

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=内分泌かく乱化学物質の作用機構に焦点を当てた新しいハイ・スルー・プットスクリーニング法の開発(総合研究報告書)

国庫補助金精算所要額(円)=45,000,000

研究期間(西暦)=1999-2001

研究年度(西暦)=2000

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)

小野 敦(国立医薬品食品衛生研究所)

研究目的=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、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、必要な改良を行うための研究を平成 10 年度に立ち上げ、引き続き当研究課題において測定を継続している。内分泌かく乱化学物質問題には、1) ヒトが暴露される既存化学物質及び、今後暴露される新規化学物質の類ホルモン作用活性の緊急的検出作業、2) 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とがあり、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。これらの情勢をふまえ、Firefly Luciferase 遺伝子の上位に各ホルモンに対する応答配列を含むシス領域が組み込まれた Reporter Plasmid と human ER alpha を常時発現するためのレセプター発現 Plasmid が同時に且つ安定的に組み込まれたヒト由来の細胞(HeLa cell)を使用し、化学物質の有するホルモン様活性の高速スクリーニング試験法の開発及びその検証を目的として、(1)ハイ・スルー・プットスクリーニング(High Through Put Screening, HTPS)を利用した超高速分析法の検証に関する調査研究を行った。また、表面プラズモン共鳴高速分析(表面プラズモン共鳴 High Through Put Screening, SPR-HTPS)は各種ホルモン受容体分子に対する化学物質の相互作用を高精度に測定可能な新規性の高い、しかも実用性を兼ね備えた方法である。この系で得られるリアルタイム情報からの、受容体における agonist 効果(作動) / antagonist 効果(阻害)などの詳

細な解析と予測の確立を目的として(2)表面プラズモン共鳴による新規無細胞系高速分析(表面プラズモン共鳴 High Through Put Screening, SPR-HTPS)の開発について検討した。現在、ヒト由来培養細胞レポーターアッセイ系で代謝活性系を含み実用に耐え得るレベルにあるものとしては、我が国の ER に関するシステムが世界をリードしている。この系から発信されるデータの有用性を含めて、研究開発の方向性を見極める作業が必要であり、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求められている。

研究方法 = (1)については、引き続きレポーター遺伝子導入ヒト由来培養細胞系を用いた高速自動分析法実証と有効性の検証を継続した。エストロゲンレセプター、アンドロゲンレセプターおよび甲状腺レセプターとレポーター遺伝子を組み込んだ培養細胞を用いたロボットアッセイシステムにより、3か年にわたり約 350 の化学物質についての試験を実施することを目的とし、また得られた結果に関して、詳細な試験を行うべき化学物質の優先順位付けのため、*in vivo* 試験データや他のスクリーニング系との比較検討を行った。また、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。(2)については、SPR による方法は生体分子間の相互作用をリアルタイム解析するシステムであり、これにより内分泌かく乱物質による、受容体の DNA 結合性、および受容体と共役因子との相互作用への影響を、それぞれの結合・解離過程の変化を解析することで、内分泌かく乱性の検討を行った。さらに本系は生体内でのホルモン作用機構に即した解析を特徴としており、個々の化合物における生体内作用の予測性の高い解析が可能である。すでにこれまでにエストロゲン受容体に作用する化学物質では、アゴニストとアンタゴニストそれぞれで特徴的な変化を示すことが明らかとなった。さらに、アンドロゲンなど他のレセプターに関しての解析と、アッセイの自動化により、本系を応用した新規の高速分析システムの開発を進めている。

結果と考察 = (1) HTPS を利用した超高速分析法の検証に関する調査研究は、(1)-1. レポーター遺伝子導入ヒト由来培養細胞株を用いた超高速分析法に関する試験研究 (主任研究者:(財)化学物質評価研究機構に対する委託業務)及び(1)-2. 超高速選別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)よりなり、前者委託研究では経済産業省との共同研究として、EDSTAC が提案した化学物質の内分泌かく乱作用の有無を評価する方法としてのヒト由来培養細胞レポーターアッセイ系の有用性を独自の立場から検討した。その結果、Firefly Luciferase 遺伝子の下流に各ホルモンに対する応答配列を含むシス領域が組み込まれた Reporter Plasmid と human ER alpha を常時発現するための Plasmid が同時に且つ安定的に組み込まれた細胞を使用し、177 物質の化学物質についてその ER alpha アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性の高速スクリーニングを実施した結果、アゴニスト検出系では 29 物質、アンタゴニスト検出系では 6 物質が比較的強い活性を有する物質として選出された。本法により選出された物質の *in vivo* 実験での成績、選出基準等について更に検討する必要はあるが、本法の簡便さ、短期間で多量の化学物質について測定を行うことが可能な点な

どから、有用な内分泌かく乱化学物質試験法の候補になるものと思われる。後者研究によって、米国 EPA/EDSTAC、OECD との連携の方向で国際的な研究の必要性が示されてきたが、欧州共同体 (EU) 諸国の参加を得、今後の研究の継続の重要性が改めて認識された。(2) High Through Put Screening、SPR-HTPS の開発研究は、(2)-1. 「表面プラズモン共鳴高速分析によるデータの高速取得技術及び HTPS に特化するための試験」(主任研究者:ピアコア株式会社に対する委託業務)(2)-2. 内分泌かく乱化学物質の作用機構を考慮した表面プラズモン共鳴法による検出系の開発(分担研究者:小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部)よりなる。内分泌かく乱物質の受容体を介した作用は、その結合による受容体立体構造変化により惹起される。受容体構造の変化は、DNA や他の生体分子との相互作用を変化させることでこれに続く生体反応を引き起こすことから、それぞれの化合物が受容体構造に与える影響を検討することにより、その生体作用を受容体作用メカニズムに応じて検討することが可能である。これまでに ER-ERE 相互作用の変化が結合した化学物質の生体作用を反映することを示してきた。今回これにあわせて、コファクターとの結合においても結合した化合物により大きく異なることが明らかになった。

結論= 177 物質の化学物質についてその ER alpha アゴニスト活性及びアンタゴニスト活性の高速スクリーニングを実施した結果、アゴニスト検出系では 29 物質、アンタゴニスト検出系では 6 物質が比較的強い活性を有する物質として選出された。本法により選出された物質の in vivo 実験での成績、選出基準等について更に検討する必要があるが、本法の簡便さ、短期間で多量の化学物質について測定を行うことが可能な点などから、有用な内分泌かく乱化学物質試験法の候補になるものと思われる。また、内分泌かく乱物質の作用メカニズムに焦点をあてたスクリーニング法の開発のためにホルモンレセプターを用いたアッセイ方法の開発研究については、5 種類のホルモンレセプターの発現、精製を行うことにより得られたレセプターを用いてアッセイ法の開発を試みた結果、ER についてすでに開発されたアッセイを高精度、ハイスループット化するための至適化研究により多くの改良を行った。今後さらに再現性の高いアッセイを組むための検討を行い、アッセイの精度、効率等の改善を加える予定である。2001 年 3 月に OECD の傘下で開催された「内分泌かく乱化学物質に関する世界規模戦略開発に向けての国際協調のための提案」と題する日米欧 3 局会合に観るように、すでに構築された本問題に関する研究協力・連携体制によって内分泌かく乱作用が疑われる化学物質を効果的にスクリーニングするための手法を中心とした試験法の開発等に鋭意取り組むことを目的として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、OECD 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遂行、また国際的な位置付けからも今後の研究の継続の重要性が改めて認識された。