

## 5. 水道水等の内分泌かく乱作用評価手法の検討

### 5. 1 酵母 Two-Hybrid System 法

#### 5. 1. 1 酵母 Two-Hybrid System 法によるフェノール類のエストロゲン様活性の検討

国立医薬品食品衛生研究所 安藤正典、西村哲治

##### (1) はじめに

外因性内分泌かく乱化学物質は体内に取り込まれた後、血液により標的器官まで運ばれ、細胞内に取りこまれる。内因性ホルモンと同様、細胞内の特異的受容体と結合し、標的細胞を特徴づける特異的な遺伝子の転写活性を促進する。この遺伝子産物が、それぞれの器官の性質を特徴づけている。本研究で用いた酵母 Two-hybrid System は、この細胞機能を利用して作製された遺伝子組換え細胞株である。エストロゲンと結合するヒトエストロゲン $\alpha$ 受容体のリガンド結合部位と GAL4 DNA 結合領域の融合タンパク質、GAL4 DNA 結合タンパク質転写活性因子とコアクチベーターの融合タンパク質である二種類の融合タンパク質を発現し、GAL4 タンパク質結合 DNA 領域と $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子及びそのプロモーターをもつ人工遺伝子のセットを持つ酵母細胞株である(図—5. 1)。細胞に取りこまれた内分泌かく乱化学物質は、ヒトエストロゲン $\alpha$ 受容体のリガンド結合部位と結合し、その結果人工遺伝子の遺伝子産物である $\beta$ -ガラクトシダーゼを誘導産生する。誘導された $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性により、エストロゲン様活性を評価する試験系である。ハイスループットによる核内エストロゲン受容体との結合能を測定する方法と、ヒト乳がん由来細胞の MCF-7 株を用いた増殖能を測定する方法(E-スクリーニング法)の中間に位置する試験法といえる。この評価系を用いることにより、簡便に、短時間で多くの化学物質に対してエストロゲン様の活性の有無と強弱を評価することが可能となる。

本研究では、界面活性剤の原料として使用されており、水環境中に広く存在しているフェノール類を対象にエストロゲン様の活性を検討し、あわせて塩素処理による変化についても考察を加えた。

##### (2) 方法・試薬

本研究では、Phenol (99%), 4-tert-Butylphenol (95%), 4-tert-Octylphenol (95%), 2-sec-Butylphenol (98%), 17- $\beta$ -Estradiol は和光純薬工業、4-sec-Butylphenol (96%)は東京化成、3-tert-Butylphenol (>90%), 2-tert-Butylphenol (>96%), 4-n-Octylphenol (96%), 4-tert-Pentylphenol (96%)は関東化学、4-n-Nonylphenol (99.6%)は林純薬、Bisphenol A

(>99%)は Aldrich Chemical Company, Inc.から入手した試薬を被験物質として使用した。

本実験では、西川らにより開発されたヒトエストロゲン $\alpha$ 受容体および転写活性コアクチベーターの導入酵母株を用いた。被験物質のエストロゲン様活性は、レポーター遺伝子として導入した $\beta$ -galactosidase の誘導活性として評価した。SD 培地 (6.7g の Difco yeast nitrogen base without amino acid を 850ml の蒸留水に溶かし、pH 5.8 に調整した後、高圧蒸気滅菌をした。ろ過滅菌をした 40% グルコース溶液を 50ml、10 倍濃度のアミノ酸混合液 (300mg/l L-Isoleucine, 1500mg/l L-Valine, 200mg/l L-Adenine hemisulfate salt, 200mg/l L-Arginine, 200mg/l L-Histidine HCl monohydrate, 300mg/l L-Lysine HCl, 200mg/l L-Methionine, 500mg/l L-Phenylalanine, 2000mg/l L-Threonine, 300mg/l L-Tyrosine) を 100ml 加えた。) で 30°C、16 時間培養後の対数増殖期にある試験酵母株に dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解した被験物質を 2.5  $\mu$ l (最終濃度 1.00%) 添加し、30°C で 4 時間暴露した。暴露後、150  $\mu$ l の反応液を取り、吸光度 (595nm) を測定し、細胞への毒性影響を調べた。さらに、100  $\mu$ l の反応液を分取し、15,000rpm、5 分間の遠心により被験物質を含む培養液を除いた。遠心により回収された細胞は、200  $\mu$ l の SDS を含む緩衝液 (100mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0), 10mM KCl, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 0.001% SDS) に浮遊した後、クロロホルムを 4.0  $\mu$ l 加え、30°C で 15 分間静置して細胞を破壊した。この細胞破壊浮遊液に 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解した 4mg/ml 2-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside (ONPG) 溶液を 40  $\mu$ l 加え、被験物質の添加により誘導された $\beta$ -galactosidase と反応させた。100  $\mu$ l の 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を加えて反応を停止した後、15,000rpm、5 分間の遠心により細胞残さを除き、上清の吸光度 (415nm および 570nm) をプレートリーダーで測定した。

