

- regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology*, **140**, 852-858.
- Li LH, Jester WF Jr., Orth JM (1998) Effects of relatively low levels of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on cocultured Sertoli cells and gonocytes from neonatal rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **153**, 258-265.
- Mylchreest E, Cattley RC, Foster PM (1998) Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(*n*-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicol. Sci.*, **43**, 47-60.
- Mylchreest E, Sar M, Cattley RC, Foster PM (1999) Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(*n*-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **156**, 81-95.
- Nagata S (1997) Apoptosis by death factor. *Cell*, **88**, 355-365.
- Nagata S, Golstein P (1995) The Fas death factor. *Science*, **267**, 1449-1456.
- Richburg JH and Boekelheide K (1996) Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **137**, 42-50.
- Richburg JH, Nanez A, Gao H (1999) Participation of the Fas-signaling system in the initiation of germ cell apoptosis in young rat testes after exposure to mono-(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **160**, 271-278.
- Rothbacher KP, Kimmel R, Hildenbrand S, Schmahl FW, Dartsch PC (1998) Nephrotoxic effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) hydrolysis products on cultured kidney epithelial cells. *Hum. Exp. Toxicol.*, **17**, 336-342.
- Saillenfait AM, Payan JP, Fabry JP, Beydon D, Langonne I, Gallissot F, Sabate JP (1998) Assessment of the developmental toxicity, metabolism, and placental transfer of di-*n*-butyl phthalate administered to pregnant rats. *Toxicol. Sci.*, **45**, 212-224.
- Treinen KA, Dodson WC, Heindel JJ (1990) Inhibition of FSH-stimulated cAMP accumulation and progesterone production by mono(2-ethylhexyl) phthalate in rat granulosa cell cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **106**, 334-340.
- Tyl RW, Price CJ, Marr MC, Kimmel CA (1988) Developmental toxicity evaluation of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate in Fischer 344 rats and CD-1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **10**, 395-412.
- van der Schoot P (1992) Disturbed testicular descent in the rat after prenatal exposure to the antiandrogen flutamide. *J. Reprod. Fertil.*, **96**, 483-496.
- Wine RN, Li LH, Barnes LH, Gulati DK, Chapin RE (1997) Reproductive toxicity of di-*n*-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ. Health Perspect.*, **105**, 102-107.
- Zacharewski TR, Meek MD, Clemons JH, Wu ZF, Fielden MR, Matthews JB (1998) Examination of the *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicol. Sci.*, **46**, 282-293.

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- ①日本食品化学学会誌、第7巻2号、フタル酸エステルの生殖および発生に対する毒性影響についての最近の研究、②2000年10月、③日本食品化学学会、④小泉睦子、江馬真、広瀬明彦、長谷川隆

2. 学会発表

なし

F. 知的所有権の取得状況

なし

表-1 フタル酸エステルの発生への影響

動物種	検体	投与日	毒性影響	文献
妊娠全期間投与の影響				
F344 ラット	DEHP	GD 0-20	胚致死	Tyl ら(1988)
CD-1 マウス	DEHP	GD 0-17	胚致死、水頭症、眼瞼開裂 尾奇形	Tyl ら(1988)
妊娠初期および中期投与の影響				
Wistar ラット	DBP	GD 0-11	胚致死	Ema ら(1997a)
Wistar ラット	DBP	GD 7-15	胚致死、口蓋裂	Ema ら(1993)
Wistar ラット	DBP	GD 7-9	胚致死、頸椎および胸椎奇形、 肋骨奇形	Ema ら(1994)
Wistar ラット	DBP	GD 10-12	胚致死	Ema ら(1994)
Wistar ラット	DBP	GD 13-15	胚致死、口蓋裂、胸骨分節癒合	Ema ら(1994)
Wistar ラット	DBP	GD 8 or 9	胚致死、頸椎および胸椎奇形 腎盂拡張	Ema ら(1997b)
Wistar ラット	DBP	GD 15	胚致死、口蓋裂、胸骨分節癒合	Ema ら(1997b)
SD ラット	DBP	GD 13, 14 or 15	胚致死、口蓋裂	Saillenfait ら(1998)
妊娠後期および授乳初期の投与				
Wistar ラット	DBP	GD 11-21	口蓋裂、精巣下降不全 肛門生殖突起間距離の短縮	Ema ら(1998)
Wistar ラット	DBP	GD 15-17	精巣下降不全 肛門生殖突起間距離の短縮	Ema ら(2000b)
LE ラット	DBP	GD 16-19	精巣下降不全 肛門生殖突起間距離の短縮	Gray ら(1999)
SD ラット	DBP	GD12-21	雄尿道下裂、停留睪丸	Mylchreest ら(1999)
SD ラット	DBP	GD14-LD3	精巣障害	Gray ら(1999)
SD ラット	DEHP	GD14-LD3	雄尿道下裂、精巣障害	Gray ら(1999)
その他				
LE ラット	DEHP	GD1-LD21	精巣重量低下、精細管上皮崩壊	Arcadi ら(1998)
SD ラット	DBP	GD3-LD20	雄尿道下裂、停留睪丸	Mylchreest ら(1998)

