

ビスフェノールA, ゲニステイン等の生殖, 免疫機能への影響及び代謝に関する研究

分担研究者 別府正敏 東京薬科大学教授

### 研究要旨

ビスフェノールA, ゲニステインについて, ①ラットの生殖関連行動, 生殖機能に対する影響を皮下投与により調べたところ, 明瞭な影響は認められなかった. ②鶏胚の孵化及び鶏胚の骨形成, 軟骨細胞の活性に対する影響を胚への直接注入により調べたところ, 明瞭な影響は認められなかった. ③ラット脳海馬の器官培養標本を両化合物存在下培養すると, ゲニステインは組織をやや増殖させ, また, わずかながらシナプス活動を促進する効果を示した. ④ヒト単球系培養細胞 U937 及びヒトTリンパ球系培養細胞 Jurkat への影響を *in vitro* で調べたところ, 両化合物とも両細胞のアポトーシスを増強する作用を示した. ⑤ヒトスルホトランスフェラーゼによる硫酸抱合代謝の可能性を組換え体ヒト酵素を用いて検討したところ, 両化合物とも容易に硫酸抱合を受けることが明らかとなった. ⑥ヒトグルタチオントランスフェラーゼによる代謝分解の可能性を組換え体π型ヒト酵素を用いて検討したところ, 両化合物とも本酵素によって代謝される可能性は低いことがわかった.

### A. 研究目的

内分泌かく乱作用があると疑われているビスフェノールA, ゲニステインなどの物質について, ヒトの生殖, 発生, 神経系, 免疫系に対する影響や生体内動態に関する手がかりを得るため, 各種の *in vivo* または *in vitro* 実験系を用いて検討した.

### B. 研究方法

1. 生殖・発生に対する影響評価はラット, 鶏胚を用いた *in vivo* 曝露実験にて検討した.
2. 神経系への影響は, ラット脳の海馬のスライスを *in vitro* で器官培養し, 組織像及び神経

活動 (電気的活動) への影響を見ることにより検討した.

3. 免疫をはじめとする細胞機能に対する影響はヒト単球系培養細胞 (U937) やヒトTリンパ球系培養細胞 (Jurkat), エストロゲン依存性ヒト培養乳ガン細胞 (MCF-7) 等を用いた細胞レベルでの *in vitro* 曝露実験にて検討した.
4. ヒト体内における動態を *in vitro* 実験から推定するためのアプローチとして, 組換え体ヒト薬物代謝酵素 (スルホトランスフェラーゼ, グルタチオンSトランスフェラーゼ), 組換え体ヒトステロイドホルモン合成酵素 (アロマターゼ) を作製し, *in vitro* においてこれら化学物質との相互作用, 代謝を検討した.

### 【略語】

GST, グルタチオンSトランスフェラーゼ

図1: Gen, ゲニステイン; BPA, ビスフェノールA

図3: C60, フラーレン

### C. 研究結果及び考察

1. 生殖・発生に対する影響

1) ラットの生殖関連行動及び生殖機能に対する影響

生後8週齢のWistar系正常雌雄ラットの背部皮下にビスフェノールAまたはゲニステインを1日2回、13日間投与し(0.3, 1.0, 3.0, 10.0 mg/kg), 投与終了後、生後10週齢の正常雄または雌ラットと同居させ、交尾行動、妊娠率等を膣栓、膣内精子有無により検査した。妊娠の成立に関して、投与群の雌雄はコントロール群とほとんど差が無かった。また、Wistar系妊娠ラットに対し、妊娠1日目より分娩1日前まで同様に両化合物を投与し、帝王切開後、胎児数、胎児体重、流産痕、奇形発生を観察したが、コントロール群とは差が認められなかった。以上の結果から、両化合物とも用いた用量ではラットの妊娠の成立、胎児の発育、奇形発生、流産発生に著明な影響は及ぼさないとと思われる。

