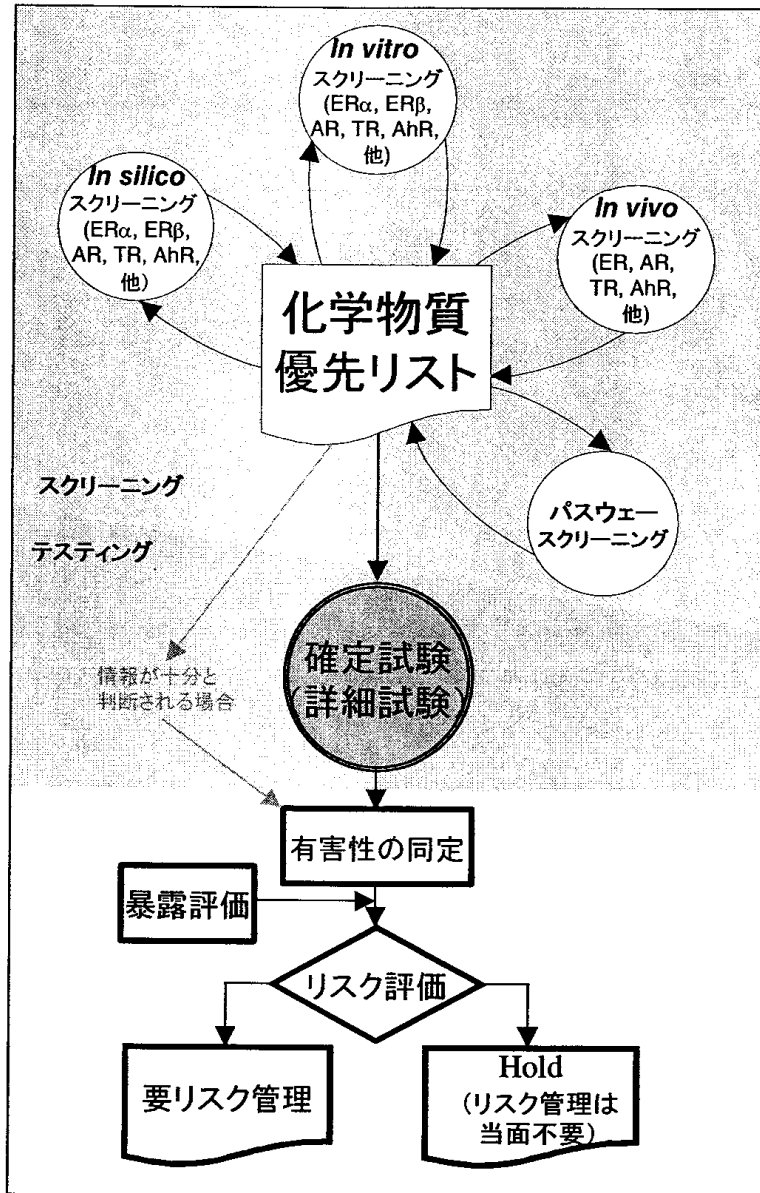


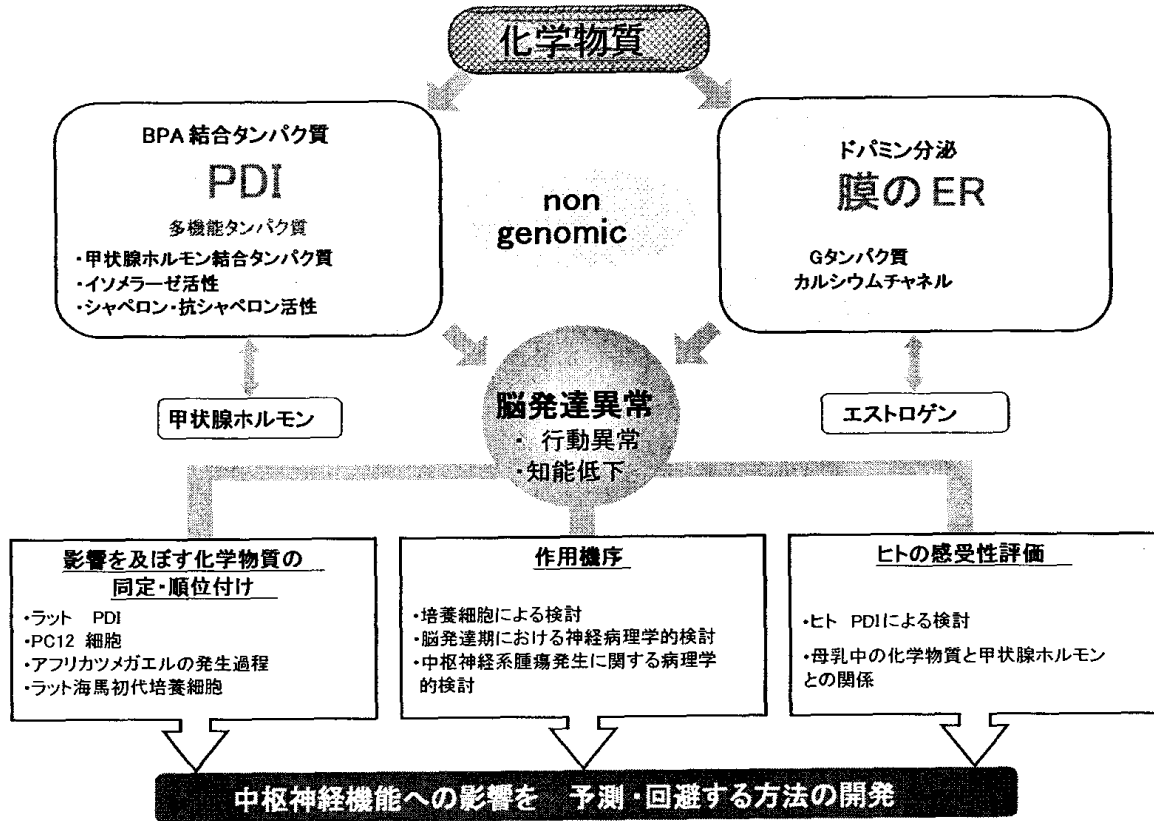
1 試験スキーム

内分泌かく乱化学物質の試験スキームについては、下図のとおり提示されたところである。