

エストロゲン様作用が検出された。エストロゲン様作用のもつ農薬は、我々が日常遭遇する1つの農作物から同時に検出されることより、農作物中に存在する検出頻度の高い2種類を組み合わせて検討したところ、エストロゲン様作用のさらなる増強が確認された。さらに標準物質である17βエストラジオールと比較して各種農薬の検出限界濃度は1/10⁵から1/10⁷の活性を示した。これより農薬に存在するエストロゲン様作用の人体に対する影響は極めて低いことが推測することができた。しかし、農薬以外のエストロゲン様作用をもつ物質が複数存在することで非常に低い濃度ではあるが将来的には複合して毒性をもつ可能性を否定することはできない。今後このような複数農薬の混合によるエストロゲン様作用の複合影響がおこる物質の組み合わせを検討し農薬における環境ホルモン作用の検討を続けていく必要がある。

A. 研究目的

MtT/Se 細胞を用いてエストロゲンの存在下で細胞が増殖する特性を用いたエストロゲン活性の測定法は過去に報告されている²⁾。今回我々は、MtT/Se 細胞の増殖能を指標としてエストロゲン活性を測定する系を確立した。内分泌かく乱物質がエストロゲン様作用をもち、野性生物やヒトの生態系に影響を及ぼすという報告は多数ある³⁻⁴⁾。しかし、複合したエストロゲン様物質の存在によって内分泌かく乱作用が相乗作用についての報告はない。前回我々は、E-CALUX assay法を用いて複数の農薬存在下におけるエストロゲン様作用増強効果について報告した⁵⁻⁶⁾。今回の研究では、農作物中に複数共存する農薬のエストロゲン様作用の増強効果を細胞増殖活性を指標として測定し、その増強効果の有無を検討することを目的とした。

B. 研究方法

材料

B.1 細胞

ラット下垂体腫瘍由来細胞株、MtT/Se は理研バイオソースセンターより供与された。

B.1-2 被験物質

ダイアジノン(*O*, *O*-diethyl, *O*-2-isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl phosphorothioate),
トリクロホスメチル

(*O*-2,6-dichloro-*p*-tolyl₁₀, *O*-dimethyl, phosphorothioate),

ピリプロキシフェン

(4-phenoxyphenyl (*RS*)-2-(2-pyridylloxy)propyl ether),

プロチオホス

((*RS*)-*O*-2,4-dichlorophenyl

O-ethyl *S*-propyl phosphorodithioate),

チアベンダゾール:

TBZ(2-(thiazol-4-yl)benzimidazole),

オルトフェニルフェノール:

OPP(*o*-phenylphenol(1,1'-Biphenyl-2-ol)2-Biphenylol

2-Hydroxybiphenyl)は標準試薬(残留農薬試験用:和光純薬)、17 β -Estradiol(生化学用:和光純薬)を用いた。タモキシフェン(trans-4-(1-(4-(2-(dimethylamino)ethoxy)phenyl)-2-phenyl-1-butenyl)phenol:Sigma)を用いた。

方法

B. 2. 細胞培養

細胞の継代用には 2.5% fetal bovine serum (FBS:Sigma)、10% horse serum(HS:Sigma), 10,000units/ml(Sigma), 10mg/mlの streptomycin(Sigma)に基本培地である Ham F12 とダルベッコ改変イーグル液体培地/Ham F-12培地(フェノールレッド添加)を用いて、37°C、5%CO₂インキュベーター内で培養した。細胞増殖試験用には、フェノールレッド除去した基本培地にチャコールデキストラン処理をしたFBS および HS を 10%加え同様に60-80%の増殖率となるように37°C、5%CO₂インキュベーター内で培養した。また、実験に使用したディッシュ、プレート、ピペット等の器具は Nunc社製を使用した。

B. 3 RNA 抽出とRT PCR

RNAはTrizol reagent (Invitrogen)を用いて抽出し定量化した後、1 μ gの TotalRNA はランダムプライマーと逆転写酵素 (Reverta Ace:東洋紡)を用いて42°C, 1時間でcDNAを合成した。0.5 μ gのcDNAをテンプレートとし特異的プライマー ER- α (5'-AATTCTGACAATCGACGCCAG3', 5'-GTGCTTCAACATTCTCCCTCC-3'), ER- β (5'

-TTCCCGGCAGCACCAGTAAC-3', 5'-TCCCTCTTTGCGTTTGGACTA-3')を用いて増幅した。PCR反応は94°C 4分、94°C 30秒、61°C 30秒、72°C 1分、30サイクルで行った。PCR反応は i-Cycler (Bio-Rad)で行った。

B. 4 Real time PCR

Real-Time PCRは、DyNAmo HS SYBR Green qPCR kit (MJ Research)を用いて製品情報に基づいて行った。DNAテンプレート 10ng と上記載のER- α と ER- β それぞれのプライマー5 pmolを用いた。PCR反応は95°C 15分、95°C 10秒、61°C 20秒、72°C 20秒を40サイクル行い Opticon2 (MJ Research)を用いて解析を行った。また、定量化するため内部標準としてG3PDHを用いた。

B. 5 免疫組織染色

細胞は 8well の chamber slide(parmanox:Nunc)上に播種した。2日後、4%のパラホルムアルデヒド(和光純薬)を用いて固定した。5%の正常ヤギ血清を用いてブロッキングした後、モノクローナル抗体 (Santa cruz, D-12 1:100), rabbit anti-ER β (Santa cruz, H-150, 1:100)を一次抗体として用いた。二次抗体として rhodamine-anti-mouse IgG (CHEMICON, 1:400) および FITC-anti-rabbit IgG (CHEMICON, 1:400)を使用した。細胞は共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview:Olympus)を用いて観察した。

B. 6 細胞増殖試験

細胞増殖能を測定するためにWST-1

試薬（和光純薬）を用いた。40mgのWST-1を11mlのPBSに溶解し、使用する直前に滅菌水に溶解した10mlの1-Methoxy PMS1を混合してWST-1試薬として用いた。96穴マイクロプレート（Nunc）に 2×10^4 cell/mlに調整した細胞懸濁液を100 μ l/wellずつ入れ、 1×10^{-10} から 1×10^{-5} Mの終濃度となる測定農薬を加え37 $^{\circ}$ C、5%CO₂・95%airインキュベーター内で3日間培養した。その後、WST-1試薬を10ml/wellずつ加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂2時間incubateした後、マイクロプレートリーダー（BioRad）で、主波長450nm、副波長650nmの吸光度を測定した。さらに、MtT/Se細胞のERに対するアンタゴニストを測定するためタモキシフェンを用いた。タモキシフェンは、99.9%エタノールで溶解した。細胞への影響を考慮するためさらにDMSOで溶解し 1×10^{-6} から 1×10^{-13} Mの濃度で細胞に添加した後、上記と同様に吸光度を測定した。

