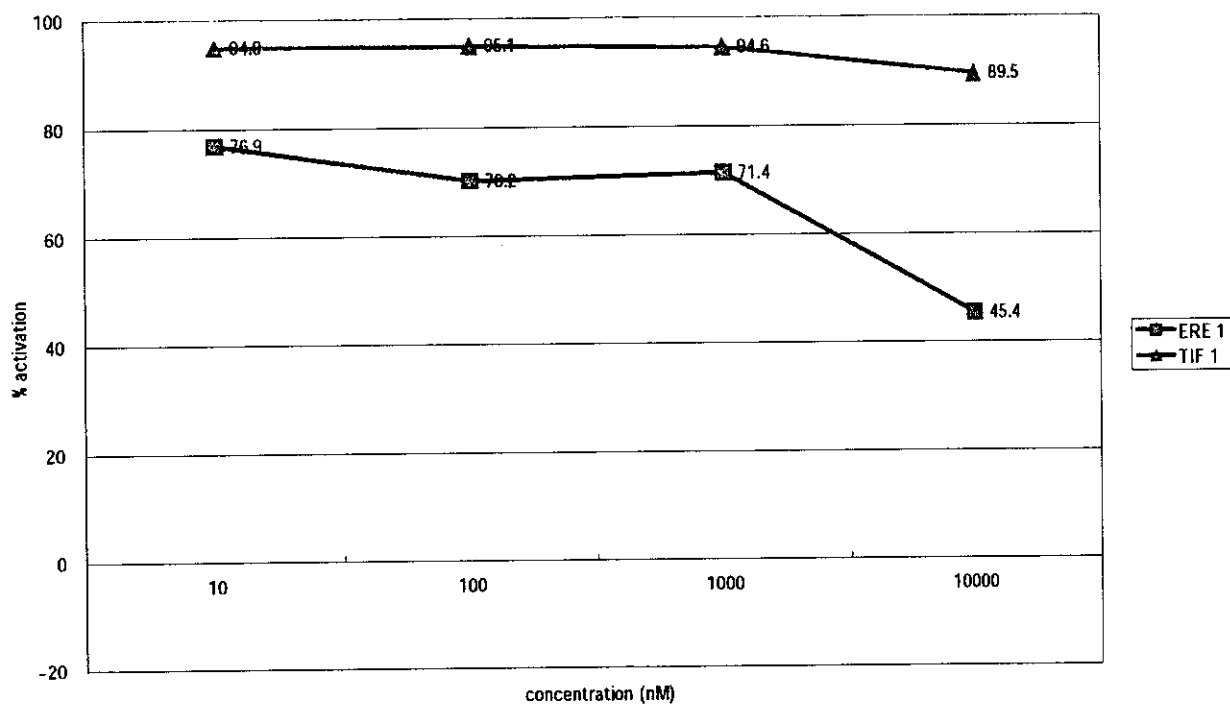
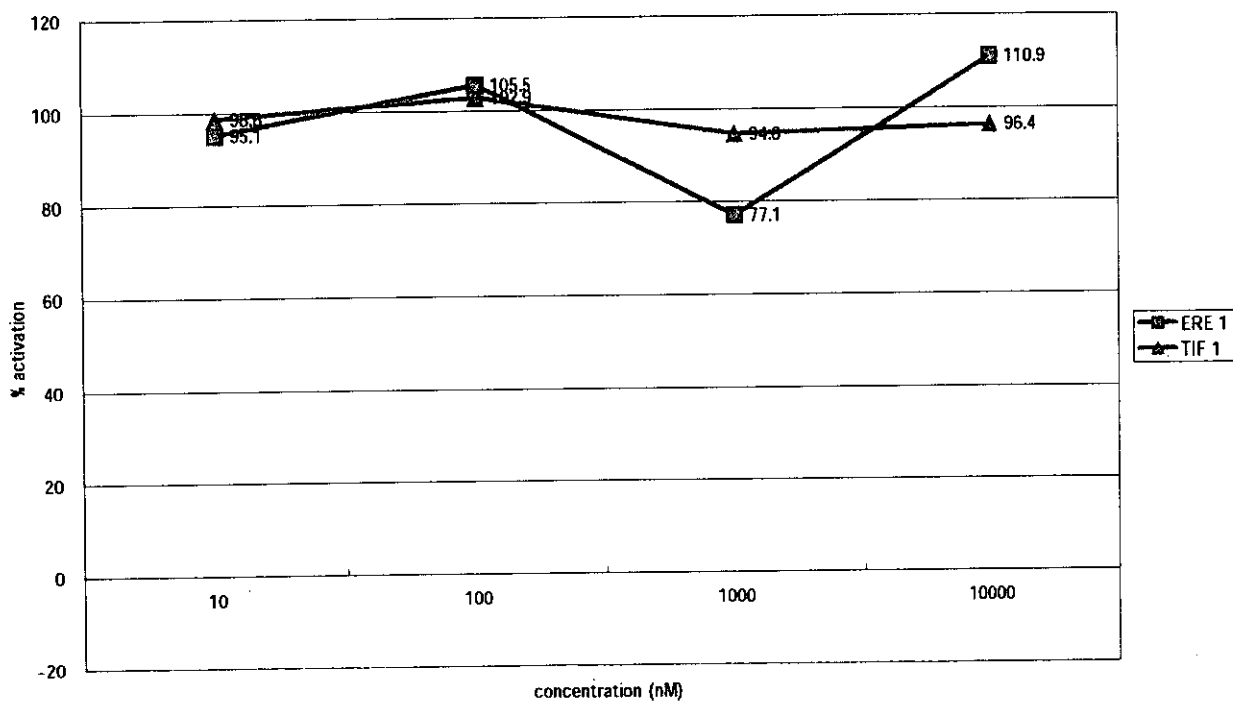


