

Toxicology, Oct 30, 2003, Seoul,  
Korea

菅野 純、「トキシコゲノミクスの新展開」、第 26 回日本学術会議トキシコロジー研究連絡委員会シンポジウム 2003 年 12 月 3 日 東京

菅野純、「IGS ラットを用いたトキシコゲノミクス」、CD(SD)IGS 研究会/研究集会 2003 年 12 月 19 日 東京

Jun Kanno “Focusing on Toxicogenomics Research” The 3<sup>rd</sup> International Congress of Asian Society of Toxicology : ASIATOX III February 1-6, 2004, Bangkok / Chiang Mai, Thailand

Jun Kanno, Aisaki Ken-ichi, Atsushi Ono, Katsuhide Igarashi  
“Toxicogenomics using “percellome” and “mille-feuille” data system”  
The Joint International Meeting of The Japanese Society of Toxicologic Pathology (JSTP) and The International Federation of Societies of Toxicologic Pathology (IFSTP) including The International Academy of Toxicologic Pathology (IATP) February 15-18, 2004, Kobe, Japan

菅野 純 「Toxicogenomics の進捗」  
第 240 回 CBI 学会研究講演会, 2004 年 3 月 19 日、東京

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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

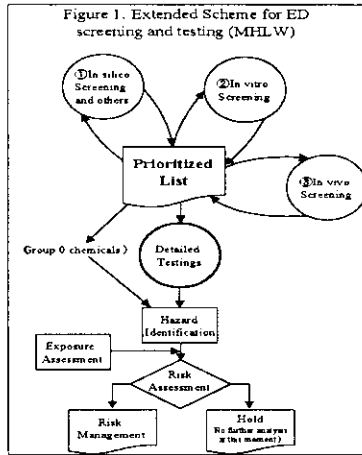


Fig. 1

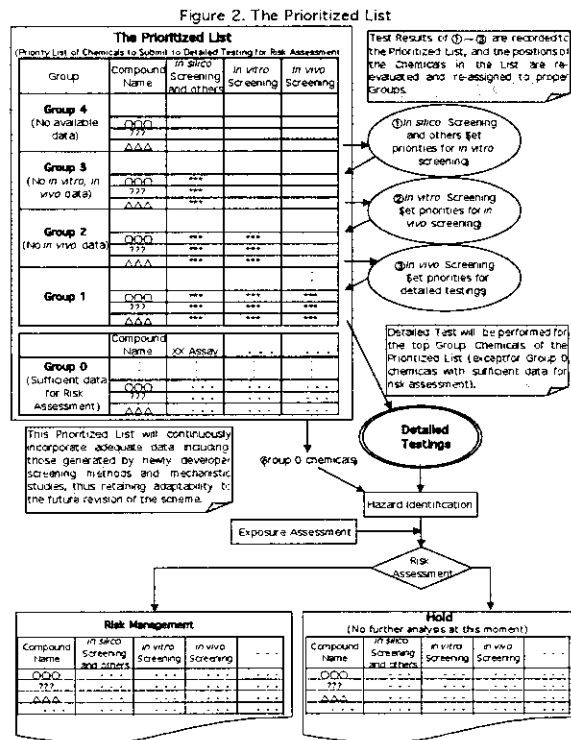


Fig. 2

## 化学物質の内分泌かく乱性を確認する試験法の開発に関する Ad hoc 会合

日 時；2003 年 11 月 11 日（火）11：00～16：00

場 所；東京国際フォーラム ガラスホール 410（G410）

出席者；15 名

今井 清：（財）食品農医薬品安全性評価センター

菅野 純：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部

宮川宗之：（独）産業医学総合研究所

鈴木 勉：星薬科大学 薬品毒性学教室

井口泰泉岡崎国立共同研究機構 総合バイオサイエンスセンター

吉田 緑：（財）佐々木研究所病理部

井上 達：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター

太田 亮：（財）食品薬品安全センター-秦野研究所 病理学研究室

山崎寛治：（財）化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 研究第 1 部

小野 宏：（財）食品薬品安全センター-秦野研究所

五十嵐勝秀：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部

松島裕子：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部

森久保 繁：（財）食品薬品安全センター-秦野研究所

角井一郎 補佐：厚生労働省 医薬局審査管理課 化学物質安全対策室

川嶋 実 主査：厚生労働省医薬局審査管理課 化学物質安全対策室

化学物質の内分泌かく乱性を確認する試験法の開発に関する Ad hoc 会合

### プログラム

日 時；2003 年 11 月 11 日（火）11：00～16：00

場 所；東京国際フォーラム ガラスホール 410（G410）

【開会】11：00～11：10

1. 班長 挨拶 今井 清
2. 厚生労働省 挨拶 角井 一郎補佐、川嶋 実主査

【経過説明】11：10～11：30

### 3. 菅野 純

【神経】 11:30~12:20 司会 今井 清

4. 鈴木 勉 (15+10) ; 神経・行動影響について
5. 宮川 宗之 (15+10) ; 神経・行動影響について

Lunch Time 12:20~13:00

【内分泌・免疫】 13:00~14:25 司会 菅野 純

6. 吉田 緑 (15+10) ; 胎生期・新生児期暴露による遅延型影響
7. 太田 亮 (15+10) ; 胎生期・新生児期暴露による遅延型影響
8. 井口 泰泉(15+10) ; 胎生期・新生児期暴露による遅延型影響
9. 林 良夫 / 菅野 純 (代理) (5+5) ; 内分泌かく乱物質の自己免疫疾患シェーグレン症候群モデルマウスへの影響

Coffee Break 14:25~14:45

【ディスカッション】 14:45~15:45 司会 井上 達

コメンテーター

- 井口 泰泉  
山崎 寛治  
小野 宏  
今井 清

【閉会の挨拶】 15:45~15:50

閉会の挨拶 今井 清

### 議事録 (案)

今井; 本日は、先生方にはお忙しい中、この Ad hoc 会合にご出席頂きありがとうございます。これまで私どもは、6年間、厚生労働科学研究費補助金で化学物質の内分泌かく乱性を確認する試験法の開発に関する研究、今井班を推進して参りました。今回提唱しておりますのは、内分泌かく乱性を「一生涯試験」でみるという試みです。内分泌かく乱性の検討を、2世代試験がありますが、この試験ではとらえることができないことは既に明白です。内分泌かく乱化学物質を胎生期、あるいは新生時期のある一定期間に暴露されたとき、成熟後に遅延性の反応や障害が生ずることは疫学的にも、母親が甲状腺ホルモンが

