

資料 4-2

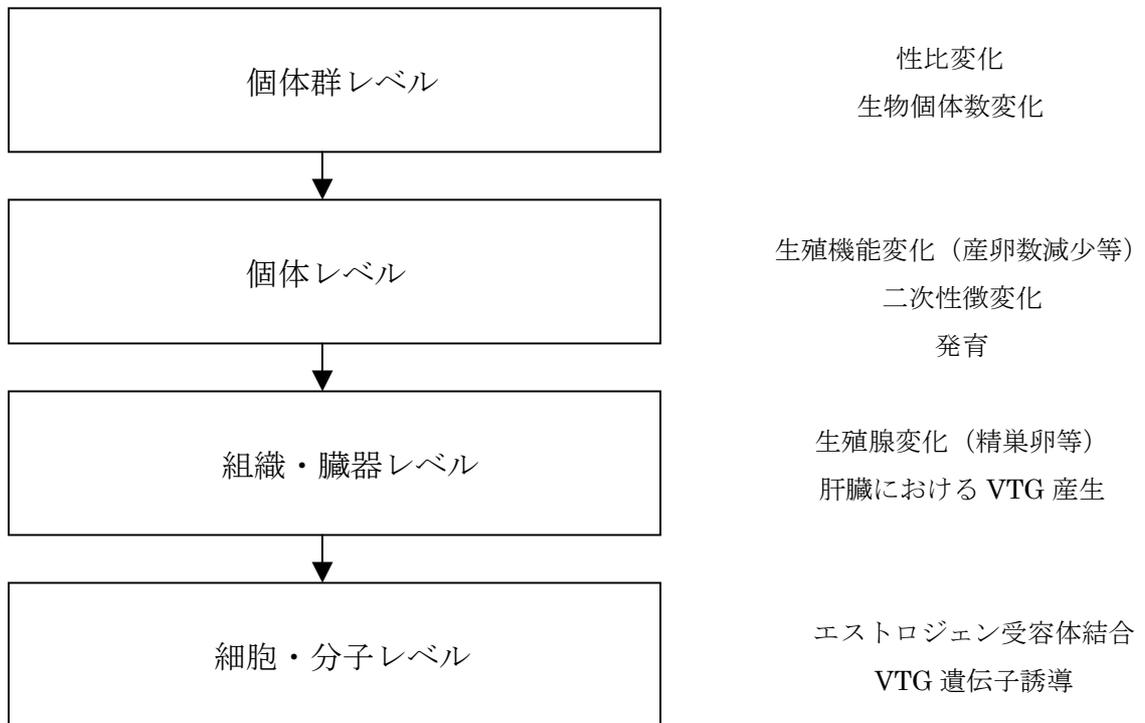
ExTEND2005 基盤的研究について

環境安全課

1. 基本的な考え方

「化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について-ExTEND2005-」においては、「観察された個体レベルでの事象が、内分泌かく乱を通しての一次的影響なのか、二次的影響なのかを見極めるためには、作用メカニズムについての知識が不可欠である。また、個体レベルでの有害影響と細胞・分子レベルでの変化との関連性も明らかにしていく必要がある。」としている。

【エストロゲン様作用での例】



(図) 内分泌かく乱作用の様々なレベルでの解明

## 2. 平成 17 年度基盤的研究課題

課題 1 魚類精巣卵の誘起機構解析

課題 2 メダカの生殖内分泌系に及ぼす化学物質の内分泌かく乱作用の作用メ  
カニズムに関する研究

課題 3 イトヨによる化学物質の内分泌かく乱作用の評価手法の研究

課題 4 メダカアンドロジェン受容体結合性試験の確立

課題 5 両生類の甲状腺ホルモンに対するかく乱作用発現のメカニズムに關  
する研究

課題 6 ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニズムの解析

課題 7 哺乳類試験において観察される変化についての研究

## 課題1 魚類精巣卵の誘起機構解析

研究者：自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター

勝 義直（代表研究者）、井口 泰泉、漆谷 博志、日名子 恵

研究目的：本研究は、魚類で見られる精巣卵に代表される生殖変化の解明を目指すものであり、個体・組織レベルでの変化から分子・細胞レベルでの変化に迫るものである。イギリスの河川において精巣卵がコイ科のローチで見つかって以来、日本においても河川の魚で精巣卵が見つかる等河川の汚染、それに伴う生体への影響が懸念されている。これまでの研究より、エストロゲン様作用を有する化学物質が精巣卵を誘起している（エストロゲンにより精巣卵の誘導は起こる）可能性が示唆されている。しかし、実際に河川中にはどのような化学物質が含まれ、そのうちの何が原因で、そしてどのような機構で精巣卵が出現してくるのか、精巣卵をもつ魚の生殖活動はどうなっているのか等の基本的な知見は乏しい。本研究では、実際に精巣卵が認められる魚の生息する河川中で見つかった化学物質のエストロゲン活性の有無、精巣卵の誘導能、精巣卵誘導に関連する遺伝子の単離を行なう。本研究により、特に精巣卵が生体（生殖活動など）に及ぼす影響が明らかになるとともに精巣卵誘起の分子機構に迫ることができると期待される。さらに、精巣卵の発生メカニズム、生殖への悪影響との関連の解明に繋がることから、試験法の開発にも寄与する。また、河川に含まれている化学物質の影響が解明されることによって、具体的な化学物質に対する調査（河川中に含まれている割合など）に貢献する。

