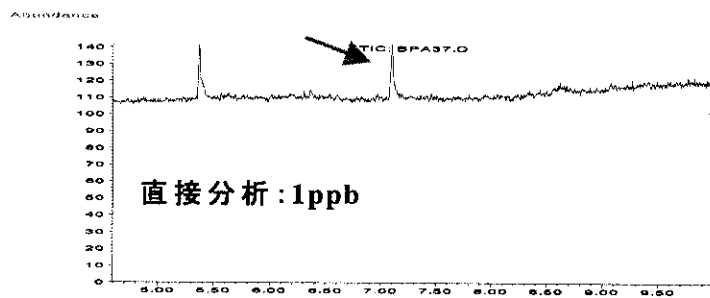


— 図.13 フタル酸エステル類の分析 バイアルキャップからのブランク —



直接分析: 1ppb

分析条件

GC
 カラム: HP-5MS 30m × 0.25mm × 0.25 μm

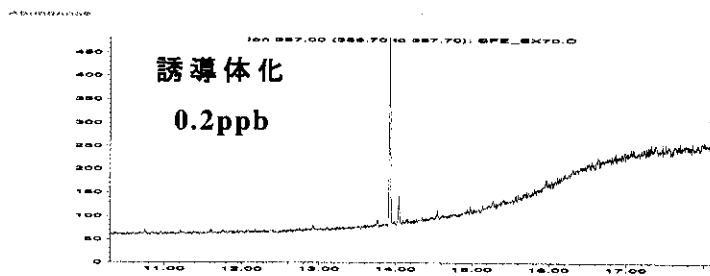
注入口温度 : 250°C

インターフェース温度 : 280°C

オープン温度 :

80°C(1分) - 20°C/分 - 300°C(3分)

