

ビスフェノール A の生分解途中で 増大するエストロゲン活性*

大谷 仁己**・嶋田 好孝**
白石 不二雄***・小澤 邦寿**

キーワード ①ビスフェノール A ②分解菌 ③分解機構 ④ジヒドロキシスチルベン
⑤エストロゲン活性

要 旨

ビスフェノール A (BPA) の生分解過程におけるエストロゲン活性の変化を河川水から分離した BPA 分解菌 MO6 株を用い、酵母ツーハイブリッド・アッセイで調べた。その結果、分解中間体の 4,4'-ジヒドロキシ- α -メチルスチルベン (DHMS) が多量に蓄積した場合には、添加 BPA 30mg/l に対して最高で約 50 倍 BPA 1,600mg/l 相当までエストロゲン活性が増大した。DHMS の蓄積が少ない場合でも 50mg/l の添加に対して 150mg/l 相当まで活性が増大した。河川水に BPA を添加して分解過程におけるエストロゲン活性の変化を測定した場合にも、8 回中 1 回であるが、エストロゲン活性が添加した BPA 以上になった。増加割合は低く、添加 BPA 50mg/l に対し最高で 100mg/l 相当であったが、BPA の分解中間体 DHMS が河川水中でもエストロゲン活性に寄与する可能性のあることが示唆された。

1. はじめに

ビスフェノール A [2,2'-ビス(4-ヒドロキシフェニル)プロパン, BPA] はポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂の原料、酸化防止剤、塩化ビニルの安定剤等として全国で年間約 25 万 t が使用されている。そのため、これまでの全国調査で環境水や底泥、魚類等からしばしば検出されており、環境汚染化学物質の一つとなっている。

Krishnan ら¹⁾は、ポリカーボネート製のフラスコを用い滅菌した水を作った。この水を使用した培地がエストロゲン活性を示し、その活性物質が BPA であることを明らかにした。BPA は実際にエストロゲン受容体に結合することが明らかにさ

れているが、エストロゲンレセプターへの結合能は 17 β -エストラジオールの数千分の 1 程度と弱い^{2,3)}。しかし、BPA はポリカーボネート製の食器や食品容器、缶詰の内面コーティング材、歯科材料のシーラント等にも使用されており、飲食を介した体内への取り込みが推定されている。BPA は環境ホルモン作用が疑われている物質の中では、ノニルフェノールとともにヒトが日常的にばく露される可能性が高い物質の一つである。

BPA はそのものにエストロゲン活性がある以外に、生分解された分解産物にもエストロゲン活性が認められている⁴⁾ため、分解過程を動的に捉える必要がある。われわれは、先に本誌で BPA

*Estrogen Activity Increases in the Process of Bio-degradation of Biphenol A

**Yoshimi OHTANI, Yoshitaka SHIMADA, Kunihisa KOZAWA (群馬県環境衛生研究所) Gunma Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences

***Fujio SHIRAIISHI (国立環境研究所) National Institute for Environmental Sciences

の生分解中間体 4,4'-ジヒドロキシ- α -メチルステルベン (DHMS) が BPA 以上にエストロゲンレセプター結合能を有するため、単離した分解菌で BPA の生分解を行うと分解途中で一時的にレセプター結合能が上昇することを示した⁵⁾。しかし、エストロゲンレセプターに結合後エストロゲン活性を発現しているか、どの程度発現しているかはエストロゲンレセプター結合能の測定からはわからない。そこで、今回酵母ツーハイブリッド・アッセイでエストロゲン活性を調べ、DHMS が蓄積した場合にはレセプター結合能以上にエストロゲン活性が上昇していることを確認した。また、河川水マイクロゾムで BPA を分解させた場合にも分解途中でエストロゲン活性が増大する場合があることも確認したので合わせて報告する。

2. 実験方法

2.1 BPA 分解菌の分離

桃ノ木川の河川水 100ml に BPA を添加し 25°C で培養した。BPA 濃度の変化を HPLC で追いつながら 1/10 濃度の標準寒天平板で生菌数の測定を行った。BPA 濃度の減少が認められてから新たに生菌数測定用の平板に生じた増殖速度の遅いコロニーを釣菌し、1/10 濃度の標準寒天平板で純培養した⁶⁾。

