

Table 1
Compound numbers, names, structures, melting points and ¹H chemical shifts

Cpd no.	Name	Structure	M.p.	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	H-6'	-OH
1	2',3,3'-trichlorobiphenyl-2-ol		112.2–118.0	–	–	7.393	6.948	7.223	–	–	7.502	7.265	7.096	5.649
2	3,4',5-trichlorobiphenyl-2-ol		105.2–106.5	–	–	7.343	–	7.197	7.466	7.418	–	7.418	7.466	5.705
3	2',3,4'-trichlorobiphenyl-2-ol		–	–	–	7.387	6.945	7.095	–	7.514	–	7.316	7.263	5.603
4	3',4,6-trichlorobiphenyl-3-ol		97.5–98.9	7.002	–	–	7.455	–	7.403	–	7.293	7.360	7.370	5.549
5	2,3',4'-trichlorobiphenyl-4-ol		124.2–125.0	–	6.995	–	6.818	7.162	7.501	–	–	7.470	7.253	6.083
6	2',4,5',6-tetrachlorobiphenyl-2-ol		96.0–96.7	–	6.942	–	7.117	–	–	7.496	7.399	–	7.287	4.934
7	3,3',4',5-tetrachlorobiphenyl-2-ol		–	–	–	7.364	–	7.202	7.652	–	–	7.509	7.378	5.731
8	2',3,3',5-tetrachlorobiphenyl-2-ol		99.5–101.0	–	–	7.406	–	7.102	–	–	7.521	7.275	7.201	5.641

Table 1 (continued)

Cpd no.	Name	Structure	M.p.	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	H-6'	-OH
9	2',3,3',4-tetrachlorobiphenyl-2-ol		114.5–117.1	–	–	–	7.129	7.050	–	–	7.512	7.271	7.201	5.830
10	2',3,3',6-tetrachlorobiphenyl-4-ol		108.0–108.8	–	7.179	–	–	7.232	–	–	7.508	7.255	7.153	5.712
11	3,3',5,5',6-penta-chlorobiphenyl-2-ol		92.0–98.0	–	–	7.527	–	–	7.198	–	7.436	–	7.198	5.744
12	3,3',4',5,6-penta-chlorobiphenyl-2-ol		–	–	–	7.522	–	–	7.414	–	–	7.564	7.148	5.555
13	2,2',3',4,6-penta-chlorobiphenyl-3-ol		83.9–84.6	–	–	–	7.467	–	–	–	7.560	7.322	7.100	5.958
14	2,3',4,5',6-penta-chlorobiphenyl-3-ol		–	–	–	7.454	–	–	7.133	–	7.441	–	7.133	5.969
15	2,3',4,4',6-penta-chlorobiphenyl-3-ol		108.0–108.8	–	–	–	7.453	–	7.346	–	–	7.547	7.083	5.972

Table 2
Ortho- and *meta*-spin coupling constants for compounds 1–15

Compound	J45	J56	J35	J46	J2'3'	J3'4'	J4'5'	J5'6'	J2'4'	J2'6'	J3'5'	J4'6'
1	8.08	7.56	–	1.58	–	–	7.92	7.56	–	–	–	1.58
2	–	–	–	2.52	8.56	–	–	8.56	–	2.24	2.24	–
3	8.00	7.52	–	1.60	–	–	–	8.20	–	–	2.05	–
4	–	–	–	–	–	–	6.72	8.24	1.92	2.00	–	2.08
5	–	8.32	2.48	–	–	–	–	8.20	–	2.08	–	–
6	–	–	1.92	–	–	8.68	–	–	–	–	–	2.56
7	–	–	–	2.44	–	–	–	8.32	–	2.08	–	–
8	–	–	–	2.40	–	–	8.00	7.52	–	–	–	1.56
9	–	8.32	–	–	–	–	8.08	7.60	–	–	–	1.60
10	–	–	–	–	–	–	8.08	7.60	–	–	–	1.60
11	–	–	–	–	–	–	–	–	1.89	1.89	–	1.89
12	–	–	–	–	–	–	–	8.16	–	2.08	–	–
13	–	–	–	–	–	–	8.12	7.60	–	–	–	1.54
14	–	–	–	–	–	–	–	–	1.89	1.89	–	1.89
15	–	–	–	–	–	–	–	8.30	–	2.05	–	–

Table 3
 Chemical shifts of carbon atoms in compounds 1–15 relative to TMS

Compound	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'	C6'
1	127.397	148.646	120.483	129.159	120.847	129.657*	138.381	132.357	133.487	130.078	127.129	129.657*
2	129.523	147.267	121.326	127.885	125.578	129.159	134.407*	130.433	128.747	134.282*	128.747	130.433
3	126.459	148.722	120.493	129.178	120.838	129.887	134.569	134.483*	129.561	134.675*	127.043	132.367
4	123.873	118.386	150.255	119.842	129.714	139.367	139.903	129.370	134.062	127.512	128.163	129.437
5	130.768	132.970*	117.017	156.010	114.441	131.888	138.965	131.467	132.118*	131.553*	129.973	129.044
6	122.820	154.200	114.996	134.790*	121.853	135.537*	133.420	133.325**	131.304	130.691	133.296**	132.004
7	128.230	147.238	121.422	128.230	125.721	129.054	135.891	131.036	132.616*	132.376*	130.385	128.412
8	128.297	147.593	121.039	128.719	125.195	129.523*	137.155	132.262	133.660	130.509	127.273	129.485*
9	125.559	149.881	119.564	132.798	121.671	129.255	137.653	132.357	133.602	130.308	127.215	129.638
10	131.400*	132.511*	117.170	151.739	118.310	130.576	139.041	133.430*	133.018*	130.346	127.091	129.638
11	127.579	148.416	119.344	129.465	125.041	131.457	136.829	128.460	135.173	128.786	135.173	128.460
12	127.809	148.435	119.305	129.351	125.032	131.524	133.028	131.946	133.861*	132.884*	130.682	129.351
13	125.491	121.316*	147.229	121.862*	128.403	137.308	136.264	132.128	133.641	130.854	127.598	129.025
14	125.147	121.316*	147.315	121.575*	128.546	138.697	136.255	128.067	135.096	128.776	135.096	128.067
15	125.243	121.134*	147.296	121.671*	128.498	135.824	136.513	131.524	132.951**	132.721**	130.567	129.006

* and ** assignments uncertain.

but this was eliminated when the compound was exposed to the S9 rat liver preparation. 2,2',3',4,6-Pentachlorobiphenyl-3-ol (13) and 2',3,3',6-tetrachlorobiphenyl-4-ol (10) both showed weak estrogenicity in the absence of the S9 mix. The estrogenicity of compound (10) was enhanced 10-fold by exposure to S9 metabolic activation but that of compound (13) remained unchanged. Very weak estrogenicity was also recorded for compound (1) and this eliminated by metabolic exposure of the compound to the S9 rat liver preparation. The S9 rat liver preparation contains a range of enzyme activities which could include the ability to conjugate the phenolic hydroxyl group (for example, by the formation of a glucuronide) and thereby eliminate estrogenic activity, and the ability to hydroxylate the aromatic ring and thereby,

possibly, induce activity. Also possible is the facility to partially dechlorinate the ring system.

The estrogenicity of compound 5 probably resides in the *p*-substituted phenol ring as this mimics most closely the A-ring of 17 β -estradiol, the usual female sex hormone. The only other compound tested that possessed this structural feature was compound 10. The much weaker estrogenicity of this compound when compared to 5 probably resulted from the hindrance caused by a chlorine substituent *ortho* to the hydroxyl group. It is interesting that exposure of compound 10 to the S9 preparation caused a 10-fold increase in its estrogenic activity. One possible reason for this is the removal, or at least partial removal, of the *ortho* chlorine atom by enzymatic activity. The estrogenic activity of compound 5

Table 4
High resolution mass spectrometric data for compounds 1–15

Compd. no.	Molecular formula	Measured values						Theoretical values					
		$^{35}\text{Cl}_3$		$^{35}\text{Cl}_2\ ^{37}\text{Cl}$		$^{35}\text{Cl}\ ^{37}\text{Cl}_2$		$^{35}\text{Cl}_3$		$^{35}\text{Cl}_2\ ^{37}\text{Cl}$		$^{35}\text{Cl}\ ^{37}\text{Cl}_2$	
		<i>m/z</i>	Int.%	<i>m/z</i>	Int.%	<i>m/z</i>	Int.%	<i>m/z</i>	Int.%	<i>m/z</i>	Int.%	<i>m/z</i>	Int.%
1	C ₁₂ H ₇ OCl ₃	271.9557	89.1	273.9531	100.0	275.9523	29.2	271.9562	100.0	273.9533	97.2	275.9504	31.5
2	C ₁₂ H ₇ OCl ₃	271.9579	98.7	273.9513	100.0	275.9516	33.0						
3	C ₁₂ H ₇ OCl ₃	271.9588	92.7	273.9555	100.0	275.9515	26.5						
4	C ₁₂ H ₇ OCl ₃	271.9587	100.0	273.9528	92.3	275.9514	28.7						
5	C ₁₂ H ₇ OCl ₃	271.9567	100.0	273.9539	91.6	275.9491	35.0						
		$^{35}\text{Cl}_4$		$^{35}\text{Cl}_3\ ^{37}\text{Cl}$		$^{35}\text{Cl}_2\ ^{37}\text{Cl}_2$		$^{35}\text{Cl}_4$		$^{35}\text{Cl}_3\ ^{37}\text{Cl}$		$^{35}\text{Cl}_2\ ^{37}\text{Cl}_2$	
6	C ₁₂ H ₆ OCl ₄	305.9157	78.5	307.9145	100.0	309.9115	50.0	305.9173	77.2	307.9143	100.0	309.9114	48.6
7	C ₁₂ H ₆ OCl ₄	305.9156	78.9	307.9139	100.0	309.9104	54.8						
8	C ₁₂ H ₆ OCl ₄	305.9144	86.0	307.9119	100.0	309.9103	42.1						
9	C ₁₂ H ₆ OCl ₄	305.9156	63.1	307.9114	100.0	309.9095	43.6						
10	C ₁₂ H ₆ OCl ₄	305.9159	72.6	307.9150	100.0	309.9111	54.1						
		$^{35}\text{Cl}_5$		$^{35}\text{Cl}_4\ ^{37}\text{Cl}$		$^{35}\text{Cl}_3\ ^{37}\text{Cl}_2$		$^{35}\text{Cl}_5$		$^{35}\text{Cl}_4\ ^{37}\text{Cl}$		$^{35}\text{Cl}_3\ ^{37}\text{Cl}_2$	
11	C ₁₂ H ₅ OCl ₅	339.8775	60.0	341.8729	100.0	343.8687	70.7	339.8783	61.7	341.8754	100.0	343.8724	64.7
12	C ₁₂ H ₅ OCl ₅	339.8779	67.9	341.8745	100.0	343.8685	59.6						
13	C ₁₂ H ₅ OCl ₅	339.8772	57.6	341.8757	100.0	343.8699	57.8						
14	C ₁₂ H ₅ OCl ₅	339.8798	61.6	341.8770	100.0	343.8699	72.1						
15	C ₁₂ H ₅ OCl ₅	339.8792	63.6	341.8773	100.0	343.8684	62.1						

