

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、中込まどか（株）イナリサーチ

研究要旨

エストロゲン発がんのリスクマーカーと考えられているカテコールエストロゲン(CE)、CE メルカプツール酸および 15 α -ヒドロキシエストロゲン(15 α -OHEs)の尿中高感度測定法を免疫化学的手法を用いて確立するとともに、エストロゲン代謝の種差、性差を in vivo および in vitro で検討し、エストロゲン発がんに的を絞った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のスクリーニングに応用する。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の暴露は複雑でかつ複数の化学物質が関与するため個々の物質を測定して暴露量を算出するのは困難である。本研究は内分泌かく乱化学物質のエストロゲンへ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ようとするものである。今年度は、

1. カテコールエストロゲン(CE)および CE メルカプツール酸(CE SR)の尿中高感度測定法を用いて、in vivo におけるエストロゲン代謝を明らかにし、加えて種差、性差を検討する。
 2. 15 α -ヒドロキシエストロゲン(15 α -OHEs)の免疫化学的手法を用いた尿中高感度測定法を確立する。
 3. エストロゲン代謝の性差をラットの in vitro 代謝実験で確認する。
- 以上の項目について実施した。

B. 研究方法

1. ラットおよびハムスター尿中 CE と CE SR の測定
 - 1) 動物実験
動物は雌の Sprague-Dawley ラット(7 週齢、IGS)および雄の Syrian ハムスター(7 週齢)を使用した。17 β -エストラジオール(E₂)、2-ヒドロキシエストロン(2-OHE₁)または 4-OHE₁ (2 or 5 mg/2 mL/kg)はコーン油に懸濁し腹腔内投与した。代謝酵素誘導群はフェノバルビタールにて前処理した。採尿はアスコルビン酸存在下 3 日間行った。
 - 2) HPLC 条件
カラムは Inertsil ODS-3 (15 x 0.45

cm i.d.) を、移動相に 0.5 % NH₄H₂PO₄ (pH3.5)/アセトニトリル/メタノール(70:26:8, v/v or 70:27:5, v/v)を流速 1.0 mL/min で用いた。検出器は Coulchem 5100A を使用し設定電位 +150 mV で測定した。

3) 尿中 CE、CE SR の定量
尿試料の一定量はフィルターろ過後、50 mM リン酸緩衝液(pH7.3)で希釈し、固定化抗体カラムに通導した。50 mM リン酸緩衝液(0.001%アスコルビン酸含有)で洗浄後、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℃にて乾固し、2) の条件で測定した。検量線は 50 mM リン酸緩衝液(0.25%アスコルビン酸含有)に CE (2-OHE₂、4-OHE₂、2-OHE₁、4-OHE₁)および CE SR (2-OHE₁ 1SR、2-OHE₁ 4SR、4-OHE₁ 2SR)を各々 1~15 ng 添加後、固定化抗体カラムに通導し同様に処理して作成した。

2. 15 α -OHEs の尿中高感度測定法の確立

- 1) 固定化抗体カラムの調製
15 α -OHEs (エストロール:E₄、15 α -OHE₂、15 α -OHE₁)に対する各抗血清をプロテイン A カラムで精製、凍結乾燥した。得られた IgG は 50 mM リン酸緩衝液(pH7.5)に溶解してアフィゲル 10 と反応した。3 種のゲルのアフィニティとキャパシティを確認した後、最適な混合比とゲル量のカラムを調製した。
- 2) HPLC 条件
移動相は 0.5 % NH₄H₂PO₄(pH3.5)/アセトニトリル (80:20, v/v)を用いた。検出器の設定電位 +650 mV で測定した。その他は 1. 2) と同条

