

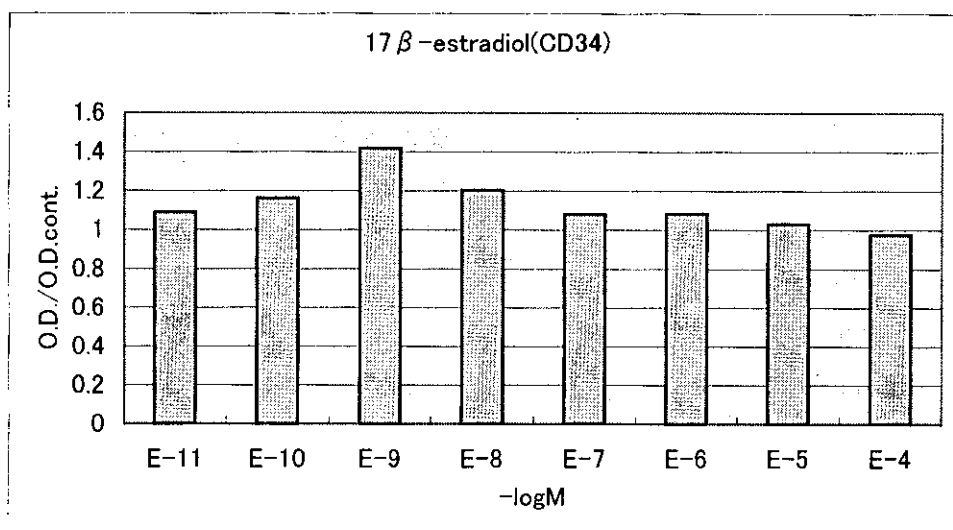


Fig1. CD34 / I-dU Assay (17β-estradiol)

CD34 / I-dU Assay による検定は、同一濃度を Triplicate well で行った。

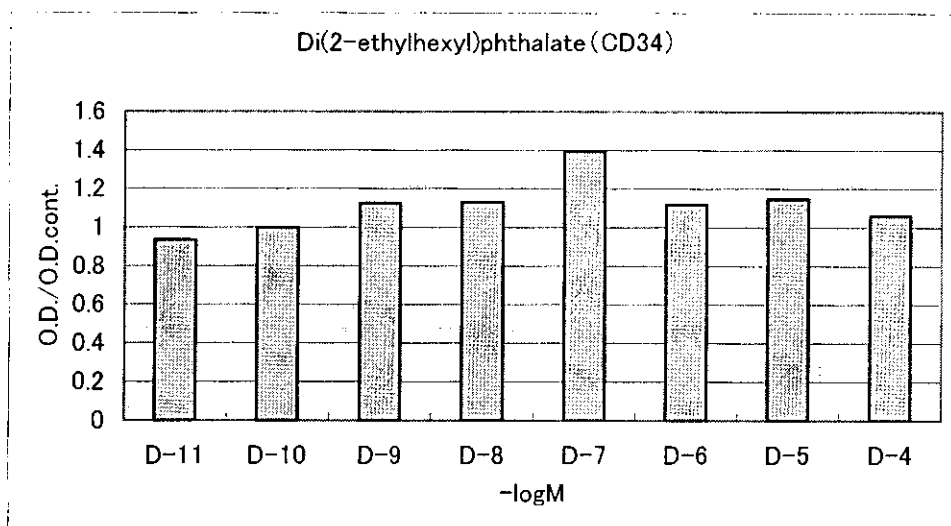


Fig 2. CD34 / I-dU Assay (Di(2-ethylhexyl)phthalate)

CD34 / I-dU Assay による検定は、同一濃度を Triplicate well で行った。

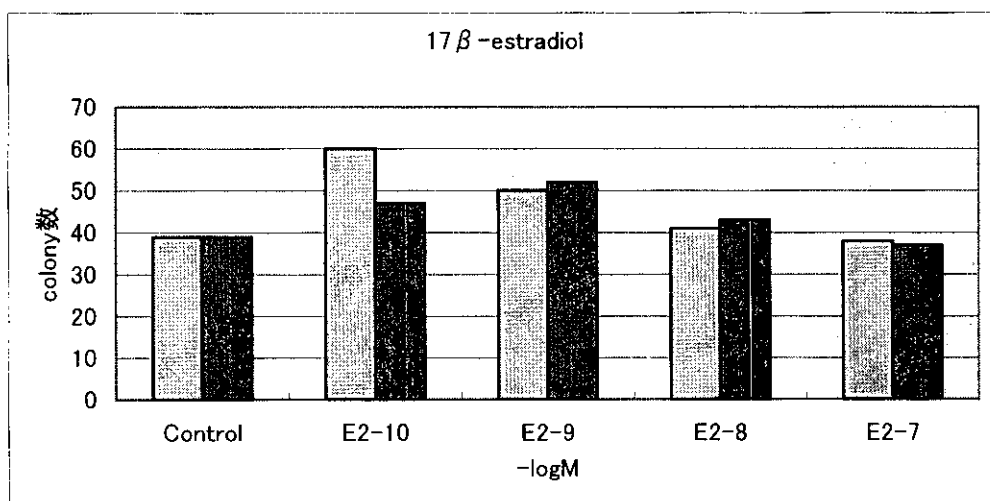


Fig 3. Colony Assay (17β-estradiol) ; 増殖能

Colony Assay による検定は、同一濃度を Triplicate well で行い、同一プロトコールで実験を 3 回繰り返し、同様の傾向が見られることを確認した上で、代表的な 2 実験を図に併示した (mean)。

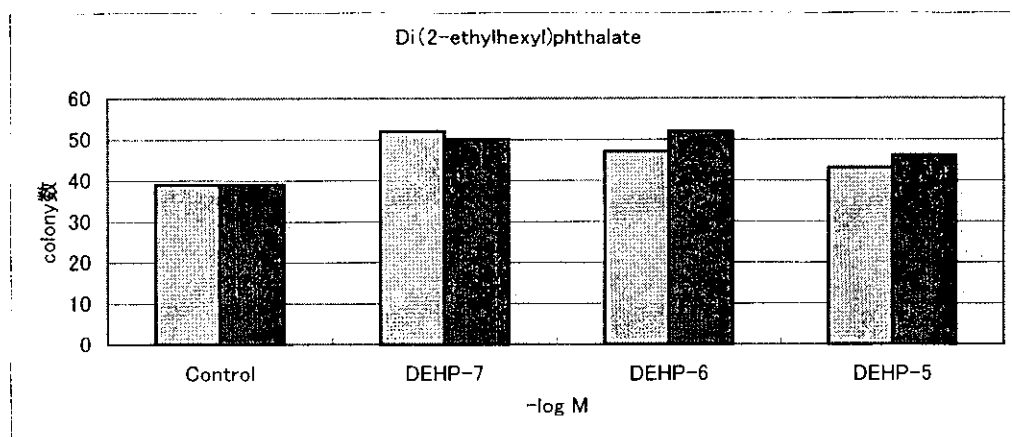


Fig4. Colony Assay (Di (2-ethylhexyl) phthalate) ; 増殖能

Colony Assay による検定は、同一濃度を Triplicate well で行い、同一プロトコールで実験を 3 回繰り返し、同様の傾向が見られることを確認した上で、代表的な 2 実験を図に併示した (mean)。

