

環境負荷物質のバイオアッセイによる検出法

小浜 恵子*、大澤 純也*

環境ホルモン様活性を有する化学物質、ダイオキシンなどをバイオアッセイにより簡便に評価する方法について調査検討を行った。実用化が進んでいる抗原抗体反応を利用したイムノアッセイ（ELISA法）を用いて県内の河川水などを評価した結果、17 β -エストラジオールが1~3ng/lで検出された。標準液の環境試料への添加を行ったところ、反応への妨害物質は認められず簡単な固層抽出で測定可能であった。ダイオキシンに関しては河川水試料の測定妨害となる脂質を簡便に除去し、有機溶媒の抽出濃縮で測定が可能と思われた。動物細胞を利用した総合的な評価方法として、熱ショックタンパク質（HSP）プロモーターの活性による環境負荷物質測定についても検討を行った。

キーワード：環境ホルモン、ダイオキシン、バイオアッセイ

Studies on Environmental Endocrine Disrupters Using Bioassay

KOHAMA Keiko, and OHSAWA Junya

The influence of endocrine disrupters and environmental chemicals on the ecological system is already a public concerned. In this study, we tested bioassay method to evaluate environmental water. We detected 1 ~ 3ng/l of 17 β -estradiol from water environments using ELISA. Extraction from water samples did not disturb the reaction. When we determined dioxins using ELISA, samples extracted by organic solvent needed to remove lipids with glass filter. We also tested some chemicals using reporter gene assay with animal cell line that had promoter activity of response to heat shock.

key words : environmental endocrine disrupter, dioxins, bioassay

1 緒言

現在、日本では約6万種類の化学物質が日常的に製造使用され、環境への影響が懸念されている。環境汚染問題が社会問題となっており、国においても早期に化学物質を同定、評価する試みが行われている¹⁾。環境ホルモン疑い物質は優先度の高いものの順で65種類あげられている。また環境ホルモン作用も有するダイオキシンは毒性の高さから問題視され、ダイオキシン類対策特別措置法により、平成12年1月より環境中の定期的測定が義務付けられている。今後ますます企業などの自主管理が求められる状況にあるものの、これらの環境負荷物質を機器により同定・定量するには、1)コストがかかる、2)作業が煩雑で長時間を要する、3)熟練技能者の養成が必要、などの問題があげられる。バイオアッセイは、

機器分析測定に比べ、精度や検出限界などで劣るものの、簡便で迅速な方法として着目されている。抗原抗体反応を利用した測定キットは広く実用化されており、米国環境保護庁（EPA）公認の測定法もある。また、動物細胞や微生物を利用した「生物応答」に関する研究開発が広く実施されており、ベンチャー企業の参入もみられる。本研究においては、特に環境ホルモン作用を有する物質とダイオキシンに着目し、機器分析前のスクリーニングや自主管理ツールとして有効なバイオアッセイの現状と今後の可能性について検討を行った。

2 実験方法

2-1 分析試料の調製

環境試料としては県内の河川水（2ヶ所）およびゴ

* 応用生物部

ルフ場内の池水(2ヶ所)を用いた。試料瓶は、ホウケイ酸褐色ガラス製ビンを用い、採取後は分析時まで4に保管した。17 β -エストラジオールの測定試料は次のように調製した。試料水450mlをガラス繊維フィルター(アドバンテック社製)によりろ過して浮遊物等を除去した。ろ液を1M酢酸緩衝液によりpHを5に合わせ、ろ紙を10%メタノール溶液(酢酸緩衝液で希釈)で洗浄してろ液に合わせた。次にメタノールおよび水で前処理した固相カートリッジ(ポンドエリートC18 ジーエルサイエンス社製)を通過させ、吸着させた。蒸留水とヘキサンでカラムを洗浄した後、酢酸エチル:メタノール(5:1)5mlで溶出し、溶媒を窒素ガスにより除去した後10%(V/V)メタノール5mlに溶解して試料とした。ダイオキシン測定用試料はEPAメソッド(8020)を参考とし、試料水500mlにジクロロメタン30mlを加えて振とう抽出を行い、ジクロロメタン層を分離した後、再度抽出を行った。さらにヘキサンを加え溶媒を除去した後、DMSO30 μ lに溶解して試料とした。

