

平成10年度

順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科修士論文

生活環境中に存在する内分泌攪乱化学物質の健康影響
—培養細胞を用いた基礎的検討—

順天堂大学大学院

スポーツ健康科学研究科 健康科学領域

吉川 菜穂子

論文指導教員：岩井 秀明 教授

合格日 平成 11 年 3 月 2 日

論文審査委員：主査 岩井 秀明 教授

副査 中村 剛二 教授

副査 櫻庭 景植 助教授

目次

第1章 緒言	1
第2章 関連文献の考証	4
第1節 環境汚染物質の健康影響に関する研究	4
第2節 内分泌攪乱化学物質問題の惹起	5
(1) 内分泌攪乱化学物質問題研究の歴史的背景	5
a. 世界の動向	5
b. 日本の取組み	7
(2) 生態系への影響	8
a. 無脊椎動物	8
b. 魚類	9
c. 爬虫類	10
d. 鳥類	10
e. 哺乳類	11
(3) 内分泌攪乱化学物質について	11
a. 定義	11
b. 種類	12
b-1. 生活環境中に存在する内分泌攪乱化学物質	13
①ビスフェノール A	13
②ノニルフェノール	14
③フタル酸エステル	14
④その他	15
b-2. 化粧品等の添加物としての化学物質	15
①ベンゾフェノン	15
②ブチルヒドロキシアニソール (BHA)	16
③その他	16
第3節 内分泌攪乱化学物質の問題点	17
(1) ヒトに対する健康影響	17
a. ジエチルスチルベストロール (DES) 問題 — 先天異常等の発生 —	17
b. 女性および男性における生殖器疾患	17
c. 発がん	18
d. 精子への影響	21
e. 免疫系や神経系への影響	23
(2) 作用メカニズム	24

a. 内分泌系	24
b. 受容体（レセプター）における問題	25
c. 情報伝達系	27
第4節 内分泌攪乱化学物質についての研究法	28
(1) in vivo 試験	28
a. けっ歯類3日子宮試験	28
b. カエル変態試験	29
c. その他	29
(2) in vitro 試験	29
a. 細胞増殖を指標とする方法	30
b. バインディングアッセイ法	31
c. レポータージーンアッセイ法	31
(3) 培養細胞を用いての生体影響評価について	31
第3章 実験方法	33
第1節 細胞培養	33
(1) 機器	33
(2) 試薬	33
(3) 細胞株	34
(4) 培養液	34
(5) 細胞培養の方法	35
第2節 E-Screen Test	35
第3節 増殖評価	36
(1) 内分泌攪乱化学物質 及び生活環境中に存在する化学物質の添加方法	36
(2) 細胞数の測定法及び生存率算定方法	36
第4章 結果	38
第1節 細胞培養条件の基礎的検討	38
(1) 血清濃度の影響	38
(2) 培地交換の効果	39
第2節 E-Screen Testの基礎的条件の検討	39
(1) 増殖曲線	39
a. MCF-7細胞	40
b. 各種細胞株の増殖速度の比較	40
(2) 至適細胞数の検討	41
(3) 血清中に含まれるホルモンの	

細胞増殖に及ぼす影響	4 1
(4) 培地中に含まれるフェノールレッド (PR) の 細胞増殖に及ぼす影響	4 2
第3節 E - Screen Test	4 3
(1) 陽性コントロール	4 4
a. 17 β -エストラジオール	4 4
b. ビスフェノール A	4 4
c. ノニルフェノール	4 5
(2) 内分泌攪乱化学物質の検討	4 5
a. トリブチル錫	4 6
b. トリフェニル錫	4 6
c. フタル酸エステル類	4 6
c-1. ジエチルヘキシルアジペート (DOP)	4 6
c-2. ジエチルフタレート (DEP)	4 7
c-3. ジn-ブチルフタレート (DBP)	4 7
(3) 身近な生活環境中に存在する化学物質の検討	4 7
a. ベンゾフェノン	4 7
b. ブチルヒドロキシアニソール (BHA)	4 8
第5章 考察	4 9
第1節 細胞培養条件の基礎的検討について	4 9
第2節 E - Screen Testの基礎的条件の検討について	5 0
(1) 増殖曲線及び増殖速度	5 0
(2) 至適細胞数	5 1
(3) 血清中に含まれるホルモンと培地中に含まれる フェノールレッド (PR) の細胞増殖に及ぼす影響	5 2
第3節 E - Screen Testについて	5 4
(1) 陽性コントロール	5 4
(2) 内分泌攪乱化学物質の検討	5 6
(3) 身近な生活環境中に存在する化学物質の検討	5 8
第6章 結論	6 1
第7章 要約	6 2
謝辞	6 4
文献	6 5
欧文要約	6 9
図 表	

第1章 緒言

Carson, R.L.は1962年に“Silent Spring：沈黙の春”を出版し、当時無分別に、多量に使用されていた合成化学物質である農薬が生物に死をもたらし、さらにはヒトの健康をむしばむ可能性があることについて、注意を喚起した⁸⁾。

Colborn, T.らは、ごく最近の1996年に“*Our Stolen Future：奪われし未来*”で、生体に障害を与えない程の低濃度の合成化学物質が、ヒトを含めた生物の次世代の生殖能や性行動に影響を及ぼす可能性があることを指摘した⁹⁾。この問題の指摘は“Silent Spring：沈黙の春”に劣らない程の衝撃を与え、欧米や日本でも大きな社会問題となった。

全世界では、現在の便利で快適な生活を支えるために約7～8万種類の化学物質が使用されている。これは、化学物質の使用と同時にそれらの多くが環境中へ放出されていることを意味している。環境中の化学物質の中には、Colborn, T.らの指摘した生殖障害や発がんリスクの上昇をもたらす可能性のある物質や、人間の内分泌系を攪乱する化学物質（いわゆる環境ホルモン）があるため⁹⁾、この問題に関する身近な、またグローバルな対策が緊急の課題となってきた。

内分泌攪乱化学物質の生体影響については、まず野生生物につ

いて報告された。米国のフロリダ州アポプカ湖では、生息しているワニの性的成熟の阻害や個体数の減少が報告がされている。この原因は湖の周囲の農薬工場で生産された DDT が湖に流入したためと推定されている²⁰⁾。また、英国では羊毛工場の下流で雄の魚の雌化が報告されており³³⁾、日本でも多摩川のコイにおいて同様な現象が見つかっている⁷¹⁾。そのほか、日本では雌の巻貝イボニシの雄化が報告されており²⁶⁾、この原因物質としては船底防汚塗料として使用されたトリブチル錫が考えられている。現在、これらの現象は、ある種の感受性の強い生物種に影響が現れたとも考えられるが、生態系に起きているこれらの様々な生殖異常の原因は、内分泌攪乱化学物質であるとほぼ認められてきている³⁰⁾。

一方、ヒトの健康への影響として、精子数の減少や精巣がん、前立腺がんおよび乳がんの増加、不妊症や子宮内膜症の増加、生殖器腫瘍等、女性および男性生殖器への影響と内分泌攪乱化学物質との関連性が疑われ、また免疫系や神経系の異常との関連も示唆されている^{16,50,70,75,79)}。

問題点として、まず内分泌攪乱化学物質については、そのリスク評価が難しく、従来のリスク評価の手法が必ずしも適当ではない点があり⁹⁹⁾、現在ほとんどの化学物質が内分泌攪乱化学物質の視点からは検討されていない。現在までのところ、我が国では内分泌

攪乱作用を持つと報告されている化学物質は約 70 種類ある⁴³⁾が、河川等における環境中濃度はほとんど測定されておらず、これらの物質の環境への広がりには把握できていないのが現状である。更に、内分泌攪乱化学物質と健康影響との因果関係については、まだはっきりせず、健康影響の有無が不明であることが大きな問題点としてあげられる。

以上の点をふまえ本研究では、まず身近な生活環境中に存在し、生体に移行する可能性がある化学物質のうち、これまでの研究の経緯から^{1,13,39,40,41,55)}、内分泌攪乱化学物質と認められている有機錫化合物について内分泌攪乱化学物質か否かを再確認すると共に、内分泌攪乱作用が疑われている物質が内分泌攪乱化学物質であるか否かを *in vitro* 試験法である培養細胞を用いた実験法で検討することを直接の目的とした。乳がん細胞株 MCF-7 を用いる E-Screen Test では、まず実験条件の検討を行い、次に身近な生活環境中に存在する化学物質が内分泌攪乱化学物質であるか否かについて検討を行った。

第2章 関連文献の考証

第1節 環境汚染物質の健康影響に関する研究

日本経済の高度成長期に大きな社会問題となった水俣病やイタイタイ病の発生は、それらの原因をつきとめる経緯において、環境中に放出された様々な環境汚染物質の生態系への影響、ひいてはヒトへの影響が深刻であることを示したが、それらは人類への警告であったともいえる。人間・環境系の研究の重要さの比重が増してきたことに意味してきた。水俣病の原因物質が有機水銀であったことから、一般的に無害なものと信じて使用してきた有機錫化合物についても危惧を抱き、有機錫化合物の健康影響について研究を行ってきた^{1,13,39,40,41,55}。

有機錫化合物のヒトへの影響が注目をあびるようになったのは1980年代のはじめにフランス、イギリス及びアメリカでカキや貝類が大量に死ぬ事件が起こり、それらの貝類、海草及び海水中に有機錫化合物が検出されたことに始まる。これは貝殻や海草などが付着するのを防ぐための船底塗料や養殖漁業で使用する漁網などに防汚剤として有機錫化合物が使用されていたことによると考えられている⁵⁾。近年、環境汚染と共に生物、特にヒトへの影響が注目され、また、最近では調理用加工紙であるクッキングシートからトリブチル錫、ジブチル錫といった有機錫化合物が検出され、生活環境中か

ら生体への移行も懸念されている。内分泌攪乱化学物質問題の重要性が認識されだした。こうして世界的注目をあびるようになったが、有機錫化合物もそれらの一種であると目されている物質である。

第2節 内分泌攪乱化学物質問題研究の惹起

(1) 内分泌攪乱化学物質問題研究の歴史的背景

a. 世界の動向

1991年、世界自然保護基金の Colborn, T. の呼びかけにより、米国ウイスコンシン州のウイングスプレッドで会議が開かれ、化学物質の野生生物、実験動物及びヒトへの影響について議論された。その際、化学物質の中には生体内で女性ホルモンと類似の作用をもつものや抗男性ホルモン作用をもつものがあり、これらは体内の内分泌系を攪乱させる作用をもつこと、また多くの野生生物種はすでにこれらの化学物質の影響を受けており、人体にもこれらの化学物質が蓄積されているとの合意が得られた⁹⁴⁾。

一方、NIEHS（アメリカ国立環境健康科学研究所）の McLacian, J. らは多量に使用された DDT などの農薬や PCB に女性ホルモン作用があることから哺乳動物の生殖及びがん化に対する女性ホルモンの影響に関する会議を 1979 年以来開催し、1994 年 1 月にワシントン D.C. において開催された第 3 回会議では、内分泌攪乱作用の

問題が取り込まれた。また、1995年には、ウイングスプレッドに魚類の研究者が集まり、化学物質による魚類の発生、生殖、生理、薬理について論議がもたれた³¹⁾。

このような流れを受けて、内分泌攪乱化学物質問題はオゾンホール、地球温暖化、生物種の多様性の減少などのテーマと同様に世界的な研究が必要であると認識され、1997年1月にワシントン D.C.においてホワイトハウス、スミソニアン財団、環境保護庁（EPA）、国連環境計画（UNEP）などの後援により、Endocrine Disruptor Workshop が開催された。

この会議の目的は全国の研究の現状及び政府の取組みを紹介し、それを基に研究を方向づけ及び世界的なコンセンサスをまとめることであった。ここでは各国の発表に加えて OECD と世界保健機構（WHO）からの発表も行われた。総括的には国際共同研究の必要性、国際的なデータベースの作成、摂取量—反応の関係の確立、受容体に基づいた検定法の改良、及びスクリーニングの評価などが必要であるとされた¹⁸⁾。

内分泌攪乱化学物質の問題が広く世に知られることとなったのは1993年にイギリス放送協会（BBC）が制作したテレビ番組“Assault on the Male：精子が減って行く”によって、ヒト精子数がこの50年間で半分になったという報告を基に構成されていた。この番組を

プロデュースした Cadbury,D.が取材経過を “The Feminization of Nature : メス化する自然” にまとめた⁶⁾。

内分泌攪乱化学物質への関心の高まりを背景に、1998年7月に米国のニューハンプシャー州プリマスで、第1回目の「Environmental Endocrine Disruptors (内分泌攪乱化学物質) の Gordon Research Conference (GRC) : ゴードン研究会議、通称ゴードン会議」が開催された³²⁾。

それまで内分泌攪乱化学物質関連の話題は、各学会のサテライトシンポジウムで「ホルモンによる発がん」や「生殖器官」などのテーマの一部として紹介されることはあったが、野生動物、実験動物、ヒトの疫学までを含めたテーマではこのゴードン会議が初めてであった。

b. 日本の取組み

1997年3月には環境庁に「外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班」が発足し、研究方針などを7月に中間答申としてまとめた。通産省では「内分泌(エンドクリン)系に作用する化学物質に関する調査研究班」(日本化学工業協会に委託)、厚生省は「化学物質のクライシスマネジメントに関する研究班」が報告書を作成している。

また、マスメディア等においてはNHKを筆頭として、特別に取

りあげられた^{34,56)}。身近には小規模焼却炉におけるダイオキシンの発生が、新たに問題の火付け役となった。こうした中、国の補正予算でも「内分泌攪乱化学物質」関連の予算が認められ、この問題を研究するための研究所が国立環境研究所に設置される予定であり、「日本内分泌攪乱化学物質学会（通称：環境ホルモン学会）」も設立されるに至った^{57,82)}。

1998年8月には日本内分泌攪乱化学物質学会主催による、主として魚類に対する影響についての講演会が行われた⁶⁴⁾。また、昨年12月には内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウムが、一昨年に地球温暖化会議の開かれた国立京都国際会館において盛大に開催され、同時に日本内分泌攪乱化学物質学会の第一回研究発表会⁴⁸⁾も行われ、日本での取組みも着々と進みつつあり、1998年から研究のスタートがきられた。

(2) 生態系への影響

内分泌攪乱化学物質問題は Colborn, T. によって大きく社会で取り上げられ、生態系への影響や異変について様々な証拠が明らかにされ⁹⁾、それ以降、数多くの研究が行われている。

a. 無脊椎動物

雌性海産巻貝が雄の生殖器（輸精管及びペニス）を持つものが英国、米国北西太平洋沿岸、東南アジア、また日本でも見つかってい

る²⁶⁾。この雌の雄性化の原因は船底防汚塗料として用いられているトリブチル錫（TBT）化合物であるとされている²⁷⁾。日本では堀口らが全国 97 地点で巻貝であるイボニシやレイシガイを採取し、雌の雄性化の出現状況を調べたところ、94 地点で両種共雌の雄性化の出現率がほぼ 100%という驚異的結果が得られた²⁴⁾。実験的にもトリブチル錫（TBT）を 1ng/l 程度、正常な成熟雌に連続曝露すると雄性化が誘導された。1ng/l とは縦 500m、横 200m、深さ 10m のプールに 1g（茶さじ一杯分）のトリブチル錫を均質に溶かした時の濃度に相当する。極めて低濃度のトリブチル錫でも巻貝に雄性化を引き起こすことが判明した。また、トリフェニル錫でも同様の結果が得られた²⁵⁾。

b. 魚類

英国では雌雄同体のコイ科の魚であるローチが下水処理施設の下流で釣り上げられたことに端を発して、雄のニジマスを一ゲージに入れて下水処理施設の下流に置かれ、血中のビデロジェニン濃度が調べられた³³⁾。ビデロジェニンは卵生の雌の魚の肝臓で合成されるリン脂質タンパクで女性ホルモンに反応する物質が確認されている^{64,77)}。下水処理場からの放出水には女性ホルモン様の化学物質が存在すると報告された⁷⁹⁾。日本においても多摩川の河川水から内分泌攪乱化学物質であるノニルフェノールが検出されており、しかも

雄のコイの約3割に生殖異常が、また5割にビデロジェニンの発現が見出されている⁷¹⁾。

c. 爬虫類

フロリダの4番目に大きな湖であるアポプカ湖は、1980年に化学工場由来の農薬 DDT、DDE の流出により汚染され、ワニの孵化率及び幼体の減少化が起こっている²⁰⁾。ジレットは、フロリダ州のアポプカ湖においては1980～1984年の間に体長1m程度の幼若なワニの個体数が90%も減少した。この湖のワニには生殖腺の形態異常、血中ホルモン量の異常もみられた。ワニの卵を使った実験及びワニの女性ホルモン受容体と化学物質との親和性を調べた実験により、湖に流れ込んだ農薬などによる内分泌系攪乱作用が異変の原因と考えられることが実証された¹⁹⁾。

d. 鳥類

鳥類の孵化率の低下も内分泌攪乱化学物質による影響が疑われている⁸⁹⁾。有機塩素系化学物質汚染のあるミシガン湖のグリーンベイでは、魚を食べるメリケンアジサシの生殖率が極端に低下している。対照となるウイスコンシンのポイガン湖からの卵と比べて、グリーンベイの卵にはダイオキシンの一種である TCDD やポリ塩素化ビフェニル (PCB) が約10倍含まれていた。1983年に採卵した卵を人工的に孵卵した結果、孵化率はグリーンベイの卵はポイガ

ン湖のものより 50%も低かった⁵⁹⁾。

e. 哺乳類

PCB、DDT、DDE、ミレックス及び水銀を含む魚を餌としているオランダのワッデン海西部地域のゼニガタアザラシの個体群が極端に減少している。特に、1950～1975年の25年間でこの地域のアザラシの数が3000頭から500頭へと急減した。西部地域と北部地域のアザラシの組織中の有機塩素系化合物濃度と重金属濃度を調査したところ、西部地域の個体群の生殖障害の原因としてPCBが考えられた。更に、ワッデン海の魚の肝臓あるいはPCBを混ぜた餌をアメリカミンクに与えたところ生殖障害が出たことから、生殖障害の原因物質としてPCBが考えられている⁸⁹⁾。

カナダ、ケベック州のセントローレンス川の入り江のシロイルカの個体数は20世紀初頭に5000頭であったのが、現在は500頭にまで減少している。個体数の減少や、甲状腺異常、副腎皮質異常及び腫瘍の増加は、PCB、ディルドリン、TCDDなどが原因であると推定されている²¹⁾。

(3) 内分泌攪乱化学物質について

a. 定義

内分泌攪乱化学物質の定義は必ずしも定まっておらず、1996年12月に欧州委員会が主催したウェイブリッジの“内分泌障害性

化学物質の健康と環境への影響に関する欧州ワークショップ”では「外来性物質であり、無処置の生物の内分泌系に対して、その個体、もしくはその子孫の世代の何れかの段階で健康障害性の変化を起こさせる物質」と定義付けられた³⁶⁾。

米国ワシントン D.C.におけるホワイトハウス科学委員会がスミソニアン財団と主催して 1997 年 1 月に行われた“内分泌障害性化学物質に関するスミソニアン・ワークショップ”で内分泌攪乱化学物質の定義を以下の如く申し合わせた。それは「生体の恒常性、生殖、発生、あるいは行動に関与する種々の生体内のホルモンの合成、貯蔵、分泌、体内輸送、結合、そしてそのホルモン作用そのもの、あるいはそのクリアランス、などの諸過程を阻害する性質を持つ外来性の物質」となっており、定義がより明確化した他、結果の解釈についても“そうした生物に引き起こされる疑う余地のない明白な毒性諸変化に限定的に用いる”こと³²⁾としている。

b. 種類

環境庁が 1997 年 7 月に出した「外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書」においては、“Our Stolen Future”で取り上げられた 63 物質（群）とその類縁 3 物質及び巻貝イボニシに生殖阻害を生じるトリフェニル錫の計 67 物質（群）と報告されている⁴³⁾。

