資料３—１—１

試験スキーム作業班　取りまとめ中間状況報告

作業班長　菅野　純

班員：　菅野　純
小野　宏
下東　康幸
井上　達
名和田　新
舩江　良彦

試験スキーム概要 2
試験スキーム本文 3
１．はじめに 3
２．研究の進捗状況及び得られている成果 3
スクリーニング試験 3
「優先リスト」 5
確定試験（詳細試験） 6
３．今後の展望 7

試験スキーム概要

1）内分泌かく乱化学物質の検討は、数万種に及ぶとされる化学物質の中からホルモン活性のあるものをスクリーニングし、次の確定試験（詳細試験）に資するための優先順位付けを行うスクリーニング試験系と、詳細試験の２段階よりなる。

2）スクリーニング試験系は、①*In silico* スクリーニング（電算機内予測）、②細胞系、無細胞系を用いた *in vitro* スクリーニング試験、及び③卵巣摘出動物又は幼若動物、あるいは去勢動物等を用いた *in vivo* 試験系によるホルモン様作用の観測から構成される。

3）このスクリーニング試験系によって、ホルモン様作用（低用量域の作用を含む）を有することが生物学的に説明可能な物質を順位付けすることができる。

4）スクリーニングが終了した物質は、順位付けに従ってリスク評価のための詳細試験を行い、ヒトに対して内分泌かく乱作用を有するかどうかを予測する。

5）詳細試験としては、生体の成長過程（胎児期・新生児期・思春期）や生体反応（神経系、内分泌系、免疫系などの高次生命系に及ぼす変化）を包括的に検討する実験を開発・実施する。

（今後の取組）

1）試験系を構成する各試験についてガイドライン及び評価基準を整備する。

2）精度及び網羅性の高いスクリーニング手法の開発整備を行って、ホルモン様作用（低用量域の作用を含む）を有することが生物学的に説明可能な物質の順位付け、リスト化を継続かつ高度化する。

3）そのためにスクリーニング試験に関しては、エストロジェン受容体に加え、アンドロジェン受容体、甲状腺受容体系等を加え、強化スキームを検討する。

4）マイクロアレイ技術を用いたパスウェー・スクリーニングを第４の項目として追加することを検討する。

5）このための詳細試験に関しては、神経・内分泌・免疫ネットワークの発生・発達・成熟・老化を考慮した「げっ歯類一生涯試験法」を開発検討する。

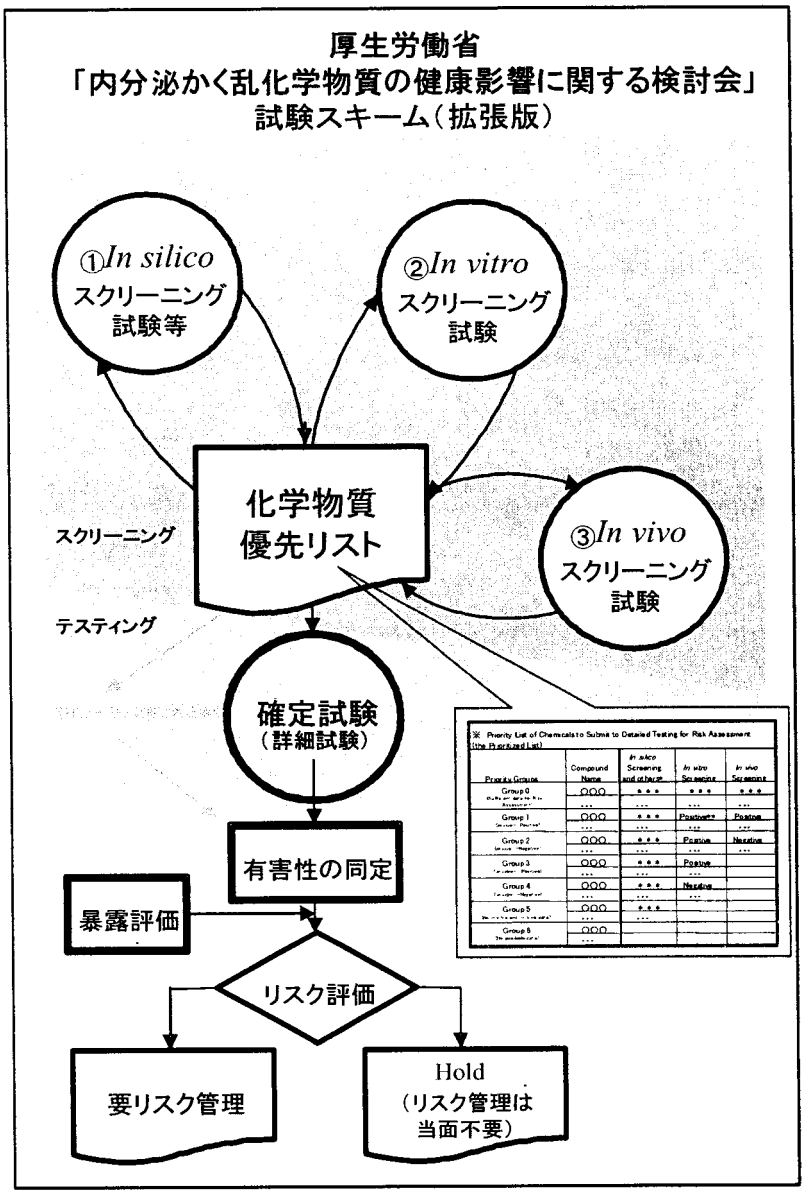
6）リスク評価を行い、ヒトに対する内分泌かく乱作用の可能性があると判断された物質に関して、暴露の実態も踏まえた上で、用途制限や監視等必要な法的措置又は行政措置を講ずる。