$\beta$ -galactosidase 活性の算出には以下の式を用いた。

$$\text{Units} = 1000 \times ( [\text{OD}_{415}] - [1.75 \times \text{OD}_{570}] / [t] \times [v] \times [\text{OD}_{595}] )$$

t = time of reaction (min)

v = Volume of culture used in assay

OD<sub>595</sub> = cell density at the start of assay

OD<sub>415</sub> = absorbance by o-nitrophenol at the end of reaction

OD<sub>570</sub> = light scattering at the end of reaction

個々の被験物質のエストロゲン様活性は、10<sup>-8</sup>M 17- $\beta$ -Estradiol が誘導する $\beta$ -galactosidase 活性の unit を基準として標準化した。

塩素処理の反応は、500  $\mu$ l の DMSO に溶解した被験物質に、等量 500  $\mu$ l の次亜塩素酸ナトリウム溶液を加え、室温で 1 時間反応させた。アスコルビン酸で脱塩素後、500  $\mu$ l のジクロロメタンにより溶媒抽出した。溶出物質は、窒素を吹き付けて

濃度に依存して出発物質である Bisphenol A は消失して行った (図 5. 4、表 5. 4)。Bisphenol A が約 40% 残存する次亜塩素酸ナトリウム処理条件下で、エストロゲン様活性は高くなる傾向を示した (表 5. 5)。この場合の残存 Bisphenol A の濃度のみでは、エストロゲン様活性は低い。正確な解析はまだ行っていないが、塩素処理によりエストロゲン様活性を示す物質が生成したものと考えられる。この物質の、抽出・濃縮を試みたが、きわめて親水性に富む性質を持つと想像され、アセトン、ベンゼン、ジクロロメタン、n-ヘキサンの有機溶媒で抽出することはできなかった。今後、この物質の同定を行わなければならない。

#### 4) 水道水及び水道原水のエストロゲン様活性の検討

水道水及び水道原水 5 リットルを塩酸で pH1.5 に調整し、GLF 固相カラム (0.5g 充填) と活性炭カラム (0.5g 充填) を直列に連結し 2.5 リットルずつ、2 組の重連カラムに 10ml/l の速さで通水した。浮遊物質は特に除去処理は行わなかった。窒素ガスで乾燥させた後、GLF 固相カラムについてはアセトニトリル 5ml、ジクロロメタン 5ml で脱離、溶出した。活性炭カラムについては、メタノール 1 ml で脱水後、ジクロロメタン 5ml で脱離、溶出した。全ての溶離液を合わせ、40°C の加熱下、窒素パージにより乾固した。乾固物を DMSO 0.5ml に溶解し、試験に供した。水道水濃縮試料では、今回行った試験からでは有意なエストロゲン活性は認められなかった。また、S 川の河川水の濃縮試料を検討した結果、濃度依存性が認められ、初期濃度 (河川水の濃度) の 10 倍濃度に相当する最終濃度で最高活性を示し、 $10^{-8}$  M 17 $\beta$ -エストラジオールの 80.2% の活性があった。河川水の塩素処理試料についても、濃度依存性が認められ、初期濃度の 10 倍濃度に相当する最終濃度で最高活性を示し、 $10^{-8}$  M 17- $\beta$ -Estradiol の 81.4% の活性があった (表 5. 5)。しかしながら、この試料中に含まれている 17- $\beta$ -Estradiol の量については検討していないので、17- $\beta$ -Estradiol 以外の化学物質の寄与については不明である。今後、同一試料について、17- $\beta$ -Estradiol の含量とそのエストロゲン様活性に対する寄与率を算定しなければならない。

