

## 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 $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性は、Chlorophenyl red- $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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性は、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、それらを除去するか、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

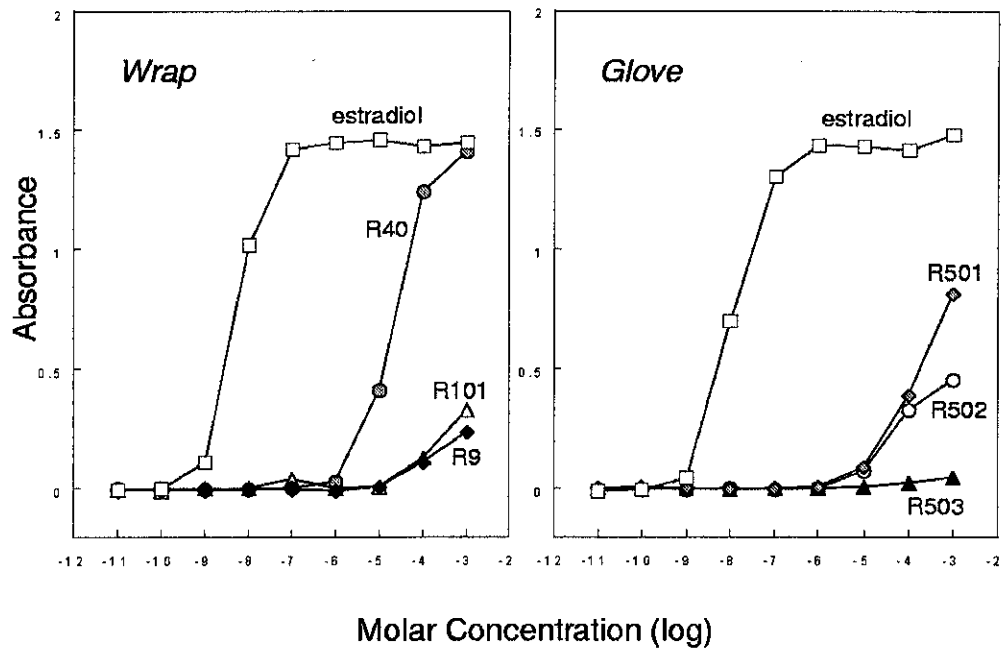


図 1: 食品包装用ラップおよび給食用手袋の抽出物の活性

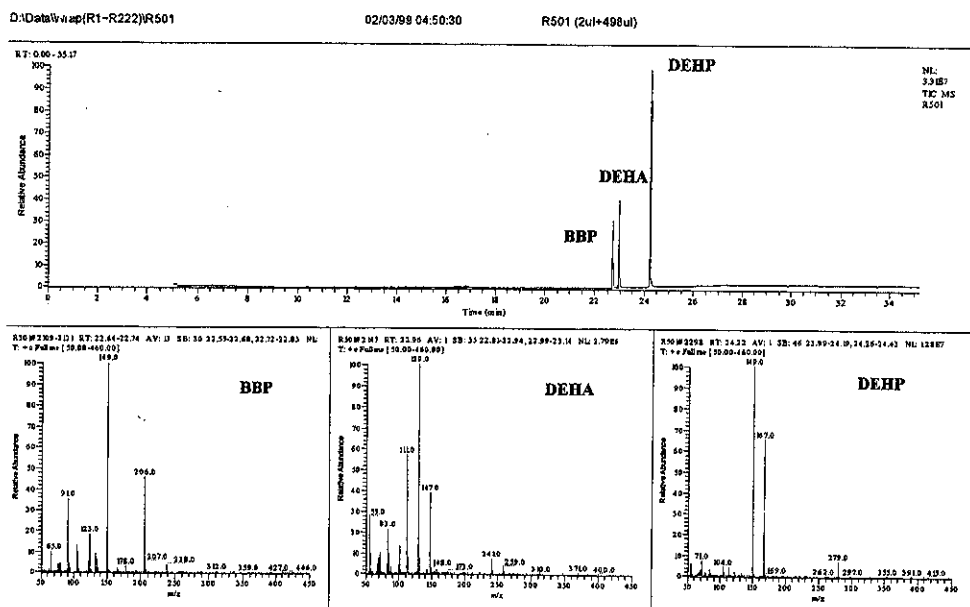


図 2: 給食用手袋 (試料番号 R501) の抽出物の MS による分析

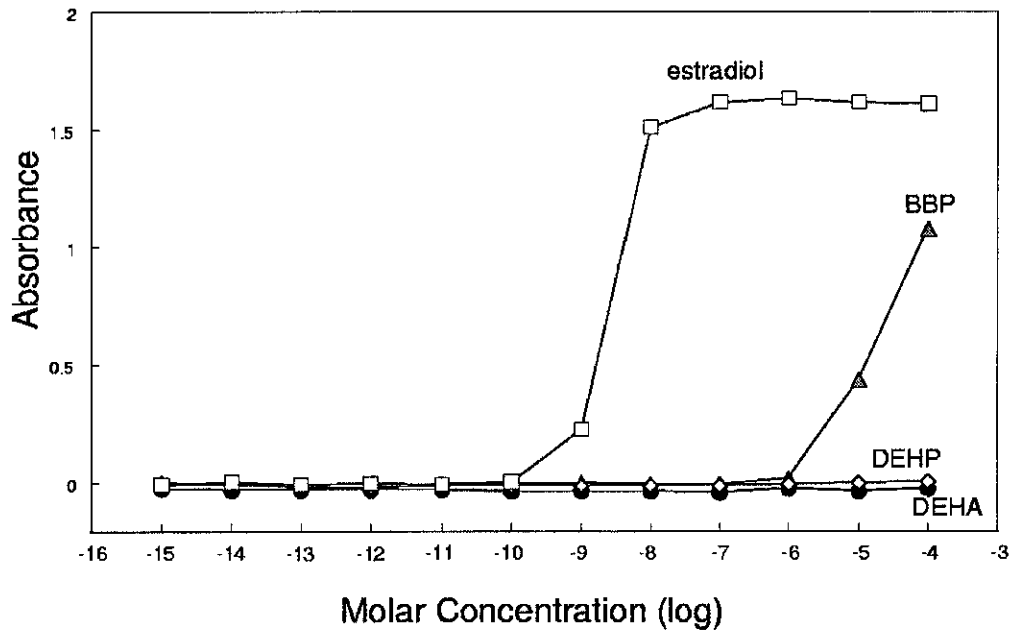


図 3: 給食用手袋抽出物中の各成分の活性

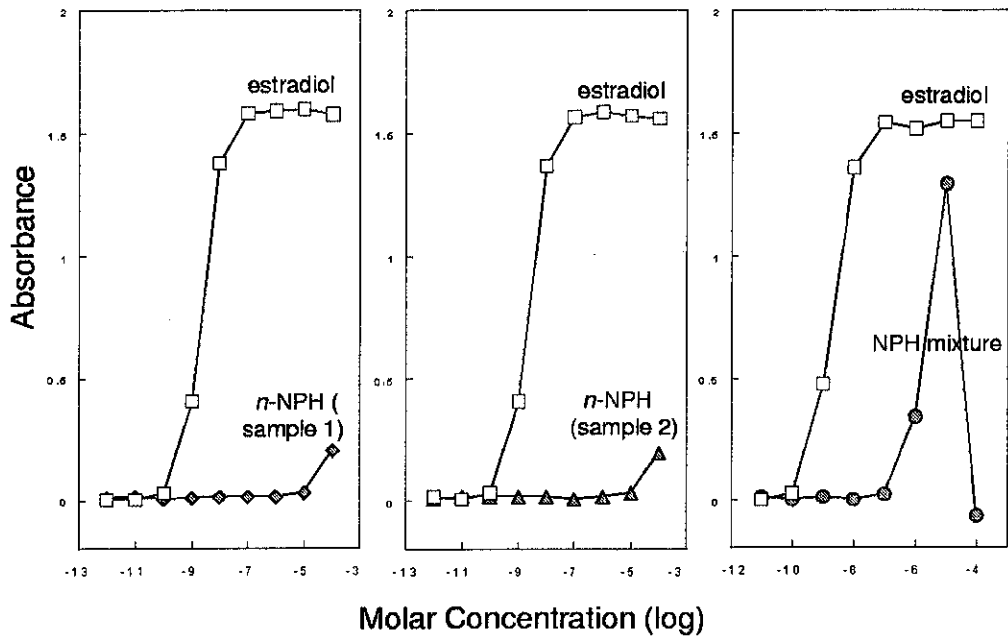


図 4: *n*-NPH と NPH 混合物のエストロゲン様活性の比較。

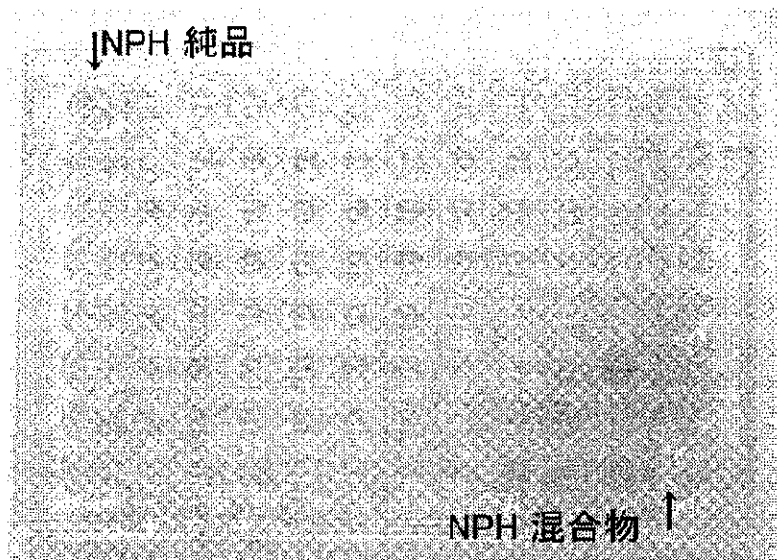


