

ホルモンレセプターを介する内分泌かく乱化学物質津の検出系に関する研究

分担研究者 西原 力 大阪大学大学院・薬学研究科・教授

研究要旨

われわれが開発した外因性化学物質のホルモンレセプターを介する遺伝子発現作用の検出系（酵母 Two-Hybrid 試験）の改良法についてエストロゲンの系を用いて検討し、96 穴マイクロプレート培養と化学発光レポーター遺伝子測定を適用することにより、より簡便化、高感度化を図った。また、S 9 による前処理により代謝活性化物質が検出でき、E 2 共存によりアンタゴニスト活性も測定できることを示した。

A. 研究目的

われわれは迅速・簡便な内分泌かく乱物質の検出系として、ホルモンレセプターとコアクチベーターのリガンド依存的な相互反応に着目して、酵母 Two-Hybrid 試験を開発した [Nishikawa, J., et al.: New Screening Methods for Chemicals for Hormonal Activities Using Interaction of Nuclear Hormone Receptor with Coactivator. Toxicol. Appl. Pharmacol. 154(1), 76-83 (1999)]。本法を環境モニタリングやメカニズムの研究に活用するためには、より簡便・迅速化、高感度化が有用である。そこで、本法の改良法について検討した。また、代謝活性化物質を検出するための前処理条件、およびアンタゴニスト活性の測定条件についても検討した。

B. 研究方法

高感度化については、化学発光基質を用いて蛍光度測定する方法、簡便化については 96 穴マイクロプレートを用いて酵母の培養から酵素活性の測定までを行える方法を検討した（図 1）。

代謝活性化物質の検出するための S 9 前処理条件、E 2 共存によるアンタゴニスト活性の測定条件の検討を行った。

C. 研究結果

市販化学発光測定用キットを用いる化学発光法について検討した結果、SD Medium 中の Dextrose 量を 1/10 にすることにより、発光量のブランク値が低下することがわかり、実質上の高感度化が達成された（図 2）。96 穴マイクロプレートで酵母の培養、化学物質との反応、溶菌、活性測定することにより、簡便化ができることがわかった（図 1）。S 9 で前処理することにより、代謝活性化物質が検出でき（表 1）、

E 2 共存下の活性阻害を測定することによりアンタゴニスト活性が検出できることを明らかにした（図 3）。

D. 考察

MD Medium 中の Dextrose の化学発光に対する影響のメカニズムは不明であるが、自動分注装置を導入すれば更に簡便・迅速化できると考えられる。また、前処理条件を検討すればより false positive-negative の少ない系を開発することができるとわかった。しかし、環境試料に適用するためには、その濃縮・分離・精製法の検討が必要である。

E. 結論

反応・測定・前処理条件を検討することにより、簡便化、高感度化、代謝活性化物質やアンタゴニストの検出が可能であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表(主なもの)

西原: いわゆる環境ホルモンについて、日本放射線技術学会近畿部会雑誌、5, 18-22 (1999)

西原(分担): 内分泌攪乱化学物質問題—私達にできること—、「環境に今何が起きているか」、第 31 回大阪大学開放講座テキスト、p. 61-70、大阪大学 (1999)

西原: 内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)の影響はどこまでわかっているか—スクリーニング試験—、公衆衛生、63, 681-686 (1999)

Nishikawa, J., et al.: Hormone Disrupters. BIA journal 6, 19-21(1999)

西原(分担):: 化学物質の環境動態—生分解と生物濃縮—、本間、樽谷(編)、検証「環境ホルモン」、p. 167-180、青木書店、東京 (1999)

西原:: 内分泌攪乱物質問題と化学物質のリスクアセスメント—私たちにできること—、学士会会報、3(824)、75-80 (1999)

西原: 内分泌攪乱化学物質のスクリーニング試験、防菌防黴、27(6)、393-402 (1999)

西原: 環境ホルモン問題「環境ホルモンのバイオアッセイを用いた検出方法」安全工学、38(2)、85-92 (1999)

