

厚生科学研究費補助金  
生活安全総合研究事業

内分泌かく乱物質等，生活環境中の化学物質による健康影響及び安全性の確保等  
に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 片瀬隆雄

平成13（2000）年3月

厚生科学研究費補助金 生活安全総合研究事業  
内分泌かく乱物質等，生活環境中の化学物質による健康影響及び安全性の確保等  
に関する研究  
平成12年度 総括・分担研究報告書

---

【訂正】

---

	(訂正前)	(訂正後)
目次の項目Ⅱ,2. 4頁15行目以下に，追加	居生体 なし	異性体 た。同様に，測定法開発の過程で，市販製 品のノニルフェノール(NPH)の揮散性や， 成分中の異性体間でエストロゲン様活性の 異なることを組み換え酵母系で検索するこ とも目的とした。(1.研究目的)
2) 7頁の項目番号を訂正	3-2-1 3-2-2	3-2-2 3-2-3

---

## 目次

I	総括研究報告	
	生活環境中の化学物質の <i>in vitro</i> 及び <i>in vivo</i> エストロゲン様活性検索-----	( 1)
II	分担研究報告書	
	1.組換え酵母実験における揮発性化合物の隣接ウェルへの影響の検討と 生活環境中の37種の化合物のエストロゲン活性検索 片瀬隆雄・上田真吾	----- (24)
	2.ノニルフェノールの居生体とエストロゲン様活性 井上 正	----- (41)
	3.ヒト乳癌由来細胞株MCF-7を用いたエストロゲン様活性物質 のスクリーニング 森友忠昭	----- (48)
	4.ラット膣スメア試験を用いたエストロゲン様活性物質 のスクリーニング 片瀬隆雄	----- (56)
III	研究成果の刊行に関する一覧表	----- (59)
IV	研究成果の刊行物・別刷	----- (60)

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

（総括）研究報告書

内分泌かく乱物質，生活環境中の化学物質による健康影響及び安全性確保等に関する研究  
生活環境中の化学物質のin vitro及びin vivo エストロゲン様活性検索

主任研究者 片瀬隆雄 日本大学生物資源科学部

研究要旨：内分泌かく乱物質等，生活環境中の化学物質による健康影響および安全性の確保等に関して，プラスチック製手袋・食品包装用ラップフィルム抽出物およびノニルフェノール分画物に関連する化合物及び医薬品・プラスチック等工業的生産による化成品・天然物成分などの合計37種類の化合物を検体として，in vitro（組み換え酵母系及び乳癌細胞系）及びin vivo（ラット膺スメアテスト）でエストロゲン様活性を定量的に測定した。二つのin vitro測定系より得られた結果は，少数の例外を除いて，よい相関を示した。一般に，合成化合物は酵母系測定で，また天然物エストロゲンハ細胞系で高めの活性値を示した。in vivo測定系では，18種類の化合物のエストロゲン様活性を測定した。これらのうち6種類の化合物については，本測定結果を1930年代に測定したDoddららが報告した結果との間で，よい相関を示した。本測定値（酵母系測定によるエストラジオールに対する比活性濃度  $R_{n_{yeast}}$ ）を用いて，これらの化合物の測定結果を評価するための次式を立てた。

$$\left\{ \begin{array}{l} \sum_{n=1}^{\infty} (E_n \cdot A_n) \leq 0.001 \quad n : \text{エストロゲン様活性物質の数} \\ E_n = R_{n_{yeast}} \cdot 10^6 \quad E_n : n \text{番目の作用物質の作用強度} \\ A_n : n \text{番目の作用物質の安全許容量} \\ \text{または存在量} \\ R_{n_{yeast}} : n \text{番目の作用物質の比活性濃度（酵母系測定）} \end{array} \right.$$

この式を用いて，医薬品，プラスチック等の化成品及び天然物成分化合物の現状の影響評価と今後の課題について考察した。その結果，日常生活で使用されているプラスチック等の化成品や天然物成分には様々な程度  
のエストロゲン様活性を有する化合物があり，個々の活性は極めて弱いといえるがその総数を考慮すると，さらに検討を重ねる必要のあることが示された。また，本実験結果に基づいて，プラスチック等市販化成品のエストロゲン様作用による危険性の回避の方法を考察したところ，可塑剤フタル酸エステル類の種類や界面活性剤ノニルフェノール混合物の画分には活性強度の差異があり，それらを選択することによって危険性を軽減できる可能性が示された。最後に，現行の食品衛生法によるプラスチック添加化合物の規制方法を考察した。その結果，安全性の確保のために改善する方策の一つとして，食品用プラスチック添加剤を基本的に非意図的な”食品添加物”として取り扱うことが必要であることを示した。

井上 正・日本大学生物資源科学部・  
教授（分担研究者）  
森友忠昭・日本大学生物資源科学部・  
講師（分担研究者）  
上田真吾・日本大学生物資源科学部・  
講師（分担研究者）  
藤本康雄・日本大学薬学部・教授  
（研究協力者）  
木村順平・日本大学生物資源科学部・  
助教授（研究協力者）

## 1. 研究目的

1990年代になり，精子の質及び量的劣化や男性器異常の増加が指摘された。これらの異常の原因は生体外から体内に摂取され，胎盤を通過したエストロゲン様化合物の作用が胎児に影響したとする仮説（妊娠第六週以後のセリトリ細胞のエストロゲン暴露による性の分化阻害）としてSharpe及びSkakkebaekにより提唱された<sup>1)</sup>。1996年のEU/OECDのワークショップで，これらの関連化学物質は内分泌攪乱物質(Endocrine Disrupting chemicals: EDs)として定義された<sup>2)</sup>。Grayら(1996)は，内分泌作用攪乱の例として，エストロゲン又はアンドロゲン様化合物及びエストロゲン又はアンドロゲン作用阻害化合物などによる生殖関連内分泌作用攪乱，並びに抗甲状腺及び副腎皮質などの内分泌作用攪乱などを挙げ，それぞれ予想される関連化合物を例示した<sup>3)</sup>。主として，塩素系化合物，エストロゲン等のホルモン様化合物及び生殖系作用攪乱化合物などである。本研究では，生活環境中のエストロゲン様化合物の検討を目的とした。

エストロゲン様化合物の一連の活性検索は，すでに，1930年代にDoddsらによって行われていた<sup>4)</sup>。エストロゲン様化合物の検索は発癌性が疑われる縮合環芳香族炭化

水素と天然estrogen構造(steroid類)関連物質から始められた。前者の多環芳香属化合物の場合，その芳香族構造に酸素が導入され，その結果，phenol構造を有することが必要であることが見いだされた。エストロゲン活性を有する最も単純なphenol化合物は，炭素数3のalkyl又はalkenylphenol(APH)で，その二量体類似化合物としてbis-phenol A(BPA)やdiethylstilbestrol(DES)及びdienestrolが掲げられた。DESやdienestrolは天然estrogenとほぼ同程度の活性強度を有し，その後，医薬品として利用された。一方のAPHやBPAの活性強度はDESの20万～25万分の1であり，医薬品としては利用されなかったが，後に，プラスチックなどの工業製品及び原料として使用され，今日に至っている。ここでは，生活環境中のエストロゲン様化合物について，化学構造などに基づいて，プラスチック等の工業製品，医薬品成分および天然物成分化合物について活性検索することを目的とした。

