

スチレンオリゴマーの内分泌攪乱作用に関する生物学的評価

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者	信原, 陽一 平野, 哲 東, 幸雅
巻/号	40巻1号
掲載ページ	p. 36-45
発行年月	1999年2月

報 文

スチレンオリゴマーの内分泌攪乱作用に関する生物学的評価

(平成 10 年 10 月 5 日受理)

信原陽一* 平野 哲* 東 幸雅* 伊達勝廣*
 大野克利* 田中和永* 松代創一郎* 櫻井敬展*
 塩澤 聡* 千葉 勝* 山田敏広*

Biological Evaluation of Styrene Oligomers for Endocrine-Disrupting Effects

Yoichi NOBUHARA, Satoshi HIRANO, Yukimasa AZUMA, Katsuhiko DATE, Katsutoshi OHNO,
 Kazunori TANAKA, Shoichiro MATSUSHIRO, Takanobu SAKURAI, Satoshi SHIOZAWA,
 Masaru CHIBA and Toshihiro YAMADA

(Central Research Institute, Nissin Food Products Co., Ltd.: 2247, Noji,
 Kusatsu, Shiga 525-0055, Japan)

In order to evaluate the endocrine-disrupting effects of the styrene oligomers in polystyrene, used in cups for instant noodles, we examined the effects of styrene monomer (SM), styrene dimers (SD: NSD-01, 08, 09) and styrene trimers (ST: NST-01, 02, 03) on the estrogen receptor (ER) binding assay, the androgen receptor (AR) binding assay, the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells, the steroidogenesis in Leydig cells of rats and the uterotrophic assay of immature rats. SM, SD and ST did not significantly bind to ER or AR of rats, did not induce the proliferation of MCF-7 cells, did not inhibit testosterone production in Leydig cells of rats, and did not induce estrogen-like alteration in the uterus and vagina of immature female rats. Therefore, it appears that these SM, SD and ST have no endocrine-disrupting effects through ER, AR and steroidogenesis mechanisms.

(Received October 5, 1998)

Key words: カップ麺容器 instant noodle cup; スチレンモノマー styrene monomer; スチレンジイマー styrene dimer; スチレントリマー styrene trimer; エストロゲン受容体 estrogen receptor; アンドロゲン受容体 androgen receptor; MCF-7 細胞 MCF-7 cells; 子宮肥大試験 uterotrophic assay

緒 言

現代社会においては、人間が自然とともに人工生成物と共存できるシステムを構築し維持することが重要な課題となっている。加工食品においては、特に安全な食品を提供することが企業の使命であり、義務でもある。

最近、河村らにより、食品包装・容器として汎用されているポリスチレン樹脂中に残存しているスチレンオリゴマーが同定され構造決定された¹⁾。また、材質試験及び溶出試験の結果、これらの物質が容器から食品中に移

行する可能性も指摘された^{2), 3)}。一方、Colbornらは、ウイングスプレット宣言において、科学的データは公表されていないが、スチレンジイマー (SD) 及びスチレントリマー (ST) を内分泌攪乱物質として記載している⁴⁾。

そこで著者らは、カップ麺容器の安全性確認の一環として、食品用ポリスチレン容器から溶出することが確認されているスチレンオリゴマーの内分泌攪乱作用の有無を検証するため、以下に述べる生物学的評価試験を実施した。

内分泌攪乱作用に関する試験方法については、経済開発協力機構 (OECD)⁵⁾、米国内分泌攪乱物質スクリーニ

* 日清食品(株)中央研究所: 〒525-0055 滋賀県草津市野路町 2247

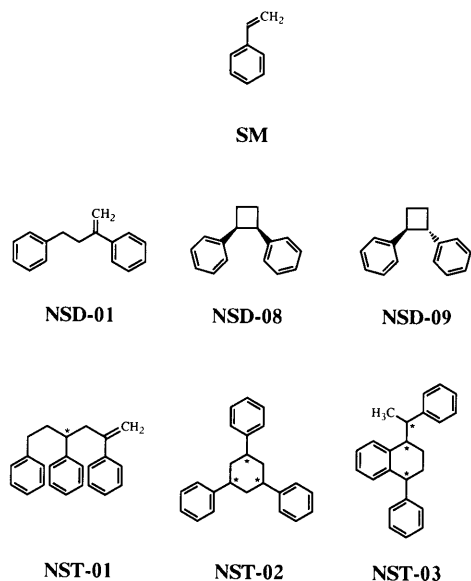


Fig. 1. Chemical structures of styrene monomer (SM), styrene dimers (NSD-01, NSD-08 and NSD-09), and styrene trimers (NST-01, NST-02 and NST-03)

ング及び試験諮問機関 (EDSTAC)⁶⁾ 及び厚生省内分泌攪乱化学物質の健康影響に関する検討会⁷⁾ などの各機関で検討中であり、現在、試験方法に関する試案が報告されている。著者らは、それら試案に準拠して、エストロゲン受容体 (ER) 結合試験、アンドロゲン (AR) 受容体結合試験、ヒト乳がん細胞 MCF-7 増殖試験、精巣細胞ステロイドホルモン生成試験及び幼若ラット子宮肥大試験を実施した。

被験物質は、河村らにより一部カップ麺容器から溶出することが確認されている^{2), 3)} SD 及び ST について当社研究所において化学的に合成、市販のスチレンモノマー (SM) とともに試験に供した。

その結果、それらの物質の安全性を確認しうる試験結果を得たので報告する。

実験方法

1. 被験物質

ポリスチレン製造中の副生成物、熱などの強制分解生成物^{8)~12)}、材質試験及び溶出試験に関する文献などで化学構造式の提出^{1), 2), 13)} されている SD 及び ST の標準品を合成した¹⁴⁾。その内、材質試験で確認される (検出限界 1 µg/g) ものは、SD3 検体、ST2 検体であった (Fig. 1)。溶出試験で確認された化学物質は、材質試験のものと同様であり、新たな化合物が溶出してくることはなく¹⁴⁾、河村らによって報告されているもの^{1), 2)} と同一であった。そこで、内分泌攪乱作用の有無を検証する

