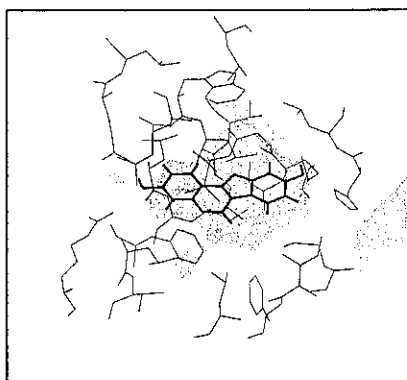
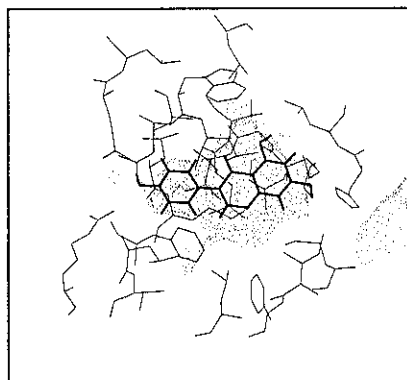


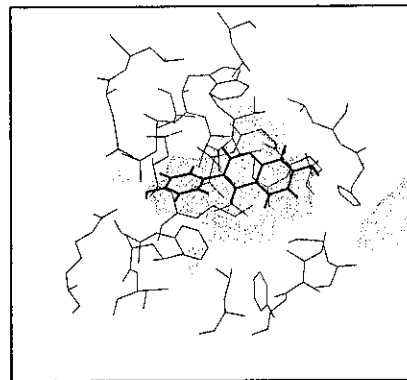
# Flavones/Isoflavones Docking Models



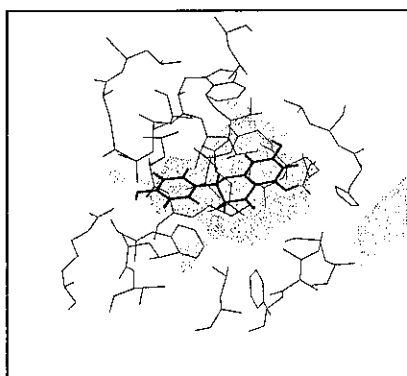
ED1 Coumestrol



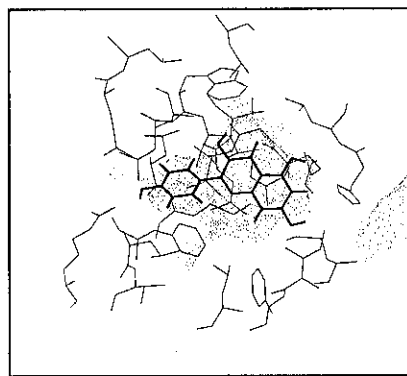
ED12 Genistein



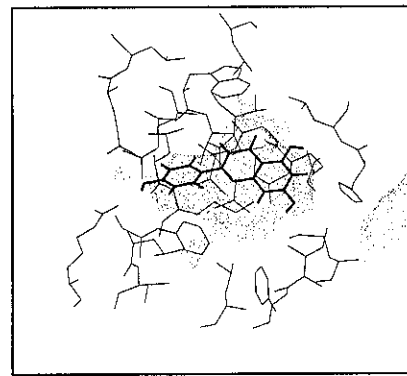
ED13 Daizein



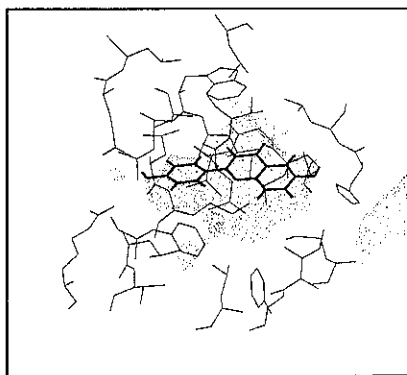
ED78 Naringenin



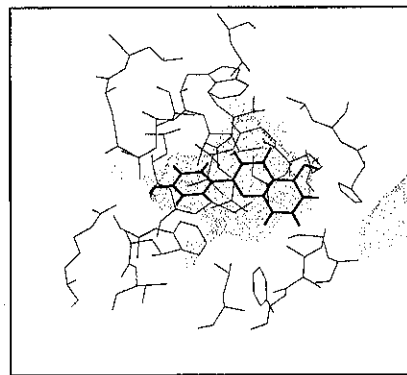
ED79 Kaempferol



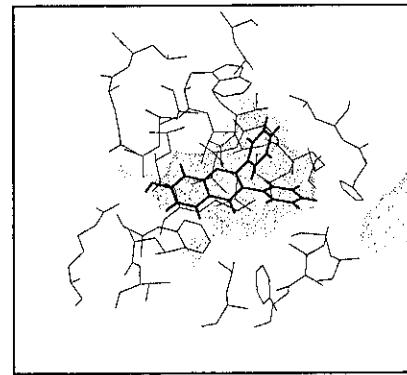
ED81 Apigenin



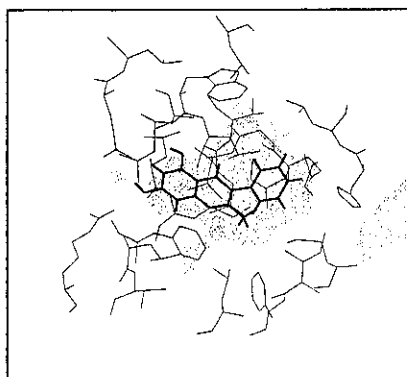
ED25 Unknown



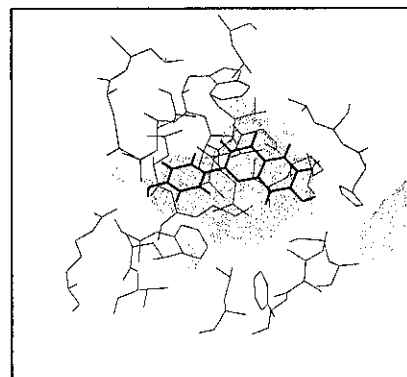
ED50 Unknown



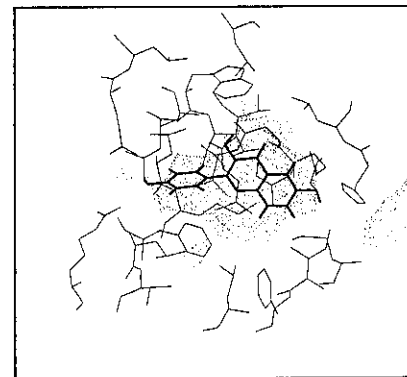
ED55 Unknown



ED51 Unknown



ED26 Unknown



ED39 Unknown

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)  
分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質の作用機構を考慮した表面プラズモン共鳴法による検出系の開発  
分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

研究要旨 内分泌攪乱物質は、ホルモン(エストロゲン、アンドロゲン、etc.)受容体に結合してその作用を現す。ホルモン受容体は、リガンド依存的な構造変化を引き金にその転写因子機能を発現する。個々のリガンドの生体作用は、そのリガンドが結合した受容体構造と関連している。本研究では、内分泌攪乱物質の生体内作用のメカニズムの解明と結果の 3D-QSAR への応用を目的として、リガンド(および内分泌かく乱物質(EDCs))結合が受容体構造に及ぼす影響を検討するため、バイオセンサーを用い、エストロゲンレセプターとそのレスポンスエレメントとの相互作用の速度論的解析を行った。

#### A. 研究目的

内分泌攪乱物質(EDCs)の生体への影響については、いまだ不明の部分が多くあるが、化学物質の多くが、エストロゲンをはじめとするホルモン受容体結合活性を有し、またレポーターアッセイ系などでホルモン様もしくは抗ホルモン様作用を示すことから、EDCs は生体内においても主にはそれら受容体を介して内分泌攪乱作用を惹起すると考えられる。エストロゲン受容体(ER)を始めとするホルモン受容体は、いずれも共通にリガンド結合部位(LBD)、DNA 結合部位(DBD)、転写活性化部位から構成されている。リガンドの結合は、受容体の立体構造を変化させて様々な生体内作用の引き金となる。

生体内におけるホルモンの作用は多岐に渡り、たとえばエストロゲンのみについてもその作用の全ては今だ明らかではない。また、生体本来の内分泌系自体のレギュレーション機構についても、*in vivo* での膨大な研究があるにも関わらず不明の部分も多く存在するため、単一の指標を基に内分泌攪乱物質の生体作用を予測することは困難である。

