

P2-075

ビスフェノール A の亜硝酸処理に伴う変異原性および エストロゲン活性の変動

増田修一、寺島結芽子、下位香代子、久留戸涼子、吉岡寿、
寺尾良保、木苗直秀

静岡県立大学大学院生活健康科学研究科

Change of mutagenic and estrogenic potency of before and after nitrite treatment
bisphenol A

Masuda Shuichi, Terashima Yumeko, Shimoi Kayoko, Kuruto Ryoko,
Yoshioka Hisashi, Terao Yoshiyasu, and Kinase Naohide
Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka

【目的】

近年、ビスフェノール A (BPA) やノニルフェノールなどの内分泌攪乱化学物質によるヒトおよび生態系に対する汚染が大きな社会問題となっている。水中に放出されたこれら化学物質は、上下水道処理場で塩素処理されることにより、塩素置換体を形成すること、また、生体内に吸収された場合、薬物代謝酵素により化学構造の変化が起こり、エストロゲン活性が変動することが知られている。

一方、我々は日常的に、葉菜類、水道水より、また食品添加物として硝酸塩および亜硝酸塩を摂り込んでいる。硝酸塩は口腔内でバクテリアの作用により還元され、亜硝酸塩に変換される。これら亜硝酸塩が魚肉中の二級アミンと胃内の酸性条件下で反応すると、変異・発がん物質であるニトロソアミンを生成すると考えられている。また、これまでに二級アミン以外の化学物質が酸性条件下で亜硝酸と反応すると変異・発がん物質を生成することも報告されている。したがって、ヒトが内分泌攪乱化学物質を亜硝酸塩と同時に摂取した場合、胃内で両者が反応して変異・発がん物質を生成する可能性が示唆される。

そこで、本研究では BPA に着目して酸性条件下で亜硝酸塩と反応させ、生成する化学物質の変異原性およびエストロゲン様活性の変動を調べた。さらに、生成物の化学構造の解析を試みた。

【方法】

BPA 1mM に 0.01~0.1M の亜硝酸ナトリウムを加え、pH3~5、37°C でインキュベートした。次いで、スルファミン酸アンモニウム溶液を加えて反応を停止し、S.typhimurium TA98 および TA100 を用いて、±S9mix で Ames 法により半反応液の変異原性を検定した。最も強い変異原性を示した反応液に酢酸エチルを加えて抽出し、ICR マウスに経口投与した後、末梢血における小核誘発能を検定した。また、ESR スピントラッピング法により、反応液中のラジカル生成の有無を調べた。BPA と亜硝酸塩との反応生成物について、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を組み込んだ MCF-7 細胞によるレポーター遺伝子発現試験および Estrogen-R(α)-Competitor Screening Kit を用いて、エストロゲンレセプター結合能を調べた。さらに、反応生成物の化学構造については LC/MS、NMR、IR 等の機器分析により検討した。

【結果および考察】

Ames 試験の結果、TA98 および TA100 株いずれにおいても BPA と 0.1M の亜硝酸塩を pH3.0、60 分間で反応させたところ、最も強い変異原性を確認した。また、S9mix 無添加で変異原性を示したことから、反応生成物が直接変異原物質であることが示唆された。反応生成物を ICR マウスに経口投与して、末梢血における小核誘発能を検討したところ、投与 48 時間後で強い小核誘発能がみられた。しかし、亜硝酸未処理の BPA には小核誘発能はみられなかった。次に反応生成物からのラジカルの発生について、ESR スピントラッピング法により検定した。未処理の BPA においてはほとんどラジカル発生は認められなかったが、亜硝酸処理後の BPA では強いラジカルの発生を確認した。

BPA と亜硝酸塩と BPA との反応で生成した物質の化学構造を解明するために機器分析を行った。反応液に酢酸エチルを加えて抽出後、HPLC で分離したところ、主に 2 つの生成物を確認した。それらの化学構造を NMR、LC/MS、IR 等により解析したところ、それらは 2-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)-2-(4-hydroxy-phenyl) propane [3-nitrobisphenolA, MW : 273] および 2,2-bis(4-hydroxy-3-nitrophenyl) propane [3,3'-nitrobisphenolA, MW : 318] であることを確認した。また、これら反応物のエストロゲン様活性を検討したところ、レセプター結合試験、レポーター遺伝子発現試験のいずれの試験においても BPA のエストロゲン様活性が亜硝酸処理することにより 1/15~1/30 にまで低下した。

これまでに BPA の塩素処理前または生体内酵素で処理した後の生成物のエストロゲン様活性を測定した報告があるが、実際にはヒトが BPA を摂取した場合、まず胃内で亜硝酸塩と反応することが考えられるが現在までにそれらに関する報告はみられていなかった。今回の結果より、BPA と亜硝酸塩がヒト胃内酸性条件下で反応することにより、新たな変異原性物質が生成することが明らかになった。しかし、亜硝酸処理後に BPA のエストロゲン様活性は低下するという新たな知見も得ることができた。今後、BPA 以外の内分泌攪乱化学物質の亜硝酸処理生成物についても変異原性およびエストロゲン様活性の変動を検討する予定である。