

MVLN 細胞を用いたエストロゲン抱合体の女性ホルモン活性の測定

横浜国立環境科学研究センター 古市琢磨、三木芳恵、丸山若重
益永茂樹、中西準子

1. はじめに

水環境中において、女性ホルモン活性が最も高い物質である 17 β -エストラジオール(E2)が検出されている。しかし、それらの抱合体の女性ホルモン活性に関する知見は少ない。そこで本研究では、E2、エストロン(E1)、およびエストリオール(E3)の抱合体の標準試料について、ヒト乳がん細胞由来の MVLN 細胞を用いて女性ホルモン活性を測定し、比活性を算出した。また、抱合体標準試料に含まれる遊離体の存在について機器分析により確認し、それらの存在による標準試料の女性ホルモン活性に対する寄与の大きさを検討した。

2. 実験方法

試験物質

E2-17(β DG)、 E2-3G-17S、 E2-3(β DG)、 E2-3S、 E2-3-17-di-S、 E1-3S、 E3-16 (α DG)、 E3-3(β DG) (SIGMA 製)

G はグルクロン酸抱合基、S は硫酸抱合基を示す。

女性ホルモン活性の測定

MVLN 細胞はフランスの INSERM より入手した。培養は 5%CO₂,37 $^{\circ}$ C で行った。前培養として 10%DCC-FBS を添加した DME 培地を用いて希釈し、96 穴マイクロプレートに分注した。24 時間後に試験物質を添加し 3 日間培養後、転写活性により誘導された酵素ルシフェラーゼを発光測定装置より測定した。

E2 及び試験物質については、用量-反応曲線を作成した。比活性は E2 の最大発光量を 100%E2-max とし、用量-反応曲線より 50%E2-max における E2 濃度(mol/l)および各抱合体濃度(mol/l)を求め、以下の式から算出を行った。

比活性= E2 濃度 / 各抱合体濃度

機器分析による抱合体標準試料中の遊離体の測定

抱合体試料中の遊離体濃度は、LC-MS を用いて測定した。

結果及び考察

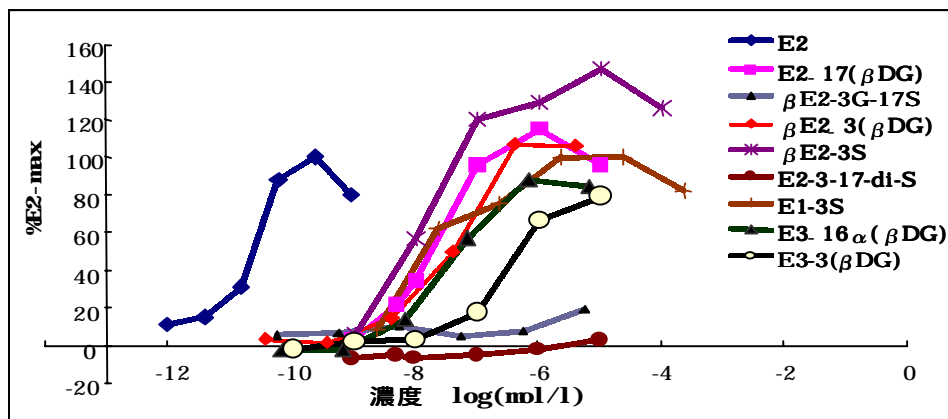


Fig.1 抱合体標準試料の用量反応曲線

E2 および抱合体標準試料の用量-反応曲線を Fig.1 に示した。 E2-3G-17S と E2-3-17di-S については、50%E2-max 以下の活性しか見られなかった。

その他の抱合体試料の比活性算出結果を Table.1 に示した。抱合体試料の比活性の範囲は $10^{-5} \sim 10^{-2}$ であった。また、これらの中で最も高い比活性を示したのは

E2,3S で、最も低かったのは E3-3S であった。比活性の再現性は C.V. = 28 ~ 57% (n=4 ~ 5)の範囲であった。

Table.1 抱合体標準試料の比活性

試験物質	比活性 [平均値(範囲)]	試験回数 n	C.V. %
E2	1		
E2-17(DG)	9.6E-04 (3.2E-04 ~ 1.6E-03)	5	57
E2-3G-17S	< 50%E2-max	4	
E2-3-17-di-S	< 50%E2-max	4	
E2-3(DG)	7.5E-04 (4.6E-04 ~ 9.5E-04)	4	32
E2-3S	2.0E-03 (1.6E-03 ~ 2.8E-03)	4	28
E1-3S	6.2E-04 (3.7E-04 ~ 7.9E-04)	4	28
E3-16 (DG)	4.0E-04 (2.6E-04 ~ 5.6E-04)	4	35
E3-3S	7.6E-05 (2.8E-05 ~ 1.1E-04)	4	55

機器分析による抱合体試料中の遊離体不純物含有率を Table.2 に示した。E2-3G-17S と E2-3-17di-S を除く標準試料において、遊離体の存在が確認され、含有率は最大 0.3% に達した。そこで、抱合体と遊離体の女性ホルモン活性は相加性が成り立つと仮定し、抱合体標準試料中の遊離体の活性寄与率を算出した。その結果、遊離体による寄与率は平均値で 2.8 ~ 25.1% であった。最も高い活性寄与率を示した物質は、E3-16 -(DG) であった。以上から、標準試料に存在する遊離体の影響は無視できないことが明らかになった。しかし、遊離体の寄与は、比較的大きかった比活性の変動を考慮しても、最大で 40% であり、 E2-3G-17S と E2-3-17di-S を除く 6 つの抱合体は、遊離体の寄与を除いても $10^{-5} \sim 10^{-2}$ 程度の女性ホルモン活性を有することが示唆された。

Table.2 抱合体標準物質における遊離体含有率及び遊離体活性寄与率

試験物質	検出された遊離体と含有率%	遊離体の活性寄与率% [平均(範囲)]	補正済比活性
E2-17(β DG)	E2: 2.6E-03	2.8 (1.7~8.3)	9.3E-04
E2-3-17-di-S	ND		
E2-3G-17-S	ND		
E2-3(β DG)	E2: 3.5E-03	4.7 (3.7~7.6)	7.1E-04
E2-3S	E2: 2.1E-02	10.8 (7.7-13.4)	1.8E-03
E1-3-S	E1: 1.4E-03	0.6 (0.4~0.9)	6.2E-04
E3-16 α (β DG)	E3: 3.3E-01	25.1 (17.7~39.2)	3.0E-04
E3-3(β DG)	E3: 1.6E-02	7.3 (4.6~13.6)	6.2E-05

ND: 2.9E-04% 以下

謝辞：本研究は科学技術振興事業団 C R E S T、および、化学物質評価研究機構の支援の下に行われました。

参考文献

M. D.,D.Gagne, J. C.Nicolas, and M.-Mehtali. 1990. A new cellular model of response to estrogen: A bioluminescent test to characterize (anti)estrogen molecules. Biotechniques 9:450-457.