河川水に多量に含まれているフミン酸についてエストロゲン様活性の有無について検討を行った。Aldrich 社製のフミン酸ナトリウムを精製水に溶解し、0.45  $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過し、不溶性の画分を除去した。硫酸を用いて、pH7.0 に調整し、再度 0.45  $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過し、被検物質とした。この溶液の総有機炭素量は、2200 TOCmg/l であった。この溶液を DMSO で段階希釈し、試験に供した。その結果、試験を行った 88 TOCng/l ~ 22 TOCmg/l の添加量では有意なエストロゲン様活性は認められなかった (結果省略)。

これらの結果から、化学物質の種類やその発生源については不明であるが、河川

濃縮・乾固した後、メタノールに溶解し、高速液体クロマトグラフ法により同定・定量した。エストロゲン様活性は、脱塩素後、反応液をそのまま  $2.5\mu\text{l}$  を反応系に加え、誘導した  $\beta$ -galactosidase 活性を測定した。

### (3) 結果および考察

#### 1) DMSO の濃度の影響

DMSO に細胞毒性が見られることから、添加する DMSO の濃度の影響について検討した。最終濃度 2.0 % ( $250\mu\text{l}$  に対して  $5.0\mu\text{l}$ ) 未満の添加では細胞毒性が認められなかったが、それ以上の濃度では細胞毒性が顕著に現れた (表 5. 1)。この結果から、本研究では DMSO の添加は最終濃度 1.0 % で行った。

#### 2) フェノール類のエストロゲン様活性

本実験で酵母の Two-hybrid システムを用いて調べた 11 種のフェノール類 (図 5. 2) については、4-tert-Octylphenol, 4-tert-Pentylphenol, 4-sec-Butylphenol, 4-tert-Butylphenol, Bisphenol A の 5 種類にエストロゲン様活性が認められた (表 5. 2)。活性のあった 5 種類では、4-tert-Octylphenol では  $1 \times 10^{-7}\text{M}$  以上  $3 \times 10^{-5}\text{M}$  以下の濃度範囲で、4-tert-Pentylphenol では  $1 \times 10^{-6}\text{M}$  以上  $1 \times 10^{-5}\text{M}$  以下の濃度範囲で他の 3 種類では  $1 \times 10^{-5}\text{M}$  以上  $3 \times 10^{-4}\text{M}$  以下の濃度範囲で活性が認められた。誘導の活性性能では、4-tert-Pentylphenol, Bisphenol A, 4-tert-Octylphenol では  $1 \times 10^{-5}\text{M}$  で最大活性が認められた。4-tert-Butylphenol では  $1 \times 10^{-4}\text{M}$  で、4-sec-Butylphenol では  $3 \times 10^{-4}\text{M}$  で最大活性が認められた。これら 5 種類の誘導最高活性はほとんど 95.5units から 374.4units の間にあり、17- $\beta$ -Estradiol の 548.2units ( $1 \times 10^{-8}\text{M}$ ) に比べ 0.17~0.68 倍であった (表 5. 3)。以上の結果より、4-tert-Octylphenol = Bisphenol A > 4-tert-Pentylphenol > 4-sec-Butylphenol = 4-tert-Butylphenol の順にエストロゲン様活性が強いことがわかった。構造から活性を比較すると、ここで調べたフェノール類では、1 位と 4 位の位置関係に水酸基とアルキル基があることが必要であった。また、直鎖のアルキル基を側鎖に持つ化合物には活性が見られず、分枝構造を持つアルキル基を持つことがエストロゲン様活性を示すのに必要であった。従って、アルキル基の構造が化合物全体の立体構造に加え、エストロゲン様作用と密接な関係があることが示唆された。

