



NIES RESEARCH BOOKLET

# 環境儀

No. 44 APRIL 2012

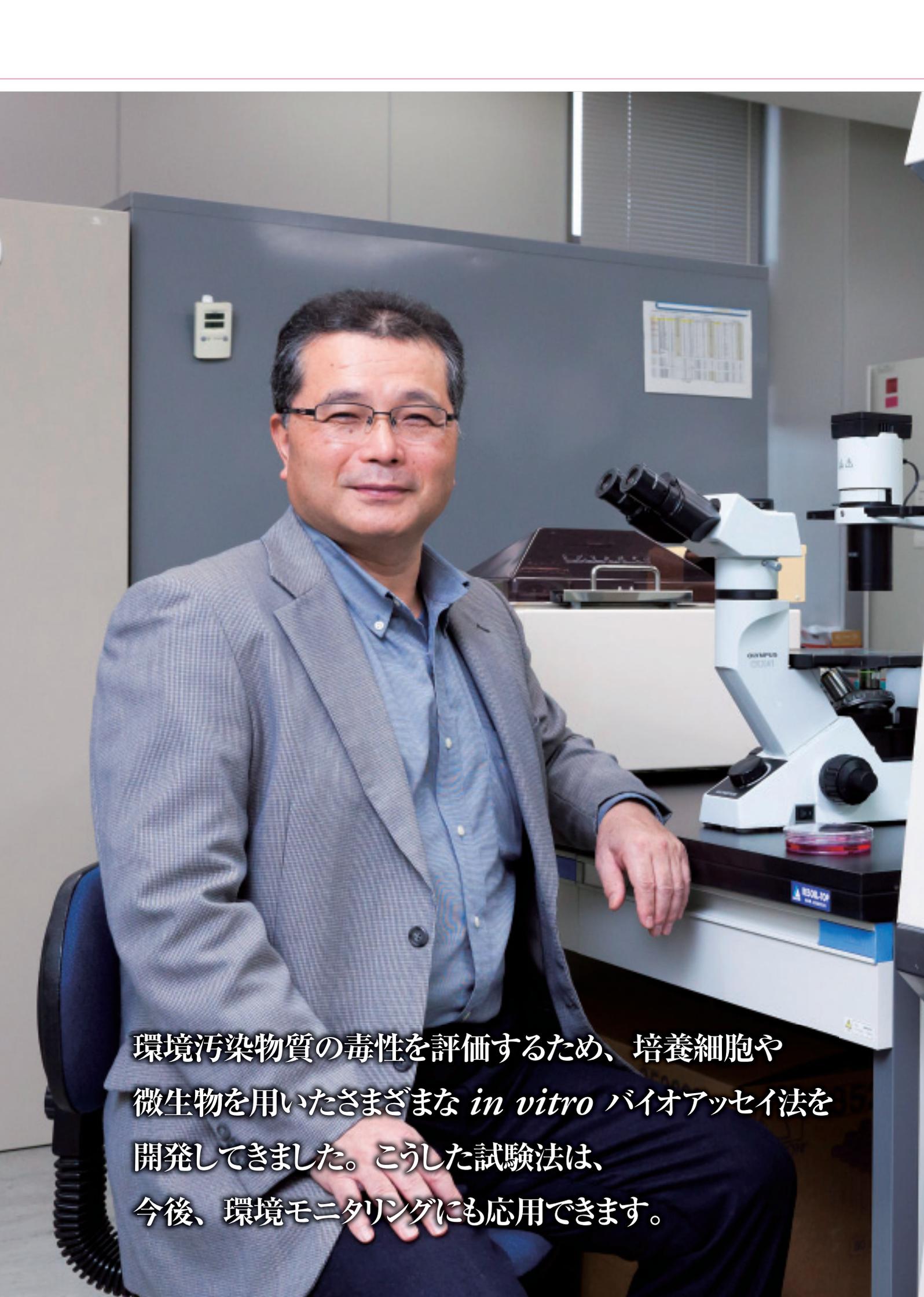
国立環境研究所の研究情報誌

## 試験管内生命で環境汚染を視る 環境毒性の *in vitro* バイオアッセイ

独立行政法人

国立環境研究所

<http://www.nies.go.jp/>

A middle-aged man with glasses, wearing a grey blazer over a blue button-down shirt, is seated in a laboratory. He is looking towards the camera with a slight smile. To his right is a white Olympus microscope on a desk. In the background, there is a large grey cabinet and a window with blinds. The overall setting is a professional laboratory environment.

環境汚染物質の毒性を評価するため、培養細胞や微生物を用いたさまざまな *in vitro* バイオアッセイ法を開発してきました。こうした試験法は、今後、環境モニタリングにも応用できます。



イン ビトロ

*in vitro* バイオアッセイとは、主に培養細胞や微生物を用いた毒性試験のことをいいます。この方法は、実験動物を用いた試験法に比べ、安価かつ迅速に毒性試験を行うことができる特長をもっています。国立環境研究所では、*in vitro* バイオアッセイに早くから取り組んできました。この方法で評価する環境汚染物質は時代とともに変化し、ガス状や粒子状のもの、揮発性で難溶性のガス、高分子などを測定するための *in vitro* バイオアッセイを新たに構築する必要がありました。培養細胞にも工夫が必要でした。また、内分泌かく乱作用の測定では、酵母を用いた迅速なバイオアッセイシステムを構築しました。

日本においては、大気や河川水などに含まれる規制化学物質による環境汚染は改善されつつあります。しかし、大気や河川水には多成分かつ低濃度の化学物質が含まれており、これらの化学物質による汚染が懸念されています。今後は迅速で簡単に使える様々な *in vitro* バイオアッセイを活用することによってこうした化学物質を計測し、平常時の環境モニタリングデータを集積することが重要です。

## C O N T E N T S



### 試験管内生命で環境汚染を視る 環境毒性の *in vitro* バイオアッセイ

- Interview  
研究者に聞く!! ..... p4~9
- Summary  
環境汚染と *in vitro* バイオアッセイの  
構築の遍歴 ..... p10~11
- 研究をめぐって  
受容体結合活性を指標とした *in vitro* バイオアッセイ  
の開発と環境モニタリングへの適用 ..... p12~13
- *in vitro* バイオアッセイを用いた様々な環境  
汚染の評価に関する研究のあゆみ ..... p14

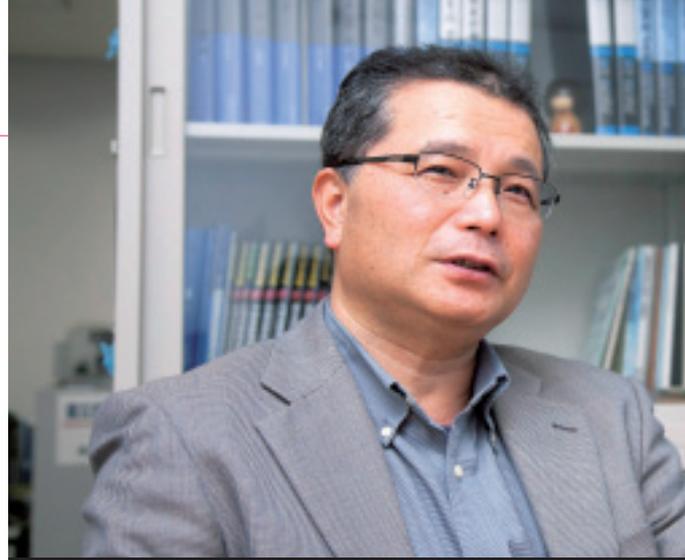
● 本研究に関する成果は以下のURLで紹介されています。  
<http://www.nies.go.jp/risk/mei/mei001.html>

● 表紙写真：右側は桜島（鹿児島県）の噴煙の写真。左側はチャイニーズ・ハムスター由来の培養細胞が火山灰粒子を貪食している光学顕微鏡写真（微分干渉像）

# Interview 研究者に聞く!!



培養細胞や微生物を用いた *in vitro* バイオアッセイは、化学物質の毒性を評価するために幅広く利用されています。この試験法には安価で迅速に測定を行えるという特長がありますが、測定する化学物質に応じて、効果的な試験法を開発する必要があります。国立環境研究所で行われてきた様々な *in vitro* バイオアッセイの開発について、環境リスク研究センター曝露計測研究室室長の白石不二雄さんにうかがいました。