MS: イオン源温度: 230°C



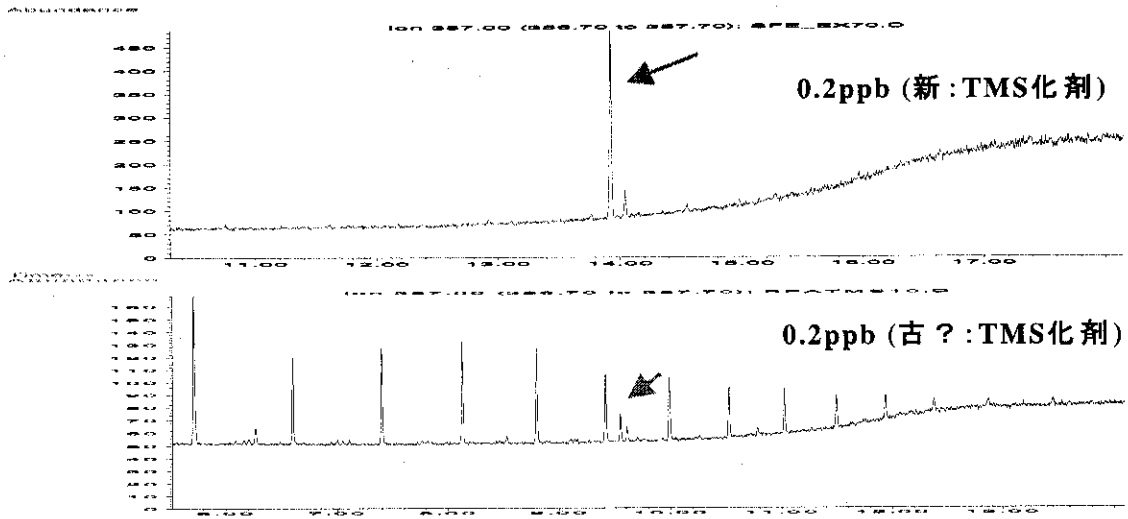
誘導体化
 0.2ppb

化合物名 SIMモニタイオン

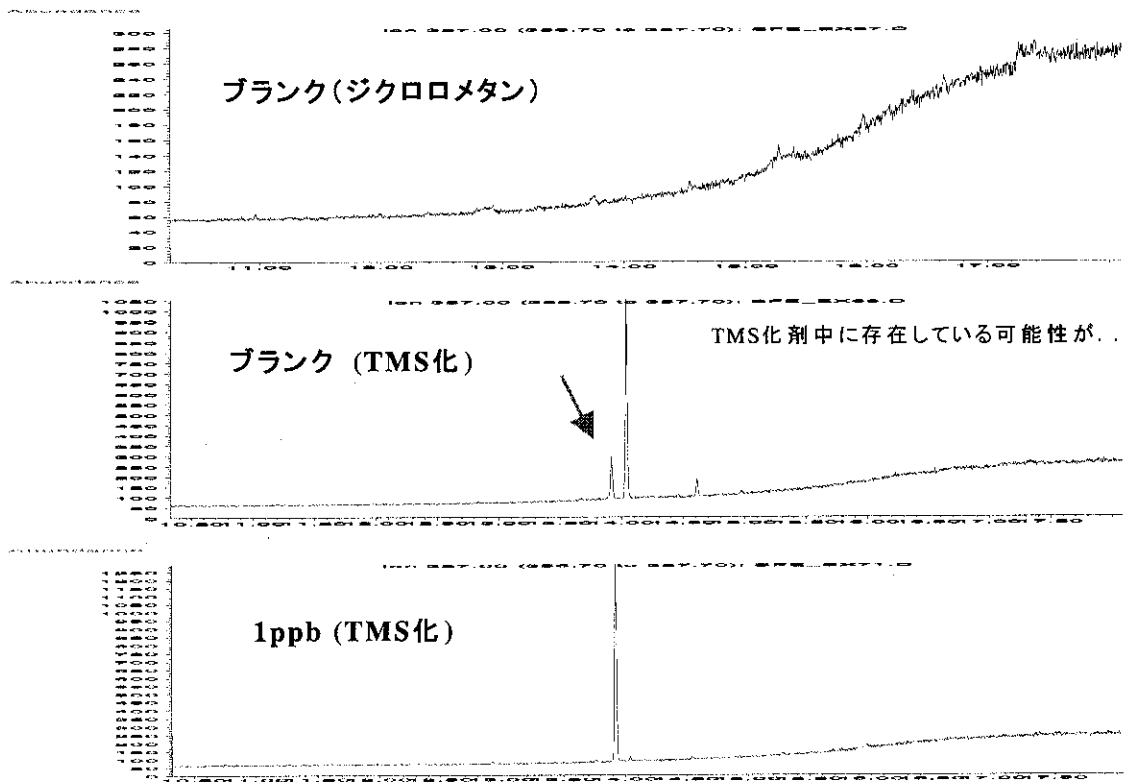
ビスフェノールA 213 228

ビスフェノールA (TMS誘導体) 357 372

— 図.14 ビスフェノールAの分析 標準溶液 —



— 図.15 ビスフェノール Aの分析 誘導体化の比較 —



— 図.16 ビスフェノールAの分析 誘導体化剤等のブランク —

平成 11 年度厚生科学研究
高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の分析
及び動態解析

酵母 Two-Hybrid 法を用いた高分子素材等の
生活関連製品由来化学物質の内分泌かく乱作用の評価

主任研究者：中澤裕之

星薬科大学薬品分析学教室

分担研究者：藤島弘道

長野県衛生公害研究所

研究協力者：織田 肇、堀 伸二郎、高取 聡

大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

酵母 Two-Hybrid 法を用い、ビスフェノール A、フタル酸エステル類及びノニルフェノールをはじめとする生活関連製品に由来する化学物質のエストロジェン様作用を評価した。パラベン (*p*-ヒドロキシ安息香酸エステル類)、*p*-アルキルフェノール類、ビスフェノール A、フタル酸ベンジルブチル及びフタル酸ジプロピルにエストロジェン様作用が認められた。その他の可塑剤のフタル酸エステル類及びアジピン酸エステル類ではエストロジェン様作用は認められなかった。また、酵母 Two-Hybrid 法に S9 mix 処理過程を組み込むことができることを示した。スチレンダイマー、一部のトリマー、ベンゾフェノン及びビフェニルの S9 mix による代謝産物にエストロジェン様作用が認められた。

A. 研究目的

食器、玩具及び医療器具等の生活関連製品からビスフェノール A、フタル酸エステル類及びノニルフェノールをはじめとする内分泌かく乱作用の疑われる化学物質が溶出していることが指摘されている。これら化学物質について内分泌かく乱作用という新たな観点からの安全性の評価が求められている。我々は、酵母 Two-Hybrid 法を運用し、これ

ら化学物質のエストロジェン様作用について評価した。

また、過去の化学発癌の研究に示されるように化学物質による生体への影響を考えるに際し、その代謝産物の作用を無視することはできない。我々は、酵母 Two-Hybrid 法の操作過程に S9 mix 処理過程を組み込み、代謝産物を含めた化学物質のエストロジェ

ン様作用の評価も併せて試みた。

B. 研究方法

B-1. エストロジェンアッセイ

ER-GAL4DBD (Estrogen receptor α - GAL4 DNA binding domain fusion protein) と TIFII-GAL4AD (TIFII-GAL4 activation domain fusion protein) とを発現させた酵母を前培養した。これを OD₅₉₀ = 0.15 前後に SD 培地で希釈し、酵母懸濁液とした。DMSO に溶解した被検化学物質を添加し、4 時間、30 °C でインキュベーションを行った。インキュベーション後、酵母を冷 Z-buffer で洗浄し、OD₅₉₀ を測定した。1 mg/ml となるようにザイモリエースを加え、37 °C、15 分間のインキュベーションを行った。0.67 mg/ml となるように *o*-ニトロフェニルガラクトピラノシド溶液を加え、30 °C、30 分間のインキュベーションを行った。OD₄₁₀ 及び OD₅₇₀ を測定し、Miller の式に基づき、生成した β -ガラクトシダーゼ活性を算出した。この酵素活性を被検化学物質のエストロジェン様作用の指標とした。各被検化学物質の酵母に対する毒性は作用前後の OD₅₉₀ を測定することにより判断した。

Miller の式：

$$U = 1000 \times ([OD_{410}] - 1.75 \times [OD_{570}]) / ([t] \times [v] \times [OD_{595}])$$

U, 酵素活性; t, 反応時間 (分) ;

v, アッセイに使用した酵母懸濁液量 (ml)

B-2. S9 mix 処理

Cofactor I 溶液 (0.8 mM NADPH, 0.8 mM NADH, 1.0 mM G-6-P, 0.4u/ml G-6-P デヒドロゲナーゼ, 20 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 6.6 mM KCl, 及び 1.6 mM MgCl₂) に 20 μ l/ml になるように ラット S9 を添加した。これに計画しているエストロジェンアッセイの 2 倍濃度になるように被検化学物質の DMSO 溶液を加え、37 °C、4 時間のインキュベーションを行った。対照には、加熱失活させた S9 を用いた。各実験時に S9 mix の活性の保証として 1.0 x 10⁻⁴ M の *trans*-スチルベンを用いた。酵素反応後、エストロジェンアッセイを行うまで -80 °C で保存した。

B-3. S9 mix 処理後のエストロジェンアッセイ

ER-GAL4DBD と TIFII-GAL4AD を発現させた酵母を常法に従い、前培養した。酵母を 2 倍濃度の SD 培地中に OD₅₉₅ = 0.30 前後になるように懸濁した。これと前述の S9 mix 処理溶液とを容量比 1 : 1 で混和し、30 °C、4 時間のインキュベーションを行った。以下、前述の方法によって酵母内の β -ガラクトシダーゼ活性を調べた。空試験を行った後の S9 mix と混和した SD 培地に 1.0 x 10⁻⁶ M の 17- β -エストラジオール (以下エストラジオール) を加え、30 °C で

4時間インキュベートした。このときに産生される β -ガラクトシダーゼ活性を100%としたとき、 1.0×10^{-4} M *trans*-スチルベンの S9 mix 代謝産物によって産生された酵素活性は、 $70 \pm 18\%$ であった。また、加熱失活させた S9 mix を用いた対照実験時では、*trans*-スチルベンの S9 mix 処理産物による酵素活性の産生は認められなかった。

B-4. 倫理面への配慮

本研究で使用した化学物質については、実験後の回収を徹底し、環境中への排出がなされないように努めた。

C. 研究結果

C-1. エストロジェンアッセイ

C-1-1. *p*-アルキルフェノール類

酵母を 1.0×10^{-6} M のエストラジオール存在下、30 °C で 4 時間インキュベートした際に産生される β -ガラクトシダーゼ活性を 100% としたとき、エストラジオールの 10% 作用濃度 (EC_{10}) は、 8.2×10^{-10} M であった (図 1)。アルキル基の主鎖長の異なる *p*-アルキルフェノール類においてエストロジェン様作用を検討した。アルキル基の主鎖長が 7 以下のアルキルフェノールにエストロジェン様作用が認められた (表 1)。一方、主鎖長が 8 以上の *p*-

オクチルフェノール、*p*-*n*-ノニルフェノール及び *p*-*n*-ドデシルフェノールには作用が認められなかった。

C-1-2. *p*-ヒドロキシ安息香酸エステル (パラベン) 類

p-ヒドロキシ安息香酸メチル、エチル、プロピル及びブチルにエストロジェン様作用が認められた (表 2)。そのエストロジェン様作用は、エストラジオールの約 $3.0 \times 10^5 \sim 6.0 \times 10^3$ 分の 1 であった。一方、*p*-ヒドロキシ安息香酸ベンジル、*p*-ヒドロキシ安息香酸塩及び安息香酸塩にはエストロジェン様作用が認められなかった。

C-1-3. フタル酸エステル類及びアジピン酸エステル類

酵母とのインキュベーション時間を 4 時間としたときフタル酸エステル類及びアジピン酸エステル類については、エストロジェン様作用が認められなかった (表 3)。次に酵母と被検化学物質とのインキュベーション時間を 24 時間に延長して検討した。エストラジオールの EC_{10} は、 3.7×10^{-10} M であった。このときフタル酸プロピル及びフタル酸ベンジルブチルにエストロジェン様作用が認められた。いずれも EC_{10} は、 1.0×10^{-3} M 以上となり、そのエストロジェン様作用は、エストラジオールの 10^6 分の 1 未満と見積られた。