試験スキーム本文[1]

１．はじめに

厚生労働省では、内分泌かく乱性を検討する必要がある数万種の対象化合物について、ホルモン活性に焦点を置いたスクリーニング手法の開発と確立を進め、もって、確定試験（詳細試験）に資する優先リストの作成を進めると同時に、詳細試験の開発を並行して行うこととした（右図）。

この方針に則り、図に示す試験スキームの各項目の開発研究が行われた。



２．研究の進捗状況及び得られている成果

スクリーニング試験

① *In silico* スクリーニング試験

「受容体分子への結合性」を検討するスクリーニング試験法については、ハイスループット性に優れる *in silico* による３次元構造活性相関（SAR）手法について検討した。事前調査の結果、ERαに関する自動ドッキングモデルを採用し、その改良研究を加えた。その上で、バーチャルスクリーニングを実施し、エストロジェンα受容体に結合する可能性のある物質の抽出を行った。

今までに、ERαについて、約 200,000 化学物質リストの中から、約 2,000 物質が結合候補物質としてリストアップされた。現在、更に計算手法を改良し、或いは 17β-エストラジオールに対する相対結合能を正確に推定する試みが成されている。また、ERβについての *in silico* ドッキング計算法を開発し、ERαとの比較検討に入っている（菅野班）。

In silico スクリーニング法に関するガイドライン及び評価基準の整備に向けての作業は、以下のような経緯の延長線上で進められている。すなわち、十分な事前調査に

[1] 別冊参照

より、従来から汎用され、米国EPAが採用したCoMFA法を初めとする一連のリガンド構造解析・回帰モデル型の手法を避け、敢えて、受容体－リガンド相互作用を計算するDocking法を採用した。

前者は、特定のリガンドの活性測定値に基づいたリガンド分子の形状に関わる統計学的な分析を行う。そのために、受容体の分子構造が未知の系に対しても検討を加えることができる特徴を有する。反面、統計分析に資するデータを作出するためにどの様な化合物を『教師』として用いるかにその予測性能が依存する、言い換えると、用いた教師化合物に類似した構造の化合物にしか適応できない傾向が強い。

後者には、受容体の構造が既知である必要がある、相互作用計算理論が複雑かつ完璧ではなく、計算自体も煩雑になる傾向がある、という制限がある。有利な点としては『教師』化合物を用いることがないため、予想するリガンドの構造的制限が無い点があげられる。実際に、計算による予測と幾つかの測定系による実測値との照合の結果、偽陽性を容認するスクリーニングの立場からは、利用可能であることが示されている。

② *In vitro*スクリーニング試験

1)細胞系：

「ホルモン受容体依存性蛋白合成誘導」を検討するスクリーニング試験法については、Hela細胞やCHO細胞等の哺乳動物由来培養細胞を用いたレポーター遺伝子試験法を検討した。その結果、ERα、ERβ、AR、及びTRβ（TRβとRXRαの組み合わせ）の各受容体系について各々500、100、50、及び50アッセイ結果を得た（菅野班）。

