

## &lt;特集&gt;

# 簡易イムノアッセイによる 内分泌かく乱化学物質スクリーニング手法

Simple Screening Method for Environmental Endocrine Disruptors by Rapid Immunoassay

羽田野 泰彦

株式会社 エンバイオテック・ラボラトリーズ つくば研究室\* 主任研究員

Yasuhiko Hatano

EnBioTec Laboratories Co. Ltd., Environmental Biotechnology R & D, Senior Researcher

## 1 はじめに

1996年に出版されたコルボーンらの「奪われし未来」を発端に<sup>1)</sup>、我々の身近にある化学工業製品に使われている原料化学物質が内分泌かく乱を引き起こす危険性が懸念されてきた。このような毒性を示す物質は外因性内分泌かく乱化学物質と呼ばれ、マスコミの過剰反応にも助長され広く一般市民へも環境ホルモンの名称で認知されるようになった。

内分泌かく乱化学物質の毒性はそれまでの化学物質の毒性と比べて以下の点で特徴的である。第一に、胎児期あるいは幼児期での化学物質曝露が成熟期以降に繁殖能力の低下や行動異常などとして現れる点である。このような曝露時期と影響発現時期のタイムラグと致死毒性ではないために、成熟期以降に生殖異常や行動異常が現象として認められたとしても、それが内分泌かく乱化学物質によるものか、原因物質が何であるかの特定が困難となる。第二に、内分泌かく乱化学物質に曝露される時期や性別によっても毒性の現れ方が異なる点である。本来内分泌物質（ホルモン）は生物の発育成長段階で決まったタイミングで合成、分泌され機能するものである。それに対して内分泌かく乱化学物質は、発育成長のタイミングに無関係に生物に作用する。すなわちホルモン様化学物質に対して感受性の高い時期とそうでない時期では、曝露の程度が同じでも毒性の出現は異なると推察される。

また、性徴に関わるホルモン作用をかく乱する化学物質では雌雄で影響が異なる可能性がある。

環境中毒性物質のスクリーニングに用いられる分析法として近年バイオアッセイの注目が高まっている。バイオアッセイとは元来、生物に直接被検物質を投与して生体応答を評価する *in vivo* 試験法のことであるが、最近ではたんぱく質などの生体材料を用いてその応答性から生物作用量を評価する *in vitro* 試験法もバイオアッセイの一種と考えられている。特に環境科学の分野では抗体を用いた ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) 法が新たな測定法として認知されつつある。すでに、女性ホルモン類（エストラジオール、DES など）、男性ホルモン類（テストステロンなど）やアルキルフェノール類など特定化学物質をターゲットとした ELISA の開発がなされている<sup>2)</sup>。しかし、化学物質の内分泌かく乱作用の評価は現在も研究段階にあるため、生体応答を利用して毒性評価を行う *in vivo* バイオアッセイが未だに重要な手法となっている。

内分泌かく乱化学物質の毒性評価に用いられる *in vivo* バイオアッセイのエンドポイントとして、女性ホルモン様作用物質のバイオマーカーであるビテロジェニンがある<sup>3)</sup>。ビテロジェニンは卵黄蛋白前駆体で、卵生生物のメスで合成されるタンパク質である。従って、本来オスではほとんど合成されることはないが、体外より女性ホルモン様作用物質が入ると、エストロジェンレセプターを介してメス同様にオスでもビテロジェニンを合成する。オスメダカの血中ビテロジェニン値を ELISA 法で測定すると正常オスメダカでは検出限界以下（100ng/ml 以下）

\* 〒305-0062 茨城県つくば市赤塚字牛ヶ淵 586-9 池田理化ビル 2F

TEL:029-838-5558 FAX:029-838-5558

E-mail:Hatano@enbiotec.co.jp

であるのに対し、エストロゲン様作用物質に曝露するとビテロジェニン値は10mg/ml以上のオーダーまで上昇する。その差は実に10万倍以上である。in vivo バイオアッセイは生体を扱うことにより、環境要因（飼育温度や湿度など）や処置法（物質の投与方法など）による試験結果のばらつきや生物の個体差（動物種、系統、年齢、栄養状態など）による反応性の違いから再現性に問題があることが古くから指摘されてきた。その点ビテロジェニンは女性ホルモン様化学物質に対する応答性が極端であるため、再現性に影響する要因を無視できる優れたバイオマーカーであるといえる。

in vivo バイオアッセイの役割は二つある。ひとつは新規あるいは既存化学物質の内分泌かく乱作用の有無を確定することであり、もう一つは環境水など実サンプル中の内分泌かく乱物質の検出を行うことである。

