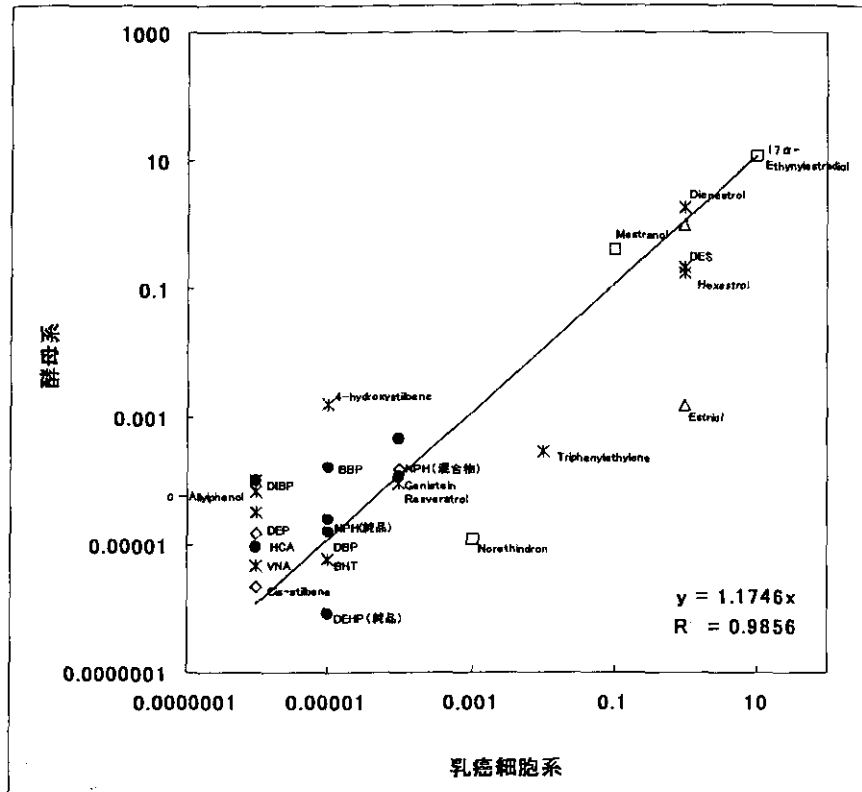


表2 生活環境中の化合物のエストロゲン様活性作用強度（ラット膣スメアテスト）

供試化合物	活性最少投与量 (g)		作用効果強度 (E : unit/g)	
	今 回	Dodds	今 回	Dodds
Estradiol (E <sub>2</sub> )* <sup>1</sup>	1x10 <sup>-6</sup>	—	1.0x10 <sup>6</sup>	—
Estriol	—	—	—	—
Ethynylestradiol (EE <sub>2</sub> )* <sup>1</sup>	1x10 <sup>-6</sup>	—	1.0x10 <sup>6</sup>	—
Mestranol* <sup>2</sup>	1x10 <sup>-5</sup>	—	1.0x10 <sup>5</sup>	—
Norethindrone	—	—	—	—
Diethylstilbestrol (DES)* <sup>1</sup>	1x10 <sup>-6</sup>	4x10 <sup>-7</sup>	1.0x10 <sup>6</sup>	2.5x10 <sup>6</sup>
Dienestrol* <sup>1</sup>	1x10 <sup>-5</sup>	5x10 <sup>-7</sup>	1.0x10 <sup>5</sup>	2.0x10 <sup>6</sup>
Hexestrol* <sup>3</sup>	1x10 <sup>-2?</sup>	1x10 <sup>-2</sup>	1.0x10 <sup>2?</sup>	1.0x10 <sup>2</sup>
4-allylanisole	—	—	—	—
Anethole	—	—	—	—
Genistein* <sup>3</sup>	1x10 <sup>-1?</sup>	—	1.0x10 <sup>?</sup>	—
Reveratrol* <sup>3</sup>	>1x10 <sup>-1</sup>	—	<1.0x10	—
Ferulic acid (FRA)* <sup>3</sup>	>1x10 <sup>-1</sup>	—	<1.0x10	—
4-Hydroxycinnamic acid(HCA)	—	—	—	—
Synapic acid (SNA)	—	—	—	—
Vanillic acid (VNA)	—	—	—	—
4-Hydroxybenzoic acid(HBA)	—	—	—	—
Triphenylethylene	1x10 <sup>-2?</sup>	1x10 <sup>-2</sup>	1.0x10 <sup>2?</sup>	1.0x10 <sup>2</sup>
Propylphenol	>1x10 <sup>-1</sup>	—	<1.0x10	—
<i>cis</i> -Stilbene	—	—	—	—
<i>trans</i> -Stilbene	—	1x10 <sup>-2</sup>	—	1.0x10 <sup>2</sup>
<i>o</i> -allylphenol	—	—	—	—
4-Hydroxystilbene	—	1x10 <sup>-2</sup>	—	1.0x10 <sup>2</sup>
<i>i</i> -Nonylphenol ( <i>i</i> -NPH)	1x10 <sup>-1</sup>	—	1.0x10	—
<i>n</i> -Nonylphenol ( <i>n</i> -NPH)	—	—	—	—
Bisphenol A (BPA)	1x10 <sup>-1</sup>	1x10 <sup>-1</sup>	1.0x10	1.0x10
Butylhydroxytoluene(BHT)	—	—	—	—
Benzyl <i>n</i> -butylphthalate(BBP)	>1x10 <sup>-1</sup>	—	<1.0x10	—
Di- <i>iso</i> -butylphthalate (DIBP)	—	—	—	—
Di- <i>n</i> -butylphthalate (DBP)	>1x10 <sup>-1</sup>	—	<1.0x10	—
Diethylphthalate (DEP)	>1x10 <sup>-1</sup>	—	<1.0x10	—
Di-2-ethylhexylphthalate(DEHP)	>1x10 <sup>-1</sup>	—	<1.0x10	—
Di- <i>i</i> -nonylphthalate (DINP)	>1x10 <sup>-1</sup>	—	<1.0x10	—
Di-cyclohexylphthalate (DCHP)	—	—	—	—
Di- <i>n</i> -heptylphthalate (DHP)	—	—	—	—
Adipate (di- <i>n</i> -C <sub>6,8,10</sub> )	—	—	—	—
Di-2-ethylhexyladipate(DEHA)	—	—	—	—



相関  
 \* : Dodds 関連物質、 ● : プラスチック関連物質、 ◇ : 天然物成分化合物、  
 □ : 医薬品、 △ : 天然エストロゲン成分化合物