白石不二雄/環境リスク研究センター / 曝露計測研究室 室長

## 様々な環境汚染を *in vitro* バイオアッセイを用いて評価する

### 1: ガス状光化学反応生成物の培養細胞への曝露方法の開発

**Q:** 国立環境研究所で開発した *in vitro* バイオアッセイについて、時系列でお話してください。

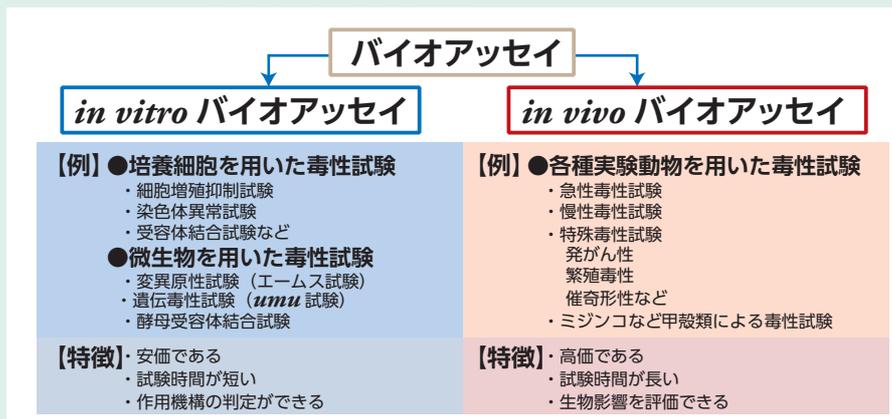
**白石:** 一番目は、ガス状大気汚染物質の毒性を培養細胞で評価するための試験系の開発でした。国立公害研究所に入所（1976年）したとき、その当時は大気汚染がひどくて、光化学スモッグも問題となっていました。光化学スモッグはガス状なものですから、これまでの *in vitro* バイオアッセイ手法では試験が困難であろうということで、ほとんど試験されてなかったのですが、とにかく培養細胞を用いて光化学スモッグの毒性を調べてみるということで、取り組みました。

**Q:** ガス状のものを *in vitro* で毒性を調べるのは、むずかしかったのではないですか。

**白石:** 国立公害研究所の大気環境部という部署では大気汚染物質の計測や光化学スモッグの生成メカニズム

の研究などをしておりましたが、光化学スモッグは生物に対して毒性があるのか、評価したいということで所内プロジェクト研究として行うことになりました。当時は、ガス状大気汚染物質のNO<sub>2</sub>やオゾン（O<sub>3</sub>）などの健康影響が問題になっていまして、そういうものと比べて光化学スモッグはどのような毒性を示すのか、ということで *in vitro* の試験法の開発を始めました。ガス状大気汚染物質の毒性についてはNO<sub>2</sub>などを用いて、いろいろな手法の *in vitro* のガス曝露試験法が開発されていました。それらを真似てやるんですけども、どれも肩つば物なんですね。それまでに報告されている試験法を検証しつつ、新たに自分で開発していったということで、ようやく光化学スモッグの毒性を評価できる試験系を開発しました。当時、光化学スモッグシミュレートガス（光化学スモッグを模倣した光化学反応生成ガス）を作成するチャンバーも高性能な装置であり、最先端の手法で詳細に測定された光化学反応生成物を曝露できたということで、他の研究機関では真似のできない試験

### *in vitro* バイオアッセイとは？



■ 図1 バイオアッセイの分類と特徴

バイオアッセイは、日本語で「生物検定法」あるいは「生物評価法」と訳されています。*in vitro* とは試験管内を意味し、主に培養細胞や微生物を用いた毒性試験を *in vitro* バイオアッセイと定義しています。*in vitro* バイオアッセイは、*in vivo* バイオアッセイに比べて安価で、試験にかかる時間は短く、例えばDNA損傷など遺伝毒性や受容体との結合活性などの作用機構を簡便に調べられる利点があります。



**Q:** 細胞層が上がってくるからその間に曝露させるというわけですね。

**白石:** そうです。そうやって4分間に1回転するようにしますと、1分間は液体の中に入っていますけれども、残り3分間は液面から出てきますので、その間にガスに曝露する。つまりガスを細胞の表面に近づけることで、反応性の高いガスはより影響が検出できるということになります。当然、対照にはきれいな空気を流して比較しながら試験しました。培養瓶を回転させながらガスを接触させる曝露方法ですと、安定したデータが得られるようになりました。再現性の高いガス曝露試験法を確立したということです。

**Q:** そうなんですか。この方法は今でも使われているのですか。

**白石:** このガス曝露方法を用いたシステムは、神奈川県秦野市にあります日本バイオアッセイ研究センターで国や民間の受託試験に用いられています。

**Q:** どのような用途に使われていますか。

**白石:** 例えば、いろいろな工業分野で開発されたガス製品に毒性があるのかどうかを調べるために、まず、培養細胞へのガス曝露試験を行って簡便に一次スクリーニングを行うことができます。

## 2: 大気粒子状物質の培養細胞への粒子曝露による毒性検出法の構築

**白石:** 1980年代後半になりますと、社会問題となっていた大気汚染としてディーゼル排ガス粒子やアスベストがありますが、地方で問題になっていたのが桜島の火山灰やアスファルト粉じんなどでした。桜島の火山灰については、私が鹿児島出身ということもあり、鹿児島県から火山灰の毒性を評価する試験を頼られました。

**Q:** 確かに地元の方々は心配だったでしょうね。

**白石:** 桜島の火山灰については健康に影響があるのか

システムが構築できました。

**Q:** 細胞の種類を選ぶとか、培養の方法を考えると、曝露の方法を考えると、いろいろな工夫があったと思います。どのあたりがポイントだったのでしょうか。

**白石:** 曝露の方法ですね。培養細胞というのは、もともとは液体培地の中で乾燥させないように培養するというのが常識なのですが、それにわざわざガスを曝露しろというのですから、非常に矛盾した発想なんです。一番先に考えるのは、培地にガスをバブリングして溶かして曝露すればいいじゃないかと。ところが、その方法で行いますと、光化学スモッグなどの不安定なガスは、反応性が高いので培地にバブリングすると培地の成分と反応してしまう。安定化してしまうとガス状物質本来の毒性が評価できない。では、どうしたらいいかということで、ガラス製の4面がフラットの細胞培養用の角瓶があるんですが、細胞を1面で培養しますと付着して単層に増殖します。培養角瓶をゆっくりと回転させると培地に浸されていた細胞は、だんだんと液面から上がってきますよね。同時にその瓶の中にNO<sub>2</sub>とか光化学スモッグシミュレートガスとかを流しておけば、液面からむき出しになった細胞はガスと接触します。

**Q:** その場合、培養瓶の上半分は水がないわけですね。

**白石:** そうです。少量の培地がそのまま下にあります。

## 日本バイオアッセイ研究センターで稼働しているガス状物質の培養細胞への曝露システム



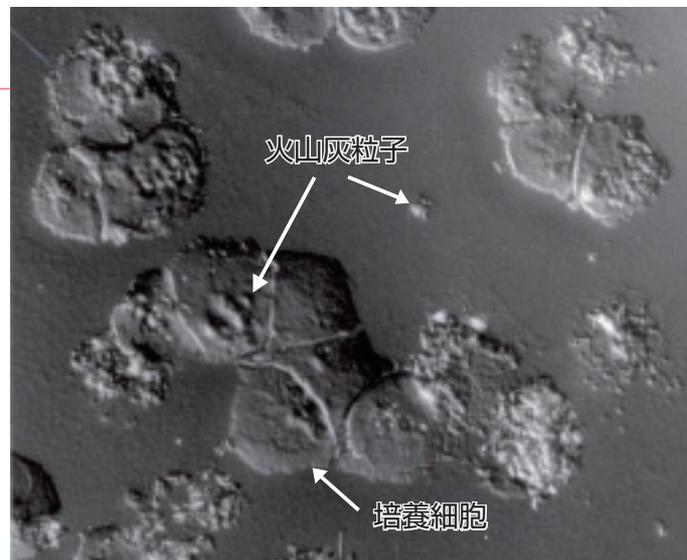
■ 図2 ガス回転曝露装置(左)と低沸点化合物曝露法(密栓回転曝露装置(右))  
(図は日本バイオアッセイ研究センターのホームページから引用)