内分泌かく乱物質の疑いのある化学物質の内分泌かく乱作用の確定試験（スクリーニングおよびテストング）は、国際経済協力機構（OECD）、米国環境保護局（U. S. EPA）などで試験方法の確立を含めて検討が進められている<sup>4),5)</sup>。日本においてもこれら国際機関と協同することにより、内分泌かく乱物質の疑いのある化学物質のスクリーニング・テストングが進行中である。2003年に岡崎市で開催されたメダカ国際会議に提出された試験計画を Fig.1 に示した<sup>6)</sup>。この試験計画に基づき、環境省

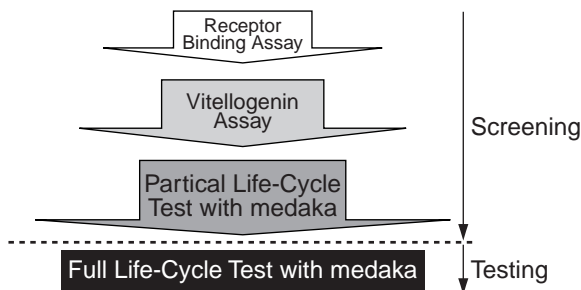


Fig.1 Testing Scheme in Evaluation of the Endocrine Disrupting Activities in Fish

の「環境ホルモン戦略計画 SPEED98」では内分泌かく乱作用の疑いのある67物質をリストアップし、レセプターバインディングアッセイで28物質を優先物質と選定した。選定された優先28物質はスクリーニング試験としてオスメダカのビテロジェニン誘導試験（21日間）を行い、さらに一世代で外部形態による性比、ビテロジェニン濃度、生殖腺性比、病理異常などをエンドポイントとして影響評価（パーシャルライフサイクル試験；70日間、PLCT）を行う。これらのスクリーニング試験で篩いを

かけ、さらに疑いの残った物質については二世代のフルライフサイクル試験（180日間、FLCT）を行い内分泌かく乱作用物質の確定をしている。28種の優先物質については現在までにPLCTまではほとんど終了している。このうち4物質に関してはFLCTまで終了し、ノニルフェノールと4-オクチルフェノールの2物質は内分泌かく乱物質と特定された。

このようにある化学物質の内分泌かく乱作用の有無を決定する確定診断では、十分な分析精度を保証できる試験設備、方法および試験計画が要求される。そのために試験は長期間を要し流水式曝露装置や試験魚の維持管理など特別な設備が必要となる。さらにそれに要する労力を考えるとバイオアッセイに習熟した専門機関でのみ実施可能な試験法であるといえる。

一方、もう一つのバイオアッセイの役割は環境水など実サンプル中の内分泌かく乱物質のスクリーニングを行うことである。試験対象は河川水、工場排水、あるいは食品や食器類などである。この場合の目的はサンプル中の有害化学物質の複合汚染による影響のモニタリングおよび未確認物質の毒性スクリーニングである。前者の化学物質のスクリーニング・テストングが確定診断であったのに対して、ここでのバイオアッセイの役割は健康診断にあたる。この目的で求められる分析法は、分析精度よりも迅速で継続して利用できるだけの簡便性が優先される。換言すれば、全国の環境モニタリングなど実サンプルを対象に行う試験法は、特別な設備を必要とせず短期間で、かつバイオアッセイに習熟していない分析者でも十分にモニタリング評価の可能な手法である必要がある。

