

国立環境研究所特別研究報告

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan

SR - 46 - 2002

環境ホルモンの新たな計測手法の開発と
環境動態に関する研究
(内分泌攪乱化学物質総合対策研究)

Studies on Analysis, Evaluation and Environmental
Fate of Endocrine Disruptors

平成 11 ~ 13 年度

FY 1999 ~ 2001

NIES



独立行政法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

<http://www.nies.go.jp/index-j.html>

環境ホルモンの新たな計測手法の開発と
環境動態に関する研究
(内分泌攪乱化学物質総合対策研究)

Studies on Analysis, Evaluation and Environmental
Fate of Endocrine Disruptors

平成 11 ~ 13 年度

FY 1999 ~ 2001

内分泌攪乱化学物質総合対策研究「環境ホルモンの新たな計測手法の開発と環境動態に関する研究」
(期間 平成 11 ～ 13 年度)

特別研究責任者：森田昌敏

特別研究幹事：白石寛明

報告書編集担当：白石寛明

序

本報告書は平成11年度から13年度の3年間にわたり内分泌攪乱化学物質総合対策研究で実施された6課題のうちの1課題、「環境ホルモンの新たな計測手法と動態解明に関する研究」の成果に最近の研究結果を加えて取りまとめたものである。

環境ホルモンが原因と考えられる野生生物の異変や人への健康影響の問題は、我が国では、1996年ごろからにわかに社会的な関心を集め、さまざまな調査研究が開始された。しかし、生態系への環境ホルモン作用の影響に関する報告は限定的であるとともに、その原因物質が特定されていないのが現状である。環境媒体のホルモン作用をいかに捕らえることができるかは、本問題を正しく認識する上で最も重要な点である。

本課題では、内分泌攪乱化学物質の計測法と評価法の開発を通じて、環境ホルモンの実態を把握する目的で検討を進めた。計測法の開発では、イオントラップ質量分析法、負イオン化学イオン化法、液体クロマトグラフ質量分析法や免疫化学的測定法を導入し、超微量成分を精度よくしかも簡単に測定できる手法を開発した。評価法の開発では、*in vitro* の評価系として受容体結合試験法、酵母two hybrid アッセイ法を、*in vivo* の評価系として魚類を用いてバイオマーカー遺伝子やタンパクを計測する試験系を構築した。また、エストロゲン作用を中心に環境媒体のホルモン作用の評価手法として、これら新たに開発した試験法の適用を試み、ホルモン作用の環境挙動について調査した。

研究成果の一部は、内分泌攪乱化学物質の実態を解明するための新たな研究手段として、すでにくつつかの研究機関や調査機関で実際に利用され始めている。今後とも、本研究成果が、環境中での内分泌攪乱化学物質の挙動解明、影響評価、及び対策を進める上で関連する方々のお役に立つならば、幸いとするところである。

おわりに、研究を進める上で大学、自治体や民間研究機関の方々に多くのご協力とご助言をいただいた。ここに深く感謝の意を表する次第である。

平成14年9月

独立行政法人 国立環境研究所
理事長 合 志 陽 一

目 次

1	研究の目的と経緯	1
1.1	研究の目的	2
1.2	研究の構成	2
2	研究の成果	3
2.1	内分泌攪乱化学物質の分析法に関する研究	3
2.1.1	イオントラップ質量分析法による簡易分析法の開発	3
2.1.2	負イオン化学イオン化質量分析法によるエストラジオール類の分析	6
2.1.3	液体クロマトグラフ質量分析法によるエストラジオールとその代謝産物の分析	9
2.1.4	免疫化学的分析法	18
2.1.5	分子プリンティングによる選択的吸着剤の開発	23
2.2	内分泌攪乱化学物質の評価法に関する研究	25
2.2.1	エストロゲン受容体結合アッセイ	26
2.2.2	酵母ツーハイブリッドアッセイ法によるアゴニスト活性測定法の開発	29
2.2.3	酵母ツーハイブリッドアッセイ法によるアンタゴニスト活性測定法の開発	36
2.2.4	魚類ビテロゲニンアッセイ	40
2.2.5	メダカエストロゲン応答遺伝子の定量法の開発	46
2.3	環境試料への応用	50
2.3.1	酵母アッセイのための試料調製法の検討	50
2.3.2	霞ヶ浦, 東京湾, 都市河川水のエストロゲン活性	52
2.4	まとめ	57
[資料]		
I	研究の組織と研究課題の構成	61
1	研究の組織	61
2	研究課題と担当者	61
II	研究成果発表一覧	62
1	誌上発表	62
2	口頭発表	64

1 研究の目的と経緯

Endocrine Disrupting Chemicals (Endocrine Disruptor) は、直訳すれば「内分泌攪乱化学物質」となるが、日本語訳は統一されていない。「内分泌障害性化学物質」、「外因性ホルモン様物質」や本報告書の表題にある「環境ホルモン」と訳される場合もある。Endocrine Disruptor とは、「外来性の物質であり、無処置の生物の内分泌系に対してその個体もしくはその子孫の世代のいずれかのレベルで健康障害性の変化を起こさせるもの」であるという定義が「European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife」(1996年12月、ロンドン)において示されている。農業として散布された DDT が食物連鎖を通じて肉食性鳥類へ濃縮し、これによって卵殻の薄化および繁殖障害が起こったことは、Endocrine Disruptor 問題の顕著な事例の一つである。人間集団においても、男性における精子数の減少、前立腺がんの増加、女性における乳がんや子宮内膜症の増加といった問題が Endocrine Disruptor との関係で議論されている。

内分泌攪乱作用に基づくとされる現象と原因物質との因果関係が明確になっている事例は少なく、科学的に解明されなければならない点が数多く残されている。我が国においては、内分泌攪乱化学物質の疑いのある化学物質として関心がもたれる物質には、「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98 (2000年11月版)」において、リストアップされた物質がある。これらの物質は、平成11年度から13年度にかけて大規模な環境調査が実施され、その測定値が公表されている。内分泌攪乱作用が疑われる物質について、環境省では平成12年度から3年間で40物質以上についてリスク評価を実施することとなっており、環境調査により得られた測定結果は、優先してリスク評価を実施する物質の選定に活用され、これを基にリスク評価が精力的に行われている。

化学物質の内分泌攪乱作用問題への対応を図るためには、現在使用されているあるいは環境中に存在している膨大な化学物質の中から有害な影響を及ぼす化学物質を識別し、そのリスクを評価していく必要がある。このため、内分泌攪乱作用を有する疑いのある化学物質を効率的にスクリーニング(選別)できる試験法の検討が国内外で行われている。日本においては、環境省が、環境ホ

ルモン戦略計画を取りまとめるとともに、メダカを用いた魚類試験法、日本ウズラを用いた鳥類試験法などを OECD の EDTA (Endocrine Disruptors Testing and Assessment) と協調して開発している。厚生労働省は、幼若ラットや卵巣を摘出したラットの子宮が女性ホルモン作用によって肥大することを利用した子宮増殖アッセイ、去勢ラットの前立腺が男性ホルモンの作用により肥大することを利用したハーシュバーガーアッセイ、28日間反復投与毒性試験の改良(改訂 TG 407)の OECD におけるバリデーション(試験法の検証と有効性の確認)作業に、中心的な機関として参加している。経済産業省では、自動化された試験装置を用いるヒト ER α のレポーター遺伝子アッセイのハイスループット手法を確立し、すでに約700物質の試験データを取得している。このデータを利用して3次元構造活性相関手法の開発も行われている。米国では、産業界、政府、環境や公衆衛生、労働安全問題の関係者および研究者の代表で構成された内分泌攪乱物質の試験法に関する諮問委員会(EDSTAC)を1996年に組織し、スクリーニング試験プログラムを開発している。EDSTACは1998年8月に最終報告書をまとめ、化学物質がほ乳類および魚などのほ乳類以外の生物の内分泌系(エストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン)に相互作用するかどうかを調べる Tier 1 試験と、それらの化合物がどのような量でどのような有害作用を示すのかを定量的に判定する Tier 2 試験など、いくつかの試験法を組み合わせ、それを段階的に実施していく試験・評価体系を模索しているが、当初、提案された試験法の開発は予定通りには進展しておらず、環境に関する政策・技術のための国立諮問委員会(NACEPT)に内分泌攪乱物質試験法確認小委員会(EDMVS)を設けて、試験法の開発に関する技術的な助言を受けている。EPA(米国の環境保護庁)では、最近の研究の進捗状況に合わせるため、2002年5月30日を締切日として新たに開発された試験法に関する一般公募も行った。欧州連合(EU)においても、毒性、生態毒性と環境に関する科学委員会(CSTEE)が、約500物質の優先順位決定手順を公表している。このように、各国様々に、色々な試験法が検討され、あるものは国際的なバリデーションが行われるに至っているが、そうし

た試験のなかから、どの試験（の組み合わせ）を用いて、どのように試験し、その結果をどのような基準で評価していくかについての合意は得られていない。

1.1 研究の目的

環境中のホルモン作用の有無に加え、その原因物質が特定されていない以上、この現象を解明するには、何万もある化学物質のスクリーニングという発生源側からの有害性の評価とともに、影響を受ける環境側でどのような活性が認められるのかを試験することができるシステムと、原因物質と思われる物質の同定と定量技術の向上が必要である。現在、開発が進んでいるスクリーニング試験法は、必ずしも環境試料を考慮しておらず、化学物質の事前スクリーニングに重点がおかれている。また、環境試料に適用可能であったとしても、コスト面から実行上不可能な場合が多い。本研究では、環境中のホルモン作用の有無の確認とその原因物質の究明に向け、簡便で、環境媒体に適用可能なホルモン活性のス

クリーニング手法と、化学物質の高感度分析法を開発することを目的とした。

1.2 研究の構成

研究は、次のサブテーマに分かれて行われた。

課題1 高感度分析法の開発

HPLC/MS/MS, GC/MS/MS, GC/NCI-MS や ELISA などによるホルモン活性のある化学物質の分析法を開発する。

課題2 バイオアッセイ手法に関する研究

エストロゲン受容体結合アッセイ、レポーター遺伝子アッセイ、ビテロゲニンアッセイなどの化学物質のホルモン活性を検定できる手法を開発する。

課題3 環境試料への応用

課題1, 2で得られた成果を環境試料に応用し、環境中のホルモン活性物質の実態把握およびその原因についての知見を集積する。

2 研究の成果

2.1 内分泌攪乱化学物質の分析法に関する研究

全国レベルで行われた内分泌攪乱物質の実態調査により、内分泌攪乱の疑いのある物質の環境中の濃度レベルが明らかにされてきた。これらの物質の分析は、「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル（環境庁水質保全局水質管理課，平成10年10月）」に基づいて行われた。本暫定マニュアルの作成には本プロジェクトからの研究成果も取り入れられているが、基本的には、物理化学的性状で分類した物質群を、ガスクロマトグラフ質量分析法（GC/MS）により多成分分析するものである。極力、分析操作に伴う試料の汚染を避けることで、低い濃度（水試料に対する検出下限値は、 $0.01\mu\text{g/l}$ ）まで測定するように工夫されている。暫定マニュアルにおいて、 $17\text{-}\beta\text{-}$ エストラジオールの分析にはGC/MS法も記載されたが、提案された機器分析の感度では不十分であり、調査の実施段階ではELISA法（酵素免疫測定法）が用いられた。ELISA法は、高感度（検出下限 $0.002\sim 0.0002\mu\text{g/l}$ ）であることに特徴があるが、定性手段をもたないため、他の類似した物質に応答するなどして誤った測定値を与える場合がある。例えば、国土交通省の実態調査により報告された霞ヶ浦湖水中のELISA法による $17\text{-}\beta\text{-}$ エストラジオールの濃度（抱合体の分解を行わないフリー体）は、夏季 $0.007\sim 0.013\mu\text{g/l}$ 、秋季 $0.012\sim 0.024\mu\text{g/l}$ であり、他の地点と比べて高濃度となっている。実験室レベルの魚類の試験では、 $0.01\mu\text{g/l}$ 以下でピテロゲニン誘導がおこることが知られている。報告された値が真の濃度とするならば、霞ヶ浦湖水中のエストラジオール濃度は、生息するオスの魚にピテロゲニンが誘導されるレベルに達しているように思われたが、その後の検討からこれは誤りである可能性が高いと考えられている。

暫定マニュアルにはエストラジオールの測定に採用されているELISA法を筆頭に、改善が必要なものがある。通常のGC/MS測定では、多量の試料を用いない限り、検出下限値を低くすることが難しいが、負イオン化学イオン化（NCI）質量分析法やMS/MSなどの手法を用い、前処理に若干の工夫をすることで、広く普及している質量分析計でも検出下限値を低くすることが可能である。一方では、測定対象物質を広げる必要もある。ステロイ

ドホルモンの多くは抱合体として動物から排泄される。環境庁（当時）の暫定マニュアルでは、エストラジオール抱合体は、酸分解でエストラジオールにもどし、エストラジオール骨格を持つ化合物の総量として計測することでエストラジオール濃度としている。この方法では、エストロゲン活性の潜在的な最大値の推定しかできず、実際のエストラジオール濃度と環境水のエストロゲン活性の比較が困難である。環境中でステロイド抱合体のステロイドホルモンへの再活性化がおこるかどうかの把握するためには、抱合体を個別にしかも高感度に測定する必要がある。代謝産物の分析には、高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS）などの新たな手法の適用が近道と考えられるが、LC/MSの環境分析への応用例は少なく、実際に環境試料への適用し、その有効性を検証する必要がある。

内分泌攪乱化学物質に対する高感度で信頼性の高い分析法を開発するため、以下の研究を実施した。

2.1.1 イオントラップ質量分析法による簡易分析法の開発

イオントラップ質量分析計は、イオンを長時間、一定の空間に閉じこめるイオントラップ手法を利用した質量分析計である。イオントラップには、構造が簡単で小型化しやすいため、高周波電場だけでイオンを閉じこめられる交流（rf）トラップが用いられることが多い。空間内に閉じこめられたイオンの質量分析には、高周波電圧やその周波数の走査によりイオンを m/z 別にセルから追い出してスペクトルを測定する。この方法の特徴として、スペクトルの高感度な測定ができることや、トラップした親イオンに衝突解離を起こさせて生じる娘イオンを測定するMS/MS測定による選択性の向上があげられる。

環境庁（当時）の暫定調査マニュアルによれば、水中のノニルフェノールの目標検出下限値は $0.1\mu\text{g/l}$ であり、この分析法を用いた水質調査の検出率は平成10、12、および13年度調査で各々、66%（夏季と秋季の平均）、26%、23%と年々減少傾向にあるようにみえる。ノニルフェノールは、魚類に対する環境ホルモンとしてのリスクが懸念されている物質であり、その挙動

を把握することは重要である。一方、年々検出率が下がっていることを考慮すると、環境中での挙動を調査するためには、現在の分析法の感度を向上させ検出率を高める必要があると思われた。本研究では、MS/MS 測定によりマトリックスの影響を除外し、高感度化できるというイオントラップ質量分析法の特徴を生かし、ノニルフェノールを中心に、同時に測定が可能なオクチルフェノールおよびビスフェノール A 分析法の改良を行った。

ビスフェノール A やノニルフェノールの分析では容器、試薬、水、大気等からの汚染の防止が高感度化には必須である。操作ブランクを低減させるため、ガラス筒を使用した固相カラムを用い、人為的な汚染をさけるため自動固相抽出装置を用いて濃縮を行った。固相カラムの充填剤には ODS やポリマー系の樹脂 (PS2, NEXUS) などが利用可能であったが、どのカラムにおいてもメタノール溶出ではノニルフェノールの回収率が悪かった。図 1 に分析操作のフローを示した。固相カラムに通水後、水、次いで水：メタノール (1 : 1) 混液による洗

浄ののち、ジクロロメタン溶出を行った。この抽出物の測定では、夾雑物による妨害が認められ、ビスフェノール A の内部標準物質はバックグラウンド信号が高く測定不能であるなどの問題があった。このため、これら物質の微量一斉分析は困難と判断し、順相カラム (シリカゲルにアミノ基を結合したもの) を用い、ジクロロメタン：ヘキサン (1 : 1) 混液による洗浄、ジクロロメタン：酢酸エチル (1 : 1) 混液によるノニルフェノールとオクチルフェノールの溶出、アセトンによるビスフェノール A の溶出というクリーンアップを行うこととした。2 画分となるが、それぞれ妨害のないクロマトグラムが得られるようになった。図 2 に霞ヶ浦湖水の抽出物の GC/MS/MS によるクロマトグラムを示した。

測定は、内部標準法により、誘導体化はアセトン中で BSTFA によるトリメチルシリル化によった。ノニルフェノールは混合物であるため、クロマトグラム上の主要なピーク 6 本を対象とした。各ピークの含有率は GC-FID により求めた。表 1 に測定条件を示した。図 3 に示

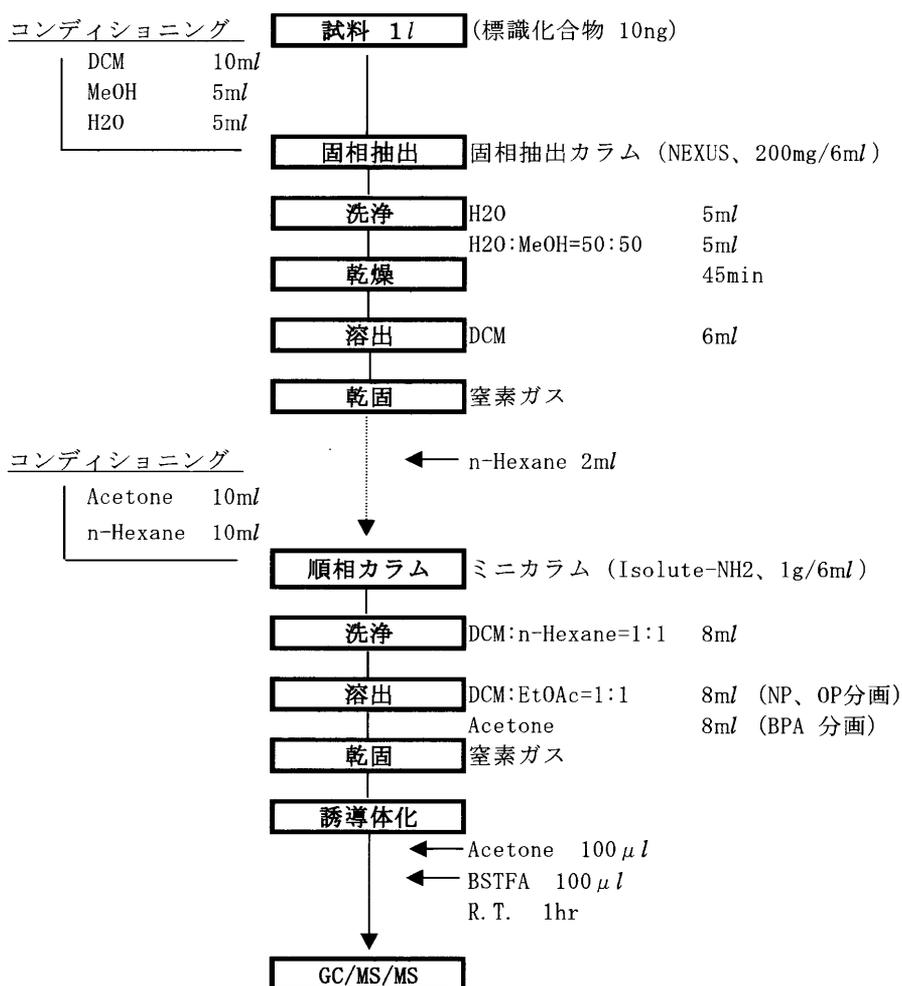


図 1 ノニルフェノール、オクチルフェノールおよびビスフェノール A の分析スキーム

したように、ノニルフェノールに由来する娘イオン m/z 163 は、親イオンからの単純な解裂では説明がつかない。このイオンは、親イオンから 16 マス少なく、また重水素標識化合物と未標識化合物で同様に生成するこ

とから、酸素原子のロスに起因するものと考えられる。この測定法での検出下限は、ノニルフェノール、オクチルフェノール及びビスフェノール A で、それぞれ、10 ng/l、1 ng/l 及び 1 ng/l 程度であり、暫定マニュアル

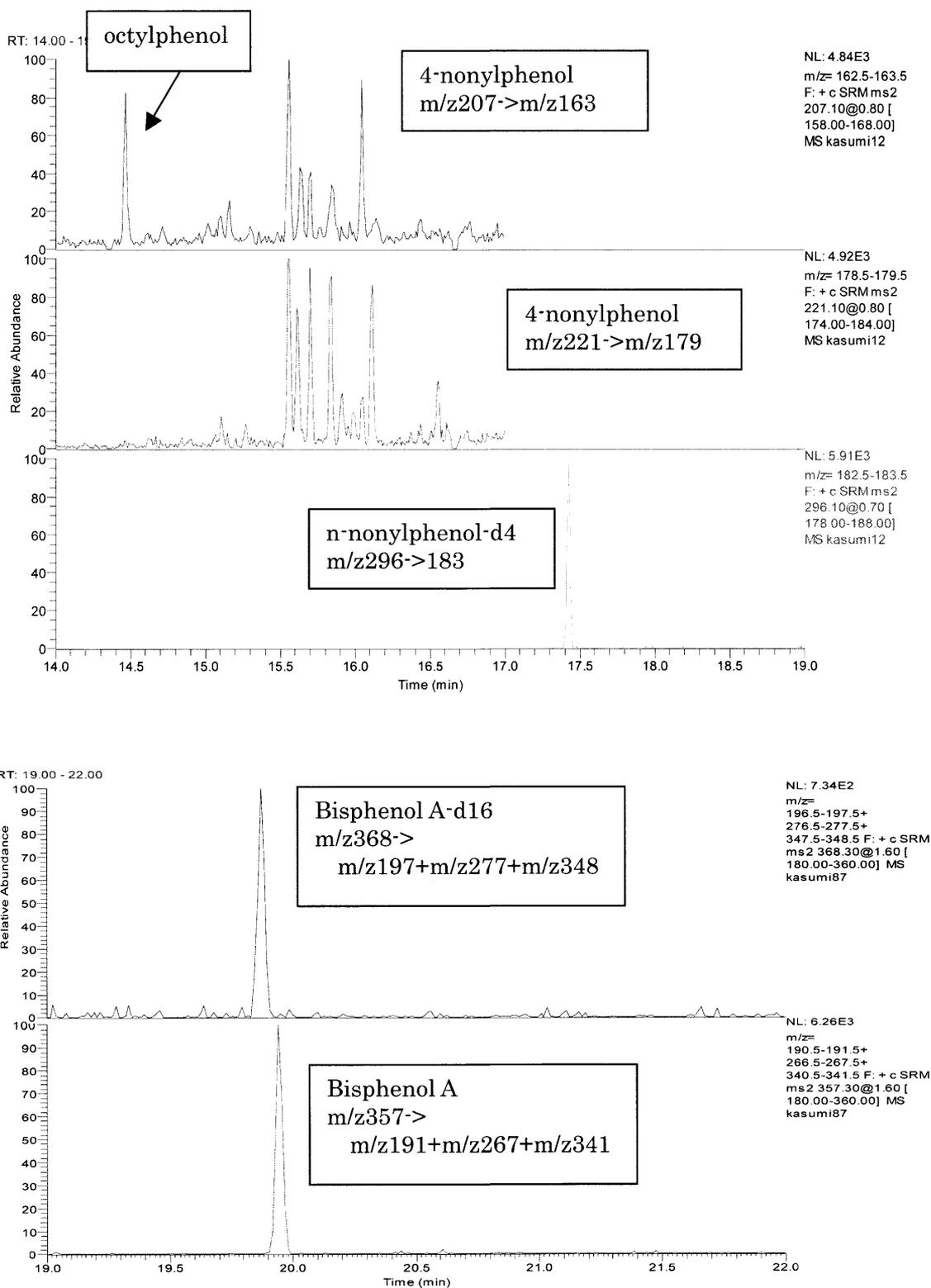


図2 霞ヶ浦湖水の抽出物のノニルフェノール（上段）とビスフェノール A（下段）の GC/MS/MS によるクロマトグラム

表1 4-tert-octylphenol, nonylphenol及びbisphenol Aの分析条件

ガス chromatogram	Trace GC (ThermoQuest)	
質量分析計	Polaris(ion trap) (ThermoQuest)	
カラム	HP-5MS(30m×0.25 mm i.d.× 0.25 μm)	
注入口温度	250°C	
カラム温度	60°C(2min)→10 °C/min→260°C	
キャリアガス・流量	He 1.2ml/min	
注入量	3μl/injection	
インターフェース温度	260°C	
イオン源温度	200°C	
化合物	R.T. min	測定イオン
4-tert-octylphenol	14.49	m/Z207→m/Z163
nonylphenol	15.59	m/Z221→m/Z179
	15.64	m/Z221→m/Z179
	15.74	m/Z221→m/Z179
	15.87	m/Z221→m/Z179
	16.08	m/Z207→m/Z163
	16.14	m/Z221→m/Z179
n-nonylphenol-d4	17.47	m/Z296→m/Z183
bisphenol A	20.38	m/Z357→m/Z191, 267, 341の合計
bisphenol A-d16	20.31	m/Z368→m/Z197, 277, 348の合計

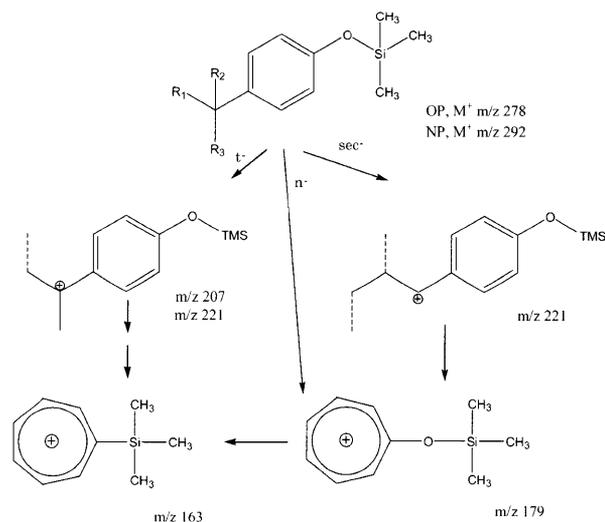


図3 アルキルフェノールの解裂様式

の10分の1まで低減することができた。本法は、尿中のビスフェノールAの測定にも適用可能であった。

2.1.2 負イオン化学イオン化質量分析法によるエストラジオール類の分析

負イオン化学イオン化質量分析法は、電子親和性の高い化合物を効率かつ特異的にイオン化する手法として知られ、PCBの分析やダイオキシンの簡易分析法として、主に有機ハロゲン化合物の高感度分析法として利用されてきた。本方法の利点は、電子親和性が高い化合物ではイオン化効率が高く、低濃度の試料でもシグナルが検出できる点にある。欠点は、日本ではあまり装置が普及していないことや、イオン化に減圧下での気相イオン反応を利用するため再現性が電子衝撃イオン化法よりも悪いこと、夾雑物質によりイオン化が抑制される場合のあること、電子衝撃イオン化と比べダイナミックレンジが狭いなどである。これらの欠点は、いずれも分析法を工夫することで回避が可能である。ステロイドホルモンなどは、電子親和性の官能基を持たないため、そのままの形では負イオンの生成効率は悪いが、フェノールや水酸基が存在するため、容易に電子親和性のある誘導体とすることができる。誘導体化試薬にはいくつか考えられるが、入手しやすい試薬としてフッ素置換した酸無水物によるアシル化及び臭化ペンタフルオロベンジルによるベンジル化の2法を検討した。

(1) パーフルオロアシル化によるエストラジオールの誘導体化法

パーフルオロアシル化によるエストラジオールの誘導体化法として、無水トリフルオロ酢酸、無水ペンタフルオロプロピオン酸、無水ヘプタフルオロ酪酸を反応試薬として、反応時間、GC/NCI-MSによる質量スペクトル、感度、直線性、ブランクなどを検討した。重水素標識した内部標準としてエストラジオールd₄およびビスフェノールA-d₁₆を使用した。いずれの酸無水物においても、0.1Mピリジントルエン溶液中で、60°C、30分間加熱することで、いずれの試薬でもほぼ定量的にアシル誘導体化することができた。無水トリフルオロ酢酸による生成物は、NCIによる感度の増大は認められなかったが、無水ペンタフルオロプロピオン酸、無水ヘプタフルオロ酪酸を用いて誘導体化すれば、NCIで高感度に測定でき、1ng/ml以下の検出が可能であった。両者を比較すると、フッ素数が多い無水ヘプタフルオロ酪酸を用いた方が2倍ほど高感度であった。試薬に由来すると思われるブランクは、ノニルフェノールやビスフェノールAで若干認められたが、エストラジオールでは認められなかった。しかしながら、無水ヘプタフルオロ酪酸および無水ペンタフルオロプロピオン酸による誘導体は、試薬に由来するイオンがベースピークであり、他の負イオンは数%しか生成しなかった。対象化合物に由来する負イオンは(エストラジオールのペンタフルオロプロピオン酸ジエステルでは、m/z 417[M-147(C₃F₅O)], 397[417-20(HF)], ヘプタフルオロ酪酸誘導体では、m/z 644[M-20(HF)], 467[M-197(C₄F₇O)])を生じ、これ

らイオンを用いて ng/ml 以下の測定が可能であるものの、対象物質を特異的に検出するための適切な誘導体化とは必ずしもいえないことがわかった。

(2) ペンタフルオロベンジル化による誘導体化による エストラジオール類の分析法

ペンタフルオロベンジル化による誘導体化条件の最適化、簡便なクリーンアップ方法について検討を加えた。GC/MS 測定には、HP 5973 (Hewlett Packard, U.S.A.) を用い、注入口温度は 260°C 、Splitless 方式でオートインジェクターにより $2\ \mu\text{l}$ 注入した。イオン源温度は 150°C 、反応ガスとしてメタンを用い負イオンモードで測定した。分離カラムに HP5-MS ($0.25\ \text{mm I.D.} \times 30\ \text{m}$, 膜厚 $0.25\ \mu\text{m}$) を用いて、カラムオープン温度を初期温度 150°C で 1 分間保持したのち、毎分 10°C の速度で昇温させ 300°C で 10 分間保持した。流速は毎分 $1.2\ \text{ml}$ (線速度 $41\ \text{cm/sec}$) でヘリウムをキャリアガスとし、インターフェース温度は 260°C とした。17 α -エストラジオールおよび 17 β -エストラジオールは、 $m/z\ 343$ と $m/z\ 344$ 、エチニルエストラジオールは $m/z\ 367$ と $m/z\ 368$ 、17 β -エストラジオール d_4 は $m/z\ 347$ と $m/z\ 348$ を測定イオンとし SIM モードで定量した。

エストラジオール、エストロン、エチニルエストラジオールなどの固相抽出や誘導体化の条件を検討した。図 4 にペンタフルオロベンジルとトリメチルシリル誘導体化による測定法のスキームを示した。この操作で、エストラジオールの検出下限 $0.1\ \text{ng/l}$ が得られた。具体的には、以下に示す手順である。

試料水 $1\ \text{l}$ を正確にサロゲート $1\ \text{ng}$ (E2- d_4 アセトン溶液) と pH 5 の $1\ \text{M}$ 酢酸緩衝液 $1\ \text{ml}$ を加え、よく振り混ぜて混合し、カートリッジカラムに通水する。精製水 $5\ \text{ml}$ 、ヘキサン $5\ \text{ml}$ でカートリッジカラムを洗浄後、メタノール $5\ \text{ml}$ で溶出し、 $10\ \text{ml}$ の遠心管に受け、窒素を吹き付け乾固する。乾固した試料に PFBB 誘導体化試薬 (PFBB 溶液: 臭化ペンタフルオロベンジル $1\ \text{g}$ 、18-クラウン 6-エーテル $1\ \text{g}$ を 2-プロパノールで溶かし $50\ \text{ml}$ としたもの) $0.5\ \text{ml}$ 及び炭酸カリウム約 $3\ \text{mg}$ を加えた後、密栓をし、 80°C で 30 分間加熱する。冷却後、精製水 $6\ \text{ml}$ 、ヘキサン $2\ \text{ml}$ を加え、激しく振り混ぜて静置する。パスツールピペットを用いてヘキサン層を採取し、抽出を再度繰り返す。ヘキサンを少量の無水

硫酸ナトリウムをつめたカラムに通じ乾燥し、容器とカラムをヘキサン $5\ \text{ml}$ で洗浄し、抽出液と合わせ、窒素を吹き付け乾固する。これにトリメチルシリルイミダゾール $20\ \mu\text{l}$ を加え、内容物と良く混合した後、室温で 30 分間放置する。反応液にヘキサン $1\ \text{ml}$ を加え良く混合した後、あらかじめ $5\ \text{ml}$ のヘキサンで洗浄したシリカゲルミニカラムに添加する。容器を少量のヘキサンで洗い、再度カラムに添加し、カラムにヘキサンを流し入れ、最初の流出液 $5\ \text{ml}$ を捨てる。次いで、ヘキサン: 酢酸エチル (9:1) $5\ \text{ml}$ で溶出する。窒素を吹き付け濃縮、乾固し、ヘキサン $0.2\ \text{ml}$ に溶解し試験液とする。

水酸基のペンタフルオロベンジル化がこの反応条件では困難なため、トリメチルシリル誘導体化をさらに行う必要がある。本方法はパーフルオロアシル誘導体化による方法より若干複雑な手順を必要とする。しかし、パーフルオロアシル誘導体化より安定な化合物を生成し、分析上妨害となる夾雑物との分離にカラムクロマトグラフィなどの前処理を組み合わせることができることや、そのトリメチルシリル誘導体がエストラジオールに由来する負イオンを主に生成するため、より高感度な測定が可能となった。環境水においては 1000 倍程度の濃縮と簡単なクリーンアップにより ELISA 法と同程度の感度を出せるようになった。

内分泌攪乱化学物質の疑いのある物質として環境庁 (当時) は 65 物質群をリストされた。このリストを参考に多くの機関で、環境調査が行われてきたが、その分析法の多くが GC/MS などを用いた機器分析であった。大規模な全国調査も同様に行われたが、唯一の例外がエストラジオールの ELISA による分析であった。本方法のように適切な前処理と最新の機器を使用すれば環境中の ng/l 以下のエストラジオールの質量分析法による測定が可能である。イオントラップ GC/MS/MS を用いたオランダの表層水のエストラジオールの測定例では、 $< 0.1 \sim 5.5\ \text{ng/l}$ と報告されている。エストラジオールの APCI 正イオンモードでの LC/MS/MS 法や、イオントラップ GC/MS/MS、LC/MS-SIM、LC/MS/MS の 3 種類の質量分析法による分析法の比較結果によれば、それらの検出下限は、それぞれ、 $20\ \text{pg}/\mu\text{l}$ 、 $200\ \text{pg}/\mu\text{l}$ および $5\ \text{pg}/\mu\text{l}$ であったという。本研究でなされたペンタフルオロベンジル化 GC/NCI-MS 法はいずれの方法に比べても高感度であった。本手法は、環境省の平成 11 年度以降の環境

