HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	環境水のエストロゲン様活性の評価～阻害作用低減への試み～
Author(s)	大野, 雪子; 平野, 景子; 鎌田, 素之; 大野, 浩一; 亀井, 翼; 眞柄, 泰基
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 9, 225-228
Issue Date	2001-11-01
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/7175
Type	bulletin (article)
Note	第9回衛生工学シンポジウム（平成13年11月1日（木）-2日（金） 北海道大学学術交流会館）. 5 リスク評価と環境修復 . P5-1
File Information	9-5-1_p225-228.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

5－1

環境水のエストロゲン様活性の評価 ～阻害作用低減への試み～

大野雪子(北海道大学)、平野景子(水道機工株式会社)
鎌田素之、大野浩一、亀井翼、眞柄泰基(北海道大学)

1. 研究背景と目的

近年、ヒトや野生生物の内分泌系を撹乱する可能性のある化学物質(内分泌撹乱物質または環境ホルモン)の存在が明らかになっている。生体の内分泌系を司るホルモンは血液などの体液に放出され、標的となる組織にある受容体と結合することでその作用を発揮するが、内分泌撹乱化学物質は生体内で誤ってホルモンとして認識され、受容体と結合するなどして内分泌系を撹乱する。特に、女性ホルモン様の作用をもたらす化学物質（エストロゲン様化学物質）が多く知られており様々な研究がされているが、その作用機構はまだなお不明な点が多い。

本研究で用いた酵母 Two-Hybrid 法は操作が簡便かつ迅速に行えることから広く利用されているバイオアッセイである。しかしこの手法においては、これまでの研究からエストロゲン様化学物質が 2 成分以上共存するとき、それぞれの物質が単独で存在するときと比較してエストロゲン様活性に相減作用が認められている。またエストロゲン様活性を有しない物質とエストロゲン様化学物質が共存するときにも同様に相減作用が認められた。これらの結果から、多成分系である環境水のエストロゲン様活性値は本来の値よりも低く見積もられている可能性が考えられる。

そこで本研究では本来化学物質のスクリーニング法として開発された酵母 Two-Hybrid 法による環境試料のエストロゲン様活性測定にむけて、エストロゲン様活性値とエストロゲン濃度とを異なる方法で測定し、結果を比較することで測定結果の妥当性を検討した。また、HPLC をもちいて環境試料の極性による分画を行い、測定を阻害する物質の影響の低減を試みた。

2. 実験方法

実験には A･B･C 下水処理場二次処理水（以下 A･B･C 二次処理水）、B 下水処理場最初沈殿流入水（以下 B 初沈流入水）、茨戸川河川水、フミン質を多く含む泥炭水、夕張川河川水、パルプ工場排水を用いた。

《試料水の濃縮》

実験に用いた試料水はガラス繊維濾紙（GF/B）を用いて吸引濾過を行った後、メタノールとジクロロメタンでコンディショニングした固相カートリッジ（SepPakC18）に通水し、ジクロロメタンで抽出する。抽出液をロータリーエバポレーターで減容、窒素パージで溶媒乾固させた後に濃縮倍率が 50000 倍になるように DMSO に転溶した。酵母 Two-Hybrid 法によって測定を行う際には、さらに六段階に希釈をして実験に供した。B 初沈流入水は遠心分離により固体部分を取り除いた後に他の試料水と同様に濃縮した。

《エストロゲン様活性の測定》

エストロゲン様活性の測定には核内に哺乳類のエストロゲン受容体を組み込んで形質転換させた酵母を用いた [1]。予め 16 時間培養した酵母懸濁液とサンプル、SD 培地を共に 4 時間培養する。核内受容体とエストロゲン又はエストロゲン様化学物質が結合することで DNA の転写が活性化され、レポーター遺伝子 LacZ が転写され、酵素(β-galactosidase)が分泌される。培養後に菌体増殖量（OD_{595}）を測定し、遠心分離により上澄みを捨て、Z-buffer 溶液で細胞壁を破壊しβ-galactosidase を o-nitrophenyl galactphranoside 溶液（以下 ONPG 溶液）を用いて呈色させる。その発現量を吸光度（OD_{420}）で測定し、以下の式に基づいて活性値を算出する。

$$\beta\text{-galactosidase 活性値} = \frac{OD_{420}-1.75\times OD_{570}}{t\times v\times OD_{595}}\times 1000$$

