

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

研究課題： 超高速選抜法の検証の評価に関する調査研究
分担研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・部長

研究要旨

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事も内分泌かく乱問題の緊急課題の一つである。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ヒト由来培養細胞系を用いた方法の有用性を独自の立場から検討するとともに、必要な改良を行った。米国プロジェクトではヒト乳癌細胞由来細胞株の内、エストロゲン受容体など、目的とする受容体を定常的に発現している細胞株を用いる事が試みられたのに対し、本研究班ではNEDOとの共同研究として、住友化学において、受容体発現が殆ど無いHela細胞に受容体分子を強制発現させた上でホルモン応答性を持たせた培養細胞株を開発した。それをもとに（財）化学品検査協会にHigh Throughput Screening (HTPS) Robotの設置を行い、その始業を成し遂げた。さらに、約60化学物質を米国EPAの内分泌かく乱化学物質リストからモデル物質として選択し、代謝系（肝S9ミックス）の有無を含め、延べ約350測定以上を行い、その結果の解析を行った。

A. 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。

B. 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価する方法の有用性を確認する事から開始されたが、米国のシステム自体が未

完成の段階であり（その後、第1段階は不成功に終わったとの連絡があった）、また、信頼性のあるHTPSを確立するための基礎研究として、特に、その系で用いられる培養細胞株の開発に関しては、特許申請も絡み世界的には未だに競争状態にある。この中で、総体的システムは、世界的データ互換の立場から、米国と共通のものとしたが、そこで用いられる解析系の詳細については本研究班において独自に開発したものが用いられること、また、検討対象化学物質に日本でのみ使用されている化学物質が含まれる点が特色である。NEDOとの共同研究として、住友化学において作製されたHela細胞をベースとするホルモン応答性培養細胞株を用い、（財）化学品検査協会にHigh Throughput Screening Robotの設置を行った。そして、約60化学物質を米国EPAの内分泌かく乱化学物質リストからモデル物質として選択し、代謝系（肝S9ミックス）の有無を含め、延べ約350測定以上を行うこととした。さらに、その結果の解析とその解釈に関する検討

を行った。

C. 研究結果

ヒトホルモンレセプター発現遺伝子及びホルモン応答配列を持つレポーター遺伝子を安定的に組み込んだ細胞を用いた High Throughput Screening (HTS) assay systemを開発し、63物質のモデル化合物を用いてその有効性について検討を行った。17 β -EstradiolやBisphenol A等を化合物としてER α 非代謝アゴニスト測定系を用いて感度及び再現性を検討した。結果、17 β -EstradiolとBisphenol Aはグラフ上からは各々おおよそ 3×10^{-11} Mと 3×10^{-7} Mであり、受容体競合試験や酵母を用いた応答試験と同等ないし、若干感度が良いというデータを得た。しかし、多くの検体については、検出感度の問題からEC50値が算出不能となることが判明した。この点を補強する目的からPC50値とThreshold値を定義した。

PC50値は、各測定プレートの陽性対照ウェル17 β -Estradiol、 10^{-10} Mの平均転写活性化倍率の1/2を示すと推定される化学物質濃度と、用量反応データより、その点を挟む2濃度区を結ぶ直線から算出した。値は、基礎転写活性化倍率に陰性対照(DMSOのみを添加)発光強度のCVの3倍を加算した値を示すと推定される化学物質濃度とした。その結果、多くの化合物では、EC50値が求められ無いことが判明した。

Threshold値は多くの物質で最高測定濃度付近の値として求めたが、PC50値が求まらない物質も認められた。その中にはThreshold値は比較的低濃度であるにもかかわらず、反応が濃度依存的に増加せず、結果としては、PC50値が求まらない様な容量作用曲線を描く物質も認められた。

さらにS9(S9をさらに15,000xgで10min.遠心した上清)及び β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(還元型NADPH, Kohjin Co., Ltd.)を添加した。代謝系を含まない場合に比較して3倍以

上の転写活性化倍率の増加が認められた。作用の強いエストロゲン物質であるにも関わらずソフトウェア的にED50が計算されない欠点が指摘された。

D. 考察

本システムでは、多くの物質ではPC50値、あるいはThreshold値しか求まらないことが判明した。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た。しかし、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。そのため、いかにThreshold値とPC50値がよく相関するからといっても、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、定性的にあるいは、上限を規定する指標値に過ぎないと思うのが正しいと解釈される。

E. 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kawasaki Y, Umemura T, Saito M, Momma J, Matsushima Y, Sekiguchi H, Matsumoto M, Sakemi K, Isama K, Inoue T, Kurokawa Y, Tsuda M: Toxicity study of a rubber antioxidant, 2-mercaptobenzimidazole, by repeated oral administration to rats. Toxicol Sci, 1998, Feb;23(1):53-68

