

#### B-4. H295R 細胞からミトコンドリアおよびマイクロソームの調製

dibutyryl cAMP (1mM) と EGF (10ng/mL) で 24 hr 処理した H295R 細胞(1.0~2.1 g wet weight)は冷却した PBS で良く洗浄後, 3 mL の 0.25 M sucrose (5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT and 0.1 mM PMSF を含む) (緩衝液 A) 中で Dounce tissue grinder (Wheaton)を用いてホモゲナイズした. 定法に従い 9,000×g, 20 min 遠心分離してミトコンドリア画分を得た. ミトコンドリア画分は更に 70 mM sucrose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> および 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.21 M mannitol で洗浄後, 同様に遠心分離し, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF および 20% glycerol を含む同緩衝液に懸濁した. 上清には 8mM CaCl<sub>2</sub> を加えて氷冷下 1hr のインキュベーションの後, 10,000×g, 10 min の遠心分離を行い, ミクロソーム画分を得た. 洗浄後ミクロソーム画分はそれぞれの画分は 20% glycerol を含む緩衝液 A に懸濁した. ミトコンドリア画分は更に酵素活性測定のために超音波処理を行った (10 cycles of 15 sec 50 W, Model VC50T, Sonic & Materials Inc.). それぞれの画分は 5.0 ~5.6 mg/mL の蛋白質濃度に調整し, -70°C で保存した.

#### B-5. 酵素活性の測定

P450scc (cholesterol 側鎖切断酵素) 活性および P45011β (11β-ヒドロキシラーゼ) 活性は各々 [4-<sup>14</sup>C] cholesterol (500 Bq/1 nmol/2μL ethanol) および [4-<sup>14</sup>C] deoxycorticosterone (500 Bq/1

nmol/2 μL ethanol) を基質としてミトコンドリア, glucose-6-phosphate (25 mM), glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.1 unit), NADP<sup>+</sup> (0.5 mM), および adrenodoxin (2 μM) の存在下 37°C, 2 hr インキュベーションすることにより測定した. 3β-HSD II (3β-hydroxysteroid dehydrogenase type II) 活性は [4-<sup>14</sup>C]

dehydroepiandrosterone (500 Bq/1 nmol/2 μL ethanol) を基質として, 0.2ml の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中でミクロソーム, NAD<sup>+</sup> (0.5 mM) の存在下 37 °C, 1 hr インキュベーションすることにより測定した.

P450c17 (17α-hydroxylase/C<sub>17,20</sub>-lyase) および P450c21 (21-hydroxylase) 活性は [4-<sup>14</sup>C] progesterone (500 Bq/1 nmol/2 μL ethanol) を基質として, 0.2 mL の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中でミクロソーム,

glucose-6-phosphate (25 mM), glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.1 unit), NADP<sup>+</sup> (0.5 mM) の存在下 37°C, 1 hr インキュベーションすることにより測定した. インキュベーション終了後ステロイドを 0.6 mL の ethyl acetate /

2,2,4-trimethylpentane (1/1, v/v) で抽出して乾固し, TLC (Kieselgel 60F254, Merck) により基質と反応生成物を分離した. 展開溶媒は benzene/acetone (8/1, v/v), benzene/ethyl acetate (2/1, v/v), benzene/acetone (7/3, v/v) を使用した. ラジオオートグラフィで放射能標識ステロイドを検出した後,

それぞれのスポットの放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定した。P450scc, P45011 $\beta$  および 3 $\beta$ -HSD II 活性は pregnenolone, corticosterone および androstenedione の生成量として, P450c17 活性は 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone と 11-deoxycortisol 生成量の総和として, 及び P450c21 活性は 11-deoxycortisol と 11-deoxycorticosterone 生成量の総和としてそれぞれ表した。

#### B-6. 有意差の検定

有意差の検定は Student's *t*-test を用いた。

### C 研究結果

#### C-1. H295R 細胞の cortisol 産生に及ぼす植物エストロゲン類曝露の影響

H295R 細胞の cortisol 産生に及ぼす植物エストロゲンである各種フラボン及びイソフラボン曝露の影響を種々濃度で検討した。実験に使用したフラボン及びイソフラボンの構造を Fig. 1 に示した。その結果, Fig. 2 に示すように 12.5  $\mu$ M の濃度の曝露において 6-hydroxyflavone (6-HF), apigenin, daidzein, genistein, biochanin A 及び formononetin 等が有意な cortisol 産生の阻害を示した。しかし他のフラボノイドには阻害効果は認められなかった。さらに, 25.0  $\mu$ M の曝露ではこれらのフラボノイドに加え biochanin A も有意な cortisol 産生の阻害を示した (結果は示していない)。各種濃度における 6-HF, apigenin, daidzein,

genistein, 及び formononetin の阻害効果を Fig. 3 に示したが, これらのフラボノイドによる阻害効果は曝露濃度に依存していた。しかし, daidzein 及び genistein の 7-グルコシドである daidzin 及び genistin は H295R の cortisol 産生を阻害しなかった (Fig. 2, 3)。

#### C-2. 植物エストロゲンの作用機序

##### C-2-1. daidzein の cortisol 産生の阻害に及ぼす ICI 182, 780 の影響

H295R 細胞の cortisol 産生阻害が認められた植物エストロゲンの作用機序を明らかにする一端として, この阻害作用がエストロゲンレセプターを介して引き起こされるかどうかを, daidzein を用いて検討した。その結果, daidzein の曝露 (5  $\mu$ g/mL) により引き起こされる cortisol 産生の阻害はエストロゲンレセプターアンタゴニストである ICI 182, 780 の添加 (50 および 500 nM) により解除されなかった (Fig. 4)。従って daidzein の曝露により引き起こされる cortisol 産生の阻害作用はエストロゲンレセプターを介した作用ではないことを認めた。

##### C-2-2. ステロイド生合成に關与する酵素に及ぼす植物エストロゲンの影響

H295R 細胞の cortisol 産生を阻害した 6-HF, apigenin, daidzein, genistein, biochanin A 及び formononetin の作用機序を明らかにするため P450scc, 3 $\beta$ -HSD II, P450c17, P450c21 および P45011 $\beta$  等のステロイド合成に關与する酵素に対する阻害作用を検討した (Table I)。これらのフラ

ポノイドは  $3\beta$ -HSD II のみならず 12.5 および 25  $\mu\text{M}$  の濃度で P450c21 活性も阻害した。さらに 6-FH は 25  $\mu\text{M}$  の濃度で P45011 $\beta$  活性も阻害した。一方, H295R 細胞の cortisol 産生の阻害に影響を及ぼさなかった daidzin はいずれのステロイド合成酵素も阻害しなかった。

