内分泌攪乱化学物質の試験管内 (*in vitro*) 試験法

斎藤幸一*, 金子秀雄*

1. 緒 言

木材防虫剤は木材防カビ剤や木材防腐剤とともに木造建築物や木質材料の寿命延長に重要な役割を果たしている。本分野の薬剤には長期の残効性が要求される場合が多く、従来はクロルデン等の有機塩素系の薬剤が用いられてきた。有機塩素剤は環境中での残留問題もあり使用禁止となり、その後、人畜に対し低毒性であり、かつ環境に対する影響も少ない薬剤としてピレスロイド系殺虫剤が使われるようになってきた¹⁾。ピレスロイド系殺虫剤の中でもベルメトリンはその効力と安定性の高さから、土壌処理用シロアリ防除剤²⁾の他、表面処理用木材保存剤や加圧注入用木材保存剤^{2),3)}としても広く使用されている。

一方、Colbon博士らの著書(Our Stolen Future : 邦題“奪われし未来”)⁴⁾の刊行を発端として、内分泌攪乱化学物質の問題が大きな社会問題として取り上げられている。マスコミ等で広く伝えられている当該問題を扱った例では、米国でのワニ生殖器の異常、日本近海でのイボニシの雌雄同体の発見、男子の精子の質・量の低下等があるが、話題性に対し、実際は正確な実態把握、原因および作用メカニズムは未解決の部分が多い^{5)~7)}。

当該問題に早くから取り組んでいる米国環境保護庁(EPA)の諮問機関EDSTAC(Endocrine Disruptors Screening and Testing Advisory Committee)もしくはOECD(Organization for Economic Cooperation and Development)では内分泌攪乱化学物質の判定は最終的には長期動物毒性試験(繁殖性試験)によることで合意されている。

しかし、現在流通する化学物質は8万種以上あると考えられ、これらの化合物のすべてについて繁殖性試験を実施することは事実上困難である。そこで試験管内試験(*in vitro* 試験)と短期動物毒性試験(*in vivo* 試験)を用いて優先順位を付け、最終的には繁殖性試験によって決定していく方針が示されている。現在、*in vitro* 試験の目的は、内分泌攪乱化学物質がホルモンと密接な関係があることから、①ホルモン受容体(レセプター)と化学物質の結合性によるホルモンまたは抗ホルモン様作用の評価、②ホルモンの生合成に対する化学物質の影響評価に大別できる。①および②の検討において、様々な*in vitro* 試験法が提案されているが、これらの試験方法は未だ検証段階にある。しかし、*in vitro* 試験は、その簡便さ、コスト等の理由で広く使用され、それを用いた化学物質の内分泌攪乱作用を示唆する報告が相次いでなされている。これらの報告が全て誤りでないにしても、結果の話題性が先行して、本来試験法が持つ問題点を曖昧にした報告が多数あることは否めないのが現状である。現在の内分泌攪乱化学物質の大きな問題は、科学的に十分に検証されていない実験手法で実施し、さらに得た結果を十分に評価せずに公表されるためではないかと考える。

本稿では、内分泌攪乱化学物質の中で最も研究が進んでいる①ホルモン受容体(レセプター)と化学物質の結合性によるホルモンまたは抗ホルモン様作用の評価について、女性ホルモン(エストロゲン)様化学物質検出のための*in vitro* 試験法を中心に概説し、さらにそれらの方法を用いて行われたピレスロイド系殺虫剤のホルモン様および

* 住友化学工業(株)生物環境科学研究所

抗ホルモン様作用試験の結果についても述べる。

2. 内分泌攪乱化学物質の作用点

内分泌攪乱作用物質の定義は“生体の恒常性、生殖、発生、あるいは行動に関与する種々の生体内ホルモンの合成、貯蔵、分泌、体内輸送、結合そしてホルモン作用そのもの、あるいはそのクリアランスなどの諸過程を阻害する作用を持つ外来性物質”⁸⁾であり、簡単に言えば“生体内のホルモン環境を攪乱し、毒性作用を惹起するもの”と換言できる。

