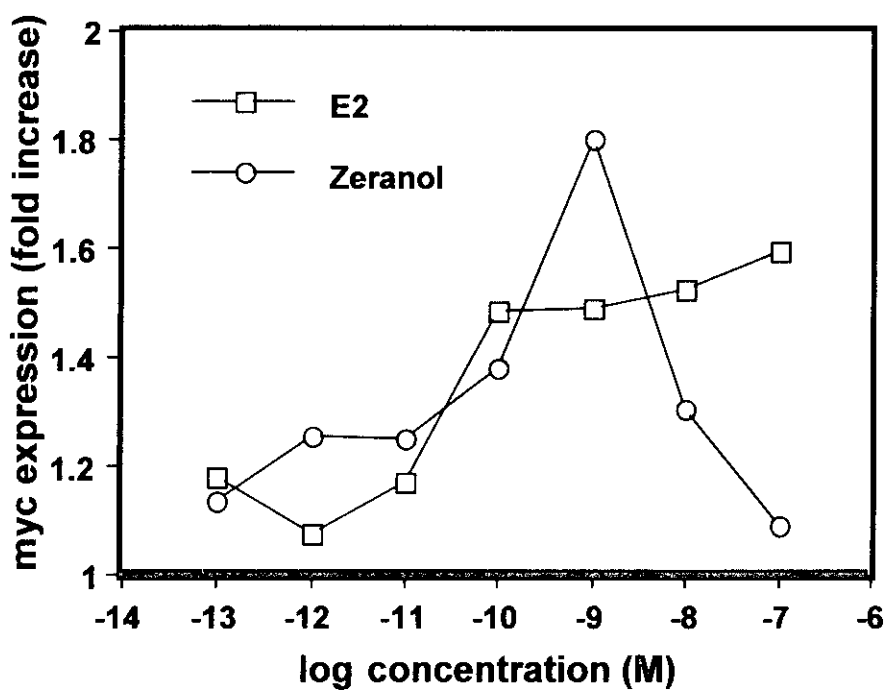
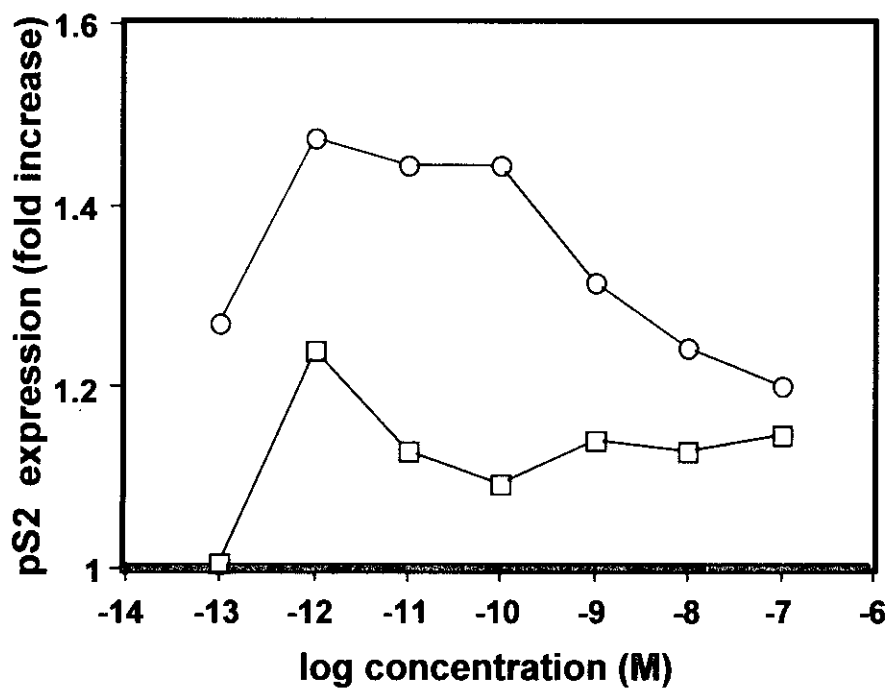


Figure 2



平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書  
内分泌かく乱物質と大豆等既存食品の発育・癌化及び内分泌かく乱作用の比較

