

・ES細胞培養系における内分泌かく乱化学物質の影響 (高木)

ES細胞をゼラチンコート Dish 上で培養後、LIFを除いたES培地上で浮遊培養し、エタノールに溶解したDESを最終濃度1nMで添加した。DES添加、4日後の浮遊培養により形成された胚様体および、4日培養胚様体にDES添加24時間後における遺伝子レベルの変化をAffymetrix社のGeneChipを用いて検索をした。

・子宮肥大試験およびHershberger試験における遺伝子発現変化に関する研究

-未成熟ラットを用いたER α 、ER β 、AR遺伝子発現の変化の解析- (永井)

子宮肥大試験における標的臓器での遺伝子発現変化に関する基礎的知見を得るため、ethynylestradiol (EE) 0.003mg/kg/dayをCrj:CD(SD)IGS系の幼若雌性ラットに単回強制経口投与し、経時的にCO₂麻酔下で解剖して、子宮の重量を測定後、全例の子宮全RNAを抽出し、ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systemを用いたReal-Time RT-PCR法により測定し、性ステロイドホルモンレセプター遺伝子(ER α 、PR、AR)およびエストロゲン応答遺伝子(complement C3)の相対的発現量を比較した。

・国内外の子宮肥大試験に関するデータ整理とその問題点の把握及び解決法の検討 (永井)

国内外の子宮肥大試験に関するデータ整理とその問題点の把握および解決法の検討では、過去に実施された試験データは、OECDバリデーション試験のプロトコールに十分反映されていると考えられる。ラットに関してはOECDプロトコールに従って実施されバリデーション試験データ、マウスに関してはOECDバリデーション試験以降に実施された試験データを収集し、評価した。

・卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験における遺伝子発現変化に関する研究 (松島)

7週齢の雌C57BL/6Nマウス(日本チャールスリバー)に卵巣摘出手術を行い、術後2週間目にE₂(溶媒corn oil)を0.1、1.0および10 μ g/kg単回皮下投与した。投与後、経時的に頸椎脱臼により屠殺し、速やかに子宮を取り出し重量を測定して、4°CのRNAlater中で保存した。採取した子宮をホモジナイズした後、RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いて全RNAを分離・精製し、Affymetrix社のプロトコールに従い、全RNAからcDNAを調製した。得られたcDNAをもとにT7 RNAポリメラーゼを用いてビオチン化CTPを取り込んで、ビオチンラベルされたcRNAを合成した。次いで、GeneChip(MGU74Av2)を用いてハイブリダイゼーションを行い、シリコンジェネティクス社のGeneSpringを用いて遺伝子解析をした。

・内分泌かく乱化学物質の胎生期暴露による包皮分離試験に関する研究 (吉村)

11週齢で購入した雌雄ラットを交配し(交尾確認日を0日とした)、コーン油に溶解したフルタミド(FUL)、DDE、DESを妊娠14~17日まで、あるいは妊娠18~21日まで4日間投与した。FLUおよびDDEは強制経口投与し、DESは皮下投与した。出生日を0日とし、生後6日に出生児のAGDを測定した後、各腹より4匹の雄出生児を残して、生後35~55日まで包皮分離時期を観察し、生後56日に麻酔下放血屠殺して解剖して、精巣、精巣上体、前立腺および精嚢の重量を測定した。精巣及び精巣上体はブアン液で固定し、肝臓、腎臓、前立腺、精嚢、陰茎および包皮はリン酸緩衝ホルマリン液で固定した後、病理組織学的に観察した。

・内分泌かく乱化学物質の新生児期暴露による包皮分離試験に関する研究 (吉村)

11週齢で購入した雌雄ラットを交配し(交尾確認日を0日とした)、コーン油に溶解したフルタミド(FUL)、DDE、DESを生後1日あるいは7~21日まで5日間投与した。また、28日齢で購入した雄ラットに生後35

～39日(あるいは34～38日)の5日間投与した。生後1～5日暴露試験では、生後1日に各腹雄6匹を残し、生後6日に各腹4匹とした。生後17～21日暴露試験では生後6日に各腹雄4匹を残した。生後35～55日までの包皮分離時期を観察した後、生後56日あるいは57日に麻酔下で放血屠殺して、解剖後、精巣、精巣上体、前立腺、および精嚢の重量を測定した。精巣および精巣上体はブアン液で固定し、肝臓、腎臓、前立腺、精嚢、陰茎および包皮はリン酸緩衝ホルマリン液で固定した後、病理組織学的に観察した。

・28日間試験の改良 - α_{2u} グロブリンの評価の利用について-(武吉)

DESを0.01～1 mg/kgの用量で7日間反復経口投与し、肝臓における遺伝子発現をDNA microarrayで検討すると共にELISA法にて血清AUGの変動を同時に検討した。

・国内外のHershberger試験に関するデータ生理とその問題点の把握及び解決法の検討(山崎)

日本の7試験機関において、OECD第2期バリデーション試験として実施したHershberger試験の結果および文献の検索の結果を基に、現状でのHershberger試験の問題点を抽出した。

(3) (OECD対応等試験開発部門)

・臓器特異的ハイスループット検出系開発のための網羅的な遺伝子発現解析(高木)

卵巣摘出術後2週間経過したマウスに、コーン油に溶解したE₂を、体重1kg当たり1 μ gを単回皮下投与した。投与4時間後に子宮、肝臓、腎臓、脳視床下部領域および海馬を採取した。また、E₂0.1、1、10 μ g/kgを単回皮下投与したマウスから、投与1、2、4、8、12、24時間後に上記の各臓器を採取した。マウス組織を分離後、ISOGENを用いて全RNAを抽出・精製し、Affymetrix社のプロトコールに従い、全RNAをもとにcDNAを調製し、T7 RNAポリメラーゼを用いてビオチン化cRNAを合成した。次いで、GeneChip(MGU74Av2)を用いてハイブリダイゼーションを行い、シリコンジェネティクス社のGeneSpringを用いて遺伝子解析を行った。

・子宮肥大およびHershberger試験(小野)

子宮肥大試験については、幼若マウスおよび卵巣摘出マウスを用いてEE、2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (THPP)およびn-heptyl-4-hydroxybenzoate(HHB)を投与し、OECD「マウスを用いた子宮肥大試験法」ガイドラインの問題点を検証した。Hershberger試験に関しては、第2期バリデーション試験の一環として、精巣摘出ラットを用いて弱い抗アンドロゲン作用物質のp,p'-DDEおよびピンクロゾリン、さらには弱い抗アンドロゲン作用物質のメチルテストステロンを投与して、OECDが提唱した「Hershberger試験法」に関するプロトコールを検証した。

・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(広瀬)

雌雄各群5匹のSD:IGSラットにEEを0.01、0.1、1.0 ppmの用量で28日間混餌投与した。雄は28日目に屠殺し、雌は投与22日目から性周期を観察した。次に、28日目から発情休止期を示す日に屠殺・剖検した。次いで、RNAlaterに保存した肝組織から全RNAを抽出し、各群3匹につきCLONTECH Atlas Glass Rat 3.8 Arraysによる解析を行った。

・内分泌かく乱化学物質検出試験の技術移転普及に関する研究(菅野)

ラットおよびマウスを実際に飼育し、以下に示す検査項目についてビデオ撮りを実施した。撮影対象検査項目：肛門生殖突起間距離(AGD)、陰開口、精巣下降、包皮分離、精子検査、性周期観察、排卵検査、身体発達(乳頭など)。

・OECD/WHO関連総括(井上)

国立研究所の安全性生物試験研究センター長として、国内の技術的な基盤を整える立場から、経済協力機構(OECD)、世界保健機構(WHO)、米国環境防護庁関係機関(EPA・ED-STAC)等の協調研究の受け皿となるような国内体制を整えることも重要であることから、国内外の会議および学会等への参加等による専門家との意見交換および情報収集をおこない、その成果を本研究班に反映する事に努めている。

