

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

**受容体アッセイ4種からなるヒト核内受容体48種
すべてに対する化学物質リスク評価スキームの構築**

平成20年度
総括・分担研究報告書

平成21（2009）年4月

研究代表者
九州大学大学院理学研究院化学部門

下東 康幸

目 次

I. 総括研究報告	
受容体アッセイ 4 種からなるヒト核内受容体 48 種すべてに 対する化学物質リスク評価スキームの構築 下東康幸-----	1
II. 分担研究報告	
1. エストロゲン関連受容体 γ に対する 500 化学物質の 受容体応答解析 岡田浩幸・酒井大樹・松島綾美-----	29
2. 核内受容体 PPAR γ 型に対する化学物質の受容体応答解析 酒井大樹-----	35
3. ヒト核内受容体に対する化学物質の結合親和性： ROR β および Rev-erb 野瀬 健-----	41
4. ヒト核内受容体に対する化学物質のレポーター遺伝子 アッセイおよび Two-hybrid アッセイ 松島綾美-----	45
5. 核内受容体コンホメーション変化センシング抗体アッセイ 野瀬 健-----	53
6. モノクローナル抗体法によるヒト核内受容体センシング アッセイ 岡田浩幸・松島綾美・下東美樹-----	59
7. ショウジョウバエの生殖機能、行動、遺伝子発現における 継代的な多世代化学物質応答解析 下東美樹-----	67
8. エストロゲン関連受容体 γ のビスフェノール A 誘導体の X 線 結晶構造解析 松島綾美-----	73
9. ドッキング計算を用いたリガンド結合性解析 野瀬 健-----	79
10. エストロゲン関連受容体 γ の変異受容体による化学物質結合 部位解析 劉 暁輝-----	85
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	93
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	95

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告

受容体アッセイ 4 種からなるヒト核内受容体 48 種すべてに対する
化学物質リスク評価スキームの構築

研究代表者 下東康幸 九州大学大学院理学研究院教授

研究要旨

本研究課題では、センシング抗体法を含めた、受容体結合試験、レポーター遺伝子試験、Two-hybrid 試験のアッセイ 4 種を適用する統合的な化学物質評価スキームを構築することを目的とする。これにより、より詳細な *in vitro* および *in vivo* 試験に供すべき化学物質のリストアップ、順位付け、対象核内受容体の同定など、国際的な化学物質管理の取組に資するデータを収集し、提供する。ビスフェノール A は、低用量で内分泌攪乱作用を引き起す、と強く懸念されている化学物質であるが、2008 年 9 月には、米国・国家毒性プログラム NTP は「胎児、乳幼児に悪影響を及ぼす可能性がある」とする最終報告書を公表した。こうしたなか、我々は胎児脳や胎盤などに多く発現する核内受容体・エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) にビスフェノール A が非常に強く結合することを世界に先駆けて発見し、報告した。これは、ヒト核内受容体 48 種すべてを視野に入れた研究の直接的な成果であり、研究方針の妥当性を示すとともに、こうした研究の迅速な展開と戦略的な評価スキーム構築へ向けて推進すべき指標を与えた。今年度は、まず、核内受容体アッセイ 4 種を可能にする受容体遺伝子、タンパク質の準備、試験法の確立に取り組んだ。そして、タンパク質全長の cDNA クローニングを完成させ、受容体結合試験に必要な受容体結合ドメイン LBD のタンパク質発現に向けたクローニングもほぼ完成した。特に、発現タンパク質の精製法を確立し、新規に ROR や PPAR など数種について LBD 受容体タンパク質調製し、飽和結合試験より試験系を完成させた。また、化学物質セット（ビスフェノール類 70、ベンゾフェノン類 24 種をはじめ、総計 500 種類）のスクリーニングを開始し、ERR γ や PPAR γ について試験した。こうしたなか、高性能プラスチック創製のため、ここ数年、生産が急上昇している代替ビスフェノール（タイプ AF および Z）について、ERR γ や ER α に高選択性・高親和性のものが発見された。一方、遺伝学的にヒト・モデルとして最適な実験動物・ショウジョウバエにビスフェノール A を多世代にわたって食餌し、行動リズムを計測する継代試験に成功し、その結果、高い割合で、「低活動量」「多動性様」の症状が現れることを発見した。こうした研究展開は、特に、胎児や乳幼児をはじめとする化学物質に対して脆弱な集団を保護するために、化学物質の総合的で迅速なリスク評価することを緊要の課題とする厚生労働研究事業における化学物質リスク研究事業に直接に資するものである。

研究分担者

野瀬 健（九州大学大学院理学研究院
化学部門・准教授）

松島綾美（九州大学大学院理学研究院
化学部門・助教）

下東美樹（福岡大学理学部・地球圏科
学・生物学分野・講師）

（研究協力者）

酒井大樹（社）日本食品衛生協会・九州大
学大学院理学府レサーチレジデント）

A. 研究目的

現代社会においては、日常の必需品や便利製品に多種多様な化学物質が使用され、豊かな生活に貢献している。現在、世界では数万種類の化学物質が流通し、我が国においても毎年約 300 種の新たな化学物質が市場に投入されている。こうしたなか、化学物質のヒトの健康への有害影響が社会的に懸念され、近年特に、胎児や乳幼児をはじめとする化学物質に対して脆弱な集団を保護するために、化学物質の総合的で迅速なリスク評価の必要性・緊要性が提唱されている。現在、ビスフェノールAは「低用量で内分泌攪乱作用を引き起す」と強く懸念されている化学物質であり、2008年9月には、米国・国家毒性プログラム NTP が「胎児、乳幼児に悪影響を及ぼす可能性がある」とする最終報告書を公表した。

我々は、核内受容体 48 種にはホルモンが結合して活性化される通常の「リガンド活性化型核内受容体」に加えて、最初から活性化されている「自発活性化型核内受容体」が 10 数種類存在し (図 1)、受容体に結合する化学物質の活性発現機構は、通常のアゴニスト&アンタゴニストに加えて、インバースアゴニスト&インバースアンタゴニストと、多様であることを明らかとした (図 2)。そして、胎児脳や胎盤などに発現する核内受容体・エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) にビスフェノールAが非常に強く結合することを世界に先駆けて発見し、報告した。これは、ヒト核内受容体 48 種すべてを視野に入れた化学物質リスク評価の必要性を直接的に証明する研究成果であり、48 種すべてに対する効率的な評価スキーム構築を迅速に展開すべきであると、その緊要性を明らかにした。

我々はこれまでに「受容体センシング抗体法」という、ホルモン受容体への結合性とホルモン活性の有無を 1 つの試験系で同時に評価する新規なアッセイ法の開発に成功し、受容体 48 種への取組みを大きく進展させてきた。本研究では、「受容体センシング抗体法」に加えて「レポーター遺伝子アッセイ」および「Two-hybrid 法」でもアゴニスト&アンタゴニストおよびインバースアゴニスト&インバースアンタゴニストの活性が評価できるようにし、「受容体結合試験」を組合せた統合的な核内受容体リスク評価システムを構築し、有害化学物質を同定するアッセ

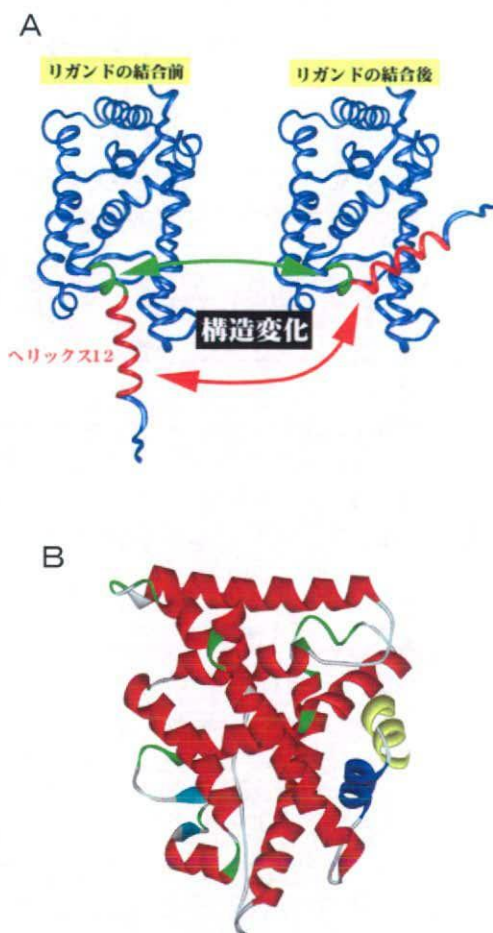


図 1. リガンド活性化型 (A) および自発活性化型核内受容体 (B) のリガンド結合ドメインの構造

(リガンド活性化型核内受容体は、レチノイン酸受容体・RXRであり、リガンド結合前(アポ型)および結合後(ホロ型)の構造を示す。リガンドがアゴニストとアンタゴニストでは、ホロ型コンホメーションのヘリックス12の位置取りが異なる。自発活性化型核内受容体は、エストロゲン関連受容体 γ 型・ERR γ である。なお、リガンド結合後のRXRと自発活性化型のERR γ には、Srcペプチド(黄色の α ヘリックス:コアクチベータの部分ペプチド)が結合した様子を示している。)

イ系を確立することを目的とする。

本研究では、したがって、それぞれの核内受容体について、その研究進展状況に鑑みたアッセイ系を考案し、全体でいくつか統合された評価スキームを構築することをめざす。これにより、より詳細な *in vitro* および *in vivo* 試験に供すべき化学物質のリストアップ、順位付け、対象核内受容体の同定など、国際的な化学物質管理の取組に資するデータを収集し、提供するようにしたい。

