

平成 11 年度厚生科学研究
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
及び動態解析

酵母 Two-Hybrid 法を用いた高分子素材等の
生活関連製品由来化学物質の内分泌かく乱作用の評価

主任研究者：中澤裕之

星薬科大学薬品分析学教室

分担研究者：藤島弘道

長野県衛生公害研究所

研究協力者：織田 肇、堀 伸二郎、高取 聡

大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

酵母 Two-Hybrid 法を用い、ビスフェノール A、フタル酸エステル類及びノニルフェノールをはじめとする生活関連製品に由来する化学物質のエストロジェン様作用を評価した。パラベン (*p*-ヒドロキシ安息香酸エステル類)、*p*-アルキルフェノール類、ビスフェノール A、フタル酸ベンジルブチル及びフタル酸ジプロピルにエストロジェン様作用が認められた。その他の可塑剤のフタル酸エステル類及びアジピン酸エステル類ではエストロジェン様作用は認められなかった。また、酵母 Two-Hybrid 法に S9 mix 処理過程を組み込むことができることを示した。スチレンダイマー、一部のトリマー、ベンゾフェノン及びビフェニルの S9 mix による代謝産物にエストロジェン様作用が認められた。

A. 研究目的

食器、玩具及び医療器具等の生活関連製品からビスフェノール A、フタル酸エステル類及びノニルフェノールをはじめとする内分泌かく乱作用の疑われる化学物質が溶出していることが指摘されている。これら化学物質について内分泌かく乱作用という新たな観点からの安全性の評価が求められている。我々は、酵母 Two-Hybrid 法を運用し、これ

ら化学物質のエストロジェン様作用について評価した。

また、過去の化学発癌の研究に示されるように化学物質による生体への影響を考えるに際し、その代謝産物の作用を無視することはできない。我々は、酵母 Two-Hybrid 法の操作過程に S9 mix 処理過程を組み込み、代謝産物を含めた化学物質のエストロジェ

ン様作用の評価も併せて試みた。

B. 研究方法

B-1. エストロジェンアッセイ

ER-GAL4DBD (Estrogen receptor α - GAL4 DNA binding domain fusion protein) と TIFII-GAL4AD (TIFII-GAL4 activation domain fusion protein) とを発現させた酵母を前培養した。これを $OD_{590} = 0.15$ 前後に SD 培地で希釈し、酵母懸濁液とした。DMSO に溶解した被検化学物質を添加し、4 時間、30 °C でインキュベーションを行った。インキュベーション後、酵母を冷 Z-buffer で洗浄し、 OD_{590} を測定した。1 mg/ml となるようにザイモリエースを加え、37 °C、15 分間のインキュベーションを行った。0.67 mg/ml となるように *o*-ニトロフェニルガラクトピラノシド溶液を加え、30 °C、30 分間のインキュベーションを行った。 OD_{410} 及び OD_{570} を測定し、Miller の式に基づき、生成した β -ガラクトシダーゼ活性を算出した。この酵素活性を被検化学物質のエストロジェン様作用の指標とした。各被検化学物質の酵母に対する毒性は作用前後の OD_{590} を測定することにより判断した。

Miller の式：

$$U = 1000 \times ([OD_{410}] - 1.75 \times [OD_{570}]) / ([t] \times [v] \times [OD_{595}])$$

U, 酵素活性; t, 反応時間 (分) ;

v, アッセイに使用した酵母懸濁液量 (ml)

B-2. S9 mix 処理

Cofactor I 溶液 (0.8 mM NADPH, 0.8 mM NADH, 1.0 mM G-6-P, 0.4u/ml G-6-P デヒドロゲナーゼ, 20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 , 6.6 mM KCl, 及び 1.6 mM $MgCl_2$) に 20 μ l/ml になるように ラット S9 を添加した。これに計画しているエストロジェンアッセイの 2 倍濃度になるように被検化学物質の DMSO 溶液を加え、37 °C、4 時間のインキュベーションを行った。対照には、加熱失活させた S9 を用いた。各実験時に S9 mix の活性の保証として 1.0×10^{-4} M の *trans*-スチルベンを用いた。酵素反応後、エストロジェンアッセイを行うまで -80 °C で保存した。

