

課題４．メダカアンドロジェン受容体結合性試験の確立

代表研究者：中井 誠

(財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所)

【ExTEND2005 との対応】

環境省は、生態系への内分泌かく乱作用による影響の評価手法として、魚類（メダカ）を用いた試験を実施してきている。これまでの SPEED'98 に基づく取組では、女性ホルモン様作用の検出が中心であった。しかし、今後は女性ホルモン様作用以外の内分泌かく乱作用についても視野に入れて取組を進める必要がある。OECD（経済開発協力機構）においても、男性ホルモン様作用や酵素阻害作用をもつ物質を含めた検出系の確立が課題となっており、男性ホルモン様作用による、個体レベルでの二次性徴変化が観察されている。細胞・分子レベルでの評価手法としては、女性ホルモン様作用の検出に参考となるエストロジェン受容体結合性及び遺伝子転写活性試験法は既に確立しており、男性ホルモン様作用の検出が可能な試験法の確立が、今後の課題である。

【具体的研究計画】

1) 研究の背景と目的

化学物質の内分泌かく乱作用のうち、性ホルモン受容体結合を介した下流遺伝子の転写制御は主要なメカニズムであり、化学物質の受容体結合性、あるいは、遺伝子転写活性化能は内分泌かく乱作用を評価する上で、重要な指標となっている。これまでに、メダカエストロジェン受容体（ER）に対する結合試験系および ER 結合を介した転写活性化試験系、ならびにアンドロジェン受容体（AR）結合を介した転写活性化試験系を構築した。

本年度は、アンドロジェン受容体の結合性試験系の最適化を行う。

2) 研究概要

CV-1 細胞と同様にアフリカミドリザル腎臓由来細胞であり、代謝能を有する COS 細胞を用いた結合試験系を構築し、代謝能をもった結合試験系の最適化を行う。また、細胞内における発現受容体濃度等の試験条件の設定についても検討する。さらに、CV-1 細胞についても、培養条件等のさらなる検討を行い、結合試験系への適用の可否について検討する。

メダカアンドロジェン受容体結合試験の確立

財団法人化学物質評価研究機構

中井 誠

研究の背景～国内、国際的な取組～

これまでのSPEED'98に基づく取組：
女性ホルモン様作用の検出が中心であった。しかし、今後は女性ホルモン様作用以外の内分泌かく乱作用についても視野に入れて取組を進める必要がある。

OECD (経済開発協力機構) の取組：
分子レベルでの作用メカニズム解明 (レベル2に位置)
女性ホルモン様作用、男性ホルモン様作用、ステロイドホルモン合成酵素阻害作用をもつ物質を含めた *in vitro* 検出系の確立が課題

研究の背景 ~ *in vitro*試験の重要性 ~

受容体結合試験などの*in vitro*試験と、*in vivo*試験の結果との関連性を検討し、相関と共通性等について検討することが必要
(ExTEND2005)



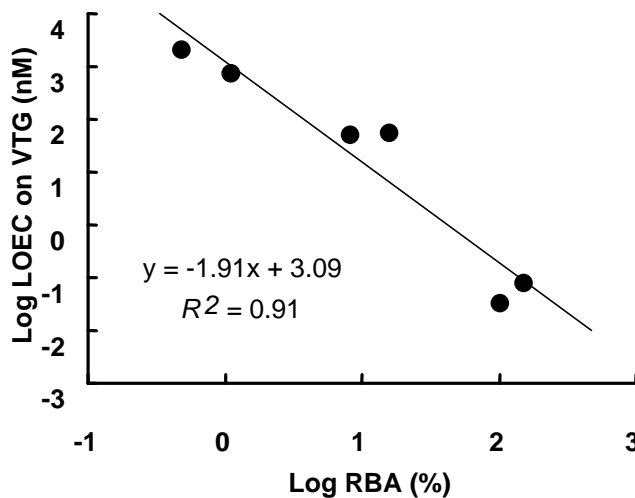
*In vitro*試験

特異的な作用メカニズムに基づいた情報



簡便で安価な*In vitro*試験の確立は重要な課題

*In vivo*試験と*in vitro*試験の関係
~ VTG誘導濃度とメダカER結合強度の関係 ~



これまでの成果と本課題の目的

個体レベルでの内分泌かく乱作用影響を評価するためには、分子・細胞レベルでの作用メカニズム解明は重要

これまでに構築したメダカ*in vitro*試験系

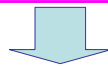
結合試験			レポーター遺伝子アッセイ アゴニスト検出系		
ER	ER	TR	ER	ER	AR

男性ホルモン様物質が魚類に対して影響 (ビテロゲン産生抑制、二次性徴変化) を引き起こすことが明らかとなっており、**アンドロジェンあるいは抗アンドロジェン作用による生態影響を作用メカニズム (受容体結合等) に基づいて評価する必要がある**

研究の背景 ~ 代謝の重要性 ~

化学物質には代謝物が**アンドロジェン受容体**に対して活性を持つものが存在

個体レベルの評価・生体への外挿には**代謝物の評価が重要**

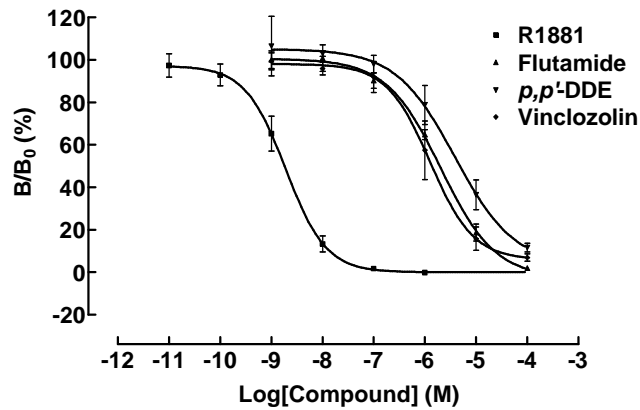


培養細胞を用いた結合試験のメリット

- ・生細胞を使用することで、細胞内のBasalな代謝能を利用することが可能
- ・無細胞系結合試験では困難であったS9等による代謝処理が容易

昨年度の成果

メダカARを用いたアンタゴニストの結合試験
 トレーサー ${}^3\text{H}$ R1881
 細胞 HeLa



Vinclozolin > Flutamide > p,p'-DDE

昨年度の成果 ~ メダカER試験系との比較 ~

試験化学物質	結合試験 (E2に対する相対結合強度)		レポーター遺伝子アッセイ アゴニスト検出系		
	ER	ER	ER	ER	AR
Flutamide	Negative ^a	Negative	Negative	Negative	Negative
p,p'-DDE	0.034	0.012	N.D. ^b	N.D.	Negative
Vinclozolin	Negative	Negative	Negative	Negative	N.D.

ER結合試験、レポーター遺伝子アッセイでは不検出



AR結合性 :Vinclozolin > Flutamide > p,p'-DDE



AR結合試験を実施することでいずれも検出可能

本年度の研究計画

代謝産物の評価



- 細胞内のBasalな代謝能の利用
COS細胞を用いた競争結合試験系の構築
と試験条件の至適化
CV-1細胞の適用可否の検討
- S9等による代謝処理
S9処理化学物質の結合性評価系の構築