Table 5
Estrogenic and thyroid hormonal activity by yeast two-hybrid assays

Compd. no.	Estrogen assay				Thyroid hormone assay			
	–S9 test		+S9 test		–S9 test		+S9 test	
	EC × 10; nM	% Activity relative to E2	EC × 10; nM	% Activity relative to E2	EC × 10; nM	% Activity relative to T4	EC × 10; nM	% Activity relative to T4
1	13 000	0.0007	–	–	– ^a	–	–	–
2	– ^a	–	–	–	–	–	–	–
3	–	–	–	–	–	–	–	–
4	–	–	–	–	1500	0.49	–	–
5	83	0.11	– ^b	–	–	–	–	–
6	–	–	–	–	150	4.9	3300	0.22
7	–	–	–	–	–	–	–	–
8	–	–	–	–	8600	0.086	–	–
9	–	–	–	–	–	–	–	–
10	5500	0.0017	680	0.014	1200	0.62	1300	0.57
11	–	–	–	–	15 000	0.049	–	–
12	–	–	–	–	–	–	–	–
13	2500	0.0037	2800	0.0033	–	–	11 000	0.067
14	–	–	–	–	780	0.95	12 000	0.062
15	–	–	–	–	–	–	–	–
PC ^c	0.092	100	– ^d	–	7.4	100	– ^e	–
PC ^f	–	–	520	0.018	–	–	–	–

^aNo activity: <10 μM tested.

^bNo activity: <1 μM tested.

^cPositive control for estrogen assay in absence of S9 preparation—17β-estradiol (E2). Positive control for thyroid assay—3,3',5,5'-tetraiodothyronine (T4).

^dNo activity: <2 nM tested.

^eNo activity: <100 nM tested.

^fPositive control for estrogen assay in presence of S9 preparation—*trans*-stilbene.

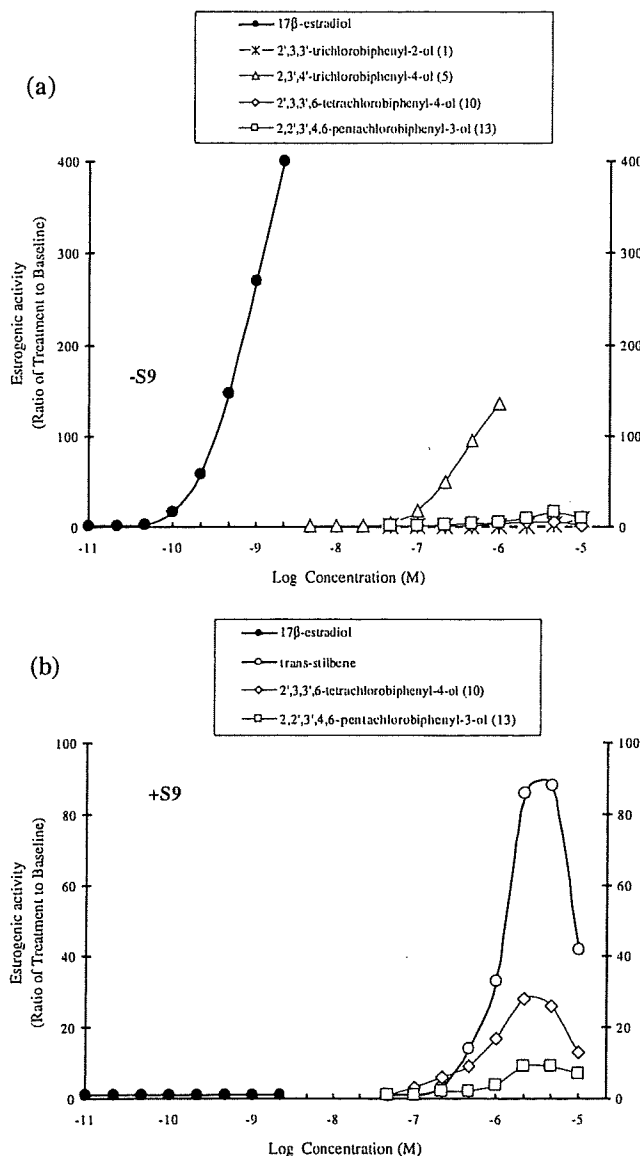


Fig. 1. Agonist activity of active hydroxy-biphenyls, 17 β -estradiol (E2) and *trans*-stilbene in yeast two-hybrid estrogenicity assay; (a) without rat liver S9 treatment, (b) with rat liver S9 treatment. Each point represents the mean of three replicates. Standard errors were smaller than the symbols used to represent the means and consequently are not shown.

was completely eliminated by subjecting the compound to the metabolic activity of the S9 preparation. In this regard its behavior was analogous to that of 17 β -estradiol (E2) itself and the loss of activity in both cases may result from the enzymatic synthesis of a phenolic conjugate.

2',4,5',6-Tetrachlorobiphenyl-2-ol (6) showed strong thyroid hormonal activity (5% of that of T4) whereas 3',4,6-trichlorobiphenyl-3-ol (4), compound (10) and 2,3',4,5',6-pentachlorobiphenyl-3-ol (14) showed moderate activity, and 2',3,3',5-tetrachlorobiphenyl-2-ol (8) and 3,3',5,5',6-pentachlorobiphenyl-2-ol (11) showed weak

activity. The activity of (4) was eliminated by S9 metabolic activation whereas those of (6) and (14) were weakened and that of (10) remained unchanged. Compound 13 exhibited no activity but showed weak activity after exposure to S9 preparation.

The molecular structural requirements for thyroid hormone activity (Messer, 2002) are different from those required for estrogenicity. The natural thyroid hormones T3 and T4 (Fig. 3) obviously exhibit all features that ideally must be satisfied. Iodine must be substituted at position 3 and 5 in the inner ring to maintain the outer ring perpendicular to the inner ring, i.e. to prevent

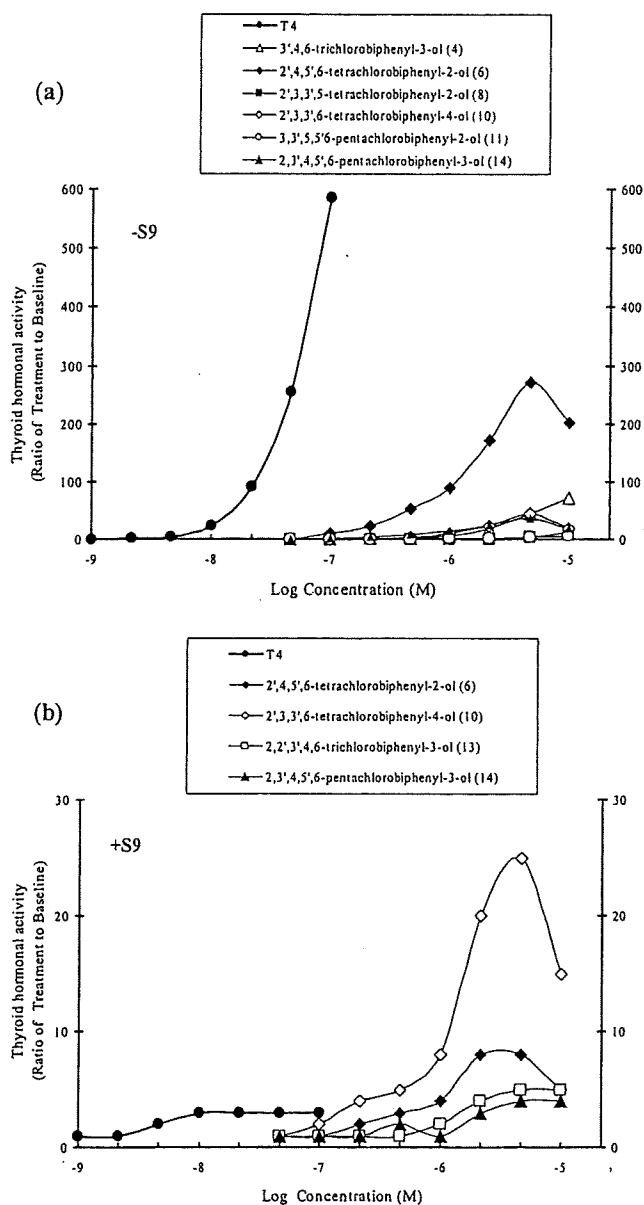


Fig. 2. Agonist activity of active hydroxy-biphenyls and thyroxine (T4) in yeast two-hybrid thyroid hormone activity assay; (a) without rat liver S9 treatment, (b) with rat liver S9 treatment. Each point represents the mean of three replicates. Standard errors were smaller than the symbols used to represent the means and consequently are not shown.

rotation of the rings relative to each other. A spacer atom (which can be O as in T3 and T4, or S or C) is required between the two rings and must form a 120° angle. The carboxyl and the phenolic hydroxyl groups must be present to maximize receptor binding. Lipophilic groups (iodine in the case of T3 and T4) must be present at the 3' position of the outer ring to optimize binding.

