

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明

—— GC/MS 分析のノウハウ（ブランクの扱いなど）
及び LC/MS 分析（フェノール類など）について ——

主任研究者 中澤 裕之
星薬科大学
研究協力者 松岡 広和、佐久井 徳広、滝埜 昌彦
横河アナリティカルシステムズ株式会社

研究要旨

内分泌攪乱化学物質の GC/MS を用いる微量分析において、分析の注意点やブランクの扱いなど分析上のノウハウに関する知見を報告する。

また、内分泌攪乱化学物質の疑いのあるジクロロフェノール、ビスフェノール A 及びアルキルフェノール類の微量分析において、LC/MS を用いる高感度分析法の知見を報告する。

A. 研究目的

内分泌攪乱化学物質の分析では、極低濃度までの測定が要求される。そのため、これまでの通常分析においてはそれほど注意を払う必要のなかった部分がクローズアップされてきている。これら化学物質の中でも特に注目度の高いフタル酸エステル類、ビスフェノール A について、分析の注意点やブランクの扱いなど GC/MS 分析上のノウハウに関する知見を報告する。

また、内分泌攪乱化学物質の分析は、通常 GC/MS を用いる手法が多く使用されている。しかし、極性物質の測定においては、誘導体化が不要で再現性も優れている LC/MS を用いる手法が注目されてきた。例えば、ジクロロフェノール、エストラジオール更にはビスフェノール A、アルキルフェノールといった水酸基を有した弱酸性化合物は、吸着性が強いため GC/MS 分析において前処理で誘導体化を行う必

要がある。しかし、誘導体化は複雑なため、より簡便な手法として LC/MS が注目を集めている。そこで、大気圧イオン化法(API)を使用した LC/MS 法の高感度化についての知見を報告する。

B. 研究方法

使用した GC/MS は通常の四重極タイプである。また、使用した LC/MS の構成図は図.1 に示す。この図に示したイオン源は API の代表的イオン源であるエレクトロスプレーイオン化(ESI)法である。また分析条件については各分析手法でのクロマトグラムに示した。

C. 研究結果及び考察

1. GC/MS 分析上のノウハウ
- 1-1. フタル酸エステル類の分析
- (1) フタル酸エステルの汚染に対する解決ポイント

フタル酸エステル類の汚染があった時、全体からひとつひとつ汚染源を特定していくのではなく、なにも無い状態からひとつひとつ条件を付加していくことが肝要である。

段階的解決のポイントに関する知見を報告する。

(2) 装置ブランク

フタル酸エステルブランクチェックメソッドを読み込み、インジェクターにシリンジを装着せず GC/MS をスタートさせる。なお、1 回目の分析では必ずフタル酸エステルのピークは検出される。この原因として、スプリットベントラインが汚染されていることが考えられる。この汚染は大量のキャリアガス (200ml/分) でパージすることにより、低減することができる。通常かなり汚染されていても、装置ブランクはパージ流量のコントロールによりほぼ解消される。

装置ブランクおよび溶媒ブランクの一例を図 2 に示す。

(3) 注入ブランク

フタル酸エステルのピークが無くなれば、次にシリンジを装着して同じように空打ちする。ピークが検出されれば、セプタム、ライナー、ゴールドシール、カラムの順にチェックする。この中で効果が大きいのは、ゴールドシールの交換である。また、セプタムの交換はくれぐれも容器から出したばかりの新品を付けず、あらかじめアルミホイルにくるみオープンで焼いておいたものを使用する。新品を使用する場合は、アルミ缶に入ったグリーンセプタムが望ましい。また、マイクロシールセプタムを使用する場合も十分に焼出しを行う。装着後の汚染に気付いた際、注入口の温度を 320 度位にしてしばらく放置しておく。また、

カラムは注入口側を 30cm 位切ると良い。同時にピーク形状の改善も期待できる。

(3) 溶媒ブランク

フタル酸エステルのピークが無くなれば (DBP は少し残ることもある)、抽出に使用する溶媒を測定する。バイアルキャップも袋から出し、デシケータ等に保存して置くと良い。バイアルキャップはテフロンタイプが良い。しかし、シリンジで孔があくと収縮しないので、サンプルを放置しておくことはできない。シリコン製のバイアルキャップは使用しない方が良い。イオン 147 にブランク (シロキサン) が存在し、同位体イオンの関係でイオン 149 の妨害となりかねないためである。

市販品溶媒の中で最もクリーンなものは、DBP のみ少量検出される。DEP や DEHP が検出される溶媒は、程度にもよるが抽出溶剤としては控えた方が良い。溶媒ブランクの確認は、抽出操作を行う前に必ず行う必要がある。なお、空打ちを行っているので、溶媒を注入すると流路よりフタル酸エステル類が洗い流されてくることがある。2 回目に検出された成分の感度が下がるようであれば、下がりきるまで何回か打って確認する。

(4) 操作ブランク

実際の抽出操作に従ってサンプルを入れず、溶媒だけで行う。器具の汚染は殆ど DEHP である。器具は使用直前に分析済みの溶媒でかるく流す。溶媒ブランクと同様の値が理想である。

(5) リファレンス

実際の抽出操作に従ってリファレンスとなる水の測定を行う。現在のところフタル酸エステルの含まれない

水はない。また、前処理はなるべく簡素化することが望ましい。濃縮はコンタミやパージによる飛散があるため、行わない方がよい。さらに、塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウムの添加はどんなに焼き出したものでもコンタミは避けられないので、少量の添加が望ましい。

(6) サンプル測定

サンプルの測定値とブランク値との差が小さく、しかもブランク値が高い時、その差を分析値として採用すべきかは疑問の残るところである。

1-2. ビスフェノールAの分析

(1) ビスフェノールAのブランクに対する解決ポイント

ビスフェノールAのブランクはなかなか無くならない。これはビスフェノールが吸着性の強い化合物であること、そのために誘導体化をしなければならぬこと、さらに分析カラムにポリカーボネートが使用されていることなどが考えられる。従って、GC/MS分析より測定感度は下がるが、HPLCやLC/MS分析の方が望ましいと言える。しかし、ここではビスフェノールAのGC/MS分析におけるブランク解決方法に関する知見を報告する。

(2) 吸着

ビスフェノールAはフェノール水酸基が2つあるため、極性が強く吸着も強い。特にガラスライナーには吸着し、5%ほど残ってしまう。

(3) 誘導体化

ビスフェノールAはGC/MSにより、誘導体化せずそのまま分析しても1 ppb位まで検出できるが、誘導体化分析が一般的である。誘導体化はトリメチルシリル(TMS)化が簡単で、1mlのサンプルに対しBSTFAを50~100 μ l位添加し、20~30分放置すれば簡

単に反応する。一つの水酸基を誘導体化すると5倍ほど感度が上がる。ビスフェノールAの場合は二つ水酸基があるので、そのままの分析より10倍位感度が上がる。この際、水酸基を持つ溶媒(水、メタノール)が入っていると反応しない。誘導体化試薬添加の際、白煙が出てサンプルが多少暖くなれば、反応していない証拠である。

(4) 分析カラム

ビスフェノールAの分析に際して、まず溶媒を、次に溶媒にBSTFAを添加した試料を分析してみる。この時、多少のビスフェノールAのピークが確認できるはずである。概略値として0.1~0.2 ppbであり、この値をゼロにすることはできない。この原因としてビスフェノールAが誘導体化剤に存在する、ライナーに以前のものが吸着している及びカラムに存在するなどが考えられる。まず、溶媒にBSTFAを添加した試料を1, 2, 4 μ lと注入してリニアリティーがあれば、誘導体化剤が原因と推定できる。リニアリティーがなく、ガラスライナーを交換して数値が下がれば、吸着が原因と推定できる。カラムの注入口側及びインターフェース側を15cmほど切り、リニアリティーが復活すれば、カラムが原因と推定できる。カラムが原因の場合、カラムのエージングを低温からしっかりとすることが肝要である。