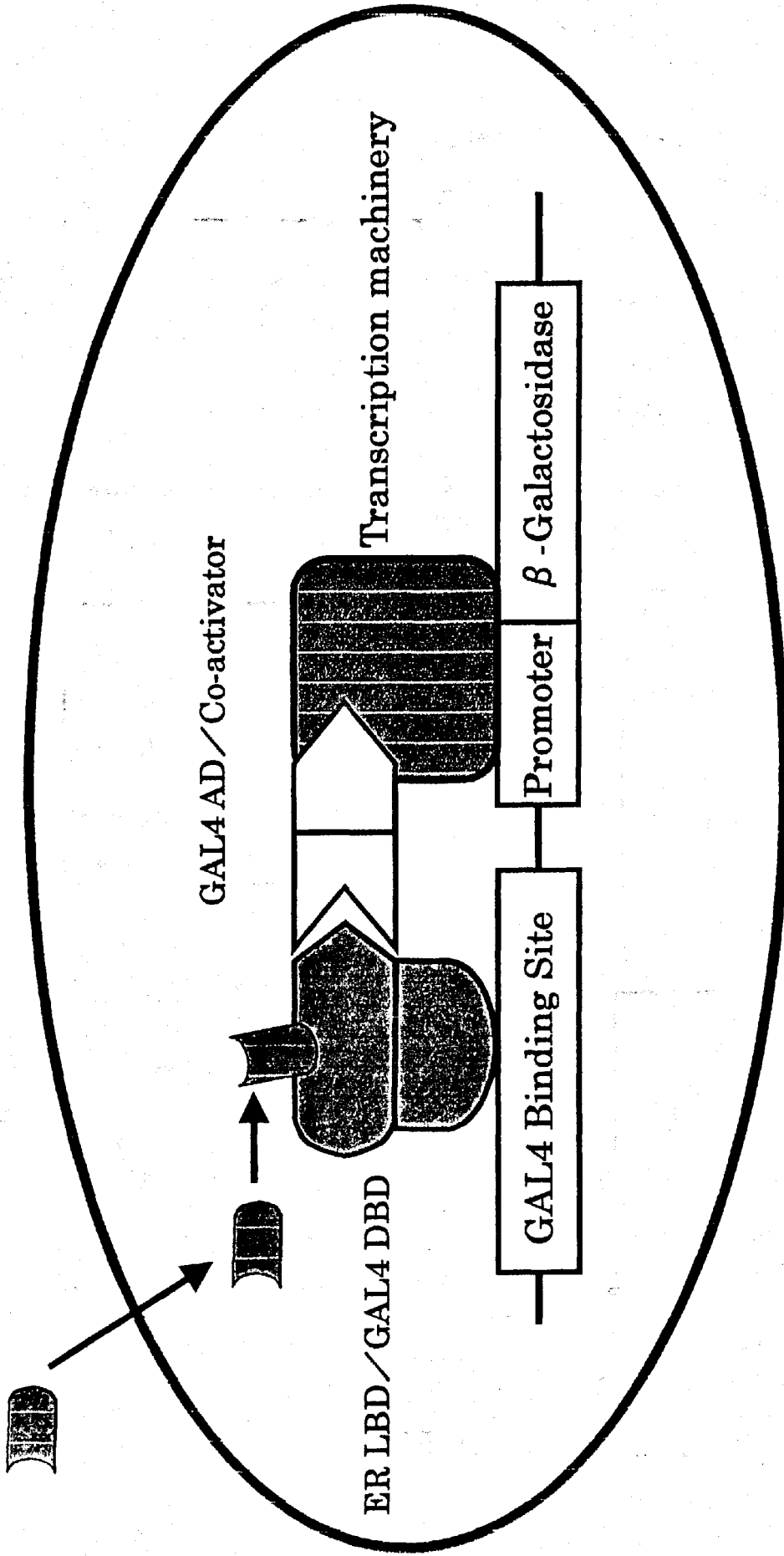
#### 3) 塩素処理の影響

Bisphenol A について、「方法」の項で述べたように室温で 1 時間、次亜塩素酸ナトリウム処理をし、高速液体クロマトグラフ法により存在量を検討した。その結果、

水には内分泌をかく乱する化学物質が含まれていることがわかった。さらに、河川水に含まれる物質を塩素処理しても、物質自身の違い（変化）はあるにしても、総合的には、エストロゲン様活性は減少しない可能性が示唆された。この物質の同定は重要な今後の課題である。また、水道水中にはエストロゲン様の活性を示す物質は、この評価法では検出できるレベル以下であり、河川水に内分泌かく乱化学物質が含まれていても、浄水過程で充分除去されている可能性が高いことがわかった。さらに、多くの地点からの試料について今後検討を行っていく必要がある。