被験物質を Fig. 1 に示した 5 検体及び河村ら¹⁾ によって溶出するとされる NSD-02 を加えた、計 6 検体とし、核磁気共鳴、質量分析、元素分析で化学構造を確認した (Table 1)。また、それらの純度は GC-FID によりすべて 98.5% 以上であり、NST-01 はラセミ体であった。NST-02 はメソ体である NST-02-1 と NST-02-2 の混合物であり、その混合比は 7:5 である。NST-03 も光学不活性な 4 種類のジアステレオマーの混合物で、それらの構造を合成的系路によって分離することにより確認した。また、GC-FID による保持時間の小さい順に NST-03-1, NST-03-3, NST-03-2, NST-03-4 とした場合、それらのピーク強度比は 3:4:2:1 であった。

被験物質の物理化学的データは、磁気核共鳴装置: JEOL JNM-GSX400 (日本電子社製)、融点装置: MP-500D (ヤナコ社製)、元素分析装置: MT-5 (ヤナコ社製)、ガスクロマトグラフ質量分析装置: JEOL AX505 H (日本電子社製)、ガスクロマトグラム: GC-15A (島津製作所社製) を用いて測定を行った。

2. 試薬

SM はナカライテスク (株) 製 (Fig. 1)、ビスフェノール A、*p*-ニルフェノールは東京化成 (株) 製、エストラジオール 17β(E₂)、ジェチルスチルベストール (DES)、フルタミド、酢酸シプロテロン、トリアムシロロンアセトニド、大豆トリプシンインヒビター (STI)、ヒト絨毛性腺刺激ホルモン (hCG)、ケトコナゾールは Sigma 社製、ジヒドロテストステロン (DHT) は和光純薬 (株) 製、[2, 4, 6, 7-³H(N)] エストラジオール ([³H]E₂)、[17α-メチル-³H] ミボレロン ([³H] MIB)、MIB は DuPont NEN 社製、ダルベッコ改変イーグル (DME) 培地、M199 培地、牛胎児血清 (FBS)、ウシ血清アルブミン (BSA) は Gibco BRL 社製を用いた。テストステロン EIA キットは Cayman 社製を用いた。その他の試薬は、市販特級品あるいは、HPLC 用を用いた。

緩衝液 E: 10 mmol/L Tris-HCl, 1.5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L thioglycerol, 10% glycerol, 10 mmol/L NaMoO₄ (pH 7.4)

緩衝液 A: 10 mmol/L Tris-HCl, 1.5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 10 mmol/L NaMoO₄ (pH 7.4)

3. 使用動物

Sprague-Dawley (SD) 系ラットを日本チャールス・リバー (株) から購入し、試験に供した。ラットの飼育は、SPF 飼育施設にて室温 23.5 ± 2°C、湿度 55 ± 10%、照明時間 12 時間 (8:00 ~ 20:00) の条件下で行った。

4. エストロゲン受容体結合試験

Krishnan らの方法¹⁵⁾ に準拠して行った。7 週齢の SD 系雌性ラット (170 ~ 190 g) の卵巣を摘出し、2 日間飼育した。

子宮を摘出し、緩衝液 E 中で 1 g/4 mL の割合で破砕した。破砕液を 110,000 × g, 4°C で 1 時間遠心分離

Table 1. Physical Data of Styrene Dimers (NSD-01, NSD-08 and NSD-09) and Styrene Trimers (NST-01, NST-02 and NST-03)