低下している場合は子に知能低下がみられるなど証明されております。これまでは、一生涯のうち断片的な試験をおこないみてきたわけですが、では、我々の目指す一生涯をみる試験をするにはどうしたらよいのか、専門の先生方にお知恵をお借りしたく今回の会合を企画致しました。どうぞよろしく御願い申し上げます。

本日は、厚生労働省の角井補佐および川嶋主査がおいでにおなっておりますので一言お話し頂ければと思います。

角井；厚生労働省 医薬局審査管理課 化学物質安全対策室の角井でございます。本日は雨の中、ご苦勞様です。

本年度は、今井班は、6年間の節目を迎えるわけで、内分泌関係の研究は、スクリーニング試験、メカニズムを検討する研究等々、14回開催しています。今後、内分泌かく乱化学物質をどの様なスケジュールでやったらよいのか、2005年を目処に確認試験の開発に向けて頑張ると言うスケジュールをすでに決めております。この確定試験は他国からも注目を浴びております。

今井；では、最初に菅野先生か一生涯試験を計画した経過を詳しくお話しして頂きます。

菅野；内分泌かく乱関係の班として、スクリーニング試験を開発する「菅野班」、メカニズムを検討する「井上班」、化学物質の内分泌かく乱性を確認する試験法を開発する「今井班」が有ります。今井班は、今年度でこれまでのテーマをが修了致しますので、現在、向こう3年間のテーマ出汁を考えているところです。

#### 菅野先生発表

今井；では、何かご質問がありましたらお願い致します。

よろしいでしょうか。菅野先生の説明によりどんな試験が必要かおわかりになったと思います。

では、鈴木先生お願いします。

鈴木；星薬科大の鈴木です。よろしくお願い致します。発表を頼まれたのですが、具体的なことが分からなくて、今回菅野先生のお話を聞いてようやく分かってきた次第です。私は、白井班で3年間、その前は福島班で1年間やっていました。

我々の試験をお話し致しますと、Bisphenol A を用いました。試験は、成熟後に投与しても変化がなかったので、胎児期に焦点を当てることにしました。

福島先生のアイデアで雄は、交配の2日前からBPAを処置しております。BSAを0.002, 0.5, 2mg/g foodで母親に与え、仔は成熟後に行動変化をみるのですが、行動変化だけで変化を捕らえるのは難しい。アゴニストなどで付加試験をかけてやると感度が良くなります。ラットをこのようなケージに置き、60分間の馴化時間をおいてから、morphineという薬物を処理して変化をモニターします。BPAは行動変化がみられました。

パラメーターとして、Head movement, sniffing, Aggression, straub tail, circling, Spining syndrome の行動変化をみます。4段階でドーパミンに関わる行動をスコアリングしました。BPA では、一番低い用量から行動異常が見られたので、その付加試験をしました。Methamphetamine はドーパミンを誘導します。Methamphetamine+BPA は相加効果がみられた。

黒い箱は、床がスリッピーになっており、白い箱は床がザラザラしています。この報酬効果の測定では、視覚と感触の面からテストします。これを6日間繰り返し、薬物を投与した動物がどちらを好むのかをみます。Methamphetamine の 0.5mg/kg は精神依存をおこさない量ですが、そこに BPA を付加するとこのように有意に上昇します。

ドーパミンがターゲットなので receptor の機能をみて G 蛋白にリンクしたもの、BSP は機能こうしんが起こる。D1 の mRNA を測定すると BPA では上昇しており、D1 系を介することが分かる。

さらに、どの時期に投与することが重要なのかを4つの時期に分けて検討した。その結果、

	自発運動促進作用	Morphine 誘発報酬効果	Methamphetamine 誘発、報酬効果	Dopamine-induced G 蛋白活性
妊娠 0-7d	→	→	→	↑
妊娠 7-14d	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
妊娠 14-分娩	→	→	→	↑
分娩 - 生後 14d	↑↑	↑↑	↑↑	↑

このように妊娠初期と、生後すぐの投与が効果的であることが分かった。

この考察として神経ネットの構築が授乳期に当たり、授乳期の暴露は変化を受けやすいのけはないかと思われる。

今井；ありがとうございました。ご質問を御願います。

菅野；サンプルは、ホールブレインですか？

A;分割してます。皮質をはずして、

Q;この ddY マウスの系統でないと駄目でしょうか？

A；おそらく大丈夫と思うが、駄目か大丈夫かは分からない。

Q;BSP 以外の弱いエストロゲン物質はやってますか。

A;これはエストロゲンを介さない変化と考えています。BPA にはエストロゲン作用もありますが、エストロゲンを介さない BPA 受容体が有ると考えています。

Q;そうすると BPA リガント選択性、あいてにするグループの化合物はみていますか

A;ノニルフェノールが同じようです。これをやる必要があると思いついています。

Q；ERKO マウスでこれらの所見が消えるかはやってますか？

A;やっていません。17β-estradiol ではこのようなことはみられなかったのです。

Q:DES ではどうですか？E<sub>2</sub> は血中蛋白とバインドするので胎児への影響が弱いのでは無いでしょうか。DES は血中でバインドしなくフリーなので我々の実験では DES を用いています。B6 マウスでやってみるのはどうでしょうか。

角井；ヒトにはどの様な影響があるのでしょうか？

A;学級破壊、第3次薬物乱用に若干関与しているのではと思います。

井口；こんなに少ない量が本当に脳に入ってみれるのでしょうか？

A;うちの大学に分析の中沢教授がいて、胎児の脳は小さいので、胎児全部をホモジナイズして濃度を測ったところ、濃度が上がっていた。

井口；エストロゲンを投与すると青班核はどの様に変化するのか？雌雄差はあるのか？

A;これだけのことを雌雄に分けて実験するのはパワー的にも、経済的にも難しく、みていません。

今井；青班核に関して何かありますか？

A；不安を引き起こしやすくなる。

山崎；匹数は毒性でどのくらいとれますか？

A;行動試験は10匹前後おく。脳は4~6匹、雄性で実験してます。

今井；宮川先生引き続きお願い致します。

宮川；この会での発表形式をどの様にするかよく分からなかったため、今日は、試験をどの様にするかというデータを持ってきました。私は、労働省なので、神経毒性が主なテーマです。

