



Title	代謝活性化を考慮した内分泌攪乱物質の評価に関する研究
Author(s)	平野, 景子; 鎌田, 素之; 山田, 卓 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 . 2-8
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 8, 104-105
Issue Date	2000-11-01
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/7216">https://hdl.handle.net/2115/7216</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	8-2-8_p104-105.pdf



2-8

代謝活性化を考慮した内分泌攪乱物質の評価に関する研究

○平野景子、鎌田素之、山田 卓、亀井 翼、眞柄泰基 (北海道大学大学院)

1. はじめに

近年、ヒトをはじめとする生物の内分泌系を攪乱し、生殖阻害などを引き起こすとされている外因性内分泌攪乱化学物質の存在が明らかとなり、それらの内分泌攪乱作用を検出するため、様々なバイオアッセイが用いられている。しかし、簡便かつ迅速な評価方法である *in vitro* 試験は、微生物や培養細胞を用いるため、生物が本来有する代謝機構を考慮することができない。

そこで、この問題を克服するため、変異原性試験の Ames 試験等において、化学物質の代謝の影響を考慮するために用いられている、哺乳類の肝ホモジネート S9mix に注目した。

本研究では、従来の酵母 Two-hybrid 法に大幅な変更を加えることなく、内分泌攪乱作用の代謝活性化を考慮できる試験系についての検討を行った。また、様々な物質が含まれている環境試料に本法を適用し、代謝活性化によるエストロゲン作用の影響を検討した。

2. 実験方法

2-1 試料の調整

化学物質は DMSO もしくはメタノールに溶解させ、これを順次希釈したものをサンプルとした。また、環境試料はガラス繊維濾紙(GF/C Whatman 社製)で濾過後、あらかじめコンディショニングした Sep Pak C18 (Waters 社製)に吸着、メタノールもしくはジクロロメタンで溶出したものを段階的に希釈し、サンプルとした。

これらのサンプルと培地、一晚培養した酵母懸濁液を混合したものを酵母 Two-hybrid 法に用いる培養溶液とした。また、代謝活性化を考慮した試験系では、同時に S9mix (オリエンタル科学社製) を添加したものを培養溶液とした。

2-2 エストロゲン活性の測定

エストロゲン様活性の測定には、組み換え酵母の染色体中に組み込んだエストロゲンレセプターとエストロゲン様物質が結合することにより、

遺伝子の転写が活性化され、分泌される酵素 ( $\beta$ -galactosidase) の量を測定し、それをエストロゲン様活性とする、酵母 Two-hybrid 法を用いた。上記の培養溶液を図 1 に示す手順で培養し、菌体濃度、 $\beta$ -gal 活性、懸濁物による散乱を測定してエストロゲン様活性を算出した。なお、エストロゲン様活性は陽性対照である 17 $\beta$ -Estradiol (以下 E2) の活性に対する比活性値で表現した。

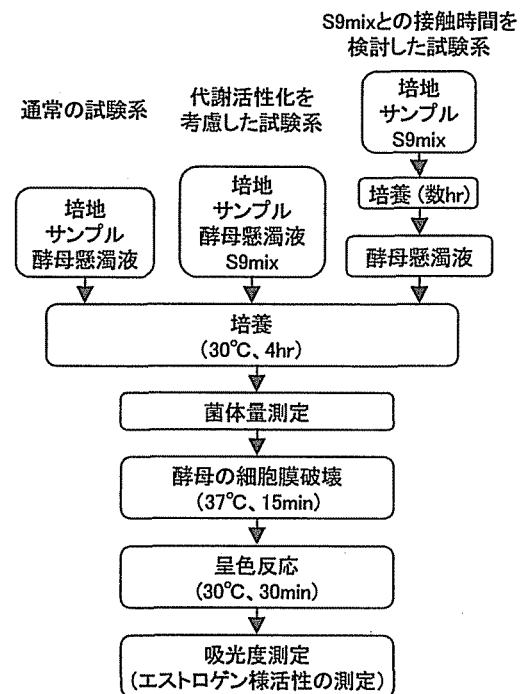


図1 酵母Two-hybrid法の手順

2-3 代謝活性化を考慮した試験系での検討項目

S9mix を導入した試験系 (以下+S9 系) では、S9mix 添加の際、従来の方法に大幅な変更を加えることなく、最も効率的に試験を進めるためには、酵母 Two-hybrid 法における培養と S9mix との反応を同時に行うことが最適であると考え、培養溶液中の SD 培地の量を減少させ、その代わりに S9mix を添加する方法を適用した。

反応に関与する因子として、S9mix の添加量について、25, 50 $\mu$ L の 2 条件で実験を行った。また、酵母 Two-hybrid 法の培養時間で十分な反応が得られない場合には、サンプルをあらかじめ