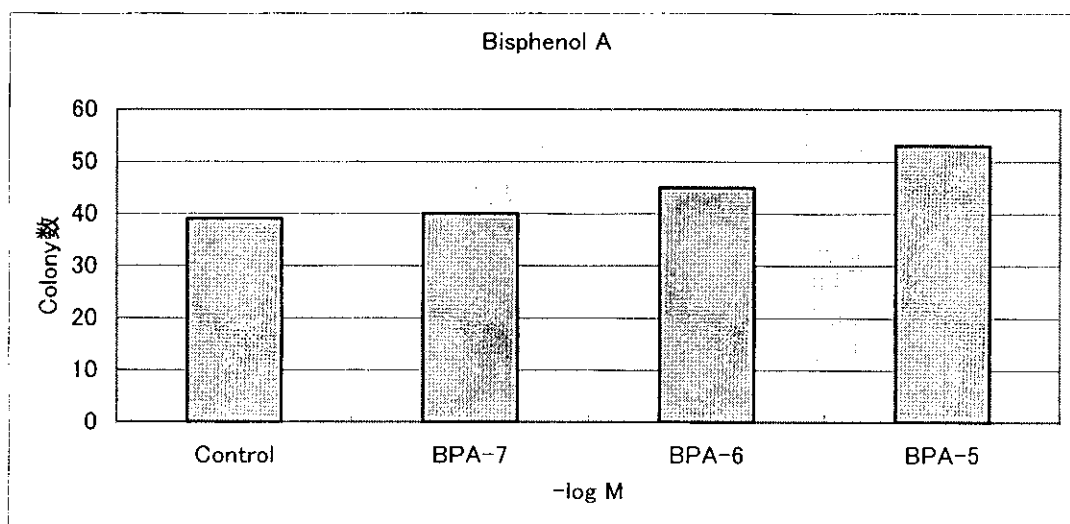


Fig5 Colony Assay (Bisphenol A) ;増殖能

E-Screen Assay による検定は、同一濃度を Triplicate well で行い、同一プロトコールで実験を 3 回繰り返し、同様の傾向が見られることを確認した上で、代表的なものを図に示した (mean)。

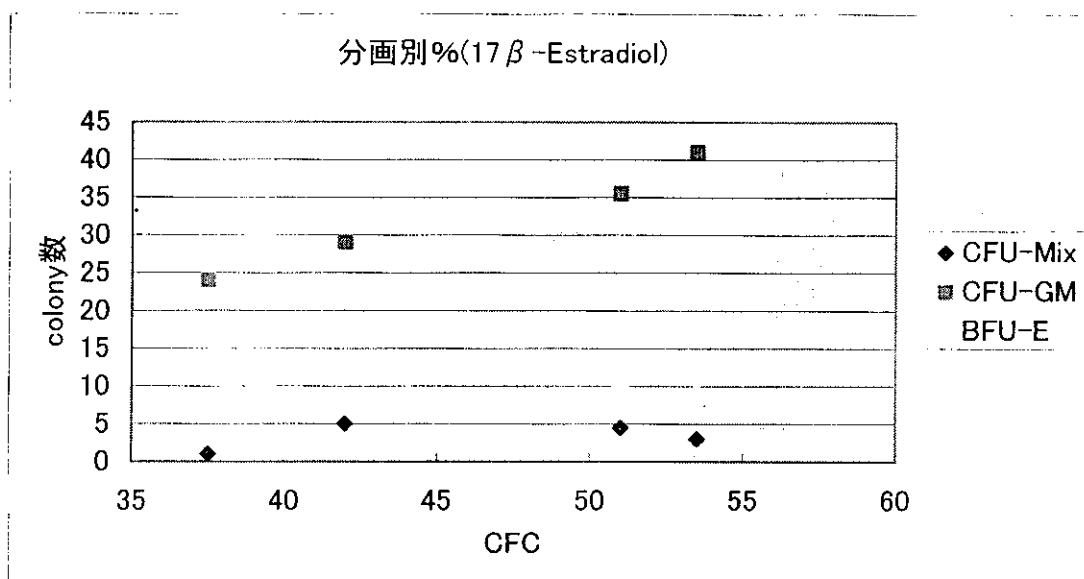


Fig6.Colony Assay (17β-estradiol) ;分化能

Colony Assay による検定は、同一濃度を Triplicate well で行い、同一プロトコールで実験を 3 回繰り返し、同様の傾向が見られることを確認した上で、代表的なものを図に示した。

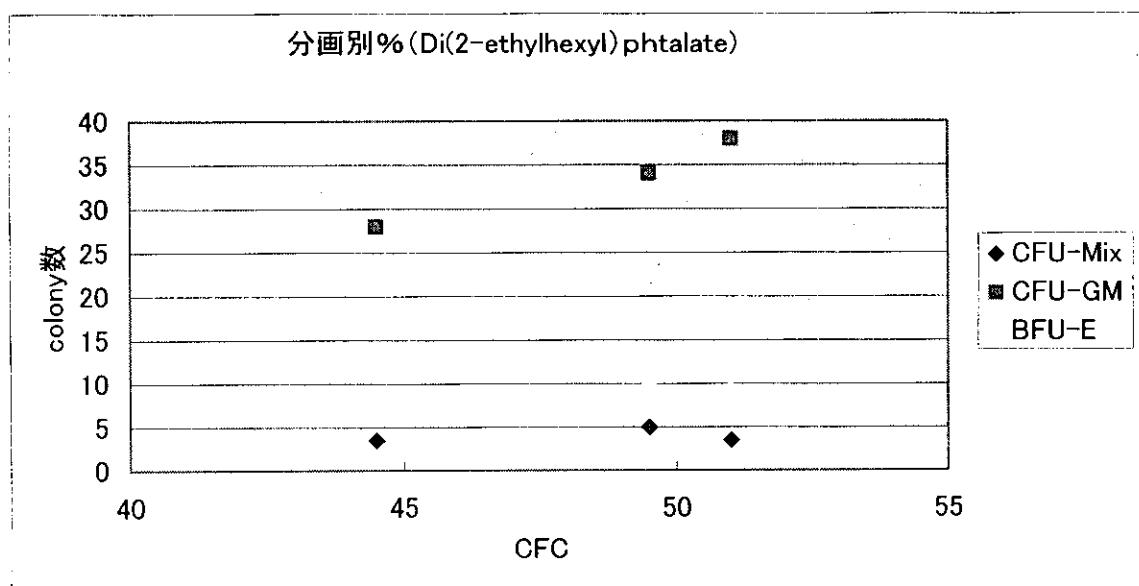


Fig7.Colony Assay (Di(2-ethylhexyl)phthalate) ; 分化能

Colony Assay による検定は、同一濃度を Triplicate well で行い、同一プロトコールで実験を 2 回繰り返す、同様の傾向が見られることを確認した上で、代表的なものを図に示した。

