

指した。

マウスおよびラット前立腺の ER 発現：我々が示してきたラットの前立腺における ER の T による調節は、マウスモデルにおいても普遍的にみられることが示された。すなわち、ER $\alpha$ 発現は去勢で増加し T 処理で低下したが、 $\beta$ 型の発現は逆の調節を受けていた。さらに今回クローニングしたラット ER $\beta$ の上流域が転写活性化能をもつことおよびその構造がマウスとの間で高度に保存されていたことから、ラットとマウスで共通の ER $\beta$ の調節がこのプロモーター活性によっている可能性が示唆された。さらに、現在マウスで進めているプロモーター *in vivo* 解析モデルが一般性をもちうることも示された。

T と E の相乗作用：前立腺細胞増殖において、E は単独では抑制的に働くが、T と同時に投与したときには相乗的に前立腺肥大を誘導しさらに前立腺癌化にも関係することが示されてきた。ER 発現の解析の結果、そのときに ER $\alpha$ の発現上昇がみられることが示された。これは、E により ER 発現が修飾されていることを示し興味深い。さらに前立腺癌化への ER $\alpha$ 発現の関与が指摘されているが、E による発癌修飾においても ER $\alpha$ 発現が役割を果たしていることを示唆した。

ラット ER $\beta$ プロモーター：ラットにおける ER $\alpha$ の発現調節は、少なくとも2つの独立したプロモーター領域により調節されていることが知られる。ラット ER $\beta$ に関して、複数の組織からの cDNA の 5'端の

解析を行ったが、基本的に同一であり、そのプロモーターは単一であることが推定された。今回その遺伝子上流域を約 0.7kbp クローニングしプロモーター活性が同定できた。マウスとの相同性や *in vitro* 実験の発現調節様式から、この領域が実際の遺伝子発現で役割を果たしていると考えられた。

#### 【マイクロアレイ基盤整備】

遺伝子発現の網羅的検索と、インフォマティクスの確立（五十嵐勝秀）

本年度は、当班基盤研究への cDNA マイクロアレイ技術の導入および各班員の研究サポートを計画し、各班員が実施中の研究をサポートする体制を整えることを第一目的とした。あわせて、高次系解析の中心である脳神経系発生への影響解析に本技術を適用する目的で、マウス脳性分化に伴う網羅的遺伝子発現解析とその内分泌かく乱候補化学物質による変動の解析を実施した。その結果、3人の班員の方と共同研究を進めることができ、各々重要遺伝子の選択の段階に到っている。来年度も本研究サポートを継続し、網羅的遺伝子発現解析による未知のホルモン作用メカニズムの同定を行う予定としている。特に、藤本班員との共同研究により、低濃度の BPA の影響が目に見えて明らかでない状態でも、GH3 細胞に対し、エストロゲン誘発遺伝子群の一部の発現変動を引き起こすことが明らかとなったことは、今後の低用量影響を解明する上で重要な知見となると考えられる。次年度はこの結果の追試、検証を行い、結論を

得たい。

視床下部発達に伴う雌雄網羅的遺伝子発現変化解析の結果から、出生後1日目の雌で比較的発現変動が大きいことに注目し、遺伝子群を抽出したところ、40ヶ程度の遺伝子リストが得られた。今後これら遺伝子の機能と性的二系性形成に関して検討したい。また、機能に関する情報の無い遺伝子群が同じリストの半数を占めていたことから、視床下部発達に伴い雌雄で異なる発現パターンを示す遺伝子は、機能未知の遺伝子が多い可能性があり、次年度は機能未知の遺伝子発現変化の網羅的解析も考慮したい。

## E. 結 論

本研究課題では、平成14年度に引き続き、

I. プロジェクト課題研究、および II. 基盤研究の2本立てで、研究を推進した。

I. のプロジェクト研究では、引き続き文献情報調査とともに、必要な緊急の実験的検討を立ち上げ、これらを含めて統括した。

II. の基盤研究では、従前通り、生殖・ステロイド代謝、免疫、神経、核内レセプターなどについて、引き続き基盤研究を、低用量問題に焦点を当てつつ推進し、井上がこれを統括した。また、それぞれの研究に対して、マイクロアレイ基盤整備の立場から、必要な研究課題をサポートした。

### I. プロジェクト課題研究

低用量問題に関連する文献調査では、DPAのみをとっても、一昨年以来100報余の論文が刊行されており、それらは低用量問題の今後のとるべき研究課題などを示唆して

おり、次年度最終計画にあっては、これに焦点を当てた方策を、基礎研究の面からも、リスクコミュニケーションの立場からも明確化して、しかるべき解答を得る努力をする必要性が明らかになりつつある。

## II. 基盤研究

基盤研究の中で、特筆すべき点は、それぞれの部門における研究の進展が著しいことである。生殖・ステロイド代謝部門では、エストラダイオールとエストロジェン様作用物質に対する応答遺伝子群の不連続性や、SXR 遺伝子群の発現レベルでの年齢的不連続性が明らかになった。免疫部門では、種々の EDCs の胸腺分化、サイトカイン応答性に対する影響が、低用量レベルで観察された。神経部門では、エストロジェンレセプター関連受容体が、オーファン受容体から見い出され、バイオマーカーとしての役割が期待されつつあるほか、神経幹細胞の分化におけるエストロジェンレセプター $\alpha$ および $\beta$ の役割などを見い出した。核内レセプター部門では、転写共役因子の同定法が進み、新たな関連因子の同定が進んだ。マイクロアレイ基盤整備では、井口班員、藤本班員、および笹野班員らへの研究の支援を中心に進行した。

これらの成果に沿って、平成15年度は、早い時期に中間目標を設定して、第2期研究成果のゴールを目指して、研究をスタートさせることが肝要と考える。

## F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

Inoue T, Igarashi K, Sekizawa J. Health hazards of endocrine-disrupting chemicals on humans as examined from the standpoint of their mechanism of action. Japan Med Assoc J. 2003, 46: 97-102.

Inoue T. Toxicogenomics- new paradigm of toxicology, In "Toxicogenomics", Inoue T. Pennic WD, Eds. pp. 3-11, Springer-Verlag Tokyo, 2002.

Katoh C, Kitajima S, Saga Y, Kanno J, Horii I, Inoue T. Assessment of quantitative dual-parameter flow cytometric analysis for the evaluation of testicular toxicity using cyclophosphamide- and ethinyl-estradiol-treated rats. J Toxicol Sci. 2002, 27: 87-96.

Hirabayashi Y, Matsuda M, Aizawa S, Kodama Y, Kanno J, Inoue T. Serial transplantation of p53-deficient hemopoietic progenitor cells to assess their infinite growth potential. Exp Biol Med (Maywood) 2002, 227: 474-9.

Hirabayashi Y, Miyajima A, Yokota T, Arai K, Li

GX, Yoon BI, Kanno J, Kaneko T, Inoue T. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (tcdd) on b cell differentiation in mouse pre-b colonization model regulated by artificially introduced human il-3 receptors. Organohalogen Compounds 2002, 55: 359-62.