図1 in vitro二系（組み換え酵母系及び乳癌細胞系）測定値の相関

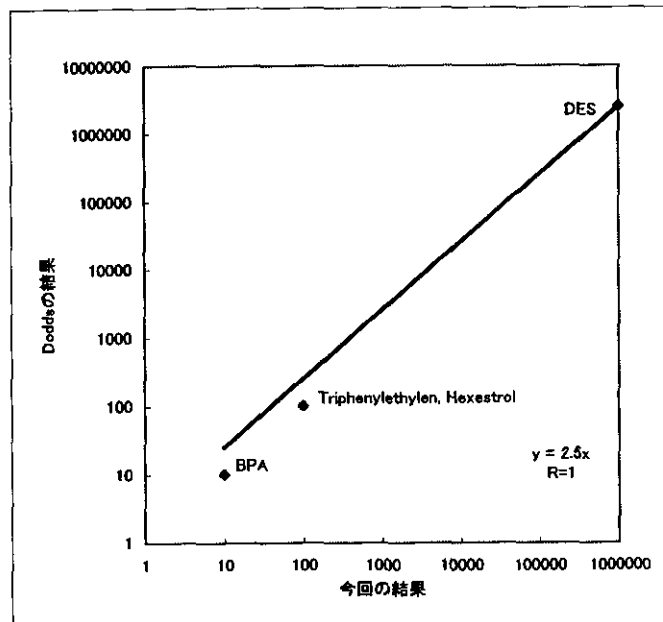


図2 Dodds と今回のin vivo ラット腔スメアテスト測定値の相関

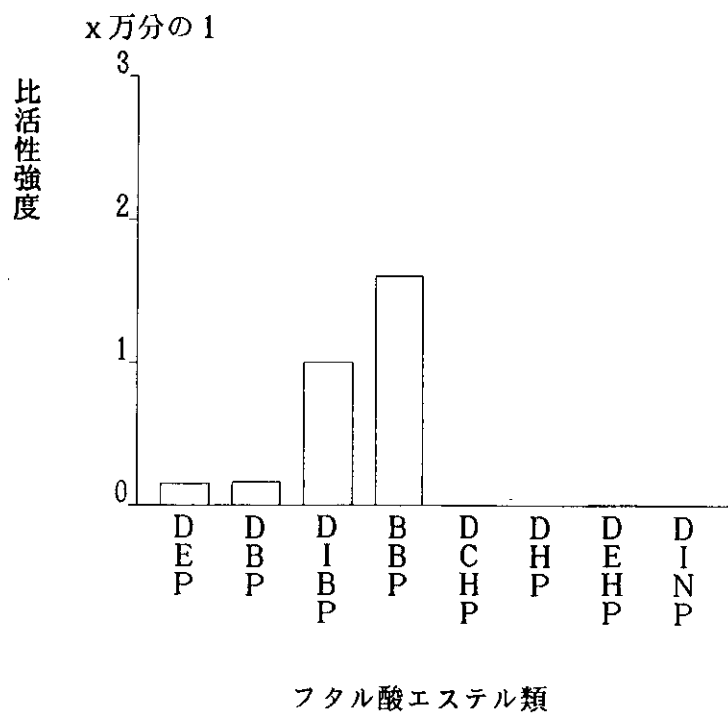


図3 フタル酸エステル類のエストロゲ様活性の比強度（組み換え酵母系測定）

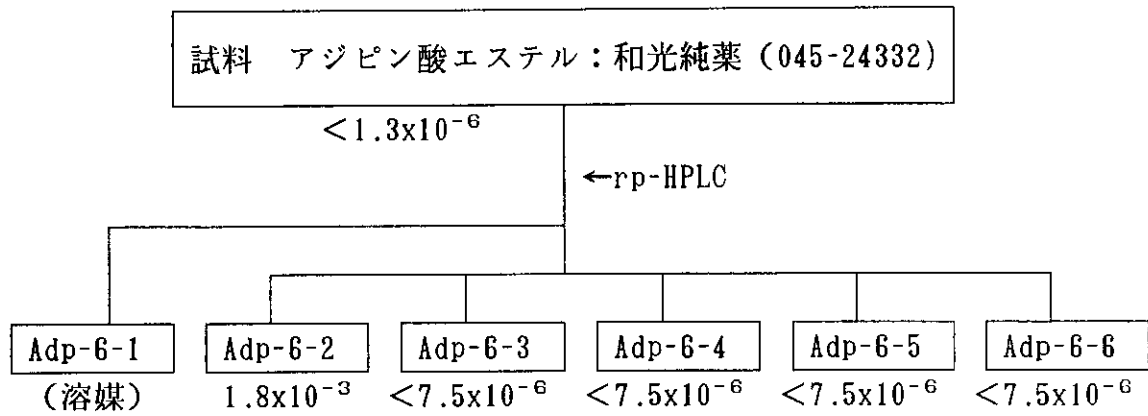


図4 アジピン酸エステル（市販品\*1）の分画  
\*1：業務用食品包装材ラップ（R40）の成分

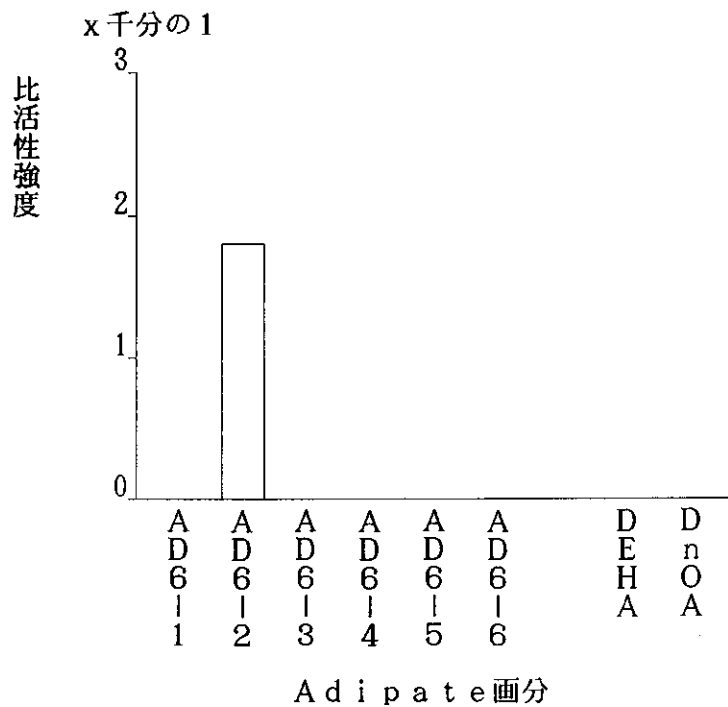


図5 アジピン酸エステル（市販品\*1）の画分のエストロゲン様活性の比強度  
（組み換え酵母系測定）

DEHA：アジピン酸ジエチルヘキシル：DnOA：アジピン酸ジnオクチル

\*1：和光純薬（045-24332）／業務用食品包装材ラップ（R40）の成分



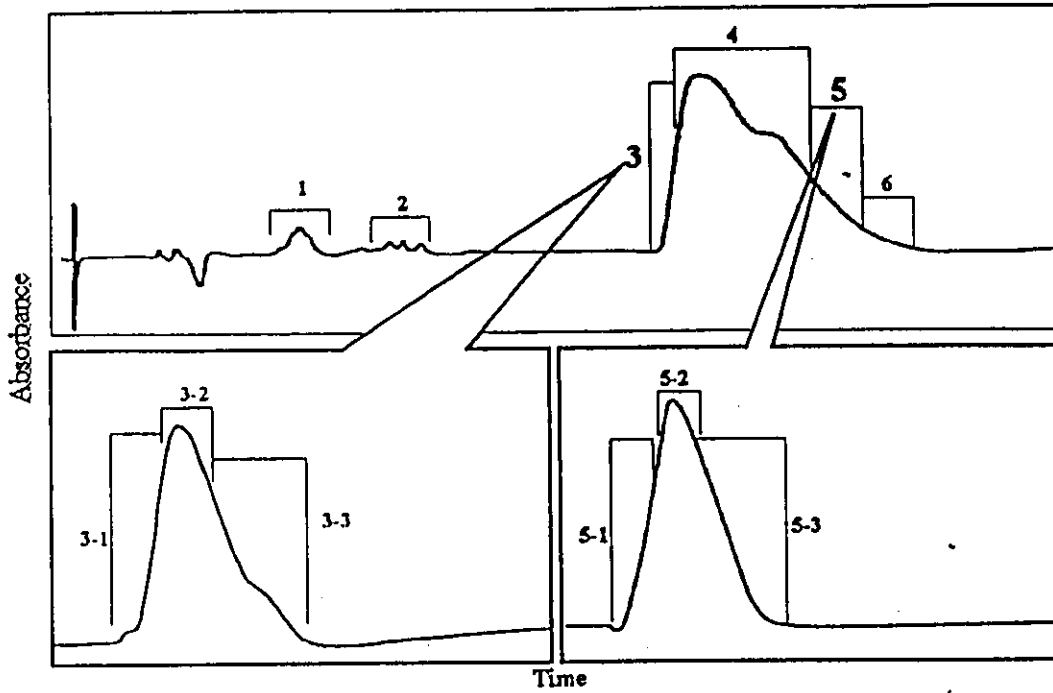


図8 ノニルフェノール（市販品）のHPLCによる分画  
 図に示された各画分のエストロゲン様活性は表1および図4に示されている。

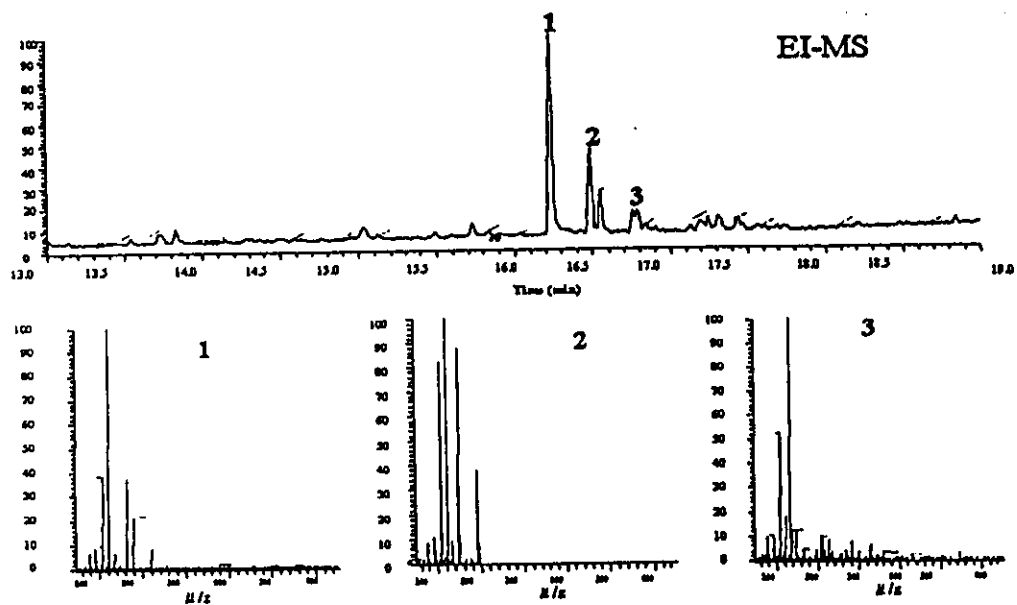


図9 ノニルフェノール（市販品）のHPLCによる画分（Frac.3）のGCクロマトグラム  
 画分3はさらに分画されることが示される。MSでノニルフェノールの異性体である  
 ことを確認。

## 組み換え酵母実験による揮発性化合物の隣接ウェルへの影響 の検討と生活環境関連化合物のエストロゲン様活性検索

分担研究者 片瀬隆雄 上田眞吾 日本大学生物資源科学科

研究要旨: エストロゲン様活性を有することが知られている市販されているノニルフェノール (*i*-NPH) を人工酵母でアッセイしてたところ、実験に用いるマイクロタイタープレート上で隣接ウェルに影響を与えていることが懸念される結果を得た。そこで、これまでに試供した合わせて 37 種化合物の隣接ウェルへの影響を検討したところ、その原因はこの *i*-NPH の揮発性にあると考え、その定量的な影響度合いと、影響を与えない条件について揮発性を得たのは *i*-NPH のみであることが分かった。その防止策を検討したうえで、合計 37 種化合物の組み換え酵母系によるエストロゲン活性を検索した。

藤本康雄 日本大学薬学部・教授  
(研究協力者)

### 1. 研究目的

ノニルフェノール (NPH) は現在我々の生活環境中で広く使用され、主に工業用界面活性剤として、あるいはプラスチック製品への添加剤として極めて大量に用いられている重要な化成品の一つである。ノニルフェノールはエストロゲン活性を有することが知られている 1)~3)。市販されているノニルフェノール (*i*-NPH) を人工酵母でアッセイしてたところ、

