

### ③ 研究報告書レイアウト

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書

内分泌攪乱作用を修飾するヒト代謝活性化系及び不活性化系導入・発現細胞の開発

分担研究者 大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所薬理部・部長

研究要旨 ビスフェノール A の抱合系代謝酵素の一種硫酸転移酵素 (SULT) による硫酸抱合反応に主に関与する肝の分子種は熱安定フェノール硫酸転移酵素 (TS-PSULT) 分子種であった。生成した硫酸抱合体のエストロゲン様作用を評価する目的で、MCF-7 細胞を用いるいわゆる E-screen 法による細胞増殖の誘導と、エストロゲン応答遺伝子 pS2 の発現誘導活性を調べたところ、硫酸抱合体のエストロゲン様作用はビスフェノール A に比べ著しく減弱していた。

#### A. 研究目的

内分泌攪乱物質 (EDC) の作用の修飾に種々の薬物代謝酵素が関与している。しかし、ヒトにおいて、これらの経路にどのような薬物代謝酵素が関与するのかは十分に明かにされてはいない。また、生成した代謝物のエストロゲン様作用も十分評価されていない。今年度の本研究では、ビスフェノール A の抱合系代謝酵素の一種硫酸転移酵素 (SULT) による硫酸抱合反応に主に関与する肝 SULT 分子種を明らかにすると共に、生成した硫酸抱合体のエストロゲン様作用を評価する目的で、MCF-7 細胞を用いるいわゆる E-screen 法による細胞増殖の誘導と、エストロゲン応答遺伝子 pS2 の発現誘導活性を調べた。

#### B. 研究方法

B-1. ビスフェノール A の SULT 活性の測定

[<sup>35</sup>S]PAPS を硫酸基供与体と、バリウム沈殿法で未反応の [<sup>35</sup>S]PAPS を沈殿させ、ビスフェノール A 硫酸抱合体と分離することにより活性を測定した。

また、逆相 C<sub>18</sub> カラムを用いた HPLC 法により生成したビスフェノール A 硫酸抱合体の量を測定する方法も用いた。

B-2. ヒト肝サイトゾールにおけるビスフェノール A SULT 分子種の同定

ヒト肝サイトゾールに存在する SULT のうち、どの分子種がビスフェノール A の硫酸抱合反応に寄与しているのかにつき、熱安定フェノール SULT (TS-PSULT) 分子種の特異的阻害剤であるケルセチン、または、TS-PSULT 分子種以外の SULT の典型的基質をヒト肝サイトゾールによるビスフェノール A の硫酸抱合反応系に共存させ、ビスフェノール A 硫酸抱合体の生成阻害をバリウム沈殿法 (ケルセチン) または、HPLC 法 (ケルセチン以外の阻害剤の場合) で測定した。

B-3 ビスフェノール A 硫酸抱合体の合成  
ビスフェノール A と三酸化硫黄ピリジンを

ベンゼン中で 2 時間加熱し、冷却後水酸化カリウムを加えた。ビスフェノール A 硫酸抱合体をビスフェノール A およびビスフェノール A の二硫酸エステルなどの混合物から分離するため、溶媒抽出を行った。

B-4. ヒト乳癌由来細胞 MCF-7 を用いた細胞増殖誘導によるエストロゲン様作用の *in vitro* 試験系 (いわゆる E-screen assay)

MCF-7 細胞は 10% FCS-RPMI1640 培地で継代した。96 穴プレートにウエルあたり 8000 細胞の MCF-7 を播種し、24 時間培養後、5% charcoal-dextran 処理した FCS (CD-FCS-RPMI1640PR(-) 培地 (フェノールレッドを含まないもの) に置換し、24 時間培養した。ビスフェノール A、ビスフェノール硫酸抱合体及び 17β-エストラジオールを同培地に溶解して添加した。144 時間培養後 PBS(-) で洗浄し、風乾させ、0.4% クリスタルバイオレットで染色し、細胞増殖を比較した。

B-5. MCF-7 細胞におけるエストロゲン応答遺伝子 pS2 の発現誘導の測定

MCF-7 細胞を 10 cm ディッシュに 20 万個播種し、48 時間培養後、10% CD-FCS-RPMI1640 (フェノールレッド(-)) に置換して、2 時間後にビスフェノール A、ビスフェノール硫酸抱合体、エストラジオールのいずれかを添加した。24 時間培養後 total RNA を抽出し、reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) を行った。PS2 遺伝子の相対発現レベルを G3PDH の発現レベルと相対比として比較した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いられたヒト肝サイトゾールは Gentest Cooperation で調製され、日本国内で、第一化学薬品により販売されている Human liver S9 を 105,000 xg、1 時間超遠心して調製した。本商品は 12 人の欧米人由来の肝の S9 が混合され、"mixed liver S9" として販売されているものである。検体提供者又は、代託者より同意を得るなどの倫理的配慮が十分なされた上で採取された検体に由来する

