

性が示唆されている (Ito, A., Fujimoto, N. and Okamoto, T.: Estrogen and carcinogenesis. J. Toxicol. Pathol. 8: 285-289. 1995)。しかし、その作用発現メカニズムについては必ずしも未だ明確にされていない。また、他の内分泌攪乱物質にこのような作用があるか否かはほとんど調べられていない。

最終屠殺時の甲状腺重量は第5群で有意に増加したが、第1から8群間に差はなかった。甲状腺における増殖性病変の発生頻度で腺癌の発生は5および6群で70%以上と高率に認められ、次いで2および3群で約50%、その他の群では25%以下であった。しかし、これら増殖性病変の個体あたりの発生個数ほどの群でも差は認められなかった。従って本実験系においては内分泌かく乱物質の甲状腺発がん促進作用は認められなかった。

今回用いた化学物質 EE、メトキシクロール、アトラジン、ビスフェノール A には甲状腺発がん促進作用は認められなかった。平成10年度の実験における第1群のDHPN+SDM+EE投与群では文献と異なる結果が得られた。これは、EEを皮下投与ではなく、混餌投与したことに起因するものと思われる。

E. 結論

本実験系においては内分泌かく乱物質の甲状腺発がん促進作用は認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Masao Hirose, Yasuko Takesada, Hikaru Tanaka, Seiko Tamano, Toshio Kato and Tomoyuki Shirai, Carcinogenicity of

antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model, Carcinogenesis, 19, 207-212, 1997

Masao Hirose, Yasumoto Mizuguchi, Makoto Yaono, Hikaru Tanaka, Tsuyoshi Yamaguchi, Tomoyuki Shirai, Effects of green tea catechins on the progression or late promotion stage of mammary gland carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats pretreated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, Cancer Letters, 112, 141-147, 1997

Masao Hirose, Tomoyuki Shirai, Mei-Sie Lee, Ching Y Wang, Charles M King, Carcinogenicity of the N-acyl derivatives of N-hydroxy-trans-4-aminostilbene in CD rats, Chemo-Biological Interactions 106, 123-132, 1997

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱物質等の文献情報に関する調査研究

分担研究者 長谷川隆一 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室

研究要旨：

環境中には内分泌かく乱物質であると疑われている化学物質が、数多く存在するといわれているが、その情報源に関する信頼性はほとんど確かめられていない状況にあると思われる。本年度は、内分泌かく乱作用を検出する各 in vitro および in vivo 試験法の有用性と欠点の整理及び、近年話題となっている物質のうち bisphenol A について、最新の文献等の情報を加えて内分泌かく乱作用に関する毒性評価を行った。

A. 研究目的

環境中には内分泌かく乱物質であると疑われている化学物質が、数多く存在するといわれているが、その情報源に関する信頼性はほとんど確かめられていない状況にあると思われる。その理由として、近年数多くの内分泌かく乱物質であることを示唆する報告がされているが、その実験方法はそれぞれの報告者によって様々な手法を用いたものであり、これらの様々な報告例を、しかも多種類の内分泌様作用に対する結果をもとに、内分泌かく乱物質という大きな定義枠の中で、総合的に評価あるいは分類することが現時点で困難なものであることがあげられる。さらに、内分泌かく乱物質であることを証明するための実験方法やその必要あるいは十分条件等に、研究者間でのコンセンサスが得られていないことは、問題を更に複雑なものにしている。しかし、評価の前段階に当たるコンセンサスの問題については、現在 OECD や IPCS などの国際機関や日米 EU 等のそれぞれの国の行政機関で、評価手法の統一のプロジェクトが進められており、近い将来には具体的な方策が打ち立てられると思われる。しかし、個々

の物質に対する評価はその後になり、環境中に数多く存在するといわれている物質に対する安全性の評価には更に時間が必要であると考えられる。

より科学的・客観的に個々の物質に対する内分泌かく乱作用を評価するには、上記プロジェクトが終了するのを待たなければならないが、現時点で大量に生産され、且つ、日常生活のうえで暴露される機会が多い化学物質については、緊急に評価することが必要であると考えられる。本研究ではこの目的のもと、近年、内分泌かく乱作用が問題となった化学物質のうち、特にプラスチックや樹脂の原料として使用されている物質を取り上げ、さらに、研究の緊急性観点から、ヒトへの健康影響に関わる情報に焦点を当て、各化学物質の内分泌かく乱作用に関する情報の信憑性を調査し、それらの物質の内分泌かく乱作用について評価することを目的とする。

B. 研究方法

一般的に、化学物質の安全性を評価するには、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、発がん性試験、生殖・発生毒性試験、変異原

性試験などの試験結果を用いて行うことになるが、内分泌かく乱作用については、必ずしもこれらの試験ですべてを検出できないと考えられる。そこで、内分泌かく乱作用を検出する様々な *in vitro* および *in vivo* 試験法が開発されてきている。また、これらの試験以外に作用メカニズムを解析した研究結果は、数多くの内分泌かく乱作用を疑われる物質を評価するうえで重要な位置を占めると考えられる。

まず最初に、内分泌かく乱作用を評価する上で、各試験法で得られる情報の限界を認識しておく必要がある。そこで本年度は、(I) 内分泌かく乱作用を検出する各 *in vitro* および *in vivo* 試験法の有用性と欠点を整理する。また、(II) 近年、話題となっている物質のうち今年度は、bisphenol A について、最新の文献等の情報を加え、情報整理を行うこととする。次年度は、フタル酸エステル類とアルキルフェノール類について、同様の情報整理を行い、最終年度では、これら 2 年間に行った物質のヒトに対する総合的な安全性評価を行うことを目標とする。この分野における研究の進歩は著しいものがあり、最終年度では更なる情報の追加と新たな試験方法を取り入れた総合判断が必要になるものと思われる。

C. 研究結果および考察

(I) 内分泌かく乱作用を検出する各 *in vitro* および *in vivo* 試験法の概要

生体内のホルモンは、細胞に存在するホルモン受容体を介してホルモン作用を発現することが、知られているが、内分泌かく乱作用を持つ物質もホルモン受容体を介して、増強あるいは抑制、あるいはその両方のホルモン様作用を引き起こして、内分泌系にかく乱作

用を引き起こすものと考えられている。さらに、内分泌かく乱作用の定義としては、生体内のホルモンの合成・代謝に影響を及ぼした結果、引き起こされる障害も含まれることになるが、微量な量で作用が発現する受容体を介した影響により注目が集まっている。この観点において、近年、エストロゲン作用などの性ホルモン受容体を介した作用の検出法が数多く開発されてきており、*in vitro* アッセイ系と *in vivo* アッセイ系に大きく分けられる。