さらに、レポーターアッセイ以外の*In vitro*スクリーニング試験系、として、ヒト卵巣顆粒膜細胞株KGN細胞を用いたアロマターゼ（エストロゲン合成）活性に影響を与える物質を55種類の物質について測定した結果、アロマターゼ活性の抑制あるいは上昇させる物質を確認出来た。また、KGN細胞を用いたELISA(enzyme-linked immunosorbent assay）によるアロマターゼ活性の測定系を立ち上げ、100種類の化合物のスクリーニングを行った結果、その中からアロマターゼ活性抑制物質を検出できた。さらに、アンドロゲン受容体(AR)系としては、ARの核内ドット分布、アクチビン受容体細胞株転移能、始原生殖細胞の遊走能を利用した抗アンドロゲン作用の新規検出系の開発も行っている（名和田班）。

2)無細胞系：

表面プラズモン共鳴(SPR)による、受容体、リガンド、DNA応答配列（ERE）及び共役因子結合配列（LxxLL）の相互作用の検討を進め、ERα+EREは300、ERβ+EREは30、ERα+TIF-2は300、ERβ+TIF-2は30測定を実施し、①、②、③の補強データ及び評価に活用している（菅野班）。

ガイドライン及び評価基準の整備に関しては、自然、あるいは人の生活の環境中に存在していて、既に何らかの内分泌学的生体影響が自然、実験を問わず報告されている化学物質を当面の陽性対象物質群として、それらの影響の機序、或いは、影響の強

度が十分な精度で観測可能であることをスクリーニング試験法の評価基準としている。そして、実験手法の内、この評価基準を満たすものを、国際的・国内的なバリデーション（有効性確認）、或いはその前段階のプレ・バリデーションの対象となる手法としてガイドライン化を念頭に提案している。

③ *In vivo* スクリーニング試験

さらに、上記の①*in silico*、及び②*in vitro* の系において認定されたホルモン活性が実際の生体内において発揮されるか否かを検討するスクリーニング試験法には、エストロゲン様作用を発揮する化合物に関する試験系として子宮肥大試験、アンドロゲン様物質に関する試験系としてハーシュバーガー試験を検討した。

その結果、前者については既存化学物質や食品関連物質２７化合物、後者についても５物質に関する試験が終了している（今井班）。OECD テストガイドライン 407（28日間反復投与試験）の改良版についても、甲状腺系などを考慮したスクリーニングとしての有用性の検討を行った。

ガイドライン及び評価基準の整備に関しては、②同様、既に何らかの内分泌学的生体影響が自然、実験を問わず報告されている化学物質を当面の陽性対象物質群として、それらの生体影響の機序、或いは、影響の強度が十分な精度で観測可能であることをスクリーニング試験法の評価基準としている。そして、実験手法の内、この評価基準を満たすものを、国際的・国内的なバリデーション（有効性確認）、或いはその前段階のプレ・バリデーションの対象となる手法としてガイドライン化を念頭に提案している。

これらのスクリーニング手法をバッテリーとして適応することにより、数万種類の検討対象化学物質のホルモン活性を順次調べることが可能となり、その結果を基に、詳細試験に資するべき物質の優先リストが提供される。

「優先リスト」[2]

優先リスト内では、新しい情報やスクリーニング試験結果が得られた化合物が、逐次順位再評価を受け、それに見合った位置へ並べ替え（ホルモン活性が強い結果が得られると上位に移動し、弱い結果が得られれば、下位に移動）が行われることにより時間とともに、その内部構造が成熟していく。スクリーニング試験結果以外の情報を加味することが可能であり、包括的な優先順位付けが行われる。

優先リスト上位の化合物から逐次、詳細試験を行い、有害性評価、暴露評価を経て、リスク評価を行い、「要リスク管理」物質及び「リスク管理は当面不要」物質にふるい分けられ、後者については新たな科学的知見により再評価が必要となるまで、暫定的に hold される。

