

| 化合物名 | EC ₁₀ (M) | 相対活性 ^{b)} | 備考 |
|--------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------|
| <i>p</i> -メチルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 消毒剤、樹脂添加剤 |
| <i>p</i> -エチルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 界面活性剤、樹脂添加剤 |
| <i>p</i> - <i>n</i> -プロピルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 界面活性剤 |
| <i>p</i> - <i>s</i> -ブチルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 界面活性剤 |
| <i>p</i> - <i>t</i> -ブチルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 界面活性剤、PC 樹脂分子量調整剤 |
| <i>p</i> - <i>n</i> -ブチルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 界面活性剤、樹脂添加剤 |
| <i>p</i> - <i>t</i> -ペンチルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 界面活性剤、樹脂添加剤 |
| <i>p</i> - <i>n</i> -ペンチルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | |
| <i>p</i> - <i>n</i> -ヘキシルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | |
| <i>p</i> - <i>n</i> -ヘプチルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | |
| <i>p</i> - <i>t</i> -オクチルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 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 | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 界面活性剤、樹脂添加剤 |
| <i>p</i> - <i>br</i> -ノニルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 界面活性剤、樹脂添加剤 |
| <i>p</i> - <i>n</i> -ドデシルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 界面活性剤、樹脂添加剤 |
| <i>o</i> -メチルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | |
| <i>o</i> -エチルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | |
| <i>o</i> -イソプロピルフェノール | 3.1 x 10 ⁻⁴ | 1/1.5 x 10 ⁴ | |
| <i>o</i> - <i>n</i> -プロピルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | |
| <i>o</i> - <i>t</i> -ブチルフェノール | 4.8 x 10 ⁻⁵ | 1/2.3 x 10 ³ | |
| <i>o</i> - <i>n</i> -ブチルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | |
| <i>o</i> -フェニルフェノール (OPP) | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 防黴剤 |
| <i>o</i> -ヨードフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | |
| <i>m</i> - <i>t</i> -ブチルフェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | |
| BHT | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 酸化防止剤 |
| BHA | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 酸化防止剤 |
| 4,4-ジヒドロキシビフェニル | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | |
| 1-ヒドロキシビレン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | ビレン代謝産物 |
| 3,5,3'-トリヨードチロニン (T3) | 2.1 x 10 ⁻⁶ | 1 | 甲状腺ホルモン |

表 4 アルキルフェノー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

| 化合物名 | EC ₁₀ (M) | 相対活性 ^{b)} | 備考 |
|---------------------------|--------------------------|--------------------|-----------|
| メチルパラベン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 保存料 |
| エチルパラベン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 保存料 |
| プロピルパラベン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 保存料 |
| ブチルパラベン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 保存料 |
| ベンジルパラベン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 保存料 |
| p-ヒドロキシ安息香酸 Na | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | パラベン代謝産物 |
| 3-フェノキシ安息香酸 | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | |
| ビスフェノール A | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | PC 樹脂原料 |
| BADGE | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | PC 樹脂原料 |
| BADGE・2HCl | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | PC 樹脂溶出成分 |
| BADGE・2H ₂ O | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | PC 樹脂溶出成分 |
| ジフェニルカーボネート | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | PC 樹脂原料 |
| トリエチルアミン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | PC 樹脂原料 |
| フェノール | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 工業原料 |
| トルエン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 工業原料 |
| スチレン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 工業原料 |
| エチルベンゼン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 工業原料 |
| イソプロピルベンゼン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 工業原料 |
| n-プロピルベンゼン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 工業原料 |
| t-ブチルベンゼン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 工業原料 |
| p-ニトロベンゼン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 工業原料 |
| p-トルエン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 工業原料 |
| ビフェニル | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 工業原料 |
| trans-スチルベン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 工業原料 |
| ジフェニルエーテル | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 熱媒体 |
| 4-ブロモジフェニルエーテル | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 難燃剤 |
| 4,4'-ジブロモジフェニルエーテル | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 難燃剤 |
| ベンゾフェノン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 紫外線吸収剤 |
| オキシベンゾン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 紫外線吸収剤 |
| ジオキシベンゾン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 紫外線吸収剤 |
| サリチル酸 | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | 紫外線吸収剤 |
| 4-t-ブチルフェノールエステル | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | |
| チロシン | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | アミノ酸 |
| チラミン HCl | > 3.0 x 10 ⁻⁴ | - | アミノ酸分解産物 |
| 3,5,3',5'-テトラヨードチロニン (T4) | 4.2 x 10 ⁻⁸ | 1/2 | 甲状腺ホルモン |
| 3,5,3'-トリヨードチロニン (T3) | 2.1 x 10 ⁻⁸ | 1 | 甲状腺ホルモン |

表5 パラベン、ビスフェノール A 誘導体及びベンゼン誘導体等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

平成 12 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
動態研究

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼすスチレンモノマー,
ダイマー, トリマー, フタル酸エステル, 及びアルキルフェノールの阻害効果

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の内因性ステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) に及ぼす影響を解明する目的で, ヒト副腎由来の H295R 細胞を用いてコルチゾール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を確立した. このアッセイ系を用いて高分子を素材とした生活関連製品から溶出が疑われており, 内分泌かく乱化学物質としてリストアップされているスチレンモノマー, ダイマー, トリマー, フタル酸エステル, 及びアルキルフェノール類の影響を検討した. さらにステロイド産生を阻害することが認められたフタル酸ジシクロヘキシル, 4-ノニルフェノールおよび 4-*t*-オクチルフェノール等についてその作用機序の検討を行ったところ, これらの化学物質はコルチゾール合成を触媒する酵素のうち, 特にチトクローム P450 モノオキシゲナーゼである P450_{scc}, P450_{c17} 及び P450_{c21} を阻害することを明らかにした.

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質は「生体の恒常性, 生殖, 発生, あるいは行動に関する種々の生体内ホルモンの合成, 分泌, 体内輸送, 結合, ホルモン作用, およびそのクリアランスなどの諸過程を阻害する性質を持つ外来性の物質」(ホワイトハウスワークショップ, 1997年1月)と定義されており, もしこれら環境由来の内分泌かく乱化学物質の曝露により内因性ホルモンの合成や分泌が阻害された場合, 正常な内分泌系がかく乱される可能性が考えられる. 特にこれらの化学物質が胎生期から新生仔期の限られた時期に曝露さ

れることで, ステロイドホルモン合成が阻害された場合, 生物における発生や生殖において深刻な影響が表れることが懸念される.

本研究では, 昨年度これら化学物質の生体内ステロイドホルモン合成に及ぼす影響を解明することに視点をおき, ヒト副腎由来の H295R 細胞を用いて *in vitro* で, ステロイドホルモン合成阻害を指標にした評価系を確立した.