内分泌かく乱物質に関する環境モニタリングは過去に環境省、国土交通省を中心に機器分析法による化学物質の測定、コイ生殖腺異常、コイビテロジェニン値測定などをエンドポイントとして実施されてきた<sup>7),8)</sup>。機器分析による化学物質の測定はルーチン項目として実施可能であり、地方保健衛生研究所や環境研究所の通常環境監視業務として実施されている。一方、in vivo バイオアッセイは環境モニタリングにおいて有用であることは認識されているにも拘わらず、実際には手技の煩雑さやデータ再現性の悪さに起因する結果の解釈の困難さなどから、ほとんど実施されていない。そのため環境モニタリングに利用できるin vivo バイオアッセイ法の開発、確立が必要である。

われわれはメダカビテロジェニン ELISA を構築して以来、より実践的な環境モニタリングシステムの構築を目的に、簡便で迅速に測定が可能なイムノクロマト法の開発を進めてきた。本稿では実サンプル中の内分泌かく乱

物質スクリーニング手法として開発した、メダカピテロジェニン・イムノクロマトグラフィ（以下、イムノクロマト）を紹介し、実際の手法について具体的に示した。

## 2 測定装置

### 2.1 イムノクロマト測定原理

Fig.2 にイムノクロマトの原理を示した。本イムノク

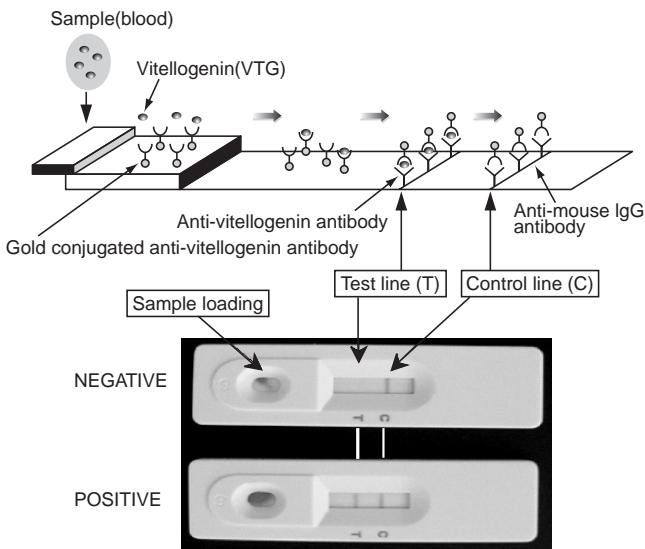


Fig.2 Principle of Immunochromatography

ロマトは抗原認識部位（エピトープ）の異なる2種のピテロジェニン特異抗体を用いている。この2種の抗体で目的のピテロジェニンを挟み込むようにしてトラップする点ではELISAのサンドイッチ法と全く同じ原理である。

構造は血液サンプルを添加する部分（サンプルパッド）、金コロイド標識抗体を含むコンジュゲートパッド、ピテロジェニンをトラップする抗体と抗マウス抗体を固定したニトロセルロース膜からなる。

血液サンプルを添加すると（Fig.2-①）、毛細管現象により金コロイド標識抗体のあるコンジュゲートパッドに移動する（Fig.2-②）。ここで血液中にピテロジェニンがあれば金コロイド標識抗体と結合しニトロセルロース膜を上昇していく（Fig.2-③）。次に、ピテロジェニン-金コロイド標識抗体の複合体はテストライン（T）に固定化してある抗ピテロジェニン抗体とピテロジェニンを介して結合し、その結果Tラインに赤いバンドが現れる（Fig.2-④）。また、未反応の金コロイド抗体はコントロールライン（C）にトラップされ赤いバンドを形成する（Fig.2-⑤）。一方、血液中にピテロジェニンが存

在しない場合、コンジュゲートパッド中の金コロイド標識抗体はフリーのまま毛細管現象でニトロセルロース膜を上昇する。金コロイド標識抗体はピテロジェニンと結合していないためTラインを素通りし、Cライン上に固定化してある抗マウス抗体にトラップされる。その結果Cライン上に赤いバンドが形成されることになる。Fig.2の写真に示したようにピテロジェニンを含む血液（成熟メスメダカ）では赤いバンドが2本（写真下）認められ、含んでいない血液サンプル（正常オスメダカ）ではCラインに1本のバンドが認められることになる（写真上）。