受容体を介した生体内作用については、それらが結合した受容体構造と関連することが、これまでの研究により示唆されている。すなわち、ER 結合性を有し EDCs と疑われる化合物について、その結合が受容体構造に与える

変化より、生体内での作用をある程度予測することが出来る。ER のリガンド結合部位(LBD)近傍の構造変化に関しては、結晶化構造解析による立体構造データをもとに、未知化合物の結合性およびLBDの構造変化の予測がある程度可能である。しかし、その信頼性に関しては今のところ充分とは言えず、また他のレセプターに関してはそれさえも不可能である。さらに、受容体全体の立体構造は解明されておらず、LBD 以外の部位の構造変化を計算科学的に予測することは出来ない。一方、受容体の構造変化は、受容体とレスポンスエレメントやコファクター等との相互作用に変化を及ぼすことから、それら相互作用の変化より立体構造の変化を解析することが可能である。

そこで、本研究ではバイオセンサーを用いてER-ERE相互作用を測定することより、リガンド(および内分泌かく乱物質(EDCs))結合による受容体構造の変化を解析し、それらの化合物の生体内作用との比較より内分泌攪乱物質の生体内作用メカニズムを解明し、得られたデータより新規 3D-QSAR への応用を目的としている。

#### B. 研究方法

1. ERE 固定化センサーチップの作成  
ストレプトアビジンをあらかじめコートしたセン

サーチップにエストロゲンのレスポンスエレメントを含むビオチン化合物オリゴヌクレオチド (5'- Biotin- tcgagcaaagtcAGGTCacagTGA CCTgatcaat-3')をインジェクトして固定化し、引き続き、相補配列のオリゴヌクレオチドをインジェクトしてセンサーチップ上でアニーリングさせ、ERE センサーチップを作成した。

## 2、ER-ERE 相互作用の測定

リコンビナント Human ER $\alpha$  を Flow バッファーで希釈して、17 $\beta$ -Estradiol (E2) もしくは、測定対象の化合物を混合し、氷冷下約1時間インキュベート後、上述の ERE センサーチップにインジェクトして、SPR 装置 (Biacore 3000, Biacore, Sweden) を用い、結合と解離の過程をそれぞれ測定した。加える化合物濃度は、結合試験の結果をもとにした。

3、ER-ERE 相互作用の変化の速度論解析  
リガンドの結合による ER-ERE 相互作用への影響を定量的に解析するため、結合解離過程の速度論解析を行った。化合物とインキュベートした ER サンプルを Flow バッファーで4~5段階に系列希釈して、ERE センサーチップにインジェクトした。得られたデータより、結合定数( $k_d$ )、解離定数( $k_a$ )および結合度(KA)を求め、結合したリガンドがそれぞれのパラメーターに及ぼす変化を検討した。なお、解析にはコンピューターソフト(BIAevaluation 3.0)を用い、Langmuir 型 1 対 1 結合式によりパラメーターを算出した。

## C. 研究結果

ER $\alpha$  は、リガンドの存在なしで ERE に対する結合活性を示す。17 $\beta$ -Estradiol (E2) の結合により ERE への親和性は濃度依存的に増加した(図 1)。一方、対照として用いたアンドロゲンレセプターレスポンスエレメントや一本鎖 ERE を結合したセンサーチップに対しては、E2 結合、非結合 ER のいずれも結合しない事などから、ER が二本鎖 ERE を特異的に認識して結合する事が確認された。

エストロゲンアゴニストの DES や、Yeast や MCF-7 を用いた系でエストロゲン様作用が示されている Bisphenol-A (BPA) の結合によっても同様に ER-ERE アフィニティーの増大が示された。しかし、BPA や Gen が結合した ER では、E2 結合 ER に比べて、ERE からの解離が遅いことが示され(図 2)、それぞれの化合物が結合した ER における DBD 構造の違いが示された。一方、アンタゴニストである ICI-182,780 や 4OH-Tamoxifen では、ER の ERE からの解離が非常に遅くなることが示された(図 2)。また、ICI-182,780 と 4OH-Tamoxifen では、阻害の作用機序が異なっており、結果はそうした違いをも明確に反映するものと考察された。

一方、3D-QSAR によりエストロゲンレセプターへの結合が予測されたフラボン誘導体について同様の検討を行ったところ、いずれの誘導体とも、BPA 型の ER-ERE 相互作用の速度論的特徴を現すことが示された(図 3)。また、このときの ER-ERE アフィニティーは、COS1 細胞レポーターアッセイ系における転写活性化レベルと相関することが示唆された。

## D. 考察

今回の結果より、ER-ERE 相互作用はリガンド依存的に変化し、生体内作用の異なる化合物では、その速度論的特徴が異なることが示された。特にアンタゴニストでは、アゴニストと比較して ER の ERE からの解離が遅く、この系を用いることでこれらを区別できる可能性が示唆された。また今回、アゴニストとして用いた BPA や Gen について ER の ERE からの解離が E2 に比べ遅い事が示された。これらの化合物はレポーターアッセイでは、E2 と同様の転写活性を示すが、in vivo では組織ごとに E2 とは異なる作用を示す可能性が示唆されている。さらに 3D-QSAR でセレクトされたフラボン類について BPA と同様の結果が示された。これらの化合物の in vivo でのデータは無いが、BPA もしくは Gen 様の作用を

示す可能性がある。ER-ERE 相互作用の変化はリガンド結合によるERのDBD構造の変化を示しており、今回の結果は、その変化がリガンド特異的であることを示している。作用の異なるリガンドの結合による受容体(ER)構造の差について、これまでにLBDに関しては、E2と4OHT結合ER-LBDの結晶解析などにより示されている。一方、DBDに関してはゲルシフトアッセイなどの結果からリガンド依存的な変化は、ほとんど認められないとされている。しかし、今回、ERへのリガンド結合による構造変化が、LBD近傍構造のみではなくDBD構造、おそらくは受容体全体、にまで及んでいる事が示された。またさらに、その構造的特徴がリガンドとして結合した化合物の生体内作用との相関が示唆された。

本研究に用いたバイオセンサーでは、生体物質の相互作用を速度論的に解析する事が可能であり、これまでの結合度のみを対象とする他の系に比較してより詳細な検討を行えることを特徴としている。この方法によれば、ホルモンレセプターを介したシグナル伝達系各ステップに対する、内分泌攪乱化学物質のmode of actionを解析するが可能であり。今後、EREのみでなくco-factorとの相互作用などの検討をあわせ、受容体全体構造への影響から、化合物の生体への本質的影響の予測を可能にできるものと考察された。

#### E. 結論

化学物質による受容体を介した生体作用は、その受容体結合により惹起される。受容体の立体構造変化は、他の生体分子との相互作用に影響することから、その立体構造は結合した化学物質の生体作用を反映することがこれまでも指摘されてきており、今回の結果においても、化合物が結合したERの構造のプロパティは生体内作用の予測に有用な情報を与えることが示された。

現在のところ、ER全体の3次元構造は不明であり、計算科学的手法による3D-QSARでは計算モデルとなる情報を必要とするため、

LBDのみを対象にその構造変化を検討可能である。しかし、今回の結果はリガンド結合による影響がDBDにまで及び、ER全体構造に及ぼす影響の検討が必要である事をしめしている。本研究による方法では3次元構造そのものを決定することなく、実験解析的にレセプター構造に関するプロパティを求め、得られた各パラメーターと生体内作用とのリレーションを構築するにより、化合物のホルモンレセプターシグナル伝達系各ステップに対する修飾を検討することが可能である。

本研究から得られる知見は、単に化学物質の内分泌攪乱作用を予測するものではなく、生体への本質的影響までを予測可能にし、またさらに動物試験などのデータと組み合わせ、得られた情報を計算科学的解析にフィードバックすることで、新規3D-QSARの発展に寄与すると結論づけられた。

#### F. 研究発表 学会発表

A.Ono, M.Yamamoto, A.Takagi, J.Kanno, and T.Inoue, Molecular mechanism of endocrine disrupting chemicals (EDCs) American Association of Cancer Research special conference on The Steroid Receptor Superfamily, 1999.

A.Ono, J.Kanno and T.Inoue, Differences of Estradiol and non-steroidal agonists and/or antagonist effects on the estrogen receptor and estrogen response element interaction kinetics. Keystone Symposia conference on Endocrine Disruptors, 1999.