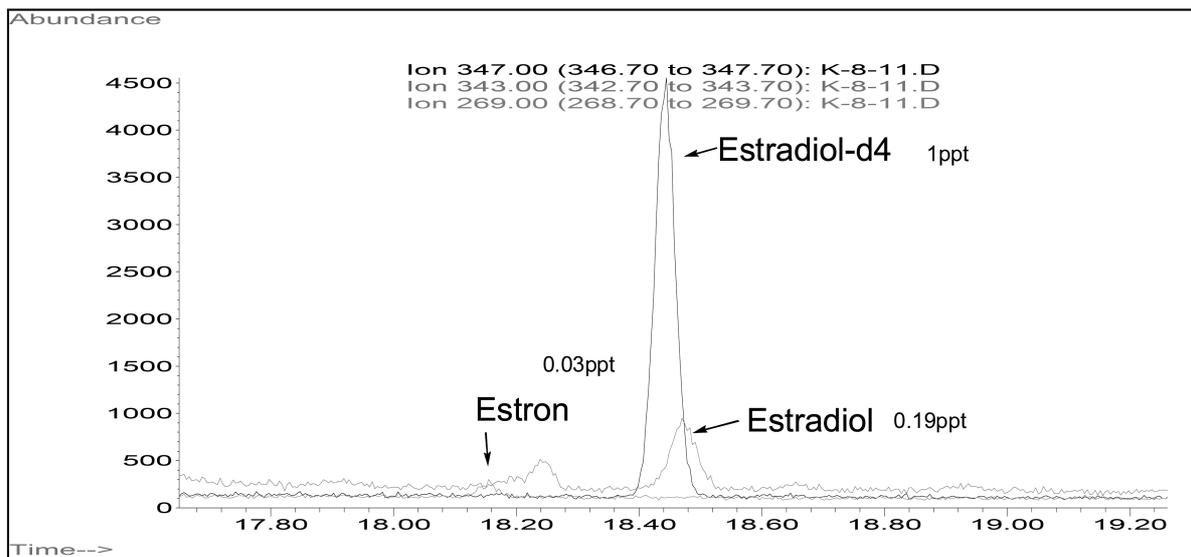
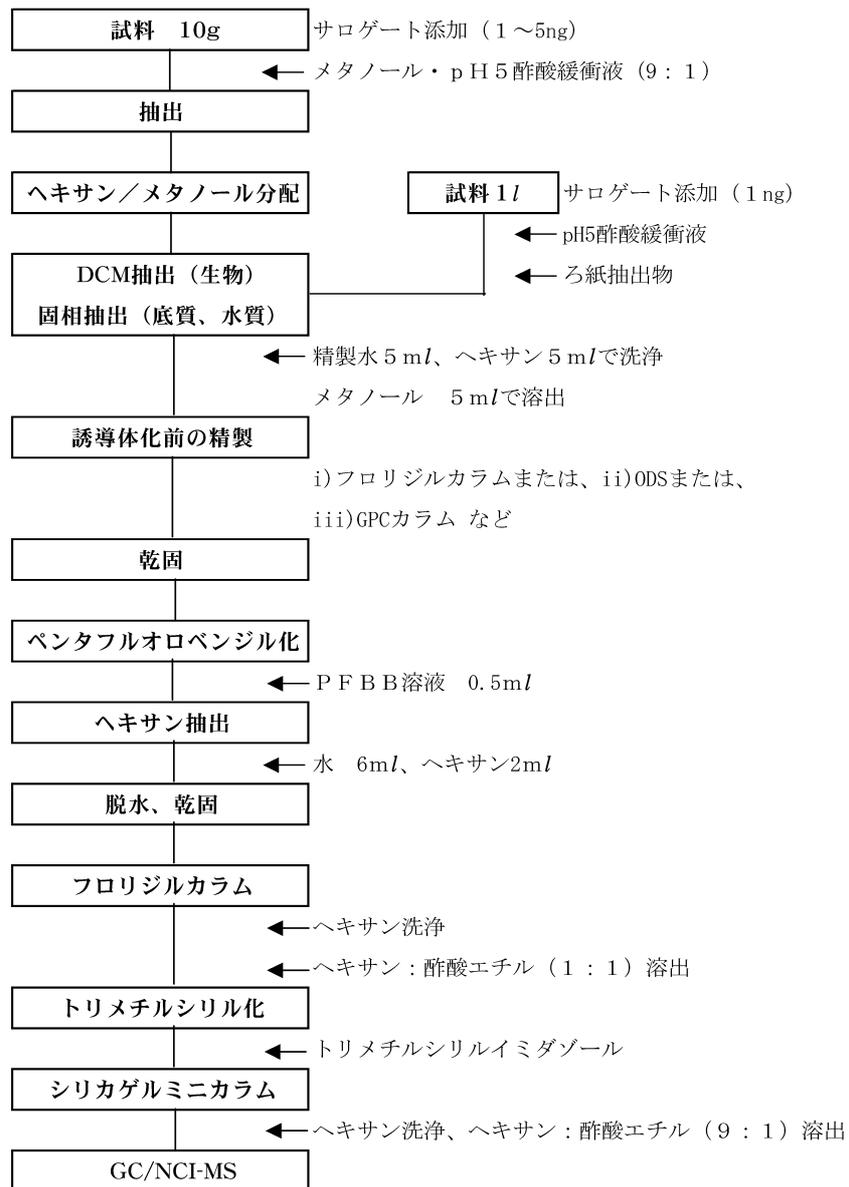


図4 ペンタフルオロベンジルとトリメチルシリル誘導体化による測定法のスキームと霞ヶ浦湖水 (ST 8, 1999/11/26) 中のエストラジオールとエストロンの GC/NCI-MS クロマトグラム

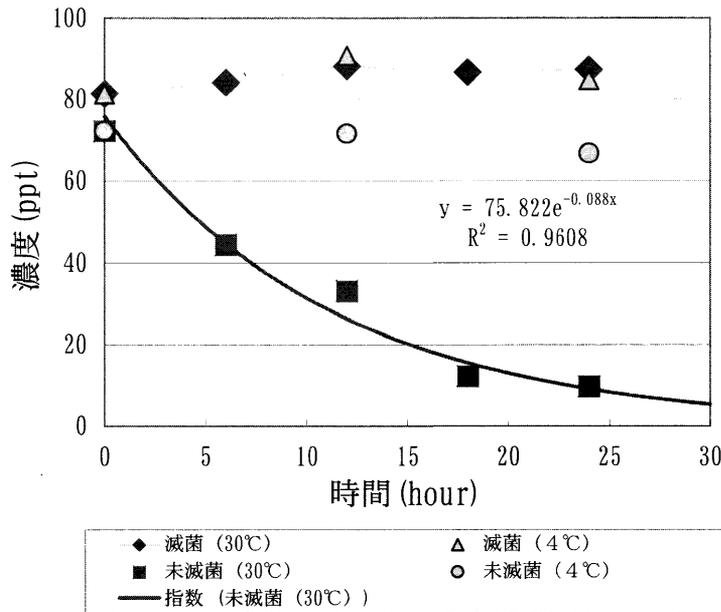


図5 霞ヶ浦湖水中での17β-エストラジールの安定性

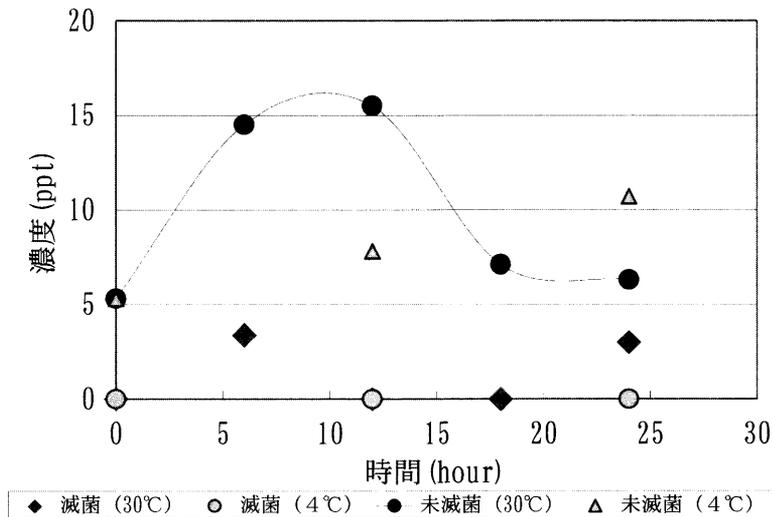


図6 霞ヶ浦湖水中でのエストラジールからのエストロンの生成

調査に活用されている。

エストラジールの環境中での安定性を見るために、加熱滅菌した霞ヶ浦湖水と処理しない湖水にエストラジールが100 ng/lになるように添加後、4℃と30℃で暗所に保管した。滅菌した湖水では、4℃及び30℃ともにほとんど変化が見られなかったが、未処理の湖水では、4℃でも徐々に濃度は減少し、30℃では、2日後にほとんど分解消失した。30℃での半減期は、およそ8時間であった(図5)。また、エストラジールの一部は、滅菌していない湖水でエストロンに変換され、エストロン濃度が10時間後には15 ng/lまで上昇した。しかし、エストロンも速やかに代謝され、その濃度はピークを経た後、徐々に減少した(図6)。この減少は、滅

菌水では観測されず、さらに低温では反応が遅いため微生物分解による作用と考えられた。エストラジールの一部はエストロンに変化するが、この水中濃度も速やかに減少することが示された。エストラジールやエストロンは微生物による分解が速いため、湖水の水温が高い夏季には速やかに分解されていると推測できた。当然のことながら、その分析にあたっては試料の保存には十分注意が必要であることが示された。

2.1.3 液体クロマトグラフ質量分析法によるエストラジールとその代謝産物の分析

エストラジールはグルクロン酸および硫酸抱合体などの代謝産物(図7)として体外に排泄される。下水に

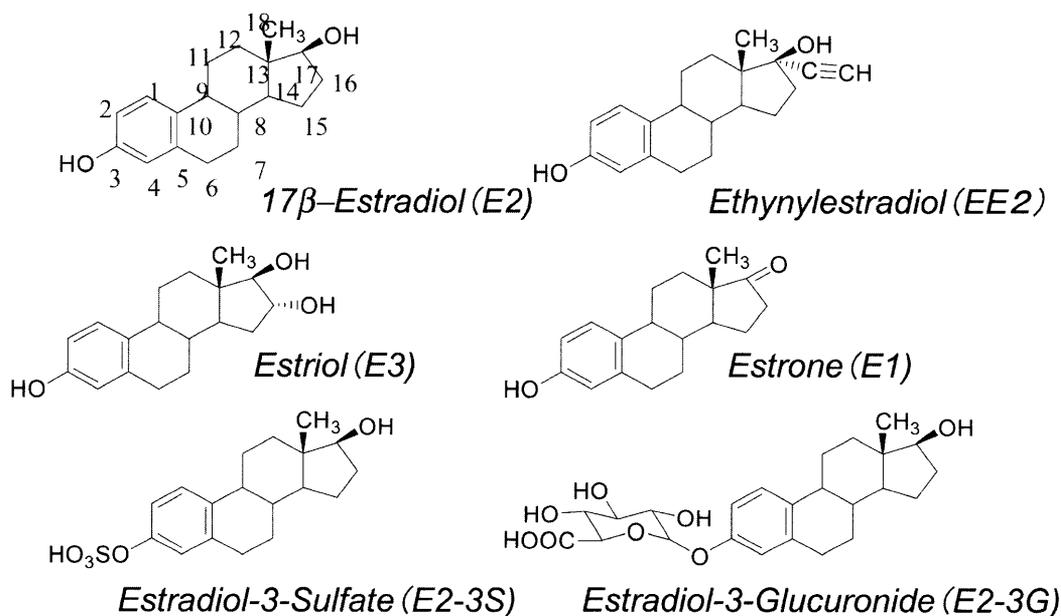


図7 エストラジオール、エチニルエストラジオールおよびその代謝産物の構造式

はグルクロニダーゼ活性があると報告されており、グルクロン酸抱合体などは環境中で分解し再びエストラジオールを産生する可能性が指摘されている。環境中のエストラジオールの分析法には、GC/NCI-MSなどによる高感度な分析法があるが、GC/MSで、代謝産物である硫酸抱合体やグルクロン酸抱合体を個別に分析することは極めて困難である。高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS/MS)を用いれば誘導体化せずとも測定が可能である。そこで、エストラジオール(E2)とその代謝産物であるエストロン(E1)、エストリオール(E3)、およびそれらの抱合体あわせて15化合物(E1, α -E2, β -E2, E3, EE2, E2-3-Glucuronide-17-Sulfate, E2-3-Sulfate-17-Glucuronide, E3-3-Glucuronide, E2-3, 17-Disulfate, E3-3-Sulfate, E2-Glucuronide(3-および17-), E1-3-Sulfate, E1-3-Glucuronide, E2-3-Sulfate)の固相カラムによる水からの濃縮法とHPLC/MS/MSによる分析条件を検討した。

測定に用いた装置は、Quattro Ultima (Micromass, UK)で、キャピラリー電圧は3.0 kVとし、エレクトロスプレーイオン化法の負イオンモードESI(-)で行った。分析対象物質および測定対象物質ごとのコーン電圧、コリジョン電圧を表2に示した。E2-d₃, E1-d₄, E2-d₄-3-SulfateおよびE1-d₄-3-Sulfateは、サロゲート化合物として用いた。HPLCはCapLC (Waters, USA)またはMP 680 Micro Flow Pump (GL Science, Japan)を用いた。カラムはX Terra MS-C 18 (1×

150 mm, 5 μ m, Waters)またはZorbax Extend-C 18 (1×150 mm, 3.5 μ m Agilent), 移動相A: 20 mM TEA H₂O, 移動相B: 20 mM TEA Acetonitrileとして移動相Bを0%から50%まで12分で直線的に変化させ、その後5分間保持した。カラム槽温度は40℃, 注入量は2 μ l, 流速は40 μ l/分とした。

ESI(負イオン)法によるLC/MS/MSの感度は、溶離液の組成により著しく変化することが知られている。フローインジェクション法によりいくつかの溶媒系についてイオン強度の違いを検討した結果、アセトニトリルを溶媒とした場合により感度が得られたが、溶離液に酢酸を含有する緩衝液を用いた場合、感度が1桁ほど減少し、特にE1, E2, E3の感度が極端に低下した。また、メタノールを溶媒として用いた場合も同様に感度が低下したが、トリエチルアミンを高濃度(10%)に添加すると感度が上昇することがわかった。同様に溶離液にトリエチルアミンなどの揮発性塩基を添加しpHを高めると感度の上昇が認められた。一方、分離に用いる逆相系では酢酸-トリエチルアミンなどの緩衝液を用いないと良好な分離が得られず、感度と分離能を両立することはシリカ系のカラムでは困難であった。そこで、耐塩基性の高分子系の分離カラムとして使い、20 mM トリエチルアミン存在下、水とアセトニトリルのグラジエントによる分離条件を検討したところ、良好なクロマトグラムが得られた。LC/MS/MSで1 pg/ μ lの標準物質を分析した際のクロマトグラムを図8(a-c)に示した。検量

表2 測定対象物質とMRMイオン, コーン電圧およびコリジョン電圧

化合物名	略号	MRMイオン	コーン電圧 (V)	コリジョン電圧 (V)
Estrone-3-Sulfate	E1-3S	349>269	70	40
Estrone-3-Glucuronide	E1-3G	445>269	40	40
Estradiol-3-Sulfate	E2-3S	351>271	70	35
Estradiol-3-Glucuronide	E2-3G	447>271	40	35
Estradiol-17-Glucuronide	E2-17G	447>271	40	35
Estradiol-3-Glucuronide-17-Sulfate	E2-3G17S	263>253	40	30
Estradiol-3-Sulfate-17-Glucuronide	E2-3S17G	263>271	35	30
Estradiol-3,17-Disulfate	E2-3,17DiS	215>97	35	35
Estriol-3-Sulfate	E3-3S	367>287	35	30
Estriol-3-Glucuronide	E3-3G	463>287	40	40
Estrone	E1	269>145	80	40
17 α -Estradiol	α -E2	271>145	80	40
17 β -Estradiol	β -E2	271>145	80	40
Estriol	E3	287>171	80	35
Ethynyl Estradiol	EE2	295>145	80	40
Estrone- <i>d</i> ₄ -3-Sulfate*	E1- <i>d</i> ₄ -3S	353>273	70	40
Estradiol- <i>d</i> ₄ -3-Sulfate*	E2- <i>d</i> ₄ -3S	355>275	70	35
Estrone- <i>d</i> ₄ *	E1- <i>d</i> ₄	273>147	80	40
Estradiol- <i>d</i> ₃ *	E2- <i>d</i> ₃	274>145	80	40

* 内部標準物質

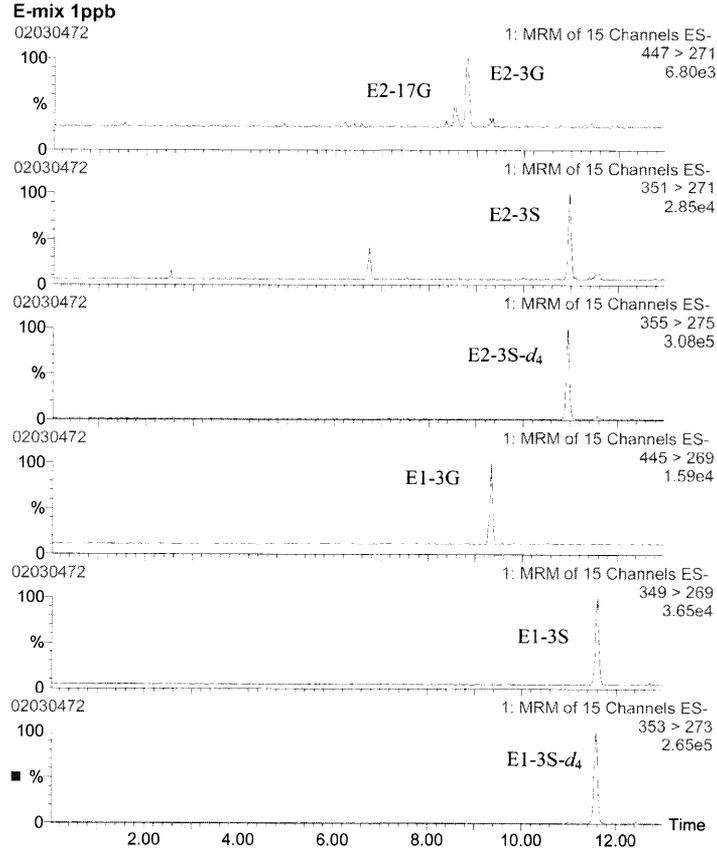
線は標準物質のレスポンスを直線回帰して求めた。0.5 ~ 100 pg/ μ l の標準物質を分析した際の検量線は、全物質について直線性が高く、0.99 を超える r^2 値が得られた。分析機器の検出下限値 (IDL) は、S/N 比が 3 以上を有意とした場合、注入量で 0.1 ~ 2.4 pg と計算された (表 3)。

市販の固相カラムによる抱合体の吸着能を検討した結果、中性条件では吸着しにくいこれらの化合物も、酸性条件あるいは酢酸トリエチルアミン (TEAA) をイオン対試薬として添加すれば中性条件下で吸着されることがわかった。さらに、20 mM TEAA (pH 5.4) に調製した水試料からの回収を試みた結果、固相カラム (ODS, PS 2, ポリアミド, EDS-1, OASIS など) のなかでは、芳香環とアミド基を有する樹脂を充てんした固相カラムが比較的良好な回収率を与えた。特に EDS-1, OASIS (スチレンジビニルベンゼン系の樹脂にアミド基などの親水基を持たせた吸着剤) の吸着能が高く、試料水を酢酸で酸性にする程度で、良好な回収率を得ることができた。また、酢酸エチルを溶離液とすることで、エストラジオールと抱合体を分離することができ、エスト

ラジオールを LC/MS/MS で分析する際の妨害も低減することができた。分析操作 (図 9) 全体を通じた回収率は、1 l の Milli-Q および霞ヶ浦湖水のろ液に 10 ng の標準物質を添加して試験を行った。標準物質を添加した Milli-Q を分析した際の再現性は、相対標準偏差 (RSD) で 2.9 ~ 17 % であった。また回収率はいずれの物質についても 75 % を超えていた (表 4)。霞ヶ浦湖水に添加した際の回収率は 57 ~ 116 % だった。E3-3S および E2-3S 17G の回収率はそれぞれ 57 および 69 % と低かったが、相対標準偏差が低かった (5.1 および 9.6 %) ことから、定量的な分析ができているものと判断した。また、分析上の定量下限値 (MDL) は、実際のサンプルを分析した際のクロマトグラムにおいて S/N 比が 3 以上の場合に有意と判断した。添加回収試験を行った際のクロマトグラムから計算した MDL を表 5 に示した。

本研究により確立された分析法によって、液-液抽出や誘導体化などといった手間のかかる煩雑な試料処理の必要がないため、環境水中のエストロゲンおよび抱合体を迅速、選択的かつ高感度に分析することが可能になった。本分析法を用いて環境水の分析を行った。内部標準

(a) E2-3G, E2-17G, E2-3S, E1-3GおよびE1-3Sのクロマトグラム



(b) E3, E2-3G17S, E2-3S17G, E3-3G, E3-3SおよびE2-3, 17DiSのクロマトグラム

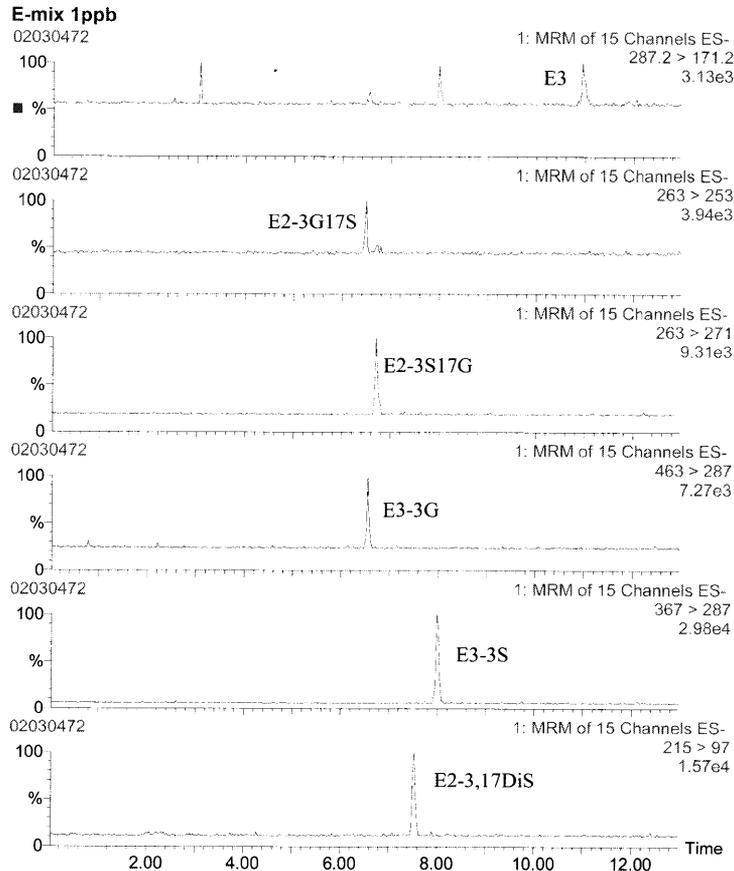


図8-1 標準物質のクロマトグラム (1 pg/μl 10 μl 分析)

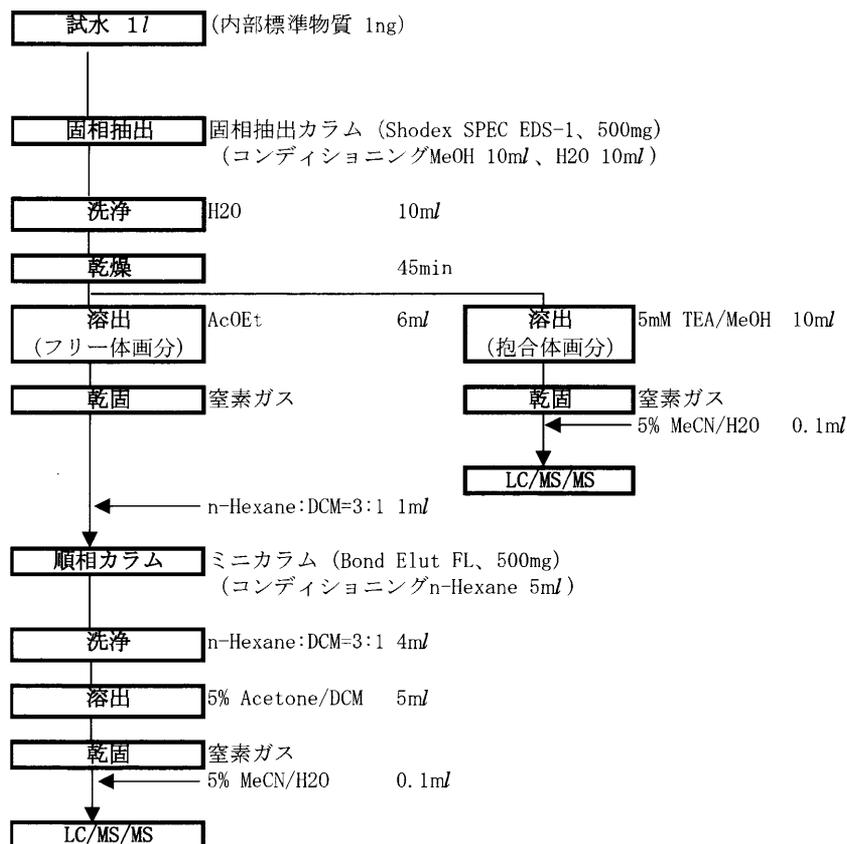


図9 エストラジオールとその代謝産物の分析法

表4 環境水からの回収率% (10 ng/l 添加)

	Milli-Qに標品を添加した際の回収率(%)*		環境水に標品を添加した際の回収率(%)	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差
E1-3S	87	3	97	8
E1-3G	88	8	82	9
E2-3S	98	6	99	6
E2-3G	93	9	71	1
E2-17G	82	5	91	7
E2-3G17S	75	13	97	10
E2-3S17G	76	9	69	7
E2-3, 17DiS	87	9	76	2
E3-3S	94	3	57	3
E3-3G	86	3	92	8
E1	101	13	116	7
α-E2	84	6	100	2
β-E2	76	2	92	6
E3	80	4	81	11
EE2	82	4	90	3

* MilliQ 1lに対し標品各10ngを添加 (n=4)

** 霞ヶ浦湖水 1lに対し標品各10ngを添加 (n=3)

表5 添加回収試験から計算した検出下限値 (ng/l)

	MDL ng/l
E1-3S	0.11
E1-3G	0.38
E2-3S	0.16
E2-3G	0.55
E2-17G	3.08
E2-3G17S	1.59
E2-3S17G	0.25
E2-3, 17DiS	0.71
E3-3S	0.31
E3-3G	2.68
E1	0.13
α-E2	0.18
β-E2	0.28
E3	1.50
EE2	0.20

MDL: 添加回収試験から計算した検出下限値

は、硫酸抱合体とフリー体が検出されたが、グルクロン酸抱合体は検出されなかった。このことは、グルクロン酸抱合体は下水処理過程で脱抱合され、フリーのエストロゲンを生成していることを示唆している。

内分泌攪乱化学物質に関する調査・研究を行う上で、内因性の女性ホルモンについてその女性ホルモン様活性や環境動態を把握することが重要である。エストラジオール (E2) やエストロン (E1), エストリオール (E3) については、環境中での分布や挙動に関する報告が増えつつあるものの、抱合体に関するデータは極めて少ない。抱合体の濃度分布や分解挙動に関する内因性の女性ホルモンの大半が硫酸あるいはグルクロン酸抱合体として排泄されていることが知られている。排泄された抱合体は水環境中で脱抱合されて元の物質、つまりエストラジオールなどを生成する可能性が指摘されているが、実際の水環境中での分解経路や速度についてはほとんど報告がない。そこで本研究では、エストラジオール類の代謝産物の水環境中での動態を把握するため、それぞれの物質について環境水を用いた簡易分解試験を行った。E1, E2, E3については、速度に違いはあるもの

表6 環境水の分析結果

	下水処理放流水 (ng/l)		多摩川 (ng/l)			霞ヶ浦 (ng/l)				
	STP-1	STP-2	no. 1	no. 2	no. 3	st. 7	st. 8	st. 10	st. 13	st. 14
E1-3S	2.2	0.3	0.3	0.9	0.8	0.3	0.3	0.4	0.8	0.8
E1-3G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E2-3S	1.0	tr	0.2	0.7	0.8	-	tr	0.3	0.2	0.4
E2-3G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E2-17G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E2-3G17S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E2-3S17G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E2-3, 17DiS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E3-3S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E3-3G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E1	34	2.5	3.4	3.8	6.6	0.7	0.2	0.6	0.8	0.8
α-E2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-E2	2.5	0.3	0.8	0.6	1.0	-	-	-	-	-
E3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EE2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: 検出下限値未満 (検出下限は別表参照)

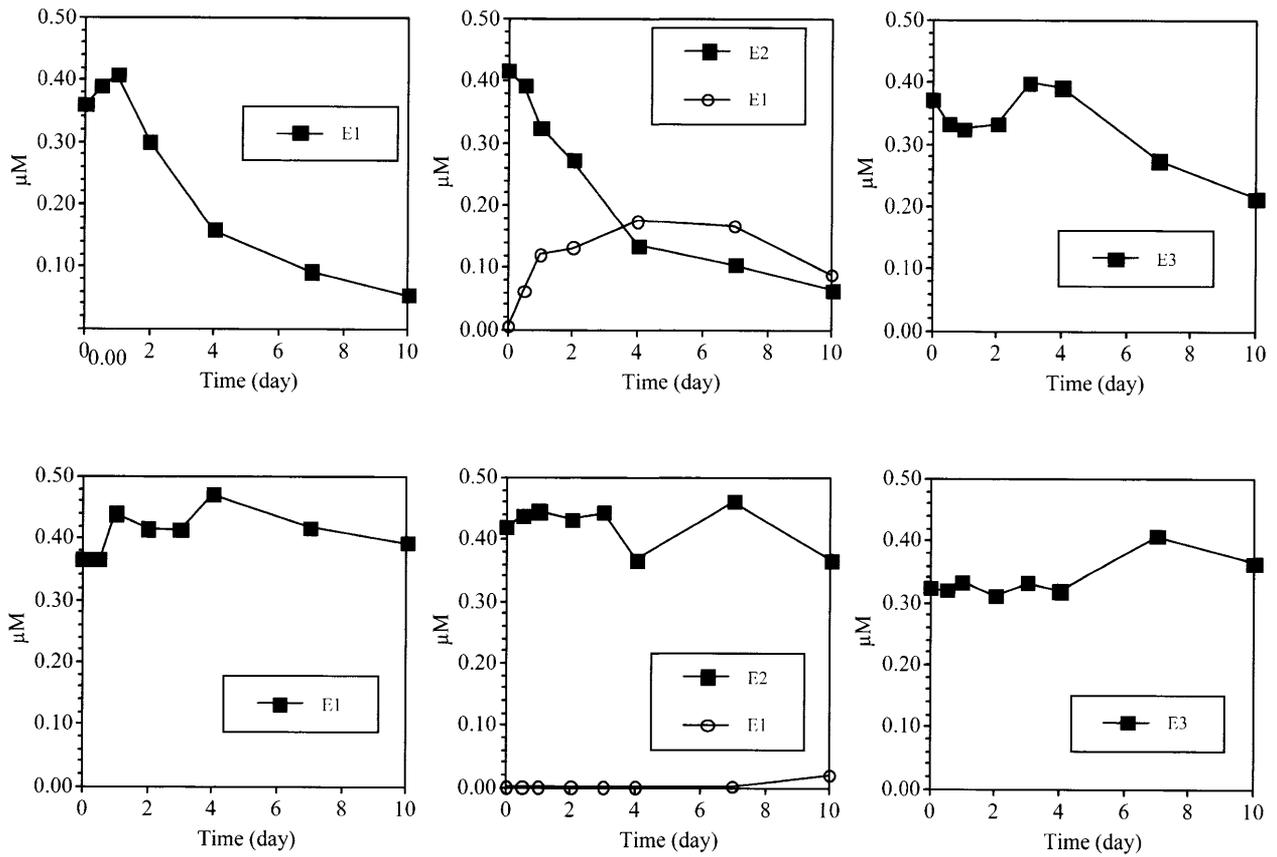


図10 多摩川河川水における E1, E2, E3 の分解 (上段: 未滅菌水, 下段: 滅菌水)

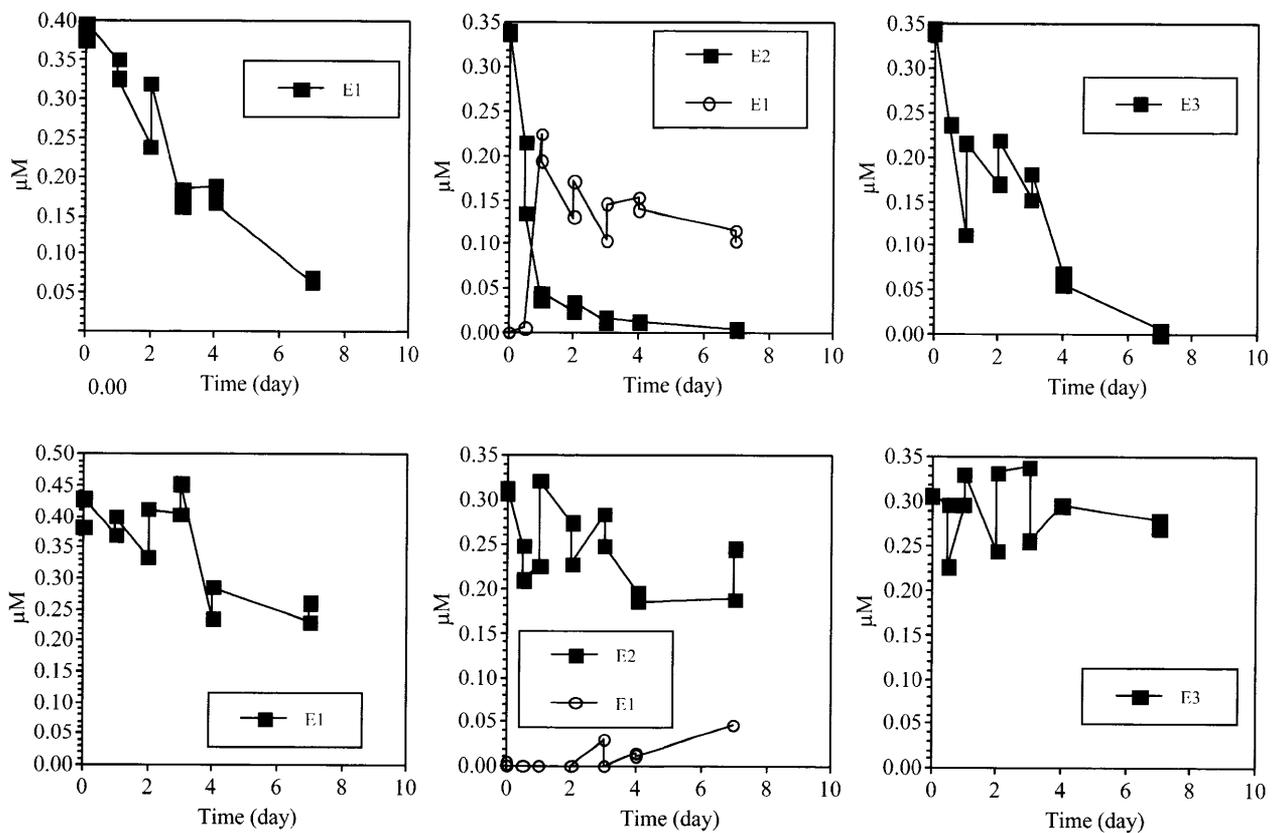


図11 霞ヶ浦湖水における E1, E2, E3 の分解 (上段: 未滅菌水, 下段: 滅菌水)

