

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)

総括研究報告書

主任研究者 今井 清 食品薬品安全センター 秦野研究所

研究要旨：本研究班は、内分泌かく乱化学物質の諸問題の中で、特にヒト健康への影響を検討するための試験法の開発を中心とした研究を推進することが主な目的であるが、3年計画の2年目にあたる本年度は、<試験法の開発部門>、<内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する調査研究部門>のほか、国際的な研究協力の一環として、新たに<OECD 対応等試験法開発部門>を設け、3分野にわけて研究を行った。

<試験法開発部門>では、カテゴリー別に、試験管内と個体レベルの一般試験(井上・菅野、永井、武吉、塚田、西原)、薬理・代謝(大野、鈴木)、生殖・発生(長尾・今井、渡辺)、生殖機能(川島)、発癌性(白井、広瀬)などについて、研究を継続した。

<OECD 対応等試験法開発部門>においては、前年度の補正予算により実施した OECD 対応試験研究の結果、新たに浮上してきた基礎的科学的問題のうち、それらの解決を計らなければ今後の内分泌かく乱化学物質の試験研究課題の本質的解決が困難となる事柄について、重点的に研究を展開した。具体的には、OECD が中心となって世界的な規模で実施している prevalidation に参加して、子宮肥大試験、Hershberger 試験の適用および OECD ガイドライン 407 (28 日間反復投与) 試験法の適用における問題点を検討した(鈴木、吉村愼、金子、広瀬)。さらに、昨年度からの特別推進研究課題の発展段階として、内分泌かく乱化学物質の計算探索と評価(板井)、および 3D-QSAR に関する実験解析的研究(菅野)を展開し、コンピュータスクリーニングによりエストロゲン受容体との結合が想定されたフラボン・イソフラボン化合物を絞り込み、in vitro 試験を実施し、新たに弱いながら活性を有する 11 物質が見出された。また、<内分泌かく乱化学物質健康影響に関する調査研究部門>において、毒性情報(長谷川)、化学物質情報(神沼、関沢)等の集積をした。また、研究成果のデータベース化と社会への還元を目標に、長村、菅野がこの問題に関する出版計画を立てて、具体案を作成して執筆者の選定を行い、執筆を依頼した(長村、菅野、井上)。

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 安全性生物試験研究センタ ー・毒性部	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
永井 賢司	三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所・薬理	主任研究員	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
武吉 正博	(財) 化学品検査協会・化学 品安全センター日田研究所	副所長	渡辺 敏明	山形大学医学部衛生教室	助教授
塚田 俊彦	国立がんセンター研究所 細胞増殖因子研究部・受容 体研究室	室長	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
大野 泰雄	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・薬理部	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
西原 力	大阪大・大学院薬学系研究 科、生命情報環境化学専攻 微生物生態学講座	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
鈴木 勝士	日本獣医畜産大学・獣医生 理学教室		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
吉村 慎介	(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所・病理学研究室	室長	関沢 純	国立医薬品食品衛生研究所 化学物質情報部	室長
金子 豊蔵	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	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
板井 昭子	(株) 医薬分子設計研究所	所長	長村 義之	東海大医学部	副学部長・ 教授
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			

A. 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、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、ならびに試験法の開発等を総合的に推進することに主眼をおいている。すなわち、1）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、生活環境化学物質、ヒトや野生生物に対するホルモン様生体内作用が疑われている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、2）既存の各種試験法の中から、あるいは改良もしくは新規に考案された方法を用いてその作用を検討して、それらの結果に基づいてスクリーニング試験、第一相試験、第二相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を確立し、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、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対応研究としての役割を果たすことを目的とした。

