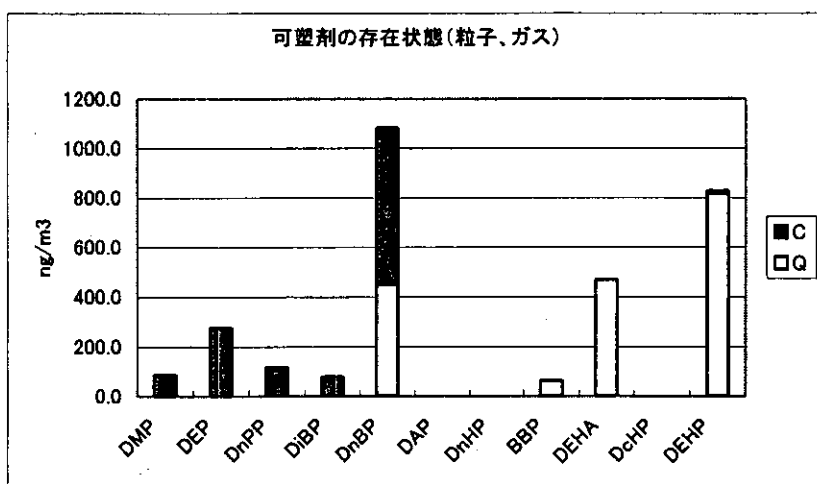
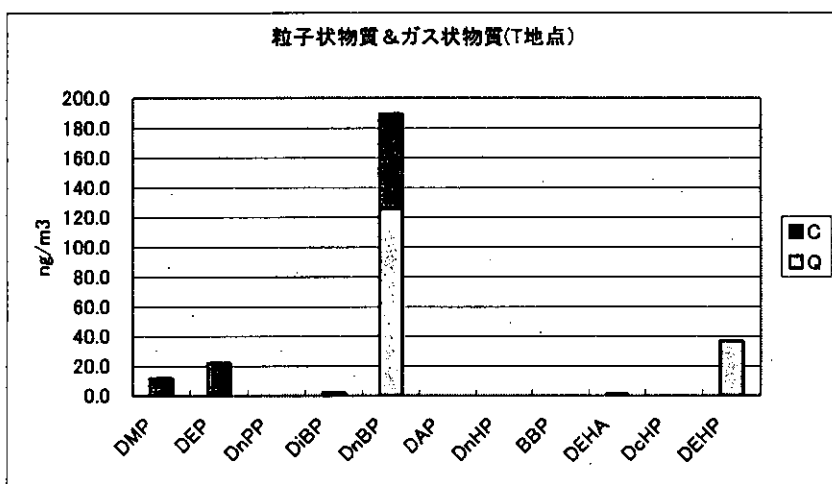




(車(B)の夏季)



(屋外空気 T地点7月)

図 10 空気中の可塑剤の存在状態 (Q 粒子状、C ガス状)

表4 屋外空气中VOC年間測定結果(2001.1-12)

$\mu\text{g}/\text{m}^3$				
区分	化合物	平均	最小	最大
芳香族 炭化水 素	Benzene	1.9	0.77	3.7
	Toluene	17	4.3	40
	Ethylbenzene	1.7	0.43	3.4
	m,p-Xylene	1.1	0.29	2.7
	o-Xylene	0.72	0.23	1.2
	1,2,4-Trimethylbenzene	1.1	0.39	1.9
脂肪族 ハロゲン 化合物	p-Dichlorobenzene	1.9	0.38	7.8
	Dichloromethane	6.1	0.029	22
	tetrachloromethane	0.85	0.52	1.4
	Trichloroethylene	0.93	0.20	2.3
フロン類	Freon11	2.2	0.61	4.0
	Freon12	3.8	1.8	6.8
	Freon113	0.87	0.54	1.6

表5 車内空气中VOC濃度

(μg/m³)													
分類	化合物名	車(A)				車(B)				外気			
		春	夏	秋	冬	春	夏	秋	冬	春	夏	秋	冬
芳香族 炭化水 素	Benzene	1.3	1.2	1.7	2.2	1.3	2.8	2.3	2.2	0.29	0.72	1.1	1.4
	Toluene	140	270	18	27	16	52	53	45	4.6	27	9.4	13
	Ethylbenzene	10	20	3.6	2.6	3.0	7.3	4.4	4.7	1.5	3.8	1.3	1.3
	m,p-Xylene	13	12	1.8	1.8	6.0	7.2	5.4	5.3	0.78	1.1	0.35	0.42
	o-Xylene	5	9.2	1.1	1.1	4.4	10	3.4	2.4	0.34	0.89	0.24	0.30
	Stylene	2	2.9	0.43	0.36	1.5	3.1	2.5	0.89	0.06	0.12	0.03	0.16
	1,3,5-Trimethylbenzene	3	4.5	0.38	0.58	12	25	3.4	1.5	0.08	0.19	0.05	0.06
	1,2,4-Trimethylbenzene	11	18	2.0	2.2	51	100	16	3.8	0.26	0.61	0.23	0.25
4-Ethyltoluene	2.3	3.7	0.45	0.62	8.8	17	2.9	1.7	0.13	0.29	0.09	0.09	
芳香族 ハロゲ ン化物	Chlorobenzene	0.096	0.18	0.081	0.074	0.10	0.22	0.082	0.15	0.03	0.08	0.08	0.07
	p-Dichlorobenzene	7.7	11	2.0	1.3	83	150	53	240	1.0	2.0	0.31	0.08
	1,2,4-Trichlorobenzene	0.30	0.25	0.048	0.044	0.25	0.67	0.38	0.044	0.25	0.25	0.04	0.04
脂肪族 化合物	Acrylonitrile	3.2	0.62	0.69	0.11	1.2	8.2	2.5	0.32	0.009	0.22	0.005	0.15
	1,3-Butadiene	0.42	0.066	0.19	0.23	0.28	0.18	0.28	0.22	0.02	0.03	0.11	0.15
	1,2-Dichloroethane	13	9.3	1.8	0.21	3.5	35	7.1	0.42	0.05	0.13	0.23	0.11

