

2, 4-di-*tert*-Butylphenolの卵巣摘出CD1マウスによる子宮肥大試験

坂本 義光*, 佐藤 かな子**, 安藤 弘*, 久保 喜一*, 長澤 明道*,
矢野 範男*, 湯澤 勝廣*, 高橋 博*, 小縣 昭夫*, 上村 尚***

Uterotrophic Effect of 2,4-di-*tert*-Butylphenol on Ovariectomized CD1 Mice

Yoshimitsu SAKAMOTO*, Kanako SATOH**, Hiroshi ANDO*, Yoshikazu KUBO*, Akemichi NAGASAWA*,
Norio YANO*, Katsuhiko YUZAWA*, Hiroshi TAKAHASHI*, Akio OGATA* and Hisashi KAMIMURA***

2,4-di-*tert*-Butylphenol (BP) is one of the migrants from disposable gloves made from nitril-butadiene rubber, and seem to be the degradation product of antioxidants used in nitril-butadiene rubber production. In this study, the uterotrophic effect of BP was tested in ovariectomized (OVX) CD1 mice. OVX mice were given 10, 50 or 250 mg/kg bw BP, or 10 µg/kg bw diethylstilbestrol (DES) as a positive control, by oral gavage at the indicated dose for 3 days. Body and uterine weights in the group of mice treated with BP were not different from those of the control mice. Histologically, obvious changes in uteri and vagina were not observed in the BP treated group compared with the control group. In the DES group, uterine weight increased 400% compared to the OVX control group and a marked increase in luminal epithelial height and stratification with cornification of the vaginal epithelium were observed. In this study, the uterotrophic effect of BP was not observed in the range of 10 to 250 mg/kg by oral gavage.

Keywords : 使い捨て手袋 disposable glove, ニトリル-ブタジエンゴム nitril-butadiene rubber, 溶出物 migrants, 2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノール 2,4-di-*tert*-butylphenol, 子宮肥大作用 uterotrophic study, 卵巣摘出マウス ovariectomized mice

はじめに

従来、弁当や給食などの食品の調製の際にポリ塩化ビニル (PV) 製手袋が多く用いられていた。PVの安全性に関しては、生殖毒性が認められている可塑剤のフタル酸エステル類が多く残存していること¹⁾, それらが*n*-ヘプタンやナタネ油などの溶媒に溶出し²⁾, さらに食品へ移行することが報告されている^{3,4)}, そのため厚生省(現, 厚生労働省)は2000年6月にポリ塩化ビニル製手袋を食品の取り扱いに使用しないよう通知した⁵⁾。それ以降, PV製手袋に代わってポリエチレン, 天然ゴム, フタル酸エステルを含まないポリ塩化ビニル及びニトリル-ブタジエンゴム(NBR)などの各種素材を使った手袋が使用されるようになった。このうち使用実績がなかったNBR手袋の安全性を検討する目的で, 蒸発残留物, 溶出金属, 溶出添加剤及び材質中アクリロニトリル量の測定などの試験が行われた⁶⁾。その際, *n*-ヘプタン溶出液から2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオール ジイソブチレート(以上可塑剤), 4,4'-ブチリデンビス(6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール), スチレン化フェノール類(以上酸化防止剤)及び酸化防止剤の分解産物と考えられる2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノール(BP)などの化学物質が検出されることが報告された^{7,8)}。当センターでは従来, 食品用容器・包装に用いられているプラスチック製品から食品へ移行する可能性のある化学物質の内分秘かく乱作用を調べる目的で *in vitro* 試験や動物を用いた試験を行っている。NBRから溶出する化学物質については食品への移行が懸念されるが, これらの化学物質の生体影響については, ほとんど報告はない。今回はNBR手袋からの溶出が認められた化学物質の一つであるBPを取り上げ, 卵巣摘出マウスによる子宮肥大試験の結果を報告する。

ール類(以上酸化防止剤)及び酸化防止剤の分解産物と考えられる2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノール(BP)などの化学物質が検出されることが報告された^{7,8)}。当センターでは従来, 食品用容器・包装に用いられているプラスチック製品から食品へ移行する可能性のある化学物質の内分秘かく乱作用を調べる目的で *in vitro* 試験や動物を用いた試験を行っている。NBRから溶出する化学物質については食品への移行が懸念されるが, これらの化学物質の生体影響については, ほとんど報告はない。今回はNBR手袋からの溶出が認められた化学物質の一つであるBPを取り上げ, 卵巣摘出マウスによる子宮肥大試験の結果を報告する。

実験方法

1. 被験物質及び動物

BPは和光純薬工業(株)製(純度98%), 陽性対照のジエチルスチルベストロール(DES)はシグマ社製を用いた。BPはフェノールの*o*-位及び*p*-位に*tert*-ブチル基の付いた化

* 東京都健康安全研究センター環境保健部病理研究科 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, Shinjyuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター環境保健部薬理研究科

*** 東京都健康安全研究センター環境保健部

学物質であり、エストロゲン様作用が報告されている抗酸化剤の2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol(BHT)や*p*-nonylphenolのようなアルキルフェノール類(AP類)と同様、構造式中にフェノール性水酸基を持った化合物である (Fig. 1-a) . また投与のための溶媒はコーン油 (ナカライテスク (株) 製) を用いた.

