

平成 10 年度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

研究課題名: 内分泌かく乱物質の超高速選別法の開発・検証に関する調査研究

主任研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・室長

研究要旨

バイオフィールド3次元定量的構造活性相関(3D-QSAR)は、既知の化学物質の化学構造と生物活性をモデル化して関連づけ、そのモデルにより生物活性が分かっている化合物の生物活性を予測する手法である。このためには実験動物あるいは試験管内試験系を用いた内分泌かく乱作用に関する試験結果、化学物質の構造及びホルモンレセプターの構造等を有機的に連携づけることが必須である。この方法は、将来的に高速でかつ経費のかからないハイスループットスクリーニングの一つとしてその効果が期待されるものである。本研究ではこのバイオフィールド3次元定量的構造活性相関に関する情報収集を行い、現在日米で進められている手法、すなわち CoMFA、HQSAR、Pharmacophore による方法、及び、板井らのドッキングモデル法について調査検討し得た。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属における職名

井上 達 国立医薬品食品衛生研究所  
部長

A. 研究目的

創薬の現場ではリード化合物の選定の過程で3次元構造活性相関を用いた電子計算機内での化合物選定が行われている。この方法は、未だに開発途上であるものの、その高速性と経済性から、膨大な数に上る環境化学物質の中から内分泌かく乱作用を持ち得る化合物をスクリーニングするための非常に有効な手段となることが期待される。そして、ここで得られたデータは、次の段階の各種試験によって環境化合物を検討するための優先順位付けの為に、大きな役割を果たすことが期待される。

本研究では、3次元構造活性相関によるエストロゲン受容体に対する各種環境化学物質の結合や機能発現のシミュレーションがどの様に可能で、その精度向上にはどのようなデータを電算機が要求するか、その実現にはどのような問題点があるかを調査研究する事を目的とするものである。また、本班研究が通産省研究班との共同研究であるという立場を利し、OECD等の国際的活動に対する実験研究の重複を国内で避けることおよび科学的情報の交換を行うことを目的として、内分泌かく乱化学物質実験者レベル会合の運営を通産省側と共同して行った。

B. 研究方法

アメリカ合衆国アーカンソー州にある  
National Center for Toxicological

Research (NCTR) の Estrogen Knowledge Base Program を指揮する Dr. Daniel Sheehan の率いる3次元構造活性相関研究グループを訪問し、使用している手法の種類、研究の進行状況と問題点などについて、詳細に意見交換を行った。日本国内においては、医薬分子設計研究所・板井昭子博士の研究所を訪問し、使用している手法の種類、研究の進行状況と問題点などについて、意見交換を行った。

(倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、本研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っており、当研究施設はそのモデル施設となっている。本研究を構成する分担研究者には、米国において AAALAC の GLP 承認国立研究機関における研究歴を有する経験者を含んでおり、実験における倫理面での配慮に明るい。

### C. 研究結果

NCTR: Estrogen Receptor に対する化合物の結合に関する 3D-QSAR の状の視察及び意見交換: Dr. Sheehan の研究室で行われている 3D-QSAR は、CoMFA、HQSAR と Pharmacophore による検討。CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) 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立体的および静電的相互

作用を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であり、従って、数を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計算が必要である。HQSAR (Hologram QSAR) は、化学物質の構造を部分に分解し、その構造を数値化することにより化合物を数値で表記するもので、その表記と生物学的活性との相関を得るものである。Pharmacophore 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方法であり、定性的判断のみをおこなうものである。Kepone がこの方法で拾い上げられる(他の方法では難しい)ことが興味深い。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である。これらの方法が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。Helix 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段階である。

ドッキングモデル(板井らの方法): ドッキングモデルは、上記の3方法とは考える順番が異なる。この方法は、受容体分子の結合ポケットを構成するアミノ酸等の構造をもとに、そのポケットの立体的、静電的情報を計算し、それに対するリガンドの相互作用

を計算するものである。リガンドとなる化学物質の構造そのものを用いないところから、構造的に非常にバラエティーに富んだリガンドがピックアップされる長所を有している。リガンドに依存したレセプター分子の構造変化、水和水の扱いなどが盛り込まれる。

内分泌かく乱化学物質実験者レベル会合：

厚生省、通産相、農林省、および環境庁の関連研究機関の実験者レベルでの打ち合わせと連絡のための会合を、各省庁係官の同席のもとで、計7回実施した。OECD 対応の子宮肥大試験やハーシュバ－ガー試験について協議した(実績報告書別添第1～7回議事録参照)。

#### D. 考察

バイオフィールド3次元定量的構造活性相関の利用が、現存する膨大な環境化学物質のみならず将来にわたり増加し続ける新規化合物に対する有効なスクリーニング手法の一つとして注目を浴びつつある。この方法は、生体側の分子(受容体)とそれに結合する化学物質の分子レベルにおける相互作用を考慮した新しい構造活性相関であり、この体系を確立する事は High Throughput の観点からも意義が大きいものであることが認識された。

#### E. 結論

調査検討したこれらの方法のなかでは、ドッキングモデルがもっとも応用性と柔軟

性に富んでおり、生体分子側の構造変化(リガンド依存性のみならず遺伝子突然変異によるアミノ酸置換等による変化を含む)にも高精度に即応できる優れた面があると考えられた。ただし、どの手法の精度を向上させる為にも、常に生物学的活性のデータなどによるシミュレーションプログラムの教育が必要であり、また、その要求に適合した生物学的実験を効率よく行うことが重要である点が再確認された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

菅野 純、相賀 裕美子、井上 達 化学物質の生物毒性試験- 内分泌障害性を中心に- 組織培養工学24 H10年7月

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(1) H11年1月

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 H11年3月

##### 2. 学会発表

井上達、菅野純 内分泌障害性化学物質(endocrine disruptors)の検出の為の新しい試み。第14回日本毒性病理学会 H10年2月

菅野 純 エンドクリン問題の最近の動向。ポリオレフィン等衛生協議会安全性セミナー

一 H10年3月

井上 達、菅野 純 内分泌攪乱物質とは何か。内分泌攪乱物質をめぐる生活と食の安全についての国際シンポジウム H10年6月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から- 第169回有機合成化学協会懇談会 H10年7月

