

組換え酵母検出系による日常生活用品中の エストロゲン様活性の分析

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: ヒトのエストロゲンリセプターを組み込んだ酵母を用いる検出系を用いて、日常的に用いられるプラスチック製品に含まれるエストロゲン様活性を調査し、複数の試料中に活性を見出した。各試料に含まれる疑わしき成分を GC-MS によって分析し、含有成分のエストロゲン様活性を調査することによって、給食用手袋抽出液中の BBP (butylbenzyl phthalate) が活性の主因になっていることを明らかにした。また、ホルモン作用を有する環境汚染物質として注目されているアルキルフェノールのうち、*n*-nonylphenol はほとんど活性を示さず、nonylphenol の活性はこれ以外の異性体によるものであることがわかった。

1 目的

環境中の内分泌攪乱物質 (特にエストロゲン様活性物質) の影響を調査するには、一次スクリーニングにおいて多数の試料を迅速に調査することが必要であり、その方法の一つとしてヒトのエストロゲンリセプターを組み込んだ酵母を用いる検出系が広く用いられている。既に、昨年度までにこの検出系を用いて、日常的に用いられるプラスチック製品に含まれるエストロゲン様活性を調査し、複数の試料中に活性を見出した。本年度は、これらの試料中に存在するどのような成分が活性の主因になっているかについて、検討を加えた。

また、ホルモン作用を有する環境汚染物質として注目されているアルキルフェノールのうち、Nonylphenol の活性が組換え酵母検出系においては検出

されていない原因についても検討した。

2 方法

2.1 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、GC-MS によって定性ならびに定量を行った。未同定の物質の濃度は、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、相対値として表した。なお抽出、濃度測定などの機器分析は研究総括者の片瀬が行った。

2.2 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 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、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。

3 結果と考察

3.1 市販プラスチック製品中の活性

既に前年度までに報告したように、日常生活で用いられるプラスチック製品の抽出物中には、組換え酵母検出系でエストロゲン様活性が認められるものがある。その例として、図 1 に、食品包装用ラップと給食用プラスチック手袋中の活性を示した。

図 1 に見られるように、ラップでは試料番号 R40 が他の試料 (R101, R9)

よりも強い活性を示し、手袋では試料番号 R501 および R502 に活性が認められたが、R503 からは検出されなかった。これらの事実は、同じ製品でも、含まれる成分 (おそらく可塑剤) の種類と量が異なっていることを示唆する。

そこで、抽出された試料に含まれる成分を GC-MS によって分析した。手袋抽出物の分析結果を表 1 に示す。また図 2 には MS による分析の一例を示す。

表 1 に掲げられた手袋から検出された各物質について、市販の試薬を用いてそのエストロゲン様活性を調べたところ、図 3 に示すように、BBP のみに活性が認められ、DEHP や DEHA からは活性は検出されなかった。試料番号 R503 の手袋にはエストロゲン様活が検出されないことと、活性を示す R501 と R502 にはいずれも BBP が含まれることより、給食用手袋中のエストロゲン様活は含まれる BBP に由来すると推測された。

また、食品包装用ラップの抽出物には表 2 に示される各成分が同定された。これらの物質のエストロゲン様活性については現在検討中である。

3.2 Nonylphenol (NPH) 中の揮発成分の活性

アルキルフェノールの中には、エストロゲン様活性を有するものが存在することは古くより知られている。なかでも NPH は環境中にしばしば検出され、その影響が憂慮されている。そこで、組換え酵母検出系によってもそのエストロゲン様活性が検出されることを期待

して、市販の *n*-NPH について検討を加えたが、昨年度の実験ではほとんど活性を検出することが出来なかった。プラスチックへの添加剤として用いられている NPH は *n*-NPH ではなく、側鎖が種々に枝別れした各種の NPH の混合物であることが予想されたので、この混合物と純粋な *n*-NPH の活性を比較した (図 4)。