(5) サンプル測定

ビスフェノールAは、アルキルフェノールと性質は全く違っており、無極性の溶媒には殆ど回収されない。また、浮遊固形物(SS)には強力に吸着するので、別に回収、抽出し、溶液部と合わせると良い。

2. 大気圧イオン化(APCI)でのアルキルフェノールの分析

2-1. ESI法との比較

ビスフェノール類及びアルキル類は、弱酸性の化合物であるイオンモードでの測定が有効である。しかし、水酸基解離は弱く、ESI法では感度が低いので、APCI法が有効である。特にアルキルフェノール類の感度は、APCI法が3~10程度高い(図.3)。この要因は、APCIでは移動相溶媒がイオン化され、そのイオンが分子/イオン反応を起こしてアルキルフェノール類の水酸基からプロトン(H⁺)を強制的に引抜くためである。従って、アルキルフェノールの様な溶液中で解離が少ない化合物は、APCIが有効である。

2-2. APCIでの加圧ガスの影響

APCIでアルキルフェノール類を測定する場合、通常移動相溶媒のイオンがプロトンを引抜く役割をする。しかし、弱酸性化合物である場合その能力は低く、十分にプロトンが脱離せず、イオン化効率が低い場合が多い。そこで、より高率良くプロトンを脱離させるため、加圧ガスに圧縮空気や高純度酸素を使用して通常の場合と比較した。その結果、ビスフェノールA及び代表的なアルキルフェノール類で高純度酸素を使用することで、感度が2倍以上向上した(図.4)。

この原因は、酸素ガスがイオン源内でイオン化されてO⁻やO₂⁻が大量に発生し、このイオンがプロトンの脱離を促進させたためと考えられる。従って、通常使用される窒素ガスを高純度酸素ガスに変更することは有効である。

2-3. スキマーCID

通常API法で測定したLC/MSで得られるマススペクトルは、GC/MSの

EI法とは異なりフラグメントイオンが少なく、プロトンが付加あるいは脱離した擬分子イオンが主イオンで、構造由来のフラグメントイオンは非常に少ない。しかし図.1で示したイオン源のフラグメンターゾーンと呼ばれるキャピラリーとスキマー間では、真空度が3 torr程度と低いため、大量の窒素ガスが存在する。従って、キャピラリー出口の印可電圧を高くし、飛び出してくるイオンを加速させることでイオンと窒素ガスとの衝突を増大させ、イオンを解裂させフラグメントイオンを生成させることが可能である。この手法は、スキマーCID(衝突誘導解裂)と呼ばれ、構造解析に用いられる。本研究においてもフラグメンター電圧を変更し、マススペクトルの測定を行った。その結果、100Vでは擬分子イオンのみが観察されたが、200Vではn-アルキルフェノールではアルキル基が脱離したイオン(m/z=106)が特徴的に観察され、t-アルキルフェノールではt-ペンチル基が脱離したイオンが観察された(図.5)。

2-4. SIMモードでの分析

微量分析においてはSIMモードが有効である。LC/MSにおいても同様であり、各化合物のベースピークイオンをターゲットイオンとして、SIMモードで測定を行った。その結果、1ppbにおいてすべてのアルキルフェノール及びビスフェノールAは、検出可能であった(図.6)。

D. 結論

これまでの研究において、分析の注意点やブランクの扱いなど内分泌攪乱化学物質の分析に関する問題点が明らかになってきた。しかし、ブランクの問題点を抱えての極低濃度にお

ける分析では、分析者の注意力や熟練の差が測定結果の信頼性に大きな影響を与えることは事実である。それをサポートするため、分析上のノウハウや新しい知見については、今後も情報を提供していくつもりである。

また、内分泌攪乱化学物質の分析には従来 GC/MS 法が主に用いられてきた。しかし、誘導体化が必要な化合物も多く、分離分析としてガスクロマトグラフィー法が必ずしも適切とは言えない。HPLC 法は検出器の感度、選択性に問題があった。ところが、近年 LC/MS 法が普及し、LC/MS 法による内分泌攪乱化学物質の分析が注目を集めている。我々は、今後も LC/MS 法の様々な検討を行い、新しい知見については情報を提供していくつもりである。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