### C-2-3. daidzein の $3\beta$ -HSD II および P450c21 活性阻害に関する反応速度論的解析

H295R 細胞の cortisol 産生を阻害した daidzein 等の植物エストロゲンの作用機序の一つとして, cortisol 産生に関与する酵素である  $3\beta$ -HSD II および P450c21 活性を阻害すること, 特に  $3\beta$ -HSD II 活性を強力に阻害することが明らかになった。そこで, daidzein を用いて,  $3\beta$ -HSD II および P450c21 活性の阻害について反応速度論的解析を行った。daidzein による  $3\beta$ -HSD II 活性阻害の Lineweaver-Burk のプロットを Fig. 5A に示した。その結果,  $3\beta$ -HSD II 活性は daidzein により競合的に阻害され, その  $K_i$  は 2.9  $\mu\text{M}$  であった。なお, この  $3\beta$ -HSD II 活性測定条件下において基質として使用した androstendione に対する  $K_m$  は 6.6  $\mu\text{M}$ ,  $V_{max}$  は 328 pmol/min/mg protein であった。一方, daidzein による P450c21 活性阻害の Lineweaver-Burk のプロットを Fig. 5B に示した。その結果, daidzein により P450c21 活性は競合的に阻害され, その  $K_i$  は 33.3  $\mu\text{M}$  であった。なお, この P450c21 活性測定条件下において基質として使用した progesterone に対する  $K_m$  は 2.8  $\mu\text{M}$ ,  $V_{max}$  は 28.93 pmol/min/mg

protein であった。

### D. 考察

内分泌攪乱化学物質のうち植物由来のエストロゲン活性物質は植物エストロゲンと呼ばれている。大豆や大豆関連製品には植物エストロゲンの一種, イソフラボンが多く含まれている。従来植物エストロゲンはヒトの健康に良い影響を与えると考えられている。特に疫学調査等により, 大豆製品を多く摂取する日本やアジアでホルモン依存性の癌である乳癌や前立腺癌発生率が低いと言われている。各種植物エストロゲンのエストロゲンレセプターに対する結合やそのエストロゲン活性に関して多数の報告がある<sup>2-8)</sup>。しかし, これらの植物エストロゲンのステロイドホルモン合成に及ぼす影響に関してはほとんど報告がない。本研究では, 特に大豆や大豆関連製品に多量に含まれるイソフラボンを中心に, 食品として摂取される可能性のある植物成分であるフラボノイドを取りあげ, ステロイドホルモン合成に及ぼす影響を検討した。その結果, 6-HF, apigenin, daidzein, genistein, biochanin A 及び formononetin 等のフラボン及びイソフラボンが cortisol 産生を阻害することを明らかにした。次に, daidzein により引き起こされる cortisol 産生の阻害がエストロゲンレセプターのアンタゴニストである ICI 182,780 により解除されないことから, daidzein の阻害作用はエストロゲンレセプターを介する作用ではないことを明らかにした。第3に, cortisol 産生を阻害する数種

のフラボノイドの cortisol 産生に關与する P450<sub>scc</sub>, P450<sub>c17</sub>, P450<sub>c21</sub>, P450<sub>11β</sub>及び 3β-HSD II 活性に及ぼす影響を検討し, 植物エストロゲンは主に 3β-HSD II を特異的かつ強力に阻害することを明らかにした. さらに阻害程度は弱いけれども植物エストロゲンの中には P450<sub>c21</sub>, P450<sub>c17</sub> および P450<sub>11β</sub> 活性を阻害するものがあることを明らかにした.

Keung *et al.* は daidzein が 3β-ヒドロキシステロイドの酸化も触媒するアルコール脱水素  $\gamma$ -アイソザイム ( $\gamma$ -ADH) を阻害する<sup>9)</sup> ことを見だし, これを基にウシ副腎の 3β-HSD に及ぼすイソフラボンの阻害効果を広範囲にわたり検討している<sup>10)</sup>. また, 最近 Bail *et al.*<sup>11)</sup> はヒト胎盤ミクロソームの aromatase, 3β-HSD 及び 17β-HSD 活性に及ぼすフラボノイドの影響を検討しており, ある種のイソフラボンが 3β-HSD を選択的に阻害することを報告している.

3β-HSD は  $\Delta^5$ -3β-ヒドロキシステロイド (pregnenolone あるいは DHEA) を対応する  $\Delta^4$ -3β-ケトステロイド (progesterone あるいは androsten-dione) に変換させる酵素である. 見かけ上異なる反応である酸化と異性化反応を触媒する. ヒトにおいては胎盤や皮膚に発現している type I と副腎, 精巣及び卵巣に特異的に発現している type II が存在することが知られている<sup>12-14)</sup>. 従って, 3β-HSD II はコルチコイドのみならずミネラルコルチコイド, ゲスタゲン, アンドロゲン及びエスト

ロゲンの生合成における重要な酵素でもある. 従って, 植物エストロゲンの内在性のステロイド産生に及ぼす影響とヒトへの健康影響との関連をさらに詳細に検討されることが望まれる.

#### E. 結論

植物エストロゲンであるフラボノイドの内在性ステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) に及ぼす影響を検討する目的で, 実験モデルとしてヒト副腎由来の H295R 細胞を用い, コルチゾール産生に及ぼすフラボン及びイソフラボンの阻害効果を検討した. その結果 6-hydroxyflavo, 4'-hydroxy-flavone, apigenin, daidzein, genistein, biochanin A 及び formononetin が H295R 細胞の産生するコルチゾール産生を阻害した. さらに産生阻害の作用機序を検討した結果, これら植物エストロゲンのコルチゾール産生阻害作用はエストロゲンレセプターを介する作用ではなく, コルチゾール合成を触媒する酵素のうち, 特にヒドロキシステロイド脱水素である 3β-HSD タイプ II 及びモノオキシゲナーゼである P450<sub>c21</sub> の阻害であることが明らかになった. 特に植物エストロゲンは 3β-HSD タイプ II を強力に阻害することが明らかとなった.