B. 研究方法：

3年計画で開始した本研究の1年目にあたる本年度は、1）試験法開発、2）OECD 対応試験法の改良・開発、3）内分

泌かく乱化学物質の健康影響に関する調査の3分野にわけて研究を行った。

<試験法開発部門>

1）試験管内と個体レベルの一般試験の研究として、去勢成熟ラットの前立腺腹葉における細胞動態を指標とした抗アンドロジェン活性評価系を検討するために、去勢成熟ラットに合成男性ホルモン testosterone propionate (TP) 0.1 ~ 1 mg/kg あるいは男性ホルモンのアンタゴニストである flutamide 0.1 ~ 3 mg/kg を皮下投与して、経時的に前立腺腹葉から単離した細胞を用いて TUNEL 法によりアポトーシスを、またフローサイトメトリーにより細胞周期を解析した。 α 2u-globulin (AUG) はエストロジェンによって生合成が低下することが知られていることから、合成エストロジェン DES を雄ラットに 0.01 ~ 1 mg/kg 14 日間経口投与して、雄ラットで特異的に産生される AUG の血中濃度に対する合成エストロジェン DES の影響を検討した。また、RT-PCR 法により肝の AUG mRNA を測定した。

培養細胞および酵母を用いた研究では、培養細胞を用いた膜受容体を介するシグナル伝達系を攪乱する化学物質検出系の検討として、ステロイドホルモン受容体遺伝子ファミリーに属する NOR-1 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子につないだプラスミドを、BALb3T3 細胞に導入し、安定した形質転換細胞（3T3NL 細胞）を作製し、forskolin あるいは TPA を添加して酵素誘導の有無を検討した。さらに、酵母 Two-Hybrid 試験法の改良およびその環境・生物試料への応用を目的としてヒトエストロジェン受容体 (ER) α および β レセプターとする系を作製し、化学発光レポーター遺伝子を導入してマイクロプレート上で測定可能な、より簡便で、高

感度の試験系を開発することを試みた。また、この系に S9 を添加することにより代謝活性化物質の作用が検出可能か否かを検討した。

2) 薬理代謝研究では、内分泌かく乱化学物質のうち、代謝活性化後 DNA 損傷をおこす物質の作用機作を明確にすることを目的として、熱安定性フェノール硫酸転移酵素の阻害剤ケルセチンを用いてヒトでのビスフェノール A の硫酸抱合に関与する硫酸転移酵素の分子種の特定を試みた。さらに、いわゆる E-screen 法により硫酸抱合体のエストロジェン様作用の強さ、および RT-PCR 法によりエストロジェン応答遺伝子 PS2 誘導活性を調べた。また、エストロジェン発癌のリスクマーカーと考えられるエストロジェン代謝物の種族差を見るために、ラットおよびハムスターに 17β -estradiol を 2~5 mg/kg 腹腔内投与し、尿中の CE メルカプツール酸を定量した。さらに、雌雄ラット肝の S9 とミクロゾームを用いて、エストロジェン代謝における性差を確認した。

3) 生殖・発生に関する研究では、生後 4 日の新生児に内分泌かく乱作用が有るとされている 10 種の化学物質を皮下あるいは経口投与して、投与 24 時間後に脳を摘出して視床下部神経核 (SDN-POA) を含む神経細胞のアポトーシスを TUNEL 法により観察した。また、ラット胎齢 9.5 あるいは 11.5 日を培養して、estradiol benzoate (EB) あるいは DES を培養液中に添加してその影響を観察するとともに、ウェスタンブロット法および免疫組織化学染色により培養胚のエストロジェン受容体の局在を調べた。さらに、妊娠および脱落膜反応を人工的に惹起した偽妊娠ラットに 250 ~ 1250 mg/kg の dibutylphthalate (DBP) 経口投与して、脱落膜形成の度

合い、血清中のプロジェステロンおよびエストロジェン濃度を測定した。

4) 生殖機能面では、フタル酸エステルによる生殖障害に関する研究として、妊娠ラット 0 ~ 8 日に 250 ~ 1500 mg/kg の dibutylphthalate (DBP) を経口投与した。偽妊娠 4 日に脱落膜反応を誘起した偽妊娠ラットの 0 ~ 8 日に DBP を経口投与した。

