

遺伝子解析技術による環境ホルモンリスク評価

Risk Assessment of Endocrine Disruptors Using Gene Analysis

菅野 美津子 赤星 英一

SUGANO Mitsuko

AKAHOSHI Eiichi

ダイオキシンなど環境ホルモンと呼ばれる化学物質類の遺伝子を介した生体への影響は深刻である。環境ホルモン作用を持つ物質のスクリーニングには、スループット性と多様性の両面が求められている。ことに、これまで環境ホルモンのスクリーニングには、性ホルモンの攪乱(かくらん)に基づく生殖毒性を指標にすることが多かったが、環境ホルモンの影響の広範さが認知されるに従い、様々な毒性への対応が求められている。

そこで、東芝では、神経細胞から単離したTIA-1など特定の遺伝子を指標とすることによって神経毒性が検出できることを示し、これら遺伝子解析技術を基盤とした環境ホルモンの簡易評価システムを開発している。

Endocrine disruptors such as dioxins are a serious problem due to the damage they cause to human health. As endocrine disruptors have many actions, various organs are known to be affected. This means that advanced assessment not based solely on estrogenic disorder is required. For screening endocrine disruptors, a technique is desired that can extensively evaluate toxicity and enable high-throughput examinations.

Toshiba has developed a high-throughput screening system for endocrine disruptors based on a genetic analysis technology. This system can be used for the assessment of neurotoxicity. Features of the system are (1) *in vitro* assays using cultured neuroblastomas, and (2) the detection of marker gene expressions, such as TIA-1, as a toxicity indicator.

1 まえがき

化学物質は日々大量に作られ、その種類は数百万を超え、現在も年間約1,000種類の新しい化学物質が追加されている。よく使用される化学物質は数万～数十万種類程度と推定されているが、このような化学物質のほとんどは安全性が十分確認されているとは言えない状況にある。また、それに追従するかのように、様々な化学物質の有害性が社会問題となっている。化学物質による健康障害のある人は、日本国内で全人口の10%に達すると言われており、化学物質の持つ毒性・生体影響の早急なスクリーニングが望まれている。

特に近年、“内分泌攪乱性”と呼ばれる新しいカテゴリーの毒性が注目されている。内分泌攪乱とは、外因性の化学物質が、性分化や脳神経系の発達、学習行動に重要な役割を担っている内分泌系を攪乱することを指す。このような毒性を持つ物質は一般には環境ホルモンと呼ばれ、ダイオキシンやPCB(ポリ塩化ビフェニル)、有機塩素系農薬などが含まれる。環境省では、65物質を内分泌攪乱性の疑いがある物質としているが、更に多くの物質に内分泌攪乱性の懸念があることから、スループット性の高いスクリーニング技術が求められている。

これらの環境ホルモンと呼ばれる化学物質に共通した特徴は、 10^{-9} mol以下の非常に低濃度で、慢性的な毒性を示

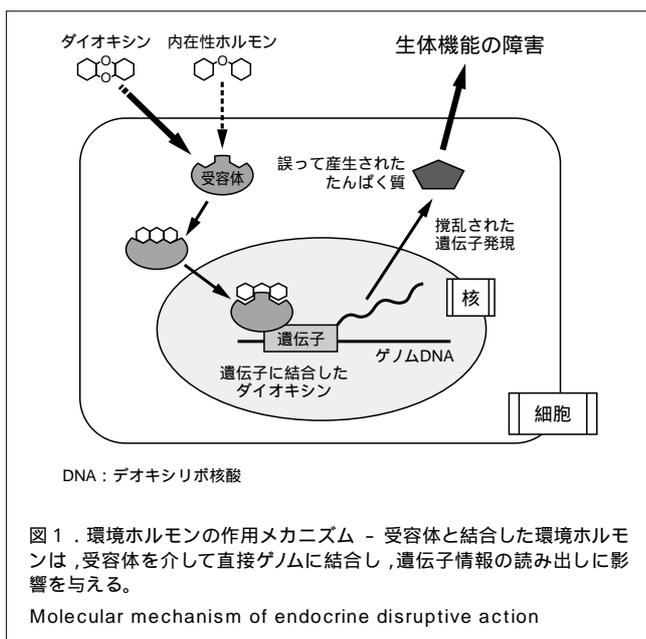
すことにある。そして、これらに共通した毒性発現メカニズムは、ゲノムから遺伝子情報が読み出される転写と呼ばれるステップの攪乱に起因することが明らかになっている。