B.7 統計解析

17 β エストラジオールおよび農薬のエストロゲン様作用の結果は、SPSSのMan-Whitney (Version 12.0) の符号付き順位検定を用いて解析を行った。

C. 研究結果

C.1 細胞の解析

MtT/Se細胞を用いてRT-PCRを行いmRNAレベルでのER α および β の発現を調べるとER α (344bp)およびER β (262bp)ともにERの発現を確認することができた(Figure1)。次に、ER α およびER β に対するプライマーを用い

てReal time PCRを3回行った。ER α のサイクル数は21.1、21.7、23.3およびER β は25.1、25.6、26.2であった。ER α および β のサイクル数の平均値の差を算出すると3.482となった。これを100%で換算するとER α および β の発現量の平均値は78:22となった(Figure2)。さらに、MtT/Se細胞のタンパク質レベルでのER α および β の発現を確認するため免疫染色した。光学顕微鏡で観察できるようにER α および β ともに核及び細胞質共に染まり両方のレセプターが同じ部位に局在していた(Figure3)。

C.2 MtT/Se細胞を用いたエストロゲン活性の測定

MtT/Se細胞に 1×10^{-12} Mから 1×10^{-6} Mの範囲で17 β エストラジオールを添加すると有意なエストロゲン活性が確認できた。それぞれのエストロゲン活性は 1×10^{-13} Mのとき0.958、 1×10^{-12} Mのとき1.011 (p値<0.05)、 1×10^{-11} Mのとき1x1.084 (p値<0.05)、 1×10^{-10} Mのとき1x1.34 (p値<0.01)、 10^{-9} Mのとき1.249 (p値<0.01)、 1×10^{-8} Mのとき1.122、 1×10^{-7} Mのとき1.1 (p値<0.05)、 1×10^{-6} Mのとき0.7 (p値<0.01)となった(Figure4)。なお、 1×10^{-8} Mの17 β エストラジオールを添加した際のエストロゲン活性は、P値が0.08であった。

C.3 タモキシフェンを用いた細胞阻害試験

17 β エストラジオールをMtT/Seに添加したとき最も細胞増殖を示した濃度 (1×10^{-10} M) とアンタゴニストで

あるタモキシフェンを細胞に添加し細胞増殖に及ぼす影響を検討した。タモキシフェンのみを添加すると細胞増殖作用はおこらなかった。化合物は最大増殖を示す濃度とし、タモキシフェンの濃度を変化させると、濃度依存的に細胞増殖の抑制がみられた (Figure5)。 1×10^{-8} のタモキシフェン添加時に、いずれもほぼ完全に増殖が抑制された (Figure5)。

これより、これらの化合物による MtT/Se 細胞を指標とした細胞増殖は ER を介したエストロゲン作用である。
C.4 農薬のエストロゲン様作用及びエストロゲン様作用の複合影響

MtT/Se 細胞を用いたエストロゲン様作用の測定系を用いて実際に各種農薬を細胞に添加し、農薬のエストロン様作用の測定及び増強効果について検討を行った。このうち、エストロゲン様作用のあった有意差のあった最も低い濃度を検出限界としてまとめた (Table1)。 17β エストラジオールの検出限界濃度は 1×10^{-12} M、有機リン系殺虫剤のプロチオホス及び昆虫生育抑制剤のピリプロキシフェンは 1×10^{-6} M、そしてこれらを両方同時に添加した混合物は 1×10^{-7} M であった。もう一つの有機リン系殺虫剤のダイアジノン 1×10^{-5} M およびトリクロホスメチルは 1×10^{-6} M、これらの混合物では 1×10^{-7} M となった。殺菌剤防かび剤の OPP と TBZ の検出限界濃度は、それぞれ 1×10^{-5} M であった。これらの混合物では、 1×10^{-7} M となった (Table1)。

D. 考察

エストロゲンは女性の第2次性徴の発現を促すステロイドホルモンであり、エストロゲン受容体と結合する。エストロゲンによって誘発される生物反応は、その標的器官に存在するエストロゲン受容体によって介される。エストロゲン受容体には ER α および 1996 年に Kuiper らが名付けた ER β がある⁷⁾。この2種類のエストロゲン受容体は器官ごとの局在や発現量、リガンドとの結合能の違いにより異なる働きを示すことが報告されている⁸⁻¹⁰⁾。内分泌かく乱物質の作用のメカニズムは、本来ホルモンが結合すべきレセプターに環境中の化学物質が結合することによって、正常なホルモンと同じように働く場合と、逆にレセプターを活性化することをできずに正常な働きを阻害することがある。このように内分泌かく乱物質は、細胞膜レセプターを介して ER α および ER β に結合して本来のホルモンと類似の作用をもたらすため核内レセプターとの関連性が注目されている。さらなるエストロゲン受容体を介したエストロゲン活性の生物学的解明について研究することは今後必要である。

我々は、MtT/Se 細胞のエストロゲン受容体の発現を解明するために RT-PCR を用いた。mRNA レベルでの ER α および ER β の発現を確認すると、内因性のエストロゲン受容体を有しているのを確認した。

ラットにおける ER α および ER β の局在臓器について Kuiper らの報告によると ER α は精巣、下垂体、子宮、腎

臓、副腎を中心にして発現するのに対し、ER β は卵巣と前立腺できわめて高い発現を示す⁷⁾。MtT/Se 細胞の mRNA レベルでの ER α および ER β の発現量を比で表すと ER α の方が ER β より優位であった (ER α :ER β =78:22)。この細胞を用いたエストロゲン様活性の測定法は、主として ER α を介し ER α 型の活性を検出していると推測した。また、MtT/Se 細胞は下垂体腫瘍由来細胞であることより ER α 型優位にエストロゲン受容体を発現しているという Kuiper らの示唆した結果を得られたと推測する。

細胞内におけるエストロゲン受容体のタンパク質の局在性についての評価を免疫組織染色を用いておこなったところ、ER α および ER β は核内と細胞質に局在していた。エストロゲン受容体は核内レセプターとして存在していることが、今回の研究で観察された。

内分泌かく乱作用が疑われる物質について検討をおこなうには、その物質がエストロゲン様作用を有するかどうかを把握することが必要である。過去に報告されてきたエストロゲン活性を検出する測定系にエストロゲンとエストロゲン受容体と結合する受容体結合試験¹¹⁾、エストロゲン受容体とコアクチベーターを酵母に導入した Two-Hybrid 試験¹²⁻¹³⁾、魚類のビトロゲニン (卵黄たんぱくの一部) をバイオマーカーとして測定する方法がある¹⁴⁾。受容体結合試験はエストロゲン受容体と一定量の放射物質でラ