Obviously monohydroxy PCBs can fulfill few of these criteria. There is no carboxyl group, no spacer atom

between the ring, and the steric functions of the iodine atoms must be carried out by smaller chlorines. Intuitively it would seem that that a phenolic hydroxyl substituent lying between an *ortho* chlorine and an unsubstituted position (T3 analog) or with the phenolic hydroxyl *ortho* to two chlorines (T4 analog) together with substituents (chlorines) in the waist of the molecule that, at least, prevent coplanarity might offer the best chance of activity. However, it is difficult to rationalize the observed activities in these terms. Although com-

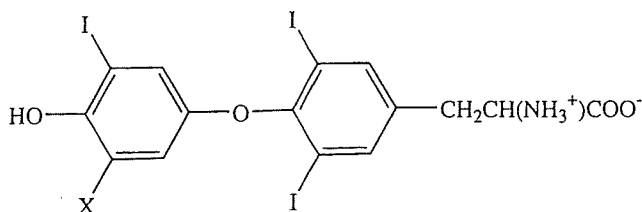


Fig. 3. Structures of T4 (thyroxine) and T3. X = I, T4; X = H, T3.

pounds showing moderate activity (4, 10 and 14) fulfilled these conditions for the environment of the phenolic hydroxyl group, the hydroxyl group of the most active compound (6) lay between a chlorine atom and the other ring. Other compounds which possessed this feature (2, 3 and 7 for example) had no measurable activity. Also, there appeared to be no correlation between measured activity and the angle likely to be adopted by the two rings in relation to each other. For example compound (4) with only a single substituent in the waist of the molecule possessed moderate activity whereas compound (13), with three 'waist' chlorines was inactive. Evidently measured activity depended on fine aspects of molecular dimensions and polarities which are not currently obvious. This inability to predict thyroid hormone activity of PCB metabolites from superficial molecular properties highlights an aspect of the caution required in assessing their risk factors.

4. Summary

A series of novel synthetic monohydroxy polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) (5 trichloro-, 5 tetrachloro- and 5 pentachloro-compounds) have been characterized (^1H and ^{13}C NMR and high resolution MS) and their estrogenic and thyroid hormone activities assessed using a yeast two-hybrid assay. Hormone activity assays were carried out both in with and without possible metabolic activation by rat liver S9 preparation. Although measured estrogenicity could be related to partial structures of the compounds examined, no precise relationship was found between thyroid hormone activity and molecular structure.

References

- Bergeron, J.M., Crews, D., McLachlan, J.A., 1994. PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environ. Health Perspect.* 102, 780–781.
- Bergman, Å., Klasson Wehler, E., Kuroki, H., 1994. Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood. *Environ. Health Perspect.* 102, 464–469.
- Fielden, M.R., Chen, I., Chittim, B., Safe, S.H., Zacharewski, T.R., 1997. Examination of the estrogenicity of 2,4,6,2'-pentachlorobiphenyl (PCB 104), its hydroxylated metabolite 2,4,6,2',6'-pentachloro-4-biphenylol (HO-PCB 104), and a further chlorinated derivative, 2,4,6,2',4',6'-hexachlorobiphenyl (PCB 155). *Environ. Health Perspect.* 105, 1238–1248.
- Hovander, L., Malmberg, T., Athanasiadou, M., Athanassiadis, I., Rahm, S., Bergman, Å., Klasson Wehler, E., 2002. Identification of hydroxylated PCB metabolites and other phenolic halogenated pollutants in human blood plasma. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 105–117.
- Kester, M.H.A., Bulduk, S., Tibboel, D., Meinel, W., Glatt, H., Falany, C.N., Coughtrie, M.W.H., Bergman, Å., Safe, S.H., Kuiper, G.G.J.M., Schuur, A.G., Brouwer, A., Visser, T.J., 2000. Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated PCB metabolites: a novel pathway explaining the estrogenic activity of PCBs. *Endocrinology* 141, 1897–1900.
- Korach, K.S., Sarver, P., Chae, K., McLachlan, J.A., McKinney, J.D., 1988. Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes. *Mol. Pharmacol.* 33, 120–126.
- Letcher, R.J., Klasson Wehler, E., Bergman, Å., 2000. Methyl sulfone and hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls. In: Paasivirta, J. (Ed.), *New Types of Persistent Halogenated Compounds*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 315–359.
- Messer, Jr., W.S., 2002. Available from <<http://www.neurosci.pharm.utoledo.edu/MBC3320/thyroid.htm>>.
- Moore, M., Mustain, M., Daniel, K., Chen, I., Safe, S., Zacharewski, T., Gillesby, B., Joyeux, A., Balaguer, P., 1997. Antiestrogenic activity of hydroxylated polychlorinated biphenyl congeners identified in human serum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142, 160–168.
- Narasimhan, T.R., Kim, H.L., Safe, S., 1991. Effects of hydroxylated polychlorinated biphenyls on mouse liver mitochondrial oxidative phosphorylation. *J. Biochem. Toxicol.* 6, 229–236.
- Okumura, T., Shibata, J., 1975. Investigation on the behavior of PCBs in the environment. Research Report of the Environmental Pollution Control Center, Osaka Prefectural Government, Japan (in Japanese).
- Sandau, C.D., Ayotte, P., Dewailly, E., Duffe, J., Norstrom, R.J., 2000. Analysis of hydroxylated metabolites of PCBs (OH-PCBs) and other chlorinated phenolic compounds in whole blood from Canadian Inuit. *Environ. Health Perspect.* 108, 611–616.
- Schultz, T.W., 2002. Estrogenicity of biphenylols: activity in the yeast gene activation assay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 332–338.
- Schuur, A.G., Brouwer, A., Bergman, Å., Coughtrie, M.W.H., Visser, T.J., 1998a. Inhibition of thyroid hormone sulfation

- by hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls. *Chem.-Biol. Interact.* 109, 293–297.
- Schuur, A.G., Legger, F.F., van Meeteren, M.E., Moonen, M.J.H., van Leeuwen-Bol, I., Bergman, Å., Visser, T.J., Brouwer, A., 1998b. In vitro inhibition of thyroid hormone sulfation by hydroxylated metabolites of halogenated aromatic hydrocarbons. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1075–1081.
- Schuur, A.G., van Leeuwen-Bol, I., Jong, W.M.C., Bergman, Å., Coughtrie, M.W.H., Brouwer, A., Visser, T.J., 1998c. In vitro inhibition of thyroid hormone sulfation by polychlorobiphenyls: isozyme specificity and inhibition kinetics. *Toxicol. Sci.* 45, 188–194.
- Shiraishi, F., Shiraishi, H., Nishikawa, J., Nishihara, T., Morita, M., 2000. Development of a simple operational estrogenicity assay system using the yeast two-hybrid system. *J. Environ. Chem.* 10, 57–64.
- Sinjari, T., Darnerud, P.O., 1998. Hydroxylated polychlorinated biphenyls: placental transfer and effects on thyroxine in the foetal mouse. *Xenobiotica* 28, 21–30.
- Vakharia, D.D., Gierthy, J.F., 2000. Use of a combined human liver microsome-estrogen receptor binding assay to assess potential estrogen modulating activity of PCB metabolites. *Toxicol. Lett.* 114, 55–65.
- van den Hurk, P., Kubiczak, G.A., Lehmler, H.-J., James, M.O., 2002. Hydroxylated polychlorinated biphenyls as inhibitors of the sulfation and glucuronidation of 3-hydroxy-benzo[a]pyrene. *Environ. Health Perspect.* 110, 343–348.

内分泌攪乱物質の核内受容体ファミリーを介する作用発現

Effect of Suspected Endocrine Disruptors on Various Kinds of Nuclear Hormone Receptors

西川 淳一*, 間宮 聡, 金山 知彦, 西原 力

JUN-ICHI NISHIKAWA, SATORU MAMIYA, TOMOHIKO KANAYAMA and TSUTOMU NISHIHARA

大阪大学大学院・薬学研究科・微生物動態学分野 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6

* TEL: 06-6879-8241 FAX: 06-6879-8244

* E-mail: nisikawa@phs.osaka-u.ac.jp

Laboratory of Environmental Biochemistry, School of pharmaceutical Sciences, Osaka University,
1-6 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(原稿受付 2003年 6月18日 / 原稿受理 2003年 8月12日)

Nuclear receptors constitute a large superfamily of ligand-inducible transcription factors. By ligand binding, nuclear receptors regulate expression of their target genes and play key roles in various physiological actions. Recently, human genome has been reported to contain 48 members of nuclear receptor family. Despite wide variation in ligand sensitivity, nuclear receptors have similar structure and share an extensive homology. Recently, endocrine disruptors have emerged as a major public health issue due to their potentially disruptive effects on physiological processes, particularly through interaction directly with nuclear receptors. In this study, we have made assay systems for several nuclear receptors and examined agonistic activities of suspected endocrine disruptors. We cloned ligand-binding domain of human nuclear receptors and subcloned these genes into a two-hybrid vector to detect ligand-dependent interaction with coactivator (TIF2). Resulted recombinant vectors which contain β -galactosidase gene as a reporter were introduced into an yeast strain Y190. Using these constructed systems, we tested induction of β -galactosidase by adding known-ligands to the yeast. As results, we could see dose-response curves as expected in concerned with all receptors tested here. Finally, the yeast two-hybrid systems were applied to 22 suspected endocrine disruptors. Several chemicals showed agonistic activities on vitamin A receptor or thyroid hormone receptor as well as estrogen receptor. These results suggest that some man-made chemicals may disturb endocrine systems by targeting to multiple nuclear receptors.