件で行った。

3) バリデーション

バリデーション用の標準試料は、50 mM リン酸緩衝液 (pH7.3) に E₄、15 α -OHE₂、15 α -OHE₁ を各々 1.25 ~ 50 ng 添加し調製した。これを 1) で作製した固定化抗体カラム (ゲル: 0.2 mL) に通導し精製水で洗浄後、95% メタノールで溶出した。溶出液を減圧下 37℃ で乾固、2) の条件で測定し、回収率と変動係数から測定値の真度と精度を求めた。

3. ラット肝臓の S9 を用いた in vitro 代謝実験

1) ラット肝 S9 の調製

雌雄の Sprague-Dawley ラット (7 週齢、IGS) の肝臓を用い、常法に従って S9 を調製した。

2) HPLC 条件

カラムは Inertsil ODS-3 (15 x 0.45 cm i.d.) を、移動相に 0.5 % NH₄H₂PO₄ (pH3.5)/アセトニトリル/メタノール (70:25:5, v/v と 60:40:0, v/v のグラジエントシステム) を流速 1.0 mL/min で用いた。UV 検出器を用い、波長 285 nm で測定した。

3) in vitro 代謝実験

E₂ (100~300 μ M) に雌あるいは雄ラットの S9mix を加えて全量 1 mL とした。これを 37℃ で 15 または 30 min インキュベートした。氷冷下反応を停止後 20% ZnSO₄ (0.1 mL)、飽和 Ba(OH)₂ (0.1 mL) およびメタノール (1.3 mL) を順次加えながらよく攪拌し、遠心 (3000 rpm, 15 min) 後の上清を 2) の条件で測定した。同様に処理し作成した検量線を用いて、時間当たりに生成した代謝物の量を算出した。

(倫理面への配慮)

実験に使用する動物数は最小限にし、ストレスや疼痛を伴う操作はできるだけ避けて実験を実施した。

C. 研究結果

1. ラットおよびハムスター尿中

CE と CE SR の測定

本測定法の真度および精度は Table 1 に示した通り良好であった。Fig. 1-A) には標準試料のクロマトグラムを示した。まず、E₂、5 mg/kg を投与した雌ラット尿中の CE と CE SR の測定結果を Table 2 に、フェノバルビタール処理し、代謝酵素を誘導後 E₂ を投与し比較した結果を Table 3 に、また E₂ 投与後の雌ラット尿の典型的なクロマトグラムを Fig. 1-B) に示した。その

結果、2 種の CE SR が検出され、2-OHE₁ 1SR の方が 2-OHE₁ 4SR よりレベルは数倍高かった。しかし 4-OHE₁ 2SR など 4 位水酸化体は同条件では検出されなかった。また、フェノバルビタール処理による各物質の有意なレベルの変動は確認されなかった。次に、2-OHE₁ または 4-OHE₁ を 2 mg/kg、雌ラットに投与した。尿中の CE と CE SR の測定結果をフェノバルビタール酵素誘導を行った場合と比較して Table 4 または 5 に、投与後得られた雌ラット尿の典型的なクロマトグラムを Fig. 2 に示した。2-OHE₁ 投与についてはフェノバルビタール処理により 2-OHE₁ 4SR の有意な上昇が見られた。また、同量を投与した 2-OHE₁ と 4-OHE₁ の尿中レベルの比較から両者の消失あるいは変換レベルに大きな差があることが明らかとなった。一方、雄ハムスター (n=2) に E₂ を 5 mg/kg 投与した時の 2-OHE₁ 1SR、2-OHE₁ 4SR、4-OHE₁ 2SR、2-OHE₁ および 4-OHE₁ の尿中レベルは、362、31.9、179、528、および 92.7 ng/kg であり、4-OHE₁ を 5 mg/kg 投与した時の 4-OHE₁ 2SR、4-OHE₂ および 4-OHE₁ の尿中レベルは、323、39.4 および 2189 ng/kg であった。ハムスターではラットと異なり 4 位水酸化体が確認された。

