

β -シクロデキストリンによる 17β -エストラジオールのエストロゲン活性の抑制効果

九州大学工学部 学生会員 ○河野圭浩 九州大学工学研究院 正会員 大石京子

1.目的

近年、多くの河川水や底質中に存在する内分泌攪乱化学物質が問題視されている。内分泌攪乱化学物質の中には女性ホルモンに類似した作用を示し本来のホルモン作用を攪乱するものもあり、PCB や DDT に代表される人工化学物質の他に、天然女性ホルモンなども含まれている。天然女性ホルモンであるエストロゲンの中で 17β -エストラジオール(E2)は特に高いエストロゲン活性を持ち、環境に及ぼす影響の重大性が指摘されている。

シクロデキストリン(CD)はグルコースが環状に連なったオリゴ糖で、内部の空孔に疎水性の有機分子を包接できる超分子の一つである。グルコースが 6、7、8 個環状に連なったものを α 、 β 、 γ -CD といい、それぞれ空孔の大きさが異なる。また CD は生分解性であり、分解産物はグルコースであるため、環境への負荷が小さい物質である。修飾 CD も合成されており、Hydroxypropyl- β -CD (HP- β -CD)は β -CD の溶解度を増加させたものである。

これまでの研究¹⁾で E2 は CD、特に β -CD と包接錯体を形成し、水への溶解度を増加させることを報告している。本研究では β -CD による E2 のエストロゲン活性の抑制効果と E2/ β -CD 包接錯体の生分解性について検討した。

2.実験方法

2.1 固相抽出による E2/ β -CD 包接錯体の回収率

10^{-5} mol/l の E2 溶液(1%メタノール溶液)に β -CD または HP- β -CD をそれぞれ 1.5%(w/v)、10%(w/v)になるように添加し、室温で 1 時間インキュベーションした。これらを Sep-Pak(Plus C18)で固相抽出し ELISA 法で E2 量を測定した。また抽出の前後の E2 量から回収率を求めた。

2.2 酵母 Two-Hybrid Assay による E2 のエストロゲン活性の測定

10^{-5} mol/l の E2 溶液(1%DMSO 溶液)に HP- β -CD を 10%(w/v)になるように添加して、室温で 1 時間インキュベーションした。これを希釈して E2 のエストロゲン

活性を測定した。

2.3 E2/ β -CD 包接錯体の生分解実験

10^{-6} mol/l の E2 溶液(1%メタノール溶液)に β -CD を 1.5%(w/v)、HP- β -CD を 1.5%(w/v)、10%(w/v)添加して 1 時間静置した。その後、植種として活性汚泥を加えて MLSS 濃度を 40mg/l とし、20℃、暗条件下でインキュベーションした。経日的に採水し GF/F でろ過した後、ろ液中の E2 を ELISA 法で測定した。

3.結果・考察

3.1 固相抽出による E2/ β -CD 包接錯体の回収率

Sep-Pak は疎水性の物質に対して高い保持能をもち、通常 E2 の濃縮に用いられている。Sep-Pak で固相抽出した E2 の回収率を図 1 に示す。 β -CD の水への溶解度が 1.8%程度であるため β -CD を 1.5%添加し、また β -CD よりも溶解度が高い HP- β -CD を 10%添加した。1%メタノール溶液からの E2 の回収率は 90%以上を示したが、E2/ β -CD、E2/HP- β -CD 錯体の回収率はそれぞれ 40%、20%程度で E2 の回収率に比べて大きく低下した。鳥屋尾ら¹⁾は E2 が β -CD と包接錯体を形成することによって水へ溶解度が増加することを示した。よって E2 は β -CD や HP- β -CD に包接されることで、疎水性から親水性へ変化したと考えられる。

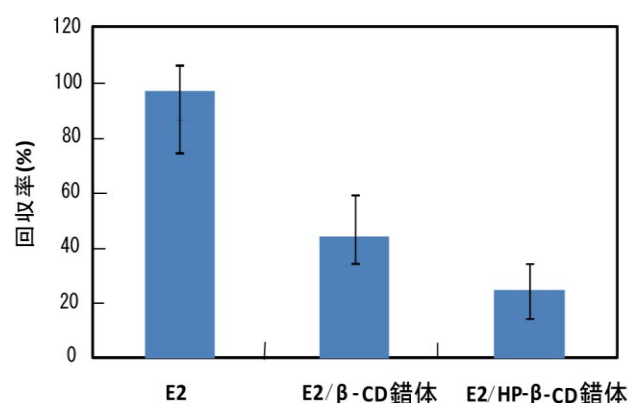


図 1 Sep-Pak(Plus C18)による E2 の回収率
(E2 : 10^{-5} mol/l β -CD : 1.5% HP- β -CD : 10%
メタノール濃度 1%)

3.2 酵母 Two-Hybrid Assay による E2 のエストロゲン活性の抑制

E2 と E2/HP- β -CD 錯体のエストロゲン活性を図 2 に

示す。E2/HP- β -CD 錯体は E2 よりエストロゲン活性が低下している。特に E2 濃度 $136 \mu\text{g/L}$ においては E2 に比べ、E2/HP- β -CD 錯体はおよそ半分までエストロゲン活性が低下している。包接能は CD の空孔の大きさで決まることから、E2/ β -CD 錯体でも E2 のエストロゲン活性は低下するものと考えられる。