ここでは、厚生労働科学研究費等によりすすめられている試験スキームに関わる研究について、概略図等を掲載した。



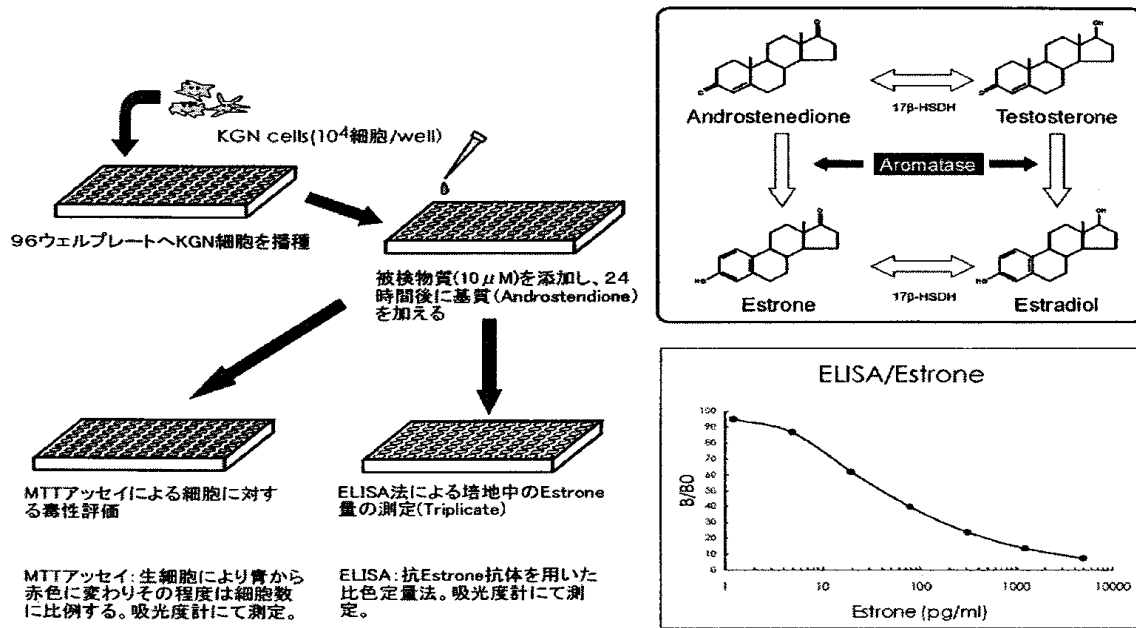
中枢神経系に影響を与える内分泌かく乱化学物質の順位付けとヒトでのリスク予測と回避法の研究