I-a) *in vitro* アッセイ系

in vitro アッセイ系には、受容体結合試験と酵母および培養細胞を用いた試験がある。

受容体結合試験は、ホルモン受容体を細胞から、あるいは遺伝子工学的手法で調整し、その受容体と検索対象化学物質との親和性を検出する方法である。ホルモン作用を引き起こすにはまず、受容体への結合が必要であること前提に考えられた方法であり、理論的に系が単純であるため、数多くの化学物質をこなし、比較するには有用な系である。しかし、結合した後の作用様式は見えないため、アゴニストであるかアンタゴニストであるかは区別できない。

次に、酵母を用いた試験であるが、これは、ホルモン受容体遺伝子とその受容体を結合する領域を上流に持って発現が制御される遺伝子（レポーター遺伝子）を同時に導入した酵母に、化学物質を暴露し、誘導されるタンパク質や酵素活性を指標に、ホルモン様作用を検出する方法である。この方法は、前述した受容体結合試験に比べ、アゴニスト作用とアンタゴニスト作用が区別できる点で有用であるが、受容体による発現様式が単純なもので

あると同時に、遺伝子の発現調節が酵母内で行われるため、必ずしも、哺乳類やヒトのような高等動物の細胞内でも同様なことが起きていることを保証するものではない。また、近年、ホルモン受容体を含めた核内レセプターは相互にクロストークすることにより発現調節を行うことや、受容体以外の co-factor が発現調節に重要な役割を担っていることが明らかにされてきており、単純にアゴニスト作用とアンタゴニスト作用を区別することはできなくなっている。しかし、次に述べる培養細胞を用いた試験に比較すれば、細胞の取り扱い等が簡便であり、やはり、数多くの物質を検索するには有用な系であると考えられる。

培養細胞を用いた試験には大きく分けて 2 種類ある。一つは、前の酵母を用いた試験同様に、受容体遺伝子とレポーター遺伝子を細胞に導入し、化学物質に対するレポーター遺伝子産物を検出する方法である。この方法は、酵母とは違い高等動物由来の細胞を用いることにより、生体に近い反応が期待できるが、使用した細胞に内在する他の核内レセプターや co-factor による影響を無視できず、使用する細胞により異なった結果が得られることが想定される。もう一つは、ホルモンに依存して増殖するか、あるいは特定のタンパクを発現する性質を持つ細胞を使用して、ホルモン様作用を検出する方法である。この方法は、外来性の遺伝子を導入する方法に比べれば、さらに生体内での反応に近い作用を検出できると考えられる。しかし、これは、生体内での数あるホルモン作用の一部を検出しているに過ぎず、検索段階で偽陰性の物質をなくするためには、作用様式ごとの細胞を用意する必要があると考えられる。また、これまで述べ

た他の *in vitro* 試験法での前提条件である “すべてのホルモン作用は受容体を介したものである” という条件とは、完全には一致せず、現象的には生体に近いものであるが、作用機序を特定することが困難である考えられる。

以上が *in vitro* アッセイ系の概略であるが、すべての方法において、*in vitro* アッセイは、*in vivo* に比べ短期間に多くの物質を検討することはできるが、化学物質の代謝、体内分布などの要素を含んでいないことは、考慮しておく必要がある。

I-b) *in vivo* アッセイ系

in vivo アッセイ系には、子宮への影響に関する試験、雄性生殖器官への影響に関する試験、生殖・発生毒性試験などがある。

子宮への影響に関する試験 (Uterotrophic アッセイ) では、離乳直後の雌動物あるいは卵巣を摘出した成熟雌動物に投与し、子宮重量の増加などを指標にエストロゲン作用を見られるものである。

雄性生殖器官への影響に関する試験 (Hershberger アッセイ) では、去勢した幼若動物に化学物質を投与し、前立腺、精囊などの副生殖器官の重量を測定してアンドロゲン作用を検出する。

また、生殖・発生毒性試験では、生殖・発生に対する化学物質の作用を検出するが、従来の方法によるエンドポイントだけでは不十分で、生殖器官の病理組織、精子数や運動能、血中ホルモンレベルなどの検査が必要であると考えられる。

しかし、*in vivo* アッセイ系で気を付けなければいけないことに、投与用量と投与・観察時期の問題がある。投与用量に関しては、現在まだ議論されている問題であるが、低用

量で発現する毒性が高用量では発現しないと言う可能性についてである。その真偽はともかく、In vivo 試験であるという特性上、in vitro 試験のように多段階の用量設定を行うことは困難であり、試験計画を立てる前に物質の特性を調べた上で用量設定を行わないと、思わぬ作用を見過ごす可能性があると考えられる。また、投与・観察時期に関しては、上に述べた試験は特に、胎児あるいは新生児期、および成体においてもホルモン状態が著しく変化している時期における内分泌かく乱作用を検出することを目的としている。そのため、生体内で通常、一過性におきているホルモン作用に対する影響を vivo のレベルで検出しなければならないので、投与・観察時期は極めて重要である。場合によっては、この物質の作用機序に基づき、投与や観察時期を変えなければならないことがおきるかもしれない。

in vivo アッセイでは、生体に対する影響を代謝も含めてトータルで検索することはできるが、in vitro に比べて多くの時間と手間を必要とする。したがって、in vitro によるスクリーニングの後に in vivo アッセイを行うというような効率を考えたアプローチを行わないと数多くの内分泌かく乱作用の疑われる物質を評価することは困難であろう。現在、米国の EPA では、in vitro アッセイ系を中心とした簡易スクリーニング (HTPS) により、約 15,000 もの高生産量化学物質の中から 1 次スクリーニングを行い、今後の試験に供する物質の選定を行おうと計画している。また、OECD においては、内分泌かく乱作用を念頭に置き、既存のガイドラインの改定や新規試験法ガイドラインの策定を計画すると共に、評価方法の国際的なハーモナイゼーションを推進している。現在は、各種スクリ

ーニング試験の妥当性を加盟国間で分担して検証中である。

(II) Bisphenol A の内分泌かく乱情報の評価

Bisphenol A はポリカーボネート、エポキシおよびポリスチレン樹脂の原料として用いられており、高温処置で容易に溶出される。この bisphenol A の内分泌かく乱作用が疑われるの最初の報告は約 60 年も前にさかのぼり、子宮摘出ラットに対する持続性発情期 (persistent estrus) の誘発が発端である (Dodds and Lawson, 1936)。また、同様に、用いられる同族体の diphenyl alkane として bisphenol F、bisphenol AF などがあり、これらについても、内分泌かく乱作用が疑われている。そこで、まず bisphenol A の安全性を評価する前に、最近の文献を中心に、in vitro 試験と in vivo 試験に分けて情報を整理してみた。