ものであり、また、本検体を使用するにあたり、国立医薬品食品衛生研究所の倫理委員会の承認を得た上で、本研究は遂行されている。

### C. 研究結果

#### C-1. ヒト肝サイトゾールにおけるビスフェノールA-SULT分子種の同定

TS-PSULTの特異的阻害剤であるケルセチンは、それ自身ヒト肝サイトゾールと硫酸基供与体である $^{35}\text{S}$ -PAPSの存在下、硫酸抱合を受けない。そこで、バリウム沈殿法によるビスフェノールAの硫酸抱合の測定系にケルセチンを共存させ、硫酸抱合反応の阻害の程度を検討した。その結果、昨年度までの本研究で調製法が確立された大腸菌内発現ST1A3 (TS-PSULTの一分子種) およびヒト肝サイトゾールのビスフェノールAの硫酸抱合活性は、ケルセチン濃度依存的に阻害された(図1)。ケルセチンにより、TS-PSULT以外のSULTが阻害されないと考えられている $10\text{ }\mu\text{M}$ の濃度で、約70%の阻害率で、ヒト肝のビスフェノールA硫酸抱合活性が阻害された。さらに、ヒト肝サイトゾールに存在することが知られている主要な分子種(TS-PSULTの他、熱不安定(TL)-PSULT、hydroxysteroid SULT(HS-SULT)、estrogen SULT(E-SULT))につき、それらの典型的基質により、ビスフェノールAの硫酸転移酵素活性が阻害されるか否かを検討した。その結果、ヒト肝サイトゾールのビスフェノールA硫酸転移酵素活性は、TS-PSULTの典型的基質p-ニトロフェノールにより $1\text{ }\mu\text{M}$ 以上で濃度依存的に阻害され、特に $8\text{ }\mu\text{M}$ 以上では90%以上の阻害が認められた。それに対し、HS-SULTの基質デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)も $1.25\text{ }\mu\text{M}$ 以上で阻害が認められたが、 $2.5\text{ }\mu\text{M}$ - $20\text{ mM}$ まで、阻害率は35-50%にとどまった(図2a, b)。

また、TL-PSULTの基質であるドパミンや、E-SULTの基質であるエストロンでは顕著な阻害は認められなかった。

#### C-2. ビスフェノールA硫酸抱合体のMCF-7細胞増殖誘導活性

内在性のエストロゲンの除去処理をしたCD-FCSを加えた培養液中では、MCF-7細胞の増殖能は非常に低い。その培養液に、エストロゲン様作用を有する物質を加えることにより惹起される細胞増殖誘導をもって、エストロゲン様作用の検定系として用いられているのがいわゆるE-screenである。我々は、MCF-7の細胞増殖を、細胞をクリスタルバイオレットで染色し、その染色強度によって定量化した。本試験を用いて、ビスフェノールA硫酸抱合体のMCF-7細胞の増殖誘導能を、ビスフェノールAと比較検討したところ、図3に示すように、ビスフェノールAが、明らかにMCF-7細胞の増殖活性を惹起する $3\text{ nM}$ 、 $30\text{ nM}$ 、 $100\text{ nM}$ で、硫酸抱合体は全く細胞増殖誘導能を示さなかった。

#### C-3. ビスフェノールA硫酸抱合体のMCF-7細胞におけるエストロゲン応答遺伝子pS2の発現誘導活性

CD-FCS添加の培養液中2時間培養後、RT-PCR法で測定したpS2 mRNAの発現量は、正常のFCSを加えた培養液の場合に比べて約40%低下した。このような条件下で

CD-FCS添加培養液中に被検物質被存在下のpS2遺伝子の発現のビスフェノールAおよびビスフェノールA硫酸抱合体による誘導能を調べた。その結果、図4に示すように、MCF-7の細胞増殖誘導実験と同様に、ビスフェノールA硫酸抱合体では、pS2遺伝子の発現誘導は認められなかった。

