

## 安定型形質転換細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイによる フタル酸エステル類のアンドロゲン及び抗アンドロゲン作用の検討

佐藤 かな子<sup>\*</sup>, 野中 良一<sup>\*</sup>, 池田 美樹<sup>\*\*</sup>, 佐藤 毅<sup>\*\*</sup>,  
上村 尚<sup>\*</sup>, 長井 二三子<sup>\*</sup>

Study on Androgenic and Anti-Androgenic Effects of Phthalate Esters  
with the Reporter Gene Assay using AR-EcoScreen, Stable Transfected CHO-K1 cells

Kanako SATOH<sup>\*</sup>, Ryouichi NONAKA<sup>\*</sup>, Miki IKEDA<sup>\*\*</sup>, Tsuyoshi SATOH<sup>\*\*</sup>,  
Hisashi KAMIMURA<sup>\*</sup> and Fumiko NAGAI<sup>\*</sup>

Phthalate diesters are widely used as plasticizers to give flexibility to a variety of polyvinyl chloride-based products such as transfusion tubes, gloves and food wraps. Because they are leached from plastic over time, and are volatile lipid-soluble compounds, phthalate diesters are ubiquitous environmental contaminants. When they are administered to rats, phthalate diesters rapidly metabolize into mono-phthalate esters. Some phthalate diesters were shown to have weak estrogenic activity *in vitro* and *in vivo* experiments. We previously revealed the binding affinity of diethylhexyl phthalate, di-n-butyl phthalate and dicyclohexyl phthalate for androgen receptors in the screening tests of many chemicals. In this study, the androgenic and anti-androgenic effects of phthalate diesters and mono-phthalate esters were examined by AR reporter gene assay using cell lines of stable transfection, which express AR and luciferase-based reporter genes. These results showed that none of the tested phthalate esters had androgenicity. On the other hand, androgen antagonistic activities were observed in diethyl phthalate, diisopropyl phthalate, di-n-hexyl phthalate, and butylbenzyl phthalate.

**Keywords :** 内分泌かく乱物質 endocrine disruptor, ジエチルフタル酸エステル diethyl phthalate, ジ-n-ブチルフタル酸エステル di-n-butyl phthalate, ジシクロヘキシルフタル酸エステル dicyclohexyl phthalate, フタル酸モノエチル mono-ethyl phthalate, フタル酸モノブチル mono-butyl phthalate, フタル酸モノシクロヘキシル mono-cyclohexyl phthalate, レポーター遺伝子アッセイ reporter gene assay, 抗アンドロゲン作用 anti-androgenic effect, アンドロゲン作用 androgenic effect

### 緒 言

フタル酸エステル類(Table 1)は, 加工性, 耐寒性, 耐揮発性, 絶縁性などの理由からプラスチックの可塑剤として広く用いられているが, 内分泌かく乱作用が疑われている<sup>1-5)</sup>. 我々も以前, 試験管内試験(*in vitro*)において, フタル酸ジエステル類の女性ホルモン(エストロゲン)様作用について報告した<sup>6)</sup>. フタル酸ジエステル類は食品包装資材<sup>7)</sup>, 医療用器具<sup>8-10)</sup>, おもちゃ<sup>11)</sup>などから溶出され, バター, チーズ等の乳製品からも高濃度に検出されている<sup>12)</sup>. また, フタル酸ジエステル類は, 体内で代謝されてフタル酸モノエステル類に変化することによって内分泌機能をかく乱する作用を現すことを示唆する報告<sup>13)</sup>もある. しかし, *in*

*vitro* でのフタル酸モノエステル類に関する報告, さらにフタル酸ジエステル類の抗アンドロゲン作用を調べた報告はない. そこで今回男性ホルモン(アンドロゲン)受容体(AR)とアンドロゲン高感受性ルシフェラーゼを安定的に発現する形質転換細胞(AR-EcoScreen)及びホルモン非依存的にルシフェラーゼを安定的に発現する細胞(c-luc)を用いたレポーター遺伝子アッセイ<sup>14)</sup>により, フタル酸ジエステル類及びそれらの生体内代謝物質であるフタル酸モノエステル類のアンドロゲン性及び抗アンドロゲン性について調べた. また, AR 結合作用についても調べたので合わせて報告する.

