

平成10年度厚生科学研究（特別研究事業）

研 究 報 告 書

—研究課題名—

新しい日米科学技術に関する研究（毒性学）

主任研究者 黒川雄二

総括研究報告書

～ 研究課題「新しい日米科学技術に関する研究（毒性学）」 ～

主任研究者 黒川 雄二（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長）

研究協力者

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）
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）
小野 敦 （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 研究員）
山本 雅也 （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 研究員）

「毒性学研究」の研究事業の一環として、内分泌障害性物質（EDCs）及びダイオキシン類に関する米国における研究進展状況の調査をし最新情報を得ること、かつ研究に関する意見・情報交換を行うことを目的とした。

A. 研究目的

最近、野生動物の生殖機能低下に対する環境汚染物質の関与が指摘されており、その主要な作用機序として内分泌系の攪乱が考えられている。そして、この様な事がヒトに対しても起こっているのではないかという危惧が広がっている。この様な物質としては、意図的に環境中に放出される化学物質ばかりでなく、ダイオキシン類等非意図的汚染物質も含まれている。その作用機序の解明、それに基づく生物学的スクリーニング法の開発、ヒト及び環境へのリスク評価法等に関する研究が米国を初め国際的に精力的に進行中である。そこで、我が国においても、このようなダイオキシンおよび内分泌系攪乱化学物質の実態把握と科学的根拠に基づいた対応が必要である。その為に米国の研究機関におけるこれらに対するの研究状況を調査し、この課題に携わっている研究者と直接意見交換を行い、もって今後の研究の展開の基盤となす。

B. 研究方法

1) 試験管内内分泌障害性試験法に関する情報収集：イーストや培養細胞を用いた、核内受容体・受容体応答配列、及びレポーター遺

伝子を用いた系に関する分子生物学的情報を収集する。

2) 実験動物を用いた内分泌障害性試験系に関する情報収集：卵巣摘出動物、卵巣機能開始前の幼若動物を用いた試験法、など、高感度な実験法に関する情報の収集。

3) 高次系に対する影響に関する情報収集：神経系、内分泌および内分泌系といった、高次性機能に対する影響の解析に関する情報の収集。

C. 研究結果及び考察

内分泌障害性物質（EDCs）及びダイオキシン類に関する米国における研究進展状況の調査をし最新情報を得ること、かつ研究に関する意見・情報交換を行うことを目的とした。特に、地下水系汚染の問題についての会見と討論、放射線白血病の発症要因にかかる実験データ・ギャップに関する会見と討論、内分泌かく乱化学物質についての日米協議の樹立と、そこでのミシガン州立大学(MSU)の役割の発揮と、その下での国立食品安全性トキシコロジーセンター(NFSTC)と国立医薬品食品衛生研究所(NIHS)の共同研究交流の推進について、ミシガン州立大学における農学・食品化学・

農業関連研究、国立食品安全性トキシコロジーセンター(NFSTC)の設立、NFSTCの国際的貢献の為の提言、MSUとしてWHO/IPCS会議をサポートする方針の了承、日米定期協議-研究交流と共同研究をMSUとNIHSがhostとなることのrationalについて、内分泌かく乱化学物質に関するTrosko博士の研究計画、GJIC(Gap Junctional Intercellular Communication)に関するTrosko labとCMTD/NIHSの共同研究に関する討論、GJICの研究に関する日米(韓)の共同研究、白血病誘発における標的細胞として造血幹細胞についての討論等を(井上研究協力者)、NCTRにおける3D-QSARは、CoMFAとPharmacophoreによる検討(前者は、3D空間に分子を配置する手作業をする化学者が必要。後者は、定性的判断のみ。Keponeがピックアップされた事にエキサイトしていた)、NIEHSにおけるエストロゲン受容体(ER) α および β ノックアウト(KO)マウスの研究について(ER α ・ β ダブル KO マウス作成し、少数を解剖。形質はER α KOに似る。ER β KOの組織は著変なしとのこと。ER α KOは卵巣に特徴的出血性濾胞形成、黄体形成欠如。子宮は低形成。膈上皮は、円柱上皮とreserve cell layerの2層のみ。DES Postnatal exposure 実験では無反応出会った)等(菅野研究協力者)の情報交換・研究交流を得た。同様に米国におけるこれらの取り組みに関する研究集会に参加し、成果の発表を行った。特に、米国がん学会主催の核内レセプターに関するシンポジウムに参加し、バイオセンサーを用いたエストロゲンレセプター機能解析及び内分泌かく乱化学物質の作用機序に関するこれまでの研究成果を発表した。またその後NIEHSおよびEPAなど内分泌攪乱化学物質に関する研究を行っている研究機関にて情報交換を行うとともに、今後の研究方針などについて討議を行った(小野、山本研究協力者)。

総括研究報告書

～ 研究課題「新しい日米科学技術に関する研究（毒性学）」 ～

主任研究者 黒川 雄二（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長）

研究協力者

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）
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）
小野 敦 （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 研究員）
山本 雅也 （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 研究員）

「毒性学研究」の研究事業の一環として、内分泌障害性物質（EDCs）及びダイオキシン類に関する米国における研究進展状況の調査をし最新情報を得ること、かつ研究に関する意見・情報交換を行うことを目的とした。

A. 研究目的

最近、野生動物の生殖機能低下に対する環境汚染物質の関与が指摘されており、その主要な作用機序として内分泌系の攪乱が考えられている。そして、このような事がヒトに対しても起こっているのではないかという危惧が広がっている。このような物質としては、意図的に環境中に放出される化学物質ばかりでなく、ダイオキシン類等非意図的汚染物質も含まれている。その作用機序の解明、それに基づく生物学的スクリーニング法の開発、ヒト及び環境へのリスク評価法等に関する研究が米国を初め国際的に精力的に進行中である。そこで、我が国においても、このようなダイオキシンおよび内分泌系攪乱化学物質の実態把握と科学的根拠に基づいた対応が必要である。その為に米国の研究機関におけるこれらに対するの研究状況を調査し、この課題に携わっている研究者と直接意見交換を行い、もって今後の研究の展開の基盤となす。

B. 研究方法

- 1) 試験管内内分泌障害性試験法に関する情報収集：イーストや培養細胞を用いた、核内受容体・受容体応答配列、及びレポーター遺伝子を用いた系に関する分子生物学的情報を収集する。
- 2) 実験動物を用いた内分泌障害性試験系に関する情報収集：卵巣摘出動物、卵巣機能開始前の幼若動物を