農薬のエストロゲン活性評価

分担研究者 西山利正 関西医科大学公衆衛生学講座 教授  
研究協力者 小嶋美穂子 滋賀県立衛生環境センター 主任主査  
辻 元宏 同上 所長  
藪下尚智 株式会社日吉技術部分析研究課 研究員  
佐々木真理 関西医科大学公衆衛生学講座 院生  
福永健治 関西大学工学部生物工学科 助教授

研究要旨

本研究では、検出頻度の高い農薬のエストロゲン活性および抗エストロゲン活性を評価した。さらに農薬のラット肝 S9 代謝物についてエストロゲン活性を評価するため、ビスフェノール A (BPA) を用いて代謝実験系を検討し、確立した方法で農薬を代謝させ活性を評価した。エストロゲン活性のみられた農薬は、有機リン系のトルクロホスメチル、プロチオホス、ダイアジノン、ベンゾイミダゾール系のチアベンダゾール (TBZ)、昆虫成長抑制剤のピリプロキシフェンであった。また、1 農産物から 2~5 種の農薬が検出されることが多いことから、活性のみられた農薬で、今まで複数検出されたものを組み合わせてエストロゲン活性を測定したところ単独の場合より活性が高くなった。また、オルトフェニルフェノール (OPP) には活性がみられなかったが、TBZ との共存によって TBZ のみの活性より高くなった。抗エストロゲン活性がみられたのは、ベンゾイルウレア系のクロルフルアズロンで、イマザリルとクロルフェナピルにもわずかに抗エストロゲン活性がみられた。BPA はラット肝 S9 代謝後も差がみられなかった。ペルメリンおよび OPP は活性がなかったが、ラット肝 S9 代謝後わずかではあるが活性がみられた。TBZ は代謝後に低くなった。

A. 研究目的

現在、わが国では食品衛生法によって農薬 229 種類に残留基準が設定されている。また、環境省がリストアップしている 65 種類の内分泌攪乱作用が疑われる化学物質のうち 6 割以上が農薬である。以上から、本研究では検出頻度の高い農薬について、エストロゲン活性および抗エストロゲン活性を評価した。また、1 農産物から 2~5 種の農薬が検出されることが多いことから、エストロゲン活性および抗エストロゲン活性のみられた農薬を 2 種類組み合わせてエストロゲン活性を測定した。さらに農薬のラット肝 S9 代謝物についてエストロゲン活性を評価するため、ビスフェノール A (BPA) を用いて検討した。

B. 研究方法

1. E-CALUX Assay 法

米国 XDS 社が開発し、(株)日吉とライセンス契約を締結している E-CALUX Assay 法によってエストロゲン活性および抗エストロゲン活性を測定した。本法はヒト卵胞がん細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、エストロゲンとエストロゲンレセプター (ER) との結合をルシフェラーゼ活性により検出するものであり、2003 年のボストンで開催されたダイオキシンの国際シンポジウムにおいてバリデーションの報告がされている<sup>1)</sup>。レポーター遺伝子を組み込んだプラスミドの構造を図 1 に、E-CALUX Assay 法の原理を図 2 に示した。細胞質中で ER は熱ショックタンパク 90 (hsp90) と結合して存在するが、リガンドが細胞壁を通して入ってくると、ER はリガンドと結合し hsp90 から解離して、

**Estrogen Responsive Elements (EREs)** に結合する。結合情報がレポーター遺伝子に伝わり、ルシフェラーゼ遺伝子は活性化され、情報が mRNA に転写される。さらに mRNA が翻訳され、ルシフェラーゼが合成される。そこへ、ルシフェリンを加えて発光させ、ルミノメーターで発光量を測定することによりエストロゲン活性を検出、定量する。

方法のフローを図 3 に示した。10<sup>-2</sup>M 農薬標準液 (DMSO) 4 μl を用い、DMSO 4 μl で希釈した。2 種混合は、標準液 2 μl ずつを用い、同様に希釈した。培地を 400 μl 加えるので、最終最大濃度は 10<sup>-4</sup>M となる。

## 2. ラット肝 S9 による代謝方法

ビスフェノール A (BPA) を用いて S9 代謝実験の検討を行った。オリエンタル酵母社製エームステスト用 S9/コファクター A セット (フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボン誘導) を用い、BPA の代謝確認には HPLC<sup>2)</sup> を用いた。HPLC のカラムは Wakosil 5C18 4.6mm × 150mm を用い、移動相はメタノール/水 = 3 : 2 (v/v)、流速 0.8ml/min、検出は UV230nm である。確立した方法を図 4 に示した。

