

別添 2.

厚生科学学研究研究費補助金

内分泌かく乱化学物質等、生活環境中化学物質による人の健康影響  
についての試験法に関する調査研究  
(H10-生活-018)

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 今井 清

平成 13 (2001) 年 4 月

別添 3.

## 目 次

### I. 総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質等、生活環境中化学物質による人の健康影響についての試験法に関する調査研究 (H10-生活-018) . . . . . 1

今井 清

### II. 分担研究報告書

#### (1) <試験法開発部門>

1. 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の検討 . . . . . 19

永井 賢司

2. 新規 in vivo スクリーニング法開発のための研究( $\alpha_2$ U-globulin の生体内動態と内分泌かく乱化学物質の Screening 法への応用) . . . . . 29

武吉 正博

3. 哺乳動物培養細胞を用いた内分泌かく乱化学物質検出系の検討 . . . . . 39

塚田 俊彦

4. ホルモンレセプターを介する内分泌かく乱化学物質の検出系の検討 . . . . . 44

西原 力

5. エストロゲン様化合物のコアクチベータ LXXLL 色素標識を指標とした内分泌かく乱化学物質の高感度検出法 . . . . . 48

正宗 行人

6. 内分泌かく乱作用を修飾するヒト代謝活性化系および不活性化系導入・発現細胞の開発 . . . . . 56

大野 泰雄

7. 内分泌かく乱化学物質のエストロゲン代謝に及ぼす影響とそのスクリーニング法の開発 . . . . . 66

鈴木恵真子

8. 内分泌かく乱化学物質の胎生期および新生児期暴露による視床下部神経核の構造変化と生殖異常 . . . . . 74

長尾 哲二

9. 哺乳動物培養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の検討	80
渡辺 敏明	
10. フタル酸エステルによる生殖障害に関する研究	88
江馬 眞	
11. 内分泌かく乱化学物質の発がんプロモーション作用の検討	98
白井 智之	
12. 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	108
広瀬 雅雄	
(2) <OECD 対応等試験法開発部門>	
13. 子宮肥大試験法および Hershberger 試験法の適用に関する研究	114
吉村 慎介	
14. 子宮肥大試験法および Hershberger 試験法の適用に関する研究	120
金子 豊蔵	
15. OECD ガイドライン 407:28 日間反復投与毒性試験法の適用に関する研究	124
広瀬 雅雄	
(3) <新規基盤整備研究部門>	
16. 内分泌かく乱化学物質の電算探索と評価に関する研究	136
板井 昭子	
17. 3D-QSAR (三次元定量的構造活性相関)に関する実験解析的研究	154
菅野 純	
18. マウスからヒトへの外挿モデル系構築のための実験動物トキシコゲノミックス・プロテオミックス系の試行実験	161
井上 達	
19. 子宮肥大試験等対応の為の試験開発としてのトキシコゲノミックス・データベース構築の基礎的試行実験	167
小野 敦	
(4) <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>	
20. 内分泌かく乱化学物質等の文献情報に関する調査研究	171
長谷川 隆一	
21. データベース構築と3次元構造活性相関に関する研究	183
中田 琴子	
22. 健康影響に関する情報収集と評価に関する研究	187

関沢 純

23. 内分泌かく乱化学物質の用語集の作成に関わる調査研究・・・・・・・・・・191

長村 義之・菅野 純

Ⅲ.研究成果の刊行に関する一覧表

Ⅳ.研究成果の刊行物・別冊

別添 4.

## 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

### 1. 総括研究報告書

#### 内分泌かく乱化学物質等、生活環境中化学物質による人の 健康影響についての試験法に関する調査研究

主任研究者 今井 清 （財）食品薬品安全センター秦野研究所 副所長

研究要旨：本研究は、内分泌かく乱化学物質の諸課題の内、試験法の開発を中心とした研究を推進し、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3年目の本年度は、〈試験法開発部門〉、〈OECD 対応等試験法開発部門〉、〈新規基盤整備研究部門〉、〈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4分野に大別して、研究を実施した。

〈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研究（永井、武吉、塚田、正宗、西原）、薬理・代謝研究（大野、鈴木）、生殖・発生研究（長尾、渡辺）、生殖機能に関する研究（江馬）、発がん性試験研究（白井、広瀬）などについて基礎的な検討を行ってきた試験法の多くが、新たな試験法として利用価値の高いものであることが明らかにされた。〈OECD 対応等試験法開発部門〉においては、国際協力に一環として実施した子宮肥大試験、Hershberger 試験および OECD ガイドライン 407（28 日間反復投与）試験のプレバリデーション、バリデーション試験の結果を基にして、子宮肥大試験においてはガイドライン化に向けて検討作業を開始した（吉村、金子、広瀬、菅野）。〈新規基盤整備研究部門〉では、内分泌かく乱化学物質の電算検索と評価に関する研究（板井）、および 3D-QSAR に関する実験解析的研究（菅野）ではこれらの試験法が新たなスクリーニング法として利用しうる可能性が示された。トキシコゲノミクス関連では、エストロゲン投与による子宮肥大