井上 達. 化学物質と健康－低用量問題.

『環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発』井口泰泉監修. 株式会社シーエムシー出版. 2003

#### H. 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. その他

なし

## Ⅱ．分担研究報告書

### I．プロジェクト課題研究

平成14年度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）

総括研究報告書

「内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究

—特に低用量効果・複合効果・作用機構について—

プロジェクト課題研究

プロジェクト課題研究総括研究者 関澤 純 国立医薬品食品衛生研究所・化学物質情報部

## 研究要旨

プロジェクト課題研究は、（１）免疫系、性分化を中心とした内分泌かく乱化学物質による低用量影響の可能性と複合効果についての検討、（２）低用量ビスフェノールA（BPA）のヒト体内動態と、神経、甲状腺機能および行動に対する影響の検討、（３）低用量暴露による遺伝子発現、タンパク発現データの解析によるホメオスタシスの検討、（４）低用量エストロゲン物質による前立腺重量、発育などに対する影響の検討、（５）甲状腺ホルモンかく乱物質に対する感受性の動物種差の解明の5課題を分担して研究した。

（１）、（２）は文献調査による研究であり、低用量効果・複合効果・作用機構に関する最新の知見を収集、解析した。（３）では、 $\alpha$ -Benzene hexachloride ( $\alpha$ -BHC)のラット肝発がん作用を発がん二段階法を用いて検討し、低用量側でのホルミシスの現象を解析、

（４）では、生長初期の前立腺における短期間の diethylstilbestrol (DES) 曝露が間質細胞のエストロゲン受容体を介し、長期間にわたりおよぼす形態的な影響を検討し、（５）では、マウス、ハムスター、ラット、モルモットに 2,2',4',5,5'-pentachlorobiphenyl (PentaCB)、2,2',3',4',5,6-hexachlorobiphenyl (HexaCB) および Kanechlor-500 (KC500) を投与時に、血清中総サイロキシシン (total  $T_4$ ) と総トリヨードサイロニン濃度の低下、肝 UGT1A1/6 の誘導及び各 PCB の代謝能における種差について示した。

## 分担研究者（順不同）

関澤 純 国立医薬品食品衛生研究所室長

井藤悦朗 社団法人日本化学物質安全情報

センター調査部部長

福島昭治 大阪市立大学大学院

医学研究科教授

杉村芳樹 三重大学医学部教授

加藤善久 静岡県立大学 薬学部講師

## A. 研究目的

低用量曝露による有害リスクの可能性を

文献調査および動物試験を組み合わせ、生物学的なメカニズムの検討と、定量的なデータに基づいて解析する。

（１）最新の文献を調査し、免疫系、性分化を中心に内分泌系に影響を及ぼす物質による生物影響が証拠の確からしさと定量的なデータに基づいて、有害リスクとして確定でき、対策の根拠としうるレベルに達しているか、また広く関心と呼んでいる BPA についてヒトにおける代謝と動態、実験動物特にげっ歯類の甲状腺機能、神経系およ

び行動に対する影響を検討する。

(2) 内分泌かく乱作用の生物学的メカニズムについて、発がん性をもつ内分泌かく乱化学物質の発がん作用におけるホルミシス現象の検証、前立腺の形態発生に DES が及ぼす影響の検討、および PCB による各種動物の甲状腺ホルモン濃度低下作用、PCB の代謝と UDP-glucuronosyl transferase (UDP-GT) 活性変動の種差の関連、血清サイロキシン ( $T_4$ ) 濃度の低下につき動物実験により解析する。

## B. 研究方法

(1) Medline 医学文献データベースを用いて最近の免疫系および性分化関連の低用量研究報告、および BPA に関する報文の検索を行った。IPCS (International Programme on Chemical Safety: 国際化学物質安全性計画) による内分泌かく乱化学物質に関する科学的な評価である "Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors" を参考にした。文献検索の不備を補完するため、第 5 回内分泌かく乱化学物質問題に関する国際シンポジウムおよび SCOPE/IUPAC International Symposium on Endocrine Active Substances and Supplementary Workshop 発表論文から、関連テーマについて発表した論文も調査した。

(2) ラットを用いた 2 段階発がん試験のプロモーション段階に  $\alpha$ -BHC に曝露し実験開始 13 週目にラットを屠殺、肝を検査した。

(3) 出生直後の雄マウスに DES0.5 $\mu$ g を投与し、60 日後に前立腺の腹葉と後側葉を微小解剖、腺管分枝構造の形態測定と組織学的検討を行った。生長初期前立腺にお

けるエストロゲン受容体 (ER- $\alpha$ および ER- $\beta$ ) の発現を免疫染色にて検討した。

(4) ddy マウス、Syrian ハムスター、Wistar ラット、Hartley モルモット、Gunn ラットに、PentaCB、HexaCB と KC500 を腹腔内投与し、投与 4 日後に血清中甲状腺ホルモン濃度、 $T_4$  消失クリアランス、肝ミクロソームの抱合活性および特異的ペプチド抗体を用いた UGT 分子種の発現量、肝臓中メチルスルホン代謝物と水酸化体濃度を測定した。

## C. 研究結果と考察

### (1) 文献調査の結果

(A) IPCS の "Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors" は、「内分泌かく乱物質」と、「内分泌系をかく乱する可能性のある物質」を区別し、「内分泌かく乱とは生体レベルでの事象である」ことを明確にした。さらに、内分泌かく乱自体を有害影響とはみなさず有害な影響につながるかも知れない機能上の変化とし、化学物質による生体機能かく乱の可能性について考察する上の要点を次のように整理した。

- 成体における曝露ではホメオスタシスにより補償され有意な影響は認められないであろう。
- 内分泌系が形成途上にある時期の曝露では機能、刺激また抑制シグナルへの感受性に不可逆的な変化を引き起こす可能性がある。
- 生体は異なる発達段階や異なる季節の同レベルの内分泌系シグナルに対して異なる反応を示す可能性がある。

- 種々の内分泌系間のクロストークにより予測されなかった内分泌系に影響が起きる可能性がある。
- インビトロの実験結果を生体レベルのホルモン活性にあてはめるには慎重でなければならない。

(B) 低用量曝露による免疫影響については、DES 投与 C57BL/6 マウスの免疫機能パラメータが動物の週令と性に依存して複雑に変化し、周産期ラットへの低用量の 2,3,7,8-TCDD による免疫系への影響は思春期の脾臓において明瞭だったが、アリルヒドロカーボン受容体経由の CYP1A1 発現に無関係と考えられることが知られた。TCDD 投与マウスでは脾臓 T 細胞の障害が示された。