### 2.2 イムノクロマトによるピテロジェニン半定量判定法

Fig.3 にイムノクロマトのピテロジェニン半定量判定法のチャートを示した。精製ピテロジェニンを標準品と

VTG conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	<2min	2min	5min	10-15min	
(2+) 10 $\mu\text{g/ml}$	T(+)	C=T	C=T	C=T	Female
(+) 1.0 $\mu\text{g/ml}$	C(+)	C>T	C>T	C>T	
(±) 0.1 $\mu\text{g/ml}$	C(+)	T(-)	T(-)	C>>T	Male
(-) 0 $\mu\text{g/ml}$	C(+)	T(-)	T(-)	T(-)	

Fig.3 Chart of Vitellogenin (VTG) immunochromatography for semi-quantitative determination

して用いて検討した結果、反応時間とバンドの検出され方により濃度分類が可能であった。ピテロジェニン濃度段階は、高濃度（10 $\mu\text{g/ml}$ 以上、2+）、中濃度（1 $\mu\text{g/ml}$ 以上、+）、低濃度（0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以上、±）、およびゼロ濃度（0 $\mu\text{g/ml}$ 、-）の4段階である。高濃度と中濃度サンプルでは10分後にいずれもテストライン（T）とコントロールライン（C）にバンドが検出されるがバンドの濃さと出現の違いで区別ができる。サンプルを添加して毛細管現象によりサンプル溶液が膜状を上昇していく際に（2分以内）、高濃度サンプルではテストライン通過とほぼ同時にTの位置にバンドが認められるのに対して、中濃度サンプルではTにバンドが出現する前にCにバンドが出現する。その後、高濃度サンプルではTとCのバンド

の濃さはほぼ同じが T のほうがわずかに濃い (C=T, C<T), 中濃度サンプルでは T バンドは C バンドより濃度が薄い (C>T). このような違いはサンプル添加して長時間放置した後では困難となるので, サンプル添加後 2-5 分以内に判断しなくてはならない.

サンプル添加後 5 分以内で T ラインにバンドが認められない場合は, サンプル中ピテロジェニン濃度は  $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$  以下と判断できる. 低濃度サンプルではサンプル添加後 10 分以上経過してから非常に薄いバンドが T ラインに検出される. ゼロ濃度サンプルでは 10 分以上経過しても T ラインにバンドが検出されることはない.

### 3 イムノクロマトを用いた試験法の実際

#### 3.1 曝露試験法

我々が行っている簡易曝露試験スケジュールについて Fig.4(A) に示した. 参考のために 2003 年岡崎で開催さ

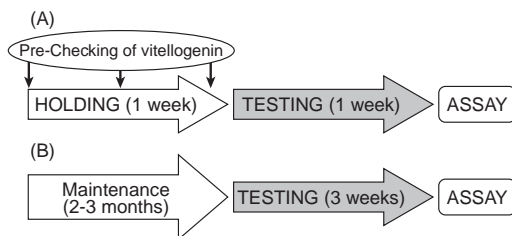


Fig.4 Medaka Vitellogenin Assay Procedure (A) Simple method, (B) Conventional method obtained in the 3<sup>rd</sup> International medaka symposium, 2003

れた第3回メダカ国際シンポジウムで提出された化学物質の内分泌かく乱作用スクリーニングのためのピテロジェニン試験スケジュールも Fig.4(B) に示した. 国際シンポジウムで検討されている曝露試験は特定化学物質の毒性評価が目的である. そのため, 試験の厳密性が要求され, 流水式曝露装置の使用が基本となる. それに対して, 環境スクリーニングを目的とした試験では, 環境サンプルなど採取量が限られるため, 流水式曝露装置の使用は困難である. そのため半止水式の曝露試験法を検討する必要がある.

また, 環境モニタリングなど実サンプルを対象とした試験では, 厳密性よりも試験にかかる時間, 人手およびコストの負担を軽減し継続可能で共通化されたプロトコルで実施されることの方が重要である. 魚のプリーディングやメンテナンスなど試験準備にかかる負担をできるだけなくすため, 市販のヒメダカを用いて試験法を行っ

ている. 日本においてヒメダカを試験魚に用いるメリットのひとつは日本全国どこでも入手できる点である. 以下に, 市販メダカを用いた簡易曝露試験法の試験条件と留意点について述べる<sup>9),10)</sup>..