反応に際し約 250 種の遺伝子発現に変動が見られ、さらにエストロゲン投与により視床下部においても遺伝子発現が変動していることが明らかにされた(井上、小野)。〈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(中田、関沢)等の集積をした調査・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、本研究の成果物として、「内分泌かく乱化学物質の生物試験研究法」を編集・出版した(長村、菅野)。

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

永井 賢司

三菱化学安全科学研究所鹿島研究所 主任研究員

武吉 正博

(財)化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所 主任研究員

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

西原 力

大阪大学大学院薬学研究科 教授

正宗 行人

金沢大学薬学部分子細胞薬学講座 教授

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

鈴木恵真子

(株)イナリサーチ第2研究所検査部 部長

長尾 哲二

(財)食品薬品安全センター秦野研究所生殖生物学研究室 室長

渡辺 敏明

山形大学医学部衛生学教室 助教授

江馬 眞

国立医薬品食品衛生研究所大阪支所生物試験部 部長

白井 智之

名古屋市立大学医学部第一病理学教室 教授

広瀬 雅雄

国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター病理部 部長

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

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

板井 昭子

(株) 医薬分子設計研究所コンピュータ医薬分子設計学 所長

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

長谷川隆一

国立医薬品食品衛生研究所総合評価研究室 室長

中田 琴子

国立医薬品食品衛生研究所化学物質情報部 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

菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部 室長

長村 義之

東海大医学部内分泌病理 副医学部長、教授



## A. 研究目的

本研究で、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、既に活動を開始した国際協調下、国内諸機関の協力のもとでこの課題に則した各種実験が行われる際に、速やかに適切な体制をとってこれに応じることができるような科学的・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の方策を、総合的に研究推進することに主眼をおいている。最終年度にあたる本年度は、この期の cDNA マイクロアレイの毒性学領域での急速な応用の動きに鑑みて内分泌かく乱化学物質として取り上げることが可能な OECD で対象とした化学物質について実験動物の内分泌機能に関連した発現遺伝子の諸臓器におけるサーベイと、各物質間の比較を行い、今後のこの方面の研究の基礎となる基盤研究を立ち上げて、可能な限り系統的成果をあげることを目的にして新たな研究グループを組織した。

## B. 研究方法

3年計画で開始した本研究の最終年度にあたる本年度は、1) 試験法開発部門、2) OECD 対応等試験法開発部門、3) 新規基盤整備研究部門、4) 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4分野に分けて研究を行った。

### <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、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ゲン活性評価系を検討するため、アンドロゲン受容体 (AR) に対しアンタゴニストである flutamide, pp'-DDE, Vinclozolin, 5 $\alpha$ -reductase 阻害剤である finasteride を3日間投与し、同時に testosterone propionate を皮下投与した。前立腺腹葉細胞を単離・固定し、DNA 鎖 TUNEL 反応によって標識することによりアポトーシス細胞の割合をフローサイトメロリーによりを解析した。更に、propidium iodide による DNA 染色により細胞周期毎のアポトーシス細胞の割合を算出した。

血清  $\alpha$ 2u-globulin (AUG) は、エストロゲ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、雄ラットに 15~375  $\mu$ g/kg の ethinyl estradiol を28日間経口投与し、血清 AUG、血清ホルモンおよび生殖腺、付属腺の重量を測定した。更に、性腺刺激ホルモンの影響を調べるために、無処置ラットに LH-RH 拮抗剤である Antide を投与し、2週間後に血清 AUG を測定した。Antide を単回投与した無処置あるいは去勢雄ラットに testosterone propionate を10日間皮下投与し、AUG の血中濃度を測定した。

哺乳動物培養細胞を用いた、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として、ベータガラクトシダーゼ遺伝子をレポーター遺伝子としてペプチド遺伝子プロモーター活性が検出できる PC12-VG 細胞、およびルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として、オーファン受容体(NOR-1)遺伝子プロモーター活性が検出できる 3T3NL 細胞を用いて、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)、2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran(TCDF)、Octylphenol および緑茶、紅茶、タバコの水抽出物の生物作用を検討した。

酵母 Two-Hybrid 試験により 500 種以上の化学物質について得られたエストロゲン様活性測定結果をまとめて、ロジスティック回帰分析法により構造活性相関を調べたほか Two-Hybrid System に ER 系の代わりに p-53-SV40 large T 系を組み込んだ酵母 Two-Hybrid System による活性阻害試験系の作成を試みた。

リガンドがエストロゲン受容体 (ER) と結合すると LXXLL 配列を持ったペプチドと結合することを利用した新しい内分泌かく乱化学物質検出法開発を目的として、N 末端をビオチンで標識したペプチドを合成し、これと ER との結合がリガンドの存在下で起こるか否かを調べた。検出方法は、ビオチンにストレプトアビジンで標識したホースラディッシュペルオキシダーゼを結合させ、TMB で発色させてその吸光度を測定するという方法により、数種のモデル化合物の影響を検討した。