Hirabayashi Y, Matsumura T, Matsuda M, Kuramoto K, Motoyoshi K, Yoshida K, Sasaki H, Inoue T : Cell kinetics of hemopoietic colony-forming units in spleen (CFU-S) in young and old mice. *Mech Ageing Dev*, 1998 , Apr 1;101(3):221-231

Sai K, Kai S, Umemura T, Tanimura A, Hasegawa R, Inoue T, Kurokawa Y: Protective effects of green tea on hepatotoxicity, oxidative DNA damage and cell proliferation in the rat liver induced by repeated oral administration of 2-nitropropane, *Food Chem Toxicol*, 1998, Dec;36(12):1043-1051

Sai K, Upham BL, Kang KS, Hasegawa R, Inoue T, Trosko JE: Inhibitory effect of pentachlorophenol on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells in vitro. *Cancer Lett*, 1998 , Aug 14;130(1-2):9-17

Mitsumori K, Imazawa T, Onodera H, Takahashi M, Kitajima S, Inoue T, Kurokawa Y: Ultrastructural changes in motor endplates of the lumbrical muscles of rats induced by a microsomal Ca²⁺ ATPase inhibitor, 2,5-di(tert-butyl)-1,4-hydroquinone. *Arch Toxicol*, 1998, 72(2):115-118

Trosko JE, and Inoue T: Oxidative stress, signal transduction, and intercellular communication in radiation carcinogenesis, *Stem Cells*, 1997, 15 (suppl2), 59-67.

Sasaki H, Matsuda M, Lu Y, Ikuta K, Matuyama S, Hirabayashi Y, Mitsui H, Matsumura T, Muramatsu M, Tsukada T, Aizawa S, and Inoue T : A fraction unresponsive to growth inhibition by TGF- β among the high-proliferative potential progenitor cells in bone marrow of p53-deficient mice. *Leukemia*, 1997, 11, 239-244.

Nishimura Y, Hirabayashi Y, Matuszaki Y, Musette P, Ishii A, Nakauchi H, Inoue T, and Yonehara S. : In vivo analysis of Fas antigen-mediated apoptosis: Effects of agonistic anti-mouse Fas monoclonal antibody on thymus, spleen, and liver. *Int Immunol*, 1997, 19, 307-316.

Yoshida K, Inoue T, Nojima K, Hirabayashi Y, and Sado T. : Calorie restriction reduces the incidence of myeloid leukemia induced by a single whole-body radiation in C3H/He mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94, 2615-2619.

Inoue T, Cronkite EP, Hirabayashi Y,

Bullis JE, Mitsui H, Umemura T.: Lifetime treatment of mice with azidothymidine (AZT) produces myelodysplasia. *Leukemia*, 1997, 11 (Suppl 3), 123-127.

Inoue T, Hirabayashi Y, Matsuda M, Furuta Y, Aizawa S, Sasaki H.: Model of MDS-like myelodysplasia that transforms into single lineage-hemopoietic malignancies upon transplantation—implication for pediatric myelodysplastic syndrome—. *Intnt'l J Ped Hematl/Oncol.*, 1997, 4:221-230.

Hanzawa C, Kobayashi K, Hirabayashi Y, Inoue T, Aizawa S, Adachi K: Hair follicle dermal papilla cell lines from p53-knockout mice. *J Dermatol Sci*, 1997, 15, 59-63.

Hirabayashi Y, Matsuda M, Matumura T, Mitsui H, Sasaki H, Tukada T, Aizawa S, Yoshida K and Inoue T: The p53-deficient hemopoietic stem cells: their resistance to radiation- apoptosis, but lasted transiently. *Leukemia*, 1997, 11 Suppl 3, 489-492.

菅野 純、相賀 裕美子、井上 達 化学物質の生物毒性試験 —内分泌障害性を中心に— 組織培養工学24
H10年7月

Atsushi Ono, Masaya Yamamoto, AtsuyTakagi, Jun Kanno, and Tohru Inoue. Molecular mechanism of endocrine disrupting chemicals (EDCs) (Celebrating the 10th Anniversary of the AACR Special Conferences in Cancer Research) H11

井上達、菅野純 内分泌障害性化学物質 (endocrine disruptors) の検出の為の新しい試み。第14回日本毒性病理学会 H10年2月

井上 達、菅野 純 内分泌攪乱物質とは何か。内分泌攪乱物質をめぐる生活と食の安全についての国際シンポジウム H10年6月

井上 達、菅野 純 エンドクリン問題の最近の動向 ポリ衛協会報 3 H10年 8月

G. 知的所有権の取得状況