

化学物質名	甲状腺ホルモン α 受容体 (TR α)		アンドロゲン受容体 (AR)		用途・備考
	アゴニスト作用 (M) ^a		アゴニスト作用 (M) ^b		
	S-9 mix (-)	S-9 mix (+)	S-9 mix (-)	S-9 mix (+)	
1 ビスフェノール A	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	ポリカーボネート樹脂原料
2 BAME	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	ポリカーボネート樹脂原料
3 BAME 2HC1	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	ポリカーボネート樹脂溶出成分
4 BAME 4H10	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	ポリカーボネート樹脂溶出成分
5 ビスフェノール F	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 5.8 x 10 ⁻³	樹脂原料
6 フタル酸ジメチル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
7 フタル酸ジエチル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
8 フタル酸ジプロピル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
9 フタル酸ジイソブチル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
10 フタル酸ジブチル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
11 フタル酸ジペンチル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
12 フタル酸ジヘプチル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
13 フタル酸ジエチルヘキシル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
14 フタル酸ジイソノニル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
15 フタル酸ジイソデシル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
16 フタル酸ジシクロヘキシル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
17 フタル酸ベンジルブチル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
18 フタル酸モノノブチル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
19 フタル酸モノノヘキシル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
20 フタル酸モノエチルヘキシル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 4.2 x 10 ⁻³ > 1.5 x 10 ⁻³	フタル酸エステル分解物 フタル酸エステル分解物 フタル酸エステル分解物
21 アジピン酸ジメチル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
22 アジピン酸ジエチル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
23 アジピン酸ジブチル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
24 アジピン酸ジイソブチル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
25 アジピン酸ジイソブチル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
26 アジピン酸ジイソブチル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
27 アジピン酸ジエチルヘキシル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
28 アジピン酸ジイソノニル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
29 バレリン酸 4-キベスロ-ハイドロキシフェニル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
30 セバシン酸ジブチル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤
31 アゼライン酸ジエチルヘキシル	> 3.0 x 10 ⁻⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁻⁴	> 1.0 x 10 ⁻³	可塑剤

表 1-1 酵母 Two-Hybrid 法による化学物質の内分泌かく乱作用の評価 (まとめ)

a. 1.0 x 10⁻⁴ M の トリヨードチロニン作用時の酵素活性の 10% を誘導する薬物の濃度

b. 1.0 x 10⁻⁴ M の 5- α -ジヒドロテストステロン作用時の酵素活性の 10% を誘導する薬物の濃度; c. 2.0 x 10⁻⁴ M の 5- α -ジヒドロテストステロン作用時に誘導される酵素活性を 70% に低下させる薬物の濃度

N.T. : Not Tested

化学物質名	中状態ホルモン α 受容体 (TRα)		アン드로ゲン受容体 (AR)		用途・備考
	アゴニスト作用 (M) ^b		アンタゴニスト作用 (M) ^d		
	S-9 mix (-)	S-9 mix (+)	S-9 mix (-)	S-9 mix (+)	
32 p-メチルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	消毒剤、樹脂添加剤
33 p-エチルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	界面活性剤、樹脂添加剤
34 p-p-プロピルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	8.4 x 10 ⁴	界面活性剤
35 p-s-ブチルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	2.8 x 10 ⁴	界面活性剤
36 p-t-ブチルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁴	界面活性剤、樹脂添加剤
37 p-p-ブチルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁴	界面活性剤、樹脂添加剤
38 p-t-ペンチルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁴	界面活性剤、樹脂添加剤
39 p-p-ペンチルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	1.8 x 10 ⁴	界面活性剤、樹脂添加剤
40 p-p-ヘキシルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	1.7 x 10 ⁴	界面活性剤、樹脂添加剤
41 p-p-ヘプチルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	2.4 x 10 ⁴	界面活性剤、樹脂添加剤
42 p-t-オクチルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	6.7 x 10 ⁴	界面活性剤、樹脂添加剤
43 p-p-オクチルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	7.6 x 10 ⁴	界面活性剤、樹脂添加剤
44 p-4t-ノニルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	3.9 x 10 ⁴	界面活性剤、樹脂添加剤
45 p-p-ノニルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	3.7 x 10 ⁴	界面活性剤、樹脂添加剤
46 p-p-ドデシルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	界面活性剤、樹脂添加剤
47 n-メチルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	界面活性剤、樹脂添加剤
48 n-エチルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	界面活性剤、樹脂添加剤
49 o-イソプロピルフェノール	3.1 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	界面活性剤、樹脂添加剤
50 o-p-プロピルフェノール	4.8 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	4.2 x 10 ⁴	界面活性剤、樹脂添加剤
51 o-フェニルフェノール (OPP)	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	3.7 x 10 ⁴	界面活性剤、樹脂添加剤
52 n-ブチルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	防かび剤
53 p-t-ブチルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	酸化防止剤
54 BHT	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	酸化防止剤
55 BHA	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	9.1 x 10 ⁴	酸化防止剤
56 メチルパラベン	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	保存料
57 エチルパラベン	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	保存料
58 プロピルパラベン	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	5.3 x 10 ⁴	保存料
59 ブチルパラベン	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁴	保存料
60 ペンチルパラベン	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	1.0 x 10 ⁴	保存料
61 p-ヒドロキシ安息香酸 Na	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	パラベン代謝物
62 3-フェノキシ安息香酸	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	6.7 x 10 ⁴	パラベン代謝物

表 1-2 糖付 Two-Hybrid 法による化学物質の内分泌かく乱作用の評価 (まとめ)

化学物質名	甲状腺ホルモン α 受容体 (TRα)		アンドロゲン受容体 (TRβ)		用途・備考
	アゴニスト作用 (M) ^a		アンタゴニスト作用 (M) ^c		
	S-G 値 (x)	S-G 値 (x)	S-G 値 (x)	S-G 値 (x)	
63 ビフェニル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	防かび剤
64 4-ブロモビフェニル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	PBB
65 4,4'-ジヒドロキシビフェニル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	PBB
66 2,4',5'-トリブロモビフェニル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	PBB
67 2,2',4,5'-ペンタブロモビフェニル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	PBB
68 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	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	PBB
69 デカブロモビフェニル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	PBB, 難燃剤
70 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	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	PBB, 難燃剤
71 BP-200 (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	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	PBB, 難燃剤
72 ジフェニルエーテル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	熱媒体
73 4-ブロモジフェニルエーテル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	PDE
74 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	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	PDE
75 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	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	PDE, 難燃剤
76 デカブロモジフェニルエーテル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	PDE, 難燃剤
77 テトラブロモビスフェノール A	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	難燃剤
78 ベンゾフェノン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	紫外線吸収剤
79 オキシベンゾン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	紫外線吸収剤
80 ジオキシベンゾン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	紫外線吸収剤
81 オクタロオキシベンゾン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	紫外線吸収剤
82 2,2'-ジヒドロキシ-4,4'-ジメトキシベンゾフェノン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	紫外線吸収剤
83 2,4'-ジヒドロキシベンゾフェノン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	ベンゾフェノン代謝物
84 サリチル酸 4-ノブチルフェノールエステル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	紫外線吸収剤
85 4-ノブチル-4'-メトキシベンゾイルメタン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	紫外線吸収剤
86 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	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	紫外線吸収剤
87 4-メトキシチンヒド 2-エチルヘキシルエステル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	紫外線吸収剤
88 2,5-ビス (5-ノブチル-2'-ベンゾイル)オキサゾイルチオフェン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	紫外線吸収剤
89 2-(2'-ヒドロキシ)-2-メトキシフェニルベンゾトリアゾール	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	紫外線吸収剤
90 2-(2'-ヒドロキシ)-2-ヒドロキシ-5-メチルフェニル-4-ヒドロキシベンゾトリアゾール	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁴	紫外線吸収剤

