

げておく)

Suemizu, H., Radosavljevic, M.,
Kimura, M., Sadahiro, S., Yoshimura,
S., Bahram, S. and Inoko, H.
A Basolateral Sorting Motif in the
MICA Cytoplasmic Tail.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99,
2971-2976 (2002)

2. 学会発表

直接的に関与する発表はないので省
略する

H. 知的財産権の出願・登録状況（予
定を含む）
特になし

PRIMERS

ESR1 intron 1

PCR F 5'CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCTATTCTCC3'
R 5'TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA3'

SEQUENCE F 5' GCTGGGCTCAAACACTACAG3'

ESR exon4

PCR F 5'TTCCACCTGTGTTTTTCAGGGA3'
R 5'AGCTGCGCTTCGCATTCTTAC3'

SEQUENCE F 5'TGCTGGAGACATGAGCT3'

AHR exon 10

PCR F 5'GTA CTTCAAGTACTGCAC3'
R 5'AGCCAAGGACTGTTGCTGTT3'

SEQUENCE F 5'GATAATACTGCACCGATGG3'

CYP1A1 exon 7

PCR F 5'AGCAAAACTGCAGCCAGATCA3'
R 5'TCAGAGATGCAGAGGAAAGGC3'

SEQUENCE F 5'GCTGAACCTTAGACCAC3'

CYP1A1 3'UTR

PCR F 5'AAAAAATTAGCCGGGTGTGGT3'
R 5'CTGTGTTGGGTTTTACTGTAGGGA3'

SEQUENCE R 5'GGGAGGAAGAAGAGGAGGTAGC3'

図 1 PCR および Sequencing 用プライマーの配列
(F は Forward primer、R は Reverse primer を示す)

ARYL HYDROCARBON RECEPTOR (AHR) GENE

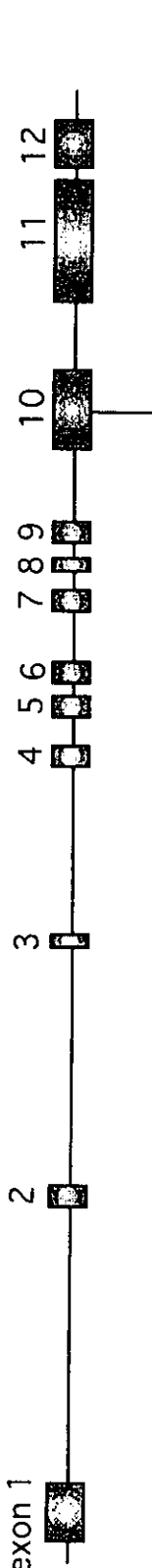
AHR

Location: Chr.7p15

genomic length: 49,5kb exon 1

cDNA: 5496bp

polypeptide: 848aa



C/T(P517S)
A/G(R554K)
A/G(V570I)

ESTROGEN RECEPTOR GENE

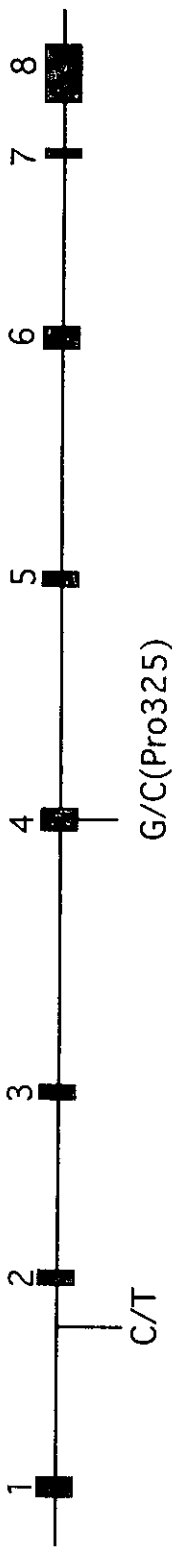
ESR1

Location: Chr.6q25.1

genomic length: 280kb

cDNA: 1785bp

polypeptide: 595aa



G/C(Pro325)

C/T
A/G
C/T

CYTOCHROME P450 SUBFAMILY I POLYPEPTIDE1 (CYP1A1)

CYP1A1

Location: Chr.15q22-q24

genomic length: 6063bp

cDNA: variant a: 2612bp

b: 2609bp

polypeptides:

variant a: 542aa

b: 541aa

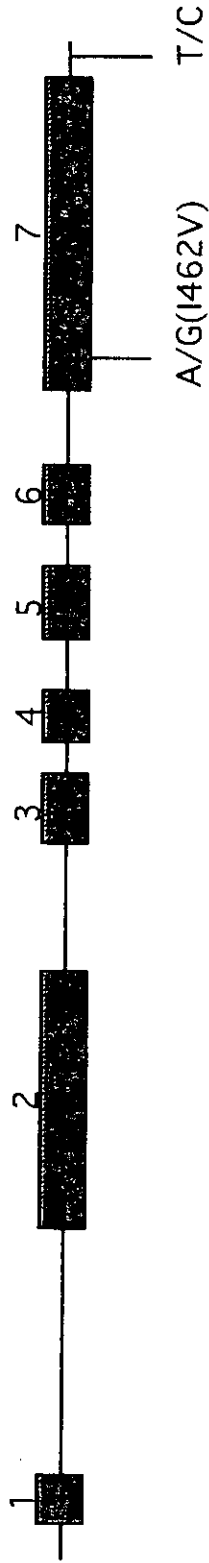


図2 今回解析した3つの遺伝子の構造と遺伝子産物

(AHRあるいはESR1で近接した箇所のSNPsは、

同一のPCR産物で一挙に解析可能とした)