用いた試験法、など、高感度な実験法に関する情報の収集。

- 3) 高次系に対する影響に関する情報収集：神経系、内分泌および内分泌系といった、高次性機能に対する影響の解析に関する情報の収集。

C. 研究結果及び考察

井上研究協力者；

1. 米国ブルックヘブン国立研究所での討論
1. 地下水系汚染の問題についての会見と討論
①Safety & Environmental Protection DivisionのNaidu博士と放射性物質や化学物質によるground water地下水系の汚染の可能性について討論した。Long Island地域は地下水系が浅いために汚染が生じやすい。放射性物質による汚染の派生したBrookhavenでの経験を聞き、周辺住民への説明に用いたvideo filmの供与を受けた。（資料1）
2. 放射線白血病の発症要因にかかる実験データ・ギャップに関する会見と討論：Cronkite博士との討論の結果、次のような見解で合意に達した。
①放射線白血病の発症にかかる実験データの問題点の1つは、どの程度がいわゆる2段階発がんの見方を見たときのイニシエーション要因に相当し、どの程度がプロモーションに相当するかが明らかでないこと

である。第2点は、one shotの放射線照射がなぜ長期にわたりプロモーションとしての効果を促し続けるのかである。

②前者を解く鍵としては、AhRノックアウトマウスに対して放射線照射をイニシエーターとして与え、しかる後にBenzo[α]pyreneを投与するようなタイプの実験を行い、AhRノックアウトとWildのそれで生ずる違い（もし違いがあれば）は、その分がプロモーター成分に基づくものと考えられる（これは逆に放射線におけるイニシエーター成分が非常に小さいことを示すかもしれない）。

③後者については、繰り返し強調しているように、grossレベルでは、Cronkite & Carstenの仕事が重要である。彼らの結果によれば放射線照射後のマウス骨髄中の造血幹細胞の数は、長期にわたってずっと対照レベルまで回復をしないことがすでに知られている。これに対応して、幹細胞レベルでのcycling fractionが持続的に亢進状態になっていることがpromotion効果の役割をするというものである。何故100%レベルまで回復しないのか、についてはデータも乏しくよく分かっていない。この間、血液細胞には何れかのレベルで持続的に増殖抑制的な遺伝子発現状態が生じていることが考えられる。これまで照射後亢進する遺伝子の検索に主要な努力が傾けられてきたが、以上の意味では、照射後、幹細胞レベルでの細胞周期の亢進状態の如何のBUUV法での確認、また何れかの細胞周期関係遺伝子で抑制状態に陥っているものの存否の如何などが重要である（資料2）。

④尚、放射線白血病は、C57BL/6では、p53欠失マウスで、no accelerationだということであり、このことは、放射線のいわゆる発がんにおけるinitiation効果がC57BL/6では低いことを示唆している。このことは、解釈は単純ではないが、myc over-expressionでも放射線白血病のearly onsetが見られなかったことと合わせて考察する必要がある。併せて、connexinノックアウトマウスは、DENの投与で高頻度且つ早期の肝腫瘍が観察されるものであるが、この時DENの代わりに放射線を照射した場合むしろ放射線白血病が早期発症の形をとるかどうかの如何については、むしろ同じく前者の可能性は少ない。

II. 内分泌かく乱化学物質についての日米協議の樹立と、そこでのミシガン州立大学(MSU)の役割の発揮と、その下での国立食品安全性トキシコロジーセンタ

ー(NFSTC)と国立医薬品食品衛生研究所(NIHS)の共同研究交流の推進について（日米非エネルギー・黒川班/厚科研・井上班/科技庁振興費・森田班）：

1. ミシガン州立大学における農学・食品化学・農業関連研究（資料3）：MSUは、1855年の創立という歴史をもった、state-orientedの大学（州立大学）としては、全米で一番歴史の古い大学で、歴史的に農学を中心とした食品化学、農芸化学、農業関連研究の領域で世界的なexpertiseを発揮している総合大学である。

2. 国立食品安全性トキシコロジーセンター(NFSTC)の設立（資料4）：NFSTCは、1昨年(1997)にMSUのキャンパス内にUSDAのサポートで創立したが、その背景は、1.のような歴史的な位置付けに基づいている。（但し、NFSTCは、USDAによってサポートされている訳ではない。研究者個別のresearch fund.）。

3. 共同研究推進のための3レベル協議の推進（Robert J. Huggettとの討論）：

①Robert J. Huggett (Vice President for Research & Graduate Studies)は、EPAの諸部門でchairmanをつとめたstate manで、EDC研究の動きについてもある程度正確に把握していた。

②Huggettは、a) 国務省のTimothy WirthのレベルにMSUがEDC研究の基礎部門でのセンターとなることを希望している旨を伝達すること、日本のSTAへ定期協議の必要性を提示すること、b) CMAとJCIAの相互に対して、前者からは、MSUから後者にはNIHSから基礎研究の基金のreleaseを求めること、c) NFSTCとNIHSの相互研究を進めること、の重要性を強調した。併せて、Huggett自身、environmental chemistとして、この問題に強い関心をもっていることを標本を示しつつ、強調した。

③さらにa) CMAの会議にはJCIAから2?3名が出席していること、b) white paperをCMAからInoue宛に送ること、c) CMAのresearch fundは、CIITに流れるが、CIITは専門上すべてをカバーできず、全米の研究者にcompetitiveに非分散型で交付されているkと、などが、CMAとの交信によって判明した（補遺資料White Paper参照）。

4. NFSTCの国際的貢献の為の提言（Edward C. Mather, VDM, PhD, 副所長との討論）（資料5）：

①NFSTCがEDC問題で、国際的な役割を果たしたいと欲していることを強調。彼自身は、発生毒性学者としての立場からの関心を持っているが、それはさておいて、environmental chemicalsに対して生物影響の面から

の研究が乏しいことを強調、これにNFSTCとしての役割を果たしたいことを強調した。Inoueはこれに同意。
②その為の方策として、a) ポスト・ドクの相互交換、b) International conferenceの誘致の2つが効果的であるとの線で認識がline-upし、前者は、立場や見解の異なる研究体が研究をnegotiateしてゆくのに歴史を替える最も(遠いようで)近道の常套策であること(知らなかった!米国各州はこういう方針でpost-doc exchangeを相互にやっているのダ)、後者については、WHO/IPCSのEDC-working group meetingの誘致が可能ならば、手っ取り早い(これはInoueがsuggestして、Motherが受けて立った形)、どの方向となった。(予算は? : 40?50人の国際会議メンバーの渡航費と会議費をサポートするのは、ワケもないこと!とのこと。) c) そして何よりもNIHSの所長や安全性生物試験研究センター長の黒川博士との交流を望んでいることを強調。(また、食品化学部門、食品衛生部門、添加物部門などの研究者との交流を望んでいる→NIHS所長への伝達)。

5. MSUとしてWHO/IPCS会議をサポートする方針の了承(学長Peter McPhersonとの討論) :

① MSUのBoard of Trusteesは、住民の直接選挙で選ばれる、との事務局説明。学長のPeter McPhersonは、MSUの出身?のBank of Americaの副頭取を勤めたこともある人物で、MSUが州に対して責任を持つ立場を強調。

② 上記4. の②について、Peter McPhersonは大いに満足との立場から作業の推進を承認。(根回しなしの即決デシタ。BOAの副頭取であったキャリアーからか、経費見通しは早いという評判という。Inoueの名前も、Brookhaven以来の仕事のキャリアーなどもあらかじめ丸暗記した状態でのメモなしのたった15分程の会議でした)。

