

## 内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)の生物評価法(in vitro)

愛媛事業所 三原 一優

### 1 はじめに

日常的に日本で使用されている化学物質の数は約6万種類に達するといわれている。現在の環境基準は個々の化合物ごとに、それぞれ膨大な毒性試験を基にして、危険・安全性/有益性評価がなされている。特に有害物質と考えられる物質には規制値が定められている。ただし、外因性内分泌攪乱化学物質いわゆる環境ホルモンと称される67物質は、その疑いがある物質群<sup>1)</sup>とこのことであり、現在その解明の為の研究・評価が推進されている。しかしながら、数限りない其他化学物質を従来の手法で評価していくことも現実的には難しい問題である。化学物質は環境中で種々の化学反応や微生物などによる生分解作用を受け、さらに別の化合物に代謝・分解しても存在する。また、ダイオキシン類をはじめとした新たな非意図的生成物質や未知物質も存在する。加えて、それらの分解産物や非意図的生成物を包含した化学物質の安全性評価ならびにそれらの環境中でのモニタリングを行うことが重要であり、また、化学物質のみならず天然に存在する物質の安全性評価・環境モニタリングも必要である。これらを考慮しようとするれば、現実的には多大な費用と時間を要するのも否定できない。そのような背景から、特定の化学物質を迅速かつ安価に定量分析する努力のみならず、ホルモンに及ぼす影響・作用に着眼した安全性評価を目的とした環境中でのモニタリング手法(生物評価法)の開発も一方で切望されている。

ホルモン作用機序に基づく毒性作用

を指標とした生物評価法としては、ホルモンレセプターとの結合拮抗試験<sup>2)</sup>、ピテロゲニン免疫測定試験<sup>3)</sup>、ヒト乳癌細胞増殖試験(E-Screen)<sup>4)</sup>、酵母Two-Hybrid試験<sup>5)</sup>などが技術開発されている。さらに哺乳動物培養細胞を用いたいわゆるレポーター遺伝子転写活性試験の利用も試みられている<sup>6)</sup>。

代表的なホルモンである17-エストラジオールの生物学的簡易分析手法としてはELISA法<sup>7)</sup>があるが、それは化学分析の簡易代替分析法である。

ここでは、培養細胞を用いた内分泌攪乱化学物質の生物評価法、特に遺伝子転写活性を指標とした毒性評価法を中心に紹介する。

### 2 内分泌攪乱化学物質の毒性を計測する考え方

内分泌攪乱化学物質の定義はスミソニアン・ワークショップ(1997)で提案されているが<sup>8)</sup>、「元々の正常な生体内ホルモンの働きに影響を及ぼす化学物質」と解釈できないわけではない。ただし、その生体内ホルモンをどう定義するかによっても捉え方が異なってくる。生体細胞で産生されて広く生体の調節機能に与する物質を総称してホルモンと呼ばれているが、狭義には性ホルモンと甲状腺ホルモンに限定して検討しようという動きがある<sup>9)</sup>。

内分泌攪乱化学物

質の多くはホルモンレセプターと呼ばれる細胞の特異的な蛋白質にある濃度で可逆的に結合して、ある物質はホルモン様応答(アゴニスト)を、また、ある物質は本来の生体内ホルモンの応答阻害物質(アンタゴニスト)として作用を示す。また、あるホルモンは細胞核内に移行して核レセプターに結合し、更に遺伝子DNAの一部に結合し、転写調節性蛋白質の介在による作用を経て、特定の蛋白質合成を調節している。代表的なホルモンと作用機構を図1に示す。

### 3 レセプターへの結合ならびに結合を通じて生ずる転写活性を指標とした内分泌攪乱化学物質の生物評価法(in vitro)

現在検討されている生物評価法は上述の生体内ホルモンレセプターとの結合やホルモン応答性機能変化に着目しているものが多い。表1にそれらの特徴を示す。また、ルシフェラーゼレポーター遺伝子転写活性試験の概略を図2に示す。

