

研究発表

口頭発表：

1. 片瀬隆雄・井上正・大山晋裕・金倫碩：エストロゲン様化合物の組換え酵母スクリーニングとラット・スメア試験との相関及び数種の日常生活関連物質のスクリーニング。内分泌攪乱化学物質研究発表会，講演要旨集43-44p，東京フォーラム，1999/8/25-26.
2. 井上正・片瀬隆雄・江角和久・金倫碩：日常生活用品中のエストロゲン様活性のスクリーニングー組換え酵母検出系の有効性の検証。日本内分泌攪乱化学物質学会第二回研究発表会要旨集74p. 1999/12/9-10.
3. 片瀬隆雄・井上正・水谷廣：内分泌かく乱物質，生活環境中の化学物質による健康影響及び安全性確保等に関する研究。平成10年度厚生省厚生科学研究生活安全総合研究成果報告会，要旨集86-89, 虎ノ門パストラル，2000/2/15-16.

出版物：

1. 片瀬隆雄：包装材にみる新たな”環境ホルモン”（第3章），環境ホルモンの最新動向：攪乱能の微量摂取をどう考えるか（シーエムシー；東京）p44-57，1999/5/20.
2. 片瀬隆雄：包材プラスチックから溶出するホルモン作用攪乱物質ー化学物質の取り扱いに対する管理体制（第4章第1節），無菌包装の最先端と無菌化技術（サイエンスフォーラム；東京）p253-262，1999/6/30.
3. 片瀬隆雄・金倫碩：ガスクロマトグラフ及びガスクロマトグラフィー／質量分析法による業務用食品包装材プラスチックフィルムから潜在的に移行するアジピン酸エステルの定量。分析化学 48： 649-655，1999.

エストロゲン様化合物の組換え酵母スクリーニングとラット・スメア試験との相関 及び数種の日常生活関連物質のスクリーニング

かたせ たかお いのうえ ただし おおやまのぶひろ きん ゆんそく
(日本大学・生物資源科学部) ©片瀬隆雄・井上 正・大山晋裕・金 倫碩

要旨

内分泌攪乱物質の動態を解析するために，生活環境中の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)。この検出系によるスクリーニングと哺乳動物活性との関連性を明らかにする試みが，次に必要となる。既に，1930年代末までに，Dodds らによって，約40種の合成化合物にエストロゲン活性のあることがラット・スメア試験標準化法で検索されている (片瀬，1988)。そこで，ラット・スメア法による活性化化合物を数種選び，組換え酵母スクリーニングの試験を行ったところ，両試験の結果はよい相関 ($r = 0.9747$) が示された。次に，日常生活物質に対して，同スクリーニングを行ったところ，市販のプラスチック製品中で，手袋については明らかな活性を示した。両試験結果の相関から，その強度はラット・スメア法で230mg 投与でラットが発情することに対応した。テーブルクロス，ラップ，玩具 (豚及び鞠) 及びスリッパにもわずかな活性 (ラット・スメア法で 9.6 g 投与) が検出された。また，天然物に含まれる genistein (大豆)，resveratrol (ブドウ) 及びフェルラ酸 (各種植物体) などでも活性を示した。Dodds らによる活性化化合物の強度は最大と最少の間で，約25万倍の効果の差異が示されている。日常生活における合成化合物も10万種類に近い数であり，今後も化合物のスクリーニングとその評価法の検討は必要な課題である。

組換え酵母スクリーニング

ヒトエストロゲンレ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 Sumpster (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 -D-galactopyranoside (CPRG) の呈色測定で得た。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日間の培養後にマイクロプレートリーダーを用いて，540nm 及び

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。DMSO 溶媒のブランク値を差し引き、また陽性対照として17β-エストラジオールを用いた。その結果、以下のような強度（活性濃度：mM）が測定された。diethylstilbestrol : 2×10^{-7} , dienestrol : 5.2×10^{-7} , bisphenol A : 7.1×10^{-8} 及び propylphenol : 3.8×10^{-5} など。

試料及びプラスチック製品の試料調整と溶出物測定

genistein, resveratrol などのすべての標準試料は市販の特級試薬を用いた。また、市販のプラスチック製品を約0.2g切り取り、供栓試験管内の4mlのn-ヘプタン中で、80°Cで90間に溶出させたn-ヘプタン溶液をプラスチック製品試料として、組換え酵母スクリーニング及び以下の化学分析に用いた。スクリーニング用の場合、溶媒をn-ヘプタンからDMSOに置き換えた。n-ヘプタン中の化合物はガスクロマトグラフィー/質量分析法で同定及び定量した（片瀬ら, 1999）。未同定化合物の定量及びモル濃度表示を可能とさせるため、すべてdi-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)で規格化して定量値とした。n-ヘプタン溶出総量として、最少3mM（豚玩具）～最大64mM（鞆玩具）であった。また、以下の化合物が同定された。豚玩具（diethyl phthalate = DEP），鞆玩具，スリッパ，テーブルクロス（以上，DEHP），手術用手袋（benzylbutyl phthalate = BBP及びDEHP），学校給食用手袋（BBP, DEHP 及び di-2-ethylhexyl adipate = DEHA），業務用ラップ（di-n-octyl adipate = DnOA）及びラップ（韓国）（DEHA）であった。

