

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（臍帯血等）分析法の開発とその実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

ヒト由来乳癌細胞を用いた内分泌かく乱物質の簡便で高精度のアッセイ系の確立の研究

主任研究者： 牧野 恒久  
東海大学医学部教授

分担研究者： 中澤 裕之  
星薬科大学教授

研究協力者： 山崎 聖美  
国立公衆衛生院

研究要旨

近年、生活環境中の化学物質の安全性について内分泌かく乱作用という新しい観点で評価する必要性が生じている。スクリーニングの一つにヒト由来乳癌細胞である MCF-7 のエストロジェンに応答する増殖反応を指標とした *in vitro* 試験法である E-SCREEN Assay がある。今回、より簡便な操作でかつ精度の高いアッセイ系の確立を目的に諸条件の基礎的検討を行い、同じくエストロジェンレセプターを発現しているヒト由来の乳癌細胞である T47D を使用したエストロジェン活性の検出系の確立を目的として研究を行った。そして、高分子素材由来の化学物質について評価を行った。

A. 研究目的

近年、生活環境中の化学物質が、微量で生物に作用し、生殖機能等に影響していると指摘されている。殺虫剤等の農薬、プラスチック等の高分子素材に関連する化学物質の安全性について内分泌攪乱作用という新しい観点で評価する必要性が生じている。既に内分泌攪乱化学物質のスクリーニングには、*in vitro*、*in vivo* で様々な方法が報告されているが、その一つにヒト由来乳癌細胞である MCF-7 のエストロジェンに応答する増殖反応を指標とした *in vitro* 試験法である E-SCREEN Assay がある。従来法では、チャコールデキストラン処理したヒト血清をメディウム中に添加するが、乳癌細胞の増殖に関わるホルモン以外の物質も影響を及ぼし、測定施設間で異なる結果をもたらす可能性がある。今回、より簡便な操作でかつ精度の高いアッセイ系の確立を目的に諸条件の基礎的検討を行い、同じくエストロジェンレセプターを発現している

ヒト由来の乳癌細胞である T47D を使用したエストロジェン活性の検出系の確立を目的として研究を行った。

B. 研究方法

1. E-SCREEN Assay

- ①サブコンフルエントの細胞（MCF-7, T47D）を、トリプシン-EDTA で剥離する。
- ②遠心分離し、細胞を回収する。
- ③細胞数を血球計算版で測定する。
- ④細胞数を、以下の数になるように DMEM-10%FCS で希釈する。  
MCF-7:  $5 \times 10^3 / 100 \mu\text{l}$   
T47D:  $3 \times 10^3 / 100 \mu\text{l}$
- ⑤96穴プレートに  $100 \mu\text{l}$  ずつ④の細胞懸濁液をまいていく。
- ⑥37°C、5%CO<sub>2</sub> 中で24時間インキュベーションする。
- ⑦フェノールレッド入りの DMEM をフェノールレッドフリーで市販低蛋白質溶液

を加えた DMEM (90  $\mu$ l) にかえる。

⑧ 10  $\mu$ l の被験物質を加える。被験物質は、DMSO に  $10^{-2}$  M になるようにして作ったものを DMEM で希釈していき、 $10^{-3}$  M ~  $10^{-10}$  M になるような溶液を作り、それを 10  $\mu$ l ずつ加えていく。最終的な濃度は  $10^{-4}$  M ~  $10^{-11}$  M になる。

⑨ 37°C、5%CO<sub>2</sub> 中で 3 日間インキュベートした後、各ウェルにセルカウンディングキット (和光純薬) 中の試薬溶液を 10  $\mu$ l ずつ加え、3 時間後にプレートリーダーで測定波長 450nm、参照波長 600nm にて測定する。

(倫理面への配慮)

本研究において使用している細胞株は細胞バンク等において入手できるものであり、倫理面の問題はないと判断する。

### C. 研究結果

本研究において、本アッセイで通常用いられるチャコールデキストラン処理血清に代えて市販の低蛋白溶液を用いたところ、エストラジオールでは  $10^{-11}$  ~  $10^{-6}$  M で増殖促進作用がみられ、同様にアッセイが行えることを確認した。低蛋白溶液を用いることにより、ホルモン以外の血清成分による結果のばらつきを抑えられたと考える。本法によるアッセイの結果、ノニルフェノール、ビスフェノール A、フタル酸ジブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチルヘキシルにエストロゲン作用が検出された。フタル酸ジシクロヘキシルについては、E-スクリーンアッセイでエストロゲン様活性がなかったという報告もあるが、我々のアッセイではエストロゲン様活性が検出された。ところで、MCF-7 細胞によるアッセイは MCF-7 細胞のエストロゲンに対する反応性の維持に技術を要し、常に同様の条件下でアッセイを行うことが容易ではないと思われたので、MCF-7 細胞にかえて、同じくヒト乳癌細胞である T47D を用い、同様にアッセイを行ったところ、エストラジオールでは MCF-7 と同様に  $10^{-11}$  ~  $10^{-6}$  M で 1.5~2.2 倍の増殖促進作用がみられた。T47D を用いた場合は細胞の増殖性がよく、ばらつきの少