5) 発癌性試験研究では、甲状腺腫瘍に対する内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究として、F344 卵巣摘出ラットを用い、術後 1 週間目に DHPN でイニシエーション処置をし、1 週間から 1000ppm のサルファジメトキシシン (SDM) を 8 週間混餌投与した。その後、50 ないし 0 mg の EB を皮下に 5 週間毎に埋植し 28 週後に殺処分した。また、内在性の性ホルモンによる前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の発生に及ぼす影響について、肝中期発癌性試験 (Liver Middle-term Bioassay) を用い、試験開始 1 週目に雄ラットの去勢、雌ラットの卵巣摘出して、前がん病変の発生率を比較した。

<OECD 対応試験法開発部門>

1) OECD における子宮肥大試験および Hershberger 試験 :

prevalidation、validation プロトコールの策定・改定の進捗状況に呼応して、以下の様な検討を行った。すなわち、子宮肥大試験においては、ethynyl estradiol (EE) をモデル物質として未成熟ラットと卵巣摘出成熟ラットの反応性の相違、投与経路の相違による反応性の相違、エストロジェンアンタゴニストあるいは B(a)P, TCDD による複合効果の検討を行い、Hershberger 試験における低用量域の用量作用曲線の形状に関する基礎的研究として TP 投与による用量作用関係を検討するとともにビスフェノー

ルAの複合効果についても調べた。

2) OECD ガイドライン 407 (28 日間反復投与毒性試験法) に関する研究として、国際共同バリデーションを早急に確立するため、同一プロトコールに従って nonylphenol および methoxychlor の prevalidation 試験を行った。また、雄に特異的に発現する蛋白質である α 2u-globulin の性ホルモン投与による影響を調べるために雄ラットには EE 0.5 ~50 μ g/kg、雌ラットには TP 1 ~100 mg/kg を投与して、肝臓での AUG および AUG mRNA の変化を、ウェスタンおよびノザン解析で検討した。

3) 内分泌かく乱化学物質の計算探索と評価の面では、内分泌かく乱化学物質の標的受容体への相互作用を、新たに分子レベルで理論的に解析することを目的として、エストロゲン受容体を標的とする内分泌かく乱化学物質について、受容体結晶構造へのドッキングスタディを行い、市販のフラボン・イソフラボン化合物についてコンピュートースクリーニングによりエストロゲン受容体と結合する可能性が推定される物質を絞り込んで、転写活性を指標にした試験管内試験系でエストロゲン受容体との結合力を調べた。

4) 3D-QSAR に関する実験解析的研究では、エストロジェンのアゴニスト・アンタゴニストそれぞれのエストロゲン受容体への結合による受容体と、DNA 上のレスポンスエレメントとの相互作用に及ぼす影響を新たに開発した試験管内試験系により検討した。

<内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する調査部門>

1) アルキルフェノールの内分泌かく乱作用について、内分泌かく乱化学物質の可能性が疑われている物質の情報を

データベース化するために、今年度はアルキルフェノールに関する種々の情報を集積した。

2) 化学物質の相互作用データベースの構築と3次元構造活性相関に関する研究として、化学物質の相互作用に関する情報のデータベース化の検討およびインターネットから利用できるシステムの構築を検討した。また、エストロゲン受容体の3次元構造のモデリングおよび甲状腺ホルモンと血液中の蛋白質 (transthyrin) との結合のモデリングの研究を開始した。

3) 健康影響に関する情報収拾と評価では、内分泌かく乱化学物質の健康影響を考える上で感受性や発達過程における不可逆性の点から考えて、最も重要性の高いと思われる胎児期暴露の情報を集中的に検索し、化合物毎に整理した。

4) 研究成果のデータベース化と社会への還元を目標に、内分泌かく乱化学物質に関する用語集の作成にむけて、内分泌かく乱化学物質のキーワードをの具体的な項目の選定、執筆者の選定を行うこととした。

C. 研究結果:

<試験法開発部門>

1) 試験管内と個体レベルの一般試験研究では、抗アンドロゲン活性評価系を検討するために、去勢成熟ラットの前立腺腹葉から単離した細胞を用いてアポトーシスおよび細胞周期を解析した。その結果、去勢後 78 時間でアポトーシスは正常ラットのその約 47 倍に達し、TP および flutamide 投与によりそれぞれ用量依存的にアポトーシスが減少および増加した。雄ラットで特異的に産生される AUG の血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、血中の AUG が用量依存的に変化するこ

