

図 3 *i*-NPH の A 法および B 法の Dose response curve の比較

(●)は A 法で、隣接 well からの影響を受けていないので吸光度は 10^{-6} の時に 1.5 以下である。(○)は B 法で、隣接 well の影響を受けており、 10^{-6} の時に 1.7 位の吸光度がある。

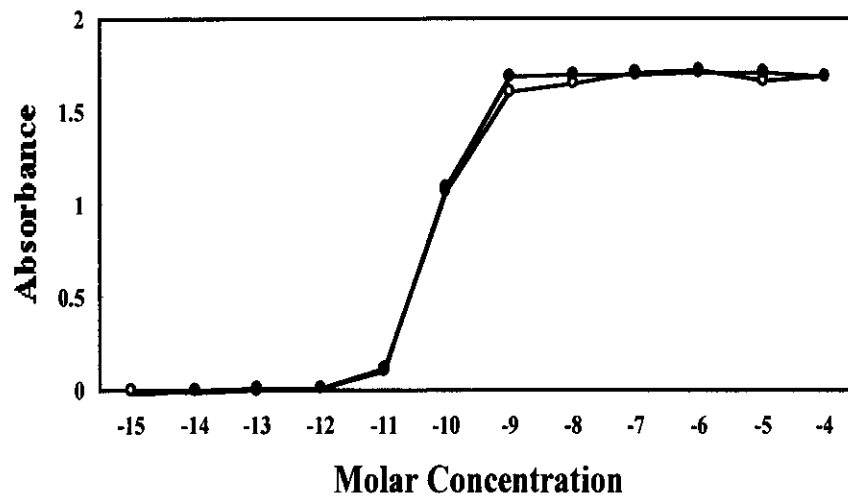


図 4 Estradiol non film と Estradiol film の比較

(○) は non film、(●) は film をして培養した Estradiol。差がないことがわかる。

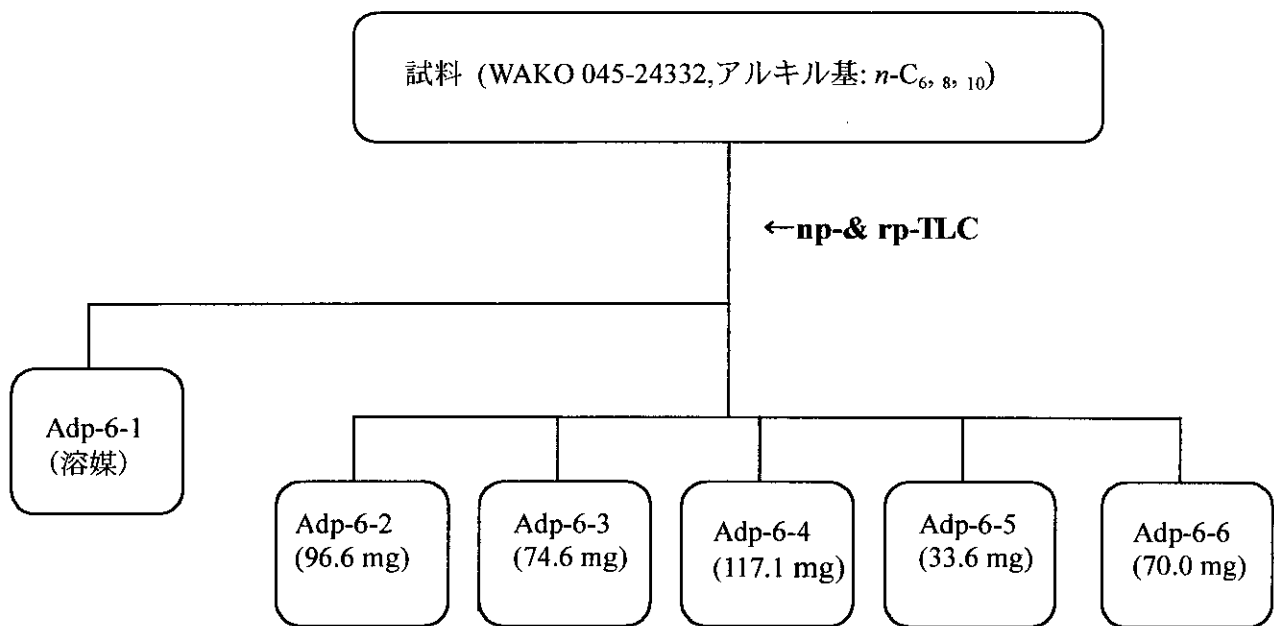


図 5 業務用食品包装材ラップ(R40) 添加成分アジピン酸エステル分離と同一手順
 同一手順: Capil-GLC, EL-MS および C13-NMR

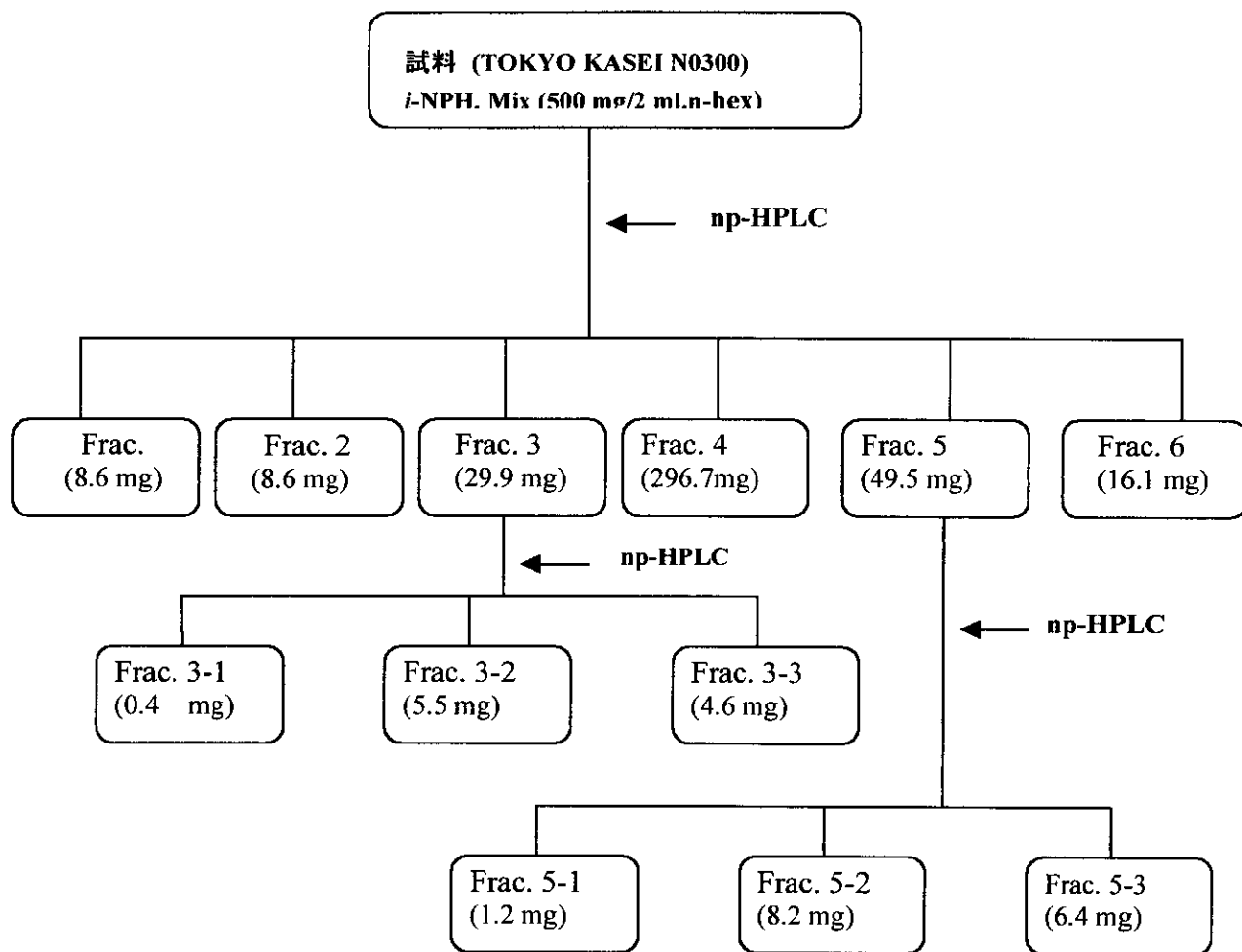


図 6 市販ニルフェノール (東京化成) の分離と同定手順
同定手順: Capil-GLC, EL-MS および C13-NMR

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

課題名: 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する研究

分担課題名: ノニルフェノールの異性体とエストロゲン様活性

分担研究者 井上 正 日本大学生物資源科学部 教授

研究要旨: プラスチック製品への添加剤として極めて広く用いられている Nonylphenol (NPH) は、エストロゲン様の生物活性を有することが知られている。NPH の側鎖である nonyl 基は、数十の異性体を構成し、それらの構造は互いに大きく異なるので、異性体の種類によってはエストロゲン様活性の大きさが異なることが予想される。そこで、直鎖状の側鎖を有する *n*-NPH に加えて、種々の異性体の混合物からなる市販の NPH を LC によって分画した画分について、それらのエストロゲン様活性を比較したところ、そのエストロゲン様活性の比活性は数十倍異なっていた。この事実は、高い活性を有する特定の異性体の含有量を低減させることによって、重要な化成品である NPH の危険性を低下させることができる可能性を示唆する。

1 研究目的

Nonylphenol (NPH) は、界面活性剤として、あるいはプラスチック製品への添加剤として極めて広く用いられており、重要な化成品のひとつであるが、この化合物はエストロゲン様の生物活性を有することが明らかにされている (White *et al.*, 1994)。ところで、NPH の側鎖である nonyl 基は、数十の異性体を構成し、それらの構造は互いに大きく異なるので、異性体の種類によってはエストロゲン様活性の大きさが異なることが予想される。

実際、昨年度までに、直鎖状の側鎖を有する *n*-NPH は、種々の異性体の混合物からなる市販の NPH (*i*-NPH)

と比較すると、明らかに低い活性しか有していないことを明らかにした。