GD: 妊娠日、LD: 授乳日

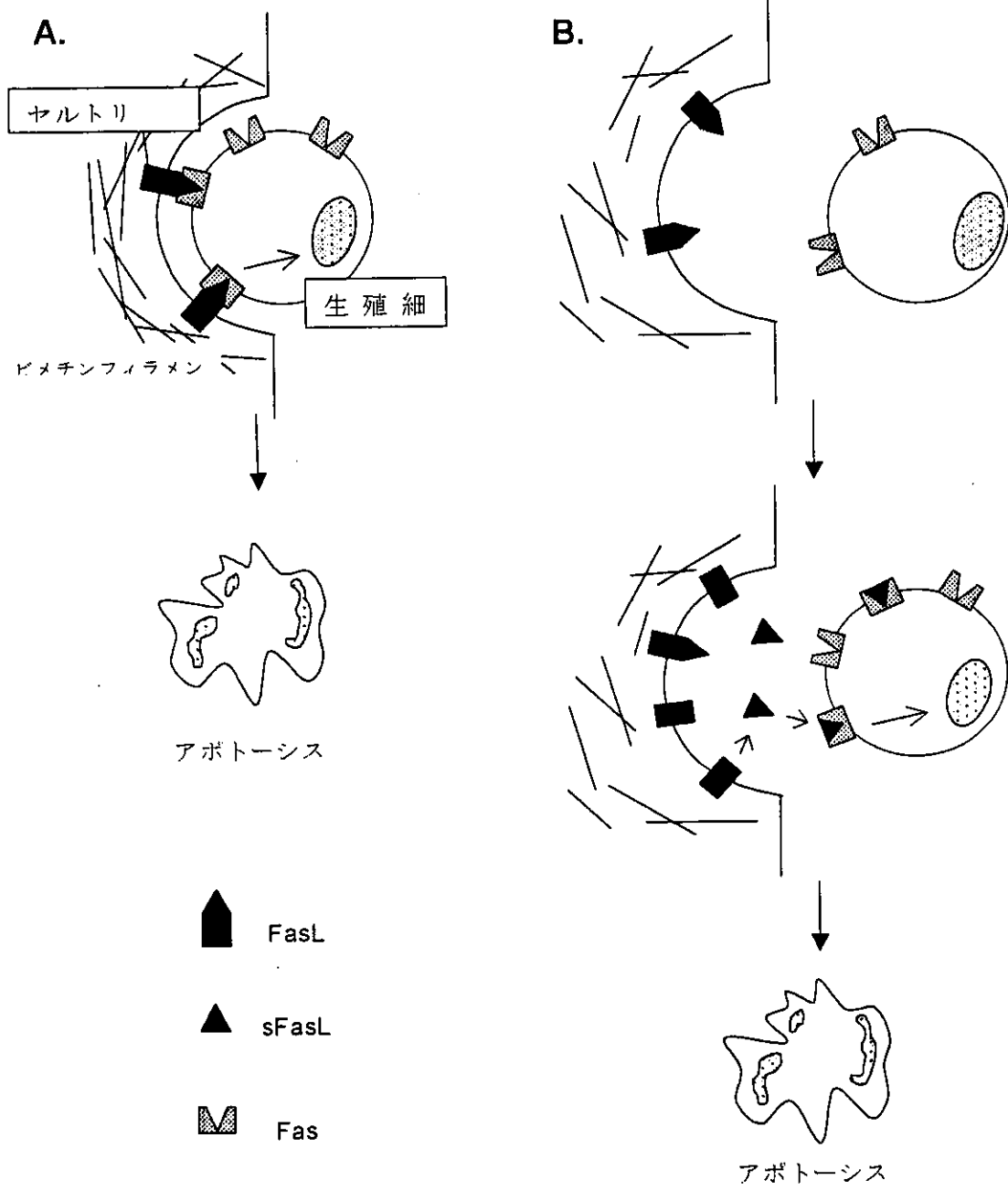


図-1 MEHP のセルトリ細胞への作用による生殖細胞のアポトーシスの推定作用機構  
(Richburg ら(1999)の仮説)

正常状態において常に行なわれている生殖細胞のアポトーシスには、生殖細胞に存在する膜レセプター蛋白である Fas、およびセルトリ細胞に存在するそのリガンド(FasL)からなる Fas システムが重要な役割を果たしていると考えられている(A)。MEHP はセルトリ細胞のデメチンフィラメントを崩壊させることにより、生殖細胞をセルトリ細胞から分離させ、Fas シグナル伝達経路を崩壊させる。その後、可溶性 FasL(sFasL)の形成および生殖細胞膜で Fas 発現が増加し、sFasL が Fas に結合することによってアポトーシスが起これり生殖細胞が死滅する(B)。

## 21. 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 中田 琴子

国立医薬品食品衛生研究所 化学物質情報部 部長

### 研究要旨

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、解析するためのデータベースを開発し整備した。また、この開発過程で蓄積された知見を活用して、分子の3次元構造に基づいた構造活性相関の研究を行った。これらの情報を用いたエストロゲン受容体と生体外からの化合物の分子間相互作用モデリングについて検討した。

### 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（特に結合）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し、かつ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、内分泌かく乱物質の候補物質、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、重金属、環境中の汚染物質などの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)、ロシアの N. Kolchakov らの転写領域についてのデータベース(TRRD)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。さらに各種の分子計算手法を用いて、内分泌かく乱化学物質と生体分子の3次元相互作用モデルを検討する。計算手法としては、リガンド分子の計算に非経験的分子軌道法プログラム Gaussian 98、相互作用モデルとして分子動力学法プログラム CHARMM 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（フラグメント分子軌道法）プログラム ABINIT-MP を用いる。

### C. 結果

#### C-1. Binding Affinity データベース

昨年度は、異なる実験から得られた測定値を相互に比較可能とするために、相対的な結合値(Relative Binding Affinity: RBA 値、Bolger, R. et al., Environ Health Perspect. (1998) 106, 551-557)を導入した。今年度はこれら数値の妥当性の検証、修正、データ追加等を行い、かつ RBA 値を構造活性相関研究に応用した。

#### C-2. 分子の3次元活性相関

内分泌かく乱性が疑われている化合物（17 $\beta$ -エストラジオール(EST)、ゲニスタイン(GEN)、DES、ビスフェノール A(BISA)、ビスフェノール F(BISF)、ラロキシフェン(RAL)、タモキシフェン(TAM)、4-OH タモキシフェン(OHT)、クロミフェン(CLO)、4-OH クロミフェン(OHC))の3次元構造をX線結晶構造から得られる構造と同程度の精度と考えられる HF/6-31G\*で最適化して求めた。エストロゲン受容体(ER)としてPDBデータベース(タンパク質の3次元構造データベース)中のデータで、ER $\alpha$ として