2. 15 α -OHEs の尿中高感度測定法の確立

調製したカラムを用いた測定法のバリデーション結果を Table 6 に示した。その結果から、今後の測定に用いるために十分な真度と精度が得られた。

3. ラット肝臓の S9 を用いた in vitro 代謝実験

雌雄ラット肝臓の S9 を用いた E₂ の各代謝物を測定した結果を Fig. 3 に示した。主生成物は雌雄ともに 2-OHE₂ であるが、雌の方が活性は高く、また、反応時間は 15 min の方が雌雄ともに高いことから、2-OHE₂ は反応時間の経過に伴いさらに酸化されていくことが明らかとなった。4-OHE₁ は雌ではほとんど検出されなかったが、雄では検出された。しかし、代謝物パターンや酵素活性に大きな雌雄差は確認できなかった。

D. 考察

今回ラットの in vivo 試験に雌ラットを用いたが、予備試験の結果から雄は尿中の CE 排泄が少なく、特に現状では CE SR の変動を定量することは難しいと判

断したからである。雌ラットの結果からフェノバルビタールの誘導では E₂ の代謝物である CE および CE SR に変動は見られなかったもので、今後他の誘導物質による代謝への影響を確認し、内分泌かく乱化学物質のスクリーニングへの応用の可能性を検討する必要がある。

ハムスターはエストロゲン発がんのモデル動物として古くから知られているが、今回特に発がんに関与すると考えられる、4-OHE₁ 2SR がハムスター尿中から検出されたことは大変興味深い。さらに今回ラットの尿中から 4-OHE₁ は検出されなかったが、2-OHE₁ と 4-OHE₁ を投与した結果から、4-OHE₁ の方が 2-OHE₁ より生体内ではかなり速く代謝、変換されて行くことが推察された。従って、E₂ をラットに投与した場合、生体内で 4 位水酸化体が生成されないのではなく、生成後さらに代謝されていく速度が速いため捕らえることが出来ない可能性が示唆された。

尿中の CE SR レベルは当初予想したよりも低レベルであった。濃度が低くなると体液中の夾雑物の妨害も大きくなる。雄ラットを含めたより低濃度の生体試料測定への応用のためには、さらに特異性やアフィニティの高いカラムの開発を行わなければならない。そこで、もう一つのリスクマーカーとして、15 α -OHEs の尿中測定法の開発を行った。固定化抗体カラムは、ゲルと反応させる IgG 量やカラムに使用するゲルの量を細かく検討すると、非常に特異性の高いクリーンアップ用カラムを作製することが出来る。今回のバリデーションの結果からほぼ尿試料測定に利用できると考えている。今後、15 α -OHEs のリスクマーカーとしての可能性と、ホルモンはそのバランスについても重要であると考えられるので、CE と 15 α -OHEs とのバランスの変化を調べるためにこのカラムは有用である。

予備的な in vivo 試験の結果からラットの E₂ 代謝には雌雄差があると判断された。そこで今まで代謝レベルが殆ど調べられていない 15 α -OHEs に注目し、雌雄ラット肝臓の S9 を用いた in vitro 代謝を検討したが、予想に反し肝臓においてはあまり大きな代謝パターンの雌雄

差は見られなかった。

E. 結論

ラットおよびハムスターの尿中から CE および CE SR を安定して検出できる測定法が確立し、これらのエストロゲン発がんのリスクマーカーとしての可能性を確認することが出来た。今後、15 α -OHEs も併せ、そのレベルの変動が内分泌かく乱化学物質の影響を反映できるかどうか検討を加える。

F. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki, E., Nakagomi, M., Hashimoto, M., Agui, M., Iida, S., Konno, K., Hara, Y., Kurihara, H., Matsuki, Y., Imai, K., Ono, H.: Preparation of Specific Antisera to 15 α -Hydroxyestrogens. *Steroids*, **64** (8): 551-557 (1999).

Nakagomi, M., Iida, S., Hara, Y., Matsuki, Y., Nambara, T., Suzuki, E.: Preparation of Specific Antiserum to 15 α -Hydroxyestrogen 15-N-acetylglucosaminides. *Steroids*, **64** (7): 491-496 (1999).