## 3. 測定農薬

滋賀県内で過去に、検出された農薬について測定した。測定農薬は、ピレスロイド農薬 8 種 (エトフェンプロックス、シフルトリン、シシペルメトリン、フェンバレレート、フェンプロパトリン、フルシトリネート、フルバリネート、ペルメトリン)、有機塩素系農薬 3 種 (キャプタン、ジクロフルアニド、ジコホール)、有機リン系農薬 7 種 (アセフェート、クロルピリホス、ダイアジノン、トルクロホスメチル、プロチオホス、マラチオン、メタミドホス)、その他 14 種 (OPP、TBZ、イマザリル、クロルフェナピル、クロルフルアズロン、ジフェニール、テブフェンピラド、トリフルミゾール、ハルフェンプロックス、ビテルタノール、ピリプロキシフェン、フルフェノクスロン、プロシミドン、ル

フェヌロン) の計 32 種類である。測定農薬の分類と分子量を表 1 に示した。

## C. 研究結果

### 1. エストロゲン活性

E2 の最大活性値を 100% とした時、10% の作用を示す濃度 (EC<sub>10</sub>) は、3.2 × 10<sup>-12</sup>M であった。エストロゲン活性がみられた農薬は、5 種で、有機リン系のトルクロホスメチル、プロチオホス、ダイアジノン、ベンゾイミダゾール系のチアベンダゾール、昆虫成長抑制剤のピリプロキシフェンである。EC<sub>10</sub> は、それぞれ、7.7 × 10<sup>-6</sup>M、3.3 × 10<sup>-6</sup>M、4.6 × 10<sup>-5</sup>M、2.2 × 10<sup>-6</sup>M、2.9 × 10<sup>-6</sup>M であった。さらに、活性のみられた農薬について、今まで複数検出されたものを 2 種類組み合わせでエストロゲン活性を測定したところ単独の場合より活性が高くなった。また、OPP には活性がみられなかったが、TBZ と組み合わせることにより TBZ のみの活性より高くなった。図 5 に、その反応曲線を示した。

### 2. 抗エストロゲン活性

抗エストロゲン活性がみられたのは、ベンゾイルウレア系のクロルフルアズロンで、イマザリルとクロルフェナピルにもわずかに抗エストロゲン活性がみられた。図 6 に抗エストロゲン活性の反応曲線を示した。

### 3. S9 代謝

ビスフェノール A (BPA) を用いて S9 代謝実験の検討を行った。直接セルに S9 を加えて代謝させることを試みたが、セルの分解が考えられたので、あらかじめ代謝させ、S9 を不活性とした後、セルに暴露することにした。S9 代謝の反応温度は 37℃ とし、反応時間は 0.5、1、2、4、8、24、48 時間で検討したが、1 時間以降には変化がなかった。余裕をみて反応時間は 2 時間とした。S9 とコファクターの添加量の検討を行った。S9 量とコファクター量の比を 1:0、1:1、1:2、1:4、1:9 (通常使用比) とした。

BPA の代謝量は順に 75%、90%、76%、64%、47%であった。代謝量のもっとも多かった 1:1 の混合比で S9 代謝を行うことにした。不活性化は、98℃、10 分の加熱処理を行った。不活性化後、0.45 μm でろ過した検液を通常と同様にセルに暴露し、活性を測定した。BPA および活性のみられた農薬の反応曲線を図7に示した。BPA は代謝後もエストロゲン活性に変化はなかった。ペルメトリンおよび OPP はエストロゲン活性がなかったが、代謝後わずかではあるが活性がみられた。TBZ は代謝後、低くなった。EC<sub>10</sub> は、それぞれ、 $2.8 \times 10^{-5}M$ 、 $4.9 \times 10^{-5}M$ 、 $1.4 \times 10^{-5}M$  であった。