もし NPH のある特定の異性体のみ活性を有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 の危険性を低下させることができると思われるので、種々の異性体の混合物からなる市販の NPH を LC によって分画した画分について、それらのエストロゲン様活性を比較した。

また、NPH は高い揮発性を有しており、この性質により、通常用いられている組換え酵母による活性測定では、活性の比較が難しいことも明らかになった。

2 研究方法

2.1 試料

NPH 異性体の混合物 (*i*-NPH) および、直鎖状側鎖を有する NPH (*n*-NPH) は市販の特級試薬を用いた。各種クロマトグラフィーで分画された画分中の NPH の量は、ピーク面積を標準試料と比較することによって求めた。なおここで用いた *i*-NPH は図 1 に示すように、検出されるレベルの *n*-NPH は含まれていない。

2.2 測定系

ヒトエストロゲンリセプター遺伝子および大腸菌 *lacZ* 遺伝子を組み込んだ酵母は Dr. Sampter (Brunel University, UK) より分与された。

エストロゲン用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して行った。全ての検体は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、DMSO で段階希釈したのち 96-well のマイクロタイタープレートの well に分注し、これに CPRG を含む酵母培養液を添加した。28°C 4 日間の培養の後にマイクロプレートリーダーを用いて、540 nm と 620 nm 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) のみの中から得られた値を差し引いた。また陽性対照として 17 β -エストラジオールを用いた。

3 研究結果

3.1 Nonylphenol (NPH) の揮発性

既に前年度までに報告したように、種々の異性体の混合物からなる市販の NPH (*i*-NPH) の活性は揮発性であり、マイクロタイターウェルを用いる組換え酵母による活性測定系では、試料を含まない隣接ウェルにも強い影響を与える (図 2)。

このような隣接ウェルへの影響を少なくするために、各ウェルをパラフィルムで密閉して測定することとした。ウェルを密閉しても、エストロゲン様活性の定量にはほとんど影響を与えないことは、陽性対照である 17 β -エストラジオールを用いて確認した (図 3)。

3.2 *i*-NPH の分画と分画された画分の活性の比較

直鎖状の側鎖を有する *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 (図 4)。すなわち、これまでに信じられていた 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。活性の高い成分を同定するために、*i*-NPH を LC によって分画し (図 5)、えられた粗画分の活性を比較した (図 6)。活性の測定に際しては、上に述べたように各ウェルを密閉して行った。