B-3. S9 mix 処理後のエストロジェンアッセイ

ER-GAL4DBD と TIFII-GAL4AD を発現させた酵母を常法に従い、前培養した。酵母を 2 倍濃度の SD 培地中に $OD_{595} = 0.30$ 前後になるように懸濁した。これと前述の S9 mix 処理溶液とを容量比 1 : 1 で混和し、30 °C、4 時間のインキュベーションを行った。以下、前述の方法によって酵母内の β -ガラクトシダーゼ活性を調べた。空試験を行った後の S9 mix と混和した SD 培地に 1.0×10^{-6} M の 17- β -エストラジオール (以下エストラジオール) を加え、30 °C で

4時間インキュベートした。このときに産生される β -ガラクトシダーゼ活性を100%としたとき、 1.0×10^{-4} M *trans*-スチルベンの S9 mix 代謝産物によって産生された酵素活性は、 $70 \pm 18\%$ であった。また、加熱失活させた S9 mix を用いた対照実験時では、*trans*-スチルベンの S9 mix 処理産物による酵素活性の産生は認められなかった。

B-4. 倫理面への配慮

本研究で使用した化学物質については、実験後の回収を徹底し、環境中への排出がなされないように努めた。

C. 研究結果

C-1. エストロジェンアッセイ

C-1-1. *p*-アルキルフェノール類

酵母を 1.0×10^{-6} M のエストラジオール存在下、 30°C で 4 時間インキュベートした際に産生される β -ガラクトシダーゼ活性を 100% としたとき、エストラジオールの 10% 作用濃度 (EC_{10}) は、 8.2×10^{-10} M であった (図 1)。アルキル基の主鎖長の異なる *p*-アルキルフェノール類においてエストロジェン様作用を検討した。アルキル基の主鎖長が 7 以下のアルキルフェノールにエストロジェン様作用が認められた (表 1)。一方、主鎖長が 8 以上の *p*-

オクチルフェノール、*p*-*n*-ノニルフェノール及び *p*-*n*-ドデシルフェノールには作用が認められなかった。

C-1-2. *p*-ヒドロキシ安息香酸エステル (パラベン) 類

p-ヒドロキシ安息香酸メチル、エチル、プロピル及びブチルにエストロジェン様作用が認められた (表 2)。そのエストロジェン様作用は、エストラジオールの約 $3.0 \times 10^5 \sim 6.0 \times 10^3$ 分の 1 であった。一方、*p*-ヒドロキシ安息香酸ベンジル、*p*-ヒドロキシ安息香酸塩及び安息香酸塩にはエストロジェン様作用が認められなかった。

C-1-3. フタル酸エステル類及びアジピン酸エステル類

酵母とのインキュベーション時間を 4 時間としたときフタル酸エステル類及びアジピン酸エステル類については、エストロジェン様作用が認められなかった (表 3)。次に酵母と被検化学物質とのインキュベーション時間を 24 時間に延長して検討した。エストラジオールの EC_{10} は、 3.7×10^{-10} M であった。このときフタル酸プロピル及びフタル酸ベンジルブチルにエストロジェン様作用が認められた。いずれも EC_{10} は、 1.0×10^{-3} M 以上となり、そのエストロジェン様作用は、エストラジオールの 10^6 分の 1 未満と見積られた。

C-1-4. その他の化学物質

C1-1～3. の範疇以外の化学物質としてビスフェノール A、ジフェニルカーボネート、ブチレーテイドヒドロキシアニソール、ブチレーテイドヒドロキシトルエン、*p*-ジクロロベンゼン、ペンタクロロフェノール、チロシン及びチラミンのエストロジェン様作用を検討した。ビスフェノール A にエストロジェン様作用が認められた(表 4)。

