

Point

レポーター遺伝子アッセイは、動物細胞を用いた簡便な試験で、環境省が実施している化学物質の内分泌かく乱作用の評価に用いられています。この試験を環境試料に適用し、内分泌かく乱作用を総括的かつ簡便に評価する取り組みについて紹介します。

# レポーター遺伝子アッセイによる環境試料の内分泌かく乱作用の評価

環境創造研究所 環境リスク研究センター リスク評価部 澤井 淳

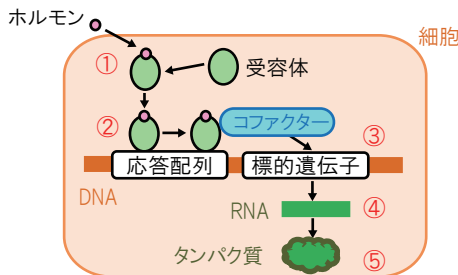
## はじめに

ホルモンは内分泌腺で作られ、ごく微量で生物の生理的な作用を調節する物質です。1990年代にホルモンのように作用する化学物質が環境中にあり、それらが生物の体内で内分泌系をかく乱して生殖機能等に悪影響を与える可能性があることが報告されました。現在も国内外で調査研究が続けられ、内分泌かく乱作用が疑われている一部の化学物質は全国の一級河川でモニタリングされています。このようななか、未知物質を含む多種多様な化学物質の内分泌かく乱作用を総括的に評価でき、モニタリングにも利用できる簡便な手法が期待されています。

ここでは、試料中の内分泌かく乱化学物質の濃度を測定するよりも簡便な手法として、試料がもつ総括的な内分泌かく乱作用の大きさを測定する「レポーター遺伝子アッセイ」を、環境試料に適用した事例についてご紹介します。

## レポーター遺伝子アッセイとは

レポーター遺伝子アッセイは、生物の体内の作用を培養細胞(特別な性質等が安定的に保持され、継代培養可能な細胞として樹立された細胞株。ヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293等)で再現した試験です。内分泌かく乱作用の評価に用いる試験は、ホルモンの作用(図1)を模しています。ホルモンは受容体に結合後(①)、細胞内のDNAに作用し(②、③)、タンパク質合成の設計図となるRNAを作らせます(④)。それをもとに作られたタンパク質(⑤)が生殖機能の調節等に関与します。



恒常性維持、エネルギー代謝、成長、生殖に関与

図1 細胞内でのホルモンの作用

## (1) レポーター遺伝子アッセイの仕組み

遺伝子を運ぶ役割をするベクターを用いて、受容体遺伝子とレポーター遺伝子を導入した培養細胞を用います(図2、3)。受容体遺伝子には、ヒト、メダカ、ニシツメガエル等さまざまな生物のものを用いることができます。レポーター遺伝子は、受容体の作用を報告(レポート)する役割をするもので、ルシフェラーゼ\*の遺伝子を用います。受容体に内分泌かく乱物質が結合すると、ルシフェラーゼが作られ、ルシフェリン\*を加えることで発光します。その発光強度を測定し、試料の内分泌かく乱作用を評価します。

## (2) アゴニスト\*作用とアンタゴニスト\*作用の評価

レポーター遺伝子アッセイでは、アゴニスト作用(図2)およびアンタゴニスト作用(図3)を評価できます。それらの強さは、試料の発光強度を陽性対照物質(ホルモン等)の発光強度と比較し、陽性対照物質の濃度に換算した相対値(活性値)として表します。レポーター遺伝子アッセイは、環境省が進める化学物質の内分泌かく乱作用の評価において、女性ホルモン、男性ホルモン、甲状腺ホルモンのアゴニストまたはアンタゴニスト作用の評価に用いられており、適切に前処理することで、環境試料にも適用できます。

\*【用語解説】参照

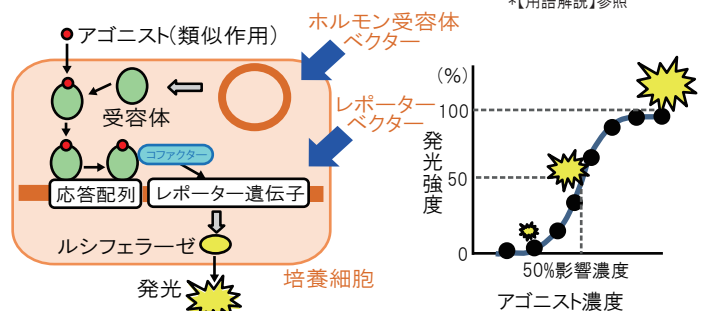


図2 アゴニスト作用検出の仕組み

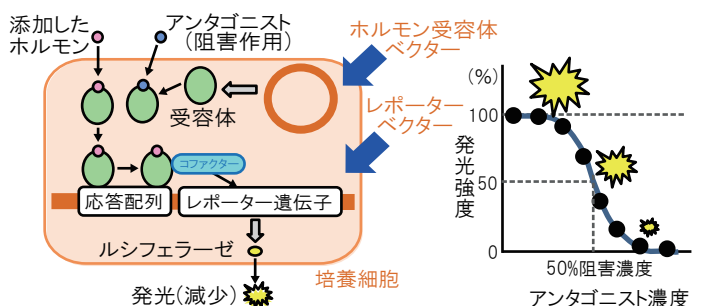


図3 アンタゴニスト作用検出の仕組み

## 環境試料へのレポーター遺伝子アッセイの適用

### (1) 試料の前処理

試料中の化学物質を固相抽出法で回収します(図4)。定流量ポンプを用いて、樹脂カートリッジに1Lの試料を通します。樹脂に吸着した化学物質を2種類の有機溶媒で溶出させ、1万倍希釈から10倍濃縮まで6種類の濃度に調製し、本アッセイに用います。