2-2 イムノアッセイ(ELISA)による測定

使用したキットは競合法による測定を基本原理としている。17 β -エストラジオールの測定にはチューブに抗体が固定化されたキット(武田薬品製)を用いた。分析方法はキットのプロトコールに従い、環境試料中の測定妨害物質の影響をみるために、17 β -エストラジオール標品を0.2 μ g/l添加した。ダイオキシンの測定にはRISC(Strategic Diagnostics社製)ダイオキシン検査キットを用いた。このキットは2,3,7-TriCDDを標準品としており、抗体がTriCDDに対して20%の交差反応をもつことを利用し、2,3,7,8-TCDDに換算した値を算出する。環境への影響と安全性上、2,3,7,8-TCDDの添加試験は困難であることから、標準品2,3,7-TriCDDを、環境試料へTCDD2.5ppb相当量を添加したときの影響をみた。

2-3 細胞を利用した測定方法

化学物質の内分泌攪乱性、(環境ホルモン活性)の有無を調べるためにEPAでは「内分泌攪乱物質のスクリーニングとテストに関する諮問委員会」(EDSTAC)の報告を受けて、スクリーニングテストプログラムを公表した²⁾。これらの試験の中で、環境試料の内分泌攪乱性評価に利用できるのは、ハイスループット予備スクリーニング及び第一段階予備スクリーニング *in vitro* (試験管)試験で使用される評価方法である。例えば、ホルモン転写活性試験では各ホルモン受容体、その受容体の応答する転写機構などを培養細胞を用いて評価する。今回は、より広範囲の化学物質の負荷を総合的に簡便に評価する方

法として熱ショックプロモーター(hsp)の転写活性で評価するための予備検討を行った。細胞は鐘淵化学工業(株)が作成したマウスHSP47プロモーターの下流にガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)を結合したプラスミドをチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞に導入した2F1813と、コントロールとしてSV40 early promoterを含むプラスミドをCHO細胞に導入した5K95を用いた。培養はMD培地(MDCB302:5.5g/l, D MEM:4.75g/l, L-Gln:0.3g/l, NaHCO₃:1.27g/l pH 7.1)に最終濃度5%FBS、200 μ g/mlのG418を添加したものを³⁷、5%CO₂の条件下で培養した。環境負荷物質に対する転写活性の測定は次のように行った。培養した細胞を、試験を実施する2日前に96穴プレートに1ウエルあたり、 1×10^4 cells/100 μ lとなるように播種した。17 β -エストラジオールは10%エタノール溶液として添加した。試料として2-1で固相抽出した10%メタノール溶液はウエルあたり5 μ l添加した。また、トリクロロエチレン、1,2-ジクロロエタンをメタノールに溶解しMD培地で1000倍以上に希釈し最終濃度 10^{-6} M添加した。試料添加後、³⁷、5%CO₂条件下で3時間インキュベートした後、培地を除去し、PBS緩衝液で2回洗浄して細胞溶解液(プロメガ製)を50 μ l/ウエル添加して30分放置した後、ガラクトシダーゼ活性測定キット(プロメガ製)を用いてマニュアルに従いONPG法により反応を行い、マイクロプレートリーダー(バイオラッド)を用いて405nmの吸光度を測定した。コントロールとして2F1813細胞を42^oで90分間インキュベートした場合の活性も測定した。

3 実験結果および考察

3-1 エストラジオールのELISAによる測定

標準液を用いた検量線を図2に示す。濃度ゼロのブランク値(B0)に対する測定した吸光度(B)の割合を百分率で表示し測定値としている(B/B0)。競合酵素免疫測定法を原理とする方法では対数目盛の抗原濃度(この場合はエストラジオール)をとった場合、検量線はシグモイド曲線を描き、ある濃度範囲では直線となり、この範囲で定量が可能である。環境試料の測定結果は表1であり、測定限界以下(今回の濃縮からは0.1ng/l以下)のものから3.3ng/lまで検出された。環境省で平成10年に「環境ホルモン緊急全国一斉調査」³⁾で河川を初めとする公共用水域、および地下水からELISAによって測定した結果では、全体の61%から検出され、濃度範囲は最大で35ng/l濃度で検出されている。また今回測定に用いた環境試料に標準物質を0.2 μ g/l添加したところ、今回