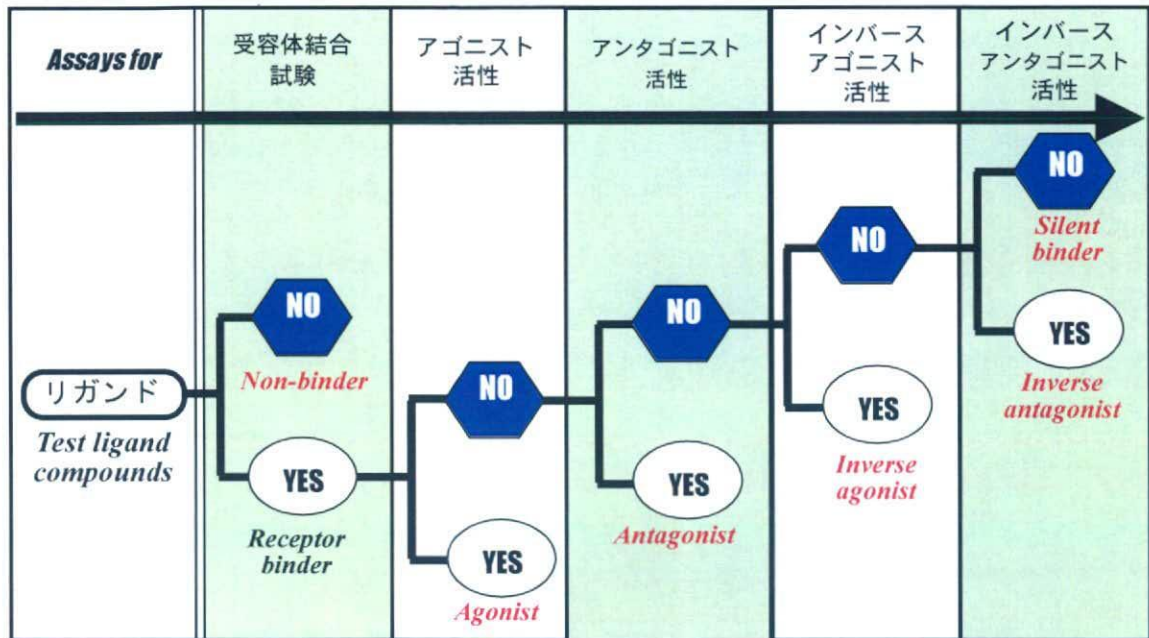


図2. リガンドの受容体応答の系統的解析システム

B. 研究方法

【核内受容体の遺伝子およびタンパク質の調製】

(1) 核内受容体 LBD タンパク質の調製

ヒト腎臓などの cDNA より、PCR を用いて核内受容体 (以後、必要な場合は NR と略) のリガンド結合ドメイン (LBD) のクローニングを行った。得られた PCR 産物の塩基配列を確認したのち、これを発現ベクターに組み換え、大腸菌 (BL21) を用いて大量発現を行った。イソプロピル 1-チオ-β-D-ガラクトシド (IPTG) で発現誘導をかけることによりグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現した。

精製はまず、グルタチオン樹脂を用いるアフィニティクロマトグラフィーを実施した。ERRγをはじめとする一群の LBD タンパク質はグルタチオンセファロース 4B ビーズを用いての精製が可能である。ERRβなどの別の一群は、セファロース 4B への吸着が著しくほとんど使用に耐えない。そこで、ポリアクリルアミド担体の Bio-Scale Mini GST Profinity 樹脂 (Bio-Rad 社製) を用いると吸着なしに精製できることが判明した。

アフィニティ精製後は、さらに、サイズ排除クロマトグラフィーによってゲルろ過精製した。吸着が問題とならない ERRγの群では Sephadex G-25 による精製を行った。一方、ERRβなど吸着が問題となるグループに

ついては、ポリアクリルアミドを担体とする Bio-Gel P 系の樹脂を用いた。

なお、各核内受容体の全長のクローニングについてもヒト 48 種について全て完成し、各試験に用いる準備が整った。

【核内受容体応答解析】

(2) 飽和結合試験

受容体に特異的な標準リガンドをトレーサーとして用いるとき、受容体とトレーサーの濃度を決定する。これが飽和結合試験である。この飽和結合試験は、結合試験系を確立するためには最も重要なアッセイである。

受容体の失活を防ぐため、4℃で行った。一定濃度の GST-NR-LBD と各濃度の放射標識された標準リガンドを binding buffer 中で混合し、インキュベートした。非特異的な結合は過剰量の標準リガンド (通常 10 μM) を共に加えることにより調べた。その後、遊離のトレーサーを分離・除外する B/F 分離、についてはデキストラン被膜活性炭 (DCC) を反応溶液に加えることにより実施した。なお、DCC 溶液は遠心分離したのちに上澄み液をシンチレーションバイアルに一定量に移してカウントした。特異的な結合が得られた場合は、Scatchard plot 分析によって、解離定数を算定した。なお、算定された最大受容体濃度は計算標準値と比較した。

(3) 競争結合試験

化学物質が核内受容体NRにどのくらい強く結合するかを調べるのに、用いる放射性トレーサーを置換える能力、阻害する能力を測定して調べる。まず、試験すべき一連の化学物質について、希釈溶液を調製する。binding bufferには、化合物の吸着性を考慮して、BSAや γ -globinなどのブロッカーを加える。希釈律に従って濃度が正確な希釈溶液を調製する。

放射性トレーサーと核内受容体を共にbinding buffer中で混合し、インキュベートした。その後、B/F分離のため遊離のトレーサーをデキストラン被膜活性炭DCCにより取り除いた。化学物質のIC₅₀値(トレーサーの受容体結合を50%阻害する値)はコンピュータプログラムALLFITにより算定した。

(4) レポーター遺伝子試験

ヒト子宮頸癌由来の細胞であるHeLa細胞に、核内受容体の全長遺伝子をコードする発現プラスミドを導入し、一過性の強制発現を行った。その際、核内受容体の転写活性を検出するために、ルシフェラーゼ系のレポータープラスミドを導入した。これには、試験する核内受容体の結合できるエレメントを導入する必要がある。

24時間後、任意の濃度で化学物質を曝露した。さらに24時間後、ルシフェラーゼ活性を測定し、化学物質によるERR γ の活性への影響を評価・算定した。

(5) 生細胞受容体結合試験

HeLa細胞に、核内受容体の全長遺伝子をコードする発現プラスミドを導入し、一過性の強制発現を行った。発現した核内受容体について、³H標識されたリガンドで牛胎児血清を含まないEMEM培地中で25°C、1時間インキュベートし結合試験を実施した。その際、B/F分離は細胞の洗いで実施できる。

化学物質の結合性は、1% Triton X-100を20 μ l/well加え、30分間インキュベートし、細胞膜を破壊して測定した。アッセイでは細胞を溶解させて測定した。なお、この測定では化学物質の通過性を反映した上で評価されることになる。

(6) Two-hybrid アッセイ

Two-hybridシステムの構築では、酵母とホ乳類培養細胞HeLa細胞、あるいはHEK293

細胞を用いて行うこととした。活性は誘導されるルシフェラーゼの活性で評価した。

① 標的タンパク質のクローニング

ヒトERR γ はClontech社より購入したhuman kidney-cDNA (BD Quick-Clone #637204)よりクローニングを行なった。転写共役因子SRC1の相互作用部位としては西原らの報告に従い(*Toxicol. Applied Pharmacol.*, **154**, 76-83 (1999))アミノ酸570-782位を選択し、これも同cDNAよりクローニングした。

② 使用した発現プラスミド

酵母Two-hybridシステムの構築には、Matchmaker GAL4 two-hybrid system 3 (Clontech社)を用いた。ホ乳類培養細胞Two-hybridシステムの構築には、CheckMate/Flexi Vector Mammalian Two-Hybrid System (Promega社 #9370)を用いた。

③ 酵母Two-hybridアッセイ

SD培地(2% glucoseを含む)5 mlに、育ち始めたばかりの小さなコロニーを接種し培養した。2000 rpm for 5 minで集菌する。OD₆₀₀ = 0.4になるように、SD培地(0.2% glucose)で懸濁した。4-OHTは1% BSAで段階希釈した。マイクロテストチューブにSD培地(0.2% glucose)、酵母培養液および4OHT溶液を分注し、vortexした。16時間後、遠心により集菌し、最終濃度1 mg/ml酵素zymolaseで菌体を可溶化の後、誘導されるルシフェラーゼの活性は、ルシフェラーゼアッセイシステム(Promega)によって測定した。

④ ホ乳細胞Two-hybridアッセイ

HeLa細胞あるいはHEK293細胞に、baitプラスミド、preyプラスミドおよびレポータープラスミドをリポフェクトアミン plus 試薬(Invitrogen)によってトランスフェクションし、一過性発現を行った。24時間後、96穴プレートに3 \times 10⁴ cells/wellとなるように播種し、1%BSAで段階希釈した4-OHTを添加した。誘導されるルシフェラーゼの活性は、ルシフェラーゼアッセイシステム(Promega)によって測定した。

(7) センシングアッセイ

核内受容体(40 nM, 90 ml)に対して化学物質(10⁻¹¹~10⁻⁵ M, 10 ml)を室温で1時間反応させ、リガンド-受容体複合体を調製し

た。この溶液をあらかじめ調製した抗原ペプチドをコートした 96 穴イムノプレートに移した。プレートの調製はウシサイログロブリンに結合した抗原ペプチドをプレートに吸着 (2.5 mg/ml, 50 ml/well) させ、室温 1.5 時間インキュベート後、洗浄し、ELISA キット (ELISAmate, KPL 社) 付属の BSA Diluent/Blocking Solution Concentrate を 10 倍に希釈したものによるブロッキングにより行った。リガンド受容体複合体溶液を移した 96 穴イムノプレートにセンシング抗体溶液 (10 ml/well) を加えて 4 °C で終夜反応させた。溶液を一括除去により捨て、プレートを洗浄後、1/500 希釈の Horseradish Peroxydase (HRP) 標識 2 次抗体溶液 (50 ml) を加えて室温で 1 時間反応させた。溶液を捨て、プレートを洗浄後、過酸化水素/ABTS を基質とした酵素反応により溶液を発色させた。基質は、ELISA キット付属の ABTS Peroxidase 基質と Peroxidase Solution B を使用直前に当量体積ずつ混合して調製し、添加量は 100 ml/well とした。405 nm の吸光度を測定してプレート上のペプチドに結合した抗体量を定量した。

