

n-ブチルベンゼンの取り扱いについて（案）

1. 背景

平成12年7月に開催された「内分泌攪乱化学物質問題検討会（座長：鈴木継美東京大学名誉教授）」において、平成12年度に優先してリスク評価に取り組むかどうかを保留としていた¹「n-ブチルベンゼン」については、試験管内試験や複数の専門家の意見を踏まえ、再度、作業グループである「内分泌攪乱作用が疑われる物質のリスク評価検討会」で検討した。

- 1 BackesらやImaokaらの報告によると、ウサギ肝臓チトクロームP450の代謝反応阻害及びラット肝臓チトクロームP450の誘導がみられたとしているが、薬物代謝酵素P450関連作用については、情報が少なく、内分泌攪乱作用との直接の関連が不明確であることから、引き続き情報を収集するとともに、エストロゲン様作用については、最終的には有するとは判定されていないが、念のため試験管内試験を行ったうえで、リスク評価の対象物質とするかどうかの判断を行うこととする（別紙1参照）。

2. 試験管内試験方法・結果（*in vitro*試験）

エストロゲン様作用の有無に関する文献の検証を行うため、レポーターバイディングアッセイ、E-screen、酵母two-hybrid assay等を行った。

その結果、エストロゲン様作用を疑わせる所見は得られなかった（別紙2参照）。

3. チトクロームP450と内分泌攪乱作用との関連性

文献調査から、ウサギ肝臓チトクロームP450の代謝反応阻害及びラット肝臓チトクロームP450の誘導がみられたとしているが、これらの反応と内分泌攪乱作用との関連性を判明させるため、文献調査・信頼性評価を行った複数の専門家に対して、本文献に記載のあるチトクロームP450と内分泌攪乱作用との関連性を確認したところ、「この論文がn-ブチルベンゼンの内分泌攪乱作用を疑う根拠とはならない」等の指摘をいただいた。

また、文献調査に掲載されているチトクロームP450が誘導する物質やその機能を専門家によるヒヤリングや文献調査によって収集すると「たばこの煙」や「アルコール」でもみられる反応であることも判明した（別紙3参照）。

4. 検討結果等

(1) 保留になった経緯

文献調査・信頼性評価により、以下の点が指摘された。

- ア．試験管内試験によってエストロゲン様作用が疑われたこと
- イ．チトクロームP450の誘導や酵素活性の阻害がみられたこと
(内分泌攪乱作用との直接の関連は不明確)

(2) 検討結果

新たに実施した試験結果や専門家からの意見を踏まえ、「内分泌攪乱作用が疑われる物質のリスク評価検討会」において検討を行った。

その結果、

- ア．試験管内試験によってエストロゲン様作用はみられなかったこと
 - イ．チトクロームP450に関するこれらの文献からは内分泌攪乱作用が疑われるとは言えないこと
 - ウ．誘導されたチトクロームP450 CYP2B1、CYP2B2、CYP2B4、CYP2E1、CYP3A2は、たばこの煙(CYP2B1)やアルコール(CYP2E1)などでも誘導されること
 - エ．チトクロームP450と内分泌攪乱作用との関連性が解明されるにはかなりの時間を要すると思われること
- などから、n-ブチルベンゼンをこのまま保留にするのではなく、現時点では現実的なリスクが想定しがたいと判断されるべきものであり、数万以上ともいわれる多くの化学物質のなかで取り立てて、内分泌攪乱作用を現時点で評価する必要はないと考える。
- しかし、今後の科学の進展によって、チトクロームP450の働きや内分泌攪乱作用との関連性などが解明されてきた場合は、これらの情報を踏まえ、再度検討していくことが望まれる。

1. n-ブチルベンゼンの有害影響に関する文献の信頼性評価結果

n-ブチルベンゼンの有害影響に関連するものとして、既存の文献において、エストロゲン様作用の有無および薬物代謝酵素 P450 に関連した作用の有無に関する報告がある。これらの作用について、個々の文献の信頼性も考慮し、その有無について文献上からの結論を現時点で以下のようにまとめた。