2.2 BPA 分解試験供試菌株

BPA 分解菌として桃ノ木川から分離した 8 株の中から MO 6 株 (*Brevundimonas vesicularis*) を用いた。

2.3 エストロゲン活性測定用試験液

MO 6 株を用いて BPA を分解させエストロゲンレセプター結合能を検査した試験液⁵⁾を -30°C で凍結保存した。エストロゲン活性測定時に溶解し、HPLC で各ピーク面積に変化のないことを確認後用いた。

2.4 エストロゲン活性の測定

酵母ツーハイブリッド・アッセイでエストロゲン活性を測定した。酵母ツーハイブリッド・アッセイは白石ら⁷⁾の方法に準じたが、マイクロプレートではなくガラス製のセルで 1 本ずつ測定したため、試薬量を 3 倍にして行った。試験の概要は以下のとおりである。

1) 凍結保存していた酵母液を解凍し、0.5ml

を三角フラスコ内の MSD 培地 100ml に接種し、30°C で約 20 時間振とう培養した。培養液の OD 595nm が 1.5 を超えた場合には、1.5 になるよう MSD 培地で希釈した。

- 2) 試験溶液に 1,200 μ l の MSD 培地を加え希釈試験溶液 (4% DMSO) を作った。
- 3) 最初のセルには 180 μ l の MSD 培地を、2 本目からは 2% DMSO 加 MSD 培地 180 μ l を加えた。
- 4) 最初のセルに希釈試験溶液 180 μ l を入れ、順次 2 倍段階希釈系列を作った。
- 5) 酵母培養液 180 μ l を各セルに加え、30°C で 4 時間振とう培養した。
- 6) 酵母細胞壁溶融酵素溶液 (Zymolyase 20T; 生化学工業) を Z buffer で溶解した溶液 (2 mg/l) と発現 β -ガラクトシダーゼを測定するための化学発光レポーター遺伝子測定用キット (Aurora Gal-XE Kit; ICN) の反応試薬を 5:3 の割合で混合した溶液を各セルに 240 μ l ずつ添加し、37°C で 1 時間反応させた。
- 7) 化学発光レポーター遺伝子測定用キットの発光促進液を 150 μ l ずつ各セルに注入混合し、レコーダーで測定した 10 秒後と 20 秒後の発光強度を平均して測定値とした。

発光強度の測定に 20~30 秒かかるため、各セルへの試薬の添加は 30~45 秒間隔で行った。各試験 3 回行い平均値をとった。

3. 実験結果および考察

3.1 BPA 分解菌の分離

BPA 分解菌は比較的容易に分離できる⁶⁾。河川水に BPA を添加し培養したところ、**図 1** に示すような 2 段階の増殖が起こった。培養 3 日後から始まった 2 段目の増殖後の培養液を 1/10 濃度の標準寒天平板にまき、25°C で 3 日間以上培養して出現した増殖速度の遅いコロニーを単離したところ 8 株すべてが BPA 分解菌であった。

BPA 分解菌として分離されている株には Lobos らがプラスチック工場排水処理施設の活性汚泥から分離した MV 1 株^{8,9)} (*Chryseomonas luteola* または *Flavimonas oryzihabita* の近縁種)⁸⁾、Ike らが BPA 含有排水を処理していた活性汚泥から分離した FJ-4 株^{10,11)} (*Pseudomonas paucimobilis*) など

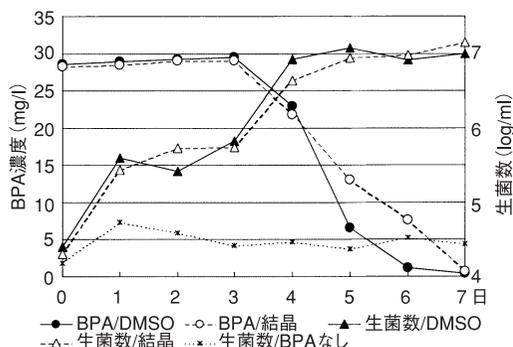


図1 河川水にBPAを添加・培養した際の生菌数の変化

がある。われわれが河川水から分離した分解菌8株⁶⁾は、簡易同定キットAPI 20NEで7種類の生化学的性状に分かれ、*Sphingomonas paucimobilis* (*Pseudomonas paucimobilis*) (2株)、*Brevundimonas vesicularis* (*Pseudomonas vesicularis*) (5株)、*Pseudomonas pseudoalkaligenes* (1株)と分類された。河川水中にはかなりの菌数のBPA分解菌が存在するものと思われる。BPAは分解できるが初期段階(図2の2種類のトリオールI, IIまで)で分解が止まってしまう菌⁶⁾*Shingomonas paucimobilis* (*Pseudomonas paucimobilis*)も分離された。BPAの生分解試験に用いたのは、このうちのMO6株(*Brevundimonas vesicularis*)である。