3ERD、3ERT、3ERE、1ERR、また ER $\beta$  として 1QKM、1QKN から作成した 3 次元構造を使用し、上記の内分泌かく乱性が疑われる化合物との分子間相互作用について CHARMM および非経験的フラグメント分子軌道 (FMO) 法プログラム ABINIT-MP を用い、受容体のリガンド結合部位とリガンドとの相互作用の詳細な解析を行った。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 (図 1)。また ER $\alpha$  と ER $\beta$  において、ゲニスタイン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 (図 2)。

#### D. 考察

Binding Affinity Database は、結合値の他に、生物種、反応系、観測系といった、さまざまな実験条件についても格納しており、これらの情報をキーワードとしても検索できることが特徴である。現時点で検索可能な情報は、Mode of Action (結合阻害実験か酵素誘導実験か)、相対的結合値の範囲、化合物名、受容体名、生物種、反応系、実験方法、測定方法、観測方法である。全てのエントリーは、それが参照している文献名を介して、米国の文献データベース PubMed にハイパーテキストリンクされており、その場で文献のアブストラクトが参照できる。

エストロゲン受容体のリガンド結合部位については、PDB で公開されているリガンドとの複合体の X 線結晶解析構造を用いて、内分泌かく乱候補物質とエストロゲン受容体との結合エネルギーの計算を行い、実験から得られた RBA との比較を行った。経験的パラメータを用いる計算方法と異なりフラグメント分子軌道計算法は計算時間がかかるが、精度を上げることができた。フラグメント分子軌道計算から得られた結合エネルギーは、RBA と高い相関を示し、今回行ったフラグメント分子軌道法を用いた分子の 3 次元活性相関解析手法が、内分泌かく乱化学物質のスクリーニングに有用であることが示された。

#### E. 結論

Binding Affinity Database はすでに試験的に公開されており、下記の URL からアクセスできる。

<http://molddb.nih.gov/eddb/afdb/>

また、この Binding Affinity Database を我々が別に開発している Receptor Database と連携して使用できるようにした。

分子の 3 次元構造活性相関として、今年度はエストロゲン受容体とリガンドとの結合エネルギー計算に力を注いだ。経験的パラメータを用いて CHARMM による計算を行ったが、CHARMM の力場が分子間相互作用に適さないことがわかり、現在開発中の非経験的 FMO 法に切り替えた。フラグメント分子軌道計算から得られた結合エネルギーは RBA と高い相関を示し、内分泌かく乱化学物質のスクリーニングに有用であることが示された。

フラグメント分子軌道法プログラム ABINIT-MP については、拡張基底関数への対応、構造最適化機能の追加を行い、更に予測精度を高めていく予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Nakata, K. (in press) Endocrine Disruptors and Environmental Impact in Japan. *Cadernos de Saúde Pública/Reports in Public Health*.
- Kaminuma, T., Nakata, K., Nakano, T. and Takai-Igarashi, T. (in press) Pharmacoinformatics Infrastructure for Genome-based Personalized Medicine. *CBI Journal*
- Nakata, K., Takai, T., Nakano, T. and Kaminuma, T. (2000) Receptor Database (RDB) As an Analytical Tool. *Frontiers Science Series*, 30, 84-86, (Eds. Miyano, S, Shamir, R. and Takagi, T.) In "Currents in Computational Molecular Biology
- Kaminuma, T., Takai, T., Nakano, T., Nakata, K.: (2000) Modeling of Signaling Pathways for Endocrine Disruptors, *BioSystems*, 55, 23-31

##### 2. 学会発表

- Nakata, K., Nakano, T., Fukuzawa, K., Koyano,

- K. and Kaminuma, T.: Mode of Action Analysis of Endocrine Disrupting Chemicals, Biophysical Society 45<sup>th</sup> Annual Meeting, (Boston, Feb. 2001)
- 福澤薫、小谷野和郎、中野達也、中田琴子、神沼二真：フラグメント MO 法を用いたエストロゲン受容体とリガンドとの結合エネルギーの理論予測、高次ゲノム公開ワークショップ（東京、2001年1月）
  - Nakata, K., Nakano, T., Takai-Igarashi, T. and Kaminuma, T.: Pharmacoinformatics infrastructure for genome based personalized medicine. Genome Informatics Workshop, (Tokyo, Dec.2000)
  - 中野達也、福澤薫、小谷野和郎、中田琴子、神沼二真：エストロゲン受容体とリガンドとの結合性の計算、日本内分泌攪乱化学物質学会（横浜、2000年12月）
  - Nakata, K., Hasegawa, S. and Kaminuma, T.: Extension of a Receptor Database for Pharmacological Research. Advanced Genomics (Yokohama, Nov. 2000)
  - Nakata, K., Takai, T., Nakano, T. and Kaminuma, T.: Receptor Database (RDB) as an analytical tool for the drug design. International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure. (Novosibirsk, Aug. 2000)
  - 高井貴子、徳永雅彦、中野達也、中田琴子、神沼二真：MOBI-DICS 開発における生体影響データベースデータベースの統合、CBI 学会第一回年会（東京、2000年7月）
  - 高井貴子・徳永雅彦・中田琴子・神沼二真：公開 SNPs データの自動収集システム、CBI 学会第一回年会（東京、2000年7月）
  - 福澤薫・大河内郁雄・小谷野和郎・中野達也・中田琴子・神沼二真：エストロゲン受容体リガンド結合エネルギーの計算による予測について、CBI 学会第一回年会（東京、2000年7月）
  - 中田琴子、高井貴子、長谷川式子、神沼二真：受容体データベースの発展、CBI 学会（東京、2000年7月）
  - Nakata, K., Nakano, T., Takai, T. and Kaminuma, T.: Structure analysis of estrogen receptor using receptor database. (Kyongyu, May 2000)
  - Nakata, K., Takai, T., Nakano, T. and Kaminuma, T. : Receptor Database (RDB): As an Analytical Tool. RECOMB 2000 (Tokyo, April 2000)