エストロゲン様化合物が両生類や魚類の性分化に作用を与えることは，すでに1950年代から検討されている。Witschi(1950)は遺伝的にオスと決定されていたアカガエル(*Rana sylvatica*)の性がエチニルエストラジオール(ピル)によってメスに転換されることを明らかにした<sup>5)</sup>。また，Yamamoto(1969)は，アカガエルには性転換をさせなかったDESなどの合成エストロゲンが，遺伝的にはオスのメダカをメスに変換させることを確認した<sup>6)</sup>。1950～80年代にヒトの流産防止薬などとしてDESを妊娠中に服用した母親から生まれた女子が成人すると膣癌(*vaginal adenocarcinoma*)が発症した<sup>7)</sup>。同時に，男子にも性生殖器異常(*Cryptorchidism*及び*Hypoplasia*)<sup>8)</sup>の発症が観察され，さらに，DESを妊娠ラットに投与すると類似の異常なオスラ

ットが生まれた<sup>9)</sup>。同時に、Dodds らの活性検索でDESに比べて2万5千分の1程度のエストロゲン活性であったヘキサストロールが、1960年代のYamamotoの研究で、前述のメダカのメスへの性転換能力では、DESの約20倍の活性を有していることが明らかにされている<sup>6)</sup>。これらの結果はエストロゲン様化合物の影響は生物種により異なることを示す。そこで、組換え酵母系及びヒト乳癌由来細胞系による*in vitro* とラット膣スメアテストの*in vivo* 系でエストロゲン様活性をスクリーニングし、同一化合物の活性の差異を検討することを目的とした。

ジエチルstilbestrol (DES) が天然物とほぼ同程度の活性を有する最も強度なエストロゲン性合成化合物であることは、1938年にDodds らによって偶然発見された<sup>10)</sup>。その後、DESの他に、ジェンストール、ヘキサストロールなどが医薬品に使用された。当時、Dodds らは、標準化した膣スメアテスト<sup>11)</sup>によるエストロゲン活性を検索した。その結果、DESの強度の25万分の一程度の活性を有する化合物を含めると、45種類の化合物が明らかにされた。ここでは、これらの化合物をDodds 化合物と称することにする<sup>12)</sup>。現在は、このようなエストロゲン活性を有することが内分泌攪乱作用 (Endocrine disrupting; ED) の一つとされている<sup>2)</sup>。この作用を有する合成化合物のうち、ノニルフェノール (NPH) やビスフェノールA (BPA) は、エストロゲン活性の*in vitro*細胞培養実験中に、NPHがポリスチレン製試験管<sup>13)</sup> から、BPAがポリカーボネート製フラスコ<sup>14)</sup> から、それぞれの溶出し、それらの化合物のエストロゲン様活性が偶然に明らかになったとされている。しかし、BPAやNPHなどのアルキルフェノールであるプロピルフェノールやプロ

ペニルフェノールなどはすでに1930年代にエストロゲン様活性を有することが明らかにされたDodds 化合物の一つに含まれていた。ここで、Dodds らの検索リストにはない化合物で、現在の日常生活で広く使用されているエチニルエストラジオール (E<sub>2</sub>)、メストラノール等の医薬品をはじめゲニステインやレスベラトロールなどの天然物やプラスチック化学合成製品関連のフタル酸エステルなどをエストロゲン検索化合物とし、標題の二系の*in vitro*及び*in vivo* テストを行うこととした。また、6種のDodds 化合物についても検索し、本実験によるラット膣スメアテストの有効性を確認することを目的とした。これらの測定系によるエストロゲン様活性検索結果をもとに、内分泌作用攪乱の影響をどのような尺度で評価するのか基本的な考え方の例示し、それに基づいて現状の様子を評価し、今後の課題を提示することを目的とした。

さらに、市販製品のなかにはフタル酸エステルやアジピン酸エステルなどの同族化合物や異性体の混合物として使用されることがあり、エストロゲン様活性が混合物の成分によって異なることが判明し、重要な化成品の場合、危険性を低下させることができる可能性を示すことも本研究の目的とした。そのために、アジピン酸エステル同族混合物とノニルフェノール異性体混合物について以下のことを実施した。すなわち、市販食品に包装されていた乗務用ラップを回収し、ガスクロマトグラフィー/ガスクロマトグラフ質量分析計でラップから潜在的に溶出する化合物を同定し、その化合物種によって約100枚のラップがA、B、C、D及びMの5種に分類されることが分かった<sup>15)</sup>。これらの中で、主な3種のA～Cラップから*n*-ヘプタン溶出物を組換え酵母系培養によるエストロゲン様活性測定を行ったところ、Bラップ (試料R40) 溶出

物が他より活性を有することが明らかになった<sup>16)</sup>。この溶出物中には、ガスクロマトグラム上に現れたピークから少なくとも5種類の化合物が含まれ、質量分析計で*n*-hexyl, *n*-octyl及び*n*-decylなどのアジピン酸エステル混合物が含まれることが明らかにされた<sup>15)</sup>。そこで、混合物のどの部分にエストロゲン活性があるのかを明らかにする目的で、各成分を薄層クロマトグラフ(TLC),及びガスクロマトグラフ(GLC)で分離し、質量分析計(MS)及び核磁気共鳴スペクトル計(NMR)で同定後、高速液体クロマトグラフ(HPLC)で分取した各画分のエストロゲン様活性を組み換え酵母系で検索し

## 2. 研究方法

### 2-1 試料

表1に示す供試化合物を使用した。また、NPH異性体の混合物(i-NPH)を各種クロマトグラフィーで分画した画分中の質量は天秤によって秤量した。

### 2-2 測定系

#### 2-2-1 組み換え酵母系スクリーニング

ヒトエストロゲンリセプター遺伝子及び大腸菌*LacZ*遺伝子を組み込んだ酵母はDr. Sumpter(Brunel University, UK)より分与された。エストロゲン様物質によって誘導されたβ-ガラクトシダーゼの活性は、Chlorophenyl red-β-D-galactopyranoside(CPRG)の呈色を測定することによって行った。分析は以下のように行った。全ての検体はジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解し、DMSOで段階希釈したのち96-wellのマイクロプレートリーダーを用いて、540nmと620nmの吸光度を測定し、その差を誘導されたβ-ガラクトシダーゼの活性とした。活性測定に際しては、溶媒(DMSO)のみから得られた値を差し引いた。また、陽性対象として17β-エストラジオールを用い

た。

#### 2-2-2 ヒト乳癌由来細胞系スクリーニング

ヒト乳癌細胞株MCF-7は北里研究所臨床医学センター坂部貢博士より分与された。培養液は10%ウシ胎児血清(FCS)添加Minimum Essential Medium(MEM)を用い、37°C, 5%CO<sub>2</sub>存在下で培養した。細胞の継代は1週間に2度、0.1%トリプシン加0.02%EDTA添加リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて細胞を剥離させ、もとに細胞の1/3~1/4量の細胞を新しいフラスコにまくことにより行った。培養液は、フェノールレッド(PR)フリーのPR(-)MEMを用いた。また、FCSはチャコール・デキストランT70で処理し、エストロゲン等のステロイドホルモンを除去したCD-FCSを用いた。アッセイ用培地は10%CD-FCS添加PR(-)MEMを用いた。

検体は、表1に示した市販試薬を2.5mM及び25mMエタノール溶液を原液として、段階的に10<sup>-4</sup>~10<sup>-13</sup>Mまで希釈して、培養液中に添加した。培養液中のエタノール濃度は0.25%以下になるようにした。Sotoら<sup>6)</sup>やVillalobos<sup>7)</sup>らの方法を改変してアッセイした。すなわち、MCF-7をトリプシンにより剥離し、10%FCS添加MEM中に浮遊させ、24wellプレートに10<sup>4</sup>/wellずつ播種した。細胞がプレートに接着した24時間後培地を除去し、各濃度(10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-11</sup>, 10<sup>-12</sup>, 10<sup>-13</sup>)の検体を添加したアッセイ培地と交換した。インキュベーター中で5~6日間培養した後、トリプシンにより細胞を剥離し、各wellの細胞数を血球計算板を用いて計測した。陽性コントロールとして、継代維持に用いた10%FCS添加PR(+)MEMを加えたwellを作製した。また、陰性コントロールとして、検体を添加していないアッセイ用培地を用いた。