(8) センシングアッセイの解析法

受容体のコンホメーション変化量 (抗体応答) は、基準のリガンドに対する相対値として、プレートに残存する 2 次抗体の酵素活性値の測定値から、次式により算出できる。

$$D(\%) = (A - B) \times 100 / (C - B)$$

- D: コンホメーション変化量 (抗体応答)
 A: 受容体および試験化学物質を添加したときの測定値
 B: 受容体のみ添加したときの測定値
 C: 受容体および過剰量の女性ホルモンを添加したときの測定値

EC₅₀ 値の算出は以下のように行った (図 4)。まず、各化学物質の濃度に対して抗体応答をプロットし、抗体応答がプラトーに達したときの値を最大抗体応答性 R_{max}(%) として、これをグラフより算出した。さらに、得られたシグモイド様曲線を解析プログラム ALLFIT で数理解析し、R_{max}(%) 値の 50% に対応する

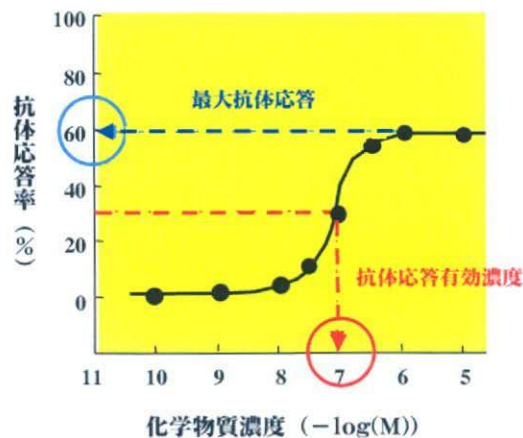


図 3. 受容体コンホメーション変化センシングアッセイの解析

化学物質濃度を抗体応答有効濃度 (EC₅₀) とし、この値を算出した。

上記のようにして求めた最大抗体応答性 R_{max}(%) は、試験化学物質が受容体を活性化型コンホメーションに転化できる割合の最大値を示し、試験化学物質のホルモン活性を表すパラメータとなる。すなわち、評価としては、抗体応答 (縦軸) はホルモン活性の強さの指標となり、EC₅₀ 値は化学物質と受容体との結合の強さの指標となる。

(9) ファージディスプレイによるモノクローナルセンシング抗体法

① 抗原ペプチド、スクリーニング用タンパク質、使用発現プラスミド

標的核内受容体 NR-LBD の H12 を含むペプチドを、キャリアタンパク質 (KLH、あるいは BthG) に架橋して抗原ペプチドとした。一方で、発現させた NR-LBD をスクリーニング用タンパク質とした。

ファージ抗体ライブラリーには、英国医学会議 (MRC) より入手した Tomlinson I および Tomlinson J ライブラリーを使用し、これらをファージ抗体ライブラリーへ変換した。

② バイオパニング

イムノチューブに抗原ペプチドを固定化し、2% スキムミルク-PBS (MPBS) でブロッキングした。4 ml の MPBS 中に 5 × 10¹² のファージを含むように調製した Tomlinson I もしくは J ライブラリーを加え、2 時間反応させた。洗浄後、トリプシン溶液 (1 mg/ml) を加えて、抗原に結合したファージを溶出させた。

常法により1回目のパンニングを実施した。図4に示すように、溶出ファージを固定化抗原への結合、非特異的なファージの洗浄、結合ファージの溶出、大腸菌への導入、ファージの増幅と回収の一連のサイクルを行った。得られたファージ液のうち1 mlを次のパンニングに使用した。2回目のバイオパンニングについては、より高親和性の抗体を回収するために固定化抗原の濃度を25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、3回目には10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と希釈した。さらに、ライブラリー反応後のファージ洗浄操作を2回目以降はTPBS、PBS共に20回と厳しくした。

③ scFvでのスクリーニング

回収したファージをscFv発現用の宿主菌HB2151(非サブレッサー株)に感染させて、培養プレートに播種した。シングルコロニーを回収し、得られたファージ抗体群をモノクローナル化した。

得られたファージクローンの中から、ペプチドを特異的に認識するscFvを発現可能なクローンを同定する。まず、固定化抗原ペプチドを用いてscFv-ELISAを行った。培養後、遠心により菌体を除いた上清を一次抗体として使用した。一次抗体を添加して1時間後、二次抗体(Anti-c-myc-peroxidase)を添加した。さらに1時間後、ABTS/ H_2O_2 によって発色させ、405 nmでの吸光度測定により検出を行った。

④ センシングアッセイ

2次スクリーニング後のファージ抗体を用いた競合ELISA法により、内因性アゴニストや外因性アゴニスト、あるいはアンタゴニストによるコンホメーション変化センシング抗体法による化学物質評価を実施した。

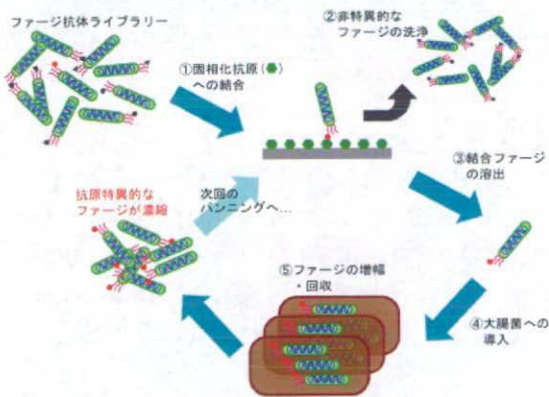


図4. バイオパンニング

(10) モノクローナル抗体によるセンシングアッセイ

① モノクローナル抗体の調製

核内受容体(NR)のうちリガンドの結合により構造変化を起こすことが見出されている α ヘリックス12(H12)部位付近の配列をもつペプチドを合成し、ポリクローナル抗体を作製した時と同様にキャリアタンパク質KLHと結合させて免疫源とした。これをBalb/cマウスの足蹠に局所免疫し、9日目に後肢大腿部より肥大したリンパ節を摘出した。リンパ細胞とマウス由来ミエローマ細胞とをポリエチレングリコールにより融合させて96ウェル培養プレート播き込んで培養した。ウェル中のハイブリドーマ細胞を順次DMEM培地に移して継代培養し、その培養上清を回収してスクリーニングに用いた。

培養上清に含まれる抗体を以下の2段階のスクリーニングで検定した。まず、ペプチドまたはNRを抗原とする間接ELISA法を一次スクリーニングとして実施し、これらの抗原に実際に結合する抗体の産生細胞を選別した。続いてペプチド抗原を固定化しNRを競合剤として用いた競合ELISA法による二次スクリーニングを実施した。ここで、NRのみを競合剤として用いた場合とNRに予めリガンドである化学物質を添加して用いた場合との間でNRへの結合に差異のあるような抗体を探索した。

センシング能を有するモノクローナル抗体の産生が確かめられたハイブリドーマは、それぞれ限界希釈法でクローン化を進めた。さらにそのうちのひとつについては、ハイブリドーマをマウスの腹腔内へ注射して飼育後に腹水を回収することにより、高濃度の抗体溶液を得た。

② センシングアッセイ

二次スクリーニングにおいて、リガンドの有無に応じて異なる免疫反応性を示した抗体について、リガンド濃度を変化させて競合の程度が変化するかどうかを調べた。さらに競合ELISAにおける抗体濃度、抗原量、受容体濃度などについての至適実験条件を詳細に検討し、基準アゴニスト物質を用いるコンホメーション変化センシングアッセイ法を確立した。センシングアッセイの方法はポリクローナル抗体で実施した解析法に基づいた。さらに、アンタゴニストを同様に用いて試験した。

【ショウジョウバエ活動リズム等の継代的な化学物質暴露に対する応答解析】

(11) ショウジョウバエの脳神経および卵産生における継代的な化学物質応答解析

① ショウジョウバエの系統と飼育培地

これまでの研究で、産卵数が安定していることがわかっている *Canton S* を研究材料として用いた。飼育培地はこれまでと同様に作製した。水 10 に、粉末寒天 8 g、砂糖 100 g、とうもろこし粉 40 g、乾燥酵母 60 g を入れて、強火で沸騰するまで煮込む。沸騰したのちは、さらに弱火で 20 分煮沸する。液体培地が冷めたのちに、ボーキニン 5.3 ml、プロピオン酸 2 ml、ペニシリン 6.67 万ユニット、ストレプトマイシン 16.67 万ユニットを入れて十分に攪拌する。これを直径 3 cm の管瓶あるいは 9.2 cm のシャーレに入れて冷蔵保存したのち、使用した。ビスフェノール A 含有の培地は、ビスフェノール A の最終濃度が 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} mol/l になるように調整した。コントロールとしては、これらの化学物質を溶かす溶媒として用いたエタノールを使用した。

② 生殖能への多世代暴露の影響

化学物質を含む飼育培地で多世代にわたり飼育されたオス、あるいはメスを、通常培地で飼育されたメスあるいはオスと交配して、オスの場合は次世代の個体数、メスの場合は産卵数を調べた。成虫時に受ける影響を排除するために実際のテストには通常培地を使用した。

