

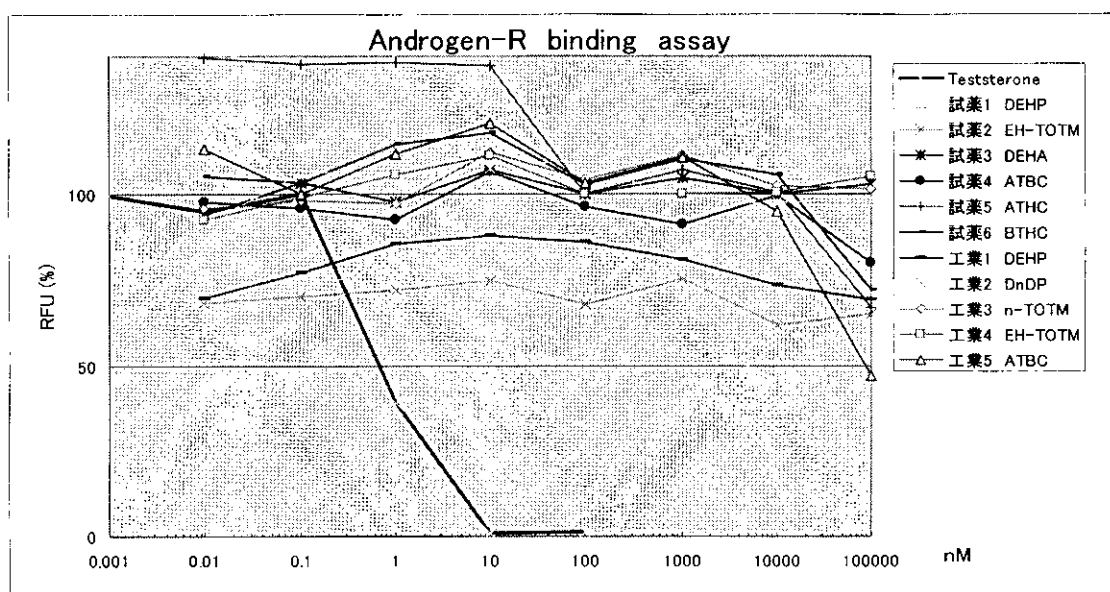


Fig. 4 Competition binding of plasticizers to AR

Table 1 可塑剤の受容体結合親和性

試料	略称	化学名		Estrogen-R (α)	Estrogen-R (β)	Androgen-R
	E2	β - Estradiol		100	100	—
	Test	Testosterone		—	—	100
試薬1	DEHP	diethylhexyl phthalate	フタル酸エステル	0.00700	NR	0.01395
試薬2	EH-TOTM	triethylhexyl trimellitate	トリメルिट酸エステル	NR	0.00097	NR
試薬3	DEHA	diethylhexyl adipate	アジピン酸エステル	NR	NR	NR
試薬4	ATBC	acethyl tributyl citrate	クエン酸エステル	NR	NR	NR
試薬5	ATHC	acethyl trihexyl citrate	クエン酸エステル	NR	NR	NR
試薬6	BTHC	butyryl trihexyl citrate	クエン酸エステル	NR	NR	NR
工業1	DEHP	diethylhexyl phthalate	フタル酸エステル	NR	NR	NR
工業2	DnDP	di-n-decyl phthalate	フタル酸エステル	NR	NR	NR
工業3	n-TOTM	tri-n-octyl trimellitate	トリメルिट酸エステル	NR	NR	NR
工業4	EH-TOTM	triethylhexyl trimellitate	トリメルिट酸エステル	NR	NR	NR
工業5	ATBC	acethyl tributyl citrate	クエン酸エステル	NR	NR	0.00067

NR : Not Reaction

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

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼす

DEHP 代替可塑剤の影響評価

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

ポリ塩化ビニル用の可塑剤として玩具や医療器具中に多く使用されてきた di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) の代替物質として、試薬用、工業用グレードを含む合計 11 候補物質を挙げ、ヒト副腎由来 H295R 細胞中のコルチゾール産生に及ぼす影響を種々の濃度で検討した。その結果、BTHC（試薬グレード）は 30 μM の濃度においてコルチゾール産生を有意に抑制した。また ATBC は、試薬と工業グレードとの間で多少差が見られたが 3.0 μM –30 μM の濃度においてコルチゾール産生を濃度依存的に抑制する傾向があった。他の可塑剤の曝露では、いずれもコルチゾール産生の抑制傾向は認められなかった。なお、コルチゾール産生を比較的強力に抑制した BTHC（試薬 6）の IC_{50} はおよそ 23 μM であった。また、いずれの検体においても曝露実験に使用した濃度では細胞毒性は認められなかった。

A. 研究目的

プラスチック製品等の高分子素材は現代の生活環境中に氾濫しており、その中でもポリ塩化ビニルは玩具や食品包装製品、医療用具等に広く使用されている。近年、ポリ塩化ビニルの可塑剤として多量に製造・使用されてきた di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) について、溶出及び生物活性が問題視され、使用が制限されるに至っている。医療用具においてはその性質上、患者の意志にかかわらず直接的な DEHP 曝露を受けることから、代替可塑剤の模索が必要命題となっている。我々は、ヒト副腎由来の H295R 細胞を

ヒトのステロイドホルモン産生細胞モデルとし、そのコルチゾール産生に及ぼす種々の化学物質の影響を評価してきた。本研究では、このアッセイ系を利用し、DEHP に代わる各種ポリ塩化ビニル用可塑剤候補物質の H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼす影響及びこれらの可塑剤候補物質の H295R 細胞に対する細胞毒性についての評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

B-1. 実験材料及び試薬

実験に使用した DEHP 代替可塑剤は表 I に示した。Dibutyryl cAMP は和光

純薬工業より購入した。Insulin、transferrin、及び vitamin はシグマアルドリッチジャパンより購入した。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。コルチゾール測定用の DPC・Cortisol 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。蛋白質量測定用の BCA assay kit は Pierce Chemical 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. 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) 及び linoleic acid (5.35 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 Medium) に、更に 1 % ITS Plus (Collaborative Research, Bedford, MA)、2 % Ultrosor G (Sepracore, France) 及び抗生物質 (penicillin: 50 IU/ml, streptomycin: 50 µg/ml) を加えた培養液を使用した。細胞は 75 cm² flasks を使用し、5 % CO₂ - 95 % air の気相中 37 °C で培養を行い、継代した。必要に応じて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コルチゾールの分析