主任研究者：船江 良彦（大阪市立大学大学院医学研究科）



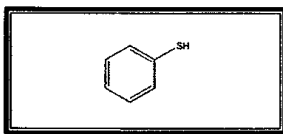
アロマターゼ高発現KGN細胞および三次元共焦点顕微鏡による内分泌代謝攪乱物質のスクリーニングシステムの開発に関する研究
主任研究者 名和田 新 (九州大学大学院医学研究院・病態制御内科)

KGN細胞を用いたELISAによるアロマターゼアッセイ法



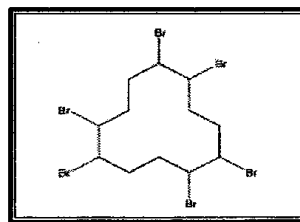
アロマターゼ活性を抑制する化学物質

74. Thiophenol



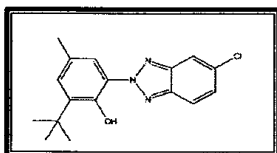
医薬品・農業用原料、有機合成中間体、重合防止剤、酸化防止剤、ゴム素練促進剤に使用。

93. Hexabromocyclododecane



臭素系難燃剤。熱安定性に優れ各種合成樹脂、合成ゴム、合成繊維に添加し、難燃剤、防火剤として使用。

88. Bumetrizole

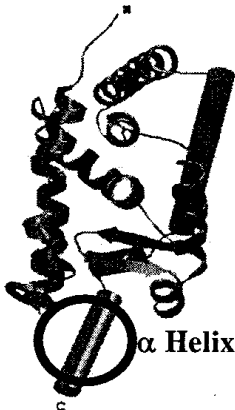


ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤。
プラスチック・合成繊維の耐候性改良、食品や医療品などの容器、包装剤に使用し内容物を紫外線から保護する。日焼け止め化粧品、シャンプーの分離防止、UVカットフィルムに使用される。

環境ホルモン受容体センシング法による内分泌かく乱性の順位予測

主任研究者 下東 康幸 (九州大学大学院理学研究院)

