

厚生科学研究費補助金（生活安全総合事業）  
総括研究報告書

内分泌攪乱物質の免疫機能に及ぼす影響に関する研究

総括研究者 山崎 聖美 国立公衆衛生院栄養生化学部主任研究官

研究要旨

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物のみならず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながる事が指摘されている。しかし、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させていると考えられ、特に、最近増加したアレルギーや化学物質過敏症との関連も危惧されている。そこで、内分泌攪乱物質が、免疫機能を低下させるか否か、アレルギー発症に関わっているか否か調べることを本研究の目的とし、まず内分泌攪乱物質がヒトリンパ球の反応性に及ぼす影響について調べた。その結果、ノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジシクロヘキシル、o,p'-DDE、p,p'-DDEはTリンパ球及びBリンパ球の反応性を低下させること、サイトカイン産生を抑制させること、またこれらの作用を示す濃度より高濃度でLDH活性が増大すること、これらの作用はエストロゲンレセプターアンタゴニストによって抑制されなかったことが明らかになった。さらに、NK細胞のNK活性への影響について調べた結果、今回用いた条件では低濃度では顕著な影響は認められなかった。また、これら内分泌攪乱物質はTリンパ球系細胞であるJurkat細胞、及びBリンパ球系細胞であるRaji細胞の反応性も低下させるが、この低下もエストロゲンレセプターアンタゴニストによって回復しないことが明らかになった。さらに、内分泌攪乱物質および植物エストロゲンは顎下腺のSS-A/Ro自己抗体を増加させること、及び胸腺細胞のアポトーシスを誘導し免疫機能に影響を与える可能性があることが、明らかとなった。

分担研究者

久松 由東 国立公衆衛生院  
地域環境衛生学部長

香山不二雄 自治医科大学  
衛生学教授

岡田由美子 国立公衆衛生院  
衛生獣医学部研究員

## A. 研究目的

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物に影響を及ぼすのみならず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながる事が指摘されているが、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させていると考えられ、特に、最近増加したアレルギーや化学物質過敏症との関連も危惧されている。そこで、内分泌攪乱物質が免疫機能を低下させるか否か、アレルギー発症に関わっているか否か調べ、内分泌攪乱物質が免疫機能に及ぼす影響に関してそのメカニズムを解明することを本研究の目的とする。

## B. 研究方法

1. ヒト末梢血リンパ球の pokeweed mitogen(PWM)に対する反応性への内分泌攪乱物質の影響

ヒト末梢血よりリンパ球を調製し、フェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を添加した RPMI1640培地にてリンパ球を内分泌攪乱物質存在下で4時間培養した

のちPWMを添加し、2日間、37度、5%二酸化炭素中で培養し、トリチウム標識チミジンを加えてさらに一晚培養し、ハーベストし、細胞核内にしたとりこまれたトリチウム標識チミジンを液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、細胞内におけるDNA合成能を比較した。

2. ヒト末梢血リンパ球のサイトカイン産生能に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

ヒト末梢血よりリンパ球を調製し、フェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を添加した RPMI1640培地にてリンパ球を内分泌攪乱物質存在下で4時間培養したのちコンカナバリンA(Con A)を添加し、24時間、37度、5%二酸化炭素中で培養し、培養上清中のIL-2、IFN- $\gamma$ の濃度を測定した。

3. ヒト末梢血リンパ球のLDH活性への内分泌攪乱物質の影響

ヒト末梢血よりリンパ球を調製し、フェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を添加した RPMI1640培地にてリンパ球を内分泌攪乱物質存在下で3日間培養し、培養上清中のLDH活性をキット(プロメガ社)を用いて測定した。

4. ヒト末梢血リンパ球のマイトージェンに対する反応性へ及ぼす内分泌攪乱物質の影響に対するエストロジェンレセプターアンタゴニストの効果

ヒト末梢血よりリンパ球を調製し、フェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を添加した RPMI1640培地にてリンパ球をエス

トロジェンレセプターアンタゴニスト（タモキシフェン、ICI182,780）非存在下あるいは存在下で1時間培養した後、内分泌攪乱物質を添加し、さらに4時間培養したのちマイトジェン（Con A、スタフィロコッカスオーレウスコーエンI（SAC）、PWM）を添加し、2日間、37度、5%二酸化炭素中で培養し、トリチウム標識チミジンを加えてさらに一晚培養し、ハーベストし、細胞核内にとりこまれたトリチウム標識チミジンを液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、細胞内におけるDNA合成能を比較した。

#### 5. NK活性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

ヒト末梢血より得られたリンパ球をフェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を添加したRPMI1640に浮遊させ、内分泌攪乱物質を加えて37℃、24時間インキュベートした。そして、target cellとしてK562細胞、あるいはMolt-4細胞を予め<sup>51</sup>C rラベルしておき、96穴マイクロプレート1ウェルあたりそれぞれ $1 \times 10^4$ コずつ加え、effector cellとして内分泌攪乱物質を加えた後洗浄したリンパ球をtarget cellに対して10:1、20:1、40:1になるように加え、4時間、37℃でインキュベートし、遠心して得られた上清のカウントを測定した。ここでは、spontaneous releaseとしてmediumのみ加えた場合の値を0%とし、max releaseとして10%Triton中にtarget cellを加えた場合の値からspontaneous releaseの値を差し引いた値を100%になるようにして% specific lysisを算出した。