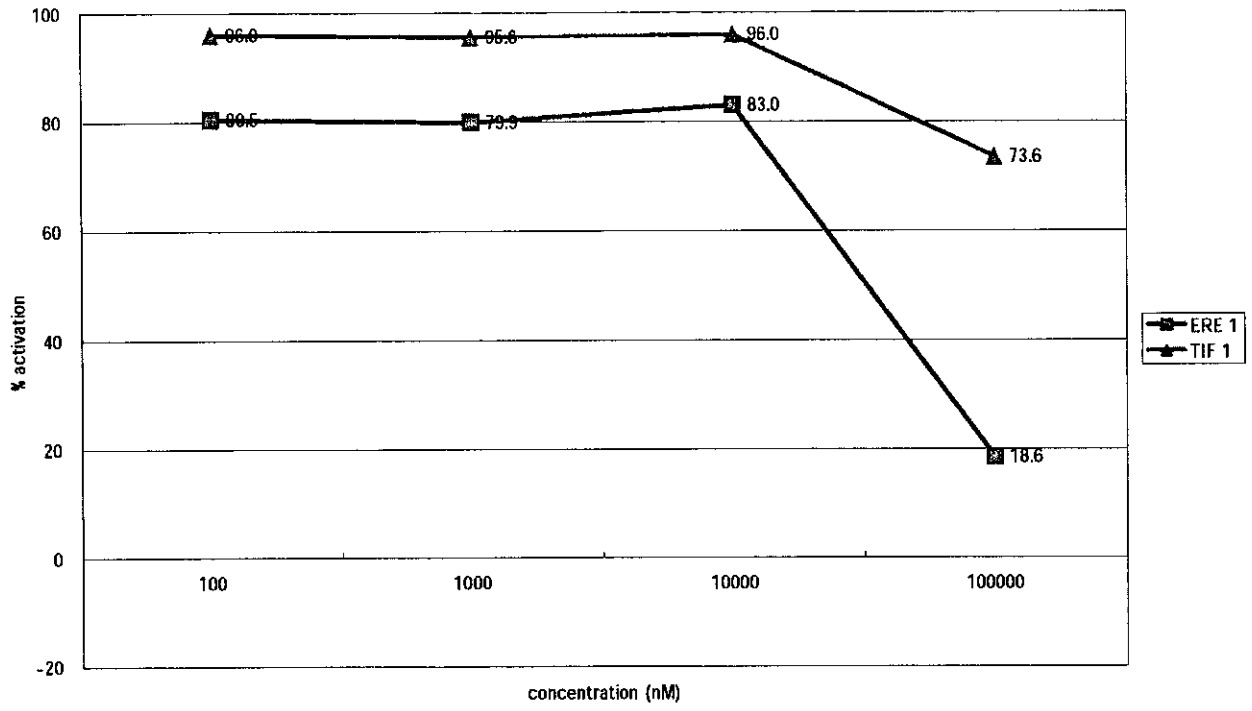
EA161



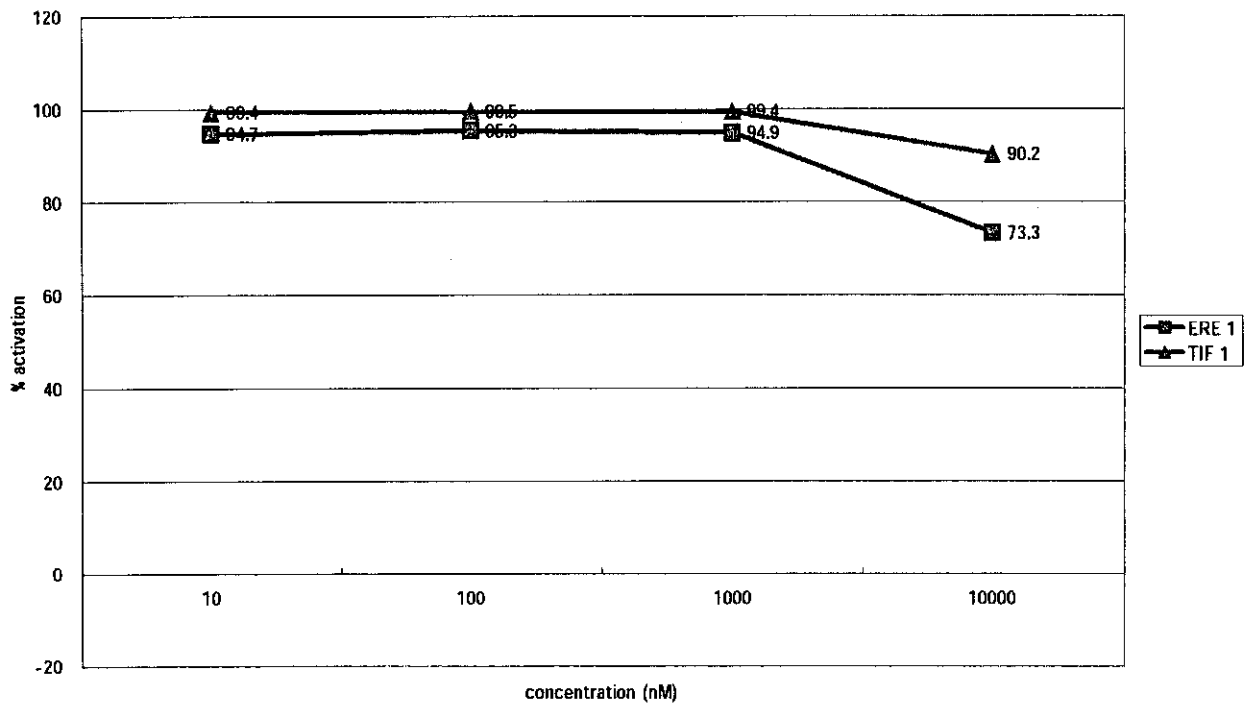
EA164



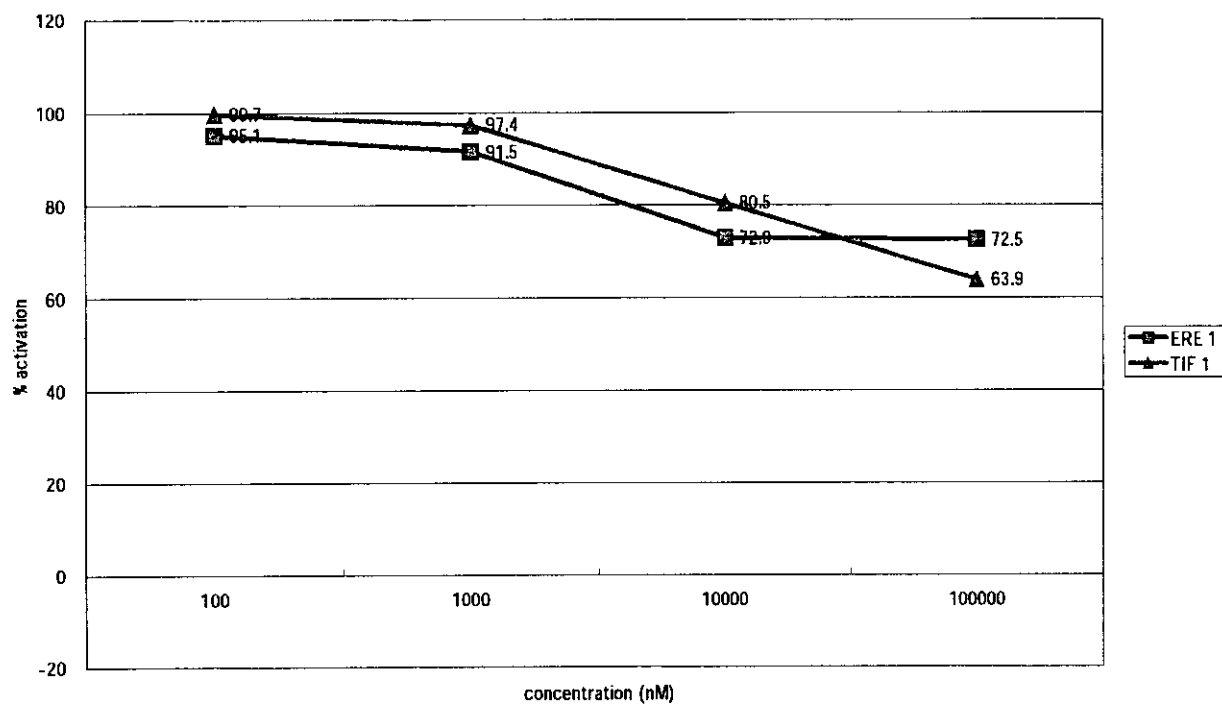
EA165



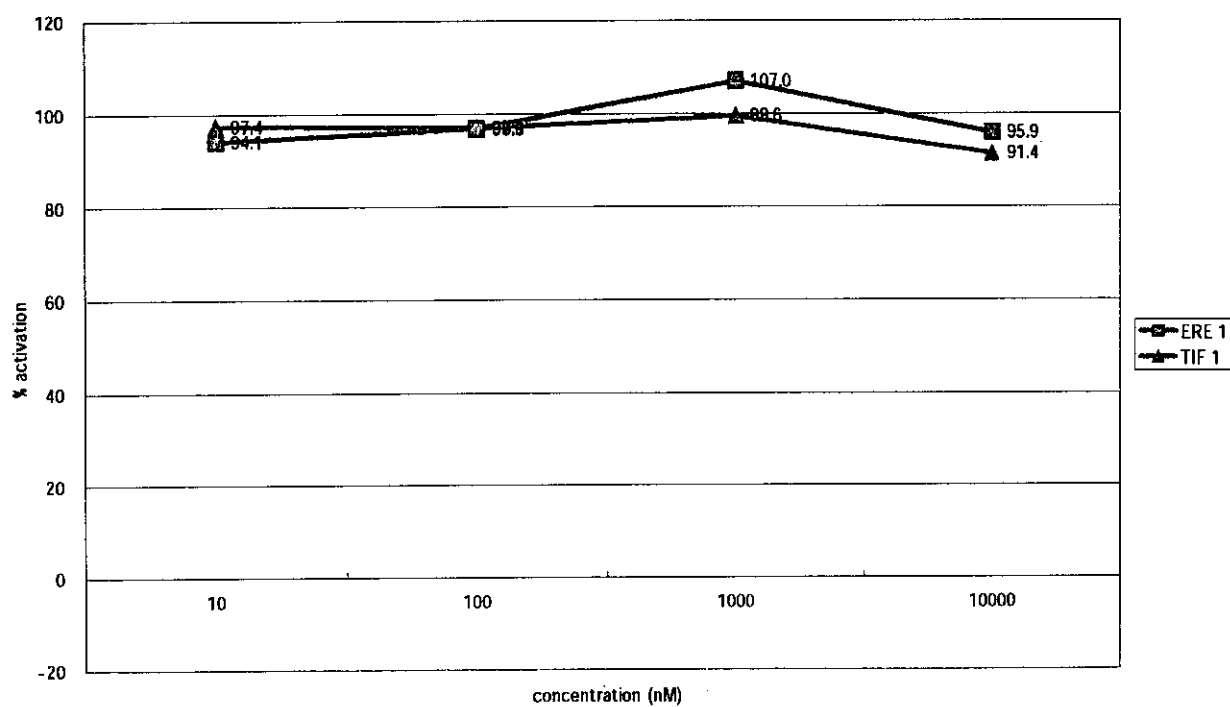
EA166



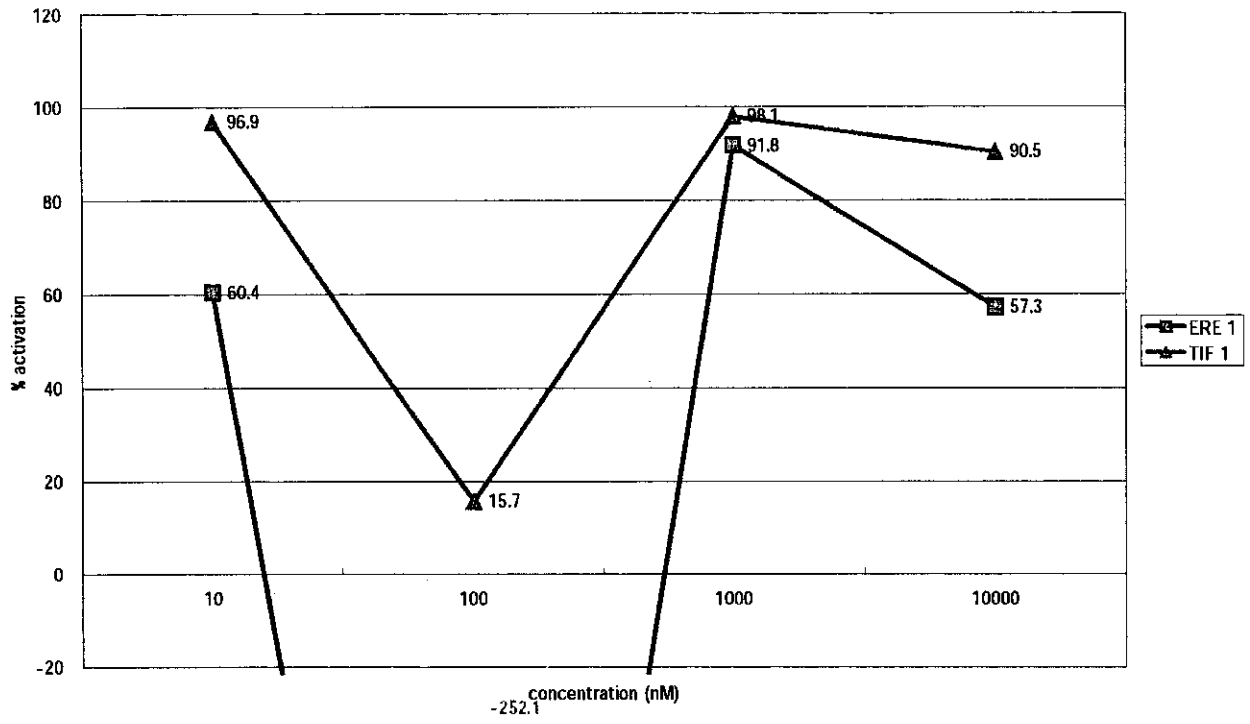
EA205



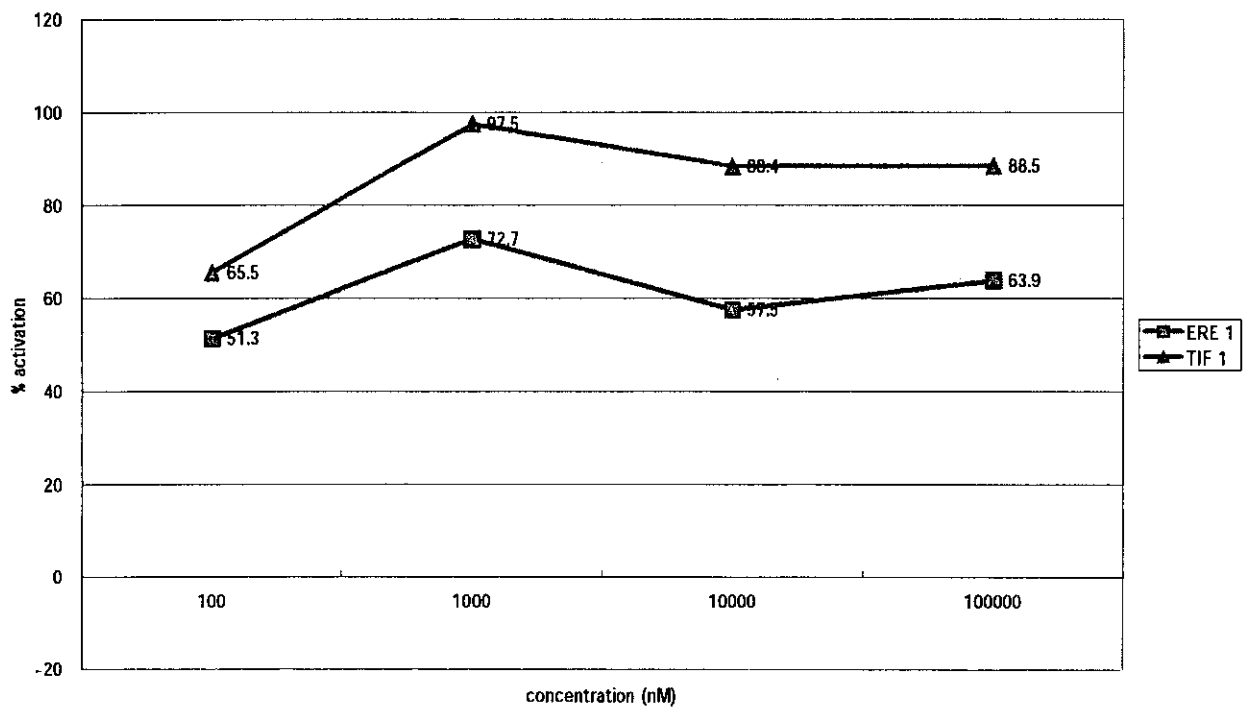
EA207



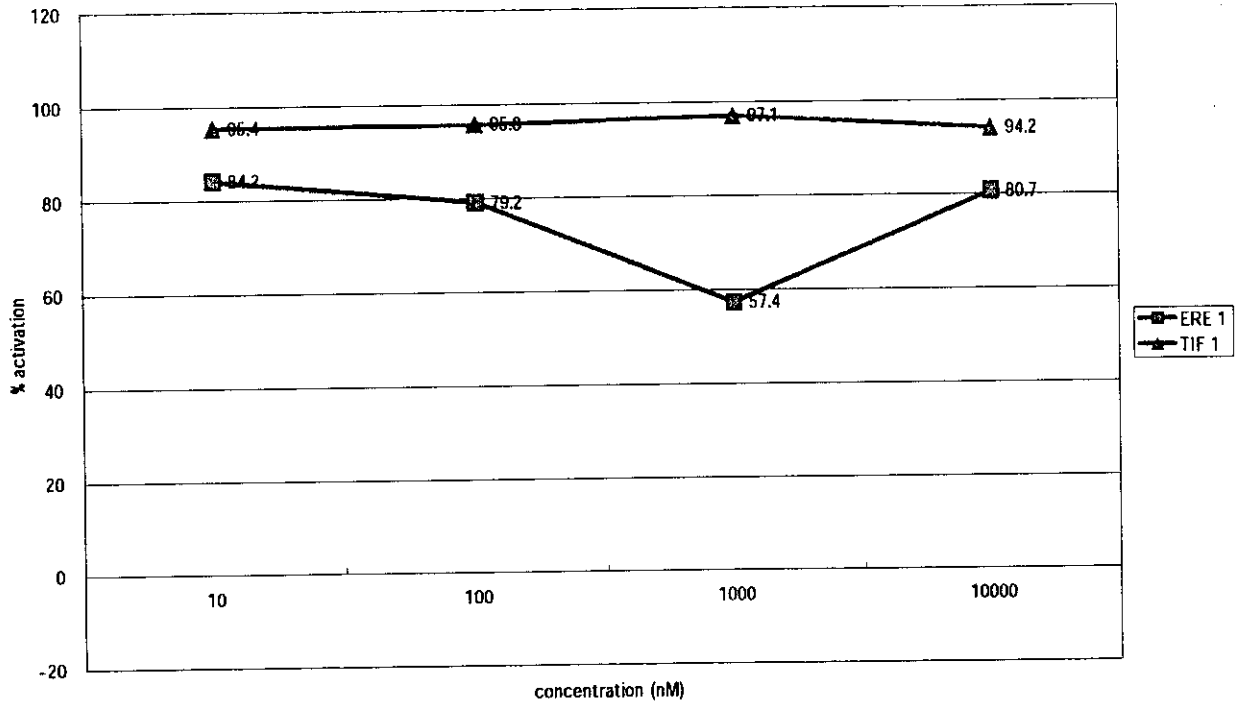
EA209



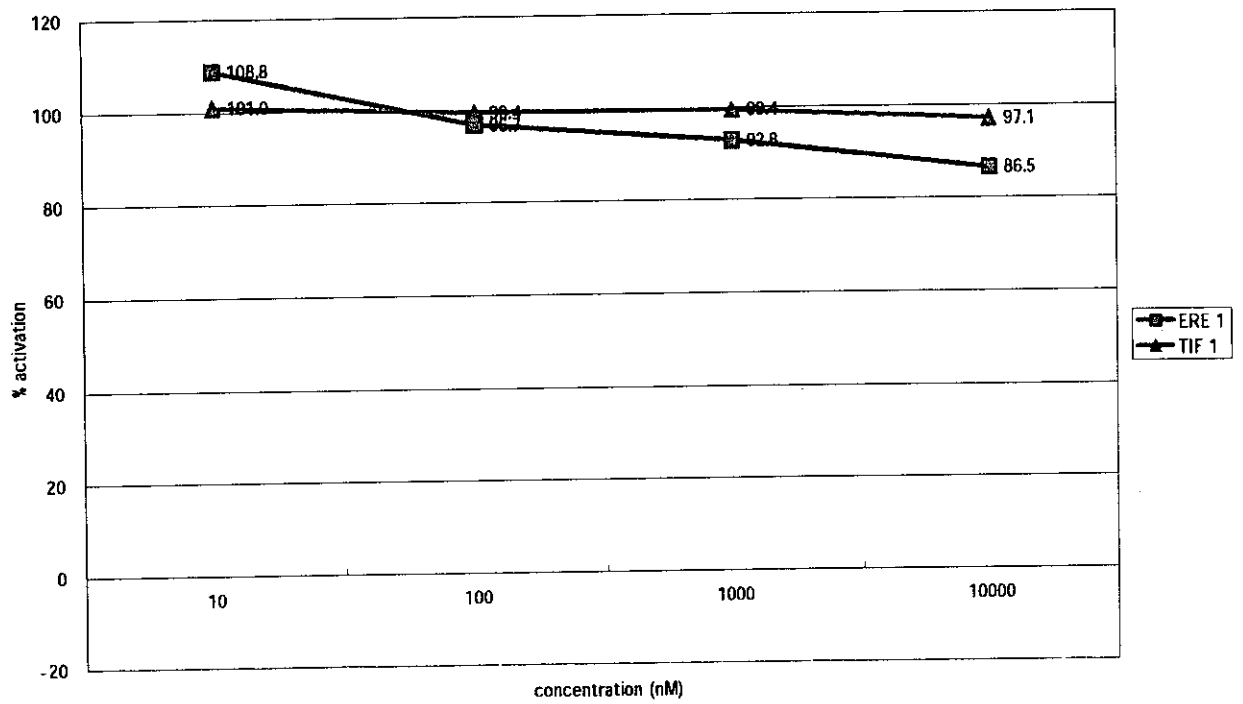
EA210



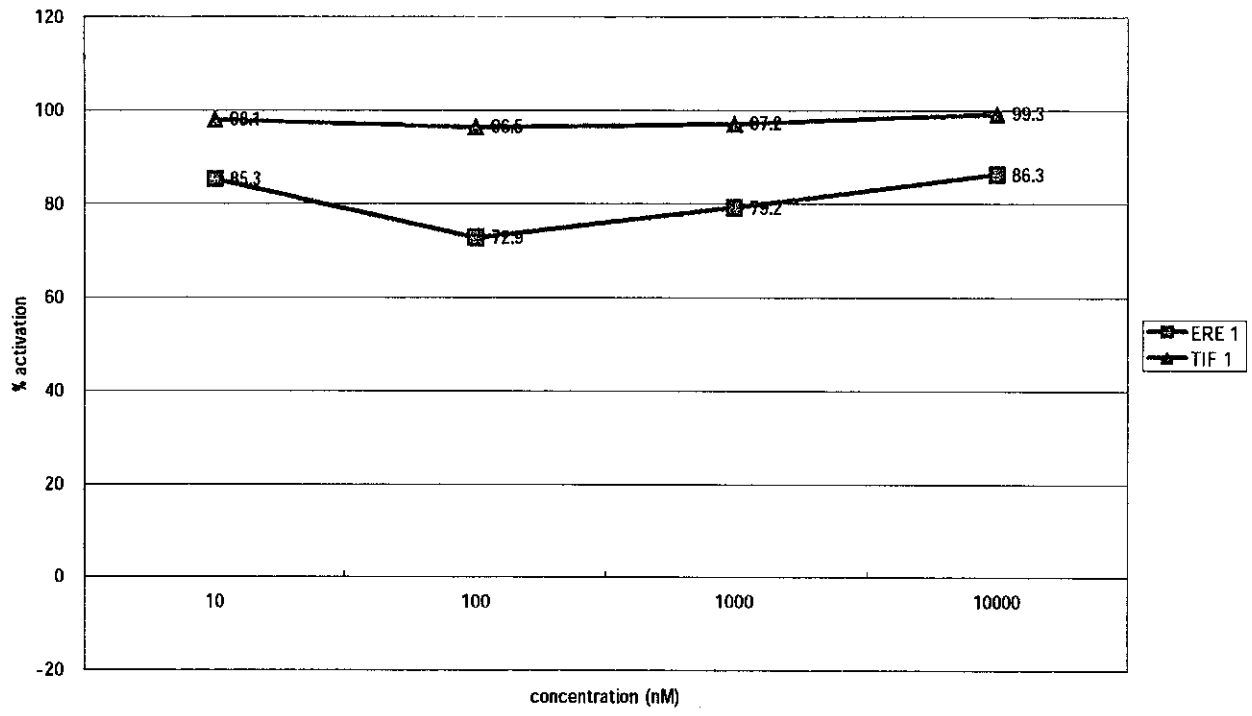
EA214



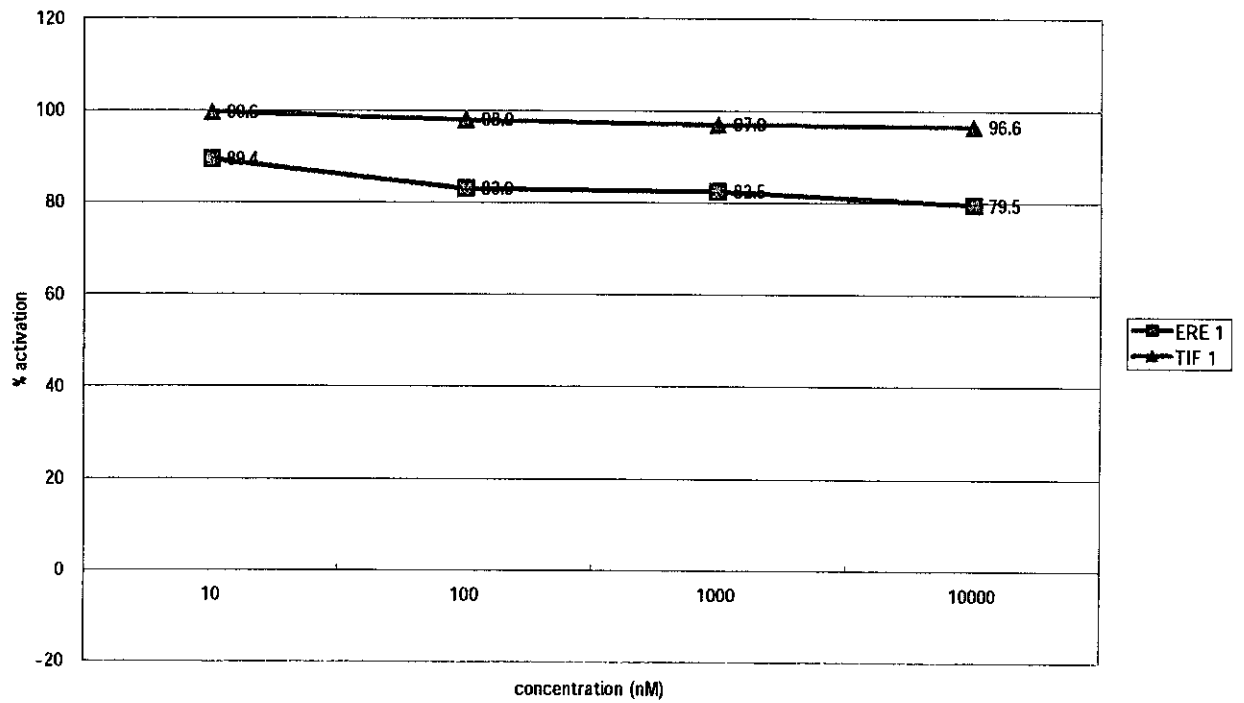
EA222



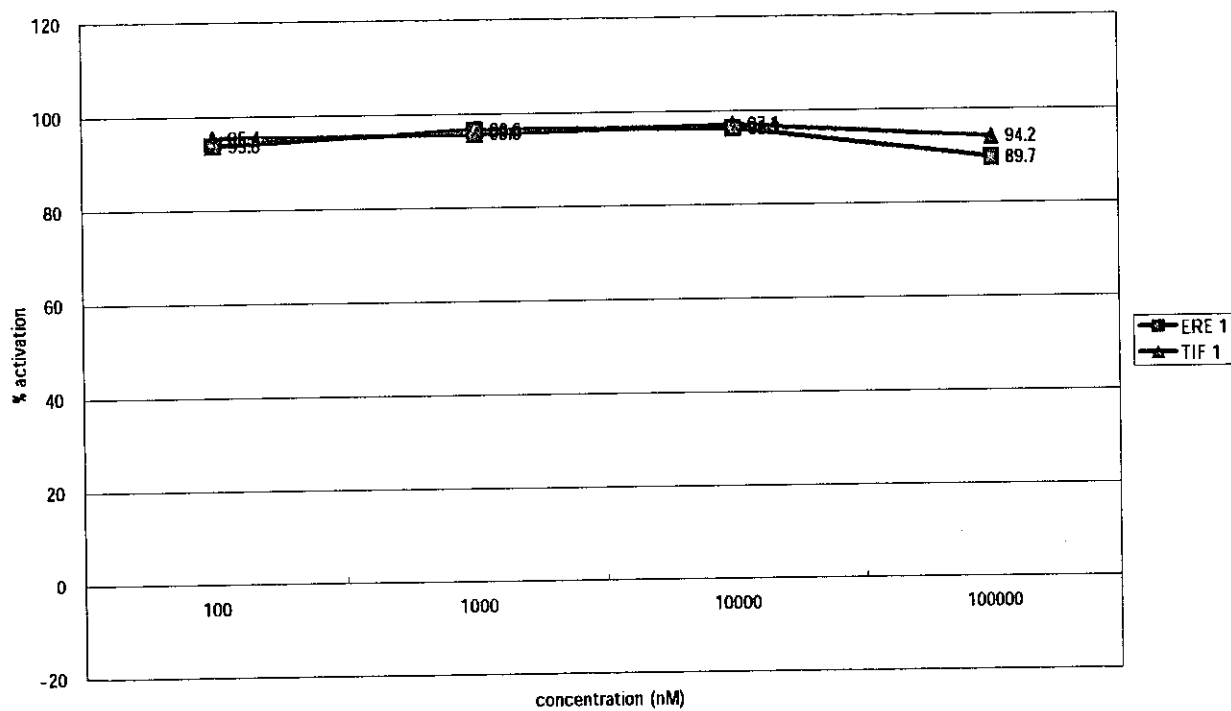
EA224



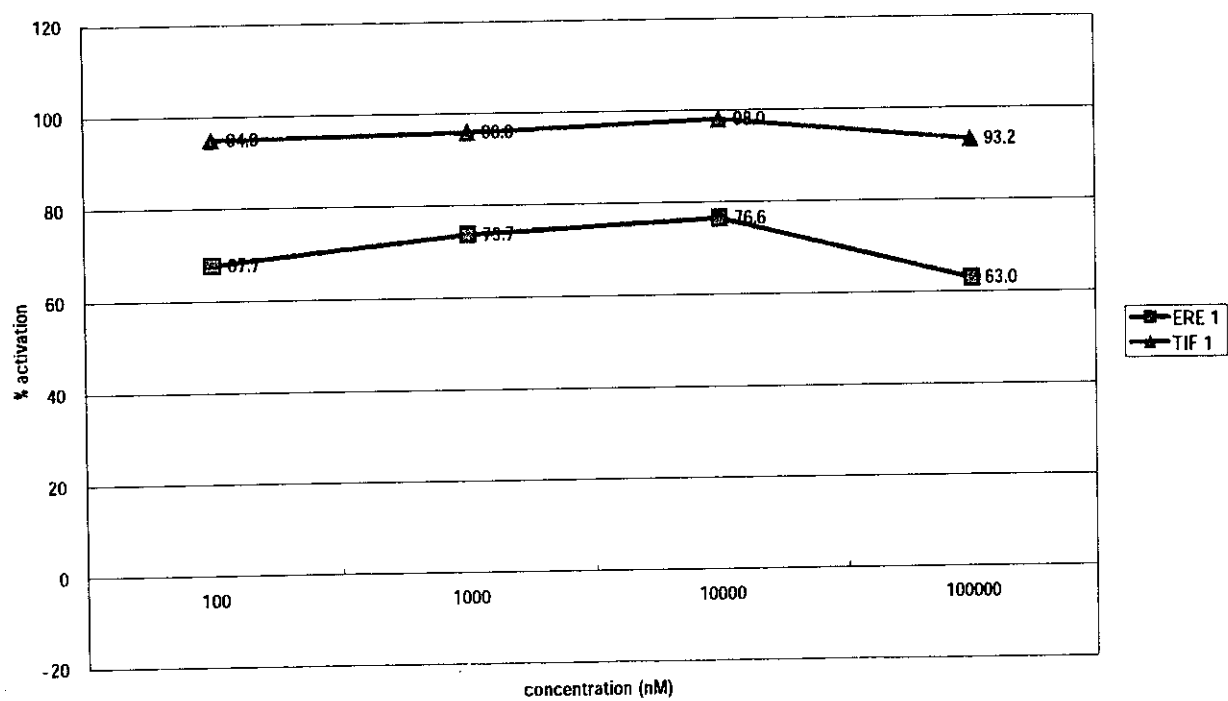