II-a) in vitro 試験

in vitro で行われた最初の実験報告は、酵母の培養液中に存在するヒト乳腺がん由来の細胞 (MCF-7) のプロゲステロン受容体を誘導する物質の検索過程において、培養容器のポリカーボネートから溶出する bisphenol A が同定され、さらに、エストロゲン受容体と結合部位を競合することが示された (Krishnan et al., 1993)。このプロゲステロン受容体の誘導活性は、エストラジオールの約 5000 分の 1 であり、10~25nM (約 2.3~5.7 ng/ml) の濃度で誘導することが示された。また、エストロゲン受容体との結合親和性の強さはエストラジオールの 2000 分の 1、さらに、25 nM では、MCF-7 の細胞増

殖率を増加することが認められた。また、最近の報告でも同様の濃度で MCF-7 の増殖活性増強とプロゲステロン受容体誘導能があることが確かめられている (Perez et al., 1998)。また、酵母にエストロゲン受容体遺伝子と共にエストロゲン受容体依存的に発現するレポーター遺伝子を組み込んで、エストロゲン活性の測定を行った報告では、bisphenol A は、 10^{-7} M から活性が発現し、 10^{-6} M で最大の活性が認められ、その相対的な強さは、エストラジオールの 15,000 分の 1 であることが示された (Gaido et al., 1997)。また、ヒト肝がん由来の HepG2 細胞に受容体とレポーター遺伝子を導入した報告では、bisphenol A は酵母のときと同様の濃度でエストロゲン作用を示したが、この細胞の場合には、エストラジオールとの相対的な活性の強さは 26 分の 1 にも達していた。しかし、この報告では、5nM のエストラジオールの受容体を競合阻害するの約 1 万倍の量の bisphenol A が必要であることが示され、同時に行った In vivo 試験や受容体の変異体を用いた実験により、bisphenol A が単に弱いエストロゲン作用を模倣するわけではなく、知られたエストロゲンアゴニストとは違うメカニズムでエストロゲン受容体と相互作用している可能性が示唆された (Gould et al., 1998)。

II - b) in vivo 試験

まず、一般毒性に関しては、米国の EPA の IRIS(Integrated Risk Information System)プログラムにおいて 1993 年に評価がなされており、NTP(National Toxicology Program) (1982)の報告に基づき、ラットへの 103 週間の混餌投与試験における 1000

ppm (50 mg/kg/day に相当) 群での体重増加抑制を LOAEL と位置づけた。同じ報告の中で、マウスに対しては 5000 ppm 群での体重抑制の他に、1000 ppm 以上で肝臓に多核巨細胞の増加が認められているが、この作用は adverse なものとみなされず、1000 ppm (130 mg/kg/day に相当) は、NOAEL と判定された。従って、ラットにおける LOAEL 値をもとに、種差と個体差および LOAEL であること考慮した不確実係数にそれぞれ 10 を適用し、総合的な不確実係数 1000 で割った値:50 μ g/kg/day をヒトの経口摂取に対する RfD(Reference Dose) として設定している。

発がん性に対する検索もこれらの試験で行われており、ラットにおいて、対照群に比較して白血病と間質細胞腫の増加が、マウスにおいて白血病とリンパ腫の合計の増加が観察されている。しかし、白血病およびリンパ腫に関しては、ラットの雄において用量依存性の傾向検定でのみ有意差が認められただけで、これ以外の増加に対して行われた検定では、統計学的有意差は認められていない。また、間質細胞腫も対照群に対しては低用量と高用量群に対して有意な統計学的増加が観察されているが、この病変は使用されたラットの系統 (F344) で通常高頻度で認められる病変であり、bisphenol A の投与によるものとは判定できないと考えられている。以上のことから、NTP(1982)の報告書では、この試験では bisphenol A の発がん性を証拠づける知見はないとしている。一方、EPA の IRIS プログラム上では発がん性に関する評価はまだ終了していない。

また、NTP(1982)では 90 日間の亜慢性試験もラットとマウスに対して行われており、

濃度設定は異なるが、上記の慢性試験と同様の結果を得ている。さらに、イヌに対する90日間試験 (EPA, 1984) では、最高用量 (9000 ppm) 群での肝臓重量の増加のみが認められている。また、古川ら (1994) によりマウスへの混餌投与による13週間の亜慢性毒性試験が行われているが、肝毒性を根拠にNOAELは0.5% (1~1.3 g/kg/day) であった。このとき2%以上で精巣と卵巣の重量低下が観察されている。

生殖・発生毒性に関しては、NTPの一連の試験の中で器官形成期のラット (160~640 mg/kg) およびマウス (500~1250 mg/kg) に経口投与した実験で、母動物に対する体重増加抑制や致死率の増加 (マウス) が認められたものの、催奇形性は認められなかった (Morrissey et al., 1987)。また、同様の母動物に対する影響が、より高用量 (600~1000 mg/kg) をラットの器官形成期に経口投与した試験で認められたが、NTPの結果と同様に催奇形性は認められなかった (高仲ら, 1991)。さらに、2世代にわたるマウスの連続混餌投与による繁殖試験では、2世代目の0.25%群 (約300 mg/kg/dayに相当) で、副睪丸および精嚢重量の減少が認められた (Reel et al., 1985, 1997)。

一方、bisphenol Aのエストロゲン作用の最初の報告は、子宮摘出ラットに全部で100 mgを1日2回、3日間皮下投与 (170 mg/kg/dayに相当) したときに持続性発情期が引き起こされたというものである (Dodds and Lawson, 1936)。このエストロゲン様作用に関連し、近年相次いでuterotrophicアッセイによる報告がなされ、未成熟雌マウスを用いた系では、0.05~5 mg/mouse (3~330 mg/kg/day) で3日

間皮下投与した結果、uterotrophic作用は検出できなかった (Coldham et al., 1997)。しかし、未成熟雌ラットを用いた系では、400~800 mg/kg/dayの用量で3日間皮下および経口投与した結果、子宮重量の増加が確認された。膣開口は、600 mg/kg/day以上の高用量でのみ認められた (Ashby and Tinwell, 1998)。また、未成熟雌ラットを用いた別の実験では、5~150 mg/kg/dayの用量で3日間経口投与した結果、子宮重量の増加は150 mg/kgでも認められなかったが、エストロゲン作用の別の指標であるperoxidase活性とプロゲステロン受容体発現量の誘導が5 mg/kg/dayから認められていた。しかし、エストラジオールと併用投与においてはエストラジオールによる子宮重量増加には影響を与えないが、peroxidase活性とプロゲステロン受容体発現量の誘導に対しては抑制作用を示すことが観察された (Gould et al., 1998)。

また、子宮への影響とは別に、前述のReelら (1985) の雄性生殖期への影響の報告も内分泌かく乱作用として位置付けられる。特に、近年vom Saalら (1998) の報告によれば、マウスの器官形成期に20 µg/kg/dayという、これまで行われてきたmg/kgオーダの実験に比べてかなり低い量を投与した実験で、次世代で精子数の減少が報告された。用量依存性は明らかではないが、このことが、以下に述べるin vitroでの低用量でのエストロゲン作用の報告と同調して、低用量域でのみホルモンかく乱作用を発現し、高用量域では発現しないと言う「低用量仮説 (Low-Dose Hypothesis)」を生み出した。しかし、これに対して、最近、bisphenol A関連工業界などの団体が共同でスポンサーとなり、vom

