

有機リン酸トリエステル類のホルモン様作用 レポーター遺伝子アッセイによる検討

大山 謙一*, 永田 紗恵子**, 細越 奈緒子**,
大貫 文*, 斎藤 育江*, 瀬戸 博*

Hormonal Effects of Organic Phosphate Triesters Study by the Reporter Gene Assay

Ken-ichi OHYAMA*, Saeko NAGATA**, Naoko HOSOGOE**,
Aya ONUKI*, Ikue SAITO* and Hiroshi SETO*

Organic phosphate triesters used as a flame retardant have been identified in indoor air, and it is apprehended that these compounds may affect human health. Therefore, we examined the androgenic and the estrogenic activities of organic phosphate triesters (11 compounds) and carried out a luciferase reporter-gene assay using cultured cells. The organic phosphate triesters examined were trimethylphosphate (TMP), triethylphosphate (TEP), tripropylphosphate (TPP), tributylphosphate (TBP), tris(2-chloroisopropyl)phosphate (TCIPP), tris(2-chloroethyl)phosphate (TCEP), tris(2-ethylhexyl)phosphate (TEHP), tri(butoxyethyl)phosphate (TBEP), tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP), triphenylphosphate (TPHP), and tricresylphosphate (TCP). TPP, TBP, TCIPP, TCEP, TBEP, TDCPP, TPHP and TCP inhibited the luciferase expression induced by dihydrotestosterone (10^{-9} M) and the IC_{50} value was 4.7×10^{-5} - 6.0×10^{-4} M. Moreover, TBP, TCIPP, TBEP, TDCPP, TPHP, and TCP inhibited the luciferase expression induced by 17β -estradiol (3×10^{-10} M) and the IC_{50} value was 3.3×10^{-5} - 2.3×10^{-4} M. It is suggested that some organic triesters have antiandrogenic and/or antiestrogenic activities.

Keywords : 有機リン酸トリエステル類 organic phosphate triesters, 抗アンドロゲン様作用 antiandrogenicity, 抗エストロゲン様作用 antiestrogenicity, レポーター遺伝子アッセイ reporter gene assay

はじめに

有機リン酸トリエステル類は繊維製品やプラスチックの難燃剤, またプラスチックの可塑剤, ラッカー溶剤, 金属塗料等に広く使用され, その内, 難燃剤や可塑剤は年間約2万t生産されている(1999年)¹⁾. これらの中には, 住宅及びオフィスビルの室内空気中に $14 \mu\text{g}/\text{m}^3$ を超える濃度で検出される化学物質があり, 居住空間を広く汚染していることが報告され²⁾, 持続的暴露による健康影響が懸念される. 有機リン酸トリエステル類は高濃度暴露による毒性実験では, コリンエステラーゼ阻害による神経毒性^{3, 4)} や遅発性神経毒性^{5, 6)}, あるいはアレルギー誘発性⁷⁾ を持つことが知られているが, 比較的低濃度での生体影響についてはよくわかっていない. そこで, 低濃度での影響が特徴であるホルモン様作用に着目し, 11種類の有機リン酸トリエステル類のアンドロゲン様作用あるいはエストロゲン様作用について明らかにするため, アンドロゲン高感受性安定発現型細胞のMDA-kb2細胞, またはエストロゲン高感

受性安定発現型細胞のMVLN細胞を用いてレポーター遺伝子アッセイを実施した.

実験方法

1. 試験物質 (Fig. 1, Table 1)

リン酸トリメチル, リン酸トリエチル, リン酸トリブチル, リン酸トリス(2-クロロイソプロピル), リン酸トリス(2-クロロエチル), リン酸トリス(2-エチルヘキシル), リン酸トリス(2-ブトキシエチル), リン酸トリス(1,3-ジクロロ-2-プロピル), リン酸トリフェニル, 及びリン酸トリクレシルは和光純薬, リン酸トリプロピル(TPP)はシグマ(USA)から購入した. これらの化学物質は, Dimethyl Sulfoxide に溶解しアッセイに供した.