順化 (Holding; 1 週間): 市販メダカは購入後直ちにヒレの形状で雌雄を分け, オスのみで順化をおこなう. このとき感染症に罹病している個体は直ちに隔離する. また, 感染症の広がるのを抑えるために大量の個体を一つの水槽で順化するのではなく, できるだけ小分けにして行う方がよい. 順化期間中に市販の魚病薬 (グリーン F) などで薬浴を行うと感染症の被害を抑えることができる. この薬浴によってオスピテロジェニン値への影響は認められていない. 購入直後と曝露試験前にイムノクロマトを用いてオスピテロジェニン値が正常であることを確認しておく. また, 順化期間中にオス数匹を用いて  $1\mu\text{g}/\text{L}$  の  $17\beta$  エストラジオールで 3 日間曝露を行い, イムノクロマトを用いてピテロジェニン誘導が生じることを確認しておく. 順化条件は水温  $25^{\circ}\text{C}$  前後, 長日条件 (明 14 時間; 暗 10 時間) で溶存酸素量を保つためエアレーションを行っている. 餌は 1 日 1, 2 回与え, 量は食べ残さない程度とする. 健康状態は毎日観察し, 状態の悪い個体は直ちに隔離する. 状態の悪い個体を放置しておく, その水槽の個体すべてが感染症に罹病し全滅する可能性があるので十分に気をつける必要がある.

曝露 (Testing; 1 週間): 曝露試験には 2L ビーカーなどのガラス容器を用いる. 個体密度は 3-5 匹/L で曝露試験を行っている. 1 試験群で最低 2 個の曝露容器を用意する. 水温, 日照条件は順化期間中と同じである. エアレーションは 1ml ピペットなどのガラス管をシリコンチューブでエアポンプにつなぎ, 3 方コックなどを用いて通気量を調整する. 通気の勢いはメダカの泳ぎを妨げない程度に穏やかに行う (溶存酸素は 60% 程度). またエアレーションにより曝露水が飛び散り隣の実験水槽に混ざることのないようにガラスの蓋をし, 水槽間の距離をとるなどの点にも留意する. 水換えは 2 日に 1 度の割合で全量取り替える. 給餌は 1 日 1 回残さない程度与える. 試験期間中に完全絶食させるとピテロジェニン上昇が認められなくなることがあるので給餌は必ず行うことが肝要である.

#### 3.2 イムノクロマト使用法の実際

Fig.5 にイムノクロマト使用法の実際を示した. 準備する器材と操作手順は以下のとおりである.

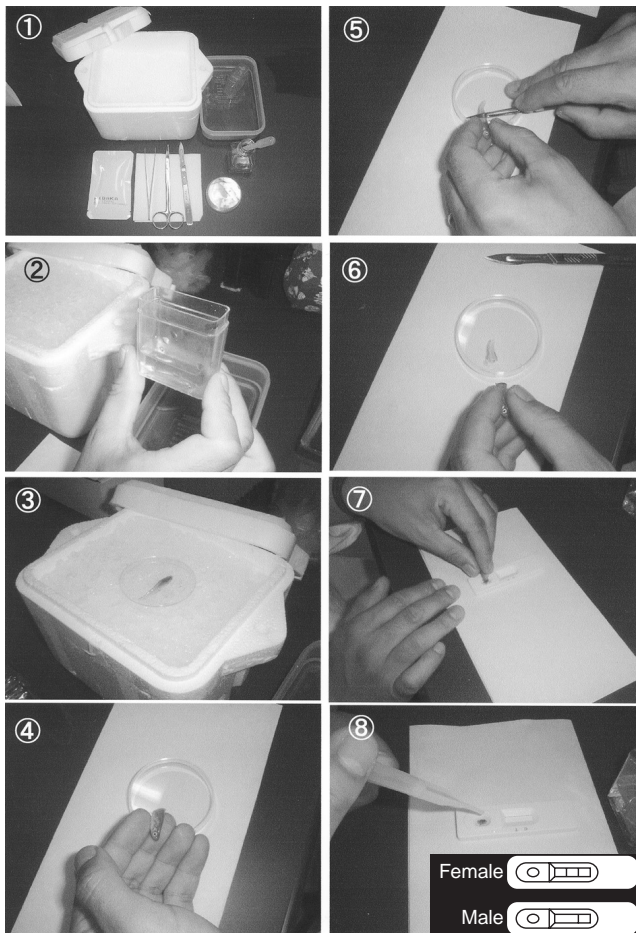


Fig.5 Procedure of sample preparation

・準備するもの (Fig.5-①) :