C-1-4. その他の化学物質

C1-1~3. の範疇以外の化学物質としてビスフェノール A、ジフェニルカーボネート、ブチレーティドヒドロキシアニソール、ブチレーティドヒドロキシトルエン、*p*-ジクロロベンゼン、ペンタクロロフェノール、チロシン及びチラミンのエストロジェン様作用を検討した。ビスフェノール A にエストロジェン様作用が認められた (表 4)。

C-2. S9 mix 処理を含むエストロジェンアッセイ

C-2-1. S9 mix 処理の条件検討

S9 mix 処理によって生成する代謝産物がエストロジェン様活性を示すことが報告されている *trans*-スチルベン及びメトキシシクロルを用いて S9 mix 処理条件の検討を行った。1.0 x 10⁻⁴ M の *trans*-スチルベンまたはメトキシシクロルを 20 µl/ml の S9 を含む S9 mix で 2、4、6 及び 8 時間、37 °C で処理した。その結果、エストロジェン様活性は 4 時間でプラトーに達した。次に S9 量について検討した。同じく 1.0 x 10⁻⁴ M の *trans*-スチルベンまたはメトキシシクロルを 2、5、10、20 及び 40 µl/ml の S9 を含む S9 mix で 4 時間、37 °C で処理した。その結果、エストロジェン様活性は 20 µl/ml でプラトーに達した。以上の結果より化学物質の S9 mix 処理条件は、20 µl/ml の S9 を含む S9 mix 中、37 °C で 4 時間

処理することとした。また、加熱失活させた S9 mix を用いた対照実験時では、*trans*-スチルベンの S9 mix 処理産物による酵素活性の産生は認められなかった。本条件下、1.0 x 10⁻⁴ M の *trans*-スチルベンまたはメトキシシクロルを S9 mix 処理し、酵母に 4 時間作用させたときのエストロジェン様作用は、1.0 x 10⁻⁶ M のエストラジオール作用時を 100% としたとき、それぞれ 70±18% 及び 62±5.9% であった。(図 2)。これにより酵母 Two-Hybrid 法に S9 mix 処理過程を組み込むことができることが判った。

C-2-2. エストロジェンアッセイ (S9 mix 代謝産物)

フェノール性水酸基を持たず、ベンゼン環を有する化学物質としてスチレン、スチレンダイマー (1,2-*trans*-ジフェニルシクロブタン、1,2-*cis*-ジフェニルシクロブタン、1,3-ジフェニルプロパン及び 2,4-ジフェニル-1-ブテン)、及びスチレントリマー (2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン、1*a*-フェニル-4*a*-(1-フェニルエチル)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン及び 1,3,5-トリフェニルシクロヘキサン)、ベンゾフェノン及びビフェニルの S9 mix 代謝産物のエストロジェン活性について検討した。その結果、全てのスチレンダイマー、2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン、ベンゾフェノン及びビフェニルの S9 mix 代謝産物にエストロジェン様作用が認められた (表 5)。

D. 考察

パラベン類、アルキルフェノール類及びビスフェノール A にエストロジェン様作用が認められた。これら化学物質の共通する構造として分子内にフェノール残基を有し、そのフェノール性水酸基の *p* 位に低極性の置換基が配されている。共通するこれらの構造がエストロジェン受容体に対するリガンドとしての結合、並びに受容体がコアクチベーターと結合するうえで有効なコンフォメーションへと変換することに重要な役割を果たしていると考えられた。

アルキル基の主鎖長の異なるアルキルフェノール類についてエストロジェン様作用を検討した結果、アルキルフェノール類のエストロジェン様作用の強弱は、アルキル基の鎖長に大きく影響されることが判った。直鎖アルキル基の場合、鎖長が 5 の *p-n*-ペンチルフェノールに最も強いエストロジェン様作用が認められた。これよりも鎖長が短く、または長くなってもエストロジェン様作用は弱くなり、鎖長が 8 以上になるとエストロジェン様作用は認められなかった。エストラジオールの A 環にアルキルフェノールのフェノール残基を重ね合わせたとき、アルキル基の鎖長が 5 のときエストラジオールの構造に重なる部分が最も多くなる。これによって最も強い活性を示したと考えられた。主鎖長が 5 より長くなるにつれてエストラジオールの構造から突出する状態となり、化学物質

がリガンドとして結合するうえで支障を生じてエストロジェン様作用が弱くなったと推察された。最も強いエストロジェン様作用を示した *p-br*-ノニルフェノールについての組成は不明であるが、4-(1,1,3,3-テトラメチル)ブチルフェノール (*p-tert*-オクチルフェノール) に類似した枝鎖を持つ置換基を有する化学物質が主成分と推察される。ノニルフェノール等のアルキルフェノール類は、環境中に広く存在していることが明らかにされている。また、ノニルフェノールについては、日常的に用いられるプラスチック容器中にも残存していることや臍帯中からの検出例の報告がある。アルキルフェノール類のエストロジェン様作用は、他のエストロジェン様作用を示す化学物質と比較して強力であることから、これら化学物質の人体への暴露実態をより詳細に検討していくことが重要であると考えられる。

パラベン類についてもフェノール性水酸基の *p* 位にある置換基の構造がエストロジェン様作用に影響を与えていると考えられた。アルキルフェノール類と同様にメチル、エチル、プロピル、そしてブチルエステルの順でエストラジオールの構造に対する類似性及び官能基の疎水性が向上することによってエストロジェン様作用が強くなった。また、ベンジルエステルではエストロジェン様作用は認められなかったが、これは置換基のかさ高さによるものと考えられる。パラベン類の主要代謝産物である *p*-ヒドロキシ安息香酸にエ

エストロゲン様作用は認められなかった。これはフェノール性水酸基の *p* 位にある置換基の極性が高いことに由来すると考えられる。パラベン類については、生体内において速やかにエストロゲン様作用のない化学物質に代謝されると考えられる。しかし、日常生活品を介して比較的多量に摂取されていることから、日常的状況に即した暴露を受けた場合の生体内での消長や胎児への移行等について調査及び研究をすることは重要であると考えられる。

フタル酸ジプロピル及びフタル酸ベンジルブチルにエストロゲン様作用が認められた。これらの化学物質のエストロゲン様作用は、エストラジオールの 10^6 分の 1 未満と弱い活性であった。その他フタル酸エステル類には、エストロゲン様作用は認められなかった。フタル酸エステル類は、分子内にフェノール性水酸基がないことによってリガンドとしての結合能力とコンフォメーションの変換能力が弱いと考えられる。Harris らは、酵母を用いたレポーター遺伝子アッセイによってフタル酸ジエチル、フタル酸ジブチル及びフタル酸ジトリデシルについても、エストロゲン様作用があることが報告している (Harris, C. A. *et al.*, *Environ. Health Perspect.*, **105**, 802-811, 1997)。それら化学物質のエストロゲン様作用は、エストラジオールの $10^6 \sim 10^7$ 分の 1 と弱い活性である。Harris らの酵母のアッセイシステムでは被検化学物質とのインキュベーション時間が 4~6