2. 培養細胞

MDA-kb2細胞は, V. S. Wilson (USEPA, USA) から分与され, MVLN細胞は M. Pons (INSERM, France)から供与さ

* 東京都健康安全研究センター環境保健部環境衛生研究科 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

** 東京家政大学家政学部環境情報学科

Table 1. Chemical substances tested

Chemicals	abb.	MW	CAS No.
trimethylphosphate	TMP	140.1	512-56-1
triethylphosphate	TEP	182.2	78-40-0
tripropylphosphate	TPP	224.2	513-08-6
tributylphosphate	TBP	266.3	126-73-8
tris(2-chloroisopropyl)phosphate	TCIPP	327.6	13674-84-5
tris(2-chloroethyl)phosphate	TCEP	285.5	115-96-8
tris(2-ethylhexyl)phosphate	TEHP	434.6	78-42-2
tri(butoxyethyl)phosphate	TBEP	398.5	78-51-3
tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate	TDCPP	430.9	13674-87-8
triphenylphosphate	TPHP	326.3	115-86-6
tricresylphosphate	TCP	368.4	78-30-8

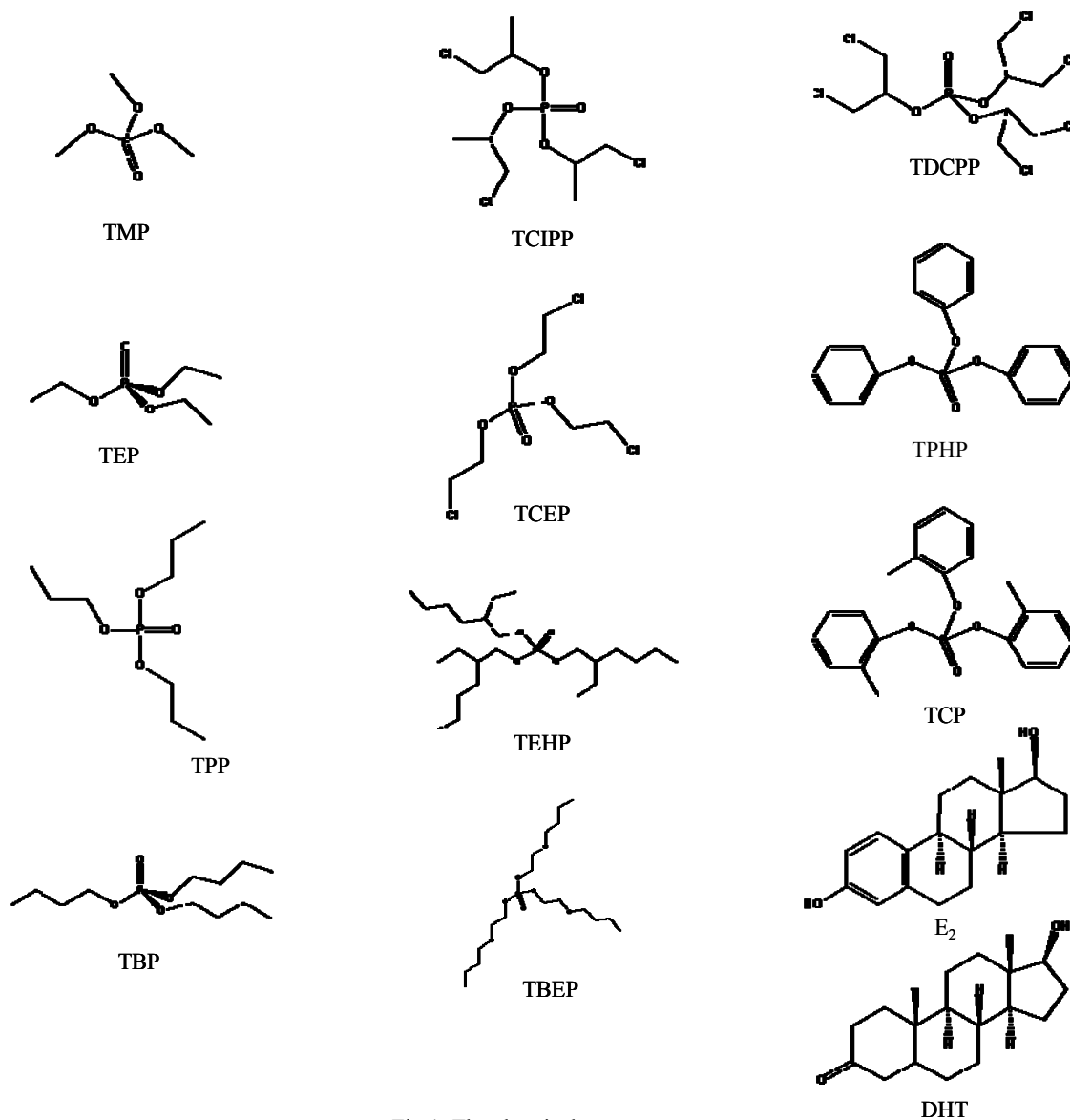


Fig. 1. The chemical structure

れた。

3. レポータージーンアッセイ

MDA-kb2 細胞では Wilson らの方法⁸⁾, また MVLN 細胞では Pons らの方法⁹⁾ により実施し, ルシフェラーゼ活性の測定は, 細胞内のルシフェラーゼを Pica Gene LT 2.0 HS (東洋インキ) により発光させ, マイクロプレートルミノメーター(Berthold, LB96V)で発光量を測定した. なお, 抗アンドロゲン様作用の検討には, アンドロゲン陽性物質の 10^{-9} M のジドロテストステロン(DHT; Sigma, USA)と各濃度の有機リン酸トリエステル類を競合させた. なお, 抗アンドロゲン陽性物質としてヒドロキシフルタミド(OHF; TRC, Canada)を用いた. 