まず、ホルモンは、特定の器官・臓器で産生され、一般に血液で運搬される。そして、標的組織で特定のレセプター（受容体）と結合し、この結合により標的細胞内に情報が伝達され、ホルモン標的遺伝子が活性化される。標的遺伝子にはそのホルモン作用に重要な役割を担うタンパク質がコードされているため、最終的にはホルモン作用が発現される。従って、化学物質がホルモン環境に与える作用点は、①ホルモンとレセプターとの結合と標的遺伝子の活性化および②ホルモンの生合成・運搬に大別できる（図1）。

図1 内分泌攪乱化学物質の作用点

3. 脂溶性ホルモンのレセプター（核内ホルモンレセプター）

一般的に、ホルモンは水溶性のペプチドホルモ

ンとステロイド等の脂溶性ホルモンに分類できる。内分泌攪乱化学物質として疑われている化学物質は比較的低分子な物が多いため、現在は脂溶性ホルモンを対照とした研究が先行している。脂溶性ホルモンには、女性ホルモン（エストロゲン）、男性ホルモン（アンドロゲン）等のステロイドホルモンの他、甲状腺ホルモン等が知られているが、これら脂溶性ホルモンにはそれぞれのホルモンに対応したレセプターが存在する。これらのレセプター群は、一般的に“核内ホルモンレセプター”と呼ばれ、非常に部分構造が類似した遺伝子ファミリーを形成していることがわかっている⁹⁾。

4. 核内ホルモンレセプターの機能

核内ホルモンレセプターは構造上の類似点の他、ホルモンの機能発現に果たす役割・機構も非常に類似している。例えばエストロゲンレセプターは細胞内で、エストラジオール等のホルモンと結合体を形成し、DNA上に存在する特異配列を認識して結合する。この特定配列は、一般的にはホルモン標的遺伝子の5'上流側に存在し、ホルモン応答配列（Hormone responsive element: HRE）と呼ばれている。この特異配列に、各種ステロイドホルモンレセプターはホモ2量体、一方、甲状腺ホルモン等のレセプターはRXR（レチノイドXレセプター）とヘテロ2量体を形成して結合する⁹⁾。そして、これらの2量体が応答配列に結合すると、リガンドレセプター結合体を認識する一群のタンパク質である転写共役因子（コアクチベーター）^{10), 11)}がさらに結合することがわかってきている（図2）。最近ではコアクチベーターにDNAの構造を弛緩して遺伝子を転写活性化するヒストンアセチル化酵素活性が見出され¹¹⁾、コアクチベーターの役割りがさらに注目を浴びている。

5. 化学物質とレセプターの結合様式

化学物質とレセプターの結合には、ホルモン標的遺伝子の機能発現の観点から2種類に分けることができる。それは、化学物質がレセプターと結合してホルモン様作用を示す場合（アゴニスト作

図2 核内ホルモンレセプターの転写活性化のメカニズム

用)とホルモンの作用をレセプターに結合することにより阻害する場合(アンタゴニスト作用)である。アゴニストおよびアンタゴニスト作用の分子メカニズムは未解決の部分が多いが、核内ホルモンレセプターの場合、一般的に、アゴニストはレセプターと結合することにより、上述のコアクチベーターと結合し標的遺伝子を活性化するのに対し、アンタゴニストはレセプターと結合してもコアクチベーターとの結合が見られない。この原因はレセプターのX線解析等の結果から、アゴニストはレセプターに結合するとレセプターの立体構造を変化させ、コアクチベーターとの結合を容易にするのに対し、アンタゴニストはレセプターに結合してもアゴニストのような立体構造の変化を起こさないためと考えられている¹²⁾。