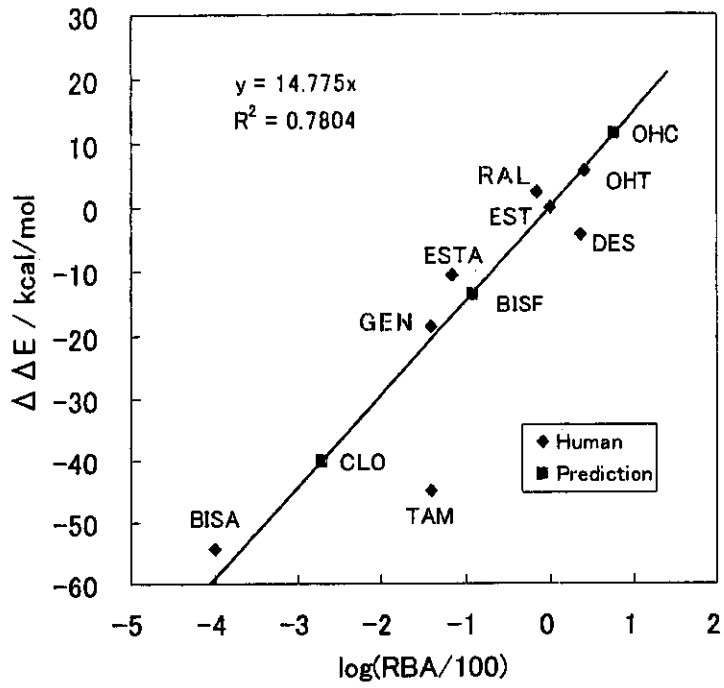


図 1. ER $\alpha$ -リガンド結合エネルギー(計算値)とRBA(実験値)の相関

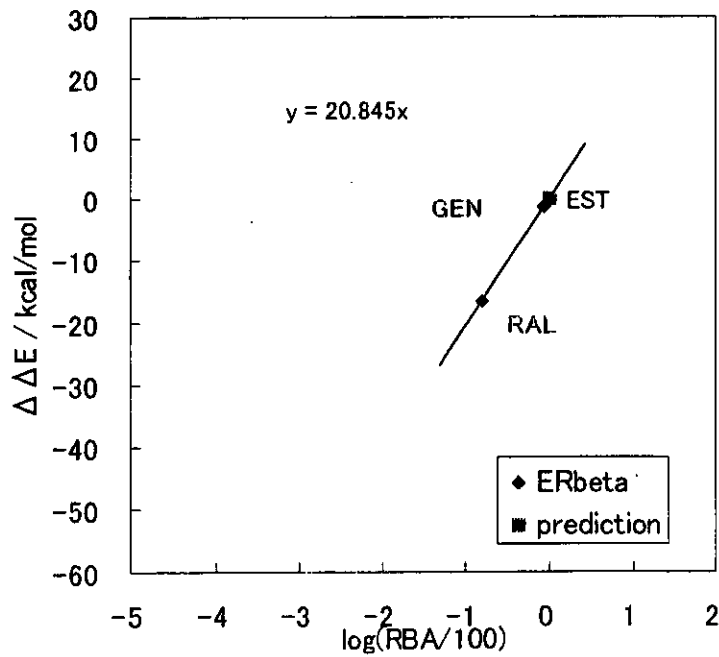


図 2. ER $\beta$ -リガンド結合エネルギー(計算値)とRBA(実験値)の相関



## 22. 健康影響に関する情報収集と評価に関する研究

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情報第一室長

研究要旨： 内分泌攪乱化学物質の健康影響を考える上で、生体の感受性や、不可逆性の点から考えて重要性が高いと思われる妊娠期間中の曝露による影響情報を中心に検索し整理した。とくに最近の関連の研究が進んでいることから、新たに健康影響の蓋然性が高い物質、すなわち大豆エストロゲン物質、有機錫、フタル酸エステル類およびダイオキシンにつき、文献を追加検索し、物質情報、動物種、試験条件、観察された影響についての情報、文献情報を整理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て、環境、食品中や食品容器からの溶出などの分析データと、インビトロ試験のデータはかなり集約されてきたが、とりわけ重要なのは健康影響リスク評価にクリティカルな情報の整備と、その内容の厳密な評価検討である。これまでとりあげられた物質のうち健康影響の蓋然性が問題となりうる物質について、リスク評価にクリティカルな情報を収集、データベースに整理し、本研究班の試験法開発を支援すること、今後調査研究を進める必要性が高いと考えられる妊娠期間中の曝露による影響に焦点をあてて、整理する。

### B. 研究方法

文献調査は次のように行った。

(1) Internet Grateful Med の Toxline を使用し、健康リスクの蓋然性が比較的高いと考えられる大豆エストロゲン物質、有機錫、フタル酸エステル類およびダイオキシン物質について、追加的に最近の報告 (1998 年-2000 年) にしぼって検索した。

(2) 検索結果を発生毒性、生殖毒性、免疫・神経毒性、分析、インビトロ、ヒトにおける知見、メカニズム、そのほかに分類し、データベース化を試みた。

(倫理面への配慮)