(1) エストロゲン様作用

Jobling らによって、n-ブチルベンゼンについて、ニジマス肝臓エストロゲン受容体への 17 β -エストラジオールの結合阻害及びヒト乳ガン細胞 ZR-75 の増殖についての検討¹⁾が行われている。n-ブチルベンゼンは、 10^{-4}M - 10^{-3}M という高濃度でエストロゲン受容体への 17 β -エストラジオールの結合を阻害したが、 10^{-5}M の濃度で ZR-75 細胞の分裂・増殖を促進せず、エストロゲン作用を有するとは判定されていない。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

(2) 薬物代謝酵素 P450 関連作用

Backes らによって、n-ブチルベンゼンについて、ウサギ肝臓チトクロム P450 の代謝反応阻害についての検討²⁾が行われている。n-ブチルベンゼンが P450 による代謝反応を比較的強く阻害したが、これは“n-ブチルベンゼンが強く阻害する”ということを示しているのではなく“疎水性の強い単脂肪鎖ベンゼン類が強く阻害する”という一般論を示しているにすぎない。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

また、Imaoka らによって、n-ブチルベンゼンについて、ラット肝臓チトクロム P450 の誘導（テストステロンの各位の水酸化活性阻害を含む）についての検討³⁾が行われている。ラットに n-ブチルベンゼンを腹腔内投与したところ、P450 の誘導が認められた。n-ブチルベンゼンが比較的強く誘導したが、これは“n-ブチルベンゼンが誘導を強くかける”ということを示しているのではなく“疎水性の強い n-アルキルベンゼン類が誘導を強くかける”という一般論を示しているにすぎない。この試験結果については文献上からみて信頼性が認められた。

以上のように現在入手した文献の評価からは、

- ・ n-ブチルベンゼンのエストロゲン様作用については、試験管内試験において比較的高濃度でニジマス肝臓エストロゲン受容体と結合したが、続いて行った細胞増殖試験においては細胞増殖を認めなかったとする信頼性のある報告が得られた。

- ・薬物代謝酵素 P450 関連作用については、ウサギ肝臓チトクロム P450 の代謝反応阻害及びラット肝臓チトクロム P450 の誘導（テストステロンの各位の水酸化活性阻害を含む）が認められたとする信頼性のある報告が得られた。

エストロゲン様作用については、最終的にはエストロゲン作用を有するとは判定されていないが、試験管内試験を行い作用について検証を行う必要が有る。また、薬物代謝酵素 P450 関連作用については情報が少なく、内分泌攪乱作用との直接の関連が不明確であることから、引き続き情報を収集する必要がある。

これらの情報が集まった時点で、*n*-ブチルベンゼンをリスク評価の対象物質とするかどうかの判断を行うこととする。

参考文献

- 1) Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G. and Sumpter, J.P. (1995) A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic (1995) *Environmental Health Perspective*, 103, 6, 582-587
- 2) Backs, W.L., Cawley, G., Eyer, C.S., Means, M., Causey, K.M. and Canady, W.J. (1993) Aromatic hydrocarbon binding to cytochrome P450 and other enzyme binding sites: Are hydrophobic compounds drawn into the active site or pushed from the aqueous phase? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 304, 1, 27-37
- 3) Imaoka, S. and Funae, Y. (1991) Induction of cytochrome P450 isozymes in rat liver by methyl *n*-alkylketones and *n*-alkylbenzenes. *Biochemical Pharmacology*, 42(Suppl.), S143-S150

1. エストロジェン作用についての試験方法

市販の *n*-ブチルベンゼンを被験物質として、エストロジェン受容体結合競合阻害試験(ER Receptor Binding Assay、以下、レセプターバインディング法という)、ヒト乳がん細胞 MCF-7 増殖試験(E-screen Assay、以下、E-screen 法という)、酵母 Two Hybrid 試験(Yeast Two Hybrid Assay、以下、酵母ハイブリッド法という)を行った。各試験方法の概略を以下に示した。

