

平成12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

主任研究者:中澤裕之 星薬科大学薬品分析学教室教授

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

分担研究者:畑山善行

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 法を用いてビスフェノール A 誘導体(ビスフェノール A ジグリシジルエーテル類)、臭素化ビフェニル、臭素化ジフェニルエーテル、ベンゾフェノン誘導体等の S-9 代謝産物のエストロゲン様作用を評価した。低臭素化ビフェニル(臭素数:0 ~ 5)、モノ臭素化ジフェニルエーテル及びベンゾフェノン誘導体にエストロゲン様作用が認められた。ビスフェノール A 誘導体にはエストロゲン様作用は認めらなかった。

また、甲状腺ホルモン受容体を導入した酵母を用いた酵母 Two-Hybrid 法によって、フタル酸エステル類及びアルキ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甲状腺ホルモン様作用を評価した。o-イソプロピルフェノール及び o-t-ブチルフェノールに甲状腺ホルモ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。

我々はエストロゲン受容体 (ER)、アンドロゲン受容体 (AR) または甲状腺ホルモン受容体 (TR) を各々導入した酵母を用いた Two-Hybrid 法を行い、化学物質及びその代謝産物について内分泌かく乱作用を多面的に評価する。酵母 Two-Hybrid 法による内分泌かく乱作用の評価は、簡便でかつその作用機構も明確である。また、S-9 mix による化学物質の代謝を操作過程に組み込むことができる。ER、AR または TR を導入した酵母を利用することによってこれら受容体を介して内分泌かく乱作用を示す化学物質及び代謝産物の一次スクリーニングの一翼を担うことができる。本研究を遂行することによって高分子素材からなる生活関連製品由来化学物質の生体影響を評価するうえで有用な基礎的情報を得ることが期待される。

## B. 研究方法

### B-1. 酵母 Two-Hybrid 法による エストロゲン様作用の検出

ER-GAL4DBD (Estrogen receptor  $\alpha$  - GAL4 DNA binding domain fusion protein) 及び TIFII-GAL4AD (TIFII-GAL4 activation domain fusion protein) を発現させた酵母を前培養した。この酵母を  $OD_{595} = 0.15$  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、30℃ で 4 時間の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、 $OD_{595}$  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℃ で 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℃ で 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  $\beta$ -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ゲ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  $OD_{595}$  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. S-9 mix 処理

Cofactor I 溶液 (0.8 mM NADPH, 0.8 mM NADH, 1.0 mM G-6-P, 0.4 u/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  $\mu$ l/ml になるように ラット S-9 を添加した。これに計画しているエストロゲンアッセイの 2 倍濃度になるように被検化学物質の DMSO 溶液を加え、37℃ で 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 S-9 を用いた。各実験時に S-9 mix の活性の保証として  $1.0 \times 10^{-4}$  M の *trans*-スチルベンを用いた。酵素反応後、エストロゲンアッセイを行うまで -80℃ で保存した。

B-3. 酵母 Two-Hybrid 法による  
エストロゲン様作用の検出  
(S-9 mix による代謝産物)

ER-GAL4DBD 及び 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 S-9 mix 処理溶液とを容量比 1:1 で混和し、30 で 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  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を調べた。

B-4. 酵母 Two-Hybrid 法による  
甲状腺ホルモン様作用の検出

TR-GAL4DBD (Thyroid hormone receptor  $\alpha$  - GAL4 DNA binding domain fusion protein) 及び TIFII-GAL4AD (TIFII-GAL4 activation domain fusion protein) を発現させた酵母を前培養した。これを  $OD_{595} = 0.01$  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、30 で 24 時間のインキュベーションを行った。以下、B-1 (エストロゲン様作用の検出) に記した方法に従って、産生された  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

B-5. 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. 酵母 Two-Hybrid 法による

エストロゲン様作用の検出  
(S-9 mix による代謝産物)

C-1-1. ビスフェノール A 誘導体

酵母を  $1.0 \times 10^7$  M のエストラジオール存在下、30 で 4 時間インキュベートした際に産生される  $\beta$ -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、 $2.5 \times 10^{-10}$  M であった。

ビスフェノール A の S-9 mix 処理時の  $EC_{10}$  は  $2.8 \times 10^{-5}$  M であった。また、S-9 mix による代謝を施さない場合、ビスフェノール A の  $EC_{10}$  は  $1.1 \times 10^{-5}$  M であった (表 1)。

