

報 文

表面プラズモン共鳴センサーを用いる内分泌攪乱化学物質
スクリーニング法浅野 和信^{®*}, 小野 敦^{**}, 橋本せつ子^{*}, 井上 達^{**}, 菅野 純^{**}Screening method of endocrine disrupting chemicals using
a surface plasmon resonance sensorKazunobu ASANO^{*}, Atsushi ONO^{**}, Setsuko HASHIMOTO^{*},
Tohru INOUE and Jun KANNO^{**}^{*}Business Development, Biacore K.K., Koyo Bldg. 5F, 2-9-5, Shiba-koen, Minato-ku, Tokyo 105-0011^{**}Division of Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501

(Received 23 January 2002, Accepted 5 March 2002)

Because concern over endocrine disrupting reactions caused by chemicals to human and animals is growing, a rapid and reliable screening assay for endocrine disrupting chemicals is required. We have developed an in vitro screening assay based on a hormone receptor mechanism using a surface plasmon resonance (SPR) sensor. When a DNA fragment containing a sequence of the estrogen response element (ERE) is immobilized on a sensor chip of a SPR sensor and an estrogen receptor α (ER) is injected over the sensor chip, the interaction of ER and ERE can be monitored in real time. In the presence of a chemical with estrogenic activity, the ER-ERE interaction is enhanced and the kinetic parameters are altered. We have validated the assay in terms of its specificity, dose dependency, optimal reaction conditions and reproducibility. It has been shown that the assay is very reliable as a rapid and quantitative screening method to judge the estrogenic activities of chemicals.

Keywords : estrogen receptor; estrogen response element; endocrine disrupting chemical; screening assay; surface plasmon resonance; SPR sensor.

1 緒 言

近年、有機塩素系農薬、プラスチック容器の可塑剤、洗剤中の界面活性剤などの様々な化学物質が、ヒトや野生動物において内分泌攪乱作用による障害を引き起こしていると懸念されている¹⁾。それらの多くはエストロゲンをはじめとしたホルモンレセプターと直接相互作用することで、本来のホルモン作用を修飾もしくは阻害し、内分泌攪乱を引き起こすと指摘されている²⁾。

化学物質の安全性については、発がん性、催奇形性、変

異原性、繁殖試験などが重要な指標とされているが、慢性的な毒性を評価する場合には、従来の指標のみで評価することは困難である。更に内分泌攪乱化学物質については、現在のところ毒性メカニズムについても未解明な点も多く、その評価方法が確立されていないのが現状である³⁾。日常使用されている多岐にわたる化学物質が、ホルモン様作用を示す例が報告されており、数万種類に及ぶ化学物質について、迅速に内分泌攪乱性を評価する試験法が求められている。

化学物質のホルモンレセプターを介した作用を検出する方法として、これまでにレセプターへの競合結合試験や、エストロゲンレセプターを発現する乳がん細胞 (MCF7) の増殖を指標とする細胞アッセイ系⁴⁾や、エストロゲンに反応するレポーター遺伝子を組み込んだ細胞によるアッセ

^{*} ビアコア(株)開発部: 105-0011 東京都港区芝公園 2-9-5 向陽ビル 5 階

^{**} 国立医薬品食品衛生研究所毒性部: 158-8501 東京都世田谷区上野 1-18-1

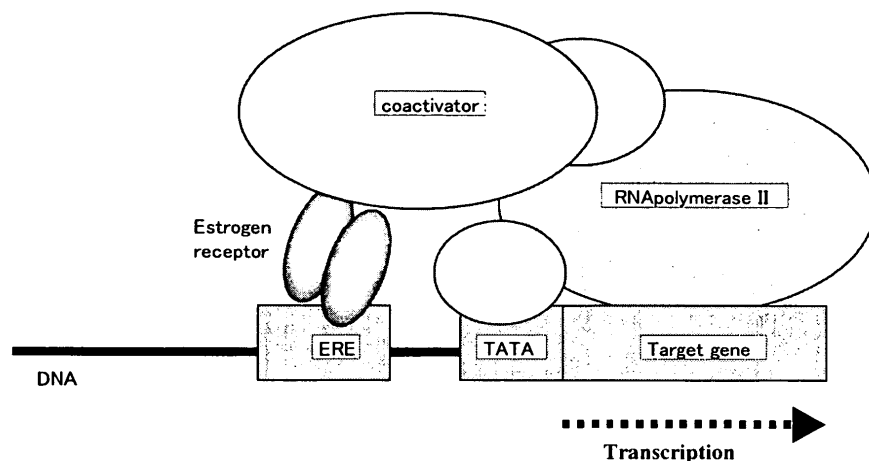


Fig. 1 Functional mechanism of estrogen receptor in gene regulation

イ系⁵⁾, また *in vivo* アッセイとして子宮肥大試験⁶⁾⁷⁾や, メダカのビテロジェニンアッセイ等が検討されている⁸⁾. しかし, これらの試験法は長い時間を要するものが多い点や, 実験動物にそれらの化学物質を投与しても, 生体本来の恒常性維持などにより, 障害を検出できないことも多い. このように, ある化学物質にホルモン様作用があっても, それのみで障害性としてとらえることは困難である. また, これまでの毒性評価手法は, フィードバック機構を持つ系や, 受容体を介した障害などについての解析経験が乏しく, また核内受容体シグナルのネットワーク機構についての知見も未知の点が少なくない. したがって化学物質の内分泌攪乱性の評価・判定には, 異なるアプローチが要求されており, 迅速かつ信頼性の高いスクリーニング法の開発が必要とされている.