食品容器として多用されているポリスチレン製品中に各種スチレンダイマーおよびスチレントリマーが存在することが報告されている. またそれらポリスチレン製品から食品へのそれらのス

チレンダイマー及びスチレントリマーの移行の可能性が示唆されている。さらに、フタル酸エステル類はプラスチックの可塑剤として多用されており4-ノニルフェノール等は、酸化防止剤や界面活性剤等の分解物として、プラスチック製品に残存する可能性が示唆される。これらの化学物質は内分泌かく乱化学物質としてリストアップされている。そこで本研究では、ステロイドホルモン合成障害を指標にした評価系を用いて、スチレンモノマー、ダイマー、トリマー、フタル酸エステル、及びアルキルフェノール類のステロイドホルモン産生に及ぼす影響を検討することとした。

B. 研究方法

B-1. 実験材料及び試薬

styrene monomer,
2,4-diphenyl-1-butene,
trans-1,2-diphenylcyclobutane,
cis-1,2-diphenylcyclobutane,
1,3-diphenylpropane,
2,4,6-triphenyl
-1-hexene,
1a-phenyl-4a-(1-phenylethyl)-1,2,3,
4-tetrahydronaphthalene,
1,3,5-triphenylcyclohexane,
dibutyl cAMP, phthalic acid,
4-*n*-nonylphenol, 4-*n*-octylphenol,
4-*t*-octylphenol, 4-*n*-heptylphenol,
4-*n*-hexylphenol, 4-*t*-pentylphenol,
4-*n*-pentylphenol, 4-*t*-pentylphenol,
4-*t*-butylphenol, 2-*t*-butylphenol 及び
3-*t*-butylphenol は和光純薬工業より購入した。Butyl benzyl phthalate,

di-*n*-butyl phthalate, dicyclohexyl
phthalate, diethyl phthalate,
diethylhexyl adipate,
di(2-ethylhexyl)phthalate,
di-*n*-hexyl phthalate, di-*n*-pentyl
phthalate, dipropyl phthalate,
4-*n*-butylphenol, 4-nonylphenol およ
び 4-*n*-dodecylphenol は関東化学より
購入した。上皮増殖因子 (EGF, human
recombinant) はフナコシより購入した。
放射能標識 [4-¹⁴C]ステロイドである
cholesterol (1887MBq/mmol),
dehydroepiandrosterone
(2.05GBq/mmol), progesterone
(2.05GBq/mmol) 及び
deoxycorticosterone (2.22GBq/mmol)
はいずれも New England Nuclear 社製
であり、日本ラジオアイソトープ協会
から購入した。各種標準ステロイド,
NAD⁺, NADPH, glucose 6-phosphate お
よび glucose 6-phosphate
dehydrogenase は Sigma-Aldrich Japan
から購入した。アドレノドキシンは
Kimura *et al.*¹⁾の報告に従いウシ副腎
より精製した。

その他の試薬は市販の分析用標準品
および特級を用いた。

B-2. 細胞培養

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞は J.
Ian Mason 博士 (University of
Edinburgh, Royal Infirmary of
Edinburgh, Edinburgh, Scotland) より
供与された。培地として insulin (6.25
µg/ml), transferrin (6.25 µg/mL),
selenium (6.25 ng/mL), および

linoleic acid (5.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む D-MEM/F-12 medium (1:1 mixture of Dulbecco's Modified Eagle's and Ham's F-12 Medium) に、更に 1% ITS Plus (Collaborative Research, Bedford, MA), 2% Ultrose G (Sepracore, France) および抗生物質 (penicillin: 50 IU/ml と streptomycin: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加えた培養液を使用した。細胞は 75 cm^2 flasks を使用し、5% CO_2 ・95% air の気相中 37 $^{\circ}\text{C}$ で培養を行い、継代した。必要に応じて 24-well plate にサブカルチャーして実験に使用した。

B-3. H295R 細胞のステロイド産生の誘導と cortisol の分析

24-well plate にサブカルチャーした H295R 細胞は、80% コンフルエントの状態に 1% ITS Plus, 0.01% bovine serum albumin (bovuminar®: Intergen) および抗生物質を含む D-MEM/F-12 培養液に交換し 24 時間培養後、同様の組成からなる新しいメジウム (0.5 mL) と置き換えた。次に、検体のステロイド産生に対する影響を検討するため、エタノールあるいはメタノールに溶解した検体を加えた。それと同時に細胞のステロイド産生を誘導する目的で dibutyryl cyclic AMP (1mM) を加え更に一定時間 (24 時間あるいは 48 時間) 培養した。なお、メジウム中のエタノールあるいはメタノール等の溶媒は最終濃度 1.0% (v/v) を越えないこととした。この濃度では細胞のコルチゾール産生には影響を及ぼさないことを確認した。検体および dibutyryl

cyclic AMP を添加した一定時間後に培養液中に分泌された cortisol はラジオイムノアッセイ法による測定キット (DPC cortisol kit, Diagnostic Product Corporation) を用いその濃度を測定した。食品や食品容器包装等に関連する化学物質の細胞に対する毒性を評価するために検体処理後に CytoTox96 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega Corp.) を用いて H295R 細胞から逸脱する LDH 活性を測定すると共に、well 中の細胞数を測定した。また、ウエルに付着している細胞数を測定する簡便な方法として、well 中の付着細胞を phosphate buffered saline で良く洗浄後、NaCl (150mM), sodium dodecyl sulfate (SDS, 1%), EGTA (5 mM), MgCl_2 (0.5mM), MnCl_2 (0.5mM) および phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 0.2mM) を含む Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4) を用いて溶解して全蛋白質量を測定した。蛋白質量の測定は BCA assay kit (Pierce Chemical Co.) を用いて測定した。

B-4. H295R 細胞からミトコンドリアおよびマイクロソームの調製

dibutyryl cAMP (1mM) と EGF (10ng/mL) で 24 hr 処理した H295R 細胞 (1.0~2.1 g wet weight) は冷却した PBS で良く洗浄後、3 mL の 0.25 M sucrose (5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT and 0.1 mM PMSF を含む) (緩衝液 A) 中で Dounce tissue grinder (Wheaton) を用いてホモゲナイ

ズした。定法に従い 9,000×g, 20 min 遠心分離してミトコンドリア画分を得た。ミトコンドリア画分は更に 70 mM sucrose, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂ および 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.21 M mannitol で洗浄後, 同様に遠心分離し, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF および 20% glycerol を含む同緩衝液に懸濁した。上清には 8mM CaCl₂ を加えて氷冷下 1hr のインキュベーションの後, 10,000×g, 10 min の遠心分離を行い, ミクロソーム画分を得た。洗浄後ミクロソーム画分はそれぞれの画分は 20% glycerol を含む緩衝液 A に懸濁した。ミトコンドリア画分は更に酵素活性測定のために超音波処理を行った (10 cycles of 15 sec 50 W, Model VC50T, Sonic & Materials Inc.). それぞれの画分は 5.0 ~5.6 mg/mL の蛋白質濃度に調整し, -70°C で保存した。

