

ExTEND2005 基盤的研究について

「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(p20)。

1. 平成 17 年度基盤的研究採択課題

平成 17 年度については下記 7 課題について採択し、調査研究を実施した。調査内容については、ExTEND2005 基盤的研究企画評価検討会での協議の上、決定した。

課題 1 . 哺乳類試験において観察される変化についての研究

代表研究者：鈴木勝士（日本獣医畜産大学獣医学部獣医学科獣医生理学教室）

改良 1 世代試験に用いてきた Wistar Hannover 系統のラットの中に自然発生的な突然変異によると考えられる異常が紛れ込んでいることが想定され、その結果として、試験を実施した際に被験物質投与に起因する変化なのか、突然変異による異常なのかを判別することは困難であった。このため、遺伝子解析によりこの課題を解決できる可能性を検討した。

研究成果：

Wistar Hannover 系統には、突然変異ホモ個体、突然変異ヘテロ個体及び正常個体が存在することが、thyroglobulin 遺伝子を解析する事で判明した。

突然変異個体では、thyroglobulin 遺伝子について、mRNA レベルで第 7 エクソンの欠失 (deletion) が認められた。

mRNA に検出される第 7 エクソンの欠失は、ゲノム DNA 上で第 6 イントロンの末尾に起こった「g」から「t」への 1 塩基置換 (single nucleotide polymorphism, SNP) によることをシーケンシングにより確認した。

突然変異ヘテロ個体には甲状腺腫大 (重量の高値) が認められ、突然変異ホ

モ個体は矮小となることが認められた。

ケルセンの改良1世代試験で得られたF0母動物の肝臓ホルマリン固定標本からゲノムDNAを抽出し、遺伝子型を判定中。

課題2．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

代表研究者：柏木昭彦（広島大学大学院理学研究科附属両生類研究施設）

OECD試験法（フェーズII）に準じ、ニシツメガエル幼生にT4, IOP, PTUを暴露した。

T4暴露個体から後肢・肝・尾をサンプリングし、遺伝子発現プロファイルを作成した。

プロファイリングの結果から、遺伝子カスケードの解析に有効と考えられる候補遺伝子を選択した。

研究成果：

T4およびPTUの暴露では、それぞれ変態の促進および抑制が確認された。

一方、IOPの暴露ではコントロールとほぼ同時に発生が進んだ。

DD法を用いたスクリーニングにより、221の遺伝子が単離され、プロファイリングの結果、これらは、発現量が発生に伴い変化した遺伝子と、発生に関係なく変化した遺伝子の2つのグループに分類できた。

作成されたプロファイルをもとに、T4の暴露で発現量が変化した遺伝子のうち、変化量の差が大きい遺伝子や発現時期の異なる遺伝子を中心に、後肢・肝・尾の組織からそれぞれ5種程度の候補遺伝子を選択した。

課題3．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

代表研究者：長濱嘉孝（自然科学研究機構基礎生物学研究所）

化学物質の内分泌かく乱作用を解析するためのマイクロアレイ系の開発と改良を行った。

稚魚の生殖腺に及ぼす性ホルモンの影響と作用メカニズムの解明研究を行った。確立したメダカ生殖腺における遺伝子発現を網羅的に解析できる高感度マイクロアレイ系を用いて、メダカ稚魚に対する2種類の性ホルモン処理（受精直後から約18日間の処理で孵化後10日まで、用いた濃度は17-エストラジオールが0.1ng/mL~200ng/mL、メチルテストステロンが0.1ng/mL~1ng/mL）の影響を調べた。

芳香化酵素遺伝子が可視化できるトランスジェニックメダカシステムの作出

研究成果：

孵化直後のメダカ 1 個体から取り出した生殖腺における遺伝子発現を解析することができる高感度マイクロアレイ系を確立することに成功した。このメダカの生殖腺特異的マイクロアレイ系は、性ホルモン投与で性を転換できる孵化後 5 ~ 20 日の生殖腺由来の遺伝子が貼り付けられている。

エストロゲンで発現が促進され、アンドロゲンで発現が抑制される遺伝子が 78 個（通常 XX 生殖腺で特異的に発現）、アンドロゲンで発現が促進され、エストロゲンで発現が抑制される遺伝子が 29 個（通常 XY 生殖腺で特異的に発現）単離された。また、それらの多くが新規の遺伝子であることが明らかになった。

芳香化酵素遺伝子が可視化できるトランスジェニックメダカ系統の作出に成功した。

課題 4 . 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

代表研究者：長江真樹（長崎大学環境科学部）

イトヨ男性ホルモン受容体 (AR) 遺伝子のクローニング及びおよびレポーター遺伝子アッセイ系の準備を行った。

スピギン mRNA 定量系の開発および曝露試験法の構築を行った。

イトヨ人工繁殖技術開発のための基礎研究を行った。

研究成果：

イトヨ腎臓から 2 種類の AR (AR および) 遺伝子を単離した。

スピギンをバイオマーカーに用いた *in vivo* 男性ホルモン作用評価を行う準備が整った。

成熟した配偶子が得られた場合、人工種苗を作出することは技術的に問題ないことが確かめられた。

課題 5 . ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニズムの解析

代表研究者：渡邊肇（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）

脱皮ホルモン受容体と関連遺伝子の解析を行った。

性決定・性分化機構関連遺伝子の解析を行った。

研究成果：

脱皮ホルモン受容体のクローニング、サブタイプのクローニング、関連遺伝子のクローニング、発現パターンの解析、レポーター系の構築を行った。

DMRT 関連遺伝子のクローニング、発現に性差のある DMRT 遺伝子の同定、性分化機構に関与している tra などの遺伝子を同定した。

課題 6 . メダカアンドロジェン受容体結合性試験の確立

代表研究者：中井誠（財団法人化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所）

アフリカミドリザル腎臓由来の COS 細胞を用いた結合試験系構築を行った。

S9 を用いた試験物質の代謝産物の結合性の測定を行った。

メダカ肝細胞の適用性の検討を行った。

研究成果：

COS 細胞の代謝活性を利用することで代謝産物のメダカ AR 結合性を評価可能であることがわかった。

S9 処理では終夜反応が効果的であった。

メダカ肝細胞は増殖速度が極端に遅く、代替として HepG2 細胞（ヒト肝がん由来）を用いた試験系構築を検討したが、安定したデータが得られなかった。しかし、同じ受容体発現プラスミドを用いた HepG2 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイでは、良好な結果が得られたことから、洗浄時の細胞の剥離の影響が考えられた。

課題 7 . 魚類精巣卵の誘起機構解析

代表研究者：勝義直（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）

化学物質のエストロゲン活性の測定を行った。

生殖腺に特異的に発現する遺伝子の探索を行った。

研究成果：

ローチ及びメダカのエストロゲン受容体レポーター遺伝子アッセイを確立した。これを用いて河川水中に含まれる化学物質のエストロゲン活性を測定した。卵巣に特異的に発現する遺伝子の単離を行った。

2. ExTEND2005 基盤的研究フィージビリティースタディについて

(1) フィージビリティースタディ研究課題の選定

平成 17 年度第 2 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会（平成 17 年 10 月 31 日）の資料 4 - 2（本検討会資料 3 - 1）において基盤的研究課題について、「今後の新規研究課題等についても検討を行う。」とされており、これを受けて平成 17 年度基盤的研究 7 課題に加えてフィージビリティースタディを実施することとした。

フィージビリティースタディ研究課題の選定にあたっては、ExTEND2005 基盤的研究企画評価検討会委員及び ExTEND2005 野生生物の生物学的知見検討会委員と環境省環境安全課が持ち回り等によって協議を行い、研究内容及び研究代表者を選定し、ExTEND2005 基盤的研究企画評価検討会座長のご了解を得た。

