

200941008A

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

受容体アッセイ4種からなるヒト核内受容体48種  
すべてに対する化学物質リスク評価スキームの構築

平成21年度  
総括・分担研究報告書

平成22(2010)年4月

研究代表者  
九州大学大学院理学研究院化学部門

下東 康幸

# 目 次

|   |    |
|---|----|
| I. 総括研究報告   |    |
| 受容体アッセイ4種からなるヒト核内受容体48種すべてに<br>対する化学物質リスク評価スキームの構築<br>下東康幸-----               | 1  |
| II. 分担研究報告  |    |
| 1. 核内受容体RAR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 型に対する化学物質の受容体応答解析<br>下東康幸・劉 暁輝----- | 33 |
| 2. 核内受容体PPAR $\gamma$ 型に対する化学物質の受容体応答解析<br>酒井大樹-----                          | 39 |
| 3. 核内受容体・構成的アンドロスタン受容体CARに対する<br>化学物質の受容体応答解析<br>酒井大樹-----                    | 47 |
| 4. ヒト・エストロゲン受容体 $\alpha$ に対するビスフェノールA<br>関連物質の結合スクリーニング<br>松島綾美-----          | 53 |
| 5. 核内受容体コンホメーション変化センシング抗体アッセイ<br>野瀬 健-----                                    | 61 |
| 6. 神経分化におけるビスフェノールAの内分泌攪乱作用の解析<br>-ショウジョウバエの株化ニューロンを実験モデルとして-<br>下東美樹-----    | 67 |
| 8. エストロゲン受容体 $\alpha$ 型のビスフェノールA誘導体のX線結晶<br>構造解析<br>松島綾美-----                 | 73 |
| 9. 複数の鋳型を用いたドッキング計算によるリガンド結合性解析<br>野瀬 健-----                                  | 77 |
| 10. エストロゲン関連受容体 $\gamma$ の変異受容体による化学物質結合<br>部位解析<br>劉 暁輝-----                 | 81 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----  | 87 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷-----  | 89 |

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総括研究報告

受容体アッセイ 4 種からなるヒト核内受容体 48 種すべてに対する  
化学物質リスク評価スキームの構築

研究代表者 下東康幸 九州大学大学院理学研究院教授

研究要旨

本研究課題では、受容体結合試験、センシング抗体法、レポーター遺伝子試験、Two-hybrid 試験のアッセイ 4 種を適用する統合的な化学物質評価スキームを構築することを目的とする。これにより、より詳細な *in vitro* および *in vivo* 試験に供すべき化学物質のリストアップ、順位付け、対象核内受容体の同定など、国際的な化学物質管理の取組に資するデータを収集し、提供する。ビスフェノール A は、低用量で内分泌攪乱作用を引き起す、と強く懸念されている化学物質であるが、2008 年 9 月には、米国・国家毒性プログラム NTP は「胎児、乳幼児に悪影響を及ぼすいくらかの懸念がある」とする最終報告書を公表した。こうしたなか、我々は胎児脳や胎盤などに多く発現する核内受容体・エストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (ERR $\gamma$ ) にビスフェノール A が非常に強く結合することを世界に先駆けて発見し、報告した。これは、ヒト核内受容体 48 種すべてを視野に入れた研究の直接的な成果であり、研究方針の妥当性を示すとともに、こうした研究の迅速な展開と戦略的な評価スキーム構築へ向けて推進すべき指標を与えた。平成 21 年度までに受容体の cDNA クローニングが完成し、これにより ROR、PPAR  $\gamma$ 、Rev-erb  $\alpha$ 、Rev-erb  $\beta$ 、CAR、RXR  $\alpha$ 、RXR  $\beta$ 、RXR  $\gamma$  など十数種、48 種中の 1/3 について結合試験系を完成させた。そして、化学物質セット（ビスフェノール類 70、ベンゾフェノン類 24 種をはじめ、総計 500 種類）のスクリーニングを開始した。こうしたなか、今 21 年度最大の発見は、ビスフェノール A (BPA) が構成的アンドロスタン受容体・CAR に非常に強く結合する事実の発見である。また、もう一つの新発見は、ビスフェノール AF が ER  $\alpha$  および ER  $\beta$  に高親和性で結合し、ER  $\alpha$  にはアゴニストとして、ER  $\beta$  にはアンタゴニストとして働くことを同定したことである。一方、遺伝学的にヒト・モデルとして最適な実験動物・ショウジョウバエにビスフェノール A を多世代にわたって食餌し、行動リズムを計測する継代試験に成功したが、今年度、「多動性」「高活動量」の症状のハエどうしを継代交配し、約 50% の出現率にまで定着させることに成就した。以上のような研究展開は、特に、胎児や乳幼児をはじめとする化学物質に対して脆弱な集団を保護するために、化学物質の総合的で迅速なリスク評価することを緊要の課題とする厚生労働研究事業における化学物質リスク研究事業に直接に資するものである。

研究分担者

野瀬 健 (九州大学大学院理学研究院  
化学部門・准教授)

松島綾美 (九州大学大学院理学研究院  
化学部門・助教)

下東美樹 (福岡大学理学部・地球圏科

学・生物学分野・講師)

(研究協力者)

酒井大樹 ((社)日本食品衛生協会・九州大  
学大学院理学府レサーチレジデント)

劉 暁輝 九州大学大学院理学研究院  
化学部門・特任助教)

## A. 研究目的

現代社会においては、日常の必需品や利便製品に多種多様な化学物質が使用され、豊かな生活に貢献している。現在、世界では数万種類の化学物質が流通し、我が国においても毎年約 300 種の新たな化学物質が市場に投入されている。こうしたなか、化学物質のヒトの健康への有害影響が社会的に懸念され、近年特に、胎児や乳幼児をはじめとする化学物質に対して脆弱な集団を保護するために、化学物質の総合的で迅速なリスク評価の必要性・緊要性が提唱されている。現在、ビスフェノールAは「低用量で内分泌攪乱作用を引き起す」と強く懸念されている化学物質であり、2008年9月には、米国・国家毒性プログラム NTP が「胎児、乳幼児に悪影響を及ぼす可能性がある」とする最終報告書を公表した。

我々は、核内受容体 48 種にはホルモンが結合して活性化される通常の「リガンド活性化型核内受容体」に加えて、最初から活性化されている「自発活性化型核内受容体」が 10 数種類存在し（図 1）、受容体に結合する化学物質の活性発現機構は、通常のアゴニスト&アンタゴニストに加えて、インバースアゴニスト&インバースアンタゴニストと、多様であることを明らかとした（図 2）。そして、胎児脳や胎盤などに発現する核内受容体・エストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (ERR $\gamma$ ) にビスフェノールAが非常に強く結合することを世界に先駆けて発見し、報告した。これは、ヒト核内受容体 48 種すべてを視野に入れた化学物質リスク評価の必要性を直接的に証明する研究成果であり、48 種すべてに対する効率的な評価スキーム構築を迅速に展開すべきであると、その緊要性を明らかにした。

我々はこれまでに「受容体センシング抗体法」という、ホルモン受容体への結合性とホルモン活性の有無を 1 つの試験系で同時に評価する新規なアッセイ法の開発に成功し、受容体 48 種への取組みを大きく進展させてきた。本研究では、「受容体センシング抗体法」に加えて「レポーター遺伝子アッセイ」および「Two-hybrid 法」でもアゴニスト&アンタゴニストおよびインバースアゴニスト&インバースアンタゴニストの活性が評価できるようにし、「受容体結合試験」を組合せた統合的な核内受容体リスク評価システムを構築し、有害化学物質を同定するアッセ

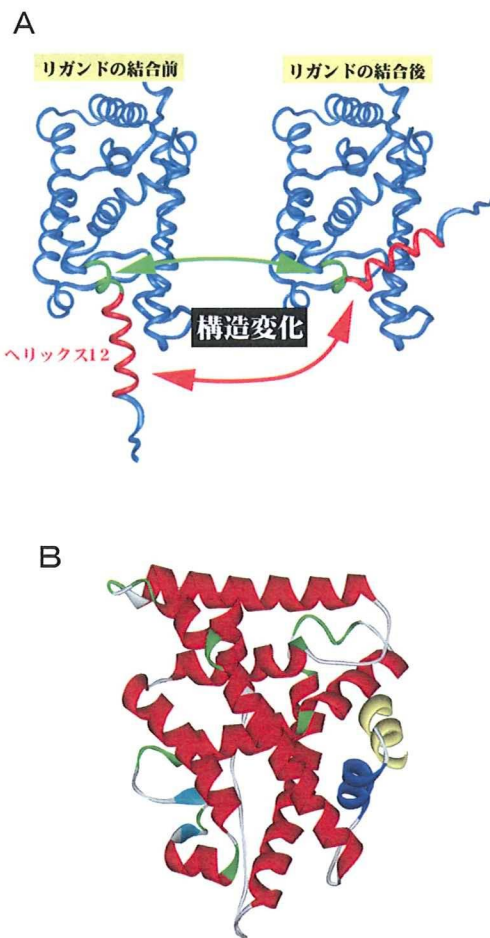


図 1. リガンド活性化型 (A) および自発活性化型核内受容体 (B) のリガンド結合ドメインの構造

(リガンド活性化型核内受容体は、レチノイン酸受容体・RXRであり、リガンド結合前(アポ型)および結合後(ホロ型)の構造を示す。リガンドがアゴニストとアンタゴニストでは、ホロ型コンホメーションのヘリックス12の位置取りが異なる。自発活性化型核内受容体は、エストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型・ERR $\gamma$ である。なお、リガンド結合後のRXRと自発活性化型のERR $\gamma$ には、Srcペプチド(黄色の $\alpha$ ヘリックス:コアクチベータの部分ペプチド)が結合した様子を示している。)

イ系を確立することを目的とする。

本研究では、したがって、それぞれの核内受容体について、その研究進展状況に鑑みたアッセイ系を考案し、全体でいくつかに統合された評価スキームを構築することをめざす。これにより、より詳細な *in vitro* および *in vivo* 試験に供すべき化学物質のリストアップ、順位付け、対象核内受容体の同定など、国際的な化学物質管理の取組に資するデータを収集し、提供するようにしたい。