宮川先生 発表

今井；ありがとうございました。質問をお願いします。

Q;BPA 以外ではやっていますか？

A; 行っておりません。

Q；これは先ほどの鈴木先生のお話ですと、BPA はエストロゲン以外の BPA 受容体があり、それを介した行動異常を起こすということですが、宮川先生のこの実験はエストロゲンレセプターを介するのですか？ポジコンは？

A;神経毒性の測定法がきちんと行われている方が重要であるので、メカニズムの面からポジコンを入れるより重要と考えている。

菅野；この班で来年度から研究をして頂く様になるとするとエストロゲンをポジコンの非取るに入れて頂きたい。

昼食

今井；では、吉田先生、ご発表をお願いします。

吉田先生発表

呑竜ラットを用いオクチルフェノールを 100mg/kg 皮下投与.

新生時期から 5 日齢、または 15 日齢まで投与し、子宮がんをみるため 15 ヶ月例までみた。また、子宮がんの誘発を高めるため、11 週齢で ENNG の initiation をかけた。

ホルモンとして FSH, LH を測定した。15 日齢まで投与した群は下がっていたが、5 週齢投与では対照群と同じであった。

子宮腺の形成は生後 2 週目から形成され、15 日間投与では子宮腺の形成が下がっていたが、5 日齢までのものは対照群と同じであった。

ER $\alpha$ は 15 値に例のものは乾湿で下がり、上皮であがっていたが、5 日齢のものは対照群と変わらなかった。

ところが、性周期は呑竜ラットは 4 ヶ月齢から持続発情がみられるようになる。5 日齢投与では、長期期間の観察で、子宮がんの自然発生が上昇し、性周期の乱れが早くおきることで視床下部、脳下垂体の経路に何らかの影響を及ぼすものと考えられる。

菅野；吉田先生ありがとうございました。質問をお願いします。

今井；今回は 100mg/kg と大量暴露ですが、用量を下げたのはみていますか？

A;25 および 50mg/kg を投与し、半年みましたが、変化はありませんでした。例数が少なかったとも考えられますが。

山崎；呑竜ラットは子宮がんが出やすい系ですが、これと同じプロトコールで他のラットの系では同じことがみれるのでしょうか？

A；持続発情は他の系のラットでもなります。

今井；井口先生、生理的な量をどのくらい超えると遅延性に生体に変化がでるのでしょうか？

井口；だれも分からないと思う。

菅野；加齢変化はラットは卵巣依存、マウスは視床下部依存だったのでしょうか？

菅野；閾値は（何の閾値だったのだ書いていませんでした）どすんと無くなるのか、あるいはだらだら続くのでしょうか？

井口；短期でみればあります。長期に最後までみたという実験がないので長期のことは分かりませんが。

菅野；では太田先生お願い致します。

太田先生発表。これまでの実験を見直したところ、データのばらつきが見られ、これはラットの系統差がデータに影響を及ぼしているのではないかと考え、インブレットで実験



しました。

食薬センターで保持されている SD ラットの HAA 系と LAA 系について検討しました。ゲニスタイン 5mg/kg をそれぞれの SD ラットに妊娠 17~離乳まで投与し、5 週齢時に、オープンフィールドでみました。片方の性で移動距離が上奏しました。排糞数は雄で上昇、雌で対象群と同じでした。回避学習試験は、床に電気が流れるのですが、これは、雌の法が成績が良く、系統差がありました。回転籠を使った試験では、系統差が有りました。Vaginal opening は系統差がありました。

菅野；太田先生ありがとうございました。ご質問をお願いします。

井上；系統差はどの様に違うのですか。

A；食薬センターの秦野で SD の中で 2 つのストレインがある。

宮川；ハイアボイダントとローアボイダントは何で選んだのか？

太田；菅野先生にお聞きしたいのですが、私のこのプロトコールに途中に子宮肥大試験や Harshbergar 試験をいれてみましたが、有効でしょうか。

菅野；子宮肥大試験というスクリーニングをした後に、確定試験をするわけですからデータは既にでているので二重になると思いますが。

太田；いえ、そうではなく、この動物は胎生期等に chemical を投与しているので、視床下部からの指令がみだれていたり、卵巣機能が働かなくなっているのです、そこに E2 を投与すると何か意味のあることが分かるかなとのことですが。

吉田；感受性が変わるのがみられると思いましたが。

菅野；では井口先生お願い致します。

井口先生ご発表。

菅野；井口先生ありがとうございました。質問をお願いします。

井上；。マウス B6 なら KO とか使えるので良いかなとも思うが。しかし、マウスはリンパ球系の病気が増加するので、バックグラウンドをしっかりとみないと chemical 投与であるのか否か混在してしまう。

Dr.パトリシアハンターの論文に、アルカリ洗剤で動物のケージを洗浄したケージに、マウスを入れたところ、縞々になった。染色体は普通には、きれいに分離するが、この洗剤によりアネupロイディが正常では 2%のところ 10%以上となった。

染色体のアネupロイミーは in vivo ではみてますか。

井口；やっています。

井上；このアネupロイミーはすぐにでますよね。Chemical によりアネupロイディがでる染

色体が異なる。先ほどの、総産仔数をみるのはデュポンの研究ですよね。母親に chemical を投与して、その仔にまた、仔を生ませる。

菅野；用量は低いところから出しているが、DES なら 1/10000 でみるのかな？

調べるのを忘れましたが、NCTR の変則 4 世代試験では〇〇。

井上；5 世代でしたよね。これには chemical 全部が入っています。

今井；新生児の 1 回投与と、7 回投与では dose は total で同じになるのですか。

井口；同じ量を、1 回あるいは 7 回投与しています。

菅野先生、林先生の発表

### 総合討論

井上；私は、遅れてきましたので全体のディスカッションができるかどうか、ご協力下さい。Ad hoc 会合では、既にご発表があったように神経、免疫、行動、内分泌の全体に渡るものがみられないかというのが趣旨ですが、特種な動物を用いている実験もありますが、切り離して、独自に成果を上げていくのも必要です。この点に焦点をあてれば、同じ系の中で実験ができると思う。