図 4 に見られるごとく、直鎖状の側鎖を有する *n*-NPH はほとんど活性を示さず、NPH 混合物には強い活性が検出された。さらにこの活性物質は、図

5 に示すように、揮発性が高いことが示された。すなわち、これまでに信じられていた NPH のエストロゲン様活は、混合物として使用されている NPH に含まれるある一部の成分による可能性が高い。したがって、それらを除くか、あるいは活性を有しない NPH を用いることにより、環境中に放出される汚染物質を低減させることができるかもしれない。また NPH の各種異性体の活性を比較することにより、活性と構造の相関を検討することができる可能性もある。

表 1: GC-MS によって同定された給食用手袋抽出液中の成分濃度。

Sample I.D.	Concentration (ppm)		
	BBP	DEHP	DEHA
R501	1800	7200	2300
R502	1900	7900	2600
R503	nd	12000	nd

nd; not detected

BBP; butylbenzyl phthalate

DEHP; di-2-ethylhexyl phthalate

DEHA; di-2-ethylhexyl adipate

表 2: GC-MS によって同定された食品包装用ラップ抽出液中の成分濃度。

Sample I.D.	Concentration (ppm)					
	DnHexA	DnHA	DEHA	DnOA	DnNA	DnDA
R9	nd	nd	nd	7300	nd	nd
R40	1600	1500	nd	2000	700	350
R101	nd	nd	7300	nd	nd	nd

