

研究要旨

本研究は、内分泌かく乱化学物質の諸課題の内、試験法の開発を中心とした研究を推進し、経済開発協力機構 (OECD) や米国環境防護庁関係機関 (EPA ・ ED-STAC) から提案されている諸試験法の試行的実施と必要に応じたそれらの改良、ならびに新規試験法の開発等を総合的に推進することを目的として実施された。

研究の1年目にあたる本年度は、1) 試験管内試験法、2) 代謝薬理作用に関する試験法、3) 動物を用いた試験法、4) 健康影響への情報収集の4分野に分けて研究を行った。試験管内試験法に関しては、数種の内分泌かく乱化学物質 (EDCs) のヒト α エストロジェン受容体に対する親和性は、ラットの子宮から得たエストロジェン受容体に対する親和性とほぼ同程度であったが、ヒト β エストロジェン受容体は genistein 対し約10倍強い親和性を示すこと、ステロイドホルモン受容体遺伝子に属する NOR-1 遺伝子あるいは膜受容体を介した転写活性の変化を、ラット副腎髄質由来の PC12 細胞に、適切なレポーター遺伝子を結合して導入することにより検出可能なことを明らかにした。代謝薬理作用に関する試験法の検討では、ヒトフェノール硫酸転移酵素分子種 SULT1A1 が、ビスフェノールAの硫酸抱合反応を触媒すること、本酵素の変異型 ^{213}His 、 ^{223}Val では触媒活性が非常に低いことを確認したほか、エストロジェン発癌のリスクマーカーと考えられているカテコールエストロジェンおよびその代謝物の尿試料を用いた同時分析法の開発、実験動物の血液中の各種ホルモンの測定法の改良を行った。

動物を用いた試験法の改良あるいは新しい試験法の開発のための研究では、dibutylphthalate (DBP)を2%含有する飼料を妊娠動物に与えると多くの胚が死亡し、母体の卵巣重量、子宮重量、血中プロゲステロン濃度が低下していること、雄ラット新生児に 17β -estradiol, nonylphenol, estradiol benzoate, bisphenol A を投与すると性的二型核あるいは第3脳室周囲層にある前腹側脳室周囲核の容積が減少し (雄の雌化)、成熟すると交尾行動の異常など生殖機能障害が起こること、マウスの全胚培養胎児に glufosinate (除草剤) を作用させると中枢神経にアポトーシスが起こり、前脳、鰓弓の低形成、神経管の開存が起きることを明らかにした。さらに、雄ラット肝で特異的に産生される $\alpha 2\text{U}$ -グロブリンの血清中濃度が、DESの投与により用量依存的に減少することが確認された。

一方、EDCs と考えられている14化合物中10物質 (alachlor, aldrin, DDT, permethrin, trifluralin, vinclozolin, DES, PCBs など) が肝発癌に促進的に作用することが明らかとなったが、methoxychlor, atrazine, bisphenol A, 17β -estradiol は、甲状腺発癌に対しては促進効果を示さなかった。さらに、内分泌かく乱化学物質の可能性が疑われている150物質をリストアップしてデータベース化し、内分泌かく乱化学物質を検出するための各試験法を比較検討して、その有用性量的点を整理する作業を開始したほか、3D-QSARによりダイオキシン類の3次元構造を予測し、エストロジェン受容体との結合様式を分子モデルを用いて推測した。また、いわゆる植物由来ホルモンおよび有機すずについて定量的なデータを収集し、人に対するリスク・ベネフィットの検討を行うとともに、内分泌かく乱化学物質に関するエンサイクロペディアの集大成を目標にして、キーワードの選択作業を開始した。本研究により、OECDなどで提案されている内分泌かく乱化学物質検索のための試験法に加えて、生体内で起きる現象をより正確に反映した簡便なスクリーニング法あるいは胎児、新生児を含む実験動物を用いた内分泌かく乱物質の神経系、免疫系および発癌性に対する影響を検討するための新たな試験法の開発が必要であることが確認され、そのための基礎的な情報を得ることが出来た。