オスの生殖能を反映するためには、メスの個体数を過剰に与え、さらにメスが未受精卵を産卵する可能性が高いため、羽化個体をカウントする必要がある。ビスフェノール A 含有培地で飼育された 13 代目のオス 1 匹に対して通常培地で飼育されたメス 10 匹（いずれも羽化直後のもの）を試験管培地で交配させ、24 時間毎に新しい試験管培地に移して、その培地から羽化する個体数をオスの次世代繁殖数とした。次世代繁殖数がピークになる羽化後の経過日数をオス個体の交配能の成熟期間、羽化後 8 日目までの次世代繁殖数の合計を生殖能として評価した。

③ 歩行活動の記録

羽化後 1~3 日目のオスのハエを LD12:12 で 3 日間歩行活動を記録した後、光周期に同調できるかを見るため、LD の時刻を 6 時間

前進させた。その後、恒常暗黒中で 8 日間以上記録し、恒常暗黒中で自由継続させた活動の周期を計算した。

（倫理面への配慮）

本研究課題では、抗体を作製するに当たって、マウスなどの実験動物を使用する。こうした実験動物は、きちんと管理された環境下で飼育され、また、飼料、飲料水、さらには清浄空気を供するなど、十分な動物愛護の配慮のもとで実験に用いられる。また、採血等に際しても麻酔をしたりして痛みの無いように配慮するなど、倫理面での問題が全くない状況で行っている。

所属部局・理学研究院でも「動物実験審査」システムが確立されており、審査を申請のうえ許可された。また、これらの実験に従事する研究者および学生に関しては、全員が「実験動物取扱」のための教育訓練のための講習を受けたうえで、「実験動物取扱者登録証」を取得して実施している。

一方、内分泌かく乱性の可能性のある化学物質を多数取り扱うが、量的にはきわめて少量であり、しかも、十分に換気されたチャンバー内で秤量し、希釈するなどの最大限の配慮をするので、特に危険性はない。実験室にはスクリーバが設置されたドラフトチャンバーが設備としてあり、また、揮発性試薬に対応するドラム式換気装置を実験室に備えている。さらに、ファージディスプレイ法は一般の抗体作製法とは異なり、実験動物に痛みを与える抗原免疫や採血を行う必要がないため、動物愛護の観点からの倫理上の問題はない。また、研究に用いたファージはヒトに対する感染性が皆無であり、安全性の点でも問題がない。その他の実験に関しては、倫理上の問題を伴うものはない。

C. 研究結果

(1) 500 化学物質受容体結合試験

ヒト核内受容体 48 種類に対する化学物質のスクリーニングにおいて、まず、試験すべき化学物質の選定、試験を優先して実施すべき重要な核内受容体の選定に取組んだ。化学物質については、現在までに、25 カテゴリー、543 種類の化合物をリストアップし（表 1）、これらから、各核内受容体に試験すべき 500 物質を選ぶこととした。

表 1. 核内受容体に対するリスク評価スキームで検討する化学物質一覧リスト

(1) ビスフェノールA誘導体		化合物名	CAS番号
1-1	4,4',4''-Trihydroxytriphenylmethane		603-44-1
1-2	Tetrachloro bisphenol A		79-95-8
1-3	Tetrabromo bisphenol A		79-94-7
1-4	Bisphenol B		77-40-7
1-5	Bisphenol AP		1571-75-1
1-6	Tetramethyl bisphenol A		5613-46-7
1-7	2,2-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane		79-97-0
1-8	1,1',1''-Tris(4-hydroxyphenyl)ethane		27955-94-8
1-9	4- α -Cumyl phenol		599-64-4
1-10	Bisphenol P		2167-51-3
1-11	Bisphenol C		14868-03-2
1-12	Bisphenol A		80-05-7
1-13	Hexachlorophene		70-30-4
1-14	α, α, α' -Tris(4-hydroxyphenyl)-1-ethyl-4-isopropylbenzene		110726-28-8
1-15	α, α' -Bis(4-aminophenyl)-1,4-diisopropylbenzene		2716-10-1
1-16	2,2-Bis(3-cyclohexyl-4-hydroxyphenyl)propane		57100-74-0
1-17	2,2-Bis(2-hydroxy-5-biphenyl)propane		24038-68-4
1-18	2,2-Bis(4-glycidyloxyphenyl)propane		1675-54-3
1-19	Bisphenol A diacetate		10192-62-8
1-20	Tetrabromobisphenol A Bis(2-hydroxyethyl) Ether		4162-45-2
1-21	2,2-Bis(4-hydroxy-3-isopropylphenyl)propane		127-54-8
1-22	4,4'-Isopropylidenediphenoxyacetic Acid		3539-42-2
1-23	2,2-Bis[4-(4-aminophenoxy)-phenyl]propane		13080-86-9
1-24	α, α' -Bis(4-hydroxy-3,5-dimethylphenyl)-1,4-diisopropylbenzene		36395-57-0
1-25	2,2-Bis(4-chloroformyloxyphenyl)propane		2024-88-6
1-26	2,2-Bis(3-sec-butyl-4-hydroxyphenyl)propane		32113-46-5
1-27	4,4'-Methylenebisphenol		620-92-8
1-28	Hexestrol		84-16-2
1-29	2,2-Bis(4-cyanatophenyl)propane		1156-51-0
1-30	Coumestrol		479-13-0
1-31	Barbaloin		1415-73-2
1-32	Isoliquiritigenin		961-29-5
1-33	4,4'-Methylenebis(2-methylphenol)		2467-25-6
1-34	2,3,4-Trihydroxydiphenylmethane		17345-66-3
1-35	2,3-Dimethyl-2,3-butanediamine		75804-28-3
1-36	Bisphenol E		2081-08-5
1-37	4,4'-(1,3-Dimethylbutylidene)bisphenol		6807-17-6
(2) ビスフェノールAF誘導体		化合物名	CAS番号
2-1	2,2-Bis(3-amino-4-hydroxyphenyl)hexafluoropropane		83558-87-6
2-2	2,2-Bis(3-aminophenyl)hexafluoropropane		47250-53-3
2-3	2,2-Bis(3-amino-4-methylphenyl)hexafluoropropane		116325-74-7
2-4	2,2-Bis(4-aminophenyl)hexafluoropropane		1095-78-9
2-5	2,2-Bis[4-(4-aminophenoxy)phenyl]hexafluoropropane		69563-88-8
2-6	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)hexafluoropropane		1478-61-1
2-7	4,4'-(Hexafluoroisopropylidene)diphthalic Anhydride		1107-00-2
2-8	2,2-Bis(4-carboxyphenyl)hexafluoropropane		1171-47-7
2-9	Bisphenol AF		1478-61-1
2-10	2,2-Bis(4-isocyanatophenyl)hexafluoropropane		10224-18-7
2-11	Hexafluoro-2,2-diphenylpropane		83558-76-3
(3) ビスフェノール化合物		化合物名	CAS番号
3-1	1,1-Bis(3-cyclohexyl-4-hydroxyphenyl)cyclohexane		4221-68-5
3-2	9,9-Bis(4-aminophenyl)fluorene		15499-84-0
3-3	4,4'-(2-Hydroxybenzylidene)-bis(2,3,6-trimethylphenol)		184355-68-8
3-4	4,4'-(1,3-Dimethylbutylidene)diphenol		6807-17-6
3-5	9,9-Bis(4-hydroxyphenyl)fluorene		3236-71-3
3-6	9,9-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)fluorene		88938-12-9
3-7	4,4'-(2-Ethylhexylidene)diphenol		74462-02-5
3-8	9,9-Bis[4-(2-hydroxyethoxy)phenyl]fluorene		117344-32-8
3-9	1,1-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)cyclohexane		2362-14-3
3-10	1,1-Bis(4-aminophenyl)cyclohexane		3282-99-3
3-11	1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)cyclohexane		843-55-0
3-12	Bisphenol M		13595-25-0
3-13	1,1-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)cyclohexane		2362-14-3
3-14	4,4'-Bicyclohexanol		20601-38-1
3-15	2,2-Bis(4-hydroxycyclohexyl)propane		1980-4-69
3-16	4-Cyclohexylcyclohexanol		2433-14-6
3-17	2-Cyclohexylphenol		119-42-6
3-18	4,4'-(1,2-Diethylethylene)diphenol		84-16-2
3-19	Diphenylsilanediol		947-42-2

3-20	4-(Phenylazo)phenol	20714-70-9
3-21	Resveratrol	501-36-0
3-22	Spirochromane	3127-14-8
3-23	TAR [4-(2-Thiazolylazo)resorcinol]	2246-46-0
3-24	6,6',7,7'-Tetrahydroxy-4,4,4',4'-tetramethyl-2,2'-spirobichroman	32737-35-2
3-25	4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-phenol	269409-97-4

(4) ベンゾフェノン	化合物名	CAS番号
4-1	4,4'-Dihydroxybenzophenone	611-99-4
4-2	4,4'-Dimethoxybenzophenone	90-96-0
4-3	2,3',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone	61445-50-9
4-4	2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone	131-55-5
4-5	4,4'-Difluorobenzophenone	345-92-6
4-6	2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenone	131-54-4
4-7	4,4'-Dichlorobenzophenone	90-98-2
4-8	3,3',4,4'-Benzophenonetetracarboxylic Dianhydride	2421-28-5
4-9	Benzophenone-2,4'-dicarboxylic Acid Monohydrate	85-58-5
4-10	4,4'-Dihydroxybenzophenone	611-99-4
4-11	2,4'-Difluorobenzophenone	342-25-6
4-12	4,4'-Diaminobenzophenone	611-98-3
4-13	4-Benzoyl 4'-Methyldiphenyl Sulfide	83846-85-9
4-14	benzophenone-4,4'-Dicarboxylic acid	964-68-1
4-15	2,2'-Dihydroxy-4-methoxybenzophenone	131-53-3
4-16	2,4'-Dichlorobenzophenone	85-29-0
4-17	2,4,4'-Trihydroxybenzophenone	1470-79-7
4-18	2,2'-Dihydroxybenzophenone	835-11-0
4-19	3,3'-Dinitrobenzophenone	21222-05-9
4-20	3,3'-Diaminobenzophenone	611-79-0
4-21	2-Amino-2',5-dichlorobenzophenone	2958-36-3
4-22	2,2',4-Trimethoxybenzophenone	33077-87-1
4-23	4,4'-Bis(methylamino)benzophenone	3708-39-2
4-24	benzophenone	119-61-9
4-25	2,3,4,4'-Tetrahydroxybenzophenone	31127-54-5

