特集・有害化学物質の環境毒性評価

数種の培養細胞を用いた内分泌攪乱物質 のスクリーニング

川合真一郎*・藤澤 由里*・
山本 早苗*・横関 友紀*・黒川 優子*

はじめに

内分泌攪乱物質（環境ホルモン）に関してこの2年間に於けるマスコミのとりあげ方はすさまじいものがあったが、最近はやや沈静化してきたようである。しかし、沈静化——尻すぼみ——うやむやというルートを辿るようなことがあってはならない。確かに人や野生生物における内分泌攪乱現象とその原因物質、すなわち因果関係が明らかになっているケースはむしろ稀であるといってもよい。しかし生物が正常な生命現象を営んでいくうえで重要な働きを演じている内分泌系（ホルモン系）に狂いが生じるということはその生物の生存を脅かすだけでなく、生殖に関わる内分泌系が攪乱される場合は次世代の誕生、すなわち再生産機構が円滑に機能しなくなるという大変な事態が生じることになる。したがって、因果関係が不明であっても野生生物等に何らかの内分泌系の異常が見られるという事実を直視し、むやみやたらに騒ぎ立てることなく、着実に原因究明に取り組むことが目下の急務と思われる。環境中に存

在する内分泌攪乱物質の質的および量的な把握を目指す場合、最も手っ取り早くアプローチし得るのは *in vitro*（試験管内）の方法である。丸ごとの実験動物を用いる *in vivo* の方法は労力、時間、コストの面から見ると第一段階のスクリーニングから用いるのではなく、ある程度の絞ってから取りかかるほうが合理的である。さらに動物愛護の観点からも用いる実験動物の数を極力少なくすることは大切である。

本稿では、*in vitro* の方法について既往の知見を簡略にレビューした後、著者らが現在取り組んでいる“培養細胞を用いた内分泌攪乱物質のスクリーニング”について問題点や注意点を述べる。

1. *in vitro* のスクリーニング法

生体内で重要な働きを演じているホルモンは特定の器官・臓器で産生され、血液を介して標的器官に運ばれ、細胞に存在する受容体（レセプター）にまず結合する。ステロイドホルモンとペプチドホルモンとでは細胞内におけるレセプターの存在部位が異なるが、この結合によってホルモン情報が遺伝子に

表1 *in vitro* での各種バイオアッセイ法の比較

方 法	細 胞	E ₂ (EC ₅₀)	分析所要日数
競争リガンド結合	MCF-7	5 nM	1
細胞増殖	MCF-7	9 pM	7
アルカリフォスファターゼ	Ishikawa cell	11 pM	3
ビテログニン	ニジマス肝細胞	1.8nM	6
エストロゲンレセプター因子に制御されるレポーター遺伝子	MCF-7	50 pM	3
キメラレセプター	MCF-7	420 pM	3
酵母			
ヒトエストロゲンレセプター, LacZ レポーター遺伝子	<i>S. cerevisiae</i>	0.8nM	1
ヒトエストロゲンレセプター, URA3レポーター	<i>S. cerevisiae</i>	3 nM	2

(T. Zacharewski, 1997)

* 神戸女学院大学人間科学部

Shinichiro KAWAI, Yuri FUJISAWA, Sanae YAMAMOTO, Yuki YOKOZEKI, Yuko KUROKAWA

伝達され、最終的に何らかのタンパク質が合成されることにより、それぞれのホルモンに応じた機能が発現される。内分泌攪乱物質の作用点は、ホルモンとレセプターとの結合の段階またはホルモンの合成・分解の段階を攪乱すると考えられている。近年、よく用いられているスクリーニング法は表1に示したとおりであるが¹⁾、これらはエストロゲン様物質が細胞の核の中にあるエストロゲンレセプターと結合する性質や、結合によって細胞が増殖することを利用したり、転写活性を指標としている。後述する乳がん由来細胞の MCF-7 の細胞増殖 (Cell proliferation) アッセイ²⁾や Ishikawa cell³⁾を用いてエストロゲン存在下でアルカリフォスファターゼ活性が上昇することを利用する方法は感受性が高いが、スクリーニングに要する日数がやや長いのが短所である。また、酵母にエストロゲンレセプター遺伝子を導入し、 β -ガラクトシダーゼなどのレポーター遺伝子の転写活性化を利用する YES (Yeast Estrogen Screen) アッセイ法⁴⁾もよく用いられている。酵母には細胞壁があるため化学物質の透過性が低く、MCF-7 に比べて感度が低いという欠点もあるが、扱いやすいこともあって利用頻度は高い。

in vitro の実験は生理・生化学、医学、薬学、毒性学などいろいろな分野で日常的に行われているが、丸ごとの生物を用いる *in vivo* のアッセイ系とは大きく異なり、化学物質の生体内での代謝、神経系やいろいろな内分泌系さらには免疫系などの制御・調節機構から解除されているため、実際の生体内での