A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Mechanism based high through put screening method for endocrine disrupting chemicals (EDCs) using bio-sensor. 2nd European Workshop 99 International Molecular Toxicology

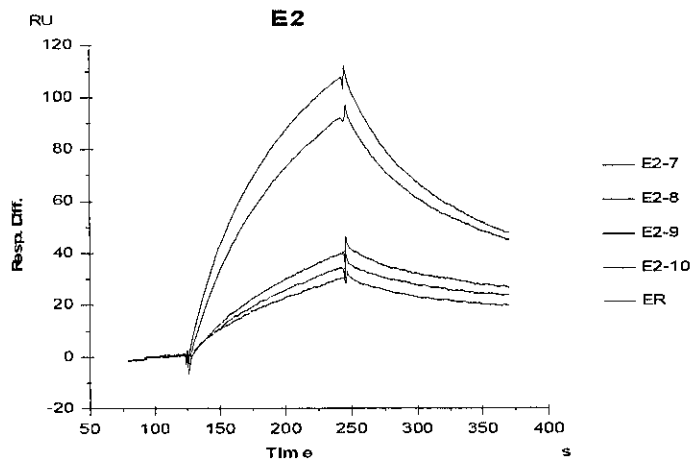


図 4 ER-ERE 相互作用における 17 $\beta$ -Estradiol(E2)濃度依存性

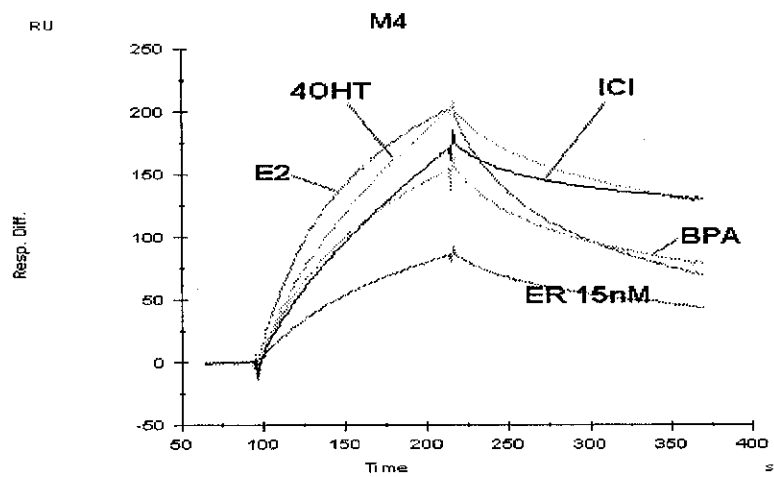


図 2 化合物(アゴニスト、アンタゴニスト)の結合による ER-ERE 相互作用の変化: 結合した化合物に特異的な相互作用から、それぞれの化合物が ER 立体構造に及ぼす変化の違いが示された。

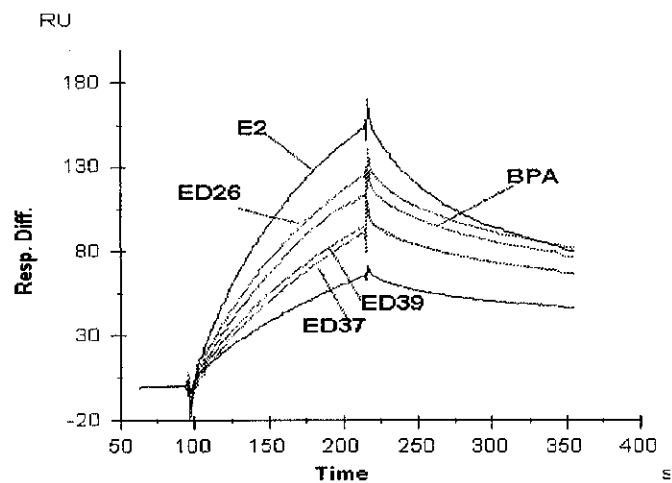


図 3 3D-QSAR で活性が予想された化合物(ED26,37 および39)の ER-ERE 相互作用への影響: いずれも BPAに近い変化を示した

## 内分泌かく乱物質等の文献情報に関する調査研究

分担研究者 長谷川隆一 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室長  
協力研究者 小泉睦子、廣瀬明彦

### 研究要旨

本年度は、最近研究が大きく進展したアルキルフェノールに関してここ数年内に公表された最新の情報に注目し、最初に培養細胞や酵母を用いたエストロゲン様作用、ほ乳動物（ラット、マウス）に投与した際の子宮を中心とする雌生殖器、乳腺および雄生殖器に対する作用を、続いて、生体における体内動態および毒性試験による成績をまとめ、最後に作用発現摂取量を踏まえ、ヒトが摂取したときのリスクアセスメントおよび総合考察を行った。その結果、培養細胞あるいは酵母を用いたエストロゲン様活性は、nonylphenolが17 $\beta$ -estradiolの1,000~300,000分の1で、octylphenolがnonylphenolの10~30倍強いとの結果が得られているが、ヒトへ外挿の場合には経口投与による作用発現投与量が最も重要である。In vivo摂取による生殖系への影響のなかで、最も低い経口摂取無毒性量は生殖発生毒性に関するNTPの多世代生殖試験の低用量で、15 mg/kg/dayである。この値を現在知られている暴露量から推定されるヒトへの摂取量と比較し、蓄積性のないことを踏まえると、成人においては十分に高い安全域が保たれていると考えられる。しかし、一般的に胎児・新生児期は内分泌かく乱物質を含む多くの化学物質に対する感受性が高いとされており、また、信憑性はともかく幾つかの動物実験で低用量の胎児・新生児期暴露による影響が報告されていることから、今後、胎児・乳児期からの長期暴露も含め、更なる検討が必要であると考えられる。

### A. 研究目的

本研究では、近年、内分泌かく乱作用が問題となった化学物質のうち、特にプラスチックや樹脂の原料として使用されている物質を取り上げ、各化学物質の内分泌かく乱作用に関する情報の信憑性を調査し、それらの物質の内分泌かく乱作用について評価する。そこで、本年度は、最近研究が大きく進展したアルキルフェノールに関して、それらの情報を網羅し、最近の報告を加えて情報整理を行ないと共に生体に対する作用を総合的にまとめることが重要であると考えられる。

### B. 研究方法

ここ数年内に公表された最新の情報に注目し、最初に培養細胞や酵母を用いたエストロゲン様作用、ほ乳動物（ラット、マウス）に投与した際の子宮を中心とする雌生殖器、乳腺および雄生殖器に対する作用を、続いて、生体にお

ける体内動態および毒性試験による成績をまとめ、最後に作用発現摂取量を踏まえ、ヒトが摂取したときのリスクアセスメントおよび総合考察を行った。

### C. 研究結果

アルキルフェノールは内分泌かく乱物質の一つとして最近注目を集め、特にその女性ホルモン様作用（エストロゲン様作用）が指摘されている。たとえば、イギリスの河川で雄魚の精巣萎縮が、その上流の羊毛洗浄工場で界面活性剤として用いられたノニルフェノールエトキシレートと関連性があるのではないかと疑われた。アルキルフェノールは抗酸化剤や非イオン性界面活性剤として近年大量に使用されているアルキルフェノールポリエトキシレート（*para*位にアルキル基が付いた構造(S-1)）の成分で、これは生態系においては容易に分解してアルキルフェノールを遊離する。抗酸化剤と

してはプラスチックやゴム製品に、非イオン性界面活性剤としては洗剤、塗料、除草剤、殺虫剤などに使用され、食品などを經由して我々が日常的に摂取する可能性がある。これらの目的に使用されているアルキル基は 80%が nonyl 基で、残りが octyl 基と考えられている。したがって、環境に溶出するアルキルフェノールは *p*-nonylphenol (S-2)と *p*-octylphenol (S-3)ということになる。しかし、*p*-nonylphenol は 22 もの異性体の混合物であり (Wheeler ら: 1997)、そのなかで S-4 が最も強いエストロゲン様作用を有するであろうことが提唱されている (Warhurst: 1994)。また、*p*-octylphenol の場合は *p*-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol [*p*-tert-octylphenol] (S-5)が主な成分と考えられている。ところが、各実験で用いられているアルキルフェノールは、*p*-nonylphenol ではほとんどの場合に混合比の不明な混合物が、*p*-octylphenol では比較的純度の高い *p*-tert-octylphenol が用いられている。そこで、本報告書では便宜上 *p*-nonylphenol 混合物を nonylphenol、*p*-tert-octylphenol を octylphenol と表記する。