ベルした 17 β エストラジオールを incubate した後、被験物質と反応させ、遊離してくる放射活性を測定しレセプター結合阻害活性を見る手法である¹¹⁾。この手法において操作は簡便ではあるが、アゴニストとアンタゴニストの区別が不可能なことや化合物が代謝活性をうけて内分泌かく乱作用を起こす場合に偽陰性の結果を出す可能性がある。酵母 Two-Hybrid 法は受容体遺伝子を組み込んだプラスミドと応答領域遺伝子及びレポーター遺伝子を組み込んだプラスミドを酵母に入れた測定法である¹²⁻¹³⁾。培養することは容易だが酵母には細胞壁があり化学物質の膜透過性が悪いことより、化合物によっては感度が低下することは否定できない。また、化学物質溶液暴露下で飼育したオスの魚が産生するビトロゲニン量を測定したメダカビトロゲニンアッセイ方法は、*in vivo*で使用されている¹⁴⁾。

今回の研究で我々は、ラット下垂体腫瘍由来細胞株 MtT/Se を用いて細胞の増殖活性を指標としてエストロゲン様作用を測定する細胞増殖試験をおこなった。また、培養細胞を用いた試験培養細胞系では通常牛胎仔血清あるいはヒト血清を添加するため、すでに血液中に含まれている性ステロイドホルモンなどの存在を考慮する必要がある。われわれはステロイドフリーにするためチャコールデキストラン処理した血清を用いた。

実際に MtT/Se 細胞に 17 β エストラジオールを添加してみたところ有意

に高いエストロゲン活性が確認できた。細胞の最大活性を示したのは $1 \times 10^{-10} \text{M}$ のとき 1.34 (p 値 < 0.01) であった。 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ のとき 0.7 (p 値 < 0.01) であった。これは細胞毒性の影響によるものと推測する。また、 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ の 17β エストラジオールを添加した際のエストロゲン活性は、無添加群と比較して有意差は検出できなかったが、 P 値が 0.08 であることより有意傾向があると推測した。これより $1 \times 10^{-12} \text{M}$ から $1 \times 10^{-6} \text{M}$ の範囲でエストロゲン無添加群と比較して有意に高いエストロゲン活性を検出したことより、MtT/Se 細胞をもちいて農薬のエストロゲン様作用を測定する系とした。

今回実験で用いた内分泌かく乱作用が疑われる化学物質として、我々は農薬を選択した。そもそも農薬は、昆虫や細菌、雑菌などの病害虫防除および作物の生理機能の抑制などを目的として農作物に散布される化学合成された物質である¹⁵⁾。しかし、農薬は農作物に散布した後に消滅するわけではなく環境中や農作物中に残留する。また、難分解性で脂肪に溶解しやすく体外に排泄されにくいという化学構造を持つダイオキシンや PCB、DDT などがある¹⁶⁾。

被験物質として用いたトリクロホスメチル、プロチオホス、ダイアジンは有機リン系殺虫剤、ピリプロキシフェンは昆虫生育抑制剤、OPP および TBZ は殺菌剤および食品添加物として分類される。有機リン系殺虫剤は化合

物の中にリンを持つリン酸エステル結合したもので殺虫効力が優れており、農業および害虫コントロールの両方で広く使用される⁵⁻⁶⁾。多くの有機リン系殺虫剤はエストロゲン活性や抗アンドロゲン活性を持つことも報告されている¹⁷⁾。昆虫生育抑制剤は、昆虫が分泌する幼弱ホルモンに似た働きをするため羽化や蛹化および昆虫の体表であるキチン質の形成を阻害する目的で用いられている¹⁸⁾。OPP および TBZ は、農薬のポストハーベスト（収穫後）の果実や野菜の防腐処理剤（防かび剤）としてアメリカやヨーロッパで使用されているがわが国ではポストハーベスト農薬としての使用は原則的に禁止されている。しかし、輸入農作物の増大により食品に付着されている可能性が否定できないことや、腐敗の防止目的で使用することができる食品添加物として取り扱われている。過去に、1993 年から 1996 年に香川県で販売されている輸入柑橘類を含むポストハーベスト農薬の残留農薬の実態調査についての報告がある¹⁹⁾。この報告の中で OPP および TBZ は、残留農薬の一日摂取許容量以下ではあるが高い頻度で検出されていた。

今回の研究の MtT/Se 細胞を用いた測定系では、有機リン系殺虫剤、昆虫生育抑制剤、防かび剤のすべてにエストロゲン様作用が検出された。我々は農薬のエストロゲン様作用が検出された最も低い濃度を検出限界とした。プロチオホス、ピリプロキシフェン、

トリクロホスメチルの検出限界濃度は $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、ダイアジノン、OPP、TBZ はそれぞれ $1 \times 10^{-6} \text{M}$ において有意差のあった最も低い濃度でエストロゲン活性を検出した。

また、輸入柑橘類には防かび剤以外の農薬についても検出されていたことが確認されておりさらなる調査が必要である示唆している¹⁹⁾。実際、われわれも滋賀県の農薬に1つの農作物中から複数の農薬が検出しており、これらが複合して存在しているのを確認することができた⁵⁻⁶⁾。このような内分泌かく乱物質の複合影響問題に関しては、環境ホルモン戦略計画 SPEED'98 (2000年11月版)¹⁾で混合物曝露による曝露影響を対象にした研究の状況把握についても推進が必要であると述べている。ヒトや野生生物における潜在的影響を評価するためには、複数の化学物質の相加作用および相乗作用についても検討しなければならない。化学物質の複合影響に関しては多くの用語があり、Calbrese²⁰⁾は次のように定義している。“Synergism”(相乗作用)とは、2つの物質の複合影響がそれぞれ単独の影響を合計したものよりも大きい場合を示し、別々に考えられる場合の合計よりも影響が小さい場合を“Antagonism”(相殺作用、拮抗作用)とする。また、2つの物質の影響を足し合わせたものが単独の影響の合計と等しくなる場合は“Additively”(相加作用)とする。農薬における複合影響の問題は、単独では安全性が確認

されている農薬が複数存在した場合に何らかの毒性を誘発させる可能性がある」と定義することができる。我々が摂取する農薬の許容摂取量を下回っていたとしても、多種類の農薬を摂取することによりこれらが複合的に作用して予期しない毒性を発する可能性がある。

これらをふまえて我々の研究では、農作物中に存在する検出頻度の高い2種類を組み合わせた農薬のエストロゲン様作用を測定した。その結果、有機リン系殺虫剤、昆虫生育抑制剤2種類、防かび剤1種類の合計3種類の農薬の組み合わせ全てにエストロゲン様作用が増強された。これらの結果から農薬のエストロゲン様作用は、単独で添加したときと比較して2種類の農薬を同時に複合して添加することによりエストロゲン様作用の増強が明らかとなった。