日間であり、本酵母 Two-Hybrid 法の 4 時間よりも長い。このことによって酵母 Two-Hybrid 法では、検出されない弱いエストロゲン様作用を検出していると推察される。フタル酸エステル類については、動物実験で精子の運動性の低下、精囊の萎縮及び精子数の減少を引き起こすことが報告されている。これらの生体への影響が、フタル酸エステル類のエストロゲン様作用によるものかは更なる検討の余地があると思われる。フタル酸エステル類は、日常の生活関連製品に多く含まれている。フタル酸エステル類の人体への暴露実態を明らかにするとともにアンドロゲン及び甲状腺ホルモンに対する影響についても解析していく必要がある。

アジピン酸エステル類については、分子内にベンゼン環を持たず、その構造にエストラジオールとの類似性を見いだすことはできない。アジピン酸エステル類は、エストロゲン受容体のリガンドとしての結合能力及びコンフォメーションの変換能力を持たないと考えられた。

化学物質の内分泌かく乱作用について検討するに際してその代謝産物の内分泌かく乱作用を検討することは不可欠である。ベンゼン環を有する化学物質においては代謝過程で水酸基が導入され、フェノール残基が生成される可能性がある。すなわち前述の研究結果から判断すると、代謝によって新たにエストロゲン様作用を発揮する化学物質が生成することが考えられる。

検討した全てのスチレンダイマー及び2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセンのS9 mix代謝産物にエストロゲン様作用が認められた。これら化学物質が有するベンゼン環に水酸基が導入され、フェノール残基が生成したと考えられる。一部のスチレンダイマー及びトリマーがポリスチレン製品中に残存し、2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセンを含む数種のスチレントリマーが溶出して食品中に移行していることが河村らによって報告されている(河村ら, 食衛誌, 39, 390-398, 1998)。1a-フェニル-4a-(1-フェニルエチル)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン及び1,3,5-トリフェニルシクロヘキサンについては、S9による代謝を受けなかった、もしくは代謝産物自体にエストロゲン様作用がなかったと考えられる。1-フェニル-4-(1-フェニルエチル)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレンについては他に3種類の異性体が存在する。これらについては、今後、検討していく予定である。

ベンゾフェノン及びビフェニルのS9 mix代謝産物についてもエストロゲン様作用が認められた。スチレンダイマー等と同様に化学物質が有するベンゼン環に水酸基が導入され、フェノール残基が生成したと考えられる。ベンゾフェノンは、紫外線吸収剤としてサンスクリーンに配合され皮膚に直接塗布される。また、ビフェニルは食品添加物としての使用実績がある。これらについても人を含む生物への暴露の実態、そして生体内に取り込まれたこれら化学物質の代謝、分布及び排泄過程を検

討する必要があると思われる。

スチレンダイマー、2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン、ベンゾフェノン及びビフェニルのS9 mix代謝産物についてエストロゲン様作用が認められたことからベンゼン環を2、ないしは3つ有する化学物質についてエストロゲン様作用を重点的に検討していく必要があると思われる。また、これらの結果は、化学物質のエストロゲン様作用の評価は、化学物質自体を評価したのみでは不十分であり、代謝産物も含めて評価する必要性があることを強く示唆した結果である。本研究を通じて酵母Two-Hybrid法は化学物質自体のみならず、その代謝産物の内分泌かく乱作用を検討するうえで有用であることが示唆された。

E. 結論

1. アルキルフェノール類にエストロゲン様作用が認められた。また、アルキル基の主鎖長とエストロゲン様作用の強度との間に関連性が認められ、アルキル基の主鎖長が5のとき最も強い作用を発揮した。これは、エストラジオールの構造に最も類似することによって由来すると推察された。
2. パラベン類にエストロゲン様作用が認められた。パラベン類の主要代謝産物である*p*-ヒドロキシ安息香酸塩にはエストロゲン様作用が認められなかった。

3. フタル酸エステル類及びアジピン酸エステル類については、エストロジェン様作用が認められなかった。フタル酸プロピル及びフタル酸ベンジルブチルについては、酵母とのインキュベーション時間を 24 時間に延長することによって弱いエストロジェン様作用が認められた。フタル酸エステル類については動物に対する生殖毒性が報告されていることからエストロジェンに加えてアンドロジェン及び甲状腺ホルモンに対する影響についても解析していく必要性があると考えられた。
 4. ビスフェノール A にエストロジェン様作用が認められた。ジフェニルカーボネート、ブチレーテイドヒドロキシアニソール (BHA)、ブチレーテイドヒドロキシトルエン (BHT)、*p*-ジクロロベンゼン、ペンタクロロフェノール、チロシン及びチラミンにエストロジェン様作用が認められなかった。
 5. 酵母 Two-Hybrid 法は化学物質自体のみならずその代謝産物の内分泌かく乱作用を検討するうえで有用であることが判った。
 6. スチレンダイマー (1,2-*trans*-ジフェニルシクロブタン、1,2-*cis*-ジフェニルシクロブタン、1,3-ジフェニルプロパン及び 2,4-ジフェニル-1-ブテン)、2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン、ベンゾフェノン及びビフェニルの S9 mix 代謝産物にエストロジェン様作用が認められた。
 7. 化学物質のエストロジェン様作用の評価は、化学物質自体を評価したのみでは不十分であり、代謝産物も含めて評価する必要性があることが示唆された。
- F. 研究業績
- 学会発表
1. 酵母 Two-Hybrid 法を用いた農薬類の内分泌かく乱作用の検討
高取 聡、北川陽子、西川淳一、西原 力、堀 伸二郎
日本食品衛生学会第 77 回学術講演会、1999 年 5 月、東京