分画された画分の活性を比較したところ、最も活性が高かったのは図 5 の

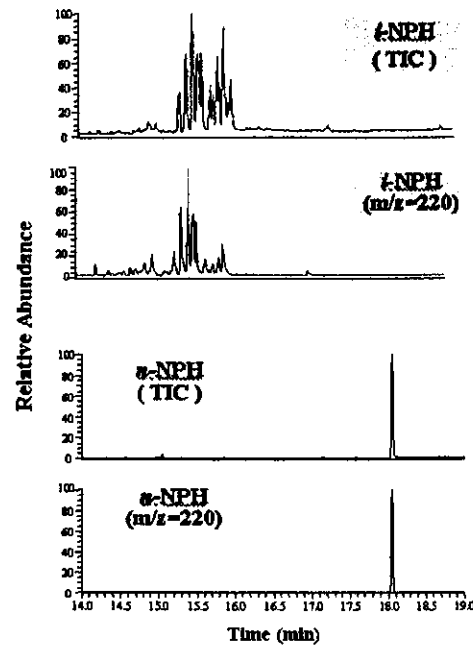


図 1: 供試した *i*-NPH には *n*-NPH は含まれない。

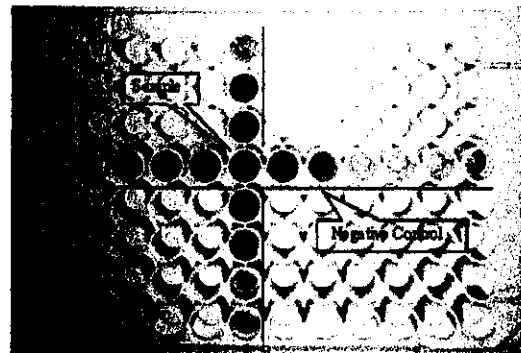


図 2: *i*-NPH の揮発性。96 穴のタイタープレートの中の一つのウェルにのみ *i*-NPH を加え、その上下左右には十字を描くように、溶媒 (DMSO) のみを加えた。これらのウェルに組換え酵母による検出系の完全な反応系を入れ培養した。試料を添加しなかった左右上下ウェルにも強い活性を示す着色が現れている。

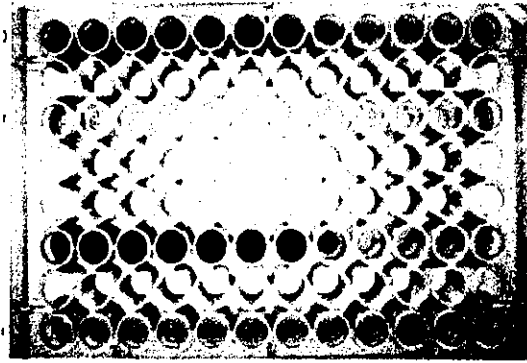


図 3: 組換え酵母による活性測定はウェルを密閉しても影響を受けない。最上列: 17β-エストラジオール (密閉せず)、上から 3 段目: 溶媒 (DMSO) のみ (密閉せず)、下から 3 段目: 17β-エストラジオール (パラフィルムにより密閉)、最下列: 17β-エストラジオール (パラフィルムにより密閉)。17β-エストラジオールの濃度は、最左列が 0.125 mM であり、右へ向かって、10 分の 1 ずつ段階希釈した。