複合影響による内分泌かく乱物質について過去にさかのぼると Arnold や McLachlan らは 1996 年、物質のエストロゲン活性に相乗効果が認められたと報告した²¹⁾。ヒトのエストロゲン・レセプターを導入した酵母を用いた測定系で農薬であるエンドサルファンとディルドリンを加えると単独に添加した場合と比較して1,600倍のエストロゲン活性を示した。その他の組み合わせでも、エストロゲン活性の100倍以上増強が確認できたと報告した。しかし、追試をおこなった McLachlan ら自身も再現できず、先の相乗効果が確認できたという報告を

取り下げざるを得なくなった (22-24)。このような経緯から複合影響の問題について現在のところ、相乗効果があったという報告については盛んに議論が交わされているが、実際きわだって相乗効果が確認できたという肯定的な報告はされていない。これより我々は Calbrase の物質の複合影響の定義に従うと農薬に存在するエストロゲン様作用に相乗作用は検出されないが相加作用というにはもう少し検討する必要があると考える。というのは、我々は農薬に含まれるエストロゲン様作用が始めて検出された最小濃度を複合する前の濃度と比較検討したものであるためエストロゲン活性を定量的に検出していないことより増強という言葉を用いるにとどめた。また、過去の複合影響に関する文献は、ER β 型が発見されていない時代の報告であった。今回我々は、MtT/Se という細胞の mRNA レベルでの ER α および ER β 型の発現を検討し、ER α 型優位に発現するという細胞を使用することで農薬の複合影響によるエストロゲン様作用が増強したという知見を得ることが出来た。

植物エストロゲンという人工の化学物質以外に植物が作り出す天然のエストロゲン様作用をもつ物質が存在している²⁵⁾。代表的な物質として大豆に含まれるイソフラボンなどがあり植物エストロゲンは健康面や細胞に対する抗酸化作用や閉経後女性の骨粗鬆症予防²⁵⁻²⁶⁾などの好ましい影響を及ぼす物質であると日本では注

目されている。このような植物エストロゲンについての研究の解明を追求することは新たな見解を提供しうるものと期待することができる。また、反対に農薬と自然環境に含まれる大豆などの食品を組み合わせることで日常的に複合影響が起こる可能性も否定できない。すなわち、植物エストロゲンと自然界に存在するエストロゲン様作用を持つ物質の生体への懸念を生じる物質が存在する可能性についてさらなる調査が必要だ。

今回の我々の研究では3種類の農薬の組み合わせ全てにエストロゲン活性の増強が確認された。しかし、この農薬の濃度は環境省が定める残留基準値の100倍から1000万倍摂取するとはじめてヒトへの影響が懸念される可能性がある。これより農薬によるエストロゲン様作用の複合効果による増強作用は直ちにヒトへの影響を及ぼす可能性は低いと推測されるという結果を導き出した。しかし、現段階では農薬同士を組み合わせた複合影響について試験するだけでも、莫大な数となり測定不可能である。このことから複合影響に関してのデータは十分でない。今後さらなるヒトや野生生物への曝露の複合による影響を考慮する必要がある。

また、今回実験で用いた細胞の持つ内因性エストロゲン受容体の作用が内分泌かく乱物質に影響を及ぼす可能性について指摘がある¹¹⁾。数多くの内分泌かく乱物質が存在すればヒト

の持つホルモン作用に変調をきたし生理学的均衡をかく乱すると報告している。この件に関しては、我々も今回の測定系を補う方法としてエストロゲン受容体を持たない細胞にER α およびER β を遺伝子導入することで内因性エストロゲン受容体の存在を考慮せずに化学物質がどちらのレセプターに結合するかを検出するレポータージーンアッセイについて検討している。

E. 結論

我々はMtT/Se細胞の増殖能を指標としたエストロゲン様作用の測定系を確立した。この細胞を用いた測定系に有機リン系殺虫剤、昆虫生育抑制剤、防かび剤に分類される農薬を単独でそれぞれ添加したところすべてにエストロゲン様作用が検出された。さらに、3種類の農薬の組み合わせすべてにおいて混合して添加すると、単独で添加したときと比較してエストロゲン様作用の増強が確認された。また、このエストロゲン様作用の増強は厚生労働省の定める農薬に残留する基準値と比較しても非常に微量であるということがいえる。

現在、農薬の複合影響についての国内及び国外での科学的な知見や国際的な基準に基づいた十分な報告はない。今回の研究以外にも、環境中に存在するエストロゲン様作用を持つ物質と農薬が複合したとき、生体に対して強いエストロゲン活性をもたらす影響がおこる可能性がある。我々が報告した研究を鋭意進めていく必要性

は明らかであり、また関連する研究を繰り返し行うことは大切である。

参考文献

- 1) 環境省、環境ホルモン戦略 SPEED'98, 1998(2000年11月改訂)
- 2) Fujimoto N, Maruyama S, Ito A. Establishment of an estrogen responsive rat pituitary cell sub-line MtT/E-2. *Endocrine Journal* 46:389-396, 1999.
- 3) Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992 Sep 12;305(6854):609-13.
- 4) Moccia RD, Fox GA, Britton A. A quantitative assessment of thyroid histopathology of herring gulls (*Larus argentatus*) from the Great Lakes and a hypothesis on the causal role of environmental contaminants. *J Wildl Dis.* 1986 Jan;22(1):60-70.
- 5) 環境ホルモン学会、第6回研究発表会、E-CALUX assayによる農薬のエストロゲン活性の評価、小嶋美穂子、藪下尚智、佐々木真理、福永健治、西山利正
- 6) Mihoko Kojima, Kenji Fukunaga, Mari Sasaki, Masafumi Nakamura, Motohiro Tuji, Toshimasa Nishiyama, Estrogenic activities of pesticides using an in vitro reporter gene assay, *International journal of environmental health.*

- 7) Kuiper GG; Enmark E; Peltö-Huikko M; Nilsson S; Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Jun 11;93(12):5925-30.
- 8) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 1998; 139(10):4252-63
- 9) Tsai, MJ, O'Malley, BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994; 63:451.
- 10) Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P; Mark M, Chambon P, et al, The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995 Dec 15;83(6):835-9.
- 11) Hiroyuki Kojima, Eiji Katsura, Shinji Takwuchi, Kazuhito Niiyama, and Kunihiko Kobayashi, Screening fo estrogen and androgen receptor activities in 200 prdticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells, *Enviromental health persprvctives* 112:5:2004:524-531
- 12) Nishikawa J, Saito K, Goto J, Dakeyama F, Matsuo M, Nishihara T. New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999 Jan 1;154(1):76-83.
- 13) Nishikawa J, Saito K, Sasaki M, Tomigahara Y, Nishihara T. Molecular cloning and functional characterization of a novel nuclear receptor similar to an embryonic benzoate receptor BXR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Oct 14;277(1):209-15.
- 14) Zhang L, Khan IA, Foran CM. Characterization of the estrogenic response to genistein in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2002 Jun;132(2):203-11.
- 15) 農林水産省、農薬取締法
- 16) Hughes CL Jr. Phytochemical mimicry of reproductive hormones and modulation of herbivore fertility by phytoestrogens. *Environ Health Perspect.* 1988 Jun;78:171-4.
- 17) Hiroyuki K, Eiji K, Shinji T, Kazuhito N, Kunihiko K. Screening foe Estrogen and