西原(分担): 化学物質安全情報研究会 (編): 環境ホルモンの問題とその対策、試験管内 (in vitro) での試験、p. 63-73. オーム社、東京 (1999)

Dateyama, F., et al.: Screening Methods for Endocrine Disruptors Based on the mechanism of Transcriptional Regulation by Nuclear Hormone Receptor. Jpn. J. Toxicol. Environ. Health, 45, P-38 (1999)

2. 学会発表(主なもの)

金山、他: 酵母 Two-Hybrid System を用いた化学物質のエストロゲン様活性の検出、日本内分泌攪乱化学物質学会 (1999)

中室、他: 酵母 Two-Hybrid 法による河川水中エストロゲン活性物質の評価、日本内分泌攪乱化学物質学会 (1999)

白石、ほか: マイクロプレート培養法による簡便な酵母 Two-Hybrid System のエストロゲンアッセイ法の開発、日本内分泌攪乱化学物質学会 (1999)

Nishihara, T.: in vitro Bioassay for Endocrine Disrupting Chemicals, The Princess Churabhorn International Science Congress IV, Bangkok (1999)

Nishikawa, J. et al.: Studies on Mode of Action of Estrogenic Chemicals, The Princess Churabhorn International Science Congress IV, Bangkok (1999)

Nishihara, T., et al.: Estrogenic activity of chemicals determined by yeast two-hybrid assay, 20th Annual Meeting of SETAC-US, Philadelphia (1999)

西原: インビトロスクリーニング試験の現状と課題、日本学術会議トキシコロジー研究連絡委員会主催公開シンポジウム (1999)

西原: 外因性内分泌攪乱化学物質のスクリーニング試験、第 40 回大気環境学会年会総会シンポジウム (1999)

西原: 内分泌攪乱化学物質—スクリーニング試験—、第 72 回産業衛生学会 シンポジウム (1999)

中室、他: 環境水中エストロゲン活性物質の酵母 Two-Hybrid 法による評価、日本薬学会・環境トキシコロジーシンポジウム (1999)

黒木、他: 酵母 Two-Hybrid 法による PCB 及び PCDF-OH タイ代謝物のエストロゲン様物質としての評価、日本薬学会・環境トキシコロジーシンポジウム (1999)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. 実用新案登録