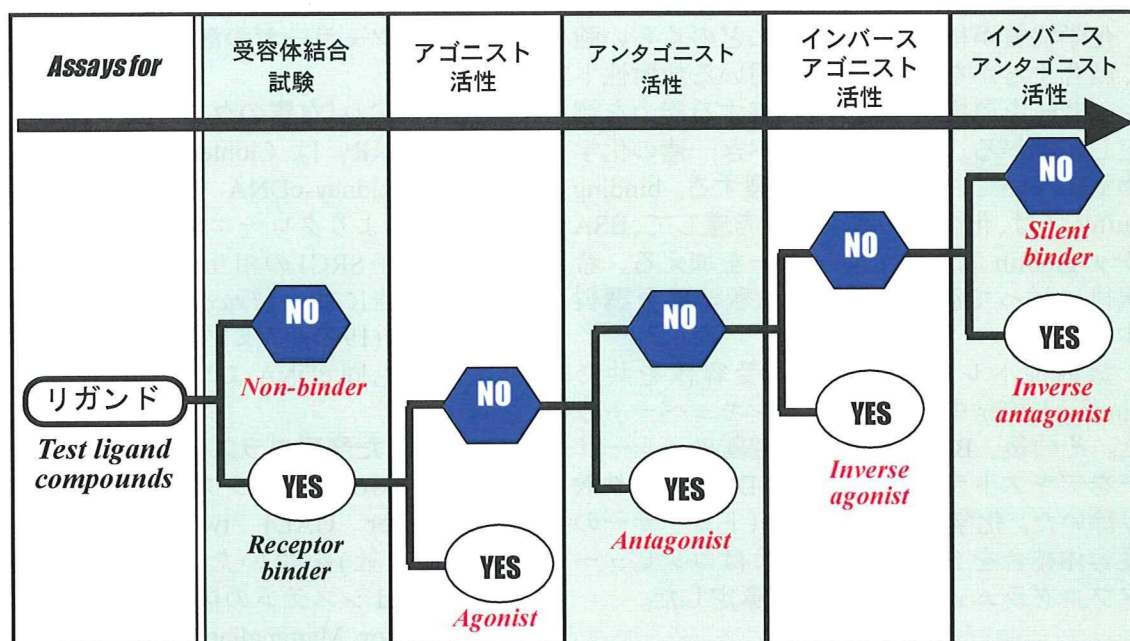


図2. リガンドの受容体応答の系統的解析システム

## B. 研究方法

### 【核内受容体の遺伝子およびタンパク質の調製】

#### (1) 核内受容体 LBD タンパク質の調製

ヒト腎臓などの cDNA より、PCR を用いて核内受容体 (以後、必要な場合は NR と略) のリガンド結合ドメイン (LBD) のクローニングを行った。得られた PCR 産物の塩基配列を確認したのち、これを発現ベクターに組み換え、大腸菌 (BL21) を用いて大量発現を行った。イソプロピル 1-チオ-β-D-ガラクトシド (IPTG) で発現誘導をかけることによりグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現した。

精製はまず、グルタチオン樹脂を用いるアフィニティクロマトグラフィーを実施した。ERRγをはじめとする一群の LBD タンパク質はグルタチオンセファロース 4B ビーズを用いての精製が可能である。ERRβ などの別の一群は、セファロース 4B への吸着が著しくほとんど使用に耐えない。そこで、ポリアクリルアミド担体の Bio-Scale Mini GST Profinity 樹脂 (Bio-Rad 社製) を用いると吸着なしに精製できることが判明した。

アフィニティ精製後は、さらに、サイズ排除クロマトグラフィーによってゲルろ過精製した。吸着が問題とならない ERRγ の群では Sephadex G-25 による精製を行った。一方、ERRβ など吸着が問題となるグループに

ついては、ポリアクリルアミドを担体とする Bio-Gel P 系の樹脂を用いた。

なお、各核内受容体の全長のクローニングについてもヒト 48 種について全て完成し、各試験に用いる準備が整った。

### 【核内受容体応答解析】

#### (2) 飽和結合試験

受容体に特異的な標準リガンドをトレーサーとして用いるとき、受容体とトレーサーの濃度を決定する。これが飽和結合試験である。この飽和結合試験は、結合試験系を確立するためには最も重要なアッセイである。

受容体の失活を防ぐため、4°Cで行った。一定濃度の GST-NR-LBD と各濃度の放射標識された標準リガンドを binding buffer 中で混合し、インキュベートした。非特異的な結合は過剰量の標準リガンド (通常 10 μM) を共に加えることにより調べた。その後、遊離のトレーサーを分離・除外する B/F 分離、についてはデキストラン被膜活性炭 (DCC) を反応溶液に加えることにより実施した。なお、DCC 溶液は遠心分離したのちに上澄み液をシンチレーションバイアルに一定量に移してカウントした。特異的結合が得られた場合は、Scatchard plot 分析によって、解離定数を算定した。なお、算定された最大受容体濃度は計算標準値と比較した。

### (3) 競争結合試験

化学物質が核内受容体NRにどのくらい強く結合するかを調べるのに、用いる放射性トレーサーを置換える能力、阻害する能力を測定して調べる。まず、試験すべき一連の化学物質について、希釈溶液を調製する。binding bufferには、化合物の吸着性を考慮して、BSAや $\gamma$ -globulinなどのブロッカーを加える。希釈律に従って濃度が正確な希釈溶液を調製する。

放射性トレーサーと核内受容体を共にbinding buffer中で混合し、インキュベートした。その後、B/F分離のため遊離のトレーサーをデキストラン被膜活性炭DCCにより取り除いた。化学物質の $IC_{50}$ 値(トレーサーの受容体結合を50%阻害する値)はコンピュータプログラムALLFITにより算定した。

### (4) レポーター遺伝子試験

ヒト子宮頸癌由来の細胞であるHeLa細胞に、核内受容体の全長遺伝子をコードする発現プラスミドを導入し、一過性の強制発現を行った。その際、核内受容体の転写活性を検出するために、ルシフェラーゼ系のレポータープラスミドを導入した。これには、試験する核内受容体の結合できるエレメントを導入する必要がある。

24時間後、任意の濃度で化学物質を曝露した。さらに24時間後、ルシフェラーゼ活性を測定し、化学物質によるERR $\gamma$ の活性への影響を評価・算定した。

### (5) 生細胞受容体結合試験

HeLa細胞に、核内受容体の全長遺伝子をコードする発現プラスミドを導入し、一過性の強制発現を行った。発現した核内受容体について、 $[^3H]$ 標識されたリガンドで牛胎児血清を含まないEMEM培地中で25°C、1時間インキュベートし結合試験を実施した。その際、B/F分離は細胞の洗いで実施できる。

化学物質の結合性は、1% Triton X-100を20  $\mu$ l/well加え、30分間インキュベートし、細胞膜を破壊して測定した。アッセイでは細胞を溶解させて測定した。なお、この測定では化学物質の通過性を反映した上で評価されることになる。

### (6) Two-hybrid アッセイ

Two-hybridシステムの構築では、酵母とホ乳類培養細胞HeLa細胞、あるいはHEK293

細胞を用いて行うこととした。活性は誘導されるルシフェラーゼの活性で評価した。

#### ① 標的タンパク質のクローニング

ヒトERR $\gamma$ はClontech社より購入したhuman kidney-cDNA (BD Quick-Clone #637204)よりクローニングを行なった。転写共役因子SRC1の相互作用部位としては西原らの報告に従い(*Toxicol. Applied Pharmacol.*, **154**, 76-83 (1999))アミノ酸570-782位を選択し、これも同cDNAよりクローニングした。

#### ② 使用した発現プラスミド

酵母Two-hybridシステムの構築には、Matchmaker GAL4 two-hybrid system 3 (Clontech社)を用いた。ホ乳類培養細胞Two-hybridシステムの構築には、CheckMate/Flexi Vector Mammalian Two-Hybrid System (Promega社 #9370)を用いた。

#### ③ 酵母Two-hybrid アッセイ

SD培地(2% glucoseを含む)5 mlに、育ち始めたばかりの小さなコロニーを接種し培養した。2000 rpm for 5 minで集菌する。OD<sub>600</sub> = 0.4になるように、SD培地(0.2% glucose)で懸濁した。4-OHTは1% BSAで段階希釈した。マイクロテストチューブにSD培地(0.2% glucose)、酵母培養液および4OHT溶液を分注し、vortexした。16時間後、遠心により集菌し、最終濃度1 mg/ml酵素zymolaseで菌体を可溶化の後、誘導されるルシフェラーゼの活性は、ルシフェラーゼアッセイシステム(Promega)によって測定した。

#### ④ ホ乳細胞Two-hybrid アッセイ

HeLa細胞あるいはHEK293細胞に、baitプラスミド、preyプラスミドおよびレポータープラスミドをリポフェクトアミンplus試薬(Invitrogen)によってトランスフェクションし、一過性発現を行った。24時間後、96穴プレートに $3 \times 10^4$  cells/wellとなるように播種し、1%BSAで段階希釈した4-OHTを添加した。誘導されるルシフェラーゼの活性は、ルシフェラーゼアッセイシステム(Promega)によって測定した。

#### (7) センシングアッセイ

核内受容体(40 nM, 90 ml)に対して化学物質( $10^{-11}$ ~ $10^{-5}$  M, 10 ml)を室温で1時間反応させ、リガンド-受容体複合体を調製し

た。この溶液をあらかじめ調製した抗原ペプチドをコートした 96 穴イムノプレートに移した。プレートの調製はウシサイログロブリンに結合した抗原ペプチドをプレートに吸着 (2.5 mg/ml, 50 ml/well) させ、室温 1.5 時間インキュベート後、洗浄し、ELISA キット (ELISAmate, KPL 社) 付属の BSA Diluent/Blocking Solution Concentrate を 10 倍に希釈したものによるブロッキングにより行った。リガンド受容体複合体溶液を移した 96 穴イムノプレートにセンシング抗体溶液 (10 ml/well) を加えて 4℃で終夜反応させた。溶液を一括除去により捨て、プレートを洗浄後、1/500 希釈の Horseradish Peroxydase (HRP) 標識 2 次抗体溶液 (50 ml) を加えて室温で 1 時間反応させた。溶液を捨て、プレートを洗浄後、過酸化水素/ABTS を基質とした酵素反応により溶液を発色させた。基質は、ELISA キット付属の ABTS Peroxidase 基質と Peroxidase Solution B を使用直前に当量体積ずつ混合して調製し、添加量は 100 ml/well とした。405 nm の吸光度を測定してプレート上のペプチドに結合した抗体量を定量した。

### (8) センシングアッセイの解析法

受容体のコンホメーション変化量 (抗体応答) は、基準のリガンドに対する相対値として、プレートに残存する 2 次抗体の酵素活性値の測定値から、次式により算出できる。

$$D(\%) = (A - B) \times 100 / (C - B)$$

- D: コンホメーション変化量 (抗体応答)  
 A: 受容体および試験化学物質を添加したときの測定値  
 B: 受容体のみ添加したときの測定値  
 C: 受容体および過剰量の女性ホルモンを添加したときの測定値

EC<sub>50</sub> 値の算出は以下のように行った (図 4)。まず、各化学物質の濃度に対して抗体応答をプロットし、抗体応答がプラトーに達したときの値を最大抗体応答性 R<sub>max</sub>(%)として、これをグラフより算出した。さらに、得られたシグモイド様曲線を解析プログラム ALLFIT で数理解析し、R<sub>max</sub>(%)値の 50%に対応する

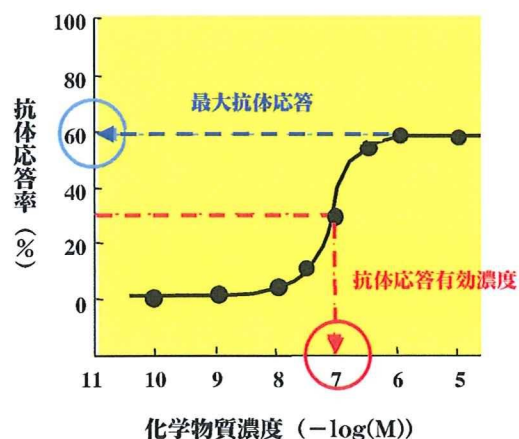


図 3. 受容体コンホメーション変化センシングアッセイの解析

化学物質濃度を抗体応答有効濃度 (EC<sub>50</sub>) とし、この値を算出した。

上記のようにして求めた最大抗体応答性 R<sub>max</sub>(%)は、試験化学物質が受容体を活性型コンホメーションに転化できる割合の最大値を示し、試験化学物質のホルモン活性を表すパラメータとなる。すなわち、評価としては、抗体応答 (縦軸) はホルモン活性の強さの指標となり、EC<sub>50</sub> 値は化学物質と受容体との結合の強さの指標となる。

### (9) ファージディスプレイによるモノクローナルセンシング抗体法

#### ① 抗原ペプチド、スクリーニング用タンパク質、使用発現プラスミド

標的核内受容体 NR-LBD の H12 を含むペプチドを、キャリアタンパク質 (KLH、あるいは BthG) に架橋して抗原ペプチドとした。一方で、発現させた NR-LBD をスクリーニング用タンパク質とした。