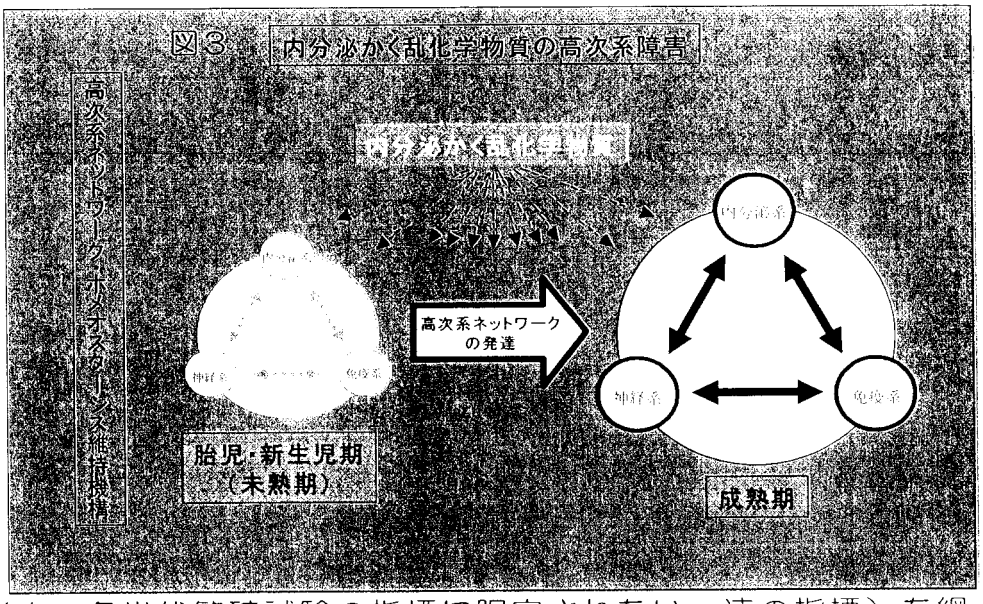
（例外として、農薬等、多世代試験などの大型詳細試験がすでに実施されている物質については、そのデータが内分泌かく乱性の評価に十分であると考えられた場合について、直ちに有害性評価、暴露評価、リスク評価へと進むことができる）

---

[2] リスク評価のための詳細試験に供する化学物質の優先リスト

確定試験（詳細試験）

詳細試験に関しては、従来の多世代繁殖毒性試験の限界を認識し、その改良を含む試験法開発を2005年を目標に進めている。具体的には、一生涯（発生、発達、成熟、老化）の全ての段階において内分泌かく乱作用により懸念される毒性指標（神経・行動、免疫毒性等、高次生命系及びその成熟に対する障害（図3）に焦点を当てた、従来の多世代繁殖試験の指標に限定されない一連の指標）を網羅的に確認する「齧歯類一生涯試験法」の開発を行っている。



神経・行動に関しては、Bisphenol A 妊娠期・授乳期暴露をモデルとし、dopamineおよびserotonin (5-HT)神経系に着目した行動影響の評価と機序、マウス・オペラント条件付けによる神経系高次機能影響の評価及び脳の性分化への影響解析を行っている。

免疫系に関しては、自己免疫発症に関わるモデルの改良、Local Lymph Node Assayを用いた免疫機能の修飾影響の解析を実施している（井上班、小野班）。

内分泌系に関しては、従前の生殖毒性に限定せず、中枢を含む性分化への影響、生殖関連臓器の形成、発達、機能、及びその加齢変化に対する影響を視野に入れた研究を進める（小野班）。

さらに、これを支援する基礎研究を並行して実施している。その中で、神経系に関しては、中枢神経系に作用する化学物質のスクリーニング法として*in vitro*でPC12細胞からのドパミン遊離を指標とした試験、アフリカツメガエル初期胚、神経ステロイドを介した微小管関連タンパク質2（MAP2）依存重合能を利用した試験、ビスフェノールAの結合蛋白質をラット脳より精製し,その蛋白質に対する結合実験より甲状腺ホルモンを介した中枢神経系への影響の評価法の開発、内分泌かく乱化学物質を胎児期暴露した仔マウスの脳内ドパミン量の測定、また、膜エストロジェン受容体や甲状腺ホルモン系を介した神経影響の解析を行っている（船江班）。

さらに、胎児発生期の神経分化に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響解析のため、神経幹細胞を用いた試験を実施している（井上、小野班）。

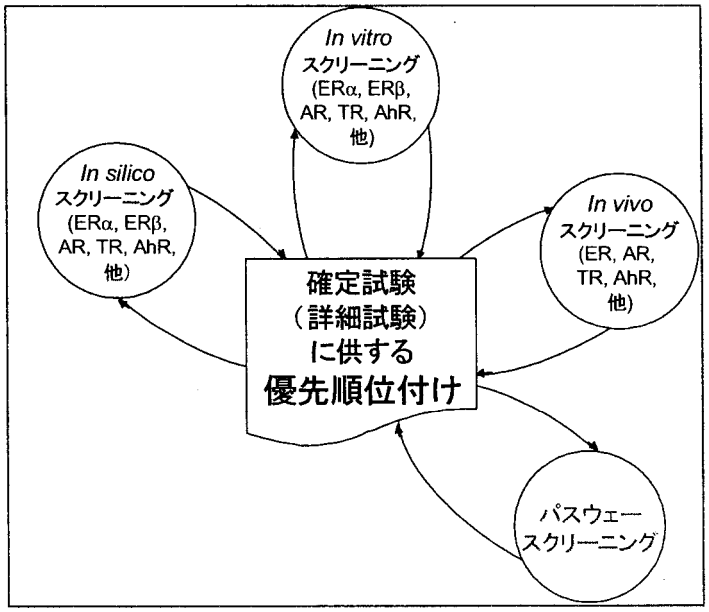
免疫系に関しては、リンパ球のT細胞系機能については胎児胸腺細胞からの分化・増殖が内分泌かく乱物質の影響を受けること、さらに、リンパ球のサイトカイン産生機能が内分泌かく乱物質の影響を受けることを明らかにしている(井上班、小野班)。