#### 6. リンパ球系培養細胞に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

Tリンパ球系培養細胞としては、Jurkat細胞を用い、A23187とホルボルミリステートアセテートで刺激した。Jurkat細胞を内分泌攪乱物質存在下でフェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を加えたRPMI 1640培地で4時間培養した後刺激し、3日間、37度、5%二酸化炭素中で培養した。ハーベストする8時間前にトリチウム標識チミジンを加えてさらに培養し、ハーベストし、細胞核内にとりこまれたトリチウム標識チミジンを液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、細胞内におけるDNA合成能を比較した。Bリンパ球系培養細胞としてはRaji細胞を用い、SACで刺激し、同様の実験を行った。

エストロジェンレセプターアンタゴニストであるICI182,780を加える場合は内分泌攪乱物質を添加する1時間前に加えた。

LDH活性はプロメガ社のキットを用いてプロトコールに従って測定した。

#### 7. 胸腺に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

マウス胸腺上皮細胞のin vitro培養系に、種々の濃度の自然由来及び人工の内分泌攪乱物質を添加して培養し、培養上清中のthymosin-alpha 1をHPLCを用いて定量した。また、卵巣摘出マウスに、内分泌攪乱物質を皮下投与し、胸腺重量を測定した。さらに、胸腺病理組織を観察し、フローサイトメトリーを用いて表面抗原の解析を行い、胸腺ホモジネート中のエストロジェン・レセ

プターアルファをenzyme immunoassay法を用いて調べた。

## 8. 内分泌攪乱物質の顎下腺におけるSS-A/Ro自己抗体の誘導

卵巣摘出ラットに、内分泌攪乱物質を皮下投与し、顎下腺におけるSS-A/Ro自己抗体の発現をreverse transcription polymerase chain reaction法(RT-PCR)及び*in situ* hybridization法(ISH)にて調べた。

## C. 研究結果

### 1. ヒト末梢血リンパ球のPWMに対する反応性への内分泌攪乱物質の影響

ノニルフェノールは $10(-5)$ Mで、ビスフェノールAは $10(-4)$ Mで、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルは $10(-5)$ Mで、フタル酸ジ-n-ブチルは $10(-4)$ Mで完全にリンパ球のPWMに対する反応性を抑制した。また、フタル酸ブチルベンジルは $10(-4)$ Mで70%抑制した。フタル酸ジシクロヘキシルは $10(-5)$ Mで70%、 $10(-4)$ Mで完全に抑制した。o, p'-DDEは $10(-5)$ Mで80%、 $10(-4)$ Mで完全に抑制した。p, p'-DDEは $10(-5)$ Mで50%、 $10(-4)$ Mで完全に抑制した。フタル酸ジエチルは $10(-4)$ Mまで影響を及ぼさなかった。

### 2. ヒト末梢血リンパ球のサイトカイン産生能に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

#### (1) IL-2産生に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

ノニルフェノールはリンパ球のCon A刺激によるIL-2産生を $10(-6)$ Mで10%、 $10(-5)$ Mで完全に抑制した。ビスフェノールA、フタル酸

ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチルは $10(-5)$ Mで50%、 $10(-4)$ Mで完全に、フタル酸ブチルベンジルは $10(-6)$ Mで20%、 $10(-5)$ Mで50%、 $10(-4)$ Mで完全に、フタル酸ジシクロヘキシルは $10(-5)$ Mで70%、 $10(-4)$ Mで完全に、フタル酸ジエチルは $10(-4)$ Mで50%、o, p'-DDEは $10(-5)$ Mで70%、 $10(-4)$ Mで完全に、p, p'-DDEは $10(-5)$ Mで40%、 $10(-4)$ Mで完全に抑制した。

#### (2) IFN- $\gamma$ 産生に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

ノニルフェノールはリンパ球のCon A刺激によるIFN- $\gamma$ 産生を $10(-5)$ Mで完全に抑制した。ビスフェノールA、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、o, p'-DDE、p, p'-DDEは $10(-4)$ Mで完全に抑制した。フタル酸ジ-2-エチルヘキシルは $10(-4)$ Mまで顕著な影響はみられなかった。フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジエチルは $10(-4)$ Mで40%抑制した。

### 3. ヒト末梢血リンパ球のLDH活性への内分泌攪乱物質の影響

3日間の内分泌攪乱物質存在下におけるリンパ球の培養で、ノニルフェノールは $10(-5)$ Mで6.6%、ビスフェノールAは $10(-4)$ Mで6.6%、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルは $10(-5)$ Mで6.2%、 $10(-4)$ Mで13.7%、フタル酸ジ-n-ブチルは $10(-4)$ Mで10.2%、フタル酸ブチルベンジルは $10(-4)$ Mで4.0%、フタル酸ジシクロヘキシルは $10(-5)$ Mで4.0%、 $10(-4)$ Mで10.2%、o, p'-DDEは $10(-4)$ Mで11.4%、p, p'-DDEは $10(-4)$ Mで13.3%のLDH活性上昇がみられた。フタル酸ジエチルには $10(-4)$ Mまで