(2) 平成 17 年度基盤的研究フィージビリティースタディ研究課題

課題 1. 野生メダカの性分化異常に関わる基礎的情報の収集と解析

代表研究者：濱口 哲（新潟大学 理学部 自然科学研究科）

内分泌かく乱現象は本来、ヒトを含め野生生物に見られる「異常現象」を見いだすことが発端となるものであるが、野生生物の性現象、とりわけ性的表現形の揺らぎについての基礎的情報は十分でない。その結果、観察される異変が真に異常なのか、それとも正常な揺らぎの範囲内なのかについての判断は現状では極めて困難である。したがって、野生生物の性現象の実態に関する基礎情報の収集は喫緊の課題である。

本研究は、実験動物としての整備が進み、生物学的な諸技術の適用が可能であり、且つ本州以南の日本各地に野生生物として生息するメダカをモデルとして、正常な揺らぎの範囲と原因を解明して、野生生物での異変判定における基礎的情報を得ることを目的としている。さらに、野生メダカの性的な揺らぎを通じて、メダカの性決定、性分化の分子機構に関わる知見を得て、メダカ以外の動物の性的可塑性に関して一定の判断を下すための基礎情報を提供できるものと考えている。

研究内容：

I. 野生メダカの性転換個体の探索とその原因の解析

これまでに採集した日本各地のメダカに加え、さらに野生メダカをサンプリングし、DMY の有無と個体の性を識別し、遺伝的性と個体の性との不一致個体の検索を行う。

1) *DMY*の有無の判定

メダカを個体識別できる状態で維持して、各個体から尾鰭の一部を採取し、DNAを抽出する。*DMY*に特異的なプライマーを用いて、PCR法により*DMY*を増幅して、特異的バンドの有無により、*DMY*の有無を判定する。その個体の第2次性徴より表現型としての性を判定して、*DMY*の有無と表現型としての性の一致、不一致を検討する。

2) 不一致個体の原因の検討

不一致個体については、近交系メダカと交配を行い、遺伝解析を行う。不一致個体のF1について、*DMY*の有無と性を検討し、不一致個体の有無を検索する。F1世代で不一致個体が出現すれば、“優性”突然変異による性転換であると推定できる。F1世代で不一致個体を得られない場合、F1個体ともとの不一致個体との交配を行い、戻し交配世代を得る。戻し交配個体で不一致個体を得られれば、“劣性”突然変異による性転換であると推定できる。それらの“突然変異”については、原因遺伝子の探索を行う。具体的には戻し交配世代の不一致個体が共通に持つ染色体領域をメダカのゲノム情報を活用して特定し、そこに存在する原因遺伝子を探索する。

同時に、その性決定関連遺伝子の機能の推定を行うために、不一致個体の生殖巣発生過程について発生生物学的解析を行い、性転換がどのような機序で起こるのかについて考察し、原因遺伝子の探索結果と併せて、性決定/性分化の遺伝的制御機構に関わる知見を収集する。

戻し交配世代で不一致個体を得られない場合、少なくとも単純な突然変異を原因と考えることは困難であることから、外因的な(後天的)原因も含め、原因の考察を行う。

3) 不一致個体の動態解析

不一致個体が比較的多数見つかる水域について、複数世代に渡っての不一致個体出現についての解析を行い、性分化関連突然変異遺伝子の世代を超えた動態について考察する。現時点で、新潟市近郊及び愛知県大府市で複数世代に渡っての調査を継続している。

・性転換を指標とした野生メダカの温度感受性の検討

性転換に関わる温度感受性についてメダカに遺伝的多様性があることが明らかになったことから、その系統差の原因遺伝子の探索を通じて、その分子機構解明の糸口を探るとともに、野生メダカの温度感受性の調査を行い、野生メダカの温度による性的可塑性の実態把握を目指す。

1) 温度感受性の系統差に関わる遺伝子の探索

HNI系統とHd-rR系統間の高温処理による性転換率の差を利用し、両系統間の交配実験、遺伝解析、さらにDNAマーカを活用した連鎖解析によって

、両系統間の温度感受性に関わる遺伝子の染色体マッピングを行い、系統差原因遺伝子(性的可塑性関連遺伝子)の探索を行う。

2) 野生メダカの温度感受性の系統差の比較

北日本集団に由来する HNI 系統と南日本集団由来の Hd-rR 系統間に温度感受性の差が存在することから、野生メダカには、温度感受性に関わる様々な多様性があることが予想される。その様な観点から、南北日本集団の他の近交系、及び、他集団(東韓国集団、中国-西韓集団)由来の近交系について、温度感受性を検討する。さらに、本学で系統維持している野性メダカ系統についての温度感受性を検討する。それら、野生メダカ系統についての結果を基礎として、現実に各地に生息する野生メダカについての調査方法を検討し、実際の野生メダカの温度性転換感受性の多様性の実態について把握し考察する。

研究成果：

メダカ野生集団中には、*DMY*突然変異による性転換(XY 雌)個体が約 1 %程度いることがわかった。

*DMY*の突然変異には「機能喪失型」と「機能低下型(発現量低下型)」の 2 種があることがわかった。

*DMY*の発現量低下型 XY 個体の性決定に影響を及ぼす常染色体上の遺伝子が(複数?)存在することがわかった。

野生集団中の性転換雄(XX 雄)個体で、常染色体上の遺伝子の変異が原因と考えられるものがあることがわかった。

メダカは外因性ステロイドや温度等で性転換することがわかった。

メダカ種内の性決定関連遺伝子の「多様性」により、メダカ個体は多様な性的可塑性を持っていることがわかった。

課題 2 . 遺伝子導入メダカを用いた内分泌かく乱物質の影響評価と作用機構の 解明

代表研究者：木下政人（京都大学大学院 農学研究科）

現在、エストロゲン様物質の暴露により野生生物雄個体とその精巣に卵を持つようになることが知られている。しかしながら、この卵の由来細胞や出現誘発メカニズムについては明らかにされていない。この点を明らかにすることは、いわゆる環境ホルモンの作用点を知り、その防御策を講じる上で重要な知見となる。また、作用点を分子的に明らかにすることにより、精巣卵誘起に関して簡便な評価系構築に貢献する。精巣内の卵に変わりうる細胞はどのようなものなのか、どのような生殖細胞の幹細胞があるのかを明らかにする事は、性の可塑性の点から生物学上も非常に関心が高い。加えて、精巣卵の出現が性行動に影響を与えるか否かを検討することで、精巣卵を生じさせるような環境物質が生物種の生殖・存続に対して、本当に影響を及ぼし得るのかを明らかにできる。この知見は、特定物質の生態系への影響評価といった環境行政政策の重要な判断材料となりうると考える。

研究内容：

精巣卵形成 E 2 暴露条件の検討：これまでに作出した雌型生殖細胞に緑色蛍光を有する 42Sp50-GFP medaka 系統は、腹腔膜のグアニン色素のため精巣を生きたまま外部から観察することが困難である。そこで本遺伝子導入系統とシースルーメダカ系統（体表・腹腔のほとんどの色素を欠くため解剖することなく精巣が観察できる）を交配することにより遺伝子導入シースルーメダカ系統を作成する。この成熟雄個体を用い、精巣卵が出現する E 2 の暴露濃度・時間を検討する。

生殖細胞標識遺伝子導入メダカの作出：42Sp50-DsRed2 遺伝子を導入し、雌型生殖細胞を赤色蛍光で標識した遺伝子導入メダカを作出する。また、雄型生殖細胞の増殖が開始される孵化後 30 日の雄生殖巣とそれ以前の生殖巣を用いたサブトラクション法、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、オス型生殖細胞にのみ発現する遺伝子を同定し、オス型生殖細胞にのみ緑色蛍光を発現するメダカ系統を作出する。これらを交配しダブル遺伝子導入メダカを作出する。