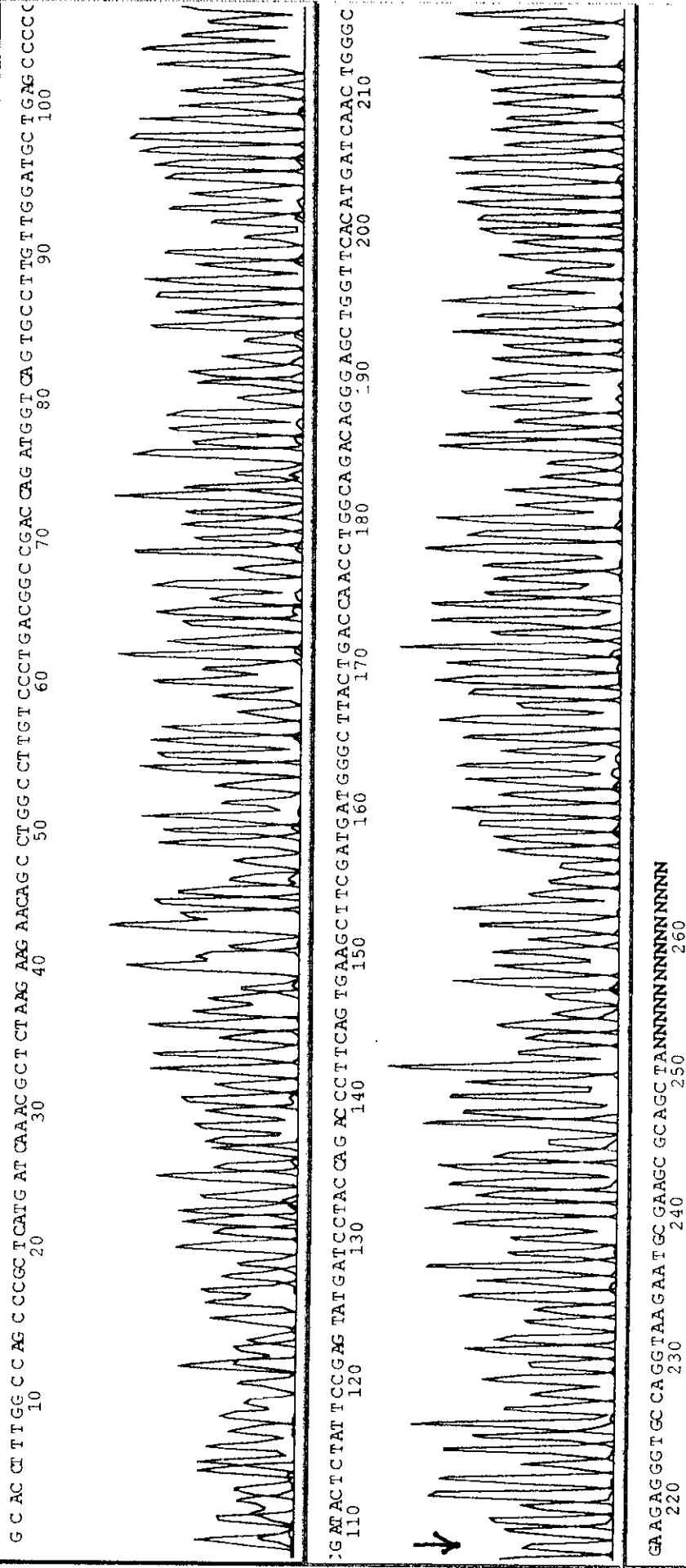


図3 ESR1 exon4 の遺伝子多型 (SNP) 部位 1
 (矢印部分がホモ)

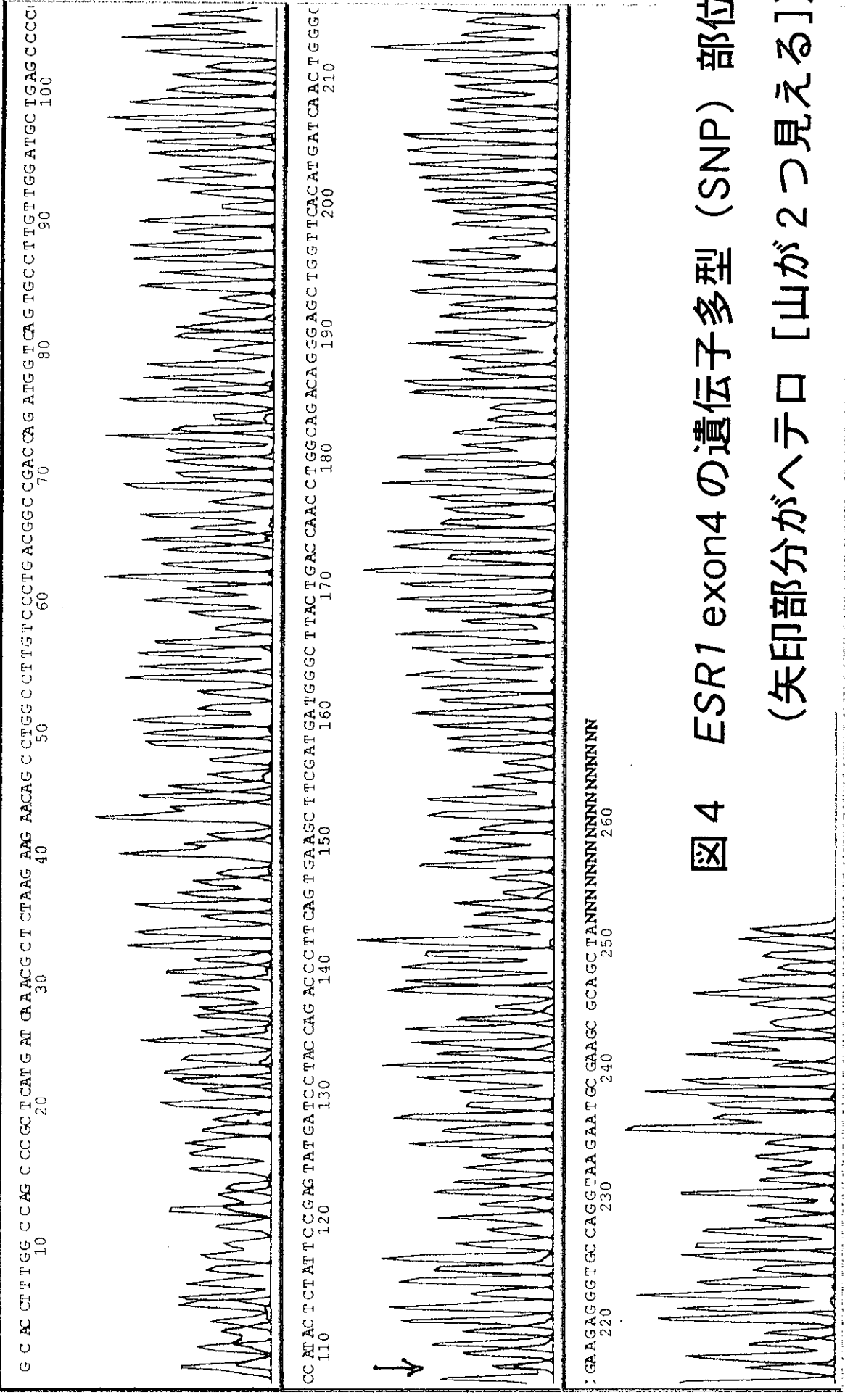


図4 ESR1 exon4 の遺伝子多型 (SNP) 部位 2
(矢印部分がヘテロ [山が2つ見える])