3.2 細菌によるBPAの分解機構

活性汚泥から分離されたMV1株^{8,9)}やFJ-4株¹⁰⁻¹²⁾を用いてBPAの分解機構が明らかにされている。推定されている分解機構を図2に示す。河川水から分離されたMO6株⁶⁾も図2の分解機構でBPAを分解しており、BPAの環境中での生分解は主に同機構で行われているものと思われる。

図2はBPAが2つの経路で分解されていくことを示しているが、主な分解経路は左側であり85%が左側、15%が右側の経路で分解されていく^{9,11)}。難分解性で残存しやすいのは右側の経路の化学種で、最後まで残存するのは2,3-ビス(4-ヒドロキシフェニル)-1,2-プロパンジオール(V)とp-ヒドロキシフェナシルアルコール(IX)である¹¹⁾。

ここで注目されるのは、主な分解経路の中間体である4,4'-ジヒドロキシ- α -メチルスチルベン

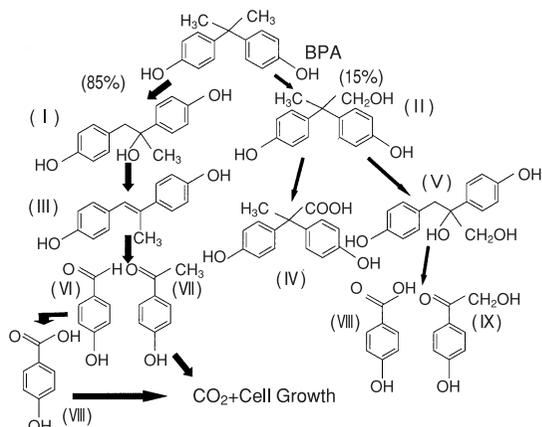


図2 MV1株やFJ-4株によるBPAの分解機構

(I)1,2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)-2-プロパノール、(II)2,2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)-1-プロパノール、(III)4,4'-ジヒドロキシ- α -メチルスチルベン、(IV)2,2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)プロパン酸、(V)2,3-ビス(4-ヒドロキシフェニル)-1,2-プロパンジオール、(VI)4-ヒドロキシベンズアルデヒド、(VII)4-ヒドロキシアセトフェノン、(VIII)4-ヒドロキシ安息香酸、(IX)4-ヒドロキシフェナシルアルコール

(DHMS, III)である。DHMSは、BPAのプロパン部分が水酸化される際にリアレンジメントを受け、その後脱水反応を受けて生成する⁹⁾。DHMSは、図3に示すように構造が合成女性ホルモンのジェチルスチルベストロール(DES)とよく似ているため、分解途中でDHMSが蓄積すると元のBPA以上にエストロゲン活性が増大する可能性がある。BPAとDHMS以外の分解中間体にもエストロゲン活性が認められているものがあるが、その活性は弱い⁴⁾。

3.3 単離した細菌によるBPAの生分解途中でのエストロゲン活性の変化

MO6株でのBPA分解途中のHPLCクロマトグラム⁵⁾を図4に示す。DHMS(III)のピークは、一段目の分解中間体である2種類のトリオール(I, II)のピーク(リテンションタイム2.84分のピークの淡色部分)とほぼ同時に出現する。DHMSのピーク面積は実験条件により大きく異なったが、多量に蓄積する場合も認められた。1晩前培養した対数増殖期にある新鮮な菌体を用いた場合には蓄積はわずかであったが、1週間前培養した古い菌体を多量に用いて生分解させた場合は多量のDHMSが蓄積した。これは、対数増殖期にある元