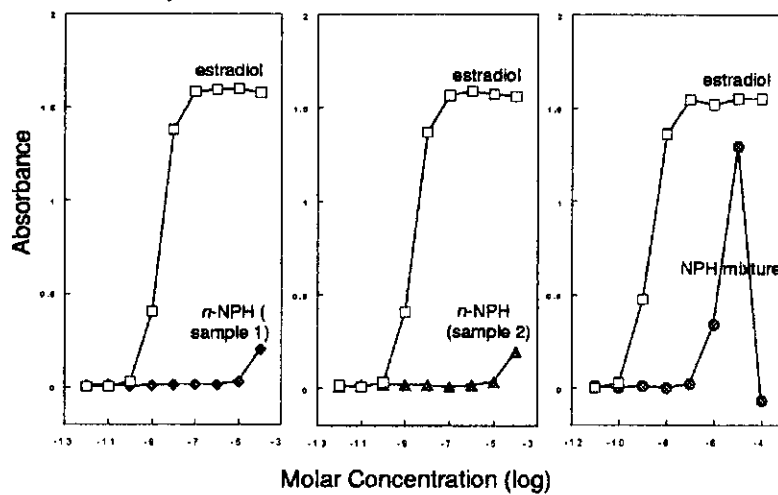


図 4: 市販の *n*-NPH の二つの異なるロット (左、中央) と *i*-NPH (右) の活性の比較。

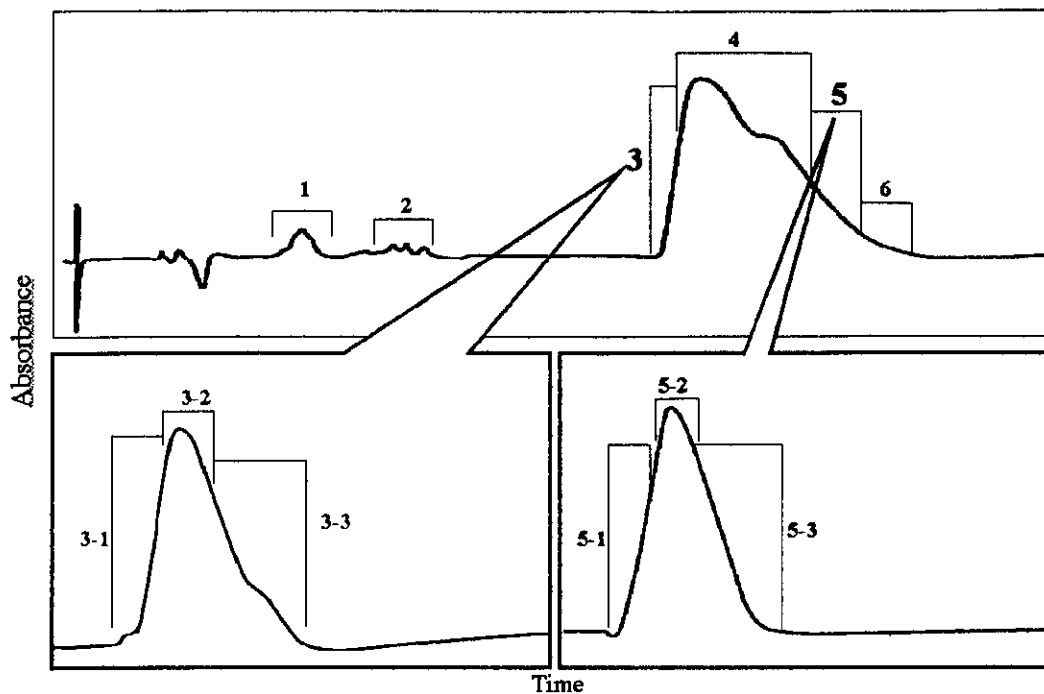


図 5: 市販の *i*-NPH の LC による分画。図に示された各画分についてその活性を測定した。

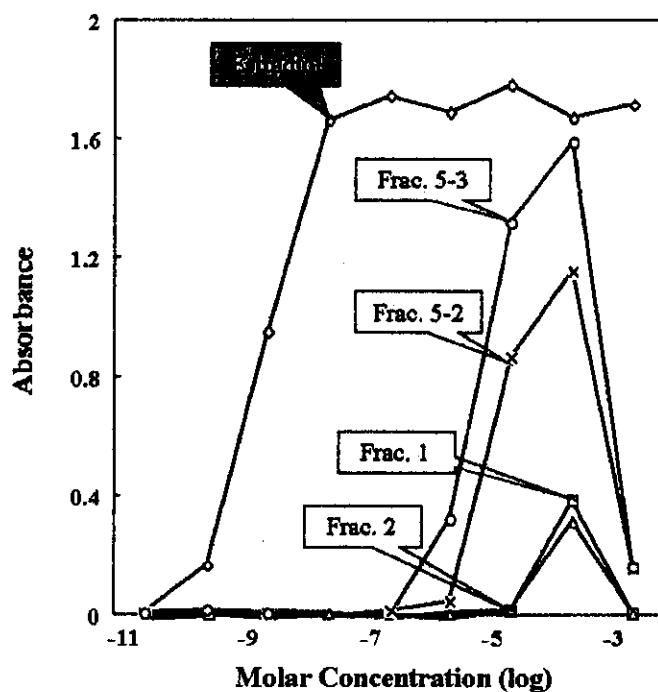


図 6: LC によって分画された *i*-NPH のエストロゲン様活性。

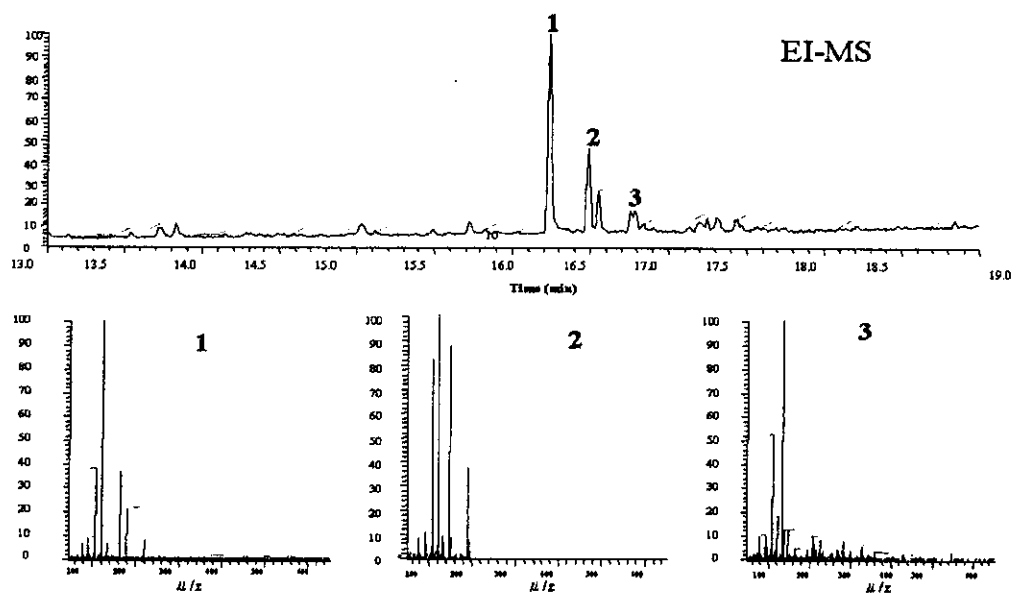


図 7: LC によって分画された画分は依然として混合物である。図 5 でえられた fraction 3 をさらに分画し、得られたピークを MS によって分析した。

fraction 5-3 であり、最も低かったのは fraction 2 であった。なお、この段階では、図 7 に示すように、各画分は依然として純粋ではなく、複数の異性体を含んでいる。

4 考察

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はなく、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有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 の危険性を低下させることができる。

本研究では、調製用 LC 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。

組換え酵母検出系におけるエストロゲン様活性の発現は、披検物質とヒトエストロゲンリセプターの結合に依存するとおもわれるので、NPH 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、調製用 LC 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、これを調製用 GC によってさらに分画する必要がある。

特定の構造の異性体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できるかもしれない。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。

5 引用文献

White, R. S. J., Hoare, S. A., Sumpter, J. P. and Parker, M. G. (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinol.* **135**, 175-182.

6 研究発表

6.1 学会報告

1. ノニルフェノールの異性体とエストロゲン様活性。関根 さやか、安藤 宏幸、井上 正、片瀬 孝雄。第 3 日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会 (パシフィコ横浜) 2000.12.15
2. 組換え酵母培養実験における揮発性化合物の隣接 well への影響。関根 さやか、片瀬 孝雄、井上 正。第 3 日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会 (パシフィコ横浜) 2000.12.15

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

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

分担研究者 森友忠昭 日本大学生物資源科学部 講師

研究要旨

これまでに多くのエストロゲン様物質のアッセイが行われてきたが、プラスチックやラップなどに可塑剤として含まれる nonylphenol、アジピン酸エステル類、フタル酸エステル類などについてはほとんど検討されていない。本研究では、エストロゲンレセプターを有し、エストロゲン依存性に増殖するヒト乳癌細胞株 MCF-7 を用いたアッセイ系を検討し、これらプラスチック関連物質を含めたエストロゲン作用を持つと考えられる種々の化学物質のスクリーニングを行った。さらに、エストロゲン様物質のアッセイ系による違いを調べるため、本学部応用生物学科の井上教授らのグループにより行われた、エストロゲンレセプター遺伝子及び大腸菌 *lacZ* 遺伝子を組み込んだ酵母を用いたアッセイ系の結果と比較した。

1. 目的

1980 年代後半にプラスチックから溶出する化学物質の中にも女性ホルモン様作用のあることが見い出された。即ち、細胞培養に用いたポリカーボネート製プラスチックから溶出したビスフェノール A¹⁾ やポリスチレン製の試験管から溶出したノニルフェノールにエストロゲン様作用があることが解った²⁾。プラスチック中にはこれらの他にアジピン酸エステル類、フタル酸エステル類などの多くの化学物質が添加剤として含まれており、これらの添加物が食器やラップ等のプラスチックから食品中へ溶出すると考えられている³⁾。このことから、これらの添加物のエストロゲン様作用の分析を行うことが重要な課題となっている。

本研究では、エストロゲンレセプターを有し、エストロゲン依存的に増殖するヒト乳癌細胞株 MCF-7 を用いたアッセイ

系により、既にエストロゲン様作用をもつことがわかっている化学物質や、プラスチック関連物質などの種々の化学物質のエストロゲン活性の有無を調べた。さらに、異なるアッセイ系においてエストロゲン様物質に対する感受性に差があるかどうかを調べるために、乳癌細胞系における測定値を酵母（エストロゲンレセプター及び大腸菌 *LacZ* 遺伝子を組み込んだもの）系における測定値と比較した。