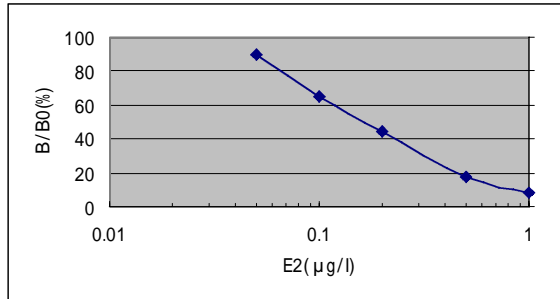


図 2 17-estradiol (E2) の検量線

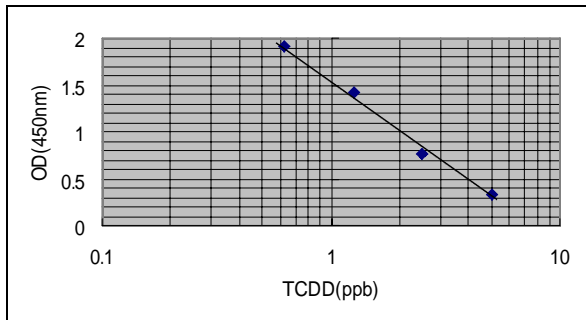


図 3 TCDD 検量線

表 1 環境試料中の E2 測定結果

試料	17-estradiol (ng/l)
ゴルフ場池水A	未検出
ゴルフ場池水B	3.3
河川水A	1.2
河川水B	3.0

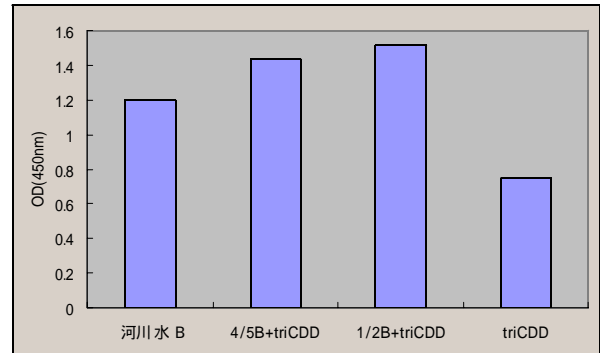


図 4 試料による測定妨害

使用した試料による測定妨害はみられなかった。

3-2 ダイオキシンの ELISA による測定

2,3,7-TriCDD を用いて作成した検量線を図 3 に示す。濃度は 2,3,7,8-TCDD 換算で表示している。

今回使用したキットでは、抗体が 2,3,7-TriCDD に 20% の交差反応を持つことを利用してこれを標準液として、検量線を作成して定量する。坂井ら⁴⁾の検討によれば、実際に 2,3,7,8-TCDD を用いて、この換算の妥当性を評価した結果、ほぼ一致しており、2,3,7,8-TCDD 濃度換算で 0.625 ~ 5ppb で直線性がみられ、定量が可能であるとしている。今回作成した検量線はこの範囲を用いた。

河川水 A 及び B の試料を用いて測定した結果、A は検出限界以下であったが、B からは陽性の反応が出た。B 試料の結果が、試料精製の不足による測定妨害であることを検証するため、試料添加量を 4/5、および 1/2 とし、2,3,7,8-TCDD 濃度として 2.5ppb 相当および 1.0ppb 相当の Tri2,3,7-TriCDD 標準液を添加して測定した結果を試料 B のみかけの測定値とともに図 4 に示した。明らかな環境試料による妨害であり、その主原因は試料の抽出方法から脂質成分と思われた。試料をガラスフィルターに 1ml/min で通水させてから同様の抽出を行った結果（ダイオキシンはガラスフィルターには吸着されない）、検出限界以下となった。該キットは粗抽出試料を用いて簡便に測定可能と思われるが、濃縮率を高くする場合にはサンプリング試料による妨害物質を考慮した処理が必

要と思われる。焼却灰の干渉効果を検討した結果では、特に妨害がみられなかったとされている⁴⁾。

ダイオキシン類の分析方法は公定法として、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析法 (HRGCMS) が採用されている。この方法は 2,3,7,8-TCDD に対する毒性等価値 (TEQ) を算出するためにダイオキシン類のうち毒性のある 29 種類の異性体を定量して、係数を乗じて総合計量するものである。極微量の定量に適しているが、コストと時間がかかり、ダイオキシン類に規定される化学物質も増加傾向にある。抗体を用いた方法は、コストを公定法の 1/10 に抑えることができるとともに、簡便である。しかし、やはり検出感度は劣ること、主に 2,3,7,8-TCDD ダイオキシンのみを定量することには変わらない。そこで、ダイオキシン受容体 arylhydrocarbon receptor (AhR) が注目されている。AhR はベンゾピレンなどもリガンドとし、AhR を介した毒性発現機構も解明されつつある⁵⁾。AhR に Arnt と呼ばれるタンパク質およびダイオキシンが結合した複合体に対する抗体を用いる測定方法、細胞中で複合体が特定の塩基配列 (XRE 配列) に結合して転写が開始することから、その下流にレポーター遺伝子を組み込んだ細胞を用いた測定方法⁶⁾が考案され、ともに国内での受託サービスを開始している。受容体を介した毒性発現機構が更に明らかになれば、高感度で安価な測定法が開発可能と思われる。