### D. 考察

D-1. ヒト肝サイトゾール画分のSULTのうち、TS-PSULTの特異的阻害剤ケルセチンや、その典型的基質p-ニトロフェノールがビスフェノールAの硫酸抱合活性をそれぞれ約70%、約90%阻害した。それ以外のヒト肝硫酸転移酵素分子種の典型的基質すなわちDHEA(HS-HSST)、ドパミン(TL-PSULT)、エストロン(E-SULT)の中で、DHEAでのみ約50%程度の阻害がみられた。これらのことより、ヒト肝で、ビスフェノールAの硫酸抱合には、TS-PSULT(ST1A3)の関与が最も大きいことが示唆された。

D-2. エストロゲン様作用の*in vitro*検定系の一つ、MCF-7による増殖誘導活性は、ビスフェノールAの硫酸抱合体では、ビスフェノールAに比べ、明らかに減弱していることが示された。また、内在性エストロゲン濃度を低くした培養系において、ビスフェノールAはエストロゲン応答性遺伝子pS2 mRNAの発現レベルを、濃度 $1\text{ }\mu\text{M}$ 以上、2時間の作用で2倍以上に上昇させた。これらを総合して、ビスフェノールAの硫酸抱合反応は、ビスフェノールAのエストロゲン作用に関わる細胞応答性を減弱させる反応であることが強く示唆された。

### E. 結論

E-1. ヒト肝サイトゾールのビスフェノールAの硫酸抱合反応には、TS-PSULT(肝においては主要分子種ST1A3)が最も大きく関与している。

E-2. ビスフェノールAの硫酸抱合反応は、エストロゲン様作用をMCF-7細胞を用いた検定系による結果から判断すると、本作用を減弱させる役割を果たすと考えられた。本研究で得られたデータはビスフェノールAに対するリスク評価において有用な手がかりを与えると考えられた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Shiraga, T., Hata, T., Yamazoe, Y., and Ohno, Y., Iwasaki, K.: N-sulpho conjugation of amines by human cytosolic hydroxysteroid sulphotransferase. *Xenobiotica*, 29, 341-347, 1999.
- 2) 大野泰雄: 代替法を組み込んだ眼刺激性評価ガイドランスについて、フレグランスジャーナル7, 21-26, 1999
- 3) Nakazawa, K., Inoue, K., Ohno, Y., Block and unblock by imipramine of clone and mutated P2X2 receptor/channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuroscience Letters* 264, 93-96, 1999.
- 4) Nakazawa, K., Ohno, Y., Neighboring glycine residues are essential for P2X2 receptor/channel function, *Eur. J. Pharmacol.* 370, R5-R6, 1999.
- 5) 大野泰雄、毒性学の現状と種差について、化学物質の安全性をいかにして見極め

るか。可塑剤インフォーメーション、12、9-13、1999

6) 大野泰雄、安全な臨床試験の実施および効率的な医薬品開発のための非臨床試験実施タイミング、J. Toxicol. Sci, 24, app.109-117, 1999.

7) Nakazawa, K., Ohno, Y., Block by 5-hydroxytryptamine and apomorphine of recombinant human neuronal nicotinic receptors, Eur. J. Pharmacol. 374, 293-299, 1999.

8) Nakazawa, K., Ohno, Y., 5-hydroxytryptamine inhibits P2X2 receptor channel pore mutants. Cellular and Molecular Neurobiology, 19, 665-669, 1999.

9) Saitoh, M., Umemura, T., -- Inoue, T., Ohno, Y., Sofuni, T., Kurokawa, Y., Tsuda, M. Toxicity study of a rubber antioxidant, mixture of 2-mercaptomethylbenzimidazoles, by repeated oral administration to rats. Food and Chemical Toxicology, 37, 777-787, 1999.

10) Shiraga, T., Niwa, T., Teramura, Y., Kagayama, A., Tsutsui, M., Ohno, Y., Iwasaki, K.: Oxidative metabolism of tacrolimus and its metabolite by human cytochrome P450 3A subfamily. Xenobio. Metabol. And Disp. 14, 277-285, 1999.

11) Ozawa, S., Shimizu, M., Katoh, T., Miyajima, A., Ohno, Y., Matsumoto, Y., Fukuoka, M., Tang Yong-Ming, Lang, N.P., Kadlubar, F.F., Sulfating-activity and stability of cDNA-expressed allozymes of human phenol sulfotransferase, ST1A3\*1 (213Arg) and ST1A3\*2 (213His), both of which exist in Japanese as well as Caucasians. J. Biochem. 126, 271-277, 1999.

