

発表者：国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部
菅野 純

研究課題名・主任研究者：

- 「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、H11～H13
- 「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による内分泌攪乱性の優先順位付けに関する研究」・菅野 純、H14～H16
- 「化学物質の内分泌かく乱性を確認する試験法の確立に関する研究」・今井 清、H13～H15
- 「内分泌かく乱性確定試験法及び内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究」・小野 宏、H16～

1. 研究目的

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、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。

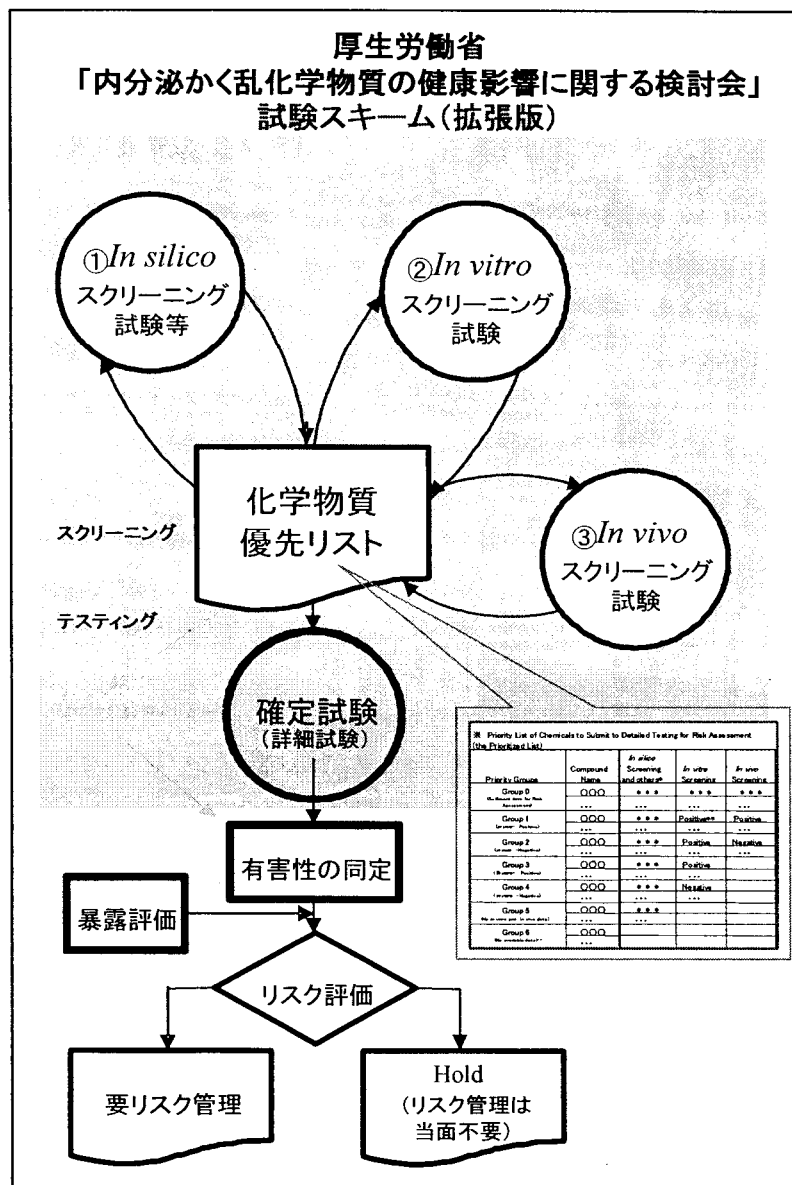
この方針に則り、図に示す試験スキームの各項目の開発研究を実施する。

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 *insilico* 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、ER α 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、エストロゲン α 受容体に結合する可能性のある物質の抽出を行った。

その結果、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、 $ER\beta$ についての *in silico* ドッキング計算法を開発し、 $ER\alpha$ との比較検討に入っている。

		<i>in silico</i> バーチャルスクリーニング	<i>in vitro</i> レポーターアッセイ	SPR (<i>cell-free</i>)	<i>in vivo</i> 試験 (UT&Hersh)	
					s.c.	p.o.
受容体	$ER\alpha$	◎/antagonist ○ (20,000)	◎ (500)	↓	◎(27)	◎(27)
	$ER\beta$	○ (20,000)	◎ (100)	↓		
	AR	△*	◎ (50)	↓	○(5)	○(5)
	$TR\beta$	△*	◎ (50)**	↓		
応答 DNA 配列	$ER\alpha$ +ERE	→		◎ (300)		
	$ER\beta$ +ERE	→		◎ (30)		
	$TR\beta$ +DR4	→		△(開発中)		
	AR+ARE	→		△***		
共役因子	$ER\alpha$ +TIF-2	→		◎ (300)		
	$ER\beta$ +TIF-2	→		◎ (30)		
	$ER\alpha$ +SRC-1	→		○		
	$ER\beta$ +SRC-1	→		○		

*:アミノ酸配列に基づくシミュレーション
 **: $TR\beta$ ・ $RXR\alpha$ 共発現系
 ***:全長蛋白待ち

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。即ち、十分な事前調査により、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・回帰モデル型的手法を避け、取って、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ような化合物を『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

「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、ヒト等の哺乳動物由来培養細胞、及び CHO 細胞株を用いたレポーター遺伝子試験法を検討した。

その結果、上表「*in vitro* レポーターアッセイ」に示す各受容体系についてカッコ内の数字に示す化合物についての測定結果を得た。

ガイドライン及び評価基準の整備に関しては、自然、或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化合物に関する試験が終了している。

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。

更に、*cell-free*系の表面プラズモン共鳴による、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、①、②、③の補強データ及び評価に活用している。

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」(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)

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)