この研究では、化学物質の環境ホルモン作用を検出するために、環境ホルモンによって誤って読み出される特定の遺伝子の発現が指標となることを示した。また、均一性が高く培養の容易な動物細胞を実験動物の代替として用いることにより、多検体を簡便に測定できるようにした。このことにより、既存化学物質の簡易毒性評価だけでなく、新材料の毒性評価や材料設計時の毒性低減化提案などにおいて幅広い活用が期待できる。

2 環境ホルモンの毒性

2.1 遺伝子に結合する化学物質

環境ホルモンは、生体内で偽ホルモンとして作用する外因性の物質である。内在性のホルモンであるステロイドや甲状腺ホルモンのような低分子脂溶性物質は、細胞膜を通過し受容体と結合して、核内へ移動しその作用を発揮する。環境ホルモンは、この低分子脂溶性ホルモンと似た構造を持つ物質であり、内在性ホルモンのようにそれぞれの受容体に結合し、内分泌系を攪乱すると考えられている⁽¹⁾。その作用機構を図1に示す。すなわち、受容体と結合した環境ホル



モンは、直接ゲノムに結合し、転写と呼ばれる遺伝子情報の読出し(遺伝子発現)に影響を与える。この攪乱により、誤って産生されたたんぱく質が細胞内でその機能を発現させたとき、細胞は本来の機能を失う。これが内分泌攪乱の実体であり、環境ホルモン作用の引き金は誤った遺伝子発現なのである。

2.2 神経系へ影響を与える環境ホルモン

Colbornらにより、内分泌攪乱性という概念が提唱されたとき⁽²⁾、主として問題にされたのは、女性ホルモンに似た作用を示す化学物質であった。本来、ホルモン受容体はホルモンに対する特異性が高く、人間が非意図的に作り出した化学物質がホルモン受容体に結合して作用を発現するとは、ほとんど考えられていなかった。ところが、大量に環境中へ放出される化学物質の中には、女性ホルモン受容体と結合し、ゲノムへの結合を介して、女性ホルモン作用を模倣して働く物質が数多く存在することが明らかになった。それらが、野生生物の個体数の減少や性行動異常に関連するという報告が相次いだことから⁽³⁾、環境ホルモンの生殖毒性が脚光を浴びたが、その後、標的となる受容体の解析が進み、他の組織への影響、特に神経系と免疫系への影響が目撃された。

発達期にある脳が環境ホルモンの影響を受けるのではないかという懸念は、PCB暴露地域の子どものIQ(Intelligence Quotient)が低いという報告などから持たれていた。特に、環境ホルモンの胎児・新生児暴露が脳の器質的障害とされる注意欠陥多動障害(ADHD)や自閉症などの多動性障害を引き起こしていることが実験動物で示され⁽⁴⁾、脳神経系における環境ホルモン作用は深刻さを増した。しかし、化学物質の脳神経系におけるゲノムへの影響、つまり環境ホルモンリスクの評価は、生殖系に比べて遅れており、評価系は