ファージ抗体ライブラリーには、英国医学会議 (MRC) より入手した Tomlinson I および Tomlinson J ライブラリーを使用し、これらをファージ抗体ライブラリーへ変換した。

#### ② バイオパンニング

イムノチューブに抗原ペプチドを固定化し、2%スキムミルク-PBS (MPBS) でブロッキングした。4 ml の MPBS 中に 5×10<sup>12</sup> のファージを含むように調製した Tomlinson I もしくは J ライブラリーを加え、2 時間反応させた。洗浄後、トリプシン溶液 (1 mg/ml) を加えて、抗原に結合したファージを溶出させた。

常法により1回目のパンニングを実施した。図4に示すように、溶出ファージを固定化抗原への結合、非特異的なファージの洗浄、結合ファージの溶出、大腸菌への導入、ファージの増幅と回収の一連のサイクルを行った。得られたファージ液のうち1 mlを次のパンニングに使用した。2回目のバイオパンニングについては、より高親和性の抗体を回収するために固定化抗原の濃度を25  $\mu\text{g/ml}$ とし、3回目には10  $\mu\text{g/ml}$ と希釈した。さらに、ライブラリー反応後のファージ洗浄操作を2回目以降はTPBS、PBS共に20回と厳しくした。

### ③ scFv でのスクリーニング

回収したファージを scFv 発現用の宿主菌 HB2151 (非サプレッサー株) に感染させて、培養プレートに播種した。シングルコロニーを回収し、得られたファージ抗体群をモノクローナル化した。

得られたファージクローンの中から、ペプチドを特異的に認識する scFv を発現可能なクローンを同定する。まず、固定化抗原ペプチドを用いて scFv-ELISA を行った。培養後、遠心により菌体を除いた上清を一次抗体として使用した。一次抗体を添加して1時間後、二次抗体 (Anti-c-myc-peroxidase) を添加した。さらに1時間後、ABTS/ $\text{H}_2\text{O}_2$  によって発色させ、405 nm での吸光度測定により検出を行った。

### ④ センシングアッセイ

2次スクリーニング後のファージ抗体を用いた競合 ELISA 法により、内因性アゴニストや外因性アゴニスト、あるいはアンタゴニストによるコンホメーション変化センシング抗体法による化学物質評価を実施した。

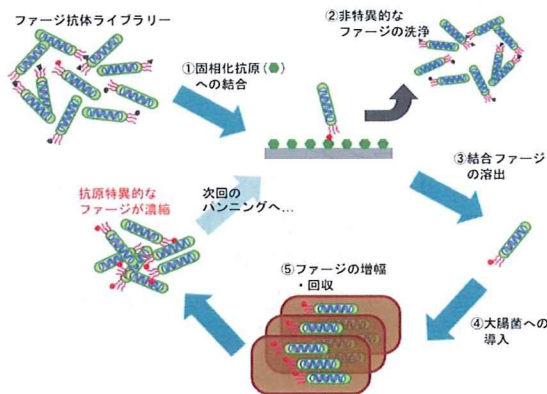


図4. バイオパンニング

## (10) モノクローナル抗体によるセンシングアッセイ

### ① モノクローナル抗体の調製

核内受容体(NR)のうちリガンドの結合により構造変化を起こすことが見出されている  $\alpha$ ヘリックス 12 (H12) 部位付近の配列をもつペプチドを合成し、ポリクローナル抗体を作製した時と同様にキャリアタンパク質 KLH と結合させて免疫源とした。これを Balb/c マウスの足蹠に局所免疫し、9日目に後肢大腿部より肥大したリンパ節を摘出した。リンパ細胞とマウス由来ミエローマ細胞とをポリエチレングリコールにより融合させて96ウェル培養プレート播き込んで培養した。ウェル中のハイブリドーマ細胞を順次 DMEM 培地に移して継代培養し、その培養上清を回収してスクリーニングに用いた。

培養上清に含まれる抗体を以下の2段階のスクリーニングで検定した。まず、ペプチドまたは NR を抗原とする間接 ELISA 法を一次スクリーニングとして実施し、これらの抗原に実際に結合する抗体の産生細胞を選別した。続いてペプチド抗原を固定化し NR を競合剤として用いた競合 ELISA 法による二次スクリーニングを実施した。ここで、NR のみを競合剤として用いた場合と NR に予めリガンドである化学物質を添加して用いた場合との間で NR への結合に差異のあるような抗体を探索した。

センシング能を有するモノクローナル抗体の産生が確かめられたハイブリドーマは、それぞれ限界希釈法でクローン化を進めた。さらにそのうちのひとつについては、ハイブリドーマをマウスの腹腔内へ注射して飼育後に腹水を回収することにより、高濃度の抗体溶液を得た。

### ② センシングアッセイ

二次スクリーニングにおいて、リガンドの有無に応じて異なる免疫反応性を示した抗体について、リガンド濃度を変化させて競合の程度が変化するかどうかを調べた。さらに競合 ELISA における抗体濃度、抗原量、受容体濃度などについての至適実験条件を詳細に検討し、基準アゴニスト物質を用いるコンホメーション変化センシングアッセイ法を確立した。センシングアッセイの方法はポリクローナル抗体で実施した解析法に基づいた。さらに、アンタゴニストを同様に用いて試験した。



## 【ショウジョウバエ活動リズム等の継代的な化学物質暴露に対する応答解析】

### (1) ショウジョウバエの脳神経および卵産生における継代的な化学物質応答解析

#### ① ショウジョウバエの系統と飼育培地

これまでの研究で、産卵数が安定していることがわかっている *Canton S* を研究材料として用いた。飼育培地はこれまでと同様に作製した。水 1ℓに、粉末寒天 8 g、砂糖 100 g、とうもろこし粉 40 g、乾燥酵母 60 g を入れて、強火で沸騰するまで煮込む。沸騰したのちは、さらに弱火で 20 分煮沸する。液体培地が冷めたのちに、ボーキニン 5.3 ml、プロピオン酸 2 ml、ペニシリン 6.67 万ユニット、ストレプトマイシン 16.67 万ユニットを入れて十分に攪拌する。これを直径 3 cm の管瓶あるいは 9.2 cm のシャーレに入れて冷蔵保存したのち、使用した。ビスフェノール A 含有の培地は、ビスフェノール A の最終濃度が  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  mol/l になるように調整した。コントロールとしては、これらの化学物質を溶かす溶媒として用いたエタノールを使用した。

#### ② 生殖能への多世代暴露の影響

化学物質を含む飼育培地で多世代にわたり飼育されたオス、あるいはメスを、通常培地で飼育されたメスあるいはオスと交配して、オスの場合は次世代の個体数、メスの場合は産卵数を調べた。成虫時に受ける影響を排除するために実際のテストには通常培地を使用した。

オスの生殖能を反映するためには、メスの個体数を過剰に与え、さらにメスが未受精卵を産卵する可能性が高いため、羽化個体をカウントする必要がある。ビスフェノール A 含有培地で飼育された 13 代目のオス 1 匹に対して通常培地で飼育されたメス 10 匹（いずれも羽化直後のもの）を試験管培地で交配させ、24 時間毎に新しい試験管培地に移して、その培地から羽化する個体数をオスの次世代繁殖数とした。次世代繁殖数がピークになる羽化後の経過日数をオス個体の交配能の成熟期間、羽化後 8 日目までの次世代繁殖数の合計を生殖能として評価した。

#### ③ 歩行活動の記録

羽化後 1~3 日目のオスのハエを LD12:12 で 3 日間歩行活動を記録した後、光周期に同調できるかを見るため、LD の時刻を 6 時間

前進させた。その後、恒常暗黒中で 8 日間以上記録し、恒常暗黒中で自由継続させた活動の周期を計算した。

#### ④ ビスフェノール A 食餌と継代飼育

ビスフェノール A  $1 \times 10^{-5}$  M を混ぜた寒天培地でショウジョウバエを飼育・継代し、そのハエの歩行運動の概日リズムを測定する。個々のショウジョウバエの歩行運動は、赤外線センサーで感知・記録する DAMS (Drosophila Activity Monitoring System) で測定し、DAMS のデータ変換のためのソフトウェア ClockLab を使って評価した。

多動性症状および高活動性症状のショウジョウバエの雌雄を交配し、仔バエの活動リズムを測定・評価した。

#### (倫理面への配慮)

本研究課題では、抗体を作製するに当たって、マウスなどの実験動物を使用する。こうした実験動物は、きちんと管理された環境下で飼育され、また、飼料、飲料水、さらには清浄空気を供するなど、十分な動物愛護の配慮のもとで実験に用いられる。また、採血等に際しても麻酔をしたりして痛みの無いように配慮するなど、倫理面での問題が全くない状況で行っている。

所属部局・理学研究院でも「動物実験審査」システムが確立されており、審査を申請のうえ許可された。また、これらの実験に従事する研究者および学生に関しては、全員が「実験動物取扱」のための教育訓練のための講習を受けたうえで、「実験動物取扱者登録証」を取得して実施している。

一方、内分泌かく乱性の可能性のある化学物質を多数取り扱うが、量的にはきわめて少量であり、しかも、十分に換気されたチャンバー内で秤量し、希釈するなどの最大限の配慮をするので、特に危険性はない。実験室にはスクリーバが設置されたドラフトチャンバーが設備としてあり、また、揮発性試薬に対応するドラム式換気装置を実験室に備えている。さらに、ファージディスプレイ法は実験動物に痛みを与える抗原免疫や採血を行う必要がないため、動物愛護の観点からの倫理上の問題はない。また、研究に用いたファージはヒトに対する感染性が皆無であり、安全性の点でも問題がない。その他の実験に関しては、倫理上の問題を伴うものはない。

## 研究結果

### (1) 500 化学物質受容体結合試験

ヒト核内受容体 48 種類に対する化学物質のスクリーニングにおいて、まず、試験すべき化学物質の選定、試験を優先して実施すべき重要な核内受容体の選定に取り組んだ。化学物質については、昨年度までに、25 カテゴリー、543 種類の化合物をリストアップし(表 1)、これらから、各核内受容体に試験すべき 500 物質を選ぶこととした(図 5 参照)。試験する核内受容体が増加するに伴い、新たなカテゴリー、化合物群が必要となり、試験すべき化学物質はバラエティーを増すことになる。以下に試験した代表的な核内受容体の結果をまとめ、列記する。

#### ① エストロゲン受容体 $\alpha$ 型 (ER $\alpha$ )

我々は、ビスフェノール A (BPA) がエストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) ではなくエストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (estrogen-related receptor  $\gamma$ ; ERR $\gamma$ ) に非常に強く結合することを世界で初めて発見した。その後、この ERR $\gamma$  と BPA 類似の多種の化合物の構造-活性相関解析研究を精力的に展開し、高機能性プラスチックの原料として、最近生産量が増えている「新世代ビスフェノール」も、ERR $\gamma$  とかなり強く結合することを明らかにした。すなわち、多くの BPA 類似構造をもつ化合物が、ERR $\gamma$  と結合すること、そして、なかでもビスフェノール E は、BPA より ERR $\gamma$  に強く結合する唯一の化合物であることを世界に先駆けて報告した。これは、BPA のみではなく、BPA 類似化合物の化学物質リスク評価の重要性を端的に示すものである。そこで今回、女性ホルモン受容体であり、最も内分泌攪乱作用の標的となりうると考えられる代表的核内受容体の一つである、エストロゲン受容体  $\alpha$  型 (ER $\alpha$ ) について、BPA 類似化合物を含む 500 化学物質の結合スクリーニングを実施した。