#### F. 参考文献

- 1) Kimura, T., *et al.*, Methods in Enzymology Vol. L II, Academic Press, New York, 1978, pp. 132-142.
- 2) Markiewicz, L., *et al.*, *J. Steroid*

- Biochem. Mol. Biol.* 45, 399-405 (1993).
- 3) Miksicek, R. J., *et al.*, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 49, 153-160 (1994).
- 4) Zava, D. T., *et al.*, *Nutr. Cancer* 27, 31-40 (1997).
- 5) Collins, B.M., *et al.*, *Steroids* 62, 365-372 (1997).
- 6) Zava, D.T., *et al.*, *Environ. Health Perspect.*, 105, 637-645 (1997).
- 7) Kuiper, G. G., *et al.*, *Endocrinology* 139 4252-4263 (1998).
- 8) Le-Bail, J.C., *et al.*, *Cancer Lett.* 130 209-216 (1998).
- 9) Keung, W. M., *Alcohol Clin. Exp. Res.* 17, 1254-1260 (1993).
- 10) Wong C. K., *et al.*, *J. Steroid Biochem. Molec. Biology.* 71, 191-202 (1999).
- 11) Le Bail, J-C., *et al.*, *Life Sci.* 66, 1281-1291 (2000).
- 12) Luu-The, V., *et al.*, *Molec. Endocrinol.* 3, 1310-1312 (1989).
- 13) Rhéaume, E., *et al.*, *Molec. Endocrinol.* 5, 1147-1157 (1991).
- 14) Labrie, F., *et al.*, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 41, 421-435 (1992).

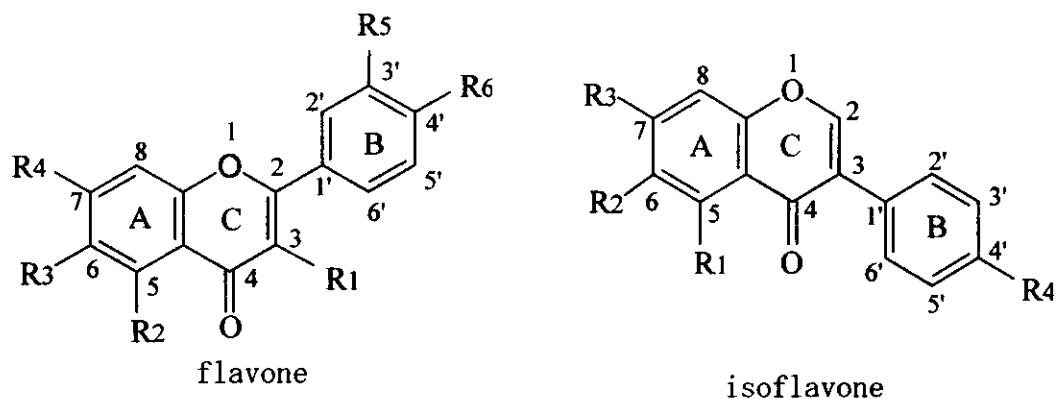
## G. 研究業績

### 学会発表

- 1) ヒト副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール分泌に及ぼす内分泌攪乱化学物

の影響: 中陳静男, 篠田 聡, 豊島 聡, 中澤裕之 (星薬大・薬), 大野修司 (日大・薬), 牧野恒久 (東海大・医), 第 73 回日本生化学大会, 2000 年, 10 月, 横浜

2) ヒト副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール分泌に及ぼすフタル酸エステル, アルキルフェノール及び植物エストロゲンの阻害効果: 中陳静男, 篠田 聡, 豊島 聡, 中澤裕之 (星薬大・薬), 大野修司 (日大・薬), 牧野恒久 (東海大・医), 第 3 回日本内分泌学会研究発表会, 2000 年, 12 月, 横浜



$R_2=OH$ ;  $R_1, R_3, R_4, R_5, R_6=H$

5-hydroxyflavone

$R_1, R_2, R_4, R_5, R_6=H$ ;  $R_3=OH$

6-hydroxyflavone

$R_1, R_2, R_4, R_5, R_6=H$ ;  $R_3=OCH_3$

6-methoxyflavone

$R_1, R_2, R_3, R_5, R_6=H$ ;  $R_4=OH$

7-hydroxyflavone

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5=H$ ;  $R_6=OH$

4'-hydroxyflavone

$R_2, R_4, R_6=OH$ ;  $R_1, R_3, R_5=H$

apigenin

$R_1, R_2, R_4, R_5, R_6=OH$ ;  $R_3=H$

quercetin

$R_1, R_2=H$ ;  $R_3, R_4=OH$

daidzein

$R_1, R_2=H, R_3=OGlc$ ;  $R_4=OH$

daidzin

$R_1, R_3, R_4=OH$ ;  $R_2=H$

genistein

$R_1, R_4=OH$ ;  $R_2=H$ ;  $R_3=OGlc$

genistin

$R_1, R_3=OH$ ;  $R_2=H$ ;  $R_4=OCH_3$

biochanin A

$R_1, R_2=H, R_3=OH, R_4=OCH_3$

formonetin

Fig. 1. Substances: structures of the flavonoids used are shown.