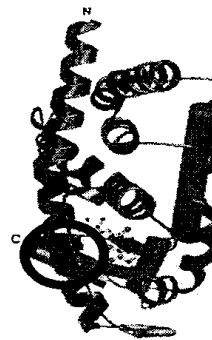
核内受容体リガンド結合ドメインの構造



リガンド非結合
アポ型

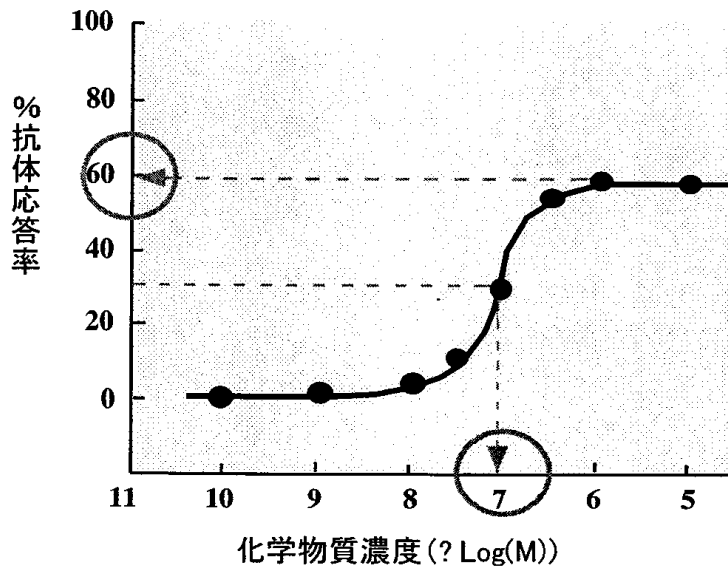


リガンド結合
ホロ型



アンタゴニスト結合
ホロ型

コンホメーション変化センシングアッセイの解析法

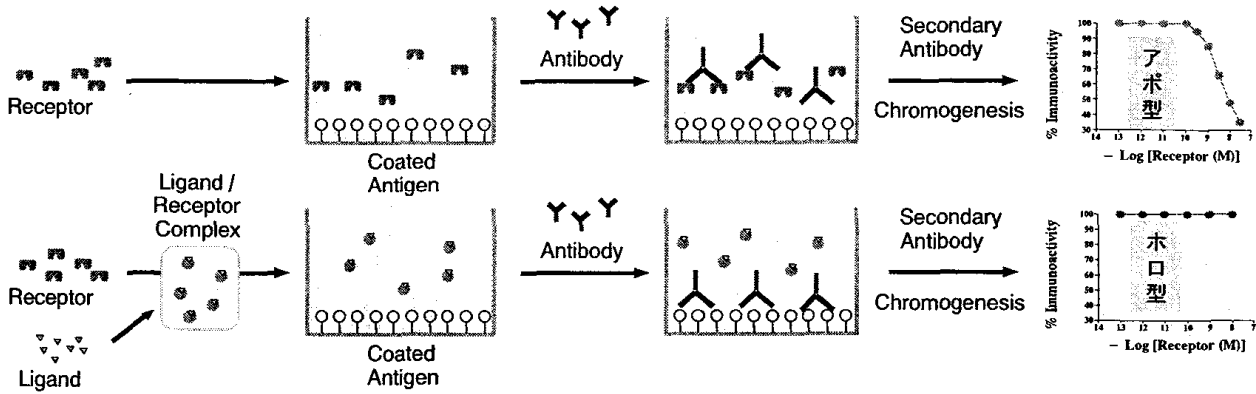


解析パラメータ

最大抗体応答性 R_{max} (%)

抗体応答有効濃度 EC_{50} (M)

競合ELISA法を用いた核内受容体コンホメーション変化センシングアッセイ



ヒト・ゲノムより解析された核内受容体48種類

TR α	TR β	RAR α	RAR β	PPAR α	PPAR β	PPAR γ	Rev-erb α
Rev-erb β	ROR α	ROR β	ROR γ	LXR α	LXR β	FXR	FXR β
VDR	PXR	CAR	HNF4 α	HNF4 γ	RXR α	RXR β	RXR γ
TR2	TR4	TLL	PNR	COUP α	COUP β	EAR2	GR
ER α	ER β	ERR α	ERR β	ERR γ	MR	PR	AR
NGFIB	NURR1	NOR1	SF1	LRH1	GCNF1	SHP	DAX