とを明らかにし、さらに低濃度の DES ($0.1 \mu\text{g/kg/day}$ 14 日間投与) によっても敏感に低下することが明らかとなった。また、AUG 遺伝子の、promoter 領域の cloning を行った結果、ERE の Half site を有するものの、ARE は確認出来なかった。

培養細胞や酵母を用いた研究では、培養細胞を用いた膜受容体を介するシグナル伝達系をかく乱する化学物質検出系の検討で、膜受容体であるステロイドホルモン受容体遺伝子ファミリーの属する NOR-1 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子につないだプラスミドを Balb3T3 細胞に導入して作製した形質転換細胞 (3T3NL 細胞) を用いて検討した。その培養細胞に forskolin や TPA を添加し刺激後、約 3 時間でルシフェラーゼ活性が基礎値の約 30 倍以上の頂値を示すことを明らかにした。

ヒト ER α および β レセプターを組み込んだ酵母に化学発光レポーター遺伝子を導入することにより、マイクロプレート上でより簡便に、また高感度に ER と結合する物質の検出が可能となり、さらに、S9 Mix 前処理により代謝活性化される物質の拮抗作用が、estradiol(E2) 共存により検出できることが明らかにされた。

2) 薬理代謝研究では、内分泌かく乱化学物質のうち、ビスフェノールAの硫酸抱合には、ヒトでは主として熱安定性のフェノール硫酸転移酵素分子種 ST1A3 が関与しており、ヒト乳癌由来細胞 MCF-7 を用いた E-Screen アッセイで、ビスフェノールAの硫酸抱合体は親化合物に比べ細胞増殖を惹起する活性が 100 倍以上減弱していることが示された。エストロゲン発癌のリスクマーカーと考えられるカテコールエストロゲン(CE)、CE メルカプツール酸 (CE SR)

および 15α -ヒドロキシエストロゲン (15α -OHEs)の同時分析法を用いて、E2 投与雌ラット尿中の CE メルカプツール酸を定量した結果、2種の CE SR が検出され、4位水酸化体より1位水酸化体濃度が約4倍高かった。一方、ハムスターでは、尿中の主な CE メルカプツール酸は、4位水酸化体であった。また、 15α -OHEs を吸着する固定化カラムを作製し、2.5 ~100 ng の範囲で定量可能となった。なお、ラットにおいては、エストロゲン代謝に大きな性差は確認できなかった。

3) 生殖・発生面では、ラット胎児あるいは新生児に内分泌かく乱化学物質を適用すると、脳の性分化に重要な役割を演ずる視床下部神経核 (SDN-POA)の容積の変化と生殖機能の異常を惹起した。更に、合成女性ホルモンおよび内分泌かく乱作用が報告されている一部の物質が新生児 SDN-POA の神経細胞にアポトーシスを誘発することが明らかにされた。

哺乳動物胚を用いた内分泌かく乱化学物質の中樞神経および生殖細胞に及ぼす影響を検討するため、ラット培養胚における ER の免疫組織化学及び western blotting による検出法を確立し、この方法を用いて、EB および DES による形態形成異常の誘発が、胚組織における ER の発現と関連することを明らかにした。また除草剤グルホシネートの神経障害にも中樞神経細胞におけるアポトーシスが関与しているが明らかにされた。

4) 生殖機能面では、フタル酸エステルによる生殖障害に関する研究として、妊娠ラット 0~8日に 250 ~ 1500 mg/kg の dibutylphthalate (DBP)を経口投与したところ、750 mg/kg 以上で胚の死亡率が有意に上昇した。偽妊娠4日に脱落膜反応を誘起した偽妊娠ラットの 0~8日に DBP を経口投与したとこ

