

* p<0.05; ** p<0.01

Fig. 2 Hershberger assay of testosterone propionate

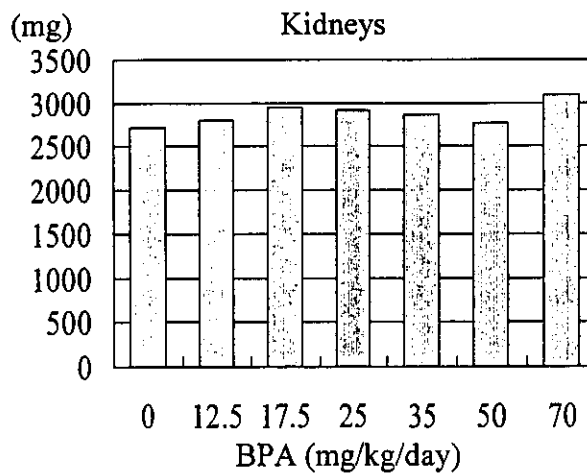
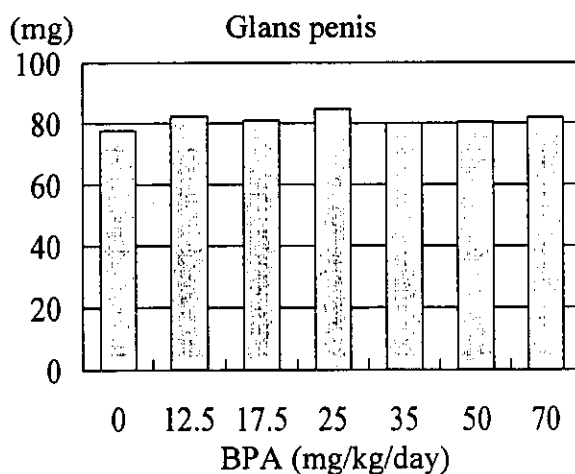
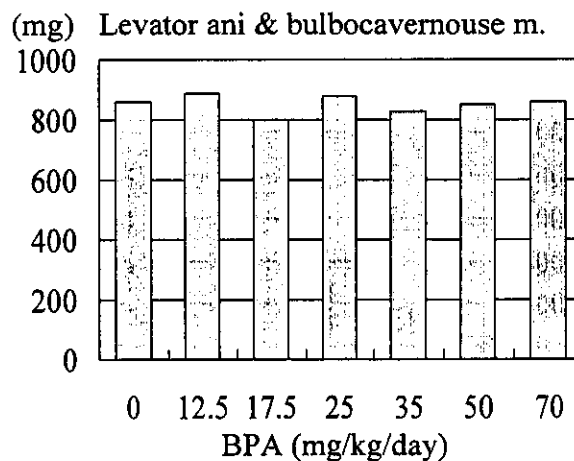
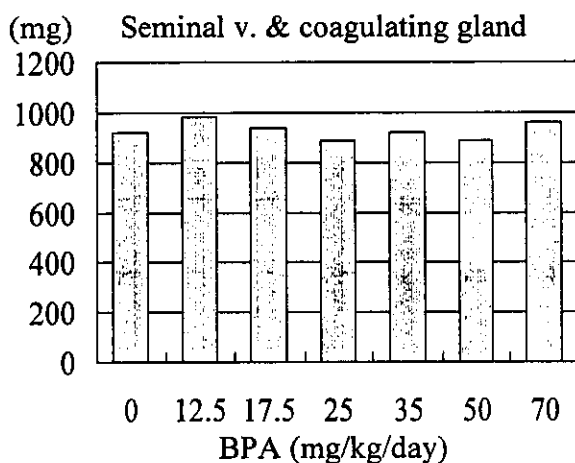
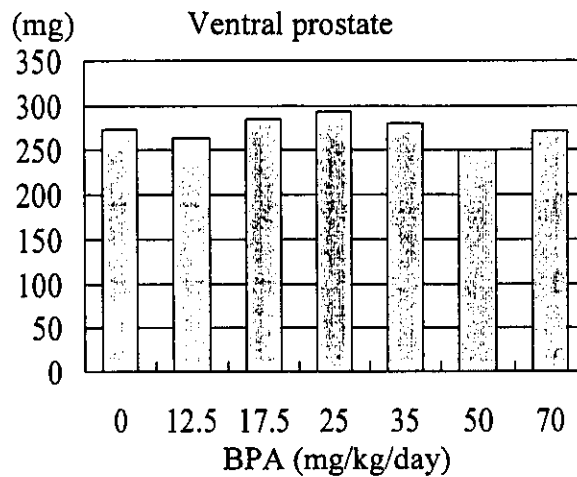
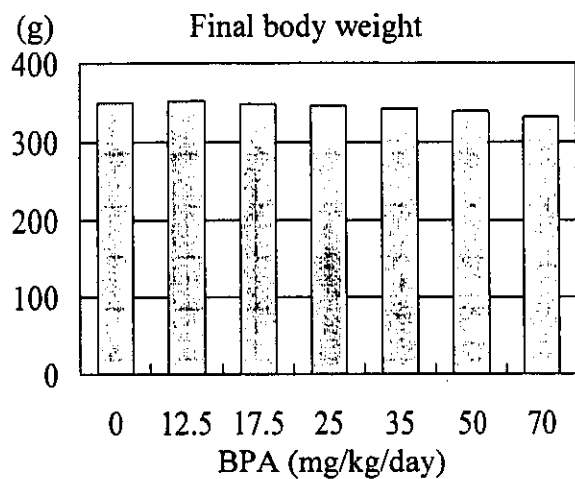


Fig. 3 Hershberger assay of bisphenol A

14. 子宮肥大試験法および Hershberger 試験法の適用に関する研究

分担研究者 金子 豊蔵/菅野 純
国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

研究要旨：先に世界各国 19 の試験研究施設においてエストロゲン作用の強いエチニールエストラジオールを用いて統一プロトコールに対する試行実験が成功裡に完了したのを受けて、次のプレバリデーション第 2 ステップとして、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同等な結果が得られるかを検討した。すなわち、Methoxychlor、Bisphenol A、Genistein、o,p'-DDT、および Nonylphenol の 5 種の化合物について統一プロトコール統一用量での試行実験が行われた。本研究では、その際のプロトコール改訂および用量設定に必要な基礎データの作出実験および予備実験を行い、OECD 子宮肥大試験におけるリードラボラトリーとして、プレバリデーション第 2 ステップの遂行、および「齧歯類」としてのガイドライン作成に寄与するマウスデータ作出に貢献した。

A. 研究目的

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同等な結果が得られるかを検討するため今回は、Methoxychlor および o,p'-DDT の 2 物質を選択し子宮肥大効果を検討する。

B. 研究方法

雌性 5 週齢の C57BL/6CR(日本 S L C) を購入し、1 週間の馴化期間後 6 週齢で卵巣摘出手術を行った。術後 3 週目に膣スメア検査を実施し、性周期が静止期にある動物を体重層別無作為化割り付けにより群分けし、化学物質の投与を開始した。群構成は、対照群は 16 匹、化学物質投与群は 1 群 8 匹で構成した。投与用