これまでの取組：代表研究者は、これまでにイギリスのタイラー博士のグループとの共同研究を行なうことにより、ローチに起こる内分泌かく乱作用メカニズムの解析を行なってきた。共同研究を開始するまでは、ローチ生殖腺の形態学的な研究はなされてきていたが、分子生物学的なアプローチを用いた研究は皆無であった。そこで、まずローチのエストロゲン受容体、及びアロマターゼ遺伝子の単離を行ない、発現解析も行なってきた（論文投稿準備中）。さらに、様々な性分化関連遺伝子やステロイドホルモン受容体、ステロイドホルモン合成酵素の単離を行なってきた。これらの遺伝子群の単離によって、分子生物学的な手法からのアプローチが可能になった。具体的にはPCRやノーザンブロット法を用いた遺伝子発現の解析、*in situ hybridization* 法を用いた局在の探索などが可能となり、現在進めているところである。さらに、これらの遺伝子の発現解析を短時間でこなせるマクロ

アレイの作製にも着手している。このように、代表研究者はローチでみられる内分泌かく乱作用メカニズムの解析を手掛けきた。これに加えて、魚の卵成熟のメカニズムに関する研究 (Katsu et al., 1993)、野生動物のエストロゲン受容体遺伝子等のクローニング (Katsu et al., 2004)、カダヤシのトレンボロンによる卵精巣の発達やアンドロゲン受容体のクローニング (Sone et al., 2004)、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いた遺伝子探索 (Katsu et al., 2003) 等を行なってきたおり、研究手法についても問題は無い。

研究概要：イギリスの河川に生息するコイ科のローチと呼ばれる魚は、内分泌かく乱化学物質の影響として精巣中に卵が発生することが知られている (Jobling et al., 2001)。しかしこの誘起メカニズムや実際にどのような化学物質が精巣卵を誘起するのかは未だに不明である。本研究ではこの精巣卵の誘起機構の解明を目指す。ローチは内分泌かく乱の影響が現れている野生動物の代表的な例であり、解析の対象魚としては最適である。しかし飼育が容易ではないこと、成熟するまでの期間が長いこと、受精卵の入手が困難であることなど、実験には向かない面もある。そこで、飼育など容易で様々な変異体も同定されているメダカを用いて、解析を進める。最終的には野外で起こっている精巣卵の誘起機構解析が目的であることから、ローチ、メダカの両者を用いて比較を行なっていく。エストロゲン様物質による精巣卵誘起が判明していることから、エストロゲン受容体を用いた転写活性における化学物質の影響、河川中に含まれる化学物質による精巣卵の誘起、精巣卵誘起の分子機構解析のための精巣、卵巣特異的遺伝子の探索を行なっていく。

## 課題 2 メダカの生殖内分泌系に及ぼす化学物質の内分泌かく乱作用の作用メカニズムに関する研究

研究者：自然科学研究機構 基礎生物学研究所  
長濱嘉孝 (代表研究者)、松田 勝、鈴木亜矢

研究目的：野生動物の生殖異常と化学物質との関連、特に内分泌かく乱作用についてはこれまで多くの報告がある。しかし、その因果関係を正確に評価するための野生動物に関する基礎的知見は未だ十分であるとはいえない。環境省は、生態系に及ぼす内分泌かく乱作用を有する化学物質の影響の評価法として、魚類 (メダカ) を用いた試験を実施している。魚類の発生初期生殖腺では遺伝的性はすでに決まっているものの、性的可塑性は高く維持されてお

り、外からの性ステロイドホルモンや内分泌かく乱作用を有する化学物質などの刺激に対して敏感に反応し、生殖腺の異常（精巣と卵巣の混在）や完全な性転換を起こすことが報告されている。このようなことから、内分泌かく乱作用を有する化学物質は野生動物の性比のバランスを乱すのではないかと懸念されている。この発生初期（臨界期）の生殖腺および生殖腺付属器官が化学物質の暴露に対して感受性を示すことは魚類に限られたことではなく、程度の差こそあれ哺乳類を含むいろいろな脊椎動物で広く知られていることである。しかし、そのメカニズムに関しては未だ不明なところが多い。本研究では、内分泌かく乱作用を有する化学物質がメダカ稚魚の生殖腺に及ぼす影響と作用メカニズムをマイクロアレイや *in situ hybridization* などの分子、細胞生物学的アプローチを駆使して解析する。また我々は最近、メダカ成魚の生殖腺も外因性の化学物質に対して感受性を保持していることを見出したので、上記の解析を成魚についても行うことにより、稚魚と成魚の生殖腺における化学物質に対する感受性の違いについても検討する。メダカでは哺乳類以外の脊椎動物では唯一性決定遺伝子 (*DMY*) が同定されており、また性分化や配偶子形成に関わるホルモン因子や遺伝子群についての研究が進んでいる。さらに、近い将来に公開されるメダカのゲノム情報を利用することもできる。本研究では、このようなメダカの利点を最大限に生かしつつ、化学物質に暴露されることによって生ずる個体レベルの変化（性転換）が、どのような分子、細胞メカニズムによりもたらされるかを明らかにすることを目的とする。

これまでの取組：我々はこれまで、種々の魚類を用いて、生殖系（性決定/分化と配偶子形成）に及ぼす性ステロイドホルモンや内分泌かく乱作用を有する化学物質の影響と作用メカニズムに関する研究を行ってきたが、そのうちで本研究に特に関連すると思われる研究成果について以下に述べる。

- 1) ポジショナルクローニングにより脊椎動物で第2番目となるメダカの性決定遺伝子 *DMY* を発見した。また、性決定遺伝子の有無により誘導される精巣分化カスケード (*DMRT1*) と卵巣カスケード（エストロゲン、芳香化酵素）に関わる主要制御因子を同定した。
- 2) 性ステロイドホルモン（エストラジオール-17 $\beta$ 、エチニルエストラジオール、11-ケトテストステロン、メチルテストステロン）や内分泌かく乱作用を有する化学物質（ノニルフェノール、ビスフェノール A、ゲニスタインなど）を稚魚期のティラピア、メダカ、ヒラメに処理することにより性転換が誘起されることを示した（琉球大・中村 将教授と熊本大・北野 健助教授との共同研究）。

