

バイオアッセイによる環境化学物質の有害性評価技術

Bioassay for Detecting Neurotoxicity of Environmental Contaminants

菅野 美津子 赤星 英一 宇留野 さえ子

■ SUGANO Mitsuko ■ AKAHOSHI Eiichi ■ URUNO Saeko

環境中に存在する様々な化学物質の生体に及ぼす影響が懸念されている。環境化学物質は様々な臓器に対して多様に作用することから、現在確立されている評価方法だけではなく、潜在的な有害性を迅速に評価することが求められており、その試験法の一つに“バイオアッセイ”がある。特に、発達期の脳に対する影響は深刻な問題になりつつあり、評価方法や指標の確立が急務である。

東芝は、環境化学物質が脳に及ぼす影響に焦点を当てた“TH (Tyrosine Hydroxylase : チロシン水酸化酵素) アッセイ”の開発を進めている。THアッセイは、神経細胞中のTH遺伝子を分子マーカー (指標) としたバイオアッセイであり、化学物質によるドーパミン神経伝達の活性化を検出することで有害性の評価を行う。毒性のある代表的な化学物質を使った評価実験によりその有効性を確認した。

Various environmental chemicals are suspected to damage human health. An adequate method of assessing the toxicity of such chemicals has not yet been established, however, because they affect different organs such as the liver, reproductive organs, immune tissues, nervous tissues, and so on.

Toshiba has developed a tyrosine hydroxylase (TH) assay method for detecting the neurotoxicity of environmental contaminants. This is an in vitro bioassay method using TH gene expression, which is a functional marker of the dopamine system in the brain, together with evaluation metrics. TH assay provides a simple screening method with high throughput for a large number of environmental contaminants.

1 まえがき

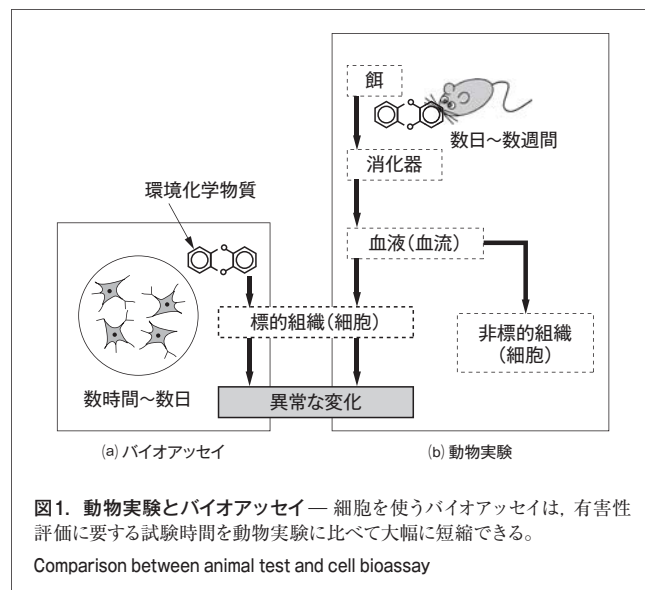
近年、環境中の様々な化学物質による健康への影響が懸念されている⁽¹⁾。環境化学物質の中には、ダイオキシンのように製造工程で意図的に生産されたものではない化学物質や、製造時には生体への影響が十分に認識されていなかった化学物質もあり、それらの作用性や環境中の分布などはまだ十分に確認されていない。そのため、環境化学物質の有害性を迅速に見極め、簡易に検出する方法の開発が求められている。

“バイオアッセイ”は、迅速な作用性検出の側面から注目されている技術であり、主に試験管内の微小環境下で、細胞や遺伝子を用いて生体の一部分の機能を再構成する試験法である。動物実験と比べると、注目した組織 (機能) に対する作用しか見ることではできないが、図1に示すように、直接細胞に作用するため試験時間を大幅に短縮できることや、個体差が生じないなどの特長がある。

ここでは、環境化学物質が脳に及ぼす影響を検出するために東芝が開発した、神経細胞を使ったバイオアッセイについて述べる。

2 環境化学物質が脳に及ぼす影響

化学物質の有害性は、その標的となる臓器や作用メカニズム



から非常に多岐にわたる。発がん性や催奇形性などは、既に有害性を検出する手法が確立されているが、作用メカニズムがわからないために検出手法が確立されていない有害性も多く残されている。その一つが、脳に対する影響の検出である。環境化学物質が神経機能へ及ぼす影響としては、発達期のPCB (ポリ塩化ビフェニル) 暴露と子供の認識能力とに負の相関が見られることや⁽²⁾、ダイオキシンを暴露した実験動物で多