実験に用いるマイクロタイタープレート上で隣接ウェルに影響を与えていることが懸念される結果を得た。その原因はこの *i*-NPH の揮発性にあると考え、その定量的な影響度合いと、さらに合わせて 37 種化合物の揮発性を検討したところ、本実験の範囲で揮発性のあるのは *i*-NPH のみであることが分かった。その防止策を検討したうえで、合計 37 種化合物の組み換え酵母系によるエストロゲン活性を検索した。

## 2. 材料および器具

### 2-1. 酵母

本実験に使用した組み換え酵母は、Dr. Sumpter (Brunel University, UK) らによって作製された組み換え酵母の継代 2 代目を使用した。この人工酵母は、より迅速簡便にエストロゲン様活性を測定することができる特性を備えている。

### 2-2. 検体

次の 37 種市販化合物を 2.5 mM (培地中の濃度で  $1 \times 10^{-4}$  M) になるように dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した検体を使用した。Estradiol (東京化成), SopheA (帝国臓器), Diethylstilbestrol (東京化成), Resveratrol (米国シグマ社), Anethole (関東化学), 4-allylanisole (関東化学), Dienestrol (東京化成), Adipates ( $C_6 \sim C_{10}$ ) (和光純薬), 4-hydroxycinnamic acid (HCA) (米国シグマ社), Ferulic acid (FRA) (米国シグマ社), Estriol (東京化成), Estrone (東京化成), *n*-Nonylphenol (関東化学), Propylphenol (米国メルク社), *o*-allylphenol (関東化学), Genistein (和光純薬), Sinapic acid (SRA) (米国シグマ社), 4-hydroxybenzoic acid (HBA) (米国シグマ社), Vanillic acid (VNA) (米国シグマ社), *cis*-stilbene (米国メルク社), *trans*-stilbene (関東化学), Hexestrol (米国シグマ社), Triphenylethylene (関東化学), 4-hydroxystilbene (ACROS), Di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) (supelco), *i*-Nonylphenol (東京化成), Di-2-ethylhexyladipate (DEHA) (和光純薬), Di-*n*-octyladipate (CHEM.SERV), 17  $\beta$ -ethynylestradiol (東京化成), Norethindrone (ICN), Mestranol (ICN), Butylhydroxytoluene (BHT) (和光純薬), Di-*n*-butylphthalate (DBP) (関東化学), Benzylbutylphthalate (和光純薬), Diethylphthalate (関東化学), Dicyclohexylphthalate (関東化学) の 37 種