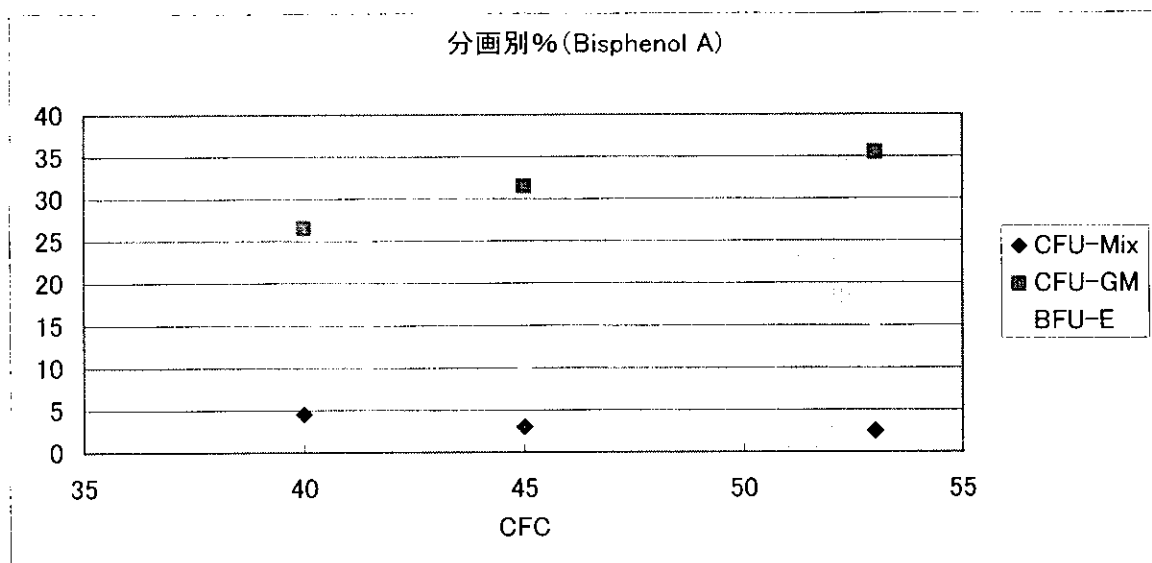


Fig8.Colony Assay (Bisphenol A) ; 分化能

Colony Assay による検定は、同一濃度を Triplicate well で行い、同一プロトコールで実験を 3 回繰り返す、同様の傾向が見られることを確認した上で、代表的なものを図に示した。

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

Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) に代わる可塑剤候補となる化学物質の
内分泌かく乱作用に関する研究

主任研究者	中澤裕之	星薬科大学教授
研究協力者	吉村吉博、井之上浩一	星薬科大学薬品分析化学教室
	牧野恒久、岩崎克彦、和泉俊一郎、村野孝代	
		東海大学医学部母子生育学系産婦人科学部門
	山崎聖美	国立公衆衛生院
	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
	中陳静男、大野修司、中島羊奈子	星薬科大学学生化学教室
	中橋敬輔、石川健次	テルモ株式会社

研究要旨

塩化ビニル樹脂は可塑剤添加量による物性制御の容易さ、加工性の高さ、低価格などの理由により、非常に多くの日用品などに使用されている。一方、その可塑剤に最も多く使用されている di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) は各方面の研究により内分泌かく乱作用が指摘されている。そこで、食品用器具・容器包装または玩具など特に高い安全性が要求される用途にも安心して使用できる可塑剤を調査するために、各種候補可塑剤を *in vitro* の各種内分泌かく乱作用のスクリーニング研究を行った。同一瓶の試料を各種試験を行って、その間の関係を明らかにする点、試薬グレードと工業用グレード間の関係を明らかにすることも目的とした。

受容体結合能試験(binding assay)、ヒト乳癌細胞増殖試験(E-screen)、酵母 Two-Hybrid 法、副腎皮質細胞のコルチゾール産生への影響試験の結果、フタル酸エステルの DnDP（工業）、トリメリット酸エステルの n-TOTM（工業）、EH-TOTM（工業）、クエン酸エステルの ATHC（試薬）は全ての試験で活性が認められず、DEHP より内分泌かく乱作用が小さいことが示唆された。また、代謝物の活性が高くなるものがあること、工業品より試薬の方が高い活性を示す傾向があること、各種試験間で違いがあることがわかった。それらの原因や代謝過程などは、今後の検討課題である。

A. 研究目的

塩化ビニル樹脂は可塑剤添加量によって給排水パイプの様な硬質なものから、風船や玩具、水まきホースの様な軟質なものまで幅広く物性制御が容易なことが知られている。また、射出成形や押出成形などの熱成形や、カレンダー成形が容易にできるため、各種部品やチューブ、シート、フィルムなどへの一次加工や、接着剤や溶剤を用いた接着、高周波シール、熱シールなどの二次加工性に優れている。加えて、難燃性であり、安全性データの蓄積が豊富、他の材料に比べても低価格で入手できるため、壁紙や床材、給排水パイプなどの建築資材、農業用ビニルハウスのシート、浮き輪や風船などの玩具類、食品用ラップやトレイ、食品製造設備、食器類、医療用具などに広く使用されている。今後、書類ファイル類や化粧品容器類の様に塩化ビニル樹脂を使わない商品群も増えてくると思われるが、多くの商品群では塩化ビニル樹脂が何らかの形で使用される状況が推定されている。

それらの可塑剤に最も多く使用されているのは、フタル酸系可塑剤である di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) であり、日本全可塑剤生産量の 85% (310 千 t / 1999) であり¹⁾、その価格は 150~175 円/kg で可塑剤の中で性能のバランスが良く、最も安価なものである²⁾。全世界で多くの製品に長年使用され、非常に多くの一般毒性試験の結果から、最も安全性を確認された化学物質の一つと言える。その一方、DEHP は *in vivo*

系実験において、動物精巣中のテストステロン量の低下³⁾、精巣萎縮⁴⁾、骨形成異常⁵⁾といった内分泌かく乱作用の疑いがあるとの報告もなされている。1996 年に OECD が各国で調査し、発表されたリストや、1997 年 7 月に環境庁（現環境省）が発表した 67 種の内分泌かく乱化学物質の疑いの有る物質一覧表⁶⁾、続いて 1998 年に環境庁から発表された「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」⁷⁾には、いずれも DEHP がリスト化されている。

また、厚生省（現厚生労働省）は 2000 年 6 月に DEHP の耐容一日摂取量 (TDI) を定め、実使用時の基準の一つを示した。その結果、食品製造時の手袋に DEHP を使用することを事実上禁止⁸⁾し、2002 年春には食品製造時に使うホースやトレイ類などと、乳幼児が口にする玩具類から DEHP と DINP (diisononyl phthalate) を事実上禁止する準備を進めている。