図 5: NPH 混合物中にはエストロゲン様活性を有する揮発性物質が存在する。96 穴のタイタープレートすべてのウェルに組換え酵母による検出系の完全な反応系を入れ、さらに対角線の両端には *n*-NPH 純品と NPH 混合物を加えて培養した。試料を添加しなかった右下のウェルの周囲のウェルに、活性を示す着色が現れている。

# 厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)

## (分担)研究報告書

### ヒト乳癌由来細胞株 MCF-7 を用いた

### エストロゲン様活性物質のスクリーニング

分担研究者 森友忠昭 日本大学生物資源科学部 講師

研究要旨: 分担研究者の井上らが組換え酵母系を用いた測定でエストロゲン様活性が認められた Dienestrol、Estrinol、NPH(混合物)等の3種類の物質について、MCF-7細胞系を用いて再検討した。MCF-7細胞系と組換え酵母系は、Dienestrol およびNPH(混合物)では同程度の検出感度であった。しかし、Estrinol は、MCF-7細胞系では酵母系と比べ、100倍低い濃度でも活性が認められ、両測定系で明らかな感度の違いが認められた。

#### 1. 目的

ヒト乳癌由来細胞株、MCF-7はエストロゲンレセプターを多く有し、エストロゲン依存的に増殖する。この性質を利用し、本細胞株はエストロゲン様活性を示す物質の評価に広く用いられている。

内分泌攪乱物質のスクリーニングには、MCF-7細胞の他、組換え酵母を用いる方法が知られており、これら2つの方法は、スクリーニングを確実にする目的で、同時に行う必要があるとされている。そこで、本研究では昨年度本研究の組換え酵母によるスクリーニングで活性の認められた、Dienestrol, Estrinol, NPH混合物等の化合物をMCF-7細胞を用いて比較し