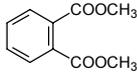
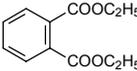
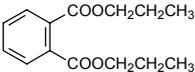
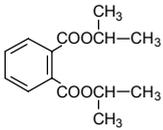
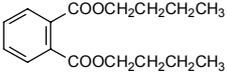
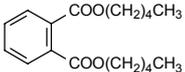
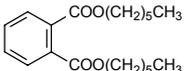
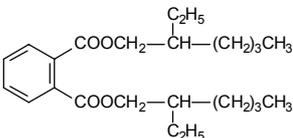
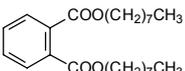
\* 東京都健康安全研究センター 環境保健部薬理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

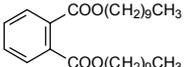
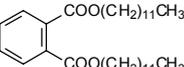
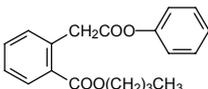
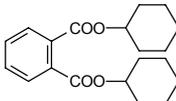
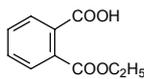
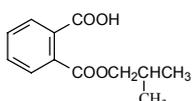
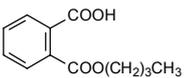
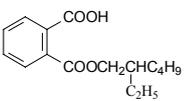
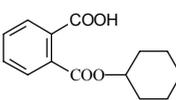
\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,

3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

\*\* 東京理科大学理学部

Table 1. Chemicals

Phthalate esters	Abbreviation	Structure	Supplier (Code No.)	Purity (%)
dimethyl phthalate	DMP		Wako (045-17041)	>99
diethyl phthalate	DEP		Tokyo Kasei (P0296)	>98
dipropyl phthalate	DPP		Kanto Kagaku (10481-30)	>98
diisopropyl phthalate	DIPP		Tokyo Kasei (P0301)	>98
di-n-butyl phthalate	DBP		Tokyo Kasei (P0292)	>98
di-n-pentyl phthalate	DPeP		Kanto Kagaku (11138-31)	>98
di-n-hexyl phthalate	DHP		Kanto Kagaku (11425-96)	>99
diethylhexyl phthalate	DEHP		Tokyo Kasei (P0297)	>98
di-n-octyl phthalate	DOP		Wako (048-22362)	>97

di-n-decyl phthalate	DDEP		Kanto Kagaku (11153-30)	>90
di-n-dodecyl phthalate	DDDP		Kanto Kagaku (8664)	>97
benzyl n-butyl phthalate	BBP		Tokyo Kasei (P0288)	>98
dicyclohexyl phthalate	DCHP		Wako (045-19545)	>99
<hr/>				
mono-ethyl phthalate	MEP		Synthesis	>90
mono-isobutyl phthalate	MIBP		Synthesis	>90
mono-n-butyl phthalate	MBP		Tokyo Kasei (P1132)	>90
mono-2-ethylhexyl phthalate	MEHP		Tokyo Kasei (P1073)	>90
mono-cyclohexyl phthalate	MCHP		Synthesis	>90

## 実験の部

## 1. 試薬

検討したフタル酸エステル類の省略記号, 化学構造式, メーカー及び純度は Table 1 に記載した. Ethanol, iso-butanol, cyclohexanol, n-butyl lithium (n-BuLi), tetrahydrofuran (THF)及び phthalic anhydride は関東化学の特級品を用いた. ウシ胎児血清(FBS)は Hyclone 社, ペニシリン-ストレプトマイシン液(5000  $\mu\text{g/mL}$ )は大日本製薬, zeocin と hygromycin B は Invitrogen 社, DME 培地(D-MEM/F-12), フェノールレッド不含 DME/F-12 培地, トリプシンは Gibco 社を用いた. AR-レポーター遺伝子アッセイには, チャコールデキストラン処理によりホルモン類を除去した FBS(DCFBS)を用いた. PBS(-)は日水製薬, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT)と dimethyl sulfoxide (DMSO)は和光純薬, cyproterone acetate (CTA)はシグマアルドリッチジャパン社を用いた. その他の試薬は特級品を用いた.

## 2. フタル酸モノエステル類の合成

フタル酸モノエステルの合成は, 以下のように行った (Fig. 1). MEP の合成は, 9.43 mL の n-BuLi (1.59 mol/L) を 15 mmol ethanol と 10 mL THF 混合液に氷冷下で撹拌しながら滴下後, phthalic anhydride 1.48 g (20 mmol) の THF(8 mL)溶解液を滴下した. 反応液を減圧留去し, 残渣を再留水 10 mL で溶解し, 塩酸性後, ベンゼン抽出した. ベンゼンを減圧留去後, 得られた薄黄色の油状物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:アセトン=1:2)で精製した. 溶出溶媒留去後の乾固物質は無色油状であり, 収量 1.36 g, 収率 70% だった.