Saal ら(1998)のグループの追試験を行ったが、再現性は確認されなかつと発表した(Cagenn et al., 1998)。この実験結果はまだ、学会発表の段階で、正式な文書はまだ公表されていないが、投与量は、vom Saal ら(1998)の2および20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ に対し、0.2 から 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ と範囲を前後に1桁増やしたうえに、1群あたりの動物数を4倍、検査項目も追加して行った結果、前立腺や精巣にまったく異常を認めなかったというものであった。この論争に対しては、雄性生殖期への bisphenol A の影響が、エストロゲン受容体を介するものであるかも含めて、特に、作用メカニズムに関して、更なる研究が必要であると考えられる。したがって、現時点で、これらの実験結果の不一致を説明し、bisphenol A の影響であるかどうかを評価することは不可能であると思われる。

以上の結果をもとに、bisphenol A の安全性を評価するわけであるが、in vivo 試験の結果から、問題の vom Saal ら(1998)の報告を除けば、やはり IRIS プログラムで評価されたとおり、50 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ が LOAEL と考えられる。しかし、これとは別に、内分泌かく乱作用を評価する観点から、Gould ら(1998)の報告を取り上げる必要があると考えられる。この実験では、最高用量の 150 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ の用量でも子宮重量には影響は認められていないが、5 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ の用量からエストロゲン作用の指標である peroxidase 活性とプロゲステロン受容体の誘導が認められており、この作用を内分泌かく乱物質としての adverse な影響であるかどうかの判定については、更なる研究が必要であると考えられる。内分泌かく乱作用に対する安全性を確保するためには、この値を

LOAEL とする必要があるかもしれない。これらの影響における作用機序は比較的明らかであると予想されるので、この場合の動物種差に対する不確実係数については、生体内代謝および動態を考慮した係数を取り入れることが可能であり、更なる情報の蓄積により、より客観的なヒトに対する許容量を算定できるものと考えられる。これ以降の評価に関しては、最終年度に検討する予定である。

また、vom Saal ら(1998)の報告で示された2~20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ という用量は、NOAEL または LOAEL としてはその他の報告より1000倍以上も低い値で、この値から、ヒトへの許容値を通常の評価法で算定すると、 $\text{ng}/\text{kg}/\text{day}$ レベルとなる。詳細な暴露データは、現在いろいろな機関で測定中あるいは、部分的に公表されている状況であるが、数 ppb より高い値としては、100ppb 近くの濃度が食料品や環境水中(高尾ら、1998)から検出されたことに加え、ヒト臍帯中においても数 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tissue の検出例も報告されており(高田ら、1998)、 $\text{ng}/\text{kg}/\text{day}$ レベルの許容値では、すでに現実のヒトでの暴露量の方が上回っている可能性がある。現時点では、vom Saal ら(1998)の報告を無視するわけにはいかいと考えられ、前述した作用メカニズムの問題も含めて早急に解決すべき必要があると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T.C., Brunstrom, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., van Leeuwen, F.X.R., Liem, A.K.D.,

Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Warn, F. and Zacharewski, T. Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and Wildlife (1998), Environ. Health Perspect. 106: 775-792.

広瀬明彦, 長谷川隆一, 黒川雄二, ダイオキシン類の生体毒性 (1998) J. Toxicol. Sci. 23: 93-106.

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究者 神沼 二真 国立医薬品食品衛生研究所化学物質情報部

研究要旨

内分泌かく乱に関わる化学物質と生体系分子との相互作用実験について参照、比較、解析するためのデータベースを開発した。われわれは、この開発過程で蓄積された知見を活用して3次元構造活性相関の研究を行い、（プレ）スクリーニング試験を補う理論予測法の開発を目指す。本年度はその基盤計算として、ダイオキシン類と内分泌かく乱候補物質の構造解析を行った。現在、候補物質とエストロゲン受容体、および Transthyretin との結合モデルについて検討している。

A. 研究目的

内分泌かく乱に関わる化学物質と生体系分子との相互作用（とくに結合）実験を相互に参照、比較、解析するための基盤となるデータベースを開発する。また、この開発過程で蓄積された知見を活用して、3次元構造活性相関の研究を行う。こうしたデータベースや理論手法の開発は実験研究とは相補的な関係にあり、実験研究の相互の比較や（プレ）スクリーニング試験を補う理論予測法開発の基盤となることが期待される。

B. 研究方法

我々はすでに、内分泌攪乱物質の候補物質、関連物質、参照物質に関するリストを、天然のホルモン、医薬品、植物エストロゲン、農薬、工業化学品、金属、環境中の汚染物質などカテゴリーに分けて作成してきた。

一方で生体外からの化学物質が生体にどのような作用を及ぼすかを分子レベルで解析、予測するために、一般的な受容体データベース、細胞信号伝達系データベース(CSNDB)

を開発し、これに共同研究者であるドイツの E.Wingender らの転写因子のデータベース (TRANSFAC)を連結し、これらをインターネット上で利用可能な各種の遺伝情報、生体分子情報、代謝データベースなどとリンクした複合システムを開発してきた。

これらの既開発の情報基盤をベースとして、内分泌かく乱作用に関係している生体内のリガンドと標的分子との結合に関する実験データを整理してデータベース化する。この際、各種の試験法の多様性に対応して、生物種差、系統株の違い、個体差（遺伝的多型）に配慮してデータを集める。さらに各種の分子モデリング手法を用いて、この結合の組み合わせごとの、分子の3次元相互作用モデルを検討する。ここで、計算法としては商品化されているパッケージソフトだけでなく、現在別プロジェクトとして開発中の精密な分子計算手法 (ab initio ペア近似法) も用いる。

(1) 内分泌かく乱化学物質の作用ごとに、生体分子との結合実験のデータを収集し、データベース化する。

(2) 3次元構造活性相関研究に関しては、受容体構造が一部解析されているエストロゲンとリガンドとの結合モデルと、受容体の3次元構造が未知のダイオキシン類の構造と機能を検討する。

C. 研究結果および考察

1. 現在までの進捗状況

文献調査により、内分泌かく乱化学物質の候補物質(約150物質)をリストアップし、現在このリストをもとに、構造と機能を考慮したパラダイム化合物のデータベース(EDSD)を開発しており、ここには物質の識別情報、分子式、構造式、3次元座標、物理化学的性質、生物作用、暴露情報などを収録している。これらに基づき相互作用(結合)実験データベースのプロトタイプをACCESSを用いて開発した。また、分子軌道法(Gaussian94)によりダイオキシン類の精密な3次元構造を求めた。また、エストロゲン受容体の3次元構造を分子モデリングで吟味した。さらに、甲状腺ホルモン(T4)と血液中のタンパク質(Transthyretin)との結合のモデリングの準備を進めている。