ただし t ＝30min(ONPG による呈色時間)、v＝0.05ml(前培養液の体積)
このβ-galactosidase 活性値は測定したサンプルのエストロゲン様活性を表現しているので、以下エストロゲン様活性値とする。
活性値の評価は陽性対照である 17β-Estradiol（以下 E2）の最大活性値を 100 として比活性値で表した。比活性値が 10%以上を示した場合に活性があると判断した。

《エストロゲン濃度の測定》
環境試料中の E2 濃度の測定には Enzyme-Linked Immunosorbent Assay（以下 ELISA）による 17β-EstradiolELISA キット（武田薬品製）を用いた。本キットは抗原とそれに対して生体内で合成された特異的で均一な抗体であるモノクローナル抗体（monoclonal antibodies）による抗原抗体反応を用いた酵素免疫測定法の一つであり、競合反応によって測定を行う。

《HPLC を用いた分画と活性値の測定》
逆相系カラム、溶離液に超純水とメタノールを用いてサンプルを分画した。表 1 に示した操作条件で初めは親水的な物質、徐々に疎水的な物質が溶出するように溶媒の割合を変化させた。濃縮倍率 10000 倍のサンプル 60μL を注入し、2 分間 400μL の溶離液を 1 フラクションとして、計 40 分間 20 個のサンプルを分取した。その後、溶媒を乾固させて 12μL の DMSO に転溶し最終的なサンプルの濃縮倍率は 50000 倍として、それぞれのフラクションの活性値を求めた。また、各フラクションに E2(10^{-6}M)を添加して活性値の測定を行い、サンプルと E2 の相減作用を測定した。

表 1. HPLC の運転条件

Instrument	HP1100
カラム	Hypersil BDS-C18 (5μm 250×4.6mm)
溶媒 A	H_2O
溶媒 B	MeOH
溶媒の割合	B:0-10min:0-100% 10-40min:100%
カラム温度	40℃
流速	0.2mL/min
サンプル注入量	60μL

3. 測定結果

《エストロゲン活性値の測定結果》
A･B･C 二次処理水のエストロゲン活性値を図 1.に示した。横軸は濃縮倍率を対数で表した。A 二次処理水は濃縮倍率 10000 倍以上で活性が認められた。一方、B･C 二次処理水は 50000 倍濃縮のサンプルでわずかに活性値が上昇しているが、活性は認められなかった。

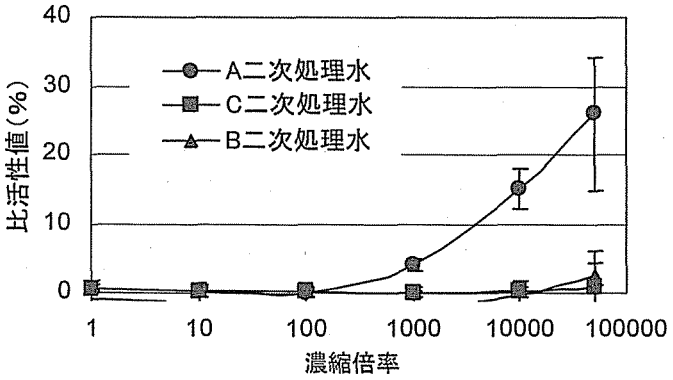

図 1. 二次処理水の比活性値

図 2 には E2 濃度と比活性値を示した。縦軸には濃縮倍率 50000 倍のサンプルの比活性値を、横軸には ELISA 法で測定したサンプルの E2 濃度をプロットした。図から E2 濃度の測定結果から算出すると活性を示すのに十分なサンプルでも、酵母 Two-Hybrid 法では活性が認められなかったことがわかる。また、活性を有するサンプルでも E2 濃度から算出できる値よりも低い活性値を示しており、環境試料中には何らかの測定阻害物質が存在することが考えられる。

