

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の研究成果概要

I. 基盤的研究

1. 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。

2. 平成 19 年度基盤的研究採択課題及び研究成果

平成 19 年度については下記 8 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

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

研究者：(財)残留農薬研究所：青山博昭(代表研究者)、北條仁、佐藤旭
理化学研究所バイオリソースセンター：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

研究概要：生殖・発生毒性試験を含む通常の毒性試験では、ヒトの集団が遺伝的に均一ではないことを考慮して、ある程度の遺伝的多型性を保持するアウトブリードストックの実験動物（いわゆるクローズドコロニー系統の動物）が用いられる。これらの動物集団は、マウスであれラットであれ、ゲノム全体の10～15%の遺伝子座（およそ3,000～4,500遺伝子座）に遺伝子多型が存在すると考えられている。このため、動物生産業者から供給され外見が正常な動物の中にも何らかの先天異常を引き起こす劣性遺伝子をヘテロに持つ個体が一定の頻度で含まれており、内分泌かく乱作用が懸念される化合物が次世代の動物に及ぼす影響を調べる生殖・発生毒性試験を実施する過程で、化合物の投与とは無関係であるにもかかわらず、投与した化合物により誘発されたものと誤解されるような先天異常がしばしば児動物に現れる。残留農薬研究所においても、生殖・発生毒性試験を実施する過程で対照群や低用量群の動物に遺伝的な奇形が生じたり、これらの突然変異遺伝子を持つラットの近交系を育成する過程で新たな突然変異遺伝子の存在に気づいたりした経験を持つ（Aoyama *et al*, 1988、1991; Kaneda *et al*, 1989、1995; Fujii *et al*, 2003）。また、アウトブリード動物を用いた毒性実験では、同じ化合物を同じ量投与したにもかかわらず、その化合物に対する反応にしばしば大きな個体差がみられることも経験的に知られており、様々な化合物に対する感受性を支配する遺伝子座に多型が存在することが強く示唆される。しかし、これらの可能性を系統的かつ詳細に解析した研究は、我々が知る限り過去にはほとんど例がない。

本研究は、種々の化合物の内分泌かく乱作用を含む生殖・発生毒性を調べるための実験に多用されるアウトブリードストック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（投与した化合物に起因すると誤解される恐れのある）異常を引き起こす突然変異遺伝子や、性ホルモンに対する感受性を修飾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簡便に診断する技術を確立することにより、アウトブリードストックに由来する実験動物の遺伝学的基盤を整備することを目的とする。アウトブリードストックのラットに現れた突然変異に関しては、カエル等の野生動物に観察される四肢奇形が何らかの化合物のレチノイン酸受容体を介した内分泌かく乱作用によるものとの懸念があることを考慮して、多指症および欠指症を誘発する突然変異遺伝子と、このような突然変異遺伝子の作用を修飾する遺伝子を対象にして、責任遺伝子のクローニングや簡便な遺伝子診断技術の開発を行う。性ホルモンに対する感受性を修飾する遺伝子（群）に関しては、雌雄の生殖器官（雌の子宮および膈と、雄の精巣、精巣上体、前立腺、精囊、カウパー線など）の重量やこれらの器官の細胞増殖活性の個体差に着目して、責任遺伝子をクローニングすると共に、それらを遺伝子レベルで診断する技術を開発する。

研究結果のまとめと考察：PD ラットの解析については、平成 19 年度の成果から、多指症を引き起こす原因遺伝子の大まかな位置が明らかになった。しかし、推定領域には 100 を越える数の遺伝子がマップされているため、ポジショナル・クローニングではこれ以上の解析が困難と考えられた。今後は、胎生期の肢芽（limb bud）から mRNA を採取して遺伝子の網羅的発現解析を実施し、候補遺伝子をさらに絞る必要があると考えられる。

