

基・野—2

ExTEND2005 に基づく平成 19 年度基盤的研究課題、野生生物の生物学的知見
研究課題及びフィージビリティースタディー研究課題について

平成 18 年度に採択された基盤的研究 7 課題、野生生物の生物学的知見研究 3 課題及びフィージビリティースタディー 6 課題の合計 16 課題の平成 18 年度研究成果について ExTEND2005 基盤的研究企画評価検討会及び ExTEND2005 野生生物の生物学的知見研究検討会による合同検討会に設置した評価会議(平成 19 年 5 月 31 日開催、非公開)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、16 課題のうち、平成 19 年度基盤的研究として 8 課題、野生生物の生物学的知見研究として 2 課題及びフィージビリティースタディーとして 2 課題を採択した。

また、平成 19 年度も来年度以降の新規研究課題候補として、フィージビリティースタディーを公募することとした。

なお、採択課題の平成 19 年度成果については、「合同成果発表会」を平成 19 年度末に公開で開催し、評価を行うこととした。

1. 平成 19 年度基盤的研究採択課題

平成 19 年度については下記 8 課題について採択した。調査内容については、ExTEND2005 基盤的研究企画評価検討会及び ExTEND2005 野生生物の生物学的知見研究検討会による合同検討会での協議の上、決定した。

課題 1. (基盤 1)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析

課題 2. (基盤 2)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

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

課題 4. (基盤 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. (基盤 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. (基盤 6)野生生物のリスク評価を目指した核内受容体リガンドの網羅的解析法の開発
- 課題 7. (基盤 7)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 8. (基盤 8)遺伝子導入メダカを用いた内分泌かく乱物質による生殖巣初期変化の把握と回復能力の検討

(1) 基盤的研究課題(基盤1)：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析

①研究者：(財)残留農薬研究所：青山博昭(代表研究者)、佐藤旭、理化学研究所バイオリソースセンター：阿部訓也、吉木淳、目加田和之、農業生物資源研究所：後藤英夫、須藤淳一

②研究概要：本研究は、内分泌かく乱作用を含む様々な生殖・発生毒性を調べるための実験に使用されるアウトブリード系統の動物集団に保持される様々な劣性突然変異や遺伝子多型に着目し、動物実験の結果を解釈する上で支障となるような(暴露した物質の投与に起因すると誤解される恐れのある)突然変異遺伝子や性ホルモンに対する感受性を支配する遺伝子多型を可能な限り同定して、これらの変異や多型を遺伝子レベルで診断する技術を整備するとともに、これらの実験動物の遺伝学的基盤を整備することを目的とする。

これまでの研究により、Wistar Hannover GALASラットに出現した甲状腺肥大症が、この系統のラットに保持されているthyroglobulin遺伝子の突然変異に起因することを明らかにした。また、表現型が正常な個体から抽出したゲノムDNAを試料として、PCRによる遺伝子増幅と増幅産物の電気泳動により、DNAレベルで遺伝子型が判定できる簡便なシステムを構築した。これらの成果により、動物を殺処分することなくその個体の遺伝子型を診断する基盤が整備できた。今後は、この方法により診断した遺伝子型と甲状腺の病理組織像との対応を再確認した後にこれらの成果を公表して、研究者が生殖・発生毒性試験の結果をより正確に評価できるよう注意を喚起する。さらに、Wistarラットに自然発生した雄性不妊を伴う多指症に関して、その原因となる劣性突然変異遺伝子のマッピングを継続して原因遺伝子の同定に努めると共に、責任遺伝子が同定できた場合は遺伝子診断法を確立する。この突然変異遺伝子はレチノイン酸受容体を介したシグナル伝達系の機能にも影響を及ぼす可能性が推測されるので、必要に応じて表現型が正常なヘテロ個体のレチノイン酸に対する感受性を調べ、アウトブリード系統の動物を用いた動物実験の精度を確認する。また、上述の研究が順調に進展した場合は、突然変異個体の表現型がレチノイン酸受容体を介したシグナルのかく乱により生じる異常と類似するその他の突然変異遺伝子の解析を追加する。

エストロゲンまたはアンドロゲンに対する感受性の個体差に関しては、理化学研究所バイオリソースセンターで維持されている129xB6 Recombinant Inbred系統(RI系統)のマウスを用いたQTL(Quantitative Trait Loci)解析を継続すると共に、親系統(C57BL/6Jおよび129/SVPas)の交配から得られるF2児動物についても同様の解析を実施して、責任遺伝子のQTL遺伝子座を同定する。さらに、ゲノムデータベースの検索と様々な分子生物学的実験を実施して、最終的にはQTL遺伝子座にある候補遺伝子群から責任遺伝子をDNAレベルで同定することを目標として解析を進める。また、予備検討によりC57BL/6JとC3Hの2系統間でエストロゲンに対する感受性に大きな差のあることが明らかになったので、これらの系統の交配から得られるF2世代の児動物を用いて、責任遺伝子の解明

