

平成 12 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スチレンモノマー，ダイマー，
トリマー，フタル酸エステル，及びアルキルフェノールの阻害効果

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

環境由来の化学物質の内因性ステロイドホルモン産生（steroidogenesis）に及ぼす影響を
解明する目的で，ヒト副腎由来の H295R 細胞を用いてコルチゾール産生に及ぼす環境化学物
質の影響を評価するアッセイ法を確立した．このアッセイ系を用いて高分子を素材とした生
活関連製品から溶出が疑われており，内分泌かく乱化学物質としてリストアップされている
スチレンモノマー，ダイマー，トリマー，フタル酸エステル，及びアルキルフェノール類の
影響を検討した．さらにステロイド産生を阻害することが認められたフタル酸ジシクロヘキ
シル，4-ノニルフェノールおよび 4-t-オクチルフェノール等についてその作用機序の検討を
行ったところ，これらの化学物質はコルチゾール合成を触媒する酵素のうち，特にチトクロ
ーム P450 モノオキシゲナーゼである P450sc_c，P450c₁₇ 及び P450c₂₁ を阻害することを明ら
かにした．

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質は「生体の恒常性，
生殖，発生，あるいは行動に關与する種々の
生体内ホルモンの合成，分泌，体内輸送，結
合，ホルモン作用，およびそのクリアランス
などの諸過程を阻害する性質を持つ外来性
の物質」（ホワイトハウスワークショップ，
1997年1月）と定義されており，もしこ
れら環境由来の内分泌かく乱化学物質の曝
露により内因性ホルモンの合成や分泌が阻
害された場合，正常な内分泌系がかく乱され
る可能性が考えられる．特にこれらの化学物
質が胎生期から新生仔期の限られた時期に
曝露されることで，ステロイドホルモン合成
が阻害された場合，生物における発生や生殖
において深刻な影響が表れることが懸念さ

れる．

本研究では，昨年度これら化学物質の生体
内ステロイドホルモン合成に及ぼす影響を解
明することに視点を置き，ヒト副腎由来の
H295R細胞を用いてin vitro で，ステロイド
ホルモン合成阻害を指標にした評価系を確立
した．

食品容器として多用されているポリスチレ
ン製品中に各種スチレンダイマーおよびスチ
レントリマーが存在することが報告されてい
る．またそれらポリスチレン製品から食品へ
のそれらのスチレンダイマー及びスチレント
リマーの移行の可能性が示唆されている．さ
らに，フタル酸エステル類はプラスチックの
可塑剤として多用されており4-ノニルフェ
ノール等は，酸化防止剤や界面活性剤等の分解

物として、プラスチック製品に残存する可能性が示唆される。これらの化学物質は内分泌かく乱化学物質としてリストアップされている。そこで本研究では、ステロイドホルモン合成阻害を指標にした評価系を用いて、スチレンモノマー、ダイマー、トリマー、フタル酸エステル、及びアルキルフェノール類のステロイドホルモン産生に及ぼす影響を検討することとした。

B. 研究方法

B-1. 実験材料及び試薬

styrene monomer, 2,4-diphenyl-1-butene, trans-1,2-diphenylcyclobutane, cis-1,2-diphenylcyclobutane, 1,3-diphenylpropane, 2,4,6-triphenyl-1-hexene, 1a-phenyl-4a-(1-phenylethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene, 1,3,5-triphenylcyclohexane, dibutyl cAMP, phthalic acid, 4-n-nonylphenol, 4-n-octylphenol, 4-t-octylphenol, 4-n-heptylphenol, 4-n-hexylphenol, 4-t-pentylphenol, 4-n-pentylphenol, 4-t-pentylphenol, 4-t-butylphenol, 2-t-butylphenol 及び 3-t-butylphenol は和光純薬工業より購入した。Butyl benzyl phthalate, di-n-butyl phthalate, dicyclohexyl phthalate, diethyl phthalate, diethylhexyl adipate, di(2-ethylhexyl)phthalate, di-n-hexyl phthalate, di-n-pentyl phthalate, dipropyl phthalate, 4-n-butylphenol, 4-nonylphenol および 4-n-dodecylphenol は関東化学より購入した。上皮増殖因子 (EGF, human recombinant) はフナコシより購入し