Key words: endocrine disruptors, nuclear receptor, estrogen, thyroid hormone, vitamin A

キーワード: 内分泌攪乱物質, 核内受容体, エストロゲン, 甲状腺ホルモン, ビタミンA

1. 緒 言

内分泌攪乱作用は、急性毒性や慢性毒性、発癌性や催奇形性といったこれまでの毒性学とは違う新しい概念の毒性であり、ホルモンの受容体を介して生物の発生や分化に深刻な影響を及ぼすと考えられている¹⁾。従来、ホルモンの受容体はそれぞれのリガンドに対し特異性が高く、人間が非意図的に作り出した化学物質がホルモン受容体に結合して毒性を発揮するとは一般には考えられてこなかった。ところが、大量に環境中に放出される化学物質(例えば農薬や洗剤、プラスチックの原料など)の中にも、ホルモン受容体と結合して、天然のホルモン作用を模倣して働く物質が数多く存在することが分かってきた。本来、ホルモンとは極微量でその作用を発揮するため、必要な時に必要な量だけ合成され、必要がなくなれば代謝され効果を持たなくされる。しかし、人工的に作り出された化学物質が体内に取り込まれれば、生体のホルモン制御系を無視して働き、人の健康や生態系に悪

影響を与える可能性がある¹⁰⁾。

ステロイドや甲状腺ホルモンなどの脂溶性低分子ホルモンの受容体である核内受容体群は、多細胞生物の内分泌調節系の主要な部分を担っている⁹⁾。内分泌攪乱物質は、この核内受容体を介して生体内システムを攪乱し、生物の発生や分化、恒常性の維持に深刻な影響を及ぼすと考えられている。これら内分泌攪乱物質の潜在的なターゲットと考えられる核内受容体ファミリーはリガンド作動性の転写調節因子であり、N端側に亜鉛フィンガーを含むDNA結合領域、C端側に転写活性化領域とリガンド結合領域を有するという一次構造上の特徴がある⁸⁾。近年のゲノムプロジェクトの進展によりヒトゲノムのほとんどの塩基配列が決定されたが、このような特徴を持つ核内受容体ファミリーの遺伝子はヒトゲノム上には48種類存在することが確定されたり。48種類の受容体は、そのほとんどが生物の発生・分化や恒常性の維持に重要な役割を果たしていると推定されており、これらの受容体のいずれに対して化学物質が干渉しても、生物

の健康は害される可能性がある。これまで、内分泌攪乱化学物質のターゲットとしてはエストロゲン受容体やアンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体を中心に研究・調査が進められてきたが、化学物質による内分泌系攪乱作用という観点からは十分とは言えない。また、現在、内分泌攪乱化学物質の作用点がエストロゲン受容体以外にある可能性がさかんに議論されるようになり、そのような観点からも多くの受容体について結合性を調べておく必要がある。そこで本研究では、ヒトの核内受容体ファ

ミリーのうち、その生体内における役割が良く知られているステロイドホルモン受容体、甲状腺ホルモン受容体、脂溶性ビタミンの受容体に焦点をあて、化学物質の影響を調べた。その結果、内分泌攪乱物質と疑われる候補物質が、エストロゲン受容体との結合だけではなく、複数の核内受容体に影響を及ぼし、これらの複合した作用が内分泌攪乱物質としての毒性につながると考えられる結果を得たので報告する。

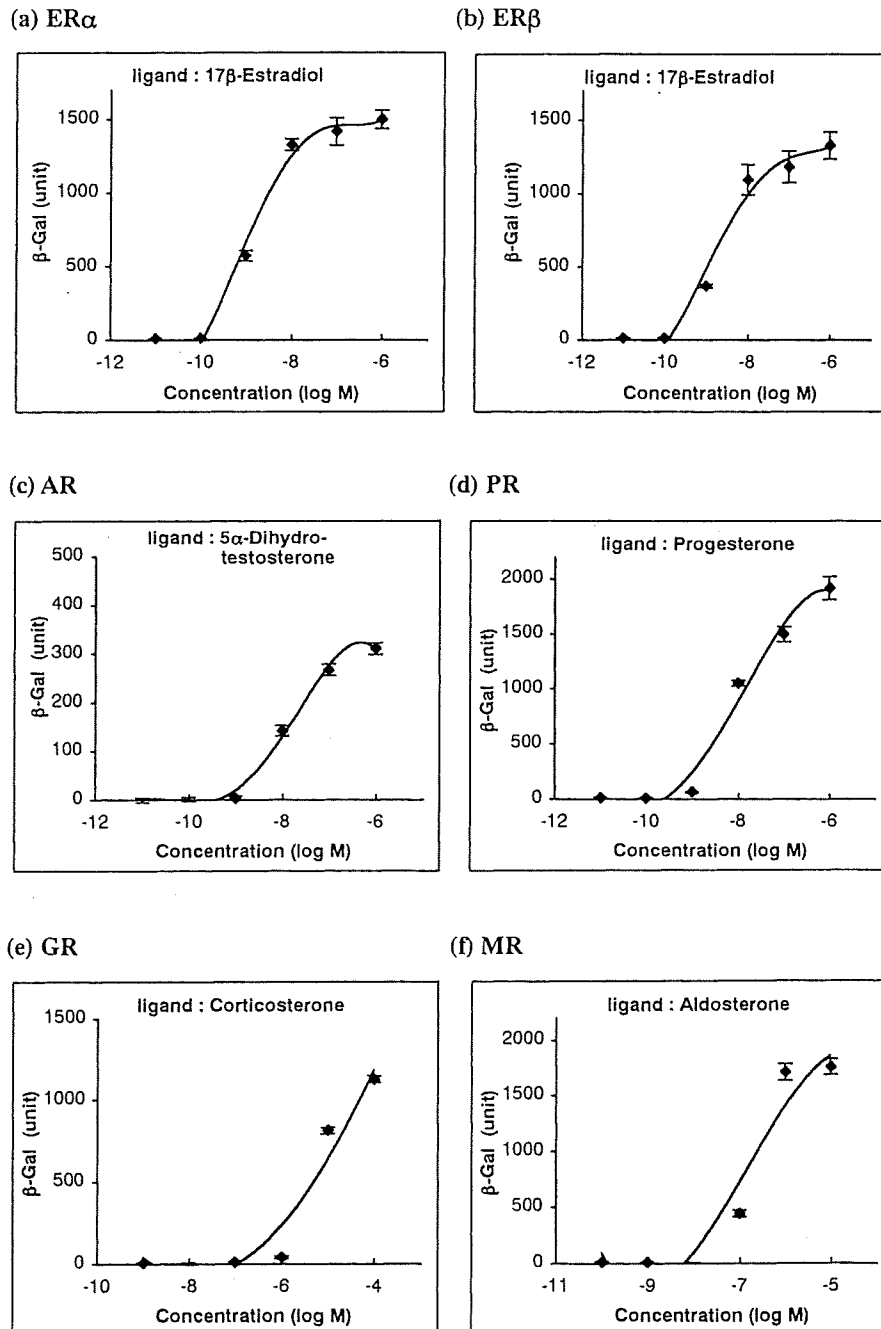


図 1 (1). 核内受容体の内因性リガンドに対する容量-応答曲線 (1)

エストロゲン受容体アルファ (ER α) とエストロゲン受容体ベータ (ER β) には 17 β -Estradiol, アンドロゲン受容体 (AR) には 5 α -Dihydrotestosterone, プログステロン受容体 (PR) には Progesterone, グルココルチコイド受容体 (GR) には Corticosterone, ミネラルコルチコイド受容体 (MR) には Aldosterone を用いて、それぞれのリガンド濃度を変化させた時の β -galactosidase の活性を調べた。縦軸は β -galactosidase の活性を、横軸はそれぞれのリガンド濃度を示す。

2. 実験方法

2.1. 核内受容体 cDNA の単離

(プライマーの設計)

ヒト核内受容体のリガンド結合ドメイン (LBD) を RT-PCR で増幅するため、GenBank に登録されている配列を基にプライマーを設計した。

(RT-PCR)

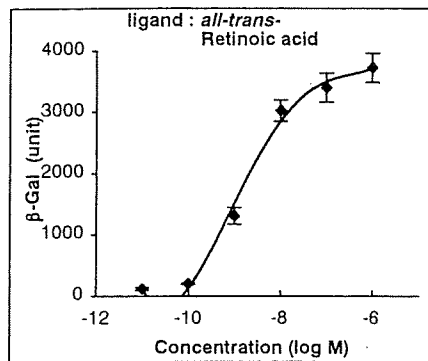
RNA はすべて OriGene Technologies, Inc. (MD, USA)

から購入し、これを鋳型として逆転写酵素 (Reverta Ace, 東洋紡) を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型とし、耐熱性 DNA ポリメラーゼ (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems 社) を用いて PCR を行い、LBD をコードする DNA を増幅した。

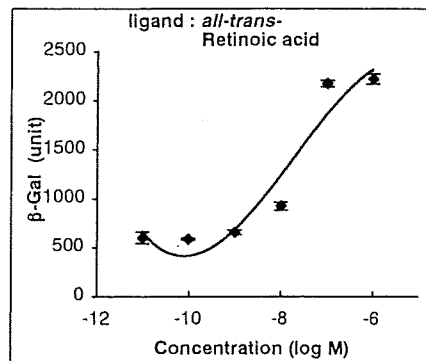
(塩基配列の決定)

PCR により増幅した DNA 断片を pBluescript (Stratagene 社) にサブクローニングし、自動蛍光式 DNA シーケンサー DSQ1000 (島津製作所) にて塩基配列を