IL-1 刺激 MCF-7 細胞の MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) 産生系に、17 $\beta$ -エストラジオール、ビスフェノール A、ノニルフェノールを添加し MCP-1 産生が濃度依存的に抑制されたが、この作用はエストロゲン受容体 (ER) を介さず MCP-1 遺伝子領域の NF- $\kappa$ B サイトを介するものだった。

PCB 類によるほ乳類の免疫系への標的として成熟 T 細胞が前駆細胞から分化を遂げる胸腺上皮が推定され、またヒトの胸腺組織はゲッシン類の胸腺組織とほぼ同程度の TCDD 感受性を持つことが示された。

(C) 性分化について外因性の抗アンドロゲン物質による動物の生殖発達への影響のレビューがあり、プラスチック工場作業者の症例対照研究では、ポリ塩化ビニルに曝露された作業員における精上皮腫のオッズは

約 6 倍高く、フタル酸エステルの寄与が疑われた。非精上皮腫の症例が増加しつつあり、鋳夫、皮革製造、食品飲料製造、光熱水道関連作業従事者のオッズはそれぞれ 12.39, 4.60, 3.20, 3.15 倍高かった。

2-Bromopropane により男性には精子数減少、女性には卵胞刺激ホルモンの高値を伴う無月経などが見られ、DES に類似した 4,4'-Diaminostilbene-2,2' disulfonic acid 製造にたずさわる男性に血中テストステロンの低下とインポテンツが見られた。DES 曝露母親から生まれた娘は脳の性分化に影響を受けると見られ性的な関係を良く保てない。性分化プロセス中にアンドロゲン物質に曝露すると女性の男性化が起こり、プロゲステンは抗アンドロゲンとして不完全な男性生殖器を生じさせる。ステロイド合成を阻害する aminoglutethimide に子宮内曝露を受けた女性は男性化する。テストステロン投与により成熟雄ラットによる精子形成に U 字型の用量-反応関係を示すことは良く知られてきた。ある種のアンドロゲン受容体 (AR) リガンドは低濃度で抗アンドロゲン作用を示すが高濃度でアンドロゲン作用を示す。

ビスフェノール A が甲状腺ホルモン受容体やソマトスタチン受容体関与の影響を示し、マウス雄の精巣精子生産だけでなく生殖能力を低用量で低下させるという報告があり、作用メカニズムと用量-反応の面からさらに詳細な検討が必要と考えられる。

生理的なホメオスタシスによる逆 U 字現象発現に関しビスフェノール A 投与により脳下垂体前葉における ER $\alpha$  と  $\beta$  の発現の増加などの報告もあり、用量に関連したレセプター発現の制御について実証的な研究

脳内の性分化を決定づけるホルモン作用メカニズムは出生前後のクリティカルな時期に起きると考えられるが、動物においては出生初期のアンドロゲン曝露が脳と行動の性分化に影響を及ぼすことはほぼ確かと思われたが、ヒトにおいては間性の治療に生後1-6ヶ月のテストステロン投与が有効か否かを結論できるだけの証拠はなく、症例対照研究の必要性がある。

ラット視索前野の脳室周辺核の前腹方でER $\beta$ mRNA発現が生後7, 14, 21, 35, 60日目の雌において雄に比べて顕著に多く観察され、ドパミン、ペプチド、オピオイド作動性神経およびグルタミン酸受容体サブユニットの性的二形性が示されているが、この部位に障害を起こすと膣における恒常的な発情状態を招く。ER $\beta$ mRNAはこの部位にER $\alpha$ mRNAと同時に発現しており、ER $\beta$ がER $\alpha$ とヘテロダイマーを形成することにより、ER $\alpha$ 応答遺伝子の発現を抑制している可能性がある。

精巣から時期依存的に適度な濃度のアンドロゲン、抗ミュレリアンホルモン、インスリン様因子が生成することで、雄化が進行するが、アンドロゲン受容体が発現しているにも関わらずホルモン抵抗性の症例からコレギュレータにおける障害が示唆され、またWntファミリーの発生関連シグナル分子が卵巣におけるミュラー管の発達とライディッヒ細胞の分化に役割を果たしているらしい証拠も見つかっている。

(D) 多種の外因性エストロゲン物質への複合曝露による影響の可能性について酵母スクリーンアッセイ(YES)系を用い、天然の17 $\beta$ -エストラジオールと11種類の外因性

エストロゲン物質を17 $\beta$ -エストラジオールのそれぞれ2.5万倍、5万倍、10万倍量で併用投与した系で、活性は相加的なものとして計測されると報告された。しかしこのデータからヒトの現実の曝露状況に外挿するには、試験で用いられた個々の成分濃度と現時点でのヒトの曝露レベルと比較することがまず必要である。たとえばこれら11種類の外因性エストロゲン物質のうち、ゲニステインについてはNOECは0.038  $\mu$ M、EC<sub>01</sub>は0.086  $\mu$ Mとされているが、他の外因性エストロゲン物質に比べてはるかに高レベルで日本人に摂取され血中濃度も高いが遊離体と硫酸抱合体を含めた場合で0.008  $\mu$ M。その他の抱合体も入れた合計では0.276  $\mu$ Mというレベルである。もっとも高濃度で曝露されていると考えられ、活性も強いとされるゲニステインがこのレベルであった。他の外因性エストロゲンの曝露レベルは、さらに数オーダー低いと考えられ本インビトロ系での加算性データが生体レベルにそのまま適用可能であるとしても、その濃度は実際の曝露レベルにほど遠い可能性が大きい。

またインビトロ系では、レセプターに独立に結合し作用すると思われた個々の成分による影響が、インビトロ系に組み込まれていないコアクチベータとの相互作用やアシルヒドロカーボンレセプターなど他のレセプターとのクロストークや、生体におけるフィードバックメカニズムの存在下でも起こりうるかが検証される必要がある。

卵巣切除マウスをo,p'-DDT,  $\beta$ -HCH( $\beta$ -hexachyclohexane)に低濃度曝露した時に、子宮上皮および膣上皮の厚さは血中濃度の対数に比例して増加し、かつ増加を示し、



対数に比例して増加し、かつ増加を示し、最も低い血中濃度は一般市民におけるそれらの濃度とほぼ同じレベルであると報告されたが、引用された日本人の $\beta$ -HCH 血中濃度(0.7-5.5 ng/mL)は 1986-88 年のデータで、マウスで子宮上皮や膈上皮の肥厚をもたらした最小濃度(22-42ng/mL)に比べてほぼ 1 オーダー低かった。またこの系は卵巣切除によりフィードバックコントロールなどのホメオスタシスが作用しない動物であった。

(E) ビスフェノールAについて昨年度報告では主として生殖・発生影響データを基にリスクベネフィット分析を行ったが、その後 2003 年はじめにかけて新たな知見が追加された。これらは人の組織(母体血、臍帯血、羊水、尿など)中のビスフェノールA濃度および吸収・体内動態など曝露に関する報告と、インビボおよびインビトロの試験系での神経・行動への影響および甲状腺ホルモンへの影響などを見たものである。