- Androgen Receptor Activities in 200 Pesticides by In Vitro Reporter Gene Assay Using Chinese Hamster Ovary cells, Environmental Health Perspectives. 2004 April 112(5):524-531
- 18) Olmstead AW, LeBlanc GA. Insecticidal juvenile hormone analogs stimulate the production of male offspring in the crustacean *Daphnia magna*. Environ Health Perspect. 2003 Jun;111(7):919-24.
- 19) Chizuru Nisioka, Masumi Miyoshi, Hisao Fujita, Takaaki Mouri, Hiroyuki Kuroda, A survey of fungicides in imported citrus fruits and banana, 71-74, 1997
- 20) Edward J Calabres, Toxicological consequences of multiple chemical interactions: a primer. Toxicology. 1995 Dec 28;105(2-3):121-35.
- 21) John A. McLachlan. Synergistic Effect of Environmental Estrogens; Report Withdrawn. Science 1997;277:462-3
- 22) Ashby J, Lefevre PA, Odum J, Harris CA, Routledge EJ, Sumpter JP. Synergy between synthetic oestrogens? Nature 1997;385:494
- 23) Arnold SF, Klotz DM, Collins BM, Vonier PM, Guillette LJ Jr, McLachlan JA., Science, Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals, Science. 1996 Jun 7;272(5267):1489-92.
- 24) John A. McLachlan. Synergistic Effect of Environmental Estrogens; Report Withdrawn. Science 1997;277:462-3
- 25) Nikander E; Metsa-Heikkila M; Ylikorkala O. Effects of phytoestrogens on bone turnover in postmenopausal women with a history of breast cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Mar;89(3):1207-12
- 26) Lissin LW, Cooke JP, Phytoestrogens and cardiovascular health. J Am Coll Cardiol 2000 May;35(6):1403-10.
- F. 健康危険情報
なし
- G. 研究発表
学会発表
1. 環境ホルモン学会、第7回研究発表会、複数農薬共存農作物におけるエストロゲン活性エンハンス効果、眞鍋真理、神田靖士、小嶋美穂子、堀伸二郎、西山利正 関西医科大学公衆衛生学講座
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

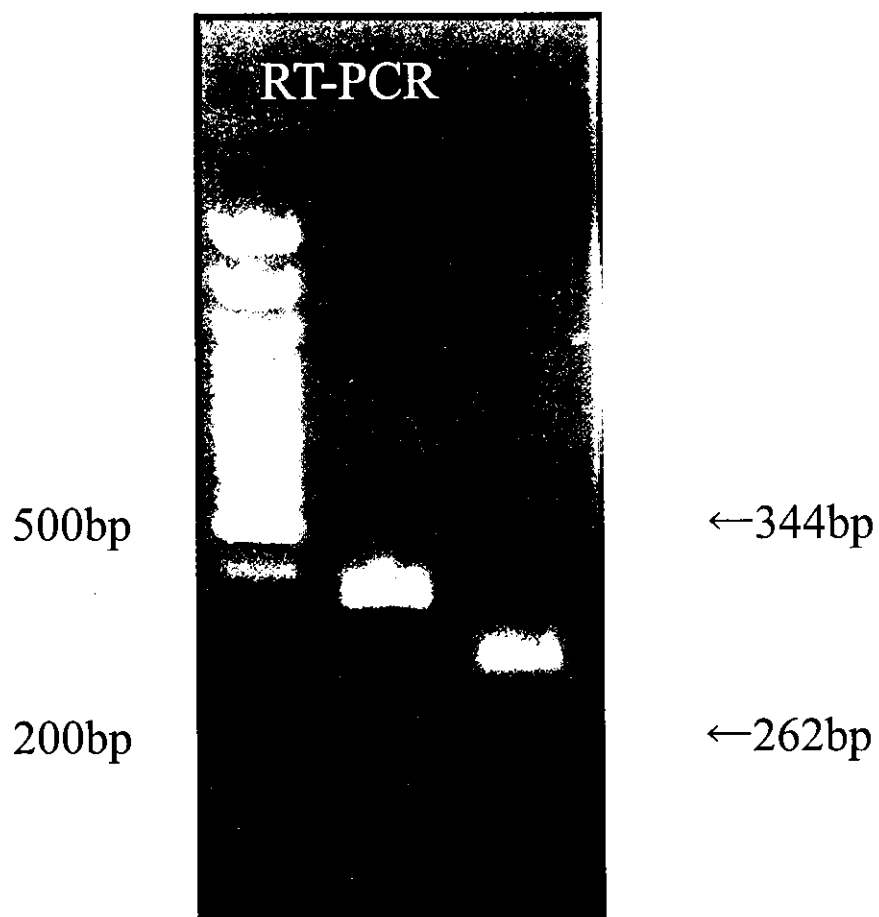
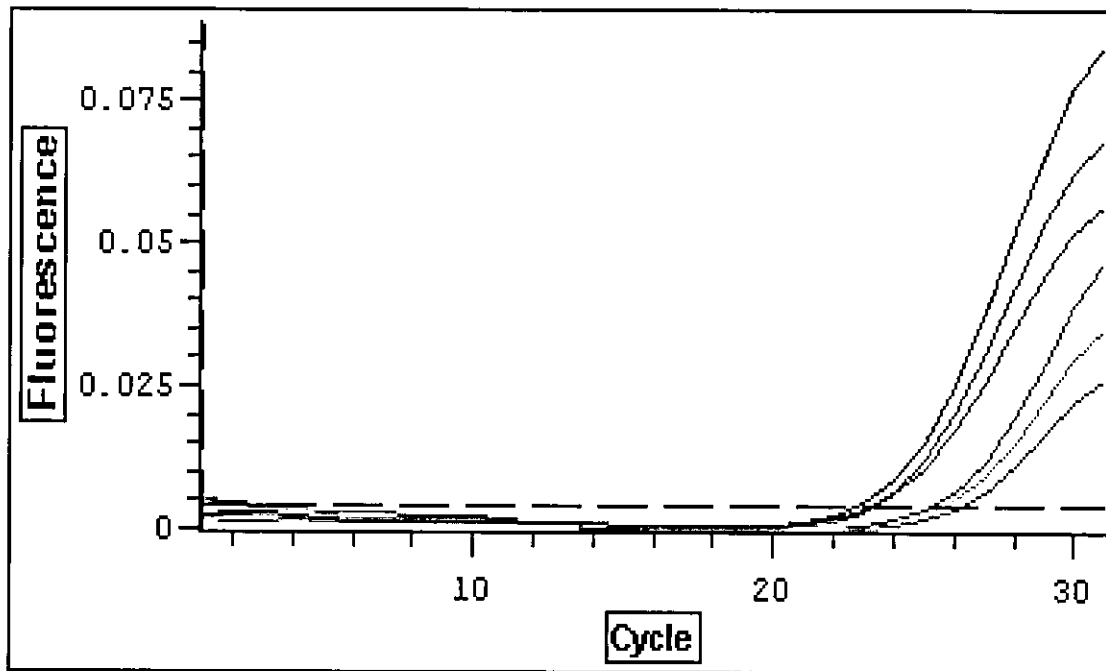