(4) 〈確定試験等開発研究〉

・内分泌かく乱化学物質の性腺構築過程に及ぼす影響に関する研究 -経世代試験の改良- (長尾)

ICR マウスの妊娠 10~13 日 (膣栓発見日=妊娠 0 日と規定) に、DES をコーン油に懸濁して、100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を連日背部皮下に注射したのち、帝王切開にて胎齢 14 および 17 日の胎児を摘出し、生殖巣あるいは精巣をパラホルムアルデヒド・グルタルアルデヒド混合固定液あるいは 0.1M 燐酸緩衝 10%ホルマリン液に固定した。更に、一部の DES 暴露した妊娠マウスは、妊娠 18 日に帝王切開して胎児を摘出し、胎児は無処置マウスに哺育させ(養母哺育)、生後 9 および 14 日にエーテル麻酔して屠殺した。実体顕微鏡下で開腹して精巣を摘出し、0.1M 燐酸緩衝 10%ホルマリン液に固定し、胎児生殖巣および新生児精巣は、常法に従いパラフィン包埋し、TUNEL 法に準じて TUNEL 陽性細胞の有無を観察した。

・内分泌かく乱化学物質のラット神経核構築過程に及ぼす影響に関する研究 (長尾)

Sprague-Dawley 系ラットの雌雄を交配して雌ラットを自然分娩させ新生児を得た。新生児に生後 1~5 日 (出生日=生後 0 日と規定) 連続して、DES 0、1、10、50 あるいは 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重を背部に皮下注射した。最終投与 24 時間後に、各腹の雄出生児の半数を屠殺して脳を摘出し、視床を含む部位を 0.1M 燐酸緩衝 10%ホルマリン液で固定した。これらの固定標本についてはパラフィン包埋後に切片を作成し、TUNEL 法に準拠してアポトーシス細胞を観察し、更に、Bcl2 について免疫染色をした。残りの雄出生児も同様に屠殺して脳を摘出し、視床を含む部位を液体窒素にて凍結して Hsp ウェスタンブロッティングによる検討を実施した。さらに、生後 1~5 日に連続して DES の 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重を背部に皮下注射し、生後 10 週目に断頭にて屠殺して脳を摘出し、氷上にて大脳皮質前頭部、線条体、海馬、中脳および視床下部に分離してドパミン(DA)、セロトニン(5-HT) およびそれらの代謝物(DOPAC、HVA、5-HIAA)を HPLC-ECD を用いて測定した。

・マウス胎児期子宮内位置と生後の発育・分化との関連に関する研究 (長尾)

ICR 雌マウスの交配前 4 週間、交配期間を通じて交尾確認後 (膣栓発見日=妊娠 0 日)、妊娠 17 日まで、コーン油あるいは E_2 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を連日皮下投与した。飼料として CE-2 あるいは植物性エストロジェンを除外して調製した PLD を自由に摂取させた。いずれの雌も妊娠 18 日に帝王切開して胎児を摘出した。その際、肛門突起生殖間距離 (AGD) および体重を測定し、生存胎児は子宮内での着床位置が雄に挟まれた雄、雌に挟まれた雄、雌に挟まれた雌、雄に挟まれた雌の各タイプに該当するもののみを、無処置のマウスに養母哺育させた。性成熟の指標として雄では生後 30 日から包皮分離の時期、雌では生後 25 日から膣開口の時期を調べ、雌雄とも完成日に体重を測定した。さらに雌については膣開口日から性周期を観察し、生後 10 週に剖検して生殖器官の重量を測定した。これらの器官および前立腺は 0.1M 燐酸緩衝 10%ホルマリン液に固定して組織観察を行った。さらに、妊娠 21 日に帝王切開にて摘出した Sprague-Dawley ラットの胎児を養母保育し、同

様に胎児期子宮内位置と生後の発育・分化との関連を調べた。

・ **トランスジェニックラットを用いた内分泌かく乱化学物質の検討** (白井)

浸潤癌がまだ高頻度にみられない 15 週時点および浸潤癌がほぼ全例に観察される 35 週時点からアンドロジェン枯渇処置 (外科的去勢、エストロジェン皮下埋植) を行い、50 週齢で屠殺解剖した。また 10 週齢の Tg ラットに作用機構が異なる 2 種類の抗アンドロジェン剤 (finasteride 及び flutamide) を 7 週間投与後、屠殺剖検し、前立腺癌の発生がどのように変化するかを病理組織学的に検討した。併せて血中のテストステロン濃度も測定した。

・ **内分泌かく乱化学物質の甲状腺発がん修飾作用を検出する鋭敏なモデルの開発に関する研究** (広瀬)

F344 妊娠雌ラット 15 匹を 3 群に分け、出産直後より EE を 0、0.2 及び 1.0ppm 濃度で餌に混じて投与した。生後 3 週で児動物を離乳すると同時に、児動物にも同様に 3 週間にわたり EE を混餌投与した。その後、生後 6 週より *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) を 0.2%濃度で 8 週間飲水に混じ、更に、生後 7 週時に 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA)を 50mg/kg 体重の用量で強制経口投与した。発がん物質処置終了後は、毎週 1 回、胸・腹部の触診を行い、触知可能な腫瘍の発生の有無を観察するとともに、腫瘍が触知された際にはその発生部位及び大きさを記録した。雄群については、イニシエーション終了後 13 週で屠殺し、甲状腺、肝臓、腎臓、肺、乳腺および食道を中心に病理組織標本を作製した。雌については、発がん物質処置終了後 17 週目 (2003 年 2 月 5 日現在)であり、実験を継続している。

・ **内分泌かく乱化学物質の乳腺発がんおよび影響の検討** (長村)

7 週齢の雌 Sprague-Dawley 系ラットに DMBA を 20mg/animal/week で合計 3 回投与した。その後、通常飼育を行い、乳腺腫瘍が発生した個体について解剖し、病理組織標本を作製して組織学的検査を行った。また、エストロジェンレセプター (ER α , ER β)および細胞増殖マーカーである Ki-67 抗原(MIB-5)について免疫組織化学的検索を行った。なお、比較対照として、同系ラットを無処置で 1~2 年飼育し発生した乳腺腫瘍を材料として用いた。さらに、DMBA による前処置を行ったラットに卵巣摘出を実施して、低濃度および高濃度の E₂ を反復投与し、発生する乳腺腫瘍への影響を検索する実験を開始した。

・ **内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生仔期暴露が雌性生殖器に与える影響に関する研究** (吉田)

以下の 1~3 の実験において子宮がん好発系の Crj:Donryu ラットを用いた。

1. 新生児期の曝露期間の長さが雌性生殖器に及ぼす影響。

生後 24 時間以内の雌新生児ラットの背部に OP 100mg/kg を 5 日齢(PNDs1~5 群)または 15 日齢 (PNDs1~15 群)まで隔日に皮下投与した。性成熟前の雌性生殖器系の発育・分化に対する OP の影響を観察するために経時的に動物を剖検し、性腺刺激ホルモン(卵胞刺激ホルモン FSH、黄体形成ホルモン LH)、子宮腺の形成、子宮のエストロジェンレセプターの発現、子宮重量、膣開口などの内分泌学および形態学的検索を行った。性周期は膣開口後、全実験期間にわたって観察した。子宮発がんへの修飾作用を検討するために、PNDs1~5 および PNDs1~15 群ともに 11 週齢にて *N*-ethyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG)を子宮腔内に投与して 15 ヶ月齢まで観察し、子宮の増殖性病変について形態学的に検索した。なお、参考のために生後 4 日齢の Sprague-Dawley 系ラット新生児に 0、15、50、150mg/kg の OP を 18 日間反復経口投与して毒性学的な評価を行った。