表6 車内空気/屋外空気のVOC濃度比

分類	化合物名	I/O車(A)				I/O車(B)				Average
		春	夏	秋	冬	春	夏	秋	冬	
芳香族 炭化水 素	Benzene	4.6	1.7	1.5	1.6	4.5	3.8	2.0	1.6	2.7
	Toluene	32	10	2.0	2.1	3.4	1.9	5.6	3.5	7.5
	Ethylbenzene	7.0	5.2	2.9	1.8	2.0	1.9	3.5	3.8	3.5
	m,p-Xylene	16	11	5.2	4.2	7.7	6.7	15	13	10
	o-Xylene	14	10	4.5	3.7	13	12	14	8.0	9.9
	Stylene	28	24	17	2.2	25	26	99	5.4	28
	1,3,5-Trimethylbenzene	33	23	8.2	9.6	150	130	73	25	57
	1,2,4-Trimethylbenzene	42	30	8.7	9	190	170	71	15	67
	4-Ethyltoluene	17	13	4.8	6.7	65	59	31	18	27
芳香族 ハロゲ ン化物	Chlorobenzene	3.3	2.2	1.1	1.0	3.4	2.8	1.1	2.0	2.1
	p-Dichlorobenzene	7.7	5.8	6.6	15	79	77	170	3000	420
	1,2,4-Trichlorobenzene	1.2	0.99	1.1	1.0	1.0	2.7	8.4	1.0	2.2
脂肪族 化合物	Acrylonitrile	350	2.8	150	0.72	140	38	530	2.1	152
	1,3-Butadiene	26	2.2	1.7	1.5	18	6.0	2.6	1.4	7.4
	1,2-Dichloroethane	250	70	8.0	1.9	69	260	31	3.8	87

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

平成13年度 分担研究報告書

大気圧光イオン化を用いた LC/MS 法による基礎研究

主任研究者	中 澤 裕 之	星薬科大学
分担研究者	畑 山 善 行	長野県衛生公害研究所
協力研究者	松 岡 広 和	横河アナリティカルシステムズ（株）
	佐久井 徳 広	横河アナリティカルシステムズ（株）
	滝 埜 昌 彦	横河アナリティカルシステムズ（株）

研究要旨

大気圧光イオン化(APPI)を用いた LC/MS の基礎研究を行い、外因性内分泌攪乱化学物質の疑いのある N-メチルカルバメート系農薬及び多環芳香族炭化水素であるベンゾ(a)ピレンの微量分析における APPI 法の有用性の知見を提供する。

A. 研究目的

従来 LC/MS 法のイオン化法として使用されてきた大気圧イオン化(API)にはエレクトロスプレーイオン化(ESI)と大気圧化学イオン化(APCI)があるが、これらイオン化はイオン化のメカニズムから分離条件である移動相の影響を受け易く、必ずしも分離に最適な条件での測定が可能ではない。一方、最近開発された紫外線ランプを用いた APPI は目的化合物を直接イオン化することから紫外線エネルギーよりイオン化電圧の低い移動相さえ使用しなければ、移動相組成などの LC 条件の影響を受けずに測定が可能である。そこで本研究において APPI の基礎研究を行い

N-メチルカルバメート系農薬及びベンゾ(a)ピレンの微量分析法での知見を報告する。

B. 研究方法

使用した LC/MS は Agilent

Technologies 製 LC1100 MSD で図.1 には本研究で使用した APPI イオン源を示した。イオン源で使用した紫外線ランプには synagen 製クリプトンランプ(10eV)を使用し、その他構成は APCI 用イオン源と同様である。

C. D. 研究結果及び考察

1.APPI での N-メチルカルバメート系農薬類の分析

1-1. APPI による質量スペクトル

N-メチルカルバメート系農薬にはメソミル、アルジカルブ及びカルバリルを対象とした。結果の質量スペクトルは図.2 に示したが、メソミル及びカルバリルでは分子関連イオンとしてプロトンやアンモニウムイオンが付加したイオンが基準ピークとして観察された。しかし分子イオンは観察されなかった。これら化合物のイオン化電圧は低いことから直接光によるイ

オン化は生じているが、不安定なラジカルカチオンである分子イオンが更に反応にて $(M+H)^+$ や $(M+NH_4)^+$ などの安定な付加イオンが観察されたと考えられる。一方アルジカルブでは ESI や APCI 同様に $m/z=116$ のフラグメントイオンが基準ピークであった。これはアルジカルブが熱に不安定な為、APPI でも気化器で分解したものと考えられる。以上の結果、質量スペクトルに関しては ESI や APCI と同様の質量スペクトルが観察された。

1-2. 移動相流量の影響

APPI における最適流量の検討を行った。その結果は図.3 に示したが、流量が大きくなるに従って各農薬のピーク強度は増加し、0.7ml/min で最大強度を示した。ESI では流量が大きくなるとチャンバー内で生成したイオンの質量分析部への透過効率が低下することから感度が低下する。しかし、APPI では APCI 同様に気体でのイオン化であり、移動相流量がイオン化後のイオンの安定化に関与することから、流量が大きい程感度が増加したものと考えられる。

1-3. キャピラリー電圧の影響

通常 API はチャンバー内でイオン化したイオンを質量分析部に導入する為、キャピラリーチューブの入口に高電圧を印加してイオンを引き込む方法が採用され、4000V 程度の高電圧を印加する。APPI においてこの電圧を 1500, 2500 及び 4000V で測定し、各農薬のピーク強度を比較検討した。その結果は図.4 に示したが、ESI や APCI とは逆に電圧が低い程、ピーク強度が高かった。この原因は詳細な研究が必要であるがイオン化促進用にアセトンなどのイオン化する溶媒を

添加すると 3000V 程度で最適値が得られることから、イオン化過程の特性によるものではないかと考えられる。

1-4. SIM モードでの分析

微量分析においては SIM モードが有効であり、各化合物の基準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、メソミル及びアルジカルブは 2ppb、カルバリルは 10ppb で検出可能であった。(図.5)

2. APPI でのベンゾ(a)ピレンの分析

ベンゾ(a)ピレンは多環芳香炭化水素の一種で ESI や APCI ではほとんど感度がない化合物である。そこで APPI で最適条件を検討し微量分析法の検討を行った。

2-1. 最適条件の検討

N-メチルカルバメート系農薬同様に移動相流量やキャピラリー電圧の最適条件を検討したが、流量は 0.6ml/min、キャピラリー電圧は 1500V で最大強度を示した。

2-2. SIM モードでの分析

SIM モードではベンゾ(a)ピレンの質量スペクトルから $(M+H)^+$ が基準ピークであったことから、このイオンをモニターイオンとした。結果の SIM クロマトグラムは図.6 に示したが、0.1ppm が検出限界であった。

E. 結論

紫外線ランプを使用した API として APPI が特定の化合物に対して有効であることが本研究において実証された。また APPI の最適化においても今後様々な化合物の検討を行うことで化合物に合った最適値の情報を提供していくつもりである。