MIBP の合成は, ethanol の代わりに isobutanol を用いる以外は MEP と同様の操作により行った. カラムクロマトグラフィーによる精製後, 収率 71% で無色油状物質を得た.

MCHP の合成は, ethanol の代わりに cyclohexanol を用いる他は, MEP と同様の操作を行った. カラムクロマトグラフィーの溶出溶媒はヘキサン:アセトン=2:1 を用いた. 乾固物質は無色油状であり, 収率は 72% だった.

合成した MEP, MIBP, MCHP の IR 及び NMR のスペクトルデータはいずれも既知のデータと一致し, 純度は 90% 以上だった (Table 1).

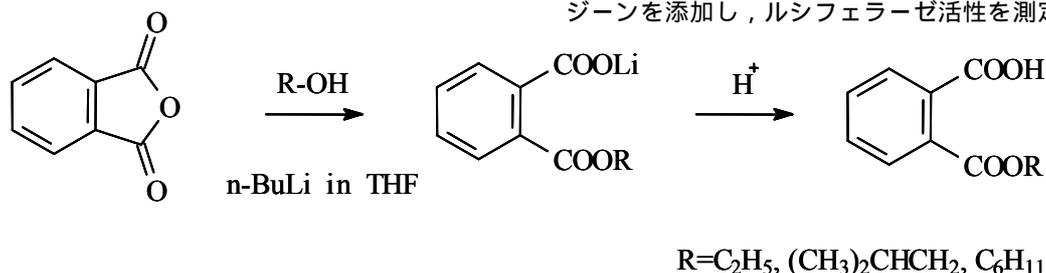


Fig. 1. Synthetic reactions of phthalic acid mono esters

## 3. 細胞株

大塚製薬より供与された, チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1 細胞)より構築したアンドロゲン受容体及びアンドロゲン高感受性ルシフェラーゼを安定的に発現する形質転換細胞(AR-EcoScreen)及びホルモン非依存的にルシフェラーゼを安定的に発現する細胞(c-luc)を既報<sup>14)</sup>に従って使用した.

## 4. AR-EcoScreen 及び c-luc 細胞の継代培養法

細胞の継代は, 既報<sup>14)</sup>に従い 3~4 日毎に行った. トリプシン処理した  $5.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$  個の AR-EcoScreen または c-luc 細胞を 75 cm<sup>2</sup> フラスコ(Corning 社)に播種した. 継代用培地 D-MEM/F12 (含 10% FBS, 100 U/mL ペニシリン, 100  $\mu\text{g/mL}$  ストレプトマイシン, 200  $\mu\text{g/mL}$  zeocin, 200  $\mu\text{g/mL}$  hygromycin B) 20 mL 加えて, 温度 37 $^{\circ}\text{C}$ , 湿度 100%, CO<sub>2</sub> 濃度 5% に制御したインキュベーター内で培養した.

## 5. AR-レポーター遺伝子アッセイ

アンドロゲン作用及び抗アンドロゲン作用の測定は, 既報<sup>14)</sup>に従った. 概要は, 以下の通りである. AR-EcoScreen をトリプシン処理後, 10% DCFBS, 100 U/mL ペニシリン, 100  $\mu\text{g/mL}$  ストレプトマイシンを添加したフェノールレッド不含 DMEN/F-12 培地を加え,  $1.2 \times 10^5$  個細胞/mL の細胞液とした. 96 穴マイクロプレート(Corning 社)に上記の細胞液を 80  $\mu\text{L}$ /穴播種し, CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した. アンドロゲン作用は, DMSO に溶解した種々の濃度の被験物質を, 抗アンドロゲン作用は, DHT(終濃度  $5.0 \times 10^{-10}$  M)と種々の濃度の被験物質をそれぞれ細胞液に 10  $\mu\text{L}$ /穴添加して測定した. CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養後, 細胞を室温に戻し, ピッカジーン® (LT2.0 HS, 東洋インキ)を 100  $\mu\text{L}$ /穴添加し, 5 分間撹拌後, ルシフェラーゼ活性を発光分析装置(LB96V, ベルトールド社)で測定した. 測定液中の 0.1% DMSO は, 測定結果に影響しなかった.

