

平成 11 年度 厚生科学研究費補助金分担研究報告書

内分泌かく乱物質に関する生体試料(さい帯血等)の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

分担項目：環境中のホルモン様物質の胎児・胎盤特異的遺伝子発現への影響

テーマ：内分泌かく乱物質を解毒するヒト UGT 分子種の特異性と母胎・胎盤・胎児での機能

分担研究者：塩田邦郎

(東京大学・大学院農学生命科学研究科。細胞生化学)

研究協力者；横田博

(酪農学園大学・獣医学部獣医生化学教室)

要旨

ビスフェノール A はラット肝臓にある UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT2B1) によってグルクロン酸抱合(解毒)される (H. Yokota ら,1999,*Biochem J.*)。今回、ノニルフェノール・オクチルフェノール・植物由来のエストロジェンについて、ヒトおよび各種動物肝におけるグルクロン酸抱合能について検討した。市販のヒト肝ミクロゾーム及び各種動物肝ミクロゾームを用いて、グルクロン酸抱合反応を行い、逆相 HPLC により反応産物の同定・定量を行った。また、ラット肝灌流法を用いてビスフェノール A の臓機内での代謝を測定した。その結果、①ラット肝臓ミクロゾームにより、ビスフェノール A のみならずノニルフェノール・オクチルフェノール・植物由来エストロジェン (ゲニステイン、ビオカニン A、ダイゼイン) もグルクロン酸抱合された。②ヒト肝臓ミクロゾームにも、これら内分泌かく乱物質のグルクロン酸抱合能が検出された。③ヒト肝における、ビスフェノール A 抱合活性値はラットの 60-50%、ノニルフェノール抱合活性値は 40%前後、オクチルフェノールは 30%前後であった。また、植物由来エストロジェンは 40-10%であった。④ウサギ・豚・牛・ヒツジの肝ミクロゾームにも同様の酵素活性が存在し、ラットと同程度以上の値を示した。⑤薬物のグルクロン酸抱合能が遺伝的に欠損しているネコには、ビオカニン A 以外の活性は検出されなかった。⑥ビスフェノール A はほとんどラット肝臓内でグルクロン酸抱合され、胆汁中に排泄されることが分かった。

以上の結果より、ヒトはじめ多くの動物肝に於いて、ビスフェノール A・ノニルフェノール・オクチルフェノール・植物由来エストロジェンはグルクロン酸抱合されること。ビスフェノール A は大部分グルクロン酸抱合で胆汁中に排泄されることが分かった。

A. 研究目的

本研究の目的は、ヒト肝において、ビスフェノール A やノニルフェノールをグルクロン酸抱合（解毒）する能力がどの程度存在しているのかを明らかにし、さらに、それを担う UGT 遺伝子をクローニングし、発現することによって分子種を特定し、母胎・胎盤・胎児期の解毒能を評価することである。内分泌かく乱機序を明らかにするためには、これら化学物質が生体内に取り込まれた後、どの様に濃縮され、代謝変換し、解毒排泄されるかを明らかにする事が求められており、そのためには、本研究目的にあるそれぞれの反応を担っている酵素を特定することがもっとも基本的である。このことは内分泌かく乱物質の安全基準濃度範囲を規定する上でも、必須の基礎的知見である。

図 1 に示したように、体内に入った化学物質は、一般に 2 つの反応 (P-450 による酸化と抱合解毒反応) を受け、排泄される。化学物質本体かまたは、この P-450 による酸化代謝物が毒性を発揮 (内分泌攪乱作用など) する。よって、内分泌攪

乱物質の人への影響を評価する上で、化学物質の代謝反応を明らかにする必要がある。現在までのビスフェノール A の代謝については図 2 に示した。昨年、我々はラットではビスフェノール A は UGT2B1 という酵素によりグルクロン酸抱合（解毒）されることを報告した (研究業績)。同年の内分泌攪乱物質学会において、ラット血液中和糞便中にビスフェノール A のグルクロン酸抱合体が検出され、ビスフェノール A は主としてグルクロン酸抱合され解毒されることが明かとなった。そこで、今年度は、ラットの肝臓にビスフェノール A を灌流し、臓器レベルで解毒反応の有無および能力を測定した。また、ヒト肝ミクロゾームにこのような解毒能力が存在するかどうかを調べた。