**2) 薬理代謝研究**では、bisphenol A は西洋ワサビパーオキシダーゼによる代謝を受け、*o*-カテコールである 5-hydroxy-bisphenol A を生じることが報告されている。カテコール体は、酸素ラジカルを発することにより、DNA 鎖に損傷を与える可能性がある。エストロゲン作用を有する bisphenol A および *o*-phenylphenol を用いて、ヒト肝ミクロソームあるいは S-9 mix とインキュベートして生成される代謝物を HPLC により分析した。さらに、酸化的代謝物の生成に関与する CYP 分子種についてその発現系を調べ、代謝反応を測定すると共にヒト肝ミクロソーム分画とヒト CYP 分子種に対する特異的阻害剤をもちいて生成代謝物量の変化を調べた。

内分泌かく乱化学物質の影響をエストロゲン発がんに的を絞り、尿中のリスクマーカーを検出した。雌雄ラットに nonylphenol, bisphenol A, buthyl benzylphthalate をそれぞれ 14 日間経口投与して、14 日目に estradiol 17- $\beta$  (E2)を腹腔内に投与し、尿中の 15 種の E2 代謝物を定量した。

**3) 生殖・発生に関する研究**では、周生期のエストロゲン様物質の暴露が雌ラットの生殖行動を調節する前腹側脳室周囲核 AVP v N-POA の構造変化を起こす可能性が示唆されていることから、生後 5 日の雌ラット新生児に内分泌かく乱化学物質を投与して、投与 24 時間後に脳を摘出した。Tunel 法により視床下部神経

核 (性的二型核: SDN-POA および前腹側脳室周囲核: AVPvN-POA) 神経細胞のアポトーシス細胞を定量的に調べた。

内分泌かく乱化学物質は、胚発育の特定な時期に高い感受性を示すことが知られていることから、ラット胎齢 11.5 日培養胚に tamoxifen, E2, estriol(E3), bisphenol A, p-nonylphenol を培養液中に添加し、42 時間培養して神経細胞及び生殖細胞の増殖、分化におよぼす影響を検討するとともに、免疫組織化学染色により神経上皮細胞のアポトーシスの有無を観察したほか、アルカリホスファターゼ染色により生殖原基における始原生殖細胞の増殖への影響を検討した。

**4) 生殖機能に関する研究**では、フタル酸エステルの一つである dibutyl phthalate はラット妊娠前半に投与すると著しい胚致死作用がみられることから、その主要な代謝物 monobutyl phthalate を妊娠ラット 0 日から 8 日および脱落膜反応を人工的に惹起した偽妊娠ラットに経口投与し胎児に対する影響を調べた。胚の生存に重要な役割を果たす子宮機能に対する影響を脱落膜反応を指標として検討し、更に、血清中のプロゲステロンおよびエストロゲン濃度を測定した。

**5) 発がん性試験研究**では、ラット中期発がん性試験法を用いて nonylphenol の肝発がんプロモーション作用を前がん病変である GST-P 陽性細胞巣を指標病変として検討した。

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は、卵巣摘出ラットを用い、DHPN でイニシエーション処置をしたのち、estradiol benzoate, methoxychlor, bisphenol A を反復投与した。更に、各群の半数の動物に甲状腺発がんプロモーターである sulfadimethoxine を併用投与し、甲状腺の病理組織学的検査と血中の甲状腺関連ホルモンの測定を行った。

#### 〈OECD 対応等試験法開発部門〉

**1) OECD における子宮肥大試験および Hershberger 試験**では、比較的弱いエストロゲン作用を有する各種化学物質においても試験研究施設間で統一した結果が得られるかを検討するため、プレバリデーション、バリデーション試験プロトコルの策定・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、OECD バリデーション試験プロトコルに準拠して、nonylphenol を未性成熟ラットに 3 日間経口投与あるいは皮下投与した場合および卵巣摘出ラットに 3 日間あるいは 7 日間皮下投与した場合それぞれの反応性の相違を比較した。更に、卵巣摘出マウスを用いて、o,p'-DDT および methoxychlor を 7 日間反復経口投与し、最終投与から 24 時間後に子宮重量を測定した。陽性対照として、 $17\beta$ -estradiol も同様に皮下投与した。Hershberger 試験では、精巣摘出ラットに testosterone propionate を皮下投与して、副生殖器の重量の変化を調べるとともに、この系を用いて bisphenol A

の作用を検討した。

## 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

、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プレバリデーション試験を行うことを目的として、雌雄ラットに、genistein を 28 日間反復強制経口投与した。また、雄に特異的に発現する蛋白質である  $\alpha 2u$ -globulin (AUG) への影響を調べるために、ethinyl estradiol, nonylphenol および methoxychlor を 28 日間投与し、肝臓あるいは腎臓における AUG の発現の変動および mRNA 発現量を解析した。

