

研究要旨：

性ホルモン受容体結合試験法のバリデーションとして、エストロゲン受容体(ER)とアンドロゲン受容体(AR)を用いた試験系の特異性評価ならびに種差の検討を実施した。ER は AR に比べて高い特異性を示した。種差に関しては、検討したいずれの化合物もヒト ER α 、ラット ER に対して同程度の結合親和性を示した。ヒト ER β に対しては結合親和性が異なる例があり、genistein では約 10 倍高い結合親和性を示した。

A. 研究目的

化学物質の内分泌かく乱作用を検出するスクリーニング法の満たすべき条件として感度・特異性・安価・迅速および簡便性があり、この点で *in vitro* 試験法が有利である。本研究においては、EDSTAC より提案されている手法のうち受容体結合試験法のバリデーションを実施する。なお、本研究によって得られる試験成績は、種々の内分泌かく乱化学物質の potential の最も基本的な指標であることから、本研究班の各分担研究に対して基礎的データを提供しようと考えられる。

B 研究方法

当研究所ではこれまでラット子宮より調製したエストロゲン受容体 (ER) および前立腺より調製したのアンドロゲン受容体 (AR) を用い、アゴニストならびに内分泌かく乱作用が疑われる物質の結合親和性を評価してきた。本研究においては、以下に示すように試験系の特異性評価および種差の検討を実施した。

1. 特異性の評価

1.1 ERとの結合親和性評価

(1)ER標本の調製

雌性SD系ラットに卵巣摘出手術を施し、7

日間以上飼育した後に子宮を摘出した。子宮を細切し、10倍量の緩衝液を加え、ホモジナイズした。ホモジネートを 200,000 x g で30分間遠心して得られる上清(細胞質画分)をER標本として用いた。

(2)ER結合試験

標識リガンドとして [^3H]estradiol を用いた。一定量の ER標本 と標識リガンドを、各種濃度の試験物質存在下4℃、16時間反応させた。反応終了後、反応液に dextran-coated charcoal (DCC)を添加し、15分間混合して遊離している標識リガンドを DCCに吸着させ、2,000rpmで15分間遠心しDCCを除去した。上清中の放射活性(標識リガンドの結合量)を液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、全結合とした。なお、標識リガンドのER標本への非特異的結合の影響を除くため、大過剰の非標識リガンド存在下で標識リガンドの結合量(非特異的結合)を求め、全結合と非特異的結合の差を特異的結合とした。

試験物質非存在下の特異的結合に対する各種濃度の試験物質存在下の特異的結合の割合(%)を求めた。なお、特異的結合に50%以上の抑制が認められた場合には、IC₅₀を算出した。

(3)試験物質

estriol, DES, genistein, tamoxifen,

progesterone, testosterone,
dihydrotestosterone, bisphenol A

1.2 ARとの結合親和性評価

(1)AR標本の調製

雄ラットに精巣摘出手術を施し、24時間後に前立腺腹葉を摘出した。前立腺腹葉は細切し、5倍量の緩衝液を加え、ホモジナイズする。以後の操作は1.1(1)項に準じて実施した。

(2)AR結合試験

標識リガンドとして [^3H]testosteroneを用いる。方法は1.1(2)項に準じた。

(3)試験物質

testosterone, dihydrotestosterone, DES, bisphenol A

2. 種差の検討

rHuman estrogen receptor α および β (PanVera社製)を購入し、受容体結合試験系を確立した。その後、1.1(3)項より適当な物質を選択して結合親和性を評価し、ラット受容体との差異ならびに α 、 β 間の差異について検討した。

C. 研究結果

1) 特異性の検討

ラットERを用いた特異性の検討結果、17 β -estradiol (IC $_{50}$: 1.1×10^{-9} M)と比較してestriolの効力は約1/3、DESは約1.5倍であった。testosterone, dihydrotestosteroneでは 1.0×10^{-5} Mから特異的結合の抑制が認められたが、 1.0×10^{-4} Mでも50%以上の抑制は認められなかった。progesteroneでは 1.0×10^{-4} Mでもまったく影響が認められなかった。

ラットARを用いた検討において、testosterone, dihydrotestosteroneのIC $_{50}$ はそれぞれ 1.1×10^{-9} M、 5.6×10^{-10} Mであった。DESでは 3.0×10^{-6} Mから影響が認められ、IC $_{50}$ は 6.9×10^{-5} Mであった。また、エストロゲン活性が疑われているbisphenol AはARへの結合に対するIC $_{50}$ が 5.1×10^{-6} MとERでのIC $_{50}$ (5.5×10^{-6}

M) とほとんど差のない結果であった。予備的検討では、estradiol, progesteroneについてもARに対して高い結合親和性が認められた。

2) 種差の検討

ラットERとヒトERについて比較した。ヒトERについては α 、 β の差異についても検討した。DES, estriol, genistein, tamoxifen, progesteroneについて検討した結果、ラットERとヒトER α はほぼ同様の結果であった。genisteinはヒトER β に対して約10倍高い親和性を示した。

D 考察

本研究によって得られる試験成績は、種々の内分泌かく乱化学物質の potential の最も基本的な指標であることから、本研究班の各分担研究に対して基礎的データを提供しうると考えられる。

E 結論

ER は AR に比べて高い特異性を示した。種差に関しては、検討したいずれの化合物もヒト ER α 、ラット ER に対して同程度の結合親和性を示した。

F. 研究発表

1 論文発表

Shinya Uchida, Shizuo Yamada, Kenji Nagai, Yoshiharu Deguchi and Ryohei Kimura: Brain pharmacokinetics and in vivo receptor binding of 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonists, Life Sciences, Vol.61, No.21, 2083-2090, 1997

2 学会発表

内分泌攪乱作用の検出のための in vitro 試験法-受容体結合試験を中心として-

In vitro 発生毒性研究会（1998 年 11 月，
大阪）