## 6. 細胞毒性測定

c-luc 細胞を 96 穴マイクロプレートに AR-EcoScreen と同様に播種し, 24 時間培養後, DMSO に溶解した種々の濃度の被験物質を添加した. 更に 24 時間培養後, ピッカジーンを添加し, ルシフェラーゼ活性を測定した<sup>14)</sup>.

## 7. AR 結合作用の測定

ヒト AR に対する結合作用は, Ligand Screening System -Androgen Receptor-Kit (ARA-101, 東洋紡)を用い, 既報<sup>6)</sup>に従って種々の濃度のフタル酸エステル類をテストステロン共存下でヒト AR と競合反応させて調べた.

## 結 果

## 1. AR-EcoScreen による AR-レポーター遺伝子アッセイの検討

## 1) AR-EcoScreen 及び c-luc ルシフェラーゼ活性に及ぼすアンドロゲン化合物・DHT の影響

DHT はテストステロンから生合成され, アンドロゲン受容体と結合してアンドロゲン作用を示す化合物である. そこで種々の濃度の DHT を細胞培養液中に添加し, 培養後, AR-EcoScreen 及び c-luc のルシフェラーゼ活性を測定した(Fig. 2). AR-EcoScreen では  $1.0 \times 10^{-11}$  M DHT でルシフェラーゼ活性が上昇し始め,  $1.0 \times 10^{-9}$  M でほぼ最高値を示した. 最大活性値の半分の値を示す DHT 濃度(半活性化濃度:EC<sub>50</sub> 値)は  $5.0 \times 10^{-10}$  M であった. DHT は, c-luc の活性には影響しなかった(データ示さず).

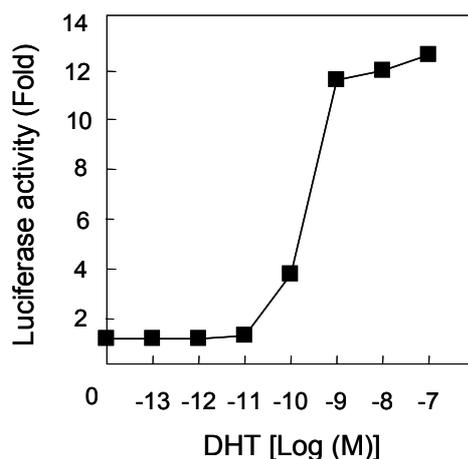


Fig. 2. AR-agonist assay of  $5\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) with AR-EcoScreen. AR-EcoScreen was treated with various concentrations of DHT. Luciferase activity with DMSO alone (vehicle control) was expressed as 1.0 fold. Data were shown as mean fold induction of luciferase by DHT compared with that of vehicle control. The concentration of DMSO in all samples including vehicle control was 0.1%. Luciferase activity in 0.1% DMSO was the same level in the absence of DMSO. The S.D. was less than 2.5% (n = 4).

## 2) AR-EcoScreen 及び c-luc ルシフェラーゼ活性に及ぼす抗アンドロゲン化合物・CTA の影響

AR-EcoScreen を  $5.0 \times 10^{-10}$  M DHT 存在下で既知の抗アンドロゲン物質である CTA の濃度を変化させて培養し, ルシフェラーゼ活性を測定した. CTA の濃度上昇に伴ってルシフェラーゼ活性が減少し,  $5.0 \times 10^{-10}$  M DHT 存在下でのルシフェラーゼ活性を 50% 阻害する CTA 濃度(半阻害濃度:IC<sub>50</sub> 値)は,  $1.5 \times 10^{-7}$  M だった. 一方, c-luc のルシフェラーゼ活性には, 調べた限りの濃度では, ほとんど影響しなかった(Fig. 3).

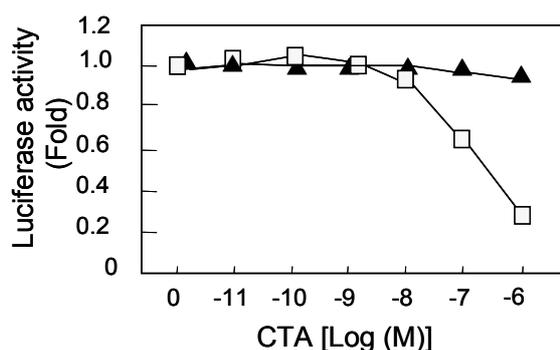


Fig. 3. AR-antagonist activity of cyproterone acetate (CTA). AR-EcoScreen and c-luc were respectively treated with various concentrations of CTA in the presence of  $5.0 \times 10^{-10}$  M  $5\alpha$ -dihydrotestosterone DHT. The S.D. was less than 2.2% (n = 4). □, AR-EcoScreen; ▲, c-luc.