## 2) 鶏胚の発生に対する影響

産卵後2日目の鶏卵の卵黄中央部に25 nmol ~ 5  $\mu$  mol のビスフェノールA(約0.1~20 mg/Kg)またはゲニステイン(約0.1~20 mg/Kg)を注入し、孵化率、孵化時の形態を調べたがコントロール群と差は認められなかった。また、同様な措置後、孵卵8日後(受精10日後)の鶏胚を取り出し、体重及び大腿骨のCa, Mg, リン酸の量を調べたがコントロール群と差はなかった。さらに、この鶏胚の軟骨細胞の*in vitro*での増殖能を検討したが、コントロールとの差はなかった。以上の結果から、両化合物は用いた用量では鶏胚の発生に著明な影響を及ぼさないとと思われる。しかしながら、受精卵形成に対する影響については、別途検討を要する。

## 2. 脳組織の*in vitro*培養系に対する影響

生後5~7日のラットの脳の海馬を摘出し、そのスライス標本を10 nM, 1  $\mu$  MのビスフェノールA及びゲニステイン存在下培養し、一週間後の組織像を光学顕微鏡で観察したところ、ゲニ

ステイン 処置標本においてやや組織の増殖の傾向が見られた。この種の変化は神経栄養因子を適用した場合にもみられるものであり、神経突起の伸張促進やグリア細胞の増殖の可能性が考えられる。そこで、この標本を電位感受性色素で染色して、光学的に電気活動を解析した。その結果、ゲニステイン1  $\mu$  M投与群では有意なシナプス活動促進効果が見られた(図1)。ビスフェノールAでは有意な影響は認められなかった。ゲニステインで認められた作用を有益作用と見るか有害作用と見るかについては、さらに詳細な今後の検討を待つ必要がある。

## 3. ヒト培養細胞の機能に対する影響

### 1) ヒト培養免疫系細胞の機能及び分化、アポトーシスに対する影響

ヒト単球系培養細胞U937及びヒトTリンパ球系培養細胞Jurkatを1 nM~10  $\mu$  MのビスフェノールAまたはゲニステインの存在下、継代培養し、増殖率、生存率、アポトーシス感受性、細胞分化能(U937のみ)、に対する影響を調べた。細胞増殖に対してはゲニステインの最高濃度(10  $\mu$  M)でのみ明らかな抑制効果が認められたが、ビスフェノールAや低濃度ゲニステインでは明らかな影響は認められなかった。細胞生存率にはいずれも影響は認められなかった。アポトーシスに対する影響を、核の断片化またはDNAの断片化で判定したところ、ビスフェノールA、ゲニステインとも、いずれの細胞に対しても明瞭なアポトーシス誘導作用を示さなかった(図2)。

しかし、アポトーシス誘導剤エトポシドで誘導されるアポトーシスに対する両化学物質の影響を調べたところ、ビスフェノールA、ゲニステインともに100 nM以上において、双方の細胞に対し増強効果を示した(図2)。従って、両化合物は弱いアポトーシス誘導活性を持つか、あ

るいは部分的な細胞活性化作用を持ち、他のアポトーシス誘導剤の作用を強めると考えられる。

U937 細胞は分化誘導剤ホルボールミリステートアセテートで処理するとマクロファージに分化し接着細胞となる。この細胞分化が 100 nM 以上のビスフェノールAによって抑制される予備的結果を得ているが、今後、検証が必要である。

また、これら免疫細胞の重要な機能であるサイトカイン産生能や活性酸素などエフェクター分子の産生能に対する影響について検討中である。

## 2) ヒト培養乳ガン細胞のエストロゲン依存性情報伝達系に対する影響

エストロゲン依存性の細胞増殖を示すヒト乳ガン細胞 MCF-7 を用いて、そのエストロゲン依存性細胞増殖機構を情報伝達の観点から検討した。ビスフェノールA、ゲニステインはエストラジオールより弱いものの、0.1~1  $\mu$  M の濃度で MCF-7 の増殖を促進した。細胞増殖時に変動する情報伝達系分子(転写因子 NF- $\kappa$  B の核移行, p44/42 Map kinase のリン酸化,  $\beta$ -catenin の核移行など)について、両化学物質の影響を検討したが、著明な変化は認められなかった。従って、これらの化合物の MCF-7 細胞増殖促進作用にはいずれの情報伝達系も関与していないと考えられる。

