

様式A(4)

厚生科学研究費補助金研究報告書

平成 14 年 04 月 10 日

厚生労働大臣 坂口 力 殿

住 所 _____
 フリガナ カン ノ ジュン
 研究者 氏 名 菅 野 純
 (所属機関 国立医薬品食品衛生研究所)

平成 13 年度厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)に係る研究事業を完了したので
 次のとおり報告する。

研究課題名(課題番号): 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(H11-生活-017)

国庫補助金精算所要額 : 金 70,000,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク
(別添 1 のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書表紙(別添 2 のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金研究報告書目次(別添 3 のとおり)
4. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書(別添 4 のとおり)
5. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書(別添 5 のとおり)
6. 研究成果の刊行に関する一覧表(別添 6 のとおり)
7. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況
総括研究報告書、分担研究報告書の中に、書式に従って記入した。
8. 健康危機情報
特になし。

別添1

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)=70,000,000

研究期間(西暦)=1999-2001

研究年度(西暦)=2001

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)

板井 昭子(医薬分子設計研究所)

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、わが国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、必要な改良を行うための研究を平成 10 年度に立ち上げ、当研究課題において引き続き測定を継続している。内分泌かく乱化学物質問題には、1) ヒトが暴露されうる既存化学物質及び、今後暴露されうる新規化学物質のホルモン作用活性の緊急的検出作業にあわせて、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みならず、メカニズム研究によりもたらされる新しい手法の検討が必須である。これらの情勢をふまえ、本研究では(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として、これまでに引き続き、ルシフェラーゼ遺伝子をER反応レポーターとして、human ER alpha 常時発現 Plasmidとともに組込んだヒト由来の細胞(HeLa cell)を使用し、化学物質のホルモン受容体作用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行った。また、ホルモン受容体の遺伝子制御メカニズムを応用した、(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。SPR-HTPS 法は、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かつ信頼性の高い方法である。これまでにこの系で得られるリアルタイム情報から、受容体における agonist 効果(作動)/antagonist 効果(阻害)などの分子メカニズムに関連を示唆する結果を得ており、本年度はさらに多くの化学物質を用いて、その有用性についての検証を進め、生体作用との関連について解析を進めた。さらに今年度は、内分泌かく乱化学物質の標的受容体への相互作用を原子レベルで理論的計算解析する *in silico* におけるドッキングスタディにより超高速スクリーニングする(3)内分泌かく乱化学物質の計算探索と評価についての検討を行った。

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目的としてこれまでに引き続き直鎖アルキルフェノール類をはじめとした化合物について ER agonist 及び antagonist 活性の測定を実施し、得られた結果に関して、他のスクリーニング系との比較検討を行った。さらに、国際的動向を把握するため、OECD におけるハザードアセスメント新規試験法のバリデーションに関する会議に出席し、我が国の HTPS の国際的位置関係や将来性の評価と現時点での問題点の整理を行った。(2)については、これまでに構築した ER と ER 応答 DNA 配列(ERE)との相互作用を測定する系にあわせ、共役因子 TIF2 の受容体結合部位を相互作用プローブとして用いる系(TIF アッセイ)を構築し HTPS 向けに至適化した。これら2つの系を用いて、昨年度 ERE アッセイを行った30種類の化学物質について TIF アッセイを、36種類の新規化学物質について ERE、TIF の両アッセイを行い、一次スクリーニング法としての有用性について検討した。(3)については、X 線結晶構造が明らかにされているアンタゴニスト結合型 ER α リガンド結合ドメインに対して、数十万種の市販化学物質が登録されているデータベースのバーチャルスクリーニングを実施した。自動ドッキングプログラムにより各化学物質の結合様式を推定しその結合親和性を比較することにより、アンタゴニスト結合型エストロゲン α 受容体に安定に結合すると推定される化学物質を選び出した。

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)よりなり、前者委託研究では ER agonist 及び antagonist 活性の測定を42物質について、また直鎖アルキルフェノール類149物質について ER antagonist 活性の測定を行った結果、比較的強い ER α アゴニスト活性が26物質で、アンタゴニスト活性が8物質に検出された。後者研究では、内分泌かく乱物質を含む化学物質のハザードアセスメントにおいて、OECD においては従来の毒性手法に合わせ、現時点での問題点を考慮した、科学の進歩に即応した新規試験法開発の重要性が確認された。(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。前者委託研究においては、これまでに引き続き各種化学物質の ER-ERE 相互作用の変化量が、他のスクリーニング系における結果と相関すること、およびコファクター配列との相互作用は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。後者においては、ヒトプロモーターにおける特殊な ERE 配列について、ER との相互作用変化を検討するため測定条件の至適化と、新規プローブ固定化法の検討を行い、一部の ERE では化合物による ER 構造の差がより明らかに示された。また、fosERE などの対向配列でない ER 結合配列において、ER がモノマーで結合することが示された。(3)内分泌かく乱物質の電算探索と評価(分担研究者:板井 昭子(株)医薬分子設計研究所)では、ラロキシフェン結合 ER 結晶構造を標的としたアンタゴニスト選別計算法を用いた市販化合物データベースのバーチャルスクリーニングにより、既知のアンタゴニストとは構造が大きく異なる化合物が選別され、内分泌かく乱物質の初期スクリーニングに有用であることが示された。

結論=化学物質による内分泌かく乱問題ではかく乱性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。本研究における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では、新たに比較的強い ER α アゴニスト活性が 26 物質で、アンタゴニスト活性が 8 物質に検出された。これらの物質については *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得るレベルにあるものとしては、我が国の ER α に関するシステムが世界をリードしており、この系から発信されるデータについては、その有用性を含めて、今後の研究開発の方向性を見極める作業が必要である。一方、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、ERE および TIF との相互作用変化を指標としたアッセイ法の有用性の検討の結果、これらを組み合わせることで簡便にアゴニストとアンタゴニストの検出、および TIF アッセイにおいては、幾つかのアゴニストが特徴的な相互作用を示し、この受容体作用の違いから生体作用の違いについても検討出来る可能性が示唆された。今後、各種 ERE 配列および共役因子との相互作用を検討するための測定より、生体作用に関連するより多くの有用な情報が得られものと考察された。さらに、内分泌かく乱物質の電算探索による *in silico* スクリーニングでは、既知リガンドと構造が全く異なる候補化合物であっても非常に高速に高精度の結果を得られることから、内分泌かく乱化学物質の初期スクリーニングに有用である。これらを組み合わせることで、次の段階として詳細試験に供する化学物質の科学的根拠に基づくより正確な優先化合物の抽出が期待される。OECD においても科学的進歩に即応した新規試験法開発の重要性が確認されたことから、今後は本研究班でこれまでに進めてきた内分泌かく乱化学物質の試験法を始め個別の試験法についてより具体的な国際的合意に向けた動きが活発化するものと考察された。