EA226



EA228

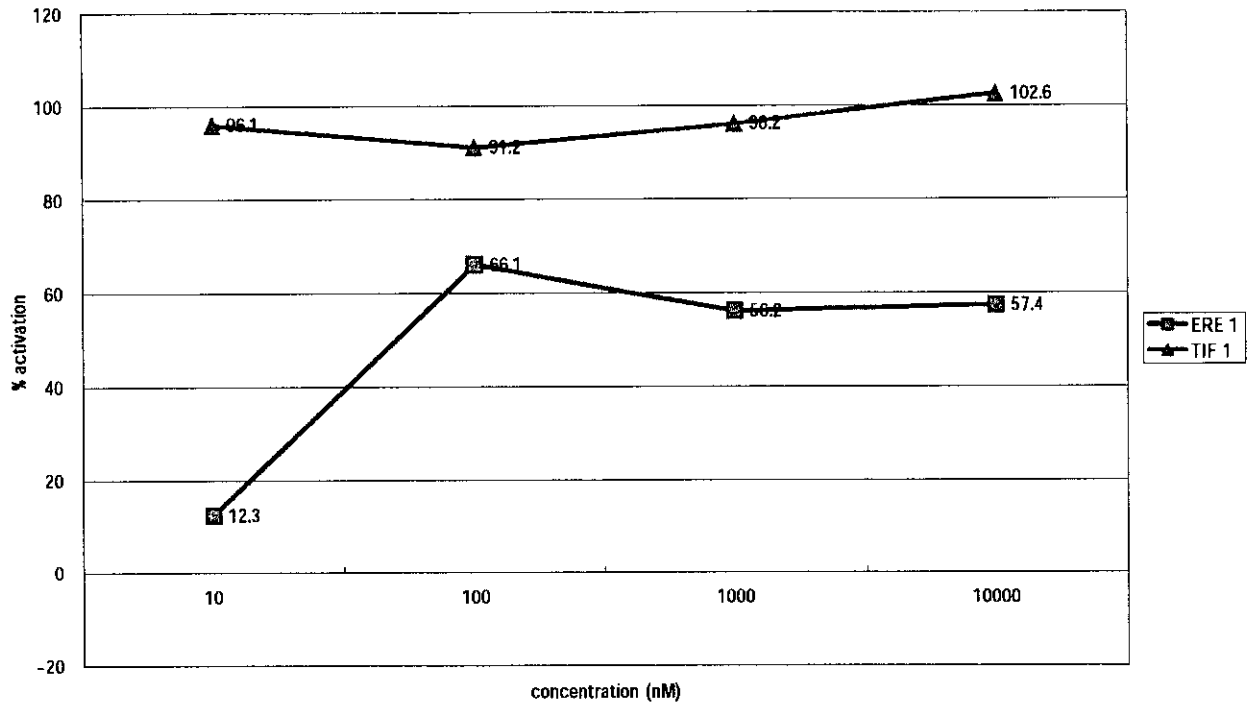


EA260

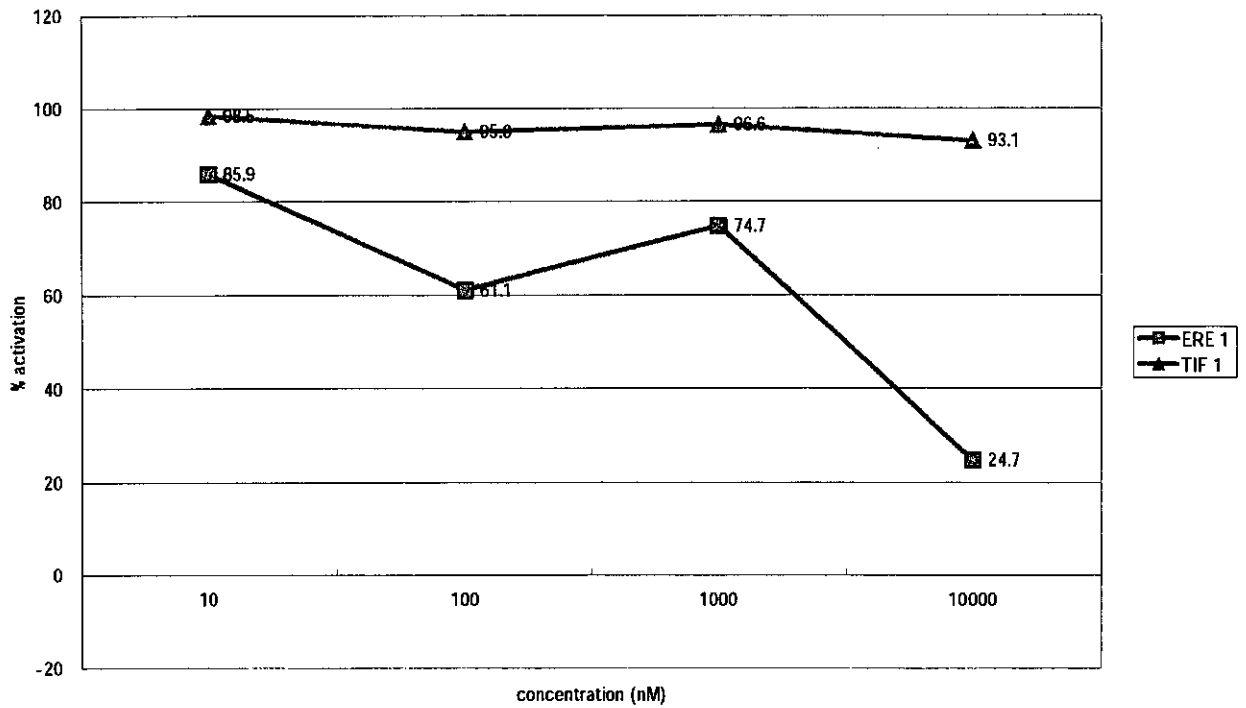




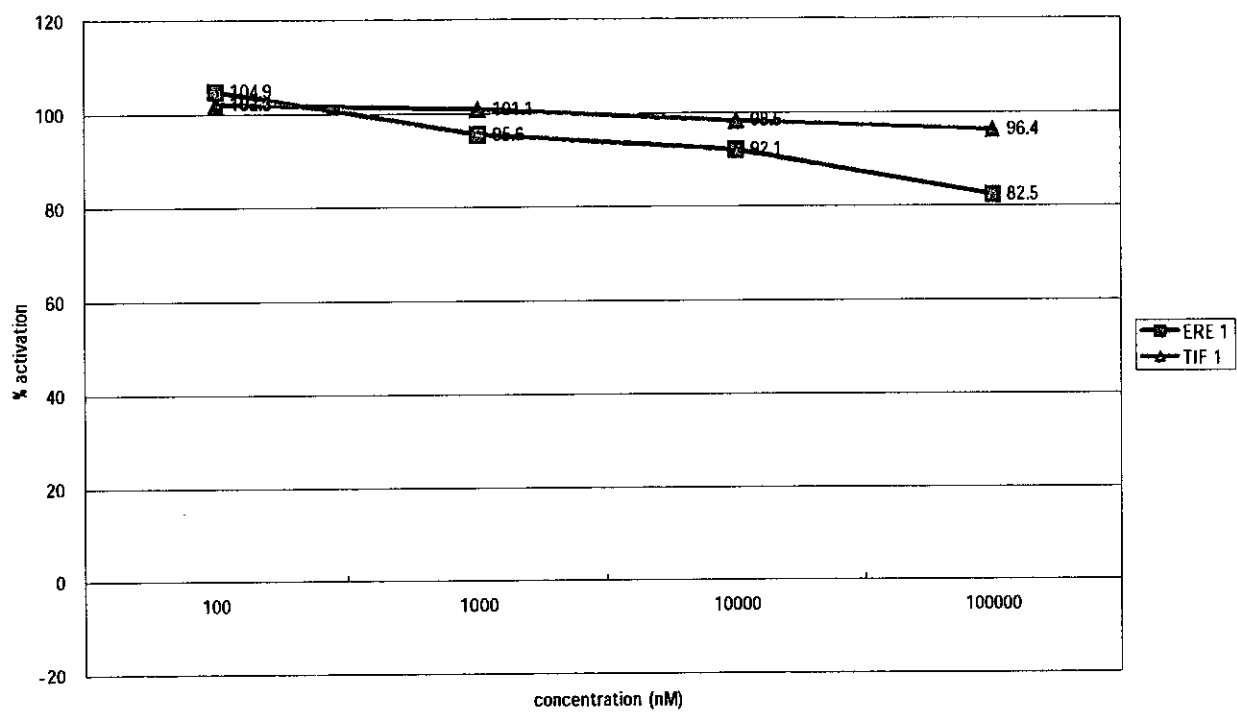
EA263



EA322



EA326



% activation

ID	ERE-1					TIF-1					ERE-2					TIF-2					
	10	100	1000	10000	100000	10	100	1000	10000	100000	10	100	1000	10000	100000	10	100	1000	10000	100000	
EA101	110.3	107.2	91.6	88.6	88.6	###	###	###	98.6	74.6	EA101	84.9	94.4	###	-26.9	EA101	97.9	99.5	14.5	49.7	
EA104	93.9	102.8	93.5	68.7	68.7	96.5	###	###	96.8	75.4	EA104	118.4	92.0	113.5	-274.0	EA104	###	###	96.5	99.0	1.2