抗エストロゲン様作用の検討には 3×10^{-10} M の 17β -エストラジオール(E_2 ; Calbiochem, USA)と競合させ, 抗エストロゲン陽性物質としてヒドロキシタモキシフェン(OHT; Sigma, USA)を用いた. ルシフェラーゼ活性は, 10^{-9} M DHT あるいは 3.0×10^{-10} M E_2 での発光量からそれぞれの溶媒コントロールでの発光量を差し引いた発光量を 100%とした.

4. 細胞毒性

Sulforhodamine-B 染色法¹⁰⁾ により細胞たんぱく質量を測定することによって, 細胞数を算出した. 細胞生存比は溶媒コントロールでの細胞数を 1 として計算した.

結果

陽性対照物質である DHT と E_2 の量作用曲線を Fig. 2 に示した. MDA-kb2 細胞を用いたレポータージーンアッセイでは, 実施試験濃度範囲で 11 種類全ての有機リン酸トリエステル類にルシフェラーゼ活性は認められなかった. しかし, TPP, TBP, TCIPP, TCEP, TBEP, TDCPP, TPHP 及び TCP は, DHT (10^{-9} M)のルシフェラーゼ活性を阻害した(Fig. 3). IC_{50} 値と相対アンタゴニスト活性値(RA) [= (OHF の IC_{50}) ÷ (各化学物質の IC_{50}) × 100] を Table 2 に示した. DHT のルシフェラーゼ活性を阻害した有機リン酸エステル類の IC_{50} 値は, $4.7 \times 10^{-5} \sim 6.0 \times 10^{-4}$ M であり, TDCPP が最も低い濃度であった. MVLN 細胞を用いたレポータージーンアッセイでも 11 種類全ての有機リン酸トリエステル類にルシフェラーゼ活性は認められなかった. しかし, TBP, TCIPP, TBEP, TDCPP, TPHP 及び TCP は, E_2 (3×10^{-10} M)のルシフェラーゼ活性を阻害した(Fig. 4). IC_{50} 値と相対アンタゴニスト活性値(RA) [= (OHT の IC_{50}) ÷ (各化学物質の IC_{50}) × 100] を Table 3 に示した. これらの化学物質の IC_{50} 値は $2.4 \times 10^{-5} \sim 2.3 \times 10^{-4}$ M であり, TPHP が最も低い濃度であった.