別添2

厚生科学研究費補助金総括・分担研究報告書表紙

厚生科学研究研究費補助金

生活安全総合研究事業

研究課題名(課題番号): 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 (H11-生活-017)

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 菅 野 純

平成 14(2002)年 4 月

別添3

厚生科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書

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

菅野 純

II. 分担研究報告書

1. 超高速選別法の検証の評価に関する調査研究

井上 達

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

小野 敦

3. 内分泌かく乱物質の電算探索と評価

板井 昭子

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)
総括研究報告書

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
主任研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

研究要旨

これまでの研究により、厚生労働省「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」における「試験スキーム」の中のスクリーニング試験前2段階に関する試験法およびその評価に資する関連データを得ることが出来た。(1) HTPS 研究のうち、財団法人化学物質評価研究機構は、引き続き、系の改良を進め、42 物質について ER agonist 及び antagonist 活性の測定並びに直鎖アルキルフェノール類 149 物質について ER antagonist 活性の測定を実施した。一方、(2) 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)研究においては、これまで検討を進めてきた化学物質による ER α 受容体の応答配列 DNA に対する結合・解離過程への影響の計測とあわせて、共役因子結合配列 LxxLL に対する受容体結合性の計測を行った。さらに本年度は、(3)内分泌かく乱化学物質の計算探索と評価として結晶構造が明らかにされているアンタゴニスト結合型エストロゲン α 受容体構造条件を解析し、数十万種の化学物質のバーチャルスクリーニングを実施した。これらにより、自動化のために必要な至適化の諸条件を引き続き検討しつつ、個々の化合物の生体作用をより詳細に検討できる新たなスクリーニング法の開発を進めた。

A. 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 年度に立ち上げた(厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業: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))。引き続き当研究班において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による化学物質の解析を実施しており、現在も継続中である。また、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 α 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。

本研究の第 1 の目的は、これまで検討を進めてきたレポーターアッセイ系において 300 化学物質に対する測定を行い、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である。第 2 の目的は、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)を用い、化学物質がホルモン受容体に与える変化からの内分泌かく乱性に関するデータの高速取得技術の開発を HTPS に特化することにより行うことである。SPR-HTPS は、*in vitro* における生体物質間相互作用をリアルタイムで測定し数値化(グラフ化)できるシステムであり、受容体に結合した化学物質による受容

体と相互作用する因子との結合と解離過程への影響が明らかとなる。ホルモン受容体はリガンド結合に伴う構造変化によりその機能が制御されており、この系より得られる結果は、受容体における agonist 効果(作動)/antagonist 効果(阻害)の予測に有効と考えられる。さらに、共役因子等を系に加えることにより、詳細な生体作用の検討を可能性が期待される。また、無細胞系であることから、検体内の夾雑物に対する寛容性が期待され、さらに、1検体当たりの測定経費が比較的安く押さえられる可能性がある。よって、他の研究により生成される *in vivo* データとの対比に用いる情報が、高速にしかも比較的安価に收拾されることが期待され、化学物質の内分泌かく乱性の迅速な評価に大きく貢献することが期待される。第3の目的は内分泌かく乱化学物質の標的受容体への相互作用を原子レベルで理論的に解析する *in silico* におけるドッキングスタディを確立し、超高速スクリーニング法を開発することである。これは、上記2つの目的と有機的に組み合わされて運用されることにより、より迅速で広汎な対応が可能となると期待される。

本年度は(1)ヒト由来培養細胞系を用いたハイスループットスクリーニング(HTPS)を利用した超高速分析法の検証に関する研究では、これまでに引き続き42物質についてER agonist 及び antagonist 活性の測定を、また直鎖アルキルフェノール類149物質についてER antagonist 活性の測定を実施した。一方、(2)表面プラズモン共鳴高速分析(SPR-HTPS)研究においては、これまで検討を進めてきた化学物質によるER α 受容体と応答配列DNAとの相互作用へ影響とあわせて、共役因子結合配列LxxLLとの相互作用の検討を行った。さらに本年度は、(3)内分泌かく乱化学物質の計算探索と評価ではアンタゴニスト結合型エストロゲン α 受容体結晶構造に対して、数十万種の化学物質のバーチャルスクリーニングを実施した。これらにより、自動化のために必要な至適手法を引き続き検討しつつ、個々の化合物の生体作用をより詳細に検討できるスクリーニング法を開発を進めた。

B. 研究方法および研究結果

(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

(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)

研究目的: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開発・評価プロジェクトがOECDなどの国際機関を中心に、展開されてきた。本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て、Firefly Luciferase 遺伝子の上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いる。これまでに引き続き国立医薬品衛生研究所より供給された42物質についてER agonist 及び antagonist 活性の測定並びに当機構で保有する直鎖アルキルフェノール類149物質についてER antagonist 活性の測定を実施した。

実施概要:Firefly Luciferase 遺伝子の上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、42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。

本研究で検出された ER agonist

Chemical Name	CAS	PC50 (pM)
4,4'-(1,3-Dimethylbutylidene)diphenyl	6807-17-6	1.99E+04
2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)HEXAFLUOROPROPANE	1478-61-1	8.02E+04
3,4-Bis(4-Hydroxyphenyl)-3,4-Hexanediol	7507-01-9	1.39E+05
BUTYL 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)ACETATE	71077-33-3	1.81E+05
3,3'-Dimethyl-4,4'-Biphenyl	59517-19-0	2.31E+05
4'-Hydroxybenzoic acid 2-Ethylhexyl ester	5153-25-3	2.34E+05
1,1'-Bis(4-Hydroxyphenyl)cyclohexane	843-55-0	2.95E+05
2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone	131-55-5	3.28E+05
6-Benzoyl-2-Naphthol	52222-87-4	3.42E+05
2,2'-Bis(Trifluoromethyl)benzidine	341-58-2	3.46E+05
ALPHA-NAPHTHOLPHTHALEIN	596-01-0	3.89E+05
P-NAPHTHOLBENZEIN	145-50-6	4.63E+05
4,4'-Diaminooctafluorobiphenyl	1038-66-0	9.22E+05
7-Hydroxy-3-Phenylcoumarin	6468-96-8	1.03E+06
2-[Bis(4-Hydroxyphenyl)methyl]benzyl alcohol	81-92-5	1.37E+06
1-(4-Hydroxy-phenyl)-octan-1-one	2589-73-3	1.45E+06
4-(1-Indanyl)phenol	5402-37-9	1.46E+06
N-Heptyl 4-Hydroxybenzoate	1085-12-7	1.51E+06
Benzyl 4-Hydroxyphenyl Ketone	2491-32-9	1.68E+06
1,1,1-Tris(4-hydroxyphenyl)-ethane	27955-94-8	2.29E+06
DIHYDROETHIDIUM	38483-26-0	2.73E+06
3,4-Dihydro-4-(4-Hydroxyphenyl)-2,2,4-Trimethyl-2H-1-Benzopyran	472-41-3	3.43E+06
P-(trans-4-Propylcyclohexyl)phenol	81936-33-6	4.45E+06
4'-Hydroxynonanphenone	14392-69-9	5.01E+06
Ethyl 4,4-Bis(4-hydroxyphenyl)valerate	7297-86-1	5.88E+06
4-N-Octyloxyphenol	3780-50-5	9.96E+06