研究成果：

E2 暴露により、まずシストの構造が崩れ、その後、精巣卵が出現することがわかった。

雌型生殖細胞緑色メダカの作出については、既存の d-rR 系統の遺伝子導入魚と ST 系統を交配中（F1 世代飼育中）。雌型生殖細胞赤色メダカの作出につい

ては、導入遺伝子 (42Sp50-DsRed2) を構築し、d-rR 系統受精卵約 200 個にマイクロインジェクションを行い、飼育中。生殖巣に赤色蛍光を発する個体を複数確認 (遺伝子導入系統の親魚となりうる)。

課題3．化学物質の胎盤内分泌機能への影響を考慮した生殖発生毒性評価

代表研究者：中西 剛（大阪大学大学院 薬学研究科）

*in vivo*生殖発生毒性評価は、主に齧歯類などの実験動物を用いて行われているが、齧歯類とヒトでは妊娠期間が異なる上、毒性の対象が母体-胎盤-胎児複合体といった多様な作用部位であることから、他の毒性試験よりもヒトへの毒性の外挿が困難である。中でも妊娠期間のみに存在する臓器である胎盤は、胎児の器官形成等に必要不可欠な種々のホルモン等を供給する第二の視床下部 - 下垂体 - 性腺複合体としての機能を有していることから、化学物質の生殖発生毒性における標的臓器になる可能性が考えられる。特にヒトにおいて胎盤は、妊娠期間中の主要なエストロゲン産生臓器であり、妊娠の維持や胎児へのローカルなエストロゲン供給に必要不可欠な臓器であるが、このことは化学物質のヒトにおける内分泌かく乱作用を議論するにあたり、胎盤がその標的臓器として無視できないことを示唆している。現に、胎盤からのエストロゲン供給が行われない胎盤性アロマターゼ（アンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素）欠損症の女兒においては、仮性半陰陽（女兒にペニスが形成される症状）を誘発することからも、その重要性が窺える。その一方で、齧歯類の胎盤はアロマターゼを有しないために、エストロゲン合成を行うことができない。齧歯類のエストロゲン産生は非妊娠時と同様に卵巣で行われ、胎児へのエストロゲンの供給はエストロゲンが卵巣から母体血に移行した後に、胎盤を経由して供給される。また齧歯類の胎盤は、ヒトのそれとは逆に妊娠期間中の主要なアンドロゲン産生臓器であり、また齧歯類の妊娠維持には胎盤からのアンドロゲン産生が重要であるとも報告されている。アンドロゲン合成酵素であるCYP17（ヒトの胎盤には存在しない酵素）のホモ欠損マウスは妊娠初期に胎生致死となることから、齧歯類においては胎盤でのアンドロゲン産生が重要であることが窺える。このように発生段階において、胎盤の内分泌機能が非常に重要であることは哺乳動物で共通してはいるものの、その機能や産生されるホルモンは種によって全く異なっている。特に内分泌かく乱化学物質問題においては、『女性化か？男性化か？』、また『エストロジェニックな作用か？アンドロジェニックな作用か？』というホルモン作用の二極化が議論の焦点になることから、化学物質の生殖発生毒性評価においては、胎盤への影響についてはもちろんのこと、その種差についても十分に考慮する必要がある。そこで本研究では、化学物質の生殖発生毒性における標的臓器として胎盤に焦点を絞り、胎盤機能修飾が与える胎児への影響を検討することで、生殖発生毒性に関する上記問題の解決を試みる。

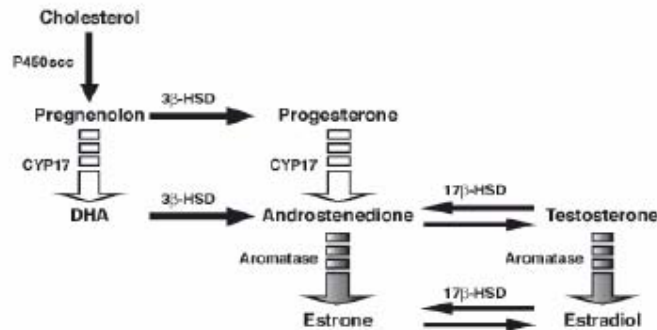


図1：コレステロールからエストロゲンまでの合成経路

齧歯類を用いた *in vivo* 生殖発生毒性評価には、前項で述べたような問題があると考えられるが、実際はこれらの動物実験の結果に安全係数を掛けることで、ヒトにおける被験物質の安全性領域を算出しているのが現状である。しかしながら、被験物質の標的部位が胎盤の内分泌機能であった場合には、動物実験の結果から得られた結論は、必ずしもヒトにおける安全性を保証しているとは言い難い。すなわちヒトの胎盤には存在せず、齧歯類の胎盤に存在するような機能（アンドロゲン産生能など）に影響を与えるような化学物質では、毒性が過大評価される可能性があり、逆に齧歯類の胎盤には存在しないが、ヒトの胎盤には存在する機能（エストロゲン産生能など）に影響を与える化合物においては、毒性が過小評価される可能性が考えられる。さらに化学物質によっては、齧歯類の胎盤ではアンドロゲン産生を上昇させる作用を有するが、ヒトの胎盤ではエストロゲン産生を亢進させるといった、全く逆の影響を与えるものも存在するかもしれない。一方で、核内受容体は、リガンド誘導性転写因子であり、ステロイドホルモン等の脂溶性リガンドの情報を受け、特定の標的遺伝子群の発現を転写レベルで制御する。またこれらの内因性脂溶性リガンドは、それぞれの産生及び代謝をお互いに制御し合うことによって、ホメオスタシスを維持していると考えられる。このことは胎盤の内分泌機能にも核内受容体が関与し、化学物質が ER や AR のリガンドとして作用しなくとも、他の核内受容体リガンドとして作用すれば、結果的にエストロゲンやアンドロゲンの産生に影響を与えることで内分泌かく乱作用を示す可能性を示唆している。しかしながら、核内受容体のヒトおよび齧歯類胎盤の内分泌機能に対する作用機構は、不明な点が多い。そこで当該年度は、さまざまな核内受容体リガンドのヒトおよびラット胎盤内分泌機能に対する影響を検討し、ステロイドホルモン産生に対する影響の違いについて検討を行う。また、既にヒト胎盤でエストロゲン産生を亢進することが明らかとなっている、retinoic acid receptor (RAR) リガンド（レチノ

イン酸など)、および PPAR /RXR のデュアルリガンドである有機スズ化合物などを妊娠ラットに投与し、ステロイドホルモン産生系への影響について比較検討を行う。レチノイン酸は、既に齧歯類およびヒトの双方において催奇形成が認められている化学物質であるが、レチノイン酸の胎盤内分泌機能に対する影響の違いにより、そのフェノタイプも異なる可能性が考えられる。一方で有機スズ化合物は、雄性化を引き起こす疑いのある代表的な化学物質であるが、申請者らの研究成果により、ヒト胎盤のアロマターゼ発現を上昇させることで、エストロゲン産生を亢進する作用を有することが明らかとなっている。また先述の通り齧歯類の胎盤にはアロマターゼが存在しないことから、齧歯類の胎盤内分泌機能に対する有機スズ化合物の作用も、ヒトとは異なる可能性が考えられる。このように本研究では、核内受容体リガンドや既知の内分分泌かく乱化学物質を用い、これらの動物種の胎盤に対する作用の違いを検討することで、申請者が警鐘している *in vivo* 生殖発生毒性評の問題点をより明確に示すことが出来るものと期待している。

研究内容：

平成17年度は、胎盤内分泌機能の種差による生殖発生毒性評価の問題点とその作用機構を明確に証明するために、レチノイン酸を初めとする核内受容体リガンドや、既に、ヒト胎盤のエストロゲン産生を亢進することが明らかとなっている有機スズ化合物であるTBTおよびTPTを用い、これらの化合物による胎盤ステロイドホルモン産生への影響について以下の検討を行う。また実験材料としては、代表的なヒト胎盤モデル細胞でヒト絨毛細胞株であるJEG-3細胞と、代表的な齧歯類の胎盤モデル細胞でラット絨毛細胞株であるRcho-1細胞を用いる。*in vivo* における検討には、妊娠マウスまたはラットを用いる。