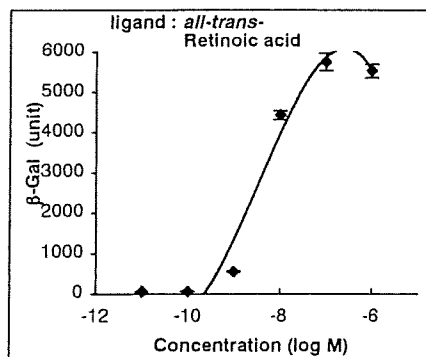
(g) RAR α



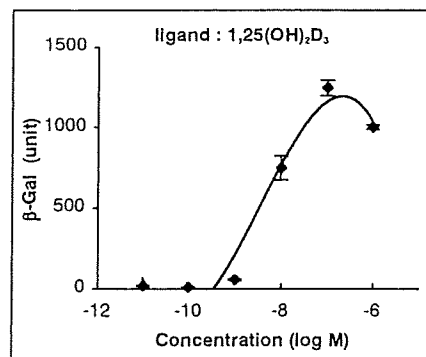
(h) RAR β



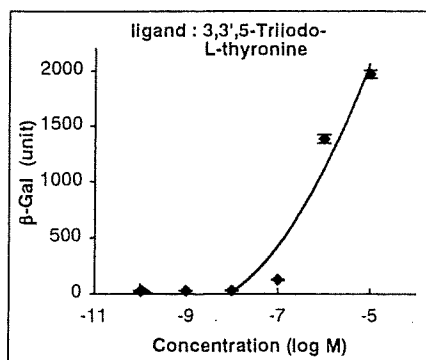
(i) RAR γ



(j) VDR



(k) TR α



(l) TR β

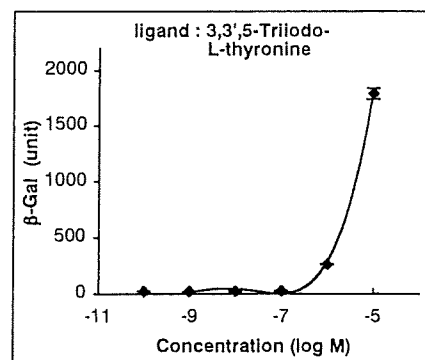


図1 (2). 核内受容体の内因性リガンドに対する容量-応答曲線(2)

ビタミン A 受容体アルファ (RAR α), ビタミン A 受容体ベータ (RAR β) とビタミン A 受容体ガンマ (RAR γ) には *all-trans*-Retinoic acid, ビタミン D 受容体 (VDR) には 1,25(OH) $_2$ VitaminD $_3$, 甲状腺ホルモン受容体アルファ (TR α) と甲状腺ホルモン受容体ベータ (TR β) には 3,3',5-Triiodo-L-thyronine を用いて、それぞれのリガンド濃度を変化させた時の β -galactosidase の活性を調べた。縦軸は、 β -galactosidase の活性を、横軸はそれぞれのリガンド濃度を示す。

決定した。

2.2. 酵母 two-hybrid 系の構築

2.1で単離したそれぞれのヒト由来核内受容体 LBD を酵母 two-hybrid 用ベクター pGBT9 (Clontech 社) に挿入し、得られた発現ベクターを pGAD424-TIF2 とともに酵母 Y190 に組み込んだ⁹⁾。

2.3. 試薬

各種核内受容体に対する標準リガンドとしては以下の物質を用いた。

- 17 β -Estradiol (ER α , β) 5 α -Dihydrotestosterone (AR)
Progesterone (PR)
Corticosterone (GR) Aldosterone (MR)
all-trans-Retinoic acid (RAR α , β , γ)
3,3',5-Triiodo-L-thyronine (TR α , β)
1,25(OH)₂VitaminD₃ (VDR)

2.4. 被験試薬の調整

ベンゾフェノン, *p*-*t*-オクチルフェノール, *p*-*t*-ブチルフェノール, *o*-*t*-ブチルフェノール, フタル酸ブチル

ベンジル, フタル酸ジ-2-エチルヘキシル, フタル酸ジシクロヘキシル, フタル酸ジ-*n*-ブチル, アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル, (塩化)トリブチルスズは和光純薬から購入した。オクタクロロスチレン, フタル酸ジエチル, (塩化)トリフェニルスズ, 4-ノニルフェノールは関東化学から購入した。ビスフェノール A, 2,4-ジクロロフェノール, 4-ニトロトルエン, フタル酸ジ-*n*-ペンチル, フタル酸ジ-*n*-プロピルは東京化成から購入した。

標準リガンドを含め全ての試薬は DMSO に溶解後 -20°C で保存し、使用前に DMSO で段階希釈して用いた。

2.5. 酵母 two-hybrid 法によるリガンドアッセイ

各種受容体 LBD とコアクチベーター (TIF2) を組み込んだレポーター遺伝子発現酵母の懸濁液に被験物質 (10⁻⁸~10⁻⁴ M) を加え、30°C で4時間反応させた。その後、酵母を遠心分離により集め、Zymolyase で酵母細胞壁を溶解後、被験試薬で誘導された β -galactosidase 活性を比色法にて定量した⁹⁾。試験はすべて n=3 で行った。

表1. 内分泌攪乱作用が疑われる化学物質の各種核内受容体へのアゴニスト活性

化学物質	ER α	ER β	AR	PR	GR	MR	RAR α	RAR β	RAR γ	TR α	TR β	VDR
ベンゾフェノン	△	△	×	×	×	×	△	△	△	×	×	×
アミトロール	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
オクタクロロスチレン	×	×	×	×	×	×	×	×	△	×	×	×
4-ニトロトルエン	×	×	×	×	×	×	△	△	×	×	×	×
2,4-ジクロロフェノール	△	△	×	×	×	×	×	△	×	×	×	×
ペンタクロロフェノール	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
4-ノニルフェノール	○	○	×	×	×	×	△	○	○	×	×	×
<i>p</i> - <i>t</i> -オクチルフェノール	○	○	×	×	×	×	△	○	○	×	×	×
<i>p</i> - <i>t</i> -ブチルフェノール	○	○	×	×	×	×	○	○	○	×	×	×
<i>o</i> - <i>t</i> -ブチルフェノール	×	×	×	×	×	×	○	○	○	○	△	×
ビスフェノール A	△	△	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
フタル酸ジエチル	×	×	×	×	×	×	△	×	△	×	×	×
フタル酸ブチルベンジル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
フタル酸ジシクロヘキシル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
フタル酸ジ- <i>n</i> -ブチル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
フタル酸ジ- <i>n</i> -ペンチル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
フタル酸ジ- <i>n</i> -プロピル	×	×	×	×	×	×	△	△	△	×	×	×
フタル酸ジ- <i>n</i> -ヘキシル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
アジピン酸ジエチルヘキシル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
(塩化)トリフェニルスズ	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
(塩化)トリブチルスズ	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×

◎; 標準リガンドと同等の活性, ○; 標準リガンドと比較して 1~1/1000 の活性
△; 標準リガンドと比較して 1/1000~1/1000000 の活性, ×; 活性なし

3. 結果及び考察

3.1. 酵母 two-hybrid 法によるリガンドアッセイ系の確立

ヒト核内受容体ファミリーのうち、高親和性の内因性リガンドが知られている12種類の受容体、エストロゲン受容体アルファ (ER α), エストロゲン受容体ベータ (ER β), アンドロゲン受容体 (AR), プログステロン受容体 (PR), グルココルチコイド受容体 (GR), ミネラルコルチコイド受容体 (MR), 甲状腺ホルモン受容体アルファ (TR α), 甲状腺ホルモン受容体ベータ (TR β), ビタミン A 受容体アルファ (RAR α), ビタミン A 受容体ベータ (RAR β), ビタミン A 受容体ガンマ (RAR γ), ビタミン D 受容体 (VDR) について、LBD 部分をコードする DNA を PCR により得ることに成功した。得られた DNA 断片の塩基配列を解析し、すべての受容体遺伝子について既報の塩基配列と一致していることを確認した。尚、取得した受容体の領域 (アミノ酸番号) と、使用した RNA の由来臓器は以下の通りである。ER α (247-596, 卵巣), ER β (213-531, 卵巣), AR (625-919, 精巣), PR (634-934, 卵巣), GR (484-778, 腎臓), MR (669-985, 肝臓), RAR α (170-463, 脳), RAR β (147-448, 脳), RAR γ (172-455, 肝臓), TR α (121-410, 腎臓), TR β (175-461, 腎臓), VDR (90-427, 腎臓)。

核内受容体 LBD は、リガンド依存的にコアクチベーターと相互作用することが知られている³⁾。そこで、得られた受容体 LBD とコアクチベーター TIF2³⁾ の発現ベク

ターを酵母に導入し、two-hybrid 法により両タンパク質のリガンド依存的な相互作用を調べた (図1)。その結果、ここで調べたすべての受容体については、それぞれのリガンドに対し容量-応答曲線が得られた。ER α , ER β , AR, PR, RAR α , RAR β , RAR γ , VDR では終濃度が約 10^{-9} M から良好な応答性が認められたが、GR では 10^{-6} M, MR では 10^{-7} M, TR α と TR β では 10^{-6} M からしか応答せず、感度は必ずしも良いとは言えない。これらの受容体も、哺乳動物細胞を用いたルシフェラーゼアッセイでは、酵母の系に較べ100倍から1000倍の感度が得られることから、今回作製したアッセイ系の感度の悪さは、各種リガンドの酵母の細胞壁や細胞膜への透過性に起因するものと考えられる。

3.2. 内分泌攪乱作用が疑われる化学物質の各種核内受容体に対する影響

3.1で作製した酵母 Two-hybrid 系を用い、内分泌攪乱物質として疑われている22物質について、各種核内受容体に対するアゴニスト作用を検討した (表1)。尚、これらの22物質は内分泌攪乱作用を持つと断定されたものではなく、環境省が優先的にリスク評価に取り組むべき物質として公表した、生殖系への影響が懸念されている化学物質を中心に選定した。

内分泌攪乱作用が疑われる22物質の各種核内受容体へのアゴニスト活性を表1に纏めた。これまでの研究から、パラ位に疎水性の側鎖を持つアルキルフェノール類やビスフェノール A、ベンゾフェノンにエストロゲン様活性