nd; not detected

DnHexA; di-*n*-hexyl adipate, DnHA; di-*n*-heptyl adipate

DEHA; di-2-ethylhexyl adipate, DnOA; di-*n*-octyl adipate

DnNA; di-*n*-nonyl adipate, DnDA; di-*n*-decyl adipate

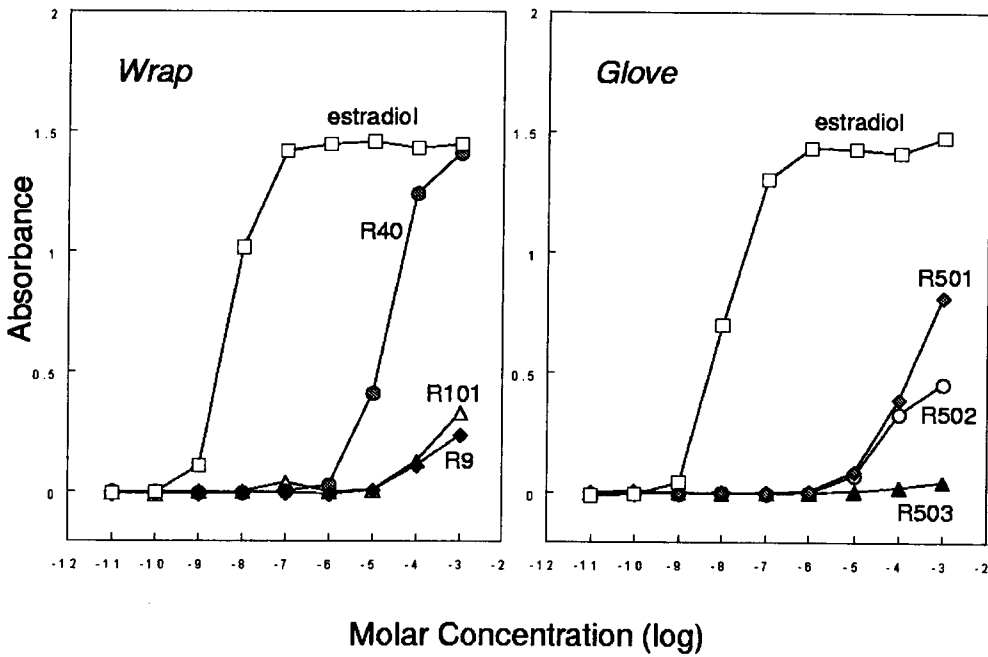


図 1: 食品包装用ラップおよび給食用手袋の抽出物の活性

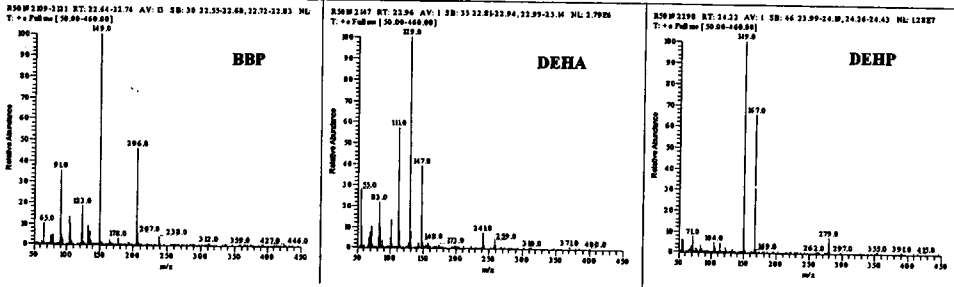
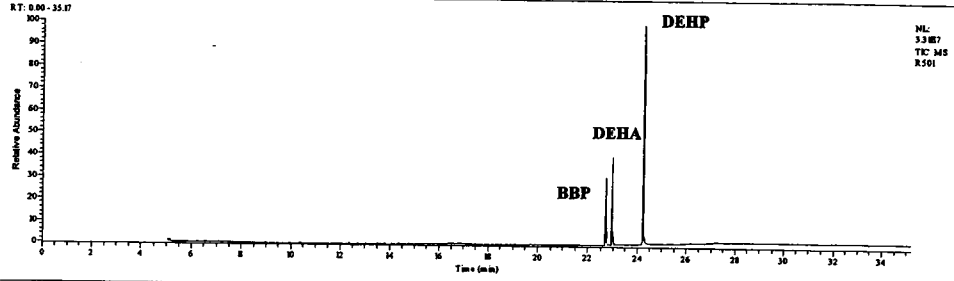


