

厚生省科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

（総括）研究報告書

組換え酵母を用いるプラスチック溶出物中の内分泌攪乱物質の検索

主任研究者 片瀬隆雄 日本大学生物資源科学部・教授

研究要旨：ヒトエストロゲンレ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、日常生活で使用されるプラスチック製品など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 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 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。本法をプラスチック製品のn-ヘプタン抽出液に適用したところ、食品包装用ラップフィルム、学校給食用手袋、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。さらに、このn-ヘプタン抽出液中の化合物をガスクロマトグラフおよびガスクロマトグラフ質量分析計を用いて分析した結果、フタル酸ジエチル、フタル酸ジベンジルブチル、フタル酸ジエチルヘキシルの3種類のフタル酸エステルおよびアジピン酸ジエチルヘキシル、アジピン酸ジn-オクチルなど6種のアジピン酸エステルが同定された。プラスチック製品のなかで、最も強い活性を示した給食用手袋3点から溶出したn-ヘプタン溶液中に同定された共通の化合物とその平均濃度は、フタル酸ベンジルブチル(BBP) (2500ppm)及びフタル酸ジ2-エチルヘキシル(DEHP)(7500 ppm)であった。さらに、この活性を有した手袋2点から、共通にアジピン酸ジ2-エチルヘキシル(DEHA)(2500ppm) が検出された。

片瀬隆雄 日本大学生物資源科学部・教授
水谷 広 日本大学生物資源科学部・教授
井上 正 日本大学生物資源科学部・教授

A. 研究目的

現在、日本で使用されている食品用合成樹脂器具及び容器包装に添加されている合成化合物は、500種類以上であると予想される¹⁾。最近、合成化合物の内分泌攪乱作用に関心が寄せられている。この作用を持つ合成化合物の、4-ノニルフェノール²⁾及びビスフェノールA (bis-2,2'-hydroxyph-

nyl propane)³⁾がプラスチックに添加されまたは本体に残留し、使用中に容易に溶出することが明らかとなって以来、日常生活における化合物の安全性の関心がさらに高まっている。これらのプラスチックから溶出する内分泌攪乱物質はエストロゲン作用をもつ。合成化合物のこの作用はすでに、1930年代の後半にDoddsらにより約40種類の合成化合物の作用強度が測定され、最大効果の250万単位/gから最少効果の10単位/gまで、その間に25万倍の強度の差異があることが明らかとなった⁴⁾。すでに活性が

明らかとなっているこれらのプラスチック溶出化合物は最少効果のエストロゲン作用を有する化合物群に属し、単独で強度の影響を与えることは考え難い。従って、重要な課題はプラスチックをはじめ日常生活で使用されている多数の合成化合物の個々の作用強度を測定することにある。

環境中の内分泌攪乱物質の動態を解析するために、多数の試料を迅速簡便に分析する必要がある。エストロゲン様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⁶⁾。この検出系は、ゲノムにヒトエストロゲンレセプター遺伝子上に、このレセプターの結合部位 (estrogen response element: ERS) 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、特に多数の試料を發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、日常生活で使われてい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。さらに、ガスクロマトグラフおよびガスクロマトグラフ質量分析計を

用いて、*n*-ヘプタン抽出物中の化合物を同定し、エストロゲン様活性との関連を考察した。

B. 研究方法

<測定法>

ヒトエストロゲンリセプター遺伝子及び大腸菌 *lacZ* 遺伝子を組み込んだ酵母は Dr. Sumpter (Brunel University, UK) より分与された。エストロゲン様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 -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の well 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、540nm と 620nm 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。活性度測定に際しては、溶媒 (DMSO) のみ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。

プラスチック製品からの溶出物の分析は既報⁶⁾に基づいて行った。すなわち、水洗し、風乾後のプラスチック製品を約 2g (ラップフィルムの場合、約 9cmx9cm) を切り取り、共栓付試験管に詰め、4ml の *n*-ヘプタンを加え、オープン加熱後、室温で放置し、*n*-ヘプタン溶液をガスクロマトグラフおよびガスクロマトグラフ質量分析計で同定および定量した。

<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一定濃度に希釈した。その濃度は、ガスクロマトグラムピーク

面積を既知量のdi-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)のそれと比較して、相対値として規格化した。

C. 研究結果

<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17β- エストラジオールを用いて、様々な条件下で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、振盪時間、振盪の有無などについて検討を加えた結果、全量200 μlの反応系を用いて、28℃ 4日間、密閉系で培養することにより、 5×10^{-11} Mの17β- 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。

<標準試料の分析>

17β- 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、estron、estriol、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。

<活性未知の試料の分析>

化学構造式から推定して、エストロゲン様活性を保有することが予想さ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、4-hydroxycinnamic acid(HCA)、4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (ferulic acid: FRA)、sinapic acid (SNA)、4-hydroxybenzoic acid (HBA)、vanillic acid (VNA)、resveratrol, genistein などである。また、DEHP、アジピン酸エステル混合物(C₆~C₁₀)やpropylphenolを試供した。genisteinは 1×10^{-6} Mで、resveratrolは 1×10^{-5} 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。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。

<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、食品包装用ラップ・フィルム3点、学校給食用等手袋4点、オモチャ2点、テーブルクロス1点およびスリッパ1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た。その他のラップ、オモチャ、テーブルクロス、スリッパにもわずかな活性が認められた。

<プラスチック製品溶出物の同定と定量>

プラスチック製品のなかで、最も強い活性を示した給食用手袋3点から溶出したn-ヘプタン溶液中に同定された共通の化合物とその平均濃度は、フタル酸ベンジルブチル(BBP) (2500ppm)及びフタル酸ジ2-エチルヘキシル(DEHP)(7500 ppm)であった。さらに、この活性を有した手袋2点から、共通にアジピン酸ジ2-エチルヘキシル(DEHA) (2500ppm)が検出された。おもちゃ、テーブルクロスおよびスリッパにもわずかな活性が認められたが、これらのプラスチック製品3点に共通してDEHPが同定され、平均濃度は18000ppmであった。また、同様にわずかな活性を示したラップ3点から、共通してDEHPまたはアジピン酸ジn-オクチル(DnOA)が平均濃度で6900ppm 検出された。活性分析に使用したn-ヘプタン抽出液は、それぞれ調製し、2.5mM(ラップなど)および28~64mM(手袋など)で適用した。

D. 考察

日常生活では、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 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ という低能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様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、内分泌攪乱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している。

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、プラスチック製品の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。

文献

- 1) 厚生省食品化学課編：食品用プラスチック衛生学，297-307pp，1980.
- 2) A.M.Soto et al.: Environ. Health Perspect. 92:167-173,1991.
- 3) A.V.Krishnan et al.:Endocrinology 132:2279-2288,1993.
- 4) 片瀬隆雄：化学工業49:913-921,1998.
- 5) E.J.Routledge,J.P.Sumpter: Environ. Toxicol. Chem. 15:241-248,1996.
- 6) 片瀬隆雄：神奈川県立衛生短期大学紀要 15:13-19,1982.