図5. 1

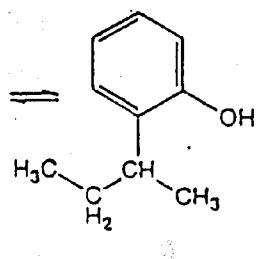
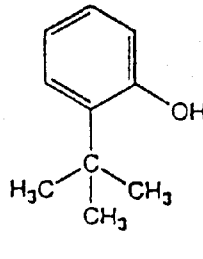
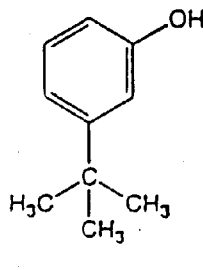
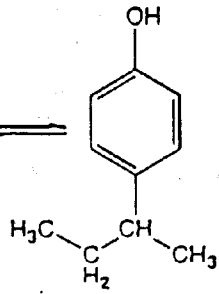
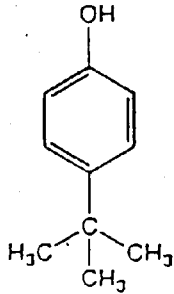
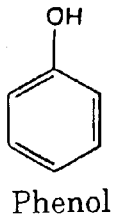
外因性内分泌かく乱化学物質



ER LBD : Estrogen Receptor Ligand Binding Domain

GAL4 DBD : GAL4 DNA Binding Domain

GAL4 AD : GAL4 Activation Domain



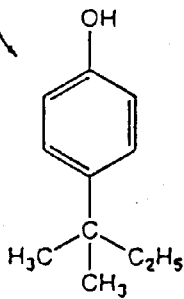
4-tert-Butylphenol