ビスフェノール A ジグリシジルエーテル (BADGE)、ビスフェノール A ジグリシジルエーテル二塩化水素付加体 (BADGE $\cdot$ 2HCl) 及びビスフェノール A ジグリシジルエーテル二水付加体 (BADGE $\cdot$ 2H $_2$ O) の S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用は認められなかった。また、S-9 mix による代謝を施さない場合もこれら化学物質にエストロゲン様作用は認められなかった。

C-1-2. ベンゾフェノン誘導体及び  
その他の紫外線吸収剤

ベンゾフェノン誘導体であるオキシベンゾン (2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン) 及びジオキシベンゾン (2,2'-ジヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン) の S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められた。また、サリチル酸 4-*t*-ブチルフェノールエステルの S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められた。

S-9 mix による代謝を施さない場合、オキシベンゾン及びジオキシベンゾンに微弱なエストロゲン様作用 ( $1.0 \times 10^{-7}$  M エストラジオール作用時の 10% 未満の活性) が認められた。また、サリチル酸 4-*t*-ブチルフェニールエステルにエストロゲン様作用は認められなかった。

### C-1-3. フタル酸エステル類及び スチレントリマー

フタル酸ジブチル、フタル酸シクロヘキシル、フタル酸ジエチルヘキシル及びフタル酸ベンジルブチルの S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用は、認められなかった。S-9 mix による代謝を施さない場合、フタル酸ベンジルブチルに微弱なエストロゲン様作用 ( $1.0 \times 10^{-7}$  M エストラジオール作用時の 10% 未満の活性) が認められた (表 1)。

また、スチレントリマーである 1*a*-フェニル-4*e*-(1-フェニルエチル)1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン、1*e*-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*e*-フェニル-4*e*-(1-フェニルエチル) 1,2,3,4-テトラヒドロナフタレンの S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用は認められなかった。

S-9 mix による代謝を施さない場合においても、これらのスチレントリマーにエストロゲン様作用は認められなかった。

### C-1-4. 臭素化ビフェニル (PBB)、臭素化ジフェニルエーテル (PBDE) 及びテトラブロモビスフェノール A

ビフェニル、4-臭素化ビフェニルの S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められ

た。2,4',5-三臭素化ビフェニル及び 2,2',4',5,5'-五臭素化ビフェニルの S-9 mix 代謝産物に微弱なエストロゲン様作用が認められた (最大活性:  $1.0 \times 10^{-7}$  M のエストラジオール作用時の 10% 未満、表 2)。4,4'-二臭素化ビフェニル、2,2',4,4',5,5'-六臭素化ビフェニル及び十臭素化ビフェニルの S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用は認められなかった。六臭素化ビフェニル、または八臭素化ビフェニルを主成分とする工業製品 (各々 BP-6 及び FR-250) の S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用は認められなかった。

ジフェニルエーテル及び 4-臭素化ジフェニルエーテルの S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められた。4,4'-二臭素化ジフェニルエーテル、十臭素化ジフェニルエーテル、及び 2,2',4,4',5,5'-六臭素化ジフェニルエーテルを主成分とする工業製品の S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用は認められなかった。

テトラブロモビスフェノール A の S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用は認められなかった。

S-9 mix による代謝を施さない場合、上記の臭素化ビフェニル、臭素化ジフェニルエーテル及びテトラブロモビスフェノール A にエストロゲン様作用は認められなかった。

### C-2. 化学物質の甲状腺ホルモン様作用の評価

#### C-2-1. 酵母 Two-Hybrid 法による 甲状腺ホルモン様作用の検出

酵母に甲状腺ホルモン様作用のアゴニストである 3,5,3'-トリヨードチロニン (T3) を 4

時間作用させた。1.0 x 10<sup>-6</sup> Mの T3 作用時に最も高い β-ガラクトシダーゼ活性が認められた。1.0 x 10<sup>-6</sup> Mの T3 作用時の β-ガラクトシダーゼ活性を 100 %としたとき、EC<sub>10</sub> は、4.0 x 10<sup>-8</sup> Mであった。検出感度の改善を図るため、インキュベーション時間を 24 時間に延長した。4 時間作用時と同様に 1.0 x 10<sup>-6</sup> M の T3 作用時に最も高い β-ガラクトシダーゼ活性が認められた(図 1)。1.0 x 10<sup>-6</sup> M の T3 作用時の β-ガラクトシダーゼ活性を 100 %としたとき EC<sub>10</sub> は、2.1 x 10<sup>-8</sup> M であった。また、T3 と同じく甲状腺ホルモン様作用のアゴニストである 3,5,3',5'-テトラヨードチロニン (T4) を 24 時間作用させた際の EC<sub>10</sub> は、4.2 x 10<sup>-8</sup> M であった。