LDH活性の上昇はみられなかった。

#### 4. ヒト末梢血リンパ球のマイトージェンに対する反応性へ及ぼす内分泌攪乱物質の影響に対するエストロジェンレセプターアンタゴニストの効果

エストロジェンレセプターアンタゴニストである4-ヒドロキシタモキシフェンを添加した場合、ヒト末梢血リンパ球のマイトージェンに対する反応性を単独で抑制した。そこで、同じくエストロジェンレセプターアンタゴニストであるICI182,780( $10^{-6}$ M)を使用した。マイトージェンとしてCon Aを用いた場合、ノニルフェノール( $10^{-7}$ M)、ビスフェノールA( $0.5 \times 10^{-6}$ M)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル( $0.5 \times 10^{-5}$ M)、フタル酸ジ-n-ブチル( $10^{-5}$ M)、フタル酸ブチルベンジル( $10^{-5}$ M)、フタル酸ジシクロヘキシル( $10^{-5}$ M)、o, p'-DDE( $0.5 \times 10^{-4}$ M)、p,p'-DDE( $0.5 \times 10^{-4}$ M)

によるCon Aに対する反応性の抑制作用はICI182,780によっても回復しなかった。次にマイトージェンとしてSACを用いた場合、ノニルフェノール( $0.5 \times 10^{-5}$ M)、ビスフェノールA( $0.5 \times 10^{-5}$ M)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル( $10^{-6}$ M)、フタル酸ジ-n-ブチル( $0.2 \times 10^{-4}$ M)、フタル酸ブチルベンジル( $0.5 \times 10^{-4}$ M)、フタル酸ジシクロヘキシル( $10^{-5}$ M)、o, p'-DDE( $10^{-5}$ M)、p,p'-DDE( $10^{-5}$ M)によるSACに対する反応性の抑制作用はICI182,780によっても回復しなかった。

次にマイトージェンとしてPWMを用いた場合、ノニルフェノール( $0.5 \times 10^{-5}$ M)、ビスフェノール

A( $0.2 \times 10^{-4}$ M)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル( $0.5 \times 10^{-5}$ M)、フタル酸ジ-n-ブチル( $0.2 \times 10^{-4}$ M)、フタル酸ブチルベンジル( $0.5 \times 10^{-4}$ M)、フタル酸ジシクロヘキシル( $10^{-5}$ M)、o, p'-DDE( $10^{-5}$ M)、p,p'-DDE( $10^{-5}$ M)によるPWMに対する反応性の抑制作用はICI182,780によっても回復しなかった。

なお、ICI182,780存在下と非存在下ではLDH活性に変化はみられなかった。

#### 5. NK活性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

ノニルフェノールは $10^{-5}$ Mで、ビスフェノールA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジシクロヘキシル、o, p'-DDE、p,p'-DDEは $10^{-4}$ MでNK活性が完全になくなった。

#### 6. Jurkat細胞の反応性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

ノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、o,p'-DDE、p,p'-DDEがJurkat細胞の反応性を半分に抑制する濃度を調べたところ、それぞれ、 $0.6 \times 10^{-5}$ M、 $0.5 \times 10^{-4}$ M、 $0.9 \times 10^{-5}$ M、 $0.2 \times 10^{-4}$ M、 $0.2 \times 10^{-4}$ M、 $0.8 \times 10^{-5}$ M、 $0.2 \times 10^{-4}$ M、 $0.2 \times 10^{-4}$ Mであった。

また、LDH活性を測定した結果、ノニルフェノールは $10^{-4}$ Mで5%、ビスフェノールAは $10^{-4}$ Mで3%、

フタル酸ジ-n-ブチルは $10(-4)$ Mで2%上昇したが、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、o,p'-DDE、p,p'-DDEでは顕著な上昇はみられなかった。

さらに、さきのJurkat細胞の反応性を半分に抑制する濃度を用いてICI182,780存在下で抑制から回復するか調べたところ、全く回復しなかった。

#### 7. Raji細胞の反応性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

ノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、o,p'-DDE、p,p'-DDEがRaji細胞の反応性を半分に抑制する濃度を調べたところ、それぞれ、 $0.8 \times 10(-5)$ M、 $0.5 \times 10(-4)$ M、 $0.4 \times 10(-4)$ M、 $0.5 \times 10(-4)$ M、 $10(-4)$ M、 $10(-5)$ M、 $10(-5)$ M、 $10(-5)$ Mであった。

また、LDH活性を測定した結果、ノニルフェノールは $10(-5)$ Mで25%、 $10(-4)$ Mで70%、ビスフェノールAは $10(-4)$ Mで33%、フタル酸ジシクロヘキシルは $10(-4)$ Mで37%、フタル酸ジ-n-ブチルは $10(-4)$ Mで10%、o,p'-DDEは $10(-4)$ Mで60%、p,p'-DDEは $10(-4)$ Mで50%上昇したが、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジエチルでは顕著な上昇はみられなかった。

さらに、さきのRaji細胞の反応性を半分に抑制する濃度を用いてICI182,780存在下で抑制から回復す

るか調べたところ、全く回復しなかった。

#### 8. 胸腺に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

胸腺上皮細胞培養系に、 $17\beta$ -エストラジオール、ジェニスタイン、クメステロール、ビスフェノールAを添加したところ、胸腺上皮細胞から分泌されるサイモシンが濃度依存的に抑制された。 $17\beta$ -エストラジオールは、0.03ppb以上で、ジェニスタインとクメステロールは3ppb以上で、ビスフェノールAは3ppm以上でサイモシン分泌の抑制が見られた。