前者については分析法(ELIZA 法と、LC/MS あるいは GC/MS 法)の感度と特異性(抱合体と遊離体の分別や、交差反応性)の問題があるが、おおむね ppb(ng/mL)前後の値であった。体内動態に関しては、ヒトでの投与試験ではグルクロン酸抱合体として速やかに排泄され、腸肝循環するゲッシン類に比べてより蓄積の可能性は低いとされた。

後者については、社会行動の変化や行動における性差の消失、あるいは海馬切片でのグルタミン酸による細胞毒性の増強など興味深いデータではあるが、標準化されていない試験系での観察であり、その意義と

再現性について検証して、リスク評価につなげる必要があると考えられる。

(F) diethylnitrosamine をイニシエーターとする発がん二段階法を用いて $\alpha$ -BHC のラット肝発がん作用を検討したところ、高用量投与では肝前がん病変である glutathione S- transferase placental form 陽性細胞巢の発生を促進し、低用量投与では抑制した。また、酸化的ストレスマーカーの 8-hydroxydeoxy guanosine 生成は $\alpha$ -BHC 500 ppm で増加し、0.1, 1, 50 ppm では減少した。CYP2B1 蛋白量は低用量で減少傾向を示し、GST-P 陽性細胞巢の結果は、 $\alpha$ -BHC の発がん作用にホルミシス現象があることを示した。

(G) 出生直後の雄マウスに 3 日間 DES 0.5 $\mu$ g を投与し、60 日後に前立腺の腹葉と後側葉を微小解剖して形態測定と組織学的検討を行い、DES 投与群では前立腺腺管分枝形態発生は著しく抑制され、一部では異常な結節状の変化を認めた。ER の免疫染色により、生後初期のマウス前立腺間質細胞に ER- $\alpha$ が存在するので、前立腺発生初期の DES 曝露により間質細胞の ER 経路で長期にわたる影響を及ぼすことが示唆された。

(H) マウス、ハムスター、ラット、モルモットに PentaCB、HexaCB および KC500 を投与し、total  $T_4$ 、総トリヨードサイロニン濃度の低下、肝 UGT1A1/6 の誘導、各 PCB の代謝能における動物種差の存在を示した。マウスの HexaCB、モルモットの KC500 投与時の血清中 total  $T_4$  濃度の低下には、肝 UGT1A1/6 誘導が関与している可能性が

示めされた。マウス、ハムスター、ラットに PentaCB および KC500 の投与時の低下には、別の作用機序が関与している可能性が示唆された。

#### D. 結論

(1) 免疫系、性分化を中心とした内分泌かく乱化学物質による低用量影響の生物学的蓋然性および有害リスクの可能性について検討した。免疫影響については、妊娠ラットに TCDD を投与した試験で T 細胞への障害としてこれまで知られているよりも低用量での影響の報告が見いだされた。性分化についてはメカニズムの解明が進んでいるが定量的な問題として低用量影響を確定できるような報告は見られなかった。多種の微量外因性エストロゲン物質が同時に摂取されている状況をベースに、複合曝露による相加的な影響の可能性を指摘する論文があったが、実際の曝露レベルを検討したところ、リスクといえるレベルに達していないと考えられた。

(2) BPA に関する論文を収集しヒト体液中 BPA 濃度に関する報告、ヒト成人を対象にした体内動態に関する報告、実験的研究報告について考察を加えた。

(3) ラット肝を DEN でイニシエーションした後、 $\alpha$ -BHC の低～高用量を投与した。13 週目における前がん病変である肝 GST-P 陽性細胞巢の発生は高用量群では有意に増加したが、低用量群では逆に抑制傾向を示した。

(4) 生直後の雄マウスに DES を投与して、60 日後に前立腺の腹葉と後側葉を微小解剖して形態測定と組織学的検討を行った。DES 投与群では前立腺腺管分枝形態発生は

著しく抑制され、一部では異常な結節状の変化を認めた。

(5) 数種の PCB を投与した後、血中甲状腺ホルモン濃度の低下、肝 UGT1 の誘導及び PCB の代謝に動物種差があることを示した。動物種ごとの各 PCB 投与による  $T_4$  濃度の低下には、肝 UGT1 の誘導が関与する可能性がある場合と、その関与が乏しい場合とがあり、別の作用機序が関与している可能性が示唆された。

#### E. 研究発表

各々の分担研究報告書に記載。

#### F. 知的所有権の取得状況

なし

平成14年度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）

「内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究—特に低用量効果・複合効果・作用機構について—」分担研究報告書

分担研究者 関澤 純 国立医薬品食品衛生研究所・化学物質情報部

免疫系、性分化を中心とした内分泌かく乱化学物質による低用量影響の可能性と複合効果についての検討

### 研究要旨

昨年度は生殖・発生を中心に内分泌かく乱化学物質による低用量影響の可能性と、試験においてデータの再現性を左右する要因について文献レビューにより検討を加えた。今年度は免疫系、性分化を中心とした内分泌かく乱化学物質による低用量影響の生物学的蓋然性および有害リスクの可能性について検討した。その結果免疫影響については、妊娠ラットにダイオキシン(2,3,7,8-TCDD)を投与した試験でTCDDによるT細胞の障害としてこれまで知られているよりも低用量での影響の報告が見いだされたが、性分化についてはメカニズムの解明が進んでいるが定量的な問題として低用量影響を確定できるような報告は見いだされなかった。個々では微量にせよ多種の外因性エストロゲン物質が同時に摂取されている状況をベースに、複合曝露による相加的な影響の可能性を指摘する論文があったが、実際の曝露レベルに照らして検討したところ、リスクといえるレベルに達していないと考えられた。

#### A. 研究目的

免疫系、性分化を中心に低用量曝露による有害リスクの可能性を生物学的なメカニズムと、定量的なデータに基づいて検討する。内分泌系に影響を及ぼす物質による生物影響が証拠の確からしさと定量的なデータに基づいて、有害リスクとして確定でき、対策の根拠としうるレベルに達しているかについて検討する。

#### B. 研究方法

Medline データベースを用いて免疫系および性分化に関連した最近の低用量報文の検索を行った。なお昨年度すでにNTP/NIEHS

内分泌かく乱化学物質低用量精査検討ワークショップ(2000年10月)で収集、検討した論文についてレビューをしたので、検索はごく最近の論文に限って行った。さらに文献検索の不備を補完する目的で、第5回内分泌かく乱化学物質問題に関する国際シンポジウムおよびSCOPE/IUPAC International Symposium on Endocrine Active Substances and Supplementary Workshop 発表論文から、関連テーマについて発表した論文を調査した。