に努める。

近交系またはRI系動物とそれらの子孫を用いた遺伝学的実験で同定された突然変異遺伝子や遺伝子多型については、ラットおよびマウスの代表的なアウトブリード系統(Wistar、Wistar Hannover、SD、ICRなど)についてそれらの変異や多型がどの程度の遺伝子頻度で保持されているかを確認して、生殖・発生毒性実験に用いられる実験動物の遺伝学的基盤を整備する。

③平成19年度研究計画

1)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

2)Wistarラットに出現した多指を伴う雄性不妊症(PD系統)の解析

3)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

4)C57BL/6JおよびC3H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

5)アウトブリード系統の動物の背景遺伝子調査

(2) 基盤的研究課題(基盤2)：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

①研究者：金沢大学大学院 自然科学研究科：早川和一(代表研究者)、鳥羽陽、
鈴木信雄、唐寧

②研究概要：大気汚染や室内空気汚染の主要因となっている、ディーゼル排ガスや石炭、木材などの燃焼煙、タバコ煙などは従来から発がん性を示すことが知られていた。最近、ディーゼル排ガスを曝露した動物の生殖系に異常が確認され、その内分泌かく乱作用が疑われた。一方申請者らは、培養細胞を用いた実験で、ディーゼル粉じんなどの燃焼排ガスに含まれるいくつかの多環芳香族炭化水素(PAH)が、エストロゲン様/抗エストロゲン作用あるいは抗アンドロゲン作用を示すこと、しかも一連の PAH 同属体及び異性体は、その物理化学的特性の類似性から同一の作用発現機序による可能性が大きいことを見出した。この事実は、実験動物においてディーゼル排ガス等に存在する多種類の PAH が複合的に影響する可能性を示唆している。そこで本研究では、これら *in vivo* および *in vitro* で観察された結果の関連性をより明らかにするために、有機物の燃焼時に同時に生成される PAH およびニトロ多環芳香族炭化水素(NPAH)類に着目して以下の研究を行う。

- 1) AH、NPAH 及びこれらから大気中あるいは生体中で生成される関連化合物(水酸化体、キノン体、ケトン体など)について、*in vitro*(酵母 two-hybrid 法)でエストロゲン様/抗エストロゲン作用およびアンドロゲン様/抗アンドロゲン作用の強さの相対値(相対活性強度、 **Relative Effective Potency**)を求め、また *in vitro* 複合影響として、複数化合物の共存による活性値を求め、個々の化合物の相対活性強度との関係を解析する。
- 2) 1)の検討化合物のうち活性化合物について、構造に関する各種パラメーターを求め、それと化合物の相対活性強度との関係(構造活性相関)を明らかにする。
- 3) 魚類のウロコには、エストロゲン受容体が存在している。そこで、上記□で強い活性を示した PAH、NPAH 及び代謝物について、ウロコの骨芽・破骨細胞に対する影響を調べ、海産魚類の骨代謝に及ぼす影響を評価すると共に、上記 *in vitro* の結果との相関性を明らかにする。

③平成19年度研究計画

1) *in vitro* 実験: PAH、NPAH 類の相対活性強度の測定

- 2)構造活性相関シミュレーション
- 3)動物細胞に及ぼす影響評価
- 4)PAH、NPAH 類の活性発現における評価

(3) 基盤的研究課題(基盤3)：胎児期におけるエストロゲンシグナルの gain of function とその性分化の可塑性

①研究者：大阪大学大学院 薬学研究科：中西剛(代表研究者)、吉田一郎

②研究概要：本研究は、哺乳動物の胎児期におけるエストロゲン受容体(ER)を介したシグナルが、性分化や出生後の発育等に如何なる影響を与えるのかを解明し、さらにエストロゲン様化学物質の胎児期曝露によって引き起こされる発生毒性に、どの程度ERを介したシグナルが関わっているのかを解明することを最終目標としている。これにより化学物質のエストロゲン作用等の評価を行った際に、正確なリスクアセスメントを行うことが可能となる。昨年度は、母体への影響を最小限に留め、胎児に対する直接的なエストロゲン曝露の影響を検討できるモデル動物として、マウス胎盤にヒトアロマターゼと enhanced green fluorescent protein(EGFP)の融合タンパク質(AromEGFP)を発現する AromEGFP-TGマウスを作成し、そのcharacterizationを行った。今年度は、昨年度検討できなかった成熟期の雄性 AromEGFP-TG マウスにおける AromEGFPの発現のリークの確認と胎盤における発現部位の同定を組織レベルで検討する。また胎児期におけるエストロゲン曝露が出生後に如何なる影響を与えるのかを検討するため、AromEGFP-TGマウスを用いて過去に化学物質のエストロゲン作用による影響として報告されているフェノタイプについて検討を行う。

