

環境水のエストロゲン様活性と内分泌攪乱化学物質との関連性

中室克彦*, 上野 仁*, 奥野智史*, 坂崎文俊*, 川井 仁*, 亀井孝幸*, 鶴川昌弘**

摂南大学薬学部環境衛生学研究室*, 大阪府立公衆衛生研究所環境衛生課**

【目的】環境水中に存在するエストロゲン様活性を示す内分泌攪乱化学物質 (EDs) の大部分が、ヒトの排泄物中に含有する女性ホルモンに由来する可能性が示唆されている。しかし、環境水が示すエストロゲン様活性に対する、ヒト由来のエストロゲンおよびエストロゲン様活性を有する合成化学物質の寄与についての詳細な検討は殆どなされていない。そのため、本研究においては酵母 Two-Hybrid 法を用いて各種環境水の XAD-2 樹脂カラム法で得られた濃縮物のエストロゲン様活性を S9mix の存在の有無によって測定するとともに、内分泌攪乱作用が疑われているステロイドホルモン、植物エストロゲンおよび *p*-アルキルフェノール類のエストロゲン様活性強度を測定することによって、本法で用いる酵母中のエストロゲン受容体へのこれら物質の親和性について解析した。

【実験方法】 1) 試料水の濃縮：一定量の環境水に HCl を用いて pH3 に調整したものを XAD-2 樹脂カラムに上向流で通水し吸着させた。その後、酢酸エチルおよびメタノール各 500mL を用いて下向流で順次溶出した。これら溶媒を減圧濃縮乾固後、DMSO 一定量に溶解した。さらに、濾過滅菌処理後それぞれを酢酸エチルおよびメタノール画分として実験に供した。

2) 対象化学物質：ステロイドホルモン 23 種、植物エストロゲン 16 種、*p*-アルキルフェノール類 8 種

3) 酵母 Two-Hybrid 法：GAL4DNA 結合領域-ホルモン受容体結合領域と GAL4 活性化領域-Coactivator を含むプラスミド導入酵母 Y190 株に環境水の XAD-2 樹脂カラム濃縮画分あるいは一定量の被験物質を加え 30°C、4 時間曝露した。その後、*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside を基質として β -Galactosidase 活性を測定し、得られた活性から検量線法によって 17 β -エストラジオール (E2) 等量値 (pg) を求め、これをエストロゲン様活性とした。

【結果および考察】 下水処理水、湖沼水および河川水の XAD-2 樹脂カラム-酢酸エチルおよびメタノール画分はいずれもエストロゲン様活性を示し、S9mix の添加によっていずれも増強する傾向を示した。内分泌攪乱作用が疑われているステロイドホルモン、植物エストロゲンおよび *p*-アルキルフェノール類 47 種について酵母 Two-Hybrid 法を用いてエストロゲン様活性を測定した。その結果、ステロイドホルモン類の 3 位のフェノール性水酸基と、17 位のアルコール性水酸基をもつものは、エストロゲン受容体への親和性が高いことが示唆された。また、アルキルフェノール類はエストロゲン様活性を発現するためには、パラ位にのみ置換基が存在する必要性が示された。また、E2 およびその代謝物であるエストロン (E1) やエストリオール (E3) については、E2>E1>E3 の順に強いエストロゲン様活性を示した。さらに、それら女性ホルモンの 3 位のフェノール性水酸基が抱合体化されることにより活性は大きく減弱することを示した。一方、エストロゲン抱合体、フロレチン、ゲニステインやナリンゲニンは S9mix を共存させることによって活性が増大することを示した。これらの事実は、環境水の濃縮物に S9mix を添加することによってエストロゲン様活性が増大することと関連する可能性を示唆した。

Contribution of endocrine disrupting chemicals to estrogenicity of environmental Water

Katsuhiko NAKAMURO*, Hitoshi UENO*, Tomofumi OKUNO*, Humitosi SAKAZAKI*, Hitoshi KAWAI*, Takayuki KAMEI*, Masahiro UGAWA**

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University*, Osaka Prefectural Institute of Public Health**, Japan

To clarify contribution of endocrine disrupting chemicals to estrogenicity of environmental water, XAD-2 resin column-concentrates of environmental waters and endocrine disrupting chemicals such as steroid hormones, phytoestrogens and *p*-alkylphenols were measured by yeast two-hybrid system with and without S9mix. River water and sewage treatment water possessed estrogenicity and their estrogenicities were enhanced by S9mix. The strong affinity to estrogen receptor in the yeast was recognized in steroid hormones involving 3-position phenolic and 17-position alcoholic hydroxyl group, and *p*-alkylphenols. Among estrogen, the magnitude of estrogenicity was in order E2>E1>E3. Estrogenicity of estrogen-conjugates was elevated by S9mix.