

内分泌かく乱化学物質のエストロゲン代謝に及ぼす影響とそのスクリーニング法の開発

分担研究者 鈴木 恵真子 （財）食品薬品安全センター 秦野研究所

研究要旨：

内分泌かく乱化学物質のエストロゲン代謝に及ぼす影響とそのスクリーニング法の開発カテコールエストロゲン（CE）メルカプツール酸はエストロゲン発がんのリスクマーカーになり得ると永年考えられてきたが、測定法がないためこれまで尿中に証明されていない。今年度は、4-ヒドロキシエストロン・メルカプツール酸のモノメチル体を標品として合成し、その性質を明らかにした。また、調製したCEメルカプツール酸の抗血清を用いて固定化抗体カラムを作製し、E2投与ラット尿中にCEメルカプツール酸をはじめて証明した。

さらに、15 α -ヒドロキシエストロゲン（3種）のBSA結合物を合成し、十分な力価の抗血清を得た。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質のエストロゲン様の影響をエストロゲンによる発がんに的を絞り、尿中リスクマーカーの検出で全体を捉える。エストロゲン発がんのリスクマーカーとしてCEメルカプツール酸の測定法の開発と併行してCEおよび15 α -ヒドロキシエストロゲン（15 α -OHEs）の測定法の開発を行う。

B 研究方法

I) 4-OHE₂-2SR のモノメチル体の合成と *in vitro* O-メチル化

1. 4-OHE₂-2SR 3-メチルエーテル (4-OHE₁-2SR 3Me) の合成

無水酢酸とピリジンの存在下常法でアセチル化して4-OHE₂-2SRの2, 3-ラクトン4-アセテート(1)を得た。これをメタノール・塩酸で処理するとアセチル基はそのままでラクトン環が加メタノール分解し、4-OHE₂-2SRのアセテートメチルエステル(2)が得られた。2をジアゾメタンでメチル化し、

3-メチルエーテル体(3)としてからアルカリで加水分解して目的とする3-メチルエーテルを得た。

2. 4-OHE₁-2SR 4-メチルエーテル (4-OHE₁-2SR 4Me) の合成

反応に際してピリジンは無水酢酸の存在下アセチル化の触媒として働くため、無水酢酸のみで処理したところ期待通り4-OHE₁-2SRの2, 3-ラクトン(4)が得られた。そこで、同様にジアゾメタンでメチル化して、4-メチル体(5)としてから、メタノール性アルカリで加水分解して目的とする4-メチルエーテルを得た。

3. 4-OHE₁-2SR の O-メチル化

Sprague-Dawley ラット (オス、8週齢) の肝 cytosol をカテコール・Oメチルトランスフェラーゼ源として用い、S-アデノシルメチオニンと Mg²⁺ イオンの存在下4-OHE₁-2SRのメチル化を検討した。同一条件で4-OHE₁のメチル化を行い両者を比較した。アッセイ条件は既報 (Suzuki, E. et al, 1993)

に準じた。HPLC カラムは Inertsil ODS-2 (15×0.46 cm id) を用い、移動相には 0.5% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 3.5)/テトラヒドロフラン/アセトニトリル (5:1:1 又は 10:3:3) を流速 1.0 または 0.8 mL で使用し、280 nm で検出した。

II) CE メルカプツール酸の測定法の開発

1. 免疫原の合成

CE メルカプツール酸のカルボキシル基を利用して合成することとし、CE メルカプツール酸を直接ウシ血清アルブミン (BSA) と活性エステル法を用いて結合させた。すなわち、2-OHE₁-1SR をジメチルスルホキシドに溶解し、N-ヒドロキシこはく酸イミドを加え、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩で脱水縮合反応を行い活性エステルを得た。この反応液を BSA の 50 mM リン酸緩衝液に加え、ハプテン-BSA 結合反応を行った。得られたゲル状の反応液を PD-10 を用いてゲル濾過し、BSA 画分を分取、凍結乾燥して免疫原を得た。他の 3 種の CE メルカプツール酸についても同様に反応し、目的物を得た。なお、各免疫原を硫酸で加水分解後、吸光光度分析により求めた 2-OHE₁-1SR、2-OHE₁-4SR、4-OHE₁-2SR、4-OHE₁-2SR 3Me の ハプテン-BSA 結合モル比は各々 13、16、22、24 であった。

2. 抗血清の作製

上記 4 種の免疫原 (1mg) の 0.9% 食塩水 (0.5 mL) を complete Freund's adjuvant (0.5 mL) で乳化し、各々 (1 mL) をウサギの背に 1 群 3 匹で 2 回/月 皮内注射した。通常エストロゲンはこの条件で十分な力価の抗血清が得られるが、今回は力価の上昇を認めなかった。そこで、2 倍量の免疫原を同様

に 1~2 回/月皮内注射したところ 2-OHE₁-1SR の 3 匹中 2 匹に力価の上昇を認め、5 か月後に抗血清を得た。

3. 固定化抗体カラムの調製

得られた抗血清の内、特異性の広い抗血清をプロテイン A カラムで精製、凍結乾燥し IgG を得た。50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解してアフィゲル 10 と反応させた後、未反応の活性基は 1M エタノールアミン-塩酸塩 (pH 8.0) で不活性化した。

4. 測定条件

HPLC カラムは Inertsil ODS-3 (15×0.46 cm id) を用い、移動相は 0.5% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 3.5)/アセトニトリル/メタノール (70:26:8) を流速 1.0 mL/min で用いた。検出器は MODEL 5010 Analytical cell 付 NBS Coulochem MODEL 5100A を用い、設定電位 +0.15V で測定した。