## 4. 組換え体ヒト酵素を用いた *in vitro* 相互作用及び代謝の検討

### 1) 組換え体ヒトスルホトランスフェラーゼの作製及びそれを用いた代謝の検討

フェノール性化合物を硫酸抱合し排泄へと導くスルホトランスフェラーゼがフェノール性化合物であるビスフェノールA、ゲニステイン、ダイゼイン、ノニルフェノール、オクチルフェノールに対してどの程度硫酸抱合活性を示すか

を、組換え体ヒトスルホトランスフェラーゼ 4 分子種 (hP-PST-1, hM-PST, hDHEA-ST, hEST) を作製して検討したところ、いずれの基質も  $\mu$  M レベルの  $K_m$  値において、hM-PST 以外の組換え体ヒトスルホトランスフェラーゼ分子種の一つまたは複数の分子種により代謝されることが明らかになった。この結果から、ヒトにおいてスルホトランスフェラーゼが、これらの化合物の人体における不活性化に大きな役割を果たしていることが示唆された (図 3)。

### 2) 組換え体ヒトグルタチオン S トランスフェラーゼとの相互作用の検討

解毒酵素の一つであるグルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) がビスフェノールAやゲニステインを代謝しうるかどうかが組換え体ヒト  $\pi$  型 GST を用いて検討した。両化合物の組換え体ヒト  $\pi$  型 GST に対する結合性を、GST 活性に対する阻害度を測定することにより検討したところ、両者とも組換え体ヒト  $\pi$  型 GST に対する結合活性を示したが、かなり弱い結合であった (図 4)。この結果から、ヒト  $\pi$  型 GST はビスフェノールA、ゲニステインの代謝にはほとんど関与しないものと推察される。しかし、 $\pi$  型以外の基質特異性の異なる GST も存在するので、それらについても今後調べる必要がある。

### 3) 組換え体ヒトステロイドホルモン合成酵素の作製及びその酵素機能に対する影響

男性ホルモンから女性ホルモンを合成する過程を制御する酵素アロマターゼに対するビスフェノールA、ゲニステイン等の影響を調べるためにヒトアロマターゼ遺伝子をバキュロウイルス系で発現させ、酵素タンパク質を精製した。現在、この精製酵素を用いてこれらの化合物の影響を検討している。

#### D. 今後の展望

本分担研究は異なる実験系から成る独立した複数の課題で構成されており、各研究の進展度はそれぞれ異なっている。いくつかの課題については、確たる結論を下すには1年間の研究期間は短く、今しばらくの検討期間が必要である。これらについてはさらに研究を継続し、充実した結果を得て所期の研究目的を達成したい。

本研究結果は必ずしも最終的に確定したものではないが、あえて全般的な印象を述べると次のようになる。すなわち、ビスフェノールA、ゲニステインの影響は *in vitro* では認められやすいが、*in vivo* では現れにくいように見える。*in vivo* (生体) においては代謝的な分解によってその影響が軽減されたり、他の恒常性維持機構が働くことによって影響が目に見える形で出るに至らないのであろうと推察される。

しかしながら、内分泌攪乱作用が疑われる各種化合物の作用の解明は、基本的な、あるいは「潜在的」な作用がわかる *in vitro* の研究と、個体における最終的な影響を知るための *in vivo* の研究の両面からの研究が重要であり、今後、ヒトへの影響を評価するためには多面的な知見を集積し、総合的に判断することが必要であろうと考える。