### 〈新規基盤整備研究部門〉

1) 電算検索と評価に関する研究では、内分泌かく乱化学物質の標的であるエストロゲン受容体の立体構造情報に基づき、コンピュータを用いた理論的な解析と検索を行った。スクリーニングを行う化学物質群を市販データベース(available chemical directory)の中の約 20 万種を使用し、バーチャルスクリーニングを行い、結合活性確認を行った。また、既知のエストロゲン作用物質については受容体との相互作用様式を推定し、結合自由エネルギーを推算した。

## 2) 3D-QSAR に関する実験解析的研究

では、バイオセンサーを用いてエストロゲン受容体とレスポンスエレメントおよびコファクターの相互作用(ER-ERE)を測定することにより、リガンドによる受容体構造変化を定量的に解析し、3D-QSAR

への適用を目的とする。ERE 固定化センサーチップを作成し、これにエストロゲン様物質をインジェクトして、SPR 装置を用い、結合と解離の過程を測定した。更に、それぞれの化合物の ER-ERE 相互作用におよぼす ED50 を求め、コンピュータ計算による推定活性スコアおよび COS-1 細胞に CAT 活性を組み込んだ系により得られた CAT activity と比較した。

## 3) トキシコゲノミックスに関する研究

では、卵巣摘出 CD-マウスに  $17\beta$ -estradiol  $0.2\mu\text{g/kg}$  を 3 日間反復皮下投与して、投与開始後 1 日から 7 日まで経時的に子宮重量を測定した。更に、子宮から全 RNA を抽出し、Cy3 あるいは Cy5 をラベルした cDNA を合成して、マイクロアレイアッセイにかけた。卵巣摘出マウスに  $17\beta$ -estradiol を 7 日間反復皮下投与あるいは浸透圧ポンプを 7 日間埋込み、子宮重量を測定した後、視床下部を摘出し、1081 種のマウスの遺伝子を載せた DNA チップに視床下部から抽出した cDNA をハイブリッドさせて、エストロゲン投与に伴う遺伝子発現パターンを調べた。

### 〈内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する調査部門〉

## 1) 内分泌かく乱化学物質等の文献情報に関する調査研究

では、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、今年度はフタル酸エステルのげっ歯類における生殖・発生毒性について近年の文献を中心に整理した。特にフタル酸エステルの

エストロゲン様作用の有無、雌雄の生殖機能への影響およびその機構について di(2-ethylhexyl)phthalate, di-n-butyl phthalate についての文献を中心に集積した。

**2) データベース構築と 3 次元構造活性相関に関する研究**では、内分泌かく乱に関わる化学物質と生体系との相互作用実験を相互に参照、比較、分析するための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。この開発過程で蓄積された知見を活用して、内分泌かく乱化学物質と生体分子の 3 次元構造に基づいた構造活性相関の研究を行い、リガンド分子の計算に非経験的分子軌道法プログラム、相互作用モデルとして分子動力学プログラムおよび現在別プロジェクトとして開発中の巨大分子計算手法プログラムを用いた。

**3) 健康影響に関する情報収集と評価に関する研究**では、内分泌かく乱化学物質の健康影響を考える上で、生体の感受性や不可逆性の点から重要性が高いと思われる妊娠期間中の暴露影響の情報を中心に検索した。Internet Greatful Med. の Toxline を使用して大豆エストロゲン物質、有機錫、フタル酸エステルおよびダイオキシン類について最近の情報検索(1998 年～2000 年)に的を絞って行い、発生毒性、生殖毒性、神経毒性、免疫毒性、化学分析、作用メカニズムなどに分類してデータベース化を試みた。

**4) 内分泌かく乱化学物質に関する用語集**では、「内分泌かく乱化学物質の生物試験研究法」の出版に向けて具体的な作業を開始した。

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の研究**として、抗アンドロジェン活性評価系を検討するために、抗アンドロゲン物質を投与したラットの前立腺腹葉細胞を単離し、アポトーシスおよび細胞周期を解析した。いずれの被験物質も前立腺腹葉重量に有意な影響を与えなかったが、前立腺腹葉におけるアポトーシス細胞の割合は、flutamide、p,p'-DDE および vinclozolin で増加した。前立腺腹葉細胞のアポトーシス誘導には、細胞周期依存性であり、AR antagonist と 5 $\alpha$ -reductase inhibitor ではそのパターンが異なることが分かった。

雄ラットに EE を 28 日間反復経口投与した結果、生殖器付属腺に減少がみられ血中 AUG も低下がみられた。LH-RH antagonist である Antide における影響は、無処置ラットに単回投与で血清 AUG に低下がみられた。Antide 単回投与した外科的あるいは化学的去勢を行った動物に、testosterone propionate を投与すると去勢ラットでは、AUG の誘導がみられたが、化学的去勢群では増加はみられなかった。