化学物質のホルモン受容体への結合に伴う受容体コンホメーション変化を感知・センシングする抗体を用いたホルモンの核内受容体(グルココルチコイド受容体、甲状腺ホルモン

受容体、プロジェステロン受容体等)結合性およびホルモン活性の同時測定評価法（下東班)、各種核内受容体転写活性迅速確認系構築、胎児モデル系としてのES細胞を用いた内分泌かく乱物質の影響解析、生殖器制御メカニズムに基づいた内分泌かく乱作用点の解析等を実施している（今井、小野班)。

さらに、従前の肉眼・組織形態所見（老化・発がん性を含む）のほか、マイクロアレイ等遺伝子発現情報を駆使する手法も取り入れた技術基盤の導入に成功している（菅野、今井、小野班)。

3．今後の展望



スクリーニング試験に関しては、当初の技術的、時間的問題から、エストロジェン受容体に関わる試験法を優先して扱ってきた。それに続いてアンドロジェン受容体系と甲状腺受容体系に関わる試験系を充実させつつある。実際に、我々の体の中にある内分泌関連受容体は、この他にも多数あることから、包括的なスクリーニングが必要であることは、当初から指摘されてきたところである。

今後の予定としては、複数の受容体系を取りこぼしなく包括するための強化スキームを検討する。すなわち、複数の受容体シグナル系に対する影響、及び系統間のクロストークの問題をより効率的に検討可能とするため、現行の各項目に現在利用可能な系を投入する。具体的には、実際に蛋白質の構造や、分子そのものが利用出来ない受容体系を考慮した網羅的検討としてマイクロアレイ技術を用いたパスウェー・スクリーニング[3]を第 4 の項目として追加することを検討する。

---

[3] パスウェー・スクリーニングとは、①各種核内受容体の典型的リガンド（ホルモンなど）が引き起こす一連の遺伝子発現プロファイルや遺伝子発現経路（パスウェー）情報が登録されたトキシコゲノミクス·データベース（比較的大掛かりな動物実験を基にしたもの）を事前に用意する、②スクリーニングすべき化学物質をごく少数の実験動物に投与し、適切な標的臓器の遺伝子発現プロファイルをトキシコゲノミクス手法を用いて取得し、③この結果と①で用意したデータベースとを比較することで、当該化学物質が作用するパスウェーを検出し、広範囲な受容体系に対する、より取りこぼしの少ないスクリーニングを行う、というものである。

尚、①のデータベースは別途進めている化学物質安全トキシコゲノミクスとの連携により作成が進んでいる。

確定試験（詳細試験）については、神経・内分泌・免疫ネットワークの発生・発達・成熟・老化を考慮した「齧歯類一生涯試験法」の開発を推進する。この中で、神経障害性に関しては、必ずしも明確な器質的障害は誘導されないことが想定される。本研究では、高次行動異常を当面の焦点に、胎生期・新生児期暴露が認知機能、場面適応性や報酬効果に及ぼす影響の確認実験系の導入をすすめる。免疫系に関しては、有害性指標として自己免疫疾患モデル（人に於いて性差が著しいことで知られるシェーグレン病のモデル）、あるいはⅣ型免疫応答のモデルであるLocal Lymph Node Assayの改良形を用いて、化学物質による自己免疫および獲得免疫機能の修飾の影響を当面の対象として解析する。内分泌系に関しては、生殖機能に関わる従来の指標に加えて、早発閉経等のモデルの一つとしての成熟後の機能異常の発生を中心とした解析をさらに推進する。

以上の、神経・内分泌・免疫３要素への影響を検討することと平行して、これら３要素を限られた時間と資金で実施可能な試験系に集約する研究を実施する。これには、前述の各支援基盤研究に加え、スクリーニングに用いた手法を詳細試験の補助手段として活用して行く予定である。