ろ 750 mg/kg 以上で脱落膜腫形成が有意に抑制された。これらのことから、DBP による胚致死作用には脱落膜反応の抑制が関与していることが示唆された。

5) 発癌性試験研究では、甲状腺腫瘍に対する内分泌かく乱化学物質の影響を調べるために、卵巢摘出ラットに DHPN でイニシエーション処置し、1 週後にサルファジメトキシシン (SDM) を 8 週間混餌投与した。その後、50 ないし 0 mg の EB を皮下に埋植し 28 週後に殺処分した。その結果、両群で過形成、腺腫、癌が認められ、DHPN/SDM/EB 群での腺腫発生個数と癌の PCNA 陽性率は DHPN/SDM 群に比し有意に増加した。また、内在性の性ホルモンによる前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の発生に及ぼす影響について、肝中期発癌性試験法を用い、試験開始 1 週目に雄ラットの去勢、雌ラットの卵巢摘出を行い、検討した。その結果内在性の性ホルモンは、肝の前がん病変の発生には影響を与えなかった。

<OECD 対応試験法開発部門>

1) 子宮肥大試験において、未成熟ラットと卵巢摘出ラットの EE に対する感受性を比較すると、7 日間皮下投与の卵巢摘出ラットで最も強い反応が見られ、ついで、未成熟ラット 3 日間皮下投与、卵巢摘出ラット 3 日間皮下投与の順で感受性が低下し、未成熟ラット 3 日間経口投与の反応が最も低かった。また、抗エストロゲン物質 ZM 189,154 は EE 0.3 μ g/kg の子宮肥大作用を用量依存的に抑制した。なお、子宮肥大試験において、B(a)P および TCDD の複合効果は認められなかった。

Hershberger 試験においては、TP 0.1~0.5 mg/kg の用量範囲で用量に依存して、ほぼ直線的に副生殖器の重量増加が認められたが、1.0 mg/kg 以上の

投与ではその反応はほぼ飽和するものと思われた。TP 0.5 mg/kg の作用に対するアンドロゲン物質 flutamide の抑制効果は見られなかった。なお、卵巢あるいは精巣摘出手術の基本操作法をビデオ撮りし、OECD をはじめ関与する国々へ配布した。

2) OECD ガイドライン 407 (28 日間反復投与毒性試験法) に関する研究として、nonylphenol および methoxychlor の prevalidation 試験を行った。その結果、標的臓器の臓器重量、性周期観察、精巣上体における精子検査は、エストロゲン作用のマーカーになるが、血中の各ホルモン測定、精巣の精巣内に存在する精子の検査は有用なマーカーにはなり得ないことが示唆された。雄ラットの肝臓において、雄に特異的に発現する蛋白質である AUG の mRNA 発現に対する EE の影響をウェスタンおよびノザン解析で検討した結果、雄に 50 μ /kg の EE を投与した群で発現の亢進が認められた。

3) 内分泌かく乱化学物質の計算探索と評価の面では、内分泌かく乱化学物質の標的受容体への相互作用を分子レベルで理論的に解析することを目的として、エストロゲン受容体を標的とする内分泌かく乱化学物質について、受容体結晶構造へのドッキングスタディを行い、複合体構造を推定することが出来た。また、市販のフラボン・イソフラボン化合物からコンピュートースクリーニングによりエストロゲン受容体と結合する可能性が示唆された物質について試験管内の試験系で転写活性を測定したところ弱いながら活性のある化合物 11 種が新たに見つかった。

4) 3D-QSAR に関する実験解析的研究では、エストロゲンのアゴニスト・アンタゴニストそれぞれのエストロ

ジェン受容体への結合による、受容体と DNA 上のレスポンスエレメントとの相互作用に及ぼす影響を検討し、それぞれの化合物が濃度依存的に特異的な相互作用変化を示すことが明らかにされた。

<内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する調査研究部門>

1) アルキルフェノールの内分泌かく乱作用について、今年度はアルキルフェノールの内分泌かく乱作用について最新の情報に注目し、in vitro 系および in vivo 系での作用に加え、体内動態及び毒性試験データからヒトに対する内分泌かく乱影響についてまとめるとともに、一部のフタル酸エステル類の内分泌かく乱作用に関する知見をまとめた。