#### C-2-2. フタル酸エステル類及びアジピン酸エステル類

フタル酸エステル (10 種類)、アジピン酸エステル類 (7 種類) 及びその他の可塑剤 (3 種類) に甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった (表 3)。

#### C-2-3. アルキルフェノール類

アルキルフェノール類 (*p* 位 : 14 種類、*o* 位 : 6 種類、*m* 位 : 2 種類)、BHT 等のフェノール残基を有する化学物質 (6 種類) の甲状腺ホルモン様作用を評価した。*o*-イソプロピルフェノール及び *o*-*t*-ブチルフェノールに甲状腺ホルモン様作用が認められた (表 4)。EC<sub>10</sub> は、各々、3.1 x 10<sup>-4</sup> M 及び 4.8 x 10<sup>-5</sup> M であった。他のアルキルフェノール及びフェノール残基を有する化学物質に甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった。

#### C-2-4. パラベン及び安息香酸類

パラベン類 (5 種類)、*p*-ヒドキシ安息香酸ナトリウム及び 3 - フェノキシ安息香酸に甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった (表 5)。

#### C-2-5. ビスフェノール A 誘導体及びポリカーボネート樹脂原料

ビスフェノール A 誘導体及びポリカーボネート樹脂原料に甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった (表 5)。

#### C-2-6. ベンゼン誘導体

フェノール、アルキルベンゼン、ビフェニル及び *trans*-スチルベンに甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった (表 5)。

#### C-2-7. その他の化学物質

チロシン誘導体、ベンゾフェノン誘導体、サリチル酸 4-*t*-ブチルフェノールエステル及び臭素化ジフェニールエーテルに甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった (表 5)。

### D. 考察

#### D-1. 化学物質の S-9 mix 代謝産物のエストロゲン様作用の評価

BADGE、BADGE・2HCl 及び BADGE・2H<sub>2</sub>O は、S-9 mix による代謝過程を与えてもエストロゲン様作用を示さなかったことから、S-9 mix による *O*-脱アルキル化反応を受けてビスフェ

ノール A に変換されている可能性は低いと思われる。BADGE 等の基本構造となるビスフェノール A のエストロゲン様作用は、S-9 mix による代謝過程を与えても著しい変化は認められなかった。しかしながら、ビスフェノール A が S-9 mix による代謝を受けることによって更に強いエストロゲン様作用を示す代謝産物が、生成している可能性があるとして推測している研究者もいる。このためビスフェノール A の S-9 mix による代謝産物については、HPLC による分画及び個別のエストロゲン様作用の評価を行うことも検討しなくてはならない。

オキシベンゾン、ジオキシベンゾン及びサリチル酸 4-*t*-ブチルフェノールエステルは、S-9 mix による代謝を受けることによってエストロゲン様作用を示した。オキシベンゾン及びジオキシベンゾンは、メトキシフェニル基を有しており、これが S-9 mix による *o*-脱アルキル化反応を受けてフェノール残基に変換されてエストロゲン様作用を示したと考えられる。サリチル酸 4-*t*-ブチルフェノールエステルについては S-9 画分に存在するエステラーゼによる加水分解反応を受け、4-*t*-ブチルフェノールが生成したと思われる。4-*t*-ブチルフェノールがエストロゲン様作用を示すことは、昨年本研究の報告書にて記述した（平成 11 年度厚生科学研究報告書 “高分子素材からなる生活関連製品由来の内分かく乱化学物質の分析及び動態解析” p.189）。従って、4-*t*-ブチルフェノールが活性代謝産物と考えられる。オキシベンゾンは、紫外線吸収成分として化粧品に使用されている。さらに、オキシベンゾン、ジオキシベンゾン及びサリチル酸 4-*t*-ブチルフェノールエステルは、食品包装容器の紫外線吸収剤として添加されて

いる。これら化学物質の化粧品からの吸収及び消長、また、食品容器包装からの溶出、食品への移行、並びに摂取量について調査及び研究することは、公衆衛生学上、意義のあることと考える。

フタル酸エステル類は、S-9 mix による代謝を受けてもエストロゲン様作用を示さなかった。肝ミクロソーム分画に存在するエステラーゼによる加水分解反応を受け、フタル酸モノエステル、またはフタル酸に分解されていると推察される。