量は、溶媒対照群（コーン油）、17 β -estradiol(E₂; SIGMA, CAS No.50-28-2)は 0.35 および 0.7 μ g/kg、o,p'-DDT(和光純薬株式会社, CAS No.789-02-6, Fig. 1)は 80 および 160mg/kg、Methoxychlor(SIGMA, CAS No.72-43-5, Fig. 1)は 35 および 70mg/kg を 7 日間反復投与した。投与経路は、E₂ は皮下投与し、o,p'-DDT および methoxychlor は強制経口投与をおこなった。最終投与から 24 時間後に屠殺し、子宮重量を測定した。

馴化期間および投与期間中は飼料 (CRF-1) および水は自由に摂取させた。試験は、温度 24 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度 55 \pm 5%、換気回数 18 回/時（オールフレッシュ）、照明 12 時間（5 時～17 時）に設定されたバリア方式の動物室で実施した。動

物は、床敷を敷いたプラスチックケージで4匹ずつ飼育した。

C. 研究結果

子宮肥大試験におけるエストロゲンの作用はE2に比し、o,p-DDTは 2×10^{-5} 倍、methoxychlorは 5×10^{-4} 倍であった(Fig. 1)。

D. 考察

これまでの子宮肥大試験 prevalidation study

世界各国 19 ラボがいつせいに実施した第一段階のエチニールエストラジオールを用いた実験では、統一されていないためにラボ間の誤差の原因になると懸念されていた動物の系統、飼料、溶媒等は問題とならないことが統計学的に示された。すなわち、19 ラボがほとんど揃った結果を得ている。子宮重量はblotted も wet もほぼ同等に有効であったが、若干 Blotted の方が分散が小さい傾向があった。Immature 系では、初期体重の制限幅を 10 g から、各ラボの背景データに基づいて試験感度が低下しない範囲で自己管理（自己規定）することとした。Immature 系では、実験開始日は現在 19-20 日齢となっているところを1日延長し、19-21 日齢で開始し、遅くとも 23 日齢には投与を終了することとした。OVX 系では、卵巣摘出後 14 日間以上 28 日間までの範囲で馴化期間を置くこととした。エンドポイントには変更が無いが、BrdU や PCNA による標識率、病理組織学的測

定が、感度向上のために推奨されるとした。膣の切り出し図を水平から垂直に変更した。

ハーシュバーガー試験に関しては重量測定を固定後にするという提案については、固定前測定と同等の結果が得られるとして、オプション項目として了承された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sai K, Kanno J, Hasegawa R, Trosko JE, Inoue T. Development of invasive adenocarcinoma in a long-standing diverted ileal J-pouch for ulcerative colitis: report of a case, *Carcinogenesis*, 2000, 21(9):1671-6.

2. 学会発表

- 1) 佐井君江、菅野 純、黒川 雄二、井上 達：Pentachlorophenol の肝培養細胞におけるアポトーシス阻害作用ならびにギャップ結合細胞間連絡阻害との関連：第 58 回日本癌学会総総会、広島(平成 11 年 9 月 29 日～10 月 1 日)
- 2) 平林容子、高木篤也、児玉幸夫、菅野 純、黒川雄二、井上 達：Mn-SOD 遺伝子導入マウス骨髄細胞での紫外線抵抗性：第 58 回日本癌学会総総会、広島(平成 11 年 9 月 29 日～10 月 1 日)
- 3) 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(xenostrotin)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
的变化：第15回日本疾患モデル学会総
会、1998年11月27日～28日東京

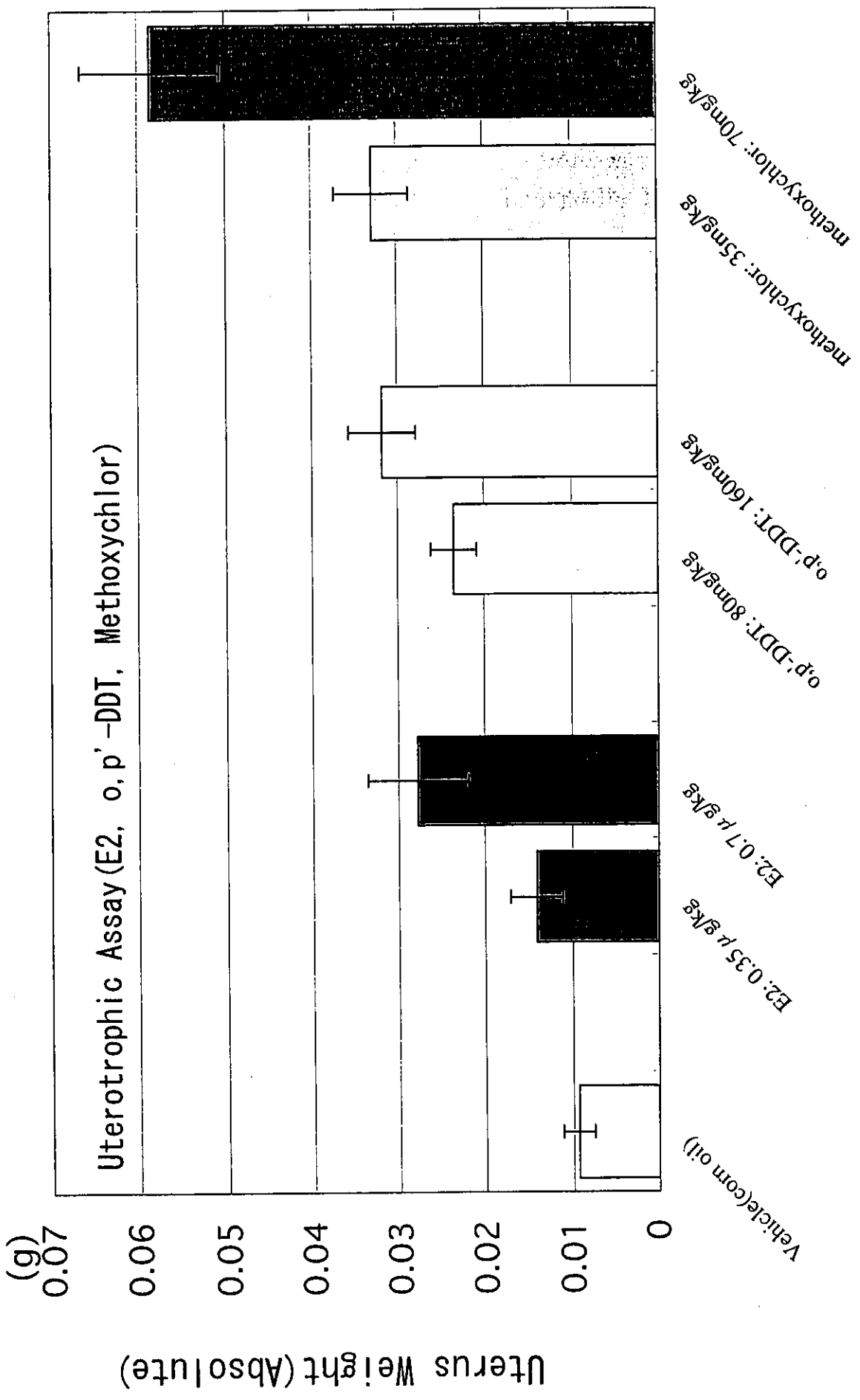
4) 萱野 純、山本雅也、松島裕子、西
岡暢彦、宮城恵理、Byung-Il Yoon、金子
豊蔵、井上 達、内分泌かく乱物質の短期
in vivo 試験系について：第1回に本内
分泌かく乱化学物質学会、平成10年11
月、京都