## 1. 細胞を用いたエストロゲン様作用の評価

最初に、Soto ら(1991)が nonylphenol はヒト乳がん由来の培養細胞 MCF-7 の細胞増殖を  $10^{-6}$ M から引き起こすことを示した。その活性は  $17\beta$ -estradiol の約 1/300,000 であった。その後、White ら(1994)は MCF-7 の細胞増殖活性を用いて、nonylphenol と octylphenol を比較検討し、nonylphenol は  $10^{-6}$ M で octylphenol は  $10^{-7}$ M 以上で、増殖作用を発現することを示した。さらに、MCF-7 にマウスのエストロゲン受容体遺伝子とレポーター遺伝子を組み込んで転写活性を見る方法では、 $10^{-7}$ - $10^{-5}$ M の範囲で活性が認められ、octylphenol の活性は nonylphenol の約 10 倍強く、 $17\beta$ -estradiol の約 1/1,000 であり、またその活性は抗エストロゲン作用

物質である hydroxytamoxifen および ICI 182,780 で完全に抑制された (White ら: 1994)。Shelby ら(1996)は数種のエストロゲン様作用を有する化学物質を比較検討する一環として、HeLa 細胞を用いてマウスのエストロゲン受容体遺伝子とレポーター遺伝子を組み込んで転写活性を測定した。その結果、nonylphenol の活性は  $10^{-3}$ M から認められ、 $17\beta$ -estradiol と活性を比較すると約 1/5,000 であったと報告している。以上のように、ほ乳動物細胞を用いたエストロゲン活性値は実験ごとにかなりばらついている (表-1)。

一方、酵母にヒトエストロゲン受容体遺伝子とレポーター遺伝子を組み込んで転写活性を見る方法は、多くの試料を短期間で安価に試験することが出来ることから、広く適用されている。Routledge & Sumpter(1997)はこの方法を用いて、各種アルキルフェノールのエストロゲン様作用の構造活性相関を解析した結果、活性発現はフェノール環のアルキル基の位置が *para* 位 > *meta* 位 > *ortho* 位の順で強く、アルキル基の側鎖としては *tertiary* > *secondary* = *normal* の順で強く現れた。なかでも *p*-tert-octylphenol が最も強いエストロゲン作用を示し、 $17\beta$ -estradiol の約 1/1,000、nonylphenol の活性は  $17\beta$ -estradiol の約 1/30,000 であった。Gaido ら(1997)および Coldhum ら(1997)も同様の試験系で各種のエストロゲン作用物質を比較検討した結果、nonylphenol の活性はそれぞれ  $17\beta$ -estradiol の約 1/5,000 および 1/20,000 であることを示した。以上のように、酵母を用いた実験では、nonylphenol の活性は  $17\beta$ -estradiol の 1/5,000 ~ 1/30,000、octylphenol は nonylphenol よりも約 10~30 倍強く、培養細胞を用いた結果と概ね一致する結果である (表-1)。

## 2. 雌動物に対する影響

### a) 子宮に対する影響

培養細胞を用いた試験で nonylphenol がエストロゲン受容体に結合して、エストロゲン様作用を示したことに基づいて、Lee & Lee(1996) は未成熟 SD 雌ラットに nonylphenol を単回腹腔内投与し、24 時間後に子宮重量を測定する子宮刺激試験を行なった。投与量は動物当たり 17 $\beta$ -estradiol を 2.5、5.0、10  $\mu$ g、nonylphenol を 1.0、2.0、4.0 mg とした。その結果、共に最低用量から子宮の重量、蛋白量および peroxidase 活性の増加が、また、17 $\beta$ -estradiol については 5.0 $\mu$ g 以上の投与で、nonylphenol については 4.0mg 投与で子宮の DNA 量増加が認められた。これらのことから、著者らは nonylphenol のエストロゲン様作用の強さは 17 $\beta$ -estradiol の約 1/1,000~1/2,000 であると判断している。動物の体重を 40 g(未記載)と仮定すると nonylphenol の最低用量は約 25 mg/kg となる。さらに、これらの子宮に対する影響は ICI 182,780 で完全に抑制された。また、Odum ら(1997)は未成熟 Alpk: AP 雌ラットを用いた子宮重量増加試験法の検討の中で、対象物質の一つとして nonylphenol の作用を検討した。分岐側鎖を有する nonylphenol を 47.5、95、190、285 mg/kg/day で 3 日間の強制経口投与により、190、285 mg/kg/day で明確な子宮重量の増加が認められたが、直鎖型 nonylphenol は全く作用を示さなかった。一方、285 mg/kg/day による子宮重量の増加は ICI 182,780 で完全に抑制された。卵巣を摘出した成熟 Noble 雌ラットに nonylphenol 45~225 mg/kg/day を 3 日間経口投与した Odum ら(1999a)の実験では、用量依存的な子宮重量の増加、臍角質化が認められ、45 mg/kg/day でもわずかな子宮重量の増加が認められている。さらに Odum ら(1999b)は再び未成熟 Alpk: AP 雌ラットに nonylphenol を 37.5、75、150、225 mg/kg/day、3 日間の強制経口投与を行った実験で、75 mg/kg/day 以上で子宮重量の増加を認めたと報告してい

る。Shelby ら(1996)は他のエストロゲン様作用を有する化学物質との比較検討で、未成熟 CD-1 雌マウスに nonylphenol を 3 日連続皮下注射した。その結果、100 mg/kg から顕著な子宮重量の増加が見られ、50%活性発現で 17 $\beta$ -estradiol と比較すると約 1/10,000 であった。

以上の実験結果から、経口投与による nonylphenol の子宮増殖作用の最小作用発現投与量は約 40 mg/kg/day と判断されている (Odum ら: 1999b)。

Bicknell ら(1995)は octylphenol を未成熟 Wistar 雌ラットに約 166 mg/kg で 3 日連続皮下注射した結果、子宮重量が対照群の 2 倍となったが、Coldham ら(1997)は未成熟 CEFL 雌マウスに octylphenol を約 80~400 mg/kg で 3 日連続皮下注射しても子宮重量の増加を認めなかった。一方で、勝田ら(1999a)は卵巣摘出した成熟 Donryu 雌ラットに octylphenol 6.25~180 mg/kg を 2 日間あるいは 14 日間皮下注射した結果、25 mg/kg、14 日間投与で子宮重量が増加し、50 mg/kg 以上では子宮被覆上皮の高さも増加したと報告している。

#### b) 雌生殖器系全般への影響

麻生ら(1999)は OECD 試験法ガイドライン 407(28 日間反復投与試験)に内分泌かく乱作用関連項目を追加した試験法で、nonylphenol の影響を検討した。12 週齢の CD、F344、Donryu 雌ラットに 60 および 250 mg/kg/day で 28 日間強制経口投与し、生殖関連器官への影響を解析した結果、性周期の異常、子宮内膜の BrdU 陽性(細胞増殖の指標)細胞の増加傾向は認められたものの、本実験条件下では有意な影響は認められなかった。

勝田ら(1999b)は octylphenol を新生児期に暴露することによる雌ラット生殖器への影響



を検討した。Donryu 雌ラットの新生児に 12.5-100 mg/kg で生後 1-15 日まで隔日に計 8 回皮下注射し、膣スメアを用いて性成熟後の性周期を観察した。その結果、100 mg/kg で全例に膣開口の早期化と性成熟後の持続発情が見られ、膣開口以降の卵巣は萎縮し、子宮内膜上皮の細胞増殖の増加が認められた。こうした持続発情による子宮および膣の変化は卵巣依存性と判断されている。一方、ocetylphenol 6.25~100 mg/kg を無処置成熟 Donryu 雌ラットに 28 日間皮下投与した実験では、50 mg/kg 以上で性周期の乱れが見られ、100 mg/kg では子宮重量の増加、内膜上皮細胞の増殖亢進が見られている(吉田ら: 1999a)。