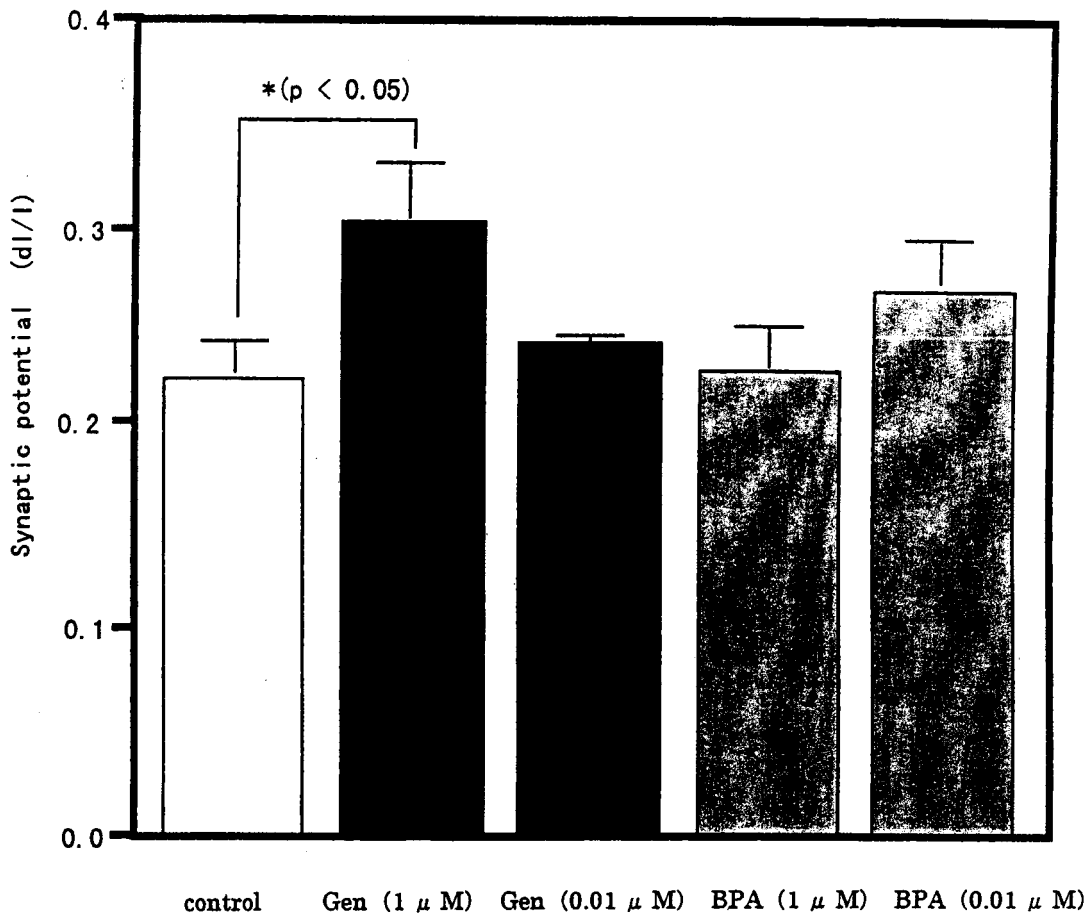
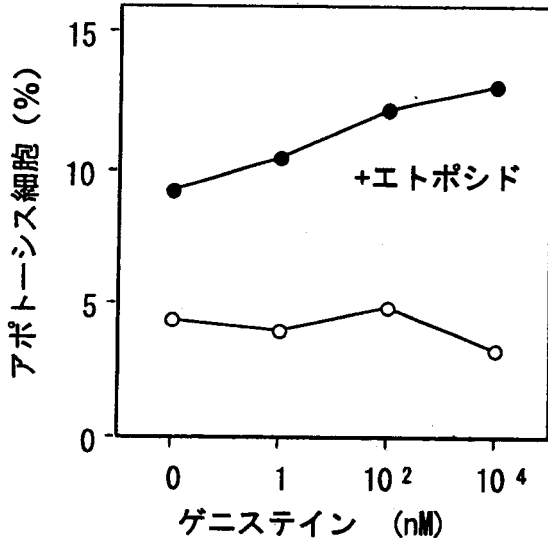