2. 方法

2.1 MCF-7 細胞

ヒト乳癌細胞株 MCF-7 は東海大学医学部、坂部貢教授より入手した。培養液は 10% 牛胎仔血清 (FCS) 添加 Minimum Essential Medium (MEM) を用い、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。細胞の継代は、1 週間に 2 度、0.1% トリプシン及び 0.02% EDTA 加リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用

いて細胞を剥離させ、もとの細胞の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。

2.2 アッセイ用培地の作製

培養液は、エストロゲン様作用をもつとされるフェノールレッド (PR) を含まない、PRフリーのMEM [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もの (CD-FCS) を用いた^{3,4)}。アッセイ用培地は10%CD-FCS添加PR (-) MEMを用いた。

2.3 被検物質

エタノール中に2.5mM～25mMになるように溶解された表1の化学物質を本学部片瀬隆雄教授から入手した (表1)⁵⁾。被検物質の最終濃度が 10^{-4} ～ 10^{-13} Mになるように被検物質を培養液中に添加し、さらに細胞への毒性がないように培養液中のエタノールの濃度が0.25%以下になるようにした。

2.4 アッセイ法

A.M.SotoやM.Villalobosらの方法を若干、改変し行った^{6,7)}。即ち、MCF-7をトリプシンにより剥離し、10%FCS加MEM中に浮遊させ、24wellプレートに 10^4 個/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、種々の濃度 (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} M) の化学物質を添加したアッセイ用培地と交換した。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カウントした。ポジティブコントロールとして継

代維持に用いている10%FCS加PR(+)MEMを加えたwellを作製し、またネガティブコントロールとして物質を添加していないアッセイ用培地のみを加えたwellを作製し同様に培養後、細胞数をカウントした

2.5 酵母系との比較

同じ被検物質を本学部井上正教授のグループが酵母系を用いて測定した結果と本乳癌細胞系の結果を比較した⁸⁾。

3. 結果

3.1 アッセイ系の検討

すでにエストロゲン作用をもつことの知られているEstradiol-17 β , dienestrol, DES, hexestrol, estriol等を用いてMCF-7細胞によるエストロゲン活性のアッセイ法検討した。その結果、Estradiol-17 β において、 10^{-11} ～ 10^{-4} Mの範囲で濃度依存性に細胞増殖が認められ、 10^{-4} M以上の濃度においてはネガティブコントロールの3～4倍の細胞増殖が認められた (図1-A)。このことはdienestrol, DES, hexestrol, estriol (図1-B)においてもほぼ同様であった。ここで、各物質の活性濃度をネガティブコントロールの2倍以上の細胞増殖を示した濃度として決定したところ、estradiol-17 β の活性濃度は 10^{-10} Mとなり、またDES, dienestrol, estriol, hexestrolでも同様に 10^{-10} Mとなった。さらに、基準物質であるestradiol-17 β の活性濃度と各被検物質の活性濃度との比 (Estradiol-17 β の活性濃度/各物質の活性濃度) を算出したところ、Estradiol-17 β , dienestrol, DES, hexestrol, estriolのいずれにおいても1であった。このこ

とから、本アッセイ系においてこれらの物質は estradiol-17 β とほぼ同等の活性を示すことがわかった (表 2)。

3.2 各被検物質のアッセイ

次に、被検物質の項で述べた種々の化学物質のアッセイを同様に行い、活性濃度を求め、さらに estradiol-17 β との比活性を算出したところ、表 2 の様な結果となった。表の上から活性濃度の高い物質を記したところ、上記のアッセイ系の検討で用いた物質以外、21 種類の物質で活性が認められ estradiol-17 β との比活性値は 10 倍から 10⁻¹ とさまざまであった。その他の物質は検出限界値 (活性濃度で 10⁻⁴M) 以下であった。

3.3 酵母系との比較

乳癌細胞系における比活性値を酵母系における比活性値と比較したところ、両アッセイ系とも、似かよった傾向は認められたものの、estriol で 100 倍以上乳癌細胞系の方が高く、一方、4-hydroxystilben では 100 倍以上酵母系の方が高いことがわかった (表 2)、(図 3)。また図 3 のように、被検物質の分類との関連を調べてみたが、特に傾向は認められなかった。

4. 考察

昨年度行った MCF-7 細胞系によるアッセイでは、ほとんどのプラスチック関連物質の活性は検出できなかった。これは、プラスチック関連物質のエストロゲン様活性が弱く、アッセイ系における検出限界値 (10⁻⁴M) よりも活性が低かったためと考えられた。そこで今年度の研究では、被検物質原液中の濃度を上げ、検出限界

が 10⁻⁴M となるようにしたところ、いくつかのプラスチック関連物質で (NPH (純品、混合物)、DEHP (純品)、BHT、BBP、DBP) エストロゲン様活性を検出することができた。

乳癌細胞系と酵母系におけるエストロゲン様活性物質に対する感受性を比較したところ、比活性において 100 倍以上異なる物質が認められた。このことから、両アッセイ系における感受性はすべての物質で一致するわけではなく、エストロゲン様活性物質のアッセイは両アッセイ系において行うほうが、より確実であると考えられた。

5. 参考文献

1. A. V. Krishnan, P. Stathis, S. F. Permuth, L. Tokes, and D. Feldman(1993) Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, 132, 2279-2280.
2. A. M. Soto, H. Justicaia, J. W. Wray, and C. Sonnenschein (1991) p-nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environmental health perspectivea*, 92, 167-173.
3. 松本 邦夫 (1995) ポリペプチド性増殖因子の検出: 特異的バイオアッセイ法と PCR 法の応用。『細胞増殖因子 (中村敏一編)』, pp.11-27, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京。
4. E. E. Blom, A. Johannisson, L. Norrgren, and M. Pesonen(1998)

- Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line(MCF-7)
Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 34, 306-310.
5. 片瀬 隆雄 (1998) 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. 月刊「化学工業」Vol.49, No.12 別冊.
6. A. M. Soto and C. Sonnenschein (1984) The role of Estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7).
Journal of steroid Biochemistry. Vol.23, No. 1,87-94.
7. M. Villalobos, N. Olea, J. A. Brotons, M. F. Olea-Serrano, J. M. Ruiz de Almodovar, and V. Pedraza(1995) The E-Screen Assay: A comparison of different MCF-7 cell.
8. 片瀬 隆雄 (1999) 組換え酵母を用いるプラスチック溶出物中の内分泌攪乱物質の検索「厚生省科学研究費補助金(生活安全総合研究事業):(総括) 研究報告書」