6. 日米定期協議-研究交流と共同研究をMSUとNIHSがhostとなることのrationalについて :

① 内分泌攪乱物質による障害発生の機構やそれらのエンドポイント設定基準についての研究の国際交流はまだない(多くはpracticalな試験法に関するものが主である。例えば、試験法について[OECD/EDTA]、Global Research Inventoryについて[WHO/IPCS]、工業界レベルでの研究White Papers[CMA & JCMA]など)(末尾の補追資料)。

② 基礎的部門に限局されるだけにexpertが乏しく、Research data gapを埋めるための国際協調が重要である。"Not to waste money"

③ MSUは、食品-農薬問題に力点を置いており、NIHSは、日本での食品のsafetyに力を置いている中心的研究機関であり、関係研究者も多く、呼びかけ機関として相応と考えられる。

④ こうした認識にたつて、すでにNIHSは、昨年11月にDr. Kanno (国立医薬品食品衛生研究所室長)をMSUに派遣し、両者で可能性の探索がすでに始まっている。

7. 内分泌かく乱化学物質に関するTrosko博士の研究計画(概念図) : これらの計画内容自体は、immatureであるが、検討のためのたたき台としては充分役割を果たすものである。

Examples: plasticizer, peroxisome-proliferator, PCB's, PBB's, DDT, etc.

a) All are non-genotoxic

b) They seem to have E-D activity at non-cytotoxic doses, and can even block apoptosis.

c) They induce signal transduction alter gene expression or post-transcription levels.

d) They all block cell-cell communication.

e) Do they all work through E2-receptor a or b

Questions: What system (in vivo or in vitro, stem cells or organoid systems) to be used to detect EDCs?

What molecular, bio-molecular biomarker or physiological marker, should be used?

Transgenic/ k.o., a model for humanized response.

III. GJIC (Gap-Junctional Intercellular Communication) に関するTrosko labとCMTD/NIHSの共同研究に関する討論(文部省・国際交流) :

1. GJICの研究に関する日米(also韓)の共同研究 : 日本の科学技術庁は、GJICの研究に関する日米(also韓)の共同研究に関するINOUE (Sai)のプロポーザルに対して、3年間にわたる渡航費を含む共同研究費を支給することを決めた(1999.4?2002.3)(資料6)。

2. Trosko研究室の概要 : Troskoは、代謝共同阻害現象の発見者として、この現象をGJICの研究へと発展させ、この研究領域のleading scientistとして活躍しており、主として上皮細胞におけるGJICのin vitroでの研究を主たる手法として研究を進めている(資料7)。

<http://www.phd.msu.edu/Trosko/home.html>
<http://www.phd.msu.edu/trosko/lectures/gjic/index.htm>
<http://www.phd.msu.edu/Trosko/lectures/home.html>
<http://www.phd.msu.edu/Trosko/assumption/stemcelltheory.pdf>

3. 本年度の方針 :

① Trosko-labは、1999.10にAnn Arbor, MIでGJICに関するInternational Symposiumを開催する。(資料8参照)。Website: www.msu.edu/~trosko/、およびプログラム(資料9)案。

② T. Inoueは、この中のEDCsに関するパネルディスカッションに出席するかもしれない。

③ T. Inoueは、この会議に少なくともKimie (佐井さん)を派遣する。

④ これと別に企画されているGJICに関するスイスmeetingはbasic。これに対して、Ann Arbor meetingは、toxicologic。

4. Pre-B cell Compact colonyでのGJICの存否について: Troskoの経験によれば、very primitive stem cellは、GJICを持たない。電顕的なerythroblastの所見などから見たわれわれのspeculationではstem cellにはGJICがあるべきと思われる。Troskoの観察との整合性を考えると、確かにvery primitive hemopoietic stem cellsは、泳ぐ性質がある。だから、その点で、「stem cellにGJICがない」こと自体は、正しいかもしれない。しかし、およそコロニーを形成するものについてはGJICは、あるのではないか。Troskoは、この考え方を最終的にagreeしたが、もちろん結果は、やってみなくてはわからない(資料10)。

5. GJICのprojectを有効に進めるためには、目的に沿って、効果的な年次計画をたてる(単なる研究者交流でなく)。

6. Melinda R. Wilsonの研究(1):

① Melinda Wilsonは、rat liver cell originのWB細胞にsrcをpolyoma virusによって導入した。

② Srcの導入によって細胞は、“neoplastic”となり、nude mouseにtumorを作るようになった。

③ このもののtelomerase activityを観察したところGJICはたしかに“shut down”、telomeraseはdown modulateしていて、説明の困難な状態にあった。(但

し細胞はdifferentiate していたが・・・。) (資料11-1, 2)

7. Melinda R. Wilsonの研究(2): Melinda Wilsonは、同じWB細胞で、rasのinducedしたGJICのdown modulationが、MAPKによって、phosphorylateする可能性を示した。この時connexin 43の蛋白は、正常controlに較べて、hypo-phosphorylateの状態にあった(資料11-3)。

III. Stem cell scienceとexperimental

leukemogenesisに関するTrosko labとCMTD/NIHSのpotential collaboration researchに関する討論(機構研究・幹細胞班、厚がん研・黒川班):

1. Trosko 研究室における幹細胞研究概要: Troskoは、Peterson研究所(マンチェスター, UK)の、Pottenとの気脈を通じたstem cell scientistであり、上皮細胞系におけるstem cell 研究を行っている。

2. Trosko研究室における幹細胞研究の成果: Trosko研究室におけるこの1年間のstem cell研究の最も大きな進展は、① Breast stem cellの一元論をほぼ実験的に確立したこと(by C.C.C.=Chia-Chen Chang, PhD)、② Pancreatic (islet) stem cellの培養に成功したこと(by ???)、③ human embryonal stem cellの培養と、このもののneuronへのMatri-gel?上での三次元organoid body形成に成功したこと(graduate student)、である。

① Breast stem cellの一元論について(この項、殆ど未発表なので、注意): C-C Changは、Breast stem cellsをType IとType IIにわけて研究してきた(これはCliftonと同じ)。Consequently, 彼はIからIIが生ずることを発見した。C-C Cは、これまで明らかになっているtype Iの性質とtype IIの性質をつかって、これらの以降を示したものである(資料12)。

② Pancreatic stem cellsについて: no discussion.