2. 新生児期曝露が卵巣に及ぼす影響

1.と同様の処置を行ったラットを用いて、卵巣交換実験では、初回排卵前の30日齢ラットの両側卵巣を摘出し、同群および異なる群の卵巣摘出動物の頸背部皮下に移植した。移植後、13週齢まで性周期を経時的に観察し各群の非移植動物と比較した。また、14週齢では正常性周期(発情期の午前中)および持続発情を示す動物の一部について、排卵数、卵巣の重量および卵胞数・黄体数など卵巣の形態について検索した。生後12週齢では、対照群と正常性周期を示すPNDs1~5群の一部の動物を用いて無処置雄ラットと交配させ、着床数、子宮重量、胎児数、胎児体重を観察した。

3. 低用量曝露が雌性生殖器に及ぼす影響

食用缶中に溶出する可能性のある投与量を基に換算した用量である0.006mg/kgを含む低用量のBPA(0、0.006および6mg/kg)を妊娠2日目から離乳前日まで母ラットに強制経口投与して、児ラットを対象に、OPの新生児期大量曝露実験で観察された各項目を指標として用いて性成熟までの発育・分化および長期に亘る性周期について検索した。ENNG誘発子宮^{乳がん}への修飾作用についても15ヶ月齢まで観察し、子宮の増殖性病変について形態学的に検索した。また、母動物から児への移行は検索するために、母ラットの血清、母乳および児ラットの血清および肝臓中のBPA濃度を測定した。さらに環境中BPAとして流水中、給水タンク内飲料水および餌中のBPA濃度も測定した。

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、各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、特に国立衛研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複数名含んでおり、実験における倫理面での配慮に明るい。

C. 研究結果

(1) 〈プレスクリーニング系追加開発〉

・酵母 Two-Hybrid 試験の改良とバリデーション—特に複合効果の検討

試験した103物質中スチレンダイマー、スチレントリマー、スチルベン、ベンゾフェノン、ジフェニール類など20物質が、S9Mix処理により代謝活性化され、エストロゲン様活性を示した。陽性代謝物のひとつはそれぞれの4-水酸化体であり、CYPにより変換されることが明らかにされた。酵母 Two-Hybrid 試験(ER-TIF2系)により、アゴニスト活性陰性と評価されたED容疑物質についてE2共存下にエストロゲン活性を測定したところ、6物質が陽性で、いずれもERに対する結合性を有し、培養細胞レポーター遺伝子試験やMGF-7細胞増殖促進試験でもアンタゴニスト活性を示した。ED容疑物質約60種類についてPXR-SRC1系の酵母 Two-Hybrid 試験を実施したところ、7物質が陽性を示し、さらにラット肝臓においてPXRの標的遺伝子であるCYP、MDR1、OATP2のmRNAレベルを増加させた。

・マイクロアレイ法の基盤技術調査

GeneChipに配置された遺伝子プローブは、発現比の大きい遺伝子に関してはその発現量に相関したシグナルを与えることが確認され、網羅的遺伝子発現パターンが異なる臓器由来のRNAを混

合して用いることで、多数の遺伝子に関する検量線を作製できることが分かった。この事実を応用すると、遺伝子プローブの配列変更等を伴うチップの version up が行われても検量線同士を比較することでデータの変換が可能になると考えられる。

(2) (スクリーニング試験系確立研究)

・ES 細胞培養系における内分泌かく乱化学物質の影響

Affymetrix 社の gene chip を用いての解析結果、DES 添加 4 日後で遺伝子発現の増加が 2 倍以上であるものは 10 遺伝子、0.5 倍以下に減少したのは 19 遺伝子、DES 添加 24 時間後で 2 倍以上増加したのは 37 遺伝子、0.5 倍以下に減少したのは 12 遺伝子結果で、最高に増加したのもでも約 3 倍であった。一方、エストロゲン様物質による EB に対する作用を形態学的に検出することを目指し、種々の培養条件を検討した結果、抗エストロゲン薬の ICI182,780 を 4 日培養 EB に 1 μ M の濃度で添加し、5 日間培養したところ、対照と比較して大きさの減少傾向が認められた。

・子宮肥大試験および Hershberger 試験における遺伝子発現変化に関する研究

-未成熟ラットを用いた ER α 、ER β 、AR 遺伝子発現の変化の解析-

EE 0.003 mg/kg 群の子宮重量では、投与後 24 時間をピークとして、投与後 6~48 時間の間で統計学的に有意な増加が認められ、投与後 24 時間の子宮重量は、溶媒群の約 2 倍であった。また、EE 0.003 mg/kg 群では、投与後 24 時間の子宮で complement C3 mRNA 発現量の著しい増加が認められた。

・国内外の子宮肥大試験に子宮肥大試験に関するデータ整理とその問題点の把握及び解決法の検討

国内外の子宮肥大試験に関するデータ整理とその問題点の把握および解決法の検討では、国内外の約 20 の機関が参加して実施した OECD バリデーション 試験の結果、いずれのプロトコールを用いても全ての試験機関で EE の子宮重量増加作用を確認でき、対照群と比較して有意に子宮重量が増加する EE の用量にも試験機関の間に大きな差は認められなかったが、EE の検出感度は投与経路が皮下の方が経口よりも約 3 倍高い結果であった。また、弱いエストロゲン活性を示す物質の検出も可能であることが確認できた。なお、今回調査した範囲内では、試験に用いるラットの系統、餌、飼育条件の試験結果への影響は認められなかった。マウスを用いた試験とラットを用いた試験とを比較すると、マウスを用いた場合若干感度が低いようである。

・卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験における遺伝子発現変化に関する研究

子宮重量は、E₂ 1.0 μ g/kg 以上の群で、投与後 8 時間目より用量に依存して重量増加がみられ、24 時間後にはもっとも高い値を示した。

網羅的な遺伝子発現の解析は、E₂ 0.1 μ g/kg 群、1.0 μ g/kg 群、10 μ g/kg 群では、148、3766、4024 遺伝子の発現がみられ、更にその半分が EST (Expressed Sequence Tag) であった。発現遺伝子の機能を大きく分類すると 1.0 μ g/kg 群で DNA binding、DNA binding transcription factor、Cell cycle 関連の遺伝子が 12 時間でプラトーに達したが、Enzyme、Ligand 関連の遺伝子は増加し続けた。10 μ g/kg 群ではこれら全ての遺伝子が 24 時間まで増加し続けた。P53 を含めた Apoptosis に関連する遺伝子発現の増減は、数遺伝子のみであった。

・内分泌かく乱化学物質の胎生期暴露による包皮分離試験に関する研究

FLU 暴露群では、胎齢 18~21 日暴露 10mg/kg 群では生殖器の発育不全に伴う排尿障害のための出生児 5 例が死亡した。AGD 体重補正值($\text{mm}^3/\sqrt{\text{g}}$)は、胎齢 14~17 日暴露で 0.3mg/kg 以上の群、胎齢 18~21 日暴露では 10mg/kg 群で有意な短縮がみられた。10mg/kg 以上の群では胎齢 14~17 および 18~21 日のいずれの暴露でも尿道下裂がみられ、これらの例では包皮分離の判定が不可能であった。包皮分離は、FLU10mg/kg 群ではいずれの暴露時期でも有意に遅延したが、1mg/kg 以下の群では分離完了時期の遅延はみられなかった。

DDE 暴露群では、300mg/kg を投与した妊娠雌が死亡したため、300mg/kg 群では出生児の観察が不可能であった。また、妊娠 18~21 日投与 100mg/kg 群では 4 腹中 3 腹の出生児が全例死亡した。胎齢 14~17 および 18~21 日暴露の 10、30 および 100mg/kg 群のいずれも AGD 体重補正值($\text{mm}^3/\sqrt{\text{g}}$)の有意な差はなく、また、尿道下裂も認められなかった。包皮分離時期に有意な差はみられなかった。