また、卵巣摘出マウスに、 $17\beta$ -エストラジオールを30ng/kg、それ以外の化学物質を300ng/kg/日、14日間連続皮下投与した。15日目に胸腺重量はコントロール群に対して、それぞれ $17\beta$ -エストラジオール群60%、ジェニスタイン43%、ビスフェノールA5%の重量減少がみられた。胸腺病理組織像ではリンパ球のアポトーシスが著しく増加し、フローサイトメトリーを用いて測定した表面抗原の解析では、コントロール群にくらべて、 $17\beta$ -エストラジオール群、ジェニスタイン群、ビスフェノールA共に、CD4+CD8+が減少し、CD4+CD8-が増加していた。サイモシンの分泌も阻害された。さらに胸腺ホモジネート中のエストロジェン・レセプターアルファをenzyme immunoassay法を用いて調べた結果、卵巣摘出マウスのコントロール群とくらべ、それぞれの群で胸腺のエストロジェン・レセプターが2倍から4倍に増加していることが明らかとなった。

## 9. 内分泌攪乱物質の顎下腺におけるSS-A/Ro自己抗体の誘導

卵巣摘出ラットに17 $\beta$ -エストラジオール、ジェニスタイン、ビスフェノールAを皮下投与したところ、17 $\beta$ -エストラジオールは3  $\mu$ g/kg/日で、ジェニスタイン、ビスフェノールAは3 mg/kg/日で52kDaSS-A/Ro自己抗体のmRNAの発現が増加することがRT-PCR及びISHにより明らかになった。

### D. 考察

昨年度の本研究により、ヒト末梢血リンパ球のうちのTリンパ球の反応性及びBリンパ球の反応性が、ノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジシクロヘキシル、o, p'-DDE、p,p'-DDEにより減少することが、マイトーゲン(Con A及びSAC)を用いた実験により明らかになった。今年度はTリンパ球とBリンパ球の相互作用に及ぼす影響を調べる目的で、マイトーゲンとしてPWMを用いたところ、これら内分泌攪乱物質はPWMに対するリンパ球の応答性を減少させることが明らかになった。また、個々の内分泌攪乱物質によってTリンパ球の反応性をより低濃度で減少させるもの、Bリンパ球に対する反応性をより低濃度で減少させるものがあったが、PWMに対する反応性の結果はそれらの間の値で減少を示し、これら内分泌攪乱物質はTリンパ球、Bリンパ球、さらに両者の相互作用に影響を及ぼしていると考えられる。また、昨年度の研究結果により得られたマイトーゲンに対する反応

性を完全に抑制する濃度で、細胞の生死をLDH活性により調べたが、最大で13%程度であった。この結果から、細胞が細胞毒性により死ぬ濃度より低濃度でリンパ球の機能に内分泌攪乱物質が影響を及ぼしていると考えられる。これは、サイトカイン産生が、やはり細胞が細胞毒性により死ぬ濃度より低濃度で抑制されたことから裏付けられる。

以上明らかになった内分泌攪乱物質によるリンパ球の反応性の抑制が、エストロゲンレセプターを介しているものかどうか調べる目的でエストロゲンレセプターのアンタゴニストであるICI182,780の存在下で同様の実験を行ったが、リンパ球の反応性の抑制からは回復しなかった。この結果から、内分泌攪乱物質はリンパ球内において、通常のエストロゲンレセプターを介して核内転写因子を動員する系ではなく、他の経路を介して作用しているものと考えられる。

さらに培養細胞を用いた研究では、昨年度の結果と合わせると、Raji細胞の反応性の内分泌攪乱物質による低下はLDH活性の上昇と関連しているという結果が得られたが、Jurkat細胞の反応性の低下はLDH活性の上昇を示す濃度より低濃度であらわれ、内分泌攪乱物質がTリンパ球の機能に影響を与えていると考えられる。また、Jurkat細胞、Raji細胞共に、エストロゲンレセプターを発現していることをRT-PCRにて確認したが、エストロゲンレセプターアンタゴニストにより内分泌攪乱物質による反応性の低下は回復せず、やはりエストロゲンレセプターを介さない、あるいは介したとし

ても一般に知られている核内転写因子をリクルートする系とは異なる新たな経路によるものと推察される。

また、今年度の条件による研究、すなわちNK細胞が全体の15~20%を占める場合ではNK活性に低濃度で影響は認められなかったが、NK細胞系の培養細胞株を用いた研究で17β-エストラジオールによりNK活性に影響がみられたという報告もあり、よりNK細胞の純度を高めて研究する必要があると考える。

さらに、サイモシンは免疫機能の発育に重要な役割を果たすTリンパ球を分化・成熟させる働きを持つことが知られており、また、体内のエストロゲン濃度により、サイモシン濃度が変化することが知られていることから、これらの結果と併せて考えるとこれら内分泌攪乱物質が免疫機能へ影響を及ぼしていることが推察された。

#### E. 結論

ノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジシクロヘキシル、o, p'-DDE、p,p'-DDEはTリンパ球とBリンパ球の相互作用による反応性を減少させた。また、細胞が内分泌攪乱物質の細胞毒性により死ぬ濃度より低濃度でリンパ球の機能に影響を及ぼしていることが明らかになった。また、ICI182,780の存在下でもリンパ球の反応性の抑制は回復せず、内分泌攪乱物質はリンパ球内において、通常のエストロゲンレセプターを介して核内転写因子を動員する系ではなく、他の経路を介して作用しているものと考えら