図1 MtT/Se 細胞のERの発現をRT-PCR法を用いて確認。
ER α (344bp) ER β (242bp)



α / β	Cycle	Mean
alpha 1	21.1	22.0
alpha 2	21.7	
alpha 3	23.3	
beta 1	25.1	25.6
beta 2	25.6	
beta 3	26.2	

$$25.6 - 23.8 = 1.8 \quad 2^{1.8} = 3.5$$

$$ER \alpha : ER \beta = 78 : 22$$

図2 MtT/Se細胞の mRNA レベルにおける ER α ・ β の発現割合の検討。横軸にサイクル数、縦軸に発光量を示した。それぞれが点線の示すラインと交わるサイクル数より平均値を算出した。

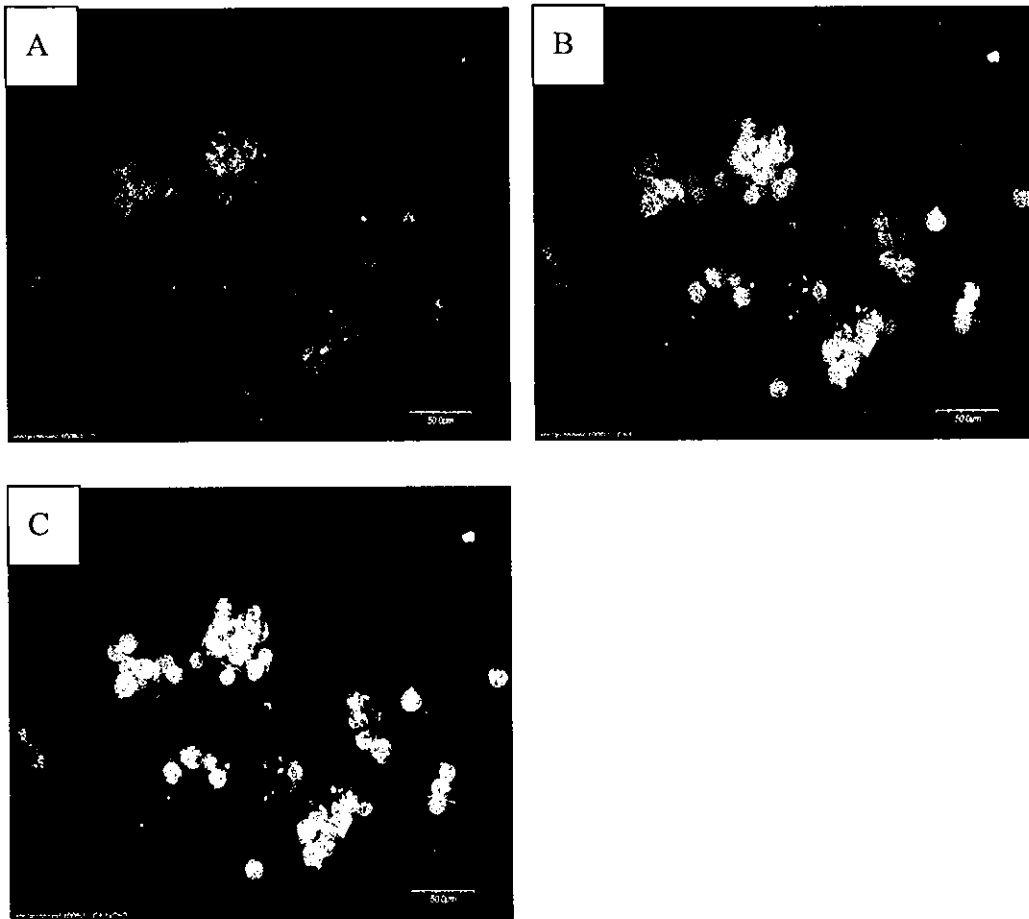
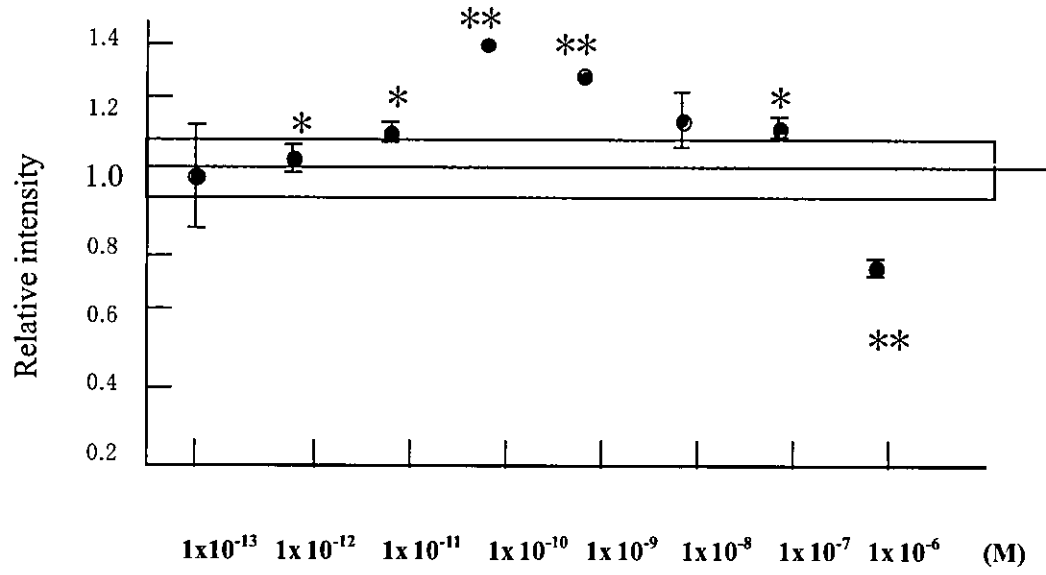


図3 ERの免疫染色($ER\alpha$, $ER\beta$)