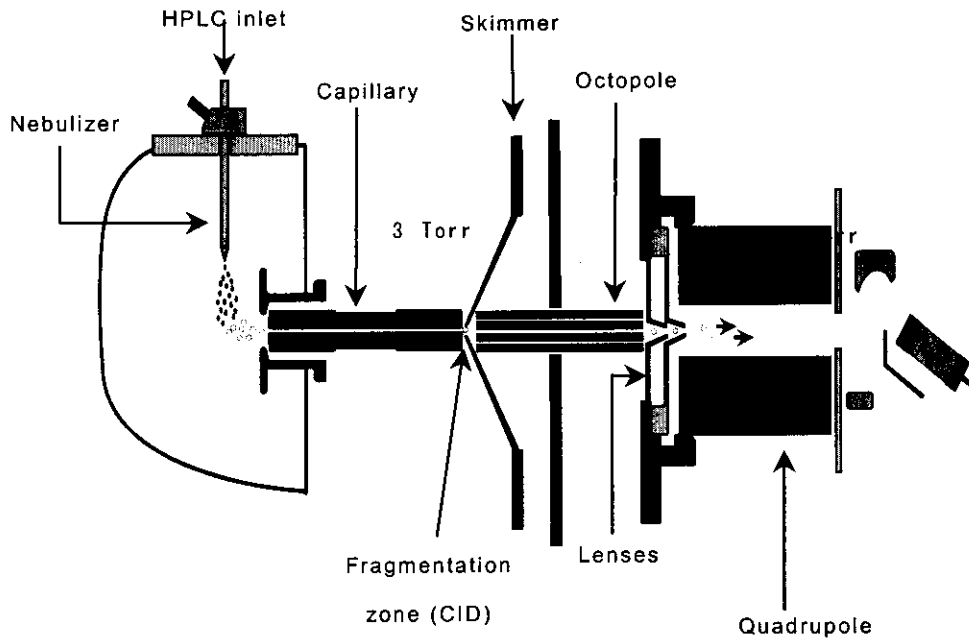


図.1 LC/ESI-MS の構成図

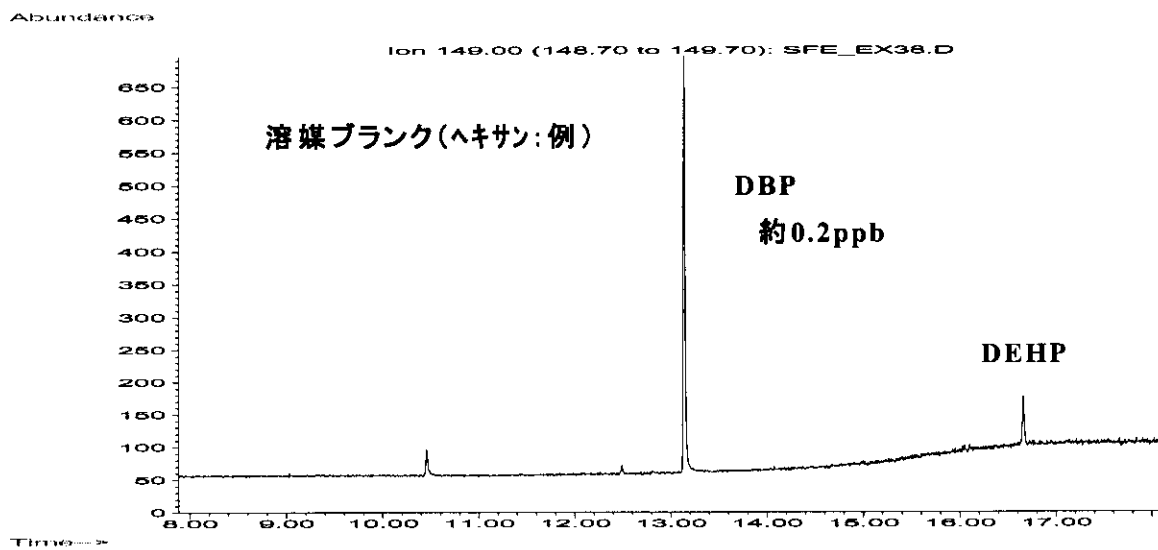
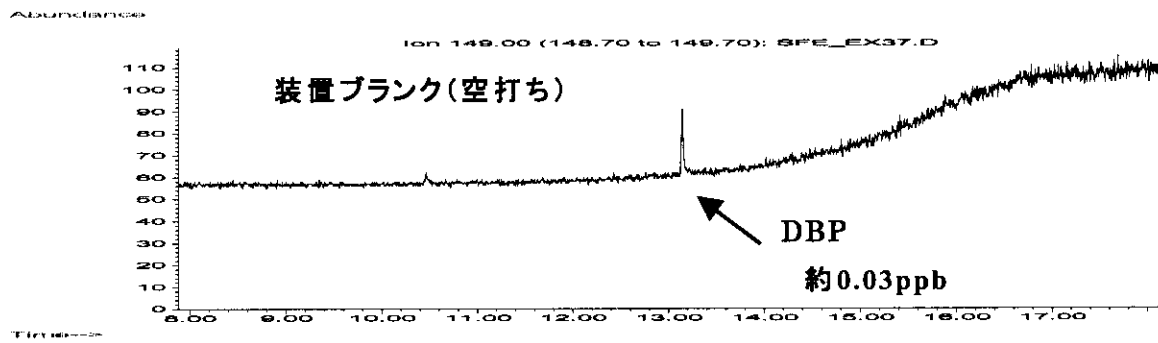


図.2 装置ブランクおよび溶媒ブランク

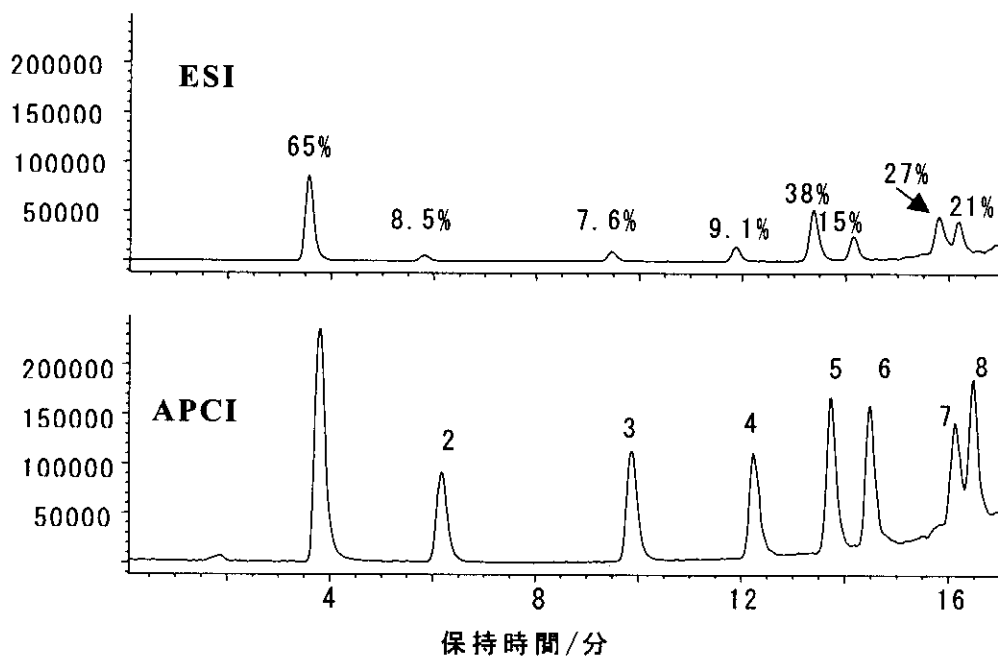


図. 3 ビスフェノール A, アルキルフェノール類の TIC(20ppm)

(Condition)

Column: Zorbax Eclips XDB C18(150mm, 4.6mm, 5 μ m), Oven temp: 40°C

A: MeCN, B: 10mMCH₃COONH₄ 50%A/B---(20min)---100%A, Flow rate: 0.2ml/min

Scan range : 100-500amu, Fragmentor voltage: 60V, polarity: Positive ion mode

1: Bisphenol A, 2: 4-t-Butylphenol, 3: 4-n-Pentylphenol, 4: 4-n-Hexylphenol,

5: 4-t-Octylphenol, 6: 4-n-Heptylphenol, 7: Nonylphenol, 8: 4-n-Octylphenol

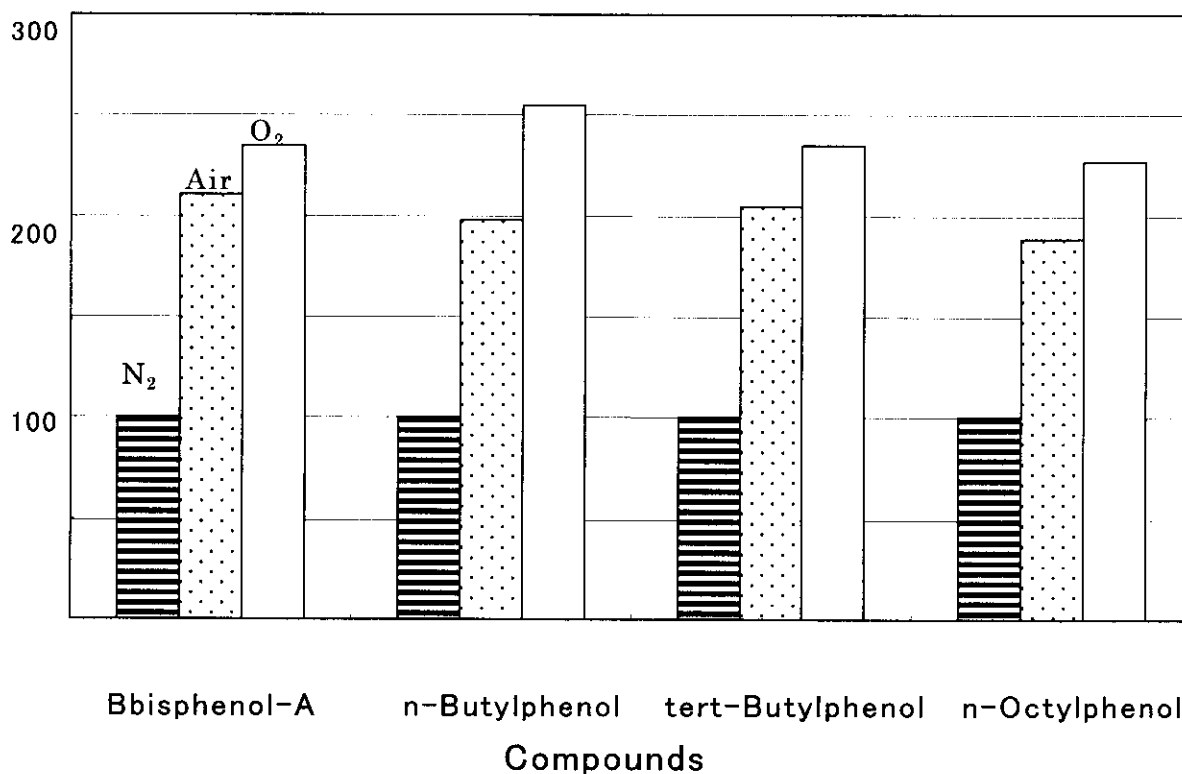


図. 4 APCI 加圧ガスの違いによる各化合物の相対強度(N₂:100)