## 3) フタル酸エステル類のアンドロゲン作用

フタル酸エステル類 (Table 1) 添加時の AR-EcoScreen ルシフェラーゼ活性は, DMSO のみを添加した場合と比較して, いずれの化合物も変化がなかった. これらの結果より, 調べたフタル酸エステル類には, アンドロゲン作用は認められなかった(Table 2).

## 4) フタル酸エステル類の抗アンドロゲン作用

フタル酸ジエステル類について抗アンドロゲン作用を調べた(Fig. 4a-d, Table 2).

DEP は  $1.0 \times 10^{-6}$  M 濃度から, DHT ( $5.0 \times 10^{-10}$  M) 添加により上昇した AR-EcoScreen ルシフェラーゼ活性を減少させ,  $1.0 \times 10^{-4}$  M で約 30% になった(Fig. 4a). IC<sub>50</sub> 値は  $3.1 \times 10^{-5}$  M であった. c-luc 細胞のルシフェラーゼ活性に対しては,  $1.0 \times 10^{-4}$  M まで調べたが, 影響せず, 細胞毒性は認められなかった.

DIPP は, DHT 添加により上昇した AR-EcoScreen のルシフェラーゼ活性を  $1.0 \times 10^{-5}$  M から減少させ始め,  $1.0 \times 10^{-4}$  M で 61% にした(Fig. 4b). c-luc のルシフェラーゼ活性には調べた濃度 ( $1.0 \times 10^{-4}$  M) では影響せず, 細胞毒性は認められなかった.

DHP は  $1.0 \times 10^{-6}$  M から, DHT 添加により上昇した AR-EcoScreen のルシフェラーゼ活性を減少させ始め,  $1.0 \times 10^{-4}$  M で約 25% に減少させた(Fig. 4c). IC<sub>50</sub> 値は  $3.8 \times 10^{-5}$  M だった. c-luc のルシフェラーゼ活性に対しては影響せず, 細胞毒性は認められなかった.

BBP は  $1.0 \times 10^{-5}$  M で, DHT 添加により上昇した AR-EcoScreen のルシフェラーゼ活性をやや減少させ,  $1.0 \times 10^{-4}$  M では約 62% に減少させた(Fig. 4d). c-luc のルシフェラーゼ活性には影響せず, 細胞毒性は認められなかった.

DMP, DPP, DBP, DPpP, DEHP, DOP, DDEP, DDDP 及び DCHP は  $1.0 \times 10^{-4}$  M まで調べたが, DHT 添加時の AR-EcoScreen ルシフェラーゼ活性を抑制せず, 抗アンドロゲン作用は認められなかった (Table 2).

フタル酸モノエステル類の抗アンドロゲン性についても

Table 2. Endocrine disruptive effects of phthalate esters

Phthalate esters	AR-Reporter gene assay		AR-Binding assay
	Antagonist activity (IC <sub>50</sub> ) <sup>a)</sup>	Agonist activity (EC <sub>50</sub> ) <sup>b)</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>c)</sup>
DMP	NE	NE	NE
DEP	3.1 x 10 <sup>-5</sup> M	NE	>1.9 x 10 <sup>-4</sup> M <sup>d)</sup>
DPP	NE	NE	NE
DIPP	>1.0 x 10 <sup>-4</sup> M	NE	NE
DBP	NE	NE	>1.9 x 10 <sup>-4</sup> M <sup>e)</sup>
DPeP	NE	NE	NE
DHP	3.8 x 10 <sup>-5</sup> M	NE	>1.9 x 10 <sup>-4</sup> M <sup>f)</sup>
DEHP	NE	NE	>1.9 x 10 <sup>-4</sup> M <sup>g)</sup>
DOP	NE	NE	NE
DDEP	NE	NE	NE
DDDP	NE	NE	NE
BBP	>1.0 x 10 <sup>-4</sup> M	NE	9.3 x 10 <sup>-5</sup> M
DCHP	NE	NE	>1.9 x 10 <sup>-4</sup> M <sup>h)</sup>
MEP	NE	NE	NE
MIBP	NE	NE	NE
MBP	NE	NE	NE
MEHP	4.0 x 10 <sup>-5</sup> M	NE	NE
MCHP	>1.0 x 10 <sup>-4</sup> M	NE	NE
DHT	NE	1.6 x 10 <sup>-10</sup> M	-
CTA	2.0 x 10 <sup>-7</sup> M	NE	-

NE: no effect at 1.0 x 10<sup>-4</sup> M (AR-Reporter gene assay) or 1.9 x 10<sup>-4</sup> M (binding assay).