しかし、門上はそれら以外にも内分泌攪乱化学物質が存在する可能性があるが、現在使用されている化学物質の大半については、内分泌攪乱作用の有無が調べられていないことを指摘している⁴⁴⁾。また、内分泌攪乱作用の試験法が確立していないため、疑われている67種のすべてが、内分泌攪乱化学物質と確認されているわけでもないことを示唆し、我が国でもできるだけ早く試験法を確立して、多量に生産されている物質や疑わしい物質などについて、内分泌攪乱作用の有無を試験する必要があると述べている⁴⁴⁾。

b-1. 生活環境中に存在する内分泌攪乱化学物質

①ビスフェノール A

パラの位置に水酸基をもつジフェニル化合物の幾つか、また4,4'-ジヒドロキシジフェニルメタンの代謝産物にエストロゲン活性があることは以前から知られていた。その一つが、二つのメチル基を持つエポキシ樹脂の原料ビスフェノール A (Bis-A) である³⁵⁾。

Bis-A は防カビ剤、抗酸化剤にも使われている他にも、ポリカーボネート製のほ乳ビンや学校給食の食器、箸、電子レンジで使用可能なプラスチック容器などに用いられている。また歯科材料の虫歯への詰め物や子供の歯のコートに PC プラスチックとして用いられている。缶詰からは缶詰の内側をコートした樹脂由来の Bis-A が検出されている⁴⁾。

②ノニルフェノール

ノニルフェノールはプロピレンの三重合体のノネンとフェノールの反応により工業的に合成される。また、国内においては非イオン界面活性剤として用いられている。特に、ノニルフェノールは起泡性が低いため、主に工業用の洗浄剤として繊維工業、製紙工業、及び金属工業などで使われている。日本では大手のメーカーでは自主規制されているが、中小のメーカーの製品や輸入品では含まれているものがある⁸⁸⁾。研究分野においてノニルフェノールが一躍有名になったのは、培養する際に用いるポリスチレン製のチューブをオートクレーブ高圧蒸気滅菌して使用したところ MCF-7 細胞が異常増殖を引き起こし、ノニルフェノールが原因物質であることがつき止められたからである⁸⁴⁾。

③フタル酸エステル

フタル酸エステルは主としてポリ塩化ビニル (PVC) の可塑剤に使用され、フタル酸エステルによる汚染としては容器包装などの使用による食品汚染、食品加工工程などでの器具からの汚染、使用後の水・土壌・大気等の汚染がある⁴⁷⁾。フタル酸エステルは化粧品の一つであるマニキュアに含まれている。フタル酸エステルの種類はアルコールの違いによって決まり、ジエチルヘキシルアジペート (DOP)、ジエチルフタレート (DEP)、ジ n-ブチルフタレート

(DBP) 等がある。フタル酸エステルはヒト胸部がん細胞に対して弱いエストロゲン活性を示すこと⁶⁹⁾が報告されている。

④その他

その他にも脂溶性物質であるポリ塩化ビフェニル類が内分泌攪乱化学物質として認められている。また、ダイオキシン類及びダイベンゾフラン類も同様である。これらの発生源は有機塩素系の農薬や殺虫剤の製造過程で副産物として生成されたり、たばこや車の排気ガスから放出されたりするが、塩化ビニールや塩素を含むプラスチックなどを燃やすゴミ焼却施設からの排出が8割以上を占めるといわれている。さらに、有機塩素系殺虫剤である DDT、DDD 等もあげられる。特に DDT は強いエストロゲン様作用を示す。有機塩素系化合物は一般に脂溶性が高く、分解と消失が極めて遅いため (DDT の環境中での半減期は 60 年以上である)、長期にわたって曝露されると、極微量でもヒト及び動物の肝臓などの生体内組織、特に脂肪組織に蓄積される。それ故、これらの化合物のエストロゲン作用は持続し、次世代に伝わる危険性が高い⁶⁹⁾。

b-2. 化粧品等の添加物としての化学物質

①ベンゾフェノン

ベンゾフェノンは紫外線吸収剤として日焼け止めクリームやファンデーション、化粧水、クリーム等に含まれている¹⁰⁰⁾。これらは

容器に成分表示する義務がないために消費者にはわからない。

②ブチルヒドロキシアニソール（BHA）

ブチルヒドロキシアニソールは化粧品の成分に含まれている。これは空気中の酸素による品質劣化防止のため、酸化防止剤として使われている。具体的には乳液、香水、口紅、アイシャドウ、ファンデーションに含まれている。ブチルヒドロキシアニソールはすべての化粧品への配合が認められている。ブチルヒドロキシアニソールは薬事法の指定成分として表示が義務づけられており、配合量の上限が2%と定められている⁹⁰⁾。

③その他

殺菌防止剤として使用されているフェニルフェノールも内分泌攪乱化学物質と疑われている。また、業務用ラップを電子レンジで加熱すると発生するアジピン酸エステルも同様である⁴⁸⁾。

最近、化粧品や醤油などに防腐剤、防カビ剤として添加されているパラオキシ安息香酸エステル（パラベン）はエストロジェンの受容体と結びつき、体内でエストロジェン様作用を起こす可能性のあることが酵母を用いた実験で明らかになった。これはビスフェノール A やノニルフェノールと同程度のエストロジェン様作用だと証明されている⁷³⁾。

第3節 内分泌攪乱化学物質の問題点

(1) ヒトに対する健康影響

a. ジエチルステルベストール (DES) 問題

—先天異常等の発生—

1950年から1970年代にかけて切迫流産の予防のために強力な合成女性ホルモンであるジエチルステルベストール (DES) が使用された。この母親から生まれた子供は生殖器に異常を有する頻度が高かった。若い女子は膣がんに、そして成人した男子は尿道下裂、停留睾丸、小睾丸、精液の異常などの先天性泌尿生殖器異常が増加していると報告されている^{15,16)}。

b. 女性及び男性における生殖器疾患

女性生殖器疾患の中でも、子宮内膜症は不妊症の主要な原因の一つである⁵²⁾。子宮内膜症とは、子宮内膜またはそれに似た細胞組織が子宮以外のところで増殖する病気で、月経のたびに子宮以外からも出血して激しい月経痛を起こしたり、不妊の大きな原因にもなったりする²⁹⁾。日本では不妊症について調査されているが、子宮内膜症は患者調査で報告される疾病分類で取り上げられていないと報告されている。第9回修正国際疾病障害及び死因統計分類 (ICD-9) が適用された1979年以降のデータによると、不妊症患者推計数が増加傾向にあり、1993年の調査では女性不妊症患者は1万

400 人であった⁵¹⁾。近年、20 代、30 代の女性の間で子宮内膜症が急増しているといわれている⁵⁰⁾。子宮内膜症は子宮がんと同様に、エストロゲンなどのホルモン作用が発症に強く関連しているので、ダイオキシンなどの内分泌攪乱化学物質が発症に関連している可能性がある。動物実験では、ホルモンレセプターを介して甲状腺ホルモン及び生殖器系のエストロゲン作用を修飾し、子宮内膜の変化が起こり、内膜症様の変化を起こすことが報告されている⁸⁰⁾。

また、男性生殖器疾患として生殖能力の低下や生殖器系腫瘍、前立腺がんの増加が内分泌攪乱化学物質の影響として疑われている⁷⁸⁾。このような疾患はホルモン環境と関連が深く、環境中の内分泌攪乱因子の影響が検討されているが、疫学調査の結果は一定ではない⁹⁸⁾。ただし、精子数の減少に関しては特筆すべく、以下 d. の項目で詳しく述べた。

c. 発がん

北欧 5 か国のがん登録データによると、がん発生率の最も低いフィンランドでも、1953 年の 10 万人あたり約 25 人から 1980 年には 40 人以上に増加し、発生率の最も高いデンマークでは、1945 年の 10 万人あたり 40 人から 1980 年の約 60 人へと上昇している。またアメリカではさらに顕著で、1973 年から 1980 年の間に、50 才未満の女性の乳がん発生率は 8 % から 32 % に増加した⁴²⁾。

その後の疫学研究、臨床研究によって乳がんの他に子宮体がん、卵巣がん、前立腺がん、精巣がんの増加が確認された。多くの疫学研究の結果、乳がんのリスクは初潮が早いこと、閉経が遅いこと、閉経後の婦人における肥満等がリスクを上昇させること、また一方では初回妊娠が早いこと、授乳の経験、身体活動強度が高いこと等がリスクを減少させると報告されている¹¹⁾。前者はいずれもエストロゲン、プロゲステロンの曝露が高まると乳がんリスクが増加し、後者は逆に曝露を低めることによって乳がんリスクが減少することを意味している²³⁾。

前立腺がんのリスクは血中テストステロンレベルに従って増加するという報告があるが、それを否定する報告もあり、乳がんのように内因性ホルモンの影響は明確ではない⁸¹⁾。

ところで、乳がんにおいて、全発症の 2/3 の症例は今まで明らかにされていない¹⁰⁾。その一つに環境汚染化学物質、特にホルモンとの関係から内分泌攪乱化学物質を示唆するとの考えもある。例えば、乳房の脂肪組織や乳汁中には殺虫剤、ハロゲン化合物などが残留物として検出されることが報告されている⁹⁵⁾。

また、アメリカで指摘された乳がんや前立腺がんの罹患率上昇は、実は乳がん検診へのマンモグラフィーの導入や前立腺がん検診への PSA 検査の導入が引き起こした見かけ状の上昇、すなわち早

期発見されたがんや、検診で発見されなければおそらく発見されなかったであろう潜在がんの発見が増加した結果であるという解釈もある¹¹⁾。

さらに、乳がんに関して一般人を対象とした疫学研究も報告されている。Wolff らは⁹⁵⁾、ニューヨーク大学の Women's Health Study と呼ばれる長期追跡調査の対象者の中で乳がん罹患した 58 名と罹患していない 171 名の過去の血清中の DDE と PCBs 濃度を測定したところ、乳がん患者の方が有意に DDE 濃度が高いことを見いだした。この研究は、大規模コホート研究をベースにした質の高い症例対照研究であり、結果の信頼性も高いといえる。

また、Dewailly らは¹²⁾、乳がん患者 20 名の脂肪組織と乳房の良性腫瘍患者 17 名における脂肪組織中の有機塩素系化合物を測定して、エストロゲンレセプター陽性の 9 名は対照群と比較して有意に DDE と PCB が高かったと報告している。

一方、Krieger らは⁵⁸⁾、57040 名の女性からなるコホートの中で乳がんと診断された 150 名と対照 150 名の血清中の有機塩素系化合物濃度を測定し比較した結果、DDE 濃度、PCBs 濃度とも症例と対照で有意な差は認められなかったと報告している。

このように一般人を対象とした乳がんの疫学研究では血清中 DDE、PCBs 濃度と乳がんとの関係の差は一定の見解が得られてい

ない。

d. 精子への影響

ここ半世紀の間でヒトの精子数が減少しているという研究報告が 1990 年代前半に相次ぎ、また、その原因が内分泌攪乱化学物質であることが示唆され⁹¹⁾、全世界的に内分泌攪乱化学物質の精子への影響が問題になっている⁶⁶⁾。

1992 年に Skakkebaek 率いる研究チームが、ヒトの精子数減少に関する研究報告を発表した⁷⁾。20 カ国の男性 1 万 5000 人を調査した結果、50 年間に成人男性の精液中の平均精子数が、精液 1 ml 中 1 億 1300 万から 6600 万と有意に減少し、同時に精液量も 25% の減少をみて有意な差を示した。また、同じ論文の中で Skakkebaek らは、精子数減少の原因が内分泌攪乱化学物質にある可能性を指摘している。

ベルギー、デンマーク、フランス、イギリスのこれまでの報告から、これらの研究は不妊外来を受診した男性や選ばれた精子提供者の精液を検査対象にしていることが分かった。それ故、男性不妊の治療方針や患者の選択にバイアスがかかっており、これらの研究結果は真の生物学的現象をとらえているとはいえないと報告している⁶⁷⁾。

一方、フランスの正常な志願者による検査では、1973 年～1992

年の精子数を比較しているが、1年に2.1%ずつの割合で有意に減少していた。さらに、精子の運動性や正常精子数についても有意に減少していた。スコットランドでの研究では、1970年以降に生まれた精子提供者の精子数は1959年以前に生まれた者の精子数より、有意に低下していた。これらの研究結果は、胎児期の化学物質暴露は成人後の精子形成能力へ悪影響を及ぼすという仮説をうらづけるものであった⁴⁹⁾。

また、内分泌攪乱物質に含まれるダイオキシン、PCB、DDT、などは、実験動物による毒性試験において、低容量で明らかに精子数の減少、精子形成障害を引き起こすことが報告されている⁶⁸⁾。

スコットランドにおいては、1951年から1973年に生まれた男性に対して11年間にわたる追跡調査をした結果、精子数、精子の質ともに低下しており、遅く生まれたものほど精液の質が低下している傾向があると報告された³⁸⁾。

そして、最近、精子数減少が認められないとしていたアメリカ合衆国から、疫学的検索によって、精子濃度が、アメリカ合衆国では1年ごとに1.5%減少しており、ヨーロッパ諸国では1年ごとに3.1%減少しているというショッキングな報告がなされている⁸⁶⁾。

この論文がアメリカ合衆国における内分泌攪乱化学物質に関する研究の中心的存在である米国国立環境健康科学研究所（NIEHS／

NIH) 発刊のジャーナルに掲載されたことは、社会的インパクトの上からも非常に興味深いところである。

日本では 1998 年 3 月、精子形成・精巢毒性研究会で帝京大学の研究グループから、精子数、精子運動率の低下が日本の 20 代の若者でも顕著であるという報告がなされた⁹⁷⁾。これは日本の若者でも諸外国同様に精子数の減少が起こっている可能性を強く示唆しているが、調査の規模が小さく、断定はできない。日本でのヒト精子数の状況に関しては、大規模な調査を複数の施設で行った上での正式な研究報告が期待される⁶⁷⁾。

e. 免疫系等への影響

女性においては自己免疫疾患の病勢と女性ホルモンレベルとは関連があるといわれている。ジエチルスチルベストロール (DES)、TCDD、PCB、有機塩素系化合物、重金属等で免疫抑制や疾病罹患率の上昇が起こることがヒトでの研究で報告されている^{15,54)}。また化学物質と非ホジキン悪性リンパ腫との関連の可能性が示唆されている。内分泌系と免疫系とは、インターロイキン-1 (IL-1) などのサイトカインや副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)、カテコールアミン、プロラクチン、エンドルフィンなどで相互に制御されており、内分泌攪乱化学物質の作用が両方の系に相互に働いていると考えられる。

発達障害や性機能障害、それに学習障害があげられている⁶⁰⁾。

しかし、総合的にみると内分泌攪乱化学物質の免疫系及び神経系への影響は、現時点では未だ十分に解明されていない。

(2) 作用メカニズム

a. 内分泌系

ホルモンとは、生物の内部環境のホメオスタシスを維持するために働く、生理学的に活性のある化学物質の一群である。ホルモンの定義は古典的には「ホルモンは、ある特定の場所の細胞から分泌される少量の化学物質で、血液あるいは体液に乗って身体全体に運ばれ、一般的には分泌部位から遠く離れた場所の組織に働いて、最終的には生体全体の協調性を保つ働きのあるもの」とされていた。

しかし、神経—内分泌—免疫系の協調的な制御のメカニズムが明らかになるにつれて、大きな概念で考えることが必要となり、現在は「ホルモンとは、情報伝達を本来の役目とする生理活性物質の一種であり、ある細胞より産生され、細胞から基底側に放出され、その活動を開始するもの」とされている。

これまでは、下垂体、甲状腺、副腎、膵臓などの内分泌腺から分泌されるものがホルモンとされていたが、胃、腸、心臓、視床下部、脳などもホルモンを産生している。脳と腸とで同じペプチドホルモンが作られ、それぞれ別の機能を果たしている例も見つかри、

局所ホルモン (local hormone) の概念が導入されてきた⁹²⁾。

また、現在の知見からホルモンを大まかに分類すると、下垂体ホルモンやカテコールアミンが含まれるペプチド・アミン系と、性ホルモンや鉱質コルチコイドなどが含まれるステロイド系、甲状腺ホルモンの含まれるジフェニルエーテル系の三系統にわけることができる⁹²⁾。

ホルモンの機能は成長、分化、発育、生殖機能、糖脂質代謝、電解質平衡、神経、免疫系の発育や機能などに深く携わっている。

近年、神経系と内分泌系、免疫系が一体となって生体のホメオスタシスを維持していることが明らかになってきた。このことは内分泌攪乱化学物質が内分泌系の情報伝達を攪乱するのみならず、他の系である免疫系や神経系の正常な機能にも影響を与えることを意味している⁵³⁾。

b. 受容体 (レセプター) における問題

個体は多くの細胞からなり、組織・器官はそれぞれの特有の機能を有している。その個体が全体として調和した機能を果たすためには、統合した情報が組織・器官へと伝達される必要がある。したがって、細胞の外からの情報 (ホルモンなどの化学物質) を受け取るためには、細胞にこれらの情報に固有なアンテナが必要である。化学物質と結合し、細胞に情報を受け取る機能をするものが受容体

(レセプター)である⁴⁵⁾。

体内の内分泌腺で合成されたステロイドホルモンは標的臓器に到着するとレセプターに結合し、DNAに働きかけ機能蛋白を合成することによって機能を発揮する。

ホルモンの種類によって結合するレセプターが決まっていることから、ホルモンとレセプターの関係は鍵と鍵穴の関係に例えられる。内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムにおいては、本来ホルモンが結合すべきレセプターに化学物質が結合することによって遺伝子が誤った指令を受けるという観点から研究が進められてきた⁴⁶⁾。

内分泌攪乱化学物質がレセプターに結合して生じる反応には本来のホルモンと類似の作用がもたらされる場合(アゴニスト)と逆に作用が阻害される場合(アンタゴニスト)がある⁶⁵⁾。

作用物質(アゴニスト)である内分泌攪乱化学物質が受容体に多数結合した場合は、ホルモン作用は亢進される。フタル酸エステルやPCB及びDDT、ノニルフェノール、ビスフェノールAなどの化学物質はエストロジェンレセプターと結合することによってエストロジェンと類似の反応がもたらされる。

一方、拮抗物質(アンタゴニスト)である内分泌攪乱化学物質が受容体に多数結合した場合はホルモンが結合できる受容体の数が減少するために、ホルモン作用は阻害されることになる。これに属

するものとしては、DDE（DDT の代謝物）やビンクロゾリン（農薬）などがあり、これらはアンドロジェンレセプターに結合し、アンドロジェンの作用を阻害する（抗アンドロジェン作用）ことが知られている⁷⁶⁾。

c. 情報伝達系

近年、ホルモンレセプターに直接結合するのではなく、細胞内のシグナル伝達経路に影響を及ぼすことによって遺伝子を活性化し機能蛋白の産生等をもたらす化学物質の存在も指摘されるようになった^{37,46)}。

例えば、ダイオキシンはエストロジェンレセプターやアンドロジェンレセプターには直接結合しないが、ある種の細胞内蛋白質に結合することにより遺伝子を活性化し、間接的にエストロジェン作用に影響を与えるとされている。