た。放射能標識 [4-¹⁴C]ステロイドである cholesterol (1887MBq/mmol), dehydroepiandrosterone (2.05GBq/mmol), progesterone (2.05GBq/mmol) 及び deoxycorticosterone (2.22GBq/mmol) はいずれも New England Nuclear 社製であり、日本ラジオアイソトープ協会から購入した。各種標準ステロイド, NAD⁺, NADPH, glucose 6-phosphate および glucose 6-phosphate dehydrogenase は Sigma-Aldrich Japan から購入した。アドレノドキシンは Kimura et al.¹⁾ の報告に従いウシ副腎より精製した。

その他の試薬は市販の分析用標準品および特級を用いた。

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 μ g/ml), transferrin (6.25 μ g/mL), selenium (6.25 ng/mL), および linoleic acid (5.35 μ g/mL) を含む D-MEM/F-12 medium (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% Ultrose G (Sepracore, France) および抗生物質 (penicillin: 50 IU/ml と streptomycin: 50 μ g/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 $^{\circ}$ C で培養を行い、継代した。必要に応じて 24-well plate に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

cortisol 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 で 1% ITS Plus , 0.01 % bovine serum albumin (bovuminar? : Intergen) および抗生物質を 含む D-MEM/F-12 培養液に交換し 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 タノールあるいはメ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 dibutyryl cyclic AMP (1mM) を加え更に一定時間 (24 時間あるいは 48 時間) 培養した。なお、メジウム中のエタ ノールあるいはメタノール等の溶媒は最終 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。検体および dibutyryl cyclic AMP を添加した一定時間後 に培養液中に分泌された cortisol はラジオ イムノアッセイ法による測定キット (DPC cortisol kit, Diagnostic Product Corporation) を用いその濃度を測定した。食 品や食品容器包装等に関連する化学物質の 細胞に対する毒性を評価するために検体処 理後に CytoTox96 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega Corp.) を 用いて H295R 細胞から逸脱する LDH 活性を測 定すると共に、well 中の細胞数を測定した。 また、ウエルに付着している細胞数を測定す る簡便な方法として、well 中の付着細胞を phosphate buffered saline で良く洗浄後、 NaCl (150mM), sodium dodecyl sulfate (SDS, 1%), EGTA (5 mM), MgCl₂ (0.5mM), MnCl₂ (0.5mM) および phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF,

0.2mM) を含む Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4) を用いて溶解して全蛋白質量を測定し た。蛋白質量の測定は BCA assay キット (Pierce Chemical Co.) を用いて測定した。

B-4. H295R 細胞からミトコンドリアおよびミ クロソームの調製

dibutyryl cAMP (1mM) と EGF (10ng/mL) で 24 hr 処理した H295R 細胞 (1.0~2.1 g wet weight) は冷却した PBS で良く洗浄後、3 mL の 0.25 M sucrose (5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT and 0.1 mM PMSF を含む) (緩衝液 A) 中で Dounce tissue grinder (Wheaton) を用いてホモゲナイズし た。定法に従い 9,000g, 20 min 遠心分離し てミトコンドリア画分を得た。ミトコンド リア画分は更に 70 mM sucrose, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂ および 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.21 M mannitol で洗浄後、同様 に遠心分離し、1 mM DTT, 0.1 mM PMSF およ び 20% glycerol を含む同緩衝液に懸濁した。 上清には 8mM CaCl₂ を加えて氷冷下 1hr のイ ンキュベーションの後、10,000g, 10 min の 遠心分離を行い、ミクロソーム画分を得た。 洗浄後ミクロソーム画分はそれぞれの画分 は 20% glycerol を含む緩衝液 A に懸濁した。 ミトコンドリア画分は更に酵素活性測定 のために超音波処理を行った (10 cycles of 15 sec 50 W, Model VC50T, Sonic & Materials Inc.)。それぞれの画分は 5.0 ~ 5.6 mg/mL の蛋白質濃度に調整し、-70 で保存した。