- a) the concentration of the test chemicals required for reducing 50 % of luciferase activity at 5.0 x 10<sup>-10</sup> M 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT).  
 b) the concentration of the chemicals producing 50 % of the maximum activity.  
 c) the concentration of the chemicals required to reduce the specific binding of testosterone by 50 %.  
 d-h) the inhibition of the testosterone binding at 1.9 x 10<sup>-4</sup> M chemical was 42, 42, 41, 11 and 45 %, respectively.

調べた。MEHPは1.0 x 10<sup>-6</sup> MからDHT添加により上昇したAR-EcoScreenのルシフェラーゼ活性を減少させ始め、1.0 x 10<sup>-4</sup> Mで約25%に減少させた(Fig. 4e)。IC<sub>50</sub>値は1.0 x 10<sup>-5</sup> Mであった。しかし、MEHPはc-lucのルシフェラーゼ活性もAR-EcoScreenとほぼ同様に1.0 x 10<sup>-6</sup> Mから減少させ始め(IC<sub>50</sub>値; 1.3 x 10<sup>-5</sup> M)、1.0 x 10<sup>-4</sup> Mで約20%に減少した。

MCHPも1.0 x 10<sup>-4</sup> Mで、DHT添加により上昇したAR-EcoScreen及びc-lucのルシフェラーゼ活性をやや減少させる傾向を示した(Fig. 4f)。

MEP, MIBP, MBPは1.0 x 10<sup>-4</sup> Mまで調べたが、DHT添加により上昇したAR-EcoScreen及びc-luc細胞のルシフェラーゼ活性に影響せず、抗アンドロゲン作用及び細胞毒性は認められなかった(Table 2)。

## 2. フタル酸エステル類のヒトAR結合作用

種々の濃度のフタル酸エステル類をテストステロン共存下でヒトARと競合反応させ、得られた競合曲線より、テストステロンのARへの結合を50%阻害するフタル酸エステル濃度(IC<sub>50</sub>値)を求めた(Table 2)。