6. エストロゲンレセプターに対する試験法

以下、化学物質のレセプターに対する結合性を調べる方法について最も研究が進んでいるエストロゲンレセプターを例に紹介する。

現在、エストロゲンレセプターに対する試験法

には大きく分けて、1) レセプター結合試験(バインディングアッセイ)、2) 培養細胞増殖アッセイ、3) レポーター遺伝子アッセイ、4) 酵母two-hybridアッセイおよび5) マーカー酵素・蛋白質アッセイの5種類に分類が可能である。

1) レセプター結合試験 (バインディングアッセイ)

放射性もしくは蛍光標識したエストロゲンと試験化合物を共存させて、エストロゲンレセプターへの競合的な結合による標識ホルモンの追い出しを測定し、結合性を知る方法である。試験

に用いるエストロゲンレセプターは、通常は実験動物の卵巣摘出後の子宮を用い、子宮ホモジネートを調製後に遠心分離して得られたエストロゲンレセプター分画を使用する。その他、遺伝子工学的手法を用いて、例えば、バキュロウイルスを用いた昆虫細胞でエストロゲンレセプターを大量発現させ調製する場合もある。また、エストロゲンレセプターを発現する培養細胞(MCF-7、T47D等)に通常バインディングアッセイのように培養液中に放射性標識のエストロゲンと試験化合物を添加してレセプターに対して競合結合させた後、レセプターに結合および遊離したホルモン量を測定することにより試験化合物とレセプターとの結合を知る方法も可能である(whole cell binding assay)。バインディングアッセイは、本質的にレセプターと化学物質のみを使用するため、結果に影響を与える因子の関与が少ない長所があるが、試験化合物にタンパク質変成作用等がある場合、化合物を高濃度で実験すると競合結合とは異なる標識ホルモンの追い出し効果を測定することになり誤った結果を与える。従って、本試験に

より得られたデータを評価する場合には、特に化合物濃度の設定根拠を注視しなくてはならない。

2) 培養細胞増殖アッセイ (E-screen)¹³⁾

ヒト乳癌由来の培養細胞 MCF-7 は、そのメカニズムは不明であるが、エストロゲン量に依存して増殖が促進される性質を持っている。従って、MCF-7 に試験化合物を添加して一定時間後に細胞数を測定し増殖度を求めることにより、試験化合物のエストロゲン様活性を知ることができる。本法の最大の問題点は、増殖メカニズムが不明で、増殖に様々な因子が関与する可能性があり、化学物質の作用点が不明な点である。例えば、細胞分裂促進剤等はエストロゲンレセプターに無関係な作用点に働き増殖を促進するため、この方法では誤った評価を下すこととなる¹⁴⁾。また、MCF-7 には種々のクローンが存在し¹⁵⁾、細胞の維持方法によっても増殖能に違いが起きる場合もあり、各研究機関の間で結果の再現性に問題がある。その他、この試験はエストロゲンレセプターのみに有効であり他のレセプターに対する影響は評価できない。

3) レポーター遺伝子アッセイ

図 2 に示したホルモンの作用機構に基づき、ホルモンがエストロゲンレセプターに結合し標的遺伝子を活性化する機構を利用した方法である。この方法には培養細胞を用いる方法と酵母を用いる

方法がある。

培養細胞を用いる方法では、ヒト子宮頸部癌由来 HeLa 細胞やサル腎臓由来 CV-1 細胞等の培養細胞にエストロゲンレセプター遺伝子を発現する環状 DNA (プラスミド) とレポータープラスミドを同時に導入する。レポータープラスミドは活性の指標となる遺伝子 (レポーター遺伝子: ルンフエラーゼや β -ガラクトシダーゼ等の酵素) の上流に、ホルモン応答配列を挿入したプラスミドを用いる。細胞内で発現したレセプターにホルモンが結合すると、レポーター遺伝子の上流にあるホルモン応答配列に結合して下流にあるレポーター遺伝子の転写活性化を増大させてレポーター酵素が発現する。その酵素活性を測定することによりレセプターと化学物質との結合を知ることができる (図 3)。また、エストロゲンレセプターが細胞内で発現している MCF-7 や T47D 細胞等を用いる場合はレポーター遺伝子のみを導入すればアッセイが可能となる。