表1 被検物質一覧

<Dodds 関連物質>

DES :Diethylstilbestrol
Bisphenol A
Dienestrol
Hexestrol
Triphenylethylene
Cis-stilbene
Trans-stilbene
4-hydroxystilbene
Propylphenol
o-Allylphenol

<プラスチック関連物質>

NPH: Nonylphenol(純品)
NPH (混合物)
DEHP: Di2-ethylhexylphthalate:フタル酸ジ2-エチルヘキシル (純品)
DCHP: Dicyclohexylphthalate:フタル酸ジシクロヘキシル
DEP: Diethylphthalate:フタル酸ジエチル
DBP: Dibutylphthalate:フタル酸ジブチル
BBP: Benzylbutylphthalate:ベンジルブチル
Adipate: アジピン酸
DEHA: Di2-ethylhexyladipate:アジピン酸ジ2-エチルヘキシル
DnOA: Di-n-octyladipate:アジピン酸ジn-オクチル
BHT: Butylhydroxytoluene:ブチルヒドロキシトルエン

<天然成分化合物>

Resveratrol
FRA : Ferulic acid
Genistain
4-allylanisole
HCA: 4-Hydroxycinnamic acid
HBA: 4-Hydroxybenzoic acid
VNA: Vanillic acid
SNA:Sinapic acid

<医薬品>

17 α Ethynylestradiol
Norethindrone
Mestranol

<天然エストロゲン成分化合物>

Estradiol-17 β
Estriol

Dodds 関連物質: 1930年代、E.C.Doddsらが最もエストロゲン様作用の強い化合物であるDESを合成するにあたりエストロゲン様作用が検討された化合物⁵⁾。

医薬品: 主としてピルの原料

NPH (混合物): 側鎖が枝分かれしたNPHの異性体混合物

天然成分化合物: 植物に含まれるエストロゲン様活性物質

表 2: 乳癌細胞系におけるエストロゲン様化学物質の活性濃度と Estradiol-17 β との比活性

化学物質名	乳癌細胞系		酵母系	両スクリーニング系の比較 (A/B)
	活性濃度 (M)	比活性値 (注 1) (A)	比活性値 (注 1) (B)	
17 α -Ethinylestradiol	1×10^{-11}	1.0 X 10	1.2×10	8.3×10^{-1}
Estradiol-17 β	1×10^{-10}	1	1	1.0
Dienestrol	1×10^{-10}	1	1.9	5.3×10^{-1}
DES	1×10^{-10}	1	2.2×10^{-1}	4.5
Hexestrol	1×10^{-10}	1	1.8×10^{-1}	5.6
Estriol	1×10^{-10}	1	1.5×10^{-3}	6.6×10^2
Mestranol	1×10^{-9}	1×10^{-1}	4.2×10^{-1}	2.3×10^{-1}
Triphenylethylene	1×10^{-8}	1×10^{-2}	2.8×10^{-4}	3.5×10^1
Norethindrone	1×10^{-7}	1×10^{-3}	1.2×10^{-5}	8.3×10^1
Bisphenol-A	1×10^{-6}	1×10^{-4}	4.6×10^{-4}	2.1×10^{-1}
NPH (混合物)	1×10^{-6}	1×10^{-4}	1.5×10^{-4}	6.6×10^{-1}
Genistein	1×10^{-6}	1×10^{-4}	1.2×10^{-4}	8.3×10^{-1}
Resveratrol	1×10^{-6}	1×10^{-4}	9.0×10^{-5}	1.1
4-hydroxystilbene	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1.6×10^{-3}	6.0×10^{-3}
BBP	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1.6×10^{-4}	6.3×10^{-2}
NPH(純品)	1×10^{-5}	1×10^{-5}	2.5×10^{-5}	4.0×10^{-1}
DBP	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1.6×10^{-5}	6.2×10^{-1}
BHT	1×10^{-5}	1×10^{-5}	5.9×10^{-6}	1.7
DEHP (純品)	1×10^{-5}	1×10^{-5}	8.4×10^{-7}	1.1×10
DINP	1×10^{-5}	1×10^{-5}	$< 1.7 \times 10^{-6}$	
Propylphenol	1×10^{-4}	1×10^{-6}	1×10^{-4}	1.0×10^{-2}
DIBP	1×10^{-4}	1×10^{-6}	1×10^{-4}	1.0×10^{-2}
o-Allylphenol	1×10^{-4}	1×10^{-6}	6.8×10^{-5}	1.5×10^{-2}
Trans-stilbene	1×10^{-4}	1×10^{-6}	3.1×10^{-5}	3.2×10^{-2}
DEP	1×10^{-4}	1×10^{-6}	1.5×10^{-5}	4.5×10^{-1}
HCA	1×10^{-4}	1×10^{-6}	9.3×10^{-6}	1.0×10^{-1}
VNA	1×10^{-4}	1×10^{-6}	4.6×10^{-6}	2.1×10^{-1}
Cis-stilbene	1×10^{-4}	1×10^{-6}	2.2×10^{-6}	4.5×10^{-1}
Adipate	1×10^{-4}	1×10^{-6}	$< 2.7 \times 10^{-6}$	
FRA	$> 1 \times 10^{-4}$	$< 1 \times 10^{-6}$	6.8×10^{-6}	
4-allylanisole	$> 1 \times 10^{-4}$	$< 1 \times 10^{-6}$	5.9×10^{-6}	
DHP	$> 1 \times 10^{-4}$	$< 1 \times 10^{-6}$	$< 1.7 \times 10^{-6}$	
DCHP	$> 1 \times 10^{-4}$	$< 1 \times 10^{-6}$	$< 1.7 \times 10^{-6}$	
Anethole	$> 1 \times 10^{-4}$	$< 1 \times 10^{-6}$	$< 1.3 \times 10^{-6}$	
SNA	$> 1 \times 10^{-4}$	$< 1 \times 10^{-6}$	$< 1.3 \times 10^{-6}$	
HBA	$> 1 \times 10^{-4}$	$< 1 \times 10^{-6}$	$< 1.3 \times 10^{-6}$	
DEHA	$> 1 \times 10^{-4}$	$< 1 \times 10^{-6}$	$< 1 \times 10^{-6}$	
DnOA	$> 1 \times 10^{-4}$	$< 1 \times 10^{-6}$	$< 1 \times 10^{-6}$	

注 1 = Estradiol-17 β の活性濃度を 1 とした場合の各物質の活性の比 (Estradiol-17 β の活性濃度 / 各物質の活性濃度)