B-5. 酵素活性の測定

P450scc (cholesterol 側鎖切断酵素) 活性 および P45011 (11 -ヒドロキシラーゼ) 活性は各々 [4-¹⁴C] cholesterol (500 Bq/1 nmol/2?L ethanol) および [4-¹⁴C]

deoxycorticosterone (500 Bq/1 nmol/2 %L ethanol) を基質としてミトコンドリア, glucose-6-phosphate(25 mM), glucose-6-phosphate dehydrogenase(0.1 unit), NADP⁺(0.5 mM), および adrenodoxin (2 %M)の存在下 37°C, 2 hr インキュベーションすることにより測定した。3 β -HSD (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type) 活性は[4-¹⁴C] dehydroepiandrosterone (500 Bq/1 nmol/2 %L ethanol)を基質として, 0.2ml の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)中でミクロソーム, NAD⁺(0.5 mM)の存在下 37°C, 1 hr インキュベーションすることにより測定した。

P450c17(17 β -hydroxylase/C_{17,20}-lyase)および P450c21(21-hydroxylase)活性は[4-¹⁴C] progesterone (500 Bq/1 nmol/2 %L ethanol) を基質として, 0.2 mL の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)中でミクロソーム, glucose-6-phosphate(25 mM), glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.1 unit), NADP⁺(0.5 mM)の存在下 37°C, 1 hr インキュベーションすることにより測定した。インキュベーション終了後ステロイドを 0.6 mL の ethyl acetate / 2,2,4-trimethylpentane (1/1, v/v) で抽出して乾固し, TLC(Kieselgel 60F254, Merck)により基質と反応生成物を分離した。展開溶媒は benzene/acetone (8/1, v/v), benzene/ethyl acetate (2/1, v/v), benzene/acetone (7/3, v/v) を使用した。ラジオオートグラフィーで放射能標識ステロイドを検出した後, それぞれのスポットの放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定した。P450scc, P45011 および 3 β -HSD 活性は pregnenolone, corticosterone および

androstenedione の生成量として, P450c17 活性は 17 β -hydroxyprogesterone と 11-deoxycortisol 生成量の総和として, 及び P450c21 活性は 11-deoxycortisol と 11-deoxycorticosterone 生成量の総和としてそれぞれ表した。

B-6. 有意差の検定

有意差の検定は Student 's の t-test を用いた。

研究結果

C-1. 化学物質のステロイドホルモン産生に及ぼす影響

C-1-1. スチレンダイマー及びスチレントリマー曝露の影響

H295R 細胞の cortisol 産生に及ぼす各種スチレンモノマー, ダイマー, トリマーの影響を種々濃度(0.25 - 10 %g/mL)で検討した。検体としてスチレンモノマーである ethenylbenzene, スチレンダイマーである 2,4-diphenyl-1-butene, trans-1,2-diphenylcyclobutane, cis-1,2-diphenylcyclobutane, 1,3-diphenylpropane, 及びスチレントリマーである 2,4,6-triphenyl-1-hexene, 1a-phenyl-4a-(1-phenylethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene, 1,3,5-triphenylcyclohexane を用いた。その結果, これらのスチレンモノマー, ダイマー, トリマーは H295R 細胞の cortisol 産生には何ら有意な影響を及ぼさなかった。(結果は示していない)。また, 実験に使用した濃度において, これらモノマー, ダイマー及びトリマーの細胞に対する毒性は認められなかった。

C-1-2. フタル酸エステル類曝露の影響

H295R細胞のcortisol産生に及ぼす各種フタル酸エステル類の影響を種々の濃度で検討した。その結果、0.3 μM および 3.0 μM の濃度の曝露では有意な変化は認められなかった。しかし比較的高濃度である 30 μM の濃度において Fig. 1 に示すように dicyclohexyl phthalate (DCHP) のみが cortisol 産生を有意に抑制した (76 %)。しかし他のフタル酸エステル類の曝露により有意な cortisol 産生の抑制は認められなかった。各種濃度における DCHP の阻害効果を Fig. 2 に示すが、この阻害効果は濃度に依存していた。なお、いずれのフタル酸エステルにおいても曝露実験に使用した濃度では細胞毒性が認められなかった。

