようなキノン体への変換は、しばしば哺乳動物の肝等でみられる。これは、いわゆる代謝的活性化反応の一種であり、フェノール性水酸基を有する物質に暴露された細胞の遺伝子上に変異を誘発したり、細胞毒性を増強したりする。このような反応による構造変換後、エストロゲン様作用がどう変化するかを調べることは、ヒト体内で代謝物を生じる場合は特に重要である。今年度は、BPA、OPP をモデル化合物として酸化的代謝とエストロゲン様作用の修飾との関連を調べる実験研究を行った。

B. 研究方法

BPA の o -カテコール体である 5-ヒドロキシ-BPA を 50mmol のフェノールとカテコールを 10 ml のアセトン中で4時間加熱することにより合成した。合成された 5-ヒドロキシ-BPA を HPLC で精製し、標準品として用いた。ヒト肝ミクロソームまたは 9000 x g 上清 (S9) を酵素原とし、生成した代謝物を HPLC で分析した。ヒト肝ミクロソームまたは S9 を NADPH 存在下 BPA (1 mM) または OPP (500 μ M) とインキュベートし、 o -キノン体、 p -キノン体の生成を HPLC で測定した。酸化

的代謝物の生成に関与する CYP 分子種について調べるため第一化学薬品の CYP 分子種の発現系を用いて代謝反応を測定すると共に、ヒト肝ミクロソーム画分とヒト CYP 分子種に対する特異的阻害剤を用いて生成代謝物量の変化を調べた。

C. 研究結果

1. ヒト肝ミクロソーム (4 mg タンパク)、S9 (20 mg タンパク) を酵素液として用いた時、BPA からは 5-ヒドロキシ-BPA とクロマトグラフィー上の挙動を同一にする代謝物の生成は認められなかった。
2. ヒト肝ミクロソームを用い、500 μ M の OPP が PHQ に変換される活性を検出しその比活性は 2.54 ± 0.48 nmol/min/mg protein であった。本活性は 5-500 μ M の OPP で認められ、基質濃度 5 μ M では、主にヒト CYP1A2 により代謝されることが明かとなった (図1)。雄 SD および F344 ラットでの主代謝酵素が CYP2C11 であったこと (図2) や、ラット CYP1A2 の誘導剤では本酵素活性は全く誘導されなかったこと (図3) と明らかに異なっており、本反応に関与する酵素分子種には顕著な種差がみられた。
3. ヒト乳癌由来 MCF-7 細胞を用いた E-

screen アッセイにより、OPP のエストロゲン様作用に由来すると思われる細胞増殖誘導作用の最大値は BPA のそれとほぼ同等か若干高値であった。一方、最大細胞増殖誘導作用を与える OPP 濃度は BPA の場合に比べ、約 300 倍程度高かった (図 4)。本アッセイ系において最大細胞増殖作用は OPP が高く、最大細胞増殖に要する濃度は BPA が低く、両者が一致しないので、OPP と BPA のエストロゲン様作用の強弱を本アッセイの結果を以て論ずるのは難しいと思われた。BPA ではヒト肝ミクロソームによる水酸化体の生成は認められなかったが、OPP の p-水酸化はヒト肝 CYP1A2 によって触媒され、細胞毒性の強い代謝物である PHQ が生成した (表 1)。ヒトにおける代謝活性化の結果として、内分泌攪乱作用にどのような変化がおこるのかについて、E-screen アッセイ法を用いて OPP と PHQ のエストロゲン様作用を比較したところ、OPP と PHQ の間にはあまり明瞭なエストロゲン様作用の差異は認められず酸素ラジカルの生成と関連した細胞毒性が PHQ の方が明らかに強いこととは異なっていた。

D. 考察

1. BPA は西洋ワサビパーオキシダーゼによる代謝を受け、o-カテコールである 5-ヒドロキシ-BPA を生じることが Atkinson らにより 1995 年に報告されている。カテコール体は酸素ラジカルの発生により、細胞毒性物質である可能性が考えられたので、ヒト肝細胞

下分画を用いて本代謝反応が触媒されるか否かを調べたが、本反応によると考えられる 5-ヒドロキシ-BPA の生成は認められなかった。本反応は植物起源の酵素により触媒されることが報告されていたが、ヒトや実験動物ではこのような活性が非常に低いものと考えられた。

2. かんきつ類の防カビ剤として用いられる OPP はエストロゲン様作用のアッセイ系の一つである E-screen によって BPA と同等の作用が認められた。OPP は実験動物肝で代謝活性化を受け、細胞毒性の強い代謝物 PHQ に変換されることが知られているので、OPP と PHQ のエストロゲン様作用の差異を E-screen アッセイ系で調べたところ両物質のエストロゲン様活性はほぼ同等であった。酸素ラジカルが関連する殺細胞作用と、エストロゲン作用とは直接的な関連は少ないことが示唆された。また、殺細胞作用より、E-screen 系で観察したエストロゲン様作用の方がより低濃度で生じた。実験動物を用いたエストロゲン様作用のアッセイ系を用いて、今回得られた知見と同様、エストロゲン様作用が組織の細胞変性等の毒性より低容量で認められるかどうかを調べることは重要であろうと考えられる。

E. 結論

BPA ではヒトや実験動物の肝により触媒される酸化代謝の活性は非常に低かった。OPP についてはヒトや実験動物の肝ミクロソームに、p-水酸化反応を触媒する活性が認められ、生じる酸化代謝活性化物 PHQ は細