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) 及び抗生物質を含む D-MEM / F-12 培地に交換し 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 dibutyl cAMP (1 mM) を加え更に 48 時間培養した。なお、メジウム中のエタノールは最終濃度 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。検体及び dibutyl cAMP を添加した一定時間後に培養液中に分泌されたコルチゾールはラジオイムノアッセイ法による測定キットを用いその濃度を測定した。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 H295R 細胞から逸脱する LDH 活性を測定した。また、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 (PBS) で良く洗浄後、150 mM NaCl、1 % sodium dodecyl sulfate、5 mM EGTA、0.5 mM MgCl₂、0.5 mM MnCl₂ 及び 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を含む 50 mM Tris-HCl buffer

(pH 7.4)を用いて溶解し、全蛋白質量を測定した。

C. 研究結果及び考察

C-1. フタル酸エステル類のステロイドホルモン産生に及ぼす影響

ヒト副腎 H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼす各種ポリ塩化ビニル用可塑剤の影響を種々の濃度で検討した結果を Fig. 1 及び Fig. 2 に示した。実験に用いた 11 種の検体の中で、BTHC (試薬 6) は 30 μM の濃度においてコルチゾール産生を比較的強力に抑制した。また ATBC (試薬 4 及び工業 5) は、試薬と工業グレードとの間で多少差が見られたが 3.0–30 μM の濃度においてコルチゾール産生を濃度依存的に抑制する傾向があった。DEHP (試薬 1)、EH-TOTM (試薬 2)、DEHA (試薬 3) についても高濃度 (30 μM) で弱いながらもコルチゾール産生を抑制する傾向が見られたが、EH-TOTM (工業 4) によるコルチゾール産生の抑制は認められなかった。他のポリ塩化ビニル用可塑剤の曝露では、いずれもコルチゾール産生の抑制傾向は認められなかった。なお、コルチゾール産生を比較的強力に抑制した BTHC (試薬 6) の IC_{50} はおよそ 23 μM (Fig. 1) であった。また、いずれの検体においても曝露実験に使用した濃度では細胞毒性は認められなかった。同じ化合物でありながら試薬と工業用のコルチゾール産生抑制に差がある事には、純度等の要因が関係しているのではないかと考える。

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) 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.

表 I

＜DEHP 代替可塑剤一覧＞

NO.	グレード	略号	化学名	種類	品名	メーカー
試薬 1	試薬	DEHP	diethylhexyl phthalate	フタル酸エステル	—	Aldrich
試薬 2	試薬	EH-TOTM	triethylhexyl trimellitate	トリメリット酸エステル	—	TCI
試薬 3	試薬	DEHA	diethylhexyl adipate	アジピン酸エステル	—	Aldrich
試薬 4	試薬	ATBC	acethyl tributyl citrate	クエン酸エステル	—	TCI
試薬 5	試薬	ATHC	acethyl trihexyl citrate	クエン酸エステル	—	Aldrich
試薬 6	試薬	BTHC	butyryl trihexyl citrate	クエン酸エステル	—	Aldrich
工業 1	工業用	DEHP	diethylhexyl phthalate	フタル酸エステル	DOP-E	ジェイプラス
工業 2	工業用	DnDP	di-n-decyl phthalate	フタル酸エステル	ビニサイザー 105	花王
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
工業 4	工業用	EH-TOTM	triethylhexyl trimellitate	トリメリット酸エステル	TOTM-NB	ジェイプラス
工業 5	工業用	ATBC	acethyl tributyl citrate	クエン酸エステル	ATBC	ジェイプラス