抗エストロゲン活性のみられた S9 代謝物はなかった。

#### D. 考察

化学物質の内分泌攪乱性は、最終的には動物実験による慢性毒性試験や次世代への影響を検討し、疫学調査や環境評価によって判断されると考えられるが、事前に *in vitro* 試験を実施し、スクリーニングすることは重要である。この *in vitro* 試験については、E-スクリーン試験、酵母 Two-Hybrid 試験、レポーター遺伝子転写活性試験等多くの方法がある。今回は、ER $\alpha$  および  $\beta$  両方を発現し、E2 の検出感度が 0.33pg/g と高感度であるレポーター遺伝子転写活性の ER-CALUX Assay を用いて、残留農薬調査で検出頻度の高い農薬についてエストロゲン活性を測定した。ピレスロイド系農薬でペルメトリン、シペルメトリン、フェンバレートは環境省の 65 種類の内分泌攪乱作用が疑われる物質にリストアップされており、また E-スクリーン試験でエストロゲン活性があったという報告<sup>3)</sup>があるが、今回の ER-CALUX Assay ではエストロゲン活性および抗エストロゲン活性はみられなかった。この 3 種については酵母 Two-Hybrid 試験<sup>4)</sup>でもエストロゲン活性はみられていない。今回エストロゲン活性のみられた 5 農薬のうち報告

があるのは、トルクロホスメチルのみで、E-スクリーン試験で弱いエストロゲン活性があった<sup>5)</sup>ということである。

活性のみられた農薬および活性があるとされている一部の農薬について、残留農薬基準値と残留農薬分析により検出された値を表2に示した。農薬検出値をモル濃度に換算すると約  $0.003 \sim 1.74 \times 10^{-4}M$  であった。過去 5 年間における最大検出値を示したので TBZ は  $1.74 \times 10^{-4}M$  と高いが、最近では 1/100~1/50 の値となっている。エストロゲン活性のみられた農薬の検出値は、約  $10^{-6}M$  以下で、エストロゲン活性のみられない濃度であった。

農薬を 2 種類あわせて測定し、その影響をみた報告はない。今回、エストロゲン活性のみられた農薬 5 種および活性はみられなかったが TBZ と同時に使われている OPP について、検出事例にしたがって 2 種類組み合わせで活性を測定した。ダイアジノンとトルクロホスメチルの混合はあまり変わらなかったが、ピリプロキシフェンとプロチオホス、TBZ と OPP の混合は活性の増加がみられ、相加効果があることがわかった。とくに、OPP はエストロゲン活性がみられなかったが、TBZ との共存によって、TBZ 単独よりエストロゲン活性が高くなった。しかし、活性のみられた濃度は実際の検出値より高いものであった。

化学物質は生体内に取り込まれると主に肝臓の異物代謝酵素によって代謝される。代謝生成物のエストロゲン活性を評価することは生体への影響を考える上で重要である。今回は、農薬をラット肝 S9 により代謝させ、エストロゲン活性について測定した。まず、BPA を用いて代謝方法を検討し、その条件で 32 農薬を代謝させた。BPA 代謝物のエストロゲン活性は数倍に増大するという報告<sup>6)</sup>、低下するという報告<sup>4),7)</sup>があるが、今回は代謝後の活性はわずかに低くなるがほとんど変化しなかった。使用した S9 はエームステスト用のオリエンタル酵母社製「S9/コファクターA セット」である。ラット肝誘導法や S9 フラクション組成、また、代謝

方法が異なり、さらに測定法が異なるので、どれがどうとはいえないが、BPA は代謝後も、エストロゲン活性がみられることが言える。代謝後、エストロゲン活性のみられた農薬は3種で、ペルメリンおよびOPPは親化合物にはエストロゲン活性はみられなかったが代謝物には活性がみられ、TBZは親化合物より低い活性となった。活性がみられたとはいえ、低い活性でありまた農薬のエストロゲン活性のみられた濃度も農薬残留基準や検出濃度から考えて実際には摂取しない値であった。また、BPA代謝物に抗エストロゲン活性があるという報告<sup>4)</sup>、<sup>6)</sup>があるが、E-CALUX Assay法では、BPA、BPA代謝物両方ともに抗エストロゲン活性はみられなかった。農薬の代謝物で、今回、抗エストロゲン活性はみられなかったが、シペルメリン、ペルメリン、エトフェンプロックス、OPPの代謝物で抗エストロゲン活性がみられたという報告がある<sup>4)</sup>。