### 2-2-3 ラット膣スメアテスト

膣スメアテストは、Dodds らの標準化法<sup>2)</sup>に準じて実施した。すなわち、市販品の供試化合物(表1)を、各濃度に調整し、実験動物のラットの頸部皮下に投与した。ウイスター系雌ラットを7週齢(体重約170~200g)になったところで、エーテル麻酔下で左右の卵巣を摘出した。約2週間後の午前10時より、所定濃度の全3mlを1mlずつ、3回に分けて同時刻に連日3日間、投与した。1群3匹を用いた。最初の投与の3日目の午前10時及び午後5時の1日2回、膣スメアテストを実施した。このテストは最初のテスト日から、連日3日間、同時刻に実施した。最後のテスト終了後、すべてのラットを深麻酔下、頸推脱臼により殺処分後、胸腔、腹腔を開き、全身臓器をホルマリン固定した。テスト結果は、Dodds らの判定に順じて行った。

## 2-3 市販製品混合物の画分

### 2-3-1 ラップ成分アジピン酸エステル画分

相対的に活性が強度であった業務用ラップ(R40)は、質量分析計による解析の結果、市販のアジピン酸*n*-アルキル(和光純薬, 045-24332)と同一であることが分かった。そこで、ラップ(R40)溶出物に代えて、市販品を分取し、エストロゲン様活性実験に供した。本分離・分取操作の概略を図1に示す。また、操作及び分析条件を以下に示す。

TLC: シリカゲル上で混合溶剤(メタノール:5%硫酸=95:5)で展開。

GLC: 一定のカラム温度(100 °C for 2 min ~280 °C at 10°C/min for 15min)のカラムULBON HR-1(25m x 0.25mm, id, 0.25 μm層厚)中を、一定のヘリウム流速(28.7 cm/sec)で走行。FID検出器。

HPLC: Capcell Pak C-18充填カラム(

250mm x 10mm id)中を、95%メタノールが一定の流速流圧(3ml/min, 4.3Mpa)で走行。UV225nm及び至差屈折率(RI)検出器。MS: JEOL GC mate装置のdirect probe inlet法で注入し, EIイオン化法で測定。NMR: <sup>1</sup>H及び<sup>13</sup>C-NMRスペクトルはJEOLGSX-400装置で溶媒CDCl<sub>3</sub>中でTMSを内標準として測定。

### 2-3-2 ノニルフェノール異性体の画分

市販のノニルフェノール(東京化成, No. 300)(約2g)を分取し、エストロゲン様活性実験に供した。本分離・分取操作の概略を図2に示す。また、操作及び分析条件を以下に示す。

GC-MS: EIイオン源MS(日本電子JMS-AM II 15)。HP-5 crosslinked 5%PHMe(32m x 0.3mm id., 0.25 μm層厚)カラムを用いて昇温条件(100 °C for 1分, 180 °Cまで, 2 °C/min)の流速1.4ml/minで走行。

HPLC(1): Pegasil silica充填カラム(250mm x 20mm, id)中、ヘキサン/酢酸エチル(30/1)混合溶媒を流速(4ml/min)で走行(画分3, 4, 5及び6の4画分分取) HPLC(2): Pegasil silica充填カラム(250mm x 10mm, id)中、ヘキサン/酢酸エチル(30/1)混合溶媒を流速(4ml/min)で走行(画分5の再画分5-0, -1, -2, 及び-3の4画分分取)。

GLC: 2-3-2と同じ。

NMR: 2-3-2と同じ。

## 3. 結果

### 3-1 生活環境中のエストロゲン活性化合物の検索:

生活環境中の化合物の組み換え酵母系及び乳癌細胞系測定による*in vitro*及びラッ



ト・腔スメアテストによる *in vivo* 実験によるエストロゲン様活性強度一覧を表1に示す。エストラジオールの活性に対する比とする比強度で表した。これまで、活性強度を絶対値で示したが、3年間を経過し、酵母の生育状態の変化などによる陽性基準のエストラジオールの活性強度が測定誤差の変動の範囲を越えたので、比強度で示すこととした。従って、他の二つの測定結果も、エストラジオールとの比で示すこととした。

### 3-1-1 *in vitro*二測定系結果の相関

組み換え酵母及び乳癌細胞を用いる *in vitro* 測定検系間の相関を図1に示す。両者の測定値は、一部の化合物を除き、かなりよい相関を示した（相関係数： $r=0.9856$ ）。天然のエストロゲンであるエストリオールは乳癌細胞系で高い値を示し、また、合成化合物の4-ヒドロキシスチルベンは組み換え酵母系測定で高い値を示した。この傾向を一般化することは早計であるが、おしなべて、合成化合物の測定で、酵母測定で高めの傾向を示した。一般に動物細胞は酵母細胞より脆弱であり、乳癌細胞系の測定で合成化合物の活性が低くなることも考えられる。また、測定に際して、組み換え酵母系では吸光度を測定するので乳癌細胞での増殖細胞数の計測よりも比較的定量化が正確であり、かつ信頼性が高いと判断された。そこで、化合物のエストロゲン様活性強度は、組み換え酵母系測定値を採用することとした。

### 3-1-2 *in vivo* 測定系とDodds 測定結果の相関

*in vivo* のラット腔スメアテストの結果を表2に示す。Dodds らの測定値と、今回の測定と共通な5種類の化合物（DES, ジェネストロール, ヘキセストロール, ト

リフェニルエチレン, ビスフェノールA）の測定値との相関を図2に示す。両者の測定値はよい相関が示され（ $r=1.00$ ）、本法によって得られた検索結果が有効であることを確認した。

すでに、このDodds らによる *in vivo* 測定結果と *in vitro* の組み換え酵母系法による、6種類の化合物（DES, ジェネストロール, トリフェニルエチレン, ビスフェノールA, 4-ヒドロキシスチルベン, プロピルフェノール）の測定結果の間でよい相関のあることはすでに報告した（ $r=0.99260$ ）。

## 3-2 市販製品中の成分分画物の組み換え酵母系測定

### 3-2-1 フタル酸エステル類の組み換え酵母系測定によるエストロゲン様活性

フタル酸エステル類の8種のエストロゲン様活性値を表1に基づいてグラフ化したものを図3に示す。Harris<sup>22)</sup> らの測定と比較して、約100の強度であった。現在、その理由を検討中である。強度の順は、 $BBP > DIBP > DBP > DEP$  で、ほぼHarrisらと同じ結果を得た。DEHPは検出限界に近い値で活性を示した。DEHPについては、これまで検出限界以下であったので、10倍の高濃度から測定し今回の値を得た。

プラスチック手袋中（R501）の溶出物が活性を示し、その溶出物中に化合物BBP, DEHP及びDEHAが同定されたことはすでに報告した。次項で示すがDEHAにエストロゲン様活性が示されないので、手袋にある化合物で、エストロゲン様活性を示したのはBBPに起因するといえる。