れた。

また、Jurkat細胞、Raji細胞共に内分泌攪乱物質によりマイトージェンに対する反応性が低下したが、エストロゲンレセプターアンタゴニストによっても反応性の低下は回復せず、新たな経路によるものと推察される。

本研究に用いた内分泌攪乱物質は胸腺細胞のアポトーシスを誘導し、SS-A/Ro自己抗体のmRNAの発現を増加させ、免疫機能に影響を与える可能性があることが明らかとなった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sakabe K, Onoe M, Okuma M, Yoshida T, Aikawa H, Kinoue T and Kayama F: Natural and environmental oestrogens increase expression of SS-A/Ro autoantigen in the salivary gland of ovariectomized immature rats. *Pathophysiology* 6:231-236, 2000

Sakabe K, Okuma M, Karaki S, Matsuura S, Yoshida T, Aikawa H, Izumi S and Kayama F: Inhibitory effect of natural and environmental estrogens on thymic hormone production in thymus epithelial cell culture. *Int. J. Immunopharmacol.* 21(12):861-868, 1999



Tahara S, Kitada Y, Nakazawa H and Hisamatsu Y, Enantiometric separation of atropine in Scopolia extract and Scopolia Rhizome by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors, J. Chromatograph. A, 1999, 848:465-471.

Ishii S, Hisamatsu Y, Inazu K, Kadoi M and Aika K, Ambient measurement of nitrotriphenylenes and possibility of nitrotriphenylenes formation by atmospheric reaction, Environ. Sci. Technol., in press.

Ishii S, Hisamatsu Y, Inazu K, Kobayashi T and Aika K, formation of mutagenic nitro oxygenated benzo(a)pyrene derivatives from reaction of benzo(a)pyrene with nitrogen dioxide in the presence of O<sub>3</sub> and under light irradiation, Chemosphere, in press.

Yamazaki T, Okada Y, Hisamatsu Y and Kayama F: The effects of endocrine disruptors on human lymphocyte responses. 投稿中

香山不二雄、環境ホルモンと健康障害 (I)、環境ホルモンの提起したもの、ドクターサロン、44: 55-58, 2000

香山不二雄、内分泌攪乱物質化学物質問題の現状と人の健康問題、ホルモンと臨床、47:13-20, 1999

香山不二雄、環境ホルモンの健康影響、保健婦雑誌、55:597-603, 1999

香山不二雄、環境ホルモン物質の人への影響、安全工学、38: 108-112, 1999

香山不二雄、化学物質の環境へのリスク、環境中のホルモン様物質、臨床検査、43:1369-1374, 1999

香山不二雄、外因性内分泌攪乱化学物質 (環境ホルモン) の生体への影響と検査、健康への影響、SRL宝函、23:70-73, 1999

香山不二雄、内分泌攪乱物質問題と人の健康問題、ホルモンと臨床 '99秋季増刊号、ステロイドホルモン研究の進歩1999、13-20、医学の世界社、1999

## 2. 学会発表

Yamazaki T, Okada Y and Hisamatsu Y: Effects of endocrine disruptors on lymphocyte functions, Keystone Symposia, 1999, p. 48

山崎聖美、岡田由美子、久松由東、内分泌攪乱化学物質のリンパ球の反応性に及ぼす影響について、第72回日本生化学大会、1999、p.897.

山崎聖美、岡田由美子、久松由東、香山不二雄、内分泌攪乱化学物質のリンパ球の反応性に及ぼす影響について、第2回日本内分泌攪乱化学物質学会、1999、p.157.

山口晃子、山崎聖美、坂部貢、中澤  
裕之、生活関連化学物質のE-  
SCREEN Assayによる評価、第2回  
日本内分泌攪乱化学物質学会、1999、  
p.69.

Sakabe K, Kayama F, Yoshida T  
and Aikawa H: Low dose effects  
of environmental endocrine  
disruptors on female mouse  
thymus, with sepecial reference  
to T cell apoptosis. International  
Symposium, Environmental  
Hormones: Past, Present, Future  
New Orleans, LA USA October  
18-20, 1999

厚生科学研究費補助金（生活安全総合事業）  
分担研究報告書

内分泌攪乱物質の免疫機能に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 久松 由東 国立公衆衛生院地域環境衛生学部長

研究要旨

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物のみならず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながる事が指摘されている。しかし、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させていると考えられる。そこで、Tリンパ球系及びBリンパ球系培養細胞を用い、内分泌攪乱物質が免疫機能を低下させるか否か調べる目的で、内分泌攪乱物質が培養細胞の反応性に及ぼす影響について調べた。その結果、ノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジシクロヘキシルはTリンパ球系及びBリンパ球系細胞の反応性を低下させるが、この低下はエストロゲンレセプターアンタゴニストによっても回復しないことが明らかになった。

A. 研究目的

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物に影響を及ぼすのみならず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながる事が指摘されているが、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内分泌系は免

疫系と密接に関係しており、内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させていると考えられる。そこで、内分泌攪乱物質が免疫機能を低下させるか否か調べ、内分泌攪乱物質が免疫機能に及ぼす影響に関してそのメカニズムを解明することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

対象とした内分泌攪乱物質は、ノニルフェノール、ビスフェノールA、

フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジシクロヘキシル、o,p'-DDE、p,p'-DDEである。