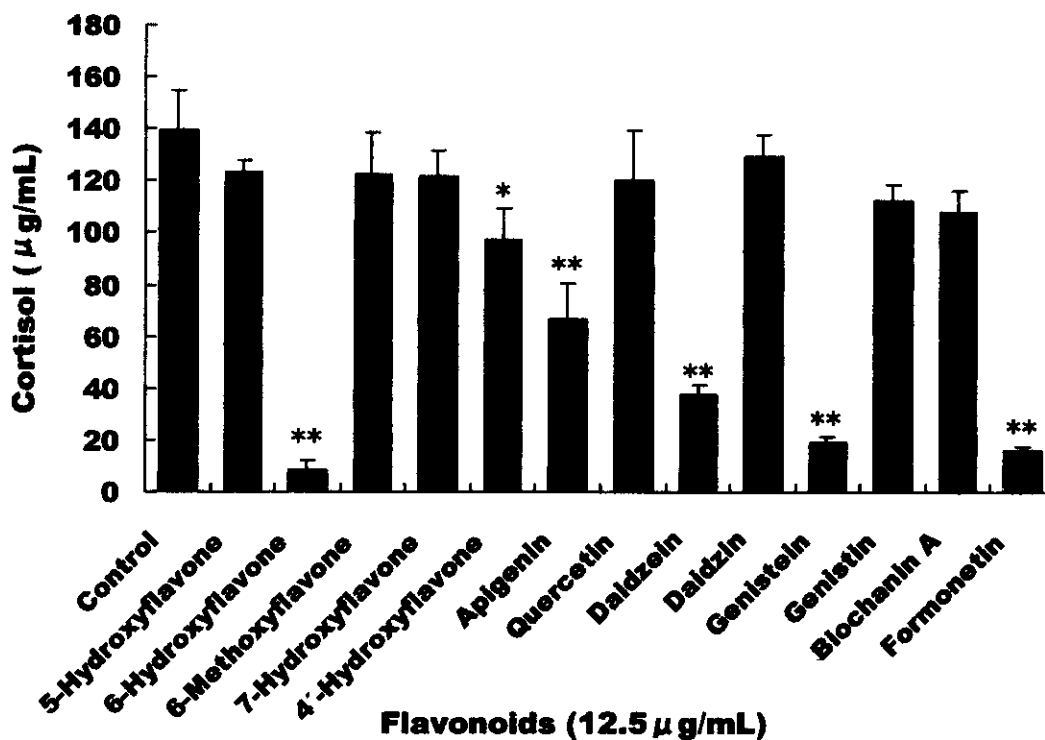


Fig. 2. The effect of exposure to phytoestrogen flavonoids on dibutyryl cAMP-induced cortisol secretion by H295R cells. Abbreviations: apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone), quercetin (3, 3',4',5, 7-pentahydroxyflavone), daidzein (4',7-dihydroxyisoflavone), daidzin (4',7-dihydroxyisoflavone-7-glucoside), genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone), genistin (4',5,7-trihydroxyisoflavone-7-glucoside), biochanin A (5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone), formonnetin (7-hydroxy-4'-methoxyisoflavone) Each column represents the mean with S.D. (n = 3-6). Asterisks denote significant difference from control value; \*p< 0.05 and \*\*p< 0.01.

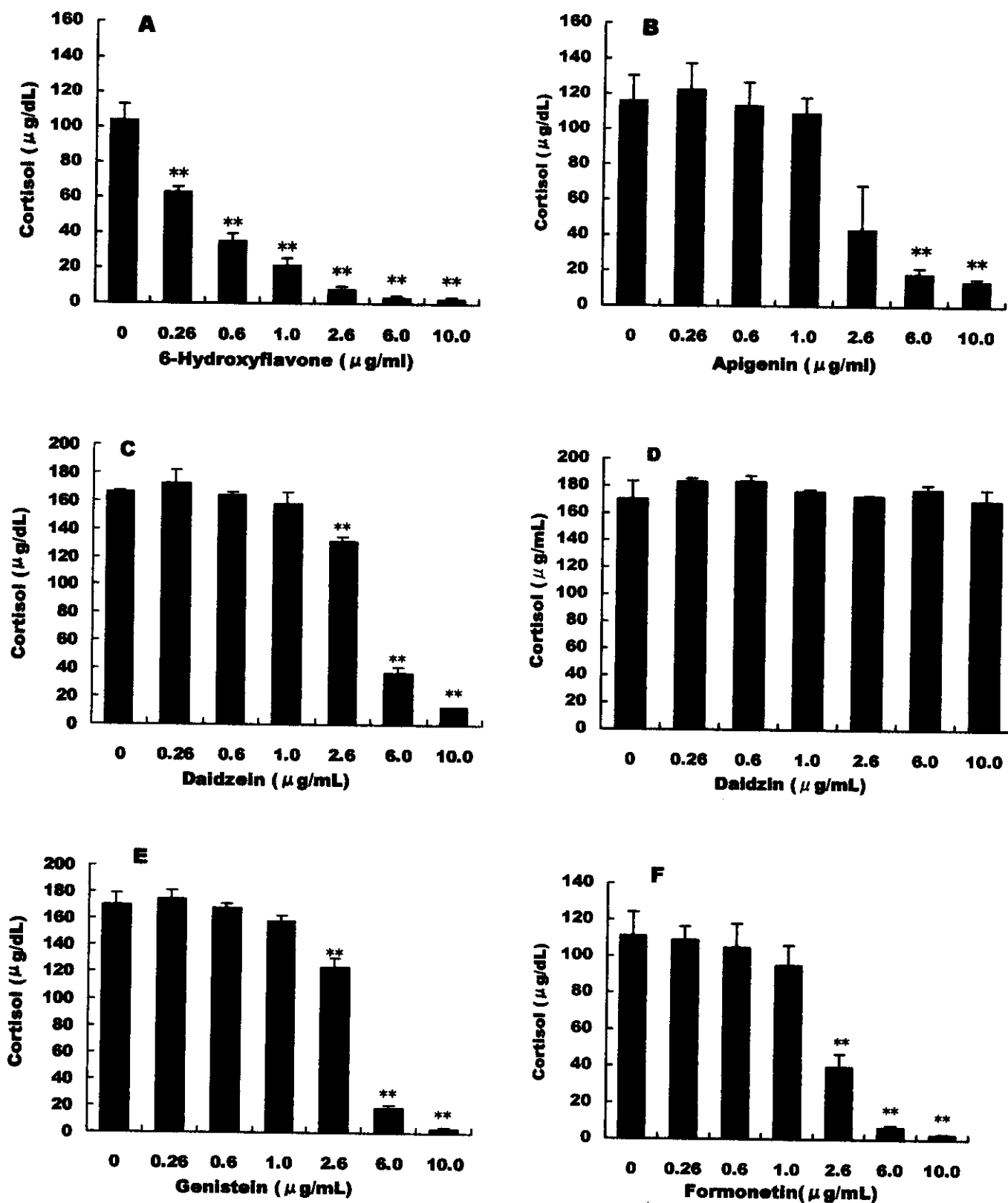


Fig. 3. The effects of increasing concentrations of 6-hydroxyflavone (A), apigenin (B), daidzein (C), daidzin (D), genistein (E) and formonnetin (F) on cortisol secretion from the adrenocortical H295R cells induced by dibutyryl cAMP. Each column represents the mean with S. D. (n = 3). Asterisks denote significant difference from the control (0 µg/ml) value which was treated without chemicals; \* p < 0.05, \*\*p < 0.01.