### 3-2-1 アジピン酸エステル分画物間の活性の差異

図4で分画されアジピン酸エステルの5画分(Adp6-2~Adp6-6)のエストロゲン様活性の比強度を図5に示す。画分Adp6-1は溶媒である。活性のある画分はAdp6-2であった。この成分のMSで、 $m/z$  314.3, 231.2, 213.2及び129 (base peak)を有し、NMRの結果からも、アジピン酸ジヘキシル(DHexA)と同定された。化合物DHexAのエストロゲン様活性は今後の課題である。しかし、Adp6-2画分の強度は相対的にかなり強い。DHexAの不純物か分画中の共雑物の可能性もある。事実、フタル酸トリデシルの活性は、その中の酸化防止剤として使用されたビスフェノールA異性体の活性のためであったという報告もある<sup>22)</sup>。従って、ラップR40の抽出画分に示されたエストロゲン活性について、さらに検討が必要である。

### 3-2-2 ノニルフェノール分画物間の活性の差異

図6で分画されたノニルフェノール(NPH)の10画分(Frac.1~Frac.6及びFrac.3-1~3-3とFrac.5-1~Frac.5-3)のエストロゲン様活性の比強度(エストラジオールを1とする)を図7に示す。ノニルフェノールを分画した際の画分(Frac.1~6)のHPLCクロマトグラムを図5に示す。また、HPLC上の画分3(Frac.3)をGLCで分画すると各画分(1~3)がよく分離された。GLC上の各画分1~3はそれぞれノニルフェノールの異性体であることがMSによって確認された。GLC上の各画分1~3はHPLC上の画分Frac.3-1~3-3に対応すると予想される。最も活性の高かった画分はFrac.3-3及びFrac.5-3で、最も低かったのはFrac.2であった。

直鎖上の側鎖を有するn-NPHのエスト

ロゲン様活性は、NPH混合物(i-NPH)に比べるとかなり低い。すなわち、これまでに信じていたNPHのエストロゲン様活性は、混合物として使用されているNPHに含まれるある一部の成分による可能性が高い。

## 4 考察

### 4-1 生活環境中のエストロゲン活性化合物の検索:

Doddsらのエストロゲン活性検索で最も単純な化学構造を有する化合物はプロピル及びプロペニルフェノールである。この化学構造を基本単位と考えて、日常生活関連物質を、医薬品関連化合物6種類、プラスチック関連等の化成品21種類および天然物成分関連化合物9種類などに分類して、1)組み換え酵母(*in vitro*)、2)ヒト乳癌細胞(*in vitro*)、3)ラット腫瘍メアテストでエストロゲン様活性を検索した。今後、これらの活性化合物の魚類、鳥・哺乳類、ヒト免疫関与系等への影響について個別的な検討が必要である。ここでは、*in vitro*及び*in vivo*スクリーニングの結果から、生活環境中のエストロゲン様活性化合物による影響評価の考え方を考察する。

### 4-2 エストロゲン様化合物の影響評価

#### 4-2-1 影響評価の提案式

性誘導の発現はリセプターを介する作用とすれば、その作用効果 $S_{total\ effect}$ ;

$$S_{total\ effect} = \sum_{n=1}^n (E_n \cdot A_n) \quad \text{---(1)}$$

$$\sum_{n=1}^n (E_n \cdot A_n) \geq 1 \quad \text{-----(2)}$$

ここで、

$A_n$  ;  $n$  番目の作用物質の量  
 $E_n$  ;  $n$  番目の作用物質の作用効果強度  
 $E_n \cdot A_n$  : 効果・作用量積

この効果が攪乱作用でもあるとすれば、この影響を与えない条件は、

$$\sum_{n=1}^n (E_n \cdot A_n) \leq 1 \text{-----(3)}$$

である。無作用係数 ( $A_{\text{non-effect}}$ ) を最少の影響を与える作用量に安全のための係数を及び、生物種間×生物個体間の安全係数 ( $F_s$ ) を与えることを考慮すると、許容安全条件  $S_{\text{acceptable safety}}$  は、

$$\sum_{n=1}^n (E_n \cdot A_n) \leq 1 \cdot A_{\text{non-effect}} \cdot F_s \text{-----(4)}$$

ここで、

$$A_{\text{non-effects}} = 10^{-1}$$

$$F_s = \text{生物種} \cdot \text{個体間} = 10^{-1} \cdot 10^{-1}$$

と仮定すれば、

$$(4) \text{ 式の左辺} = 0.001 \text{-----(5)}$$

$$\therefore \sum_{n=1}^n (E_n \cdot A_n) \leq 0.001 \text{-----(6)}$$

となる。ここで、

$n$  : エストロゲン様活性物質の数  
 $E_n$  ;  $n$  番目の作用物質の作用強度  
 $A_n$  ;  $n$  番目の物質の安全許容量

#### a)作用強度 $E_n$ の決定

Dodds によって確率されたラット膺スミア法によるエストロゲン効果測定に基づいて、ヒトに対する合成エストロゲンの医薬品効果が定められている。従って、現段階で同測定法で、ヒトの攪乱作用の影響度を定めることに正当性がある。また、(6) 式には、ラットで求めた結果の生物種間安全率を10とすることでヒトに対する評価因子を考慮している。Dodds らの測定結果と、

同法による本実験結果に相関のある結果を3-1-2 で得ている。従って、今後、Dodds らが測定した以外の化合物を、同法によって測定し、その結果を評価することができる。この系とin vitro ヒト乳癌細胞測定系の測定結果の間で、例外を除いてよい相関が求められている(3-1-1)。また、in vitroの組み換え酵母測定系とDodds 測定結果の間で例外を除いてよい相関が得られている(3-1-3)。これらの検討をもとに、作用強度を簡易に求めるin vitroの組み換え酵母測定系で得た値を用いる。たとえば、 $n$  番目の化合物の作用強度  $E_n$  は、(7) 式で表される。すなわち、表1に示した酵母系測定によるエストラジオールの強度に対するエストロゲン様活性比強度  $R_{\text{yeast}}$  を用いて以下に示す。

$$E_n = R_{\text{yeast}} \cdot 10^6 \text{-----(7)}$$

ここで、エストラジオールの絶対強度は本実験で得られた表2に示す  $1.0 \times 10^6$  (unit/g) を採用した。

さらに、エストロゲン作用以外の攪乱物質の作用強度  $E'_n$  は同様にして別に求めることになる。また、エストロゲン・リセプター- $\alpha$  以外の作用強度  $E''_n$  については同様にして別に求めることになる。

#### b)安全許容量 $A_n$ の決定

作用強度  $E_n$  の決定後に、(6) 式を用いて  $n$  番目の安全許容量  $A_n$  が求めることになる。しかし、ヒトは生活環境で  $n$  個の作用化合物を摂取しているので、 $n$  番目の作用物質の作用強度  $E_n$  を用いて  $A_n$  を決められないことを示している。従って、まず必要なことは作用物質  $n$  個を定めることになる。現在、米国環境庁は年間生産量が1万ポンド(約4.5 トン)を越える約1万5千種類の化合物のホルモン様作用の検索を行っている。