なお、内分泌系の医療薬剤は、ホルモンレセプターに影響を及ぼすことによって作用を発揮するが、その中にはホルモンの作用を増強する物質も存在する。DES を例にあげると、エストロジェンレセプターに結合し、エストロジェンのシグナルを遺伝子に与え続ける結果、がん化、あるいは妊娠中であれば胎児の催奇形成等が懸念される。

第4節 内分泌攪乱化学物質についての研究法

アメリカの EDSTAC (Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee) では、内分泌攪乱化学物質の試験法として Tire 方式の評価方法を提案している。なお、Tire 方式というのは段階的に高次の試験の検定を行う(階層を積み重ねる方式)試験法のことである。この試験法は Tire 1 と Tire 2 の2段階からなり、Tire 1 が内分泌攪乱作用を評価する簡易・短期スクリーニング法で、Tire 2 は Tire 1 によって陽性・擬陽性とされた化学物質をいろいろな動物種で世代を経た場合の生殖などへの影響をみるための試験法となっている。

Tire 1 は in vivo (生体内) 試験と in vitro (試験管内) 試験から構成されており、被検物質がエストロゲン活性、アンドロゲン活性、甲状腺ホルモン活性を示すかどうかをスクリーニングする。そして Tire 2 は Tire 1 を補足する試験として位置づけられており、ヒト及び野生生物の内分泌攪乱の性質、可能性、用量-反応関係、世代にわたっての影響を調べるなど、より詳細に内分泌攪乱作用を同定するものである²⁾。

(1) in vivo 試験

a. けっ歯類3日子宮試験

卵巣除去あるいは未成熟のメスのラット・マウスに1-3日間エ

ストロゲン作用をもつ物質を皮下投与して、子宮の重量が増加する現象を利用した試験である³⁾。

b. カエル変態試験

50—54 日令のオタマジックシ段階のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) を被検物質に 14 日間曝露し、変態時の尾の再吸収変化を調べ、(抗) 甲状腺ホルモン効果を評価する。

c. その他

この他に雄魚類ビドロゲニン誘導試験⁷⁷⁾、けっ歯類 20 日性成長試験、魚類の生殖能復帰試験などがあげられる。

(2) in vitro 試験

in vitro 試験法は短時間で簡便に実施でき、自動化することも可能である。1998 年 3 月に発表された米国の EDSTAC の内分泌攪乱化学物質対策案においても迅速性・簡便性から 1 次スクリーニング手法として in vitro 試験をあげている。

生体ホルモンの作用機構として、性ホルモンや甲状腺ホルモンなどは核内レセプターと結合して標的タンパク質の転写調節をするものと、細胞膜レセプターと結合してセカンドメッセンジャーを介してシグナル伝達をするものの二つがある。内分泌攪乱化学物質として問題になっているのは核内レセプターを介するホルモンが対象となっていることから、主として核内レセプターとの結合性、あるいは

はそれに基づく転写活性化能を測定する *in vitro* 試験法も検討されつつある⁷⁴⁾。

女性ホルモンレセプターに対する化学物質の結合性をみることで、その物質が生体本来の女性ホルモンの働きを攪乱するかどうかはわかる。つまり、内分泌攪乱化学物質であるかどうかはわかる。この原理を使って *in vitro* 試験法を用いて内分泌攪乱化学物質か否か調べた。試験法には女性ホルモンレセプターへの結合試験である「バインディングアッセイ」、培養細胞を用いた細胞増殖性を指標とする方法、転写活性を指標としたアッセイ系（レポータージーンアッセイ）の3種類があげられる。

a. 細胞増殖を指標とする方法

化学物質の女性ホルモンレセプターに対する作用性を調べる方法として、MCF-7の増殖活性を調べる方法がある。

ヒト乳がん由来の細胞である MCF-7 は、女性ホルモン量に依存してその増殖が促進される。同細胞を培養し、そこに試験化合物を添加して一定時間後に細胞数を測定することで増殖度を測定すれば化合物の女性ホルモン活性を知ることができる⁴⁵⁾。この方法は E-スクリーン (E - Screen) と呼ばれており、本研究ではこの方法を用いるため後に詳しく述べることとする。

b. バインディングアッセイ法

バインディングアッセイ法とは、レセプターに天然のホルモンを結合させた後に、そこに試験する化学物質を添加してレセプターに結合したホルモンがどのくらい遊離するかを調べることで試験化合物のレセプターに対する結合の強さ（親和性）を知る方法である。

c. レポータージーンアッセイ法

女性ホルモンレセプターにホルモンが結合してから標的遺伝子が活性化するまでの過程をまねした方法であり、in vitro 試験法ではポピュラーな方法である。培養細胞を用いる方法と、酵母を用いる方法がある⁴⁵⁾。

(3) 培養細胞を用いての生体影響評価について

環境汚染物質の生体影響評価は、従来より in vivo（生体内）試験法である動物実験を中心として行われてきたが、動物実験法では関与する因子があまりにも多く、生体影響を明確に解析するには難しい面があった。それらを補う実験法に in vitro（試験管内）試験法の培養細胞実験があげられるが、この方法は技術の進歩と共に、近年、一般的な実験技術として普及してきた⁷²⁾。本研究においては、試験方法として in vivo（生体内）試験法と in vitro（試験管内）試験法のうち、試験の簡便さや、結果を解析しやすい等の利点を備えている in vitro 試験法の中の培養細胞を用いた実験法で実験を行

うことにした。

培養細胞実験では、培養細胞実験法の長所と共に、その短所についても認識する必要がある。培養細胞実験で得た実験結果が、そのまま生体内にも同じように起こると判断してはならない。黒木ら⁶¹⁾は、培養細胞があくまで一つのモデルにすぎないことを忘れてはならないと述べている。例えば、生理的反応を観察する時には、培養細胞実験法よりも動物実験法の方が有効であると考えられる。このように目的に応じて実験法を選び、また培養細胞実験法でも必要に応じて、得た結果を個体レベルにフィードバックすることも重要である。

したがって、培養細胞を用いた生体影響評価は、いくつかの短所があるものの、その長所は本研究の目的である生活環境中に存在する化学物質が内分泌攪乱化学物質であるか否かの検討を簡便に行うことが可能であり、スクリーニングとしても正確に解析できることから、本研究においても培養細胞を用いて生体影響評価の結果を解析することとした。

第3章 実験方法

第1節 細胞培養

(1) 機器

メスピペット、培養液など細胞に直接ふれるものはすべて滅菌して使用し、それらの操作は Class II A 安全キャビネット（日立製作所製）内で無菌的に行った。

滅菌は高圧蒸気滅菌器（TOMY 社製）と乾熱滅菌器（YAMATO 社製）により各々 121°C：20 分、180°C：2 時間の条件で行った。シャーレ（Corning 社製）は滅菌済みプラスチックシャーレを使用した。

その他に液体窒素保存容器（ダイヤ冷機工業社製）、CO₂ インキュベーター（ESPEC 社製）、倒立顕微鏡（オリンパス社製）を使用した。

(2) 試薬

試薬は、17 β -エストラジオール、ビスフェノール A、ノニルフェノール、トリブチル錫、トリフェニル錫、フタル酸エステル類、ブチルヒドロキシアニソール（BHA）、ベンゾフェノンを使用した。フタル酸エステル類については、ジエチルヘキシルアジペート（DOP）、ジエチルフタレート（DEP）、ジ n-ブチルフタレート（DBP）の 3 種類を用いた。

以上の試薬は全て和光純薬社製のものを購入した。

(3) 細胞株

使用する細胞株については、内分泌攪乱化学物質のスクリーニング法として、乳がん細胞株を使用していることからヒト乳がん細胞株（MCF-7細胞）をアメリカのATCC社より入手し、また、白血病細胞株（HL-60細胞、Friend細胞）はガン研究振興財団の細胞バンクより入手した。なお、本研究において用いた各種細胞株については図1に示した。

(4) 培養液

ろ過滅菌したRPMI-1640培地（ニッスイ①：日水製薬社製）250mlに、ろ過滅菌した牛胎児血清（FBS：Gibco社製）27.5ml（10%）、10%Bica（重炭酸水素ナトリウム：Irvine Scientific社製）3mlをそれぞれ加えて調整する。ろ過滅菌は100mlシリンジ（JMS社製）とシリンジフィルター（45 μ ，CORNING社製）を用いて行った。血清中の内在性ホルモンの影響を見る場合には活性炭によりホルモンを除去した牛胎児血清（FBS：Sigma社製）を使用した。また、フェノールレッド（PR）の影響の検討する際には、コスモバイオ社製のフェノールレッド（PR）を含むRPMI-1640培地と、それを含まないRPMI-1640培地を使用した。

(5) 細胞培養の方法

滅菌済シャーレに、10%FBS（牛胎児血清）を含む培養液 5 ml を入れ、更に、そこへ実験に適した細胞数を添加し、CO₂ インキュベーター内で培養した。MCF-7 細胞はシャーレの底に付着して増殖する細胞であり、その他の細胞は浮遊して増殖する細胞である。培養細胞は継代しつつ、適宜実験に供した。

第2節 E - Screen Test

方法の概略を図2にフローチャートとして示した。E - Screen Test は、まずヒト乳がん細胞株（MCF-7）を 10%FBS（牛胎児血清）、RPMI - 1640 培地にて CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養する。その後、培地を吸引しフェノールレッドと牛胎児血清中内在性ホルモンを除去した培地に交換し、それから試薬を添加する。CO₂ インキュベーター内で 6 日間培養後、トリプシン処理を行う。トリプシン処理とは接着系細胞をシャーレからはがすために行う処理のことをいう⁹³⁾。そのためにまず培地を吸引し 0.02% の EDTA を含有した 0.25% トリプシン溶液（Sigma 社製）0.5ml を添加し、CO₂ インキュベーター内に 8 分間放置後、シャーレを取り

出し、よく振とうを行い細胞を底面からはがし、培地を 4.5ml 添加し、ピペットで細胞をよくほぐす。次にマイクロピペットを用いて細胞液を 0.1ml 分取する。そして同量のトリパンプルー溶液を添加し攪拌する。その混合溶液を血球計算盤に流し込み、後に 1 ml 中の生細胞数及び生存率を算定する。

第 3 節 増殖評価

(1) 内分泌攪乱化学物質及び生活環境中に存在する

化学物質の添加方法

細胞株の対数増殖期に至適細胞数の細胞をシャーレに分取し、細胞が付着した 1 日後に、1 シャーレに 1 種類の化学物質を添加し実験をおこなった。添加した化学物質は陽性コントロールとして 17β -エストラジオールを用いた。その他の試薬は、ビスフェノール A、ノニルフェノール、ブチルヒドロキシアニソール (BHA)、ベンゾフェノン、フタル酸エステル類 (3 種類)、有機錫化合物 (2 種類) である。

(2) 細胞数の測定法及び生存率算定方法

増殖評価は細胞の形態観察後、トリパンプルー染色法により細胞数を数え、それとともに生存率を決定した。

細胞数の算定は細胞液 0.1ml に 0.4% トリパンプルー溶液

の 0.1ml を添加し、軽く攪拌した後 EKDS 改良ノイバウエル血球計算盤にて生細胞数および全細胞数を測定した。生存率は全細胞に対する生細胞数の割合（％）で表示する。

第4章 結果

第1節 細胞培養条件の基礎的検討

本研究においては、実験時に培養細胞を規則的に入手する必要上、細胞を多量に、かつ定常的に培養するベースが必要となる。そこで、まずはじめに細胞培養条件の基礎的検討を行った。

(1) 血清濃度の影響

細胞培養においては、培地中に添加する牛胎児血清（FBS）の濃度が細胞培養に対して大きな影響を与えることから、血清の濃度の影響について観察を行った。

牛胎児血清（FBS）濃度は5%と10%の2濃度について観察した。図3に結果を示したが培養開始後、細胞がコンフルエント（細胞が増殖し、シャーレの底面に付着しだし、増殖の結果ほぼ100%付着した状態）に達するのに要した時間の比較により示した。

5%牛胎児血清（FBS）の培地ではコンフルエントに達するまで9日間かかったが、10%牛胎児血清（FBS）の場合は3日間でコンフルエントに達した。10%牛胎児血清（FBS）添加培地で培養した場合は1日目でほとんどの細胞がシャーレの底面に付着していたの比べ、5%添加培地では1日目では付着していない細胞も多く、2日目でも付着率は悪かった。それゆえ、従来使用されてきた10%牛胎児血清（FBS）添加培地の方が5%牛胎児血清（FBS）添加培

地に比べ、極めて有効であることが判明した。したがって、本研究においては 10%牛胎児血清（FBS）添加培地を用いて細胞を培養することとした。

（2）培地交換の効果

今回用いた MCF-7 細胞は付着細胞であるため、一度付着すれば培地交換が可能となる。そこで、培地交換をした場合としなかった場合とに分け、細胞増殖に及ぼす効果について観察を行った。ちなみに、培地交換は 1、2、4 日目に行った。

各々の細胞数は 30 万個/ml で実験を開始し、6 日後に、増殖した細胞数の測定を行った。培地交換をした場合は 110 万個/ml に増殖したが、培地交換をしなかった場合は 79 万個/ml であり、細胞増殖に及ぼす培地交換の効果が認められた（図 4）。

第 2 節 E - Screen Test の基礎的条件の検討

（1）増殖曲線

細胞培養実験において一番基本的な実験は細胞の増殖曲線を得ることであり、その分析は各々の細胞の遅滞期や対数増殖期、定常期そして死滅期の各期の進行する速度を知るために有用である⁷²⁾。そこで本実験では E - Screen Test の基礎的条件の検討として、まず E - Screen Test に使用する MCF-7 細胞の増殖評価を行った。

a. MCF-7 細胞

本実験では MCF-7 細胞を 10 万個/ml でスタートし、9 日間の経日変化を求めた。計測方法としては 1、2、3、4、7、9 日目のシャーレを用意し、各々の日に細胞数を測定し、その結果を図 5 に示した。細胞数は 10 万個/ml でスタートしたが 1 日目に少し付着しなかった細胞があったものの、以降は順調に増殖し 7 日目には定常期へと進行し、細胞数も最高数となった。ちなみに、その細胞数は 53 万個/ml であった。生存率は各測定日とも約 90% の高率であり、良い結果が得られた。9 日目には細胞数が 10 万個/ml と減少し、生存率も 72.5% に減少した。

b. 各種細胞株の増殖速度の比較

乳がん細胞株 MCF-7 の増殖速度は遅いように思われたので、今まで本研究室の実験において使用してきた血液系細胞との比較を検討することにした。本研究において用いた血液系細胞株のヒト白血病細胞株 (HL-60 細胞) 及びマウス白血病細胞株 (Friend 細胞) は、浮遊して増殖する細胞である。図 6 に示した通り、Friend 細胞は 3 日目で 120 万個/ml に達し、HL-60 細胞はそれよりは遅いものの 6 日目に同様に 120 万個/ml に達した。しかし、MCF-7 細胞は 6 日目の時点で 22 万個/ml であり、血液細胞に比べて増殖速度は非常に遅いことが明らかとなった。

(2) 至適細胞数の検討

培養細胞の増殖曲線は培養開始時の細胞数によって異なってくるといわれている。そこで、細胞数を各々5、10、20、30、40万個/mlで培養開始し、7日目の細胞増殖の結果を観察し、各々の増殖曲線を得た(図7)。

5万個/mlでスタートした細胞は11万個/mlに、以下同様に10万個/mlが35万個/ml、20万個/mlが75万個/ml、30万個/mlが113万個/ml、40万個/mlが122万個/mlに増加した。

この中で30万個/ml実験を開始したものが、7日目で3.8倍となり、本研究において最も増殖率が高かった。

(3) 血清中に含まれるホルモンの細胞増殖に及ぼす影響

今回はE-Screen Testを用いて、先行研究にみられるように^{14,83,85}、MCF-7細胞を増殖させる物質を内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)とした。細胞培養には欠せない牛胎児血清(FBS)中には内在性のホルモンが含まれており、E-Screen Testを行う際にはそれらを除かなければ正確な結果を得ることは難しい。そこで、内在性ホルモンを除去した牛胎児血清(FBS)と、内在性ホルモンを除去していない従来から使用している牛胎児血清(FBS)との細胞増殖に及ぼす影響について観察を行い、図8に示した。また、pH指示薬であるフェノールレッド(PR)もMCF-7を増殖させる作用

があることがわかっており⁹³⁾、そのことも考慮に入れて実験を行った。図8の上方のグラフは生存率(%)を示している。細胞数30万個/mlでスタートした場合は、内在性ホルモンと、フェノールレッド(PR)の両方を含む培地の場合は約115万個/mlに増殖した。一方、内在性ホルモンを除去し、またフェノールレッド(PR)も含まない培地、即ちコントロールの場合を点線で示したが、6日目でも29.6万個/mlとほとんど増殖しなかった。フェノールレッド(PR)を除去し、内在性ホルモンを除去していない培地の場合はコントロールに比べ58万個/mlにもなり、内在性ホルモンの増殖作用の強いことがわかった。逆にいえばE-Screen Testを行う場合、牛胎児血清(FBS)中の内在性ホルモンは除かねばならないことが観察された。

(4) 培地中に含まれるフェノールレッド(PR)の

細胞増殖に及ぼす影響

次に培地中に含まれるフェノールレッド(PR)の細胞増殖に及ぼす影響について検討を行った。フェノールレッド(PR)を含まないRPMI-1640培地(コスモバイオ社製)を調整し、フェノールレッド(PR)の影響について観察し、図9に示した。

細胞数は30万個/mlでスタートした。コントロール、即ちフェノールレッド(PR)を含まず、また内在性ホルモンを除去した牛

胎児血清（FBS）を用いた培地で培養した場合に比べ、フェノールレッド（PR）のみを含む場合は 44 万個/ml に増加し、内在性ホルモンの増殖作用よりは弱いものの、かなり強い増殖作用を有することが判明した。したがって本研究では牛胎児血清（FBS）中の内在性ホルモンを除去し、またフェノールレッド（PR）も含まない培地で培養した場合を内分泌攪乱化学物質が添加されていない時の増殖曲線のコントロールとした。

第 3 節 E - Screen Test

E - Screen Test の陽性コントロールとして、本実験では 17β -エストラジオールと、内分泌攪乱化学物質として認められ、MCF-7 細胞を増殖させる作用が判明しているビスフェノール A 及びノニルフェノールを用いた。内分泌攪乱作用のある化学物質としてはトリブチル錫、トリフェニル錫、及び 3 種類のフタル酸エステル類について E - Screen Test を行った。身近な生活環境中に存在する化学物質の代表としては、例えば乳液等の化粧品の主成分であるブチルヒドロキシアニソール（BHA）とベンゾフェノンの 2 種類について内分泌攪乱作用の有無について検討を行った。細胞数は全て 30 万個/ml で培養を開始し、また各物質の濃度は 3 段階の濃度で実験を行った。結果については増殖のみられた濃度のみを図示した。

(1) 陽性コントロール

a. 17β -エストラジオール

MCF-7 細胞は女性ホルモン様作用のある増殖因子である 17β -エストラジオールが培地中に添加されると、それをレセプターがキャッチして急激に増殖することが報告されている²²⁾。そこで本研究では、まず乳がん細胞である MCF-7 が 17β -エストラジオールで増殖するか否かを確認することにした。培地中の濃度は 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M になるように各々のシャーレに 17β -エストラジオールを添加した。