EA109	82.2	94.3	94.3	30.2	30.2	93.3	94.6	91.9	91.9	75.4	EA109	77.3	44.0	-110.3	80.8	EA109	95.1	92.0	19.7	94.0	
EA113	73.0	50.3	35.9	30.2	30.2	95.5	92.2	91.2	86.8	86.8	EA113	76.7	85.0	65.7	64.4	EA113	96.0	93.2	###	93.0	
EA116	95.9	104.0	-31.6	-31.6	-31.6	97.7	97.6	32.8	39.1	39.1	EA116	94.0	90.9	-19.9	10.0	EA116	98.5	96.4	95.8	73.2	
EA117	92.1	91.9	91.8	82.6	82.6	###	###	###	97.7	###	EA117	114.4	69.5	10.0	###	EA117	98.8	94.1	89.9	32.2	
EA118	87.5	101.4	98.4	103.7	103.7	###	###	###	96.3	###	EA118	94.0	90.9	-19.9	10.0	EA118	98.8	94.1	89.9	32.2	
EA145	76.2	91.4	83.9	26.1	26.1	###	###	###	84.8	###	EA145	94.0	90.9	-19.9	10.0	EA145	98.8	94.1	89.9	32.2	
EA159	94.6	63.4	83.4	-13.8	-13.8	94.5	91.0	90.5	51.7	51.7	EA159	94.0	90.9	-19.9	10.0	EA159	98.8	94.1	89.9	32.2	
EA221	128.6	102.8	99.4	51.6	51.6	###	###	###	87.5	87.5	EA221	94.0	90.9	-19.9	10.0	EA221	98.8	94.1	89.9	32.2	
EA243	76.7	85.0	65.7	64.4	64.4	###	###	###	93.0	93.0	EA243	94.0	90.9	-19.9	10.0	EA243	98.8	94.1	89.9	32.2	
EA245	94.0	78.4	90.9	-19.9	-19.9	98.5	96.4	95.8	73.2	73.2	EA245	94.0	90.9	-19.9	10.0	EA245	98.8	94.1	89.9	32.2	
EA308	114.4	69.5	90.0	10.0	10.0	98.8	94.1	89.9	32.2	32.2	EA308	94.0	90.9	-19.9	10.0	EA308	98.8	94.1	89.9	32.2	