ホルモンレセプターはリガンド依存性転写因子である. 例えばエストロゲンレセプターは, 内在性リガンドであるエストロゲンの結合によりレセプター立体構造が変化して, 標的遺伝子上流の応答配列 DNA に結合して, 支配下にある遺伝子転写を活性化する (Fig. 1). これまで報告されているエストロゲン様作用物質の構造の多様さからは, そのすべてがエストロゲンと全く同じ作用をレセプターに引き起こすとは考えにくく, それぞれは微妙に異なる遺伝子発現制御を引き起こすと想定される⁹⁾.

近年, 表面プラズモン共鳴センサーが新たな解析装置として注目されている¹⁰⁾. この装置は非標識で, リアルタイムに分子間の相互作用を測定できるという特徴を持っているために, 高速スクリーニングアッセイを行うのに適している. また, 単に結合量のみを測定対象とするほかの系と異なり, 相互作用における結合・解離過程を詳細に検討することで, 相互作用する分子の微妙な構造変化を推察することができる.

著者らはこの表面プラズモン共鳴 (surface plasmon res-

onance, SPR) センサーを用いた内分泌攪乱化学物質高速スクリーニング法として, ホルモンレセプターの作用機構に焦点をあてた cell free 系スクリーニング法を構築した.

SPR センサーを用いて生体分子の相互作用を分子レベルで測定するには, 対象となる生体分子の一方をセンサーチップと呼ばれる表面に固定化し, これに作用する分子を含む試料を, マイクロ流路系を介して一定流量で送液する. 2 分子間の結合, 解離に伴うセンサーチップ表面での微量な質量変化を, SPR シグナルとして検出し, このシグナルの経時変化をセンサーグラムと呼ぶグラフとして表示する. したがって, 従来法と異なり分子を標識することなく, 少量の試料を用いて短時間で相互作用の測定が可能である. 更に, 生体分子間の相互作用に関して, 平衡状態における 2 分子間の親和性 (解離定数: K_D あるいは親和定数: K_A) だけではなく, 結合・解離反応の速さに関する情報, すなわち結合速度定数 (k_a), 及び解離速度定数 (k_d) を得ることができるという特徴を持っている.

SPR センサーを用いて, センサーチップ上にエストロゲン応答遺伝子のプロモーター領域のホルモン応答配列 DNA (ERE) を固定化し, 精製したエストロゲンレセプター α (ER) を添加することで, ER と ERE の相互作用¹¹⁾ を非標識でリアルタイムに測定することができる (Fig. 2).

この試験法を検証し, 30 種類の化学物質についてエストロゲン様作用の有無を評価した.

2 実 験

2.1 試薬及び装置

2.1.1 試薬 測定用緩衝液に用いたトリシン, 塩化カリウム, 塩化マグネシウム, 水酸化カリウム, Tween 20 はナカライテスク製 (試薬特級), ジメチルスルホキシド (DMSO) は Sigma 製, 再生用試薬に用いた水酸化ナ

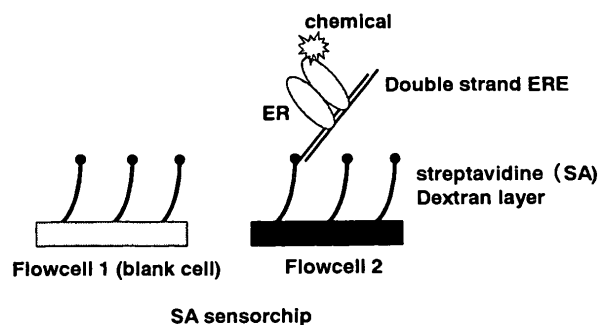


Fig. 2 Scheme of ER-ERE assay with SPR sensor

トリウム (NaOH), 塩酸 (HCl) はナカライテスク製 (試薬特級) を用いた。エストロゲンレセプター (ER) は PanVera 製, ビテロジェニン遺伝子の ERE 配列を含む 5' をビオチン化した 34 mer の合成オリゴマー (5'-biotin-tcgagcaaagtcaggtcacagtgcacgtgatcaat-3') 及びその相補鎖は日清紡製を用いた。ER は非常に不安定な分子なので, 1 回のアッセイに必要な量 (6 μ l) を分注して -80°C で保存して, アッセイの度に 1 本ずつ取り出して実験に用いた。また, 合成オリゴマーは MilliQ で 1 mg/ml に希釈して, 使用時まで -20°C で保存した。測定緩衝液は, 25 mM トリシン, 160 mM 塩化カリウム, 5 mM 塩化マグネシウムの組成で, 8 M 水酸化カリウムを用いて pH 7.8 に調製した後にフィルター通過及び脱気を行い, 最後に 0.05% Tween 20 になるように調製を行った。