分担研究者氏名・所属施設名および所属施設における役職名

井上 達 国立医薬品食品衛生研究所 部長
安全性生物試験研究センター・毒性部

永井 賢司 三菱化学安全科学研究所 主任研究員
鹿島研究所・薬理

武吉 正博 (財) 化学品検査協会・化学 副所長
品安全センター日田研究所

塚田 俊彦 国立がんセンター研究所 室長
細胞増殖因子研究部・受容
体研究室

大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所 部長
安全性生物試験研究センタ
ー・薬理部

小島 幸一 (財)	食品薬品安全センター 秦野研究所・中央試験 管理部	部長
鈴木恵真子 (財)	食品薬品安全センター 秦野研究所・中央試験 管理部	研究員
長尾 哲二 (財)	食品薬品安全センター 秦野研究所・研究部	室長
渡辺 敏明	山形大学医学部衛生教室	助教授
川島 邦夫	国立医薬品食品衛生研究所 大阪支所・生物試験部	部長
白井 智之	名古屋市立大学医学部第一 病理学教室	教授
広瀬 雅雄	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センタ ー・病理部	部長
長谷川隆一	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センタ ー・総合評価研究室	室長
神沼 二真	国立医薬品食品衛生研究所 化学物質情報部	部長
関沢 純	国立医薬品食品衛生研究所 化学物質情報部	室長
菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センタ ー・毒性部	室長
長村 義之	東海大医学部	副学部長・教授

研究目的：

本研究では、内分泌かく乱化学物質の諸課題の内、試験法の開発を中心とした研究を推進し、ごく近い将来、国際協調下、国内諸機関の協力のもとでこの課題に則した、各種実験が行われる際に、速やかに適切な体制をとってこれに応じることができるような、国内の技術的な基盤を整える立場から、国内のこの領域での専門的試験研究者が分担して、経済開発協力機構 (OECD) や、米国環境防護庁関係機関 (EPA・ED-STAC) から提案されている諸試験法の試行的実施と必要に応じたそれらの改良、ならびに新規試験法の開発等を総合的に推進することに主眼をおいた。すなわち、内分泌機能の障害性を巡って危惧を引き起こ

し内分泌機能の障害性を巡って危惧を引き起こしている諸物質のうち、とくに生活環境化学物質の、ヒトや野生生物に対するホルモン様生体内作用の検知のための試験技術分野において、既存の各種試験法の中から、1) 具体的な参照被験物質と重点的検討対象となる化学物質を選定し、それらの結果に基づいて、2) スクリーニング試験、第一段試験、第二段試験、ならびに確定試験などからなる階層的試験法に基づいて試験を実施し、3) その結果の総合評価を2世代試験 (エンドポイント試験) と比較することにより、バッテリー試験系として確立し、それらを基礎に、4) 来るべき国際的共同研究に際して適切な提案と分担研究を推進し、以って、この課題におけるヒトへの影響問題についての国内外に対する生活安全対応研究としての役割を果たすことが主たる目的である。この目的に従って、本年度は、カテゴリ別に、1) 試験管内試験法、2) 代謝薬理作用に関する試験法、3) 動物を用いた試験法の検討を主な研究課題として研究を行う3分野の実験班のほか、毒性情報、化学物質情報などの担当者を組織構成に加え、更に、特別推進研究課題として、実験的成果と化学物質情報を基盤とした三次元定量的構造活性相関 (3D-QSAR) の研究を共同して推進し、研究成果のデータベース化と、社会への還元を目標に、この課題に関する出版物を刊行することを目的とした文献調査班を加えて組織された。