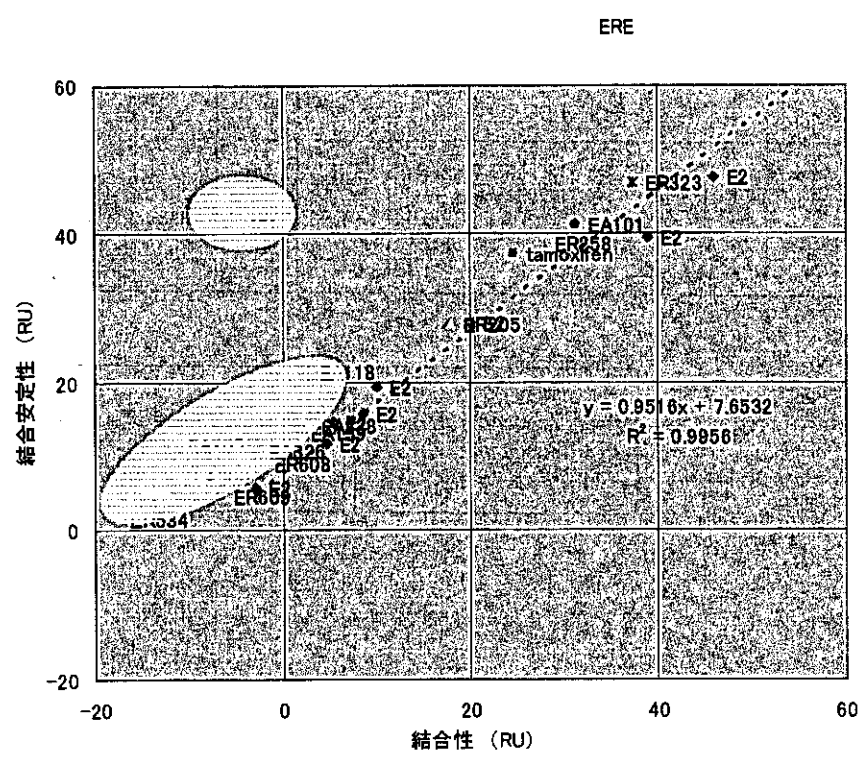
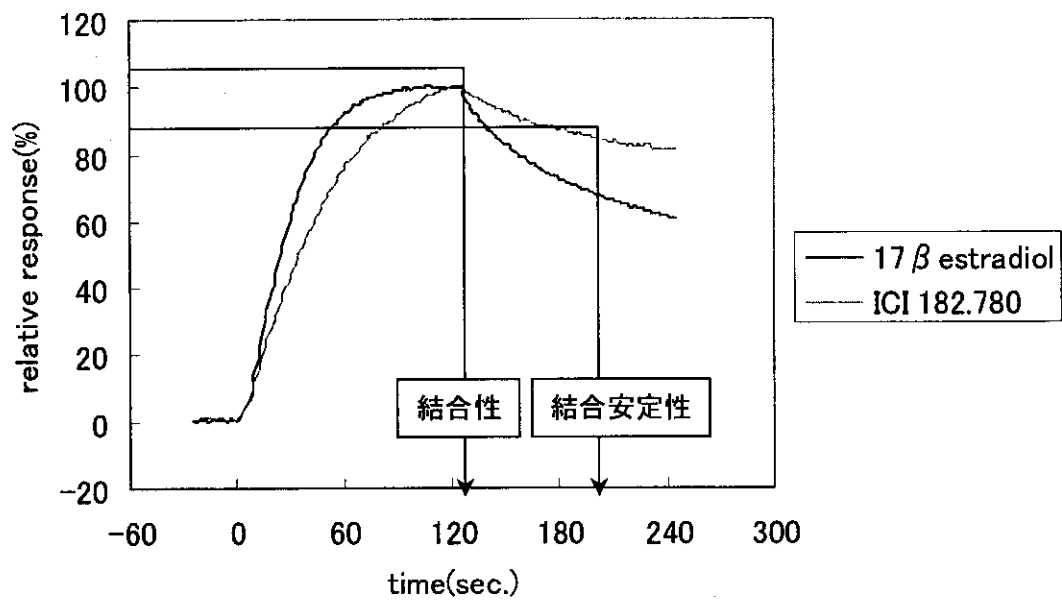
% activation

ID	ERE 1					TIF 1					ERE 2					TIF 2									
	10	100	1000	10000	100000	10	100	1000	10000	100000	10	100	1000	10000	100000	10	100	1000	10000	100000	10	100	1000	10000	100000
EA120	90.3	4.1	91.7	87.2	98.0	EA120	97.5	79.0	98.9	98.0	EA120	87.7	71.4	32.1	81.6	EA120	90.8	91.9	92.3	93.4	EA120	90.8	91.9	92.3	93.4
EA121	110.4	91.7	106.0	88.6	96.5	EA121	104.6	99.5	101.8	96.5	EA121	87.7	96.7	-226.6	84.9	EA121	96.0	13.9	92.0	87.1	EA121	96.0	13.9	92.0	87.1
EA133		90.5	95.2	92.5	70.4	EA133		97.7	98.4	98.3	EA133		66.2	85.1	74.0	EA133		92.3	96.5	95.6	EA133		92.3	96.5	95.6
EA148		66.2	85.1	74.0	1.4	EA148		92.3	96.5	95.6	EA148					EA148					EA148				
EA151						EA151					EA151					EA151					EA151				
EA160	112.3	80.1	105.4	48.2	90.9	EA160	103.6	98.5	101.6	90.9	EA160	112.3	80.1	105.4	48.2	EA160	103.6	98.5	101.6	90.9	EA160	103.6	98.5	101.6	90.9
EA161	76.9	70.2	71.4	45.4	89.5	EA161	94.9	95.1	94.6	89.5	EA161	86.1	66.7	75.6	-32.2	EA161	99.6	97.7	99.3	93.8	EA161	99.6	97.7	99.3	93.8
EA164	95.1	105.5	77.1	110.9	96.4	EA164	98.6	102.9	94.6	96.4	EA164	95.1	105.5	77.1	110.9	EA164	98.6	102.9	94.6	96.4	EA164	98.6	102.9	94.6	96.4
EA165		80.5	79.9	83.0	18.6	EA165		96.0	95.6	96.0	EA165					EA165					EA165				
EA166	94.7	95.3	94.9	73.3	90.2	EA166	99.4	99.5	99.4	90.2	EA166	94.7	95.3	94.9	73.3	EA166	99.4	99.5	99.4	90.2	EA166	99.4	99.5	99.4	90.2
EA205		95.1	91.5	72.9	72.5	EA205		99.7	97.4	80.5	EA205		80.7	127.4	82.0	EA205		96.3	103.1	78.7	EA205		96.3	103.1	78.7
EA207	94.1	96.8	107.0	95.9	91.4	EA207		97.1	99.6	91.4	EA207	94.1	96.8	107.0	95.9	EA207		97.1	99.6	91.4	EA207		97.1	99.6	91.4
EA209	60.4	-252.1	91.8	57.3	90.5	EA209	96.9	15.7	98.1	90.5	EA209		51.3	72.7	57.5	EA209		65.5	97.5	88.4	EA209		65.5	97.5	88.4
EA210		51.3	72.7	80.7	63.9	EA210		65.5	97.5	88.4	EA210					EA210					EA210				
EA214	84.2	79.2	57.4	80.7	94.2	EA214	95.4	95.8	97.1	94.2	EA214					EA214					EA214				
EA222	108.8	96.7	92.8	86.5	97.1	EA222	101.0	99.4	99.4	97.1	EA222					EA222					EA222				
EA224	85.3	72.9	79.2	86.3	99.3	EA224	98.1	96.5	97.2	99.3	EA224					EA224					EA224				
EA226	89.4	83.0	82.5	79.5	96.6	EA226	99.6	98.0	97.0	96.6	EA226					EA226					EA226				
EA228		93.8	96.6	96.3	89.7	EA228		95.4	95.8	97.1	EA228					EA228					EA228				
EA240						EA240					EA240					EA240					EA240				
EA246						EA246					EA246					EA246					EA246				
EA258						EA258					EA258					EA258					EA258				
EA260						EA260					EA260					EA260					EA260				
EA263	12.3	67.7	73.7	76.6	63.0	EA263	96.1	91.2	96.2	102.6	EA263					EA263					EA263				
EA318		66.1	56.2	57.4	93.1	EA318					EA318					EA318					EA318				
EA322	85.9	61.1	74.7	24.7	82.5	EA322	98.5	95.0	96.6	93.1	EA322					EA322					EA322				
EA328		104.9	95.6	92.1	82.5	EA328		102.3	101.1	98.5	EA328					EA328					EA328				

95.131 91.541 72.928 72.49

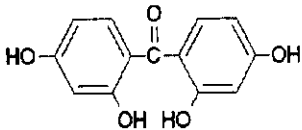
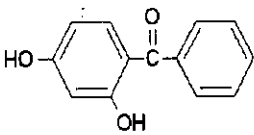
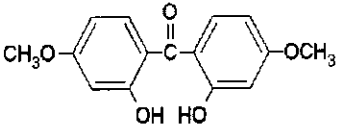
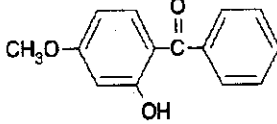
EA205

99.699 97.389 80.53 63.94



	結合量 (RU)	
	結合性	結合安定性
E2_1	85.1	87.2
E2_2	46.0	47.6
E2_3	39.0	39.4
E2_4	5.3	14.5
E2_5	8.6	15.7
E2_6	-2.9	5.8
E2_7	105.6	109.3
E2_8	83.7	90.2
E2_9	78.8	83.8
E2_10	10.2	19.3
E2_11	20.1	28.0
E2_12	4.6	11.6
BIA26	24.7	37.2
ER205	17.9	27.8
ER258	27.7	38.7
ER323	37.3	46.8
EA101	31.2	41.1
ICI	5.3	19.04
EA118	2.5	21.5
EA159	1.6	13.2
EA308	-10.9	7.3
EA205	-11.5	11.6
EA228	2.7	14.2
EA326	-2.9	10.8
ER608	-2.4	9.1
ER609	-6.7	4.7
ER534	-17.6	1.6

図5 カイネティクス解析

ID	CAS-No.	Name		%activation of 10 $\mu$ M			
				ERE assay		TIF assay	
ER608	000131-55-5	2,2',4,4'-Tetrahydroxy benzophenone		102.53	H	61.60	H
ER609	000131-56-6	2,4-Dihydroxy benzophenone		55.22	H	6.83	L
ER607	000131-54-4	2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxy benzophenone		3.68	L	1.01	N
ER610	000131-57-7	2-hydroxy-4-methoxy-benzophenone.		6.93	L	-0.33	N