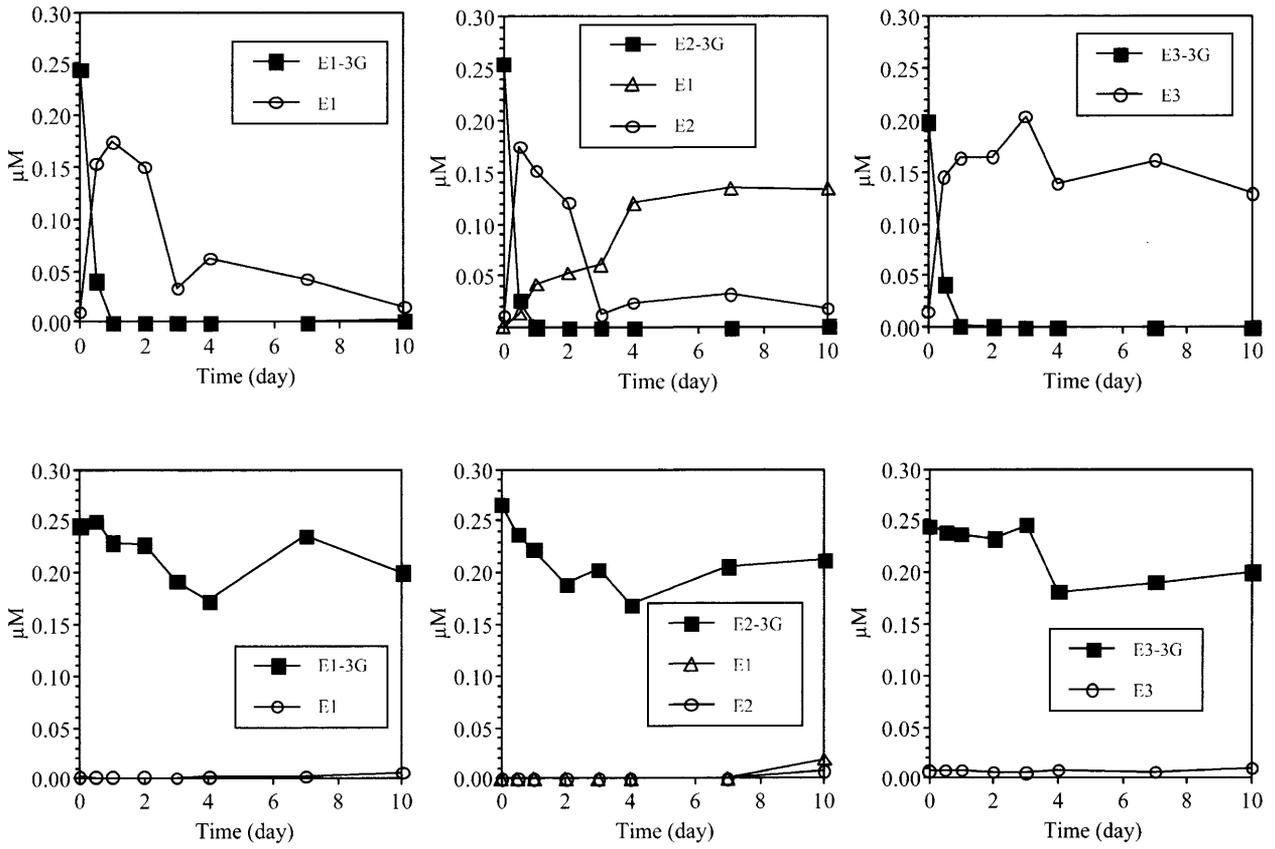


図12 多摩川河川水における E1-3G, E2-3G, E3-3G の分解 (上段: 未滅菌水, 下段: 滅菌水)

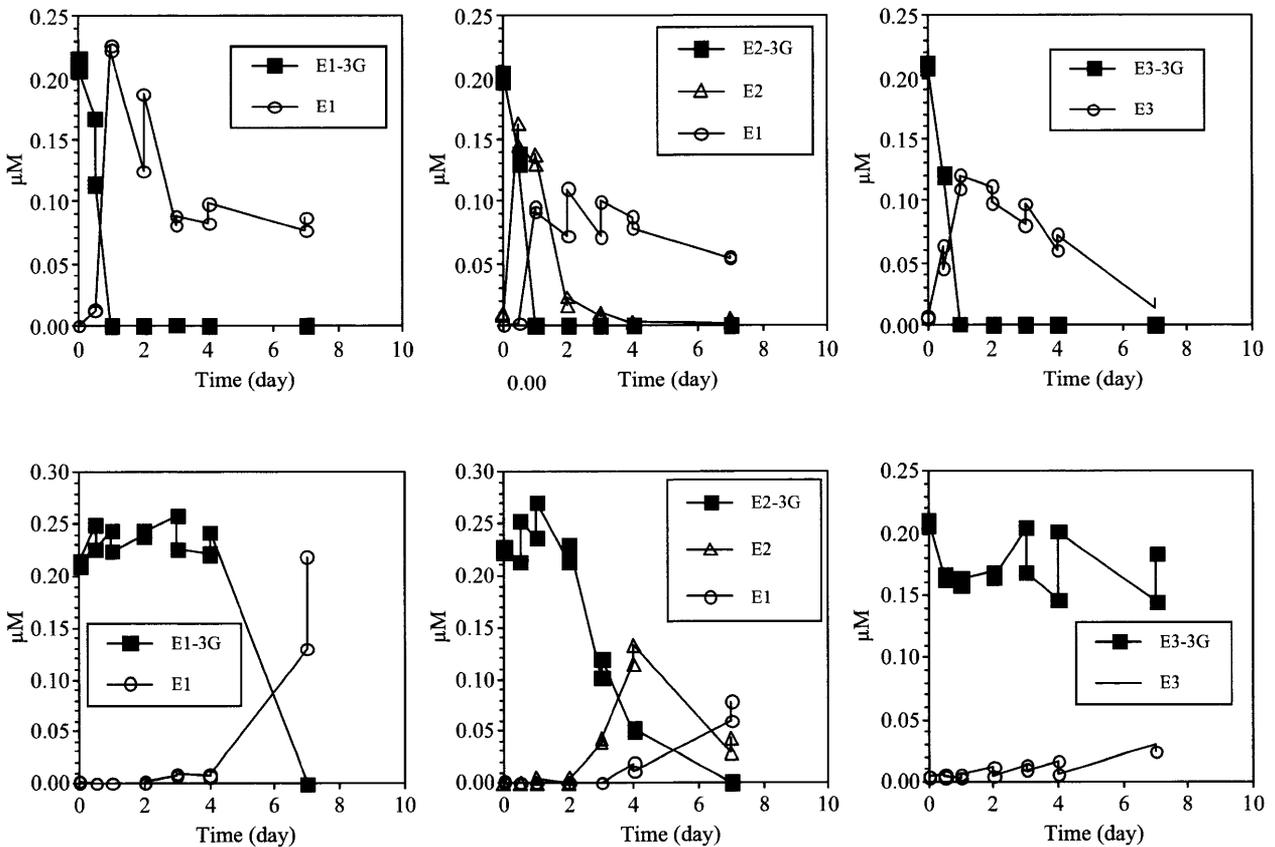


図13 霞ヶ浦湖水における E1-3G, E2-3G, E3-3G の分解 (上段: 未滅菌水, 下段: 滅菌水)

のいずれも分解を受けて減衰することが確認された(図10, 11)。半減期はE1が3日前後、E2は多摩川の水では3日、霞ヶ浦の水では12時間程度、E3は多摩川の水で10日、霞ヶ浦の水で3日だった。E2についてはその減衰とともにE1が生成することが確認された。

未滅菌の環境水においてグルクロン酸抱合体(E1-3G, E2-3G, E3-3G)は、いずれも比較的にすみやかに分解されてそれぞれE1, E2, E3を生成することが確認された(図12, 13)。半減期は多摩川の水を使用した際にはE1-3G, E2-3G, E3-3Gいずれも約8時間前後、霞ヶ浦の水を使用した際には15時間程度であった。それに対し環境水を滅菌した場合には、一部を除いて7日後も減衰が見られず、分解が微生物活動によるものであることを裏付ける結果が得られた。ただし、霞ヶ浦の水を用いた際には滅菌した場合でも4日前後の半減期が観察された。これはおそらく操作中に混入した微生物による分解であろうと思われる。

硫酸抱合体(E1-3S, E2-3S, E3-3S)は、未滅菌水中でも明確な減少は認められず、環境中でも安定して存在し続ける可能性が示唆された(図14, 15)。霞ヶ浦の水を用いた際にはE2-3SおよびE3-3Sの分解が観察され、半減期は4日前後であった。多摩川の水では分解が観察できなかったのに対して霞ヶ浦の水では分解された原因としては、水中の微生物の質および量の違いによるものが考えられる。

多摩川河川水および霞ヶ浦湖水においても、グルクロン酸抱合体が検出されず、一部の硫酸抱合体とフリー体のみが検出された。このことは、グルクロン酸抱合体の生分解は速いという分解実験の結果とよく符合している。多摩川および霞ヶ浦におけるE2濃度は、環境省や国土交通省によって行われた調査の報告値とほぼ一致していた。今回いずれの試料からもEE2が検出されなかった。これは、おそらくピルの使用が日本ではまだ一般的でないためであると考えられた。

2.1.4 免疫化学的分析法

ELISA法は、高感度で、しかも高価な装置を必要としない簡易な微量分析法として生体試料を中心に医療での診断などに広く用いられているが、環境試料中の化学物質の分析への適用は、研究レベルでもそれほど多くはない。化学物質の環境分析法として公的な調査で利用されたELISA法によるエストラジオールの分析は、まれな

例である。しかし、ELISA法による測定は、測定値を与えるのみで定性情報が付随しないため、さまざまな測定上の妨害の有無を判定できない欠点がある。環境ホルモンの分析では、環境試料という複雑なマトリックス中の微量成分を分析する必要がある、生体試料のように比較的均質な媒体を対象とする分析法とは異なった困難さが予想できる。ELISA法を環境試料に適用するには、測定時のマトリックス効果をできるだけ抑える必要があり、環境分析に特化した新たなELISA系の構築や前処理法の設計が必要と考えられている。また、ELISA法の特徴の1つに交叉反応性がある。これは、欠点と見ることもできるが、類似の構造を有する物質をトータルとして評価できる可能性を示しており、環境ホルモンのように、原因物質が特定できていない現状では、機器分析で見逃している類似物質を同時に測定できることは意味のあることである。

現在測定に利用されているGC/MS, LC/MS/MSなどの機器分析においては、大量の試料からの濃縮、煩雑なクリーンアップ操作、誘導体化が必要であり、モニタリング等多検体測定への適用は容易でない。17 β -エストラジオール(E2)及びエストロゲン(E2とエストロン(E1)の総和)を迅速・高感度に測定する全自動酵素免疫測定システムの開発を試み、測定時間約50分の測定法を確立し基本性能を評価後、河川水・湖沼水サンプルを用いてGC/NCI-MS法やLC/MS/MS法との比較検討を実施した。また、環境測定に適用可能と思われるビスフェノールAのELISA法と機器分析の相関性についても検討を加えた。

(1) エストラジオール類

環境水中には人畜由来のエストロゲン類が存在することが報告されており、これらは微量で高い女性ホルモン活性を有することから、そのモニタリングは化学物質のモニタリングとともに重要である。本研究では、モニタリングにおける多検体測定への適用を考慮して、17 β -エストラジオール(E2)ならびにエストロン(E1)とE2の総和(E1+E2)を測定する簡便迅速な全自動EIA法を確立し、評価を行った。全自動酵素免疫測定システムの構築にあたり、全自動EIA測定装置としてAIA-600II(東ソー製)を用い、抗E2抗体、E1とE2に反応する抗エストロゲン抗体は市販品を用いた。アルカリ性ホスファターゼ標識E2を用いた1ステップ競合

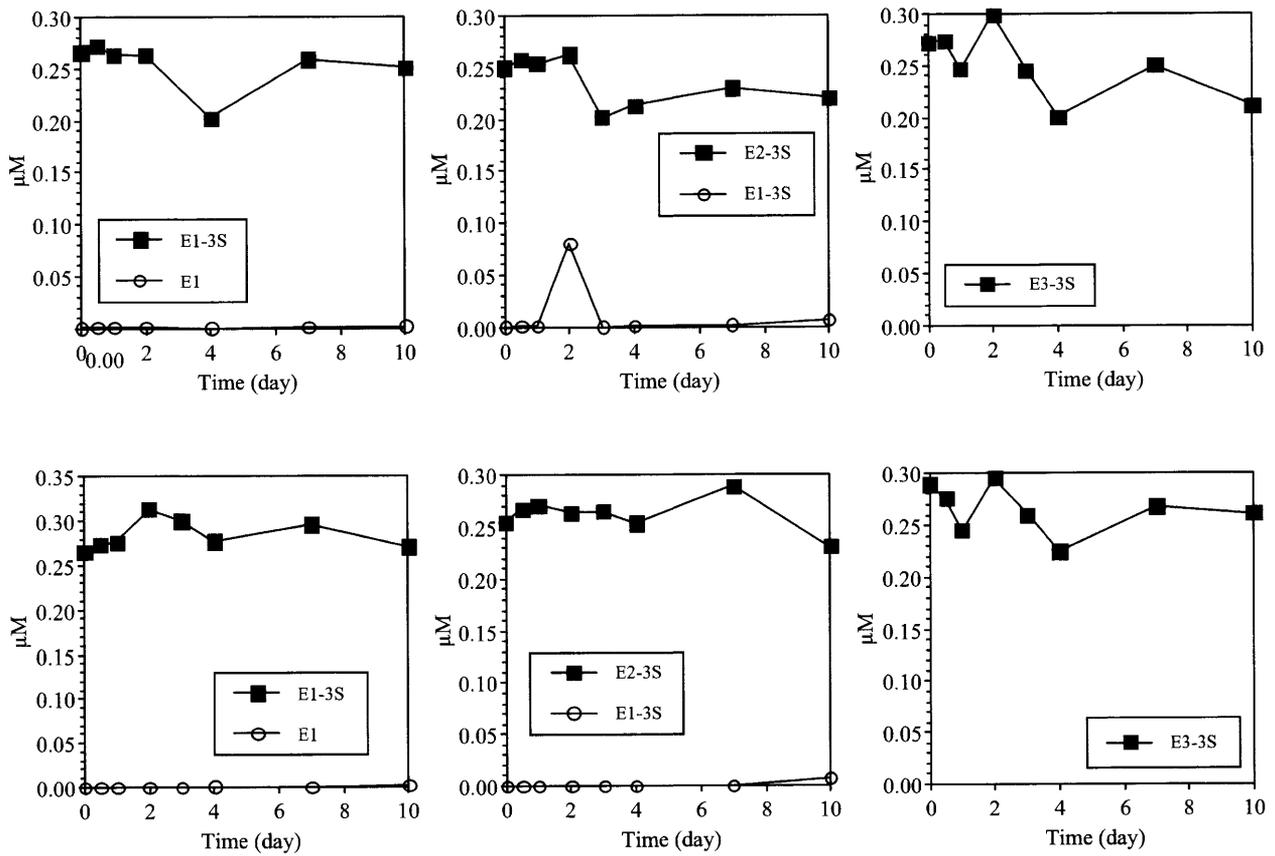


図14 多摩川河川水における E1-3S, E2-3S, E3-3S の分解 (上段：未滅菌水, 下段：滅菌水)

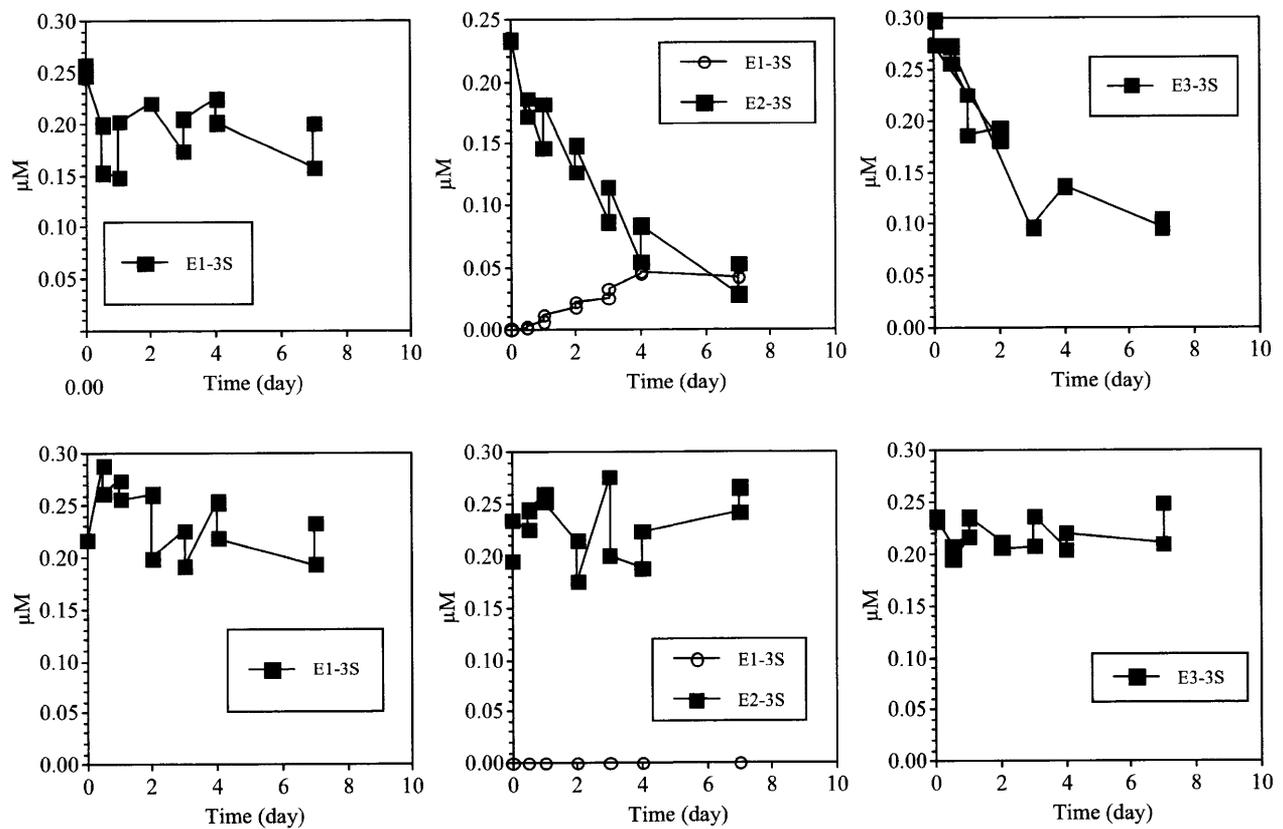


図15 霞ヶ浦湖水における E1-3S, E2-3S, E3-3S の分解 (上段：未滅菌水, 下段：滅菌水)

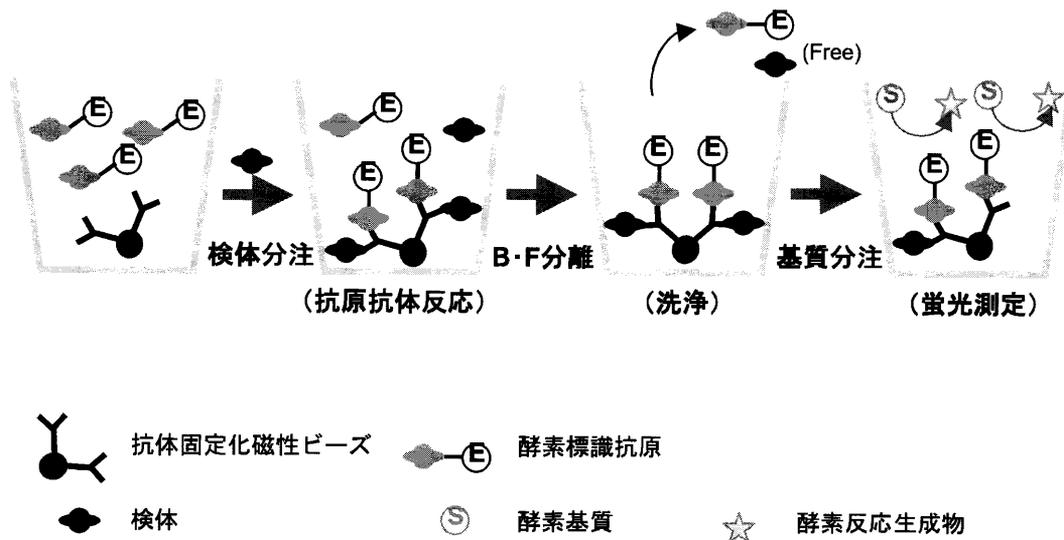


図16 1ステップ競合法の測定系

法の測定系を構築した。試料中の抗原と酵素標識抗原の競合反応を37℃、40分間実施し、B/F分離後、磁性ビーズに固定化した抗体に結合した標識抗原中アルカリ性ホスファターゼ活性を、基質である4-メチルウンベリフェリリン酸の分解速度を求めることにより測定し(図16)、基質(4-メチルウンベリフェリリン酸)分解速度を縦軸に、E2濃度を横軸にした標準曲線を作成し、濃度換算を行った。酵素活性は、単位時間あたりの酵素基質(4-メチルウンベリフェリリン酸)の分解量を、生成する蛍光物質(4-メチルウンベリフェロン)増加量を測定することにより求める。このように反応速度を求めることにより、試薬中のバックグラウンド蛍光を無視できる。

構築したE2測定系ならびにE1+E2測定系の基本仕様と性能は、添加回収試験、希釈直線性試験結果はともに良好であった。表7に、構築したE2測定系ならびにエストロゲン測定系(E1+E2測定系)の測定原理、測定範囲、最小検出限界、交叉反応性などをまとめて示した。また、測定間再現性については、E2測定系でCV 5.0~8.5%、E1+E2測定系で同5.4~8.3%であった。河川水の固相抽出メタノール溶液を希釈して測定範囲内の希釈直線性を評価したところ、回収率はE2測定系で103.5~113.3%、E1+E2測定系で同108.9~125.0%であった。河川水固相抽出メタノール溶液に既知量のE2を添加して回収を見たところ、回収率はE2測定系で93.0~105.3%、E1+E2測定系で85.0~100.3%であった。

採水後、凍結保存した河川水ならびに湖沼水サンプル

合わせて34サンプルを用い、環境庁(当時)暫定マニュアルに従いBond Elut C18(Varian社製)を用いて固相抽出を行い、メタノールにて溶出したものの一部を共通の試料とし、前述のGC/NCI-MSとEIAの関連試験を実施した。ELISA法のE1+E2測定系は、固相抽出後精製せず測定してもGC/NCI-MSによるE1とE2の総和値と非常に相関を示しており(相関係数0.986)、簡便なエストロゲンモニタリング系として非常に有効であることが示唆された(図17)。E2測定系については、相関係数は0.837と比較的良好であるが、回帰係数2.77とEIA測定値が高値になる傾向があった(図18)が、低濃度の地点(霞ヶ浦および周辺河川など)では乖離は小さく、非常に相関性を示しており、都市河川での高値が傾きを大きくしていると思われた(図19)。一方、乖離の大きな試料の固相抽出物をODSカラムにて分画し、各フラクションをELISA法の2系で測定したところ、E2系ではE2の溶出位置に、E1+E2系ではE1及びE2の溶出位置にのみ検出され、両系とも固相抽出物に混入する夾雑物の影響を受けず、E1及びE2に特異性が高いことが確認された(図20)。下水道の塩素処理で生成すると考えられるE2の塩素化体を分析したところ、塩素化物の濃度は低く、LCの保持時間も一致しなかった。また、16-ヒドロキシエストロンもLCの保持時間が一致しないことから乖離の原因物質ではないと判断された。このため、機器分析による測定値とE2系による測定値の乖離の原因は特定できていない。機器分析値が正しいとすると、都市河川にはE2にかなり近い構造の物質の存在が予見される。

表7 E2測定系ならびにE1+E2測定系の測定原理, 測定範囲, 最小検出限界, 交叉反応性

名称	E2系	E1+E2系
測定対象	E2	E1+E2
測定原理	1ステップ競合法	1ステップ競合法
使用サンプル量	75 μ l	75 μ l
サンプル溶液組成	25%メタノール	40%メタノール
測定範囲	5-200 pg/ml	E2 : 5-200 pg/ml E1 : 20-1000 pg/ml
最小検出限界	2 pg/ml	E2 : 3 pg/ml
交叉反応性	E1 : 3.3%, E3 : 0.2%	E1 : 49.9%, E3 : 0.1%
測定所要時間	約50分	約50分

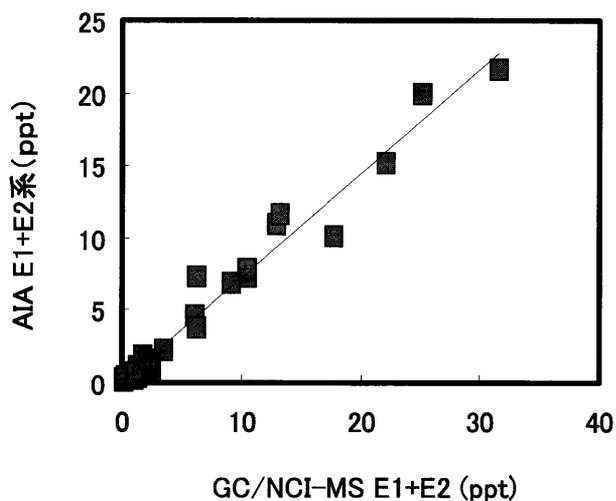


図17 GC/NCI-MS法とELISA (E1+E2系)法の相関

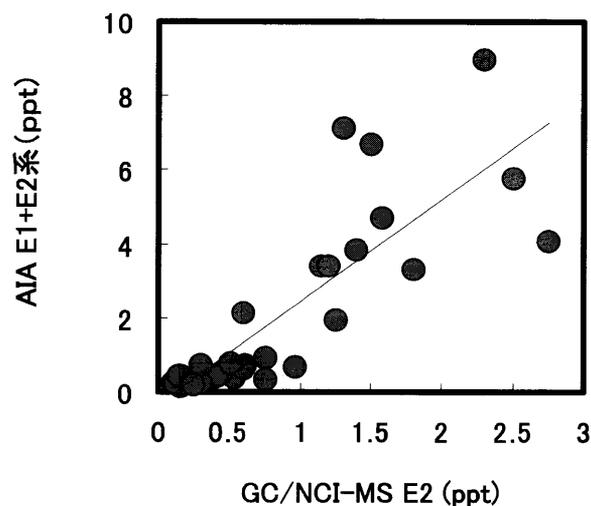


図18 GC/NCI-MS法とELISA (E2系)法の相関

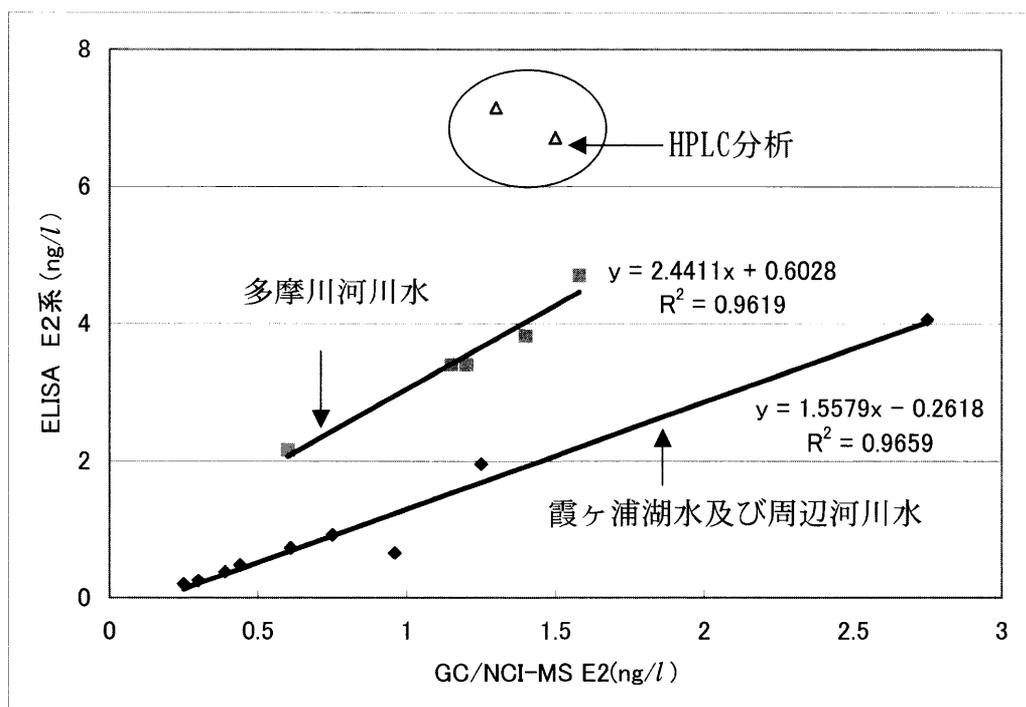


図19 同一時期に採取された環境水中のエストラジオールのELISA法とGC/NCI-MS法による測定値の相関(地点別)

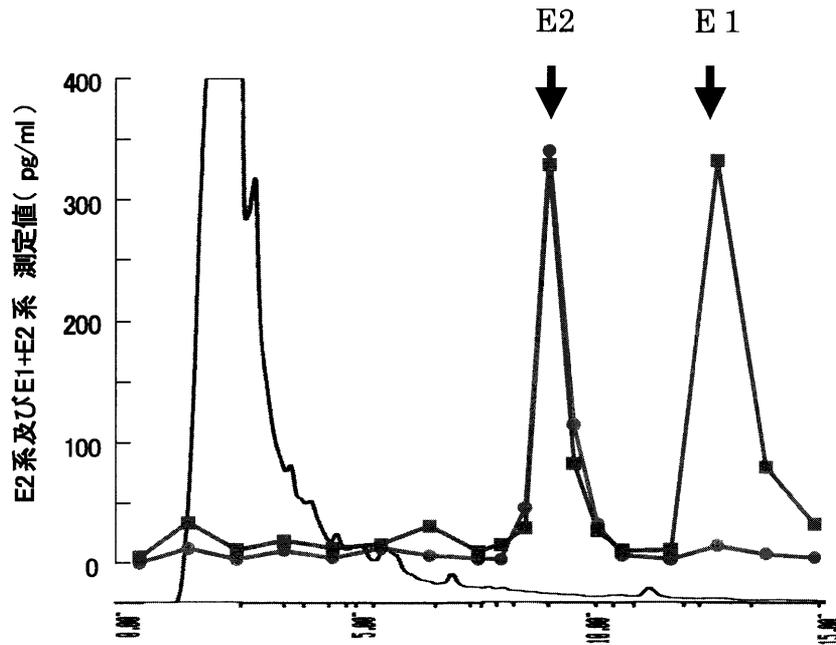


図20 乖離の大きな固相抽出物の ODS カラム画分の ELISA 測定 (● E2 系, ■ E1 + E2 系)

E2 に特異性の高い全自動 EIA, ならびに E1 と E2 に特異性の高い全自動 EIA 測定法を確立した。両系とも機器分析と良好な相関を示し, 特に E1 + E2 系はエストロゲンモニタリング系として簡便で優れた測定系であることが示された。

(2) ビスフェノール A

ビスフェノール A は低用量でも, ヒトへの内分泌攪乱作用がある疑いもたれており, その簡便な微量分析法を確立することは重要である。ELISA 法は感度が高いため微量試料での測定が可能であり, 複雑な前処理をしなくとも測定できる利点があり, 分析操作上の汚染が懸念されるビスフェノール A などの分析に利用できれば, 環境調査の効率の向上が期待できる。そこで, 免疫化学的測定法の開発の一環として, 霞ヶ浦湖水を共通試料としてビスフェノール A と前述のイオントラップ質量分析法での測定との比較を行った。ビスフェノール A の ELISA 測定は, 環境試料用に設計され, さらに高感度化したキットによって行い, 前処理は行わず, 抽出液をそのまま試料とした。図 21 に, 両者の測定値の相関を示した。ELISA 法では, 前処理をしていないにもかかわらず, 200 ml 以下の試料量で測定でき, 機器分析と良好な相関 ($ELISA = 1.285 \times GCMS + 0.39$, $R^2 = 0.9115$) が得られた。ELISA 法には正の切片 (0.4 ng/l) が認められたが, 暫定マニュアルの目標検出下限 (10 ng/l) と

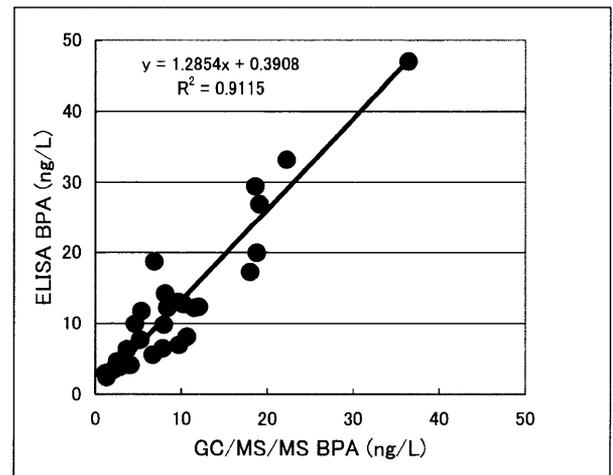


図21 霞ヶ浦湖水中のビスフェノール A の ELISA 法とイオントラップ質量分析法の測定結果の相関

比較すれば無視できる程度であろう。ただし, 今回の試料は, 人工汚染物質が少ないと思われる霞ヶ浦の湖水であり, 今後, 他地点の試料についての比較検討も必要であると思われる。

酵素反応や抗原抗体反応を利用する免疫化学的測定法で正確な測定をするためには, 機器分析以上に測定条件を規定する必要がある。生体試料と異なり, 環境試料に由来する複雑なマトリックスの影響を, いかに防止するかが開発の要点となる。免疫化学的測定法を環境試料に適用するにあたっては, 少なくとも, 環境分析用に設計された ELISA 法を用いるべきであり, さらに, あらかじめ機器分析との相関を確認しておく必要がある

う。このような手順を踏んだ ELISA 法は、環境モニタリングのスループットの高い分析法としての利点があると考えられた。しかしながら、定性能力がない欠点があり、偽高値の問題には明確な解決策は現状ではないと思われる。このため、測定結果を何等かの重大な判断の根拠とするような場合には、機器分析など、他の手法による裏付けが必要であると考えられた。

2.1.5 分子プリンティングによる選択的吸着剤の開発

分析法の高感度化によって、環境中の環境ホルモン物質の定量分析がある程度可能になってきた。しかしながら、環境中に存在する多数の夾雑物の存在が分析結果の安定性、信頼性の向上の妨げとなっていることは依然として改善されていない。そこで、環境中から目的物質を

効率的に捕そく、濃縮する前処理技術を開発することによって、既存の分析機器を用いて定量分析を行うことが可能となり、分析法の信頼性向上ならびに簡易化につながるものと考えた。

分析の前処理に用いられる吸着剤としては、固相抽出(疎水性相互作用, イオン交換作用), 液-液抽出や最近では抗体を用いた選択的濃縮などがあげられる。しかしながら、既存の方法では、目的の物質に対する選択性の低さや機械的, 化学的に制限があるなど、環境試料に用いるのが困難である場合が多い。そこで、これらの欠点を満たすような新規吸着剤が必要となる。

特定の物質を選択的に吸着する技術として、分子インプリンティング(図22)を用いた架橋ポリマーがあげられる。この手法では、目的の物質とその物質と相互作用

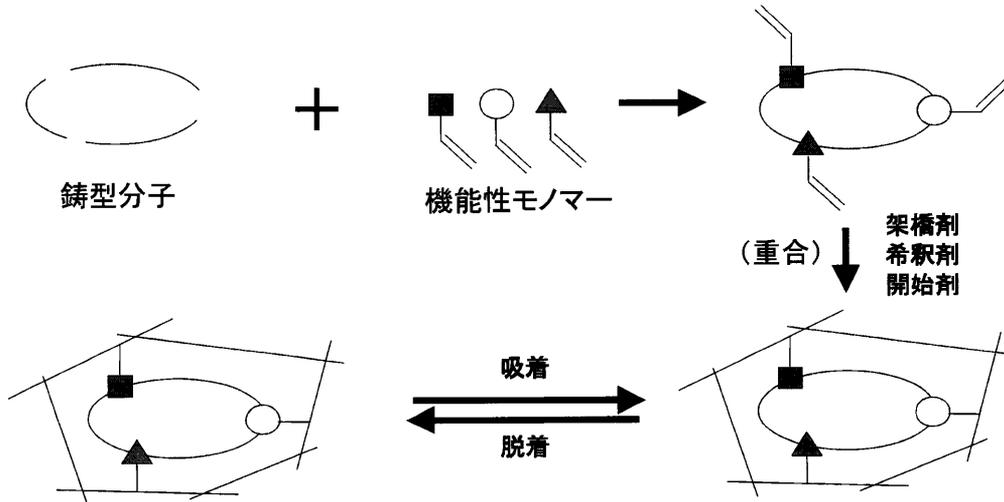
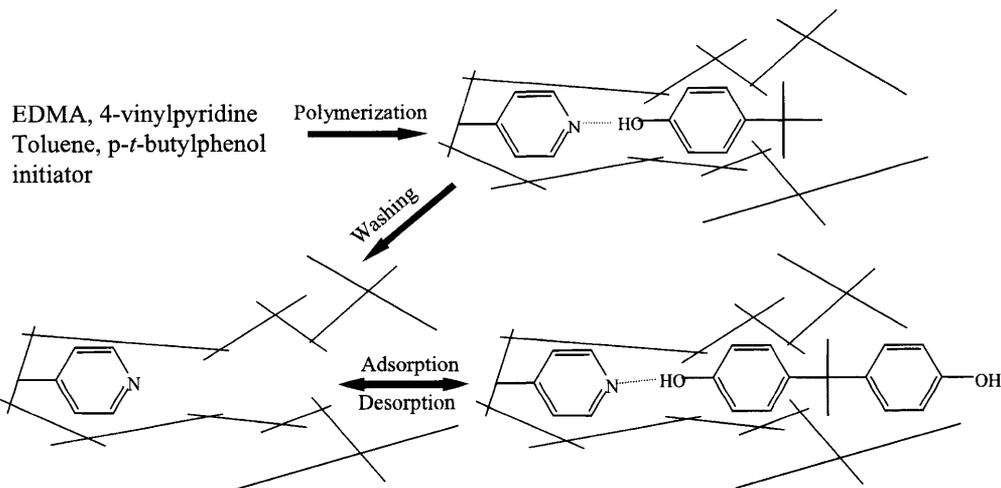