確立されているとは言えず、十分なスクリーニングを行うことは困難とされていた。

3 環境ホルモン簡易評価システム

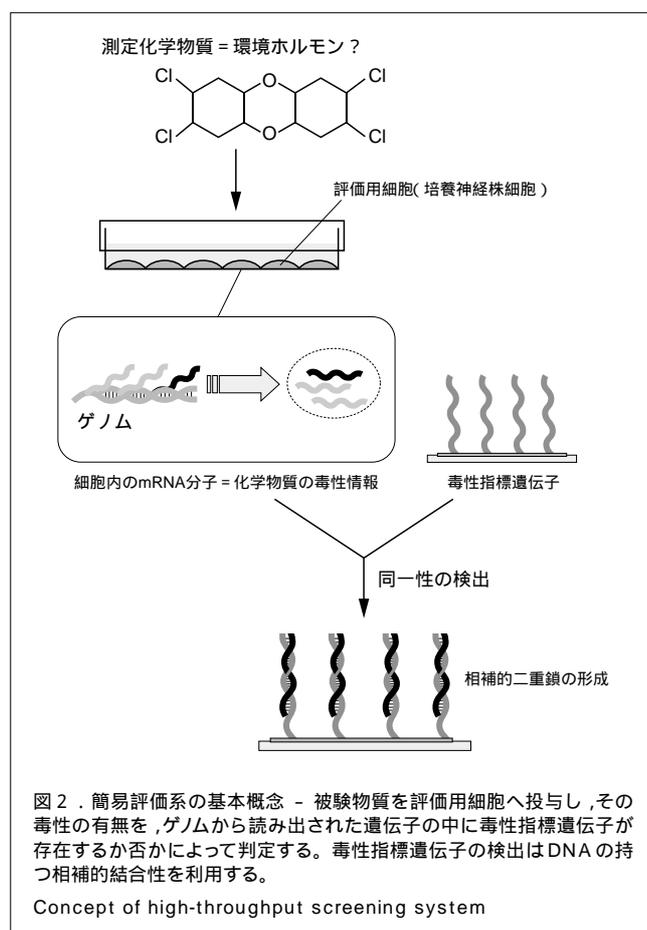
3.1 簡易評価システムの概要

この研究では、リスク評価のスループット性と多様性実現の手段として、攪乱された遺伝子から生じるmRNA(メッセンジャーリボ核酸)分子の検出に基づく簡易評価システムの開発を目指している。概要を図2に示す。

この評価系では、環境ホルモンの神経毒性を評価するために、被検物質を添加する細胞として、神経系の細胞を選択した。用いた細胞は、均一に株化された培養細胞である神経芽細胞腫Neuro2aという細胞で、甲状腺ホルモン存在下で神経様の形態を示す(図3)。この細胞を用いることにより、脳の発達形成に必要なホルモンであり、環境ホルモンの標的となる甲状腺ホルモンの攪乱に基づく神経毒性評価を可能にした。

3.2 評価指標

また、図2に示したとおり、この評価系の感度とスループット性を担うのは、指標遺伝子である。



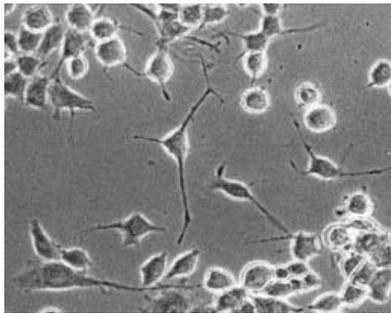


図3 . Neuro2a 細胞の位相差観察 - 甲状腺ホルモン存在下の Neuro2a 細胞を示す。

Morphology of Neuro2a neuroblastoma

内分泌攪乱性に対して高感度で特異性を示す指標遺伝子を求めるため、約4,800 遺伝子の有効性評価を行った。有効性評価は、環境ホルモンモデル物質として 2,3,7,8-tetra chloro dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を評価用細胞 Neuro2a に投与した際、安定して発現が変化し、すなわち環境ホルモンによる遺伝子発現の攪乱に対する相関の強さを指標に行った。

