

第4章 酵母 two-hybrid 法による市販実験動物用飼料中のエストロゲン活性と植物エストロゲン含量

4. 1 研究目的

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報告されている。これら内分泌かく乱化学物質は性ホルモンと類似構造を持つため、ホルモン受容体に誤って結合しホルモン活性を異常に高め、ある種の薬物代謝酵素の誘導や酵素活性の阻害による生体内代謝系の攪乱、免疫系の阻害、発ガン作用あるいは遺伝子損傷を引き起こすことが知られている¹⁾。現在、性ステロイドホルモン受容体に結合しうる内分泌かく乱化学物質をスクリーニングするための *in vitro* 試験法が各種開発され、受容体との直接的な結合能を調べる受容体結合試験や、受容体遺伝子を導入した培養細胞や酵母を用いた方法が頻用されている²⁻⁷⁾。一方、*in vivo* 試験においては、哺乳類では主に子宮肥大試験や前立腺肥大試験^{8,9)}が、魚類や両生類では血中のビテロゲニン産生試験等が用いられている^{10,11)}。一般にこれら *in vivo* 試験系において、実験動物に対して様々な市販飼料が用いられており、それら飼料中に含まれるエストロゲン様物質についてはほとんど評価されていない。第3章において、市販飼料中に含まれるエストロゲン様物質が雄キンギョ血中ビテロゲニンを産生し、植物エストロゲンがその原因である可能性が高いことを示唆した。

植物エストロゲンは欧米では主に健康面での恩恵から注目されている天然化学物質である。しかしながら、クメステロールを含んだクローバーを大量に食べたオーストラリアの羊に流産が増加したとの報告がある¹²⁾。また、ゲニステ

インやダイゼインはエストロゲン受容体に結合親和性を示し、エストロゲン活性を持つことが知られているビスフェノール A やノニルフェノールなどの合成化学物質と比較しても高い結合親和能を示す¹³⁾。これらのことより、内分泌かく乱化学物質の *in vivo* スクリーニング試験において、飼料中の植物エストロゲン含有量や試験化学物質のエストロゲン活性強度によっては、試験化学物質以外の要因が実験動物に対し様々な影響を与える可能性が考えられる。

本研究では、市販の実験動物用飼育飼料のエストロゲン様活性を *in vitro* 試験によって明らかにし、その活性に寄与した要因を明らかにすることを目的とした。代表的な植物エストロゲン（ゲニステイン、ダイゼイン、イクオール、クメステロール、ゲニスチン及びダイジン）のエストロゲン活性を、two-hybrid 法によりヒトエストロゲン受容体アルファ及びベータがそれぞれ組み込まれた酵母を用い評価し、ラット肝を用い代謝活性化した植物エストロゲンについても同様に評価した。さらに、魚類、両生類、及び爬虫類など市販の実験動物用飼育飼料からの抽出物についてエストロゲン活性及び植物エストロゲン（ゲニステイン及びダイゼイン）含有量を測定し、飼料中のエストロゲン活性における植物エストロゲンの寄与及びその他のエストロゲン様物質の存在の可能性について検討した。

4. 2 実験方法

4. 2. 1 酵母 two-hybrid 法によるエストロゲン活性試験

4. 2. 1. 1 試薬類

エストラジオール-17 β (E2 : Sigma)、*t*-スチルベン (T-S : 東京化成) をそれぞれ-S9 試験及び+S9 試験の陽性対照物質として用いた。内分泌かく乱作用が疑われている化学物質として、ノニルフェノール (NP : Aldrich)、ビスフェノール A (BPA : 和光純薬) 及びジエチルスチルベストロール (DES : Sigma) を用いた。植物エストロゲンはゲニステイン (和光純薬)、ダイゼイン (フジッコ)、クメステロール (フナコシ)、及びイクオール (フナコシ) のアグリコン 4 種類、ゲニスチン (Sigma)、ダイジン (フナコシ) のグルコシド 2 種類を用いた。また、ゲニスチン及びダイジンは β -グルクロニダーゼで酵素処理したものも作製した (2-2-1 参照)。これらはジメチルスルフォキシド (DMSO) で溶解し少量ずつガラス製サンプル瓶に分注、-20 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

4. 2. 1. 2 使用菌株

エストロゲン活性試験は、Shiraishi ら¹⁴⁾の方法に従って行った。すなわち、酵母 Y190 株にエストロゲン受容体遺伝子 human- α 、 β 、コアクチベーターの発現プラスミド、及び β -ガラクトシダーゼ発現系レポータープラスミドを酵母 two-hybrid 法により導入した酵母 (hER- α 及び β 株) を使用した¹⁵⁾。

4. 2. 1. 3 エストロゲン・アゴニスト試験

(1) 凍結保存していた酵母を tryptophan 及び leucine を除き、0.86 % dextrose を添加した SD 培地 (MSD med.) に接種後、振とう培養 (約 18 時間、30 $^{\circ}$ C) し、対数増殖期の試験用酵母浮遊液とした。試験用酵母浮遊液は分光光度計

- (UV-2200A; Shimadzu) で OD 595 nm を測定し一定の濃度になるように調製した。
- (2) 解凍した各化学物質は DMSO で希釈調製した後、-S9 試験用と+S9 試験用にガラス試験管に分注した。また抽出試料も同様に調製した。
- (3) -S9 試験用試料は MSD med. で 25 倍に希釈し、+S9 試験用試料は S9 mix 溶液 (組成 ; β -NADP+ 14 mg, G-6-P 7 mg, HEPES buffer 40 μ l, rat liver S9 0.5 ml, Z buffer 10 ml) を添加して 25 倍に希釈し、代謝反応 (1 時間、37°C) を行った。
- (4) 発光測定用黒色 96 ウェルプレート (スミロン) を自動分注希釈装置 (NSP-700 ; ニチリョー) で、横 1 行目には MSD med. を 60 μ l ずつ分注し、横 2 行目から 8 行目までは、2% DMSO 含有 MSD med. を 60 μ l ずつ分注した。
- (5) -S9 試験用試料と 1 時間の代謝反応後の+S9 試験用試料は一試料につき 60 μ l ずつを 1 行目の 3 ウェルにマイクロチップで添加した (n=3)。また、各プレートに E2 の陽性対照を 3 列設けた。
- (6) 試料を添加したプレートは自動分注希釈装置にセットして、60 μ l ずつの倍率希釈を 1 行目から 7 行目まで行い、7 行目の 60 μ l は捨てた。
- (7) 用意した酵母浮遊液を自動分注希釈装置で全ウェルに 60 μ l ずつ分注した。
- (8) プレートはボルテックスミキサーでよく混合した。
- (9) プレートを 30°C の加湿インキュベーターで 4 時間静置培養した。
- (10) 酵母細胞壁融解酵素 zymolyase (20T; 生化学工業) を Z buffer で溶解した溶液 (2 mg/ml) と β -ガラクトシダーゼを測定用化学発光用キット (Aurora Gal-XE kit; ICN) の反応試薬を 5:3 の割合で混合した溶液を自動分注希釈装置で

全ウェルに 80 μ l ずつ添加した。ボルテックスミキサーで攪拌後、37°C加温インキュベーターで1時間、静置培養し溶菌と反応を同時に行った。

(11) 1時間後、プレートは発光測定装置 (AB2100; ATTO) にセットして、化学発光用キットの発光促進液を 50 μ l ずつ装置内蔵の自動ポンプでウェルに添加しながら 1秒間の積算化学発光強度を計測し、 β -ガラクトシダーゼ量を測定した。

(12) エストロゲン活性の強さを評価する方法として、各試料とも倍率希釈濃度ごとの化学発光強度の平均値を求め、対照の化学発光強度の平均値に対する発光比を算出した。さらに、各濃度における化学発光比が次の希釈濃度の2倍以上を示すような試験濃度領域で回帰直線式を求め、その計算式から化学発光比を 10倍誘導する濃度を 10倍影響濃度 (EC_{x10}) として算出した。得られた E2 及び T-S の EC_{x10} 値の逆数を 100 とし、各飼料も同様にして E2 相対活性値を算出した。

4. 2. 2 HPLC によるゲニステイン及びダイゼイン含量の測定

4. 2. 2. 1 抽出及び調製

魚類用飼料 8種類、両生類用飼料 1種類、爬虫類用飼料 3種類、計 12種類の実験動物用飼育飼料を用いた (Table 1)。粉碎した飼料 5g にメタノール：酢酸バッファーを加えホモジナイズし、10分間の振とう抽出後遠心分離 (2,000 rpm、10分間、室温) した。遠心分離後、上層を取り下層に上記バッファーを入れ再度抽出を行い、さらに同様の操作を繰り返した。抽出した試料はメタノールで 200 ml とし、1 ml を窒素ガス気流下で乾固した。乾固した試料は、精製水で溶