表 1-3 酵母 Two-Hybrid 法による化学物質の内分泌かく乱作用の評価 (まとめ)

化学物質名	中核ホルモンα受容体 (TRα)		アンドロゲン受容体 (AR)		用途・備考
	アゴニスト作用 (nM) ^a		アゴニスト作用 (nM) ^b		
	S-9 mix (-)	S-9 mix (+)	S-9 mix (-)	S-9 mix (+)	
91 4-ヒドロキシメチル-2,6-ジ- <i>n</i> -プロピルフェノール	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	酸化防止剤
92 4,4'-チオビス(3-メチル-6- <i>n</i> -プロピルフェノール)	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	酸化防止剤
93 2,2'-メチレンビス(4-メチル-6- <i>n</i> -プロピルフェノール)	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	酸化防止剤
94 1,1'-ビス(2-メチル-4-ヒドロキシ-5- <i>n</i> -プロピルフェノール) ブタン	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	酸化防止剤
95 2,2'-メチレンビス(4-エチル-6- <i>n</i> -プロピルフェノール)	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	酸化防止剤
96 4,4'-メチレンビス(2,6-ジ- <i>n</i> -プロピルフェノール)	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	酸化防止剤
97 2,2'-メチレンビス[6-(4-メチルシクロヘキシル)- <i>p</i> -クレゾール]	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	酸化防止剤
98 ペンタエリトリールセトラキス[3- <i>tert</i> -ブチル-5'-ジ- <i>n</i> -プロピル-4'-ヒ ドロキシフェニル]プロピオネート [†]	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	酸化防止剤
99 1,3,5-トリメチル-2,4,6-トリリス(3,5'-ジ- <i>n</i> -プロピル-4'-ヒドロキシ ベンゼン)ベンゼン	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	酸化防止剤
100 3- <i>tert</i> -ブチル-5'-ジ- <i>n</i> -プロピル-4'-ヒドロキシフェニル]プロピオン酸	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	酸化防止剤
101 3,3'-チオジプロピルビオン酸ジ- <i>p</i> -トギルエチル	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	酸化防止剤
102 スチレン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	工業品原料
103 1,2- <i>cis</i> -ジフェニルシクロブタン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	スチレンダイマー
104 1,2- <i>trans</i> -ジフェニルシクロブタン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	スチレンダイマー
105 2,4-ジフェニル-1-プロパン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	スチレンダイマー
106 1,3-ジフェニルプロパン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	スチレンダイマー
107 2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	スチレントリマー
108 1,3-フェニル-4- <i>n</i> -プロピルフェニル]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	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	スチレントリマー
109 1,3-フェニル-4- <i>n</i> -プロピルフェニル]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	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	スチレントリマー
110 1,3-フェニル-4- <i>n</i> -プロピルフェニル]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	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	スチレントリマー
111 1,3-フェニル-4- <i>n</i> -プロピルフェニル]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	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	スチレントリマー
112 1,3,5-トリフェニルシクロヘキサン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ⁵	スチレントリマー

表 1-4 酵母 Two-Hybrid 法による化学物質の内分泌かく乱作用の評価 (まとめ)

化学物質名	甲状腺ホルモン α 受容体 (TRα)		アンドロゲン受容体 (AR)		用途・備考
	アゴニスト作用 (W) ^a		アゴニスト作用 (W) ^b		
	S-9 mix (-)	S-9 mix (+)	S-9 mix (-)	S-9 mix (+)	
113 フェノール	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	工業品原料
114 トルエン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	工業品原料
115 エチルベンゼン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	工業品原料
116 イソプロピルベンゼン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	工業品原料
117 n-プロピルベンゼン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	工業品原料
118 n-ブチルベンゼン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	工業品原料
119 p-ニトロトルエン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	工業品原料
120 trans-スチルベン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	工業品原料
121 cis-スチルベン	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	工業品原料
122 1-ヒドロキシビレノ	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.2 x 10 ⁴	ビレノ代謝物
123 ジフェニルカーボネート	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	ポリカーボネート樹脂原料
124 トリエチルアミン	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	ポリカーボネート樹脂原料
S1 フタル酸ジエチルヘキシル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	テルモ (株) 提供試料
S2 トリメリット酸トリエチルヘキシル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	テルモ (株) 提供試料
S3 アジピン酸ジエチルヘキシル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	テルモ (株) 提供試料
S4 クエン酸アセチルトリブチル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	テルモ (株) 提供試料
S5 クエン酸アセチルトリヘキシル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	テルモ (株) 提供試料
S6 クエン酸ブチルトリヘキシル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	テルモ (株) 提供試料
K1 フタル酸ジエチルヘキシル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	テルモ (株) 提供試料
K2 フタル酸ジ-n-デシル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	テルモ (株) 提供試料
K3 トリメリット酸トリ-n-オクチル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	テルモ (株) 提供試料
K4 トリメリット酸トリエチルヘキシル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	テルモ (株) 提供試料
K5 クエン酸アセチルトリブチル	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	テルモ (株) 提供試料
125 17-β-エストラジオール (E ₂)	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.9 x 10 ⁴	9.0 x 10 ⁴	女性ホルモン
126 ジエチルスチルベスチロール (DES)	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	2.9 x 10 ⁴	旧医薬品
127 5-α-ジヒドロテストステロン (DHT)	> 3.0 x 10 ⁴	N.T.	2.9 x 10 ⁴	N.T.	男性ホルモン
128 3,5,3'-トリヨードチロニン (T ₃)	2.1 x 10 ⁴	3.1 x 10 ⁴	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	甲状腺ホルモン
129 3,3',5'-トリヨードチロニン (T ₄)	8.0 x 10 ⁴	N.T.	N.T.	N.T.	甲状腺ホルモン誘導体
130 チロキシン (T ₄)	4.2 x 10 ⁴	N.T.	> 3.0 x 10 ⁴	> 1.0 x 10 ³	甲状腺ホルモン

表 1-5 酵母 Two-Hybrid 法による化学物質の内分泌かく乱作用の評価 (まとめ)

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
動態研究

精巣ライディッヒ細胞初代培養系の構築とテストステロン産生に及ぼす
アルキルフェノール及びフタル酸エステルのリスク評価

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

内分泌かく乱化学物質の内因性ステロイドホルモン産生に及ぼす影響を解明する目的で精巣（幼若ブタ）ライディッヒ細胞の初代培養系を利用したテストステロン産生に及ぼす影響を検討するアッセイ系を構築し、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、昨年度の本研究で副腎 H295R 細胞のコルチゾール産生を阻害したアルキルフェノール及びフタル酸エステル類等影響を検討し、それらのリスク評価を行った。その結果、副腎 H295R 細胞のコルチゾール産生を阻害した 4-nonylphenol 及び 4-*t*-octylphenol のみならず 4-*n*-heptylphenol、4-*n*-octylphenol 及び 4-*n*-nonylphenol の曝露によってもライディッヒ細胞のテストステロン産生が抑制されることを明らかにした。一方、di (2-ethylhexyl) phthalate、di-*n*-butyl phthalate 及び昨年度の本研究により H295R 細胞のコルチゾール産生を抑制した dicyclohexyl phthalate は本アッセイ系におけるテストステロン産生に影響を及ぼさなかった。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の曝露により生体内の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。ステロイドホルモンは生物の発生・分化や生殖に関して重要な役割を担っている。特に内分泌かく乱化学物質により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・