各先生の実験からは統一できないような問題もありそうですが、投与時期は統一できるのかな？全体を振り返って、繰り返しても結構ですのでご意見を伺いたい。

今井；経胎盤的に投与すると、本当に胎児にいつているのだろうかと不安なので、new born に投与した方が良いのではないかということですが、免疫は可能なようですが、神経経はどうでしょうか。

鈴木；やったことがないのでよく分かりませんが、例があるので可能は可能です。

井上；胎児に入ったことを確認することは必要である。ネズミは早産であり、形態形成はまだ終了していない。

菅野；新生時期に集中させても良いような気がするが。

宮川；PCB を投与している者には post netal だけでは考えられない。

菅野；全部経母で、しかし、ラジオアイソトープで胎児への移行をみる。

井口；一腹 1 unit となるので匹数が大きくなる。

井上；同腹効果はあるという前提で行うのか。

菅野；n は母親の数ですよね。

井口；私の実験では、以前、同腹でやってみて良い結果が出たので、母親を増やしたところ影響が無くなったりした。同腹効果というよりも個体差である。

井上；同腹効果より、個体差が大きいことになる。

行動はランダムセレクションをみる？

菅野；神経は同腹効果があると思う。親を 10 匹以上とり仔は雄 4 匹、雌 4 匹あれば良

い。

井上；では、ラットかマウスかという問題はどうでしょう。

山崎；性周期はマウスではわかりにくく重量なども、下垂体等をはかるのはマウスでは難しい。ホルモンをはかるときも量がとれない。

井口；性ホルモンを測るといのは本当に必要ですか。性ホルモンは良い指標とはならない。

井上；系統はどうでしょうか

宮川；学習行動試験もマウスのバックグラウンドデータは少ない。一般には、ラットで行動試験をやっている。オープンフィールドもラットとマウスでは全く異なるデータとなる。

鈴木；実験によりマウスあるいはラットということになるのでは。

井上；神経行動以外では、ホルモンをみるのにラットでないと量的な問題からどうしようもなくなるとなると、ラットかな。

菅野；BPA のレセプターた有るとい鈴木先生のお話があったが、エストロゲンの影響かもしれないとなると ERKO マウスをもちいれば、その問題は解決するわけで、マウスを用いることにより、いろいろな KO マウスを使えるようになるので、マウスを推奨したい。

井上；とりあえず、菅野先生はマウスで、そのほかラットの方が都合の良い先生はラットということで、平行して進めていっては遅すぎますか？

菅野；背景に、KO も取り入れられるというマウスの方がよいのでは。

井口；ここでマウスを使うのは良いが、世の中が神経行動試験にマウス使ったことを認めてくれないと困るし、シャットアウトされてしまう。

菅野；将来を見越すとマウスに移行しても良いのではと思う。呑竜ラット系のものでも子宮がん好発系のマウスを探せば有る可能背がある。

今井；性周期にこだわるのは、屠殺しなくとも継続的にみれるということで、このメリットは非常に大きい。性周期がマウスでは難しいということであるとラットを用いることになる。

井上；マウスだけ、あるいはラットだけでやろうというのは良くないのかもしれない。ラットについても必要なデータは取らないといけないし、ラットではとれないデータもあるのでマウスと平行して進めていく方針ではどうでしょう。ラットを念頭に置くとラットの系は呑竜に統一するのか？どうするか。