この APPI による内分分泌かく乱化学物質の分析においても N-メチルカルバメート系農薬やベンゾ(a)ピレンといった多環芳香族炭化水素についても選択性の高い高感度分析が可能であり環境試料中の微量分析に有用であることが実証された。今後さらに様々な内分分泌かく乱化学物質への応用についての情報を提供していくつもりである。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 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

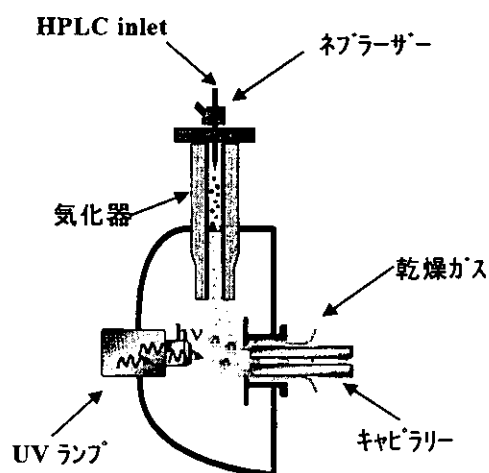


図.1 大気圧光イオン源の構成図

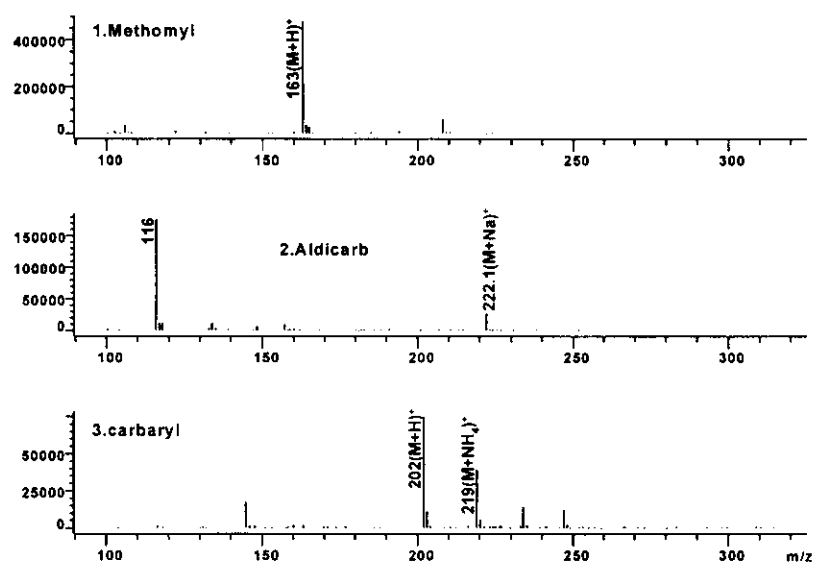


図.2 各 N-メチルカルバメート系農薬の質量スペクトル

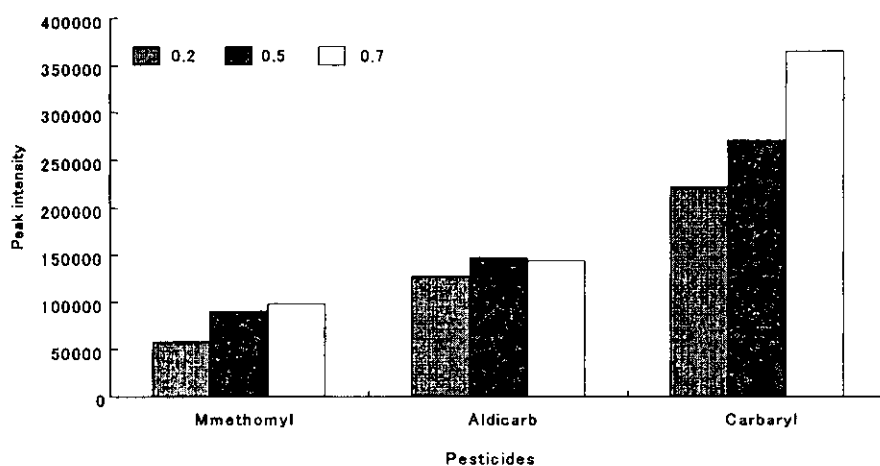


図.3 移動相流量と各 N-メチルカルバメート系農薬のピーク強度

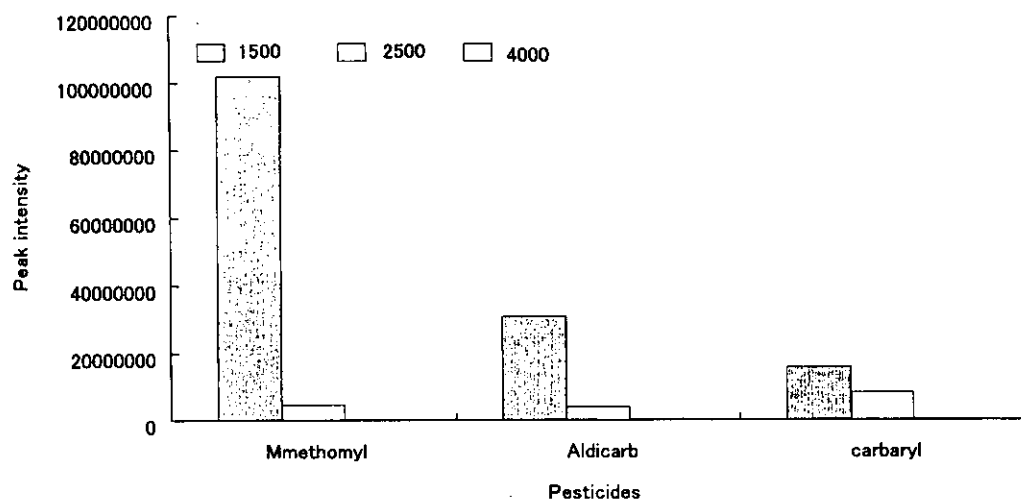


図.4 キャピラリー電圧と各 N-メチルカルバメート系農薬のピーク強度

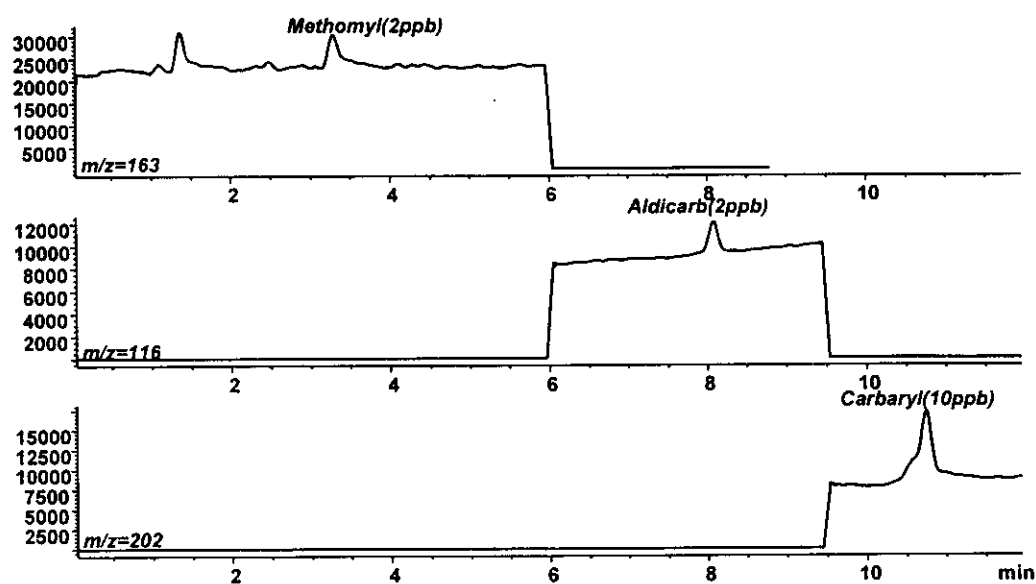


図.5 APPI による各 N-メチルカルバメート農薬類の SIM クロマトグラム

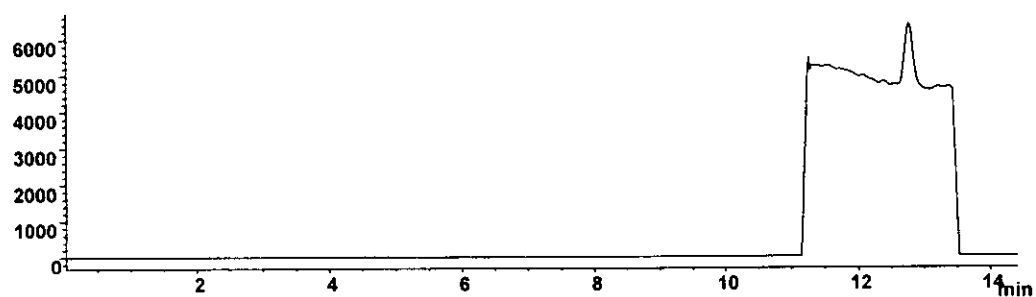


図.6 ベンゾ(a)ピレンの SIM クロマトグラム(0.1ppm)

平成 13 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の分析

及び動態解析

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、北川陽子、高取 聡 大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

酵母 Two-Hybrid 法を用いてスチレンダイマー、トリマー、臭素化ビフェニル及び臭素化ジフェニルエーテル等ならびにこれらの代謝物の甲状腺ホルモン様作用を評価した。これら化学物質及びそれらの代謝物には甲状腺ホルモン様作用は認められなかった。

また、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アンドロジェン様作用を評価した。評価した化学物質にアンドロジェン様作用は、認められなかった。化学物質の抗アンドロジェン作用を併せて評価した。アルキルフェノール類、パラベン類及びベンゾフェノン誘導体等に作用が認められた。抗アンドロジェン作用を示すうえでフェノール残基を有することが重要であった。抗アンドロジェン作用が認められた化学物質の中には、エストロジェン様作用を有するものがあった。これら化学物質は、エストロジェン様作用及び抗アンドロジェン作用の独立した双方の作用によって性バランスを雌性に偏重させる可能性が示唆された。

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. 甲状腺ホルモン様作用の評価