図4に示したのは、4,800 遺伝子の TCDD 投与群と非投与群との遺伝子発現相関図である。4,800 遺伝子の各条件下での発現量をスポットした。投与群における発現量が対照群における発現量の2倍以上又は1/2以下のものを()で示し、有意な発現量の差があるとみなした。その結果、特に発現量の差が大きい遺伝子として26 遺伝子が得られた。

図5は、TCDD 投与と非投与の Neuro2a における TIA-1 遺伝子の発現量の差を示したものである。指標遺伝子として単離した遺伝子の一つである TIA-1 は、TCDD を Neuro2a に投与した際に明らかな発現の増加を示した。26 遺伝子の中で TIA-1 を含む7 遺伝子は、機能的に近縁の遺伝子群であり、アポトーシスと呼ばれる細胞死現象に関与する遺伝子

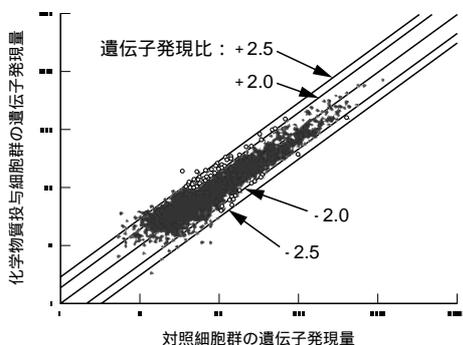
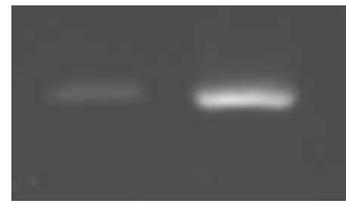


図4 . ダイオキシン投与による遺伝子発現量比相関 - ダイオキシン投与条件下における4,800 遺伝子の発現量を、非投与条件下における発現量に対してプロットし、発現量の差が大きい26 遺伝子()が得られた。

Scatter plot of gene expressions after 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) treatment



(A) (B)

図5 . ダイオキシン投与による TIA-1 遺伝子の発現 - ダイオキシン投与時(B)は非投与時(A)に比べ、TIA-1 の発現の増加を示している。

Induction of TIA-1 expression after TCDD treatment

群であった。

これらの結果から、神経系における環境ホルモン作用の指標として同遺伝子群を選択した。

4 あとがき

増大する化学物質から、環境ホルモン作用のある物質を迅速にスクリーニングし、安全な社会生活と地球環境を守るための技術が求められている。そのための当社の取組みとして、遺伝子発現を指標とした環境ホルモン作用の簡易評価システムについて述べた。ここでは、環境ホルモンの持つ多様な毒性の一つであり、これまで評価が困難であった神経毒性を効率よく検出するためのシステム作りに必須の指標遺伝子の単離について示した。なお今後は、指標遺伝子の拡充により、評価毒性の多様化を実現していく。

文 献

- (1) 諸橋憲一郎 . 内分泌攪乱物質をめぐる研究の現状と今後の展開に向けて . 実験医学 . 13 ,2000 ,p.728 - 730 .
- (2) Colborn, T., et al. "Our Stolen Future". Dutton, USA, Plume, 1988, p.47 - 68.
- (3) 環境省 . 内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について . < <http://www.env.go.jp/chemi/end/speed98.pdf> > (参照 2003-10-9) .
- (4) Masuo, Y., et al. "Effects of neonatal 6-hydroxydopamine lesion on the gene expression profile in young adult rats." Neurosci. Lett. 335, 2002, p.124 - 128.



菅野 美津子 SUGANO Mitsuko

研究開発センター 環境技術ラボラトリー 研究主務。
遺伝子解析による環境ホルモン評価技術開発に従事。日本内分泌攪乱物質学会、日本神経科学会、米国神経科学会会員。
Environmental Technology Lab.



赤星 英一 AKAHOSHI Eiichi, D. Agr.

研究開発センター 環境技術ラボラトリー、農博。
遺伝子解析による環境ホルモン評価技術開発に従事。日本内分泌攪乱物質学会会員。
Environmental Technology Lab.