解後、 β -グルクロニダーゼ及びスルファターゼ（日本バイオテスト研究所）をそれぞれ 2,100 U/ml 及び 1,050 U/ml になるように添加し、17 時間酵素反応を行った。酵素反応後、ジエチルエーテルで 2 回抽出を行い遠心分離し、抽出試料は窒素ガス気流下で乾固した。得られた試料はそれぞれメタノール：アセトニトリル：精製水（2：1：3）（ゲニステイン及びダイゼイン含量測定用）及びジメチルスルフォキシド（DMSO：和光純薬）（エストロゲン活性測定用）に溶解し測定に用いた。

4. 2. 2. 2 ゲニステイン及びダイゼイン測定条件

ゲニステイン及びダイゼインの標準溶液は、それらをそれぞれ 5 mg ずつ秤量しメタノール 10 ml に溶解させたものを作製後、100 μ g/ml になるように希釈、混合した。これを順次希釈して 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 及び 10 μ g/ml に調製し用いた。メタノール：アセトニトリル：精製水（2：1：3）に溶解した抽出試料は、濾過フィルター（Ultrafree-MC, 0.22 μ m; Millipore）で遠心濾過し（10,000 rpm、1 分間、室温）、測定用試料とした。HPLC は日本分光社製 LC 2000 Plus シリーズ、分析カラムは PEGASIL ODS (4.6 mm \times 150 mm; センシユウ科学) を用い、注入量 20 μ l、移動相はメタノール/アセトニトリル（2:1）と 0.1 %酢酸によるリニアグラジエントで溶出するピークを紫外可視光吸収 280 nm にて検出し、得られたピーク面積から定量した。

本測定系におけるゲニステイン及びダイゼインの定量下限値はともに 0.5 μ g/ml、飼料からの回収率は両物質ともに 90 %以上であった。また、日内再現性は変動係数 2 %以下、日間再現性は変動係数 5 %以下であった (n=3)。

Table 1. Ingredients and compositions of diets

Diets	Ingredients
Carp A	flour, defatted soybean, fish meal, alfalfa meal, shrimp meal, spirulina
Carp B	no data*
Carp C	fish meal, flour, soybean cake and meal, yeast, salt, calcium phosphate
Carp D	artemia
Trout A	fish meal, flour, soybean cake and meal, rice bran, yeast, vegetable oil
Trout B	no data*
Medaka A	fish meal, cereal, yeast
Medaka B	fish meal, flour, soybean cake, sake lees, corn, shrimp meal, alfalfa meal, gluten meal, spirulina, vitamin mix
Frog	spirulina, daphnia, fish liver, plankton, mussel
Turtle	no data*
Alligator A	no data*
Alligator B	spirulina

* Data which could not obtain about the ingredients was shown.

4. 3 結果および考察

4. 3. 1 酵母 two-hybrid 法によるエストロゲン活性測定における基礎的検討

4. 3. 1. 1 グルコース濃度が及ぼす影響

酵母の増殖に及ぼすグルコース濃度の影響を検討するため、グルコース濃度を 0.86 % (Fig. 1-A)、1.31 % (Fig. 1-B) 及び 1.74 % (Fig. 1-C) に調製した培養液 30 ml に、0.2, 0.5 及び 0.7 ml の酵母菌液をそれぞれ加え培養を行ったときの増殖曲線を Fig. 1 に示した。グルコース濃度 1.31 % 及び 1.74 % の培養液 30 ml に、0.2~0.7 ml の酵母菌液をそれぞれ添加し 24 時間培養したときの濁度 (OD=595 nm) はそれぞれ 0.3 程度であった。グルコース濃度 0.86 % の培養液 30 ml に、0.5 及び 0.7 ml の酵母菌液をそれぞれ添加し 24 時間培養したときの濁度は 0.5 程度で最も酵母の増殖率が高かった。また、酵母菌液を 0.2 ml 加えた培養液 30 ml において酵母の増殖率は明らかに低かった。以上のことより、酵母 two-hybrid 試験において、グルコース濃度 0.86 % に調製した培養液 30 ml に酵母菌液 0.7 ml を加え培養した対数増殖期の酵母菌液を以下の実験に使用することとした。

酵母 two-hybrid 法によるエストロゲン活性測定において、前培養した酵母の菌量は検出感度や再現性などに影響を与える可能性が考えられる。そこで前培養後の酵母菌量が、E2 を標準物質としたエストロゲン活性測定においてどのような影響を及ぼすか検討した (Fig. 2)。前培養後の酵母濁度を 0.183 に調製し E2 のエストロゲン活性試験を行ったところ、0.254 及び 0.315 に調製した酵母を用いた場合と比較して若干感度が低い傾向を示したが、エストロゲン活性の指標となる EC_{x10} 値においてほとんど差は認められず、E2 の検出下限値は 63 pM であ

った。しかしながら、酵母濁度0.254においてE2最高濃度区の発光強度は低下した。以上のことから、E2のエストロゲン活性測定感度、再現性の点において、前培養後の酵母濁度0.183が最も優れていたため、本試験系においては酵母濁度を0.183に調整後、エストロゲン活性試験を行うこととした。

多くの化学物質は主に肝臓中で代謝され不活性化されるが、逆に代謝されて活性化される物質も多く知られている。そこで、それら代謝産物のエストロゲン活性評価を行う際の基礎的検討として、ラット肝S9によって代謝反応を行ったT-Sを用いエストロゲン活性試験を行った (Fig. 3)。T-Sは156~5000 nMの濃度範囲において良好な用量反応曲線を示し、代謝産物のエストロゲン活性が測定可能であることが示された。以上のことから、本試験系は各種エストロゲン様物質のスクリーニングに十分適用できる感度であり、また代謝活性化試料についても評価を行うことができ、非常に優れた試験系であることが示唆された。