Tリンパ球系培養細胞としては、Jurkat細胞を用い、A23187とホルボルミリステートアセテートで刺激した。Jurkat細胞を内分泌攪乱物質存在下でフェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を加えたRPMI 1640培地で4時間培養したのち刺激し、3日間、37度、5%二酸化炭素中で培養した。ハーベストする8時間前にトリチウム標識チミジンを加えてさらに培養し、ハーベストし、細胞核内とりこまれたトリチウム標識チミジンを液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、細胞内におけるDNA合成能を比較した。Bリンパ球系培養細胞としてはRaji細胞を用い、スタフィロコッカスオーレウスコーエンI (SAC)で刺激し、同様の実験を行った。

エストロゲンレセプターアンタゴニストであるICI182,780を加える場合は内分泌攪乱物質を添加する1時間前に加えた。

LDH活性はプロメガ社のキットを用いてプロトコールに従って測定した。

## C. 研究結果

### 1. Jurkat細胞の反応性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

ノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、o,p'-DDE、p,p'-DDEがJurkat細胞の反

応性を半分に抑制する濃度を調べたところ、それぞれ、 $0.6 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $0.5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $0.9 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $0.2 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $0.2 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $0.8 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $0.2 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $0.2 \times 10^{-4} \text{M}$ であった。

また、LDH活性を測定した結果、ノニルフェノールは $10^{-4} \text{M}$ で5%、ビスフェノールAは $10^{-4} \text{M}$ で3%、フタル酸ジ-n-ブチルは $10^{-4} \text{M}$ で2%上昇したが、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、o,p'-DDE、p,p'-DDEでは顕著な上昇はみられなかった。

さらに、さきのJurkat細胞の反応性を半分に抑制する濃度を用いてICI182,780存在下で抑制から回復するか調べたところ、全く回復しなかった。

### 2. Raji細胞の反応性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

ノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、o,p'-DDE、p,p'-DDEがRaji細胞の反応性を半分に抑制する濃度を調べたところ、それぞれ、 $0.8 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $0.5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $0.4 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $0.5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $10^{-4} \text{M}$ 、 $10^{-5} \text{M}$ 、 $10^{-5} \text{M}$ 、 $10^{-5} \text{M}$ であった。

また、LDH活性を測定した結果、ノニルフェノールは $10^{-5} \text{M}$ で25%、 $10^{-4} \text{M}$ で70%、ビスフェノールAは $10^{-4} \text{M}$ で33%、フタル酸ジシクロヘキシルは $10^{-4} \text{M}$ で37%、フタル酸ジ-n-ブチルは $10^{-4} \text{M}$ で10%、

o,p'-DDEは $10^{-4}$ Mで60%、p,p'-DDEは $10^{-4}$ Mで50%上昇したが、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジエチルでは顕著な上昇はみられなかった。

さらに、さきのRaji細胞の反応性を半分に抑制する濃度を用いてICI182,780存在下で抑制から回復するか調べたところ、全く回復しなかった。

#### D. 考察

昨年度の結果と合わせると、Raji細胞の反応性の内分泌攪乱物質による低下はLDH活性の上昇と関連しているという結果が得られたが、Jurkat細胞の反応性の低下はLDH活性の上昇を示す濃度より低濃度であらわれ、内分泌攪乱物質がTリンパ球の機能に影響を与えていると考えられる。また、Jurkat細胞、Raji細胞共に、エストロゲンレセプターを発現していることをRT-PCRにて確認したが、エストロゲンレセプターアンタゴニストにより内分泌攪乱物質による反応性の低下は回復せず、エストロゲンレセプターを介さない、あるいは介したとしても一般に知られている核内転写因子をリクルートする系とは異なる新たな経路によるものと推察される。

#### E. 結論

Jurkat細胞、Raji細胞共に内分泌攪乱物質によりマイトージェンに対する反応性が低下したが、エストロゲンレセプターアンタゴニストによっても反応性の低下から回復せず、新たな経路によるものと推察される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tahara S, Kitada Y, Nakazawa H and Hisamatsu Y, Enantiometric separation of atropine in Scopolia extract and Scopolia Rhizome by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors, J. Chromatograph. A, 1999, 848:465-471.

Ishii S, Hisamatsu Y, Inazu K, Kadoi M and Aika K, Ambient measurement of nitrotriphenylenes and possibility of nitrotriphenylenes formation by atmospheric reaction, Environ. Sci. Technol., in press.

Ishii S, Hisamatsu Y, Inazu K, Kobayashi T and Aika K, formation of mutagenic nitro oxygenated benzo(a)pyrene derivatives from reaction of benzo(a)pyrene with nitrogen dioxide in the presence of O<sub>3</sub> and under light irradiation, Chemosphere, in press.

##### 2. 学会発表

Yamazaki T, Okada Y and Hisamatsu Y: Effects of endocrine disruptors on lymphocyte functions, Keystone Symposia, 1999, p. 48

山崎聖美、岡田由美子、久松由東、内分泌攪乱化学物質のリンパ球の反応性に及ぼす影響について、第72回日本生化学大会、1999、p.897.

山崎聖美、岡田由美子、久松由東、香山不二雄、内分泌攪乱化学物質のリンパ球の反応性に及ぼす影響について、第2回日本内分泌攪乱化学物質学会、1999、p.157.