### c) 乳腺への影響

Colerangle & Roy (1996) は幼若 Noble 雌ラットに nonylphenol を含有するミニポンプを皮下に埋め込み、11 日間処理した後、乳腺の詳細な解析を行なった。投与量は 0.01 および 7.1 mg/24h で、これは 0.073 および 53.2 mg/kg/day に相当する。両投与量ともに乳腺の細胞増殖および分化の有意な促進が見られた。この 0.073 mg/kg/day の投与量は上述した子宮重量増加作用の見られる最小投与量(40 mg/kg/day)の約 600 分の 1 という極低用量である。この実験に対して、Odum ら(1999a)は Noble ラットの乳腺が nonylphenol に特異的に感受性が高い可能性を考えて、全く同様の実験条件下(0.073 および 53.2 mg/kg/day)で追試実験を行なった。その結果、陽性対照として投与した 0.076 mg/kg/day の diethylstilbestrol (ミニポンプ) によっては強い細胞増殖および分化の促進が認められたが、nonylphenol は 53.2 mg/kg/day の投与量(高用量)によってさえも全く影響が見られなかった。さらに、Odum ら(1999b)は別系統の Alpk: AP 雌ラットを用いて全く同様の実験を行ない、同様に nonylphenol の影響が全く認められないことを示した。また、Alpk: AP 雌ラットに nonylphenol を 100

mg/kg/day で 11 日間強制経口投与したところ、弱い乳腺細胞増殖作用が観察された。したがって、Odum ら(1999b)は Noble ラットの乳腺が nonylphenol に特異的に感受性が高いことはなく、乳腺細胞増殖作用の最小作用量は、子宮増殖作用が見られた最小投与量に相当する約 40 mg/kg/day であろうと結論している。

### 3. 雄生殖器系への影響

De Jager ら(1999a)は近年ヒトの平均精子数が減少し、生殖不能者数の増えていることが環境汚染物質による影響の可能性を考え、nonylphenol の雄性生殖機能への影響を検討した。試験は OECD 試験法ガイドライン 415 に従い、SD 雄ラットに 100、250、400 mg/kg/day で 12-22 週齢まで強制経口投与した。100 mg/kg/day 以上で輸精管径の減少および組織学的変化が、250 mg/kg/day 以上で精巣上体重量の減少が、400 mg/kg/day では精巣重量の減少および精子数の減少が認められた。De Jager ら(1999b)はさらに器官形成期から成熟期まで投与して、nonylphenol の雄性生殖機能への影響を検討した。試験は同系ラットを用いて、同量を妊娠 7 日から出産後 3 週(授乳期間)まで、その後雄児動物に同様に 10 週齢まで強制経口投与した結果、100 mg/kg/day 以上で輸精管径の減少および組織学的変化が、250 mg/kg/day で精巣上体、精巣重量の減少、および精巣上体精子数の減少が認められた。なお、400 mg/kg/day を投与した妊娠動物からは児は得られなかった。

一方、生殖器官は出生前後に最も著しく分化・発育することから、Lee(1998)は SD 雄ラットの生後 1-15 日に nonylphenol を 0.08、0.8、8.0 mg/kg/day で腹腔内連続投与し、31 日の時点で雄性生殖器官重量を測定した。その結果、精巣、精巣上体、精囊、前立腺重量の減少が 0.8 mg/kg/day 以上で認められた。しかし、生後 13-30 日まで 8.0 mg/kg/day を投与した場合は全く影響が認められなかった。

また、生後 1-5 日または 1-10 日に 8.0 mg/kg/day を投与すると 31 日の時点で停留率の発生率が 30-60 %認められ、これは ICI 182,780 の同時投与により完全に抑制された。さらに生後 1-15 日に 8.0 mg/kg/day を投与した雄と無処置の雌とを交配した結果、受胎率はばらついたものの、平均 44 % (対照群は平均 99 %) に減少した。

吉田ら(1999b)は octylphenol を新生児期に暴露することによる雄ラット生殖器への影響を検討した。Donryu 雄ラットの新生児に 100 および 200 mg/kg を生後 1-15 日まで隔日に計 8 回皮下注射し、56 日齢まで経時的に生殖器の重量および形態変化を観察した。両投与量とも 49 日齢までは精巣、精巣上体あるいは前立腺重量の一次的な減少が一部で観察されたが、56 日齢では変化はなく、また組織学的検査でも影響は認められなかった。

#### 4. 生体内動態

Octylphenol は nonylphenol よりも *in vitro* でのエストロゲン様作用が強く、構造が確定していることから、Certa ら(1996)は Wistar 雄ラットに octylphenol を静脈内投与で 5 mg/kg、経口投与で 50、200 mg/kg 投与し、血中濃度を GC-MS で測定した。静脈内投与での投与直後の血中濃度は約 2,000 ng/ml で、30 分以内に急速に減少し、6-8 時間後には検出出来なくなった (検出感度: 1-5 ng/ml)。消失半減期は 310 分であった。経口投与 10 分後に見られた血中濃度は 50 mg/kg 投与で 40 ng/ml および 200 mg/kg 投与で 130 ng/ml で、バイオアベイラビリティはそれぞれ 2 および 10 %であった。さらに、50、200 mg/kg で 14 日間連続経口投与、あるいは 800 µg/kg/day 相当量 (溶解最大濃度) を 28 日間飲水投与した。経口投与による血中濃度推移は 1 日と 14 日目で変化なく、50 mg/kg 14 日後では脂肪組織に 10 ng/g、肝に 7 ng/g

が、200 mg/kg 14 日後では脂肪組織に 1285 ng/g、肝に 87 ng/g、腎に 71 ng/g、筋肉に 43 ng/g、脳に 9 ng/g、肺に 7 ng/g 検出されたが、飲水投与の 28 日後では血中、組織中いずれでも検出されなかった。一方、Upmeier ら(1999)は DA/Han 雌ラットに octylphenol を静脈内投与で 5 mg/kg、経口投与で 50、200 mg/kg 投与し、血中濃度を測定した。その結果、経口投与によるバイオアベイラビリティは 50 mg/kg で 12.3 %、200 mg/kg で 8.4 %であり、血中最大値は Wistar 雄ラットに比べ 4.5(50 mg/kg)および 3(200 mg/kg)倍と高い値であった。こうした違いは腸肝循環の違いに基づくものと考えられた。また、高用量投与では 48 時間でも血中から完全に消失しなかったことから、いくらかの体内蓄積が起こっている可能性が示唆されている。

Müller ら(1998b)は 1 名のボランティアに <sup>13</sup>C-nonylphenol を経口および静脈内投与する実験を行なった。経口投与では 5 mg を投与し、15 分から 522 分まで 9 回採血し、静脈内投与では 1 mg を注射し、35 分から 558 分まで 5 回採血して親化合物と抱合体について分析した。経口投与の血中最大値は 32 分後で親化合物が 646 pg/g blood、抱合体が 86,040 pg/g blood と、99.3 %が抱合体であった。静脈内投与の 36 分後の血中濃度は親化合物が 626 pg/g blood、抱合体が 117 pg/g blood と、抱合体はわずか 15.7 %であった。血中からの親物質の消失半減期は 2-3 時間であり、また、経口投与によるバイオアベイラビリティは 20%であった。一方、nonylphenol は体内で 2 時間以内に脂肪相に移行すると考えられるので、nonylphenol と octylphenol の体内暴露を推定するために、職業暴露を受けていないヒトの脂肪組織中の濃度を測定した。その結果、nonylphenol は 19-85 ng/g lipids、octylphenol は 0.58-4.07 ng/g lipids 検出されたが、これらの値はいずれも定量限度値未満であった。

代謝研究として、Certaら(1996)はWistarラット肝ホモジネートを用いて octylphenol のグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体の生成することを示した。一方、Leeら(1998)は肝ミクロソームを用いて nonylphenol が cytochrome P450 により代謝されること、特に CYP2B の関与の可能性が高いことを示した。また、Müllerら(1998a)はマウスの初代肝培養細胞を用いて代謝試験を行なった。培養液に添加した  $10^{-5}$ M の nonylphenol(総量 6600 ng)は 24 時間後に 150-400 ng、48 時間後に 80-150 ng となり、細胞内濃度は 2 時間後で約 30  $\mu$ g/g 細胞、48 時間後に約 10  $\mu$ g/g 細胞に減少した。また、 $10^{-6}$ M の octylphenol(総量 600 ng)は 24 および 48 時間後に 6-10 ng となり、細胞内濃度は 2 時間後で約 1  $\mu$ g/g 細胞、48 時間後に約 0.7  $\mu$ g/g 細胞に減少した。このように、両化合物とも肝細胞による代謝は非常に速いと考えられる。