5) 松島裕子、萱野 純、宮城恵理、井
上 達、卵巢摘出ラットにおけるエスト
ロゲン枯渇期間と子宮肥大反応の關係に

ついて：第2回に本内分泌かく乱化学物
質学会、平成11年12月、神戸

6) 松島裕子、井上 達、萱野 純、17
 β -estradiolの思春期ラット投与における
子宮肥大反応について-内分泌かく乱作用
を照準とした経世代試験改良のための考
察-：第3回に本内分泌かく乱化学物質学
会、平成12年12月、横浜

7) 松島裕子、井上 達、萱野 純、子
宮肥大反応の特性について：第28回日
本トキシコロジー学会学術年会、平成1
3年6月、東京



15. OECD ガイドライン 407:28 日反復投与毒性試験法の適用に関する研究

分担研究者 広瀬 雅雄
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長

研究要旨：OECD Test Guideline 407 Enhanced 案に基づき、Genistein を用いてラット 28 日間反復投与毒性試験を実施した。その結果、雌の性周期観察、雄の精子検査及び器官重量の各検査で生殖器に対する Genistein の影響は検出できなかった。現在、血清ホルモンの測定及び病理組織学的検査が進行中である。また、ホルモン作用の新たなパラメーターとしての可能性を検討するため、Ethinyl estradiol を混餌投与し、肝臓及び腎臓における α_2 -globulin の発現の変動及び mRNA 発現量を解析し、さらに nonylphenol 及び methoxychlor のラット 28 日間反復経口投与毒性試験において同様の検索を行った結果、nonylphenol 投与群では発現量は変化せず methoxychlor 投与群では中用量から発現が抑制されることが明らかになった。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質のスクリーニングと安全性評価を目的としたラット 28 日間反復投与毒性試験法 "OECD Test Guideline 407 enhanced" 案の有用性を検証するための実験として、すでにホルモン作用の強い物質についての検討を終えたが、弱い物質での検討はほとんどなされていない。今回の研究では弱いエストロゲン作用を有する Genistein を用い、試験法の有用性を検証するための実験を行った。また、内分泌影響を高感度に検出できる新規パラメーター候補の一つとして、ラットの雄に特異的に発現し、多数のホルモンにより転写制御を受けることが知られている蛋白質である α_2 -globulin に着目して、性ホルモン投与による肝臓及び腎臓でのその蛋白質と mRNA の発現量の変動を解析した。

B. 研究方法

7 週齢の Cj:CD (SD) IGS 系ラット各実験雌雄各 80 匹を 1 群 10 匹の各 8 群に分け、Genistein (OECD より供与) を 0、120、400、1000mg/kg 体重の用量で CMC-Na 水溶液に混じて強制経口投与した。雄は投与回数を 28 回とし、最終

投与の翌日に全生存動物を屠殺した。雌は膣スメア法にて 24 日目より性周期を観察し、28 回投与の翌日から 4 日の間で発情静止期に相当する日に屠殺、或いは性周期の異常を認められた場合は 28 回投与の翌日に屠殺し、いずれも屠殺前日まで投与を継続した。最高用量は OECD TG407 における最大用量である 1000mg/kg/day を設定した。基礎食はオリエンタル酵母社製 CRF-1 を用いた。主な検査項目として、第 4 週の投与後に感覚機能、握力、自発運動等、その他、体重、臓器重量、血液、血液生化学、血清ホルモン、精子および病理組織学的検査を行った。

α_2 -globulin 解析のためには、7 週齢の Cj:CD(SD)IGS 雄ラットに各濃度の Ethinyl estradiol (EE) を 4 週間混餌投与した (Fig.1)。屠殺・剖検後肝及び腎皮質の一部を採取し液体窒素で急速に凍結し破碎した。蛋白質は TCA 沈殿後 SDS buffer で可溶化して Western blotting による検出を行い、RNA は RNA-STAT により total RNA を抽出して Northern blotting により解析した。また、血中ホルモン濃度の測定も行った。なお、本実験における EE の摂取量は、体重約 300g のラットで一日の摂餌量を 20g として計算すると 2.5ppm の混餌投与では 166 μ g/kg/day に相当すると考えられた。

更に、TG407 Enhanced 案に基づいた nonylphenol 及び methoxychlor の 28 日間投与毒性試験においても、各群 5 匹の肝及び腎皮質の一部を採取し α 2u-globulin 蛋白質及び mRNA 発現量を解析した。 α 2u-globulin は雄特異的に発現する蛋白質とされているが、今回雌の腎臓でもわずかではあるが検出されたことから、解析の対象に雌の腎臓を加えた。

(倫理面への配慮)

「動物の保護及び管理に関する法律(昭和 48 年 10 月 1 日)」及び「実験動物の飼育及び保管等に関する基準(昭和 55 年 3 月 27 日)」に準じ、動物に対する苦痛を出来る限り少なくした。

C. 研究結果

反復投与毒性試験では投与期間中、雌雄いずれの投与群にも死亡はみられず、一般状態の異常も観察されなかった。また、体重、摂餌量、血液学検査、性周期観察 (Table1) 及び精子検査 (Table2) において対照群と比べ明らかな差はみられなかった。血液生化学検査では、総タンパク質の有意な増加 (対照群平均と比べ 3%増) が 1000mg/kg 投与群の雄にみられた。なお、雌については検査未了である。各臓器の相対重量では、肝臓において 400 及び 1000mg/kg 投与群の雌雄で増加傾向もしくは有意な増加 (対照群平均と比べ 7~9%増) が認められた (Table3)。その他の検査については現在進行中である。

α 2u-globulin に関しては、EE の混餌投与では、2.5ppm の群で体重の増加抑制がみられた。摂餌量のデータは粉末飼料のためばらつきが大きく摂餌忌避によるものかどうかはこれだけでは断定できない。肝、腎の重量は群間で差はなく、精巣は EE 投与による萎縮はみられなかった。副生殖器についても群間で差はなかった。血中エストラジオール及びテストステロンレベルにも差は検出されなかった。腎 α 2u-globulin 蛋白質量は全ての群で高値を示し、EE 投与の影響はみられなかった (Fig.2)。なおこの図で実験による数値の違いが大きい、標準品として使用した蛋白質が異なるためで

ある。肝 α 2u-globulin 蛋白質量 (Fig.3) 及び肝 RNA 量 (Fig.4) についても同様に群間で差はなかった。なお精巣上体にも α 2u-globulin 蛋白質が僅かながら検出されたが、やはり群間に差はなかった。nonylphenol 投与では雄肝及び雌雄腎の蛋白質発現量、雄肝 mRNA 発現量に投与に依存した変化は認められなかった (Fig.5)。methoxychlor 投与では雄の腎及び肝蛋白質量、雄肝 mRNA 量に投与に依存した減少が認められ、肝では蛋白質量、mRNA 量ともに中用量から強い抑制を認め、腎蛋白質量の抑制は高用量群で有意であった (Fig.6)。また雌腎蛋白質量にはどちらの場合でも変化はなかった。