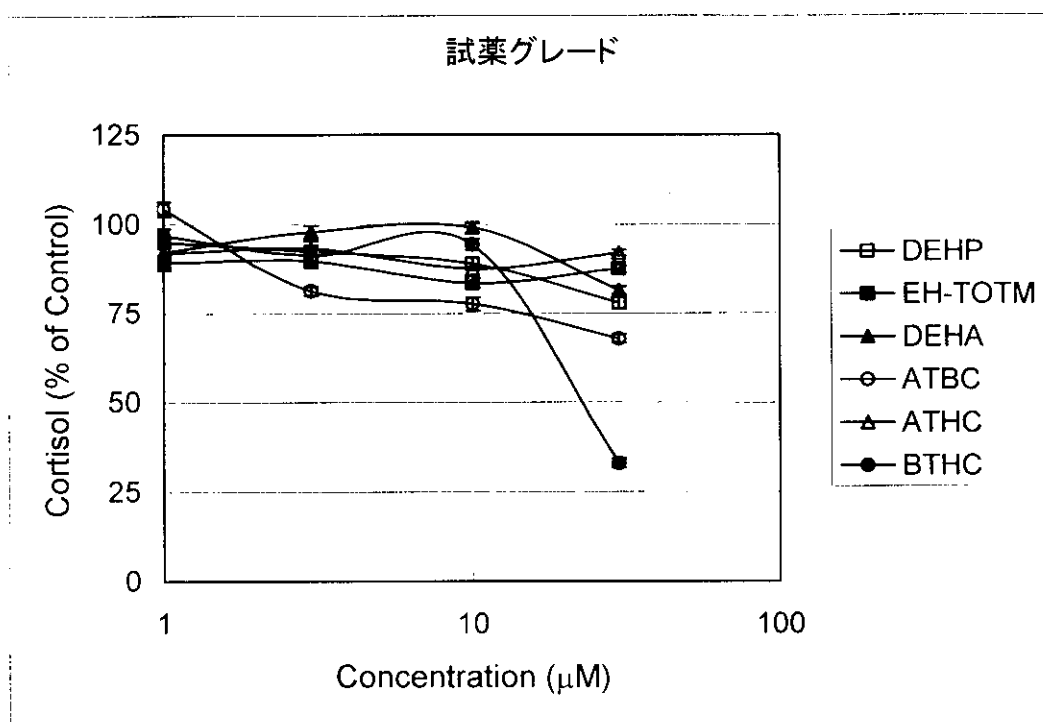


Fig. 1

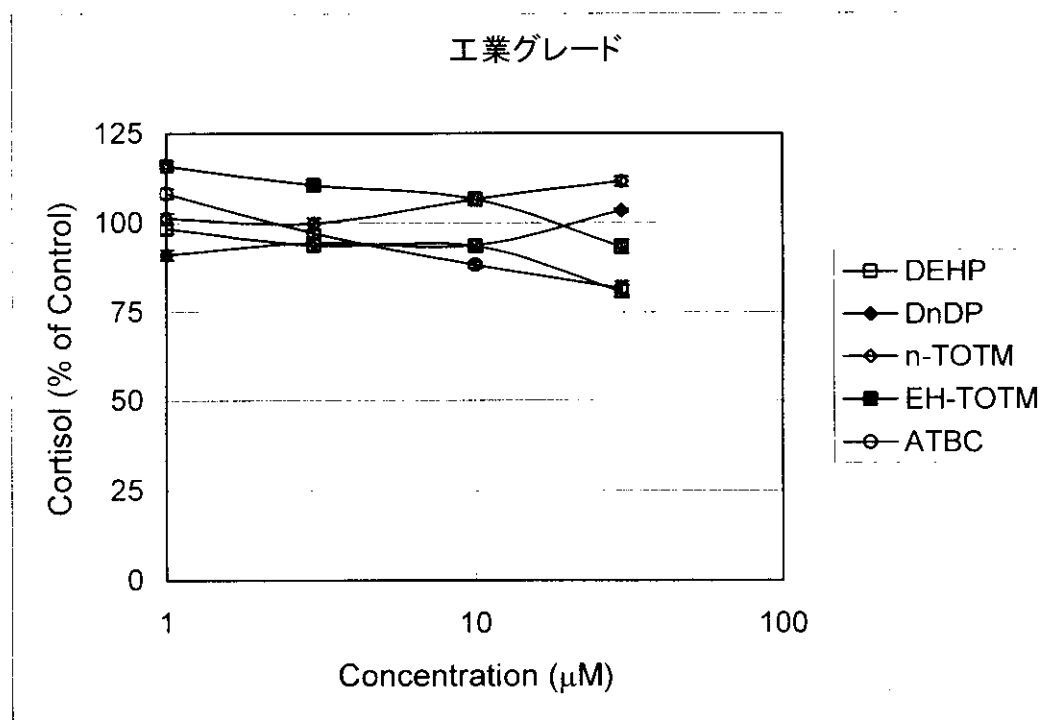


Fig. 2

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

フタル酸ジエチルヘキシル及びその代替化学物質のエストロジェン様作用

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

塩化ビニル製プラスチック製品の可塑剤として用いられてきたフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)が一部規制され、その代替化学物質が色々と使用されるようになった。DEHP は、内分泌かく乱作用を有する疑いがもたれている。そこで、DEHP の代替化学物質として用いられるようになったアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHA)等の化学物質について E-SCREEN Assay によりエストロジェン様作用の評価を行うとともに、生体内における化学物質の代謝を考慮し、化学物質を S-9mix で処理し、各化学物質の代謝産物のエストロジェン様作用についても E-SCREEN Assay を用いて調べた。その結果、代謝によってもエストロジェン様作用に変化がないもの、代謝によってエストロジェン様作用がなくなるもの、代謝によってむしろエストロジェン様作用がみられるようになるものがあった。

A. 研究目的

ビスフェノール A(BPA)、ノニルフェノール(NP)等の高分子素材由来生活関連化学物質には、内分泌かく乱作用を有する疑いがもたれている。E-SCREEN Assay はエストロジェンレセプター(ER)を有するヒト乳癌細胞を用い、細胞増殖促進作用を指標として、化学物質のエストロジェン様作用を評価するために広く用いられてきた。塩化ビニル製プラスチック製品の可塑剤として用いられてきたフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)が一部規制され、その代替化学物質が色々と使用されるようになった。そこで、DEHP の代替化学物質として用いられるようになったアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHA)等の化学物質について E-SCREEN Assay によりエストロジェン様作用の評価を行うとともに、生体内における化学物質の代謝を考慮し、化学物質を S-9mix で処理し、各化学物質の代謝産物のエストロジェン様作用についても E-SCREEN Assay を用いて調べた。

B. 研究方法

B-1. 検討物質

検討した化学物質は、ポジティブコントロールである 17 β -エストラジオール(E2)の他、ノニルフェノール(NP)、オクチルフェノール(OP)、ビスフェノール A(BPA)、そして、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP) (アルドリッチ社 (試薬)、ジェイプラス (工業用、品名: DOP-E))、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHA) (アルドリッチ社 (試薬))、トリメリット酸トリエチルヘキシル(EH-TOTM)(TCI 社 (試薬)、ジェイプラス (工業用、品名: TOTM-NB))、クエン酸アセチルトリブチル(ATBC) (TCI 社 (試薬)、ジェイプラス (工業用、品名: ATBC))、クエン酸アセチルトリヘキシル(ATHC) (アルドリッチ社 (試薬))、クエン酸ブチルトリヘキシル(BTHC) (アルドリッチ社 (試薬))、フタル酸ジ-n-デシル(DnDP) (花王 (工業用、品名: ビニサイザー105)、トリメリット酸トリ-n-オクチル (花王 (工業用、品名: トリメックス NewNSK)) である。

B-2. E-SCREEN Assay

ヒト乳癌細胞株である T47D を DMEM で細胞数 3750 cells/well となるようにプレートに播き、一晚 37°C、5%CO₂ 中でインキュベートした。その後、培養液をフェノールレッドフリー、またウシ胎児血清のかわりに低蛋白質溶液である TCH (CELOX Laboratories, Inc.) を用いた DMEM に交換し、各ウェルに被験物質を添加した。被験物質添加後さらに 4 日間インキュベートし、WST-1 を用いたアッセイにより細胞数をカウントした。

B-3. S-9mix 処理

Cofactor-I 溶液 9ml にラット肝臓ホモジネートである S-9 を 1ml 添加し、そのうちの 200 μ l にさらに被験物質を加え、37°C で 4 時間インキュベートした。酵素反応終了後、80°C で 30 分インキュベートし、酵素を失活させた。遠心して上清を DMEM で希釈したものをうい、E-SCREEN Assay を行った。

C. 研究結果

C-1. E2

まず、E2 をポジティブコントロールとして E-SCREEN Assay を行った。また、E2 を S-9mix 処理したものについても同様に行った (図 1)。コントロールとして、被験物質の代わりにそれと等用量の DMSO を添加し、同様に行った。グラフの縦軸には被験物質の吸光度をコントロールの吸光度で除した値をとり、横軸には被験物質の濃度を 10⁻¹¹~10⁻⁴M の範囲でとった。縦軸において 1.0 より大きな値を示す物質は、その濃度において、細胞増殖促進作用 (エストロゲン様作用) を示すものである。この結果から、E2 にはエストロゲン様作用があるが、S-9mix 処理によりエストロゲン様作用がなくなることが明らかになった。

C-2. アルキルフェノール類 (NP、OP)