動的な行動異常や学習能力の低下が認められることなど^{(3), (4)}, 数多く報告されている。

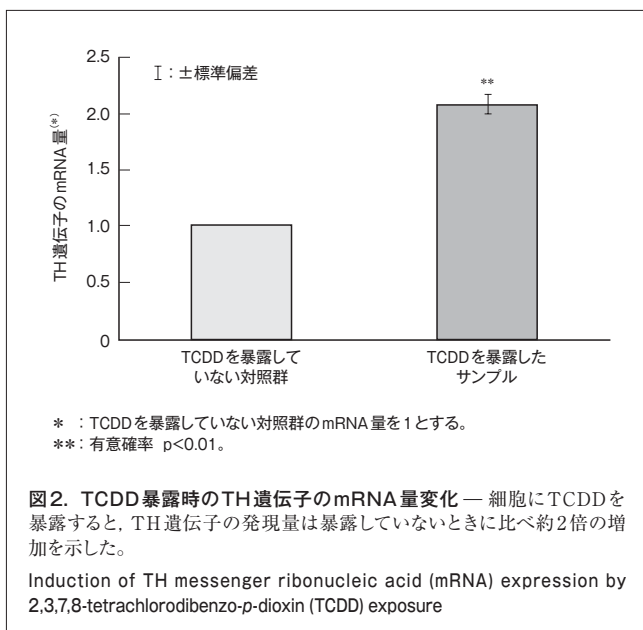
脳に対する影響は、致命的な有害性というより、長期的に人類の生産性や社会活動を低下させる可能性があるという点で深刻である。しかし、これらの作用メカニズムは未解明な部分が多く、化学物質の神経機能への影響を検出する手法はこれまで確立されていなかった。

3 有害性の指標となるTH遺伝子

特定の組織に対するバイオアッセイを構築するためには、標的とする細胞で有害性の指標となる変化（遺伝子やタンパク質の変化）を同定する必要がある。脳の細胞、すなわち神経細胞において、化学物質の有害性の指標となる変化の一つとして、当社はチロシン水酸化酵素（TH: Tyrosine Hydroxylase）遺伝子のmRNA（messenger Ribonucleic Acid）量の変化を世界で初めて^(注1)見いだした。

mRNAは、ゲノム^(注2)にコードされている遺伝子から、実際に細胞内で機能するタンパク質を作るために読み出される設計図である。このゲノムからのmRNAの読出しを転写という。転写量（mRNA量）は細胞内で機能するタンパク質の量とほぼ比例することから、転写は個体における機能発現の素過程になる。

当社は、未分化の神経細胞と似た性質を持つ神経芽細胞腫^(注3)のNeuro2a細胞に、ダイオキシンの一種である2,3,7,8-テトラクロロジベンゾダイオキシン（TCDD）を暴露したところ、TH遺伝



(注1)、(注4) 2004年12月環境ホルモン学会で発表、当社調べ。
 (注2) 細胞のすべての遺伝情報が含まれているDNA（デオキシリボ核酸）。
 (注3) 神経がん細胞の一つで、無限に増殖する特徴を持つ。

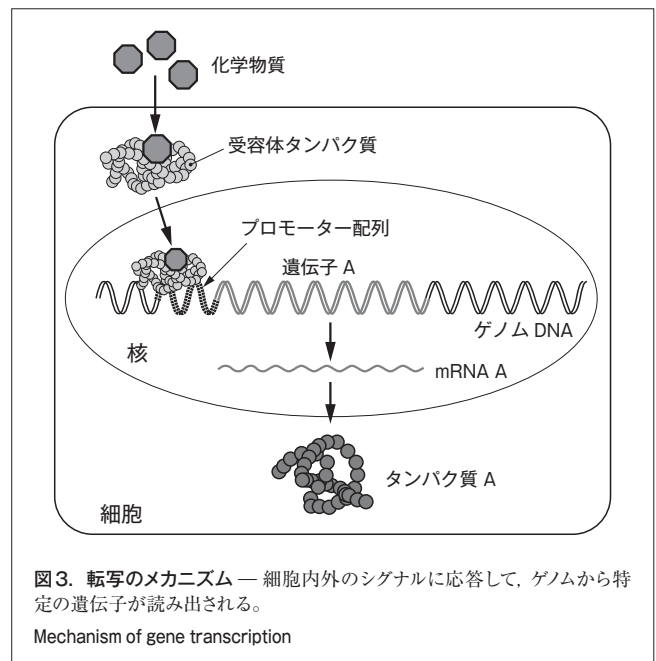
子のmRNAが増加することを見いだした⁽⁵⁾。TCDDの暴露によりNeuro2a細胞内でゲノムから読み出されたTH遺伝子のmRNA量を、TCDDを暴露していない対照群と比較して^{図2}に示す。TCDDを暴露したNeuro2a細胞内のmRNA量は、暴露していない対照群に対して2倍程度増加していた。