研究方法：

1) 試験管内試験法に関する研究：

受容体結合試験法における種々のリガンドに対するエストロジェン、アンドロジェン受容体の特異性を比較するため、市販のヒト α 、 β および卵巣あるいは精巣を摘出した Sprague-Dawley 系ラットの子宮あるいは前立腺から抽出したエストロジェンあるいはアンドロジェン受容体を用いて、 ^3H で標識した 17β -estradiol, DES, genistein, tamoxifen, progesterone, testosterone, dihydro-testosterone, bisphenol A を試験管内で反応させて上清中の放射活性を測定することにより、各リガンドの受容体に対する結合性を比較検討した。また、細胞内 cAMP の上昇を介して血管作動性腸管遺伝子のプロモーター領域により転写されるベータガラクトシダーゼ遺伝子をリポーター遺伝子として導入したラットの副腎髄質由来の PC12-VG 細胞を用いて cAMP の上昇を介した遺伝子発現に対するグルカゴン、TPA およびヒト胎盤性性腺刺激ホルモンの影響を調べ、さらに、核受容体遺伝子に属する NOR-1 遺伝子を介した遺伝子発現に対するインスリン、TPA、磁場の影響を PC12 細胞および CHO 細胞により同様に検討した。

2) 代謝薬理作用の試験法に関する研究：

米国人 52 人、日本人 143 人について、ヒトのフェノール硫酸転移酵素分子種 SULT1A1_{hum} の変異型を、PCR-REFP 法により調べるとともに ^{35}S -3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (^{35}S -PAPS) をバリウムを用いて沈澱させ、基質の硫酸抱合体と分離するという新たな方法を開発して、これら変異型の bisphenol A

の硫酸抱合能の差異を検討した。さらに、代謝過程で酸素ラジカルを発生させることが知られているカテコールエストロジェン及びその尿中の代謝物の同時定量を目的として、酵素免疫測定法による分析法の開発を行うとともに、ラットでは血中の濃度が低く、阻害物質が存在するため、市販の測定用キットでは正確な値が測定不可能とされているエストロジェンの有機溶媒抽出による微量定量法を検討した。エストロジェン受容体の存在が確認されているヒトの骨肉腫由来の MG-63、SaOS-2、HOS 細胞および正常骨芽細胞を用いて、アルカリホスファターゼ活性を指標にエストロジェンおよびフタル酸誘導体の骨代謝に及ぼす影響を検討した。

3) 動物を用いた試験法に関する研究：

既存の 28 間反復投与毒性試験法に血清 $\alpha 2U$ -globulin (AUG) 測定のを取り込んで、内分泌かく乱化学物質のスクリーニングとして利用しうるか否かを検討するために、雄ラットに DES を 1、10、100 mg/kg/day の用量で 14 日間反復経口投与して血中の AUG の酵素標識免疫抗体法による測定および精巣の病理組織学的検査を行った。また、化学物質に暴露された新生児の視床下部の神経核の構造変化とその後の生殖行動の関連を調べるため、ラットの新生児に内分泌かく乱化学物質として、 17β -estradiol, estradiol benzoate, bisphenol A, buthylbenthy phthalate, nonylphenol あるいは tamoxifen を 5 日間皮下投与して、視床下部特に性的二型核(SDN-POA)と全腹側脳室周囲核 (AVPVN-POA) の発達への影響をニューロン数の増減を指標に検討し、マウス胎児の全胚培養法により、環境汚染物質の 1 つである glufosinate (除草剤) を、5、10 および $20 \mu\text{g/ml}$ の濃度で作用させて、中枢神経系の形態変化およびアポトーシスの発現の様子を観察した。さらに、フタル酸エステルの一つである dibutyl phthalate (DBP) を 2% 含有する飼料を妊娠動物に与え、胚の死亡率、奇形の有無、母体の卵巣重量、子宮重量および母体の血中のプロゲステロン濃度を測定した。発がん性試験研究として、6 週齢の F344 ラットに diethylnitrosamine を 100 mg/kg 皮下投与し、肝の 2/3 を部分切除した後、14 種の内分泌かく乱化学物質を投与して、肝の胎盤型 Glutathione S transferase 陽性細胞巢を画像処理装置を用いて定量的に解析した。併行して methyl-N-nitrosourea 2000 mg/kg を 1 回皮下投与した卵巣摘出 F-344 ラットに、1000 ppm の sulfadimethoxine (SDM) を混餌投与し、methoxychrol atrazine, bisphenol A, 17β -estradiol, SDM を追加投与して甲状腺の腫瘍性病変について形態学的に検討した。