12) Usami, M., Tabata, H., Ohno, Y., Effects of glutathione depletion on selenium- and selenate-induced embryotoxicity in cultured rat embryos. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis, 19, 257-266, 1999.

13) Hirabayashi N., Matsuki, Y., Suzuki E., Usami M., Ohno, Y., Shimada, K., Toxicokinetic study of fadrozole, a non-steroidal aromatase inhibitor, in chicken eggs by the injection into the air sac. Japan. Poultry Sci. 36, 382-387, 1999.

14) 酒見和枝、宇佐見誠、紅林秀雄、大野泰雄、亜塩酸ナトリウム(NaClO<sub>2</sub>)のラットを用いた経口投与による催奇形性試験. Bull. Natl. Health Sci. 117, 99-103, 1999

15) Ohno, Y.: Harmonization of the timing of non-clinical tests in relation to the conduct of clinical trials. J. Controlled Release 62, 57-63, 1999.

16) Sakemi, K., Usami, M., Mitsunaga, K., Ohno, Y., Tsuda, M.: Comparative toxicokinetic study of rubber antioxidants, 2-mercaptobenzimidazole and 2-mercaptomethylbenzimidazole, by single oral administration in rats. J. Toxicol. Sci. 24, 399-405, 1999.

17) Nishikimi, H., Kansaku, N., Saito, N., Usami, M., Ohno, Y., Shimada, K.: Sex differentiation and mRNA expression of P450c17, P450arom and AMH in gonads of the chicken. Molecular reproduction and development 55, 20-30, 1999.

## 2. 学会発表

1) 小澤正吾、加藤貴彦、稲富久人、松本哲朗、大野泰雄 ヒトフェノール硫酸転移酵素、アリルアミン N-アセチル転移酵素の遺伝子多型と尿路上皮癌感受性 第26回日本トキシコロジ学会学術年会 (札幌) 平成11年7月21日-23日 第26回日本トキシコロジ学会学術年会 要旨集 232頁 1999年

2) 小澤正吾、清水万紀子、松本宜明、福岡正道、加藤貴彦、大野泰雄 ヒト組織フェノール硫酸転移酵素の遺伝子多型と多型分子種の性質 第14回 日本薬物動態学会年会 (浜松) 平成11年10月19日-21日 薬物動態・14巻 S96-S97 1999年