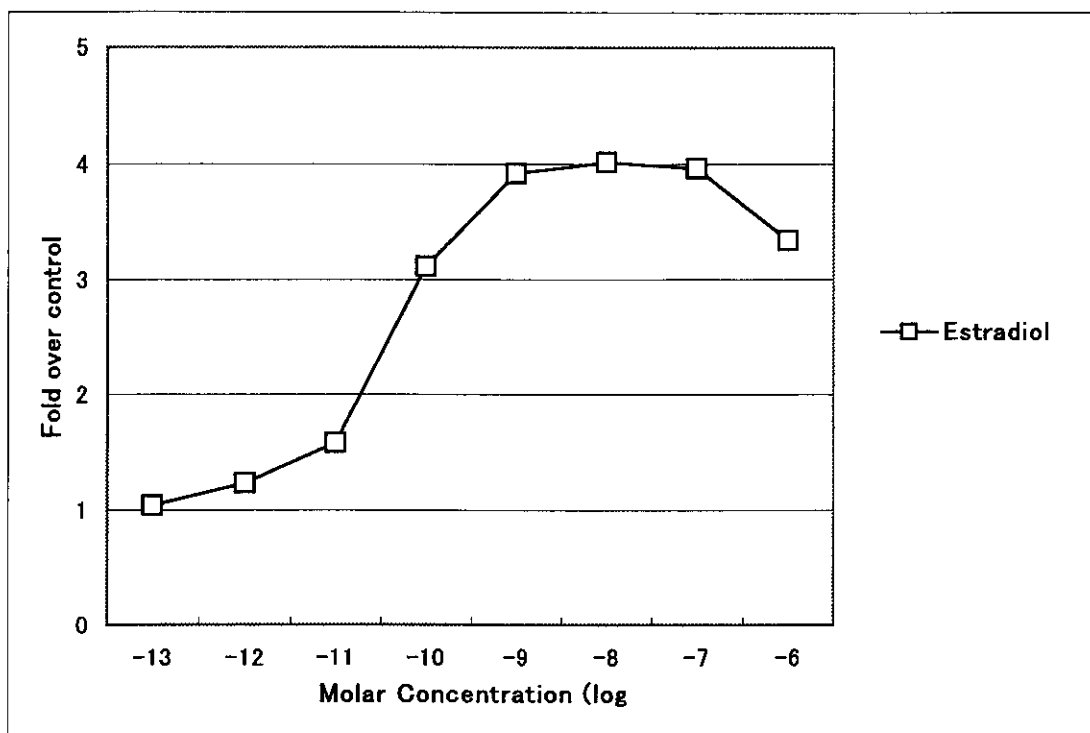


図 1 : エストラジオール 17 β 存在下での MCF-7 細胞の増殖

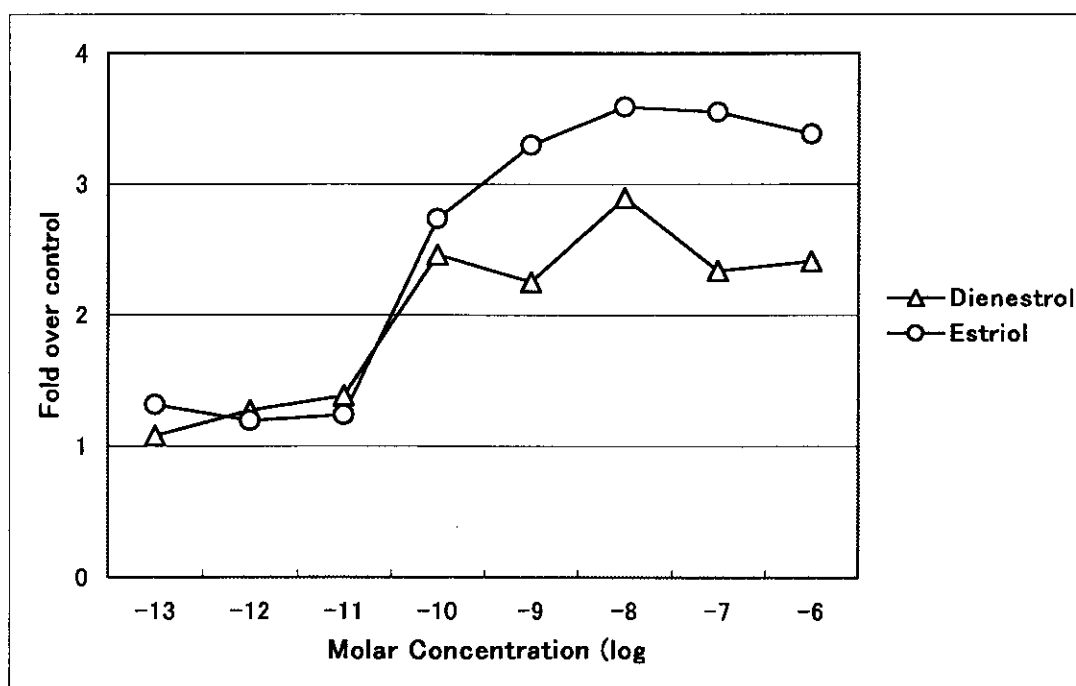


図 2 : Dienestrol、Estriol 存在下での MCF-7 細胞の増殖

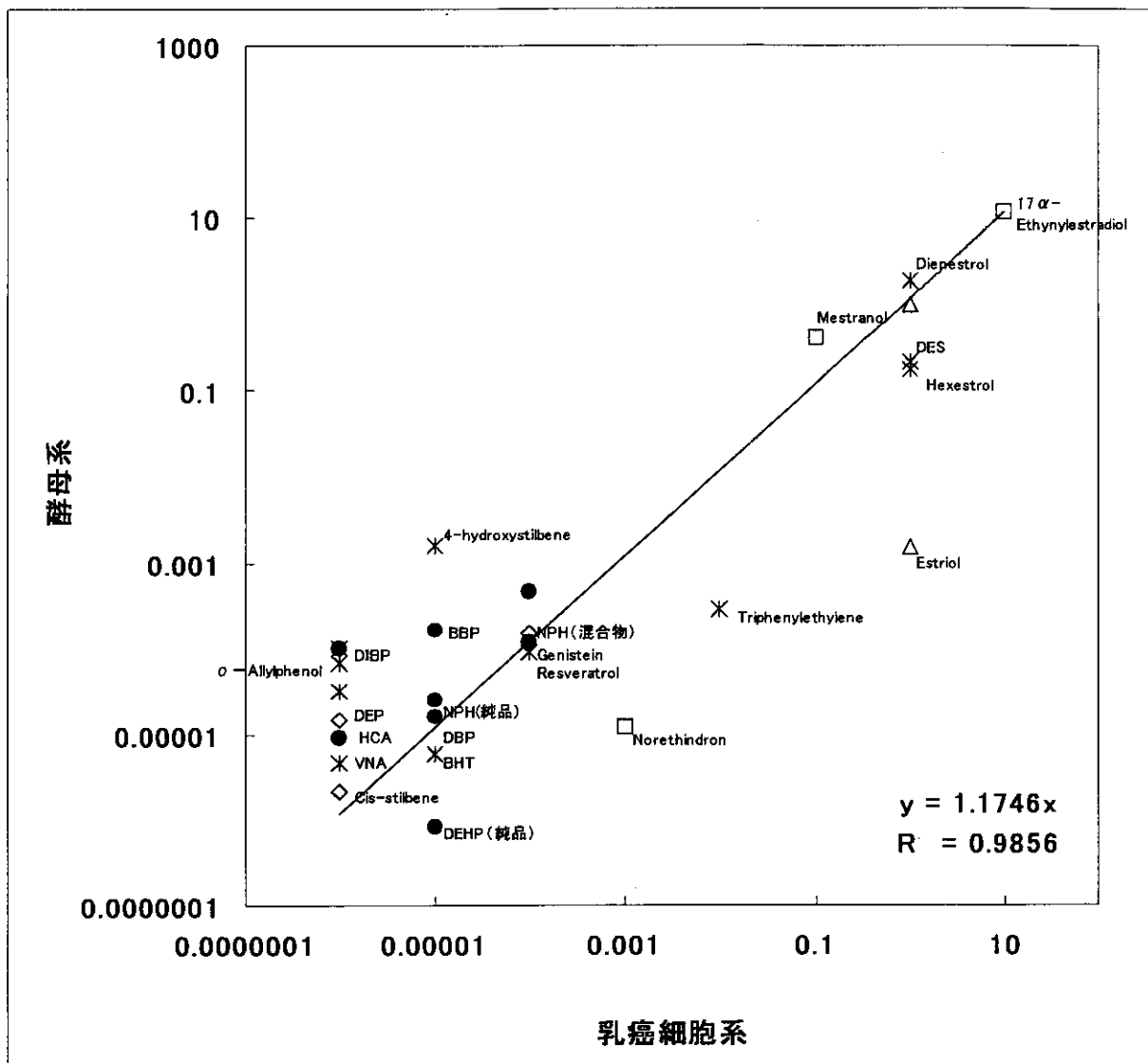


図3. 27種類の化合物における乳癌細胞系と酵母系の比活性値の相関

* : Dodds 関連物質、 ● : プラスチック関連物質、 ◇ : 天然物成分化合物、
□ : 医薬品、 △ : 天然エストロゲン成分化合物

厚生省科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
（分担）研究報告書

生活環境中の化合物のラット膣スメアテストスクリーニング

分担研究者 片瀬隆雄 日本大学生物資源科学部

研究要旨：18種の化合物のラット膣スメアテストでエストロゲン活性を検索した。過去にDodds らによって検索された6種の化合物について実施した本実験結果とDodds 結果とのよい相関がみられ、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。12種の日常生活で使用されている化合物の結果、医薬品のエチニルエストラジオール活性はエストラジオールやDESとほぼ同程度の活性であった。メストラノールの活性はその10分の1程度であった。天然物のレスベラトロールやフェルラ酸の強度はBPAと同程度の強度であった。*i*-ノニルフェノール（*i*-NPH）もBPAと同程度であった。5種のフタル酸エステルはいずれも、投与量の範囲でエストロゲン活性を示さなかった。ラット等によるエストロゲン活性強度は子宮重量測定によって実施されているが、ラット膣スメア法はその反応を経時的に観察できる利点を有する。また、すでに、実施されたDodds 化合物との比較検討が可能な点も有利といえる。今後、他の日常生活で使用されている化合物のテストも実施し、*invitro* の細胞培養系と合わせて、*in vivo* のエストロゲン活性スクリーニングを実施する計画である。

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

ジェチルスチルベストロール（DES）は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が、1938年にDodds らによって偶然発見された¹⁾。その後、Dodds らのエストロゲン活性化合物はDESの他に、ジェンストロール、ヘキセストロールなどが医薬品に使用されている。当時、Dodds らは、標準化した膣スメアテスト²⁾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1程度の活性を有する化合物を含めると、45種類の化合物を明らかにした。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³⁾。現在、このエストロゲン活性を有することが内分泌攪乱作用の一つとされ⁴⁾、この検討課題となっているビスフェノールA（BPA）及びノニルフェノールなどのアルキルフェノールであるプロピルフェノールなどはすでにDodds 化合物の一つに含まれている。