Code name	Compound name	¹ H-NMR data (δ Value, 400 MHz/TMS) in CDCl ₃	mp (°C)	Elemental analysis (%)		
				Calcd.	C	H
NSD-01	2,4-Diphenyl-1-butene	7.43 (dd, 2 H, <i>J</i> =1.5, 8.8 Hz), 7.35 (dd, 2 H, <i>J</i> =8.8, 8.8 Hz), 7.30~7.25 (m, 3 H), 7.21~7.17 (m, 3 H), 5.29 (d, 1 H, <i>J</i> =1.5 Hz), 2.85~2.74 (m, 4 H)	Oil	92.29	7.69	EI: 208 (M ⁺)
NSD-08	<i>cis</i> -1,2-Diphenylcyclobutane	7.10~6.90 (m, 10 H), 4.04~4.00 (m, 2 H), 2.52~2.40 (m, 4 H)	38~39	92.30	7.66	EI: 208 (M ⁺)
NSD-09	<i>trans</i> -1,2-Diphenylcyclobutane	7.31~7.13 (m, 10 H), 3.62~3.54 (m, 2 H), 2.38~2.27 (m, 2 H), 2.19~2.09 (m, 2 H)	Oil	92.47	7.91	EI: 208 (M ⁺)
NST-01	2,4,6-Triphenyl-1-hexene	7.32~7.02 (m, 15 H), 5.15 (s, 1 H), 4.89 (s, 1 H), 2.87~2.77 (m, 2 H), 2.71~2.64 (m, 1 H), 2.45~2.30 (m, 2 H), 2.08~2.01 (m, 1 H), 1.92~1.83 (m, 1 H)	Oil	92.25	7.71	EI: 312 (M ⁺)
NST-02-1	1e,3e,5a-Triphenylcyclohexane	7.51~7.18 (m, 15 H), 3.48 (m, 1 H), 2.98~2.91 (m, 2 H), 2.59~2.56 (m, 2 H), 2.01~2.09 (m, 3 H), 1.75 (td, 1 H, <i>J</i> =12.4, 12.4)	97~98	92.03	7.80 ¹⁾	EI: 312 (M ⁺) ¹⁾
NST-02-2	1e,3e,5e-Triphenylcyclohexane	7.33~7.14 (m, 15 H), 2.98~2.88 (m, 3 H), 2.20~2.17 (m, 3 H), 1.72 (td, 3 H, <i>J</i> =12.5, 12.5)	Oil			
NST-03-1	1S*-Phenyl-4S*(1R*-phenylethyl)tetralin	7.36 (d, 2 H, <i>J</i> =7.3 Hz), 7.27~7.16 (m, 9 H), 7.09~7.05 (m, 1 H), 6.97~104~6.95 (m, 2 H), 6.84 (d, 2 H, <i>J</i> =7.8 Hz), 4.01 (dd, 1 H, <i>J</i> =7.3, 8.8 Hz), 3.20 106 (dq, 1 H, <i>J</i> =7.3, 7.3 Hz), 3.02~2.98 (m, 1 H), 1.95~1.79 (m, 2 H), 1.79~1.67 (m, 1 H), 1.66~1.58 (m, 1 H), 1.38 (d, 3 H, <i>J</i> =7.3 Hz)	Oil			
NST-03-2	1S*-Phenyl-4R*(1S*-phenylethyl)tetralin	7.33 (d, 2 H, <i>J</i> =7.8 Hz), 7.25~7.10 (m, 9 H), 7.06~7.03 (m, 1 H), 6.95~56~6.93 (m, 2 H), 6.77 (d, 1 H, <i>J</i> =7.8 Hz), 3.90 (dd, 1 H, <i>J</i> =5.9, 5.9 Hz), 3.17 ~3.12 (m, 2 H), 2.15~2.07 (m, 1 H), 1.85~1.75 (m, 1 H), 1.65~1.58 (m, 1 H), 1.51~1.42 (m, 1 H), 1.32 (d, 3 H, <i>J</i> =6.8 Hz)	56~57	92.00	7.74 ²⁾	CI: 313 (M+H) ⁺²⁾
NST-03-3	1S*-Phenyl-4S*(1S*-phenylethyl)tetralin	7.31~7.18 (m, 8 H), 7.11~7.09 (m, 2 H), 7.05~6.97 (m, 3 H), 6.92~6.90 119~(m, 1 H), 4.15 (dd, 1 H, <i>J</i> =6.3, 6.3 Hz), 3.48 (dq, 1 H, <i>J</i> =6.8, 6.8 Hz), 3.06 122 (br.q, 1 H, <i>J</i> =6.8 Hz), 2.10~1.99 (m, 2 H), 1.87~1.76 (m, 1 H), 1.49~1.38 (m, 1 H), 1.24 (d, 3 H, <i>J</i> =6.8 Hz)	Oil			
NST-03-4	1S*-Phenyl-4R*(1R*-phenylethyl)tetralin	7.34~7.16 (m, 9 H), 7.12~7.06 (m, 3 H), 7.01~6.98 (m, 1 H), 6.75 (d, 1 92~H, <i>J</i> =7.8 Hz), 4.01 (dd, 1 H, <i>J</i> =5.8, 8.3 Hz), 3.85 (dq, 1 H, <i>J</i> =6.8, 7.3 Hz), 94 3.27 (br.q, 1 H, <i>J</i> =6.8 Hz), 2.18~2.09 (m, 1 H), 1.78~1.65 (m, 2 H), 1.63 ~1.55 (m, 1 H), 1.15 (d, 3 H, <i>J</i> =7.3 Hz)	92~94			

¹⁾Unseparated mixture of 2 diastereomers (NST-02-1: NST-02-2=7:5)²⁾Unseparated mixture of 4 diastereomers (NST-03-1: NST-03-3: NST-03-2: NST-03-4=3:4:2:1)

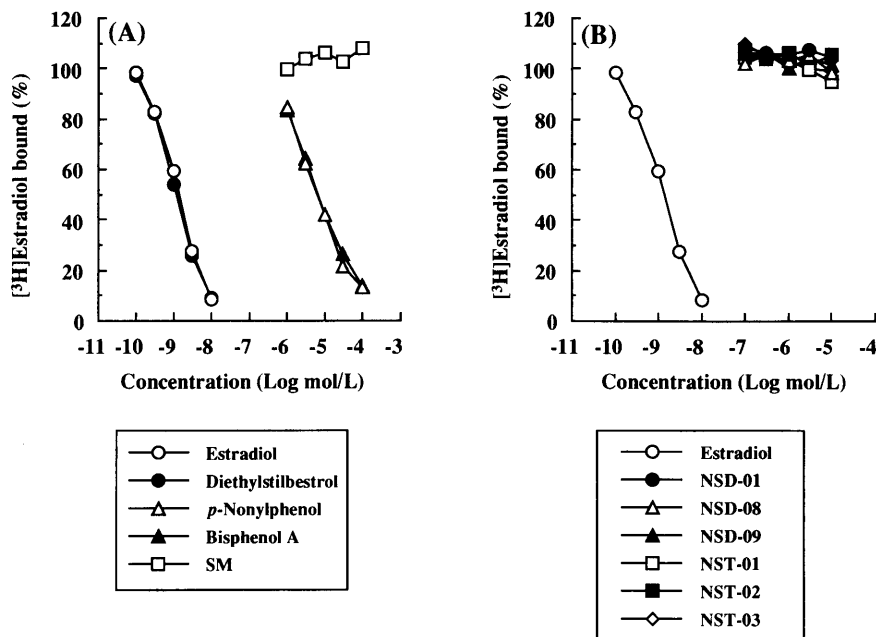


Fig. 2. Estrogen receptor binding assay of styrene monomer (SM) (A), styrene dimers (NSD-01, NSD-08, NSD-09) and styrene trimers (NST-01, NST-02, NST-03) (B). Rat uterine cytosol was incubated with 1 nmol/L of [³H]estradiol and test compounds. After incubation for 18 hr at 0°C, the receptor was separated by Norit A-Dextran T-70 and the radioactivity was counted. Each value represents the mean of duplicate assays.