分化や生殖において深刻な影響が表れることが懸念される。

昨年度の本研究において、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* の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。更にその評価系を用いて、食品容器として多用されているポリスチレン製品中から溶出が疑われている各種スチレン

ダイマー及びスチレントリマー、プラスチックの可塑剤として多用されているフタル酸エステル類及び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ているアルキルフェノール類の影響を検討し、一部のフタル酸エステルやアルキルフェノールがH295R細胞のコルチゾール産生を阻害することを明らかにしてきた¹⁾。

一方、テストステロンは主に精巣のライディッヒ細胞で産生され、高等動物の発生初期において性分化と密接に関連しており、この産生が何らかの理由で阻害された場合、発生や性分化及び生殖の初期の段階において深刻な影響が現れることが懸念される。そこで本年度の本研究では、テストステロンを産生するライディッヒ細胞の初代培養系を構築し、そのテストステロン産生に及ぼすフタル酸エステルやアルキルフェノール類の影響を検討した。テストステロンの合成経路には Δ^4 経路と Δ^5 経路が存在し、動物種により大きく異なることが知られており、ブタ精巣におけるテストステロン合成経路はヒトと良く類似していることから、ブタ精巣からライディッヒ細胞を単離して初培養系を構築し、テストステロン産生に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

B-1. 実験材料及び試薬

4-*n*-nonylphenol、4-*n*-octylphenol、4-*t*-octylphenol、4-*n*-heptylphenol、4-*n*-hexylphenol、4-*n*-pentylphenol、

4-*t*-pentylphenol、4-*t*-pentylphenol、2-*t*-butylphenol、3-*t*-butylphenol、4-*t*-butylphenol 及び胎盤性性腺刺激ホルモン (hCG) は和光純薬工業より購入した。Di-*n*-butyl phthalate、dicyclohexyl phthalate、di(2-ethylhexyl)phthalate、4-nonylphenol、4-*n*-butylphenol 及び 4-dodecylphenol は関東化学より購入した。Trypsin inhibitor、insulin、transferrin、vitamin E 及び 8-bromo-cyclic AMP (8Br-cAMP) はシグマアルドリッチジャパンより購入した。Collagenase / dispase はロシュ・ダイアグノスティックより購入した。Percoll® はアマシャムバイオサイエンスより購入した。Fetal bovine serum は三光純薬より購入した。抗生物質は ICN Biomedicals より購入した。D-MEM / F-12 培地はインビトロジェンより購入した。テストステロン測定用の DPC・total testosterone kit (Diagnostic Product Corporation) は日本アイソトープ協会より購入した。LDH 活性測定用の CytoTox96® non-radioactive cytotoxicity assay kit はプロメガより購入した。

その他の試薬は市販の分析用標準品及び特級を用いた。

B-2. ライディッヒ細胞の単離と細胞培養

生後 2 - 3 週齢の幼若ブタ去勢により得られる精巣を 0.3 % collagenase / dispase - 0.03 % trypsin inhibitor を用いて 34 °C で処理し、ライディッヒ

細胞を含有する上清を得た。この上清を 5 - 70 %の Percoll® gradient に積層し、2,500 g×20 分間の遠心分離を行い、ライディッヒ細胞を単離した。培養液として 0.1 % fetal bovine serum、insulin (5 µg/mL)、transferrin (5 µg/mL)、vitamine E (10 µg/mL) 及び抗生物質 (penicillin: 50 IU/ml, streptomycin: 50 µg/ml) を含む D-MEM / F-12 培地 (1:1 mixture of Dulbecco's Modified Eagle's and Ham's F-12) を使用した。細胞は 5 % CO₂ - 95 % air の気相中 37 °C で、必要に応じてサブカルチャーして実験に使用した。

B-3. ライディッヒ細胞のステロイド産生の誘導とテストステロンの分析

96-well plate にライディッヒ細胞を 24 時間サブカルチャーした後、培養液を交換し、検体のステロイド産生に対する影響を検討するため、エタノールに溶解した検体を加えた。3 時間培養後、細胞のステロイド産生を誘導する目的で 8Br-cAMP (0.1 mM) または hCG (10 IU/mL) 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、培養液中のエタノール濃度は最終濃度 1.0 % (v/v) を越えないこととした。この濃度では細胞のテストステロン産生には影響を及ぼさないことを確認した。検体及び 8Br-cAMP または hCG を添加した一定時間後に培養液中に分泌されたテストステロン濃度をラジオイムノアッセイ法による測定キットを用いて測定した。検体の細胞に対する毒性を評価す

るために、CytoTox96®non-radioactive cytotoxicity assay kit を用いてライディッヒ細胞から逸脱する LDH 活性を測定した

C. 研究結果

C-1. 精巣 (幼若ブタ) ライディッヒ細胞の単離と初代培養の構築

精巣ライディッヒ細胞のテストステロン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響を評価するアッセイ法の確立にあたり、まず精巣ライディッヒ細胞の初代培養系を構築した。ライディッヒ細胞のオリジンとして、ヒトのテストステロン合成経路と類似しており、入手可能なものとして、生後 2 - 3 週齢の幼若ブタ去勢で得られる精巣を準無菌的に実験室に搬送後、直ちにコラゲナーゼ/ディスパーゼで処理を行い、Percoll 勾配の遠心分離によりライディッヒ細胞を調製した (Fig. 1 参照)。次に、得られたライディッヒ細胞のステロイド合成を誘導するための hCG 及び cAMP アナログの処理条件を検討した結果、処理時間に対してテストステロン産生が依存して増加し (Fig. 2)、LH レセプターやステロイド産生誘導のシグナル伝達系が正常であることを確認した。従って生後 2 - 3 週齢の幼若ブタ精巣より調製したライディッヒ細胞は、トロピックな刺激である hCG あるいはセカンドメッセンジャーである cAMP の処理によりテストステロン産生の誘導を行うことが可能となった。

C-2. アルキルフェノール類曝露の影響

ブタ精巣ライディッヒ細胞初代培養系に及ぼす各種アルキルフェノールの影響を種々濃度で検討した。検体として以下の14種類を用いた。

4-*n*-butylphenol (*pnB*)、
4-*n*-pentylphenol (*pnP*)、
4-*n*-hexylphenol (*pnHx*)、
4-*n*-heptylphenol (*pnHp*)、
4-*n*-octylphenol (*pnO*)、
4-*n*-nonylphenol (*pnN*)、
2-*t*-butylphenol (*otB*)、
3-*t*-butylphenol (*mtB*)、
4-*t*-butylphenol (*ptB*)、
4-*t*-pentylphenol (*ptP*)、
4-*t*-octylphenol (*ptO*)、
4-nonylphenol (*pN*)、
4-dodecylphenol (*pD*)、
bisphenol A (BPA)を用いた。