	<i>ESR1</i> intron1	<i>ESR1</i> exon4	<i>AHR</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>CYP1A1</i> 3'UTR
KK1	T A T	G	C G G	A	C/T
KK2	C G T	C	C G G	G	C
C1	C/T A T	G/C	C G G	A	T
C2	C A T	G/C	C G/A G	A	C/T
C3	T A T	C	C G G	A/G	C/T
C4	C A/G T	G/C	C A G	A/G	C/T
C5	C/T A/G T	G	C G/A G	A/G	C/T
C6	T A T	G/C	C G G	A	T
C7	C G T	C	C G/A G	A	T
C8	T A T	G/C	C G/A G	A	T

表1 10人の試料提供者のDNA解析結果

(KKが子宮内膜症患者、Cが対照群を示す)

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合 研究事業）
分担研究報告書

試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究

「DEHP の臍帯血造血幹細胞エストロゲンレセプター発現に及ぼす影響について」

主任研究者 牧野 恒久 （東海大学）
分担研究者 牧野 恒久 （東海大学）
研究協力者 和泉俊一郎 （東海大学）

研究要旨

DEHP は軟質ポリ塩化ビニル樹脂（polyvinylchloride : PVC）製血液バッグの可塑剤であり、生殖発生毒性、精巣毒性、内分泌攪乱作用に対する疑い等の様々な問題点を持つ。DEHP の溶出報告がある PVC 製血液バッグは、保存血の採取・保存において、その簡便さから汎用されている。今回我々は、本分担研究において、PVC 製血液バッグの血球細胞に対する影響を、臍帯血造血幹細胞を用いて検討した。

近年造血幹細胞移植に応用の試みられている臍帯血造血幹細胞は、その採取から移植に使用されるまでの一部の過程において血液バッグが使用される。一方、臍帯血造血幹細胞は、保存血として用いられる分化の完了した血球細胞とは異なり、その機能は未熟で未知なものである。したがって、臍帯血造血幹細胞が PVC 製血液バッグ処理時に DEHP から何らかの影響を及ぼされることは危惧される。本研究は DEHP の「弱いエストロゲン様作用を持つ」という点に着目し、エストロゲン（E）の核内レセプター（ER）を臍帯血造血幹細胞で同定し、その発現調節への影響を検討した。臍帯血造血幹細胞は、RT-PCR と制限酵素切断法により、ER として 2 種のサブタイプ（ER α と ER β ）が共に発現していることが確認された。その 2 種の ER のサブタイプに対する作用を、MCF-7 ヒト乳癌細胞を用いたタイムコースによる検討したところ DEHP は E とビスフェノール A（BPA）と同様に ER α を up-regulation するが、ER β に対する up-regulation 作用は DEHP のみにおいて認められなかった。

A. 研究目的

高分子化学の著しい進歩に伴い、現代医療においても様々なプラスチック製医療用具が使用されている。人工腎臓用材料（ダイヤライザー、吸着型血液浄化器等）、人工心肺回路、各種カテーテル等のプラスチック製材料、輸血バッグ、血液バッグ、歯科材料等にポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート樹脂、ポリ塩化ビニル（PVC）等の素材が用いられている。特に人工心肺回路、輸液・輸血ルート等の体外血液循環に伴う回路は PVC 製が多く、種々の機能を付与させるために様々な添加剤が使われている。中でも、可塑剤はその利便性から、プラスチック添加剤として最も多く利用される。その作用は、樹脂の分子間に入り込み、硬い網状構造の原因である分子間結合を弱め、柔軟な性質を与えること

にある。このような可塑剤には、フタル酸エステル類、リン酸エステル類、脂肪酸エステル類、アジピン酸エステル類等が挙げられるが、フタル酸エステル類の使用度が最も高く、フタル酸ジエチルヘキシル（DEHP）は、全可塑剤生産量の約 50%以上を占めている。一方、昨年、厚生労働省は、食品用塩化ビニル手袋や新生児を対象とした玩具等の可塑剤として使用されている DEHP 等について TDI を設定しこれらの製品に対して使用を規制した。輸液バッグや血液バッグ等の医療用具においても、当該可塑剤の濃度は高く、血液や輸液等を介して体内に取り込まれる可能性が危惧される。従って、様々な医療行為を通して、直接ヒト生体内にこれら化学物質が取り込まれる可能性が懸念されることから、そのリスク評価が必須であると考えて「適用する医薬品の

脂溶性等とプラスチック製医療器具に使用される可塑剤の溶出度の相関性に関する研究」を進めている。

DEHP は PVC 製血液バッグの可塑剤であり、生殖発生毒性、精巣毒性、内分泌攪乱作用に対する疑い等の様々な問題点を持つ。PVC 製血液バッグは、DEHP の溶出報告があるが、保存血の採取・保存において、その簡便さから汎用されている。今回我々は、本分担研究において、PVC 製血液バッグの血球細胞に対する影響を、臍帯血造血幹細胞を用いて検討した。

臍帯血造血幹細胞は、近年造血幹細胞移植に応用の試みられており、その採取から移植までの一部の過程において血液バッグが使用される。臍帯血造血幹細胞は、保存血に用いられる分化の完了したの血球細胞とは異なり、その機能は未熟で未知なものである。したがって、臍帯血造血幹細胞が PVC 製血液バッグ保存時に DEHP により何らかの影響を及ぼされることは危惧される。本研究はとくに DEHP の「弱いエストロゲン様作用を持つ」という点に着目し、エストロゲンの核内レセプター (ER) を臍帯血造血幹細胞で同定し、その 2 種のサブタイプ (ER α と ER β) についての発現変化を mRNA レベルで探究を目的とした。

また、現在、エストロゲン自身のその作用発現機構について、ER を介してから作用を発現するまでの間にはブラックボックスと言われるまだ未解明の部分がたくさんある。エストロゲンは女性ホルモン的一种であり、女性の生殖器への作用が主であるが、脳、心血管、骨、皮膚等の生器外作用も示すことが報告されており、骨粗鬆症、心筋梗塞、高血圧症などの関連も推測されている。エストロゲンの作用発現機構におけるブラックボックスを解明することは、多くの疾患の解明、治療につながると考えられている。また、ビスフェノール A (BPA) のようにエストロゲン様作用を示すと報告されている物質の作用発現機構を解明することも必要である。本研究では、「DEHP のエストロゲン様作用についての遺伝子レベルでの基礎的検討」と共に、E2、BPA を用いて、「ER を介するエストロゲン作用の発現機構解明に対する基礎的検討」を同時に行った。