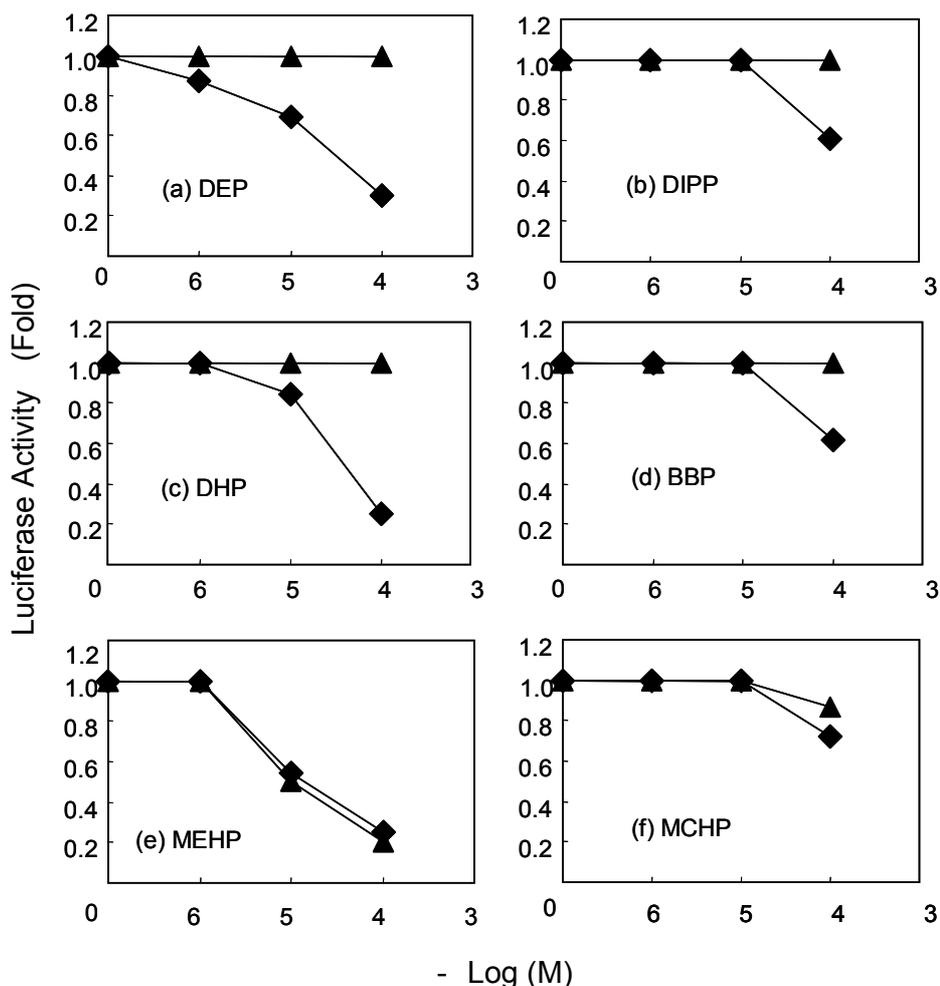


Fig. 4. AR-Antagonist assay of phthalate esters. AR-EcoScreen and c-luc were treated with various concentrations of phthalate esters in the presence of  $5.0 \times 10^{-10}$  M  $5\alpha$ -ydrtestosterone. The S.D. was less than 2.4% ( $n = 4$ ). ◆, AR-EcoScreen; ▲, c-luc.

BBPはARに対して結合作用を示し、 $IC_{50}$ 値は $9.3 \times 10^{-5}$  Mであった。DEP、DBP、DHP、DEHP及びDCHPのAR結合作用は比較的弱く、各々 $1.9 \times 10^{-4}$  Mまで調べたが、 $IC_{50}$ 値は求められなかった。DMP、DPP、DIPP、DPeP、DOP、DDEP及びDDDPについても調べたが、ARに対する結合作用は認められなかった。

フタル酸モノエステル類MEP、MIBP、MBP、MEHP、MCHPについても、 $1.9 \times 10^{-4}$  Mまで調べたがAR結合作用は認められなかった。

#### 考 察

AR-EcoScreenは、典型的なアンドロゲン物質であるDHT、及び抗アンドロゲン物質であるCTAに対する反応性より、アンドロゲン作用及び抗アンドロゲン作用に対して安定的に、しかも特異的かつ鋭敏に反応することが確認できた。2種類の細胞を同時に同じ方法で処理することにより、アンドロゲン性と抗アンドロゲン性を迅速に測定でき、ハイスループットスクリーニング法としての利点は大きい。本レポーター遺伝子アッセイは、数多くの物質のアンドロゲン性及び抗アンドロゲン性を簡便にスクリーニン

グするための非常に有用な方法である。

フタル酸エステル類についてAR-EcoScreenによる、AR-レポーター遺伝子アッセイを行ったところ、DEP、DIPP、DHP、BBPに抗アンドロゲン作用、MEHPに細胞毒性があることが明らかになった。

DEPは、医療用輸液用のプラスチック容器の可塑剤として使用されていたが、当センター<sup>9)</sup>等の測定において輸液中に溶出することが明らかとなったため、現在は輸液チューブには使用されなくなってきている。また、空気中のDEPは、室内で最高 $241 \text{ ng/m}^3$ 、屋外で $42.7 \text{ ng/m}^3$ 濃度だったことが当センターより報告されている<sup>15)</sup>。本研究において、抗アンドロゲン作用が示唆される結果を得たが、今後は実際に生体内に取り込まれたDEPが内分泌系に影響する可能性を動物実験により検討する必要があると考えられる。

DIPPは、高濃度( $1 \times 10^{-4}$  M)においてのみDHT誘導性ルシフェラーゼ活性を減少させた。しかしARに対する結合性は認められなかったことから、他のメカニズムを介する作用である可能性が考えられる。

DHPは、耐寒性、耐揮発性に優れ、水不溶性であるこ

とから、自動車の部品、食器洗い機のかご部分や、フロアリングなどに利用されている。一方、DHP を餌に混和して投与した雄マウスの精子運動能および精子濃度の低下、精巣重量の低下が、また雌マウスの体重、腎臓、副腎の重量減少、及び肝臓重量の増加が認められている<sup>16)</sup>。更に、この雌雄マウスを同棲させた結果、妊娠率の著しい低下、同腹児数と生児数の著しい減少も認められ、DHP は生殖毒性を有する可能性が示唆された<sup>16)</sup>。今回の研究により、DHP は抗アンドロゲン作用を示すことが明らかになった。DHP の AR 結合能は比較的弱いが生動物への影響を表す一つのメカニズムとして抗アンドロゲン作用が考えられる。