C-1-3. アルキルフェノール曝露の影響

H295R 産生に及ぼすアルキルフェノール類曝露の影響を種々の濃度で検討した。その結果、1.0 μM の濃度の曝露では何ら影響は認められなかったが、10 μM の濃度の曝露では 4-t-octylphenol (4-t-OP) が cortisol の産生を有意に阻害した。50 μM の濃度の曝露では Fig. 3 に示すように、4-t-butylphenol (4-t-BP)、4-t-pentylphenol (4-t-PP)、4-t-OP および 4-nonylphenol (4-NP) が cortisol の産生を有意に阻害した。しかし、フェノールのパラ位に5個から7個の炭素からなるアルキル鎖を有する 4-n-アルキルフェノールは H295R の cortisol 産生に影響を及ぼさなかった。各種濃度における 4-t-PP、4-t-OP および 4-NP の阻害効果を Fig. 4 に示した。これらの阻害効果は曝露濃度に依存していた。また、実験に使用した濃度において、アルキルフェノール類の曝露による細胞毒性は認められなかった。

C-2. ステロイドホルモン合成阻害作用機序の解明

C-2-1. DCHP びアルキルフェノール類の作用機序

H295R 細胞の cortisol 産生を阻害する DCHP、4-t-PP、4-t-OP および 4-NP の作用機序を明らかにするための一端として cortisol 産生に關与する酵素である P450_{scc}、3β-HSD、P450_{c17}、P450_{c21} および P450_{11β} に対する阻害作用を検討した (Table 1)。その結果、DCHP は 25 μM の濃度で P450_{c21} 活性を有意に阻害した。4-t-OP は 12.5 および 25 μM の濃度で P450_{scc} 活性を強力に阻害し、さらに 25 μM の濃度で P450_{c17} 及び P450_{c21} を阻害した。同様に、4-NP は 25 μM の濃度で P450_{scc} 活性を阻害し、さらに 12.5 及び 25 μM の濃度で P450_{c17} 及び P450_{c21} 活性を強力に阻害した。H295R 細胞の cortisol 産生に影響を及ぼさなかった 4-n-OP はいずれのステロイド合成酵素も阻害しなかった。また、酵素の阻害効果を検討した DCHP やアルキルフェノール類は 3β-HSD を全く阻害しなかった。

D. 考察

ヒトの副腎皮質腫瘍細胞からライン化された細胞である H295R 細胞は P450_{scc}、P450_{c17}、P450_{c21}、P450_{11β}、P450_{ald} 及び 3β-HSD を発現しており、ヒトの副腎皮質3層から由来する aldosterone、cortisol 及び DHEA を分泌することが報告されている。ACTH レセプターを発現していないものの、cAMP 添加により cortisol 分泌が亢進するほか、アンジオテンシン や K⁺ にも反応して aldosterone を分泌することも報告されている多機能の細胞である²⁻⁵⁾。

昨年度、我々は in vitro でのステロイド

ホルモン合成阻害を指標にして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影響を、簡便かつ迅速に評価する系をヒトのステロイド産生細胞のモデルである H295R 細胞を使用して開発した。

食品容器として多用されているポリスチレン製品中に各種スチレンダイマーおよびスチレントリマーが存在することが報告されており⁶⁾、それらは内分泌かく乱化学物質としてリストアップされている。ポリスチレン製品から食品へのそれらのスチレンダイマー及びスチレントリマーの移行の可能性が示唆され、特に脂肪含有量が高く、調理時に熱湯を用いるポリスチレン製容器入りの即席麺への移行が報告されており^{7,8)}、ヒトの健康に対する影響が懸念されている。そこで、これらスチレンダイマー及びスチレントリマーの H295R 細胞の cortisol 産生に及ぼす影響を検討したが、有意な影響は認められなかった。

内分泌かく乱化学物質としてリストアップされている各種フタル酸エステルはプラスチック製品の可塑剤として多用されており、プラスチック製の食品容器包装等から食品に移行する可能性が示唆されている。そのため各種フタル酸エステルのエストロゲン作用がレセプターとの結合や乳癌の細胞増殖等のアッセイにより調べられている⁹⁾。また、プラスチックの原料や工業用の界面活性剤が分解されて得られる各種アルキルフェノールも内分泌かく乱化学物質としてリストアップされており、*invitro*¹⁰⁾あるいは *in vivo*¹¹⁻¹⁵⁾でそのエストロゲン活性が調べられている。しかし、ステロイドホルモン産生に及ぼす影響についてはほとんど検討されていない。また、関連することとして、

di-n-butyl phthalate (DBP)の雄ラットの生殖器官の発達に悪影響を及ぼすことが報告されている^{16,17)}。更に DCHP やその代謝物である monocyclohexyl phthalate が同様に精巣に悪影響を及ぼすことが報告されている¹⁸⁾。