特に必要なし

### C. 研究結果

#### (1) 文献検索結果

最近になって内分泌攪乱の検出をエンドポイントとした試験研究が急速に増えていることを考慮して、健康リスクの蓋然

性が比較的高いと考えられる大豆エストロゲン物質、有機錫、フタル酸エステル類およびダイオキシン物質について、追加的に最近の報告 (1998 年-2000 年) にしぼって検索した結果を表 1 に示す。また同じ期間について、4 つのキーワード (fetus, embryo, fetal exposure, reproduction) を組み合わせて検索した結果を表 2 に示す。

(2) 検索結果を発生毒性、生殖毒性、免疫・神経毒性、分析、インビトロ、ヒトにおける知見、メカニズム、そのほかに分類しデータベース化した結果を表 3 に示す。

### D. 考察

(1) 内分泌攪乱化学物質といわれる物質は、化学的にのみならず、作用メカニズムにおいても多岐にわたり、必ずしも受容体経路で影響を及ぼしているものばかりではなく作用メカニズムと定量的なリスクの可能性をあわせて検討してリスクの評価を検討してゆかなければならない。

(2) この意味でとりわけ胎児期曝露による影響についての的確に検出する試験系の整備が必要と考えられる。発生過程における発生・分化の制御メカニズムの解明に向けた研究の推進が内分泌攪乱化学物質のリスク評価にとり必要である。

(3) ヒト以外で見られた影響がヒトにもあてはまるかについて、作用メカニズムと、キネティクス (吸収、分布、代謝など) とダイナミクス (標的臓器における分子レベルでの感受性) および、ヒトと試験動物における曝露レベルの相違について検討する必要がある。

## E. 結論

(1) 問題とされている物質を中心に、内分泌攪乱化学物質の健康影響の評価にとりクリティカルと考えられる胎児期曝露による影響を中心とした情報を中心に収集し、試験の条件、メカニズムの考察などの面から考察を加え整理した。

◦(2) 胎児、胚の曝露試験を報告した文献<sup>④</sup>の数は多くない。また内分泌攪乱の検出をエンドポイントとした試験研究は必ずしも多くはなかった。

(3) 人における健康影響と影響メカニズムのデータ、曝露のデータを総合して、関心が持たれている物質についておよそのリスクレベルを推測するために、本研究で試みたようなデータベースを整備し内容を充実させることが有用であろう。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Sekizawa J. Suter G. Vermeire T & Munns W  
(2000) An example of an integrated approach  
for health and environmental risk  
assessment : the case of organotin compounds,  
Water Sci. Technol., 42, 305-313

### 2. 学会発表

関澤、江馬 (2000) 環境ホルモン物質としてのリスク評価の検討、日本内分泌攪乱化学物質学会第3回研究発表会 (12月、横浜)

## G. 知的所有権の取得状況

- 1.特許 なし
- 2.実用新案登録なし
- 3.その他なし

表1 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の検索  
CAS登録番号と発行年で絞った検索結果

分類	化合物	CAS登録番号	1998	1999	2000	合計
有機せず	TPTCI	639-58-7	9	8	8	25
	TPTH	76-87-9	10	6	5	21
	TBTO	56-35-9	16	12	9	37
	TBTCI	1461-22-9	18	10	11	39
フタル酸エステル	DEHP	117-81-7	108	97	110	315
	DBP	84-74-2	77	42	94	213
	BBP	85-68-7	34	17	70	121
	DEP	84-66-2	25	27	59	111
ダイオキシン	2,3,7,8-TCDD	1746-01-6	638	383	429	1450
大豆エストロゲン	genistein	446-72-0	166	116	71	353
	daidzein	486-66-8	35	27	14	76
	equol	531-95-3	13	3	5	21

表2 キーワードによる絞り込み検索の結果 (1998-2000年分)  
 CAS登録番号と キーワード(fetus, embryo, fetal exposure, reproduction) で検索

分類	Compound	CAS-No	fetus	embryo	fetal exposure	reproduction	合計
有機せず	TPTCI	639-58-7	1	1	1	4	7
	TPTH	76-87-9	0	1	0	1	2
	TBTO	56-35-9	0	0	0	3	3
	TBTCI	1461-22-9	1	1	1	3	6
フタル酸エステル	DEHP	117-81-7	4	6	5	20	35
	DBP	84-74-2	9	8	13	33	63
	BBP	85-68-7	4	3	2	13	22
	DEP	84-66-2	0	0	0	5	5
ダイオキシン	2,3,7,8-TCDD	1746-01-6	39	62	86	299	486
大豆エストロゲン	genistein	446-72-0	8	10	7	51	76
	daidzein	486-66-8	5	2	1	18	26
	equol	531-95-3	3	1	3	8	15

## 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

分担研究者 長村 義之 東海大学医学部内分泌病理

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所毒性部

研究要旨：ホルモン様の作用をもつ化学物質の環境中での影響や生体作用が話題になっている。ある化学物質がホルモン様の作用を持つかどうかを調べることに困難はないが、「なんらかの障害」があるのかどうかを実際に同定することは容易くない。内分泌攪乱化学物質問題を「障害問題」とよばず「かく乱問題」と呼称している認識もそうしたこの領域の未知性に基づいている。内分泌攪乱化学物質試験法の出版に当たり、内分泌かく乱化学物質についての現段階での認識に即して、その標準試験法とともに、発展途上の新しい試験法について、いわば研究法の一貫として各々を紹介する形をとった。

### A. 研究目的

本研究の目的は、広い科学的知識を基礎にした内分泌かく乱物質の影響に関する試験法の開発であるが、この研究結果を広く研究者のみならず一般に報告するために、今井班班員の研究成果を結集した、「内分泌かく乱化学物質試験法提要」の編集を計画した。内分泌かく乱物質問題には、その生体影響の有無を判定すべき対象化学物質の数が膨大であるという問題点の他に、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から、その影響がヒトや動物の生殖、後世代影響にどのように現れるかを検討するエンドポイントの問題まで、広い分野の知識を結集した上で、対象物質あるいは物質群に対処しなければならないという問題点がある