TH遺伝子から作られるTHは、脳でドーパミンを合成する。細胞内のTH遺伝子のmRNA量変化は、脳内のドーパミン量の変化と相関しているため、個体におけるドーパミン機能の変化の指標となる。

ドーパミン神経は運動の調節や喜怒哀楽といった情動に重要な役割を果たしており、ドーパミン伝達量の増加は、多動的な行動や興奮的な情動行動に関係することが知られている。いくつかの環境化学物質が実験動物に対して自発行動量を増加させることが報告されていたが⁽⁶⁾、原因となる標的分子はこれまで明らかになっていなかった。当社は、TH遺伝子がダイオキシシンなど化学物質の直接の標的になっていることを世界で初めて^(注4)示し、独自の有害性指標として、神経細胞におけるTH遺伝子のmRNA量変化を用いることとした。

4 THアッセイ

前記のTH遺伝子を使って、環境化学物質が神経細胞へ及ぼす影響を検出するためのバイオアッセイとして開発したのが、“THアッセイ（TH promoter activation assay）”である。THアッセイは、TH遺伝子の一部に発光遺伝子を結合させたもので、化学物質によるTH遺伝子の転写量変化を発光遺伝子の転写量変化に置換し、発光強度の変化として検出する方法である。



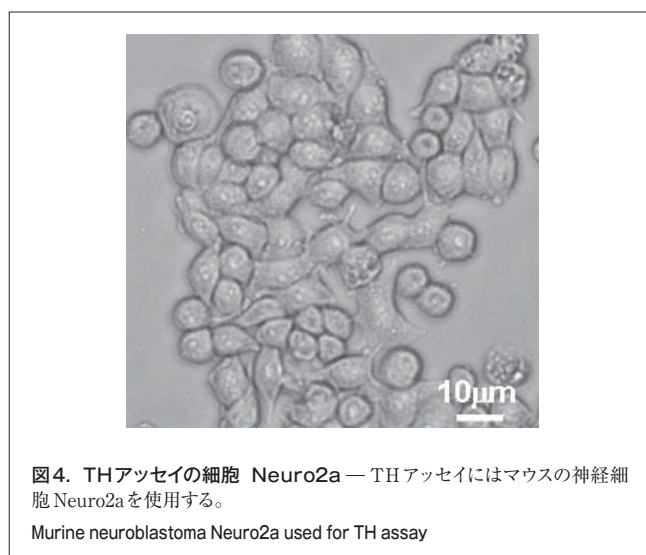
4.1 遺伝子転写のメカニズム

遺伝子は、それぞれの遺伝子を読み出される際にスイッチとなるプロモーターと呼ばれる配列を、その遺伝子配列の近傍に持っている(図3)。遺伝子を読み出されるか、すなわち転写されるかどうかは、プロモーター配列に転写を促進するタンパク質が結合するか否かで決まる。その転写を促進するタンパク質は転写因子と呼ばれ、多くの転写因子は受容体である。受容体とは、細胞内外の様々なシグナルを受容しそれぞれの遺伝子の読出しを制御するもので、細胞内に非常に多く存在している。