し、得られた上清を細胞質画分 (ER 画分) として使用した。ラット子宮細胞質画分 20 μ L, 1 nmol/L [³H] E₂ 及び被験物質を含む緩衝液 E より成る反応液 (0.2 mL) を 0°C で 18 時間インキュベートした。被験物質はジメチルスルホキシド (DMSO: 最終濃度 0.2%) に溶解させて反応液に添加した。反応液に 0.5% Norit A 及び 0.05% Dextran T-70 の混合液 0.2 mL を添加し、更に 0°C で 10 分間インキュベートした。その後、1,000 \times g, 4°C で 10 分間遠心分離し、得られた上清の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。[³H]E₂ の ER 結合に対する被験物質の拮抗阻害活性により受容体結合性を評価し、その力価を 50% 抑制濃度 (IC₅₀ 値) で表示した。

5. アンドロゲン受容体結合試験

Dalton らの方法¹⁶⁾ に準拠して行った。7 週齢 SD 系雄性ラット (220~250 g) を去勢し、24 時間後に前立腺を摘出、緩衝液 A 中で 1 g/2 mL の割合で破碎した。破碎液を 110,000 \times g, 4°C で 1 時間遠心分離し、得られた上清を細胞質画分 (AR 画分) として使用した。ラット前立腺細胞質画分 20 μ L, 2 nmol/L [³H] MIB, 1 μ mol/L トリアムシノロンアセトニド及び被験物質を含む緩衝液 A より成る反応液 (0.2 mL) を 0°C で 18 時間

インキュベートした。被験物質は DMSO (最終濃度 0.2%) に溶解させて反応液に添加した。反応液に 0.5% Norit A 及び 0.05% Dextran T-70 の混合液 0.2 mL を添加し、更に 0°C で 10 分間インキュベートした。その後、1,000 \times g, 4°C で 10 分間遠心分離し、得られた上清の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。[³H]MIB の AR 結合に対する被験物質の拮抗阻害活性により受容体結合性を評価し、その力価を 50% 抑制濃度 (IC₅₀ 値) で表示した。

6. ヒト乳ガン細胞 MCF-7 増殖試験

ヒト乳ガン細胞株 MCF-7 は大日本製薬(株)より購入した。5% FBS 添加 DME 培地で、37°C, 5% 二酸化炭素、飽和湿度中で継代培養を行った。

増殖試験は、Soto らの方法¹⁷⁾ に従った。MCF-7 細胞を 12 well plate に播種し (2.0 \times 10⁴ cells/well), 5% FBS 添加 DME 培地 1 mL 中で 24 時間培養した。培地を被験物質を含む 5% 活性炭処理ヒト血清添加 DME 培地 (フェーノールレッド不含) 1 mL に交換して 6 日間培養した後、細胞数を計測した。被験物質はエタノール (最終濃度 0.1%) に溶解させて培地に添加した。

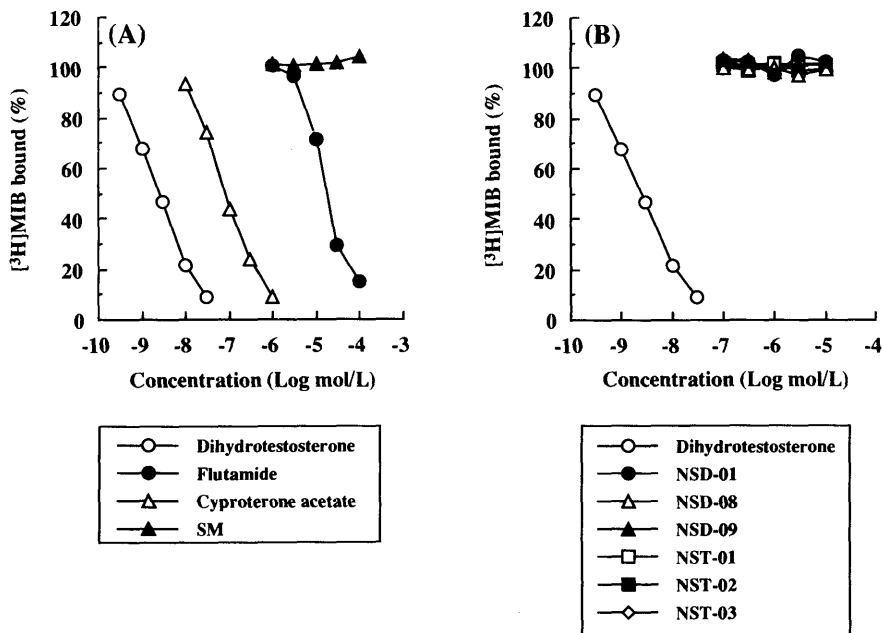


Fig. 3. Androgen receptor binding assay of styrene monomer (SM) (A), styrene dimers (NSD-01, NSD-08, NSD-09) and styrene trimers (NST-01, NST-02, NST-03) (B)

Rat prostatic cytosol was incubated with 2 nmol/L of $[^3\text{H}]$ miboleron (MIB) and test compounds. After incubation for 18 hr at 0°C , the receptor was separated by Norit A-Dextran T-70 and the radioactivity was counted. Each value represents the mean of duplicate assays.

7. 精巣細胞ステロイドホルモン生合成試験

Klinefelter らの方法¹⁸⁾に準拠して行った。7週齢のSD系雄性ラット(230~240 g)の精巣の白膜を除き、0.25 mg/mL コラゲナーゼを含む0.1% BSA 及び0.0025% STI 添加 M199 培地中、 37°C で20分間振盪処理(90 rpm)した。等量の0.1% BSA 及び0.0025% STI 添加 M199 培地を加えた後、ろ過、遠心分離により精巣間質細胞を得た。この間質細胞にはテストステロン合成を行うライディッヒ細胞が約14%含まれている¹¹⁾。間質細胞を24 well plate に播種し(2.0×10^6 cells/well)、被験物質を含む0.1% BSA 及び0.0025% STI 添加 M199 培地 1 mL 中、 37°C 、5% 二酸化炭素、飽和湿度の条件下で1時間培養した後、hCG を0.1 IU/mL 添加し、更に3時間培養した。被験物質はDMSO (最終濃度 0.2%) に溶解させて反応液に添加した。