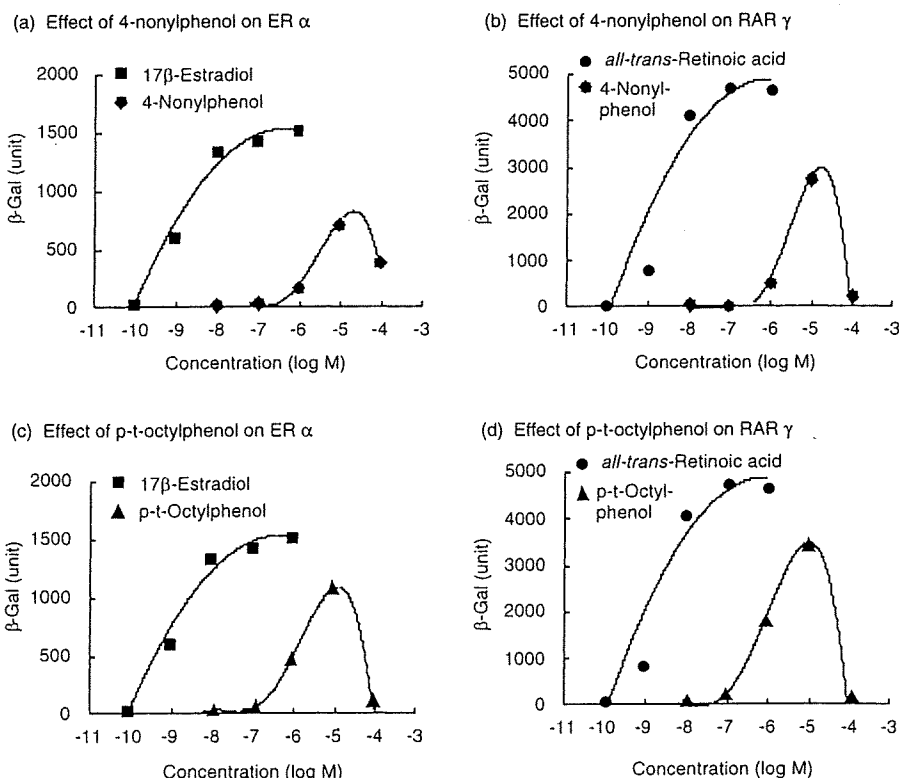


図2. アルキルフェノールのエストロゲン受容体及びビタミン A 受容体への影響
エストロゲン受容体アルファ (ER α) とビタミン A 受容体ガンマ (RAR γ) に対する、ノニルフェノール及びオクチルフェノールのアゴニスト活性を調べた。■は 17 β -Estradiol に、●は *all-trans*-Retinoic acid に、◆は 4-Nonylphenol に、▲は *p-t*-Octylphenol に対応する。縦軸は、 β -galactosidase の活性を、横軸はそれぞれのリガンド濃度を示す。

があることが知られている⁹⁾。本研究においても、これらの物質は ER にアゴニスト作用を示したが、それに加えて RAR にも活性を持つ事が分かった。また、オルト位に疎水性の側鎖を持つ *o*-*t*-ブチルフェノールは、ER には活性を示さなかったが、RAR と TR にアゴニスト作用を示す事が明らかになった。これら以外の化学物質にも RAR に活性を持つものは多く、今後、内分泌攪乱作用における RAR の関与を検討する必要がある。

3.3. アルキルフェノール類のビタミン A 受容体 (RAR) への作用

3.2 で、アルキルフェノール類が RAR にアゴニスト作用を示すことが明らかになったので、その作用についてさらに詳細に検討した。4-*n*-ニルフェノール及び *p*-*t*-オクチルフェノールは、RAR に対し 10^{-6} M から影響を示し、ER への最少影響濃度とほぼ同じであった (図 2)。RAR のリガンドである全トランスレチノイン酸 (ATRA) は、催奇形性試験の陽性コントロールとして使われるほど強い催奇形性作用を持ち、RAR に結合する物質が生殖や発生段階において毒性を示すことはよく知られている⁹⁾。今回、内分泌攪乱物質と疑われているアルキルフェノール類が RAR にアゴニスト活性を示したことは、これらの物質が ER との結合だけでなく、RAR を介して、場合によっては両者の複合作用として生体に悪影響を及ぼす可能性を強く示唆している。さらに、パラ位以外に側鎖を持つアルキルフェノール (*o*-*t*-ブチルフェノール) は ER には結合しないが RAR には結合した。このことは、今後、アルキルフェノール類について、さらに別の観点からその内分泌攪乱作用を検討しなければいけないことを示唆している。

*本研究は、平成14年度「内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムの解明等基礎的研究」(環境省)において行われたもので

ある。

文 献

- 1) Chawla, A., J.J. Repa, R.M. Evans, and D.J. Mangelsdorf. 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the x-files. *Science* 294: 1866-1870.
- 2) Colborn, T., D. Dumanoski, and J.P. Myers. 1996. *Our stolen future*. Dutton, New York.
- 3) Herry, D.M., E. Kalkhoven, S. Hoare, and M.G. Parker. 1997. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387: 733-736.
- 4) Mangelsdorf, D.J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and R.M. Evans. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839.
- 5) Nau, H., Chahoud, I., Dencker, L., Lammer, E.J., and Scott, W.J. 1994. Teratogenicity of vitamin A and retinoids. In *Vitamin A in Health and Diseases* (ed. Blomhoff, R.) 615-664. New York: Marcel Dekker Inc.
- 6) Nishikawa, J., K. Saito, J. Goto, F. Dakeyama, M. Matsuo, and T. Nishihara. 1999. New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154: 76-83.
- 7) Nishihara, T., J. Nishikawa, T. Kanayama, F. Dakeyama, K. Saito, M. Imagawa, S. Takatori, Y. Kitagawa, S. Hori, and H. Utsumi. 2000. Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.* 46: 282-298.
- 8) Tsai, M., and B.W. O'Malley. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 451-486.
- 9) Voegel, J.J., M.J.S. Heine, C. Zechel, P. Chambon, and H. Gronemeyer. 1996. TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 15: 3667-3675.
- 10) 西川淳一, 今川正良, 西原 力. 内分泌攪乱物質の核内受容体に対する影響. *実験医学*. 2000年 6月号: 731-736. 羊土社

家庭用の蚊取線香，電気蚊取等に広く使用されているピレスロイド系殺虫剤の
共力剤である2, 3, 3, 3, 2', 3', 3', 3'-Octachlorodipropyl ether (S-421) の
ラットを用いた28日間反復強制経口投与毒性試験

松島裕子，内田雄幸，斉藤 実，川崎 靖，伊佐間和郎，鹿庭正昭，井上 達，菅野 純

Twenty-Eight Day Repeated Dose Oral Toxicity Test of Synergist of a pyrethroid insecticide,
2, 3, 3, 3, 2', 3', 3', 3'-Octachlorodipropyl ether (S-421) in Rats

Yuko Matsushima, Osayuki Uchida, Minoru Saitoh, Yasushi Kawasaki, Kazuo Isama, Masaaki Kaniwa, Tohru Inoue, Jun Kanno

家庭用の蚊取線香、電気蚊取等に広く使用されているピレスロイド系殺虫剤の
共力剤である2,3,3,3,2',3',3',3'-Octachlorodipropyl ether (S-421) の
ラットを用いた28日間反復強制経口投与毒性試験

松島裕子[#], 内田雄幸, 齊藤 実, 川崎 靖, 伊佐間和郎, 鹿庭正昭, 井上 達, 菅野 純

Twenty-Eight Day Repeated Dose Oral Toxicity Test of Synergist of a pyrethroid insecticide,
2,3,3,3,2',3',3',3'-Octachlorodipropyl ether (S-421) in Rats

Yuko Matsushima[#], Osayuki Uchida, Minoru Saitoh, Yasushi Kawasaki, Kazuo Isama, Masaaki Kaniwa, Tohru Inoue, Jun Kanno

2,3,3,3,2',3',3',3'-Octachlorodipropyl ether (Abbreviation ; S-421) is originally developed as synergist of a pyrethroid insecticide. In recent years, S-421 is used widely at home, for a mosquito-repellent incense, electric mosquito-repellent, an insect-killing spray, a vacuum cleaner paper pack, etc. as well.

On the other hand, S-421 has been detected in vacuum cleaner dust samples as well as human milk samples in Japan indicating that our living environment is already contaminated by this compound. Long term toxicity studies including a carcinogenesis study have been performed and NOEL of chronic toxicity has been settled. However, it is clear that S-421 is used in close proximity so that acute or subacute exposure at relatively higher dose levels than chronic NOEL values are easily assumed, such as use of a spray in an ill-ventilated room, etc.

This study, 28 day repeated oral dose toxicity study of S-421 was performed to monitor the outcome of acute and subacute exposure assuming possible exposure accidents mentioned above. The protocol is as follows; Groups of 10 rats of each sex(5 week-old), were treated with intragastric administration of S-421 with a dose of 0 (olive oil, control), 10, 40, 160 or 640mg/kg body weight. For recovery test, 14 day after the last treatment, the control and 640mg/kg groups were examined, respectively.

All animals of all groups in both sexes survived. In the 640mg/kg groups of the both sexes, all animals were set to drowsiness from about 5 hours after administration, however, they recovered by the next morning. In the hematology examination, Hb, MCH, MCHC, WBC values were significantly decreased and MCV value was significant increased in the 640mg/kg group of both sexes. In the serum biochemistry, items increased in the 640mg/kg groups of both sexes returned to normal level after 14 days recovery period. Absolute and relative liver weight increase seen in the 160mg/kg and above also returned to control level after recovery. Histopathologically, slight hepatocellular swelling was observed in the 160mg/kg groups and severe hepatocellular swelling with vacuolization and slight necrosis was seen in the 640mg/kg group.

In conclusion, the no-observed-effect levels (NOEL) of S-421 under these conditions, was judged to be 40mg/kg/day.