2. 開発中のシステム全体の概念

本研究も含めて、開発している内分泌かく乱化学物質に関連した情報システムは、図1の如くである。このうち今年度は相互作用データベースの開発と、超高速コンピュータを用いたab initio分子軌道法による構成生成計算と、リガンド受容体結合解析を行った。

3. 相互作用データベースの開発

相互作用データベースは、内分泌かく乱化学物質が何らかの標的分子と相互作用し、その結果が信号伝達されるという、因果関係を基本に考えている。本データベースは、理論および実験家を含めた研究者のために、内分泌かく乱化学物質(リガンド)と生体分子(受容体)との相互作用に関し、とくに結

合の強さ(Binding Affinity)の詳細情報を提供することを目的とする。

[データの収集方法]

内分泌かく乱(候補)物質、ないし内分泌かく乱作用の最初の標的となる生体物質とくに受容体をキーワードとしてPubMed上で検索し、検索結果の中から、結合実験から得られた測定値を報告している文献を選出した。

[データ構造]

データベースは5つの主要なテーブルから構成されている。このうち2テーブルは2種の作用モード「競争阻害活性」、「転写活性」ごとに結合実験の条件と結合値を格納するために用いる。残りの3テーブルには「リガンド」、「受容体」、「文献」に関する情報が格納される。この他にこれらのテーブル間の関係を規定する8テーブルを定義し、全部で13テーブルを管理する。表1に「競争阻害活性」モードを表す結合実験テーブルの属性を例示する。

報告される実験データは、生物種、反応系、観測系が各々異なる。多数の実験結果を横断的に評価する為には、これらの条件の標準化が必要となるので、実験値を格納する際には、その値を導出した実験の条件を併せて格納することとした。

[システム構成]

データベース管理システムとしてACCESSを用いた。ユーザインターフェースはVisual Basicで作成した。ユーザインターフェースは「リガンド」、「受容体」、「文献」の3テーブルについてアクセスできるように設計した。

[結果]

ユーザは「リガンド」、「受容体」、「文献」テーブルに格納されたレコードについて、ワイルドカードを用いた問い合わせを行える。検索結果として得られたレコードのひとつを選択すると、そのレコードに関する実験データが表示される。更にユーザインターフェー

スからは、リガンドと受容体の組み合わせに基づく検索ができる。例えばリガンドが「e*」で始まる分子と、受容体が「er*」で始まる分子が結合するような結合実験の検索ができる。実験データの出力ウィンドでは、実験テーブルのタグを切り替えることで、同一のリガンドに関する2種の作用モードに対する実験結果をブラウズできる。個々の実験レコードが参照する文献は、ウィンドウ内の「Reference」ボタンにリンクしている。「リガンド」テーブルに格納されたEDSDレコードは、パラダイム化合物のデータベース(EDSD)にハイパーテキストリンクしているので、マウスでクリックすることにより、EDSDの該当するレコードへWWWを介して移動する。同様に「受容体」テーブルに格納されたRDBレコードは、受容体データベース(RDB)にハイパーテキストリンクしている。

現在13の論文により、151の実験レコードを格納している。

基本的なアプローチ

内分泌かく乱化学物質は、それ自身も、またその作用メカニズムも多様であるため、いわゆる統計解析手法を基礎として構造活性相関の手法を、内分泌かく乱化学物質(候補)全体に適用することはできない。そこで我々はまず、我々が作成した内分泌かく乱化学物質のリストと構造作用データベースと相互作用データベースを参照しながら、相互作用メカニズムが分子の3次元構造から解析できる3つのケースを研究の対象とした。この3つのケースとは、

(1) 受容体の3次構造は未知であるが、リガンドとその作用データが比較的蓄積されている、Ahレセプターとダイオキシン類の構造と活性、

(2) 3次元構造の一部が解析されているエストロゲン受容体のモデリングとそのリ

ガンドとの結合、

(3) 3次元構造が決定されている、甲状腺ホルモン(T4)と結合する血液中のタンパク質(Transthyretin)である。これらについて、並行してモデリングを進めている。以下それぞれの研究について述べる。

ダイオキシン類の構造解析

ダイオキシン類の中で毒性が強いと考えられ、2,3,7,8-TCDDの毒性を1としたときの相対的な毒性の強さを表す毒性等価指数(Toxic Equivalency Factors, TEFs)が設定されている29化合物について、非経験的分子軌道法による構造最適化計算を行い、得られた波動関数から3次元静電ポテンシャルマップを作成し、検討を行った。構造最適化には、Gaussian 94プログラムを使用した。得られた構造のもとで、Gaussian 98 for Windowsを使用し、HF/3-21G計算で静電ポテンシャルを計算した。静電ポテンシャルマップの作成には、AVS Chemistry Viewerを使用した。構造最適化計算および静電ポテンシャルマップの作成には、科学技術振興事業団のJST複合スーパーコンピュータシステムを利用した。得られた静電ポテンシャルマップから、ダイオキシン類とAhレセプターとの相互作用には、塩素原子の位置の違いによる、疎水性相互作用の差が重要であることが示唆された。

エストロゲン受容体とその結合

エストロゲン受容体に結合する内分泌かく乱候補物質につき、パッケージソフトであるChem3D Proを用い、その中の分子力場MM2を用いた初期構造を生成し、これを非経験的分子軌道法計算のパッケージソフトであるGaussian 94によって最適化した。ここで、軌道関数としてはHF/6-31G*を用いた。さらに、この計算で生成された電子密度を用いてリガンド化合物分子の静電ポテンシャルを計算し、等電面を立体的に表現する図を作成した。現在、この図を用いてレセプタ

一側の認識部位を推定することを試みている

またエストロゲン受容体のリガンド結合部位については、 17β -エストラジオールとラキシフェンとの複合体の X 線結晶解析構造が発表されており、これらの構造を用いて、内分泌かく乱候補物質とエストロゲン受容体との結合定数の計算を行っている。リガンド結合部位の実験構造には、ディスオーダーにより構造がわかっていない部分があるため、Insight II の Search/Loop, Splice/Loop 機能およびホモロジーモデリング機能を用いて推測を行っている。結合定数の計算には Insight II/ CHARMM を使い、分子動力学計算を行う予定である。さらに、現在開発中の ab initio ペア近似法プログラム ABINIT-IP を使い、リガンド結合部位のファーマコフォアとリガンドとの相互作用の詳細な解析を予定している。

Transthyretin との結合モデル

現在甲状腺ホルモンと血中結合タンパク質について、Insight II/ CHARMM を用いた分子動力学計算を行い、結合定数の予測を行っている。今後はダイオキシン類と血中結合タンパク質について同様に計算を行い、ダイオキシン類の体内動態について検討を行なう予定である。

類似性の判定

我々が目標としているのは、未知な化合物が与えられたときその内分泌かく乱性のある程度判定することである。その方法としては、まず図 1 で示されているように、パラダイム化合物とのマッチングでどのカテゴリー（クラス）に属するかを判定し、つぎに相互作用データを利用して、既知の内分泌かく乱化学物質との類似性を判定するという、2 段階の方式である。この方式の検討は次年度以後行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takako Takai-Igarashi, Yoko Nadaoka, and Tsuguchika Kaminuma, A database for cell signaling networks, Journal of computational biology, 5, 747-754, 1998

Nakata K, Takai T and Kaminuma T: Development of The Receptor Database: Application to the Endocrine Disruptor Problem (BIOINFORMATICS in press).