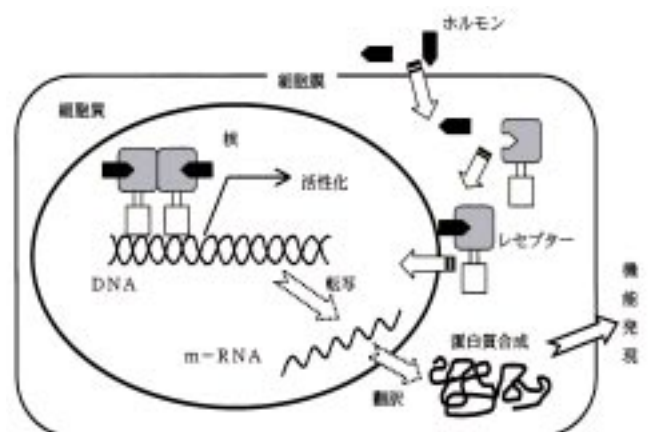


図1 代表的なホルモンと作用機構

表1 内分泌攪乱化学物質の生物評価法 (in vitro) の特徴

試験法	特徴	備考
レセプター結合拮抗試験	エストロゲンレセプターに放射性 <sup>125</sup> I-エストロジオールと供試試料との競合阻害作用を利用したもの	アゴニストかアンタゴニストかの区別がつかない
ビテロゲニン免疫測定試験	試料溶液曝露下で飼育した雄の魚が産生するビテロゲニン量をELISA法にて測定する	感受性は高く特異性はあるが、魚の飼育を伴う
E-スクリーン試験	供試試料によるMCF-7ヒト乳癌由来細胞の増殖細胞数を測定する	エストロゲン様作用に限られる
酵母Two-Hybrid試験	2つの複合蛋白(レセプター・GAL4とコアアクチベーター)の発現プラスミドとガラクトシダーゼ発現系レポータープラスミドを酵母に導入した方法	培養容易だが、抗エストロジェンの反応があらわれない場合もある
レポーター遺伝子転写活性試験	レポーター遺伝子としてルシフェラーゼなどを用い、遺伝子上流にホルモン応答配列を導入した方法 培養細胞: HeLa, CV-1, CHO など	アゴニストかアンタゴニストかの区別が可能

規制を念頭にした環境汚染物質の毒性評価試験を確立するにはまだ多くの問題点が山積している。環境計測に要求される検出下限も一段と低濃度となっており、定量分析を行うには十分な評価確認が必要であろう。検出感度の一層の向上も必要である。

試験法確立後も常に簡易毒性試験としての限界に留意し、試験結果を過大評価することなく正しく用いる必要がある<sup>11)</sup>。

文献

- 1) 環境庁: 「外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について - 環境ホルモン戦略計画SPEED'98 - 」(1998)。
- 2) W. R. Kelceら: Nature, 375, 581(1995)。
- 3) A. E. Goodwinら: Comp. Biochem. Physiol., 101B, 441(1992)。
- 4) A. M. Soto: Environ. Health Perspect., 103, 113(1995)。
- 5) S. F. Arnoldら: Environ. Health Perspect., 104, 544(1996)。
- 6) 金子秀雄, 庄野文章, 松尾昌季: 科学, 68, 598(1998)。
- 7) 彼谷邦光: 第24回日本環境化学会講演会資料集, p.92(1998)。
- 8) 厚生省: 内分泌かく乱化学物質と健康影響に関する検討会中間報告(1998)。  
[http://www.mhw.go.jp/search/docj/shingi/s9811/s1119-2\\_13.html#1](http://www.mhw.go.jp/search/docj/shingi/s9811/s1119-2_13.html#1)
- 9) EDSTAC: Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee。  
<http://www.epa.gov/opptintr/opptendo/edborger.pdf>
- 10) <http://www.moc.go.jp/river/hormon/990330-a.html>
- 11) 鈴木基之・内海英雄編: “バイオアッセイ水環境のリスク管理”, p.11(1998)(講談社)。

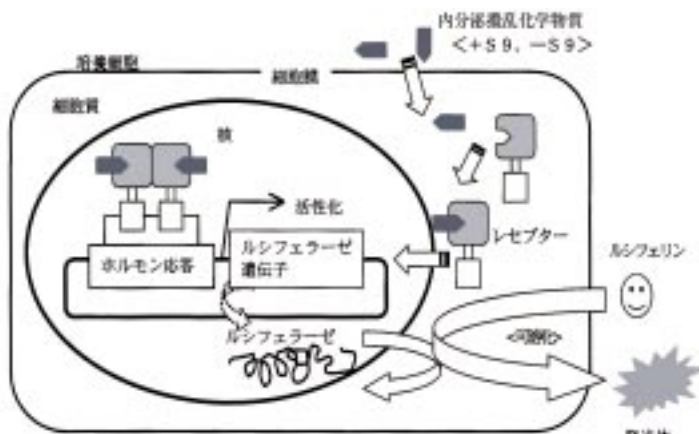


図2 ルシフェラーゼレポーター遺伝子転写活性試験の概略

判断できないとしている<sup>10)</sup>。

生物評価法による応答性からある有害性を評価することが可能であれば、有害物質による環境毒性負荷の程度をある程

度予測することができる。環境の汚染には意図・非意図の関係に生成されたものが混在する。それらすべてを化学的に定量していくには限界がある。予防的対策を講じる必要な地域・箇所などを生物評価法である程度特定化し、さらに原因物質を化学的分析手法により定性・定量化することが望ましい。

汚染の実態把握の為の生物評価法の利用には大きな期待もてる。しかしながら、生物評価法を確立するためには毒性発現機序の解明、各試験の特性を生かした基礎的データの蓄積・解析が必要である。そのうえで、各細胞毒性試験の適用範囲を正しく認識し、複数の評価系を組み合わせながら、より精確な汚染状況の把握を行う必要がある。

4 現状と問題点

建設省は「平成10年度水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果」を公表した。測定地点のほとんどで、調査対象物質とした内分泌攪乱化学物質として疑われている物質を検出した。あわせて調査した人畜由来ホルモン(17 エストロジオール)も調査した雄のコイの約4分の1でビテロゲニンが生成していることを確認した。その要因を、同じ場所で生息する雌のコイが排出する女性ホルモン、餌等により摂取する植物性のホルモン様物質、河川水中の人畜由来の女性ホルモンや内分泌攪乱化学物質などの様々な要因が考えられ、今回の結果がどのような要因によりもたらされたものかは



三原 一優  
(みはら かずまさ)  
愛媛事業所