MtT/Se 細胞のタンパク質レベルでの発現を確認した。

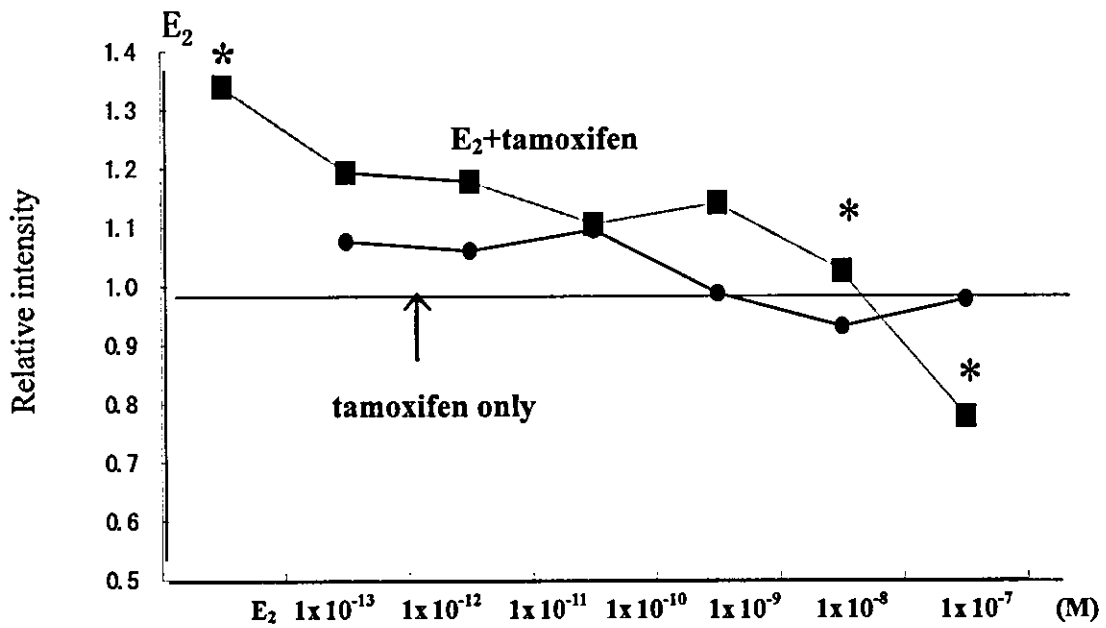
A:写真 $ER\alpha$ B: $ER\beta$ C: merged A and B



Wilcoxon signed rank test

*p<0.05 **p<0.01

図4 MtT/Se 細胞に 17β エストラジオールのエストロゲン活性の測定。MtT/Se 細胞に各濃度の 17β エストラジオールを添加した際のエストロゲン活性を縦軸にエストロゲン無添加群を“1”とした時の相対値で示した。



Wilcoxon signed rank test

*p<0.05 **p<0.01

図5 ER結合競合試験。E₂(10⁻¹⁰M)及び各濃度のタモキシフェンを添加した際のMtT/Seによる増殖活性を相対値で示した。

Tamoxifen only:タモキシフェンをMtT/Se細胞に単独添加した。

E₂+tamoxifen:17βエストラジオールをMtT/Se細胞に添加した際に最大活性を示した10⁻¹⁰Mと横軸濃度のタモキシフェンを添加した。

E₂:17βエストラジオール

表 1 17βエストラジオールと各種農薬の検出限界濃度の比較

農薬	検出限界濃度(M)
17βエストラジオール	1×10^{-12}
プロチオホス	1×10^{-6}
ピリプロキシフェン	1×10^{-6}
プロチオホス+ピリプロキシフェン	1×10^{-7}
ダイアジノン	1×10^{-5}
トリクロホスメチル	1×10^{-6}
ダイアジノン+トリクロホスメチル	1×10^{-7}
オルトフェニルフェノール(OPP)	1×10^{-5}
チアベンダゾール(TBZ)	1×10^{-5}
チアベンダゾール+オルトフェニルフェノール (TBZ+OPP)	1×10^{-7}

食品関連化学物質の細胞内シグナル伝達

分担研究者：松岡洋一郎

関西医科大学病理学第二講座 助教授

研究要旨

ヒト正常型遺伝子トランスジェニックラット 1 個体に発生した乳腺腫瘍より乳癌細胞株 7 株 (C1、C2、C3、C6、C11、C15、C17) を樹立した。Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によるエストロゲン受容体 (ER) 遺伝子発現の解析では、ER 陰性 (C17)、ER α のみ陽性 (C1)、ER β のみ陽性 (C2、C11)、ER α , β 陽性 (C3、C6、C15) の各細胞株であることが判明した。C3 (ER α , β 陽性)、C11 (ER β 陽性)、C17 (ER 陰性) 細胞の増殖はいずれもエストロゲン (17 β -estradiol) 非依存的であった。ゲニステインおよびダイゼイン (0-50...M) 添加 24 時間後での DNA 合成活性への影響を C3、C11、C17、MCF7 を用いて測定すると、ゲニステイン 10 μ M 以上で C3、C11 に DNA 合成の阻害を、MCF7 (ER α , β 陽性、エストロゲン依存性) には促進を認め、C17 では無効であった。一方、ダイゼインは 50 μ M まで全細胞の DNA 合成活性へ影響を与えなかった。ER β 陽性 C11 株を用いゲニステイン添加後の遺伝子発現変動を DNA アレイにより解析した。10 μ M ゲニステイン添加 72 時間後に 2 倍以上の発現変動を認めた遺伝子は、発現上昇 410 個、低下 327 個の 737 遺伝子で、全体の 3.6% (737/20,500) であった。発現上昇群には eaf2 (2.6 倍)、IL-15 (2.5 倍)、tumor necrosis factor receptor superfamily 12 (2.2 倍)、caspase recruitment domain protein 9 (2.1 倍)、発現低下群には transcription factor 2a1 (1/4.4 倍)、connexin 26 (1/3.4 倍)、apoptosis inhibitor 2 (1/2.5 倍)、cyclinG (1/2.2 倍) が含まれていた。以上の結果は、ゲニステインがエストロゲン非依存的乳癌細胞の転写活性抑制ならびにアポトーシス誘導により乳癌抑制作用を発揮している可能性を示唆している。

A. 研究目的

本邦女性の乳癌死亡率は近年急激に上昇しており、食生活の欧米化との関連が指摘されている。他方、アジア諸国における大豆の高摂取量と乳癌低発症率の相関が注目され、大豆に含まれるエストロゲン様物質であるイソフラボンによる乳癌の予防効果が期待されている。これら疫学的研究の結果は、食品中に含まれる天然ならびに合成エストロゲン様物質が乳癌発生の促進あるいは抑制に

関与する可能性を示唆している。また、食品中のエストロゲン様物質には内分泌かく乱作用も懸念されている。本研究の目的は、食品中のエストロゲン様物質の作用を測定するための培養細胞系を樹立し、その作用機構を解析することである。