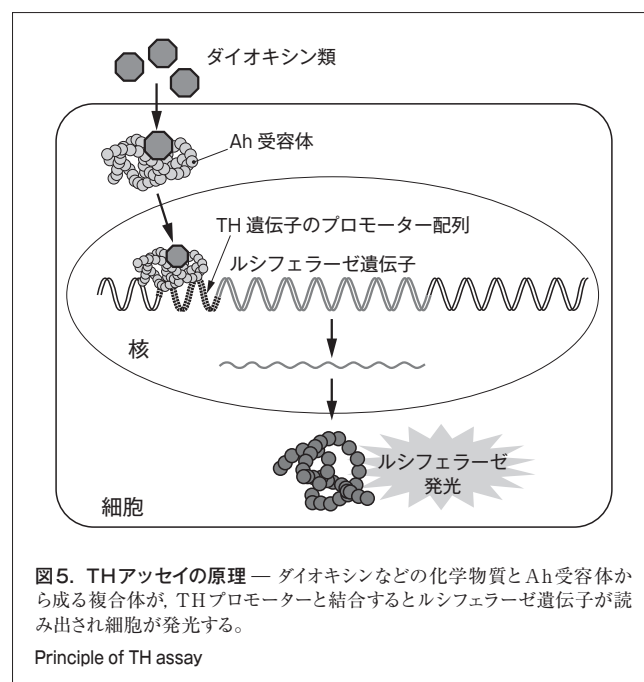
TH遺伝子の転写量は、TH遺伝子プロモーターに対する受容体の結合量で決まり、また、受容体はシグナルと結合して活性化することでプロモーターとの結合が促進される。このことから、受容体の結合量は、受容体に結合するシグナル、すなわち化学物質の量及びその作用性と相関していると言える。

4.2 THアッセイの原理

THアッセイ用の細胞としては、マウスの神経芽細胞腫のNeuro2a細胞中に、TH遺伝子のプロモーターとホタルの発光遺伝子(ルシフェラーゼ遺伝子)を結合させて、その遺伝子の発現を見やすくしたレポーター遺伝子を組み込んだものを使用する(図4)。また、化学物質が結合するための受容体には、細胞内のアリルハイドロカーボン(Ah)受容体を利用する。このAh受容体は、有害な環境化学物質であるダイオキシンやPCBなど環状の有機化学物質の一部と結合することが明らかとなっている⁽⁷⁾。



Neuro2a細胞を用いたTHアッセイの原理を図5に示す。ダイオキシンなどの化学物質とAh受容体から成る複合体がTHプロモーターと結合すると、THプロモーターに読出しのスイッチが入り、隣接しているルシフェラーゼ遺伝子を読み出されて細胞が発光する。ルシフェラーゼ遺伝子の転写量は、神



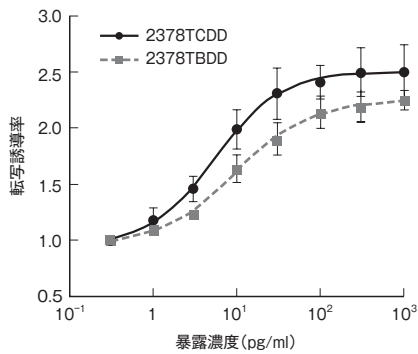
経細胞内でのTH遺伝子の転写量と比例することから、化学物質が固有に持っている転写への影響度合いの強さ、すなわち化学物質の有害性と比例している。

4.3 THアッセイによる評価例

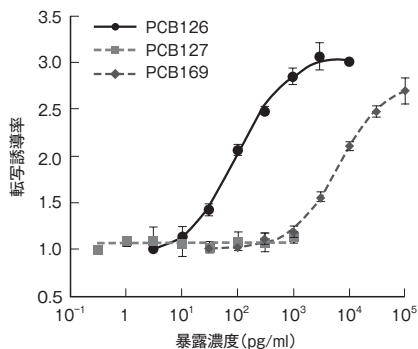
代表的な環境化学物質について、THアッセイを用いて評価した。THアッセイの応答性は、暴露した化学物質の濃度に対する細胞の発光誘導率(化学物質を暴露した細胞の発光強度を、未暴露細胞の発光強度で割った値)で示した。化学物質として、TCDD、2,3,7,8-テトラブロモジベンゾダイオキシン(TBDD)、3,3',4,4',5-P₅CB(PCB126)、3,3',4,4',5,5'-H₆CB(PCB169)、及び3,3',4,5,5'-P₅CB(PCB127)のそれぞれについて、化学物質の暴露濃度とTHアッセイの応答性との相関を図6に示す。

生体毒性が特に強く、神経行動に対する影響が報告されているTCDDやTBDD、コプラナーPCBと呼ばれるPCB126及びPCB169ではTHアッセイに顕著な応答が表れている。また、ここでは示していないが、生体毒性が報告されている1,2,3,7,8-ペンタクロロジベンゾダイオキシン(PeCDD)についても応答性が確認できた。

これらの応答性を化学物質固有の物性値として算出したものをTH-TEF(Toxicity Equivalency Factor: 毒性等価係数)という(表1)。各化学物質のTH-TEFは、図6の応答特性の曲線から発光誘導率が最大値の1/2となるときの50%影響濃度(EC50)を算出し、TCDDのEC50での値を1とした時の比で求めている。この値は、それぞれの化学物質がTH遺伝子の転写に及ぼす影響の強さを定量化したものであり、THアッセイの化学物質との反応の強さを表している。表1には、WHO(世界保健機関)が各化学物質の生体に及ぼす影