Fig. 3にそれぞれ10 μ M曝露の影響を示した。その結果直鎖状のアルキルフェノールである *pnP*、*pnHx*、*pnHp*、*pnO* 及び *pnN*、枝分かれ構造を有するアルキルフェノールである *ptO*、*pN* 及び *pD* がライディッヒ細胞のテストステロン産生を明らかに抑制した。しかし *pnHp*、*pnO*、*pnN*、*pN* 及び *pD* の10 μ M曝露ではLDH活性を指標とした時、わずかな細胞毒性が認められた。またBPAについてはテストステロン産生の抑制は認められなかった。次にテストステロン産生の抑制が認められた7種について曝露濃度を3.0 μ Mとしたときの結果をFig. 4に示した。その結果、*pnHp*、*pnO*、*pnN*、*ptO*、*pN* 及び *pD* が明らかにライディッヒ細胞のテストステロン産生を抑制し

た。また、3.0 μ Mの濃度における曝露による細胞毒性はほとんど認められなかった。*pnHp*、*pnO*、*pnN*、*ptO*、*pN* 及び *pD* 曝露によるテストステロン産生はそれぞれ濃度に依存して抑制されることを明らかにした (Fig. 5 及び Fig. 6)。

C-3. フタル酸エステル類曝露の影響

プラスチック製品の可塑剤として代表的なフタル酸エステルである di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)、di-*n*-butyl phthalate (DBP) 及び昨年度の本研究により H295R 細胞のコルチゾール産生を抑制した dicyclohexyl phthalate (DCHP) を選択し、ブタ精巣ライディッヒ細胞初代培養系のテストステロン産生に及ぼす影響を検討した。その結果を Fig. 8 - 10 に示すが、0.03 - 3.0 μ M の曝露において、いずれのフタル酸エステルもテストステロン産生に影響を及ぼすことはなかった。更に、これらの濃度による曝露では、LDH 活性を指標とした細胞毒性もほとんど認められなかった。

D. 考察

昨年度の本研究において、我々は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 細胞を利用して *in vitro* において、副腎皮質ステロイドホルモン合成阻害を指標にして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構築した。その評価系を利用して、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としてスチレンダイマー及びスチレントリマー、アルキルフェノール類及びフタル酸エステル類のリスク評価

を行い、DCHP、*pN* 及び *pt0* が H295R 細胞のコルチゾール産生を抑制することを明らかにしている。副腎皮質をはじめとし、精巣及び卵巣は同一の生殖原基から発生・分化することからその生合成機構において基本的には大きな差異はないが、産生されるステロイドの種類に大きな違いがある。精巣におけるテストステロンの産生はライディッシュ細胞で行われており、高等動物の発生初期の段階で性分化に重要な役割を演じていることは良く知られている。特に雄型の生殖器や付属性腺の発生・分化に必須であり、胎生期から新生仔期の限られた時期にテストステロン産生が阻害された場合、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。

そこで、H295R 細胞のコルチゾール産生に影響を与えたアルキルフェノールとフタル酸エステルについて、ライディッシュ細胞のテストステロン産生に及ぼす影響を検証した。

その結果、副腎 H295R 細胞のコルチゾール産生を阻害した *pN* 及び *pt0* のみならず *prHp*、*pr0*、*prN* 及び *pD* の曝露によってもライディッシュ細胞のテストステロン産生が抑制されることを明らかにした。更に、その抑制効果は H295R 細胞の場合と比較して低濃度であった。一方、H295R 細胞のコルチゾール産生を阻害した DCHP はライディッシュ細胞のテストステロン産生が抑制することはない。従って *prHp*、*pr0*、*prN*、*pN*、*pt0* 及び *pD* 曝露によるライディッシュ細胞のテストステロン産生抑制の作用機

序は H295R 細胞のコルチゾール産生抑制機序と異なる可能性が十分考えられる。

最近マウスやラットの培養ライディッシュ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^{2, 3)}。一方、octylphenol、octylphenol diethoxylate 及び octylphenol monocarboxylate が肝臓の CYP1A2、CYP2A、CYP2B2、CYP2C11 及び CYP3A2 等の P450 を阻害すること⁴⁾、また nonylphenol が同様に CYP1A 及び CYP3A を阻害すること^{5, 6)}も報告されている。これら CYPs を阻害するという報告は、テストステロンの生合成過程を 2 種の CYPs が関与していることを考え合わせると、octylphenol、nonylphenol のブタ精巣ライディッシュ細胞のテストステロン産生抑制の作用機序を考える上で非常に興味深い。

E. 結論

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に及ぼす影響を解明する目的で精巣(幼若ブタ)ライディッシュ細胞の初代培養系を利用したテストステロン産生に及ぼす影響を検討するアッセイ系を構築し、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、昨年度の本研究で副腎 H295R 細胞のコルチゾール産生を阻害したアルキルフェノール及びフタル酸エステル類の影響を検討し、それらのリスク評価を行った。

その結果、副腎 H295R 細胞のコルチ

ゾール産生を阻害した 4-nonylphenol 及び 4-*t*-octylphenol のみならず 4-*n*-heptylphenol、4-*n*-octylphenol 及び 4-*n*-nonylphenol の曝露によってもライディッヒ細胞のテストステロン産生が抑制されることを明らかにした。一方、di(2-ethylhexyl)phthalate、di-*n*-butyl phthalate 及び昨年度の本研究により H295R 細胞のコルチゾール産生を抑制した dicyclohexyl phthalate は本アッセイ系におけるテストステロン産生に影響を及ぼさなかった。

F. 参考文献

- 1) Nakajin, S., Shinoda, S., Ohno, S., Nakazawa, H. and Makino, T.: Effect of phthalate esters and alkylphenols on steroidogenesis in human adrenocortical H295R cells, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **10**, 103-110 (2001).
- 2) Nikula, H., *et al.*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **157**, 166-173 (1999).
- 3) Murono, E.P., *et al.*, *Reprod Toxicol.* **14**, 275-288 (2000).
- 4) Hanioka, N., *et al.*, *Xenobiotica.* **29**, 873-883 (1999).
- 5) Lee, P.C., *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* **52**, 885-889 (1996).
- 6) Lee, P.C., *et al.*, *Xenobiotica.* **26**, 831-838 (1996).

G. 研究業績

研究論文

- 1) Nakajin, S., Shinoda, S., Ohno, S., Nakazawa, H. and Makino, T.: Effect

of phthalate esters and alkylphenols on steroidogenesis in human adrenocortical H295R cells, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **10**, 103-110 (2001).

- 2) Ohno, S., Shinoda, S., Toyoshima, S., Nakazawa, H., Makino, T. and Nakajin S.: Effects of flavonoid phytochemicals on cortisol production and on activities of steroidogenic enzymes in human adrenocortical H295R cells, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **80**, (2002) in press.