先に述べたように可塑剤のほとんどは DEHP に代表されるフタル酸系であるが、その他の可塑剤も特徴をもって数多く工業化されている。例えば、アジピン酸系は低温特性を活かして食品ラップ用に、トリメリット酸系は耐熱特性や難燃性、低溶出性で電線被覆材や医療用具用に、クエン酸系は体内代謝性などの安全性などで食品用や玩具用に既に使用されている。そこで、食品容器など特に高い安全性が要求される用途にも安心して使用できる可塑剤を調査することを目的とした。そのために、各種可塑剤を現在試験可能な *in*

vitro の各種内分泌かく乱作用の研究を同一試薬を用いて試験することにした。そこで、各種試験間の比較をする、可能な限り試薬と工業用原料を用意すること、の2点を本研究の大きな特徴とした。

B. 研究方法

B.1 試験系の設定

B.1.1 被験物質の設定

安全性の高い可塑剤を選定することが目的であるので、一般毒性などが低いと考えられる食品用器具・容器包装用途、医療用具用途で使用実績のある可塑剤を候補可塑剤として可能な限り集めた。Table 1 にそのリストと製造元、ロット番号などを、Fig 1 に構造式、物性値を示した。入手した被験物質は、アセトンで洗浄後、200℃で一晩熱処理をして環境からのコンタミを防止した旭テクノグラス社（旧岩城硝子）製7 mL ネジ付試験管に分注し、同社製耐熱キャップをして、各試験に供した。

B.1.2 試験系の設定

内分泌かく乱作用の *in vitro* 測定で代表的な、

- 1) 受容体結合試験 (Binding assay)
- 2) ヒト乳癌細胞増殖試験 (E-screen)
- 3) 酵母 Two-Hybrid 法
- 4) 副腎皮質細胞の産生物質への影響を選択し、研究協力者の下記の5施設にて異なる方法で測定を行った。

①星薬科大学薬品分析化学教室

- ・エストロゲン受容体 (α) 受容体結合試験
- ・エストロゲン受容体 (β) 受容体結合試験
- ・アンドロゲン受容体受容体結合試験

②東海大学医学部

- ・ヒト乳癌細胞 MCF-7 での E-screen

③国立公衆衛生院

- ・ヒト乳癌細胞 T47D での E-screen
- ・同上 S-9 混合系

④大阪府立公衆衛生研究所

- ・エストロゲン受容体 (α) 導入酵母 Two-Hybrid 法
- ・同上 S-9 混合系
- ・アンドロゲン受容体導入酵母 Two-Hybrid 法
- ・抗アンドロゲン受容体導入酵母 Two-Hybrid 法
- ・甲状腺ホルモン受容体 (α) 導入酵母 Two-Hybrid 法
- ・同上 S-9 混合系

⑤星薬科大学学生化学教室

- ・ヒト副腎皮質細胞 H295R 細胞のステロイドホルモンコルチゾール産生影響評価
- それぞれの研究施設での測定系を Table 2 に示した。

B.2 試験方法

各施設からの別途研究報告書参照。

C. 結果と考察

詳細な結果と考察は各施設からの別途研究報告書参照とし、総括的に各試験結果を Table 3 に示した。

受容体結合試験は、 IC_{50} 値を求め、ポジティブコントロールのエストラジオールあるいはテストステロンの 1/1000 以下を定量限界値と考えた結果、いずれも活性が見られなかった。ヒト乳癌細胞 T47D 細胞を用いた細胞増殖試験では、ポジティブコントロール値 1.5 に対して 1.2 を定量下限値と考えた結果、

S-9 非混合系ではいずれも活性が見られず、S-9 混合系では DEHP (試薬 1、工業 1) と DEHA (試薬 3) に活性が見られたが、その他の被験物質には活性が見られなかった。ヒト乳癌細胞 MCF-7 細胞を用いた細胞増殖試験では、ポジティブコントロール値 1.28 対して 1.10 を定量下限値と考えた結果、試薬 1 ~ 4 の DEHP、EH-TOTM、DEHA、ATBC に活性が見られたが、その他の被験物質には活性が見られなかった。この試験系は、先の T47D 細胞を用いた試験系と違い、培養液中に血清が添加されているため被験物質の酵素分解があり、T47D 細胞に S-9 混合した系と似た結果が出たものとする。酵母 Two-Hybrid 法は、ポジティブコントロールのガラクトシダーゼ活性 10% 以下を定量下限と考え、エストロゲン(α)、同 S-9 混合系、アンドロゲン、抗アンドロゲン、甲状腺ホルモン(α)、同 S-9mix 系のいずれでも、いずれの被験物質も活性は認められなかった。副腎皮質細胞のコルチゾール産生への影響は、BTHC (試薬 6) の 30 μ M、ATBC (試薬 4、工業 5) の 3.0 ~ 30 μ M の濃度でコルチゾール産生を抑制する傾向が見られたが、その他の被験物質には活性が見られなかった。

DnDP (工業 2)、n-TOTM (工業 3)、EH-TOTM (工業 4)、ATHC (試薬 5) は全ての試験で活性が認められず、DEHP (試薬 1、工業 1) より活性が低かった。2つの系のヒト乳癌細胞増殖試験結果から、DEHP や DEHA 等は代謝後に活性が上がる傾向があり、代謝物の内分泌かく乱作用には十分注意する必要がある

あると考える。試薬と工業用を DEHP、EH-TOTM、ATBC で比較すると、試薬の方が高い活性を示す傾向が見られたが、純度などに大きな違いは無いと考えられ原因は分からなかった。今後の検討すべき課題である。

被験物質の分解前の受容体結合能試験とヒト乳癌細胞増殖試験、酵母 Two-Hybrid 法では、活性が見られなかったという点では同様な傾向が見られた。MCF-7 を用いたヒト乳癌細胞増殖試験は先に述べたように血清添加による代謝が進んでいると仮定すると、T47D 細胞を用いた系と同様の傾向と示したと考える。副腎皮質細胞のコルチゾール産生への影響は他の試験系と似た傾向は見られず、細胞内の内分泌系活性作用の機序が異なるものと推測される。

D. 結論

1. 受容体結合能試験、ヒト乳癌細胞増殖試験、酵母 Two-Hybrid 法、副腎皮質細胞のコルチゾール産生への影響試験の結果、DnDP (工業 2)、n-TOTM (工業 3)、EH-TOTM (工業 3)、ATHC (試薬 5) は全ての試験で活性が認められず、DEHP (試薬 1、工業 1) より内分泌かく乱作用が小さいことがわかった。
2. DEHP や DEHA など、代謝物の活性が高くなるものがあること、工業品より試薬の方が高い活性を示す傾向があること、各種試験系間で違いがあることがわかった。それらの原因や代謝過程などは、今後の検討課題である。