培養細胞の毒性試験においては、通常化学物質は細胞の培養液に溶解または懸濁して培養細胞に処理しますが、ガス状或いは揮発性の化学物質は、その方法では細胞との接触ができません。そこで気層にある化学物質を培養瓶に貼り付いている細胞に接触させやすくし、かつ細胞の培養が可能なガス曝露法(ガス回転曝露装置)及び低沸点化合物曝露法(密栓回転曝露装置)を開発しました。ガス回転曝露装置(写真左)と密栓回転曝露装置(写真右)では、培養瓶が装置内で回転し、気層及び培養液中の化学物質を交互に細胞に接触させる仕組みになっています。

どうかについては、以前から動物曝露実験等が行われていましたが、発がんへの関与は見いだせないわけです。弱い発がん作用ですと1～2年程度の動物曝露実験では発がん性を見いだすには曝露期間は短いですね。それで発がん性が見いだされなかったとしても本当に安全なのかということと不安があったんです。そこで火山灰の粒子が生体に取り込まれた場合、発がんに関与する遺伝毒性（DNAの損傷）を引き起こすのかどうかということを確認しなければいけません。一般的な *in vitro* 試験法は、直径10 $\mu$ m以下の小さい粒子を培地に浮遊させて細胞に曝露すればよいのですが、粒子は溶けませんので曝露しただけでは細胞への影響を調べることはできません。

**Q:** それではどうすればいいのでしょうか。

**白石:** そこで、チャイニーズ・ハムスター由来の細胞株に注目しました。その細胞は粒子状物質を食べる性質があるんです。貪食作用（ファゴサイトーシス）といいますけれども、火山灰粒子やアスベスト粒子を食べさせたら食べるのではないかと。案の定、食べてくれたんです。アスベストは発がん性があるということが言われておりましたが、どういうメカニズムでがんを引き起こすかは解明されていなかったのですがアスベストを小さくすりつぶして粒子状にした状態で細胞に曝露しましたら、細胞は死んでいくんです。これはアスベストが細胞に貪食されて、細胞内に入ることによって毒性を示していると。アスベストから溶け出すような毒性物質は何もないんです。アスベストが細胞内の核に接触すると、アスベスト表面のイオンが近くのDNAと反応してダメージを与えるのではと推測しました。チャイニーズ・ハムスター由来の培養細胞を用いた試験法で、アスベスト粒子を曝露すると貪食され、遺伝毒性があることを



火山灰粒子を貪食した細胞の顕微鏡写真。微分干渉像(左) 位相差像(右)

見いだしました。アスベストを陽性対照として、長崎の普賢岳の火山灰や桜島の火山灰の数種類について試験したら、アスベストと同じ量の曝露では毒性も遺伝毒性も示さないということがわかりました。アスベスト粒子の10倍以上の大量の曝露では細胞表面を覆う接触阻害による毒性は検知されますが。

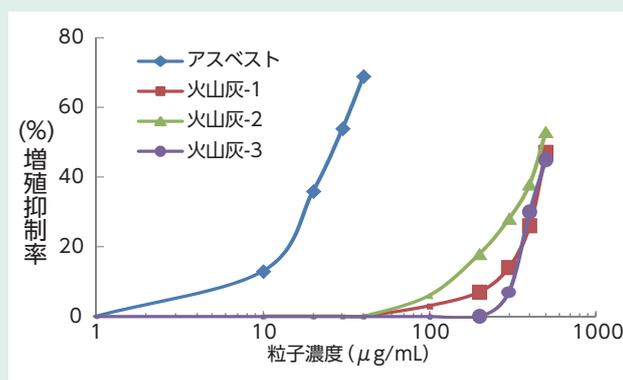
**Q:** 粒子をある程度細かくして細胞が食べられるぐらいのサイズにしてあげれば、いろいろな物質を調べることができますね。

**白石:** われわれが呼吸しますと肺の中まで到達できる粒子の大きさは、だいたい直径10 $\mu$ m以下だと言われています。貪食できる培養細胞株を使えばアスベスト粒子のように毒性を試験することができます。

### 3: ハロン代替物質など揮発性、難溶性物質の培養細胞による毒性検出法の構築

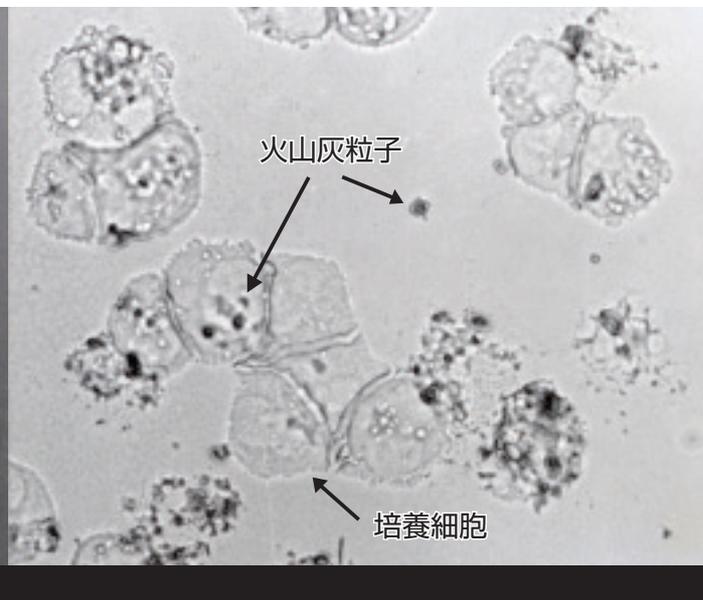
**白石:** 3番目に取り組みました試験法は、代替ハロンの毒性評価でした。フロンやハロンなどはオゾン層を破壊することが問題になりまして、代替フロンや代替ハロンを作る必要がありました。ハロンは化学系消火剤ですが、火災予防の観点から航空機や美術館などの

## 大気粒子状物質の培養細胞による毒性試験



■ 図3 火山灰粒子とアスベスト粒子のチャイニーズ・ハムスター培養細胞に及ぼす細胞増殖抑制作用

ふるいにかけた火山灰粒子や粉碎したアスベスト粒子をチャイニーズ・ハムスター由来の培養細胞に曝露しますと、粒子は細胞に貪食され、細胞増殖抑制作用を示します。異なる3種類の桜島の火山灰粒子は、200 $\mu$ g/mLから500 $\mu$ g/mLの4段階の24時間の曝露で濃度に依存した増殖抑制作用が見られます。一方、アスベスト粒子(クリソタイル)は、火山灰粒子の10分の1量にあたる低濃度で強い増殖抑制作用が見られます。粒子状物質の細胞毒性は細胞に貪食させることにより調べることができます。



で、培養角瓶の細胞を培地といっしょに回転させるのは同じ方式ですが、試験ガスを閉じ込めて、24時間回します。回転しながら培養しますと、溶けにくい試験ガスも培地の中にわずかずつですが溶け込みます。溶けたガス成分は細胞にジワジワと曝露されることになり、遺伝毒性のあるものは検出できます。それで数パーセントという比較的高い曝露濃度でも遺伝毒性が検出されれば、その候補物質は代替ハロンとしては不的確だろうという発想です。培養角瓶の中に試験ガスを閉じ込めて培養しながら24時間以上、回転できる装置を作り、揮発性ではあるが難溶性の物質を培養細胞で試験できる方法を開発したわけです。この方法も日本バイオアッセイ研究センターで改良され、受託試験に用いられています。

室内空気に数パーセント混合することで使用されてもいました。当時、共同研究を行っていた通産省の名古屋工業技術研究所の研究者の方々がいろんな代替ハロン候補物質を合成したのですが、それらの毒性を調べる必要がありました。

**Q:** 確かにそうですね、毒性を調べないといけないうすね。

**白石:** 最初から多数の代替ハロン候補物質の毒性を実験動物で調べることはできませんので、一次スクリーニングできる *in vitro* の試験法はないかということで、毒性試験法の開発を行いました。最初にお話したガス状光化学反応生成物やNO<sub>2</sub>というのは不安定で非常に反応性が高く、曝露時間が短くても濃度が低くても細胞毒性が強いのですが、ハロンや毒性試験する代替ハロン候補物質というのは、水に溶けにくく反応性が極めて低いために毒性が弱いことが予想されます。そういうものを最初のガス曝露方法で行っても毒性は検出できません。