TR-GAL4DBD (thyroid hormone receptor α -GAL4 DNA binding domain fusion protein) 及び TIF2-GAL4AD (TIF2-GAL4 activation domain fusion protein) を発現させた酵母に化学物質を作用させた (30 °C、24 時間)。作用後、酵母を冷 Z-buffer で洗浄し、OD₅₉₅ を測定した。1 mg/ml となるようにザイモリエースを加え、細胞壁を分解した (37 °C、15 分間)。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 (ONPG) 溶液を加え、インキュベーションを行った (30 °C、

30 分間)。OD₄₁₀ 及び OD₅₇₀ を測定し、Miller の式に基づき、生成した β -ガラクトシダーゼ (以下、ガラクトシダーゼ) 活性を算出した。この酵素活性を化学物質の甲状腺ホルモン様作用の指標とした。各化学物質の酵母に対する毒性は作用前後の OD₅₉₅ を測定することにより評価した。

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

S-9 mix (20 μ l/ml ラット S-9, 0.8 mM NADPH, 0.8 mM NADH, 1.0 mM G-6-P, 0.4u/ml G-6-P デヒドロゲナーゼ, 20 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 6.6 mM KCl, 及び 1.6 mM MgCl₂) に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化学物質を加え、インキュベーションを行った (37 °C、4 時間)。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 $\times 10^{-1}$ M の *trans*-スチルベンを用いた。インキュベーション後、アッセイを行うまで -80 °C で保存した。

B-3. 甲状腺ホルモン様作用の評価 (S-9 mix による代謝物)

TR-GAL4DBD と TIF2-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 $OD_{595} = 0.02$ 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、インキュベーションを行った (30 °C、4 時間)。以下、B-1. (甲状腺ホルモン様作用の評価) に記載した方法によって酵母内のガラクトシダーゼ活性を調べた。S-9 mix 処理によって生成する代謝物が甲状腺ホルモン様活性を示す化学物質は、報告されていない。そこで代謝物がエストロゲン様活性を示す *trans*-スチルベンを各実験時に併せて処理し、ER を導入した酵母を用いて S-9 mix 処理の有効性を確認した。

B-4. アンドロゲン様作用の評価

AR-GAL4DBD (androgen hormone receptor - GAL4 DNA binding domain fusion protein) 及び SRC1-GAL4AD (SRC1-GAL4 activation domain fusion protein) を発現させた酵母に化学物質を作用させた (30 °C、24 時間)。作用後、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、細胞壁を分解した (37 °C、15 分間)。0.67 mg/ml となるように ONPG 溶液を加え、インキュベーションを行った (30 °C、60 分間)。以下、B-1. (甲状腺ホルモン様作用の評価) に記載した方法に従って、酵母内に産生されたガラクトシダーゼ活性を算出した。この酵素活性を化学物質のアンドロゲン様作用の指標とした。