D. 考察

反復投与毒性試験では性周期観察、精子検査及び器官重量の各検査で雌雄いずれの群においても、本実験条件下では Genistein の生殖器に対する影響は検出できなかった。現在、血清ホルモンの測定や病理組織学的検査が進行中であるが、いずれにしても、Genistein の生殖器に与える影響は本実験条件下では小さいことが予想される。以前に行った Nonylphenol 及び Methoxychlor の実験から得られた結果では、特に血清ホルモン、器官重量、病理組織学的検査及び雌の性周期観察により生殖器に対する影響が検出されている。上記 2 被験物質では、投与液はコーンオイルで懸濁していたのに対し、今回の Genistein では CMC-Na 水溶液を用いたことから、Genistein の生体内への吸収の程度が懸念された。また、今回用いた基礎飼料はタンパク源として大豆が用いられており、これに含まれるイソフラボンが何らかの影響を与えている可能性も否定できない。

今回、内分泌作用の新たなパラメーター候補の一つとして、性ホルモン投与後の肝臓及び腎臓における α 2u-globulin 発現の変動について検討した。その結果、EE の混餌投与では明らかな影響はみられなかった。 α 2u-globulin は雄肝臓での強い発現がみられ、その腎での蓄積量は非常に多いことが知られている。そのた

め精巣機能が正常な状態にエストラジオールを投与してもその影響が現れにくいと考えられた。少なくとも今回用いた 0.00025-2.5ppm という濃度領域では明らかな影響はみられず、高感度指標としては推奨できない。また、methoxychlor には雄の α 2u-globulin 発現を非常に強く抑制する作用が認められたが、nonylphenol では全く変動は見られなかった。methoxychlor による発現抑制作用は去勢による抑制効果と同等であり、本試験の他のパラメータでのホルモン影響を示唆する作用の強度と一致しないため、methoxychlor のエストロゲン作用による抑制効果とは断定できなかった。ある程度高用量の EE 投与や nonylphenol での発現抑制作用がみられなかったことを併せて考慮すると、これは methoxychlor のエストロゲン作用以外の特異的作用によるものと考えられた。また雌腎臓での α 2u-globulin の検出はこれまで報告がなく、新知見である。

E. 結論

- 1) OECD Enhanced TG 407 案に基づく Genistein の反復投与毒性試験では、明らかなホルモン作用を検出できなかった。
- 2) α 2u-globulin の雄での発現量はエストロゲン作用の高感度指標とはなりにくいと考えられる。
- 3) 雌腎 α 2u-globulin はアンドロゲン様作用の検出系として検討する余地はあると思われる。
- 4) MXC には雄の α 2u-globulin 発現を非常に強く抑制する作用が認められたが、これはエストロゲン様作用の結果であるとは考えにくい。
- 5) 4-NP は α 2u-globulin の発現に影響を与えなかった。

F. 研究発表：

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

畝山智香子、渋谷淳、中川恵子、武吉正博、
榎富直哉、二保直子、高橋則行、小林恒雄、
岡崎修三、一鬼勉、広瀬雅雄、4-nonylphenol

および methoxychlor のラット 28 日間反復経口投与による α 2u-globulin の肝での発現及び腎蓄積量の解析。第 17 回日本毒性病理学会、2001 年 1 月、淡路、要旨集 80 頁

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. 実用新案登録
なし。

Table 1. Sperm analysis of male rats treated with genistein

Dose (mg/kg)	No.of rats	Sperm No. ($\times 10^6$ /g)	
		Tail of epididymis	Abnormal sperms (%)
0	10	1147.6 \pm 132.4	0.5 \pm 0.4
120	10	1282.0 \pm 245.8	0.2 \pm 0.2
400	10	1273.7 \pm 216.3	0.5 \pm 0.5
1000	10	1069.3 \pm 173.2	0.6 \pm 0.7

Table 2-1. Final body and relative organ weights of rats treated with genistein

Sex and dose (mg/kg bw)	Final body wt. (g)	Pituitary (mg/100g bw)	Thyroids (mg/100g bw)	Liver (g/100gbw)	Kidneys (g/100g bw)	Adrenals (mg/100g bw)	Seminal vesicle (g/100g bw)
Male							
0	412±35	2.8±0.3	4.1±1.1	3.58±0.14	0.67±0.046	14±2	0.33±0.06
120	411±23	2.8±0.3	4.0±0.9	3.71±0.25	0.66±0.06	15±2	0.32±0.06
400	421±30	2.8±0.3	3.6±0.7	3.85±0.31*	0.69±0.05	15±3	0.31±0.05
1000	417±27	2.9±0.4	4.2±0.6	3.87±0.20*	0.70±0.04	14±3	0.31±0.04
Female							
0	257±14	5.4±0.7	5.3±1.0	3.67±0.18	0.71±0.06	26±3	
120	248±20	5.1±0.7	5.5±0.8	3.82±0.25	0.70±0.05	26±2	
400	249±17	5.6±0.7	5.3±1.3	3.99±0.30	0.71±0.07	27±3	
1000	253±16	5.6±0.5	5.5±1.1	4.00±0.42	0.71±0.07	23±3	

*P<0.05

Table 2-2. Final body and relative organ weights of rats treated with genistein

Sex and dose (mg/kg bw)	Prostate				Epididymides (mg/100g bw)	Testes (g/100g bw)	Ovaries (mg/100g bw)	Uterus (mg/100g bw)
	Ventral (g/100g bw)	Dorsolateral (g/100g bw)	Combined (g/100g bw)					
Male								
0	0.13±0.03	0.08±0.02	0.25±0.06	234±20	0.78±0.08			
20	0.12±0.03	0.09±0.01	0.25±0.03	233±19	0.74±0.06			
100	0.12±0.03	0.10±0.02	0.26±0.03	229±23	0.73±0.05			
500	0.11±0.02	0.09±0.02	0.24±0.03	230±23	0.75±0.07			
Female								
0						35.1±4.7	176±30	
20						32.9±3.2	162±20	
100						35.0±5.3	159±32	
500						33.6±4.9	167±33	