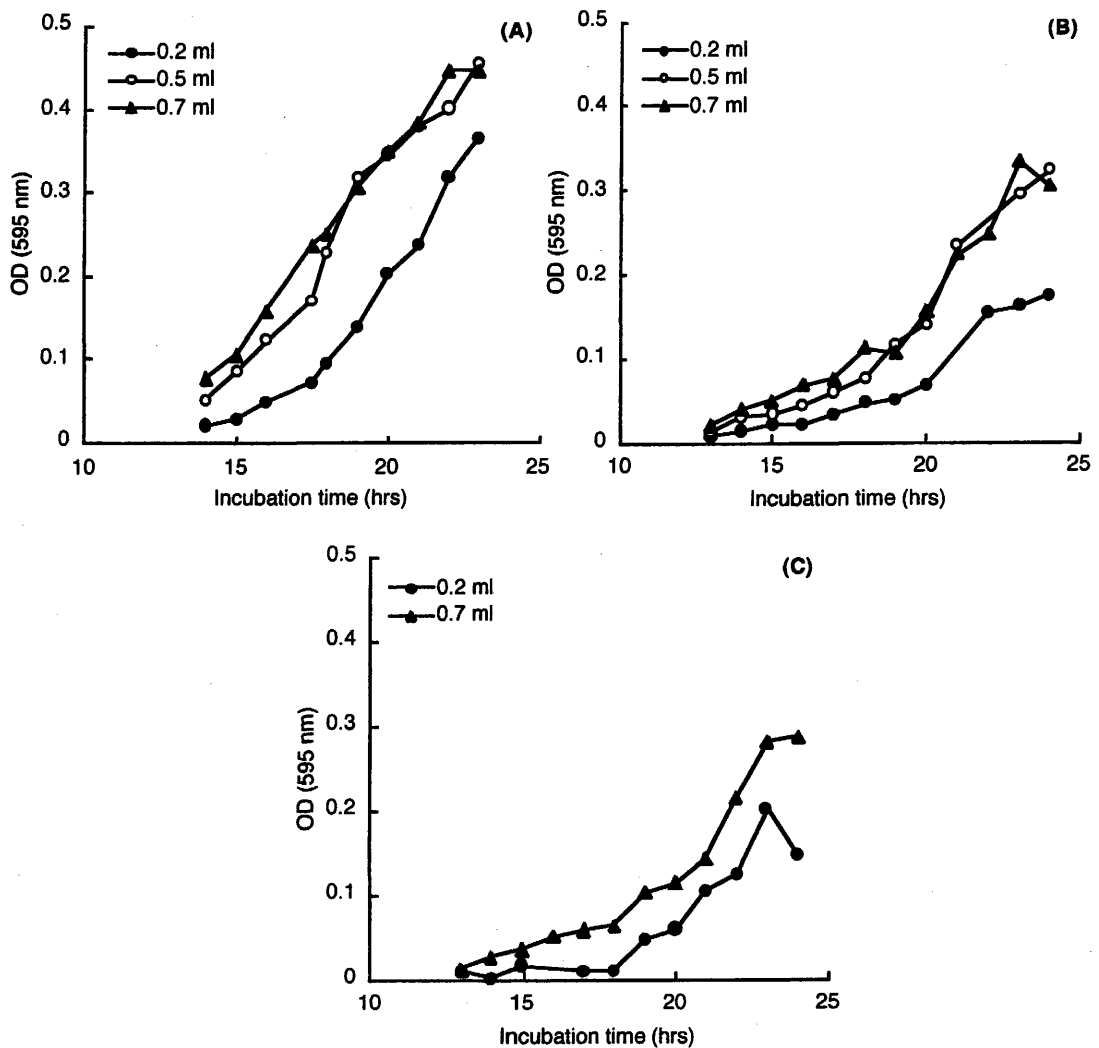


Fig. 1. Effects of dextrose concentration in SD medium to operation density on the yeast two-hybrid assay. Incubate solutions (30 ml) of 0.86 % (A), 1.31 % (B), and 1.74 % (C) glycerol concentration were added to 0.2 ml (●), 0.5 ml (○), and 0.7 ml (▲) yeast solutions, respectively.

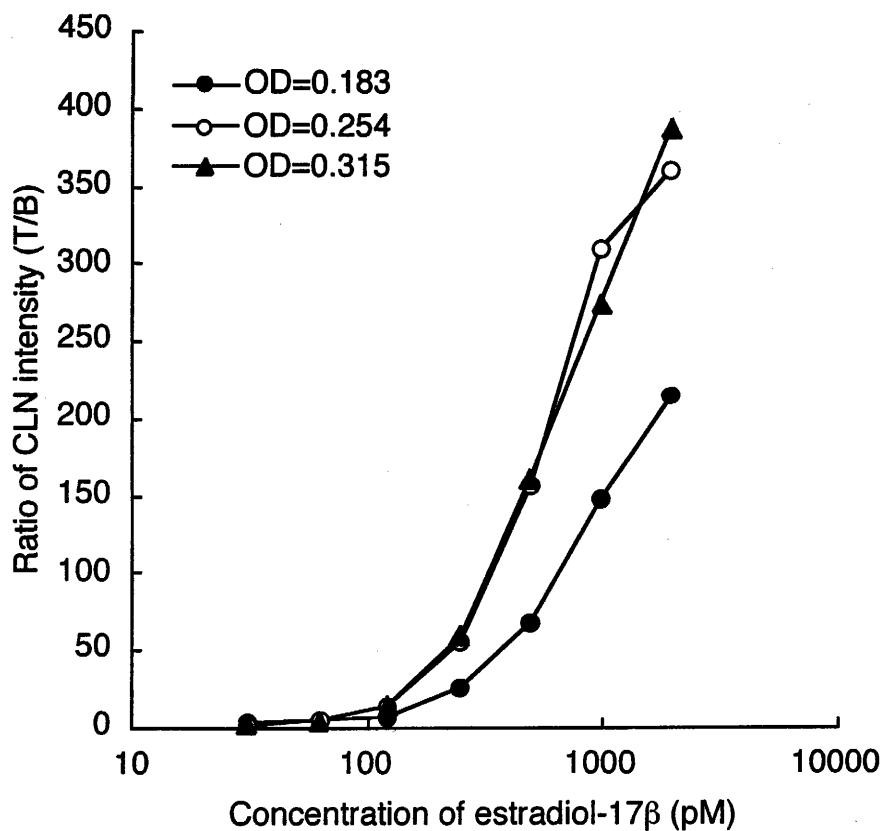


Fig. 2. Dose-response curves for estradiol-17 β using the agonist test. The values were represented as the ratio of chemiluminescence (CLN) intensity (T/B) of β -galactosidase. The operation densities (595 nm) of 0.183 (●), 0.254 (○), and 0.315 (▲) were used.

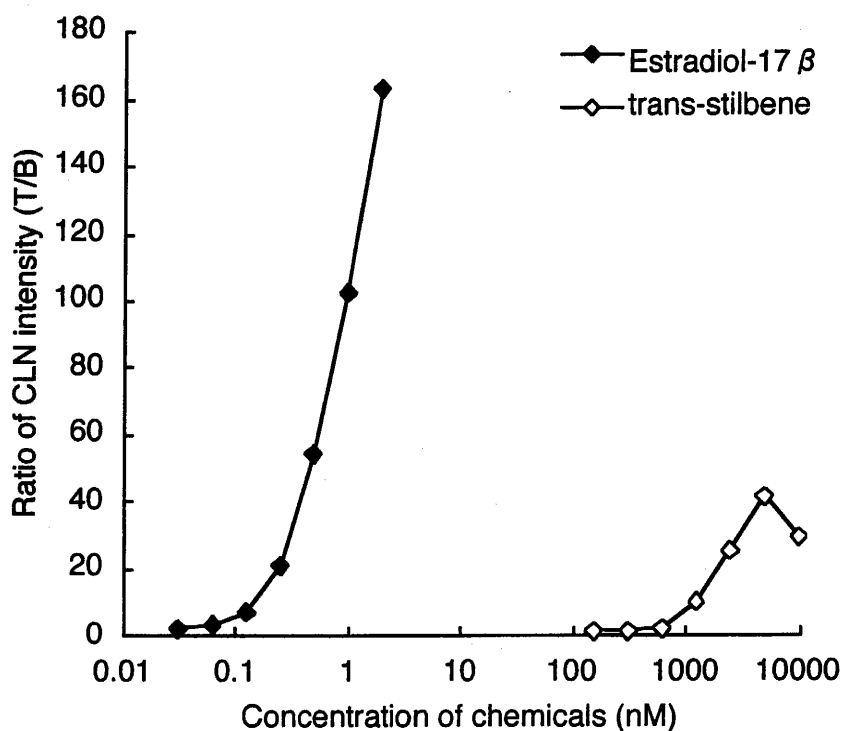


Fig. 3. Dose-response curves for estradiol-17 β (\blacklozenge) and *trans*-stilbene (\diamond) using the agonist (-S9 and +S9) test. The values were represented as the ratio of chemiluminescence (CLN) intensity (T/B) of β -galactosidase.

4. 3. 1. 2 内分泌かく乱化学物質のエストロゲン活性

内分泌かく乱作用が疑われている各種化学物質のエストロゲン活性を酵母 two-hybrid法により測定した。合成化学物質として界面活性剤の原料などに使用されているノニルフェノール (NP)、プラスチックの可塑剤などに使用されているビスフェノール-A (BPA)、流産防止剤として使用されていた合成エストロゲンのジエチルスチルベストロール (DES) を測定試料とした。また陽性対照物質としてエストラジオール-17 β (E2) についても同様に測定を行った(Fig. 4)。これら化学物質のEC_{x10}値を算出したところ、NP ; 124 nM、BPA ; 918 nM、DES ; 71 pM及びE2 ; 105 pMであり、ステロイド化学物質と比較してNP及びBPAのエストロゲン活性は高濃度領域にシフトし、活性は比較的弱いことが示されたが、いずれも比較的強い発光比を示し、顕著なアゴニスト作用が確認された。また、EC_{x10}値からE2のエストロゲン活性値を100としたとき、今回測定を行ったNP、BPA及びDESのE2に対する相対活性値はそれぞれ0.08、0.00001及び149と算出された。これらの物質のエストロゲン活性強度はDES>E2>NP>BPAの順であった。今回得られた結果は、これまで報告されている結果と同様であり、今後、本試験系は、様々な内分泌かく乱化学物質のスクリーニングに適用できることが示唆された。