図1 光学的に計測されたラット脳海馬シナプス電位に及ぼす  
ゲニステイン(Gen)とビスフェノール A(BPA)の作用

### U937細胞



### Jurkat細胞

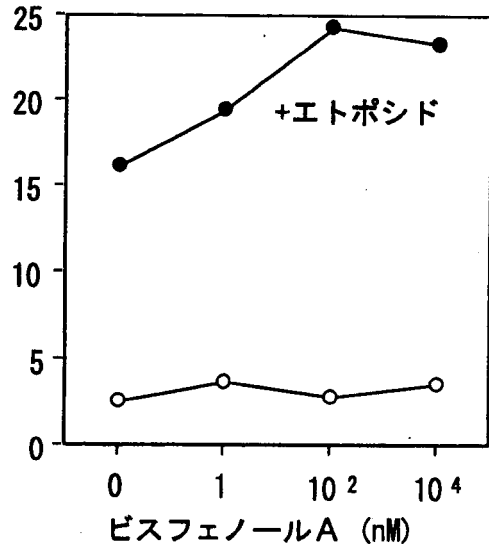
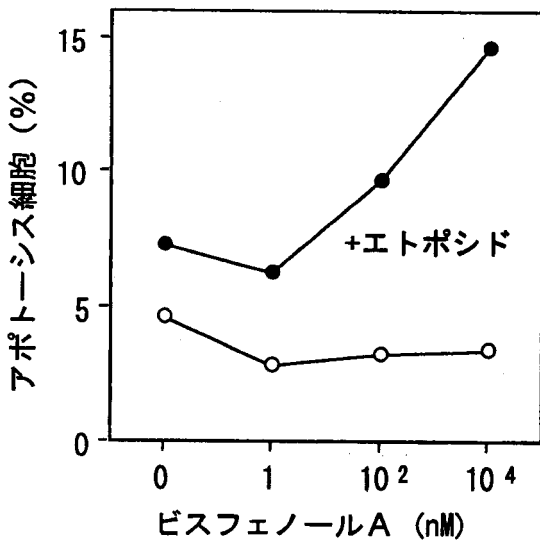
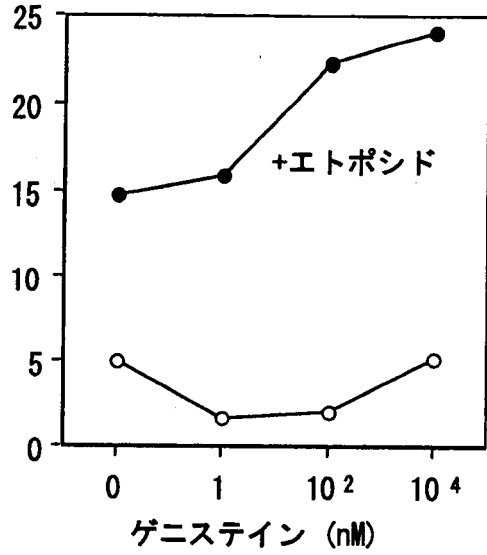


図2 ヒト単球系細胞U937及びヒトTリンパ球系細胞Jurkatのアポトーシスに及ぼすビスフェノールA, ゲニステイン曝露の影響 (曝露期間4日間)

