

## 飼料中に含まれる植物エストロゲンの分析及びエストロゲン活性評価

松岡宗和<sup>1)</sup>、犬童真紀子<sup>1)</sup>、上村葵<sup>1)</sup>、石橋弘志<sup>2)</sup>、Hutchinson T.H.<sup>3)</sup>、趙 顯書<sup>4)</sup>、牛嶋真利恵<sup>5)</sup>、岩原正宣<sup>5)</sup>、有菌幸司<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>熊本県立大学環境共生学部、<sup>2)</sup>長崎大学大学院生産科学研究科、<sup>3)</sup>アストラゼネカ、<sup>4)</sup>麗水大学、<sup>5)</sup>崇城大学工学部

[目的] 近年、内分泌かく乱化学物質によるヒトや野生生物への影響が危惧されている。これら化学物質の内分泌かく乱作用を *in vivo* 試験で評価する場合、実験動物用飼料中に含まれる植物エストロゲンなどのエストロゲン様物質が実験結果に影響を及ぼす可能性が考えられる。我々はこれまで魚類用飼料中に含まれる植物エストロゲン（ゲニステイン、ダイゼイン）含量を LC/MS により測定し、同時に酵母 two-hybrid 法によるエストロゲン活性評価を行い報告してきた。今回、イギリス製飼料 6 種類、韓国製飼料 6 種類の評価を行ったので報告する。

[方法] 粉碎した飼料にメタノール：酢酸バッファー溶液を加え抽出後、 $\beta$ -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、LC/MS により飼料中に含まれるゲニステイン、ダイゼイン量を測定した。また、エストロゲン活性試験は two-hybrid 法によりヒトエストロゲンレセプター遺伝子アルファ及びベータ (hER- $\alpha$ ,  $\beta$ ) がそれぞれ組み込まれた酵母を用いた。

[結果及び考察] ほとんどの飼料においてゲニステイン、ダイゼインが検出され、エストロゲン活性も認められた。これらは hER- $\alpha$  より hER- $\beta$  に対し高いエストロゲン活性を示した。イギリス製飼料 2 種類及び韓国製飼料 1 種類を除いて植物エストロゲン含量とエストロゲン活性に正の相関が認められた。相関が認められなかったイギリス製飼料 2 種類についてエストロゲン・アンタゴニスト試験を行ったところアンタゴニスト活性は認められず、アゴニスト活性を阻害する何らかの夾雑物質の混在が考えられた。また、相関が認められなかった韓国製飼料においては、植物エストロゲン以外のエストロゲン・アゴニスト活性を示す物質の混在が考えられた。以上のことから、日本国内のみならず海外においても魚類用飼料は様々なエストロゲン様物質が含まれている可能注が示唆された。

### Levels of Phytoestrogen in Feeding Diet and Estrogenic Activity for Human Estrogen Receptor $\alpha$ and $\beta$

Munekazu Matsuoka<sup>1)</sup>, Makiko Inudo<sup>1)</sup>, Aoi Kamimura<sup>1)</sup>, Hiroshi Ishibashi<sup>2)</sup>, Hutchinson T.H.<sup>3)</sup>, Hyeon-Seo Cho<sup>4)</sup>, Marie Ushijima<sup>5)</sup>, Masayoshi Iwahara<sup>5)</sup>, Koji Arizono<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Faculty of Environmental and Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto, <sup>2)</sup>Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University, <sup>3)</sup>Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca, <sup>4)</sup>Yosu National University, <sup>5)</sup>Faculty of engineering, Sojo University

Currently, endocrine-disrupting chemicals (EDCs) are giving rise to serious concerns about human life and wildlife. EDCs study was carried out various animals *in vivo*, and was used a diet for test animals. However, many of these diets may have already estrogenic activity and contain the estrogenic isoflavones such as genistein and daidzein, which can disrupt normal functions of sex steroid in all classes of vertebrates. In this study, the amount of phytoestrogen (genistein and daidzein) in feeding diet was determined by LC/MS analysis and the estrogenic activity was evaluated with the yeast two-hybrid assay (human estrogen receptor- $\alpha$  and  $\beta$ : hER- $\alpha$  and  $\beta$ ) *in vitro*. We used the diets for test fish, made in UK and Korea. Genistein and daidzein were detected in most of the diets. These diets have estrogenic activities for hER- $\alpha$  and hER- $\beta$ , and the estrogenic activities by hER- $\beta$  were much higher than that by hER- $\alpha$ . There were correlation between the phytoestrogen contents and estrogenic activities in the diets except for a part of the diet. Some of diet made in UK and Korea which the correlation was not shown have contaminant components but no estrogen-antagonistic effects, and have unknown estrogenic substances in the diets. Therefore, our results suggested that fish diets have a variety estrogenic substance not only made in Japan but also made in UK and Korea.