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各種フラボノイドの阻害効果：篠田 聡，大野修司，豊島 聡，中澤裕之，牧野恒久，中陳静男，第 74 回日本生化学大会，2001 年 10 月，京都
- 2) ヒト副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼす各種有機スズ化合物の阻害効果：篠田 聡，大野修司，藤巻照久，中澤裕之，牧野恒久，中陳静男，第 4 回環境ホルモン学会研究発表会，2001 年 12 月，つくば
- 3) ブタ精巣ライディッヒ細胞初代培養系構築とテストステロン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質のリスク評価への応用：中島羊奈子，佐藤 剛，大野修司，中澤裕之，牧野恒久，中陳静男，第 4 回環境ホルモン学会研究発表会，2001 年 12 月，つくば
- 4) ブタ精巣ライディッヒ細胞初代培養系構築とテストステロン産生に

及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響：佐藤 剛，中島羊奈子，大野修司，中澤裕之，牧野恒久，中陳静男，日本薬学会第122年会，2002年3月，千葉

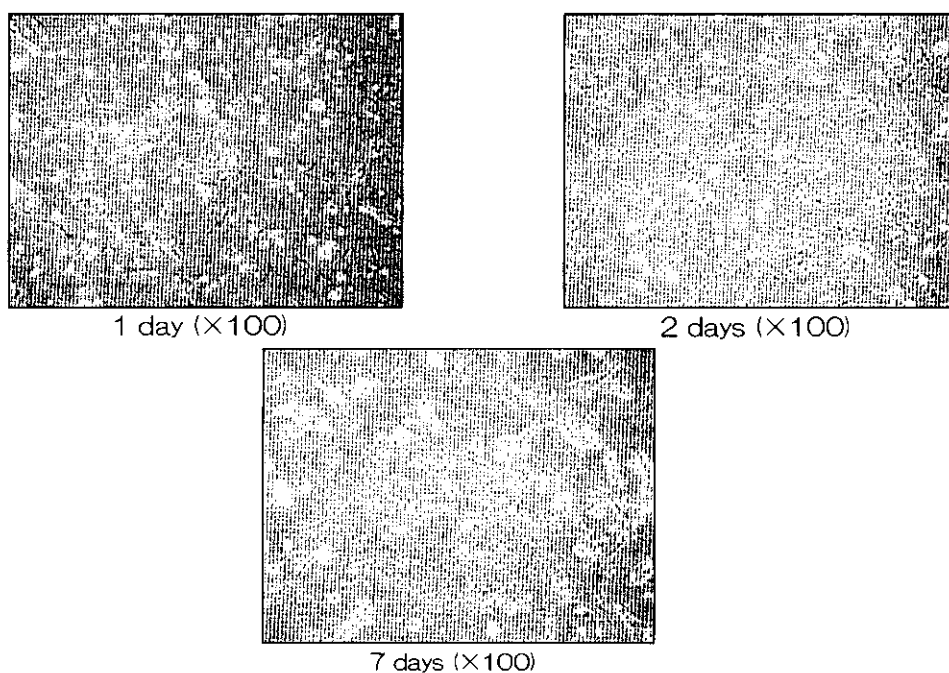


Fig. 1 ライディッヒ細胞の検鏡像

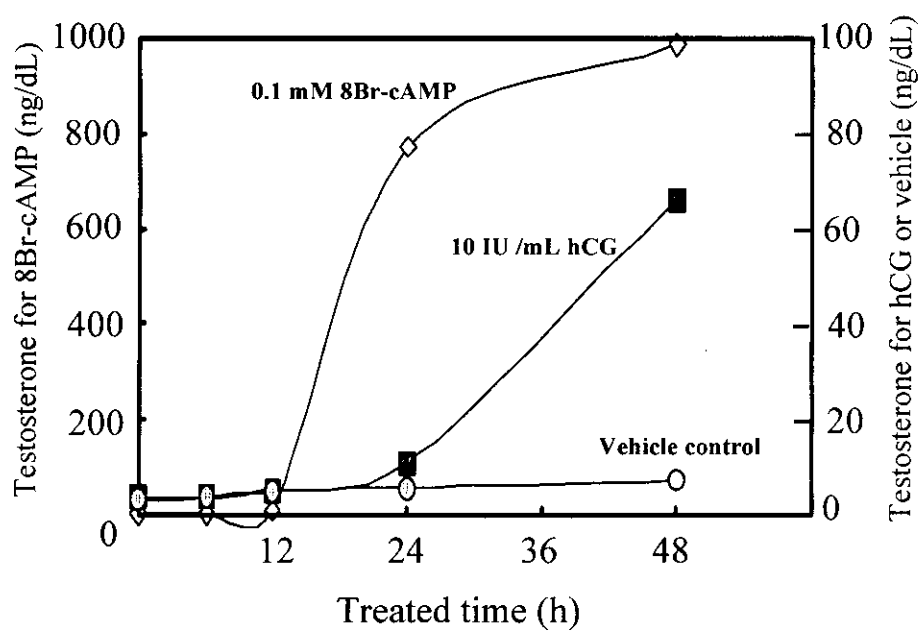


Fig. 2 cAMPおよびhCG添加によるテストステロン産生の誘導

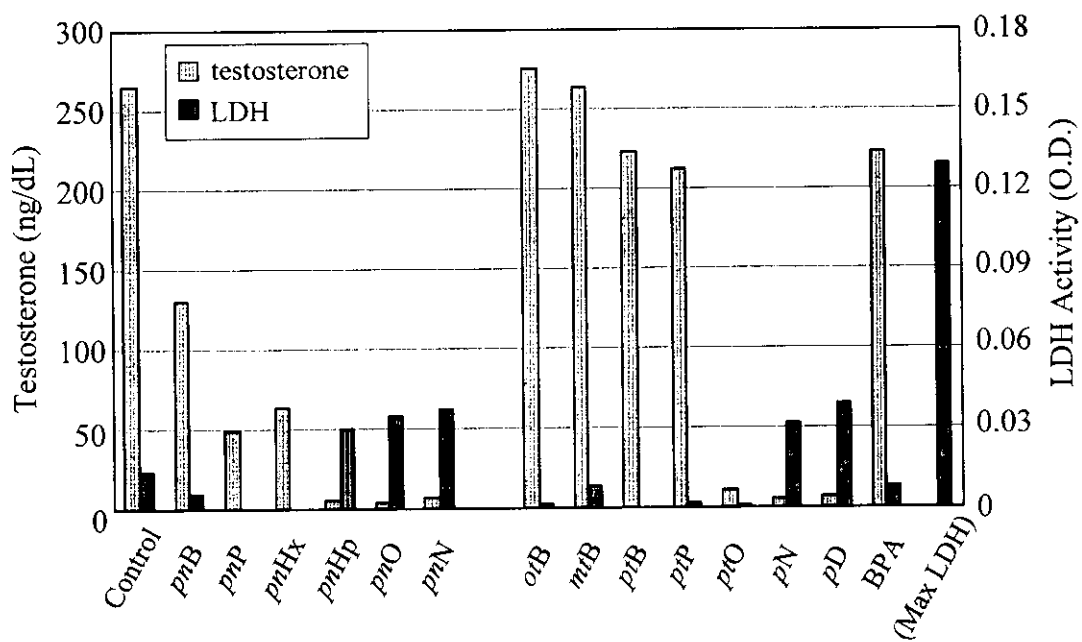


Fig. 3 Alkylphenols (10 μ M)