B-5. 抗アンドロゲン作用の評価

AR-GAL4DBD 及び SRC1-GAL4AD を発現させた酵母を前培養した。これを $OD_{595} = 0.2$ 前後に SD 培地で希釈し、酵母懸濁液とした。DMSO に溶解した化学物質及び 5- α -ジヒドロテストステロン (DHT; 2.0×10^{-8} M) を添加し、インキュベーションを行った (30 °C、4 時間)。以下、B-4. (アンドロゲン様作用の検出) に記載した方法にしたがって、産生されたガラクトシダーゼ活性を測定した。DHT 単独作用時のガラクトシダーゼ活性と比較し、化学物質による抗アンドロゲンの指標とした。酵母に 2.0×10^{-8} M の DHT を 4 時間作用させたときの酵素活性を 100% とし、70% 未満になるものをポジティブとした。抗アンドロゲン作用の評価は、酵母に対する毒性が認められない 1.0×10^{-5} M 以下の濃度で行った。

B-6. 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 (表 1)

C-1. 化学物質の甲状腺ホルモン様作用の評価

C-1-1. 甲状腺ホルモン様作用の評価 (S-9 mix 処理なし)

酵母に 3, 5, 3'-トリヨードチロニン (T_3) を 24 時間作用させた。 1.0×10^{-6} M の T_3 作用時に最も高いガラクトシダーゼ活性

が認められた。 1.0×10^{-6} M の T_3 作用時の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。また、3, 5, 3', 5'-テトラヨードチロニン(チロキシニン; T_4)または、3, 3', 5'-トリヨードチロニン (リバース T_3 ; rT_3) を各々 24 時間作用させた際の EC_{10} は、 4.2×10^{-8} M 及び 5.0×10^{-7} M であった (図 1)。

C-1-2. 甲状腺ホルモン様作用の評価 (S-9 mix 処理あり)

酵母に T_3 を 24 時間作用させたとき、 1.0×10^{-6} M の T_3 作用させた際に最も高いガラクトシダーゼ活性が認められた。 1.0×10^{-6} M の T_3 作用時のガラクトシダーゼ活性を 100% としたとき EC_{10} は、 3.1×10^{-8} M であった。

C-1-3. 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
ビフェニル、臭素化ビフェニル、ジフェニルエーテル、臭素化ジフェニルエーテル、テトラブロモビスフェノール A 及びこれら化学物質の S-9 mix 代謝物に甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった。

C-1-4. 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、その他の紫外線吸収剤及びこれら化学物質の S-9 mix 代

謝物に甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった。

C-1-5. 酸化防止剤

フェノール系酸化防止剤及びその他の酸化防止剤に甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった。

C-1-6. スチレンダイマー及びトリマー
スチレンダイマー、トリマー及びこれら化学物質の S-9 mix 代謝物に甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった。

C-2. 化学物質のアンドロジェン様 作用及び抗アンドロジェン作用 の評価

C-2-1. アンドロジェン様作用の評価

酵母に DHT を 4 時間作用させた。 1.0×10^{-6} M の DHT 作用時に最も高いガラクトシダーゼ活性が認められた。 1.0×10^{-6} M の DHT 作用時のガラクトシダーゼ活性を 100% とした時 EC_{10} は、 2.3×10^{-9} M であった (図 2)。

C-2-2. 抗アンドロジェン様作用の評価

抗アンドロジェン作用を有するフェニトロチオン (MEP)、リニュロン及び *p, p'*-DDE は、それぞれ 1.0×10^{-5} M 作用時において DHT によって誘導される酵素活性を 11、44、及び 59% に低下させた (図 3)。このとき薬物の酵母に対する毒性は認められなかった。

C-2-3. ビスフェノール A 誘導体及び ビスフェノール F

ビスフェノール A 誘導体及びビスフェノール F にアンドロジェン様作用は、認められなかった。BADGE・2HCl 及びビスフェノール F に抗アンドロジェン作用が認められた。

C-2-4. 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、アジピン酸エステル類及びその他の可塑剤にアンドロジェン様作用は、認められなかった。フタル酸モノヘキシル及びフタル酸モノエチルヘキシルに抗アンドロジェン作用が認められた。

C-2-5. アルキルフェノール類

p、*m* 及び *o*-アルキルフェノール及び BHT 等のフェノール残基を有する化学物質にアンドロジェン様作用は、認められなかった。*p*-アルキルフェノール (*n*-プロピル、*n*-ブチル、*s*-ブチル、*t*-ブチル、*n*-ペンチル、*t*-ペンチル、*n*-ヘキシル、*n*-ヘプチル、*n*-オクチル、*t*-オクチル、*n*-ノニル、*br*-ノニル)、*o*-*t*-ブチルフェノール、*o*-フェニルフェノール及び BHA に抗アンドロジェン作用が認められた。

C-2-6. パラベン及び安息香酸類

パラベン類、*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アンドロジェン様作用は、認められなかった。

プロピルパラベン、ブチルパラベン、ベンジルパラベン及び 3-フェノキシ安息香酸に抗アンドロジェン作用が認められた。

C-2-7. 臭素化ビフェニル、 臭素化ジフェニルエーテル及び テトラプロモビスフェノール A

ビフェニル、臭素化ビフェニル、ジフェニルエーテル、臭素化ジフェニルエーテル及びテトラプロモビスフェノール A にアンドロジェン様作用は、認められなかった。テトラプロモビスフェノール A に抗アンドロジェン作用が認められた。

C-2-8. 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及びその他の紫外線吸収剤にアンドロジェン様作用は、認められなかった。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)、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)、2, 2'-ジヒドロキシ-4, 4'-ジメトキシベンゾフェノン及び 2, 4-ジヒドロキシベンゾフェノンに抗アンドロジェン作用が認められた。

C-2-9. 酸化防止剤

フェノール系を主とする酸化防止剤にアンドロジェン様作用及び抗アンドロジェン作用は、認められなかった。

C-2-10. スチレン、スチレンダイマー 及びスチレントリマー

スチレン、スチレンダイマー及びスチレントリマーにアンドロジェン様作用及び抗アンドロジェン作用は、認められなかった。

C-2-11. ベンゼン誘導体及び

その他化学物質

フェノール、アルキルベンゼン及びスチルベンにアンドロジェン様作用及び抗アンドロジェン作用は、認められなかった。17- β -エストラジオール (E_2) にアンドロジェン様作用が認められた。 E_2 、DES、及び 1-ヒドロキシピレンに抗アンドロジェン作用が認められた。

C-3. 新規可塑剤候補となる

化学物質の評価

テルモ株式会社から提供された新規可塑剤候補を含む化学物質（フタル酸エステル類、トリメリット酸エステル類、アジピン酸エステル類及びクエン酸エステル類）のエストロジェン様作用、甲状腺ホルモン様作用、アンドロジェン様作用及び抗アンドロジェン作用を評価し、これらに作用がないことを明らかにした。