培養上清を採取し、テストステロン濃度をEIA法で定量した。

8. 幼若ラット子宮肥大試験

Odum らの方法¹⁹⁾に準拠して行った。21日齢の雌性ラット(40~50 g)にコーン油に溶解した被験物質を1日1回、3日間連続皮下投与した。最終投与の24時間

後に子宮及び膈を摘出し、子宮の湿重量を測定した。その後、子宮及び膈を中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンブロックを作製した。これを薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った後、子宮及び膈粘膜上皮細胞の病理組織学的検査を実施した。

統計処理

数値結果は平均値±標準偏差で表示した。統計学的有意差検定は、2群間では分散分析検定後、等分散の場合は Student's *t*-検定を、不等分散の場合は Aspin-Welch 検定を用いた。多群間では Dunnett の多重比較検定を用いた。いずれも $p < 0.05$ の場合を有意差ありと判定した。

実験結果

1. エストロゲン受容体結合試験

結果を Fig. 2 に示した。 E_2 及び合成エストロゲンである DES は、濃度依存的に $[^3\text{H}]\text{E}_2$ の ER への結合を阻害し、 IC_{50} 値が 1.41 及び 1.29 nmol/L と強力な ER 結合性を示した。エストロゲン様作用が報告されている *p*-ノニルフェノール²⁰⁾ 及びビスフェノール A²¹⁾ は、 E_2 に比べると作用は弱いものの濃度依存的に $[^3\text{H}]\text{E}_2$ の ER への結合を阻害し、それらの IC_{50} 値は 7,060 及び 7,440 nmol/L であった。これに対し、SM は 100

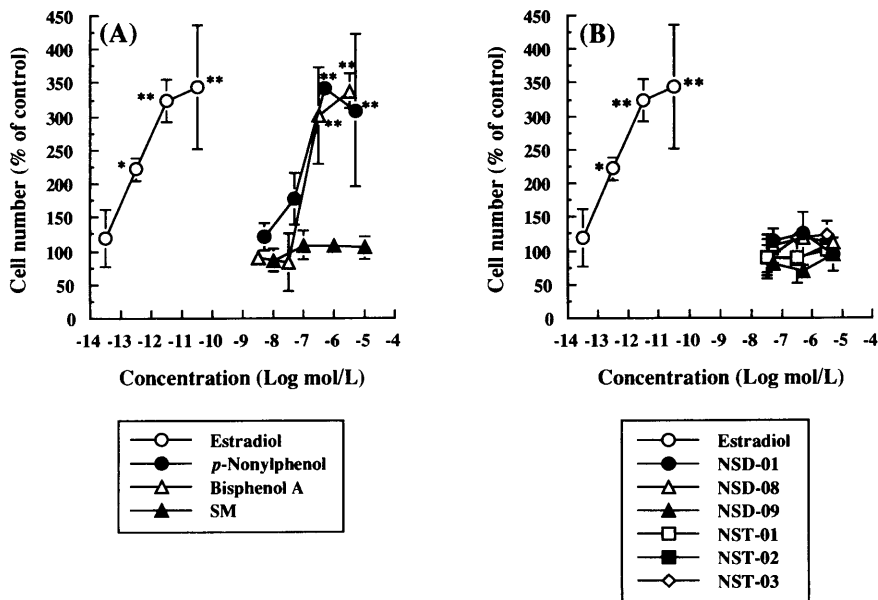


Fig. 4. Effects of styrene monomer (SM) (A), styrene dimers (NSD-01, NSD-08, NSD-09) and styrene trimers (NST-01, NST-02, NST-03) (B) on proliferation of MCF-7 cells. The cells were treated with test compounds for 6 days, as described in Methods. ***: $p < 0.05, 0.01$ (vs. Control). Each value represents the mean \pm SD ($n = 3$ wells).

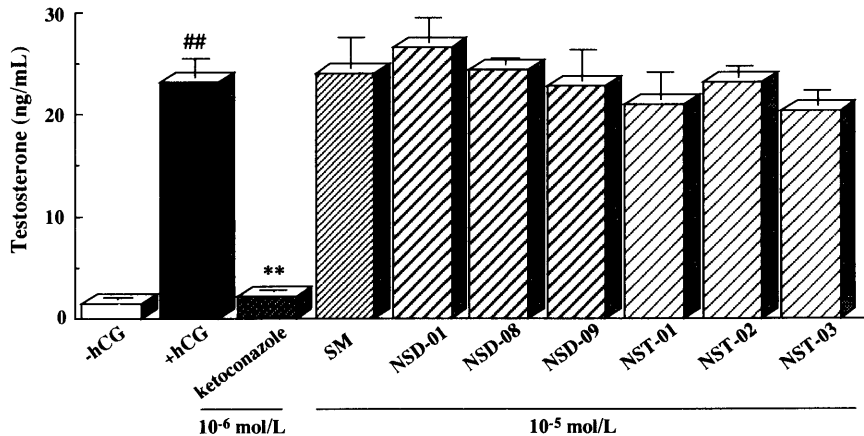


Fig. 5. Effects of styrene monomer (SM), styrene dimers (NSD-01, NSD-08, NSD-09) and styrene trimers (NST-01, NST-02, NST-03) on hCG stimulated testosterone production by Leydig cells of rats.

Testicular interstitial cells containing Leydig cells were incubated with test compounds for 1 hr followed by the addition of 0.1 IU/mL hCG to the assigned wells. After incubation for 3 hr, culture media were removed and analyzed for testosterone concentrations by EIA. ##: $p < 0.01$ (vs. -hCG), **: $p < 0.01$ (vs. +hCG). Each value represents the mean \pm SD ($n = 3$ wells).