イソプロピルベンゼン及びプロピルベンゼンは、S-9 mix による代謝を受けてもエストロゲン様作用を示さなかった。トルエンが肝臓においてベンジルアルコールに変換されるように S-9 mix による水酸基は、芳香環ではなくアルキル基の芳香環に結合している炭素に導入されたと考えられる。

スチレンダイマー（*trans*-1,2-ジフェニルシクロブタン、*cis*-1,2-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（1,2,6-トリフェニル-1-ヘキセン）の代謝産物にエストロゲン様作用が認められることを昨年、本研究において報告した<sup>3)</sup>。今回、スチレントリマーに分類される 1 $\alpha$ -フェニル-4 $\epsilon$ -(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その異性体の S-9 mix 代謝産物についてエストロゲン様作用を評価した。これら化学物質の S-9 mix 代謝産物は、エストロゲン様作用を示さなかった。これら化学物質は、かさ高い構造のため、芳香族水酸化反応を受けた代謝産物が生成してもエストロゲン受容体に対する結合性を有さなかったと思われる。

臭素化ビフェニル、臭素化ジフェニルエ

ーテル及びテトラプロモビスフェノール A は、難燃剤として家電製品等に使用実績がある。とりわけ、臭素化ジフェニルエーテルは、近年、海洋生物及び母乳の高度な汚染が報告されている (Boer, J., *et al.*, *Nature*, **394**, 28, 1998; Noren, K., *et al.*, *Organohalogen Compounds*, **38**, 1, 1998)。これら化学物質の基本骨格を成すピフェニル及びジフェニルエーテルは、S-9 mix による代謝を受けることによってエストロゲン様作用を示した。ピフェニル及びジフェニルエーテルの二つのフェニル基の 4 位に臭素が導入されることによってエストロゲン様作用が消失することから、薬物代謝酵素による 4 位の水酸化が代謝によるエストロゲン様作用の発揮のうえで鍵になると考えられる。また、ピフェニルについて臭素化が高度になるにつれてエストロゲン様作用の低下が認められた。この理由については臭素化によって薬物代謝酵素によるフェニル基の 4 位の水酸化が阻害されている、もしくは、代謝産物のエストロゲン様作用が弱化されている、双方の可能性が考えられる。ジフェニルエーテルについても構造上の類似により臭素化が高度になるにつれて同様にエストロゲン様作用が低下すると考えられる。テトラプロモビスフェノール A についてはフェニル基の 4 位に水酸基を有していることから、臭素の存在によってエストロゲン様作用が弱化されていると考えられる。工業的に使用実績のある臭素化ピフェニル (臭素置換数 : 6 以上) 臭素化ジフェニルエーテル (臭素置換数 : 4 以上) 及びテトラプロモビスフェノール A は、生体内で代謝を受けてもエストロゲン様作用を発揮する可能性を本研究から見出せなかった。しかしながら、これら臭素化合物は、光化学的に容易に脱臭素化反応を

受ける (Watanabe I., *et al.*, *Environ. Contamination Toxicol.*, **39**, 953, 1987)。臭素化ジフェニルエーテルについては、紫外線照射によって短時間に脱臭素化を受けて低臭素化ジフェニルエーテル (臭素置換数 : 3 以下) が生成することが報告されている。本研究結果よりこれらは、代謝を受けることによってエストロゲン様作用を示す可能性が考えられる。従って、臭素化ピフェニル、臭素化ジフェニルエーテル及びテトラプロモビスフェノール A は、生活関連製品からの直接的摂取のみならず、製品廃棄後、環境中で生成した分解産物の食物連鎖を経た間接的摂取も検討する必要があると考えられる。

#### D-2. 化学物質の甲状腺ホルモン様作用の評価

甲状腺ホルモンが、神経細胞等の分化、増殖、及び細胞死、また生体のエネルギー代謝調節に重要な役割を果たすことは広く認識されているが、化学物質の甲状腺ホルモン受容体を介した生体への悪影響に関する情報は、著しく欠如しているのが現状である。生活関連製品由来の化学物質の甲状腺ホルモン様作用について TR を導入した酵母 Two-Hybrid 法を用いて評価した。

TR を導入した酵母 Two-Hybrid 法のインキュベーション時間を 4 時間から 24 時間に延長することにより T3 に対する  $EC_{10}$  は、 $4.0 \times 10^{-8}$  M から  $2.1 \times 10^{-8}$  M になった。更にインキュベーション時間を延長しても酵母のフルグロースによる生育状況の悪化及び被検化学物質による毒性によって甲状腺ホルモン様作用の検出感度の向上は困難であった。従って、被検化学物質とのインキュベーション時間を 24 時間