- 3) 性ステロイドホルモンや内分泌かく乱作用を有する化学物質は、生殖腺の体細胞（精巣ではライディッチ細胞とセルトリ細胞、卵巣では莢膜細胞と顆粒膜細胞）に作用して性転換を誘起すること、すなわち、これら化学物質の作用点は性分化期生殖腺の体細胞であること、を示した。
- 4) メダカの孵化前2日から孵化後15日までの間の遺伝子ライブラリーを作製し、それらをカタログ化することにより得られた独立遺伝子を貼り付けたマイクロアレイを作製した。さらに、微量なRNAを出発材料として解析できる生殖腺由来の遺伝子のみをプリントした高感度マイクロアレイ系も構築した。
- 5) ジェチルスチルベストロール (DES) が卵表に局在する新規のステロイド膜受容体との結合を介してメダカやゼブラフィッシュの卵成熟を誘起することを発見した。内分泌かく乱作用を有する化学物質が7回膜貫通型ステロイド膜受容体を介して作用することを示した最初の例である。
- 6) 魚類の生殖系に及ぼす化学物質の影響をきたまま、同一個体でモニターできるトランスジェニックメダカを数系統確立した。
- 7) 内分泌かく乱作用を有する化学物質の *in vitro* 評価系（芳香化酵素プロモーターの転写活性とステロイド核内受容体との結合性を指標とした）を確立した。

研究概要： 発生初期の脊椎動物の生殖腺は化学物質の暴露に対して高い感受性を示す。その顕著な例としてあげられるのが、発生初期の魚類や両生類が内分泌かく乱作用を有する化学物質に暴露されたときに起こる不可逆的な機能的性転換である。本研究では、化学物質に暴露されることによって起こる性転換（個体レベルの変化）がどのような分子、細胞メカニズムによるものであるのかをメダカを用いて解析する。我々は最近、メダカ生殖腺由来の遺伝子のみを貼り付けた高感度マイクロアレイ系を構築した。このアレイ系は化学物質がもつ内分泌かく乱作用や毒性を検索するためにも非常に有効であると考えられる。すでに、この新規マイクロアレイを用いて、メダカの正常性分化時の XX/XY 生殖腺での遺伝子発現パターンを解析することによりいくつかの性特異的遺伝子 (*DMY*、*DMRT1*、芳香化酵素、*42Sp43*、*ZP* 遺伝子、*SCP3*) が同定できているので、これらは遺伝子マーカーとして本研究の遂行には非常に有益である。そこで先ず、このマイクロアレイ系を用いて、エストラジオール-17 $\beta$ 、メチルテストステロン、DES で処理した稚魚と成魚の XX/XY 生殖腺における遺伝子発現パターンを解析する。このような正常時および性ステロイドホルモン処理時における遺伝子発現パターンに関する基礎的知見は化学物質の影響を正確に評価する上で非常に重要である。次

いで、同じアレイ系を用いて、種々の化学物質（ノニルフェノール、4-t-オクチルフェノール、ビスフェノール A など）を処理された稚魚と成魚の生殖腺における遺伝子発現パターンを解析するとともに、処理魚の生殖腺で特徴的に変動する遺伝子を同定して、その遺伝子の発現細胞や経時的発現パターンを *in situ hybridization* などにより詳しく調べる。このような解析を通して、個々の化学物質や性ステロイドホルモンの影響や作用の分子、細胞メカニズムを明らかにすることができるばかりでなく、それぞれの化学物質間における作用メカニズムの違いをも明確にできるものと期待される。

### 課題3 イトヨによる化学物質の内分泌かく乱作用の評価手法の研究

研究者：長崎大学環境科学部、自然科学研究機構、北海道大学  
長江真樹（代表研究者）、勝 義直、原 彰彦、征矢野清

研究目的：卵生脊椎動物を用いた化学物質の内分泌かく乱作用検出において、バイオマーカーの利用は非常に有効である。エストロゲン様作用の検出においては現在、卵黄タンパク前駆物質（ビテロゲニン）が多用されており、その有効性は広く認められている。しかしながら、アンドロゲン様物質に関しては有効なバイオマーカーが少なく、個体レベルでの作用把握等が十分に行われていないのが現状である。トゲウオ科魚類の仲間であるイトヨ (*three-spined stickleback, Gasterosteus aculeatus*) は繁殖期に営巣することは広く知られており、その際、雄がアンドロゲンの刺激により営巣接着タンパク「スピギン」を腎臓で特異的に産生することが近年明らかになった。雌は巣を作らず、通常はスピギンを合成しないが、外因性アンドロゲンにより極めて容易に腎臓での合成が誘導される。そのため、イトヨ雌を用いたアンドロゲン様物質の影響評価は非常に有効であると考えられる。また、イトヨは北半球の高緯度地域に広く分布する魚種であり、その生息数も世界的には極めて多いが、日本においては減少しており、特に本州では地域個体群の保全が進んでいるのが現状である。そこで、実験魚としてのイトヨの安定供給をはかるためには、人工繁殖技術の確立も急務である。本研究では、バイオマーカーとしてのスピギンの利用も含めて、イトヨを試験魚に用いたアンドロゲン様作用の評価手法確立を目的とする。これにより、将来的にはアンドロゲン様作用の検出とともにバイオマーカーの産生レベルと個体での具体的な影響発現との関係を明らかにすることが可能と考えられる。