(1) レセプターバインディング法

被験物質のエストロジェン受容体に対する親和性を測定するため、蛍光偏光度測定装置 (Full-Range BECON 2000, 宝酒造製) とエストロジェン受容体親和性測定キット (FP Screen-for-Competitors Kit, 精製したヒト組換えエストロジェン受容体 ER の および、エストラジオールとほぼ同等の結合親和力を持つとされる蛍光リガンド ES1、宝酒造製) を用い、受容体結合競合阻害試験を実施した。種々の用量の被験物質及び陽性対照物質 (17 β -エストラジオール、以下、E2 という) 並びに陰性対照の測定を 1 用量につき 3 サンプルずつ行った。溶解および希釈用の溶媒として、Dimethyl Sulfoxide(DMSO、和光純薬工業製) を用いた。被験物質を可能な限りの高濃度で DMSO に溶解して、被験物質溶液の原液とした。

被験物質の溶解が困難な場合には、ヴォルテックスミキサーを用いた攪拌および超音波洗浄機を用いた超音波処理を行った。溶解の有無は、目視で確認した。析出が認められた用量については、測定を実施しなかった。測定バッファー 49 μ l、各用量の被験物質溶液 1 μ l および ER-ES1 複合体 50 μ l を混合した溶液を測定チューブに移し、室温で 1 時間静置後に測定した。

(2) E-screen 法

エストロジェン作用を示す物質の添加により増殖する性質を持つヒト乳がん細胞 MCF-7 を用いて被験物質のエストロジェン作用について検討を行った。24-well plate に MCF-7 細胞 (Tufts Univ., Prof. A.M. Soto より分与) を約 10,000 個/well 播種した。24 時間後、試験培地 (活性炭処理済みヒト血清 5% 含有 D-MEM) に交換した。溶媒を DMSO とし、被験物質溶液を調製した。被験物質溶液を各濃度当たり 3 well に入れた。DMSO の培地濃度は 0.1% 以下とした。6 日間培養後、試験培地を廃棄し、0.1ml のトリプシン EDTA 液を添加し、37 $^{\circ}$ C で 10 分間保温した。100% 冷メタノールを 1ml 添加し、室温で 15 分間放置し ATP を抽出した。このメタノール抽出液を純水で 100 倍希釈し、その 100 μ l に発光試薬 (ルシフェリン ルシフェラーゼ混合試薬) を 100 μ l 添加してルミノメーターにて発光量を測定し、

増殖細胞数に換算した。

(3) 酵母ハイブリッド法

酵母の転写調節因子である GAL4 遺伝子にコードされる GAL4 タンパク質は、DNA 結合ドメイン GAL4DBD と転写活性化ドメイン GAL4AD の二つに分離することができる。そこで、DNA 結合ドメイン GAL4DBD とラット卵巣エストロゲン受容体のリガンド結合ドメイン ERLBD を繋いだコンストラクトと転写活性化ドメイン GAL4AD とコアクチベーターの TIF2 を繋いだコンストラクトを作成し、パン酵母 Y190 株内で発現させ、もし組み込んだタンパク質同士が相互作用すれば、GAL4 タンパク質が活性化体として遺伝子の発現に正に働き、相互作用の強さは酵母の染色体にあらかじめ組み込まれているレポーター遺伝子 - ガラクトシダーゼの活性の強さとして測定できる。ERLBD と TIF2 はリガンドであるエストラジオールの存在下でのみ相互作用することが知られているので、ホルモン活性に依存して - ガラクトシダーゼ遺伝子の発現が上昇することを測定原理としている。改良 SD 合成培地 (-Leu, -Trp) にエストロゲン受容体遺伝子、コアクチベーターの発現プラスミド及び -ガラクトシダーゼ発現系レポータープラスミドを導入した酵母 Y190 株を接種し、30℃ で 24 時間振とうした後、10%グリセロールを添加した改良 SD 合成培地に 1/10 量加え、凍結保存した。試験実施時に酵母液を解凍し、100ml 容ガラス製培養角ビンに改良 SD 合成培地 30mL と解凍酵母液 0.8ml を入れ、30℃ で約 17 時間振とう前培養した。DMSO に溶かした被験物質試験液 20 µl を試験管に分注し、480 µl の改良 SD 合成培地を添加した。発光測定用黒色 96-well plate に改良 SD 合成培地を 60 µl ずつ分注し、希釈した被験物質溶液を各濃度当たり 3 well に 60 µl ずつ添加した。各 well に改良 SD 合成培地を 60 µl ずつ添加し、さらに、酵母前培養を 60 µl ずつ添加し、よく混和後、30℃ で 4 時間培養した。培養後、酵母溶解酵素 Zymolase 液と化学発光用反応液を混合した溶液を 80 µL ずつ加え、37℃ で反応させた。発光測定装置にプレートを置き、促進液を 50 µl ずつ添加しながら -ガラクトシダーゼの化学発光量を測定した。