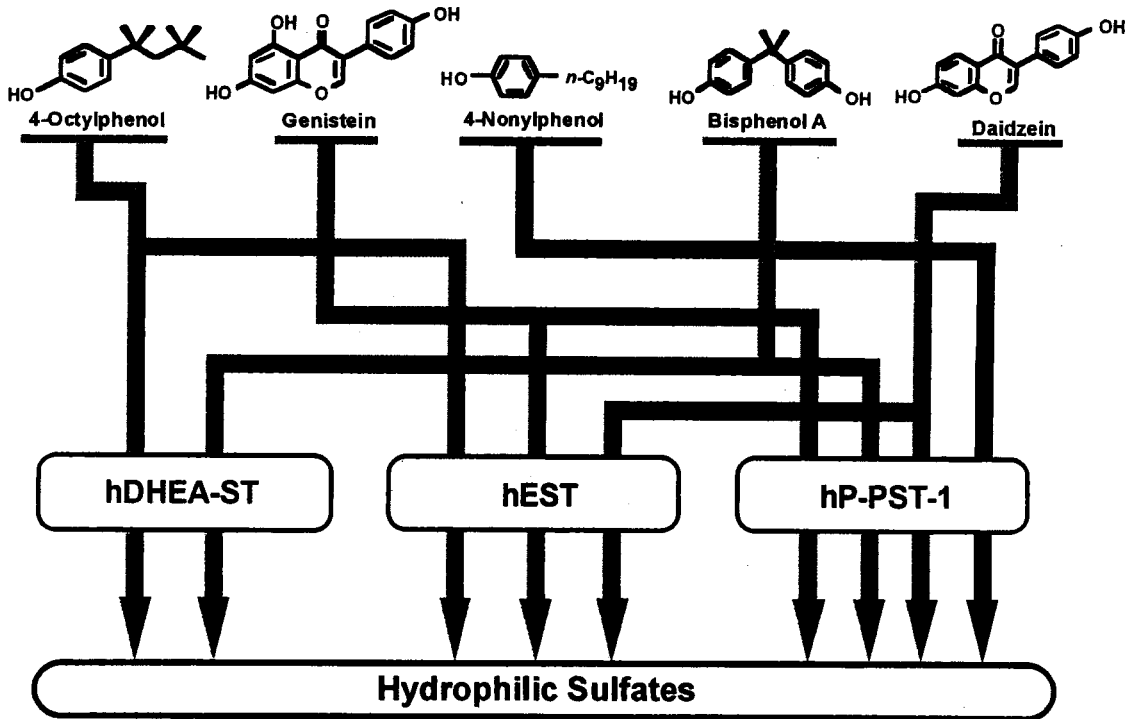


図3 ビスフェノールA、ゲニステイン等のフェノール性化合物のヒトスルホトランスフェラーゼによる推定代謝経路

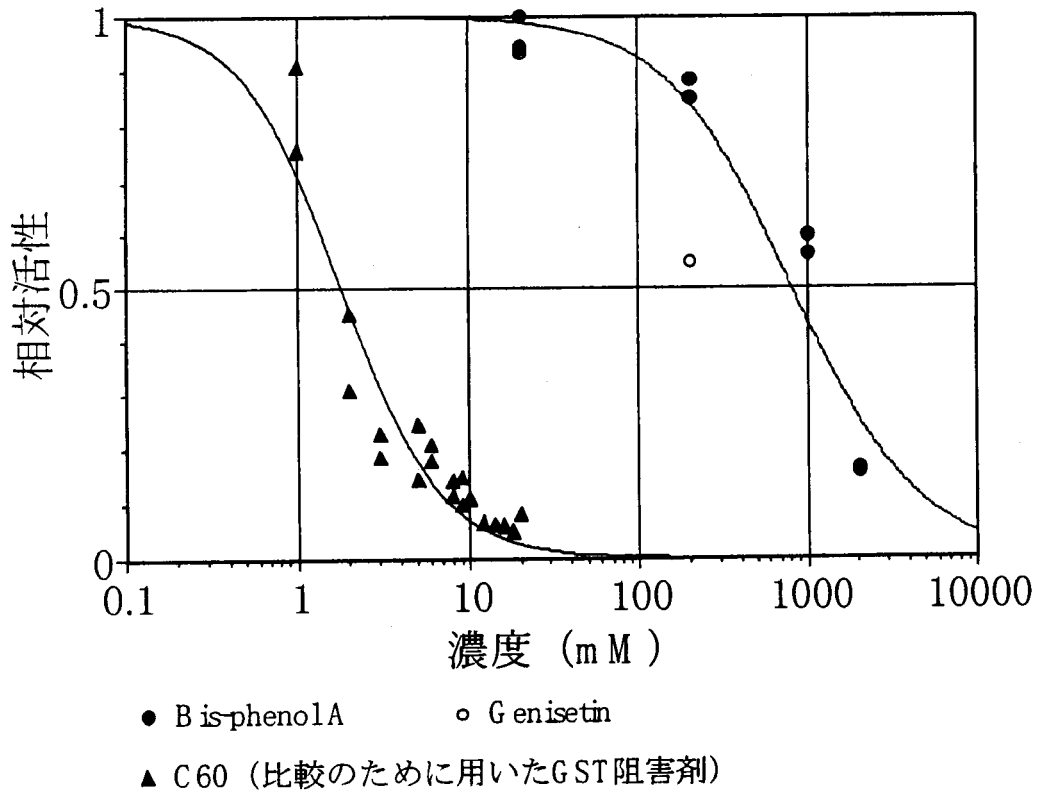


図4 ヒトGSTの抱合反応に対するビスフェノールA、ゲニステインの阻害効果