図4 固相抽出法の流れと定流量ポンプ

### (2) レポーター遺伝子アッセイ

1週間培養した動物細胞を96ウェルマイクロプレートに入れ、24時間培養した後、受容体遺伝子と2種類のレポーター遺伝子を試薬とともに添加します(図5)。このとき、動物細胞に各遺伝子が導入されます。その後、各濃度に調製した被験試料を添加し、40時間培養した後、ルシフェラーゼによる発光の強さを測定します。レポーター遺伝子アッセイは4日程で結果が得られるため、迅速に評価できます。

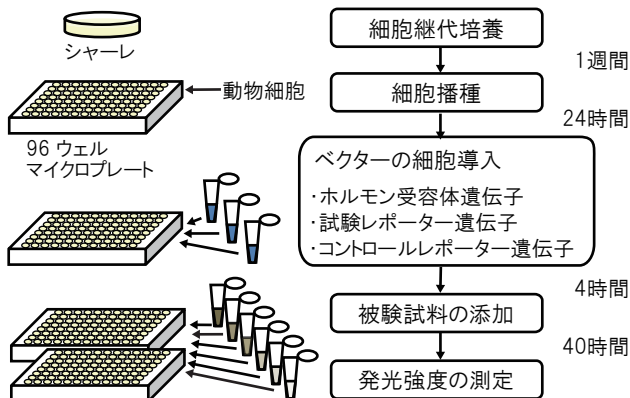


図5 レポーター遺伝子アッセイの流れ

#### 【用語解説】

- ルシフェラーゼ：ホタル等の生物発光を触媒する酵素の総称。ルシフェリンを酸化する働きをもつ。
- ルシフェリン：ホタル等の生物発光の際に酸化されて発光する化合物の総称。
- アゴニスト：受容体に結合して、生体内の物質(ホルモン等)と同様の反応を引き起こす物質。
- アンタゴニスト：受容体に結合しても反応を引き起こさない物質。生体内の物質(ホルモン等)の作用を阻害する。

### (3) 適用事例

排水とその処理水への適用事例を図6に示します。排水では女性ホルモン、男性ホルモンのアゴニスト作用および甲状腺ホルモンのアンタゴニスト作用が検出されました。処理水では女性ホルモンのアゴニスト作用が検出されましたが、排水の1/4程度まで低減していました。このように、レポーター遺伝子アッセイを適用することで、環境試料の各内分泌かく乱作用を定量的に評価することができ、排水処理の有効性を評価する手法として適用できます。

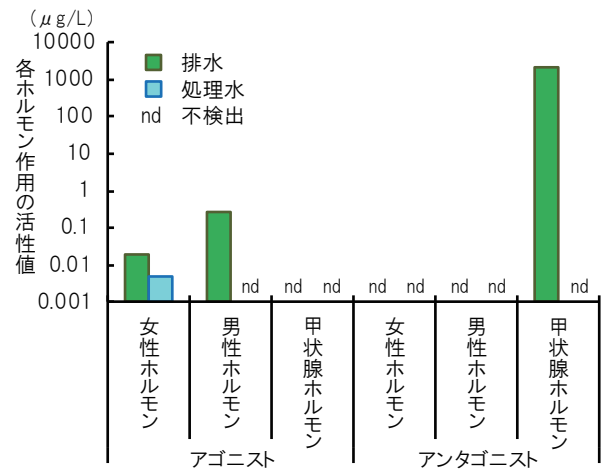


図6 環境試料の測定例

### おわりに

レポーター遺伝子アッセイを用いた調査により、環境中でアゴニストとアンタゴニストが複合的に作用している事例が報告されています<sup>1)</sup>。環境中の多種多様な化学物質による生物への影響を評価するためには、各内分泌かく乱作用を総合的かつ定量的に評価できるレポーター遺伝子アッセイの適用が有効であると考えられます。また、比較的簡便な手法なため、河川水や排水処理水のモニタリングにも活用されることが期待されます。

当社は化学物質GLP適合確認試験施設を有しており、化審法に基づく毒性試験や、化学物質の内分泌かく乱作用を調べる試験において、高い技術と多くの経験を有しています。また、環境試料の内分泌かく乱作用の評価においても、動物細胞を用いるレポーター遺伝子アッセイから生物を用いる毒性試験まで、さまざまな試験実績があります。今後も、目的に応じた試験のご提案と信頼性の高い試験をご提供してまいります。

#### 【参考文献】

- 1) M. Ihara et al. (2014), Environ. Sci. Technol., 48(11), pp.6366-6373