最近マウスやラットの培養 Lydig 細胞を用いた実験で octylphenol がステロイドホルモン産生を阻害することが報告されている^{19,20)}。一方、octylphenol, octylphenol diethoxylate および octylphenol monocarboxylate が肝臓の CYP1A2, CYP2A, CYP2B2, CYP2C11 and CYP3A2 等の P450 を阻害すること²¹⁾、また nonylphenol が同様に CYP1A and CYP3A を阻害すること^{22,23)}も報告されている。

本研究により我々は μM のオーダーあるいは ppm という高濃度ではあるが DCHP, 4-t-PP, 4-t-OP および 4-NP が副腎由来の H295R 細胞の産生する cortisol 分泌を阻害することを初めて見だし、更にその作用機序を検討したところ、DCHP は cortisol 産生に関与する酵素である P450c21 を、4-t-PP, 4-t-OP および 4-NP は P450scc, P450c17 および P450c21 を阻害することを明らかにした。特に P450scc はステロイドホルモン産生の最初のステップである、コレステロールの側鎖切断に関与しており、副腎のみならず精巣及び卵巣におけるステロイドホルモン産生に重要な酵素である。また P450c17 はアンドロゲン産生に重要な酵素であり、P450c21 はコルチコイド産生に欠くことの出来ない酵素でもある。

E. 結論

高分子を素材とした生活関連製品から溶出が疑われている内分泌かく乱化学物質の

内在性ステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) に及ぼす影響を解明する目的で、ヒト副腎由来の H295R 細胞を用いてコルチゾール産生に及ぼすスチレンモノマー、ダイマー、トリマー、フタル酸エステル、及びアルキルフェノールの阻害効果を検討した。

マイクロMあるいはppmオーダーという高濃度ではあるが、DCHP、4-NP および 4-t-OP がコルチゾール産生を阻害することを明らかにした。産生を阻害することが認められた DCHP、4-NP および 4-t-OP についてその作用機序の検討を行ったところ、これらの化学物質はコルチゾール合成を触媒する酵素のうち、特にチトクローム P450 モノオキシゲナーゼである P450sc_c、P450c₁₇ 及び P450c₂₁ を阻害することを明らかにした。

F. 参考文献

- 1) Kimura, T., et al., *Methods in Enzymology* Vol. L, Academic Press, New York, 1978, pp.132-142.
- 2) Rainey W. E., et al., *Mol Cell Endocrinol.* **100**, 45-50 (1994).
- 3) Bird I. M., et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 2171-2178 (1996).
- 4) Gazdar A.F., et al., *Cancer Res.* **50**, 5488-5496 (1990).
- 5) Rainey W. E., et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**, 731-737 (1993).
- 6) 河村葉子ら, 食衛誌, **39**, 199-205 (1998).
- 7) 河村葉子ら, 食衛誌, **39**, 310-314 (1998).
- 8) 河村葉子ら, 食衛誌, **39**, 390-398 (1998).
- 9) Harris, C.A., et al., *Environ. Health. Perspect.* **105**, 802-811 (1997).
- 10) Sato, A.M., et al., *Environ. Health Perspect.* **103**, 19-25 (1991).

- 11) Jobling, S., et al., *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 194-202 (1996).
- 12) Lech, J. J., et al., *Appl. Toxicol.* **30**, 229-232 (1996).
- 13) Madsen, S.S., et al., *Fish Physiol. Biochem.* **17**, 303-312 (1997).
- 14) Christiansen, L.B., et al., *Mar. Environ. Res.* **46**, 137-140 (1998).
- 15) Korsgaard, B., et al., *Toxicol. Endocrinol.* **120**, 159-166 (1998).
- 16) Mylchreest, E., et al., *Toxicol. Sci.* **43**, 47-60 (1998).
- 17) Forster, P.M., et al., *Food Chem. Toxicol.* **38**, S97-99 (2000).
- 18) Lake, B.G., et al., *Acta Pharmacol. Toxicol.* **51**, 217-226 (1982).
- 19) Nikula, H., et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **157**, 166-173 (1999).
- 20) Muroso, E.P., et al., *Reprod Toxicol.* **14**, 275-288 (2000).
- 21) Hanioka, N., et al., *Xenobiotica.* **29**, 873-883 (1999).
- 22) Lee, P.C., et al., *Biochem. Pharmacol.* **52**, 885-889 (1996).
- 23) Lee, P.C., et al., *Xenobiotica.* **26**, 831-838 (1996).