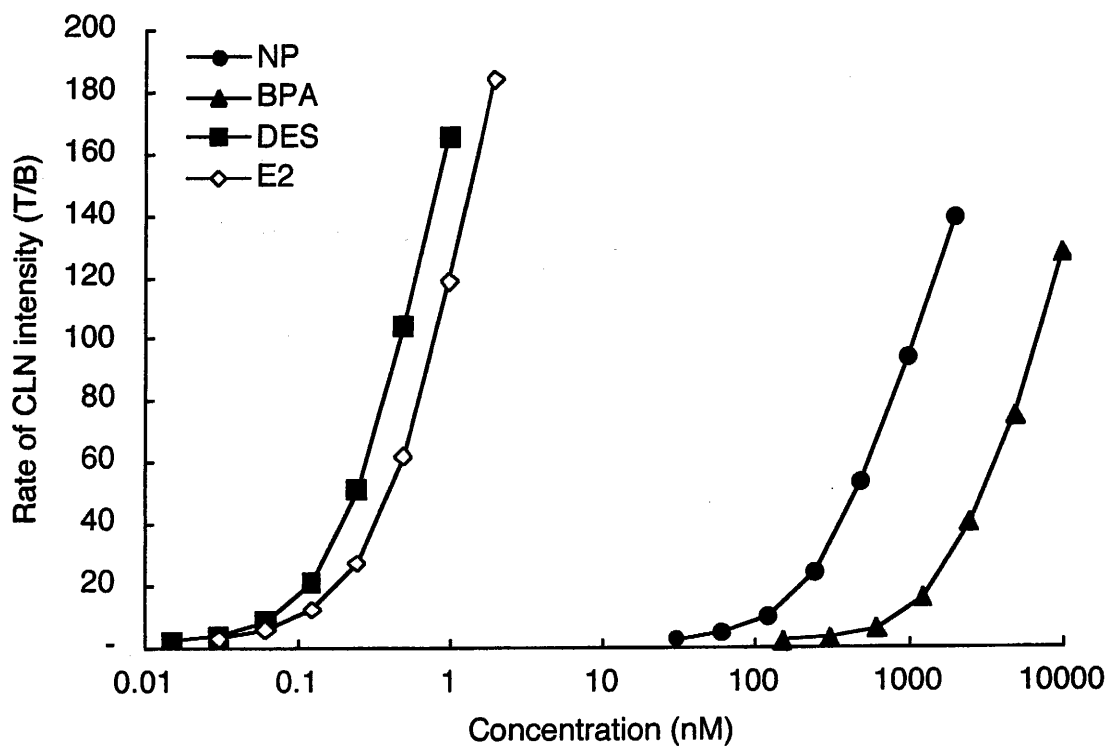


Fig. 4. Dose-response curves for nonylphenol (NP: ●), bisphenol A (BPA: ▲), diethylstilbestrol (DES: ■) and estradiol-17 β (E2: ◇) using the agonist (-S9) test. The values were represented as the ratio of chemiluminescence (CLN) intensity (T/B) of β -galactosidase.

4. 3. 2 実験動物用飼育飼料中に含まれるゲニステイン及びダイゼイン含有量

飼料中に含まれるゲニステイン、ダイゼイン含量は、飼料中に配糖体として含まれるゲニスチン、ダイジンを β -グルクロニダーゼ、スルファターゼで加水分解し、総ゲニステイン、総ダイゼイン量として Table 2 に表した。総ゲニステイン含量は、Carp A 飼料が最も多く $237.2 \pm 7.1 \mu\text{g/g}$ であり、ついで Alligator B 飼料 ($186.1 \pm 1.3 \mu\text{g/g}$)、Carp B 飼料 ($141.6 \pm 5.3 \mu\text{g/g}$) の順であった。一方、総ダイゼイン含量も同様で Carp A 飼料 ($175.8 \pm 2.6 \mu\text{g/g}$) が最も多く、ついで Alligator B 飼料 ($140.0 \pm 1.4 \mu\text{g/g}$)、Carp B 飼料 ($107.2 \pm 2.6 \mu\text{g/g}$) の順であった。Tsukamoto ら¹⁶⁾はゲニステイン及びダイゼインの配糖体であるゲニスチン、ダイジンがそれぞれ大豆全粒中に $1.1 \pm 0.6 \sim 15.0 \pm 1.5 \text{ mg/100g}$ 、 $0.6 \pm 0.1 \sim 10.2 \pm 1.8 \text{ mg/100g}$ 含まれていると報告しており、さらに大豆中のイソフラボンは、ダイゼイン、ゲニステイン及びグリシチンの 3 種類のアグリコンとそれぞれの配糖体であるダイジン、ゲニスチン、グリシチン及びそれらのマロニル化配糖体、アセチル化配糖体の 12 種類の存在が確認されている。今回、飼料中に含まれるゲニスチン、ダイジン配糖体を加水分解しゲニステイン、ダイゼイン総量として測定を行った。そのため加水分解前のそれら含量と、ゲニスチン、ダイジン含量は不明である。しかし飼料のエストロゲン活性試験においては、加水分解前にその活性がほとんど認められず、加水分解後に活性が認められた (Table 4) ことから、これら飼料中には主にゲニスチン、ダイジンとして含まれ、それら配糖体が加水分解を受け、ゲニステイン、ダイゼインとして検出されたと考えられる。また Court ら¹⁷⁾は市販のキャットフード中のゲニステイン、

ダイゼイン含量を測定し、調査した 42 種類のうち 24 種類の飼料中にゲニステイン、ダイゼインが検出され、その濃度は 1~163 $\mu\text{g/g}$ であったと報告している。今回、最もゲニステイン、ダイゼイン含量が高かった Carp A 飼料は原料に脱脂大豆が使用されており、これらの報告と比較しても高含量のゲニステイン、ダイゼインを含んでいた。さらに今回測定を行った 12 種類のうち 10 種類の飼料において、ゲニステイン、ダイゼインが検出されたことから、大部分の市販の実験動物用飼育飼料中に植物エストロゲンが含まれていることが示唆された。

Pelissero ら¹⁸⁾はシベリアチョウザメ *Acipenser baeri* に体重 20 g あたり 0.2 mg のゲニステインを投与したところ、血中ビテロゲニン濃度が $213 \pm 56 \mu\text{g/ml}$ (対照群 : 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以下) に上昇したと報告している。今回、ゲニステインが最も高かった Carp A 飼料 ($237.2 \pm 7.1 \mu\text{g/g}$) をシベリアチョウザメに体重 20g あたり 3%量摂取させたと仮定すると、約 0.14 mg のゲニステインを与えたと試算され、十分に血中ビテロゲニンを産生させえる量にほぼ等しいと考えられる。これらのことは、内分泌かく乱化学物質のスクリーニング試験を血中ビテロゲニンの産生を指標として行った場合、試験物質のエストロゲン活性が Carp A 飼料中のゲニステイン及びダイゼインのエストロゲン活性に大きく影響され、試験物質のエストロゲン活性強度によっては活性の変動が検出できない可能性を示唆している。

一般にヒトでは、吸収されたイソフラボンがグルクロン酸抱合や硫酸抱合され血中へと移行し、ほとんどは尿中へ排泄され、一部は胆汁から小腸内へ移行、腸内細菌叢によって脱抱合を受け、腸肝循環することが知られている¹⁹⁾。一方、マウスやラットなどの哺乳類、さらに魚類、爬虫類及び両生類といった動物種

は、植物エストロゲンの吸収、代謝及び排泄機構がヒトと全く同じとは限らず、また、生体内でエストロゲン活性を示すものは遊離型及び硫酸抱合型であるとされるが、グルクロン酸抱合型と比べてこれらの存在量は極めて少量であると考えられる²⁰⁾。今後、それぞれの動物種における植物エストロゲンの体内動態を明らかにするとともに、それら遊離型及び硫酸抱合型の個別測定法の確立が必要かもしれない。さらにゲニステインやダイゼインは、アンドロゲンをエストロゲンに変換させるアロマターゼ阻害作用²¹⁾や、活性化エストロゲンを減少させる性ホルモン結合グロブリンの肝臓における産生を刺激すること²²⁾なども報告されていることから、*in vivo* 試験系において内分泌かく乱化学物質のスクリーニングを行う際、飼育飼料中のゲニステイン及びダイゼインといった植物エストロゲン含量を測定するとともに、これら飼料を摂取した場合の基礎的な生理作用等も考慮し評価する必要があるだろう。

Table 2. Contents of genistein and daidzein in a feeding diet for an animal using HPLC analysis.

Diet	Total genistein ($\mu\text{g/g}$)	Total daidzein ($\mu\text{g/g}$)
Carp A	237.2 ± 7.1	175.8 ± 2.6
Carp B	141.6 ± 5.3	107.2 ± 2.6
Carp C	67.5 ± 0.3	50.2 ± 0.9
Carp D	N.D.	N.D.
Trout A	41.6 ± 2.2	30.5 ± 0.4
Trout B	50.2 ± 0.7	33.2 ± 0.6
Medaka A	9.3	33.2
Medaka B	58.5	37.3
Frog	N.D.	-
Turtle	31.4 ± 1.2	33.6 ± 1.6
Alligator A	26.7 ± 0.4	19.9 ± 0.3
Alligator B	186.1 ± 1.3	140.0 ± 1.4

N.D.: Not Detected ($<0.8 \mu\text{g/g}$), -: Not Determined. The data represent the mean and standard deviation (medaka A and B: $n=2$, other diet: $n=3$).