NP、OP ともに S-9mix 処理前にはエス

トロジェン様作用がみとめられたが、S-9mix 処理によりエストロゲン様作用がなくなることが明らかになった (図 2)。さらに、10⁻⁴M では NP、OP ともに T47D 細胞の細胞死にともない増殖が著しく抑制されていたのに対し、S-9mix 処理された NP、OP は、コントロールと同レベルの増殖を示すようになった。

C-3. BPA

BPA は S-9mix 処理前にはエストロゲン様作用がみとめられたが、S-9mix 処理によりエストロゲン様作用がなくなることが明らかになった (図 3)。

C-4. DEHP

DEHP は、試薬として用いられているものには、S-9mix 処理前はエストロゲン様作用がみられなかったが、S-9mix 処理によりエストロゲン様作用がみとめられるようになった。一方、工業用の DEHP では、S-9mix 処理前は試薬用のものに比べ若干エストロゲン様作用があるようにみうけられるが、コントロールと比べ有意さはなかった。また、S-9mix 処理によりエストロゲン様作用がみとめられるようになった (図 4)。

C-5. DEHA

DEHA は、S-9mix 処理前はエストロゲン様作用がほとんどみられなかったが、S-9mix 処理によりエストロゲン様作用がみとめられるようになった (図 5)。

C-6. EH-TOTM

EH-TOTM は、試薬用、工業用ともに S-9mix 処理前にはエストロゲン様作用がほとんどみられなかったが、S-9mix 処理によりエストロゲン様作用がみとめられるようになった (図 6)。

C-7. ATBC

ATBC は、試薬用、工業用ともに S-9mix 処理前にはエストロゲン様作用が弱いな

がらも見受けられたが、S-9mix 処理によりエストロゲン様作用がなくなることが明らかになった (図 7)。

C-7. ATHC

ATHC は、S-9mix 処理前はエストロゲン様作用がみられなかったが、S-9mix 処理によりエストロゲン様作用がみとめられるようになった (図 8)。

C-8. BTHC

BTHC は、S-9mix 処理前はエストロゲン様作用がみられなかったが、S-9mix 処理によりエストロゲン様作用がみとめられるようになった (図 9)。

C-9. DnDP

DnDP は、S-9mix 処理前後ともエストロゲン様作用がみられなかった (図 10)。

C-10. n-TOTM

n-TOTM は、S-9mix 処理前後ともエストロゲン様作用がみられなかった (図 11)。

D. 考察

化学物質により、代謝によってもエストロゲン様作用に変化がないもの、代謝によってエストロゲン様作用がなくなるもの、代謝によってむしろエストロゲン様作用がみられるようになるものがあり、やはり、代謝を考慮した上での研究はヒトなどへの影響を考える場合には必要であると思われる。

また、同じ化学物質であっても、試薬として用いられ、研究に使用されているものと、工業用として実際に製品を作るのに使用されているものとで若干の作用の違いがみられた。純度に関しては、両者とも 99% 以上とのことであり、これが、純度の違いによるものとは考えにくい。この点に関しては、さらに検討する必要があるが、これらの化学物質が入れられている容器による可能性もあると思われる。

E. 結論

内分泌かく乱化学物質として知られているアルキルフェノール類や BPA、DEHP、そして DEHP の代替化学物質として利用されている化学物質について E-SCREEN Assay によりエストロゲン様作用の評価を行うとともに、生体内における化学物質の代謝を考慮し、化学物質を S-9mix で処理し、各化学物質の代謝産物のエストロゲン様作用についても E-SCREEN Assay を用いて調べた。その結果、アルキルフェノール類、BPA のように代謝によってエストロゲン様作用がなくなるもの、ATBC、DnDP、n-TOTM のように代謝によってもエストロゲン様作用に変化がないもの、DEHP、DEHA、EH-TOTM、ATHC、BTHC のように代謝によってむしろエストロゲン様作用がみられるようになるものがあった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

マクロファージ系培養細胞における内分泌攪乱化学物質の影響

加藤未歩、山崎聖美

第 4 回日本内分泌攪乱化学物質学会、つくば、2001. 12. 14-15、研究発表会要旨集、326、2001.

アジピン酸ジエチルヘキシル (DEHA) の生体影響

川口研、山崎聖美、中澤裕之

第 4 回日本内分泌攪乱化学物質学会、つくば、2001. 12. 14-15、研究発表会要旨集、355、2001.