図22 分子インプリンティングの概念図



EDMA; Ethyleneglycoldimethacrylate

図23 ビスフェノール A の吸脱着の概念

用可能な機能性モノマーとを架橋剤の存在下で共に重合することによって、架橋ポリマー内に特異的識別サイトを構築することが可能であり、バイオセンサー、HPLC用充てん剤、医薬品分析など広く適用が試みられている。しかし、この手法では目的の物質を直接鑄型として用いるために、実際に吸着剤として使用する場合にその鑄型物質が溶出する恐れがあり、環境中の微量物質の前処理剤としての使用は困難である。そこで、今回我々は目的物質の化学構造の一部を疑似鑄型分子として用いて、架橋ポリマーを調製し選択的濃縮能の効果についての検討を行った。目的物質には、代表的な環境ホルモン

物質であるビスフェノールAを使用し、疑似鑄型分子として *p-t*-butylphenol (図23)、機能性モノマーとして 4-Vinylpyridine を用いて架橋ポリマー粒子を調製した。

ポリマーの調製には二段階膨潤重合法を用いて、粒子径約10 μ mの粒子径均一ポリマー粒子を調製した。調製したポリマー粒子をガラスカートリッジに充てんし、試料に人工的に調製した含ビスフェノールA水溶液、ならびに実際にビスフェノールAが検出された実環境水を用いて、固相抽出を行いビスフェノールAに対する選択的濃縮効果について検討を行った(図24)。

まず、人工的に調製したフミン質とビスフェノールA

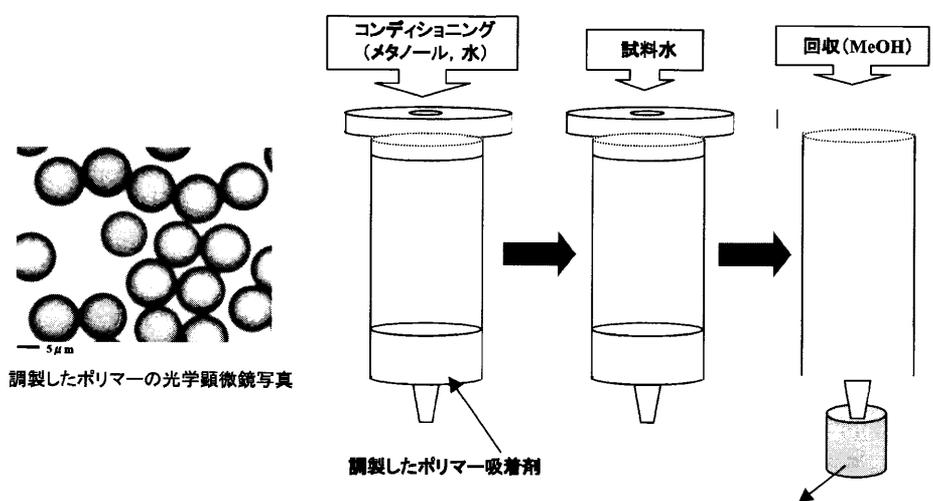


図24 固相抽出の操作法

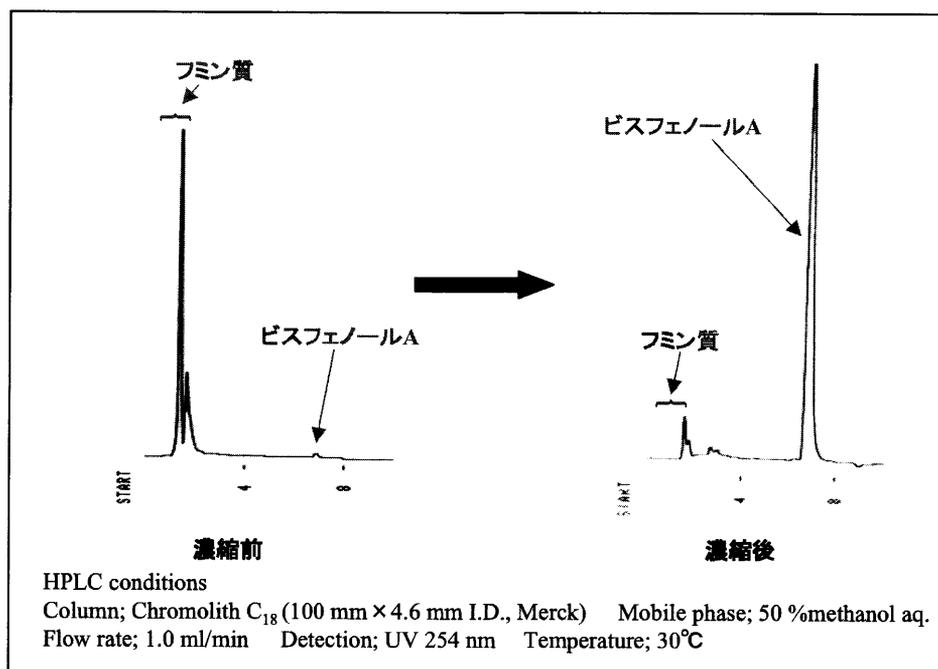


図25 人工試料の固相抽出前後のクロマトグラム

を含む水溶液の濃縮実験の結果を図 25 に示す。濃縮前後の各試料のクロマトグラムより、フェノール系の物質を多く含むフミン質はほとんど濃縮されていないのに対して、ビスフェノール A に対しては濃縮効果が大きく発現していることがわかる。これは、疑似鑄型によって構築された識別サイトの効果が大きく寄与しているものと考えられ、そのため比較的高分子量のフミン質はフェノール系の物質を含むにもかかわらず、ほとんど保持されなかったものと考えられる。

そこで、次に実際にビスフェノール A が検出された実環境水を用いて同様の検討を行った。また、同時に従来疎水性物質の濃縮に用いられるオクタデシル基を有した C₁₈ カートリッジも同様の操作により評価を行い、それぞれのビスフェノール A に対する選択性について比較検討を行った。その結果を図 26 に示す。図に示したクロマトグラムは、C₁₈ カートリッジ、調製したポリマーを用いたカートリッジそれぞれにおける固相抽出後に回収した試料の HPLC 評価の結果である。この結果から分かるように、前処理剤として汎用されている C₁₈ カート

リッジを用いた場合には、多くの夾雑物が濃縮されており、ビスフェノール A のピークがほとんど確認することができない。それに対して、調製したポリマーを用いた場合には C₁₈ の場合と同様に夾雑物も濃縮されているものの、ビスフェノール A のピークがはっきりと確認することができ、調製したポリマーがビスフェノール A を選択的に濃縮されていることがわかる。

以上の実験結果より、目的物質の構造の一部を用いた新規吸着剤が有効的に機能する可能性が示唆された。しかしながら、実環境水を用いた実験結果からも分かるように、目的物質以外の多くの夾雑物を共に濃縮しており、この点のある程度改善する必要があると思われる。また、この手法は今回用いたビスフェノール A だけではなく、その他の有害物質にも適用が可能であると思われる、今後他の物質についても検討を行う予定である。

2.2 内分泌攪乱化学物質の評価法に関する研究

現代社会では多数の化学物質が様々な用途で我々の身近で使用されており、それらの体内への取り込みや環境

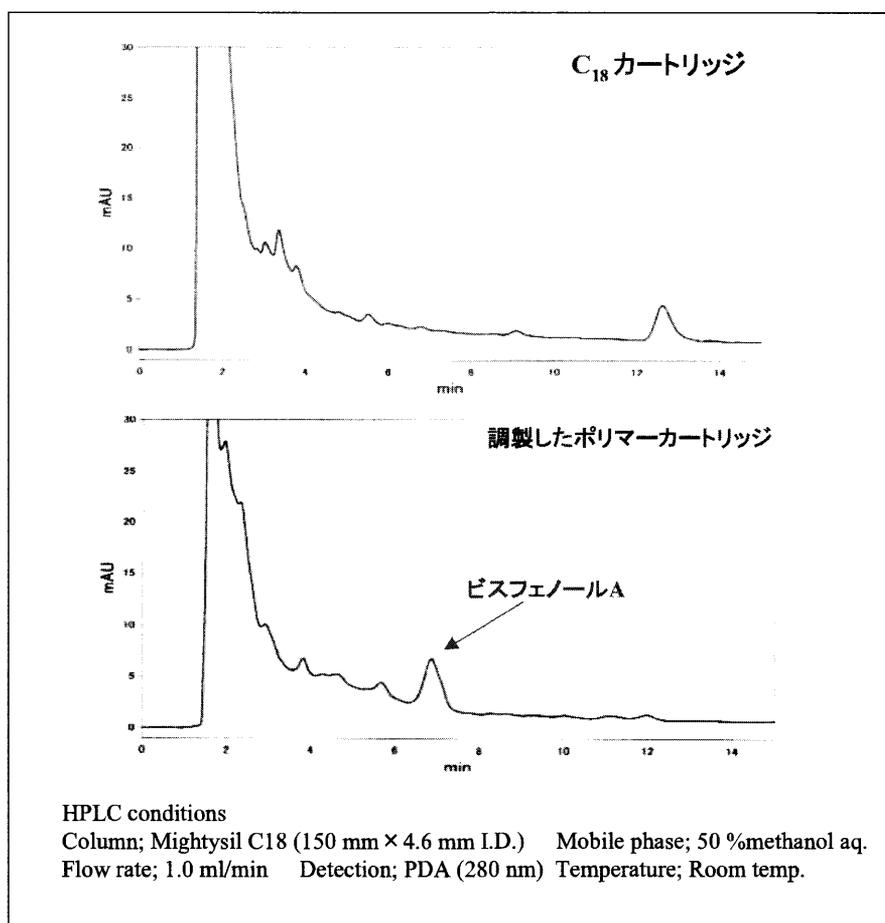


図26 C₁₈ と調製したポリマーのビスフェノール A に対する選択性の比較

への漏出などによる生態系への影響は避けがたいものとなっている。現代社会で必要とされ、生産されてきた化学物質の中には、取り込まれた生体内で内分泌攪乱作用を示すものの存在が明らかになってきた。近年、それら化学物質による人体、あるいは生態系への影響として内分泌攪乱作用が危惧され、化学物質個々のホルモン様活性のスクリーニングや環境での汚染実態を調べるためのモニタリングが試みられつつある。特に、化学物質が体内の性ホルモン受容体に結合することにより、生殖機能や生殖器の発達に影響することの危険性が指摘されており、数多くの化学物質の中から、性ホルモン受容体に結合する化学物質をスクリーニングするための *in vitro* の試験法が各種開発されてきた。それらを大別すると化学物質と受容体との直接的な結合性を調べる受容体結合性試験（バインディングアッセイ）法のような無細胞系と、受容体遺伝子を導入した細胞を用いるレポーター遺伝子アッセイ、細胞のホルモン依存的な増殖を用いるアッセイ法などの細胞系の試験に分けられる。バインディングアッセイ法は、受容体への結合性のみを指標とするため、化学物質が受容体に結合してホルモン様作用を誘発するアゴニスト（agonist）活性と、化学物質が結合することにより、競合する性ホルモンの受容体への結合を阻害し、ホルモン作用を抑制するアンタゴニスト（antagonist）活性を区別することはできない。一方、酵母や培養細胞を用いたバイオアッセイ法では、受容体との結合により細胞内で情報が発現遺伝子に伝達され、酵素の誘導や細胞増殖といったホルモン作用としての遺伝子応答を測定することで化学物質のアゴニスト作用を検索できる試験（アゴニスト試験）のほかに、例えば女性ホルモンの 17β -estradiol と化学物質とを共存させ、エストロゲン受容体へ競合させることで 17β -estradiol のホルモン活性をどの程度抑制するかを測定することにより、化学物質のアンタゴニスト作用を検索できる試験（アンタゴニスト試験）も可能であるが、その抑制効果を受容体を介した作用であるかどうかの判定には受容体結合性試験の結果が必要である。そこで、*in vitro* の試験法として受容体結合アッセイと酵母を用いたレポーター遺伝子アッセイの検討を行った。

2.2.1 エストロゲン受容体結合アッセイ

内分泌攪乱性は最終的には動物を使用した長期間の毒性試験により判断されると考えられているが、これらの

試験の前に高い処理能力を持つ *in vitro* 試験を行うことは、内分泌攪乱性の有無を判定する重要なステップとなりうる。*In vitro* 試験の中でも受容体結合アッセイは、化学物質の受容体結合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。また、動物実験に比べれば、測定時間が短く、コストもそれほどかからない方法である。エストロゲン受容体結合アッセイには幾つかの試験系があるが、通常の実験室で実施可能な試験法として、受容体競合結合アッセイ（ER-ELISA）法と蛍光偏光法を実施した。蛍光偏光法の利点は、ラジオアイソトープを使わず、生理学的な条件下で相互作用を検出でき、また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などである。しかし、この方法では蛍光を持つ物質、溶けにくい化学物質や懸濁物質のある溶液は測定ができないことや、ラット肝 S9 による代謝試験系の構築が困難であるといった問題を有する。ER-ELISA 法は、試料と未標識のリガンド（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、より多くの化合物や試料に適用可能であると考えられた。そこで、ER-ELISA 法によるエストロゲン受容体結合アッセイの欠点と考えられた感度を上昇させることを試み、高感度 ER-ELISA 法を構築することにした。

蛍光偏光法は、エストロゲン受容体と蛍光エストロゲン複合体（ER-ES1）から化学物質が蛍光エストロゲン（ES1）を置換する能力を測定する方法で、10 化学物質（エストラジオール、ビスフェノール A、*m-t*-ブチルフェノール、*p-t*-ブチルフェノール、*p-n*-ペンチルフェノール、*p-t*-ペンチルフェノール、*p-n*-オクチルフェノール、*p-t*-オクチルフェノール、*p-n*-ノニルフェノール、*p*-ノニルフェノール）について Competitors-FP Screen-for-Competitors Kit, ER α （Pan Vera 社）を用いて検討した。蛍光偏光度は Full-Range BEACON[®] 2000（Pan Vera 社）で測定した。結合阻害率、 $I\% = (A_0 - A) / (A_0 - A_{100}) \times 100$ 、（I% は結合阻害率、 A_0 は 0% 阻害における異方性値、 A_{100} は 100% 阻害における異方性値、 A は異方性値。）を求め、IC₅₀ を結合阻害率と濃度の回帰直線から算出し、相対結合親和性（RBA = エストラジオールの IC₅₀ / 化学物質の IC₅₀）を計算した。

ER-ELISA 法でも同様に、10 化学物質 (17 β -エストラジオールは測定できないのでジエチルスチルベストロールを陽性対照とした) について 17 β -エストラジオールのエストロゲン受容体 α に対する結合阻害性を検討した。測定は、Ligand Screening System-Estrogen Receptor α キット (東洋紡) を使用した。各化学物質の測定濃度は 50 % 阻害率を含むように 3 濃度設定した。化学物質はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解後、希釈緩衝液で 1 % DMSO となるように調製した。この化学物質溶液とエストロゲン受容体溶液、17 β -エストラジオール溶液を 96 ウェルの反応プレートにて 37 $^{\circ}$ C、1 時間反応させた。この反応溶液とパーオキシダーゼで標識した 17 β -エストラジオール (エストラジオール HRP) 溶液をエストラジオール抗体固相プレートで 37 $^{\circ}$ C、1 時間反応させた。洗浄液で各ウェルを 3 回洗浄後、洗浄液を完全に除去して 37 $^{\circ}$ C、20 分基質反応させた。反応後、450 nm と 655 nm の波長における吸光度を測定した。1 % DMSO 溶液をブランク、ジエチルスチルベストロール 300 nM を陽性対照とした。

結合親和性は、[B] をブランク試験での吸光度、[S] を本試験の吸光度、[P] を陽性対照試験の吸光度として、結合阻害度 (α) = $([B] - [S]) / ([B] - [P])$ を求めこれを次式により、受容体と化学物質の結合に関する解離定数 (Kd) に近似できる ER α index により評価した。

$$ER \alpha \text{ index} = (1 - \alpha) \times (S \times 3/8 - R \times \alpha) / \alpha$$

α は結合阻害度、S は化学物質濃度 (nM)、3/8 は液量補正定数、R は受容体濃度 (nM)

また、IC 50 を測定した化学物質の濃度とその結合阻害度の回帰直線より求め、ジエチルスチルベストロールに対する相対結合親和性 (RBA = ジエチルスチルベストロールの IC 50 / 測定化学物質の IC 50) を算出した。免疫競合法の利点は、アッセイ方法が簡単で、特別な機器やラジオアイソトープを使わず、多くの化学物質を同時に測定でき、S9 による化学物質の代謝影響も見ることが出来る点にある。特に、化学物質と受容体の結合に特異的な ER α index を指標とすることで、試験結果が実際に受容体結合によるものか、他のメカニズムによるものなのかある程度判定することができる。それぞれの化学物質はどの測定濃度においても同じ ER α index を持つはずであり、もし測定濃度によって ER α index が異なればその化学物質は受容体に対する結合性がないも

のと判断できる。また、化学物質濃度と ER α index が半比例していたら受容体の変性によるものと考えられる。

表 8 に高感度 ER-ELISA 法と ER-ELISA 法、蛍光偏光法による IC 50 値を、表 9 に RBA を示した。ELISA 法の結果と蛍光偏光法の結果はほぼ同じであった。しかし、両測定法において測定濃度範囲内で結合性の低い化学物質の IC 50 は算出できなかった。ER-ELISA 法では弱いエストロゲン様作用を持つ化学物質の測定濃度は測定誤差を避けるために 100 μ M 以上にすることが必要であった。このため、測定方法の感度を高めるための検討を行った。ER-ELISA 法の原理は図 27 で示したように、未標識のリガンド (17 β -エストラジオール) と測定試料を受容体に対し競合的に反応させた後、反応液中の遊離 17 β -エストラジオールの量を酵素免疫競合法により測定するものである。この試験の感度に関連するパラメーターは受容体濃度、リガンド濃度、反応温度、標識リガンド濃度、リガンド抗体濃度である。

表 8 高感度 ER-ELISA 法と ER-ELISA 法、蛍光偏光法による IC 50 値

	高感度法 IC50 (nM)	ER-ELISA法 IC50 (nM)	蛍光偏光法 IC50 (nM)
E ₂	—	—	13
DES	8	17	—
BPA	883	5386	7169
m-t-BP	28776	88347*	176100
p-t-BP	31651	78693*	88440
p-n-PeP	27487	73314	69770
p-t-PeP	9757	76909*	30510
p-n-OP	32792	68068*	32120
p-t-OP	2832	8121	11490
p-n-NP	25625	85600*	28490
p-NP	699	8619	5540

* ER α index からの計算値

表 9 相対結合親和性 (RBA)

化合物	高感度法 RBA	ER-ELISA RBA	蛍光偏光法 RBA
E ₂	—	—	1
DES	1	1	—
BPA	8.82E-03	3.17E-03	1.81E-03
m-t-BP	2.70E-04	1.93E-04*	7.38E-05
p-t-BP	2.46E-04	6.84E-04*	1.47E-04
p-n-PeP	7.97E-04	3.86E-04	4.26E-04
p-t-PeP	2.83E-04	2.22E-04*	4.26E-04
p-n-OP	2.37E-04	2.51E-04*	4.05E-04
p-t-OP	2.75E-03	2.10E-03	1.13E-03
p-n-NP	3.04E-04	1.99E-04*	4.56E-04
p-NP	1.11E-02	1.98E-03	2.35E-03

* ER α index からの計算値

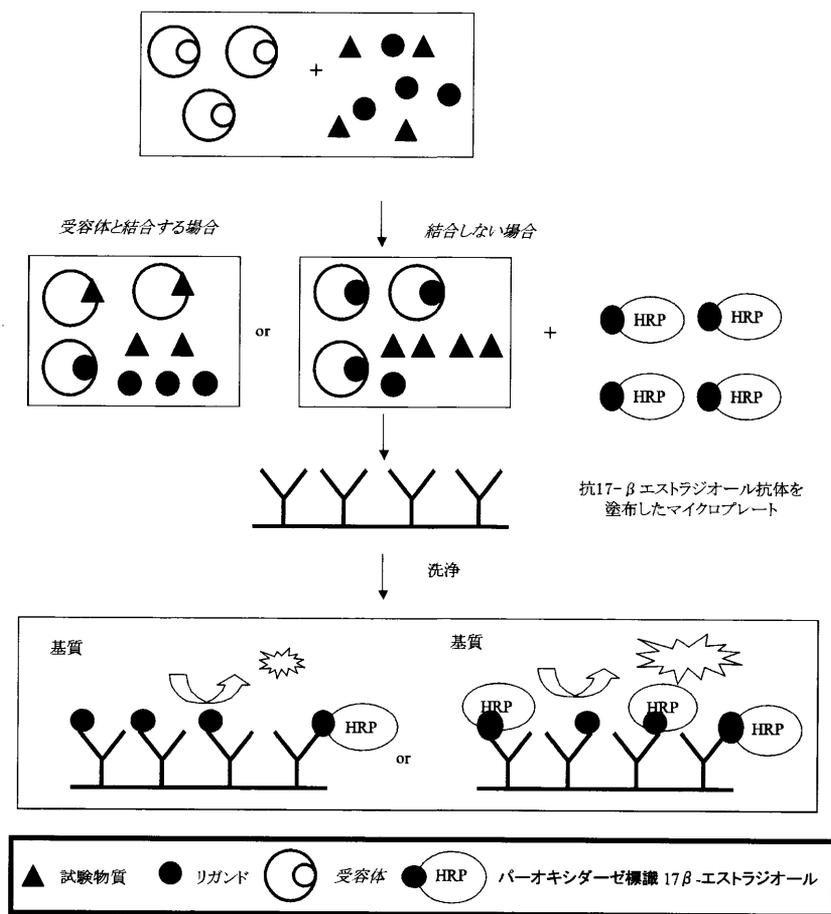


図27 ER-ELISA 法の原理

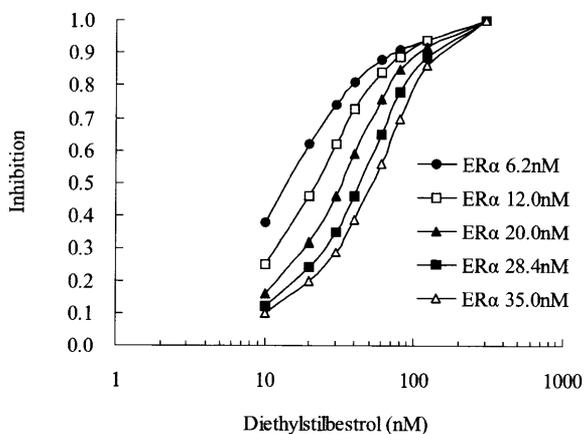


図28 受容体濃度を変えたときの応答曲線

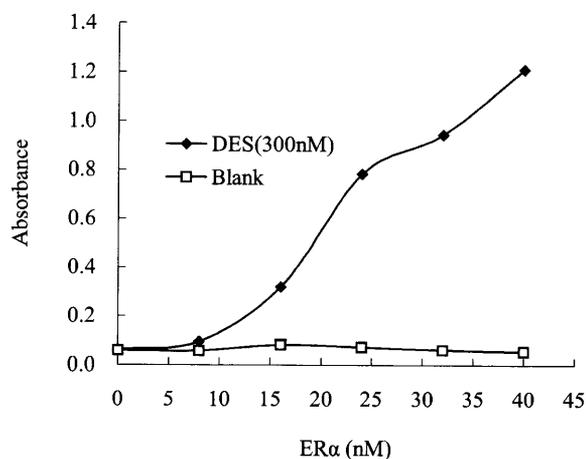


図29 受容体濃度と遊離のリガンド量

図 28 に、受容体濃度を変えたときの応答曲線を示した。受容体濃度が減少すれば、同じ阻害率を得るために必要な化学物質の量も減少する。一方、図 29 で示したように受容体濃度が減少するほど、遊離のリガンド量は増加し、吸光度が低くなる。また、リガンド/抗体反応の反応温度を低下させるとリガンドあるいは標識リガンドの抗体への反応性も減少し、測定濃度範囲は減少する。測定濃度範囲は 37℃ では 1.5 ~ 20 nM だったが、

4℃ では 0.5 ~ 3 nM に減少した (図 30)。4℃ ではリガンドあるいは標識リガンドの抗体への反応性が減少したため吸光度が減少したと考えられ、標識リガンド濃度、固相抗体濃度を増加させ吸光度を高めた。受容体濃度を 36 nM から 12 nM、リガンド濃度を 12.5 nM から 4.2 nM、反応温度を 37℃ から 4℃、固相抗体を 62.5 ng/well から 125 ng/well、基質量を 50 μl から 100 μl に変更し、高感度 ER-ELISA 法とした。図 31 はビス

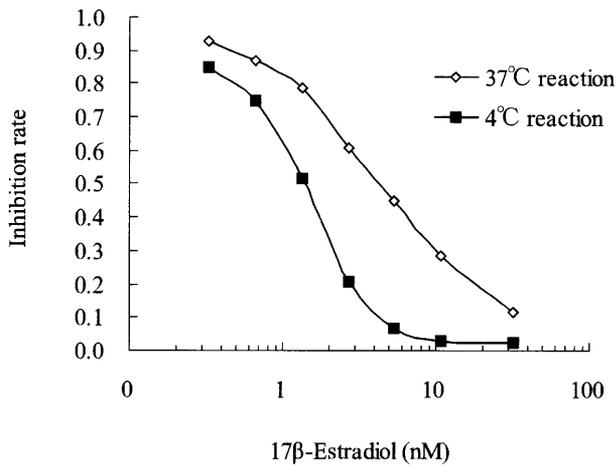


図30 反応温度の比較

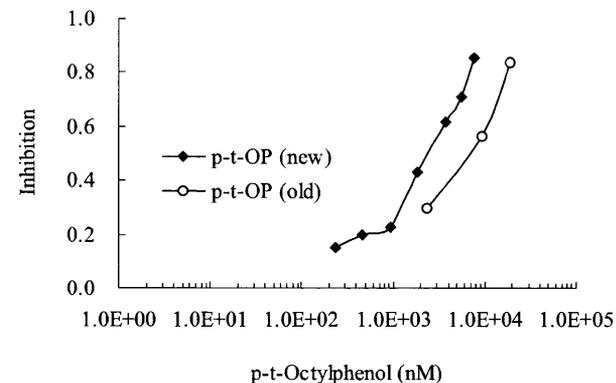
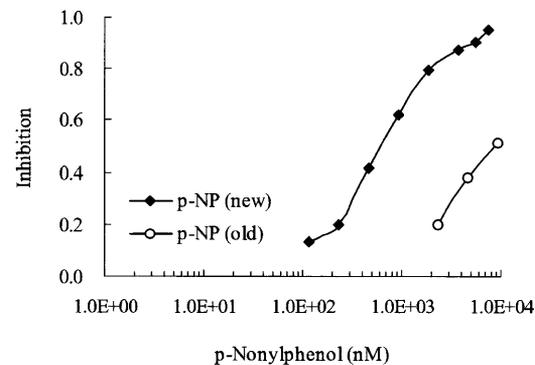
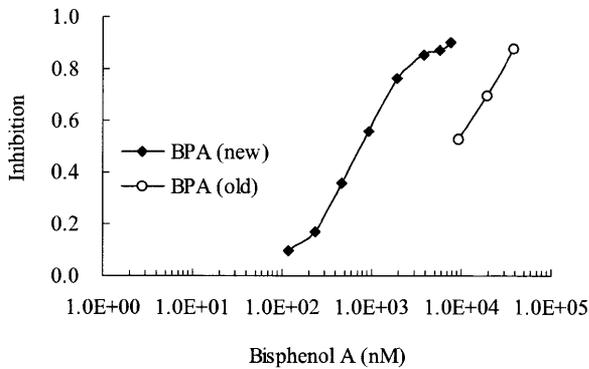


図31 ビスフェノール A, *p*-ノニルフェノール, *p*-*t*-オクチルフェノールの阻害曲線

フェノール A, *p*-ノニルフェノール, *p*-*t*-オクチルフェノールの阻害曲線を示した。同じ阻害率を得るのに高感度 ELISA 法では、より少ない量の化学物質ですみ、エストロゲン結合親和性はより効率的に測定できるようになった。

ビスフェノール A やアルキルフェノール類はエストロゲン様作用を示す内分泌攪乱化学物質として注目を集めており、いくつかの方法により、単独でのエストロゲン活性が報告されているが、環境中では、動物やヒトはこれらの化学物質に同時に曝露される可能性が高い。ビスフェノール A, *p*-ノニルフェノール, *p*-*t*-オクチルフェノール等の弱いエストロゲン様物質について、これらの化学物質を混合した場合の結合活性を比較検討し、化学物質がエストロゲン受容体 α に複合的に作用する場合において、相乗効果や相加効果が認められるかどうかを検討した。図 32 にビスフェノール A の濃度を一定にし、*p*-ノニルフェノールの濃度を変えた場合の結合阻害曲線を示した。全体として、混合物の阻害曲線が化合物単独で測定した阻害曲線の間を通ることから、混合物の受容体への結合活性は、個々の物質和と同等なレベルであると推察された。ビスフェノール A と *p*-ノニルフェノール, *p*-*t*-オクチルフェノールを等モル混合したときの測定からも比較する阻害濃度によって結果がばらついたが、全体としては、相加的な影響と見ることができた。

2.2.2 酵母ツーハイブリッドアッセイ法によるアゴニスト活性測定法の開発

化学物質のホルモン様活性を簡便に検索する試験方法として、は乳類の培養細胞や酵母を用いた *in vitro* による試験系が開発され、内分泌攪乱物質を検討する公的機関などから一次スクリーニング試験法として提示・推奨されている。そのなかで酵母は培養細胞に比べ培養が簡単であり、古くから遺伝子組換えの材料としても利用されており、内分泌攪乱作用研究の目的で、ホルモン受容体遺伝子とそれら作用を発現するためのレポーター遺伝子が組み込まれた試験用酵母株が開発されてきた。特に、内分泌攪乱作用としてもっとも問題視される女性ホルモン様物質の検出系として、我が国では、主に E. J. Routledge と J. P. Sumpter の報告した試験系 (以下、Sumpter の試験系と略) と J. Nishikawa らの酵母 Two-Hybrid System を用いた試験系 (以下、Nishikawa の試

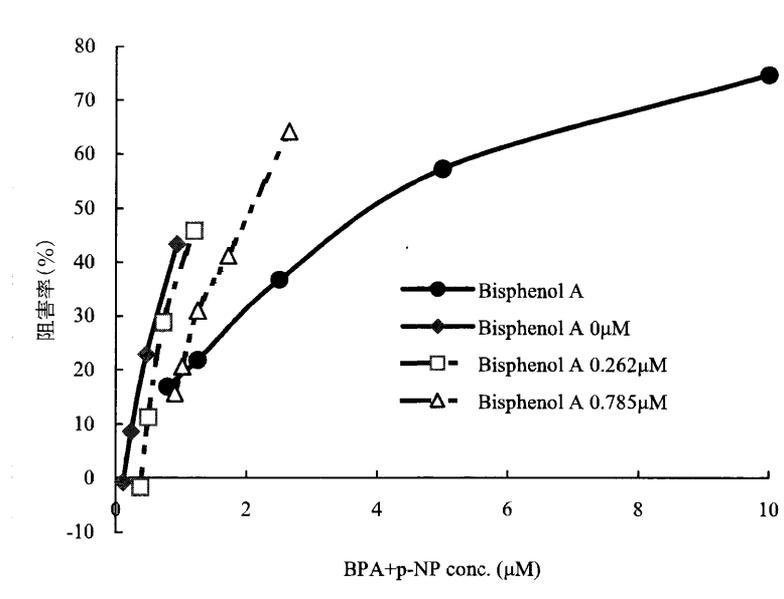


図32 ビスフェノール A と *p*-ニルフェノールが共存した場合の結合阻害曲線

験系と略)が化学物質のスクリーニングや環境水等のモニタリングに使用されている。

Sumpter の試験系は透明プラスチックの 96 ウェルプレートを用いて処理と培養を行い、女性ホルモン様物質が酵母のエストロゲン受容体と結合し、その結果レポーター遺伝子のコードしていた β -ガラクトシダーゼが発現し、酵母から遊離してきた β -ガラクトシダーゼを基質の赤色発色で測定することにより定量する簡便な試験法である。しかしながら、培養に 3 日間と時間を要することや試験中プレートによる培養を無菌的に取り扱う必要があるなどの欠点がある。一方、Nishikawa の試験系は、酵母にエストロゲン受容体遺伝子とコアクチベーター(共役因子)、及び発現用レポーター遺伝子を組み込み、結果として女性ホルモン様物質の受容体への結合で発現する酵母内の β -ガラクトシダーゼ活性を測定する試験系(図 33)であり、約 4 時間程度の短時間の培養で測定できる。しかしながら、酵母内の β -ガラクトシダーゼを測定するためには Sumpter の試験系と異なり酵母の細胞壁を溶解しなければならず、原法ではあらかじめマイクロテストチューブで培養し、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から 96 ウェルプレートに移し、 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。また、分光光度計による比色定量のために測定領域の幅が狭く、感度が低いという欠点があった。

(1) 化学発光法による酵母エストロゲンアッセイ系の開発

多くの化学物質の内分泌攪乱作用をすみやかにスクリーニングし、多数の環境試料を簡便にモニタリングするためには、操作性にすぐれ、かつ高感度の *in vitro* の試験法が望まれているところである。酵母 Two-Hybrid System 法による Nishikawa の試験系は生体でのホルモン作用発現メカニズムを模倣したシステムであり、しかも 4 時間という比較的短い培養時間でホルモン活性を測定できるという長所を持った手法である。そこで、Nishikawa の試験系をもとに培地を改良するとともに 96 ウェルプレート培養法と化学発光によるレポーター遺伝子測定法を取り入れることにより、簡便で操作性にすぐれ、かつ高感度に測定ができる試験法の開発を行った。使用した酵母は酵母 Y 190 株(Clontech 社から導入)にエストロゲン受容体遺伝子、コアクチベーターの発現プラスミド、及び β -ガラクトシダーゼ発現系レポータープラスミドを酵母 Two-Hybrid System 法により導入したものである。

操作性の向上のため、発光測定用黒色 96 ウェルプレートを用いて希釈操作から培養も行い、同一プレートで発現する β -ガラクトシダーゼをプレート用発光測定装置で計測することとした。化学発光による β -ガラクトシダーゼの測定は比色定量法に比べて簡便に底濃度領域から高感度に検出できる利点を有する。まず、96 ウェルプレートで希釈操作、培養、測定までの操作をできるだけ少なくするため、ウェルへの試薬の添加回数を

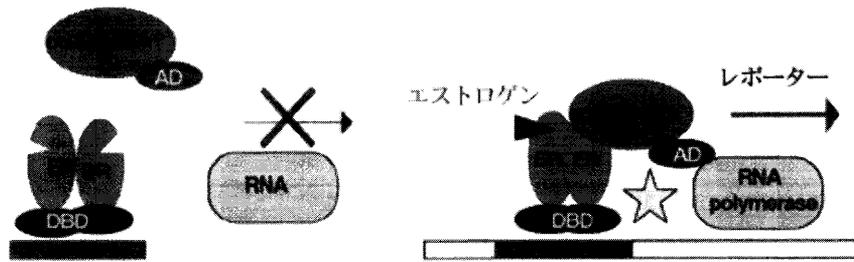


図33 酵母ツーハイブリッド法によるエストロゲンのスクリーニング試験の原理
(左：エストロゲンがない場合、右：エストロゲンがある場合)