B. 研究方法

B-1. 実験用造血幹細胞

実験に使用した臍帯血造血幹細胞はインフォームドコンセントにより承諾を得た妊婦の臍帯血から出産後に採取し、東海大学の臍帯血バンクに集められたもののうち、移植に使用するためには採取量が過少なため、研究用に提供されたものである。研究用に提供を受ける臍帯血は、臍帯血を用いる研究者による週一回の定例会議で申請が検討され、割り当てられる。血幹細胞の表面には CD34 と呼ばれる糖タンパク質が選択的に発現している。この CD34 をマーカーとして、臍帯血から造血幹細胞を分離する。実際には、臍帯血から Ficoll-Paque PLUS を用いて抽出した単核細胞に CD34 に対する磁気ビーズつき抗体を反応させ、細胞分離システム (MACS) を用いて、造血幹細胞を分離する (Fig.1)。

B-2. Colony Assay による造血幹細胞の分化及び増殖の観察

CD34 陽性の臍帯血造血幹細胞を 35mm dish に 200 個 / dish 播種し、E2 (10^{-10} ~ 10^{-7} mol/L) 及び DEHP (10^{-7} ~ 10^{-5} mol/L) を添加した培地 (Metho Cult GF H4434V) 上で、37°C、2 週間インキュベートする。2 週間のインキュベート後、培地上に形成されるコロニーの形態の違いから分化の方向性を特定し、物質が造血幹細胞の分化及び増殖に与える影響を顕微鏡下で観察し、カウントした。分化及び増殖の観察対象コロニーは、混合コロニー形成細胞 (mixed colony-forming unit in spleen:CFU-Mix)、顆粒球マクロファージ形成細胞 (colony-forming unit granulocyte/macrophage:CFU-GM)、赤芽球コロニー群形成細胞 (burst-forming unit erythroid :BFU-E) とした (Fig.2、Fig.3)。

B-3. DNA-Idu Labeling and Detection Assay による造血幹細胞の増殖能評価

CD34 陽性の臍帯血造血幹細胞を 96 穴プレートに 500 個 / well 播種し、E2 (10^{-11} ~ 10^{-4} mol/L) 及び DEHP (10^{-11} ~ 10^{-4} mol/L) を添加した培地 (StemSpan SFEM) 上で、37°C、2 週間インキュベートする。2 週間のインキュベート後、培地上の細胞数を

DNA-Idu Labeling and Detection kit を用いてカウントすることにより増殖に与える影響について検討した (Fig.4)。

DNA-Idu Labeling and Detection kit を用いると、DNA 合成量を指標として間接的に細胞増殖を測定することができる。つまり、チミジンのアナログである 5-ヨード-2'-デオキシウリジン (Idu) を、チミジン同様にして分裂中の細胞の DNA に取り込ませ、その Idu に対する抗 Idu モノクローナル抗体を用いた ELISA により細胞増殖を測定することになる。

C. 研究結果

C-1. 分化及び増殖への影響

Colony Assay の結果から、臍帯血造血幹細胞は、DEHP、E2 存在下で増殖が有意に亢進することが分かった (Fig.5)。また、DEHP 及び E2 の存在下でともに CFU-GM への分化の促進、BFU-E への分化を抑制する傾向がみられた (Fig.6)。

また、Colony Assay の増殖能の結果と同様に、DNA-Idu Labeling and Detection Assay の結果でも、臍帯血造血幹細胞の増殖は DEHP、E2 存在下で有意に亢進することが分かった (Fig.7)。また、両 Assay とも、 10^{-7} mol/L の DEHP 及び 10^{-9} mol/L の E2 存在下で最大の増殖能を示した。

以上の結果より、臍帯血造血幹細胞を軟質 PVC 製のバッグに保存した場合、溶出した DEHP により分化及び増殖に影響が及ぼされることが示唆された。また、そのコロニー形成能への影響では、E2 及び DEHP で類似の傾向がみられたため、この影響に関して、DEHP は E2 と類似の機序、つまり、エストロゲンと類似の機序により作用することが示唆された。

D. 考察

臍帯血造血幹細胞が移植時までの一連の過程において使用するバッグには、「血液保存バッグであること」という以外には規定がない。そのため、利便性、経済性に優れている軟質 PVC 製血液バッグが汎用されている。しかし、軟質 PVC 製血液バッグには、生体影響が懸念されている DEHP が

可塑剤として添加されており、これが溶出することが報告されている。したがって、臍帯血造血幹細胞を軟質 PVC 製血液バッグに保存した際に、DEHP が溶出し、臍帯血造血幹細胞の分化及び増殖に何らかの影響を及ぼすことを危惧し、それについて検討した。その結果、DEHP、E2 存在下で有意な増殖の亢進 (最大増殖濃度: DEHP 10^{-7} mol/L、E2 10^{-9} mol/L) がみられ、また、CFU-GM への分化の促進、BFU-E への分化の抑制の傾向がみられた。これにより、DEHP、E2 が臍帯血造血幹細胞の分化及び増殖に影響を及ぼすことが分かり、この DEHP の及ぼす影響は E2 の及ぼす影響と類似しているため、これは、「E2」すなわち、「エストロゲン」と類似の機序により起こっていることが示唆された。さらに、臍帯血造血幹細胞がエストロゲンに対するストレートな作用を受ける場合の機序を探るために、ER α 、ER β の存在の有無について RT-PCR 法と電気泳動法により、検討した。その結果、臍帯血造血幹細胞には、mRNA レベルで ER α 、ER β が発現していることが確認できた。

以上のことから、臍帯血造血幹細胞を軟質 PVC 製血液バッグに保存する際には、その可塑剤である DEHP によりその分化及び増殖に影響を及ぼされることが分かった。その作用発現機序として、ER を介する可能性も示唆された。

本検討結果より、PVC 製血液バッグを臍帯血造血幹細胞の保存に用いることは、品質保持の観点から見た場合は、避ける必要があるのではないかと考えられる。しかし、現在、臍帯血造血幹細胞はその採取量が少ないことが問題の一つとなっており、*in vitro* での増殖方法が検討されている。今回の結果において、DEHP、E2 には臍帯血造血幹細胞の増殖を促進させる作用があることが分かったため、*in vitro* での増殖方法検討に際し、これは参考となる結果であるとも考えられる。