③ Neuronal stem cellsについて: 大学院生が成果をまとめ中(資料13)。

3. Human stem cellについてのadvantageとdisadvantage: 幹細胞研究には次のような二つのジレンマがあるが、その主要な側面は、後者にある(Troskoも基本的にはしかし時々これを了承)。

① 現在のmolecular biological な様々な研究の進展は、可能ならば、動物実験を迂回する手間が省けるという点で、これを排除する流れが少なくとも米国では強い。

② しかし、embryonic stem cells における pluripotencyの維持の保証や、hemopoietic long-term repopulating stem cells (致死線量照射したマウスの生存を維持する能力を持つ幹細胞)の維持に関する問題など、ヒトでは扱えない、しかし幹細胞研究に欠かせない種々の動物実験を必要とする背景もある。

4. 白血病誘発における標的細胞として造血幹細胞についての討論より：

Splenectomyによってstem cell kineticsは、変わるか？

Splenectomy は、leukemiaを減らす (R+Splex v.s. Splex + R → ask 吉田)

(菅野研究協力者)

1. NCTR: Estrogen Receptor に対する化合物の結合に関する3D-QSARの状況の視察及び意見交換

Dr. Sheehanのところで行われている3D-QSARは、CoMFAとPharmacophoreによる検討。前者は、2オングストロームの3次元格子点空間にリガンド分子を置き、格子点にプローブ原子核(通常炭素13)を置いたときのリガンドとの相互作用全ての格子点についてシミュレーション計算しリガンドの性質の数値化を行う。3D空間に分子を配置するところで、手作業が入り経験を有する化学者が必要。よって、こなせるスピードに限度があるので、別にプレスクリーニングが必要。後者は、モデル分子(estradiolとDES)の特徴的構造部位を3次元の球で代表させ、その配置と生物活性を連関させる。定性的判断のみ。Keponeがこれでピックアップされた事にエキサイトしているとのこと。これからは、非活性物質から得られた禁止sphere的な要素を加える段階。両方法とも我々が考える板井先生らの方法(ドッキングモデル)とは、考える順番が異なる。最終的には近いところまで行く可能性はある。彼らの拠り所としているのは、生物アッセイデータと、4化合物(DES, E2, Tamoxifen, raloxifen)のER ligand binding domainの結合したままの結晶回析データである。Herix 12がantagonistの結合時に90度方向が変わることも、ある程度条件に組み込んだとも言っていた。

2. NIEHS: (1)エストロジェン受容体 α および β ノックアウトマウスの研究の状況の視察及び意見交換、(2)遺伝子改変動物を用いた癌関連研究の意見交換

(1) ERKO / BERKO :

Dr. Ken Korach: ER α ・ β ダブルノックアウトマウス作成開始。ごく少数を解剖。形質はおおよそER α KOに似るとのコメント。とにかくviable。

Dr. Joel Mohler: BERKOの組織診断を担当。BERKOは著変なしとのこと。標本を直に検鏡した限りは、若干卵巣の黄体形成が少ないか？ ただし、動物数少なく、卵巣標本が正しく評価できる保証もなく、はっきりしない。文献的には、妊娠率がやや低い(同腹数が少ない傾向)。

(非公式ながらER α ・ β ダブルノックアウトマウスの卵巣を1つだけ見せられたとのこと。Ovotestisだったという。ただし、たったの一匹のみ。多の生殖器の状況については不明(標本を見せられていないとのこと))。

Dr. Darlin Dixon: ERKOの組織診断を担当。ERKOは、卵巣に特徴的出血性濾胞形成、Hemosiderine-laden macrophage集積、theca cellの相対的増加傾向を認める。卵細胞の核の消失が早期(卵胞成熟のごく初期から核が見えなくなる)ように感じられた。黄体形成欠如。卵胞内出血の原因は不明。形態学的には、毛細血管が卵胞に接して顕在化しており、卵胞の拡張(過拡張)によって出血が起こる可能性がある。子宮は、小さいが構成成分はすべて揃っている。すなわち、子宮腺の形成は起こる。上皮、腺の細胞はhypofunctionalに見えるがatresiaではない。膈上皮は、角化層なく、円柱上皮とreserve cell layerの2層からなる部分がほとんどである。ERKOにはDES 2 μ g/head/day s.c. Postnatal 1-5 day exposureを組み合わせたものが行われている。DESによる効果はERKOでは認められないという結論。慢性(持続性)エストロジェン投与実験は行っていない。

Dr. Retha Newbold: John Ashbyの問題行動(彼女に対するいわれない倫理的非難を行ったとされる)について少し話した。ERKOやBERKOの実験にも噛んでいる様子。NCTRでの5世代試験のスポンサー側の一人。彼女の昔の実験で、野生型動物での低用量DES暴露の影響が2世代後まで残るとの文献をもらう。vom Saalの結果に近いデータをもつ一人とされる。ERKOにはDES 2 μ g/head/day s.c. Postnatal 1-5 day exposureの実験で無影響との判断に対して、その後の持続的低濃度エストロジェン暴露が必要ではないか、との問いに対しては、そのような実験はそのうち行われるであろうとのコメント。

(2) 遺伝子改変動物を用いた癌関連研究

Dr. Bob Maronpot: NIEHSでは前立腺を標的のひとつとして、SV40LTをTgしたマウスで検討中。過去の前立腺ラット腫瘍とされているもの(cf. Boorman et al. F344 rat book)の多くは過形成性あるいは炎症性変化(前立腺炎)。

(小野研究協力者)

1、核内レセプターシンポジウムの概要:

エストロゲンを始めとしたホルモンは、特異的核内レセプターに結合して転写因子として機能する。本シンポジウムでは、核内レセプターの一連の作用過程における個々の化合物の結合による立体構造変化やそれに続くDNAへの結合および補因子との結合といった作用メカニズムについての最新の知見を中心とした講演、発表および討議が行われた。内分泌攪乱物質の多くはホルモンレセプターを介して作用を惹起すると想定されているものの、そのメカニズムには未解明の部分が多く、これらの知見は毒性部における今後の研究方針を決定する上で非常に重要である。また毒性部で推進する関連研究について発表を行い、それについて論議および情報交換を行った。

2、NIEHS, EPA および CIIT 訪問および内分泌攪乱物質(EDS) に関する討議

NIEHSにおいては、Dr. Michael D. ShelbyとEDSのアッセイ系についての意見交換を行った。現段階では、アッセイ系ごとにデータが異なりこれがベストといえる系はないこと、メカニズムにそくした別の系が必要なのではないかという意見で一致した。また Dr. Masahiko Negishiは、ステロイド代謝についての研究を行っており、一部の化合物ではレセプターそのものでなくそうしたステロイド代謝に影響を与えることで内分泌攪乱作用をするのではないかという意見を得た。Dr. Kenneth Korachの研究室ではエストロゲンレセプターのノックアウトマウスを用いた研究について意見交換を行った。これらを用いた検討は内分泌攪乱物質の生体内でのターゲットおよび作用メカニズムの解明に有用である。

EPAにおいて、Dr. Ralph Cooperの研究室ではEDSについて動物実験を中心に広範な研究を行っており、同研究室スタッフとの議論により、動物試験による実際の作用についての研究と平行した形でそのメカニズムの解明に向けた研究が必要であるとの結論を得た。また、その際の方針などについても意見交換を行った。

CIITでは、Dr. Paul Fosterの研究室を訪問した。一部の化合物が胎生期のごく一時期に暴露されることにより雄新生児の生殖能に影響を与える機構の研究について議論を行った。メカニズムについては、まだ未解明であるとのことであった。また、EDSの生体への影響を探るためマイクロアレイ(DNAチップ)の応用について検討を行っているとの事であった。この技術はEDSの研究だけでなく多くの毒性研究にも応用が可能であり興味深いものであった。