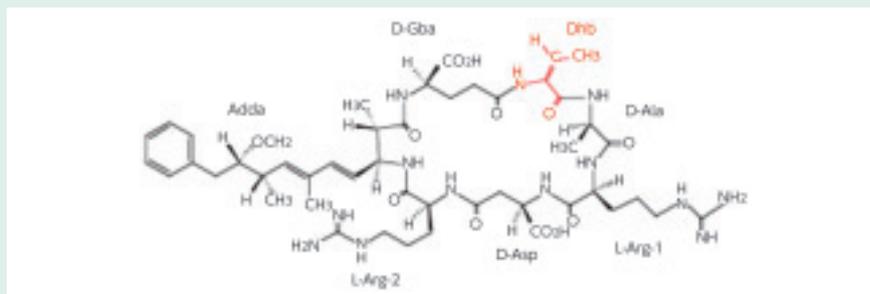
**Q:** それでは、どのような方法をとったのですか。

**白石:** 代替ハロン候補物質などの毒性を調べる *in vitro* 試験法は、遺伝毒性を指標に調べればいわけ

#### 4: アオコ毒など高分子化合物の培養細胞を用いた毒性評価法の構築

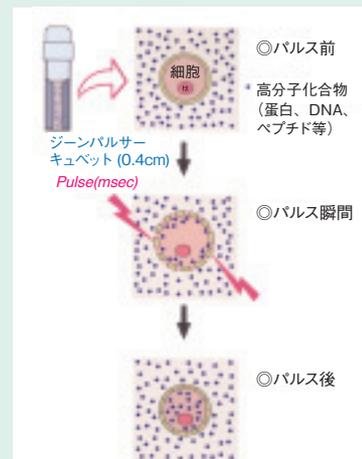
**白石:** アオコ毒の主な原因物質はマイクロシスチンという、分子量としては1000前後の比較的大きな高分子化合物です。当時、私が所属していました化学環境部環境毒性研究室の彼谷邦光室長（現；筑波大）がそういうアオコ毒を研究していたのですが、いろいろなアオコからアオコ毒らしい物質を抽出して生成し、マウスのお腹に注射して毒性の有無を判定していました。マウスでの毒性試験の代わりに培養細胞で判定はできないものかと相談されましたが、アオコ毒は継代培養細胞株では細胞内に取り込まれないために毒性が調べられなかったのです。そこで考えましたのは、強引にでも何とかしてアオコ毒を細胞の中に入れていいじゃないかと。これは彼谷室長のアイデアなのですが、遺伝子やDNAなどの高分子を細胞の中に入れる「エレクトロ

### アオコ毒などの高分子化合物の培養細胞を用いた毒性試験法



■ 図4 アオコ毒(Dhb-マイクロシスチン-RR)の構造式(分子量:1,023)

アオコ毒などのような高分子化合物は、培養細胞に曝露しても細胞内に取り込まれないために、毒性を試験することは不可能でした。右の模式図のように、キューベット(容器)に培養細胞(浮遊細胞株HL60)と高分子化合物を混合したものを入れ、電気パルスを加えると細胞膜は瞬間的に開き、高分子化合物が細胞内に入ります。細胞を別の培養器に移し、24時間培養後の細胞増殖抑制率を調べて毒性を評価します。上の図はこの試験法で強い細胞毒性が確認されたアオコ毒のDhb-マイクロシスチン-RR(分子量:1,023)の構造式です。



■ 図5 培養細胞へのエレクトロポレーション法による高分子化合物の導入メカニズム

ポレーション」を使ってみよう。強い電気ショックを与えますと、細胞膜がパッと瞬時に開き、開いた瞬間に周りの高分子の化合物を培地とともに細胞内に入れるという仕組みです。エレクトロポレーション法を使うと、マウスで毒性を示したアオコ毒は細胞毒性を示したわけです。

**Q:** これを使えば、毒性がどのぐらい強いのかも評価はできるのですか。

**白石:** いろいろな有毒アオコについて培養細胞での細胞毒性を試験し、マウスなど動物実験との致死毒性の相関性を解析するしかないのですが、当時は培養細胞での試験法の開発を目的としていましたので、そこまでは突っ込んで行ないませんでした。

## 5: 環境ホルモン作用の酵母を用いた迅速、簡便な試験法の構築

**Q:** 酵母を用いた試験もありましたね。

**白石:** 環境庁（現：環境省）は、98年に、環境ホルモンに関する、いわゆる「環境ホルモン戦略計画 SPEED '98」を策定しましたが、ほぼ同じ頃、国立環境研究所でも環境ホルモン研究がスタートしまして、何らかの形で環境ホルモン研究に取り組みたいと思っていました。

**Q:** なぜ酵母に目を付けられたのですか。

**白石:** 酵母は培養細胞に比べて取り扱いが容易で細胞毒性に強いという利点があります。そのころ広く利用されていた培養細胞の試験法は結果を得るまで4日間ぐらひはかかる方法だったですね。しかも環境試料の試験では雑菌が混入する心配がありますので試料を濾過滅菌する必要があります。当時、大阪大学の西川淳一先生（現：武庫川女子大学）らが受容体遺伝子を



中国の池で大発生したアオコ

組み込んだ酵母株を開発されており、その酵母試験法はホルモン様物質と酵母とを混ぜてわずか4時間の反応時間でホルモン活性を高感度に測定できるすぐれたものでした。

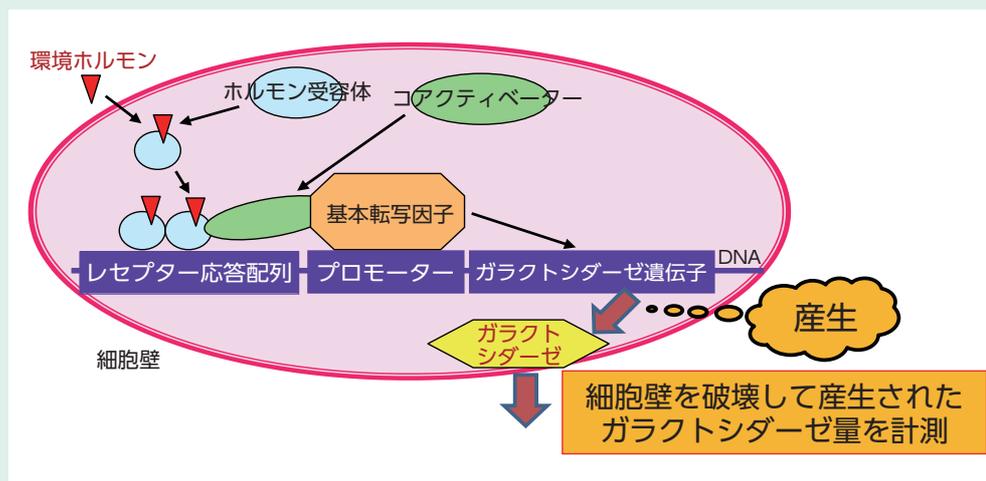
**Q:** そのような方法は以前からあったのですか。

**白石:** 西川先生らは、エストロゲン受容体以外にもいろいろなホルモン受容体を組み込んだ種類の酵母株を開発されており、今後いろいろな環境ホルモン作用を検出するのに役立つのではと思ひまして、開発された酵母株を譲渡していただきました。西川先生らは受容体を導入した酵母株を開発するのが目的でしたので、当時、用いていた試験法の操作は非常に煩雑な方法で、そのままですと、とても1日に多数の試料を試験することはできませんでした。私たちは環境研究に適用できる試験法として、1日に100検体ぐらひは試験できて、なおかつ再現性のある高感度の試験法を開発・構築しようと考へたわけですね。

**Q:** 酵母にある特定の受容体遺伝子を入れて、該当する物質があるかどうか調べるわけですね。

**白石:** レポータージーンアッセイと言ひますが、受容体が酵母や細胞の中にあり、そこに環境ホルモンが結

## 環境ホルモン作用を計測する遺伝子導入酵母



■ 図6 環境ホルモンを計測するための遺伝子導入酵母の模式図

環境ホルモンを計測するために西川淳一博士らが開発したレポータージーンアッセイ用酵母の模式図です。酵母ツーハイブリッド法という遺伝子導入法でホルモン受容体とコアクチベーターの2種類のタンパク質を同時に入れることで高感度にかつ迅速にホルモンと受容体との結合活性を計測することができます。受容体結合によりレポーター遺伝子で産生されたガラクトシダーゼ量を計測して受容体結合活性値とします。



茨城県水戸市千波湖でのアオコ採取風景



すね。

**白石:** そうですね、核内受容体は50種類ぐらい知られておりまして、西川先生らが酵母に導入した受容体は10種類ぐらいで、現在、その中でわれわれが試験として使えるのは5、6種類です。構築しました酵母アッセイを使いまして、数百種類の化学物質について様々なホルモン活性をスクリーニング（選別）したり、水環境、大気環境、土壌環境中の環境ホルモンの環境モニタリングを行っています。