なし

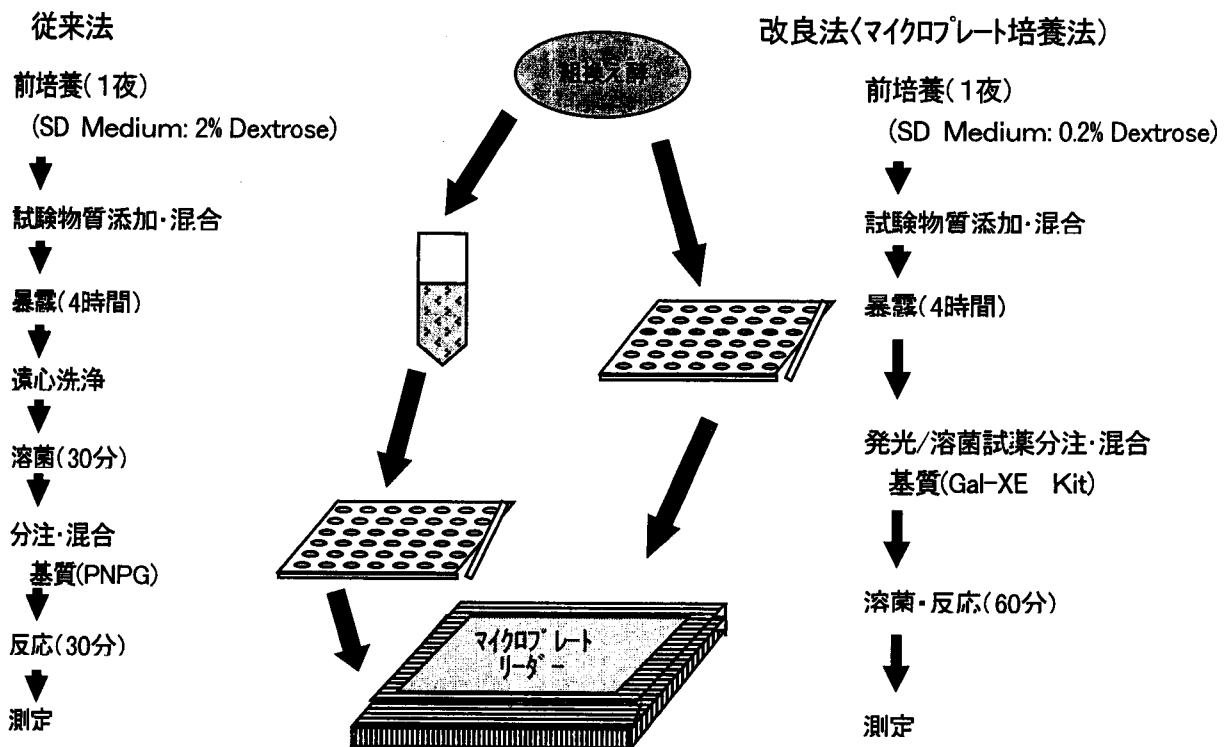


図1 酵母 Two-Hybrid 法の改良法マイクロプレート培養法)

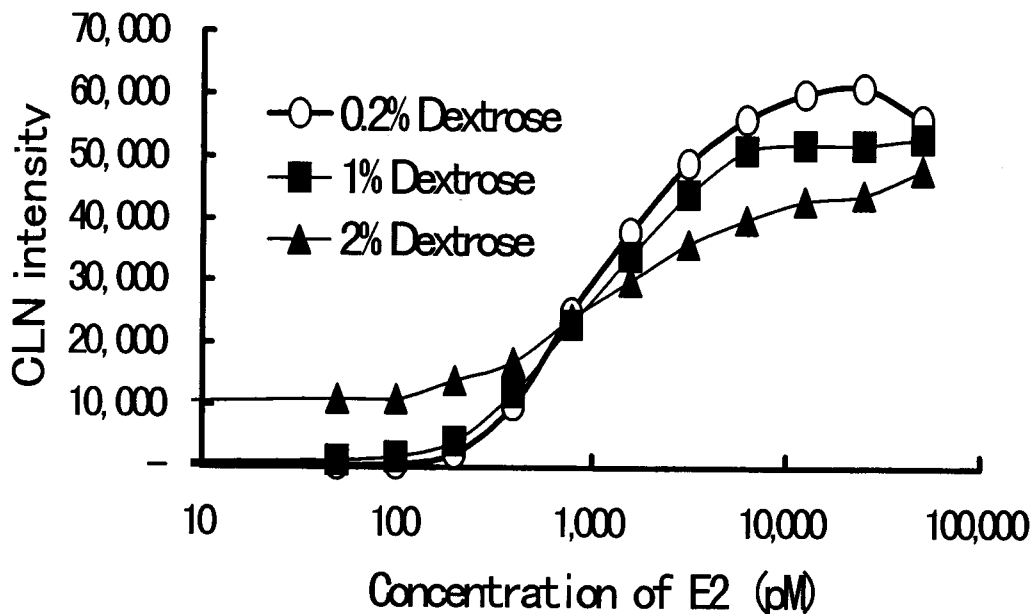


図2 化学発光量に及ぼす SD Medium 中の Dextrose の影響

表 1 S9mix 前処理による代謝活性化物質の検出

Compound	PC10* (M)	
	-S9mix	+S9mix
17-β-Estradiol	5 × E-10	9 × E-10
Genistein	5 × E-07	5 × E-07
Methoxychlor	>3 × E-03	5 × E-06
4-t-Nonylphenol	7 × E-06	2 × E-06
Bisphenol A	2 × E-05	9 × E-06
Di-n-butyl phthalate	>4 × E-03	>3 × E-03
Di-2-ethylhexyl phthalate	>3 × E-03	>3 × E-03
n-Butylbenzyl phthalate	>3 × E-03	3 × E-03
Diocetyl phthalate	>3 × E-03	>3 × E-03