H. 知的所有権の取得状況

特になし。

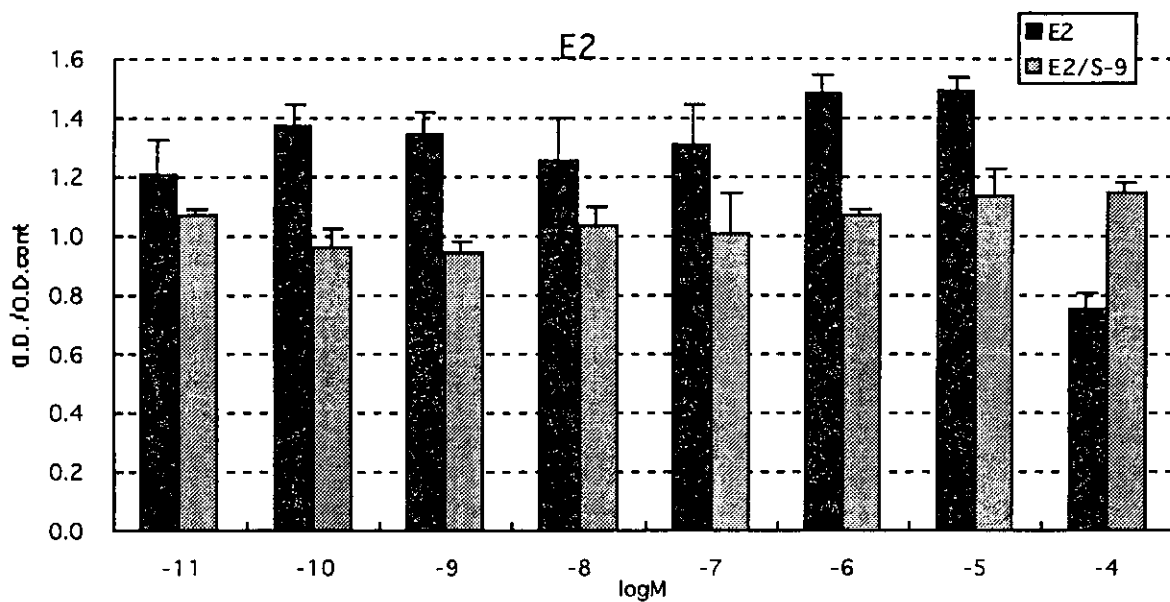


図1 E2 の S-9mix 処理前後のエストロゲン様作用

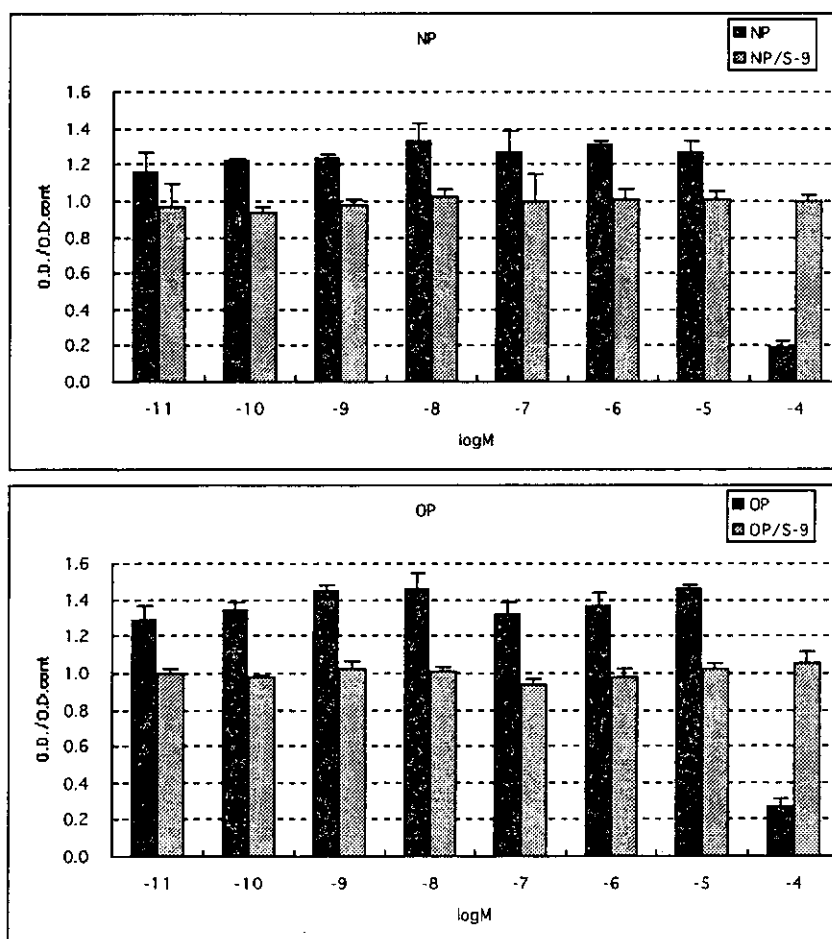


図2 NP、OP の S-9mix 処理前後のエストロゲン様作用

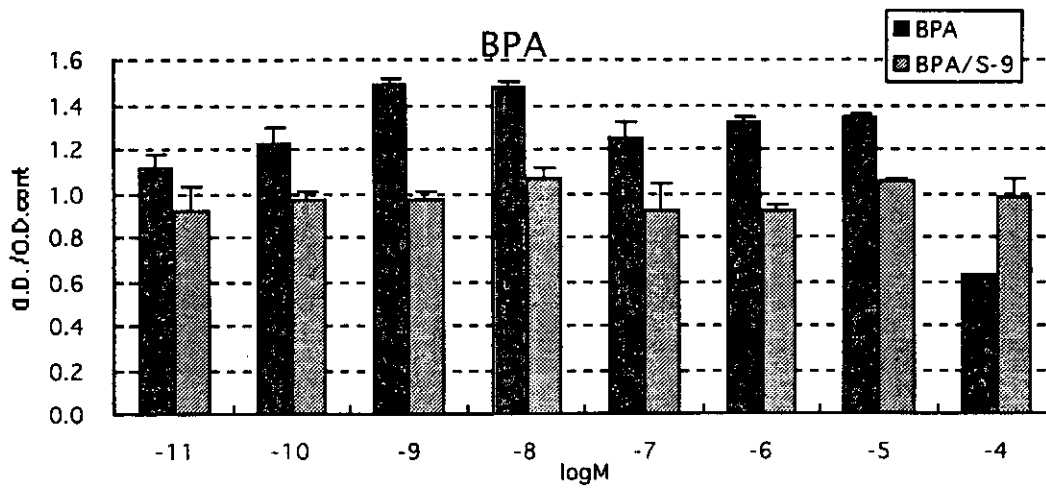


図3 BPA の S-9mix 処理前後のエストロゲン様作用

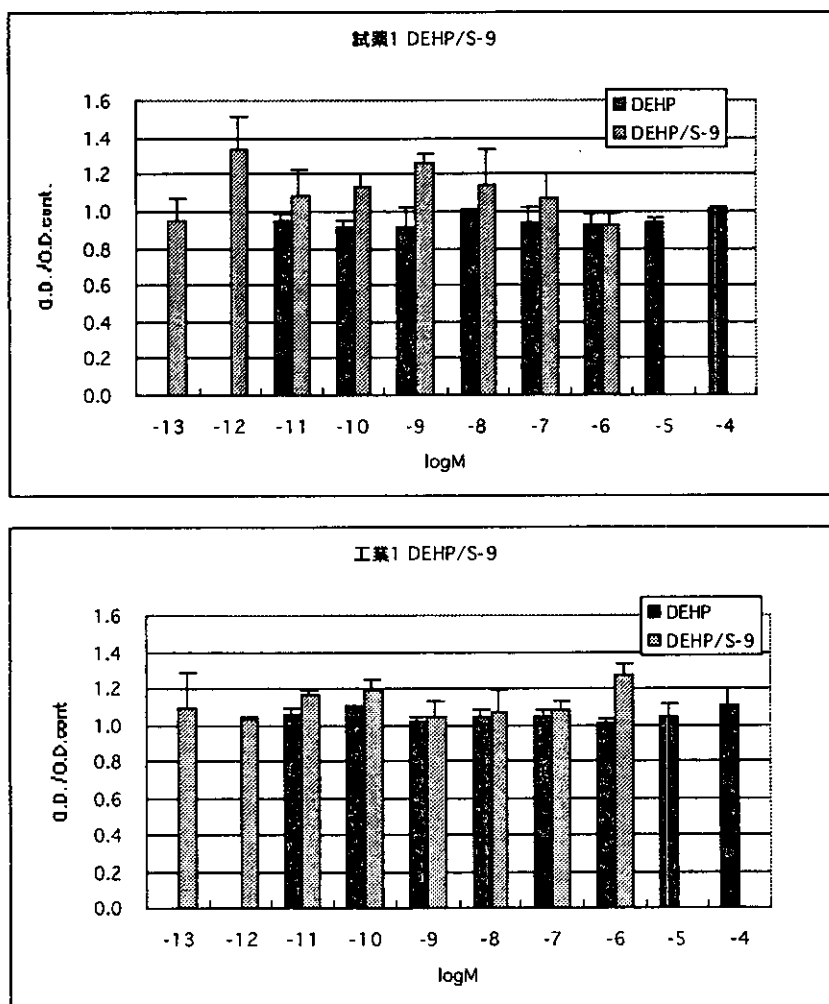