とした。

甲状腺ホルモン受容体の結晶構造の X 線解析によって、リガンドとの結合にリガンドが所有するフェノール性水酸基が重要な役割を果たしていることが明らかにされている (Wagner, R.L., *et al. Nature*, **378**, 690, 1995)。そこでフェノール残基を有するアルキルフェノールに重点を置いての甲状腺ホルモン様作用を評価した。その結果、*o*-イソプロピルフェノール及び *o*-*t*-ブチルフェノールに甲状腺ホルモン様作用が認められた。一方、*p*-アルキルフェノール及び *m*-アルキルフェノールに甲状腺ホルモン様作用は認められなかったことから、*o* 位にアルキル基を有することが作用を示す条件の一つと考えられた。また、*o*-アルキルフェノールのアルキル鎖長を変えて検討したところ、イソプロピル基及び *t*-ブチル基にのみ作用が認められた。このことから比較的厳密な置換基サイズの条件があると考えられる。ヨウ素を含まない甲状腺ホルモンアゴニストとして GC-1 [3,5-ジメチル-4-(4'-ヒドロキシ-3'-イソプロピルベンジル)フェノキシ酢酸] の合成が報告されている (Chiellini, G., *et al., Chemistry Biology*, **5**, 299, 1998)。GC-1 は、ヨウ素に代わる *o* 位の置換基としてイソプロピル基が採用されており、*o*-イソプロピルフェノール及び *o*-*t*-ブチルフェノールにおいても各々、イソプロピル基及び *t*-ブチル基が T3 の 3' 位のヨウ素をミミックしたと考えられる。

また、イソプロピルベンゼン及び *t*-ブチルベンゼンについて甲状腺ホルモン様作用を評価した結果、作用は認められなかった。このことから酵母 Two-Hybrid 法による検出システムにおいてもフェノール性水酸基の必要性が明らかになった。*o*-イソプロピルフェノール及び *o*-*t*-ブチルフェノールに認められた

甲状腺ホルモン様作用が *in vivo* で発揮される作用であるかは不明であり、この結果の取扱いは慎重に行う必要がある。別の評価システム及び動物実験による結果のサポートが必要である。また、*p*-*t*-ブチルフェノールは、工業的に利用されており、*o*-*t*-ブチルフェノールを含む製品もある可能性がある。これら化学物質の生活関連製品中における存在量について検討することは興味深い。

フタル酸エステル類、アジピン酸エステル類、パラベン類、ビスフェノール A 誘導体及び臭素化ジフェニルエーテル等の多岐にわたる化学物質の甲状腺ホルモン様作用を評価したが、作用を有する化学物質は見い出せなかった。これら化学物質が *o*-アルキルフェノールの検討から明らかになった作用を示す化学物質の構造上の二つの条件 (1, フェノール性水酸基を有する; 2, 水酸基に対して *o* 位にイソプロピル基程度のかさを持つ置換基を有する) を満たしていないためと考えられる。

甲状腺ホルモン様作用を示すためにリガンドに要求される構造上の特性は、エストロゲン様作用を示すための構造上の特性 (フェノール残基を有し、このフェノール性水酸基の *p* 位に疎水性の置換基を有する) と比較して限定的である。しかしながら、エストロゲン様作用と同様にフェノール性水酸基を有することが甲状腺ホルモン様作用を示すための鍵になることから化学物質の代謝産物についても精査する必要がある。PCB の代謝産物 (水酸化体) は、甲状腺ホルモンの輸送蛋白質のトランスサイレチンに対して T4 と競合的に結合し、甲状腺ホルモンの代謝をかく乱していることが報告されている (Cheek, A. O., *et al., Environ. Health Perspect.*, **107**, 273, 19



99)。従って、これらの化学物質と類似した構造を有する臭素化ジフェニルエーテル等の化学物質の代謝産物の甲状腺ホルモン様作用について重点的に検討することも必要であろう。

#### E. 結論

1. BADGE、BADGE·2HCl 及び BADGE·2H<sub>2</sub>O は、S-9 mix による代謝過程の有無によらず、エストロゲン様作用は認められなかった。

2. ビフェニル、4-臭素化ビフェニル、2,4', 5-三臭素化ビフェニル及び 2,2', 4', 5,5'-五臭素化ビフェニルの S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められた。また、ジフェニルエーテル及び 4-臭素化ジフェニルエーテルの S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められた。