2. 学会発表

- ・神沼二眞、中田琴子、中野達也、高井貴子：内分泌攪乱物質研究を支援する情報計算基盤の概念について、第 21 回情報化学討論会、第 26 回構造活性相関シンポジウム
- ・中田琴子、中野達也、神沼二眞：エストロゲン受容体のモデリング、タンパク質立体構造の構築原理ワークショップ、1998 年 12 月 8, 9 日、早稲田国際会議場
- ・神沼二眞、中田琴子、中野達也、高井貴子、情報化学討論会内分泌攪乱物質（環境ホルモン）研究を支援する情報計算基盤の概念について
- ・神沼二眞、中田琴子、中野達也、高井貴子、山本 都、内分泌攪乱物質研究支援環境の構築、内分泌攪乱物質問題に関する国際シンポジウム、日本内分泌攪乱化学物質学会（環境ホルモン学会）、国立京都国際会館、1998 年 12 月 11 日～12 日
- ・山本都、森田真理子、中野達也、神沼二眞、農薬の内分泌攪乱作用に関する文献調査と解析、内分泌攪乱物質問題に関する国際シンポジウム、日本内分泌攪乱化学物質学会（環境ホルモン学会）、国立京都国際会館、1998 年 12 月 11 日～12 日

- ・ 中田琴子、高井貴子、神沼二真、受容体データベース：内分泌かく乱への応用、内分泌攪乱物質問題に関する国際シンポジウム、日本内分泌攪乱化学物質学会（環境ホルモン学会）、国立京都国際会館、1998年12月11日～12日
- ・ 高井 貴子、長谷川 式子、神沼 二真、内分泌攪乱物質に関する生体作用データベース、第21回情報化学討論会講演要旨集、pp58-61、1998年11月10-11日、東京
- ・ 神沼二真、中田琴子、中野達也、高井貴子、内分泌攪乱物質（環境ホルモン）研究を支援する情報計算基盤の概念について、第21回情報化学討論会講演要旨集、pp90-93、（1998.11 東京）
- ・ 中野達也、小谷野和郎、大竹千代子、山本 都、長谷川式子、瀧 明子、山本美智子、神沼二真、内分泌攪乱物質の構造データベースの開発、第21回情報化学討論会講演要旨集、pp94-97、（1998.11 東京）
- ・ 中野達也、高井貴子、中田琴子、神沼二真、内分泌攪乱物質と生体との相互作用を記述するためのインターフェイスの開発、第21回情報化学討論会講演要旨集、pp62-63、（1998.11 東京）
- ・ 小谷野和郎、中野達也、神沼二真、ダイオキシン類の毒性の分子計算による解析、第26回構造活性相関シンポジウム

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

健康影響に関する情報収集と評価

分担研究者 関沢 純 国立医薬品食品衛生研究所・化学物質情報部

研究要旨：

内分泌かく乱化学物質によるヒトへの影響の観点から、影響強度、暴露レベル、メカニズムから考えて、実際に影響の可能性が高いと考えられた植物エストロゲンと、有機錫について、健康影響に関するクリティカルな情報を収集、解析し、リスク・ベネフィットを推測した。この目的のため、植物エストロゲン物質の関連文献 200 件以上を物質の種別、生物種と試験系、影響の種類などにより索引付けし、分類し、データベース化した。

A. 研究目的

内分泌攪乱化学物質に関し関連情報は膨大に存在し種々のかたちで提供されているが、多くは厳密な評価に基づいたものでなく、むしろ事態を混乱させている面もある。情報のデータベース化も進められているが、リスク評価の観点から内容を精査し検討する必要がある。問題とされている物質を中心に、内分泌攪乱化学物質としてのリスク評価にクリティカルな情報を収集、評価し、本研究班における試験法開発を支援する。

B 研究方法

問題とされる主要な物質について、健康影響評価に必要とされる定量的な情報を中心に収集し、試験条件と結果、背景メカニズムの検討、当該物質への日本人の曝露実態について検討する。本プロセスを通して、内分泌攪乱物質のリスク評価に必要なデータの種類と内容、今後必要な試験研究を検討、提示する。

(1) 大豆中の植物ホルモン物質について

人が摂取するエストロゲン作用物質として重要でありながら、影響レベルについて十分

確認されていない植物エストロゲン物質につき、日本人の摂取、体内レベル、人における知見を中心に定量的なデータを収集し、メカニズムの考察を基礎に、リスクとベネフィットの検討を行った。

1998年6月までのMEDLINE医学文献データベースを用い“Phytoestrogen”(PE)でヒットした207文献およびその後の文献と、関連の文献の計、約300文献を調査、分類し、データベース化した。生薬、ハーブ、一部の微生物の生産物にもPEは含まれるがこれらの摂取量は相対的に少ない。エストロゲン作用が知られ文献も多く、日本人が多量に摂取する大豆に含まれるイソフラボノイドおよび、亜麻など多くの植物に含まれ、腸内細菌によりエストロゲン作用を持つ物質に代謝されるリグナンを中心に、人での疫学および臨床データ、摂取量、インビボ試験データと背景メカニズムの研究情報を調査した。

(2) 有機すずについて

わが国の環境汚染が環境中生物の生殖に影響を及ぼすレベルにあるとして問題になっている有機すずの健康影響について、同様の検討を行った。

C. 研究結果および考察

(1) 大豆中の植物ホルモン物質について

さまざまな植物ホルモン物質の活性レベルと日本人の摂取量から考え、もっとも影響を及ぼす可能性が高い大豆中のエストロゲン物質を中心に検討した。欧米人での疫学的、臨床的知見と、日本人の摂取量、体内濃度から、日本人の曝露レベルは、健康にベネフィシャルな影響を与えている可能性が大きいと推定された。これら物質は、エストロゲン作用のほかに、抗酸化作用などの作用も有するため、影響の内容をより多角的に検討すべきこと、またエストロゲン活性の高い代謝物を生成する能力は日本人の中でも個体差が大きく、日本人での臨床、疫学的知見の収集と確認が必要なこと、経胎盤曝露による影響データが限られておりこの方面の研究データが必要なこと、また自己免疫疾患との関連を示唆する報告を考慮すると、より多角的な検討の必要が指摘された。