ヒト絨毛細胞株のホルモン産生系に与える核内受容体リガンドの影響

先述のとおり核内受容体は、ステロイドホルモン等の内因性脂溶性リガンドの産生及び代謝をお互いに制御し合うことによって、ホメオスタシスを維持していると考えられる。したがって任意の化学物質が、ERやAR以外の核内受容体を介する作用を有する場合には、それらの化学物質により少なからず内分分泌かく乱作用が誘導される可能性が考えられる。しかしながら、核内受容体のヒトおよび齧歯類胎盤の内分分泌機能に対する作用機構は、未だ不明な点が多い。そこでまず各種核内受容体リガンドを用いて、胎盤ステロイドホルモン産生系に対する核内受容体の影響について検討を行う。各種核内受容体リガンドをJEG-3細胞に作用させて、図1に示すようなステロイドホルモン合成酵素のmRNA発現変動に与える影響をリアルタイムRT-PCRにより検討を行う。次に、顕著な変動が認められた化学物質について、mRNA変

動がホルモン産生に与える影響について検討を行う。この際に検討するステロイドホルモンは、プロゲステロン、アンドロステンジオン、テストステロン、エストロン、エストラジオールである。

ラット絨毛細胞株のホルモン産生系に与える核内受容体リガンドの影響

動物実験で *in vitro-in vivo* 相関を確認する際には、その実験動物の細胞における変化を確認しておく必要がある。そこでラットの胎盤細胞についても同様の検討を行う。

in vivo における変動遺伝子群の検出

の結果を踏まえ、Rcho-1 細胞で変動が確認された遺伝子群が、*in vivo* においても変動するかを、および で変動が確認されたりガンドやレチノイン酸などを妊娠動物に投与して検討する。投与経路は、胎盤での直接的な影響を検討するため子宮内投与を予定している。また代表的な環境化学物質として有機スズ化合物についても同様に検討を行うが、こちらについては体内動態を検討した上で、投与経路を決定する予定である。

in vivo におけるステロイドホルモン産生への影響

の結果を踏まえ、胎盤において確認された遺伝子発現変動が、*in vivo* におけるステロイドホルモン産生に及ぼす影響を検討するために、有機スズ化合物を投与した妊娠動物の母体血、胎盤、胎児等を回収し、各ステロイドホルモン濃度を測定する。

研究成果：

ヒト胎盤細胞では、RAR または RXR アゴニスト、および有機スズ化合物により、エストロゲン産生が亢進されるが、ラットでは、胎盤のステロイドホルモン合成にはほとんど影響を与えないことがわかった。

妊娠マウスにおいて TPTOH は、胎盤を通過して胎児にも移行するが、母胎における体内半減期は約 24 時間であり、1 週間でほとんど排泄されることがわかった。

課題4．化学物質の内分泌かく乱作用に対する代謝的活性変動の研究

代表研究者：太田 茂（広島大学大学院 医歯薬学総合研究科）

化学物質の内分泌かく乱作用のスクリーニング法が各種開発されてきているが、化学物質は生体内で容易に代謝変換されることより、本来内分泌かく乱作用を示さない物質が活性体に代謝されることが考えられる。特に、内分泌かく乱作用の場合、微量の代謝物でも高い活性を発現する可能性があるため、代謝による活性変動を調べる必要性がある。また、発生時期における内分泌かく乱作用が特に懸念されていることより、胎児期、新生児時期における薬物代謝酵素活性についても調べる。本研究では、生体内での化学物質の代謝活性化を主眼として、内分泌かく乱作用をスクリーニングすることにより、内分泌かく乱作用を示す前駆化学物質を検索し、リスク評価の基礎となる研究結果を集積することを目的とする。

研究内容：平成17年度の研究計画として、以下の項目を予定している。

化学物質の内分泌かく乱作用の代謝的活性発現検出

これまで、*in vitro*内分泌かく乱作用検出試験法である受容体結合試験、動物細胞あるいは酵母のレポーター試験系を用い、化学物質のエストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモンの受容体およびAh受容体結合活性の調査を行っている。これに加え、代謝による化学物質の内分泌かく乱作用活性化を調べるため、被検化学物質をラット肝酵素液と*in vitro*で反応させ、反応後の活性変動を*in vitro*試験法を用いて調べる予定である。活性変動の認められた物質についてはHPLC、LC/MSなどで分析を行い、被検化学物質の残存量および代謝物の同定を行う。同定した主要代謝物の活性を調べることにより、強活性物質の特定を行う。*In vitro*代謝で代謝的活性化を示した被検物質につき、*in vivo*試験として子宮肥大試験（Uterotropic Assay）やハーシュバガーアッセイを行い*in vivo*での代謝活性化影響の発現を確認する。

被検物質としては、これまで研究を進めている stilbene, diphenyl, styrene oligomer類以外に、UV吸収剤として日焼け止め剤、プラスチック類に多用されている benzophenone類、保存料として食品、化粧品類にも使用されている parabene類、衣料から建築資材にも使われているブロム化難燃剤である tetrabromobisphenol A (TBBPA) および polybromodiphenyl ether類を予定している。さらに、殺虫剤、農薬として今も使用されている pyrethroid類、carbamate系農薬、また製造は禁止されたが今も食物を通しての摂取が続いている PCB、およびその代謝物で生体内での蓄積が認められている水酸化PCB類は調査が急務である。

胎仔期・新生仔の代謝機能と内分泌かく乱作用発現

内分泌かく乱作用が最も大きな影響を示すのが発生、成長段階であると予想されている。そこで、本研究ではまだ余り研究されていない胎仔期・新生仔期における薬物代謝酵素の活性および発現の変動についてラットを実験動物として用い調べる。また、胎仔期・新生仔期に特異的な薬物代謝酵素を用い、化学物質の内分泌かく乱作用の代謝活性化につき、成熟ラットとの比較を行う。

薬物代謝酵素を発現させた細胞を用いた *in vitro* レポーター試験系の作成

これまで *in vitro* レポーター試験に用いられている細胞はほとんど薬物代謝活性を持たない。そこで、主要な薬物代謝酵素であるチトクロームP450とその関連酵素であるチトクロームP450還元酵素遺伝子を含むプラスミドを細胞に組み込み、薬物代謝活性を有する細胞の作成を行う。この薬物代謝酵素を強制発現させた細胞を用いて *in vitro* レポーター試験を行うことにより、簡便に化学物質の代謝活性化を調べることが可能になると考えられる。

研究成果：

化学物質のエストロゲン作用、抗アンドロゲン作用、甲状腺ホルモン作用の代謝的活性の測定を行った。

胎仔期・新生仔の薬物代謝酵素活性の測定及び薬物代謝酵素誘導の確認を行った。

薬物代謝酵素を発現させた細胞を用いた *in vitro* レポーター試験系を確立した。

課題5．核内ホルモン受容体による転写調節における環境化学物質の作用機構

代表研究者：鯉淵典之（群馬大学大学院医学系研究科）

本研究の目的はPCBにおいて明らかとなった環境化学物質の新たな作用機構の解明とその機構を考慮にいれたスクリーニング系の確立である。我々の近年の研究により、PCBなど環境化学物質の一部が従来とは全く異なった機構で受容体へ作用することが明らかとなった。作用機構の詳細はまだ不明で、解明の必要がある。詳細が明らかになることで、今後の環境化学物質の作用機構研究に全く新しい方向性を示すことができる。さらに、新たな作用機構は従来のスクリーニング系では考慮されておらず、作用機構に対応したスクリーニング系を構築する必要がある。本スクリーニング系は一度に多サンプルを簡便に処理できるシステムにすることも考慮に入れており、確立すれば、従来のスクリーニングで漏れていた物質の毒性の同定や多サンプルの処理が可能となり、今後の環境政策にも役立てることができる。