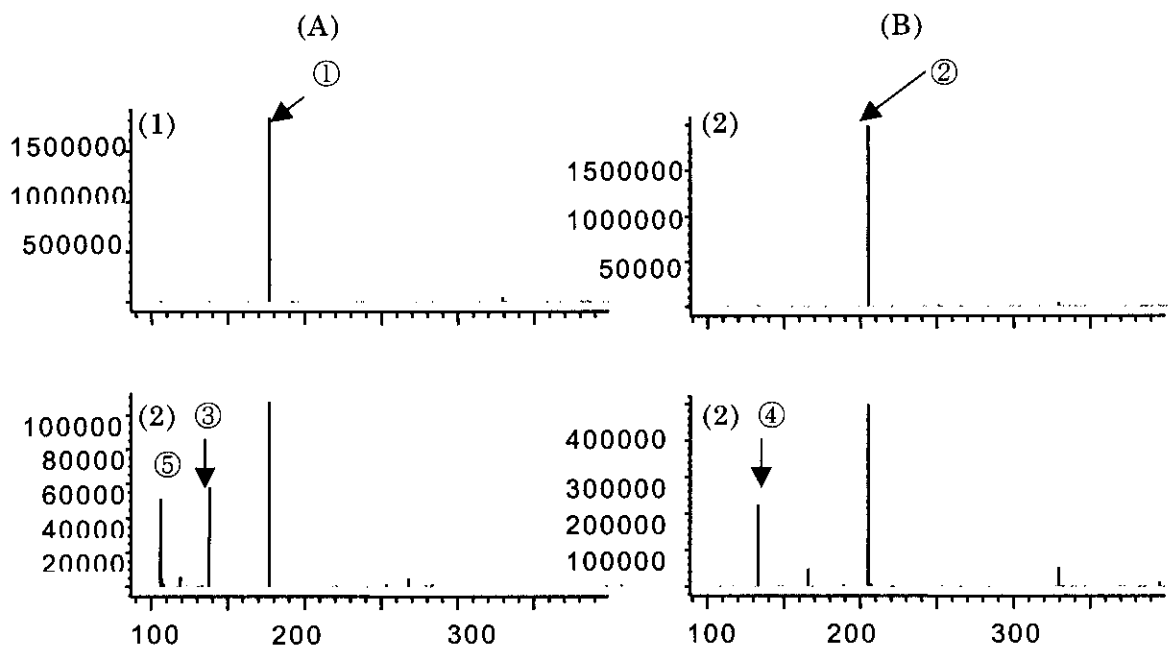


図.5 スキマーCIDによるアルキルフェノール類のマスペクトル

(A):4-n-Hexylphenol, (B):4-t-Octylphenol

Fragmentor Voltage(V) ; (1):100V, (2):200V

①:177(M-H)-, ②:205(M-H)-, ③:138)-, ④:133[M-H-(CH₃)₃CHCH₂]-,

⑤:106(CH₂C₆H₄O)-

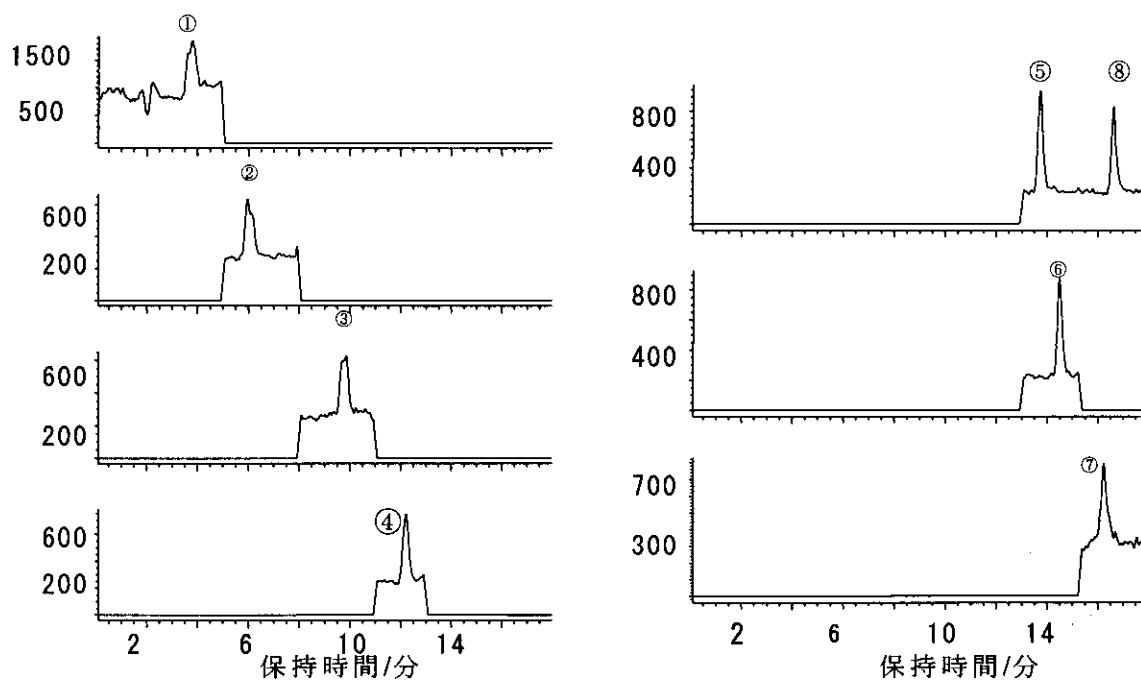


図.6 ビスフェノール A 及びアルキルフェノール類の SIM クロマトグラム

(1ppb)

①:Bisphenol A, ②:4-t-Butylphenol, ③:4-n-Hexylphenol, ④:4-n-Pentylphenol

⑤:4-t-Octylphenol, ⑥:4-n-Heptylphenol, ⑦:Nonylphenol, ⑧:4-n-Octylphenol

平成 12 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

主任研究者：中澤裕之 星薬科大学薬品分析学教室教授

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

分担研究者：畑山善行

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 法を用いてビスフェノール A 誘導体（ビスフェノール A ジグリシジルエーテル類）、臭素化ビフェニル、臭素化ジフェニルエーテル、ベンゾフェノン誘導体等の S-9 代謝産物のエストロジェン様作用を評価した。低臭素化ビフェニル（臭素数：0～5）、モノ臭素化ジフェニルエーテル及びベンゾフェノン誘導体にエストロジェン様作用が認められた。ビスフェノール A 誘導体にはエストロジェン様作用は認められなかった。

また、甲状腺ホルモン受容体を導入した酵母を用いた酵母 Two-Hybrid 法によって、フタル酸エステル類及びアルキ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甲状腺ホルモン様作用を評価した。o-イソプロピルフェノール及び o-t-ブチルフェノールに甲状腺ホルモ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、エストロジェン受容体 (ER)、アンドロジェン受容体 (AR) または甲状腺ホルモン受容体 (TR) を各々導入した酵母を用いた Two-Hybrid 法を行い、化学物質及びその代謝産物について内分泌かく乱作