さてその一方で、マウスの胎児血中には α -フェトプロテイン(AFP)が存在しており、過剰に供給されたエストロゲンの組織への移行を阻害することが報告されている。したがってAromEGFP-TGマウスの胎盤においても、『産生されたエストロゲンはAFPにどの程度中和されてしまうのか?』を検討する必要があると考えられる。そこでAromEGFP-TGマウスの胎児において過剰供給されたエストロゲンが十分に胎児組織中のERに作用しているのかを検討するために、レポーター遺伝子の上流にエストロゲン応答配列(ERE)を連結したコンストラクトを導入したレポーターTGマウス(ERE-mycLUC-TGマウス)を作成してその解決を試みる。今年度はこのERE-mycLUC-TGマウスを作成し、そのcharacterizationを行う。また可能であればAFPには中和されないために、微弱なエストロゲン活性であるにもかかわらず胎児に影響を与えると報告されているビスフェノールA(BPA)を妊娠マウスに投与して、どの程度レポーター遺伝子が活性化されるのかについても検討を行う。

さらに、これまで内分泌かく乱化学物質の齧歯類の胎児期における影響については、隣接する胎盤や胎児がお互いを血管で連結しているという前提のもと、雌雄の胎児の子宮位置によって隣接する胎児から産生される性ステロイドホルモンの影響も考慮する必要があるという、いわゆる『子宮位置効果』が提唱されていた。しかしながら、我々の知る限り齧歯類の胎盤や胎児でそのような解剖学的データは存在しない。そこで今年度は、『子宮位置効果』の真偽についても、AromEGFP-TGマウスの交配を駆使し、同腹内に存在するAromEGFP-TG胎児と野生型胎児のホルモン濃度を比較することで検討を行う

。

③平成 19 年度研究計画：

- 1)AromEGFP-TGマウスの胎盤組織像の確認
- 2)成熟期の雄性AromEGFP-TGマウスにおけるAromEGFPの発現の確認
- 3)AromEGFP-TGマウスのフェノタイプの検討
- 4)AromEGFP-TGマウスを用いた『子宮位置影響』の検討
- 5)ERE-mycLUC-TGマウスの作成

(4) 基盤的研究課題(基盤4)：胎仔期、新生仔期の代謝機能と内分泌かく乱作用
発現

①研究者：広島大学大学院 医歯薬学総合研究科：太田茂(代表研究者)、古武弥一郎、日本薬科大学 健康薬学科：北村繁幸、広島大学 薬学部：杉原数美

②研究概要：化学物質による内分泌かく乱作用でもっとも懸念されているのが胎児期、新生児期における影響である。昨年度までの本研究で、この時期は薬物代謝酵素活性がほとんどないか非常に低く、**adult** のラットやマウスで行われた毒性試験で安全とされた化学物質の曝露量でも、毒性が現れる可能性があることを示した。今年度はラットを用い胎仔期、新生仔期に環境化学物質曝露を行い、成長後の影響について調べる。また、成長に伴う薬物代謝酵素の増加曲線より、**cytochrome P450 (CYP)**の分子種によっては、離乳期に著しい増加が認められたものがあり食餌の影響が考えられた。そこで、成長発達段階での食餌による影響を調べるため、ラット妊娠時より通常飼料(オリエンタル酵母社製MF)と精製飼料(AIN-93G)で飼育した仔ラットの肝薬物代謝酵素の発達の違いを調べる。また、通常食餌中の内分泌かく乱作用を示す成分の分析を行う。また、異なる飼料飼育時の化学物質の影響の違いについても調べる。以上、新生仔期の食餌の違いと薬物代謝酵素の変動、それに関連する化学物質への感受性の違いを調べることにより、日常生活の食事成分と環境化学物質の健康影響に関する基礎データとなり、環境行政に貢献できると考えている。

③平成 19 年度研究計画：

- 1)胎仔期新生仔時期化学物質曝露による影響
- 2)食餌成分による薬物代謝酵素および転写因子の変動
- 3)精製飼料飼育ラットと通常飼料飼育ラットでの環境化学物質による影響の比較
- 4)食餌成分中の薬物代謝酵素変動成分の解析
- 5)環境化学物質の代謝による内分泌かく乱作用の活性化不活性化の検索

(5) 基盤的研究課題(基盤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

①研究者：群馬大学大学院 医学系研究科：鯉淵典之(代表研究者)、岩崎俊晴、下川哲昭

②研究概要：内分泌系を介して作用する環境化学物質の多くは、ステロイドや甲状腺ホルモンなどの脂溶性ホルモンの核内受容体に作用し、内因性ホルモン作用をかく乱する。これらの物質は“疑似リガンド”として内因性ホルモンと競合的にリガンド結合領域へ結合し、ホルモン類似、または拮抗作用を生ずると考えられてきた。しかし、PCB(ポリ塩化ビフェニル)など一部の物質は、リガンド結合領域以外にも作用して受容体をDNAから解離させる。また、ホルモン受容体に作用するのみならず、神経細胞を中心とする興奮性細胞の細胞膜に作用し、膜の興奮性を変化させ、細胞機能に影響する物質も存在する。しかし、これらの新たに知られた作用機構の詳細については不明な点が多い。