結合試験の結果、17 種の BPA A 類似化合物が、BPA より強い結合性を示した(表 2)。BPA 自身は ER $\alpha$  に弱く結合し、IC<sub>50</sub> は 1040 nM である。近年、生産および使用量が增大している新世代ビスフェノールが、ER $\alpha$  に BPA よりも遥かに強く結合することは、驚くべき新発見である。これらのうち、特に結合力の強

い 11 種の BPA 類似化合物について、レポーター遺伝子アッセイにより転写活性を評価したところ、少なくとも 2 種は ER $\alpha$  の新規なアンタゴニストであると考えられた。これらについては、今後さらに詳細に検討する予定である。

#### ② エストロゲン受容体 $\beta$ 型 (ER $\beta$ )

エストロゲン受容体  $\beta$  型 (ER $\beta$ ) は、ER $\alpha$  のサブタイプである。この ER $\beta$  に対する結合試験系を構築し、ER $\alpha$  に強く結合したビスフェノール A 類似化合物の結合試験を行った。その結果、ビスフェノール AF (BPAF) が、ER $\alpha$  よりもむしろ ER $\beta$  に強く結合するという興味深い事実が明らかになった。BPAF は米国厚生省所轄の国家毒性プログラム (NTP) において、BPA 類似化合物の中でも特にその健康リスク、危険性が注目されている。

これは後に詳しく述べるが、ビスフェノール AF についてさらに、レポーター遺伝子アッセイ系を構築して転写活性を測定したところ、BPAF は ER $\alpha$  のアゴニストであり、かつ ER $\beta$  のアンタゴニストであるという非常に面白い結果が得られた。これらの事実は、ビスフェノール類似化合物は、内分泌攪乱物質としてのリスクが大きいことを直接に示すきわめて重要な成果である。

#### ③ エストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型 (ERR $\gamma$ )

エストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (estrogen-related receptor  $\gamma$ ; ERR $\gamma$ ) については、ビスフェノール A の特異的な標的核内受容体であることから、詳細な解析を実施した。特に、ビスフェノール誘導体と考えることのできるカテゴリー番号 (1) ~ (5) の合計 125 化学物質については、高活性な化合物が予想された。また、ビスフェノール A の一方のフェニル-ヒドロキシル基を削除した化合物の 4- $\alpha$ -クミルフェノールが、ビスフェノール A とほぼ同じ強さの高い結合親和性を示したことから、フェノール類 (14) (17) 合計 34 化学物質についても詳細に試験した。その結果、表 2 に示すように、6 段階に分類した結合親和性の程度で、IC<sub>50</sub> 値 1 桁で最も高活性なグループ 2 種、2 桁で活性な化合物 11 種、3 桁でかなり強い化合物 16 種であり、

表 1. 核内受容体に対するリスク評価スキームで検討する化学物質一覧リスト

| (1) ビスフェノールA誘導体  |   |             |
|------------------|---|-------------|
|                  | 化合物名  | CAS番号       |
| 1-1              | 4,4',4"-Trihydroxytriphenylmethane  | 603-44-1    |
| 1-2              | Tetrachloro bisphenol A   | 79-95-8     |
| 1-3              | Tetrabromo bisphenol A  | 79-94-7     |
| 1-4              | Bisphenol B   | 77-40-7     |
| 1-5              | Bisphenol AP  | 1571-75-1   |
| 1-6              | Tetramethyl bisphenol A   | 5613-46-7   |
| 1-7              | 2,2-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane                                    | 79-97-0     |
| 1-8              | 1,1',1"-Tris(4-hydroxyphenyl)ethane   | 27955-94-8  |
| 1-9              | 4- $\alpha$ -Cumyl phenol   | 599-64-4    |
| 1-10             | Bisphenol P   | 2167-51-3   |
| 1-11             | Bisphenol C   | 14868-03-2  |
| 1-12             | Bisphenol A   | 80-05-7     |
| 1-13             | Hexachlorophene   | 70-30-4     |
| 1-14             | $\alpha, \alpha, \alpha'$ -Tris(4-hydroxyphenyl)-1-ethyl-4-isopropylbenzene | 110726-28-8 |
| 1-15             | $\alpha, \alpha'$ -Bis(4-aminophenyl)-1,4-diisopropylbenzene                | 2716-10-1   |
| 1-16             | 2,2-Bis(3-cyclohexyl-4-hydroxyphenyl)propane                                | 57100-74-0  |
| 1-17             | 2,2-Bis(2-hydroxy-5-biphenyl)propane  | 24038-68-4  |
| 1-18             | 2,2-Bis(4-glycidyloxyphenyl)propane   | 1675-54-3   |
| 1-19             | Bisphenol A diacetate   | 10192-62-8  |
| 1-20             | Tetrabromobisphenol A Bis(2-hydroxyethyl) Ether                             | 4162-45-2   |
| 1-21             | 2,2-Bis(4-hydroxy-3-isopropylphenyl)propane                                 | 127-54-8    |
| 1-22             | 4,4'-Isopropylidenediphenoxyacetic Acid                                     | 3539-42-2   |
| 1-23             | 2,2-Bis[4-(4-aminophenoxy)-phenyl]propane                                   | 13080-86-9  |
| 1-24             | $\alpha, \alpha'$ -Bis(4-hydroxy-3,5-dimethylphenyl)-1,4-diisopropylbenzene | 36395-57-0  |
| 1-25             | 2,2-Bis(4-chloroformyloxyphenyl)propane                                     | 2024-88-6   |
| 1-26             | 2,2-Bis(3-sec-butyl-4-hydroxyphenyl)propane                                 | 32113-46-5  |
| 1-27             | 4,4'-Methylenebisphenol   | 620-92-8    |
| 1-28             | Hexestrol   | 84-16-2     |
| 1-29             | 2,2-Bis(4-cyanatophenyl)propane   | 1156-51-0   |
| 1-30             | Coumestrol  | 479-13-0    |
| 1-31             | Barbaloin   | 1415-73-2   |
| 1-32             | Isoliquirtigenin  | 961-29-5    |
| 1-33             | 4,4'-Methylenebis(2-methylphenol)   | 2467-25-6   |
| 1-34             | 2,3,4-Trihydroxydiphenylmethane   | 17345-66-3  |
| 1-35             | 2,3-Dimethyl-2,3-butanediamine  | 75804-28-3  |
| 1-36             | Bisphenol E   | 2081-08-5   |
| 1-37             | 4,4'-(1,3-Dimethylbutylidene)bisphenol                                      | 6807-17-6   |
| (2) ビスフェノールAF誘導体 |   |             |
|                  | 化合物名  | CAS番号       |
| 2-1              | 2,2-Bis(3-amino-4-hydroxyphenyl)hexafluoropropane                           | 83558-87-6  |
| 2-2              | 2,2-Bis(3-aminophenyl)hexafluoropropane                                     | 47250-53-3  |
| 2-3              | 2,2-Bis(3-amino-4-methylphenyl)hexafluoropropane                            | 116325-74-7 |
| 2-4              | 2,2-Bis(4-aminophenyl)hexafluoropropane                                     | 1095-78-9   |
| 2-5              | 2,2-Bis[4-(4-aminophenoxy)phenyl]hexafluoropropane                          | 69563-88-8  |
| 2-6              | 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)hexafluoropropane                                   | 1478-61-1   |
| 2-7              | 4,4'-(Hexafluoroisopropylidene)diphthalic Anhydride                         | 1107-00-2   |
| 2-8              | 2,2-Bis(4-carboxyphenyl)hexafluoropropane                                   | 1171-47-7   |
| 2-9              | Bisphenol AF  | 1478-61-1   |
| 2-10             | 2,2-Bis(4-isocyanatophenyl)hexafluoropropane                                | 10224-18-7  |
| 2-11             | Hexafluoro-2,2-diphenylpropane  | 83558-76-3  |
| (3) ビスフェノール化合物   |   |             |
|                  | 化合物名  | CAS番号       |
| 3-1              | 1,1-Bis(3-cyclohexyl-4-hydroxyphenyl)cyclohexane                            | 4221-68-5   |
| 3-2              | 9,9-Bis(4-aminophenyl)fluorene  | 15499-84-0  |
| 3-3              | 4,4'-(2-Hydroxybenzylidene)-bis(2,3,6-trimethylphenol)                      | 184355-68-8 |
| 3-4              | 4,4'-(1,3-Dimethylbutylidene)diphenol                                       | 6807-17-6   |
| 3-5              | 9,9-Bis(4-hydroxyphenyl)fluorene  | 3236-71-3   |
| 3-6              | 9,9-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)fluorene                                   | 88938-12-9  |
| 3-7              | 4,4'-(2-Ethylhexylidene)diphenol  | 74462-02-5  |
| 3-8              | 9,9-Bis[4-(2-hydroxyethoxy)phenyl]fluorene                                  | 117344-32-8 |
| 3-9              | 1,1-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)cyclohexane                                | 2362-14-3   |
| 3-10             | 1,1-Bis(4-aminophenyl)cyclohexane   | 3282-99-3   |
| 3-11             | 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)cyclohexane   | 843-55-0    |
| 3-12             | Bisphenol M   | 13595-25-0  |
| 3-13             | 1,1-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)cyclohexane                                | 2362-14-3   |
| 3-14             | 4,4'-Bicyclohexanol   | 20601-38-1  |
| 3-15             | 2,2-Bis(4-hydroxycyclohexyl)propane   | 1980-4-69   |
| 3-16             | 4-Cyclohexylcyclohexanol  | 2433-14-6   |
| 3-17             | 2-Cyclohexylphenol  | 119-42-6    |
| 3-18             | 4,4'-(1,2-Diethylethylene)diphenol  | 84-16-2     |
| 3-19             | Diphenylsilanediol  | 947-42-2    |

|      |  |             |
|------|--|-------------|
| 3-20 | 4-(Phenylazo)phenol  | 20714-70-9  |
| 3-21 | Resveratrol  | 501-36-0    |
| 3-22 | Spirochromane  | 3127-14-8   |
| 3-23 | TAR [4-(2-Thiazolylazo)resorcinol]                               | 2246-46-0   |
| 3-24 | 6,6',7,7'-Tetrahydroxy-4,4,4',4'-tetramethyl-2,2'-spirobichroman | 32737-35-2  |
| 3-25 | 4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-phenol           | 269409-97-4 |

| (4) ベンゾフェノン | 化合物名  | CAS番号      |
|-------------|---|------------|
| 4-1         | 4,4'-Dihydroxybenzophenone                        | 611-99-4   |
| 4-2         | 4,4'-Dimethoxybenzophenone                        | 90-96-0    |
| 4-3         | 2,3',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone                | 61445-50-9 |
| 4-4         | 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone                | 131-55-5   |
| 4-5         | 4,4'-Difluorobenzophenone                         | 345-92-6   |
| 4-6         | 2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenone         | 131-54-4   |
| 4-7         | 4,4'-Dichlorobenzophenone                         | 90-98-2    |
| 4-8         | 3,3',4,4'-Benzophenonetetracarboxylic Dianhydride | 2421-28-5  |
| 4-9         | Benzophenone-2,4'-dicarboxylic Acid Monohydrate   | 85-58-5    |
| 4-10        | 4,4'-Dihydroxybenzophenone                        | 611-99-4   |
| 4-11        | 2,4'-Difluorobenzophenone                         | 342-25-6   |
| 4-12        | 4,4'-Diaminobenzophenone                          | 611-98-3   |
| 4-13        | 4-Benzoyl 4'-Methyldiphenyl Sulfide               | 83846-85-9 |
| 4-14        | benzophenone-4,4'-Dicarboxylic acid               | 964-68-1   |
| 4-15        | 2,2'-Dihydroxy-4-methoxybenzophenone              | 131-53-3   |
| 4-16        | 2,4'-Dichlorobenzophenone                         | 85-29-0    |
| 4-17        | 2,4,4'-Trihydroxybenzophenone                     | 1470-79-7  |
| 4-18        | 2,2'-Dihydroxybenzophenone                        | 835-11-0   |
| 4-19        | 3,3'-Dinitrobenzophenone                          | 21222-05-9 |
| 4-20        | 3,3'-Diaminobenzophenone                          | 611-79-0   |
| 4-21        | 2-Amino-2',5-dichlorobenzophenone                 | 2958-36-3  |
| 4-22        | 2,2',4-Trimethoxybenzophenone                     | 33077-87-1 |
| 4-23        | 4,4'-Bis(methylamino)benzophenone                 | 3708-39-2  |
| 4-24        | benzophenone                                      | 119-61-9   |
| 4-25        | 2,3,4,4'-Tetrahydroxybenzophenone                 | 31127-54-5 |