厚生科学研究費補助金（生活安全総合事業）  
分担研究報告書

内分泌攪乱物質の免疫機能に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 香山 不二雄 自治医科大学衛生学教授

研究要旨

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物のみならず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながる事が指摘されている。しかし、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させていると考えられ、特に、最近増加したアレルギーや化学物質過敏症との関連も危惧されている。そこで、内分泌攪乱物質が、アレルギー発症に関わっているか否か調べることを目的として研究を行った。その結果、内分泌攪乱物質および植物エストロジェンは顎下腺のSS-A/Ro自己抗体を増加させること、及び胸腺細胞のアポトーシスを誘導し免疫機能に影響を与える可能性があることが、明らかとなった。

A. 研究目的

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物に影響を及ぼすのみならず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながる事が指摘されているが、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させてい

ると考えられ、特に、最近増加したアレルギーや化学物質過敏症との関連も危惧されている。そこで、内分泌攪乱物質が、アレルギー発症に関わっているか否か調べ、内分泌攪乱物質が免疫機能に及ぼす影響に関してそのメカニズムを解明することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

1. 胸腺に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

マウス胸腺上皮細胞のin vitro培養系に、種々の濃度の自然由来及び

人工の内分泌攪乱物質を添加して培養し、培養上清中のthymosin- $\alpha$  1をHPLCを用いて定量した。また、卵巣摘出マウスに、内分泌攪乱物質を皮下投与し、胸腺重量を測定した。さらに、胸腺病理組織を観察し、フローサイトメトリーを用いて表面抗原の解析を行い、胸腺ホモジネート中のエストロゲン・レセプターアルファをenzyme immunoassay法を用いて調べた。

## 2. 内分泌攪乱物質の顎下腺におけるSS-A/Ro自己抗体の誘導

卵巣摘出ラットに、内分泌攪乱物質を皮下投与し、顎下腺におけるSS-A/Ro自己抗体の発現をreverse transcription polymerase chain reaction法(RT-PCR)及び*in situ* hybridization法(ISH)にて調べた。

## C. 研究結果

### 1. 胸腺に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

胸腺上皮細胞培養系に、 $17\beta$ -エストラジオール、ジェニスタイン、クメステロール、ビスフェノールAを添加したところ、胸腺上皮細胞から分泌されるサイモシンが濃度依存的に抑制された。 $17\beta$ -エストラジオールは、0.03ppb以上で、ジェニスタインとクメステロールは3ppb以上で、ビスフェノールAは3ppm以上でサイモシン分泌の抑制が見られた。

また、卵巣摘出マウスに、 $17\beta$ -エストラジオールを30ng/kg、それ以外の化学物質を300ng/kg/日、14日間連続皮下投与した。15日目に胸腺重量はコントロール群に対して、それぞれ $17\beta$ -エストラジオール

群60%、ジェニスタイン43%、ビスフェノールA5%の重量減少がみられた。胸腺病理組織像ではリンパ球のアポトーシスが著しく増加し、フローサイトメトリーを用いて測定した表面抗原の解析では、コントロール群にくらべて、 $17\beta$ -エストラジオール群、ジェニスタイン群、ビスフェノールA共に、CD4+CD8+が減少し、CD4+CD8-が増加していた。サイモシンの分泌も阻害された。さらに胸腺ホモジネート中のエストロゲン・レセプターアルファをenzyme immunoassay法を用いて調べた結果、卵巣摘出マウスのコントロール群とくらべ、それぞれの群で胸腺のエストロゲン・レセプターが2倍から4倍に増加していることが明らかとなった。

### 2. 内分泌攪乱物質の顎下腺におけるSS-A/Ro自己抗体の誘導

卵巣摘出ラットに $17\beta$ -エストラジオール、ジェニスタイン、ビスフェノールAを皮下投与したところ、 $17\beta$ -エストラジオールは3 $\mu$ g/kg/日で、ジェニスタイン、ビスフェノールAは3mg/kg/日で52kDaSS-A/Ro自己抗体のmRNAの発現が増加することがRT-PCR及びISHにより明らかになった。

## D. 考察

サイモシンは免疫機能の発育に重要な役割を果たすTリンパ球を分化・成熟させる働きを持つことが知られている。また、体内のエストロゲン濃度により、サイモシン濃度が変化することが知られていることから、これらの結果と併せて考えるとこれら内分泌攪乱物質が免疫機能



へ影響を及ぼしていることが推察された。

## E. 結論

本研究に用いた内分泌攪乱物質は胸腺細胞のアポトーシスを誘導し、SS-A/Ro自己抗体のmRNAの発現を増加させ、免疫機能に影響を与える可能性があることが明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Sakabe K, Okuma M, Karaki S, Matsuura S, Yoshida T, Aikawa H, Izumi S and Kayama F:

Inhibitory effect of natural and environmental estrogens on thymic hormone production in thymus epithelial cell culture. *Int. J. Immunopharmacol.* 21(12):861-868, 1999

Sakabe K, Onoe M, Okuma M, Yoshida T, Aikawa H, Kinoue T and Kayama F: Natural and environmental oestrogens increase expression of SS-A/Ro autoantigen in the salivary gland of ovariectomized immature rats. *Pathophysiology* 6:231-236, 2000