昨年までのExTEND2005基盤的研究により、われわれはPCBをモデルとして、甲状腺ホルモン受容体を中心とした核内受容体への低用量の環境化学物質による作用を解析し、レポーターアッセイやそれ以外のインビトロ実験系を用いて作用機構を解析するシステムを確立した。また、インビトロで共役因子-核内受容体-DNA結合におよぼす環境化学物質の影響を調べる迅速スクリーニング系を開発した。本年度はこれらのシステムを使い、研究を実施する。また、動物実験を開始するためのモデルシステムの開発にも着手する。

③平成19年度研究計画：

- 1) Liquid Fluorescent DNA-Pull Down Assay法を用いたDNA-受容体-共役因子結合に及ぼす化学物質の作用のスクリーニング
- 2) レポーターアッセイやその他のインビトロ実験系を用いた環境化学物質作用の分子基盤の解析
- 3) 環境化学物質の甲状腺ホルモン系への作用を解析するためのモデル動物の開発

(6) 基盤的研究課題(基盤6)：野生生物のリスク評価を目指した核内受容体リガンドの網羅的解析法の開発

①研究者：愛媛大学 沿岸環境科学研究センター：岩田久人(代表研究者)、金恩英

②研究概要： 鳥類や水棲哺乳動物を含む野生生物の個体数減少の一要因として、化学物質による環境汚染の関与が指摘されているが、多くの種について適切なリスク評価は依然として実施されていない。リスク評価が困難な理由として、現在使用されている化学物質が多種多様であり、安全性試験に時間がかかることが挙げられる。また、すでに数種のモデル動物で明らかのように、化学物質に対する毒性発症の感受性はモデル動物種・系統間でさえも大きく異なり、このことは野生生物種にも該当すると予想される。

申請者は、化学物質の潜在的なリスクを評価するため、核内レセプター(受容体)を介する生体反応に着目した。核内レセプターの機能は通常、内因性物質(ステロイド・甲状腺ホルモン・レチノイドなど)によって制御されているが、PCB・環境ホルモンなどの化学物質によって活性化(もしくは不活化)されると、代謝酵素であるチトクロームP450 (CYP) やトランスポーター等の遺伝子発現レベルを変調させる。つまり、核内レセプターは体内生理環境のホメオスタシスに関与しており、核内レセプターを起点とする情報伝達機構は化学物質によってかく乱されるのである。

そこで申請者は化学物質による核内レセプターを介した情報伝達機構のかく乱について、比較生物学的に検討することを考えた。生物種特異的な毒性影響について評価するためには、毒性発現に関与する遺伝子産物の遺伝情報や機能を系統的・生態学的に重要な生物種間で比較検討することが不可欠である。本申請では野生生物の核内レセプターを潜在的に活性化・不活化する化学物質を調査すること、核内レセプターを指標とした敏感種・鈍感種の探索と感受性を決定する分子機構について解明することを計画した。

③平成 19 年度研究計画

- 1)ダイオキシン類による魚類・鳥類・水棲哺乳類 AHR シグナル伝達系攪乱能の解析
- 2)有機ハロゲン化合物による水棲哺乳類 PXR シグナル伝達系攪乱能の解析
- 3)有機フッ素化合物による水棲哺乳類 PPAR シグナル伝達系攪乱能の解析
- 4)網羅的リガンド解析のためのハイスループットスクリーニング(HTS)アクセシ法の開発
- 5)感受性差を考慮したリスク評価

6)種内での個体間差の検討

(7) 基盤的研究課題(基盤7)：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

①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)、鈴木 亜矢、Bindhu Paul-Prasanth

②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-17β、メチルテストステロン、DES等で処理した稚魚の雌雄生殖腺における遺伝子発現パターンを解析する。さらに、処理魚の生殖腺で特徴的に発現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RT-PCRやin situ hybridizationなどにより詳しく調べる。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、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有害性(受精率の低下)が示されている種々の化学物質を処理された稚魚の生殖腺における遺伝子発現パターンを解析する。稚魚について行う上記の研究を成魚を用いても実施する(本研究の後半期)。このような解析を通して、個々の化学物質や性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。最終的には、各種化学物質の影響に関する分子、細胞レベルでの解析結果と有害性との関連について評価する。

③平成 19 年度研究計画

- 1)DES 処理により発現を変動する遺伝子の網羅的解析と同定
- 2)メダカ生殖腺の性分化に関わる遺伝子群(DMY、DMRT1、Dax1、Sox9、Foxl2、Ad4BP/SF-1、LRH1、P450arom 等)の発現に及ぼす DES 処理の影響検討