本研究では、DEHP が臍帯血造血幹細胞に及ぼす影響とそのエストロゲン活性についての検討を行った。

DEHP が臍帯血造血幹細胞に及ぼす影響については、臍帯血造血幹細胞が移植に使用

されるまでの過程のうちいくつかの部分において、PVC 製バッグが汎用されており、PVC 製バッグから様々な問題点を持つ DEHP が溶出するという報告があること、また、臍帯血造血幹細胞はその機能が未熟で未知なものであること、の二つを危惧要因として検討を行った。その結果、DEHP は E2 添加時と同様に臍帯血造血幹細胞に対して、その増殖を促進させ、また、増殖に従い CFU-GM への分化を促進し、BFU-E への分化を抑制する傾向がみられた。さらに、臍帯血造血幹細胞は mRNA レベルでの検討により ER α 、ER β を持つことを確認できた。以上のことから、DEHP が臍帯血造血幹細胞の分化及び増殖に影響を及ぼすことが分かり、その際には、ER を介した機序が一つの可能性として考えられることが示唆された。

E. 結論

本研究では、DEHP が臍帯血造血幹細胞に及ぼす影響とそのエストロゲン活性についての検討を行った。

DEHP が臍帯血造血幹細胞に及ぼす影響については、臍帯血造血幹細胞が移植に使用されるまでの過程のうちいくつかの部分において、PVC 製バッグが汎用されており、PVC 製バッグから様々な問題点を持つ DEHP が溶出するという報告があること、また、臍帯血造血幹細胞はその機能が未熟で未知なものであること、の二つを危惧要因として検討を行った。その結果、DEHP は E2 添加時と同様に臍帯血造血幹細胞に対して、その増殖を促進させ、また、増殖に従い CFU-GM への分化を促進し、BFU-E への分化を抑制する傾向がみられた。さらに、臍帯血造血幹細胞は mRNA レベルでの検討により ER α 、ER β を持つことを確認できた。以上のことから、DEHP が臍帯血造血幹細胞の分化及び増殖に影響を及ぼすことが分かり、その際には、ER を介した機序が一つの可能性として考えられることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

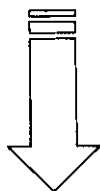
- ・ポリ塩化ビニル製医療用具の安全性評価（第3報）：コロニーアッセイ法によるフタル酸エステル類の評価
堀田明子、村野孝代、和泉俊一郎、牧野恒久、吉村吉博、中澤裕之
第122年会日本薬学会（3月26～28日 幕張メッセ）
- ・ヒト造血幹細胞、末梢血リンパ球の増殖とプロラクチン；血液バッグからのフタル酸エステルの効果について
堀田明子、和泉俊一郎、森恵生、村野孝代、吉村吉博、中澤裕之、牧野恒久
日本下垂体研究会第17回学術集会（8月1～3日 東京農工大学）
- ・内分泌かく乱化学物質の不妊症婦人における測定（その1）：ビスフェノールA、クロルデン関連物質の血中、腹水中分析及と子宮内膜症
貴家剛、和泉俊一郎、奥脇伸二、松林秀彦、鈴木隆弘、牧野恒久

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

With the informed consent, cord blood samples were collected from healthy donors.

- ① They placed in sterile tubes and layered on a Ficoll-Paque gradient .
- ② The low-density mononuclear cells were washed twice by PBS and resuspended in IMDM (Iscoe's modified Dulbecco's medium).



< Separation >

The haemopoietic stem and progenitor cells were isolated using positive selection of CD34-expressing cells.

- ① The cord LD-MNCs were incubated for 10-15 min with the FCR Blocking Reagent (Direct CD34 Isolation Kit).
- ② The cord LD-MNCs were incubated for 30 min CD34 Micro Beads Reagent (Direct CD34 Isolation Kit), washed and filtered through a 50µ m nylon mesh to remove clumps and placed on a column in the midiMACS cell separator .
- ③ The labeled cells were separated using a high-gradient magnetic field, and eluted from the column after their removal from the magnet.
- ④ The positive fraction was then placed on a new column and the magnetic separation step repeated.
- ⑤ At the end of the separation, the cells were counted.

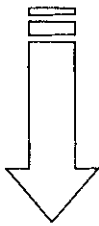
Fig. 1 The separation procedure of CD34⁺ cells from the cord blood

① CD34⁺ cells were plated into 35mm dish 96-well at initial concentration of 200 cells per dish.

• Medium: Metho Cult GF H4434V

② A range of concentrations of the test compounds was added to this medium.

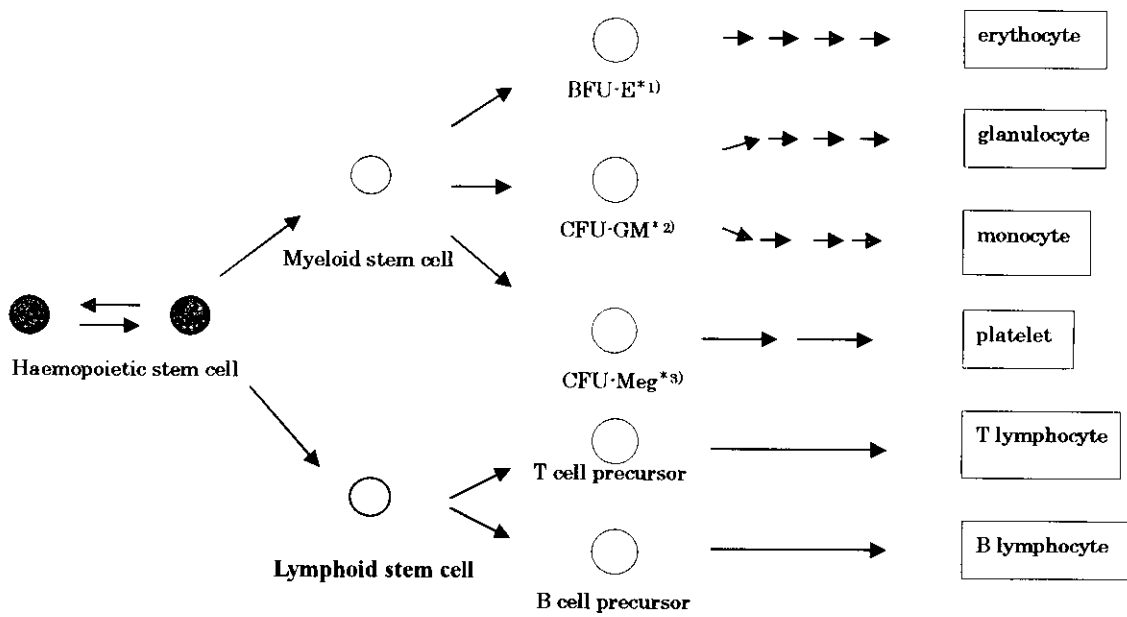
• The test compounds: DEHP ($10^{-7} \sim 10^{-5}$ mol/L)
E2 ($10^{-10} \sim 10^{-7}$ mol/L)



Incubation (37°C, 5% CO₂)

③ Microscopical observation was performed on day 14 to count the colony and determined the differentiation from the stem cell.