Nakagomi, M., Yamada, K., Matsuki, Y., Kurihara, H., Suzuki, E.: Enzyme Immunoassay for the Measurement of 17 α -Estradiol 17-N-acetylglucosaminide in Rabbit Urine. *Steroids*, **64** (5): 301-307 (1999).

2. 学会発表

中込まどか, 鈴木恵真子: カテコールエストロゲンとその抱合体の分析法の開発.

日本薬学会 119 年会, Vol 4, p. 92 (1999) .

鈴木恵真子, 中込まどか, 橋本光宣, 安居院 学, 飯田さやか, 原 康夫, 今野和則, 栗原博之, 松本容彦, 今井 清, 小野 宏: 15 α -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 119 年会, Vol 4, p. 93 (1999) .

Table 1 Accuracy and precision of the clean-up procedure for CE and CE SR

	Spiked	Assayed Mean $\pm$ SD	CV	Recovery
	(ng)	(ng)	(%)	(%)
2-OHE ₁ 1SR	1.00	0.944 $\pm$ 0.087	9.17	94.4
	2.00	2.01 $\pm$ 0.13	6.43	101
	5.00	5.28 $\pm$ 0.16	2.96	106
	10.0	10.8 $\pm$ 0.65	6.02	108
	15.0	15.1 $\pm$ 0.87	5.75	101
2-OHE ₁ 4SR	1.00	1.16 $\pm$ 0.04	3.73	117
	2.00	2.10 $\pm$ 0.08	3.88	105
	5.00	5.01 $\pm$ 0.21	4.12	100
	10.0	9.80 $\pm$ 0.33	3.40	98.0
	15.0	13.1 $\pm$ 1.30	9.93	87.3
2-OHE ₂	1.00	0.992 $\pm$ 0.071	7.12	99.2
	2.00	1.95 $\pm$ 0.04	2.04	97.5
	5.00	4.87 $\pm$ 0.29	5.88	97.5
	10.0	10.3 $\pm$ 0.26	2.55	103
	15.0	14.5 $\pm$ 0.83	5.72	96.5
2-OHE ₁	1.00	1.07 $\pm$ 0.07	6.26	107
	2.00	2.04 $\pm$ 0.10	4.70	102
	5.00	5.17 $\pm$ 0.24	4.62	103
	10.0	10.2 $\pm$ 0.27	2.62	102
	15.0	14.7 $\pm$ 0.86	5.85	97.9
4-OHE ₁	1.00	0.890 $\pm$ 0.076	8.54	89.0
	2.00	1.98 $\pm$ 0.08	4.07	99.1
	5.00	5.21 $\pm$ 0.20	3.92	104
	10.0	10.5 $\pm$ 0.25	2.41	105
	15.0	15.2 $\pm$ 0.97	6.36	101
4-OHE ₁ 2SR	2.00	1.68 $\pm$ 0.08	4.80	84.1
	5.00	5.07 $\pm$ 0.24	4.75	101
	10.0	10.9 $\pm$ 0.46	4.26	109
	15.0	15.3 $\pm$ 1.07	7.02	102
4-OHE ₂	2.00	1.81 $\pm$ 0.03	1.91	90.7
	5.00	4.88 $\pm$ 0.27	5.49	97.7
	10.0	10.5 $\pm$ 0.27	2.61	105
	15.0	14.4 $\pm$ 1.16	8.01	96.1

N=5

Table 2 Urinary excretion of CE and CE SR in female rats treated E₂ (5 mg/kg)

Estrogen metabolite	Urinary excretion (μg/kg)
	Mean ± SD
2-OHE ₁ 1SR	2.75 ± 1.14
2-OHE ₁ 4SR	0.60 ± 0.22
2-OHE ₂	1.15 ± 0.85
2-OHE ₁	14.24 ± 4.41
N=6	