写真左下から時計回りに、イムノクロマト (アルミ袋入り), アイスボックス (クラッシュ・アイス, メダカを冷却麻酔するのに用いる.), 浅底のタッパーウェアと小型透明容器 (被検メダカを入れておく. メダカ雌雄判別のためヒレの形状を確認するのに横から観察する際に狭い透明容器を用いる.), PBS (または生理食塩水) 入り容器とスポイト, プラスティックシャーレ (メダカの尾部を切断するときの台として使用する.), メス (メダカを切断するたびに水で洗いキムワイプで刃をふき取ること. この操作により前のメダカの血液のコンタミを防ぐとともに鱗が刃に付着して切れなくなるのを防ぐ.), 解剖はさみと精密ピンセット (採血後のメダカを解剖して卵巣, 精巣の存在を確認することにより雌雄の確定を行う.), その他に反応時間計測用ストップウォッチやキムワイプを用意する.

・測定手順:

- 1) メダカを透明な小型透明容器に入れ, 写真のように横からヒレの形状を確認することにより雌雄の確認をする (Fig.5-②).
- 2) メダカを氷の上に乗せ, 冷却麻酔を行う (飛び出さないようにシャーレを被せるとよい) (Fig.5-③).
- 3) 動きの止まったメダカを素早くキムワイプで包むようにしてつまみ上げ, 左手で写真のように保持する (Fig.5-④).
- 4) プラスティックシャーレの上にメダカの尾部を置き, 総排泄腔より少しヒレ側をよく切れるメスで切断する (Fig.5-⑤, ⑥).
- 5) メダカ胴体の切断面をイムノクロマトのサンプル穴のコットンに接触させ, 血液を塗布する (約 20 秒間ホールドする) (Fig.5-⑦).
- 6) 血液塗布後直ちに PBS (または生理食塩水) をスポイトでゆっくり 3 滴 (約  $150\mu\text{L}$ ) をサンプル穴に添加し, ラインの出現を観察する (Fig.5-⑧).

### 3.3 ELISA 法とのデータ比較

オスメダカを  $17\beta$ -エストラジール (E2), 4-ノニルフェノール (NP), ビスフェノール A (BPA) の 3 種の化学物質で曝露試験を行い ELISA 法によりピテロジェニン値を測定した結果を Fig.6 に示した. 今回提示したイムノクロ

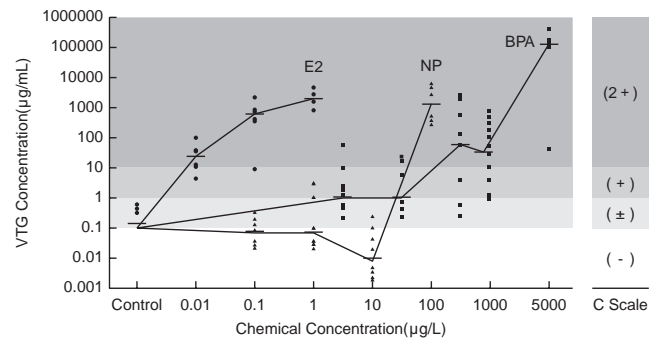


Fig.6 Vitellogenin (VTG) Induction of male medaka exposed by some estrogenic chemicals. E2, 17beta-estradiol; NP, 4-Nonylphenol; BPA, Bisphenol A. IC Scale, Scale of Immunochromatography

マトの半定量法による検出範囲も図中に示した. ELISAの結果をイムノクロマトと対比させた結果, イムノクロマトでポジティブバンドが検出される各化学物質の濃度は, E2 曝露では  $0.01\mu\text{g/L}$ , NP では  $10\text{--}100\mu\text{g/L}$  の間, BPA では  $500\mu\text{g/L}$  であった. このことから, 内分泌が