本研究で検出された ER antagonist

Chemical Name	CAS Number	IC50 (pM)
3-Methylcholanthrene	56-49-5	1.66E+05
4,4'-(OCTAHYDRO-4,7-METHANO-5H-INDEN-5-YLIDENE) BISPHEOL	1943-97-1	5.69E+05
2,4-di-tert-butylphenol	96-76-4	1.06E+06
Benzo[a]pyrene	50-32-8	3.29E+06
3-(2,6-DIMETHYLPHENYL)-2,5-DIPHENYLTETRAZOLIUM CHLORIDE		4.83E+06
4-propoxyphenol	18979-50-5	5.25E+06
meta-Thymol	3228-03-3	6.17E+06
Octyl gallate	1034-01-1	9.84E+06

* 尚、生データ及びグラフを総括報告書末尾に添付した。

研究結果: ER agonist 及び antagonist 活性の測定を 42 物質について、また直鎖アルキルフェノール類 149 物質について ER antagonist 活性の測定を行った結果、比較的強い ER alpha アゴニスト活性が 26 物質で、アンタゴニスト活性が 8 物質に検出された。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、有用な内分泌攪乱化学物質試験法、特に高次試験実施の際の優先順位設定のためのプレ・スクリーニング法として有用と思われる。また、この成果によってレポーターアッセイを用いた HTPS の有用性の確認が可能となると同時に、既存化学物質について子宮増殖試験等の高次試験へ進む際、優先順位決定のための判断材料となる。

(1)-2.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)

研究目的:内分泌かく乱化学物質(EDCs)問題に関しては、科学的に未解明な点が多く、人の健康や生態系への影響に対する取り組みにあたって、本研究班では従来の試験法の枠組みを越えた検討により、その作用メカニズムに関する科学的知見の収集等に努めることを基本としている。本研究では得られた知見から内分泌攪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、本問題に関する OECD などの国際機関との研究協力・連携体制によって、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。

研究方法:内分泌かく乱化学物質試験法について国際的動向および我が国の立場を把握するため、OECD におけるハザードアセスメントに関する新規及び改正試験法認証のバリデーションと規制のための会議に出席し、現時点での問題点の整理と、ピアレビュー及び関係各国研究機関におけるデー

タの検討を行い、ハザードアセスメントにおける国際協調にむけ、新規試験法の開発、評価、行政受諾について検討を行った。

研究結果:化学物質の試験法は、科学の進歩に合わせてヒトを始めとした動物への危険性を評価するため科学的根拠に基づく新規試験法の開発が必要であり、新規試験法の信頼性と妥当性を評価するための基本方針として新規試験法の開発からプレバリデーション、バリデーションを経て最終承認されるまでの基本的道筋として“Data Interpretation Prediction”が提案され了承された。また新規試験法開発が動物愛護にもつながるよう、試験法の開発においては、これまで動物実験の代替、予測、改善を基本方針とすることが合意された。新規試験法による結果の評価においては、科学的に妥当性のある他の試験データとの比較により試験法の妥当性が検討されるべきであるが、その比較対象となる従来法がない場合など、ヒトデータのあるものについては、その積極的な活用が提唱された。また新しい試験法の妥当性を検討するためのバリデーション過程においては、その目的に適合するリフェレンスとなる化学物質の選択が重要であることが確認された。さらに、新しい手法をハザードアセスメントに用いることを促進するためには、試験法個別にその目的に応じた科学的評価がなされるべきであるものの、現時点では構造的で解りやすい評価手法がないため、詳細なガイダンスの策定に向け、上記の基本的道筋にあわせてヒトデータの活用なども含め、今後、ワークショップや専門家会議を開催して議論する必要があることが確認されるに至った。一方、これまでに情報がほとんどない数多くの化学物質については、迅速な危険性評価のため 3 次元構造活性相関(QSAR)手法の積極的な活用が推奨された。そうした状況において、これまでの本研究班における細胞系、無細胞系および 3 次元構造計算による内分泌かく乱候補化合物の選択に関する研究は、内分泌かく乱問題のみでなく、ハザードアセスメントにおける国際的ガイドライン策定においても重要であることが確認された。

(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) の開発研究

(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: ビアコア株式会社に対する委託業務)

研究目的: 本委託研究では、化学物質のホルモン作用を評価する一次スクリーニング法の開発のために、ホルモンレセプターの作用メカニズムに焦点をあてた無細胞系のスクリーニング用アッセイの研究を行っている。ビアコア社の表面プラズモン共鳴センサーを用いて、エストロゲンレセプターを組み込んだ内分泌かく乱候補化学物質のアッセイ系の開発を行っている。表面プラズモン共鳴センサーは分子間の結合・解離を非標識で、リアルタイムに測定することができる。さらに分子間の相互作用に関して、結合の有無だけでなく、結合の反応速度論的解析が可能であるという特徴を持っている。アッセイに用いるレセプターとしてはリガンドが既知の α 型エストロゲンレセプター (ER) を用いた。昨年度までの研究によって表面プラズモン共鳴センサーを用いて α 型エストロゲンレセプターとエストロゲンレセプターホルモン応答 DNA 配列 (ERE) との相互作用を測定する系を構築した (ERE アッセイ)。今年度はさらに小野分担研究者が開発した新たなアッセイをスクリーニング向けに至適化した。この新規のアッセイは、ER の遺伝子発現調節の共役因子 (コファクター) である TIF2 の ER 結合サイトを用いたものである。活性化 ER はコファクターの LxxLL モチーフ (NRbox) と相互作用することが知られている。TIF2 には 3 つの LxxLL モチーフが存在するが今回第 2 モチーフを含むペプチドをセンサーチップに固定化し、ER との相互作用を測定するアッセイを構築した (TIF アッセイ)。化学物質を添加したレセプターの同一試料を用いてこの 2 つのアッセイを同時に行うことができるよう条件を至適化した。新たなアッセイ法の開発により、ER 上の異なる二つの作用点に対する化学物質の影響を同時に観察することが可能となった。これにより、ひとつのアッセイでは確実に判定できないエストロゲン様作用をより