G. 研究業績

学会発表

- 1) ヒト副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール分泌に及ぼす内分泌攪乱化学物の影響：中陳 静男、篠田 聡、豊島 聡、中澤裕之 (星薬大・薬)、大野修司 (日大・薬)、牧野恒久 (東海大・医) 第 73 回日本生化学大会、2000 年、10 月、横浜
- 2) ヒト副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール

分泌に及ぼすフタル酸エステル、アルキルフェノール及び植物エストロゲンの阻害効果：中陳静男、篠田 聡、豊島 聡、中澤裕之（星薬大・薬）、大野修司（日大・薬）、牧野恒久（東海大・医）、第3回日本内分泌学会研究発表会、2000年、12月、横浜

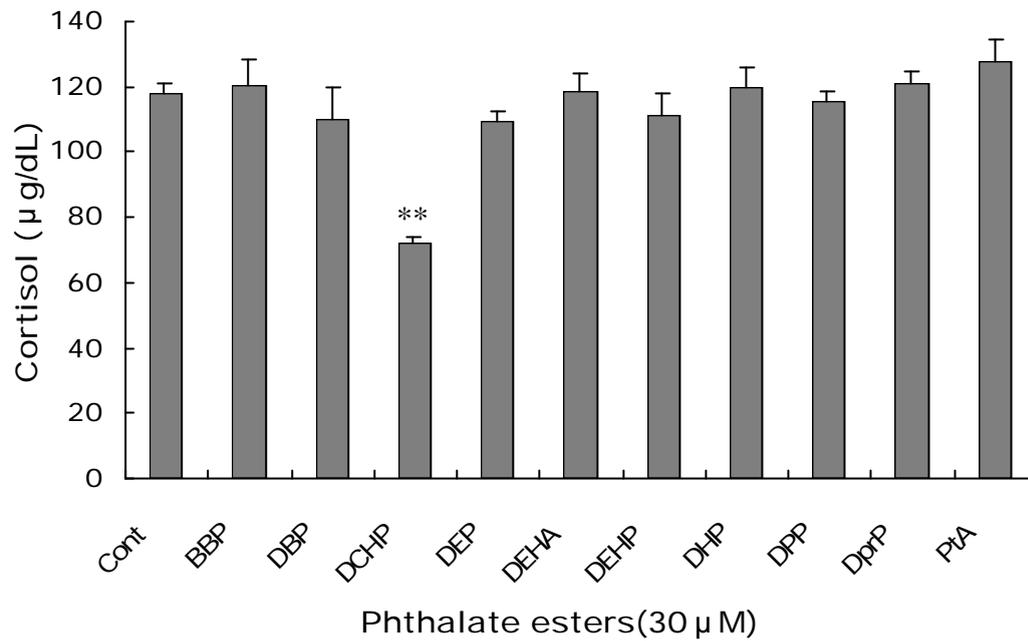


Fig. 1. The effect of the exposure of various phthalate esters and related chemicals on cortisol secretion from the adrenocortical H295R cells induced by dibutyryl cAMP.

BBP (Butyl benzyl phthalate), DBP (di-*n*-butyl phthalate), DCHP (dicyclohexyl phthalate), DEP (diethyl phthalate), DOA (diethylhexyl adipate), DEHP (di(2-ethylhexyl)phthalate), DHP (di-*n*-hexyl phthalate), DPP (di-*n*-pentyl phthalate), DprP (dipropyl phthalate), and PtA (Phthalic acid) were used as the abbreviation. Each column represents the mean with S.D. ($n = 3$). Asterisks denote significant difference from the control value which was treated without chemicals; ** $p < 0.01$.