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

発明の名称：補体成分C3含有組成物

特許出願人：国立衛生試験所長

代理人：川上宣男

特許出願番号：平成8年特許願 第212169

起案日：平成11年10月28日

発明人：宇佐見 誠、酒見 和枝、大野 泰雄

## 以上の留意事項について

1. 日本工業規格A列4番の用紙を使用して下さい。
2. 文字の大きさは、11ポイントでお願いいたします。

図1. 熱安定性フェノール硫酸転移酵素 (ST1A3)、  
ヒト肝サイトゾールのビスフェノールA硫酸抱合活性の  
ケルセチンによる阻害

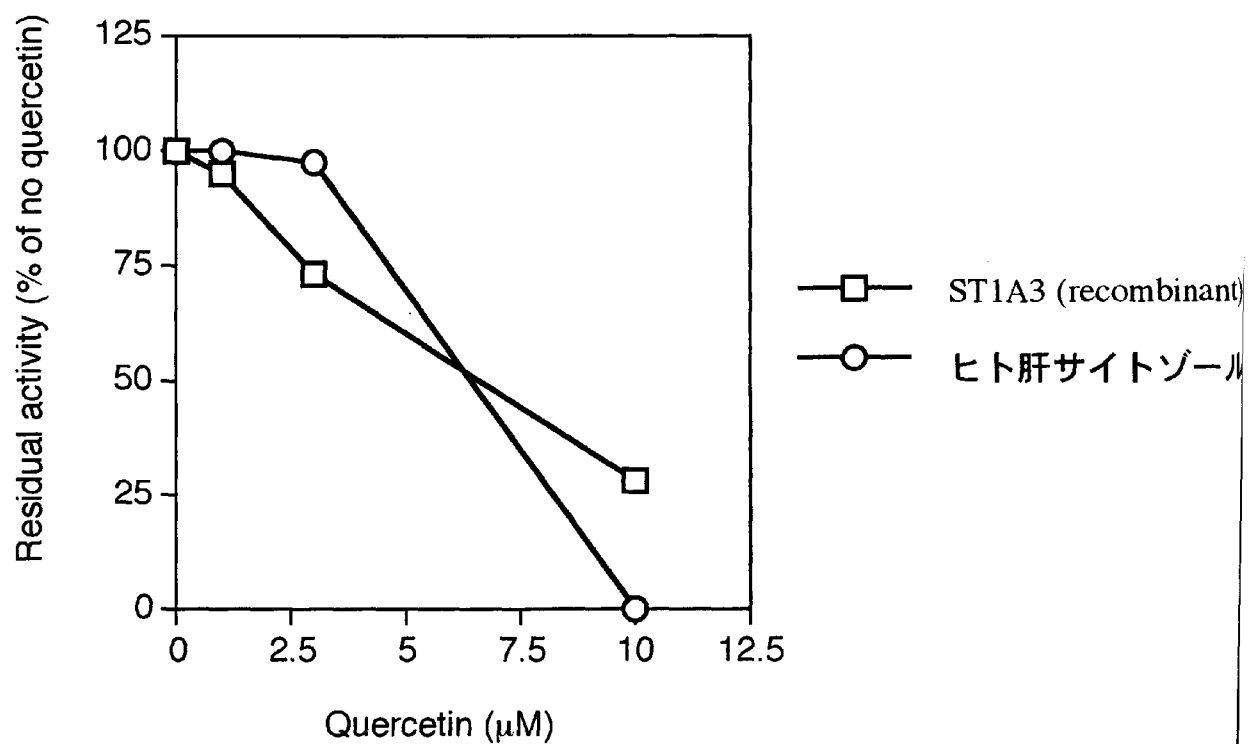


図2. ヒト肝サイトゾールによるビスフェノールAの硫酸抱合活性  