性分化関連文献については、キーワードとLow doseを組み合わせると該当文献が極度に少なくなるので、2002年以降の性分化

のメカニズムに関連する文献中から関連する報告を検討した。また低用量曝露に複合曝露関連による影響の文献は、網羅的な検

索を行わなかったが、主なものについて検討を加えた（表1）。

表1 Medline データベースでの検索結果

キーワード	調査期間	文献数
Low dose	2000/1/1~2003/1/12	824
Low dose * immune	2000/1/1~2003/1/12	34
同上	1998/1/1~1999/12/31	16
Low dose * sex differentiation	1998/1/1~2003/1/12	1
Sex differentiation	2002/1/1~2003/2/12	128

### C. 研究結果と考察

#### (1) はじめに

関澤がこの20年間その仕事に関わっており、科学的な化学物質のリスク評価を国際的に推進する中核である IPCS (International Programme on Chemical Safety: 国際化学物質安全性計画) は、内分泌かく乱化学物質に関する科学的な評価の到達点について国際的な最新の状況を専

門家の協力を得て "Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors" として2002年にまとめた<sup>1)</sup>。本報告をまとめるにあたり、本書の見解をひとつのよりどころにしたので、参考となる記述を引用しておく。まずこの中では内分泌かく乱化学物質について1996年のウェイブリッジ会議の合意を一步進めて、次のように定義した(表2)。

表2 IPCS 専門家グループによる内分泌かく乱物質などの定義<sup>1)</sup>

- ・ 「内分泌かく乱物質」とは、外因性の物質あるいはその混合物であり内分泌系の機能に変化を及ぼしその結果生体またはその子孫あるいはそれらの部分集団に有害な健康影響を引き起こす物質である
- ・ 「内分泌系をかく乱する可能性のある物質」とは生体またはその子孫あるいはそれらの部分集団に内分泌かく乱を起こすと思われる性質を有する物質である

この定義は、「内分泌かく乱物質」と、「内分泌系をかく乱する可能性のある物質」を区別し、かつ「内分泌かく乱とは生体レベルでの事象である」ことを明確にしたが、このことは議論に混乱を持ち込まな

いために非常に重要なことであろう。さらに IPCS 専門家グループは、内分泌かく乱自体は有害影響とはみなされない ("endocrine disruption is not considered a toxicological end point per

se”)が、有害な影響につながるかも知れない機能上の変化とした。また化学物質による生体機能かく乱の可能性について考察す

る上で、以下の点を重要なポイントとしてあげている(表3)。

表3 内分泌かく乱物質による生体機能かく乱の可能性を考察する上で重要な諸点<sup>1)</sup>

- ・ 成体における曝露では生体恒常性(ホメオスタシス)メカニズムにより補償されるため何らの有意な影響は認められないであろう。
- ・ 内分泌系が形成途上にある時期の曝露では機能や刺激または抑制シグナルへの感受性における不可逆的な変化を引き起こす可能性がある。
- ・ 生体は異なる発達段階あるいは異なる季節における同レベルの内分泌系シグナルへに対して異なる反応を示す可能性がある。
- ・ 種々の内分泌系間のクロストークにより、影響が予測されていなかった内分泌系に予想外の影響が起きる可能性がある。
- ・ 以上の考察を基にすれば試験管内(インビトロ)で得られた実験結果を生体レベルでのホルモン活性にあてはめるには慎重でなければならない。

## (2) 低用量曝露による免疫影響関連の報告から

胸腺の正常な発達にエストロゲンが必要とされる。低濃度(餌中 0.4-4.0 µg/kg)のジェチルスチルベストロール(DES)を若いC57BL/6マウスに2ヶ月間投与し、胸腺、脾臓関連細胞のサブポピュレーション、マイトジェン刺激への反応、ナチュラルキラー細胞活性を調べたところ、免疫機能のパラメータは動物の週令と性に依存して、複雑に変化することが観察された<sup>2)</sup>。

低用量(12.5-800 ng/kg 体重)のダイオキシン(2,3,7,8-TCDD)を妊娠15日目のラットに投与し、胸腺と脾臓における変化を調べた。50 ng/kg 体重以上の投与で、生後21日目の胸腺におけるCYP1A1mRNA発現は用量依存的に増加したが、T細胞の数、CD4、

CD8ポピュレーションの投与による変化は見られなかった。12.5-800 ng/kg 体重の投与により、生後49日目には用量に依存して脾細胞数が減少していたが、CYP1A1mRNA発現への影響は微弱であった。周産期の低用量のTCDDによる免疫系への影響は思春期の脾臓において明瞭だったが、アリルヒドロカーボンレセプター経路のCYP1A1発現には無関係と考えられた<sup>3)</sup>。

TCDDによる液生免疫への障害メカニズムを知るためにC57BL/6Nマウスにダイオキシン(2,3,7,8-TCDD)を20 ng/kg 体重投与した後ovalbuminで感作した。TCDD投与マウスでは脾臓CD3(+)T細胞の数は増加せず、IL2産生も感作4日目には抑制された。B細胞を活性化するTh2細胞由来のIL4、IL5、IL6産生も投与マウスでは抑制された。IL5

産生の抑制は TCDD による T 細胞の障害によるものであり、抗原提示細胞への障害によるものではないと示された<sup>4)</sup>。

MCF-7 細胞を IL-1 で刺激し MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) を産生させる系に、 $17\beta$ -エストラジオール、ビスフェノール A あるいはノニルフェノールを添加すると、MCP-1 産生が濃度依存的に抑制された<sup>5)</sup>。この作用は  $17\beta$ -エストラジオールにおいて、他の 2 物質の 1000-10,000 倍強力であったが、エストロゲン受容体 (ER) を介したのではなく、MCP-1 遺伝子の領域における NF- $\kappa$ B サイトを介するものであった。

PCB 類によるほ乳類の免疫系への標的として、成熟 T 細胞が前駆細胞から分化を遂げる胸腺上皮が推定され、その結果として細胞性免疫の低下を来す。ヒト胸腺細胞を重症複合免疫不全マウスに移植した実験からヒトの胸腺組織はゲッシー類の胸腺組織とほぼ同程度の TCDD 感受性を持つことがわかった<sup>6)</sup>。

### (3) 性分化についての影響の報告から

#### (a) 内分泌かく乱化学物質の関与を検討した報告から

Gray ら (2001)<sup>7)</sup> は、環境中 (外因性) の抗アンドロゲン物質による動物の生殖発達への影響についてレビューしている。母体のホルモンへの曝露と精巣の胚細胞腫瘍のリスクに関する症例対照研究では、外因性ホルモン物質への曝露した場合のオッズ比は 4.9 倍高かった<sup>8)</sup>。プラスチック工場作業者を対象とした別の症例対照研究では、ポリ塩化ビニルに曝露された作業における精上皮腫のオッズは約 6 倍高かった<sup>9)</sup>。

プラスチック製造に用いられるフタル酸エステルの寄与が疑われた。非精上皮腫の症例が増加しつつあり、鉦夫、皮革製造、食品飲料製造、光熱水道関連作業従事者において、このオッズはそれぞれ 12.39, 4.60, 3.20, 3.15 倍高かった<sup>10)</sup>。