(5) ジフェニルメタン	化合物名	CAS番号
5-1	4,4'-Methylenebis(2,6-di-tert-butylphenol)	118-82-1
5-2	Methylenedisalicylic Acid	122-25-8
5-3	Bis(3-ethyl-5-methyl-4-maleimidophenyl)methane	105391-33-1
5-4	2,2'-Methylenebis(4-chlorophenol)	97-23-4
5-5	4,4'-Bismaleimidodiphenylmethane	13676-54-5
5-6	4,4'-Methylenebis(2-ethyl-6-methylaniline)	19900-72-2
5-7	4,4'-Diamino-3,3'-dimethyldiphenylmethane	838-88-0
5-8	4,4'-Diaminodiphenylmethane	101-77-9
5-9	Bis[4-dimethylamino-phenyl]methane	101-61-1
5-10	2,2'-Methylenebis(6-tert-butyl-4-ethylphenol)	88-24-4
5-12	4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline)	101-14-4
5-13	4,4'-Methylenebis(2,6-dimethylphenol)	5384-21-4
5-14	3,4'-Diaminodiphenylmethane	19430-83-2
5-15	2,2'-Methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol)	119-47-1
5-16	4,4'-Dinitrodiphenylmethane	1817-74-9
5-17	Bis(4-amino-2,3-dichlorophenyl)methane	42240-73-3
5-18	2,2'-Methylenebis(4-methylphenol)	3236-63-3
5-19	2,4'-Dihydroxydiphenylmethane	2467-03-0
5-20	4,4'-Difluorodiphenylmethane	457-68-1
5-21	4,4'-Diphenylmethane Diisocyanate	101-68-8
5-22	4,4'-Diisocyanato-3,3'-dimethyldiphenylmethane	139-25-3
5-23	Bisphenol F	620-92-8
5-24	3,3'-Diaminodiphenylmethane	19471-12-6
5-25	2,2'-Dihydroxydiphenylmethane	205672
5-26	4,4'-Dihydroxytetraphenylmethane	1844-01-5
5-27	2,3,4,4'-Tetrahydroxydiphenylmethane	174462-43-2

(6) ジフェニル17-ケトステロイド	化合物名	CAS番号
6-1	Dehydroepiandrosterone Acetate	853-23-6
6-2	Epiandrosterone	481-29-8
6-3	Δ 4-Androstene-3,17-dion	63-05-8
6-4	Dehydroepiandrosterone	53-43-0
6-5	1,4-Androstadiene-3,17-dion	897-06-3
6-6	Adrenosterone	382-45-6
6-7	Triamcinolone Acetonide	76-25-5
6-8	Estrone	53-16-7
6-9	Estrone 3-hemisuccinate	58534-72-8
6-10	Δ 1-Adrenosterone	7738-93-4
6-11	Equilin	474-86-2

6-12	16 α -hydroxyestrone	566-76-7
6-13	Androsterone	53-41-8
(7) ステロイド		
	化合物名	CAS番号
7-1	Hecogenin	467-55-0
7-2	hecogenin Acetate	915-35-5
7-3	Spirolactone	51-01-7
7-4	Oxandrolone	53-39-4
7-5	Stanozolol	10418-03-8
7-6	16,17-Epoxyprogesterone	1097-51-4
7-7	Cholesteryl Bromide	516-91-6
7-8	Cholic Acid Methyl Ester	1448-36-8
7-9	16,17-Epoxypregnenolone	34209-81-9
7-10	(+)-4-Cholesten-3-one	601-57-0
7-11	pregnenolone	145-13-1
7-12	Dipotassium Glycyrrhizinate, Hydrate	68797-35-3
7-13	Diosgenin	512-04-9
7-14	Cholesteryl Chloride	910-31-6
7-15	4-Pregnene-3,11,20-trione	516-15-4
7-16	Digitoxigenin	143-62-4
7-17	Flunisolide	3385-03-3
7-18	Cholesterol-5 α ,6 α -epoxide	1250-95-9
7-19	Pregnenolone Acetate	1778-02-5
7-20	Progesterone	57-83-0
7-21	Deoxycholic Acid Sodium Salt	302-95-4
7-22	1,2,3,4-Tetrahydro-1-naphthylamine	2217-40-5
(8) ステロイドグリコシド		
	化合物名	CAS番号
8-1	Tomatine	17406-45-0
8-2	Difitonin	11024-24-1
8-3	g-Strophanthin	630-60-4
8-4	Difitoxin	71-63-6
8-5	Digoxin	20830-75-5
(9) ヒドロキシケトステロイド		
	化合物名	CAS番号
9-1	17 β -hydroxy-17methylandrosta-1,4-dien-3-one	72-63-9
9-2	Oxymetholone	434-07-1
9-3	Dexamethasone	50-02-2
9-4	Pregnenolone	145-13-1
9-5	Norethynodrel	68-23-5
9-6	Medroxyprogesterone 17-acetate	71-58-9
9-7	Corticosterone	50-22-6
9-8	Cortisone	53-06-5
9-9	D(-)-Norgestrel	797-63-7
9-10	17 α -Acetoxyprogesterone	302-23-8
9-11	Testosterone Propionate	57-85-2
9-12	Methyltestosterone	58-18-4
9-13	5 β -Cholanic acid-3-one	1553-56-6
9-14	Testosterone Enanthate	315-37-7
9-15	Mesterolone	1424-00-6
9-16	19-Norethindrone	68-22-4
9-17	Cyproterone acetate	2098-66-0
9-18	17- α -hydroxyprogesterone caproate	630-56-8
9-19	5 α -Dihydrotestosterone	521-18-6
9-20	Prednisolone	50-24-8
9-21	Mifepristone	84371-65-3
9-22	Testosterone	58-22-0
9-23	17 α -Methylandrostan-17 β -ol-3-one	521-11-9
9-24	11-Ketotestosterone	564-35-2
9-25	17 α -hydroxyprogesterone caproate	630-56-8
9-26	Testosterone isocaproate	15262-86-9
9-27	Aldosterone	52-39-1
9-28	Norethindrone	68-22-4
9-29	Ethisterone	434-03-7
9-30	(-)-Norgestrel	6533-00-2
9-31	Norethisterone acetate	51-98-9
9-32	Medroxyprogesterone acetate	71-58-9
9-33	Betamethasone 21-acetate	987-24-6
9-34	Mesterolone	1424-00-6
9-35	Tibolone	5630-53-5
9-36	Nandrolone	434-22-0
9-37	Betamethasone 17,21-dipropionate	5593-20-4
9-38	Corticosterone 21-acetate	1173-26-8
9-39	Δ 9(11)-methyltestosterone	1039-17-4

9-40	Hyodeoxycholic acid	83-49-8
9-41	11 α -hydroxyprogesterone acetate	2268-98-6
9-42	Trenbolone	10161-33-8
9-43	Hydrocortisone	50-23-7
9-44	Methandrostenolone	72-63-9
9-45	Mestanolone	521-11-9
9-46	Cortisone Acetate	50-04-4
9-47	Stanolone	521-18-6
9-48	Hydrocortisone Acetate	50-03-3
9-49	11 α -hydroxyprogesterone	80-75-1
9-50	Deoxycorticosterone Acetate	56-47-3
9-51	17 α -Hydroxyprogesterone Caproate	630-56-8
9-52	Fluorometholone	426-13-1
9-53	Betamethasone	378-44-9
9-54	Fluticasone Propionate	80474-14-2
9-55	Norethisterone	68-22-4
9-56	Predonisorlone acetate	52-21-1
9-57	Cortexolone	152-58-9
9-58	Triamcinolone	124-94-7
9-59	Predonisone	53-03-2
9-60	Dexamethasone 21-acetate	1177-87-3

(10) ヒドロキシステロイド	化合物名	CAS番号
10-1	Methylandrostenediol	521-10-8
10-2	Ethynylestradiol	57-63-6
10-3	Ergosterol	57-87-4
10-4	β -Sitosterol Acetate	915-05-9
10-5	β -Estradiol	50-28-2
10-6	Estradiol Benzoate	50-50-0
10-7	5 β -Pregnane-3 α ,20 α -diol	1852-49-9
10-8	Stigmastanol	19466-47-8
10-9	Estriol	50-27-1
10-10	β -Cholestanol	80-97-7
10-11	β -Sitosterol	83-46-5
10-12	Lanosterol	79-63-0
10-13	β -estradiol 17-hemisuccinate	7698-98-3
10-14	17 α Ethynylestradiol	57-63-6
10-15	Danazol	17230-88-5
10-16	5 α -Androstane-3 β ,17 β -diol	571-20-0
10-17	6 α -Hydroxyestradiol	1229-24-9
10-18	17 α -Ethylestradiol 3-cyclopentyl ether	152-43-2
10-19	Estrone Acetate	901-93-9
10-20	16-Ketoestradiol	566-75-6
10-21	β -Estradiol-6-one 6	35048-47-6
10-22	17-Epiestriol	1228-72-4
10-23	2-Methoxyestradiol	362-07-2
10-24	16-Epiestriol	547-81-9
10-25	Ethynylestradiol	57-63-6
10-26	25-Hydroxycholesterol	2140-46-7
10-27	17 α -Estradiol	57-91-0
10-28	Mestranol	72-33-3
10-29	β -estradiol 3-Benzoate	50-50-0
10-30	Stigmasterol	83-48-7