D. 考察

D-1. 化学物質の甲状腺ホルモン様作用の評価

昨年の本研究において、種々の *p*、*o*、*m*-アルキルフェノール及びアルキルベンゼン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。その結果、(1) フェノール性水酸基を有すること (2) 水酸基に対して *o* 位にイソプロピル基程度の大きさを持つ置換基を有することの 2 点が甲状腺ホルモン様作用を示す化学物質の構造上の条件として考えられた。

臭素化ビフェニル、臭素化ビフェニルエーテル、テトラプロモビスフェノール A、ベンゾフェノン誘導体、スチレンダイマー及びスチレントリマー等の化学物質の甲状腺ホルモン様作用を評価したが、作用する化学物質は見出せなかった。評価を行った化学物質が前述の作用を示す化学物質の構造上の条件を満たしていないためであると考えられた。

樹脂に添加される酸化防止剤には、分子内に *o*-*t*-ブチルフェノール残基を有するものがある。これら化学物質について甲状腺ホルモン様作用を評価したが、作用は認められなかった。これは、*o*-*t*-ブチルフェノール残基に付随する部分がかさ高いためと考えられる。

甲状腺ホルモン様作用を示すうえでフェノール性水酸基が一つの鍵となっている。このことから、エストロジェン様作用と同様に代謝物について評価する必要がある。甲状腺ホルモンに類似した構造をもつ PCB の代謝物（水酸化体）が、トランスサイレチンに対して、 T_4 と競合的に結合し、甲状腺ホルモンの代謝をかく乱し

ているとの報告がある (Cheek, A. O., *et al.*, *Environ. Health Perspect.*, **107**, 273, 1999)。また、臭素化難燃剤がトランスサイレチンに対して T_4 と競合的に結合するとの報告 (Meerts, I. A. T., *et al.*, *Toxicol. Sci.*, **56**, 95, 2000) もある。そこで臭素化ジフェニルエーテル、臭素化ビスフェニル及びテトラブロモビスフェノール A 等の化学物質及びその代謝物について甲状腺ホルモン様作用の評価を行った。その結果、S-9 mix の有無に関わらず、これらの化学物質に甲状腺ホルモン様作用は認められなかった。しかしながら、これら化学物質については、臭素数の異なる異性体が数多く存在し、今回評価を行った化学物質以外の異性体が作用を持つ可能性は否定できない。今後、抗甲状腺ホルモン作用も視野に入れて検討を行う必要がある。

D-2. 化学物質のアンドロジェン様作用及び抗アンドロジェン作用の評価

化学物質のアンドロジェン様作用を評価した結果、DHT を除いて作用を示した化学物質は、 E_2 のみであった。DHT が AR に結合する際に A 環のケト基が AR の極性アミノ酸残基 (グルタミン及びアルギニン) との間で水素結合を形成することが知られている (Matias, P. M., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **275**, 26164, 2000)。また、同じく D 環の水酸基は、AR の極性アミノ酸残基 (アスパラギン及びトレオニン) との間で水素結合を形成することが知ら

れている。 E_2 にのみアンドロジェン様作用が認められたことから A 環の水酸基と D 環の水酸基の双方が AR の極性アミノ酸残基との間での水素結合の形成に寄与したと考えられる。また、強力なエストロジェン様作用を有する DES については、アンドロジェン様作用が認められなかった。このことから、ステロイド骨格もリガンド認識上重要な要素であると推測される。

抗アンドロジェン作用を示す化学物質として、MEP、*p,p'*-DDE、リニュロン、フルタミド及びビクロゾリンが知られている。これら化学物質は、本実験系においても抗アンドロジェン作用を有することが認められた。本実験系は、化学物質の抗アンドロジェン作用を評価しうると考えられる。

化学物質の抗アンドロジェン作用を評価した結果、BADGE・2HCl、ビスフェノール F、テトラブロモビスフェノール A、フタル酸モノヘキシル、アルキルフェノール類、パラベン類、ベンゾフェノン誘導体及び 1-ヒドロキシピレンに抗アンドロジェン作用が認められた。これら化学物質の構造上の特徴として、(1) ベンゼン環を有すること及び(2) BADGE・2HCl 及びフタル酸モノエステル類を除きフェノール性水酸基を有することの二点が挙げられる。

前立腺がん等のアンドロジェンに対して応答性を有するがんについては、治

療に抗アンドロジェン薬が使用される。抗アンドロジェン作用を有する薬物の構造活性相関についての知見がある (Singh, S. M. *et al.*, *Current Med. Chem.*, 7, 211, 2000)。ステロイド骨格を持たない化学物質が強い抗アンドロジェン作用を示すための条件として (1) 電子不足状態のベンゼン環を有すること、(2) 水素結合を形成するうえでの電子を供与する置換基を有すること 及び (3) 分子内水素結合の形成によって一定のコンフォマーが存在しうることが挙げられている。MEP、*p*, *p'*-DDE、リニュロン、フルタミド及びビンクロゾリンのベンゼン環は、附随するニトロ基、塩素基、トリフルオロメチル基等の電子吸引性の置換基によって電子不足状態にあると考えられる。また、これらのニトロ基、塩素基、トリフルオロメチル基等は、AR との間での水素結合の形成に寄与しうると考えられる。この点において抗アンドロジェン作用を有する化学物質の構造は、抗アンドロジェン薬をデザインするときに考慮される条件を満たしている。

本研究で見出された抗アンドロジェン作用を有する化学物質の構造上の特徴として、(1) ベンゼン環を有すること 及び (2) BADGE・2HCl 及びフタル酸モノヘキシルを除きフェノール性水酸基を有することの二点が挙げられる。そのベンゼン環には、水酸基及びエーテルに由来する酸素原子ないしはカルボキシル基が付随しており、ベンゼン環内は、電子

不足状態の状態にあると考えられる。また、水酸基、エーテルもしくはカルボキシル基に由来する酸素原子は、AR との間での水素結合の形成に寄与しうると考えられる。従って、見出された化学物質の構造についても、抗アンドロジェン薬をデザインするときに考慮される条件を満たしていると思われる。

見出された抗アンドロジェン作用を有する化学物質群の中にフェノール残基を有するものが多く含まれたことは、興味深い結果である。これらは、抗アンドロジェン作用を示すに加えてフェノール残基を有するためエストロジェン様作用も有している。則ち、エストロジェン様作用と抗アンドロジェン作用の二つの独立した作用機序によって性分化のバランスを雌性に偏重させる可能性が考えられる。