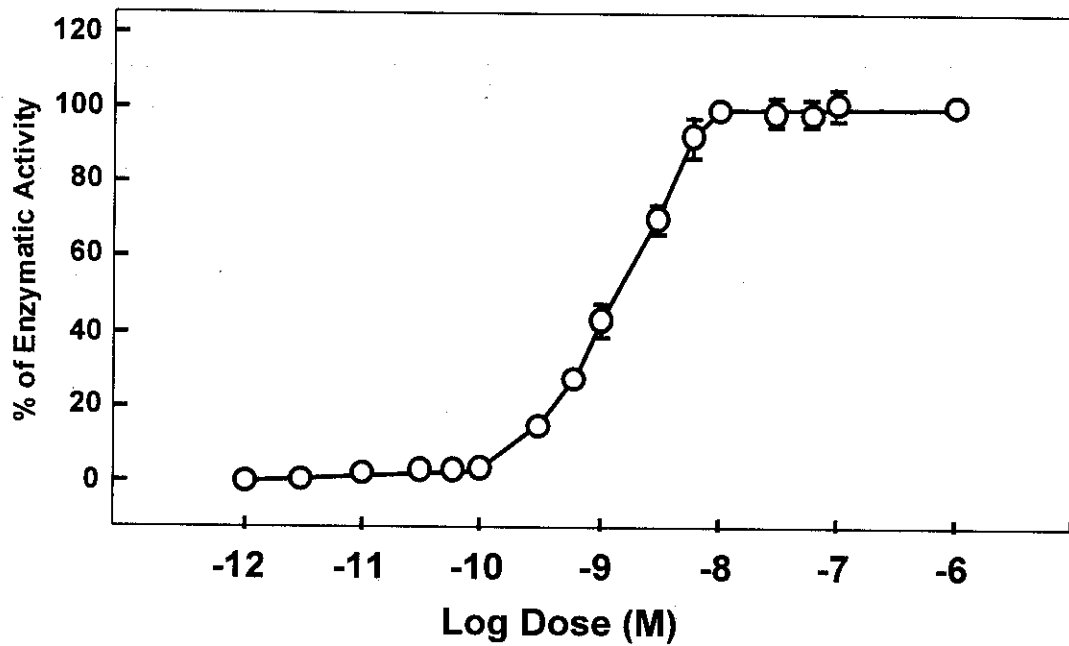


図1 酵母 Two-Hybrid 法におけるエストラジオールの用量反応曲線

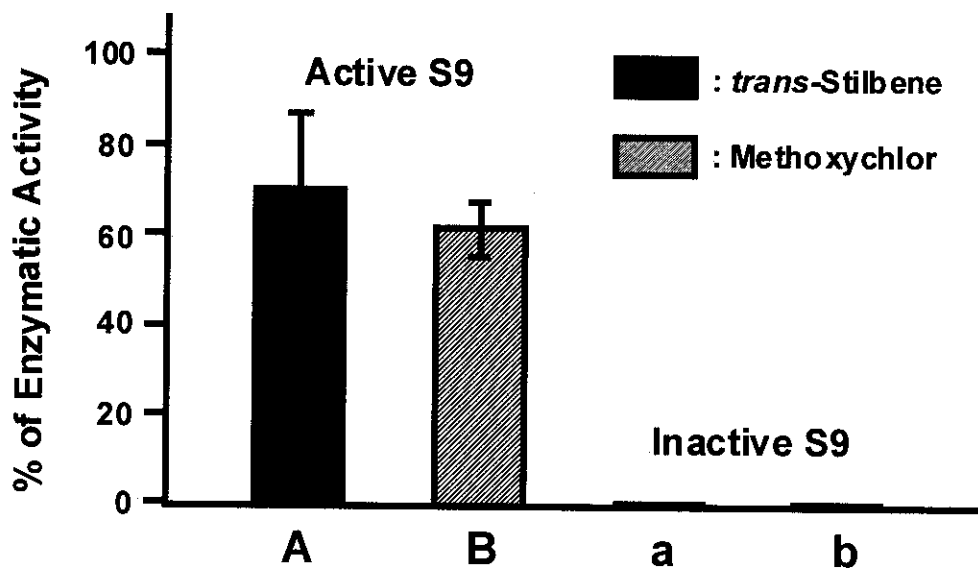


図2 *trans*-スチルベン (A/a: 1.0×10^{-4} M) 及びメトキシクロル (B/b: 1.0×10^{-4} M) の S9 mix 代謝産物のエストロゲン様作用
A, B: 活性 S9 mix を作用させた、a, b: 不活性 S9 mix を作用させた

化学物質名	EC ₁₀ (M)	相対活性	アルキル主鎖長	備考
<i>p</i> - <i>n</i> -ドデシルフェノール	>1.0 x 10 ⁻³	-	12	界面活性剤、樹脂添加剤
<i>p</i> - <i>n</i> -ノニルフェノール	>1.0 x 10 ⁻³	-	9	界面活性剤、樹脂添加剤
<i>p</i> - <i>n</i> -オクチルフェノール	>1.0 x 10 ⁻³	-	8	界面活性剤、樹脂添加剤
<i>p</i> - <i>n</i> -ヘプチルフェノール	3.0 x 10 ⁻⁵	3.7 x 10 ⁻⁴	7	
<i>p</i> - <i>n</i> -ヘキシルフェノール	7.5 x 10 ⁻⁶	9.0 x 10 ⁻³	6	
<i>p</i> - <i>n</i> -ペンチルフェノール	2.5 x 10 ⁻⁶	3.0 x 10 ⁻³	5	
4-(1,1,3,3-テトラメチル)- ブチルフェノール	4.6 x 10 ⁻⁷	5.6 x 10 ⁻²	4	界面活性剤、樹脂添加剤
<i>p</i> - <i>n</i> -ブチルフェノール	1.3 x 10 ⁻⁵	1.6 x 10 ⁻⁴	4	
<i>p</i> - <i>t</i> -ペンチルフェノール	2.3 x 10 ⁻⁶	2.8 x 10 ⁻³	3	界面活性剤、樹脂添加剤
<i>p</i> - <i>s</i> -ブチルフェノール	2.0 x 10 ⁻⁵	2.4 x 10 ⁻⁴	3	界面活性剤
<i>p</i> - <i>t</i> -ブチルフェノール	3.5 x 10 ⁻⁵	4.3 x 10 ⁻⁴	2	界面活性剤、ポリカーボネ ート分子量調整剤
<i>p</i> -メチルフェノール (<i>p</i> -クレゾール)	9.0 x 10 ⁻⁴	1.1 x 10 ⁻⁶	1	界面活性剤、樹脂添加剤
<i>p</i> - <i>br</i> -ノニルフェノール#	2.4 x 10 ⁻⁷	2.9 x 10 ⁻²	~9	界面活性剤、樹脂添加剤
17-β-エストラジオール	8.2 x 10 ⁻¹⁰	1	-	女性ホルモン

表 1 アルキルフェノール類のエストロジェン様作用

相対活性：被検化学物質の EC₁₀ / エストラジオールの EC₁₀

br:枝分かれ

化学物質名	EC ₁₀ (M)	相対活性	備考
<i>p</i> -ヒドロキシ安息香酸メチル	2.2 x 10 ⁻⁴	2.7 x 10 ⁻⁵	保存料
<i>p</i> -ヒドロキシ安息香酸エチル	1.3 x 10 ⁻⁴	1.6 x 10 ⁻⁵	保存料
<i>p</i> -ヒドロキシ安息香酸プロピル	1.5 x 10 ⁻⁵	1.8 x 10 ⁻⁴	保存料
<i>p</i> -ヒドロキシ安息香酸ブチル	5.0 x 10 ⁻⁶	6.1 x 10 ⁻³	保存料
<i>p</i> -ヒドロキシ安息香酸ベンジル	>1.0 x 10 ⁻³	-	保存料
<i>p</i> -ヒドロキシ安息香酸ナトリウム	>1.0 x 10 ⁻³	-	パラベン代謝産物
安息香酸ナトリウム	>1.0 x 10 ⁻³	-	保存料
17-β-エストラジオール	8.2 x 10 ⁻¹⁰	1	女性ホルモン