| (5) ジフェニルメタン | 化合物名   | CAS番号       |
|--------------|--|-------------|
| 5-1          | 4,4'-Methylenebis(2,6-di-tert-butylphenol)     | 118-82-1    |
| 5-2          | Methylenedisalicylic Acid                      | 122-25-8    |
| 5-3          | Bis(3-ethyl-5-methyl-4-maleimidophenyl)methane | 105391-33-1 |
| 5-4          | 2,2'-Methylenebis(4-chlorophenol)              | 97-23-4     |
| 5-5          | 4,4'-Bismaleimidodiphenylmethane               | 13676-54-5  |
| 5-6          | 4,4'-Methylenebis(2-ethyl-6-methylaniline)     | 19900-72-2  |
| 5-7          | 4,4'-Diamino-3,3'-dimethyldiphenylmethane      | 838-88-0    |
| 5-8          | 4,4'-Diaminodiphenylmethane                    | 101-77-9    |
| 5-9          | Bis[4-dimethylamino-phenyl]methane             | 101-61-1    |
| 5-10         | 2,2'-Methylenebis(6-tert-butyl-4-ethylphenol)  | 88-24-4     |
| 5-12         | 4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline)             | 101-14-4    |
| 5-13         | 4,4'-Methylenebis(2,6-dimethylphenol)          | 5384-21-4   |
| 5-14         | 3,4'-Diaminodiphenylmethane                    | 19430-83-2  |
| 5-15         | 2,2'-Methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol)       | 119-47-1    |
| 5-16         | 4,4'-Dinitrodiphenylmethane                    | 1817-74-9   |
| 5-17         | Bis(4-amino-2,3-dichlorophenyl)methane         | 42240-73-3  |
| 5-18         | 2,2'-Methylenebis(4-methylphenol)              | 3236-63-3   |
| 5-19         | 2,4'-Dihydroxydiphenylmethane                  | 2467-03-0   |
| 5-20         | 4,4'-Difluorodiphenylmethane                   | 457-68-1    |
| 5-21         | 4,4'-Diphenylmethane Diisocyanate              | 101-68-8    |
| 5-22         | 4,4'-Diisocyanato-3,3'-dimethyldiphenylmethane | 139-25-3    |
| 5-23         | Bisphenol F                                    | 620-92-8    |
| 5-24         | 3,3'-Diaminodiphenylmethane                    | 19471-12-6  |
| 5-25         | 2,2'-Dihydroxydiphenylmethane                  | 205672      |
| 5-26         | 4,4'-Dihydroxytetraphenylmethane               | 1844-01-5   |
| 5-27         | 2,3,4,4'-Tetrahydroxydiphenylmethane           | 174462-43-2 |

| (6) ジフェニル17-ケトステロイド | 化合物名                            | CAS番号      |
|---------------------|---------------------------------|------------|
| 6-1                 | Dehydroepiandrosterone Acetate  | 853-23-6   |
| 6-2                 | Epiandrosterone                 | 481-29-8   |
| 6-3                 | $\Delta$ 4-Androstene-3,17-dion | 63-05-8    |
| 6-4                 | Dehydroepiandrosterone          | 53-43-0    |
| 6-5                 | 1,4-Androstadiene-3,17-dion     | 897-06-3   |
| 6-6                 | Adrenosterone                   | 382-45-6   |
| 6-7                 | Triamcinolone Acetonide         | 76-25-5    |
| 6-8                 | Estrone                         | 53-16-7    |
| 6-9                 | Estrone 3-hemisuccinate         | 58534-72-8 |
| 6-10                | $\Delta$ 1-Adrenosterone        | 7738-93-4  |
| 6-11                | Equilin                         | 474-86-2   |

|                         |   |              |
|-------------------------|---|--------------|
| 6-12                    | 16 $\alpha$ -hydroxyestrone                         | 566-76-7     |
| 6-13                    | Androsterone  | 53-41-8      |
| <b>(7) ステロイド</b>        |   |              |
|                         | <b>化合物名</b>   | <b>CAS番号</b> |
| 7-1                     | Hecogenin   | 467-55-0     |
| 7-2                     | hecogenin Acetate                                   | 915-35-5     |
| 7-3                     | Spirolactone  | 51-01-7      |
| 7-4                     | Oxandrolone   | 53-39-4      |
| 7-5                     | Stanozolol  | 10418-03-8   |
| 7-6                     | 16,17-Epoxyprogesterone                             | 1097-51-4    |
| 7-7                     | Cholesteryl Bromide                                 | 516-91-6     |
| 7-8                     | Cholic Acid Methyl Ester                            | 1448-36-8    |
| 7-9                     | 16,17-Epoxypregnenolone                             | 34209-81-9   |
| 7-10                    | (+)-4-Cholesten-3-one                               | 601-57-0     |
| 7-11                    | pregnenolone  | 145-13-1     |
| 7-12                    | Dipotassium Glycyrrhizinate, Hydrate                | 68797-35-3   |
| 7-13                    | Diosgenin   | 512-04-9     |
| 7-14                    | Cholesteryl Chloride                                | 910-31-6     |
| 7-15                    | 4-Pregnene-3,11,20-trione                           | 516-15-4     |
| 7-16                    | Digitoxigenin                                       | 143-62-4     |
| 7-17                    | Flunisolide   | 3385-03-3    |
| 7-18                    | Cholesterol-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxide         | 1250-95-9    |
| 7-19                    | Pregnenolone Acetate                                | 1778-02-5    |
| 7-20                    | Progesterone  | 57-83-0      |
| 7-21                    | Deoxycholic Acid Sodium Salt                        | 302-95-4     |
| 7-22                    | 1,2,3,4-Tetrahydro-1-naphthylamine                  | 2217-40-5    |
| <b>(8) ステロイドグリコシド</b>   |   |              |
|                         | <b>化合物名</b>   | <b>CAS番号</b> |
| 8-1                     | Tomatine  | 17406-45-0   |
| 8-2                     | Difitonin   | 11024-24-1   |
| 8-3                     | g-Strophanthin                                      | 630-60-4     |
| 8-4                     | Difitoxin   | 71-63-6      |
| 8-5                     | Digoxin   | 20830-75-5   |
| <b>(9) ヒドロキシケトステロイド</b> |   |              |
|                         | <b>化合物名</b>   | <b>CAS番号</b> |
| 9-1                     | 17 $\beta$ -hydroxy-17methylandrosta-1,4-dien-3-one | 72-63-9      |
| 9-2                     | Oxymetholone  | 434-07-1     |
| 9-3                     | Dexamethasone                                       | 50-02-2      |
| 9-4                     | Pregnenolone  | 145-13-1     |
| 9-5                     | Norethynodrel                                       | 68-23-5      |
| 9-6                     | Medroxyprogesterone 17-acetate                      | 71-58-9      |
| 9-7                     | Corticosterone                                      | 50-22-6      |
| 9-8                     | Cortisone   | 53-06-5      |
| 9-9                     | D(-)-Norgestrel                                     | 797-63-7     |
| 9-10                    | 17 $\alpha$ -Acetoxypregesterone                    | 302-23-8     |
| 9-11                    | Testosterone Propionate                             | 57-85-2      |
| 9-12                    | Methyltestosterone                                  | 58-18-4      |
| 9-13                    | 5 $\beta$ -Cholanic acid-3-one                      | 1553-56-6    |
| 9-14                    | Teststerone Enanthate                               | 315-37-7     |
| 9-15                    | Mesterolone   | 1424-00-6    |
| 9-16                    | 19-Norethindrone                                    | 68-22-4      |
| 9-17                    | Cyproterone acetate                                 | 2098-66-0    |
| 9-18                    | 17- $\alpha$ -hydroxyprogesterone caproate          | 630-56-8     |
| 9-19                    | 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone                     | 521-18-6     |
| 9-20                    | Prednisolone  | 50-24-8      |
| 9-21                    | Mifepristone  | 84371-65-3   |
| 9-22                    | Testosterone  | 58-22-0      |
| 9-23                    | 17 $\alpha$ -Methylandrostan-17 $\beta$ -ol-3-one   | 521-11-9     |
| 9-24                    | 11-Ketoteststerone                                  | 564-35-2     |
| 9-25                    | 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone caproate           | 630-56-8     |
| 9-26                    | Teststerone isocaproate                             | 15262-86-9   |
| 9-27                    | Aldosterone   | 52-39-1      |
| 9-28                    | Norethindrone                                       | 68-22-4      |
| 9-29                    | Ethisterone   | 434-03-7     |
| 9-30                    | (-)-Norgestrel                                      | 6533-00-2    |
| 9-31                    | Norethisterone acetate                              | 51-98-9      |
| 9-32                    | Medroxyprogesterone acetate                         | 71-58-9      |
| 9-33                    | Betamethasone 21-acetate                            | 987-24-6     |
| 9-34                    | Mesterolone   | 1424-00-6    |
| 9-35                    | Tibolone  | 5630-53-5    |
| 9-36                    | Nandrolone  | 434-22-0     |
| 9-37                    | Betamethasone 17,21-dipropionate                    | 5593-20-4    |
| 9-38                    | Corticosterone 21-acetate                           | 1173-26-8    |
| 9-39                    | $\Delta$ 9(11)-methylteststerone                    | 1039-17-4    |

|      |   |            |
|------|---|------------|
| 9-40 | Hydeoxycholic acid                        | 83-49-8    |
| 9-41 | 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone acetate  | 2268-98-6  |
| 9-42 | Trenbolone                                | 10161-33-8 |
| 9-43 | Hydrocortisone                            | 50-23-7    |
| 9-44 | Methandrostenolone                        | 72-63-9    |
| 9-45 | Mestanolone                               | 521-11-9   |
| 9-46 | Cortisone Acetate                         | 50-04-4    |
| 9-47 | Stanolone                                 | 521-18-6   |
| 9-48 | Hydrocortisone Acetate                    | 50-03-3    |
| 9-49 | 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone          | 80-75-1    |
| 9-50 | Deoxycorticosterone Acetate               | 56-47-3    |
| 9-51 | 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone Caproate | 630-56-8   |
| 9-52 | Fluorometholone                           | 426-13-1   |
| 9-53 | Betamethasone                             | 378-44-9   |
| 9-54 | Fluticasone Propionate                    | 80474-14-2 |
| 9-55 | Norethisterone                            | 68-22-4    |
| 9-56 | Prednisolone acetate                      | 52-21-1    |
| 9-57 | Cortexolone                               | 152-58-9   |
| 9-58 | Triamcinolone                             | 124-94-7   |
| 9-59 | Prednisone                                | 53-03-2    |
| 9-60 | Dexamethasone 21-acetate                  | 1177-87-3  |

