

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

超高速選別法(HTPS)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

研究要旨

HTPS 研究のうち、ヒト由来培養細胞・レポーターアッセイは、米国環境防護庁(EPA)の Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee(EDSTAC)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ことから開始されたが、米国 EPA が委託業務として立ち上げを試みたシステムが細胞の応答反応性等に関して問題を抱え、中断している状態である。他方、本邦では当研究班が要となって、ヒト由来培養細胞-レポーターアッセイ系基礎研究・培養細胞株の立ち上げを、技術的問題は残るものの平成 10 年度研究においてほぼ完了した。本研究では、ヒト由来培養細胞レポーターアッセイ系の扱いを継続検討している米国 EPA などの国際機関と連絡を密に取り、世界的協調およびデータ互換の立場から本研究の発展・遂行のための基礎データの集積を行った。

A. 研究目的

近年、化学物質の持つ有害作用の中で動物の生殖機能に影響を与えることが懸念される毒性影響、いわゆる内分泌攪乱化学物質(EDCs)問題が注目を集めている。化学物質の内分泌かく乱作用を評価するための毒性試験法は未だ確立されておらず、米国では環境保護庁(EPA)の諮問機関として 1996 年に設置された Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee(EDSTAC)では現在使用されている化学物質の内分泌かく乱能力を評価するためのフロースキームを提案し、ポリマー及び年間生産量が 10000 ポンドを下回る化学物質を除く約 15000 種の化学物質について High Throughput Prescreening を行い、内分泌かく乱作用について優先順位を付けた上で齧歯類子宮増殖試験・Hershberger 試験等の高次 Screening 試験へ移行し化学物質の持つ内分泌かく乱作用を明らかにしていく方針を示した。また、OECD に於いても *in vivo* 試験系の立ち上げが進むとともに、その前段階としての *in vitro* スクリーニング法の開発・評価プロジェクトの必要性が取り上げられつつあるといった、展開となってい

る。上述の HTPS は EDCs スクリーニング法の中でも迅速且つ高感度に多種類の化学物質の類ホルモン作用を検出する手法と位置付けられており、現在、我が国で継続的に実験手法の開発及び検証試験が進められている。

本年度は、WHO/IPCS、EPA/EDSTAC、および OECD/EDTA 等の各方面からの情報を収集し、もって、我が国の HTPS の国際的位置関係、将来性を含んだ当 HTPS の将来性の評価、問題点を整理した。

B. 研究方法

本班研究の前身的研究班であった「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(H10-生活-508)」で数次にわたって開催したところの、厚生省・通産省を主体とし、農林省・環境庁を含んだ「内分泌かく乱化学物質実験者レベル会合」において、得られた情報を中心に(座長)、この会合において、国内の進捗状況及び、諸外国の情報を集積した。また WHO/IPSC や OECD/EDTA への出席、米国 EPA メンバーとの情報交換により、国際的動向および我が国の立場を把握するための情報を収集し

別途会議報告資料としてこれをまとめた。

C. 研究結果

米国 EPA/EDSTAC が OSI Pharmaceuticals に委託したヒト由来培養細胞レポーターアッセイ系立ち上げ研究に関する報告 (Endocrine Profiling Pilot Screen Report) によると、まずホルモン受容体の発現が細胞株自体に見られるヒト細胞株 (ER=T47D 細胞、AR=MDA-MB-453 細胞、TR=HeLa 細胞) にレポーター遺伝子のみを導入する方法で行われた HTPS 系は、経費の見積もりが低すぎたため、所定の結果を得るところまで検討が続行出来なかった点以外に、①細胞株の応答性が乏しく、更に、この②培養血清のロット間での反応性のばらつきも見られ③代謝系を模倣する系の組み込み (cyp3A4 系) が完了していない、④手作業とロボット作業での反応性に差があり、ロボット設定が至適でない、などの問題点も指摘されている。

今後の EDSTAC の対応として、EPA は現行の HTPS は中止し、「HTPS Challenge Program」と称する方法を開始することとした。これは、情報が豊富な既知の化学物質 (数百物質) について、参加希望者が個々に持っている既存のシステムを用いてそれが HTPS として機能するかの如何を試行し、そのデータを持ち寄って最良の方法を見出すというものである。