動物は6週齢時に卵巣摘出を行ったCrIj:CD1(ICR)マウスを日本チャールスリバー (株) より購入し、3週間予備飼育を行った後実験に用いた.

実験期間中、動物は個別に飼育し、固型飼料 (日本クリア製CE-2) 及び水 (ろ過滅菌器經由水道水) を給水瓶にて自由に摂取させた. 飼育室内環境は温度22-24°C, 湿度50-60%, 換気 1時間に10回 (効率99.9% HEPAフィルター經由) に設定されている.

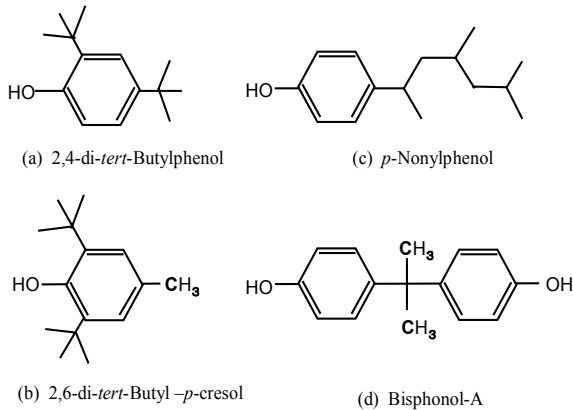


Fig. 1. Chemical Structure of (a) 2,4-di-*tert*-Butylphenol, (b) 2,6-di-*tert*-Butyl-*p*-cresol (BHT), (c) A isomer of *p*-nonylphenol and (d) Bisphenol-A

2. 子宮肥大試験

BP及びDESはいずれもコーン油に溶解し、胃ゾンデを用い強制経口投与した. BPの用量は10, 50, 250 mg/kg, DESは10 µg/kg体重とし、3日間投与を行った. 被験物質溶液の投与量は10 ml/kg体重とした. 投与終了後、動物はエーテル麻酔下で大腿動静脈からの瀉血により屠殺し子宮及び膣を摘出した. 子宮は子宮頸部下で膣部と切断し、臓器周囲の脂肪組織や結合組織を除去後、ろ紙で血液及び分泌液を拭い重量を測定し、湿重量とした. 秤量後、膣とともに10%緩衝ホルマリン固定後、パラフィン包埋切片を作製しHE染色を行ない顕微鏡で観察した.

3. 形態計測

子宮肥大の指標として内皮細胞の高さを画像解析装置 (オリンパス製 SP-500) を用いて計測した. 測定は左右子宮角のほぼ中央部から得た横断組織切片を用い、各切片について上皮細胞が一層に配列した部位を約 10 箇所選び、倍率 200 倍で測定した. 2 枚の切片から得られた数値の平均値をその動物の子宮内膜上皮高とした.

4. 統計学的分析

体重、子宮重量及び内膜上皮高値の検定は Bartlett 検定を用い、分散の均一性について検定し、分散が一様であれば一元分散分析及び Scheffé の多重比較検定を行った. また分散が非一様であれば Kruskal-Wallis 検定及び Scheffé 型の順位和検定を行った.

結 果

1. 体重および子宮重量

Table 1 に体重及び子宮重量の平均値±SD を示した. BP の各投与群では体重および子宮重量は、ともに対照群と比べて有意な差はなかった. DES 投与群では体重は対照群と差はなかった. 子宮重量は対照群と比べて約 4 倍に増加した.

Table 1. Body Weights and Uterine Weights of Ovariectomized CD1 Mice Treated with 2,4-di-*tert*-Butylphenol (BP) by Oral Gavage for 3 days

Groups	Dose	No. of Rats	Body weight(g)		Uterine weight (mg)
			Initial	Final	
Control	—	10	29.7±1.1 ^{a)}	29.0±1.1	20.6±2.9
BP (mg/kg)	10	10	29.7±2.2	29.3±2.0	22.5±3.4
	50	10	29.9±1.3	29.5±1.4	21.7±4.0
	250	10	29.8±1.5	29.9±1.5	23.4±4.7
DES (µg/kg)	10	10	29.8±1.3	29.5±1.3	81.9±11.6 ^{**}

a) mean ± SD, ** Significantly different from the control group (p<0.01)

2. 組織学的観察及び形態計測

対照群の卵巣摘出マウスの子宮では、内膜の内壁は一層の丈の低い円柱状の細胞で覆われており、上皮下の内膜間質ではやや濃縮した核をもった間質細胞 (線維芽細胞) が密に存在し、子宮腺は上皮の丈は低く腺腔も狭かった. 筋層は子宮の長軸に対して輪状に取り巻く内側の筋層と縦走する外層筋の二層から成っているが、いずれもやや小形で濃縮した核をもち胞体の少ない平滑筋細胞が密に配列していた.