Table 3 Urinary excretion of CE and CE SR in female rats treated E₂ (5 mg/kg) with or without treatment by Phenobarbital

Estrogen metabolite	Urinary excretion (μg/kg)	
	Non-induced	Induced (Phenobarbital)
	Mean ± SD	Mean ± SD
2-OHE ₁ 1SR	3.19 ± 0.90	2.64 ± 1.66
2-OHE ₁ 4SR	0.55 ± 0.24	0.42 ± 0.39
2-OHE ₂	0.72 ± 0.42	1.10 ± 0.29
2-OHE ₁	16.42 ± 11.54	21.17 ± 5.84
N=4		

Table 4 Urinary excretion of CE and CE SR in female rats treated 2-OHE₁ (2 mg/kg) with or without treatment by Phenobarbital

Estrogen metabolite	Urinary excretion (µg/kg)	
	Non-induced	Induced (Phenobarbital)
	Mean ± SD	Mean ± SD
2-OHE ₁ 1SR	2.59 ± 0.75	2.59 ± 0.65
2-OHE ₁ 4SR	0.32 ± 0.07	0.61* ± 0.24
2-OHE ₂	1.69 ± 0.33	1.24 ± 0.62
2-OHE ₁	22.86 ± 1.57	15.82** ± 3.79

N=5

*P<0.05; **P<0.01

Table 5 Urinary excretion of CE and CE SR in female rats treated 4-OHE₁ (2 mg/kg) with or without treatment by Phenobarbital

Estrogen metabolite	Urinary excretion (µg/kg)	
	Non-induced	Induced (Phenobarbital)
	Mean ± SD	Mean ± SD
4-OHE ₁ 2SR	0.35 ± 0.06	0.33 ± 0.08
4-OHE ₂	0.94 ± 0.46	0.49 ± 0.18
4-OHE ₁	2.21 ± 0.52	1.82 ± 0.85

N=5

Table 6 Accuracy and precision of the clean-up procedure for 15 α -OHEs

	Spiked	Assayed	CV	Recovery
	(ng)	Mean $\pm$ SD (ng)	(%)	(%)
E ₄	1.25	1.45 $\pm$ 0.0692	4.78	116
	2.50	2.65 $\pm$ 0.121	4.58	106
	5.00	5.15 $\pm$ 0.146	2.84	103
	12.5	13.0 $\pm$ 0.486	3.75	104
	25.0	26.0 $\pm$ 0.729	2.81	104
	50.0	50.7 $\pm$ 1.80	3.56	101
15 α -OHE ₂	1.25	1.03 $\pm$ 0.220	21.4	82.2
	2.50	2.33 $\pm$ 0.272	11.6	93.4
	5.00	5.00 $\pm$ 0.233	4.67	99.9
	12.5	13.1 $\pm$ 0.593	4.51	105
	25.0	26.9 $\pm$ 1.09	4.06	108
	50.0	52.1 $\pm$ 2.25	4.31	104
15 α -OHE ₁	1.25	1.32 $\pm$ 0.252	19.1	106
	2.50	2.59 $\pm$ 0.290	11.2	104
	5.00	5.06 $\pm$ 0.217	4.29	101
	12.5	12.8 $\pm$ 0.532	4.15	102
	25.0	26.3 $\pm$ 0.956	3.63	105