井上 達、菅野 純 エンドクリン問題の最近の動向 ポリ衛協会報 3 H10年8月

菅野 純 内分泌かく乱化学物質について 平成10年度化工誌ニュース委員会第1回研究会 H10年10月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について-生物学的立場から-学術情報センター軽井沢公開ワークショップ パネルディスカッション H10年10月

宮城恵理、松島裕子、平林容子、井上 達、菅野 純 内分泌かく乱化学物質 (Xenoestrogen)高感度検出系としての卵巣摘出マウスのエストロゲン反応性の経時変化 第15回日本疾患モデル学会 H10年11月

菅野 純 動物の生態と内分泌攪乱物質 (環境ホルモン)について パネルディスカッション 第25回環境保全・公害防止研

究発表会 H10年11月

菅野 純、Kyung-Sun Kang、武木田薫、宮城恵理、斉藤 実、松島裕子、山本雅也、平林容子、金子豊蔵、井上 達 内分泌かく乱化学物質におけるin vitro試験系のin vivo 試験に対する代替性 第12回日本動物実験代替法学会 H10年11月

菅野 純 内分泌攪乱化学物質について 第9回安科研学術講演会 H10年12月

菅野 純、山本雅也、松島裕子、西岡暢彦、宮城恵理、Byung-Il Yoon 内分泌かく乱物質の短期in vivo試験系について 日本内分泌攪乱化学物質学会第1回研究会 H10年12月

小野 敦、山本雅也、高木敦也、菅野 純、井上 達 Molecular mechanism of endocrine disrupting chemicals (EDCs) (Celebrating the 10th Anniversary of the AACR Special Conferences in Cancer Research)H11年1月

菅野 純 内分泌かく乱化学物質について 第26回建築物環境衛生管理全国大会 H11年1月

G.知的所有権の取得状況

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

研究課題：超高速選抜法の検証の評価に関する調査研究  
分担研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・部長

研究要旨

現代生活においては膨大な種類の化学物質が利用されており、これらの化学物質が内分泌かく乱作用を有するかどうかを早急に調査する事も内分泌かく乱問題の緊急課題の一つである。このため、本研究では米国が提案している化学物質の内分泌かく乱作用の有無を評価するヒト由来培養細胞系を用いた方法の有用性を独自の立場から検討するとともに、必要な改良を行った。米国プロジェクトではヒト乳癌細胞由来細胞株の内、エストロゲン受容体など、目的とする受容体を定常的に発現している細胞株を用いる事が試みられたのに対し、本研究班ではNEDOとの共同研究として、住友化学において、受容体発現が殆ど無いHela細胞に受容体分子を強制発現させた上でホルモン応答性を持たせた培養細胞株を開発した。それをもとに（財）化学品検査協会にHigh Throughput Screening (HTPS) Robotの設置を行い、その始業を成し遂げた。さらに、約60化学物質を米国EPAの内分泌かく乱化学物質リストからモデル物質として選択し、代謝系（肝S9ミックス）の有無を含め、延べ約350測定以上を行い、その結果の解析を行った。

A. 研究目的

現在、ある種の化学物質が生物の内分泌系を攪乱し、野生生物及びヒトの健康に影響を及ぼすことが懸念されている。その一方、我々の現代生活においては膨大な種類の化学物質が利用されており、これらの化学物質が内分泌かく乱作用を有するかどうかを早急に調査する必要がある。このため、本研究では米国が提案している化学物質の内分泌かく乱作用の有無を評価する方法の有用性を独自の立場から検討するとともに、必要な改良を行う事を目的とした。信頼性のあるHigh Throughput Screening法を確立することにより、約数万種の化学物質に対する内分泌かく乱作用の有無を確認するための優先順位付けを早急に行うことが可能となる。

B. 研究方法

本HTPS研究は、米国が提案している化学物質の内分泌かく乱作用の有無を評価する方法の有用性を確認する事から開始されたが、米国のシステム自体が未

完成の段階であり（その後、第1段階は不成功に終わったとの連絡があった）、また、信頼性のあるHTPSを確立するための基礎研究として、特に、その系で用いられる培養細胞株の開発に関しては、特許申請も絡み世界的には未だに競争状態にある。この中で、総体的システムは、世界的データ互換の立場から、米国と共通のものとしたが、そこで用いられる解析系の詳細については本研究班において独自に開発したものが用いられること、また、検討対象化学物質に日本でのみ使用されている化学物質が含まれる点が特色である。NEDOとの共同研究として、住友化学において作製されたHela細胞をベースとするホルモン応答性培養細胞株を用い、（財）化学品検査協会にHigh Throughput Screening Robotの設置を行った。そして、約60化学物質を米国EPAの内分泌かく乱化学物質リストからモデル物質として選択し、代謝系（肝S9ミックス）の有無を含め、延べ約350測定以上を行うこととした。さらに、その結果の解析とその解釈に関する検討

を行った。

### C. 研究結果

ヒトホルモンレセプター発現遺伝子及びホルモン応答配列を持つレポーター遺伝子を安定的に組み込んだ細胞を用いた High Throughput Screening (HTS) assay systemを開発し、63物質のモデル化合物を用いてその有効性について検討を行った。17 $\beta$ -EstradiolやBisphenol A等を化合物としてER $\alpha$ 非代謝アゴニスト測定系を用いて感度及び再現性を検討した。結果、17 $\beta$ -EstradiolとBisphenol Aはグラフ上からは各々おおよそ $3 \times 10^{-11}$ Mと $3 \times 10^{-7}$ Mであり、受容体競合試験や酵母を用いた応答試験と同等ないし、若干感度が良いというデータを得た。しかし、多くの検体については、検出感度の問題からEC50値が算出不能となることが判明した。この点を補強する目的からPC50値とThreshold値を定義した。