用を多面的に評価する。酵母 Two-Hybrid 法による内分泌かく乱作用の評価は、簡便でかつその作用機構も明確である。また、S-9 mix による化学物質の代謝を操作過程に組み込むことができる。ER、AR または TR を導入した酵母を利用することによってこれら受容体を介して内分泌かく乱作用を示す化学物質及び代謝産物の一次スクリーニングの一翼を担うことができる。本研究を遂行することによって高分子素材からなる生活関連製品由来化学物質の生体影響を評価するうえで有用な基礎的情報を得ることが期待される。

B. 研究方法

B-1. 酵母 Two-Hybrid 法による

エストロジェン様作用の検出

ER-GAL4DBD (Estrogen receptor α - GAL4 DNA binding domain fusion protein) 及び TIFII-GAL4AD (TIFII-GAL4 activation domain fusion protein) を発現させた酵母を前培養した。この酵母を $OD_{595} = 0.15$ 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、30 °C で 4 時間の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、 OD_{595} 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 で 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 で 30 分間のインキュベーションを行った。 OD_{410} 及び OD_{570} 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 OD_{595} 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. S-9 mix 処理

Cofactor I 溶液 (0.8 mM NADPH, 0.8 mM NADH, 1.0 mM G-6-P, 0.4 u/ml G-6-P デヒドロゲナーゼ, 20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 , 6.6 mM KCl, 及び 1.6 mM $MgCl_2$)

に 20 μ l/ml になるように ラット S-9 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 で 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 S-9 を用いた。各実験時に S-9 mix の活性の保証として 1.0×10^{-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. 酵母 Two-Hybrid 法による

エストロジェン様作用の検出

(S-9 mix による代謝産物)

ER-GAL4DBD 及び 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 $OD_{595} = 0.30$ 前後になるように懸濁した。これと前述の S-9 mix 処理溶液とを容量比 1:1 で混和し、30 °C で 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。

B-4. 酵母 Two-Hybrid 法による

甲状腺ホルモン様作用の検出

TR-GAL4DBD (Thyroid hormone receptor α - GAL4 DNA binding domain fusion protein) 及び TIFII-GAL4AD (TIFII-GAL4 activation domain fusion protein) を発現させた酵母を前培養した。これを $OD_{595} = 0.01$ 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、30 °C で 24 時間のインキュベーションを行った。以下、B-1 (エストロジェン様作用の

検出) に記した方法に従って、産生された β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

B-5. 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. 酵母 Two-Hybrid 法によるエストロジェン様作用の検出 (S-9 mix による代謝産物)

C-1-1. ビスフェノール A 誘導体

酵母を 1.0×10^7 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、 2.5×10^{-10} M であった。

ビスフェノール A の S-9 mix 処理時の EC_{10} は 2.8×10^5 M であった。また、S-9 mix による代謝を施さない場合、ビスフェノール A の EC_{10} は 1.1×10^5 M であった (表 1)。

ビスフェノール A ジグリシジルエーテル (BADGE)、ビスフェノール A ジグリシジルエーテル二塩化水素付加体 (BADGE \cdot 2HCl) 及びビスフェノール A ジグリシジルエーテル二水付加体 (BADGE \cdot 2H $_2$ O) の S-9 mix 代謝産物にエストロジェン様作用は認められなかった。また、S-9 mix による代謝を施さない場合もこれら化学物質にエストロジェン様作用は認められなかった。

C-1-2. ベンゾフェノン誘導体及びその他の紫外線吸収剤

ベンゾフェノン誘導体であるオキシベンゾン (2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン) 及びジオキシベンゾン (2,2'-ジヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン) の S-9 mix 代謝産物にエストロジェン様作用が認められた。また、サリチル酸 4-*t*-ブチルフェノールエステルの S-9 mix 代謝産物にエストロジェン様作用が認められた。

S-9 mix による代謝を施さない場合、オキシベンゾン及びジオキシベンゾンに微弱なエストロジェン様作用 (1.0×10^{-7} M エストラジオール作用時の 10% 未満の活性) が認められた。また、サリチル酸 4-*t*-ブチルフェノールエステルにエストロジェン様作用は認められなかった。

C-1-3. フタル酸エステル類及びスチレントリマー

フタル酸ジブチル、フタル酸シクロヘキシル、フタル酸ジエチルヘキシル及びフタル酸ベンジルブチルの S-9 mix 代謝産物にエストロジェン様作用は、認められなかった。S-9 mix による代謝を施さない場合、フタル酸ベンジルブチルに微弱なエストロジェン様作用 (1.0×10^{-7} M エストラジオール作用時の 10% 未満の活性) が認められた (表 1)。

また、スチレントリマーである 1*a*-フェニル-4*e*-(1-フェニルエチル)1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン、1*e*-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*e*-フェニル-4*e*-(1-フェニルエチル)

1,2,3,4-テトラヒドロナフタレンの S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用は認められなかった。

S-9 mix による代謝を施さない場合においても、これらのスチレントリマーにエストロゲン様作用は認められなかった。

C-1-4. 臭素化ビフェニル (PBB)、臭素化ジフェニルエーテル (PBDE) 及びテトラブロモビスフェノール A

ビフェニル、4-臭素化ビフェニルの S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められた。2,4',5'-三臭素化ビフェニル及び 2,2',4',5,5'-五臭素化ビフェニルの S-9 mix 代謝産物に微弱なエストロゲン様作用が認められた (最大活性: 1.0×10^{-7} M のエストラジオール作用時の10%未満、表 2)。4,4'-二臭素化ビフェニル、2,2',4,4',5,5'-六臭素化ビフェニル及び十臭素化ビフェニルの S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用は認められなかった。六臭素化ビフェニル、または八臭素化ビフェニルを主成分とする工業製品 (各々 BP-6 及び FR-250) の S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用は認められなかった。

ジフェニルエーテル及び 4-臭素化ジフェニルエーテルの S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められた。4,4'-二臭素化ジフェニルエーテル、十臭素化ジフェニルエーテル、及び 2,2',4,4',5,5'-六臭素化ジフェニルエーテルを主成分とする工業製品の S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用は認められなかった。

テトラブロモビスフェノール A の S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用は認

められなかった。

S-9 mix による代謝を施さない場合、上記の臭素化ビフェニル、臭素化ジフェニルエーテル及びテトラブロモビスフェノール A にエストロゲン様作用は認められなかった。

C-2. 化学物質の甲状腺ホルモン様作用の評価

C-2-1. 酵母 Two-Hybrid 法による甲状腺ホルモン様作用の検出

酵母に甲状腺ホルモン様作用のアゴニストである 3,5,3'-トリヨードチロニン (T3) を 4 時間作用させた。 1.0×10^{-6} M の T3 作用時に最も高い β -ガラクトシダーゼ活性が認められた。 1.0×10^{-6} M の T3 作用時の β -ガラクトシダーゼ活性を 100% としたとき、 EC_{10} は、 4.0×10^{-8} M であった。検出感度の改善を図るため、インキュベーション時間を 24 時間に延長した。4 時間作用時と同様に 1.0×10^{-6} M の T3 作用時に最も高い β -ガラクトシダーゼ活性が認められた (図 1)。 1.0×10^{-6} M の T3 作用時の β -ガラクトシダーゼ活性を 100% としたとき EC_{10} は、 2.1×10^{-8} M であった。また、T3 と同じく甲状腺ホルモン様作用のアゴニストである 3,5,3',5'-テトラヨードチロニン (T4) を 24 時間作用させた際の EC_{10} は、 4.2×10^{-8} M であった。