DES 暴露群では、胎齢 14~17 日暴露 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では胎児に死亡例が認められ、観察は不可能であったため、1 および 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で検査を実施した。胎齢 14~17 日暴露では AGD 体重補正值($\text{mm}^3/\sqrt{\text{g}}$)が増加する傾向がみられ、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で有意差がみられた。一方、胎齢 18~21 日暴露では 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の全ての群で AGD 体重補正值が有意に短縮したが、尿道下裂は認められなかった。包皮分離の観察の結果、胎齢 14~17 日暴露では包皮分離時期に差はみられなかったが、胎齢 18~21 日暴露では 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で有意に遅延した。

・内分泌かく乱化学物質の新生仔期暴露による包皮分離試験に関する研究

FLU 暴露群では、生後 1~5 日暴露試験および生後 17~21 日暴露試験では、10mg/kg 投与群においても包皮分離完了時期の有意な遅延はみられなかったが、生後 35~39 日暴露では 10mg/kg 投与群で有意な遅延が認められた。

DDE 暴露群では、300mg/kg 生後 17~21 日暴露、生後 35~39 日暴露ともに新生児が死亡したが、300 mg/kg 生後 1~5 日暴露では死亡例はみられなかった。包皮分離時期は、生後 17~21 日暴露では 300 mg/kg 群、生後 35~39 日暴露試験では 100mg/kg 投与群で有意に遅延し、300mg/kg 群の生存例 2 例も遅延がみられた。

DES 暴露群では、いずれの暴露時期でも死亡例はなかったが、包皮分離完了時期は生後 1~5 日暴露では用量依存性に遅延し、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 20 例中 2 例は 57 日齢の解剖時も分離が完了せず、生後 17~21 および 34~38 日暴露では 10 および 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で軽度に遅延した。

・28 日間試験の改良 - $\alpha_{2\mu}$ グロブリンの評価の利用について-

0.1g/kg×7 day 以上の DES 投与によって、投与 1 日後の血清 AUG レベルの上昇と 3~7 日後にかけての血清 AUG レベルの減少が観察された。これらの動物の肝臓について、網羅的に遺伝子の変動を観察した結果、DES の投与の用量及び血清 AUG と連動した一連の遺伝子群が抽出され、その一部は血清 AUG の変動との関連性を有することが示唆された。

・国内外の Hershberger 試験に関するデータ整理とその問題点の把握及び解決法の検討

OECD 第 2 期バリデーション試験を実施した結果、問題点として以下のことがあげられた。

- 1) Androgen agonist である methyltestosterone では各試験機関、各測定器官でのばらつき軽度であったが、antagonist である vinclozolin、*p,p'*-DDE、特に *p,p'*-DDE で顕著であった。
- 2) Androgen の作用を有する methyltestosterone、vinclozolin、*p,p'*-DDE のいずれの物質においても、

さらにはいずれの器官においても高用量群で作用が検出できた。

(3) (OECD 対応等試験開発部門)

・臓器特異的ハイスループット検出系開発のための網羅的な遺伝子発現解析

E₂投与後ごく初期に変動する遺伝子として、子宮では大きく変動する遺伝子が少ないことに加え、肝臓で発現が低下する遺伝子群、海馬で発現が上昇する遺伝子群が存在することが分かった。更に、視床下部、腎臓においても E₂濃度依存的に発現変動する遺伝子群が捉えられたが、それらの遺伝子群は各臓器で異なるものが多く、E₂の各臓器に対する特徴的な作用を担う遺伝子である可能性が考えられた。

・子宮肥大および Hershberger 試験

幼若マウスを用いた子宮肥大試験では、EE 投与群の子宮重量 (blotted weight) は、経口投与で 30 µg/kg/day 以上、皮下投与で 1µg/kg/day 以上の投与群において有意に増加し、卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験では、経口投与で 10µg/kg/day 以上、皮下投与で 0.3µg/kg/day 以上の投与群において有意に増加した。また、幼若マウスでは膣の開口が、経口投与では 30µg/kg/day 以上で、皮下投与では 1µg/kg/day 以上の動物で観察された。

p,p'-DDE およびピンクロゾリンの Hershberger 試験では、いずれの器官とも用量に依存して低下し、それぞれ抗アンドロジェン作用が確認された。各器官におけるアンタゴニストとしての最小有効量は、p,p'-DDE で前立腺、精嚢ならびに肛門挙筋・球海綿体筋では 30mg/kg/day、亀頭および尿道球腺では 100mg/kg/day、ピンクロゾリンで球尿道球腺では 100mg/kg/day、精嚢、肛門挙筋・球海綿体筋および亀頭では 30mg/kg/day、前立腺では 100mg/kg/day であった。メチルテストステロンの Hershberger 試験においては、すべて器官重量が用量に依存して増加し、アンドロジェン作用が確認され、各器官重量における最小有効量は前立腺で 5mg/kg/day、精嚢、肛門挙筋・球海綿体筋、亀頭および尿道球腺で 50mg/kg/day であった。

THBP は、マウス子宮肥大試験でエストロジェン作用がおよび抗エストロジェン作用が確認されたが、HHB はマウス子宮肥大試験では影響は認められなかった。

・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

EE を 28 日間混餌投与した結果、性周期回帰検索では 1.0ppm 群の雌で 5 例中 3 匹に発情期の延長が認められ、雄の 1.0 ppm 群で乳腺腺管の過形成、雌の 1.0ppm 群で子宮内膜上皮の高円柱上皮化等が認められた。EE 投与により、2 倍以上ないし 0.2 倍以下の発現の増減を示す遺伝子とも雌で多く認められ、用量依存性の反応を示す遺伝子のうち発現が上昇した遺伝子は雄で 3 個、雌で 24、発現が低下した遺伝子は雄で 0 個、雌で 3 個得られた。一方、非依存的な発現変動を示す遺伝子の多くは、相対発現量が低いものや、低用量 (0.01 ppm)での反応性が個体間でばらつくものが多い傾向にあった。

・内分泌かく乱化学物質検出試験の技術移転普及に関する研究

内分泌かく乱化学物質検出試験の技術移転普及のために、AGD の測定、陰茎包皮分離および膣開口の確認法、精子検査についてビデオ撮影を行った。今回撮影した検査方法のほかに、性周期の観察方法、乳頭などの身体発達検査法、さらには性行動の観察などが内分泌かく乱のエンドポイントとしてビデオ撮影の対象になると思われた。

・ OECD/WHO 関連総括

国立研究所の安全性生物試験研究センター長として、国内の技術的な基盤を整える立場から、経済協力機構(OECD)、世界保健機構(WHO)、米国環境防護庁関係機関(EPA・ED-STAC)等の国際協調研究の受け皿となるような国内体制を整えることも重要である。本年度は、毒性学方面における基盤と応用にかかる幅広い研究を集積する学会である米国トキシコロジー学会へ参加し、内分泌かく乱性試験に関する情報収集と専門家との意見交換を行い、研究課題の今後の進展および職務の反映への参考とした。(井上)

(4) 〈確定試験等開発研究〉

・ 内分泌かく乱化学物質の性腺構築過程に及ぼす影響に関する研究 - 経世代試験の改良

胎齢 14 日 (最終暴露の 24 時間後) の生殖巣の光顕観察の結果、DES 暴露群の間質細胞の細胞質に多数の脂肪滴、グリコーゲンの蓄積が確認されたが、生殖索には、DES 暴露による傷害を示唆する変化は、観察されなかった。胎児生殖巣に TUNEL 陽性細胞の増加は観察されなかったが、生後 9 および 14 日の新生児の精巣に顕著な TUNEL 陽性細胞の増加が観察された。一方、各種エストロゲン様物質の暴露により程度の差はあるが、生殖索では生殖細胞の細胞質の部分的な脱落、細胞質全体の淡明化、生殖細胞の萎縮および間質細胞の軽度過形成などが観察された。