に対する種々の硫酸転移酵素分子種の典型的基質による阻害

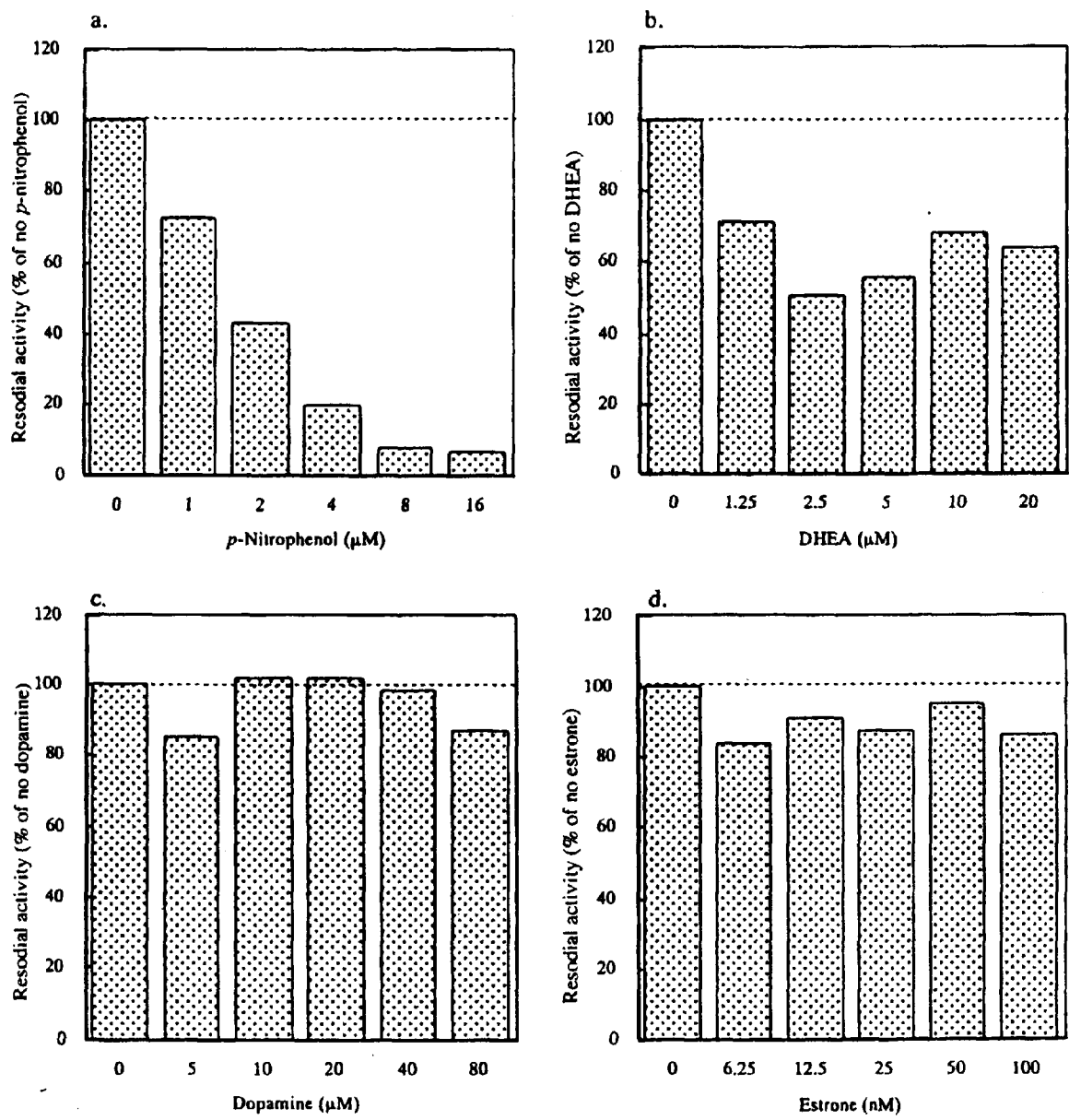
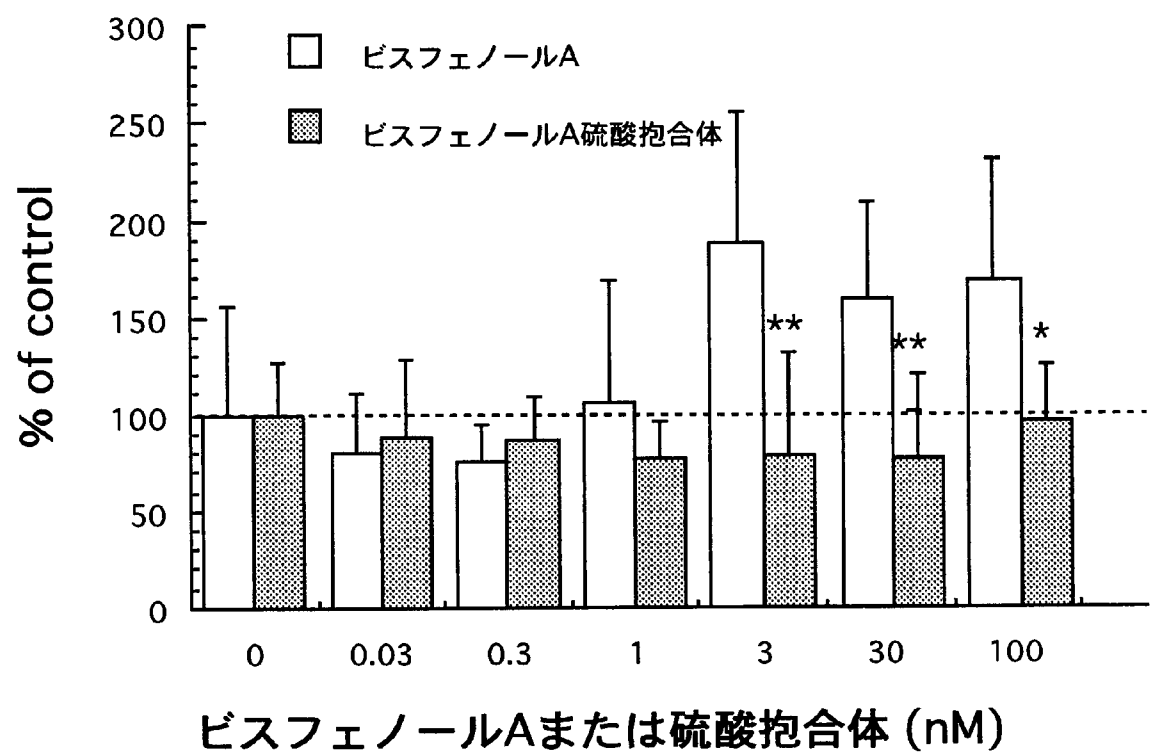


図 3. ビスフェノールAおよび硫酸抱合体によるMCF-7細胞の増殖誘導活性



データは、6 ウェルの細胞の染色強度の平均と、標準偏差を表すバーをもって表示されている。\*および\*\*は当該濃度におけるビスフェノールAと硫酸抱合体との差の有意差をt-検定により、検定した結果を表す。

\*:  $p < 0.01$ , \*\*:  $p < 0.001$

図4. ビスフェノールAおよび硫酸抱合体によるMCF-7細胞のエストロゲン応答遺伝子pS2の発現誘導活性