Fig. 1. Experimental design

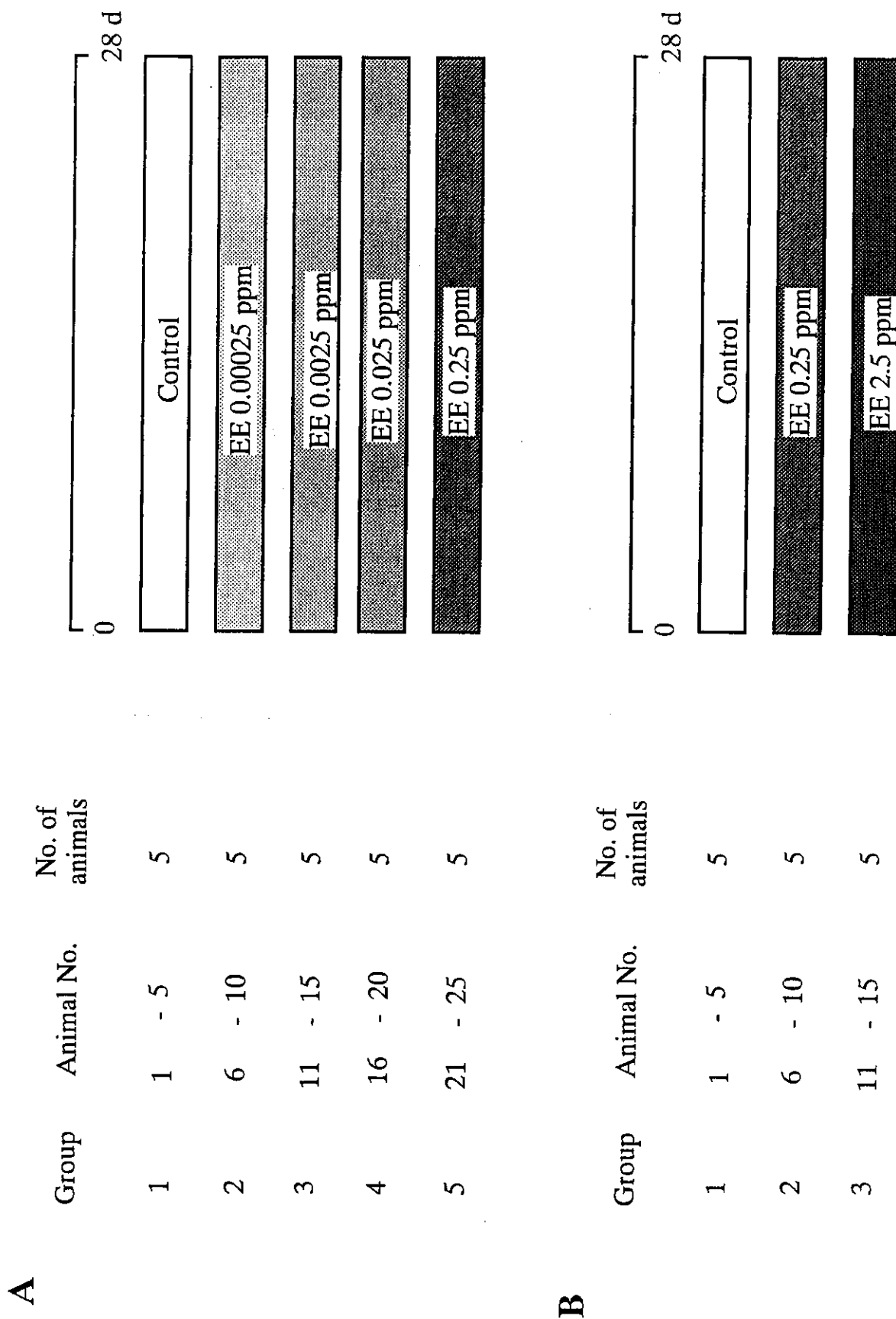


Fig. 2. Kidney α 2u-globulin protein level in male rats with EE

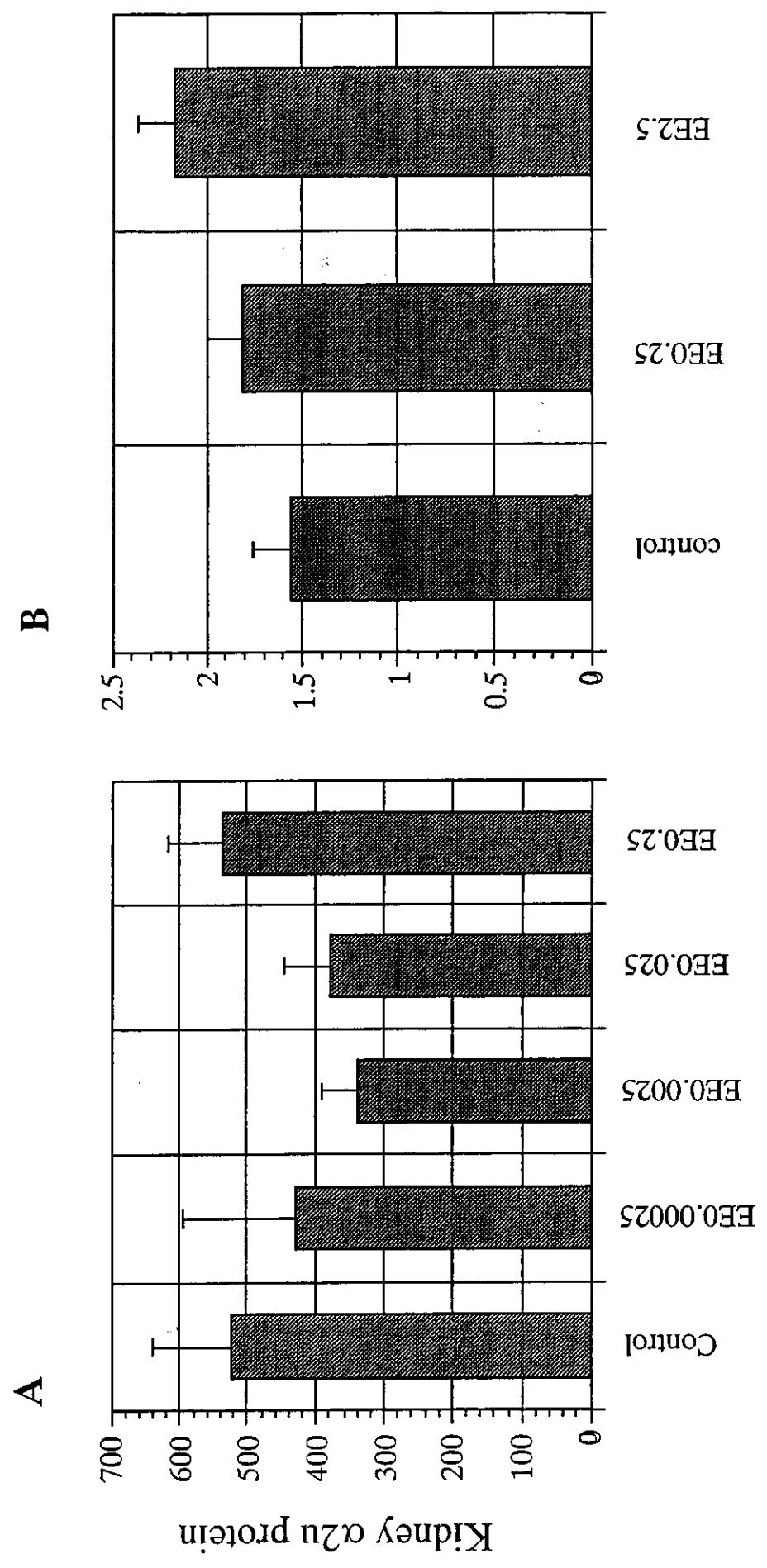
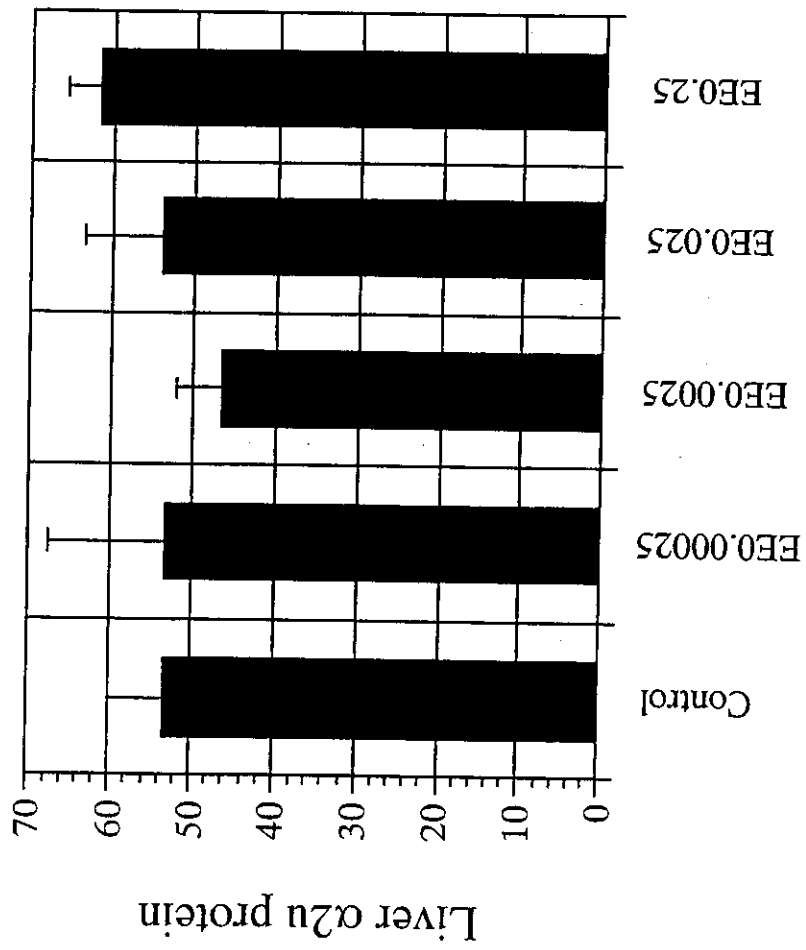