(11) 胆汁酸	化合物名	CAS番号
11-1	Sodium Glycocholate Hydrate	207614-05-9
11-2	Tauroursodeoxycholic Acid	14605-22-2
11-3	3 α -Hydroxy-7-oxo-5 β -cholanic Acid	4651-67-6
11-4	Lithocholic Acid	434-13-9
11-5	Taurocholic Acid Sodium Salt	145-42-6
11-6	Chenodeoxycholic Acid	474-25-9
11-7	Methyl Hyodeoxycholate	2868-48-6
11-8	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate	75621-03-3
11-9	12-Oxochenodeoxycholic Acid	番号なし
11-10	Ursodeoxycholic Acid	128-13-2
11-11	Chenodeoxycholic Acid	474-25-9
11-12	Cholic Acid	81-25-4
11-13	Sodium Cholate	361-09-1
11-14	Hyodeoxycholic Acid Sodium Salt	10421-49-5
11-15	Dehydrocholic Acid	81-23-2
11-16	Sosium Dehydrocholate	145-41-5
11-17	3 β -Hydroxy- Δ 5-cholenic Acid	5255-17-4
11-18	Sodium Deoxycholate	302-95-4
11-19	Deoxycholic Acid	83-44-3

(12) フラボノイド	化合物名	CAS番号
12-1	Kaempferol	520-18-3
12-2	Coumestrol	479-13-0
12-3	Biochanin A	491-80-5
12-4	Genistein	446-72-0
12-5	Hesperidin	520-26-3
12-6	(±)-Naringenin	67604-48-2
12-7	Daidzein	486-66-8
12-8	Quercetin	117-39-5
12-9	3,7,3',4'-Tetrahydroxyflavone	528-48-3
12-10	5,7-hydroxyflavone	480-40-0
12-11	3-hydroxyflavone	577-85-5
12-12	flavone	525-82-6
12-13	5-hydroxyflavone	491-78-1
12-14	5,6-benzoflavone	6051-87-2
12-15	6-hydroxyflavone	6665-83-4
12-16	Acacetin	480-44-4
12-17	7,8-dihydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one	38183-03-8
12-18	Galangin	548-83-4
12-19	6-chloroflavone	10420-73-2
12-20	6-methylflavone	29976-75-8
12-21	6-methoxyflaxone	26964-24-9
12-22	Naringenin	480-41-1
12-23	7-methoxyflavone	22395-22-8
12-24	Baicalein	491-67-8
12-25	3',4',7,8-tetrahydroxyflavone	3440-24-2
12-26	3',4',7-tromethoxyflavone	22395-24-0
12-27	5,6-dihydroxy-7-methoxyflavone	29550-13-8
12-28	6,7-dimethoxy-3',4',5-trihydroxyflavone	34334-69-5
12-29	3',4'-dimethoxyflavone	4143-62-8
12-30	3',4'-dihydroxyflavone	4143-64-0
12-31	4',5-dithoxy-7methoxyflavone	437-64-9
12-32	4'-methoxy-3,5,7-trihydroxyflavone	491-54-3
12-33	3'-benzyloxy-5,7-dihydroxy-3,4'-dimethoxyflavone	62507-01-1
12-34	3',4',5,7-tetramethoxyflavone	855-97-0
12-35	5,6,7-trimethoxyflavone	973-67-1
12-36	Luteolin	491-70-3
12-37	7-hydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one	6665-86-7
12-38	3,7-dihydroxyflavone	492-00-2
12-39	Morin	6472-38-4
12-40	Apigenin	520-36-5
12-41	Rutin	153-18-4
12-42	7-hydroxyflavone	6665-86-7
12-43	7,8-dihydroxyflavone	38183-03-8
12-44	Diosmin	520-27-4
12-45	3,6-dihydroxyflavone	108238-41-1
12-46	3-hydroxy-7-methoxyflavone	7478-60-6
12-47	Formononitin	485-72-3
12-48	2-carbethoxy-5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone	15485-76-4
12-49	4',7-dimethoxyisoflavone	1157-39-7
12-50	3',4',7-trihydroxyisoflavone	485-63-2
12-51	6,7,4'-trihydroxyisoflavone	17817-31-1
12-52	4',5,7-trihydroxyisoflavone 7-glucoside	529-59-9
12-53	Glycitein	40957-83-3
12-54	Flavanone	487-26-3
12-55	4'-hydroxyflavanone	6515-37-3
12-56	3'-hydroxyflavanone	1621-55-2
12-57	7-hydroxyflavanone	6515-36-2
12-58	(+) - Catechin hydrate	225937-10-0
12-59	(±) - Catechin dydrate	7295-85-4
12-60	Hesperetin	520-33-2
12-61	Taxifolin	98006-93-0
12-62	2'-hydroxyflavanone	17348-76-4
12-63	Naringin	10236-47-2
12-64	Quercetin dihydrate	6151-25-3
12-65	Phloretin	60-82-2
12-66	4'-hydroxychalcone	2657-25-2
12-67	4-hydroxchalcone	20426-12-4
12-68	Chalcone	94-41-7
12-69	2-hydroxychalcone	42224-53-3
12-70	2'-hydroxychalcone	644-78-0
12-71	Chromone	491-38-3

12-72	Chromone-2-carboxylic acid	4940-39-0
12-73	4-chromanone	491-37-2
12-74	2'-hydroxy-2,4,4',5',6'-pentamethoxychalcone	73694-15-2
(13) フタル酸エステル		
	化合物名	CAS番号
13-1	Diheptyl phthalate	3648-21-3
13-2	Dinonyl phthalate	84-76-4
13-3	Dimethyl phthalate	131-11-3
13-4	Benzyl n-Butyl Phthalate	85-68-7
13-5	Di-2-ethylhexyl Phthalate Standard	117-81-7
13-6	Di-iso-butyl Phthalate	84-69-5
13-7	Phthalic Acid Dicyclohexyl Ester	84-61-7
13-8	Terephthalic Acid Diallyl Ester	1026-92-2
13-9	Diethyl phthalate	84-66-2
13-10	Dicyclohexyl phthalate	84-61-7
13-11	Di-n-octyl phthalate	117-84-0
13-12	Diallyl Phthalate	131-17-9
13-13	Di-n-butyl phthalate	84-74-2
13-14	isophthalic Acid Diallyl Ester	1087-21-4
13-15	Di-n-propyl phthalate	131-16-8
13-16	Di-n-heptyl phthalate	3648-21-3
(14) アルキルフェノール		
	化合物名	CAS番号
14-1	4-Propylphenol	645-56-7
14-2	4-n-Hexylphenol	2446-69-7
14-3	4-sec-Butylphenol	99-71-8
14-4	4-Ethylphenol	123-07-9
14-5	4-n-Heptylphenol	1987-50-4
14-6	4-tert-Butylphenol	98-54-4
14-7	4-(1,1,3,3,-Tetramethylbutyl)phenol	140-66-9
14-8	4-Isopropylphenol	99-89-8
14-9	4-tert-Amylphenol	80-46-6
14-10	p-Dodecylphenol	27193-86-8
14-11	p-Nitrotoluene	99-99-0
14-12	p-n-Octylphenol Standard	1806-26-4
14-13	nonylphenol	104-40-5
14-14	4-(tert-Octyl)phenol	140-66-9
14-15	4-Octylphenol	1806-26-4
14-16	p-Cresol	106-44-5
(15) ビフェニル		
	化合物名	CAS番号
15-1	3,3' -Dihydroxydiphenylamine	65461-91-8
15-2	2,2' -Dihydroxydiphenyl ether	15764-52-0
15-3	Bis(4-hydroxyphenyl) sulfide	2664-63-3
15-4	4,4' -Dihydroxydiphenyl ether	1965-09-9
15-5	4,4' -Dihydroxytetraphenyl methane	1844-01-5
15-6	4-Phenylphenol	92-69-3
15-7	Bis(4-hydroxyphenyl) sulfone	80-09-1
15-8	4,4'-Biphenol	92-88-6
15-9	4-Methoxybiphenyl	613-37-6
15-10	Diphenyl	92-52-4
15-11	4,4'-diethoxydiphenyl	7168-54-9
15-12	4,4'Biphenyldiol	92-88-6
15-13	4,4'-Biphenol	92-88-6
15-14	4-Hydroxy-4'-methoxydiphenyl	16881-71-3
(16) アルカン		
	化合物名	CAS番号
16-1	n-Octylbenzene	2189-60-8
16-2	2,2,4-Trimethylpentane	540-84-1
16-3	n-Nonane	111-84-2
16-4	n-Octane	111-65-9
(17) フェノール		
	化合物名	CAS番号
17-1	Sennoside A	81-27-6
17-2	Bergenin	477-90-7
17-3	Arbutin	497-76-7
17-4	paeonol	552-41-0
17-5	Baicalein	491-67-8
17-6	4-n-amylphenol	14938-35-3
17-7	4-benzylphenol	101-53-1
17-8	4-Triphenylmethylphenol	978-86-9
17-9	3(2)-t-Butyl-4-hydroxyanisole	25013-16-5
17-10	p-Naphtholbenzein	145-50-6
17-11	Amoxicillin Trihydrate	61336-70-7
17-12	3,3,5-Triiodo-L-thyronine	6893-02-3
17-13	4-Cyclohexylphenol	1131-60-8