17β -エストラジオールの 10^{-9}M を添加した場合は6日目に細胞が 39 万個/ml に増加し、コントロールに比べて増殖していることが確認された (図 10)。また生存率もコントロールとほぼ同じ 82% であった。一方、 10^{-10}M は 21 万個/ml、 10^{-8}M は 22 万個/ml に減少した結果が得られた。

b. ビスフェノール A

給食用食器からの溶出で問題となったビスフェノール A は、 17β -エストラジオールと同様に 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M の濃度になるように添加した。その結果は図 11 にみられるように 10^{-8}M においては 38 万個/ml に増殖したが、 10^{-9}M と 10^{-10}M では増殖はみられなかった。

c. ノニルフェノール

ノニルフェノールの場合には少し濃度が高くなるように 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M について観察を行った。 10^{-8} M となるようにノニルフェノールを添加した細胞の場合には 44 万個/ml に増殖し (図 12)、その一桁下の 10^{-9} M でも 35 万個/ml に増殖した。しかし、 10^{-7} M では 2 万個/ml にまで減少した結果であったが、この際の生存率は 36% であった。このことからわかるように、この濃度ではフェノールレッド (PR) の毒性により細胞が死滅してしまったものと考えられた。

以上の結果、陽性コントロールとみなした 3 物質とも Soto らの報告⁸³⁾ に比べ、感受性はにぶいものの増殖作用がみられた。本研究ではこの増殖率で内分泌攪乱作用を判定することにした。

(2) 内分泌攪乱化学物質の検討

有機錫化合物は雌性巻貝イボニシの雄性化の原因物質とみなされている。そこで MCF-7 細胞に有機錫化合物を添加した際、どのような影響があらわれるか検討を行った。有機錫化合物としては船底塗料に用いられているトリブチル錫と、プラスチックの添加剤や農薬としても用いられたトリフェニル錫の 2 物質を選択した。また、プラスチックの可塑剤であるフタル酸エステル類についても同様に検討を行った。

a. トリブチル錫

トリブチル錫は 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M となるように添加し検討を行った。 10^{-10}M 添加においては 54 万個/ml と増殖した (図 13A) が、 10^{-9}M 添加と 10^{-8}M 添加とも増殖はみられなかった。しかし、これらの生存率はそれぞれ 83%、83%、81% と全て良い値が得られた。

b. トリフェニル錫

トリフェニル錫も同様に添加濃度を 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M とし、実験を行ったが、 10^{-8}M は 40 万個/ml に (図 13B)、 10^{-10}M も 36 万個/ml に増殖し、また、これらの生存率はそれぞれ 81.6%、72% であった。 10^{-9}M 添加においては、30 万個/ml と増殖しなかったが生存率は 85% と高かった。

c. フタル酸エステル類

c-1. ジエチルヘキシルアジペート (DOP)

3 種類のフタル酸エステルについて実験を行った。急性毒性の指標である 50% 致死量 (LD_{50}) 値より ¹⁸⁾ 毒性は弱いと考えられたので、添加濃度は各々 10^{-8}M 、 10^{-7}M 、 10^{-6}M で実験を行った。各添加群の生存率はそれぞれ 88.4%、70%、74.5% であり 10^{-7}M 、 10^{-8}M 添加群でも顕著な毒性がみられていないが 10^{-8} 添加のみ 42 万個/ml に増殖した (図 14A)。

c-2. ジエチルフタレート (DEP)

ジエチルフタレート (DEP) は 10^{-8} M 添加のみ 36 万個/ml に増殖し (図 14B)、他の添加濃度では増殖がみられなかった。生存率はほぼ全てが 80%前後で、これらの結果はジエチルヘキシルアジペート (DOP) と同様の結果であった。

c-3. ジ n-ブチルフタレート (DBP)

ジ n-ブチルフタレート (DBP) は 10^{-8} M において 38 万個/ml に増殖したが (図 14C)、 10^{-7} M 添加では増殖がみられなかった。一方 10^{-6} M は毒性のためか死滅してしまい、計測できなかった。生存率は 10^{-8} M で 88%、 10^{-7} M で 81%であり、毒性はみられなかった。

(3) 身近な生活環境中に存在する化学物質の検討

身近な生活環境中に存在する化学物質として化粧品中の成分に関心を持ち、乳液やファンデーション等の成分として含まれる 2 物質 [(ベンゾフェノン及びブチルヒドロキシアニソール (BHA))] について検討を行った。

a. ベンゾフェノン

ベンゾフェノンは毒性は弱いと考えられたので添加濃度は 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M という高濃度で実験を行った。 10^{-7} M 添加においては、28 万個/ml とコントロール並みの値を示した (図 15: ●印)

が、 10^{-6}M と 10^{-5}M では各々 18 万個/ml、13 万個/ml の結果であった。またこれらの生存率はそれぞれ 89%、79%、75%の値を示したにもかかわらず全添加濃度において増殖がみられなかった。

b. ブチルヒドロキシアニソール (BHA)

ブチルヒドロキシアニソール (BHA) は、濃度をベンゾフェノンと同様に 10^{-5}M 、 10^{-6}M 、 10^{-7}M で添加した。 10^{-7}M においては 26 万個/ml とコントロール並みの値を示した (図 15:▲印) が他の添加群では 10^{-6}M は 15 万個/ml、 10^{-5}M は 7 万個/ml と減少傾向を示した。生存率は 10^{-7}M は 74%、 10^{-6}M は 55%、 10^{-5}M は 52%という低い値であった。

第5章 考察

第1節 細胞培養条件の基礎的検討について

細胞培養実験においては、添加血清が重要な役割を果たしている。血清を添加しないとほとんどの細胞は増殖しない。また、添加するにしても細胞の種類や実験目的によって至適血清濃度を求める必要がある。

そこで本研究では、まず細胞増殖に及ぼす血清濃度の影響について、検討を行った(図3)。牛胎児血清(FBS)を10%添加した培地で培養した場合は5%添加した場合より細胞増殖が高く、6日程早くコンフルエントに達した。それは、牛胎児血清(FBS)中にMCF-7細胞の増殖因子である女性ホルモンも多量に含まれているためと考えられる。牛胎児血清(FBS)を5%添加した培地では細胞のシャーレに対する付着も悪かった。付着しないで浮遊している細胞は死滅していくため、牛胎児血清(FBS)を5%添加した培地の場合はコンフルエントに達するのに日数がかかったと思われる。本来ならば更に高濃度(15%や20%)を添加した場合においても検討を行い、至適濃度を求める必要があったが、本研究では従来使用されてきた10%牛胎児血清(FBS)添加培地で十分な細胞増殖が得られ、極めて有効であることが判明したため、本研究においては、この血清濃度で実験を行うこととした。

1週間程、細胞を培養すると実験開始時の細胞数にもよるが、培地が赤色から茶色に変色しているケースが多くあった。それは培地が酸性側へと傾いているためであるが、培地の至適 pH 値は 7.2 前後といわれており⁷²⁾、酸性側では細胞がダメージを受ける可能性、もしくは増殖効率を悪くすることが考えられた。MCF-7 細胞は幸にも付着細胞であるため培地交換が可能である。そこで培地交換の効果が細胞増殖に及ぼす影響を観察したが、約 1.4 倍程の差が現れた(図 4)。そのため、培地交換の効果が認められ、数日毎に培地交換を行うことにした。これらの実験条件については文献に記載されていないが、このような点を明確化させたことによって本研究がより円滑に行うことができた。

以上の結果より、継代群を牛胎児血清 (FBS) 10% 含む培地を用いて培養し、細胞の付着後、数日毎に培地交換を行い細胞を増殖させることにより多量に、かつ定常的に細胞を入手できるようにした。

第 2 節 E - Screen Test の基礎的條件の検討について

(1) 増殖曲線及び増殖速度

細胞培養実験を行う際、実験に用いる細胞の性質を理解するために最も有効な実験として細胞の増殖曲線があげられる。E - Screen Test を行う際に用いる MCF-7 細胞の特性を理解するため、

本研究では MCF-7 細胞の増殖曲線を検討し、それと同時に従来、本研究室の実験において使用してきた血液系細胞株と MCF-7 細胞の増殖速度の比較について検討を行った。まず、MCF-7 細胞の増殖曲線を求めたが（図 5）、10 万個/ml で実験開始した場合は 7 日目で増殖の最高到達点に達した。その後、9 日目には細胞数が 10 万個/ml に減少し、生存率も約 90%前後から 72.5%に減少した。これは、MCF-7 細胞が 10 万個/ml で実験開始した場合において 9 日目に死滅期へと進行したと思われる。したがって、実験に用いる細胞は 3～6 日目頃が最適と判断した。

次に増殖速度について各種細胞株と比較してみると、MCF-7 細胞はヒト白血病細胞株やマウス白血病細胞株といった血液系細胞に比べ、増殖速度は非常に遅いという結果が得られた（図 6）。がん細胞は増殖速度の速いことが特徴であるが、同じがん細胞でも増殖速度に大きな違いがあることを明確に示すことができた。MCF-7 細胞の増殖速度が遅いのは、その由来が表皮細胞であることによるものと思われる。臨床的にも乳がんは、がんの中でもその原発巣の進行及び転移の進行は緩徐であるため⁸⁷⁾、培養細胞を用いた *in vitro* 試験においても同様の結果が得られた。

（2）至適細胞数

培養細胞を用いる実験では、至適細胞数が重要である。至適細胞

胞数より少ない細胞数でスタートすると細胞が効率よく増殖しないため、コンフルエントに達する前で結果を判断しなければならず、また、逆に細胞数があまりに多いと、すぐに定常期へと達してしまい、コンフルエントを過ぎて死滅期に入ってしまう、判定に大きな誤差が生じる。E - Screen Test は実験開始 1 日後に試薬を添加し、その後 6 日間の増殖率を判定に用いるため、7 日間で 1 番増殖率がよく、かつコンフルエント近くに達する細胞数が実験に適していると考えた。10 万個/ml から 30 万個/ml では増殖率が各々約 3.8 前後であったがコンフルエント近くに達する細胞数ということで 30 万個/ml を実験開始時の至適細胞数として用いることにした。

(3) 血清中に含まれるホルモンと培地中に含まれる

フェノールレッド (PR) の細胞増殖に及ぼす影響

通常、牛胎児血清 (FBS) を含め、培地中には細胞を増殖させる物質が入っているため⁸³⁾、E - Screen Test を行う際にはそれらを除去した培地を調整する必要がある。

細胞培養に欠かせない牛胎児血清 (FBS) 中には内在性のホルモンが含まれており、それらを除かなければ正確な結果を得ることは難しい。そこで内在性ホルモンを除去した牛胎児血清 (FBS) と内在性ホルモンを除去していない従来の牛胎児血清 (FBS) を用いて、内在性ホルモンの細胞増殖に及ぼす影響について観察を行った。な

お、今回の実験においては、チャコール処理（活性炭吸着による除去）により内在性ホルモンを除去した血清を入手し、実験に供した。ちなみに、その血清中のホルモンレベルはテストステロン（Testosterone）:0.1ng/ml 以下、甲状腺ホルモンであるトリヨードサイロニン（T3）:0ng/dl、チロキシン（T4）:1.0 μ g/dl 未満の血清である。その他のホルモン濃度についての記述はなかったが、エストロゲン等の他のホルモンも同程度に除去されていると考えられた。これは以下に述べる如く、実験結果からも実証された。内在性ホルモンが除去されていない場合（図8:●印）、113 万個/ml にも達するのに、除去された場合（図8:▲印）は約 43.5 万個/ml 程にしか増殖せず、血清中の内在性ホルモンは細胞増殖に多大な影響を及ぼすことが判明した。即ち E-Screen Test においては牛胎児血清（FBS）中の内在性ホルモンの除去は必須である。

培地中には普通、pH 指示薬であるフェノールレッド（PR）が含まれており、これも同様に MCF-7 細胞を増殖させることが報告されている²⁸⁾。フェノールレッド（PR）を除去した培地では 30 万個/ml で実験開始後、58 万個/ml となり（図9:◆印）、やはりフェノールレッド（PR）に細胞増殖効果のあることが本実験でも示された。

内在性ホルモンとフェノールレッド（PR）の細胞増殖に及ぼす

影響の強さを比較してみると、フェノールレッド（PR）除去の 58 万個/ml に比べ、内在性ホルモン除去の場合は 43.5 万個/ml であり、内在性ホルモンの方がより強い細胞増殖能を有していると思われる。いずれにしろ E - Screen Test を行うには両物質の除去は前提条件となる。事実、両物質除去の場合は 6 日目でもほとんど増殖しておらず、両物質除去の場合をコントロールとすれば実験を行えることが考察された。

第 3 節 E - Screen Test について

（1）陽性コントロール

E - Screen Test を行うにあたり、まず陽性コントロールによって増殖効果がみられるのか否か、検討を行った。陽性コントロールとしては 17β -エストラジオール、ビスフェノール A 及びノンルフェノールについて実験を行った。女性ホルモンである 17β -エストラジオール ($10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$) の影響は $10^{-9}M$ 添加の場合に 6 日目で 38.5 万個/ml の増殖を示した (図 10)。しかし、Lippman らは増殖の程度が 10 万個/ml から 55 万個/ml と、その増殖率は高く⁶³⁾、また今回の実験では $10^{-10}M$ では増殖がみられなかったが、Soto は、より低濃度の $10^{-11}M$ でも増殖がみられたとしている⁸⁵⁾。これらから、本研究に用いた MCF-7 細胞は感受性が低いと考えら

れる。高濃度の 10^{-8} M 添加の場合は生存率が 58%であり、試薬の毒性影響を受けたため、増殖を示さなかったと考えられた。

ビスフェノール A に関しても同様の濃度 (10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M) において影響をみたが、Feldman らの研究¹⁴⁾ (10^{-6} M~ 10^{-10} M) によると、 10^{-6} M と 10^{-7} M が最も増殖の程度が高かった。本実験でも 10^{-8} M において増殖がみられ、 10^{-9} M や 10^{-10} M といった、より低濃度ではほとんど増殖がみられず、Feldman らの結果と一致した (図 11)。しかし本実験では、更に増殖効果のあると思われる 10^{-6} M と 10^{-7} M について検討を行わなかったので、今後、更に検討を要すると思われる。

ノニルフェノールについては、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M の濃度において実験を行った。 10^{-8} M 添加の場合は 44 万個/ml に、 10^{-9} M 添加の場合は、35 万個/ml の増殖を示した (図 12)。より低濃度の影響を観察する必要がある。一方、 10^{-7} M では 2 万個/ml に減少し、この際の生存率は 36%しかなく、これは明らかにノニルフェノールの毒性によるダメージと思われた。Soto らによると⁸⁴⁾、 10^{-5} M で最も細胞数が増殖すると報告されているが、本実験で 10^{-7} M でも細胞がダメージを受けており、先行研究との不一致はこれからの課題である。ノニルフェノールは今回試した最低濃度でも増殖作用がみられたので、更に低濃度の方が汚染は広がりやすいといえよ

う。

以上の結果、陽性コントロールとみなした3物質とも感受性はにぶいものの増殖作用がみられた。本研究ではこの増殖率で内分泌攪乱作用を判定することにした。即ち、この程度の増殖を示せば内分泌攪乱作用があると判定する。但し、濃度によるはっきりした傾向がみられなかったが、それらの詳しい解析は今後の課題と考える。

(2) 内分泌攪乱化学物質の検討

次に内分泌攪乱作用のある化学物質としてトリブチル錫、トリフェニル錫、及び3種類のフタル酸エステル類についてE-Screen Testを行った。

堀口らは、トリブチル錫が1ng/l程度でも正常な雌の巻貝に雄の生殖器を発生させるといった雄性化が誘導されるとしている²⁶⁾。1ng/lとは縦500m、横200m、深さ10mのプールに1g(茶さじ一杯分)のトリブチル錫を均質に溶かした時の濃度に相当する。極めて低濃度のトリブチル錫でも巻貝に雄性化を引き起こすことがわかる²⁴⁾。また、トリブチル錫は生物個体に既に内分泌攪乱化学作用を起こしている物質である。本研究では、トリブチル錫とトリフェニル錫の両物質のE-Screen Testを行った。

トリブチル錫とトリフェニル錫の添加濃度は、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} Mで実験を行ったが、生存率がほぼ同じであるにもかかわらず

ず最も低濃度である 10^{-10} M で陽性コントロールよりも高い増殖作用がみられた (図 13A)。更により低濃度での影響を観察することが必要と思われる。 10^{-8} M、 10^{-9} M での増殖に及ぼす影響がみられなかったのは、生存率が高いだけに判断しかね、再実験が必要と思われる。また、トリフェニル錫は 10^{-8} M と、 10^{-10} M 添加において増殖を示した (図 13B) が、 10^{-9} M 添加においては増殖を示さなかった。中間濃度だけ増殖しなかったのはなぜか、今後の課題であると考えられる。

フタル酸エステル類についてはジエチルヘキシルアジペート (DOP)、ジエチルフタレート (DEP) 及びジ n-ブチルフタレート (DBP) の 3 種類について実験を行った。急性毒性の指標である 50% 致死量 (LD_{50}) 値がラットの経口投与によると DOP :31 g/kg DEP:9.5~31g/kg、DBP8~12 g/kg であることにより¹⁷⁾、毒性は弱いと考えられたので、添加濃度は各々 10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M の高濃度にて実験を行った。3 物質とも最低濃度で細胞増殖がみられ (図 14A,B,C)、更により低濃度についても観察する必要がある。3 物質に共通する特徴は各々、最低濃度でのみ増殖がみられ、より高濃度では生存率がほぼ一定であるにもかかわらず、増殖作用がみられないことである。これは細胞のダメージにまでは至らないが、増殖については抑制気味に作用しているのかもしれない。これらの

共通性は更に追求すべき課題として考えられる。

以上の結果、2種類の有機錫化合物とプラスチックの可塑剤であるフタル酸エステル類は本実験系でも増殖がみられ、しかも非常に低濃度でも増殖が起こり、内分泌攪乱化学物質として疑われている物質だけに興味をひかれる結果であると考察された。

(3) 身近な生活環境中に存在する化学物質の検討

身近な生活環境中に存在する化学物質としては、化粧品中の成分に関心を持ち主成分としてよく使われている2物質 [ベンゾフェノン及びブチルヒドロキシアニソール (BHA)] について内分泌攪乱作用の有無の検討を行った。ベンゾフェノンは紫外線吸収剤として、日焼け止めクリームやファンデーション、化粧品、クリーム等に含まれている⁶²⁾。ブチルヒドロキシアニソール (BHA) は空気中の酸素による品質劣化防止のため、酸化防止剤として使用されている。具体的には乳液、香水、口紅等に含まれている。

本研究において、ベンゾフェノンは毒性が低いと考えられたので添加濃度は 10^{-5}M 、 10^{-6}M 、 10^{-7}M という高濃度で実験を行った。それにもかかわらず全添加濃度において増殖がみられず (図 15)、ベンゾフェノンには MCF-7 細胞を増殖させる作用はないと思われる。また、ブチルヒドロキシアニソール (BHA) についてもベンゾフェノンと同様に濃度は 10^{-5}M 、 10^{-6}M 、 10^{-7}M の高濃度を添加

した（図 15）。生存率については、 10^{-7} M は 74%、 10^{-6} M は 55%、 10^{-5} M は 52%の値であり 10^{-7} M 添加以外は毒性が現れたものと考えられた。 10^{-7} M 添加では生存率が 74%であり、毒性を受けているとは考えにくく、ブチルヒドロキシアニソール（BHA）についてもベンゾフェノンと同様、MCF-7 細胞を増殖させる作用はないと判断した。今後はより濃度範囲を広げて影響を評価する必要があると考えられる。