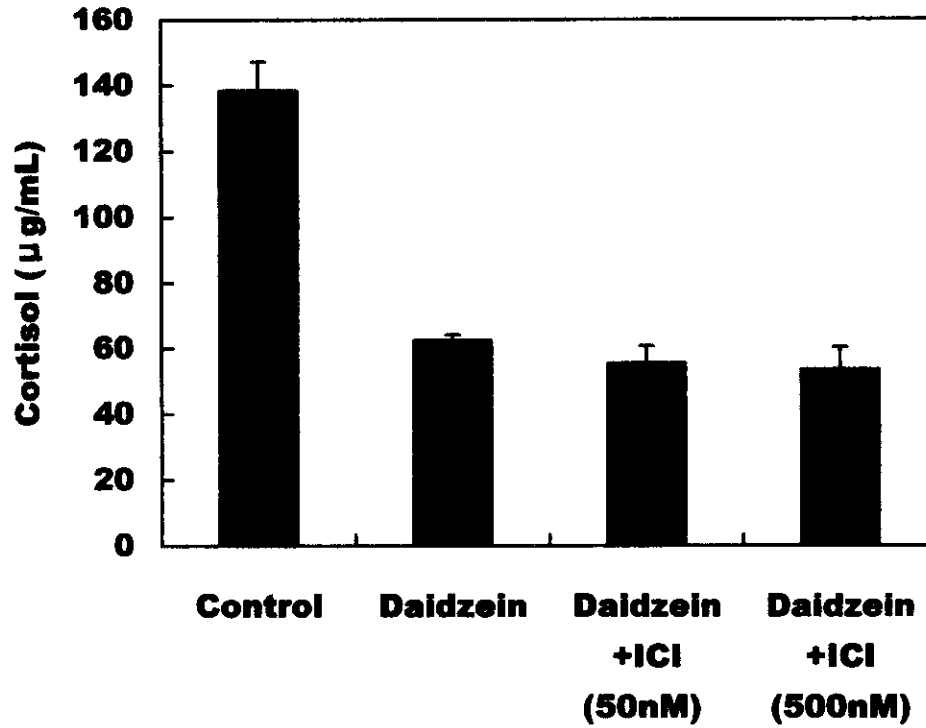


Fig. 4. The effect of the estrogen receptor antagonist ICI 182,780 on the reduction of H295R cells cortisol production by exposure of daidzein (5µg/mL). Each column represents the mean with S.D. (n = 3). Asterisks denote significant difference from the control (untreated); \*\*p < 0.01.

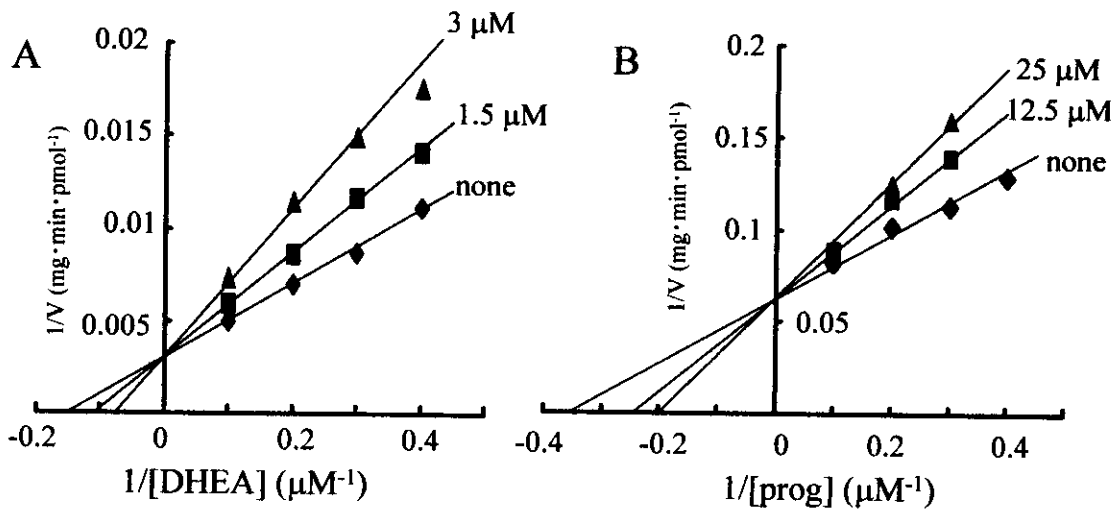


Fig. 5. The inhibitory effect of daidzein on the enzyme activities of 3β-HSD II and P450c21. (A): Lineweaver-Burk plots of 3β-HSD II activity are shown in the absence and in the presence of various concentration of daidzein (◆: none addition, ■: 1.5 μM, ▲: 3.0 μM). (B): Lineweaver-Burk plots of P450c21 are shown in the absence and in the presence of various concentration of daidzein (◆: none addition, ■: 12.5 μM, ▲: 25 μM). Each point represents the mean of three determinations.

Table I Inhibition of enzyme activities of steroid lyase, hydroxylases and dehydrogenase involved in cortisol synthesis

Addition ( $\mu\text{M}$ )	Enzyme activity (% of control)					
	P450scc	3 $\beta$ -HSD-II	P450c17	P450c21	P45011 $\beta$	
None	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	(3.1)	40.8 $\pm$ 1.7 **	----	----	----	----
Daidzein	81.6 $\pm$ 4.8*	17.4 $\pm$ 1.5 **	95.2 $\pm$ 13.5	63.3 $\pm$ 4.4**	159.2 $\pm$ 16.4	
	(25.0)	101.6 $\pm$ 16.1	9.0 $\pm$ 0.6 **	101.3 $\pm$ 16.1	57.3 $\pm$ 2.4**	143.2 $\pm$ 13.1
Daidzin	115.6 $\pm$ 20.1	94.9 $\pm$ 1.4	112.6 $\pm$ 9.0	117.9 $\pm$ 19.1	110.3 $\pm$ 3.6	
	(25.0)	122.2 $\pm$ 15.1	93.1 $\pm$ 1.2	111.8 $\pm$ 6.2	105.7 $\pm$ 10.4	115.5 $\pm$ 7.4
	(1.0)	----	47.3 $\pm$ 0.6**	----	----	----
Genistein	134.7 $\pm$ 11.4	7.9 $\pm$ 0.0 **	109.6 $\pm$ 2.4	82.7 $\pm$ 9.2**	123.1 $\pm$ 22.3	
	(25.0)	110.0 $\pm$ 6.9	4.6 $\pm$ 0.7 **	95.0 $\pm$ 2.6	51.2 $\pm$ 1.9**	94.3 $\pm$ 17.5
	(1.0)	---	33.2 $\pm$ 1.0**	---	---	---
Biochanin A	78.1 $\pm$ 12.7	5.1 $\pm$ 0.1**	73.7 $\pm$ 1.1	71.3 $\pm$ 2.3*	99.5 $\pm$ 10.0	
	(25.0)	72.0 $\pm$ 1.0	2.5 $\pm$ 0**	71.6 $\pm$ 4.9	69.5 $\pm$ 3.2*	96.1 $\pm$ 23.7
	(1.0)	---	75.7 $\pm$ 2.5**	---	---	---
Formononetin	116.4 $\pm$ 8.2	18.1 $\pm$ 0.1**	88.7 $\pm$ 6.5	87.9 $\pm$ 5.6	92.3 $\pm$ 2.6	
	(25.0)	115.4 $\pm$ 8.8	9.4 $\pm$ 0.2**	103.4 $\pm$ 2.8	86.0 $\pm$ 1.3*	93.0 $\pm$ 1.5

	(1.0)	---	57.3 ± 0.7**	---	---	---
6-hydroxyflavone	(12.5)	153.5 ± 10.2	8.5 ± 0.4**	85.3 ± 2.0	45.3 ± 2.3**	77.4 ± 2.6**
	(25.0)	121.4 ± 6.3	4.2 ± 0.1**	68.3 ± 1.8*	34.7 ± 1.1**	61.5 ± 3.5**