4-sec-Butylphenol

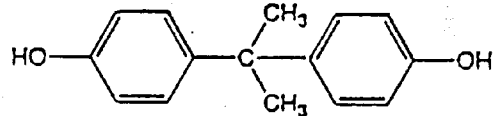
3-tert-Butylphenol

2-tert-Butylphenol

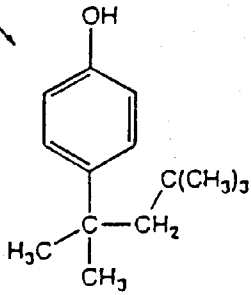
2-sec-Butylphenol



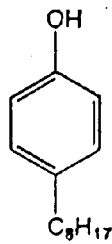
4-tert-Pentylphenol



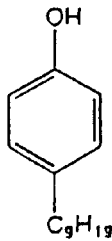
Bisphenol A



4-tert-Octylphenol



4-n-Octylphenol



4-n-Nonylphenol

図5. 2 フェノール類の構造

図5.3 フェノール類のエストロゲン様活性

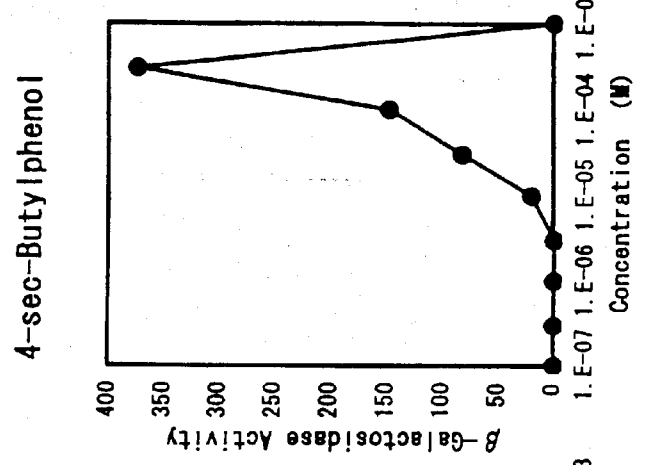
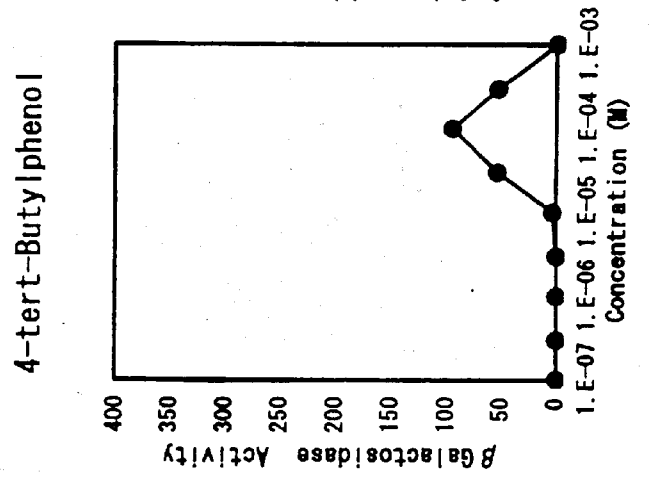