的確に判定できる可能性が示唆された。昨年度 ERE アッセイを行った 30 種類の化学物質について TIF アッセイを行い、さらに 36 種類の新規化学物質について ERE、TIF の両アッセイを行った。スクリーニングの結果、化学物質を ER の結合活性化度によって 3 つのグループに分類することができた。また、スクリーニングで得られたデータの詳細な反応速度論的解析から、ER のアンタゴニストの場合には、いったん ERE に結合した ER は解離速度が遅く、ERE 上により安定に保持される傾向が見出された。こうした解析をすることにより、ひとつのアッセイでアゴニストとアンタゴニストを区別する可能性が示された。表面プラズモン共鳴センサーを用いた内分泌かく乱化学物質の高速スクリーニング法は、従来の試験法と比較しても迅速、かつ高精度に判定が可能で、しかもより多くの情報をもたらす手法であることが確かめられた。数万種類にもおよぶ化学物質のホルモン作用を判定するための、一次スクリーニング法としての有用性が示された。

研究方法

1) 化学品の調整

- ① 化学物質を 0.1M となるように 100% DMSO に溶解する。
- ② ①のストック溶液を 10 倍ずつ 5 段階、100% DMSO で希釈する。
- ③ 5 段階の希釈サンプルを 4mL ガラスバイアルに入れ、 -60°C で保存。

2) 表面プラズモン共鳴高速分析法

使用機器: Biacore® 3000

センサーチップ: ストレプトアビジンを固定化したセンサーチップ SA を使用

ランニングバッファー: 25mM Tricine, 160mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.05% Tween20 (pH 7.8)

再生溶液 1: 50mM NaOH, 再生溶液 2: 20mM HCl
エストロゲンレセプター (ER α : Estrogen Receptor- α human recombinant (P2187, PANVERA 社))

- ① 化学物質を含む DMSO 溶液 1 μl を 500 μl のランニングバッファーで希釈する。
- ② ER を 40nM となるようにランニングバッファーで希釈する

- ③ ①、②の溶液を 40 μ l ずつサンプルチューブに取り、37℃、5 分間加温後、4℃に冷却した Biacore 3000 のサンプルラックに乗せる。
- ④ ③のサンプルを SA センサーチップにインジェクトする。流速:20 μ l/min. 結合2分間、解離2分間の kinject mode を使用。
- ⑤ 再生溶液1を 30 秒間インジェクト、次に再生溶液2を 15 秒間インジェクトしてセンサーチップを再生する。

3) ERE アッセイ

センサーチップに固定化するリガンドにはビテロジェニンの ERE 配列を含む 5' 末端 をビオチン化した 34 mer の合成オリゴマーを用いた。このオリゴマーをセンサーチップのフローセル 2 番に固定化し、そこにアンチセンス ERE をハイブリダイズさせた。

biotin-sense ERE:

5'-biotin-tcgagcaaagtcaggtcacagtgacctgatcaat-3'

antisense ERE:

5'-attgatcaggtcactgtgacctgactttgctcga-3'

アッセイ法の詳細は昨年度報告書に記載のとおりである。

4) TIF アッセイ

ER の遺伝子発現コファクターとして機能することが知られている TIF2 の 3 つの LxxLL モチーフ (NRbox) のうち第 2 モチーフを含む合成ビオチン化ペプチド (KEKKHILHRLQLD) を用いた。このペプチドをセンサーチップのフローセル3番に約 100RU 固定化した。ERE アッセイと TIF アッセイを同時に行えるよう、相互作用反応のすべての条件は ERE アッセイと同じ条件で設定した。

5) 化学物質のスクリーニング

化学物質毎に 3 段階の濃度で ERE アッセイおよび TIF アッセイを行い、ER の結合について濃度依存的活性化作用の有無を調べた。センサーチップのフローセル 1 番にはリガンド分子を何も固定化せずブランクコントロールとして用いた。2 番目のフローセルに ERE、3 番目のフローセルに TIF を固定化しあらかじめ化学物質とインキュベートした ER 溶液を各フローセルに1→2→3と連続的に添加し、各々

のフローセルで相互作用を同時に測定した。ERE アッセイについてはフローセル 2 のセンサーグラムからフローセル1のブランクコントロールのセンサーグラムを差し引いたセンサーグラムを用いてデータを解析した。同様に TIF アッセイについてはフローセル 3 からフローセル1を差し引いたセンサーグラムを用いた(図 1)。また、時間経過による ER の結合活性低下の影響を補正するために、化学物質毎に 1 セットのスクリーニングの最初と最後に ER に 100nM 17 β エストラジオール (E2) を加えたポジティブコントロール、DMSO(終濃度 0.1%)を加えたネガティブコントロールの試料を測定した。1セットのスクリーニングは下記のような構成となる。

サイクル1 ポジティブコントロール

サイクル2 ネガティブコントロール

サイクル3 対象化学物質 1 μ M

サイクル4 対象化学物質 100nM

サイクル5 対象化学物質 10nM

サイクル6 ポジティブコントロール

サイクル7 ネガティブコントロール

1回目と2回目のポジティブコントロールおよびネガティブコントロールの結合量からサイクル毎の ER 結合活性の低下率を求め、これから各サイクルでのネガティブコントロールおよびポジティブコントロールの推定結合量を算出し、この値をもとに以下の式で得られる相対活性化度(% activation)を求め、化学物質の濃度との相関を解析した。

$$\% \text{ activation} = (\text{化学物質存在下の結合量} - \text{ネガティブコントロールの結合量}) / (\text{ポジティブコントロールの結合量} - \text{ネガティブコントロールの結合量}) \times 100$$

研究結果

1) TIF アッセイの条件検討

昨年度確立した ERE アッセイに引き続き、今年度は ER の遺伝子発現調節の共役因子(コファクター)である TIF2 の ER 結合サイトを用いたアッセイを開発した。今回のアッセイでは TIF2 の 2 番目の LxxLL モチーフを含む 13 アミノ酸からなるビオチン化合成ペプチドをセンサーチップに固定化した。まず ER、E2 の濃度を振って、このアッセイ法の至適