(8) 基盤的研究課題(基盤8)：遺伝子導入メダカを用いた内分泌かく乱物質による生殖巣初期変化の把握と回復能力の検討

①研究者：京都大学大学院 農学研究科：木下政人(代表研究者)、京都大学 放射線生物研究センター：亀井保博、信州大学 理学部：柴田直樹

②研究概要：化学物質による野生生物への内分泌かく乱作用の最も重大な弊害は、受精率の低下を引き起こす事である。では、生殖巣のどのような変化により、この受精率の低下が引き起こされるのだろうか。我々は、「精子になる精原細胞やその分化を支えるセルトリ細胞、始原生殖細胞などの変化」がその原因であると考ええる。しかし、これまでの通常の方法でこの変化を把握するのは、高品質の組織切片と観察力が必要であり、困難と熟練が必要である。そこで、本研究で我々は、遺伝子導入技術を用いこれらの細胞を明瞭に標識し、簡便に観察可能にし、内分泌かく乱物質による生殖巣での初期変化、および、その変化の受精率へ及ぼす影響について検証する。

また、一時的なエストロゲン様物質の暴露により被った影響が、その後の生涯においてまで影響を及ぼし続けるのか、あるいは、回復・修復され正常な状態に戻るのかについては、直接的な観察はなされていない。そこで、本研究では、これらの疑問についても検証を行う。

本研究の特徴は、遺伝子導入技術、および、透明メダカ(ほとんどの体表色素を欠くために、内臓が生きたまま外から観察できるメダカ)の技術を組み合わせ、これまで観察が困難であった細胞種を標識し、内分泌かく乱物質により引き起こされる、個体への影響を同一個体で、生きたまま、長期にわたり追跡する点にある。

研究の概略は以下の通りである。エストロゲン様物質に応答して肝臓に緑色蛍光を発現するメダカ系統、精巣および卵巣に存在する細胞を細胞種別に色の異なる蛍光タンパク質で標識した遺伝子導入メダカ系統を作出する。これらと透明メダカを交配し、複数の細胞種を異なる蛍光色で標識した、透明遺伝子導入メダカ系統を作出する。この透明遺伝子導入メダカの雄個体を用い、性分化が完了するまでの期間または、完了後に様々な濃度・期間、各種化学物質による暴露試験を行い、標識された細胞や組織の変化を生きたまま、同一個体で観察する。

③平成19年度研究計画

- 1) 特定の細胞の標識化と分離
- 2) 成熟生殖巣における始原生殖細胞存在の検討
- 3) 化学物質により萎縮した生殖巣の回復能力の検討
- 4) 行動観察システム構築

2. 平成 19 年度野生生物の生物学的知見研究採択課題

平成 19 年度については下記 2 課題について採択した。調査内容については、**ExTEND2005** 基盤的研究企画評価検討会及び **ExTEND2005** 野生生物の生物学的知見研究検討会による合同検討会での協議の上、決定した。

課題 1. (野生 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

課題 2. (野生 2)沿岸域を中心とした湖沼生態系かく乱の実態とそのメカニズムの解明

なお、平成 18 年度にフイージビリティースタディー研究課題として実施した以下の 2 課題については、本年度もフイージビリティースタディー研究課題として採択した。調査内容については、**ExTEND2005** 基盤的研究企画評価検討会及び **ExTEND2005** 野生生物の生物学的知見研究検討会による合同検討会での協議の上、決定した。

課題 1. (FS1)東京湾における生態系かく乱の実態解明とその要因解析

課題 2. (FS2)アカトンボ減少傾向の把握とその原因究明

(1) 野生生物の生物学的知見研究課題(野生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

①研究者：新潟大学大学院 自然科学系：濱口哲(代表研究者)、酒泉満、四宮愛

②研究概要：メダカは、ほ乳類以外の脊椎動物で唯一性決定遺伝子が同定されている生き物である。我々は各地から野生メダカを採集して、性決定遺伝子*DMY*の存否を指標に当該個体の遺伝的性(XXかXY)を調べ、個体の性との異同について検討を行ってきた。これまでに、野生メダカ約8,000個体を調べた結果、おおよそ1%程度、遺伝的性と個体の性が一致しない個体(性転換個体)が存在することを見いだした。それらの性転換個体について、順次それが遺伝的原因によるものか、あるいは後天的要因によるものかの検討を行っているが、これまでに遺伝解析が終了しているXY雌の全てと、幾つかの地点でのXX雄個体の性転換は、遺伝的要因による事が判明している。XY雌個体の遺伝的要因が、*DMY*そのもの突然変異か、*DMY*以外の関連遺伝子の突然変異によるのかについて検討を行っているが、これまでに得られた結果では、全ての例が*DMY*の変異によるものであること、但し、*DMY*の変異によっては雌雄両方のXY個体が現れ、各個体が雌になるか雄になるかには、さらに常染色体上の別の遺伝子が関与している可能性があることも判明している。また、XX雄個体についても、その性転換に関与している遺伝子の探索を進めているところである。さらに最近、我々は、発生過程で高温条件におかれたメダカで雌から雄への性転換個体(XX雄)が現れることを見だし、その出現率に近交系間で系統差があることを報告している。