(山本研究協力者)

アメリカ癌学会『核内レセプタースーパーファミリーシンポジウム』は、参加者は約220名で、講演はすべて招待演者による最新の研究で、その数は34であった。また、一般演題はすべてポスター発表で、その数は88であった。

特に注目したものは、Dr. Jan-Ake GustafssonとDr. Kenneth Korachによるestrogen receptor?(ER?)のノックアウトマウスに関する報告で、ER^{-/-}の雌マウスは生殖能力はあるが、野生型に比べ子供数の減少と大きさの低下が認められた。また、ER^{-/-}の雄マウスが、若年では異常は認められなかったが、歳をとると、前立腺と嚢の過形成がみられた。他には、転写の共役因子の機能解析とレセプター・リガンドの立体構造解析について詳しい研究が多数発表され、この分野での研究の進展の速さを知ることができた。

また、我々の研究分野である内分泌かく乱化学物質については、興味は持たれているがそれを中心とした機能のメカニズムの解析を意図した研究はまだほとんどなく、我々の研究の重要性を認識した。

その後、リサーチトライアングルパーク[NC]にあるNIEHS、EPA、CIITを訪問した。(NIEHS)

Dr. StokesからNIEHS施設の説明を受け、Dr. Michael D. Shelby (Office of International Programs)から、NIEHS組織全体の目的、役割等全般的な説明を受けた後、個別に各研究者と討論した。Dr. Michael D. Shelby (Laboratory of Toxicology)とは、内分泌かく乱化学物質のスクリーニングについての討論した。Dr. Masahiko Negishi (Laboratory of Reproductive & Developmental Toxicology)と、エストロジェンの硫酸化とそれに関わる酵素であるヘパリン硫酸N-デアセチラーゼ/N-スルフォターゼ1の立体構造に関する研究と、オフアンレセプ

ターCARとレチノイドXレセプターの相互作用に関する研究について説明をうけた。Ms. Retha A. Newbold とは内分泌かく乱化学物質の中でもジエチルスチルベストロールの世代をこえた影響について議論した。Dr. Kenneth Korach (Laboratory of Reproductive and Developmental Toxicology)とは、(ER?)のノックアウトマウスについて説明を受け、エストロゲンレセプター????以外のレセプターの可能性について討論した。(EPA)

Dr. Ralph Cooperとそのスタッフと、内分泌かく乱化学物質に関するEPAとしての取り組みとスクリーニング法などについて説明を受けた。また、内分泌かく乱化学物質と甲状腺ホルモンに関する研究などについて討論した。(CIIT)

Dr. Paul Fosterより、男性生殖器における化学物質の作用として、Di(*n*-butyl)phthalateに関する研究の説明を受けた。また酵母を用いたエストロゲン様作用物質検出のための実験系について討論した。

今回の各研究機関の個別の研究室訪問は、内分泌かく乱化学物質に関する取り組みの方針をじかに知ることができ、大変有意義であった。また、今後の共同研究等などを行う際に、迅速かつ円滑にことを運ぶことが可能となり、極めて意義の高いものと考ええる。

分担研究報告書

～ 研究課題「新しい日米科学技術に関する研究（毒性学）」 ～

研究協力者

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）

要約

地下水系汚染の問題についての会見と討論、放射線白血病の発症要因にかかる実験データ・ギャップに関する会見と討論、内分泌かく乱化学物質についての日米協議の樹立と、そこでのミシガン州立大学(MSU)の役割の発揮と、その下での国立食品安全性トキシコロジーセンター(NFSTC)と国立医薬品食品衛生研究所(NIHS)の共同研究交流の推進について、ミシガン州立大学における農学・食品化学・農業関連研究、国立食品安全性トキシコロジーセンター(NFSTC)の設立、NFSTCの国際的貢献の為の提言、MSUとしてWHO/IPCS会議をサポートする方針の了承、日米定期協議-研究交流と共同研究をMSUとNIHSがhostとなることのrationalについて、内分泌かく乱化学物質に関するTrosko博士の研究計画、GJIC (Gap-Junctional Intercellular Communication) に関するTrosko labとCMTD/NIHSの共同研究に関する討論、GJICの研究に関する日米 (also 韓) の共同研究、白血病誘発における標的細胞として造血幹細胞についての討論等を行った。

研究目的；

米国ブルックヘブン国立研究所での討論、放射線白血病の発症要因にかかる実験データ・ギャップに関する会見と討論、内分泌かく乱化学物質についての日米協議の樹立など

研究期間；平成11年3月12日、13日

米国ニューヨーク州ブルックヘブン国立研究所

平成11年3月14日、16日（資料0th：英文報告）

ミシガン州 East Lansing

ミシガン州立大学附属国立食品安全性トキシコロジーセンター

訪問者：米国ブルックヘブン国立研究所

Eugene P. Cronkite, MD, PhD, Chairman Emeritus

Jan Naidu, MD, PhD, Senior Scientist

ミシガン州立大学附属国立食品安全性トキシコロジーセンター

James E. Trosko, PhD, Professor

研究成果及び考察；

会見内容：（応対者のアドレスは、資料4参照）

1. 米国ブルックヘブン国立研究所での討論

地下水系汚染の問題についての会見と討論

①Safety & Environmental Protection DivisionのNaidu博士と放射性物質や化学物質によるground water地下水系の汚染の可能性について討論した。Long Island地域は地下水系が浅いた

めに汚染が生じやすい。放射性物質による汚染の派生した Brookhaven での経験を聞き、周辺住民への説明に用いた video film の供与を受けた。(資料 1)

2. 放射線白血病の発症要因にかかる実験データ・ギャップに関する会見と討論：

Cronkite 博士との討論の結果、次のような見解で合意に達した。

①放射線白血病の発症にかかる実験データの問題点の 1 つは、どの程度がいわゆる 2 段階発がんの見方で見たときのイニシエーション要因に相当し、どの程度がプロモーションに相当するかが明らかでないことである。第 2 点は、one shot の放射線照射がなぜ長期にわたりプロモーションとしての効果を促し続けるのかである。

②前者を解く鍵としては、AhR ノックアウトマウスに対して放射線照射をイニシエーターとして与え、しかる後に Benzo[α]pyrene を投与するようなタイプの実験を行い、AhR ノックアウトと Wild のそれで生ずる違い（もし違いがあれば）は、その分がプロモーター成分に基づくものと考えられる（これは逆に放射線におけるイニシエーター成分が非常に小さいことを示すかもしれない）。