Fig. 2 The procedure of conventional Colony Assay



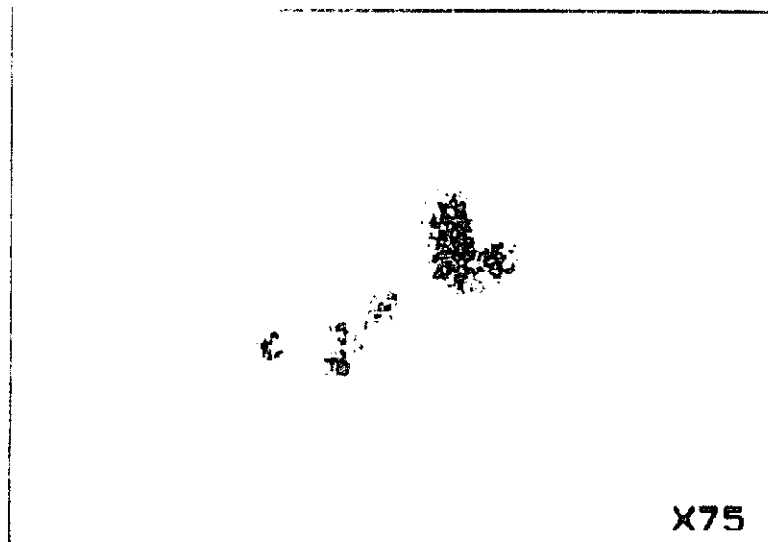
- * 1) BFU-E : Burst-forming unit erythroid
- * 2) CFU-GM : Colony forming unit granulocyte / macrophage
- * 3) CFU-Meg : Colony forming unit megakarvocyte

Fig.3-a Differentiation of haemopoietic stem cell

• CFU-Mix:



• CFU-GM:



• BFU-E:

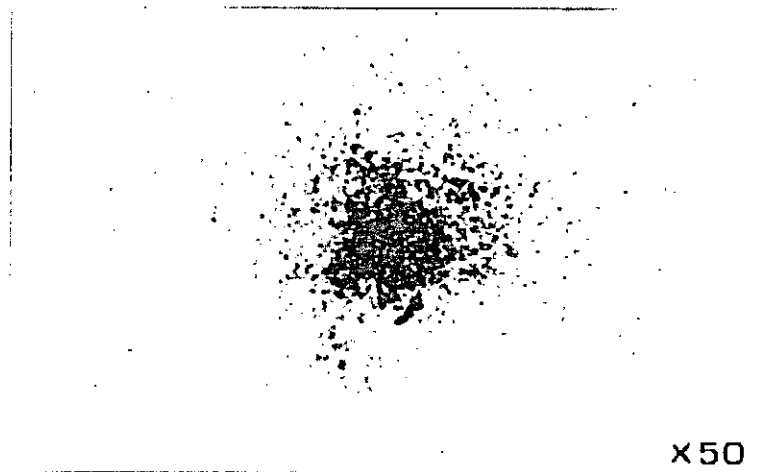


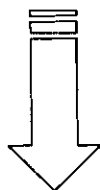
Fig.3-b CD34⁺ cells colony after day14

① CD34⁺ cells were plated into 96-well plates at initial Concentration of 500 cells per well.

• Medium: StemSpan SFEM

② The test compounds were added to this medium.

• The test compounds : DEHP ($10^{-11} \sim 10^{-4}$ mol/L)
E2 ($10^{-11} \sim 10^{-4}$ mol/L)

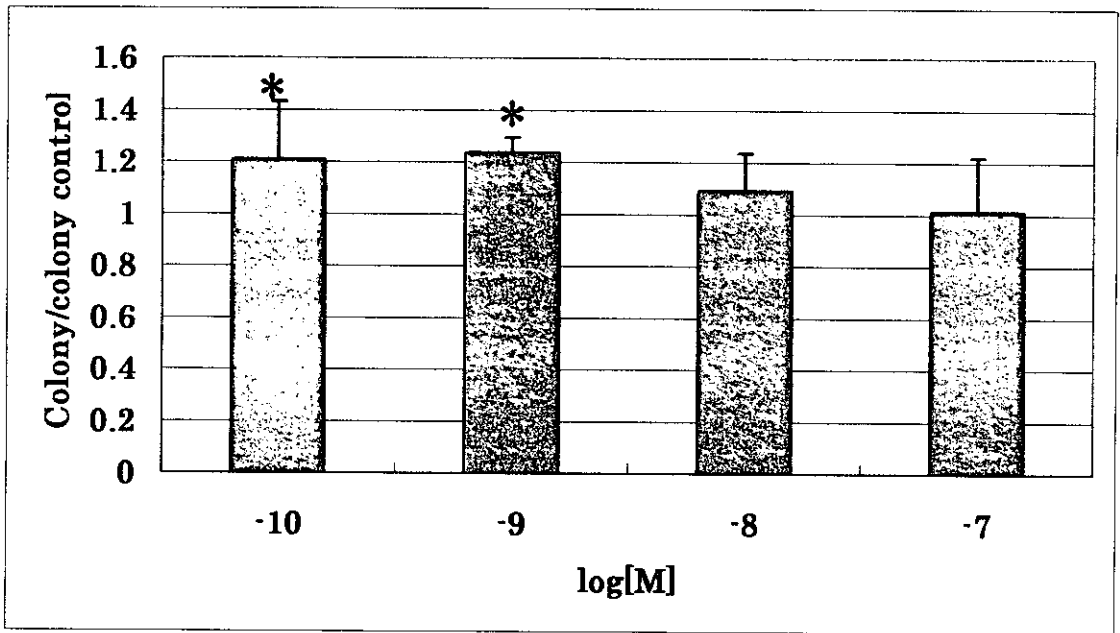


Incubation (37°C, 5% CO₂)