#### 5. 毒性試験における内分泌系器官の精査

上述したように、nonylphenol には弱いながらも明確なエストロゲン様作用のあることが判明したことから、アルキルフェノールエトキシレート業界では生殖機能を解析する項目を加えた 90 日間混餌投与試験を実施し、1997 年にその結果を公表した(Cunnyら: 1997)。この試験は米国環境保護庁の試験法のもと、GLP 下で行なわれた。試験は雌雄の SD ラットに 200、650、2,000 ppm の nonylphenol を含む餌を 90 日(12 週)間与え、通常の試験項目に加えて 8 週目に雌で性周期を、試験終了時に雄で精子の数、運動性および形態異常の解析を行なった。その結果、2,000 ppm の雌雄で軽度の体重増加抑制、雄では腎重量の増加が認められたが、その他のすべての検査項目で異常は認められなかった。したがって、無毒性量は 650 ppm (50 mg/kg/day)と判断されたが、生殖器に対する影響は 2,000 ppm (150 mg/kg/day)までないとの結論である。

一方、米国では国家毒性計画(National Toxicology Program: NTP)の一環として nonylphenol の多世代生殖試験を行ない、1999 年に公表した(Chapinら: 1999)。この試験でも同様に雌雄の SD ラットに 200、650、2,000 ppm の nonylphenol を含む餌を与え、通常の試験項目に加えて詳細な生殖系の解析を行なっている。その結果、2,000 ppm で後世代に軽度の体重増加抑制、精子細胞数の減少、性周期の延長、子宮重量の低下などが認められ、650 ppm でも一部に同様の変化が認められた。なお、生殖指標(受胎率、新生児数など)の異常や奇形は全く認められていない。したがって、生殖発生毒性に関する無毒性量は 200 ppm (15 mg/kg/day)となるが、体重増加抑制の認められる用量でも重篤な影響は見られなかったことになる。なお、雄では 200 ppm でも腎の鉍質化が認められており、この腎毒性に関してはさらに検討が必要であろう。

#### 6. リスクアセスメント

アルキルフェノールのリスクアセスメントに関して 2 つの報告がある。

Boltら(1998)は nonylphenol の評価を、大豆に含まれる天然エストロゲン様物質である daidzein との比較検討によりおこなった。欧州連合の既存化学物質計画で用いられているヒトの暴露シナリオに基づき、nonylphenol の 1 日摂取量を 1.26  $\mu$ g/kg、daidzein および genistein を含む大豆中の isoflavone の 1 日摂取量を 1 mg/kg(ドイツ)と見積もった。また、nonylphenol の *in vitro* エストロゲン様作用は octylphenol の約 1/10 であるが、安全性の観点から nonylphenol と octylphenol の *in vitro* エストロゲン様作用強度を同等であると仮定した。各種の試験で octylphenol と daidzein の *in vitro* エストロゲン様作用強度はほぼ同等の結果が得られているが、子宮増殖作用では octylphenol の方が daidzein より約 10 倍強いことから、nonylphenol の *in vivo*

エストロゲン様作用強度を daidzein より 10 倍強いとした。以上の仮定に基づく内分泌かく乱作用の評価は、nonylphenol を最大に摂取した時のエストロゲン様作用暴露量は daidzein の日常摂取量の 1/100 に相当することになる。

Nonylphenol (1.26  $\mu\text{g}$ ) の活性強度を Daidzein の量に換算 (1.26 ( $\mu\text{g}$ ) X 10 = 0.0126 (mg)) して比較すると以下のようになる。

$$\frac{\text{Daidzein}}{\text{Nonylphenol}} = \frac{1}{0.0126} = 79 \approx 100$$

Müllerら(1998c)は nonylphenol の評価を、17 $\beta$ -estradiol および大豆等に含まれる天然エストロゲン様物質である genistein との比較検討でおこなった。職業暴露を受けていないヒトでの nonylphenol 経口 1 日摂取量は最大で 0.16 mg/day、また一般のヒトの genistein 経口 1 日摂取量は西欧では 7 mg/day、アジアでは 77 mg/day と考えられている。経口摂取による nonylphenol の無毒性量 : 50 mg/kg/day (Cunny ら: 1997) から、安全域 (無毒性量 / 摂取量) は約 20,000 となる [I]。血中濃度の比較では、ボランティアに 0.16 mg の nonylphenol を 3 回/日に分けて投与した時、最大血中濃度が 10 pg/ml となり、男性の平均 17 $\beta$ -estradiol 血中濃度を 30 pg/ml、エストロゲン様活性比を 1,000 とした場合に、安全域は約 3,000 となる [II]。さらに、genistein のエストロゲン様作用が nonylphenol の約 10 倍で、nonylphenol を摂取した時の体内暴露量はバイオアベラビリティに基づいた計算から genistein の 10~200 分の 1 であることから、nonylphenol のエストロゲン様作用暴露量は genistein の 100~2,000 分の 1 となる。こうした結果から、現時点で職業暴露を受けていないヒトでの

nonylphenol のエストロゲン様作用の健康リスクはないと結論している。

$$\text{[I]} \frac{50 \text{ mg/kg/day}}{0.16 \text{ mg/60 kg/day}} = 18,800$$

(ヒトの体重を 60 kg とする)

$$\text{[II]} \frac{30 \text{ pg/ml}}{10 \text{ pg/ml} / 1000} = 3,000$$

#### D. 考察

培養細胞あるいは酵母を用いたエストロゲン様活性は、表-1 に示す様に nonylphenol が 17 $\beta$ -estradiol の 1,000~300,000 分の 1 で、octylphenol が nonylphenol の 10~30 倍強いとの結果が得られているが、ヒトへ外挿の場合には経口投与による作用発現投与量が最も重要である。In vivo 摂取による生殖系への影響の無毒性量あるいは最小無毒性量を表-2, 3, 4 に示した。このなかで、生殖発生毒性に関する最も低い経口摂取無毒性量は NTP の多世代生殖試験の低用量で、15 mg/kg/day (Chapin ら: 1999) である。職業的暴露を受けていないヒトの nonylphenol 摂取量が最大で 1.3-2.7  $\mu\text{g/kg/day}$  と推定されていることから (Bolt ら: 1998, Müller ら: 1998c)、安全域は 5,500 となる。発現した主な毒性は、100 mg/kg/day の投与量からは子宮増殖作用、雌生殖器発育促進作用、雌乳腺細胞増殖作用および雄生殖器障害作用である。一方、ボランティアに nonylphenol を経口投与した実験では、吸収、代謝 (抱合化) および血中からの消失は速く (Müller ら: 1998b, 1998c)、蓄積性はないと考えられる。実際、ヒトの脂肪組織中に明らかな蓄積を示す量の nonylphenol あるいは octylphenol は検出されていない (Müller ら: 1998b)。以上のように、蓄積性のないこと、安全域が 5,500 であ

ることから、種差および個体差の係数 100 を考慮しても通常の暴露では十分安全性が保たれていると考えられる。

一方、雌ラットに nonylphenol を皮下に埋め込んだ実験 (Colerangle & Roy: 1996) では、0.073 mg/kg/day という極低用量でも乳腺刺激作用が報告されているが、用量依存性がなく、同様の条件での追加実験では 53.2 mg/kg/day でも影響の出なかったこと (Odum ら: 1999a)、別系統ラットを用いた試験でも影響が見られなかったこと (Odum ら: 1999b) から、信憑性に欠けるものと考えられる。また、Lee (1998) の雄ラット生後 1-15 日に nonylphenol を腹腔内連続投与した実験では、8.0 mg/kg/day で精巣に対して強い影響が出ているが、投与経路が異なることから経口摂取投与量としての評価はできないと考えられる。一般的に経口投与された低用量のアルキルフェノールは、肝で直ちに代謝されると考えられる (Müller ら: 1998a)。

なお、Bolt ら (1998) および Müller ら (1998c) はそれぞれ植物性エストロゲン様物質である daidsein あるいは genistein と nonylphenol とをエストロゲン様作用等量を用いて比較しているが、これらの植物性エストロゲン様物質がどのような生体影響を及ぼしているのか不明な現時点では、比較の意味がどの程度あるのか疑問である。