研究内容：

キメラタンパクを用いた化学物質作用領域の同定

右に用いるキメラタンパクの構造とリガンド、及び各キメラが結合するDNA応答配列を示す。核内受容体は、N末端より転写活性決定領域、DNA結合領域、リガンド結合/転写活性化領域の3つの機能的ドメインに大別される。PCBは甲状腺ホルモン受容体(TR)に作用し転写を抑制するが、グルココルチコイド受容体(GR)には作用しない。

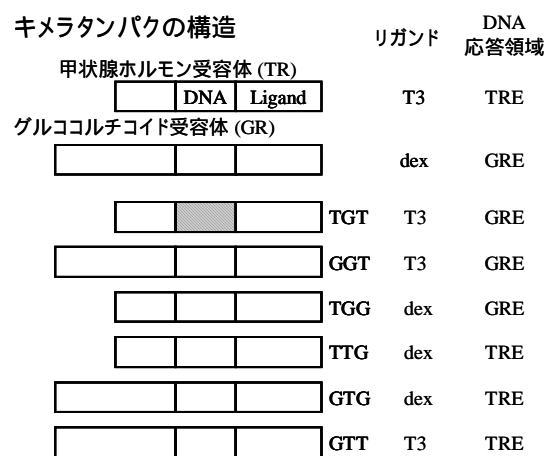
PCBがどの領域に結合し、各機能を修飾するのか調べるためには少なくとも6種のキメラタンパクが必要である。例えば、TRのDNA結合領域に

作用しているのであれば、TTG、GTG、GTTのキメラに対しては転写を抑制し、TGT、GGT、TGGについては転写には影響しないはずである。

そこで、これらの発現ベクターを、対応する応答配列を持つルシフェラーゼレポータープラスミドと共に培養細胞に導入し、各リガンドと共にPCBを投与し、転写活性がPCBにより修飾されるか解析する。大まかな同定により領域を確定したあとは、アミノ酸配列を細かく変化させた変異タンパクを作製し、PCBの作用部位を決定する。

DNA-受容体-共役因子結合に及ぼす化学物質の作用測定のためのスクリーニング系開発

従来、タンパク間やタンパク-DNA間の結合測定のために、ゲルシフト

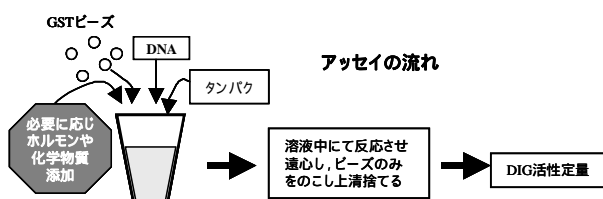


dex: dexamethazone, TRE: 甲状腺ホルモン応答配列, GRE: グルココルチコイド応答配列

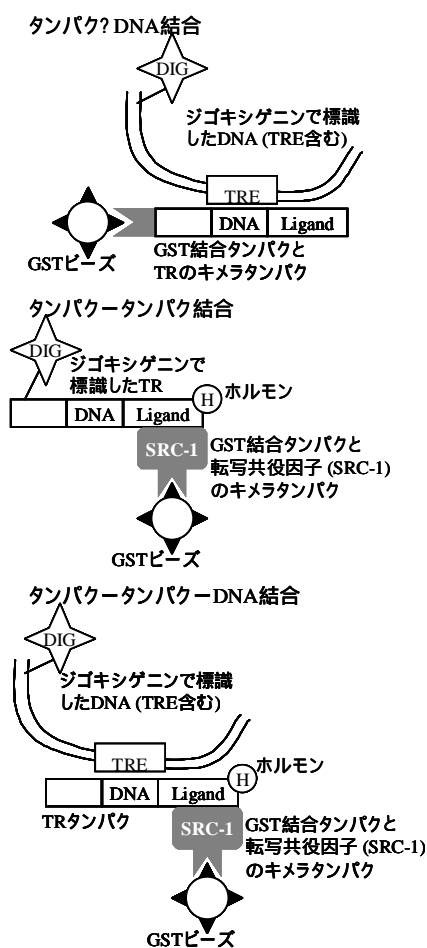
やブルダウンと呼ばれる方法が用いられてきた。これらはいずれも試験管内で検体を結合させた後、アクリルアミドなどで泳動させ、放射性同位元素で結合を測定していた。しかし、この方法は放射性同位元素を用いること、結果までに数日かかること、多サンプルの処理が難しいこと、安定してデータを得るには熟練を要することなどの欠点がある。さらに、環境化学物質の場合、内因性のリガンドと異なりタンパクやDNAの立体構造は不安定で、ゲルの中でタンパクやDNAの結合が解離してしまう可能性もある。そこで全反応を簡便に試験管内で行う方法を開発する。

測定原理を右に示す。GST結合タンパクと受容体や共役因子のキメラタンパクを作製し、GSTビーズに吸着させる。ここへDNAやタンパクを結合させる。タンパクやDNAの標識はジゴキシゲニンで行い、化学発光法によって定量的にジゴキシゲニンを検出する。上述のように、化学物質が受容体に作用すると、タンパク間結合のみならずタンパク-DNA結合にも影響するが、このシステムであればいずれの作用にも対応できる。また、短時間で多量のサンプルの処理も可能である。

アッセイ流れを簡単に下に示した。右のようなタンパク間やタンパク-DNA結合に及ぼす化学物質の作用は、反応液中に化学物質を添加することにより簡単に調べることができる。物理的に強い刺激を加えないため、結合がたとえ脆弱であっても検出が可能である。



スクリーニング系の原理



研究成果：

PCBの甲状腺ホルモン受容体タンパクにおける作用部位について検討を行った。甲状腺ホルモン受容体のDNA結合領域へ作用している可能性が示唆さ

れた。
独自に開発した Liquid DNA pull down アッセイ法を用いて、DNA-タンパク結合が種々のホルモンによりどのような影響を受けるかについて試験中。

課題 6 . 燃焼排ガスに含まれる多環芳香族炭化水素類の内分泌かく乱作用の評価

代表研究者：早川和一（金沢大学大学院 自然科学研究科 環境衛生化学）

これまで専ら発がん性が論じられてきた PAH および NPAH について、最近エストロゲン様/抗エストロゲン作用や抗アンドロゲン作用を有することが明らかになってきた。本研究では、PAH、NPAH、およびこれらから環境中であるいは体内で代謝されて生成する関連化合物について、それぞれの活性の強さと大気環境やヒト曝露量を求め、これらから活性等価係数や活性等量の試算することにより、内分泌かく乱作用の観点から PAH、NPAH のリスクを評価する。ヒトの呼吸による PAH、NPAH 曝露量はダイオキシン類の 1 万倍以上と推定されるが、その内分泌かく乱作用のリスクは不明である。本研究により、この点から初めて PAH、NPAH のリスク評価がなされ、今後の環境施策に有用な知見が提供できる。

研究内容：

2～7 環構造を有する PAH（約 30 化合物）およびその代謝関連化合物（水酸化体、キノン体：約 80 化合物）について、主に酵母 two-hybrid 法および MCF-7 培養細胞 E-スクリーンテストを用いて、エストロゲン様/抗エストロゲン作用の強さを測定する。エストロゲン様および抗エストロゲン作用の陽性対象はそれぞれエストラジオールとタモキシフェンを用い、測定対象化合物の作用の強さを表す相対値（活性等価係数）を求める。

2～6 環構造を有する NPAH（約 30 化合物）およびその代謝物（アミノ体、アセチルアミノ体、ニトロソ体）について、主に酵母 two-hybrid 法および PC3/AR 培養細胞を用いてアンドロゲン様/抗アンドロゲン作用の強さを測定する。アンドロゲン作用の陽性対象としてジヒドロテストステロン、抗アンドロゲン作用の陽性対象としてサイプロテロンアセテートをそれぞれ用い、作用の強さを表す相対値（活性等価係数）を求める。