被験物質を添加していない well の測定値を分母として、それぞれの濃度についての化学発光比を算定して、量 反応関係が認められ、なおかつ最大の発光比が 4 以上を示す被験物質を陽性とした。

2. エストロゲン作用についての試験結果

(1) レセプターバインディング法

試験結果を図 1 に示した。

陽性対照物質である E2 の測定値は、エストロゲン受容体 及び につ

いて量 反応曲線がシグモイド曲線として描け、その IC_{50} 値はエストロジェン受容体 については $4 \times 10^{-8}M$ 、エストロジェン受容体 については $10^{-7}M$ であった。

n-ブチルベンゼンにおいては、エストロジェン受容体 及び について E2 が示すようなシグモイド曲線を描けず、結合阻害は認められなかった。

(2) E-screen 法

試験結果を図 2 に示した。

陽性対照物質である E2 は、 $10^{-13}M$ から細胞増殖が認められ、その増加傾向は $10^{-8}M$ まで濃度依存的であった。 $10^{-8}M$ での平均細胞数は約 122,000 個/well で、E2 を添加していない対照の細胞増殖量と比較して 4.8 倍の増殖量であった。

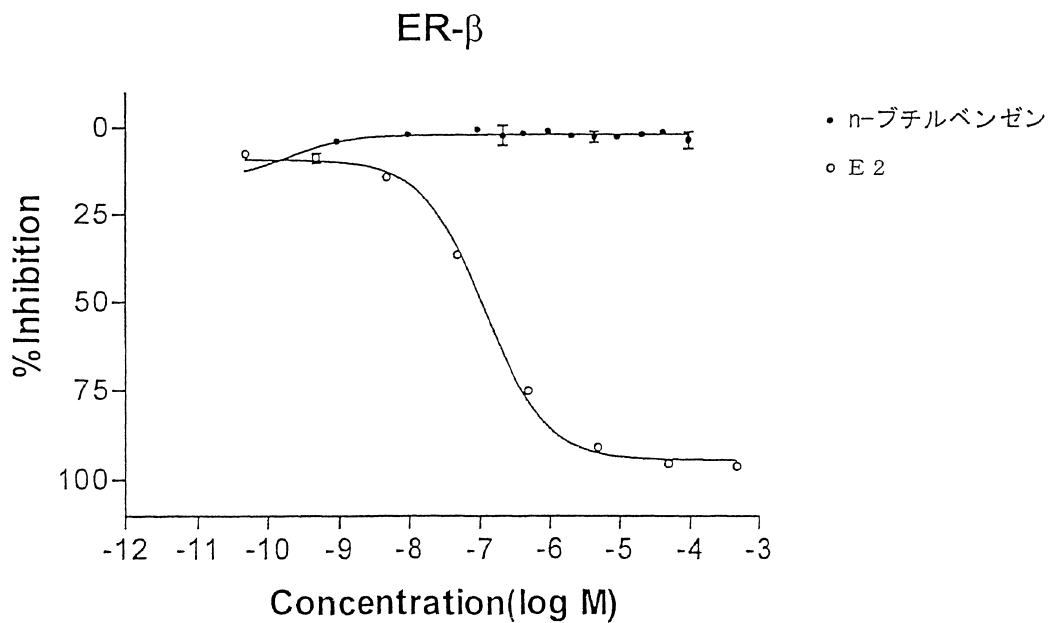
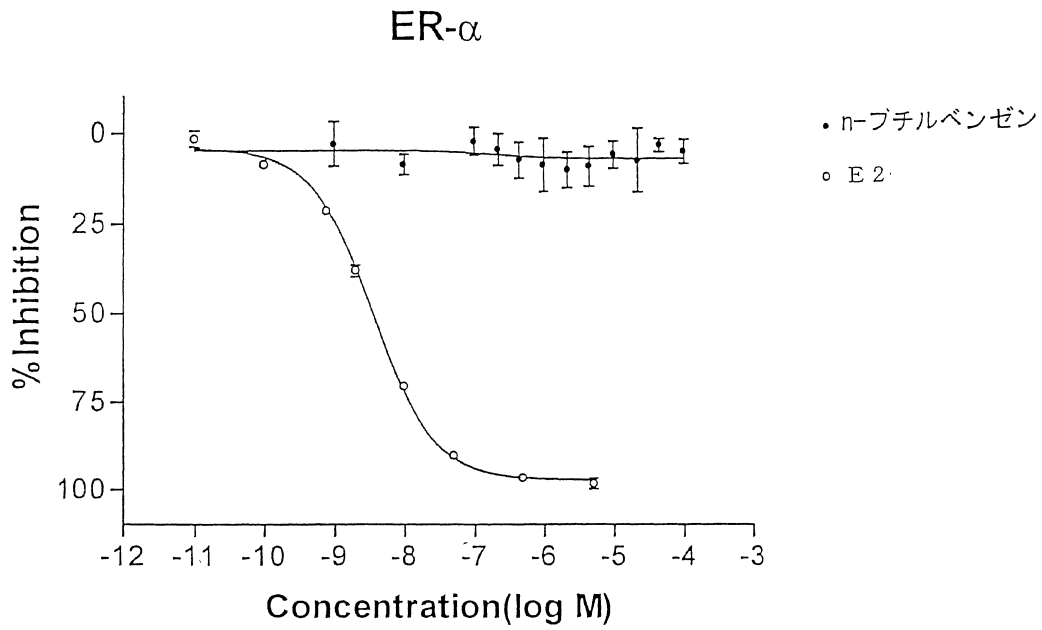
n-ブチルベンゼンにおいては、 $10^{-9}M$ から $10^{-4}M$ まで細胞増殖は認められなかった。