酵母を用いる方法は YES (Yeast estrogen screen) と呼ばれ、酵母にエストロゲンレセプター遺伝子を遺伝子工学的手法により導入し、培養細胞と同様にレポーター遺伝子の転写活性を指標にして化学物質の転写活性化能を調べる。酵母には細胞壁があり化学物質の透過性が哺乳動物細胞

と異なる問題点がある。しかし、酵母の形質転換株の作製は培養細胞に比べて著しく容易で、維持等にかかるコストも安い利点がある。

レポーター遺伝子アッセイの特徴は感度が高く、作用点のメカニズムが明確であることと、他の核内ホルモンレセプターにも応用が可能な点である。

4) 酵母 two-hybrid アッセイ¹⁶⁾

核内ホルモンレセプターにホルモンが結合すると、先述したようにレセプターの立体構造が変化する¹¹⁾。近年、その構造変化を認識してホルモンの結合情報を基本転写因子群に

図3 レポーター遺伝子アッセイの原理

A: GAL4の構造

B: Two-hybrid法

図4 酵母 Two-hybrid アッセイの原理

伝えるコアクチベーターが発見されてきた^{10), 11)}。本法は、コアクチベーターとレセプターのリガンド依存的なタンパク質間の相互作用をtwo-hybrid法により検出する。具体的には図4に示すように酵母内にエストロゲンレセプターと酵母の転写因子GAL4のDNA結合領域の融合タンパク質およびコアクチベーターとGAL4の転写活性化領域の融合タンパク質を発現させる。もし酵母内でエストロゲン様化合物がレセプターに結合すると両融合タンパク質は結合し、転写因子GAL4の働きを持つタンパク質が形成される。このタンパク質複合体は転写因子として機能し、レポーター遺伝子であるβ-ガラクトシダーゼを発現する。従って、化学物質のレセプターとの結合性をβ-ガラクトシダーゼ活性で評価することができる。この方法は、酵母のレポータージーンアッセイに哺乳動物のコアクチベーターを導入して、さらに哺乳動物の系に近くなった系でレポーター遺伝子アッセイと同様、様々な核内レセプターに対して応用が可能である。

5) マーカー酵素・蛋白質アッセイ

特殊な培養細胞はエストロゲン様化合物を処理すると、その細胞特有の酵素やタンパク質が誘導されることが知られている。

例えば、Ishikawa Ver-1細胞はエストロゲンを加えるとアルカリフォスファターゼが誘導される¹⁷⁾。

しかし、この方法はメカニズムの不明な特殊な細胞の特殊な現象に基づいているため現在あまり使用されない。

7. *in vitro* 試験法の比較と問題点

上記の5種の*in vitro*試験法はそれぞれ特徴を有しているが、EPAのEDSTAC等の評価から、最も推薦されているのはレセプター結合性試験（バインディングアッセイ）とレポーター遺伝子アッセイである。これは両アッセイが高感度で、作用点およびメカニズムが明確であるからである。酵母two-hybridアッセイは近年開発された方法で世界的に実施例は多くはないが、感度、

メカニズムの明確さから言えば上記両試験に近い物と考えられる。しかし、これら全ての*in vitro*試験に共通な問題点は、試験に用いる化学物質の濃度である。細胞を使用するアッセイ（細胞系）では細胞毒性と試験化合物の溶解度の検討により適切な濃度設定が必要であるが、残念ながら、かなりの内分泌攪乱関連*in vitro*試験でこの点が曖昧にされている。特に、化合物に細胞毒性があれば、アンタゴニストと同様な結果を与えるために偽陽性の結果が出てしまう。細胞を用いない試験（非細胞系）でも、化合物の溶解度と界面活性/蛋白変成作用の検討がなければ正しい評価はできない。特に、高濃度の試験化合物のバインディングアッセイ結果については溶解度を含めて結果の解析に注意が必要である。以上のように、*in vitro*試験は簡便で、動物試験よりも廉価で、実施しやすいのは事実であるが、実験条件に十分注意を払わないと、評価を誤る可能性がある。