吉田；我々は子宮がんをみたいために子宮がん好発系の呑竜を使っているが、性周期でみるなら他の系でもみれる。

井上；どんな動物も思春期を早めると死が早まるのは周知のことです。どんな系がよいのか、行動神経系はどの系がよいのでしょうか。

山崎；呑竜ラットは特種という気がします。メリットは子宮がんができることぐらい。

井上；わざわざ特種な系を使いたくは無いよね。

吉田先生には引き続き呑竜ラットを使ってもらうが、他の人は・・・。

今井；太田先生の試験は、かなり全体をも一裸子ているので、太田先生の試験のラットがよいのでは。何を使っていたっけ。

太田；SD です。私の試験系はストレインは関係なくラットで有ればよい。

山崎；SD が良いですね。F344 ではクレストファレス（？）がみれない。

宮川；わたくしも SD を使っています。

井上；投与時期は pot natal を共通に使えますね。では、投与経路は、経口あるいは皮下がよいでしょうか。

菅野；確定試験なのでヒトと同じにするという意味からも経口がよいと思う。

井上；実験本意で考えて良いと思うが。

菅野；本日はありがとうございました

### ●井上先生板書（白板）

#### 投与経路

胎児に確実に到達させる

合成

↑

RI ラベルした BPA 等を合成し、胎児に到達したかを確認する。

投与時期            potnatal を主とする

☆ 器官形成期も神経行動については解析する

#### 動物

マウス・・・・・・C57BL/6 を用い、本班の主流とする。

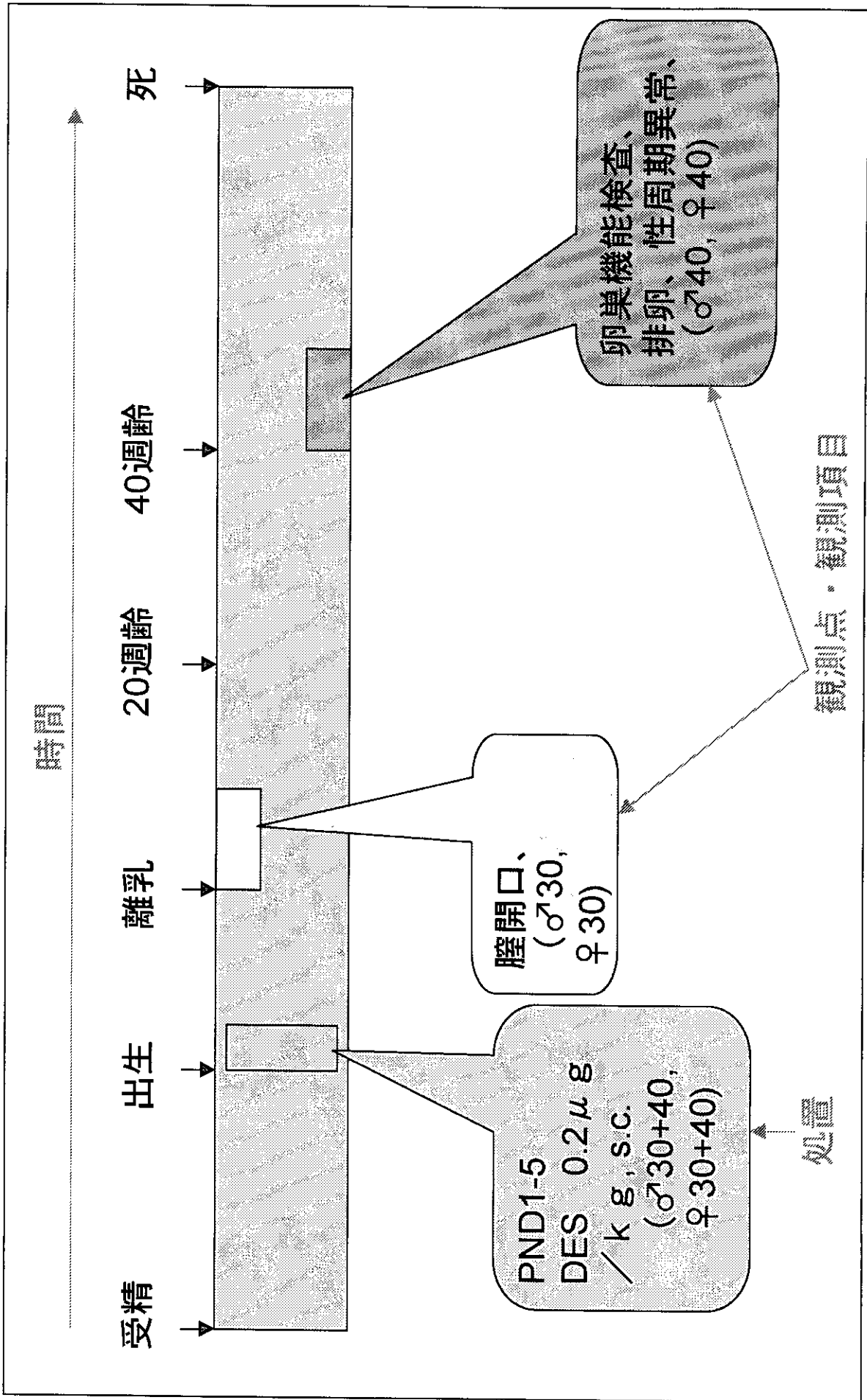
ラット・・・・・・SD を、ただし、子宮がんとうの Donryu を用いた方が良い研究にかんしては他の系統を用いる

結論、マウスかラットかと、どちらかに絞ることは現段階では難しい

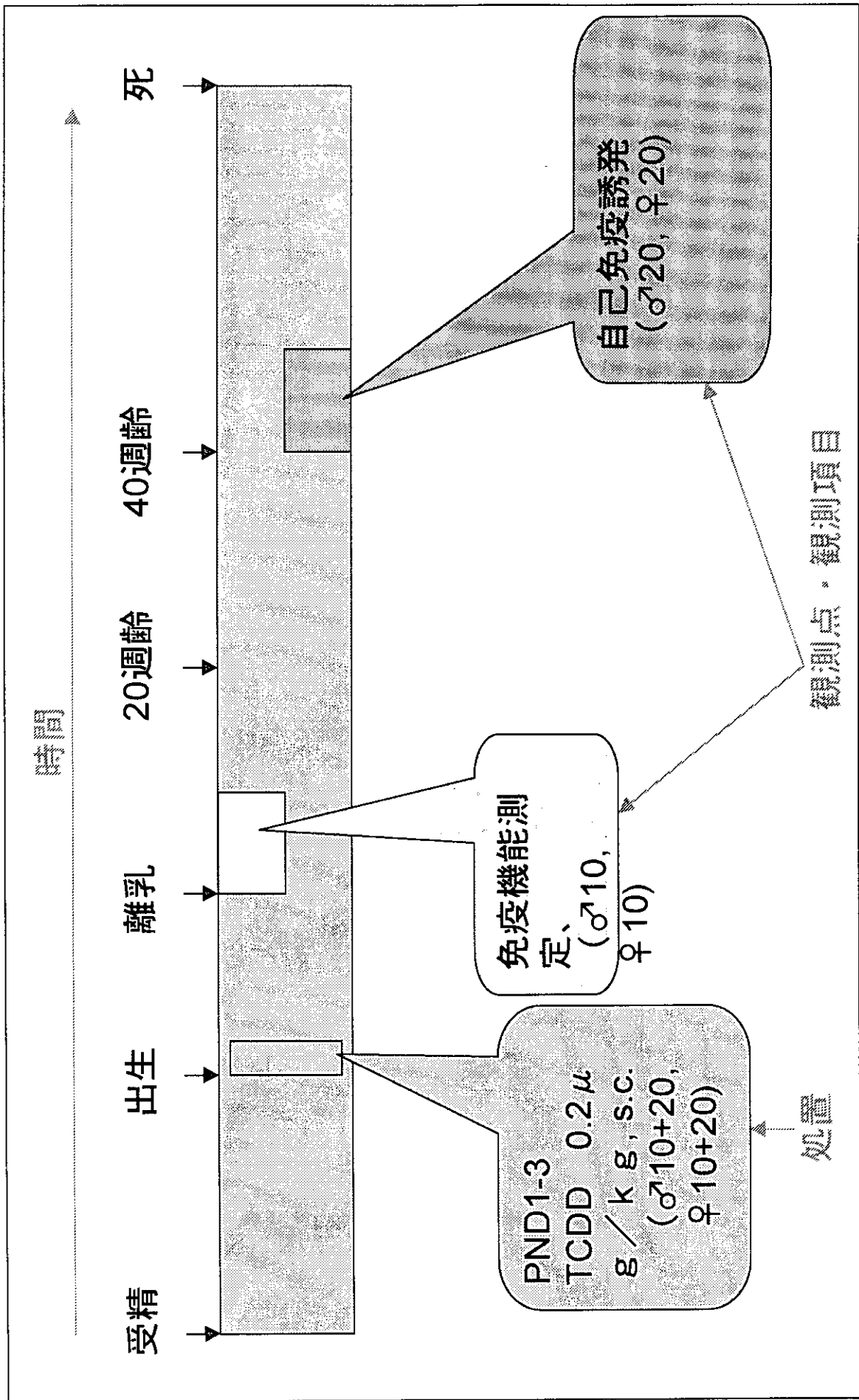
動物数； 親  $> 10 + \alpha$  ← 1 群 10 匹以上とする。