4. 3. 3 植物エストロゲンのエストロゲン活性

植物エストロゲンのエストロゲン活性評価は、ラット肝 S9 などによる代謝活性化していない (-S9 試験) 物質については行われているが、代謝活性化した (+S9 試験) 物質については少ない。しかし生体内にとりこまれた植物エストロゲンは肝臓などの薬物代謝酵素により代謝されるため、代謝生成物のエストロゲン活性を評価することは生体への影響を考える上で重要と考えられる。そこで、酵母 two-hybrid 法を用い、6 種の植物エストロゲンのエストロゲン活性を -S9 試験 (Fig. 4) 及び +S9 試験 (Fig. 5) において評価し、陽性対照物質として用いた E2 及び T-S のエストロゲン活性と比較した (Table 3)。

-S9 試験において、hER- α 及び β に対して最も強いエストロゲン活性を示した物質はクメステロールであり、その相対活性強度はそれぞれ 9.7×10^{-1} 及び 2.1 と試算された。E2 の相対活性強度 100 と比較するとそれぞれ約 1/100, 1/50 であった。一方、+S9 試験において、クメステロールは hER- α 及び β に対してともにエストロゲン活性は検出されなかった。ゲニスチン及びダイジンの -S9 試験における hER- α に対する相対活性強度はそれぞれ 3.4×10^{-4} 及び 3.2×10^{-4} となり、 β -グルクロニダーゼで加水分解することによってそれらの相対活性強度はそれぞれ 7.8×10^{-2} 及び 5.4×10^{-4} となった。これらはアグリコンであるゲニステイン (相対活性強度; 7.6×10^{-2}) 及びダイゼイン (相対活性強度; 5.4×10^{-4}) とほぼ同等の相対活性強度を示した。一方、hER- β に対する相対活性強度は、それぞれ 4.4×10^{-3} 及び 3.3×10^{-4} 、 β -グルクロニダーゼで加水分解することによって相対活性強度はそれぞれ 3.9×10^{-1} 及び 1.9×10^{-3} となり、これもゲニステイン (相対活性強度; 4.7×10^{-1})、ダイゼイン (相対活性強度; 1.9×10^{-3}) とほぼ

同等のエストロゲン活性を示した。これらのことより、ゲニスチン及びダイジンは、生体内において腸内細菌の β -グルクロニダーゼによって配糖体が加水分解され、ゲニステイン及びダイゼインに代謝されるというこれまでの報告¹⁶⁾と同様であった。さらに、加水分解したゲニスチン及びダイジンの hER- β に対するエストロゲン活性は hER- α と比較して約 3~5 倍高いものであった。+S9 試験における hER- α に対する相対活性強度は、ゲニスチンは 9、ダイジンではエストロゲン活性は検出されなかった。また β -グルクロニダーゼで加水分解することによって、ゲニスチンはエストロゲン活性が検出されず、ダイジン（相対活性強度; 6）はダイゼイン（相対活性強度; 4）とほぼ同等の相対活性強度を示した。一方、hER- β に対する相対活性強度は、ゲニスチンは 4、ダイジンではエストロゲン活性は検出されなかった。また β -グルクロニダーゼで加水分解することによって hER- α と同様に、ゲニスチンはエストロゲン活性を示さず、ダイジン（相対活性強度; 2）はダイゼイン（相対活性強度; 1）とほぼ同等のエストロゲン活性を示した。-S9 試験におけるイクオールの hER- α 及び β に対する相対活性強度は、それぞれ 7.3×10^{-2} 及び 1.7×10^{-1} と試算された。一方、+S9 試験における hER- α に対する相対活性強度は 224、hER- β に対してエストロゲン活性は検出されなかった。これらの結果より、ラット肝 S9 を用いた+S9 試験により大部分の植物エストロゲンは、代謝されることでエストロゲン活性が低減することが示唆された。

Morito ら²³⁾は酵母 two-hybrid 法を用いダイゼイン、ゲニステイン及びイクオールの hER- α 及び β に対するエストロゲン活性試験を行い、-S9 試験においてイクオールは両受容体に対して最も強い遺伝子発現能を示し、特に α に対して顕

著であると報告している。また、それらの物質の遺伝子発現能は、ダイゼイン<ゲニステイン<イクオールと報告しているが、本研究においては hER- α 及び β に対してダイゼイン<イクオール<ゲニステイン<クメステロールの順であった。今回の結果と比較するとイクオールとゲニステインのエストロゲン活性を示した濃度はほとんど同程度であり Morito らの結果とほぼ同様と思われる。今回の結果でクメステロール、イクオール及びゲニステインはダイゼインと比較して高いエストロゲン活性を持つことが再確認された。In vitro 試験系により化学物質のエストロゲン活性評価を行う際には、肝 S9 等を用いた代謝を考慮し評価を行う必要があると思われる。

Kuiper ら¹³⁾はゲニステイン、ダイゼイン、ビスフェノール A 及びノニルフェノールのエストロゲン活性試験を hER- α 及び β について行い、hER- α に対する結合親和性は E2 を 100 としたとき、それぞれ 4, 0.1, 0.05 及び 0.01 であり、また hER- β に対してはそれぞれ 87, 0.5, 0.09 及び 0.01 であったと報告している。In vivo 試験系において内分泌かく乱化学物質のスクリーニングを行う際、飼料中に含まれるゲニステインやダイゼイン等の植物エストロゲンを評価する必要性が強く示唆されたが、今後、試験化学物質とそれら植物エストロゲンの相互作用についても考慮し評価を行う必要があるだろう。