B-5. 酵素活性の測定

P450scc (cholesterol 側鎖切断酵素) 活性および P45011β (11β-ヒドロキシラーゼ) 活性は各々 [4-¹⁴C] cholesterol (500 Bq/1 nmol/2μL ethanol) および [4-¹⁴C] deoxycorticosterone (500 Bq/1 nmol/2 μL ethanol) を基質としてミトコンドリア, glucose-6-phosphate (25 mM), glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.1 unit), NADP⁺ (0.5 mM), および adrenodoxin (2 μM) の存在下 37°C, 2 hr インキュベーションすることにより測定した。3β-HSD II (3β-hydroxysteroid dehydrogenase type II) 活性は [4-¹⁴C] dehydroepiandrosterone (500 Bq/1

nmol/2 μL ethanol) を基質として, 0.2ml の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中でミクロソーム, NAD⁺ (0.5 mM) の存在下 37 °C, 1 hr インキュベーションすることにより測定した。

P450c17 (17α-hydroxylase/C_{17,20}-lyase) および P450c21 (21-hydroxylase) 活性は [4-¹⁴C] progesterone (500 Bq/1 nmol/2 μL ethanol) を基質として, 0.2 mL の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中でミクロソーム, glucose-6-phosphate (25 mM), glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.1 unit), NADP⁺ (0.5 mM) の存在下 37°C, 1 hr インキュベーションすることにより測定した。インキュベーション終了後ステロイドを 0.6 mL の ethyl acetate / 2,2,4-trimethylpentane (1/1, v/v) で抽出して乾固し, TLC (Kieselgel 60F254, Merck) により基質と反応生成物を分離した。展開溶媒は benzene/acetone (8/1, v/v), benzene/ethyl acetate (2/1, v/v), benzene/acetone (7/3, v/v) を使用した。ラジオオートグラフィーで放射能標識ステロイドを検出した後, それぞれのスポットの放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定した。P450scc, P45011β および 3β-HSD II 活性は pregnenolone, corticosterone および androstenedione の生成量として, P450c17 活性は 17α-hydroxyprogesterone と 11-deoxycortisol 生成量の総和として, 及び P450c21 活性は 11-deoxycortisol

と 11-deoxycorticosterone 生成量の総和としてそれぞれ表した。

B-6. 有意差の検定

有意差の検定は Student's *t*-test を用いた。

研究結果

C-1. 化学物質のステロイドホルモン産生に及ぼす影響

C-1-1. スチレンダイマー及びスチレントリマー曝露の影響

H295R 細胞の cortisol 産生に及ぼす各種スチレンモノマー、ダイマー、トリマーの影響を種々濃度 (0.25–10 µg/mL) で検討した。検体としてスチレンモノマーである ethenylbenzene, スチレンダイマーである 2,4-diphenyl-1-butene, trans-1,2-diphenylcyclobutane, cis-1,2-diphenylcyclobutane, 1,3-diphenylpropane, 及びスチレントリマーである 2,4,6-triphenyl-1-hexene, 1a-phenyl-4a-(1-phenylethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene, 1,3,5-triphenylcyclohexane を用いた。その結果、これらのスチレンモノマー、ダイマー、トリマーは H295R 細胞の cortisol 産生には何ら有意な影響を及ぼさなかった。(結果は示していない)。また、実験に使用した濃度において、これらモノマー、ダイマー及びトリマーの細胞に対する毒性は認められなかった。

C-1-2. フタル酸エステル類曝露の影響

H295R 細胞の cortisol 産生に及ぼす

各種フタル酸エステル類の影響を種々の濃度で検討した。その結果、0.3 µM および 3.0 µM の濃度の曝露では有意な変化は認められなかった。しかし比較的高濃度である 30 µM の濃度において Fig. 1 に示すように dicyclohexyl phthalate (DCHP) のみが cortisol 産生を有意に抑制した (76%)。しかし他のフタル酸エステル類の曝露により有意な cortisol 産生の抑制は認められなかった。各種濃度における DCHP の阻害効果を Fig. 2 に示すが、この阻害効果は濃度に依存していた。なお、いずれのフタル酸エステルにおいても曝露実験に使用した濃度では細胞毒性が認められなかった。

C-1-3. アルキルフェノール曝露の影響

H295R 産生に及ぼすアルキルフェノール類曝露の影響を種々の濃度で検討した。その結果、1.0 µM の濃度の曝露では何ら影響は認められなかったが、10 µM の濃度の曝露では 4-*t*-octylphenol (4-*t*-OP) が cortisol の産生を有意に阻害した。50 µM の濃度の曝露では Fig. 3 に示すように、4-*t*-butylphenol (4-*t*-BP), 4-*t*-pentylphenol (4-*t*-PP), 4-*t*-OP および 4-nonylphenol (4-NP) が cortisol の産生を有意に阻害した。しかし、フェノールのパラ位に 5 個から 7 個の炭素からなるアルキル鎖を有する 4-*n*-アルキルフェノールは H295R の cortisol 産生に影響を及ぼさなかった。各種濃度における 4-*t*-PP, 4-*t*-OP および 4-NP の阻害効果を Fig. 4 に示した。これらの阻害効果は曝露濃度に依

存していた。また、実験に使用した濃度において、アルキルフェノール類の曝露による細胞毒性は認められなかった。

C-2. ステロイドホルモン合成阻害作用機序の解明

C-2-1. DCHP びアルキルフェノール類の作用機序

H295R 細胞の cortisol 産生を阻害する DCHP, 4-*t*-PP, 4-*t*-OP および 4-NP の作用機序を明らかにするための一端として cortisol 産生に関与する酵素である P450_{scc}, 3β-HSD II, P450c17, P450c21 および P45011β に対する阻害作用を検討した (Table I)。その結果, DCHP は 25 μM の濃度で P450c21 活性を有意に阻害した。4-*t*-OP は 12.5 および 25 μM の濃度で P450_{scc} 活性を強力に阻害し, さらに 25 μM の濃度で P450c17 及び P450c21 を阻害した。同様に, 4-NP は 25 μM の濃度で P450_{scc} 活性を阻害し, さらに 12.5 及び 25 μM の濃度で P450c17 及び P450c21 活性を強力に阻害した。H295R 細胞の cortisol 産生に影響を及ぼさなかった 4-*m*-OP はいずれのステロイド合成酵素も阻害しなかった。また, 酵素の阻害効果を検討した DCHP やアルキルフェノール類は 3β-HSD II を全く阻害しなかった。

D. 考察

ヒトの副腎皮質腫瘍細胞からライン化された細胞である H295R 細胞は P450_{scc}, P450c17, P450c21, P45011β, P450ald 及び 3β-HSD II を発現しており, ヒトの副腎皮質 3 層から由来する

aldosterone, cortisol 及び DHEA を分泌することが報告されている。ACTH レセプターを発現していないものの, cAMP 添加により cortisol 分泌が亢進するほか, アンジオテンシン II や K⁺ にも反応して aldosterone を分泌することも報告されている多機能の細胞である²⁻⁵⁾。

昨年度, 我々は *in vitro* でのステロイドホルモン合成阻害を指標にして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影響を, 簡便かつ迅速に評価する系をヒトのステロイド産生細胞のモデルである H295R 細胞を使用して開発した。