4) 健康影響への情報収集：

内分泌かく乱化学物質の可能性が疑われている約 150 物質をリストアップしてデータベース化し、内分泌かく乱化学物質を検出するための各試験法を比較検討したほか、3D-QSAR によりダイオキシン類の 3 次元構造を予測し、エストロジェン受容体との結合様式を分子モデルを用いて推測した。また、いわゆる植物由来ホルモンおよび有機す

ベネフィットの検討を行った。さらに、エンサイクロペディアの集大成を目的として、国内外の研究者との意見交換を行い、試験法のマニュアル、内分泌に関するキーワードの選択作業を開始した。

研究結果：

1) 試験管内試験法に関する研究：

ラットのエストロジェン受容体に対する各種ホルモンの結合能は、 17β -estradiol と比較して、estriol は約 1/3、DES は約 1.5 倍であったが、testosterone, dihydrotestosterone, progesterone はきわめて弱い結合能が認められるにすぎなかった。一方、ラットのアンドロジェン受容体に対し、testosterone, dihydrotestosterone はきわめて強い親和性を示し、DES にも弱いながら結合能が認められた。さらに、DES, estriol, tamoxifen, progesterone のエストロジェン受容体に対する親和性は、ラットの子宮から得たエストロジェン受容体に対する親和性とほぼ同程度であったが、ヒト β エストロジェン受容体は、genistein に対して約 10 倍強い親和性を示すことが明らかにされた。ステロイドホルモン受容体遺伝子に属する、NOR-1 遺伝子の転写が、cAMP, TPA 神経栄養因子、インスリンなどによる A キナーゼおよび C キナーゼの活性化により促進され、さらに膜受容体を介した cAMP の上昇による転写活性の変化を、ラット副腎髄質由来の PC12 細胞に β ガラクトシダーゼ遺伝子をレセプター gene として導入することにより検出可能であり、この細胞に性腺刺激ホルモン受容体を強制発現した細胞では、ヒト胎盤性ゴナドトロピンによる cAMP 上昇の検出が可能であった。

2) 代謝薬理の試験法に関する研究：

ヒトフェノール硫酸転移酵素分子種 SULT1A1 が、代謝活性化後 DNA に損傷を与えることが知られているビスフェノール A の硫酸抱合反応を触媒し、その平均的代謝活性は約 95 pmol/min/mg protein と考えられること、触媒活性が非常に低い本酵素の ^{213}His 、 ^{223}Val が変異型が存在し、野生型に対する ^{213}His の変異型の比率が日本人では 2.8%、米国人では 17.3% であることが明らかにされた。また、エストロジェン発癌のリスクマーカーと考えられているカテコールエストロジェンおよびその代謝物の同時分析が尿試料を用いて可能となり、ヒトにおける内分泌かく乱化学物質に対する感受性の個体差およびその機序の解明に、有用な情報を提供するものと考えられるが、ヒト正常骨芽細胞及びヒト骨肉腫由来の MG-63 細胞を用いた、エストロジェンの骨代謝に及ぼす影響を検討した結果、培養中に 17β -estradiol あるいはフタル酸エステル誘導体を添加しても細胞数および培養液中のアルカリホスファターゼ活性に変化は認められなかった。