今回、本実験では化粧品の成分である 2 種類の化学物質には細胞増殖作用、即ち内分泌攪乱作用は確認されなかった。しかし、化粧品や醤油などに防腐剤や防カビ剤として添加されているパラオキシ安息香酸エステル（パラベン）が酵母の研究において内分泌攪乱化学作用を起こす可能性のあることが報告された⁷³⁾。添加剤（酸化防止剤）として含まれているパラベンについては、これはビスフェノール A やノニルフェノールと同程度のエストロゲン様作用だと証明されている。したがって、今回の培養細胞を用いた実験系である E - Screen Test においては、この 2 物質とも内分泌攪乱化学物質として確認されなかったが、酵母による研究、細胞内ホルモンレセプター結合テスト、生物個体への影響をみる動物実験などとの結果とあわせての検討が必要である。今後は身近な生活環境中に存在する化学物質に焦点を当てて更に内分泌攪乱化学物質作用の有

無について調べる予定である。

本研究においては乳がん細胞の増殖を指標として内分泌攪乱化学物質をスクリーニングするということを行ってきた。近年、女性の疾患、特にアメリカにおける乳がんは増加傾向にある¹¹⁾。1997年 WHO は女性のがんの1位は乳がん、2位は子宮がんと発表した⁹⁶⁾。女性生殖器系疾患の中で子宮内膜症の罹患率も上昇し、これはダイオキシンとの関連も疑われている⁷⁵⁾。本研究では化学物質の添加による乳がん細胞の増殖を観察したが、低濃度でも増殖を促す物質、また逆に高濃度でも増殖がみられない物質があるという特徴的な結果から乳がんの原因の一つに化学物質、特に内分泌攪乱化学物質が関与しているという仮説⁴¹⁾がより近く感じられた。本研究の結果からも内分泌攪乱化学物質は極めて低濃度で影響があり、低濃度汚染の環境調査や健康への影響は確かめられておらず、調査研究の進行によっては更に汚染が広がったり、新たな問題が生じる可能性がある。この内分泌攪乱化学物質問題については未解明な部分が多く、その因果関係は未だはっきりしていない段階であり、今後はリスク評価やスクリーニング法を含め、試験法を更に検討し、作用メカニズムの解明をも目指して研究を進めていきたい。

第6章 結論

本研究において、以下の如く結論が得られた。

- 1) 細胞培養条件の基礎的検討及び E - Screen Test の基礎的条件の検討を行った結果、陽性コントロール（ 17β -エストラジオール、ビスフェノール A 及びノニルフェノール）についてエストロジェン様作用（MCF-7 細胞の細胞増殖）が確認された。
- 2) 濃度は、 10^{-8} ~ 10^{-10} M と極めて低濃度で微量でも健康影響が危惧された。最大増殖は生存率を考え、7日でみられた。
- 3) E - Screen Test で検討を行ったところ、有機錫化合物（トリブチル錫、トリフェニル錫）及びフタル酸エステル（3種類）に関しても同様な細胞の増殖が得られ、特にトリブチル錫については大きな増殖がみられた。これらの物質は内分泌攪乱化学物質と認められている物質であり、本実験でもそれを示唆する結果が得られた。
- 4) 身近な生活環境中に存在する化学物質に化粧品（乳液、口紅、香水等）があるが、それらに共通して含まれるベンゾフェノンとブチルヒドロキシアニソール（BHA）について検討を行った。しかし、本実験では両物質とも細胞の増殖がみられず、E - Screen Test において、内分泌攪乱作用は確認されなかった。

今後は、身近な生活環境中に存在する化学物質のヒトへの健康影響について検討していきたい。

第7章 要約

現在、我々が便利で快適な生活を支えるために全世界では約7～8万種類の化学物質が使用されている。環境中に放出されたそれらの化学物質の中には、精子数の減少などの生殖障害や発がんリスクの上昇をもたらす可能性のある物質、つまり内分泌攪乱化学物質の存在が問題となっている。

現在までのところ内分泌攪乱化学物質であると判明されたのは67種類である。その他の化学物質については、まだほんのわずかしかスクリーニングされておらず、内分泌攪乱化学物質の研究はまだ始まったばかりである。

そこで本研究においては、まず身近な生活環境中に存在し、ヒトへ移行する可能性のある化学物質が内分泌攪乱化学物質か否かを検討することを直接の目的とした。

内分泌攪乱化学物質のスクリーニング法としては細胞増殖を指標とする E - Screen Test を選び、基礎的条件の検討から実験を開始した。

- 1) E - Screen Test に用いる MCF-7 細胞の増殖には、牛胎児血清を 10% 含む培地を用い、またその培地は数日毎に交換するのが良いことが判明した。
- 2) 10 万個/ml の MCF-7 細胞は 7 日目でピークに達し、実験を行

うのに適した細胞数は 30 万個/ml であることもわかった。

- 3) 培地中のフェノールレッド (PR) や血清中に含まれる内在性ホルモンが細胞増殖に影響を及ぼすので、フェノールレッド (PR) と内在性ホルモンを除去した培地を用いて実験を行った。
- 4) 本実験の E - Screen Test においても 17β -エストラジオール、ビスフェノール A 及びノニルフェノールはコントロールに比べ、有意の増殖が観察されたので、本実験でエストロゲン様作用を検討できることが確認された。
- 5) 内分泌攪乱化学物質と認められているトリブチル錫とトリフェニル錫及びフタル酸エステルにおいてもエストロゲン様作用が確認できた。
- 6) 身近な生活環境中に存在する化学物質として乳液や口紅、香水など化粧品の成分であるベンゾフェノン及びブチルヒドロキシアニソールに (BHA) ついて検討を行ったが、高濃度であるにもかかわらず増殖はみられず、本実験では内分泌攪乱化学物質ではないと判断し、化粧品の安全性の一つが確認された。

今後は身近な生活環境中に存在する化学物質のヒトへの健康影響について更に検討していきたい。

謝 辞

本論文の作成にあたり、長きにわたり御指導を賜りました本学環境保健学研究室の岩井秀明教授に心から感謝の意を表します。

論文審査においては主査として野原三洋子教授、副査として中村勝二教授ならびに櫻庭景植助教授に多くの御示唆、御助言を頂きましたこと謹んでお礼申し上げます。

また本学の諸先生方をはじめとして学友諸兄からのご指導、御援助に厚くお礼申し上げるとともに、環境保健学ゼミナールの皆様のご協力に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) 味戸 健, 小澤 洋, 草刈 基治, 佐藤 旬, 鈴木 正浩, 高橋 良司, 吉川 菜穂子, 吉田 裕: 培養細胞を用いた環境汚染物質の生体影響評価, 順天堂大学学生 研究報告集, 21, 154-162, (1996・1997)
- 2) 有蘭 幸司: 環境ホルモンの影響をはかる, 別冊化学, 11, 48-53, (1998)
- 3) Bittner, J. J. : The causes and control of mammary cancer in mice, Harvey Lect, 42, 221-246, (1947)
- 4) Brotous, A. J. : Xenoestrogens Released from Lacquer Coatings in Food Cans Environmental Health Perspectives, 103, (6), 608-612, (1995)
- 5) Cardwell, R. D. ,Pavlou, S. P. : An assesment of environmental chemistry and aquatic toxicology of trialkyltin compounds, 1-9, Envirosphere:Washington(1984)
- 6) Cadbury, D.(古草 秀子訳) :The Feminization of Nature(邦訳 メス化する自然), 第1刷, 集英社:東京(1998)
- 7) Carlsen, E. ,Giwerzman, A. ,Keiding, N. and Skakkebaek, N. E. : Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years, British Medical Journal, 305, 609-613, (1992)
- 8) Carson, R. L.(青樹 梁一訳) :Silent Spring(邦訳 沈黙の春), 新潮社:東京(1967)
- 9) Colborn, T. ,Dumanoski, D. ,Myers, J. P.(長尾 力訳) :Our Storen Future(邦訳 奪われし未来), 翔泳社, 東京:(1997)
- 10) Davis, D. L. and Bradlow, H. L. : Can environmental estrogens cause breast?, Scientific American, (10), 144-149, (1995)
- 11) Davis, D. L. and Bradlow, H. L. : 乳ガンと環境中のホルモン様物質, 日経サイエンス, 臨時増刊号 9, 41-47, (1998)
- 12) Dewaily, E. ,Dodin S. ,et. al. : High organochlorine body burden in women with estrogen receptor-positive breast cancer, J. Natl Cancer Inst, 86, 232-234, (1994)
- 13) 遠藤 悟, 出川 篤, 佐藤 亮輔, 徳永 源一郎, 下山 文裕, 牧 達也, 田中 正人, 山本 千華 : 新しい健康問題「環境ホルモン」について, 順天堂大学学生 研究報告集, (1997) 印刷中
- 14) Feldman, D. ,Krishnan, A. : Estrogenic in Unexpected Places, Possible Implications for Researchews and Consumers, Environmental Health Perspectives, 103, (9), 129-133, (1995)
- 15) Gill, W. : in Intrauterine exposure to diethylstilbestrol in the Human, A.L.Herbsted., American College of Obstetricians and gynecologists, (1978)
- 16) Gill, W. ,Schumacher, G. ,Bibbo, M. ,Straus, F. ,Schoenberg, H. : Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities, J. Urol, 122, 36-39, (1997)
- 17) 後藤 稠, 池田 正之, 原 一郎: エステル類—フタル酸エステルの経口急性毒性—, 産業中毒便覧, 960-969:東京(1977)
- 18) Gray, E. ,William, R. : ENDOCRINE SCREENING METHODS WORKSHOP REPORT, Reproductive Toxicology, 11, (5), 719-750, (1997)
- 19) Guillette, L. J. Jr. : ワニの胚発生を攪乱する環境汚染物質, 科学, 68, (7), 552-557, (1998)
- 20) Guillette, L. J. Jr. ,Gross, T. S. ,Masson, G. R. ,Matter, J. M. ,Percival, H. F. and Woodward, A. R. : Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and controllakes in Florida, Environmental Health Perspectives, 102, 680-688, (1994)
- 21) Guise, D. S. ,Maartineau, D. ,Beland, P. and Fournier, M. : Possible mechanisms of action of environmental contaminants on St. Lawrence beluga whales, Environmental Health Perspectives, 103, (4), 73-77, (1995)
- 22) 萩野 義明: ホルモン・生理活性物質—MCF-7, 蛋白質 核酸 酵素, 33, (6), 1147-1148, (1988)
- 23) Henderson, B. E. ,Pike, M. C. : Breast cancer. Cancer Epidemiology and Prevention, Shottenfeld, D. and Fraumeni, J. E. Jr. , Oxford University Press, 1022-1039, (1996)
- 24) 堀口 敏宏: 内分泌攪乱化学物質としての有機スズ化合物, ぶんせき, 276, (12), 1014-1016, (1997)

- 25) 堀口 敏宏：有機スズ化合物と海産巻貝類の生殖異常, 科学, 68, (7), 515-517, (1998)
- 26) Horiguchi, T., Shiraishi, H., Shimizu, M., Yamazaki, S. and Morita, M. : Imposex and organotin compounds in *Thais clavigera* and *T. bronni* in Japan, *J. Mar Biol Assoc UK*, 74, 651-669, (1994)
- 27) Horiguchi, T., Shiraishi, H., Shimizu, M., Yamazaki, S. and Morita, M. : Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds in the development of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*, *Environ Pollu*, 95, 85-91, (1997)
- 28) 堀内 龍也：皮膚系細胞—乳腺上皮細胞(ヒト乳がん細胞株)について, 生体の科学, 43, (5), 363-367, (1992)
- 29) 五十嵐正雄：子宮内膜症の問題点と新しい治療法, *ASAHI MEDICAL*, 11, 28-31, (1998)
- 30) 井口 泰泉：内分泌攪乱化学物質問題のこれまでの報告 生態系への影響, 外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書, 33-59, (1997)
- 31) 井口 泰泉：環境ホルモンの野生生物への影響, *かんきょう*, 23, (4), 9-13, (1998)
- 32) 井口 泰泉：環境ホルモン問題を整理する—ゴードン会議にみる世界の動向—, *現代化学*, 10, 24-31, (1998)
- 33) 井口 泰泉：環境ホルモンの魚類への影響—海外の報告, 科学, 68, (7), 59, (1998)
- 34) 井口 泰泉：生殖異常—環境ホルモンの反逆—, 第1刷, *かもがわ出版*(1998)
- 35) 井口 泰泉：PCプラスチックから溶出するビスフェノールA, *別冊化学*, 11, 61-65, (1998)
- 36) 井上 達：内分泌攪乱化学物質問題に関する概況, 外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書, 1-4, (1997)
- 37) 井上 達：内分泌攪乱を生じるメカニズム, 外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書, 100-104, (1997)
- 38) Irvine, S., Cawood, E., Richardson, D., MacDonald, E. and Aitken, J. : Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years, *British Medical Journal*, 312, 467-471, (1996)
- 39) Iwai, H., Kurosawa, M., Matsui, H. and Wada, O. : Inhibitory Effects of Organotin Compounds on Histamine Release from Rat Serosal Mast Cells, *Industrial Health*, 30, 77-84, (1992)
- 40) Iwai, H., Wada, O., Arakawa, Y. and Ono, T. : Intestinal uptake site, enterohepatic circulation, and excretion of tetra- and trialkyltin compounds in mammals, *Journal Toxicological Environmental Health*, 9, 41-49, (1982)
- 41) 岩井 秀明：有機錫化合物の肥満細胞機能に及ぼす影響. *順天堂大学保健体育紀要*, 第33号, 11-18, (1990)
- 42) Jordan, V. : 女性の病気を予防する新しいホルモン調節物質, *日経サイエンス*, 1, 78-87, (1999)
- 43) 門上希和夫：内分泌攪乱作用が疑われる化学物質問題の我が国の環境中濃度, 外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書, 78-99, (1997)
- 44) 門上希和夫：環境ホルモンと「化学物質と環境」調査, *かんきょう*, 23, (4), 17-20, (1998)
- 45) 金子 秀雄, 庄野 文章, 松尾 昌季：女性ホルモン様物質の検出系, 科学, 68, (7), 598-605, (1998)
- 46) 環境庁：外因性内分泌攪乱化学物質問題について, 外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について—環境ホルモン戦略計画SPEED'98—, (5), 4-5, (1998)
- 47) 片瀬 隆雄：可塑剤フタル酸エステルの影響, *別冊化学*, 11, 70-78, (1998)
- 48) 片瀬 隆雄：食品包装材用プラスチック・フィルムから移行するアジピン酸エステル, *日本内分泌攪乱化学物質学会 第一回研究発表会要旨集*, 45, (1998)
- 49) 香山 不二雄：環境汚染物質の健康影響 —内分泌系及び免疫系への影響について—, *環境情報科学*, 26, (1), 13-17, (1997)
- 50) 香山 不二雄：環境ホルモンの人への影響, *かんきょう*, 23, (4), 14-16, (1998)
- 51) 香山 不二雄：内分泌攪乱化学物質問題のこれまでの報告, 外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書, 19-24, (1997)
- 52) 香山 不二雄：環境中のホルモン様化学物質の現状, *労働の科学*, 53, (4), 217-221, (1998)
- 53) 香山 不二雄：環境ホルモン問題とは何か, *化学*, 53, (7), 12-15, (1998)

- 54) Kerkvliet, N. I. : Immunological effects of chlorinated dibenzo-p-dioxins, *Environmental Health Perspectives*, 103, (9), 47-53, (1995)
- 55) 金城 学 : 培養細胞に及ぼす有機錫化合物と微量金属の影響に関する基礎的研究—増殖評価及び分化誘導について—, 順天堂大学大学院体育学研究科 修士論文, (1996)
- 56) 小島 正美 : 生活 いいきい 家庭, しのびよる人体汚染, 毎日新聞10月10日, (1997)
- 57) 小島 正美 : 基礎研究不足の日本 今年度ようやく調査・研究予算, *エコノミスト*, 43, (4), 34-38, (1998)
- 58) Krieger, N. ,Wolff, M. S. : Breast cancer and serum organochlorine: a prospective study among white,black, and Asian women, *J. Natl Cancer Inst*, 86, 589-599, (1994)
- 59) Kubiak, T. J. ,Harris, H. J. ,Smith, L. M. : Microcontaminants and reproductive impairment of the Forster's tern on Green Bay, Lake Michigan -1983, *Arch Environ Contam Toxicol*, 18, 706-727, (1989)
- 60) 黒田洋一郎 : 環境化学物質と学習障害, *科学*, 68, (6), 470-474, (1998)
- 61) 黒木登志夫, 許 南浩, 千田 和広編: 分子生物学研究のための培養細胞実験法, 12-13, 羊土社:東京(1995)
- 62) 境野 米子 : 環境ホルモンは化粧品にも使われている. *食品と暮らしの安全*, 第107号, 18, (1998)
- 63) Lippman, M. ,Bolan, G. and Huff, K. : The Effects of Estrogens and Antiestrogens on Hormone-responsive Human Breast Cancer in Long-Term Tissue Culture, *Cancer Research*, 36, 4595-4601, (1976)
- 64) 松原 孝博: 魚の性の攪乱の現状, 第1回日本環境ホルモン学会(仮称)講演会テキスト, 10-17, (1998)
- 65) 松尾 昌季 : 合成化学物質とホルモンの類似性を探る, *化学*, 53, (7), 23-26, (1998)
- 66) 森 千里 : 内分泌攪乱化学物質問題のこれまでの報告 人の健康影響, 外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書, 5-12, (1997)
- 67) 森 千里 : 環境ホルモンによるヒト精子数のへの影響, *科学*, 68, (7), 524-528, (1998)
- 68) 森 千里 : 特集 環境保健のトピックス 環境ホルモンの健康影響—精子への影響について—, *公衆衛生*, 62, (7), 473-477, (1998)
- 69) 長尾 哲二 : 内分泌攪乱物質とその周辺, *衛生化学*, 44, (3), 154-160, (1998)
- 70) 内分泌攪乱化学物質対策は来世紀への大課題, *現代化学*, 323, 42-43, (1998)
- 71) 中村 将, 井口 泰泉 : 特集 環境ホルモンの現在 多摩川に見る魚類の異変, *科学*, 68, (7), 515-517, (1998)
- 72) 日本生化学会編 : 新生化学実験講座18細胞培養技術, 1-92, 東京化学同人:東京(1990)
- 73) 西原 力 : 化学物質の環境動態, *化学工業*, 49(8), 599-602, (1998)
- 74) 西原 力 : 試験管内(インビトロ)スクリーニング試験, 日本学術会議環境保健学研究連絡委員会公開シンポジウム, 8-9, (1998)
- 75) 及川 伸二, 川西 正祐 : 内分泌攪乱化学物質—特に環境エストロゲンによる生殖毒性について—, *産業衛生学雑誌*, 40, 30, (1998)
- 76) 大村 実 : 内分泌攪乱の機序について, 第1回日本水環境学会シンポジウム講演集, (9), 196-197, (1998)
- 77) 大嶋 雄治, 本城 凡夫, 小林 邦男 : 環境中のホルモン様活性物質による複合汚染, *化学と生物*, 36, (7), 418-419, (1998)
- 78) 大竹千代子, 神沼二真 : 環境中ホルモン様物質(内分泌攪乱物質)の環境暴露情報について, 第11回環境情報科学論文集, 159-164, (1997)
- 79) Purdom, C. E. ,Hardiman, P. A. ,Bye, V. J. ,Eno, N. C. ,Tyler, C. R. and Sumpter, J. P. : Estrogenic effects of effluents from sewage treatments works, *Chem Ecol*, 8, 275-285, (1994)
- 80) Rier, S. E. ,Martin, D. C. : Immunoresponsiveness in endometriosis: implications of estrogenic toxicants, *Environmental Health Perspectives*, 103, (7), 151-156, (1995)

