

高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の分析及び動態解析
－エストロジェン活性検出系の確立－

主任研究者： 中澤 裕之
星薬科大学

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。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

B. 研究方法

E-スクリーンアッセイ法

- 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。
- ⑥ 37°C 、5% CO_2 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 ($90 \mu\text{l}$) にかえる。
- ⑧ $10 \mu\text{l}$ 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、 $10^{-3}\text{M} \sim 10^{-10}\text{M}$ になるような溶液を作り、それを $10 \mu\text{l}$ ずつ加えていく。最終的な濃度は $10^{-4}\text{M} \sim 10^{-11}\text{M}$ にな

る。

⑨37℃、5%CO₂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ティングキット（和光純薬）中の試薬溶液を10 μl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、倫理面の問題は無いと判断する。

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 ~10⁻⁶M 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。ところで、MCF-7 細胞によるアッセイは MCF-7 細胞のエストロジェ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 ~10⁻⁶M 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。このアッセイ系を用いた結果、p-ジクロロベンゼンでは 10⁻¹¹ ~10⁻⁴M で 1.1 倍以下の弱いエストロジェン活性が、p-ヒドロキシ安息香酸では 10⁻¹¹ ~10⁻⁵M で 1.1~1.3 倍のエストロジェン活性が検出された。また、エポキシ樹脂のモノマーであるビスフェノール A ジグリシジルエーテルの塩化水素付加体（2HCl 型）は 10⁻¹¹ ~10⁻⁵M で 1.2~1.5 倍のエストロジェン活性が、4OH 付加体は 10⁻¹¹ ~10⁻⁵M で 1.3~1.9 倍のエストロジェン活性が検出された。

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、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。本研究によりビスフェノール A ジグリシジルエーテルの 2HCl 付加体及び 4OH 付加体に、ビスフェノール A と同等のエストロジェン活性が検出され、これら化学物質に対しても慎重に検討する必要があると考える。

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 ~10⁻⁶M 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。このアッセイ系を用いた結果、p-ジクロロベンゼン及び p-ヒドロキシ安息香酸では弱いエストロジェン活性が検出された。また、エポキシ樹脂のモノマーであるビスフェノール A ジグリシジルエーテルの 2HCl 付加体及び 4OH 付加体にはビスフェノール A と同等のエストロジェン活性が検出された。

F. 研究業績

学会発表

Yamazaki. T. , Okada. Y. , and Hisamatsu. Y. Effects of endocrine disruptors on lymphocyte functions, *Endocrine Disruptors, Keystone Symposia, California, 1999; 48.*

山崎聖美、岡田由美子、久松由東. 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. 第72回日本生化学大会, 横浜. 1999 ;897.

山崎聖美、岡田由美子、久松由東、香山不二雄. 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. 第2回日本内分泌攪乱化学物質学会, 神戸. 1999;157.

山口晃子、山崎聖美、坂部貢、中澤裕之. 生活関連化学物質の E-SCREEN Assay による評価. 第2回日本内分泌攪乱化学物質