N=5

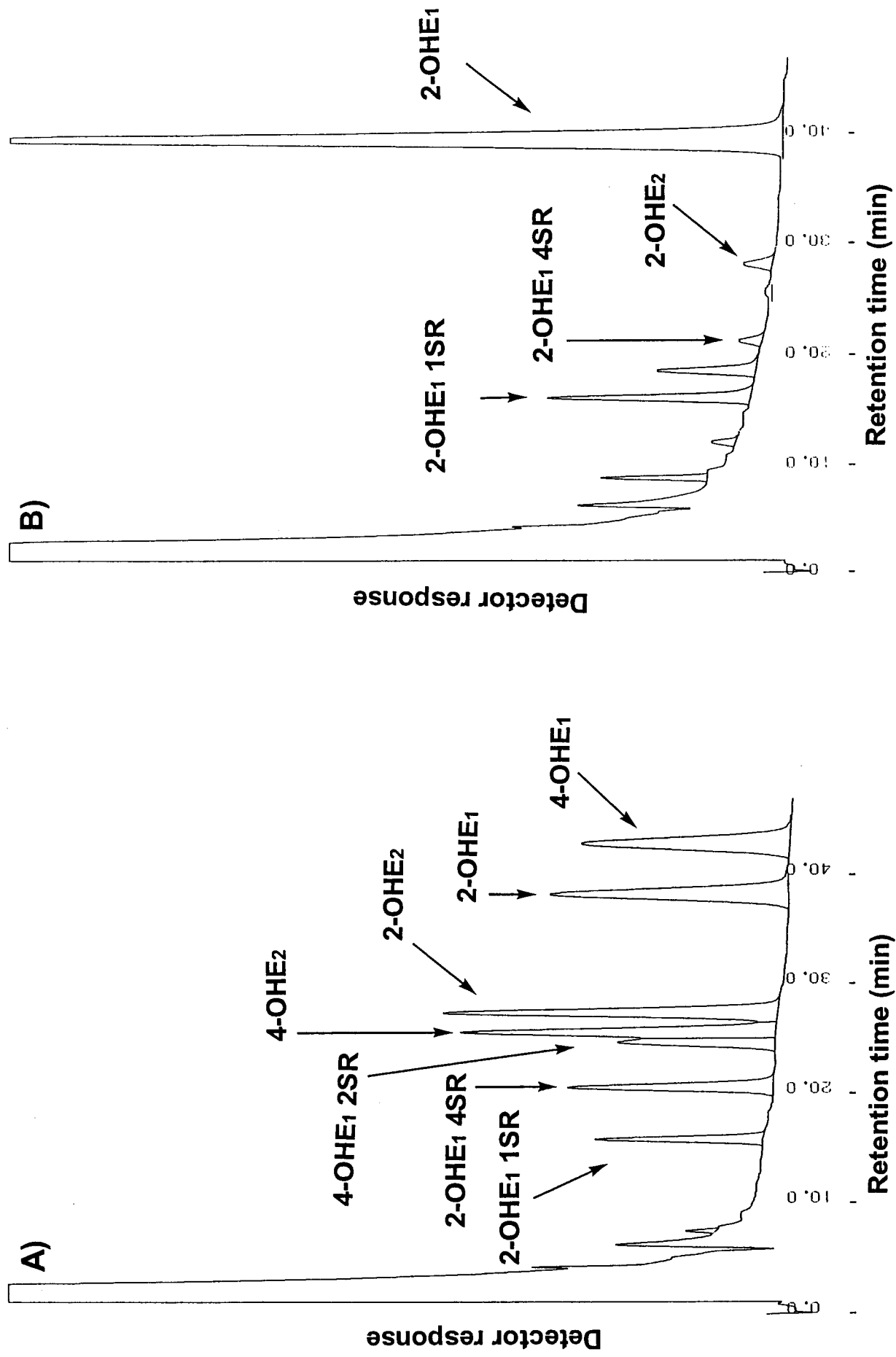


Fig. 1 Typical HPLC chromatograms of CE and CE SR obtained from A) standard sample