### C. 研究結果

「内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法」を出版した。

発行 2000年9月19日

監修 井上 達

発行者 平野皓正

発行所 シュプリング・フェアラク  
東京株式会社

印刷所 昭和堂印刷所

### 目次

#### 1) 標準的な試験法

##### 1. 試験管内試験

無細胞系受容体結合試験、酵母を用いたレポーター遺伝子発現試験、酵母を用いたツーハイブリッド試験、MCF-7細胞を用いた細胞増殖試験、ヒト由来ホルモン受容体導入細胞系、下垂体細胞を用いた

## 試験系

### 2. ヒト影響モデルとしての動物試験

子宮肥大試験およびハーシュバークー試験、28日間連続投与試験、子宮内暴露試験、1世代繁殖試験、2世代生殖毒性試験、多世代繁殖毒性試験

### 3. 環境生物への影響を指標とする試験

海産魚を用いる試験法、メダカを用いる試験法、線虫を用いる試験法

### 2) 新たな試験系の開発

1. 胚幹細胞を用いた検討

2. 培養細胞を用いた検討

3. 神経幹細胞を用いた検討

4. 胎生期および新生仔曝露-視床下部神経核の構造変化

5. 哺乳動物培養胚を用いた神経細胞におよぼす影響

6. 胎生期および新生仔期曝露-生殖行動への影響

7. 哺乳動物培養胚を用いた生殖細胞におよぼす影響

8. 免疫系への影響の評価系の検討

9. 発がんプロモーション作用の検討

10. 甲状腺腫瘍に対する影響

## 付録

1. イムノアッセイによる迅速測定とスクリーニング

2. OECD バリデーションプロトコルの解説

の内容を構成した。

## E. 結論

本年度は、最終年度として内分泌攪乱

科学物質の用語集「内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法」の出版を実現した。用語集は、in vivo 実験法、培養細胞および最新の分子病理学的手法から構成されている。内分泌攪乱物質の評価を考えるうえで貴重な指針を与えるものと思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

・ Endocrinology 141, 1, 333-339, 2000

Jin L, Osamura RY, Kulig E, Lloyd RV et al  
Leptin and Leptin Receptor Expression in Rat and Mouse Pituitary Cells

・ Endocrine Journal 47, 1, 13-20, 2000

Murakoshi M, Osamura RY et al  
Immunoreactive Pit-1 protein in hyperplastic pars intermedia induced by calcitonin of the rat pituitary gland

・ J Histochemistry & Cytochemistry 48, 4, 445-458, 2000

Osamura RY et al Contributions of immunohistochemistry and in situ hybridization to the functional analysis of pituitary adenomas

・ Human pathology 31, 7, 789-794, 2000

Matsuno A, Osamura RY et al Growth hormone-releasing hormone expression in pituitary somatotroph adenomas, studied by immunohistochemistry and in situ hybridization using catalyzed signal amplification system

• J Histochem Cytochem 48, 7, 885-891, 2000

Osamura RY et al Applications of Plastic Embedding to Electron Microscopic Immunocytochemistry and In Situ Hybridization in Observations of Production and Secretion of Peptide Hormones

• Modern Pathology 13, 10, 1097-1108, 2000

Tahara S, Osamura RY et al Expression of pituitary Homeo Box 1(Ptx1) in human non-neoplastic pituitaries and pituitary adenomas

Review Prevention of the down-regulation of gap junction intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol.

Sai K, Kanno J, Hasegawa R, Trosko JE, Inoue T.

Carcinogenesis. 2000 21(9):1671-6

Development of invasive adenocarcinoma in a long-standing diverted ileal J-pouch for ulcerative colitis: report of a case.

Iwama T, Kamikawa J, Higuchi T, Yagi K, Matuzaki T, Kanno J, Maekawa A.

Dis Colon Rectum. 2000 43(1):101-4

Significant increase in prostaglandin E-main urinary metabolite by laxative administration: comparison with ulcerative colitis.

Fujiwara M, Okayasu I, Oritsu M, Komatsu J, Yoshitsugu M, Katoh Y, Bandoh T, Toyoshima H, Kase Y, Sugihara K, Kanno J, Hayashi Y.

Digestion. 2000;61(3):201-6

Effect of restraint stress on immune system and experimental B16melanoma metastasis in aged mice

Kanno, J., Wakikawa, A., Utsuyama, M., Hirokawa, H.

Mechanisms of ageing and development, 1997 93:107-117

Enhancement of cell proliferation and prostaglandin biosynthesis by 1,8-dihydroxyanthraquinone in the rat large intestine

Nishikawa, A., Kase, Y., Hayakawa, T., Yanagisawa, T., Kanno, J. and Hayashi, Y. Carcinogenesis, 1997 18:1259-1263

[Small cell carcinoma of the urinary bladder: a case report and review of the Japanese Literature]

Okada Y., Kawakami S., Fukuda H., Nagahama K., Saito K., Ohtsuka Y., Kihara k., Morita T., Oshima H., Eishi Y., Kanno J. Hinyokika Kyo. 1997 Oct;43(10):739-42  
Review

#### Books

Mechanisms of Chemically Induced Thyroid

Follicular Carcinogenesis. Cellular and Molecular Mechanisms of Hormonal Carcinogenesis: Mechanisms of Hormonal Carcinogenesis: Environmental Influences, ed. In: J. Kanno, Ward, J.M., Maronpot, R.R. J. Huff pp.345-389 Wiley-Liss, Inc., 1996

## 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) 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

3) 菅野 純、山本雅也、松島裕子、西岡暢彦、宮城恵理、Byung-II 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

4) 松島裕子、菅野 純、宮城恵理、井上 達、卵巣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関係について：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

5) 松島裕子、井上 達、菅野 純、17 $\beta$ -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