表 2 *p*-ヒドロキシ安息香酸エステル (パラベン) 類のエストロジェン様作用

化学物質名	EC ₁₀ (M)	
	4 h Incubation	24 h Incubation
フタル酸ジメチル	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³
フタル酸ジエチル	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³
フタル酸ジプロピル	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³ #
フタル酸ジブチル	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³
フタル酸イソブチル	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³
フタル酸ジヘキシル	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³
フタル酸ジシクロヘキシル	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³
フタル酸ジイソノニル	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³
フタル酸イソデシル	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³
フタル酸ベンジルブチル	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³ #
ブチルフタロイル ブチルグリコレート	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³
アジピン酸ジメチル	>1.0 x 10 ⁻³	N.T.
アジピン酸ジエチル	>1.0 x 10 ⁻³	N.T.
アジピン酸イソプロピル	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³
アジピン酸ジブチル	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³
アジピン酸ジイソブチル	>1.0 x 10 ⁻³	N.T.
アジピン酸ジオクチル	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³
アジピン酸ジイソノニル	>1.0 x 10 ⁻³	N.T.
ジブチルセバシン酸	>1.0 x 10 ⁻³	N.T.
アゼライン酸ジ-2-エチルヘキシル	>1.0 x 10 ⁻³	N.T.
17-β-エストラジオール	8.2 x 10 ⁻¹⁰	3.7 x 10 ⁻¹⁰

表 3 フタル酸エステル類及びアジピン酸エステル類のエストロジェン様作用

: 1.0 x 10⁻³ M の被検化学物質を作用させた時にエストロジェン様作用が、認められたが、1.0 x 10⁻⁶ M のエストラジオールによる作用の 10% 未満であった。

N.T. : 実験せず

化学物質名	EC ₁₀ (M)	相対活性	備考
ビスフェノール A	2.3 x 10 ⁻⁵	2.8 x 10 ⁻⁴	ポリカーボネート樹脂原料
ジフェニルカーボネート	>1.0 x 10 ⁻³	-	ポリカーボネート樹脂原料
ブチレーテッドヒドロキシアニソール	>1.0 x 10 ⁻³	-	酸化防止剤
ブチレーテッドヒドロキシトルエン	>1.0 x 10 ⁻³	-	酸化防止剤
p-ジクロロベンゼン	>1.0 x 10 ⁻³	-	防虫剤
ペンタクロロフェノール	>1.0 x 10 ⁻³	-	殺菌剤
チロシン	>1.0 x 10 ⁻³	-	アミノ酸
チラミン	>1.0 x 10 ⁻³	-	腐敗アミン
17-β-エストラジオール	8.2 x 10 ⁻¹⁰	1	女性ホルモン

表 4 その他の化学物質のエストロジェン様作用

化学物質名	EC ₁₀ (M)		相対活性	備考
	Active S9	Inactive S9		
スチレン	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³	-	スチレンモノマー
1,2- <i>cis</i> -ジフェニル-シクロブタン	1.4 x 10 ⁻⁴	8.2 x 10 ⁻⁴	5.6 x 10 ⁻⁵ (3.3 x 10 ⁻⁶)*	SD-A [§]
1,2- <i>trans</i> -ジフェニル-シクロブタン	3.2 x 10 ⁻⁵	>1.0 x 10 ⁻³	1.3 x 10 ⁻⁵	SD-B
2,4-ジフェニル-1-ブテン	3.0 x 10 ⁻⁴	>1.0 x 10 ⁻³	1.2 x 10 ⁻⁶	SD-C
1,3-ジフェニルプロパン	2.3 x 10 ⁻⁴	>1.0 x 10 ⁻³	9.2 x 10 ⁻⁵	SD-D
2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン	3.3 x 10 ⁻⁵	>1.0 x 10 ⁻³	1.3 x 10 ⁻⁵	ST-A
1 <i>a</i> -フェニル-4 <i>a</i> -(1-フェニルエチル)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³	-	ST-D
1,3,5-トリフェニル-シクロヘキサン	>1.0 x 10 ⁻³	>1.0 x 10 ⁻³	-	ST-F
ベンゾフェノン	2.6 x 10 ⁻⁵	>1.0 x 10 ⁻³	1.0 x 10 ⁻⁵	紫外線吸収剤
ビフェニル	1.7 x 10 ⁻⁵	>1.0 x 10 ⁻³	6.8 x 10 ⁻⁴	防かび剤
17- <i>B</i> -エストラジオール [#]	2.5 x 10 ⁻¹⁰	1.6 x 10 ⁻¹⁰	1	女性ホルモン

表 5 ポリスチレン関連化学物質、ベンゾフェノン及びビフェニルの S9 mix 代謝産物のエストロジェン様作用

: 空試験を行った後の S9 mix と混和した SD 培地に 1.0 x 10⁻⁶ M のエストラジオールを加え、30 °C で 4 時間インキュベートした条件下での EC₁₀

* : Inactive S9 とインキュベートした際のエストラジオールの EC₁₀ に対する相対活性

§ : SD, スチレンダイマー ; ST, スチレントリマー

高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の分析及び動態解析

ヒト副腎由来の培養細胞を用いたステロイドホルモン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響

主任研究者： 中澤 裕之
星薬科大学

研究協力者： 中陳 静男
星薬科大学

研究要旨

環境由来の化学物質が内在性のステロイドホルモン産生（steroidogenesis）にどのような影響を及ぼすかを解明する目的で、H295R細胞を用いてステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を評価するアッセイ法の基礎的検討を行い、方法を確立した。このH295R細胞はヒト副腎皮質由来のステロイドホルモン産生細胞であり、この細胞を用いて環境由来の化学物質の及ぼす影響を検討することは、ヒトにおけるリスクを評価できるが可能性がある。このアッセイ法を用いて、プラスチック可塑剤として用いられているフタル酸エステル類の影響、プラスチック関連物質としてビスフェノールA、4-ノニルフェノールおよび4-*t*-オクチルフェノールの影響、および食品包装用ラップ類のジクロロメタン抽出物低分子画分・メタノール可溶部分の影響を検討し、コルチゾール産生を抑制するいくつかの化学物質を特定した。

A. 研究目的

ステロイドホルモンは個体発生、細胞の増殖・分化、性の分化と行動、神経情報伝達の制御など重要な生理機能に関わっており、生体の恒常性を保つためには必須の作用分子である。近年になりステロイドホルモン合成に関与する酵素群がクローニングされ、それらの転写調節をはじめとするステロイド合成機序の詳細、およびステロイドホルモンの核内受容体が明らかにされたことからその作用発現機構が分子レベルで明らかにされつつある。

本研究は、環境ホルモンといわれる環境由来の化学物質が生体のステロイドホルモン産生（steroidogenesis）にどのような影響を及ぼすかを解明する目的で、ヒト副腎皮質由来のステロイドホルモン産生細胞（H295R細胞）を用いて、*in vitro*でその直接的な影響を検討するものである。このH295R細胞はヒト由来であり、かつ広範囲にわたるステロイドホルモンの産生能力を