た。

#### 2. 方法

##### 2.3. MCF細胞の継代・維持

MCF細胞の継代維持には、維持培地として10%ウシ胎仔血清加 Eagle's Minimum Essential Medium (MEM)を用い、1週間に2度、0.1%トリプシン加0.02% EDTA-PBS(-)を用いて細胞を分散し、新しいフラスコに継代した。

MCF-7細胞は東海大学医学部、坂部博士より分与された。

##### 2.4. アッセイ用培地の作製

通常のMEM中にはエストロゲン様活性を示すフェノールレッドが含まれており、また、ウシ胎仔中にも天然エストロゲンが存在する。そのため、アッセイ用培地にはフェノールレッドフリーのMEMを用い、ウシ胎仔血清は常法に従い、チャコール-デキスロランT-70で処理し、内因性のホルモンを除去したもの (CD-FCS) を使用した。

## 2.5. 被検物質の調整

内分泌攪乱物質の溶媒として、DMSO、エタノールなどが用いられる。まず、DMSOを用いて検討したところ、0.1%以下の濃度でMCF-7細胞の増殖を促進させることがわかった。一方、エタノールは0.1%以下の濃度で細胞の増殖に影響を与えないことが分かった。そこで、本実験では被検物質 (Estradiol-17 $\beta$ , Dienestrol, Estriol, NPH混合物) をエタノール中に溶解した原液 (2.5mM) を調整し、最終濃度で被検物質が $10^{-6}$ ~ $10^{-13}$ Mになるように、さらにエタノール濃度は0.1%以下になるように、被検物質を培地中に添加した。