2) 化学物質の相互作用データベースの構築と 3 次元構造活性相関に関する研究として、内分泌かく乱化学物質の可能性が疑われている物質の情報をデータベース化するために、化学物質の相互作用データベースの構築と 3 次元構造活性相関に関する研究として、プロトタイプとして access 上に開発した相互作用（結合）実験データベースの内容（データと機能）を充実するとともに、これをインターネットから利用できるシステムへと発展させた。

3) 健康影響に関する情報収拾と評価では、内分泌かく乱化学物質の健康影響を考える上で感受性や発達過程における不可逆性の点から考えて、最も重要性の高いと思われる胎児期暴露の情報を集中的に検索し、化合物毎に整理した。この情報を基に、観察された健康影響とその背景メカニズムの検討が可能ならしめるように、物質特定情報、動物種、試験条件などの情報、観察された影響情報、文献特定情報に分類し、整理してデータベースを作成した。このうち植物由来のホルモン物質、有機錫およびダイオキシン

について詳細な検討を行った結果を公表した。

4) 研究成果のデータベース化と社会への還元を目標に、内分泌かく乱化学物質に関する用語集の作成にむけて、平成 10 年度で検討された内分泌かく乱化学物質のキーワードを基に具体的な細かい項目の選定を行った。化学物質、自然動物への影響、人体への影響、病態の把握（血清、組織、細胞レベル）、治療、対策（医学的、行政的）、予防などについて項目立てを行い、それぞれの項目の縦断的あるいは横断的な検索が可能になるような工夫をした。以上の具体案を作成して執筆者の選定、執筆の依頼を行った。

D. 考察:

本年度実施した本研究は、大別して 3 分野の研究によって構成された。

<試験法開発部門>

1) 試験管内と個体レベルの一般試験の研究として、抗アンドロジェン活性を、去勢成熟ラットの前立腺腹葉から単離した細胞を用いて、アポトーシスおよび細胞周期をフローサイトメロリーによる解析を指標として評価しうる可能性が示唆され、雄ラットで特異的に産生される AUG の血中濃度が合成エストロジェン DES 投与により用量依存的に変化し、低濃度の DES ($0.1 \mu\text{g/kg/day}$ 14 日間投与) によっても敏感に低下することが明らかとなった。この結果、これらの測定項目がいずれも内分泌かく乱作用の新たな指標になりうる可能性が示唆され、AUG に関しては、OECD ガイドライン 407 の prevalidation においても女性ホルモンあるいは男性ホルモン作用の指標に成りうるか否かを検討した。その結果、予想に反して EE 投与により肝組織中の AUG の発現の亢進が認めら

れたが、その理由を明らかにすることは出来なかった。

培養細胞をもちいた膜受容体を介するシグナル伝達系の研究として、受容体であるステロイドホルモン受容体遺伝子ファミリーの属する NOR-1 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子につないだプラスミドを導入して作製した形質転換細胞 (3T3NL 細胞) では、forskolin や TPA で刺激後、ルシフェラーゼ活性が基礎値の約 30 倍以上の頂値を示すことを明らかにした。この結果は、性腺刺激ホルモンなどの膜受容体を介したホルモン作用を試験管内の試験系で検出できる可能性を示唆するものであり、今後の研究の発展が期待される。また、ヒト ER α および β を組み込んだ酵母にさらに化学発光レポーター遺伝子を導入することにより、より簡便かつ高感度な解析が可能になった。

2) 薬理代謝研究では、内分泌かく乱化学物質の硫酸抱合には、ヒトでは主として熱安定性のフェノール硫酸転移酵素分子種 ST1A3 が関与しており、ヒト乳癌由来細胞 MCF-7 を用いた E-Screen アッセイで、ビスフェノール A の硫酸抱合体は親化合物に比べ細胞増殖を惹起する活性が 100 倍以上減弱していたことから、内分泌かく乱化学物質の不活性化に硫酸抱合が関与していることが明らかにされた。エストロゲン発癌のリスクマーカーと考えられるカテコールエストロゲン、カテコールメルカプツール酸および 15 α -ヒドロキシエストロゲンの同時分析法を用いて E2 を投与したラットおよびハムスターの尿中の CE メルカプツール酸を定量した結果、2 種のカテコールメルカプツール酸が検出され、4 位水酸化体より 1 位水酸化体濃度が約 4 倍高かった。一方、ハムスターでは、尿中の主なカテコールメルカプ