環境省がリストアップしている65種類の内分泌攪乱作用が疑われる化学物質のうち6割以上が農薬であり、残留農薬の試験を行って1つの農産物から多種類の農薬が検出されることが多いことから、この研究を行った。エストロゲン活性、抗エストロゲン活性を有する農薬はあったが、高頻度で検出される濃度では活性はなかった。また、2種類混合した場合、エストロゲン活性は高くなったが、この場合もかなり高濃度における活性で、通常の農薬使用では心配のないものであった。しかし、組み合わせさせて活性を測定したのはごく一部の農薬であり、もっと低濃度で活性がみられる可能性もある。さらに、今回は2種類の混合であったが3種類、4種類の混合でどうなるかは未知である。また、生体内での代謝変換による活性が心配されることから、S9による代謝生成物の活性をみたが、エストロゲン活性がみられるようになった農薬もあったが、これも通常の農薬使用から考えると、問題のないものであった。農薬が残留基準内で使用されている限り、今回調査した農薬については、内分泌攪乱作用に関

して悪影響はないと考える。

## E. 結論

1. トルクロホスメチル、プロチオホス、ダイアジノン、チアベンダゾール、ピリプロキシフェンにエストロゲン活性がみられた。
2. ダイアジノンとトルクロホスメチル、ピリプロキシフェンとプロチオホス、OPPとTBZを組み合わせることにより、単独の場合よりエストロゲン活性が高くなった。
3. 抗エストロゲン活性がみられたのは、クロルフルアズロン、イマザリル、クロルフェナピルである。
4. ビスフェノール A(BPA)を用いてS9代謝実験系を検討した。
5. BPA代謝物のエストロゲン活性は、BPAよりわずかに低いけどほとんど変わらなかった。TBZ代謝物と親化合物にはエストロゲン活性のなかったペルメリン代謝物およびOPP代謝物にエストロゲン活性がみられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

E-CALUX Assayによる農薬のエストロゲン活性評価:小嶋美穂子、藪下尚智、西山利正、佐々木真理、福永健治、辻元宏、第6回日本内分泌攪乱化学物質学会、2003年12月、仙台

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## I. 参考文献

- 1) John D. Gorden, Andrew C. Chu, Michael D. Chu, Charlotte L. Taylor, Michael S. Denision, George C. Clark, Validation of the LUMI-CELL ER reconminant bioassay for rapid evaluation of chemicals for potential

estrogenic activity. *Organohalogen Compounds, Volumes 60-65, Dioxin 2003 Boston, MA*

- 2) 瀧野昭彦,津田泰三,小嶋美穂子,原田浩之,村木一枝,和田稔,魚肉・缶詰中のビスフェノール A の HPLC による分析法の検討,食衛誌,Vol.40,No.4,325-333(1999)
- 3) Haiyan Chen, Jigao Xiao, Gang Hu, Jianwei Zhou, Hang Xiao, Xinru Wang, Estrogenicity of Organophosphorus and pyrethroid pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 65: 1419-1435, 2002
- 4) 白石不二雄, 国立環境研究所:化学物質のエストロゲン活性データ, HYPERLINK "http://www.nies.go.jp/edc/estrogen/"
- 5) 小島弘幸、桂英二、兼俊明夫、堀義宏、末吉達也、根岸正彦、殺

菌剤トルクロホスメチルのエストロゲン様作用について, 第 9 回環境科学討論会, 2000 札幌

- 6) Yoshihara S, Makishima M, Suzuki N, Ohta S. Metabolic activation of bisphenol A by rat liver S9 fraction. *Toxicol. Sci.*, 62, 221- 227(2001)
- 7) Legler J, Dennekamp M, Vethaak AD, Brouwer A, Koeman JH, van der Burg B, Murk AJ. Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using in vitro reporter gene assays. *Sci Total Environ.* 2002 Jul 3;293(1-3):69-83.