C-2. S9 mix 処理を含むエストロジェンアッセイ

C-2-1. S9 mix 処理の条件検討

S9 mix 処理によって生成する代謝産物がエストロジェン様活性を示すことが報告されている *trans*-スチルベン及びメトキシシクロルを用いて S9 mix 処理条件の検討を行った。1.0 x 10⁻⁴ M の *trans*-スチルベンまたはメトキシシクロルを 20 µl/ml の S9 を含む S9 mix で 2、4、6 及び 8 時間、37 °C で処理した。その結果、エストロジェン様活性は 4 時間でプラトーに達した。次に S9 量について検討した。同じく 1.0 x 10⁻⁴ M の *trans*-スチルベンまたはメトキシシクロルを 2、5、10、20 及び 40 µl/ml の S9 を含む S9 mix で 4 時間、37 °C で処理した。その結果、エストロジェン様活性は 20 µl/ml でプラトーに達した。以上の結果より化学物質の S9 mix 処理条件は、20 µl/ml の S9 を含む S9 mix 中、37 °C で 4 時間

処理することとした。また、加熱失活させた S9 mix を用いた対照実験時では、*trans*-スチルベンの S9 mix 処理産物による酵素活性の産生は認められなかった。本条件下、1.0 x 10⁻⁴ M の *trans*-スチルベンまたはメトキシシクロルを S9 mix 処理し、酵母に 4 時間作用させたときのエストロジェン様作用は、1.0 x 10⁻⁶ M のエストラジオール作用時を 100% としたとき、それぞれ 70±18% 及び 62±5.9% であった。(図 2)。これにより酵母 Two-Hybrid 法に S9 mix 処理過程を組み込むことができることが判った。

C-2-2. エストロジェンアッセイ (S9 mix 代謝産物)

フェノール性水酸基を持たず、ベンゼン環を有する化学物質としてスチレン、スチレンダイマー (1,2-*trans*-ジフェニルシクロブタン、1,2-*cis*-ジフェニルシクロブタン、1,3-ジフェニルプロパン及び 2,4-ジフェニル-1-ブテン)、及びスチレントリマー (2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン、1*a*-フェニル-4*a*-(1-フェニルエチル)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン及び 1,3,5-トリフェニルシクロヘキサン)、ベンゾフェノン及びビフェニルの S9 mix 代謝産物のエストロジェン活性について検討した。その結果、全てのスチレンダイマー、2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン、ベンゾフェノン及びビフェニルの S9 mix 代謝産物にエストロジェン様作用が認められた(表 5)。

D. 考察

パラベン類、アルキルフェノール類及びビスフェノール A にエストロジェン様作用が認められた。これら化学物質の共通する構造として分子内にフェノール残基を有し、そのフェノール性水酸基の *p* 位に低極性の置換基が配されている。共通するこれらの構造がエストロジェン受容体に対するリガンドとしての結合、並びに受容体がコアクチベーターと結合するうえで有効なコンフォメーションへと変換することに重要な役割を果たしていると考えられた。

アルキル基の主鎖長の異なるアルキルフェノール類についてエストロジェン様作用を検討した結果、アルキルフェノール類のエストロジェン様作用の強弱は、アルキル基の鎖長に大きく影響されることが判った。直鎖アルキル基の場合、鎖長が 5 の *p-n*-ペンチルフェノールに最も強いエストロジェン様作用が認められた。これよりも鎖長が短く、または長くなってもエストロジェン様作用は弱くなり、鎖長が 8 以上になるとエストロジェン様作用は認められなかった。エストラジオールの A 環にアルキルフェノールのフェノール残基を重ね合わせたとき、アルキル基の鎖長が 5 のときエストラジオールの構造に重なる部分が最も多くなる。これによって最も強い活性を示したと考えられた。主鎖長が 5 より長くなるにつれてエストラジオールの構造から突出する状態となり、化学物質