| (10) ヒドロキシステロイド | 化合物名   | CAS番号      |
|-----------------|--|------------|
| 10-1            | Methylandrostenediol                               | 521-10-8   |
| 10-2            | Ethinylestradiol                                   | 57-63-6    |
| 10-3            | Ergosterol   | 57-87-4    |
| 10-4            | $\beta$ -Sitosterol Acetate                        | 915-05-9   |
| 10-5            | $\beta$ -Estradiol                                 | 50-28-2    |
| 10-6            | Estradiol Benzoate                                 | 50-50-0    |
| 10-7            | 5 $\beta$ -Pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol  | 1852-49-9  |
| 10-8            | Stigmastanol                                       | 19466-47-8 |
| 10-9            | Estriol  | 50-27-1    |
| 10-10           | $\beta$ -Cholestanol                               | 80-97-7    |
| 10-11           | $\beta$ -Sitosterol                                | 83-46-5    |
| 10-12           | Lanosterol   | 79-63-0    |
| 10-13           | $\beta$ -estradiol 17-hemisuccinate                | 7698-98-3  |
| 10-14           | 17 $\alpha$ Ethinylestradiol                       | 57-63-6    |
| 10-15           | Danazol  | 17230-88-5 |
| 10-16           | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol | 571-20-0   |
| 10-17           | 6 $\alpha$ -Hydroxyestradiol                       | 1229-24-9  |
| 10-18           | 17 $\alpha$ -Ethylestradiol 3-cyclopentyl ether    | 152-43-2   |
| 10-19           | Estrone Acetate                                    | 901-93-9   |
| 10-20           | 16-Ketoestradiol                                   | 566-75-6   |
| 10-21           | $\beta$ -Estradiol-6-one 6                         | 35048-47-6 |
| 10-22           | 17-Epiestriol                                      | 1228-72-4  |
| 10-23           | 2-Methoxyestradiol                                 | 362-07-2   |
| 10-24           | 16-Epiestriol                                      | 547-81-9   |
| 10-25           | Ethinylestradiol                                   | 57-63-6    |
| 10-26           | 25-Hydroxycholesterol                              | 2140-46-7  |
| 10-27           | 17 $\alpha$ -Estradiol                             | 57-91-0    |
| 10-28           | Mestranol  | 72-33-3    |
| 10-29           | $\beta$ -estradiol 3-Benzoate                      | 50-50-0    |
| 10-30           | Stigmasterol                                       | 83-48-7    |

| (11) 胆汁酸 | 化合物名   | CAS番号       |
|----------|--|-------------|
| 11-1     | Sodium Glycocholate Hydrate                                | 207614-05-9 |
| 11-2     | Tauroursodeoxycholic Acid                                  | 14605-22-2  |
| 11-3     | 3 $\alpha$ -Hydroxy-7-oxo-5 $\beta$ -cholanolic Acid       | 4651-67-6   |
| 11-4     | Lithocholic Acid   | 434-13-9    |
| 11-5     | Taurocholic Acid Sodium Salt                               | 145-42-6    |
| 11-6     | Chenodeoxycholic Acid                                      | 474-25-9    |
| 11-7     | Methyl Hyodeoxycholate                                     | 2868-48-6   |
| 11-8     | 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate | 75621-03-3  |
| 11-9     | 12-Oxochenodeoxycholic Acid                                | 番号なし        |
| 11-10    | Ursodeoxycholic Acid                                       | 128-13-2    |
| 11-11    | Chenodeoxycholic Acid                                      | 474-25-9    |
| 11-12    | Cholic Acid  | 81-25-4     |
| 11-13    | Sodium Cholate   | 361-09-1    |
| 11-14    | Hyodeoxycholic Acid Sodium Salt                            | 10421-49-5  |
| 11-15    | Dehydrocholic Acid   | 81-23-2     |
| 11-16    | Sosium Dehydrocholate                                      | 145-41-5    |
| 11-17    | 3 $\beta$ -Hydroxy- $\Delta$ 5-cholenic Acid               | 5255-17-4   |
| 11-18    | Sodium Deoxycholate  | 302-95-4    |
| 11-19    | Deoxycholic Acid   | 83-44-3     |

| (12) フラボノイド | 化合物名   | CAS番号       |
|-------------|--|-------------|
| 12-1        | Kaempferol                                       | 520-18-3    |
| 12-2        | Coumestrol                                       | 479-13-0    |
| 12-3        | Biochanin A                                      | 491-80-5    |
| 12-4        | Genistein  | 446-72-0    |
| 12-5        | Hesperidin                                       | 520-26-3    |
| 12-6        | (±)-Naringenin                                   | 67604-48-2  |
| 12-7        | Daidzein   | 486-66-8    |
| 12-8        | Quercetin  | 117-39-5    |
| 12-9        | 3,7,3',4'-Tetrahydroxyflavone                    | 528-48-3    |
| 12-10       | 5,7-hydroxyflavone                               | 480-40-0    |
| 12-11       | 3-hydroxyflavone                                 | 577-85-5    |
| 12-12       | flavone  | 525-82-6    |
| 12-13       | 5-hydroxyflavone                                 | 491-78-1    |
| 12-14       | 5,6-benzoflavone                                 | 6051-87-2   |
| 12-15       | 6-hydroxyflavone                                 | 6665-83-4   |
| 12-16       | Acacetin   | 480-44-4    |
| 12-17       | 7,8-dihydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one     | 38183-03-8  |
| 12-18       | Galangin   | 548-83-4    |
| 12-19       | 6-chloroflavone                                  | 10420-73-2  |
| 12-20       | 6-methylflavone                                  | 29976-75-8  |
| 12-21       | 6-methoxyflaxone                                 | 26964-24-9  |
| 12-22       | Naringenin                                       | 480-41-1    |
| 12-23       | 7-methoxyflavone                                 | 22395-22-8  |
| 12-24       | Baicalein  | 491-67-8    |
| 12-25       | 3',4',7,8-tetrahydroxyflavone                    | 3440-24-2   |
| 12-26       | 3',4',7-tromethoxyflavone                        | 22395-24-0  |
| 12-27       | 5,6-dihydroxy-7-methoxyflavone                   | 29550-13-8  |
| 12-28       | 6,7-dimethoxy-3',4',5-trihydroxyflavone          | 34334-69-5  |
| 12-29       | 3',4'-dimethoxyflavone                           | 4143-62-8   |
| 12-30       | 3',4'-dihydroxyflavone                           | 4143-64-0   |
| 12-31       | 4',5-dithdroxy-7methoxyflavone                   | 437-64-9    |
| 12-32       | 4'-methoxy-3,5,7-trihydroxyflavone               | 491-54-3    |
| 12-33       | 3'-benzyloxy-5,7-dihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone | 62507-01-1  |
| 12-34       | 3',4',5,7-tetramethoxyflavone                    | 855-97-0    |
| 12-35       | 5,6,7-trimethoxyflavone                          | 973-67-1    |
| 12-36       | Luteolin   | 491-70-3    |
| 12-37       | 7-hydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one         | 6665-86-7   |
| 12-38       | 3,7-dihydroxyflavone                             | 492-00-2    |
| 12-39       | Morin  | 6472-38-4   |
| 12-40       | Apigenin   | 520-36-5    |
| 12-41       | Rutin  | 153-18-4    |
| 12-42       | 7-hydroxyflavone                                 | 6665-86-7   |
| 12-43       | 7,8-dihydroxyflavone                             | 38183-03-8  |
| 12-44       | Diosmin  | 520-27-4    |
| 12-45       | 3,6-dihydroxyflavone                             | 108238-41-1 |
| 12-46       | 3-hydroxy-7-methoxyflavone                       | 7478-60-6   |
| 12-47       | Formononitin                                     | 485-72-3    |
| 12-48       | 2-carbethoxy-5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone  | 15485-76-4  |
| 12-49       | 4',7-dimethoxyisoflavone                         | 1157-39-7   |
| 12-50       | 3',4',7-trihydroxyisoflavone                     | 485-63-2    |
| 12-51       | 6,7,4'-trihydroxyisoflavone                      | 17817-31-1  |
| 12-52       | 4',5,7-trihydroxyisoflavone 7-glucoside          | 529-59-9    |
| 12-53       | Glycitein  | 40957-83-3  |
| 12-54       | Flavanone  | 487-26-3    |
| 12-55       | 4'-hydroxyflavanone                              | 6515-37-3   |
| 12-56       | 3'-hydroxyflavanone                              | 1621-55-2   |
| 12-57       | 7-hydroxyflavanone                               | 6515-36-2   |
| 12-58       | (+) - Catechin hydrate                           | 225937-10-0 |
| 12-59       | (±) - Catechin dydrate                           | 7295-85-4   |
| 12-60       | Hesperetin                                       | 520-33-2    |
| 12-61       | Taxifolin  | 98006-93-0  |
| 12-62       | 2'-hydroxyflavanone                              | 17348-76-4  |
| 12-63       | Naringin   | 10236-47-2  |
| 12-64       | Quercetin dihydrate                              | 6151-25-3   |
| 12-65       | Phloretin  | 60-82-2     |
| 12-66       | 4'-hydroxychalcone                               | 2657-25-2   |
| 12-67       | 4-hydroxchalcone                                 | 20426-12-4  |
| 12-68       | Chalcone   | 94-41-7     |
| 12-69       | 2-hydroxychalcone                                | 42224-53-3  |
| 12-70       | 2'-hydroxychalcone                               | 644-78-0    |
| 12-71       | Chromone   | 491-38-3    |

