

研究費の名称=厚生科学研究費補助金

研究事業名=生活安全総合研究事業

研究課題名=内分泌かく乱物質の超高速選別法の開発・検証に関する調査研究（総合研究報告書）

国庫補助金精算所要額（円）=100,000,000

研究期間（西暦）=1998

研究年度（西暦）=1998

主任研究者名=菅野 純（国立医薬品食品衛生研究所）

分担研究者名=井上 達（国立医薬品食品衛生研究所）

研究目的=現在、ある種の化学物質が生物の内分泌系を攪乱し、野生生物及びヒトの健康に影響を及ぼすことが懸念されている。その一方、我々の現代生活においては膨大な種類の化学物質が利用されており、これらの化学物質が内分泌かく乱作用を有するかどうかを早急に調査する必要がある。このため、本研究では米国が提案している化学物質の内分泌かく乱作用の有無を評価する方法の有用性を独自の立場から検討するとともに、必要な改良を行う事を目的とした。信頼性のあるHigh Throughput Screening(HTPS)法を確立することにより、約数万種の化学物質に対する内分泌かく乱作用の有無を確認するための優先順位付けを早急に行うことが可能となる。また、創薬の現場ではリード化合物の選定の過程で3次元構造活性相関を用いた電子計算機内での化合物選定が行われている。この方法は、未だに開発途上であるものの、その高速性と経済性から、膨大な数に上る環境化学物質の中から内分泌かく乱作用を持ち得る化合物をスクリーニングするための非常に有効な手段となることが期待される。そして、ここで得られたデータは、次の段階の各種試験によって環境化合物を検討するための優先順位付けの為に、大きな役割を果たすことが期待される。本研究では、3次元構造活性相関によるエストロゲン受容体に対する各種環境化学物質の結合や機能発現のシミュレーションがどの様に可能で、その精度向上にはどのようなデータを電算機が要求するか、その実現にはどのような問題点があるかを調査研究する事を目的とするものである。

研究方法=本 HTPS 研究は、米国が提案している化学物質の内分泌かく乱作用の有無を評

が判明した。PC50値はその物質のEC50値の代用として使用可能であると考えられるが、Threshold値は対数表示でのシグモイド用量反応曲線の裾野の部分を示すものである。Threshold値とPC50値が相関するからとはいえ、その値とEC50値あるいはPC50値を同等に意義のある値として扱うことは出来ない。おそらく、定性的に或いは、上限を規定する指標値に過ぎないと考えるのが正しいと解釈される。また、Dr. Sheehanの研究室における3D-QSARに関する検討では、CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) は、2オングストロームの3次元格子点空間にリガンド分子、格子点にプローブ原子核(通常炭素13)を置いたときのリガンドとの立体的及び静電的相互作用を全ての格子点についてシミュレーション計算し、リガンドの性質の数値化を行う。3D空間に分子を配置する際に手作業が入るため、別にプレスクリーニング計算が必要である。HQSAR

(Hologram QSAR) は、化学物質の構造を部分に分解し、その構造を数値化することにより化合物を数列で表記するもので、その表記と生物学的活性との相関を得るものである。Pharmacophoreは、モデル分子(estradiolとDES)の特徴的構造部位を3次元の球で代表させ、その配置と生物活性を連関させる方法であり、定性的判断のみを行うものである。Keponeがこの方法で拾い上げられることが興味深い。非活性物質から得られた禁止sphere的な要素を加える段階である。これらの拠り所は、生物アッセイデータと、4化合物(DES、E2、Tamoxifen、raloxifen)のER ligand binding domainの結合したままの結晶回析データである。Helix 12がantagonistの結合時に90度方向が変わることもある程度条件に組み込んだ段階である。ドッキングモデルは上記の3方法とは考える順番が異なり、受容体分子の結合ポケットを構成するアミノ酸等の構造をもとに、そのポケットの立体的、静電的情報を計算し、それに対するリガンドの相互作用を計算する。リガンドとなる化学物質の構造そのものを用いないので、構造的に非常にバラエティーに富んだりリガンドがピックアップされる長所を有し、リガンドに依存したレセプター分子の構造変化、水和水の扱いなどが盛り込まれる。バイオフィールド3次元定量的構造活性相関の利用が、現存する膨大な環境化学物質のみならず将来にわたり増加し続ける新規化合物に対する有効なスクリーニング手法の一つとして注目を浴びつつある。この方法は、生体側の分子(受容体)とそれに結合する化学物質の分子レベルにおける相互作用を考慮した新しい構造活性相関であり、この体系を確立する事はHTPSの観点からも意義が大きいものである。

結論=本研究により、ほ乳類由来培養細胞を用いたホルモン応答性試験の開発が所定の成果を持って開始されたと結論される。本方法においてエストロゲン α 受容体に関して比較的満足の行くロボットシステムを構築し得たと考えられるが、感度、費用の点を含めて更なる問題点が克服されるべき課題として残されており、さらに、残る受容体系に対しても、細胞株を含めた改良が必要であると考えられる。調査検討したこれらの方法のなかでは、ドッキングモデルがもっとも応用性と柔軟性に富んでおり、生体分子側

の構造変化(リガンド依存性のみならず遺伝子突然変異によるアミノ酸置換等による変化を含む)にも高精度に即応できる優れた面があると考えられた。ただし、どの手法の精度を向上させる為にも、常に生物学的活性のデータなどによるシミュレーションプログラムの教育が必要であり、また、その要求に適合した生物学的実験を効率よく行うことが重要である点が再確認された。また、本班研究が通産省研究班との共同研究であるという立場を利用して、OECD等の国際的活動に対する実験研究の重複を国内で避けることおよび科学的情報の交換を行うことを目的とした厚生省、通産相、農林省、および環境庁の関連研究機関の内分泌かく乱化学物質実験者レベルでの会合を兼ねて計7回開催し、OECD対応の子宮肥大試験やハーシュバーガー試験について協議した(実績報告書別添第1~6回議事録参照)