フタル酸エステルが、精巣重量の低下等の影響を及ぼすことが指摘されている。今回、フタル酸モノヘキシルに抗アンドロジェン作用が認められた。フタル酸エステルの生体への影響が弱いエストロジェン様作用 (他の評価系でエストロジェン様作用があると指摘されている) に由来している可能性に加えて、フタル酸モノエステルによる抗アンドロジェン作用に由来している可能性も考えられる。このためフタル酸モノエステルの抗アンドロジェン作用について評価することは重要である。今後もフェノール残基を有する化学物質について重点的に抗アンド

ロジェン作用を評価する必要性があると考えられる。

酵母 Two-Hybrid 法は、評価する化学物質の毒性によって誘導されるガラクトシダーゼの活性が低下し、アンタゴニスト作用に関しては偽陽性を生じうる。そのため、酵母の増殖を抑制しない 1.0×10^{-6} M 以下の濃度での評価を行ったが、結果の解釈はアゴニスト作用の評価よりも慎重に行う必要がある。さらに、化学物質が、DHT の酵母内への移行を阻害することによっても偽陽性を生じうる。従って、本研究によって見出された化学物質については、単離した AR を用いた競合試験等を行い、より詳細かつ確実な評価が必要と思われる。

D-3. 新規可塑剤候補となる

化学物質の評価

可塑剤は、生活関連製品に欠くことのできない原料である。しかし、一部のフタル酸エステルには、エストロゲン様作用があることが指摘されている。そのため、内分泌かく乱作用のない可塑剤への移行が求められている。そこで新規可塑剤候補を含む化学物質のエストロゲン様作用、甲状腺ホルモン様作用、アンドロゲン様作用及び抗アンドロゲン作用を評価した。これらの化学物質には、いずれの作用も認められなかった。しかし、本研究では、フタル酸モノエステルに抗アンドロゲン作用があることを認めている。従って、今後、これら化学物

質の代謝物についても評価する必要があると思われる。内分泌かく乱作用を有する化学物質の構造上の特徴が明らかになりつつある。これらの情報が、可塑剤をはじめとする生活関連製品の原料選択及び開発に活かされることが望まれる。

E. 結論

1. 酵母 Two-Hybrid 法の操作過程に化学物質の S-9 mix 処理過程を導入し、代謝物の甲状腺ホルモン作用を評価する条件を確立した。
2. S-9 mix 処理の有無に関わらず、評価した PBB、PBDE 及びテトラブロモビスフェノール A に甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった。
3. S-9 mix 処理の有無に関わらず、スチレンダイマー及びトリマーに甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった。
4. *p*-ブチルフェノール残基を分子内に有する酸化防止剤に甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった。
5. アンドロゲン様作用を評価する酵母 Two-Hybrid 法を運用した。 1.0×10^{-6} M の DHT を 4 時間作用させた際に最も高いガラクトシダーゼ活性が認められた。 1.0×10^{-6} M の DHT 作用時のガラクトシダーゼ活性を 100%としたとき EC_{10} は、 2.3×10^{-9} M であった。
6. E_2 にアンドロゲン様作用が認められた。その EC_{10} は、 3.9×10^{-6} M で

あった。

7. E₂ 以外の化学物質にアンドロジェン様作用は認められなかった。
8. BADGE・2HC1、ビスフェノール F、フタル酸モノヘキシル、アルキルフェノール類、パラベン類、ベンゾフェノン類及びテトラブロモビスフェノール A に抗アンドロジェン作用が認められた。
9. 抗アンドロジェン作用を示す化学物質の多くが、フェノール残基を有していた。このため、抗アンドロジェン作用に加えてエストロジェン様作用を示すものもあった。よって、複数の作用機序によって内分泌かく乱作用を発揮する化学物質があると示唆される。
10. 新規可塑剤候補を含む化学物質（フタル酸エステル類、トリメリット酸エステル類、アジピン酸エステル類及びクエン酸エステル類）のエストロジェン様作用、甲状腺ホルモン様作用、アンドロジェン様作用及び抗アンドロジェン作用を評価し、これらに作用がないことを明らかにした。

F. 健康危険情報

1. ビスフェノール A
歯科治療に使用されるビスフェノール A ジグリシジルエーテルメタクリル酸 (bis-GMA) をベースとする密封剤、50mg で加療 1 時間後、bis-GMA に含まれるビスフェノール

A がだ液中から検出された (90-931 μ g) された (Olea, N., *et al.*, *Environ. Health Perspect.*, 104, 298, 1996)。

2. 臭素化ビフェニル

妊娠中や幼児期にポリ臭化ビフェニル類の曝露を受けた 19 名のミシガンの子供達に成長への影響が指摘された (Seagull, E. A., *Am. J. Public Health*, 79, 1401, 1989)。

3. 臭素化ジフェニルエーテル

スウェーデン人の母乳中の臭素化ジフェニルエーテル濃度が 1972 年から 1997 年において 0.07 ng/g から 4.02 ng/g (対脂肪重量) へと著しい上昇傾向を示している (Meironyté, D., *et al.*, *J. Toxicol. Environ. Health*, 58, 329, 1999)。

4. ベンゾフェノン

接触性皮膚炎及び光過敏性皮膚炎の原因として指摘されている (Schauder, S., *et al.*, *Contact Dermatitis*, 37, 221, 1997)。

5. スチレン

プラスチック製造時にスチレン及びアセトンに曝露された従業員の精子に関する調査結果では、生存率、運動性は良好であるが、正常な形状をした精子が減少していた。(Jelnes, J. E., *Reprod. Toxicol.*, 2, 209, 1988)。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 酵母 Two-Hybrid 法を用いた化学物質及び代謝物の甲状腺ホルモン様作用の評価

北川陽子、高取 聡、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 4 回研究
発表会、2001 年 12 月、つくば

2. 酵母 Two-Hybrid 法を用いた化学物質のアンドロジェン様作用及び抗アンドロジェン作用の評価

高取 聡、北川陽子、小西良昌、
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 4 回研究
発表会、2001 年 12 月、つくば