赤字で示す核内受容体は既にクローニングが完了したもの。

結果の例

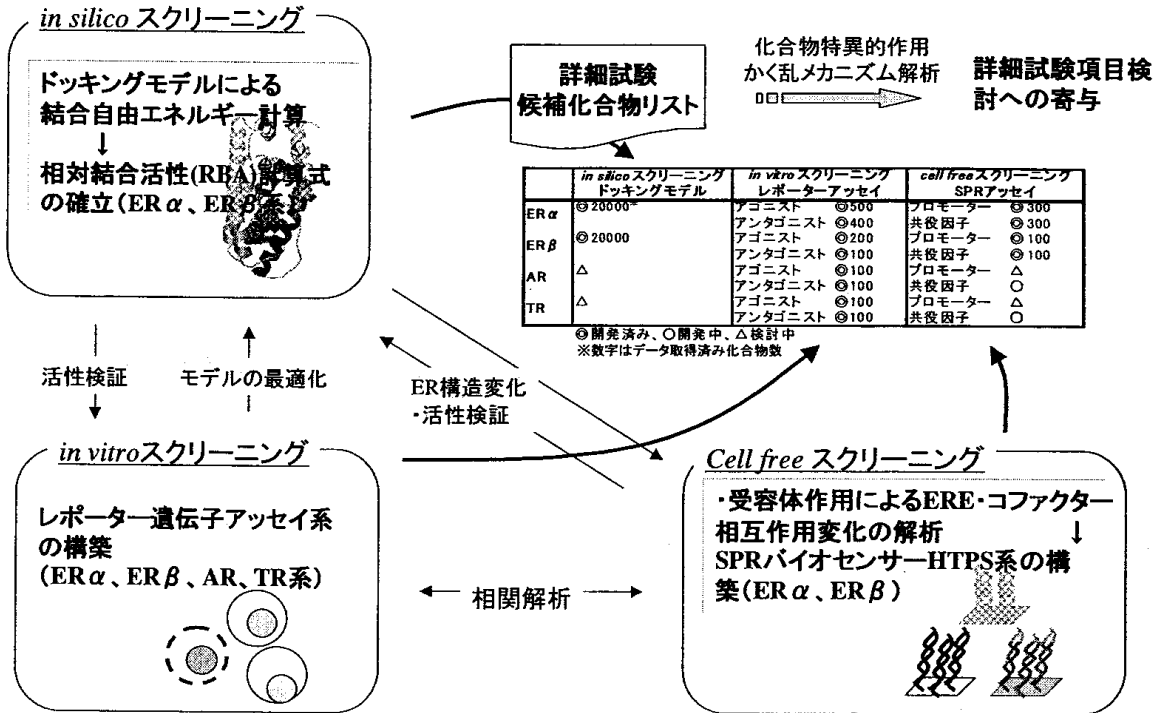
表. エストロゲン受容体センシング抗体アッセイの結果

順位	化合物名	抗体応答有効濃度 (nM)	最大抗体応答性 (%)	順位	化合物名	抗体応答有効濃度 (nM)	最大抗体応答性 (%)
1	Diethylstilbestrol Dipropionate	1.03	41.0	33	Estriol 3-methylether	269	79.7
2	Estrone	4.88	38.0	34	Nafoxidine	273	34.0
3	Hexestrol	10.1	54.0	35	17 α -Ethynelestadiol-3-cyclopentaether	274	97.3
4	17-Epiestriol	11.6	102	36	Daidzein	324	38.0
5	Estriol	13.0	113	37	2, 4, 4'-Trihydroxybenzophenone	329	64.9
6	Diethylstibestrol	13.5	79.0	38	5 α -Dihydrotestosterone	363	77.0
7	16-Ketoestradiol	14.9	64.4	39	Norethindrone	490	77.7
8	16 α -Hydroxyestrone	16.9	63.6	40	β -Zearalanol	506	47.0
9	Ethynyl estradiol	17.1	91.0	41	Isoliquiritigenin	555	42.1
10	Diethylstilbestrol	22.9	74.1	42	4, 4'-Dihydroxydiphenyl	565	65.1
11	17 β -Estradiol	23.1	100	43	2, 2-Bis (4-hydroxyphenyl)-4-methyl-n-pentane	608	12.0
12	6 β -Hydroxyestradiol-17	23.3	42.0	44	4, 4'-Dihydroxybenzophenone	610	56.9
13	6-Ketoestradiol	27.2	73.0	45	6-hydroxy-2-naphthylidisulfide	716	37.0
14	β -Zearalanol	28.3	43.0	46	<i>p</i> -naphtholbenzein	833	42.0
15	Mestranol	29.2	82.0	47	6-hydroxyflavanone	969	43.0
16	α -Zearalanol	30.1	61.0	48	3', 4', 7-Trihydroxyisoflavone	1040	45.3
17	17 α -Estradiol	10.1	54.0	49	2, 3, 4, 4'-Tetrahydroxybenzophenone	1190	48.2
18	Dehydrostilbestrol	32.9	61.0	50	β -Estradiol-3-benzoate	1250	89.4
19	Coumestrol	35.8	61.0	51	Kaempferol	1280	50.6
20	6 α -Hydroxyestradiol	42.3	73.0	52	Norethynodrel	1360	109
21	Equilin	48.3	50.1	53	4-Cyclohexylphenol	1420	33.0
22	Estrone 3-hemisuccinate	54.6	31.9	54	6-Benzoyl-2-naphthol	2050	10.6
23	2-Methoxy- β -estradiol	67.4	80.7	55	Nonylphenol	2470	30.0
24	4-Hydroxyestradiol	81.0	85.0	56	6-Ketoestradiol-6-(<i>o</i> -carboxymethyl)oxime	3310	104
25	2-Hydroxyestriol	94.3	91.0	57	Levonorgestrel	3610	52.9
26	Estrone acetate	106	38.2	58	2, 2-Bis (4-hydroxy-3-methylphenyl) propane	4080	78.0
27	5 α -androstane-3 β , 17 β -diol	107	92.0	59	Benzyl-4-hydroxybenzoate	7660	112
28	2-Hydroxyestradiol	144	88.0	60	Triphenylethylene	8090	58.0
29	Genistein	175	56.0	61	4, 4'-Dihydroxydiphenylmethane	55400	44.0
30	4, 4'-Dihydroxytetraphenyl methane	177	41.0	62	4, 4'-Thiobis-naphenol	133000	48.0
31	4-(1-Adamantyl) phenol	194	51.0		4-Octylphenol		
32	4, 4'-Thiobis-naphenol	241	58.9				