本研究では、多くの地点からのメダカについて、遺伝的性と個体の性の異同を調べるとともに、得られた不一致個体について遺伝解析を行い、その原因が遺伝的要因によるのか、後天的要因かを検討する。また、過去に不一致個体が認められた水系から数カ所を選び、継続的調査を行う。不一致個体出現の経年的な状況把握を行い、性転換を引き起こす遺伝的要因が個体群の中でどのように推移するのかについての知見を得て、性転換に関わる多様な遺伝子の対立遺伝子の集団中での挙動について基礎的情報を収集する。また、後天的要因として、性ステロイドに加えて温度の影響の可能性を検討する目的で、温度性転換現象について性転換機構の検討を行うとともに、近交系間の系統差の原因遺伝子の探索を行う。また、並行して、野生メダカの温度性転換感受性について、水温など気候条件を異にする地域(系統)差の有無等を検討する。得られる知見から、野生メダカの性がどの程度可塑的であるのかについて考察する。

③平成19年度研究計画

- 1)野生メダカの性転換個体の探索とその原因の解析
- 2)XX雄の散発的な出現原因に関する検討(温度性転換に関する検討)

(2) 野生生物の生物学的知見研究課題(野生2)：沿岸域を中心とした湖沼生態系
かく乱の実態とそのメカニズムの解明

①研究者：信州大学 山岳科学総合研究所：花里孝幸(代表研究者)、宮原裕一

②研究概要：環境水中の水生生物に及ぼす毒性を明らかにするため、昨年度に引き続き、諏訪湖とそこに流れ込む河川をフィールドとして、定期的に環境水中の有害化学物質(主に農薬)の種類と濃度を分析する。それとともに、ミジンコを用いてバイオアッセイを行い、水の毒性を評価する。これまでの研究で、諏訪湖水にはミジンコに対する毒性が高くなる時期が、初夏と秋の2回あることがわかった。今年度も同じ現象が見られるのかどうかを確認する。これまでの解析で、初夏には環境水中に農薬が検出されたが、その濃度は単独でミジンコに毒性影響を及ぼすほど高くはなかった。その毒性が農薬単独によるものか、他の要因との複合影響の結果か、はたまた農薬とは関わりのない未知の物質によるものか、毒性をもたらす要因について解析する。また、農薬が検出されない秋に水の毒性を高めた物質の解明も試みる。そして、毒性物質の起源や作用機序の解明を試みる。

これまでの研究で、湖沼沿岸帯に形成される水草帯に生息するミジンコ種が、沖帯に生息する種よりも殺虫剤耐性が高いことが明らかになった。このことから、沖帯よりも水草帯の方が有害化学物質濃度が高くなるものと考えられた。また、水草帯に生息する微小動物の多くは、水草上で繁茂する付着藻類に依存していることが示された。このことから、付着藻類が水域を汚染する化学物質によってダメージを受けると、それは、そこに生息する微小動物の分布に影響するものと考えられる。そこで、実際に環境水が、付着藻類の増殖を阻害することがあるのか否かを確認するため、付着藻類を用いた環境水の毒性のバイオアッセイを行い、毒性が認められたときにはその原因物質の特定もめざす。

水中の生物たちは、彼ら自身がつくって体外に放出している化学物質(におい物質)を介してケミカルコミュニケーションを行っており、それが生態系を維持する重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。そして、それが殺虫剤などの人工の化学物質によって攪乱されることが見いだされた。そこで、本研究では、昨年度に引き続き、人工の化学物質による生物たちのケミカルコミュニケーションの攪乱について実験的な解析を進める。具体的には、捕食者が出す化学物質に誘導されるミジンコの形態変化に及ぼす殺虫剤の影響の解析、ミジンコが放出する物質によって誘導される藻類の群体形成に及ぼす界面活性剤の影響の解析、フェロモンを介して維持されているミジンコ个体群の秩序を攪乱する人工化学物質の働きの解析などである。そして、その結果から、人工化学物質が生態系に与える新たな影響を評価する。

また、これまで、有害化学物質のミジンコ个体群への影響を評価する際には、単為発生雌の幼体に対する毒性影響を基準としてきた。しかし、ミジンコ个体群は環境の変化に応じ、時には両性生殖を行い、また耐久卵で越冬するなど、多様な生活史を持つ。そのため、个体群への毒性影響は、ミジンコの生活史の段階の違いによって変わることが推測される。そこで、異なる生活史段階に