2～7 環構造を有する PAH の代謝物（水酸化体：約 70 化合物）について、上記と同様な方法で、アンドロゲン様/抗アンドロゲン作用の強さを表す相対値（活性等価係数）を求める。

研究成果：

PAH は代謝的活性化（水酸化）を受け、エストロゲン様/抗エストロゲン活性若しくは抗アンドロゲン活性を発現することがわかった。

モノ OHPAH とエストロゲン様抗エストロゲン活性の間には構造活性相関があることがわかった。

NPAH は、そのまま若しくは代謝的活性化（還元化）を受け、抗アンドロ

ゲン活性を発現することがわかった。

課題7．内分泌かく乱物質の生態影響試験法の開発

代表研究者：蔵崎正明（北海道大学大学院地球環境科学研究院）

発展途上国およびわが国を対象とした内分泌かく乱化学物質を含む環境汚染化学物質の水域における実態調査はこれまでほとんど行われていない。従来、発展途上国の多くが存在している熱帯地域特有の動植物の生態調査は頻繁に行われているが、工業廃水および生活廃水による水環境中の汚染を明らかにするための調査は、未だ手付かずに近い状況にある。さらに内分泌かく乱化学物質を含む環境汚染化学物質の生体濃縮等を考慮した研究はまったくと言っていいほど行われておらず、生態あるいは生体影響を考える上で極めて重要なポイントであると思われる。また、我々がこれまで行って来た内分泌かく乱化学物質の影響評価法の開発および環境修復法の開発を応用する場としての意義も十分に期待できる。

研究内容：

内分泌かく乱化学物質の環境中濃度および有害汚染物質の生物及び人体への移行・濃縮過程の解明

本調査は主として西ジャワ地方、すなわちジャカルタ近郊のジャワ海流入河川水域、ボゴール、チビノンおよび中央ジャワのジョグジャカルタ周辺の河川湖沼で行いすでに河川水等のサンプルの収集は行っている。これら地域は開発が十分行われ人口も密集している。ボゴールは大統領の別邸もある郊外都市で農業も盛ん、その河川下流はジャカルタ工業地域も含まれている。チビノンは新興の工業都市、バンドンは古くからの工業都市として有名である。ジョグジャカルタはインドネシアの古都としてやはり多くの人口を抱えている。これらの開発地域の対照地域として、これまでの調査実績のある中央カリマンタン（ボルネオ島）のカハヤン川、セバンガウ川およびそれらの流域を選択した。またさらに北海道札幌市近郊の汚染が進んでいると思われる茨戸川、創成川、汚染がほとんど無いことが予想される日本第二の清流である尻別川のサンプルも採集している。サンプルの前処理はすでに北海道大学の当該研究室で行われ、サンプルの溶存態有機炭素濃度(DOC)、pH、電気伝導度、溶存酸素濃度、陰イオン濃度、酸化還元電位等および混入大腸菌測定などはすでに分析を終え、データのとりまとめ中である。今後サンプルの内分泌かく乱化学物質濃度の化学分析を進めて行く予定である。

また同時に採取した魚類、水生昆虫およびプランクトン等の生体試料の内分泌かく乱化学物質の濃度分析にも着手し、水界生態系の食物網を構成する動物プランクトン、底生動物、魚類などの種組成を調べるとともに、魚類、底生動物および動物プランクトン等の食性解析から食物網を解明する。汚染河川に特有の底生動物について形態異常の有無を検討し、フィールド調査結果を総合して

内分泌かく乱化学物質の生態影響評価法構築に努める。

内分泌かく乱化学物質の生態・生体影響評価の文献調査

過去の論文調査を行い、内分泌かく乱化学物質の性ホルモンかく乱作用以外の生体への影響の報告、あるいはフィールド調査等で明らかにされた環境中および生物体内において検出された内分泌かく乱化学物質の濃度等に関する報告を調査し、本フーズビリティスタディの主目的である食物連鎖等を考慮し、水質、底質、水生昆虫、魚類等の生物試料中の内分泌かく乱物質の濃度について数多くの報告データの収集に努めたい。また生活に密着した河川水等における内分泌かく乱化学物質の濃度については環境法が整備された先進国と整備されていない発展途上国に分けその違いを明らかにしたい。

また、内分泌かく乱化学物質の性ホルモンかく乱作用以外の作用にも着目し、論文調査を進める予定である。ラット脳室内投与により多動性障害様作用を示すビスフェノールなどの例があるため、様々な作用機序に関する論文が検索されることが期待される。さらに重金属は、現在内分泌かく乱化学物質のリストには入れられてないが、すでに内分泌かく乱作用に関する報告がいくつも出されており、我々のフィールド調査で得た検出濃度との関連に注目している。以上のとりまとめにより、現実に河川水等で検出された内分泌かく乱化学物質が、生態および生体に影響を与える可能性があるのか否かの判定に資することが可能かどうかを検討し、併せて今後の内分泌かく乱化学物質の生態・生体影響評価法構築に向けた研究動向の指針となるものを見出すように努める。

研究成果：

微量化学物質のアポトーシス誘導に対する影響評価法の開発を行った。

熱帯魚類の水銀濃度の測定を行った。

バイオチン化エストラジオールを用いた高感度アッセイ法の開発を行った。

3. 平成 18 年度基盤的研究課題

平成 17 年度に当初採択された 7 課題及びフィージビリティースタディ研究 7 課題の合計 14 課題の平成 17 年度の研究成果について ExTEND2005 基盤的研究企画評価検討会に設置した評価会議において評価を行い、研究の継続または終了、予算規模、ExTEND2005 において実施している他の枠組みへの移動等についての検討を行った。その結果、14 課題のうち、以下の 7 課題について平成 18 年度基盤的研究課題として採択した。

課題 1. 遺伝子導入メダカを用いた内分泌かく乱物質の影響評価と作用機構の解明

課題 2. 哺乳類を用いた毒性実験の結果に影響を及ぼす実験動物の遺伝的要因解明と新たな内分泌かく乱メカニズムの検証

課題 3. 胎児期におけるエストロゲンシグナルの gain of function と性分化の可塑性

課題 4. 胎仔期、新生仔期の代謝機能と内分泌かく乱作用発現

課題 5. 核内ホルモン受容体による転写調節における環境化学物質の作用機構

課題 6. 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 7. 燃烧排ガスに含まれる多環芳香族炭化水素類の内分泌かく乱作用の評価

なお、平成 17 年度に基盤的研究フィージビリティースタディとして実施した以下の 1 課題については、今後は「野生生物の生物学的知見検討会」の枠組みで実施する。

課題 野生メダカの性分化異常に関わる基礎的情報の収集と解析

また、平成 17 年度に基盤的研究として実施した以下の 3 課題については、今後は「国際協力関係事業」の枠組みで実施する。

課題 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

課題 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 ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニズムの解析

4 . 平成 18 年度研究課題案

課題 1 遺伝子導入メダカを用いた内分泌かく乱物質の影響評価と作用機構の 解明

木下政人（京都大学大学院農学研究科） 亀井保博（京都大学放射線生物研究センター） 柴田直樹（信州大学理学部）

（ 1 ）研究の目的

本研究では、内分泌かく乱物質により引き起こされる受精率の低下のメカニズムの解明、内分泌かく乱作用により被った生理学的な変化の可逆性を検討することを目的とする。内分泌かく乱物質の毒性メカニズムの解明は、「今後どのような物質を内分泌かく乱物質として監視していくか」という施策の重要な根拠・判断基準となる。また、毒性の判断には、「受精率の検証」が良いとされるが、個体の成熟まで判断を待つ必要がある。しかし、受精率低下の源を明らかにし、これにより毒性を判断することで評価までの期間が大いに短縮される。また、「内分泌かく乱物質による体内変化は可逆的なのか」を知ることは、生物を復元する施策を提言するために必要である。個体レベルで、生きたまま細胞・組織の変化を簡便に観察できる技術はない。本研究で、この技術が確立されれば、内分泌かく乱物質の研究のみならず、生物学・医学に大きく貢献すると考えられる。その一例として、宇宙空間など、実験スペースや器具に余裕がないところで、リアルタイムに生体の変化を追跡できる。