E. 参考文献

- 1)通産省「化学工学統計年報」(1999)
- 2)化学工業日報社「13599 の化学商品」
p.1032(1999)
- 3)Oishi S, Hiraga K, Effect of
phthalic acid esters on mouse
testes, Toxicol. Lett.,5,413-
416(1980)
- 4)Oishi S, Hiraga K, Testicular
atrophy induced by phthalic acid
esters:effect in testosterone and
zinc concentrations, Toxicol. Appl.
Pharmacol., 53,35-41(1980)
- 5)Yagi Y, Nakamura Y, Tomita I,
Tsuchikawa K, Shimoi N,
Teratogenic potential of di- and
mono-(2-ethylhexyl)phthalate in
mice, J.Environ Pathol Toxicol.,
4,533-544(1980)
- 6)環境庁リスク対策検討会監修,「環境
ホルモンー外因性内分泌攪乱化学物
質問題に関する研究班中間報告書」
環境新聞社(1997)
- 7)環境庁環境安全課,「外因性内分泌攪
乱化学物質問題への環境庁の対応方
針についてー環境ホルモン戦略計画
SPEED'98」(1998)
- 8)衛化第31号(平成12年6月14日)
厚生省生活衛生局食品化学課長通知
「塩化ビニル製手袋の食品への使用
について」

F. 研究発表

なし

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

H. 健康危険情報

なし

使用細胞についても各施設内の規定
に基づき適性と考える。

Table 1 被験物質一覧

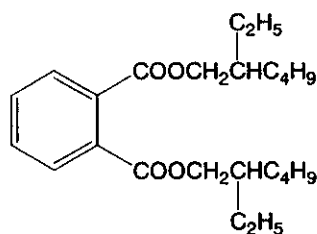
NO.	グレード	略号	化学名	種類	品名	製造元	Lot.No.	実績
試薬1	試薬	DEHP	di-2-ethylhexyl phthalate	フタル酸エステル	—	Aldrich	Lot.03622TU	食品、医療(全世界多い)
試薬2	試薬	EH-TOTM	tri-2-ethylhexyl trimellitate	トリメリット酸エステル	—	TCI	Lot.GJ01	医療(少)
試薬3	試薬	DEHA	diethylhexyl adipate	アジピン酸エステル	—	Aldrich	Lot.05916AX	食品ラップ、医療(少)
試薬4	試薬	ATBC	acethyl tributyl citrate	クエン酸エステル	—	TCI	Lot.GI01	食品ラップ、乳児玩具
試薬5	試薬	ATHC	acethyl trihexyl citrate	クエン酸エステル	—	Aldrich	Lot.03916TY	なし
試薬6	試薬	BTHC	butyryl trihexyl citrate	クエン酸エステル	—	Aldrich	Lot.01406PY	欧米医療(少)
工業1	工業用	DEHP	di-2-ethylhexyl phthalate	フタル酸エステル	DOP-E	ジェイブラス	—	食品、医療(全世界多い)
工業2	工業用	DnDP	di-n-decyl phthalate	フタル酸エステル	ビニサイザ-105	花王	Lot.2214	日本医療(少)
工業3	工業用	n-TOTM	tri-n-octyl trimellitate	トリメリット酸エステル	トリメックス NewNSK	花王	Lot.5191	不明
工業4	工業用	EH-TOTM	tri-2-ethylhexyl trimellitate	トリメリット酸エステル	TOTM-NB	ジェイブラス	Lot.1311	医療(少)
工業5	工業用	ATBC	acethyl tributyl citrate	クエン酸エステル	ATBC	ジェイブラス	Lot.7903	食品ラップ、乳児玩具

Table 2 各施設の試験系

NO	施設名	試験系
1	星薬科大学/分析化学	①エストロゲン受容体(α) 結合能試験(binding assay)
2		②エストロゲン受容体(β) 結合能試験(binding assay)
3		③アンドロゲン受容体結合能試験(binding assay)
4	東海大学医学部	①ヒト乳癌細胞 MCF-7 での細胞増殖試験(E-Screen)
5	国立公衆衛生院	①ヒト乳癌細胞 T47D での細胞増殖試験(E-Screen)
6		②同上 S-9 mix 系
7	大阪府立公衆衛生研究所	①エストロゲン受容体(α)導入酵母 Two-Hybrid 法
8		②同上 S-9 mix 系
9		③アンドロゲン受容体導入酵母 Two-Hybrid 法
10		④抗アンドロゲン受容体導入酵母 Two-Hybrid 法
11		⑤甲状腺ホルモン受容体(α)導入酵母 Two-Hybrid 法
12		⑥同上 S-9 mix 系
13	星薬科大学/生化学	①ヒト副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼす影響を評価する系

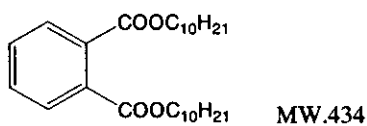
Table 3 各種試験方法での内分泌かく乱作用スクリーニング試験結果総括

施設		星薬科／分析			公衆衛生院		東海大		星薬／生化学		大阪府立公衆衛生研究所				
試験系		受容体結合能			細胞増殖		細胞増殖		副腎皮質細胞の コルチゾール産生への 影響度		酵母 Two-Hybrid法				
試験対象		E(α)	E(β)	An	T47D		MCF-7	細胞の コルチゾール産生への 影響度		E(α)		甲状腺(α)		An	anti-An
S-9		-	-	-	-	添加	-	-	-	-	添加	-	添加	-	-
測定範囲		-log[M]	11～4	11～4	11～4	13～6	11～5	6～5	-	7～3	7～3	7～3	7～3	7～3	7～3
結果の表現		IC50 が陽性対照の 1/1000≧NR			BL増殖(1.0)と比較 1.2≧NR		同左 1.1≧NR	-	ガラクトダーゼ活性が陽性対照の 10%≧NR						
試験1	DEHP	NR	NR	NR	NR	1.3	1.20	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
試験2	EH-TOTM	NR	NR	NR	NR	NR	1.25	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
試験3	DEHA	NR	NR	NR	NR	1.3	1.17	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
試験4	ATBC	NR	NR	NR	NR	NR	1.19	±	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
試験5	ATHC	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
試験6	BTHC	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
工業1	DEHP	NR	NR	NR	NR	1.3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
工業2	DnDP	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
工業3	n-TOTM	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
工業4	EH-TOTM	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
工業5	ATBC	NR	NR	NR	NR	NR	NR	±	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
estradiol (E2)		100	100		1.5	NR	1.28			100	100				
nonylphenol					1.4	NR									
bisphenol A					1.5	NR									
testosterone				100											
triiodothyronine															
5- α-Dihydrotestosterone												100	100	100	100



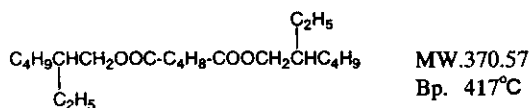
MW.390
Bp.386°C

フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP、DOP)