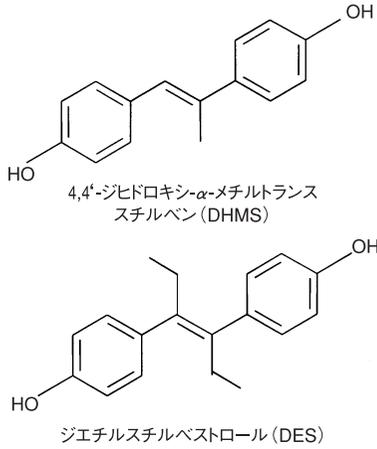


図3 DHMS と DES の構造類似性

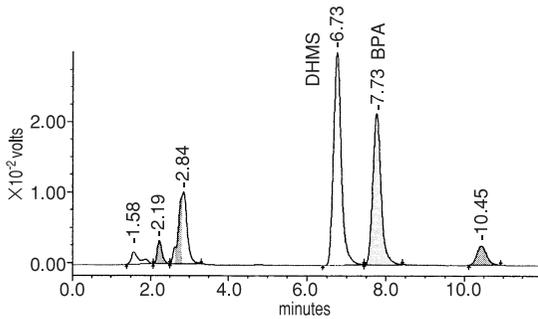


図4 MO 6 株による BPA の生分解途中の HPLC クロマトグラム

気な菌体では DHMS の分解過程もスムーズに進行するが、長期間前培養した弱った菌体では DHMS の生成に関与する酵素よりも DHMS の分解に関与する酵素のほうが先に失活していくことによると思われた⁵⁾。

DHMS が多量に蓄積した場合のエストロゲン活性の変化を酵母ツーハイブリッド・アッセイ^{7,13)}で測定した(図5)。BPA の初期濃度は30mg/lであったが、生分解の途中で BPA 換算で最高約50倍の1,600mg/l 相当までエストロゲン活性が増大した¹⁴⁾。最大のエストロゲン活性が観測された時点での残存 BPA 濃度は約 1mg/l であり、エストロゲン活性のほとんどが DHMS によるものであった。同じ培養液のエストロゲンレセプター結合能の測定では BPA 換算で100mg/l と3倍強の増大に留まっており⁵⁾、DHMS のエストロゲンレセプター結合能は BPA に比べてそう強くはないも

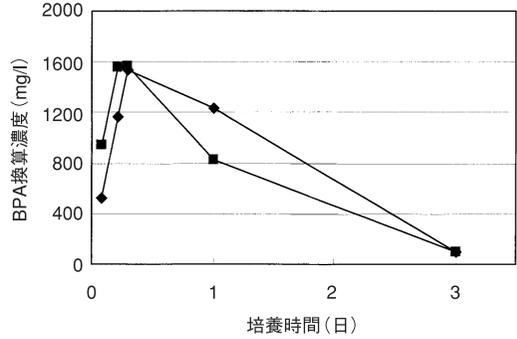


図5 DHMS が多量に蓄積した場合のエストロゲン活性の変化

添加 BPA 濃度 30mg/l

◆, ■: エストロゲン活性から換算した BPA 濃度

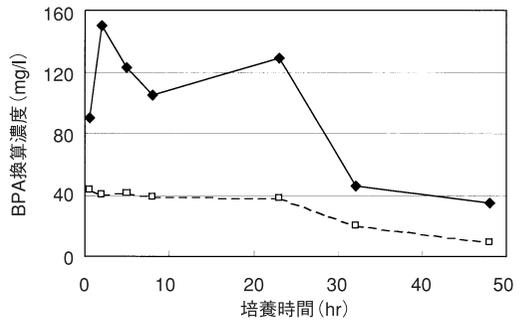


図6 DHMS がわずかしか蓄積しない場合のエストロゲン活性の変化

添加 BPA 濃度 50mg/l

◆: エストロゲン活性から換算した BPA 濃度

□: HPLC で測定した残存 BPA 濃度

のの、その後のコアクチベーター(共役因子)の認識過程などで大きな差が出るものと思われる。なお、DHMS の標準品は入手できなかったため DHMS のエストロゲン活性、エストロゲンレセプター結合能の定量はできなかった。

一方、1日前培養したばかりの新鮮な菌体を用いて分解させた場合生分解途中での DHMS の蓄積はわずかで、エストロゲンレセプター結合能の測定では一時的な上昇は認められなかった⁵⁾。この培養液のエストロゲン活性の測定結果¹⁴⁾を図6に示す。