順位は抗体応答有効濃度 EC₅₀ (M) に基づいて付けた。

内分泌かく乱化学物質の作用機構に焦点を当てたハイ・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

主任研究者 菅野 純 (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)



詳細試験
候補化合物リスト

化合物特異的作用
かく乱メカニズム解析

詳細試験項目検討への寄与

	<i>in silico</i> スクリーニング ドッキングモデル	<i>in vitro</i> スクリーニング レポーターアッセイ	<i>cell free</i> スクリーニング SPRアッセイ
ER α	◎20000	アゴニスト ◎500 アンタゴニスト ◎400	プロモーター ◎300 共役因子 ◎300
ER β	◎20000	アゴニスト ◎200 アンタゴニスト ◎100	プロモーター ◎100 共役因子 ◎100
AR	△	アゴニスト ◎100 アンタゴニスト ◎100	プロモーター △ 共役因子 ○
TR	△	アゴニスト ◎100 アンタゴニスト ◎100	プロモーター △ 共役因子 ○

◎開発済み、○開発中、△検討中
※数字はデータ取得済み化合物数

成果の概要

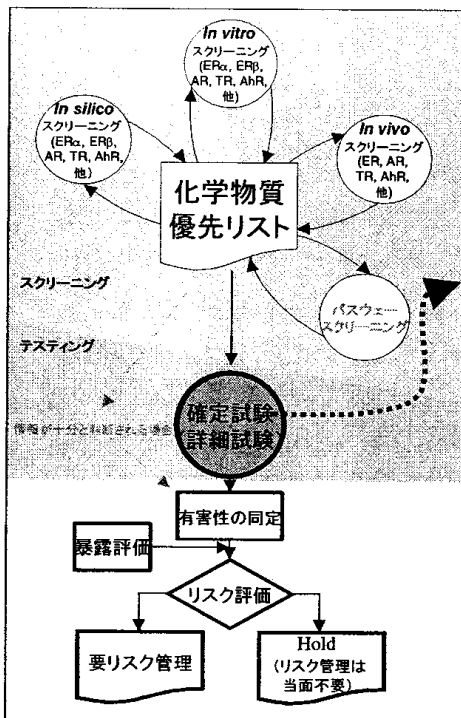
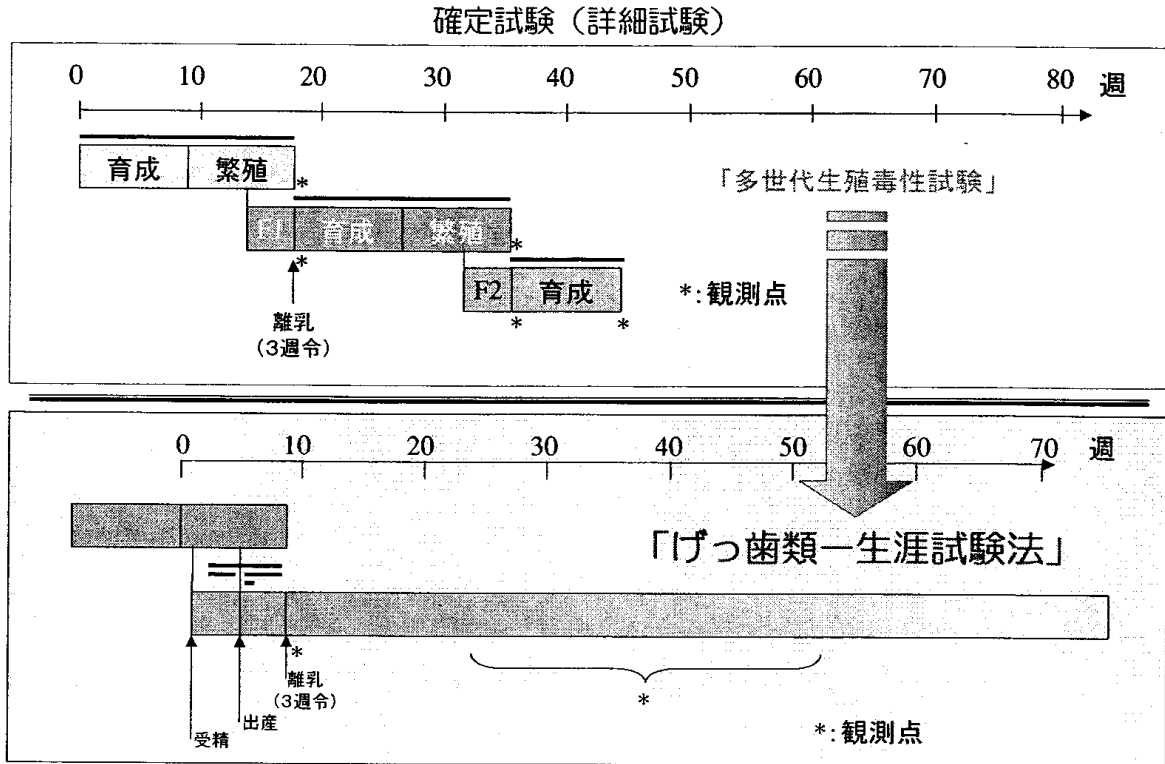
		<i>in silico</i> バーチャル スクリーニング	<i>in vitro</i> * レポーター アッセイ	SPR (<i>cell-free</i>)	<i>in vivo</i> 試験* (UT & Hersh)	
					s.c.	p.o.
受容体	ER α	◎/antagnist ○ (200,000)	◎ (500)	↓	◎(27)	◎(27)
	ER β	○ (200,000)	◎ (100)	↓	○(5)	○(5)