そのために母体投与であれば親の数はこれだけ必要

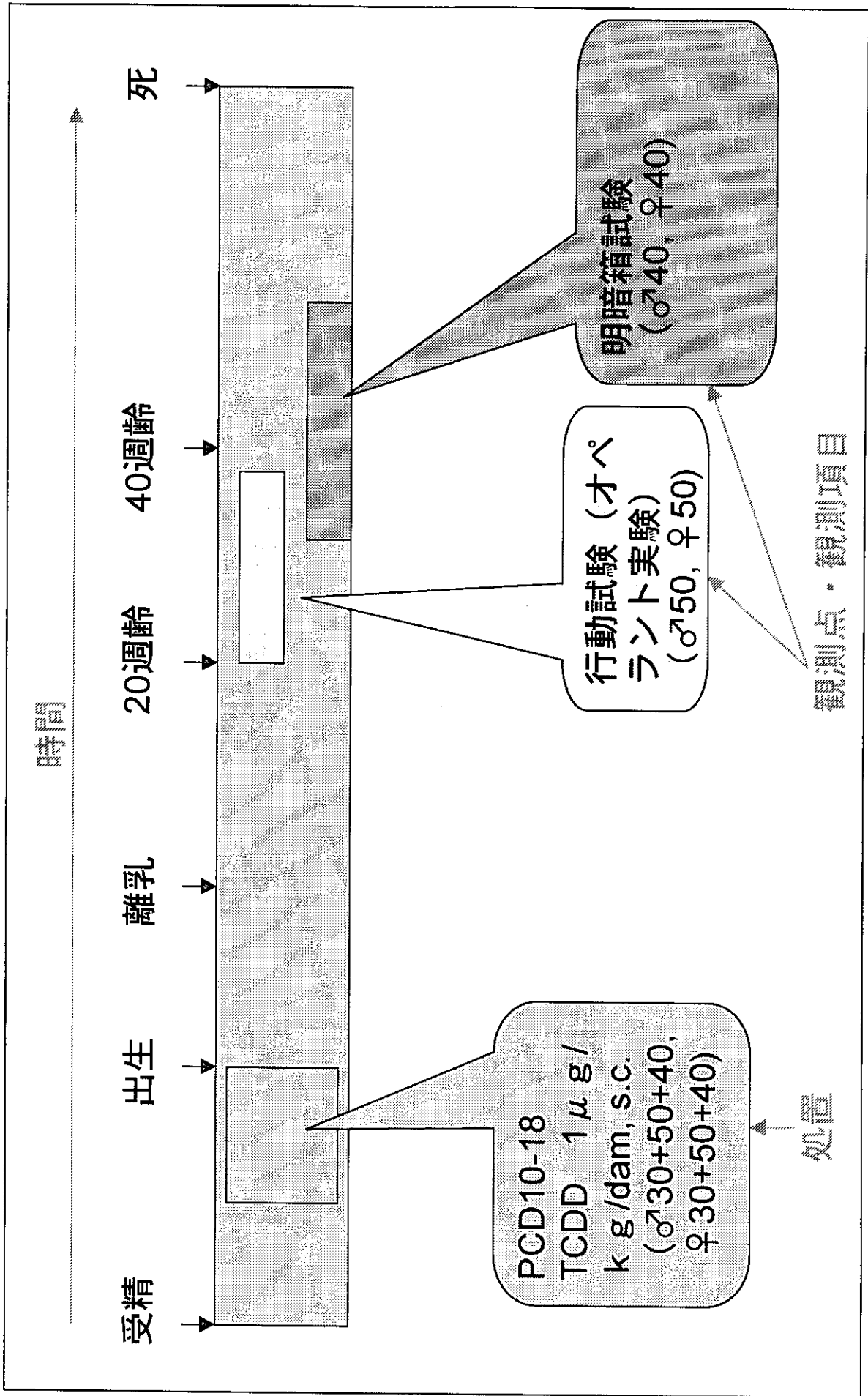
# A先生 (生殖機能)



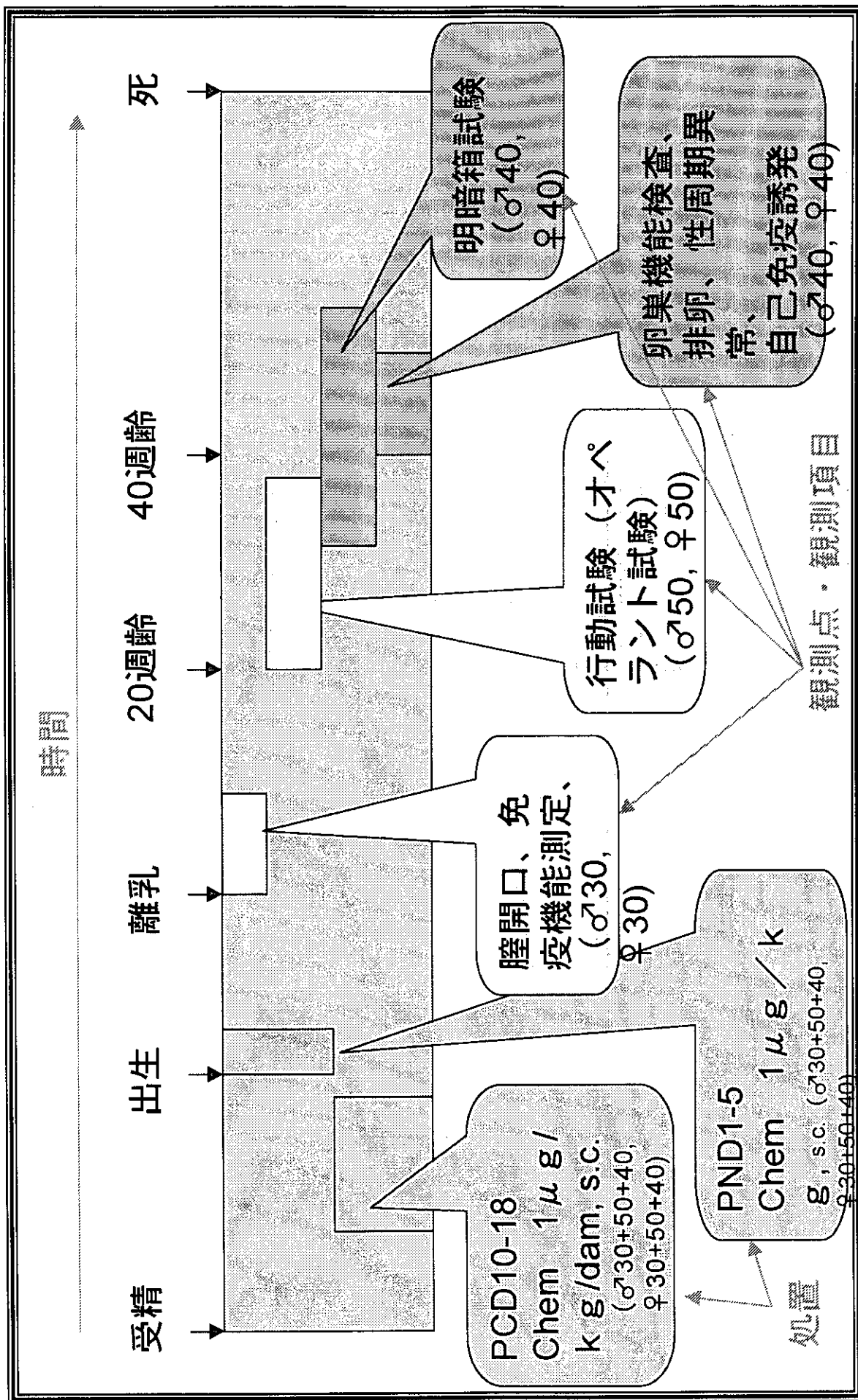
# B先生 (免疫機能)