6) 松島裕子、井上 達、菅野 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 13 年 6 月、東京



## Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
James E. Trosko, <u>Tohru Inoue</u>	Radiation Injury and the Chernobyl Catastrophe, (Stem Cells) Oxidative stress, signal transduction, and intercellular communication in radiation carcinogenesis			AplhaMed Press.	U.S. A	1997	
西川淳一、 <u>西原 力</u>	1.3 酵母を用いたツーハイブリッド試験	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法	シュプリングー・フェアラーク東京	日本	2000/9/19	p.20-27
<u>長尾 哲二</u>	胎児期および新生児期暴露－視床下部神経核の構造変化－	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法	シュプリングーフェアラーク東京	日本	2000	pp. 163-170
<u>長尾 哲二</u>	胎児期および新生児期暴露－生殖行動への影響－	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法	シュプリングーフェアラーク東京	日本	2000	pp. 179-185
<u>渡辺敏明</u> 、 <u>桑形麻樹子</u> 、 <u>岩瀬隆之</u>	哺乳動物培養胚を用いた神経細胞に及ぼす影響	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法	シュプリングーフェアラーク東京	日本	2000	pp. 171-178
<u>渡辺敏明</u> 、 <u>大川恵子</u>	哺乳動物培養胚を用いた生殖細胞に及ぼす影響	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法	シュプリングーフェアラーク東京	日本	2000	pp. 186-193
<u>T. Shirai, M. Hirose and N Ito</u>	The Use of Short- and Medium-term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation	In: D. B. McGregor, J. M. Rice, S. Venitt (eds.).	Medium-term bioassays in rats for rapid detection of the carcinogenic potential of chemicals.	WILEY-LESS		1999	Vol. IARC Scientific Publications No. 146, pp. 251-272
<u>Nakata K.</u> , <u>Tsuguchika Kaminuma,</u> et al	Receptro databasa (RDB) as and analytical tool	(Eds. Miyano, S,Shamir, R.and Takagi, T.)		In "Currents in Computational Molecular Biology		2000	84-86

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Masako Sato, Kazuyoshi Wada, hideki Marumo, Tetsuji nagao, <u>Kiyoshi Imai</u> , and Hiroshi Ono	Influence of corn oil and diet on reproduction and the kidney in female Sprague-Dawley rats.	Toxicological Sciences	56	156-164	2000
Tetsuji Nagao, Yoshiaki Saito, Kenji Usumi, Makiko Kuwagata, <u>Kiyoshi Imai</u>	Reproductive function in rats exposed neonatally to bisphenol A and estradiol benzoate	Reproductive Toxicology	13	303-311	1999
Tetsuji Nagao, Shinsuke Yoshimura, Yoshiaki Saito, and <u>Kiyoshi Imai</u>	Developmental toxicity of the topoisomerase inhibitor, etoposide, in rabbits after intravenous administration	Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis,	19	233-241	1999
Byung-II Yoon, Yoko Hirabayashi, Yasushi Kawasaki, Yukio Kodama, Toyozo Kaneko, DaeYong Kim, and <u>Tohru Inoue</u>	Mechanism of action of benzene toxicity: Cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells(CFU-GM)	Experimental Hematology	29	278-285	2001
Thakahashi Y, Koizumi K, Takagi A, Kitajima S, <u>Inoue T</u> , Koseki H, Saga Y	Mesp2 initiates somite segmentation through the Notch signaling pathway.	Nat Genet.	25	390-6	2000
Kitajima S, Takagi A, <u>Inoue T</u> , Saga Y	MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm.	Development	127	3215-26	2000
Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, Kitajima S, Miyazaki Ji, <u>Inoue T</u>	MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube.	Development	126 (15)	3437-47	1999
Yoshida K, <u>Inoue T</u> , Hpirabayashi Y, Nojima K, Sado T.	Calorie restriction and spontaneous hepatic tumors in C3H/HE mice	J Nutrition, Health and Aging	3(2)	121-126	1999
Shinya Uchida, Shizuo Yamad, <u>Kenji Nagai</u> , Yoshiharu Deguchi and Ryohei Kimura	Brain pharmacokinetics and in vivo receptor binding of 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonists in vivo receptor binding of 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonists.	Life Sciences	Vol. 61, No. 21	2083-2090	1997
<u>Takeyoshi M</u> , Anai S, Shinoda K.	Hepatic $\alpha_{2u}$ -globulin mRNA levels and diethylstilbestrol-associated testicular atrophy in rats.	Reprod Toxicol.	14(4)	355-357	2000
Takeyoshi M, Anai S, Shinoda K	Changes in serum $\alpha_{2u}$ -globulin levels in male rats given diethylstilbestrol (DES) and their applicability to a screening test for endocrine-disrupting chemicals	Arch. Toxicol.	74	48-53	2000
Takao Ohkubo, Naganari Ohkura, Kouji Maruyama, Kazuki Sasaki, Koichi Nagasaki, Hiroaki Hanzawa, <u>Toshihiko Tsukada</u> , Ken Yamaguchi	Early induction of the orphan nuclear receptor NOR-1 during cell death of the human breast cancer cell line MCF-7.	Mol Cell Endocrinol.	162	151-156	2000
Tetsuji Hosono,	Regulation of the NGFI-B family gene	Biomed. Res.	21	263-268	2000