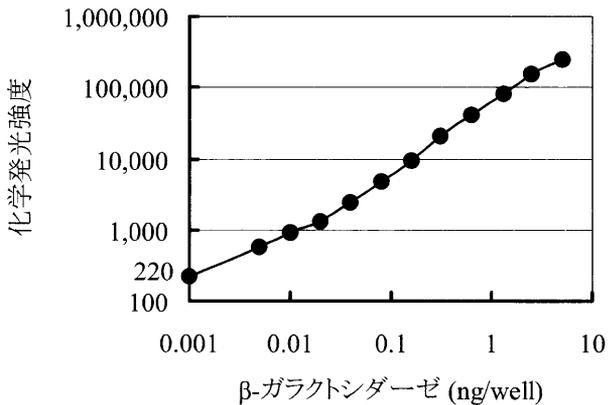


図34 化学発光法による酵母融解液中のβ-ガラクトシダーゼの定量

減らす必要から、酵母を融解するための zymolyase 溶液と化学発光用反応試薬を混合してβ-ガラクトシダーゼの測定が可能か、どうかを試験した。zymolyase 溶液+化学発光反応液の混合液と市販のβ-ガラクトシダーゼ(Wako)を96ウェルプレート内で1時間、37℃で反応させた後、化学発光促進液を添加して測定することで、極めて低いレベルから高いレベルまでの広範囲のβ-ガラクトシダーゼ濃度の検出が可能であることが示された(図34)。

Nishikawaの試験系で用いられているSD培地で試験を行ったところ、化学発光法ではベースラインのβ-ガラクトシダーゼの化学発光強度が異常に高いことが明らかとなった。化学発光法に適した使用培地を検討した結果、Nishikawaらの使用している tryptophan と leucine のアミノ酸を除いたSD培地への dextrose (グルコース)の添加量によってバックグラウンドの発光量に変化することを見いだした。すなわち、従来のSD培地の dextrose 濃度を2%から0.8%に下げることにより、エストロゲンを加えないコントロールでの発光量が著しく減少し、検出感度を高めることに成功した。この培地を改良SD培地(以下、MSD培地と略)として使用した。

酵母ツーハイブリッドアッセイにおける培地中の dextrose 濃度がレポーター遺伝子の発現にどのように関与しているかは様々な要因が作用するため、今回のデータだけでは説明は困難である。しかしながら、dextroseの添加濃度を0.8%に下げたことで、結果として本試験法の高感度測定が可能となった。試験に供する酵母はMSD培地に接種し、30℃で振とうしながら24時間培養を行い、分光光度計を用いてOD_{595nm}での濁度をおおよそ1.0に調整した後、10%にグリセロールを添加したMSD培地に十分の量加えフリージングチューブに分注して、凍結(-80℃)保存すればよい。

化学物質は生体内に取り込まれると肝臓などの薬物代謝酵素で代謝される。代謝生成物のエストロゲン活性を検討することは生体への影響を考えるうえで重要である。ラット肝S9を用いた+S9試験法も開発した。今回、自動分注希釈装置を96ウェルプレートへの培地及び酵母浮遊液の分注や倍率希釈操作に用いることで、手動のマルチチャンネルマイクロピペットで行う操作に比べて、労力の削減と迅速化につながり、多試料のスクリーニングテストが可能となった。本手法は、1日で多検体の処理ができるように、設計したものであり、準備段階の酵母培養の操作を除き、試験操作自体には滅菌処理を必要としない点が、他のバイオアッセイと比べ優れている。簡便なエストロゲンアッセイ系を開発するにあたり、目標を多試料(10試料以上)を短時間(1日以内)に、96ウェルプレートのみで希釈操作から培養及び測定が連続的にできる操作性にすぐれた高感度アッセイシステムとした。P450を誘導したラット肝S9による代謝活性化した試料(+S9)と代謝活性化しない試料(-S9)のエストロゲン活性を測定できる方法として最終的に完成した操作は、図35のとおりである。

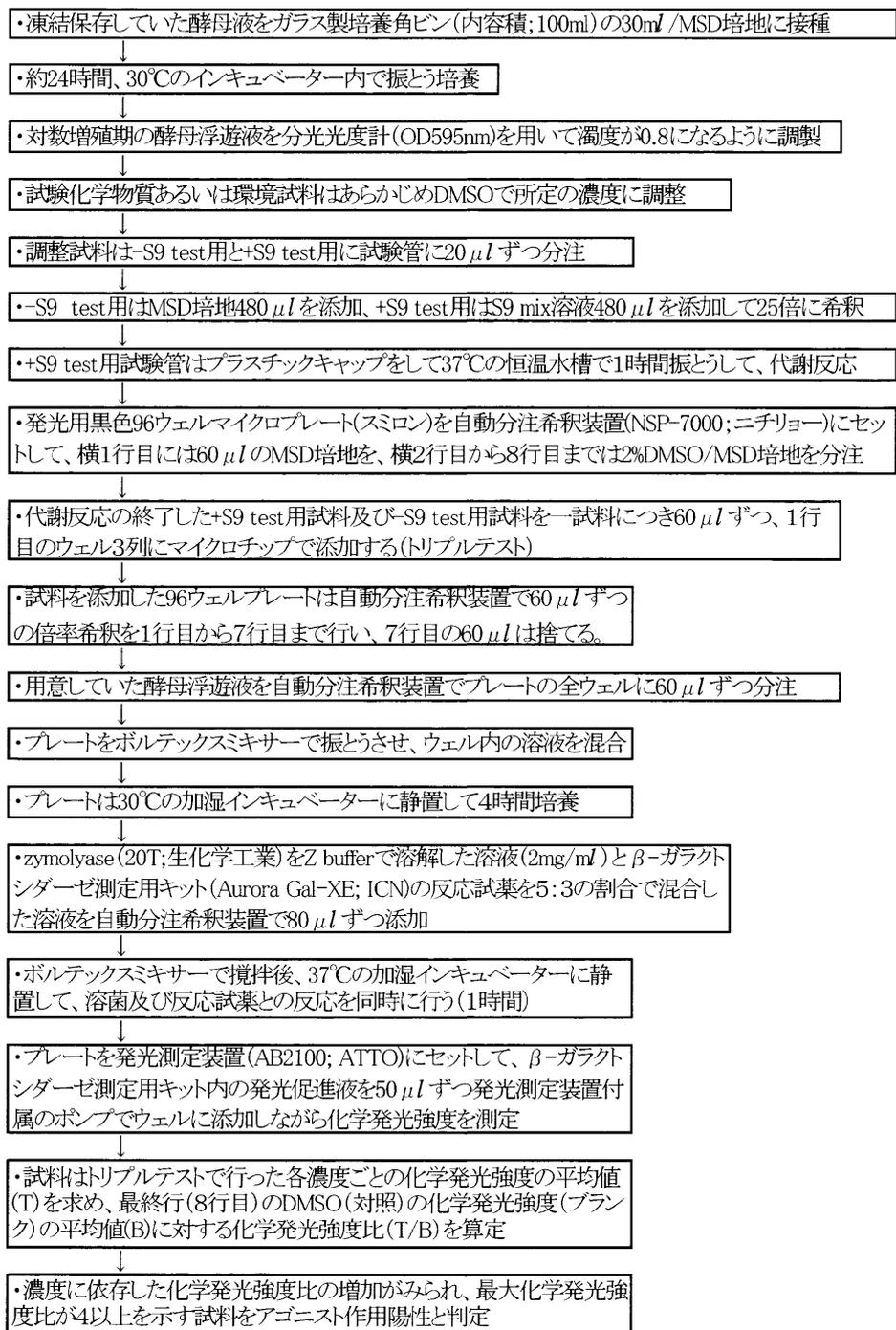


図35 酵母ツーハイブリッドアッセイ法によるアゴニスト活性の測定法

(2) 化学物質の酵母ツーハイブリッドアッセイによるスクリーニング

エストロゲン活性のアゴニスト作用を有する化学物質を用いて、開発したエストロゲンアッセイ系のアゴニスト試験の検討を試みた。まず、エストロゲン活性を示すステロイド化合物のアゴニスト試験を行った。いずれの化学物質も比較的強いアゴニストとしてのエストロゲン活性を示した(図36)。これら化学物質のアゴニストとしてのエストロゲン活性の強さを評価する方法として、

化学物質の各濃度における化学発光比がつぎの希釈濃度の2倍以上を示すような試験濃度領域で回帰直線式を求め、その計算式から化学発光比を10倍誘導する濃度を10倍影響濃度(EC_{x10})として算定した。女性ホルモンのEC_{x10}値(濃度)が低い方、すなわち活性の強い方から列記すると ethynylestradiol; 0.085 nM, E2; 0.14 nM, diethylstilbestrol; 0.47 nM, estrone; 1.1 nM, 17 α -estradiol; 2.4 nM, estriol; 48 nM となった。Sumpterの試験系で同様の物質を検討した Routledgeら

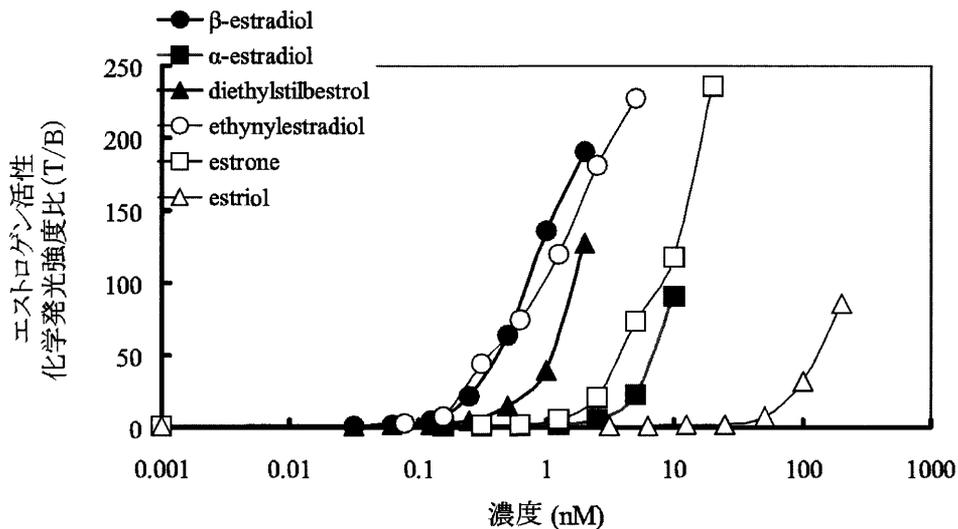


図36 エストラジオール関連物質及び合成女性ホルモンの酵母アッセイによるエストロゲン活性

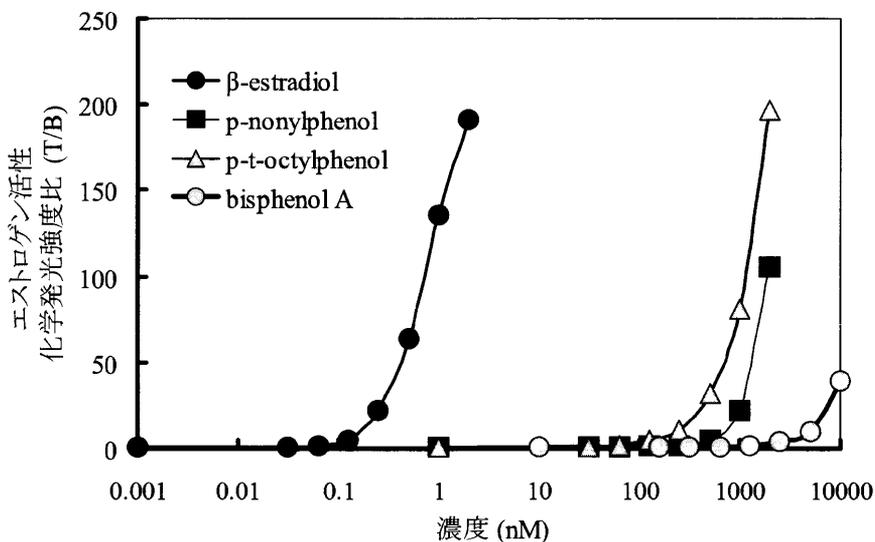


図37 酵母アッセイによるエストロゲン活性アゴニスト試験の例

は、E₂、estrone、diethylstilbestrol、17 α -estradiol、estriolの順に活性が強いことを報告しており、本試験法とはestroneとdiethylstilbestrolが逆の結果となったがほぼ一致する結果であった。エストロゲン活性が知られている*p*-ノニルフェノール、*p*-*t*-オクチルフェノール、及びビスフェノールAについて検討したところ、陽性対照に用いたE₂に比べてそれらのエストロゲン活性は高濃度領域にシフトし、濃度的には比較的弱いことが示されたが、いずれも比較的強い発光比を示し、顕著なアゴニスト作用が確認された(図37)。これら化学物質のEC_{x10}値を算定したところ、*p*-*t*-オクチルフェノール；67 nM、*p*-ノニルフェノール；550 nM、ビスフェノールA；3,500 nMであった。これら化学物質はいずれもステロイドホルモンに比べてエストロゲン活性は弱いこ

とが示された。-S₉試験ではエストロゲン(アゴニスト)活性はみられないが、ベンゾ(a)ピレン、メトキシクロル、ピレン、及び1-ニトロピレンに+S₉試験では顕著な量-反応性のエストロゲン活性が認められた(図38)。これら化学物質のEC_{x10}値を算定したところ、ベンゾ(a)ピレン；1,800 nM、メトキシクロル；3,000 nM、ピレン；5,100 nM、1-ニトロピレン；12,000 nMであった。本試験法はわずかな β -ガラクトシダーゼの発現も有意に測定できることから、+S₉試験のように活性の弱い物質については有効なエストロゲンアッセイ系であることが示唆された。なお、ベンゾ(a)ピレンについては、正宗らがベンゾ(a)ピレン水酸化体単体のエストロゲン活性を酵母及びバインディングアッセイで調べており、2-ヒドロキシあるいは3-ヒ

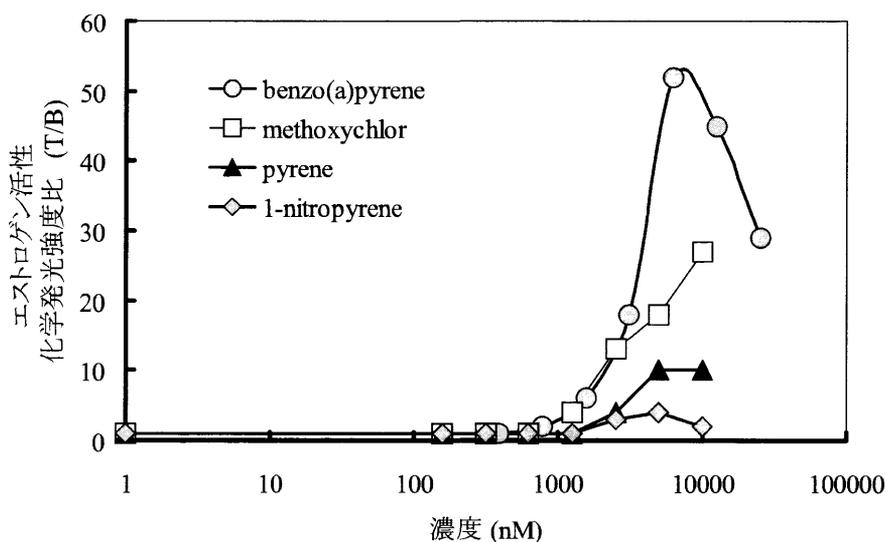


図38 酵母アッセイのS9代謝 (+ S9 test) による化学物質のエストロゲン活性の測定例

ドロキシベンゾ(a)ピレンにアゴニスト作用があることを認めている。

(3) 各種生物のERとそのサブタイプを導入した遺伝子組換え酵母の開発

脊椎動物のエストロゲン受容体遺伝子の相同性は比較的高いと考えられているが、ヒメダカに対してアルキルフェノール類が比較強いエストロゲン活性を示すことや、*in vitro* 結合試験においてヒトエストロゲン受容体(ER)と比較してヒメダカERはアルキルフェノールに対して強く結合することが報告され、アルキルフェノール類のエストロゲン作用に種間差のあることが示唆されている。また、生体内には同一リガンドに対する受容体のサブタイプがいくつかの存在することが知られている。これら受容体の機能については不明な点が多いが、ヒトのER α とER β では、エストロゲンとの反応性に違いが見られることが知られている。内分泌攪乱化学物質の影響を評価する上で、さまざまな生物の感受性の違いや受容体の種類の違いを試験できる系が必要であろう。これらを比較検討する第1歩として、ラットEr α 、ヒトER α 、ER β の酵母アッセイ法に加え、ヒメダカのER α 、ER β 、ER γ を導入した酵母アッセイ法を新たに構築した。このため、ヒメダカER α 、ER β 、ER γ の受容体結合部位(ヒトEr α の247番目のアミノ酸より下流に相当する領域)をクローニングし、リガンド依存的な共役因子(TIF2)とERの相互作用を β -ガラクトシダーゼの活性に基づいて測定する酵母ツーハイブリッドアッセイ系を導入した。アッセイ法の変更はなく、構築

した組換え酵母を試験物質と4時間培養後、発現した β -ガラクトシダーゼの発現量を化学発光法によって測定し、化学発光強度をバックグラウンドの10倍となる濃度を基準に、エストラジオール濃度に換算し、試験物質のエストラジオールに対する比活性を求めた。

ヒメダカER α を用いた場合、試験した化合物のエストラジオールに対する比活性は、ヒトER α を用いた場合と比べて明らかに高く、ヒメダカER α の化学物質に対する特異性がヒトER α と比べて低いことが推測された(表10)。また、ヒトER α ではn-アルキルフェノールとt-アルキルフェノールの活性は10倍以上異なる場合があるのに対して、ヒメダカER α ではそのような傾向は認められていない。また、ヒメダカER β はt-アルキル基を持つアルキルフェノール類に対してはエストロゲン活性を示さず、ヒトER β と異なる特異性を示した。ヒメダカER β を用いる受容体結合試験によると、4-t-オクチルフェノールや4-n-ニルフェノールは、ヒトER α の10倍以上、ヒメダカER α の10分の1程度の強さで結合することが報告されており、ヒメダカER β を用いた本アッセイで活性を示さなかったことから、4-t-アルキルフェノールは、ヒメダカER β のアンタゴニストとして働く可能性が示唆された。

ヒメダカER α を用いた場合、植物エストロゲンとされるいくつかの物質では、Genistein, Coumestrol, Biochanin A, Kaempferol, Apigenin, Equalに0.1%以上の比活性が認められた(表10)。ヒトでは植物エストロゲンに対してER β の方がER α より高い比活性を示す傾向にあったが、ヒメダカではER β はCoumestrolに対し

表10 17β-Estradiolの活性を100にしたときの酵母 Two-hybrid 法による比活性

	hERα	hERβ	mERα	mERβ	mERγ
17β-Estradiol	100	100	100	100	100
Estriol	0.46	0.47	— ¹⁾	0.27	— ¹⁾
Estrone	16	21	17	5.4	4.2
4- <i>s</i> -Butylphenol	0.0021	0.0055	0.051	0.0091	0.0029
4- <i>t</i> -Butylphenol	— ²⁾	0.0041	— ²⁾	— ²⁾	— ²⁾
4- <i>n</i> -Pentylphenol	0.011	0.036	0.19	0.026	0.055
4- <i>t</i> -Pentylphenol	0.0098	0.020	0.16	— ²⁾	0.0030
4- <i>n</i> -Octylphenol	0.0033	0.0014	0.16	0.0056	0.014
4- <i>t</i> -Octylphenol	0.21	0.066	0.44	— ²⁾	0.015
4- <i>n</i> -Nonylphenol	0.0025	0.00088	0.085	0.0067	0.011
4-Nonylphenol	0.033	0.018	0.26	— ²⁾	0.021
Bisphenol A	0.0042	0.0033	0.029	— ²⁾	— ²⁾
Bisphenol B	0.0049	0.0036	0.11	0.0010	0.00059
Genistein	0.051	0.38	0.35	0.055	0.29
Genistin	— ²⁾	— ²⁾	— ²⁾	0.0023	0.0011
Coumestrol	0.41	1.8	1.2	3.3	0.90
Daidzin	— ²⁾				
β-Sitosterol	— ²⁾				
Biochanin A	0.018	0.028	0.13	0.054	0.030
Quercetin Dihydrate	— ²⁾	— ²⁾	— ²⁾	0.0014	— ²⁾
Kaempferol	0.0015	0.0054	0.11	0.043	— ²⁾
Phloretin	— ²⁾	— ²⁾	0.073	0.0045	— ²⁾
Apigenin	0.00049	0.0044	0.26	0.11	— ²⁾
4',5,7-Trihydroxyflavanone	— ²⁾	0.0013	0.030	0.011	— ²⁾
Crysin	0.00034	0.0037	0.058	0.029	0.00083
Luteolin	— ²⁾	— ²⁾	— ²⁾	0.00048	— ²⁾
Indole-3-Carbinol	— ²⁾	— ²⁾	0.049	0.016	0.00068
Hesperetin	— ²⁾	— ²⁾	— ²⁾	0.00075	— ²⁾
Equol	0.043	0.13	0.32	0.25	0.039
Enterolactone	— ²⁾				
Formononetin	— ²⁾	— ²⁾	— ²⁾	0.0026	— ²⁾

1) 試験濃度100nM以下で活性が未検出 2) 試験濃度10μM以下で活性が未検出

表11 エストロゲン受容体リガンド結合領域のアミノ酸配列の相同性
(数値は各受容体間の Identity を示す, h: ヒト, m: メダカ)

	hERα	hERβ	mERα	mERβ	mERγ
hERα	—	58.5	64.9	57.5	57.0
hERβ	58.5	—	60.4	66.0	65.4
mERα	64.9	60.4	—	57.3	55.3
mERβ	57.7	66.0	57.3	—	74.3
mERγ	57.0	65.4	55.3	74.3	—

て高い比活性を示すのみであり、ヒトとは異なった傾向を示した。また、ヒメダカ ERγ は Genistein と Coumestrol 以外に 0.1 % 以上の比活性を示さず、エストラジオールに対する特異性が高いことが示された。本研究から ER の化学物質に対する活性は、生物種やサブ

タイプ間で異なることが明らかとなり、生物種間で化学物質ごとに感受性が異なる可能性が示された。

表 11 にヒトとメダカの ER のリガンド結合領域 (LBD) のアミノ酸の一次配列の相同性を示した。同じサブタイプ間で 65 % の相同性がある一方、異なるサブ

タイプ間では約60%の相同性しか示していない。4-tert-オクチルフェノールはヒメダカER α に対してヒトER α と同様の強い活性を示したが、ERサブタイプのアシルフェノール類および植物エストロゲンに対する活性とERの相同性の間には相関関係が見られなかった。また、エストロゲン受容体として働くために重要であると考えられているリガンド結合ポケット（鍵穴）に面しているアミノ酸残基や転写活性化領域（AF-2 domainなど）もER間で高度に保存されており、ERの化学物質に対する活性とアミノ酸の一次配列の間には相関が見られなかった。

このようにERの種差やサブタイプ間で応答性の違いが認められることから、各種ERの生体内での機能については今後さらに検討する必要があるが、ER受容体を用いた化学物質のエストロゲン作用のスクリーニングには、ヒトER α 以外のER受容体についても検討を進める必要があると考えられた。

現在までに作成あるいは入手した酵母ツーハイブリッドアッセイ法のための遺伝子組換え酵母を表12にまとめた。これらの酵母を用いたアッセイも基本的に、上記に示した方法で行えることを確認している。

2.2.3 酵母ツーハイブリッドアッセイ法によるアンタゴニスト活性測定法の開発

これまで、化学物質のバイオアッセイ法を用いた内分泌攪乱作用のスクリーニングは、主にエストロゲン活性としてアゴニスト作用に着目して試みられてきた。しかしながら、エストロゲン・アゴニストである化学物質の

表12 酵母ツーハイブリッドアッセイのための遺伝子組換え酵母のリスト

ホルモン	種	受容体のタイプ	略称
エストロゲン	ヒト	α	hER α
	ヒト	β	hER β
	ラット	α	rER α
	カエル*	α	xER α
	メダカ	α	mER α
	メダカ	β	mER β
	メダカ	γ	mER γ
アンドロゲン	ヒト	-	hAR
	ラット	-	rAR
甲状腺ホルモン	ヒト	α	hTR α
	ヒト	β	hTR β
	ラット	α	rTR α

*:アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)

活性は、生体内の性ホルモンに比べて数千分の一以下であるものがほとんどである。一方、化学物質のエストロゲン・アンタゴニスト作用は、受容体に結合することで競合する性ホルモンの作用を抑制するため、生体内でのホルモンの攪乱作用としては、アンタゴニスト作用もアゴニスト作用と同様に評価する必要がある。

(1) エストロゲン・アンタゴニスト試験法

酵母 Two-Hybrid System による高感度で迅速なアッセイ系を開発したが、エストロゲン・アンタゴニスト試験法についても、17- β -estradiol (E2) を添加した培地中で化学物質との競合反応により、E2の活性抑制率を指標とした手法によりアッセイが可能である。酵母によるエストロゲン・アンタゴニスト試験では、試験化学物質と女性ホルモンE2のエストロゲン受容体への競合反応を行い、E2の強いホルモン作用をどの程度押さえたかを調べる。アンタゴニスト活性測定法は、2.1.2のアゴニスト試験法と、ほぼ同様の操作ではあるが、化学物質とE2を共存させ曝露する点と、試験物質の酵母に対する毒性影響（増殖阻害や転写に対する阻害作用）なのか、エストロゲン受容体への結合による影響なのかを区別して評価しなければならない点が大きく異なる。

リガンド (E2) の培地への添加濃度の多少はアンタゴニスト活性の強弱を左右する重要な因子であり、リガンドが少ない方が、必然的に同一試験濃度での結合阻害率 (アンタゴニスト活性) は高くなる。アンタゴニスト試験法の信頼性はリガンドによるアゴニスト活性をどれだけ高感度に再現性よく測定できるかが重要である。E2のアゴニスト活性は約50 pM付近の濃度からレポーター遺伝子発現酵素である β -ガラクトシダーゼの増加が認められ、250 pMでの化学発光強度 (CLN) は2,800

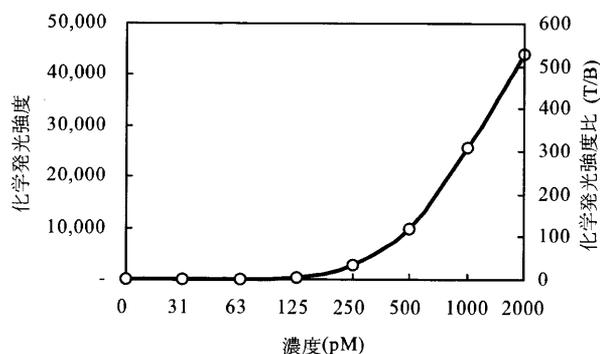


図39 リガンド (E2) の培地への添加濃度と発光強度との関係

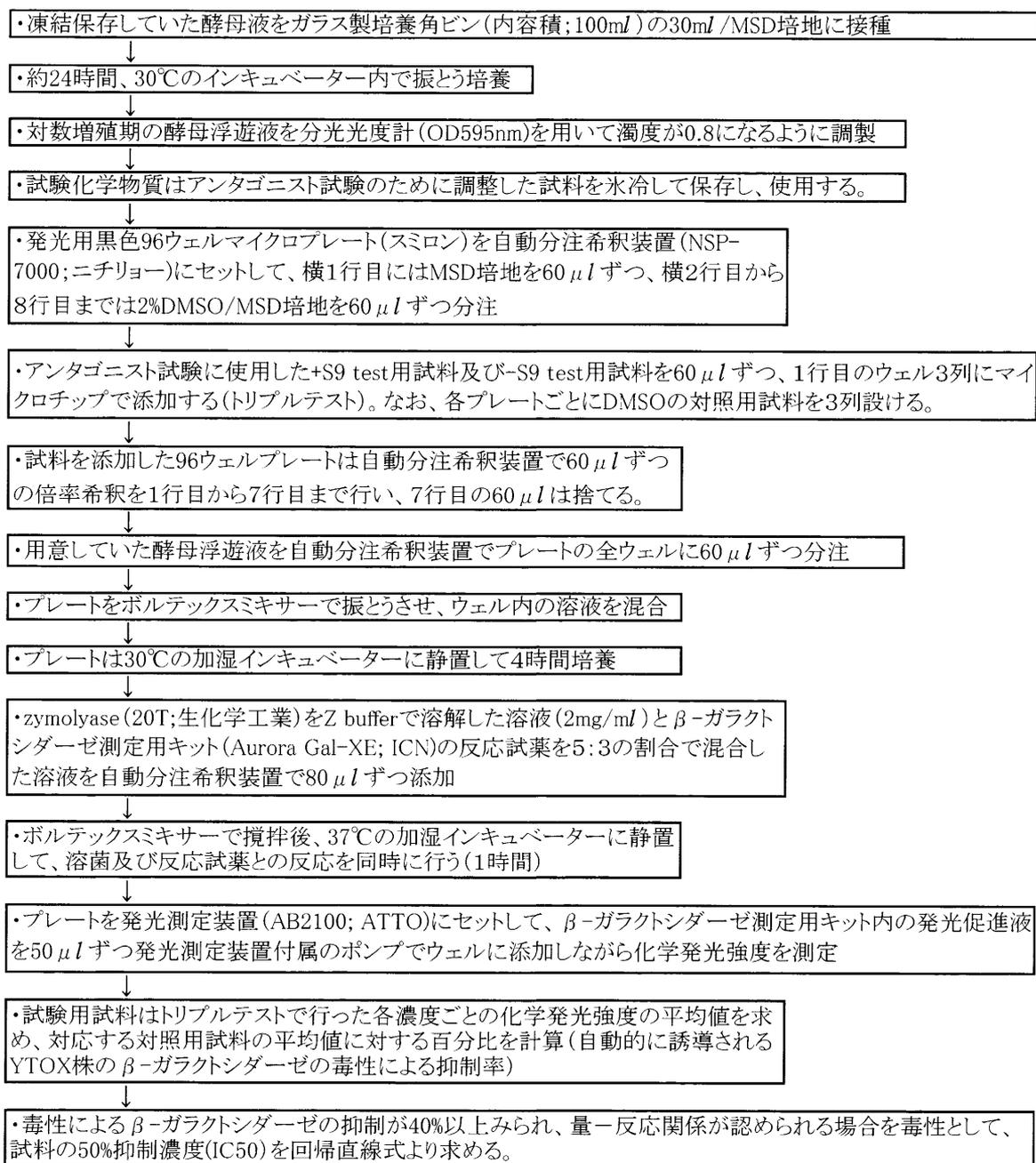


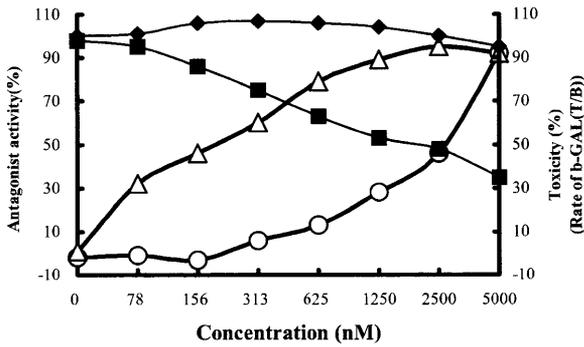
図 41 酵母 YTOX 株を用いる酵母毒性試験法

験を酵母エストロゲンアッセイ法の補助試験として採用することを検討したが、アンタゴニスト試験に用いる酵母とは生物種が異なることや曝露(処理)時間が異なるため、アンタゴニスト試験における酵母への毒性作用の評価に十分対応しているとは言い難かった。化学物質の酵母への毒性作用を評価するために、元株(Y190株)が同じであり、受容体結合性に依存しないでレポーター遺伝子発現酵素のβ-ガラクトシダーゼを誘導する遺伝子導入酵母株(YTOX株)を作成して、アンタゴニスト試験と同一の処理システムによる毒性試験法を開発した。酵母ツーハイブリッド法によるアンタゴニスト活性

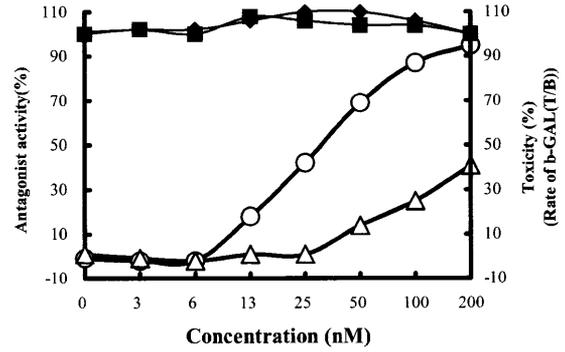
の測定法を図40に、毒性効果を調べる手法として、酵母YTOX株を用いる毒性試験(酵母毒性試験と略)法を図41に示した。

化学物質のエストロゲン・アンタゴニスト作用は、化学物質の試験濃度において、酵母のアンタゴニスト試験でアンタゴニスト作用の指標である EC_{50} 値が算定でき、酵母毒性試験で毒性作用が認められないか、あるいは毒性作用の指標である IC_{50} 値が EC_{50} 値の4倍以上を示した場合を陽性と評価した。

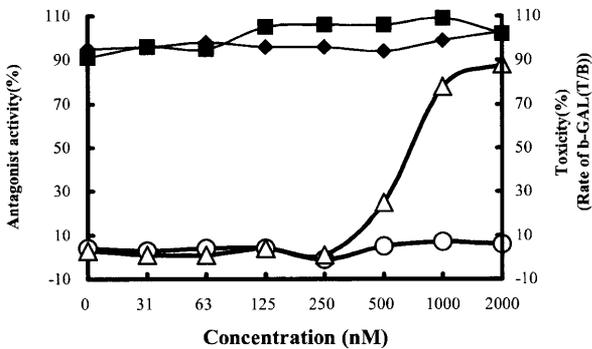
4-hydroxy-tamoxifen (4H-TF)



triphenyltin chloride (TPT)



tamoxifen (TF)



tributyltin chloride (TBT)

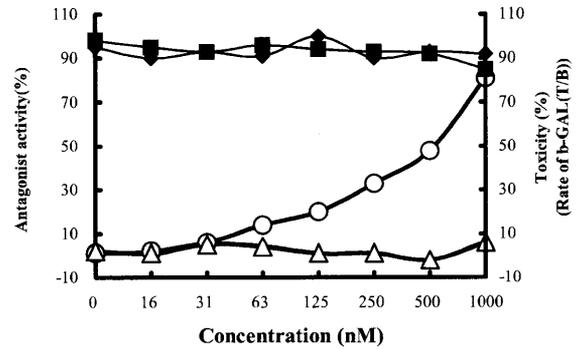


図42 4-hydroxy-tamoxifen (4H-TF) と tamoxifen (TF) の-アンタゴニスト試験結果
アンタゴニスト活性 (左軸): S9 (○), +S9 (△),
毒性 (右軸): -S9 test (◆), +S9 test (■).

図43 TPT と TBT の-アンタゴニスト試験結果
アンタゴニスト活性 (左軸): S9 (○), +S9 (△),
毒性 (右軸): -S9 test (◆), +S9 test (■).