レセプター結合能よりもエストロゲン活性で測定の方が BPA と DHMS の差が大きく出たため、添加した BPA 50mg/l に対し最大で約3倍150mg/l 相当のエストロゲン活性が観測された。図中の波

線は、HPLCで測定した残存BPA濃度である。最高のエストロゲン様活性を示した時点での培養液中の残存BPA濃度は約40mg/lであり、110mg/l相当はDHMSによる寄与であった。HPLCのピーク面積から、DHMSの量は多量に蓄積した場合の1/25程度であった。エストロゲン活性への寄与の程度は、蓄積が多い場合と比べ1/15とほぼ濃度差に見合う寄与であった¹⁴⁾。

3.4 河川水中におけるBPAの生分解途中でのエストロゲン活性の変化

単離した分解菌を用いてBPAを生分解させた場合には、前述のとおり程度の差は見られるがすべての実験で分解途中での一時的なエストロゲン活性の増大が認められた。しかし、河川水中にはBPA分解菌のみでなくDHMSを分解できる菌も存在する。

その確認のため河川水にBPAを添加した実験を行った。8回のうち1回はエストロゲン活性に影響を与える程度にDHMSが蓄積した¹⁴⁾。その場合のエストロゲン活性の変化を図7に示す。図中の波線で示される様に、BPAは3日間の誘導期を経て4日目に急速に分解され、その際に一時的にDHMSが蓄積した。蓄積量はBPA分解菌で1晩前培養した新鮮な菌体を用いた場合と同程度であった。酵母ツーハイブリッド・アッセイによるエストロゲン活性では初期BPA濃度の2倍まで増大していた¹⁴⁾。その他の7回の実験ではDHMSはBPAが急速に分解されていく過程ですべての例で若干認められたが、その量はわずかで

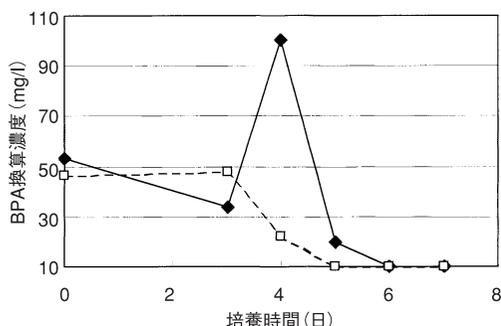


図7 河川水によるBPAの生分解途中におけるエストロゲン活性の変化

添加 BPA 50mg/l

◆：エストロゲン活性から換算した BPA 濃度
□：HPLC で測定した残存 BPA 濃度

あった(エストロゲン活性への寄与が認められた例の1/10程度)。この場合は図8に示すようにエストロゲン活性は残存BPAで説明でき、DHMSの寄与は認められなかった¹⁴⁾。河川水中ではDHMSは速やかに生分解されるものと思われる。

鈴木ら¹⁵⁾はDHMSを含めた数種類のBPA分解中間体の河川水中濃度を測定している。多摩川水系中流域ではBPAが112-252ng/l検出され、BPAの分解中間体である1,2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)-2-プロパノール(I)、2,2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)-1-プロパノール(II)、2,2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)プロパン酸(IV)が一部の検体から最大で72ng/l検出されている。図2の分解中間体にはないベンゼンリングがヒドロキシ化された3-ヒドロキシ-BPAも最大11ng/l検出されている。しかしエストロゲン活性の高いDHMSはすべての検体で検出されていない。

4. ま と め

単離したBPA分解菌を用いた実験ではエストロゲン活性の高い分解中間体のDHMSが蓄積するため、BPAの分解途中でエストロゲン活性が増大する現象が観測された。DHMSが多量に蓄積した場合は最大で50倍に、蓄積が少ない場合でも約3倍までエストロゲン活性が増大した。

河川水でのBPA分解実験では、多くの場合酵母ツーハイブリッド・アッセイのエストロゲン活性に影響を及ぼすほどのDHMSの蓄積は起こらなかった。実際の河川水の分析でもDHMS以外