化学物質の影響をどこまで評価し得るかが常に問われるのである。肝ミクロソーム画分である S-9 を添加することにより供試化合物を代謝活性化してエストロゲン活性が発現するかどうかを調べることもなされている⁵⁾。

2. 乳がん由来細胞を用いる方法 (E-screen)²⁾

A. M. Soto らによって開発された E-screen はエストロゲンレセプターを保有している乳がん由来細胞 (MCF-7, T-47D, ZR-75-1) が培養液中に存在するエストロゲン様物質によって増殖するという性質を利用したスクリーニング法である。E-screen の概略は図-1 に示したとおりである。24穴のプレートに対数増殖期の乳がん由来細胞の浮遊液を入れて6日間培養後、細胞をトリクロロ酢酸で固定する。次に固定された細胞をスルホローダミン-B (SRB) で染色後、492 nm における吸光度を測定し⁶⁾、後述する方法で細胞数に換算する。但し通常の細胞培養法とは異なり、E-screen の場合、使用する血清 (ヒトの血清またはウシの胎児血清) いずれも用いられる) はあらかじめ活性炭-デキストラン処理 (CD treatment) を行う必要がある。これは血清中に含まれるエストロゲンを除去するためである。

同じ MCF-7 細胞でも保存株の違いによってエストロゲンに対する感受性が異なることが報告されている。図-2 は E₂、*p*-ノニルフェノール (NP) およびビスフェノール A (BPA) に対する4種の保存株の感受性を E-screen によって比較した結果で

ヒト乳がん由来細胞

- 5% FBS を含む D-MEM で培養した細胞を 24穴 の培養プレートに 2×10^4 cells / well の細胞密度で植える。
- 24時間 培養し、プレートの底面に細胞を付着させる。
- CD-FBS を 5% の濃度で含み、かつ供試化合物を添加した D-MEM と交換する。
- 37℃, 5% CO₂ / 95% air の条件下で 6日間 培養する。
- 培地を除去し、10% TCA を加え、4℃ で 30分間 静置し、細胞を固定する。
- 純水で洗浄後、風乾する。
- 0.4% SRB で 10分間 染色後、1% 酢酸 を用いて洗浄、風乾する。
- 10mM トリス緩衝液 (pH 10.5) を用い、細胞に結合した色素を可溶化する。
- 492nm における吸光度を測定する。

図-1 E-Screen の概要

図一 2 MCF-7 細胞の保存株の違いが E_2 , N P および BPA による細胞増殖効果におよぼす影響 (M. Villalobos ら, 1995)
 —●—: E_2 —▲—: N P, —■—: BPA

ある⁷⁾。図中の A はタフツ大学所有の株 (BUS) であるが、最も高い増殖応答を示し、6 日間の培養でコントロールの 6 倍以上の増殖を示している。図中の C は ATCC (American Type Culture Collection) が扱っている株であり、購入が容易であるためこの ATCC 株を利用している研究機関は多いが、上述の BUS に比べると E_2 に対する感受性は 3 分の 1 程度である。感受性が低くても E_2 , N P, BPA に対する増殖の応答性の傾向はいずれの保存株も類似しているの、使用することは可能である。

このように、保存株の違いによって

エストロゲン様物質に対する感受性が異なるだけでなく、乳がん由来細胞の培養条件、たとえば実験開始時の細胞密度、使用する血清などによって細胞の増殖が左右されることも知られている¹⁾。また、これらのことが表 2 に示したように研究者間でのデータの違に関わっている。 E_2 、微生物エストロゲンのゼアラレノン、植物エストロゲンのクメストール、合成エストロゲンのジェチルスチルベストール (DES) を供試化合物として MCF-7 を用いる E-screen アッセイが 3 つの研究機関で行われているが、化合物によっては数倍～30 倍程度の感受性の違いが見られる¹⁾。

著者らも E-screen アッセイに関して 2, 3 の実験条件の検討を行った。図一 3 は活性炭ーデキストラン処理したウシ胎児血清 (Charcoal Dextran treated Fetal Bovine Serum: CD-FBS) と無処理の FBS の配合比を変えて MCF-7 細胞の培養液に添加したときの増殖の様相を示したものである。CD-FBS/FBS の比の値が小さくなるにつれて増殖が上昇していることから FBS 中のエストロゲンが適正に除去されている

ことがわかる。FBS 中にはエストロゲンが 400 pM 程度含まれている場合もあり⁷⁾、CD 処理により 1 pM まで除去することができるといわれている。CD 処理で血清中のエストロゲンを除去することは必須であるが、細胞にとって大切な栄養成分まで除