(2) 有機スズのエストロゲン・アンタゴニスト活性

本手法の応用として船底防汚塗料として広く用いられてきた有機スズを用いた。有機スズは海洋汚染を引き起こし、巻き貝の一種であるイボニシのインボセックスを引き起こすことが知られている有機スズのトリブチルスズとトリフェニルスズについて、エストロゲン・アンタゴニスト活性の測定を行った。トリブチルスズやトリフェニルスズはこれまで性ホルモン受容体への結合を介さない内分泌攪乱物質として注目され、酵母によるエストロゲン・アゴニスト試験でも陰性であった。しかしながら、開発した酵母によるエストロゲン・アンタゴニストアッセイ系を用いて塩化トリフェニルスズ (TPT) 及び塩化トリブチルスズ (TBT) のアンタゴニスト作用について検討を試みたところ、両者とも陽性の結果を得た。図42, 43にはTPTとTBTの両有機スズ化合物、及び陽性対照とした4-ヒドロキシ-タモキシフェンとその前駆体であるタモキシフェン (TF) のアンタゴニスト試験及び毒性試験の結果を示した。陽性対照とした4

H-TFは0~5,000 nMの処理濃度で、-S9試験では濃度に依存したアンタゴニスト活性 (EC₅₀; 2,500 nM) を示し、毒性作用は認められなかったが、+S9試験では毒性作用 (IC₅₀; 2,000 nM) が認められたものの、強いアンタゴニスト活性 (EC₅₀; 210 nM) が認められた。TFは0~2,000 nMの処理濃度で、-S9試験ではアンタゴニスト作用も毒性作用も検出されなかったが、+S9試験ではアンタゴニスト活性 (EC₅₀; 740 nM) が濃度に依存して認められ、しかも毒性作用は認められなかった。TFはS9の薬物代謝酵素で水酸化されることによりアンタゴニスト作用を獲得することが知られている。化学物質の薬物代謝酵素による代謝試験 (+S9試験) をアンタゴニスト試験に取り入れることは、アゴニスト試験におけるbenzo(a)pyreneやmethoxychlorなどのようにエストロゲン・アゴニスト前駆物質の検出手法と同様、化学物質のエストロゲン・アンタゴニスト前駆物質の検出手法として重要であることが示された。

試験に供したTPTは0~200 nMの処理濃度で、

-S9 試験では濃度に依存したアンタゴニスト活性 (EC_{50} ; 32 nM) を示し, +S9 試験ではアンタゴニスト活性 (EC_{50} ; 250 nM) は-S9 試験より弱まる傾向が認められ, -S9, +S9 の両試験とも毒性作用は認められなかった。TPT はラット肝 S9 により代謝化すると, 主な代謝物として水酸化体の diphenyl-*p*-hydroxyphenyltin chloride ができることが NMR により同定された。TPT は, TF とは逆に代謝されて水酸化体になるとアンタゴニスト作用がなくなることが示唆された。TBT は 0~1,000 nM の処理濃度で, -S9 試験では濃度に依存したアンタゴニスト活性 (EC_{50} ; 560 nM) を示し, +S9 試験ではアンタゴニスト作用は消失した。なお, -S9, +S9 の両試験とも毒性作用は認められなかった。酵母によるエストロゲン・アンタゴニストアッセイ系を用いたスクリーニング試験の結果, TPT 及び TBT はエストロゲン・アンタゴニスト作用を有することが認められた。

TPT 及び TBT が直接的にエストロゲン受容体と結合性を有するかをバインディングアッセイ法 (ER-ELISA) により比較検討したところ, TPT は, -S9 試験ではリガンドの 50% 結合阻害濃度 (IC_{50} 値) が 11 μ M, +S9 試験では 40 μ M を示し, また TBT は, -S9 試験では毒性が強く結合性の測定は不能であったが, +S9 試験では IC_{50} 値が 78 μ M を示し, 両者とも陽性の結果が得られた。有機スズ化合物の TPT のアンタゴニスト作用 (EC_{50} ; 32 nM) は陽性対照として用いた 4H-TF のアンタゴニスト作用 (EC_{50} ; 2,500 nM) に比べても極めて強い活性であり, 32 nM (12.4 ng/ml) という EC_{50} 値はイボニシにインボセックスを引き起こすに十分な体内濃度 (10~20 ng/g 湿重量) に相当する濃度である。巻き貝のインボセックスは, 有機スズによる巻き貝の性及び性成熟に関与しているアロマトラーゼの阻害などいくつかの作用機構が提案されているが, 今回の結果は有機スズのエストロゲン・アンタゴニスト作用による可能性も示唆するものである。

(3) SPEED'98 に掲載された「内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質」等のスクリーニング

SPEED'98 に掲載された「内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質」のなかには, エストロゲン・アゴニスト作用ではなく, アンタゴニスト作用を有するものが多く含まれていることが示唆されており, しかもアゴニ

スト活性を引き起こす多くの化学物質の活性濃度レベルよりもアンタゴニスト活性を示す化学物質は低濃度レベルで作用を示す例が多い。開発した酵母によるエストロゲンアッセイ系を用いて, SPEED'98 に掲載された化学物質も含めて, 約 300 物質のスクリーニングを実施した。このうちエストロゲン・アゴニスト活性が認められたものは, 約 30% (88 物質/291 物質, このうち+S9 試験でのみ陽性のものが 24 物質) であった。SPEED'98 に掲載された化学物質のスクリーニング結果を表 13 に示した。エストロゲン・アゴニスト (-S9) 試験では, DDT, *o,p'*-DDD, メトキシクロル, *p-t* ペンチルフェノール, ビスフェノール A, ヘキサクロロベンゼン (HCB), *p*-ノニルフェノール, *p-n*-オクチルフェノール, *p-t* オクチルフェノール及びフタル酸ブチルベンジルが受容体結合アッセイ及び酵母アッセイ共に陽性となった。このうち, メトキシクロルとビスフェノール A は+S9 試験でも両試験とも陽性であった。ベンゾ(a)ピレンは+S9 試験で, 陽性となった。エストロゲン・アンタゴニスト (-S9) 試験では, トリフェニルスズとフタル酸ジシクロヘキシルが陽性であり, アンタゴニスト (+S9) 試験では, メチラム, ベンゾ(a)ピレン, トリフェニルスズ, トリブチルスズ及びスチレンの 3 量体異性体の一部が陽性であった。なお, これらの化合物では, 受容体結合試験でヒト ER α に対して陽性であるものは, 一例を除きヒト ER β でも陽性であった。トリブチルスズは, 受容体結合試験 (-S9) でヒト ER β に対して陽性であり, 毒性が強く受容体結合試験はできなかったが, 代謝活性化しない状態でもヒト ER α に結合する可能性が示唆される。

2.2.4 魚類ビテロゲニンアッセイ

肝臓で合成され血液を經由して卵に蓄積される卵黄タンパク質の前駆体であるビテロゲニンは, 雌に特異的なタンパク質である。このタンパク質は, エストロゲンの作用により雌のみならず雄にも誘導されることが知られており, 魚類を用いる内分泌攪乱作用を評価する手法として, 雄魚におけるビテロゲニン誘導をバイオマーカーとして用いる方法が検討されている。東京湾のマコガレイなど, 雄魚にビテロゲニンの誘導が認められており, 内分泌攪乱作用との関連が議論されている。また, サケ, カレイ, ハゼやボラなどの魚類の測定法が研究され, 環境の生物モニタリングに活用されている。メダ

カ、鯉をはじめとする種々の魚についてビテロゲニンの測定法の開発が行われつつあり、OECDの内分泌攪乱に関する魚類試験法でもビテロゲニンアッセイがスクリーニング試験として取り上げられている。遺伝的に雌雄で体色の異なる d-rR メダカでの性転換の研究など、メダカは試験魚として内分泌攪乱作用を研究する上で重要な

魚種であるが、メダカのビテロゲニン誘導を指標とした内分泌作用のスクリーニング試験の開発は遅れていた。魚類の雌化に社会的な関心が高いことから、魚類の *in vivo* の試験系としてメダカビテロゲニンアッセイを検討することとした。

表 13-1 SPEED'98 掲載化学物質の酵母ツーハイブリッドアッセイと ER-ELISA 法によるエストロゲン活性 (1)

No.	物質名	用途	Yeast Estrogen Assay(humanER α)				Estrogen Receptor Binding Assay			
			Agonist		Antagonist		human ER α		human ER β	
			-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
1	ダイオキシン類	(非意図的生成物)	Not tested		Not tested		Not tested		Not tested	
2	ポリ塩化ビフェニール類(PCB)	熱媒体、ノンカーボン紙、電気製品	+	+	Not tested		Not tested		Not tested	
3	ポリ臭化ビフェニール類(PBB)	難燃剤	Not tested		Not tested		Not tested		Not tested	
4	ヘキサクロロベンゼン(HCB)	殺菌剤、有機合成原料	+	-	-	-	+	-	+	-
5	ペンタクロロフェノール(PCP)	防腐剤、除草剤、殺菌剤	-	-	+	-	-	-	-	-
6	2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸	除草剤	-	-	-	-	-	-	-	-
7	2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	除草剤	-	-	-	-	-	-	-	-
8	アミトロール	除草剤、分散染料、樹脂の硬化剤	-	-	-	-	-	-	-	-
9	アトラジン	除草剤	-	-	-	-	-	-	-	-
10	アラクロール	除草剤	-	-	-	±	-	-	-	-
11	シマジン	除草剤	-	-	-	-	+	-	-	-
12	ヘキサクロロシクロヘキサン	殺虫剤	-	-	-	-	+	-	-	-
13	カルパリル	殺虫剤	-	-	-	-	-	-	-	-
14	クロルデン	殺虫剤	-	-	-	-	+	+	+	+
15	オキシクロルデン	クロルデンの代謝物	-	-	Not tested	Not tested	-	-	-	-
16	trans-ノナクロル	殺虫剤	+	-	-	-	-(Toxic)	-	-	-
17	1,2-ジプロモ-3-クロロプロパン	殺虫剤	-	-	-	-	-	-	-	-
18	DDT	殺虫剤	+	+	-	-	+	-	+	-
19	o,p'-DDE	DDTの代謝物	-	-	-	-	+	-	+	-
	p,p'-DDE		-	-	-	-	-	-	-	-
	o,p'-DDD		+	+	-	-	+	-	+	-
	p,p'-DDD		-	-	-	-	+	-	+	-
20	ケルセン	殺ダニ剤	-	-	-	+	+	-	+	-
21	アルドリン	殺虫剤	-	-	-	-	+	+	+	+
22	エンドリン	殺虫剤	-	+	-	-	-	-	+	+
23	ディルドリン	殺虫剤	-	-	-	-	+	+	+	+
24	エンドスルファン(α -ベンゾエピン)	殺虫剤	-	-	-	-	+	+	+	+
	エンドスルファン(β -ベンゾエピン)		-	-	-	-	+	+	-(Toxic)	+
25	ヘプタクロル	殺虫剤	-	-	-	-	+	-	-	-
26	ヘプタクロルエポキシサイド	ヘプタクロルの代謝物	-	-	-	-	-	-	+	-
27	マラチオン	殺虫剤	-	-	-	-	-	-	-	-
28	メソミル	殺虫剤	-	-	-	-	-	-	-	-
29	メトキシクロル	殺虫剤	+	+	-	-	+	+	+	+
30	マイレックス	殺虫剤	-	-	-	-	-	-	-	-

表13-2 (つづき) SPEED'98 掲載化学物質の酵母ツーハイブリッドアッセイとER-ELISA法によるエストロゲン活性(2)

No.	物質名	用途	Yeast Estrogen Assay(humanER α)				Estrogen Receptor Binding Assay			
			Agonist		Antagonist		human ER α		human ER β	
			-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
31	ニトロフェン	除草剤	-	-	-	+	-	-	-	-
32	トキサフェン	殺虫剤	-	-	-	-	-	+	-	+
33	トリブチルスズ	船底塗料、漁網の防腐剤	-	-	+	+	-(Toxic)	+	+	+
34	トリフェニルスズ	船底塗料、漁網の防腐剤	-	-	+	+	+	+	+	+
35	トリフルラリン	除草剤	-	-	-	+	+	-	-	-
36	アルキルフェノール p-Nonylphenol	界面活性剤の原料 /分解生成物	+	-	-	+	+	-	+	-
	p-n-Octylphenol		+	-	-	+	+	-	+	-
	p-t-Octylphenol		+	-	-	+	+	-	+	-
	p-n-Pentylphenol		+	-	-	+	-	-	+	-
	p-t-Pentylphenol		+	+	-	-	+	-(Toxic)	+	+
37	ビスフェノールA	樹脂の原料	+	+	-	+	+	+	+	+
38	フタル酸ジ-2-エチル ヘキシル	プラスチックの可塑 剤	-	-	-	-	+	-	+	-
39	フタル酸ブチルベンジ ル	プラスチックの可塑 剤	+	-	-	-	+	-	+	-
40	フタル酸ジ-n-ブチル	プラスチックの可塑 剤	-	-	-	-	-	-	-	-
41	フタル酸ジシクロヘキ シル	プラスチックの可塑 剤	-	-	+	-	+	-	+	-
42	フタル酸ジエチル	プラスチックの可塑 剤	-	-	-	-	-	-	-	-
43	ベンゾ(a)ピレン	(非意図的生成物)	-	+	-	+	+	+	+	+
44	2,4-ジクロロフェノール	染料中間体	-	-	-	+	-	-	-	-
45	アジピン酸ジ-2-エチ ルヘキシル	プラスチックの可塑 剤	-	-	-	-	-	-	-	-
46	ベンゾフェノン	医薬品合成原料、 保香剤等	-	-	-	-	-	-	-	-
47	4-ニトロトルエン	2,4ジニトロトルエン などの中間体	-	-	-	-	-	-	-	-
48	オクタクロロスチレン	(有機塩素系化合 物の副生成物)	-	-	-	-	-	-	-	-
49	アルディカーブ	殺虫剤	-	-	-	-	-	-	-	-
50	ベノミル	殺菌剤	-	-	-	±	-	-	-	-
51	キーボン(クロルデコン)	殺虫剤	-	-	-	-	+	+	+	+
52	マンゼブ(マンコゼブ)	殺菌剤	-	-	+	-	-	-	-	-
53	マンネブ	殺菌剤	-	-	-	+	-	-	+	-
54	メチラム	殺菌剤	-	-	-	+	-	+	-	-
55	メトリブジン	除草剤	-	-	-	-	+	-	-	-
56	シペルメトリン	殺虫剤	-	-	-	-	-	-	-	-
57	エスフェンバレレート	殺虫剤	-	-	-	-	-	-	-	-
58	フェンバレレート	殺虫剤	-	-	-	-	+	-	+	-
59	ペルメトリン	殺虫剤	-	-	-	-	-	-	-	-
60	ピנקロゾリン	殺菌剤	-	-	-	±	-	-	-	-

表13-3 (つづき) SPEED'98 掲載化学物質の酵母ツーハイブリッドアッセイと ER-ELISA 法によるエストロゲン活性 (3)

No.	物質名	用途	Yeast Estrogen Assay(humanER α)				Estrogen Receptor Binding Assay				
			Agonist		Antagonist		human ER α		human ER β		
			-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
61	ジネブ	殺菌剤	-	-	+	-	-	-	-	-	
62	ジラム	殺菌剤	-	-	-	-	+	+	+	-	
63	フタル酸ジベンチル	(本邦では非生産)	-	-	-	+	+	-	+	-	
64	フタル酸ジヘキシル	(本邦では非生産)	-	-	-	+	+	-	+	-	
65	フタル酸ジプロピル	(本邦では非生産)	-	-	-	-	-	-	-	-	
66	スチレンの2量体 (a)1,3-Diphenylpropane	スチレン樹脂の未反応物	-	-	-	-	-	-	-	-	
	(b)cis-1,2-Diphenylpropane		+	-	-	-	-	-	-	-	
	(c)trans-1,2-Diphenylcyclobutane		-	+	-	+	-	-	-	-	
	(d)2,4-Diphenyl-1-butane		-	-	-	-	-	+	-	-	
	スチレンの3量体 (e)2,4,6-triphenyl-1-hexcene		-	-	-	+	+	+	+	+	+
	(f)1-Phenyl-4-(1-phenylethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene		-	-	-	+	+	-	+	+	
	(g)異性体B		-	-	-	+	-	-	-	-	
	(h)異性体C		-	-	-	+	+	+	+	+	
	(i)異性体D		-	-	-	+	+	-	+	-	
	(j)1,3,5-Triphenylcyclohexane		-	-	-	+	-	-	-	-	
67	n-ブチルベンゼン	合成中間体、液晶製造用	-	-	-	±	-	-	-	-	
陽性数(擬陽性も含む)/試験物質群			10/66	9/66	6/63	18/63	27/64	14/64	26/64	13/64	

* ; +印は活性が明らかに認められる物質。-印は活性が認められない物質。±印はアンタゴニスト作用が試験濃度範囲内で 40%以上の抑制率を確認できなかった物質。

(1) メダカビテロゲニンの定量法の開発

ビテロゲニンを酵素免疫化学的に計測するために抗体の作成を行った。17 β -エストラジオールを含有する餌で飼育したメダカの腹水より POROS-HQ カラムを用いて精製したビテロゲニンを抗原として、フロイント・コンプリートアジュバンドと等量混合しエマルジョンとした。体重 2 kg の予備飼育をしたウサギ 2 羽に 2 週間おきに 4 回免疫し、採血した。血清は、プロテイン A カラムで精製し IgG 画分を分取した。最終濃度は、10.1 mg/ml であった。このポリクローナル抗体 (PoAb) を用いて、ELISA 系を構築し、エストロゲンを曝露したメダカの肝臓、血清、全個体を測定対象としてビテロゲニンの測定を実施したところ、対照群に比して曝露群で有意な上昇が観察された。しかしながら、本抗体を用いたビテロゲニンの ELISA 法による測定は、陰性対照とされるメダカでも陽性と判定される場合があり、偽陽性

の疑いがある測定結果がしばしば認められた。ELISA に使用している抗体を用いてメダカの卵巣などの組織を免疫染色したところ、抗体の特異性に問題があることが明らかとなった。本抗体を用いた場合でも吸収操作などで抗体を精製すれば、ELISA による測定系の再構築が可能と考えられたが、同様の方法で調製したポリクローナル抗体を用いた ELISA 系で試験を実施している他機関では、血液の測定が困難であり肝臓を試料に用いている事例もあり、メダカビテロゲニンモノクローナル抗体 (MoAb) を新たに作成することとした。

ポリクローナル抗体作成時と同様に調製した抗原をマウス (BALB/c メス 6 週齢) に 14 日ごとに 3 回免疫した。このマウスの脾臓細胞とミエローマ細胞をポリエチレングリコール法で融合したのち、HAT 選択培地でハイブリドーマを培養した。抗原に特異性の高い抗 VTG 抗体を産生するハイブリドーマを選択した後、雄の全身

および肝臓ホモゲネート，血清に反応しない独立した複数のクローン株 (MVP 25, MVP 47, MVP 49, MVP 51) を樹立した。得られたモノクローナル抗体を使ってウエスタンブロット解析を行った結果，これらの抗体は E2 曝露雄あるいは産卵期の雌において血中に誘導されるピテロゲニンおよびその分解物と思われるいくつかのフラグメントと反応すること，また，すべてのモノクローナル抗体のエピトープがリポビテリンの重鎖 (VTG の N 末端約 120 kDa) に存在することが示された。これらのモノクローナル抗体を用いて，ELISA 法によるメダカピテロゲニン測定法の構築の可能性を検討したところ，MVP 25-MVP 47 系および MVP 47-MVP 49 系においてピテロゲニンの測定が可能であることが示され，MVP 25-MVP 49 系では測定系は構築できず，MVP 25 と MVP 49 は同一あるいは近傍のエピトープを認識していると考えられた。

これらの抗メダカピテロゲニン MoAb の中で，異なるエピトープを有すると考えられる MVP 47 及び MVP 25 を用いて，固相 MVP 47- 標識 PoAb 系，及び固相 MVP 47- 標識 MVP 25 系という 2 種の全自動 1 ステップサンドイッチ測定系を構築し，比較検討を行った。免疫測定は，MVP 47 を固定化した磁性ビーズの入ったカッ

プに，サンプルと標識 PoAb あるいは標識 MVP 25 を同時に加えて 40 分反応を行い，B/F 分離後，4-メチルウンベリフェリリン酸を基質としその分解速度を求めることから，磁性ビーズに結合したアルカリ性ホスファターゼ量を定量した。ピテロゲニン濃度 12 $\mu\text{g/ml}$ まで磁性ビーズ結合酵素量は単調増加を示し，本法におけるピテロゲニン最小検出濃度 (2 SD 法) は MVP 47-PoAb 系で 0.03 ng/ml, MVP 47-MVP 25 系で 0.06 ng/ml となった。0.6 ~ 37 ng/ml のメダカ全個体ホモゲネート希釈液を用いて検討したところ，再現性は両系とも測定内 10 ~ 94 %，測定間 1.6 ~ 8.6 % と良好であり，希釈直線性試験，添加回収試験についても良好な結果を得た。魚類 6 種のピテロゲニンとの交叉反応性は両測定系とも 0.2 % 未満であったが，MVP 47-MVP 25 系の方がより低い値を示した。エストロゲン曝露個体より得た全個体ホモゲネートならびに血漿を希釈し測定したところ，両測定系について対照群に比して曝露群で有意な上昇が観察された。ポリクローナル抗体系で見られる非特異反応を抑制し，特異性の高い自動 EIA 測定系を確立できた。

自動測定機のない機関でも本抗体が利用可能なようにプレート法による測定系を構築した。エストラジオール

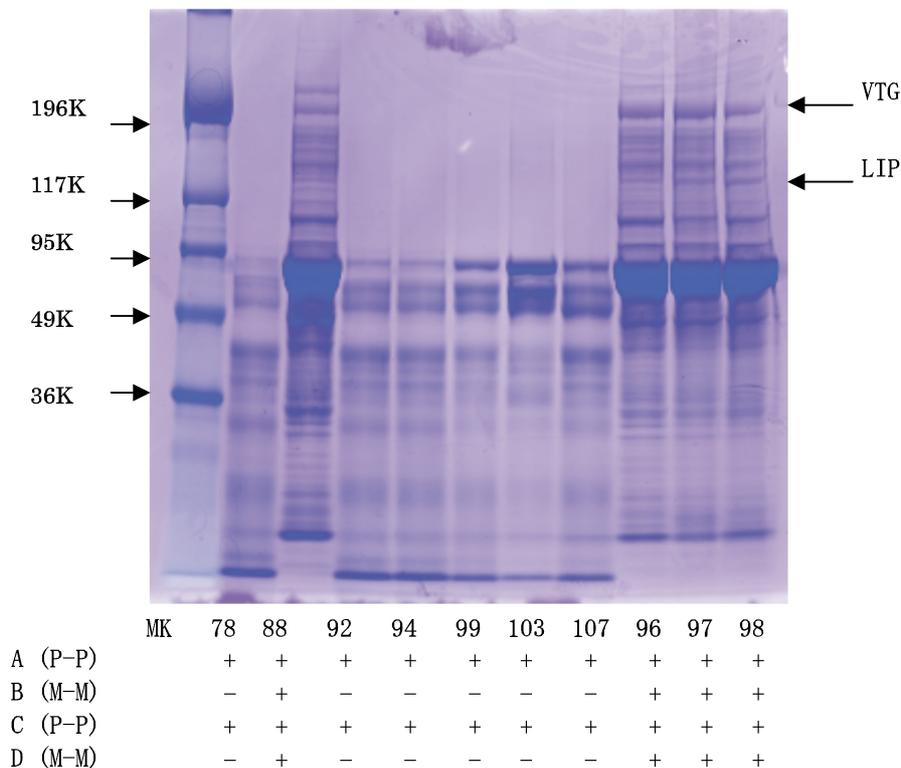


図44 エストラジオールに曝露したメダカの肝臓抽出物の電気泳動像

に曝露したメダカの肝臓を試料として、入手可能となった他の ELISA 測定キットとのクロスチェックを行った。この際に用いた試料の電気泳動像を図 44 に示した。図 44 中、+と記載したものは、そのキットで測定値（陽性）を与えた試料である。電気泳動のパターンは 2 群に別れ、ビテロゲニンのバンドが見られない試料は E2 曝露により肝臓に障害を受けている可能性が考えられた。図 44 よりポリクローナル抗体を用いた ELISA 法では、ビテロゲニン及びその分解物が電気泳動上では確認されない場合でも陽性の結果を示していることが確認された。一方、今回作成したプレート法によるメダカビテロゲニンのサンドイッチ ELISA 法は、市販の別のモノクローナル抗体を使用した測定キットとよい類似性を示した。また、両者とも電気泳動上では確認されない場合は、陰性となり、偽陽性の問題は PoAb を用いた場合より明らかに改善された。

ビテロゲニンアッセイにおいてはビテロゲニン産生量の有意差を曝露濃度区の間で求めればよく、相対的な値でも問題は少ない。しかし、複数の試験や試験機関間の比較を行う際には、統一基準に基づいた校正が不可欠である。異なる抗体では、認識するエピトープが異なるため、ビテロゲニン分解物への応答性などに違いを生じることが予想でき、測定結果になんらかの差異を生じる可能性が指摘できる。今後、標準ビテロゲニンとして使用できるメダカビテロゲニンタンパクを調製し、これをもとに、メダカビテロゲニン測定標準化をする必要があると思われる。なお、本研究で作成したモノクローナル抗体産生細胞は、誰でも研究目的に利用できるように細

胞バンクに登録中である。

(2) ワカサギビテロゲニン ELISA 測定法の開発と湖沼調査への応用

ワカサギは、全国的に生息し全国調査が可能であること、また湖沼内を回遊するため湖沼の平均的な内分泌攪乱作用の評価を可能にすることが期待できる。本種による内分泌攪乱作用評価の可能性を追求するため、ワカサギビテロゲニンを特異的に測定する全自動酵素免疫測定システムを開発し、いくつかの湖沼におけるワカサギ肝臓中ビテロゲニン量の予備的な調査を実施した。

ワカサギの卵から、イオン交換カラムを用いビテロゲニン画分を分取した。精製品の分子量は、SDS-PAGE による測定では 120 kDa であり、リポビテリンが主成分と思われた。本精製品を免疫原として家兎に免疫してポリクローナル抗体を取得した。ウエスタンブロッティングの結果から、本抗体は E2 曝露した雄ワカサギの血漿中に特異的に誘導される免疫原と同一分子量のタンパク質、および雌に発現するビテロゲニンと等しく反応していることを確認した。ビテロゲニン測定は、メダカビテロゲニン全自動 EIA 測定法と同様の方法で、11 倍希釈した肝臓ホモゲネートをサンプルとして行った。また、3 湖沼において産卵時のワカサギを採取し、肝臓ホモゲネート中のビテロゲニン濃度を測定した。ビテロゲニン濃度の測定範囲を 0.3 ~ 60.0 ng/ml に設定して検討を行ったところ、再現性は測定内 2.7 ~ 9.0 %、測定間 3.5 ~ 5.3 % と良好であり、また希釈直線性試験結果は 93.9 ~ 103.4 % であった。本法におけるビテロゲニン最

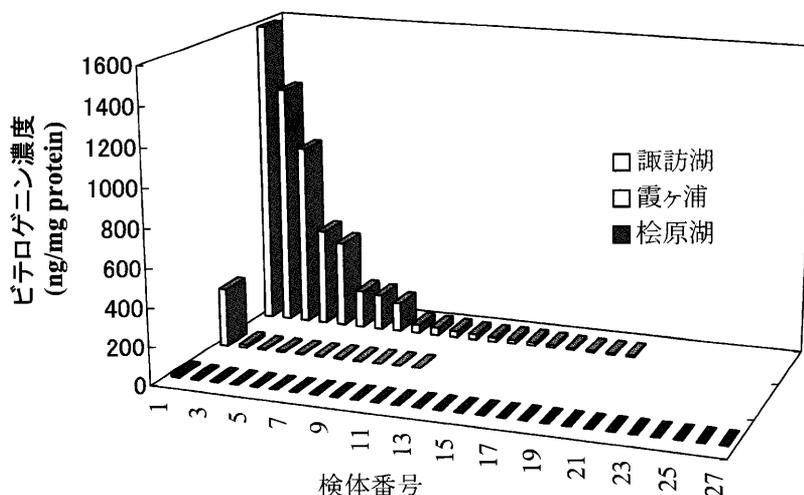


図 45 ワカサギ肝抽出物中のビテロゲニン濃度 (ng/mg タンパク)

小検出濃度(2SD法)は0.08 ng/ml となった。

湖沼より採取したワカサギについて測定したところ、
松原湖では雄肝臓中ビテロゲニンは、27 個体中 24 個体
が定量下限値以下であり、3 個体で検出された量は肝タ
ンパク質量当たり 2.5 ~ 13.1 ng/mg protein であった。
同様に霞ヶ浦(11 匹)および諏訪湖(20 匹)ではすべ
ての個体で検出され、そのレベルは霞ヶ浦で 1.8 ~
307 ng/mg (中央値 5.8 mg/mg)、諏訪湖で 7.0 ~
1590 ng/mg (中央値 32.2 mg/mg) であった(図 45)。同
時に捕獲した雌(10 匹)の濃度は、2730 ~ 24400 ng/mg
であった。諏訪湖において高値を示した雄肝臓ホモゲ
ネートには、E2 曝露した雄ワカサギ血漿中に誘導され
るタンパク質(120 kDa)と同一分子量のものが特異的
に発現していた(図 46)。カッスロートトラウトおよ
びサクラマス雌雄ビテロゲニンの周年変化を調査した
結果では、通常に再生産を行っている池中養殖魚の雄に
も血中に 3.1 µg/ml 以下のビテロゲニンが季節的に検出
されている。また、サクラマス成熟雌個体の尿はビテロ
ゲニン誘導能を有し、飼育水を介して雄にビテロゲニ
ンを誘導する可能性が強く示唆されている。湖沼により雄
肝臓ビテロゲニン量に違いが観察されたが、今回のワカ
サギの結果も、産卵期の雌や餌由来の影響である可能性
があり、内分泌攪乱化学物質による作用であると結論づ
けることはできない。今後、雌雄のビテロゲニン量の

ベースラインやその季節変動に関するデータの収集と解
析が必要であると考えられた。

2.2.5 メダカエストロゲン応答遺伝子の定量法の開発

酵素免疫学的に計測する手法は、適切な抗原や抗体の
入手に時間がかかるなどの問題がある。一方、タンパク
生成に先立って体内で合成されるビテロゲニンなどのバ
イオマーカー遺伝子を定量すれば、より高感度な評価手
法になり得る可能性がある。遺伝子配列が既知ならば、
標的となる遺伝子フラグメントは容易に抽出が可能であ
り、保存や増幅が可能である。mRNA は、RT-PCR によ
り高感度に検出できるものの、その定量には指数関数的
な増幅領域を知る必要があり、その範囲の検討など定量
精度を確保するには非常な労力が必要であった。しかし
ながら、リアルタイム RT-PCR 法の出現により mRNA
の簡便な定量は可能となりつつある。メダカでは、卵膜
タンパクの前駆体であるコリオゲニン H と L、エストロ
ゲン受容体、アロマターゼなど内分泌攪乱と関係する遺
伝子配列が報告されており、PCR 反応に使用するプライ
マーを設計すれば、これら遺伝子の定量が可能状況に
あった。一方、重要な遺伝子であるビテロゲニンに関
しては、その塩基配列の決定する必要があった。

(1) メダカビテロゲニン cDNA の塩基配列の決定

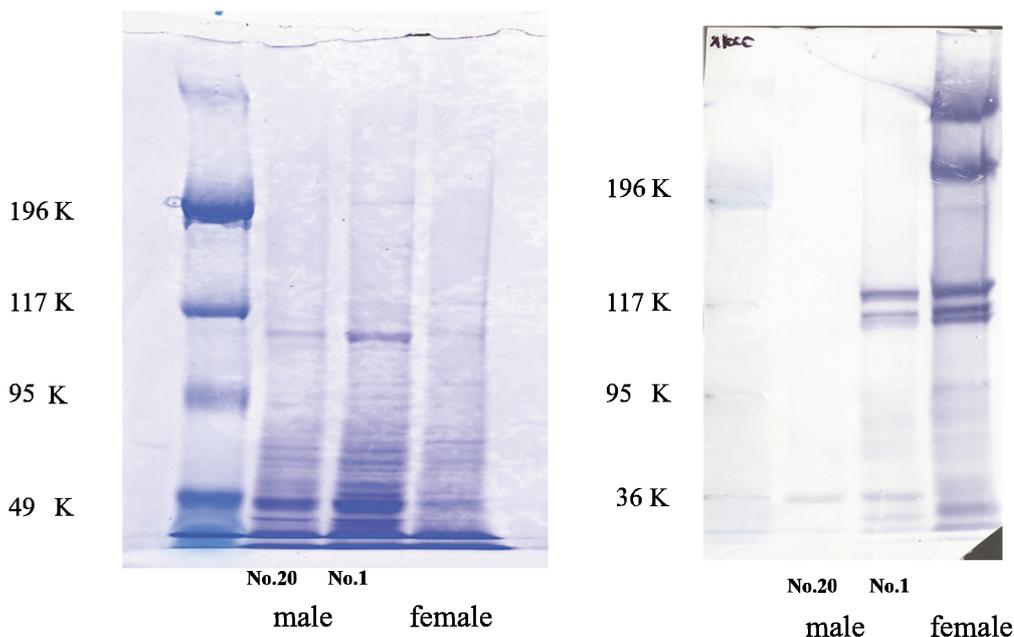


図46 ワカサギ肝抽出物の SDS 電気泳動(左)とウエスタンブロット(右)
(試料 諏訪湖 No 20, No 1, 雌, 矢印: リポビテリンと推定されるバンド)

全 RNA は 17 β -エストロジオールを含有する餌で飼育したメダカの肝臓より、SV total RNA 抽出システム (Promega) を用い、キットに記載の手順に従って抽出した。RNA の最終濃度は 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ であった。cDNA の配列が既知のマミチヨグ (gene bank U 07055) やニジマス (X 92804) を参考にプライマーを設計しエストロゲン曝露したメダカの肝臓中のピテロゲニン mRNA を PCR により増幅しその配列を決定した。ピテロゲニン cDNA の部分配列とマミチヨグやニジマスのピテロゲニン cDNA 配列の比較から、3 つの未知の部分配列として決定し、それらを結合してメダカピテロゲニンの全長 cDNA とした。5' 末端の 1600 bp の配列の決定には、5' RACE 法を適用した。遺伝子特異的なプライマーを cDNA の部分配列の中から 5'-GCACA GGCAT TGCAT GGTGG AAATT GAC-3' を選択した。SMART™ RACE cDNA 増幅キット (CLONTECH) を用い、付属のマニュアルにしたがって 5' RACE 産物を