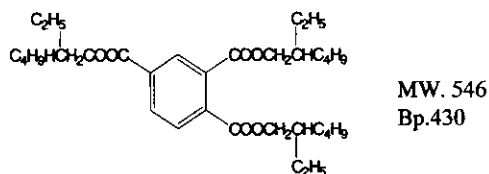
MW.434

フタル酸ジ-n-デシル(DnDP)



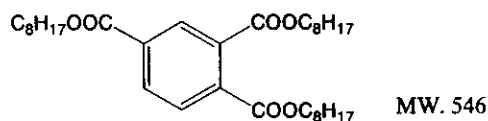
MW.370.57
Bp. 417°C

アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHA)



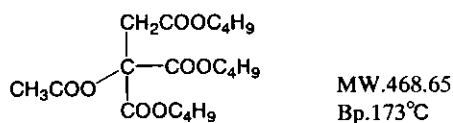
MW. 546
Bp.430

トリメット酸トリ-2-エチルヘキシル(EH-TOTM)



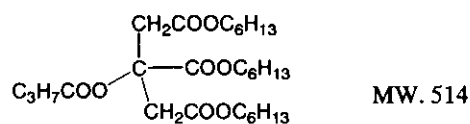
MW. 546

トリメット酸トリ-n-オクチル(n-TOTM)



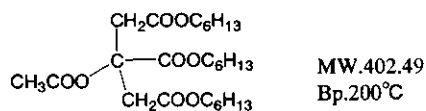
MW.468.65
Bp.173°C

クエン酸アセチルトリブチル(ATBC)



MW. 514

クエン酸ブチリルトリヘキシル(BTHC)



MW.402.49
Bp.200°C

クエン酸アセチルトリヘキシル(ATHC)

Fig 1 被験物質の構造式と物性値

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

受容体結合試験によるフタル酸ジエチルヘキシル及びその他の可塑剤の
活性評価

主任研究者	中澤 裕之	星薬科大学
研究協力者	吉村 吉博	星薬科大学
	石川 健次	テルモ

研究要旨

フタル酸ジエチルヘキシルは、可塑剤として汎用され、主に塩化ビニル製品に使用されており、内分泌かく乱作用があるとして医療用具、食品用手袋等からの溶出が問題視されている。そこで、フタル酸ジエチルヘキシルと現在、内分泌かく乱作用に関する報告がない可塑剤の生殖関連受容体（エストロゲン、アンドロゲン）への結合能を評価する目的で受容体結合試験を行った。

A. 研究目的

現在、数多くの可塑剤が販売され、使用されている。その中でも、特にフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) は、塩化ビニル製品との相溶性、可塑化効率、耐揮発性、低温柔軟性をバランス良くもつことや、1 kg 当たり 150～170 円という、価格の安さから最も多く使用され、全可塑剤の生産量の 85 % (309, 719 t) を占めている¹⁾。その一方で DEHP は、*in vivo* 系実験において、精巣中の亜鉛濃度の低下やテストステロン量の低下²⁾、精巣萎縮³⁾、骨形成異常⁴⁾ といった内分泌かく乱作用の疑いがあるとの報告があり、塩化ビニル製品への使用に関して規制をする必要性が言われてきている。

内分泌かく乱作用を懸念した場合、

その物質のエストロゲン作用について最も注目される。そのため、エストロゲン活性の有無を調べることは、必要であるとされている。

現在、プラスチック可塑剤としてフタル酸エステル系が主に使用され、その他の可塑剤としては、アジピン酸系、トリメット酸系、クエン酸系、セバシン酸系、リン酸系等が使用されている。

アジピン酸系エステルは、食品用ラップフィルムに使用され耐寒性に優れている特徴がある。トリメット酸系可塑剤は、耐熱性が優れていることから、ビニル電線皮膜分野を中心に使用されている。又、耐熱性、耐寒性、保留性に優れ、価格も 1 kg 当たり、500～600 円と安価なことから、需要が伸びてい

る。クエン酸系可塑剤は、熱安定性や、透明性が良いことから、食品包装用樹脂に多く用いられ、FDA では、食品包装用プラスチック材料として認可されている。クエン酸は、生体内でのクエン酸回路として知られる物質であることから、安全であるとの見方があり、食品包装だけでなく、幅広い分野で使用されつつある。これは、1 kg 当たり、850 円という比較的安価な価格も関与していると思われる。

これらの、7 品目についての内分泌かく乱作用の報告は、現在のところ全くないが、DEHP と同様、プラスチック製品から溶出していると考えられ、何らかの内分泌系への作用がある可能性がある。

未だに、内分泌かく乱化学物質の生体に対する作用機序については不明な点が多い。しかし、一般的に、ホルモンに作用をもたらす物質はまず、核内受容体へ結合し、この核内受容体が転写因子として機能して、標的遺伝子の転写を制御するとされている。そのため、これらの物質の受容体への結合性を測ることは、物質固有の性質を知る上で欠かすことのできない試験法であると言える。そこで、内分泌かく乱作用として代表的な、エストロゲン (α , β) 及びアンドロゲン受容体への結合能を調べ、これらの物質の活性評価を行った。

今回は、フタル酸系として DEHP とフタル酸ジ-n-デシル (DnDP)、アジピン酸系としてアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHA)、トリメット酸系として

トリメット酸トリ-2-エチルヘキシル (EH-TOTM)、トリメット酸トリ-n-オクチル (n-TOTM)、クエン酸系としてクエン酸アセチルトリブチル (ATBC)、クエン酸ブチリルトリヘキシル (BTHC)、クエン酸アセチルトリヘキシル (ATHC) の 8 品目の可塑剤 (Fig. 1) について受容体活性評価を行った。

B. 研究方法

B・1 試薬・試料

Estradiol 及び Testosterone は (和光純薬社製; 生化学用試薬) を使用した。

試料として用いた可塑剤は、フタル酸系として、DEHP (Aldrich 社製, ジェイプラス社製; 工業用, 合計 2 種), DnDP (花王社製; 工業用, 1 種), アジピン酸系として、DEHA (Aldrich 社製, 1 種), トリメット酸系としては、EH-TOTM (東京化成社製, ジェイプラス社製; 工業用, 合計 2 種), n-TOTM (花王社製; 工業用, 1 種), クエン酸系として、ATBC (東京化成社製, ジェイプラス社製; 工業用, 合計 2 種), BTHC (Aldrich 社製, 1 種), ATHC (Aldrich 社製, 1 種) を用いた。

溶媒には、DMSO (和光純薬社製; 特級) を用いた。

測定試料は、すべて DMSO に溶解し、標準溶液を調製した。これを DMSO で希釈し、 10^{-11} ~ 10^{-4} M の各濃度に調製し、試験溶液とした。

B・2 活性評価

エストロゲン活性評価には、和光純薬社製環境分析用 Estrogen-R (α)