これまでの取組：

- 1) スピギン cDNA のクローニング：スピギンをバイオマーカーとして利用するための準備として、これまで2種類のスピギン (SPG-I および SPG-II)をコードする cDNA を雄腎臓 cDNA ライブラリーから単離・構造解析を行った。それら遺伝子の構造は極めて類似性が高いこと (相同性約80%)、それら遺伝子の発現が腎臓でほぼ1：1の割合で起こること、アンドロゲン特異的に誘導されることを示し、両方の分子がバイオマーカーとして利用可能であることを明らかにした。
- 2) スピギン mRNA 定量系の開発：上記で明らかにした配列を基にリアルタイム定量 RT-PCR 測定系を開発し、曝露試験法を含めたスピギン定量による評価系確立の準備を進めている。
- 3) イトヨアンドロゲン受容体 cDNA のクローニング：化学物質の受容体結合能を詳細に調べるための準備として、イトヨのアンドロゲン受容体 $\alpha$  および $\beta$  (AR $\alpha$  および AR $\beta$ )をコードする遺伝子の部分的クローニングを行った。

研究概要：本研究では下記の3項目について研究を進めていく予定である。

- 1) イトヨアンドロゲン受容体を用いたレポーター遺伝子アッセイ系の構築
  - a) イトヨホルモン受容体の発現解析
  - b) レポーター遺伝子アッセイ系に利用するベクター系の構築と遺伝子導入
  - c) レポーター遺伝子アッセイ系の評価
  - d) レポーター遺伝子アッセイ系による化学物質の評価
- 2) スピギンを用いたアンドロゲン作用評価試験法の開発
  - a) スピギンのリアルタイム定量 RT-PCR の確立
  - b) イトヨを用いた曝露試験法の構築
  - c) イトヨを用いた対照物質曝露試験の実施
  - d) イトヨを用いた曝露試験の実施
  - e) 環境水のイトヨを用いた曝露試験の実施
- 3) イトヨの人工繁殖技術の開発
  - a) 人為催熟のための条件設定
  - b) 人工授精および孵化仔魚の育成

#### 課題4 メダカアンドロゲン受容体結合性試験の確立

研究者：財団法人化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所

中井 誠（代表研究者）、江藤千純、横田弘文

研究目的：化学物質の内分泌かく乱作用には、性ホルモン等が結合する核内受容体を介した作用ならびにホルモン合成酵素を阻害あるいは誘導することにより、直接的な受容体結合を介さずに発現する作用などが考えられている。個々の化学物質の個体レベルにおける有害影響を行う場合、その作用経路を詳細に解明することはリスク評価を行う上でも非常に重要な課題である。このためには、*in vivo* 試験において得られた結果と分子レベルあるいは細胞レベルにおける特異的な作用メカニズムとの関連性を詳細に検討する必要がある。この点において、受容体結合試験は化学物質の受容体結合を介した遺伝子転写調節という、内分泌かく乱作用の主要なメカニズムあり、かつ、特異的な作用メカニズムを非常に簡便に評価することが可能であり、生体への影響評価において、重要なデータを提供することができる。受容体結合試験において、組み換え受容体タンパク質を用いる利点として、品質の安定な受容体ソースの提供が可能で良好な再現性が得られるという点が挙げられる。組み換え受容体タンパク質の発現系としては、ほ乳動物培養細胞、昆虫細胞、酵母あるいは大腸菌を用いた発現系が知られており、これまで、われわれはメダカ ER の大量発現系として大腸菌を利用してきた。しかしながら、一般的に、AR については発現産物が分解されやすく不安定であることが知られており、無細胞系での結合試験の実施が困難であると考えられたため、ほ乳動物培養細胞（HeLa および CV-1）発現系を用いた結合試験系を開発してきた。その結果、HeLa 細胞を用いた結合試験系の開発に成功し、種々の化学物質のメダカ AR に対する結合強度を測定した。しかしながら、生体内における代謝反応による化学物質の構造変化に伴い、受容体に対する相互作用も変化する。例えば、代謝による受容体結合能の増強・獲得や減少・欠失が考えられる。従って、親化合物とその代謝産物の受容体結合能を測定することは、生体内での受容体結合ポテンシャルを評価する上で、特に有害性が増加する場合において非常に重要である。本課題では、これまでに構築した培養細胞を用いた結合試験をさらに発展させ、化学物質の代謝を考慮した試験系を構築することを目的とする。化学物質の代謝としては、細胞内で容易に生じると考えられるエステル結合の加水分解反応や水酸化あるいは抱合化のような反応がある。抱合化された化学物質はその構造的特徴から、受容体結合能は非常に弱い、あるいは結合性を示さないことが予想されるため、本課題では、代謝による化学物質の受容体結合能の増強あるいは獲得に着目し、主に内因的な酵素反応による加水分解と P450 等の代謝酵素による水酸化反応について検討を行う。ここで、魚類における代謝経路とラットのそれは基

本的に同様であり、ある種の農薬の代謝産物の AR 結合性の活性化は、ほ乳動物と魚類で類似したメカニズムによって誘発されると考えられていることから (Martin van den Berg ら、Pure Appl. Chem., 75, 1917-1932, 2003)、魚類体内における化学物質の代謝産物の AR 結合性を評価する上で、ほ乳動物由来の細胞や代謝酵素をツールとして用いることは簡便性の面からも有効であると考えられる。そこで、本課題では、内因的な代謝能が高いとされる CV-1 細胞類縁種である COS 細胞を用い、分子内エステル構造の有無と HeLa 細胞を用いたときとの差について検討する。さらに、水酸化反応を検討するために、メダカ肝細胞およびラット肝 S9 を用いた試験系を構築する。今日、生体内イベントの詳細を解明するための分子生物学的手法として DNA マイクロアレイ解析の利用が盛んである。このような手法は本課題で得られる化学物質の受容体結合という分子情報伝達の「トリガー」によって引き起こされる毒性発現に関与する遺伝子の役割を解明するために有効であると考えられる。受容体結合という「トリガー」の情報と、代謝活性化に伴って変化する結合性データの蓄積は、将来的に得られるであろう有用な遺伝子発現情報と高次試験結果を解析し、そのメカニズムを解明する上で重要な役割を果たし、生体への影響評価に要な知見を与えることが期待される。