3. 臭素化ビフェニルまたは臭素化ジフェニルエーテルの 4,4'-臭素化体の S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められないことから、4 位に水酸化を受けることが作用を発揮するうえで重要であると考えられた。

4. ベンゾフェノン誘導体のオキシベンゾンの S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められた。また、サリチル酸 4-*t*-ブチルフェノールエステル<sup>1)</sup>の S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用が認められた。

5. スチレントリマーである 1*a*-フェニル-4*e*-(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その異性体

の S-9 mix 代謝産物にエストロゲン様作用は認められなかった。

6. 甲状腺ホルモン様作用を評価する酵母 Two-Hybrid 法を運用した。甲状腺ホルモン様作用のアゴニストである  $1.0 \times 10^{-6}$  M の T3 を 24 時間作用させた際に最も高いベータガラクトシダーゼ活性が認められた。 $1.0 \times 10^{-6}$  M の T3 作用時のベータガラクトシダーゼ活性を 100 %としたとき 10 %作用濃度 (EC<sub>10</sub>) は、 $2.1 \times 10^{-8}$  M であった。

7. *o*-イソプロピルフェノール及び *o-t*-ブチルフェノールに甲状腺ホルモン様作用が認められた。EC<sub>10</sub> は、各々、 $3.1 \times 10^{-4}$  M 及び  $4.8 \times 10^{-5}$  M であった。他のアルキルフェノール及びフェノール残基を有する化学物質に甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった。

8. ビスフェノール A 誘導体、フタル酸エステル類、アジピン酸エステル、パラベン類及びベンゼン誘導体に甲状腺ホルモン様作用は、認められなかった。

#### F. 研究発表

##### 学会発表

1. 酵母 Two-Hybrid 法を用いた代謝活性化エストロゲン様作用物質の検出

高取 聡、北川陽子、織田 肇、西川淳一、西原 力、中澤裕之、堀 伸二郎

日本食品衛生学会第 79 回学術講演会、2000 年 5 月、東京

2. 酵母 Two-Hybrid 法を用いた proestrogen 候補物質の検出

高取 聡、北川陽子、織田 肇、  
西川淳一、西原 力、中澤裕之、  
堀 伸二郎  
環境ホルモン学会第 3 回研究発表会、  
2000 年 12 月、横浜

1. Takatori, S., Kitagawa, Y., Nishikawa, J.,  
Nishihara, T., Oda, H., Nakazawa, H., Hori,  
S. " Detection of proestrogenic activities of c  
hemicals using a Yeast Two-Hybrid Assay. "

*Toxicol. Appl. Pharmacol.* ( 投稿中 )

論文発表

化合物名	EC <sub>10</sub> (M)		相対活性 <sup>a)</sup>	備考
	Active S-9	Inactive S-9		
ビスフェノール A	2.8 x 10 <sup>-5</sup>	1.1 x 10 <sup>-5</sup>	1/1.1 x 10 <sup>5</sup> (1/6.8 x 10 <sup>4</sup> )	PC 樹脂原料
BADGE	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	PC 樹脂原料
BADGE・2HCl	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	PC 樹脂溶出成分
BADGE・2H <sub>2</sub> O	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	PC 樹脂溶出成分
オキシベンゾン	1.4 x 10 <sup>-5</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup> #	1/5.6 x 10 <sup>4</sup>	紫外線吸収剤
ジオキシベンゾン	1.1 x 10 <sup>-5</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup> #	1/4.4 x 10 <sup>4</sup>	紫外線吸収剤
サリチル酸 4- <i>t</i> -ブチルフェノールエステル	2.1 x 10 <sup>-5</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	1/8.4 x 10 <sup>4</sup>	紫外線吸収剤
4- <i>t</i> -ブチル-4'-メトキシ- ジベンゾイルメタン	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	紫外線吸収剤
4-ジメチルアミノ安息香酸 2-エチルヘキシルエステル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	紫外線吸収剤
4-メトキシケイヒ酸 2-エチルヘキシルエステル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	紫外線吸収剤
フタル酸ジブチル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ジシクロヘキシル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ジエチルヘキシル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ベンジルブチル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup> #	-	可塑剤
イソプロピルベンゼン(クメン)	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	工業原料
プロピルベンゼン	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	工業原料

1a-フェニル-4e-(1-フェニルエチル) 1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	スチレントリマー
1e-フェニル-4a-(1-フェニルエチル) 1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	スチレントリマー
1e-フェニル-4e-(1-フェニルエチル) 1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	スチレントリマー
17-β-エストラジオール	2.5 x 10 <sup>-10</sup>	1.6 x 10 <sup>-10</sup>	1	女性ホルモン

