

## 飼料中に含まれる植物エストロジェンの分析及びエストロジェン活性評価

犬童真紀子<sup>1)</sup>、宮原真紀<sup>2)</sup>、柳 英碩<sup>3)</sup>、石橋弘志<sup>3)</sup>、西島治香<sup>1)</sup>、白石不二雄<sup>4)</sup>、西原 力<sup>5)</sup>、

Guillette LJ Jr.<sup>6)</sup>、川越信秀<sup>7)</sup>、宮川秀則<sup>7)</sup>、中村優子<sup>7)</sup>、井口泰泉<sup>2,8)</sup>、有菌幸司<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>熊本県立大学環境共生学部、<sup>2)</sup>科学技術振興事業団戦略的基礎推進事業 (CREST)、<sup>3)</sup>長崎大学大学院生産科学研究科、

<sup>4)</sup>国立環境研究所、<sup>5)</sup>大阪大学大学院薬学研究科、<sup>6)</sup>フロリダ大学、<sup>7)</sup>榊エスアールエル医科学分析センター、

<sup>8)</sup>岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター

【目的】植物中に含まれる植物エストロジェンは、その化学構造が天然の女性ホルモンと類似しておりエストロジェン活性をもつことから、内分泌攪乱作用が懸念されている物質である。内分泌攪乱化学物質による生物への影響評価を *in vivo* 試験で行う場合、実験動物用飼料中に含まれる植物エストロジェンの影響が考えられる。そこで本研究では、各種飼料中の植物エストロジェン (ゲニステイン、ダイゼイン) の含量を HPLC により測定し、それぞれの飼料について酵母 two-hybrid 法によりエストロジェン活性評価を行った。

【実験方法】飼料は魚類、ワニ用など約 15 種類を用いた。粉碎した飼料にメタノール：酢酸バッファ一溶液を加え抽出後、β-グルクロニダーゼで 17 時間酵素処理した。さらにジエチルエーテルを用いて再度抽出し、HPLC により飼料中に含まれるゲニステイン、ダイゼイン濃度を測定した。また、エストロジェン活性試験はヒトエストロジェンレセプター遺伝子アルファ及びベータ (hER-α, β) をそれぞれ組み込んだ酵母を用いた two-hybrid 法で行った。

【結果及び考察】今回、植物エストロジェンの含量を、酵素処理して測定した 15 種類の飼料抽出物中で、最も高いゲニステイン、ダイゼイン量を示したものは、大豆成分を主原料とした魚類用飼料であった。また、この飼料抽出物はエストロジェン活性試験においても最も高い活性を示し、さらに hER-β は hER-α より約 10 倍程度高い活性を示した。多くの飼料抽出物中において、ゲニステイン濃度とエストロジェン活性に相関が見られたため、飼料抽出物のエストロジェン活性はゲニステイン含量が大きく寄与しているものと示唆された。

### The Determination Of Phytoestrogen In Feeding Diet And Its Estrogenic Activity

Makiko Inudo<sup>1)</sup>, Maki Miyahara<sup>2)</sup>, Young-Seok You<sup>3)</sup>, Hiroshi Ishibashi<sup>3)</sup>, Haruka Nishijima<sup>1)</sup>, Fujio Shiraiishi<sup>4)</sup>, Tsutomu Nishihara<sup>5)</sup>, Guillette L. J. Jr.<sup>6)</sup>, Nobuhide Kawagoe<sup>7)</sup>, Hidenori Miyagawa<sup>7)</sup>, Yuko Nakamura<sup>7)</sup>, Taisen Iguchi<sup>2,8)</sup>, Koji Arizono<sup>1, 2)</sup>

<sup>1)</sup> Faculty of Environmental and Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto, <sup>2)</sup> CREST <sup>3)</sup> Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University, <sup>4)</sup> National Institute for Environmental Studies, <sup>5)</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, <sup>6)</sup> Department of Zoology, University, of Florida, <sup>7)</sup> Analysis Center for Medical Science, SRL Inc. <sup>8)</sup> Bioenvironmental Research, National Institute for Integrative Bioscience

Plant estrogenic compounds are thought to be endocrine-disrupting chemicals (EDCs), because they have estrogenic activity. Phytoestrogenic compounds present in the diet of animals used for *in vivo* testing of EDC, could themselves have endocrine-disrupting effects. In this study, phytoestrogens (Daidzein and Genistein) in feeding diet were determined by HPLC analyses and their estrogenic activities were evaluated with yeast two-hybrid assay *in vivo*. Different kinds of test animal diets were analyzed for estrogenic activity. Five-gram (5g) samples were crushed and extracted with methanol and 1M-acetic acid buffer solution (9:1 v/v). Portions of the extracts were hydrolyzed with enzymes. Isoflavone was isolated using diethyl ether. The dried extract was dissolved in methanol:acetonitrile:water (2:1 :3 v/v/v), and analyzed using HPLC. The solutions were tested for estrogenic activity using the yeast two-hybrid system (humanestrogen receptor-α : hER and -β). Fish diet containing soybean showed the highest genistein and daidzein concentration. This diet also showed the highest estrogenic activity by yeast-assays. The hER-β activity exhibited higher activity than hER-α in the diets. Additionally, there were the correlation between the contents of genistein and estrogenic activity in the diets. Therefore, it is suggested that genistein mainly contributed to the estrogenic activity of the diets.