# C先生 (神経行動)



# A+B+C先生





## (1) 〈プレスクリーニング系追加開発〉

### 2. 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—

分担研究者 ○西原 力、西川淳一、長田茂宏 大阪大学大学院薬学研究科 教授

研究要；E2 との共存下に培養細胞レポーター遺伝子試験を行うことにより、酵母 Two-Hybrid 試験〔ER-TIF2 系〕では陰性であった物質中、3 物質に E2 作用を促進する物質が検索された。また、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ をはじめとした 17 種類の核内レセプターについて酵母 Two-Hybrid 試験の系を作成した。その結果、いくつかの物質が複数のレセプターと反応することを見出した。

#### A. 研究目的

本来、体内には 17 $\beta$ -Estradiol (E2) が存在することから、内分泌攪乱 (ED) 物質のスクリーニングも E2 共存下に行う必要がある。すなわち、E2 作用促進物質や抑制物質である。そこで、前年度、私たちが開発した酵母 Two-Hybrid 試験 (ER-TIF2 系: Fig. 1) で E2 作用抑制物質を検索し、hexachlorophene (HCP)、menadione (K3) および pentachlorophenol (PCP) の 3 物質を報告した。今年度は E2 促進物質を検索した。

ヒトゲノム解析によりヒトでは 48 種類の核内レセプターが存在することが明らかにされている。ある種の化学物質は ER だけではなく、PXR と結合して作用を顕すことを前年度明らかにした。そこで、酵母 Two-Hybrid 試験で性ホルモンレセプターの系に加えてリガンド既知の他のレセプターの系を作成し、各種化学物質についてアゴニスト活性を測定した。

#### B. 研究方法

環境省がリストアップしている ED 作用

が疑われる物質および関連物質のうち、アンタゴニスト活性を示さなかった物質 50 種類について、酵母 Two-Hybrid 試験 (ER-TIF2 系) と培養細胞 (MGF-7) レポーター遺伝子試験で E2 共存下にエストロゲン様活性を測定することにより、E2 作用促進物質を検索した。

ヒト核内レセプターのうちリガンドが明らかにされているレセプター 17 種類について、ER-TIF2 系に準じて試験系を作成し、試験系の確立を確認したのち、ED 容疑物質 23 種についてアゴニスト活性を測定した (Table 1)。

#### C. 研究結果

E<sub>2</sub> 作用促進物質を Yeast Two-hybrid 試験によりスクリーニングしたが、検索できなかった。しかし、乳がん細胞 MGF-7 を用いたレポーター遺伝子試験で E2 共存下にエストロゲン様活性を測定したところ、7-benzyloxy-4-(trifluoromethyl)-coumarin (BFC)、1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) および 2-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride (CNBT) が検索さ

れた (Fig. 2)。中でも CDNB は 5  $\mu$ M で 1 nM E2 の活性を 4 倍程度増強した。なお、これらの物質は単独ではエストロゲン作用を示さず、ER との結合性もなかったことから、ER と E2 の相互反応には直接関係のない経路、例えば MAPK 経路で、その作用を顕わしたと推定された。

17 種類 (ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、PR、AR、GR、MR、RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 、RAR $\gamma$ 、TR $\alpha$ 、TR $\beta$ 、VDR、RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、RXR $\gamma$ 、FXR、CAR) の核内レセプターの系について酵母 Two-Hybrid 試験系を作成し、既知リガンドによりその反応性や感度を確認したのち、Table 1 に示した ED 容疑物質を中心とした 23 物質について網羅的にアゴニスト活性を測定した。その結果、No. 1、No. 3、No. 4、No. 5 の 4-alkylphenol 類や No. 18 (benzophenone)、No. 8 の DES は、強さに強弱はあるもの、ERs だけではなく、RARs や RXR、CAR にも結合し、また、No. 21 と 22 の有機スズ化合物は RXRs と強く反応した (Fig. 3)。

#### D. 考察

前年、ER に対する E2 作用抑制物質として 6 物質を検索したが、今回 E2 作用促進物質として検索された 3 物質についても共通な部分構造は明確ではない。これらは ER のリガンド結合部位に結合するのではなく、その他の部分と相互反応したり、ER とは関係のない経路、例えば MAPK 経路で作用したりするためと考えられた。

単一物質が複数のレセプターの系でアゴニスト活性を示す例を酵母 Two-Hybrid 試験 (PXR 系) で示したが、今回作成した系においても多数検出された。特に CAR は多くの物質と反応し、ED 作用にも関与してい

る可能性が示唆された。また、化学構造上でも物理化学的性状でも全く異なる有機スズ化合物が 9-cis-retinoic acid とほぼ同等の強さで RXR を介して転写活性化した。これらに関しては今後さらに詳細な作用機構の検討が必要である。

これらの事実は内分泌攪乱作用を評価しようとする場合、EDs が RXR 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、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、in vitro 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 E2 共存時には陰性であるが、MCF-7 培養細胞を用いたレポーター遺伝子試験により E2 の作用を促進する物質が検索された。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に RXR などの核内レセプターにも結合し、ED 作用を示す可能性を示した。

#### F. 健康危険情報

無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 西川淳一、間宮 聡、金山知彦、西原 力: 内分泌攪乱物質の核内受容体ファミリーを介する作用発現. *J. Environ. Biotechnol.*, **3**, 37-42, 2003.