$\mu\text{mol/L}$ まで、被験物質は可溶化上限濃度である $10 \mu\text{mol/L}$ まで $[^3\text{H}]\text{E}_2$ の ER 結合に対し阻害作用を示さず、 IC_{50} 値を求めることはできなかった。したがって、

SM 及び被験物質には ER 結合性は認められなかった。

2. アンドロゲン受容体結合試験

結果を Fig. 3 に示した。DHT は濃度依存的に $[^3\text{H}]$

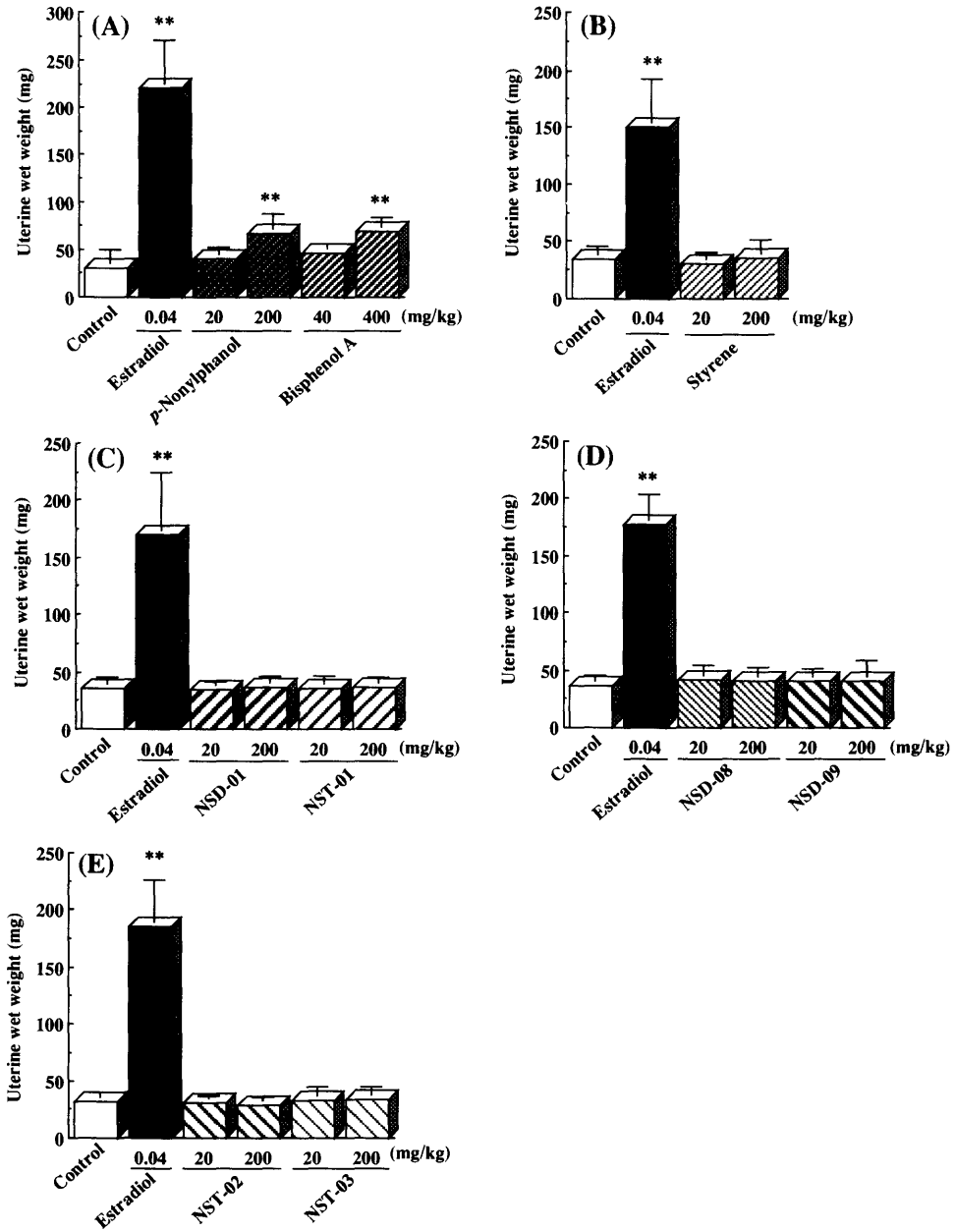


Fig. 6. Effects of styrene monomer (SM), styrene dimers (NSD-01, NSD-08, NSD-09) and styrene trimers (NST-01, NST-02, NST-03) on uterus wet weight in immature rats. Immature rats were treated subcutaneously with each test compounds dissolved in corn oil for 3 days. After 24 hr of final treatment, uteri and vaginae were removed and uteri were weighed. **: $p < 0.01$ (vs. Control). Each value represents the mean \pm SD ($n = 5$).

MIBのARへの結合を阻害し、その IC_{50} 値は3.40 nmol/Lであった。

ARアンタゴニストであるフルタミド²²⁾及び酢酸シブ

ロテロン²²⁾は、DHTに比べると作用は弱いものの濃度依存的に $[^3H]MIB$ のARへの結合を阻害し、それらの IC_{50} 値は22,300及び97.1 nmol/Lであった。これに

Table 2. Summary of the Effects of Styrene Monomer (SM), Styrene Dimers (NSD-01, NSD-08, NSD-09) and Styrene Trimers (NST-01, NST-02, NST-03) on Immature Rat Uterotrophic Assay

Compound	Dose (mg/kg)	Increase of uterine weight	Histopathological evaluation	
			Hypertrophy of uterine luminal epithelium	Cornification of vaginal mucosa
Control			—	—
Estradiol	0.04	+++	+	+
<i>p</i> -Nonylphenol	20	—	—	—
	200	++	+	+
Bisphenol A	40	—	—	—
	400	++	+	+

SM	20	—	—	—
	200	—	—	—
NSD-01	20	—	—	—
	200	—	—	—
NSD-08	20	—	—	—
	200	—	—	—
NSD-09	20	—	—	—
	200	—	—	—
NST-01	20	—	—	—
	200	—	—	—
NST-02	20	—	—	—
	200	—	—	—
NST-03	20	—	—	—
	200	—	—	—

+: Positive test results, relative levels of effects are indicated by number of +. -: Negative test results.