図 2: 給食用手袋 (試料番号 R501) の抽出物の MS による分析

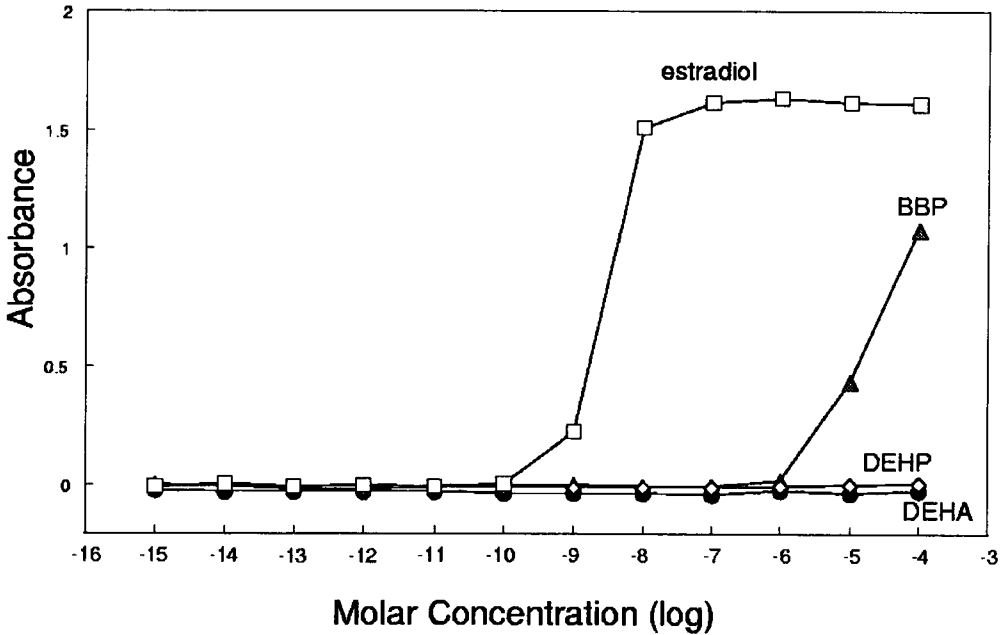


図 3: 給食用手袋抽出物中の各成分の活性

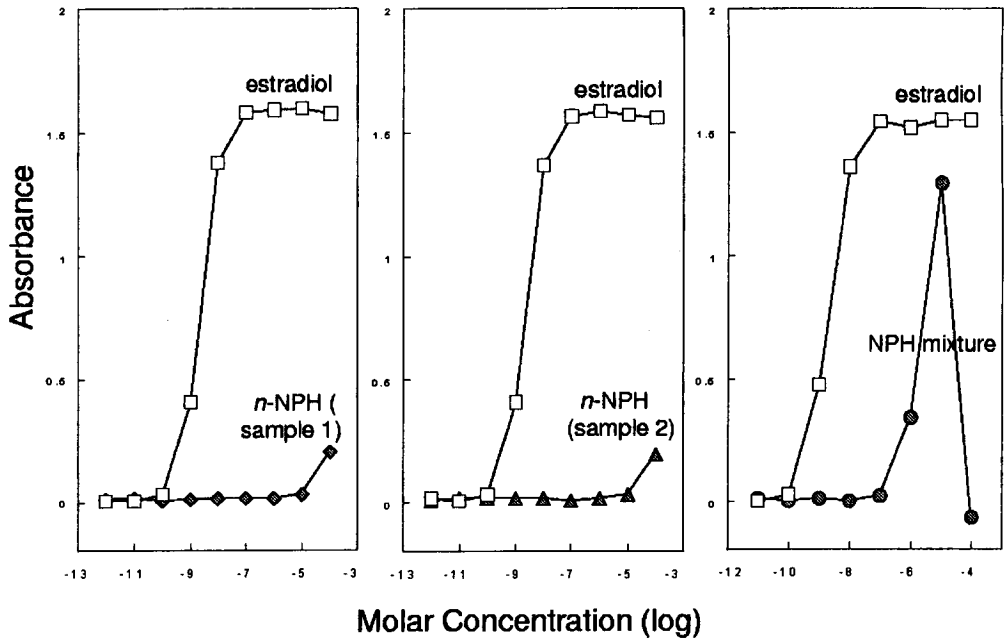


図 4: *n*-NPH と NPH 混合物のエストロゲン様活性の比較。

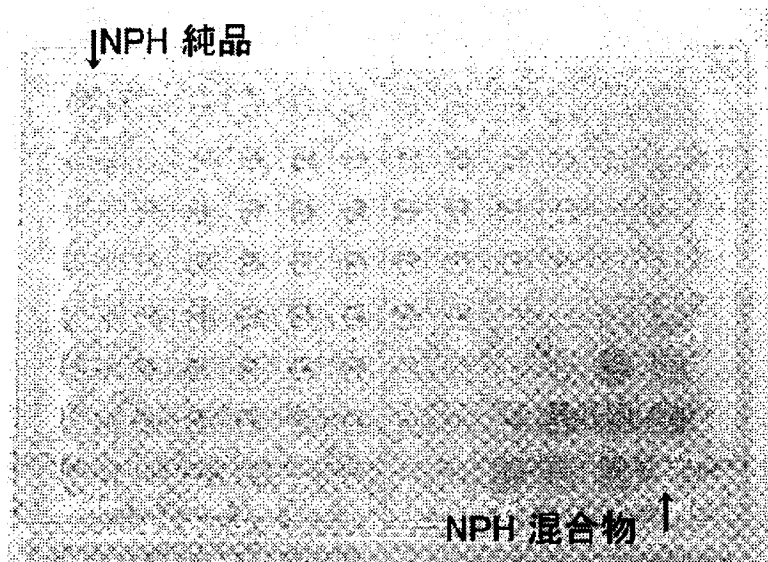


図 5: NPH 混合物中にはエストロゲン様活性を有する揮発性物質が存在する。96 穴のタイタープレートすべてのウェルに組換え酵母による検出系の完全な反応系を入れ、さらに対角線の両端には *n*-NPH 純品と NPH 混合物を加えて培養した。試料を添加しなかった右下のウェルの周囲のウェルに、活性を示す着色が現れている。