2-Bromopropane に曝露した韓国の電子産業労働者 (男 8 名、女 25 名) の間で、男性には精子数減少、女性には卵胞刺激ホルモンの高値を伴う無月経などが見られた<sup>11)</sup>。DES に類似したスティルベンの 1 種で染料や蛍光白色料製造に用いられる 4,4'-Diaminostilbene-2,2' disulfonic acid (DAS) の製造にたずさわった男性に血中テストステロンの低下とインポテンツが見られた<sup>12,13)</sup>。DES 曝露母親から生まれた娘は脳の性分化に影響を受けると見られ、性的な関係を良く保てないという<sup>14)</sup>。性分化プロセス中にアンドロゲン物質である Danazol や methyltestosterone に曝露すると、女性の男性化が起こり、プロゲステインは抗アンドロゲンとして不完全な男性生殖器を生じさせる<sup>15)</sup>。

他方、aminoglutethimide はステロイド合成を阻害することにより子宮内曝露を受けた女性を男性化する<sup>15)</sup>。テストステロン投与により成熟雄ラットによる精子形成に U 字型の用量-反応関係を示すことは良く知られてきた<sup>16)</sup>。ある種のアンドロゲン受容体リガンドは低濃度は抗アンドロゲン作用を示すにもかかわらず、高濃度でアンドロゲン作用を示す<sup>17)</sup>。

ビスフェノール A がエストロゲンレセプターを介さない影響 (甲状腺ホルモン受容体<sup>18)</sup> やソマトスタチン受容体が関与<sup>19)</sup> など) や、精巣精子生産だけでなくマウス雄

の生殖能力を低用量で低下させたという報告<sup>20)</sup>あり、作用メカニズムの面と、用量—反応の面について、さらに詳細な検討が必要と考えられる。

生理的なホメオスタシスによる逆U字現象発現の関係についていえば、ビスフェノールA投与により脳下垂体前葉におけるエストロゲンレセプター $\alpha$ と $\beta$ の発現の増加などの報告もあり、用量に関連したレセプター発現の制御について実証的な研究が待たれる。

#### (b) 時期特異的な性分化のメカニズムに関する報告から

脳内の性分化を決定づけるホルモン作用メカニズムは出生前後のクリティカルな時期に起きると考えられるが、発生期の視床下部において過渡的に生起する性分化に関わる遺伝子発現と分子レベルの事象については、未解明な点が多い。視床下部における細胞の移行がその後の脳内性分化を決定づける初期遺伝子の作用におけるひとつの重要な標的ではないかと示唆されている<sup>21)</sup>。

脳の性差は個体発生の特定の時期に起きるが、妊娠期間の永い動物では胎生期に、ラットやマウスでは周産期に精巣からのテストステロンにより雄化が進行する。エストロゲンは胎児期、周産期に肝臓で生成する $\alpha$ フェトタンパクと結合するため血液脳関門を通過しないが、テストステロンは通過した後、脳内でアロマターゼによりエストロゲンが脳内でER $\alpha$ に結合し脳の特定位におけるニューロン数と分布、シナプス、樹状突起の形態に性に特有な変化を起こす<sup>22)</sup>。ヒトの $\alpha$ フェトタンパクはエストロゲンに結合しないなどにより、脳の性分化はラットなどとは異なる。

動物およびヒトの出生後初期のアンドロゲン曝露が脳の性分化に及ぼす影響についての証拠が検討された。動物においては、出生初期のアンドロゲン曝露が脳と行動の性分化に影響を及ぼすことはほぼ確かと思われたが、ヒトにおいては間性(intersex)の治療に生後1—6ヶ月のテストステロン投与が有効か否かを結論できるだけの証拠はなく、症例対照研究の必要性がある。<sup>23)</sup>

ラット視索前野の脳室周辺核の前腹方でのエストロゲンレセプター $\beta$ mRNA発現が生後7, 14, 21, 35, 60日目の雌において雄に比べて、顕著に多く観察された。視索前核内側や分界条床核ではこの差はみられなかった。またこの現象は第3脳室上皮内側50ミクロン以内で見られたが内側から150—300ミクロンの範囲ではER $\beta$ mRNA発現は雄に多く見られ、全体の数における違いはなかった。新生ラット雄の睾丸切除または雌子のエストロゲン処理により、この現象は見られなくなり、この現象がエストロゲンによる雌特異的な黄体ホルモン放出誘発の制御に重要な役割を持つと思われた<sup>24)</sup>。視索前野の脳室周辺核の前腹方におけるドパミン、ペプチド、オピオイド作動性神経およびグルタミン酸レセプター・サブユニットの性的二形性が示されているが、この部位に障害を起こすと膣における恒常的な発情状態を招く。ER $\beta$ mRNAはこの部位にER $\alpha$ mRNAと同時発現しており、ER $\beta$ がER $\alpha$ とヘテロダイマーを形成することにより、ER $\alpha$ 応答遺伝子の発現を抑制している可能性があり、前記処理による雌特異性の消失は内分泌かく乱物質の標的のひとつの可能性を示している。

雌雄の区別がない生殖器系から精巣の形

成が時期特異的なアンドロゲンの生合成と作用をとおして雄への性分化を決定づける。アンドロゲンレセプターがリガンド依存性の遺伝子発現調節に重要だが、アンドロゲンレセプターの多形から雄化における障害を部分的に説明できる<sup>27)</sup>。

テストステロンとその代謝物であるエストロゲンへの雌雄胎児脳の曝露が脳の性分化に関与することは知られている。ラット脳の視索道前野の周室核の前腹側 (anteroventral periventricular nucleus) と、内側視索前核 (medial preoptic nucleus) は性的二形を示し、性分化のホルモン制御モデルに使える。これらは周産期の雄において劇的に高いプロゲステロン受容体としての抗原活性を示す。出生前の testosterone propionate あるいは DES への曝露は雌胎児脳におけるプロゲステロン受容体抗原活性を高めるが dihydrotestosterone propionate はそのような活性を示さない。アロマターゼ阻害剤は活性を抑えるが、アンドロゲン受容体アンタゴニストの flutamide は効果がない。すなわち脳内でテストステロンから生成するエストロゲンがこの効果を持つと思われる。<sup>28)</sup>

精巣から時期依存的に適度な濃度のアンドロゲン、抗ミュレリアンホルモン、インスリン様因子が生成することで、雄化が進行する。アンドロゲンレセプターが発現しているにも関わらずホルモン抵抗性の症例からコレギュレータにおける障害が示唆された<sup>27)</sup>。しかし Wnt ファミリーの発生関連シグナル分子が卵巣におけるミュラー管の発達とライディッヒ細胞の分化に役割を果たしているらしい証拠も見つかっている。