Naganari Ohkura, Toshihiko Tsukada, Kouji Maruyama, Ken Yamaguchi.	expression by steroid and related hormones in MCF-7 breast cancer cells.				
Naganari Ohkura, Takao Ohkubo, Kouji Maruyama, Toshihiko Tsukada, Ken Yamaguchi	The orphan nuclear receptor NOR-1 interacts with the homeobox containing protein Six3.	Dev. Neurosci.	23	17-24	2001
Ohkura N, Hosono T, Maruyama K, Tsukada T, Yamaguchi K	An isoform of Nurrl functions as a negative inhibitor of the NGFI-B family signaling.	Biochimica Biophysica Acta	1444	69-79	1999
Ohkura N, Ito M, Tsukada T, Sasaki K, Yamaguchi K and Miki K	Alternative splicing generates isoforms of human neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) mRNA.	Gene	211	79-85	1998
Miyakoshi J, Tsukada T, Tachiiri S, Bandoh S, Yamaguchi K and Takebe H.	Enhanced NOR-1 gene expression by exposure of Chinese hamster cells to high-density 50 Hz magnetic fields.	Mol Cell Biochem	181	191-195	1998
Ohkura N, Hosono T, Maruyama K, Tsukada T and Yamaguchi K	The human NGFI-B gene gives rise to two isoforms with different expression profiles.	Biomed. Res.	29 (4)	213-218	1999
Nagasaki K, Manabe T, Hanazawa H, Tsukada T and Yamaguchi K.	Identification of a novel gene, LDOC1, down-regulated in cancer cell lines.	Cancer Lett	140	227-234	1999
Nagasaki K, Maass N, Manabe T, Hanzawa H, Tsukada T, Kikuchi K and Yamaguchi K.	Identification of a novel gene, DAMI, amplified at chromosome 1p13.3-21 region in human breast cancer cell lines.	Cancer Lett	140	219-226	1999
Naganari Ohkura, Tetsuji hosono, kouji Maruyama, Toshihiko Tsukada and Ken Yamaguchi	Staurosporine enhances cAMP-induced expression of neural-specific gene VGF and tyrosine hydroxylase.	Neurosci. Lett.	267	177-180	1999
J. Nishikawa, K. Saito, M. Sasaki, Y. Tomigahara, T. Nishihara	Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Nuclear Receptor, Similar to an Embryonic Benzoate Receptor BXR.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	277	209-215	2000
川越保徳、福永 勲、西川淳一、西原 力	酵母 Two-Hybrid 法を用いた処理場浸出水のエストロン様活性の測定.	用水と排水	42(9)	787-792	2000
T. Nishihara, J. Nishikawa, T. Kanayama, F. Dakeyama, K. Saito, M. Imagawa, S. Takatori, Y. Kitagawa, S. Hori, H. Utsumi	Estrogenic Activities of 517 Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay.	J. Health Sci.	46(4)	282-298	2000
川越保徳、福永 勲、西川淳一、西原 力	酵母 Two-Hybrid システムによるエストロゲン様活性測定法の簡便化に関する検討.	環境化学	10(1)	65-72	2000
白石不二雄、白石 寛明、西川淳一、	酵母 Two-Hybrid システムによる簡便なエストロゲンアッセイ系の開発	環境化学	10(1)	57-64	2000

西原 力、森田昌敏					
西原 力	内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)の影響はどこまでわかっているか—スクリーニング試験—	公衆衛生	63	681-686	1999
Jun-ichi Nishikawa and Tsutomu Nishihara	Hormone Disrupters.	BIA journal	6	19-21	1999
西原 力	内分泌攪乱化学物質のスクリーニング試験	防菌防黴	27(6)	393-402	1999
西原 力	環境ホルモン問題「環境ホルモンのバイオアッセイを用いた検出方法」	安全工学	38(2)	85-89	1999
Fumi Dakeyama, Jun-ichi Nishikawa, Jun Goto, Koichi Saito, Masayoshi Imagawa, and Tsutomu Nishihara	Screening methods for endocrine desruptors based on the mechanism of transcriptional regulation by nuclear hormone receptor	Journal of Health Science	45	38	1999
Jun-ichi Nishikawa, Koichi Saito, Jun Goto, Fumi Dakeyama, Masatoshi Matuo, and Tsutomu Nishihara	New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator	Toxicology and Applied Pharmacology.	154	76-83	1999
Keiko Morito, Toshiharau Hirose, Junei Kinjo, Tomoki Hirakawa, Masafumi Okawa, Toshihiro Nohara, Sumito Ogawa, Satoshi Inoue, Masami Muramatsu, and Yukito Masamune	Interaction of Phytoestrogens with estrogen receptors $\alpha$ and $\beta$	Toxicology			In press
S. Ozawa et al	Metabolic activation of o-phenylphenol to a major cytotoxic metabolite, phenylhydroquinone: role of human CYP1A2 and rat CYP2C11/CYP2E1	Xenobiotica	30 (10)	1005-1017	2000
小澤正吾、清水万紀子、松本宜明、福岡正道、加藤貴彦、大野泰雄	ヒト組織フェノール硫酸転移酵素の遺伝的多型性	日本薬物動態学会	15(2)	171-176	2000
M.Nakajima, H. Takahashi M. Sasaki, Y. Kobayashi, T., Awano D. Irie, K. Sakemi Y. Ohno M. Usami	Developmental toxicity of indium chloride by intravenous or oral administration in rats.	Teratogenesis, Carcinogenesis, Mutagenesis.	18	231-238	1998
Ozawa S, Shimizu M, Katoh T, Miajima A, Ohno Y, et al	Sulfating-activity and stability of cDNA-expressed allozymes of human phenol sulfotransferase, ST1A3*1( <sup>213</sup> Arg) and ST1A3*2( <sup>213</sup> His), both of which exist in Japanese as well as caucasians.	J. Biochem.	126	271-277	1999
Nakagomi, M., and Suzuki, E	Quantitation of catechol estrogens and their N-acetylcysteine conjugates in urine of rats and hamsters.	Chem. Res. Toxicol.	13	1208-1213	2000
Emako Suzuki, Junji Abe, Seiji Krasawa	Enzymic and chemical O-methylation of a 4-hydroxyestrone N-acetylcysteine	Steroids	63	672-677	1998