大豆中の PE には、イソフラボノイドの Daidzein, Genistein がある。日本人の大豆と大豆製品の平均摂取量は 1 日約 65g だが、Daidzein と Genistein は豆腐、味噌、大豆、納豆、油揚げなどにそれぞれ 32-146, 71-366, 22-1915, 199-354, 74-187 および 86-306, 149-524, 200-1897, 374-506, 185-228 μ g/g (湿重当り) 含まれる。日本人の大豆と大豆製品からの PE 平均一日摂取量は Daidzein 10.2 mg, Genistein 15.4 mg のレベルといえる。他方、日本人男性の血清中の遊離・抱合体合計の Genistein, Daidzein 濃度はフィンランド人男性の各々 44 倍(75 μ g/L)、17 倍(27 μ g/L)であった。

東アジアの人には乳がん、前立腺がんが少な

いが米国へ移住すると増す。大豆摂取により閉経前の女性の乳がんリスクが低下する。乳がんリスクと尿中 Daidzein /Equol 排泄量には量依存の逆相関関係が見られる。動物では発情期前のイソフラボノイド短期曝露により乳腺上皮細胞の分化が促進され乳がん発生が抑制された。Genistein の抗がん作用はチロシナーゼ阻害作用¹⁰⁾と、がん細胞の apoptosis 促進という機作が推測されている。

Daidzein の代謝物 Equol は in vitro で抗酸化作用を示し、大豆蛋白 (38 報告中の平均 47g/日)あるいは大豆 PE(11mg/kg 体重/日)の摂取は、LDL Cholesterol 値を各々高脂血のヒト (平均 22mg/dL 低下) およびサル (36%低下)で低下させた。

Daidzein の前駆体 Ipriflavone (600 mg/日) が骨粗鬆症を含む更年期障害治療に有効と報告されている。Genistein は濃度によりエストロゲンにもアンチエストロゲンにも作用することが、エストロゲン受容体を組み込んだ MCF-7 ヒト乳がん細胞の増殖の低濃度での高進と高濃度での抑制という結果から推測されている。

Daidzein をマウスに経口投与(0-40mg/kg 体重/日)した時に、用量に依存し腹腔マクロファージのファゴサイトーシスと胸腺重量の増大で見た非特異的な免疫活性および、脾臓の IgM 産生細胞による羊赤血球溶血で見た特異的な免疫活性の高進が見られた。

牛乳で下痢を起こす幼児のための大豆食品 (イソフラボノイド 43-48mg/日) 摂取によるエストロゲン作用が懸念されたが、米国で 50 年間の使用に関わらず内分泌への影響は見られていない。

ヒト血清蛋白の添加時と非添加時のエストロゲン受容体への結合を Estradiol と比べると、Genistein, Equol は相対的により多く受容

体に結合する。また Genistein はβエストロゲン受容体により親和性がある。

環境中に極く微量存在しエストロゲン様作用のリスクが危惧されている他の“環境ホルモン”と共存した時に、PE がエストロゲン受容体結合において競合し保護的な作用を示すか否かは興味あるところである。

日本人における植物由来ホルモン作用物質の役割として、種々のデータからみられるさまざまな作用は、日本人の大豆と大豆製品からの PE 平均摂取量の同程度から数倍の範囲で観察されている。トにより摂取量や感受性は異なるし、比較的low濃度でもある程度のリスク、ベネフィットがこれまでの日本人集団に見られている筈である。また日本人は昔から多量に摂取しているので、耐性があるのではないかもいわれている。適切な疫学調査を行うか、臨床データを収集すれば、これらは判定可能であろう。

日本人の摂取する植物からのリグナンの摂取量、あるいは植物中物質が腸内細菌により代謝されてできるリグナンの摂取量の定量的なデータはない。しかし伝統的な食品を摂取している日本人の尿中排泄量は少ない。現在、日本人の体内レベルを推測するデータを収集、解析中である。欧米のデータでは植物を多く摂取する女性のリグナンの排泄量は、雑食性の女性や乳がんの女性に比べて有意に高いと報告されている。リグナンの作用もさまざまあるが、生理的に観察されるレベルでの *in vitro* 試験データでエストラジオールのレセプター (タイプ II, bioflavonoid receptor) 結合を競合的に阻害し、やや高い濃度ではアロマトラーゼを阻害することが知られている。

いくつかの PE の多様な作用につき一見矛盾する報告もあるが、曝露時期や用量による

違いがありうる。Daidzein は代謝されてより活性の強い Equol を生成するが、日本人の間でも大きな個体差が見られており¹⁹⁾、代謝能力の違いの分布による不確実性を考慮しなければならない。コーバーに含まれる PE の Coumestrol は羊が大量に摂取した時に不妊になる原因物質といわれており、低濃度でアロマトラーゼを阻害するが、大豆には検出されない。PE の種類によって作用は異なり、ポリフェノールの場合はエストロゲン作用だけでなく、抗酸化作用を示したりする。このような作用機作を踏まえた人を主とした定量的なデータを収集解析することにより、日本人が曝露される PE のより正確なリスク、ベネフィットの解明が可能となろう。また乳児に豆乳を与えることと自己免疫疾患との関連を示唆する報告もあるなど、食品中に多量に含まれる活性物質の作用については多面的な作用のチェックが必要であろう。

同様な手法により、現在関心が高く、現実に問題となりうるほかの物質についても、調査を進めていく予定である。この調査の中で国内で優先的に調査研究すべき課題が、浮き彫りにできれば幸いである。

(2) 有機すずについて

内分泌攪乱化学物質としてはもっぱら巻き貝のイボセックスのみ注目されているが、日本人の平均摂取量は動物での免疫系への影響から設定された安全指針値の6割程度になり、摂取量の個体差を考慮すると注意を要する。細胞レベルでの知見から、有機すずの免疫系への影響と生殖・発達毒性にメカニズム的に共通する背景も考えられ、多様な毒性プロファイルをより統合的に検討する必要性が指摘された。

我が国の有機すず汚染のリスク評価

＜環境中生物への影響＞有機すずは環境中生物への影響において次のいくつかの特徴を持つ。(1) 巻き貝の一部にイボセックスといわれる現象を引き起こし生殖に影響を及ぼす。(2) イボセックスを含む軟体動物や藻類への影響は極低濃度 (1 ng/L レベル) で生ずる。(3) 影響を受ける生物種は微生物、甲殻類、軟体動物、両棲類、魚類まで広範囲である。