17-14	4-tert-Amylphenol	80-46-6
17-15	p,p-DDE	72-55-9
17-16	(-)-epinephrine	51-43-4
17-17	p-Phenolsulfonic Acid	98-67-9
17-18	Synephrine	94-07-5
(18) 安息香酸		
	化合物名	CAS番号
18-1	4-Hydroxybenzoic acid n-butyl ester	94-26-8
18-2	4-Hydroxybenzoic acid ethyl ester	120-47-8
18-3	4-(4'-hydroxyphenoxy)-benzoic Acid	598-31-2
18-4	4-Chlorophthalic Anhydride	118-45-6
18-5	4,5-Dichlorophthalic Anhydride	942-06-3
18-6	Terephthalic acid dimethyl ester	120-61-6
18-7	4-Hydroxybenzoic acid n-nonyl ester	38713-56-3
18-8	4-Hydroxybenzoic acid phenyl ester	17696-62-7
18-9	4-Hydroxybenzoic acid benzyl ester	94-18-8
18-10	Tetrachlorophthalic Anhydride	117-08-8
18-11	Tetrachlorophthalic Acid di-n-propyl ester	6928-67-2
18-12	4-Hydroxyphthalic acid	610-35-5
18-13	4-Hydroxybenzoic acid n-hexyl ester	1083-27-8
(19) アダマンタン		
	化合物名	CAS番号
19-1	p-(1-Adamantyl)toluene	459-55-8
19-2	Adamantane	281-23-2
19-3	4-(1-Adamantyl)phenol	29799-07-3
(20) フルオレン		
	化合物名	CAS番号
20-1	9-Aminofluorene Hydrochloride	5978-75-6
20-2	9,9'-Bifluorenylidene	746-47-4
(21) 塩素化有機化合物		
	化合物名	CAS番号
21-1	1,3-Dichlorobenzene	541-73-1
21-2	1,2-Dichlorobenzene	95-50-1
21-3	2,4-Dichlorophenol	120-83-2
21-4	DDT	50-29-3
21-5	1,4-Dichlorobenzene	106-46-7
21-6	2,4,5-Trichlorophenol	95-95-4
21-7	2,2-Bis(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethane	番号なし
21-8	α -benzoepin	959-98-8
21-9	2,4,5-T (2,4,5-triChlorophenoxyacetate)	93-76-5
21-10	β -benzoepin	33213-65-9
21-11	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	94-75-7
21-12	PCP	87-86-5
21-13	Linuron	330-55-2
21-14	Vinclozolin	50471-44-8
21-15	Procymidone	32809-16-8
21-16	Atrazine	1912-24-9
21-17	Hexachlorobenzene	118-74-1
21-18	2,2-Bis(4-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene	72-54-8
21-19	(\pm)-Baclofen	1134-47-0
21-20	Aldrin	309-00-2
(22) 一般有機化合物		
	化合物名	CAS番号
22-1	α -(Hydroxymethyl)benzeneacetic acid	101-31-5
22-2	Loganin	18524-94-2
22-3	Rhynchophylline	76-66-4
22-4	Ribavirin	36791-04-5
22-5	Molinate	2212-67-1
22-6	Pentadecafluoro octanoic acid	335-67-1
22-7	Malathion	121-75-5
22-8	Alendronate	121268-17-5
22-9	Gossypol	303-45-7
22-10	Triphenylethylene	58-72-0
22-12	1,2-Benzopyrene	50-32-8
22-13	2,2-Diphenylpropane	778-22-3
22-14	Lansoprazole	103577-45-3
22-15	Tamoxifen	10540-29-1
22-16	Vincristine Sulfate	2068-78-2
22-17	4-hydroxytamoxifen	68047-06-03
22-18	Orcein	1400-62-0
22-19	Diclofenac Sodium	15307-86-5
22-20	Diethylstilbestrol	56-53-1
22-21	p-n-Nonylphenol	104-40-5
22-22	3,3-Diethylthiacyanine	2197-01-5
22-23	DOA=di(2-ethylhexyl) adipate(DEHA)	103-23-1
22-24	Urapidil hydrochloride	64887-14-5

22-26	Disodium Etidronate	7414-83-7
22-27	Atropine Sulfate	51-55-8
22-28	Clarithromycin	81103-11-9
22-29	Fluvoxamine maleate	54739-18-3
22-30	Osthole	484-12-8
22-31	Diethylstilbestrol Dipropionate	130-80-3
22-32	Betaine	107-43-7
22-33	4-Bromocrotonic Acid	13991-36-1
22-34	Methoxyacetic Acid	625-45-6
22-35	1,2,5,6,9,10-Hexabromocyclododecane	3194-55-6
(23) 保護アミノ酸		
23-1	L-Tyrosine Ethyl Ester Hydrochloride	4089-07-0
23-2	L-Tyrosine Hydrazide	7662-51-3
23-3	L-Tyrosine Methyl ester Hydrochloride	3417-91-2
(24) 有機フッ素化合物		
24-1	Nonafluorobutanesulphonic Acid (C4)	375-73-5
24-2	Perfluoropentanoic Acid (C5)	2706-90-3
24-3	Perfluorohexanoic Acid (C6)	307-24-4
24-4	Perfluoroheptanoic Acid (C7)	375-85-9
24-5	Perfluorooctanoic Acid (C8)	335-67-1
24-6	Perfluorononanoic Acid (C9)	375-95-1
24-7	Perfluorodecanoic Acid (C10)	335-76-2
24-8	Perfluoroundecanoic Acid (C11)	2058-94-8
24-9	Tricosafuorododecanoic Acid (C12)	307-55-1
24-10	Perfluorotetradecanoic Acid (C14)	376-06-7
24-11	Perfluorohexadecanoic Acid (C16)	67905-19-5
24-12	Perfluorooctane	307-34-6
24-13	Perfluorooctanesulfonic Acid	1763-23-1
24-14	Perfluorooctanoic Acid Methyl Ester	376-27-2
24-15	1H,1H,2H,2H-Perfluorohexan-1-ol, Telomer (4:2)	2043-47-2
24-16	1H,1H,2H,2H-Perfluoro-1-octanol, Telomer (6:2)	647-42-7
24-17	1H,1H,2H,2H-Perfluoro-1-decanol, Telomer (8:2)	678-39-7
24-18	1H,1H,2H,2H-Perfluorododecan-1-ol, Telomer (10:2)	865-86-1
(25) 有機スズ化合物		
25-1	Monobutyltin oxide	2273-43-0
25-2	Dibutyltin oxide	818-08-6
25-3	Dibutyltin dichloride	683-18-1
25-4	Dibutyltin diacetate	1067-33-0
25-5	Dibutyltin maleate	78-04-6
25-6	Dibutyltin bis(trifluoromethanesulfonate)	38438-11-8
25-7	Tributyltin chloride	1461-22-9
25-8	Tributyltin hydride	688-73-3
25-9	Tributyltin fluoride	1983-10-4
25-10	Tributyltin acetate	56-36-0
25-11	Allenyltributyltin	53915-69-8
25-12	Allyltributyltin	24850-33-7
25-13	Tributylethynyltin	994-89-8
25-14	Tributylvinyltin	7486-35-3
25-15	Tributyl(2-pyridyl)tin	17997-47-6
25-16	Bis(tributyltin)	813-19-4
25-17	Tetra-butyltin	1461-25-2
25-18	Tetraallyltin	7393-43-3
25-19	Dibutyltin dilaurate	77-58-7
25-20	Monophenyltin trichloride	1124-19-2
25-21	Diphenyltin sulfide	20332-10-9
25-22	Triphenyltin chloride	639-58-7
25-23	Triphenyltin hydroxide	76-87-9
25-24	Allyltriphenyltin	76-63-1
25-25	Tetraphenyltin	595-90-4
25-26	Dioctyltin oxide	870-08-6
25-27	Trioctyltin hydride	869-59-0
25-28	Dimethyltin dichloride	753-73-1
25-29	Trimethyltin chloride	1066-45-1
25-30	Tetramethyltin	594-27-4
25-31	Diethyltin dichloride	866-55-7
25-32	Triethyltin chloride	994-31-0
25-33	Tri-i-propyltin chloride	14101-95-2
25-34	Tri-n-propyltin chloride	2279-76-7
25-35	Tri-n-propyltin Acetate	3267-78-5
25-36	Tetra-i-propyltin	2949-42-0
25-37	Tetra-n-propyltin	2176-98-9

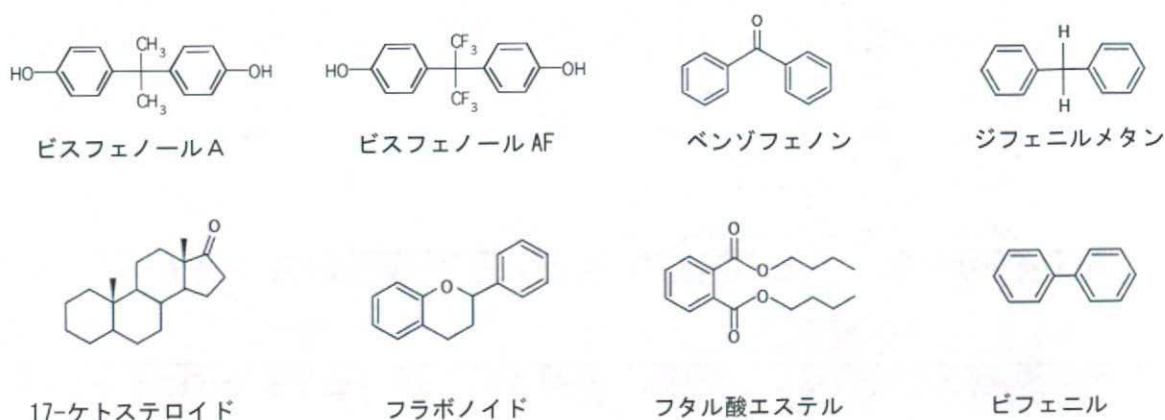


図5. 核内受容体応答スクリーニングに供される代表的な化学物質群

本年度においては、表1にあげた化学物質から、ERR γ に491種類、ER α に423種類、PPAR γ に405種類など、本格的なスクリーニングを実施した。ER α については、これまで多くのグループがアッセイ結果を報告してきた。しかしながら、そうした過去のスクリーニングでは試験されなかった化合物で、今回結合性が明らかになったものが数件あった。そして、それらの化合物は現在その使用量が大きく増大しているもので、しかも、いずれの化合物とも、唯一その内分泌かく乱作用性が懸念されているビスフェノールAの誘導体である。今回、ビスフェノールAF、ビスフェノールZ、ビスフェノールCがER α にかなり強く結合することが判明した。これらについては、現在特に、検証のため詳細な結合試験を実施している。