**Q:** 最後に伺いたいのですが、大学の時にも培養細胞を使った研究をされていたのですか。

**白石:** いいえ。私は獣医学科の微生物の部屋で、病原性細菌を取り扱う研究をしていました。

**Q:** それではどうして。

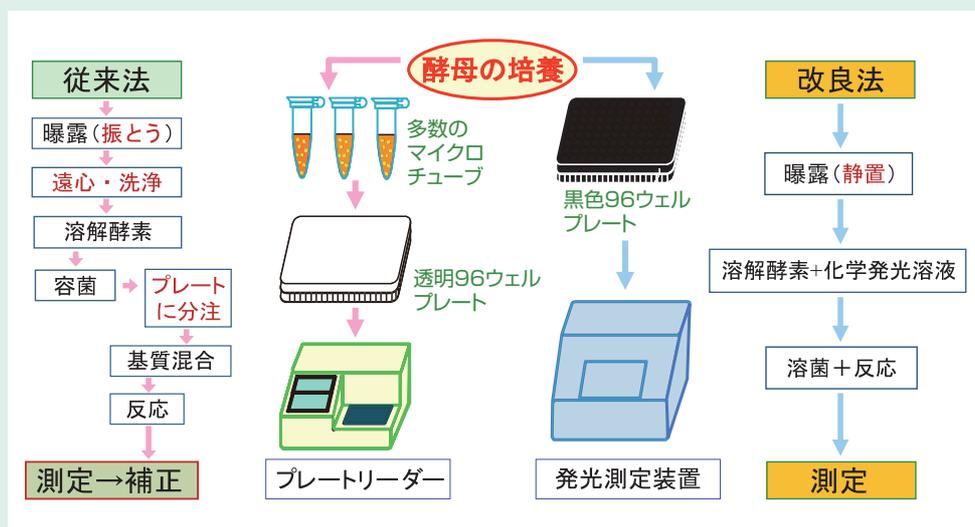
**白石:** 上司に「細菌培養ができるのなら無菌操作ができるよね。同じ無菌操作だから培養細胞を使って光化学スモッグの毒性試験をやりなさい」と言われたという極めて簡単な理由からです。細胞を培養する技術の習得から始めたのですが、ただ逆に言えば、培養細胞にガスを曝露するという、細胞培養技術の固定概念を捨ててできたという意味では、まさに経験がなかったから発想できたのかもしれないと思っています。私の場合は、研究生活のほとんどは社会的に問題になっている環境汚染の毒性をどうやって調べるかということで研究テーマを見つけ、*in vitro* の毒性試験法の開発だったり構築だったりしたんですけれども、若手の研究者にはいろいろな社会的事象から研究テーマをみつけて積極的に飛び込んでいってほしいです。

**Q:** ありがとうございます。

合すると、遺伝子情報としてシグナルを出し、レポーター遺伝子（伝達遺伝子）である種のタンパクを作らせ、そのタンパク量を測定する試験法です。酵母の試験系の場合、レポーター遺伝子でガラクトシダーゼというタンパクができてきます。ところが、酵母には細胞壁があるので、溶解酵素で細胞壁を破壊してガラクトシダーゼを酵母から出す操作を行ってから、ガラクトシダーゼを測ります。ガラクトシダーゼは化学発光法で測ることができ、測定試薬はキットとして市販されています。そのシステムを使って測れば、ガラクトシダーゼ量を測るのに通常の比色法に比べて1,000倍ぐらい感度がいいんですね。私たちは細胞壁の破壊と化学発光の反応を同時に行い、なおかつ、煩雑だった操作を96ウェルプレート上だけで行うことで、迅速で簡便な試験システムを立ち上げました。また、機械化することでさらに簡便化できました。西川先生らが開発したいろいろな受容体を導入した酵母株について試験できるようにしました。

**Q:** なるほど。そういう受容体をいろいろ酵母に入れていけば、様々な化学物質を測ることができるわけ

## 高感度で簡便な環境ホルモン計測用酵母アッセイへの改良



西川博士らは、ホルモン受容体結合活性を短時間に計測できる酵母ツーハイブリッド・アッセイ法を開発しましたが、その試験法(従来法)は、多数のマイクロチューブによる培養や、遠心・洗浄、プレートへの分注など操作が煩雑で、1日に数検体のアッセイしかできませんでした。私たちは、96ウェルプレートで培養と反応を行い、化学発光法による改良法を構築しました。「改良法」の導入で化学物質や環境試料を1日に100検体近くアッセイすることが可能となりました。

■図7 酵母ツーハイブリッド・アッセイ法の従来法と改良法の操作比較

## 環境汚染と *in vitro* バイオアッセイ

1960年代から70年代にかけて、我が国では高度成長とともに様々な環境汚染の発生が問題となりました。その中で光化学スモッグの発生も騒がれるようになり、健康への影響が懸念されていました。私たちは、光化学スモッグの二次反応生成物の解析や発生メカニズムとともに光化学スモッグによる生体影響を研究する所内プロジェクトを立ち上げ、光化学スモッグチャンバーで作成した光化学シミュレートガスを培養細胞に曝露して毒性を評価するという「*in vitro* バイオアッセイ」による研究をスタートしました。その後もいろいろな環境汚染が問題となりましたが、ヒトや生態系への影響解明の一環として、環境汚染物質に適応した「*in vitro* バイオアッセイ」を構築して毒性作用を評価する研究を進めてきました。

### 様々な環境汚染に適用した *in vitro* バイオアッセイの構築

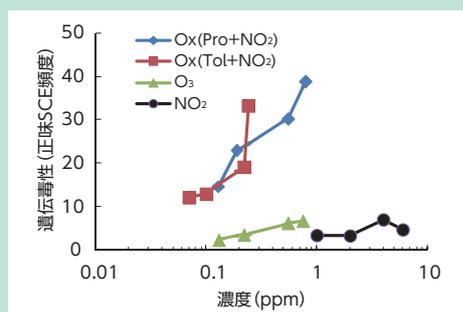
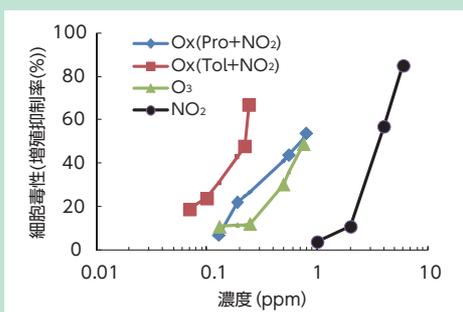
#### (1) 光化学スモッグシミュレートガスの培養細胞による毒性試験法

1970年代、全国各地で光化学スモッグの発生が報告されていました。高性能の光化学スモッグチャンバーを用いた低濃度領域での光化学反応実験が行われるようになり、光化学二次汚染物質の生成メカニズムもしだいに明らかにされつつありました。しかしながら、光化学二次汚染物質の生体影響に関する研究はほとんどありませんでした。私たちは、光化学スモッグチャンバーにプロピレンやトルエンなど炭化水素と二酸化窒素( $\text{NO}_2$ )の混合ガスを導入して光化学反応を行いながら、光化学オキシダントのオゾン( $\text{O}_3$ )とパーオキシアセチルナイトレート(PAN)の濃度をモニターし濃度が安定した2時間を光化学スモッグシミュレートガスとして培養細胞に曝露できる *in vitro* バイオアッセイシステムを

開発しました。細胞へのガス曝露は一面に細胞を培養・付着させたガラス製角瓶を回転ドラムにセットして回転させながら、光化学スモッグシミュレートガスを角瓶に流し込む方式を採用しました。細胞毒性と遺伝毒性として姉妹染色分体交換(SCE)頻度を指標に2種類の光化学スモッグシミュレートガスを試験したところ、 $\text{O}_3$ や $\text{NO}_2$ の単独曝露に比べて、細胞毒性は $\text{O}_3$ 単独と同程度でしたが、遺伝毒性は両者に比べて極めて強い作用であることが明らかになりました(図8)。