対し, SMは100 $\mu\text{mol/L}$ まで, 被験物質は可溶化上限濃度である10 $\mu\text{mol/L}$ まで ^3H MIBのAR結合に対し阻害作用を示さず, IC_{50} 値を求めることはできなかった。したがって, SM及び被験物質にはAR結合性は認められなかった。

3. ヒト乳ガン細胞 MCF-7 増殖試験

結果を Fig. 4 に示した。MCF-7細胞は0.03~30 nmol/Lの E_2 添加により約4倍に増殖した。*p*-ノニルフェノール及びビスフェノールAもMCF-7細胞を増殖させたが, その作用は E_2 と比較して約17,000及び約100,000倍弱いものであった。これに対し, SM及び被験物質には明らかな増殖刺激性は認められなかった。

4. 精巣細胞ステロイドホルモン生合成試験

結果を Fig. 5 に示した。ラット精巣ライディッチ細胞のテストステロン産生量はhCG刺激により約17倍に増加した。これに対し, 対照物質として用いたケトコナゾールは, いくつかのステロイド合成酵素(P450酵素)活性を抑制し, ライディッチ細胞のテストステロン産生を阻害することが報告されている²³⁾が, 1 $\mu\text{mol/L}$ の濃度ではほぼ完全にhCG刺激テストステロン合成を阻害した。一方, SM及び被験物質は10 $\mu\text{mol/L}$ においてライディッチ細胞のhCG刺激テストステロン合成を

有意に抑制しなかった。

5. 幼若ラット子宮肥大試験

結果を Fig. 6 及び Table 2 に示した。幼若ラット子宮重量は40 $\mu\text{g/kg}$ E_2 の3日間投与により顕著に増加した。対照物質として用いた*p*-ノニルフェノール及びビスフェノールA投与群では, 各々200及び400 mg/kgにおいて有意な子宮重量の増加が認められた。これに対し, SM及び被験物質投与群(20及び200 mg/kg)には有意な子宮重量増加作用は認められなかった。

一方, 病理組織学的検査において, E_2 投与群では子宮内膜上皮(luminal epithelium)の顕著な肥厚及び上皮細胞の高円柱化が認められた。また, 膣では粘膜上皮の角化形成が認められた。*p*-ノニルフェノール及びビスフェノールA投与群においても同様な変化が子宮及び膣粘膜において認められた。これに対し, SM及び被験物質投与群にはいずれもこのような変化は観察されなかった。

考 察

食品包装容器の安全性の確保は, 食品そのものと同様, 食生活にとって重要な課題である。とりわけ食品用プラスチック製の容器に使用される材質については, 食品衛生法(第8, 9, 10条)が適用され, その規格と基準が定められている。カップ麺用ポリスチレンに関して

は、熱湯を用いるものとして材質中の総揮発分 2,000 ppm 以下、スチレンモノマー 1,000 ppm 以下、エチルベンゼン 1,000 ppm 以下と規制されており、現在市販されている製品は、すべてこの規格に適合した製品である。

最近、河村らにより、カップ麺用ポリスチレン容器材質中に、スチレンオリゴマーが残存していることが指摘され¹⁾、溶出試験の結果から、これらの物質が容器から食品中に移行する可能性も指摘された^{2), 3)}。一方、Colborn らは、科学的データは公表されていないが、SD 及び ST を内分泌攪乱作用の疑いのある物質としてリストに記載している⁴⁾。そこで著者らは、ポリスチレン容器素材中に存在し、一部カップ麺容器から溶出することが確認され、構造決定されている SD 及び ST を生物学的評価の対象物質とし、それらを化学的に合成することにより、内分泌攪乱作用の有無を検証した。

まず、ホルモン受容体レベルの検討において、SM 及びこれらの被験物質は、いずれも ER 及び AR に対して結合性を示さなかった。レセプター理論において、「結合無きところに作用無し」と言われるように、これらの結果は、上記の物質が ER 及び AR に対しアゴニストにもアンタゴニストにもなりえないことを示しており、これらの性ホルモン作用に影響を及ぼさないことが強く示唆された。また、ER 及び AR は、エストロゲンの標的組織（子宮、膣、卵管、乳腺）及びアンドロゲンの標的組織（前立腺、精嚢腺）の他、視床下部、脳下垂体前葉にも高濃度に分布し、ホルモン生成のフィードバック機構を構成している。したがって、本試験に用いた SM 及び被験物質は、これらの受容体を介した性ホルモンフィードバック系に対しても影響を与えないことが示唆された。

次に、Soto らの方法¹⁷⁾に準拠して実施した細胞レベルの検討、すなわちヒト乳ガン細胞 MCF-7 増殖試験において、SM 及び被験物質は増殖作用を示さなかった。対照物質として用いた *p*-ノニルフェノール及びビスフェノール A は高濃度ではあるが明らかな増殖作用を示した。SM が MCF-7 に対して増殖活性を有さないことは、既に Soto らが報告しており¹⁷⁾、他の対照物質の結果も既報^{17), 20)}を支持するものである。以上の結果は、本試験に用いた SM 及び被験物質がエストロゲン様作用を有さないことを細胞レベルで証明したものであり、ER 結合試験の結果を強く支持するものである。

次に、受容体を介さない内分泌攪乱作用の可能性として、ホルモン生成系への影響も指摘されている。テストステロンのほか、E₂を含むエストロゲン、糖質コルチコイド、鉱質コルチコイドなどのステロイドホルモンの生成経路は重複しており、チトクロム P450 酵素群に担われている。特にエストロゲンはテストステロンから形成される。このような理由から、EDSTAC はその

試案の中でステロイド生合成アッセイ系として、培養精巣又は単離した精巣ライディッヒ細胞を用いてテストステロン産生への影響を検討する方法を提案している⁶⁾。本研究では、Kleinfelter らの方法¹⁸⁾に準拠してラット精巣よりライディッヒ細胞を含む間質細胞画分を調製し、hCG 刺激テストステロン産生に対する検討を行った。その結果、SM 及び被験物質はいずれも有意な作用を示さなかった。これらの結果から、被験物質がテストステロン産生のみならず、ステロイドホルモン生合成系に影響を与えないことが示唆された。