ない安定した結果が得られた。ノニルフェノールでは、 $10^{-11}$  M ~  $10^{-5}$  M で 1.5~1.7 倍、ビスフェノール A では  $10^{-11}$  M ~  $10^{-5}$  M で 1.2~1.5 倍、フタル酸ジブチルでは  $10^{-11}$  M ~  $10^{-4}$  M で 1.1~1.4 倍、フタル酸ブチルベンジルでは  $10^{-8}$  ~  $10^{-5}$  M で 1.1 倍、フタル酸ジエチルでは  $10^{-11}$  ~  $10^{-4}$  M で 1.1~1.2 倍、フタル酸ジシクロヘキシルでは  $10^{-11}$  ~  $10^{-4}$  M で 1.1~1.7 倍、フタル酸ジエチルヘキシルでは  $10^{-11}$  ~  $10^{-5}$  M で 1.1~1.2 倍の増殖促進作用がみられた。これらの増殖促進作用はエストロゲンレセプターのアンタゴニストである ICI182,780 で阻害され、これらの作用がエストロゲンレセプターを介した系によるものであることを確認した。

### D. 考察

MCF-7 細胞と T47D 細胞でどちらか一方にのみ細胞増殖性を示すようなことはなく、T47D 細胞はエストロゲン活性の検出に有用であることが確認された。T47D 細胞を用いた場合、結果にばらつきが少なく安定した結果が得られたが、MCF-7 細胞と T47D 細胞で反応性の度合いが異なる場合も見受けられた。これは、前者にはエストロゲンレセプターの  $\alpha$  が、後者にはエストロゲンレセプターの  $\beta$  が多く発現しているとの報告があるので、その影響が考えられる。今後、用いた細胞株においてエストロゲンレセプターの発現について確認を行う必要がある。さらに、細胞増殖を示した条件における細胞内での各分子の挙動を調べるために、ディファレンシャルディスプレイ法を用いて発現に差異のある遺伝子を検索する。

### E. 結論

E-スクリーンアッセイで通常用いられるチャコールデキストラン処理血清に代えて市販の低蛋白溶液を用いたところ、エストラジオールでは  $10^{-11}$  ~  $10^{-6}$  M で増殖促進作用がみられ、同様にアッセイが行えることを確認した。低蛋白溶液を用いることにより、ホルモン以外の血清成分による結果のばらつきを抑えられたと考える。また、MCF-7 細胞にかえて T47D 細胞を用いたところ、結果にばらつきが少なく安定した結

果が得られ、T47D 細胞はエストロジェン活性の検出に有用であることが確認された。MCF-7細胞及びT47D細胞を用いてアッセイを行った結果、ノニルフェノール、ビスフェノール A、フタル酸ジブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチルヘキシルにエストロジェン作用が検出された。フタル酸ジシクロヘキシルについては、E-スクリーンアッセイでエストロジェン様活性がなかったという報告もあるが、我々のアッセイではエストロジェン様活性が検出された。さらに、これらの増殖促進作用はエストロジェンレセプターを介した系によるものであることを確認した。

## F. 研究業績

学会発表

1. 内分泌攪乱化学物質のリンパ球の反応性に及ぼす影響について：山崎聖美、岡田由美子、久松由東、第72回日本生化学大会，横浜，1999年 p 897.
2. 内分泌攪乱化学物質のリンパ球の反応性に及ぼす影響について：山崎聖美、岡田由美子、久松由東、香山不二雄、第2回日本内分泌攪乱化学物質学会，神戸，1999年、p157.
3. 生活関連物質の E-Screen Assay による評価：山口晃子、山崎聖美、坂部 貢、中澤裕之、第2回日本内分泌攪乱化学物質学会、p69、1999年、神戸
4. Effects of endocrine disruptors on lymphocyte functions, Endocrine Disruptors : Yamazaki. T., Okada. Y., and Hisamatsu. Y., Keystone Symposia, California, 1999; p48.