2.1.2 装置 測定にはピアコア製 Biacore[®]3000, 東京理化学器械製ヒートブロック, 井内盛栄堂製恒温循環装置を用いた。センサーチップにはピアコア製で, ストレプトアビジンを固定化したセンサーチップ SA を用いた。また, Biacore3000 本体には恒温循環装置を外部接続して, 本体内のサンプルラックを 4°C に保ち, 本体の反応検出部は 25°C に温度設定して測定を行った。

2.2 操 作

2.2.1 ビオチン化合成オリゴマーの固定化 ビオチン化 ERE を固定化するために, まずストレプトアビジン (SA) が既に固定化されているセンサーチップ SA を Biacore3000 本体にセットして, 測定用緩衝液を用いてシステム全体の平衡化を行った。約 7 分の平衡化後, ベースラインの安定性を得るために, 実際の測定で用いる 2 種類の再生溶液である 100 mM NaOH, 50 mM HCl をそれぞれ 30 秒間, 5 回ずつ添加してベースラインが安定したことを確認した後に, ビオチン化 ERE の固定を行った。まず, 1 mg/ml のビオチン化 ERE を測定用緩衝液で 10 万倍に希釈して, その 100 μ l を沸騰水中で 5 分間加熱した後, 急冷し直鎖化を行った。これをサンプルラックにセットし, 結合量を観察しながらセンサーチップに約 60 レ

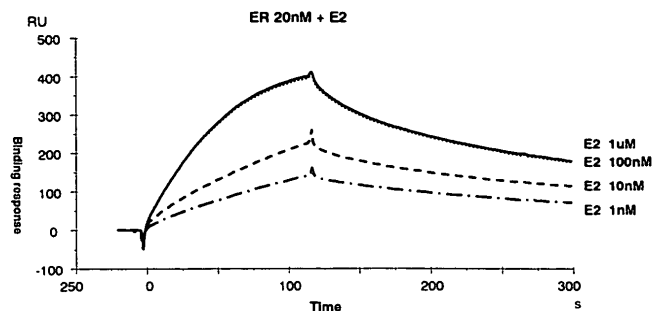


Fig. 3 Dose dependent responses of E2

ゾナンスユニット (RU) 固定した。次に, 1 mg/ml の相補鎖 ERE を測定用緩衝液で 100 倍に希釈して, ビオチン化 ERE と同様に直鎖化処理を施した後に, ビオチン化 ERE を固定化したフローセルに 2 分間添加し, 二重鎖 ERE を形成した。その後, ビオチン化 ERE が結合していないストレプトアビジンをブロックングするために, 1 μ g/ml のビオチンを 30 秒間 2 回添加した後に, 再度 100 mM NaOH, 50 mM HCl をそれぞれ 30 秒間 3 回ずつ添加して, 相補鎖 ERE を解離させて, センサー表面のコンディショニングを行った。また, 別のフローセル一つを空試験セルとして用いるために, ERE 固定化フローセルの作製法と同様にコンディショニングを行い, ビオチンのみを固定化したフローセルを作製した。

2.2.2 測定対象の化学物質の調製 各化学物質を 0.1 M となるように 100% DMSO に溶解して, これをストック溶液とした。このストック溶液を 10 倍ずつ 5 段階 (0.00001 ~ 0.01 M) に DMSO で希釈し, ガラスバイアルに入れ, -80°C で使用時まで保存した。測定直前に, 各濃度の 100% DMSO 溶液 1 μ l を 4°C に冷やした測定用緩衝液で 500 倍に希釈し, 分注保冷した ER は測定用緩衝液で 40 nM になるように希釈して, 各濃度の化合物溶液と 50 μ l の等量を混和して, ER は終濃度 20 nM, 化合物は 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M になるように調製した。このとき, ER の活性を保つために穏やかに混和し, 全試料の調製が終了するまで 4°C に冷やしたサンプルラック中に静置した。また, 測定のポジティブコントロールとして, ER の内在性リガンドである 17β -エストラジオールを用いた。 17β -エストラジオールの濃度を 1 nM から 1 μ M まで 10 倍ごとに調製して, ER-ERE の結合反応を観察した (Fig. 3)。100 nM 以上では結合活性は同等であったので, 測定においては 100 nM の 17β -エストラジオールを用いた。また, ネガティブコントロールは化学物質を含まない試料を調製した。測定試料は調製後, 37°C のヒートブロックで 5 分間加熱を行った後に, 冷却したサンプルラックにセットした。