図4 DEHP の S-9mix 処理前後のエストロゲン様作用

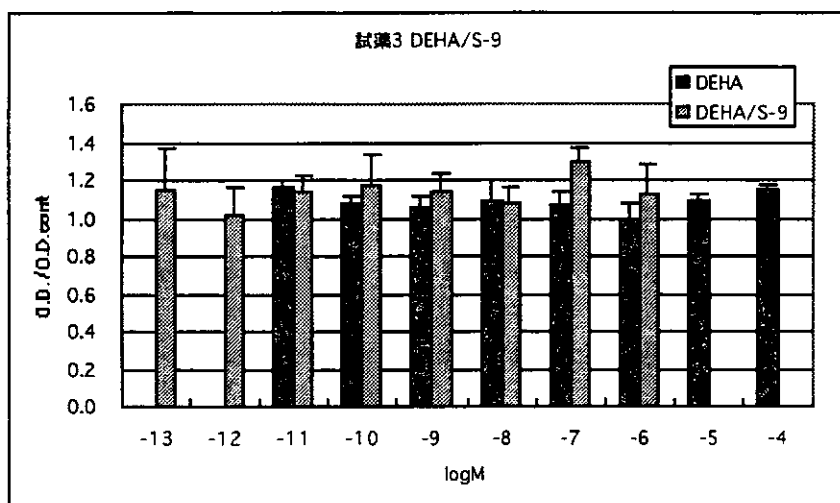


図5 DEHA の S-9mix 処理前後のエストロゲン様作用

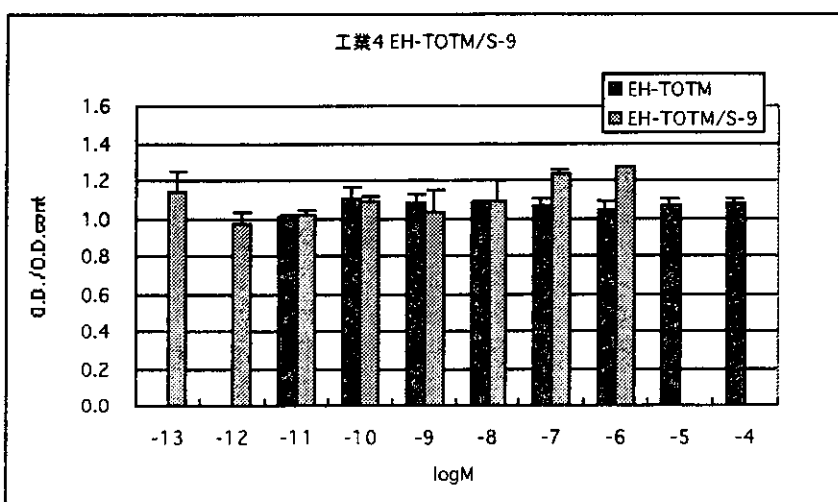
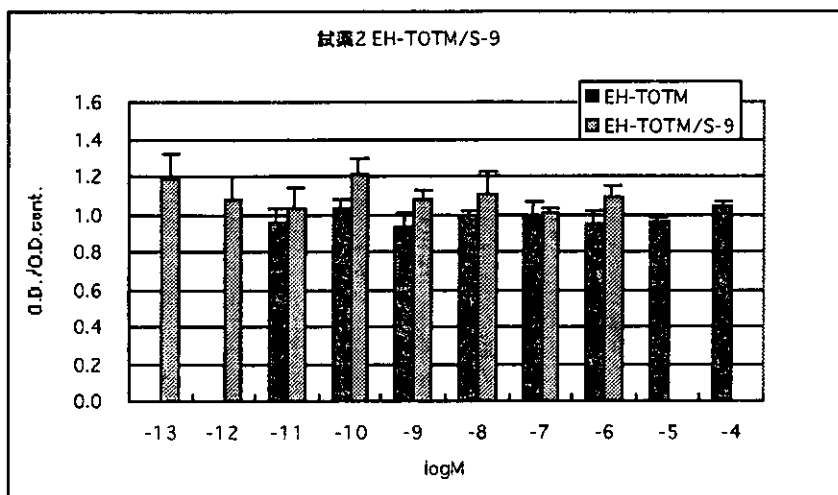


図6 EH-TOTM の S-9mix 処理前後のエストロゲン様作用

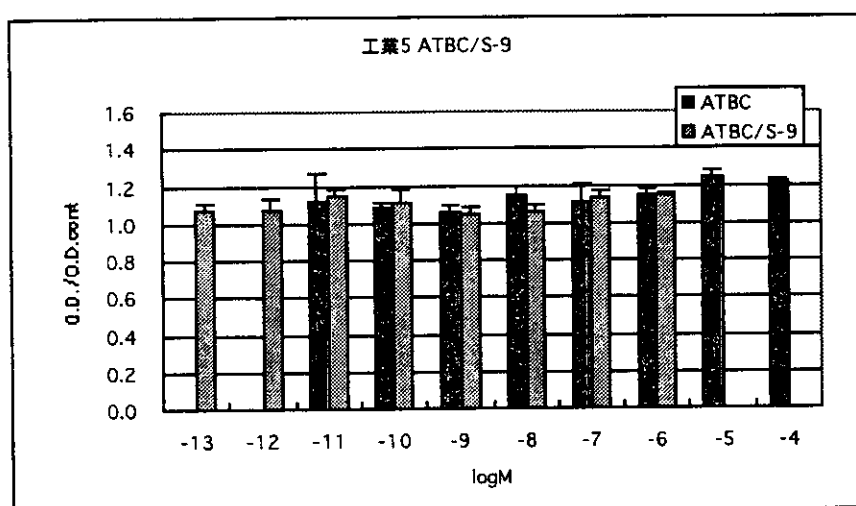
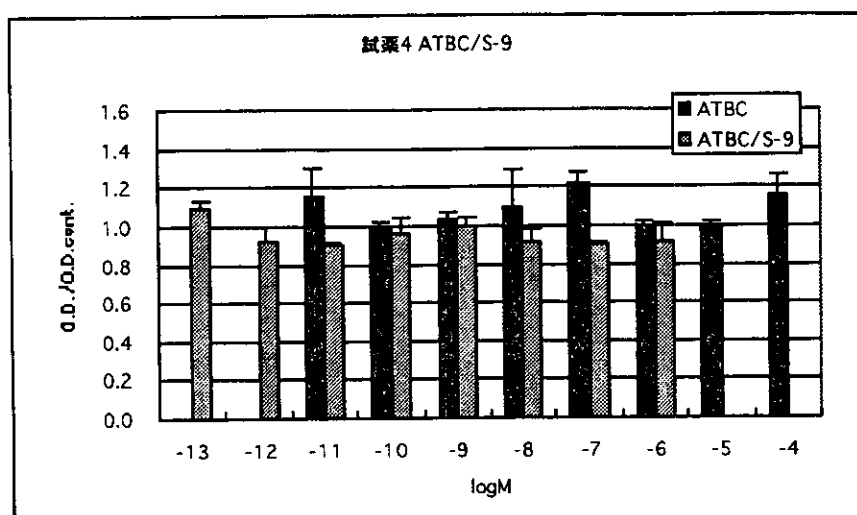