考察

今回検討した有機リン酸トリエステル類の内, TMP と TEP を除いて, 抗アンドロゲン様作用あるいは抗エストロゲン様作用を有する物質が認められた. 分子量が E_2 (272.4)

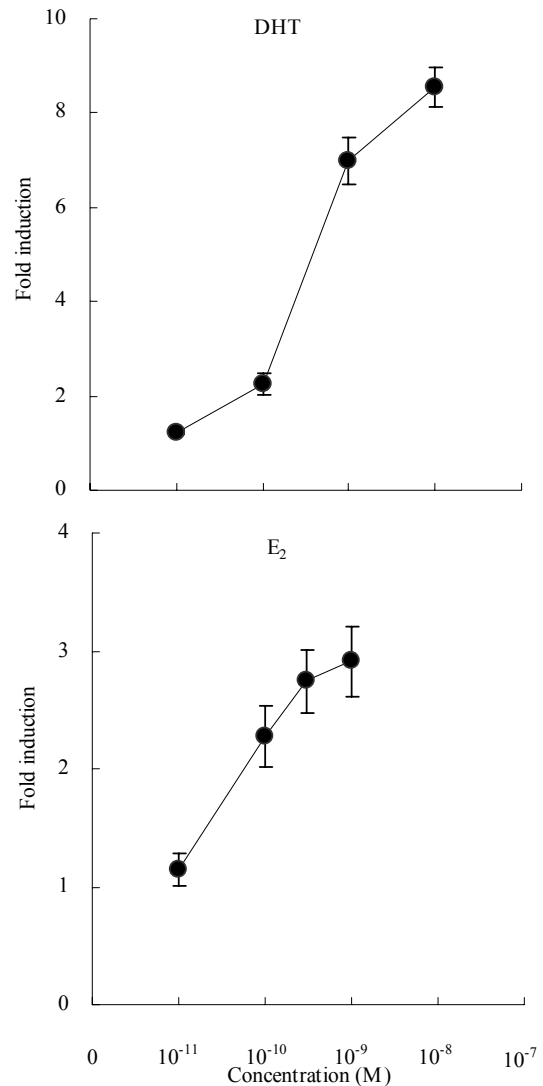


Fig. 2. Dose response of MDA-kb2 to DHT and MVLN to E_2 . Data are presented as fold induction compared to solvent controls. Each point is the mean \pm SD of 5 independent assays in triplicate.

や DHT (290.4)より同程度か小さい TMP (140.1), TEP (182.2), TPP (224.2)及び TCEP (285.5)では作用が見られないか, 弱い傾向が認められた. これらの化学物質の内, TBP, TCIPP, TBEP, TDCPP, TPHP 及び TCP は抗アンドロゲン様作用と抗エストロゲン様作用を共有していた. 有機リン酸トリエステルの分子構造と抗ホルモン様作用の関係では, 置換分にクロロアルキル基, 炭素数が 4 以上のアルキル基, あるいはアリル基を持っている場合に認められた. TPHP や TCP のようなフェニル基を持っている化学物質は比較的高い抗エストロゲン性を示した. このように *in vitro* 試験の結果から, 有機リン酸トリエステル類が生体での内分泌をかく乱させている可能性があることが示唆された. 住宅やオフィスビルで高頻度にかつ高濃度に検出される TCIPP²⁾ や, 比較的高いアンタゴニスト活性を示した TDCPP, TPHP 及び TCP の内分泌かく乱作用について, 実験動物を用いた周産期暴露実験により検討する必要があると思われる.