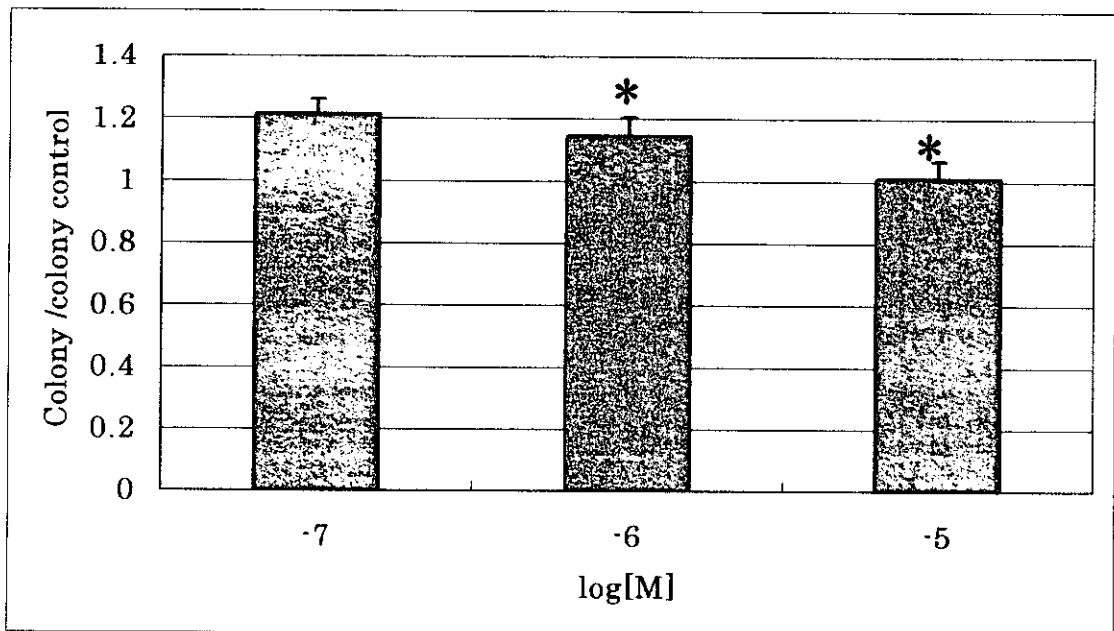
③ The bioassay was terminated on day 14 by removing the media from the wells, and added a cytolytic solution and counted the nuclei in a Coulter Counter Apparatus.

* The Coulter Counter Apparatus: DNA-Idu Labeling and Detection kit

Fig.4 The procedure of DNA-Idu Labeling and Detection Assay



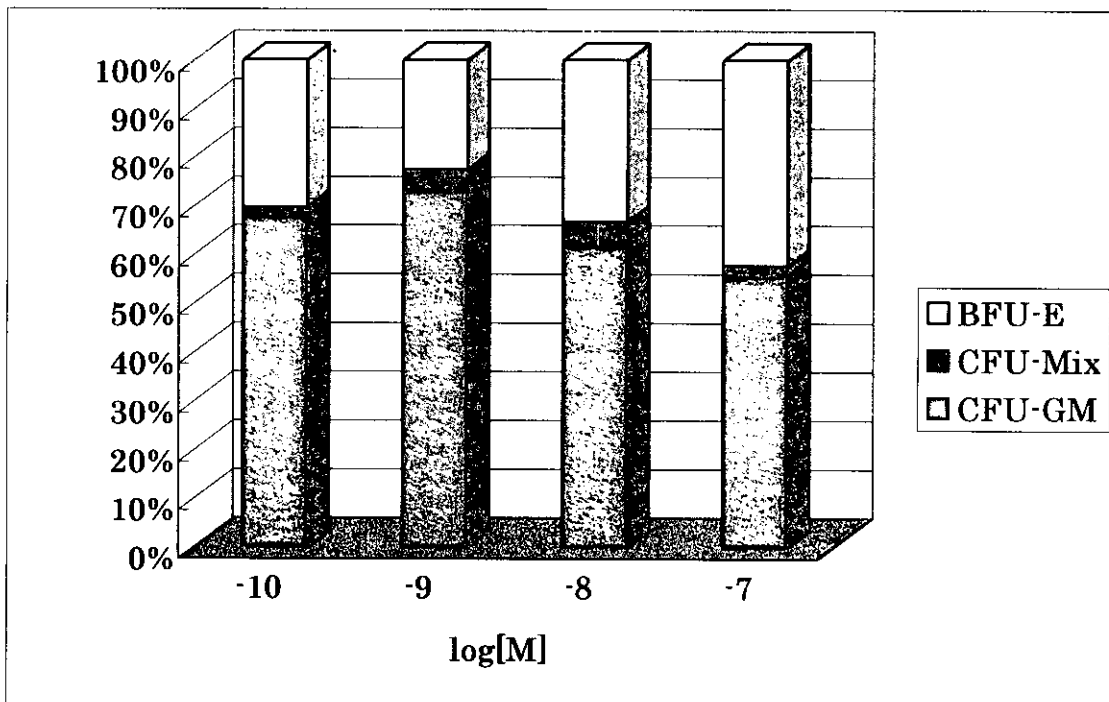
E2



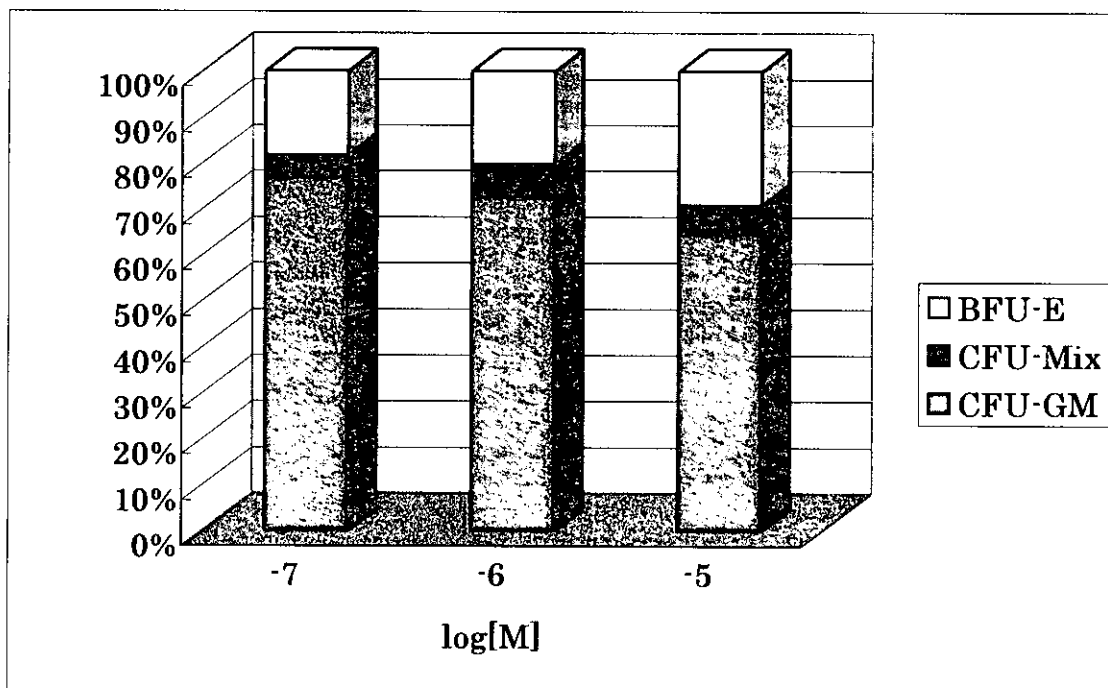
DEHP

Fig.5 Proliferation ability by colony assay(n=4)