図7 ATBC の S-9mix 処理前後のエストロゲン様作用

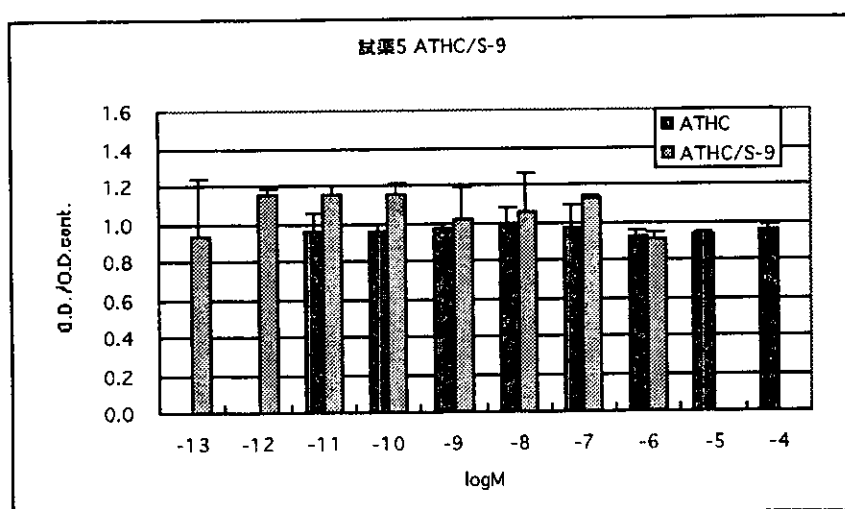


図8 ATHC の S-9mix 処理前後のエストロゲン様作用

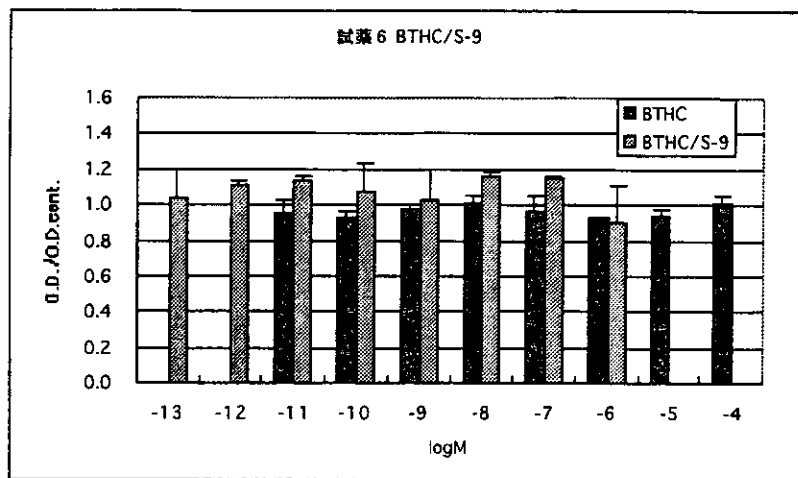


図 9 ATHC の S-9mix 処理前後のエストロジェン様作用

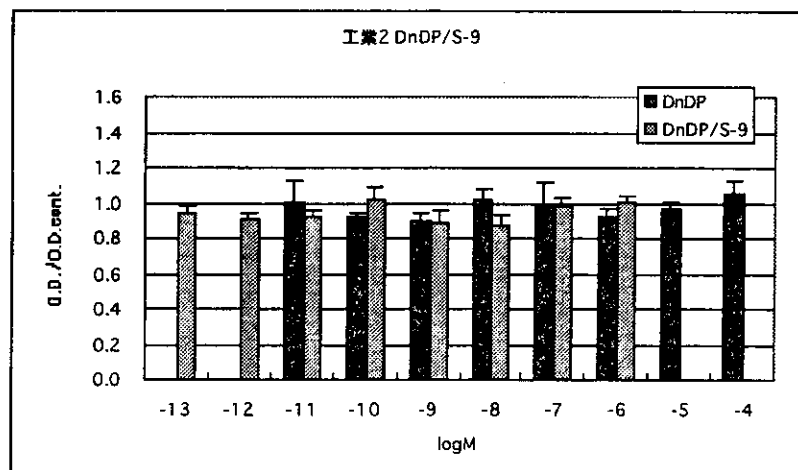


図 1 0 BTHC の S-9mix 処理前後のエストロジェン様作用

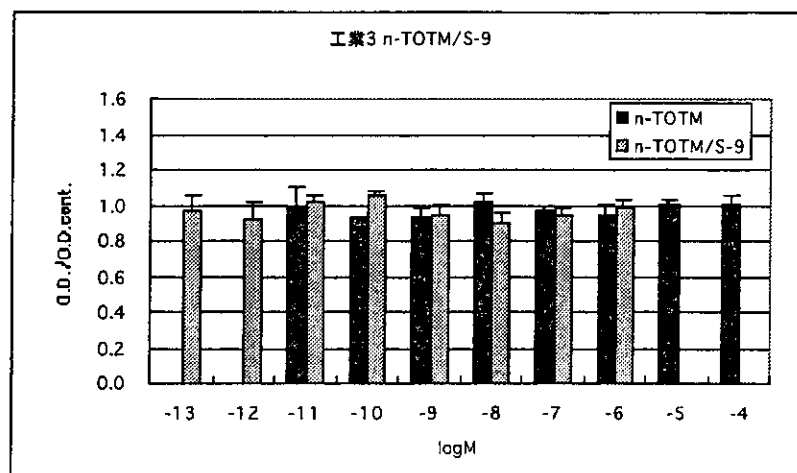


図 1 1 BTHC の S-9mix 処理前後のエストロジェン様作用

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

E-Screen Assay 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 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、血液バッグ中の保存血への DEHP の溶出が報告されている。そこで、生体への影響を考慮して DEHP の代替品の候補が挙げられており、そのエストロゲン様作用について検討した。