3-3 細胞を利用した測定方法

熱ショックタンパク質は生物が温度や乾燥、有害物質の存在など生育環境が変動した場合に誘導されるタンパク質である。各処理条件におけるガラクトシダーゼ活性を無処理の細胞の活性を1として図5に示した。2F1813は、トリクロロエチレン、1,2-ジクロロエタンの添加により活性が誘導されていた。

今回調製した河川水試料による活性の増大はなく、キットによる試料の測定濃度の17⁻-エストラジオールの添加では活性の増大は検出できなかった。本方法を用いて各種の内分泌攪乱物質、塩素系有機化合物、金属類などのレスポンスが報告されており⁷⁾、実際の埋立地浸出水の浄化処理時の指標としてEDSTACの推奨法であるヒト乳がん細胞(MCF-7)の増殖による評価法⁸⁾と同様に有用であるとされている⁹⁾。レスポンス濃度は、今回のONPG法より検出感度のよい蛍光法を用いていることもあり、10⁻⁷~10nMといわれている。本方法は特異的な1物質の測定よりも総合的な環境評価の指標として有用であり、多検体の測定や廃棄物浸出液などの浄化指標として有用であると考えられる。今後、蛍光検出や実試料などを用いてさらに検討を進めたい。

環境負荷物質をバイオアッセイにより評価する方法は企業やベンチャーの参入が相次いでいる。大学や独立行政法人の起業もみられ環境ホルモンチップ(DNAチップ)の作成などが実施されている。環境問題としての重要性に加え、今後の市場成長が期待される分野であり調査検討を継続する予定である。

4 結言

バイオアッセイによる環境負荷物質の測定方法について調査検討を行った。市販のELISAキットを用いて河川水、池水など環境試料を分析したところ、簡便な抽出方法で測定可能であることがわかった。また、熱ショックタンパク質のプロモーターを利用した細胞による総合評価方法は、環境試料の浄化の指標として、また多検体のスクリーニング方法として有効と思われた。

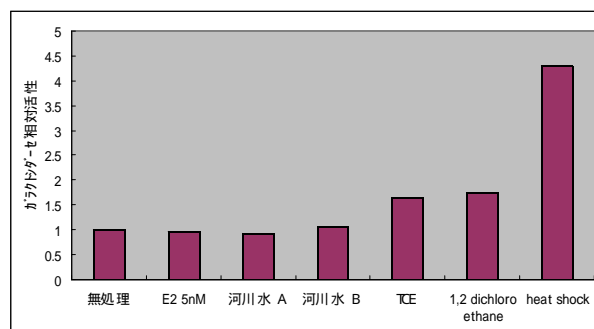


図5 細胞による環境負荷物質評価

謝辞

本研究を進めるにあたり、快く細胞を分譲いただきました鐘淵化学工業(株) 横田真一氏、筑波大学 磯田博子氏、また、ご助言いただきました岩手県環境保健センター高橋悟、中南真理子両研究員に深く感謝申し上げます。

文献

- 1)第6回化学物質評価研究機構研究発表会要旨集(2001)
- 2) Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee(EDSTAC), Final Report. August (1998)
- 3)環境省：「環境ホルモン緊急全国一斉調査」(1998)
- 4) 坂井るり子、大迫政弘、吉田幸弘、芳賀直樹、岩島清、田中勝：廃棄物学会誌論文誌別冊、8, 311(1997)
- 5) 三村純正、藤井義明：蛋白質・核酸・酵素 44, 2384(1999)
- 6) 村田浩次：環境研究、119, 75, (2000)
- 7) 磯田博子ら：「環境有害物質の高感度検出法」特願 2001-272478
- 8)Soto A.M. et al: Environ. Health Perspect., 103, 113, (1995)
- 9)古山貴士ら：水環境学会講演要旨(2002)