そこで、Dodds らの検索にない化合物で現在の日常生活で使用されているエチニルエストラジオール（EE₂）、メストラノールをはじめ天然物や化学合成製品のフタル酸エステルなどの化合物の標題のテスト

によるスクリーニングを行った。また、6種のDoods 化合物についても実施する事により、Dodds らの実験結果と比較して、本実験の有効性を確認した。

2. 方法

膣スメアテストは、Dodds らの標準化法²⁾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、頸推脱旧により殺処分後、胸腔、腹腔を開き、全身臓器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。

3. 結果及び考察

18種の化合物の、ラット膣スメアテストの結果を表1に示す。

まず、6種のDoods 化合物について実施した本実験結果とDodds 結果とのよい相関がみられた。したがって、本実験が有効であることを確認した。ついで、12種の日常生活で使用されている化合物の結果、医薬品のEE₂の活性はエストラジオール(E₂)やDESとほぼ同程度の活性であった。メストラノールの活性はその10分の1程度であった。EE₂やメストラノールは避妊薬ピルとして利用されている。天然物の

レスベラトロールやフェルラ酸の強度はBPAと同程度の強度であった。レスベラトロールは果物のブドウの果皮や種子に、フェルラ酸は野菜をはじめ多くの陸上植物等に含まれる。*i*-ノニルフェノール(*i*-NPH)もBPAと同程度であった。ポリ塩化ビニルの可塑剤として汎用されている5種のフタル酸エステルは強度はいずれも、投与量の範囲でエストロゲン活性を示さなかった。

ラット等によるエストロゲン活性強度は子宮重量測定によって実施されているが、ラット膣スメア法はその反応を経時的に観察できる利点を有する。また、すでに、実施されたDodds 化合物との比較検討が可能な点も有利といえる。今後、他の日常生活で使用されている化合物のテストも実施し、*in vitro*の細胞培養系と合わせて、*in vivo*のエストロゲン活性スクリーニングを実施する計画である。

4. 文献

- 1) Dodds, E.D., L. Goldberg, W. Lawson, R. Robinson: Estrogenic activity of certain synthetic compounds, *Nature*, 141:247, 1938.
- 2) 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.
- 3) 片瀬隆雄, Dodds による合成エストラス効果化合物の内分分泌攪乱作用の定量化, *化学工業*, 49:913-920, 1998.
- 4) J.W. Jost, Executive summary, *IUPAC*, 70(9), v-vii, 1998.