

組換え酵母を用いる環境中の内分泌攪乱物質の検索

分担研究者 井上 正 日本大学生物資源科学部 教授

研究要旨: ヒトエストロゲンリセプター遺伝子および大腸菌 *lacZ* 遺伝子を組み込んだ酵母の、エストロゲン様活性定量系としての有効性を検証し、我々の身近に存在するプラスチック製品のエストロゲン様活性を定量することを試みた。陽性対照として β -エストラジオールを用いたところ、この測定系は、反応液中の 5×10^{-11} M のエストラジオールを再現性よく検出定量できることが分かった。この感度は、同じレセプターを試験管内 細胞系で用いるものよりも数倍高感度で、さらに簡便さを勘案すれば、内分泌攪乱物質の第一次スクリーニングに本法は極めて有効であると結論できる。本法を身近にあるプラスチック製品の *n*-ヘプタン抽出物に適用したところ、手術用手袋やおもちゃの一部に明らかなエストロゲン様活性が検出された。

1 目的

環境中の内分泌攪乱物質の動態を解析するためには、多数の試料に関して、迅速簡便に分析を行う必要がある。内分泌攪乱物質のうちでいわゆるエストロゲン様活性を示す化合物は既に数多く知られているが、それらの活性を高感度でかつ再現性高く検出できる系として、組換え酵母を用いる検出系が考案されている (Routledge and Sumpter, 1996)。この検出系は、ゲノムにヒトエストロゲンリセプター遺伝子を組み込み、さらに核外遺伝子上に、このレセプターの結合部位 (ERS: estrogen response element) とそれに支配されるレポーターとして大腸菌 *lacZ* 遺伝子を組み込んだ酵母を用いるものである。この酵母がエストロゲンないしはエストロゲン様活性を有すると思われる物質

に暴露されると、それらはレセプター分子に結合し、これを活性化する。活性化されたレセプター分子は ERS に結合して、その結果、レポーターである *lacZ* 遺伝子から β -ガラクトシダーゼが生産され培地中に放出される。 β -ガラクトシダーゼの活性は容易に検出できるので、試料が有するエストロゲン様活性を定量することができる。

この方法はヒトのエストロゲンレセプターを用いるので、原理的にヒトの細胞を用いる実験系と同様の特異性を有しているはずであるが、培養ヒト細胞ではなく、微生物である酵母を用いるので、より簡便迅速に定量することが可能であると予想され、特に多数の試料の第一次スクリーニングには有効性を発揮することが期待される。そこで、本研究では、この方法の感度や特性あるいは再現性を検討し、分析条件

の最適化を計ると同時に、我々の周囲に存在するいくつかのプラスチック製品の n-ヘプタン抽出物中のエストロゲン様活性の有無を調査した。

2 方法

2.1 測定系

ヒトエストロゲンリセプター遺伝子および大腸菌 *lacZ* 遺伝子を組み込んだ酵母は Dr. Sampter (Brunel University, UK) より分与された。

エストロゲン用物質によって誘導された β -ガラクトシダーゼの活性は、Chlorophenyl red- β -D-galactopyranoside (CPRG) の呈色を測定することによって行った。

分析は以下のようにして行った。dimethyl sulfoxide (DMSO) で希釈した試料を 96-well のマイクロタイタープレートに分注し、これに CPRG を含む酵母培養液を添加した。28°C 4 日間の培養の後にマイクロプレートリーダーを用いて、540 nm と 620 nm の吸光度を測定し、その差を誘導された β -ガラクトシダーゼの活性とした。

活性測定に際しては、溶媒 (DMSO) のみのから得られた値を差し引いた。また陽性対照として 17 β -エストラジオールを用いた。

2.2 試料

標準試料は特級試薬を用いた。またプラスチック製品の試料は、市販品を n-ヘプタン抽出したものを濃縮し、その濃度は、ガスクロマトグラムのピーク

面積を既知量の di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) のそれと比較して、相対値として表した。なお抽出、濃度測定は研究総括者の片瀬が行った。

3 結果

3.1 測定条件の至適化

本法の有効性を検証するために、陽性対照である 17 β -エストラジオールを用いて、様々な条件下にエストロゲン活性を測定し、測定条件の至適化を図った。培養液量、培養温度、培養時間、振盪の有無などについて検討を加えた結果、全量 200 μ l の反応系を用いて、28°C で 4 日間、密閉系で培養することにより、 5×10^{-11} M の 17 β -エストラジオールを再現性高く検出できる条件を設定することができた。

3.2 標準試料の分析

17 β -エストラジオールに加えて、既に強いエストロゲン様活性を有することが知られている、estriol, estron, Sopia A, norethindrone について、本法を用いてその活性を測定した。予想通りこれらの化合物のいずれもが、エストロゲン様活性を呈し、本法の有効性が支持された (Fig. A)。しかし、弱いながらも、活性を有していることが知られている NPH に関しては、現在までのところそれを検出するには至っていない (Fig. B)。

3.3 活性未知の試料の分析

構造から推定して、エストロゲン様活性を保有することが疑われる数種の化合物について、本法を適用して活性の検出を試みた。供試した試料は、sinapic acid (SNA), 4-hydroxybenzoic acid (HBA), vanillic acid (VNA), ferulic acid (FRA), DEHP, 4-hydroxycinnamic acid (HCA), resveratrol, genistein, propylphenol, *o*-allylphenol, である (Figs. B, C, D)。これらのうち、genistein は 1×10^{-6} M (Fig. B) で、resveratrol は 1×10^{-5} M (Fig. D) で明らかな活性が検出された。また、HBA と SNA には全く活性が認められなかった (Fig. C)。その他の化合物は、最高濃度の実験区においてわずかの活性が認められたが、これらについては今後の検討が必要である。

3.4 市販プラスチック製品試料の分析

市販のプラスチック製品から、オモチャ 2 点、スリッパ 1 点、テーブルクロス 1 点、手術用手袋 4 点を選び、その *n*-ヘプタン抽出物について検討した。手袋については 3 点が明らかな活性を示し (Fig. E)、スリッパやテーブルクロスおよびオモチャ (まり、豚のオモチャ) にもわずかの活性が認められた

(Figs. C, F)。

4 考察

我々の環境中には非常に多数のプラスチック製品が存在しており、それらに含まれる内分泌攪乱物質の定量・定性は火急の問題である。これらの多数の試料を能率良く検定するには、簡便でコストが低く、かつ定量性と再現性に富んだ測定系が必要である。本研究で検討対象とした組換え酵母を用いるエストロゲン様活性検出系は、陽性対照である 17β -エストラジオールの活性を 5×10^{-11} M という低濃度で再現性よく検出することができ、さらに調査した既知のエストロゲン用活性物質の殆どに対して、陽性の結果を与えた。この事実は、本法にかかる費用が比較的安くまた特殊な装置を必要としないこととあいまって、内分泌物質の第一次スクリーニングにおいて、本法が極めて有効であることを示す。

本法を、活性未知の数種の化合物、あるいはプラスチック抽出物に適用したところ、genistein や resveratrol あるいは、手術用手袋の一部に明らかな活性が見出された。これらの陽性物質に関しては、試料の純度や部分分解物の含有量などを検討した後に、さらに高次の検定系を用いて、内分泌攪乱作用を定量する必要がある。