これまでの取組：われわれは、化学物質の内分泌かく乱作用の生態影響を評価するために、メダカを用いた生態毒性試験およびメダカ由来核内受容体を用いた *in vitro* 試験法を開発してきた。さらに、*In vitro* 試験法を用いて、SPEED'98 に掲載されている種々の化学物質について、ER および AR を介した遺伝子の転写活性可能ならびに ER および甲状腺ホルモン受容体 (TR) に対する結合性を定量した。これまでに、メダカを用いたビテロジェニン産生試験などの *in vivo* 試験と ER に対する結合強度の間には非常に良好な相関があることを見いだしている。さらに、化学物質の受容体結合性には種間差が存在することを明らかにしている。実際に内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の環境中濃度における、ラットおよびメダカに対する影響は異なっていることから、生態への影響を評価するためには、種間差を考慮し環境生物由来の受容体に対する結合性を測定する必要があると考えられる。メダカアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子はこれまで報告されていなかったが、われわれは、メダカ肝臓由来 cDNA ライブラリーを構築し、RACE 法により、全長 2,235 塩基対の cDNA の新規単離に成功している。メダカ AR を用いた試験としては、遺伝子転写活性可能だけでなく、培養細胞を用いた受容体結合試験を開発しており、化学物質の性ホルモン受容体を介した作用に対して、メカニズムに基づいたデータを提供することが可能となっている。

研究概要：化学物質の内分泌かく乱作用のうち、性ホルモン受容体結合を介した下流遺伝子の転写制御は主要なメカニズムであり、化学物質の受容体結合性、あるいは、遺伝子転写活性化能は内分泌かく乱作用を評価する上で、重要な指標となっている。また、*in vitro* 試験結果を生体における作用に対してメカニズムに基づいたサポートデータとして利用する、あるいは、スクリーニング手法として利用するためには、生体内における代謝反応を反映した系の構築が望ましい。昨年度までに受容体発現系としてヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞およびアフリカミドリザル腎臓由来 CV-1 細胞を用いて、メダカアンドロジェン受容体 (AR) 結合試験系を開発した。HeLa 細胞を用いた系では試験系を確立し、種々の化学物質の AR 結合性を測定することが可能であった。また、CV-1 細胞は内因的な代謝能を有するといわれており (EDSTAC Final Report, Chapter5: Screening and Testing,1998)、レポーター遺伝子アッセイ用の細胞種として推奨されているが、結合試験の操作時に培養器材からの剥離等の問題があり、結合試験系としての至適化はできていない。ここで、CV-1 細胞と同様にアフリカミドリザル腎臓由来細胞であり、接着強度の高い COS 細胞を用いた結合試験系を構築し、内因的な代謝能をもった結合試験系としての至適化を行うとともに、CV-1 細胞についても、培養条件等のさらなる検討を行い、結合試験系への適用の可否について検討する。さらに、生体における化学物質の代謝器官として重要な肝臓由来の培養細胞を使用することで、代謝を考慮した試験系として適用可能であると考えられるため、メダカ肝臓由来細胞 (OLHE-131、理化学研究所) を用いた結合試験系の構築を検討する。また、化学物質の代謝産物の作用を検出するために、ラット肝 S9 による処理を昨年度までに構築した HeLa 細胞を用いた結合試験系に適用し、試験物質の水酸化等による活性化あるいは不活性化による受容体結合性の変化を解析する。さらに代謝により、活性が変動した化学物質についてはその構造と活性との関係についても考察する。

## 課題 5 両生類の甲状腺ホルモンに対するかく乱作用発現のメカニズムに関する研究

研究者：広島大学大学院 理学研究科附属両生類研究施設  
柏木昭彦 (代表研究者)

研究目的：OECD では、化学物質の生態影響評価の観点から、内分泌かく乱作用を評価するための試験法の開発が推進されており、我国も、開発に大きく

貢献している。両生類については、両生類に対する影響を評価するのみならず、脊椎動物を代表するモデルとしての位置づけも加わり、甲状腺ホルモンに対する化学物質の作用を評価するための「変態アッセイ」の開発が進められている。変態アッセイでは、甲状腺ホルモンによって制御されている、無尾両生類に特有の“変態”に着目し、尾の退縮や肢芽の伸長等をエンドポイントとし、化学物質の暴露によって生じる個体レベルの変化に基づいて、甲状腺ホルモンかく乱作用を評価すること、を目指している。しかしながら、変態アッセイの開発において、エンドポイントである個体レベルの変化が、必ずしも甲状腺ホルモンかく乱作用を正確に反映している保証はなく、変態アッセイの妥当性を担保するため、化学物質による甲状腺ホルモンかく乱作用のメカニズム解明は急務であり、試験法の開発と平行して実施すべき課題である。本研究は、上記の通り、変態アッセイの基礎的知見として、甲状腺ホルモンに対するかく乱作用発現のメカニズムを、細胞・分子レベルで解明する必要がある点に鑑み、これまで変態アッセイの開発過程において認められた、暴露した化学物質種や濃度による個体レベルの変化（尾の退縮や肢芽の伸長等に代表される変化）を、その変化を引き起こす遺伝子の発現パターンの変化と比較評価することで、化学物質の甲状腺ホルモンかく乱への作用メカニズムを理解し、試験法の妥当性を保証する上で必要不可欠な情報を取得するとともに、未知の化学物質による甲状腺ホルモンかく乱作用が生じた場合に、その作用メカニズムを推定し、化学物質の評価を与えるための基本情報を整備することを目的としている。また、両生類の新たなモデル動物として、OECD はもちろん、世界的にその有用性が認識されながら、生物学的な基本情報が少ないために運用が滞っている「ニツメガエル」を試験動物として利用することで、ニツメガエルの基本情報の整備にもつながることから、試験動物としての運用拡大に貢献することも目的の一つである。本研究の推進により、化学物質の暴露により個体レベルで生じる変化と、遺伝子発現との相関が明確化され、化学物質の作用メカニズムに一定の理解が得られることから、甲状腺ホルモンかく乱作用を評価するための唯一の手段として、現在、OECD を軸として開発中である「変態アッセイ」の試験法としての妥当性を、化学物質の作用メカニズムの観点から評価することが可能となり、変態アッセイの開発を通して、生態系を視野においた化学物質対策の原点として、社会に貢献できると考える。さらに、未知の化学物質による甲状腺ホルモンに対するかく乱作用が生じた場合に、その作用メカニズムを推定し、化学物質の評価を与えるための基本情報として大きく貢献するものとなる。さらに、ニツメガエルの基本情報が整備されることで、基礎実験のモデル動物としてのニツメガエル、という位置づけとともに、試験動物としての運用拡大に向け、大きく国際貢献することは確実である。