表1 ビスフェノール A 誘導体、紫外線吸収剤、フタル酸エステル類及びスチレントリマーの S-9 mix 代謝産物のエストロゲン様作用の評価  
a) 相対活性：17-β-エストラジオールの EC<sub>10</sub> / 被検化学物質の EC<sub>10</sub>  
#：1.0 x 10<sup>-7</sup> M 17-β-エストラジオール作用時における β-ガラクトシダーゼ活性の10%未満の活性が認められた。  
PC：ポリカーボネート

化合物名	EC <sub>10</sub> (M)		相対活性 a)	備考
	Active S-9	Inactive S-9		
ビフェニル	1.7 x 10 <sup>-5</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	1/6.8 x 10 <sup>4</sup>	防黴剤
4-ブロモビフェニル	1.8 x 10 <sup>-5</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	1/7.2 x 10 <sup>4</sup>	PBB
2,4',5-トリブロモビフェニル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup> #	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	PBB
2,2'4',5,5'-ペンタブロモビフェニル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup> #	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	PBB
2,2',4,4',5,5'-ヘキサブロモビフェニル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	PBB
デカブロモビフェニル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	難燃剤、PBB
ファイアーマスター BP-6 (ヘキサブロモビフェニル工業製品)	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	難燃剤、PBB
FR-250 (オクタブロモビフェニル工業製品)	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	難燃剤、PBB
ジフェニルエーテル	2.7 x 10 <sup>-5</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	1/1.1 x 10 <sup>5</sup>	熱媒体
4-ブロモジフェニルエーテル	4.6 x 10 <sup>-5</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	1/1.8 x 10 <sup>5</sup>	PBDE

4,4'-ジブロモジフェニルエーテル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	0 <sup>5</sup>	-	PBDE
2,2'4,4',5,5'-ヘキサブロモジフェニルエーテル(工業製品)	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	-	難燃剤、PBDE
デカブロモジフェニルエーテル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	-	難燃剤、PBDE
テトラブロモビスフェノール A	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	-	難燃剤
17-β-エストラジオール	2.5 x 10 <sup>-10</sup>	1.6 x 10 <sup>-10</sup>	1	-	女性ホルモン

表2 臭素化ビフェニル及び臭素化ジフェニルエーテルの S-9 mix 代謝産物のエストロゲン様作用の評価

a) 相対活性：17-β-エストラジオールの EC<sub>10</sub> / 被検化学物質の EC<sub>10</sub>

# : 1.0 x 10<sup>-7</sup> M 17-β-エストラジオール作用時における β-ガラクトシダーゼ活性の 10% 未満の活性が認められた。

PBB, Polybrominated biphenyl; PBDE, Polybrominated diphenyl ether

図1 酵母

Two-Hybrid 法

における甲状腺ホルモン様作用の用量反応曲線

T3 ( ) T4 ( ) *o-t*-ブチルフェノール ( ) *o*-イソプロピルフェノール ( )

\* : 1.0 x 10<sup>-6</sup> M T3 作用時の β-ガラクトシダーゼの活性を 100 % としたときの相対活性

化合物名	EC <sub>10</sub> (M)	相対活性 <sup>b)</sup>	備考
フタル酸ジメチル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ジエチル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ジプロピル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ジイソブチル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ジブチル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ジエチルヘキシル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ジイソノニル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤

フタル酸ジイソデシル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ジシクロヘキシル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
フタル酸ベンジルブチル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
アジピン酸ジメチル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
アジピン酸ジエチル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
アジピン酸ジビニル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
アジピン酸ジイソプロピル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
アジピン酸ジイソブチル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
アジピン酸ジエチルヘキシル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
アジピン酸ジイソノニル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
バレリン酸	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
4,4-ビス(4-ヒドロキシフェニル)			
セバシン酸ジブチル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
アゼライン酸ジエチルヘキシル	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	可塑剤
3,5,3'-トリヨードチロニン (T3)	2.1 x 10 <sup>-8</sup>	1	甲状腺ホルモン

表3 フタル酸エステル類及びアジピン酸エステル類の甲状腺ホルモン様作用の評価  
b) 相対活性：3,5,3'-トリヨードチロニンの EC<sub>10</sub> / 被検化学物質の EC<sub>10</sub>