（ 2 ）平成 18 年度研究計画

- ・ 特定の細胞の蛍光標識メダカの作出
- ・ 遺伝子導入透明メダカの作出

課題2．哺乳類を用いた毒性実験の結果に影響を及ぼす実験動物の遺伝的要因 解明と新たな内分泌かく乱メカニズムの検証

青山博昭（残留農薬研究所）、北條 仁（残留農薬研究所）、清水直子（残留農薬研究所）、佐藤 旭（残留農薬研究所）、阿部訓也（理化学研究所バイオリソースセンター）、吉木 淳（理化学研究所バイオリソースセンター）

（1）研究の目的

アウトブレッド系統を用いた毒性実験では、先に指摘した如く、偶発性の異常を暴露した化合物の影響と誤解したり、高感受性個体が偶然ある特定の群に偏ったために反応の閾値を正確に評価することが困難となったりする可能性が常に存在する。しかし、遺伝的に不均一なヒト集団のモデルとして遺伝的に均一な動物が必ずしも最適ではないこと、およびアウトブレッド系統ではこれまでに十分な背景データが蓄積されていることを考えると、内分泌かく乱作用が疑われる物質を含むあらゆる化合物の毒性実験に、これまで汎用されてきたアウトブレッド系統由来の動物に変わって常に近交系の動物を用いるとの短絡的な判断も正しくない。重要なことは実験に用いる動物の特性を十分に理解した上で実験結果を解釈することであり、そのためには実験結果に影響を及ぼす遺伝子（自然発生病変を引き起こす遺伝子や個体の感受性を支配する遺伝子）をひとつずつ丹念に見つけ出して解析し、多型を示す遺伝子については個体の遺伝子型を確定診断する手法を確立して、必要に応じてこれらの知見や診断技術を利用できる体制を整備することである。実験動物の特性を十分理解することの重要性は、SPEED'98改訂の議論に際しても本研究の代表研究者が指摘したところであり、この点について検討会委員のコンセンサスも得られ、ExTEND2005においてもこの点が明確に記載されている（本文23ページ、試験法開発に資する基盤的研究、i）試験動物の基礎的データの整備）。

本研究は、このような目的に沿って、毒性実験の結果を修飾する遺伝的要因を順次明らかにすることを目標とするものである。本研究には遺伝子のマッピングやシーケンシングなどが不可欠であり、原因遺伝子を特定するためにはまず近交系の動物を用いた実験を実施して、その結果を基にアウトブレッド系統における変異遺伝子の存在やその頻度を確認する必要があるため、その進行は必ずしも早くはない。しかし、このような努力なくしては、アウトブレッド系統に由来する実験動物の特性を正しく理解することは甚だ困難である。本研究の進展により、内分泌かく乱作用が疑われる物質を含む様々な化合物の毒性を調べる実験に使用されるアウトブレッド系統の特性をより正確に把握することが可能となり、ひいては実験結果のより客観的な解釈が可能になるものと期待される。

一方、種々のホルモン受容体の発現調節を介した内分泌かく乱メカニズムに関しては、理論的にはその存在が推測されるものの、適切なモデル化合物がないために具体的な研究に着手されていない。内分泌かく乱物質の相加・相乗効果が懸念される中、類似の作用機序を持つ物質の複合影響については解析例がある（例えば、エストロゲン受容体に結合することが知られている複数の化合物の暴露実験等）ものの、ある特定のホルモン作動系に対して異なる作用機序

を持った物質群の複合影響に関しては未だ詳細な解析例がみあたらない。提案者らは、プロモエタンがエストロゲン受容体の発現量を増加させる作用をもつことを最近見出し (Aoyama et al., 2005) この物質の暴露が内因性または外因性のエストロゲンに対する感受性の上昇を引き起こす可能性を指摘した。

エストロゲン受容体の発現に及ぼす影響 (発現増強作用) は種々のヒ素化合物にも観察されており、これらの物質にはエストロゲンに対する感受性を高める作用のあることが示唆されるが、これらの物質とエストロゲンを同時に暴露するような研究は、これまでのところ細胞レベルでも個体レベルでも実施されていない。本研究の実施により、受容体の発現亢進を介した内分泌かく乱作用の有無や、異なる作用を持つ化合物のエストロゲン作動系に対する相乗効果に関する基礎的知見が得られるものと期待される。

(2) 平成 18 年度研究計画

- ・ Wistar Hannover ラットに自然発生する甲状腺腫に関する遺伝学的解析
- ・ アウトブリード Wistar ラットに出現した EGF-EGFR シグナル伝達系に異常を生ずると考えられる突然変異遺伝子 (cv) の解析
- ・ Recombinant inbred マウスを用いたホルモン感受性の差に関する遺伝学的解析
- ・ エストロゲン受容体の発現制御を介した内分泌かく乱メカニズムの解析

課題3 胎児期におけるエストロゲンシグナルの gain of function と性分化の可塑性

中西 剛 (大阪大学大学院薬学研究科)、吉田一郎 (大阪大学大学院薬学研究科)

(1) 研究の目的

脊椎動物の発生段階において、性ステロイドホルモンが少なからず性分化に影響を与えることは異論のないところであるが、その程度は生物種によって大きく異なると考えられる。昨今の内分泌かく乱化学物質問題においては、ビスフェノール A を初めとするエストロゲンおよびエストロゲン様化学物質のヒトおよび野生生物への影響が大いに懸念されてきた。化学物質の内分泌かく乱作用を議論するための基礎的知見は十分とは言えないものの、魚類などの下等脊椎動物ではその因果関係に関する知見が集積しつつある。一方で、ヒトを初めとする哺乳動物においても、エストロゲンおよびエストロゲン様化学物質の発生段階への影響について、様々な検討が精力的に行われてきたが、不明な点が多く残されているのが現状である。ヒトの発生段階において、性ステロイドホルモンのバランスが極度に変動した場合、胎児の外生殖器の形成に深刻な影響を与えることは、胎盤性アロマターゼ欠損症の女児の症例 (胎盤は妊娠期間中の主要なエストロゲン産生臓器であるため、胎盤から母胎・胎児共にエストロゲンが全く供給されず、女児の内生殖器は女性様であるが、外生殖器は男性様の症状を示す) から明白ではあるが、化学物質による内分泌かく乱作用のように、微妙なホルモンバランスの変動による胎児への影響は明らかにはされていない。特に Dr. vom Saal らの提唱するエストロゲン様化学物質の低用量効果については、実験的手技や用いる動物種の問題等により再現性が乏しく、この問題を明確に解明する実験系の構築が望まれる。また現在、化学物質のエストロゲン様作用を検討するために、*in vitro* および *in vivo* 試験が行われているが、先述の問題から明確な閾値を決定することができないという問題もある。本研究では、このような問題を解決すべく、マウスの器官形成期において、胎児に対しローカルに過剰なエストロゲンを曝露できる AromEGFP-Tg マウスの作成を試みた。この Tg マウスが、先述の低用量効果に纏わる様々な実験的手技の問題を解決できるモデルとなるならば、この Tg マウスの様々なフェノタイプを解析することで、これまで議論されてきた哺乳動物におけるエストロゲン様化学物質の内分泌かく乱問題を明確に解決できるかもしれない。また化学物質のエストロゲン様作用に関する試験にも、ある一定の方向性を示すことが出来るかもしれない。このように本研究は、これまで未解決であった哺乳動物の性分化におけるエストロゲンの影響を、遺伝子改変動物を用いることで明確に示すものであり、環境政策にも大いに貢献できるものと期待している。