③後者については、繰り返し強調しているように、gross レベルでは、Cronkite & Carsten の仕事が重要である。彼らの結果によれば放射線照射後のマウス骨髄中の造血幹細胞の数は、長期にわたってずっと対照レベルまで回復をしないことがすでに知られている。これに対応して、幹細胞レベルでの cycling fraction が持続的に亢進状態になっていることが promotion 効果の役割をするというものである。何故 100% レベルまで回復しないのか、についてはデータも乏しくよく分かっていない。この間、血液細胞には何れかのレベルで持続的に増殖抑制的な遺伝子発現状態が生じていることが考えられる。これまで照射後亢進する遺伝子の検索に主要な努力が傾けられてきたが、以上の意味では、照射後、幹細胞レベルでの細胞周期の亢進状態の如何の BUUV 法での確認、また何れかの細胞周期関係遺伝子で抑制状態に陥っているものの存否の如何などが重要である（資料 2）。

④尚、放射線白血病は、C57BL/6 では、p53 欠失マウスで、no acceleration だということであり、このことは、放射線のいわゆる発がんにおける initiation 効果が C57BL/6 では低いことを示唆している。このことは、解釈は単純ではないが、myc over-expression でも放射線白血病の early onset が見られなかったことと合わせて考察する必要がある。併せて、connexin ノックアウトマウスは、DEN の投与で高頻度且つ早期の肝腫瘍が観察されるものであるが、この時 DEN の代わりに放射線を照射した場合むしろ放射線白血病が早期発症の形をとるかどうかの如何については、むしろ同じく前者の可能性は少ない。

II. 内分泌かく乱化学物質についての日米協議の樹立と、そこでのミシガン州立大学(MSU)の役割の発揮と、その下での国立食品安全性トキシコロジーセンター(NFSTC)と国立医薬品食品衛生研究所(NIHS)の共同研究交流の推進について（日米非エネルギー・黒川班/厚科研・井上班/科技庁振興費・森田班）：

1. ミシガン州立大学における農学・食品化学・農薬関連研究（資料 3）：

MSU は、1855 年の創立という歴史をもった、state-oriented の大学（州立大学）としては、全米で一番歴史の古い大学で、歴史的に農学を中心とした食品化学、農芸化学、農薬関連研究の領域で世界的な expertise を発揮している総合大学である。

1. 国立食品安全性トキシコロジーセンター(NFSTC)の設立（資料 4）：

NFSTC は、1 昨年(1997)に MSU のキャンパス内に USDA のサポートで創立したが、その背景は、1. のような歴史的な位置付けに基づいている。（但し、NFSTC は、USDA によってサポートされている訳ではない。研究者個別の research fund. ）。

2. 共同研究推進のための 3 レベル協議の推進（Robert J. Huggett との討論）：

①Robert J. Huggett (Vice President for Research & Graduate Studies)は、EPA の諸部門で chairman をつとめた state man で、EDC 研究の動きについてもある程度正確に把握していた。

②Huggett は、a) 国務省の Timothy Wirth のレベルに MSU が EDC 研究の基礎部門でのセンターとなることを希望している旨を伝達すること、日本の STA へ定期協議の必要性を提示すること、b) CMA と JCIA の相互に対して、前者からは、MSU から後者には NIHS から基礎研究の基金の release を求めること、c) NFSTC と NIHS の相互研究を進めること、の重要性を強調した。併せて、Huggett 自身、environmental chemist として、この問題に強い関心をもって、この問題を標本を示しつつ、強調した。

③さらに a) CMA の会議には JCIA から 2, 3 名が出席していること、b) white paper を CMA から Inoue 宛に送ること、c) CMA の research fund は、CIIT に流れるが、CIIT は専門上すべてをカバーできず、全米の研究者に competitive に非分散型で交付されていること、などが、CMA との交信によって判明した（補追資料 White Paper 参照）。

3. NFSTC の国際的貢献の為の提言 (Edward C. Mather, VDM, PhD, 副所長との討論) (資料 5) :

① NFSTC が EDC 問題で、国際的な役割を果たしたいと欲していることを強調。彼自身は、発生毒性学者としての立場からの関心を持っているが、それはさておいて、environmental chemicals に対して生物影響の面からの研究が乏しいことを強調、これに NFSTC としての役割を果たしたいことを強調した。Inoue はこれに同意。

② その為の方策として、a) ポスト・ドクの相互交換、b) International conference の誘致の 2 つが効果的であるとの線で認識が line-up し、前者は、立場や見解の異なる研究体が研究を negotiate してゆくのに歴史を替える最も（遠いようで）近道の常套策であること（知らなかった！米国各州はこういう方針で post-doc exchange を相互にやっているのダ）、後者については、WHO/IPCS の EDC-working group meeting の誘致が可能ならば、手っ取り早い（これは Inoue が suggest して、Mother が受けて立った形）、どの方向となった。（予算は？：40, 50 人の国際会議メンバーの渡航費と会議費をサポートするのは、ワケもないこと！とのこと。）c) そして何よりも NIHS の所長や安全性生物試験研究センター長の黒川博士との交流を望んでいることを強調。（また、食品化学部門、食品衛生部門、添加物部門などの研究者との交流を望んでいる→NIHS 所長への伝達）。

4. MSU として WHO/IPCS 会議をサポートする方針の了承 (学長 Peter McPherson との討論) :

① MSU の Board of Trustees は、住民の直接選挙で選ばれる、との事務局説明。学長の Peter McPherson は、MSU の出身？の Bank of America の副頭取を勤めたこともある人物で、MSU が州に対して責任を持つ立場を強調。

② 上記 4. の②について、Peter McPherson は大いに満足との立場から作業の推進を承認。（根回しなしの即決デシタ。BOA の副頭取であったキャリアーからか、経費見通しは早いという評判という。Inoue の名前も、Brookhaven 以来の仕事のキャリアーなどもあらかじめ丸暗記した状態でのメモなしのたった 15 分程の会議でした）。

5. 日米定期協議—研究交流と共同研究を MSU と NIHS が host となることの rational について :

① 内分泌攪乱物質による障害発生の機構やそれらのエンドポイント設定基準についての研究の国際交流はまだない（多くは practical な試験法に関するものが主である。例えば、試験法について [OECD/EDTA]、Global Research Inventory について [WHO/IPCS]、工業界レベルでの研究 White Papers [CMA & JCMA] など）（末尾の補追資料）。

② 基礎的部門に限局されるだけに expert が乏しく、Research data gap を埋めるための国際協力が重要である。“Not to waste money”

③ MSU は、食品—農業問題に力点を入れており、NIHS は、日本での食品の safety に力を置いている中心的研究機関であり、関係研究者も多く、呼びかけ機関として相応と考えられる。

④ こうした認識にたつて、すでに NIHS は、昨年 11 月に Dr. Kanno (国立医薬品食品衛生研究所室長) を MSU に派遣し、両者で可能性の探索がすでに始まっている。

6. 内分泌かく乱化学物質に関する Trosko 博士の研究計画 :

Examples: plasticizer, peroxisome-proliferator, PCB's, PBB's, DDT, etc.

a) All are non-genotoxic

b) They seem to have E-D activity at non-cytotoxic doses, and can even block apoptosis.

c) They induce signal transduction alter gene expression or post-transcription levels.

d) They all block cell-cell communication.

e) Do they all work through E2-receptor a or b

Questions: What system (in vivo or in vitro, stem cells or organoid systems) to be used to detect EDCs?