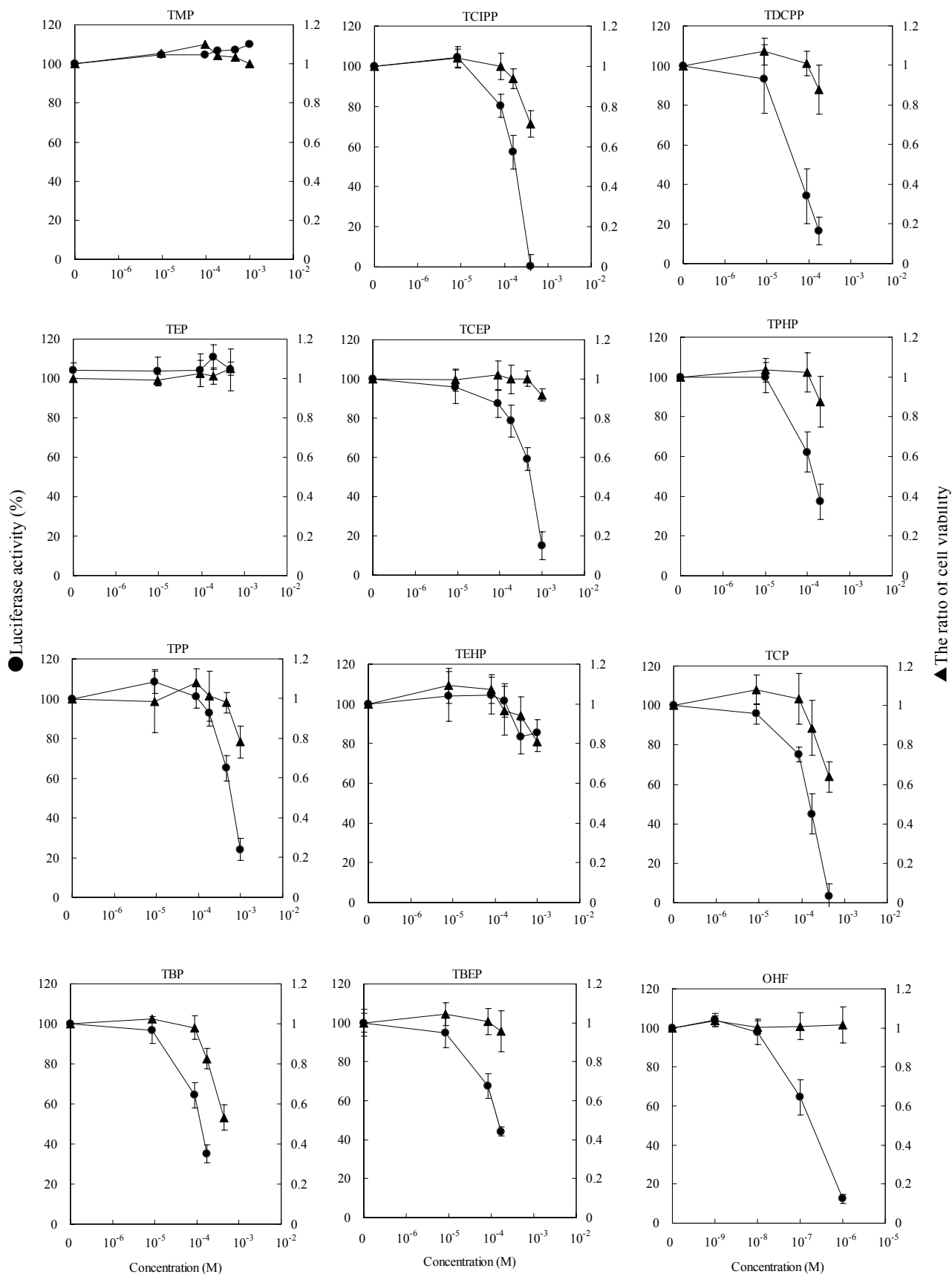


Fig. 3. AR-antagonist Assay of Organic Phosphate Triesters. Reporter gene assay was carried out with various concentrations of chemicals in the presence of 10^{-9} M DHT. Luciferase activity in the presence of DHT alone was shown as 100%. Each point is the mean of values \pm SD of three independent assays in triplicate. Cell viability in control was shown as 1.

