HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	内分泌撹乱物質の複合影響に関する研究
Author(s)	山田, 卓; 平野, 景子; 鎌田, 素之 他
Description	第8回衛生工学シンポジウム（平成12年11月16日（木）-17日（金） 北海道大学学術交流会館） . 2 環境保全・リスク環境 . P2-7
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 8, 100-103
Issue Date	2000-11-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/7215
Type	departmental bulletin paper
File Information	8-2-7_p100-103.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

2−7

内分泌撹乱物質の複合影響に関する研究

○ 山田 卓、平野 景子、鎌田 素之、亀井 翼、眞柄 泰基（北海道大学大学院）

1. はじめに

近年、人間が作り出した危険な化学物質の一群として注目を集めているのが、外因性内分泌撹乱物質、いわゆる「環境ホルモン」と称されるものである。これらの物質は、生体内に侵入してホルモンの類似の作用をしたり、ホルモンの働きを阻害したりすることによって内分泌機能を撹乱させる。環境中には複数の内分泌撹乱物質が共存していると考えられるため、個々の化学物質の評価に加え、人への暴露量の多い物質あるいはその可能性が高い物質については、複合による影響を考慮していかなければならない。現在のところ、内分泌撹乱物質について、相加的な影響の可能性については指摘されているものの [1]、相乗的な影響については確認されていないのが現状である。本研究では、内分泌撹乱作用の中でもエストロゲンレセプターに結合しホルモン作用を撹乱する物質に焦点を当て、酵母 Two-hybrid 法を用いて化学物質の多成分系や環境試料における発現パターンについて検討し、内分泌撹乱物質の評価手法としての適正について検討した。

2. 実験原理・方法

2. 1 環境試料の濃縮方法

環境試料をガラス繊維濾紙（Whatman 社製 GF/B）で吸引ろ過する。ろ過した環境試料をメタノール（Wako 社製 残留農薬試験用）と精製水でコンディショニングした Sep Pak C18 カートリッジ（Waters 社製）に通水する。通水終了後、精製水で洗浄し N_2 で乾燥させメタノールで溶出し、DMSO に転溶し、エストロゲン様活性を測定するサンプルとした。

2. 2 酵母 Two-hybrid 法

今回実験に用いた組み替え酵母は、ほ乳類のエストロゲンレセプター遺伝子と、エストロゲン様物質との結合により活性化したエストロゲンレセプターの応答部位およびそれに続くレポーター遺伝子（lacZ）が組み込まれている。エストロゲン様物質は、酵母の細胞壁を透過すると発現しているエストロゲンレセプターと結合し、さらに二量体となって応答部位に結合する。それによりレポーター遺伝子が転写活性化するため、生成される β-galactosidase の活性を測定することでエストロゲン様活性の測定が可能となる。

実験手順は、低温保存してある組み替え酵母菌株を SD 液体培地に植菌し、30℃で 24 時間旋回培養する（前培養液と呼ぶ）。この前培養液に SD 培地を加えテスト物質を添加し、さらに 30℃で 4 時間旋回培養した後、培養液の 595nm(OD595：酵母の菌体量)の吸光度を測定する。残りの培養液を遠心分離し、上澄みを捨てて、残った沈殿に 1mg/ml Zymolyase20T を含む Z-Buffer を加え撹拌し、37℃で 15 分間静置する。これに 4mg/ml ONPG 溶液を加え撹拌した後、30℃で 30 分間静置する。これを遠心分離し、上澄み液の 420nm(OD420：ONPG の発色量)、570nm(OD570：液中の不純物量)の吸光度を測定する。これらの吸光度を次式に代入して β-galactosidase 活性を算出する。

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

ただし、t=ONPG による呈色時間

v=前培養液の体積

エストロゲン様活性値は陽性対照である 17ß-エストラジオールの最大活性値を 100 として換算し、比活性値で表した。なお、希釈溶媒液には DMSO を用い、その濃度は最終 1%とした。

2. 3 多成分系の実験方法

エストロゲン様作用を示す物質として 17ß-エストラジオール(E2)、4-ノニルフェノール(NP)、ビスフェノール-A (BPA)、p-ヒドロキシ安息香酸 n-ブチル (SPF) を、エストロゲン様作用を示さない物質として安息香酸を用い、これらを 2 成分もしくは 3 成分を 1:1 で等量共存させて、エストロゲン様活性を測定した。さらに、エストロゲン様作用を示す物質と環境試料を共存させてエストロゲン様活性を測定した。