## 2.6. アッセイ法

維持培地中で単層に増殖した、MCF-7細胞をトリプシン処理にて剥離させた後、5% FCS加MEM中に浮遊させ、24穴マイクロプレート1穴あたり $10^4$ 個づつ蒔き、36時間

培養した。その後、種々の濃度の被検物質を含むアッセイ用培地に交換し、5~6日間培養後、細胞数をカウントした。また、同時に、被検物質を含まないアッセイ用培地をnegative controlとして同様に培養後、細胞数を計数した。

## 3. 結果

### 3.1 エストラジオール 17 $\beta$ を用いた MCF-7 細胞系と組換え酵母系との比較

種々の濃度のエストラジオール 17 $\beta$  存在下で MCF-7 を培養したところ、図 1 のように、 $10^{-11}$ ~ $10^{-9}$ M の範囲で濃度依存性に MCF-7 が増殖し、 $10^{-8}$ M 以上の濃度において Negative control の約 4 倍の細胞増殖が認められた。このことは前年度井上らが報告した酵母系における感度とほぼ同程度であった (表 1)。

### 3.2 Dienestrol、Estriol、NPH (混合物) の活性測定と組換え酵母系との比較

エストラジオール-17 $\beta$  と同様の方法で、Dienestrol および NPH (混合物) の MCF-7 細胞の増殖に及ぼす影響を測定したところ、図 2 の様に Dienestrol では、 $10^{-11}$ ~ $10^{-9}$ M で濃度依存性が、また、NPH (混合物) では、 $10^{-9}$ ~ $10^{-6}$ M で濃度依存性が認められ、これら 2 種類の化合物に関しては、酵母系と同程度の検出感度であった。一方、Estriol では組換え酵母

系の場合、 $10^{-9}$ ~ $10^{-7}$ Mで濃度依存性が認められるのに対して、MCF-7細胞系では、 $10^{-11}$ ~ $10^{-9}$ Mの範囲で濃度依存性が認められ、MCF-7細胞系は、酵母系に比べ100倍低い濃度でも活性が認められた。

#### 4. 考察

両測定系で異なった結果が出ることはすでにいくつかの化合物で知られている(文献1.)。今回行った3種類の化合物の内、EstriolにおいてMCF-7細胞系と組換え酵母系の結果に明らかな差が認められ、Estriolが両測定系で異なる挙動を示す物質の一つであることが明らかになった。これらのことから、日常生活用品中の化学物質のスクリーニングにおいても両測定系を組み合わせる必要があると考えられた。

#### 5. 文献

1. 坂部 貢:ヒト乳癌培養細胞株(MCF-7)を用いた内分泌攪乱物質の評価. In vitro 発生毒性研究会要旨集(XVIII)、1998年.



表 1. MCF-7 細胞系と組替酵母系の検出限界比較

被検物質	MCF-7細胞系	組替酵母系
Estradiol	$\sim 10^{-10}$ M	$\sim 10^{-11}$ M
Estriol	$\sim 10^{-10}$ M	$\sim 10^{-8}$ M
Dienestrol	$\sim 10^{-10}$ M	$\sim 10^{-10}$ M
hexestrol	$\sim 10^{-10}$ M	$\sim 10^{-9}$ M
NPH(mixture)	$\sim 10^{-6}$ M	$\sim 10^{-7}$ M