8. *in vitro* 試験の実際

我々は上記の*in vitro*試験の問題点等を考慮して、ピレスロイド系殺虫剤8剤(*d-trans*-アレスリン、フェンバレート、*d*-フェノトリン、プラレスリン、エンペントリン、ペルメトリン、シペルメトリン、イミプロトリン)のエストロゲン^{18), 19)}、アンドロゲン¹⁹⁾およびプロゲステロン^{19), 20)}レセ

プターに対するホルモン様および抗ホルモン様作用を検討した。試験方法としてはメカニズムが最も明確なレセプター結合性試験（バインディングアッセイ）、レポーター遺伝子アッセイおよび酵母 two-hybrid アッセイを選択した。

培養細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにおいては最初に適切な化合物濃度の設定実験を行った。まず、細胞毒性等を検出するために作製したレポーター遺伝子を恒常的に発現するコントロール細胞に各種化合物を加え、レポーター遺伝子発現に与える影響濃度を検討した。また、培地中の化合物の溶解度を濁度で測定した。その結果、最高適用濃度は1～10 μ Mと決定された。それらの濃度で、ホルモン様および抗ホルモン作用を検討したが、試験の有効性を検証する陽性対照化合物は全て陽性結果が得られたのに対し、いずれの

ピレスロイド殺虫剤もホルモン様および抗ホルモン様作用は認められなかった。

レセプター結合性試験（バインディングアッセイ）および酵母 two-hybrid アッセイにおいては化合物の溶解度を指標に適切な化合物適用濃度を設定し検討を行ったが、いずれのピレスロイド殺虫剤も検討した3種のレセプターに対してホルモン様および抗ホルモン様作用は認められなかった。この結果は、エストロゲンおよびアンドロゲンレセプターに関しては既に報告されている陰性結果と同様であった^{21), 22)}。

図5に具体例としてペルメトリンのエストロゲンレセプターの結果を示す。図5-Aに示すようにアゴニストであるエストラジオールやアンタゴニストの4-ヒドロキシタモキシフェンはエストロゲンレセプターに結合するのにに対しペルメトリン

図5 3種の *in vitro* アッセイを用いたエストロゲンおよび抗エストロゲン様作用の評価例

では結合活性は認められない。また、図5-BおよびCに示すようにペルメトリンにはエストロゲンレセプターを介したアゴニストおよびアンタゴニスト活性は全く認められなかった。

9. おわりに

現在、内分泌攪乱化学物質を評価するために様々な *in vitro* 試験が提唱されているが、それぞれに利点、問題点があることを紹介した^{5)~7)}。そして、その問題点を補い信頼性を向上するには、例えば、レセプター結合性試験（バインディングアッセイ）、レポーター遺伝子アッセイ、酵母 two-hybrid アッセイのようなメカニズムの明らかな *in vitro* 試験を複数組み合わせることで評価することが有効であると考えられる。そこで、これら3種の *in vitro* 試験を用いて、ピレスロイド系殺虫剤8種のホルモン様および抗ホルモン様作用について検討したが、いずれの化合物もそのような作用を示さなかった。

また、今回詳しく述べなかったが、一般的に化学物質は生体内に入ると薬物代謝酵素により多くの代謝物に変換されることが知られている。従って、親化合物にはホルモン様活性がなくても、生体内で代謝反応を受けてホルモン様活性を有するようになる化合物が存在する⁷⁾。しかし、現存する多くの *in vitro* 試験は代謝活性化を考慮できず、代謝物の作用を調べることが出来ない。そこで、現在、Ames 試験と同様の考えから肝臓薬物代謝酵素画分で前処理をする方法が考案されているが検証段階である^{23), 24)}。