B. 研究方法

- ① ラット肝臓門脈へビスフェノール A を灌流し、肝臓から胆管や静脈に排泄されるビスフェノール A の代謝物を分析した (図-3)。
- ② 市販ヒト肝臓ミクロゾームを用い、各種内分泌かく乱物質のグルクロ

ン酸抱合活性を HPLC 等で測定した。
③ ヒト cDNA から、UGT2B 分子種を複数クローニングした。今後、酵母内で発現し活性測定することにより、担当する分子種を特定する予定である。

C. 研究結果

① ラット肝門脈に注入したビスフェノール A は、ほとんどが胆汁中にグルクロン酸抱合体として排泄され、他の代謝物は検出されなかった (図-4、6)。一方静脈中にも、グルクロン酸抱合体として排泄されたが、投与量が多い場合にはわずかに未反応のビスフェノール A が検出された (図-5)。
② ヒト肝マイクロゾームにも、ビスフェノール A、ノニルフェノール、オクチルフェノールおよび各種植物由来エストロゲンのグルクロン酸抱合活性が検出された (図-8)。
③ ヒト UDP-グルクロン酸転移酵素の分子種 UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10 の cDNA をクローニングできた (図-9)。今のところ、UGT2B10 のみ発現できているが、かすかにビスフェノール A のグルクロン酸抱合活性が検出された (図-10)。

D. 考察および E. 結論

ビスフェノール A はラット生体に侵入後、肝臓でその大半がグルクロン

酸抱合される。ヒトも多種類の内分泌かく乱物質のグルクロン酸抱合 (解毒) 活性を有するが、動物種によってその活性値は大きな差があった。図-7 に示したごとく、内分泌かく乱物質は食品に含まれ、腸管で吸収された後、必ず肝臓を通過し、そこで、UGT2B1 によってほとんどがグルクロン酸抱合され、その大半が胆汁中に排泄される。吸収量が 0.01mM を越えるときにはわずかながら未反応のビスフェノール A が静脈中に漏れだし、これが各臓器に分配され、精巣・卵巣・胎児に暴露されることが予測された。ここで示したように、肝臓での解毒能力はその生物の生殖器官および胎児が暴露される化学物質量を決定するので、個々での代謝解毒能力を把握しておくことは、その種への影響を予測・評価する上で重要なファクターになる。

F. 研究業績

① 学会発表
植物エストロゲンをグルクロン酸抱合する UDP-グルクロン酸転移酵素分子種 ○横田 博・牛頭圭介・湯浅 亮 (酪農学園大学・獣医生化学)

第 72 回日本生化学会

② 論文等

Glucuronidation of the Environmental Estrogen Bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the Rat Liver

Yokota,H., Iwano, H., Endo, M., Kobayashi,T.,

Inoue, H., Ikushiro, S. and Yuasa, A.:

Biochem. Journal (1999) 340, 405-409

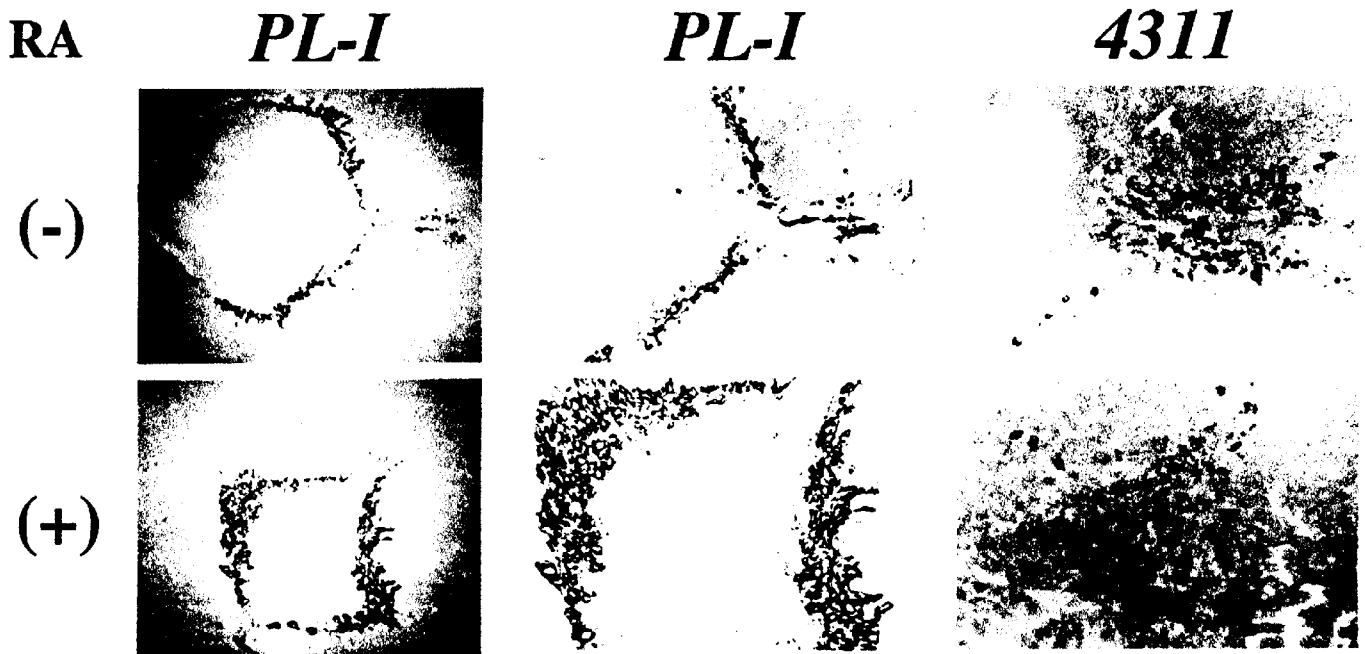


図1 栄養膜細胞の分化に対するレチノイン酸 (RA) の影響
RA 処理による栄養膜巨細胞 (PL-1 陽性細胞) 数の増加と、
海綿栄養膜細胞 (4311 陽性細胞) 数の減少が見られた。

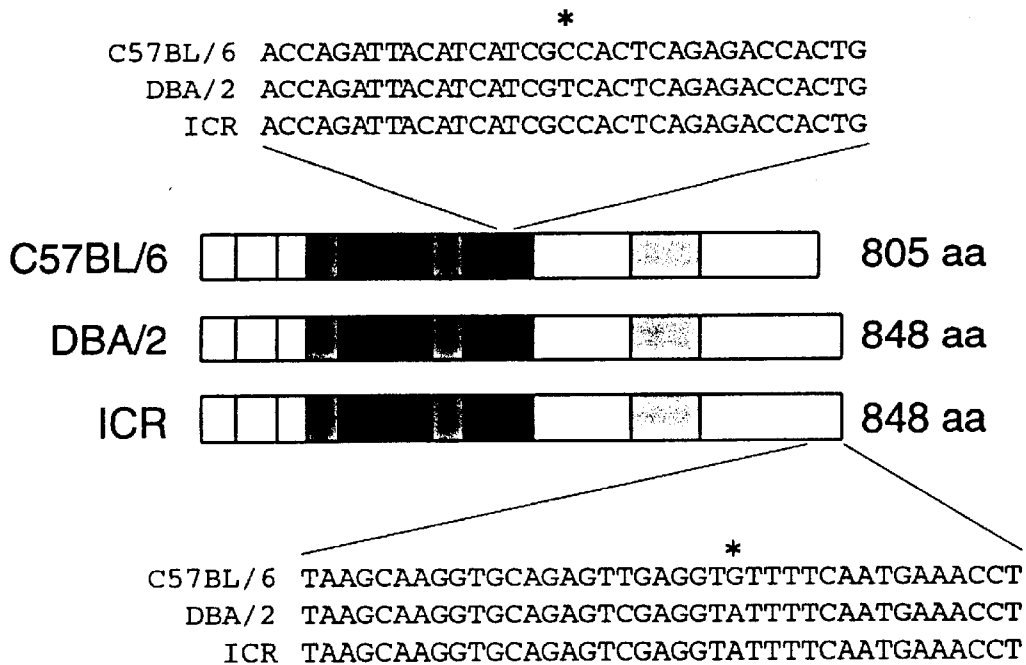


図2 マウス AhR 遺伝子の構造比較
ICR の AhR 遺伝子は、C57BL/6 型と DBA/2 型の特徴的配列
を合わせ持つ中間型の構造を有する。