膣粘膜は 2~3 層の立方上皮細胞から成り、粘膜下の間質では濃縮した核をもったやや小形で紡錘形の線維芽細胞が存在していた. BP 各投与群では子宮及び膣ともに対照群と比べて明らかな組織変化は認められなかった. DES 群では子宮内膜上皮細胞の肥大及び増生による内膜上皮の肥厚やひだ形成、内膜間質の線維芽細胞、子宮腺上皮細胞及び平滑筋細胞の肥大が顕著に見られた. 画像解析装置による、内膜上皮細胞の高さの形態計測結果では DES 投与群では対照群に比べて約 2 倍に増加していたが、BP 投与群ではいずれの群においても対照群と差は認められなかった (Fig.2).

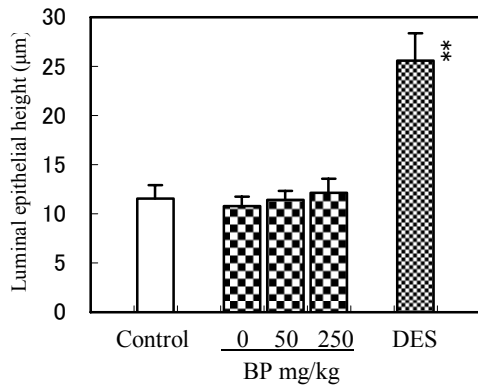


Fig.2. Uterine Luminal Epithelial Height of OVX Mice treated with 2,4-di-*tert*-Butylphenol by Oral Gavage for 3 days. ** Significantly different from control, $P < 0.01$

考 察

BP は NBR 製の使い捨て手袋から溶出が認められている化学物質の一つで、ニトリルゴム製造過程で使用される抗酸化剤の分解産物と考えられている⁸⁾。BP はエストロゲン様作用が指摘されている抗酸化剤の BHT⁹⁾ やノニル及びオクチルフェノールなどのアルキルフェノール類¹⁰⁻¹²⁾ と同様、フェノール性水酸基を持つことから、エストロゲン様作用を有する可能性が考えられた。今回は BP のエストロゲン様作用を確かめる目的で、卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験を行ったが、10~250 mg/kg の投与量では明らかな子宮肥大作用は認められなかった。また今回の実験では、BP は 250 mg/kg、3 日間の投与によっても体重は対照群と差がなかった。BP の経口投与による LD50 はマウスで 700 mg/kg、ラットで 2,000 mg/kg であることが報告されている¹³⁾。BP の毒性は低く、生殖器以外の諸臓器に対しても急性的な障害作用はないものと思われる。

今回の試験では子宮肥大反応を反映する指標の一つとして画像解析装置により内膜上皮細胞の高さを測定した。内膜上皮細胞の高さは、エストロゲン様化学物質による子宮重量の増加に伴って増加し、また有意な重量増加が認められない用量域においても、子宮に対する微弱な作用を検出できる組織学的な指標になっている^{14,15)}。しかし今回の試験では 250 mg/kg の投与量でも内膜上皮細胞の高さの増加は認められないことから、BP は設定用量の 10~250 mg/kg では子宮に対する作用はないものと考えられた。

BP と同様に、フェノール性水酸基を持つ化合物として抗酸化剤の BHT (Fig. 1-b) やアルキルフェノール類 (Fig. 1-c) がある。BHT は *in vitro* 試験で弱いエストロゲン様作用が報告されている⁹⁾。またアルキルフェノール類のノニルフェノール (Fig. 1-c) やオクチルフェノールは 50~250 mg/kg 程度の用量でラット子宮への作用が報告されている¹⁰⁻¹²⁾。Fig. 1-b に示すように、BHT は二つの *tert*-ブチル基が水酸基に対して隣接した位置 (2 及び 6 位) に付いているが、BP では、BHT の 6 位の *tert*-ブチル基が、BHT の 4 位 (*p*-位) のメチ

ル基にかわって付いている点で BHT と異なっている。またノニルフェノール (Fig. 1-c) は *p*-位に分岐型の炭素数の多いアルキル基が付いたフェノールで、BP や BHT における水酸基に隣接するアルキル基などの置換基を欠いている。