Key Words: a twenty-eight-day repeated oral dose toxicity test, rat, S-421, pyrethroid, insecticides, hepatotoxicity

はじめに

家庭用品の中には、さまざまな化学物質をそのまま又は希釈・混合して製品化した製品があり、これらの製品を総称して「家庭用化学製品」と呼んでいる。これらの製品は、現在では、私たちの日常生活のいろいろな場

で活用され、暮らしの中で欠くことのできないものとなっている。

一方、化学物質は、多かれ少なかれ人体に対して何らかの作用をもたらす側面を有しており、その利用法によっては思わぬ健康被害を引き起こすおそれがある。このため、国立衛研においては、「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律（家庭用品規制法）」に基づき、家庭用品の安全性を点検するために生物試験等を継続して行っており、ここ数年は、近年需要の伸びてきた防菌・防かび・殺虫剤等を主体として毒性試験を実施してきている。

[#]To whom correspondence should be addressed:

Yuko Matsushima; Division of Cellular & Molecular Toxicology,
National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya,
Tokyo 158-8501, Japan; Tel:03-3700-9672; Fax:03-3700-9647;
E-mail: matsushi@nihs.go.jp

今回検討した2, 3, 3, 3, 2', 3', 3', 3'-Octachlorodipropyl ether (以下S-421) は、ピレスロイド系殺虫剤の効果を増強する共力剤として主剤に対して2~10倍量添加され、近年家庭用の蚊取線香、電気蚊取、殺虫スプレー、衣料用防虫剤(樟脳)、カーペット、電気掃除機用紙パック等に繁用されている。更に、塵性ダニ、白アリに対して忌避、防虫効果を有することから、住宅用白アリ駆除剤として繁用されている¹⁾。

S-421の汚染状況に関しては、調査母乳の半数以上から検出され^{2, 3)}、更に、一般家庭の屋内汚染調査として電気掃除機中の集塵袋内容物を分析した結果、全試料から0.01~3.9 ppmの範囲で検出され⁴⁾、一般家庭においても広範囲な屋内汚染が進行していることが判明し、更にS-421は長期間残留することが確認された¹⁾。このような状況から、S-421がヒトにどのような毒性作用があるのか注目されてきている。

S-421の毒性に関するこれまでの知見としては、遺伝子突然変異誘発性は直接法TA1535、代謝活性法TA100およびTA1535が陽性、染色体異常誘発性は直接法および代謝活性化法ともに陰性との報告⁵⁾がある。LD₅₀値は、ラット単回経口投与で雌雄共に2800 mg/kgであった。関田らのラットを用いた3ヶ月亜慢性毒性試験では、肝臓および腎臓の重量増加がみられ、病理組織学的検査で肝細胞の空胞化あるいは肥大が認められている⁶⁾。慢性毒性・がん原性試験では、投与に起因する腫瘍の発生はみられず、最大無作用量(NOEL)は120 ppmと報告されている⁷⁾。

今回我々は、家庭用品に使用される化学物質の評価研究の一環として、すでに得られている慢性暴露における毒性情報に加えて、S-421の製造過程、散布現場での事故、家庭内にあつては誤飲や殺虫剤の多量散布等で生ずる害作用を推定し、単回投与致死量あるいは比較的多量に持続的に摂取した場合に生ずる害作用およびその回復を検討し、安全量の目安を得ることをことを目的とし、単回投与及び28日間反復投与を実施した。

試験材料および方法

1. 被験物質^{1, 8)}

化学名; Ether, bis(2,3,3,3-tetrachloropropyl)

一般名; 2, 3, 3, 3, 2', 3', 3', 3'-Octachlorodipropyl ether, Bis(2, 3, 3, 3, -tetrachloropropyl)ether

商品名; S-421

分子式; C₆H₆Cl₈O

化学構造式; CCl₃-CHCl-CH₂-O-CH₂-CHCl-CCl₃

分子量; 377.74

CAS No.: 127-90-2

純度; 98.5% (化学分析法)

溶解性; 水に難溶、油脂に良く溶ける

性状; わずかな特異臭を有する無色あるいは淡黄色透明の液体

入手先; 三共化成工業(株)

2. 予備試験・投与方法・試料調整および安定性

予備試験の投与用量は、LD₅₀値の半分の量から徐々に落とし、各群4匹に15日間反復強制経口投与をおこなった。その結果、体重の変化は、800 mg/kg以上の群で顕著な増加抑制がみられたが、600 mg/kg群は対照群と変わらなかったことから、本試験は、公比4で0(オリーブ油、対照群)、10, 40, 160および640 mg/kg B.W.の5群を設定した。更に、0および640 mg/kg群には14日間休業による回復群を設けた。

投与方法は、5 ml/kg体重の容量となるようS-421をオリーブ油に溶解し、テフロン経口ゾンデを用いて、1日1回、28日間強制経口投与した。

調製被験物質の安定性の検討は、640 mg/kg(12.8w/v%)試料溶液について、調製当日のものと同様に薬用冷蔵庫内あるいは室温暗所に1週間保存したものをヘキサンで1000倍に希釈し、ガスクロマトグラフィーにて解析・定量した。その結果、どの条件下でも100%であることが確認された。

3. 動物・群分け・飼育環境

4週齢の雌雄Wistarラット(日本エスエルシー・株)各73匹の動物を購入し、1週間の馴化飼育後、5週齢で試験を開始した。動物の群分けは、ノルム値法により群分けした。

試験は、温度24±1℃、湿度55±5%、換気回数18回/時(オールフレッシュ)、照明12時間(5時~17時)に設定されたバリア方式の動物室で実施した。動物は、アルミ製金網ケージで5匹ずつ集団飼育し、F-2固型飼料(船橋農場・株)および水道水を自由に摂取させた。

4. 検査項目

一般状態および死亡の有無は毎日観察し、体重は3日毎に測定した。尿検査は雄は投与25日目、雌は24日目の投与直後に尿検査用試験紙を用いて行った。

動物は、採血に先立って16時間絶食し、エーテル麻酔下にて血液学的検査と血清生化学検査用の動物は眼窩静脈より、血液凝固能検査用の動物は頸静脈より採血した。血液採取後、動物は、エーテル麻酔下で、頸動脈切断により放血致死させ、全臓器に対して剖検し、臓器を採取後重量を測定した。

血液学的検査はRBC, HB, PCV, MCV, MCH, MCHC, Plt, WBCについて多項目自動血球計数装置で、白血球百分比はEDTA中に血液を滴下し遠心塗抹装置を用いてスライドグラスに塗抹後、ライト染色を施し血液

細胞自動分析装置で、血液凝固能検査は、クエン酸ナトリウム液を入れた注射筒で採取した血液を遠心分離し、PTとAPTTを血液凝固能測定装置で、血清生化学検査は採取した血液を遠心分離し、血清をTable 1に示す項目について臨床生化学自動分析装置で測定した。

病理組織学的検査は、臓器を10%ホルマリン溶液で固定し、常法に従いパラフィン切片を作製し、H-E染色を行い、鏡検した。

5. 統計学的解析法

体重、飼料摂取量、尿検査、血液学的検査、血清生化学検査、血液凝固能検査および臓器重量の結果は、各群の分散比をBartlettの方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不等分散の場合はKruskal-Wallisの方法により検定した。群間に有意差が認められた場合の多重比較は、例数が等しければDunnett型で、また例数が異なればScheffe型でそれぞれ対照群と各投与群間との有意差検定を行った。回復試験の体重、飼料摂取量、血液学的検査、血清生化学検査、血液凝固能検査および臓器重量の結果はt検定を行った。尿検査の結果は、Pitman検定を行なった。

結 果

- ①一般状態と死亡の有無；雌雄全群とも試験終了時まで生存した。一般状態は、雌雄共に640 mg/kg群は、投与後約5時間から傾眠状態となったが、翌朝には回復した。
- ②体重の変化；雄の640 mg/kg群は投与期間後半に有意な体重増加抑制がみられ、休薬により回復しなかった。雌の640 mg/kg群は投与期間中は対照群と変わらなかったが、休薬期間中有意な増加抑制がみられた。
- ③尿検査；雄160 mg/kg以上の群でケトン体が有意に増加し、雌は、640 mg/kg群で蛋白とケトン体が有意に増加したが、休薬により回復した。
- ④血液学的検査；雌雄640 mg/kg群でHb, MCHおよびMCHCが有意に減少した。同群で白血球数の減少がみられたが休薬により回復した。
- ⑤白血球百分比；雌の640 mg/kg群でリンパ球が有意に増加したが、休薬により回復した。
- ⑥血液凝固能検査；雌雄共に全群において変化はみられなかった。
- ⑦血清生化学検査 (Table 1a, 1b)；雌雄共に、主に肝臓に関連する項目の上昇がみられたが、休薬によりほぼ回復した。
- ⑧臓器重量 (Table 2a, 2b)；雄は、160 mg/kg以上の群で肝臓および腎臓の重量が増加した。肝臓は休薬により回復したが、腎臓の相対重量は回復しなかった。雌は、160mg/kg以上の群で肝臓および腎臓の重量が増加し、

休薬により回復しなかった。

⑨病理学的所見 (Table 3)；雌雄10および40 mg/kg群は、被験物質に起因する所見はみられなかった。雌雄共に160 mg/kg群で肝細胞の軽度肥大および小壊死巣、640 mg/kg群で肝細胞の肥大、細胞質空胞変性、肝細胞壊死および核の大小不同がみられたが、休薬により回復した。

考 察

肝臓重量が雌雄共に160 mg/kg以上の群で用量依存的に顕著に増加した。これらの動物の病理組織学的検査で局所性壊死、肝細胞の肥大、空胞変性等がみられた。同群の血清生化学検査では肝実質細胞障害のマーカーとして用いられる γ -GTおよびALT値に軽度な増加がみられ病理学的所見と血清生化学値がよく対応した。一方、これらの結果より、S-421を一生涯摂取し続けることによる肝機能障害の誘発が危惧されたが、ラットを用いた2年間の慢性毒性試験でそのような所見はみられなかったとの報告がある⁷⁾。

血清生化学検査で最も変動の大きかった項目は、脂質関係であり、TG値は対照群と同じであったが、TCho値は雌雄160 mg/kg以上の群で、PL値は雌雄640 mg/kg群で有意な増加がみられたことから、S-421投与により高脂血症が誘発される可能性がある。

雌雄共に160 mg/kg以上の群で腎臓の絶対および相対重量が用量依存的に増加したが、これを反映する血清生化学、病理組織学的所見はみられなかった。

血液学的検査で赤血球数は、雌雄共に対照群と投与群で差はみられなかったが、Hb, MCH, MCHCの軽度減少、MCVの軽度上昇より大球性低色素性貧血の傾向がみられた。