Competitor Screening Kit により、受容体結合試験を行った。又、測定機器（蛍光リーダー）には、TECAN 社製 SPECTRA Fluor Plus を使用し、測定を実施した。エストラジオール受容体（Estradiol Receptor;ER）を固相化したマイクロプレートに、試験溶液と反応溶液として、蛍光標識したエストラジオール（E₂）を同時に添加することで、ER に対して、競合反応を起こさせ、測定物質の受容体への親和力を測定する方法である。測定物質の ER への親和力が強いと、標識化 E₂ と ER の結合を競合的に阻害し、測定物質が、ER へ結合する。逆に、親和力が弱いと、標識化 E₂ が ER に多く結合する。競合反応後、受容体に結合しなかった物質を洗浄し、受容体に結合した標識化 E₂ の蛍光強度を測定する。標識化 E₂ の蛍光強度の最も高い濃度が、受容体飽和結合強度と考え、その蛍光強度を 100% として、横軸に各物質の対数濃度 (nM)、縦軸に飽和結合強度に対する物質の割合 RFU(%) をとる。競合反応が、濃度依存的に起こるとシグモイドカーブとして描ける。この曲線上で、50% 阻害濃度 (IC₅₀) を算出し、受容体との親和性の指標とする (Fig. 2)。

エストロゲン (β) 活性評価には、東洋紡社製 Ligand Screening System – Estrogen Receptor β により、受容体結合試験を行った。又、測定機器には、Bio-Rad 社製 550 マイクロプレートリーダーにて測定した。

アンドロゲン活性評価には、東洋紡社製 Ligand Screening System –

Androgen Receptor を用い、マイクロプレートリーダーにて測定した。

B・3 測定条件

B・3・1 ER(α) 結合能試験

テストチューブに、114 μl の反応溶液と 6 μl の試料溶液を混合して ER 固相化マイクロプレートにこの溶液を 100 μl 移行した。また、A1, A2 ウェルにはブランク溶液 (DMSO 5 μl + 反応溶液 95 μl) の混液を添加した。2 時間放置後、規定の洗浄液で 2 回洗浄し、残り液を充分に取り除き、100 μl の測定溶液を添加して蛍光リーダーで測定を行った。蛍光リーダーの測定条件は、Ex. 485 nm, Em. 535 nm で検出条件を設定し、Gain:Optimal 及び Flash Number:100 で行った。

B・3・2 ER(β) 結合能試験

反応プレートにレセプター溶液 20μl、試験溶液 30μl、リガンド (17β-エストラジオール) 溶液 30μl を添加混和した。4℃で 1 時間静置後、抗エストロゲン抗体固相化プレートに反応液を 50μl 移行し、エストラジオール HRP 標識溶液を等量加えた。その後、4℃で 1 時間静置し、規定の洗浄液で 3 回洗浄し、100μl の基質液を添加した。37℃で 20 分間放置後、停止液を 100μl 添加し、マイクロプレートリーダーにより 450nm の吸光度を測定した。

B・3・2 AR 結合試験

反応プレートにレセプター溶液 20μl、試験溶液 30μl、リガンド (テストステロン) 溶液 30μl を添加混和した。4℃で 1 時間静置後、抗テストステロン抗体固相化プレートに反応液を

50 μ l 移行し, テストステロン HRP 標識溶液を等量加えた. その後, 4°C で 1 時間静置し, 規定の洗浄液で 3 回洗浄し, 100 μ l の基質液を添加した. 37°C で 20 分間放置後, 停止液を 100 μ l 添加し, マイクロプレートリーダーにより 450nm の吸光度を測定した.

C. 研究結果

C・1 ER(α) 結合能

Estrogen-R (α) Competitor Screening Kit を利用して, DEHP, DnDP, DEHA, EH-TOTM, n-TOTM, ATBC, BTHC, ATHC のエストロゲン活性評価を実施した. 本法を用いて, エストラジオールを評価した際, Fig. 2 のようにシグモイドカーブ(競合結合曲線)が得られ, 標識エストラジオールとの競合が確認された. よって, 本法を用いることにより, ER(α)との結合能が確認できる.

上述の可塑剤 8 品目 11 種においては, DEHP の IC₅₀ が 100mM であった. その他の物質については, IC₅₀ を求めることが出来なかった(Fig. 2).

C・2 ER(β) 結合能

Ligand Screening System - Estrogen Receptor β により, ER(β) 活性評価を実施した. エストラジオールの IC₅₀ は 0.3nM であった. 上述の可塑剤においては, EH-TOTM の IC₅₀ が 31mM であった. その他の物質については, IC₅₀ を求めることが出来なかった(Fig. 3).

C・3 AR 結合能

Ligand Screening System - Androgen Receptor により, アンドロゲン活性評価を実施した. テストステロンの

IC₅₀ は 0.6nM であった. 上述の可塑剤においては, DEHP, ATBC に結合が見られた. それぞれの IC₅₀ は 4.3mM, 90mM であった. その他の物質については, IC₅₀ を求めることが出来なかった(Fig. 4).

D. 考察

エストロゲン及びアンドロゲン活性評価法として, エストロゲン受容体(α , β) 及びアンドロゲン受容体バインディングアッセイ法を利用した. 受容体サブタイプである α , β においてエストラジオールの IC₅₀ がそれぞれ, 8nM, 0.3nM であることから化学物質のエストロゲン受容体(α , β) との結合能が確認できることが示唆された. また同様にアンドロゲン受容体においては, テストステロンの IC₅₀ が 0.6nM であることから化学物質のアンドロゲン受容体との結合能が確認できることが示唆された.

エストロゲン(α , β) 及びアンドロゲン受容体において活性評価をお行ったところ, IC₅₀ が求まる物質があった. これらの物質において, 17 β -エストラジオール及びテストステロンの IC₅₀ を 100 として, 各物質の受容体結合親和性(RBA)を求めた(Table 1). RBA が 100 より大きいと, 受容体への親和性は強く, 100 より小さいと親和性は弱いことがいえる.

今回の測定物質では, ER(α) において, DEHP(試薬 1) が, ER(β) においては, EH-TOTM(試薬 2), AR においては, DEHP(試薬 1) と ATBC(工業 5) にお

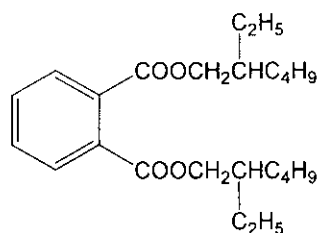
いて RBA が求まり，それぞれ，0.007, 0.001, 0.014, 0.0007 であった。これらの RBA は値が低いことから，他のアッセイ等での評価が必要と推測される。又，その他の可塑剤については，受容体への活性は無いと評価した。

E. 結論

今回の測定法では，極弱いながら各受容体に作用する物質が挙げられた。しかし，これらの物質において再現性等が十分に得られていないため，再評価を実施する必要があると思われる。

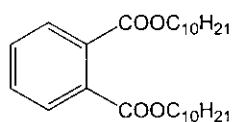
参考文献

- 1) 化学工学統計年報, 通産省(1999)
- 2) Oishi S, Hiraga K, Effect of phthalic acid esters on mouse testes. *Toxicol Lett*, 5, 413-416, (1980).
- 3) Oishi S, Hiraga K, Testicular atrophy induced by phthalic acid esters: effect on testosterone and zinc concentrations. *Toxicol Appl Pharmacol*, 53, 35-41, (1980).
- 4) Yagi Y, Nakamura Y, Tomita I, Tsuchikawa K, Shimoi N, Teratogenic potential of di- and mono-(2-ethylhexyl)phthalate in mice. *J Environ Pathol Toxicol*, 4, 533-544, (1980).