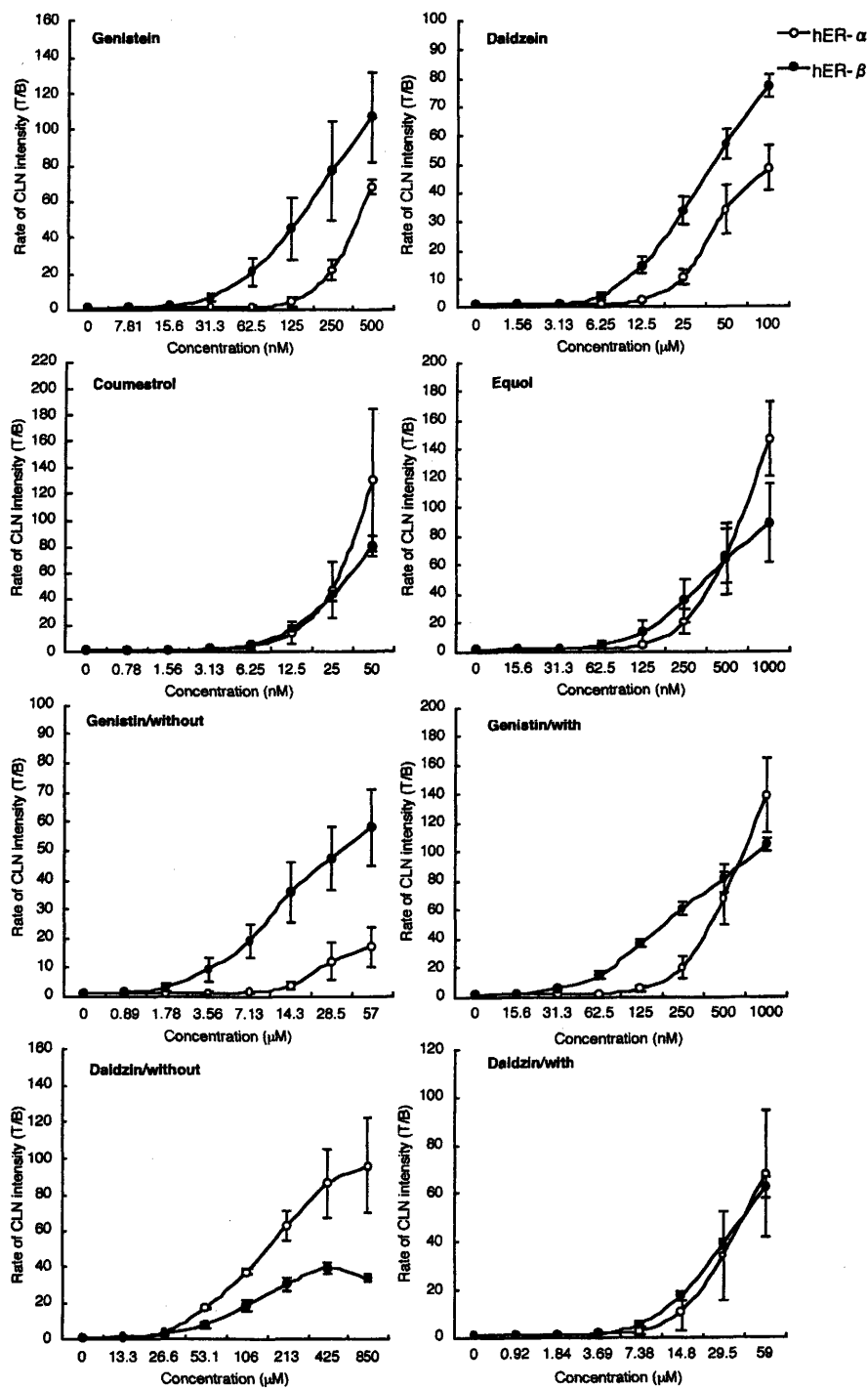


Fig. 4. Dose-response curves for genistein, daidzein, coumestrol, equol, genistin with and without the hydrolysis, and daidzin with and without the hydrolysis using the agonist (-S9) test for the yeast two-hybrid assay for estrogen receptor α (\circ) and β (\bullet). The values were represented as the ratio of chemiluminescence (CLN) intensity (T/B) of β -galactosidase. Data represent as the mean and the standard deviation (n=4).

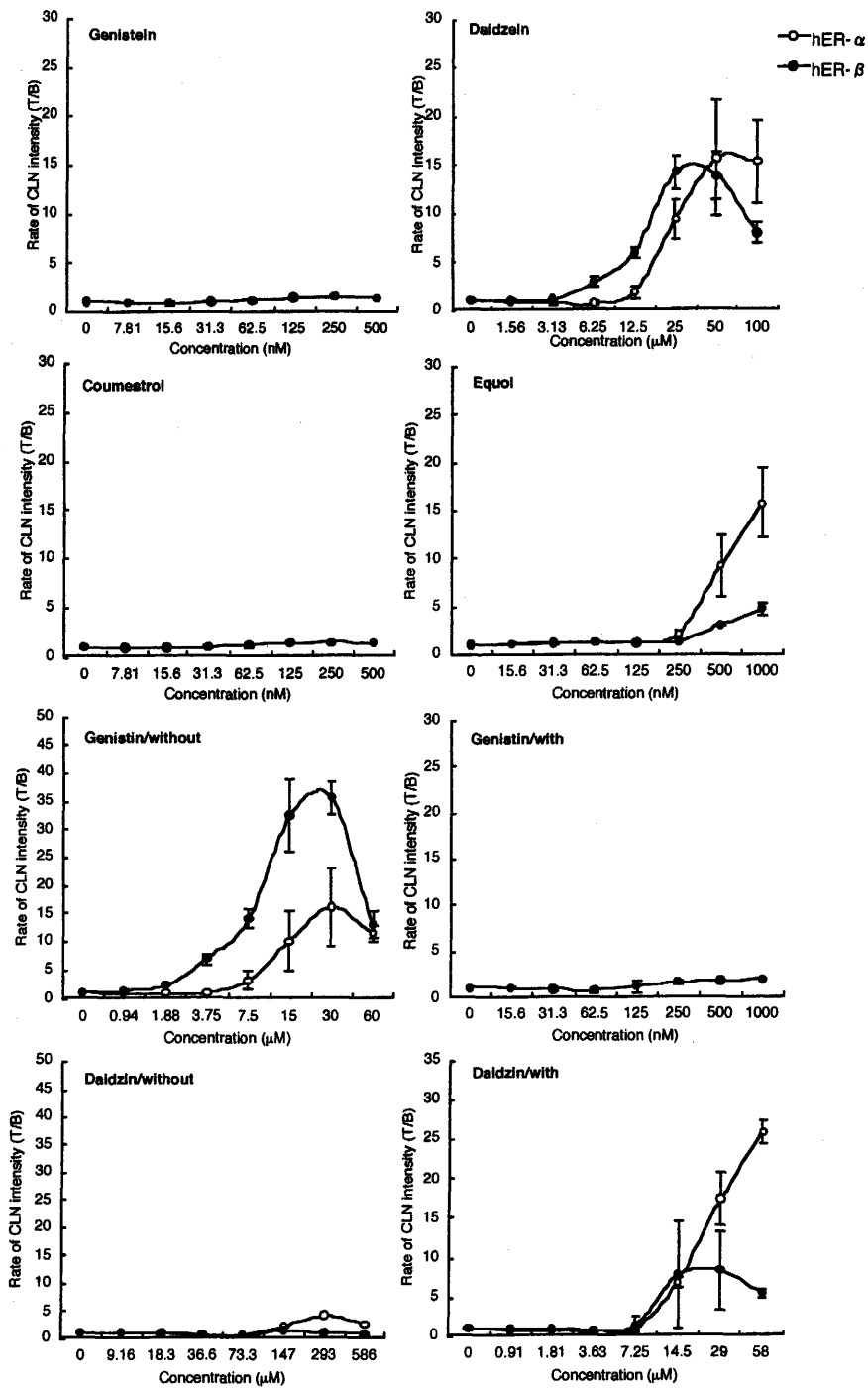


Fig. 5. Dose-response curves for genistein, daidzein, coumestrol, equol, genistin with and without the hydrolysis, and daidzin with and without the hydrolysis using the agonist (+S9) test for the yeast two-hybrid assay for estrogen receptor α (\circ) and β (\bullet). The values were represented as the ratio of chemiluminescence (CLN) intensity (T/B) of β -galactosidase. Data represent as the mean and the standard deviation (n=4).

Table 3. Estrogenic activities of phytoestrogens for human estrogen receptor- α and β using yeast two-hybrid assay.

Compounds	*Relative estrogenic activity			
	hER- α		hER- β	
	-S9	+S9	-S9	+S9
E2	100	-	100	-
T-S	-	8.2×10^{-3} (100)	-	8.1×10^{-3} (100)
Genistein	7.6×10^{-2}	-	4.7×10^{-1}	-
Daidzein	5.4×10^{-4}	3.6×10^{-4} (4.3)	1.9×10^{-3}	1.0×10^{-3} (1.2)
Coumestrol	9.7×10^{-1}	-	2.1	-
Equol	7.3×10^{-2}	1.9×10^{-2} (224)	1.7×10^{-1}	-
Genistin/without	3.4×10^{-4}	7.3×10^{-4} (8.9)	4.4×10^{-3}	3.2×10^{-3} (4.0)
Genistin/with	7.8×10^{-2}	-	3.9×10^{-1}	-
Daidzin/without	3.2×10^{-4}	-	3.3×10^{-4}	-
Daidzin/with	5.4×10^{-4}	4.8×10^{-4} (5.9)	1.9×10^{-3}	1.5×10^{-3} (1.8)

*The estrogenic activities of phytoestrogens were showed by relative activity, expressed as EC_{x10} (10% relative effective concentration) that is the concentration of the test chemical showing 10% of the estrogenic activity of DMSO control. Data of -S9 test were calculated as estrogenicity of E2; 100, and +S9 test were calculated as estrogenicity of T-S; 100. Genistin and daidzin with or without the hydrolysis were also showed. E2: estradiol-17 β , T-S: *trans*-stilbene. The all data represent the mean (n=4).