食品容器として多用されているポリスチレン製品中に各種スチレンダイマーおよびスチレントリマーが存在することが報告されており⁶⁾, それらは内分泌かく乱化学物質としてリストアップされている。ポリスチレン製品から食品へのそれらのスチレンダイマー及びスチレントリマーの移行の可能性が示唆され, 特に脂肪含有量が高く, 調理時に熱湯を用いるポリスチレン製容器入りの即席麺への移行が報告されており^{7,8)}, ヒトの健康に対する影響が懸念されている。そこで, これらスチレンダイマー及びスチレントリマーの H295R 細胞の cortisol 産生に及ぼす影響を検討したが, 有意な影響は認められなかった。

内分泌かく乱化学物質としてリストアップされている各種フタル酸エステルはプラスチック製品の可塑剤として多用されており, プラスチック製の食

品容器包装等から食品に移行する可能性が示唆されている。そのため各種フタル酸エステルのエストロゲン作用がレセプターとの結合や乳癌の細胞増殖等のアッセイにより調べられている⁹⁾。また、プラスチックの原料や工業用の界面活性剤が分解されて得られる各種アルキルフェノールも内分泌かく乱化学物質としてリストアップされており、*in vitro*¹⁰⁾あるいは *in vivo*¹¹⁻¹⁵⁾でそのエストロゲン活性が調べられている。しかし、ステロイドホルモン産生に及ぼす影響についてはほとんど検討されていない。また、関連することとして、*di-n-butyl phthalate* (DBP)の雄ラットの生殖器官の発達に悪影響を及ぼすことが報告されている^{16,17)}。更に DCHP やその代謝物である *monocyclohexyl phthalate* が同様に精巣に悪影響を及ぼすことが報告されている¹⁸⁾。最近マウスやラットの培養 Lydig 細胞を用いた実験で *octylphenol* がステロイドホルモン産生を阻害することが報告されている^{19,20)}。一方、*octylphenol*, *octylphenol diethoxylate* および *octylphenol monocarboxylate* が肝臓の CYP1A2, CYP2A, CYP2B2, CYP2C11 and CYP3A2 等の P450 を阻害すること²¹⁾、また *nonylphenol* が同様に CYP1A and CYP3A を阻害すること^{22,23)}も報告されている。

本研究により我々は μM のオーダーあるいは ppm という高濃度ではあるが DCHP, 4-*t*-PP, 4-*t*-OP および 4-NP が副腎由来の H295R 細胞の産生する cortisol 分泌を阻害することを初めて

見だし、更にその作用機序を検討したところ、DCHP は cortisol 産生に参与する酵素である P450c21 を、4-*t*-PP, 4-*t*-OP および 4-NP は P450_{scc}, P450c17 および P450c21 を阻害することを明らかにした。特に P450_{scc} はステロイドホルモン産生の最初のステップである、コレステロールの側鎖切断に参与しており、副腎のみならず精巣及び卵巣におけるステロイドホルモン産生に重要な酵素である。また P450c17 はアンドロゲン産生に重要な酵素であり、P450c21 はコルチコイド産生に欠くことの出来ない酵素でもある。

E. 結論

高分子を素材とした生活関連製品から溶出が疑われている内分泌かく乱化学物質の内在性ステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) に及ぼす影響を解明する目的で、ヒト副腎由来の H295R 細胞を用いてコルチゾール産生に及ぼすスチレンモノマー、ダイマー、トリマー、フタル酸エステル、及びアルキルフェノールの阻害効果を検討した。

マイクロ M あるいは ppm オーダーという高濃度ではあるが、DCHP, 4-NP および 4-*t*-OP がコルチゾール産生を阻害することを明らかにした。産生を阻害することが認められた DCHP, 4-NP および 4-*t*-OP についてその作用機序の検討を行ったところ、これらの化学物質はコルチゾール合成を触媒する酵素のうち、特にチトクローム P450 モノオキシゲナーゼである P450_{scc}, P450c17 及び P450c21 を阻害することを明らかにした。

F. 参考文献

- 1) Kimura, T., et al., *Methods in Enzymology* Vol. LII, Academic Press, New York, 1978, pp.132-142.
- 2) Rainey W. E., et al., *Mol Cell Endocrinol.* **100**, 45-50 (1994).
- 3) Bird I. M., et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 2171-2178 (1996).
- 4) Gazdar A.F., et al., *Cancer Res.* **50**, 5488-5496 (1990).
- 5) Rainy W. E., et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**, 731-737 (1993).
- 6) 河村葉子ら, 食衛誌, **39**, 199-205 (1998).
- 7) 河村葉子ら, 食衛誌, **39**, 310-314 (1998).
- 8) 河村葉子ら, 食衛誌, **39**, 390-398 (1998).
- 9) Harris, C.A., et al., *Environ. Health Perspect.* **105**, 802-811 (1997).
- 10) Sato, A.M., et al., *Environ. Health Perspect.* **103**, 19-25 (1991).
- 11) Jobling, S., et al., *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 194-202 (1996).
- 12) Lech, J. J., et al., *Appl. Toxicol.* **30**, 229-232 (1996).
- 13) Madsen, S.S., et al., *Fish Physiol. Biochem.* **17**, 303-312 (1997).
- 14) Christiansen, L.B., et al., *Mar. Environ. Res.* **46**, 137-140 (1998).
- 15) Korsgaard, B., et al., *Toxicol. Endocrinol.* **120**, 159-166 (1998).
- 16) Mylchreest, E., et al., *Toxicol. Sci.* **43**, 47-60 (1998).
- 17) Forster, P.M., et al., *Food Chem. Toxicol.* **38**, S97-99 (2000).
- 18) Lake, B.G., et al., *Acta Pharmacol. Toxicol.* **51**, 217-226 (1982).
- 19) Nikula, H., et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **157**, 166-173 (1999).
- 20) Muroso, E.P., et al., *Reprod Toxicol.* **14**, 275-288 (2000).
- 21) Hanioka, N., et al., *Xenobiotica.* **29**, 873-883 (1999).
- 22) Lee, P.C., et al., *Biochem. Pharmacol.* **52**, 885-889 (1996).
- 23) Lee, P.C., et al., *Xenobiotica.* **26**, 831-838 (1996).