環境中生物への影響のうち最も低濃度で影響が見られるのは腹足類のイボセックスである。有機すずがシクロム P-450 依存アロマーターゼの阻害剤またテストステロンとその活性代謝物の硫酸抱合を阻害することによりテストステロンが蓄積して、雌の雄化が促進されイボセックスが生ずるという最近の研究がある。イボセックスは当初腹足類に特殊な現象と考えられていたが、今や有機すずは正式に“環境ホルモン”物質の仲間入りをするようになった。＜健康影響＞免疫系への影響が最もクリティカル (低い濃度で起りうる重要な) 影響とされた。ラットの 18 か月長期毒性試験 (投与量: 0, 0.025, 0.25, 2.5 mg/kg 体重) における線虫 (*Trichinella spiralis*) 感染への抵抗性を調べた胸腺依存免疫系の障害が見られた TBTO の最小毒性発現量が 0.25 mg/kg 体重であることから、無毒性量は 0.025mg/kg 体重とされた。この免疫系への影響は出産後、間もない時期が最も感受性が高かった。

生殖への影響は以前は比較的高濃度 (母獣に毒性が見られる) でのみ観察されたので、二次的なものではないかと考えられていた。ラットの妊娠初期 (妊娠 0-3 日目) に TPT を投与 (0, 3.1, 4.7, 6.3 mg/kg 体重投与) すると、妊娠 4-6 日目に投与した時より低い濃度 (4.7 mg/kg 体重) で着床阻害、胎児死亡が見られた。胸腺細胞の apoptosis への影響、

sarcoplasmic reticulum cell による Ca^{++} 取り込みや Ca ATPase の阻害などが報告されている。一見ばらばらに見えるこれらの影響が分子レベルで共通のメカニズムに由来している可能性がある。＜環境リスク評価＞環境中の生物への影響を評価する際には広範な生物種に見られる種々の影響と、その起こりうる濃度の全体像を考慮する必要がある。環境庁のとりまとめによれば、1995 年の東京湾内 5 定点のトリブチルスズ (TBT) の平均水質濃度は 2.7 $\mu\text{g/L}$ であり、藻類の胞子形成や一部の巻き貝のイボセックスはこの濃度で起りうるが、稚ガキへの影響や淡水条件でクビレへの影響が起るのは一桁高い濃度である。比、ゾウバエ、微生物への影響はさらに一桁高い濃度ではじめて起ることが知られている。しかし底質中の TBT 濃度の改善が緩慢であることから、汚染の高い沿岸、感潮域に棲息する生物にとってのリスクはまだ高い。生態系全体になんら影響が見られないようにするには、さらに汚染を低減する必要がある。＜健康リスク評価＞蒸気圧から考えて大気経由曝露の可能性はなく、また飲料水中での検出の報告はない。食品経由の有機すず摂取量がマーケットバスケット法により調査されている。魚介類と野菜類からのみ摂取されており 1991 年を境に漸減傾向にある。マーケットバスケット法による摂取量調査結果によると 1990-1997 年の TBT と TPT の平均一日摂取量は、にそれぞれ 3.9 $\mu\text{g/人}$ 、および 3.0 $\mu\text{g/人}$ (塩化物として) であった。

TBT の値は、わが国の TBTO 暫定許容一日摂取量評価値の 5.2%、あるいは CICAD で示唆されている TBTO の経口曝露の指針値の 4.7% である。TPT の値は FAO/WHO 合同農薬会議の TPT 許容一日摂取量評価値

の12%であった。汚染の高い港や河口で底質中TBT濃度の低下が緩慢であることから、沿岸、感潮域に棲息する魚介類の多量摂取は高リスク要因と推測される。有機錫としての作用が相加的である可能性、汚染魚介類を特に多く摂取する地域や個人の存在が推定され、有機錫の環境中への放出をさらに少なくすべきであろう。

F. 研究発表

1 論文発表

Jun Sekizawa, Health and environmental risk assessment of organotin pollution in Japan, Bull.Natl.Inst.Health Sci.,116、126-131, 1998

2 学会発表

Sekizawa, J.. Uncertainty analysis using database on chemical risk, Proceedings of the First China-Japan Conference on Risk Assessment (November 1998,

Beijing), pp.456-461

内分泌かく乱化学物質学会（環境ホルモン学会）、平成10年12月11日（金）・12日（土）、国立京都国際会館、植物エストロゲン物質の日本人における定量的リスク・ベネフィット解析—Quantitative Risk Benefit Analysis of the Effects of Phytoestrogens、関沢 純、大屋幸江

関沢 純、大屋幸江. 日常摂取する植物由来ホルモン物質の役割. 第4回バイオアッセイ研究会・日本環境・毒性学会合同研究発表会（1998年9月、草津） pp. 26-27

関沢 純. わが国の有機すず汚染のリスク評価. 第4回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会（1998年9月、草津） pp. 48-49

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱物質に関する用語集作成

分担研究者 長村義之 東海大学医学部病態診断系病理学部門

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

研究要旨：

広い分野の知識を要求される学際的問題であるところの内分泌かく乱物質問題は、他分野の研究者との学術的連携の際にも、共通認識の希薄さがその促進の妨げとなっていることが考えられる。本研究班では内分泌かく乱物質問題に関する用語集を学際的立場から、「内分泌かく乱物質問題用語集（仮称）」の編集を開始した。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質問題は、その生体影響の作用メカニズムを主に核内受容体を介する遺伝子転写活性制御の基礎生物学的問題に根ざしつつ、その影響がヒトや動物の生殖・後世代影響に如何に現れるかを検討することを最大の目標としているところの、広い分野の知識を要求される学際的問題である。

内分泌かく乱物質問題は、一方で世論の直接的関心と呼び、研究者は時としてマスメディアへの対応に迫られるが、そのときの障害の一つに、この学際的知識の普及の難しさが挙げられる。また、他分野の研究者との学術的連携の際にも、共通認識の希薄さがその促進の妨げとなっていることが考えられる。

そこで、本研究班では、試験法開発と平行して、内分泌かく乱物質問題に関する用語集を学際的立場から、特に内分泌学の権威の最新知識をベースとして、従来の毒性学、バイオ医薬品などの新世代医薬品に対応した新しい毒性学、遺伝子改変動物学を含む実験動物学、内分泌かく乱化学物質の研究過程で明らかとなりつつある点、などの幅広い知識を結

集し、「内分泌かく乱物質問題用語集（仮称）」の編集を計画した。

B. 研究方法

対象者：研究者レベル、出版社：（医歯薬出版）にて、取り上げるべき項目の選定とその文字数の設定を行う。

C. 研究結果

対象者、研究者レベル、出版社（医歯薬出版）にて、取り上げるべき項目の選定とその文字数の設定を行い、今年度は、別表に示す項目を選定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

菅野 純、内分泌かく乱化学物質の生物影響、ファルマシア、35、219-223、1999

菅野 純、内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から-有機合成化学協会誌、57、35-39、1999