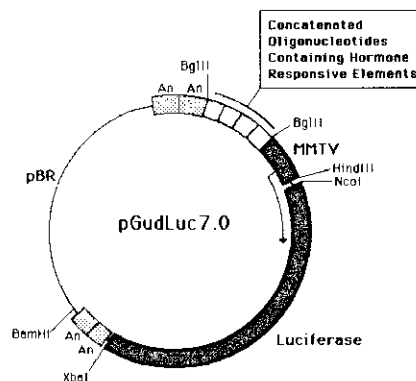


図1 レポーター遺伝子を組み込んだプラスミドの構造

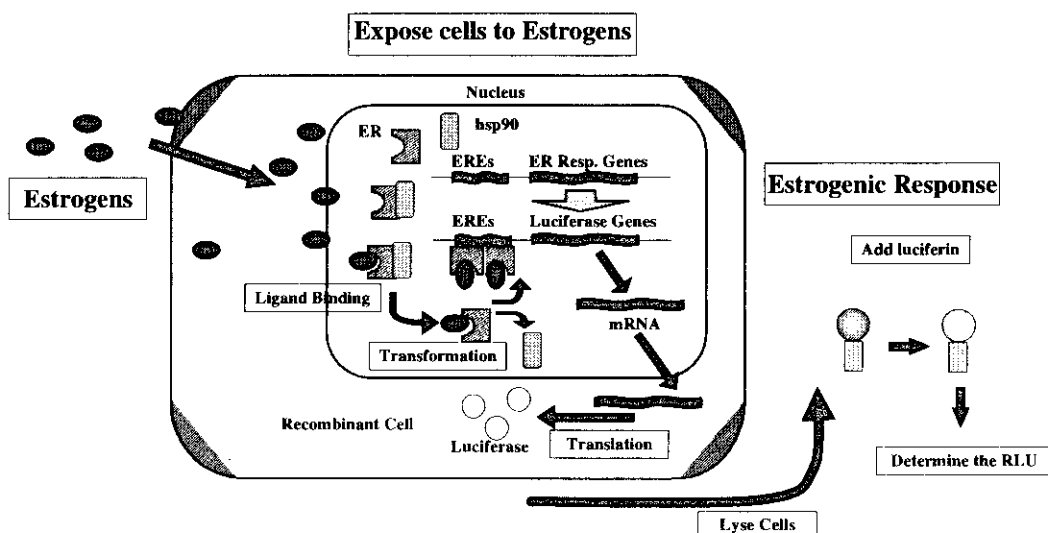


図2 E-CALUX Assay の原理

○ プレート作成

- 1 フェノールレッド含まないトリプシンで75cm<sup>2</sup>フラスコ×2からハーベストする。  
DMEM Media (5%Carbon Stripped fetal calf serum+1%penicillin/streptomycin+2%L-glutamine)でサスペンドする。  
半分は、RPMI1640 Media(8% fetal calf serum+1%penicillin/streptomycin)の75cm<sup>2</sup>フラスコ×2に撒く。  
半分は、DMEM Mediaの75cm<sup>2</sup>フラスコ×2に撒く。  
RPMI1640 Mediaは、DMEM Mediaのフラスコを準備している間に培養する。
- 2 24時間後、DMEM Media の培地の交換をする。
- 3 2を3回繰り返す。(計4回繰り返す。)
- 4 24時間後、トリプシンを使用して、ハーベストする。DMEM10mlでサスペンドする。
- 5 セルカウント( $2.0 \times 10^5$  cell/ml)
- 6 200ul/wellで撒く。
- 7 36-38°C、5%CO<sub>2</sub>のインキュベーターで24hr培養する。

○ 曝露操作

検量線作成

- 1 ① 10ng/mlのE2 4ul  
② 10ng/mlのE2 4ul + DMSO 4ul  
③ ② 4ul + DMSO 4ul  
これを繰り返し、10段階の標準液を作成する。
- 2 DMEM Media を400ul加え、15秒ボルテックスかける

サンプルの作成

- 1 ① 農薬標準液 4ul  
② 農薬標準液 4ul + DMSO 4ul  
③ ② 4ul + DMSO 4ul  
これを繰り返し、10段階の農薬系
  - 2 DMEM Media を400ul(200ul)加え、15秒ボルテックスかける
- 曝露
- 1 36-38°C、CO<sub>2</sub>5%環境下で15hr.培養する。
  - 2 190ulずついれて、24hr.インキュベートする。
- 評価
- 1 ルミノメーターでルシフェラーゼ活性を測定する。
  - 2 検量線より農薬のpME2当量を計算する。