(3) 酵母ハイブリッド法

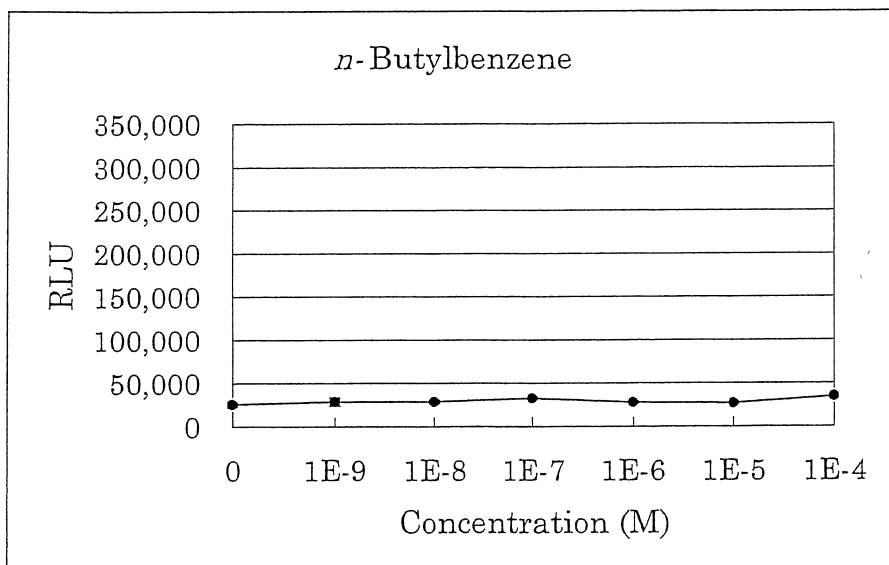
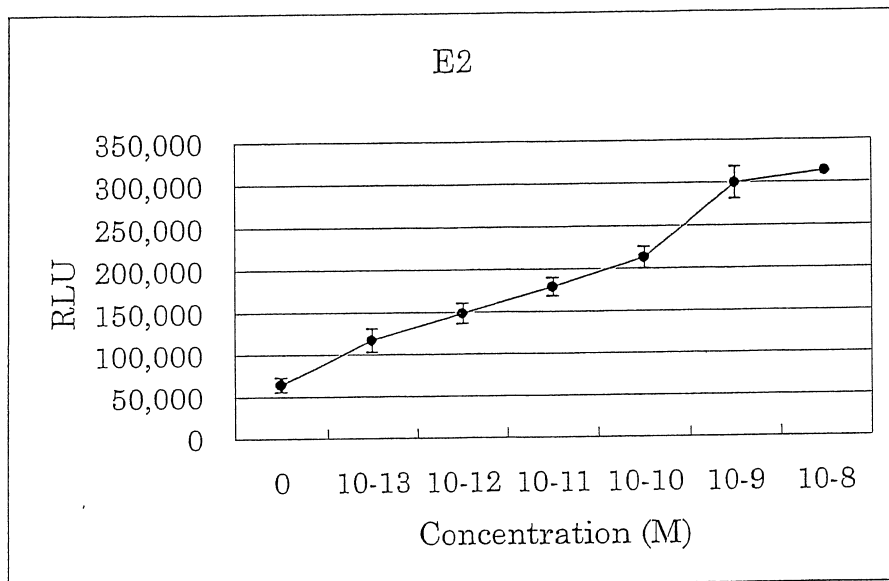
試験結果を図 3 に示した。

陽性対照物質である E2 は、 $3.1 \times 10^{-11}M \sim 2 \times 10^{-9}M$ の範囲で濃度依存的に活性の増加がみられた。

n-ブチルベンゼンにおいては、エストロジェン受容体 を導入した酵母では、E2 を添加していない対照との有意差が認められず、陽性と判定されなかった。



図一 1 エストロジェン受容体結合競合阻害試験結果
 E 2 及び n-ブチルベンゼンとエストロジェン受容体 α (ER α) との結合競合阻害
 並びに E 2 及び n-ブチルベンゼンとエストロジェン受容体 β (ER β) との結合競合
 阻害