***P < 0.05; Significantly different from control value**

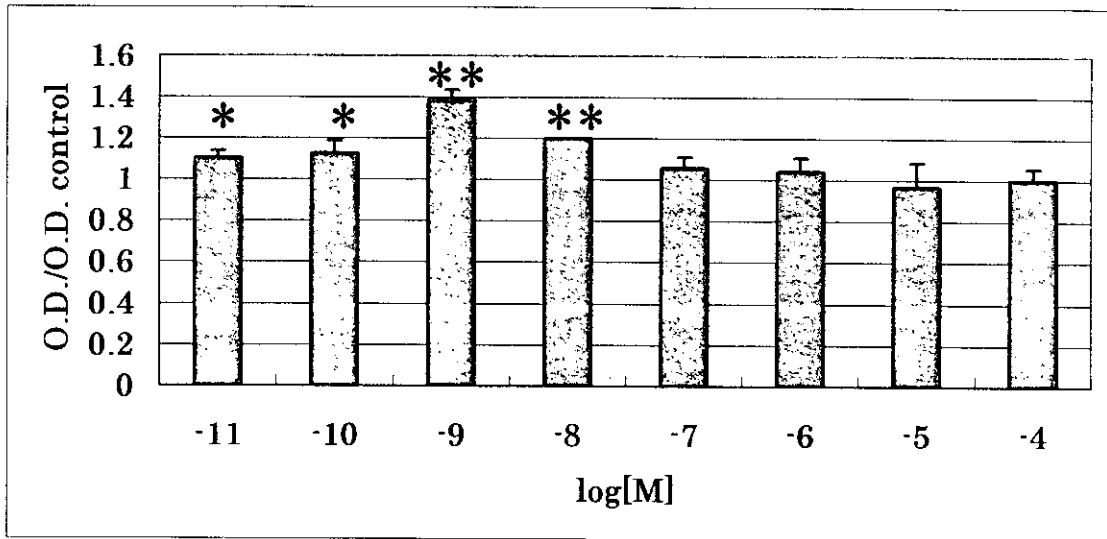


E2

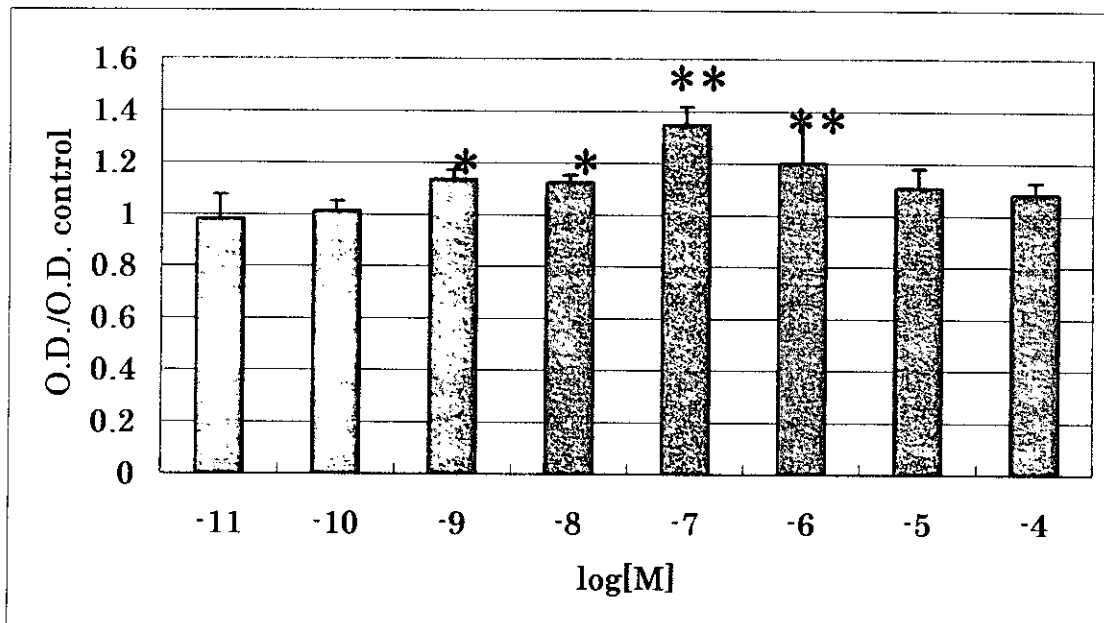


DEHP

Fig.6 Differentiation ability by colony assay (n=4)



E2



DEHP

Fig.7 Proliferation ability by DNA-Idu Labeling and Detection Assay (n=3)

*** P < 0.05; Significantly different from control value**

**** P < 0.01; Significantly different from control value**

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Koichi Inoue, Migaku Kawaguchi, Fumio Okada, Natsuko Takai, Yoshihiro Yoshimura, Masakazu Horie, Shun-ichiro Izumi, Tsunehisa Makino and Hiroyuki Nakazawa	Measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human urine by column-switching LC/MS coupled with on-line extraction	Analytica Chimica Acta		in press	
Tsunehisa MAKINO	Female Reproductive Tract and Mammary Disorders Caused by Endocrine Disruptors	Japan Medical Association Journal	46(3)	93-96	2003
Inoue, H., Yuki, G., Yokota, H. and Kato, S	Bisphenol A Glucuronidation and Absorption in Rat Intestine	Drug Metab Dispos	31	140-144	2003
Suemizu,H., Radosavljevic,M., Kimura,M,Sadahiro, S., Yoshimura,S.Bahram, S. and Inoko, H	A Basolateral Sorting Motif in the MICA Cytoplasmic Tail	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.	99	2971-2976	2002
Koichi Inoue, Sachiko Kondo, Yuriko Yoshie, Kayoko Kato, Yoshihiro Yoshimura, Masakazu Horie and Hiroyuki Nakazawa	Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride films for food-wrapping into food simulants and foods.	Food Additives & Contaminants	18	157-164	2001
Koichi Inoue, Yoshihiro Yoshimura, Tsunehisa Makino, and Hiroyuki Nakazawa	Determination of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human blood samples by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical coulometric-array detection	The Analyst	125	1959-1961	2000

20020932

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.81の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。