Fig. 3. Liver α 2u-globulin protein level in male rats treated with EE

A



B

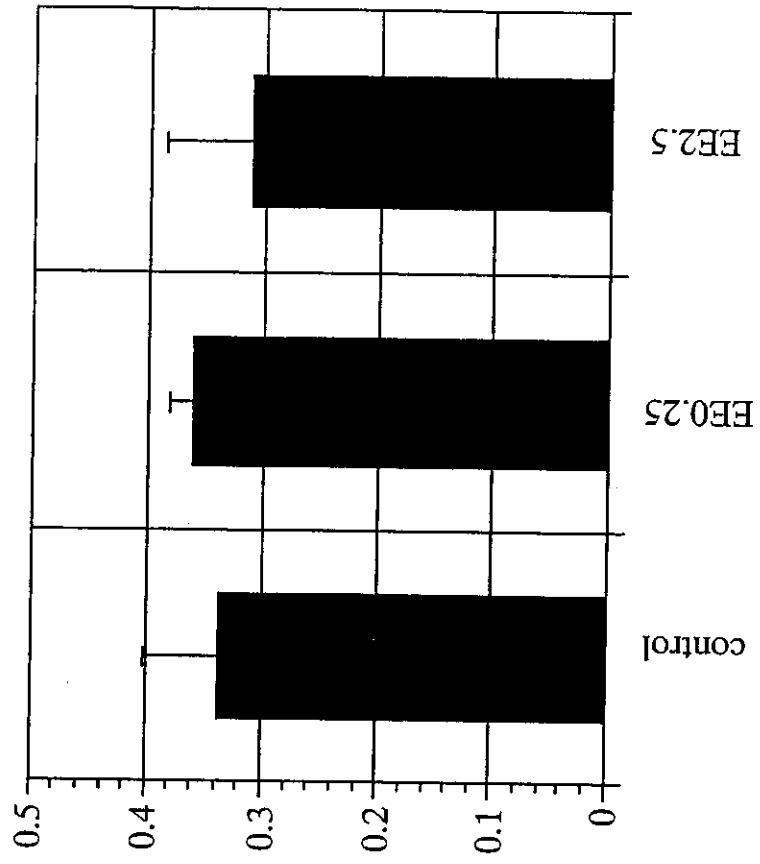


Fig. 4. Liver α 2u-globulin mRNA level in male rats treated with EE

