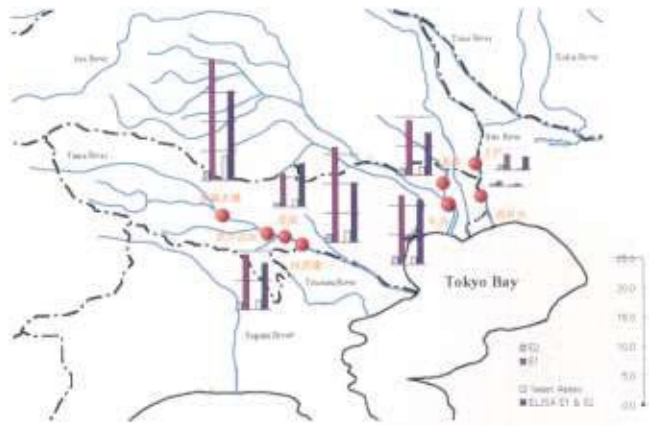
化学物質と計測法

環境省の「Strategic Programs on Environmental Endocrine Disruptors '98」（SPEED'98）には、内分泌撹乱作用を有すると疑われる化学物質のリスト65物質群と、トリブチルスズ、ノニルフェノール、4-オクチルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、ベンゾフェノン、オクタクロロスチレンとフタル酸ジ-2-エチルヘキシルを優先してリスク評価に取り組むべき物質が示されています。これらの環境ホルモンは、ガスクロマトグラフ質量分析法を用いて0.01μg/Lという極めて低い濃度まで測定されます。人の女性ホルモン（17β-エストラジオール）のように、非常に微量でもその影響が現れると考えられる物質の分析には負イオン化学イオン化（NCI）質量分析法などの手法を用い、より低濃度まで測定し、これらの物質が環境中でどのような挙動を示し、どのような影響を及ぼしているのかを研究します。また、環境中に存在しているものの分析対象となっていない未知の環境ホルモンを見つけ出すために、高速液体クロマトグラフ質量分析法や核磁気共鳴法を使った研究を進めています。



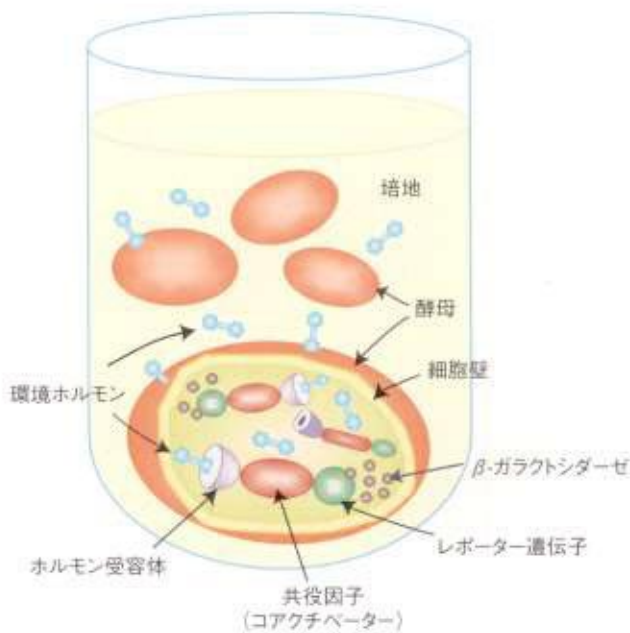
河川水中の女性ホルモン濃度の測定例（ng／L）

左からGC／MS測定によるエストラジオール（E2）濃度、エストロン（E1）濃度、酵母ツーハイブリッド法による女性ホルモン活性（E2換算）、免疫学的測定によるエストロジェン濃度（E2とE1）

環境ホルモンのin vitroアッセイ法

内分泌かく乱物質（環境ホルモン）の多くは体内のホルモンと同じように細胞のホルモン受容体（レセプター）に結合することにより体内のホルモンバランスをかく乱すると言われております。化学物質が環境ホルモンであるか、どうかを検索する簡単な手法として、in vitroアッセイ法があります。in vitroアッセイ法には、化学物質のホルモン受容体への結合能を調べる方法と、化学物質が細胞のホルモン受容体へ結合した情報により細胞が活性化され、何らかのタンパク質を作り出す機能を調べる方法があります。前者には結合を物理化学的に調べる蛍光偏光法や酵素免疫競合法によるバインディングアッセイなどがあり、後者には結合能を培養細胞の増殖能で調べるアッセイ（E-スクリーン）やホルモン受容体遺伝子を組み込んだ酵母を用いるレポータージーンアッセイなどがあります。本研究施設では、バインディングアッセイとして酵素免疫競合法を、レポータージーンアッセイとして酵母Two-Hybrid法による遺伝子組み換え酵母を用いたアッセイ法（図）を化学物質のスクリーニングに使用しています。

遺伝子組み換え酵母による環境ホルモンの検出のしくみ



（1）ホルモン受容体、共役因子、レポーターの三種類の遺伝子が組み込まれた酵母を増殖させます。
（2）環境ホルモンと疑われる化学物質の入った培地に酵母を加え、4時間培養します。
（3）酵母のホルモン受容体に化学物質（環境ホルモン）が結合すると、結合した情報が共役因子を介してレポーター遺伝子に伝わります。
（4）レポーター遺伝子の指令によりβ-ガラクトシダーゼという酵素が酵母内で作られます。
（5）酵母を破壊してβ-ガラクトシダーゼを測定することで、環境ホルモンを検出することができるようになっています。