化合物および DEHP, BHT, DBP の混合物 1 種。その他エストロゲン様活性検索化合物は表 2 に示す。

### 2-3. 試薬および培地の調製

#### 2-3-1. 試薬の調製

50 ml 超純水に  $Fe_2(SO_4)_3 \cdot nH_2O$  [和光純薬] 53.5 mg を加え、 $Fe_2(SO_4)_3$  solution を調製した。Biotin [和光純薬] 5.0 mg に 250 ml 超純水を加え、Biotin solution を調製した。180 ml 超純水に Thiamine [和光純薬] 8.0 mg, Pyridoxine [和光純薬] 8.0 mg, Pantothenic Acid [和光純薬] 8.0 mg, Inositol [和光純薬] 40 mg, Biotin Solution (2.0 mg/100 ml  $H_2O$ ) 20 ml を加えて Vitamin solution を調製した。30 ml 超純水に L-Aspartic acid [和光純薬] 120 mg を加えて L-Aspartic Acid solution を調製した。10 ml 超純水に L-Threonine [和光純薬] 240 mg を溶解して L-Threonine solution を調製した。10 ml 超純水に Copper (II) Sulfate [和光純薬] 32 mg を加えて Copper (II) Sulfate solution を調製した。10 ml 超純水に Chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside [和光純薬] 100 ml を加えて Chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG) stock solution を調製した。以上の各溶液を調製した後、0.2  $\mu$ m pore size filter で滅菌し、各溶液を 4°C で保存した。300 ml 超純水に D-(+)-Glucose [和光純薬] 80 mg を溶解し、さらに超純水で、全体で 400 ml になるまで加え D-(+)-Glucose solution を調製した。Glycerol [和光純薬] 25 ml を超純水で全体で 50 ml になるまで加え 50% Glycerol を調製した。以上の各溶



液を調製後、オートクレーブ滅菌後、各溶液を 4℃で保存した。

## 2-3-2. 培地の調製

### (a) Minimal Medium (pH 7.1)

900 ml の超純水に  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  [和光純薬] 13.61 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  [和光純薬] 1.98 g, KOH Pellets [和光純薬] 4.2g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  [和光純薬] 0.41g,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  Solution (53.5 mg/50 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) 1 ml, L-Leucine [和光純薬] 50 mg, L-Histidine [和光純薬] 50 mg, Adenine-硫酸塩  $2\text{H}_2\text{O}$  [和光純薬] 74.8 mg, L-Arginine- HCl [和光純薬] 20 mg, L-Methionine [和光純薬] 20 mg, L-Tyrosine [協和発酵工業株式会社] 30 mg, L-Isoleucine, [和光純薬] 30 mg, L-Lysine-HCl [協和発酵工業株式会社] 150 mg, 30 mg, L-Phenylalanine, [和光純薬] 25 mg, L-Glutamic acid [和光純薬] 100 mg, L-Valine [協和発酵工業株式会社], L-Serine [和光純薬] 375 mg を加え、超純水で全体を 1 ℓ 溶液を調製し、その溶液をオートクレーブ滅菌後、Minimal Medium (pH 7.1) として室温で保存した。

### (b) Growth Medium

22.5 ml minimal medium に 2.5 ml glucose solution, 625  $\mu\text{l}$  L-aspartic acid solution, 250  $\mu\text{l}$  vitamin solution, 200  $\mu\text{l}$  L-threonine solution, 62.5  $\mu\text{l}$  copper (II) sulfate solution を加え Growth Medium を調製し、室温で保存した。

### (c) Assay Medium

25 ml の growth medium に 250  $\mu\text{l}$  の CPRG を加え、さらに、24 時間培養した  $4 \times 10^7$  yeast cells (2.0 ml~2.5 ml の間) を加えて Assay Medium を調製した。

### (d) YPD plate

900 ml 超純水に Bact Pepton [和光純薬] 20 g, Yeast Extract [和光純薬] 10 g, 更に Bact Ager [和光純薬] 20 g を溶かし、オートクレーブ滅菌後冷後、glucose solution 100 ml を加えて、溶液 (YPD) を調製した。その後、petridish に YPD を約 25 ml ずつ加えて作製した。各 plate をラップで包んで 4℃で保存した (Routledge and Sumpter, 1996; Routledge and Sumpter, 1997)。

## 2-4. 実験器具および装置

振とう機は Orbital Shaker (TAITEC, BIO-SHAKER BR-40LF) を使用し、その成長曲線を見るための吸光度測定に分光光度計 (BECKMAN, DU-65 Spectrophotometer) を用いた。活性測定用の培養に 96-well Flat Bottom Microtitre Plate (FALCON) を用いた。yeast の培養器は Incubate Box (TAIYO, M-210) を用いて培養した。エストロゲン用活性の吸光度測定に MICRO PLATE READER, MPR A4 (TOSOH) を用いた。また、yeast stock 作成の際には、冷却遠心機 (TOMY SEIKO, RS-20BH) を用いた。

## 3. 方法

### 3-1. Yeast stock の調製と酵母生長曲線

#### 3-1-1. Yeast stock の調製

-80℃ で凍結保存された yeast を 1 ml

メスピペットで掻きだし、YPD plate に植菌した。2日後、single colony を 1 ml メスピペットでとり、約 50 ml growth medium に加え、orbital shaker (28°C、100 shakes/min) でおよそ 48 時間培養した。yeast stock の作成は、冷却しながら行った。培養液を 50 ml centrifuge tube へ移し、冷却遠心機 (4 °C, 10 minutes, 2000 g) にかけて、上澄みをメスピペットで取り除く。その後、あらかじめ作製していた 15 % glycerol (minimal medium 10 ml に glycerol 3 ml を加えたもの) を 5 ml を加えて攪拌した。作製した溶液をメスピペットで 2.0 ml sterile cryovial に 0.4 ml ずつ分注し、作成時に使用した sterile cryovial 立てにいれたのまま、-80 °C で保存し、約 2 時間後に -80 °C の box へ移しかえて保存した。

### 3-1-2. Yeast の培養と成長曲線

本培養に用いる yeast の菌数を  $4 \times 10^7$ /ml にするために、前培養を行った。つまり、growth medium 約 25 ml に -80°C で凍結保存された yeast を室温で放置して解凍し、62.5  $\mu$ l 加え、orbital shaker (28°C, 100 shakes/min) で培養した。培養時間に伴う yeast の菌数を把握するために、1~2 時間置きに分光光度計で OD 値を測定し、同時に minimal medium で培養液を希釈して YPD plate へ植菌し、28°C で培養した。2 日後、YPD plate 上の yeast colony を数えて 1 ml 当たりの yeast 数を計算した。