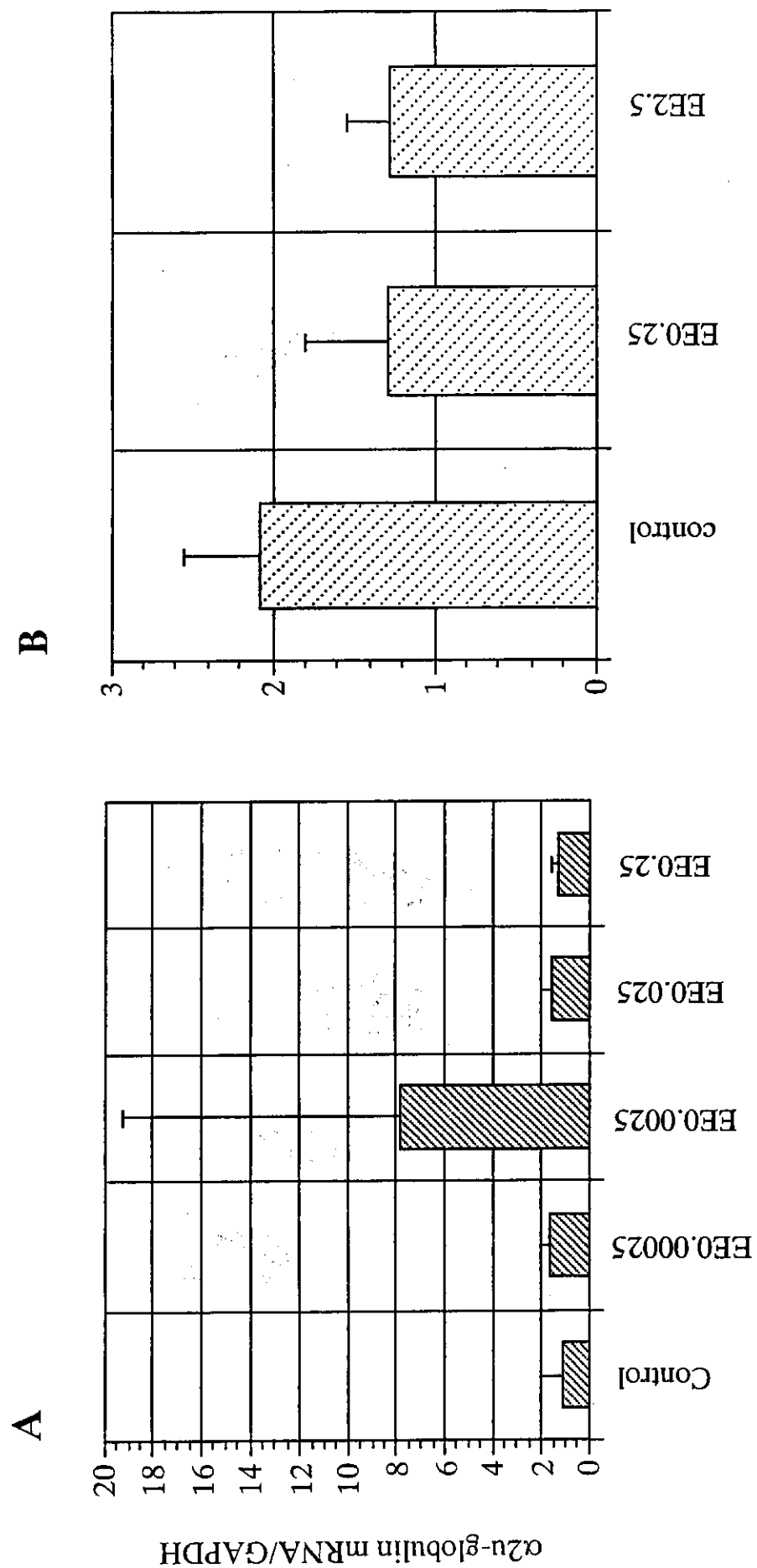


Fig. 5. α 2u-globulin protein and mRNA levels in rats treated with NP

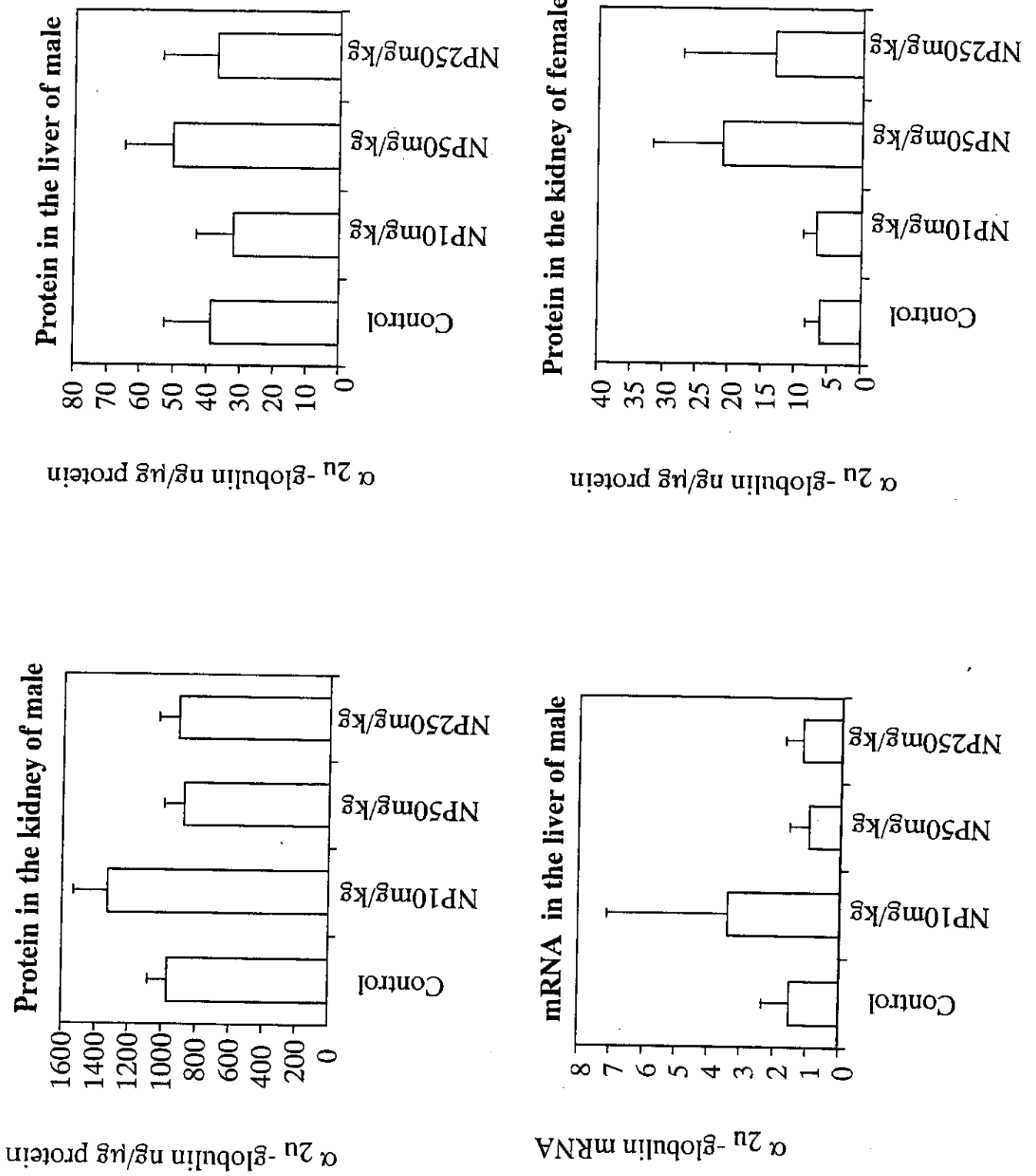
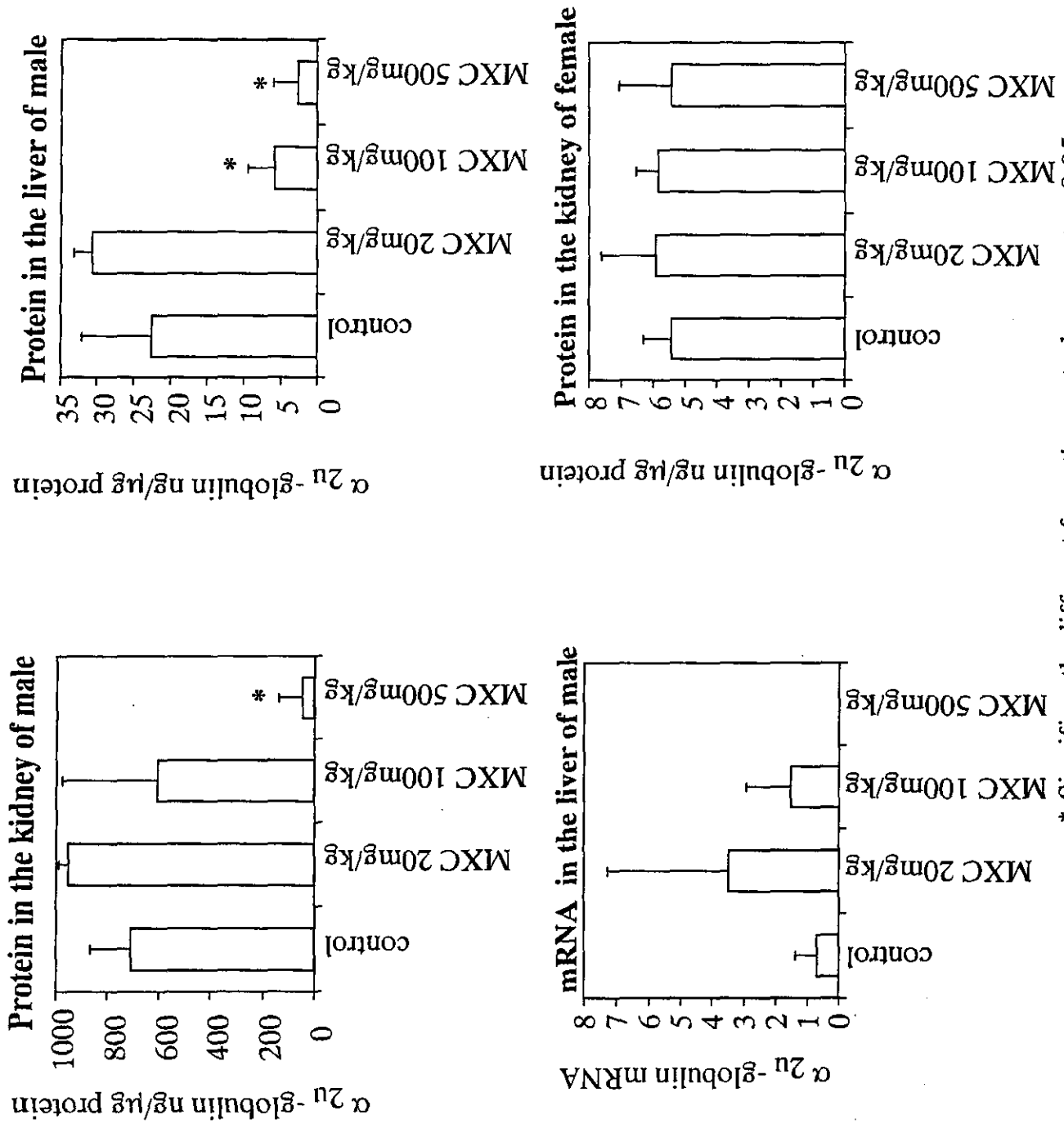