BBP は、環境省の平成 13 年度内分泌攪乱化学物質に関する食事調査(フタル酸エステル類)資料<sup>17)</sup>によると家庭内外での食事、インスタント食品から最大値 30 µg/kg 検出されている。今回の実験において BBP は、高濃度であるが  $1 \times 10^{-4}$  M で抗アンドロゲン作用を示し、更に AR への結合作用 ( $IC_{50}$  値;  $9.3 \times 10^{-5}$  M) も認めた。これらの結果より、BBP が AR に結合し、抗アンドロゲン作用が現れた可能性も考えられる。

DEHP は食品包装資材<sup>7)</sup>、医療用器具<sup>8-10)</sup>、おもちゃ<sup>11)</sup>等に使用されているが、それらから DEHP の溶出実態を示す報告がある<sup>18)</sup>。更に、環境庁の食事調査資料<sup>17)</sup>によると、DEHP は家庭内外での食事、インスタント食品、人工乳、離乳食いずれからも 80~89% の高確率で平均濃度 63~74 µg/kg 検出されている。また、当センターの調査によると空気中の DEHP 濃度は、室内で最高 2,370 ng/m<sup>3</sup>、屋外で 547 ng/m<sup>3</sup>であった<sup>15)</sup>。今回の実験において、DEHP はアンドロゲン性、抗アンドロゲン性及び AR 結合作用ともほとんど認められなかった。また、DEHP の生体内代謝物であり<sup>8)</sup>、内分泌攪乱作用を有する可能性が示唆されている MEHP についても検討したが、細胞毒性が強く、レポーター遺伝子アッセイでは、抗アンドロゲン性を有すると認めることはできなかった。MEHP は、AR への結合作用を示さないことから、抗アンドロゲン作用を有する可能性は低いと考えられる。これらの結果から、DEHP に関しては今後内分泌かく乱作用以外の生体影響について検討する必要があると考えられる。

## 文 献

- 1) Jobling, S., Reynolds, T., White, R., *et al.* *Environ. Health Perspect.*, **103**, 582-587, 1995.
- 2) Sonnenschein, C., Soto, A.M., Fernandez, M.F., *et al.*: *Clin. Chem.*, **41**, 1888-1895, 1995.
- 3) Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., *Environ. Health Perspect.*, **103** (suppl 7), 113-122, 1995.
- 4) Nakai, M., Tabira, Y., Asai, D., *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **254**, 311-314, 1999.
- 5) Sharpe, R.M., Fisher, J.S., Millar, M.M., *et al.*: *Environ. Health Perspect.*, **103**, 1136-1143, 1995.
- 6) Satoh, K., Nagai, F., Aoki, N.: *J. Health Sci.* **47**, 495-501, 2001.
- 7) 斉藤勲, 上野英二, 大島晴美, 他: 食衛誌, **43**, 185-189, 2002.
- 8) Lygre, H., Solheim E., Gjerdet N.R. *et al.*: *Acta. Odontol. Scand.*, **51**, 46-51, 1993.
- 9) 長嶋真知子, 宮武ノリエ, 高橋美佐子, 他: 東京衛研年報, **53**, 45-48, 2002.
- 10) 矢野良一, 中村敏明, 青野浩直, 他: 薬誌, **121**, 139-144, 2001.
- 11) 阿部有希子, 杉田たき子, 和久井千世子他, : 食衛誌, **44**, 168-174, 2003.
- 12) Sharman, M., Read, W.A., Castle, L. *et al.*: *Food Addit. Contam.*, **11**, 375-385, 1994.
- 13) Eigenberg, D., A., Bozigian, H. P., Carter, D., E., *et al.*: *J. Toxicol. Environ. Health*, **17**, 445-456, 1986.
- 14) Satoh, K., Ohyama, Y., Aoki, N., *et al.*: *Food Chem. Toxicol.*, **42**, 983-993, 2004.
- 15) 斉藤育江, 大貫文, 瀬戸博, 他: 東京衛研年報, **53**, 191-198, 2002.
- 16) Lamb IV JC, Chapin RE, Teague J. *et al.*: *Toxicol Appl Pharmacol.*, **88**, 255-269, 1987.
- 17) 環境省:平成 13 年度内分泌攪乱化学物質に関する食事調査(フタル酸エステル類)資料.
- 18) 尾崎麻子, 山口之彦, 岡本章良, 他: 食衛誌, **43**, 260-266, 2002.