条件を検討した。その結果、TIF アッセイにおいても、ER の濃度依存的に結合量は増加した。E2 は 100nM で最大活性を示した。これらの結果から TIF アッセイにおいても ERE アッセイと同様に E2 100nM、ER 20nM の条件で測定することとした(図 3)。スクリーニングを効率よく行うために ERE アッセイと TIF アッセイを同時に実施できるようランニングバッファー、ER の反応時間、再生溶液などを同一条件で同時に実施し、二つのアッセイの反応性を検証した。ERE アッセイと TIF アッセイを同時に実行し、かつ再現性の高いスクリーニング法とするために、センサーチップの再生条件、次サイクルへの化学物質のキャリーオーバーをなくすための洗浄操作プロトコル、再生溶液の希釈を最小限に抑えるための工夫を行った。表面プラズモン共鳴センサーではリアルタイムモニタリングしたアッセイの結果をすべてセンサーグラムおよびレゾナンスシグナルとして得ることができるので、アッセイのエンドポイントの結果だけでなく、センサーチップの再生の可否、センサーチップに固定化した DNA、ペプチドの状態など途中のさまざまなポイントの状況をデータで確認することが容易である。プレリミナリーなスクリーニングを行った結果をもとにアッセイ系の再現性に影響を及ぼす可能性のある要因を拾い上げ改善した。

2) アッセイの検証

ERE アッセイ及び TIF アッセイの再現性を確認するため、ポジティブコントロール(100nM E2)とネガティブコントロール、(DMSO、終濃度 0.1%)を交互に繰り返し計 16 サイクル繰り返す測定を行った。ERE アッセイ(図4)、TIF アッセイ(図5)でポジティブコントロールの平均値はそれぞれ 99.98%、100.14%、標準偏差は 4.68%、3.14%という非常に高精度の結果が得られ、これら 2 つのアッセイの再現性の高さが示された。両アッセイにおいて、ER の結合活性低下の補正法の妥当性、サイクルを繰り返したときのベースラインの安定性についても合わせて検証した。16 サイクルのアッセイを繰り返したときの ER の結合活性の変化は線形一次近似式でフィッティングすると相関係数 R^2 は 0.99 以上であり、この活性の補正法は妥当であることが示された。またアッ

セイ終了時のベースラインの値の変化を見ると、16 サイクルでその差は±10RU 以内でありとくに上昇、減少するような傾向も見られなかったので再生は十分かつ適切に行われていることが確認された。ベースラインの変化は結合シグナル(133–327 RU)に対しても充分小さい値であり、アッセイの結果に影響を及ぼさない範囲であることも確認できた。これまでのスクリーニングで得られたデータを元に検証した結果、一つセンサーチップで 15 化合物(計 105 サイクル)以上のスクリーニングを繰り返しても再現のあるデータが得られることを確認した。

3) 化学物質のスクリーニング

これまでに開発した 2 つのアッセイを用いて化学物質のスクリーニングを行った。まず昨年度に ERE アッセイを行った 30 種類の化学物質について TIF アッセイを 2 回ずつ行った。アッセイの結果を表 1 に示した。次に 36 種類の新たな化学物質について ERE、TIF の両アッセイを 2 回ずつ行った。その結果を表 2, 3 に示す。スクリーニングの結果から相対結合活性過度を判定基準として化学物質を分類した(図6)。ERE アッセイでは 100nM において E2 と比較して 50%以上の活性化が起こる物質を高反応性物質(high responder, H)、20-50%の活性化が起こる物質、あるいは 20%よりも低いがあきらかに濃度依存的に活性化が見られる物質を低反応性物質(low responder, L)、活性化が 20%以下の物質を無反応性物質(non-responder, N)とした。TIF アッセイでは 100nM において 50%以上の活性化が起こる物質を高反応性物質(high responder, H)、10-50%の活性化が起こる物質、あるいは 10%よりも低いがあきらかに濃度依存的に活性化が見られる物質を低反応性物質(low responder, L)、活性化が 10%以下の物質を無反応性物質(non-responder, N)とした。

4) アゴニストとアンタゴニストの判定

ERE アッセイでは E2 の結果に対して、 17α エストラジオール、ジェチルスチルベストロール(DES)、タモキシフェン、男性ホルモンのプロゲステロンのセンサーグラムの形はあきらかに異なることが判る。化学物質により ER と ERE の相互作用反応に違いが

あると考えられる。これを定量的に比較するために $1\mu\text{M}$ の化学物質存在下で測定したセンサーグラムから ER の結合量(結合レベル)と ER 添加終了後 2 分間解離反応をした後の結合量(結合安定性)の相関関係をプロットしてみると、アゴニスト、アンタゴニストで有意な差が見られた(図7)。例えばタモキシフェンは E2 に比べて ER と ERE の結合をより安定的に保持させることが示された。Biacore の特徴であるリアルタイム測定データの解析により、化学物質のエストロゲン作用の有無だけでなく、アゴニスト・アンタゴニストを区別できる可能性が示唆された。

(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)

研究目的:本研究では、核内受容体による遺伝子転写メカニズムを応用した、内分泌かく乱化学物質の新規高速分析法構築のため、種々のエストロゲンレセプター作用物質が ER におよぼす影響を表面プラズモン共鳴バイオセンサーを用いて解析した。本年度は、ヒトプロモーターにおける様々な ERE 配列について、化合物による ER の相互作用変化を検討した。あわせて、アフィニティーの低い ERE との相互作用を検討するため測定条件の再検討、および新しいプローブ固定化法を開発した。検討の結果、一部の ERE では化合物による ER 構造の差がより明らかに示された。また、fosERE などの対向配列でない ER 結合配列において、ER がモノマーで結合することが示唆された。

研究方法:

1. センサーチップの作成:ストレプトアビジンを予めコートしたセンサーチップにエストロゲンのレスポンスエレメントを含むビオチン化合物オリゴヌクレオチド(5'- Biotin- tcgagcaaagtcAGGTCAcagTGACC Tgatcaat-3')をインジェクトして固定化し引き続き、相補配列のオリゴヌクレオチドをインジェクトしてセンサーチップ上でアニーリングさせ、ERE センサーチップを作成した。ER-コファクター相互作用を検