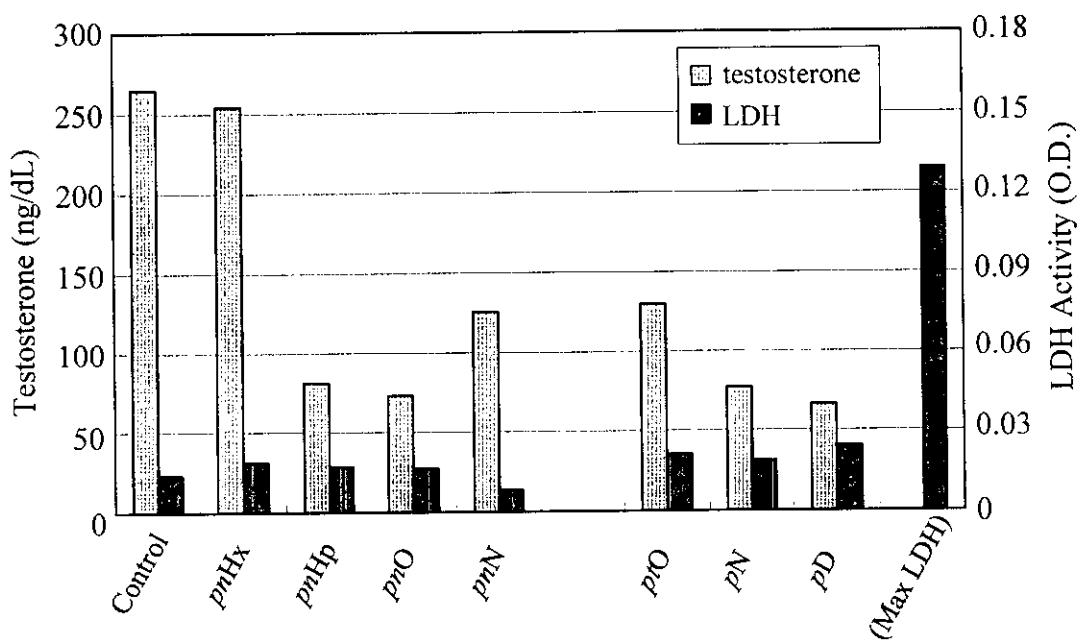


Fig. 4 Alkylphenols (3 μ M)