C-2-2. フタル酸エステル類及びアジピン酸エステル類

フタル酸エステル (10 種類)、アジピン酸エステル類 (7 種類) 及びその他の可塑剤 (3 種類) に甲状腺ホルモン様作用は、認められ

なかった (表 3)。

C-2-3. アルキルフェノール類

アルキルフェノール類 (*p* 位:14 種類、*o* 位: 6 種類、*m* 位:2 種類)、BHT 等のフェノール残基を有する化学物質 (6 種類) の甲状腺ホルモン様作用を評価した。*o*-イソプロピルフェノール及び *o*-*t*-ブチルフェノールに甲状腺ホルモン様作用が認められた (表 4)。 EC_{10} は、各々、 $3.1 \times 10^{-4} M$ 及び $4.8 \times 10^{-5} M$ であった。他のアルキルフェノール及びフェノール残基を有する化学物質に甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった。

C-2-4. パラベン及び安息香酸類

パラベン類 (5 種類)、*p*-ヒドキシ安息香酸ナトリウム及び3-フェノキシ安息香酸に甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった (表 5)。

C-2-5. ビスフェノール A 誘導体及びポリカーボネート樹脂原料

ビスフェノール A 誘導体及びポリカーボネート樹脂原料に甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった (表 5)。

C-2-6. ベンゼン誘導体

フェノール、アルキルベンゼン、ビフェニル及び *trans*-スチルベンに甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった (表 5)。

C-2-7. その他の化学物質

チロシン誘導体、ベンゾフェノン誘導体、サリチル酸 4-*t*-ブチルフェノールエステル及び臭素化ジフェニールエーテルに甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった (表 5)。

D. 考察

D-1. 化学物質の S-9 mix 代謝産物のエストロジェン様作用の評価

BADGE、BADGE·2HCl 及び BADGE·2H₂O は、S-9 mix による代謝過程を与えてもエストロジェン様作用を示さなかったことから、S-9 mix による *O*-脱アルキル化反応を受けてビスフェノール A に変換されている可能性は低いと思われる。BADGE 等の基本構造となるビスフェノール A のエストロジェン様作用は、S-9 mix による代謝過程を与えても著しい変化は認められなかった。しかしながら、ビスフェノール A が S-9 mix による代謝を受けることによって更に強いエストロジェン様作用を示す代謝産物が、生成している可能性があると推測している研究者もいる。このためビスフェノール A の S-9 mix による代謝産物については、HPLC による分画及び個別のエストロジェン様作用の評価を行うことも検討しなくてはならない。

オキシベンゾン、ジオキシベンゾン及びサリチル酸 4-*t*-ブチルフェノールエステルは、S-9 mix による代謝を受けることによってエストロジェン様作用を示した。オキシベンゾン及びジオキシベンゾンは、メトキシフェニル基を有しており、これが S-9 mix による *O*-脱アルキル化反応を受けてフェノール残基に変換されてエストロジェン様作用を示したと考えられる。サリチル酸 4-*t*-ブチル

フェノールエステルについては S-9 画分に存在するエステラーゼによる加水分解反応を受け、4-*t*-ブチルフェノールが生成したと思われる。4-*t*-ブチルフェノールがエストロジェン様作用を示すことは、昨年の本研究の報告書にて記述した（平成 11 年度厚生科学研究報告書“高分子素材からなる生活関連製品由来の内分かく乱化学物質の分析及び動態解析” p.189）。従って、4-*t*-ブチルフェノールが活性代謝産物と考えられる。オキシベンゼンは、紫外線吸収成分として化粧品に使用されている。さらに、オキシベンゼン、ジオキシベンゼン及びサリチル酸 4-*t*-ブチルフェノールエステルは、食品包装容器の紫外線吸収剤として添加されている。これら化学物質の化粧品からの吸収及び消長、また、食品容器包装からの溶出、食品への移行、並びに摂取量について調査及び研究することは、公衆衛生学上、意義のあることと考える。

フタル酸エステル類は、S-9 mix による代謝を受けてもエストロジェン様作用を示さなかった。肝ミクロソーム分画に存在するエステラーゼによる加水分解反応を受け、フタル酸モノエステル、またはフタル酸に分解されていると推察される。

イソプロピルベンゼン及びプロピルベンゼンは、S-9 mix による代謝を受けてもエストロジェン様作用を示さなかった。トルエンが肝臓においてベンジルアルコールに変換されるように S-9 mix による水酸基は、芳香環ではなくアルキル基の芳香環に結合している炭素に導入されたと考えられる。

スチレンダイマー (*trans*-1,2-ジフェニルシクロブタン、*cis*-1,2-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 (1,2,6-

トリフェニル-1-ヘキセン) の代謝産物にエストロジェン様作用が認められることを昨年、本研究において報告した³⁾。今回、スチレントリマーに分類される 1*a*-フェニル-4*e*-(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その異性体の S-9 mix 代謝産物についてエストロジェン様作用を評価した。これら化学物質の S-9 mix 代謝産物は、エストロジェン様作用を示さなかった。これら化学物質は、かさ高い構造のため、芳香族水酸化反応を受けた代謝産物が生成してもエストロジェン受容体に対する結合性を有さなかったと思われる。

臭素化ビフェニル、臭素化ジフェニルエーテル及びテトラブロモビスフェノール A は、難燃剤として家電製品等に使用実績がある。とりわけ、臭素化ジフェニルエーテルは、近年、海洋生物及び母乳の高度な汚染が報告されている (Boer, J., *et al.*, *Nature*, **394**, 28, 1998; Noren, K., *et al.*, *Organohalogen Compounds*, **38**, 1, 1998)。これら化学物質の基本骨格を成すビフェニル及びジフェニルエーテルは、S-9 mix による代謝を受けることによってエストロジェン様作用を示した。ビフェニル及びジフェニルエーテルの二つのフェニル基の 4 位に臭素が導入されることによってエストロジェン様作用が消失することから、薬物代謝酵素による 4 位の水酸化が代謝によるエストロジェン様作用の発揮のうえで鍵になると考えられる。また、ビフェニルについて臭素化が高度になるにつれてエストロジェン様作用の低下が認められた。この理由については臭素化によって薬物代謝酵素によるフェニル基の 4 位の水酸化が阻害されている、もしくは、代謝産物のエストロジェン様作用が弱化されている、双

方の可能性が考えられる。ジフェニルエーテルについても構造上の類似により臭素化が高度になるにつれて同様にエストロゲン様作用が低下すると考えられる。テトラブロモビスフェノール A についてはフェニル基の 4 位に水酸基を有していることから、臭素の存在によってエストロゲン様作用が弱化されていると考えられる。工業的に使用実績のある臭素化ビフェニル（臭素置換数：6 以上）、臭素化ジフェニルエーテル（臭素置換数：4 以上）及びテトラブロモビスフェノール A は、生体内で代謝を受けてもエストロゲン様作用を発揮する可能性を本研究から見出せなかった。しかしながら、これら臭素化化合物は、光化学的に容易に脱臭素化反応を受ける (Watanabe I., *et al.*, *Environ. Contamination Toxicol.*, **39**, 953, 1987)。臭素化ジフェニルエーテルについては、紫外線照射によって短時間に脱臭素化を受けて低臭素化ジフェニルエーテル（臭素置換数：3 以下）が生成することが報告されている。本研究結果よりこれらは、代謝を受けることによってエストロゲン様作用を示す可能性が考えられる。従って、臭素化ビフェニル、臭素化ジフェニルエーテル及びテトラブロモビスフェノール A は、生活関連製品からの直接的摂取のみならず、製品廃棄後、環境中で生成した分解産物の食物連鎖を経た間接的摂取も検討する必要があると考えられる。