討するにあたっては、ER による遺伝子発現においてコファクターとして機能することが示されている TIF2 の ER 結合サイトをコードするオリゴペプチドを合成して用いた。すなわち、活性化 ER はコファクターの LxxLL モチーフと相互作用することが知られている。そこで、TIF2 の LxxLL モチーフを含む領域のペプチドをコファクタープローブとして用いた。TIF2 は 3 つの LxxLL モチーフを有するが、実験では第 2 モチーフを含むビオチン化ペプチドを合成して、ERE と同様にストレプトアビジンコートセンサーチップに固定化した。

2. 相互作用の測定:ER はリコンビナント Human ER を使用した。予備検討の結果、E2 結合 ER は、ER-ERE 相互作用解析における測定条件下で特異的結合を示すことが確かめられたため、ER-ERE および ER-LxxLL 相互作用いずれも同じ条件下で測定を行った。ER をバッファ(50mM Tricine-NaOH pH7.8、160mM KCl、5mM MgCl₂、0.05% Tween 20)で希釈して、対象化合物と混合し、37℃で 5 分間インキュベートした後、サンプルを ERE および LxxLL を固定化したセンサーチップにインジェクトして SPR 装置(Biacore 3000, BiacoreAB)を用い、結合と解離の過程をそれぞれ測定した。化合物の結合による相互作用への影響を解析するにあたっては、化合物を $10^{-5} \sim 10^{-8}\text{M}$ の濃度範囲で 10nM ER と混合し、ER の ERE および LxxLL ペプチドに対する結合解離過程を測定した。

3. 解析:各化合物の存在下及び非存在における ER-ERE 相互作用の結合解離過程をそれぞれ 2 分間測定してそのレスポンスの変化を比較した。また、2 分間のレスポンスの増加を、結合量として求めた。解析は市販のコンピューターソフト(BIAevaluation 3.0(BIACORE AB)および JMP ver.3(SAS institute))を用いて行った。

研究結果:

ヒト遺伝子プロモーター ERE 配列を用いた検討では、ヒト遺伝子由来 ERE 配列としてまず始めに ERE による制御が報告されている cathepsin D の上流プロモーター由来の ERE 配列を用いた検討において

これまで用いてきた測定条件では十分な結合が認められず、測定条件の再検討を行った結果、buffer中の Mg^{2+} 濃度が、これら低アフィニティーEREとERの相互作用に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。これは、 Mg^{2+} によるDNA2本鎖構造への影響によると考えられる。新たに調整した測定条件下で代表的なERリガンドによるER-ERE相互作用への影響をCathD、C3、Oxytocin、fosなどのEREを用いて検討した結果、化合物ごとの相互作用の差はより明らかに示され、HTPS系としてより有用であると判断された。一方、ERE結合におけるER2量状態の実験的解析では、ERはERE対向配列に対して、ダイマーを形成して結合することが知られているが、ヒト遺伝子プロモーター由来のいくつかのEREでは、ER結合サイトを片側しか持たないものもあることから、チップに固定化するERE量を変化させて、それぞれER-E2複合体を結合がほぼ飽和するまでインジェクトして最大結合量を実験的に求め、EREオリゴ1分子あたりに結合する、ERの分子数を求めた結果、最大ER量はEREオリゴ量に比例関係にあることが示され、さらにERとそれぞれのオリゴとの分子量比から、VitA2やC3など対向配列を形成するEREでは、ERE1分子あたりER2分子が結合し、Oxytocinやfosの片側EREではERE1分子あたりER1分子すなわちモノマーで結合していることが示された。これらのヒトERE配列は、これまでに用いてきたVitA2-EREに比べ、ヒト生体内におけるERの挙動を反映する可能性があることからSPR-HTPSのプロープとして有用であることが示唆された。

(3) 内分泌かく乱物質の電算探索と評価(分担研究者:板井 昭子 株)医薬分子設計研究所)

研究目的:近年、環境中に存在する多くの天然または化学合成された化学物質が内分泌かく乱作用を示して、生物体の健全な発育を阻害することが明らかになり、その科学的な確認と対策が急務となっている。女性ホルモン等核内受容体のリガンド結合ドメインは結晶構造が解析されており、標的受容体の立体構造の情報に基づくコンピュータを用いた理論的なアプローチが可能である。当研究者らは以前から、標的受容体の立体構造が利用できる場

合に、受容体-リガンド間で形成され得る水素結合を足がかりとして任意の化合物が形成できる最安定な複合体の構造を予測し、原子レベルでの相互作用様式と結合の強さを推定する自動ドッキング法およびその方法に基づいて新規の活性化合物を探索する目的で、膨大な化合物群から標的受容体に安定に結合する可能性の高い少数の化合物を選別する三次元データベース検索法の開発を行ってきた。本研究は、この三次元データベース検索法を利用して内分泌かく乱化学物質の標的であるエストロゲン受容体の立体構造情報に基づき、コンピュータを用いた理論的な解析と検索を行うことを目的としている。今年度はリガンド結合ドメインのX線結晶構造が明らかにされているアンタゴニスト結合型エストロゲン α 受容体に対して、数十万種の市販化学物質が登録されているデータベースのバーチャルスクリーニングを実施した。自動ドッキングプログラムにより各化学物質の結合様式を推定しその結合親和性を比較することにより、アンタゴニスト結合型エストロゲン α 受容体に安定に結合すると推定される化学物質を選び出した。

研究方法:

(1)スクリーニングに使用する受容体立体構造の準備

ドッキングに使用する受容体立体構造は、Protein Data Bank(PDB)に登録されているアンタゴニスト結合型ER α のリガンド結合ドメイン結晶構造のうち、ラロキシフェン(RAL)が結合している1err.pdbを使用した。PDB中の蛋白質座標に水素を付加し、蛋白質分子力場計算プログラムAMBERで付加した水素の構造の最適化・AMBER原子タイプ・原子電荷の割り振りを行った。さらに自動ドッキングプログラムAdam & Eveを実行する際に必要な水素結合情報を割り振り以下のスクリーニングに使用した。

(2)低分子化合物データベース

スクリーニングを行う化学物質群として、市販データベースACD(Available Chemical Directory)中の全化合物(約20万化合物)を使用した。これらの化合物は三次元化した後、自動ドッキングに必要な情

報(水素結合情報とコンフォメーション探索時の結合回転情報)を付加した。なお、三次元化には単純なディスタンスジオメトリ法による構造立ち上げの後 MMFF 力場を用いた構造最適化と MOPAC-MNDO 法による原子電荷計算を行うプログラム Olive を使用し、自動ドッキングに必要な情報付加には、Adam & Eve の部分プログラムである Eve-make を使用した。