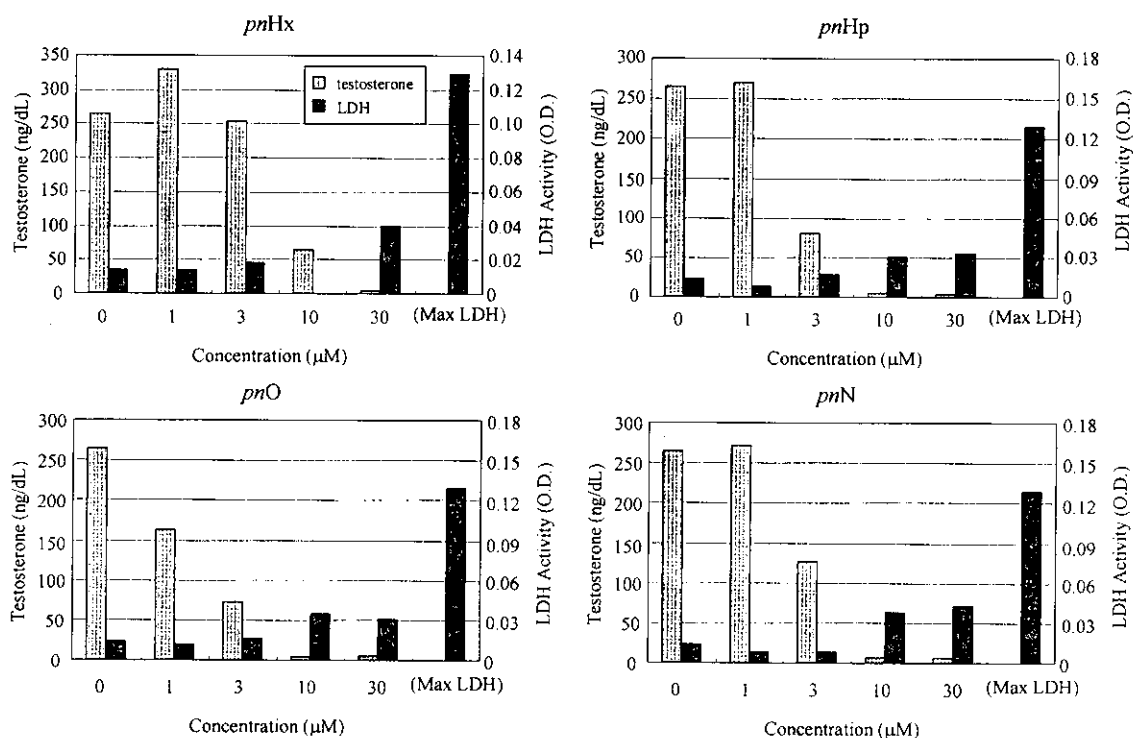


Fig. 5 hexylphenol, heptylphenol, octylphenol, nonylphenol

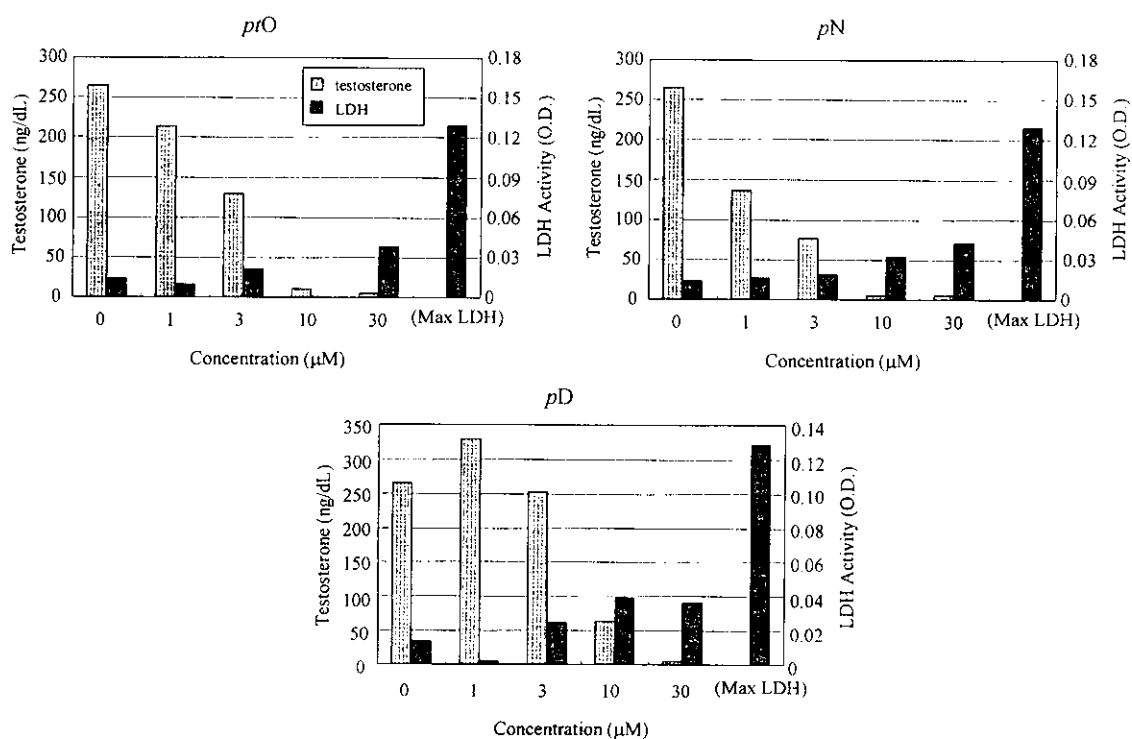


Fig. 6 octylphenol, nonylphenol, dodecylphenol

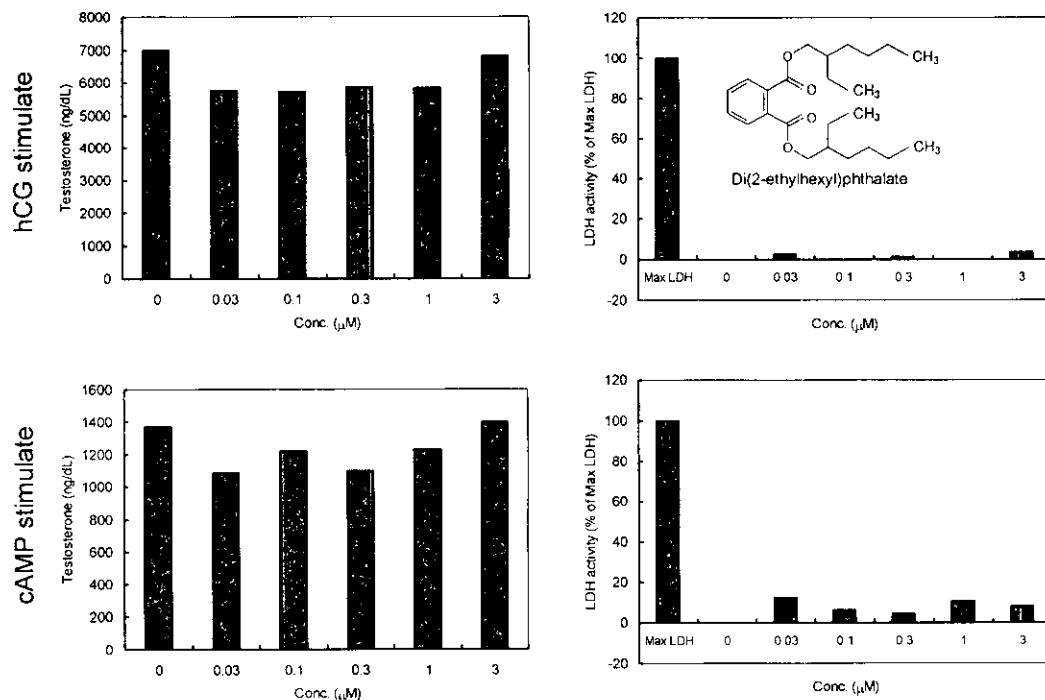


Fig. 7 Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)

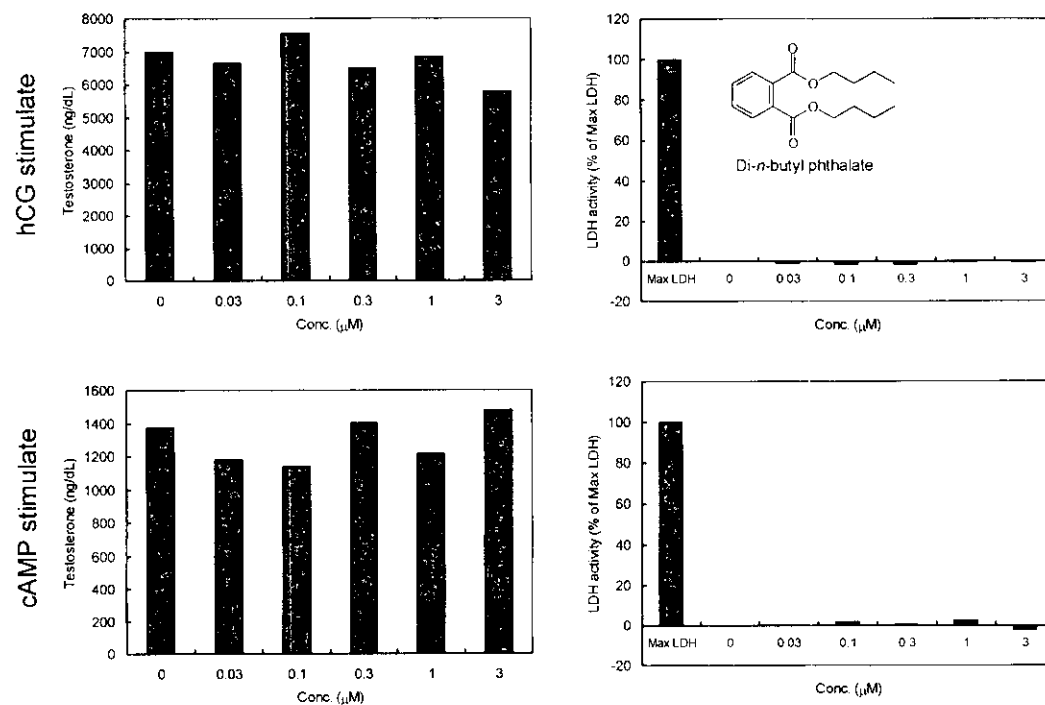


Fig. 8 Di-*n*-butyl phthalate (DBP)

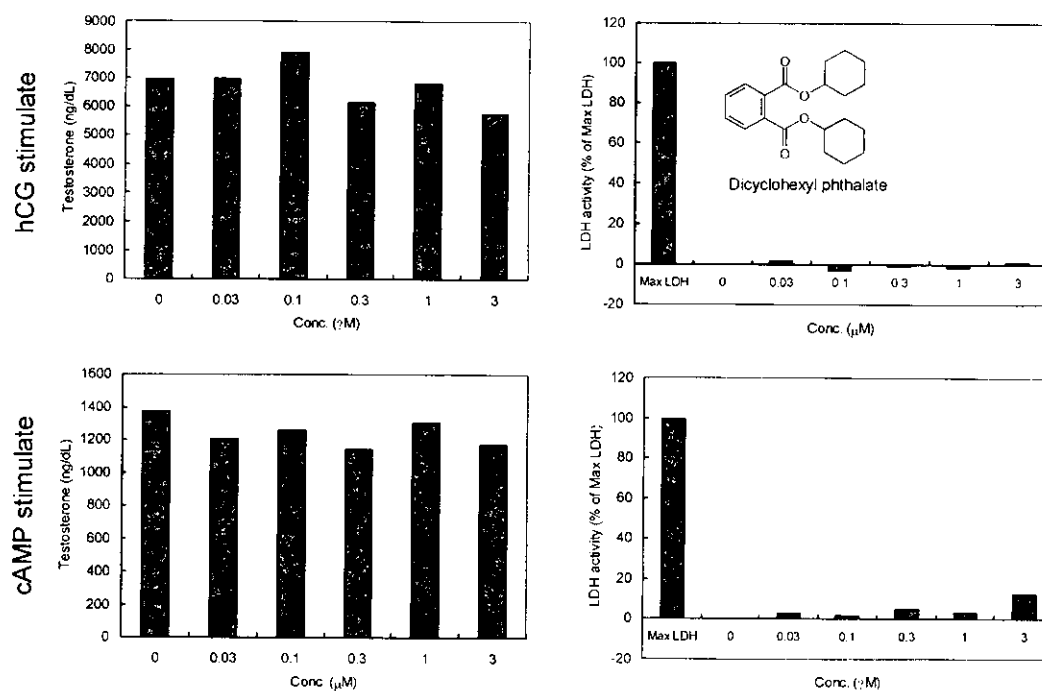


Fig. 9 Dicyclohexyl phthalate (DCHP)