以上の原則のもとで、本研究で得られた結果の範囲で以下に安全許容量を求め、具体的な課題を考察する。

#### 4-2-2 ジエチルスチルベストロールなど医薬品

たとえば、ジエチルスチルベストロール (DES) のみ場合であれば、 $n=1$  だから(6)式は、

$$E_{DES} \cdot A_{DES} \leq 0.001$$

作用強度  $E_{DES(veast)}$  は、

$$E_{DES} = R_{DES} \cdot 10^6 \text{ (unit/g)}$$

$R_{DES(veast)} = 2.2 \times 10^{-1}$  (表1) だから、

$$E_{DES} = 2.2 \times 10^5$$

従って、

$$2.2 \times 10^5 \cdot A_{DES} \leq 0.001$$

$$\therefore A_{DES} \leq 4.5 \times 10^{-9} \text{ (g)} \text{ ---- (7)}$$

一方、表2の  $E_{DES(smear)}$  を採用すると、

$$E_{DES} = 1.0 \times 10^6 \text{ (unit/g)}$$

$$\therefore A_{DES} \leq 1.0 \times 10^{-9} \text{ g ---- (8)}$$

(8) は in vivo の結果で、(7) は in vitro 実験から求めた値なので、(8) の値の確度は大きい。

DES は医薬品として、月経不順、更年期障害や不妊症治療のために卵胞ホルモンとして一日当たり、 $1 \sim 5 \times 10^{-4} \text{ g}$  投与されている。同様の目的で、ジネンストール、ヘキサストールやベンゼストールが使用されている<sup>17)</sup>。それらの投与量は安全摂取量を遥かにこえているが、治療行為として通常とは異なる判断因子が加味される。最近、避妊薬として使用が許可された、エチニルエストラジオールやメストラノールも同様である。しかしながら、治療行為に用いられた医薬品としてのジエチルスチルベストロール薬禍が起こったことも事実であり、これらの化合物を医薬品として使用に当たって、徹底した管理が必要である。

#### 4-2-3 ビスフェノールAなどの工業製品

同様に、弱い作用強度  $E_n$  を有する化合物の安全摂取量  $A_n$  を求める。in vivo で求める弱いエストロゲン様活性強度は検出されても表2に示す0.1gの投与量では活性を示さない場合が多い。前項の強いエストロゲン様活性化合物の安全許容量を、in vivo と in vitro の測定結果で比較すると同じレベルのオーダーの値が得られた。従って、ここでは、比活性強度を組み換え酵母系測で得られた表2の  $R_{veast}$  の値を用いる。

$$E_n = 1.0 \times 10 \text{ (unit/g)}$$

$$\therefore A_n \leq 1.0 \times 10^{-4} \text{ g}$$

この場合の  $R_{veast}$  は、

$$1.0 \times 10 = R_{veast} \cdot 10^6$$

$$R_{veast} = 10^{-4} \text{ (g)} \text{ ---- (9)}$$

表1から、このエストロゲン比強度を有する化合物を選ぶと、ビスフェノールA、*i*-ノニルフェノール、BHT (ラット膺スメアテストは未実施) などがある。また、現在実施中であるがスチレン三量体と化学構造上関連するトリフェニルエチレンなどがある。ラット膺スメアテストでは投与量100mg以下では活性を示さなかったが、フタル酸エステルBBP、DBP及びDIBPも、エストロゲン比強度を有する化合物である。これらの化合物は、生活環境中に広く存在する。また、全て8種類が共存すると、(6)式において、 $n=8$  となり、それぞれの安全摂取量  $A_n$  を単独で決定できない。存在の割合が同程度であるとすれば、各化合物、例えばビスフェノールAの安全摂取量は、

$$\sum_{n=1}^n (1 \times 10 \cdot A_n) \leq 0.001$$

$$8 A n \leq 10^{-4} \text{ (g)}$$
$$\therefore A n \leq \text{約}0.01 \text{ (mg)}$$

0.01mg以下と計算される。

約10万種類の合成化合物を日常生活で使用していると推定されるので、弱いエストロゲンを有する化合物が $n=100$ となればそれらの1化合物についての平均安全摂取量 $A n$ はさらに10分の1の $1.0 \times 10^{-5} \text{g}$ と計算される。この値はすでに現在の環境汚染の測定値に近い値であり、十分に安全性のための配慮が必要となる。現在、米国環境庁は年間生産量が1万ポンド(約4.5トン)を越える約1万5千種類の化合物のホルモン様作用の検索を実施している<sup>17)</sup>。本研究で、プラスチック添加の可塑剤のフタル酸エステル類やアジピン酸エステル類および界面活性剤ノニルフェノールや原料モノマー等のビスフェノールAについて検索した。プラスチックには500種類を越える化合物が使用されている<sup>18)</sup>。今後、紫外線吸収剤などフェノール系化合物を中心に検索をすすめる必要がある。

#### 4-2-4 天然物成分化合物

天然物の中に、従来、ヒトがエストロゲン様活性を期待せずに使用していた化合物であるイソフラボノイド、クメストロール、リグナン及びリグニンの前駆化合物などがある。ここでは、ゲニステイン及び8種のリグニンの前駆化合物の4-プロペニルフェノール関連物質及びその構造類似体を検討した。その結果は、測定系によってエストロゲン様活性を示す場合や示さない場合があるが、いずれも弱いエストロゲン様活性であることが分かった。ゲニステインはラット膣スメアテストを含めて3種の測定系でエストロゲン様活性を示した。スチルベストロール構造を有するレスベラトロールはin vitroでゲニステインと同程度か

それ以下の活性であったが、in vivoで測定限界以下であった。

アネトールの脱メチル化生成物のアノールやその重合生成物のエストロゲン様活性が、すでに1938年にDoddsらによって検索されている。反応生成物中に同定されたジヒドロキシフェニルアルカチエンの中で<sup>19)</sup>、ヘキサジエン体(ジエンストロール)がほぼジエチルスチルベストロール(DES)と同程度のエストロゲン様活性(表2)で、他にその24分の1程度のオクタジエン体などの活性が測定された<sup>21)</sup>。アネトールはダイウイキョウ油中に90%、アニス油中に80~90%、ウイキョウ油中に50~60%存在する。食物、菓子、飲料の香料として多量に、またアニス油と同様に芳香料、健胃剤、去タン薬として、1回につき0.06~0.3ml飲用される<sup>21)</sup>。アネトールの位置異性体であるエストラゴール(4-allylanisole)はエストラゴン油、メボウキ油、ダイウイキョウ油、アニス油、ペイ油中に含まれる。ベルモット酒や酢の芳香づけ、またアネトールの原料に使われている<sup>22)</sup>。そこで、まず、アネトール及びアネトールの側鎖位置異性体である4-アリルアニソール(エストラゴノール)につきin vitro系で検索したが、いずれもエストロゲン様活性はしめされなかった。しかし、摂取された後、生体内で加水分解を受け、生成したアノールがさらに体内で重合し、前述の強いエストロゲン活性物質が生成する可能性もある。工業的化成品のフタル酸ジエチルヘキシルの場合、すでにその体内加水分解物を同定試し、それらのエストロゲン様活性のないことが確認されている<sup>23)</sup>。従って、天然物成分化合物についても、摂取後の生体内反応物の化学的同定とそのエストロゲン様活性の検索が今後の課題である。また、これまで未知であった天然植物中のエストロゲン様活性検索も必要といえる

。現在、ブラジル産薬用植物抽出物のエストロゲン様活性も検索している。

胎児の血中に含まれる体内から分泌されるエストラジオールなどのエストロゲンは、胎児性タンパク質の $\alpha$ -フェトプロテインと結合して、不活性体となっている<sup>24)</sup>。生物体は進化の歴史を経て形成されたシステムであり、天然物成分化合物の場合、生物体内で危害を回避するサブシステムがすでに組み込まれていることも予想される。しかし、考えられる危害の回避についてはさらに検討が必要であるといえる。

#### 4-3 市販化成品のエストロゲン様作用の危険性の回避の方策

すでに前年度までに報告したように、日常生活で用いられているプラスチック製品のなかで、食品調理用プラスチック手袋及び食品包装用ラップフィルム抽出物が組み換え酵母系測定でエストロゲン様活性を示し、抽出物の化合物を質量分析計で分析したところ、フタル酸エステル類及びアジピン酸エステル類が同定された。また、ノニルフェノール(NPH)に、活性が示されるのは側鎖が直鎖状でない、分枝状の異性体であることを示した。フタル酸エステルについては、各種のエステル同族体の活性を、またアジピン酸エステル及びNPHについてはHPLCを用いて分画した成分の活性をそれぞれ測定した。その結果をもとに、市販化成品のエストロゲン様作用の危険性の回避の方策を以下に考察する。