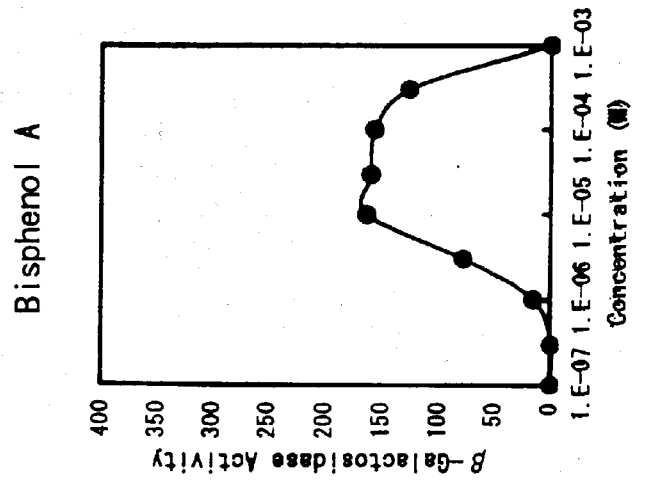
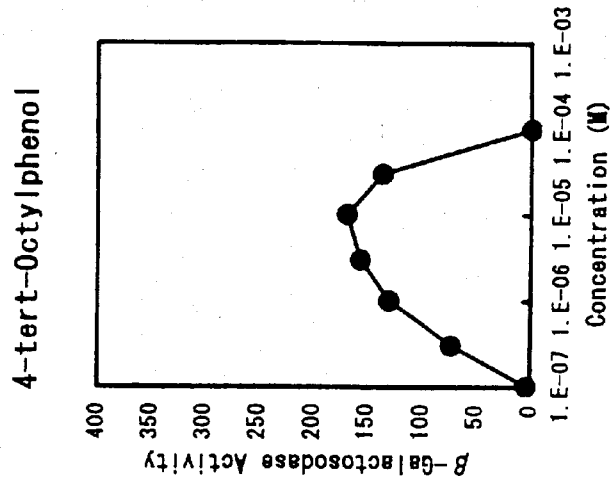
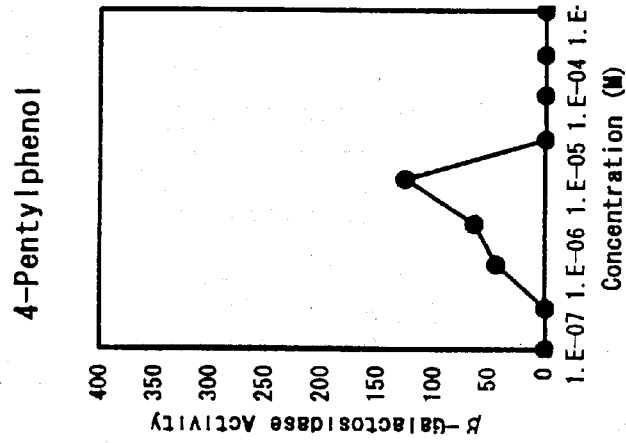
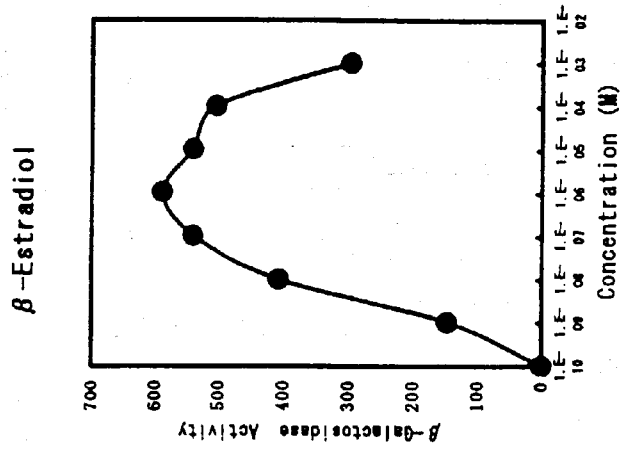
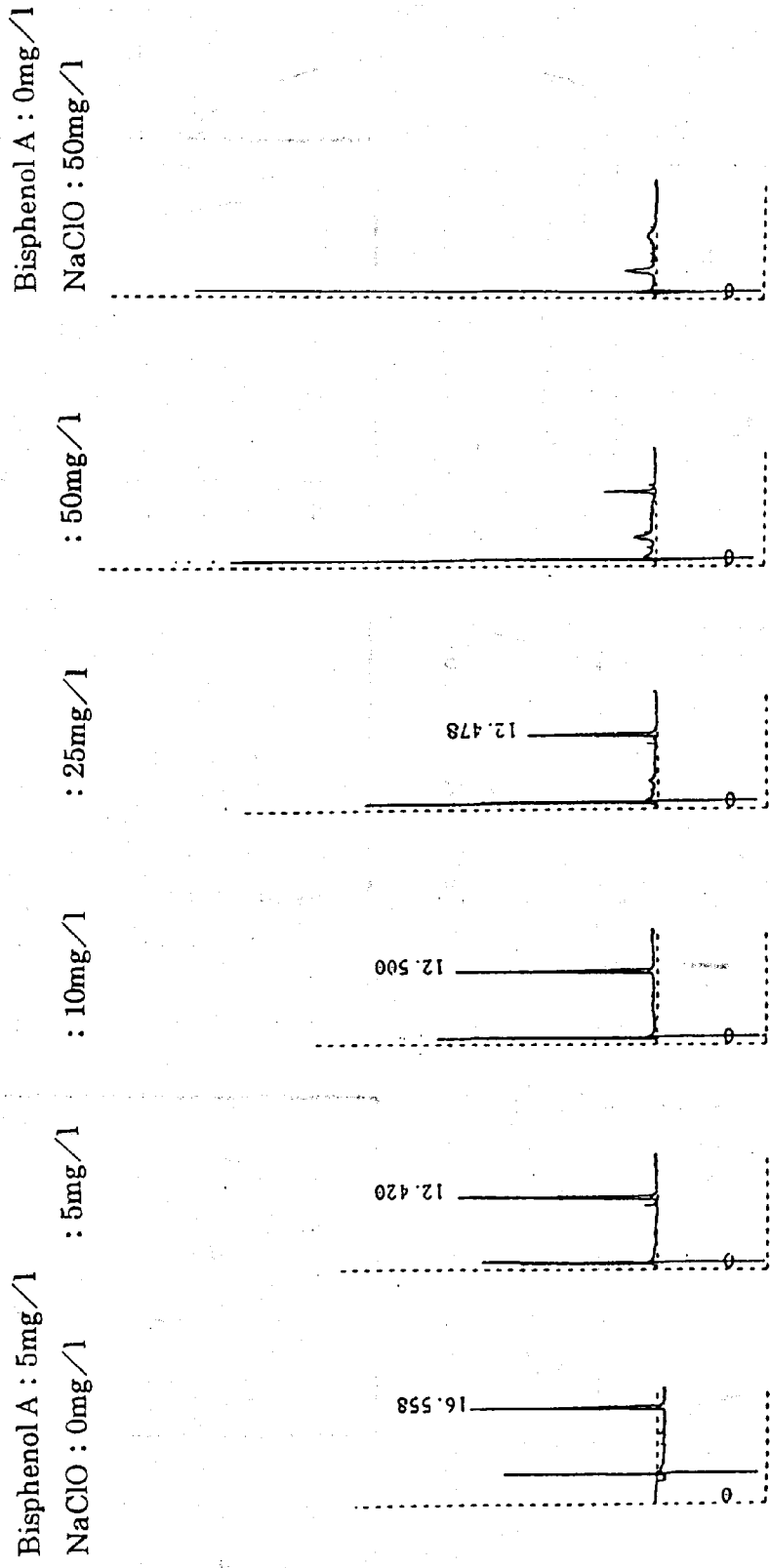




図5. 4 Bisphenol A の塩素処理後における残存量 (高速液体クロマトグラフ法)



Analytical Condition;

Column : Inertsil ODS 80A (4.6 x 150 mm)  
Mobile Phase: 32%(v/v) acetonitrile  
Flow Rate : 1.2ml/min  
Detection : 285nm(UV)  
Injection : 20  $\mu$ l