これまでの取組：これまで研究代表者は、本研究に関連し、無尾両生類を用いた両生類の変態の解明と、化学物質が甲状腺軸に対し与える影響について、形態学および分子生物学的知見から研究に取り組んできた。以下に、研究内容を示す。

(1) 変態アッセイの開発

OECD で推進されている「変態アッセイ」の開発に、日本代表として参画している。これまでに、第一段階のバリデーション試験（フェーズ I）が終了し、変態アッセイの有効性が確認されたことから、現在、改訂されたプロトコルにより、第二段階のバリデーション試験（フェーズ II）を実施している。

(2) ニシツメガエルの情報・供給の整備

(2) - 1 標準データベースの作製

モデル動物として基本情報が不十分であるニシツメガエルについて、発生過程を通じて、全長、尾長、発生段階、生殖腺および甲状腺の発達、ビテロジェニンの合成について、測定、観察、記録を行い、標準データベースを作成した。

(2) - 2 暴露試験

変態アッセイに準じた方法で、T<sub>4</sub>およびプロピルチオウラシル（PTU）をニシツメガエルに対し暴露し、その応答性を検証した。

(2) - 3 ナショナル・バイオリソースプロジェクト

ニシツメガエルの純系統の維持、ならびに世界の研究者に向けた安定供給を目指し、維持・管理システムを構築し運用している。

(3) 甲状腺ホルモン応答性トランスジェニックカエルの作製と評価

アフリカツメガエルの TR $\beta$  遺伝子のプロモータ領域の下流に EGFP 遺伝子を繋いだベクターを導入したトランスジェニックカエルを作製した。この幼生および成体のいずれも、1nM の T<sub>3</sub> に対して応答し、暴露 24 時間以内に EGFP の蛍光強度が増加することから、プロモータ領域を決定するとともに、モデル動物としての有用性を示した。また、トランスジェニックカエルに対し、ビスフェノール A を暴露し、EGFP の蛍光強度を測定することにより、ビスフェノール A が甲状腺ホルモンレセプターを介して甲状腺ホルモン作用を抑制することを明らかにした。

(4) 尾の退縮阻害試験とプロテオーム解析

甲状腺ホルモンに応答する発生段階のツチガエル幼生にビスフェノール A を添加し、尾の退縮の変化を経時的に追跡することにより、ビスフェノール A の甲状腺軸に対するかく乱作用を評価した。また、このかく乱作用の作用点や作用メカニズムを明らかにするために、尾および肝臓より蛋白質を抽出して二次元電気泳動し、コントロールとタンパク質の発現パターンを比較することにより、ビスフェノール A の暴露と関連したタンパク質候補を特定している。この取り組みは、甲状腺軸に対するかく乱作用を評価するマーカーの探索に役立つと考えている。

(5) オタマジャクシの尾部消失の分子機構の解明

アポトーシスは遺伝子発現により整然と実行されるプログラムされた細胞死である。アポトーシスは多細胞生物における形態形成やホメオスタシスのみならず、癌や自己免疫疾患、エイズなど多くの疾病を未然に防ぐ生体防御にも重要な役割を担う。近年、アポトーシス関連遺伝子が同定され、その調節機構に関する研究が飛躍的に進み、分子機構も次第に明らかになってき

た。しかし、Cell free 系を用いた研究が主流で、そこから得られた知見が正しいかどうかについては今後、生体での証明が必要となる。オタマジャクシの変態時における尾部の消失は生体におけるアポトーシスの典型的な例として古くからよく知られている。その分子機構についてはよくわからなかったが、最近、研究代表者らが行った一連の研究から活性酸素代謝と活性酸素分子間のクロストークの関与が明らかになってきた。これまでに得た結果から、オタマジャクシの尾部アポトーシスは、①レセプターを介する、および②ミトコンドリアを介する、2 経路を通して起こる可能性が示唆されている。すなわち、レセプターを介する経路では、甲状腺ホルモンの増加→NO 生成(NOS の活性化)→カタラーゼ活性阻害→H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の蓄積→リソソーム酵素の遊出→Caspase-3 の活性化。ミトコンドリアを介する経路では甲状腺ホルモンの増加→ミトコンドリアからのシトクロム C(Apaf 構成要素の一つ)の遊出→Caspase-3 の活性化。経路 1,2 で活性化された Caspase-3 はさらにカスケードを経由して、最終的に細胞にアポトーシスを引き起こす。尾部アポトーシスの解析が進めば、尾の短縮機構にとどまらず、広くアポトーシス機構一般の解明にも重要な貢献を果たすものと期待される。