最近、日本においても nonylphenol の測定が行われるようになった。国包 (1999) は水環境中の内分泌かく乱化学物質の分析を広く行い、水道原水から nonylphenol を最大値として 0.11 µg/l 検出したが、水道水では定量下限値 (0.1 µg/l) 以下であることを報告した。たとえば、水道原水を 50 kg のヒトが 1 日 2 リットル飲むとすると、その 1 日摂取量は 4.4 ng/kg/day となり、上記データと照らしてみても問題は無いと考えられる。また、1999 年 12 月 9 日の朝日新聞夕刊によると、塩ビラップに包んだ食品を電子レンジで温めると、最大値としてコロッケ

から 2.8 ppm の nonylphenol が検出されたという。仮に、このコロッケを 50 kg のヒトが 1 日 200 g 食べると 1 日摂取量は 2.8 ppm (2.8 µg/g) × 200 g / 50 kg = 11.2 µg/kg/day となる。この値を NTP の無毒性量 15 mg/kg/day (Chapin ら: 1999) と比較すると、安全域が約 1,000 となる。したがって、成人を考えた場合、この暴露量のみによる内分泌系への影響は考えられないが、一般的に胎児・新生児期は内分泌かく乱物質を含む多くの化学物質に対する感受性の高いことはよく知られた事実であり、また、信憑性はともかく幾つかの動物実験で低用量の胎児・新生児期暴露による影響が報告されていることから、今後、胎児・乳児期からの長期暴露も含め、更なる検討が必要であると考えられる。

最後に、本稿ではアルキルフェノールの内分泌系への影響をヒトに外挿することを考えるために、出来るだけ関連性の高い研究結果に焦点を絞った。そのため、アルキルフェノールエトキシレート体や誘導体、またエストロゲン受容体との直接結合性やほ乳動物以外の動物種 (魚類や鳥類など) を用いた実験結果の情報は含まれていないことに留意されたい。一般的には in vivo におけるアルキルフェノールの生殖器系への影響はホメオスタシスの発達しているほ乳動物と、そうでない魚類、鳥類、爬虫類などの野生動物とは同一視できず、別々の問題として考慮する必要がある。

#### E. 参考文献

- Bicknell RJ, Herbison AE, Sumpter JP (1995) Oestrogenic activity of an environmentally persistent alkylphenol in the reproductive tract but not the brain of rodents. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 54, 7-9.
- Bolt HM, Schuhmacher US, Degen GH (1998) Special aspects of endocrine modulators in human and

- environmental risk assessment of existing chemicals. *Arch. Toxicol.*, 72, A72-A75.
- Certa H, Fedtke N, Wiegand HJ, Muller AMF, Bolt HM (1996) Toxicokinetics of *p*-tert-octylphenol in male Wistar rats. *Arch. Toxicol.*, 71, 112-122.
- Chapin RE, Delaney J, Wang YF, Lanning L, Davis B, Collins B, Mintz N, Wolfe G (1999) The effects of 4-nonylphenol in rats: A multigeneration reproduction study. *Toxicol. Sci.*, 52, 80-91.
- Coldham NG, Dave M, Sivapathasundaram S, McDonnell DP, Connor C, Sauer MJ (1997) Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environ. Health Perspect.*, 105, 734-742.
- Colerangle JB, Roy D (1996) Exposure of environmental estrogenic compound nonylphenol to Noble rats alters cell-cycle kinetics in the mammary gland. *Endocrine*, 4, 115-122.
- Cunny HC, Mayes BA, Rosica KA, Trutter JA, Van Miller JP (1997) Subchronic toxicity (90-day) study with *para*-nonylphenol in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 26, 172-178.
- Dejager C, Bornman MS, Vanderhorst G (1999a) I. The effect of *p*-nonylphenol, an environmental toxicant with oestrogenic properties, on fertility potential in adult male rats. *Andrologia*, 31, 99-106.
- Dejager C, Bornman MS, Oosthuizen JMC (1999b) II. The effect of *p*-nonylphenol on the fertility potential of male rats after gestational, lactational and direct exposure. *Andrologia*, 31, 107-113.
- Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babal D, Portier CJ, McDonnell DP (1997) Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 143, 205-212.
- Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS (1999) Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature*, 401, 763-764
- Lee PC (1998) Disruption of male reproductive tract development by administration of the xenoestrogen, nonylphenol, to male newborn rats. *Endocrine*, 9, 105-111.
- Lee PC, Lee W (1996) *In vivo* estrogenic action of nonylphenol in immature female rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 57, 341-348.
- Lee PC, Marquardt M, Lech JJ (1998) Metabolism of nonylphenol by rat and human microsomes. *Toxicol. Lett.*, 99, 117-126
- Müller S, Schmid P, Schlatter C (1998a) Distribution and pharmacokinetics of alkylphenolic compounds in primary mouse hepatocyte cultures. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 6, 45-48.
- Müller S, Schmid P, Schlatter C (1998b) Pharmacokinetic behavior of 4-nonylphenol in humans. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 5, 257-265.
- Müller S, Schmid P, Schlatter C (1998c) Evaluation of the estrogenic potency of nonylphenol in non-occupationally exposed humans. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 6, 27-33.
- Odum J, Lefevre PA, Tittensor S, Paton D,

- Routledge EJ, Beresford NA, Sumpter JP, Ashby J (1997) The rodent uterotrophic assay: Critical protocol features, studies with nonylphenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 25, 176-188.
- Odum J, Pyrah ITG, Foster JR, Vanmiller JP, Joiner RL, Ashby J (1999a) Comparative activities of *p*-nonylphenol and diethylstilbestrol in noble rat mammary gland and uterotrophic assays. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 29: 184-195.
- Odum J, Pyrah ITG, Soames AR, Foster JR, Vanmiller JP, Joiner RL, Ashby J (1999b) Effects of *p*-nonylphenol (NP) and diethylstilboestrol (DES) on the alderley park (Alpk) rat: Comparison of mammary gland and uterus sensitivity following oral gavage or implanted mini-pumps. *J. Appl. Toxicol.*, 19, 367-378.
- Routledge EJ, Sumpter JP (1997) Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J. Biol. Chem.*, 272, 3280-3288.
- Shelby MD, Newbold RR, Tully DB, Chae K, Davis VL (1996) Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays. *Environ. Health Perspect.*, 104, 1296-1300.
- Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C (1991) *p*-Nonyl-phenol: An estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ. Health Perspect.*, 92, 167-173.
- Upmeier A, Degen GH, Schuhmacher US, Certa H, Bolt HM (1999) Toxicokinetics of *p*-tert-octylphenol in female DA/Han rats after single i.v. and oral application. *Arch. Toxicol.*, 73, 217-222.
- Warhurst AM (1994) An environmental assessment of alkylphenol ethoxylates and alkylphenols, pp. 1-15, Friends of the Earth, Scotland, Edinburgh.
- White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, 135, 175-182.
- Wheeler TF, Heim JR, LaTorre MR, Blair Janes A (1997) Mass spectral characterization of *p*-nonylphenol isomers using high-resolution capillary GC-MA. *J Chromatogr. Sci.*, 35, 19-30.
- 麻生 直、穴井真紀子、野田修志、今田中伸哉、山崎寛治、前川昭彦 (1999) 28 日間反復投与試験によるノニルフェノールおよびアトラジンのラット雌性生殖器に対する影響の検討. 第 26 回日本トキシコロジー学会学術年会要旨集 p 178.
- 勝田真一、吉田 緑、黒田博之、渡辺隆夫、安藤 進、高橋正一、前川昭彦 (1999a) Octylphenol の雌ラットにおよぼす影響 2. 卵巣摘出ラットを用いた検討. 第 15 回日本毒性病理学会講演要旨集 p 58.
- 勝田真一、吉田 緑、黒田博之、安藤 進、高橋正一、渡辺 元、田谷一善、前川昭彦 (1999b) *p*-tert-octylphenol を新生仔期暴露による雌ラット生殖器への影響. 第 26 回日本トキシコロジー学会学術年会要旨集 p 179.
- 国包章一 (1999) 内分泌攪乱作用を疑われている化学物質の水道における実態調査.

水環境学会誌, 22, 663-635.

吉田 緑、勝田真一、黒田博之、渡辺隆夫、安藤 進、高橋正一、前川昭彦 (1999a)

Octylphenol の雌ラットにおよぼす影響

1. 成熟ラットによる検討. 第 15 回日本毒性病理学会講演要旨集 p 58.