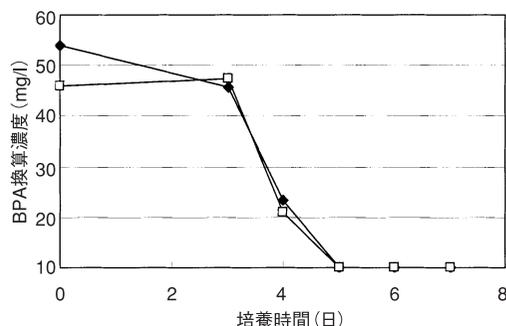


図8 河川水によるBPAの生分解途中におけるエストロゲン活性の変化

添加 BPA 50mg/l

◆：エストロゲン活性から換算した BPA 濃度
□：HPLC で測定した残存 BPA 濃度

の分解中間体は検出されるもののエストロゲン活性の高い DHMS は検出されていない⁴⁾。しかし河川水への BPA 添加実験では、DHMS によりエストロゲン活性が増大する場合もあり DHMS についてさらに検討する必要がある。

* * *

本研究は、当所の特別研究「内分泌かく乱化学物質(環境ホルモン)の環境動態研究」の一環として行ったものである。また、本研究を行うにあたり、ご配慮とご助言をいただいた当所調査研究グループリーダーの木村博一博士に深謝いたします。

—引用文献—

- 1) Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S. F., Tokes, L., Feldman, D.: Bisphenol-A: An Estrogenic Substance is Released from Polycarbonate Flasks during Autoclaving, *Endocrinol.*, **132**, 2279-2286, 1993.
- 2) 麻柄由樹, 辻本善政, 近藤昭宏, 加藤郁野進: 蛍光偏光度を用いた環境ホルモンの測定, 日本内分泌攪乱化学物質学会第一回研究発表会要旨集, p1, 1998.
- 3) 根岸治美, 白石寛明, 森田昌敏: 蛍光偏光度を用いた環境ホルモン活性測定の化学物質スクリーニングへの応用, 日本内分泌攪乱化学物質学会第一回研究発表会要旨集, p14, 1998.
- 4) 鈴木俊也, 中川好男, 高野伊知郎, 矢口久美子, 安田和男: ビスフェノール A およびその分解物のエストロゲン様活性および河川水中濃度, 第12回環境化学討論会要旨集, 22-23, 2003.
- 5) 大谷仁己, 藤波洋征, 嶋田好孝: 河川水から分離した細

- 菌によるビスフェノール A の分解機構—分解過程におけるエストロゲンレセプター結合能の変化—, 全国環境研究会誌, **26**, 176-184, 2001.
- 6) 大谷仁己, 藤波洋征, 斎藤武夫: ビスフェノール A 分解菌の河川水からの分離, 群馬県衛生環境研究所年報, **32**, 92-98, 2000.
 - 7) 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, **10**, 57-64, 2000.
 - 8) Lobos, J. H., Leib, T. K. and Su, T-M.: Biodegradation of Bisphenol A and Other Bisphenols by a Gram-Negative Aerobic Bacterium, *Appl. and Environ. Microbiol.*, **58**, 1823-1831, 1992.
 - 9) Spivack, J., Leib, T. K. and Lobos, J. H.: Novel Pathway for Bacterial Metabolism of Bisphenol A, Rearrangements and Stilbene Cleavage in Bisphenol A Metabolism, *J. of Bio. Chem.*, **269**, 7323-7329, 1994.
 - 10) Ike, M., Jin, C.S. and Fujita, M.: Isolation and Characterization of a Novel Bisphenol A-degrading Bacterium *Pseudomonas paucimobilis* Strain FJ-4, *Japanese J. Wat. Treat. Biol.*, **31**, 203-212, 1995.
 - 11) 陳昌淑, 池道彦, 藤田正憲: *Pseudomonas paucimobilis* FJ-4 株によるビスフェノール A の代謝経路, 日本水処理生物学会誌, **32**, 199-210, 1996.
 - 12) 池道彦, 藤田正憲: 水環境における内分泌攪乱物質の生分解挙動—ニルフェノールエトキシレイトとビスフェノール A を例として—, 環境技術, **29**, 450-454, 2000.
 - 13) Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, F., Matsuo, M. and Nishihara, T.: New Screening Methods for Chemicals with Hormonal Activities Using Interaction of Nuclear Hormone Receptor with Coactivator, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **154**, 76-83, 1999.
 - 14) 大谷仁己, 嶋田好孝, 白石不二雄, 小澤邦寿: ビスフェノール A の生分解過程におけるエストロゲン様活性の変化, 環境化学, **13**, 1027-1031, 2003.