図3 E-CALUX Assay 分析フロー

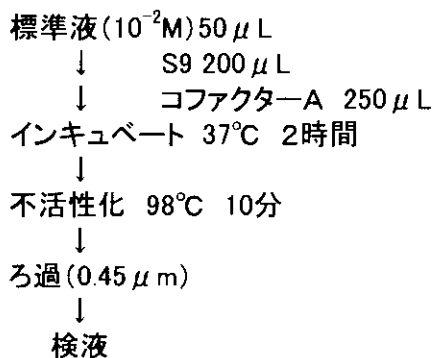


図4 S9代謝 分析フロー

表1 測定農薬の分類と分子量

No	農薬名		分類	分子量
1	OPP	o-phenylphenol	殺菌剤	170.2
2	TBZ	thiabendazole	ベンゾイミダゾール系殺菌剤	201.3
3	アセフェート	acephate	有機リン系殺虫剤	183.2
4	イマザリル	imazalil	イミダゾール系殺菌剤	297.2
5	エトフェンプロックス	ethofenprox	ピレスロイド系殺虫剤	376.5
6	キャプタン	captan	有機塩素系殺菌剤	300.6
7	クロルピリホス	chlorpyrifos	有機リン系殺虫剤	350.6
8	クロルフェナピル	chlorfenapyr	殺虫剤	407.6
9	クロルフルアズロン	chlorfluazuron	ベンゾイルウレア系殺虫剤	540.7
10	ジクロフルアニド	dichlofluanid	有機塩素系殺菌剤	333.2
11	ジコホール	dicofol	有機塩素系殺虫剤	370.5
12	ジフェニール	diphenyl	ビフェニル系殺菌剤	154.2
13	シフルトリン	cyfluthrin	ピレスロイド系殺虫剤	434.3
14	シペルメトリン	cypermethrin	ピレスロイド系殺虫剤	416.3
15	ダイアジノン	diazinon	有機リン系殺虫剤	304.4
16	テブフェンピラド	tebufenpyrad	ピラゾール系殺虫剤	333.9
17	トリフルミゾール	triflumizole	イミダゾール系殺菌剤	345.8
18	トルクロホスメチル	tolclofos-methyl	有機リン系殺菌剤	301.1
19	ハルフェンプロックス	halfenprox	ベンジルエーテル系殺虫剤	477.4
20	ピテルタノール	bitertanol	トリアゾール系殺菌剤	337.4
21	ピリプロキシフェン	pyriproxyfen	昆虫成長抑制剤	321.4
22	フェンバレレート	fenvalerate	ピレスロイド系殺虫剤	419.9
23	フェンプロパトリン	fenpropathrin	ピレスロイド系殺虫剤	349.4
24	フルシトリネート	flucythrinate	ピレスロイド系殺虫剤	451.5
25	フルバリネート	flualinate	ピレスロイド系殺虫剤	502.9
26	フルフェノクスロン	flufenoxuron	ベンゾイルウレア系殺虫剤	488.8
27	プロシミドン	procymidone	ジカルボキシイミド系殺菌剤	284.2
28	プロチオホス	prothiofos	有機リン系殺虫剤	345.2
29	ペルメトリン	permethrin	ピレスロイド系殺虫剤	391.3
30	マラチオン	malathion	有機リン系殺虫剤	330.4
31	メタミドホス	methamidophos	有機リン系殺虫剤	141.1
32	ルフェヌロン	lufenuron	殺虫剤	511.2