4. 3. 4 実験動物用飼育飼料のエストロゲン活性

飼育中に用いられる実験動物用飼料に含まれるゲニステインやダイゼイン等の植物エストロゲンが、*in vivo* 試験により内分泌かく乱化学物質のスクリーニングを行う際に影響を及ぼす可能性がある。本研究では、市販の実験動物用飼育飼料中の hER- α 及び β に対するエストロゲン活性を測定した (Table 4)。

一部の飼料を除いて、 β -グルクロニダーゼによる加水分解前には hER- α 及び β に対してエストロゲン活性は認められなかった。しかし、加水分解後に活性が上昇し、最もエストロゲン活性が高かったものは主原料に脱脂大豆が使用されていた Carp A 飼料であり、その相対活性強度は hER- α で 1.4×10^{-5} 、hER- β で 1.6×10^{-4} であった。この飼料はゲニステイン及びダイゼイン含量も、今回測定した飼料中で最も高い値を示した。ゲニスチン及びダイジンは加水分解することによりエストロゲン活性が増加した (Table 3) ことから、おそらく Carp A 飼料中にゲニスチン及びダイジンが含まれており、加水分解することによってゲニステイン及びダイゼインとして存在し、これらの物質が Carp A 飼料中のエストロゲン活性に寄与したものと考えられた。

一方、植物エストロゲン同様、各種飼料のエストロゲン活性試験においても hER- α に比べ hER- β により高いエストロゲン活性がみられた。一般に植物エストロゲンは α 受容体より β 受容体に対して親和性が高いことが知られている²²⁾。今回、エストロゲン活性が認められた全ての飼料において、 α 受容体より β 受容体により高い親和性が認められ、飼料中のエストロゲン活性に寄与した物質は大部分植物エストロゲンであったと推察された。近年、hER- β が単離されたが生理作用に関しては現在のところ全く未知である。しかし hER- α との生理作用

の類似性以外にも、標的遺伝子の調節能や発現部位などの相違により生じる生理作用が考えられる。今回、植物エストロゲンや各種飼料で hER- β に高いエストロゲン活性がみられたことは、*in vivo* の実験系において植物エストロゲンが含まれている飼料を用い、内分泌かく乱化学物質のスクリーニングを行う際に様々な生理作用を起こす可能性が考えられる。今後、試験化学物質の作用以外にそれら飼料を摂取した場合の基礎的な生理作用や、それらの複合影響についても詳細な検討を行う必要がある。また Matthews らは、ヒト、マウス、ニワトリ、グリーンアノールトカゲ及びニジマスのエストロゲン受容体に対するゲニステインの親和性を試験し、グリーンアノールトカゲのエストロゲン受容体が他の 4 生物種のそれと比較して最も高い親和性を示したと報告している²⁴⁾。また近年、環境省は、大腸菌を用いて発現したメダカ及びヒトエストロゲン受容体 (α) リガンド結合ドメインに対するノニルフェノール (混合物)、4-*t*-オクチルフェノールの結合能を [³H] E2 との競争結合試験によって測定した。ノニルフェノール (混合物) 及び 4-*t*-オクチルフェノールはいずれも濃度依存的にメダカエストロゲン受容体 (α) との結合性を示し、その相対結合強度はそれぞれ E2 の約 1/10、1/5 であり、ヒトエストロゲン受容体 (α) に対する強度 (いずれも E2 の約 1/2,000~1/3,000) と比較して強い結合性を持つことを示唆している。また、 β 受容体についても同様の試験を行った結果、E2 と比較して、ノニルフェノールは約 1/110 とヒトに比べて約 30 倍の相対結合強度を示した²⁵⁾。本研究において、hER- α 及び β を用いて魚類、爬虫類及び両生類用飼育飼料のエストロゲン活性試験を行ったが、本来それら動物種が持つ受容体に対する植物エストロゲンの親和性は異なることが考えられる。今後、各動物種の受容体を

それぞれ組み込んだエストロゲン活性試験系を開発し評価する必要がある。

第5章において、雄キンギョに植物エストロゲンを多く含む飼料と少ない飼料をそれぞれ与えた場合に、誘導される血中ビテロゲニンレベルが異なり、さらにそれらの飼料をそれぞれ与えノニルフェノールのエストロゲン活性試験を行った場合、活性を検出できるノニルフェノール濃度が異なる可能性があることを示唆した。一般に、魚類を用いて試験を行う際、飼育に使用する飼料中に植物エストロゲンが含まれる可能性があり、血中ビテロゲニンの産生を指標とした *in vivo* スクリーニング試験系において、得られる結果が大きく異なることが考えられる。今後、内分泌かく乱化学物質の評価を目的とする試験を行う際には、飼料中の植物エストロゲンや総エストロゲン活性を測定した飼料を試験に適用する必要がある。また、植物エストロゲンはエストロゲン受容体に結合して遺伝子活性化に働き、タモキシフェンなどの物質と同じように濃度依存性がある。従って、エストロゲン様作用を示す場合と、拮抗的に作用する場合が考えられる。今回、評価を行った飼料が摂取された場合、生体内でエストロゲンやその他のエストロゲン様作用をもつ試験化学物質と協調あるいは拮抗的に働くかは不明であるが、生体内ではそれらエストロゲン様物質との相互作用も考えられることから、それらの作用メカニズムについて明らかにしなければならないだろう。

Table 4. Estrogenic activities of a feeding diet for an animal for human estrogen receptor- α and β using yeast two-hybrid assay.

Diet	*Relative estrogenic activity			
	hER- α		hER- β	
	Without	With	Without	With
E2	100	100	100	100
Carp A	-	1.4×10^{-5}	5.4×10^{-6}	1.6×10^{-4}
Carp B	-	9.6×10^{-6}	4.0×10^{-6}	7.6×10^{-5}
Carp C	-	4.9×10^{-6}	-	3.5×10^{-5}
Carp D	-	-	-	-
Trout A	-	1.6×10^{-6}	-	1.9×10^{-5}
Trout B	-	2.7×10^{-6}	-	3.0×10^{-5}
Medaka A	-	-	-	-
Medaka B	-	3.6×10^{-6}	-	2.1×10^{-5}
Frog	-	-	-	-
Turtle	-	-	-	7.7×10^{-6}
Alligator A	-	-	-	1.2×10^{-5}
Alligator B	-	8.4×10^{-6}	2.4×10^{-6}	6.1×10^{-5}

*The estrogenic activities of the diets were showed by relative activity, expressed as EC_{x10} (10% relative effective concentration) that is the concentration of the test chemical showing 10% of the estrogenic activity of DMSO control. Data were calculated as estrogenicity of E2; 100. Diets with or without the hydrolysis were also showed. -: Not Detected. The all data represent the mean (n=4).

4. 3. 5 実験動物用飼育飼料中のエストロゲン活性と植物エストロゲン含量

実験動物用飼育飼料の酵母 two-hybrid 法によるエストロゲン活性値と HPLC による総ゲニステイン及びダイゼイン含有量を用い、それらの関連性について検討した。酵母 two-hybrid 法による E2、ゲニステイン及びダイゼインの EC_{X10} 値から、HPLC により測定した飼料中総ゲニステイン含量の E2 換算量及び総ダイゼイン含量の E2 換算量を算出した。また、両者の総量を植物エストロゲン (ゲニステイン及びダイゼイン) 含量からの E2 換算量とした (Fig. 6-X 軸)。一方、酵母 two-hybrid 法による E2、ゲニステイン及びダイゼインの EC_{X10} 値と各種飼料の EC_{X10} 値から、酵母 two-hybrid 法によるエストロゲン活性 E2 換算量を算出した (Fig. 6-Y 軸)。

大部分の飼料において hER- α 及び β において、植物エストロゲン含量からの E2 換算量と酵母 two-hybrid 法によるエストロゲン活性 E2 換算量の間には正の相関性が認められた ($p < 0.001$)。従って、これら飼料中における hER- α 及び β に対するエストロゲン活性は、植物エストロゲンであるゲニステイン及びダイゼインが大きく寄与していることが強く示唆された。しかし今回、飼料中の植物エストロゲン含量からの E2 換算量と酵母 two-hybrid 法によるエストロゲン活性 E2 換算量との関係で回帰直線から多少外れた飼料がいくつか存在した。Pelissero ら²⁶⁾は、市販の魚類用飼料中に、女性ホルモンである E2 及びエストロン (E1) がそれぞれ 9.35 ± 3.5 ng/g, 6.15 ± 1.9 ng/g 含まれ、シベリアチョウザメ *Acipenser baeri* の血中ビテロゲニン合成に関与していたと報告し、魚粉などの生物由来の原料に E2 及び E1 が含まれていた可能性が高いことを示唆した。

また、原材料の植物中に農薬等や抗エストロゲン及び（抗）アンドロゲン様作用をもつ物質等も含まれている可能性が考えられる。したがって、ゲニステイン及びダイゼイン以外の植物エストロゲンや、原料に含まれる（抗）エストロゲン及び（抗）アンドロゲン様物質についても存在を明らかにする必要があると考えられる。今後、飼料中に含まれる既知のエストロゲン様物質の機器分析による測定のみならず、その他の物質の影響も考慮に入れ、本研究で行った酵母 two-hybrid 法による飼料中の総エストロゲン活性の測定や、より詳細な飼料の選択及び新規の植物エストロゲン低含量飼料の開発等が期待される。