・ 内分泌かく乱化学物質のラット神経核構築過程に及ぼす影響に関する研究

DES 暴露群の雄新生児の SDN-POA 部位に TUNEL 陽性細胞の増加が認められたが、雌新生児では逆にアポトーシスは抑制しており、Bcl2 の発現は観察されなかった。また、DES 投与群(10 μ g/kg)では Hsp 90 が多く産生されることが示唆され、大脳皮質前頭部の DA 濃度が有意に減少し、DOPAC 濃度も減少傾向を示した。しかし、線条体、海馬および中脳のモノアミン濃度には DES 投与の影響は認められなかった。

・ マウス胎児期子宮内位置と生後の発育・分化との関連に関する研究

マウス、ラットともに、胎児期子宮内位置による AGD、膈開口および包皮分離の時期などの生後の発育・分化の差は認められなかった。

・ トランスジェニックラットを用いた内分泌かく乱化学物質の検討

いずれのアンドロゲン枯渇処置群においても処置開始時期および処置期間に関わらず癌病巣の高度な退縮が認められ、また抗アンドロゲン剤投与群においても、Tg ラットの前立腺癌発生が部分的ではあるが、有意に抑制された。特に 5 α -reductase の阻害剤である finasteride では用量相関をもって前立腺癌の発生が抑制された。

・ 内分泌かく乱化学物質の甲状腺発がん修飾作用を検出する鋭敏なモデルの開発に関する研究

雄では処置終了後 13 週時の死亡/切迫屠殺率が EE 0、0.2、1.0ppm の各群で 33、45、44%に達したため、全例を屠殺した。肉眼所見では、甲状腺の結節が EE の 0、0.2 及び 1.0ppm で各々 9/12(75)、13/20 (65)及び 8/15 例 (53%)にみられた。雌の発がん物質処置終了後、16 週までの触知可能な腫瘍の発生頻度は、EE 0、0.2、1.0ppm の各群で 3/18 (17)、9/19 (47)、12/19 (63%) であり、EE 投与により発生頻度および個数が増加する傾向がみられた。

・ 内分泌かく乱化学物質の乳腺発がんおよび影響の検討

DMBA 誘発乳腺腫瘍では、自然発生乳腺腫瘍と同様に腺管癌の組織形態像を示し、自然発生腫

瘍と比較して異型性の強い腫瘍細胞から構成されていたが、細胞の大きさは自然発生乳腺腫瘍と比較して小型であった。ER α は、今回用いた自然発生乳腺腫瘍では腫瘍細胞に明らかな陽性像が認められたが、DMBA 誘発乳腺腫瘍ではほとんどの腫瘍細胞で陰性であり、ER β は、自然発生乳腺腫瘍、DMBA 誘発乳腺腫瘍ともに弱陽性を示した。Ki-67 抗原は、DMBA 誘発乳腺腫瘍よりも自然発生腫瘍の方が高頻度に陽性となった。

・内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生仔期暴露が雌性生殖器に与える影響に関する研究

1. 新生児期の曝露期間の長さが雌性生殖器に及ぼす影響

PNDs1~15 群では、性腺刺激ホルモン測定の下値、子宮腺の形成抑制、免疫組織化学染色による子宮被覆、腺上皮および間質のエストロジェンレセプター発現および細胞増殖活性の異常あるいは膣開口の早期化などが観察されたが、PNDs1~5 群ではいずれの項目も対照群と同様で異常は認められなかった。さらに、PNDs1~15 群では膣開口後全例が速やかに持続発情となったが、PNDs1~5 群では大多数の動物が膣開口後正常な性周期を示したにもかかわらず、同群では対照群より早期に持続発情となり、5ヶ月齢では対照群より6ヶ月間早く全例が持続発情となった。PNDs1~15 群では、子宮がんの発生頻度は対照群と同程度であったが、中・低分化型あるいは遠隔転移等の悪性型が有意に増加した。一方 PNDs1-5 群では対照群と同程度の子宮内に留まる分化型の内膜腺癌が有意に増加した。なお、4日齢のSDラットにOPを連続投与した結果、150mg/kg 投与群に肝細胞の空胞化、腎細尿管障害が見られその一部が死亡したほか、成熟卵胞の減少子宮内膜上皮の空胞化、乳腺腺管上皮の増生が認められた。

2. 新生児期曝露が卵巣に及ぼす影響

対照群同士あるいは対照群に PNDs1~5 群および1~15 群の卵巣交換個体では、8週齢以降大部分が正常性周期を示したが、PNDs1~5 群の個体に対照群あるいは PNDs1~5 群の卵巣を移植した群では生後8週齢以降大部分が正常性周期で、非移植群と同様、漸次持続発情が増加した。PNDs1~15 群に対照群および PNDs1~15 群の卵巣を移植した個体では非移植群と同様、いずれも9週齢までに全例が持続発情を示した。さらに、PNDs1~5 群では卵胞数・黄体数とも同様であったが、PNDs1~5 群の持続発情および PNDs1~15 群では嚢胞状の閉鎖卵胞が認められ、黄体数が顕著に減少または全く認められなかった。

3. 低用量曝露が雌性生殖器に及ぼす影響

0.006 および 6mg/kgBPA 群では、性成熟前の観察項目である子宮の発育・分化および性腺刺激ホルモン、膣開口において異常は認められず、15ヶ月齢まで実施した性周期観察にも対照群との間に有意差は認められなかった。また、子宮がんの発生にも BPA 投与による影響は観察されなかった。6mg/kgBPA 群の母ラットでは BPA の血清値が有意に増加したが、いずれの群も母乳および児の血清および肝臓中 BPA 値に差は認められなかった。なお、餌および給水タンク内の水から BPA が検出された。

D. 考察

プレスクリーニング系追加開発を目的に、酵母 Two-Hybrid 試験系の改良を行った結果、代謝活性化によりホルモン作用を示す化学物質が効率よく検出可能であるだけでなく、ホルモン作用を示す化学物質の複合効果も捕らえられることが明らかにされたことから、*in vitro* 試験から *in vivo* 試験の間に

位置するスクリーニング試験として有用であると考えられる。

スクリーニング試験系確立のために、子宮肥大試験あるいは Hershberger 試験の標的臓器である各器官・組織の遺伝子発現をマイクロアレイにより検索した結果、エストロゲン作用あるいはアンドロゲン作用物質を投与することにより、それぞれの器官・組織において明らかに変化する遺伝子群が捉えられた。一方、胎生期あるいは新生児期に性ホルモン作用物質を投与して包皮分離の状況を詳細に検討した結果、胎生期あるいは新生児期早期のホルモン作用物質の暴露による包皮分離遅延機序と性成熟直前に投与された性ホルモン作用物質の包皮分離遅延作用の機序が異なる可能性が示唆され、包皮分離を指標とした内分泌かく乱作用を検討するさまざまな試験系の結果を評価する上で示唆に富む成績であり、さらに詳細な包皮分離の機構の解明が望まれる。

OECD 対応等試験開発において実施してきた、OECD より提案された子宮肥大試験法プロトコールの 2 期に亘るバリデーション試験により、本試験プロトコールはエストロゲン作用物質のみならず抗エストロゲン作用物質を検出するための有効で安定した結果の得られる試験法であることが確認され、すでに OECD においてガイドライン化が最終段階に至っており、多くの物質についてスクリーニング実施段階にある。一方、Hershberger 試験法に関しては、第 2 期のバリデーション試験が終了し、現在試験結果の解析が行われている段階であるが、国内においても幾つかの問題点が指摘されており、OECD 試験法ガイドラインに向けて新たな展開があるものと思われる。なお、今回、内分泌かく乱化学物質試験法の技術の移転普及を目的として雄の性成熟の指標となる検査法を主体にその手技をビデオ撮りし、幅広い分野でこれらに技術が利用されることを期待する。