### 3-2. エストロゲン様活性物質のスクリーニング法

組み換え酵母によるエストロゲン様活性の定量化実験を行う際には、1 枚の 96-well flat bottom microtitre plate (縦番号 ; A~H, 横番号 ; well 1~well 12) の A に、positive control の estradiol を、また H に negative control の DMSO を統一して用いた。

また、サンプルの希釈は以下のようにして行った。

はじめに、96-well flat bottom microtitre plate の実験前に決めた列の well 2~12 に DMSO を 90  $\mu$ l ずつ分注する。次に、同列 well 1 にサンプルを 30  $\mu$ l 入れ、そこから 10  $\mu$ l とって、well 2 に希釈する。同様の手順で、必要希釈倍率まで希釈を行う (通常は well 12 まで希釈を行う)。

#### (a) 揮発性確認法

96-well flat bottom microtitre plate の 4 隅 (A well 1, H well 1, A well 12, H well 12) に 10  $\mu$ l のサンプル (原濃度) を入れる。また、サンプルを分注した well より、well 2 個分までのすべての well に DMSO を 10  $\mu$ l ずつ分注する。その後、assay medium を DMSO が入った well より先に 200  $\mu$ l ずつ分注し、28°C ルームで 3 日間培養した。

#### (b) 揮発影響度定量法 (A 法)

6 枚の 96-well flat bottom microtitre plate を使用して、中心に位置する well D 6 に DMSO で希釈したサンプル希釈倍率、 $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、

をそれぞれ  $10\ \mu\text{L}$  ずつ入れ、各 plate の well D6 を中心に、その上方向 (up)、下方向 (down)、右方向 (right)、左方向 (left) の well 18 個に  $10\ \mu\text{L}$  ずつ DMSO のみを分注する。その後、はじめに DMSO が入った well に assay medium を  $200\ \mu\text{L}$  ずつ分注し、最後にサンプルが入った well D6 に  $200\ \mu\text{L}$  assay medium を分注し、 $28^\circ\text{C}$  ルームで 3 日間培養し、隣接 well への影響度合いを検討した。

### (c) B 法

1 枚の 96-well flat bottom microtitre plate の D well 1 から  $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$ 、希釈倍率のものをそれぞれ  $10\ \mu\text{L}$  分注し、well 12 から well 1 に向かって  $200\ \mu\text{L}$  の assay medium を分注していく。その後、 $28^\circ\text{C}$  ルームで 3 日間培養した。

### 3-3. 測定法

エストロゲン様活性分析の測定は、マイクロタイタープレートを用いて行った。 $540\ \text{nm}$  で吸光度を測定するが、その時同時にマイクロプレートリーダーによりすべてのデータは  $620\ \text{nm}$  の吸光度測定で、濁り分が引かれる。以下にはその計算式を示す。

$$\text{Absorbance} = \text{chemical absorbance (540 nm)} - \text{chemical absorbance (620 nm)}$$

この時、マイクロプレートリーダーによって測定されたデータは、直接パソコ

ンの中に保存されるが、その時の状態はただの数字の羅列に過ぎない。エストロゲン様活性を求めるには、さらににそのデータを excel に移して negative control の平均値を算出し、それぞれのデータから negative control の平均値を差し引く必要がある。

### 3-4. エストロゲン様活性算出法

マイクロプレートリーダーによって読み込まれたデータから、エストロゲン様活性値を算出するには excel を用いて negative control の平均値を差し引かれたそれぞれのデータからグラフを作製しなければならない (グラフの横軸を molar concentration とし、縦軸を absorbance とする)。グラフの最高活性値 (最高吸光度) の半数値の濃度をエストロゲン様活性濃度 (半値最大濃度; Half Maximal Conclusion; HM) とし、対数グラフを用いた比計算をした後、それぞれのサンプルの濃度計算を行い、絶対値を算出した。

### 3-5. 市販製品の分画

#### 3-5-1. アジピン酸エステル

2000 年の分析結果により、相対的に活性が強度であった業務用ラップ (R40) は、質量分析計による解析の結果、市販のアジピン酸 n-アルキル (和光純薬、045-24332) と同一であることが分かっている。そこで、ラップ (R40) 容出物に代えて、市販品を分取し、本分離、分取操作を行った。本分離、分取操作の概略を図 5 に示す。また、操作および分析条件を以下に示す。

TLC: シリカゲル上で混合溶剤 (メタノ

ール: 5 % 硫酸 = 95: 5) で展開。

GLC: 一定のカラム温度 (100 °C for 2 min ~ 280 °C at 10 °C/min for 15 min) のカラム URBON HR-1 (25 mx 0.25 mm, id, 0.25 μm 層厚) 中を、一定のヘリウム流速 (28.7 cm/sec) で走行。FDI 検出器。

HPLC: Capcell Pak C-18 充カラム (250 mmx10mmid) 中を 95 % エタノールは一定の流速流厚 (3ml/min, 4.3 Mpa) で走行。UV 225 nm および至差屈折率 (RI) 検出器。

MS: JOEL GC mate 装置の direct probe inlet 法で注入し、EI イオン化法で測定。

NMR: <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C-NMR スペクトルは JOELGSX-400 装置で溶媒 CDCl<sub>3</sub> 中で TMS を内標準として測定。

### 3-5-2. ノニルフェノール

2000 年の結果により市販品のノニルフェノールにもエストロゲン様活性が認められ、これらをさらに分離、精製した。

ノニルフェノール混合物の分離、精製は、市販のノニルフェノール混合物 (TOKYO KASEI NO 300) 2.07 G を順相 HPLC (カラム: pegasil silica 20 mm<sup>φ</sup> × 250 mm 溶媒: Hex: AcOEt (30: 1) 流速: 12 ml/min) で分離、清々し NPH 3~6 の 4 個のフラクションを得た。ここで、エストロゲン様活性試験 ( ) を行ったところ、NPH 5-2 NPH 5-3 に特に強い活性が認められた。この 2 個のフラクションを GC-MS ( ) で検出したところ、混合物であることが確認できたので、これらを逆相 HPLC (カラム: CAPCELL PAK C18 UG 120A 10 mm<sup>φ</sup> × 250 mm 溶媒: 65 % CH<sub>3</sub>CN 流速: 3ml/min) で分離、精製し NPH 5-2-1~10, NPH 5-3-1~8 の 19 個のフラクションを得た。 ( ) これらの中で収量が多く、比較的明瞭なピークが認

められた NPH 5-2-6 と NPH 5-2-7 および NPH 5-3-5 と NPH 5-3-7 について <sup>1</sup>H<sup>13</sup>, C-NMR スペクトルで構造解析を行った。