(3) バーチャルスクリーニング

Adam & Eve を用いてアンタゴニスト結合型 ER α のリガンド結合ドメインとデータベース中化合物の安定な複合体構造を推定した。このプログラムは、対象データベース中のすべての化合物についてそのコンフォメーションを系統的に変えながら結合キャビティへのドッキングを試行する。その結果、蛋白質-低分子化合物間の原子同士のぶつかりや静電的な反発のない安定な結合コンフォメーションを得ることができる。今回は、条件を満たす結合コンフォメーションが複数得られた場合には一化合物につき最大5つのコンフォマーを出力した。

(4) 自由エネルギー値の推算

Adam & Eve のドッキング過程では低分子化合物側だけが構造最適化され受容体側はリジッドなまま扱われるため、自動ドッキングで使用されるエネルギー値は非常に荒い見積もりとなっている。そこで得られたすべての複合体構造について、低分子化合物と受容体のリガンド結合キャビティを構成しているアミノ酸残基全体の構造最適化を行った後、当研究所で開発した蛋白質-リガンド間の結合自由エネルギーを見積もるプログラム GenB を利用して結合自由エネルギーを算出した。

研究結果:ラロキシフェン(RAL)結合型 ER-LBD 立体構造(1err.pdb)を基に、自動ドッキングプログラムによる複合体構造の推定および蛋白質構造まで含めた複合体構造の最適化、蛋白質-リガンド間の結合自由エネルギー推算プログラムを実行した。さらに化合物の結合コンフォメーションでの結合自由エネルギー値、活性発現に有効である水素結合の有無、アンタゴニスト特有の開いたキャビティ上部

の(リガンドによる)占有率等を考慮して化合物を絞込んだ。最終的に結合活性を有することが期待された100化合物を選び出した。

C. 結論

(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)および(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 遺伝子の上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、前年に引き続き 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 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、内分泌かく乱化学物質を含む化学物質のハザードアセスメントにおいて、OECD で従来の毒性手法に合わせ、現時点での問題点を考慮し、科学の進歩に即応した新規試験法開発の重要性が確認された。今後は本研究班でこれまでに進めてきた内分泌かく乱物質の試験法を始め個別の試験法についてより具体的な国際的合意に向けた動きが活発化するものと考察された。

(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-HTTPS) 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 HTTPS に特化するための試験」 (主任研究者: ビ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。内分泌かく乱化学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。すなわち、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。そこで、ホルモンレセプターの作用機構に焦点をあてた cell free 内分泌かく乱化学物質スクリーニング法として表面プラズモン共鳴高速分析法を構築し、その有用性について検討を行った。ER をあらかじめ様々な化学物質とインキュベートして測定を行うことにより ER と ERE の結合反応に変化を引き起こすことが示され、ER の結合量の変化を観察することにより化学物質のエストロゲン様作用の有無を判定することができた。さらに、ER と ERE の相互作用の結合および解離の ER 結合量の解析からアゴニストとアンタゴニストが大きく異なる相互作用変化を引き起こすことが示された。測定のエンドポイントとして結合量のみを指標とする従来の競合結合試験ではアゴニスト、アンタゴニストの区別は判定できなかったが、表面プラズモン共鳴センサーの特徴であるリアルタイム解析により、アゴニスト、アンタゴニストといったリガンドの作用を判別する可能性が示された。一方、後者においては、ヒトプロモーターにおける様々な ERE 配列について、化合物による ER の相互作用変化を検討するため、アフィニティーの低い ERE との相互作用を測定可能な測定条件の最適化を行い、さらに新しいプローブ固定化法を開発した。検討の結果、一部の ERE では化合物による ER 構造の差がより明らかに示された。また fosERE などの対向配列でない ER 結合配列にお

いて、ER がモノマーで結合することが示唆された。これらの SPR-HTTPS 系への応用により、生体作用に関連するより多くの情報が得られものと考察された。

(3) 内分泌かく乱物質の電算探索と評価 (分担研究者: 板井 昭子 株) 医薬分子設計研究所) ではラロキシフェン結合 ER モデルを標的としたアンタゴニスト選別計算法を用いた市販化合物データベースのバーチャルスクリーニングにより、これまで既知のアンタゴニストとは構造が大きく異なる多くの化合物が選別された。これまでに、アゴニストモデル計算においても、実際にアゴニスト作用を有する多様な構造の化合物の選別に成功しており、さらに実際に内分泌かく乱性が報告されている多くの化合物の構造は本来のリガンドであるエストロゲンと大きく異なることなどから、今回、計算で選別された化合物もまた、新規のエストロゲンアンタゴニストとして内分泌かく乱を有する可能性が示唆された。内分泌かく乱化学物質のスクリーニングにおいて計算による方法は、その対象化合物の数が多いため非常に有用な手段となりえる。本手法によれば、従来の QSAR 法に比較して、非常に高速に高精度の結果を得られ、さらに既知リガンドと構造が全く異なる化合物をも選別できることから、内分泌かく乱化学物質の初期スクリーニングに有用であることが示された。

D. 考察

レポーター遺伝子導入細胞による高速分析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、有用な内分泌攪乱化学物質試験法、特に高次試験実施における優先順位設定のためのプレ・スクリーニング法として有用であると考察された。内分泌かく乱化学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 SPR-HTTPS 開発研究については、ER-ERE アッセイについては測定条件の改良を行うことにより、ハイスループットスクリーニング法として信頼性と再

現性の向上を得た。培養細胞を用いた比較して、本アッセイ系は *in vitro* の再構成系であり、純粋なレセプター—シグナル伝達系への作用のみを検討することができる特色があり、さらに同じアゴニストであっても相互作用に与える影響が異なることが示され、本系から得られる情報が引き続く内分泌かく乱性の評価において有用であることが示された。また ER 以外のホルモンレセプターもほぼ同様のメカニズムで遺伝子転写を行っていることからそれらについても今後、同様のアッセイ系の構築が期待される。それにより複数のホルモンレセプターを介した反応を比較することにより内分泌かく乱化学物質の毒性メカニズムの研究を多面的に展開することができると考えられる。本系は内分泌かく乱化学物質によるホルモン作用機構の各ステップへの影響を個別に解析することにより従来のアッセイ法とは異なり、個々の化合物の受容体構造への影響を詳細に検討することが可能である。今後、ハイスループットスクリーニング法として、アッセイの精度、効率等の改善を行うとともに、臓器特異的に発現するコファクターや配列の異なる ERE との相互作用解析を進め、化合物特異的な受容体作用のメカニズムについての検討を進める予定である。また、内分泌かく乱物質の電算探索と評価では、ラロキシフェン結合 ER モデルを標的としたアンタゴニスト選別計算法を用いた市販化合物データベースのバーチャルスクリーニングにより、既知のアンタゴニストとは構造が大きく異なる多くの化合物が選別された。これまでに、アゴニストモデル計算においても、実際にアゴニスト作用を有する多様な構造の化合物の選別に成功しており、今回、計算で選別された化合物もまた、新規のエストロゲンアンタゴニストとして内分泌かく乱を有する可能性が示唆される。本研究班で開発された電算検索法によれば、従来の QSAR 法に比較して、非常に高速に高精度の結果を得られることから、さらに既知リガンドと構造が全く異なる化合物を選別できることから、内分泌かく乱化学物質の初期スクリーニングに有用であることが示され、今後は、細胞系や無細胞系における ER 作用強度のデータを計算にフィードバックしつつ、さらには結合した化合物がレセプター構造に与えるエネルギー変化を計算することで ER への結合活性のみではなく化合物作用の計算的推定手法の