PC12-VG および 3T3NL 細胞に TCDD, TCDF, octylphenol を作用させても、ペー

タガラクトシダーゼ活性上昇はみられなかった。一方、PC12-VG 細胞を用いて、緑茶、紅茶、タバコの水抽出物の生物作用を検討した結果、緑茶抽出物にはベータガラクトシダーゼ活性を誘導するアデノシン様作用を有する物質と、これを抑制するカフェイン・テオフィリンが含まれていることが明かとなった。

酵母 Two-Hybrid 試験 (ER $\alpha$ 系) による 500 種類以上の各種化学物質のエストロゲン活性測定結果をまとめたところ、534 物質中 64 物質が陽性と評価された。このうちの 480 物質を用いて、2 次元構造と分子量に基づく 34 種類の記述子についてバイナリーデータを作成し、ロジスティック回帰分析法により評価結果との構造活性相関を試みた結果、93%の正答率で予測可能であった。また、ER 系の代わりに p53 系を用いて活性阻害試験系の開発を試みたところ、アゴニストだけでなくアンタゴニストなどの評価に利用できる可能性がある、安定してガラクトシダーゼを発現する酵母株が得られた。

リガンドが ER と結合するとコアクチベータが LXXLL というアミノ酸配列を介して結合することを利用してエストロゲン様作用物質検出のために新たに開発された試験法では ER $\alpha$ よりも ER $\beta$ の方が安定した結果を得た。この方法で、E2, DES, genistein, cumesterol は再現性良く検出することが可能であったが、bisphenol A, nonylphenol の作用にあまり良好な再現性は認められなかった。また、

ベンツピレンの 3 位の水酸基体がこの系に反応することが明らかにされたほか、エストロゲンのアンタゴニストである tamoxifen がエストロゲンによるペプチドを阻害することが示唆された。

**2) 薬理代謝研究**では、エストロゲン作用を持つ bisphenol A および o-phenylphenol のヒトでの代謝様式を調べるため、ヒト肝ミクロソームあるいは S-9 mix とインキュベートして生成される代謝物を HPLC で分析した結果、bisphenol A では o-カテコールへの変換は認められず、o-phenylphenol ではフェニルヒドロキノン (PHQ) への変換が確認されたが o-phenylphenol と PHQ との間にエストロゲン活性の差は見られなかったことから、酸素ラジカルと内分泌かく乱作用との直接的な関連は少ないと考えられた。

内分泌かく乱化学物質である nonylphenol, bisphenol A, buthyl benzyl phthalate の影響をエストロゲン発がんに的を絞って、エストロゲン代謝物の尿中のリスクマーカーを分析した結果、ラット雄では nonylphenol および buthyl benzyl phthalate 投与により 2-hydroxyestrone (2-OHE<sub>1</sub>) および 15 $\alpha$ -hydroxyestrone の排泄量が増加、15 $\alpha$ -hydroxyestriol (15 $\alpha$ -OHE<sub>3</sub>; E<sub>4</sub>) は減少し、bisphenol A 投与では 2-OHE<sub>2</sub> および E<sub>4</sub> の排泄量が減少した。雌では nonylphenol および bisphenol A 投与による 2-OHE<sub>1</sub> の変動は雄と同様の傾向を示したが、buthylbenzylphthalate 投与群では、雄と逆の結果がみられた。3 種の内分泌

かく乱化学物質は E<sub>2</sub> の代謝に異なる影響を与えることが示唆された。

**3) 生殖・発生面に関する研究**では、生後5日の雌ラットに tamoxifen, clomiphen(CL), nonylphenol あるいは estradiol benzoate を投与すると AVPVN-POA では神経細胞のアポトーシスが誘発された。一方、estradiol benzoate 投与により SDN-PON で細胞死が逆に抑制された。

内分泌かく乱化学物質の培養胚に及ぼす影響の検討では、E<sub>2</sub>, bisphenol A および nonylphenol で軽度の発育抑制、神経上皮細胞のアポトーシスの増加があり、bisphenol A では心臓および肝臓にもアポトーシス増加が認められた。各物質ともに始原生殖細胞には影響を与えなかった。

**4) 生殖機能に関する研究**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、妊娠および偽妊娠ラットに 250~1000 mg/kg の MBnP を経口投与したところ、1000 mg/kg 以上で着床前および着床後の胚の死亡率が有意に上昇し、偽妊娠ラットでは子宮重量が有意に低下した。

**5) 発がん性試験研究**では、ラット中期発がん性試験法を用いて nonylphenol の肝発がんプロモーション作用を検討した結果、肝発がんに対しプロモーション作用を示さなかった。

卵巣摘出ラットに DHPN でイニシエーション処置後、estradiol benzoate,

methoxychlor, bisphenol A を反復投与あるいは sulfadimethoxine を併用投与した結果、estradiol benzoate+sulfadimethoxine 投与群に於いてのみ甲状腺腫瘍が発生し、TSH 値も上昇した。

#### 〈OECD 対応等試験法開発部門〉

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

子宮肥大試験において、未成熟ラットと卵巣摘出ラットの nonylphenol に対する感受性を比較すると、いずれの方法に於いても用量依存的に子宮重量は増大し、卵巣摘出ラット7日間皮下投与でもっとも強い反応が認められた。卵巣摘出マウスに o,p'-DDT あるいは methoxychlor を7日間反復経口投与した結果、子宮に対するエストロゲン作用は、E<sub>2</sub> に比し o,p'-DDT は  $2 \times 10^{-5}$  倍、methoxychlor は  $5 \times 10^{-4}$  倍であった。Hershberger 試験においては、testosteron propionate 0.1~0.5 mg/kg の用量範囲で用量に依存して、前立腺腹葉、肛門挙筋、球海綿体筋、亀頭、精囊、および凝固腺、尿道球腺の重量増加がみられた。Bisphenol A の投与では、対照群と差がなかった。

#### 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、

genistein を用いてプレバリデーション試験を実施したが、genistein の生殖器に対する影響は認められなかった。一方、methoxychlor の混餌投与により雄ラットの肝臓および腎臓に於いて蛋白質含量、肝臓の AUG の mRNA 発現の抑制が認

められたが、nonylphenol 投与では変化は見られなかった。

#### 〈新規基盤整備研究部門〉

**1) 内分泌かく乱化学物質の電算検索と評価の研究**では、スクリーニングを行う化学物質群を市販データベース(available chemical directory)の中の約 20 万種を使用し、バーチャルスクリーニングを行い、結合活性確認を行った結果、60 物質でエストロゲン受容体との結合率の上昇が見られ、そのうち 15 物質はフェノール基を持たない新規物質であった。既知のエストロゲン作用物質については受容体との相互作用様式を推定し、結合自由エネルギーを推算して結合活性値との間に高い相関性が得られることを確認した。

**2) 3D-QSAR に関する実験解析的研究**では、測定を行った化合物はいずれも E2 同様に ER の ERE へのアフィニティを増加させることから、ER に作用し構造変化を引き起こすことが示された。コンピュータ探索により得られた各化合物のエストロゲン様活性は、EC50 を求めたところそれぞれ E2 の 1/100～ 1/1000 程度と見積もられ、CAT 遺伝子をリポーターとして組み込んだ COS-1 細胞を用いた *in vitro* アッセイ系での活性値と比較したところ非常に良い相関がえられた。

**3) トキシコゲノミックスに関する研究**では、約 5000 種の配列既知のマウス遺伝子を載せた cDNA マイクロアレイを用いて E2 による子宮肥大反応時の遺伝子発現変動を調べた結果、約 250 種の遺伝

子が発現変動を示し、それらの遺伝子の変動パターンはさまざまなパターンに分類可能であった。一方、投与方法の違いによる遺伝子発現パターンの相違を調べるため、卵巣摘出マウスに E2 を皮下投与および浸透圧ポンプによる埋植投与して視床下部における遺伝子発現パターンを比較した結果、子宮肥大作用は、E2 皮下投与に比較してポンプ投与に反応は低く、更に、視床下部における遺伝子発現変動パターンも異なっており、各投与方法に共通して発現する遺伝子は少なかった。

#### 〈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) 内分泌かく乱化学物質等の文献情報に関する調査研究**では、フタル酸エステル類は子宮肥大試験ではエストロゲン様活性がみられず、エストロゲン受容体に結合するための共通の構造を有していない。しかし、ラット雄の投与において抗アンドロゲン様作用がみられ、妊娠後半のラットへの投与でアンドロゲン受容体を介さない抗アンドロゲン作用の発現がみられた。

**2) データベース構築と 3 次元構造活性相関に関する研究**では、CHARMm による結合エネルギーの値は、実験値と相関を示さなかった。FMO 法の計算結果による ER $\alpha$ -リガンド結合エネルギーと実験値 (RBA) との相関係数は  $R^2=0.78$  と高い相関を示した。また ER $\alpha$ と ER $\beta$ において、genistein とラロキシフェンの RBA の順序が逆転することが計算からも示さ



れた。

### 3) 健康影響に関する情報収集と評価に

関する研究では、健康リスクの蓋然性が考えられる化学物質についての最近の文献検索では、有機錫：TPTCI 7件

TPTH 2件、TBTO 3件、TBTCI 6

件、フタル酸エステル：DEHP 35件、

DBP 63件、BBP 22件、DEP 5件、

ダイオキシン：2,3,7,8-TCDD 486件、

大豆エストロゲン：genistein 76件、

daidzein 26件、equol 15件検索できた。

4) 内分泌かく乱化学物質に関する用語集では、「内分泌かく乱化学物質の生物試験研究法」を出版した。

## D. 考察

本年度は、1) 試験法開発部門、2) OECD 対応等試験法開発部門、3) 新規基盤整備研究部門、4) 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4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研究

では、抗アンドロジェン活性評価系を検討するために、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。前立腺腹葉細胞のアポトーシス誘導には細胞周期依存性があり、AR antagonist と  $5\alpha$ -reductase inhibitor ではそのパターンが異なることが判明した。AR antagonist および  $5\alpha$ -reductase inhibitor のいずれも前立腺腹葉細胞に *in vivo* でアポトーシスを誘導した

ことから、本実験系はアンドロジェン依存性細胞のアポトーシスを指標とした抗アンドロジェン活性評価系として有用であることが示唆された。

雄ラットで特異的に産生される AUG の血中濃度は、EE 反復経口投与により明らかに低下し、化学物質の内分泌系に対する影響を類推する上で有用な指標となると思われる。LH-RH antagonist である Antide を無処置ラットに投与した場合も血清 AUG の低下がみられた。去勢動物に、TP を投与すると血中 AUG の増加がみられた。血清 AUG は Estrogen 作用物質のみでなく LH-RH antagonist の投与によっても減少することから、視床下部-下垂体-性腺軸のかく乱に関しても捕らえることが可能と思われた。血清 AUG は通常行われる毒性試験の中で測定・評価することが可能であり、estrogen 作用物質及び視床下部-下垂体-性腺軸のかく乱に関しても捕らえることが可能と思われるため、本蛋白質は Endocrine Disrupter 検出のための新規生物指標として有用と思われる。

PC12-VG 細胞および 3T3-NL 細胞は、主に細胞内 cAMP の上昇を簡便に検出できる試験系であり、膜受容体を介するシグナル伝達のうち、cAMP をセカンドメッセンジャーとするシグナル伝達系の変調を来す物質の検出に利用できると考えられる。内分泌かく乱化学物質の多くが脂溶性物質であり、主に細胞の核内受容体に作用すると推定されるが、一方自然

界にはアルカロイドなど膜受容体に作用する物質が多数存在しており、このようなアルカロイドの日常的な摂取も神経・内分泌系に多大な影響を及ぼしているものと推定できる。本試験系では、TCDD、TCDF、octylphenolの生物作用は検出されなかったが、緑茶成分の中に、PC12-VG細胞で検出できるアデノシンと類似の活性を有する物質が存在することが明らかになった。PC12-VG細胞を用いた検出系が、環境中の生物作用を有する物質を簡便に検出できることが明らかとなった。

酵母 Two-Hybrid 試験系でエストロゲン活性を測定した 480 物質のデータを用いてロジスティック回帰分析法により構造活性相関を解析した結果、良好な正答率であり、また、ER 系の代わりに p53 系を用いて活性阻害試験系の開発を試みたところ、安定してガラクトシダーゼを発現する酵母株が得られたことからほぼ満足できる試験系が作製出来たと考えられる。

リガンドが ER と結合するとコアクチベータが LXXLL というアミノ酸配列を介して結合することを利用してエストロゲン様作用物質検出のために新たに開発された試験法では、エストロゲンニアゴニストの検出のみならず、アンタゴニストも検出できることが示唆された。この試験系では、植物性エストロゲンであるゲニスタインは再現性、感度とも良く検出できることが分かったが、bisphenol A のようなエストロゲンレセプターへの結

合力が弱いと思われる物質の検出はあまり良くなかった。

**2) 薬理・代謝研究**では、エストロゲン作用のある bisphenol A および octylphenol を、ヒト肝マイクロソームあるいは S-9 mix とインキュベートし代謝物を分析した結果、bisphenol A では  $\alpha$ -カテコールへの変換は認められなかった。Octylphenol は代謝により細胞毒性の強いフェニルヒドロキノン(PHQ)への変換が確認されたが octylphenol と PHQ との間にエストロゲン活性の差は見られなかった。

エストロゲン発癌のリスクマーカーと考えられるエストロゲン代謝に対するホルモン様作用物質の影響を調べるために、nonylphenol, bisphenol A, buthyl benzylphthalate を投与したラットの尿中代謝物を分析した。nonylphenol, bisphenol A、buthyl benzylphthalate のいずれも E<sub>2</sub> 代謝物の尿中排泄量に影響を及ぼし、その挙動はそれぞれこととなった。これら内分泌かく乱化学物質の影響が今回の新規マーカーで確認できたことは、今後これら代謝物が、エストロゲン発がんのリスクマーカーとなる可能性を示唆するものと考えられる。

**3) 生殖・発生に関する研究**では、雌ラット新生児に内分泌かく乱化学物質を投与すると、前腹側脳室周囲核 AVPVN-PON でアポトーシスが促進されたが、SDN-POA で逆にアポトーシスが抑制されたことから、異なったニューロン群の間で内分泌かく乱化学物質に対する遺伝

子発現の反応性が異なっている可能性が示唆された。

内分泌かく乱化学物質の培養胚に及ぼす影響の検討では、E2, bisphenol A および p-nonylphenol で神経上皮細胞のアポトーシスの増加があり、bisphenol A では心臓および肝臓にもアポトーシス細胞の増加が認められたが、各物質ともに始原生殖細胞には影響を与えなかった。従って、始原生殖細胞を指標にした内分泌かく乱物質の評価法の開発に関しては、被験物質の暴露時期、胞子体の観察法などさらに検討が必要である。