G. 研究業績

学会発表

1) ヒト副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール分泌に及ぼす内分泌攪乱化学物の影響: 中陳静男、篠田 聡、豊島 聡、中澤裕之 (星薬大・薬)、大野修司 (日大・薬)、牧野恒久 (東海大・医)、第 73 回日本生化学大会、2000 年、10 月、横浜

2) ヒト副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール分泌に及ぼすフタル酸エステル、アルキルフェノール及び植物エストロゲンの阻害効果: 中陳静男、篠田 聡、豊島 聡、中澤裕之 (星薬大・薬)、大野修司 (日大・薬)、牧野恒久 (東海大・医)、第 3 回日本内分泌学会研究発表会、2000 年、12 月、横浜

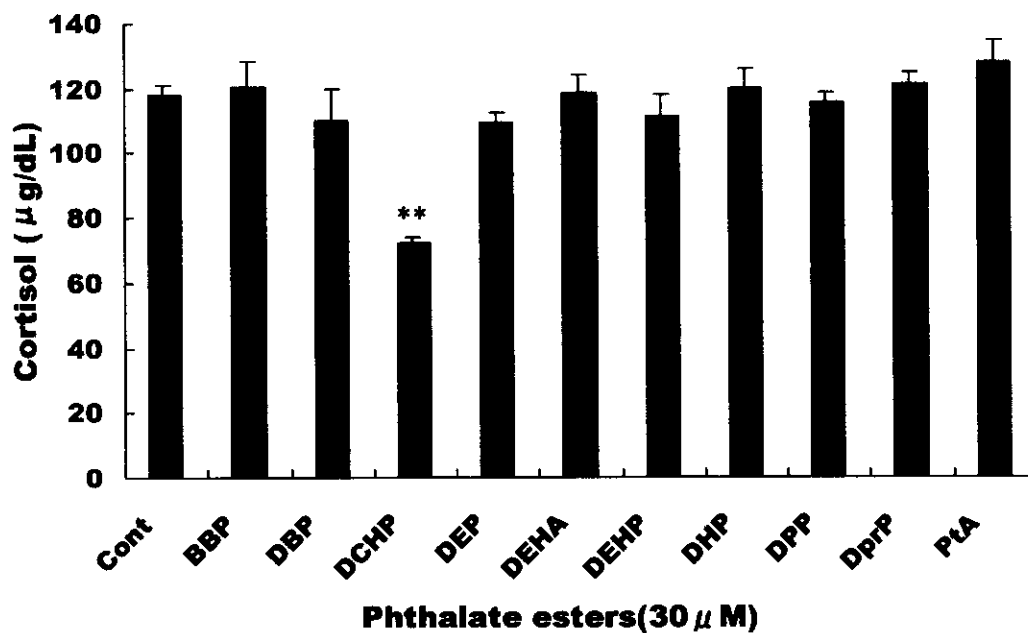


Fig. 1. The effect of the exposure of various phthalate esters and related chemicals on cortisol secretion from the adrenocortical H295R cells induced by dibutyl cAMP.

BBP (Butyl benzyl phthalate), DBP (di-*n*-butyl phthalate), DCHP (dicyclohexyl phthalate), DEP (diethyl phthalate), DOA (diethylhexyl adipate), DEHP (di(2-ethylhexyl)phthalate), DHP (di-*n*-hexyl phthalate), DPP (di-*n*-pentyl phthalate), DprP (dipropyl phthalate), and PtA (Phthalic acid) were used as the abbreviation. Each column represents the mean with S.D. (n = 3). Asterisks denote significant difference from the control value which was treated without chemicals; **p < 0.01.

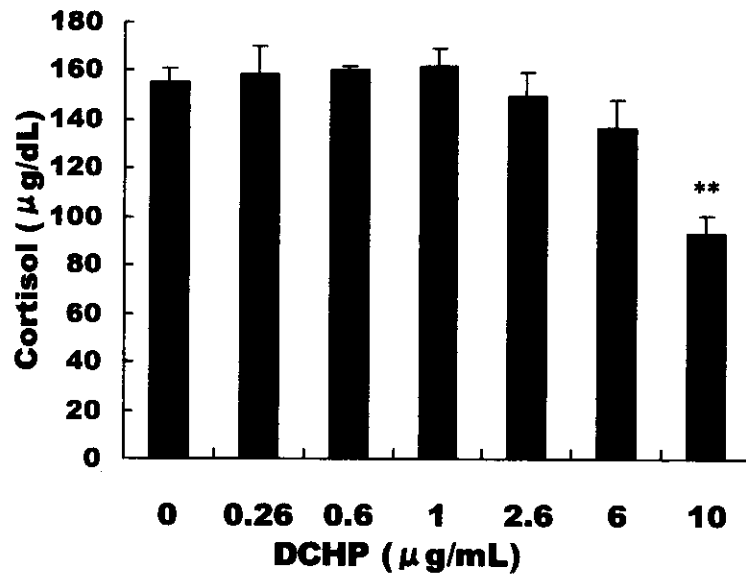


Fig. 2. The effect of increasing concentrations of dicyclohexyl phthalate (DCHP) on cortisol secretion from the adrenocortical H295R cells induced by dibutyryl cAMP. Each column represents the mean with S.D. (n = 3). Asterisks denote significant difference from the control (0 µg/mL) value which was treated without DCHP; **p < 0.01.

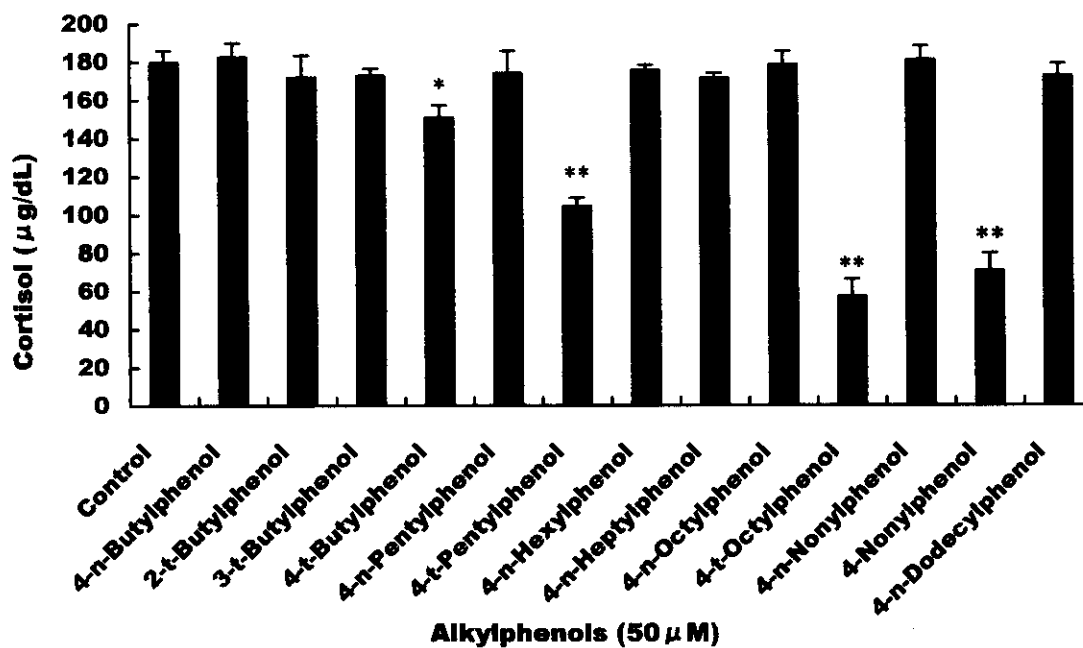


Fig. 3. The effect of the exposure of various alkylphenols on cortisol secretion from the adrenocortical H295R cells induced by dibutyl cAMP.

Each column represents the mean with S.D. (n = 3 to 6). Asterisks denote significant difference from the control value which was treated without chemicals; **p < 0.01.