3) 動物を用いた試験法に関する研究：

エストロジェン受容との親和性が非常に低いと言われている dibutyl phthalate (DBP) を 2% 含有する飼料を妊娠動物に与えると、母動物の摂餌量の低下および体重の抑

制があり、多くの胚が死亡し、母体の卵巣重量、子宮重量、血中プロゲステロン濃度が低下しているが、黄体数、着床数、着床前胚死亡率には影響が認められないこと、雄ラット新生児に estoradiol benzoate (EB), bisphenol (BA) を投与すると性的二型核あるいは第3脳室周囲層にある前腹側脳室周囲核の容積が減少し（雄の雌化）、成熟すると交尾行動の異常など生殖機能障害が起り、同様の所見は estradiol, nonylphenol を雄ラット新生児に投与しても観察されることが明らかにされた。さらに、マウス培養胚に環境汚染物質の1つであるグルホシネート（除草剤）を作用させると中枢神経および神経管の上皮細胞層にアポトーシスが起り、前脳、鰓弓の低形成、神経管の開存が起きることを確認した。また、雄ラット肝で特異的に産生される α 2U-グロブリン (AUG) の血清中濃度に対する合成エストロゲン DES の影響を検討した結果、血清中の AUG が用量依存的に減少することが明らかにされ、新たな試験法の開発に有用な情報を提供するきわめて重要な研究結果であった。一方、内分泌かく乱化学物質の発癌への影響を検討した結果、ラット中期肝発癌性試験法により EDCs と考えられている 14 化合物について肝発癌への影響を調べ、10 物質(alachlor, aldrin, DDT, permethrin, trifluralin, vinclozolin, DES, PCBs など) が陽性であったが、DHPN を投与した卵巣摘出したラットに SDM を混餌投与し、内分泌かく乱化学物質と考えられている methoxychlor, atrazine, bisphenol A, 17 β -estradiol, SDM を付加的に投与した結果、SDM 投与群で甲状腺重量が有意に増加したが、その他の物質では陰性であった。

健康影響への情報収集：内分泌かく乱化学物質の可能性が疑われている 150 物質をリストアップしてデータベース化し、内分泌かく乱化学物質を検出するための各試験法を比較検討して、その有用性量的点を整理する作業を開始し特に bisphenol A については vom Saal ら(1998)の報告を除けば、50 mg/kg/day が LOAEL と考えられるが、人への外挿のためには、作用メカニズムを含め早急に解決しなければ成らない問題点が依然として存在することが確認されたほか、3D-QSAR によりダイオキシン類の3次構造を予測し、エストロゲン受容体との結合様式を分子モデルを用いて推測した。さらに、いわゆる植物由来ホルモンおよび有機すずについて、定量的なデータを収集し、人に対するリスク・ベネフィットの検討を行うとともに、試験法のマニュアル内分泌に関する用語集を盛り込んだエンサイクロペディアの集大成を目標にして、国内外の研究者との意見交換の結果に基づいてキーワードの選択を行った。

考察

本年度実施した本研究は、大別して4分野の研究によって構成されていたが、第1分野の「試験管内試験法に関する研究」では、性ホルモンのような核内に存在する受容体を介した反応だけでなく、性腺刺激ホルモンのような膜受容体を介した cAMP の上昇による転写活性化を検出する

新たな試験系の樹立出来る可能性が示唆された。「代謝薬理作用の試験法の開発に関する研究」においては、エストロゲン代謝過程で発生する活性酸素の発生状況を、尿中の代謝物を分析することにより類推しうる新たな分析法が開発されたほか、bisphenol A のようなフェノール化合物の硫酸抱合酵素に幾つかの変異型が存在することが明らかにされた。一方、「動物を用いた試験法に関する研究」では、ホルモン活性のきわめて低いフタル酸エステルを妊娠動物に投与すると、胎児の发育障害が惹起される事が明らかにされたほか、新生児にエストロゲンを投与すると性の分化、性行動の発達の関与すると考えられている神経核が、雄型から雌型に変化し、成熟後の性行動に影響を与えること、全胚培養した胎児に、環境汚染物質の1つである glufosinate を作用させると、神経細胞のアポトーシスにより脳の発達が阻害されること、中期肝発癌性試験法により内分泌かく乱化学物質と考えられている 14 物質中 10 物質に肝発癌促進作用がみとめられることが明らかにされた。