**4) 生殖機能に関する研究**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、妊娠および偽妊娠ラットに MBnP を経口投与したところ、1000 mg/kg 以上で着床前および着床後の胚の死亡率が有意に上昇し、偽妊娠ラットでは子宮重量が有意に低下した。この結果、MBnP 投与による早期胚死亡は、子宮機能の低下、すなわち脱落膜形成の抑制に起因していることが示唆された。

**5) 発がん性試験研究**では、ラット中期発がん性試験法を用いて nonylphenol の肝発がんプロモーション作用の検討に対して、nonylphenol は肝発がんに対しプロモーション作用を示さないことが明らかとなった。

卵巣摘出ラットに DHPN によりイニシエーション処置後、estradiol benzoate, methoxychlor, bisphenol A を反復投与あるいは sulfadimethoxine を併用投与した

結果、estradiol benzoate + sulfadimethoxine 投与群に於いてのみ甲状腺腫瘍が発生し、TSH 値も上昇した。これらの結果から、甲状腺腫瘍の発生には、甲状腺内におけるホルモンの合成阻害に起因したネガティブフィードバック、甲状腺濾胞細胞に対する直接刺激などが複合的に関与している可能性が示唆された。

#### 〈OECD 対応などに関わる試験法開発部門〉

**1) 子宮肥大試験**において、未成熟ラットと卵巣摘出ラットの nonylphenol に対する感受性を比較すると、いずれの方法に於いても用量依存的に子宮重量は増大し、卵巣摘出ラット7日間皮下投与でもっとも強い反応が認められた。一方、

**Hershberger 試験**においては、testosterone propionate 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、前立腺、肛門挙筋、亀頭に比較すると精囊、および凝固腺、尿道球腺の反応は鈍かった。

#### **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、

genistein を用いてプレバリデーション試験を実施したが、genistein の生殖器に対する影響は認められなかった。

methoxychlor 投与により雄ラットの肝臓および腎臓に於いて蛋白質含量、肝臓の AUG の mRNA 発現抑制が認められたが、nonylphenol 投与では肝臓および腎臓の蛋白質含量および肝臓の AUG の

mRNA 発現に変化は見られなかった。これらの成績をもとにして OECD が中心となって内分泌かく乱化学物質検出のための試験法プロトールについて国際的な協議がなされている。

#### 〈新規基盤整備研究部門〉

**1) 内分泌かく乱化学物質の電算検索と評価の研究**では、今回のバーチャルスクリーニングではフェノール系化合物及びアニリン系・ベンズアミド系化合物だけでなく新規の ER 結合活性化化合物が見つかった。これは本コンピュータスクリーニングの有用性を示していることを示唆し、受容体立体構造を利用して化合物の結合様式を推定し、そのときの結合自由エネルギーを推算することで、活性未知化合物の活性値の推定が可能となった。今後さらに擬陽性化合物を減らす必要はあるが、本法を利用することにより化合物を実際に入手する前に結合活性値予測を行なうことができる可能性が示された。必要とされる時間は1化合物につき数分であり、膨大な数の化合物のスクリーニングにも適している。

#### **2) 3D-QSAR に関する実験解析的研究**

では、今回の結果は、ER-ERE 相互作用変化の解析により作用未知の化合物による受容体作用の定量的予測が可能であることを示した。本研究から得られる知見は、単に化学物質の内分泌作用を予測するものではなく、生体への本質的影響までを予測可能にし、さらに、動物実験などのデータと組み合わせ、得られた情報

を計算科学的解析にフィードバックすることで、新規 3D-QSAR の発展に寄与すると考えられる。

#### **3) トキシコゲノミックスに関する研究**

では、約 5000 種の配列既知のマウス遺伝子を載せた cDNA マイクロアレイを用いてエストロゲンによる子宮肥大反応時の遺伝子発現変動を調べた結果、約 250 種の遺伝子が発現変動を示し、それらの遺伝子の変動パターンはさまざまなパターンに分類可能であった。一方、投与方法の違いによる遺伝子発現パターンの相違を調べる研究では、エストロゲンの1日当たりの投与量が同じでも投与方法が異なることで子宮肥大及び遺伝子の発現パターンが異なることが分かった。一過性であるにせよエストロゲンの血中濃度の上昇と関連すると考えられる。今後、さらにエストロゲンにより子宮あるいは視床下部に誘導される遺伝子発現変動パターンに関する基礎データを集積することにより、構造の異なるエストロゲン様物質の検出が遺伝子発現パターンの解析により可能になることが期待される。

#### 〈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〉

**1) 内分泌かく乱化学物質等の文献情報に関する調査研究**では、フタル酸エステルはエストロゲン様作用を有する内分泌かく乱物質の可能性が指摘されていたが、現段階では、少なくとも *in vivo* ではエストロゲン様作用は有しないものと考えられる。しかし、フタル酸エステルは雄ラ