ERR γ については、ビスフェノールAの特異的な標的核内受容体であることから、詳細な解析を実施した。特に、ビスフェノール誘導体と考えることのできるカテゴリー番号(1)～(5)の合計125化学物質については、高活性な化合物が予想された。また、ビスフェノールAの一方のフェニル-ヒドロキシ基を削除した化合物の4- α -クミルフェノールが、ビスフェノールAとほぼ同じ強さの高い結合親和性を示したことから、フェノール類(14)(17)合計34化学物質についても詳細に試験した。その結果、表2に示すように、6段階に分類した結合親和性の程度で、

IC₅₀値1桁で最も高活性なグループ2種、2桁で活性な化合物11種、3桁でかなり強い化合物16種であり、約30種もの活性な化学物質が存在することが明らかとなった。なかでもIC₅₀値8～90nMの化合物が13種も存在すること、また、ビスフェノール類、アルキルフェノール類に結合親和性の高いものが多いことが注目される。

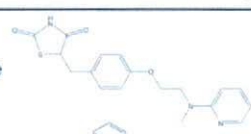

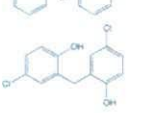
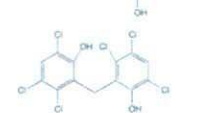
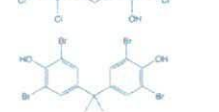



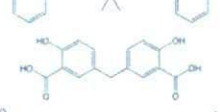
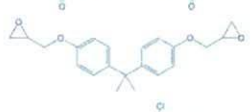
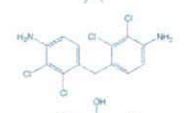

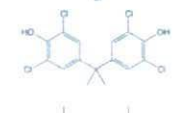
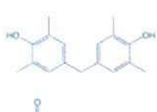
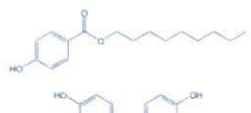



PPAR γ については、トリチウム標識したロシグリタゾンを用いて結合試験を実施した。この化合物自体の結合親和性が中程度の強さ(IC₅₀値32nM)であるが、現在までの試験でこれを凌ぐ強さの化学物質は見出せていない。こうしたなか、有機スズ化合物であるトリフェニルスズ、トリブチルスズがかなり強い結合親和性を示すことがはじめて明らかとなった(表3)。また、ジフェニルメタンに分類される5-4:2,2'-メチレンビス(4-クロロフェノール)がこれらと同程度の強さで結合することが判明した。この化合物はベンゼン環に塩素原子が結合した構造を持つが、こうした有機ハロゲン系の化合物、例えば、1-2:テトラクロロビスフェノールA、1-3:テトラブロモビスフェノールAのような化学物質が、PPAR γ と強い結合性を示すことが分かった。ビスフェノールAは全く結合しないことから、塩素、臭素による電気的な相互作用増強、あるいは、立体的なかさばり、疎水相互作用による結合増強などが考えられた。

表2. 核内受容体 ERR γ に対する化学物質の活性: ビスフェノールAの結合親和性に対する比活性

化合物名	RBA*
Bisphenol E	121
Bisphenol A	100
4- α -cumylphenol	92.9
1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)cyclohexane	39.2
4- <i>tert</i> -butylphenol	37.7
Bisphenol B	37.5
4- <i>sec</i> -Butylphenol	30.5
4- <i>tert</i> -amylphenol	29.7
Bisphenol C	29.5
Bis(4-hydroxyphenyl) sulfide	26.0
4-(1,1,3,3,-Tetramethylbutyl)phenol	20.7
4-isopropylphenol	13.9
2,2-Bis(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethane	10.8
4-Benzylphenol	8.87
Bisphenol AP	8.01
Bisphenol F	7.46
Bisphenol A diacetate	6.40
2,2-Bis(4-chloroformyloxyphenyl)propane	6.31
4-Propylphenol	6.04
4-Phenylphenol	5.35
4- <i>tert</i> -octylphenol	4.14
4-ethylphenol	3.41
Bisphenol P	3.08
4- <i>n</i> -amylphenol	3.03
4- <i>n</i> -Hexylphenol	2.95
Bisphenol AF	2.74
4,4'-(1,3-Dimethylbutylidene)bisphenol	2.27
4-(1-Adamantyl)phenol	1.56
1,1-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)cyclohexane	1.12
Many other chemicals	N.D.

[^3H]ビスフェノールAをトレーサーにした結合試験の結果を、ビスフェノールAの IC_{50} 値 (9.85 nM) を 100 にして計算した比活性を大きい順番に並べた結果を示した。

表3. 核内受容体 PPAR γ に対して結合すると判定された化学物質の構造と結合親和性 (IC_{50})

化学物質番号	構造	IC_{50} 値 (μM)
Rosiglitazone		0.0324
22-25		0.298
5-4		0.320
1-13		0.402
1-3		0.532
1-16		0.565
22-11		0.647
1-17		0.955
5-2		1.23
1-18		1.33
5-17		1.71
21-12		2.12
1-2		2.27
5-13		3.05
18-7		3.64
1-21		4.20
22-20		5.24
5-12		5.48

他の核内受容体についてもトレーサーの入手できるものから逐次に試験系を確立している。しかしながら、トレーサーが確定していない核内受容体が多く、この点での困難性がある。こうした例の一つにレチノイン関連オーファン受容体・RORがある。レチノインが結合するところから命名されたものであるが、 $[^3\text{H}]$ all-*trans*-retinoic acid (ATRA)でのROR β に対する飽和結合試験の結果、その解離定数 K_d 値は 65.5 nM であり、かなり弱い結合親和性しか示さないことが判明した。事実、 ^3H ATRA をトレーサーにした競合結合試験では 441 nM の IC_{50} 値しか示さず (表4)、とても特異的、強いとは言えない程度の結合親和性であった。ROR β に対して、現在まで化学物質 30 種類を試験したが、その結果の一部を表4に示す。

表4. 核内受容体 ROR β に対する化学物質の結合親和性 (IC_{50})

Chemicals	IC_{50} (nM)
all- <i>trans</i> retinoic acid (ATRA)	441 ± 68
13- <i>cis</i> retinoic acid	4,260 ± 770
dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)	2,560 ± 390
4-nonylphenol	2,490 ± 380
stearic acid	N.D.
diethylstilbestrol (DES)	N.D.
bisphenol A (BPA)	N.D.
4-hydroxytamoxifen (4-OHT)	N.D.
17 β -estradiol (E_2)	N.D.
progesterone	N.D.
cholesteryl sulfate	N.D.
cholesterol	N.B.
stearic acetate	N.B.
9- <i>cis</i> retinoic acid	N.B.
bisphenol F	N.B.
D- α -tocopherol	N.B.
corticosterone	N.B.
sitosterol	N.B.
2,2'-dihydroxydiphenylmethane	N.B.

(2) 生細胞受容体結合試験

本試験では、HeLa 細胞に核内受容体を一過的に強制発現させ、これにより発現した核内受容体について、 $[^3\text{H}]$ 標識されたリガンドを用いて結合試験を実施する。今回、核内受容体として、ER α 、ER β 、GR、CAR、RXR α 、RXR β 、RXR γ 、PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ について試験系の構築を試みた。ER α および ER β に対しては 17 β -エストラジオール、GR に対してはデキサメタゾンのトリチウム標識体、その他については 4-OHT を用いて実施した。受容体結合のため、25 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間インキュベートし、その後に細胞の洗

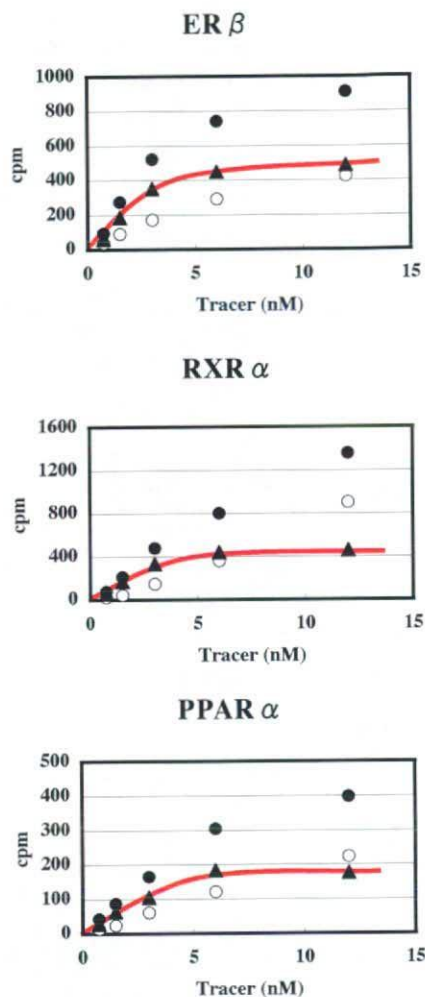


図6. 核内受容体 ER β 、RXR α 、PPAR α に対する生細胞飽和結合試験。
●: 全結合、○: 非特異的結合、▲: 特異的結合。

いの操作を実施した。その細胞洗浄によって B/F 分離が実施できる。

結合試験で最も重要な操作の一つは B/F 分離である。細胞洗浄によって実施する場合、丁寧に洗いを繰り返して実施することが非特異的結合を少なくし、特異的結合から競合結合試験の実施に結びつける最も重要な要件である。さらに、洗浄の後、Triton X で細胞を溶解させるが、この操作も重要な成因の一つである。

この測定では化学物質の通過性を反映した上で評価されることになる。したがって、細胞膜に吸着性の高いもの、細胞膜リン脂質