## 4. 結果

### 4-1. 検体揮発性結果

37 種化合物の揮発性の有無を検討した。その結果、揮発して隣接 well に影響を与えていると考えられる化学物質は *i*-nonylphenol のみであった (図 1)。この確認実験で、サンプルとして用いた化学物質が揮発していれば、その周りの negative control は揮発の影響を受け、黄色から赤色に変わる。図 1 は、各化合物の well の吸光度 (a) を 100% とし、隣接 well の最大吸光度 (b) との比  $b/a \times 100$  を影響度 (%) で示したグラフである。つまり、38 サンプル中、*i*-nonylphenol のみが揮発の影響を受けていると判断された。

### 4-2. 隣接ウェルの影響度

*i*-NPH 検体揮発性結果のデータをもとに、隣接 well に与える影響の度合いについて検討した。揮発影響度定量法として、A 法を用いて検体 (*i*-NPH) からの上方向 (up)、下方向 (down)、右方向 (right)、左方向 (left) の各方向および距離にある well への影響を、well D6 の検体 10<sup>-5</sup> M の吸光度を 100% とし算出した結果、well 3 個分以上離れると、揮発の影響は受けないと判断される結果

を得た (図 2)。

### 4-3. 揮発影響度比較結果

揮発性化合物が隣接 well に影響を与えることが分かったことにより、その揮発の影響が活性濃度にどれ位影響したかについて、*i*-NPH を用いて、A 法 (揮発の影響を受けない系)、B 法 (揮発の影響を受ける系) でアッセイした結果を比較し、検討を行った。結果、影響を受けたまま活性を計算すると、約 20% だけエストロゲン活性強度が増する結果を得た (表 1、図 3)。

### 4-4. エストロゲン様活性検索結果

エストロゲン様活性検索の結果を表 2 に示す。活性は 17  $\beta$ -Estradiol の活性に対する比 (比活性強度:  $R_{\text{yeast}}$ ) として示した。

## 5. 考察

### 5-1. 検体揮発性

*i*-NPH に揮発性があることが明らかになり、これまでに組み換え酵母を用いてエストロゲン様活性を測定してきたサンプルに揮発性がなかったか改めて確認実験を行う必要が生じた。

今回、揮発性の有無を確認した結果では、37 種化合物のうち *i*-NPH のみに揮発性が確認された。しかし、既に方法にも記したように、本実験で使用している組み換え酵母には、ヒトエストロゲンリセプターしか組み込まれておらず、そ

の他のホルモン様活性には対処し得ないものである。よって、今回の確認実験では揮発しないとされた化合物でも、他の環境ホルモン、例えばアンドロジェン様活性物質のみが揮発している可能性も否定は出来ないものであり、本実験で得た結果は、あくまでエストロゲン様活性物質に対しての揮発性の有無の結果であることを承知しなければならない。

### 5-2. 隣接ウェルへの影響度

揮発性化合物のエストロゲン様活性の定量化は非常に困難である。*i*-NPH の隣接 well への影響度合いを定量化をする実験でも、再現性ある結果は得られなかった。揮発性化合物のスクリーニングの過程の中で最も重要であると思われるのが、28°C incubater で 3 日間培養するという過程である。28°C incubater で 3 日間培養する前と後とでは、3 日間培養した後の方が培養液の蒸発が目でも確認される程に明らかであり、常に約 30% ~70% の蒸発が確認され、ひどい時には、培養液のそのほとんどが蒸発してしまう結果も得た。空気に触れる度合いが大きい 96-well flat bottom microtitre plate の端の well 程、中心部よりも蒸発が目立った。本実験で使用した incubate box は 3 段で区切られ、上から風を送ることによって温度を下まで行き渡せる仕組みになっている。この 28°C incubater の中は、常に風量とその方向、温度、湿度が一定に保たれているわけではなく、同じ場所に固定して置いても実験毎に揮発する向き (上方向、下方向、右方向、左方向) は異なり、また揮発の程度にも大

きな差異が見られた。

また、隣接 well への影響度結果として提示した図 2 は A 法により出た結果であり、96-well flat bottom microtitre plate の一連でスクリーニングする B 法では、各の希釈倍率の化合物がそれぞれ互いどのように影響しあっているかについては解らない。

### 5-3. 揮発影響度比較結果

揮発影響度比較結果 (表 1、図 3) では、影響を受ける系、すなわち B 法の方が約 20 % 吸光度が増した。しかしながら、人工酵母を用いるスクリーニングでは 20 % の吸光度の差は誤差の範囲であると言え、隣接 well に影響を与える B 法でも実験が可能だと言える。

### 5-4. スクリーニング方法

本実験では揮発性化合物のスクリーニング方法として 4 方法を行った。1 つは揮発の影響を受けない系の A 法である。2 つは揮発の影響を受けて 1 枚のプレートに 1 サンプルを一連でアッセイする B 法である。3 つは B' 法と称し、従来行っていた 96-well flat bottom microtitre plate 上の最上列の A 列に positive control の estradiol を、また H の列には positive control として DMSO のみを培養し、他のすべての列にサンプルを一連でアッセイする方法である。4 つは C 法と称し、一連でアッセイする際にパラフィルムで密閉する方法である。

揮発性化合物をアッセイする際のスクリーニング方法は重要であると思われる。

何故なら、揮発性化合物は温度、湿度にその揮発の程度が大きく左右され、本培養実験時の時間が長くなれば長くなる程、揮発の程度が大きくなり、また、実験時の温度が高ければ高い程、湿度が低ければ低い程に揮発の程度が大きくなり、これは実験結果にも大きな影響を与えると考えられるからである。

これら 4 つの異なる方法の良い点、悪い点を考えると、A 法はそれぞれの希釈濃度にそれぞれ一枚ずつプレートを使用し、互いの影響を受けることはないが、一連で行うよりも手間とお金がかかり、さらに時間もかかることから、実験系としてはあまり好ましくないと思われる。B 法は手間と時間はかからないが、互い隣接する well が影響し合うことから実験系として再現性に乏しく、揮発性化合物のスクリーニング方法としては最適とは言えない。B' 法はいくつものサンプルがそれぞれに影響し合い、さらに、本来発色しえない negative control も赤色に発色してしまい、B 法よりもはるかに再現性に乏しいと言え、揮発性化合物のスクリーニング方法としては不適切である。C 法は一連で行うため時間と手間も省け、またパラフィルムで密閉するので、隣接する well に影響を与えないことから本実験に適していると考えられる。C 法については、「5-6. 防止策」のところで詳しく述べることにする。

### 5-5. 培養環境

揮発性化合物のスクリーニング方法を検討した上で、培養条件を考えることはさらに重要であると考えられる。何故なら、

「5-2. 隣接 well への影響度」でも議論したように、揮発の程度は 28°C incubate box 内の培養環境に大きく依存するからである。培養環境を考慮する際には 2 つのキーワードが考えられる。1 つめは、28°C incubate box 内の湿度である。本実験で用いた 28°C incubate box の内部で送られる風は、外から取り込んだ空気をフィルターを通してから内部で送風しているため、内部の湿度は外の湿度に由来するもので、当然、外の湿度の高い時期には内部も湿度も高く、揮発の度合いも低くなるが、逆に外の湿度が低い時期には内部の湿度も低く、揮発の度合いが大きくなると言える。2 つめは、28°C incubate box 内の送風方向である。外部から取り込まれた空気は、28°C incubate box の内部の天井に位置する所から下に向かって送り込まれている。既に内部構造が 3 段であることは述べたが、ここは常に複数の者が 28°C incubate box を利用しているわけだから、プレート類の置かれている場所、数が送られる風の障害物となって、風の送られる方向は散乱し、実験毎に送風方向とその強さは異なると言える。このことから、常に同じ位置で培養しても風が送られる向きと強さが異なるわけであるから、揮発の程度にも差異が見られるのは必然であると考えられる。