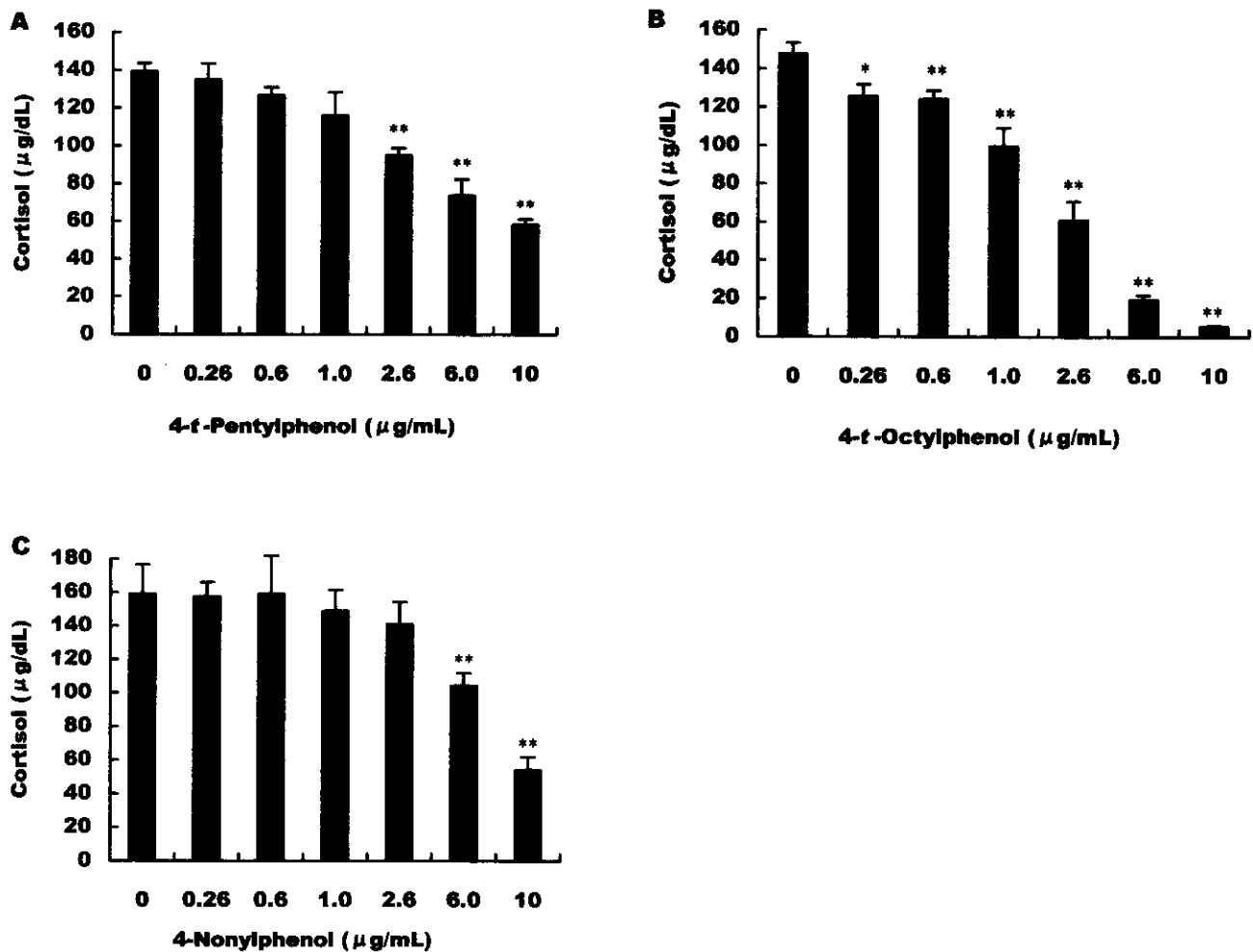


Fig. 4. The effect of increasing concentrations of 4-*t*-pentylphenol (A), 4-*t*-octylphenol (B) and 4-nonylphenol (C) on cortisol secretion from the adrenocortical H295R cells induced by dibutyryl cAMP.

Each column represents the mean with S.D. (n = 3). Asterisks denote significant difference from the control (0 µg/mL) value which was treated without chemicals; * p < 0.05, **p < 0.01.

Table I Inhibition of enzyme activities of steroid lyase, hydroxylases and dehydrogenase involved in cortisol synthesis

| Addition (μ M) | Enzyme activity (% of control) | | | | |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| | P450scc | 3 β -HSD II | P450c17 | P450c21 | P45011 β |
| None | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| DCHP | (12.5) 96.5 \pm 19.8 | 90.8 \pm 6.5 | 89.9 \pm 4.8 | 87.3 \pm 3.3 | 99.3 \pm 18.6 |
| | (25.0) 94.8 \pm 27.6 | 90.9 \pm 6.6 | 84.5 \pm 3.9 | 79.6 \pm 3.0* | 101.8 \pm 7.9 |
| 4-Nonylphenol | (12.5) 72.7 \pm 13.6 | 110.2 \pm 3.9 | 56.6 \pm 3.4* | 51.4 \pm 1.5** | 121.2 \pm 8.5 |
| | (25.0) 55.5 \pm 11.4* | 91.3 \pm 2.3 | 39.8 \pm 4.8** | 43.2 \pm 1.4** | 109.2 \pm 12.8 |
| 4- <i>n</i> -Octylphenol | (12.5) 156.8 \pm 22.6 | 106.2 \pm 1.1 | 137.2 \pm 10.8 | 116.8 \pm 3.9 | 78.4 \pm 9.5 |
| | (25.0) 145.2 \pm 14.4 | 106.0 \pm 2.2 | 99.4 \pm 6.0 | 118.6 \pm 8.8 | 78.3 \pm 3.5 |
| 4- <i>t</i> -Octylphenol | (12.5) 54.8 \pm 4.5* | 116.6 \pm 3.6 | 108.3 \pm 7.4 | 78.7 \pm 0.9 | 126.0 \pm 12.3 |
| | (25.0) 47.7 \pm 4.4** | 113.5 \pm 1.6 | 73.6 \pm 11.8* | 54.8 \pm 2.3** | 103.6 \pm 8.5 |
| 4- <i>t</i> -Pentylphenol | (12.5) 106.9 \pm 7.4 | 107.8 \pm 0.9 | 150.1 \pm 6.4 | 106.3 \pm 2.7 | 100.9 \pm 11.2 |
| | (25.0) 122.1 \pm 9.3 | 107.1 \pm 2.2 | 137.0 \pm 5.3 | 84.1 \pm 2.0 | 94.9 \pm 10.0 |

Enzyme activities are expressed relative to control experiment. Values are mean \pm S.E.M. (n = 3 to 9). Specific enzyme activity of a typical preparation of mitochondria and microsomal enzyme from H295R cells was 9.4 \pm 1.1 pmol/min/mg protein for P450scc (C_{20,22}-lyase), 103.2 \pm 7.7 pmol/min/mg protein for 3 β -HSD II (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II), 100.5 \pm 6.0 pmol/min/mg protein P450c17 (17 α -hydroxylase/C_{17,20}-lyase), 24.4 \pm 1.5 pmol/min/mg protein for P450c21 (21-hydroxylase), and 28.8 \pm 2.6 pmol/min/mg protein for P45011 β (11 β -hydroxylase). Methods for determination of enzyme activities are given in "Materials and Methods." Statistical analysis was carried out using the actual values. Asterisks denote significant difference from control (untreated);

*p < 0.05, **p < 0.01.