PC50値は、各測定プレートの陽性対照ウェル17 $\beta$ -Estradiol、 $10^{-10}$ Mの平均転写活性化倍率の1/2を示すと推定される化学物質濃度と、用量反応データより、その点を挟む2濃度区を結ぶ直線から算出した。値は、基礎転写活性化倍率に陰性対照(DMSOのみを添加)発光強度のCVの3倍を加算した値を示すと推定される化学物質濃度とした。その結果、多くの化合物では、EC50値が求められ無いことが判明した。

Threshold値は多くの物質で最高測定濃度付近の値として求まったが、PC50値が求まらない物質も認められた。その中にはThreshold値は比較的低濃度であるにもかかわらず、反応が濃度依存的に増加せず、結果としては、PC50値が求まらない様な容量作用曲線を描く物質も認められた。

さらにS9(S9をさらに15,000xgで10min.遠心した上清)及び $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(還元型NADPH, Kohjin Co., Ltd.)を添加した。代謝系を含まない場合に比較して3倍以

上の転写活性化倍率の増加が認められた。作用の強いエストロゲン物質であるにも関わらずソフトウェア的にED50が計算されない欠点が指摘された。

### D. 考察

本システムでは、多くの物質ではPC50値、あるいはThreshold値しか求まらないことが判明した。PC50値はその物質のEC50値の代用として使用可能であると考えられた。しかし、Threshold値は、対数表示でのシグモイド用量反応曲線の裾野の部分を示すものである。そのため、いかにThreshold値とPC50値がよく相関するからといっても、その値とEC50値あるいはPC50値を同等に意義のある値として扱うことは出来ない。おそらく、定性的にあるいは、上限を規定する指標値に過ぎないと思えるのが正しいと解釈される。

### E. 結論

本研究により、ほ乳類由来培養細胞を用いたホルモン応答性試験の開発が所定の成果を持って開始されたと結論される。本方法においてエストロゲン $\alpha$ 受容体に関して比較的満足の行くロボットシステムを構築し得たと考えられるが、感度、費用の点を含めて更なる問題点が克服されるべき課題として残されており、さらに、残る受容体系に対しても、細胞株を含めた改良が必要であると考えられる。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Kawasaki Y, Umemura T, Saito M, Momma J, Matsushima Y, Sekiguchi H, Matsumoto M, Sakemi K, Isama K, Inoue T, Kurokawa Y, Tsuda M: Toxicity study of a rubber antioxidant, 2-mercaptobenzimidazole, by repeated oral administration to rats. Toxicol Sci, 1998, Feb;23(1):53-68

Hirabayashi Y, Matsumura T, Matsuda M, Kuramoto K, Motoyoshi K, Yoshida K, Sasaki H, Inoue T : Cell kinetics of hemopoietic colony-forming units in spleen (CFU-S) in young and old mice. *Mech Ageing Dev*, 1998 , Apr 1;101(3):221-231

Sai K, Kai S, Umemura T, Tanimura A, Hasegawa R, Inoue T, Kurokawa Y: Protective effects of green tea on hepatotoxicity, oxidative DNA damage and cell proliferation in the rat liver induced by repeated oral administration of 2-nitropropane, *Food Chem Toxicol*, 1998, Dec;36(12):1043-1051

Sai K, Upham BL, Kang KS, Hasegawa R, Inoue T, Trosko JE: Inhibitory effect of pentachlorophenol on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells in vitro. *Cancer Lett*, 1998 , Aug 14;130(1-2):9-17

Mitsumori K, Imazawa T, Onodera H, Takahashi M, Kitajima S, Inoue T, Kurokawa Y: Ultrastructural changes in motor endplates of the lumbrical muscles of rats induced by a microsomal Ca<sup>2+</sup> ATPase inhibitor, 2,5-di(tert-butyl)-1,4-hydroquinone. *Arch Toxicol*, 1998, 72(2):115-118

Trosko JE, and Inoue T: Oxidative stress, signal transduction, and intercellular communication in radiation carcinogenesis, *Stem Cells*, 1997, 15 (suppl2), 59-67.

Sasaki H, Matsuda M, Lu Y, Ikuta K, Matuyama S, Hirabayashi Y, Mitsui H, Matsumura T, Muramatsu M, Tsukada T, Aizawa S, and Inoue T : A fraction unresponsive to growth inhibition by TGF- $\beta$  among the high-proliferative potential progenitor cells in bone marrow of p53-deficient mice. *Leukemia*, 1997, 11, 239-244.

Nishimura Y, Hirabayashi Y, Matuszaki Y, Musette P, Ishii A, Nakauchi H, Inoue T, and Yonehara S. : In vivo analysis of Fas antigen-mediated apoptosis: Effects of agonistic anti-mouse Fas monoclonal antibody on thymus, spleen, and liver. *Int Immunol* , 1997, 19, 307-316.

Yoshida K, Inoue T, Nojima K, Hirabayashi Y, and Sado T. : Calorie restriction reduces the incidence of myeloid leukemia induced by a single whole-body radiation in C3H/He mice. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1997, 94, 2615-2619.

Inoue T, Cronkite EP, Hirabayashi Y,

Bullis JE, Mitsui H, Umemura T.: Lifetime treatment of mice with azidothymidine (AZT) produces myelodysplasia. *Leukemia*, 1997, 11 (Suppl 3), 123-127.

Inoue T, Hirabayashi Y, Matsuda M, Furuta Y, Aizawa S, Sasaki H.: Model of MDS-like myelodysplasia that transforms into single lineage-hemopoietic malignancies upon transplantation—implication for pediatric myelodysplastic syndrome—. *Intnt'l J Ped Hematl/Oncol.*, 1997, 4:221-230.

Hanzawa C, Kobayashi K, Hirabayashi Y, Inoue T, Aizawa S, Adachi K: Hair follicle dermal papilla cell lines from p53-knockout mice. *J Dermatol Sci*, 1997, 15, 59-63.

Hirabayashi Y, Matsuda M, Matumura T, Mitsui H, Sasaki H, Tukada T, Aizawa S, Yoshida K and Inoue T: The p53-deficient hemopoietic stem cells: their resistance to radiation- apoptosis, but lasted transiently. *Leukemia*, 1997, 11 Suppl 3, 489-492.

菅野 純、相賀 裕美子、井上 達 化学物質の生物毒性試験 —内分泌障害性を中心に— 組織培養工学24  
H10年7月

Atsushi Ono, Masaya Yamamoto, AtsuyTakagi, Jun Kanno, and Tohru Inoue. Molecular mechanism of endocrine disrupting chemicals (EDCs) (Celebrating the 10th Anniversary of the AACR Special Conferences in Cancer Research) H11

井上達、菅野純 内分泌障害性化学物質 (endocrine disruptors) の検出の為の新しい試み。第14回日本毒性病理学会 H10年2月

井上 達、菅野 純 内分泌攪乱物質とは何か。内分泌攪乱物質をめぐる生活と食の安全についての国際シンポジウム H10年6月

井上 達、菅野 純 エンドクリン問題の最近の動向 ポリ衛協会報 3 H10年8月

G. 知的所有権の取得状況



別添資料1

内分泌かく乱化学物質実験者レベル会合（厚生省生活科学研究菅野班班会議を兼ねる）

第1回 菅野班 議事録

日時：平成10年9月22日（火）午前10：00～12：00

場所：通産省本館17階第4共用会議室

座長：井上 達

進行：菅野 純

事務：高月峰夫

出席者：22名

井上 達（国立医薬品食品衛生研究所）

菅野 純（国立医薬品食品衛生研究所）

高月峰夫（財・化学品検査協会）

青山博昭（財・残留農薬研究所）

山崎寛治（財・化学品検査協会）

佐藤正邦（財・化学品検査協会）

矢可部芳州（財・化学品検査協会）

長尾哲二（財・食品薬品安全センター）

永井賢司（三菱化学安全科学研究所）

米澤義堯（通商産業省）

広瀬雅雄（国立医薬品食品衛生研究所）

三森国敏（国立医薬品食品衛生研究所）

中山 誠（厚生省）

斉藤幸一（住友化学工業株式）

山本雅也（国立医薬品食品衛生研究所）

小野 敦（国立医薬品食品衛生研究所）

宮城恵理（国立医薬品食品衛生研究所）

松島裕子（国立医薬品食品衛生研究所）

山本 史（厚生省）

羽深康雄（通産省）

田中俊博（通産省）

米山隆浩（通産省）

（敬称略）

本会合の目的：第一の目的は、省庁の枠を越えた実権者レベル、特に人体影響に対する研究を行う立場にある方々の間での忌憚のない情報交換と科学的ディスカッションの場を提供すること。本会合の第二の目的は、日本国内での研究の重複の無いプロとコールの異同等を相互に認識することにより、調整が可能な場合は調整し、科学的に相補性の高いデータの蓄積が可能となるような方向性を見いだすこととしたい。

議題：

1. In vitro 試験・研究

HTPS, cell line, estrogen receptor 系について、androgen receptor 系について、thyroid hormone receptor 系について、米国 EPA/OSI トの対応について。

Chemical choice、350 化合物質の選定について厚生省予算。

2. In vivo 試験・研究

OECD issue, methodology,

Uterotrophic assay, Hershberger assay, 28day assay(407 enhanced), Two generation assay, Chemical choice

井上：内分泌かく乱物質がクローズアップされてきて補正予算が通り、通産省 6 億 5 千万で、通産省としては試験法の開発、暴露、〇〇を実施いたします。厚生省としては、ハイスルーブットを用いた試験ということでバリデーション、福島斑は二世世代試験、広瀬斑は 28 日間試験があります。更に、厚生省としてハイスルーブットを中心とした菅野斑があります。この菅野斑を利用して実験者の手技交換があるとよいと思っている。通産、厚生省も研究交流の場として利用して欲しい。

名簿上の四人は、ハイスルーブット菅野斑の班員で、下の方々は、技術的面でこの斑を越えて、協力研究員として入っています。このため目的は二重となっております。

通産省の化学物質対策室の羽深さんよりお話いただきます。

羽深：この会議はお客様と呼んでいただいているという立場でよいでしょうか。これからの問題としてバリデーションをどのようにしていくのか。日本が OECD に提案できるものができてくれることを望みます。通産省も厚生省と一緒にやっていければ良い試験法が出来るのではと期待しております。バリデーションとして物質の選択にどのように対処していくのかを考えなくてはならないと考えております。

生活衛生局食品化学課・中山：昨今、内分泌かく乱物質については世論的に人気があり、問い合わせ等非常に多くなってきております。HTPS を中心にやっていくということで、厚生省のみでなくいろいろな方の御意見を聞いてより素晴らしい物にして欲しいと望んでいます。

菅野：in vitro ではハイスルーブットを OECD の問題があるのでそれに絡めていけたら面白いであろうと考えています。高月先生に cell line のところから御説明いただきます。

高月：住友化学さんの方で cell line を作製していただき、それを用いて試験法の実施を試みるつもりです。日本での assay 系と致しましては、エストロゲンレセプター $\alpha$ および $\beta$ のレポーター gene の assay 系を開発いたします。Cell line はエストロゲンに反応する細胞として、MCF-7、HeLa cell、アンドロジェンに反応する細胞は、MDA、HeLa cell、甲状腺ホルモンに反応する細胞は、HeLa cell を用い、これらに、それぞれのホルモン反応領域を組み込んだレポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）のプラスミドを導入いたします。

住友化学工業・斉藤：安定株が出来そうです。化検協に 9 月末にハイスルーブットが入るので実際の化学物質を実施してみる予定です。米国でも数百万をハイスルーブットで検出している。12 月までに 150 物質を米国で検出する。日本でもその同じ物質を米国から入手して比較できればよいと考えています。

井上：物質の選定はまだこれからであり、産業界からより広い物質を選定して欲しいのと以来により、150 物質となりました。

住友化学工業・斉藤：MCF-7 はレセプターを発現しているが、 $\alpha$ が主で、 $\beta$ は少量です。操作的には、レポーターのプラスミドを 1 つ入れるだけなので簡単です。米国と異なる点は、日本では、甲状腺ホルモンレセプター $\alpha$ および $\beta$ の 2 種類もはかる試みがなされることです。レポーターはルシフェラーゼで行います。甲状腺ホルモンレセプターの $\alpha$ と $\beta$ の違いは良く分かっています。また、HeLa 細胞における甲状腺ホルモンレセプターの発現の有無はこれから検討する予定です。