##### 4-3-1 食品調理用手袋等のフタル酸エステル類

フタル酸エステルの8種類のなかで、それらの活性強度(図3)は異なっている。プラスチック手袋から同定されたエステルで、DEHP(最大、材質当たりの重量で15%)は活性をほとんど有しないがBBP

(同、3.6%)は弱いエストロゲン様活性物質のなかではかなり活性のあることが分かった。したがって、プラスチックに添加する可塑剤の選択によって危惧を回避することができる。最近、食品中の残留フタル酸エステルについて、市販弁当1食から平均1.8mg(0.3-4.3mg)、病院食1食から平均0.5mg(0.03-2.5mg)のDEHPが検出されている。これらは、弁当箱詰め作業に使用されたポリ塩化ビニル(PVC)製手袋からの溶出によるものと考えられている。厚生省は前述の食品残留DEHPについて、食品製造工程で使用するPVC製手袋のDEHP添加を避ける行政指導が行われた。本研究で、類似の手袋に添加されていたエストロゲン様活性を有するBBPが、この行政指導によって、DEHPに代替おいて使用されないことが期待される。

##### 4-3-2 食品包装用ラップ等のアジピン酸エステル類

エストロゲン様活性を示した食品包装用ラップ(R40)抽出物の化合物の同定にはさらに検討を要する。これらは販売する食品にすでに包装されていたいわゆるを包装して食品をいわゆる業務用ラップである。一般に市販されているラップには東京都条例により、添加剤が明記されているが、業務用ラップの添加剤名は不明である。

##### 4-3-3 ノニルフェノールの異性体よエストロゲン様活性

ノニルフェノール(NPH)の有用性は多方面にわたり、また製造コストも低いがゆえに、他の代替品を求めることは容易でなく、その使用を全面的に停止することは現在のところ極めて困難である。したがって、もしある特定の異性体のみ活性をゆうしていることが明らかにされれば、その含有量を低減させることによって、NPHの

危険を低下させることができる。本研究では、分取用HPLCによって、各種異性体を含む試料を分画したいくつかの画分を比較した。その結果、各画分の活性に明らかな差異が認められた。また、直鎖状のn-NPHの活性は比較的低かった。組み換え酵母検出系におけるエストロゲン様活性の発現は、被検物質とヒトエストロゲンレセプターの結合に依存するとおもわれるので、NHPの側鎖の形状によって、活性の差が現れるのは当然であろう。ところで、分取様HPLCで得られた粗精製画分は、未だ単一のNPH異性体ではなく、複数の異性体の混合物であるので、これをGLC等を用いてさらに分画する必要がある。特定の構造の異性体にのみ活性が局在するならば、その異性体を取り除くことにより、NPH全体の活性を低下させることがかも知れない。また、NPH以外のアルキルフェノール類の構造と活性の関係もあわせて考察することにより、プラスチック添加剤中のエストロゲン様活性物質の活性-構造相関を明らかにできる可能性もある。

#### 4-4 食品衛生法によるプラスチック添加化合物の安全性の確保の方策

エストロゲン様作用を有する合成化合物のうち、ノニルフェノール(NPH)やビスフェノールA(BPA)は、実験中に使用したプラスチック器具から溶出していたことが契機で、その後、プラスチックの安全性に強い関心もたれた。すなわち、エストロゲン活性のin vitro細胞培養実験中に、NPHがポリスチレン製試験管<sup>13)</sup>から、BPAがポリカーボネート製フラスコ<sup>14)</sup>から、それぞれの溶出し、偶然にそれらの化合物のエストロゲン様活性が明らかになった。そこで、これらの溶出物に関連するプラスチックの食品衛生上の安全管理の方策を以下に考察する。

#### 4-4-1 現状の食品衛生法におけるプラスチック等容器包装材の扱い

食品衛生法(以下、同法と略記)は昭和22(1947)年12月に制定された。第一章総則の第二条で、食品、添加物、化学的合成品、器具、容器包装などが定義されている。第二章食品及び添加物の第四条の二で、「健康に無害であることの確証のない新食品の販売の禁止」と第六条で「化学的合成品等の販売等の禁止」条項で原則として食品の添加物に化学的合成品等の使用が禁止されている。この原則は、第七条の基準・規格の設定によって、第四条二項の「無害であることの確証」が得られることによって使用が許可される。この規格は、省令で定められ、現在、約400種の化学的合成品が食品添加物として使用許可されている。しかし、同法における「器具」および「容器包装」の扱いは、この食品添加物とは別の第三章器具および容器包装の第九条で、「有害器具等の販売使用等の禁止」で、有害な物質が含まれている器具容器包装の使用が禁止され、該当する恐れのある物質については、第十条の「規格・基準の設定」が必要となる。この規格基準は、厚生省告示として定められ通達される。

すなわち、プラスチック「器具」および「容器包装」の規制の範囲で、主として20種およびその他として15種の合計35種類のプラスチックが前項の食品用プラスチックとして日本で使用されている(1988年現在)。このうち、同法の第九条で、有害物質が含まれる恐れが強いと考えられるものとして、個別規格が設定されているものは次の14種類のプラスチックである。その他のものは一般規格として、カドミウム・鉛および重金属・過マンガン酸カリウム量のみ規制対称プラスチックである。個別規格・一般規格で、規制の対称となっている化合物は17種類・グループである。業界の自

主規制で示された使用を推奨されている化合物の数は最低で592種類である。

#### 4-4-2 容器包装材溶出化合物安全確保のための法的改善の方策

食品用プラスチックの米国保健福祉省食品医薬品局（FDA）は、溶出する可能性のあるプラスチック添加剤を食品添加物として扱うための法的改正を1958年に実施した。すなわち、食品医薬品化粧品法（FDCA）の施行規則 CFR21を改正した。この改正で、従来の食品添加物を直接食品添加物として、改正前までは食品添加物の扱いをしていなかった食品用プラスチックに使用される化学物質も間接的的食品添加物として、安全性の毒性試験などに関して、いずれも法的区別をつけない「申請・許可」制度が導入されている。従って、同時に発効した発癌物質の使用を禁じたデラニー条項も食品用プラスチックに適用された。未認可物質を食品包装材に使用したいときは、用途、使用条件を含めて、事前にFDAに申請し、許可を受けた後に製品が市場に供給される。

日本でも、1975年に当時の行政管理庁の食品衛生に関する行政監察で、プラスチックに関する規制について次のような行政勧告を行っている（昭和50年8月4日）。すなわち、「④合成樹脂製（著者注：プラスチック製）及びゴム製の容器包装等については、毒性試験等により安全性が必ずしも十分確認されていない物質が原材料として使用されており、また、市販の各種食品から容器包装等から溶出したものと推測される各種の物質が検出されている。従って、合成樹脂製及びゴム製の容器包装等の原材料について安全性の確認が不十分なものの使用等を防止するため食品添加物の場合における規制方式を勘案し、指定制度を採用することの是非につき検討を進める必要が

ある。」これに対して、当時の厚生省は次の回答をしている（昭和51年4月6日）。すなわち、「合成樹脂製及びゴム製容器包装等については、当該容器包装等からの各種物質の溶出につき規制を強化する。なお、原材料についても、その使用の規制につき、所要の検討を行う。」