図一2 ヒト乳がん細胞 MCF-7 増殖試験結果
E 2 及び *n*-ブチルベンゼンによる MCF-7 の増殖

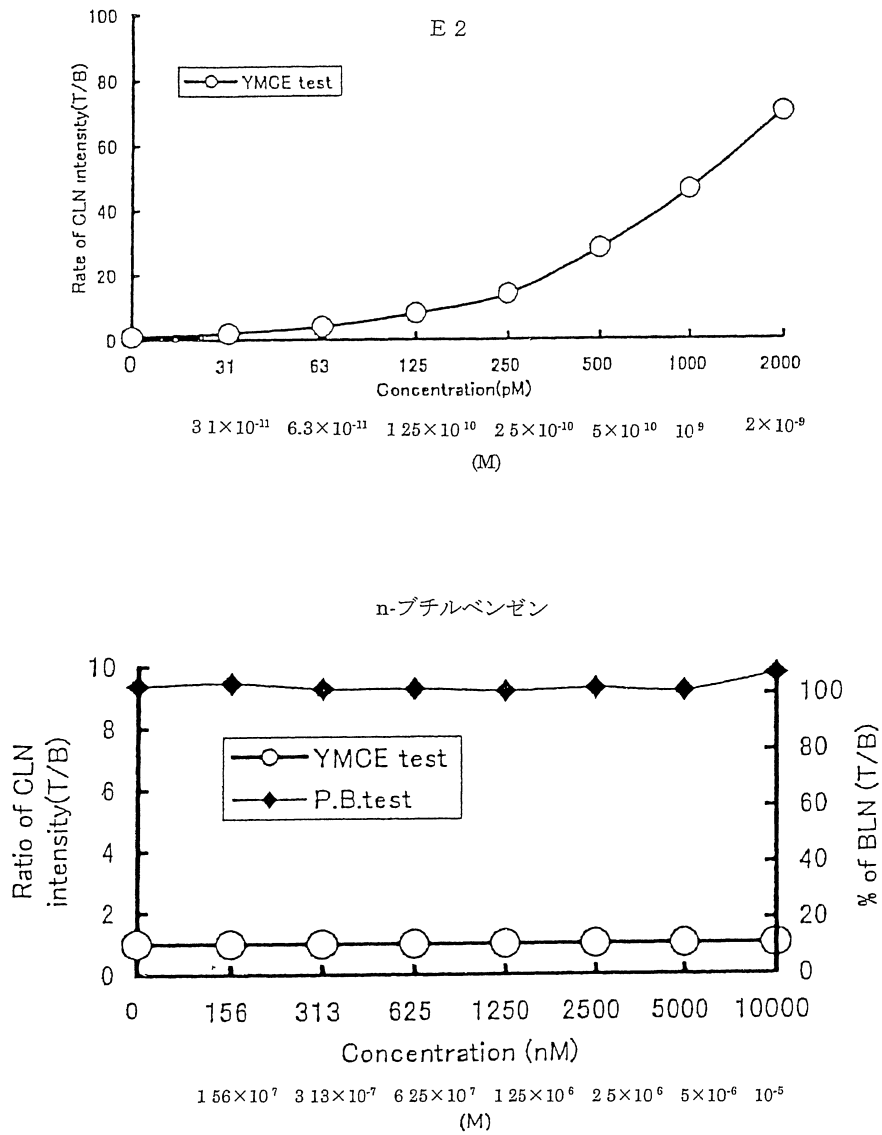


図-3 酵母 Two Hybrid 試験結果
 エストロゲン受容体 α を導入した酵母での
 E 2 及び n-ブチルベンゼンの化学発光比(YMCE test)
 P.B.test は海洋性発光細菌を用いた急性毒性試験結果

誘導されたチトクローム P450 の機能について

1) チトクローム P450IIE1⁶⁾

現名称：CYP2E1

発現種¹⁾：ラット、マウス、ウサギ、サル、ヒト主な活性：エタノール酸化¹⁾、アニリン p-水酸化¹⁾、アセトン 1-水酸化¹⁾、アセタール 1-水酸化¹⁾、ベンゼン²⁾、アニリン²⁾、クロロゾキサゾン²⁾、ジメチルニトロソアミン N-脱メチル化¹⁾、ラウリン酸 ω -1 酸化¹⁾、アセトアミノフェン活性化¹⁾、p-ニトロフェノール水酸化¹⁾、クロロゾキサゾン 6-水酸化¹⁾誘導：アルコール³⁾、アセトン^{3,6)}、ベンゼン⁴⁾、メチルエチルケトン⁶⁾、メチル n-プロピルケトン⁶⁾、メチル n-ブチルケトン⁶⁾、プロピルベンゼン⁶⁾2) チトクローム P450IIB1⁶⁾