化合物名	EC <sub>10</sub> (M)	相対活性 <sup>b)</sup>	備考
<i>p</i> -メチルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	消毒剤、樹脂添加剤
<i>p</i> -エチルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	界面活性剤、樹脂添加剤
<i>p-n</i> -プロピルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	界面活性剤
<i>p-s</i> -ブチルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	界面活性剤
<i>p-t</i> -ブチルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	界面活性剤、PC 樹脂分子量調整剤
<i>p-n</i> -ブチルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	界面活性剤、樹脂添加剤
<i>p-t</i> -ペンチルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	界面活性剤、樹脂添加剤
<i>p-n</i> -ペンルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	
<i>p-n</i> -ヘキシルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	
<i>p-n</i> -ヘプチルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	
<i>p-t</i> -オクチルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	界面活性剤、樹脂添加剤
<i>p-n</i> -オクチルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	界面活性剤、樹脂添加剤
<i>p-br</i> -ノニルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	界面活性剤、樹脂添加剤
<i>p-n</i> -ドデシルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	界面活性剤、樹脂添加剤
<i>o</i> -メチルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	
<i>o</i> -エチルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	
<i>o</i> -イソプロピルフェノール	3.1 x 10 <sup>-4</sup>	1/1.5 x 10 <sup>4</sup>	
<i>o-n</i> -プロピルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	
<i>o-t</i> -ブチルフェノール	4.8 x 10 <sup>-5</sup>	1/2.3 x 10 <sup>3</sup>	
<i>o-n</i> -ブチルフェノール	> 3.0 x 10 <sup>-4</sup>	-	

<i>o</i> -フェニルフェノール (OPP)	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	防黴剤
<i>o</i> -ヨードフェノール	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	
<i>m-t</i> -ブチルフェノール	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	
BHT	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	酸化防止剤
BHA	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	酸化防止剤
4,4-ジヒドロキシビフェニル	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	
1-ヒドロキシピレン	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	ピレン代謝産物
3,5,3'-トリヨードチロニン (T3)	2.1 × 10 <sup>-8</sup>	1	甲状腺ホルモン

表4 アルキルフェノール類の甲状腺ホルモン様作用の評価

b) 相対活性：3,5,3'-トリヨードチロニンの EC<sub>10</sub> / 被検化学物質の EC<sub>10</sub>

化合物名	EC <sub>10</sub> (M)	相対活性 <sup>b)</sup>	備考
メチルパラベン	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	保存料
エチルパラベン	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	保存料
プロピルパラベン	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	保存料
ブチルパラベン	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	保存料
ベンジルパラベン	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	保存料
<i>p</i> -ヒドロキシ安息香酸 Na	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	パラベン代謝産物
3-フェノキシ安息香酸	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	
ビスフェノール A	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	PC 樹脂原料
BADGE	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	PC 樹脂原料
BADGE・2HCl	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	PC 樹脂溶出成分
BADGE・2H <sub>2</sub> O	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	PC 樹脂溶出成分
ジフェニルカーボネート	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	PC 樹脂原料
トリエチルアミン	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	PC 樹脂原料
フェノール	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	工業原料
トルエン	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	工業原料
スチレン	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	工業原料
エチルベンゼン	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	工業原料
イソプロピルベンゼン	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	工業原料
<i>n</i> -プロピルベンゼン	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	工業原料
<i>t</i> -ブチルベンゼン	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	工業原料
<i>p</i> -ニトロベンゼン	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	工業原料
<i>p</i> -トルエン	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	工業原料
ビフェニル	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	工業原料
<i>trans</i> -スチルベン	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	工業原料
ジフェニルエーテル	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	熱媒体
4-プロモジフェニルエーテル	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	難燃剤
4,4'-ジプロモジフェニルエー	> 3.0 × 10 <sup>-4</sup>	-	難燃剤

テル				
ベンゾフェノン	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-		紫外線吸収剤
オキシベンゾン	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-		紫外線吸収剤
ジオキシベンゾン	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-		紫外線吸収剤
サリチル酸	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-		紫外線吸収剤
4- <i>t</i> -ブチルフェノールエステル				
チロシン	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-		アミノ酸
チラミン HCl	$> 3.0 \times 10^{-4}$	-		アミノ酸分解産物
3,5,3',5'-テトラヨードチロニン (T4)	$4.2 \times 10^{-8}$	1/2		甲状腺ホルモン
3,5,3'-トリヨードチロニン (T3)	$2.1 \times 10^{-8}$	1		甲状腺ホルモン

表5 アルキルフェノール類の甲状腺ホルモン様作用の評価

b) 相対活性：3,5,3'-トリヨードチロニンの  $EC_{10}$  / 被検化学物質の  $EC_{10}$