D-2. 化学物質の甲状腺ホルモン様作用の評価

甲状腺ホルモンが、神経細胞等の分化、増殖、及び細胞死、また生体のエネルギー代謝調節に重要な役割を果たすことは広く認識され

ているが、化学物質の甲状腺ホルモン受容体を介した生体への悪影響に関する情報は、著しく欠如しているのが現状である。生活関連製品由来の化学物質の甲状腺ホルモン様作用について TR を導入した酵母 Two-Hybrid 法を用いて評価した。

TR を導入した酵母 Two-Hybrid 法のインキュベーション時間を 4 時間から 24 時間に延長することにより T3 に対する EC_{10} は、 $4.0 \times 10^{-8} M$ から $2.1 \times 10^{-8} M$ になった。更にインキュベーション時間を延長しても酵母のフルグロースによる生育状況の悪化及び被検化学物質による毒性によって甲状腺ホルモン様作用の検出感度の向上は困難であった。従って、被検化学物質とのインキュベーション時間を 24 時間とした。

甲状腺ホルモン受容体の結晶構造の X 線解析によって、リガンドとの結合にリガンドが所有するフェノール性水酸基が重要な役割を果たしていることが明らかにされている (Wagner, R.L., *et al.* *Nature*, **378**, 690, 1995)。そこでフェノール残基を有するアルキルフェノールに重点を置いての甲状腺ホルモン様作用を評価した。その結果、*o*-イソプロピルフェノール及び *o-t*-ブチルフェノールに甲状腺ホルモン様作用が認められた。一方、*p*-アルキルフェノール及び *m*-アルキルフェノールに甲状腺ホルモン様作用は認められなかったことから、*o* 位にアルキル基を有することが作用を示す条件の一つと考えられた。また、*o*-アルキルフェノールのアルキル鎖長を変えて検討したところ、イソプロピル基及び *t*-ブチル基にのみ作用が認められた。このことから比較的厳密な置換基サイズのある条件があると考えられる。ヨウ素を含まない甲状腺ホルモンアゴニストとして GC-1

[3,5-ジメチル-4-(4'-ヒドロキシ-3'-イソプロピルベンジル) フェノキシ酢酸] の合成が報告されている (Chiellini, G., *et al.*, *Chemistry Biology*, **5**, 299, 1998)。GC-1 は、ヨウ素に代わる *o* 位の置換基としてイソプロピル基が採用されており、*o*-イソプロピルフェノール及び *o*-*t*-ブチルフェノールにおいても各々、イソプロピル基及び *t*-ブチル基が T3 の 3' 位のヨウ素をミミックしたと考えられる。

また、イソプロピルベンゼン及び *t*-ブチルベンゼンについて甲状腺ホルモン様作用を評価した結果、作用は認められなかった。このことから酵母 Two-Hybrid 法による検出システムにおいてもフェノール性水酸基の必要性が明らかになった。*o*-イソプロピルフェノール及び *o*-*t*-ブチルフェノールに認められた甲状腺ホルモン様作用が *in vivo* で発揮されうる作用であるかは不明であり、この結果の取扱いは慎重に行う必要がある。別の評価システム及び動物実験による結果のサポートが必要である。また、*p*-*t*-ブチルフェノールは、工業的に利用されており、*o*-*t*-ブチルフェノールを含む製品もある可能性がある。これら化学物質の生活関連製品中における存在量について検討することは興味深い。

フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類、パラベン類、ビスフェノール A 誘導体及び臭素化ジフェニルエーテル等の多岐にわたる化学物質の甲状腺ホルモン様作用を評価したが、作用を有する化学物質は見い出せなかった。これら化学物質が *o*-アルキルフェノールの検討から明らかになった作用を示す化学物質の構造上の二つの条件 (1, フェノール性水酸基を有する; 2, 水酸基に

対して *o* 位にイソプロピル基程度のかさを有する) を満たしていないためと考えられる。

甲状腺ホルモン様作用を示すためにリガンドに要求される構造上の特性は、エストロゲン様作用を示すための構造上の特性 (フェノール残基を有し、このフェノール性水酸基の *p* 位に疎水性の置換基を有する) と比較して限定的である。しかしながら、エストロゲン様作用と同様にフェノール性水酸基を有することが甲状腺ホルモン様作用を示すための鍵になることから化学物質の代謝産物についても精査する必要がある。PCB の代謝産物 (水酸化体) は、甲状腺ホルモンの輸送蛋白質のトランスサイレチンに対して T4 と競合的に結合し、甲状腺ホルモンの代謝をかく乱していることが報告されている (Cheek, A.O., *et al.*, *Environ. Health Perspect.*, **107**, 273, 1999)。従って、これらの化学物質と類似した構造を有する臭素化ジフェニルエーテル等の化学物質の代謝産物の甲状腺ホルモン様作用について重点的に検討することも必要であろう。

E. 結論

1. BADGE、BADGE・2HCl 及び BADGE・2H₂O は、S-9 mix による代謝過程の有無によらず、エストロゲン様作用は認められなかった。
2. ビフェニル、4-臭素化ビフェニル、2,4',5'-三臭素化ビフェニル及び 2,2',4',5,5'-五臭素化ビフェニルの S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められた。また、ジフェニルエーテル及び 4-臭素化ジフェニルエーテルの S-9 mix 代謝産物

にエストロゲン様作用が認められた。

3. 臭素化ビフェニルまたは臭素化ジフェニルエーテルの 4,4'-臭素化体の S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められないことから、4 位に水酸化を受けることが作用を発揮するうえで重要であると考えられた。
4. ベンゾフェノン誘導体のオキシベンゾンの S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められた。また、サリチル酸 4-*t*-ブチルフェノールエステルの S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められた。
5. スチレントリマーである 1*a*-フェニル-4*e*-(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その異性体の S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用は認められなかった。
6. 甲状腺ホルモン様作用を評価する酵母 Two-Hybrid 法を運用した。甲状腺ホルモン様作用のアゴニストである 1.0×10^{-6} M の T3 を 24 時間作用させた際に最も高いベータガラクトシダーゼ活性が認められた。 1.0×10^{-6} M の T3 作用時のベータガラクトシダーゼ活性を 100%としたとき 10%作用濃度 (EC_{10}) は、 2.1×10^{-8} M であった。
7. *o*-イソプロピルフェノール及び *o*-*t*-ブチルフェノールに甲状腺ホルモン様作用が認められた。 EC_{10} は、各々、 3.1×10^{-4} M 及び 4.8×10^{-5} M であった。他のアルキルフェノール及びフェノール残基を有する

化学物質に甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった。

8. ビスフェノール A 誘導体、フタル酸エステル類、アジピン酸エステル、パラベン類及びベンゼン誘導体に甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった。

F. 研究発表 学会発表

1. 酵母 Two-Hybrid 法を用いた代謝活性化エストロゲン様作用物質の検出
高取 聡、北川陽子、織田 肇、西川淳一、西原 力、中澤裕之、堀 伸二郎
日本食品衛生学会第 79 回学術講演会、2000 年 5 月、東京
2. 酵母 Two-Hybrid 法を用いた proestrogen 候補物質の検出
高取 聡、北川陽子、織田 肇、西川淳一、西原 力、中澤裕之、堀 伸二郎
環境ホルモン学会第 3 回研究発表会、2000 年 12 月、横浜

論文発表

1. Takatori, S., Kitagawa, Y., Nishikawa, J., Nishihara, T., Oda, H., Nakazawa, H., Hori, S. "Detection of proestrogenic activities of chemicals using a Yeast Two-Hybrid Assay." *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (投稿中)