ある個体の薬剤耐性を調べ、それに基づいてミジンコ個体群に及ぼす有害化学物質の影響を総合的に評価する。

③平成 19 年度研究計画

1)環境水の毒性評価と、その原因物質の解明

2)ケミカルコミュニケーションに及ぼす有害化学物質の影響の解明

(3) フィービリティースタディー研究課題(F S 1)：東京湾における生態系かく乱の実態解明とその要因解析

①研究者：(独)国立環境研究所 環境リスク研究センター：堀口敏宏(代表研究者)、児玉圭太、北九州市立大学大学院 国際環境工学研究科：門上希和夫、長崎大学大学院 生産科学研究科：李政勳

②研究概要：本研究は、内分泌攪乱化学物質をはじめとする有害化学物質や、その他の人間活動に由来する因子が沿岸生態系に及ぼす影響に着目したものである。特に、多数の人口を抱える首都圏に隣接し、種々の人間活動の影響を長年にわたって被ってきたと考えられる東京湾を対象に据えて、東京湾における底棲魚介類群集の質的及び量的な変化をフィールド調査によって追跡し、解析する。これにより、その特徴や傾向を評価する。また、そうした生物相の変化をもたらした要因を明らかにするべく、種々の解析を行う。

その際の着眼点は、1)1980年代後半以降、複数の種が同調的に激減したのはなぜか、2)それらの種は現在まで低水準が続いていて、回復の兆候が見られないのはなぜか、3)その一方、板鰓類とスズキは増加しているが、それはなぜか、の3つである。具体的方法論として、代表種の生活史特性の変化など、個体群減少の背後にあった、もしくはそれと関連があると見られる現象を抽出し、それに対する物理、化学、生物的要因あるいは漁獲の影響を解析・評価する予定である。

その一環として、昨年度と同様に、今年度も東京湾における生物・環境調査、いわゆる、東京湾 20 定点調査を継続し、底棲魚介類の代表種(シャコ、マコガレイ及びハタタテヌメリ)の生活史特性に関する解析と、貧酸素水塊がそれらの種に及ぼす影響の解析を行う。

また、1)の観点から、環境省が 1970 年代から現在に至るまで継続的に実施している生物モニタリング調査の中で、特に東京湾で漁獲されたスズキ試料(国立環境研究所の環境試料タイムカプセル棟にて凍結保存中)の一部を用いて、そこに含有される重金属の分析・測定を行う。これにより、1970 年代から現在までの東京湾における重金属汚染の経年推移を復元する。また、既に明らかとなっている残留性有機汚染物質(POPs)や有機スズ化合物(TBT 及び TPT)による汚染実態の知見と合わせて、東京湾における過去 30 年程度の有害物質汚染の経年推移を明らかにする。これにより、1980 年代後半以降、複数の種が同調的に激減したことに関与した可能性があると考えられる物質(群)の絞り込みを図る。

また、2)の観点から、東京湾 20 定点調査で採取された底質試料を用いてガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)による一斉分析を行い、東京湾の底質(表層泥)における化学物質の空間分布を明らかにする。これにより、現在もなお底棲

魚介類の個体数増加を阻害している可能性があると考えられる物質(群)の探索を行う。

これまでに海上保安庁などによって実施されてきた東京湾における種々の調査結果も参考にして、東京湾における有害物質の空間分布と、その汚染の経年推移を検討し、底棲魚介類群集に悪影響を及ぼしてきた可能性がある物質(群)を精査する。

③平成 19 年度研究計画

- 1)東京湾に設定した 20 定点における試験底曳き及び環境調査
- 2)東京湾における底質中化学物質の同定と定量
- 3)1970 年代から 2000 年代にかけて東京湾で漁獲されたスズキ筋肉中の重金属の測定

(4) フィージビリティースタディー研究課題(F S 2) : アカトンボ減少傾向の把握とその原因究明

①研究者：石川県立大学 生物資源環境学部：上田哲行(代表研究者)、宮城大学 食産業学部：神宮字寛、愛媛大学 農学部：日鷹一雅

②研究概要：近年、アキアカネをはじめとしたアカトンボ類の急激な減少が各地で指摘されている。その原因として、浸透性殺虫剤、耕地整備による乾田化などが指摘されている。しかし、アカトンボ類の高い移動力や広い生息場所選択性などにより、その個体数を定量的に把握することはきわめて難しく、減少傾向の指摘も印象の域を脱していない。この研究は、アカトンボ類の現状について定量的調査を実施すると共に、過去の資料を収集分析して減少傾向を把握する。また、学校プールから発見されるアカトンボ類幼虫の定量的把握をはじめ、市民、農民、トンボ研究者によるモニタリング体制の構築を目指し、アカトンボ類の個体数変動を広域的・長期的にモニタリングする体制の確立を目指す。