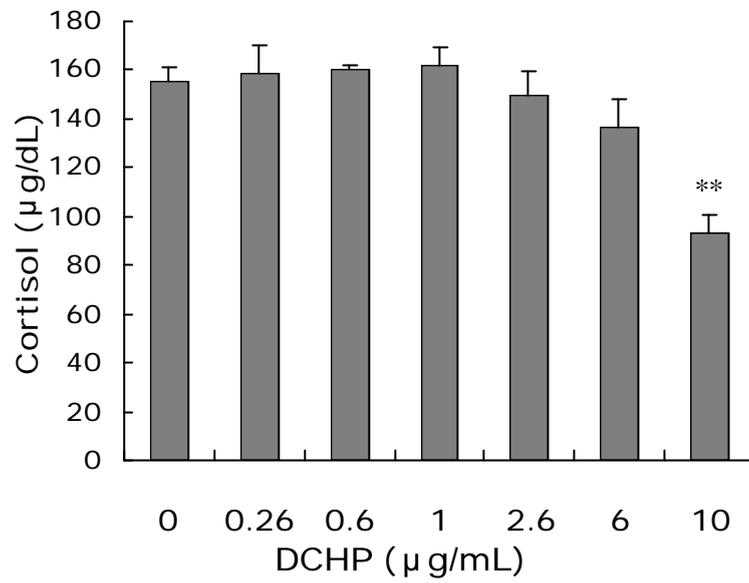


Fig. 2. The effect of increasing concentrations of dicyclohexyl phthalate (DCHP) on cortisol secretion from the adrenocortical H295R cells induced by dibutyryl cAMP.

Each column represents the mean with S.D. (n = 3). Asterisks denote significant difference from the control (0 µg/mL) value which was treated without DCHP; **p < 0.01.

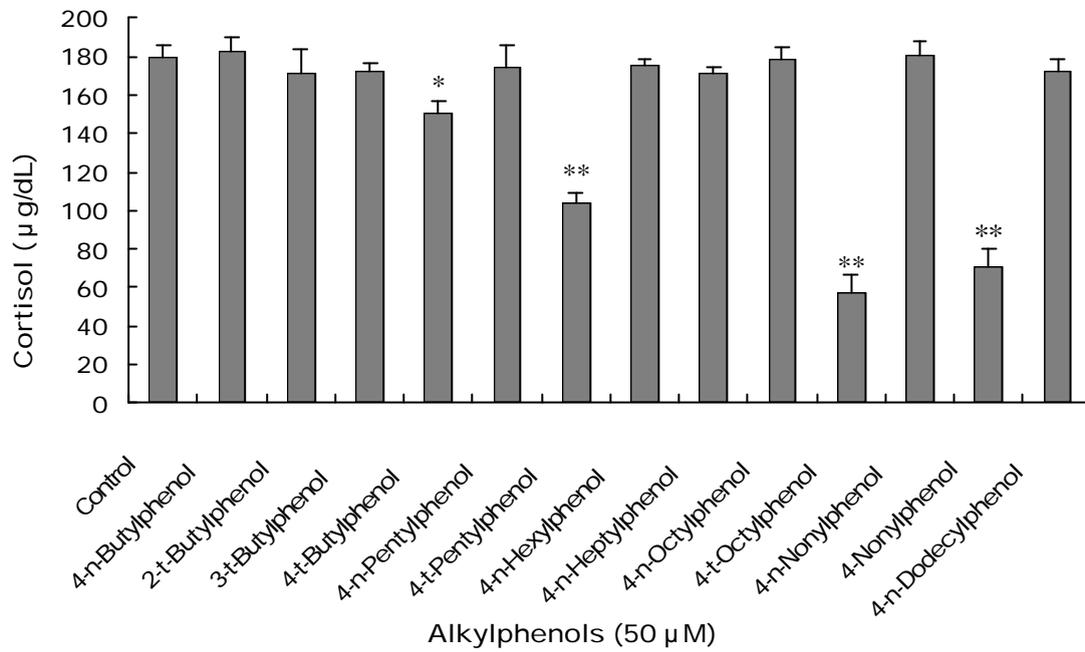


Fig. 3. The effect of the exposure of various alkylphenols on cortisol secretion from the adrenocortical H295R cells induced by dibutyl cAMP.

Each column represents the mean with S.D. (n = 3 to 6). Asterisks denote significant difference from the control value which was treated without chemicals; **p? 0.01.