ツール酸は、4 位水酸化体であった。このことが、ラットおよびハムスターにおけるエストロゲンの発癌性に対する感受性に差が生じる要因になっている可能性も考えられる。

3) 生殖・発生面では、ラット胎児あるいは新生児に内分泌かく乱化学物質を適用し、脳の性分化に重要な役割を演ずる視床下部神経核 (SDN-POA) の容積の変化と生殖機能の異常を来すことを明らかにし、さらに、合成女性ホルモンおよび内分泌かく乱作用が報告されている一部の物質が新生児 SDN-POA の神経細胞にアポトーシスを誘発することが明らかにされた。一方、哺乳動物胚を用いた試験系により、EB および DES による形態形成異常の誘発が、胚組織における ER の発現と関連があり、その発現機序としてアポトーシスが関与が明らかにされた。従って、内分泌かく乱化学物質の発達異常には標的細胞のアポトーシスが重要であり、アポトーシスを観察することにより短期間にスクリーニングが出来る可能性が示唆された。

4) 生殖機能面では、フタル酸エステルによる生殖障害に関する研究として、ラットに DBP を経口投与したところ、胚の死亡率が有意に上昇し、脱落膜反応を誘起した偽妊娠ラットに DBP を経口投与したところ脱落膜腫形成が有意に抑制されたことから、DBP による胚致死作用には脱落膜反応の抑制が関与していることが示唆された。しかし、脱落膜反応の抑制に、内分泌かく乱作用が関与しているか否かは不明であり、さらなる検討が必要と思われる。

5) 発癌性試験研究では、甲状腺腫瘍に対する内分泌かく乱化学物質の影響を調べるために、卵巣摘出ラットに DHPN でイニシエーション処置し、1 週後にサルファジメトキシシン (SDM) を 8

週間混餌投与し、その後、50 ないし 0 mg の EB を皮下に埋植し 28 週後に殺処分した。その結果、両群で過形成、腺腫、癌が認められ、DHPN/SDM/EB 群での腺腫発生個数と癌の PCNA 陽性率は DHPN/SDM 群に比し有意に増加した。また、肝中期発癌性試験法を用い、試験開始 1 週目に雄ラットの去勢、雌ラットの卵巢摘出を行って、内在性の性ホルモンによる前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の発生に及ぼす影響について検討した。その結果内在性の性ホルモンは、肝の前がん病変の発生には影響を与えなかった。中期肝発癌性試験により内分泌かく乱化学物質と考えられている 14 物質 10 物質に肝発癌促進作用が認められていることから、内分泌かく乱化学物質の甲状腺腫瘍並びに肝腫瘍の発生に対する促進効果については、その作用機序の詳細な検討が必要であろう。

<OECD 対応試験法開発部門> では、主として OECD でのプレバデーション・バリデーション試験に呼応した研究を行い

1) 子宮肥大試験において、EE に対する感受性を比較すると、7 日間皮下投与の卵巢摘出ラット、未成熟ラット 3 日間皮下投与、卵巢摘出ラット 3 日間皮下投与、未成熟ラット 3 日間経口投与の順で感受性が低下することが明らかにされた。一方、Hershberger 試験においては、TP 0.1~0.5 mg/kg の用量範囲で用量に依存して、ほぼ直線的に副生殖器の重量増加が認められたが、1.0 mg/kg 以上の投与では反応はほぼ飽和に達するものと思われた。

2) OECD ガイドライン 407 (28 日間反復投与毒性試験法) に関する研究として、nonylphenol および methoxychlor のプレバリデーションを行った結果、標的臓器の臓器重量、性周期観察、精巣上体における精子検査は、

エストロゲン作用のマーカーになるが、血中の各ホルモン測定、精巣の精巣内に存在する精子の検査は有用なマーカーにはなり得ないことが示唆された。これらの成績をもとにして OECD が中心となって実施する国際的なバリデーション試験のプロトールについて協議がなされ、現在最終的なプロトコールの確認作業がおこなわれている。