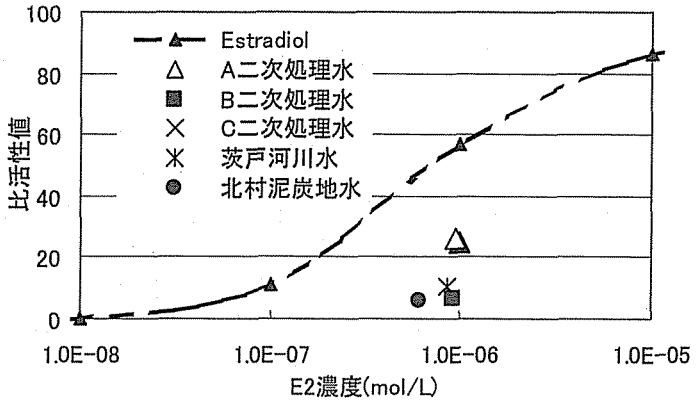

図 2. ELISA 法により測定した E2 濃度と
エストロゲン様活性値の比較

《分画したサンプルの活性値》

分画した A 二次処理水のフラクション No.ごとの活性値を図 3 に示した。エストロゲン様活性を示したフラクション No.12 の活性値は分画を行っていない 50000 倍濃縮のサンプルの活性値よりも高いことがわかる。また、段階希釈したサンプルでは活性が認められなかった泥炭水でも分画をすることによって活性が認められた。E2 を環境水と同様に分画・測定した場合にも同じフラクションで活性が認められたことから、今回行った逆相系カラムによる分画方法でエストロゲン様活性を示す物質群の分離が可能であるといえる。また、E2 のみの比活性値は 60%であるのに対して、E2 を添加して測定を行ったサンプルのフラクション No.11・13 では活性値が減少しており、なんらかの阻害物質が存在することが考えられる。

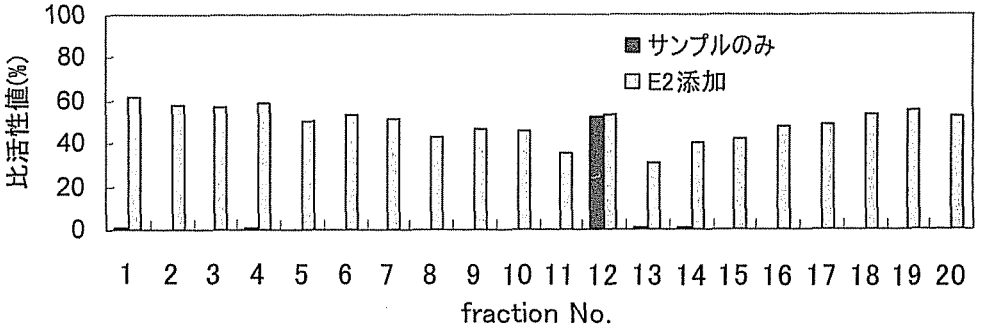

図 3. 分画した A 二次処理水の比活性値

図 4 には分画したサンプルのフラクション No.12 の比活性値と E 2 濃度をともに示した。図 2 で示した比活性値と比較してすべてのサンプルで比活性値が上昇している。

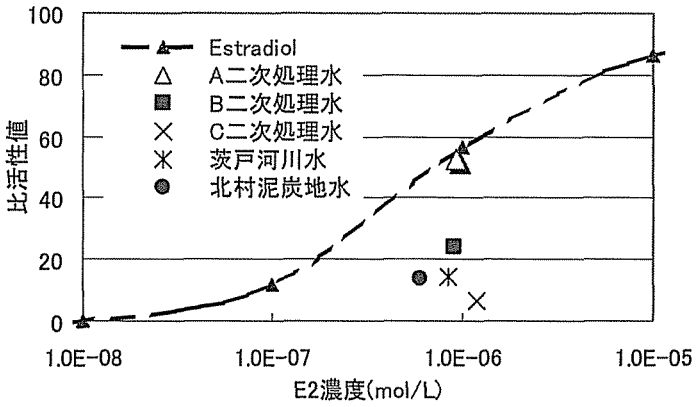

図 4 . ELISA 法により測定した E2 濃度とエストロ
ゲン様活性値の比較(分画 No.12 の場合)

4. 結論

濃縮した環境水のエストロゲン様活性値は E2 の濃度から算出されるエストロゲン様活性値を下回る、又はエストロゲン活性が認められないことが確認された。その原因として共存する物質がエストロゲン様活性の発現を何らかの形で阻害していることが明らかになった。

HPLC の分画によりエストロゲン様物質群の分離が可能であり、通常の測定では活性が認められない環境試料でも、分画により活性の発現を確認できる事が明らかになった。また、分画によって測定阻害物質の存在が確認された。活性を減少させる物質はエストロゲン様物質群と近接するフラクションに存在することから、エストロゲン様物質と類似した構造をもつことが予測される。また、HPLC による分離は十分ではない可能性も考えられ、今後は運転条件や分画の方法についてさらなる検討が必要である。

5. 参考文献

1.) Jun-ichi Nishikawa, Koichi Saito, Jun Goto, Fumi Dakeyama, Masatoshi Matsuo and Tsutomu Nishihara "New Screening Method for Chemicals with Hormonal Activities Using Interaction of Nuclear Hormone Receptor with Coactivator" Toxicology and Applied Pharmacology, Vol.154, No1, pp.76-83(1999)