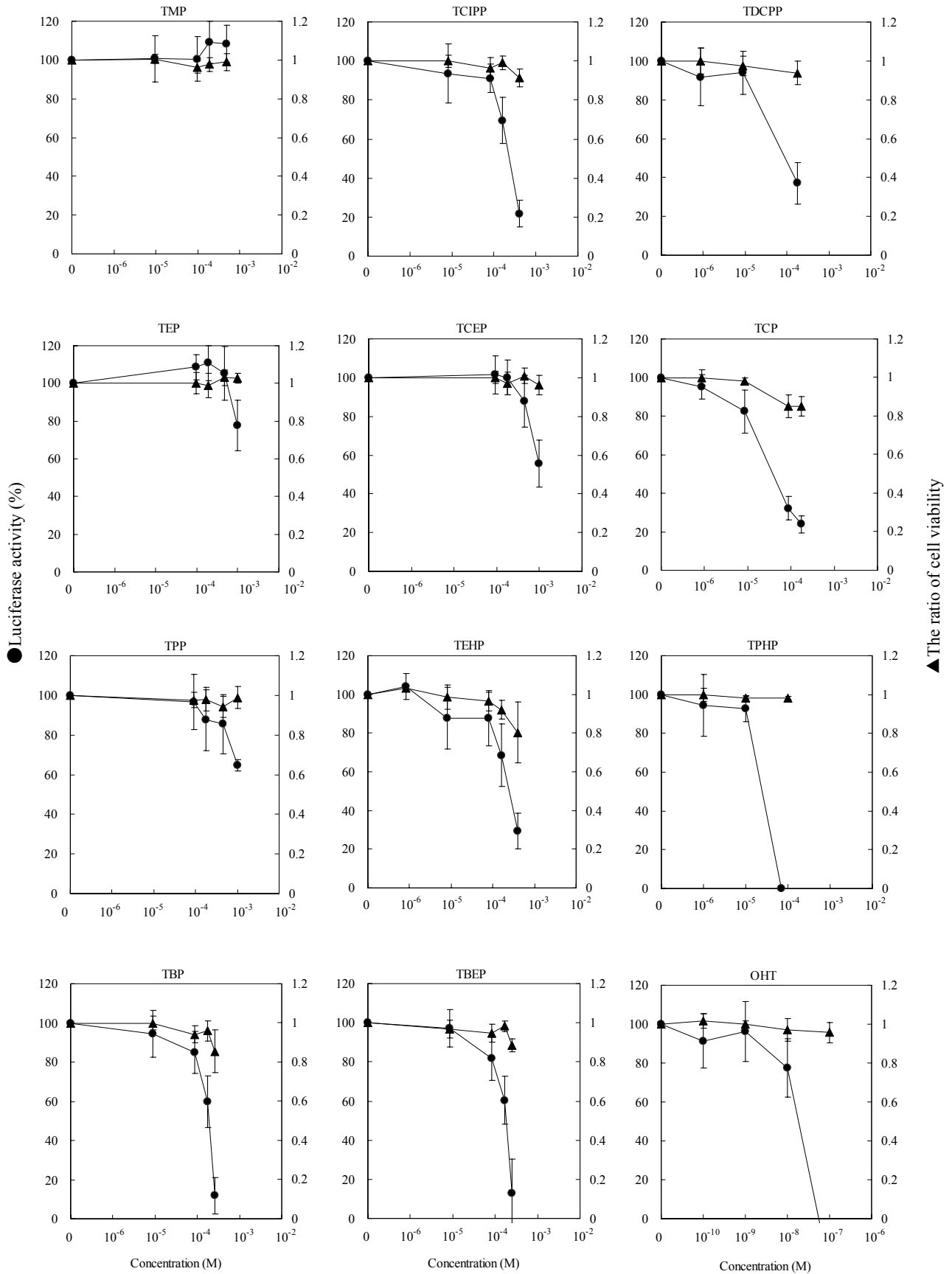


Fig. 4. ER-antagonist Assay of Organic Phosphate Triesters. The assay was carried out with various concentrations of chemicals in the presence of 3×10^{-10} M E_2 . Luciferase activity in the presence of E_2 alone was shown as 100%. Each point is the mean of values \pm SD of three independent assays in triplicate. Cell viability in control was shown as 1.