Fig. 6. α 2u-globulin protein and mRNA level in rats treated with MXC



*:Significantly different from the control group at $p < 0.05$.

(3) 〈新規基盤整備研究部門〉

16. 内分泌かく乱物質の電算検索と評価に関する研究

分担研究者 板井昭子

株式会社 医薬分子設計研究所所長

研究要旨：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なう。今年度は数十万種の化学物質が登録されているデータベースのバーチャルスクリーニングを行ない、内分泌かく乱作用を有する可能性の高い化学物質を選び出し入手して結合活性確認を行なった。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て、結合活性値との間に高い相関が得られることを確認した。

A. 研究目的

近年、環境中に存在する多くの天然または化学合成された化学物質が内分泌かく乱作用を示して、生物体の健全な発育を阻害することが明らかになり、その科学的な確認と対策が急務となっている。これらの化学物質はたまたま女性ホルモン等の核内受容体に結合するためにそうした作用を発現することが推定されており、同定・検出・試験の方法についての研究と共に、個々の既知かく乱物質がどのように生物作用を発現するかを明らかにするための数多くの実験的研究がなされている。

一方、女性ホルモン等核内受容体のリガンド結合ドメインは結晶構造が解析されており、標的受容体の立体構造の情報に基づくコンピュータを用いた理論的なアプローチが可能である。当研究者らは以前から、標的受容体の立体構造が利用

できる場合に、任意の化合物が形成できる最安定な複合体の構造を予測し、原子レベルでの相互作用様式と結合の強さを推定する自動ドッキング法およびその方法に基づいて新規の活性化合物を探索する目的で、膨大な化合物群から標的受容体に安定に結合する可能性の高い少数の化合物を選別する三次元データベース検索法の開発を行ってきた。本研究は、これらの方法を利用して、既知内分泌かく乱物質について作用発現に必要な構造条件を明らかにし、さらに、三次元データベース検索法を利用して選別した少数の候補化合物を入手して実験的に活性確認することにより未知のかく乱物質を効率よく探索することを目的とする。

昨年度は、エストロゲン受容体 α (ER α)を標的としてイソフラボンおよびフラボン系の化合物群のバーチャルスクリーニングを行なった。エストロゲン受容

体に結合する可能性の高い21種の化合物を選び出し、入手して、ratER α 遺伝子を導入したCOS-1細胞のルシフェラーゼレポーターアッセイを行なうことにより、その転写活性を測定し、11化合物に活性があることを確認した。また、結合安定性評価スコアと活性値との相関をより良好にすることは、本研究を成功へ導く一因であると考えられるため、併せてその検討も行なった。

今年度も昨年度に引き続き、受容体として精度の高い三次元座標が入手可能なエストロゲン受容体 α を標的として検討を行なった。バーチャルスクリーニングは、市販化合物データベース中の数十万化合物すべてを対象として実行した。さらに、活性評価スコアの検討も継続して行なった。

B. 研究方法

(1) 受容体立体構造

ドッキングに使用する受容体立体構造は、Protein Data Bankに登録されているER α のリガンド結合ドメインの結晶構造のうち、17 β -エストラジオール (E2) が結合している1ere.pdbおよび、ジェチルスチルベストロール (DES) が結合している3erd.pdbの結晶構造を参考に作成した。一般に、結合しているリガンドに依存して蛋白質の立体構造が動くこと(induced fit)はよく知られている。E2とDESは、それぞれ分子内に水酸基を2つ有しているが、この二つの水酸基間距離が異なるため、今回参考にした1ere.pdbと3erd.pdbを比較すると、E2のD環側

の水酸基と水素結合する524HIS周辺の立体構造が異なっている。また、DESでは、E2のD環部分に相当する環がベンゼン環となって立体的な厚みが少なくなっているため、それにあわせて421METの側鎖が大きく動き、生じたキャビティの隙間を埋めている。われわれの開発したドッキングプログラムでは結合様式推定時には受容体側の動きは考慮されないため、用いる受容体キャビティは十分広い必要がある。これらのことから今回は3erd.pdbの構造をもとに、421METだけを1ere.pdbのものに置き換えた受容体構造を作成し、後のバーチャルスクリーニングやスコア検討に使用した。

(2) 化合物データベース (ACD)

今回、スクリーニングを行なう化学物質群として、市販データベースACD (Available Chemical Directory)中の全化合物(約20万化合物)を使用した。

これらの化合物は三次元化した後、ドッキングするのに必要な情報を付加して使用した。三次元化には、単純なディスタンスジオメトリ法による構造立ち上げの後MMFF力場を用いた構造最適化・MOPAC-MNDO法による原子電荷計算を行なうプログラムOliveを利用した。

(3) バーチャルスクリーニング

昨年度同様、リガンドの配座の自由度を考慮しながら網羅的に結合モデルを探索できる蛋白質-リガンド自動ドッキングプログラムAdam & Eveを用いてリガンドの結合状態を探索した。Adam & Eveでは、受容体蛋白質の構造を動かすこと