確定試験等開発研究では、新生児期の早い段階でエストロゲン作用を受けた雌動物においては、それらが性成熟に達した段階で生殖機能障害が発現し、特に子宮の化学物質に対する感受性に影響を及ぼすことが確認されたその機序としては、エストロゲン作用物質が性腺の発生・発育に直接影響を及ぼすのではなく、性分化に関与する神経核の構築異常による可能性が指摘された。従って、従来から生殖発生毒性試験の一環として行われていた 1 世代繁殖試験では、このような遅発性の内分泌異常を検出することが不可能であることが判明し、新たに動物に一生涯に亘り視床下部・下垂体・性腺軸への影響を観察する試験法(一生涯試験と仮称)の開発に向けて研究を開始した。また、内分泌かく乱化学物質が甲状腺腫瘍、前立腺腫瘍あるいは乳腺腫瘍に影響を及ぼす可能性が指摘されていることから、これらの腫瘍発現に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響を効率よく評価するための試験法の開発に向けて遺伝子改変動物あるいは 2 段階発がんモデルを用いて検討を行っているが、現時点では有効な試験法を立ち上げるには至っておらず今後の研究成果が期待される。

E. 結論

本研究において、すでに OECD でガイドライン化が進んでいる子宮肥大試験法、Hershberger 試験法は内分泌かく乱化学物質の動物を用いたスクリーニング法としてはきわめて有用であることが明らかになった。更に、新生児期の早い段階でエストロゲン作用を受けた雌動物においては、それらが性成熟に達した段階で生殖機能障害が発現し、特に子宮の化学物質に対する感受性に影響を及ぼすことが確認されたことから、今後の胎生期、新生児期に関わる試験法、あるいは経世代試験法の加え動物に一生涯に亘り視床下部・下垂体・性腺軸への影響を観察する試験法(一生涯試験と仮称)を開発する必要性が浮上して来たほか、既存の試験法改良のためには遺伝子発現、包皮分離時期の確認等の新たな

な指標を組み込んだ試験法を開発していく必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

○T. Nagao, Y. Saito, K. Usumi, M. Kuwagata and K. Imai, Reproductive function in rat exposed neonatally to bisphenol A and estradiol benzoate. Reproductive Toxicology, 1999, 13, 303-311

○T.Nagao, Y. Yoshimura, Y. Saito and K.Imai, Developmental toxicity of the topoisomerase inhibitor, etoposide in rabbits after intravenous administration. Teratogenesis, Carcinogenesis and mutagenesis ,1999, 19 233-241

M. Seki, K. Kasama and K. Imai, Effects of food restriction on hepatotoxicity of carbon tetrachloride in rats. J. Toxicol. Sci., 2000, 25, 33-40

Sato M., Wada K., Marumo H., Nagao T., Imai K., Ono H., Influence of corn oil and diet on reproduction and the kidney in female Sprague-Dawley rats, toxicological Sciences, 56, 156-164 (2000)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

II 分担研究報告

(1) 〈プレスクリーニング系追加開発〉

1. 酵母 Two-Hybrid 試験の改良とバリデーション —特に複合効果の検討—

研究者 西原 力 大阪大学大学院薬学研究科

研究要旨：酵母 Two-Hybrid 試験 (ER-TIF2 系) で、試料を S9Mix で前処理後に、またはエストラジオール共存下にエストロゲン様活性を測定することによって代謝活性化物質およびアンタゴニスト活性物質が検出できることがわかった。さらに、PXR-SRC1 系でメトキシクロルなどは転写活性化作用を示し、内分泌攪乱作用が性ホルモンレセプター以外のレセプターを介して間接的にあらわれる可能性を示した。

A. 研究目的

私たちが開発した酵母 Two-Hybrid 試験 (Fig. 1) を基に、代謝活性化物質やアンタゴニストの検出系を開発するために、酵母 Two-Hybrid 試験の測定条件や前処理法について検討し、改良とそのバリデーションを行う。さらに、個々の物質のメカニズムを検討することにより、食品や環境試料などの混合物について総合評価手法の確立を試みる。

B. 研究方法

S9Mix 前処理条件 (30°C、4 時間) を確立し、スチレンダイマーやトリマー、ビフェニル化合物等約 100 物質 (Table 1) を S9Mix で前処理し、酵母 Two-Hybrid 試験 (ER-TIF2 系) でエストロゲン様活性を測定した。陽性物質につい

ては代謝物の同定も試みた。

ER-TIF2 系においてエストラジオール (E2) 共存下に約 60 種の化学物質についてエストロゲン様活性を酵母 Two-Hybrid 試験で測定することにより、アンタゴニスト活性物質を検索した。なお、測定系への影響を評価するためにコントロール系 (p53 系) を用いた (Fig. 1)。陽性物質については、ER 結合性試験および培養細胞 (HeLa) レポーター遺伝子試験により確認した。

PXR-SRC1 系の酵母 Two-Hybrid 試験を作成し、ED 容疑物質約 70 種類についてアゴニスト活性を測定した。陽性物質のについては培養細胞レポーター遺伝子試験で確認後、雄性ラットに投与し、肝臓中の PXR 標的遺伝子の mRNA レベル等を検討した。

C. 研究結果

試験した 103 物質中スチレンダイマー、スチレントリマー、スチルベン、ベンゾフェノン、ジフェニール類など 20 物質が S9Mix 処理により、陽性となることが知られているメトキシクロールと同様、代謝活性化され、エストロゲン様活性を示した (Table 1)。陽性代謝物のひとつはそれぞれの 4-水酸化体であり、CYP により変換されることがわかった。

酵母 Two-Hybrid 試験 (ER-TIF2 系) により、アゴニスト活性陰性と評価された ED 容疑物質について E2 共存下にエストロゲン活性を測定したところ、6 物質が陽性であった。これらの物質は ER に対する結合性を示し、培養細胞レポーター遺伝子試験や MGF-7 細胞増殖促進試験 (E-SCREEN) でもアンタゴニスト活性を示した (Table 2)。

ED 容疑物質約 60 種類について PXR-SRC1 系の酵母 Two-Hybrid 試験を実施したところ、メトキシクロールやベンゾフェノンなど 7 物質が陽性を示し (Table 3)、それらは PXR-RXR を導入した培養細胞レポーター遺伝子試験でも陽性であった。さらにこれらをラットに投与したところ、肝臓において PXR の標的遺伝子である CYP、MDR1、OATP2 の mRNA レベルを増加させた。CYP 分子種では既知の 2B1/2 と 3A1 に加えて 2C11 が誘導された (Fig. 2)。

D. 考察

化学物質の体内代謝を考慮に入れるため、ラット S9Mix 処理を試料の前処理として導入した結果、約 20% (21/104) の物質が代謝活性化を受けることを明らかにできた。一般に S9Mix で処理すると水酸化されるが、ビフェニル化合物の代謝活性化物質の主なものは 4 位

(パラ位) の水酸化体であった。もちろんその他の代謝体、例えばオルト位水酸化体や三水酸化体なども予想されるが、今までのデータから陰性あるいは極弱い陽性であると予測される。

アンタゴニスト活性物質として今回 Table 2 に示した 6 物質が検索されたが、共通な部分構造は明確ではない。アゴニストに比べてレセプターへの結合様式・部位に構造特異性が低いのかもかもしれない。なお、培養細胞系でアンタゴニスト活性を示したビタミン A 酸は本試験および結合性試験では陰性であった。

内分泌攪乱作用を評価しようとする場合、単一物質が複数のレセプターの系でアゴニスト活性やアンタゴニスト活性を示す例も検出されており、代謝活性化も考慮に入れるべきであり、PXR のような性ホルモンレセプター以外のレセプターを介したり、複数のレセプターを介したりして作用を発現しているとなると、インビトロのスクリーニング系で総合評価することはますます困難になる。しかし、インビトロの試験系は候補物質の確認に必要なメカニズムの検討には重要なツールである。

E. 結論

酵母 Two-Hybrid 試験 (ER-TIF2 系) により代謝活性化物質およびアンタゴニスト活性物質が検出できることがわかった。また、内分泌攪乱作用が疑われている物質のいくつかは性ホルモンレセプター以外の PXR などの核内レセプターを介して作用する可能性を示した。

G. 研究発表 (過去 3 年)

1. 論文発表

1) 書籍

- ・ T. Nishihara: *in vitro* Screening Assay for Endocrine Disrupting Chemicals.