3) 内分泌かく乱化学物質の計算探索と評価の面では、内分泌かく乱化学物質の標的受容体への相互作用を分子レベルで理論的に解析することを目的として、エストロゲン受容体を標的とする内分泌かく乱化学物質について、受容体結晶構造へのドッキングスタディを行い、複合体構造を推定することが出来た。また、市販のフラボン・イソフラボン化合物からコンピュータスクリーニングによりエストロゲン受容体と結合する可能性が示唆された物質について in vitro の試験系で転写活性を測定したところ弱いながら活性のある化合物 11 種が新たに見つかった。

4) 3D-QSAR に関する実験解析的研究では、エストロジェンのアゴニスト・アンタゴニストそれぞれのエストロゲン受容体への結合による、受容体と DNA 上のレスポンスエレメントとの相互作用に及ぼす影響を検討し、それぞれの化合物が濃度依存的に特異的な相互作用変化を示すことが明らかにされた。それぞれ、多数の化学物質の中から、大規模なスクリーニング試験を実施するための候補化合物を絞り込むための有効な試験法として注目される。

<内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する調査研究部門> では、

1) アルキルフェノールの内分泌かく乱作用について、in vitro 系あるいは in vivo 系での作用に加え、体内動態及び毒

性試験データからヒトに対する内分泌かく乱影響についてまとめるとともに、一部のフタル酸エステル類の内分泌かく乱作用に関する知見をまとめた。

2)化学物質の相互作用データベースの構築と3次元構造活性相関に関する研究として、相互作用(結合)実験データベースの内容を充実させるとともに、これをインターネットから利用できるシステムへと発展させた。

3)健康影響に関する情報収拾と評価では、内分泌かく乱化学物質の健康影響を考える上で感受性や発達過程における不可逆性の点から考えて、最も重要性の高いと思われる胎児期暴露の情報を集中的に検索し、化合物毎に整理した。この情報を基に、物質特定情報、動物種、試験条件などの情報、観察された影響情報、文献特定情報に分類し、整理してデータベースを作成した。

4)研究成果のデータベース化と社会への還元を目標に、内分泌かく乱化学物質に関する用語集の作成にむけて、化学物質、自然動物への影響、人体への影響、病態の把握、治療、対策(医学的、行政的)、予防などについて項目立てを行い、それぞれの項目の執筆者を選定し、執筆の依頼を行った。これらの情報が、今後の内分泌かく乱化学物質に対する対策の策定、研究の指針として役立つものと考ええる。

E. 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、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、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ており、第2年目の本年度は、<試験法開発部門>、<OECD 対応試験法開発部門>、<内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する調査研究部門>の3分野に大別して、研究を実施した。その結果、細胞膜表面の受容体を介した内分泌かく乱作用の検出のための試験法や生体内の反応をより正確に反映した簡便な試験管内試験法の開発の基礎となる情報を得ることが出来た。さらに、新たな試験法の開発に繋がる胎児、新生児の分化・発達あるいは発癌に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響の一部が明確にされた。国際協力の一環として、OECD プレバリデーション・バリデーション試験を実施し、示唆に富む情報を提供することが出来た。また、内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する情報の調査研究成果を基にデータベースを作成し、その一部をインターネットから利用できるシステムを開発するとともに、内分泌かく乱化学物質に関する用語集の作成のための執筆・編集活動を開始した。

F. 研究発表

Nagao T., Yoshimura S., Saito Y., Imai K., Teratogen Carcinogen Mutagen., (1999) 19, 233-241, Developmental toxicity of the topoisomerase inhibitor, etoposide in rabbits after intravenous administration.

Nagao T, Saito Y, Watanabe C and Imai K., Reproductive Toxicology, (1999)11, 37-45, Reproductive effects

of prenatal exposure to 5-bromo-2'-
deoxyuridine on male rats.

今井 清、山口一喜、池田 久、松本浩

孝、稲田浩子、青木道子、加藤博健、関 剛
幸、小島幸一、吉村慎介、松本容彦、薬
理と治療 (1997) Vol.25, suppl.2. 87-
114