がリガンドとして結合するうえで支障を生じてエストロジェン様作用が弱くなったと推察された。最も強いエストロジェン様作用を示した *p-br*-ノニルフェノールについての組成は不明であるが、4-(1,1,3,3-テトラメチル)ブチルフェノール (*p-tert*-オクチルフェノール) に類似した枝鎖を持つ置換基を有する化学物質が主成分と推察される。ノニルフェノール等のアルキルフェノール類は、環境中に広く存在していることが明らかにされている。また、ノニルフェノールについては、日常的に用いられるプラスチック容器中にも残存していることや臍帯中からの検出例の報告がある。アルキルフェノール類のエストロジェン様作用は、他のエストロジェン様作用を示す化学物質と比較して強力であることから、これら化学物質の人体への暴露実態をより詳細に検討していくことが重要であると考えられる。

パラベン類についてもフェノール性水酸基の *p* 位にある置換基の構造がエストロジェン様作用に影響を与えていると考えられた。アルキルフェノール類と同様にメチル、エチル、プロピル、そしてブチルエステルの順でエストラジオールの構造に対する類似性及び官能基の疎水性が向上することによってエストロジェン様作用が強くなった。また、ベンジルエステルではエストロジェン様作用は認められなかったが、これは置換基のかさ高さによるものと考えられる。パラベン類の主要代謝産物である *p*-ヒドロキシ安息香酸にエ

エストロゲン様作用は認められなかった。これはフェノール性水酸基の *p* 位にある置換基の極性が高いことに由来すると考えられる。パラベン類については、生体内において速やかにエストロゲン様作用のない化学物質に代謝されると考えられる。しかし、日常生活品を介して比較的多量に摂取されていることから、日常的状況に即した暴露を受けた場合の生体内での消長や胎児への移行等について調査及び研究をすることは重要であると考えられる。

フタル酸ジプロピル及びフタル酸ベンジルブチルにエストロゲン様作用が認められた。これらの化学物質のエストロゲン様作用は、エストラジオールの 10^6 分の 1 未満と弱い活性であった。その他フタル酸エステル類には、エストロゲン様作用は認められなかった。フタル酸エステル類は、分子内にフェノール性水酸基がないことによってリガンドとしての結合能力とコンフォメーションの変換能力が弱いと考えられる。Harris らは、酵母を用いたレポーター遺伝子アッセイによってフタル酸ジエチル、フタル酸ジブチル及びフタル酸ジトリデシルについても、エストロゲン様作用があることが報告している (Harris, C. A. *et al.*, *Environ. Health Perspect.*, **105**, 802-811, 1997)。それら化学物質のエストロゲン様作用は、エストラジオールの $10^6 \sim 10^7$ 分の 1 と弱い活性である。Harris らの酵母のアッセイシステムでは被検化学物質とのインキュベーション時間が 4~6

日間であり、本酵母 Two-Hybrid 法の 4 時間よりも長い。このことによって酵母 Two-Hybrid 法では、検出されない弱いエストロゲン様作用を検出していると推察される。フタル酸エステル類については、動物実験で精子の運動性の低下、精囊の萎縮及び精子数の減少を引き起こすことが報告されている。これらの生体への影響が、フタル酸エステル類のエストロゲン様作用によるものかは更なる検討の余地があると思われる。フタル酸エステル類は、日常の生活関連製品に多く含まれている。フタル酸エステル類の人体への暴露実態を明らかにするとともにアンドロゲン及び甲状腺ホルモンに対する影響についても解析していく必要がある。

アジピン酸エステル類については、分子内にベンゼン環を持たず、その構造にエストラジオールとの類似性を見いだすことはできない。アジピン酸エステル類は、エストロゲン受容体のリガンドとしての結合能力及びコンフォメーションの変換能力を持たないと考えられた。

化学物質の内分泌かく乱作用について検討するに際してその代謝産物の内分泌かく乱作用を検討することは不可欠である。ベンゼン環を有する化学物質においては代謝過程で水酸基が導入され、フェノール残基が生成される可能性がある。すなわち前述の研究結果から判断すると、代謝によって新たにエストロゲン様作用を発揮する化学物質が生成することが考えられる。