The proceedings of The Fourth Princess Chulabhorn International Science Congress, 2002, 322-326. Chulabhorn Res. Inst., Bangkok.

- 西原 力: 安全の百科事典, 田村 (編), 2002, .28-50、他, 丸善、東京
- 西原 力: 環境と化学物質-化学物質とうまく付き合うには. 大阪大学新世紀セミナー, 2001, 1-92, 大阪大学出版会, 大阪.
- 西原 力: 化学物質のリスクアセスメント-環境ホルモン問題で私たちにできること-, 2000, 科学技術と人間のかかわりⅡ, 宮西・畑田 (編), 157 - 180, 大阪大学出版会, 大阪.
- 西川淳一、西原 力: 酵母を用いたツークハイブリッド試験, 2000, 内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法, 井上 (監修), 20-27, シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京.

2) 雑誌

- S. Takatori, et al.: Detection of Proestrogenic Activities of Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay. J. Health Sci., 49, in press, 2003.
- Y. Kitagawa, et al.: Detection of Tyromimetic Activities of Chemicals Using a Yeast Two-Hybrid Assay. J. Health Sci., 49, in press, 2003.
- M. Yasui, et al.: An Arming Yeast with the Ability to Entrap Fluorescent 17 β -Estradiol on the Cell Surface. Appl. Microbiol. Biotechnol., 59, 329-331, 2002.
- 黒木広明、ほか: 酵母Two-hybrid法によ

るPCB水酸化体及びPCDF水酸化体のエストロゲン様物質としての評価. 福岡医学雑誌, 92, 158-166, 2001.

- 白石不二雄、ほか: 酵母を用いたエストロゲン・アンタゴニストアッセイ系の開発と有機スズへの応用. 環境化学, 11, 65-73, 2001.
- J. Nishikawa, et al.: 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.
- T. Nishihara, et al.: Estrogenic Activities of 517 Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay. J. Health Sci., 46, 282-298, 2000.
- 川越保徳、ほか: .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, 787-79, 2000.
- 川越保徳、ほか: 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, 65-72, 2000.
- 白石不二雄、ほか: 酵母 Two-Hybrid System 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, 57-64, 2000.
- 西川淳一、今川正良、西原 力: 内分泌攪乱物質の核内ホルモン受容体に対する影響. 実験医学, 18, 731-736, 2000.

2. 学会発表 (招待講演のみ)

- in vitro Assay for Detecting Endocrine Disruptors by using Yeast Two-Hybrid System, APEC Workshop, Korea, 2002/9/28
- in Vitro Assays and Models for

Detection of Endocrine Disruptors, Food Safety 2002, Portugal, 2002/5/24

- ・ 内分泌攪乱物質問題の現状と課題、富山医科薬科大学和漢薬研究所セミナー、富山、2002/4/15
- ・ 化学物質とうまくつきあうには-内分泌攪乱物質問題を中心に-、第17回湯川記念講演会、大阪、2001/11/10
- ・ 化学物質のリスクアセスメント-ダイオキシン、内分泌攪乱物質を例に-、特別講義「科学技術論」、大阪、2001/7/6
- ・ 酵母 Two-Hybrid System を用いたエストロゲン作用活性の検出法、JEMS. BMS 研究会第27回定例会、東京、2001/6/1
- ・ 酵母 Two-Hybrid System 試験：内分泌攪乱化学物質の評価・試験法-in vitro assay 法とその問題点、日本薬学会121年会、札幌
- ・ in Vitro Biossay for Endocrine Disruptors. The ROC-Japanese Symposium on Endocrine Disrupting Chemicals、台湾、2000/11/11
- ・ 酵母レポーター遺伝子試験、第6回環境ホルモン学会講演会、東京、2000/10/24

H. 知的財産所有権の出願

なし

Table 1 Estrogenic Activities of Chemicals after Treatment with S9Mix

Chemicals	-S9Mix +++++	+S9Mix +++++	Chemicals	-S9Mix	+S9Mix
17 β -Estradiol			● Methoxychlor	-	+S9Mix
1,2,3-Trichlorobenzene	-	-	Bifenox	-	-
1,2,4-Trichlorobenzene	-	-	BPMC	-	-
1,2-Dichlorobenzene	-	-	Captan	-	-
1,2-Dinitrobenzene	-	-	Carbaryl (NAC)	-	-
● 1,2-Diphenylcyclobutane (cis)	±	+	Chlorobenzene	-	-
● 1,2-Diphenylcyclobutane (trans)	±	++	Chlorothalonil (TPN)	-	-
1,2-Epoxyethylbenzene	-	-	Diazinon	-	-
1,3,5-Triphenyl-cyclohexane	-	-	Dibenzyl ether	-	-
● 1,3-Diphenylpropane	-	+	Diethylbenzene mixture	-	-
1,4-Dichlorobenzene	-	-	● Diphenyl-acetylene	-	++
1a-Phenyl-4a-(1'-phenylethyl)tetralin	±	-	● Diphenyl-amine	-	++
1a-Phenyl-4a-(1'-phenylethyl)tetralin	-	-	● Diphenyl-ether	-	++
● 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	-	+	● Diphenyl-methane	-	++
1-Chloro-2-nitrobenzene	-	-	Diquat dibromide H ₂ O	-	-
● 1e-Phenyl-4a-(1'-phenylethyl)tetralin	+	+	Edifenfos (EDDP)	-	-
1e-Phenyl-4a-(1'-phenylethyl)tetralin	-	-	EPN [O-Ethyl-O-(4-nitrophenyl)phenyl-phosphono	-	-
● 2,2'-Dihydroxy-4-methoxybenzophenone	+++	+++	Ethyl benzene	-	-
● 2,3,4-Trihydroxybenzophenone	-	-	Fenitrothion (MEP)	-	-
2,4,5-Trichlorophenol	-	-	Fenthion (MPP)	-	-
● 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid	-	+	IBP	-	-
2,4,5-Triphenyl-1-hexene	-	-	Keithane (Dicofo)	-	-
● 2,4-Diaminotoluene	-	+	Melamine	-	-
2,4-Dichloroaniline	-	-	Menadione	-	-
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)	+++	+++	N,N-Dimethylaniline	-	-
2,4-Dihydroxybenzophenone	-	++	n-Butylbenzene	-	-
2,4-Dinitroaniline	-	-	N-Ethylaniline	-	-
2,4-Diphenyl-1-butene	-	±	Nitrobenzene	-	-
2,5-Dichloroaniline	-	-	Nitrofen	-	-
2,5-Dichloroaniline	-	-	N-Methylamine	-	-
● 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone	-	+++	● N-Nitroso-diphenylamine	-	+
2-Hydroxy-4-n-octyloxybenzophenone	-	-	● N-Phenyl-1-naphthylamine	-	+
2-Mercaptobenzothiazole	-	-	N-Phenyl-2-naphthylamine	-	-
2-Mercaptoimidazolone	-	-	o-Tolidine (3,3'-Dimethylbenzidine)	-	-
2-Methylpyridine	-	-	Parquat	-	-
2-Naphthol	-	-	PCNB [Pentachloronitrobenzene]	-	-
2-Phenylene diamine	-	-	Permethrin	-	-
3,4-Dichloroaniline	-	-	Phenthoate (PAP)	-	-
● 3-Nitrophenol	-	+	Phenylhydrazine	-	-
4-Chloroaniline	-	-	Propanil (DCPA)	-	-
4-Chloronitrobenzene	-	-	Quinoline	-	-
4-Chlorotoluene	-	-	● Stilben (trans)	-	+++
4-Nitrophenol	-	-	● Stilben (cis)	-	+++
● 4-Nitroquinoline-N-oxide	-	++	Styrene	-	-
4-Nitrotoluene	-	-	Terphthalic acid	-	-
4-tert-Butylbenzoate	-	-	Thiobencarb	-	-
4-Toluenesulfonamide	-	-	Thiophanate-methyl	-	-
Aniline	-	-	Toluene	-	-
Benzaldehyde	-	-	Trifluralin	-	-
Benzhydril	-	-	Vinclozolin	-	-
● Benzophenone	-	+	α-Methylstyrene	-	-
Benzylalcohol	-	-	γ-Hexachlorocyclohexane (HCH, BHC)	-	-
● Bibenzyl	-	++			