表 2 細胞増殖測定による天然および合成エストロゲンのエストロゲン活性の比較

化 合 物	Mayr et al.	Welshons et al.	Soto et al.
17 β -エストラジオール*	1.0	1.0	1.0
ゼアラレノン	0.04	0.0085	0.010
クメストール	0.0030	0.0011	0.00010
ジェチルスチルベストール		0.070	10

*17 β -エストラジオールの値を 1 としている。(T. Zacharewski, 1997)

図-3 MCF-7細胞の増殖とCD-FBS/FBSとの関係

図-4 MCF-7細胞の増殖におよぼすDMSOおよびエタノール濃度の影響

去してはならないので、このCD処理の成否はE-screenにおいて重要と思われる。

E-screen法を用いるときに供試化合物を培養液中に添加する際の分散溶媒としてジメチルスルホキシド(DMSO)やエタノールがよく用いられるが、これらの溶媒が細胞の増殖に影響を与えない濃度で使用する必要がある。図-4はMCF-7細胞の増殖とDMSOおよびエタノール濃度との関係を示したものである。いずれの溶媒も0.5%以下で使用する事が望ましい。1%以上になるとDMSOにおいて増殖阻害がとくに顕著である。

著者らは上述のことを考慮して、E-screenアッセイを行う際にCD-FBS-DMSO(0.5%)を陰性対照(Negative Control)としている。

E-screenでは細胞の増殖程度を測定することが不可欠である。培養プレートの底面に付着している細胞をトリプシン処理により底面から剥離させて細胞懸濁液とし、血球計算盤を用いて細胞数をカウントすることは容易であるが、試料数が多いときは労力や所要時間の面で難がある。コールターカウンターを用いることができれば迅速に細胞数を計測し得る。著者らは培養プレート中の細胞を上述のようにSRBで染色したのち、492nmにおける吸光度を測定し、別途血球計算盤でカウントした細胞数との関係式を求め(図-5)、以後は吸光度の測定値を細胞数に換算して細胞の増殖量を評価している。

図-6はATCCから入手した3種の乳がん由来細胞(MCF-7, T-47D, ZR-75-1)において、5pM~500nMの濃度範囲でE₂に対する感受性がどのように異なるかを調べた結果である。MCF-7やT-47D細胞においては5pMのE₂で増殖が顕著に認められ、500pMではほぼ平衡状態に達した。図には示さなかったが、E₂濃度が10μM

図-5 MCF-7細胞の細胞数とSRB法による吸光度との関係

図一 6 3種の乳がん由来細胞の増殖におよぼす E_2 の影響

H C : Hormoneless control, A : 5×10^{-12} M, B : 5×10^{-11} M, C : 5×10^{-10} M, D : 5×10^{-9} M, E : 5×10^{-8} M, F : 5×10^{-7} M

を越えると細胞の増殖は抑制されることを確かめている。ZR-75-1細胞は E_2 の濃度上昇に応じて細胞数がやや増加する傾向もみられるが、他の2種の細胞に比して、感受性が低く、E-screen に関しては実用的でないといえよう。これらの3種の細胞はいずれもエストロゲンレセプターを保有しているが、継代を繰り返すうちに、細胞の性質が変化することもあり得る。したがって、培養細胞を用いるバイオアッセイでは細胞を入手後できるだけ早い時期に、大量の細胞を液体室素中に小分けして保存し、アッセイの際には継代数 (passage) をある程度同じくする配慮も大切である。図一8においてMCF-7とT-47Dの感受性を比較すると前者の方が良好のようにみられるがいずれの細胞もE-screenの実施に関して問題はない。

3. 合成エストロゲンおよび数種の化学物質が乳がん由来細胞の増殖におよぼす影響

経口避妊薬ピルの主成分であるエチニルエストラジオール (EE_2) とかつて流産治療薬として世界中で使用されたDESがMCF-7細胞の増殖におよぼす影響を図一7に示した。いずれの合成エストロゲンも0.5 pMで細胞の増殖は上昇して5~50 pMで最大に達し、 E_2 と同程度もしくはそれ以上のエストロゲン活性を有していることがわかる。英国では EE_2 が下水処理場からの放流水中に微量ながら検出されており、雌の成魚が本来的に産生する卵黄タンパク前駆物質のビテロジェニンを、雄の魚類が産生することに E_2 とともに関わっているのではないかとされている⁸⁾。また、 EE_2 は通常の下水処理工程では分解されにくいともいわれている。DESは今日では使用量が少なく用途も限定されているが、大