A. 研究目的

医療用血液バッグにはポリ塩化ビニル (PVC) 製のものが汎用されている。PVC 製品には内分泌攪乱作用の疑いのある Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) が可塑剤として多用されており、保存血液への移行も報告されている。DEHP の内分泌攪乱作用への懸念を考慮して、医療用血液バッグの可塑剤を内分泌攪乱作用の疑いのないものに差し替えようという動きがある。そこで、今回 DEHP 代替品の候補として挙げられている物質のエストロゲン様作用について MCF-7 ヒト乳癌細胞を用いて E-Screen Assay 法により検討した。

B. 研究方法

B・1 試薬

- 実験用試薬 1.
Di(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP)
SIGMA-ALDRICH 社製
- 実験用試薬 2.
Triethylhexyl trimellitate (EH-TOTM)
東京化成工業社製
- 実験用試薬 3.
Di(2-ethylhexyl)adipate(DEHA)
SIGMA-ALDRICH 社製
- 実験用試薬 4
Acethyl tributyl citrate(ATBC)
東京化成工業社製
- 実験用試薬 5.
Acethyl trihexyl citrate (ATHC)
SIGMA-ALDRICH 社製
- 実験用試薬 6.
Butyryl trihexyl citrate(BTHC)

SIGMA-ALDRICH 社製

- ・ 工業用試薬 1.
Di (2-ethylhexyl) phthalate(DEHP)
ジェイプラス社製
- ・ 工業用試薬 2.
Di-n-decyl phthalate(DnDP)
花王社製
- ・ 工業用試薬 3.
Tri-n-octyl trimellitate(n-TOTM)
花王社製
- ・ 工業用試薬 4.
Triethylhexyltrimellitate(EH-TOTM)
ジェイプラス社製
- ・ 工業用試薬 5.
Acethyl tributyl citrate (ATBC)
ジェイプラス社製
- ・ 17 β -Estradiol(生 化 学 用)
和光純薬工業株式会社製
- ・ ICI182,780
TOCRIS 社製

上記の試薬の調整に用いた溶媒は、特級試薬の Ethanol で和光純薬工業株式会社製を用いた。

B・2 試料調整

実験用試薬 1~6、工業用試薬 1~5、17 β -Estradiol、ICI182,780 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・2 E-Screen/WST-1 assay

96 穴平底プレート (FALCON 社製) に Dulbecco's Modified Eagle

Medium(DMEM) で希釈した細胞 (MCF-7) 懸濁液を 5000cells/50 μ l/well ずつ播種し、37℃、5%CO₂ で、24 時間培養する。前培養後、フェノールレッド不含、10% Charcoal-dextran 処理 FCS 含有 DMEM に交換し、濃度調整した被検物質を加えさらに 5 日間同条件で、培養する。培養後 WST-1 assay(Cell Counting Kit : 和光純薬工業株式会社製)にて細胞増殖を評価 (生細胞中で活性をもつミトコンドリア脱水素酵素の基質である WST-1 を各 Well に 10 μ l ずつ加え、3 時間 37℃にて incubation 後 OD_{450nm} を測定) する。

A. 研究結果

MCF-7 は、実験用試薬 1.DEHP の添加により 10^{-4} mol/l で、実験用試薬 2.EH-TOTM の添加により 10^{-4} mol/l で、実験用試薬 3.DEHA の添加により 10^{-7} mol/l で、実験用試薬 4.ATBC の添加により 10^{-4} mol/l で濃度依存性の MCF-7 ヒト乳癌細胞の細胞増殖を亢進する作用が認められた。実験用試薬 5.ATHC、実験用試薬 6.BTHC、工業用試薬 1.DEHP、工業用試薬 2.DnDP、工業用試薬 3.n-TOTM、工業用試薬 4.EH-TOTM、工業用試薬 5.ATBC においては MCF-7 ヒト乳癌細胞の増殖を亢進する作用は見られなかった。(Fig.1-11) また、MCF-7 ヒト乳癌細胞は E2 の添加により、 10^{-8} mol/l で濃度依存性の細胞増殖能の亢進が認められた。(Fig.12) (10^{-9} mol/l E2 により 1.04 ± 0.005 、+FCS により

0.99±0.008。)

D.考察

E2は単独で、MCF-7ヒト乳癌細胞の増殖を亢進した。この細胞増殖の亢進はエストロゲンレセプターアンタゴニストであるICI182,780により阻害され、E2が主にエストロゲンレセプターを介した作用をしていることが示唆された。DEHPの代替品候補物質の結果を表1に示したが、実験用試薬1～実験用試薬4ではMCF-7ヒト乳癌細胞の増殖を亢進する作用が見られたが、実験用試薬5,6と工業用試薬1～5ではMCF-7ヒト乳癌細胞の増殖を亢進する作用は見られなかった。このため、実験用試薬1～4ではエストロゲン様作用を示すことが、また、実験用試薬5,6、工業用試薬1～5ではエストロゲン様作用を持たないことが示唆された。

E.結論

MCF-7ヒト乳癌細胞を用いた細胞増殖試験により、DEHP代替可塑剤の候補物質のエストロゲン様作用について検討したところ、候補物質のうち、実験用試薬1～4はMCF-7細胞の増殖を亢進し、エストロゲン様作用があることが示唆されたが、その他の実験用試薬5,6、工業用試薬1～5はいずれも、MCF-7細胞の増殖を亢進する作用は見られず、エストロゲン様作用がないことが示唆された。今回の検討から、MCF-7ヒト乳癌細胞における代替候補物質のエストロゲン様作用の

有無に焦点を当てた内分泌攪乱作用の検討はできたと考えるが、今後将来的に内分泌攪乱作用について考えていく時には、エストロゲンがいくつかの機序を介して作用することを考慮して、エストロゲン様作用を持つ物質についてはその作用機序についても検討を行っていくことが必要であると考え。

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

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 モノ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. 健康危険情報

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