3. 実験結果・考察

3. 1 内分泌撹乱物質の複数共存におけるエストロゲン様活性発現特性

内分泌撹乱物質を 2 成分、3 成分共存させた場合の結果を図 1～3 に示す。この結果を見ると、エストロゲン様活性は共存させた中でもっとも強い物質（より低濃度でエストロゲン様活性が認められる物質）に発現パターンは支配されていた。また、エストロゲン様活性に相加・相乗性はなく、むしろ減少する傾向が見られた。おそらく、4 成分以上でも同様の結果が得られと思われる。[2)]

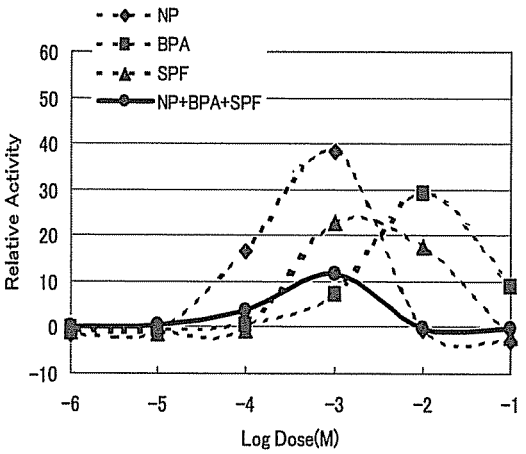

図1 NP,BPA,SPFのエストロゲン様活性

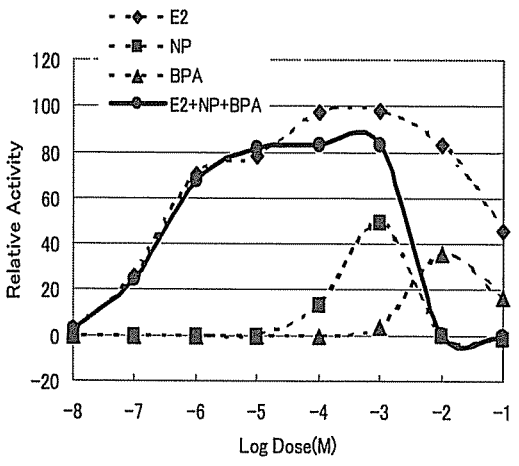

図2 E2NP,BPAのエストロゲン様活性

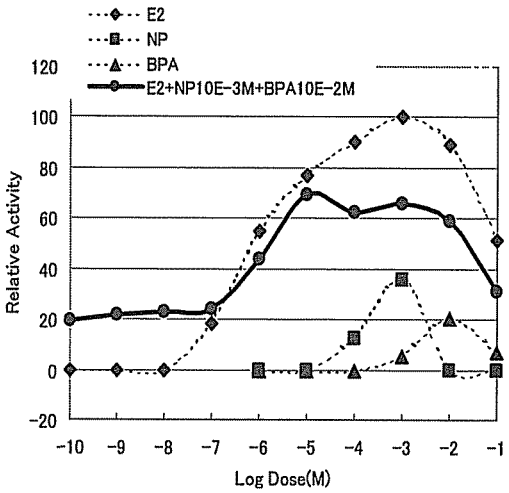

図3 E2,NP 10E-2M,BPA 10E-3Mの
エストロゲン様活性

3．2 内分泌撹乱物質と非内分泌撹乱物質の共存におけるエストロゲン様活性発現特性

本研究で使用した安息香酸 10^{-2}M、10^{-1}M と E2 10^{-n}M（n=1～8）を 1：1 で共存させたときの結果を図 4 に示す。安息香酸 10^{-2}M と E2 を共存させた場合、内分泌撹乱物質の多成分系の時と同様、E2 単独よりもエストロゲン様活性は減少していた。安息香酸 10^{-1}M と E2 を共存させた場合、すべての濃度でエストロゲン様活性がうち消されていた。そこで、4 時間培養前後の安息香酸 10^{-1}M の菌体濃度を見ると増加が認められなかった（図 5）。つまり、安息香酸自身の毒性が酵母菌に増殖阻害を起こしたことが原因だと思われる。