Enzyme activities are expressed relative to control experiment. Values are mean ± S.E.M. (n=3). Specific enzyme activity of a typical preparation of mitochondria and microsomal enzyme from H295R cells was 9.4 ± 1.1 pmol/min/mg protein for P450scc, 103.2 ± 7.7 pmol/min/mg protein for 3β-HSD II, 100.5 ± 6.0 pmol/min/mg protein P450c17, 24.4 ± 1.5 pmol/min/mg protein for P450c21 and 28.8 ± 2.6 pmol/min/mg protein for P45011β. Methods for determination of enzyme activities are given in "Materials and Methods." Statistical analysis was carried out using the actual values. Asterisks denote significant difference from control (none addition); \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

母乳試料中のポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)濃度

化合物	母乳中濃度 (ng/g 脂肪)										母乳中濃度 (ng/g 脂肪)	
	東海大20	東海大21	東海大22	東海大25	東海大27	東海大30	東海大38	東海大43	東海大45	東海大39	計	東海大39
3臭素化体	#28	0.093	0.298	0.278	0.031	0.136	0.176	0.046	0.232	0.121	#28	37.680
4臭素化体	#37	ND	0.042	0.016	0.005	0.017	0.021	0.007	0.033	ND	#37	1.100
	#75	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	#75	0.490
5臭素化体	#71	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	#71	ND
	#47	0.568	0.366	2.152	0.298	0.518	0.816	0.204	2.247	0.578	#47	186.49
	#66	0.016	ND	0.016	0.009	0.011	0.056	0.010	0.040	ND	#66	3.240
	#77	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	#77	0.110
6臭素化体	#100	0.174	0.106	0.281	0.080	0.100	0.205	0.047	0.377	0.098	#100	27.230
	#119	0.009	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	#119	ND
7臭素化体	#99	0.158	0.118	0.390	0.137	0.111	0.235	0.056	0.447	0.113	#99	21.130
	#85	0.013	ND	0.025	0.008	ND	ND	ND	0.046	ND	#85	2.050
	#154	0.032	0.024	0.035	0.020	0.019	0.059	0.011	0.056	0.017	#154	1.330
計	#153	0.432	0.308	0.273	0.174	0.355	0.257	0.160	0.396	0.140	#153	10.220
	#138	0.006	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	#138	0.220
	#183	0.090	0.086	0.042	0.040	0.059	0.078	0.031	0.076	0.033	#183	0.080
計	#190	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	#190	ND
計	1.59	1.35	3.51	0.80	1.33	1.90	0.57	3.95	1.10	291.37	計	291.37

母乳中 PBDEs濃度 (ng/g 脂肪, 東海大39を除いた9検体について)

平均 1.79

最大 3.95

最小 0.57

\*東海大39のPBDEs濃度 (ng/g 脂肪) : 291.37

他の9検体と比較して「東海大39」のPBDEs濃度は約2桁高い

◎質問事項  
職歴

家電・OA製品, 自動車, プラスチック, 廃棄物等と関連がある職業か?

食事の嗜好等

魚介類(クジラ等を含む)の摂取量は多いか?

妊娠期間中に何か健康食品（肝油，魚油等）や薬剤を摂取したか？  
居住地近辺の環境条件等  
樹脂工場，自動車工場，家電工場，廃棄物処理場等が近隣にあるか？  
母体および子供の病歴，医学的所見  
喫煙歴，その他

平成 12 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（さい帯血等）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

エストロゲン受容体  $\alpha$ 、 $\beta$  を介した内分泌攪乱物質の作用機序についての研究

主任研究者 牧野恒久 東海大学  
研究協力者 和泉俊一郎 東海大学  
岩崎克彦 東海大学  
村野孝代 東海大学

研究要旨

近年、化学物質の持つ内分泌攪乱作用が問題となっており、その内分泌攪乱作用については、近年様々な評価法が確立しつつある。しかし作用機序の解明は充分になされていない。今回は、代表的な評価法として、エストロゲンレセプター発現細胞を用いた E-screen assay（エストロゲン依存性細胞増殖効果の評価）、及び、エストロゲンレセプター  $\alpha$ 、 $\beta$  における Binding assay を行い、内分泌攪乱物質のエストロゲンレセプターを介した作用機序について検討した。その結果、全ての被検物質にエストロゲン様細胞増殖効果が認められた。またエストロゲン受容体における  $17\beta$ -estradiol との Competition binding assay では、各々の物質特有の競合結合を認め、それぞれのエストロゲン様作用の発現においては、介するレセプターが必ずしも均一ではないことが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、内分泌攪乱作用を持つ化学物質が多数報告されているが、それら内分泌攪乱物質の作用機序についてはまだ十分な解明がなされていない。代表的な内分泌攪乱作用のスクリーニングの一つにエストロゲンレセプター発現細胞を用いた E-screen assay があるが、これまでのヒト乳腺細胞由来の MCF-7 に加え、今回は、子宮内膜由来細胞である、HHUA を用い同様の検討を行い、組織間における内分泌攪乱物質のエストロゲン作用の違いにつ

いて検討した。2種の細胞間におけるエストロゲン様細胞増殖作用の違いに関して、今回はエストロゲンレセプター  $\alpha$ 、 $\beta$ 、それぞれにおける Binding assay を行い、レセプターサブタイプの関与について検討した。さらにこれらの検討から、現在報告されている代表的な内分泌攪乱物質について、それらレセプターを介した作用から作用機序別に分類することも今回の目的とした。

## B. 研究方法

### B.1 被検物質

Diethyl- hexil phthalate

Butyl- benzil phthalate

Bisphenol-A

p-Nonylphenol

Dizein

Genistein

### B.2.1 E-screen / WST-1 assay assay

96 穴プレートに細胞 (MCF-7、HHUA) 懸濁液を 5000cells/50  $\mu$ l/well ずつ播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub>で、24 時間培養する。前培養後、フェノールレッドフリー、10%Charcoal-dextran 処理 FCS 含有 Medium に交換し、濃度調整した被検物質を加えさらに 5 日間同条件で、培養する。培養後 WST-1 assay (Cell Counting Kit:和光純薬) にて細胞増殖を評価 (生細胞中で活性をもつミトコンドリア脱水素酵素の基質である WST-1 を各 Well に 10  $\mu$ l ずつ加え 3 時間 37°Cにて incubation 後 OD<sub>450nm</sub> を測定) する。

### B.2.2 E-screen / Idu assay

細胞増殖効果を Thymidine analogue である Idu (5-Iodo-2-deoxyuridine )