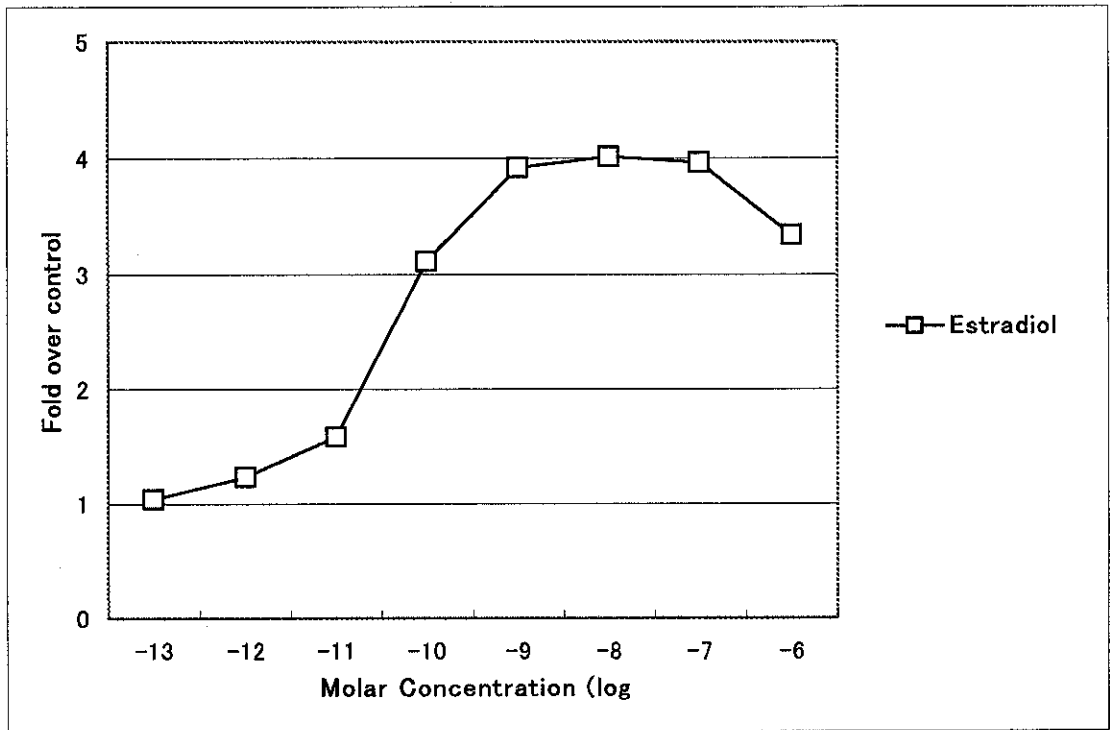


図 1: エストラジオール  $17\beta$  存在下での MCF-7 細胞の増殖

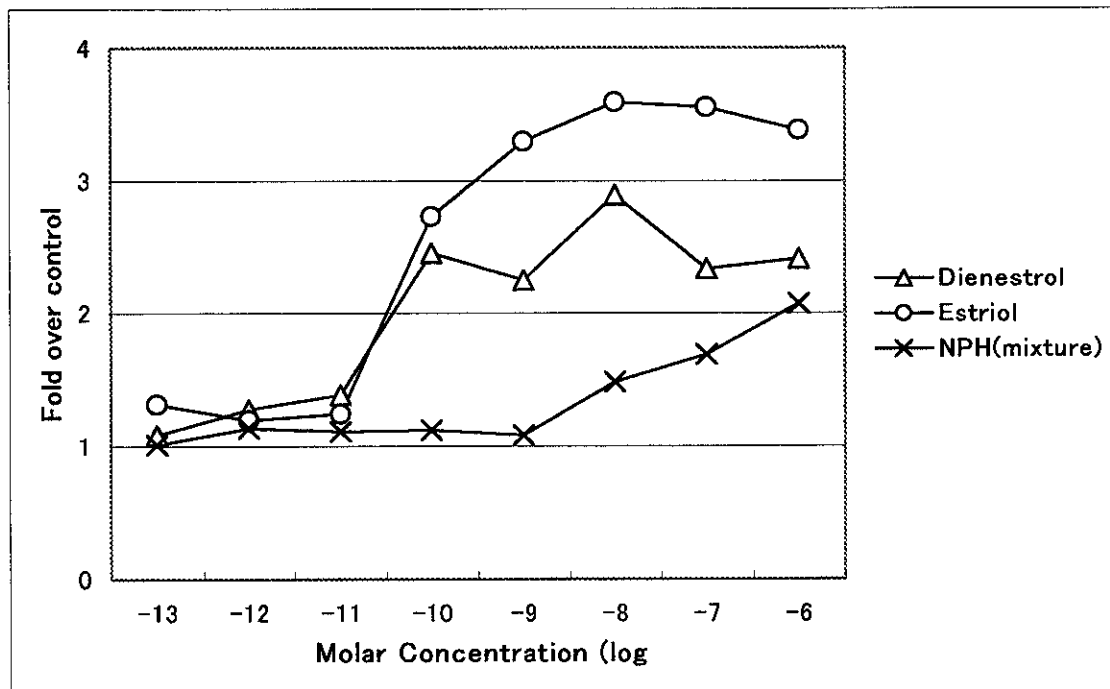


図 2: 各種被検物質存在下での MCF-7 細胞の増殖

# 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.

19990632

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

### 「研究成果の刊行に関する一覧表」

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.

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-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.

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.

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-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.

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.