化合物名	EC ₁₀ (M)		相対活性 ^{a)}	備考
	Active S-9	Inactive S-9		
ビスフェノール A	2.8 x 10 ⁻⁶	1.1 x 10 ⁻⁶	1/1.1 x 10 ⁵ (1/6.8 x 10 ⁴)	PC 樹脂原料
BADGE	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	PC 樹脂原料
BADGE·2HCl	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	PC 樹脂溶出成分
BADGE·2H ₂ O	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	PC 樹脂溶出成分
オキシベンゾン	1.4 x 10 ⁻⁶	> 3.0 x 10 ⁻⁴ #	1/5.6 x 10 ⁴	紫外線吸収剤
ジオキシベンゾン	1.1 x 10 ⁻⁶	> 3.0 x 10 ⁻⁴ #	1/4.4 x 10 ⁴	紫外線吸収剤
サリチル酸 4- <i>t</i> -ブチルフェノールエステル	2.1 x 10 ⁻⁶	> 3.0 x 10 ⁻⁴	1/8.4 x 10 ⁴	紫外線吸収剤
4- <i>t</i> -ブチル-4'-メトキシ- ジベンゾイルメタン	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	紫外線吸収剤
4-ジメチルアミノ安息香酸 2-エチルヘキシルエステル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	紫外線吸収剤
4-メトキシケイヒ酸 2-エチルヘキシルエステル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	紫外線吸収剤
フタル酸ジブチル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	可塑剤
フタル酸ジシクロヘキシル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	可塑剤
フタル酸ジエチルヘキシル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	可塑剤
フタル酸ベンジルブチル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴ #	-	可塑剤
イソプロピルベンゼン (クメン)	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	工業原料
プロピルベンゼン	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	工業原料
1 <i>a</i> -フェニル-4 <i>e</i> -(1-フェニルエチル) 1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	スチレントリマー
1 <i>e</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	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	スチレントリマー
1 <i>e</i> -フェニル-4 <i>e</i> -(1-フェニルエチル) 1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	スチレントリマー
17-β-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1 ビスフェノール A 誘導体、紫外線吸収剤、フタル酸エステル類及びスチレントリマーの S-9 mix 代謝産物のエストロゲン様作用の評価

a) 相対活性：17-β-エストラジオールの EC₁₀ / 被検化学物質の EC₁₀

#：1.0 x 10⁻⁷ M 17-β-エストラジオール作用時における β-ガラクトシダーゼ活性の10%未満の活性が認められた。

PC：ポリカーボネート

化合物名	EC ₁₀ (M)		相対活性 ^{a)}	備考
	Active S-9	Inactive S-9		
ビフェニル	1.7 x 10 ⁻⁵	> 3.0 x 10 ⁻⁴	1/6.8 x 10 ⁴	防黴剤
4-ブロモビフェニル	1.8 x 10 ⁻⁵	> 3.0 x 10 ⁻⁴	1/7.2 x 10 ⁴	PBB
2,4',5'-トリブロモビフェニル	> 3.0 x 10 ⁻⁴ #	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	PBB
2,2',4',5,5'-ペンタブロモビフェニル	> 3.0 x 10 ⁻⁴ #	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	PBB
2,2',4,4',5,5'-ヘキサブロモビフェニル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	PBB
デカブロモビフェニル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	難燃剤、PBB
ファイアーマスター BP-6 (ヘキサブロモビフェニル工業製品)	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	難燃剤、PBB
FR-250 (オクタブロモビフェニル工業製品)	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	難燃剤、PBB
ジフェニルエーテル	2.7 x 10 ⁻⁵	> 3.0 x 10 ⁻⁴	1/1.1 x 10 ⁵	熱媒体
4-ブロモジフェニルエーテル	4.6 x 10 ⁻⁵	> 3.0 x 10 ⁻⁴	1/1.8 x 10 ⁵	PBDE
4,4'-ジブロモジフェニルエーテル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	PBDE
2,2',4,4',5,5'-ヘキサブロモジフェニルエーテル (工業製品)	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	難燃剤、PBDE
デカブロモジフェニルエーテル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	難燃剤、PBDE
テトラブロモビスフェノール A	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 3.0 x 10 ⁻⁴	-	難燃剤
17-β-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2 臭素化ビフェニル及び臭素化ジフェニルエーテルの S-9 mix 代謝産物のエストロゲン様作用の評価

a) 相対活性：17-β-エストラジオールの EC₁₀ / 被検化学物質の EC₁₀

#：1.0 x 10⁻⁷ M 17-β-エストラジオール作用時における β-ガラクトシダーゼ活性の10%未満の活性が認められた。

PBB, Polybrominated biphenyl; PBDE, Polybrominated diphenyl ether

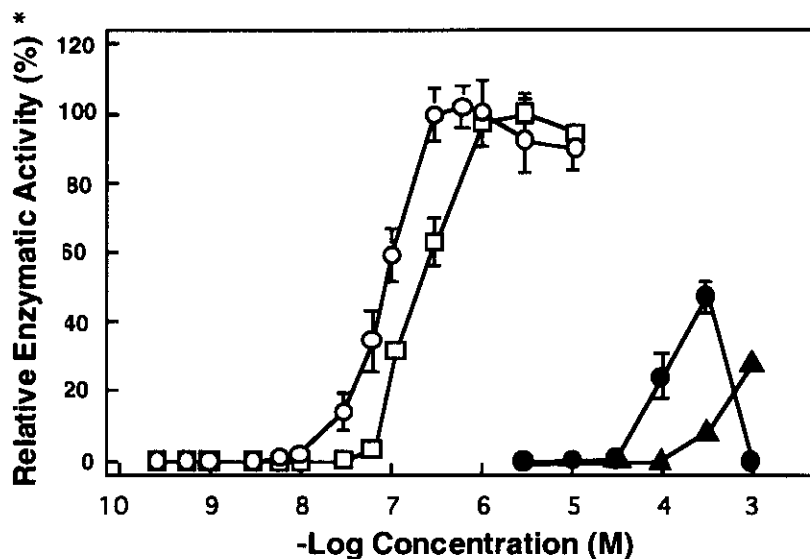


図1 酵母 Two-Hybrid 法における甲状腺ホルモン様作用の用量反応曲線
 T3 (○)、T4 (□)、*o*-*t*-ブチルフェノール (●)、*o*-イソプロピルフェノール (▲)
 * : 1.0×10^{-6} M T3 作用時の β -ガラクトシダーゼの活性を 100% としたときの相対活性

化合物名	EC ₁₀ (M)	相対活性 ^{b)}	備考
フタル酸ジメチル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
フタル酸ジエチル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
フタル酸ジプロピル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
フタル酸ジイソブチル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
フタル酸ジブチル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
フタル酸ジエチルヘキシル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
フタル酸ジイソノニル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
フタル酸ジイソデシル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
フタル酸ジシクロヘキシル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
フタル酸ベンジルブチル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
アジピン酸ジメチル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
アジピン酸ジエチル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
アジピン酸ジピニル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
アジピン酸ジイソプロピル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
アジピン酸ジイソブチル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
アジピン酸ジエチルヘキシル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
アジピン酸ジイソノニル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
バレリン酸	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
4,4'-ビス(4-ヒドロキシフェニル)			
セバシン酸ジブチル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
アゼライン酸ジエチルヘキシル	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-	可塑剤
3,5,3'-トリヨードチロニン (T3)	2.1×10^{-8}	1	甲状腺ホルモン

表3 フタル酸エステル類及びアジピン酸エステル類の甲状腺ホルモン様作用の評価
 b) 相対活性 : 3,5,3'-トリヨードチロニンの EC₁₀ / 被検化学物質の EC₁₀