の取り込み (DNA・Idu Labeling and Detection Kit: TAKARA) により、各 well の細胞増殖効果について評価した。96 穴プレートに細胞 (MCF-7、HHUA) 懸濁液を 5000cells/50  $\mu$ l/well ずつ播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub>で、24 時間培養する。前培養後、フェノールレッドフリー、10%Charcoal-dextran 処理 FCS 含有 Medium に交換し、濃度調整した被検物質を加えさらに 24 時間 incubation

する。各 well の medium 中に Idu を加え (終濃度 10  $\mu$ M)、24 時間 incubation し、細胞中の DNA に Idu を取り込ませる。PBS 洗浄、blocking (細胞の固定と DNA の一本鎖化) 後、抗 Idu 抗体 (5  $\mu$ g/ml、37°C、30min)、ウサギ抗マウス IgG・POD 標識抗体 (37°C、30min) を反応させる。発色試薬 (TMBZ) を加え、呈色反応後 OD<sub>450nm</sub> を測定する。

### B.3 エストロゲン受容体 binding assay

エストロゲン受容体 (ER) の既知サブタイプ  $\alpha$ 、 $\beta$  における 17  $\beta$ -estradiol との competition binding assay (TOYOBO) を施行して、各化学物質のサブタイプ親和性を検討した。

receptor 蛋白溶液に、17  $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) と濃度調整した測定サンプルを加え競合反応 (37°C、60min) させる。反応溶液を抗 E<sub>2</sub> 抗体固相プレートに移し、HRP 標識 E<sub>2</sub> を加え遊離 E<sub>2</sub> と競合反応させる。反応後プレートを PBS にて洗浄し、発色基質を加え呈色反応後、OD<sub>450nm</sub> を測定する。

## C. 研究結果

MCF-7 は、E<sub>2</sub> の添加により、10<sup>-9</sup>~10<sup>-8</sup>mol/l で、濃度依存性の細胞増殖能の亢進が認められた (図 1-2)。一方子宮内膜由来細胞である HHUA でも 10<sup>-7</sup>~10<sup>-11</sup>mol/l で同様の細胞増殖が認められた。今回の被検物質は MCF-7 ではすでにエストロゲン様の細胞増殖効果が認められていたが、今回 HHUA 細胞でも同様のアッセイを行ったところ MCF-7 と同様の効果が認められた (図 1~7-1)。



一方エストロゲン受容体との Binding assay では、E-screen assay で反応がみられた全ての物質で程度の差はあるものの、エストロゲン受容体との競合結合が認められた。しかし物質によっては、エストロゲン受容体  $\alpha$ 、 $\beta$  間で、Binding に差が見られた。(図 1 ~ 7-2)

#### D. 考察

今回  $E_2$  の添加により、子宮内膜由来 HHUA 細胞でも、MCF-7 同様の細胞増殖効果を認め、内分泌攪乱物質の子宮内膜への作用として、HHUA 細胞を用いた評価が可能であることが明らかとなった。E-screen assay では、MCF-7 と HHUA との間に、反応の程度や濃度において、若干の相違を認めたが、今後は、両細胞のエストロゲン受容体 サブタイプの発現量の違いについても定量的な評価が必要であると考えられる。

またエストロゲン受容体との Binding assay では、レセプターとの反応を認めた濃度と E-screen assay で細胞増殖効果を認めた濃度との間で、差が認められる物質が存在し、今後はエストロゲン受容体  $\alpha$ 、 $\beta$  それぞれに対し、レセプター結合の下流での転写活性の有無についても、検討する必要があるものと考えられる。

今後はこれらの検討を通し、それぞれの、エストロゲン受容体  $\alpha$ 、 $\beta$  に対する作用 (agonist、antagonist) を明らかにし、現在多数存在する内分泌攪乱物質について作用機序別による分類を行っていく予定である。

#### E. 結論

今回 Diethyl- hexil phthalate、Butyl- benzil phthalate、Bisphenol-A、p-Nonylphenol、Dizein、Genistein の 6 種の物質に対し、乳癌細胞 MCF-7、及び子宮体癌細胞 HHUA を用い E-screen assay を施行したところ、全ての物質にエストロゲン様細胞増殖効果が認められた。またエストロゲン受容体 における  $17\beta$ -estradiol との Competition binding assay では、各々の物質で、競合結合を認め、それらエストロゲン様作用はレセプターを介した反応であることが明らかとなった。しかしながら、レセプターとの反応と細胞増殖を来たした濃度との間に差が見られることから、物質の濃度、もしくは、サブタイプの違いによっては、レセプターに対して、アンタゴニストとして作用している可能性が示唆された。

#### F. 研究業績

##### 学会発表

1. 内分泌かく乱物質の細胞増殖におけるエストロゲン受容体の関与についての検討: 村野孝代、和泉俊一郎、鈴木隆弘、松林秀彦、新井正、Shanta F Haque、牧野恒久 (東海大学医学部)、第 52 回日本産科婦人科学会、4、2000、徳島
2. 内分泌かく乱物質の作用について、cell line システムと酵母系アッセイシステムでの比較検討: 村野孝代、和泉俊一郎、鈴木隆弘、奥脇伸二、内田能安、牧野恒久 (東海大学医学部)、第 73 回日本内分泌学会、6、2000、京都
3. Environmental Endocrine Disruptors in an E-Screen Assay and a

Yeast-Based Transcriptional Assay

T Murano, S Izumi, K Sakabe, S F Haque,  
T Suzuki, H Matsubayasi, S Okuwaki, T  
Makino

11th International Congress of  
Endocrinology (Sydney, Australia.  
Oct 29- Nov 2, 2000)

4. Effect of Environmental  
Endocrine Disruptors on Cell  
Proliferation and Estrogen  
Receptor-Mediated Transcription.

T. Murano, S-I. Izumi, H. k. Sakabe, S.  
F. Haque, M. Onoe, T. Makino.

8th World Congress of Gynecological  
Endocrinology.