Table 2 Antagonistic Activities of Chemicals against ER

Chemicals	Agonist	Antagonist			Binding
	YTH	YTH	HeLa	MGF-7	
4-Hydroxytamoxifen	-	+++	++	++	++++
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	-	+			±
Captans	-	++			±
Hexachlorophen	-	++	+		+
Pentachlorophenol	-	++	+		+
Retinoic acid	-	-	+	+	-
2,4,6-Tribromophenol	-	++			±
Menadione	-	+		+	+

Table 3 Agonistic Activities of Chemicals against PXR

Test Chemicals	Act.	Test Chemicals	Act.
Benzenes and heterocyclics (11)		Pesticides and related (21)	
1-Chloro-2-nitrobenzene	-	1, 2-Dibromo-3-chloropropane	-
1, 2-Dinitrobenzene	-	2, 4, 5-Trichlorophenol	-
2, 4-Dinitroaniline	-	2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid	-
2, 5-Dichloroaniline	-	Alachlor	++
2-Phenylene diamine	-	Aldicarb	-
4-Chloroaniline	-	Captan	-
Benzophenone	++	Carbaryl (NAC)	-
Biphenyl	-	Hexachlorophene	-
<i>N</i> -Ethylaniline	-	Hexachlorocyclohexane (BHC)	+
<i>N</i> -Nitrosodiphenylamine	-	Maneb	-
<i>trans</i> -Stilbene	-	Methomyl	-
		Methoxychlor	++++
Phthalate and adipate (2)		Molinate	-
Di-2-ethylhexyl phthalate	-	Pentachlorophenol	-
Di-2-ethylhexyl adipate	-	Permethrin	-
		Simazine	-
Phenols (11)		Thiobencarb	-
2, 4-Dichlorophenol	-	Thiuram	-
2, 4-Dichlorophenoxy acetic acid	-	Trifluralin	+
2, 4-Dinitrophenol	-	Vinclozolin	++
2, 4, 6-Tribromophenol	-	Ziram	-
2, 5-Dichlorophenol	-		
3-Nitrophenol	-	Flavonoids (5)	
4-Cresol	-	Apigenin	-
4-Nonylphenol	+	Coumesterol	-
Bisphenol A		Daizein	-
Diethylstilbesterol		Genistein	-
Tetrabromobisphenol A		Naringenin	-
Aliphatics (4)			
Cyclohexyl amine			
<i>N, N</i> -Dimethylformamide			
Nitrilotriacetic acid			
<i>N</i> -Nitrosodimethylamine			

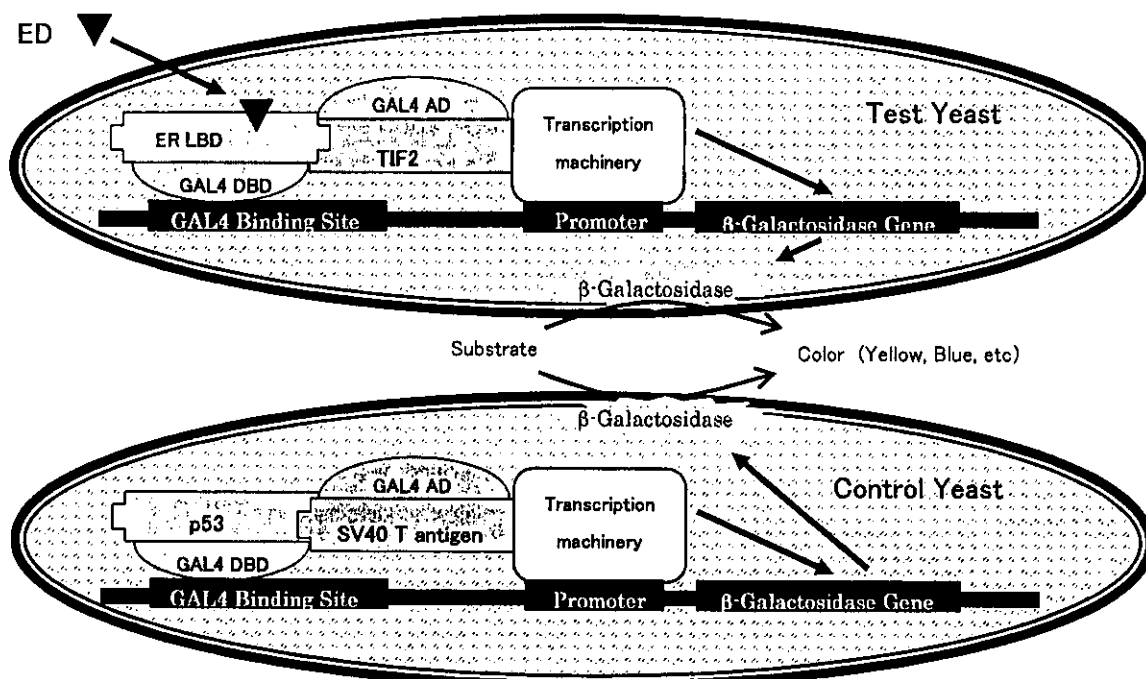


Fig. 1 Outline and Principle of Yeast Two-Hybrid Assay

HR LBD: Hormone Receptor Ligand Binding Domain

GAL4 AD: GAL 4 Activation Domain

GAL4 DBD: GAL4 DNA Binding Domein

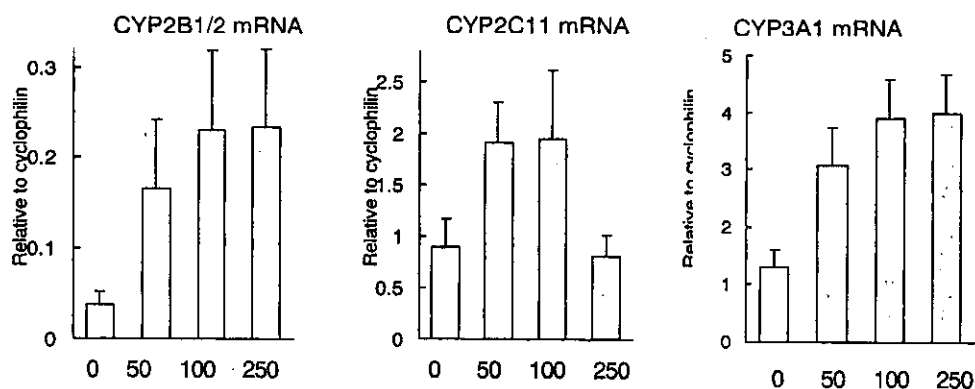


Fig. 2 Effect of Methoxychlor on Expression of CYP

Rats were administrated 50, 100 or 250 mg/kg methoxychlor in corn oil or vehicle alone for 7 days. Twenty-four hours after the last treatment, the expression pattern of each CYP mRNA was assessed by competitive RT-PCR. Values represent means \pm SD of 5~6 rats (RNA isolation and RT-PCR reactions were performed per rat). The graphs show the amount of CYP mRNA level. It calculated from densitometrically intensity of each band normalized by that of cyclophilin as relative intensity of coexistent competitor.