吉田 緑、勝田真一、黒田博之、安藤 進、高橋正一、渡辺 元、田谷一善、前川昭彦

(1999b) *p-tert-octylphenol* を新生仔期暴露が雄ラットの生殖器系に与える影響.

第 26 回日本トキシコロジー学会学術年會要旨集 p 180

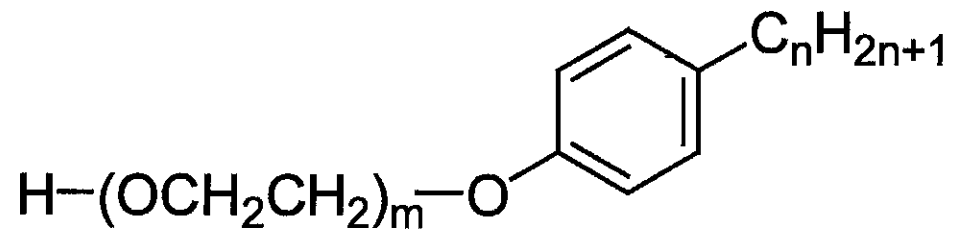
#### 研究論文発表

Koizumi, M. and Hasegawa, R. (1999),  
Detection of Endocrine disrupting  
chemicals. Journal of Food  
Hygienic Society of Japan. 40.  
J-203 – J-207.

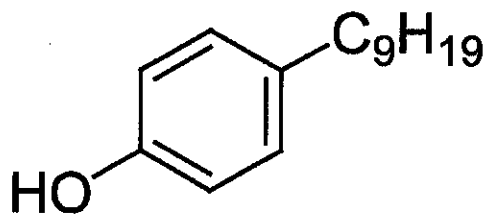
Koizumi, M. and Hasegawa, R. (1999)

Endocrine disrupting action of  
environmental chemicals on mammals.  
Journal of Japan Oil Chemists' Society.  
48. 431 – 437.

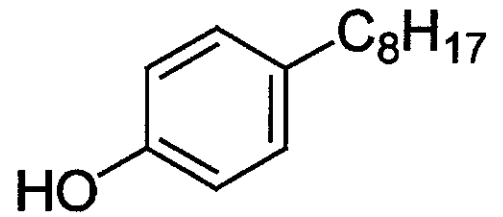




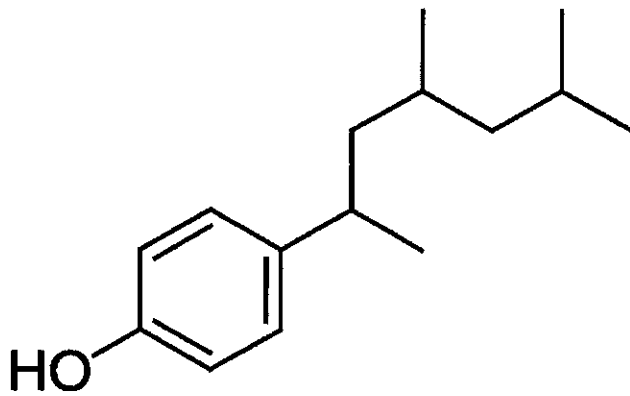
アルキルフェノールポリエトキシレート [S-1]



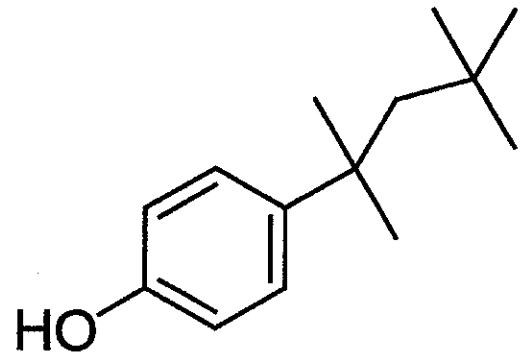
*p*-Nonylphenol [S-2]



*p*-Octylphenol [S-3]



A Isomer of *p*-Nonylphenol [S-4]



*p-tert*-Octylphenol [S-5]

### Scheme

表-1 細胞を用いたアルキルフェノールのエストロゲン様作用

Chemical	細胞: 検出法	比活性*	文献
nonylphenol	MCF-7: 細胞増殖	0.000003	Soto ら(1991)
nonylphenol	MCF-7: 細胞増殖	<0.001	White ら(1994)
octylphenol	MCF-7: 細胞増殖	<0.01, >0.001	White ら(1994)
nonylphenol	MCF-7: 転写活性	<0.001	White ら(1994)
nonylphenol	HeLa 細胞: 転写活性	0.0002	Shelby ら(1996)
octylphenol	MCF-7: 転写活性	0.001	White ら(1994)
nonylphenol	酵母: 転写活性	0.00003	Routledge & Sumpter(1997)
nonylphenol	酵母: 転写活性	0.0002	Gaido ら(1997)
nonylphenol	酵母: 転写活性	0.00005	Coldham ら(1997)
octylphenol	酵母: 転写活性	0.001	Routledge & Sumpter(1997)

\* : 17 $\beta$ -estradiol に対する活性比

表-2 アルキルフェノールの雌生殖器系への影響

動物種	NOAEL (LOAEL)	投与期間: 方法	文献
<u>子宮への影響</u>			
<u>Nonylphenol</u>			
未成熟 SD ラット	約 25 mg/kg	単回: 腹腔内	Lee & Lee(1996)
未成熟 Alpk: AP ラット	95 mg/kg/day	3 日: 強制経口	Odum ら(1997)
卵巣摘出 Noble ラット	45 mg/kg/day	3 日: 強制経口	Odum ら(1999a)
未成熟 Alpk: AP ラット	37.5 mg/kg/day	3 日: 強制経口	Odum ら(1999b)
未成熟 CD-1 マウス	約 10 mg/kg	3 日: 皮下	Shelby ら(1996)
未成熟 CFLP マウス	約 100 mg/kg	3 日: 皮下	Coldham ら(1997)
<u>Octylphenol</u>			
未成熟 Wistar ラット	約 166 mg/kg	3 日: 皮下	Bicknell ら(1995)
未成熟 CFLP マウス	約 400 mg/kg	3 日: 皮下	Coldham ら(1997)
成熟 Donryu ラット	12.5 mg/kg	14 日: 皮下	勝田ら(1999a)
<u>雌生殖器全般への影響</u>			
<u>Nonylphenol</u>			
CD ラット	250 mg/kg/day	28 日: 強制経口	麻生ら(1999)
F344 ラット	250 mg/kg/day	28 日: 強制経口	麻生ら(1999)
Donryu ラット	250 mg/kg/day	28 日: 強制経口	麻生ら(1999)
<u>Octylphenol</u>			
新生児 Donryu ラット	50 mg/kg	1-15 日計 8 回: 皮下	勝田ら(1999b)
成熟 Donryu ラット	25 mg/kg	28 日: 皮下	吉田ら(1999a)
<u>乳腺への影響</u>			
<u>Nonylphenol</u>			
Noble ラット	0.073 mg/kg/day	11 日: 皮下	Colerangle & Roy (1996)
Noble ラット	53.2 mg/kg/day	11 日: 皮下	Odum ら(1999a)
Alpk: AP ラット	53.2 mg/kg/day	11 日: 皮下	Odum ら(1999b)
Alpk: AP ラット	100 mg/kg/day	11 日: 強制経口	Odum ら(1999b)

表-3 アルキルフェノールの雄生殖器系への影響

動物種	NOAEL (LOAEL)	投与期間: 方法	文献
<u>Nonylphenol</u>			
SD ラット	<u>100 mg/kg/day*</u>	10 週 : 強制経口	De Jager ら(1999a)
SD ラット	<u>100 mg/kg/day*</u>	妊娠 7 日から出産後 3 週 及び次世代の 10 週齢まで : 強制経口	De Jager ら(1999b)
SD ラット	0.08 mg/kg/day	生後 1-15 日 : 腹腔内	Lee(1998)
<u>Octylphenol</u>			
Donryu ラット	200 mg/kg	1-15 日計 8 回 : 皮下	吉田ら(1999b)

\* : 最小の毒性影響

表-4 ノニルフェノールの毒性試験結果

動物種	NOAEL	投与期間: 方法	文献
雌雄 SD ラット	50 mg/kg/day	90 日間 : 混餌	Cunny ら(1997)
雌雄 SD ラット	15 mg/kg/day	多世代生殖 : 混餌	Chapin ら(1999)