Table 2. Antiandrogenic Activity of Organic Phosphate Triesters in Reporter Gene Assay

Chemicals	IC ₅₀ (M)	RA (%)
OHF	1.9×10^{-7}	100
TMP	NE	–
TEP	NE	–
TPP	6.0×10^{-4}	0.03
TBP	1.3×10^{-4}	0.15
TCIPP	1.8×10^{-4}	0.10
TCEP	5.4×10^{-4}	0.03
TEHP	NE	–
TBEP	1.5×10^{-4}	0.13
TDCPP	4.7×10^{-5}	0.40
TPHP	1.3×10^{-4}	0.15
TCP	1.5×10^{-4}	0.12

IC₅₀, the concentration of test chemicals for 50% inhibition of luciferase activity by 10^{-9} M DHT; NE, the value could not be estimated from the response curve; RA = (IC₅₀ of OHF) ÷ (IC₅₀ of the test compound) × 100.

Table 3. Antiestrogenic Activity of Organic Phosphate Triesters in Reporter Gene Assay

Chemicals	IC ₅₀ (M)	RA (%)
OHT	2.0×10^{-8}	100
TMP	NE	–
TEP	NE	–
TPP	$> 10^{-3}$	–
TBP	1.9×10^{-4}	0.011
TCIPP	2.3×10^{-4}	0.009
TCEP	$> 10^{-3}$	–
TEHP	2.5×10^{-4}	0.008
TBEP	1.8×10^{-4}	0.011
TDCPP	8.9×10^{-5}	0.023
TPHP	2.4×10^{-5}	0.084
TCP	3.8×10^{-5}	0.054

IC₅₀, the concentration of test chemicals for 50% inhibition of luciferase activity by 3×10^{-10} M E₂; NE, the value could not be estimated from the response curve; $> 10^{-3}$, IC₅₀ was over 10^{-3} M; RA = (IC₅₀ of OHT) ÷ (IC₅₀ of the test compound) × 100.

文 献

- 1) 化学工業日報：化学工業年鑑，354-365，2000，化学工業日報，東京.
- 2) 斎藤育江，大貫 文，瀬戸 博：エアロゾル研究 16，209-216，2001.
- 3) Sprague, G.L., Sandvik, L.L., Brookins-Hendricks, M.J. *et al.*: *J. Toxicol. Environ. Health*, **8**, 507-518, 1981.
- 4) Carrington, C.D., Lapadula, D.M., Othman, M. *et al.*: *Toxicol. Ind. Health*, **6**, 415-423, 1990.
- 5) Varghese, R.G., Bursian, S.J., Tobias, C. *et al.*: *Neurotoxicology*, **16**, 45-54, 1996.
- 6) Weiner, M.L. and Jortner, B.S.: *Neurotoxicology*, **20**, 653-673, 1999.
- 7) Camarasa, J.G. and Serra-Baldrich, E.: *Contact Dermatitis*, **26**, 264-265, 1992.
- 8) Wilson, V.S., Bobseine K., Lambright, C.R., *et al.*: *Toxicol Sci*, **66**, 69-81, 2002.
- 9) Pons, M., Gagne, D., Nicolas, J.C., *et al.*: *BioTechniques*, **9**, 450-459, 1990.
- 10) Villalobos M., Olea, N., Brotons, J.A., *et al.*: *Environ Health Perspect*, **103**, 844-850, 1995.