く乱化学物質の生物作用量の検出系としては ELISA に匹敵する感度を有していると推察できる。今後は、イムノクロマトの実用性を環境モニタリングなどの実サンプル用いた実証試験により検討していく必要がある。

#### 4 おわりに

本稿の冒頭に内分泌かく乱化学物質（環境ホルモン）へのマスコミと市民の過剰反応について触れた。このような状況をまねいた背景には内分泌かく乱物質の毒性についての知識不足と環境汚染状況が正確に把握できていなかったために、得体の知れないものに対する恐怖心をあおったことによるものであったと考えられる。現在では環境ホルモンは 1990 年後半に騒がれたほど大きな危険性がないと考えられている。その理由は環境ホルモンの多くは他の毒性物質と比較して易分解性であること（蓄積性が少ないこと）、野外調査の結果、環境中に重篤な毒性を示すほど大量に存在していないと考えられることが挙げられる。今後環境ホルモン問題は沈静化するであろうが、内分泌をかく乱する毒性物質が消滅したわけではない。生殖行動の異常や繁殖能力の低下を引き起こす内分泌かく乱化学物質は、最終的には生物種の保存を脅かす危険性が懸念されており、野生生物への影響（生態毒性）に関してもまだ決着していない。

問題の沈静化は危険が消失したことを意味するのではなく、適切な対応によって解決可能な問題であることが明らかになったということである。汚染対策を適切かつ早期に講じるためには、汚染状況を監視し続けることが肝要である。継続可能な内分泌かく乱化学物質スクリーニングが今後ますます重要となっていくと考えられる。

イムノクロマトは測定に要する時間がサンプリングから結果判定まで 10 分程度で可能である。現在一般的に実施されている ELISA はサンプリング以外の測定に要する

時間が最短のものでも 2.5 時間かかる。さらに、ELISA は検出範囲の限界（数 ng/ml～数 100ng/ml）から検出範囲外になるサンプルの再測定が必要となるため、サンプルを再希釈して測定する煩雑さと測定時間はさらにかかるといえる。イムノクロマトは ELISA の様な厳密な定量はできないが、環境モニタリングなど実サンプルを対象とした試験など使用目的によっては非常に有効な測定ツールになるものと考えられる。

#### [参考文献]

- 1) シーア・コルボーン, ダイアン・ダマノスキ, ジョン・ピーターソン・マイヤーズ (長尾力 訳): 奪われし未来, 翔泳社 (1997).
- 2) 藤本茂: 酵素免疫法 (ELISA) による超高感度微量分析, エンバイオ, 2, 53-60 (2002).
- 3) 羽田野泰彦: 企業が開発した免疫化学測定法「バイオマーカー類」, 免疫化学測定法研究会年報, 8, 19-25 (2004).
- 4) OECD: *Draft test guideline on fish two-generation: Fish life-cycle test guideline*, 1-18 (2002).
- 5) U. S. EPA: *Draft detailed review paper on fish screening assays for endocrine disruption*. EPA contract number 68-W-01-023 Work assignment 2-12 (2002).
- 6) Ministry of the Environment, Japan, Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan: *Development of test methods and suitability of medaka as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals Summary*. The 3<sup>rd</sup> International Medaka Symposium, 3-6 (2003).
- 7) 環境庁: 平成 11 年度 水環境中の内分泌かく乱化学物質実態調査, (1999).
- 8) 建設省: 平成 10 年度 水環境における内分泌かく乱化学物質に関する実態調査結果, (1998).
- 9) 羽田野泰彦, 近江みゆき, 西和人, 鎌迫典久, 水上春樹, 山下倫明, 民谷栄一, 榊原隆三: 簡易メダカ・ピテロジェニンアッセイによる外因性エストロジェンの影響評価研究, 水環境学会誌, 26 (11), 779-785 (2003).
- 10) 羽田野泰彦: 魚類ピテロジェニンを指標にした環境中エストロジェン様物質の検出, エンバイオ, 2, 61-65 (2002).