2.2.3 ER と ERE の結合反応 2.2.2 のサンプルを,

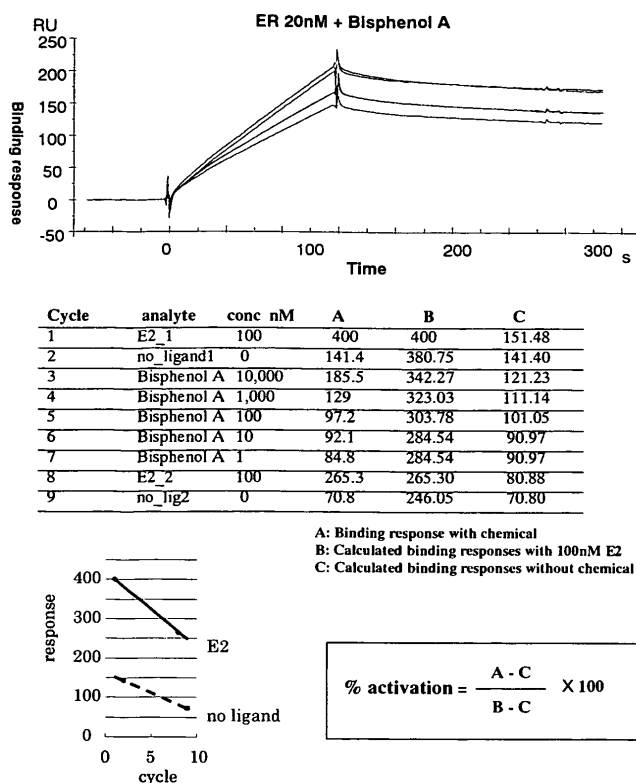


Fig. 4 Data evaluation of chemical screening

ERE を固定化したフローセル及び空試験セルに流量 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ で 2 分間添加して、解離についても 2 分間データを測定した。この際、kinject コマンドを使用した。結合及び解離について反応を測定した後に、100 mM NaOH を 30 秒間添加し、続いて 50 mM HCl を 30 秒間添加してセンサー表面を再生した。試料を変えてこの測定を連続的に行った。

2.3 データ評価

測定は各化学物質ごとに化学物質を加えないサンプルをネガティブコントロール、100 nM 17β -エストラジオールを加えたサンプルをポジティブコントロールとして測定し、 17β -エストラジオール存在下での ER の ERE への結合量との比を求め、反応性の違いを比較した。しかし、ER は非常に不安定な分子であり、活性を安定化させるために測定条件の検討を行ったが、複数の試料を連続して測定している間に、ERE への結合活性が経時的に低下してしまう。そこで、ER の結合活性を求めるために、ER の活性の経時変化の影響を補正した。各化学物質のアッセイの始めと終わりに、 17β -エストラジオール 100 nM を加えたポジティブコントロールと、化学物質を加えないネガティブコントロールをそれぞれ測定し、このアッセイで得られた結合量から、試料ごとの ER 結合活性のサイクルごとの低下率をポジティブコントロール、ネガティブコントロ

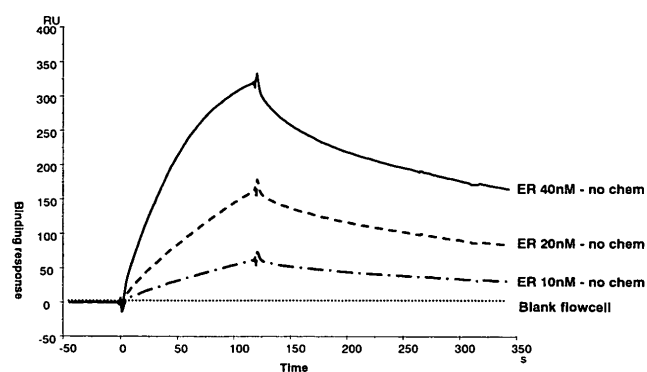


Fig. 5 Dose dependent responses of ER-1

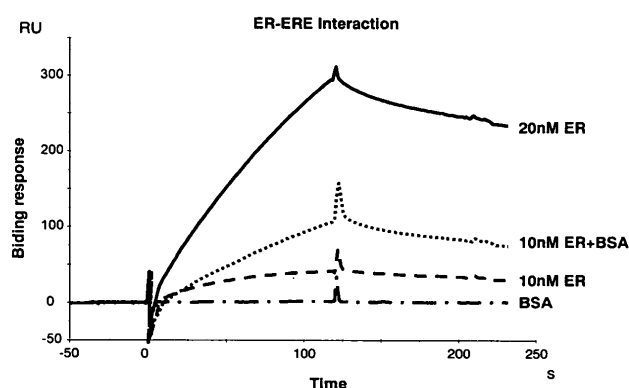


Fig. 6 Dose dependent responses of ER-2

ールそれぞれの系で求め、これから各サイクルでのポジティブコントロール及びネガティブコントロールの推定結合量を算出した (Fig. 4)。また、各化学物質の ER 結合促進能は、 17β -エストラジオール 100 nM 存在下での ER の結合量との比、相対的な活性化度 (%activation) として表現した。すなわち、Fig. 4 の方法で経時変化を補正した結合量から計算式を用いて求めた。