Doddsらによるラット・スメア試験

Dodds らのラット・スメア法は以下のように行われた（Cook et al., 1934）。ラット（Wistar系）体重が140gになったとき卵巣を切除し、供試化合物 100mgを、3mlのセサミ油に溶解させ、3日連続で1ml注射投与し、最後の投与の12時間後とその3日間の朝夕に、発情変化が消えるまで膣スメアを採取し、スライド上で固定し、膣上皮角化と完全な白血球欠損を陽性とする。陽性の場合、さらに投与量を少なくし、最少効果量を定める。通常3～5匹のラットで判定する。観察された約40種の活性合成化合物のうち、その強度（効果投与量；mg）として、ここでは以下の測定例を引用した。diethylstilbestrol (DES) : 4×10^{-4} , dienestrol : 5×10^{-4} , bisphenol A : 30 及び propylphenol : 100 など。

【文献】Cook J.W. et al. (1934) *Proc. Roy. Soc.*, 114, [B]272-285. 片瀬隆雄 (1998) *化学工業* 49, 913-920. 片瀬隆雄 (1999) *分析化学* 48: 649-655. Routledge, E.J. and J.P. Sumpter (1996), *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 241-248.

平成11年度厚生省科学研究費補助金の研究課題「内分泌かく乱物質等、生活環境中の化学物質による健康影響及び安全性の確保等に関する研究」（課題番号H11-生活-022）の一部

日常生活用品中のエストロゲン様活性のスクリーニング

— 組換え酵母検出系の有効性の検証

SCREENING OF ESTROGEN-LIKE ACTIVITIES IN PLASTICS FOR DAILY USE

— EVALUATION OF THE RECOMBINANT YEAST SCREEN

(日大・生資科) 井上 正、片瀬 隆雄、江角 和久、金 倫碩

【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。この検出系の有効性を検証するために、古く Dodds 等 (*Nature*, 141, 247-249, 1938) がラットを用いて *in vivo* におけるエストロゲン活性を定量した数種の化合物に関して、組換え酵母を用いてその比活性を定量し、両検出系の間にもどのような相関があるかを調べた。また、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、酵母検出系を用いて調査することにより、スクリーニング法としての本法の確立をめざした。

【方法】ヒト由来のエストロゲンリセプター遺伝子を組み込んだ酵母は Sumpter 等 (*Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 241-248, 1996) によって開発されたものを用いた。この組換え酵母は、ヒトのエストロゲンリセプターに結合しこれを活性化するエストロゲン様物質を、 β -galactosidase の誘導を指標として検出するものであり、 5×10^{-11} M の 17β -estradiol を検出できる感度を有している。供試試料は日常生活で用いられるプラスチック製品およそ 150 点を市場より求め、その 0.2 g を 4 ml の *n*-heptane を用いて 80°C, 90 分間溶出し、溶媒を DMSO に置き換えたものを用いた。溶出された化合物は、GC-MS により同定および定量した。未同定の物質に関しては、GC による分析結果を用いて、di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) 相当量に換算することにより定量値とした。

【結果と考察】ラット *in vivo* 試験で陽性を示す dienestrol, diethylstilbestrol, bisphenol A, propylphenol および 17β -estradiol に関して、組換え酵母検出系を用いて比活性を定量したところ、両検出系による結果は極めて高い相関性を示した。これらの化合物は、その比活性においておよそ 10^6 の範囲に広がっており、酵母においてもこのような広い範囲で活性の定量ができることが示された。しかし *in vivo* 試験では弱い活性を有するとされている nonylphenol に関しては、酵母検出系ではその活性を検出できなかった。不純な nonylphenol では明らかな活性が認められるので、現在用いた標品中の活性物質の同定を試みている。

一方、市販プラスチック製品から上記の方法で溶出することにより、diethyl phthalate, DEHP, benzylbutyl phthalate, di-2-ethylhexyl adipate, di-*n*-octyl adipate などを含む試料が得られた。これらの試料について酵母検出系によってその活性を調べたところ、給食用手袋に明らかな活性が認められた。また、テーブルクロスやプラスチック製おもちゃにもわずかな活性が検出され、一次スクリーニング法として本検出系が極めて有効であることが示された。

研究費の名称=厚生省科学研究費

研究事業名=厚生省特別研究事業

研究課題名=内分泌かく乱物質、生活環境中の化学物質による健康影響及び安全性確保等に関する研究（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）

国庫補助金精算所要金額=3,000,000

研究期間（年度）=1998

主任研究者=片瀬隆雄（日本大学生物資源科学部）

分担研究者=水谷広（日本大学生物資源科学部），井上正（日本大学生物資源科学部）

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'-hydroxyphenyl 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つて以来、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Dodd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⁾。すでに明らかとなったこれらのプラスチック溶出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。従つて、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⁵⁾。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。

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。di-methyl 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℃ 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、陽性対象として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。

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17 β -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 μ l 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。

（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、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-hydroxy-cinnamic 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、おもちゃ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。

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 5×10^{-11} 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。

結論=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、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 5×10^{-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、オモチャ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。