検討を進める。

E. 結論および今後の展望

本研究班において構築されたこれら、*in silico*, *cell free*, *in vitro* スクリーニング手法により、対象の化学物質について、それぞれ特異的な情報を得ることが可能である。これらを組み合わせることで、次の段階として詳細試験に供する化学物質の科学的根拠に基づく、より正確な優先化合物の抽出が期待される。このリストにより、内分泌かく乱化学物質問題の効率的な解決への一つの道筋ができるものと期待される。また、ここで得られる受容体、応答 DNA 配列、共役因子等の相互作用に関するデータと細胞、個体レベルでの作用データが有機的に組み合わせられることにより、内分泌かく乱化学物質の作用メカニズムの解明への貢献が期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kanno, J., Onyon, L., Haseman, J., Fenner-Crisp, P., Ashby, J., and Owens, W. The OECD program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *in Vivo* Estrogenic Responses Phase 1 **Environmental Health Perspectives** 2001 109(8):785-794

Haraguchi, S., Kitajima S., Takagi A., Takeda H., Inoue T. and Saga Y. Transcriptional regulation of *Mesp1* and *Mesp2* genes: differential usage of enhancers during development. *Mech Dev*, 108, 59-69.2001

表面プラズモン共鳴センサーを用いた内分泌かく乱化学物質スクリーニング法：実験医学別冊 クローズアップ実験法総集編 pp.199-204（羊土社、2002）

表面プラズモン共鳴センサーを用いた内分泌かく乱化学物質スクリーニング法：浅野和信、小野敦、

橋本せつ子、井上達、菅野純 分析化学
(accepted, 2002)

2. 学会発表

橋本 せつ子, 小野 敦, 浅野 和信, 大藤 努,
井上 達, 菅野 純 : 表面プラズモン共鳴センサ
ーを用いた内分泌かく乱化学物質スクリーニング法
第 74 回 日本生化学会大会 2001

菅野純、松永信人、吉村功 子宮肥大試験等、実
験動物を用いた相加相乗性の検討の際の統計解
析 第 28 回日本トキシコロジー学会、東京、2001

菅野 純: 第7回日本環境毒性学会・バイオアッセ
イ研究会 合同研究発表会 (東京水産大学)

菅野 純: 内分泌かく乱化学物質－受容体原生
毒性としての考察 日本病理学会2001.4.5-7 会
誌90(1)pp.122 (2001.4)

Kanno J., Matsunaga N., Yoshimura I.: Evaluation
Method for synergism and its application on
in vivo studies for endocrine disruptor
International Conference on Statistical Challenges
in Environmental Health Problems
(2001.8.30-9.1)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

Transcriptional Activity Report
SP Number
AP Number

Conc.(pM)	Concentration
1000000	10 μ M
100000	1 μ M
10000	100nM
1000	10nM
100	1nM
10	100pM
	10pM

Negative Control Positive Control	
Average	
SD	
CV	
Activity	

Compounds	

HTS01127	HTS01128	HTS01129	HTS01130
	4-Heptylsulfanyl-phenol	2,4-Dihydroxyphenyl 1-Naphthyl Ketone	N-Heptyl 4-Hydroxybenzoate

RawData											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
636	621	676	964	805	926	1584	1422	1641	4787	4250	5515
1245	1090	1273	532	482	520	729	657	697	996	986	990
623	612	592	528	484	504	499	455	502	519	523	569
518	462	537	518	466	453	474	471	485	481	483	480
471	481	475	445	442	447	448	440	465	480	495	472
492	518	472	481	449	467	449	453	468	486	510	477
457	483	465	471	481	451	466	458	483	471	496	496
486	478	471	461	476	472	2810	2714	2907	3158	2570	3241

A
B
C
D
E
F
G
H

Mean Data(上段)/S.D Data (下段)											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
644.333333			898.333333			1549			4850.666667		
28.43120352			83.0321223			113.6177803			634.8986796		
1202.666667			511.333333			694.333333			990.6666667		
98.57146308			26.1023626			36.07399802			5.033222957		
609			505.333333			485.333333			537		
15.71623365			22.03028219			26.31222783			27.78488798		
505.6666667			479			476.6666667			481.3333333		
38.99145205			34.39476704			7.371114796			1.527525232		
489			462.333333			451			482.3333333		
23.06512519			14.18919777			12.76714533			11.67618659		
494			463.333333			456.6666667			491		
23.06512519			19.75685535			10.0166528			17.05872211		
468.3333333			467.6666667			469			487.6666667		
13.31665624			15.27525232			12.76714533			14.43375673		
474						2900					
8.318653737						258.6464769					

A
B
C
D
E
F
G
H

Mean Data/ct(上段)/S.D Data/ct(下段)											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.359353024			1.895218003			3.267932489			10.23347398		
0.059981442			0.175173254			0.239699958			1.339448691		
2.537271449			1.078762307			1.464838256			2.090014065		
0.207956673			0.055068276			0.076105481			0.010618614		
1.284810127			1.066104079			1.023909986			1.132911392		
0.033156611			0.046477389			0.055511029			0.058617907		
1.066807314			1.010548523			1.005625879			1.015471167		
0.082260447			0.0725628			0.015550875			0.003222627		
1.03164557			0.975386779			0.951476793			1.017580872		
0.048660602			0.029935016			0.026934906			0.024633305		
1.042194093			0.977496484			0.963431786			1.035864979		
0.048660602			0.041681129			0.021132179			0.035988865		
0.988045007			0.986638537			0.989451477			1.02883263		
0.028094211			0.032226271			0.026934906			0.030450964		
1						6.11814346					
0.017549902						0.545667673					

A
B
C
D
E
F
G
H