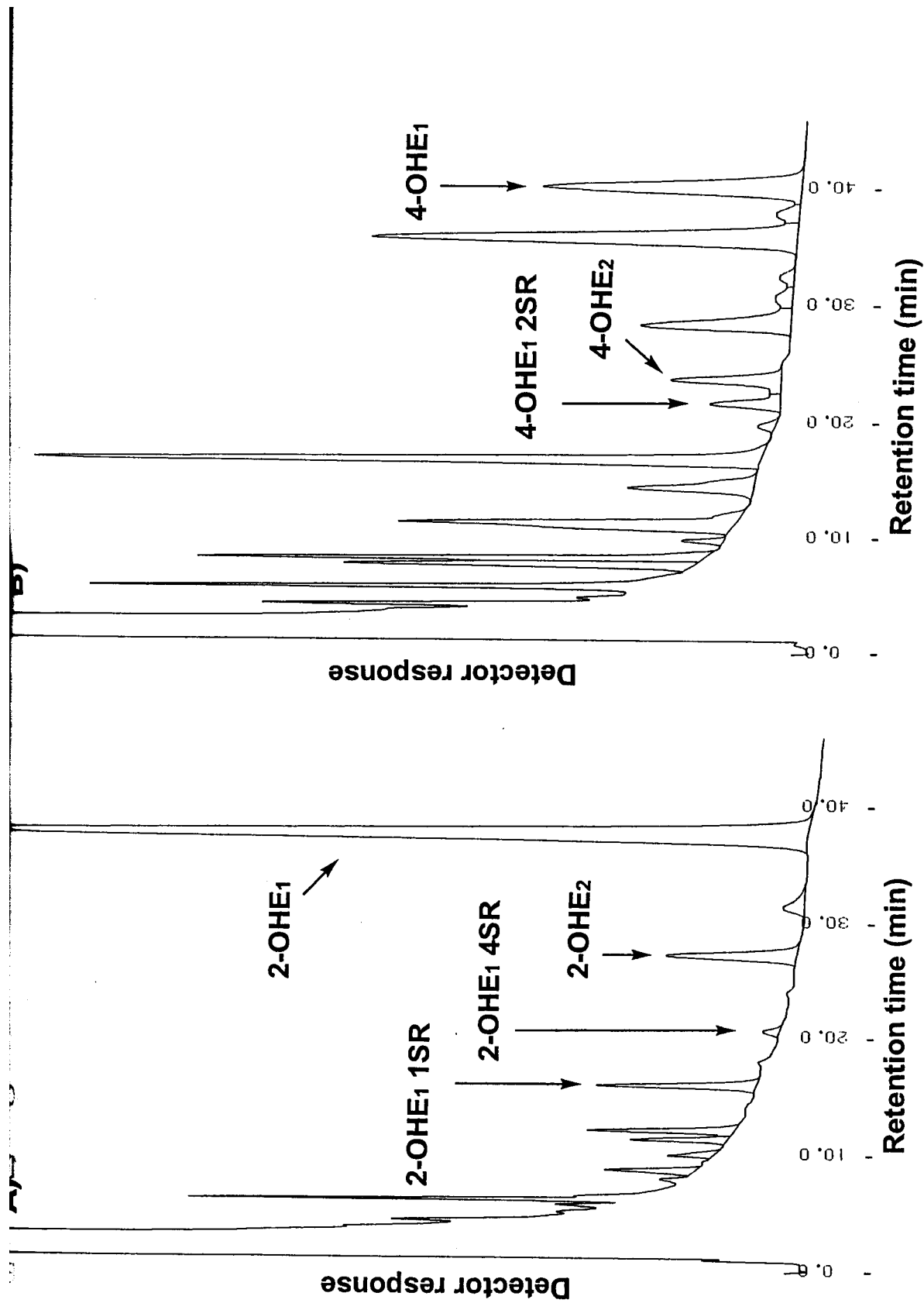


Fig. 2 Typical HPLC chromatograms of female rat-urine treated with A) 2-OHE1 (2 mg/kg) or B) 4-OHE1 (2 mg/kg)