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
動態研究

内分泌かく乱化学物質の造血幹細胞に対する影響について

主任研究者 中澤裕之(星薬科大学)

研究協力者 牧野 恒久(東海大学)

岩崎 克彦(東海大学)

和泉俊一郎(東海大学)

研究要旨

ポリ塩化ビニル (PVC) 製の医療用具の可塑剤として多用されている Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) は内分泌かく乱作用の疑いが持たれている物質であり、血液バッグの保存血への溶出が報告されている。この血液バッグは近年再生医療として注目を集めてきている造血幹細胞を多くもつ臍帯血の保存にも汎用されている。造血幹細胞はエストロゲン受容体を持つ可能性があるため、バッグから溶出してきた DEHP のエストロゲン様作用により影響を受ける可能性がある。そこで、DEHP を含めた内分泌かく乱化学物質について造血幹細胞への影響を検討した。造血幹細胞への作用は従来よりのコロニーアッセイ法により検討し、DEHP 等のエストロゲン様増殖能の検討のためには、従来の E-Screen Assay 法を応用した CD34/I-dU assay 法による検討を追加した。

今回検討した用量において被験物質は、CD34 の増殖を抑制する作用は認められなかった。

A. 研究目的

医療用血液バッグとしてポリ塩化ビニル (PVC) 製のものが汎用されている。最近では、造血幹細胞を多く持つ臍帯血が血液疾患の治療に用いられており、PVC 製の血液バッグに保存されている。これら PVC 製品には内分泌攪乱作用の疑いのあるフタル酸エステル類が可塑剤として多用されており、保存中の血液に Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) 等の移行が懸念される。DEHP は E-Screen Assay により、エ

ストロゲン様細胞増殖効果を示すことが確認されているが、その生体影響については様々な視点から検証する必要がある。本研究では、DEHP が臍帯血中の造血幹細胞の分化・増殖に与える影響について、Colony Assay 法を用いて検討した。また同時にその他の内分泌かく乱化学物質についても検討を試みた。

造血幹細胞に対する影響は、コロニーアッセイ法による検討に加え、エストロゲン増殖能の検討を単純化する

目的で従来の E-Screen Assay を改良した CD34/I-dU Assay 法による検討も行った。

B.研究方法

被検物質

Diethyl- hexil phthalate

Butyl- benzil phthalate

Bisphenol-A

p-Nonylphenol

Dizein

Genistein

試薬は、Ethanol に溶解して 10^{-2} mol/l とし、アッセイに用いる培養液で希釈することにより試料溶液を 10^{-11} ~ 10^{-4} mol/l に調製した。

B・1 CD34/I-dU assay

96 穴平底プレート (FALCON 社製) に Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/Nutrient Mixture F-12 (Ham) で希釈した細胞 (CD34 陽性細胞) 懸濁液を 5000 cells/90 μ l/well ずつ播種し、濃度調整した被検物質を加え、37℃、5% CO₂ で、6 日間培養する。細胞増殖効果は、Thymidine analogue である I-dU (5-Iodo-2-deoxyuridine) の取り込みにより評価した (DNA・I-dU Labeling and Detection Kit: TAKARA)。手技としては、培養後各 well の medium 中に Idu を添加後、37℃にて 24 時間 incubation し、分裂中の細胞の DNA に取り込ませ、その Idu に対する抗 Idu モクローナル抗体を用いた ELISA により細胞増殖を測定した。

B・2 Colony Assay

35mm Culture Dish (IWAKI 社製) に Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; GIBCO 社製) で希釈した細胞 (CD34 陽性細胞) 懸濁液を 200 cells/dish ずつ播種し、濃度調整した被検物質を加え、MethoCult GF H4434V 培地上で 37℃、5% CO₂ で、14 日間培養する。その後、混合コロニー形成細胞 (CFU-Mix)、顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞 Colony forming unit granulocyte / macrophage (CFU-GM)、芽球コロニー形成細胞 burst-forming unit erythroid (BFU-E) のコロニー数をカウントし、観察することにより、被検物質による CD34 陽性細胞が分化・増殖能への影響を検討した。

C.研究結果

CD34/I-dU assay において、E2 の添加により、CD34 陽性細胞に 10^{-9} mol/l で最大となる増殖能が認められ (Fig.1)、エストロゲンに対する反応性があることが確認された。DEHP の添加においても、 10^{-7} mol/l で最大となる増殖能が認められた (Fig.2)。

Colony Assay においては、E2、DEHP、BPA はそれぞれ 10^{-9} mol/l、 10^{-7} mol/l、 10^{-5} mol/l で最大となる増殖促進能が認められ、コロニー数の増加を促進することと (Fig.3~5)、CFU-GM の分化能の促進との相関が認められた (Fig.6~9)。

その他の被検物質は、両 Assay において CD34 陽性細胞の増殖に変化を及ぼさなかった。

D. 考察

E₂ と DEHP を被検物質として用いた CD34/I-dU assay の検討により、CD34 陽性細胞の増殖が認められたことから、CD34 陽性細胞はエストロゲンに対する反応性を持つことが示唆された。

また、E₂、DEHP、BPA を被検物質として用いた Colony Assay の検討により、CD34 陽性細胞の増殖能の促進と CFU-GM のみ増殖促進が認められたため、まだ機序は不明であるが、エストロゲン様作用による CD34 陽性細胞の分化能・増殖能への影響が示唆された。

DEHP に関しては、まだ、再現性の得られるデータ数が少なく、現段階でのデータのみで判断することが難しいため、今後さらに検討していく必要があると考えている。しかし、今回使用した被検物質は全て CD34 の増殖能を阻害もしくは抑制する作用は認められなかった。

E. 結論

CD34/I-dU assay により E₂、DEHP の添加でいずれも細胞増殖が認められ、CD34 陽性細胞がエストロゲンに対する反応性をもつことが示唆された。また、Colony Assay により、E₂、DEHP、BPA の添加で、CD34 陽性細胞の増殖能の促進と CFU-GM

のみ増殖促進が認められたため、まだ機序は不明であるが、エストロゲン様作用により CD34 陽性細胞の分化能・増殖能に影響が及ぶことが示唆されたが、エストロゲン様作用により CD34 陽性細胞の分化能・増殖能に影響が及ぶことが示唆された。

ただし、DEHP に関しては、まだ、再現性の得られるデータ数が少なく、現段階でのデータのみで判断することが難しいため、今後さらに検討していく必要があると考えている。

しかし、今回使用した被検物質は全て CD34 の増殖能を阻害もしくは抑制する作用は認められなかった。

F. 健康危惧情報

該当無し

G. 研究発表

投稿中

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し