当時の行政管理庁の勧告した「食品添加物の場合における規制方式を勘案した指定制度の採用の是非」について、現在、この指定制度が採用されていないので、化学物質の管理の方法は食品衛生法が制定された1947年当時のままである。したがって、この点の法的改善がプラスチック容器包装材溶出化合物の安全確保のための方策の一つとして検討することが必要である<sup>25)</sup>。



## 5. 文献

- 1<sup>)</sup> Sharpe, R.M and N.E. Skakkebaek:  
Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*, 341:1392-1395 (1993)
- 2<sup>)</sup> Jost, J.W.: Executive summary of "natural and anthropogenic environmental oestrogens". *IUPAC*, 70:v-vii (1998)
- 3<sup>)</sup> Gray, E.J., E. Monosson and W.R. Kelce:  
The effects of endocrine disrupters on reproductive development. Chapt. 4. in: *Interconnections between Human and Ecosystem Health* (ed. E. Monosson and R.T. Diulio). Chapman & Hall, Cornwall, UK, 45-82pp (1996)
- 4<sup>)</sup> Dodds, E.C., L. Goldberg, W. Lawson and R. Robinson: et al.: Oestrogenic activity of certain synthetic compounds. *Nature*, 141:247-248 (1938) (合成経緯について, 次の総説に掲載。片瀬隆雄: Dodds による合成エストラス効果化合物の内分泌攪乱作用の定量化. *化学工業* 49:913-920, 1998)
- 5<sup>)</sup> Witschi, E: Génétique et physiologie de la différenciation du sexe. *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.* 39:215-246 (1950)
- 6<sup>)</sup> Yamamoto, T.: Sex differentiation. in: *Fish Physiology Vol. 3* (ed. W.S. Hoar and D.J. Randall), Academic Press, NY, US, 117p- (1969)
- 7<sup>)</sup> Herbst, A., H. Ulfelder and D.C. Poskanzer: Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *New England J. Med.*, 284:878-881 (1971).
- 8<sup>)</sup> Stillman, R.J.: *In utero* exposure to diethylstilbestrol: adverse effects on the reproductive tract and reproductive performance in male and female offspring. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 142:905-921 (1982).
- 9<sup>)</sup> Newbold, R.R. and J.A. McLachlan: Vaginal adenosis and adenocarcinoma in mice exposed prenatally or neonatally to diethylstilbestrol. *Cancer Research* 42:2003-2011 (1982)
- 10<sup>)</sup> Dodds, E.D., L. Goldberg, W. Lawson, R. Robinson: Estrogenic activity of certain synthetic compounds, *Nature*, 141:247, 1938.
- 11<sup>)</sup> Cook, J.W., E.D. Dodds, C.L. Hewitt and W. Lawson: The estrogenic activity of some condensed-ring compounds in relation to their other biological activities. *Proc. Roy. Soc.*, 114:[B]272-285, 1936.
- 12<sup>)</sup> 片瀬隆雄, Dodds による合成エストラス効果化合物の内分泌攪乱作用の定量化, *化学工業*, 49:913-920, 1998.
- 13<sup>)</sup> A.M. Soto, H. Justicia, J.W. Wnay and C. Sonnenschein: p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from 'modified' polystyrene. *Environ. Health Perspect.* 92:167-173 (1991)
- 14<sup>)</sup> A.V. Krishnan, P. Stathis, S.F. Permuth, L. Tokes, D. Feldman; Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinol.* 132:2279-2286, 1993.
- 15<sup>)</sup> 片瀬隆雄・金倫碩: ガスクロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィー/質量分析法による業務用包装材プラスチックフィルムから潜在的に移行するアジピン酸エステルの定量. *分析化学* 48: 649-

655,1999.

- 16) 井上正：組換え酵母検出系による日常生活用品中のエストロゲン様活性の分析。本（分担）研究報告書。表2，図1，2000.
- 17) Macilwain,C:US panel split on endocrine disruptors. *Nature* 395:828 (1988).
- 18) 茂木幸夫，秋山秀夫：食品用プラスチックに添加されている物質名一覧，食品プラスチック衛生学p.297-307,厚生書環境衛生局食品化学課編，講談社(1980).
- 19) Campbell,N.R.,Dodds,E.C.,W.Lawson: The nature of the oestrogenic substances produced during the demethylation of anethole. *Proc. Roy. Soc. (London)*. B128:253-262 (1939).
- 20) Dodds,E.C.,L.Goldberg,W.Lawson and R.Robinson: Estrogenic activity of alkylatedstilbestrol. *Nature* 142:34 (1938).
- 21) 化学大辞典1,項目アネトール, 210-211,1960.
- 22) 化学大辞典1,項目エストラゴール, 876,1960.
- 23) Harris,C.A.,P.Henttu,M.G.Parker and J.P.Sumpter: The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ.Health Perspect.* 802-811, 1997.
- 24) 越川豊・北野日出男・岩沢久彰・長井幸史著：♂と♀のはなし。p190, 培風館ライフサイエンス教養叢書15, 1985.
- 25) 片瀬隆雄：攪乱能の微量摂取をどう考えるか。包装材にみる新たな”環境ホルモン”（第3章），p44-57, シーエムシー，東京，1999.

## 6. 研究発表

### 6-1 論文発表

- 1) 片瀬隆雄：内分泌かく乱物質研究の最前線（分担課題：第6章第6節フタル酸エステル），季刊化学総説No.50（日本化学会企画実効委員会編，学会出版センター），2001年3月出版予定。
- 2) 片瀬隆雄：エストロゲン様活性を有するフタル酸エステルの生産動態と環境残留，科学（岩波書店）（投稿中）
- 3) 片瀬隆雄：合成化合物による内分泌作用攪乱仮説の提唱で，食品衛生法によるプラスチックの規制方法を再び考える。合同出版（12月出版予定）

### 6-2 口頭発表

- 1) 金倫碩・片瀬隆雄・井上正：プラスチック製品など生活環境中のエストロゲン様化学物質の検索。日本分析化学会第49年会講演要旨集3P-29,（岡山大学）9月26～28日，2000.
- 2) 関根さやか・安藤宏幸・井上正・片瀬隆雄：日本内分泌攪乱化学物質第3回研究発表会講演要旨集PA-14（パシフィコ横浜），12月15～16日，2000.<英文要旨は *Environmental Sciences* Vol.8 No.2,3, 掲載予定>
- 3) 関根さやか・片瀬隆雄・井上正：日本内分泌攪乱化学物質第3回研究発表会講演要旨集PA-25（パシフィコ横浜），12月15～16日，2000.<英文要旨は *Environmental Sciences* Vol.8 No.2,3, 掲載予定>
- 4) 金倫碩・片瀬隆雄：プラスチックワーム汚染とフタル酸エステル。日本内分泌攪乱化学物質学会第3回研究発表講演要旨集PA-26,12月15～16日，2000.<英文要旨は *Environmental Sciences* Vol.8 No.2,3, 掲載予定>