- 81) Ross, R. K. and Shottenfeld, D. : Prostate cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention*, Shottenfeld, D. and Fraumeni, J. E. Jr. , Oxford University Press, 1180-1206, (1996)
- 82) 椎葉 茂樹 : 化学物質と環境ホルモン, *生活と環境*, 43, (4), 34-38, (1998)
- 83) Soto, A. M. ,Sonnenschein, C. ,Chung, K. L. ,Fernandez, M. F. ,Olea, N. and Serrano, F. O. : The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens : an update on estrogenic environmental pollutants, *Environmental Health Perspectives*, 103, (7), 113-122, (1995)
- 84) Soto, A. M. ,Justicia, H. ,Wray, J. W. and Sonnenschein, C. : p-Nonyl-phenol : an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene, *Environmental Health Perspectives*, 92, 167-173, (1991)
- 85) Soto, A. M. ,Chung, K. L. and Sonnenschein, C. : The Pesticides Endosulfan, Toxaphene, and Dieldrin Have Estrogenic Effects on Human Estrogen-Sensitive Cells, *Environmental Health Perspectives*, 102, (4), 380-383, (1994)
- 86) Swan, S. H. ,Elkin, E. P. and Fenster, L. : Have Sperm Densities Declined? A Reanalysis of Global Trend Data, *Environmental Health Perspectives*, 105(11), 1228, (1997)
- 87) 田島 知郎, 武藤 輝一 : 標準外科学, 第7版, 321, 医学書院:東京(1976)
- 88) 高田 秀重 : 川や海を汚染するノニルフェノール, *別冊化学*, 11, 66-69, (1998)
- 89) 田辺 信介 : 環境ホルモンー何が問題なのかー, 37-39, 岩波ブックレット456:東京(1998)
- 90) 地球環境情報センター : 環境ホルモンって何だろう, 106-108, ダイヤモンド社:東京(1998)
- 91) Toppari, J. ,Larsen, J. C. : Male Reproductive Health and Environmental Xenoestrogens, *Environmental Health Perspectives*, 104, (4), 741-750, (1996)
- 92) 内山 巖雄 : 内分泌攪乱化学物質とは, 日本学術会議環境保健学研究連絡委員会公開シンポジウム, 2-3, (1998)
- 93) 渡邊 利雄 : 細胞工学バイオ実験イラストレイテッド, 第1版, 24-26, 秀潤社:東京(1996)
- 94) 綿貫礼子, 武田玲子, 松崎早苗 : 環境ホルモンとは何かーリプロダクティブヘルスの視点からー, 初版, 122-126, 藤原書店:東京(1998)
- 95) Wolff, M. S. : Occupationally derived chemicals in breast milk, *American Journal Industrial Medical*, 4, 259-281, (1983)
- 96) World Health Organization : *Environmental Health Criteria 15; Tin and organotin compounds, A preliminary review*, 35-53, WHO:Geneva(1980)
- 97) 山口 直人 : 内分泌攪乱化学物質問題のこれまでの報告 人の健康影響, 外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書, 13-18, (1997)
- 98) 安田 峯生 : 環境科学物質の内分泌攪乱作用, *化学と工業*, 50, (4), 543-545, (1997)
- 99) 米元 純三 : 環境ホルモンの提起した問題, *産業衛生学雑誌*, 40, 107, (1998)
- 100) 吉岡 安之 : 暮らしに潜む危ない化学物, 日本実業出版社, 112-113, 東京:(1998)

Health effects of endocrine disruptors in the normal living environment

- Basic experiments used the cell line -

Naoko YOSHIKAWA

(Juntendo University)

summary

The purpose of this study was to research endocrine disruptors and whether or not this was caused by chemical substances in our normal living environment. Choosing E-Screen Test as the guideline the experiment started cell proliferation from the examination of the basic condition for the screening test of endocrine disruptors .

The results were as follows:

- 1) A medium was used that included 10% FBS in the proliferation of the cells and the medium was decided to change the medium every several days.
- 2) One hundred thousands cells per ml were understood to be the appropriate cell count that was suited to do the experiment. A maximum of 300,000 cells per ml was reached after 7 days.
- 3) E-Screen Test did the experiment by using a medium that removed phenol red and indwelling sex hormones.
- 4) It was confirmed that 17- β estradiol, bis phenol A and nonylphenol allowed us to examine the estrogen action with this experiment because a more significant proliferation was observed in comparison with the control.
- 5) It was possible to confirm the estrogenic effects in the tributyl tin and

the triphenyl tin and also the phthalic acid ester that were determined to be the endocrine disruptors .

6) The proliferation was not observed even the high concentration, although were examined in the cosmetics such as a milky lotion, lipstick and perfume about benzophenone and BHA. And one aspect of the safety of the cosmetics was confirmed.