研究概要：現在、OECD では、化学物質の甲状腺ホルモンに対する内分泌かく乱作用を評価するための試験法の確立を目指し、無尾両生類を用いた変態アッセイの開発を推進しており、我国も、開発に大きく貢献している。この変態アッセイの開発過程において、異なる作用メカニズムにより甲状腺ホルモンかく乱作用を惹起する化学物質（甲状腺ホルモン；T<sub>4</sub>、プロピルチオウラシル；PTU、イオパノ酸；IOP）を幼生に暴露すると、個体レベルで生じる変化に大きな差が生じた。これまでの研究から、変態のメカニズムについてはある程度理解されているが、分子レベルでのメカニズム解明については、一部の組織における遺伝子の挙動について報告されているにすぎず、化学物質の暴露によって個体レベルで生じる変化と遺伝子発現変化との関連性や、遺伝子間の相互作用、時間・空間的な発現メカニズム等については、いまだ十分に解明されていない。本研究では、甲状腺ホルモンかく乱作用を惹起する上記 3 つの化学物質（T<sub>4</sub>、PTU、IOP）を、変態アッセイに準じてニシツメガエル幼生に暴露し、継時的に、これらの幼生から後肢、尾、肝臓等の組織を採取する。各組織から遺伝子を取得し、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いた遺伝子発現解析により、遺伝子発現変化をプロファイリングし、将来のデータベース化の基となる基礎情報としての位置づけも念頭におき、尾の退縮や枝芽の伸長等に代表される個体レベルで生じた変化と、そのような変化を引き起こした遺伝子の発現の変化を対応させて遺伝子カスケードを整理する。さらに、甲状腺ホルモンかく乱作用応答モデル両生類を用いて遺伝子発現と個体レベルで生じる変化とをリアルタイムで調べることにより、両生類の甲状腺ホルモンに対する内分泌かく乱作用発現のメカニズムの解明を目指す。

## 課題6 ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニズムの解析

研究者：自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター、国立環境研究所

渡邊 肇（代表研究者）、加藤泰彦、大塚絵里、鑑迫典久、小田正人

研究目的：通常単為生殖を行っているミジンコは、餌の減少、日照時間の減少、個体密度の増加などによって、オスを産生することが知られていた。しかし、こうした環境の変化によるオスの産生の割合は高くても数十%程度である。しかし、最近になって我々は幼若ホルモン様化学物質により、100%オス産生を誘導する化学物質を同定した。こうした知見に基づき、OECDにおいてもテストガイドラインの改定(enhancedTG211)が進められている。しかし、オス産生の誘導は、一連の幼若ホルモンのアゴニストにより誘導されることが明らかになってきたものの、その作用メカニズムについては全く解明されていない。そこで本研究では、化学物質曝露からオス産生に至るまでの作用メカニズムを解明することにより、enhancedTG211 を分子レベルからサポートすると同時に、無脊椎動物におけるホルモンと性についての基礎的な知見を得る。

これまでの取組：

- 1) ミジンコをフェノキシカルブ 1 $\mu$ g/l に曝露することにより、通常の場合で99.99%メスしか生まないミジンコが100%オスを産むようになることを見出した。
- 2) 一連の曝露による解析から、フェノキシカルブのみならず、ピリプロキシフェン、メトプレンなど、昆虫、甲殻類の幼若ホルモン様化学物質がオスの産生を誘導することを見出した。
- 3) こうした幼若ホルモン様化学物質によるオス産生は、*Daphnia magna* のみならず、*Daphnia* 属以外の、*Ceriodaphnia reticulata*, *C. dubia*, *Moina macrocopa*, *M. micrura* などにおいても誘導されることを確認し、比較的広範囲のミジンコにおいて共通に生じることを明らかにした。
- 4) ミジンコにおけるゲノミクス関連の情報が非常に不足していたために、まず遺伝子情報の取得を行った。通常に飼育していたミジンコから作製したcDNAライブラリーをもとにランダムに選択したクローンおよそ1万について塩基配列を決定することにより、遺伝子情報を取得した。

研究概要：内分泌かく乱作用については科学的に未解明な点が多いことから、

その影響に関連した作用メカニズムを細胞・遺伝子・分子レベルで解明していくことが重要である。中でも内分泌かく乱化学物質により引き起こされる一連の遺伝子の発現変化と、それにより引き起こされる細胞レベルでの変化などを明らかにすることは、内分泌かく乱作用のメカニズムの解明への糸口となる。こうした試みは従来、実験動物や魚類を中心として進められてきた。しかし、今後生態系への影響を明らかにしていくためには、対象を生態系を構成する生物種に広げ解析を進めていく必要がある。特に無脊椎動物においては、様々な影響が報告される中で、作用メカニズムを解明するための基礎的な知見は非常に限られている。我々は、すでに幼若ホルモンのアナログがミジンコ (*Daphnia magna*) においてオスの産生を誘導することを見出している。本研究では、このミジンコのオス産生の誘導モデルとして、無脊椎動物における内分泌かく乱作用の分子レベルでのメカニズムの解明を目指す。

