

環境試料におけるバイオアッセイによるエストロゲン、 抗エストロゲンの活性測定の実用

中村昌文¹、D. J. Brown²、Michael Chu²、藤野潤子¹、北川宏子¹、半田洋士¹、藪下尚智¹、山本司¹、村田弘司¹、G.C.Clark²

¹株式会社日吉、²Xenobiotic Detection Systems Inc.

【目的】 現在、環境中にはホルモン作用を引き起こす疑いのある化学物質が、多数存在することがわかっており、これらは内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）と呼ばれている。環境ホルモンが問題になるにつれて、様々なアッセイ方法が開発され、応用されている。近年開発された、ルシフェラーゼ遺伝子を導入した培養細胞を利用し、エストロゲンとエストロゲンレセプター（ER）との結合を、ルシフェラーゼ活性により検出する簡易測定法である。そこで、我々はバイオアッセイによる環境試料中のエストロゲン及び抗エストロゲン活性測定を試みたので報告する。

【方法】 環境試料の抽出方法 エタノール存在下でホモジナイズした環境試料（caterpillar、wild cherry leaves、caterpillar frass）を採取し、水分及び粒子状物質の除去のため、硫酸ナトリウム、珪藻土でろ過をして、抽出液とした。抽出液は DMSO 転溶し、これを細胞培養培地に懸濁させ、検液としバイオアッセイに供した。

バイオアッセイ エストロゲン活性；検液及び検量液（ β -エストラジオール）を、96 穴プレート内で培養した細胞に曝露した。このプレートを、ルシフェラーゼ活性の誘導を最適にするため CO₂ 5%、37°C の CO₂ インキュベーターの中で培養した。20～24 時間培養後、エストロゲンにより誘導されたルシフェラーゼ活性をルミノメーターにより測定した。

抗エストロゲン活性；検液及び検量液（ β -エストラジオールを一定量含んだ、タモキシフェン）を、96 穴プレート内で培養した細胞に曝露した。エストロゲン活性同様の条件下で培養後、エストロゲンにより誘導されたルシフェラーゼ活性の阻害量をルミノメーターにより測定した。

環境試料中エストロゲン活性濃度及び抗エストロゲン活性濃度は、得られた活性を検量線と比較し、 β -エストラジオールに対する活性濃度とした。

【結果・考察】 検量線における定量下限値は 0.1ng/g であった。

今回使用した 3 試料についてエストロゲン活性は、示さなかった。しかし、抗エストロゲン活性について、 $64 \pm 3 \text{ ng/g}$ (caterpillar)、 $96 \pm 21 \text{ ng/g}$ (wild cherry)、 $62 \pm 2 \text{ ng/g}$ (caterpillar frass) と高い活性を示した。

以上の結果から、バイオアッセイは環境試料中のエストロゲン及び抗エストロゲン活性濃度を把握するスクリーニング法として有用であることが示された。今後、様々な環境中に存在する化合物、試料についてスクリーニングを実施し、この有用性を確認していく必要がある。また、LC/MS 等を用い、環境中に存在するエストロゲン及び抗エストロゲン活性を示す物質を特定していきたいと考えている。

Use of a cell based bioassay to detect estrogenic and anti-estrogenic endocrine disruptors in environmental samples.

Masafumi Nakamura¹, David J. Brown², Michael Chu², Junko Fujino¹, Hiriko Kitagawa¹, Hiroshi Handa¹, Yabushita Hisatoshi¹, Tsukasa Yamamoto¹, Hiroshi Murata¹, George C. Clark²

¹ Hiyoshi Corporation, ² Xenobiotic Detection Systems Inc.

Samples of plant materials, insects and feeds were analyzed for estrogenic activity in order to trace the cause of reproductive failures in horses. Analysis was conducted using a transfected cell line, which responds to β -estradiol and other estrogenic compounds in a dose dependent manner. All samples had little or no estrogenic activity, but three samples appeared to have anti-estrogenic activity. These three samples: caterpillars, wild cherry leaves and caterpillar frass; were further studied by re-suspending the samples in medium containing 5 pg β -estradiol/ml. From these results

the anti-estrogenic activities of the samples, estimated by comparison with a standard curve of tamoxifen in the same medium, were 64 ± 3 (caterpillar), 96 ± 21 (wild cherry leaves) and 62 ± 2 (caterpillar frass) ng tamoxifen equivalents/gram.

These results suggest that the horses may have been exposed to anti-estrogenic compounds through inadvertently eating caterpillars or the frass from caterpillars feeding on wild cherry tree leaves. More extensive tests will be needed to determine whether these compounds were involved in the miscarriages and high fowl mortality that were observed in the horses.