5. 固定化抗体カラムを用いる CE および CE メルカプツール酸の測定法の開発

50mM リン酸緩衝液 (0.025%アスコルビン酸含有、4 mL) に CE (2-OHE₂、4-OHE₂、2-OHE₁、4-OHE₁) と CE メルカプツール酸 (2-OHE₁-1SR、2-OHE₁-4SR、4-OHE₁-2SR) を添加し、固定化抗体カラム (ゲル:0.9 mL) に通導、50mM リン酸緩衝液 (0.001%アスコルビン酸含有、4 mL) にて洗浄後、95%メタノール (0.001%アスコルビン酸含有) で溶出した。溶出液を減圧下 37°C にて乾固し、HPLC で測定した結果、これら 7 物質が 1 (2) ~15 ng の範囲で一斉分析出来ることが明らかとなった。

6. 尿中代謝物の同定

Sprague Dawley ラット (IGS, メス、7 週齢、4 匹) に E₂ を 5 mg/kg 投与し、24 hr 尿を 3 日間採取し測定まで -80°C で保存した。

72 hr プール尿の一定量をフィルター過後、50mM リン酸緩衝液で希釈、固定化抗体カラムに通導し、同様に測定した。得られたクロマトグラムを Figure 5 に示した。尿 1 mL 中の平均値は、2-OHE₁:120ng, 2-OHE₁-1SR:7.0 ng, 2-OHE₂: 5.6 ng, 2-OHE₁-4SR: 4.0 ng であった。

C. 研究結果および考察

CE メルカプツール酸は、一部メチル化をうけて尿中に排泄されると予測されるため、まず、4-ヒドロキシエストロン 2-*S-N*-アセチルシス테인 (4-OHE₁-2SR) のモノメチル体 (4-OHE₁-2SR 3Me と 4-OHE₁-2SR 4Me) の合成法を検討した。常法に従ってジアゾメタンを用いて 4-OHE₁-2SR を直接メチル化後、生成したモノメチル体を分離する方法を検討したが、この方法では 4-メチル体が得られなかった。そこで、4-OHE₂-2SR が脱水縮合して7員環ラク톤を生成する性質 (Suzuki E. et al, 1996) を利用する方法について検討した結果、両者を高収率で選択的に合成することが出来た (Figure 2、Figure 3)。これらを標品として用いて、*in vitro* O-メチル化を検討したところ 4-OHE₁ はすでに報告 (Teranishi M. et al., 1983) されている通り、4-メチル体を主に生成したが、4-OHE₁-2SR は予期に反して 3-メチル体 (チオエーテルのオルト位のメチル体) のみを生成するという結果が得られた (Figure 4)。2-OHE₁-1-*S* -グルタチオンを投与すると 2-OHE₁-1-*S* -3-メチルエーテル (チオエーテルのメタ位のメチル体) が得られたという報告とは逆の位置が選択的にメチル化されており興味深い。

つぎに、CE メルカプツール酸の分析法を

検討した。CE および CE メルカプツール酸は化学的に不安定で、かつ尿中には微量しか存在しない上、体液中には構造の酷似するステロイドが多く存在するため、通常の方法では測定が困難である。そこで、免疫化学的手法を用いて測定することとし、2-OHE₁ の CE メルカプツール酸 2 種 (2-OHE₁-1SR と 2-OHE₁-4SR、Figure 5) と 4-OHE₁-2SR とその 3-メチル体 計 4 種の BSA 結合物を合成した。これを家兎に注射免疫し、力価の上昇を認めた抗血清を用いて固定化抗体カラムを作製した。標準品のリン酸緩衝液をこのカラムに通導して clean-up した。HPLC で測定し、ECD (電気化学検出器) で検出した結果、CE (2-OHE₁、2-OHE₂、4-OHE₁、4-OHE₂) および CE メルカプツール酸 (2-OHE₁-1SR、2-OHE₂-4SR、4-OHE₂-2SR) を同時に測定出来ることが明らかとなった。本法を用い E₂ を投与したラット尿について検討した結果、2-OHE₁、2-OHE₂、2-OHE₁-1SR および 2-OHE₁-4SR を尿中に同定することが出来た (Figure 5)。CE メルカプツール酸の存在は予測されていたが、これまでチオエーテル結合を切断して間接的に証明されていたに過ぎず、E₂ 投与尿中に 2-OHE₁-1SR と 2-OHE₁-4SR を直接証明したのは、今回が初めての例である。GSH との反応では 2-OHE₁-1SG と 2-OHE₁-4SG は同量生成すると予想されるが、尿中には 2-OHE₁-1SR が主として生成するのは興味深い。これはメチル化に対する反応性の差に基づくと推測している。

F. 研究発表

1 論文発表

Suzuki, E., Abe, J., Karasawa, S., and

Matsuki, Y: Enzymic and Chemical O-methylation of a 4-Hydroxyestrone N-Acetylcysteine Conjugate, Steroids, 63 672-677 (1998).

2 学会発表

鈴木恵真子, 阿部純二, 梶澤誠司, 松木容彦: カテコールエストロゲンの N-アセチルシステイン抱合 (3) ー標品の合成ー. 日本薬学会第 118 年会講演要旨集 Vol.3, p. 110 (1998) .

鈴木恵真子, 中込まどか, 橋本光宣, 安居院学, 飯田さやか, 今野和則, 原 康夫, 松木容彦, 今井 清, 小野 宏, 栗原博之: 15α -ヒドロキシエストロゲンの特異抗血清の調製. 日本薬学会第 119 年会, 1999. 3.

中込まどか, 鈴木恵真子: カテコールエストロゲンおよびその抱合体の測定 (1) ー固定化抗体カラムの作製ー. 日本薬学会第 119 年会, 1999. 3.