H. 知的所有権の取得状況

なし

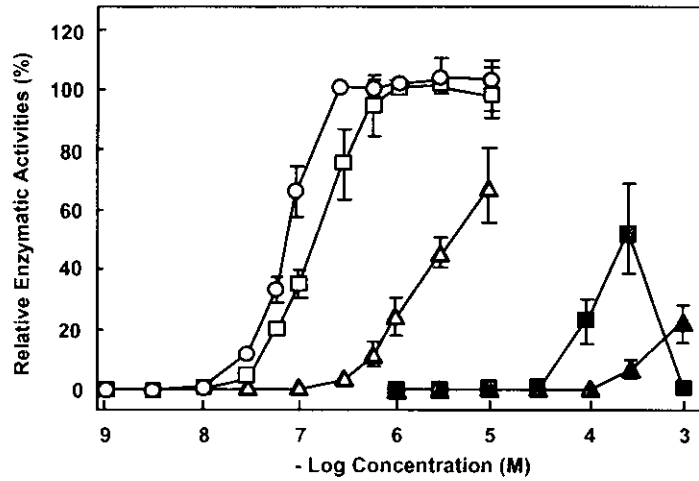


図 1

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 (S-9 mix 処理なし) T₃ (○)、T₄ (□)、rT₃ (△)、*o*-イソプロピルフェノール (■)、*o*-*t*-ブチルフェノール (▲) . * : 1.0×10^{-6} M T₃ 作用時のガラクトシダーゼの活性を 100% としたときの相対活性.

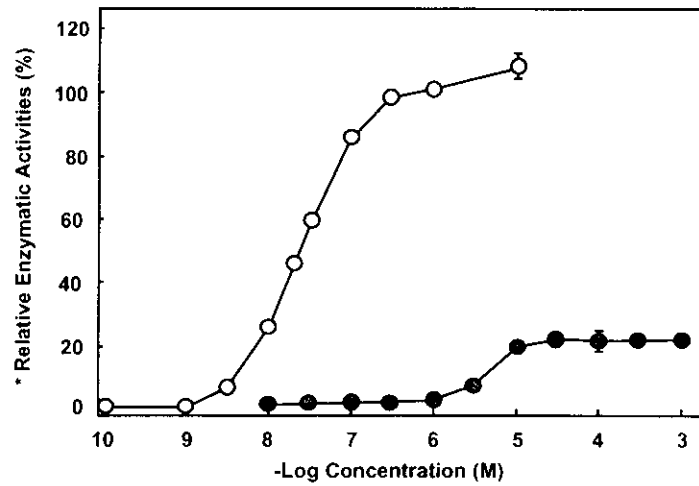


図 2

酵母 Two-Hybrid 法におけるアンドロゲン様作用の用量反応曲線 (S-9 mix 処理なし) DHT (○)、E₂ (●) . * : 1.0×10^{-6} M DHT 作用時のガラクトシダーゼの活性を 100% としたときの相対活性.

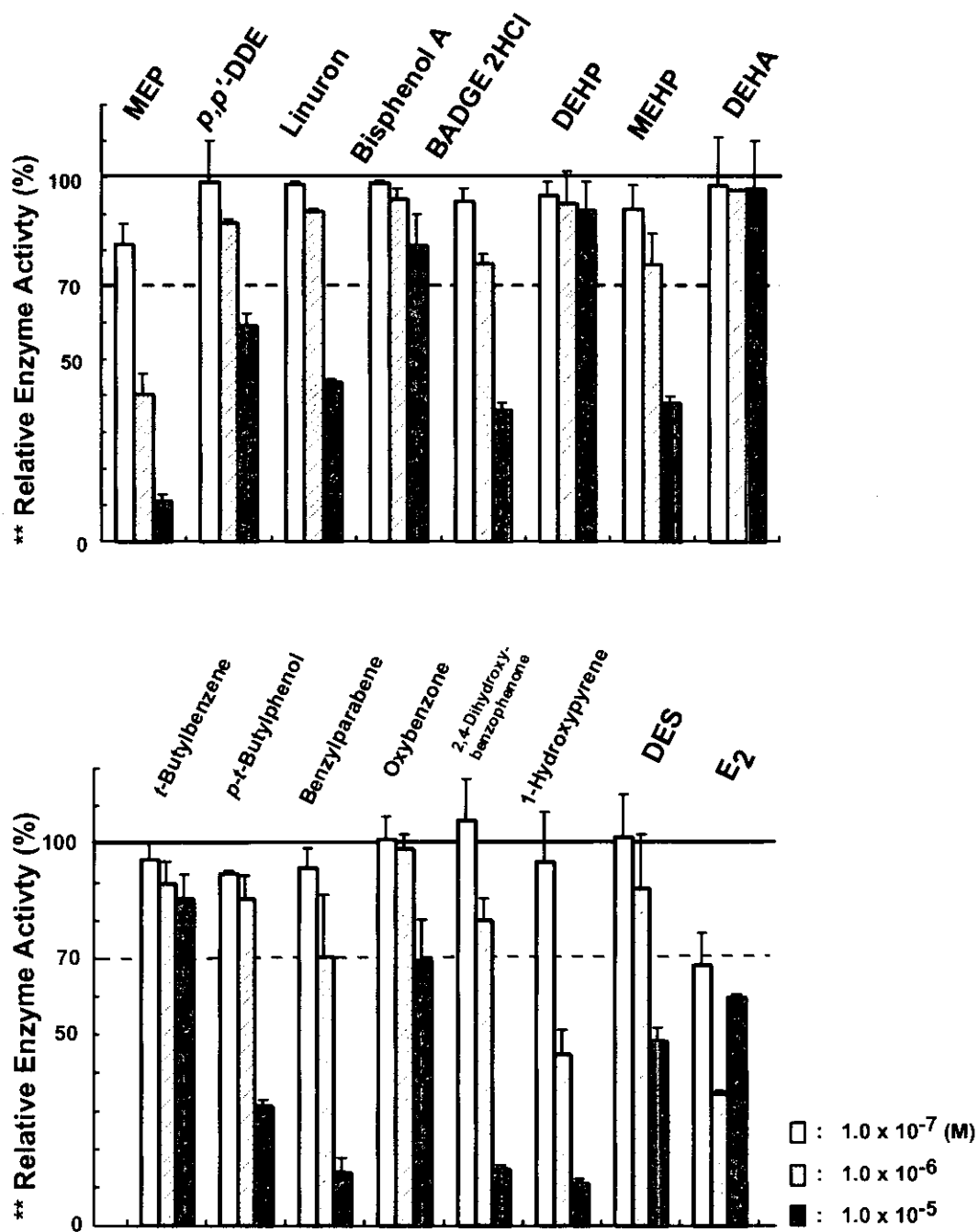


図 3

酵母 Two-Hybrid 法における抗アンドロジェン作用の評価.

DEHP, diethylhexylphthalate; MEHP, monoethylhexylphthalate; DEHA, diethylhexyladipate.

**: 2.0×10^{-8} M DHT 作用時のガラクトシダーゼの活性 100% としたときの相対活性.