井上：他に cell line に関する御質問はありませんでしょうか。

住友化学工業・斉藤：Hela 細胞を用い、エストロゲンレセプター $\alpha$ に関して、リポフェクタミンを用い活性の高い細胞が得られるか否か検討しているところです。96 穴プレートを 500～1000 枚使います。 $\alpha$ に関しては活性が高い細胞が取れることが分かりました。ホルモン反応領域はヒト由来のものではなく、魚のピテロジェニンの反応領域をタンデムに組み込んだものを用いています。一方、MCF-7 細胞においては、活性にばらつきがあります。

井上：米国と交換したりするのはどのようにするのですか。

羽深：ネド？との調整が必要です。

井上：国立サイドの研究あるいは営業はどのようにするつもりでしょうか。

羽深：国の開発なのでお金は取りません。ですからコントラクトラボで使用するのは可能ですが、細胞の売買はだめです。

工技院資環研・米沢：MCF-7 をサーベイに使えるでしょうか。細胞の活性、安定性が悪いので使用時に供給してもらうのがよい。10 月初旬に〇〇が出来上がることになっている。10 月 5 日には講演会を予定している。

井上：物質の選択はどのように致しましょうか。

高月：まだどのものにするのかは決めていません。試験実施可能な物質を選択したいと考えております。

井上：350 物質についてアウトラインはあるのですか。

山本（通産省）：この班でプライオリティを決めていただきたいと思います。外部の人気も高いのでやっておく必要があると思いますが、何をするために 350 物質をかけるのかを考えていただきたい。EPA の 150 物質の選定に準えて日本も選択していただきたい。そのためトータルでどの位の物質になるのかもこれからの選定にかかってきます。今年度は、このような基準で選定したとはっきりとする能名もノにしていきたい。

羽深：このバリデーションをどのように位置づけるかですね。ハイスループット以外に in vivo もありますし、ハイスループットの結果をどのように評価していくのが良いのか。ハイスループットで引っ掛かったものは in vivo 試験に持って行って in vivo との関連づけでやってもらうと良いと考えています。日本では、引っ掛かると報道等で騒ぎになる可能性がある。

井上：ウィブリッジ会議（英国）ではホルモンの産生、輸送、ホルモン作用のあらゆるところに影響のある物質を内分泌かく乱物質とするという事になりました。EPA を中心に煮詰めていく過程で、ホルモンの産生～排出はエンドクラインと disruptor がどう違うかが米国で論争となりました。エンドポイントは、後世代に影響があるか否かということです。ハイスループットで黒と出たものがこれから内分泌かく乱物質として考えるという手始めのところでありまして、〇〇〇・・・。内分泌かく乱物質とは、かく乱の可能性のあるものは外し、確実にかく乱作用があるものをこれとする。

350 前後の物質を選定するにあたり、このようなカテゴリーで入れたらよいのではという何か御提案はありますでしょうか。

三森：消費者に問題であるのは難分解性で体に入ってくるものであると考えますと分解性が悪く、蓄積性の高いものはどの位あるのでしょうか。

山本（通産省）：PCB などいろいろな異性体がありますが、それを全部一まとめにして、PCB は 1 つと考えるというスキームで行きますと 9 つです。蓄積性なしは 23 物質ですが、トリブチルスズや PTP? は環境中で分解するのでそれを除くと 15 物質。

三森：化審法から考えてみるということも必要ではないでしょうか。

井上：試験法の開発がきちんと動くか否かということはある物質で見ておく必要があります。

高月：化審法で引っ掛かるものは、新規化学物質であり、トン単位で生産されているものは少ないのではないのでしょうか。疑いのある内分泌かく乱物質で濃縮性のあるものはほとんど無いのではないのでしょうか。

井上：ここでは化学物質の選定の取り扱いのみを決めたい。

羽深：日化協に考えてもらって、選定した物質をもらい受けることにしようと思う。ハイスループットと in vivo がセットでないと難しいと考えています。

井上：この物質を positive control に入れると面白いのでは、あるいは negative control にいれると面白いのではという物質はないのでしょうか。日本独自の現場から出てくるハイスループットで白、黒、灰色にできるものを選択して欲しい。

羽深：ハイスループットは 2 つで 1 セットです。

住友化学工業・斉藤：入るのは 11 月末～12 月になります。

化学品検査協会・矢可部：10月末に入ります。11月初旬にハイスルーブットが作動しているのを見れると思います。

井上：では *in vivo* に移ります。

菅野：別紙2, OECDの11月の会議に向けてバリデーションを実施しようとしています。OECDで *Uterotrophic* および *Hershberger* を実施しようとしています。*Uterotrophic* における問題点は、卵巣摘出動物を用いるのかあるいは未成熟動物を用いるのか、ラットかマウスかということです。*Hershberger* の問題点は、何週齢のラットを用いるのか、カストレーション後すぐに投与するのかあるいは1週間待つのか、カストレーションで精巣上体も取るのかということですが、いまのところバラバラなプロとコールが走りそうであります。

井上：ということは試験法の確率ということですね。菅野先生は、11月まで各研究機関で実施する *Hershberger* の試験を統一したほうが良いと考えているのでしょうか。でも現在は試験結果にしても模索中なのでいろいろな試験を実施してみてその結果を比べないとどの試験法がいいのか分からないのではないのでしょうか。用量の設定をいろいろな機関でオーバーラップさせると比較しやすいのではないのでしょうか。

高月：*Uterotrophic assay* は低用量のDESを7日間投与しています。経口でDES投与3日間では膣開口は起きないが、DESでも膣開口に4日間必要で、対照群は約33日で膣開口する。

青山：二世代繁殖試験ではSD rat(チャールスリバー、SLC)、27日齢でcontrol群に膣開口は起きない、平均で30日齢で膣開口となる。*antiestrogen* の投与ではもっと膣開口が遅れる。我々の研究所では、エストロゲンを投与して膣開口が合った日に屠殺し、体重および子宮重量を測定しています。膣開口があった日が性成熟の日と考えています。