(2) 平成 18 年度研究計画

- ・ AromEGFP-Tg胎児における胎盤特異的なAromEGFPの発現の確認
- ・ AromEGFP-Tg胎児の胎盤でのアロマターゼ活性と組織像の確認
- ・ 母体血中および胎盤、胎児中のステロイドホルモン濃度の測定
- ・ AromEGFP-Tg胚から生まれた雄マウスの生殖器官への影響

課題４．胎仔期、新生仔期の代謝機能と内分泌かく乱作用発現

太田 茂（広島大学大学院医歯薬学総合研究科）北村繁幸（日本薬科大学健康薬学科環境科学分野）古武弥一郎（広島大学大学院医歯薬学総合研究科）、杉原数美（広島大学薬学部）

（１）研究の目的

本研究は、現在化学物質の内分泌かく乱作用で注目されている胎児期、新生児期での影響を調べる上で考慮しなければならない代謝活性化、およびこの時期における薬物代謝酵素変動に関する調査を目的とするものである。

主にラット、マウスを用い、胎仔期、新生仔期の薬物代謝酵素の変動および化学物質による酵素誘導や阻害など、薬物代謝酵素に関する基礎データの収集を行うことにより、この期間に生じる化学物質による影響およびその予測に役立てることができる。以上の研究により、胎児期、新生児期における化学物質の影響のリスク評価に薬物代謝酵素の変動というパラメーターの必要性を提示することを目標としたい。さらに、これまで行ってきたヒトでの暴露が予想される環境化学物質や薬物の内分泌かく乱作用の代謝活性化のスクリーニングを継続し、構造活性相関の基礎となるデータを蓄積し、新たな活性物質の検出に役立てる予定である。

（２）平成 18 年度研究計画

- ・ラット胎仔期、新生仔期における肝薬物代謝酵素の変動
- ・ラット胎仔期、新生仔期における環境化学物質、薬物による肝薬物代謝酵素への影響
- ・環境化学物質、薬物等の代謝による内分泌かく乱作用の（不）活性化
- ・ヒト胎児期、新生児期における薬物代謝酵素変動と代謝活性化

課題5．核内ホルモン受容体による転写調節における環境化学物質の作用機構

鯉淵典之（群馬大学大学院医学系研究科） 岩崎俊晴（群馬大学大学院医学系研究科） 下川哲昭（群馬大学大学院医学系研究科）

（1）研究の目的

本研究の目的は、従来のアッセイ系を用いたPCB以外の物質の毒性評価、PCBにおいて明らかとなった環境化学物質の新たな作用機構の解明とその機構を考慮にいれたスクリーニング系の確立である。レポーター転写アッセイ系は比較的簡便なアッセイ系と考えられ、多くの研究者が用いている。しかし、用いる株細胞の由来器官、および細胞の種差、そして受容体の種差を考慮しない限りアッセイ系で得られたデータの応用性には疑問が残る。また、株細胞を数世代にわたって培養すると、細胞の性質自体も変わってくる。さらに細胞の培養密度によっても遺伝子発現に差が生ずる。これらを考慮して初めて信頼のあるデータが得られる。我々の研究室はこれらのパラメーターを常に考察し研究を進めており、信頼性の高いデータを提供することが出来る。一方、我々の近年の研究により、PCBなど環境化学物質の一部が従来とは全く異なった機構で受容体へ作用することが明らかとなった。作用機構の詳細が明らかになることで、今後の環境化学物質の作用機構研究に全く新しい方向性を示すことができる。また、今回用いているキメラタンパクを使った解析手法は他の受容体にも応用可能であり、また他の化学物質にも用いることが出来る。従って環境化学物質の作用機構研究に新たな解析手法を提供することが出来る。

さらに、核内受容体のリガンド結合領域以外への作用や興奮性膜に対する作用など、新たな作用機構は従来のスクリーニング系では考慮されておらず、作用機構に対応したスクリーニング系を構築する必要がある。確立できれば、従来のスクリーニングで漏れていた物質の毒性の同定が可能となり、今後の環境政策にも役立てることが出来る。

（2）平成18年度研究計画

- ・レポーターアッセイによる環境化学物質作用のスクリーニング
- ・キメラタンパクを用いた化学物質作用領域の同定
- ・DNA-受容体-共役因子結合に及ぼす化学物質の作用測定のためのスクリーニング系の開発
- ・環境化学物質の神経細胞膜への作用の解析

課題 6 . 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

長濱嘉孝（自然科学研究機構基礎生物学研究所） 松田 勝（自然科学研究機構基礎生物学研究所） 鈴木亜矢（自然科学研究機構基礎生物学研究所）

（ 1 ）研究の目的

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脊椎動物を通して未だ不明である。

本研究では、内分泌かく乱作用を有する化学物質（環境中でも検出され、魚類に対する内分泌かく乱作用によると考えられる受精率の低下などの有害性が示されているノニルフェノール、4-t-オクチルフェノール、など）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、ディフェレンシャルハイブリダイゼーション、*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。特に、それぞれの化学物質処理に反応して変動する遺伝子発現パターンをプロファイリングすることにより、生殖腺の性転換カスケードを分類化する。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*）が同定されているばかりでなく、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。また、遺伝子の機能解析には不可欠な遺伝子の過剰発現（トランスジェニック）やノックダウンなどについてもすでに代表研究者の研究室ではルーティーンに行っている。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、性ホルモンや種々の内分泌かく乱作用を有する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。

（ 2 ）平成 18 年度研究計画

- ・平成 17 年度のアレイ解析により得られた遺伝子の性ホルモン処理過程における発現変動パターンの解析
- ・遺伝的雌雄メダカの雌雄生殖腺での遺伝子発現パターンの解析
- ・新しく開発された各種 GFP 標識トランスジェニックメダカによる稚魚期

生殖腺及び脳での遺伝子発現（アロマターゼ等）に及ぼす性ホルモン（エストラジオール-17 β とメチルテストステロン）処理の影響の解析

課題 7 . 燃焼排ガスに含まれる多環芳香族炭化水素類の内分泌かく乱作用の評価

早川和一（金沢大学大学院自然科学研究科） 鳥羽 陽（金沢大学大学院自然科学研究科） 亀田貴之（金沢大学大学院自然科学研究科） 唐 寧（金沢大学大学院自然科学研究科）

（ 1 ）研究の目的

ディーゼル排ガスやタバコ煙に含まれる PAH、NPAH については、これまで専ら発がん性が論じられてきた。これら PAH 及び NPAH について、最近エストロゲン様/抗エストロゲン作用や抗アンドロゲン作用を有することが明らかになってきた。そこで本研究では、PAH、NPAH 及び環境中で化学反応により、あるいは生体内で代謝によりこれらから生成される関連化合物について、*in vitro* 実験で、それぞれの活性の強さを測定して相対活性強度を求める。更に、*in vivo* 実験でそれらの活性を確認する。また、これら一連の化合物の構造活性相関を解析して複合影響を考察する。

呼吸によるヒトの PAH、NPAH 類の曝露量はダイオキシン類の 1 万倍以上と推定されるが、個々の化合物の内分泌かく乱作用の発現機序の詳細は明らかでない点が多いだけでなく、一連の化合物の複合影響についても全く研究がなされていない。本研究を実施することにより、PAH、NPAH の内分泌かく乱作用発現機序の一部を明らかにでき、この活性の強さを指標とした活性評価方法が確立できる。更に、この評価法を用いて得られる活性強度は PAH、NPAH 類全体の活性評価の一指標となり、今後の環境施策に有用な知見が提供できる。

（ 2 ）平成 18 年度研究計画

- ・ *in vitro* 実験：PAH、NPAH 類の相対活性強度の測定
- ・ 構造活性相関シミュレーション

5．今後の方針（案）

採択した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。

なお、「基盤的研究課題」の本年度成果及び「野生生物の生物学的知見研究課題」の本年度成果については、「合同成果発表会」を本年度末に公開で開催し、評価を行う。

「国際協力関係事業」の枠組みで実施する研究の成果についても、「合同成果発表会」において報告する。