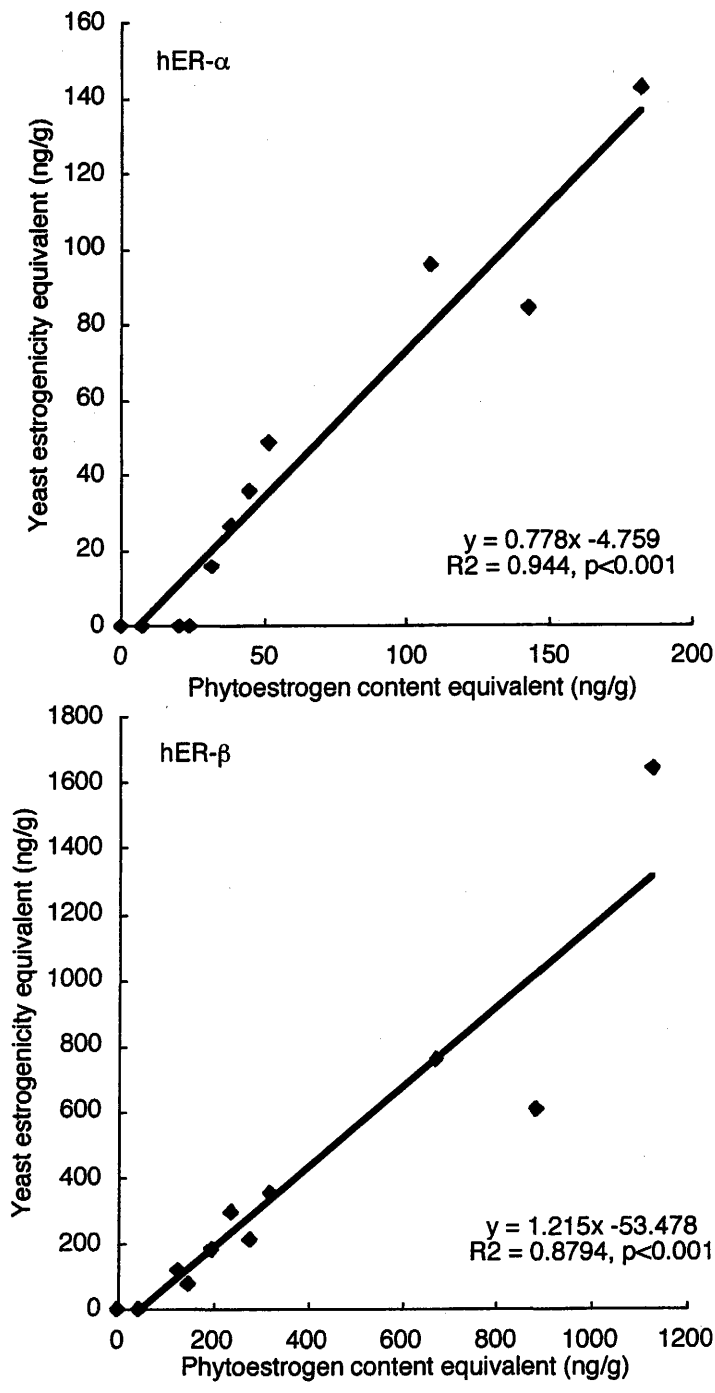


Fig. 6. Relationship between the estrogenicity equivalent from the estrogenic activities for the human estrogen receptor- α (hER- α) and β (hER- β) using the yeast two-hybrid assay and the estrogenicity equivalent from the contents of genistein and daidzein using HPLC analysis in a feeding diet for an experimental animal.

4. 4 参考文献

- 1) 環境庁リスク対策検討会監修: 環境ホルモン, 環境新聞社 (1997).
- 2) Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC), *Final Draft Report*, Washington (1998).
- 3) C.M. Taylor, B. Blanchard, D.T. Zava: A simple method to determine whole cell uptake of radiolabelled oestrogen and progesterone and their subcellular localization in breast cancer cell lines in monolayer culture. *J. Steroid Biochem.*, Vol. 20, 1083-1088 (1984).
- 4) Y. Azuma, Y. Nobuhara, K. Date, K. Ohno, K. Tanaka, S. Hirano, K. Kobayashi, T. Sakurai, M. Chiba, T. Yamada: Biological evaluation of styrene oligomers for endocrine-disrupting effects (II). *J. Food Hyg. Soc. Japan*, Vol. 41, 109-115 (2000).
- 5) A.M. Soto, C. Sonnenschein, K.L. Chung, M.F. Fernandez, N. Olea, F.O. Serrano: The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 103 (Suppl. 7), 113-122 (1995).
- 6) K. Sumida, N. Ooe, H. Nagahori, K. Saito, N. Isobe, H. Kaneko, I. Nakatsuka: An in vitro reporter gene assay method incorporating metabolic activation with human and rat S9 or liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 280, 85-91 (2000).
- 7) P. Balaguer, A. Joyeux, M.S. Denison, R. Vincent, B.E. Gillesby, T. Zacharewski: Assessing the estrogenic and dioxin-like activities of chemicals and complex mixtures using in vitro recombinant receptor-reporter gene assays. *Can. J. Physiol.*

- Pharmacol.*, Vol. 74, 216-222 (1996).
- 8) J. Ashby, J. Odum, D. Paton, P.A. Lefevre, N. Beresford, J.P. Sumpter: Re-evaluation of first synthetic estrogen, 1-keto-1,2,3,4-tetrahydrophenanthrene, and bisphenol A, using both the ovariectomised rat model used in 1933 and additional assays. *Toxicol. Lett.*, Vol. 115, 231-238 (2000).
 - 9) H. Tinwell, R. Joiner, I. Pate, A. Soames, J. Foster, J. Ashby: Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature mouse. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, Vol. 31, 118-126 (2000).
 - 10) L. Lutz, W. Kloas: Amphibians as a model to study endocrine disruptors: 1. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *The Science of the Total Environment*, Vol. 225, 49-57 (1999).
 - 11) L.B. Christiansen, K.L. Pedersen, S.N. Pedersen, B. Korsgaard, P. Bjerregaard: *In vivo* comparison of xenoestrogens using rainbow trout vitellogenin induction as a screening system. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 19, 1867-1874 (2000).
 - 12) H. W. Bennets, *et al.*: A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in western Australia. *Aust. Vet. J.* Vol. 22, 2-12 (1946).
 - 13) G.G.J.M. Kuiper, J.G. Lemmen, B. Carlsson, J.C. Corton, S.H. Safe, P.T. van der Saag, B. van der Burg, Jan-Åke Gustafsson: Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β , *Endocrinology*, Vol. 139, 4252-4263 (1998).
 - 14) 白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 西原 力, 森田昌敏: 酵母 Two-Hybrid System による簡便なエストロゲンアッセイ系の開発, *環境化学*, Vol. 10, 57-64

(2000).

- 15) J. Nishikawa, K. Saito, J. Goto, F. Dakeyama, M. Matsuo, T. Nishihara: New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Vol. 154, 76-83 (1999).
- 16) 家森幸男, 太田静行, 渡邊 昌編: 大豆イソフラボン, 幸書房 (2001).
- 17) M.H. Court, L.M. Freeman: Identification and concentration of soy isoflavones in commercial cat foods. *Am. J. Vet. Res.*, Vol. 63, 181-185 (2002).
- 18) C. Pelissero, B. Bennetau, P. Babin, F. Le Menn, J. Dunogues: The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 38, 293-299 (1991).
- 19) K.D.R. Setchell, H. Adlercreutz: Role of the gut flora in toxicity ad cancer, I.R.Roland ed. *Academic Press*, New York, 315-345 (1998).
- 20) H. Adlercreutz, T. Fotsis, J. Lampe, K. Wahala, T. Makela, G. Brunow, T. Hase: Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, Vol. 215, 5-18 (1993).
- 21) H. Adlercreutz, C. Bannwart, K. Wahala, T. Makela, G. Brunow, T. Hase, P.J. Arosemena, J.T. Kellis Jr, L.E. Vickery: Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 44, 147-153 (1993).
- 22) Y. Mousavi, H. Adlercreutz: Genistein is an effective stimulator of sex hormone-

- binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture. *Steroids*, Vol. 58, 301-304 (1993).
- 23) K. Morito, T. Hirose, J. Kinjo, T. Hirakawa, M. Okawa, T. Nohara, S. Ogawa, S. Inoue, M. Muramatsu, Y. Masamune: Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol. Pharm. Bull.*, Vol. 24, 351-356 (2001).
- 24) J. Matthews, T. Celius, R. Halgren, T. Zacharewski: Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 74, 223-234 (2000).
- 25) 環境省: ノニルフェノールが魚類に与える内分泌攪乱作用の試験結果に関する報告 (2001).
- 26) C. Pelissero, B. Cuisset, F. LeMenn: The influence of sex steroids in commercial meals and fish diets on plasma concentration of estrogens and vitellogenin in cultured Siberian sturgeon *Acipense baeri*. *Aquat. Living Resour.*, Vol. 2, 161-168 (1989).