MOD ラットに関しては、CGH 解析によって示唆された Y 染色体の異常を確認するため、候補領域の遺伝子を含む BAC クローンから得られる DNA を標識して、FISH 法による染色体標本の観察が必要と考えられる。今後は、MOD 雄と BN 雌との交配から得られる F1 雄を BN 雌に戻し交配することにより N2 世代の雄動物を得て、生殖・発生毒性試験において催奇形性物質に対する個体の感受性を左右する可能性のある、欠指症抑制遺伝子の探索を重点的に進める予定である。

マウスを用いて実施している性ホルモンに対する感受性を修飾する遺伝子群の解析については、RI 系統群を用いた QTL スクリーニングにより、予想を上回る数の候補遺伝子領域が示唆された。また、C3H と B6 の間にはエストロゲンに対する感受性に明確な系統差が確認され、生殖器官重量の差からアンドロゲンに対する感受性にも差のあることが推測された。さらに、エストロゲンに対する感受性については、F2 個体群の表現型がほぼ期待通りに分離した。これらの結果から、エストロゲンおよびアンドロゲンに対する感受性を修飾する遺伝子が実際に存在することが、ほぼ確認されたと判断される。今後は、これらの遺伝子を DNA レベルで同定し、簡便な遺伝子診断法を確立して、これらの遺伝子座に多型が存在すると推測されるアウトブレッドストックの動物の遺伝子型を判定するための遺伝学的基盤を整備する必要があるものと考えられる。

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

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

研究概要：昨年度までの一連の酵母のtwo-hybrid法を用いた研究により、多環芳香族炭化水素（PHA）類自体にはエストロゲン様の活性はなく、ヒドロキシ基（OH基）が必須であり、水酸化PAHのみが強いエストロゲン様活性を示すことが判明した。一方、魚類のウロコは、石灰化した骨質層の上に骨芽細胞と破骨細胞が共存して、ヒトの骨と同様に骨代謝をしている。魚類の椎骨には骨髄に相当する構造がなく、造血は腎臓の一部で行っている。また、骨とウロコがカルシウムの貯蔵庫であるが、魚類にとって、ウロコがヒトの骨と同様の役割を持つことは、放射性同位元素（⁴⁵Ca）を用いた実験で証明されている。

そこで本年度は、動物培養細胞系の一つとして、キンギョのウロコの培養システムを開発した。さらに、この評価系により水酸化PAHの骨代謝に対する影響を解析して、酵母two-hybrid系における活性との関連を調べた。

その結果、水酸化PAHの中で最も強い活性を示した4-ヒドロキシベンゾ[a]ピレン(4-OHBaA)は、魚類においては強い抗エストロゲン作用があった。即ち、 10^{-7} Mの4-OHBaAでも影響があり、キンギョの骨芽及び破骨細胞の活性を抑制した。また3-ヒドロキシベンゾ[a]ピレン(3-OHBaA)にも抗エストロゲン作用がみられた。これら4-OHBaAと3-OHBaAの作用は、海産魚のベラにおいても確認できた。なお、水酸化PAHのこれらの作用は、ビスフェノールA¹⁾よりも強いことも判明した。

エストロゲン受容体の・タイプがメインで発現している哺乳類とは異なり、魚類の硬組織においては、エストロゲン受容体の・タイプの発現が・タイプの発現量よりも多い。さらにPAHとエストロゲン受容体との構造活性相関を調べた結果、エストロゲン活性を示す範囲は非常に狭いが、抗エストロゲン活性を示す範囲は広いことも、酵母two-hybrid assayで明らかになった²⁾。これらのことが、水酸化PAHの作用の種差を導いた可能性がある。

PAHの汚染は、例えば重油流出事故等を通じて海洋等の水域にも広がっていることが報告されている。実際に、重油汚染によりヒラメの稚魚の脊椎湾曲現象が確認されている。したがって、PAH類の生態系、特に海洋動物への影響の一つとして、PAHの魚類の骨代謝に及ぼす影響にも今後注目すべきである。

1)Suzuki, N. and Hattori, A.: Bisphenol A suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the cultured scales of goldfish. *Life Sci.*, 73: 2237-2247 (2003).