- E. Mikamo, S. Harada, J. Nishikawa & T. Nishihara: Endocrine Disruptors Induce Cytochrome P450 by Affecting Transcriptional Regulation via Pregnane X Receptor. *Toxicol. & Appl. Pharmacol.* **193**, 66-72, 2003.
- T. Kanayama, S. Mamiya, T. Nishihara & J. Nishikawa: Basis of a High-Throughput Method for Nuclear Receptor Ligands *J. Biochem.* **133**, 791-797, 2003.
- K. Eguchi, M. Ozawa, Y.S. Endoh, J. Nishikawa, T. Nishihara, K. Goto, & H. Yoshimura: Validity Test for a Yeast Two-Hybrid Assay to Screen for Estrogenic Activity, and Its Application to Insecticides and Disinfectants for Veterinary Use. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **70**, 226-232, 2003.
- E. Mikamo, S. Harada, J. Nishikawa, & T. Nishihara: Methoxychlor Induces CYP2C11 to Convert Itself into Hormonally Active Metabolites. *J. Health Sci.*, **49**, 229-232, 2003
- Y. Kawamura, Y. Ogawa, T. Nishimura, Y. Kikuchi, J. Nishikawa, T. Nishihara, & K. Tanamoto: Estrogenic Activities of UV Stabilizers Used in Food Contact Plastics and Benzophenone Derivatives Tested by the Yeast Two-Hybrid Assay. *J. Health Sci.*, **49**, 205-212, 2003.
- M. Nishizuka, E. Arimoto, T. Tsuchiya, T. Nishihara, & M. Imagawa: Crucial Role of TCL/TC10bL, a Subfamily of Rho GTPase, in Adipocyte Differentiation, *J. Biol. Chem.* **278**, 15279-15284, 2003.
- S. Takatori, Y. Kitagawa, G. Miwa, J. Nishikawa, T. Nishihara, H. Oda, H. Nakazawa, & S. Hori: Estrogenicity of Metabolites of Benzophenone Derivatives Examined by a Yeast Two-Hybrid Assay. *J. Health Sci.* **49**, 91-98, 2003.
- Y. Kitagawa, S. Takatori, H. Oda, J. Nishikawa, & T. Nishihara: Detection of Thyroid Hormone Receptor-Binding Activities of Chemicals Using a Yeast Two-Hybrid Assay. *J. Health Sci.*, **49**, 99-104, 2003.
- M. Tsuzuki, A. Inoue, Y. Takimoto, & T. Nishihara: Using Simulation Models to Assess the Ecological Risk of Pesticides to Aquatic Organisms *J. Health Sci.*, **49**, 249-259, 2003.
- H. Nakayama & T. Nishihara: Discovery of Anti-Infective Drugs Using Genome-Based Technologies, *Biocont. Sci.*, **8**, (2), 43-54, 2003.
- M. Yasui, S. Shibasaki, K. Kuroda, M. Ueda, N. Kawada, J. Nishikawa, T. Nishihara, & A. Tanaka: An Arming Yeast with the Ability to Entrap Fluorescent 17 $\beta$ -Estradiol on the Cell Surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 329-331, 2002.

- M. Okuno, E. Arimoto, M. Nishizuka, T. Nishihara, M. Imagawa: Isolation of up- or down-regulated genes in PPAR $\gamma$ - expressing NIH-3T3 cells during differentiation into adipocytes. *FEBS Letters* 519, 108-112, 2002.
- M. Nishizuka, T. Tsuchiya, T. Nishihara, & M. Imagawa: Induction of Bach1 & ARA70 gene expression at an early stage of adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells. *Biochem. J.*, 361, 629-633, 2002.
- A. Tanabe, M. Kurita, K. Oshima, S. Osada, T. Nishihara, & M. Imagawa: Functional Analysis of Zinc Finger Proteins That Bind to the Silencer Element in the Glutathione Transferase P Gene. *Biol. Pharm. Bull.* **25**. 970-974, 2002.
- N. Nishiyama & T. Nishihara: Biodegradation of Dodecyltrimethylammonium Bromide by *Pseudomonas fluorescens* F7 and F2 Isolated from Activated Sludge. *Microbes & Environ.*, **17**, 164-169, 2002.
- A. Kitamura, M. Nishizuka, K. Tominaga, T. Tsuchiya, T. Nishihara, & M. Imagawa: Expression of p68 RNA Helicase Is Closely Related to the Early Stage of Adipocyte Differentiation of Mouse 3T3-L1 Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 435-439, 2001.
- M. Nishizuka, K. Honda, T. Tsuchiya, T. Nishihara, & M. Imagawa: RGS2 Promotes Adipocyte Differentiation in the Presence of Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.*, **276**, 29625-29627, 2001.
- L. J. Forney, W.-T. Liu, J. B. Guckert, Y. Kumagai, E. Namkung, T. Nishihara, & R. J. Larson: Structure of Microbial Communities in Activated Sludge: Potential Implications for Assessing the Biodegradability of Chemicals. *Ecotox. Environ. Safety*, **49**, 40-53, 2001.
- 黒木広明、米倉さゆり、迫田智子、藤野恭子、中岡ひとみ、荒牧弘範、古賀信幸、西川淳一、西原力: 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.
- S. Arai K. Ogawa, S. Yamachika, T. Nishihara, J. Nishikawa: Cloning and functional characterization of chicken p160 coactivator family members. *Biochim. Biophys. Acta*, **1518**, 7-18, 2001.
- 白石不二雄、白石寛明、西川 淳一、曾家義博、佐野友春、彼谷邦光、西原力、森田昌敏: 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.