B. 研究方法

B-1. ラット乳癌細胞株の樹立

ラット乳癌細胞株は 7,12-dimethylbenz[a]anthracene 投与により

ヒト正常型遺伝子トランスジェニックラット1個体に発生した腫瘍よりHallowesらの方法に従い樹立した。方法を略記すると、細切した1.5g腫瘍組織を0.2%コラゲナーゼ、0.1%ヒアルロニダーゼ、5%牛胎児血清含有199メディウム中で37°C、2時間処理した。分離細胞塊を500 μ m、70 μ mメッシュフィルターにて濾過後、40 μ mフィルターにて残った細胞を再浮遊し、培養皿に2時間接着させた。非接着上皮細胞を採取、培養し、2回の限界希釈により単コロニー由来の細胞株7株(C1、C2、C3、C6、C11、C15、C17)を樹立した。

B-2. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

全RNAからの1st. strand cDNA合成はReverTra Ace α (東洋紡、大阪)を用いて行った。増幅はKOD plus (東洋紡、大阪)により、デネイチャー95°C、15秒、アニーリング60°C、30秒、伸長68°C、1分、サイクル数30回の条件にて施行した。用いたプライマーは次の通りである。

ER α

forward: 5'-atgaccatgacccttcacaccaag-3'

reverse: 5'-ggcgtcgattgtcagaattggacc-3'

ER β

forward: 5'-aggaatggtcaagtgtggatccagg-3'

reverse: 5'-tgctggagtttaactcacggaacc-3'

GAPDH

forward: 5'-ttcaacggcacagtcaagg-3'

reverse: 5'-catggactgtggtcatgag-3'

B-3. DNA 合成活性の測定

DNA 合成活性は5-bromo-2'deoxyuridine (BrdU) labeling kit (ベーリンガー・マンハイム、ドイツ)を用い

て測定した。対数増殖期にある細胞0.5-1 $\times 10^4$ 個を96穴マイクロタイタープレート各ウェルに播種し、10%血清存在下24時間培養後、含3%チャコール処理血清培養液にてさらに24時間前培養する。0-1000pM 17 β -estradiol (E2) および0-50 μ Mのゲニステイン、ダイゼイン存在下で24時間培養後、10 μ M BrdUで2時間ラベルする。引き続き、70%エタノール/0.5M塩酸で-20°C、30分固定、ヌクレアーゼ処理(37°C、30分)、peroxidase 標識抗BrdU抗体で37°C、30分インキュベートした後、peroxidase 基質を加え405nmでの吸光度を測定した。

B-4. DNA マイクロアレイ

遺伝子発現の網羅的解析は、ER α 発現陰性C11細胞を10 μ Mゲニステイン非存在および存在下(ϕ 6cmディッシュ各3枚)で72時間培養後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN、CA)にて精製した全RNAを鋳型としてcRNAを合成し、アジレント社製ラットオリゴヌクレオチドアレイ(約20,500遺伝子搭載)を用いて行った。

C. 研究結果

C-1. ラット乳癌細胞株のER発現とp53遺伝子変異

ヒト正常型遺伝子トランスジェニックラット1個体に発生した乳腺腫瘍より乳癌細胞株7株(C1、C2、C3、C6、C11、C15、C17)を樹立した。RT-PCR法によるエストロゲン受容体(ER)遺伝子発現の解析では、ER陰性(C17)、ER α のみ陽性(C1)、ER β のみ陽性(C2、C11)、ER α , β 陽性(C3、C6、C15)の各細胞株であることが判明した(図1)。一方、細胞増殖ならびにアポトーシス関連

分子群と ER 発現との間には明らかな相関は認められなかった。

DNA 傷害等細胞内傷害によるアポトーシス誘導に中心的役割を担う p53 の遺伝子変異について解析した。全株について RT-PCR で全長 p53 遺伝子が増幅され、大きな欠失等は存在しなかった。また、PCR 産物の塩基配列を解析した結果 C11 のコドン 246 に 1 塩基変異が検出された。この変異は、ゲノム DNA の塩基配列解析により確認された。さらに、導入ヒト H-ras 遺伝子には全株で変異が認められたのに対して、ラット H-ras 遺伝子には変異が見られなかったことは興味深い (表 1)。

C-2. C3、C11、C17 株の増殖のエストロゲン依存性

C3 (ER α , β 陽性)、C11 (ER β 陽性)、C17 (ER 陰性) 細胞のエストロゲン依存性を 0-1000pM E2 添加による DNA 合成活性の変動により検討した。1000pM E2 添加時の DNA 合成活性はそれぞれ非添加対照群の C3 91.1 \pm 2.0%、C11 96.1 \pm 3.3%、C17 92.0 \pm 20.6% でいずれもエストロゲン非依存性であった。エストロゲン依存性 MCF-7 細胞では 1000pM E2 添加により約 1.4 倍の DNA 合成の上昇を認めた (図 2)。

C-3. ゲニステイン、ダイゼインの DNA 合成活性への影響

ゲニステインおよびダイゼイン (0-50 μ M) 添加 24 時間後での C3、C11、C17、MCF-7 細胞の DNA 合成活性への影響を測定した。5 μ M ゲニステインまで C3、C11、C17 細胞では明らかな影響は認めなかったが、10 μ M 添加時より C3、C11 細胞で DNA 合成抑制が認められ、50

μ M 添加により非添加対照群の C3 34.7 \pm 8.0%、C11 59.0 \pm 17.9% であった。一方、C17 細胞では 120.8 \pm 9.6% であった。MCF-7 細胞では 25 μ M 添加時より有意な DNA 合成亢進を認め、50 μ M 添加により約 1.8 倍の DNA 合成上昇を認めた。ダイゼインは 50 μ M までいずれの細胞の DNA 合成活性へも明らかな影響を認めなかった (図 3)。

C-4. DNA マイクロアレイ解析

ER β 陽性 C11 細胞を用いゲニステイン添加後の遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイにより解析した。10 μ M ゲニステイン添加 72 時間後に 2 倍以上の発現変動を認めた遺伝子は、発現上昇 410 個、低下 327 個の 737 遺伝子で、全体の 3.6% (737/20,500) であった。発現上昇群には eaf2 (2.6 倍)、IL-15 (2.5 倍)、tumor necrosis factor receptor superfamily 12 (2.2 倍)、caspase recruitment domain protein 9 (2.1 倍)、発現低下群には transcription factor 2a1 (1/4.4 倍)、connexin 26 (1/3.4 倍)、apoptosis inhibitor 2 (1/2.5 倍)、cyclinG (1/2.2 倍) が含まれていた (図 4)。

D. 考察

大豆イソフラボンによる乳癌抑制がエストロゲン受容体を介する作用であるのか否か未解決のままである。大豆イソフラボンの腫瘍抑制効果は乳癌のみならず、エストロゲン非依存性癌である大腸癌、皮膚癌でも報告されている。研究分担者も、エストロゲン非依存性乳癌を好発する正常型 ras 遺伝子導入ラットを用いた動物実験で大豆イソフラボンの発癌抑制効果を確認している (Toxicol. Pathol., 2003)。また、大豆イソフラ