保持している。この細胞を用いて直接環境由来の化学物質の及ぼす影響を検討することは、内在性のステロイドホルモン産生に影響を及ぼすと考えられる化学物質を特定することができ、信頼できる結果を迅速に得ることが可能である。さらに本研究を発展させることにより、ステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を細胞レベル、分子レベルで解明することが可能である。

そこで本研究では、はじめに環境由来の化学物質のステロイドホルモン産生に及ぼす影響を評価するアッセイ系の検討を行い、方法を確立した。次に確立したアッセイ系を利用して内分泌かく乱化学物質として知られ、プラスチック可塑剤であるフタル酸エステル類の影響、プラスチック関連物質としてビスフェノールA、4-ノニルフェノールおよび4-*t*-オクチルフェノールの影響、および食品包装用ラップ類のジクロロメタン抽出物低分子画分・メタノール可溶部分

の影響を検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養

H295R 細胞は英国エジンバラ大学の J. I. Mason 教授から供与を受けた。細胞は ITS⁺(1.0%)、Ultrosor G (2.0%) および抗生物質を含有する D-MEM-F12 メジウムを用い 5% CO₂-95% Air の気相中、37 °C の条件下で継代培養した。細胞を実験に使用に当たり細胞をトリプシンで処理後、24 well のプレートにサブカルチャーし、コンフルエント後、ITS⁺(1.0%)、牛血清アルブミン (0.01%) および抗生物質含有の D-MEM-F12 メジウムに交換した。24 時間後さらにメジウムを交換し、種々の検体のエタノール溶液を添加し (エタノール濃度は 1% 以下)、同時にステロイド合成を誘導するため (Bu)₂cAMP を添加した。一定時間後にメジウム中に分泌されたステロイドをラジオイムノアッセイ (RIA) により測定した。サンプルの細胞毒性を考慮してメジウム中に放出される LDH を測定した。さらに well 中の細胞を洗浄後溶解し、全タンパク質量を測定して、細胞数の指標とした。なお、コルチゾールの測定にはコルチゾール測定 RIA キット (DPC 社製) を用いた。LDH の測定は細胞障害試験用の CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay (Promega 社製) を用いた。well 中の細胞は SDS (1%) NaCl (150mM)、EGTA (5mM) MgCl₂ (0.5 mM)、MnCl₂ (0.5mM)、および PMSF (0.2mM) 含有の Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を用い溶解させた後、BCA Protein assay reagent (Pierce 社製) を用いて測定した。

2) 材質試験用試料の調製

食品包装用ラップ 0.5 g をジクロロメタン 20mL に溶解させ室温で放置。その後、10mL のメタノールで高分子を沈殿させ遠心分離、上清のみを濃縮乾固させ、10mL のメタノールで溶解し、メンブランフィルターを通し試験試料とした。

C. 研究結果

ステロイドホルモン産生に及ぼす影響を評価するアッセイ法の検討

H295R 細胞を使用してステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を評価するアッセイ法の基礎的検討を行い、“研究方法”に示した方法を確立した。H295R 細胞の産生するステロイドホルモンについては、産生量の多いコルチゾールを測定することとし、生合成を誘導する cAMP の処理時間と濃度について検討を加えた。その結果、処理時間に依存して 60 時間まで、培地中のコルチゾール産生がほぼ直線的に増加すること、また cAMP 濃度に依存してコルチゾール産生がほぼ直線的に増加することを明らかにした。cAMP の濃度は 1mM を越える濃度になるとコルチゾール産生はほぼ飽和した。以後の実験には、コルチゾール生合成の誘導を行うための cAMP 濃度は 1mM とし、処理時間は 48 時間に設定した。

フタル酸エステル類の影響

検体として、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、アジピン酸ジエチルヘキシル、フタル酸ジエチルヘキシル、フタル酸ヘキシル、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジプロピル、およびフタル酸を用いた。検体の濃度は 10 μg/mL (10ppm) を最大濃度として、以下影響の認められない濃度まで各種濃度を設定し、影響を検討した。その結果、フタル酸ジシクロヘキシルが 5 および 10 μg/mL の濃度において H295R 細胞のコルチゾールの産生を抑制することを明らかにした。その他のフタル酸エステル類およびフタル酸は何ら影響を及ぼさなかった。またこれらの濃度では細胞に対する毒性はほとんど認められなかった。

ビスフェノール A、4-ノニルフェノールおよび 4-*t*-オクチルフェノールの影響

プラスチック関連物質としてビスフェノール A、4-ノニルフェノールおよび 4-*t*-オクチルフェノールを検体として用いた。検体の濃度は 10 μg/mL を最大濃度として、以下影響の認められない濃度まで各種濃度を設定し、影響を検討した。その結果、4-*t*-オクチルフェノールが 0.26 μg/mL の低濃度において、H295R 細胞のコルチゾールの産生を 84% に抑制することを明らかにした。10 μg/mL の高濃度ではコルチゾールの産生

ほとんど認められなかった (5%以下)。またこれらの濃度における細胞毒性は認められなかった。また、ビスフェノール A はコルチゾール産生に対して全く影響を及ぼさなかった。

食品包装用ラップ類のジクロロメタン抽出低分子画分・メタノール可溶部分の影響

食品包装用ラップフィルムの材質から溶出される成分によりヒトが曝露される可能性を考慮して、業務用あるいは一般用食品包装用ラップフィルムのジクロロメタン抽出低分子画分・メタノール可溶部分についてその影響を検討することとした。試料は業務用、一般用食品包装用ラップフィルム 32 種から材質試験用試料の調製に従って調製したものをを用いた。試料の最終濃度は 5 $\mu\text{L}/\text{ml}$ として、影響を検討した。その結果、32 品目のうち 8 品目からの抽出物が H295R 細胞のコルチゾールの産生を有意に抑制した。この濃度では検体の細胞毒性は認められなかった。同時にこれらラップフィルムのジクロロメタン抽出低分子画分・メタノール可溶部分のノニルフェノールの含有量が測定されている (主任研究者、中澤 裕之) ことから、試料中のノニルフェノール含有量とコルチゾール産生の抑制との間の相関関係を調べたところ、相関関係は認められなかった ($r = -0.3069$)。

D. 考察

内分かく乱化学物質の野生動物並びにヒトに対する影響について関心が高まっている中、過去十数年にわたって同定されてきた内分泌かく乱化学物質は環境エストロゲンといわれる物質で、エストロゲン受容体に低濃度で結合して天然のエストロゲンと同様な作用を示す物質である。したがって、さまざまな環境化学物質と野生動物並びにヒトに及ぼす影響との関連を明らかにするため、それらの化学物質のエストロゲン受容体との結合性あるいはエストロゲン活性を調べることに主眼が置かれてきた。ステロイドホルモンは "key of the life" と称されるように個体発生、細胞の増殖・分化、性の分化と行動、および神経情報伝達の制御など重要な生理機能に関わっている。従って環境由来の化学物質が生体にお