以上のように、*in vitro* 試験は化学物質の生体の特定部位における作用を検証することが可能である。また、内分泌攪乱化学物質を評価する上での優先順位の設定や内分泌攪乱作用の機構解明にも有効である。従って、各 *in vitro* 試験の有効性を知り、うまく活用していくことが重要である。

参考文献

- 1) 手嶋勇人, 伊藤高明: 木材保存, **20**, 93-99 (1994)
- 2) 藤本いずみ: 木材保存, **25**, 121-129 (1999)

- 3) (社)日本木材保存協会: 木材保存剤ガイドライン (1994)
- 4) T. Colborn, D. Dumanoski, J.P. Myers: Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence, and Survival? - A Scientific Detective Story. New York Dutton (1996)
- 5) 金子秀雄, 庄野文章, 松尾昌季: 科学, **68**, 598-605 (1998)
- 6) 金子秀雄: 周産期医学, **29**, 399-402 (1999)
- 7) 金子秀雄: エコインダストリー, **4**, 20-27 (1999)
- 8) 米国ホワイトハウス科学委員会: スミソニアン・ワークショップ (1997)
- 9) 加藤茂明: “核内レセプターと情報伝達”, 実験医学バイオサイエンス, 羊土社, (1994)
- 10) S.A. Oñate, S.Y. Tsai, M.-J. Tsai and B.W. O'Malley: Science, **270**, 1354-1357 (1995)
- 11) H. Chen, R.J. Lin, R.L. Schiltz, D. Chakravarti, A. Nash, L. Nagy, M.L. Privalsky, Y. Nakatani and R.M. Evans: Cell, **90**, 569-580 (1997)
- 12) A. M. Brzozowski, A. C. W. Pike, Z. Dauter, R. E. Hubbard, T. Bonn, O. Engström, L. Öhman, G. L. Greene, J.-Å. Gustafsson and M. Carlquist: Nature, **389**, 753-758 (1997)
- 13) A. M. Soto, C. Sonnenschein, L. K. Chung, M. F. Fernandez, N. Olea and F. Olea Serrano: Env. Health Persp., **103**, 113-122 (1995)
- 14) R. B. Dickson and M. E. Lippman: Endocr. Rev., **16**, 559-589 (1995)
- 15) M. Villalobos, N. Olea, J. A. Brotons, M. F. Olea-Serrano, J. M. R. de Almodovar and V. Pedraza: Environ. Health Persp., **103**, 844-850 (1995)
- 16) J. Nishikawa, K. Saito, J. Goto, F. Dakeyama, M. Matsuo and T. Nishihara: Toxicol. Appl. Pharmacol., **154**, 76-83 (1999).
- 17) L. Markiewicz, J. Garey, H. Adlercreutz and E. Gurbide: J. Steroid Biochem. Mol. Biol., **45**, 399-405 (1993)
- 18) 斎藤幸一, 富ヶ原祥隆, 磯部直彦, 金子秀雄, 中塚巖, 西原力, 第26回日本トキシコロジー学会学術年会要旨集, 171 (1999)
- 19) K. Saito, K. Sumida, Y. Tomigahara, N. Ohe, N. Isobe, I. Nakatsuka and H. Kaneko, The Toxicologist, **54**, 234-235 (2000)
- 20) 住田佳代, 斎藤幸一, 磯部直彦, 金子秀雄, 中塚巖,

第26回日本トキシコロジー学会学術年会要旨集,
172 (1999)

21) 西原力: 日本食品化学学会第9回食品化学シンポジ
ウム講演要旨集, 7-24 (1998)

22) 西原力: 安全工学, 38, 85-92 (1999)

23) 住田佳代, 大江師久, 松永治之, 金子秀雄: 日本内

分泌攪乱化学物質学会第1回研究発表会講演要旨集,
11 (1998)

24) 住田佳代, 大江師久, 斎藤幸一, 磯部直彦, 金子秀
雄, 中塚巖, 第2回日本内分泌攪乱化学物質学会研
究会講演要旨集, 93 (1999)

(2000. 6. 8 受理)