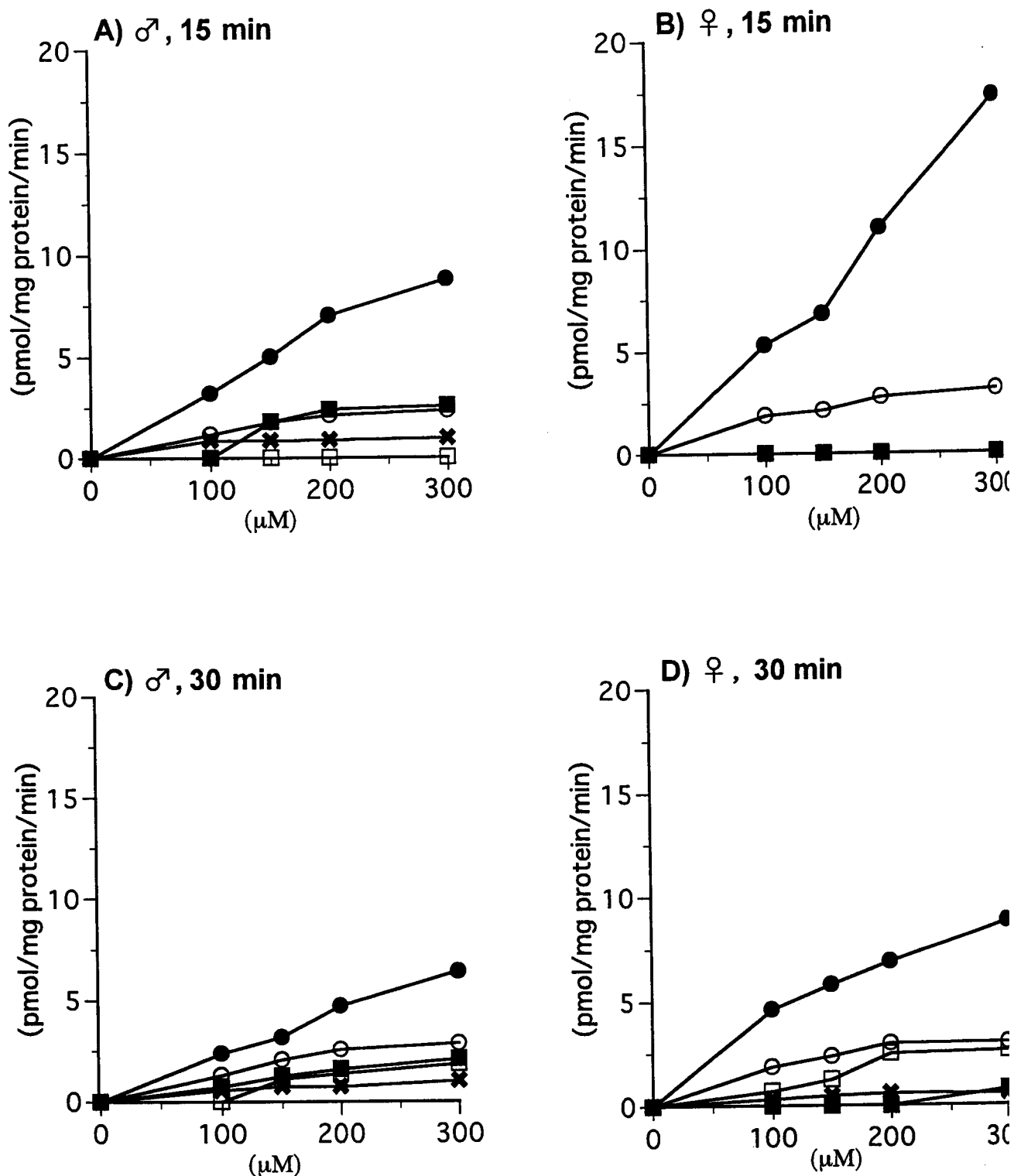


Fig. 3 Metabolites formed after incubation (15 or 30 min) of E₂(100-300 μM) with male (A, C) and female (B, D) rat-liver S9

—○— E₄ —✱— 15α-OHE₂ —●— 2-OHE₂ —□— 2-OHE₁ —■— 4-OH