表1 生活環境中の化合物のエストロゲン様活性強度一覧（比活性強度）\*

供試化合物	化合物 分類**	<i>in vitro</i>		<i>in vivo</i>
		組換え酵母系 R <sub>yeast</sub>	ヒト乳癌細胞 R <sub>breast</sub>	膾スメアテスト R <sub>smear</sub>
Estradiol (E <sub>2</sub> )* <sup>1</sup>	□	1.0	1.0	1.0
Estriol	□	1.5x10 <sup>-3</sup>	1.0	
Ethinylestradiol (EE <sub>2</sub> )* <sup>1</sup>	○	10.0	10.0	1.0
Mestranol* <sup>2</sup>	○	4.2x10 <sup>-1</sup>	1.0x10 <sup>-1</sup>	1.0x10 <sup>-1</sup>
Norethindrone	○	1.2x10 <sup>-5</sup>	1.0x10 <sup>-3</sup>	
Diethylstilbestrol (DES)* <sup>1</sup>	☆○	2.2x10 <sup>-1</sup>	1.0	1.0
Dienestrol* <sup>1</sup>	☆○	1.9	1.0	1.0x10 <sup>-1</sup>
Hexestrol* <sup>3</sup>	☆○	1.8x10 <sup>-1</sup>	1.0	
4-allylanisole	◎	<1.3x10 <sup>-6</sup>	<1.0x10 <sup>-6</sup>	
Anethole	◎	<1.3x10 <sup>-6</sup>	<1.0x10 <sup>-6</sup>	
Genistein* <sup>3</sup>	◎	1.2x10 <sup>-4</sup>	1.0x10 <sup>-4</sup>	1.0x10 <sup>-5</sup>
Reveratrol* <sup>3</sup>	◎	9.0x10 <sup>-5</sup>	1.0x10 <sup>-4</sup>	<1.0x10 <sup>-5</sup>
Ferulic acid (FRA)* <sup>3</sup>	◎	6.8x10 <sup>-6</sup>	<1.0x10 <sup>-6</sup>	<1.0x10 <sup>-5</sup>
4-Hydroxycinnamic acid(HCA)	◎	9.3x10 <sup>-6</sup>	1.0x10 <sup>-6</sup>	
Synapic acid (SNA)	◎	<1.3x10 <sup>-6</sup>	<1.0x10 <sup>-6</sup>	
Vanillic acid (VNA)	◎	4.6x10 <sup>-6</sup>	1.0x10 <sup>-6</sup>	
4-Hydroxybenzoic acid(HBA)	◎	<1.3x10 <sup>-6</sup>	<1.0x10 <sup>-6</sup>	
Triphenylethylene* <sup>5</sup>	☆●	2.8x10 <sup>-4</sup>	1.0x10 <sup>-2</sup>	
Propylphenol* <sup>5</sup>	☆●	1.0x10 <sup>-4</sup>	1.0x10 <sup>-6</sup>	
<i>cis</i> -Stilbene* <sup>6</sup>	☆●	2.2x10 <sup>-6</sup>	1.0x10 <sup>-6</sup>	
<i>trans</i> -Stilbene* <sup>5</sup>	☆●	3.1x10 <sup>-5</sup>	1.0x10 <sup>-6</sup>	
<i>o</i> -allylphenol* <sup>5</sup>	☆●	6.8x10 <sup>-5</sup>	1.0x10 <sup>-6</sup>	
4-Hydroxystilbene* <sup>7</sup>	☆●	1.6x10 <sup>-3</sup>	1.0x10 <sup>-5</sup>	
<i>i</i> -Nonylphenol ( <i>i</i> -NPH)* <sup>1</sup>	●	1.3x10 <sup>-4</sup>	1.0x10 <sup>-4</sup>	1.0x10 <sup>-5</sup>
<i>n</i> -Nonylphenol ( <i>n</i> -NPH)* <sup>5</sup>	●	2.5x10 <sup>-5</sup>	1.0x10 <sup>-5</sup>	
Bisphenol A (BPA)* <sup>1</sup>	☆●	4.6x10 <sup>-4</sup>	1.0x10 <sup>-4</sup>	1.0x10 <sup>-5</sup>
Butylhydroxytoluene(BHT)	●	1.1x10 <sup>-5</sup>	1.0x10 <sup>-5</sup>	
Benzyl <i>n</i> -butylphthalate(BBP)* <sup>4</sup>	●	1.6x10 <sup>-4</sup>	1.0x10 <sup>-5</sup>	<1.0x10 <sup>-5</sup>
Di- <i>iso</i> -butylphthalate (DIBP)* <sup>5</sup>	●	1.0x10 <sup>-4</sup>	1.0x10 <sup>-6</sup>	
Di- <i>n</i> -butylphthalate (DBP)* <sup>5</sup>	●	1.6x10 <sup>-5</sup>	1.0x10 <sup>-5</sup>	<1.0x10 <sup>-5</sup>
Diethylphthalate (DEP)* <sup>5</sup>	●	1.5x10 <sup>-5</sup>	1.0x10 <sup>-6</sup>	<1.0x10 <sup>-5</sup>
Di-2-ethylhexylphthalate(DEHP)* <sup>4</sup>	●	8.4x10 <sup>-7</sup>	1.0x10 <sup>-5</sup>	<1.0x10 <sup>-5</sup>
Di- <i>i</i> -nonylphthalate (DINP)* <sup>5</sup>	●	<1.7x10 <sup>-6</sup>	1.0x10 <sup>-5</sup>	<1.0x10 <sup>-5</sup>
Di-cyclohexylphthalate (DCHP)* <sup>5</sup>	●	<1.7x10 <sup>-6</sup>	<1.0x10 <sup>-6</sup>	
Di- <i>n</i> -heptylphthalate (DHP)* <sup>5</sup>	●	<1.7x10 <sup>-6</sup>	<1.0x10 <sup>-6</sup>	

Adipate (di-n-C <sub>6,8,10</sub> )* <sup>4</sup>	●	<2.7x10 <sup>-7</sup>	1.0x10 <sup>-6</sup>	
Di-2-ethylhexyladipate(DEHA)* <sup>4</sup>	●	<1.0x10 <sup>-6</sup>	1.0x10 <sup>-6</sup>	
Di-n-octyladipate(DnOA)* <sup>4</sup>	●	<1.0x10 <sup>-6</sup>	1.0x10 <sup>-6</sup>	
<hr/>				
Adipate (di-n-C <sub>6,8,10</sub> )* <sup>4</sup> Adp-6-2	△	5.7x10 <sup>-2</sup>	—	—
Adp-6-3	△	<7.5x10 <sup>-6</sup>	—	—
Adp-6-4	△	<7.5x10 <sup>-6</sup>	—	—
Adp-6-5	△	<7.5x10 <sup>-6</sup>	—	—
Adp-6-6	△	<7.5x10 <sup>-6</sup>	—	—
<hr/>				
<i>i</i> -Nonylphenol ( <i>i</i> -NPH)* <sup>1</sup> Frac.-1	▽	2.5x10 <sup>-5</sup>	—	—
Frac.-2	▽	2.5x10 <sup>-5</sup>	—	—
Frac.-3-1	▽	3.1x10 <sup>-5</sup>	—	—
Frac.-3-2	▽	1.6x10 <sup>-4</sup>	—	—
Frac.-3-3	▽	2.0x10 <sup>-4</sup>	—	—
Frac.-4	▽	1.6x10 <sup>-4</sup>	—	—
Frac.-5-1	▽	1.0x10 <sup>-4</sup>	—	—
Frac.-5-2	▽	1.6x10 <sup>-4</sup>	—	—
Frac.-5-3	▽	2.0x10 <sup>-4</sup>	—	—
Frac.-6	▽	1.6x10 <sup>-4</sup>	—	—

\*<sup>1</sup>東京化成, \*<sup>2</sup>ICN, \*<sup>3</sup>Sigma社, \*<sup>4</sup>和光純薬, \*<sup>5</sup>関東化学, \*<sup>6</sup>MERK社, \*<sup>7</sup>ACROS 社

\*<sup>8</sup>: 和光純薬 (045-24332)

\* : 比強度 = Estradiol-17β (E2) / 試料

\*\* : □ 天然エストロゲン ☆ Dodds化合物 ○ 医薬品成分 ◎ 天然物成分  
● プラスチック関連物質等化成品 △ アジピン酸エステル (市販品) の画分  
▽ ノニルフェノール (市販品) の画分