(Florence, Italy. Dec 6-9, 2000)

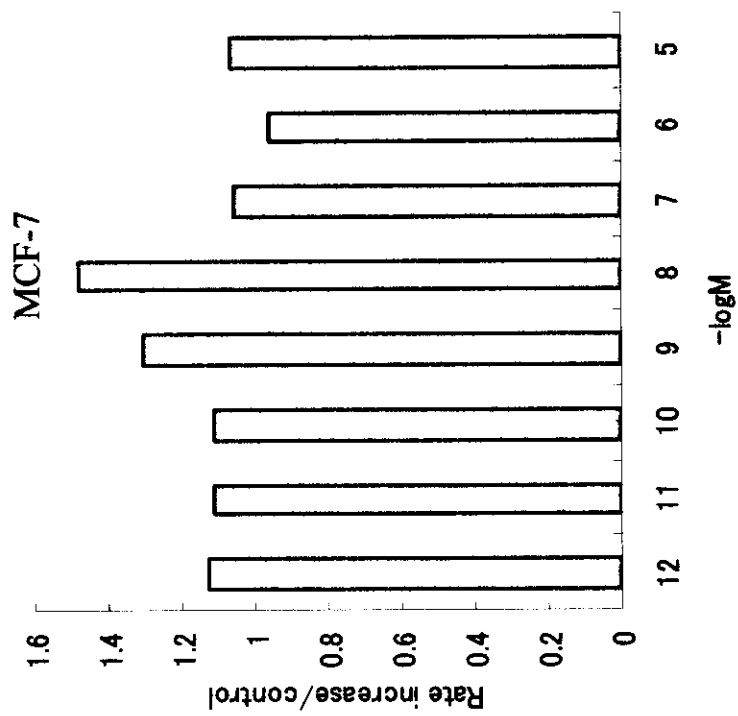


图1-2 E-screen assay ( $17\beta$ -Estradiol)  
MCF-7細胞

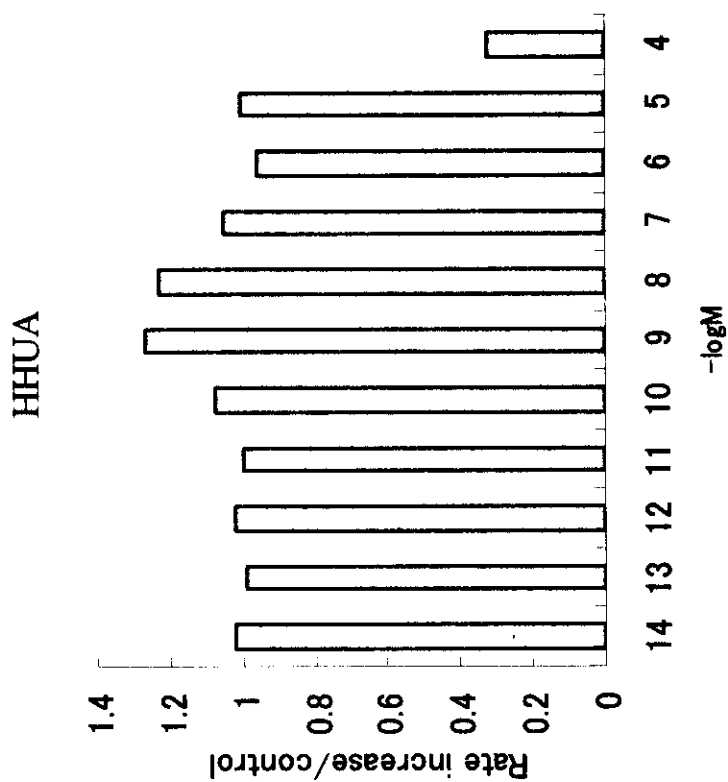


图1-1 E-screen assay ( $17\beta$ -Estradiol)  
HHUA細胞

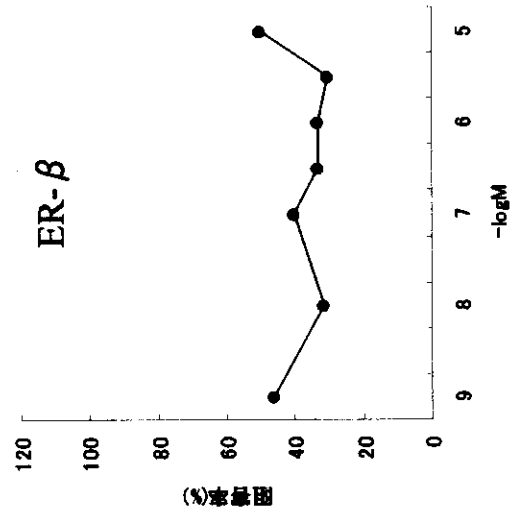
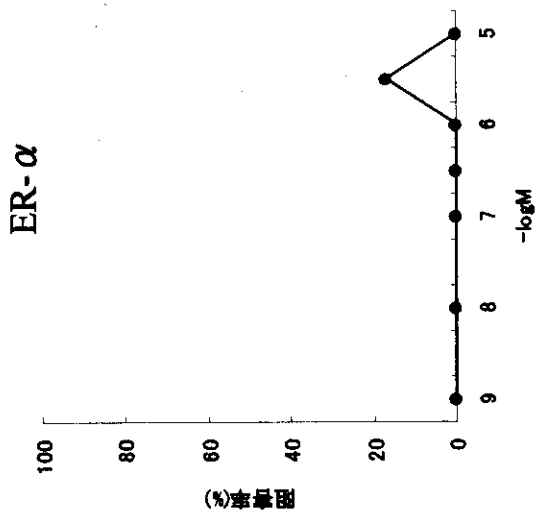


图2-2 Competition binding assay (EHP)

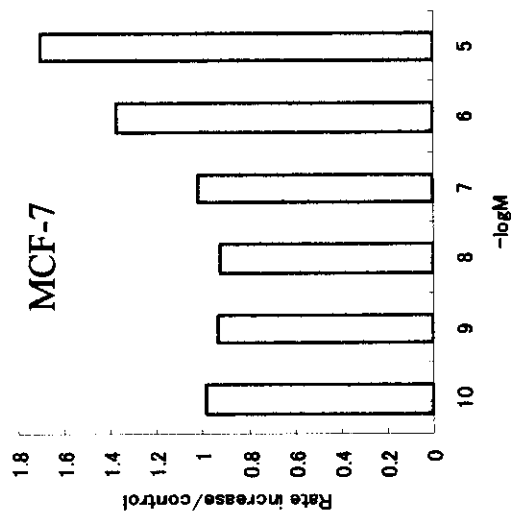
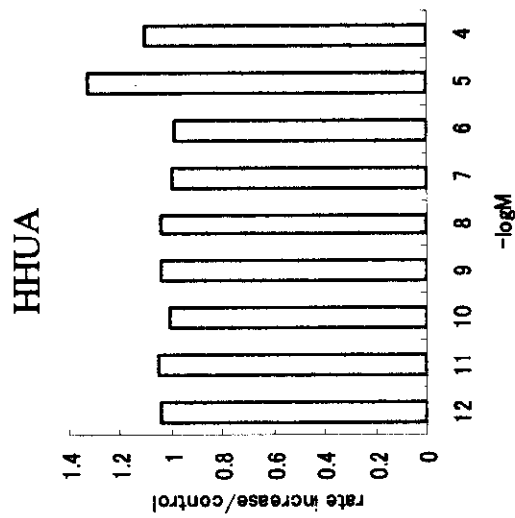


图2-1 E-screen assay (EHP)