量に使用された1960年代において胎児期 (妊娠3~4ヶ月) にDESに曝露された女子では、思春期に陰がんが多発するといわれている。

界面活性剤のアルキルフェノールポリエトキシレート分解産物である *p*-オクチルフェノールがMCF-7とT-47D細胞の増殖におよぼす影響を図一8に示した。5 nMにおいて細胞の増殖が認められ、500 nM~5 μ Mで最大増殖が観察された。しかし E_2 、 EE_2 、DESなどの天然および合成エストロゲンと比べると細胞増殖効果は $10^4 \sim 10^5$ 分の1である。また、*p*-ノニルフェノールやビスフェノールAについても *p*-オクチルフェノールと類似の傾向が見られ、図一9に示したように5 nM~500 nMでT-47D細胞の最大増殖が認められた。*p*-オクチルフェノール、*p*-ノニルフェノール、ビスフェノールA

図一 7 MCF-7細胞の増殖におよぼす EE_2 および DES の影響
C : control

図-8 MCF-7 および T-47D 細胞の増殖におよぼす *p*-オクチルフェノールの影響

図-9 T-47D 細胞の増殖におよぼすビスフェノールAおよび *p*-ノニルフェノールの影響

などはいずれも内分泌攪乱作用が疑われている物質である。これらの物質に曝露された雄の魚類においてビテロジェニンが産生されることも飼育実験で確かめられており、要注意物質の1つではあるが、河川、湖沼、海水中の濃度レベルで雄の魚類にビテロジェニン産生をひき起こし、かつ再生産機構に影響をおよぼしているかどうかは現時点では不明であ

り、今後の課題である。

おわりに

乳がん由来細胞を用いた内分泌攪乱物質のスクリーニングについて述べ、その有効性と若干の問題点さらに数種の化合物をE-screenアッセイにかけエストロゲン様活性の比較を行った。

本稿では *in vitro* のスクリーニング法のうち乳がん由来細胞を用いる方法のみについて述べたが、Ishikawa cell, 組換え酵母・リポーター遺伝子アッセイなどでスクリーニングした場合のデータと比較することも重要である。何故なら、1つのバイオアッセイ法で得られる情報には限度があるし、また、それぞれのアッセイ法の特徴を加味した考察が必要と思われるからである。これらについて現在著者もとりに組んでいるところである。

参考文献

- 1) Zacharewski, T : *In vitro* bioassays for assessing estrogenic substances, Environ. Sci. Technol., **31**, 613-623 (1997).
- 2) Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N. and Serrano, F. O. : The E-screen assay as a tool to identify estrogens : An update on estrogenic environmental pollutants, Environ. Health Perspect., **103** (Suppl. 7), 113-122 (1995).
- 3) Holinka, C. F., Hata, H., Kuramoto, H. and Gursipide, E. : Effects of steroid hormones and antisteroids on alkaline phosphatase activity in human endometrial cancer cells (Ishikawa line), Cancer Res., **46**, 2771-2774 (1986).
- 4) Routledge, E. J. and Sumpter, J. P. : Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, Environ. Toxicol. Chem., **15**, 241-248 (1996).
- 5) 金子秀雄, 庄野文章, 松尾昌季 : 女性ホルモン様物質の検出系, 科学, **68**, 598-605 (1998).
- 6) Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R. : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, J. Natl. Cancer Inst., **82**, 1107-1112 (1990).
- 7) Villalobos, M., Olea, N., Brotons, J. A., Olea-Serrano, M. F., Almodovar, J. M. R. and Pedraza, V. : The E-screen assay : A comparison of different MCF7 cell stocks, Environ. Health Perspect., **103**, 844-850 (1995).
- 8) Desbrow, C., Routledge, E. J., Brighty, G. C., Sumpter, J. P. and Waldock, M. : Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening, Environ. Sci. Technol., **32**, 1549-1557 (1998).

新刊図書

道なぜなぜおもしろ読本

(株)建設技術研究所編著

A5版 217頁

本体 2,500円 (税別)

道は、人間の歴史とともに始まり、今日まで人々の生活を支え続けてきました。人や物を運び、まちは道を基

本として形づくられてきました。

本書は道についてのさまざまな疑問や興味をひきそうな話題を一般の人々に理解していただけるよう説明したものです。道のおいたち、道路をつくる、

まもる、利用する、活用するといった視点からの疑問点をQ&A形式で取り上げ、道全体がわかるように心がけました。

本書を通じて、道について多少でも理解を深めていただき、また親しみを抱いていただければと願っています (「まえがき」より)。

目次

1. 道のおいたち, 2. 道のいろいろ, 3. 道路をつくる, 環境を考える, 4. 道路まもる, 環境を考える, 5. 道路を利用する, 道をいかす, 6. 道の夢, 7. 参考文献

問合先: 山海堂宣伝部

〒113-8430 東京都文京区本郷5-5-18

TEL 03-3816-1613 FAX 03-3816-1619