化検協・佐藤：クロミフェンは *antiestrogen* ですが、高用量では *estrogen* 作用を示し、5日間の投与で膣開口があります。

永井：膣開口と子宮重量はわけて考えたほうが良いと思います。膣開口は特異性のあるものです。子宮重量は3日間の投与で十分であると思います。

井上：未成熟動物に対する考え方の違いについて

山崎：膣開口と子宮重量とはわけて考えないといけないのではないのでしょうか。組織の反応の方が先で、子宮重量が増加するよりも膣開口の方が遅いのではないかと考えます。

青山：*immature* を用いた *assay* では18日齢の動物に3日間投与というのがある。

山崎：膣開口をいつ見るのかで結果は異なってくると思います。朝、昼、夜で観察した時間帯でも異なる。夜に見過ぎて、翌朝膣開口をチェックしたとすると1日ずれたことになります。組織も同時に見た人がいないのでそこから始めないといけないのではないのでしょうか。

現在我々の研究所では、DES 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  できたので？追試をしています。公比10で、0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ○○・・・。

高月：OECDのプロとコールには膣開口も入れてある。

矢可部：我々の研究所では、OVX動物でのデータがよくなかったので未成熟動物を用いた試験法に進みたいと考えています。物質の投与を1日1回にするのかあるいは2回が良いのか。投

与経路は経口あるいは皮下投与どちらにするのか。いろいろな問題があります。

菅野：Sensitivity の問題で知見のあるかたはいらっしゃいますか。

井上：量的な問題とクオリティの問題があるようですね。未成熟動物と卵巣摘出動物で sensitivity の有るほうが良い人がある？。ラットの方はマウスに比してばらつきが有るとい人もいます。Hershberger についてはいかがですか。

菅野：我々の研究所ではテストステロンを何にするのか。メチルテストステロン、BHT、テストステロンあるいは何にするか迷っているところです。投与経路は皮下を考えています。

高月：uterotrophic assay の投与経路は経口にしたいと考えています。

菅野：Hershberger の試験で各研究機関の先生方は何週齢の動物を購入しカストレーションを何週齢で実施するのかをお聞きした。

永井：カストレーション後すぐに投与するのか、あるいはカストレーション後 1 週間位してから投与するのかいろいろな系を試すしかないのではないのでしょうか。私が考えていますのは、カストレーション後未成熟動物は 2 週間、成熟動物は 1 週間おいてから投与したほうが良いと考えています。

高月：21 日齢でカストレーションし、28 日齢で投与開始が良いと思う。

菅野：我々は投与期間は 3、5、7 日をみたいと考えている。ここは調整するかかなさそう。

永井：少なくとも各研究機関で投与物質は揃えたほうが良いのではないのでしょうか。

アンドロゲン系を確立してから。

山崎：positive control のデータを持つてるヒトはいらっしゃいますでしょうか。フルタミドを考えていますが。

菅野：二世代の方も青山さんから説明をお願いいたします。

青山：日本で農業についてのガイドラインが出来ましてこのプロトコールに従いまして農薬の内分泌かく乱物質があります。メトキシクロール、パラパラ DPD?どの項目が引っ掛かってくるのか。今回我々は、メトキシクロールのラットにおける繁殖毒性試験を計画しておりますのでそのプロトコールを御紹介いたします。

菅野：28 日間試験に関して、広瀬先生から説明をお願いいたします。

広瀬：まだスタートしていません。OECD に準じて実施しようと考えております。一般には 3 用量ですが、ここにもう 1 用量追加したいと思っています。化学物質に関してはヒトへの暴露量に近いものを暴露していきたいと思えます。また、物質によっては用量設定が取れないものが出てくる可能性が有ります。低容量を試験に入れた理由は、マスコミが低容量で何か影響が出るのではないかと疑心しているのを追加しました。28 日試験での化学物質は uterotrophic および hershberger に準じた物質を使用したいと考えています。フルタミド、エチルテストステロンなど。甲状腺の系は今回は 5 物質しか出来ないということで除外しました。投与経路は diet にしていきたいが in utero の関連で強制経口を採用したい。しかし、ラットへの強制経口投与はストレスがかかるのでホルモン系には大丈夫であろうかと思案しているところです。血中ホルモンの測定は、採決時にどれだけ動物が静止していたかで変動する。午前 8~10 の間に測定する

ようにプロとコールには書いてあるがはたして実現可能であるかも問題です。また、屠殺前に動物を一晩絶食させるのか否かもまだ確定されていないところです。

井上：407 のガイドラインではどのようになっているのでしょうか。

高月：407 についてはどの研究機関からも出てきてません。

広瀬：今回我々はこの試験で OECD に積極的に何かするつもりは有りません。407 は強制経口にする可能性が高いようですがそれがかまいません。

井上：次の会議の日程はどう致しましょうか。

山本（通産省）：データを付け合わせて他の省庁の方とも調整を取りたいので早いほうが良い。OECD 対応の話をするのは菅野班だけ出よいのでしょうか。また、他のヒトにも集まってもらったほうが良いのでしょうか。

井上：OECD にブレーキをかけることは出来るのか。ブレーキをかけたとしても問題は OECD の全部の日程がずれてしまうことです。このままでは OECD は今回の班会議で出たような細かなところまでの問題点は煮詰めていないのでわれわれがブレーキをかけないとこのままで OECD のプロとコールが通過してしまうでしょうね。

次回、第 2 回班会議は 1998 年 11 月 2 日午後 1：30 からです。

以上

文責（松島・宮城）

内分泌かく乱化学物質実験者レベル会合  
(厚生省生活科学研究菅野班班会議を兼ねる)

第2回菅野班議事録

日時：平成10年11月2日(月)午後1:00～5:00

場所：通産省別館902室

座長：井上 達

進行：菅野 純

事務：高月峰夫

出席者：24名

青山博昭(財・残留農薬研究所)

池田年仁(厚生省)

井上 達(国立医薬品食品衛生研究所)

今井 清(財・食品薬品安全センター)

今沢孝喜(国立医薬品食品衛生研究所)

梅村建夫(ボゾリサーチセンター)