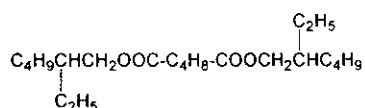
MW.390
Bp.386°C

フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP、DOP)



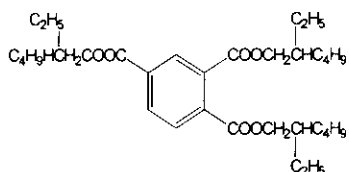
MW.434

フタル酸ジ-n-デシル(DnDP)



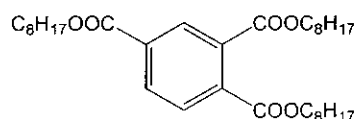
MW.370.57
Bp. 417°C

アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHA)



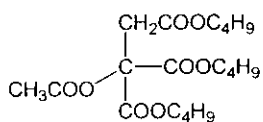
MW. 546
Bp.430

トリメット酸トリ-2-エチルヘキシル(EH-TOTM)



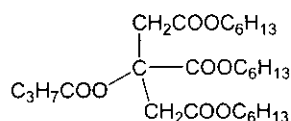
MW. 546

トリメット酸トリ-n-オクチル(n-TOTM)



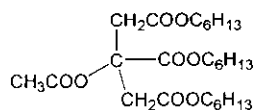
MW.468.65
Bp.173°C

クエン酸アセチルトリブチル(ATBC)



MW. 514

クエン酸ブチリルトリヘキシル(BTHC)



MW.402.49
Bp.200°C

クエン酸アセチルトリヘキシル(ATHC)

Fig.1 可塑剤の構造式

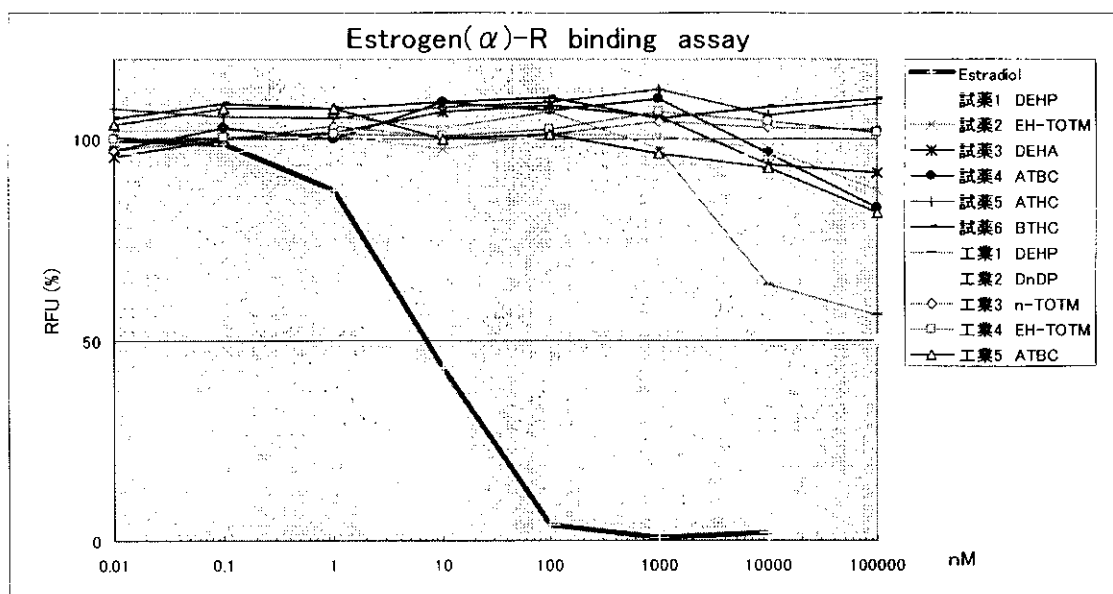


Fig. 2 Competition binding of plasticizers to ER- α

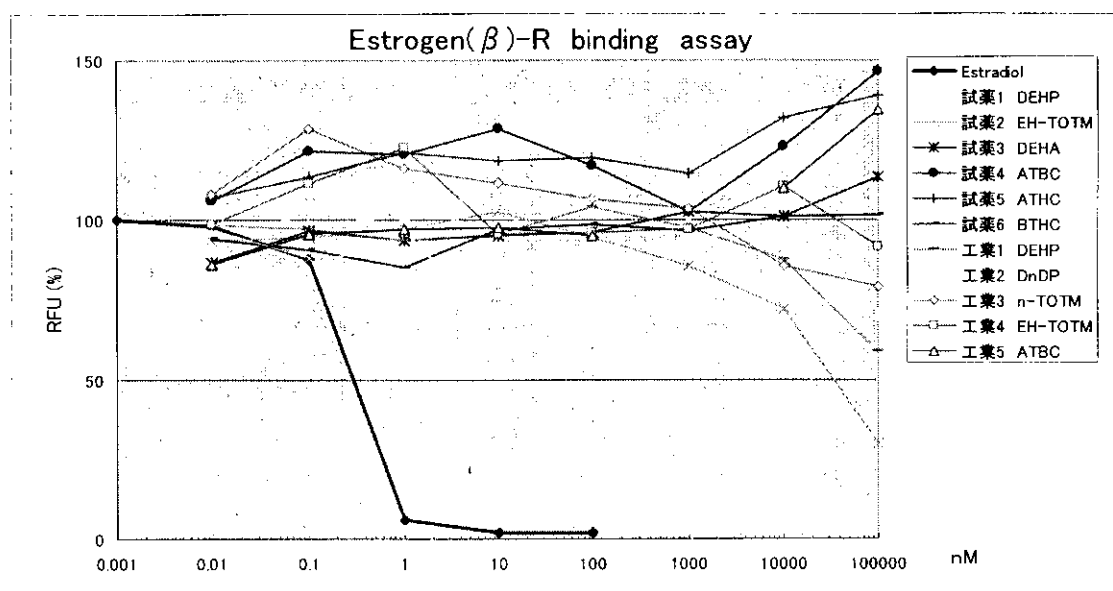


Fig. 3 Competition binding of plasticizers to ER- β