アカトンボ類減少の原因として、主に育苗箱に使用される浸透性殺虫剤の影響と圃場整備による乾田化の影響に焦点を当てて究明する。水稻に使われる浸透性殺虫剤類は植物への残留性は高いが水・土壌などの環境中での分解速度が大きいので、イネを食害する昆虫だけを選択的に殺し長期間の効果を発揮する理想に近い農薬であると考えられている。アカトンボ類はイネを食害することはないが、水田に依存した生活様式をもつため、次のような形で浸透性殺虫剤の影響を受ける可能性がある。(1)薬剤耐性の低い若齢幼虫期と田植えの時期が重なるため、分解前の殺虫効果によって死亡率が高まる(直接効果)、(2)イネ枯死部・菌類・ミジンコ・アカトンボ類幼虫の腐食性食物連鎖を介した生物濃縮がおきる(間接効果)などである。これらの可能性について圃場調査や圃場・室内での実験を組み合わせた検討を行う。一方、圃場整備による乾田化は、(1)非灌漑期の田面水の滞留時間を短くし、アキアカネなどの産卵場所供給量を減少させる、(2)中干し時の乾燥度合を強化し、幼虫の死亡率を高くするなどによって個体数の減少を招く可能性がある。この点について、主に圃場整備前後の水田調査により検討する。夏季に高地へ移動して越夏するアキアカネについては、地球温暖化による越夏可能場所の縮小が起こっている可能性もあり、その影響についても検討する。

③平成 19 年度研究計画

- 1)減少傾向の把握と個体数モニタリング法の確立
- 2)浸透性殺虫剤の影響評価

3)圃場整備による乾田化の影響

3. 平成 19 年度フィージビリティースタディーについて

フィージビリティースタディーの採択について（公募要綱）

①ExTEND2005 基盤的研究フィージビリティースタディーの目的

環境省では、平成 17 年 3 月に公表した「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—」に基づき、取組を進めています。その柱の一つとして基盤的研究及び野生生物の生物学的知見研究を推進しています。平成 19 年度は、基盤的研究及び野生生物の生物学的知見研究として別添の研究課題が採択されています。

②フィージビリティースタディーの実施

今年度以降の新規研究課題候補として、フィージビリティースタディーを公募します。フィージビリティースタディーでは、平成 19 年度研究計画承認後から平成 20 年度末までの 1 年強で、平成 21 年度以降概ね 1 年間の研究の実行可能性を検証していただきます。

- (1) 研究内容； 原則的に、ExTEND2005 に即した研究であること。
- 野生生物の生物学的知見の収集（2 課題程度）
野生生物の観察によって生物個体(群)の変化やその前兆を発見した場合、その変化が異常か否かを評価し、その変化のメカニズムを把握するための考察研究を行う。その際、実験室内における化学物質の内分泌かく乱作用に関する研究とリンクされるフィールド調査であること。
 - 化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究（2 課題程度）
- (2) 研究費の規模； 1 課題当たり 200 万円程度（平成 19 年度）
※ 平成 20 年度は 400 万円程度
- (3) 採択予定課題数； 4 課題程度
- (4) 研究期間； 基盤的研究企画評価検討部会及び野生生物の生物学的知見検討部会による研究計画書承認後～平成 21 年 3 月 31 日
- (5) 研究成果； 今年度の研究進捗状況及び来年度の計画については基盤的研究企画評価検討部会及び野生生物の生物学的知見検討部会合同成果発表会（平成 20 年 2 月開催予定）にて発表していただきます（来年度の研究成果発表会は平成 21 年度末を予定）。

③応募要件

- (1) 提出物 [1] 平成19年度 ExTEND2005 フィージビリティースタディー研究応募票（参考：記載例）
[2] 研究概要を説明するパワーポイント（スライド6～8枚程度、発表時間として5分程度）資料
- (2) 応募受付期間 平成19年9月18日(火)～10月9日(火)
- (3) 提出先 ehs@env.go.jp
- ※ メールタイトルは「研究応募(所属・氏名)」としてください。
また、メールの容量が2MBを超える場合は、パワーポイント資料をCD-Rに記録し郵送してください(10月9日(火)消印有効)。

④研究課題の採択

応募要件を満たした研究課題について、基盤的研究企画評価検討部会・野生生物の生物学的知見検討部会の合同検討部会（平成19年10～11月東京にて開催予定。非公開）において審査を行います。その際、応募者には、合同検討部会委員のヒアリングを受けていただく場合があります。ヒアリングの詳細については、別途メールにて連絡します。なお、応募者が参加出来ない場合には、代理人の参加も可とします。さらに、応募者多数の場合は、応募提出物をもとに一次選考します。

⑤研究課題採択後の流れ

検討委員による審査の後、採択された研究課題については、改めて、合同検討部会からの意見を踏まえた詳細な研究計画書及び詳細な見積書を提出していただき、基盤的研究企画評価検討部会及び野生生物の生物学的知見検討部会での承認の後、研究を開始していただきます。

⑥その他

「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-」に関するより詳しい情報については、環境省ホームページをご参照ください。

<http://www.env.go.jp/chemi/end/extend2005/index.html>