ける内在性のステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) に影響を与えることにより野生生物やヒトに重要な生体影響を与えることが懸念される。そこで本研究では環境由来の化学物質が内在性のステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) にどのような影響を及ぼすかを解明する目的で、H295R 細胞を用いてステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を評価するアッセイ法の基礎的検討を行い、その方法を確率した。この H295R 細胞はヒト副腎皮質由来のステロイドホルモン産生細胞であり、この細胞を用いて直接環境由来の化学物質の及ぼす影響を検討することは、ステロイドホルモン産生異常などステロイドホルモン産生に影響を及ぼす化学物質を特定することができ、ヒトにおけるリスク評価が可能となる。

結果は示していないが、今回確立したアッセイ系に農薬 DDT の主成分である p, p' -DDT およびその代謝物を適用した結果、コルチゾール産生を抑制することを明らかにしている。農薬である p, p' -DDT およびその関連化合物は副腎皮質においてステロイド合成に関与する 11β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の阻害剤として臨床に供されているメチラポンの開発の発端となった化合物である。本アッセイ系においてもコルチゾール産生を抑制することが考えられた化合物であり、本アッセイ系がステロイド産生に及ぼす影響を評価出来ることを示したものである。

フタル酸エステル、アジピン酸エステル類はプラスチックの可塑剤として用いられる。またこれらは内分泌かく乱化学物質としての疑いをもたれており、生活全般に塩化ビニル樹脂を中心としたプラスチック製品が利用されていることからヒトへの健康影響が懸念されている。そこで代表的な化合物 8 種の影響を検討し結果、フタル酸ジシクロヘキシルが高濃度において H295R 細胞のコルチゾールの産生を抑制したが、その他の化合物は何ら影響を及ぼさなかった。ビスフェノール A はエポキシ樹脂やポリカーボネートの原料として用いられており、ノニルフェノールやオクチルフェノールは工業用洗剤であるノニルフェノール・エトキシレートやオクチルフェノール・エト

キシレートの分解により生成され、それぞれ環境中で広範囲に汚染されていることが考えられている。これらの中で、4-*t*-オクチルフェノールが 0.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の比較的低濃度において、コルチゾールの産生を抑制することを明らかにした。

食品包装用ラップフィルムからノニルフェノール等の内分泌かく乱化学物が食品へ移行するおそれが懸念されている。そこで一般用・業務用食品包装用ラップフィルム 32 種から材質試験用試料の調製に従って調製した試料の影響を検討した結果、8 品目からの抽出物が H295R 細胞のコルチゾールの産生を有意に抑制することを明らかにした。この試料中のノニルフェノール含量とコルチゾールの産生の抑制との間には相関関係が認められないことから、ノニルフェノール以外の成分がコルチゾールの産生を抑制している可能性が考えられる。

近年になりステロイドホルモン生合成に関与する酵素群がクローニングされそれらの転写調節をはじめとするステロイド合成機序の詳細が分子レベルで明らかにされつつある。本研究を発展させることにより、ステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を細胞レベル、分子レベルで解明することが可能になると思われる。

E. 結論

ステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) に及ぼす環境由来の化学物質の影響を解明する目的で、ヒト副腎皮質由来の H295R 細胞を用いて、アッセイ法の基礎的検討を行い、方法を確率した。このアッセイ法を用いて、プラスチック可塑剤として用いられているフタル酸エステル類の影響、プラスチック関連物質としてビスフェノール A、4-ノニルフェノールおよび 4-*t*-オクチルフェノールの影響、および食品包装用ラップ類のジクロロメタン抽出物低分子画分・メタノール可溶部分の影響を検討した結果、コルチゾール産生を抑制するいくつかの化学物質を特定した。

F. 研究業績

学会発表

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のコルチゾール分泌に及ぼす DDT とその代謝物の影

響：中陳静男、篠田 聡、豊島 聰、中澤裕之 (星薬大・薬)、牧野恒久 (東海大・医)、日本内分泌攪乱化学物質学会第 2 回研究発表会、12、1999、神戸

平成11年度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

高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の分析及び動態解析
－エストロジェン活性検出系の確立－

主任研究者： 中澤 裕之
星薬科大学

研究協力者： 山崎 聖美
国立公衆衛生院

研究要旨

近年、生活環境中の化学物質の安全性について内分泌かく乱作用という新しい観点で評価する必要性が生じている。スクリーニングの一つにヒト由来乳癌細胞である MCF-7 のエストロジェンに応答する増殖反応を指標とした *in vitro* 試験法である E-SCREEN Assay がある。今回、より簡便な操作でかつ精度の高いアッセイ系の確立を目的に諸条件の基礎的検討を行い、同じくエストロジェンレセプターを発現しているヒト由来の乳癌細胞である T47D を使用したエストロジェン活性の検出系の確立を目的として研究を行った。そして、高分子素材由来の化学物質について評価を行った。

A. 研究目的

近年、生活環境中の化学物質が、微量で生物に作用し、生殖機能等に影響していると指摘されている。殺虫剤等の農薬、プラスチック等の高分子素材に関連する化学物質の安全性について内分泌攪乱作用という新しい観点で評価する必要性が生じている。既に内分泌攪乱化学物質のスクリーニングには、*in vitro*、*in vivo* で様々な方法が報告されているが、その一つにヒト由来乳癌細胞である MCF-7 のエストロジェンに応答する増殖反応を指標とした *in vitro* 試験法である E-SCREEN Assay がある。従来法では、チャコールデキストラン処理したヒト血清をメディウム中に添加するが、乳癌細胞の増殖に関わるホルモン以外の物質も影響を及ぼし、測定施設間で異なる結果をもたらす可能性がある。今回、より簡便な操作でかつ精度の高いアッセイ系の確立を目的に諸条件の基礎的検討を行い、同じくエストロジェンレセプターを発現しているヒト由来の乳癌細胞である T47D を使用したエストロジェン活性の検出系の確立を目的として研究を行った。そして、高分子素材由来の化学物質について評価を行った

B. 研究方法

E-スクリーンアッセイ法

- ①サブコンフルエントの細胞（MCF-7、T47D）を、トリプシン-EDTA で剥離する。
- ②遠心分離し、細胞を回収する。
- ③細胞数を血球計算版で測定する。
- ④細胞数を、以下の数になるように DMEM-10%FCS で希釈する。
MCF-7： $5 \times 10^3 / 100 \mu\text{l}$
T47D： $3 \times 10^3 / 100 \mu\text{l}$
- ⑤96穴プレートに $100 \mu\text{l}$ ずつ④の細胞懸濁液をまいていく。
- ⑥37°C、5%CO₂ 中で24時間インキュベーションする。
- ⑦フェノールレッド入りの DMEM をフェノールレッドフリーで市販低蛋白質溶液を加えた DMEM ($90 \mu\text{l}$) にかえる。
- ⑧ $10 \mu\text{l}$ の被験物質を加える。被験物質は、DMSO に 10^{-2}M になるようにして作ったものを DMEM で希釈していき、 $10^{-3}\text{M} \sim 10^{-10}\text{M}$ になるような溶液を作り、それを $10 \mu\text{l}$ ずつ加えていく。最終的な濃度は $10^{-4}\text{M} \sim 10^{-11}\text{M}$ にな