(a) ダイオキシン類



(b) PCB類

図6. THアッセイによる化学物質の評価例 — ダイオキシン類及びPCB類のTHアッセイの測定値とそれぞれの濃度との相関から、化学物質の生体への影響度合いが評価できる。

Evaluation of dioxins and polychlorinated biphenyls (PCBs) using TH assay

表1. 化学物質のTH-TEF算出例

Determination of dioxins and PCBs using TH assay in accordance with toxicity equivalency factor (TEF) principle

化学物質	毒性等価係数		
	TH-TEF	WHO-TEF	
ダイオキシン類	2,3,7,8-TCDD	1	1
	1,2,3,7,8-PeCDD	0.699	0.5
	2,3,7,8-TBDD	0.545	-
PCB類	3,3',4,4',5'-P ₅ CB (PCB126)	0.057	0.1
	3,3',4,4',5,5'-H ₆ CB (PCB169)	0.00085	0.01
	3,3',4,5,5'-P ₅ CB (PCB127)	定量下限値未満	-

WHO-TEF出典: Toxicol Sci., 93(2)⁽⁸⁾

響を総括して示したWHO-TEFを併記したが、TH-TEFはWHO-TEFともよく相関している。

5 あとがき

環境化学物質の脳への影響は全容が解明されておらず、完全なスクリーニングは今も困難な状況にある。THアッセイは、

化学物質のドーパミン神経伝達への影響を検出するバイオアッセイであり、化学物質が生体に及ぼす症状と分子レベルで遺伝子の異常がもたらす生体への作用が合致していることを利用し、脳への影響を検出して有害性を評価するための有効な手法と考えている。

また、試験期間が長く評価指標があいまいな動物実験に替わり、多検体を迅速に評価できるバイオアッセイの必要性は、予防原則の視点から今後更に高まると考えられる。将来的には、バイオアッセイをより汎用性の高い解析技術とするため、更に細胞の平易な取扱いを可能にする細胞のチップ化やカートリッジ化を目指して開発を進めていく。

文献

- (1) Grinwis, GC., et al. Toxicology of environmental chemicals in the flounder (*Platichthys flesus*) with emphasis on the immune system: field, semi-field (mesocosm) and laboratory studies. *Toxicol Lett.* 112-113, 2000, p.289-301.
- (2) Korrick, SA., et al. High breast milk levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) among four women living adjacent to a PCB-contaminated waste site. *Environ Health Perspect.* 106(8), 1998, p.513-518.
- (3) Schantz, SL., et al. Effects of gestational and lactational exposure to TCDD or coplanar PCBs on spatial learning. *Neurotoxicol. Teratol.* 18, 1996, p.305-313.
- (4) Seo, BW., et al. Radial arm maze performance in rats following gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Neurotoxicol. Teratol.* 22, 2000, p.511-519.
- (5) Akahoshi, E., et al. Over-expression of AhR (aryl hydrocarbon receptor) induces neural differentiation of Neuro2a cells: neurotoxicology study. *Environ Health.* 5, 2006, p.24-35.
- (6) Ishido, M., et al. Bisphenol A causes hyperactivity in the rat concomitantly with impairment of tyrosine hydroxylase immunoreactivity. *J. Neurosci. Res.* 76(3), 2004, p.423-433.
- (7) Machala, M., et al. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutat. Res.* 497, 2001, p.49-62.
- (8) Van den Berg M., et al. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci.* 93(2), 2006, p.223-241.



菅野 美津子 SUGANO Mitsuko

研究開発センター 機能材料ラボラトリー主任研究員。環境有害物質を検出するTHアッセイの開発に従事。日本内分秘攪乱物質学会、日本神経科学会、米国神経科学会会員。Functional Materials Lab.



赤星 英一 AKAHOSHI Eiichi, Ph.D.

研究開発センター 機能材料ラボラトリー研究主務、農博。環境有害物質を検出するTHアッセイの開発に従事。日本内分秘攪乱物質学会、日本薬学会、トキシコロジー学会会員。Functional Materials Lab.



宇留野 さえ子 URUNO Saeko

研究開発センター 機能材料ラボラトリー。環境有害物質を検出するTHアッセイの開発に従事。日本内分秘攪乱化学物質学会、日本化学会会員。Functional Materials Lab.