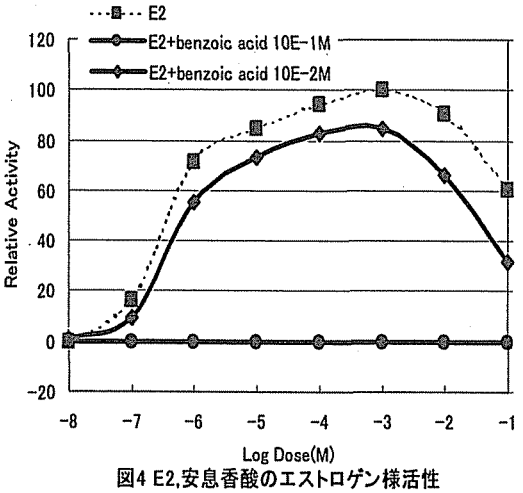

図4 E2,安息香酸のエストロゲン様活性

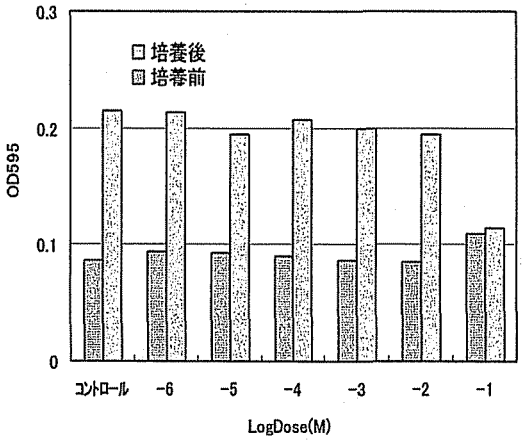

図5 4時間培養前後の菌体濃度変化(安息香酸)

3．3 環境試料と内分泌撹乱物質の共存におけるエストロゲン様活性発現特性

図 6 に環境試料と E2 10^{-n}M（n=1～8）を等量共存させたときの測定結果の一例を示した。すべての濃度でエストロゲン様活性は E2 単独の場合よりも減少傾向を示した。この傾向は、環境試料のエストロゲン様活性の有無、共存させる化学物質の種類によらなかった。このことから、内分泌撹乱物質が環境中に存在する場合、エストロゲン様活性を低く見積もってしまう可能性があることを示している。

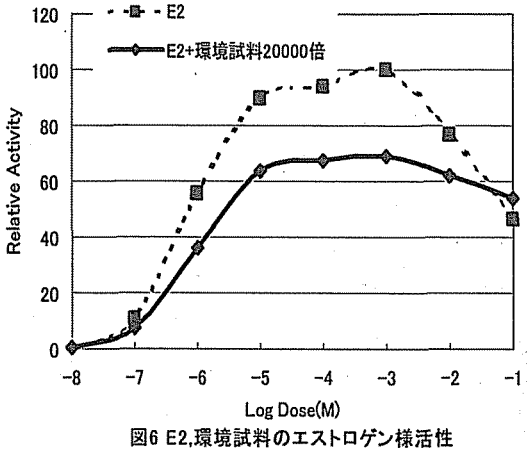

図6 E2,環境試料のエストロゲン様活性

4．結論

本研究で用いた酵母 Two-hybrid 法では、すべてのグラフで逆 U 字型の用量-作用曲線を示したが、内分泌撹乱物質は疎水的なものが多いために析出したり、その物質自身の毒性によって酵母の増殖阻害を引き起こしたことが原因で起こる場合があることが確認できた。したがって、実験で得られる用量-作用曲線が本来の生物学的作用によるものなのか、上述の原因に起因するのか確認する必要がある。このことは、本実験で用いた酵母 Two-hybrid 法のみならず、他のほ

ぼすべてのバイオアッセイでも起こる可能性があると考えられる。

酵母 Two-hybrid 法における多成分系のエストロゲン様活性の相加・相乗作用は認められず、むしろ抑制作用が認められた。このような抑制作用は、内分泌攪乱物質に非内分泌攪乱物質、環境試料を共存させたときも同様のことが確認できた。また、エストロゲン様活性の発現パターンはその成分の中で最も活性が強い物質の影響が支配的であることも確認できた。よって、酵母 Two-hybrid 法を始めレセプターを介するすべてのバイオアッセイ試験において、環境試料のエストロゲン様活性を測定した場合、本来のエストロゲン様活性よりも低く見積もってしまう可能性がある。

5. 参考文献

1. Klaus Graumann and Alois Jungbauer : Agonistic and Synergistic Activity of Tamoxifen in a Yeast Model System, Biochemical Pharmacology, vol.59, pp.177-185, 2000
2. 大桶　伸行：バイオアッセイによる内分泌撹乱物質の発現特性，北海道大学工学部衛生工学科卒業論文, 1998