

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

5-1953 甲状腺ホルモン受容体結合化学物質の 簡便スクリーニングと新規バイオマーカー探索

令和元年度～令和3年度

Screening and Exploration of New Biomarkers for
Thyroid-Hormone-Receptor Binding Chemicals

<研究代表機関>

京都大学 大学院工学研究科

<研究分担機関>

国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター
県立広島大学 生物資源科学部
京都大学 大学院医学研究科

令和4年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究目標	
4. 研究開発内容	
5. 研究成果	
5-1. 成果の概要	
5-2. 環境政策等への貢献	
5-3. 研究目標の達成状況	
6. 研究成果の発表状況	
6-1. 査読付き論文	
6-2. 知的財産権	
6-3. その他発表件数	
7. 国際共同研究等の状況	
8. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	
II-1 受容体模倣クロマトグラフィーによる簡便スクリーニングとバイオマーカー探索	19
(京都大学 大学院工学研究科、京都大学 大学院医学研究科)	
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
II-2 甲状腺ホルモン受容体結合化学物質の精密質量と生理活性に関するデータベースの作成	33
(国立環境研究所、県立広島大学)	
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
III. 研究成果の発表状況の詳細	49
IV. 英文Abstract	51

I. 成果の概要

課題名 5-1953 甲状腺ホルモン受容体結合化学物質の簡便スクリーニングと新規バイオマーカー探索

課題代表者名 久保 拓也 (国立大学法人 京都大学 大学院工学研究科 材料化学専攻 准教授)

重点課題 主：【重点課題⑭】化学物質等の包括的なリスク評価・管理の推進に係る研究

副：【重点課題⑮】大気・水・土壌等の環境管理・改善のための対策技術の高度化及び評価・解明に関する研究

行政要請研究テーマ（行政ニーズ） (5-10) 子どもへの新規化学物質に関する分析方法等の健康
響検出に係る先進的研究

研究実施期間 令和元年度～令和3年度

研究経費

98,670千円（合計額）

（各年度の内訳：令和元年度：38,220千円、令和2年度：31,200千円、令和3年度：29,250千円）

研究体制

（サブテーマ1）受容体模倣クロマトグラフィーによる簡便スクリーニングとバイオマーカー探索
（京都大学）

（サブテーマ2）甲状腺ホルモン受容体結合化学物質の精密質量と生理活性に関するデータベース
の作成
（国立環境研究所）

研究協力機関

研究協力機関はない。

本研究のキーワード 受容体、甲状腺ホルモン、内分泌かく乱化学物質、クロマトグラフィー、分子
インプリント、受容体模倣、バイオマーカー、スクリーニング

1. はじめに（研究背景等）

環境省は、EXTEND 2016やエコチル調査において、リスク管理が必要な物質の特定と未知物質の探索及びそれらの体内動態の把握を進めている。とりわけ、脆弱であるとされている子どもたちの健全な成長・発達に対して、化学物質の曝露や生活環境など環境要因が与える影響を評価する必要がある。

我々は、環境研究総合推進費（5-1552）研究において、受容体の分子認識部位を模倣した分離基材を用いてER結合活性物質の選択的な吸着・分離を実現し、環境中のER活性物質の一次スクリーニング手法の可能性を示した（Chemosphere, 2019）。本概念は、受容体を模倣した基材であることから、結合強度との相関性を示すスクリーニング手法としての可能性が期待できる。これを実現するためには、受容体結合に関する基礎的な知見に基づく精密な基材設計を行い、化学物質の受容体結合強度に応じたシグナルを獲得できる新たな方法論が求められる。これにより、本概念は受容体を介した影響機序を示すすべての受容体かく乱作用化学物質に応用可能な汎用性の高い概念となり得る。

本研究では、EXTEND2016及びエコチル調査において特に重要視されており、受容体構造情報が多く報告されている甲状腺ホルモン受容体（TR）をモデルとして、化学分析結果のみでTR結合活性を評価できる革新的なスクリーニング手法を創出する。本法の確立によって、化学物質の簡便なTR活性評価、生体・環境試料中の未知活性物質の同定、血液・尿試料中のバイオマーカー探索及び精密質量データベースの作成を目指す。

2. 研究開発目的

本研究では、TR結合活性物質のスクリーニング手法を確立することを目的として、TR模倣分離基材によるクロマトグラフィー的手法と機器分析を用いたTR結合活性評価法を開発し、さらに、同法及び酵母アッセイと精密質量分析計との組み合わせによりTR結合活性化合物のデータベースを作成する。また、研究期間後半において、新規TR結合物質の検出とそのバイオマーカー探索を行う。

本研究で創出される新規スクリーニング手法は、行政ニーズ内であげられたノンターゲット分析やバイオマーカー探索を含んでいることから、子どもたちの血液・尿等の生体試料に対する、少量で精度・感度良く効率的に分析する方法の開発に取り組み、信頼性のある手法の確立に貢献すると予想できる。

さらに、本研究の成果は、TRのみならず受容体結合活性を有する多くの化学物質への応用が可能であり、生理活性メカニズム解明などの学術的知見の獲得に始まり、将来的には汎用のスクリーニング手法として、国内・国外での環境化学物質モニタリングに適用可能であると予想される。そのため、これらに関連する専用の分離基材及び化学物質データベース（精密質量、生理活性、化学構造）は、継続的にアップデートされる消耗品として潜在的な環境ビジネスの市場として期待できる。

3. 研究目標

全体目標	○ TR模倣クロマトグラフィーとTR生理活性／精密質量データベースを組み合わせた新規TRスクリーニング手法の確立 ○ 実環境試料中の複数の未知TR活性物質の同定
サブテーマ1	受容体模倣クロマトグラフィーによる簡便スクリーニングとバイオマーカー探索
サブテーマリーダー /所属機関	久保拓也／京都大学
目標	・ TR活性物質の包括的な濃縮・分離を可能とする吸着剤開発 ・ TR結合活性vs保持時間に線形相関性のあるLC評価法開発 ・ 未知TR活性物質の同定とバイオマーカー探索

サブテーマ2	甲状腺ホルモン受容体結合化学物質の精密質量と生理活性に関するデータベースの作成
サブテーマリーダー /所属機関	中島大介／国立環境研究所
目標	・ 約600物質の<i>in vitro</i>試験によるTR生理活性（アゴニスト，アンタゴニスト）評価とデータベース化 ・ TR結合活性物質の精密質量データベースの作成 ・ 下水処理場排水における既知TR結合活性物質及び未知活性物質の寄与率評価

4. 研究開発内容

サブテーマ1

TR模倣基材の開発

TRに対する活性物質として、トリヨードサイロニン (T3) とサイロキシシン (T4) が生体内物質として、広く研究されている。また、TRに対するこれらの結合は、X線構造解析から明らかとなっており、それぞれと作用するアミノ酸残基もある程度明らかとなっている。これらの情報から、分子インプリントポリマー (MIP) をデザインし、結合活性選択的な吸着基材を合成した。より結合活性特異性の高いMIPの合成のために以下の項目を検討した。① 架橋剤、機能性モノマー、鋳型分子の選定によるMIPの合成、② バッチ吸着法を用いたMIPの吸着選択性評価、③ 液体クロマトグラフィー (LC) を用いた保持時間と結合活性の相関評価のための条件検討。

TR模倣基材による未知TR結合活性物質の探索

様々な化学物質を用いて、結合活性特異基材を用いたクロマトグラフィー評価を行った。① TR結合活性の可能性が報告されている種々のハロゲン化芳香族（塩素化・臭素化ビスフェノール、水酸化ポリ塩素化ビフェニル等々を用いたクロマトグラフィー評価、② 非ハロゲン化芳香族のうち、サブテーマ2で結合陽性が認められた物質の評価、③ 上記を含む種々の化学物質に対するLCを用いた活性評価の検討、④ サブテーマ2で得られたTR活性候補物質を用いた動物実験

迅速・精密なTR結合活性法の確立

TR結合活性法の迅速化・精密分離を目的として、TR模倣基材と同等の分子認識能を有するシリカあるいは有機高分子の均一粒子カラムを作製した。当初の計画では、モノリス型カラムを想定していたが、実試料の分析においては、粒子充填型の方が操作性が高いため、均一粒子による分離能向上を目指した。評価した項目は以下のとおりである。① シリカ粒子表面へのTR模倣基材の修飾、② 有機ポリマー粒子の合成、③ シリカ・ポリマー粒子の通水性評価と活性特異性評価、④ 生体・環境試料を用いた活性評価法の実証とバイオマーカーの探索、⑤ 動物実験での陽性物質に対する生体試料中バイオマーカー探索。

サブテーマ2

化学物質のTR結合活性データベース作成

*in vitro*試験による約600種類の化学物質のTR結合活性（アゴニスト及びアンタゴニスト）評価を行った。ER等の他の受容体結合活性試験に供した約600物質について、*in vitro*試験である酵母ツーハイブリッド法によりTR結合活性を同一条件で測定して定量化した。文献調査及びUS EPAによる内分泌かく乱化学物質スクリーニングプログラム (EDSP21) によるTR結合活性情報等も参照し、必要に応じて測定対象に加えるなど効率的に実施した。

新規活性物質を含む精密質量データベースの作成

① TR結合活性陽性物質の多段階精密質量データベースの作成：液体クロマトグラフィー（LC）／四重極（Q）／飛行時間型質量分析計（ToFMS）を用いてプレカーサーイオン及びプロダクトイオンの精密質量を測定し、定性解析用データベースを作成した。② 環境水試料のMIP吸着画分からのTR結合活性物質の探索：TR結合活性が報告されている下水処理場排水を用い、サブテーマ1で前年度に作製したMIPへの吸着画分を、LC/Q/ToFMS（必要に応じてGC/Q/ToFMSも）測定し、①の精密質量データベースを用いてTR結合活性物質の検出及び定量を行った。またTR結合活性物質のLC/MS/MSによる定量法も作成した。それらの結果から各検出物質の寄与率を算出した。

生体試料評価によるバイオマーカー探索

環境・生体水試料のMIP吸着画分からのTR結合活性物質の探索及び構造推定：前年度に下水処理場排水等から検出されたMIP溶出画分中のデータベース未収載のピークについて、サブテーマ1で開発したMIPによる活性測定を実施し、活性の強い順に構造推定の優先順位付けを行った。また、血液・尿等の生体試料について、TRかく乱作用物質を代謝物も含めて検索・同定し、甲状腺疾患のバイオマーカーの探索を行った。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

5-1-1 サブテーマ1

TR模倣MIPの作製と評価

先行研究においてT4を鋳型、methacrylic acidを機能性モノマーに使用したMIP (T4-MIP) を作製した。T4-MIPはT3、T4に対して強い吸着能を示した一方で、TR結合物質であるTRIACに対しては吸着能を示さなかった。TRIACはTRに対して高い結合活性を持ち、本研究における標的分子の一つと言えるため、T3、T4のみならずTRIACに対しても吸着能を有するMIPの作製が求められた。本研究では、TR結合物質の包括的な吸着を実現すべく、より精緻な受容体模倣を行ったMIPの再設計・合成を行った。MIPの分子認識場をデザインするにあたっては、TRのリガンド認識機構を参考にした。また、異なる分子サイズを持つ鋳型分子を使用したMIPの吸着選択性を比較することによって、鋳型分子のサイズ効果について考察を行った。

さらに、表0. 1の組成で鋳型分子、機能性モノマー、架橋剤、溶媒を混合し、3h攪拌し、鋳型分子-機能性モノマー複合体を形成させた。次に窒素バブリングを行った後に開始剤を加え光重合 (365 nm, 3h) を行った。

表0. 1. AcetylT4-MIP、TRIAC-MIP重合溶液の組成.

	Cross linker	Template	Functional monomer	Initiator	Solvent
AcetylT4-MIP	EDMA 1.0 g	AcetylT4 14 μ mol	4-Vp 56 μ mol	ADV N 20 mg	methanol 1.0 mL
TRIAC-MIP		TRIAC 14 μ mol			

先に作製したT4-MIPと上記のTRIAC-MIPにおける種々の溶質の保持係数を図0. 1に示す。なお網掛けの棒グラフは溶質が溶出しなかったため保持係数が測定不可能であったことを示している。鋳型分子であるTRIACは20 min 経過しても溶出せず非常に強くTRIAC-MIPに保持された。そこで20 min経過後に移動相をmethanol/acetonitrile = 2/8からmethanol 100%に切り替えることで溶出させた。また、TR結合物質であるTRIAC、T3、T4のMIP充填カラムにおける保持係数は、NIP充填カラムにおける保持係数と比べ増加し、MIPはTR結合物質に対して選択的に分子インプリント効果を発現した。一方で、TRIAC-MIP及

びNIP充填カラムにおいてTR非結合物質であるE2、BPAは保持されなかった。以上の結果から作製したTRIAC-MIPのTR結合物質に対する選択的な保持能を確認した。

次に分子認識機構について考察を行った。TRIAC、T3、T4はいずれも分子内にphenol, carboxy基を共通して持っているため、TRIAC-MIPの機能性モノマーである4-Vpはこれらの酸性官能基と相互作用することによって分子認識を行っていると考えられる（図0.2）。

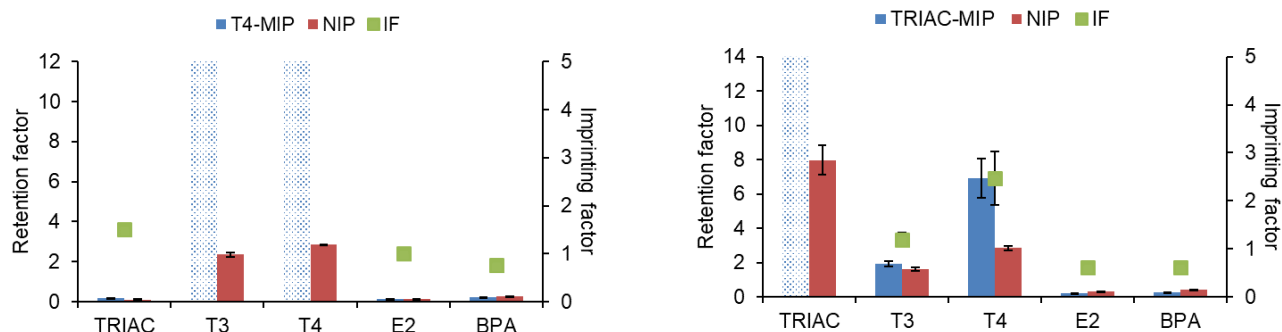


図0.1 T4-MIP及びTRIAC-MIPにおける種々の溶質の保持係数

LC condition: column, T4-MIP or TRIAC-MIP packed column (100×4.6 mm i.d), NIP packed column (100×4.6 mm i.d.); injection volume, 20 μ L; flow rate, 1.5 mL/min; temperature, 30 $^{\circ}$ C; detection, UV (300 nm), mobile phase, methanol/acetonitrile = 2/8.

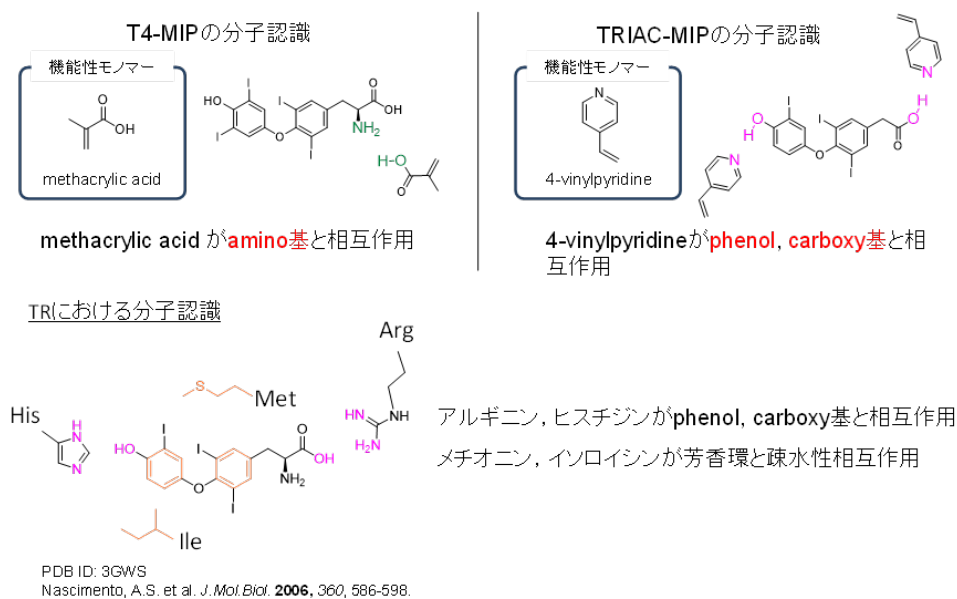


図0.2 T4-MIP、TRIAC-MIPにおける分子認識機構とTRにおけるリガンド認識機構

次に、異なる分子サイズを有する化合物であるTRIACとAcetylT4を鋳型分子に使用してMIPを作製し、鋳型分子の分子サイズが吸着選択性に与える影響を評価した。各溶質のMIP、NIP充填カラムにおける保持係数を図0.3に示す。TR結合物質であるTRIAC、T3、T4、GC-1、DITPAのAcetylT4-MIP充填カラムにおける保持係数は、NIP充填カラムにおける保持係数と比べ増加し、AcetylT4-MIPはTR結合物質に対して、活性選択的な吸着能を有することを確認した。また、AcetylT4-MIPは、TRIAC-MIPと比較していずれの溶質もより強く保持した。特にT3、T4に対する保持挙動に顕著な差が確認された。TRIAC-MIPは、T3、T4に対しては分子インプリント効果を発現しなかった。一方で、AcetylT4-MIPはT3、T4に対しても分子インプリント効果を発現した。TRIAC-MIPとAcetylT4-MIPの異なる吸着選択性は鋳型分子のサイズに由来すると考えられる。T3、T4よりも小さい分子サイズを持つTRIACを鋳型分子に使用したTRIAC-MIPにおいては、分子認識場への吸着において立体障害が大きく寄与しており、鋳型分子よりも大きな分子サイズを有するT3、T4の吸着には不利な小さなキャビティが構築されていることが

示唆された。一方、T3、T4よりも大きな分子サイズを有するAcetylT4を鋳型分子に用いたTRIAC-MIPにおいては、T3、T4に対しても吸着に有利な大きなキャビティが構築されたと考えられる。

本研究では、すべてのTR結合物質を保持するMIP充填カラムの作製が目的であるため、T3、T4に対しても吸着能を示すようにAcetylT4を鋳型分子に使用してMIPを作製することが適切と考えられる。また、T4は有機溶媒への溶解度が低く、DMSO、DMFにしか溶解しない一方、AcetylT4はDMSO、DMFに加えてmethanol、THF、ethylacetate等の様々な極性溶媒に溶解する。重合溶媒が制限されることは今後必要になるカラムの高性能化を行う上で、大きな障害になる。そのため、有機溶媒への溶解性という観点からも、AcetylT4はT4と比べより扱いやす分子と言える。

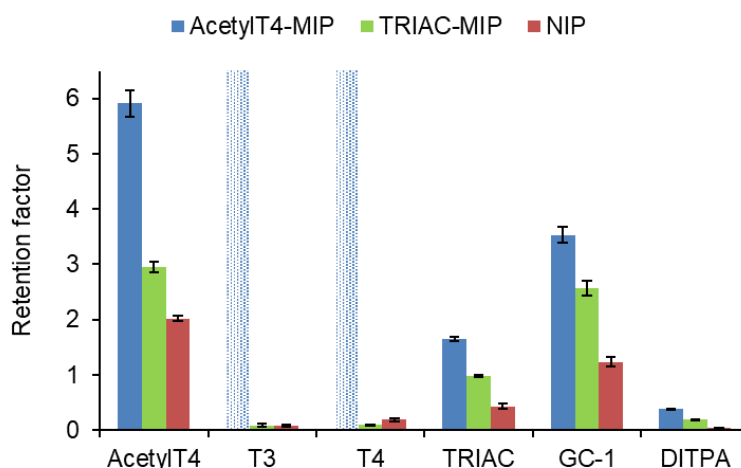


図0.3 AcetylT4-MIP及びTRIAC-MIPにおけるTR結合物質の保持係数

LC condition: column, AcetylT4-MIP packed column (100×4.6 mm i.d), TRIAC-MIP packed column (100×4.6 mm i.d), NIP packed column (100×4.6 mm i.d); injection volume, 20 μ L; flow rate, 1.5 mL/min; temperature, 30 $^{\circ}$ C; detection, UV (240 nm), mobile phase, methanol/acetonitrile = 2/8.

作製したAcetylT4-MIPはTR結合物質に対して選択的な吸着能を発現した一方でTR非結合物質であるE2、BPAに対しては吸着能を発現しなかった。しかし、TR結合物質の一つであるDITPAに対する保持は弱く、TR結合／非結合物質の分離は困難であるという問題が残されていた。そこで、分子認識場密度を向上させたMIPを再び合成し、TR結合物質の保持を増大させることを目指した。認識場密度を増加させたAcetylT4-MIPにおけるDITPAのクロマトグラムを図0.4に示す。分子認識場の密度を増加させたAcetylT4-MIPにおいてDITPAが強く保持されたため、TR結合／非結合物質の二分化溶出が可能となった。

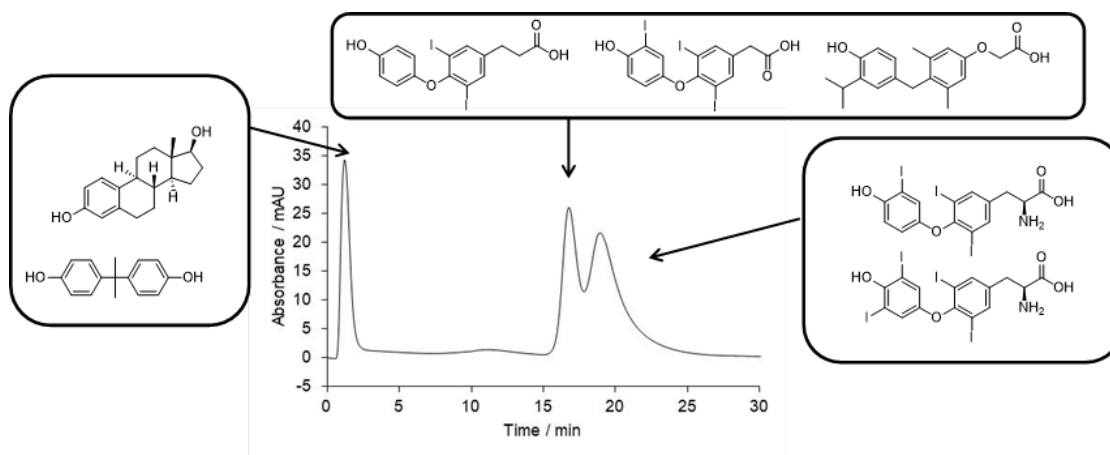


図0.4 AcetylT4-MIP（認識場増）でのTR結合／非結合物質の分離

Gradient condition: mobile phase, (A) methanol, (B) acetonitrile; 0–10 min, B, 10–30 min, A; flow rate, 0–10 min, 0.2 mL/min, 10–30 min, 0.4 mL/min.

ハロゲン結合を利用したMIP

現在までに、水素結合やイオン結合など様々な分子間相互作用を組み合わせ、抗体に迫る分子認識能を持ったMIPの開発が報告されている。一方で、ハロゲン結合を用いたMIP合成の例はほとんどなく、ハロゲン結合に基づくMIPの基礎的な知見収集は、人工分子認識材料の飛躍的な発展、新規材料開発設計に寄与すると期待される。そこで本研究では、ハロゲン結合を分子認識の主たる駆動力に利用した新規MIPの合成と、その分子認識能の評価を行った。

鋳型分子に*m*-diiodobenzene (*m*-DIB)、1, 3, 5-triiodobenzene (TIB)、tetrafluorodiiiodobenzene (TFDIB)、機能性モノマーに 1-vinylimidazole、架橋剤にdivinylbenzeneをそれぞれ用いてMIPを調製した。鋳型分子を加えない非インプリントポリマー (NIP) も作製し、MIP及びNIPを充填したHPLC用カラムを作製した。各カラムのHPLC測定によって、種々のハロゲン化ベンゼンの保持選択性を評価した。この際、分子認識における疎水性相互作用の影響を抑制するため、移動相にはcyclohexaneを用いた。また、NMRの化学シフトを評価することで、各MIPの分子認識機構について考察を行った。

鋳型分子にTIB、TFDIBを用いたMIPにおいて、鋳型分子に対する選択的保持が確認された。特にTIBでは、*m*-DIBに対する保持選択性も向上しており、芳香環の*m*-位に存在するヨウ素選択的なMIP合成が示唆された(図0. 5)。また、¹H NMR、¹³C NMRにおける化学シフトの変化から、この位置選択的な分子認識には、機能性モノマー由来のイミダゾール基とヨウ素原子間とに働く強いハロゲン結合が寄与していることが示唆された。今後、ハロゲン結合に基づくMIPを用いるTR結合物質や臭素化難燃剤等ハロゲン化芳香族類の選択的分離・分析の進展が期待される。

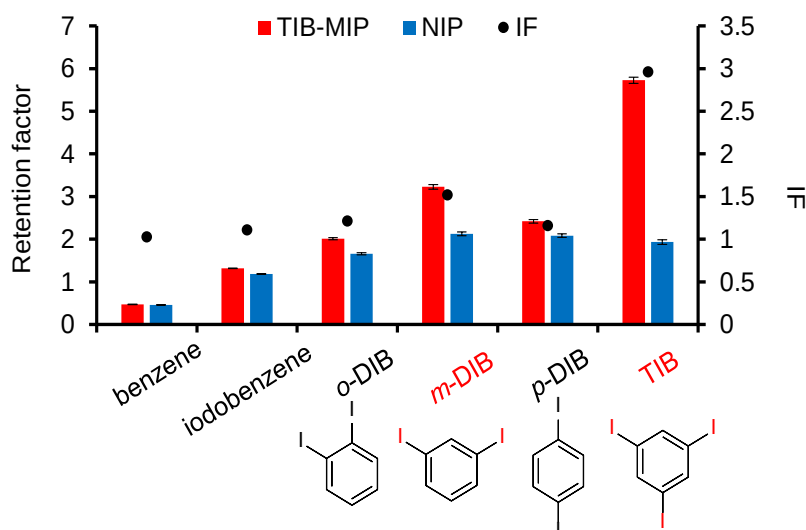


図0. 5 TIB-MIP及びNIP充填カラムにおける各溶質の保持係数。

MIP被覆ポリマー粒子の作製と評価

MIP合成の最適化では、機能性モノマーの選定や重合条件が検討される。しかし、これまでに架橋剤の影響を詳細に検討した報告はほとんどない。本課題では、長さの異なる架橋剤を用いて、甲状腺ホルモン受容体 (TR) を模倣したMIPを合成し、分子認識能の違いを検討した。架橋剤として、エチレンオキシドユニット数が異なる ($n=1$ から23) ポリエチレングリコールジメタクリレートを用いて、MIPを合成した。得られたMIPを粉砕、洗浄後、HPLC用のカラムに充填し、TR活性物質に対する保持選択性を評価した。

その結果、エチレンオキシド数が少ない場合には、認識能が発現せず、逆に多すぎる場合にも認識能が低下することが明らかとなった。N=9の場合に、非常に高い保持選択性が見られ、他のMIPと比べて最大で10倍程度のインプリンティングファクターが得られた(図0. 6)。

また、興味深い結果として、N=9のMIPを用いた温度変化に対する認識能評価の結果では、重合温度に近い評価温度において、もっとも高い認識能が得られた。通常、水素結合性のMIPでは、低温において

高い認識能が得られるが、今回の系では、柔軟性のある架橋剤を用いたことによって、重合時の環境を精密に記憶したMIPの合成が可能になったと考えられる。

最後に、このMIP (N=9) を充填したカラムを用いて、TR活性物質の一斉分析を行った。その結果、各物質の保持強度と酵母アッセイで得られたTRに対する生理活性との間に線形の相関がみられた (図0.7)。以上のことから、柔軟な分子認識場の構築によって、受容体と類似した誘導適合的な分子認識能が発現したと考えられる。

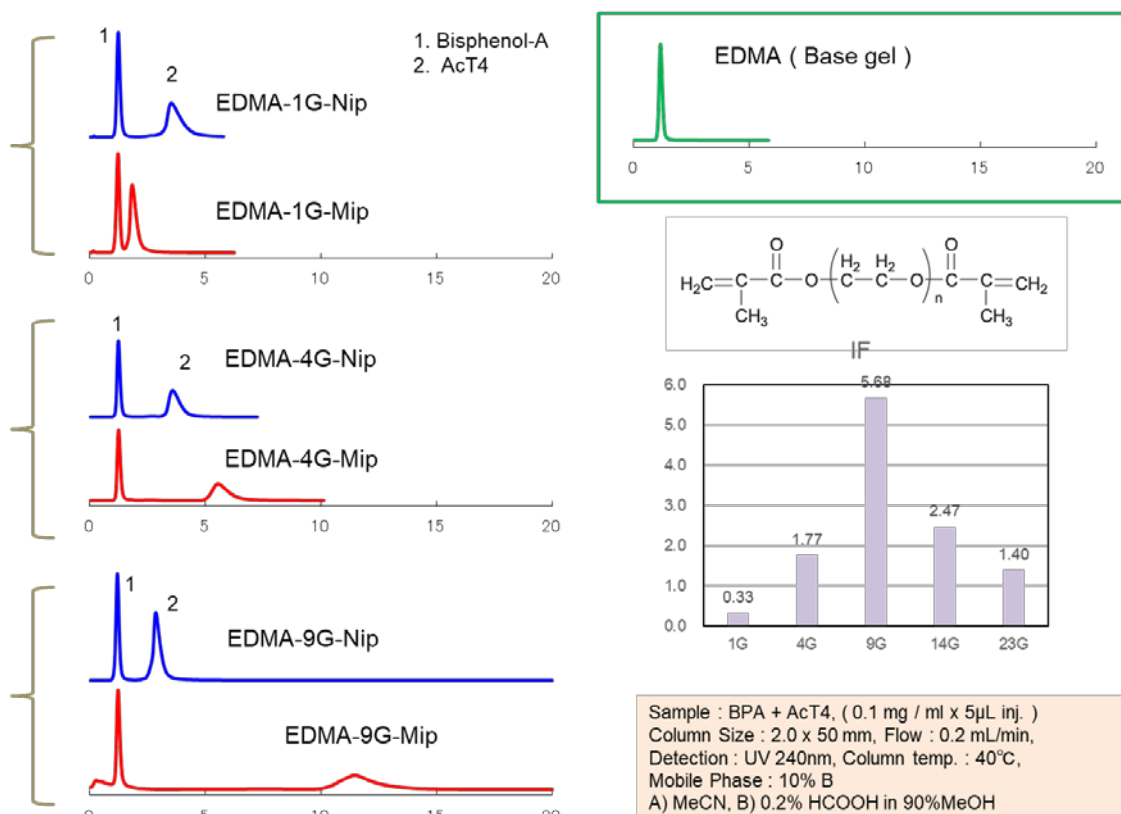


図0.6 架橋剤の異なるMIP充填カラムの評価。

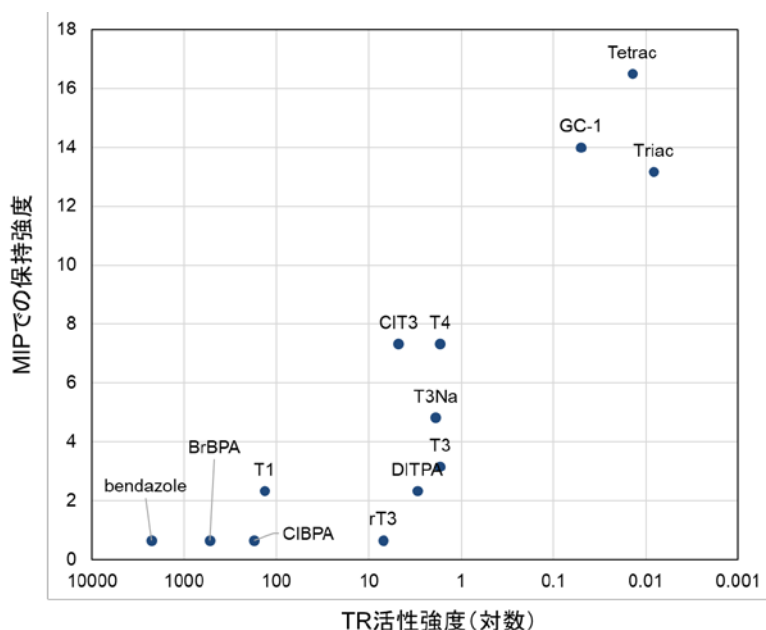


図0.7 MIPカラムにおける保持とTRに対する生理活性の相関。

動物実験によるTRIACの活性評価

動物実験による生理活性評価を行うべく、まずTR活性物質の生体作用を評価する系の確立を行った。TR異常症の臨床像をもとに、成長度（体長、体重）、下垂体-甲状腺軸、肝臓、心臓、脳をTR作用と関連する指標に設定した。甲状腺機能低下症を惹起したオスのC57BL/6Jマウスに、3週齢からTR活性物質を4週間給水投与し、評価を行った。

まずポジティブコントロールとしてT3を投与した。有意なT3血中濃度の上昇は見られたが、体長はわずかに伸びたものの、体重には差が見られなかった。評価系としての感度を上げるため、内因性のT3やT4を減少させる、すなわち甲状腺機能低下症状態にすることを考案した。条件検討を行い、100ppmの濃度でプロピルチオウラシル（PTU）を給水投与することにより、free T4感度未満、TSHの顕著な上昇が得られ、甲状腺機能低下症の惹起に成功した。体長、体重の増加量は有意に少なくなった一方で、この成長障害はT3の共投与を行うことにより回復したことから、PTUの毒性ではなく、TR作用低下によるものであることを確認できた。

この系を用いて、サブテーマ2で同定されたTRIACの生体作用の評価に進んだ。1:Vehicle投与、2:PTU投与、3:PTU+0.1 ppm T3投与、4:PTU+0.1 ppm TRIAC投与の4群を作成した。T3、TRIACの分子量はほぼ差がなく、飲水量にも差がなかったことから、T3とTRIACは物質量としても同等に摂取されたと推定される。結果として、成長障害、下垂体から分泌されるTSHを介した甲状腺腫とも、T3、TRIAC投与のいずれにおいても回復していた。次に肝臓、心臓、脳における遺伝子発現変化を検討した。既報からピックアップしたTR標的遺伝子について、定量PCR法による群間比較を行った。肝臓、心臓においてはT3投与群とTRIAC投与群で同方向への遺伝子発現変化が見られた。しかし、脳においてはT3投与では有意な変化が見られたものの、TRIAC投与では全く変化を認めなかった（図0. 8）。

ここまでの結果から脳に対する作用についてTRIACとT3の間に違いがあることが示唆された。このメカニズムを考察するにあたり、血液脳関門の移行性に着目した。血液脳関門におけるT3の輸送はMCT8、OATP1C1に依存するが、TRIACはMCT8による輸送を受けにくいことが報告されている。よってTRIACはT3と比較して血液脳関門の通過性が低いことが想定される。一方でTRIACは下垂体に対するTSH分泌抑制作用はT3と同様に発揮していた。言い換えると、TRIAC投与は甲状腺ホルモン分泌を抑制し、T3血中濃度を下げる方向に働いていた。以上をまとめると、TRIAC投与は血中T3を低下させ、脳においてのみTR作用を減弱させるという仮説が立つ。この仮説の検証のため、1 ppm TRIAC投与群を作成し、Vehicle投与群と比較した。肝臓においてはTR標的遺伝子の発現増加が見られるのに対し、脳においてはTR標的遺伝子の発現はむしろ減少し、仮説を支持する結果を得た。

結論として、TRIACは甲状腺からのT4及びT3分泌を抑制する一方で、トランスポーターとの親和性の違いからT4やT3よりも脳へ届きにくく、健常人では脳におけるTR作用を低下させることが示唆された。TRIACが新規TR作用かく乱物質であることを明らかとし、生体試料や環境中のTRIAC濃度がバイオマーカーとなる可能性を示す成果を得た。

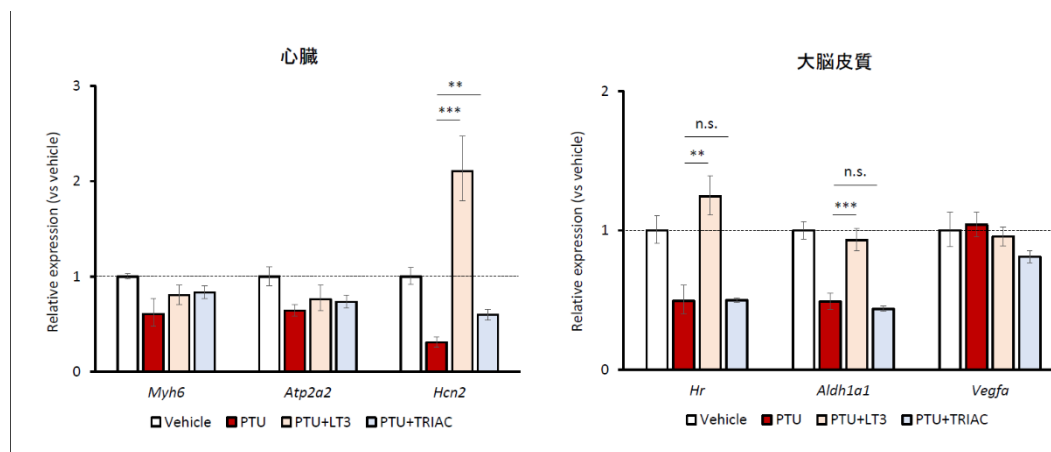


図0. 8 TRIAC投与による心臓と大脳皮質における遺伝子発現。

5-1-1 サブテーマ2

化学物質のTR結合活性スクリーニング

過去に課題分担者らは、化学物質630種のhER結合活性等をY2H法にて評価してきた。本研究では、その630物質を対象にTR結合活性（アゴニスト及びアンタゴニスト作用）をY2H法にて評価した。対象とした630物質には、生態系生物へのエストロゲン様作用が懸念された化合物をはじめ、各種受容体との結合活性が化学構造的に懸念される市販化合物、共同研究者らにより提供された合成試薬などが含まれている。TR結合活性試験の結果、10物質がアゴニスト作用を、17物質がアンタゴニスト作用を示した。アゴニスト作用で特に活性が強かった5物質はいずれもサイロニン骨格を有していた。最も強い活性がみられたのは甲状腺ホルモンであり、医薬品にも使われている3,3',5-triiodothyroacetic acid (TRIAC, チラトリコール)、次いでテトラヨードチロ酢酸、T3、T4と実際の甲状腺ホルモンが続き、人工物としてはビスフェノール、アルキルフェノールのハロゲン化体が活性を示した（表0.2）。一方でアンタゴニスト作用を示した17物質に関しては、特異的な類似性は認められなかった（表0.3）。

表0.2 Y2H法による 630物質のTR結合活性試験結果（アゴニスト陽性）

英名	和名	hTR agonist (μM)	CAS	組成式	分子量	構造式
3,3',5-Triiodothyroacetic acid (TRIAC)	チラトリコール	2.7E-05	51-24-1	C ₁₄ H ₉ I ₃ O ₄	621.93	
3,3',5,5'-Tetraiodothyroacetic acid (TETRAC)	テトラヨードチロ酢酸	2.3E-04	67-30-1	C ₁₄ H ₈ I ₄ O ₄	747.83	
T3 (3,5,3'-Triiodothyronine)	トリヨードサイロニン	5.0E-03	6893-02-3	C ₁₅ H ₁₂ I ₃ NO ₄	650.97	
T4 (3,3',5,5'-Tetraiodothyronine)	サイロキシニン	1.2E-02	51-48-9	C ₁₅ H ₁₁ I ₄ NO ₄	776.87	
3,3',5'-Triiodo-L-Thyronine (rT3)	リバーストリヨードチロニン	2.8E-02	5817-39-0	C ₁₅ H ₁₂ I ₃ NO ₄	650.97	
Tetrachlorobisphenol A	テトラクロロビスフェノールA	0.38	79-95-8	C ₁₅ H ₁₂ Cl ₄ O ₂	366.07	
Tetrabromobisphenol A	テトラブロモビスフェノールA	0.55	79-94-7	C ₁₅ H ₁₂ Br ₄ O ₂	543.87	
3,3',5-trichlorobisphenol A	3,3',5-トリクロロビスフェノールA	3.5	40346-55-2	C ₁₅ H ₁₃ Cl ₃ O ₂	331.62	
2-chloro-4-octylphenol	-	3.9	79162-47-3	C ₁₄ H ₂₁ ClO	240.77	
2,6-dichloro-4-tert-butylphenol	-	7.5	34593-75-4	C ₁₀ H ₁₂ Cl ₂ O	219.11	

更なる活性データベース拡充のため、各種文献及びEDSP21のデータベースを参照し試験物質の追加を試みた。EDSP21とは、米国環境保護庁が策定する内分泌かく乱化学物質スクリーニングプログラム (Endocrine Disruptor Screening Program in the 21st century) の略称であり、ハイスループットスクリーニング (HTS) による内分泌かく乱作用試験の対象となる化学物質の優先順位設定を行っている。現在までに10,000種以上の化学物質を対象にエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体及びTR等に関する結合活性を評価しており、その結果をデータベースとして作成・公表している。ただし、EDSP21で測定しているTR結合活性はrat由来のTRを用いており、本研究のY2H法で使用しているヒトTRとは異なる点に注意が必要である。本研究では、EDSP21のTR結合活性評価結果を参照し、アゴニスト陽性が報告されている9物質、アンタゴニスト陽性が報告されている190物質をY2H法による評価対象物質として追加選定した。EDSP21では、2376物質と非常に多くのアンタゴニストが報告されているが、以降作成したMIPの性能評価に活用できるよう、活性強度 (IC₅₀) を8段階に分け、最も強い10⁻¹ (μM) 以下のものは全て（約50物

質)、以降は各活性段階の物質数が均等になるよう追加選定した。

さらに、各種文献、特にEXTEND2010及び2016において信頼性が確認されている文献等を参考に、TR結合阻害、甲状腺ホルモン様作用、遺伝子発現への作用など、TR結合活性が強く疑われる化学物質21種に関しても同様にY2H法による評価対象物質として追加した。これら220物質のうち、技術的に試験が困難なものを除外した206物質をY2H試験に供した。

結果として、Y2H法においては5物質がアゴニスト陽性を、21物質がアンタゴニスト陽性を示した(表0. 4)。アゴニスト作用を示した5物質のうち4物質はT3のNa付加体や、T4のアセチル化体などサイロニン骨格を有していた。残る1物質はベンゾイミダゾール系の殺虫成分で、ベンゼンにイミダゾール環や塩素が結合した構造を持つトリクラベンダゾールであった。また、アンタゴニスト作用を示した物質に関しては、その構造中にSn(すず)を含む物質で特に強い活性がみられたが、先ほどの結果と同様に明確な共通性は示されなかった(表0. 5)。

表0. 3 Y2H法による 630物質のTR結合活性試験結果(アンタゴニスト陽性)

英名	和名	hTR antagonist (μM)	CAS	組成式	分子量	構造式
10,10'-Oxibis (phenoxarsine)	バイナジン	0.011	58-36-6	C ₂₄ H ₁₆ As ₂ O ₃	502.23	
Chlorotharonil	テトラクロロイソフタロニトリル	0.051	1897-45-6	C ₈ Cl ₄ N ₂	265.91	
Anthrarobin	1,2,10-アントラセントリオール	0.49	577-33-3	C ₁₄ H ₁₀ O ₃	226.23	
Zinc pyrrhione	ビリチオン亜鉛	0.56	13463-41-7	C ₁₀ H ₈ N ₂ O ₂ S ₂ Zn	317.72	
Captan	キャプタン	1.1	133-06-2	C ₉ H ₈ Cl ₃ NO ₂ S	300.59	
3-Hydroxy-1H-phenalen-1-one	3-ヒドロキシ-1H-フェナレン-1-オン	1.1	5472-84-4	C ₁₃ H ₈ O ₂	196.20	
2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one	オクチリノン	1.3	26530-20-1	C ₁₁ H ₁₉ NOS	213.34	
Dehydroabietic acid	デヒドロアビエチン酸	1.3	1740-19-8	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	300.44	
Tributyltin (IV) chloride	トリブチルすずクロリド	1.9	1461-22-9	C ₁₂ H ₂₇ ClSn	325.51	
Abietic Acid	アビエチン酸	2.6	514-10-3	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	302.45	
Metiram	メチラム	2.6	9006-42-2	C ₁₆ H ₃₃ N ₁₁ S ₁₆ Zn ₃	1088.70	
2,4,6-Tribromophenol	2,4,6-トリブロモフェノール	3.5	118-79-6	C ₆ H ₃ Br ₃ O	330.80	
Copper quinolate	ビス(8-キノリノラト)銅(ⅠⅠ)	3.9	10380-28-6	C ₁₈ H ₁₂ CuN ₂ O ₂	351.85	
5-β-Pregnane-3,20-dione	5β-プレグナン-3,20-ジオン	4.1	128-23-4	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	316.48	
Chlordane	クロルデン	4.2	57-74-9	C ₁₀ H ₆ Cl ₈	409.78	
2-mercaptopyridine-N-oxide, sodium salt	2-メルカプトピリジンN-オキシドナトリウム	4.3	3811-73-2	C ₅ H ₄ NNaOS	149.15	
CD336	AM-580	4.8	102121-60-8	C ₂₂ H ₂₅ NO ₃	351.44	

表 0. 4 Y2H法による追加206物質の試験結果 (アゴニスト陽性)

英名	和名	hTR agonist (μM)	CAS	組成式	分子量	構造式
GC-1(Sobetirome)	ソベチロム	5.0E-05	211110-63-3	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	328.4	
3,3',5-Triiodo-L-thyronine sodium salt (Sodium T3)	リオチロニンナトリウム	1.9E-03	55-06-1	C ₁₅ H ₁₁ I ₃ NNaO ₄	672.96	
3,5-Diiodothyropropionic acid	-	2.8E-03	1158-10-7	C ₁₅ H ₁₂ I ₂ O ₄	510.06	
N-Acetyl L-Thyroxine	アセチルT4	1.8E-02	26041-51-0	C ₁₇ H ₁₃ I ₄ NO ₅	818.91	
Triclabendazole	トリクラベンダゾール	2.1	68786-66-3	C ₁₄ H ₉ Cl ₃ N ₂ OS	359.66	

表 0. 5 Y2H法による追加206物質の試験結果 (アンタゴニスト陽性)

英名	和名	hTR antagonist (μM)	CAS	組成式	分子量	構造式
Triphenyltin fluoride	フッ化トリフェニルすず	0.031	379-52-2	C ₁₈ H ₁₅ FSn	369.02	
Triphenyltin hydroxide	水酸化トリフェニルすず	0.041	76-87-9	C ₁₈ H ₁₅ OSn	367.03	
Triphenyltin acetate	酢酸トリフェニルすず	0.19	900-95-8	C ₂₀ H ₁₈ O ₂ Sn	409.07	
Captafol	カプタホル	0.22	2425-06-1	C ₁₀ H ₉ Cl ₄ NO ₂ S	349.06	
Nitroxoline	8-ヒドロキシ-5-ニトロキノリン	0.36	4008-48-4	C ₉ H ₆ N ₂ O ₃	190.16	
Malachite green oxalate	マラカイトグリーンしゅう酸塩	0.37	2437-29-8	C ₅₂ H ₅₄ N ₆ O ₁₂	927.02	
Gentian Violet	クリスタルバイオレット	0.73	548-62-9	C ₂₅ H ₃₀ ClN ₃	407.98	
Mycophenolic acid	ミコフェノール酸	0.83	24280-93-1	C ₁₇ H ₂₀ O ₆	320.34	
Methyl Violet	ベーシックバイオレット	0.84	8004-87-3	C ₂₄ H ₂₈ ClN ₃	393.95	
4-Aminofolic acid (Aminopterin Hydrate)	アミノプテリン水和物	1.2	54-62-6	C ₁₉ H ₂₀ N ₆ O ₅	440.41	
5,7-Dichloro-8-hydroxy-2-methylquinoline	クロルキナルドール	1.2	72-80-0	C ₁₀ H ₇ Cl ₂ NO	228.08	
Basic Green	ベーシックグリーン	1.4	633-03-4	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₄ S	482.64	
Rhodamine 6G	ローダミン6G	2.5	989-38-8	C ₂₈ H ₃₁ ClN ₂ O ₃	479.01	
Actinomycin D	アクチノマイシンD	2.7	50-76-0	C ₆₂ H ₈₆ N ₁₂ O ₁₆	1255.42	
Aristolochic acid sodium	8-メトキシ-6-ニトロフェナントロ[3,4-d]-1,3-ジオキソール-5-カルボン酸ナトリウム	2.7	10190-99-5	C ₁₇ H ₁₀ NNaO ₇	363.25	
Diclofenac Metabolite	ジクロフェナックカルボン酸	2.7	13625-57-5	C ₁₃ H ₉ Cl ₂ NO ₂	282.12	
Oxazolone	2-フェニル-4-(エトキシメチレン)オキサゾール-5(4H)-オン	2.8	15646-46-5	C ₁₂ H ₁₁ NO ₃	217.22	
Cycloheximide	シクロヘキシミド	3.0	66-81-9	C ₁₅ H ₂₃ NO ₄	281.35	
Lapachol	2-ヒドロキシ-3-(3-メチル-2-ブテニル)-1,4-ナフタレンジオン	3.2	84-79-7	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	242.27	
Methotrexate	メトトレキサート	3.2	59-05-2	C ₂₀ H ₂₂ N ₆ O ₅	454.44	
Hexachlorophene	ヘキサクロロフェン	4.2	70-30-4	C ₁₃ H ₆ Cl ₆ O ₂	406.90	

新規活性物質を含む精密質量データベースの作成

アゴニスト陽性となった13種の化合物について、液体クロマトグラフィー (LC) / 四重極(Q) / 飛行時間型質量分析計 (ToFMS) を用い、プレカーサーイオン及びプロダクトイオンの精密質量を測定し、定性解析用データベースを作成した。また、プレカーサーイオンを用いた検量線も作成し、簡易的な定量も可能な情報を得た。なお後述するように、下水処理場排水から検出されたTRアゴニスト活性の要因となる化学物質を探索したところ、整理したアゴニストで説明できたため、新規活性物質は含めなかった。本データベースの作成には、液体クロマトグラフー四重極ー飛行時間型質量分析計 (LC-QToFMS) Agilent 1260 Infinity LC / Agilent 6546 UHD Accurate-Massを用いた。測定条件は表1の通りとした。移動相組成は適宜検討して調整した。

環境試料中、特に下水処理場排水にはTRアゴニスト活性が検出されることが報告されているが、その要因物質は同定されていない。その探索にはTR結合活性物質のLC-QToFMSやLC-MS/MSでの測定が欠かせない。そこで、Y2H法でhTRアゴニスト陽性と評価された化合物17種を対象として、標準試料が入手可能である13化合物の測定情報を取得した。測定情報はLC-QToF-MS (Agilent LC 1260 / MS 6546) を用い、同定用の多段階精密質量 (MSMSスペクトル) 及び定量用のToFモードでの検量線とした。多段階精密質量は、陽性化合物のPrecursor ionを対象に5段階のコリジョンエネルギー (10, 20, 30, 40, 50) を設定し、Product ion scanから獲得した。また、獲得した多段階精密質量の情報はPersonal Compound Database and Library (PCDL) に登録し、同定用のデータベースを作成した。

検量線情報の取得は、各陽性化合物のPrecursor ionを対象として、10, 20, 50, 100 μ g/Lの濃度範囲で行った。各検量線は、内標準 (T3, T4の13C-6体) に対する面積比から取得し、得られた検量線情報は同定用のPCDLと合わせて陽性化合物の精密質量データベースとして作成した (図0.9)。一方、後述するように、下水処理場排水から検出されたTRアゴニスト活性の要因となる化学物質を探索した結果、前述のhTRアゴニスト陽性化合物で説明できたため、新規活性物質は含めなかった。

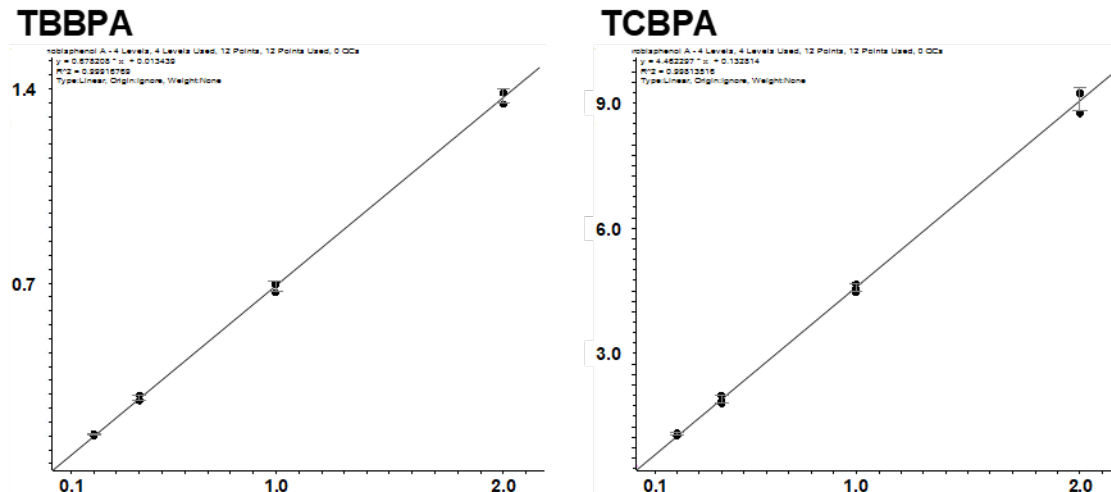


図0.9 hTRアゴニスト陽性13化合物の検量線情報 (一部、全体は別添資料1参照)

※いずれも内部標準はT4 ¹³C-6体を使用

環境水試料のMIP吸着画分からのTR結合活性物質の探索

サブテーマ1で作製したMIPを使用して環境水中に存在するTRアゴニスト活性物質の探索を実施した。2021年6月～2022年5月にかけて茨城県内の下水処理場排水を採水し (Site1)、加えて、東京都 (Site2) 及び北海道内 (Site3) の下水処理場排水も採水することで探索用の環境試料とした。また、神奈川県内から下水処理場由来でない排水を採水し、対照試料 (Site4) として設定した。各排水試料は前処理後に化学分析及び酵母ツーハイブリッドアッセイによる評価に供された。下水放流水1Lを抽出・乾固後、500 μ Lのアセトニトリルへ再溶解した。その500 μ L溶液をMIPへ充填後、メタノール1mLで溶出した試料を

MIP吸着画分とし、LC-QToFMSによる測定へ用いた。測定はTOFモードで行い、hTRアゴニスト陽性13化合物のPrecursor ionから探索し、同定された化合物に関してはPCDLによる再同定から確定する事とした。TOFモードによる測定結果を13化合物のPrecursor ionによるExtracted ion chromatogram (EIC) から確認した結果、全化合物でピークを確認できなかった。本研究で作成されたLC-QToFMSによるhTRアゴニスト陽性13化合物の検量線では10 µg/Lを最低濃度としているが、これはLC-QToFMSの検出感度に起因している。そのため、最終試料中濃度が10 µg/L未満である場合、LC-QToFMSでの検出は困難である。そのため、PCDLを用いた同定は実施できなかった。一方、対象のhTR陽性化合物が10 µg/L未満の極低濃度で試料中に含まれている可能性もある。そのため、高感度測定が可能なLC-MSMS (Sciex5500+) による同定を検討した。

また、検討したLC-MSMSの測定条件から、Site1-Site4の排水試料中におけるhTRアゴニスト活性化合物の同定を試みた。化学分析による活性化合物の同定と合わせて、それら排水試料中のhTRアゴニスト活性を酵母ツーハイブリッドアッセイにより評価した。化学分析による同定結果とアッセイの評価結果から、対象とした排水試料中のhTRアゴニスト活性値に対する各同定化合物の寄与率(%)を算出した。寄与率は以下の式から求めた。

$$\text{寄与率 (\%)} = \frac{EFC \times T3R}{EFA} \times 100$$

EFC：排水中から検出された13の化合物の各濃度 (ng / L)

T3R：各物質のhTRアゴニスト活性とT3のhTRアゴニスト活性の比

EFA：排水試料のY2H法によるhTRアゴニスト活性 (ng-T3eq./L)。

図0.10にSite1で同定された各活性化合物の寄与率を示した。この結果から、Site1の排水試料では、年間を通してTRIACが活性の99%以上に寄与していることが明らかとなった。TRIACはSite1の全試料で検出された(0.46-1.2 ng/L)。また、TCBPA, TBBPA, トリクラベンダゾールの検出頻度が高い結果となっており、T1及びT3の検出も比較的多くみられた。

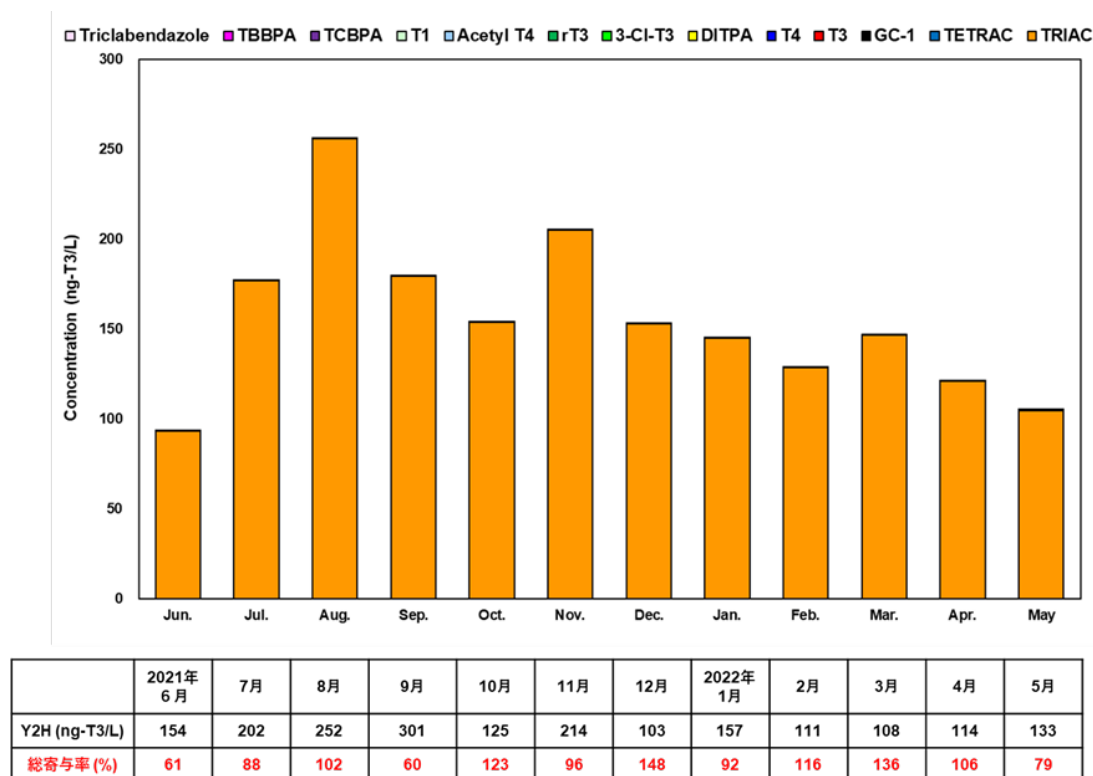


図0.10 Site1におけるhTRアゴニスト活性の年間変動

環境水試料のhTR結合活性物質の探索及び構造推定

下水処理場排水中のhTRアゴニスト活性の主要因はTRIACであると考えられたが、その由来について確認するため、Site3において流入水(Site_IF)、中間処理水(Site3_AS、活性汚泥処理後)、放流水(Site3_AS、活性汚泥処理後に塩素処理後)を採取し、LC-MSMS及び酵母ツーハイブリッドアッセイで評価し、排水処理過程におけるTRIACの挙動を検討した。

各排水試料はSDBフィルターでメタノール抽出し、窒素乾固後に500 µLのメタノールで再溶解した。LC-MSMSによる同定結果を図0. 1 1に示す。アゴニスト類の合計濃度としては放流水では流入水に比べて1/20程度に大きく減少していた。

流入水(Site3_IF)では比較的高濃度のT3(2.5 ng/L)及びT4(6.3 ng/L)に加え、GC-1(4.3 ng/L)、T1(1.2 ng/L)などが同定定量されたが、TRIACは不検出であった。一方、Site3_AS及びSite3_EFの試料からは、それぞれ0.5 ng/L及び0.3 ng/LのTRIACが検出された。T3は両試料から検出されず、T4濃度はそれぞれ0.066 ng/L(Site3_AS)及び0.054 ng/L(Site3_AS)と、Site3_IFのT4濃度に比べて1/100程度まで減少していた。

生体中において、TRIACはT3、T4の代謝物として生成されることが知られている。これらの結果は、下水放流水中のTRIACが排水処理過程で流入したT3またはT4から生成される可能性を示唆している。また、TRIACはSite3_ASから検出されることから、活性汚泥処理を含む過程で生成している可能性が示唆された。一報Site3_EFにおけるTRIAC濃度はSite_ASより4割程度減少しており、塩素処理により生成することは考えにくく、また逆に塩素処理による分解効率は高くないと考えられた。

一方、hTRアゴニスト活性に着目すると、Y2H法で測定した活性はSite3_ASで114 ng-T3 eq./L、Site3_EFで65 ng-T3 eq./Lであった。Site3_IFでは不検出であったが、これは多様な成分が含まれている流入水では酵母に対する毒性等の影響が排除できず、試験が不成立であったと考えられる。このバイオアッセイ結果に対して、LC-MSMSで定量されたアゴニスト濃度にそれぞれの活性値を積算すると、Site3_IFではGC-1が活性の主要因であるのに対し、Site3_AS及びSite3_EFではTRIACが主要因になっていた。また、Site3_AS及びSite3_EFではY2H法で得た活性値とLC-MSMSで測定して算出した活性推定値とは良好に一致していた。

これらの結果を総合すると、流入水に含まれていたT4、GC-1、T3、T1、rT3及びTBBPA等は処理過程で大部分が分解除去されるが、一部TRIACが生成し、それが放流水のhTRアゴニスト活性の主要因となっていることが示された。特にTRIACはその元物質であるT3及びT4に対してモル当たりの活性がいずれも約200倍であることから、T3、T4→TRIACの変換率が0.5%以上であると活性は増大することを意味している。

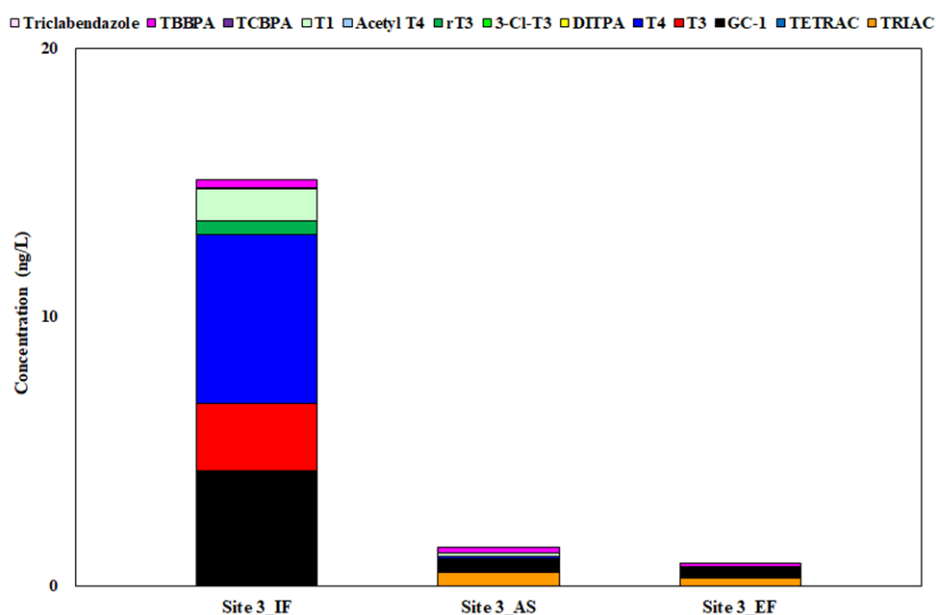


図0. 1 1. 下水流入水、中間処理水、放流水におけるhTRアゴニスト活性化合物の挙動

5－2．環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

該当なし。

<行政等が活用することが見込まれる成果>

重点課題 ⑭ において掲げられるニーズのうち、「子どもへの新規化学物質に関する分析方法等の健康影響検出に係る先進的研究」では、子どもの化学物質を取り巻く状況として、未解明な健康影響に対する子どもへのばく露評価等を確立し、リスク評価をすることが求められている。本研究で創出される新規スクリーニング手法は、本ニーズ内であげられているノンターゲット分析やバイオマーカー探索を含んでいることから、子どもたちの血液・尿等の生体試料に対する、少量で精度・感度良く効率的に分析する方法の開発に取り組み、信頼性のある手法の確立に貢献すると予想できる。

本研究の成果は、TRのみならず受容体結合活性を有する多くの化学物質への応用が可能であり、生理活性メカニズム解明などの学術的知見の獲得に始まり、将来的には汎用のスクリーニング手法として、国内・国外での環境化学物質モニタリングに適用可能であると予想される。そのため、これらに関連する専用の分離基材及び化学物質データベース（精密質量、生理活性、化学構造）は、継続的にアップデートされる消耗品として潜在的な環境ビジネスの市場として期待できる。

さらに、本研究で得られる受容体模倣基材は、環境中のアレルゲンや生理活性物質を選択的に捉えるハウスケア製品（家庭用クロス）、ヘルスケア製品（マスク、フィルター）にも適用可能であると予想され、今後需要が強まる有害環境から派生した医薬・健康ビジネスの市場として期待できる。

5－3．研究目標の達成状況

○TR模倣クロマトグラフィーとTR生理活性／精密質量データベースを組み合わせた新規TRスクリーニング手法の確立 【自己評価：計画通りに進展した】

サブテーマ1、2ともに当初の計画よりも成果が出ており、TR模倣クロマトグラフィーの確立とTR活性／精密質量データベースの作成が着実に進行した。最終的には、TR模倣基材を用いたクロマトグラフィーによって、既知TR活性物質の保持強度と生理活性強度の間に線形の関係が確認されたことから、今後、同手法を用いることで未知TR活性物質特定の可能性が見いだされた（図1. 14参照）。

○実環境試料中の複数の未知TR活性物質の同定

【自己評価：計画以上の大きな進展があった】

実試料を用いた評価においては、新規TR活性物質は明にならなかったものの、TR模倣基材を用いることで、環境中のTR活性物質を完全に捕捉し、さらに、データベースから寄与率を算出することができた。また、これまで見落とされていた原因物質が特定され、さらにその物質を用いた動物実験から、特殊な内分泌かく乱作用の可能性が示唆された。本成果は、環境中における化学物質の同定とともに、今度検討すべき新たな課題創出にもつながった（図1. 15，図2. 6参照）。

※本研究は、研究前半で研究体制を変更し、動物実験を交えた研究を進めた。その結果、当初の目的のみにとどまらず、毒性評価、さらにはその毒性機構解明にまで踏み込んだ成果を出すことができた。

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

2件

<主な査読付き論文>

1) E. KANAO, T. MORINAGA, T. KUBO, T. NAITO, T. MATSUMOTO, T. SANO, H. MAKI, M. YAN、 K. OTSUKA: **Chemical Science** 409-418, 11 (2020)

Separation of Halogenated Benzenes Enabled by Investigation of Halogen-p Interactions with Carbon Materials.

2) R. OMAGARI, M. YAGISHITA, M. YAMASAKI, R. KAMATA, M. TERASAKI, F. SHIRAISHI, T. KUBO, D. NAKAJIMA: **Environmental Monitoring & Contamination Research**, accepted (2022)

Evaluation of human thyroid receptor-agonist activity in 796 chemical compounds using a yeast two-hybrid assay with *Saccharomyces cerevisiae* Y190.

6-2. 知的財産権

該当なし。

6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	2件
その他誌上発表（査読なし）	0件
口頭発表（学会等）	5件
「国民との科学・技術対話」の実施	1件
マスコミ等への公表・報道等	0件
本研究に関連する受賞	1件

7. 国際共同研究等の状況

「日本国国立環境研究所とヤンゴン第二医科大学との間における化学物質の内分泌かく乱作用に関する共同研究についての覚書」に基づき、共同研究を実施中。同大学と農地における受容体結合活性物質のスクリーニング試験を行うこととしており、本課題において作成予定のTR結合活性物質の化学分析法を活用する予定である。

8. 研究者略歴

研究代表者：久保 拓也

京都工芸繊維大学大学院機能科学専攻修了、博士（工学）。東北大学助手／助教を経て、現在、京都大学大学院工学研究科 材料化学専攻 准教授

研究分担者：

1) 中島 大介（サブテーマ代表者）

東京理科大学大学院薬学研究科博士後期課程修了、博士（薬学）。東京理科大学助手を経て、現在、国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター室長。

2) 中山 祥嗣

岡山大学大学院医学系研究科社会医学専攻修了、医師、博士（医学）。USEPA招聘研究員を経て、現在、国立環境研究所 環境リスク・健康研究センターエコチル調査コアセンター次長。

3) 柳下 真由子

東邦大学理学研究科環境科学専攻博士後期課程修了、博士（理学）。国立環境研究所特別研究員を経て、現在、県立広島大学 生物資源科学部 生命環境学科 助教。

4) 谷川 哲也

東北大学大学院環境科学研究科博士後期課程修了、博士（学術）。現在、京都大学大学院工学研究科 材料化学専攻 研究員

5) 山内 一郎

京都大学大学院医学研究科医学専攻博士課程修了、博士（医学）。現在、京都大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学 助教

II. 成果の詳細

II-1 受容体模倣クロマトグラフィーによる簡便スクリーニングとバイオマーカー探索

国立大学法人京都大学

大学院工学研究科

大学院工学研究科

大学院医学研究科

久保 拓也

谷川 哲也

山内 一郎 (R2～R3年度)

【要旨】

本研究では、TRをモデルとして、化学分析結果のみでTR結合活性を評価できる革新的なスクリーニング手法を創出するための基礎検討として、TR模倣分離基材の設計、評価を行った。生体内で産生されるTR活性物質であるthyroxine (T4) を鋳型としたMIP充填カラムを作製し評価した結果、分子インプリント効果に基づく保持選択性を確認した。次に、ステップワイズ溶出を用いることで、TR非活性は保持なく溶出した一方で、TR活性物質はMIPに強く保持され溶出が確認されなかったことから、TR活性／非活性の2分割分離が実現した。また、T4のアミノ基をアセチル化したAcetylT4を鋳型分子としたMIPを球状シリカ上に被覆したAcetylT4-MIP@SiO₂を作製し、同じくLC評価を行った。その結果、TRの結合活性強度に基づく分離の可能性が示唆された。

また、生体内での分子認識に重要な役割を果たしているハロゲン結合に注目し、新概念のMIP合成とその評価を行った。ハロゲン結合によるMIPを合成し、種々のハロゲン化ベンゼンの保持選択性を評価した結果、位置選択的な分子認識能の発現が示唆され、世界で初めてハロゲン結合を機動力とするMIPの合成に成功した。

次に、迅速・精密なTR結合活性法の確立を目指して、高分離性能を有する分離基材の開発を行った。当初の計画では、モノリス型基材を想定していたが、環境試料の効果的な分離を想定して、均一径粒子に対してMIPを被覆した粒子合成を試作した。また、さらなる分子認識能向上のために、MIPの最適化も行った。長さの異なる架橋剤を用いて、TR模倣MIPを合成し、分子認識能の違いを検討した。その結果、エチレンオキシド数が少ない場合には、認識能が発現せず、逆に多すぎる場合にも認識能が低下することが明らかとなった。さらに、MIP (N=9) を充填したカラムを用いて、TR活性物質の一斉分析を行った。その結果、各物質の保持強度と酵母アッセイで得られたTRに対する生理活性との間に線形の相関がみられた。以上のことから、柔軟な分子認識場の構築によって、受容体と類似した誘導適合的な分子認識能が発現したと考えられる。

最後に、動物実験による生理活性評価を行うべく、まずTR活性物質の生体作用を評価する系の確立を行った。TR異常症の臨床像をもとに、成長度（体長、体重）、下垂体-甲状腺軸、肝臓、心臓、脳をTR作用と関連する指標に設定し、サブテーマ2で同定されたTRIACの生体作用の評価として、マウスを用いた実験を行った。結論として、TRIACは甲状腺からのT4及びT3分泌を抑制する一方で、トランスポーターとの親和性の違いからT4やT3よりも脳へ届きにくく、健常人では脳におけるTR作用を低下させることが示唆された。以上から、TRIACが新規TR作用かく乱物質であることを明らかとし、生体試料や環境中のTRIAC濃度がバイオマーカーとなる可能性を示す成果を得た。

1. 研究開発目的

我々は先行研究において、受容体の分子認識部位を模倣した分子インプリント高分子基材を用いてエストロゲン受容体 (Estrogen Receptor、ER) 結合活性物質の選択的な吸着・分離を実現し、環境中のER活性物質の一次スクリーニング手法の可能性を示した。本概念は、受容体を模倣した基材であることから、結合強度との相関性を示すスクリーニング手法としての可能性が期待できる。これを実現するためには、受容体結合に関する基礎的な知見に基づく精密な基材設計と合成から、化学物質の受容体結合強

度に応じたシグナルを獲得できる新たな方法論が求められる。本研究では、甲状腺ホルモン受容体 (TR) をモデルとして、化学分析結果のみでTR結合活性を評価できる革新的なスクリーニング手法を創出するための基礎検討として、TR模倣分離基材の設計、評価を行った。また、TR結合物質の生理活性評価やバイオマーカー探索においては、工学的試験よりも生物学的試験が好適であると考えられ、TR活性候補物質が、TRの内因性リガンドであるT4やT3のTRへの結合を競合阻害すると仮定すれば、甲状腺ホルモン不応症にみられる低身長や精神発達遅滞、筋力低下などの異常が出現する可能性がある。また、TRシグナルはフィードバック機構を介して甲状腺ホルモンの分泌調節も行っております。同定されたTR活性候補物質がin vitroだけでなく、in vivoでも変化を起こすかを検証することは大変重要であり、マウスへの投与実験から、TR阻害のバイオマーカー探索を目指した。

2. 研究目標

- ・ TR活性物質の包括的な濃縮・分離を可能とする吸着剤開発
- ・ TR結合活性vs保持時間に線形相関性のあるLC評価法開発
- ・ 未知TR活性物質の同定とバイオマーカー探索

3. 研究開発内容

3. 1 試薬

用いた市販の試薬は、特に断らない限り市販品をそのまま使用した。以下、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Tokyo, Japan), Tokyo Chemical Industry Co. Ltd. (Tokyo, Japan), Nacalai Tesque, Inc. (Tokyo, Japan), Shin-Nakamura Chemical Co., Ltd (Wakayama, Japan), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Toronto Research Chemicals (North York, Canada), Cayman Chemical Company (Michigan, USA) はそれぞれWako, TCI, nacalai tesque, Shin-Nakamura, Sigma, TRC, Caymanと示す。使用した試薬は次の通りである。(nacalai tesque): ethanol (HPLC grade), acetonitrile (HPLC grade), methanol (HPLC grade), ethylacetate (HPLC grade), magnesium sulfate, formic acid, acetone, molecular sieves 3A 1/16, (Wako): 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile) (ADVN), ethylene glycol dimethacrylate (EDMA), bisphenol A, hydrochloric acid, (TIC), thyroxine sodium salt pentahydrate, *N*-succinimidyl acetate, 4-vinylpyridine (4-Vp), triiodothyronine, 3, 5, 3'-triiodothyroacetic acid (TRIAC), 17 β -estradiol (E2), (others): polyethylene glyco 400 dimethacrylate (9G), L-thyroxine, *N*-acetyl thyroxin, 3,5-dimethyl-4-(4'-hydroxy-3'-isopropylbenzyl)-phenoxy acetic acid (GC-1), diiodothyropropionic acid (DITPA).

3. 2 装置

HPLC装置: ポンプ, LC-20AB (SHIMADZU), カラムオーブン, CTO-20A (SHIMADZU), 検出器, SPD-M20A (SHIMADZU), UVランプ: Handy UV lamp LUV-16 365 nm (ASONE), UVランプ: Handy UV lamp LUV-16 254 nm (ASONE), 振とう器: Thermomixer C (Eppendorf), オイルバス: ECオイルバススターラー EOS-200RD (ASONE), FT-IR: Nicolet iS5 ATR (Thermo Fisher Scientific Inc.), 液体クロマトグラフタンデム質量分析計 (LC/MS/MS): ポンプ, LC-30AD (SHIMADZU), カラムオーブン, CTO-20AC (SHIMADZU), オートサンプラ, SIL-30AC (SHIMADZU), UV検出器, SPD-M30A (SHIMADZU), 質量分析計, LCMS-8030 (SHIMADZU)

3. 3 シリカ被覆型MIPの合成

シリカゲル (nucleosil) 2.5 gを150 °Cのオーブンで一晩乾燥させた。次にシリカゲル2.5 g、 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate (γ -MAPS) 1.5 mL、 triethylamine 0.25 mL、 toluene 30 mLを混合し、サーモミキサーを用いて90 °Cで加熱攪拌を行った。攪拌終了後、methanolで洗浄した、減圧乾燥を行った。表 1. 1 の組成で鋳型分子、機能性モノマー、架橋剤、溶媒を混合し、3 h攪拌し、鋳型分子-機能性モノマー複合体を形成させた。次に窒素バブリングを行った後に開始剤、 γ -MAPSコートシリカゲルを加え熱重合 (50 °C、 24 h) を行った。残存する鋳型分子を完全に除去するため、作製したMIPをカラ

ムに充填し、1% formic acid in methanolを通液した。溶離液のLC測定を行い、鑄型分子が検出されなくなるまで通液を行った。種々の溶質のLC測定を行い、MIPの吸着選択性を評価した。

表 1. 1 AcetylT4-MIP@SiO₂重合溶液の組成.

	Template	Cross linker	Functional monomer	Initiator	Solvent	Support
AcetylT4-MIP@SiO ₂	AcetylT4 28 μ mol	EDMA 0.25 g	4-vinylpyridine 112 μ mol (23.6 mg)	ADVN 20 mg	methanol 1.7 mL	γ -MAPS coated Silica gel 1.0 g
NIP@SiO ₂	—					

3. 4 ハロゲン結合を利用したMIPの合成

TR模倣MIPの分子認識能向上を目的として、ハロゲン結合を駆動力とするMIPの合成を行った。位置選択的な保持能を獲得するために、*m*-diiodobenzene (*m*-DIB)をターゲットとしたMIPの合成を行った。*m*-DIB が形成するハロゲン結合は弱いため、*m*-DIB-MIPの重合において*m*-DIBの芳香環上の水素が機能性モノマーと水素結合を形成している可能性が考えられる。そこで、機能性モノマーの量を*m*-DIBの水素数にあわせ、鑄型分子の4当量にして表 1. 2 に示す組成でMIPを作製した。比較のためにNIPも作製し、それぞれカラムに充填した。そして、LC測定によって各カラムにおける種々のハロゲン化ベンゼンの保持係数を評価した。また、*m*-diiodotetrafluorobenzene (*m*-DITFB)を鑄型分子に用いたMIPも同様に評価した。同様に、表 1. 3 に示す組成で1, 3, 5-triiodobenzeneを鑄型とするMIP (TIB-MIP及びNIP) を作製し、カラムに充填してLC測定で保持能を評価した。DIBよりも電子求引基のヨウ素が多く、より強力なハロゲン結合形成が期待される。LC評価のほかにNMRを用いた検証も行った。

表 1. 2 *m*-DIB-MIP, *m*-DITFB-MIP重合溶液の組成 (50 °C, 24 h).

	Template	Cross linker	Functional monomer	Initiator	Solvent
<i>m</i> -DIB-MIP	<i>m</i> -DIB 151 mg (320 μ mol)	DVB 1.0 g	1-vinylimidazole 236 μ L (2.56 mmol)	ADVN 20 mg	methanol 2.0 mL
<i>m</i> -DITFB-MIP	<i>m</i> -DITFB 30.1 mg (320 μ mol)				
NIP	—				

表 1. 3 TIB-MIP重合溶液の組成 (50 °C, 24 h).

	Template	Cross linker	Functional monomer	Initiator	Solvent
TIB-MIP	TIB 146 mg (320 μ mol)	DVB 1.0 g	1-vinylimidazole 89 μ L (0.96 mmol)	ADVN 20 mg	methanol 2.0 mL
NIP	—				

3. 5 ポリマー粒子被覆型MIPの合成

図 1. 1 に示すスキームで、MIP被覆ポリマー粒子の合成を行った。このとき、被覆するMIPの合成では、鎖長の異なる架橋剤を使用した。同時に、得られた粒子を走査型電子顕微鏡 (SEM)で観察した。

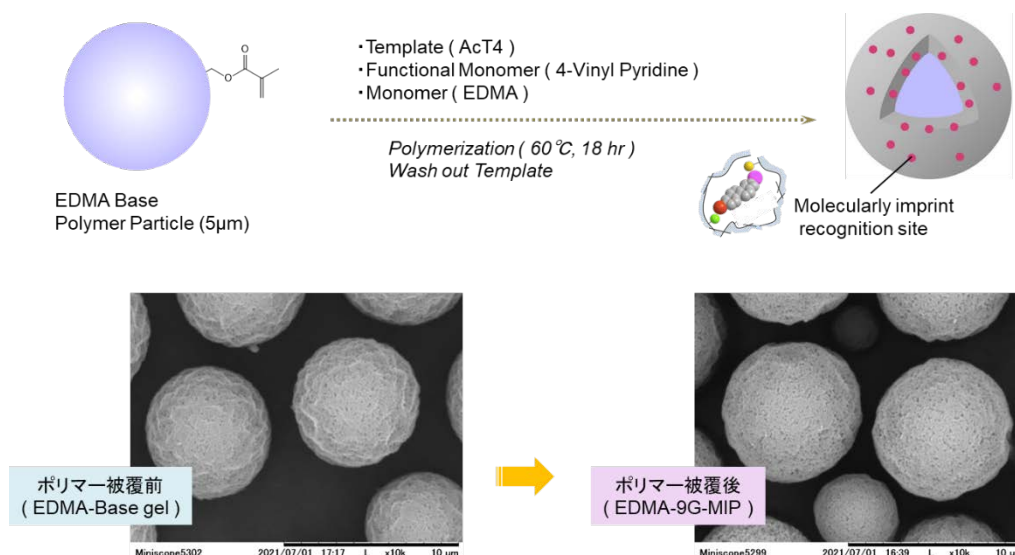


図 1. 1 MIP被覆型ポリマー粒子の合成とSEM画像

3. 6 動物実験

動物実験による生理活性評価を行うべく、まずTR活性物質の生体作用を評価する系の確立を行った。TR異常症の臨床像をもとに、成長度（体長、体重）、下垂体-甲状腺軸、肝臓、心臓、脳をTR作用と関連する指標に設定した。甲状腺機能低下症を惹起したオスのC57BL/6Jマウスに、3週齢からTR活性物質を4週間給水投与し、評価を行った。

4. 結果及び考察

4. 1 表面インプリンティング法を用いた均一径MIP粒子の作製

AcetylT4-MIPはTR結合物質に対して選択的吸着能を発現し、AcetylT4-MIP充填カラムを用いることによって、TR結合／非結合物質の二分化分離に成功した。しかし、これまで作製したMIP充填カラムは、破砕状で粒径が不均一はポリマー粒子を充填することによって作製しているため、分離性能が低いという課題が残されていた。そこで均一径MIP粒子の合成法として表面インプリンティング法を用いて新たなMIPを合成、評価した。ポリマー被覆前後のシリカ粒子のSEM画像を図 1. 2 に示す。MIP被覆シリカ粒子の平均粒径は $4.66 \mu\text{m}$ (RSD 13.7%, $n = 30$) であり、破砕状のポリマーと比べ均一な粒子径を持つことを確認した。

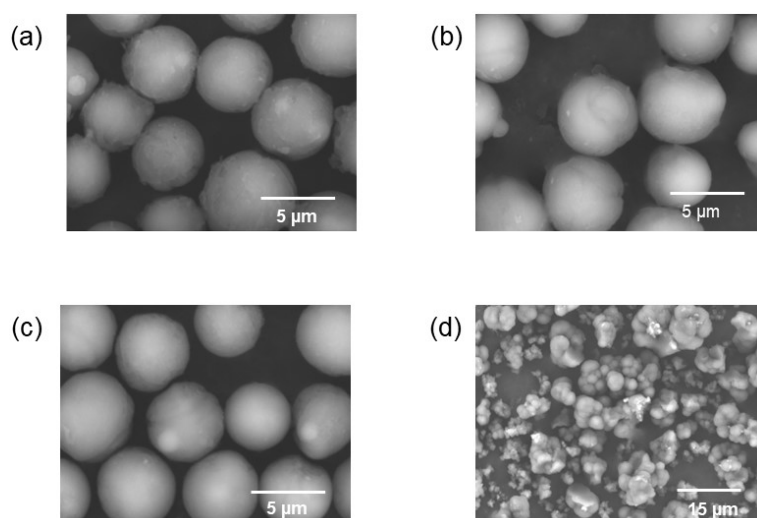


図 1. 2 ポリマー被覆前後のシリカ粒子のSEM画像. (a) AcetylT4-MIP@SiO₂, (b) NIP@SiO₂, (C) bare SiO₂, (d) Table 3-3の組成で作製した破砕状のMIP

次にAcetylT4-MIP@SiO₂とNIP@SiO₂における種々の溶質の保持係数を図1. 3に示す。AcetylT4-MIP@SiO₂はNIP@SiO₂と比べTR結合物質に対して強い保持を示し分子認識能を発現することを確認した。また、AcetylT4-MIP@SiO₂の分離性能を評価するため、AcetylT4-MIP@SiO₂充填カラム及び破碎状のAcetylT4-MIP充填カラムにおける分離性能を評価したところ、破碎状のAcetylT4-MIP充填カラムの段数 $N = 13$ であったのに対してAcetylT4-MIP@SiO₂充填カラムにおける段数は $N = 583$ であり、段数が50倍以上向上したことを確認した。さらに、AcetylT4-MIP@SiO₂充填カラムを用いてTR結合物質であるT3、T4、TRIAC、TETRAC、GC1、DITPAと非結合物質であるE2、BPAの一斉分析を行った。TR非結合物質は試料注入直後に溶出した一方で、TR結合物質は強く保持されたため、グラジエント溶出を行うことによってTR結合／非結合物質の活性の有無に基づいた分離に成功した（図1. 4）。

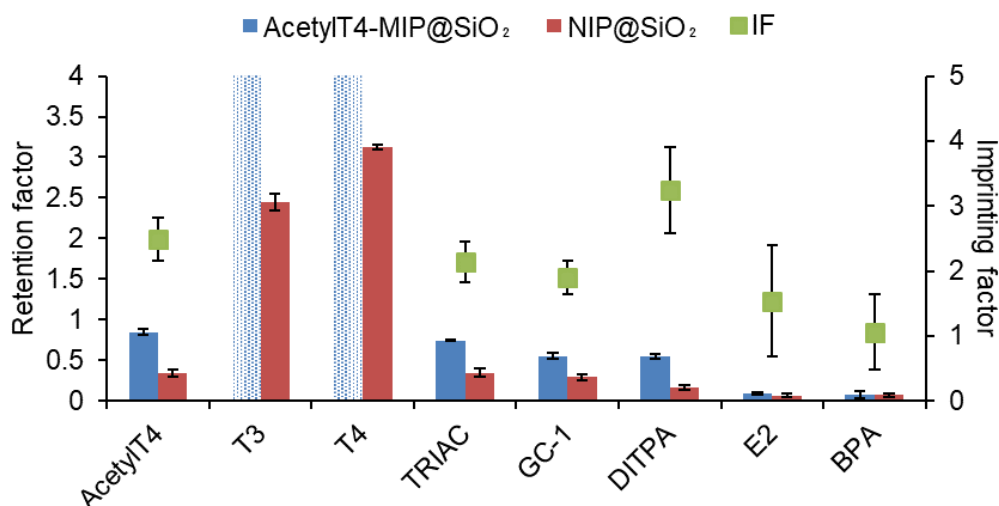


図1. 3 AcetylT4-MIP@SiO₂及びNIP@SiO₂充填カラムにおける種々の溶質の保持係数

LC condition: column, AcetylT4-MIP@SiO₂ packed column (50×2.0 mm i.d.), NIP@SiO₂ (0.25 g) packed column (50×2.0 mm i.d.); injection volume, 5 μ L; flow rate, 0.2 mL/min; temperature, 30 $^{\circ}$ C; detection, UV (240 nm); mobile phase, methanol/acetonitrile = 3/7.

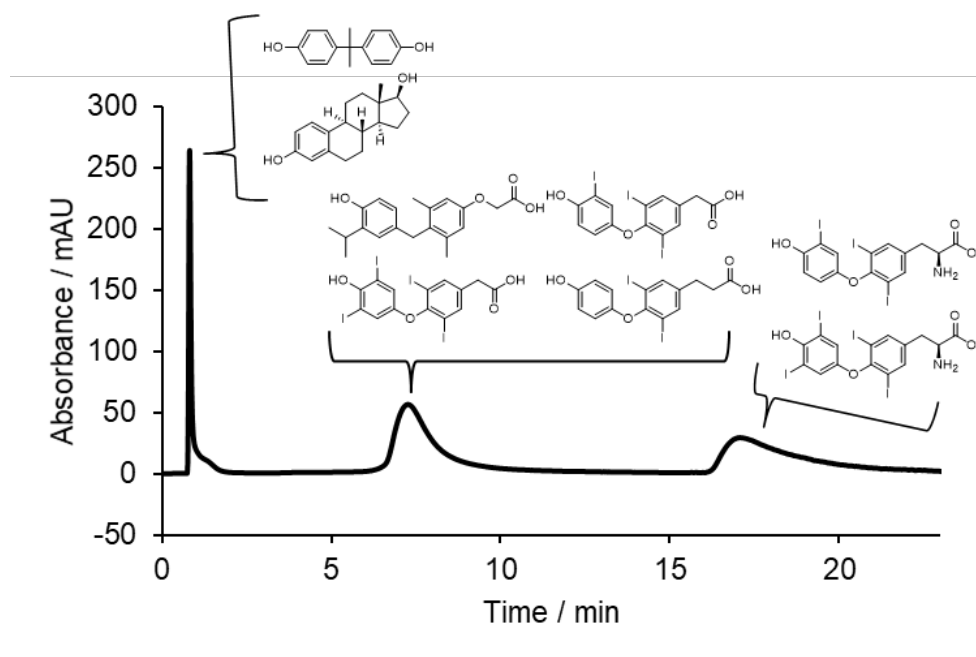


図1. 4 AcetylT4-MIP@SiO₂充填カラムを用いたTR結合物質と非結合物質の分離

LC condition: injection volume, 5 μ L; flow rate, 0.2 mL/min; temperature, 30 $^{\circ}$ C; detection, UV (240 nm), gradient condition: Mobile phase, (A) acetonitrile, (B) 0.1% formic acid in methanol; 0–3 min, 100% A, 3–18 min, linear gradient from 0% to 50% B, 18–23 min, 50% B.

4. 2 ハロゲン結合を利用したMIPの評価

機能性モノマーを1.3 mmolおよび2.6 mmol用いて調製したm-DIB-MIPカラムにおける各溶質の保持係数とImprinting factorを図1. 5に示す。機能性モノマーを1.3 mmolおよび2.6 mmol用いて調製したm-DITFB-MIPカラムにおける各溶質の保持係数とImprinting factorを図1. 6に示す。機能性モノマー量を増やすことでDITFB群への保持が顕著に増加しており、機能性モノマーである1-vinylimidazoleとDITFB間のハロゲン結合が保持に寄与していることがわかった。

また、m-DIB-MIPにおいて機能性モノマーを2当量から4当量に増加することでm-DIB、m-DITFBに対するImprinting factorが増大している。これは、m-DIBと機能性モノマー間のハロゲン結合が弱く、鋳型分子の2当量の機能性モノマーでは複合体を形成しきれていないためだと考えられる。ハロゲン結合による複合体を形成していない機能性モノマーはm-DIBの水素と水素結合している可能性が考えられる。m-DITFB-MIPにおいては4当量にすることでImprinting factorが減少した。このことからm-DITFBと機能性モノマー間のハロゲン結合が十分に強力であるため、鋳型分子の2当量の機能性モノマーでハロゲン結合が形成しきっていると考えられる。m-DITFB-MIPにおいてm-DIBに対する保持選択性が小さい理由はm-DIBがハロゲン結合を形成しにくいからだと考えられる。

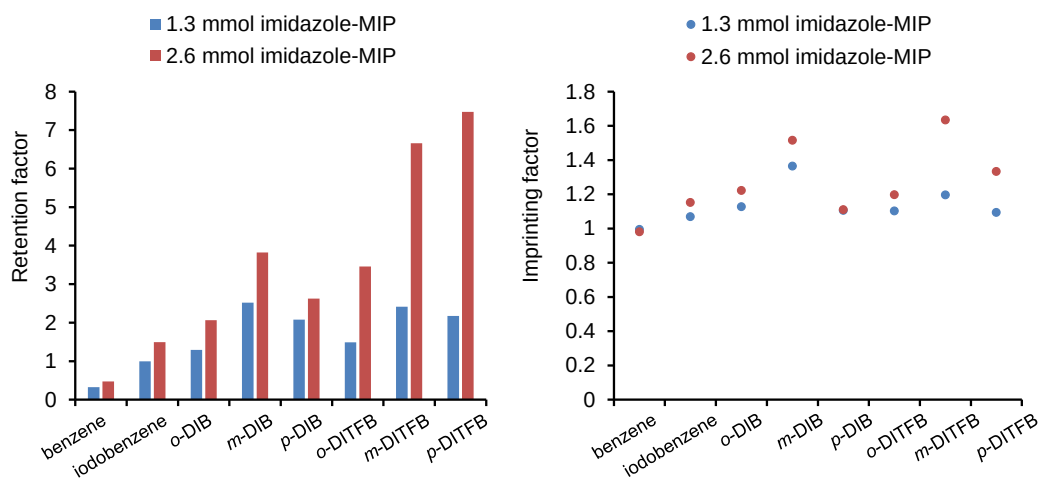


図1. 5 1.3 mmolおよび2.6 mmol用いて調製したm-DIB-MIPカラムにおける各溶質の保持係数とImprinting factor.

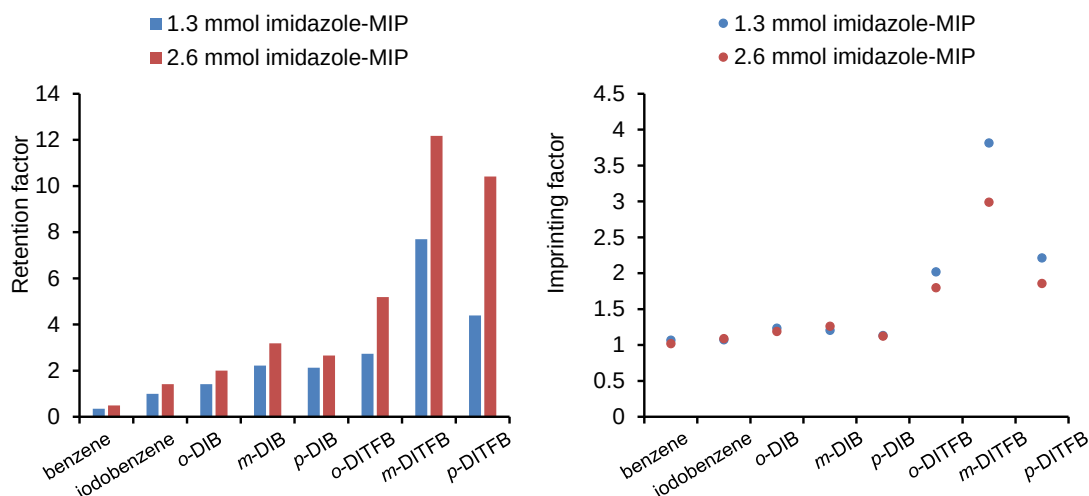


図1. 6 1.3 mmolおよび2.6 mmol用いて調製したm-DITFB-MIPカラムにおける各溶質の保持係数とImprinting factor.

TIB-MIP、NIPにおける各溶質の保持係数およびImprinting factorを図1. 7に示す。TIBに対するImprinting factorが一番大きいことから鑄型分子に対する分子認識場の形成に成功したと考えられる。m-DIBに対する保持選択性は確認できたが、m-DITFBに対する保持選択性は確認できなかった。このことから、ハロゲン結合より水素結合が優先された可能性がある。機能性モノマーの増量および1,3,5-triiodo-2,4,6-trifluorobenzene-MIPの保持選択性評価を行うことで確認が可能だと考えられる。次に、TIP-MIP、NIPにおける各溶質の保持係数およびImprinting factorを図1. 8に示す。1,3,5-TBrPに対するImprinting factorが一番大きいため、鑄型分子であるTIBに対してと同様の相互作用に基づく分子認識能が確認できた。また、ヨウ素化合物より保持が小さいため、ハロゲン結合に基づく保持であると示唆された。ヨウ素化合物のImprinting factorが小さいのは分子サイズが小さいことと σ ホールが小さいことに起因すると考えられる。

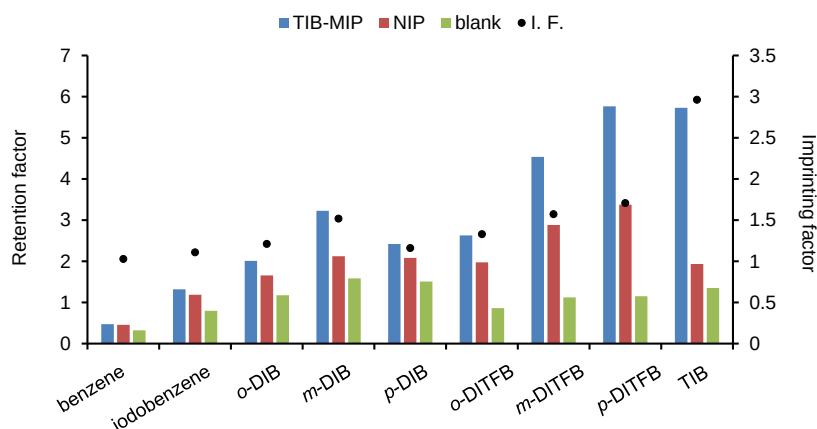


図1. 7 TIB-MIP, NIPにおける各ヨウ素化合物の保持係数およびImprinting factor.

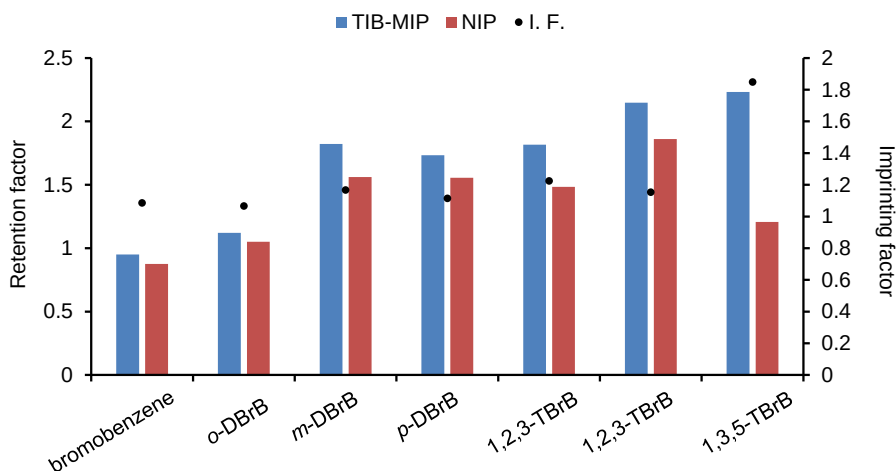
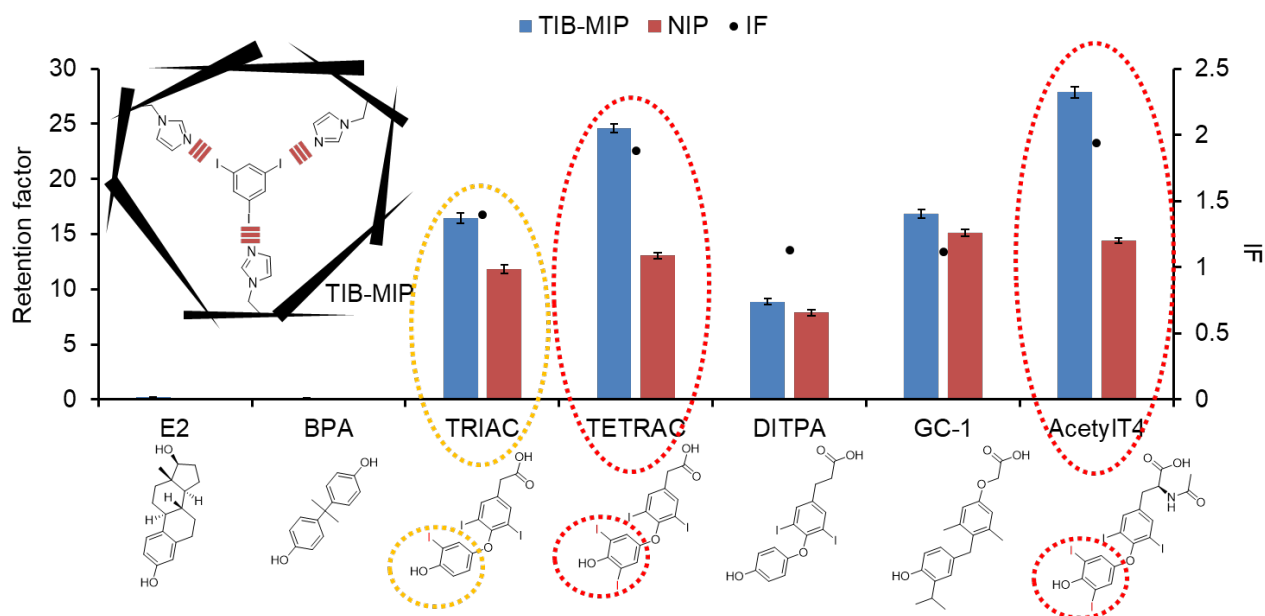


図1. 8 TIP-MIP, NIPにおける各ブロモ化合物の保持係数およびImprinting factor.

さらに、ハロゲン結合を用いたMIPのTR活性物質に対する評価を行った。TIB-MIPを充填したカラムを用いて、種々の物質に対する保持選択性を評価した。その結果、水素結合性のMIPと同様に、E2やBPAなどのTR非活性物質には保持を全く示さなかった(図1. 9)。一方で、TR活性物質に対しては、特に、フェノール骨格側のヨウ素に対する選択性が高く発現し、TETRACやAcetylT4に対する選択性が確認された。以上のことから、単純なハロゲン結合を発現するMIPが、水系評価におけるTR活性物質に対しても、選択性を示すことが明らかとなった。



LC Condition

column, 50×4.6 mm i.d.; injection volume, 10 μ L; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 30 $^{\circ}$ C; sample, in ethanol; detection, UV (240 nm); mobile phase, ethanol/water = 97/3.

図 1. 9 TIB-MIPカラムにおけるTR活性物質の保持挙動

4. 3 NMRを用いたハロゲン結合の評価

上記で、ハロゲン結合に基づく分子認識能が確認された。そこで、この科学的根拠を明らかにするために、NMRのケミカルシフト変化を比較した。ヨウ素を含むいくつかのベンゼン誘導体に対して、ビニルイミダゾールを当量、2当量、4当量加えた際の変化を確認した。通常、何の相互作用も発現していない場合には、NMRにおけるケミカルシフトは変化しない。

それぞれの測定の結果は、図 1. 10 に示す通り、 ^1H 及び ^{13}C のいずれの評価においても、ヨウ素が置換していない炭素原子及びその水素原子でのみ水素結合によるケミカルシフトの変化が確認された。一方で、トリヨードベンゼンの場合には、水素結合が確認されなかった。また、トリヨードベンゼンでは、ヨウ素の置換した炭素では、イミダゾールの存在によって、ケミカルシフトが低磁場側にシフトしている。以上のことから、TIBを鋳型にすることで、通常働くと予想された水素結合性の相互作用は打ち消されて、ハロゲン結合のみが寄与したと考えられる。結果として、TIB-MIPにおいてはメタ位のヨウ素のみが選択的に保持されることが明かとなった。

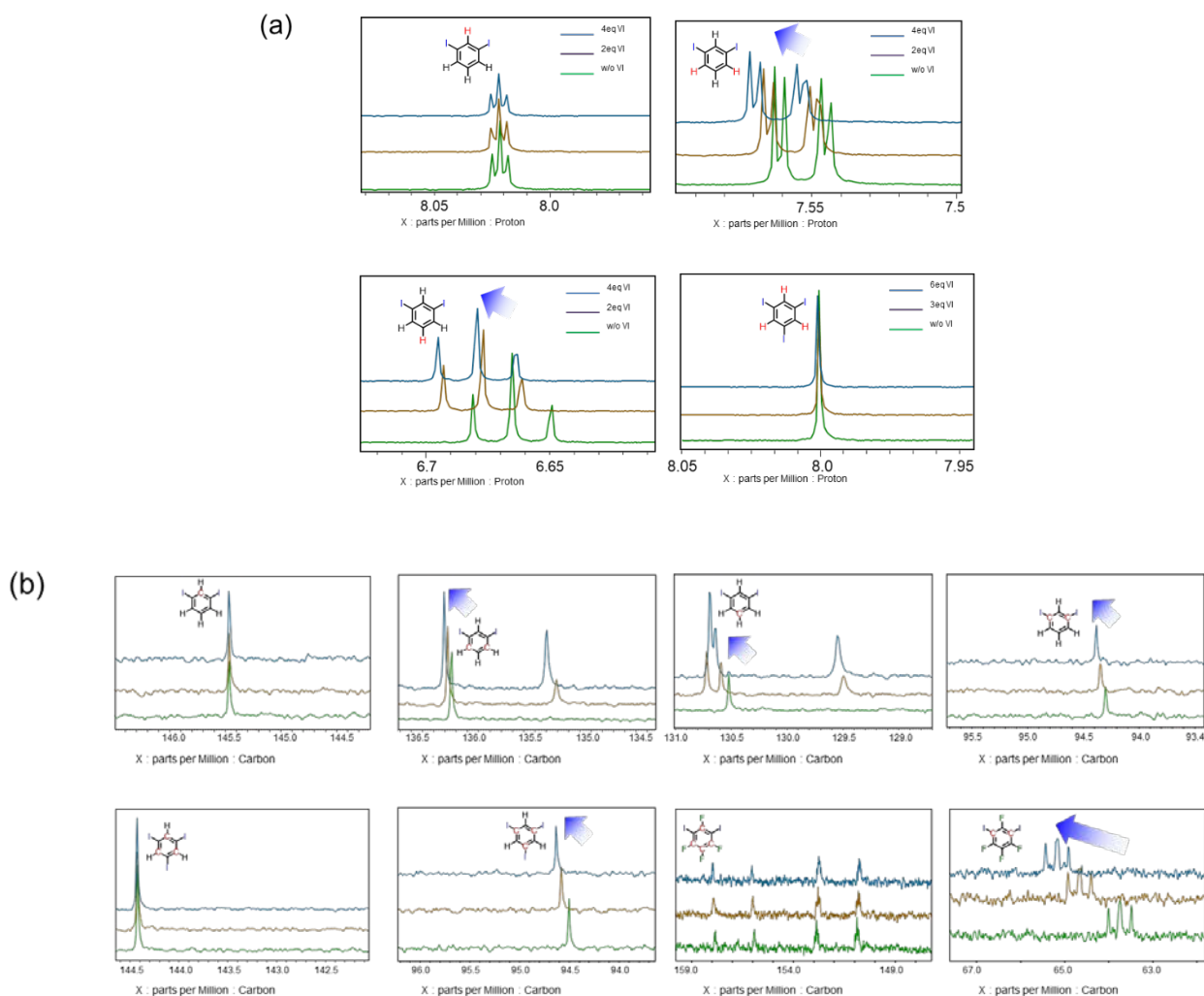


図 1. 10 ビニルイミダゾールを加えた際のTIBのNMRスペクトル

4. 4 ポリマー粒子被覆型MIPの合成

分子インプリント法は、人工的に分子認識能を獲得する手段として、広く研究が展開されている。通常、MIP合成の最適化では、機能性モノマーの選定や重合条件が検討される。しかし、これまでに架橋剤の影響を詳細に検討した報告はほとんどない。そこで、長さの異なる架橋剤を用いて、TRを模倣したMIPを合成し、分子認識能の違いを検討した。架橋剤として、エチレンオキシドユニット数が異なる ($n=1$ から23) ポリエチレングリコールジメタクリレートを用いて、MIPを合成した。得られたMIPを粉碎、洗浄後、HPLC用のカラムに充填し、TR活性物質に対する保持選択性を評価した。

その結果、エチレンオキシド数が少ない場合には、認識能が発現せず、逆に多すぎる場合にも認識能が低下することが明らかとなった。N=9の場合に、非常に高い保持選択性が見られ、他のMIPと比べて最大で10倍程度のインプリンティングファクターが得られた。特徴的な評価結果として、N=9で合成したMIP、NIPにおけるAcetylT4のクロマトグラムを図1. 11に示した。MIPにおいて非常に強い保持が見られており、インプリント効果が発現したことがわかる。

また、興味深い結果として、N=9のMIPを用いた温度変化に対する認識能評価の結果では、重合温度に近い評価温度において、もっとも高い認識能が得られた。通常、水素結合性のMIPでは、低温において高い認識能が得られるが、今回の系では、柔軟性のある架橋剤を用いたことによって、重合時の環境を精密に記憶したMIPの合成が可能になったと考えられる(図1. 12)。

最後に、このMIP (N=9) を充填したカラムを用いて、TR活性物質の一斉分析を行った(表1. 4及び図1. 13)。これからの結果から、NIPではどのTR活性物質に対しても、ほぼ保持が見られなかった

のに対して、MIPでは、明確な保持が確認された。そこで、これらの保持の強度をバイオアッセイにおける活性と比較を行った。その結果、各物質の保持強度と酵母アッセイで得られたTRに対する生理活性との間に線形の相関がみられた（図1. 14）。図0. 7とは、分析条件が異なっており、ピークの形状を改善するための移動相を用いたため、プロットの形状が異なっているが、基本的な保持強度の順位は同じであり、かつクロマトグラフィーとして明確な形状が確認された。

以上のことから、柔軟な分子認識場の構築によって、受容体と類似した誘導適合的な分子認識能が発現したと考えられる。これらの結果から、本研究で目標としていた保持強度と活性強度に線形に近い相関がみられ、新しい概念としての受容体模倣クロマトグラフィーのProof of Conceptが得られた。

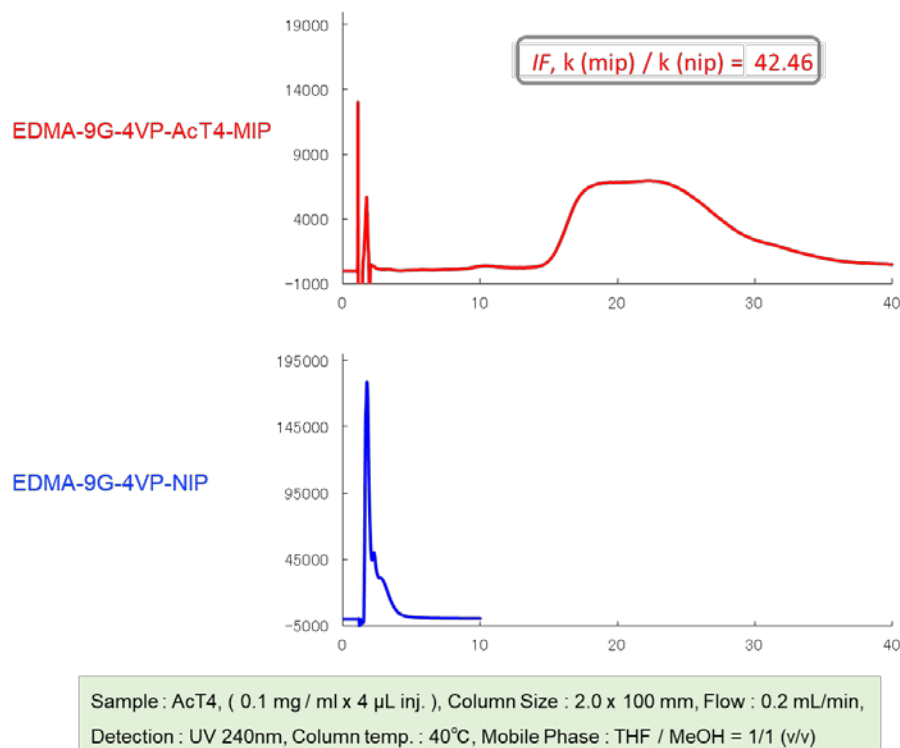


図1. 11 AcT4-MIPとNIP (N=9) におけるAcetylT4のクロマトグラム

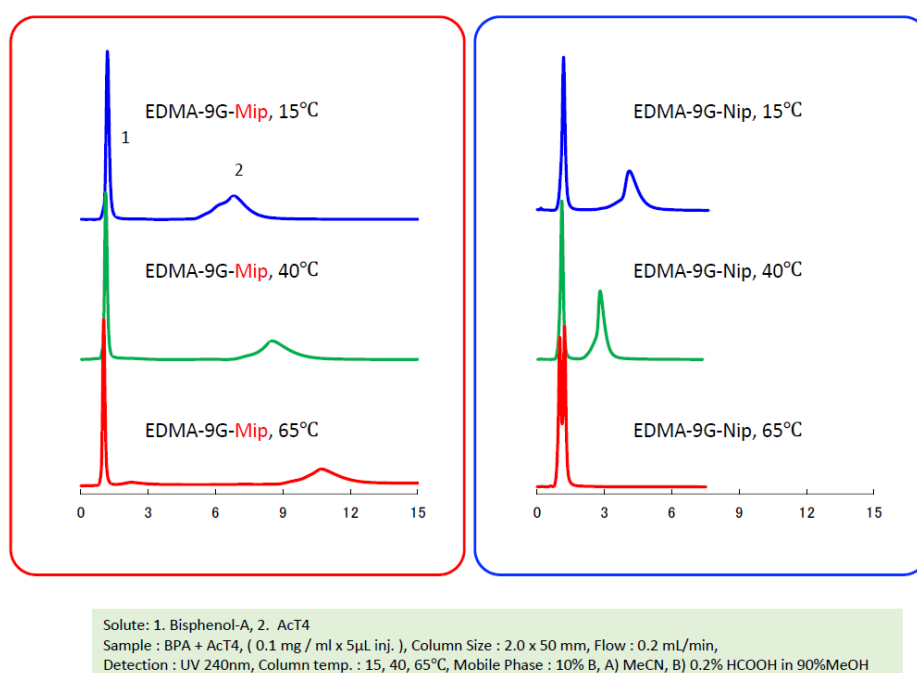


図1. 12 N=9の架橋剤を用いたMIPカラムの温度変化に伴う保持変化

表 1. 4 N=9の架橋剤を用いたMIPカラムでのTR活性物質の保持

Solute	nM	MIP		NIP	
		tR	k	tR	k
Triac	0.0083	7.009	5.042	1.736	0.437
Tetrac	0.014	11.481	8.897	1.652	0.368
GC-1	0.051	8.425	6.263	1.215	0.006
T4	1.7	3.347	1.885	1.262	0.045
T3	1.7	1.581	0.363	1.258	0.041
T3Na	1.9	1.438	0.240	1.215	0.006
DITPA	3	3.636	2.134	2.081	0.723
Cl3-T3	4.8	3.917	2.377	1.708	0.414
AcT4	24	22.322	18.243	1.727	0.430
T1	135	1.730	0.491	1.557	0.289
Tetra-Cl-BPA	177	1.736	0.497	1.860	0.540
Tetra-Br-BPA	530	1.697	0.463	1.688	0.397
Triclabenzole	2272	1.736	0.497	2.021	0.673
t0 (Acetone)	----	1.160	----	1.208	----

Sample: 0.1 mg/ml x 4 μ L inject. Column Size: 2.0 x 100 mm, Flow : 0.2 mL/min

Detection: UV 240nm, Column temp.: 40 °C, Mobile Phase: 50% B, A) THF, B) MeOH

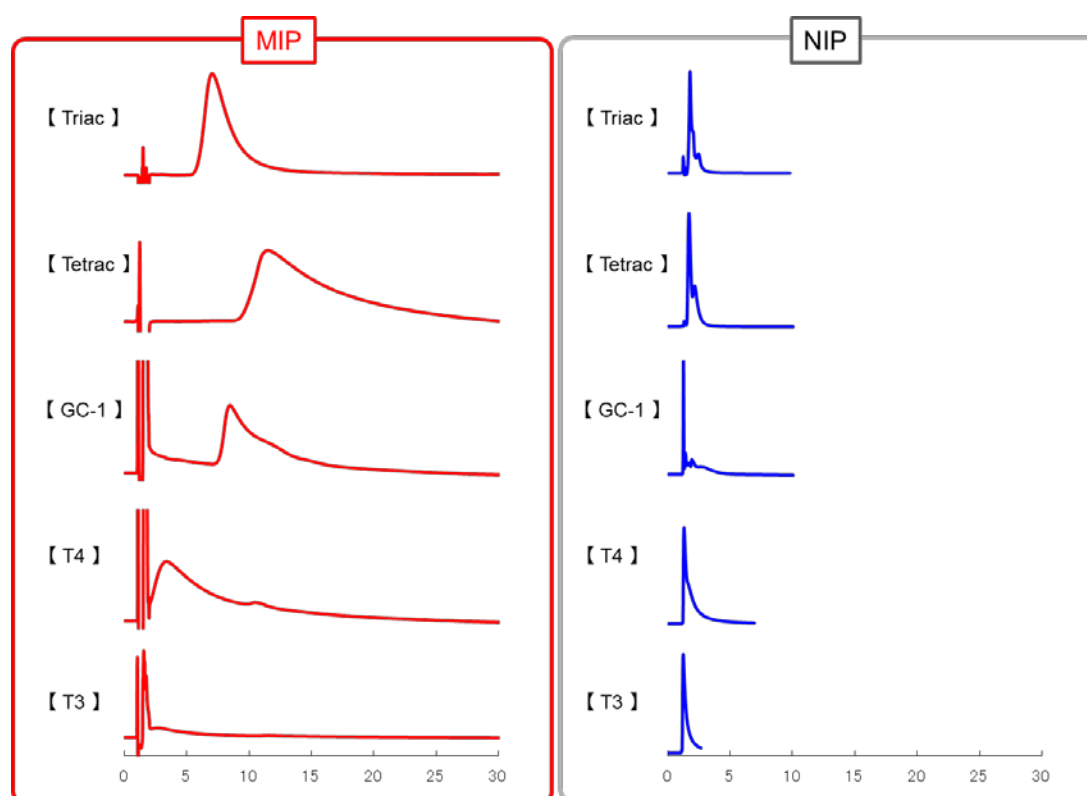


図 1. 13 TR活性物質に対するMIP, NIPでのクロマトグラム (その1)

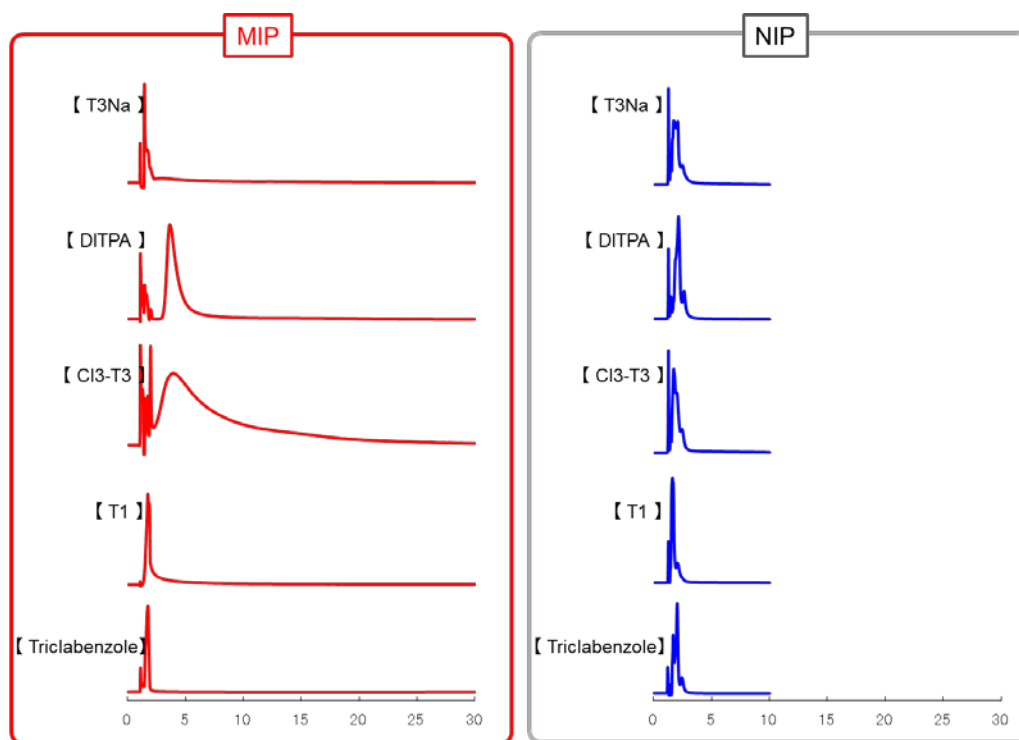


図 1. 1 3 TR活性物質に対するMIP, NIPでのクロマトグラム (その2)

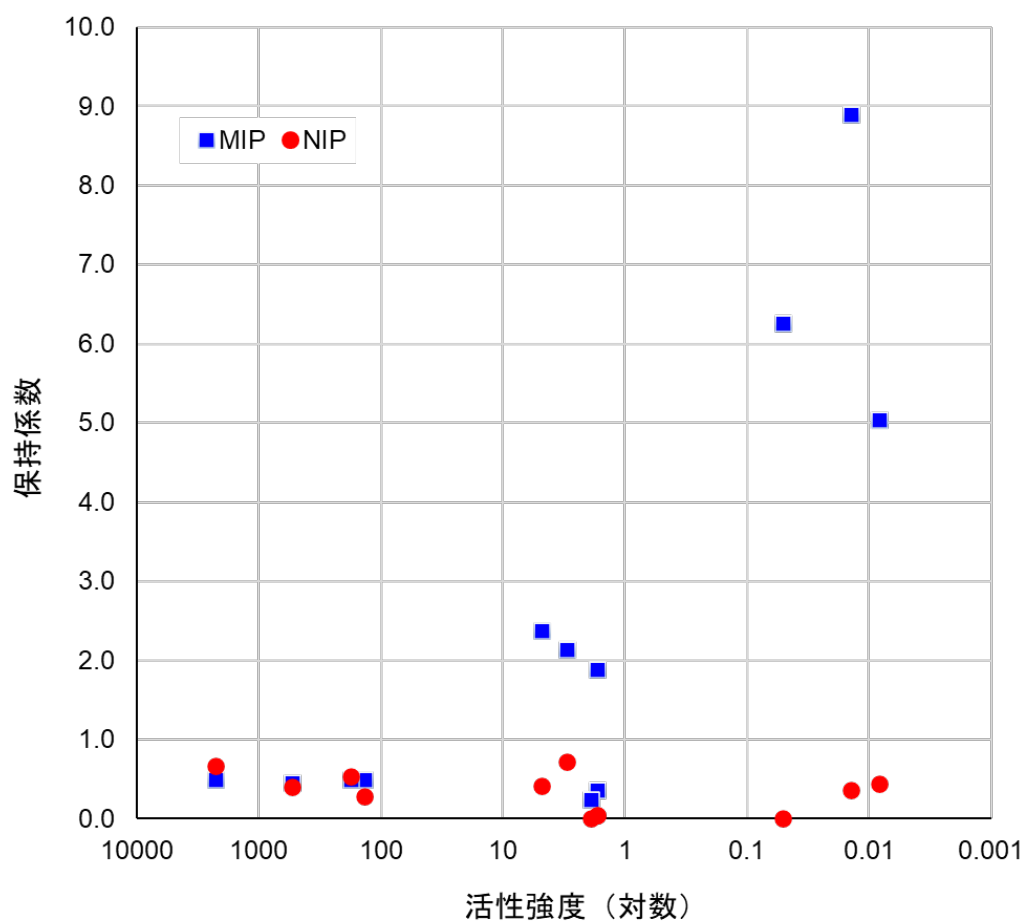


図 1. 1 4 TR活性物質のカラムでの保持係数と生理活性強度の相関図

4. 5 動物実験

まずポジティブコントロールとしてT3を投与した。有意なT3血中濃度の上昇は見られたが、体長はわずかに伸びたものの、体重には差が見られなかった。評価系としての感度を上げるため、内因性のT3やT4を減少させる、すなわち甲状腺機能低下症状態にすることを考案した。条件検討を行い、100 ppmの濃度でプロピルチオウラシル (PTU)を給水投与することにより、free T4感度未満、TSHの顕著な上昇が得られ、甲状腺機能低下症の惹起に成功した。体長、体重の増加量は有意に少なくなった一方で、この成長障害はT3の共投与を行うことにより回復したことから、PTUの毒性ではなく、TR作用低下によるものであることを確認できた。

この系を用いて、サブテーマ2で同定されたTRIACの生体作用の評価に進んだ。1:Vehicle投与、2: PTU投与、3:PTU+0.1ppm T3投与、4:PTU+0.1ppm TRIAC投与の4群を作成した。T3、TRIACの分子量はほぼ差がなく、飲水量にも差がなかったことから、T3とTRIACは物質量としても同等に摂取されたと推定される。結果として、成長障害、下垂体から分泌されるTSHを介した甲状腺腫とも、T3、TRIAC投与のいずれにおいても回復していた。次に肝臓、心臓、脳における遺伝子発現変化を検討した。既報からピックアップしたTR標的遺伝子について、定量PCR法による群間比較を行った。肝臓、心臓においてはT3投与群とTRIAC投与群で同方向への遺伝子発現変化が見られた。しかし、脳においてはT3投与では有意な変化が見られたものの、TRIAC投与では全く変化を認めなかった。

ここまでの結果から脳に対する作用についてTRIACとT3の間に違いがあることが示唆された。このメカニズムを考察するにあたり、血液脳関門の移行性に着目した。血液脳関門におけるT3の輸送はMCT8、OATP1C1に依存するが、TRIACはMCT8による輸送を受けにくいことが報告されている。よってTRIACはT3と比較して血液脳関門の通過性が低いことが想定される。一方でTRIACは下垂体に対するTSH分泌抑制作用はT3と同様に発揮していた。言い換えると、TRIAC投与は甲状腺ホルモン分泌を抑制し、T3血中濃度を下げる方向に働いていた。以上をまとめると、TRIAC投与は血中T3を低下させ、脳においてのみTR作用を減弱させるという仮説が立つ。この仮説の検証のため、1 ppm TRIAC投与群を作成し、Vehicle投与群と比較した。肝臓においてはTR標的遺伝子の発現増加が見られるのに対し、脳においてはTR標的遺伝子の発現はむしろ減少し、仮説を支持する結果を得た（図1. 15）。

結論として、TRIACは甲状腺からのT4及びT3分泌を抑制する一方で、トランスポーターとの親和性の違いからT4やT3よりも脳へ届きにくく、健常人では脳におけるTR作用を低下させることが示唆された。TRIACが新規TR作用かく乱物質であることを明らかとし、生体試料や環境中のTRIAC濃度がバイオマーカーとなる可能性を示す成果を得た。

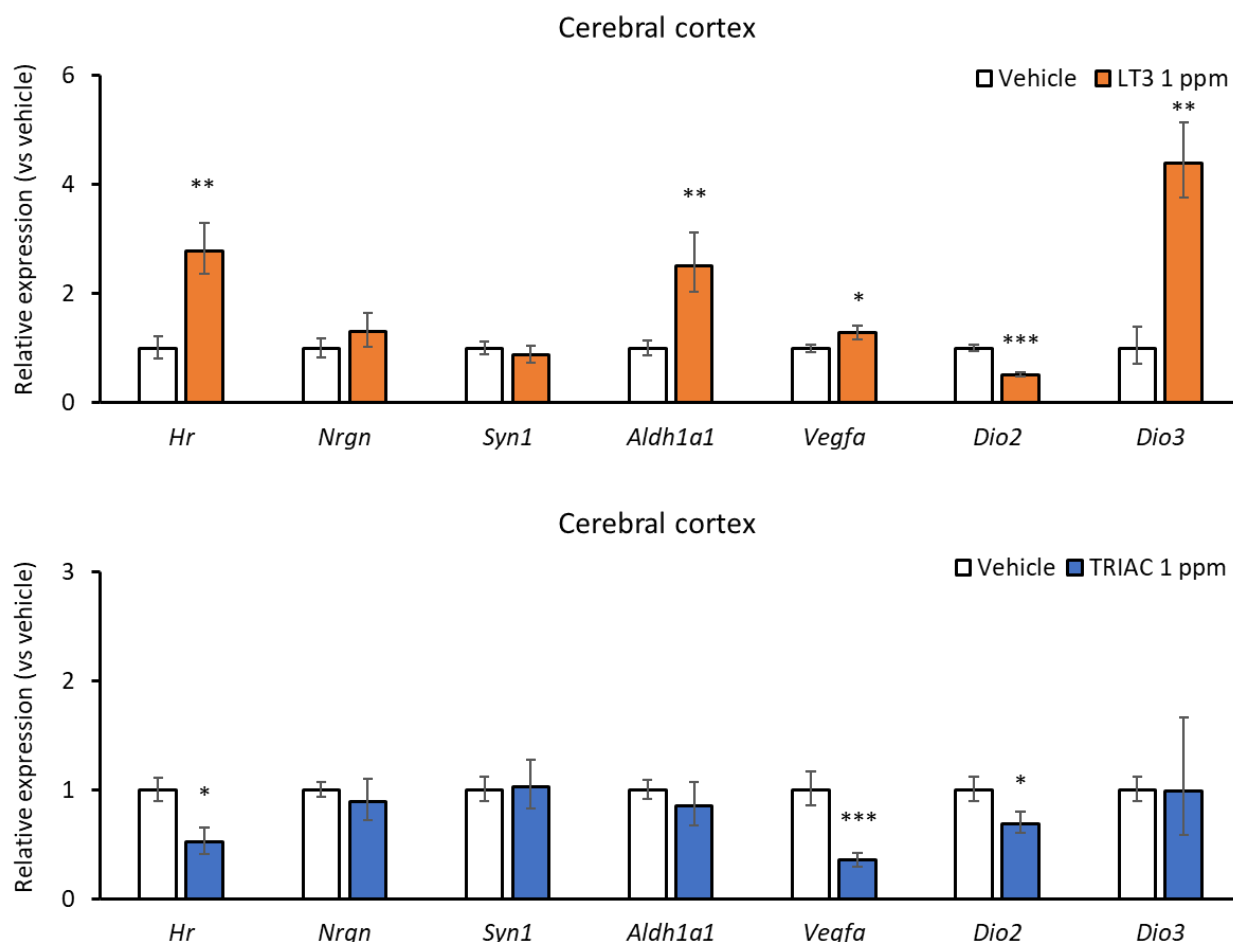


図1. 15 T3及びTRIAC投与によるマウスの標的遺伝子発現結果

5. 研究目標の達成状況

・TR活性物質の包括的な濃縮・分離を可能とする吸着剤開発

【自己評価：計画通りの成果を得た】

研究期間前半において、TR活性物質の包括的な濃縮・分離を実現した。実試料を用いた評価においても、TR活性物質をすべてトラップ可能な吸着剤の開発に成功した（図1. 4参照）。

・TR結合活性vs保持時間に線形相関性のあるLC評価法開発

【自己評価：計画通りの成果を得た】

ポリマーの柔軟性を利用した分子認識能の最適化によって、非常に分子認識能の高いMIPの合成に成功した。また、TR活性物質の保持に対して、生理活性との線形の相関を得ることに成功し、LC評価法として、生理活性を見積もるための新たな概念創出につなげた（図1. 14参照）。

・未知TR活性物質の同定とバイオマーカー探索

【自己評価：計画通りの成果を得た】

実環境試料中からは、新規活性物質は検出できなかったが、サブテーマ2において環境中のTR関与物質を特定した。さらに、その物質の動物実験の結果から、TRIACがTRのアゴニストとして作用するだけでなく、脳に対してだけ作用しないという新たな仮説立てるまでに至った（図1. 15参照）。

6. 参考文献

特に記載すべき事項はない。

Ⅱ－２ 甲状腺ホルモン受容体結合化学物質の精密質量と生理活性に関するデータベースの作成

国立研究開発法人国立環境研究所

環境リスク・健康領域 曝露影響計測研究室

中島 大介

環境リスク・健康領域 曝露動態研究室

中山 祥嗣

広島公立大学法人県立広島大学

生命環境学部

柳下 真由子

〈研究協力者〉

国立研究開発法人国立環境研究所

環境リスク・健康領域 曝露影響計測研究室

大曲 遼

〔要旨〕

環境試料または生体試料のような混合物中から甲状腺ホルモン受容体（TR）結合活性物質のスクリーニング手法を確立することを目的とし、化学物質のhTR結合活性データベース作成、hTR結合活性物質の化学分析のための精密質量データベースの作成、環境水試料のhTR結合活性物質の探索及び構造推定を行った。その結果、796種のアゴニスト活性及び691種のアンタゴニスト活性をY2H法で評価してその活性値の一覧を作成した。うちアゴニスト陽性は17種、アンタゴニスト陽性は47種であった。続いてアゴニスト陽性物質について多段階のコリジョンエネルギーにおけるブリカーサイオンとプロダクトイオンの精密質量（多段階精密質量）を取得し、併せて検量線情報も取得してデータベースを作成した。これらの成果を用い、これまで未解明であった下水処理場排水が示すhTRアゴニスト活性の要因物質の探索を行ったところ、主要因は3,3',5-トリヨードチロ酢酸（TRIAC）であること、排水中のTRIACは流入水中のT3やT4から下水処理場内で変化物として生成している可能性が高いこと等を明らかにした。本サブテーマの研究目標である(a) 約600 物質の*in vitro* 試験によるTR 生理活性（アゴニスト、アンタゴニスト）評価とデータベース化、(b) TR 結合活性物質の精密質量データベースの作成及び(c) 下水処理場排水における既知TR 結合活性物質及び未知活性物質の寄与率評価については、計画通り、あるいは計画以上の成果を達成した。研究成果は3本の論文に整理して投稿し、うち1本は受理済である。

1. 研究開発目的

本サブテーマでは、環境試料または生体試料のような混合物中から甲状腺ホルモン受容体（TR）結合活性物質のスクリーニング手法を確立することを目的とした。この目的を達成するため、TR結合活性を定量的に評価できる酵母アッセイを用い、多種の化学物質のTR結合活性を評価し、データベース化する。また活性を有する物質については、高分解能飛行時間型質量分析計（TofMS）を用いた同定や、トリプル四重極型質量分析計（MS/MS）を用いた高感度定量を実現するために多段階のコリジョンエネルギーにおけるブリカーサイオンとプロダクトイオンの精密質量（多段階精密質量）を取得し、データベースを作成する。またこれらの成果を用い、環境中における未解明のTR活性要因物質の構造推定を行う。

2. 研究目標

- ・約600 物質の*in vitro* 試験によるTR 生理活性（アゴニスト、アンタゴニスト）評価とデータベース化
- ・TR 結合活性物質の精密質量データベースの作成
- ・下水処理場排水における既知TR 結合活性物質及び未知活性物質の寄与率評価

3. 研究開発内容

（1）化学物質のTR結合活性データベース作成

*in vitro*試験により、ER等の他の受容体結合活性試験に供した約600物質について、*in vitro*試験である酵母ツーハイブリッド（Y2H）法によりTR結合活性（アゴニスト及びアンタゴニスト）を同一条件で測

定して定量化した。これらの結果に加え、文献調査及びUS EPAによる内分泌かく乱化学物質スクリーニングプログラム（EDSP21）によるTR結合活性情報等も参照し、測定対象に加えることにより最終的に802物質のアゴニスト活性、691物質のアンタゴニスト活性を評価して整理した。

本研究ではヒト甲状腺受容体（hTR）のリガンド結合領域及び転写活性化因子GAL4のDNA結合領域の発現プラスミド（pGBT9-RLBD）と、コアクチベーターTIF2及びGAL4の転写活性化領域の発現プラスミド（pGAAD424-TF-2）をレポーター遺伝子である β -ガラクトシダーゼを組み込んだ酵母Y190株に導入した株を使用した。試験法は白石らの既報⁹⁾に準じた。TR結合活性強度について、アゴニスト陽性物質に関しては EC_{x10} （nM）で示した。陽性判定は化学発光強度の増加が用量依存性を示し、且つ溶媒対照の4倍以上を示すこととした。 EC_{x10} は、溶媒対照に対する化学発光比が10倍を示す濃度（nM）を回帰直線式により算出した値で示した。アンタゴニスト陽性物質の活性強度は $EC50$ （nM）で表し、陽性判定はリガンド（T3）による活性を用量依存的に抑制した結果、対照に対して40%以上の抑制率を示した場合とした。 $EC50$ はリガンドの活性を50%抑制（影響）する被験物質濃度である。

（２）新規活性物質を含む精密質量データベースの作成

（１）で評価した結果、アゴニスト陽性となった13種の化合物について、液体クロマトグラフィー（LC）／四重極（Q）／飛行時間型質量分析計（ToFMS）を用い、プレカーサーイオン及びプロダクトイオンの精密質量を測定し、定性解析用データベースを作成した。また、プレカーサーイオンを用いた検量線も作成し、簡易的な定量も可能な情報を得た。なお（３）で後述するように、下水処理場排水から検出されたTRアゴニスト活性の要因となる化学物質を探索したところ、（１）で整理したアゴニストで説明できたため、新規活性物質は含めなかった。

本データベースの作成には、液体クロマトグラフィー四重極－飛行時間型質量分析計（LC-QToFMS）Agilent 1260 Infinity LC / Agilent 6546 UHD Accurate-Massを用いた。測定条件は表 2. 1 の通りとした。移動相組成は適宜検討して調整した。

表 2. 1 LC-QToFMSの測定条件

移動相	A MeOH : B 水	ドライガス流量	8 L/min
測定時間	10-15 min	ネブライザ	35 psi
Mass range	100~1100	シースガス温度	350°C
流速	0.2 mL/min	シースガス流量	11 L/min
イオン源	ESI法	キャピラリー電圧	3500 V
ガス温度	350°C	ノズル電圧	1000 V

（３）環境水試料のMIP吸着画分からのTR結合活性物質の探索

TR結合活性が報告されている下水処理場排水を用い、サブテーマ1で作製したMIPへの吸着画分を、LC/QToFMS測定し、（２）項目で作成した精密質量データベースを用いてTR結合活性物質の検出及び定量を行ったが、いずれの物質も検出されなかった。そこで、TR結合活性物質のLC/MS/MSによる定量法を作成し、下水処理場排水中のアゴニストを定量し、各検出物質の寄与率を算出した。

（４）環境水試料のhTR結合活性物質の探索及び構造推定

環境試料として下水処理場排水を用い、バイオアッセイによって検出されたhTRアゴニスト活性の要因となる物質を探索した結果、活性に寄与する新規物質は見当たらず。（１）で得られたアゴニスト陽性物質によって説明ができた。したがって精密質量等により同定を確認し、また下水処理場の流入水・放流水中濃度を計測し、その生成の可能性を検証した。生体試料評価によるバイオマーカー探索についてはサブテーマ1の項に記載した。

4. 結果及び考察

(1) 化学物質のTR結合活性データベース作成

過去に課題分担者らは、化学物質588種のhER結合活性等をY2H法にて評価してきた。本研究では、その約600物質を対象にTR結合活性（アゴニスト及びアンタゴニスト作用）をY2H法にて評価した。対象とした物質には、生態系生物へのエストロゲン様作用が懸念された化合物をはじめ、各種受容体との結合活性が化学構造的に懸念される市販化合物、共同研究者らにより提供された合成試薬などが含まれている。これらの物質についてTR結合活性試験を実施した結果、10物質がアゴニスト作用を、17物質がアンタゴニスト作用を示した。アゴニスト作用で特に活性が強かった5物質はいずれもサイロニン骨格を有していた。最も強い活性がみられたのは甲状腺ホルモンであり、医薬品にも使われている3, 3', 5-triiodothyroacetic acid (TRIAC, チラトリコール)、次いでテトラヨードチロ酢酸、T3、T4と実際の甲状腺ホルモンが続き、人工物としてはビスフェノール、アルキルフェノールのハロゲン化体が活性を示した（表2. 2①）。一方でアンタゴニスト作用を示した20物質に関しては、特異的な類似性は認められなかった（表2. 2②）。

表2. 2 hTRアゴニスト活性化合物一覧

	Test compounds	CAS No.	hTR-agonist activity (nM)
①	3,3',5-Triiodothyroacetic acid (TRIAC)	51-24-1	0.0083
①	3,3',5,5'-Tetraiodothyroacetic acid (TETRAC)	67-30-1	0.014
②	Sobetirome (GC-1)	211110-63-3	0.051
①	3,3',5,5'-Tetraiodothyronine (T4)	51-48-9	1.7
①	3,5,3'-Triiodothyronine (T3)	6893-02-3	1.7
②	3,3',5-Triiodo-L-thyronine sodium salt (T3Na)	55-06-1	1.9
②	3,5-Diiodothyropropionic acid (DITPA)	1158-10-7	3.0
②	3-Chloro-3',5,5'-triiodo-L-thyronine (Cl-3-T3)	909279-46-5	4.8
①	3,3',5'-Triiodo-L-Thyronine (rT3)	5817-39-0	7.0
②	N-Acetyl L-Thyroxine	26041-51-0	24
②	3-Iodo-L-thyronine (T1)	10468-90-3	135
①	Tetrachlorobisphenol A	79-95-8	177
①	Tetrabromobisphenol A	79-94-7	530
②	Triclabendazole	68786-66-3	2272
①	3,3',5-trichlorobisphenol A	40346-55-2	3544
①	2-chloro-4-octylphenol	79162-47-3	3921
①	2,6-dichloro-4-tert-butylphenol	34593-75-4	7513

また、hTR結合活性物質の更なる探索を目的として、TR結合活性に関する文献調査及びアメリカ合衆国環境保護庁（US EPA）による内分泌かく乱化学物質スクリーニングプログラム（EDSP21）によるhTR結合活性の情報等を参照した。EDSP21とは、米国環境保護庁が策定する内分泌かく乱化学物質スクリーニングプログラム（Endocrine Disruptor Screening Program in the 21st century）の略称であり、ハイスループットスクリーニング（HTS）による内分泌かく乱作用試験の対象となる化学物質の優先順位設定を行っている。このEDSP21では、約10,000化合物に関するラットTR（rTR）に対する結合活性（アゴニスト及びアンタゴニスト）が登録され公表されている。このうちアゴニスト活性を有する物質に関しては全てピックアップし、208物質の標準を入手してY2HによりhTRアゴニスト活性を測定した。その結果、7化合物をhTRアゴニスト陽性（表2. 3）と判定した。

表 2. 3 hTRアンタゴニスト活性化化合物一覧

	Test compounds	CAS No.	hTR-antagonist activity (nM)	YTOX (nM)
①	10,10'-Oxibis (phenoxarsine)	58-36-6	11	170
②	Triphenyltin fluoride	379-52-2	31	3435
②	Triphenyltin hydroxide	76-87-9	41	3341
①	Chlorotharoneil	1897-45-6	51	941
②	Triphenyltin acetate	900-95-8	192	3218
②	Captafol	2425-06-1	222	1233
②	Nitroxoline	4008-48-4	361	3808
①	Anthrarobin	577-33-3	493	-
①	Zinc pyrrhione	13463-41-7	558	3525
②	Gentian Violet	548-62-9	734	-
②	Methyl Violet	8004-87-3	836	-
①	3-Hydroxy-1H-phenalen-1-one	5472-84-4	1146	-
②	4-Aminofolic acid (Aminopterin Hydrate)	54-62-6	1194	-
①	2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one	26530-20-1	1261	-
①	Dehydroabietic acid	1740-19-8	1321	-
②	Basic Green	633-03-4	1396	-
①	Tributyltin(IV)chloride	1461-22-9	1856	-
②	Rhodamine 6G	989-38-8	2483	-
①	Abietic Acid	514-10-3	2599	-
①	Metiram	9006-42-2	2628	13746
②	Actinomycin D	50-76-0	2652	-
②	Sodium aristolochate-I	10190-99-5	2659	-
②	Diclofenac Metabolite	13625-57-5	2699	-
②	Oxazolone	15646-46-5	2776	-
②	Cycloheximide	66-81-9	3028	-
②	Lapachol	84-79-7	3191	-
②	Methotrexate	59-05-2	3203	-
①	Copper quinolate	10380-28-6	3923	-
②	Hexachlorophene	70-30-4	4190	-
①	Chlordane	57-74-9	4212	-
①	2-mercaptopyridine-N-oxide,sodium salt	3811-73-2	4322	-
①	AM-580	102121-60-8	4813	-
①	α -Benzoepin	959-98-8	5023	-
②	Phenylarsine oxide	637-03-6	5159	-
①	Dibutyltin(IV)Dichloride	683-18-1	5389	-
①	Ethinylestradiol	57-63-6	5506	-
②	Diclofenac Sodium Salt	15307-79-6	5769	-
②	Diclofenac	15307-86-5	5960	-
①	Ziram	137-30-4	6004	-
②	Omeprazole	73590-58-6	6351	-
②	Thiram	137-26-8	6450	-
②	Methylene blue	61-73-4	6554	-
②	Astemizole	68844-77-9	7330	-
②	Clotrimazole	23593-75-1	8172	-
①	trans-Chlordane	5103-74-2	9700	-
①	cis-Heptachlorepoxyde	1024-57-3	9940	-

一方、EDSP21によるrTRのアнтаゴニスト陽性化合物数は2,000種を超えていたため、活性強度(IC50)を8段階に分け、活性が最も強い群である100 nM以下のものは58種全て、100 nMより活性が弱い化合物に関しては各活性強度域からそれぞれ20化合物を抽出、合計190物質を選定した。さらに、各種文献、特にEXTEND2010及び2016において信頼性が確認されている文献等を参考に、TR結合阻害、甲状腺ホルモン様作用、遺伝子発現への作用など、TR結合活性が強く疑われる化学物質20種に関してもY2H法による評価対象物質に追加した。これら合計210物質のうち、技術的に試験が困難なものを除外した205物質についてもアゴニストと同様に標準物質を入手してY2H法によりhTRアンタゴニスト活性を測定し、26種を陽性と判定した(表2. 2②)。アンタゴニスト作用を示した物質に関しては、その構造中にSn(すず)を含む物質で特に強い活性がみられたが、構造と活性との明確な共通性は示されなかった。

以上、本研究のhTR結合活性物質の探索では、796種のアゴニスト活性及び691種のアнтаゴニスト活性をY2H法で評価した結果、17種をアゴニスト陽性として、47種をアンタゴニスト陽性として判定した。また、これらhTR結合活性物質の化合物情報及び活性値を統合して、hTR結合活性化合物のデータベースを作成した。

(2) 新規活性物質を含む精密質量データベースの作成

環境試料中、特に下水処理場排水にはTRアゴニスト活性が検出されることが報告されているが²⁾、その要因物質は同定されていない。その探索にはTR結合活性物質のLC-QToFMSやLC-MS/MSでの測定が欠かせない。そこで、(1)のY2H法でhTRアゴニスト陽性と評価された化合物17種を対象として、標準試料が入手可能である13化合物の測定情報を取得した。測定情報はLC-QToF-MS (Agilent LC 1260 / MS 6546)を用い、同定用の多段階精密質量(MSMSスペクトル)及び定量用のToFモードでの検量線とした。多段階精密質量は、陽性化合物のPrecursor ionを対象に5段階のコリジョンエネルギー(10, 20, 30, 40, 50)を設定し、Product ion scanから獲得した。また、獲得した多段階精密質量の情報はPersonal Compound Database and Library (PCDL)に登録し、同定用のデータベースを作成した(図2. 1)。

検量線情報の取得は、各陽性化合物のPrecursor ionを対象として、10, 20, 50, 100 µg/Lの濃度範囲で行った。各検量線は、内標準(T3, T4の¹³C-6体)に対する面積比から取得し、得られた検量線情報は同定用のPCDLと合わせて陽性化合物の精密質量データベースとして作成した(図2. 2)。一方、後述するように、下水処理場排水から検出されたTRアゴニスト活性の要因となる化学物質を探索した結果、前述のhTRアゴニスト陽性化合物で説明できたため、新規活性物質は含めなかった。

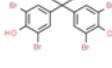
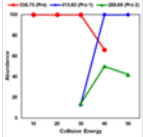
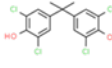
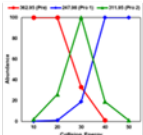
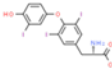
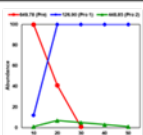
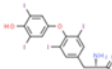
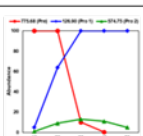
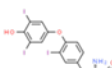
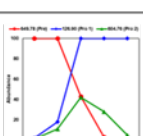
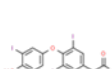
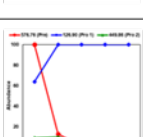
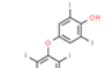
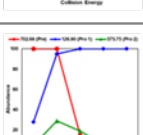
化合物名	CAS	分子式	分子量	構造式	PCDL
Tetrabromobisphenol A	79-94-7	$C_{15}H_{12}Br_4O_2$	543.87		
Tetrachlorobisphenol A	79-95-8	$C_{15}H_{12}Cl_4O_2$	366.07		
3,5,3'-Triiodothyronine (T3)	6893-02-3	$C_{15}H_{12}I_3NO_4$	650.97		
3,3',5,5'-Tetraiodothyronine (T4)	51-48-9	$C_{15}H_{11}I_4NO_4$	776.87		
3,3',5'-Triiodo-L-Thyronine (rT3)	5817-39-0	$C_{15}H_{12}I_3NO_4$	650.97		
3,3',5-Triiodothyroacetic acid (TRIAC)	51-24-1	$C_{14}H_9I_3O_4$	621.93		
3,3',5,5'-Tetraiodothyroacetic acid (TETRAC)	67-30-1	$C_{14}H_8I_4O_4$	747.83		

図 2. 1. hTR アゴニスト陽性13化合物の多段階精密質量とコリジョンエネルギーを変化させたときのプロダクトイオン強度の変化 (その 1)

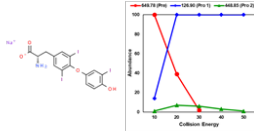
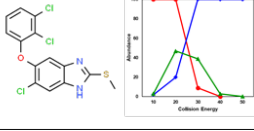
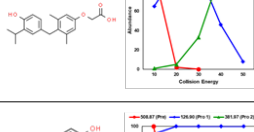
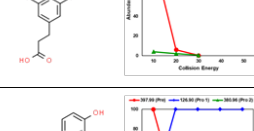
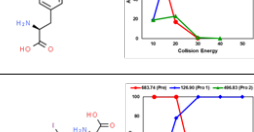
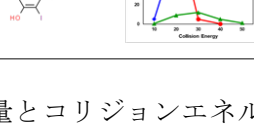
化合物名	CAS	分子式	分子量	構造式
3,3',5-Triiodo-L-thyronine sodium salt (T3Na)	55-06-1	C ₁₅ H ₁₁ I ₃ NNaO ₄	672.96	
Triclabendazole	68786-66-3	C ₁₄ H ₉ Cl ₃ N ₂ OS	359.66	
N-Acetyl L-Thyroxine (Acetyl T4)	26041-51-0	C ₁₇ H ₁₃ I ₄ NO ₅	818.91	
Sobetirome (GC-1)	211110-63-3	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	328.4	
3,5-Diiodothyropropionic acid (DITPA)	1158-10-7	C ₁₅ H ₁₂ I ₂ O ₄	510.06	
3-Iodo-L-thyronine (T1)	10468-90-3	C ₁₅ H ₁₄ INO ₄	399.18	
3-Chloro-3',5,5'-triiodo-L-thyronine (3-Cl-T3)	909279-46-5	C ₁₅ H ₁₁ ClI ₃ NO ₄	685.42	

図 2. 1 hTRアゴニスト陽性13化合物の多段階精密質量とコリジョンエネルギーを変化させたときのプロダクトイオン強度の変化（その 2）

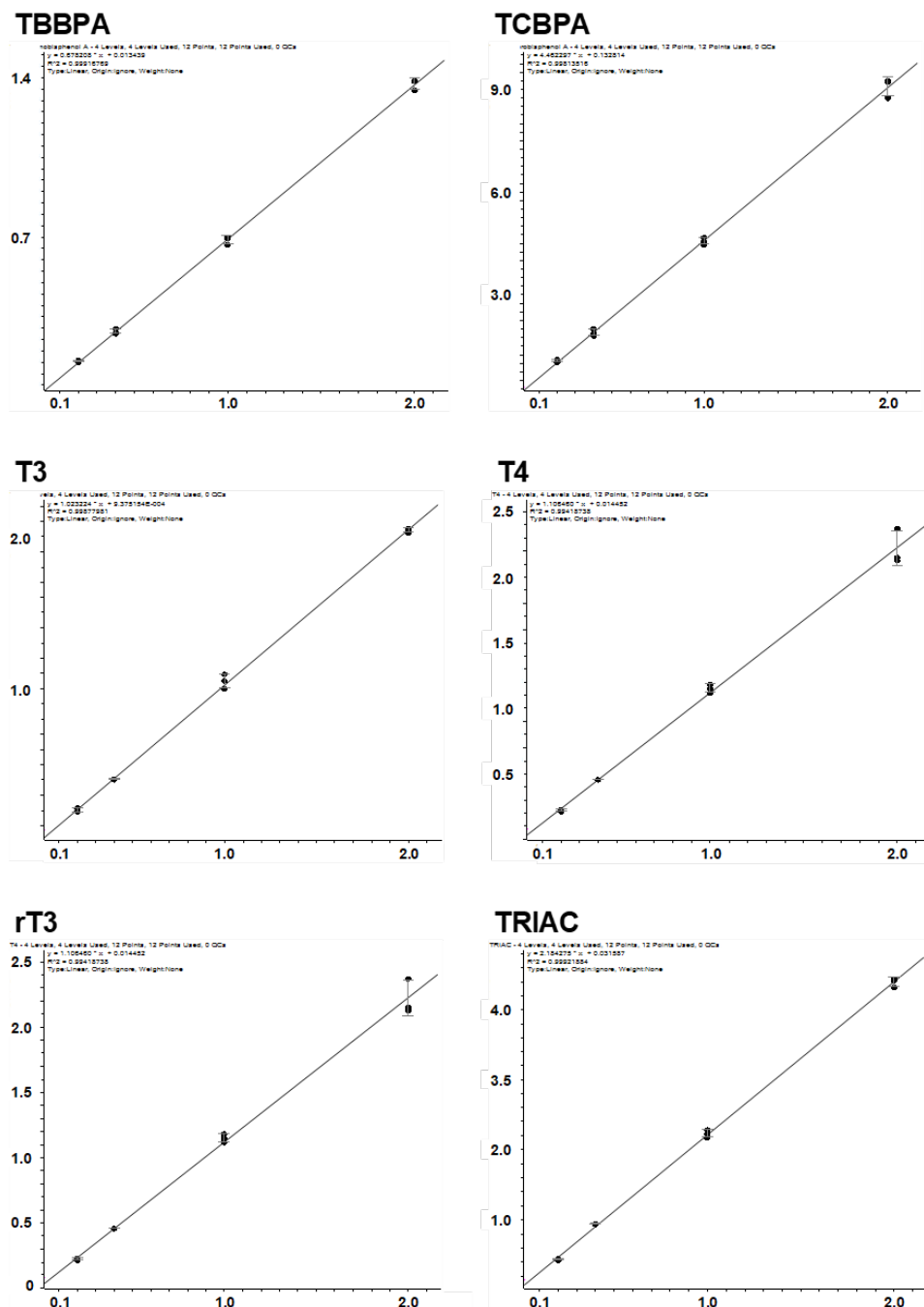


図2. 2 hTRアゴニスト陽性13化合物の検量線情報 (その1)
 いずれも内部標準はT4-¹³C-6体を使用

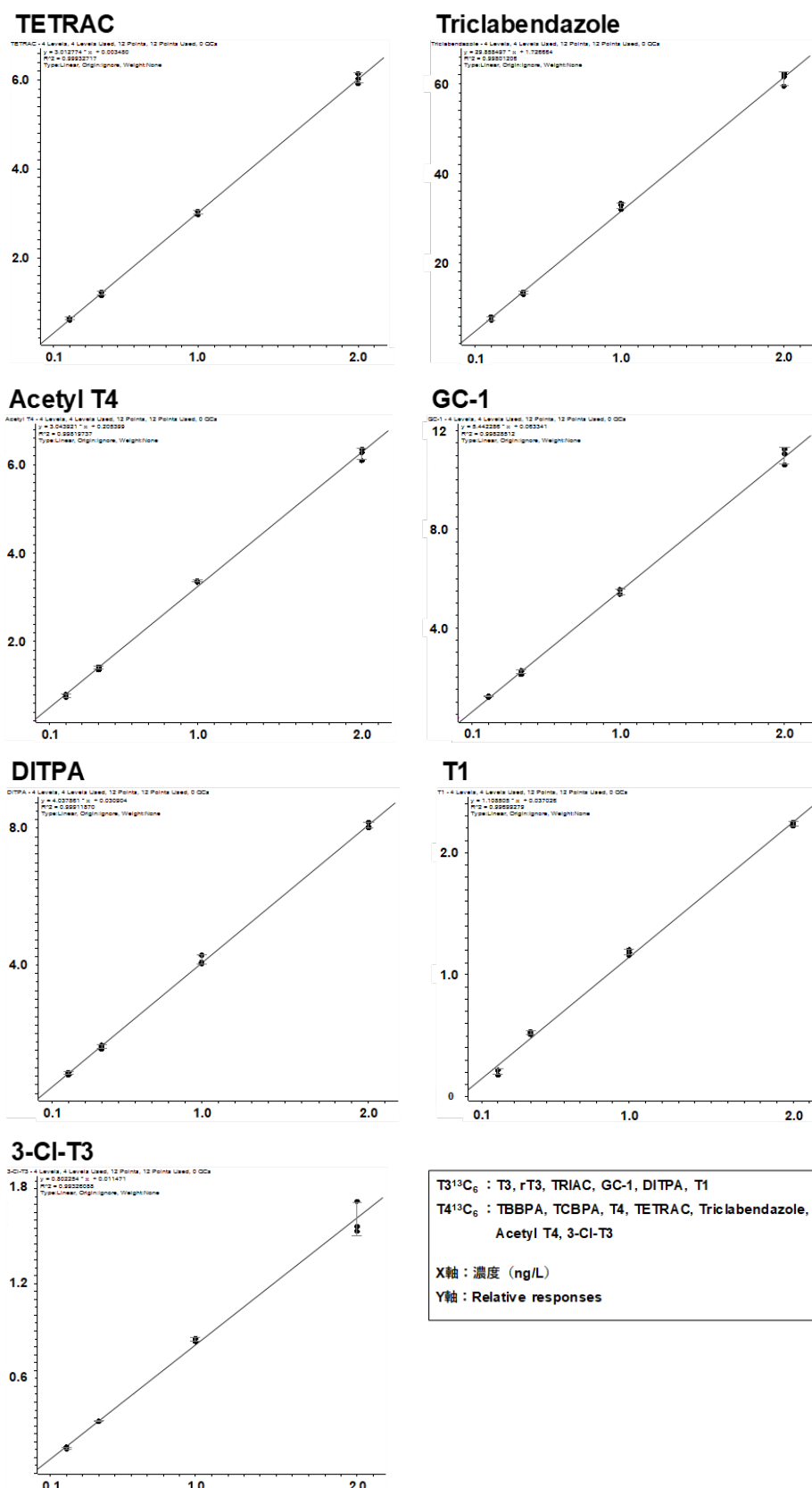


図 2. 2 hTRアゴニスト陽性13化合物の検量線情報 (その2)
いずれも内部標準はT4 ¹³C-6体を使用

(3) 環境水試料のMIP吸着画分からのTR結合活性物質の探索

(3) - 1 下水処理場排水のMIP処理

サブテーマ1で作成したTR模倣分子鑄型（MIP）を使用して環境水中に存在するTRアゴニスト活性物質の探索を実施した。2021年6月～2022年5月にかけて茨城県内の下水処理場排水を採水し（Site1）、加えて、東京都（Site2）及び北海道内（Site3）の下水処理場排水も採水することで探索用の環境試料とした。また、神奈川県内から下水処理場由来でない排水を採水し、対照試料（Site4）として設定した。各排水試料は前処理後に化学分析及び酵母ツーハイブリッドアッセイによる評価に供された。下水放流水1 Lを抽出・乾固後、500 μ Lのアセトニトリルへ再溶解した。その500 μ L溶液をMIPへ充填後、メタノール1mLで溶出した試料をMIP吸着画分とし、LC-QToFMSによる測定へ用いた。測定はTOFモードで行い、hTRアゴニスト陽性13化合物のPrecursor ionから探索し、同定された化合物に関してはPCDLによる再同定から確定する事とした。TOFモードによる測定結果を13化合物のPrecursor ionによるExtracted ion chromatogram (EIC) から確認した結果、全化合物でピークを確認できなかった。本研究で作成されたLC-QToFMSによるhTRアゴニスト陽性13化合物の検量線では10 μ g/Lを最低濃度としているが、これはLC-QToFMSの検出感度に起因している。そのため、最終試料中濃度が10 μ g/L未満である場合、LC-QToFMSでの検出は困難である。そのため、PCDLを用いた同定は実施できなかった。一方、対象のhTR陽性化合物が10 μ g/L未満の極低濃度で試料中に含まれている可能性もある。そのため、高感度測定が可能なLC-MSMS（Sciex5500+）による同定を検討した。

(3) - 2 LC-MSMSによるアゴニスト分析法の高感度化

hTRアゴニストの高感度分析に向けて、まず測定装置をLC-QToFMS（Agilent6540）からLC-MSMS（Sciex5500+）に変更した。一般にToFMSは高分解能であるものの、感度はMSMSのSRM測定に及ばない。一方でMSMSは整数質量での測定になり、低分解能である。したがってToFMSは主に同定に、MSMSは高感度定量にそれぞれ強みがある。続いて移動相の組成を検討した。表2. 4に各物質の測定条件を、表2. 5に各移動相条件によるhTRアゴニスト陽性13化合物の感度を示した。

表2. 4 hTRアゴニスト陽性13化合物のSRM条件等

	Precursor ion	Product ion	Collision energy
TRIAC	576.6	126.7	-40
TETRAC	702.5	126.7	-48
GC-1	327.0	269.1	-32
T3	649.6	126.6	-62
T4	775.5	126.6	-114
DITPA	508.9	126.8	-56
3-Cl-T3	684.5	126.8	-144
rT3	649.6	126.6	-128
Acetyl T4	817.5	126.6	-156
T1	397.9	126.8	-42
TCBPA	364.9	313.5	-36
TBBPA	542.6	78.5	-110
Triclabendazole	358.8	196.9	-50

最も高い検出感度を示した条件は移動相に0.5mMフッ化アンモニウム（ NH_4F ）を添加した条件で、最大 2.7×10^6 倍程度の感度向上がみられた。この条件での検出限界（ $\text{S/N}=3$ ）は注入液濃度で0.1～10 ng/L程度となり、LC-QToFMSと比較して1000倍以上の感度向上が認められた。そのため、以降の測定では移動相条件を「A：0.5 mM NH_4F 超純水，B：メタノール」とした。濃縮倍率を2,000倍とした場合、環境試料中濃度の検出限界は $3.5 \times 10^{-5} \sim 1.2 \times 10^{-2}$ ng/L となった。また、検討した移動相条件での装置検出限界（IDL）を算出した（表2. 6）ところ、算出したIDLは注入量6 μ L中の絶対量で3.4～31 agとなり、注入溶液中濃

度に換算した場合、0.56~5.1 ng/Lに相当した。

表 2. 5 hTRアゴニスト陽性13化合物の各種移動相条件における感度（S/N=3における濃度）比較

NIES ID	Chemical	A Water	A 0.1%酢酸水	A 0.01%酢酸水	A 0.001%酢酸水	A 0.0001%酢酸水	A 0.5mM NH4F水	A 0.5mM NH4F水
		B MeOH	B 0.1%酢酸メタ	B 0.01%酢酸メタ	B 0.001%酢酸メタ	B 0.0001%酢酸メタ	B MeOH	B MeOH
		S/N=3 (pg/2μL)	S/N=3 (pg/2μL)	S/N=3 (pg/2μL)	S/N=3 (pg/2μL)	S/N=3 (pg/2μL)	S/N=3 (pg/2μL)	S/N=3 (pg/6μL)
A0138	TBBPA	2.0	9.7	1.8	0.52	0.39	0.40	0.025
A0139	TCBPA	1.2	1.5	0.49	0.29	0.34	0.16	0.0047
A0260	T3	4.7	1.3	0.60	0.49	0.84	0.75	0.0036
A0261	T4	6.4	0.79	0.27	0.40	0.93	0.38	0.0041
A0348	rT3	15	1.9	1.0	0.40	2.4	0.74	0.0093
A0354	Triac	1.4	5.1	0.78	0.70	2.0	0.44	0.0045
A0355	Tetrac	13	0.97	0.91	0.63	4.6	1.0	0.0044
A0764	TCBD	0.080	1.2	0.62	0.16	0.09	0.021	0.0018
A0833	AcetylT4	4.2	1.6	1.0	1.3	3.3	0.24	0.0035
A0836	GC-1	0.58	0.20	0.17	0.11	0.38	0.17	0.0037
A0837	DITPA	0.84	0.38	0.21	0.17	0.41	0.19	0.00043
A0840	T1	2.3	1.2	0.41	0.31	0.46	0.59	0.012
A0841	3-Cl-T3	14	18	4.2	1.9	7.3	2.3	0.14

表 2. 6 hTRアゴニスト陽性13化合物のIDL (ag)

TRIAC	TETRAC	GC-1	T3	T4	DITPA	(ag)
12	17	10	14	17	9.3	
3-Cl-T3	rT3	Acetyl T4	T1	TCBPA	TBBPA	Triclabendazole
19	30	31	8.6	18	17	3.4

(3) - 3 下水処理排水の各物質の濃度と寄与率

検討したLC-MSMSの測定条件から、Site1-Site4の排水試料中におけるhTRアゴニスト活性化合物の同定を試みた。化学分析による活性化合物の同定と合わせて、それら排水試料中のhTRアゴニスト活性を酵母ツーハイブリッドアッセイにより評価した。化学分析による同定結果とアッセイの評価結果から、対象とした排水試料中のhTRアゴニスト活性値に対する各同定化合物の寄与率（%）を算出した。寄与率は以下の式から求めた。

$$\text{寄与率 (\%)} = \frac{EFC \times T3R}{EFA} \times 100$$

EFC：排水中から検出された13の化合物の各濃度（ng/L）

T3R：各物質のhTRアゴニスト活性とT3のhTRアゴニスト活性（ECx10、表 2. 2 参照）の比

EFA：排水試料のY2H法によるhTRアゴニスト活性（ng-T3eq./L）。

図 2. 3 にSite1で同定された各活性化合物の寄与率を示した。この結果から、Site1の排水試料では、年間を通してTRIACが活性の99%以上に寄与していることが明らかとなった。TRIACはSite1の全試料で検出された（0.46–1.2 ng/L）。また、TCBPA, TBBPA, トリクラベンダゾールの検出頻度が高い結果となっており、T1及びT3の検出も比較的多くみられた。

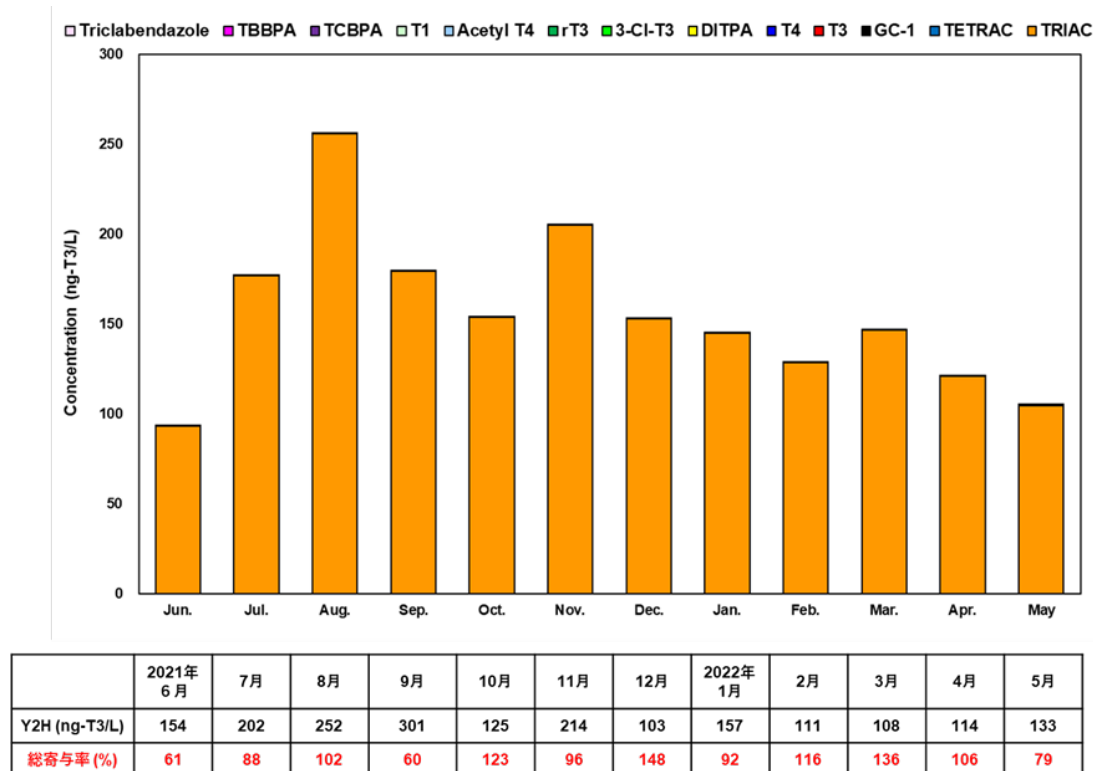


図2. 3 Site1におけるhTRアゴニスト活性の年間変動

一方、TETRAC, DITPA, Acetyl T4の検出はSite1の全試料で確認できなかった。しかしながら、TRIACを除く全ての同定化合物の寄与率は1%未満に過ぎず、Site1排水中のhTRアゴニスト活性に関しては殆ど寄与していなかった。なおSite1の6月及び9月の試料では、活性値に対して同定された全化合物による総寄与率が60%程度に留まった。この要因として、この時期の試料に未知の活性物質が含まれている可能性も否定できないが、試料の前処理過程におけるTRIACの損失も原因のひとつとして考えられた。即ち、排水試料はメタノールによる抽出後に窒素乾固しているが、上記の2試料では試料由来の水成分が僅かに残存していたため、熱処理を伴った遠心エバポレーターによる乾固に供したことが要因である可能性がある。

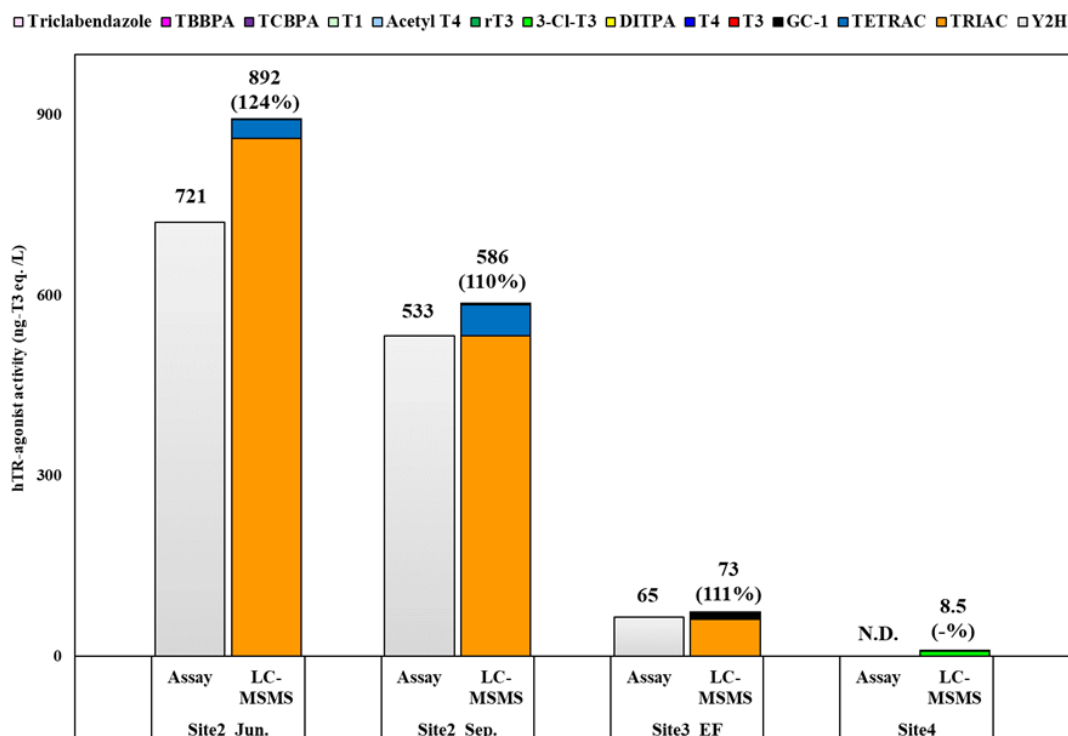


図 2. 4 Site2, 3, 4のhTRアゴニスト活性及びその寄与化合物

同様にSite2, 3, 4で同定された各化合物によるhTRアゴニスト活性への寄与率を図2. 4に示した。Site1と同様に、Site2及びSite3の排水試料中からTRIACが主要な寄与物質として同定され、TRIAC単体での寄与率は、Site2_Junで124%、Site2_Sepで110%、Site3_EFで111%であった。一方、その他化合物ではSite1と異なる傾向がみられ、Site2の試料ではTRIACを除く活性への寄与率が4~10%であり、Site3_EFでは17%と比較的高い寄与率を示した。Site2ではTETRAC、Site3ではGC-1がTRIACに次ぐ寄与化合物であった。

Site4は下水処理場由来の排水ではない対照試料である（宮内排水樋管）。hTRアゴニスト活性も不検出、LC-MSMSの測定でもTRIACなどの主要因化合物は同定されなかった。

以上のようにSite1－Site3の下水排水試料の評価結果から、環境水中のhTRアゴニスト活性化合物の主要因はTRIACであると考えられた。

（４）環境水試料のhTR結合活性物質の探索及び構造推定

上述のように下水処理場排水中のhTRアゴニスト活性の主要因はTRIACであると考えられたが、その由来について確認するため、Site3において流入水（Site_IF）、中間処理水（Site3_AS、活性汚泥処理後）、放流水（Site3_AS、活性汚泥処理後に塩素処理後）を採取し、LC-MSMS及び酵母ツーハイブリッドアッセイで評価し、排水処理過程におけるTRIACの挙動を検討した。

各排水試料はSDBフィルターでメタノール抽出し、窒素乾固後に500 µLのメタノールで再溶解した。LC-MSMSによる同定結果を図2. 5に示す。アゴニスト類の合計濃度としては放流水では流入水に比べて1／●程度に大きく減少していた。

流入水（Site3_IF）では比較的高濃度のT3（2.5 ng/L）及びT4（6.3 ng/L）に加え、GC-1（4.3 ng/L）、T1（1.2 ng/L）などが同定定量されたが、TRIACは不検出であった。一方、Site3_AS及びSite3_EFの試料からは、それぞれ0.5 ng/L及び0.3 ng/LのTRIACが検出された。T3は両試料から検出されず、T4濃度はそれぞれ0.066 ng/L（Site3_AS）及び0.054 ng/L（Site3_AS）と、Site3_IFのT4濃度に比べて1/100程度まで減少していた。

生体中において、TRIACはT3、T4の代謝物として生成されることが知られている。これらの結果は、下水放流水中のTRIACが排水処理過程で流入したT3またはT4から生成される可能性を示唆している。ま

た、TRIACはSite3_ASから検出されることから、活性汚泥処理を含む過程で生成している可能性が示唆された。一報Site3_EFにおけるTRIAC濃度はSite_ASより4割程度減少しており、塩素処理により生成することは考えにくく、また逆に塩素処理による分解効率は高くないと考えられた。

一方、hTRアゴニスト活性に着目すると、Y2H法で測定した活性はSite3_ASで114 ng-T3 eq. /L、Site3_EFで65 ng-T3 eq. /Lであった。Site3_IFでは不検出であったが、これは多様な成分が含まれている流入水では酵母に対する毒性等の影響が排除できず、試験が不成立であったと考えられる。このバイオアッセイ結果に対して、LC-MSMSで定量されたアゴニスト濃度にそれぞれの活性値を積算すると図2. 6のようになった。Site3_IFではGC-1が活性の主要因であるのに対し、Site3_AS及びSite3_EFではTRIACが主要因になっていた。また、Site3_AS及びSite3_EFではY2H法で得た活性値とLC-MSMSで測定して算出した活性推定値とは良好に一致していた。

これらの結果を総合すると、流入水に含まれていたT4, GC-1, T3, T1, rT3及びTBBPA等は処理過程で大部分が分解除去されるが、一部TRIACが生成し、それが放流水のhTRアゴニスト活性の主要因となっていることが示された。特にTRIACはその元物質であるT3及びT4に対してモル当たりの活性がいずれも約200倍であることから、T3, T4→TRIACの変換率が0.5%以上であると活性は増大することを意味している。

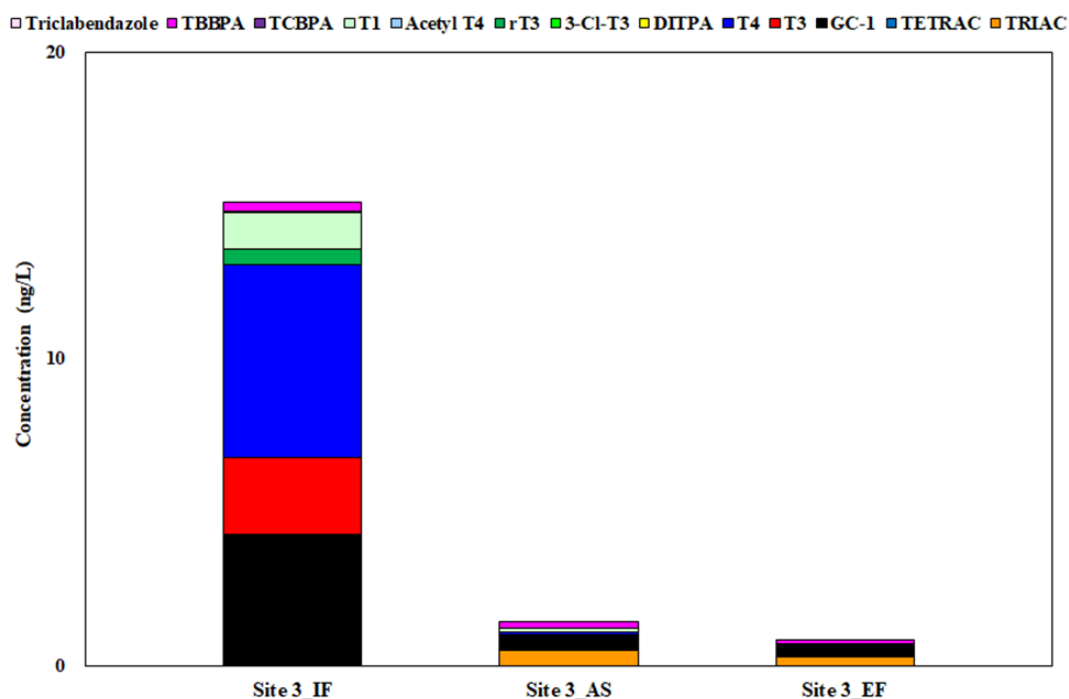


図2. 5 下水流入水、中間処理水、放流水におけるhTRアゴニスト活性化合物の挙動

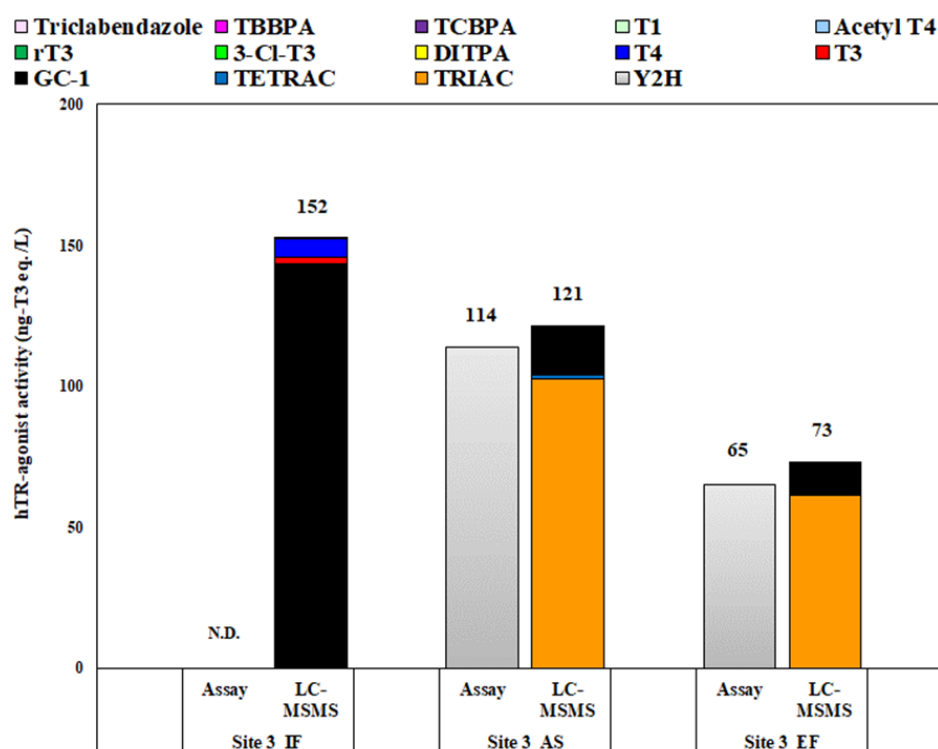


図 2. 6 下水流入水、中間処理水、放流水のhTRアゴニスト活性及びその寄与化合物

5. 研究目標の達成状況

・約600物質の*in vitro*試験によるTR生理活性（アゴニスト、アンタゴニスト）評価とデータベース化

【自己評価：計画以上の成果を得た】

化学物質のTR結合活性について、分担者らが過去にER結合活性等に応じた約600物質に加え、EDSP21におけるrTR結合活性評価結果、EXTEND2010及び2016において信頼性が確認されている文献等を参考にスクリーニング対象物質を追加し、アゴニストについては802物質、アンタゴニストについては691物質の評価を実施し、いずれも目標物質数を大きく上回った。アゴニストの活性についてはEnvironmental Monitoring & Contamination誌に受理済み、アンタゴニストについてはData in Brief誌に投稿中である（表2. 2, 2. 3参照）。

・TR結合活性物質の精密質量データベースの作成

【自己評価：計画通りの成果を得た】

前項で陽性を示したアゴニストについて、LC-QToFMSを用いてESIにより検出可能かどうかの評価を行い、衝突誘起解離（CID）によるプロダクトイオンの精密質量を測定した。これらの結果を整理し、アジレント社製装置で検索可能な様式（PCDL）でデータベース化した。また検量線情報も作成し、ToFモードでの簡易的な定量も可能とした（図2. 1, 2. 2参照）。

・下水処理場排水における既知TR結合活性物質及び未知活性物質の寄与率評価

【自己評価：計画以上の成果を得た】

下水処理場排水が酵母ツーハイブリッド法により示すhTRアゴニスト活性に対し、本課題で陽性を確認して比活性を求めた13物質の同定定量を行うことにより、各物質の活性寄与率を算出した。その結果、ほぼすべての活性をTRIACが占めていることを初めて明らかにした。また、排水中のTRIACは下水処理過程においてT3またはT4から生成している可能性を示した。本成果はEnvironmental Science & Technology誌に投稿中である（図2. 6参照）。

6. 引用文献

- 1) 白石 不二雄, 白石 寛明, 西川 淳一, 西原 力, 森田 昌敏 (2000) 酵母Two-Hybrid Systemによる簡便なエストロゲンアッセイ系の開発. 環境化学 **10**, 57-64
- 2) Jugan M.L., Oziol L., Bimbot M., Huteau V., Tamisier-Karolak S., Blondeau J.P., and Lévi Y. 2009. In vitro assessment of thyroid and estrogenic endocrine disruptors in wastewater treatment plants, rivers and drinking water supplies in the greater Paris area (France). *Science of the Total Environment* **407**, 3579-3587. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.01.027>.

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

(1) 誌上発表

<査読付き論文>

【サブテーマ1】

E. KANAO, T. MORINAGA, T. KUBO, T. NAITO, T. MATSUMOTO, T. SANO, H. MAKI, M. YAN、 K. OTSUKA: *Chemical Science* 409-418, 11 (2020) (IF = 9.556)

Separation of Halogenated Benzenes Enabled by Investigation of Halogen-p Interactions with Carbon Materials.

【サブテーマ2】

R. OMAGARI, M. YAGISHITA, M. YAMASAKI, R. KAMATA, M. TERASAKI, F. SHIRAISHI, T. KUBO, D. NAKAJIMA, *Environmental Monitoring & Contamination Research*, accepted. (2022)

Evaluation of human thyroid receptor-agonist activity in 796 chemical compounds using a yeast two-hybrid assay with *Saccharomyces cerevisiae* Y190.

<その他誌上発表（査読なし）>

【サブテーマ2】

特に記載すべき項目はない。

(2) 口頭発表（学会等）

【サブテーマ1】

1) 久保拓也、山本周平、内藤豊裕、柳下真由子、中島大介、大塚浩二、第28回環境化学討論会（2019）受容体模倣基材を用いた内分泌かく乱化学物質のスクリーニング手法の開発（さいたま市）

2) 久保拓也、山本周平、谷川哲也、内藤豊裕、中島大介、大塚浩二、第30回クロマトグラフィー科学会議（2019）分子インプリント基材を利用した受容体結合物質の簡便スクリーニング（京都市）**招待講演**

3) 久保拓也、中島大介、大塚浩二、第29回環境化学討論会（2021）分子認識材料を利用したTR結合物質のスクリーニング（大阪市）

【サブテーマ2】

1) 大曲遼、柳下真由子、中山祥嗣、久保拓也、中島大介（2022）下水処理放流水における甲状腺受容体（TR）結合活性の季節変動に関する評価．第56回日本水環境学会年会．（オンライン）

2) 大曲遼、柳下真由子、中山祥嗣、久保拓也、中島大介（2022）下水処理排水におけるTR活性寄与化合物の同定．環境化学物質3学会合同大会．

(3) 「国民との科学・技術対話」の実施

【サブテーマ2】

中島大介、中山祥嗣、大曲 遼、山崎美穂、白石不二雄、久保拓也、柳下真由子、国立環境研究所 夏の公開（2019）環境ホルモンを探索するための新たなアプローチ～ヒトの受容体を模倣した分子鋳型の開発とその応用～．2019年7月20日、参加者6,165名

(4) マスコミ等への公表・報道等>

【サブテーマ1，2】

特に記載すべき項目はない。

(5) 本研究費の研究成果による受賞

【サブテーマ2】

中島大介：2020年日本環境化学会学術賞、一般社団法人日本環境化学会、令和2年6月25日

IV. 英文Abstract

Screening and Exploration of New Biomarkers for Thyroid-Hormone-Receptor Binding Chemicals

Principal Investigator: Takuya Kubo

Institution: Graduate School of Engineering, Kyoto University

Tel: +81-75-383-2448 / Fax: +81-75-383-2450

E-mail: kubo.takuya.6c@kyoto-u.ac.jp

Cooperated by: National Institute for Environmental Studies, Prefectural University of Hiroshima, Graduate School of Medicine, Kyoto University

[Abstract]

Key Words: Receptor, Thyroid hormone, Endocrine-disrupting compound, Chromatography, Molecular imprinting, Receptor-mimic, Biomarker, Screening

Ministry of the Environment has encouraged to specify a substance that is required a risk management, seek an unknown substance and figure out their disposition on EXTEND 2016 and Japan Environment and Children's Study (JECS). An evaluation of the effects on exposure of chemical substances and environmental factors such as a life environment is necessary for children's health and development as they are supposed to be particularly vulnerable.

This study, which may contribute to EXTEND 2016 and JECS, constructed an innovational screening technique that can evaluate binding activity of receptors through only the result of chemical analysis using thyroid hormone receptors (TR) that has a large number of reports on information of receptor structures. We developed the assessment technique of TR binding activity using a method of like chromatography with a TR imitated separation medium as an aim to establish the screening technique of TR binding activity. Then we created a database for TR binding active compounds with the combination of its technique, yeast assay and an accurate mass analysis. Furthermore, identifying substances of TR activity contribution in environmental analytes, we revealed disposition of compounds through animal experiments.

This study makes possible an application for not only TR but also chemical substances having a lot of receptors binding activity, opening the door to acquisition of academic perceptions such as a resolution for physiological mechanisms. We anticipate that it can apply for observation of environmental chemicals from home and abroad as the screening measurement that would be widely used in the future.