#### (2) 大気粉じん粒子状物質の培養細胞への粒子曝露による毒性試験法

1980年代になると、ディーゼル排ガス粒子、アスベスト(石綿)、地域的な問題ではありますが、スパイクタイヤ使用によるアスファルト道路粉じん、桜島の火山灰など大気粉じんの健康影響が懸念されていました。それらはいずれも発がん性との関連が問題視されていましたが、粒子状物質を評価できる *in vitro* バイオアッセイはありませんでした。粒子状物質は生体内に呼吸により肺に取り込まれ、細胞に貪食されて生体影響を示すことが推測されます。培養細胞の中でチャイニーズ・ハムスター由来の細胞株が極めて強い貪食能を示すことが明らかになりました。チャイニーズ・ハムスター由来のV79細胞やCHL細胞を24ウェルプレートで前培養を行い、培養液に浮遊した粒子状物質を曝露して、細胞毒性と遺伝毒性を調べる毒性試験法を構築しました。アスベスト粒子(クロシドライトやクリソタイル)の曝露は、細胞増殖抑制作用の細胞毒性とSCE頻度を高める遺伝毒性が確認されました。一方、桜島の火山灰や長崎の普賢岳の火山灰粒子はアスベストと同程度の曝露量では細胞毒性も遺伝毒性も検出されず、10倍以上の高濃度曝露量で細胞との接触阻害と思われる細胞毒性が認められました。



■ 図8 光化学スモッグシミュレートガス2種類、 $\text{O}_3$ 単独、 $\text{NO}_2$ 単独曝露による培養細胞に及ぼす細胞毒性(左図)と遺伝毒性(右図)

プロピレン(Pro)あるいはトルエン(Tol)と $\text{NO}_2$ の段階的な濃度の混合ガスについて光化学スモッグシミュレートガスを作成して、培養細胞に曝露を行い、それぞれのオキシダント(Ox)濃度を指標として、 $\text{O}_3$ 単独、 $\text{NO}_2$ 単独曝露との細胞毒性と遺伝毒性を比較しました。Ox(Pro+ $\text{NO}_2$ )とOx(Tol+ $\text{NO}_2$ )の2種類の光化学スモッグシミュレートガスは $\text{O}_3$ と同程度かやや強い細胞毒性を示しましたが、遺伝毒性は $\text{O}_3$ や $\text{NO}_2$ などに比べて明らかに強い作用を示すことが明らかとなりました。



# の構築の遍歴

## (3)ハロン代替物質など揮発性・難溶性物質の培養細胞へのガス曝露による毒性試験法

地球温暖化が問題となり、消火剤に使われていたハロンも代替品が求められていました。1995年から名古屋工業技術研究所とハロン代替物質の開発を目的とした共同研究が行われ、様々な候補化合物が合成されました。私たちは代替ハロンの候補化合物として合成された、揮発性で難溶性のガス状化学物質の毒性を一次スクリーニングする *in vitro* バイオアッセイの構築を行いました。難溶性のガス状化学物質の細胞への曝露は、光化学スモッグシミュレートガスの曝露方式を改良し、代替ハロン候補化合物ガスを培養角瓶に封入し、回転ドラムで24時間回転しながら細胞に曝露させる *in vitro* バイオアッセイを完成しました。

## (4)アオコ毒など高分子化合物の培養細胞を用いた毒性試験法

栄養塩を含んだ生活排水の流入のため、池や湖ではアオコなどの藻類が大発生しており、有毒アオコによる生体影響が懸念されていました。アオコ毒の研究は、アオコからの抽出物のマウスへの腹腔注射により毒性を判定していました。アオコ毒は分子量が1,000程度と大きく、培養細胞による毒性試験は、通常の試験方法では株化培養細胞はアオコ毒を取り込むことができないため、毒性を調べることはできませんでした。「エレクトロポレーション」という手法を用い、アオコ毒のマイクロシスチンを浮遊細胞のHL60株に電気ショックで瞬時に取り込ませたところ、細胞増殖抑制作用を指標とし

た細胞毒性を調べる試験法を構築できました。

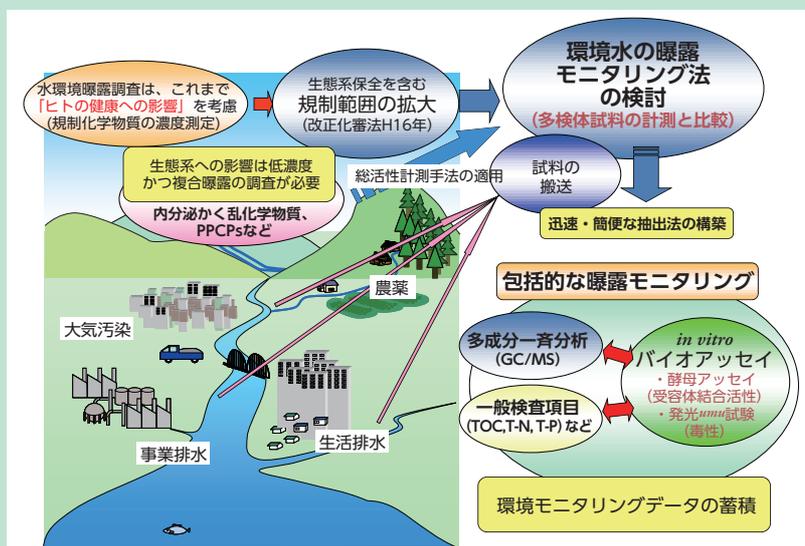
## (5)環境ホルモン作用を迅速、簡便に計測できる酵母アッセイ法

1990年代後半、内分泌かく乱物質、いわゆる環境ホルモンによる生体影響がクローズアップされてきました。大阪大学の西川淳一先生らが開発したホルモンあるいはホルモン様物質と受容体との結合活性を短時間に、かつ高感度に検出できる酵母ツーハイブリッド・アッセイを導入して、改良を加えました。結合活性により誘導されるガラクトシダーゼ量を鋭敏な化学発光法で測定するとともに、96ウェルプレート用自動分注希釈装置を用いる機械化により、1日で多検体が測定できる迅速で簡便な酵母アッセイ法を構築しました。

## *in vitro* バイオアッセイの活用について

これまで社会問題となっていた環境汚染の毒性解明の一環として、迅速で簡便な *in vitro* バイオアッセイ法の開発や構築を行ってきました。先進国では法的規制の効果もあり、近年、大気や河川水などの規制化学物質による環境汚染はしだいに改善されつつあります。しかしながら、近年、大気や河川水は多成分かつ低濃度の化学物質による汚染が懸念されております。これからは、大気環境、水環境の低濃度で複合化した活性物質の総合的計測ができる、様々な迅速で簡便な *in vitro* バイオアッセイを活用することにより、平常時の環境モニタリングデータを集積することが重要と考えております。

## 環境モニタリングへの *in vitro* バイオアッセイの適用



環境水の生態系への影響は、環境汚染化学物質の低濃度かつ複合化の曝露が想定され、活性を総合的に計測できる *in vitro* バイオアッセイによる評価は重要です。これからは迅速で簡便な *in vitro* バイオアッセイを適用して、機器分析や一般調査項目などとともに包括的な環境モニタリングを行い、平常時のデータの蓄積が必要と考えています。

■図9 河川水の *in vitro* バイオアッセイを適用した環境モニタリングの概念図

# 受容体結合活性を指標とした *in vitro*

様々な内分泌かく乱作用が問題となっております。それらの指標として

## 内分泌かく乱作用を検索するための *in vitro* バイオアッセイの開発

1996年、シーア・コルボーンらにより、「奪われし未来」が上梓され、多数の内分泌かく乱作用による異常が報告されました。内分泌かく乱作用はこれまでの環境毒とは異なり、繁殖機能や知能の低下といった継世代的影響であり、ホルモン様物質がホルモン受容体に結合することで引き起こされることが主な原因であると言われています。一次スクリーニングにホルモン様物質のホルモン受容体との結合活性を調べるため、様々な *in vitro* バイオアッセイが開発されました。

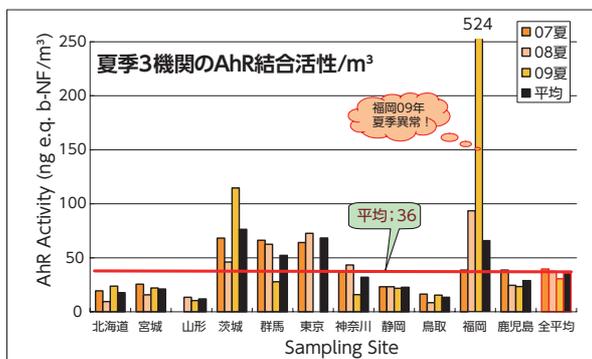
### ■世界では

米国は、1996年に内分泌かく乱物質スクリーニング及び試験法諮問委員会 (EDSTAC) を米国環境保護庁内の諮問委員会として設置して、第1段階 (Tier 1 Screen/Test) としてエストロゲン受容体結合とアンドロゲン受容体結合試験の検証を開始しました。また、経済協力開発機構 (OECD) は、1996年に内分泌かく乱化学物質の試験及び評価法に関する特別作業に着手し、2002年にはレベル2としてエストロゲン、アンドロゲン、甲状腺受容体結合試験の3種類をメカニズム