ビスフェノール A (BPA, Fig. 1-d) 及び BPA 関連物質のホルモン作用と化学構造との関係が報告されている¹⁶⁾。BPA の二つのフェニル基のうち一方のフェニル基 (A 環) の水酸基 (4 位水酸基) はエストロゲン作用の発現に必須であるが、水酸基に隣接する置換基の大きさや位置、また二つのフェニル基の間の架橋構造や、もう一方のフェニル基の置換基の疎水性の強さなどによって、エストロゲン作用や抗アンドロゲン作用の発現が修飾されることが知られている¹⁶⁾。BP ではフェノール性水酸基に隣接する置換基が BHT 同様比較的大きな *tert*-ブチル基であり、さらにもう一方の *tert*-ブチル基はフェノール性水酸基から離れた位置 (*p*-位) についている。今回の試験では BP のエストロゲン作用は検出できなかった。このことは BP のエストロゲン作用は極めて弱いものであるか、または作用を欠いていることを示している。BP が *tert*-ブチル基のような大きな置換基を持つこと、またそのような大きな置換基がフェノール性水酸基から離れた位置に付いているなどの化学構造上の性質が、BP のエストロゲン作用が極めて弱いか、または BP がエストロゲン作用を欠いていることの一つの要因になっていると考えられる。

NBR 製手袋の使用は今後増えていくと考えられる。NBR 製手袋から溶出する化学物質としては BP の他にも BPA と似た構造の化学物質も報告されており、これらの化学物質については、さらに食品への移行、食品からの摂取量に関する分析と同時に生体影響についても検討する必要がある。

ま と め

PV 製手袋に代わって、使用されることが多くなった NBR 製手袋から溶出する化学物質のうち BP のエストロゲン様作用の有無を調べる目的で卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験を行った。BP を 10, 50, 250 mg/kg 体重の用量で、3 日間経口投与した。BP の各投与群とも体重及び子宮重量には対照群と差はなく、また内膜上皮の高さの計測値も対照群と差はなく、BP は 250 mg/kg 以下の用量では明らかな子宮肥大作用はないものと考えられた。

文 献

- 1) Kawamura, Y., Tagai, C. Maehara, T. and Yamada, T: *Shokuhinn Eiseigaku Zasshi (Journal of the Food Hygienics Society of Japan)*, **40**, 247-284, 1999.
- 2) Kawamura, Y., Maehara, T., Wakui, C. and Yamada, T: *Shokuhinn Eiseigaku Zasshi (Journal of the Food Hygienics Society of Japan)*, **41**, 330-334, 2000.
- 3) Tsumura, Y., Ishimitsu, S., Kaihara, A., Yoshii, K., Nakamura, Y. and Tonogai, Y: *Food Additives and C*

- ontaminants, **18**, 569-579, 2001.
- 4) Tsumura, Y., Ishimitsu, S., Saito, I., Sakai, H., Kobayashi, Y. and Tonogai, Y: *Food Additives and Contaminants*, **18**, 449-460, 2001.
 - 5) 厚生省生活衛生局食品化学課長通知"塩化ビニル製手袋の食品への使用について"平成12年6月14日, 衛化第31号.
 - 6) Wakui, C., Kawamura, Y. and Maitani, T: *Shokuhinn Eiseigaku Zasshi (Journal of the Food Hygienics Society of Japan)*, **42**, 322-328, 2001.
 - 7) Mutsuga, M., Wakui, C., Kawamura, et.al.: *Food Additives and Contaminants*, **19**, 1097-1103, 2002.
 - 8) Mutsuga, M., Kawamura, Y., Wakui, C. and Maitani, T : *Shokuhinn Eiseigaku Zasshi (Journal of the Food Hygienics Society of Japan)*, **44**, 103-109, 2003.
 - 9) Wada, H., Tarumi, H., Imazato, S., et.al.: *J Dent Res*, **84**, 222-226, 2004.
 - 9) Wada, H., Tarumi, H., Imazato, S., et.al.: *J Dent Res*, **84**, 222-226, 2004.
 - 10) 広瀬明彦, 小泉睦子, 長谷川隆一 : *日本臨床*, **58**, 54-59, 2000.
 - 11) Watanabe, H., Suzuki, A., Goto, M., et.al.: *J. Mol E ndocrinol.* **33**, 243-252, 2004.
 - 12) Odum, J., Pyrah, I.T., Soames,A.R, et.al.: *J Appl Toxicol.*, **19**, 367-378, 1999.
 - 13) Bandman, A.L: *Chimia*, p211, 1994.
 - 14) Carthew, P., Edwards, R.E., and Nolan, B.M: *Toxicology and Applied Pharmacology*, **158**, 24-32, 1999.
 - 15) Papaconstantinou, A.D., Umbreit, T.H., Fisher, B.R., et.al.: *Toxicological Science*, **56**, 332-339, 2000.
 - 16) Kitamura,S., Suzuki, T., Sanoh, S., et al.: *Toxicological Science*, **84**, 2429-259, 2005.