細胞株の種類

MCF-7 : ヒト乳がん細胞株

HL-60 : 急性骨髄性白血病細胞株

Friend : マウスフレンド白血病細胞株

図-1 使用した細胞株

E-Screen Test 法

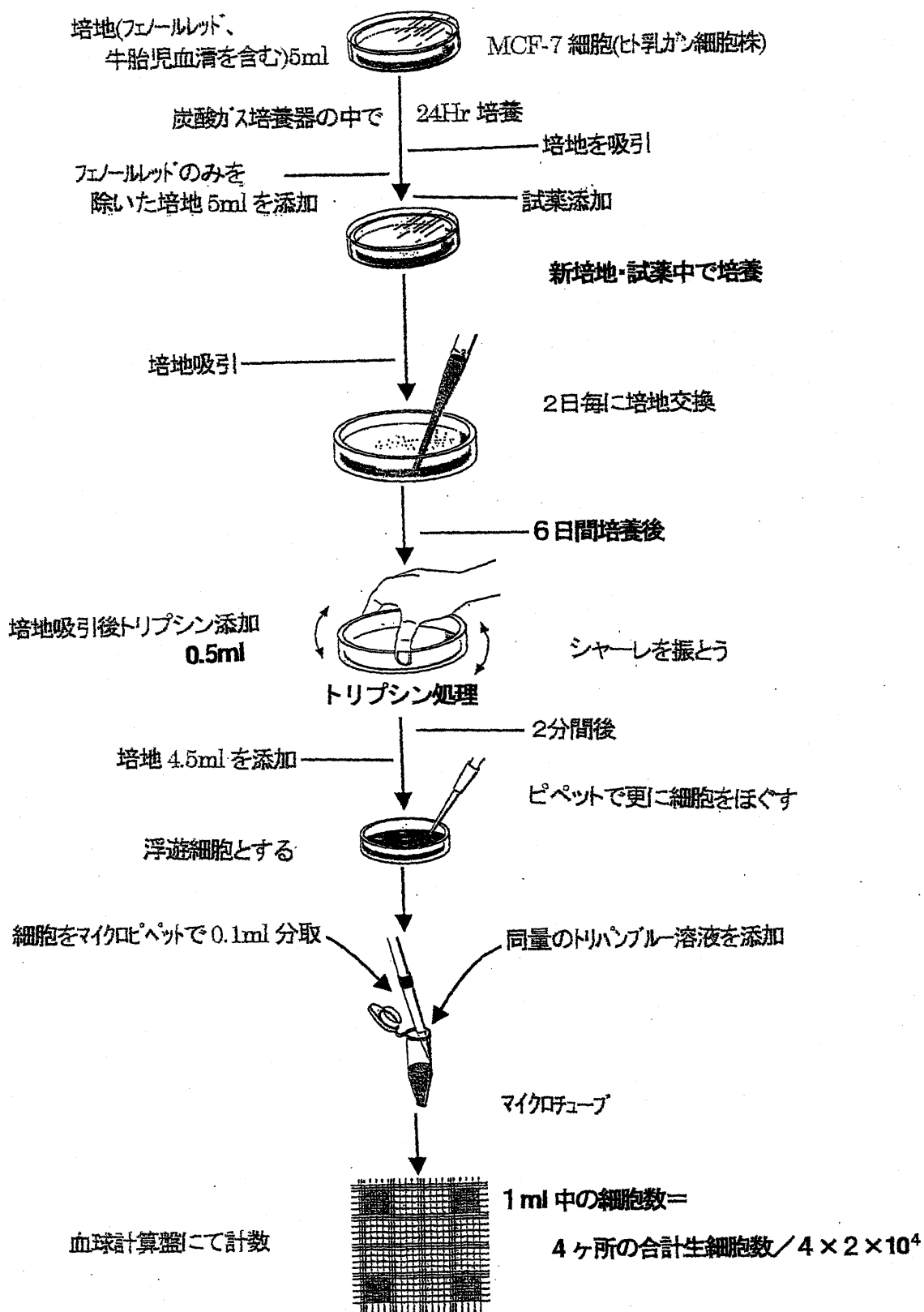


図-2 E - Screen Test 法の模式図

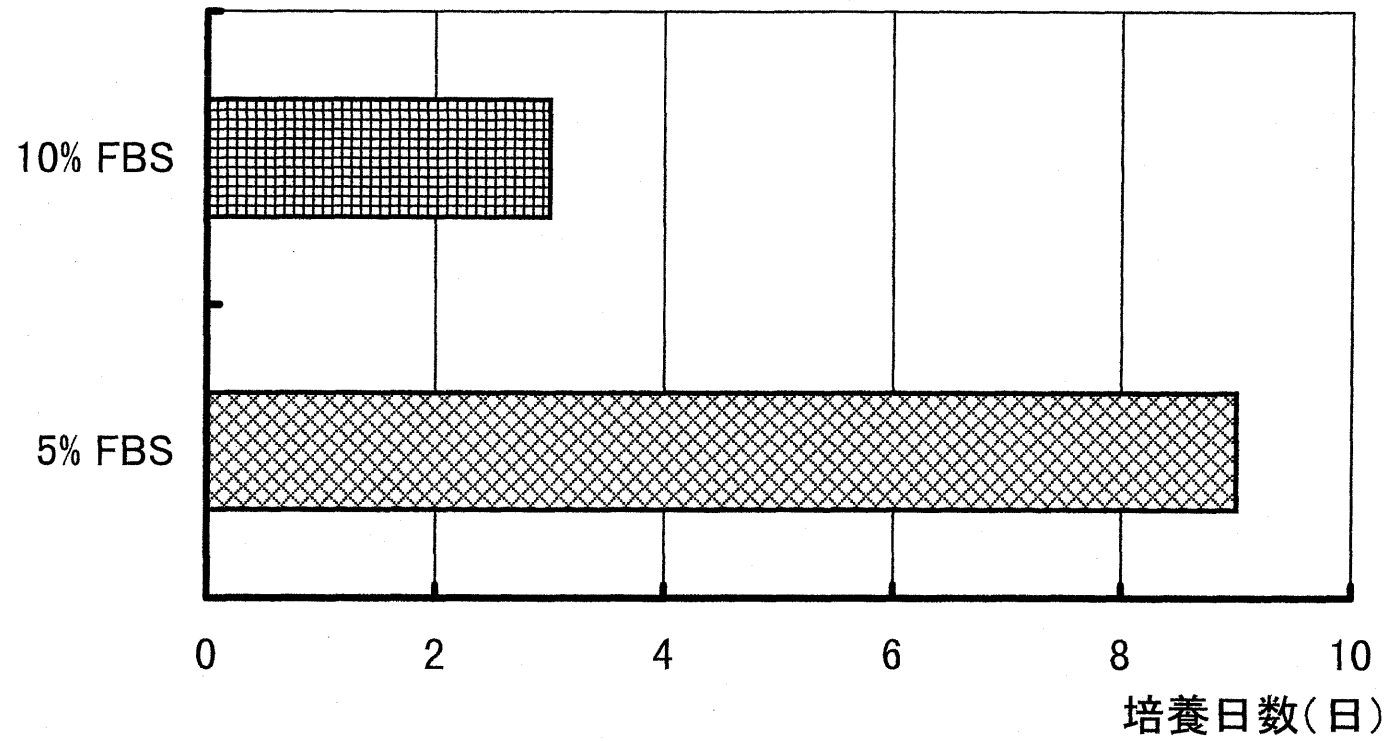


図-3 牛胎児血清(FBS)濃度の影響

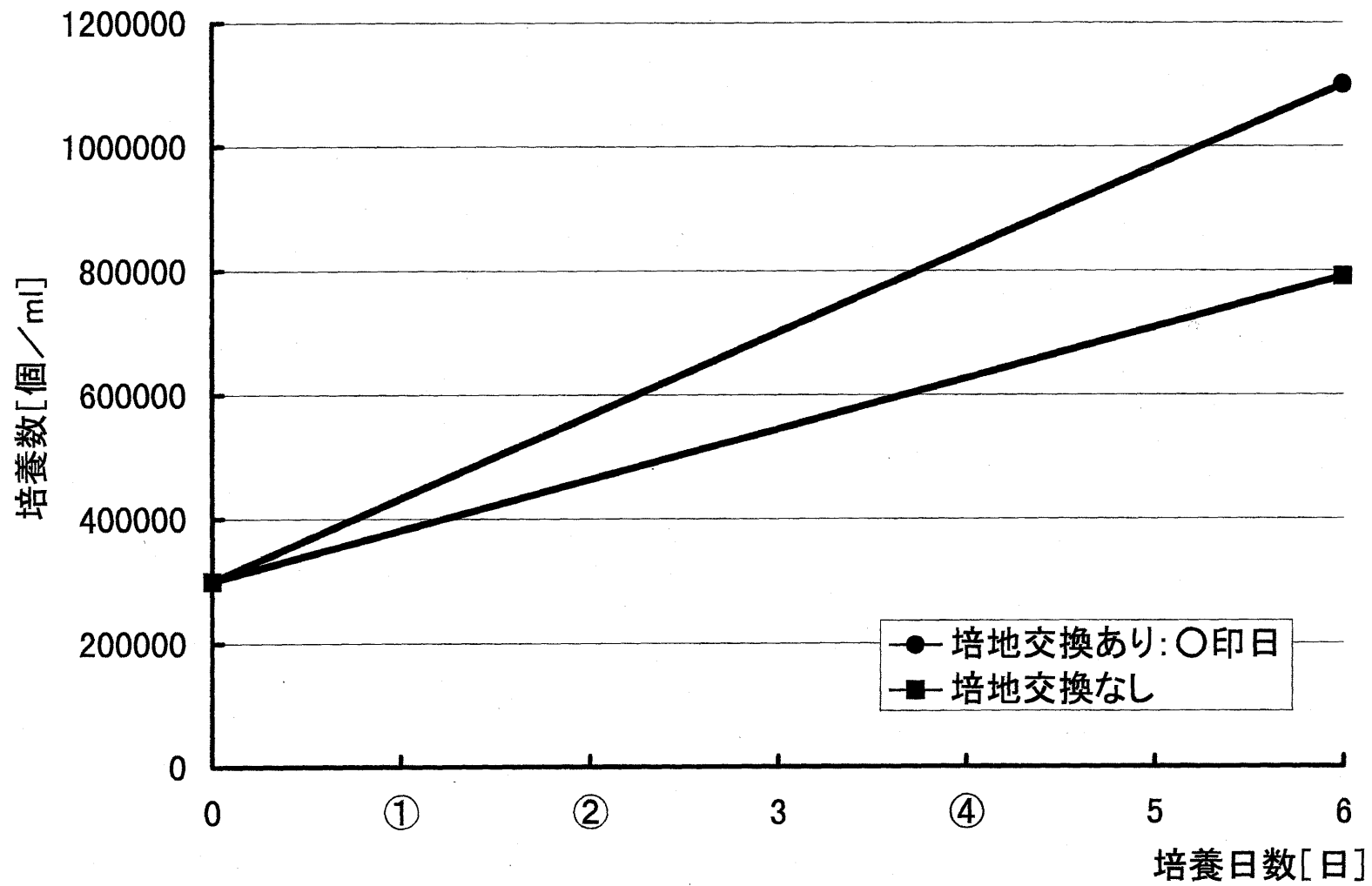


図-4 培地交換の影響

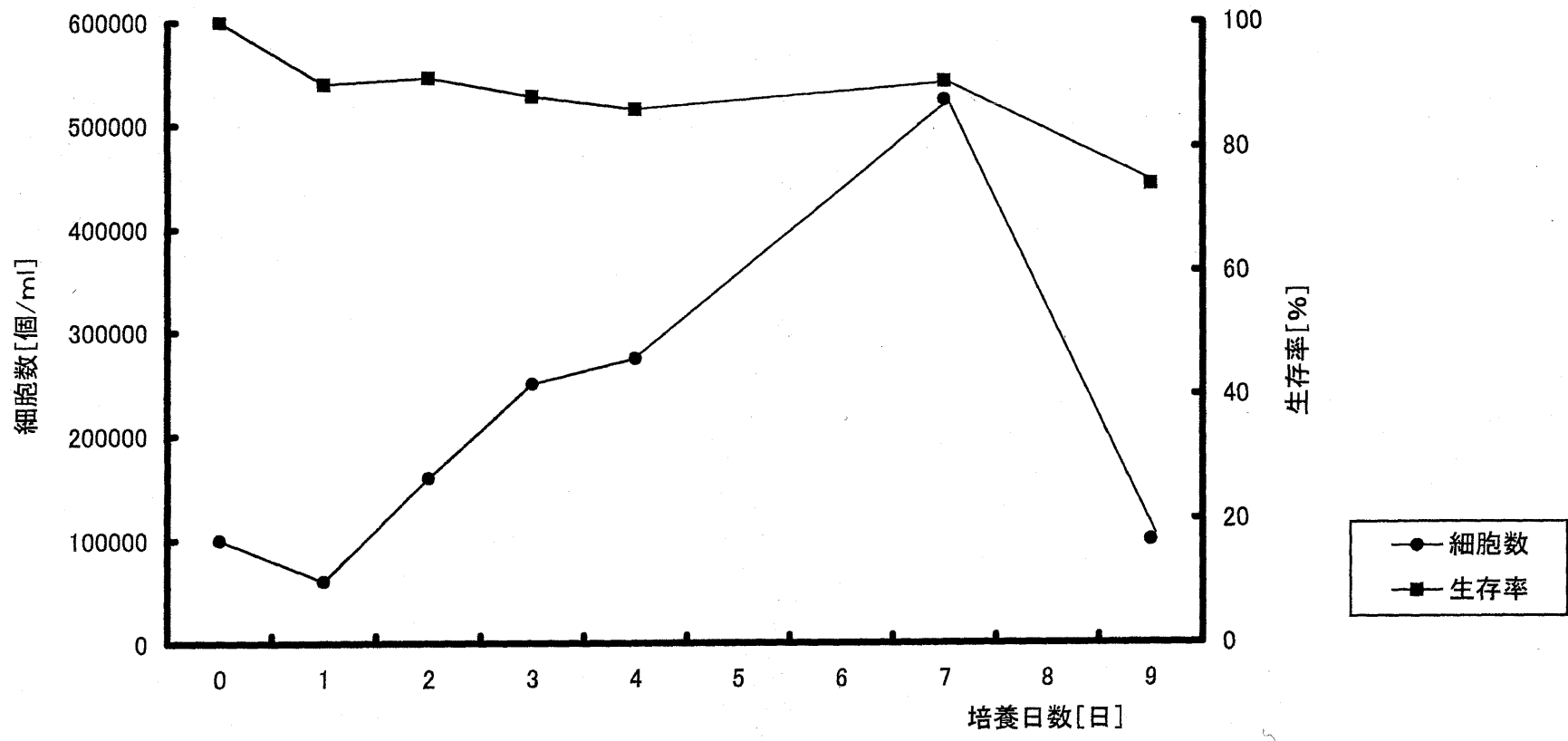


図-5 MCF-7細胞の増殖曲線

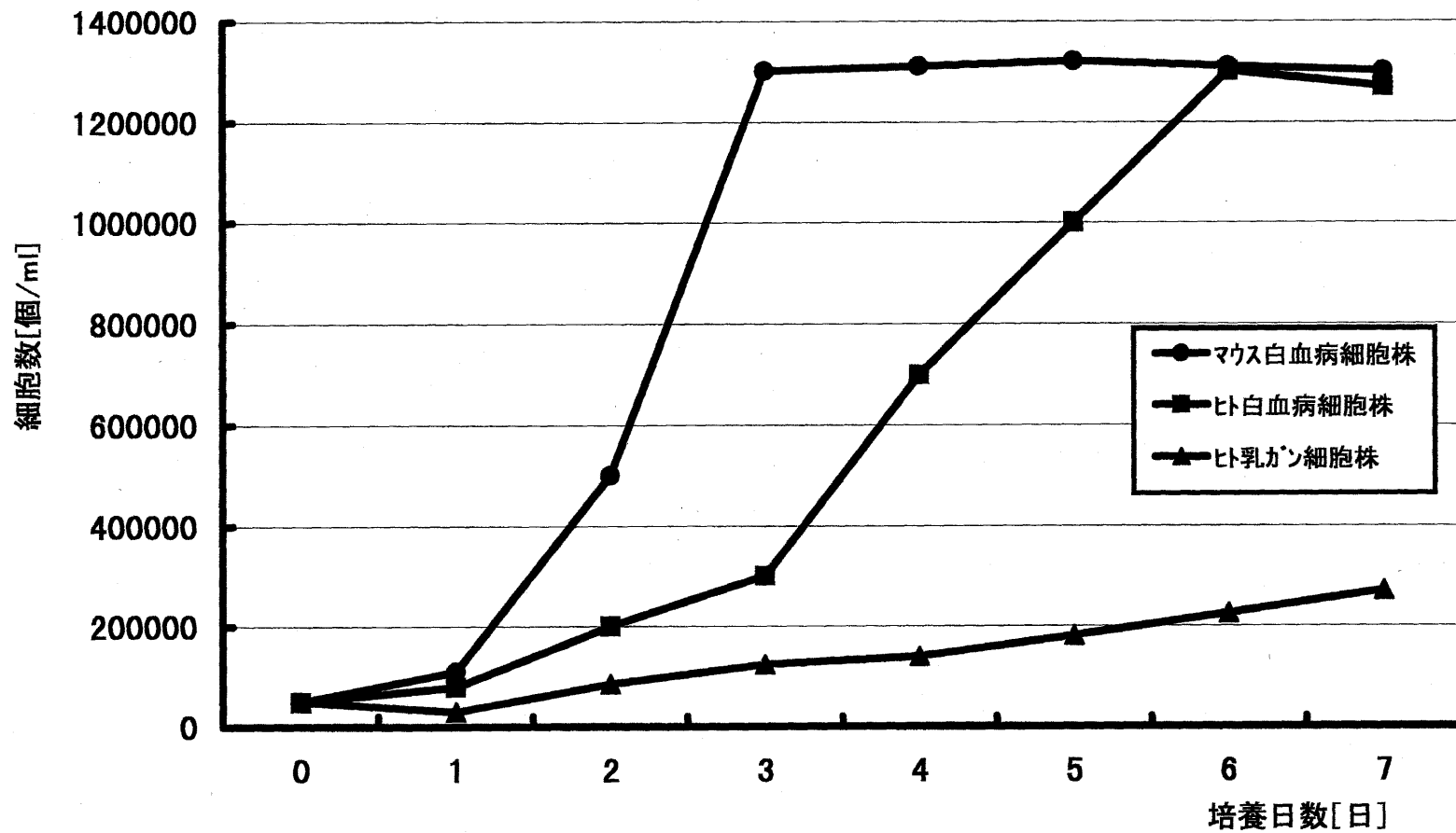


図-6 各種細胞株における増殖速度の比較

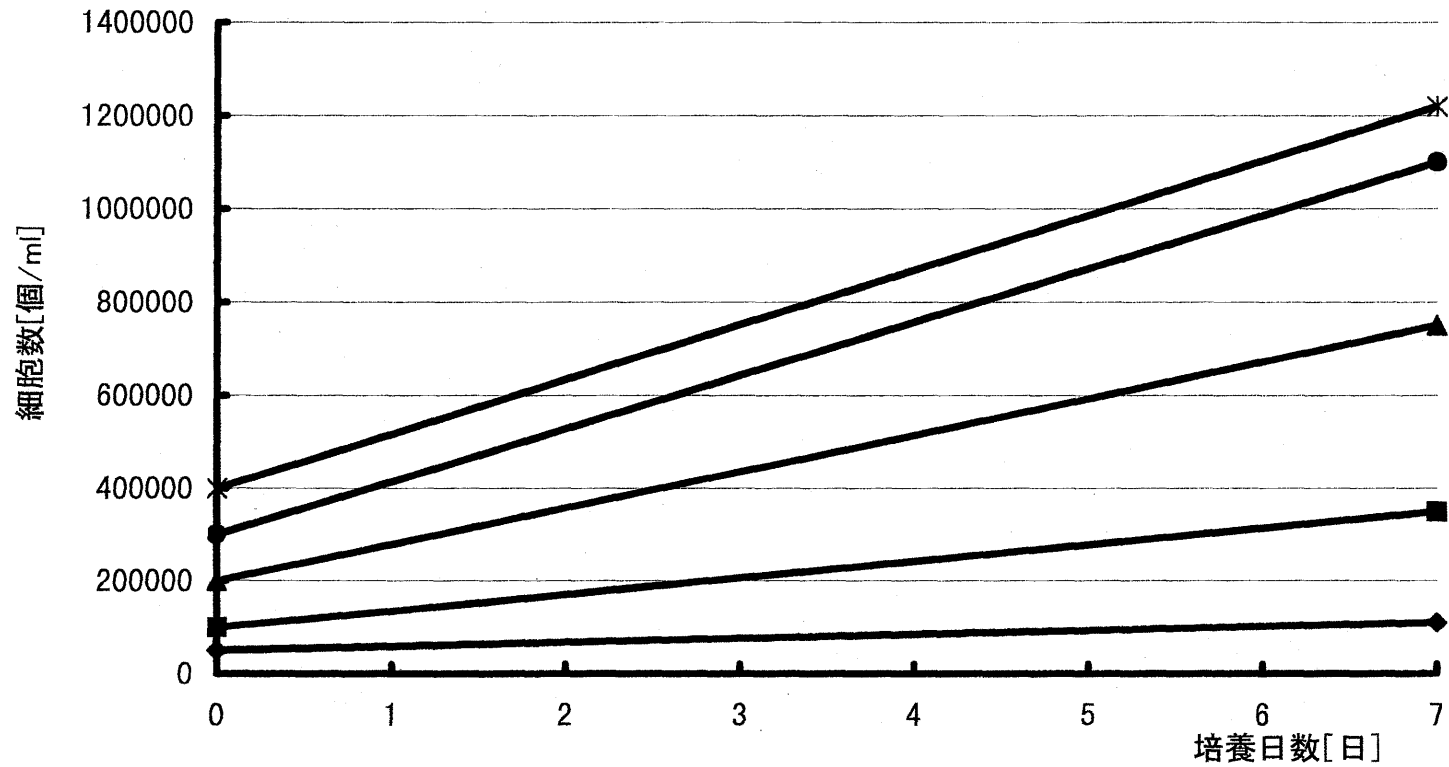


図-7 至適細胞数の検討(MCF-7細胞)