	AR	△*	◎ (50)	↓		
	TR β	△*	◎ (50)**	↓		
応答 DNA 配列	ER α + ERE	→		◎ (300)		
	ER β + ERE	→		◎ (30)		
	TR β + DR4	→		△ (開発中)		
	AR + ARE	→		△***		
共役 因子	ER α + TIF-2	→		◎ (300)		
	ER β + TIF-2	→		◎ (30)		
	ER α + SRC-1	→		○		
	ER β + SRC-1	→		○		

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

*ただし、上記には 多省庁間「実験者レベル会合」に基づいた共同研究部分・調整部分は含んでいない(重複を避けて計画されている)

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

主任研究者 小野 宏 ((財) 食品薬品安全センター 秦野研究所)



確定試験 (詳細試験) 開発研究

【内分泌かく乱性確定試験開発 (げっ歯類一生涯試験)】

- 1) 神経・行動
 - ・妊娠期・授乳期暴露による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
 - ・脳の性分化への影響
- 2) 免疫
 - ・免疫異常に及ぼす影響
- 3) 内分泌 (生殖器発達・老化等)
 - ・雄性生殖器発達及びその機能に及ぼす影響
 - ・胎生期・新生児期暴露が雌性生殖器に与える影響
 - ・生殖器系の老化に至る過程に対する影響
- 4) 内分泌かく乱性確定試験開発支援基礎研究
 - ・確定試験に関わる発がん性検討: 乳腺上皮系
 - ・確定試験に関わる核内受容体転写活性迅速確認系構築
 - ・多分化能修飾メカニズムとしてのES細胞分化増殖影響解析
 - ・生殖器制御メカニズムに基づいた内分泌かく乱作用点解析
 - ・神経系形成・発達メカニズムに基づいた内分泌かく乱作用点