平成12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
動態研究

エポキシ樹脂関連化学物質の妊娠期及び授乳期暴露による次世代への影響

主任研究者 中澤裕之 星薬科大学教授

研究協力者 山崎聖美 国立公衆衛生院

研究要旨

エポキシ樹脂は高分子素材由来製品に多く応用されており、食品用缶の内面コーティングや接着剤等に用いられる。ビスフェノール A ジグリシジルエーテルはエポキシ樹脂であり、水系食品の缶に用いられた場合、加水分解体（BADGE-4OH）としての食品移行が報告されている。この物質に関する内分泌かく乱作用という視点での毒性評価はなされていない。日常、食品を介して摂取する可能性のあるこの物質に関して、生体影響についての研究が必要とされる。従って、BADGE-4OH の次世代影響を検討した。その結果、妊娠 3.5 日より離乳時まで BADGE-4OH を母マウスに投与した場合、雄仔マウスの精巣及び胸腺重量が減少することが明らかになった。従って我が国においても食品中残留基準を設ける等、食品衛生上の対応が必要であると考えられる。

A. 研究目的

近年、我々の身の周りには高分子素材由来製品が多数存在する。その中でエポキシ樹脂は、我々の生活に欠かす事の出来ない物となっている。エポキシ樹脂であるビスフェノール A ジグリシジルエーテル（BADGE）は、缶の内面コーティング、接着剤及び床板塗料等に用いられており、食品用缶に用いられた場合は食品へ移行することが報告されている。また、BADGE はエポキシ環を有するため、水系食品における缶コーティングに用いられた場合には、加水分解体（BADGE-4OH）として存在することが示唆されており、我々が食品を介して微量ながらも確実に摂取

し続けていると考えられる。

BADGE は、ビスフェノール A（BPA）とエピクロロヒドリンにより合成される（Fig. 1）。BADGE の原料であるビスフェノール A のエストロゲン活性は、*in vitro* 及び *in vivo* 試験系により調査されており、*in vitro* におけるエストロゲン活性及び低用量暴露による次世代への生殖影響等が報告され、安全性が見直しが必要とされている。一方 BADGE 関連物質においては、EU の Scientific Committee On Food (SCF) が、BADGE、BADGE の塩素付加物及び BADGE 加水分解物の合計量について、食品中の暫定溶出限度を、1 mg/kg とするよう勧告しており、更なる詳細な安全性評

価を必要としているが、我が国においては食品衛生上の規制値が設けられていない。加えて、BADGE-40H に関しては、十分な毒性評価がなされておらず、詳細な検討が必要であると考えられる。

昨年度、乳癌細胞増殖試験法により、BADGE-40H のエストロジェン活性を測定したところ、エストロジェンレセプター (ER) を介した乳癌細胞増殖促進作用が認められた (Fig. 2)。しかし十分な毒性評価がなされておらず、エストロジェン作用が観察された BADGE-40H の生体影響を調査することは重要である。従って近年問題視されている低用量暴露による次世代への影響を、経口摂取させた妊娠マウスを用いて評価した。

B. 研究方法

B・1 試薬・試料

BADGE-40H は Fluka 社製 (> 97%) を用いた。

骨染色：エタノール、水酸化カリウム及びグリセロールは、和光純薬工業社製を使用した。

B・2 マウスの育成と交尾

雌雄ともに 8 週齢 ddY 系マウスを用いた。温度、湿度及び光 (12h light/ 12h dark) は全て一定に調節された状態で飼育した。マウスは一匹ずつケージへ入れ、餌及び水の摂取は自由とし、ストレスを最小限に抑えるため、出来る限り騒音及び観察は控えた。

マウス購入一週間以上は環境への不慣れが考えられるため、交配はそれ以降とした。発情期を迎えていることを

確認した雌のケージに、雄を一匹ずつ入れ、翌朝膣腺の確認を行い、雄は雌のケージから取り除いた。膣腺が確認された雌はその日の朝を妊娠 0.5 日目とし、以後の実験に用いた。

B・3 BADGE-40H の投与

BADGE-40H の投与は、粉末飼料への混合 (low dose ; 3.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、high dose ; $50 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) により行った。Low dose の濃度設計は、我々の日常暴露を想定したものであり、high dose に関しては、BADGE の原料である BPA の最大無作用量を参考にしたものである。

マウスへの投与は、妊娠 3.5 日目から仔の離乳 (生後 21 日目) までとした。実験計画を Fig. 3 に示す。

B・4 胎仔生殖腺分化に及ぼす影響

マウス胎仔生殖腺の雌雄分化が始まる前までの段階で、BADGE-40H high dose 投与群における生殖腺の形態に及ぼす影響を検討した。妊娠 13.5 日に胎仔から生殖腺を摘出し、実体顕微鏡を使用して、雌雄生殖腺の観察を行った。

B・5 胎仔骨形成に対する影響

エストロジェン様作用の疑われる化学物質であるフタル酸エステル類は、妊娠親マウスへの投与により、生まれてくる仔に骨格異常を引き起こすという報告がある。従って、フタル酸エステル類と同様にエストロジェン作用を有する BADGE-40H を、妊娠マウスに投与 (low dose、high dose) した場合の胎児骨形成に及ぼす影響を、骨染色標本により検討した。

妊娠 3.5 日より BADGE-40H を含んだ

粉末飼料を経口投与し、仔が生まれてくる直前の18.5日目に親マウスより胎仔を取り出した。コントロールとして通常の粉末飼料を与えた。胎児を95%のエタノールで固定し、1週間以上浸漬し、剥皮、内臓摘出後、1%水酸化カリウム水溶液に一昼夜浸漬して胎児を軟化させた。その後、胎児をアリザリン色素液(0.1mgアリザリン/L 1% KOH)へ一昼夜浸漬し、さらに、Mall液(20%グリセリン 200 ml+1%水酸化カリウム 800 ml)へ一昼夜浸漬した。その後50%、80%、100%グリセリン水溶液にそれぞれ一昼夜ずつ浸漬し、80%浸漬後に、シャーレに入れ、胎児を浮かせて、骨の形態及び配列等を観察した。

B・6 仔の体重及び諸臓器重量測定

出生時、及び離乳時における仔マウス体重を測定した。加えて、離乳時においては脾臓、胸腺、子宮、及び左右精巣重量を測定した。

C. 研究結果

C・1 マウス胎仔生殖腺分化に対する影響

マウスの場合、形態的に性腺の原基が認められるのは胎齢10.5日前後である。この時期の生殖隆起には、形態上明確な雌雄差が認められない。胎齢12.5日頃になると生殖隆起の構造に性差が認められるようになる。雄性生殖隆起内部には短軸方向に数本の精巣索と呼ばれる管状構造が形成される。精巣索の内部には始原生殖細胞が集まっており、それらを将来セルトリ細胞になる体細胞が取り囲んでいる。精巣索