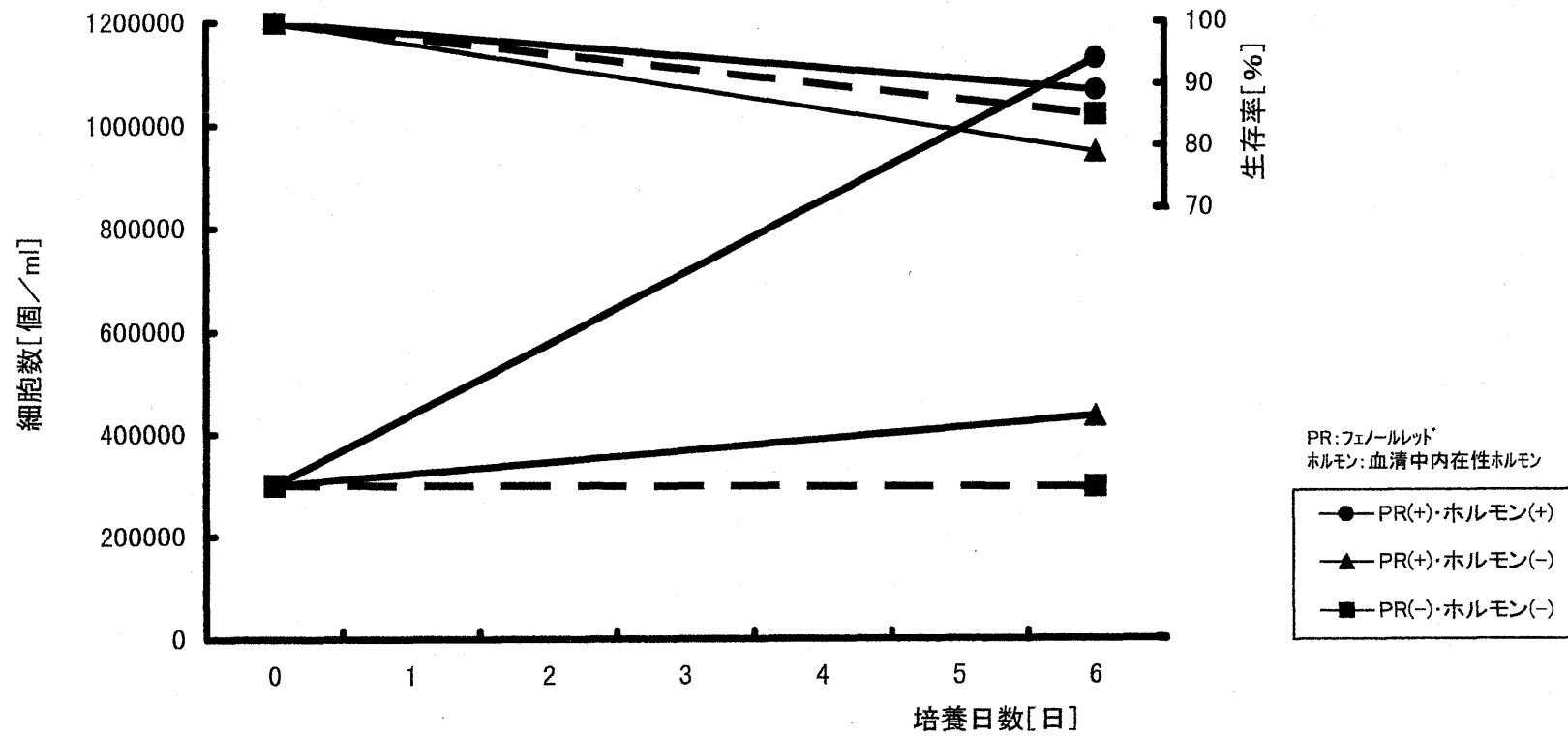


図-8 血清中に含まれるホルモンの細胞増殖に及ぼす影響

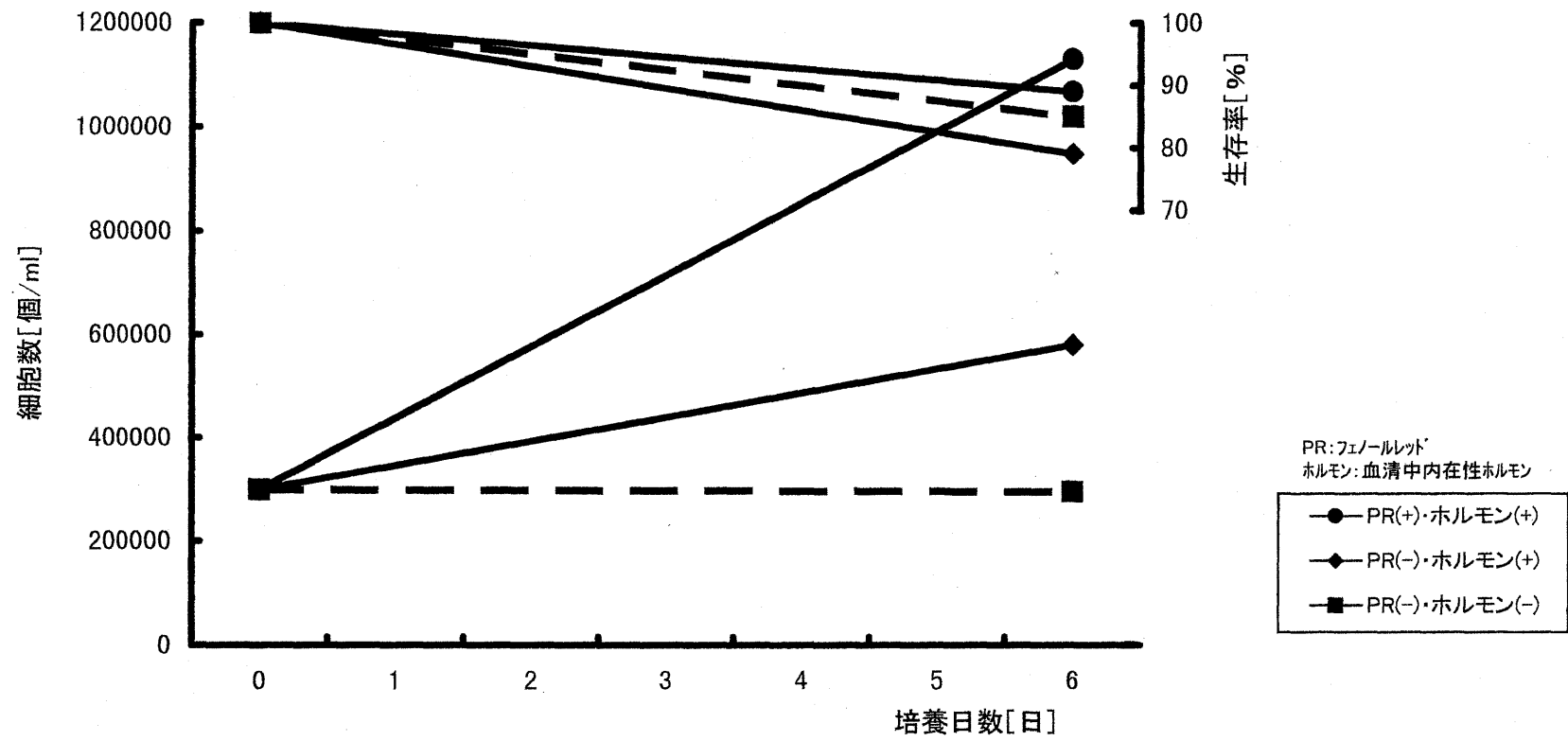


図-9 培地中に含まれるフェノールレッドの細胞増殖に及ぼす影響

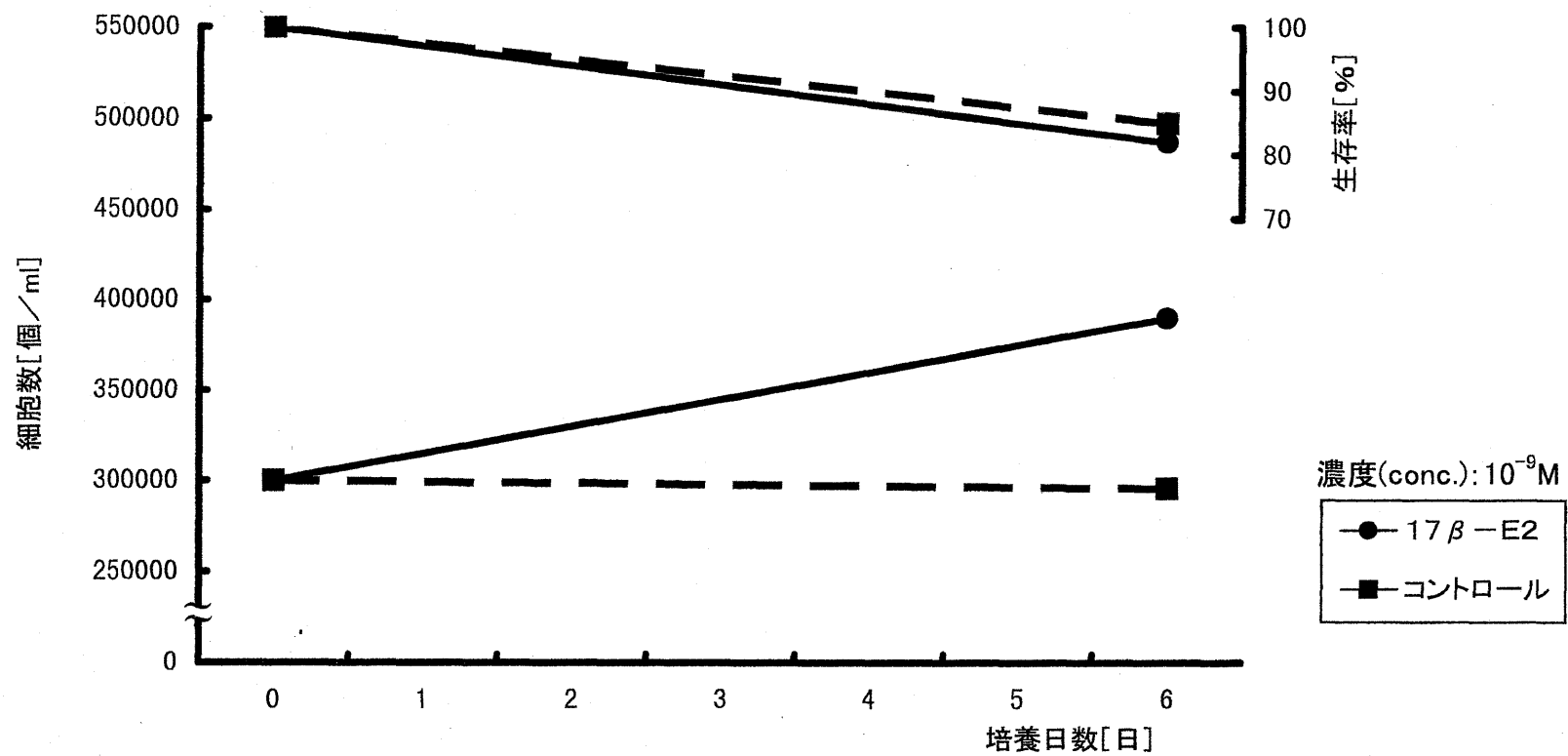


図10 17β -エストラジオールの細胞増殖に及ぼす影響

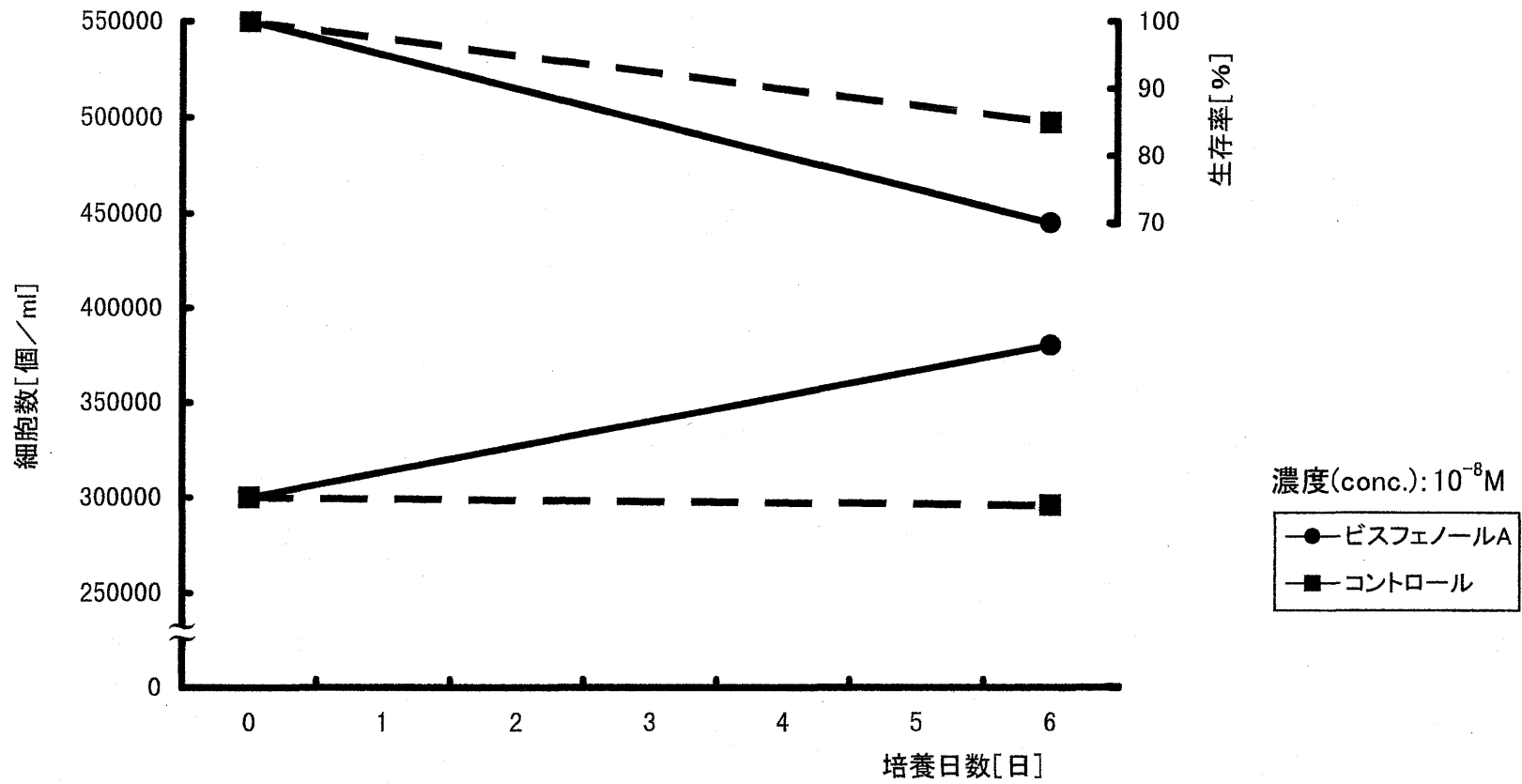


図-11 ビスフェノールAの細胞増殖に及ぼす影響

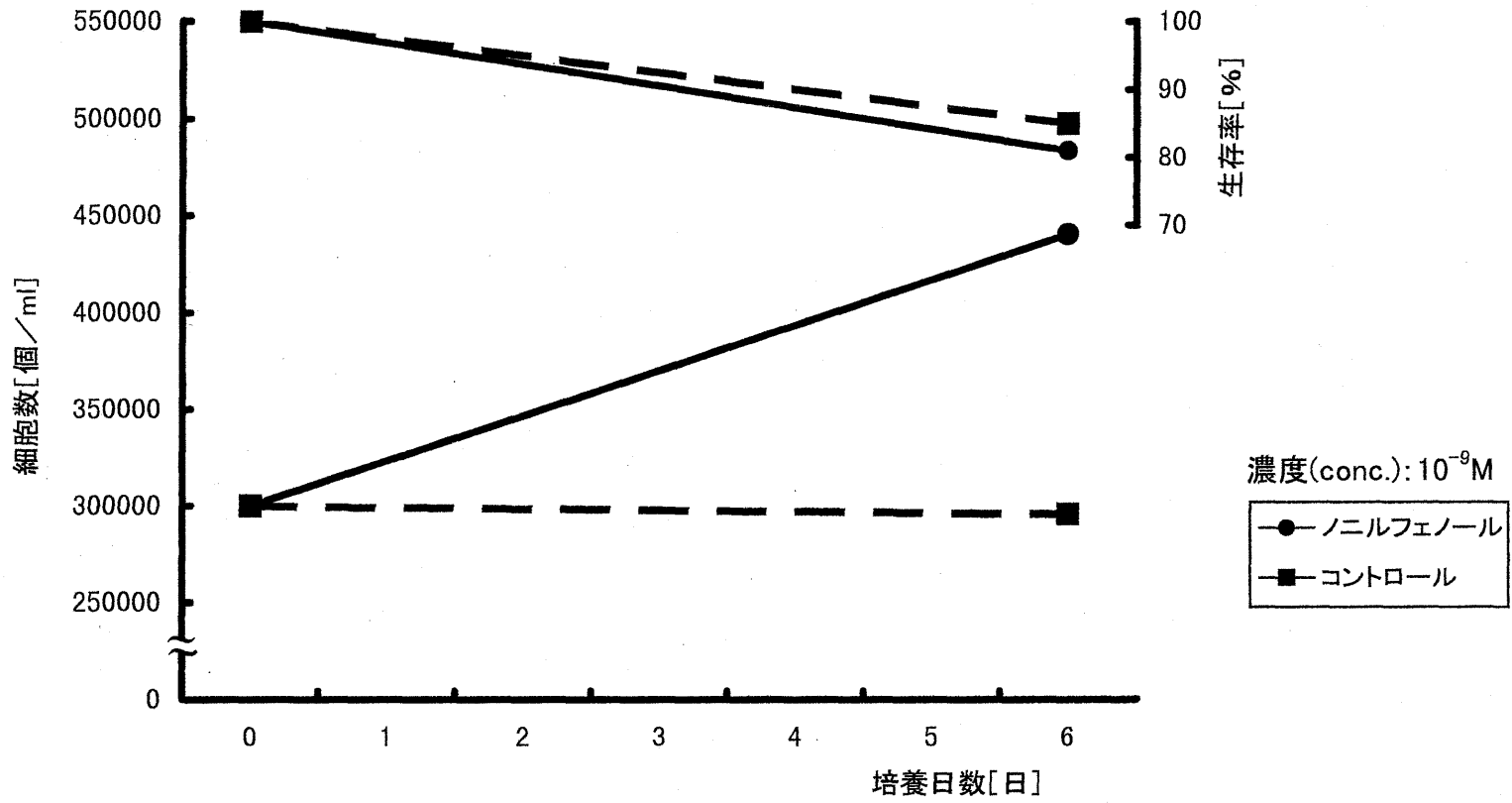


図-12 ノニルフェノールの細胞増殖に及ぼす影響

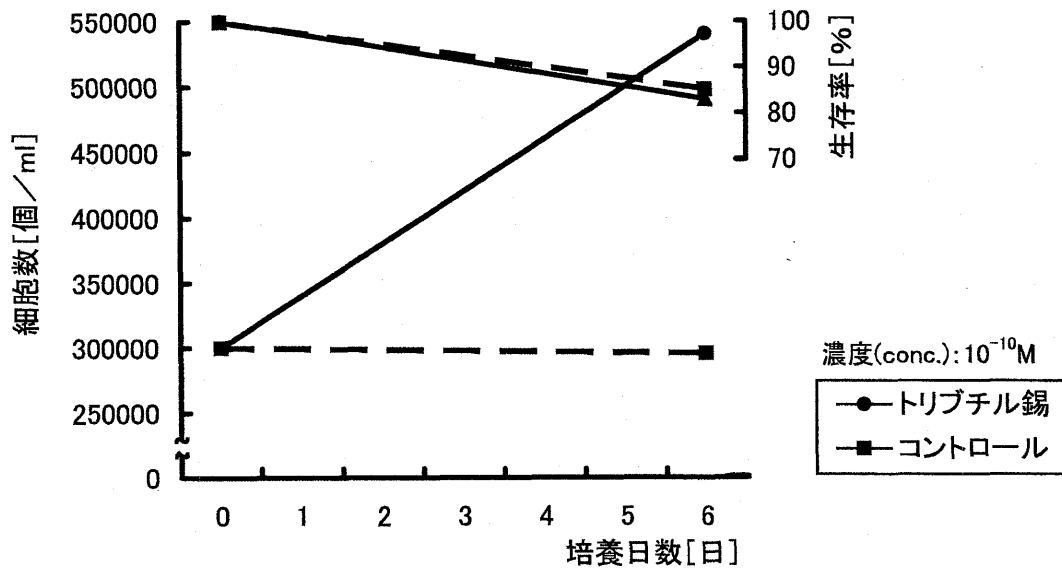


図-13 A トリブチル錫の細胞増殖に及ぼす影響

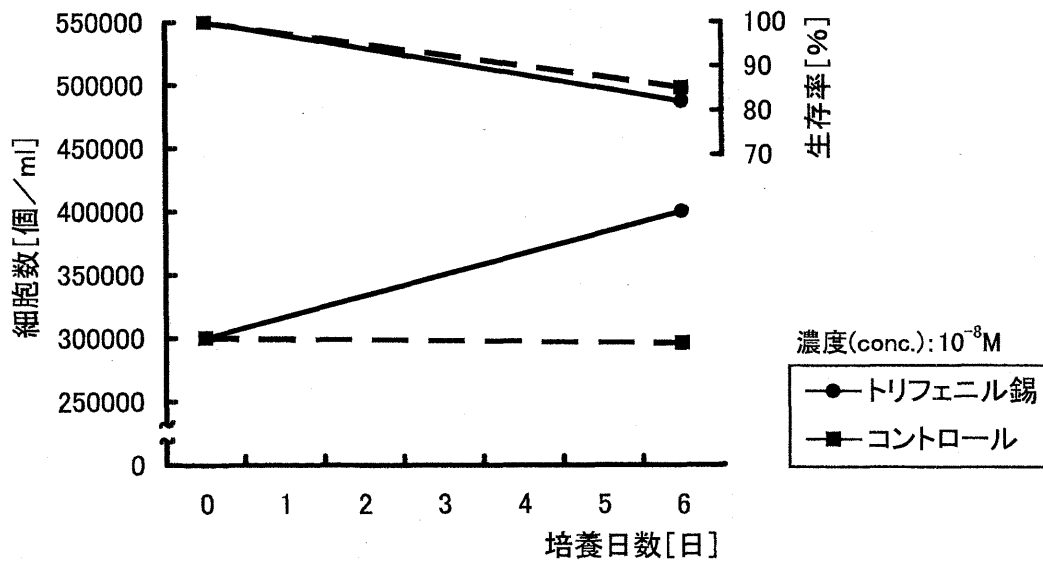


図-13 B トリフェニル錫の細胞増殖に及ぼす影響

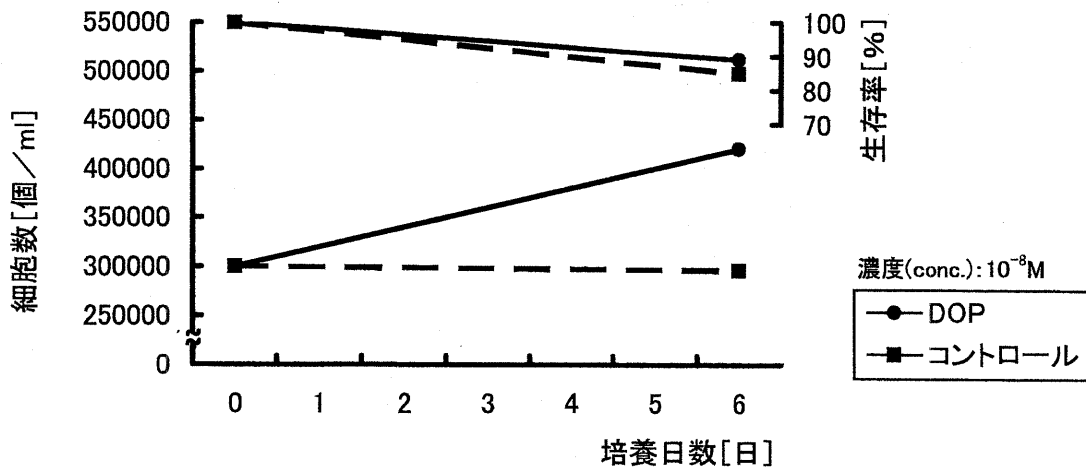


図-14 A フタル酸エステル(DOP)の細胞増殖に及ぼす影響

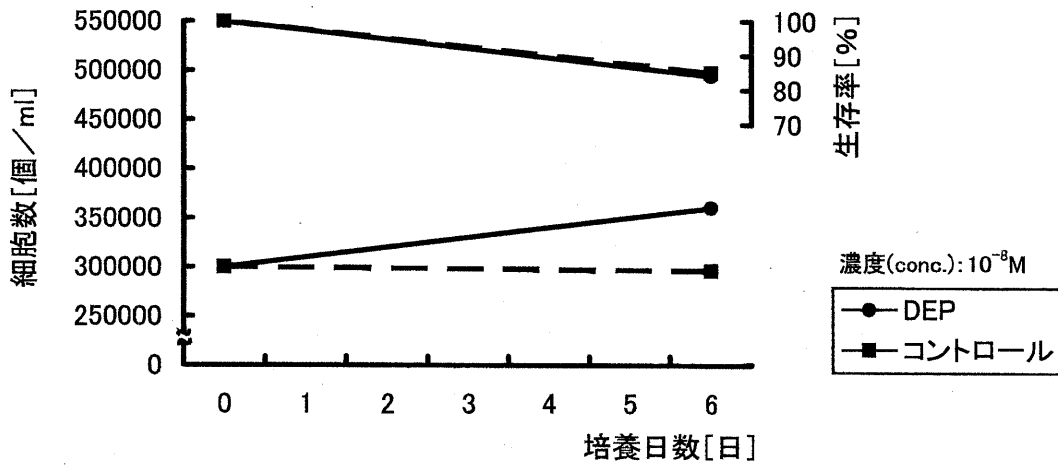


図-14 B フタル酸エステル(DEP)の細胞増殖に及ぼす影響

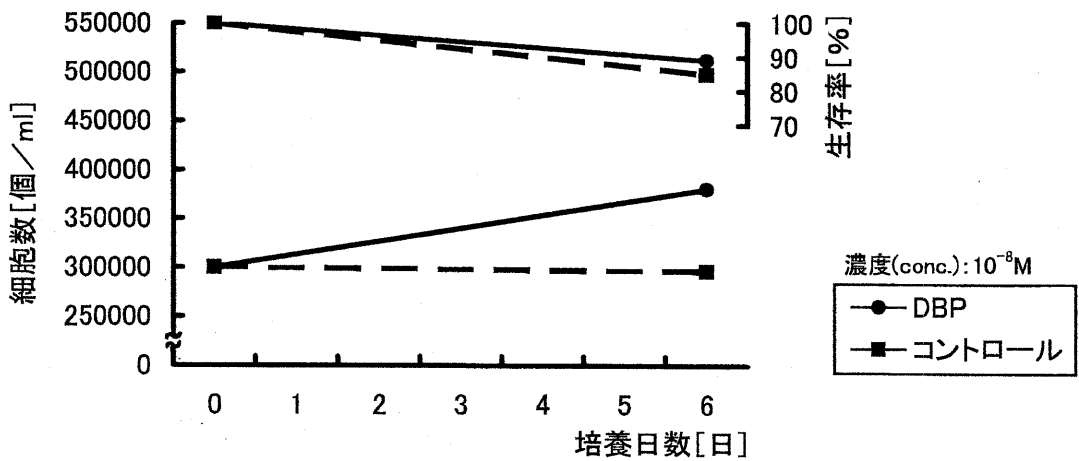


図-14 C フタル酸エステル(DBP)の細胞増殖に及ぼす影響

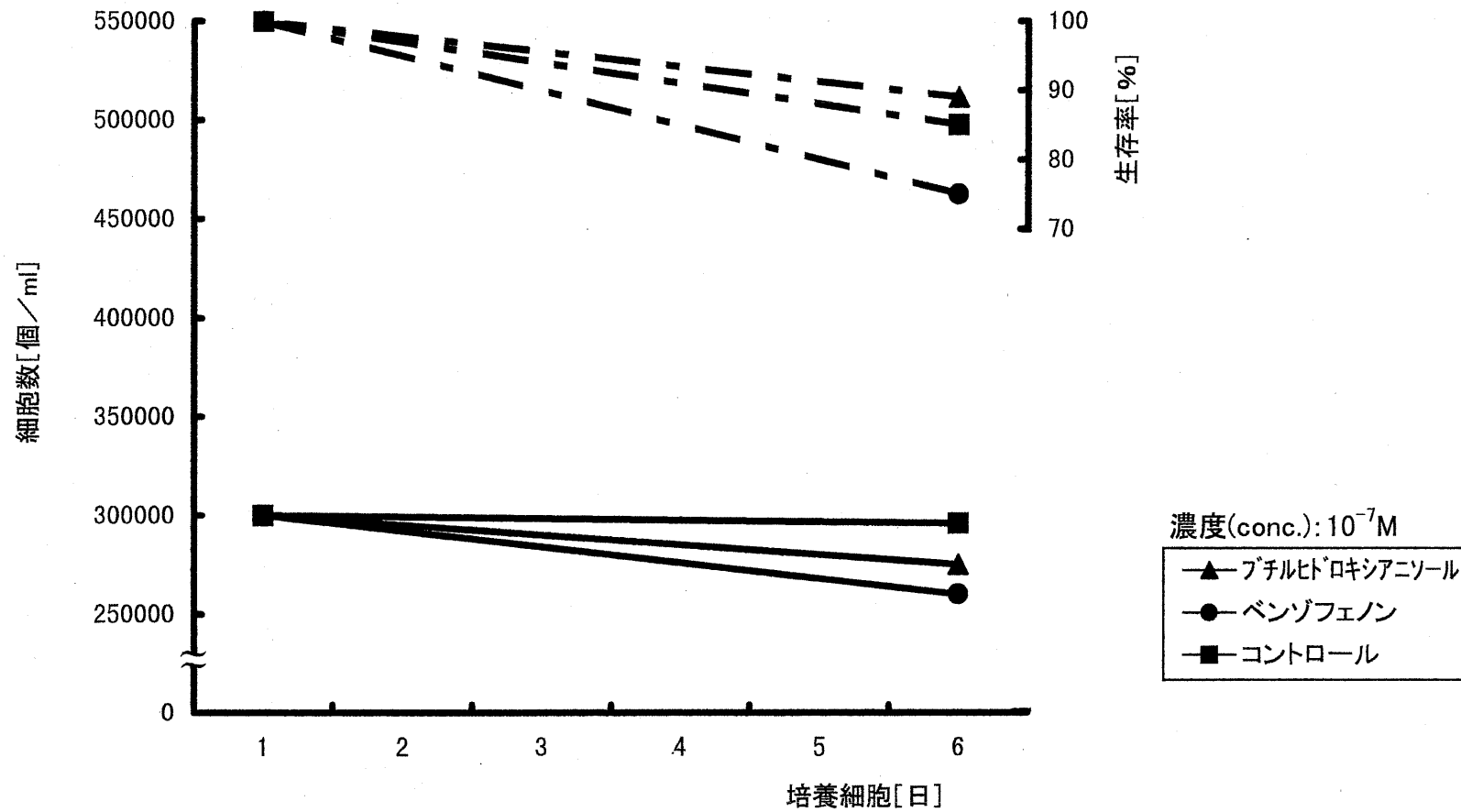


図-15 ブチルヒドロキシアニソール及びベンゾフェノンの細胞増殖に及ぼす影響