3 結 果

3.1 Biacore を用いた ER-ERE アッセイ系の有意性の検証

Biacore のアッセイ系の有意性を確認するために、化学物質を添加しない条件で ER の濃度を変えて ER と ERE の結合量を観察した。ER の濃度依存的に結合量は増加し、一方 ERE を結合させていないフローセルでは、ER の結合は全く見られなかった (Fig. 5)。

更に 1 μM の BSA を注入しても ERE には全く結合は見られなかった (Fig. 6)。このことから、このアッセイでは ER の ERE 特異的な結合を観察していることが示された。ER 10, 20, 40 nM での結合量を比較すると、10 nM では結合量が相対的に低く出ることが多い。1 μM BSA を

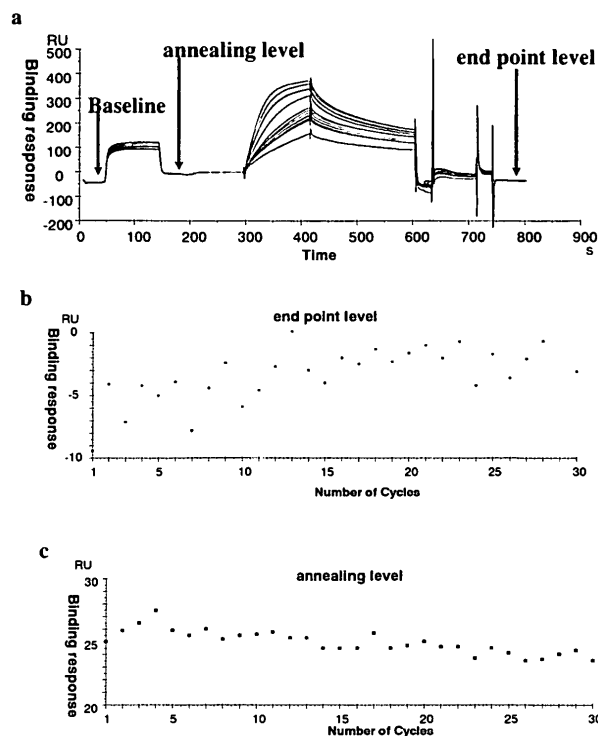


Fig. 7 Reproducibility of ER-ERE assay

添加して測定したところ, 10 nM で ER 結合量の増加が見られた。これは 10 nM ではタンパク濃度が低いために, 試料調製中に ER がプラスチックバイアル, チップ等へ吸着してしまい, 実際には所定の濃度の ER がセンサーチップ表面に送液されていないことが原因と考えられる。

これらの結果をもとに, 以後の実験はすべて ER 終濃度 20 nM で行った。

Biacore を用いたアッセイ系において再現性を向上させるためには, 測定ごとにセンサー表面を再生することが重要である。今回, アッセイ系の再現性を検証するために 30 サイクル連続で測定を行い (Fig. 7, a), 各サイクルごとのベースラインの変動値を求めた結果 (Fig. 7, b), センサー表面は再現性高く再生されていることが示された。30 サイクルを通じて約 4 RU 程度の値を示し, 各サイクルごとの相補鎖 ERE アニリング量についても, 30 サイクルを通じて約 25 RU で安定しており (Fig. 7, c), このアッセイ系は再現性が高いことが検証された。また, アッセイ系全体の精度についても, ポジティブコントロールとネガティブコントロールを繰り返し計 16 サイクルの測定を行った結果, Fig. 8 に示すように RSD 値は 4.68% であり, 精度についての検証結果が得られた。

3・2 化学物質 30 種類のスクリーニング結果

化学物質のスクリーニングとして, 30 種類の各化学物質ごとに 5 段階の濃度で測定し, ER の結合について濃度

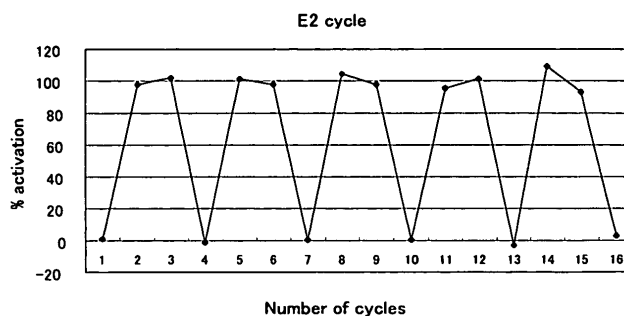


Fig. 8 Precision of ER-ERE assay

Average (% activation) 99.98, SD 4.68, RSD 4.68%

依存的な活性化作用の有無を調べた。1 サイクルのアッセイ所要時間は 15 分であり, 1 化学物質のスクリーニングはコントロールの測定も含めて 9 サイクル, 約 2 時間半で測定が行われた。

Fig. 4 の計算式を用いて 30 種類の化合物について相対的な活性化度を求めた結果, 化学物質濃度 100 nM において, E2 と比較して 50% 以上の活性化が起こる物質を高反応性物質 (high responder), 20~50% の活性化が起こる物質, あるいは 20% よりも低いがあきらかに濃度依存的に活性化が見られる物質を低反応性物質 (low responder), 活性化が 20% 以下の物質を無反応性物質 (non-responder) として分類した (Fig. 9)。2 回のスクリーニングの結果を Table 1 に示す。その結果, 30 種類の化学物質中, 28 種類の化合物において 2 回とも同じ結果が得られた。17 β -エストラジオールやその誘導体は高反応性で, 男性ホルモンでは無反応性であった。また, 環境ホルモン物質といわれているビスフェノール A は低反応性に分類され (Fig. 10), これまでの報告と一致した結果が得られた。

更に, 17 β -エストラジオール以外にこれまでに内分泌攪乱作用が指摘されている化学物質ビスフェノール A, 17 β -エストラジオール誘導体である 17 α -エストラジオール, ジエチルstilbestrol (DES), タモキシフェン, 更に男性ホルモンのプロゲステロン等では, センサーグラムの形から結合反応に違いがあることが明らかになった (Fig. 11)。一方, 全化学物質について, 1 μ M での ER 添加後の結合量と 2 分間解離反応をした後の結合量 (結合安定性) をプロットしてみると, アゴニスト, アンタゴニストで有意な差が見られた。代表的な化学物質の結果を Fig. 12 に示す。アンタゴニストの場合には, ER と ERE の結合がより安定的に保持させる作用を有することが示され, Biacore を用いた測定により化学物質のエストロゲン作用の有無だけでなく, アゴニスト・アンタゴニストを区別できる可能性が示唆された。

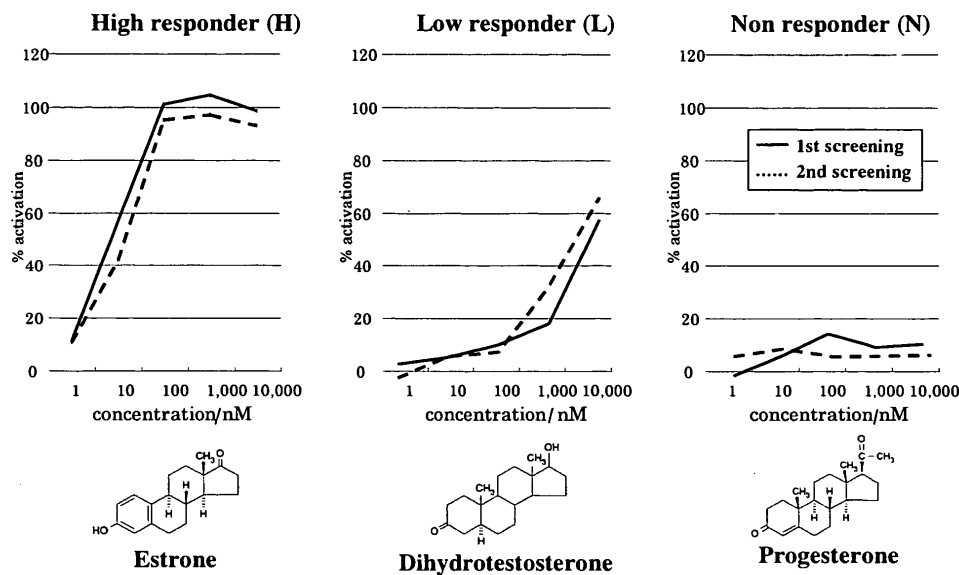


Fig. 9 Three types in chemical responses

Table 1 Result of ER-ERE screening with SPR sensor

No.	CAS No.	Name	1st screening	2nd screening
1	000050-28-2	Estradiol	H	H
2	000057-91-0	Estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol (17 α)	H	H
3	000053-16-7	Estrone	H	H
4	000057-63-6	19-Nor-17-alpha-pregna-1,3,5(10)-trien-20-yne-3,17-diol	H	H
5	000362-05-0	Estra-1,3,5(10)-triene-2,3,17-beta-triol	H	H
6	000362-07-2	Estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol, 2-methoxy-, (17 β)-	L	L
7	000068-22-4	19-Nor-17-alpha-pregn-4-en-20-yn-3-one, 17-hydroxy-	L	L
8	000063-05-8	Androst-4-ene-3,17-dione	N	N
9	000057-83-0	Progesterone	N	N
10	000501-24-6	3-Pentadecylphenol	N	N
11	005153-25-3	Benzoic acid, 4-hydroxy-, 2-ethylhexyl ester	N	L
12	001034-01-1	Gallic acid, octyl ester	N	N
13	006807-17-6	4,4'-(1,3-Dimethylbutylidene)bisphenol	L	L
14	027955-94-8	Phenol, 4,4',4''-ethylidynetri-	N	N
15	000081-92-5	Benzenemethanol, 2-[bis(4-hydroxyphenyl)methyl]-	L	L
16	000081-90-3	<i>o</i> -Toluic acid, .alpha.,.alpha.-bis(p-hydroxyphenyl)-	N	N
17	000978-86-9	4-(Triphenylmethyl)phenol	L	L
18	062625-31-4	Phenol, 4,4'-(3H-1,2-benzoxathiol-3-ylidene)bis 3-methyl-, S,S-dioxide, monosod	N	N
19	005384-21-4	Phenol, 4,4'-methylenebis[2,6-dimethyl-	L	L
20	005613-46-7	2,6-Xylenol, 4,4'-isopropylidenedi-	L	L
21	000084-16-2	Phenol, 4,4'-(1,2-diethylethylene)di-, meso-	H	H
22	000084-17-3	Phenol, 4,4'-(diethylideneethylene)di-	L	H
23	56-53-1	diethylstilbestrol	H	H
24	006893-02-3	Alanine, 3-(4-(4-hydroxy-3-iodophenoxy)-3,5-diiodophenyl)-, L-	N	N
25	000500-38-9	Nordihydroguaiaretic acid	N	N
26	023239-51-2	Benzyl alcohol, p-hydroxy-alpha-(1-((p-hydroxyphenethyl)amino)ethyl)-, hydrochlo	N	N
27	001050-28-8	L-Tyrosine, N-L-tyrosyl-	N	N
28	000145-50-6	1(4H)-Naphthalenone, 4-.alpha.-(4-hydroxy-1-naphthyl)benzylidene -	L	L
29	000446-72-0	Genistein	L	L
30	000080-05-7	Bisphenol A	L	L

H: high responder; L: low responder; N: non-responder

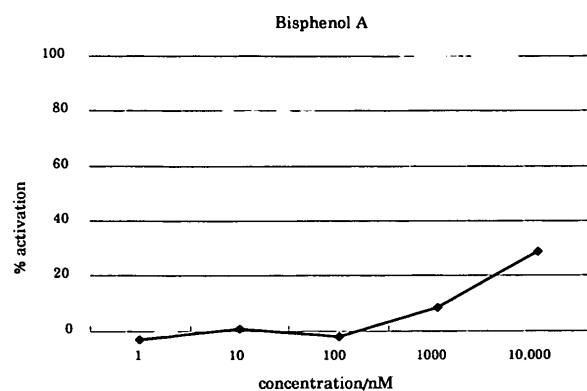


Fig. 10 Results of Bisphenol A

4 考 察

ホルモンレセプターの作用機構に焦点をあてた cell free 系スクリーニング法として, SPR 高速分析法を構築した. ER をあらかじめ様々な化学物質とインキュベートして測定を行うことにより, ER と ERE の結合反応に変化を引き起こすことが示され, ER の結合量の変化を観察することにより, 化学物質のエストロゲン様作用の有無を判定することができた. 更に, ER と ERE の相互作用の結合及び解離の ER 結合量の解析から, アゴニストとアンタゴニストが大きく異なる相互作用変化を引き起こすことが示された. 測定のエンドポイントとして, 結合量のみを指標とする従来の競合結合試験では, アゴニスト, アンタゴニストの区別は判定できなかったが, SPR センサーの特徴であるリアルタイム解析により, アゴニスト, アンタゴニストといったリガンドの作用を検討することが可能である. また, 細胞を用いた試験系では, 対象物質のレセプター以外への作用を考慮する必要があるが, 本アッセイ系では純粋なレセプターシグナル伝達系への作用のみを検討することができる. ホルモンレセプターの作用メカニズムをもとにした本スクリーニング法により, 多数の化学物質についてそのホルモン様作用を迅速にスクリーニングすることが可

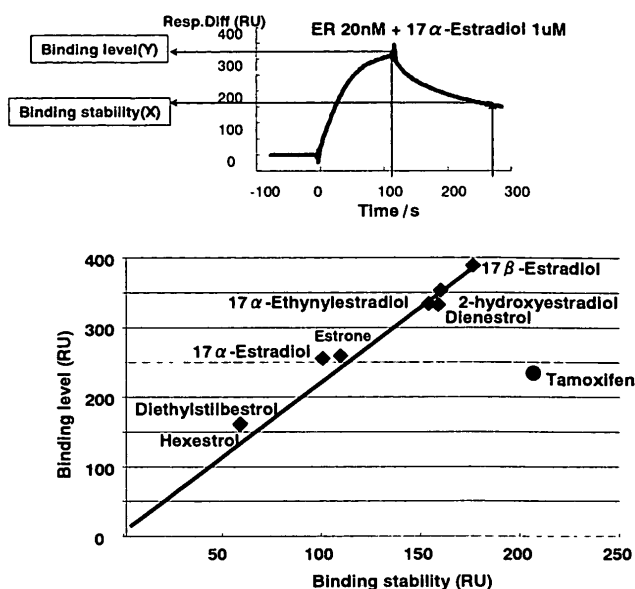


Fig. 12 Binding level vs. Binding stability plot

能である.

ER 以外のホルモンレセプターもほぼ同様のメカニズムで遺伝子転写を行っていることから, それらについて同様のアッセイ系を組むことも可能であり, 数万種類に及ぶといわれる化学物質の一次スクリーニング法として, 有効的な方法であることが示唆された.

この研究は厚生労働省厚生科学研究 (班長, 国立医薬品食品衛生研究所毒性部菅野 純) として行われた.

文 献

- 1) 環境庁環境保健部環境安全課 (監修): 環境ホルモン科学白書'99, (1999), (公害対策技術同友会).
- 2) M. Nakai, Y. Tabita, D. Asai, Y. Yakabe, T. Shinmyozu, M. Noguchi, M. Takatsuki, Y. Shimohigashi: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **254**, 311 (1999).
- 3) 厚生省: 「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会 中間報告書」, (平成 10 年 11 月).
- 4) A. M. Soto, C. Sonnenschein: *Biochem. Biophys. Res.*

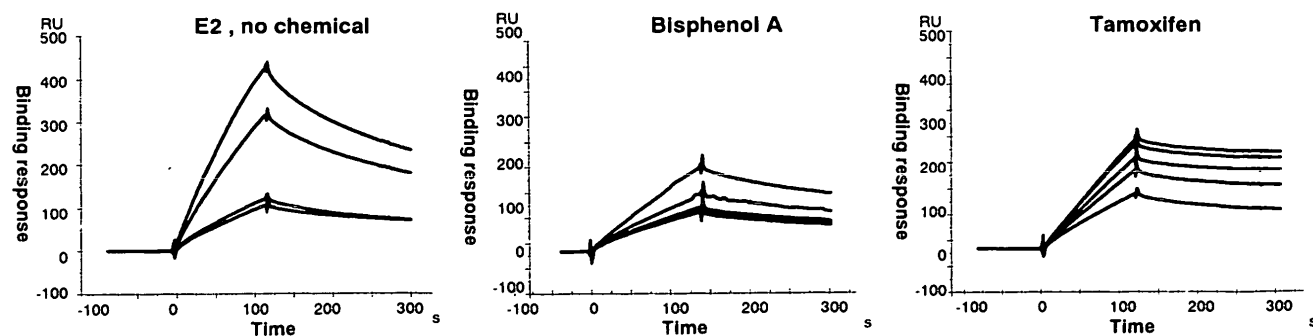


Fig. 11 Different kinetic patterns in ER-ERE interaction

- Commun.*, **122**, 1097 (1984).
- 5) M. Pons, D. Gagne, J. C. Nicolas, M. Mehtali: *BioTechniques*, **9**, 450 (1990).
- 6) J. R. Reel, I. V. J. C. Lamb, B. H. Neal: *Appl. Toxicol.*, **34**, 288 (1996).
- 7) OECD: OECD Validation Work on *in-vivo* Uterophic Screening Assay, (1999).
- 8) 井上 達 (監修): “内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法”, (2000), (シュプリンガー・フェアラーク東京).
- 9) P. Diel, T. Schulz, K. Smolnikar, E. Strunck, G. Vollmer, H. Michna: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **73**, 1 (2000).
- 10) 永田和宏・半田 宏 (共編): “生体物質相互作用のリアルタイム解析実験法”, (1998), (シュプリンガー・フェアラーク東京).
- 11) B. J. Cheskis, S. Karathanasis, C. R. Lyttle: *J. Biol. Chem.*, **272**, 11384 (1997).

要 旨

近年ヒト、野生動物の内分泌系を攪乱する化学物質の存在が懸念されており、これらの化学物質の作用機構として、内分泌系を制御する種々のホルモンレセプターと化学物質との相互作用が指摘されている。著者らは内分泌攪乱化学物質の迅速な *in vitro* スクリーニング法としてホルモンレセプターの作用機構に焦点をあてた表面プラズモン共鳴高速分析法を構築した。表面プラズモン共鳴センサーのセンサーチップ上にエストロゲンレセプターのホルモン応答配列 DNA (ERE) を固定化し、エストロゲンレセプター α (ER) を添加すると ER と ERE の相互作用を非標識でリアルタイムに測定することができる。この系で ER を様々な化学物質と共存させると、ER と ERE の結合・解離の反応速度が変化する。このアッセイ法について特異性、用量依存性、至適条件及び系の再現性を検討した。その結果、この方法はある化学物質がエストロゲン様作用を有するかどうかを迅速かつ定量的に判定するスクリーニング法として有効であることが示された。