得た。PCR 産物のサイズを電気泳動で確認した後、pGEM-T easy vector (Promega) に T/A クローニングした。プラスミドを抽出し、制限酵素 (*EcoRI*) による分解産物および T7 と SP6 プライマーを用いた PCR 産物のサイズを確認した。5'-TCATC CTCTA GCTCT TCCTC ACGCC CCAG-3' をプライマーとして 3' RACE に用い、5' RACE と同様の操作を行い 3' RACE 産物を得た。さらに、この産物の内側にある配列 5'-CGACT CCAGC CTTTG AGGCC ATTTA CGCA-3' をプライマーとして得た PCR 産物を T/A クローニングした。これらの cDNA とを継ぎ合わせて全長 cDNA 配列とした。他の生物と同様にポリセリンの配列が存在し、BLASTP によるとアミノ酸配列の一致は、マミチヨグとは 62%、ニジマスとは 47% であった。メダカピテロゲニン 1 の cDNA (登録番号: AB 064320) より翻訳したアミノ酸配列を図 47 に示した。

```

MKAVVLALTLALVAGQHPNFAPDFSAGKTYVYKYEASIMSGLPDEGLARAGLNVSSKIL
ISAVHENTYMLKPLELIINEYNGIWPKDHPEPVGKLTAAAMPPELNIPKFEYSNGVVGK
VFAPEGVSDLVLFYRGLNQLNIKKTHNVYDLQEAGTQGVCKTLYSVNEDVKADRI
LLTKTRDMNHCHERISREIGLAYTEKCECQKESKNLRGSTSRYIILKPVPSGIMILEA
DVNELIQFSPVSERYGAAQTETRQTLVFLEIQKSPIAPVSAEYHHRGSLKYEFSEFEL
SPLQLVKVTDERAQTEELLNHLVTHNAEKVNDHAPLKYLELIQFLRLARYEDLEVLWSK
YRNMPSHRFWLLLEAIPAIGTSAAVRFIKEKFQAEEDLSVAEAVRTLVAAVHVMKANPESI
KLFETLTEDNKIDANPVLREIVFLGYGTMISKYCEESDVCPVEYIKPIQKRLSEAVSKG
ETEDIILYLKVLGNARHPSSLKSITKIMPIHSTAAASLPITVHIEAIMALRNIAKKEPR
MVQELALQLYMDKALDPELRMLSCIVLFEETNPSMALISTLANAVKSEENLQVASFTYSH
MKSLSRSASMIHPSVAAACNVAMKILSPKLDRLSLRYSKAVYGEAYSSSLMLGAAAAAF
YINDAATFLPRSVVAKTKAFFVGAADVLEIGVRTDGLQETLLKNPISDSADRITKMK
RVIKALSQWRSLPNNKPLVSCYVKLFGQEI AFANIDKPMIERAIELASGPSVQAYGLKA
LKTLLLSGVNFHHAMPVLFSEVRRILPTAAGIPVELSLYSAVAVAAVEIKPTLSPRLP
EDFPLPRLLETEIKLETEIRPSYAMDTYALMGVNTPVFQAFMVSRAKFNSTLPAKISAR
LDIKEGDFKIEALPVTAPENITAGSFEIYAVTRNIEEPTAEKITPILPNKVLPSISSQI
VSSSEDSSSAEISSEIIEEDVKRKVPFLAKRYCAKYRAIGLKACFKVATENAAFIRD TAF
YRMIGSHNASFSIKPIEGEEVERLEMEVKVGAKAAEKIKQINMKDSAGTVLSKLNKIL
TSNLNRTSSSSSSSSSSSSSSSKHSSKSSSSSSSSSSSRPSGSSSSSNSSSSSSSRNSSKS
SSSSRRSSSSSSSRLSSRSFSNSSRSSSASSLASLFSAESSSSSRDSARRSMQKVNSHR
FRKGHNQTLASEERSRSRSDSSFEAIYAKNELLDERSVAVVVTVRAVKANKEDPGYQ
VAVYVDKPNARLQIILFPLSGSNWKL CADGVLLSKHKVTAKIAWGAECKQYSTMITGET
GLVSSSPAARLRMSWEKLPYIKRSAEKVYDYMPNKMLADLIKAKSTNSTRLSFTVVA
ESEKSIELIAKTPRRTFYNMTLHLPITLPLQEI KSLTPFEEVIDKVHYVFAKAVAAECS
LSNNTIKTFNRRYKNIKIPESCYQVLAQDCTEELKFMVLQMYATKQNHNLVVKIADIDI
DLYPKSESEVHVKNVNGMEIPRTSLPYQHPTASIEIRENEEGVSVFASSHGLHEVYVNKTS
WRIKIADWMKGKTCGLCGKADGEVRQDYRAPNGRLARNSVSFALSWILPAESCKDNSEC
RMKYESIQLKKNVNHGQDSTCFVPEVLRCLPGCSPVKTTSVNVGFKCFAADSSRDL
NIFNESVDLRDSTEAHLCSCSAQCS

```

図47 メダカピテロゲニン I の cDNA (受理番号 AB 064320) より翻訳したアミノ酸配列

表14 TaqMan プローブ, プライマーと Tm (°C) の予測値および PCR の効率 (%)

mRNA	Yield %	TaqMan Probe		Tm	
β -Actin	100	VIC-ATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCTGG-TAMRA		68	
Vitellogenin	95	FAM-CTTCTTTGTTGGAGCTGCTGCTGATGTTCT-TAMRA		69	
Choriogenin -L	97	FAM-TACCGTCAAGCAGTACTTCCACGTGCCT-TAMRA		69	
Choriogenin -H	97	FAM-AGCTTGGACCCCTCAAGTGTACTTGCA-TAMRA		69	
ER	98	FAM-ATCTCGAGGCAGAATCGAGAGTCCGA-TAMRA		68	
mRNA	Forward Primer		Tm	Reverse Primer	Tm
β -Actin	TCCACCTTCCAGCAGATGTG		58	AGCATTGCGGTGGACGAT	60
VTG	TCTGTTGTTGCCAAGACCAAAG		59	TCCATCAGTTCTCACTCCAATCTC	58
CHG-L	CCTTGGAGACTTGATCCACATAG AG		59	GCAACACATCTGTCCACGTAAAC	59
CHG-H	CGGATAGTCTCTTCCATTGC		59	TTTGACACTGCCCATTTGGC	59
ER	AATCGCTCCCGTTCTATATCA		59	CGACCCTCCATACTGAAGGACA	60

(2) 定量的 RT-PCR に使用するプライマーと TaqMan プローブの設計

すべてのプライマーとプローブは Primer Express™ (PE バイオシステムズ) を用いて設計した。 β -アクチン, コリオゲニン L, コリオゲニン H, および, エストロゲン受容体の cDNA 配列には, Gene Bank に登録されている, それぞれ, D 89627, D 38630, D 89609, および, D 28954 を用いた。ピテロゲニン cDNA の配列は, 本研究で上記の方法で決定したものをを用いた。 β -アクチンの TaqMan プローブの蛍光色素には VIC を用い, 他のプローブの蛍光色素は FAM とした。表 14 に用いた TaqMan プローブ, プライマーの塩基配列と Tm (°C) の予測値および PCR の効率 (%) を示した。

(3) リアルタイム RT-PCR 法による mRNA の定量

全 RNA の抽出には, Qiagen 社の RNeasy キットを用いた。Gene Spec III (那珂インストルメンツ) を用い, 260 nm で抽出液中の RNA の濃度を測定し, 試料濃度を約 50 μ g/ml 程度に調製した。リアルタイム RT-PCR には, ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE バイオシステムズ) および TaqMan Gold RT-PCR キットまたは TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix キットを用いた。PCR 反応は One Step RT-PCR 法で, 反応液量は 50 μ l とした。サーマルサイクラーの条件は逆転写 48 °C (30 分), AmpliTaq Gold を 95 °C (10 分) で活性化した後, 95 °C (15 秒), 60 °C (1 分) の条件で PCR

反応を 40 回まで繰り返した。得られたデータは PRISM 7700 付属のソフトにより解析をした。RT-PCR は 3 重測定を行い, 2 ウェル以上で再現性のある結果の平均値を採用した。

(4) Multiplex RT-PCR による 2 種の遺伝子の同時定量

表 14 に示したプライマーを用いて, 標準的なサーマルサイクラー条件で, 特定の mRNA 単独での PCR 効率を検量線濃度 (濃度-サイクル数) の傾きから求めたところ, すべて 95 ~ 100 % の効率を有していることが示された。Multiplex RT-PCR を行う場合, 多量に存在する mRNA の増幅に伴い PCR 試薬が消費をされ, 微量に存在する標的 mRNA の増幅が押さえられる。このため, 定量性を損なわず, かつ他の遺伝子の増幅に影響を与えないように多量に存在する mRNA のためのプライマーの濃度を制限する必要がある。このため, Forward と Reverse Primer の濃度を変化させ, サイクル数 (Ct) が変化せず, かつ遺伝子の増幅量 (Rn) が低く抑えられる領域を決定した。 β -アクチンでは, プライマーの濃度が減少すればサイクル数が増加し, 増幅量が減少するが, F-Primer と R-Primer 濃度がそれぞれ 80 nM および 40 nM までは Ct の値は変化せず (表 15), Rn のみ減少することから (表 16), β -アクチン mRNA の F-Primer と R-Primer 濃度をそれぞれ 80 nM および 60 nM に設定した。ピテロゲニンおよびコリオゲニン mRNA の発現量は, エストロゲンの作用により大きく変化し,

表15 β アクチン mRNA の RT-PCR における Forward Primer 濃度 (nM) および Reverse Primer 濃度 (nM) と Ct (回数) の関係

F/R	20	40	60	80	100
20	26.9	26.2	26.0	25.2	25.0
40	25.0	24.0	23.9	23.5	23.3
60	25.2	23.8	23.1	22.9	23.2
80	25.3	23.7	22.6	22.5	22.5
100	25.3	23.0	22.6	22.6	22.4

表16 β アクチン mRNA の RT-PCR における Forward Primer 濃度 (nM) および Reverse Primer 濃度 (nM) と Rn の関係

F/R	20	40	60	80	100
20	1.41	1.94	2.23	2.54	2.43
40	1.48	1.90	2.35	2.56	2.72
60	1.35	1.81	2.26	2.21	2.33
80	1.15	1.59	1.94	2.42	2.48
100	1.17	1.71	2.18	2.44	2.59

表17 3日間のエストロゲン等の曝露によるメダカ肝での遺伝子 (V: ビテロゲニン, H: コリオゲニン, L: コリオゲニン L, E: エストロジェン受容体) の発現

曝露濃度	0.01ppb	0.1ppb	1ppb	10ppb	100ppb
EE2	H, L	V, H, L			
E2	(V, E)	V, L, E			
E1		-	(V), H, L		
E3				V, H, L	V, H, L
Genistein				-	(V), H, L
Tamoxifen				-	(H), L

(危険率: $p < 0.01$, (括弧内) $p < 0.05$; -: 未検出; 空欄: 未試験)

β -アクリン mRNA の発現量を超える場合も観測されるため、これら mRNA のプライマーの濃度を同様に最適化した。エストロゲン受容体 mRNA の発現量は小さく、プライマーの濃度を制限する必要はなかった。これらの条件で Multiplex RT-PCR を行った結果、単独の RT-PCR と同様の検量線が得られた。

エストラジオール (100 ng/l) を流水式で雄メダカに曝露すると、ビテロゲニン遺伝子は曝露後数時間で、ビテロゲニンタンパクは3日以内に誘導され、曝露の継続にしたがって血中ビテロゲニン濃度は上昇した。3日間のエストロゲン等の曝露によるメダカ肝での遺伝子の発現結果を表17にまとめた。リアルタイム RT-PCR 法により実際に *in vivo* でエストロゲン活性を評価することが可能かビテロゲニン1遺伝子 (*vtg 1*) の発現を測定することによって詳細に検討を行った。図48に、成魚雄メダカの飼育水にエストラジオール (E2) を投与し、一定時間後の肝臓における *vtg 1* 遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法によって定量した結果を示した。100 ng/l 以上の E2 投与区では3時間で、10 ng/l E2 投与区でも12時間以内に *vtg 1* 遺伝子発現量が対照区に比較して有意に上昇した。*vtg 1* 遺伝子の有意な上昇が血

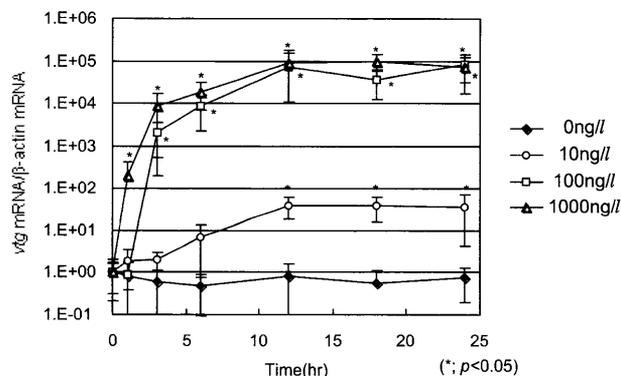


図48 E2の曝露による成魚雄ヒメダカ肝臓における *vtg 1* 遺伝子発現

中ビテロゲニン濃度の有意な上昇に先立って観察されたことから、今回検討したリアルタイム RT-PCR 法を用いた *vtg 1* 遺伝子の測定の結果は、従来行われてきたビテロゲニンタンパクの測定による *in vivo* アッセイ法に比べてより高い感度で活性を測定できる可能性を示している。内分泌攪乱化学物質であるビスフェノール A (図49) およびノニルフェノール (図50) を曝露したメダカの肝臓 *vtg 1* 遺伝子の発現量を測定した結果について示した。ビスフェノール A の曝露では1000 μ g/l 投与後18時間で対象区と比べて有意な *vtg 1* 遺伝子の誘導が観

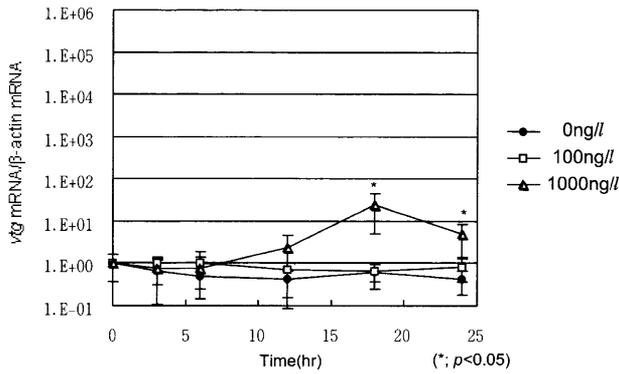


図49 ビスフェノール A の曝露による成魚雄ヒメダカ肝臓における *vtg 1* 遺伝子発現

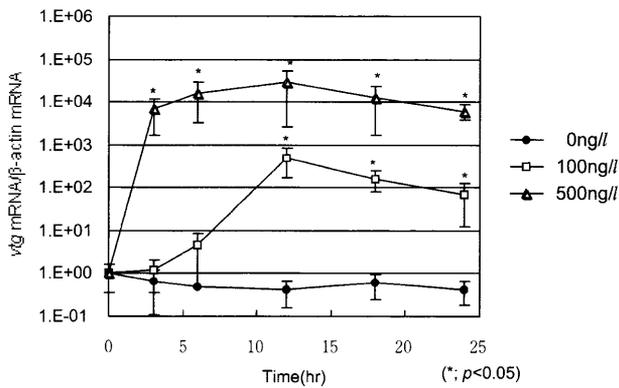


図50 ノニルフェノールの曝露による成魚雄ヒメダカ肝臓における *vtg 1* 遺伝子発現

察された。ノニルフェノールの曝露では 100 $\mu\text{g/l}$ 投与区で 12 時間後、500 $\mu\text{g/l}$ で 3 時間後に *vtg 1* 遺伝子の有意な発現上昇が観察された。これらの結果から、エストロゲン作用を持つ化学物質の曝露によってピテロゲンタンパクの誘導に先立って、*vtg 1* 遺伝子が時間単位で発現すること、化学物質の曝露濃度に依存して発現量が増加すること、曝露時間とともに発現量は一定値（または減少傾向）となること、また、発現量には最大値（天井値）が存在することがわかる。

また、エストロゲンのアンタゴニスト活性の測定も可能であると考えられるため *vtg 1* 遺伝子発現測定による *in vivo* エストロゲン・アンタゴニストアッセイ法の検討を行った。雌メダカは性周期が存在するため肝臓 *vtg 1* 遺伝子発現量がたえず変化する可能性があり *in vivo* アンタゴニストアッセイには適さないため、雌ヒメダカの代わりに雄ヒメダカに E2 と化学物質を同時に投与し、E2 投与による肝臓 *vtg 1* 遺伝子発現誘導の化学物質投与による抑制を観察した (図 51)。100 ng/l E2 投与により肝臓 *vtg 1* 遺伝子は 3 時間で対照区と比較して有意

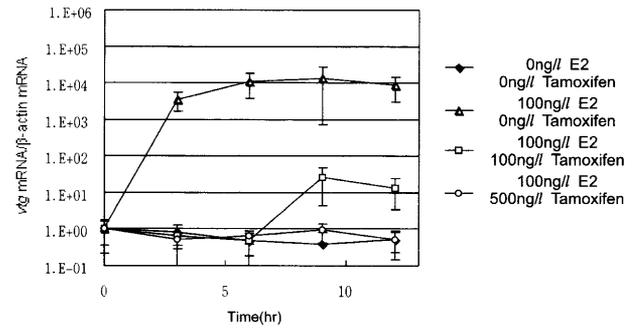


図51 タモキシフェンの曝露による E2 依存的な *vtg 1* 遺伝子発現の抑制

に発現が上昇した。しかしながら、エストロゲンのアンタゴニスト物質として知られるタモキシフェンを 100 $\mu\text{g/l}$ 同時に曝露すると E2 による *vtg 1* 遺伝子の誘導を顕著に抑制した。さらに 500 $\mu\text{g/l}$ 投与区においてはほぼ完全に E2 投与による *vtg 1* 遺伝子の誘導を抑制した。雄メダカに E2 と化学物質の同時投与を行い *vtg 1* 遺伝子の発現を観察することによってエストロゲンのアンタゴニスト物質のアッセイも可能であることが示唆された。

2.3 環境試料への応用

環境中にどのようなエストロゲン様物質がどの程度存在するかの知見はヒトや生態への影響を把握するうえで重要である。しかしながら、多種多様にわたるエストロゲン様物質を同定し、分析定量することは現在の化学分析技術をもってしても大変な手間とコストを要する。一方、簡便なエストロゲン活性のバイオアッセイ系をモニタリングに適用することで環境中のトータルとしてのエストロゲン活性をある程度把握することは可能である。霞ヶ浦（茨城県）湖水、諏訪湖（長野県）、東京湾、プラスチック等の産業廃棄物の最終埋立処分場からの浸出水などを試料として、開発した酵母のバイオアッセイ法や分析法が環境試料のエストロゲン活性モニタリングに使用できるかどうか検討した。

2.3.1 酵母アッセイのための試料調製法の検討

水環境試料から有機化合物を抽出・濃縮する手法は水環境試料中の低濃度の内分泌攪乱 (EDs) 活性をモニタリングする上で重要である。水環境試料には様々な有機化合物が汚染物質として含まれており、それらの中には、バイオアッセイや ELISA 法において抑制や偽陽性作用に働く物質もあり、環境試料の EDs 活性を調べる

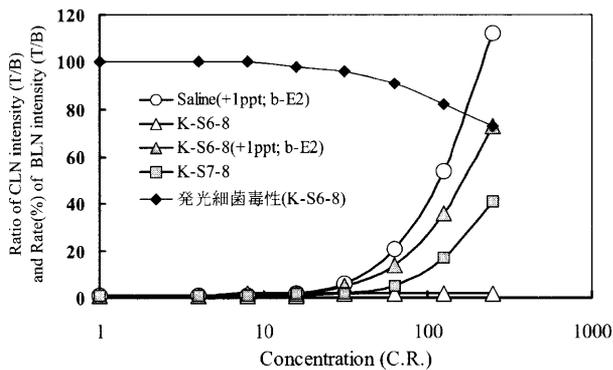


図52 霞ヶ浦湖水の固相抽出法によるエストロゲン活性と毒性

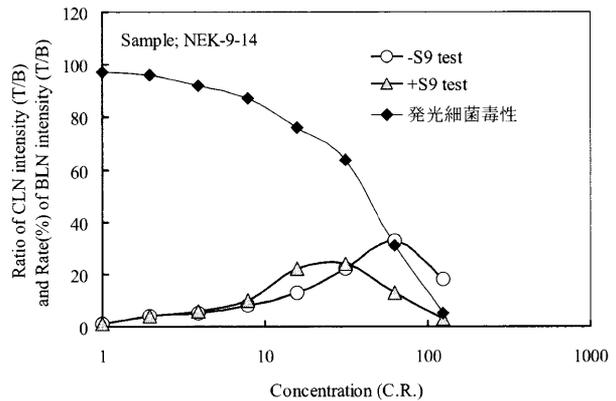


図53 産廃処分場浸出水のエストロゲン活性と毒性

上で阻害因子となる場合がある。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検討を試みた。

図52は1999年8月に採取した霞ヶ浦湖水 K-S6-8と K-S7-8を固相抽出法で濃縮した試料のエストロゲン活性を示した。試料 K-S6-8は化学発光比の増加はみられず、エストロゲン活性は認められなかった。一方、試料 K-S7-8は濃縮比63倍から濃縮比250倍まで濃度に依存した顕著な化学発光比の増加(5-41倍)が認められ、17-β-エストラジオール(E2)濃度に換算したエストロゲン活性は0.49 ng/lと計算された。E2を1 ng/lになるように添加した生理食塩水の固相抽出液について、同様の操作を行いE2に換算したエストロゲン活性は1.06 ng/lで、ほぼ添加量に等しい結果が得られた。一方、エストロゲン活性が認められなかった湖水 K-S6-8にE2を1 ng/lになるように添加したところ、エストロゲン活性は0.86 ng/lと算定され、添加したE2濃度よりも低い結果となった。湖水 K-S6-8のマイクロトックス試験は、濃縮比125倍から250倍の濃度で18%から27%の生物発光強度の抑制作用が観察され、濃縮した湖水に毒性が認められた。エストロゲン活性が添加量より低めに算定されたのは、湖水に含まれる濃縮された様々な物質が、酵母の検出系に抑制(毒性)的に働いたためと考えられた。

産廃処分場の浸出水などは、その酵母への毒性作用を考慮して500 mlの固相抽出を行い、濃縮試料とした。産廃処分場からの浸出水で比較的強いエストロゲン活性(アゴニスト)を示した試料 NEK-9-14の例を図53に示した。試料 NEK-9-14はマイクロトックス試験で濃度(濃縮比)に比例した毒性作用が認められ、濃縮比125倍ではほぼ生物発光強度は完全に抑制されるという

下水処理場排水

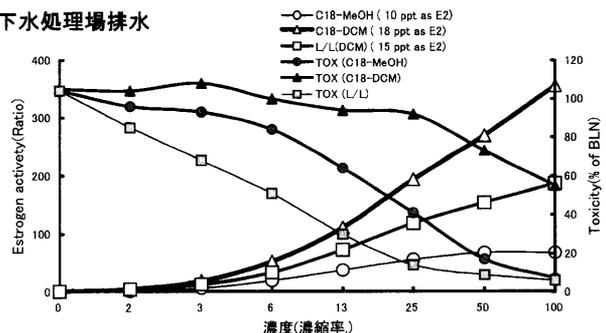


図54 エストロゲン活性に及ぼす水試料の抽出法の比較

強い毒性を示した。このような条件下でのエストロゲンアッセイは-S9試験においてEC₁₀値からE2に換算したエストロゲン活性は-S9試験で2.88 ng/l、+S9試験で4.91 ng/lという結果であった。

毒性影響を避けるため、水試料の抽出・濃縮法の検討を固相抽出法と溶媒(液液)抽出法で行った。下水処理場排水をC18固相ディスク(C18 FF; エムポア社)により固相抽出し、MeOH溶出(C18-MeOH)、あるいはDCM溶出(C18-DCM)した試料、及びジクロロメタンによる液液抽出(L/L(DCM))した試料の3通りの試料の酵母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(発光抑制率)結果を図54に示した。下水処理場排水はC18-DCM試料がもっともエストロゲン活性が高く、E2換算で18 ng/lを示し、次にL/L(DCM)試料の15 ng/l、C18-MeOH試料の10 ng/lと抽出法の違いにより差が認められた。発光細菌毒性試験ではL/L(DCM)試料で最も強い毒性(TOX)が認められ、C18-DCM試料の毒性は弱いことが示された。C18-MeOH試料には酵母アッセイに対して毒性あるいは抑制作用があると考えられ、C18-DCMによる試料調製法が好ましい手法であることが示唆された。多摩川の

下流域の試料について同様の比較を行ったところ、C18-MeOH抽出液、C18-DCM抽出液とも、E2換算で3.1 ng/lを示した。しかしながら、濃縮率の高い領域では、C18-MeOH抽出液でエストロゲン活性が抑えられる傾向が認められた。ELISA法によるエストロゲン活性換算値（E2換算）は、3手法とも1.6 ng/lと酵母アッセイの約半分程度であり、本試料にはE1とE2以外の活性物質の存在が示唆されている。

環境試料への本エストロゲンアッセイ系の検出下限は、1 lの濃縮試料の場合、E2濃度に換算して0.05 ng/l程度の感度が得られる。また、エストロゲン活性の環境モニタリング手法として実用に耐え得ると考えられたが、これを環境試料に適用する際には、酵母への毒性や試料に含まれるアンタゴニスト活性のある物質などにより反応が抑制されることがあることを考慮しておく必要がある。

2.3.2 霞ヶ浦、東京湾、都市河川水のエストロゲン活性

霞ヶ浦の土浦入りから湖心にいたる4地点（図55）での湖水の測定を1999年7月から2001年1月までGC/NCI-MS法により行った結果を表18に示した。湖心（ST-9）のエストラジオール濃度は、最大値が0.58 ng/l、平均で0.30 ± 0.16 ng/lであった。エストラジオールの濃度は、河川や下水等の流入域（ST-6, 7）で散発的に0.5 ng/lを超えることはあったが、ほぼすべての測定において1 ng/l未満であり、また、季節的な濃度変動も2年間の観測期間では認められなかった。酵母によるエストロゲン活性は、1999年4月から2001年3月の2年間でほとんど認められず、検出下限値0.05 ng/lで検出率8%（6検体/72検体）、検出範囲0.1～0.78 ng/lであった。+S9試験では、すべての試料で活性は認められなかった。エストラジオールとの相関は認められていないが、これは非常に低濃度であるため、両者の測定精度がこの濃度域では十分でないためである。魚類の雌化の鋭敏な指標であるビテロゲニンアッセイ

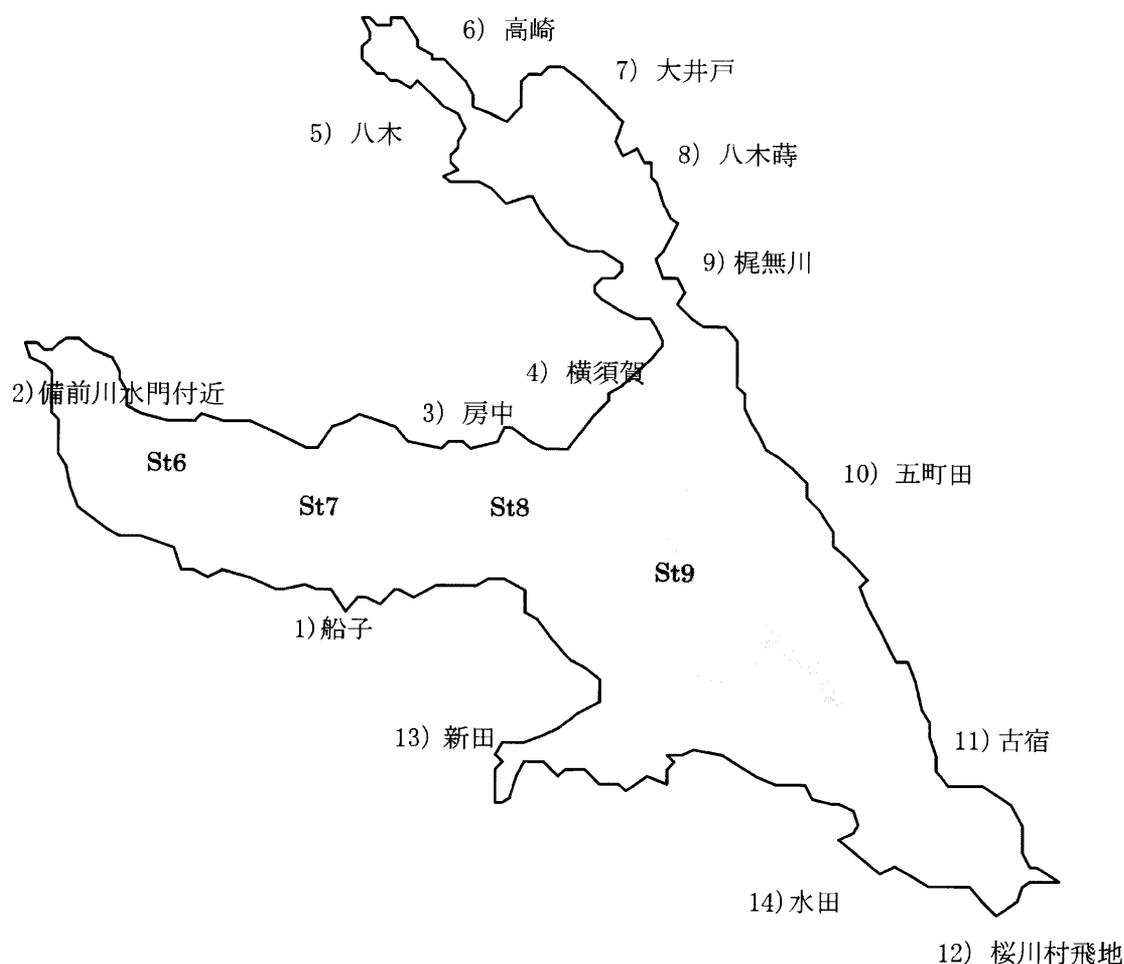


図55 霞ヶ浦での採水地点

で、E2の閾値が10 ng/l程度と報告されていることから、今回の結果から、霞ヶ浦湖水のエストロゲン活性は、魚類に雌化を起こすレベルにはないと言えるだろう。

一方、霞ヶ浦の湖岸に生息するヒメタニシの性比の異常が報告されている。湖心の湖水ではエストロゲン活性が認められなかったが、湖岸の湖水のエストロゲン活性を明らかにするために、図55に示す湖岸でのエストロゲン活性の調査を行った。エストラジオール類の測定は、調査の効率化をはかるため、機器分析と良好な相関が認められ、低濃度でも測定精度の高い全自動ELISA法を用いた。結果を図56に示した。エストロゲン活性は湖心と同様であり特段大きな負荷源も認められなかつ

た。また、GC/MS/MS法によりノニルフェノール、オクチルフェノール及びビスフェノールAの分析を行った(表19, 20, 21)。ノニルフェノール、オクチルフェノール及びビスフェノールA濃度の平均値は、それぞれ16.4 ± 9.1 ng/l, 2.5 ± 0.6 ng/l および11.1 ± 9 ng/lであった。これらの物質のエストラジオールに対する比活性は数千分の1であるため、これらの物質のエストロゲン活性に対する寄与はほとんどない。以上の結果から、湖岸においても雌化を引き起こすようなエストロゲン活性は、湖水からは認められなかった。また、化合物ごとのエストロゲン活性への正確な寄与率を算出することは困難であるが、その大部分が、天然のホルモンであるエ

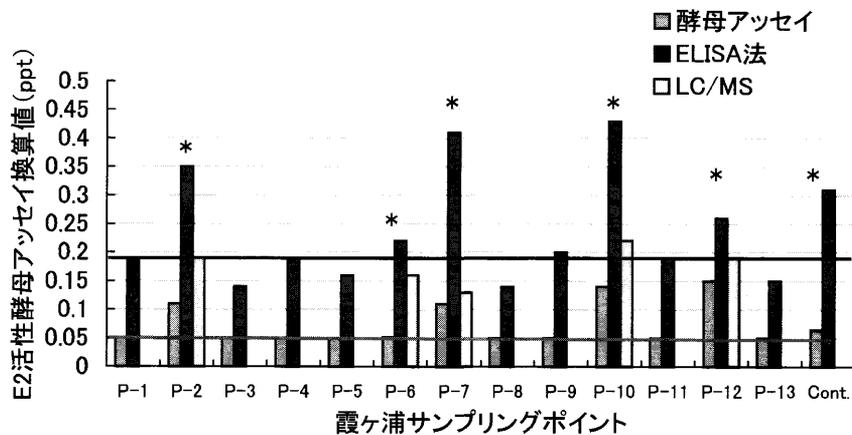


図56 霞ヶ浦湖岸湖水(2002年4月)の酵母アッセイ法によるエストロゲン活性とELISA法およびLCMS法(E2とE1濃度から算出)との比較

*は酵母アッセイで有意なエストロゲン活性(0.05 ppt以上)が認められたサンプル

表18 霞ヶ浦の湖水中のエストラジオール(E2)とエストロン(E1)濃度(ng/l)

年月	ST6		ST7		ST8		ST9	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2	E1	E2
1999年7月	<0.1	0.44	<0.1	0.56	<0.1	0.89	<0.1	0.58
1999年8月	0.14	0.19	<0.1	0.11	<0.1	0.17	0.10	0.20
1999年9月	<0.1	0.38	<0.1	0.38	<0.1	0.48	<0.1	0.38
1999年10月	<0.1	0.29	0.25	0.14	0.16	0.14	0.19	0.21
1999年11月	<0.1	<0.1	<0.1	0.18	<0.1	0.21	<0.1	<0.1
1999年12月	<0.1	0.28	<0.1	0.08	<0.1	0.20	<0.1	0.42
2000年1月	0.19	0.28	<0.1	0.27	<0.1	0.10	<0.1	0.15
2000年2月	<0.1	0.16	<0.1	0.15	0.11	0.64	<0.1	0.21
2000年3月	0.30	0.26	<0.1	0.14	<0.1	0.07	0.06	<0.1
2000年5月	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
2000年7月	1.15	0.16	0.95	0.37	N.A.	N.A.	0.60	0.53
2000年9月	0.87	0.41	3.46	0.66	0.85	0.31	0.80	0.19
2000年11月	0.25	0.35	<0.1	0.22	<0.1	0.21	<0.1	0.14
2001年1月	0.16	0.42	<0.1	0.12	0.1	0.14	<0.1	0.24

表19 霞ヶ浦湖水中のノニルフェノールの濃度 (ng/l)

年月	2001.8	2001.9	2001.11	2002.1	2002.3
KS-01	16.6	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
KS-02	53.7	35.3	N. A.	N. A.	N. A.
KS-03	10.1	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
KS-04	12.0	12.8	16.2	22.6	10.9
KS-05	12.5	9.3	N. A.	N. A.	N. A.
KS-06	16.3	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
KS-07	17.3	N. A.	16.8	22.4	15.4
KS-08	15.5	N. A.	20.2	13.6	10.6
KS-09	16.4	N. A.	20.0	26.8	16.0
KS-10	8.2	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
KS-11	9.9	8.2	N. A.	N. A.	N. A.
KS-12	12.5	10.3	N. A.	N. A.	N. A.
KS-13	8.9	10.3	N. A.	N. A.	N. A.
平均	16.1	14.4	18.3	21.4	13.2

表20 霞ヶ浦湖水中のオクチルフェノールの濃度 (ng/l)

年月	2001.8	2001.9	2001.11	2002.1	2002.3
KS-01	2.6	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
KS-02	4.1	2.6	N. A.	N. A.	N. A.
KS-03	2.5	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
KS-04	2.9	2.2	2.2	2.2	2.4
KS-05	2.6	2.7	N. A.	N. A.	N. A.
KS-06	3.0	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
KS-07	2.4	N. A.	2.4	1.9	2.4
KS-08	2.0	N. A.	2.4	2.4	2.1
KS-09	2.3	N. A.	2.5	4.2	4.0
KS-10	2.2	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
KS-11	2.1	2.5	N. A.	N. A.	N. A.
KS-12	2.0	2.3	N. A.	N. A.	N. A.
KS-13	2.3	2.3	N. A.	N. A.	N. A.
平均	2.5	2.5	2.4	2.7	2.7

表21 霞ヶ浦湖水中のビスフェノールAの濃度 (ng/l)

年月	2001.8	2001.9	2001.11	2002.1	2002.3
KS-01	18.0	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
KS-02	18.6	36.9	N. A.	N. A.	N. A.
KS-03	7.8	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
KS-04	9.7	18.8	3.7	10.4	5.4
KS-05	8.0	22.2	N. A.	N. A.	N. A.
KS-06	12.0	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
KS-07	8.4	N. A.	1.3	19.7	6.9
KS-08	2.6	N. A.	1.2	4.1	4.6
KS-09	9.7	N. A.	2.2	10.2	8.1
KS-10	3.0	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
KS-11	10.6	36.4	N. A.	N. A.	N. A.
KS-12	11.5	19.1	N. A.	N. A.	N. A.
KS-13	5.2	6.7	N. A.	N. A.	N. A.
平均	9.6	23.4	2.1	11.1	6.2

表 22 諏訪湖湖水のエストロゲン活性とエストラジオール類の濃度 (ng/l)

4月 (4月22日採水)

	エストロゲン活性 (E2換算)		E2, E1濃度 (ng/l)		
	-S9 test	+S9 test	E2	E1+E2	E2活性
湖心 表層	0.18	<0.05	0.10	0.34	0.18
湖心 水深4.5m	0.15	<0.05	0.10	0.33	0.18
天竜川下水道 排水	2.6	0.20	2.86	4.74	3.48
上川河口	0.20	<0.05	0.10	0.32	0.17

8月 (8月8日採水)

	エストロゲン活性 (E2換算)		E2, E1濃度 (ng/l)		
	-S9 test	+S9 test	E2	E1+E2	E2活性
湖心 表層	<0.1	<0.1	0.05	0.09	0.06
湖心 水深4.5m	<0.1	<0.1	0.06	0.09	0.07
天竜川下水道 排水	<0.1	<0.1	0.06	0.08	0.07
上川河口	<0.1	<0.1	0.09	0.16	0.11