のデータを提供するための *in vitro* 試験として策定しました。注目された *in vitro* 試験法として、米国の A.M. SotoらのMCF-7細胞の増殖促進を指標とするエストロゲン作用を調べる「E-SCREEN アッセイ」があります。また、環境試料にも適用された試験法として、イギリスのE.J. RoutledgeとJ.P. Sumpterの開発したエストロゲン活性を調べる「YES法」(Yeast Estrogen Screening assay) という遺伝子組換え酵母を用いたレポーター遺伝子アッセイもよく知られています。

### ■日本では

1998年に環境庁 (現;環境省) は、「環境ホルモン戦略計画SPEED' 98」を策定し、さらに2005年には、「化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について -ExTEND2005-」を策定して、受容体結合活性試験などの *in vitro* 試験と、*in vivo* 試験の結果との関連性を検討することが必要であると提案しています。我が国では初期には、米国やイギリスなどからE-SCREENやYES法などの様々な *in vitro* 試験が導入され、それらを用いて化学物質のスクリーニングや環境試料中のエストロゲン活性が測定されてきました。一方、1999年に大阪大学の西川淳一博士らは、酵母ツーハイブリッド・システムという手法を用いて、酵母にエストロゲンやアンドロゲンなどの核内受容体とコアクチベーターの両遺伝子を導入することで受容体結合活性を迅速、高感度に計測できる酵母ツーハイブリッド・アッセイ法を開発しました。私たちは西川博士から提供を受けた酵母株を用いて酵母ツーハイブリッド・アッセイ法の改良を行い、1日に多検体を高感度かつ簡便に検索できるハイスループットの試験システムを構築しました。私たちは、ヒトエストロゲン受容体 (ER)、メダカエストロゲン受容体 (medER)、ヒトアンドロゲン受容体 (AR)、ヒト甲状腺ホルモン受容体 (TR)、ヒトレチノイン酸X受容体 (RXR)、ヒトレチノイン酸受容体 (RAR)、ヒト構成的アンドロスタン受容体 (CAR) の7種類の核内受容体



■ 図10 全国11都道府県夏季の大気粉じん試料のAhR結合活性  
大気環境モニタリングにおいて、夏季3年間の大気粉じん中のAhR活性は茨城、群馬、東京、福岡が平均よりも高い値を示しました。福岡での09年夏季は近隣での火災の影響を受けて平均より10倍高い値を示しております。

# バイオアッセイの開発と環境モニタリングへの適用

注目される受容体結合活性の *in vitro* バイオアッセイに関する研究動向と今後の取り組みについて紹介します。



とC.A. Millerの開発したヒトアリルヒドロカーボン受容体 (AhR) 導入酵母株の *in vitro* バイオアッセイを構築しております。一方、培養細胞を用いるレポータージーンアッセイも広く行われており、例えば、AhR結合を介して発現するルシフェラーゼ発光を計測するなどの様々な環境媒体や生体試料のダイオキシン類の定量を行う試験法が数多く開発されています。これらの *in vitro* バイオアッセイ法は2005年に環境大臣が定めるダイオキシン類の測定方法として指定されています。

## ■ 国立環境研究所では

近年、工場排水や下水処理水などが流入する河川では法規制をクリアした低濃度の化学物質や分解生成物などの複合曝露による生態系生物への影響が危惧されています。要因の1つとして、生殖機能や免疫系の低下・抑制などを引き起こす受容体を介する内分泌かく乱作用が疑われています。私たちは、これまで内分泌かく乱作用としてメス化の問題がクローズアップされたことから性ホルモンに関連する受容体であるERやmedERの酵母アッセイを用いて、化学物質のスクリーニングや環境媒体のモニタリングを行ってきました。一方、他の受容体導入酵母アッセイを用いた試験では、RXRがイボニシ (巻貝の一種) のインボセックスに関与することを明らかにしました。さらに、催奇形性との関連が示唆されるRARは、アオコなど藻類から遊離される化合物と強い結合活性を示すことを見だし、活性物質がレチノイン酸の異性体であることを報告しました。

環境媒体に含まれる汚染化学物質の受容体結合活性がどのようなレベルにあるかを *in vitro* バイオアッセイによるモニタリングで数値化することは、内分泌かく乱作用による生体影響を予測する指標の1つとなると考えております。私たちは、2007～2009年にかけて、地方環境研究所との共同研究により全国16都道府県の110カ所の河川水について、ER、medER、RAR、AhRの受容体導入酵母アッセイによる環境モニタリング

を実施しました。全国の河川水データの平均値を100%として評価すると、例えば、東京都や愛知県などの都市部を流れる河川水ではER結合活性が4、5倍高く、上流部に多く存在する下水処理場排水のエストラジオール関連物質の影響を受けていることがわかりました。また、製紙工場排水など工場排水が流入する河川水ではAhR結合活性が3～5倍高く、工場排水に含まれる化学物質の影響を受けていることがわかりました。また、同様に2007～2009年の夏季と冬季に、全国11都道府県の大気粉じんのサンプリングを行い、*in vitro* バイオアッセイによる環境モニタリングを実施しました。AhR結合活性は夏季には、茨城、群馬、東京、福岡などで高い傾向にあり、特に近隣で火災が発生した福岡のサンプルでは全国平均の10倍以上高い活性を示す試料もありました (図10)。河川水や大気試料の地域ごとの平常時の *in vitro* バイオアッセイによる環境モニタリングデータは、有害汚染化学物質の総合的な監視指標となるとともに、緊急時の環境モニタリングデータの比較解析に役立つことが期待されます。

私たちは、東日本大震災の震災対応研究として、宮城県の被災地の大気粉じんのサンプリングと震災がれき置き場からの排水など環境水のサンプリングを経時的に行っており、緊急時の環境モニタリングと位置づけ、特に、津波堆積物が混入した震災がれきの撤去や処理作業で発生する大気粉じんの *in vitro* バイオアッセイによる環境モニタリングデータの継続的収集は今後の被災地における健康への影響指針になると考えております。



■ 宮城県石巻商業高校屋上での大気粉じんのサンプリング風景と震災がれき置き場 (奥)

## *in vitro* バイオアッセイを用いた様々な環境汚染の評価に関する研究のあゆみ

私たちは、環境汚染の毒性評価を行う一環として、様々な *in vitro* バイオアッセイの開発を行ってきました。開発・構築の研究に関わる主な研究課題を紹介します。

### 課題名

#### 1. 光化学二次汚染物質の分析とその細胞毒性に関する基礎的研究 (1979-1984年度)

ガス状光化学反応生成物や二酸化窒素など酸化性ガスの培養細胞への曝露方式を開発して、光化学スモッグ・シミュレートガスの毒性を評価しました。

### 課題名

#### 2. 環境汚染物質の毒性評価手法に関する研究(1989-1994年度)

アスベストや火山灰など不溶性の粒子状物質の毒性やアオコ毒のような高分子化合物を培養細胞を用いて評価する試験法の構築を行いました。

### 課題名

#### 3. 低沸点有機化合物の毒性評価手法の開発に関する研究 (1995-1997年度)

代替ハロン候補化合物、パラジクロロベンゼンなどの低沸点有機化合物を培養細胞に曝露する試験法を構築して、毒性を評価しました。

### 課題名

#### 4. 外因性内分泌攪乱化学物質の培養細胞を用いた バイオアッセイ系の基礎的研究(1999-2000年度)

迅速で簡便な酵母ツーハイブリッド・アッセイ法を構築しました。

### 課題名

#### 5. 内分泌かく乱物質の新たな計測手法と環境動態に関する研究 (2001-2005年度)

様々な受容体酵母ツーハイブリッド・アッセイ法の構築と、それらを用いて化学物質のスクリーニングを行うとともに環境中のモニタリング手法の検討を行いました。

### 課題名

#### 6. 化学物質曝露に関する複合的要因の総合解析による曝露評価 (2006-2010年度)

酵母アッセイなど *in vitro* バイオアッセイを用いて日本全国の河川水や大気試料の環境モニタリングを行ってきました。

本号で紹介した研究は、以下の機関、スタッフにより実施されました(所属は当時、敬称略、順不同)。

<研究担当者>

国立環境研究所 …… 白石不二雄、清水不二雄、坂東博、秋元肇、彼谷邦光、佐野友春、藤巻秀和、古山昭子、山本貴士、安原昭夫、米元純三、白石寛明、森田昌敏、滝上英孝、鎌迫典久、堀口敏宏、John S. Edmonds、中島大介、鎌田亮、影山志保、後藤純雄、鈴木規之、櫻井健郎、今泉圭隆

東京大学 …… 黒木登志夫、森本兼囊

信州大学 …… 宮原裕一

静岡県立大学 …… 寺崎正紀

名古屋工業技術研究所 …… 阿部隆

近畿大学 …… 沢辺昭義

大阪大学 …… 西川淳一、西原力

大阪府環境情報センター …… 奥村為男

地方環境研究所(北海道、岩手県、宮城県、山形県、群馬県、長野県、静岡県、名古屋市、京都府、兵庫県、鳥取県、福岡県、鹿児島県)

## ● 過去の環境儀から ●

これまでの環境儀から、バイオアッセイに関わる環境研究に関連するものをいくつか紹介します。

### No.38 バイオアッセイによって環境をはかる—持続可能な生態系を目指して

国内で使用される化学物質は年々増えており、個別に管理することが難しくなっています。排水等の環境水の生態影響の大きさを、生物を使って直接測定し、改善目標と手法を提案して、市民が安心して暮らせる環境づくりの研究を紹介しています。

### No.27 アレルギー性疾患への環境化学物質の影響

健康への影響が指摘されている環境中の化学物質。その実態を動物個体レベルで明らかにしつつ、細胞レベルでの毒性メカニズムの解明への取り組みを紹介しています。

### No.17 有機スズと生殖異常—海産巻貝に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響

本号では、巻貝に及ぼす「有機スズ」の内分泌かく乱作用について、自然界における影響を明らかにするための個体群を対象とするフィールド研究と、なぜそのようなことが起こるのかを明らかにするための実験室における雄性化のメカニズム研究の最新動向を紹介しています。

### No.1 環境中の「ホルモン様化学物質」の生殖・発生影響に関する研究

環境ホルモン（内分泌攪乱化学物質）による生殖・発生影響に対するほ乳類の感受性が高いにもかかわらず、生殖機能への影響のリスクに関する研究は不十分で基礎データは決定的に不足していました。本号ではラットを用いた典型的な環境ホルモン物質であるダイオキシン (TCDD) の生殖・発生影響に関する研究を紹介しています。

## 環境儀 No.44

—国立環境研究所の研究情報誌—

2012年4月30日発行

編集 国立環境研究所編集委員会

(担当WG: 田中嘉成、白石不二雄、竹中明夫、鈴木武博、佐治光、滝村朗)

発行 独立行政法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

問合せ先 (出版物の入手) 国立環境研究所情報企画室 029 (850) 2343

(出版物の内容) // 企画部広報室 029 (850) 2310

環境儀は国立環境研究所のホームページでもご覧になれます。

<http://www.nies.go.jp/kanko/kankyogi/index.html>

編集協力 財団法人日本宇宙フォーラム

〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台 3-2-1

新御茶の水アーバントリニティビル 2階

無断転載を禁じます

リサイクル適性の表示：紙へリサイクル可

本冊子は、グリーン購入法に基づく基本方針における「印刷」に係る判断の基準にしたがい、印刷用の紙へのリサイクルに適した材料「Aランク」のみを用いて作製しています。

## 「環境儀」既刊の紹介

No.1	環境中の「ホルモン様化学物質」の生殖・発生影響に関する研究	2001年 7月
No.2	地球温暖化の影響と対策— AIM: アジア太平洋地域における温暖化対策統合評価モデル	2001年 10月
No.3	干潟・浅海域—生物による水質浄化に関する研究	2002年 1月
No.4	熱帯林—持続可能な森林管理をめざして	2002年 4月
No.5	VOC—揮発性有機化合物による都市大気汚染	2002年 7月
No.6	海の呼吸—北太平洋海洋表層のCO <sub>2</sub> 吸収に関する研究	2002年 10月
No.7	バイオ・エコエンジニアリング—開発途上国の水環境改善をめざして	2003年 1月
No.8	黄砂研究最前線—科学的観測手法で黄砂の流れを遡る	2003年 4月
No.9	湖沼のエコシステム—持続可能な利用と保全をめざして	2003年 7月
No.10	オゾン層変動の機構解明—宇宙から探る 地球の大気を探る	2003年 10月
No.11	持続可能な交通への道—環境負荷の少ない乗り物の普及をめざして	2004年 1月
No.12	東アジアの広域大気汚染—国境を越える酸性雨	2004年 4月
No.13	難分解性溶存有機物—湖沼環境研究の新展開	2004年 7月
No.14	マテリアルフロー分析—モノの流れから循環型社会・経済を考える	2004年 10月
No.15	干潟の生態系—その機能評価と類型化	2005年 1月
No.16	長江流域で検証する「流域圏環境管理」のあり方	2005年 4月
No.17	有機スズと生殖異常—海産巻貝に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響	2005年 7月
No.18	外来生物による生物多様性への影響を探る	2005年 10月
No.19	最先端の気候モデルで予測する「地球温暖化」	2006年 1月
No.20	地球環境保全に向けた国際合意をめざして—温暖化対策における社会科学的アプローチ	2006年 4月
No.21	中国の都市大気汚染と健康影響	2006年 7月
No.22	微小粒子の健康影響—アレルギーと循環機能	2006年 10月
No.23	地球規模の海洋汚染—観測と実態	2007年 1月
No.24	21世紀の廃棄物最終処分場—高規格最終処分システムの研究	2007年 4月
No.25	環境知覚研究の勧め—好ましい環境をめざして	2007年 7月
No.26	成層圏オゾン層の行方—3次元化学モデルで見るオゾン層回復予測	2007年 10月
No.27	アレルギー性疾患への環境化学物質の影響	2008年 1月
No.28	森の息づかいを測る—森林生態系のCO <sub>2</sub> フラックス観測研究	2008年 4月
No.29	ライダーネットワークの展開—東アジア地域のエアロゾルの挙動解明を目指して	2008年 7月
No.30	河川生態系への人為的影響に関する評価—よりよい流域環境を未来に残す	2008年 10月
No.31	有害廃棄物の処理—アスベスト、PCB処理の一翼を担う分析研究	2009年 1月
No.32	熱中症の原因を探る—救急搬送データから見るその実態と将来予測	2009年 4月
No.33	越境大気汚染の日本への影響—光化学オキシダント増加の謎	2009年 7月
No.34	セイリング型洋上風力発電システム構想—海を旅するウィンドファーム	2010年 3月
No.35	環境負荷を低減する産業・生活排水の処理システム—低濃度有機性排水処理の「省」「創」エネ化～	2010年 1月
No.36	日本低炭素社会シナリオ研究—2050年温室効果ガス70%削減への道筋	2010年 4月
No.37	科学の目で見る生物多様性—空の目とミクロの目	2010年 7月
No.38	バイオアッセイによって環境をはかる—持続可能な生態系を目指して	2010年 10月
No.39	「シリカ欠損仮説」と海域生態系の変質—フェリーを利用してそれらの因果関係を探る	2011年 1月
No.40	VOCと地球環境—大気中揮発性有機化合物の実態解明を目指して	2011年 3月
No.41	宇宙から地球の息吹を探る—炭素循環の解明を目指して	2011年 7月
No.42	環境研究 for Asia/in Asia/with Asia—持続可能なアジアに向けて	2011年 10月
No.43	藻類の系統保存—微細藻類と絶滅が危惧される藻類	2012年 1月

## 「環境儀」

地球儀が地球上の自分の位置を知るための道具であるように、『環境儀』という命名には、われわれを取り巻く多様な環境問題の中で、われわれは今どこに位置するのか、どこに向かおうとしているのか、それを明確に指し示すべしという意図が込められています。『環境儀』に正確な地図・行路を書き込んでいくことが、環境研究に携わる者の任務であると考えています。

2001年7月 合志 陽一  
(環境儀第1号「発刊に当たって」より抜粋)



このロゴマークは国立環境研究所の英語文字N.I.E.Sで構成されています。

N=波(大気と水)、I=木(生命)、E・Sで構成されるOで地球(世界)を表現しています。

ロゴマーク全体が風を切った五羽に差もつする動きは、研究所の躍動性・進歩・向上・発展を表現しています。