めプレインキュベーションする必要があり、S9mix とサンプルの接触時間による反応特性を確認するため、酵母 Two-hybrid 法における培養時間以外にサンプルと S9mix との反応時間を設ける実験を行った。試験物質としては、E2, *p*-Nonylphenol (以下 NP), Bisphenol-A (以下 BPA), Estriol, Estron, Methoxychlor, Benzo(a)pyrene を用い、上記の項目について検討した。

### 3. 結果および考察

#### 3-1 S9mix の添加量の検討

25, 50 $\mu$ L の 2 条件で検討を行ったが、添加量による違いは認められず、25  $\mu$ L の S9mix で化学物質は十分に代謝されることがわかった。さらに、培地量の減少が酵母の増殖やエストロゲン様活性に及ぼす影響を検討するため、S9mix の代わりに滅菌水を添加する実験を行ったが、培地量の減少による影響は認められなかった。

#### 3-2 時間による S9mix との反応特性

反応時間を変化させたときの E2 のエストロゲン様活性を図 2 に示した。S9mix を添加すると、エストロゲン活性の発現濃度が高濃度側に移動し、時間とともに活性が低くなった。同様の実験を他の化学物質について行ったところ、一時的にエストロゲン活性が高くなっても、時間とともに活性は低くなる傾向が見られた。このことは、化学物質が S9mix により代謝を受け、違う物質に変化したことを示している。また、+S9 系においては 4 時間の反応時間、すなわち酵母 Two-hybrid 法における培養時間でエストロゲン様活性が大きく変動していた。これより短い反応時間での検討も必要であるが、S9mix との反応時間を 4 時間とすることで十分な反応が得られ、かつ、本法は従来の酵母 Two-hybrid 法手順を大幅に変更することなく、代謝の影響を容易に組み込める手段となることがわかった。

#### 3-3 環境試料への適用

代謝活性化を考慮した酵母 Two-hybrid 法を用い、環境試料のエストロゲン活性を測定した。フミン質を多く含む湖沼水では  $\pm$ S9 とともに活性が認められなかった。また、下水処理場二次処理水は -S9 系では活性がほとんど認められな

かったが、+S9 系で非常に強い活性が認められた (図 3)。さらに、+S9 系での活性が -S9 系に比べて低いサンプルも存在した。これらのことから、環境水中には、生物の代謝機構により代謝活性化される物質の存在が明らかとなった。

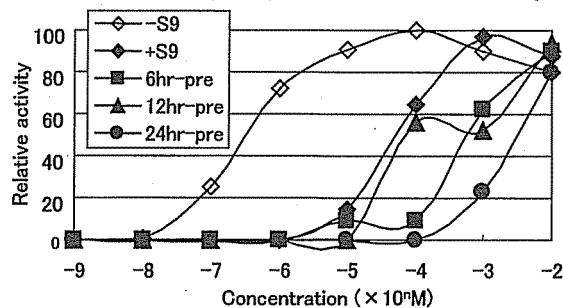


図2 +S9系におけるE2のエストロゲン様活性の経時変化

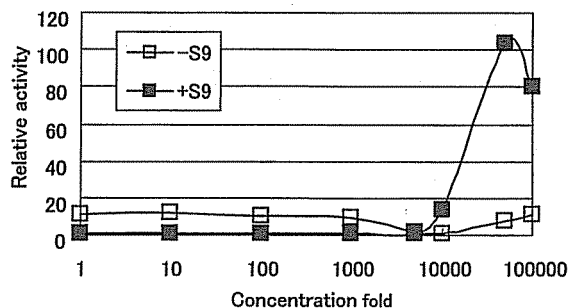


図3 下水処理場二次処理水のエストロゲン様活性

### 4. まとめ

内分泌攪乱作用を評価するバイオアッセイの一つである酵母 Two-hybrid 法において、S9mix を用い代謝活性化についての検討を行った結果、以下のことが明らかになった。

- 化学物質の中には、S9mix と接触することにより、エストロゲン様活性が抑制されるものと増大するものが存在すること
- S9mix によってエストロゲン様活性が変動する物質は、反応時間を 4 時間とすることで、十分な作用を受けること
- 環境試料にも S9mix により、エストロゲン様活性が抑制もしくは増大するサンプルが存在すること

今後、環境試料において+S9 系で活性の上昇が認められたものについては、寄与物質の特定を行い、さらに *in vivo* 試験の結果と比較、検討することで、本法が代謝を考慮した簡易試験法として、内分泌攪乱作用の評価に適用できるか否かについて検討を行う予定である。