他方、OECD は、子宮肥大試験、Hershberger 試験、および改良テストガイドライン 407 (28日間反復投与試験) のプロトコールのプレバリデーション・バリデーション作業の目途が立ち始めたことから、未知の物質に遭遇した際の用量設定方法を含む体系的な内分泌かく乱物質問題対応構図の描出に着手する意向が顕在化しつつあり、*in vitro* 評価系の一つとして HTPS そのもの、あるいはそこから発信されるデータの入手法、利用法についての提案が準備されつつある状況にある。

国内では、ヒト由来培養細胞レポーターアッセイ系を、全て HeLa 細胞をベースに構築し、少なくとも ER α について、代謝活性系を組み合わせたものも含めて、ある程度の感度を保存したロボットが完了している。しかし細胞株の不安定性、方法の煩雑さ、経費の問題などから、この系の細胞株を含めた改良の必要性が指摘されている。特に、安定細胞株を得て、それを維持する事の難しさが明らかとなり、transient transfection 法の再考論も現場からは持ち上がっていると伝えられている。また、併せて無細胞系の新しい方法 (小野・橋本班員報告参照) の開発も同時に進行させる事の重要性が確認されている。

D. 考察

内分泌かく乱化学物質問題には、(1)無作用量と無毒性量の見極めや、胎児影響の解析など、化学物質による内分泌かく乱の分子生物学的メカニズム解明が必要な研究対象、および(2)ヒトが暴露されうる既存化学物質および、今後暴露されうる新規化学物質のホルモン様作用活性の緊急的検出作業とがあるが、後者についても、既存概念に基づく手法の技術開発のみならず、メカニズム研究によりもたらされる新しいエンドポイントと手法の検討が必須である。

E. 結論

現在、ヒト由来培養細胞レポーターアッセイ系で実用に耐えそうなレベルにあるもの (代謝活性系を含む) は我が国の ER α に関するシステムが世界をリードしている。今後、この系から発信されるデータの有用性を含めて、今後の研究開発の方向性を見極める作業が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshida K, Inoue T, Hirabayashi Y, et al.: Calorie restriction and spontaneous hepatic tumors in C3H/He mice, J Nutrition, Health and Aging, 1999, 3:121-126

2) Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, Kitajima S, Miyazaki Ji, Inoue T: MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. Development 126(15):3437-47, 1999.

3) Kurata H, Liu CB, Valkova J, Koch AE, Yssel H, Hirabayashi Y, Inoue T, Yokota T, Arai Ki.: Recombinant adenovirus vectors for cytokine gene therapy in mice. Allergy Clin Immunol, 103: 471-84, 1999.

2. 学会発表

1) A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Conformational changes on ERA induced by endocrine disrupting chemicals (EDCs). Keystone symposia, 2000

2) K.Sai, B.L. Upham, K.-S. Kang, R. Hasagawa, J.E.Trosko, T.Inoue, Pentachlorophenol inhibits gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells. 1999 International Gapjunction Conference Gwatt, Switzerland (August 28 September 2, 1999)

3)佐井君江、菅野 純、黒川 雄二、井上達:Pentachlorophenolの肝培養細胞におけるアポトーシス阻害作用ならびにギャップ結合細胞間連絡阻害との関連: 第58回日本癌学会総総会、広島(平成11年9月29日-10月1日)

4)平林容子、高木篤也、児玉幸夫、菅野

純、黒川雄二、井上達:Mn-SOD 遺伝子導入マウス骨髄細胞での紫外線抵抗性: 第58回日本癌学会総会、広島(平成11年9月29日-10月1日)

5) K.Sai, J.E.Trosko, T.Inoue:Pentachlorophenol induced down-regulation of gap junctional intercellular communication was ameliorated by (-)-epigallocatechin gallate in rat liver epithelial cells. Epigenetic Toxicant-Induced Signal Transduction and Altered Cell-Cell Communication, Ann Arbor, Michigan (Oct.17-20,1999)

6) A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Mechanism based high through put screening method for endocrine disrupting chemicals (EDCs) using bio-sensor. 2nd European Workshop 99 International Molecular Toxicology 1999

7) 松島裕子、菅野 純、宮城恵理、井上達, 卵巣摘出ラットにおけるエストロゲン枯渇期間と子宮肥大反応の関係について, 日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会 1999

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし