



内分泌攪乱物質の環境計測手法としての

バイオアッセイ*

白 石 不二雄**

キーワード ①内分泌攪乱物質 ②環境ホルモン ③バイオアッセイ
④酵母ツーハイブリッドアッセイ法 ⑤エストロゲン



1. はじめに

内分泌攪乱物質、いわゆる環境ホルモンの問題がわが国でも騒がれ、調査・研究が始まって約5年が経過した。環境ホルモン(特にエストロゲン様物質)の使用量や作用の強さが少しではあるが明らかになるにつれ、日本の汚染レベルにおいてはヒトへの生殖に深刻な影響をもたらすのではという不安は薄らぎつつあるようである¹⁾。しかしながら、これまで明らかにされた環境ホルモンは、現代社会で使用されている数万といわれる化学物質の中の一握りであり、甲状腺ホルモン作用などのホルモン活性はスクリーニング試験さえ行われていない物質が大多数であることは事実である。

環境ホルモンは、今のところ、女性ホルモン(エストロゲン)様作用、男性ホルモン(アンドロゲン)様作用、甲状腺ホルモン様作用の3つについて、生態系生物やヒトに対する影響が危惧され、重点的に研究が進められている。まず、これらのホルモン作用を示す物質を検出することが最優先課題であり、作用(活性)を検出できる簡便な方法を開発することが必要となっている。環境ホルモン作用の検出手法としてのポイントは被験化学物質がホルモン受容体(レセプター)と結合する能力を鋭敏に確認できる試験系であるか、どうかである。*in vitro* のバイオアッセイは被験化学物質がホルモン受容体に結合するか、否かを測定するもっとも簡単な試験系に位置づけられ、次のステップとしての *in vivo* のバイオアッセイは、環境ホルモンが生物個体の体内ホルモン受容体に結

合することにより引き起こされる生体内反応(応答)を計測して評価するのに用いられている。

環境ホルモン研究における *in vitro* のバイオアッセイは、主に酵母や動物由来の培養細胞などを用いる試験系が主流ではあるが、バクテリアに作らせた受容体タンパク質そのものや動物に作らせた抗体を用いて行う試験を含めている。*in vivo* のバイオアッセイとしては、日本ではメダカやアフリカツメガエルなどを用いた試験系が知られている。マウスやラットといったほ乳類の実験動物を用いた影響試験も広義的には「*in vivo* のバイオアッセイ」であるが、環境計測手法に適用するまでには至っていないようである。

これまで毒性試験に用いられてきたさまざまなバイオアッセイ系(例; 遺伝毒性、神経毒性試験)は試験に供される濃度と実際の環境濃度との間に大きなへだたりがあった。すなわち、毒性試験のためのバイオアッセイは現実離れした高濃度で応答が見られるため、環境計測に用いられる機器分析法と比べた場合、きわめて感度が劣るというのが常識であった。しかしながら、環境ホルモン研究において、*in vitro* のバイオアッセイは機器分析から得られる濃度レベルの情報との間に差は見られなくなり、逆に機器分析よりも高感度にその環境濃度(活性)を測定できる場合もある。

これまで環境ホルモン研究に用いられている主なバイオアッセイ法について簡単に紹介するとともに、環境ホルモンの計測手法としての側面から、筆者らが採用している酵母ツーハイブリッドアッ

* Bioassay as a Method for Measuring the Endocrine Disrupting Properties of Environmental samples

**Fujio SHIRAISHI (独立行政法人国立環境研究所) National Institute for Environmental Studies

セイ法について紹介する。

2. 主な *In vitro* バイオアッセイ法

2.1 受容体結合アッセイ

in vitro バイオアッセイの中でもホルモン受容体結合アッセイは、被験化学物質のホルモン受容体のリガンド(本来のホルモン)結合部位との親和性を見るもので、受容体を介したメカニズムの出発点となる反応を見る方法である。放射能(R.I.)を使うアッセイがもっとも高感度であるが、通常の実験室では取り扱えない欠点がある。R.I.を使わない方法として、エストロゲン活性を測定する蛍光偏光法とエストロゲン受容体結合アッセイ(ER-ELISA)法が企業レベルで開発され、試薬はキット化され市販されている。蛍光偏光法は短時間で測定が可能であること、遊離のリガンドと結合したリガンドを分離する必要がないこと等の利点もあるが、蛍光を持つ物質、溶けにくい化学物質やにごりが少しでも見られる物質は測定ができず、ラット肝S9を使用する代謝試験系は困難である²⁾。ER-ELISA法は試料と未標識のリガンド(エストロゲンの場合、エストラジオール(E2))をエストロゲン受容体に対して競合的に反応させた後、反応液中の遊離リガンド量を酵素免疫競合法により測定する試験法である。ER-ELISA法は蛍光偏光法に比べ、S9による代謝試験系など多くの試料に適用可能である。両アッセイ系から得られた活性は受容体への親和性(結合力)であり、いわゆるアゴニスト作用(結合反応による転写活性化)とアンタゴニスト作用(結合のみでリガンドによる転写活性化の抑制)を区別することはできない。また、結合反応を直接測定するために、増幅作用が見られないために培養系に比べ感度が鈍いこと、たんぱく質であるホルモン受容体や抗体が試料の毒性により変性すると測定システム上擬陽性に判定されるなどの欠点もある。両アッセイ系とも夾雑物の混在する環境試料の適用は、抑制される値を評価するシステムであるために夾雑物による毒性や着色などの妨害因子により擬陽性の結果が出やすく、不向きである。

2.2 培養系を用いるバイオアッセイ

培養系のバイオアッセイは、被験化学物質が細胞内のホルモン受容体と結合したときの何らかの

転写活性化情報を測定するアッセイ系であり、培養することで細胞の増殖と転写活性化を増幅させることができ、転写活性の積算値を測定するため受容体結合アッセイ法に比べて一般に高感度であるといえる。

2.2.1 細胞増殖性アッセイ(E-screen)

ヒト乳癌培養細胞MCF-7株を用いたアッセイで、女性ホルモンの刺激で細胞増殖が促進される特性を利用したもっとも先駆的なエストロゲンアッセイ系であり、E-Screenとも呼ばれている。E2などエストロゲンを除去した血清の入った培養液に試料を添加し、細胞を約5日間培養して、試料を加えてない対照に比べて細胞増殖が促進されていれば試料にエストロゲン様活性物質が含まれていると判定するアッセイ系である。このアッセイ法はエストロゲンの存在が乳癌細胞の増殖促進というわかりやすい表現形であることからアッセイシステムとしては理解しやすいが、高感度の細胞株でも5日間での細胞増殖率はもっとも強いE2活性で対照の10倍程度と陽性の判定領域が狭く、活性の弱い物質は陰性に判定され、また、エストロゲン以外による因子で増殖が促進される場合があるなどの欠点も指摘されている。環境試料の適用は、培養日数が長いため測定までに時間がかかることと微生物によるコンタミも起こりやすく、不向きであるといえる。

2.2.2 培養細胞を用いるレポータージーンアッセイ

培養細胞にホルモン受容体遺伝子とレポーター遺伝子(ジーン)を組み込んだアッセイ系である。試験系には、一過性発現系と安定形質転換株を用いる手法とがある。一過性発現系試験法は、アッセイのたびごとに培養細胞にホルモン受容体とレポータージーンを導入(トランスフェクション)する³⁾。一方、安定形質転換株試験法は、両方の遺伝子を培養細胞に導入し、目的とする活性が良好に測定できる細胞のみを選択し、継代しながらアッセイに用いる。一過性発現系試験法は、常に大量の受容体とレポータージーンを確保している必要があり、試験手技もやや複雑である。安定形質転換株試験法は、一過性発現系試験法に比べて試験手技は容易であるが、遺伝子発現が不安定になりやすい欠点があり、米国で年間数万という化学物質をスクリーニングするというハイスルー

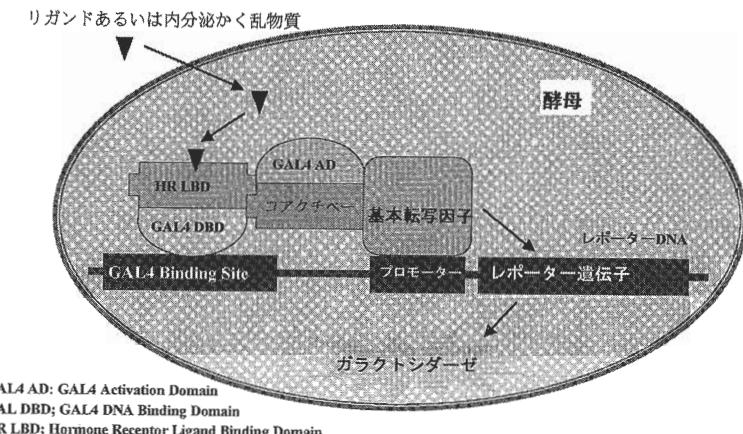


図1 酵母ツーハイブリッドアッセイ用遺伝子組み換え酵母の仕組み

プット計画の失敗は用いようとした安定形質転換株細胞の発現系が消失したためといわれている。わが国にはレポーター遺伝子としてMCF-7細胞株にルシフェラーゼが組み込まれたMVLN細胞が外国から導入され、環境計測に用いられている⁴⁾。いずれにしても動物培養細胞株によるアッセイは試験期間中無菌的培養が要求されることはないまでもなく、扱いはやや面倒である。

2.3 酵母を用いるバイオアッセイ

酵母は培養細胞に比べて遺伝子の導入や取り扱い操作が容易であることから、ホルモン受容体遺伝子とレポーター遺伝子を組み込んだ環境ホルモンのスクリーニングやモニタリングのためのさまざまなアッセイ系が作られてきた。日本では、環境エストロゲン計測のために、イギリスのSumpter博士から提供されたYES(Yeast Estrogen Screen)アッセイ法と大阪大学の西川教授が構築した酵母ツーハイブリッド(Two-Hybrid)・エストロゲンアッセイ法の2種類が主に用いられている。

SumpterらのYESアッセイ系⁵⁾は、酵母にエストロゲン受容体とβ-ガラクトシダーゼを発現するレポーター遺伝子が組み込まれており、化学物質が受容体と結合すると転写活性が起こり、レポーター遺伝子が発現してβ-ガラクトシダーゼを作るしくみとなっている。この酵母はβ-ガラクトシダーゼが細胞壁から外の培地に漏れ出るという特徴を有しており、培地に基質を混在させておくと反応してオレンジに着色し、その着色程度をマイクロプレートリーダーで比色定量すること

でエストロゲン活性が測定できる。細胞壁を溶解せずに酵素を測定できるというメリットがあるが、増殖が比較的遅いために72時間の培養を必要とし、迅速性に欠ける。また、培養時間が長いために微生物のコンタミを防ぐ意味から、無菌的培養操作を必要とする。

酵母ツーハイブリッドアッセイ系は、2種類の遺伝子の相互作用をレポーター遺伝子の発現で調べる「酵母 Two-Hybrid System」という米国のクロンテック社が開発した試験法をホルモンの検出に応用したものである⁶⁾。「酵母 Two-Hybrid System を用いた酵母レポータージーンアッセイ」というのが正確な表現であるが、われわれは「酵母ツーハイブリッドアッセイ」と呼んでいる。酵母ツーハイブリッドアッセイはホルモン受容体の結合領域遺伝子と遺伝子を活性化するのに必要な補助因子(コアクチベーター)とを酵母にいっしょに組み込み、被験化学物質とホルモン受容体が結合するとコアクチベーターを介して転写活性化を促しレポーター遺伝子によりβ-ガラクトシダーゼが作られるというしくみである(図1)。ホルモン受容体とコアクチベーターの両者を酵母内に導入することは、生体内でのホルモンによる活性システムを模倣しているといえ、酵母のレポーター遺伝子への迅速、かつ強い転写活性化にもつながり、酵母ツーハイブリッドアッセイ系が高感度かつ迅速な検出系である理由もある。

酵母を用いるアッセイ系は、培養細胞に比べて取扱いが容易なこと、細胞毒性に強いことなどから

環境試料のモニタリングに適用しやすいといえる。

3. 日本で行われている *in vivo* バイオアッセイ

生物の体内で、内分泌搅乱作用がどの程度の濃度で、どのように起こるかを知るために実際には生物へのばく露を行う *in vivo* のバイオアッセイによる検証しか方法はない。現在、生物を用いた内分泌搅乱化学物質のスクリーニング試験は、国際的な統一基準のもとに標準化が進められている。日本では魚類を用いた試験として、ヒメダカが試験魚となっており、ビテロジエニン産生試験、パーシャルライフサイクル試験、フルライフサイクル試験が環境省により執り行われている。また、両生類を用いたバイオアッセイとして、甲状腺ホルモン様作用を調べるアフリカツメガエルのオタマジャクシを用いた変態アッセイ(XEMA)が試みられている。これら *in vivo* のバイオアッセイについては、本特集の最後に鑑迫氏に紹介をお願いした。

4. 酵母ツーハイブリッドアッセイ法の改良

種々のホルモン受容体とコアクチベーターを酵母 Two-Hybrid System でレポーター遺伝子の組み込まれている酵母(Y190株)に導入すれば、さまざまなホルモンの試験系が作れる。大阪大学の西川先生らは、ラット由来のエストロゲン受容体を中心として、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体などを導入した酵母を作成した⁶⁾。それ

らはそれぞれのリガンド(本来のホルモン)に対して高い感受性を示し、エストロゲン活性試験において環境ホルモンと疑われている物質に対しても顕著な応答を示した。

彼らの試験法はマイクロチューブで酵母と試料を1個ずつ回転培養装置で4時間培養し、遠心後、集めた酵母の細胞壁を融解するなどの操作を経て、それぞれ溶液を96ウェルプレートに手作業で移し、 β -ガラクトシダーゼを呈色反応で測定するという煩雑な操作が必要である。

われわれは多くの化学物質をすみやかにスクリーニングでき、多数の環境試料を簡便にモニタリングできる、操作性に優れかつ高感度に測定できるアッセイ法の開発を試みた⁷⁾。酵母ツーハイブリッドアッセイ法は培養時間が短くてすむという利点に着目し、すべての操作と培養を96ウェルマイクロプレート上で行う、マイクロプレート培養法と、 β -ガラクトシダーゼを化学発光法により測定する方法を取り入れることで簡便かつ高感度に測定できるアッセイ法を考案した。

図2に酵母ツーハイブリッドアッセイ法の従来法と改良法の比較を示した。化学発光法は透過光による比色定量法と異なり、細胞壁の残さなど濁度による補正を行なう必要もなく、 β -ガラクトシダーゼの検出感度も約1,000倍高くなることが示された。また、試料と酵母を混合してから測定までの培養が4時間で終了することは試験中の無

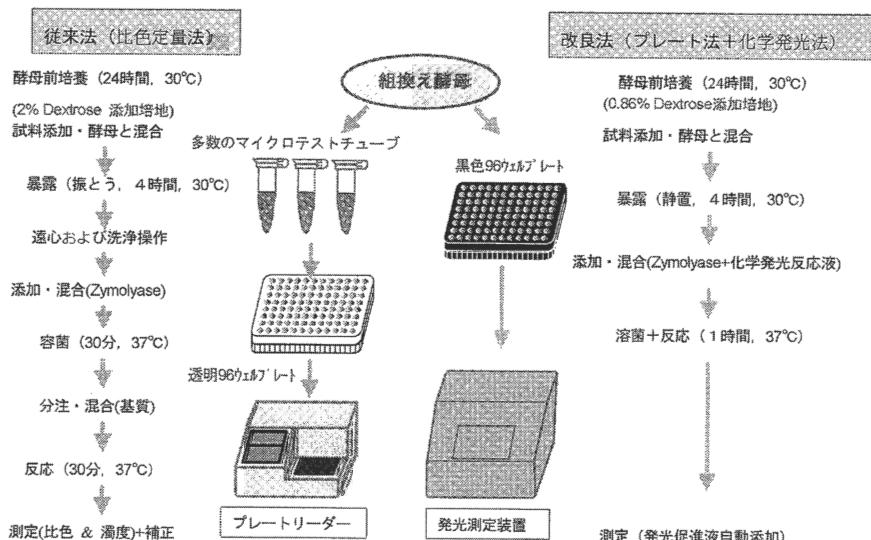


図2 酵母ツーハイブリッドアッセイ法の従来法と改良法の比較

菌操作は不要であり、無菌操作にかかる煩雑な手間も除くことができた。さらに、培地のマイクロプレートへの分注や試料の希釈、酵母の添加などの操作に全自动分注希釈装置を導入することにより、機械化による試験精度の向上と多試料のアッセイが可能となった。ちなみに、1日に24検体の環境試料についてラット肝S9による代謝化試験も含め、発光細菌毒性試験も同時にルーチンとして行っている。

現在、主にヒトエストロゲン受容体 α (hER α)を組み込んだ酵母を用いて環境試料のエストロゲン活性を調べているが、その他にもヒトエストロゲン受容体 β 、ラットやメダカ(α , β , γ)、アフリカツメガエルなどのエストロゲン受容体、ヒトとラットのアンドロゲン受容体、ヒト甲状腺ホルモン受容体(α , β)についても試験系として構築している。

5. 水環境試料の前処理(濃縮)とバイオアッセイ

河川、湖、海などの水試料の環境ホルモン活性をバイオアッセイで測定するには、前処理(濃縮)を必要とする。環境ホルモン作用の疑われている物質は有機化合物がほとんどであり、活性を示す有機化合物について抽出・捕集を行えばよい。水試料からの有機化合物の抽出・捕集法はバイオアッセイに用いる場合と機器分析に用いる場合と基本的には同じであるが、バイオアッセイにはサンプルができるだけ簡単に前処理できる抽出法が望まれる。水試料からの有機化合物の抽出・捕集法にはさまざまな方法があり、水試料からの有機化合物のさまざまな抽出・捕集法については、昨年の全国環境研会誌の「特集/化学物質と環境」のなかで笛井氏が詳しく紹介している⁸⁾ので、参考にしていただきたい。

われわれは操作に熟練を要せず、有機溶媒の使用量も少なくて済み、対象物質を捕集できるC18 FFディスク(3M社)による固相抽出法を用いており、良好な試験結果を得ている。前処理法について検討した一例を示す。

図3には比較的エストロゲン活性が高いといわれる都市型下水処理場の排水について、異なる前処理(抽出・溶出)法で行った酵母ツーハイブリッドアッセイによるエストロゲン活性と発光細菌毒性試験による毒性を示したグラフである。試

下水処理場排水

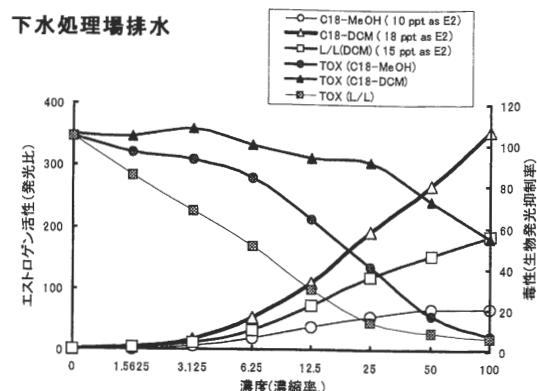


図3 下水処理場排水の前処理法の違いによるエストロゲン活性と毒性

下水処理場排水

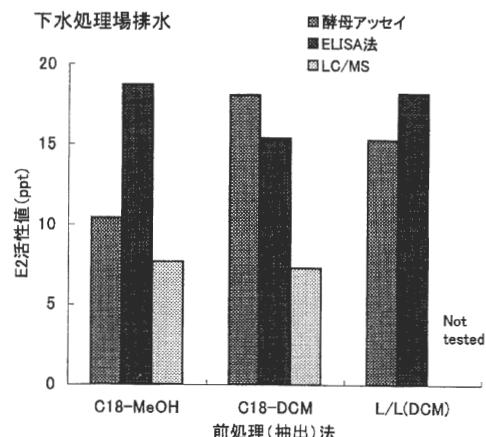


図4 下水処理場排水の前処理法および測定法の違いによるE2活性値の比較

料C18-MeOHは下水処理場排水をC18固相ディスクで捕集後、メタノールで溶出したもの、試料C18-DCMは下水処理場排水をC18固相ディスクで捕集後、ジクロロメタンで溶出したものである。試料L/L(DCM)は下水処理場排水をジクロロメタンによる液液抽出法で作成したものである。酵母アッセイによるエストロゲン活性は、試料C18-DCMがE2に換算して18pptともっとも高い活性を認め、試料L/L(DCM)は15ppt、試料C18-MeOHは10pptと低い値を示した。同じサンプルについて、発光細菌毒性試験を試みたところ、試料L/L(DCM)がもっとも毒性が強く、続いてC18-MeOH、C18-DCMの順であった。

図4には同じ下水処理場排水の抽出法および溶出別の試料を酵母アッセイ法、E2およびE2

+E1を測定するELISA法、LC/MS分析法(E2とE1を測定)について酵母アッセイによるE2活性値に換算して示した。LC/MS分析ではE2とE1濃度をE2活性値に換算した値はC18固相抽出法のメタノールおよびジクロロメタン両溶出とも8ppt程度の値を示したのに対し、ELISA法は3つの前処理法とも15~18pptとLC/MS分析法の2倍以上の値を示した。2つの結果から酵母アッセイでは下水処理場排水に含まれるエストロゲン活性物質以外の夾雑物をメタノール溶出や液液抽出法はジクロロメタン溶出に比べて試料中に多く取り込むため、夾雑物の酵母への毒性(あるいはアンタゴニスト作用)を反映して活性が低くなつたためと推察される⁹⁾。

一方、ELISA法がLC/MS分析に比べ強くE2活性値を感知したのは、試料中に交叉反応を示す物質の存在が疑われ、後にこのような高濃度E2活性値を示す下水処理場排水には塩素置換体E2関連物質が存在することが確認された。これら塩素置換体E2関連物質はELISA法において交叉反応性を持ち、酵母アッセイ法においてはE2の十分の一程度の活性を持つことが明らかとなった。酵母アッセイにおいては、環境水の前処理は毒性等を考慮するとC18固相ディスクによるジクロロメタン溶出が優れているようである。

6. おわりに

水環境の環境ホルモン活性は環境省が実施している化学物質の機器分析による測定結果のみで十分論議できるものではなく、トータルとしての活性はバイオアッセイに頼らざるを得ない。環境計測において、バイオアッセイによるトータルの活性測定と機器分析による活性物質の特定という両者がうまくからまることで、環境ホルモンのリスク評価につながるであろう。環境試料の機器分析については多くの試験研究機関で測定が可能であるのに対して、バイオアッセイについては測定できる機関は限られており、また、統一した測定システムで測定しているわけでもない。われわれの用いている改良酵母ツーハイブリッドアッセイ法は無菌操作もほとんど必要とせず、多試料を短時間(反応4時間)に測定できるという試験系であり、必要とする備品(測定機器)もGC/MSなどの分析

機器に比べると安価である。多くの試験研究機関に導入されれば、環境ホルモンのリスク評価に寄与できるものと考えている。現在、2、3の地方環境研究所との共同研究であるが、事業所排水のエストロゲン活性を酵母ツーハイブリッド法でモニタリングしており、E2換算値で100pptを超えるようなきわめて高濃度の排水例も確認している。

今回、「環境計測手法としてのバイオアッセイ」を主眼に紹介したために、酵母ツーハイブリッドアッセイ法の利点に重きをおいた、かなり我田引水的な論調になり、他のバイオアッセイ手法で検討されている研究者の方々にはお許しを願いたい。

多くの研究機関で環境ホルモンを計測するバイオアッセイが導入され、ヒトへの健康影響のみならず、生態系生物への影響を未然に防ぐ一助になればと願っている。

一参考文献

- 1) 内山幸男; 脳への影響新たな懸念, 朝日新聞, p.11, 2002年8月27日号
- 2) 根岸治美, 白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 西川 力, 森田昌敏; *in vitro* エストロゲン活性スクリーニングにおける酵母アッセイ法とレセプター結合アッセイ法の比較, 第9回環境化学討論会講演要旨集, pp.456~457, 2000
- 3) 飯田 満, 小栗英生, 山下成人, 川西正祐, Jorma J. Palvimo; 哺乳動物細胞を用いたエストロゲンレセプター応答性レポータージーンアッセイ法の開発, 第9回環境化学討論会講演要旨集, pp.126~127, 2000
- 4) 吉元健司, 中尾真澄, 濱田一明, 大村 浩, K. Kannan J. P. Giesy, 堀内晶雄, 橋本伸哉; レポーター遺伝子を用いた東京湾周辺環境試料中の女性ホルモン様物質の測定, 第9回環境化学討論会講演要旨集, pp.458~459, 2000
- 5) Routledge, E. J. and Sumpter, J. P.: Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, pp.241~248, 1996
- 6) Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Daikayama, F., Matsuo, M. and Nishihara, T.: New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 154, pp.76~83, 1999
- 7) 白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 西原 力, 森田昌敏; 酵母 Two-Hybrid System による簡単なエストロゲンアッセイ系の開発. 環境化学, 10, pp.57~64, 2000
- 8) 笹井春雄; 水試料からの有機化合物の抽出・捕集法, 全国環境研会誌, 26, pp.144~150, 2001
- 9) 白石不二雄, 丸尾直子, 白石寛明, 磯部友彦, 西川淳一, 西原 力, 森田昌敏; 水環境試料の *in vitro* エストロゲン試験法のための前処理手法について -酵母アッセイ法及びエストロゲンELISA測定法での比較-. 第11回環境化学討論会講演要旨集, pp.504~505, 2002