#### 課題 7 哺乳類試験において観察される変化についての研究

研究者：日本獣医畜産大学 獣医学部獣医学科獣医生理学教室、財団法人 残留農薬研究所

鈴木勝士 (代表研究者)、鈴木浩悦、斉藤賢一、青山博昭、佐藤 旭

研究目的：これまでに実施した内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の改良型世代試験において、実験動物生産業者から購入した動物（一定頻度で遺伝的多型性を保持するクローズドコロニーラット）の中に自然発生的な遺伝性の突然変異とおぼしき変化を示す事例が紛れ込んでおり、投与群で低頻度にそのような変化が出現した場合、誘発性の変化なのか自然発生性の変化なのか判断が難しい局面に多々遭遇した。背景的な出現頻度や異常の種類を把握しているだけでは、この問題は基本的には解決せず、遺伝性あるいはエピジェネティックな変化であることを証明することが本質的な問題解決として最も簡明であると考えられた。そのためには、そのような自然発生性の異常の発見、遺伝的固定、様々な遺伝実験や病態の解明と共に、原因遺伝子を探索確立し、診断用プローブを作製することが必要である。このような表現型異常には既に摘発、遺伝的固定が行われているものも含まれており、日獣大と残留農薬研で維持されている系統を活用すれば早期に目的が達成できると考えられる。日獣大にあっては、雄性性腺形成不全を呈する矮小症(hgn/hgn)について、ポジショナルキャンディデートクローニングにより特定の遺伝子異常が同定できる段階にある。同様に染色体に割り当てられている異常（系

統) が他にもあり、それぞれ分子的な段階で異常の解明が進行する予定である。残留農薬研にあっては甲状腺の異常(Wistar Hannover 由来)が、その病態からサイログロブリンの分子異常と想定されており、この遺伝子の cDNA には部分的欠失があることやホモ接合体が矮小となることも確認されていることから、比較的早期 (1 年以内) にゲノム上の遺伝子異常が把握され、分子診断プローブが開発される可能性が高いと考えられる。最終的に診断用プローブが作製されたり、リンケージ試験の間に得られたマイクロサテライト多型の情報が得られたりした場合には、動物生産業者の段階で保有しているラットのサーベイに役立てる予定である。この準備として様々な業者からラットのゲノムサンプルを集めておく必要も生じるが、他の研究の進捗状況をにらみながら準備すれば間に合うと考えている。

これまでの取組：代表研究者および共同研究者は、内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の改良型世代試験において実務者レベルでの指導的役割を果たすとともに、低頻度で起こる現象の統計学的解釈、誘発性と偶発性、インビボ戦略等について研究方法を公表し、問題提起をしてきた。日獣大にあっては、Wistar Imamichi ラットのクローズドコロニーから偶発性の異常を他種類発見し、遺伝的に固定 (近交系作出) して、病態の解明、リンケージ分析、遺伝子マッピング、原因遺伝子の探索を継続して来ている。また、東京実験動物由来の Wistar 系からも新規の異常を発見し、同様の試みをしている。残留農薬研においても、Wistar Hannover 系ラットに出現した甲状腺肥大について遺伝的固定と病態解明を試みるとともに、日本クレアより購入したクローズドコロニーラット (Wistar ラット) の集団から単離した 5 系統の突然変異系を維持しつつ、これらの異常について遺伝学的・奇形学的解析を続けている。いずれの場所でも、微生物学的に制御された環境で動物を飼育する清浄な環境が整えられており、動物の移入、移出に問題がない状況が担保されている。

研究概要：環境省は、ヒト健康への内分泌かく乱作用による影響の評価手法として、哺乳類 (ラット) を用いた改良一世代試験を実施してきた。この試験は、メスのラットに妊娠及び哺育期間を通じて内分泌かく乱作用が疑われる化学物質を暴露して、親動物及び仔動物への影響を把握するものであり、各エンドポイントで認められた変化が有害影響であるか否かを判断するためには、組織・臓器レベル及び個体レベルでの自然発生性の変化 (化学物質の暴露とは無関係な突然変異による異常) についての知見が不可欠である。判定の難しかった自然発生性の変化としては、試験に用いた Wistar Hannover

系ラットに一定の頻度で自然発生することが知られている甲状腺の肥大等が挙げられる。このような自然発生性の変化と化学物質暴露に起因した変化とを区別して評価するためには、内分泌系だけでなく神経系・免疫系も含めた個体レベルでのエンドポイントについて、母集団（試験に用いるクローズドコロニー系統）での発生頻度や遺伝学的根拠、あるいは生物学的意義付けを明確にしておく必要がある。本研究では、生殖・発生毒性試験を実施する過程で新規に発見される偶発異常の摘発、調査、系統化、表現型分析、遺伝子診断に加えて、従来そのような経緯で系統化されてきた異常についても積極的に活用し、遺伝子診断用プローブの作製を目指す。上述の繁殖から免疫、神経系を含む異常については、しばしば共通の表現型として矮小症、成長不良が含まれているので、過去に拾われた成長不良や致死を含む異常について分子診断のプローブを持つことは、生殖・発生毒性試験で観察された異常が誘発性であるか否かを判断する上で極めて大きな価値をもつことになる。系統化からスタートすると目的を達するのにかなりの年月を有するが、既存の異常系統を利用すれば比較的早期に目的を達するものも含まれることになる。日獣大と残留農薬研で維持している異常系統は 10 種類以上あり、年間 10,000 頭以上の生産が見込まれることから、本研究の遂行にあたってはそれらの系統を維持することも重要な業務となる。また、各系統の研究進捗状況が異なることから、プリミティブな交配実験、マイクロサテライトリンケージ分析、様々な遺伝子クローニング（ファンクショナル、ポジショナル、ポジショナル・キャンディデート、ノンポジショナル・キャンディデート、古典的なフォワードジェネティクスアプローチなど）を駆使して実験することになり、異常動物の系統化や確実な表現型診断に基づいて、DNA、RNA およびタンパク質について分析する。遺伝子のシーケンシングについては、基本的に外注する方針である。比較的最近遺伝的固定が試みられている系統もあることから、その異常について初期の目的を達するのに最低 5 年必要として、本研究を当面 5 年のプロジェクトと位置づけている。

### 3. 今後の方針

前記 7 課題について、具体的研究内容を調整の上、研究を実施する。また、今後の新規研究課題等についても検討を行う。