<b>ERE assay</b> High responder 50% Low responder 20-50% Non responder <20%	<b>TIF assay</b> High responder 50% Low responder 10-50% Non responder <10%
--	--

図7 化学物質の構造とER活性との相関

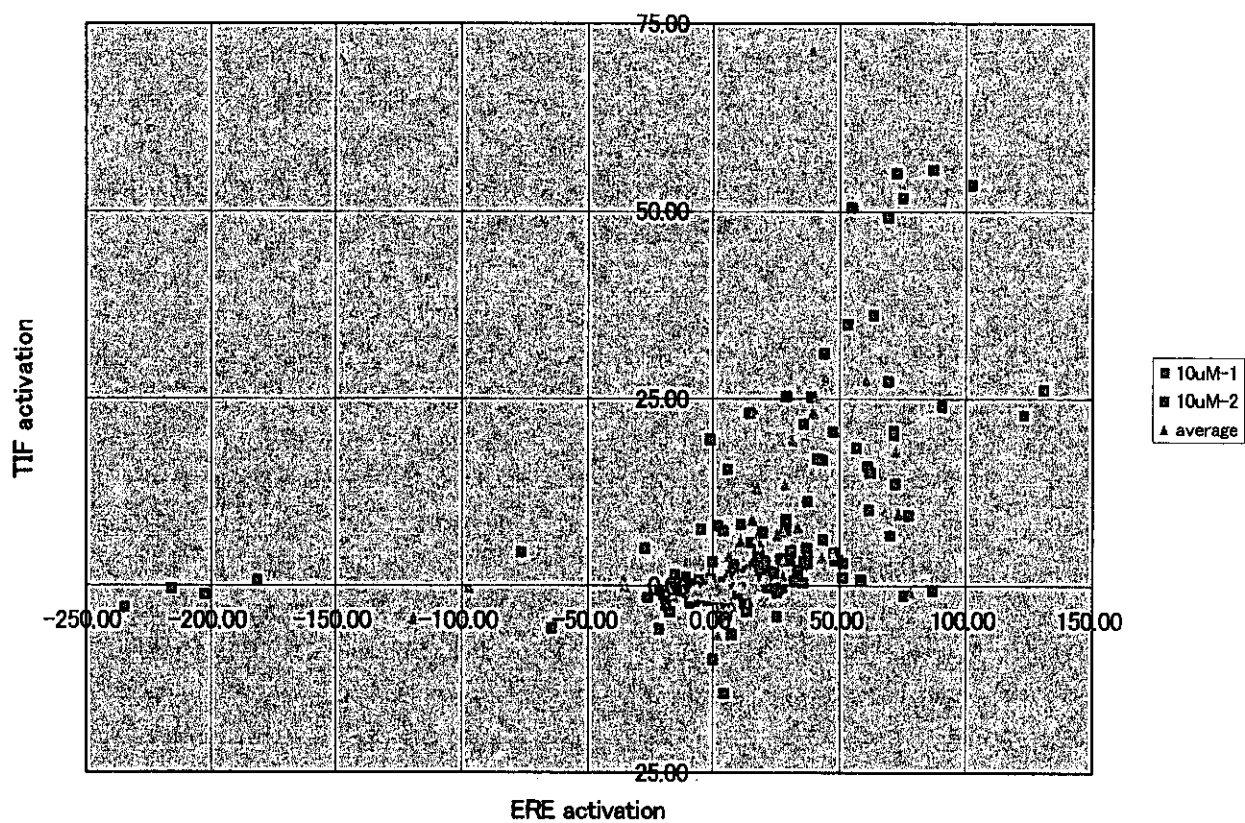


図8 平成15年度の89化合物のスクリーニング結果

2回のスクリーニング結果のうち10 $\mu$ Mの化学物質濃度におけるERE、TIFアッセイの結果をプロットした。

0.1、1、10 $\mu$ Mの結果の平均スコアもプロットした。

厚生科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書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

## 研究要旨

本研究班では、内分泌かく乱化学物質問題の解明に向けた厚生労働省の「試験スキーム」に沿って要求される順位付けの為の大規模スクリーニングをすすめるとともに、順位付けの科学的根拠に関わる諸要因に関する基礎的研究をさらに進め、内分泌かく乱の評価やメカニズム研究への応用を目指している。WHO/IPCS によるグローバルアセスメントの出版以降、この1年半で、人々の内分泌攪乱化学物質に対する研究や理解は大きく進んだ。本研究では東京フォローアップ会議でのまとめを中心に、現在、解決すべき課題として残されているものは何で、解決されるべきものとして新たに明らかになったものは何かについて、今後のリスクアセスメントの問題とも合わせて調査を行った。

## A. 研究目的

グローバルアセスメントの出版以降、この1年半で、人々の内分泌攪乱化学物質(EDCs)に対する理解が日本でも大きく進んだ。ことに野生生物に関しては、限定的ながら、グローバルアセスメントでもまとめているように、環境中のホルモン類似作用をもつ化学物質の曝露によって、明確な傷害を受けている事実を確認するにいたった。実験動物でも、哺乳綱動物の体内には絶えず大量の内在性ホルモンがあり、これらの動物はその体内をそうしたホルモンにさらされて生きていながら、そして本来そうした内在性ホルモンに対して生体には防御作用が備わっていないが、この内在性のホルモン自身が制御からはずれて障害を引き起こすことがあることも、知られるようになり(思春期早発、経口避妊薬、閉経後のホルモン補充療法など)、ヒトへの影響の蓋然性が取り上げられるに至っている。なお、ヒトでの発がん性に予防効果が期待されているいわゆる植物ホルモン(phytoestrogens)については、そうした予防効果の反面、日常用量との乖離は大きいものの、可能性の問題として機構上はエピジェネティックな発がん性を示唆する指摘がなされている。これが植物ホルモンの dual な作用機構を意味するものか、投与時期などの生体側の要素に起因するものか、その

乖離の原因は明らかでない。

この間に明らかになった膜受容体の発見は、内分泌攪乱研究での研究戦略のありかたについて新たに示唆するものがあつた。膜受容体はテキサス大学の Peter Thomas らのグループによって発見されクローニングされた。この発見によって、それまで即時型反応として核内受容体での説明の困難であつた non-genomic な現象(Moggs and Orphanides, 2001) の理解がたやすくなつた。今回の発見ではエストロゲン受容体に対応する膜受容体が見出されたが、相同体があるようであり、さらに、アンドロゲン受容体に相当するものも想定されている。ステロイド系にも他のサイトカインなど同様の膜受容体があるものとの推測、これが荒唐無稽ではなかつたようであるから、そのような推論の上に立つて研究してきた研究者には戦略的に優位な展望があつたと考えられ、科学者の本来の責務として問われている先見性の面からみてこれは教訓的である。本研究では、そうした事柄を念頭に置いて、解決すべき課題として残されているものは何で、解決されるべきものとして新たに明らかになったものは何かについて WHO/IPCS 東京フォローアップ会議でのまとめを中心に、今後のリスクアセスメントの問題とも合わせて調査を行った。



## B. 研究目的

これまでに得られている知見から化学物質の内分泌かく乱性についてリスクアセスメントを行うに際して、今日、解決すべき課題として残されているものは何で、解決されるべきものとして新たに明らかになったものは何かについては、大きくはふたつあり、第1に、引き続き低用量問題を巡る高感受性問題、第2にマイクロアレイゲノム解析による今後の内分泌攪乱のメカニズムの解明を挙げることが出来る。そこで本研究ではそれらに包含される重要な問題を整理したうえで、今後の課題について考察した。

## C. 研究結果

【高感受性期-胎生期・新生児期・思春期問題】内分泌攪乱化学物質は、グローバルアセスメントでもまとめているように、ホメオステシスの安定した成獣での影響は、現在の試験系では、ヒトの受精を人為的に抑制するような "高用量" の "adverse effect" でさえもなら検出できないので、試験法開発の問題が重点として取り上げられていることは上述の通りである。しかしそれはさておいて、成獣での長期試験で眼に見えた影響が見出されないという点で、成獣についてはさしあたり眼に見えた障害性の焦点とはならないであろう、とも考えられ、そのように結論した。これに対して、形態形成期の機能的安定性の成立する前の胎生期の影響には、無視できないものがある。また、性に関するホメオステシスの不安定な思春期についても、特別な研究上の注目が成されるべきである。

【高感受性期と低用量問題】この胎生期・新生児期・思春期問題には、低用量問題がリンクしていることを示す数多くのデータが見出されている。すなわちそれらは、核内もしくは膜の受容体を介しての生体影響であり、コ・ファクターなどによるシグナルクロストークの修飾と、それらによる受容体機能のリダンダンシーなど、相互にリンクした影響を及ぼしあっている。①閾値問題、②非線形の用量相関、あるいは③相加

反応などの問題も、これらとリンクした問題であることが明らかになってきた。厳密な意味での閾値の有無はともかくとして、無処置の成獣で検知できない用量オーダーにおける、"新しい概念の影響(毒性)" であることが認識されるに至りそこでは、米国 FDA や、同じく米国 EPA の研究者らによって非線形反応性が確認されるとともに、英国の研究者らは低用量域に限局的ながら相加反応についても一端の実験的事象を報告している。これが胎生期形態形成期に特発的に影響する胎生期ウィンドウ現象とリンクすることは、井口らによって早くから示されているが、これについても追加報告が進んでいる。そうした中で、グローバルアセスメントの記載で、研究的に訂正されなくてはならないことは、EDCs の影響が胎児・新生児期に限局的と記載されているのに対して、思春期 (pubertal stage) での影響が無視できない点である。これについては、東京会議の総意として報告書に記載されるであろう。