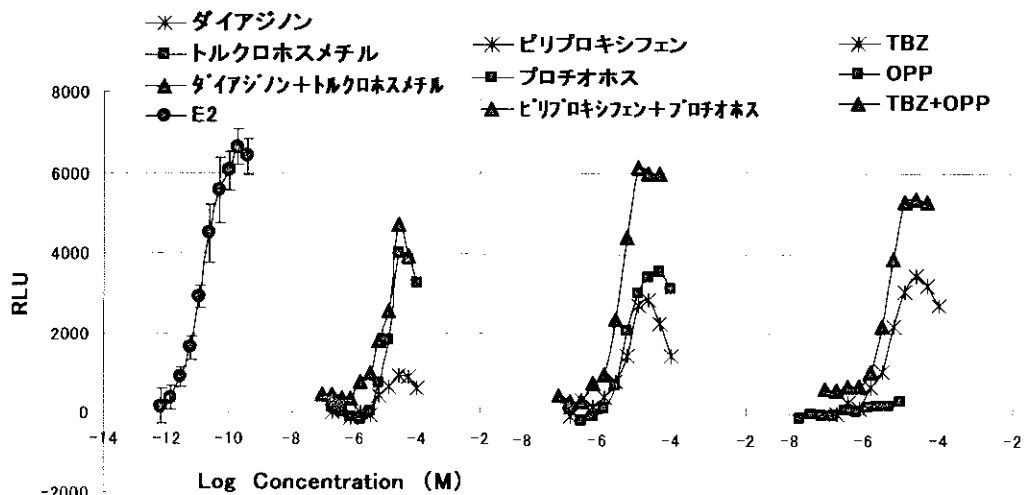


図5 エストロゲン活性の用量反応曲線



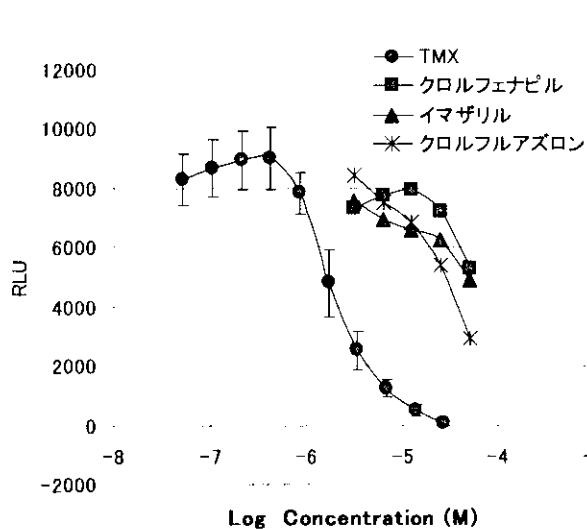


図6 抗エストロゲン活性の用量反応曲線

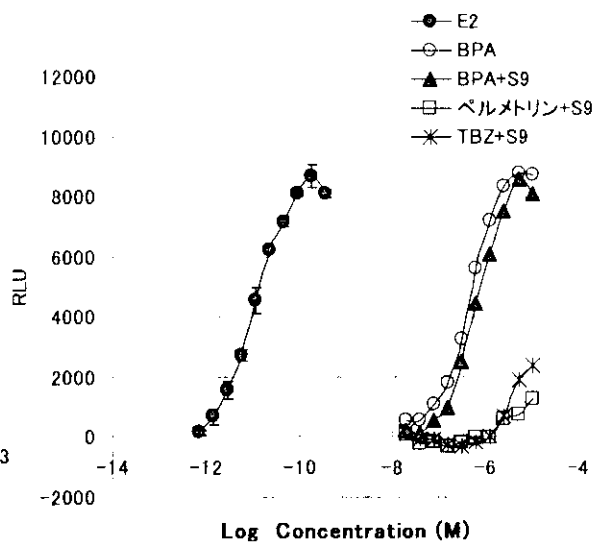


図7 S9代謝後のエストロゲン活性反応曲線

表2 残留農薬基準値と検出濃度

	分子量	残留基準 ( $\mu\text{g/g}$ )		検出値	
		最大	最小	$\mu\text{g/g}$	$\times 10^{-4}\text{M}$
シベルメトリン	416.3	20	0.05	1	0.24
ベルメトリン	391.3	50	0.05	0.5	0.13
ダイアジノン	304.4	0.1	0.1	0.05	0.02
トルクロホスメチル	301.1	3	0.1	0.1	0.03
ピリプロキシフェン	321.4	1	0.5	0.01	0.003
プロチオホス	345.2	5	0.01	0.02	0.01
TBZ	201.3	10	3	3.5	1.74
OPP	170.2	10	10	0.2	0.12
基準設定農薬最大		1440	20		
基準設定農薬最小		0.02	0.005		

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
裴 仁正, 四方伸明, 坂 貴司, 段原直行, 辻田 (久徳) 美樹, 螺良愛郎.	周生期Genistein暴露による化学発癌剤誘発ラット乳癌の抑制ならびにその作用機序.	乳癌基礎研			印刷中
Nikaido Y, Yoshizawa K, Pei R-J, Yuri T, Danbara N, Hatano T, Tsubura A.	Prepubertal zearalenone exposure suppresses <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea-induced mammary tumorigenesis but causes severe endocrine disruption in female Sprague-Dawley rats.	Nutr Cancer			in press
Pei R-J, Sato M, Yuri T, Danbara N, Nikaido Y, Tsubura A.	Effect of prenatal and prepubertal genistein exposure on <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats.	In Vivo	17	349-358	2003
Sato M, Pei R-J, Yuri T, Danbara N, Nakane Y, Tsubura A.	Prepubertal resveratrol exposure accelerates <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea-induced mammary carcinoma in female Sprague-Dawley rats.	Cancer Lett	202	137-145	2003

20031284

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。