香山不二雄、環境ホルモンと健康障害 (I)、環境ホルモンの提起したもの、ドクターサロン、44: 55-58, 2000

香山不二雄、内分泌攪乱物質化学物質問題の現状と人の健康問題、ホルモンと臨床、47:13-20, 1999

香山不二雄、環境ホルモンの健康影響、保健婦雑誌、55:597-603, 1999

香山不二雄、環境ホルモン物質の人への影響、安全工学、38: 108-112, 1999

香山不二雄、化学物質の環境へのリスク、環境中のホルモン様物質、臨床検査、43:1369-1374, 1999

香山不二雄、外因性内分泌攪乱化学物質 (環境ホルモン) の生体への影響と検査、健康への影響、SRL宝函、23:70-73, 1999

香山不二雄、内分泌攪乱物質問題と人の健康問題、ホルモンと臨床 '99秋季増刊号、ステロイドホルモン研究の進歩1999、13-20、医学の世界社、1999

### 2. 学会発表

Sakabe K, Kayama F, Yoshida T and Aikawa H: Low dose effects of environmental endocrine disruptors on female mouse thymus, with special reference to T cell apoptosis. International Symposium, Environmental Hormones: Past, Present, Future New Orleans, LA USA October 18-20, 1999

山崎聖美、岡田由美子、久松由東、  
香山不二雄:内分泌攪乱化学物質のリンパ球の反応性に及ぼす影響について、第2回日本内分泌攪乱化学物質学会、p.157, 1999

厚生科学研究費補助金（生活安全総合事業）  
分担研究報告書

内分泌攪乱物質の免疫機能に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 岡田 由美子 国立公衆衛生院衛生獣医学部研究員

研究要旨

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物のみならず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながる事が指摘されている。しかし、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させていると考えられる。そこで、内分泌攪乱物質が免疫機能を低下させるか否か調べる目的で、内分泌攪乱物質がヒトリンパ球の反応性に及ぼす影響について調べた。その結果、ノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジシクロヘキシル、o, p'-DDE、p, p'-DDEはTリンパ球及びBリンパ球の反応性を低下させること、サイトカイン産生を抑制させること、またこれらの作用を示す濃度より高濃度でLDH活性を増大させること、これらの作用はエストロゲンレセプターアンタゴニストによって完全には抑制されなかったことが明らかになった。さらに、NK細胞のNK活性への影響について調べた結果、今回用いた条件では低濃度では顕著な影響は認められなかった。

A. 研究目的

現在、内分泌攪乱物質として疑われている物質は、我々が日常生活で使用しているものにも多く含まれ、70種にのぼる。これらの物質は、野生生物に影響を及ぼすのみならず、人においても生殖器ガンや精子数の減少につながる事が指摘され

ているが、内分泌攪乱物質の人の健康に対する影響についてはまだ研究が進んでおらず、早急にこの問題に対処する必要がある。内分泌系は免疫系と密接に関係しており、内分泌攪乱物質は免疫機能を低下させていると考えられる。そこで、内分泌攪乱物質が免疫機能を低下させるか否

か調べ、内分泌攪乱物質が免疫機能に及ぼす影響に関してそのメカニズムを解明することを本研究の目的とする。

## B. 研究方法

### 1. ヒト末梢血リンパ球の

pokeweed mitogen(PWM)に対する反応性への内分泌攪乱物質の影響

ヒト末梢血よりリンパ球を調製し、フェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を添加したRPMI1640培地にてリンパ球を内分泌攪乱物質存在下で4時間培養したのちPWMを添加し、2日間、37度、5%二酸化炭素中で培養し、トリチウム標識チミジンを加えてさらに一晚培養し、ハーベストし、細胞核内にとりこまれたトリチウム標識チミジンを液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、細胞内におけるDNA合成能を比較した。

### 2. ヒト末梢血リンパ球のサイトカイン産生能に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

ヒト末梢血よりリンパ球を調製し、フェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を添加したRPMI1640培地にてリンパ球を内分泌攪乱物質存在下で4時間培養したのちコンカナバリンA(Con A)を添加し、24時間、37度、5%二酸化炭素中で培養し、培養上清中のIL-2、IFN- $\gamma$ の濃度を測定した。

### 3. ヒト末梢血リンパ球のLDH活性への内分泌攪乱物質の影響

ヒト末梢血よりリンパ球を調製し、フェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を添加したRPMI1640培

地にてリンパ球を内分泌攪乱物質存在下で3日間培養し、培養上清中のLDH活性をキット(プロメガ社)を用いて測定した。

### 4. ヒト末梢血リンパ球のマイトージェンに対する反応性へ及ぼす内分泌攪乱物質の影響に対するエストロゲンレセプターアンタゴニストの効果

ヒト末梢血よりリンパ球を調製し、フェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を添加したRPMI1640培地にてリンパ球をエストロゲンレセプターアンタゴニスト(タモキシフェン、ICI182,780)非存在下あるいは存在下で1時間培養した後、内分泌攪乱物質を添加し、さらに4時間培養したのちマイトージェン(Con A、スタフィロコッカスオーレウスコーエンI(SAC)、PWM)を添加し、2日間、37度、5%二酸化炭素中で培養し、トリチウム標識チミジンを加えてさらに一晚培養し、ハーベストし、細胞核内にとりこまれたトリチウム標識チミジンを液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、細胞内におけるDNA合成能を比較した。

### 5. NK活性に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

ヒト末梢血より得られたリンパ球をフェノールレッドフリー、無血清、低蛋白溶液を添加したRPMI1640に浮遊させ、内分泌攪乱物質を加えて37℃、24時間インキュベートした。そして、target cellとしてK562細胞、あるいはMolt-4細胞を予め $^{51}\text{Cr}$ ラベルしておき、96穴マイクロプレート1ウェルあたりそれ