What molecular, bio-molecular biomarker or physiological marker, should be used? Transgenic/ k.o., a model for humanized response.

III. GJIC (Gap-Junctional Intercellular Communication) に関する Trosko lab と CMTD/NIHS の共同研究に関する討論 (文部省・国際交流) :

1. GJIC の研究に関する日米 (also 韓) の共同研究 :

日本の科学技術庁は、GJIC の研究に関する日米 (also 韓) の共同研究に関する INOUE (Sai) のプロポーザルに対して、3年間にわたる渡航費を含む共同研究費を支給することを決めた (1999.4 . 2002.3) (資料 6)。

2. Trosko 研究室の概要 :

Trosko は、代謝共同阻害現象の発見者として、この現象を GJIC の研究へと発展させ、この研究領域の leading scientist として活躍しており、主として上皮細胞における GJIC の in vitro での研究を主たる手法として研究を進めている (資料 7)。

<http://www.phd.msu.edu/Trosko/home.html>

<http://www.phd.msu.edu/trosko/lectures/gjic/index.htm>

<http://www.phd.msu.edu/Trosko/lectures/home.html>

<http://www.phd.msu.edu/Trosko/assumption/stemcelltheory.pdf>

3. 本年度の方針 :

① Trosko-lab は、1999.10 に Ann Arbor, MI で GJIC に関する International Symposium を開催する。(資料 8 参照)。Website: www.msu.edu/~trosko/、およびプログラム (資料 9) 案。

② T. Inoue は、この中の EDCs に関するパネルディスカッションに出席するかもしれない。

③ T. Inoue は、この会議に少なくとも Kimie (佐井さん) を派遣する。

④ これと別に企画されている GJIC に関するスイス meeting は basic。これに対して、Ann Arbor meeting は、toxicologic。

4. Pre-B cell Compact colony での GJIC の存否について :

Trosko の経験によれば、very primitive stem cell は、GJIC を持たない。電顕的な erythroblast の所見などから見たわれわれの speculation では stem cell には GJIC があるべきと思われる。Trosko の観察との整合性を考えると、確かに very primitive hemopoietic stem cells は、泳ぐ性質がある。だから、その点で、「stem cell に GJIC がない」こと自体は、正しいかもしれない。しかし、およそコロニーを形成するものについては GJIC は、あるのではないか。Trosko は、この考え方を最終的に agree したが、もちろん結果は、やってみなくてはわからない (資料 10)。

5. GJIC の project を有効に進めるためには、目的に沿って、効果的な年次計画をたてる (単なる研究者交流でなく)。

6. Melinda R. Wilson の研究 (1) :

① Melinda Wilson は、rat liver cell origin の WB 細胞に src を polyoma virus によって導入した。

② Src の導入によって細胞は、“neoplastic” となり、nude mouse に tumor を作るようになった。

③ このものの telomerase activity を観察したところ GJIC はたしかに “shut down”、telomerase は down modulate していて、説明の困難な状態にあった。(但し細胞は differentiate していたが・・・) (資料 11-1, 2)

7. Melinda R. Wilson の研究 (2) :

Melinda Wilson は、同じ WB 細胞で、ras の induced した GJIC の down modulation が、MAPK によって、phosphorylate する可能性を示した。この時 connexin 43 の蛋白は、正常 control に較べて、hypo-phosphorylate の状態にあった (資料 11-3)。

IV. Stem cell science と experimental leukemogenesis に関する Trosko lab と CMTD/NIHS

の potential collaboration research に関する討論 (機構研究・幹細胞班、厚がん研・黒川班) :

1. Trosko 研究室における幹細胞研究概要 :

Trosko は、Peterson 研究所 (マンチェスター, UK) の、Potten との気脈を通じた stem cell scientist であり、上皮細胞系における stem cell 研究を行っている。

2. Trosko 研究室における幹細胞研究の成果 :

Trosko 研究室におけるこの 1 年間の stem cell 研究の最も大きな進展は、① Breast stem cell の一元論をほぼ実験的に確立したこと (by C.C.C.=Chia-Chen Chang, PhD)、② Pancreatic (islet) stem cell の培養に成功したこと (by ???)、③ human embryonal stem cell の培養と、このものの neuron への Matri-gel® 上での三次元 organoid body 形成に成功したこと (graduate student)、である。

① Breast stem cell の一元論について (この項、殆ど未発表なので、注意) : C-C Chang は、Breast stem cells を Type I と Type II にわけて研究してきた (これは Clifton と同じ)。Consequently, 彼は I から II が生ずることを発見した。C-C は、これまで明らかになっている type I の性質と type II の性質をつかって、これらの以降を示したものである (資料 12)。

② Pancreatic stem cells について : no discussion.

③ Neuronal stem cells について : 大学院生が成果をまとめ中 (資料 13)。

3. Human stem cell についての advantage と disadvantage :

幹細胞研究には次のような二つのジレンマがあるが、その主要な側面は、後者にある (Trosko も基本的にはしかし少々これを了承)。

① 現在の molecular biological な様々な研究の進展は、可能ならば、動物実験を迂回する手間が省けるという点で、これを排除する流れが少なくとも米国では強い。

② しかし、embryonic stem cells における pluripotency の維持の保証や、hemopoietic long-term repopulating stem cells (致死線量照射したマウスの生存を維持する能力を持つ幹細胞) の維持に関する問題など、ヒトでは扱えない、しかし幹細胞研究に欠かせない種々の動物実験を必要とする背景もある。

4. 白血病誘発における標的細胞として造血幹細胞についての討論より :

Splenectomy によって stem cell kinetics は、変わるか?

Splenectomy は、leukemia を減らす (R+Splex v.s. Splex + R → ask 吉田)

5. その他

1. Trosko に門馬論文を送る。

2. Threshold issue について。

Threshold issue における strain difference の問題について。(資料 14)

MNU の P53 K.O. マウスにおける Stem cell survival curve を見ること。

尚、比較ケミカルとして、Upham paper を参照。(資料 15)

3. Clotho の aging について :

① aging marker としての β -galactosidase が働くか否か : reference あり。(資料 16)

② Vitamin D3 treatment が抗加齢効果を持つか、そのときの aging marker としての β -galactosidase の発現は?