#### (4) 低濃度曝露と複合影響の蓋然性の検討

Kortenkamp らは、多種の外因性エストロゲン物質が相当量同時に摂取されている状況にあることから、複合曝露時のエストロゲン活性は無視できない可能性を指摘した<sup>27)</sup>。酵母スクリーンアッセイ (YES) 系を用い、天然の  $17\beta$ -エストラジオールと 11 種類の外因性エストロゲン物質を  $17\beta$ -エストラジオールのそれぞれ 2.5 万倍、5 万倍、10 万倍量で併用投与した時に、活性は相加的なものとして計測されることを報告した。すなわち少なくともこのインビトロ試験系に関する限り、複合曝露時には個々の成分が個別にレセプター結合して示す活性の総和として測定されると報告した<sup>29)</sup>。

しかしこのデータからヒトの現実の曝露状況に外挿するには、試験で用いられた個々の成分濃度と現時点でのヒトの曝露レベルと比較することがまず必要である。たとえばこれら 11 種類の外因性エストロゲン物質のうち YES での活性が 4 番目に強く、NOEC は  $0.038 \mu\text{M}$ 、 $EC_{01}$  は  $0.086 \mu\text{M}$  とされたゲニステインについては、他の外因性エストロゲン物質に比べてはるかに高レベルで日本人に摂取され血中濃度も高いと知られているが、その血中濃度は遊離体と硫酸抱合体を含めた場合で  $0.008 \mu\text{M}$  (その他の抱合体も入れた合計では  $0.276 \mu\text{M}$ ) というレベルであった<sup>30)</sup>。すなわちもっとも高濃度で曝露されていると考えられ、活性も強いとされるゲニステインがこのレベルであった。他の外因性エストロゲンの曝露レベルは、さらに数オーダー低いと考えられ本インビトロ系での加算性データが生体レ



ベルにそのまま適用可能であるとしても、能性が大きい(表4)。その濃度は実際の曝露レベルにほど遠い可

表4 低用量複合曝露の蓋然性について

化合物	In Vitro	Mouse	Human(日本人)	(比率)
Genistein	NOEC 38nM <sup>1)</sup> EC01 86nM		8nM (遊離+硫酸抱合体) <sup>5)</sup> 276nM (遊離+抱合体)	10 <sup>-1</sup> ~1
nonyl phenol	NOEC 0.4μM <sup>2)</sup>		<10nM (痕跡) <sup>3)</sup> 0.1-1μM (commercial human blood samples)*	<10 <sup>-2</sup> * 溶出汚染
4-octyl phenol	NOEC 2.0μM <sup>2)</sup>		<1nM (検出限界) <sup>3)</sup> 2nM (commercial human serum sample)	<10 <sup>-3</sup>
O,p'-DDT	NOEC 0.2μM <sup>2)</sup> =70 ng/mL	NOEC 5-18ng/mL <sup>4)</sup>	1.5-2.2 ng/mL <sup>4)</sup> Japanese in Florida, 1971**	**10 <sup>-1</sup> ~1
β-HCH		NOEC 22-42ng/mL <sup>4)</sup>	0.7-5.5 ng/mL <sup>6)</sup>	10 <sup>-2</sup> ~10 <sup>-1</sup>

1) Rajapakse et al (2002); 2) Payne et al (2000); 3) Inoue et al (2000); 4) Ulrich et al (2000);  
5) Aldercreutz et al (1993); 6) Sasaki et al (1991)

Kortenkamp らのもうひとつの報告<sup>29)</sup>で試験に用いられた4-ノニルフェノールと4-オクチルフェノールの血中濃度については少数例であるが血液中濃度の分析データによれば、それぞれ痕跡(10nM)、また検出限界(1nM)以下であった<sup>31)</sup>。これらの濃度はインビトロ系で試験された濃度範囲以下でそれぞれ最小反応濃度の1-3オーダーより低い濃度である。ただしプラスチックチューブを用いて採血したと考えられる市販の血清または血漿中でも4-オクチルフェノールは1検体のみ2nMで他は検出せず、4-ノニルフェノールは0.1-1μMの範囲にあった。輸血を受ける際には4-ノニルフェノールは一時的にインビトロ系で活性が見られる最小濃度に達する可能性がある。

次にはインビトロ系では、レセプターに独立に結合し作用すると思われた個々の成分による影響が、インビトロ系に組み込まれていないコアクチベータとの相互作用やアрилハイドロカーボンレセプターなど他のレセプターとのクロストークや、生体におけるフィードバックメカニズムの存在下でも起こりうるかが検証される必要がある。

卵巣切除マウスにo,p'-DDT, β-HCH(β-hexachlorohexane)を低濃度曝露(埋め込みsilastic capsuleからの徐放)した時に、子宮上皮および膈上皮の厚さは血中濃度の対数に比例して増加し、かつ増加を示した最も低い血中濃度は一般市民におけるそれらの濃度とほぼ同じレベルであると報告された<sup>32)</sup>。ここで引用された日本人のβ-HCH

血中濃度 (0.7-5.5 ng/mL) は 1986-88 年のデータ<sup>33)</sup>であるが、マウスで子宮上皮や膈上皮の肥厚をもたらした最小濃度 (22-42ng/mL) に比べてほぼ 1 オーダー低かった。また生体レベルでの影響を検出した

この系は卵巣切除により、フィードバックコントロールなどのホメオスタシスが作用しない動物においてであった。

以上の議論を表 5 にまとめたが、これらについて今後さらに詰める必要がある。

表5 低濃度曝露による複合影響の蓋然性の検討課題

- =====
- ・ 試験濃度と実際の曝露濃度の関係 ——>試験濃度にはるかに達しない可能性
  - ・ In vitro系の受容体数と、標的臓器でアクセス可能な受容体数の関係  
——>限られた数の受容体に競合した場合の拮抗阻害の可能性
  - ・ In vitro系にないdown regulation, coregulators との相互作用の関与などによる影響
  - ・ 活性代謝物の時期特異的な標的器官濃度の確認
- =====

#### D. 結論

免疫影響については、妊娠ラットにダイオキシン(2,3,7,8-TCDD)を投与した試験で TCDD による T細胞の障害としてこれまで知られているよりも低用量での影響の報告が見いだされたが、性分化についてはメカニズムの解明が進んでいるが定量的な問題として低用量影響を確定できるような報告は見いだされなかった。個々では微量にせよ、多種の外因性エストロゲン物質が同時に摂取されている状況をベースに、複合曝露による相加的な影響の可能性を指摘する論文があったが、実際の曝露レベルに照らして検討したところ、リスクといえるレベルに達していないと考えられた。

#### 引用文献

- 1) IPCS (2002) Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors, World Health Organization, WHO/PCS/EDC/02.2
- 2) Utsuyama M, Kanno J, Inoue T, Hirokawa K,

Age/sex dependent and non-monotonous dose-response effect of diethylstilbestrol on the immune functions in mice, *Toxicol. Lett.*, 2002, 135(1/2): 145-153

3) Nohara K, Fujimaki H, Tsukumo S, Ushio H, Miyabara Y, Kijima M, Tohyama C, Yonemoto J, The effects of perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on immune organs in rats, *Toxicology*, 2000 154(1-3): 123-133