|                       |  |              |
|-----------------------|--|--------------|
| 12-72                 | Chromone-2-carboxylic acid                   | 4940-39-0    |
| 12-73                 | 4-chromanone                                 | 491-37-2     |
| 12-74                 | 2'-hydroxy-2,4,4',5',6'-pentamethoxychalcone | 73694-15-2   |
| <b>(13) フタル酸エステル</b>  |  |              |
|                       | <b>化合物名</b>                                  | <b>CAS番号</b> |
| 13-1                  | Diheptyl phthalate                           | 3648-21-3    |
| 13-2                  | Dinonyl phthalate                            | 84-76-4      |
| 13-3                  | Dimethyl phthalate                           | 131-11-3     |
| 13-4                  | Benzyl n-Butyl Phthalate                     | 85-68-7      |
| 13-5                  | Di-2-ethylhexyl Phthalate Standard           | 117-81-7     |
| 13-6                  | Di-iso-butyl Phthalate                       | 84-69-5      |
| 13-7                  | Phthalic Acid Dicyclohexyl Ester             | 84-61-7      |
| 13-8                  | Terephthalic Acid Diallyl Ester              | 1026-92-2    |
| 13-9                  | Diethyl phthalate                            | 84-66-2      |
| 13-10                 | Dicyclohexyl phthalate                       | 84-61-7      |
| 13-11                 | Di-n-octyl phthalate                         | 117-84-0     |
| 13-12                 | Diallyl Phthalate                            | 131-17-9     |
| 13-13                 | Di-n-butyl phthalate                         | 84-74-2      |
| 13-14                 | isophthalic Acid Diallyl Ester               | 1087-21-4    |
| 13-15                 | Di-n-propyl phthalate                        | 131-16-8     |
| 13-16                 | Di-n-heptyl phthalate                        | 3648-21-3    |
| <b>(14) アルキルフェノール</b> |  |              |
|                       | <b>化合物名</b>                                  | <b>CAS番号</b> |
| 14-1                  | 4-Propylphenol                               | 645-56-7     |
| 14-2                  | 4-n-Hexylphenol                              | 2446-69-7    |
| 14-3                  | 4-sec-Butylphenol                            | 99-71-8      |
| 14-4                  | 4-Ethylphenol                                | 123-07-9     |
| 14-5                  | 4-n-Heptylphenol                             | 1987-50-4    |
| 14-6                  | 4-tert-Butylphenol                           | 98-54-4      |
| 14-7                  | 4-(1,1,3,3,-Tetramethylbutyl)phenol          | 140-66-9     |
| 14-8                  | 4-Isopropylphenol                            | 99-89-8      |
| 14-9                  | 4-tert-Amylphenol                            | 80-46-6      |
| 14-10                 | p-Dodecylphenol                              | 27193-86-8   |
| 14-11                 | p-Nitrotoluene                               | 99-99-0      |
| 14-12                 | p-n-Octylphenol Standard                     | 1806-26-4    |
| 14-13                 | nonylphenol                                  | 104-40-5     |
| 14-14                 | 4-(tert-Octyl)phenol                         | 140-66-9     |
| 14-15                 | 4-Octylphenol                                | 1806-26-4    |
| 14-16                 | p-Cresol                                     | 106-44-5     |
| <b>(15) ビフェニル</b>     |  |              |
|                       | <b>化合物名</b>                                  | <b>CAS番号</b> |
| 15-1                  | 3,3' -Dihydroxydiphenylamine                 | 65461-91-8   |
| 15-2                  | 2,2' -Dihydroxydiphenyl ether                | 15764-52-0   |
| 15-3                  | Bis(4-hydroxyphenyl) sulfide                 | 2664-63-3    |
| 15-4                  | 4,4' -Dihydroxydiphenyl ether                | 1965-09-9    |
| 15-5                  | 4,4' -Dihydroxytetraphenyl methane           | 1844-01-5    |
| 15-6                  | 4-Phenylphenol                               | 92-69-3      |
| 15-7                  | Bis(4-hydroxyphenyl) sulfone                 | 80-09-1      |
| 15-8                  | 4,4'-Biphenol                                | 92-88-6      |
| 15-9                  | 4-Methoxybiphenyl                            | 613-37-6     |
| 15-10                 | Diphenyl                                     | 92-52-4      |
| 15-11                 | 4,4'-diethoxydiphenyl                        | 7168-54-9    |
| 15-12                 | 4,4'Biphenyldiol                             | 92-88-6      |
| 15-13                 | 4,4'-Biphenol                                | 92-88-6      |
| 15-14                 | 4-Hydroxy-4'-methoxydiphenyl                 | 16881-71-3   |
| <b>(16) アルカン</b>      |  |              |
|                       | <b>化合物名</b>                                  | <b>CAS番号</b> |
| 16-1                  | n-Octylbenzene                               | 2189-60-8    |
| 16-2                  | 2,2,4-Trimethylpentane                       | 540-84-1     |
| 16-3                  | n-Nonane                                     | 111-84-2     |
| 16-4                  | n-Octane                                     | 111-65-9     |
| <b>(17) フェノール</b>     |  |              |
|                       | <b>化合物名</b>                                  | <b>CAS番号</b> |
| 17-1                  | Sennoside A                                  | 81-27-6      |
| 17-2                  | Bergenin                                     | 477-90-7     |
| 17-3                  | Arbutin                                      | 497-76-7     |
| 17-4                  | paeonol                                      | 552-41-0     |
| 17-5                  | Baicalin                                     | 491-67-8     |
| 17-6                  | 4-n-amylphenol                               | 14938-35-3   |
| 17-7                  | 4-benzylphenol                               | 101-53-1     |
| 17-8                  | 4-Triphenylmethylphenol                      | 978-86-9     |
| 17-9                  | 3(2)-t-Butyl-4-hydroxyanisole                | 25013-16-5   |
| 17-10                 | p-Naphtholbenzein                            | 145-50-6     |
| 17-11                 | Amoxicillin Trihydrate                       | 61336-70-7   |
| 17-12                 | 3,3,5-Triiodo-L-thyronine                    | 6893-02-3    |
| 17-13                 | 4-Cyclohexylphenol                           | 1131-60-8    |



|                      |  |             |
|----------------------|--|-------------|
| 17-14                | 4-tert-Amylphenol                            | 80-46-6     |
| 17-15                | p,p-DDE                                      | 72-55-9     |
| 17-16                | (-)-epinephrine                              | 51-43-4     |
| 17-17                | p-Phenolsulfonic Acid                        | 98-67-9     |
| 17-18                | Synephrine                                   | 94-07-5     |
| <b>(18) 安息香酸</b>     |  |             |
| 18-1                 | 4-Hydroxybenzoic acid n-butyl ester          | 94-26-8     |
| 18-2                 | 4-Hydroxybenzoic acid ethyl ester            | 120-47-8    |
| 18-3                 | 4-(4'-hydroxyphenoxy)-benzoic Acid           | 598-31-2    |
| 18-4                 | 4-Chlorophthalic Anhydride                   | 118-45-6    |
| 18-5                 | 4,5-Dichlorophthalic Anhydride               | 942-06-3    |
| 18-6                 | Terephthalic acid dimethyl ester             | 120-61-6    |
| 18-7                 | 4-Hydroxybenzoic acid n-nonyl ester          | 38713-56-3  |
| 18-8                 | 4-Hydroxybenzoic acid phenyl ester           | 17696-62-7  |
| 18-9                 | 4-Hydroxybenzoic acid benzyl ester           | 94-18-8     |
| 18-10                | Tetrachlorophthalic Anhydride                | 117-08-8    |
| 18-11                | Tetrachlorophthalic Acid di-n-propyl ester   | 6928-67-2   |
| 18-12                | 4-Hydroxyphthalic acid                       | 610-35-5    |
| 18-13                | 4-Hydroxybenzoic acid n-hexyl ester          | 1083-27-8   |
| <b>(19) アダマンタン</b>   |  |             |
| 19-1                 | p-(1-Adamantyl)toluene                       | 459-55-8    |
| 19-2                 | Adamantane                                   | 281-23-2    |
| 19-3                 | 4-(1-Adamantyl)phenol                        | 29799-07-3  |
| <b>(20) フルオレン</b>    |  |             |
| 20-1                 | 9-Aminofluorene Hydrochloride                | 5978-75-6   |
| 20-2                 | 9,9'-Bifluorenylidene                        | 746-47-4    |
| <b>(21) 塩素化有機化合物</b> |  |             |
| 21-1                 | 1,3-Dichlorobenzene                          | 541-73-1    |
| 21-2                 | 1,2-Dichlorobenzene                          | 95-50-1     |
| 21-3                 | 2,4-Dichlorophenol                           | 120-83-2    |
| 21-4                 | DDT  | 50-29-3     |
| 21-5                 | 1,4-Dichlorobenzene                          | 106-46-7    |
| 21-6                 | 2,4,5-Trichlorophenol                        | 95-95-4     |
| 21-7                 | 2,2-Bis(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethane   | 番号なし        |
| 21-8                 | $\alpha$ -benzoepin                          | 959-98-8    |
| 21-9                 | 2,4,5-T (2,4,5-triChlorophenoxyacetate)      | 93-76-5     |
| 21-10                | $\beta$ -benzoepin                           | 33213-65-9  |
| 21-11                | 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid               | 94-75-7     |
| 21-12                | PCP  | 87-86-5     |
| 21-13                | Linuron                                      | 330-55-2    |
| 21-14                | Vinclozolin                                  | 50471-44-8  |
| 21-15                | Procymidone                                  | 32809-16-8  |
| 21-16                | Atrazine                                     | 1912-24-9   |
| 21-17                | Hexachlorobenzene                            | 118-74-1    |
| 21-18                | 2,2-Bis(4-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene | 72-54-8     |
| 21-19                | ( $\pm$ )-Baclofen                           | 1134-47-0   |
| 21-20                | Aldrin                                       | 309-00-2    |
| <b>(22) 一般有機化合物</b>  |  |             |
| 22-1                 | $\alpha$ -(Hydroxymethyl)benzeneacetic acid  | 101-31-5    |
| 22-2                 | Loganin                                      | 18524-94-2  |
| 22-3                 | Rhynchophylline                              | 76-66-4     |
| 22-4                 | Ribavirin                                    | 36791-04-5  |
| 22-5                 | Molinate                                     | 2212-67-1   |
| 22-6                 | Pentadecafluoro octanoic acid                | 335-67-1    |
| 22-7                 | Malathion                                    | 121-75-5    |
| 22-8                 | Alendronate                                  | 121268-17-5 |
| 22-9                 | Gossypol                                     | 303-45-7    |
| 22-10                | Triphenylethylene                            | 58-72-0     |
| 22-12                | 1,2-Benzopyrene                              | 50-32-8     |
| 22-13                | 2,2-Diphenylpropane                          | 778-22-3    |
| 22-14                | Lansoprazole                                 | 103577-45-3 |
| 22-15                | Tamoxifen                                    | 10540-29-1  |
| 22-16                | Vincristine Sulfate                          | 2068-78-2   |
| 22-17                | 4-hydroxytamoxifen                           | 68047-06-03 |
| 22-18                | Orcein                                       | 1400-62-0   |
| 22-19                | Diclofenac Sodium                            | 15307-86-5  |
| 22-20                | Diethylstilbestrol                           | 56-53-1     |
| 22-21                | p-n-Nonylphenol                              | 104-40-5    |
| 22-22                | 3,3-Diethylthiacyanine                       | 2197-01-5   |
| 22-23                | DOA=di(2-ethylhexyl) adipate(DEHA)           | 103-23-1    |
| 22-24                | Urapidil hydrochloride                       | 64887-14-5  |