検討した全てのスチレンダイマー及び 2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセンの S9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められた。これら化学物質が有するベンゼン環に水酸基が導入され、フェノール残基が生成したと考えられる。一部のスチレンダイマー及びトリマーがポリスチレン製品中に残存し、2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセンを含む数種のスチレントリマーが溶出して食品中に移行していることが河村らによって報告されている (河村ら, 食衛誌, 39, 390-398, 1998)。1*a*-フェニル-4*a*-(1-フェニルエチル)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン及び 1,3,5-トリフェニルシクロヘキサンについては、S9 による代謝を受けなかった、もしくは代謝産物自体にエストロゲン様作用がなかったと考えられる。1-フェニル-4-(1-フェニルエチル)-1,2,3,4-テトラヒドロナフタレンについては他に 3 種類の異性体が存在する。これらについては、今後、検討していく予定である。

ベンゾフェノン及びビフェニルの S9 mix 代謝産物についてもエストロゲン様作用が認められた。スチレンダイマー等と同様に化学物質が有するベンゼン環に水酸基が導入され、フェノール残基が生成したと考えられる。ベンゾフェノンは、紫外線吸収剤としてサンスクリーンに配合され皮膚に直接塗布される。また、ビフェニルは食品添加物としての使用実績がある。これらについても人を含む生物への暴露の実態、そして生体内に取り込まれたこれら化学物質の代謝、分布及び排泄過程を検

討する必要があると思われる。

スチレンダイマー、2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン、ベンゾフェノン及びビフェニルの S9 mix 代謝産物についてエストロゲン様作用が認められたことからベンゼン環を 2、ないしは 3 つ有する化学物質についてエストロゲン様作用を重点的に検討していく必要があると思われる。また、これらの結果は、化学物質のエストロゲン様作用の評価は、化学物質自体を評価したのみでは不十分であり、代謝産物も含めて評価する必要性があることを強く示唆した結果である。本研究を通じて酵母 Two-Hybrid 法は化学物質自体のみならず、その代謝産物の内分泌かく乱作用を検討するうえで有用であることが示唆された。

E. 結論

1. アルキルフェノール類にエストロゲン様作用が認められた。また、アルキル基の主鎖長とエストロゲン様作用の強度との間に関連性が認められ、アルキル基の主鎖長が 5 のとき最も強い作用を発揮した。これは、エストラジオールの構造に最も類似することによって由来すると推察された。
2. パラベン類にエストロゲン様作用が認められた。パラベン類の主要代謝産物である *p*-ヒドロキシ安息香酸塩にはエストロゲン様作用が認められなかった。

3. フタル酸エステル類及びアジピン酸エステル類については、エストロジェン様作用が認められなかった。フタル酸プロピル及びフタル酸ベンジルブチルについては、酵母とのインキュベーション時間を 24 時間に延長することによって弱いエストロジェン様作用が認められた。フタル酸エステル類については動物に対する生殖毒性が報告されていることからエストロジェンに加えてアンドロジェン及び甲状腺ホルモンに対する影響についても解析していく必要があると考えられた。

4. ビスフェノール A にエストロジェン様作用が認められた。ジフェニルカーボネート、ブチレーティドヒドロキシアニソール (BHA)、ブチレーティドヒドロキシトルエン (BHT)、*p*-ジクロロベンゼン、ペンタクロロフェノール、チロシン及びチラミンにエストロジェン様作用が認められなかった。

5. 酵母 Two-Hybrid 法は化学物質自体のみならずその代謝産物の内分泌かく乱作用を検討するうえで有用であることが判った。

6. スチレンダイマー (1,2-*trans*-ジフェニルシクロブタン、1,2-*cis*-ジフェニルシ

クロブタン、1,3-ジフェニルプロパン及び 2,4-ジフェニル-1-ブテン)、2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン、ベンゾフェノン及びビフェニルの S9 mix 代謝産物にエストロジェン様作用が認められた。

7. 化学物質のエストロジェン様作用の評価は、化学物質自体を評価したのみでは不十分であり、代謝産物も含めて評価する必要があることが示唆された。

F. 研究業績

学会発表

1. 酵母 Two-Hybrid 法を用いた農薬類の内分泌かく乱作用の検討
高取 聡、北川陽子、西川淳一、
西原 力、堀 伸二郎
日本食品衛生学会第 77 回学術講演会、
1999 年 5 月、東京