最後に、実験動物レベルの試験として幼若ラット子宮肥大試験を実施した。子宮肥大試験には生後 21 日齢の性的未成熟ラットを用いる方法と、卵巣摘出した成熟ラットを用いる方法が報告されている。Cook らは卵巣摘出成熟ラットに E₂ を 4 日間腹腔内投与した場合、子宮重量増加、内膜肥厚などの変化を観察し、内分泌攪乱化学物質の疑いのあるビスフェノール A を高用量投与した場合もこのような作用を示したと報告している²⁴⁾。一方、未成熟ラット^{16), 25), 26)}を用いた場合でも、同様な子宮に対するエストロゲン作用が観察されている。一般に動物実験を実施する場合、動物への無用なストレスを与える処置はできるだけ除くことが GLP 施行上においても指摘されており、著者らは、実験動物への手術ストレスが無い未成熟ラットを用いる方法を採用した。その結果、SM 及び被験物質は子宮重量並びに子宮及び膀胱膜上皮細胞に対しても作用を示さず、*in vivo* においてもエストロゲン様作用を有さないことが示唆された。

以上のことから、SM 及び本試験に用いたこれらの被験物質は、ホルモン受容体レベル、細胞レベル及び実験動物レベルにおいてエストロゲン様作用を有さないことが明らかになった。また、AR 結合試験及び精巣細胞ステロイド生合成試験の結果より、これらの被験物質がアンドロゲン系にも作用を与えず、更に他のステロイドホルモン生合成系にも影響しないことから、いわゆる内分泌攪乱作用を有しないと推察された。

結 論

ポリスチレン製カップ麺容器から微量に溶出することが確認されている SD3 検体 (NSD-01, 08, 09), ST3 検体 (NST-01, 02, 03) 及び SM の内分泌攪乱作用の有無をエストロゲン受容体 (ER) 結合試験、アンドロゲン受容体 (AR) 結合試験、ヒト乳ガン細胞 MCF-7 増殖試験、ラット精巣細胞ステロイドホルモン生合成試験及び幼若ラット子宮肥大試験により検討した。その結果、これらの被験物質は、いずれの試験においても有意な活性を示さなかった。以上の結果、本試験に用いた SM, SD 及び ST は内分泌攪乱作用を有しないと推察された。

文 献

- 1) 河村葉子, 杉本直樹, 武田由比子, 山田 隆: 食衛誌. **39**, 110~119 (1998).
- 2) 河村葉子, 河村麻衣子, 武田由比子, 山田 隆: 食衛誌. **39**, 199~205 (1998).
- 3) 河村葉子, 西 暁子, 佐々木春美, 山田 隆: 食衛誌. **39**, 310~314 (1998).
- 4) Colborn, T., Dumanoski, D., Myers, J. P.: "Our Stolen Future" p. 253 (1996) The Penguin Group, New York.
- 5) The OECD Joint NCM/RAAB the Risk Working Group on Endocrine Disrupter Testing and Assessment: August 10~11 (1998).
- 6) Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) : Final draft report, June 17 (1998).
- 7) 厚生省内分泌攪乱化学物質の健康影響に関する検討会: 第2回議事録, 平成10年5月27日 (1998).
- 8) Corson, B. B., Heintzelman, W. J., Moe, H., Rousseau, C. R.: *J. Org. Chem.* **27**, 1,636~1,640 (1962).
- 9) Okuda, Y., Yoshihara, M., Maeshima, T., Fujii, M., Aida, T.: *Chem. Express* **3**, 459~462 (1988).
- 10) Holzer, G., Miller, R., Hathcock, S. L., Bertsch, W.: *Polymer Bulletin* **22**, 421~428 (1989).
- 11) Kurze, V. J., Stein, D. J., Simak, P., Mosthaf, P.: *Angew. Makromol. Chem.* **12**, 25~41 (1970).
- 12) Lai, S. T., Locke, D. C.: *J. Chromatography* **255**, 511~527 (1983).
- 13) Gramshaw, J. W., Vandenburg, H. J., Lakin, R. A.: *Food Addit. Contam.* **12**, 211~222 (1995).
- 14) 山田敏広: *有機合成化学協会誌* **57**(1), 58~64 (1999).
- 15) Krishnan, A. V., Stathis, P., Permuth, S. F., Tokes, L., Feldman, D.: *Endocrinology* **132**, 2,279~2,286 (1993).
- 16) Dalton, J. T., Mukherjee, A., Zhu, Z., Kirkovsky, L., Miller, D. D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 1~4 (1998).
- 17) Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N., Serrano, F. O.: *Environ. Health Perspect.* **103**, 113~122 (1995).
- 18) Klinefelter, G. R., Laskey, J. W., Roberts, N. L.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **107**, 460~471 (1991).
- 19) Odum, J., Lefevre, P. A., Tittensor, S., Paton, D., Routledge, E. J., Beresford, N. A., Sumpter, J. P., Ashby, J.: *Reg. Toxicol. Pharmacol.* **25**, 175~188 (1997).
- 20) Soto, A. M., Justicia, H., Wray, J. W., Sonnenschein, C.: *Environ. Health Perspect.* **92**, 167~173 (1991).
- 21) Krishnam, A. V., Stathis, P., Permuth, S. F., Tokes, L., Feldman, D.: *Endocrinology* **132**, 2,279~2,286 (1993).
- 22) Kelce, W. R., Monosson, E., Gamcsik, M. P., Laws, S. C., Gray, Jr., L. E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **126**, 276~285 (1994).
- 23) Kan, P. B., Hirst, M. A., Feldman, D.: *J. Steroid Biochem.* **23**, 1,023~1,029 (1985).
- 24) Cook, J. C., Kaplan, A. M., Davis, L. G., O'Connor, J. C.: *Reg. Toxicol. Pharmacol.* **26**, 60~68 (1997).
- 25) Lee, P. C., Lee, W.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **57**, 341~348 (1996).
- 26) Ashby, J., Odum, J., Foster, J. R.: *Reg. Toxicol. Pharmacol.* **25**, 226~231 (1997).