現名称：CYP2B1

発現種¹⁾：ラット主な活性¹⁾：テストステロン 16 α/β -水酸化、ベンツフェタミン N-脱メチル化誘導：フェノバルビタール¹⁾、タバコ煙⁵⁾、アセトン⁶⁾、メチルエチルケトン⁶⁾、メチル n-プロピルケトン⁶⁾、ベンゼン⁶⁾、トルエン⁶⁾、エチルベンゼン⁶⁾、プロピルベンゼン⁶⁾3) チトクローム P450IIB2⁶⁾

現名称：CYP2B2

発現種¹⁾：ラット主な活性¹⁾：ベンツフェタミン N-脱メチル化

CYP2B1 とほぼ同じ。薬物代謝に関し、広い特異性と強い活性を持つ。

誘導⁶⁾：フェノバルビタール、メチルエチルケトン、メチル n-プロピルケトン、ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、プロピルベンゼン4) チトクローム P450IIIA2⁶⁾

現名称：CYP3A2

発現種¹⁾：ラット主な活性¹⁾：テストステロン 6 β -水酸化、エチルモルヒネ N-脱メチル化、エリスロマイシン 脱メチル化、プロポキシマリン O-脱エチル化誘導：プレグネノロン 16 α カルボニトリル⁷⁾、メチル n-プロピルケトン⁶⁾、メチル n-ブチルケトン⁶⁾5) チトクローム P450LM2⁹⁾

現名称：CYP2B4

発現種¹⁾: ウサギ

活性²⁾: テストステロン 16 α -水酸化、ベンツフェタミン N-脱メチル化、7-エトキシ
クマリン O-脱エチル化

誘導³⁾: フェノバルビタール

参考文献

- 1) 薬物代謝学辞典、山本郁男編、廣川書店 (1997)
- 2) <http://www.dml.georgetown.edu/depts/pharmacology/davetab.html>
- 3) Song, B.-J., Gelboin, H.V., Park, S.-S., Yang, C.S. and Gonzalez, F.J. (1986) Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P-450s. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the rat enzyme. *J Biol Chem* 261, 16689-16697
- 4) Johansson, I., Ekstrom, G., Sholte, B., Puzycki, D., Jornvall, H. and Ingelman-Sundberg, M. (1988) Ethanol-, fasting-, and acetone-inducible cytochromes P-450 in rat liver; Regulation and characteristics of enzyme belonging to the IIB and IIE gene subfamilies. *Biochemistry* 27, 1925-1934
- 5) Kawamoto, T., Yoshikawa, M., Matuno, K., Kayama, F., Oyama, T., Aarashidani, K., and Kodama, K. (1993) Effect of side-stream cigarette smoke on the hepatic cytochrome P450, *Arch Environ Health*, 25, 255-259
- 6) Imaoka, S. and Funae, Y. (1991) Induction of cytochrome P450 isozymes in rat liver by methyl *n*-alkylketones and *n*-alkylbenzenes. *Biochemical Pharmacology*, 42(Suppl.), S143-S150
- 7) Miyata, M., Nagata, K., Shimada, M., Yamazoe, Y. and Kato, R. (1994) Structure of a gene and cDNA of major constitutive form of testosterone 6 beta-hydroxylase (P450-6 beta A) encoding CYP3A2: comparison of the cDNA with P450PCN2. *Arch Biochem Biophys* 314, 351-359
- 8) Tarr, G.E., Black, S.D., Fujita, V.S. and Coon, M.J. (1983) Complete amino acid sequence and predicted membrane topology of phenobarbital-induced cytochrome P-450 (isozyme 2) from rabbit liver microsomes. *Proc Natl Acad Sci* 80, 6552-6556
- 9) Backes, W.L., Cawley, G., Eyer, C.S., Means, M., Causey, K.M. and Canady, W.J. (1993) Aromatic hydrocarbon binding to cytochrome P450 and other enzyme binding sites: Are hydrophobic compounds drawn into the active site or pushed from the aqueous phase? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 304, 1, 27-37