雌雄640 mg/kg群で白血球数の有意な減少がみられたが、白血球百分比からは減少した細胞を特定できず白血球全体が減少したものと考えられるが原因は不明である。

今回実施した28日間反復経口投与毒性試験のNOELは、肝臓および腎臓の臓器重量が雌雄ともに160 mg/kg以上の群で増加し、病理組織学的検査では同群で肝細胞の軽度肥大および小壊死巣がみられたのに対して、40 mg/kg/day以下の群では体重、臓器重量、血液学的検査、血清生化学検査、病理組織学的所見等すべての検査項目に変化はみられなかった事より、本条件下におけるNOELは雌雄ともに40 mg/kg/dayと考えられた。

ピレスロイド系の共力剤の一つであるピペロニルブトキサイドは、ラットに肝癌を発生させることが報告⁴⁾されている。一方、S-421は2年間の慢性毒性試験では、検体に起因する腫瘍の発生および重篤な器質変化はみられておらず⁷⁾、ピペロニルブトキサイドの代替えとして適切であると考えられる。

Table 1a Serum chemistry in male rats treated with S-421 for 28 days and 14 days recovery period

Group (mg/kg)	28 days dosing test						14 days recovery test							
	0		10		40		160		640		0		640	
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
Effective No.														
TP	6.04±0.12	6.14±0.08	6.08±0.08	6.27±0.17	6.55±0.20**	6.43±0.03	6.55±0.20**	6.27±0.17	6.55±0.20**	6.43±0.03	6.50±0.13			
Alb	4.19±0.09	4.29±0.12	4.27±0.14	4.33±0.16	4.42±0.14	4.40±0.13	4.42±0.14	4.33±0.16	4.42±0.14	4.40±0.13	4.27±0.10			
A/G	2.28±0.07	2.32±0.18	2.38±0.23	2.24±0.14	2.08±0.12	2.17±0.22	2.08±0.12	2.24±0.14	2.08±0.12	2.17±0.22	1.93±0.13			
BUN	9.7±0.5	9.9±0.4	9.8±0.9	10.2±0.8	10.1±0.4	12.4±0.7	10.1±0.4	10.2±0.8	10.1±0.4	12.4±0.7	13.8±1.4			
CRN	0.27±0.02	0.25±0.02	0.22±0.02**	0.26±0.02	0.23±0.01*	0.23±0.02	0.23±0.01*	0.26±0.02	0.23±0.01*	0.23±0.02	0.22±0.02			
UA	0.69±0.11	0.65±0.14	0.69±0.12	0.77±0.18	0.93±0.21	0.51±0.15	0.93±0.21	0.77±0.18	0.93±0.21	0.51±0.15	0.66±0.06			
Glc	126±9	125±6	124±5	105±12**	85±12**	121±6	85±12**	105±12**	85±12**	121±6	112±9			
PL	106±8	116±5	118±5	118±7	197±23**	115±5	197±23**	118±7	197±23**	115±5	113±9			
TG	83±11	135±25*	118±28	76±19	60±32	158±27	60±32	76±19	60±32	158±27	60±12**			
TCho	49±3	52±4	52±4	58±3*	117±15**	51±6	117±15**	58±3*	117±15**	51±6	60±9			
TBil	0.03±0.01	0.04±0.01	0.03±0.00	0.03±0.00	0.06±0.00	0.04±0.00	0.06±0.00	0.03±0.00	0.06±0.00	0.04±0.00	0.05±0.01			
AlP	357±32	393±34	348±23	335±36	305±9*	247±8	305±9*	335±36	305±9*	247±8	259±26			
AlT	41±10	35±5	39±10	35±6	61±13*	41±9	61±13*	35±6	61±13*	41±9	54±11			
Amy	6964±264	7120±129	7321±450	6421±370	6798±501	6661±299	6798±501	6421±370	6798±501	6661±299	5068±381**			
AsT	66±4	63±4	64±2	67±6	69±6	68±4	69±6	67±6	69±6	68±4	71±5			
ChE	171±16	167±20	155±8	178±11	216±21**	167±17	216±21**	178±11	216±21**	167±17	175±15			
γ-GT	1.04±0.16	0.98±0.34	0.90±0.32	0.97±0.21	7.57±2.17	0.15±0.14	7.57±2.17	0.97±0.21	7.57±2.17	0.15±0.14	0.23±0.15			
LPO	0.02±0.02	0.01±0.00	0.03±0.03	0.06±0.08	0.18±0.07**	0.00±0.00	0.18±0.07**	0.06±0.08	0.18±0.07**	0.00±0.00	0.00±0.00			
LAP	46±2	45±2	44±2	46±2	59±5**	45±2	59±5**	46±2	59±5**	45±2	45±3			
LDH	330±55	374±143	396±125	477±314	531±197	372±187	531±197	477±314	531±197	372±187	380±86			
Fe	129±45	131±105	137±77	80±13	88±51	113±49	88±51	80±13	88±51	113±49	88±8			
Cu	140±11	135±13	141±10	150±6	175±19**	123±9	175±19**	150±6	175±19**	123±9	137±9*			
Ca	9.6±0.2	9.7±0.2	9.6±0.3	9.6±0.3	9.5±0.2	10.0±0.2	9.5±0.2	9.6±0.3	9.5±0.2	10.0±0.2	10.1±0.2			
NS	1.82±0.15	1.76±0.08	1.80±0.15	1.87±0.13	2.02±0.09	1.84±0.11	2.02±0.09	1.87±0.13	2.02±0.09	1.84±0.11	1.89±0.11			
P	7.6±0.3	7.5±0.2	7.4±0.5	7.9±0.2	8.7±0.4**	7.1±0.2	8.7±0.4**	7.9±0.2	8.7±0.4**	7.1±0.2	7.7±0.3*			
Na	136±1	136±0	137±1	137±1	136±0	137±1	136±0	137±1	136±0	137±1	136±1			
K	4.6±0.4	4.5±0.3	4.4±0.2	4.6±0.4	4.4±0.4	4.4±0.2	4.4±0.4	4.6±0.4	4.4±0.4	4.4±0.2	4.4±0.3			
Cl	101±1	101±1	102±1	101±1	103±1*	100±1	103±1*	101±1	103±1*	100±1	100±1			

Values represent mean ± S.D..

* and ** show significant difference from the control at p<0.05 and p<0.01, respectively.

Table 1b Serum chemistry in female rats treated with S-421 for 28 days and 14 days recovery period

Group (mg/kg)	28 days dosing test					14 days recovery test				
	0	10	40	160	640	0	640	160	640	640
Effective No.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
TP	6.00±0.17	6.07±0.13	6.13±0.29	6.49±0.09**	6.92±0.16**	6.48±0.11	6.76±0.25			
Alb	4.31±0.11	4.33±0.10	4.43±0.33	4.54±0.05	4.84±0.06**	4.38±0.11	4.66±0.14**			
A/G	2.56±0.15	2.50±0.16	2.62±0.36	2.34±0.19	2.33±0.14	2.08±0.09	2.24±0.19			
BUN	11.4±1.1	10.4±0.9	11.1±1.4	9.8±0.5	9.1±1.6*	12.1±0.9	13.9±0.9*			
CRN	0.20±0.03	0.19±0.02	0.16±0.03	0.16±0.02	0.18±0.02	0.22±0.03	0.16±0.02*			
UA	0.51±0.19	0.55±0.22	0.48±0.20	0.68±0.19	0.83±0.11*	0.48±0.07	0.64±0.17			
Glc	111±11	108±16	104±6	104±11	83±8**	111±13	113±11			
PL	140±10	137±8	152±18	220±13	306±47**	176±26	205±14			
TG	39±30	35±21	35±20	60±52	39±13	49±25	87±21*			
TCho	80±11	79±3	89±11	143±8*	215±34**	99±16	126±8*			
TBil	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.00	0.04±0.01	0.07±0.01**	0.07±0.01	0.06±0.01			
AlP	264±43	242±34	221±26	204±33	221±16	161±20	158±24			
AlT	35±6	32±5	32±4	31±5	45±7*	34±4	32±5			
Amy	3505±768	3334±522	3258±740	4740±1431	5744±248*	3383±954	3557±605			
AsT	70±6	64±2	64±8	59±7	66±9	65±4	66±9			
ChE	1464±232	1557±173	1371±294	962±114**	397±54**	1893±71	966±36**			
γ-GT	0.21±0.40	0.02±0.03	0.02±0.01	0.37±0.36	24.66±8.32*	0.36±0.13	1.14±0.23**			
LP0	0.03±0.05	0.02±0.03	0.04±0.07	0.08±0.15	0.06±0.06	0.00±0.00	0.00±0.00			
LAP	49±3	47±3	46±3	49±5	53±2	46±3	45±5			
LDH	658±656	380±246	326±240	407±315	559±478	390±111	472±185			
Fe	183±8	187±24	237±78	116±31	48±19*	297±88	214±74			
Cu	189±9	195±7	203±15	215±26	177±17	207±13	214±23			
Ca	9.2±0.1	9.2±0.1	9.4±0.2	9.5±0.2*	9.5±0.1*	10.0±0.3	10.2±0.2			
Ng	1.96±0.11	1.93±0.04	1.92±0.11	2.01±0.09	2.13±0.07*	1.97±0.05	2.09±0.07*			
P	6.5±0.4	6.3±0.4	7.0±0.7	6.8±0.8	7.5±0.2*	5.8±0.6	6.7±0.3*			
Na	137±1	138±0	138±1	138±1	137±1	135±1	136±2			
K	4.5±0.4	4.3±0.4	4.2±0.5	4.4±0.2	4.4±0.3	3.9±0.2	4.1±0.3			
Cl	101±1	101±2	102±2	102±2	102±2	102±1	101±2			

Values represent mean ± S.D..

* and ** show significant difference from the control at p<0.05 and p<0.01, respectively.