## 5-6. 防止策

揮発性化合物のスクリーニングは非常に難しく、再現性を得るのは困難ということは再三に渡って述べた。しかし、そうした中でも揮発性化合物をスクリーニングする際に、一番最適なスクリーニン

グ方法を考案しなければ、エストロゲン用活性の定量は出来ない。そこで、揮発性化合物をスクリーニングする際に考慮しなくてはならない条件を満たす C 法を考案するに至った。C 法とは、従来の系の B' 法、もしくは、1 枚のプレートに 1 サンプルを一連でアッセイする B 法を行う際に、パラフィルムでそれぞれの well を密閉し、その上から従来通りにプレートの蓋をする方法である。C 法のメリットは、従来通りに 1 枚のプレートでそれぞれの濃度をアッセイすることができることから、A 法のように時間をかけずに行え、実験時の揮発を最小限に押さえられること、さらに 28°C incubate box で 3 日間培養している間も、一個一個の well が密閉されているため、揮発するのを防ぐことができ、再現性のある結果が得られるというところにある。しかしながら、ここで考慮しなければならないのは、密閉することによって well 内の yeast の growth にどのような影響がでて、それがエストロゲン様活性の定量にどれくらいの負荷が掛かるのかということである。それを確認するために B 法と C 法で比較する必要が生じたが、揮発性のある *i*-NPH および、その各画分の B 法はパラフィルムで密閉しないので培養中に揮発し、その結果にも再現性が得られないので、常に positive control として用いている estradiol でその比較を行った (図 4)。結果パラフィルムで密閉しない B 法と、パラフィルムで密閉する C 法とでは差はほとんど見られなかったことから揮発性化合物をスクリーニングする方法には

C 法が最適であると考える。

## 5-7. 生活環境中の化合物のエストロゲン様活性検索

生活環境中で使用される 37 種化合物のエストロゲン様活性を表 2 に示す。37 種化合物は 17  $\beta$ -Estradiol を陽性対象としてエストロゲン様活性比強度で表わした。Ferulic Acid, Vanillic Acid は 37 種化合物の中でも特に活性は弱かったが、Dienestrol, 17  $\beta$ -Etynylestradiol は非常に強い活性が見られた。また、工業用界面活性剤などとして大量に使用されている Nonylphenol も直鎖状の *n*-Nonylphenol に比べ、*i*-Nonulphenol には強い活性が見られた。

## 6. 引用文献

1. White, R. S. J., Hoare, S. A., Sumpter, J. P. and Parker, M. G. (1994).  
Environmientally Persistent alkylphenolic compound are estrogenic. *Endocrinol.*, 135. 175-182.
2. Robert M. Harris, Rosemary H. Waring, christopher J. Kirk, and Philip J. Hughes. (2000)  
Sulfation of "Estrogenic" Alkylphenols and 17  $\beta$  -Estradiol by Human Platelet Phenol Sulfotransferases. *Biochem.*, 275. 159-166.
3. Ana M. soto, Honorato Justicia, Jonathan W. Wray, and Carlos Sonnenschein (1991)  
*p*-Nonyl-Phenol: An estrogenic Xenobiotic Released from "Modified" Polystyrene. *Rnvironmental Health Perspectives*, 92. 167-173.

## 7. 研究発表

### 7-1. 学会報告

1. 金 倫碩・片瀬 隆雄・井上 正：プラスチック製品などの環境中のエストロゲンよう化学物質の検索。日本分析化学会 49 年会講演要旨集 3P 29、9 月 26～28 日、2000
2. 金 倫碩・片瀬 隆雄：芦ノ湖におけるプラスチックワーム汚染とフタル酸エステル。日本内分泌攪乱化学物質学会第三階講演要旨集 PA26 (パシフィコ横浜) 12 月 15～16 日、2000
3. ノニルフェノールの異性体とエストロゲン様活性。関根 さやか、安藤 宏幸、井上 正、片瀬 隆雄。第 3 回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会講演要旨集 PA-14 (パシフィコ横浜) 12 月 15～16 日 2000.
4. 組み換え酵母培養実験における隣接 well への影響。関根 さやか、片瀬 隆雄、井上 正。第 3 回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会 (パシフィコ横浜) 講演要旨集 PA-25, 12 月 15～16 日、2000



表 1 ノニルフェノール (*i*-NPH)の組み換え酵母培養実験の A 法と B 法によるエストロゲン様活性測定

	A 法 (a)	B 法 (b)	a-b
吸光度*1 ( <i>i</i> -NPH $10^{-7}$ M)	0.04	0.18	0.14
吸光度*2 ( <i>i</i> -NPH $10^{-6}$ M)	1.4	1.67	0.27
エストロゲン活性濃度*3	$2.1 \times 10^{-3}$	$1.6 \times 10^{-3}$	$0.5 \times 10^{-3}$
エストロゲン比強度*4	$7.1 \times 10^{-4}$	$2.6 \times 10^{-4}$	$4.5 \times 10^{-4}$

\*1  $10^{-7}$  M の *i*-NPH

\*2  $10^{-6}$  M の *i*-NPH

\*3 半値最大濃度 (HM)