江藤千純(財・化学品検査協会)

川崎 一(住友化学工業株式会社)

菅野 純(国立医薬品食品衛生研究所)

高月峰夫(財・化学品検査協会)

田中俊博(厚生省)

豊田和弘(国立医薬品食品衛生研究所)

永井賢司(三菱化学安全科学研究所)

中井 誠(財・化学品検査協会)

長尾哲二(財・食品薬品安全センター)

中山 誠(厚生省)

羽深康雄(通産省)

広瀬雅雄(国立医薬品食品衛生研究所)

松島裕子(国立医薬品食品衛生研究所)

山崎寛治(財・化学品検査協会)

山田智也(住友化学工業株式会社)

山本 史(厚生省)

米澤義堯(通商産業省)

米山隆浩(通産省)



(五十音順および敬称略)

菅野：開会挨拶

井上：座長挨拶

省庁から挨拶

羽深：OECD バリデーションのプロトコールについて日本からの指摘があれば積極的に日本からの案として検討したい。通産側としては、ハイスループットの操作を用いたデータを提出する。

山田：エストロゲン $\alpha$ レセプターについて検討しているが、MCF-7 では 2 倍程度とあまり上昇せずこの試験系は適切ではないと考えられる。しかし、MCF-7 には亜種もあるのでそちらでの検討を考えている。HeLa 細胞でも検討を行っているが、のぞましい適切なクローンについては未だ検討中です。

羽深： $\alpha$ 、 $\beta$ など 5 種類について検討しているということですが、いつごろまでにデータが出てくるのか。

高月： $\alpha$ については 11 月中旬。残りも 12 月までにデータを出したい。現在は、HeLa 細胞を中心に実施している。

山田：MCF7 は 2 倍の上昇しか見られなかったので、アッセイには不十分と考える。HeLa 細胞を用いた理由は、米国の場合 $\alpha$ および $\beta$ の両方をアッセイするというので検討しているが、 $\beta$ は弱いので、 $\alpha$ および $\beta$ を分けてアッセイしようという考えで、HeLa 細胞に組み込んで試験しているが、現在目星が付きはじめた。

井上：今の御説明ですが、どこまでエクспRESSION出来ているのか具体的に示していただかないと技術的には納得いかない。

羽深：前回の会議で、今回具体的なところを発表していただくことになっていたのですが、どうでしょうか。

井上：データとしてのものが具体的に示されないのどう致しましょうか。HeLa 細胞を用いたということは、方針転換ということ認めざるを得ないでしょう。Cell line を変えたということで。

山田：MCF-7 はこれは試験することに決まっているが、HeLa 細胞については、ハイスループットの機械が 12 月に入ることになっているのでハイスループットを用いてセレクションすることになります。細胞に遺伝子を導入することはすでに出来ていますが、セレクションの方は、機械で行おうと思っているので。

井上；その場合、ラインは幾つ取れるのですか。何個しかけて、何ラインとれて、最終的に取れたのは何ラインで。エクспRESSIONはみていないにしても。

羽深：住友さんは、いま井上先生がおっしゃられた内容を 12 月 25 日の分科会で発表していただくのでその前に井上先生へペーパーで報告して下さい。

井上：活性は見えていないのですか。どのような形で増えているのかを報告していただきたい。ロボットで走らせて、セレクションをしていくということなのでそれについても報告していた

だきたい。

では、化学物質の選定ということについて話を進めます。

青山：エストロゲン作用のあるパラベンを入れたらどうでしょうか。

羽深：厚生省の方には未だお見せしていませんが、通産省としての考え方は、米国 EPA 選定物質 75、CMA 選定予定物質 150 および構造活性相関を見るための物質をあわせて 350 物質選定する。これらの物質のサンプルは、日化協からの提供、市場から購入、米国から入手する事を考えている。米国とは、細胞交換も行い、物質もある程度ダブらせてその結果を比較検討してみたい。最終的には、in vitro での結果を in vivo に持って行って欲しいですね。もう少し、厚生省サイドと詰めていきたいが、日化協では、あつかえる物質であれば協力しようという姿勢です。入手には約 1 ヶ月くらいかかります。

通産資料の 3 頁目にありますように、通産省としては、10 年度補正は約 4.5 億円、これはプレスクリーニング試験法の開発とスクリーニング試験開発および OECD バリデーション試験の実施の予算です。2 次補正として 5 億円要求しています。これは in vivo のための予算で 15 ヶ月分です。

井上：厚生省サイドで何か御意見はありますか。

池田：リストの案が出ていないということであれば未だコメントすることは有りません。

井上：日本として物質の選定機序をどうしましょうか。

通産省から提案のあったリスト、衛研では関沢さんのリスト、EPA の 75 物質、CMA のサジェスションおよび化検協のリストがあります。ハイスループットが動くでしょうが、ハイスループットにかける物質にも順序が必要でしょうか？。タイムテーブルの問題もありますし。

高月：HTPS で 15000 づつ測定する手順は書いてあります。クライテリアとしてエストロゲン、アンドロゲンレセプターの方向で、資料(Subject: Draft criteria for substances to be evaluated in the HTPS assay)に有りますように 7 つこれらを盛り込むかたちでやっていったほうが良いのではないのでしょうか。米国でやっている無機酸等は必要ないと思いますが。最終的には 270 位であるが、とても試験できそうな物質もあるので現在セレクトしてリストを作成中です。150 物質のうち 75 を選択しています。これはオフィシャルにつかめています。EPA には 150 物質くらいあります。CMA のカテゴリーはこのリストを考えている。工業界の方であまり公にしたいくない、入れたくないという物質もありますのでそれらは調整しているところです。

井上：これらをどのように調整していきましょうか。12 月の初めまでに計画的にリストができればよいと思いますが。

羽深：本格的に試験が動くのは 1 月に入ってからなので、12 月にはリストを作っておきたい。最終的に決定するのは、厚生省サイドですけれども。

井上：この班の考え方としては、バリデーションのための試験として取るべきではないでしょうか。ハイスループットで出てきたデータは、一審判決さえ出ていないという考え方で。ハイスループットで出てきたデータは、たんなる証拠調べの予備データとして出すのが良いのか、あるいはいっさい公表しないのが良いのかはかりかねますが。