|                      |   |            |
|----------------------|---|------------|
| 22-26                | Disodium Etidronate                               | 7414-83-7  |
| 22-27                | Atropine Sulfate                                  | 51-55-8    |
| 22-28                | Clarithromycin                                    | 81103-11-9 |
| 22-29                | Fluvoxamine maleate                               | 54739-18-3 |
| 22-30                | Osthole   | 484-12-8   |
| 22-31                | Diethylstilbestrol Dipropionate                   | 130-80-3   |
| 22-32                | Betaine   | 107-43-7   |
| 22-33                | 4-Bromocrotonic Acid                              | 13991-36-1 |
| 22-34                | Methoxyacetic Acid                                | 625-45-6   |
| 22-35                | 1,2,5,6,9,10-Hexabromocyclododecane               | 3194-55-6  |
| <b>(23) 保護アミノ酸</b>   |   |            |
| 23-1                 | L-Tyrosine Ethyl Ester Hydrochloride              | 4089-07-0  |
| 23-2                 | L-Tyrosine Hydrazide                              | 7662-51-3  |
| 23-3                 | L-Tyrosine Methyl ester Hydrochloride             | 3417-91-2  |
| <b>(24) 有機フッ素化合物</b> |   |            |
| 24-1                 | Nonafluorobutanesulphonic Acid (C4)               | 375-73-5   |
| 24-2                 | Perfluoropentanoic Acid (C5)                      | 2706-90-3  |
| 24-3                 | Perfluorohexanoic Acid (C6)                       | 307-24-4   |
| 24-4                 | Perfluoroheptanoic Acid (C7)                      | 375-85-9   |
| 24-5                 | Perfluorooctanoic Acid (C8)                       | 335-67-1   |
| 24-6                 | Perfluorononanoic Acid (C9)                       | 375-95-1   |
| 24-7                 | Perfluorodecanoic Acid (C10)                      | 335-76-2   |
| 24-8                 | Perfluoroundecanoic Acid (C11)                    | 2058-94-8  |
| 24-9                 | Tricosafuorododecanoic Acid (C12)                 | 307-55-1   |
| 24-10                | Perfluorotetradecanoic Acid (C14)                 | 376-06-7   |
| 24-11                | Perfluorohexadecanoic Acid (C16)                  | 67905-19-5 |
| 24-12                | Perfluorooctane                                   | 307-34-6   |
| 24-13                | Perfluorooctanesulfonyl Acid                      | 1763-23-1  |
| 24-14                | Perfluorooctanoic Acid Methyl Ester               | 376-27-2   |
| 24-15                | 1H,1H,2H,2H-Perfluorohexan-1-ol, Telomer (4:2)    | 2043-47-2  |
| 24-16                | 1H,1H,2H,2H-Perfluoro-1-octanol, Telomer (6:2)    | 647-42-7   |
| 24-17                | 1H,1H,2H,2H-Perfluoro-1-decanol, Telomer (8:2)    | 678-39-7   |
| 24-18                | 1H,1H,2H,2H-Perfluorododecan-1-ol, Telomer (10:2) | 865-86-1   |
| <b>(25) 有機スズ化合物</b>  |   |            |
| 25-1                 | Monobutyltin oxide                                | 2273-43-0  |
| 25-2                 | Dibutyltin oxide                                  | 818-08-6   |
| 25-3                 | Dibutyltin dichloride                             | 683-18-1   |
| 25-4                 | Dibutyltin diacetate                              | 1067-33-0  |
| 25-5                 | Dibutyltin maleate                                | 78-04-6    |
| 25-6                 | Dibutyltin bis(trifluoromethanesulfonate)         | 38438-11-8 |
| 25-7                 | Tributyltin chloride                              | 1461-22-9  |
| 25-8                 | Tributyltin hydride                               | 688-73-3   |
| 25-9                 | Tributyltin fluoride                              | 1983-10-4  |
| 25-10                | Tributyltin acetate                               | 56-36-0    |
| 25-11                | Allenyltributyltin                                | 53915-69-8 |
| 25-12                | Allyltributyltin                                  | 24850-33-7 |
| 25-13                | Tributylethynyltin                                | 994-89-8   |
| 25-14                | Tributylvinyltin                                  | 7486-35-3  |
| 25-15                | Tributyl(2-pyridyl)tin                            | 17997-47-6 |
| 25-16                | Bis(tributyltin)                                  | 813-19-4   |
| 25-17                | Tetraethyltin                                     | 1461-25-2  |
| 25-18                | Tetraallyltin                                     | 7393-43-3  |
| 25-19                | Dibutyltin dilaurate                              | 77-58-7    |
| 25-20                | Monophenyltin trichloride                         | 1124-19-2  |
| 25-21                | Diphenyltin sulfide                               | 20332-10-9 |
| 25-22                | Triphenyltin chloride                             | 639-58-7   |
| 25-23                | Triphenyltin hydroxide                            | 76-87-9    |
| 25-24                | Allyltriphenyltin                                 | 76-63-1    |
| 25-25                | Tetraphenyltin                                    | 595-90-4   |
| 25-26                | Diocetyl tin oxide                                | 870-08-6   |
| 25-27                | Triocetyl tin hydride                             | 869-59-0   |
| 25-28                | Dimethyltin dichloride                            | 753-73-1   |
| 25-29                | Trimethyltin chloride                             | 1066-45-1  |
| 25-30                | Tetramethyltin                                    | 594-27-4   |
| 25-31                | Diethyltin dichloride                             | 866-55-7   |
| 25-32                | Triethyltin chloride                              | 994-31-0   |
| 25-33                | Tri-i-propyltin chloride                          | 14101-95-2 |
| 25-34                | Tri-n-propyltin chloride                          | 2279-76-7  |
| 25-35                | Tri-n-propyltin Acetate                           | 3267-78-5  |
| 25-36                | Tetra-i-propyltin                                 | 2949-42-0  |
| 25-37                | Tetra-n-propyltin                                 | 2176-98-9  |

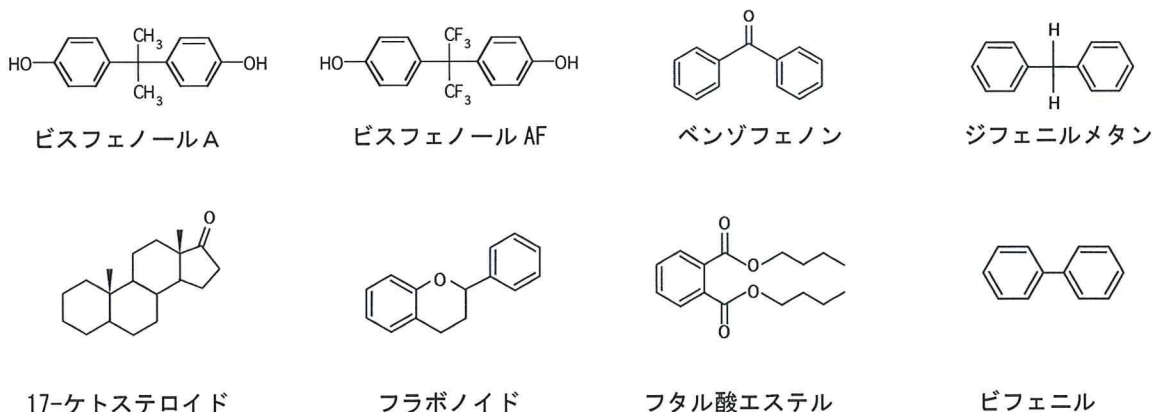


図 5. 核内受容体応答スクリーニングに供される代表的な化学物質群

表 2. 核内受容体  $ER\alpha$  に対する化学物質の活性 (17 $\beta$ -エストラジオールに対する比活性)

| 化合物名   | 比活性   |
|--|-------|
| 17 $\beta$ -estradiol  | 100   |
| bisphenol C  | 31.32 |
| 4,4'-(1,3-dimethylbutylidene)bisphenol                                     | 15.30 |
| 4,4'-(2-hydroxybenzylidene)-bis(2,3,6-trimethylphenol)                     | 7.15  |
| 4,4'-(2-ethylhexylidene)bisphenol  | 4.76  |
| 1,1-bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)cyclohexane                               | 2.28  |
| bisphenol AF   | 1.65  |
| bisphenol M  | 1.55  |
| 1,1-bis(4-hydroxyphenyl)cyclohexane (bisphenol Z)                          | 1.55  |
| $\alpha,\alpha'$ -tris(4-hydroxyphenyl)-1-ethyl-4-isopropylbenzene         | 1.43  |
| 4-(1-adamantyl)phenol  | 0.96  |
| bisphenol B  | 0.50  |
| bisphenol AP   | 0.34  |
| 9,9-bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)fluorine                                  | 0.27  |
| 2,2-bis(3-amino-4-hydroxyphenyl)hexafluoropropane                          | 0.26  |
| spirobicomane  | 0.24  |
| 2,2-bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane                                   | 0.24  |
| 2,2-bis[4-(4-aminophenoxy)phenyl]hexafluoropropane                         | ND    |
| $\alpha,\alpha'$ -bis(4-hydroxy-3,5-dimethylphenyl)-1,4-diisopropylbenzene | ND    |
| tetramethyl bisphenol A  | ND    |
| 9,9-Bis(4-hydroxyphenyl)fluorine   | ND    |

表3. 核内受容体 ERR $\gamma$ に対する化学物質の活性：ビスフェノールAの結合親和性に対する比活性

| 化合物名   | RBA* |
|--|------|
| Bisphenol E                                  | 121  |
| Bisphenol A                                  | 100  |
| 4- $\alpha$ -cumylphenol                     | 92.9 |
| 1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)cyclohexane          | 39.2 |
| 4- <i>tert</i> -butylphenol                  | 37.7 |
| Bisphenol B                                  | 37.5 |
| 4- <i>sec</i> -Butylphenol                   | 30.5 |
| 4- <i>tert</i> -amylphenol                   | 29.7 |
| Bisphenol C                                  | 29.5 |
| Bis(4-hydroxyphenyl) sulfide                 | 26.0 |
| 4-(1,1,3,3,-Tetramethylbutyl)phenol          | 20.7 |
| 4-isopropylphenol                            | 13.9 |
| 2,2-Bis(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethane   | 10.8 |
| 4-Benzylphenol                               | 8.87 |
| Bisphenol AP                                 | 8.01 |
| Bisphenol F                                  | 7.46 |
| Bisphenol A diacetate                        | 6.40 |
| 2,2-Bis(4-chloroformyloxyphenyl)propane      | 6.31 |
| 4-Propylphenol                               | 6.04 |
| 4-Phenylphenol                               | 5.35 |
| 4- <i>tert</i> -octylphenol                  | 4.14 |
| 4-ethylphenol                                | 3.41 |
| Bisphenol P                                  | 3.08 |
| 4- <i>n</i> -amylphenol                      | 3.03 |
| 4- <i>n</i> -Hexylphenol                     | 2.95 |
| Bisphenol AF                                 | 2.74 |
| 4,4'-(1,3-Dimethylbutylidene)bisphenol       | 2.27 |
| 4-(1-Adamantyl)phenol                        | 1.56 |
| 1,1-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)cyclohexane | 1.12 |
| Many other chemicals                         | N.D. |

[<sup>3</sup>H]ビスフェノールAをトレーサーにした結合試験の結果を、ビスフェノールAのIC<sub>50</sub>値(9.85 nM)を100にして計算した比活性を大きい順番に並べた結果を示した。

約30種もの活性な化学物質が存在することが明らかとなった。なかでもIC<sub>50</sub>値8-90 nMの化合物が13種も存在すること、また、ビスフェノール類、アルキルフェノール類に結合親和性の高いものが多いことが注目される。

#### ④ PPAR $\gamma$

核内受容体の中でも脂質代謝系や免疫系に重要な役割を担うことが知られる、ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体(peroxisome proliferator-activated receptors)  $\gamma$ 型 $\gamma$ ; PPAR $\gamma$ )に着目し、特異的リガンドであるチアゾリジン系薬剤の[<sup>3</sup>H]rosiglitazoneを用いた受容体結合試験系の構築を試みた。飽和結合試験で特異的結合を観測される条件を設定後、競合結合試験系の確立に成功した。そして、482種の化学物質に対しPPAR $\gamma$ への結合性解析を実施したところ、rosiglitazone(ロシグリタゾン)より強く結合する化学物質は同定されなかった。しかしながら、ビスフェノールAアナログ、ジフェニルメタン、アルキルフェノール、フラボノイド、内分泌攪乱物質など構造的に多岐にわたる68種の化学物質において有意な結合性が認められた。表4には、それをロシグリタゾンへの比活性で示している。

PPAR $\gamma$ は他の核内受容体に比べ大きなリガンド結合ポケットを持つことが知られており、これが様々な化学物質との結合を可能にしている。H20年度、有機スズ化合物・トリフェニルスズ、トリブチルスズがかなり強い結合親和性を示すことがはじめて明らかとなった。また、ジフェニルメタンに分類される5-4:2,2'-メチレンビス(4-クロロフェノール)がこれらと同程度の強さで結合することが判明した。この化合物はベンゼン環に塩素原子が結合した構造を持つが、こうした有機ハロゲン系の化合物、例えば、1-2:テトラクロロビスフェノールA、1-3:テトラブromoビスフェノールAのような化学物質が、PPAR $\gamma$ と強い結合性を示すことが分かった。ビスフェノールAは全く結合しないことから、塩素、臭素によるハロゲン結合を介した相互作用増強などが考えられた。