ストラジオールやエストロンで説明できるように思われた。

ワカサギの雄魚でビテロゲニンが認められた諏訪湖のエストロゲン活性は、湖水の表層、下層ともに霞ヶ浦と同等に、ほとんど活性は認められなかった (表 22)。エストラジオール類も同様にきわめて微量しか検出されなかった。E2 活性に換算した結果は、両者ともに良い一致を示している。生物中の微量なビテロゲニン誘導を指標にした環境モニタリングには、内因性の生物固有の生理的現象や餌からの植物ホルモンなどを考慮に入れる必要性が指摘されており、ビテロゲニン誘導を指標としたモニタリング結果を内分泌攪乱物質との関連で評価するには、ワカサギのビテロゲニン産生に関する基礎的な検討を加えなければならないと考えられた。

多摩川などの下水放流水による流量の多い都市河川 (多摩川, 荒川, 中川及び坂川などの都市河川中の 2000 年 10 月採水) では、エストラジオール濃度は 1 ~ 2 ng/l と測定され、エストロン (E1) 濃度は 20 ng/l を超える場合があった (図 57)。GC/NCI-MS 法で測定された E1 及び E2 の濃度から $E2 + E1 \times 0.15$ (0.15 は E1 の酵母アッセイでの比活性) より換算したエストロゲン活性と酵母アッセイによるエストロゲン活性 (E2 換算値) の相関を示した (図 58)。酵母アッセイが低めの数値を与えているが、良い相関があった ($y = 0.7984x - 0.5377$, $R^2 = 0.7927$)。酵母活性による測定に何等かの抑制作用が働いていると考えられるが、本調査での河川水のエストロゲン活性の大部分は、人や家畜由来のエストロゲンで説明がつくように思われた。下水処理場排水の ELISA 法による E1, E2 の測定を、酵母アッセイ法

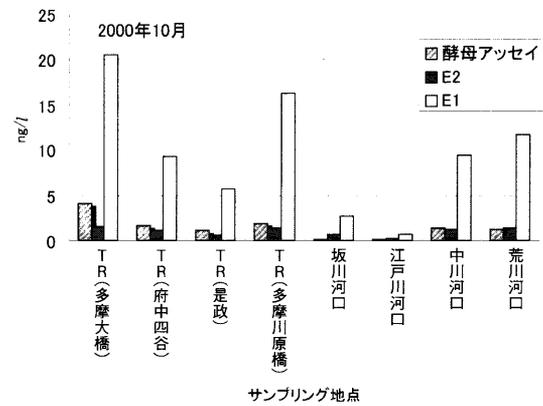


図 57 酵母アッセイによるエストロゲン活性 (E2 換算値) と E1 及び E2 の濃度 (多摩川, 荒川, 中川, 坂川, 2000 年 10 月採水)

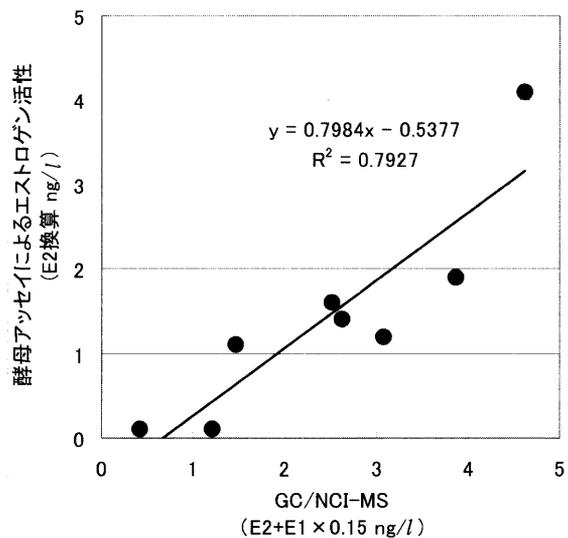


図 58 酵母アッセイと GC/NCI によるエストロゲン活性 (E2 換算値) の相関 (多摩川, 荒川, 中川, 坂川, 2000 年 10 月)

によるE2活性に換算(E2酵母活性値)したところ、C18-DCM抽出物は15 ng/l、C18-MeOH抽出物は19 ng/l、L/L(DCM)抽出物は18 ng/lであり、抽出法による差は、ほとんど認められなかった。測定されたELISA法によるE2とE1濃度から計算される活性は、酵母アッセイによる総エストロゲン活性と近い値ではあったが、LC/MS/MSによる確認を行ったところ、ELISA法のE2測定に2倍程度の高値が認められた。下水処理場排水のエストロゲン活性がすべてE2関連物質によるものとは断定はできないため、さらに、HPLCによる分画を行ったところ、E1画分にE1濃度から予想されるエストロゲン活性以上の活性が認められた。この結果は、他のエストロゲン活性物質の寄与を示唆しているが、原因物質の同定は、今後の課題である。

これらの河川が流入する、東京湾海水のエストロゲン

活性の予備的調査を行った(図59)。2002年夏に湾内7地点の表層と底層水を採取した。底層水ではすべての地点でエストロゲン活性は認められず、湾奥に近い表層水の4地点でのみE2換算で0.3~0.7 ng/l相当、平均で0.49 ng/lの活性が認められ、湾口からは検出されなかった(表23)。また、このエストロゲン活性は+S9処理で消失し、また、すべてのサンプルで+S9処理で新たなエストロゲン活性が現れることはなかった。東京湾では、夏季に成層しており、上下の混合が少ないことが知られている。河川からの流入水は、表層を経て、湾外へと流出していくと考えられる。エストロゲン活性に富む下水道の放流水や河川水は、夏季には成層している東京湾の表層へ拡散していくと仮定すると今回の測定結果をよく説明することができる。ELISAによるE2系の平均濃度およびE1+E2系での平均濃度は、それぞれ、底

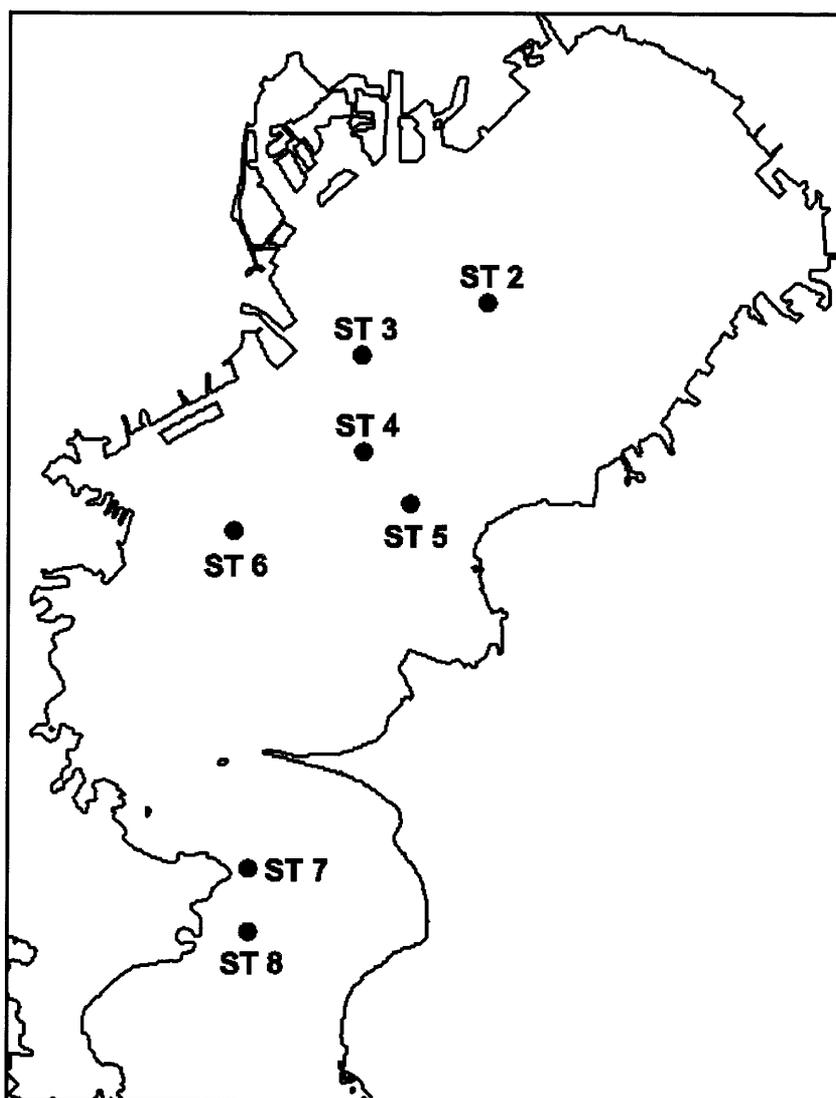


図59 東京湾海水の採水地点

層では $0.02 \pm 0.02 \text{ ng/l}$ および $0.08 \pm 0.05 \text{ ng/l}$ ($n = 7$), 湾内の表層で $0.3 \pm 0.1 \text{ ng/l}$ および $0.70 \pm 0.15 \text{ ng/l}$ ($n = 5$) 湾口では, 0.09 ng/l および 0.2 ng/l ($n = 2$) であった。底層水中のエストラジオール類の濃度はきわめて低く, 酵母アッセイでエストロゲン活性が認められないことと一致している。また, 表層水で測定されたエストラジオール類の濃度を酵母によるエストロゲン活性に換算すると平均で 0.78 ng/l 相当であり, 実測の活性 0.49 ng/l とほぼ等しい。+S9 処理でエストロゲン活性がなくなることは, エストラジオールなどの天然ホルモンの特徴である。これらの結果は, 表層水のエストロゲン活性の大部分は, 天然ホルモンであるエストラジオール類の計測値で説明することができることを示しており, その濃度は, 魚類の雌化を引き起こすレベルにはない。しかし, 今回の調査は夏季のみであるため, 海流や生分解性が異なると考えられる冬季など, 年間を通じた調査を通じてエストロゲン活性やエストラジオール類の挙動を把握する必要があると思われた。

2.4 まとめ

本研究は, 内分泌攪乱化学物質の計測法と評価法の開発を通じて, 環境ホルモンの実態を把握する目的で検討を進めた。超微量分析の領域である ng/l 以下の測定を必要とするエストラジオールなどを精度よく測定することは, きわめて困難である。微量なるがゆえに, 用いる機器の最高感度で測定せざるを得ず, また, 妨害物質の除去のために多くの前処理が必要であった。機器の検出下限値付近での測定は, 測定精度 (繰り返し再現性) の悪いことを意味し, 各種の測定法のクロスチェックを行う

際に問題となった。LC/MS/MS など新しい分析機器による定量分析法は, 未だに発展段階である。液体状態からイオン化するためイオン化が不安定であることや, イオン源やレンズ系の汚れで感度が容易に変化するなど, GC/MS 以上の精度管理が必要である。このような問題は, 同位体標識の内部標準物質を用いることや溶離液の選択, 誘導体化の方法, 前処理法の改良で克服してきた。エストラジオールの GC/NCI-MS 法など, 本研究で, 開発した方法は, その後の環境省のモニタリング事業に活用されている。

環境モニタリングを限られた資源で行うためには, 効率的な測定系が必要である。特に, 超微量分析が必要なエストラジオールは, 機器分析では多くの手間と時間がかかり, 処理できる試料数には限りがあった。ELISA 法は簡便で, 処理が早く多くの試料の測定が必要な環境モニタリングには非常に有用な手法である。しかしながら, ELISA 法では, 固相化, 抗原抗体反応, 酵素反応, 生成物の測定などの複雑な過程を同一条件ですることが前提である。この条件が十分に満たされていないと, 特に, 環境試料のような不均質なものを試料とする場合には, 不正確な測定結果を与えかねない。このため, 対象とする試料の性質に応じた試薬設計が必要であり, さらに分析操作の自動化が有効であると考えられた。本研究では, エストラジオール類, 魚類のビテロゲニンなどを中心に, ELISA 法の有用性を検証した。エストラジオール類やビスフェノール A の ELISA 法と機器分析値との相関性の確認やメダカビテロゲニン測定系の構築などの成果があり, 有効性の確認されたエストラジオール類の ELISA 法に関しては, その後のモニタリングに活用し

表 23 東京湾海水のエストロゲン活性とエストラジオール類の濃度 (ng/l)

地点	採水m (水深)	エストロゲン活性 (E2 ng/l)		E1及びE2濃度 (ng/l)		酵母換算 (E2 ng/l)
		-S9 test	+S9 test	AIA-E2	AIA-E1E2	
湾内 St2	0m	0.35	<0.1	0.26	0.63	0.74
湾内 St3	0m	0.50	<0.1	0.23	0.60	0.74
湾内 St4	0m	0.31	<0.1	0.24	0.57	0.66
湾内 St5	0m	0.58	<0.1	0.40	0.78	0.76
湾内 St6	0m	0.70	<0.1	0.45	0.94	0.98
湾口 St7	0m	<0.1	<0.1	0.09	0.21	0.24
湾口 St8	0m	<0.1	<0.1	0.08	0.18	0.20
湾内 St2	16m (17m)	<0.1	<0.1	0.00	0.09	0.18
湾内 St3	22m (24m)	<0.1	<0.1	0.02	0.14	0.24
湾内 St4	19m (20m)	<0.1	<0.1	0.05	0.13	0.16
湾内 St5	22m (24m)	<0.1	<0.1	0.03	0.06	0.06
湾内 St6	25m (27m)	<0.1	<0.1	0.03	0.10	0.14
湾口 St7	30m (35m)	<0.1	<0.1	0.02	0.05	0.06
湾口 St8	70m (79m)	<0.1	<0.1	0.00	0.01	0.02

た。

生態系への環境ホルモン作用の影響に関する報告は限定的である。また、その影響の原因物質が特定されていないのが現状である。環境媒体のホルモン作用をいかに捕らえることができるかを中心に、環境ホルモンの評価法の検討を行い、簡便な酵母ツーハイブリッドアッセイ法や *in vivo* の評価系としてメダカを用いバイオマーカー遺伝子やタンパクを計測する試験系を構築した。酵母ツーハイブリッドアッセイ法では、エストロゲン受容体やそのサブタイプに加え、甲状腺ホルモン受容体、アンドロゲン受容体、さらにヒト以外の動物の受容体など多くの遺伝子組換え酵母を作成しアッセイ系を拡張し

た。本研究で開発された方法は、化学物質のみならず、環境試料にも適用できるアゴニスト活性とアンタゴニスト活性の評価システムとして広く利用されはじめている。本システムにより測定された東京湾の海水や霞ヶ浦湖水のエストロゲン活性は、魚類を雌化するレベルにはなかった。一方、下水道が多く流入する河川では、エストラジオール換算で数 ng/l 相当の活性が認められた。エストロゲン活性の多くはエストラジオール類が原因と考えられたが、エストラジオール類ですべての活性を説明できない検体もみられた。環境媒体のエストロゲン活性の実態の解明には、今後、活性物質の同定を着実に進めていく必要があると思われた。

[資料]

I 研究の組織と研究課題の構成

1 研究の組織

[A 研究担当者]

環境ホルモン・ダイオキシン研究プロジェクトグループ	
プロジェクトリーダー	森田昌敏 (併)
計測・生物検定・動態研究チーム	白石寛明 (併)
	白石不二雄
	彼谷邦光 (併)
	高木博夫 (併)
化学環境研究領域	
生態化学研究室	John Edmonds
NIES フェロー	鑑迫典久
NIES ポスドクフェロー	西川智浩
	磯部友彦
NIES アシスタントフェロー	近藤卓哉
	小宇田智子
	小塩正朗

[B 客員研究員]

西川 淳一	(大阪大学)	(平成 11 ~ 14 年度)
橋本 伸哉	(静岡県立大学)	(平成 11 ~ 13 年度)
丸尾 直子	(東ソー株式会社)	(平成 12 ~ 14 年度)
笹井 春雄	(長野県衛生公害研究所)	(平成 11 ~ 14 年度)
小口 文子	(長野県衛生公害研究所)	(平成 11 ~ 14 年度)
細井 要一	(長野県衛生公害研究所)	(平成 12 ~ 14 年度)
深澤 均	(静岡県環境衛生科学研究所)	(平成 13 ~ 14 年度)
渡邊 雅之	(静岡県環境衛生科学研究所)	(平成 14 年度)
中嶋 智子	(京都府保健環境研究所)	(平成 12 ~ 14 年度)
高橋 悟	(岩手県環境保健研究センター)	(平成 13 ~ 14 年度)

2 研究課題と担当者 (*客員研究員)

(1) 内分泌攪乱化学物質の分析法に関する研究

白石寛明・彼谷邦光・高木博夫・John Edmonds・磯部友彦・近藤卓哉・丸尾直子*

(2) 内分泌攪乱化学物質の評価法に関する研究

白石不二雄・白石寛明・鑑迫典久・西川智浩・小宇田智子・小塩正朗・西川淳一*・橋本伸哉*・丸尾直子*・深澤 均*・渡邊雅之*

(3) 環境試料への応用

白石寛明・白石不二雄・高木博夫・磯部友彦・丸尾直子*・笹井春雄*・小口文子*・細井要一*・深澤 均*・渡邊雅之*・中嶋智子*・高橋 悟*

Ⅱ 研究成果発表一覧

1 誌上発表

発表者	題 目	掲 載 誌	巻(号)	ページ	刊年
森田昌敏	環境ホルモン問題－トータルリスクを今考える－	資源環境対策	35(11)	6-8	1999
森田昌敏	内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）問題の現状と課題	公衆衛生	63	907-912	1999
森田昌敏	環境ホルモンの生体への影響と検査法	SRL 宝函	23	67-69	1999
彼谷邦光	環境ホルモンと環境汚染	空気調和・衛生工学	73	1026-1028	1999
白石寛明, 中杉修身, 橋本俊次, 山本貴士, 安原昭夫, 安田憲二	内分泌攪乱化学物質と廃棄物	廃棄物学会誌	10(4)	293-305	1999
白石寛明, 安原昭夫, 奥村為男	Ⅲ-1-3 フェノール類, ビスフェノール-A, 有機スズ	環境ホルモンのモニタリング技術分析・測定法の実際（森田昌敏監修, シーエムシー, 309 p.）		100-114	1999
森田昌敏	内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム'99	資源環境対策	36	26-34	2000
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 による簡便なエストロゲンアッセイ系の開発	環境化学	10(1)	57-64	2000
西 和人, 水上春樹, 筒井通雄, 白石寛明, 山下倫明, 榊原隆三, 民谷栄一	メダカを利用した環境ホルモン・バイオアッセイの開発	実験医学	18(19)	2701-2705	2000
白石寛明	計測技術の諸問題	第2回内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム報告書（環境庁環境保健部環境安全課編, 670 p.）		289-292	2000
彼谷邦光	内分泌攪乱物質研究の最近の動向	遺伝	54(9)	24-29	2000
堤 治, 森田昌敏, 紫芝義昌	内分泌攪乱物質の状況とヒトへの影響	治療学	34(5)	545-555	2000

発 表 者	題 目	掲 載 誌	巻(号)	ページ	刊年
白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 曾家義博, 佐野友春, 彼谷邦光, 西原 力, 森田昌敏	酵母を用いたエストロゲン・アン タゴニストアッセイ系の開発と有 機スズへの応用	環境化学	11(1)	65-73	2001
森田昌敏	生化学 環境ホルモンとその測定 法	Lab. Clin. Pract.	19	14-17	2001
森田昌敏	内分泌攪乱物質 (環境ホルモン) 問題の本質と解決の方向性につい て	環境科学会誌	14	433-439	2001
Fukazawa H., Watanabe M., Shiraishi F., Shiraishi H., Shiozawa T., Matsushita H., Terao Y.	Formation of chlorinated derivatives of bisphenol A in waste paper recycling plants and their estrogenic activities	J. Health Sci.	48(3)	242-249	2002
森田昌敏, 崔 宰源	日韓・ダイオキシン・PCB 測定 法のハーモナイゼーションについ て	平成 13 年度内分泌攪乱 化学物質問題に関する 日韓共同研究報告書		40-48	2002
白石寛明, 畠山成久	内分泌攪乱物質の評価手法の開 発 魚等の生物に対する内分泌攪 乱作用の生物検定法の開発	内分泌攪乱物質による 生殖への影響とその作 用機能に関する研究			2002
Koda T., Soya Y., Negishi H., Shiraishi F., Morita M.	Improvement of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for screening estrogen receptor binding activity	Environ. Toxi. Chem. (in press)			2002

2 口頭発表

発表者	題目	学会等名称	開催都市名	年月
森田昌敏	環境ホルモン類とそのモニタリング法概論	第24回日本環境化学会講演会	東京	10. 7
Morita M.	Endocrine disrupting chemicals-problems and current research in Japan-	Korean Soc. Toxicol. Spec. Symp. Endocr. Disrupting Chem.	Seoul	10.10
森田昌敏	外因性内分泌攪乱物質の測定方法と精度管理	第26回日本環境化学会講演会	東京	10.10
森田昌敏	環境ホルモンとその検出法	第9回クロマトグラフィー科学会議	東京	10.11
白石寛明, 大内和幸, 高木博夫, 寺島千晶	フェノール骨格を持つ環境ホルモンの電気化学検出器による高感度分析法に関する研究	日本内分泌攪乱化学物質学会第1回研究発表会	京都	10.12
白石寛明, 今須淳子, 森田昌敏	負イオン化学イオン化GC/MS法によるフェノール性内分泌攪乱物質の分析	日本内分泌攪乱化学物質学会第1回研究発表会	京都	10.12
森田昌敏	内分泌攪乱物質研究の現状と展望	日本薬学会第119年会	徳島	11. 3
森田昌敏	環境ホルモンとダイオキシン	日本薬学会第23回市民講演会	金沢	11. 6
森田昌敏	内分泌かく乱物質の環境への放出と残留	日本臨床環境医学会特別講演会	東京	11. 6
川田邦明, 茨木 剛, 雅楽川憲子, 小熊千佳子, 中野友香, 坂井正明, 貴船育英, 森田昌敏	環境試料中のスチレン2量体及び3量体の分析	日本環境化学会第8回環境化学討論会	北九州	11. 7
増崎優子, 松村 徹, 服部達也, 森田昌敏	血液中のダイオキシン類・PCBの分析	日本環境化学会第8回環境化学討論会	北九州	11. 7
白石寛明, 横田弘文	メダカコリオゲン mRNA の TaqMan システムによる定量法	日本環境化学会第8回環境化学討論会	北九州	11. 7
白石寛明	内分泌攪乱化学物質の分析上の課題	内分泌攪乱化学物質研究発表会	東京	11. 8
森田昌敏	外因性内分泌攪乱物質の発生, 環境への移行及び蓄積	第40回大気環境学会年会	津	11. 9

発表者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
森田昌敏	環境ホルモナー調査研究の現状と分析上の課題	第3回分析化学東京シンポジウム1999 機器分析東京討論会	千 葉	11. 9
白石寛明	国内の環境ホルモンの検出状況	第10回環境科学会セミナー	東 京	11. 9
森田昌敏	内分泌攪乱化学物質の環境モニタリング	日本学術会議50周年記念事業 第5回植物保護・環境シンポジウム	東 京	11.11
Shiraishi H.	Environmental analysis of endocrine disruptors in Japan	Korea-Jpn. Coop. Jt. Semon. Endocr. Disruptors	Seoul	11.11
白石寛明, 白石不二雄, 永洞真一郎, 森田昌敏	水中ステロイドホルモンのNCI-GC/MS分析法の開発とその応用	日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会	神 戸	11.12
白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 西原 力, 森田昌敏	マイクロプレート培養法による簡便な酵母 Two-Hybrid System のエストロゲンアッセイ法の開発	日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会	神 戸	11.12
根岸治美, 森田昌敏	レセプター結合アッセイを用いた環境ホルモン活性測定の化学物質スクリーニングへの応用	日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会	神 戸	11.12
宮田恵里, 森田昌敏	Betta splendens の初期生活段階に及ぼす Ethynyl estradiol と Methyltestosterone の影響	日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会	神 戸	11.12
吉田成一, 鹿川香那子, 平田悟史, 榊沼俊明, 武田 健, 森田昌敏	ディーゼル排気微粒子の性ステロイドホルモンレセプター発現抑制作用	日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会	神 戸	11.12
今井裕恵, 壁谷俊彦, 森田昌敏	Er α -LBD-リガンド複合体の分子構造の視覚化	日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会	神 戸	11.12
殷 熙沫, 遠田浩司, 彼谷邦光, 森田昌敏	PVC液膜を用いたフェノール類 (<i>p</i> -ノニルフェノール) の新規分析法	日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会	神 戸	11.12
白石寛明	計測技術の諸問題	第2回内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム	神 戸	11.12

発 表 者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
Morita M.	Environmental chemistry and emission sources of EDCs	UNU Int. Symp. Endocr. Disruptors Compounds (EDCs)	Kuala Lumpur	12. 4
桜井健郎, 白石寛明, 森田昌敏	ノニルフェノール関連化合物の環境水中での挙動	日本環境化学会第9回環境化学討論会	札 幌	12. 6
渡部悦幸, 今井裕恵, 近藤卓哉, 森田昌敏	カラムスイッチング及び膜濃縮を用いた環境水中ビスフェノール A の HPLC 簡易分析	日本内分泌攪乱化学物質学会第3回研究発表会	横 浜	12.12
白石不二雄, 曾家義博, 白石寛明, 西川淳一, 西原 力, 森田昌敏	SPEED' 98 掲載化学物質の <i>in vitro</i> アッセイ系によるエストロゲン活性	日本内分泌攪乱化学物質学会第3回研究発表会	横 浜	12.12
芹沢滋子, 森田昌敏	スチレンダイマー・トリマーのキャピラリー・ガスクロマトグラフィーにおける挙動	日本内分泌攪乱化学物質学会第3回研究発表会	横 浜	12.12
奥山 亮, 西 和人, 水上春樹, 小崎俊司, 切畑光統, 宮武和孝, 森田昌敏	コプラナー PCB モノクローナル抗体の作製	日本内分泌攪乱化学物質学会第3回研究発表会	横 浜	12.12
Shiraishi H.	Feminization of fish and analysis of estrogenic compounds	UNU Int. Sympo. Ind. EDC Pollut.	Seoul	13. 4
白石寛明, 磯部友彦, 今須淳子, 安田 克, 篠田晶子, 鈴木廣志, 森田昌敏	環境中エストラジオール関連物質の LC/MS/MS 分析における HPLC 条件の最適化	日本環境化学会第10回環境化学討論会	松 山	13. 5
丸尾直子, 白石寛明, 今須淳子, 高木博夫, 森田昌敏	環境水中エストロゲン測定用全自動 EIA 法の構築とその評価	日本環境化学会第10回環境化学討論会	松 山	13. 5
滝上英孝, 井上純子, 原田 新, 河辺 聖, 森田昌敏	<i>Xenopus Laevis</i> を用いた甲状腺機能攪乱化学物質検出法の開発	日本環境化学会第10回環境化学討論会	松 山	13. 5
白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 佐野友春, 彼谷邦光, 西原 力, 森田昌敏	酵母アッセイシステムを用いたスチレン・ダイマー及びトリマーのエストロゲン活性	日本環境化学会第10回環境化学討論会	松 山	13. 5

発表者	題目	学会等名称	開催都市名	年月
永洞真一郎, 阿賀裕英, 芥川智子, 沼辺明博, 村田清康, 坂田康一, 白石不二雄	固相抽出-酵母 Two-Hybrid 法による環境 試料中のエストロゲン活性物質アッセイ におけるフミン物質の影響	日本環境化学会 第 10 回環境化学討論会	松 山	13. 5
滝上英孝, 井上純子, 原田 新, 河辺 聖, 森田昌敏	Xenopus laevis を用いた甲状腺機能攪乱 化学物質検出法の開発	日本環境化学会 第 10 回環境化学討論会	松 山	13. 5
白石寛明	内分泌攪乱物質の計測手法及び評価手法 の開発	シンポジウム 2001「明日 をめざす科学技術」科 学技術振興調整費の成果 を中心として	東 京	13.10
柳 英硯, 石橋弘志, 武政剛弘, 野村雄二, 白石不二雄, 西原 力, 西島治香, 古賀 実, 篠原亮太, 有蘭幸司	歯科材料基材のエストロゲン活性及び遺 伝毒性評価と代謝活性化	日本薬学会フォーラム 2001: 衛生薬学・環境ト キシコロジー	金 沢	13.10
宮原真紀, 柳 英硯, 西島治香, 犬童真紀子, 石橋弘志, 白石不二雄, 西原 力, 有蘭幸司, 井口泰泉, Guillette L.J.Jr.	酵母 Two-Hybrid 法による各種実験動物用 飼料中のエストロジェン様物質評価	日本薬学会フォーラム 2001: 衛生薬学・環境ト キシコロジー	金 沢	13.10
Shiraishi H.	Chemical analysis of estrogenic compounds	SETAC Asia/Pac. Symp. 2001	Kanazawa	13.11
Hashimoto S., Cho S-M., Kurihara R., Strusmann C., Uozumi M., Yamakawa H., Yamasaki T., Soyano K., Shiraishi H., Morita M.	Gonadal abnormalities in wild Konosiro gizzard shad (Konosirus punctatus) from Tokyo Bay, Japan	SETAC Asia/Pac.Symp. 2001	Kanazawa	13.11

発 表 者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
Kurihara R., Bessyo H., Strussmann C., Yamasaki T., Soyano K., Hara A., Shiraishi H., Morita M., Hashimoto S.	Gonadal observation of Bigeye tuna (<i>Thunnus obesus</i>) collected in the North Pacific	SETAC Asia/Pac. Symp. 2001	Kanazawa	13.11
You Y-S., Ishibashi H., Takemasa T., Nomura Y., Shiraishi F., Nishihara T., Nishijima H., Koga M., Shinohara R., Arizono K.	Estrogenic activity, genotoxicity and metabolic activation of monomers and polymerization initiator on dental resin in vitro, SETAC Asia-Pac. Symp. 2001	Environ. Toxicol., Chem. & Risk Assess. Asia/Pac. -Affect, Analyze Assess-	Kanazawa	13.11
Miyahara M., You Y-S., Nishijima H., Inudo M., Ishibashi H., Shiraishi F., Nishihara T., Arizono K., Iguchi T., Guillette L.J.Jr.	The estrogenic activity on feeding diet evaluated with yeast two-hybrid assay in vitro	SETAC Asia-Pac. Symp. 2001	Kanazawa	13.11
中嶋智子, 白石不二雄, 白石寛明, 太田真弓, 井上 壽	遺伝子組み換え酵母を用いた廃棄物埋立処分場からの外因性内分泌かく乱物質検出の試み	日本水環境学会関西支部第3回研究発表会	大 阪	13.11
Takigami H., Inoue J., Harada A., Morita M.	Development of bioassays using <i>Xenopus laevis</i> for the determination of the effects of causative substances on its development and metamorphosis	Int. Workshop EDs Eff. Amphibians EDs Res. Protoc. Standard	Tsukuba	13.12
滝上英孝, 井上純子, 原田 新, 森田昌敏	アフリカツメガエル (<i>Xenopus laevis</i>) の発生及び変態課程に影響を及ぼす化学物質の検索	日本内分泌攪乱化学物質学会第4回研究発表会	つくば	13.12
中嶋智子, 白石不二雄, 白石寛明, 太田真弓, 井上 壽	酵母 Two-hybrid Assay System を用いた事業所排水からの外因性内分泌かく乱化学物質検出法の試み	日本内分泌攪乱化学物質学会第4回研究発表会	つくば	13.12

発表者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
犬童真紀子, 宮原真紀, 柳 英硯, 石橋弘志, 西島治香, 白石不二雄, 西原 力, Guillette L.J.Jr., 川越信秀, 宮川秀則, 中村優子, 他	飼料中に含まれる植物エストロジェンの 分析及びエストロジェン活性評価	日本内分泌攪乱化学物質 学会第4回研究発表会	つくば	13.12
西川淳一, 白石不二雄, 深澤 均, 渡邊雅之, 小宇田智子, 寺尾良保, 白石寛明, 森田昌敏	Bisphenol A の塩素付加によるエストロゲ ン活性の増強	日本内分泌攪乱化学物質 学会第4回研究発表会	つくば	13.12
Kouda T., Shiraishi F., Edmonds J.S., Oshima Y., Nakajima N., Morita M.	Synthesis and estrogenic activity of bisphenol A mono-and di-beta-D- glucopyranosides	4th Annu. Meet. Jpn. Soc. Endocr. Disrupters Res.	Tsukuba	13.12
近藤卓哉, 森田昌敏, 渡辺悦幸	カラムスイッチング HPLC によるエスト ロゲンの簡易測定法	日本内分泌攪乱化学物質 学会第4回研究発表会	つくば	13.12
渡辺悦幸, 山本文子, 今井裕恵, 近藤卓哉, 大島幸子, 森田昌敏	カラムスイッチング法を用いた環境水中 ビスフェノール A の HPLC 簡易分析	日本内分泌攪乱化学物質 学会第4回研究発表会	つくば	13.12
Imai H., Morita M.	Determination of bisphenol A and bisphenol A-B-glucuronide in human urine	4th Annu. Meet. Jpn. Soc. Endocr. Disrupters Res.	Tsukuba	13.12
羽田野泰彦, 西 和人, 水上春樹, 山下倫明, 榊原隆三, 民谷栄一, 森田昌敏	ゼブラフィッシュビテロゲニン ELISA 測 定系の構築	日本内分泌攪乱化学物質 学会第4回研究発表会	つくば	13.12
西 和人, 近江みゆき, 羽田野泰彦, 水上春樹, 山下倫明, 榊原隆三, 民谷栄一, 森田昌敏	メダカビテロゲニン・バイオアッセイの 基礎検討	日本内分泌攪乱化学物質 学会第4回研究発表会	つくば	13.12

発 表 者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
鑓迫典久, 小塩正朗, 早川洋一, 河辺 聖, 近藤卓哉, 白石不二雄, 森田昌敏	メダカを用いた <i>in vivo</i> 系エストロゲンア ンタゴニスト活性測定法の開発	日本内分泌攪乱化学物質 学会第4回研究発表会	つくば	13.12
丸尾直子, 西川智浩, 鑓迫典久, 高木博夫, 白石寛明	モノクローナル抗体を用いたメダカビテ ロゲニン全自動 EIA 測定系の構築	日本内分泌攪乱化学物質 学会第4回研究発表会	つくば	13.12
高木博夫, 丸尾直子, 春日清一, 西川智浩, 白石寛明	Development of Wasakagi vitellogenin enzyme immunoassay and its application to the evaluation of endocrine disrupting effects in lakes	日本内分泌攪乱化学物質 学会第4回研究発表会	つくば	13.12
西川智浩, 丸尾直子, 鑓迫典久, 白石寛明, 森田昌敏	抗メダカビテロゲニンモノクローナル抗 体の樹立とその特性	日本内分泌攪乱化学物質 学会第4回研究発表会	つくば	13.12
鑓迫典久	メダカを用いたバイオアッセイ法の開発	第一回日韓共同研究シン ポジウム	インチョン (韓 国)	13.12
丸尾直子, 磯部友彦, 白石寛明, 高木博夫, 森田昌敏	環境水中のエストロゲン測定用全自動 EIA 法の構築とその評価	第36回日本水環境学会 年会	岡 山	14. 3
渡邊雅之, 深澤 均, 平賀由利子, 白石不二雄, 白石寛明, 寺尾良保	塩素置換アルキルフェノール類のエスト ロゲン活性	日本環境化学会 第11回環境化学討論会	箱 根	14. 6
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 <i>in vitro</i> エストロゲン試験法 のための前処理について—酵母アッセイ 法及びエストロゲン ELISA 測定法での比 較—	日本環境化学会 第11回環境化学討論会	箱 根	14. 6
白石寛明, 白石不二雄, 鑓迫典久, 西川智浩	内分泌攪乱化学物質のアンタゴニスト活 性の評価とその作用メカニズムに関する 研究	平成13年度内分泌攪乱 化学物質等の作用メカニ ズムの解明等基礎的研究 研究発表会	東 京	14. 6

REPORT OF SPECIAL RESEARCH FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所特別研究報告

SR-46-2002

平成 14 年 9 月 30 日発行

編 集 国立環境研究所 編集委員会

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 番 2
電話 0298-50-2343 (ダイヤルイン)

印 刷 株式会社 イ セ ブ

〒305-0005 茨城県つくば市天久保 2 丁目 11-20

Published by the National Institute for Environmental Studies

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan

September 2002

無断転載を禁じます