青山：エストロゲンが必ず陽性にでる物質を第一候補として選定し、環境庁の 75 物質については、あまりこだわらなくとも良いのではないのでしょうか。バラベンは *in vivo* でも陽性になっているので候補にしたい。

井上：12 月上旬には決める必要があるが、どのような手順が考えられるでしょうか。

高月：化検協は、今月末までに考えたい。基本的には、将来、構造活性相関の比較に使える物質を選定したいと考えている。

井上：タイムテーブルはどうでしょうか。

高月：EPA のリストがいつ出てくるのが問題です。ホームページにあるものは、正式なものではないのですよね。EPA のコアリストはあるが。

井上：ワーキンググループを作ってそこで検討してもらいましょう。ワーキンググループでは 12 月 25 日までに提案の準備をして欲しい。このワーキンググループはどうでしょうか。

羽深：高月先生、菅野先生、田中さん、私羽深の 4 人をコアにして、あとは化検協さん。

井上：HTPS についてはここまでにして、*uterotrophic assay* の *immature rat* 系、*OVX rat* 系、投与経路、試験系全体に対する位置づけについて御討議をお願いします。

菅野：*uterotrophic assay* を実施した機関は、衛研、安科研、食薬センターです。

永井：資料説明。*Immature* に比し、*OVX rat* のほうが感度が良い。3 日間投与よりも 5 日間の方が良い。

食薬：資料説明。

菅野：資料説明。*OVX* の方が数値的にも 3 倍くらい感度が良い。*Immature* はごく狭い 3~5 日くらいしか使えない系である。*Vaginal opening* と黄体の形成には、少しずつがあるようです。

井上：*immature* 系をどのように評価するか。あと投与経路について。ラットを生きた試験管としてとらえるのか、あるいは *in vivo* 系としてとらえるのかによって考え方が変わります。*Dose response* は *immature* 系でも 3 日間では大丈夫であるが、日が経つと *immature* 系では、できなくなるのですね。

永井：生後 28 日齢ではもう遅すぎます。*Immature* 系はとてもクリティカルである。18-20 日齢投与よりも 24-26 日齢投与の方が感度が良い。*BrdU* による RDS は感度が良い。

井上：*immature* 系は、ナローウインドウのところでは実施しているデータということですね。*OVX* 系の方が 3 倍感度が良いが、3 日間の投与では、*OVX* の手間のいらぬ *immature* 系が良いということでしょうか。

*Histology* に関してはいかがでしょうか。

今井：*BrdU* に関しては、メリットは非常に高い。1 つのエンドポイントに加えるべきだと思われる。*Immature* は *OVX* とコンパラティブなのでどちらでも良いと思う。

井上：*OVX* の方が、3 倍感度が良いので捨てがたいですね。日本としては、バリデーションをすとなったらある程度 *OVX* をするあるいは平行する方向で行ったらどうでしょうか。

山崎：DES の経口投与で、6 時間後の腸管と胃と血中の DES を測定したところ、腸管と胃内

の DES は振り切れるほど高かったのですが、血中にはほとんど行っていませんでした。これは DES が吸収されなかったためと考えられます。

井上：immature rat でも十分に検出可能。しかし、OVX は 3 倍感度が良い、長い期間投与可能、ウインドウが広いなど良い面がある。

永井：投与する日齢をどうするかという問題では、immature rat は 20 日齢以前の投与寄りも 20 日齢以降の投与感度が良い。しかし、25 日齢になるともう危ない。

菅野：エストロゲン投与による膣開口の反応は、子宮の反応よりも遅い。エストロゲン様物質の反応を見るには、膣開口のみよりも、子宮重量の方が感度が良い。

井上：そうですね。膣開口と子宮重量は別と考えるべきでしょう。経口と皮下投与の問題はどうでしょう。

永井：皮下投与に賛成します。経口は、吸収などの問題が出てきますし、皮下投与の方がその物質のポテンシャルを検出できる。次の F1 の問題も考えていかないといけない。

井上：皮下投与ということは、ラットを生きた試験管とする考え方です。

川崎：OECD は基本的には、経口投与です。一般の人が、ラットでの試験をテストチューブとして認識するかどうか、きちんと説明しないとイケない。

井上：Immature 系を用いて投与したときは、一般の人は子供への暴露とかそのようなことを考えかねないので非生理的なすなわち生きた試験管的な方向へ持っていけないといけないが、そのような意味でも皮下投与の方が良いと思う。

永井：10 月 27 日付けでは、OECD は経口投与となっている。

菅野：経口と皮下投与では、感度に十倍ほどの差があることは、すでに明白です。試験管として実施するには、感度の良い皮下投与のほうが良いと思います。

羽深：その物質が *in vitro* では灰色でも *in vivo* で白黒を付けて欲しい。

川崎：皮下投与で実施したときに環境中のエストロゲンには、刺激性のあるものなど含まれているので、皮下に刺激を起こし、炎症性のサイトカインなどでエストロゲン様に反応がモデファイされる恐れがある。高次アッセイの時にまた経口投与になるならば同じことではないでしょうか。最初から皮下投与ではなく経口投与に持っていったほうが、二重手間を省けるのでは。

井上：ハイスルーブットでは、フォールスネガティブがよくでるのか良く分かっていないが、ハイスルーブットで陰性ならネガティブとするのが正しいと思う。しかし、次の過程の Uterotrophic assay をどのように位置づけるのか良いのでしょうか。Uterotrophic assay で陰性ならばどのように判断するのか。

高月：たとえばポリマーなど、環境エストロゲン様物質には溶けにくい物質がたくさん存在すると考えられますが、その場合皮下投与で大丈夫なのでしょうか。経口投与の方が良いのではないのでしょうか。

井上：そうですね。日本だけ皮下投与にするというわけには行かないでしょうね。

菅野：*in vivo* を実施した中で、一番高感度の方法で実施したとうスキームがよいのではないのでしょうか。*In vitro* はハイスルーブットしかないわけです。そのギャップと 407 をつなげる