の外側の間質細胞からはライディッヒ細胞が分化する。一方、この時期の雌性生殖隆起の表面には上皮様細胞の分化は観察されず、内部には多数の斑点状の構造が認められる(Fig. 4)。通常、精巣索と斑点状の構造は実体顕微鏡による観察で識別できるため、これらの構造の出現により雌雄の判別が可能となる。

high dose BADGE-40H投与群マウスは11匹(雄5匹、雌6匹)であったが、この時点での死産及び外皮の奇形は観察されなかった。実体顕微鏡により生殖腺の観察を行ったところ、構造上の異常は認められなかった(Fig. 5)。

C・2 骨形成に対する影響

コントロール群の胎仔12匹、BADGE-40H low dose投与群の胎仔11匹、BADGE-40H high dose投与群の胎仔16匹を観察したが、母親の胎内から取り出した時点での死産や外皮奇形は、いずれの群においても見られなかった。また、骨標本についても、いずれの群においても奇形は認められなかった(Fig. 6)。

C・3 出生時及び離乳時における体重変化

コントロール群5匹の母マウスからは1匹あたり平均8.4匹、low dose群4匹からは平均8.3匹、そしてhigh dose群3匹からは平均12匹の仔が生まれた。しかし、high dose群の親のうち1匹は、離乳直後に死亡し、その仔は生後2週過ぎあたりから体重が減少し、生後3週の時点においても片目が開眼していない仔が見られたため、対象から除外

し、high dose 群は、雌の親マウス 2 匹、仔 24 匹として実験を行った。生まれた仔の雌雄割合を Table 1 に示す。

出生時における体重は、各群間で有意な差は認められなかった。しかし、離乳時において雌雄別に体重を測定したところ、雌に関してはコントロールと比較し有意な体重変化は観察されなかったのに対し、雄は low dose 及び high dose 投与群それぞれコントロールと比較し、有意な体重減少が認められた (Fig. 7)。

C・4 離乳時における諸臓器重量測定

妊娠期及び授乳期に母親を通して BADGE-40H に暴露された仔マウスの胸腺、脾臓、子宮及び左右精巣の重量を、離乳時(生後 21 日目)に測定した (Fig. 8, 9)。離乳時において、各群間で平均体重にわずかに差が見られたため、これらの臓器は、その重量の各々の体重に対する割合で示した。雌に関しては、胸腺、脾臓及び子宮重量は、コントロールとほぼ同様であった。しかし雄に関しては、胸腺及び左右精巣において low dose 及び high dose 投与群ともにコントロールと比較し有意な重量の減少が観察された。

D. 考察

胎仔 13.5 日では、生殖腺の形態に関して、low dose 及び high dose 投与による変化は観察されなかった。昨年度、乳癌細胞増殖試験法によりエストロゲン活性が認められた BADGE-40H は、フィードバック機構が働いていない雌仔マウスに対し、子宮重量を増加する

ものと思われたが、low dose 及び high dose 投与群においてその様な結果は観察されなかった。しかし、離乳期における雄仔マウス精巣重量は、両投与群で有意に減少した。

生殖腺の形成過程における核内レセプター機能は明瞭になっていない。しかし、生殖腺細胞に関して、セルトリ細胞及び生殖細胞では ER β が、ライディッヒ細胞においては ER α 、 β ともに発現していることが明らかとなっている。マウスでは、卵巣機能の成熟過程は出生後に始まるために、胎生期には雌であっても胎仔自身がエストロゲンを産生することはない。しかし雄胎仔では精巣機能の成熟過程はすでに胎生期に進行しており、アンドロゲンの産生が可能となっている。従って体外からのエストロゲンに対する雌雄における感受性の違いや、胎生期の精巣機能成熟過程で、変化が起こることは推測可能である。従って、エストロゲン活性が示唆されている BADGE-40H による、生殖腺の形成過程での影響を、遺伝子レベルで解析することが必要となるだろう。また、BADGE-40H 投与における精巣重量の減少が、一時的なものであるか、不可逆的な変化であるのかは、ヒトへの影響を考える上で重要な問題であり、更なる研究が必要である。

E. 結論

BADGE-40H に関する毒性評価は、遺伝毒性が報告されているが、それ以外は全くなく、低用量暴露による次世代影響を含め、詳細な研究が必要である。

本研究により、BADGE-40H 投与により、次世代に精巣重量及び胸腺重量の減少として影響があらわれることが明らかになった。粉末飼料への混合によるBADGE-40H 摂取であったため、親及び胎仔又は仔における組織、血中移行に関する詳細は不明である。従って、生体に影響を及ぼす濃度レベルを解明する目的で、血中への移行及び代謝に関する研究を行っていく事が必要不可欠となる。また、妊娠期及び授乳期暴露による次世代への影響という視点から、ヒトへの暴露レベル実態解明の必要性も示唆された。これらの実験を行った上で、我が国においても食品中残留基準を設ける等、食品衛生上の対応の必要性が示唆された。

参考文献

- 1) Summerfield W, Goodson A, Cooper I, 1998, Survey of bisphenol a diglycidyl ether (BADGE) in canned foods. *Food Additives and Contaminants*, **15**, 818-830
- 2) A. Theobald, C. Simoneau, P. Roncari, A. Roncari and E. Anklam, 1999, Monitoring of Bisphenol-A-Diglycidyl-Ether (BADGE) in Canned Milk Products and Vegetable Oils. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **95**, 362-365
- 3) Maurus Biedermann and Konrad Grob, 1998, Food contamination from epoxy resins and organosols used as can coatings: analysis by gradient NPLC. *Food Additives and Contaminants* **15**, 609-618
- 4) John E. Biles, Kevin D. White, Timothy P. McNeal, and Timothy H. Begley, 1999, Determination of the Diglycidyl Ether of Bisphenol A and Its Derivatives in Canned Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 1965-1969
- 5) L. Hammarling, H. Gustavsson, K. Svensson and A. Oskarsson, 2000, Migration of bisphenol-A diglycidyl ether (BADGE) and its reaction products in canned foods. *Food Additives and Contaminants*, **17**, 937-943
- 6) Susanna Suarez, Rosa Ana Sueiro, Joaquin Garrido, 2000, Genotoxicity of the coating lacquer on food cans, bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), its hydrolysis products and a chlorohydrin of BADGE. *Mutation Research*, **470**, 221-228

学会発表

EFFECT OF ENDOCRINE

DISRUPTING CHEMICALS ON LYMPHOCYTE RESPONSES

Tomomi Yamazaki, Yumiko Okada, Yoshiharu Hisamatsu, Shunichiro Kubota and Fujio Kayama

DIOXIN 2000, Vol.49 p394-396, August 2000, Monterey, California, USA

日本食品化学学会第六回総会・学術大会 (2000)「食品衛生関連化学物質のE-SCREEN Assayによる評価」;山口晃子、