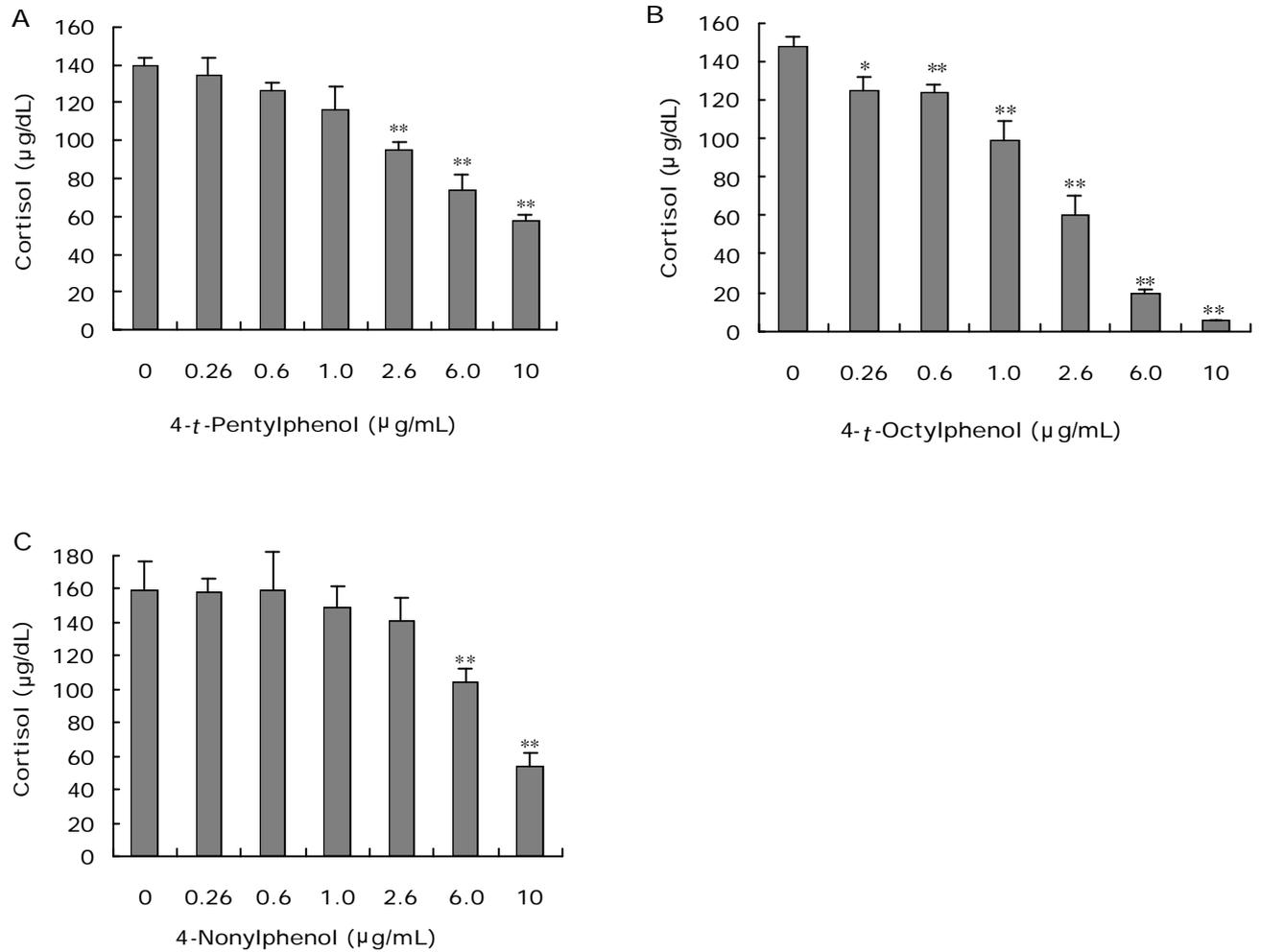


Fig. 4. The effect of increasing concentrations of 4-*t*-pentylphenol (A), 4-*t*-octylphenol (B) and 4-nonylphenol (C) on cortisol secretion from the adrenocortical H295R cells induced by dibutyryl cAMP.

Each column represents the mean with S.D. (n = 3). Asterisks denote significant difference from the control (0 μg/mL) value which was treated without chemicals; * p? 0.05, **p? 0.01.