現在、経済開発協力機構 (OECD) や米国環境防護庁関係機関 (EPA・ED-STAC) から提案されている、内分泌かく乱化学物質に関する試験管内試験法は、主にホルモン受容体と化学物質（リガンド）との結合能を指標にした試験法であり、動物を用いた試験法は、主としてエストロゲンの標的臓器である子宮、あるいはアンドロゲンの標的臓器である雄性副生殖器（主として前立腺）への影響およびこれらに関連したホルモンの変動を指標にした試験法である。しかしながら、現在提案されている内分泌かく乱物質に対する試験管内スクリーニング試験法は、必ずしもその結果が、動物体内で起きる反応を正確に反映したものではないと考えられている。また、本研究での動物実験の結果から、多くの内因性エストロゲンあるいは内分泌かく乱化学物質と考えられている一部の化学物質は、その標的臓器と考えられていた内分泌系臓器・組織だけでなく、神経系臓器・組織にも影響を与え、さらに胎児あるいは新生児の发育過程においてもこれらの臓器・組織に作用し、加えて発癌過程にも影響を及ぼす可能性が示唆された。従って、今年度の研究結果は、OECD など提案されている内分泌かく乱化学物質検索のための試験法に加えて、生体で起こる現象をより正確に反映した High-throughput 法などの試験管内での簡便なスクリーニング法あるいは神経毒性、発癌性に加えて内分泌かく乱化学物質により影響される可能性が考えられている、免疫系への作用を検討する新たな試験法の開発が必要であることを示唆する所見であり、この研究によりそのための基礎的な成績をえることが出来たと考えられる。また、化学構造と内分泌かく乱作用との構造相関あるいはエストロゲン受容体との結合様式を分子モデルを用いて明らかにする研究の一環として、3D-QSAR によりダイオキシン類の3次構造を予測することが出来たが、これらの研究は、内分泌かく乱化学物質のスクリーニング試験を実施する前段階でその作用及び機序を予測する上で重要な情報を提供しうる有効な手段であり、そのためには更なる情報の収集が必要で

ある。また、内分泌かく乱作用に関する様々な研究成果をデータベース化することは、内分泌かく乱に関する情報を公開して社会へ還元するための有効な手段であり、これらの研究成果をもとに出版が予定されている、試験法マニュアルの編集、エンサイクロペディアの集大成により、世界各国が同じ水準で内分泌かく乱化学物質に関する研究を遂行することが出来るものと期待される。

結論

本研究は、内分泌かく乱化学物質の諸課題の内、試験法の開発を中心とした研究を推進し、経済開発協力機構 (OECD) や米国環境防護庁関係機関 (EPA ・ ED-STAC) から提案されている諸試験法の試行的実施と必要に応じたそれらの改良ならびに新規試験法の開発等を総合的に推進することを目的として、研究の1年目にあたる本年度は、1) 試験管内試験法に関する研究、2) 代謝薬理作用に関する試験法に関する研究、3) 動物を用いた試験法に関する研究、4) 健康影響への情報収集の4分野に分けて研究を行った。その結果、本研究により、OECD など提案されている内分泌かく乱化学物質検索のための試験法に加えて、生体内で起きる現象をより正確に反映した簡便なスクリーニング法あるいは胎児、新生児を含む実験動物を用いた内分泌かく乱化学物質の神経系、免疫系および発癌性に対する影響を検討するための新たな試験法の開発が必要であることが確認され、そのための基礎的な情報を得ることが出来た。