4) Ito T, Inoue K, Fujimaki H, ohyamaC, NoharaK, mechanism of TCDD-induced syppression of antibody production: effect on T cell-derived cytokine production in the primary immune reaction of mice, *Toxicol. Sci.*, 2002 70(1): 46-54

5) Inadera H (2002) Molecular analysis of the inhibition of chemokine gene expression by xenoestrogens, 第 5 回内分泌かく乱化学物質問題に関する国際シンポジウム (December 2002, Hiroshima) 37

6) van Loveren H (2002) Health effects of PCB's :

- the immune system, 第5回内分泌かく乱化学物質問題に関する国際シンポジウム (December 2002, Hiroshima) 33
- 7) Gray LE, Ostby J, Furr J, Wolf CJ, Lambright C, Parks L, Veeramachaneni DN, Wilson V, Price M, Hotchkiss A, Orlando E, Guillette L (2001) Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals, *Human Reproduction Update*, 7(3): 248-264
  - 8) Weir HK, Marrett LD, Kreiger N et al. (2000) Prenatal and perinatal exposures and risk of testicular germ-cell cancer, *Int.J. Cancer* 87: 438-443
  - 9) Ohlson CG & Hardell L (2000) Testicular cancer and occupational exposures with a focus on xenoestrogens in polyvinyl chloride plastics, *Chemosphere*, 40: 1277-1282
  - 10) Knight JA, Marrett LD, Weir HK (1996) Occupation and risk of germ cell testicular cancer by histologic type in Ontario, *J Occup. Environ. Med.*, 38:884-890
  - 11) Kim Y, Jung K, Hwang T et al. (1996) Hematopoietic and reproductive hazards of Korean electronic workers exposed to solvents containing 2-bromopropane, *J Work Environ. Health*, 22: 387-391
  - 12) Grajewski B, Whelan EA, Schnorr TM et al. (1966) Evaluation of reproductive function among men occupationally exposed to a stilbene derivative, I Hormonal and physical status, *Am. J. Ind Med.* 29, 49
  - 13) Whelan EA, Grajewski B, Wild DK et al. (1996) Evaluation of reproductive function among men occupationally exposed to a stilbene derivative, II Perceived libido and potency, *Am. J. Ind Med.* 29, 59
  - 14) Meyer-Bahlburg HFL, Ehrhardt AA, Feldman JF et al (1985) Sexual activity level and sexual functioning in women prenatally exposed to diethylstilbestrol, *Psychosom.Med.* 47, 497-511
  - 15) Schardein JL (1993) Hormones and hormonal antagonists, In Schardein JL ed. *Chemically Induced Birth Defects*, Marcel-Dekker, New York, pp. 271-339
  - 16) Robaire B, Ewing LL, Irby DC, Desjardins C (1979) Interaction of testosterone and estradiol-17 $\beta$  on the reproductive tract of the male rat, *Biol. Reprod.*, 21: 455-463
  - 17) Wong C, Kelece WR, Sar M, Wilson EM (1995) Androgen receptor antagonist versus agonist activities of fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide, *J. Biol. Chem.* 270: 19998-20003
  - 18) Morikawa K, Tagami T, Akamatsu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, Hataya Kanamoto N, Hataya , Shimatsu A, Kuzuya H. and Nakao K (2002) Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist, *J. Clinical Endocrinol. & Metabol.*, 87 (11), 5185-5190
  - 19) Facciolo RM, Alo R, Madeo M, Canonaco M and Dessi-Fulgheri F (2002) Early cerebral activities of the environmental estrogen bisphenol A appear to act via the Somatostatin receptor subtype sst2, *Environm. Health Persp.* 110 suppl.3: 397-402
  - 20) Al-Hiyasat AS, Darmani H. and Elbetieha AM (2002) Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility, *Eur. J. Oral Sci.*, 110: 163-167
  - 21) Tobet SA Genes controlling hypothalamic development and sexual differentiation, *Eur.J Neurosci.* 2002, 16(3): 373-376
  - 22) Sakuma Y (2003) Estrogen receptor and brain sex differentiation, 第5回内分泌かく乱

化学物質問題に関する国際シンポジウム  
(December 2002, Hiroshima) 57

23) Hrabovszky Z, Hutson JM, Androgen imprinting of the brain in animal models and humans with intersex disorders: review and recommendations, *J.Urol*, 2002, 168(5), 2142-2148

24) Orikasa C, Kondo Y, Hayashi S, McEwen BS Sakuma Y, Sexually dimorphic expression of estrogen receptor beta in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in lutenizing hormone surge, *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99(5): 3306-3311

25) Hughes IA, Lim HN, Martin H, Mongan NP, Dovey L, Ahmed SF, Hawkins JR, Developmental aspects of androgen action, *Mol. Cell Endocrinol.*, 2001, 185(1/2), 33-41

26) Hughes IA, Minireview: sex differentiation, *Endocrinology* 2001, 142(8): 3281-32817

27) Rajapakse N, Silva E, Kortenkamp A Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action, *Environ. Health Persp.* 2002, 110(9): 917-921

28) Quadros PS, Pfau JL, Goldstein AY, De Vries GJ, Wagner CK, Sex differences in progesterone receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation, *Endocrinology*, 2002, 143(10), 3727-3739

29) Payne J, Rajapakse N, Wilkins M, Kortenkamp A, Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens, *Environ. Health Persp.* 2000, 108(10): 983-987

30) Adlercreutz H, Markkanen H, Watanabe S, Plasma concentrations of phyto-estrogens in

Japanese men, *Lancet* 1993, 342(13): 1209-1210

31) Inoue K, Yoshimura Y, Makino T, Nakazawa H, Determination of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human blood samples by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical coulometric array detection, *The Analyst* 125: 1959-1961 (2000)

32) Ulrich EM, Caperell-Grant A, Jung Sin-Ho, Hites RA, Bigsby RM, Environmentally relevant xenoestrogen tissue concentrations correlated to biologic responses in mice, *Environ. Health Persp.* 2000, 108(10): 973-977

33) Sasaki K, Ishizaka T, Suzuki T, Takeda M, Uchiyama M, Accumulation level of organochlorine pesticides in human adipose tissue and blood, *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, 46: 662-669 (1991)

## E. 研究発表

### 1. 論文・図書発表

1) Sekizawa J, Suter G, Birnbaum L, Integrated human and ecological risk assessment : a case study of tributyltin and triphenyltin compounds, *J. Human and Ecological Risk Assessment.* (2003) 9(1): in press

2) 関澤 純(2002)内分泌攪乱化学物質のリスクアセスメントとリスクコミュニケーション、最新医学, 57, 273-278

3) 関澤 純, 第5章 環境ホルモンのヒトへのリスク、「環境ホルモンの基礎と最前線—水環境を中心に—」技報堂出版 (印刷中)