【生体影響の焦点-高次生命系】ホルモンの概念は、以前より生物学的には細胞によって血中に放出されるサイトカインを含むすべての細胞機能に拡張されているが、これに伴って EDCs が高次生命系に与える影響が焦点になってきた。なぜ高次生命系か、それに明確な解答はないが、高次系が総じて記憶の仕組みを含む近似した情報伝達システムを保持していることが窺われることは、一つの理由になるかもしれない。こうした立場から考えると、EDCs による免疫系の影響が殆ど見られないなどとする点は奇異に映る。実際、Jeff Vos によって起草されたグローバルアセスメントにおける免疫系の記載は明らかに不十分であり、改稿される必要がある。併せて、各種受容体結合域上流のスズやヒ素などによる xenobiotic element を介した免疫系シグナルへの修飾が見出されていて、むしろその機構には新しい科学としての高い注目が集中している。高次生命系の中で、神経系については、行動 (neurobehavioral) に関する研究成果が出始めている。EDCs の生体影響の最もコ

アにあったステロイドホルモン系についても、リガンドを結合したダイオキシン受容体の転写因子としてのエストロゲン受容体との相互作用が発見され、また、性決定遺伝子のクローニングが進み性決定のメカニズム解明が進んでいる。高次生命系への影響には、それぞれの入り口から入力された影響に、シグナル構造の類似性やシグナル相互のリンクがあることが認識されつつあり、EDCs の今後の研究のひとつの焦点となってゆくものと考えられる。

【ゲノミクス手法による EDC 研究】マイクロアレイを用いた内分泌かく乱の研究は、飛躍的に多くの人々によって取り上げられるようになり、バイオマーカーとなる遺伝子プロファイルの抽出の試みが進んでいる。これにもとづいて、想定される内分泌かく乱で引き起こされ得る生体障害マーカーに特化したチップの構築と、表現型抜きの専ら遺伝子発現の面からリバーシ・サイエンス手法で絞り込む方法との双方からの取り組みが試みられており、それぞれに有効性があると考えられる。それぞれでの解決すべき課題としては、①初期変化による長期変化の予測性や、②用量相関に対する方法論、③複合効果の予測性、などをはじめ、④動物種間外挿性や⑤試験管内細胞・組織と個体レベルでの遺伝子発現の相互外挿性などが取り上げられるが、それは、とりもなおさず先の低用量問題であげた課題と重なり合う部分が少なくない。こうした中で、他のオミクス、とりわけインフォマティクスの果たす今後の役割の重要性も指摘されている。ゲノミクス手法の導入については、WHO/IPCS がすでにベルリンにてワークショップを開催し、留意すべき諸点などをまとめておりこれらを参照することも重要である。

#### D. 考察

内分泌かく乱問題において、今日、解決すべき課題として残されているものは何で、解決されるべきものとして新たに明らかになったものは何かについては、大きくはふたつあり、第1に、引き続き低用量問題を巡る高感受性問題、第2

にマイクロアレイゲノム解析による今後の内分泌攪乱のメカニズムの解明を挙げることが出来る。前者については、まず、ヒトの受精を人為的に抑制するような adverse effect を引き起こす用量での影響が、通常の実験動物の試験法で検知できないという、先にも述べた EDCs での試験法の根本問題である。これは受容体原性障害にリンクしたすべての対象に共通した問題であり、結果として多くの毒性試験に根本的な改良が求められるに至っている。無処置の通常の実験動物で生体反応を正しく把握できないことと相俟って、これまでの毒性試験法の概念を変える様々の試験法の確立が求められている。本邦をリードカントリーとして進めてきた子宮肥大試験系の早急な確立には、そうした先駆けとしての重要な意義がある。また、ビスフェノールを素材にして低用量問題の本質と限界を明らかにするプラクティカルな検討も、早急な現在求められている大きな課題である。後者については、マイクロアレイを用いたゲノミクス手法による EDC の研究があるが、これにも用量相関などの課題を含む低用量問題が関連しており、またこれは強いては今後のリスクアセスメントの問題にもつながってゆくものであり、こうした中で、他のオミクス、とりわけインフォマティクスの果たす今後の役割の重要性も指摘されている。

#### E. 結論

現在の国際的状況に鑑み、今後のリスクアセスメントの問題に関連して、本研究班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重要である。とりわけ、レセプター構造と活性制御の研究をはじめとした核内レセプターによる遺伝子制御機構の解明はもとより、個々の化合物の生体作用について解明にあたっては、マイクロアレイを用いたゲノミクス手法による作用物質と遺伝子発現プロファイルに関する知見などインフォマティクスの果たす役割も大きいと考察された。これら多方面からの検討と知識の蓄積が、内分泌かく乱問題の解決及びリスクアセスメントにとって非常に重要である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

Yoon, B.I., G.X. Li, K. Kitada, Y. Kawasaki, K. Igarashi, Y. Kodama, T. Inoue, K. Kobayashi, J. Kanno, D.Y. Kim, T. Inoue and Y. Hirabayashi (2003). Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. *Environ Health Perspect* 111: 1411-20.

Tanaka, M., Y. Hirabayashi, T. Sekiguchi, T. Inoue, M. Katsuki and A. Miyajima (2003). Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* 102: 3154-62.

Takahashi, Y., T. Inoue, A. Gossler and Y. Saga (2003). Feedback loops comprising Dll1, Dll3 and Mesp2, and differential involvement of Psen1 are essential for rostrocaudal patterning of somites. *Development* 130: 4259-68.

Inoue, T. Introduction: Toxicogenomics - a New Paradigm of Toxicology. In: T. Inoue and W. D. Pennie (eds.), *Toxicogenomics*, pp. 3-11. Tokyo: Springer-Verlag Tokyo, 2003.

学会発表

Hirabayashi Y, Li GX, Yoon BI, Kawasaki Y, Kodama Y, Yodoi J, Kanno J, Inoue T. Leukemia-Prevention in vivo-Model: Attenuation of Spontaneous and Benzene-Induced Thymic Lymphoma by Absorption of Reactive Oxygen Species (ROS) using Thioredoxin Over-Expression Mouse. 6th Joint conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association *Advances in Cancer Research: Molecular and Cellular Biology, Genomics and Proteomics, Targeted Therapeutics, Novel Clinical Trials, Molecular and Genetic Epidemiology / Prevention* (2004.1.28) [Waikoloa, HI, (Conference proceedings, pp158, 2004)]

Inoue T: The Next Step of the

TOXICIGENOMICS- From forward to reverse, a predicting genomics -Toxicogenomics International Forum (2003.10.13) [Seoul Korea, (Meeting abstract p6-7, 2003)]

Yoon BI, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Inoue T, Kobayashi K, Kanno J, Kim DY, Inoue T, Hirabayashi Y: Exploration of the hematotoxic mechanism of benzene based on the cDNA microarray analyses in the mouse bone marrow tissue. *Toxicogenomics International Forum 2003* (2003.10.9) [Tokyo, (Meeting abstract, p89-90, 2003)]

Inoue T: Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bonemarrow tissue. A symposium in Honor of Wagner BM, MD at New York Medical College, *Chemical Safety Assessment: Contributions of Toxicological Pathology and Mechanistic Investigations* ㊦, (2003.9.23) [Valhalla, NY]

Hirabayashi Y, Li GX, Yoon BI, Fujii-Kuriyama Y, Kaneko T, Kanno J, Inoue T: AhR suppresses hemopoiesis during steady state but accelerates cell cycle as an early response: a study of AhR-knockout mice. *DIOXIN 2003* (2003.8.26) [Boston, MA, (Organo-halogen Compounds 64:270-273, 2003)]

Hirabayashi Y, Yoon BI, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Li GX, Kanno J, Kim DY, Inoue T: cDNA microarray analysis addressing the mechanisms of benzene-induced epigenetic and genotoxic changes. *Gordon Research Conference on Toxicogenomics* (2003.6.25) [Lewiston, ME]

H. 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

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

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

#### 研究要旨

核内受容体の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、表面プラズモン共鳴バイオセンサーを用いて化学物質が受容体に与える影響の解析を行った。本年度は新たに最適化したエストロゲン受容体 $\beta$  (ER $\beta$ )測定系を用いて、種々の化学物質がER $\alpha$ 、ER $\beta$ それぞれに及ぼす変化の測定を行い、化合物ごとのER分子選択性の検討を行った。また、ERによる遺伝子制御メカニズムの詳細を明らかにする目的のため、リガンド結合ERへのDNAの結合及びコファクターの結合による双方の相互作用へ及ぼすアロステリック効果について解析を進めた。

#### A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質についての対応は、特にその候補物質であるホルモン受容体作用を有する化合物が環境中や食品中に存在し、ヒトを始めとした様々な生物種が日常的に暴露される可能性のある化合物も含まれている事などから緊急性を有している。一方でホルモン様作用を示す化合物は天然にも多く存在することから、科学的に裏付けられた対応が求められている。しかし、これまでに内分泌系自体の機能やレギュレーションについて膨大な研究があるにも関わらず未だ不明の部分も多く、結果としてホルモン様作用を示す内分泌かく乱性が示唆される化合物について、その生体影響や危険性については依然不明のままである。

そのため、化合物の内分泌かく乱メカニズムに即した信頼性の高いスクリーニング系の構築が必要である。想定される化学物質による内分泌かく乱のメカニズムは様々で、例えば内因性ホルモンの生合成、代謝系、フィードバックに影響を与えることによっても内分泌系は攪乱される可能性があるが、特にエストロゲンレセプター(ER)を始めとする核内レセプターを介した生体作用では低用量かつ非線形の用量反応性を示すことが示唆されており、より詳細な検討が必要である。これまでに多くの化合物について、ERを始めとしたホルモン受容

体への結合性が示されており、それらの化合物については様々な内分泌かく乱作用が危惧されている。

エストロジェンを始めとする内分泌ホルモンは、その「特異的」レセプターと結合することでその作用を発現する。ERはエストロゲンとの結合により立体構造が変化して、ERにより制御される遺伝子のプロモーター領域に存在するレスポンスエレメント(ERE)にコファクターをリクルートして転写を制御しこれに続く生体反応を引き起こす。ERとEREやコファクターとの相互作用はリガンド結合による受容体立体構造変化により制御されており、これまでの研究から化合物のリガンドとしての生体作用と、その化合物が結合した受容体構造との関連が指摘されている。

本研究では、内分泌かく乱化学物質のレセプターを介した生体作用におけるレセプターシグナル伝達系の個々のステップへの影響を解析し、その結果をもとにした新規ハイスループット(HTPS)系への応用を目的として、表面プラズモン共鳴を応用したバイオセンサー(BIAcore™)を用い、化学物質のエストロゲンレセプター(ER)への結合がERとそのレスポンスエレメント(ERE)との相互作用やコファクターとの相互作用に及ぼす影響から、ERに結合した化合物の生体作用との関連について解析を進めてきた。