細胞膜は脂溶性の低分子などは拡散で透過させるが、糖やタンパク質などの高分子や極性分子は透過させない。E2 のように低分子で脂溶性物質は細胞膜を透過し、細胞内のエストロゲンレセプターと結合してエストロゲン活性を示す。E2/CD 錯体は図 1 に示すように親水性となることで細胞膜の透過能が低下した結果、エストロゲン活性が減少したものと考えられる。従って β -CD で包接することで、E2 の環境ホルモンとしての働きを抑制できる。

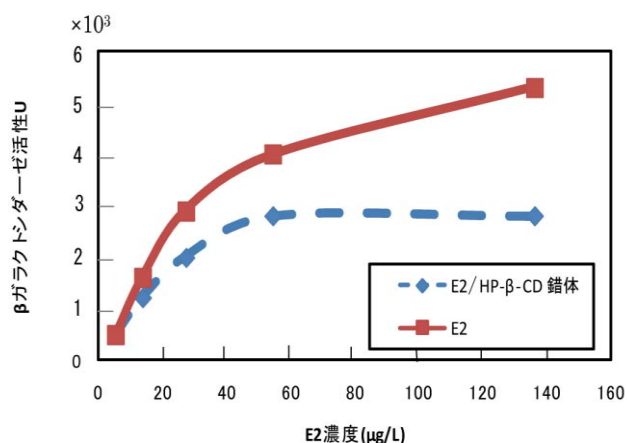


図2 酵母 Two-Hybrid Assay による E2 及び E2/HP- β -CD 錯体のエストロゲン活性

3.3 E2/ β -CD 包接錯体の生分解性

E2/ β -CD 錯体のエストロゲン活性抑制の持続性を検討した。E2、E2/ β -CD(1.5%)、E2/HP- β -CD(1.5%)、E2/HP- β -CD(10%)の E2 量の経日変化を図 3 に示す。E2 は 1 日目ではほぼ分解されている。一方それぞれの CD を 1.5% ずつ添加した E2/ β -CD 錯体と E2/HP- β -CD 錯体を比較してみると、E2/ β -CD 錯体では 10 日間で E2 量に大きな減少は見られなかったが、E2/HP- β -CD 錯体は徐々に E2 量が減少していき 5 日目までにほぼ全量が分解された。次に β -CD よりも溶解度が高い HP- β -CD の添加量を 10%とした場合、E2/ β -CD 錯体と同様に 10 日目までに E2 量に大きな減少は見られなかった。

以上の結果より、E2 は CD に包接されることで分解速度が小さくなることが確認された。活性汚泥は初め

に CD を分解し、その後 E2 の分解を始めると推測される。また同じ添加量(1.5%)でも HP- β -CD よりも β -CD の方が E2 の分解に時間がかかることから、 β -CD の方がより E2 の包接の持続性があると考えられる。ただし HP- β -CD は β -CD よりも溶解度が高いことから添加量を増加させることで β -CD と同じ、もしくはそれ以上に E2 の包接を持続できると考えられる。

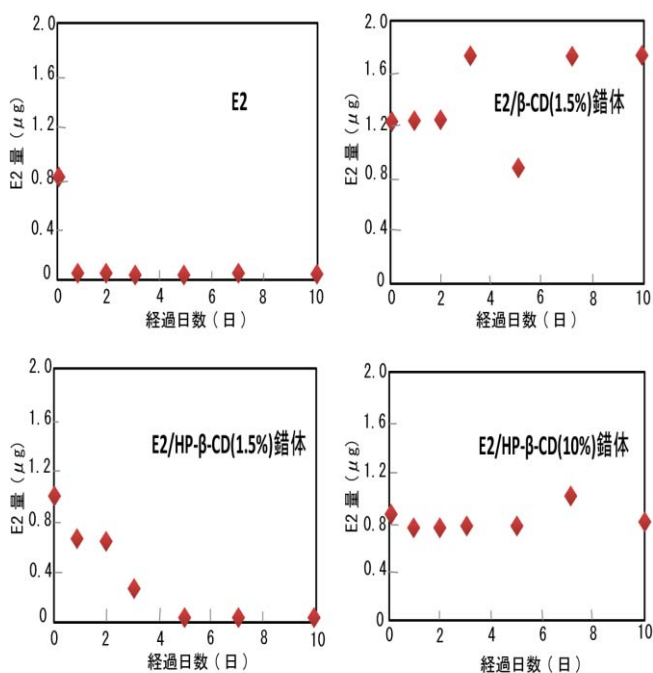


図3 E2 及び E2/ β -CD、E2/HP- β -CD 錯体の生分解による E2 量の経日変化

(E2: 10^{-6}mol/l β -CD: 1.5% HP- β -CD: 1.5%、10%
メタノール濃度 1% 活性汚泥の MLSS: 40mg/l)

4. 結論

- 1) Sep-Pak(PlusC18)による保持能が低下したことから、 β -CD や HP- β -CD による E2 の包接錯体は水溶性であることが確かめられた。
- 2) 酵母 Two-Hybrid Assay から、E2/HP- β -CD 錯体は E2 よりもエストロゲン活性が低下した。
- 3) E2 は β -CD と錯体を形成することで微生物による分解が抑制され、その効果は HP- β -CD より β -CD の方が大きかった。

5. 参考文献

- 1) 鳥屋尾啓太: シクロデキストリンの包接能を利用した 17 β -エストラジオール活性の抑制、平成 18 年度土木学会西部支部研究発表会講演概要集、pp.959-960