補) 同じく、早期老化マウス SAM における、aging marker としての β -galactosidase の発現について検索することについて。

4. 放射線とくに α particle で照射すると、照射を受けなかった周辺の細胞でも、照射を受けた細胞

における p53 や p21^{Waf-1} の expression が modify されることが分かっている。Biological reaction としての諸変化に注目！。(資料 17)

5. 日本環境庁の 12 月の国際シンポジウムに向けての invitees の提案について。(資料 18)

平成10年度 厚生科学研究「特別研究事業」

分担研究報告書

～ 研究課題「新しい日米科学技術に関する研究（毒性学）」 ～

研究協力者

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）

研究目的；

1. NCTR: Estrogen Receptor に対する化合物の結合に関する 3D-QSAR の状況の視察及び意見交換
2. NIEHS: (1)エストロジェン受容体 α および β ノックアウトマウスの研究の状況の視察及び意見交換、(2)遺伝子改変動物を用いた癌関連研究の意見交換

研究期間；1999年3月22日、3月31日

訪問先：

1. 米国アーカンソー州・国立毒性研究センター (NCTR: National Center for Toxicological Research, FDA) c/o Dr. Daniel Sheehan
2. 米国ノースカロライナ州・国立環境衛生研究所 (NIEHS: National Institute of Environmental Health Sciences, NIH) c/o Dr. Robert Maronpot

研究成果及び考察；

1. NCTR: Estrogen Receptor に対する化合物の結合に関する 3D-QSAR の状況の視察及び意見交換

Dr. Sheehan のところで行われている 3D-QSAR は、CoMFA と Pharmacophore による検討。前者は、2 オングストロームの 3 次元格子点空間にリガンド分子を置き、格子点にブローブ原子核（通常炭素 13）を置いたときのリガンドとの相互作用全ての格子点についてシミュレーション計算しリガンドの性質の数値化を行う。3D 空間に分子を配置するところで、手作業が入り経験を有する化学者が必要。よって、こなせるスピードに限度があるので、別にプレスクリーニングが必要。後者は、モデル分子(estradiol と DES)の特徴的構造部位を 3 次元の球で代表させ、その配置と生物活性を連関させる。定性的判断のみ。Kepone がこれでピックアップされた事にエキサイトしているとのこと。これからは、非活性物質から得られた禁止 sphere 的な要素を加える段階。両方法とも我々が考える板井先生らの方法（ドッキングモデル）とは、考える順番が異なる。最終的には近いところ

まで行く可能性はある。彼らの拠り所としているのは、生物アッセイデータと、4化合物 (DES, E2, Tamoxifen, raloxifen) の ER ligand binding domain の結合したままの結晶回析データである。Herix 12 が antagonist の結合時に 90 度方向が変わることも、ある程度条件に組み込んだとも言っていた。

2. NIEHS: (1) エストロジェン受容体 α および β ノックアウトマウスの研究の状況の視察及び意見交換、(2) 遺伝子改変動物を用いた癌関連研究の意見交換

(1) ERKO / BERKO

Dr. Ken Korach: ER α ・ β ダブルノックアウトマウス作成開始。ごく少数を解剖。形質はおおよそ ER α KO に似るとのコメント。とにかく viable。

Dr. Joel Mohler: BERKO の組織診断を担当。BERKO は著変なしとのこと。標本を直に検鏡した限りは、若干卵巣の黄体形成が少ないか？ ただし、動物数少なく、卵巣標本が正しく評価できる保証もなく、はっきりしない。文献的には、妊娠率がやや低い (同腹数が少ない傾向)。

(非公式ながら ER α ・ β ダブルノックアウトマウスの卵巣を1つだけ見せられたとのこと。Ovotestis だったという。ただし、たったの一匹のみ。多の生殖器の状況については不明 (標本を見せられていないとのこと))。

Dr. Darlin Dixon: ERKO の組織診断を担当。ERKO は、卵巣に特徴的出血性濾胞形成、Hemosiderine-laden macrophage 集積、theca cell の相対的増加傾向を認める。卵細胞の核の消失が早期 (卵胞成熟のごく初期から核が見えなくなる) ように感じられた。黄体形成欠如。卵胞内出血の原因は不明。形態学的には、毛細血管が卵胞に接して顕在化しており、卵胞の拡張 (過拡張) によって出血が起こる可能性がある。子宮は、小さいが構成成分はすべて揃っている。すなわち、子宮腺の形成は起こる。上皮、腺の細胞は hypofunctional に見えるが atresia ではない。膈上皮は、角化層なく、円柱上皮と reserve cell layer の2層からなる部分がほとんどである。ERKO には DES 2 μ g/head/day s.c. Postnatal 1-5 day exposure を組み合わせたものが行われている。DES による効果は ERKO では認められないという結論。慢性 (持続性) エストロジェン投与実験は行っていない。

Dr. Retha Newbold:

John Ashby の問題行動 (彼女に対するいわれのない倫理的非難を行ったとされる) について少し話した。ERKO や BERKO の実験にも噛んでいる様子。NCTR での5世代試験のスポンサー側の一人。彼女の昔の実験で、野生型動物での低用量 DES 暴露の影響が2世代後まで残るとの文献をもらう。vom Saal の結果に近いデータをもつ一人とされる。

ERKO には DES 2 μ g/head/day s.c. Postnatal 1-5 day exposure の実験で無影響との判断に対して、その後の持続的低濃度エストロジェン暴露が必要ではないか、との問いに対

しては、そのような実験はそのうち行われるであろうとのコメント。

(2) Bob Maronpot: NIEHS では前立腺を標的のひとつとして、SV40LT をを Tg したマウスで検討中。過去の前立腺ラット腫瘍とされているもの (cf. Boorman et al. F344 rat book) の多くは過形成性あるいは炎症性変化 (前立腺炎) 。

平成10年度 厚生科学研究「特別研究事業」

分担研究報告書

～ 研究課題「新しい日米科学技術に関する研究（毒性学）」 ～

研究協力者

小野 敦 （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 研究員）

研究目的：

米国がん学会主催の核内レセプターに関するシンポジウムに参加し、バイオセンサーを用いたエストロゲンレセプター機能解析に関するこれまでの研究成果を発表した。またその後 NIEHS および EPA など内分泌攪乱化学物質に関する研究を行っている研究機関にて情報交換を行うとともに、今後の研究方針などについて討議を行った。

研究期間； 平成10年1月7日（金） . 17日（月）

訪問先；米国（インディアンウェルズおよびローリーダラム）

研究成果及び考察；

1、核内レセプターシンポジウムの概要：

エストロゲンを始めとしたホルモンは、特異的核内レセプターに結合して転写因子として機能する。本シンポジウムでは、核内レセプターの一連の作用過程における個々の化合物の結合による立体構造変化やそれに続く DNA への結合および補因子との結合といった作用メカニズムについての最新の知見を中心とした講演、発表および討議が行われた。内分泌攪乱物質の多くはホルモンレセプターを介して作用を惹起すると想定されているものの、そのメカニズムには未解明の部分が多く、これらの知見は毒性部における今後の研究方針を決定する上で非常に重要である。また毒性部で推進する関連研究について発表を行い、それについて論議および情報交換を行った。

2、NIEHS, EPA および CIIT 訪問および内分泌攪乱物質（EDS）研究に関する討議

NIEHS においては、Dr. Michael D. Shelby と EDS のアッセイ系についての意見交換を行った。現段階では、アッセイ系ごとにデータが異なりこれがベストといえる系はないこと、メカニズムにそくした別の系が必要なのではないかという意見で一致した。また Dr. Masahiko Negishi は、ステロイド代