\*4 Estradiol (E2)/試料, E2= $1.5 \times 10^{-6}$  or  $4.2 \times 10^{-7}$

表 2 生活環境関連化合物のエストロゲン様活性

試料名	エストロゲン 比強度*	試料名	エストロゲン 比強度*
Bisphenol A (東京化成)	$4.6 \times 10^{-4}$	4-Hydroxystilbene (ACROS)	$1.6 \times 10^{-3}$
Resveratrol (米国シグマ社)	$9.0 \times 10^{-5}$	Di-2-ethylhexyladipate (和光純薬)	$< 1 \times 10^{-6}$
Dienestrol (東京化成)	1.9	Di-n-Octyladipate (CHEM. SERV)	$< 1 \times 10^{-6}$
Ferulic Acid (米国シグマ社)	$6.8 \times 10^{-6}$	Butylhydroxytoluene (和光純薬)	$1.1 \times 10^{-5}$
17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (東京化成)	$1.2 \times 10^1$	Di-n-butylphthalate (関東化学)	$1.6 \times 10^{-5}$
Mestranol (ICN)	$4.2 \times 10^{-1}$	Diethylphthalate (関東化学)	$1.5 \times 10^{-5}$
Benzylbutylphthalate (和光純薬)	$1.6 \times 10^{-4}$	Dicyclohexylphthalate (関東化学)	$< 1.7 \times 10^{-6}$
Anethole (関東化学)	$< 1.3 \times 10^{-6}$	Diheptylphthalate (関東化学)	$< 1.7 \times 10^{-6}$
4-Alliyanisole (関東化学)	$5.9 \times 10^{-6}$	Diisononylphthalate (関東化学)	$< 1.7 \times 10^{-6}$
Adipate (和光純薬)	$2.7 \times 10^{-7}$	Diisobutylphthalate (関東化学)	$6.8 \times 10^{-4}$
Di-2-Ethylhexylphthalate (和光純薬)	$8.4 \times 10^{-5}$	Estradiol (東京化成)	1
4-Hydroxycinnamic (米国シグマ社)	$9.3 \times 10^{-5}$	Diethylstilbestrol (関東化学)	$2.2 \times 10^{-1}$
<i>n</i> -Nonylphenol (関東化学)	$2.5 \times 10^{-5}$	Estriol (東京化成)	$1.5 \times 10^{-3}$
Propylphenol (関東化学)	$1 \times 10^{-4}$	<i>i</i> -Nonylphenol (東京化成)	$1.3 \times 10^{-4}$
<i>o</i> -Allylphenol (関東化学)	$6.8 \times 10^{-5}$	Genistein (和光純薬)	$1.2 \times 10^{-4}$
Sinapic Acid (米国シグマ)	$< 1.3 \times 10^{-6}$	Hexestrol (米国シグマ)	$1.8 \times 10^{-1}$
4-Hydroxybenzoic acid (米国シグマ社)	$< 1.3 \times 10^{-6}$	Triphenylethylene (関東化学)	$2.8 \times 10^{-5}$
cis-stilbene (米国メルク)	$2.2 \times 10^{-6}$	Norethindrone (ICN)	$1.2 \times 10^{-4}$
trans-stilbene (関東化学)	$3.1 \times 10^{-5}$	Vanillic Acid (米国シグマ)	$4.6 \times 10^{-6}$

\*Estradiol (E2)/試料:  $3.3 \times 10^{-6} \sim 1.3 \times 10^{-7}$

表 3 アジピン酸エステル各画分のエストロゲン様活性結果

画分名	エストロゲン 比強度*
Adp6-2	$1.8 \times 10^{-3}$
Adp6-3	$< 7.5 \times 10^{-6}$
Adp6-4	$< 7.5 \times 10^{-6}$
Adp6-5	$< 7.5 \times 10^{-6}$
Adp6-6	$< 7.5 \times 10^{-6}$
Adp7,9-2	$< 7.5 \times 10^{-6}$
Adp7,9-3	$< 7.5 \times 10^{-6}$
Adp7,9-4	$< 7.5 \times 10^{-6}$
Adp7,9-4-2	$< 7.5 \times 10^{-6}$
Adp7,9-4-3	$< 7.5 \times 10^{-6}$

\*E2/試料, E2= $7.5 \times 10^{-6}$

表 4 ノニルフェノールの各画分エストロゲン様活性

各画分	エストロゲン 比強度*
frac.1	$2.5 \times 10^{-5}$
frac.2	$2.5 \times 10^{-5}$
frac.3-1	$3.1 \times 10^{-5}$
frac.3-2	$1.6 \times 10^{-4}$
frac.3-3	$2.0 \times 10^{-4}$
frac.4	$1.6 \times 10^{-4}$
frac.5-1	$1.0 \times 10^{-4}$
frac.5-2	$1.6 \times 10^{-4}$
frac.5-3	$2.0 \times 10^{-4}$
frac.6	$1.6 \times 10^{-4}$
<i>n</i> -NPH	$2.5 \times 10^{-5}$
<i>i</i> -NPH	$1.3 \times 10^{-4}$

\*E2/試料, E2= $7.9 \times 10^{-7} \sim 4.0 \times 10^{-7}$

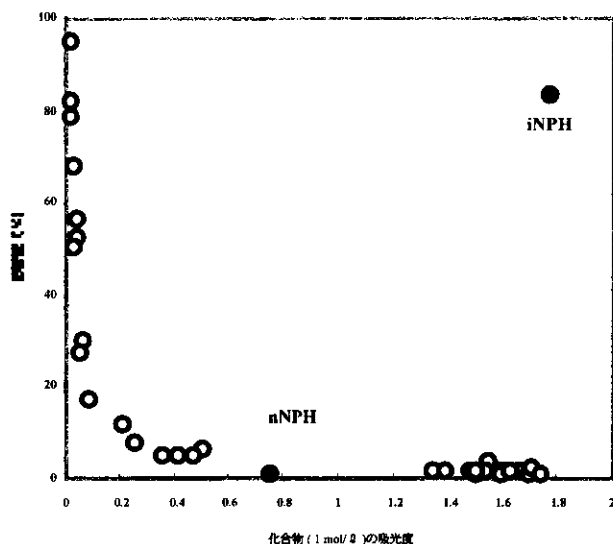


図 1 化合物 37 種の揮発性の有無

横軸は各化合物の 1 mol/l の吸光度、縦軸は隣接 well の最大吸光度である。

1 mol/l 当たりの吸光度が高く、さらに隣接 well の最大吸光度も高い化合物は *i*-NPH のみであり、隣接 well に影響を与えたのは *i*-NPH だけと判断された。

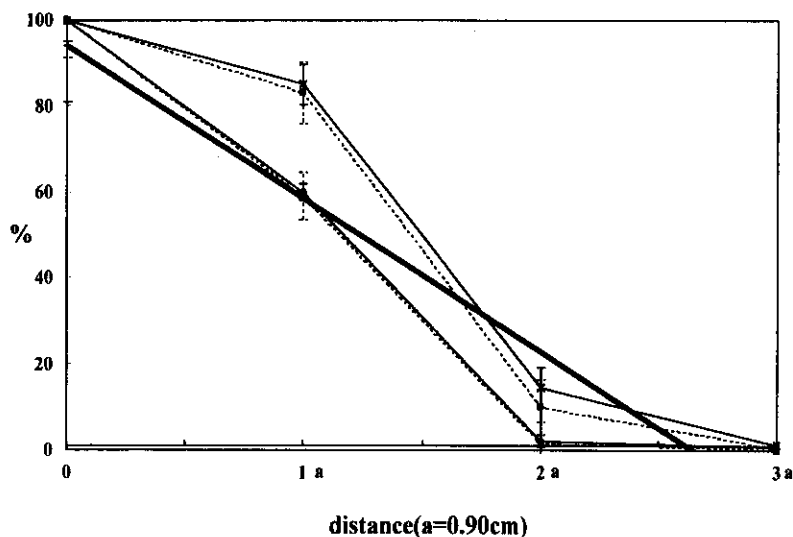


図 2 *i*-NPH ( $10^{-5}$  M) が隣接 well に与える影響

96-well flat bottom microtitre plate の D well 6 に *i*-NPH ( $10^{-5}$  M) を中心に、(◆) は左方向、(■) は右方向、(▲) は上方向、(×) は下方向、(—) は回帰線である。横軸は 96-well flat bottom microtitre plate の well 1 個分を 1a とした時の距離で、縦軸は 1 mol/l 当たりの吸光度である。このグラフから 96-well flat bottom microtitre plate 上で well 3 個分以上離れると、揮発の影響を与えないと言える。