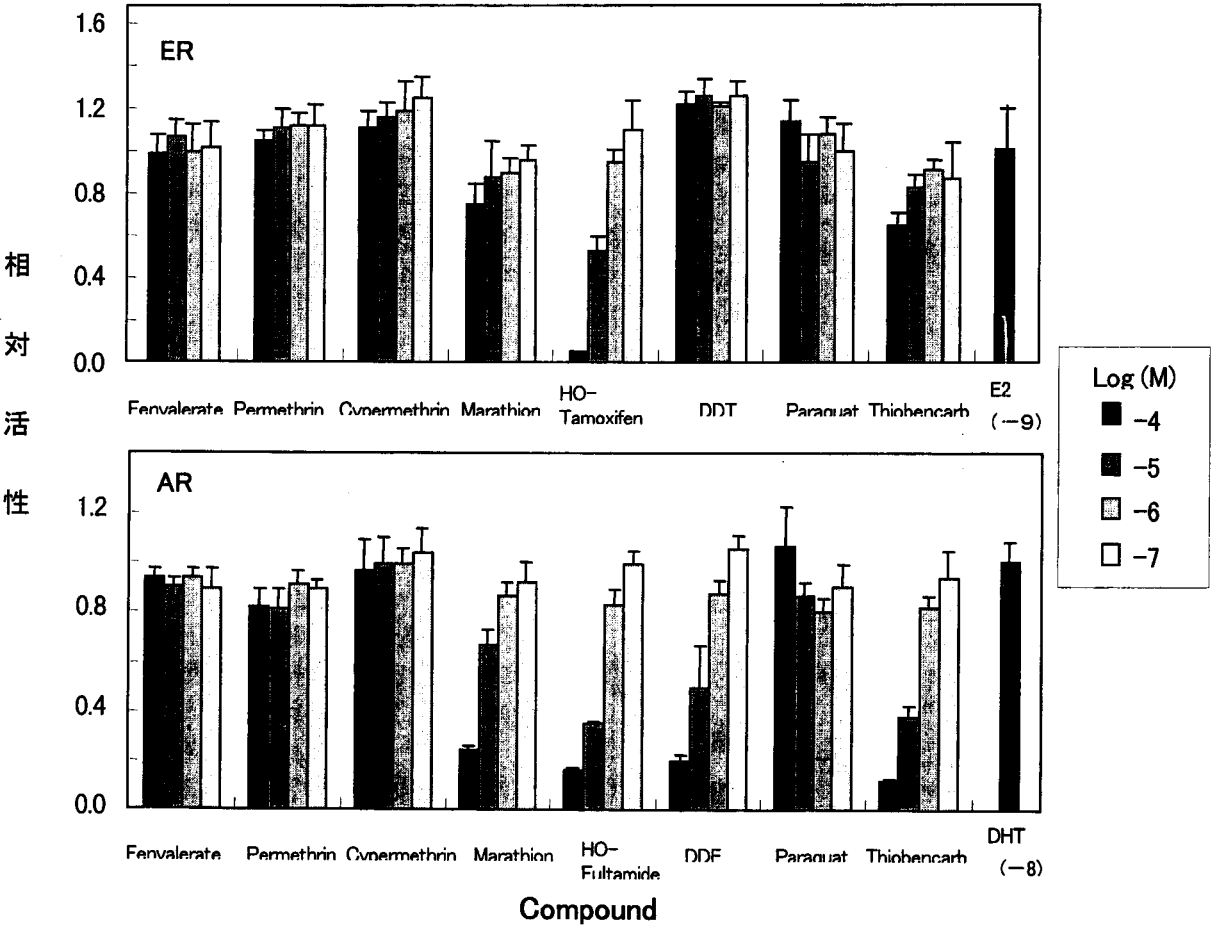


図 3 E2 あるいは DHT 共存によるアンタゴニスト活性物質の検出