2)Hayakawa, K. et al., Estrogenic/antiestrogenic activities of polycyclic aromatic hydrocarbons and their monohydroxylated derivatives by yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.*, 53: 562-570 (2007); 日本薬学会 *J. Health Sci.* 2007年度最優秀論文.

研究結果のまとめと考察：開発した魚のウロコ細胞を用いる方法を用いて次のことが明らかになった。

1. 酵母 two-hybrid 法で強いエストロゲン様活性を示した 40HBaA、30HBaA は共に、魚類のウロコの破骨・骨芽細胞の活性抑制作用があり、魚類においてこれらの水酸化 PAH は抗エストロゲン作用が認められた。
2. 酵母 two-hybrid 法でエストロゲン様活性を示さなかった 10HPy は、魚類のウロコの破骨・骨芽細胞のいずれにも作用を示さなかった。
3. 40HBaA は、破骨及び骨芽細胞のマーカー遺伝子の発現も抑制し、細胞の活性と同様の変化を確認できた。

以上より、魚のウロコ細胞を用いる方法は、海洋や河川中のエストロゲン様活性/抗エストロゲン活性物質（例えば PAH 類など）の優れたバイオアッセイ法となる可能性が大きい。

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

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

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、どの程度エストロゲン受容体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。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)融合タンパク質(AromEGFP)を発現させた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した。その結果、雄では精巣で若干の発現リークが認められたラインが存在したものの、アロマターゼ活性やホルモン濃度の変動が確認できるレベルではなかった。またAromEGFPは、胎盤のGiant cellに発現していることが確認された。次に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、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、雌雄の体重変動、肛門-生殖結節間距離(AGD)、生殖器重量、雄の精子数、雌の膻開口日、初回発情期到来日および性周期の変化について検討を行った。同腹の野性型マウスと比べて体重変動やAGDに若干の差がある時期が存在するものの、今回検討したほとんどすべての項目において有意な差が認められないことから、エストロゲン暴露が体重増加や生殖器官形成には本質的な影響を与えない可能性が示唆された。

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マウスにおいても、『過剰に産生されたエストロゲンは、AFPに中和されずにERの転写を活性化しているのか？また胎児のどの組織に移行してERの転写を活性化しているのか？』を検討する必要があると考えられる。そこでこの問題を解決するために、ルシフェラーゼ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作成し、この遺伝子を導入したレポーターTGマウス(ERE-MycLUC-TGマウス)の作成を試みた。その結果、17匹のfounderマウスを得ることが出来たが、そのうちTGマウスは1匹であった。今後はこのマウスを繁殖し、そのcharacterizationを行う予定である。

研究結果のまとめと考察：

1. AromEGFP-TGマウスの各組織におけるAromEGFP発現の確認とフェノタイプの検討について

本研究では、胎児に対するエストロゲンの直接的な曝露の影響を検討できるモデルマウスとして AromEGFP-TG マウスを作成し、その検討を行ってきた。既に AromEGFP-TG マウスは、雄性 TG マウスと雌性の野生型マウスと交配させることにより、野生型の母体環境内においてエストロゲンに曝露されている TG 胎児と、エストロゲンに曝露されていない野生型 (TW) 胎児を共存させることが可能であることが確認されており、母体への影響を最小限に止めた理想的なモデルマウスになり得る可能性が示されている。今年度は、昨年度検討できなかった分娩後の雄性 TG マウスの生殖組織における AromEGFP の発現のリークについて検討を行った。導入 AromEGFP が胎盤特異的に発現しているかを検討したところ、今回検討を行った D13 ラインの精巣で AromEGFP の mRNA 発現が認められた。本 TG マウスを作成したマイクロインジェクション法では導入遺伝子のゲノム上への挿入位置は制御できず、その挿入位置によっては近傍のプロモータにより異所性の発現が見られることが知られている。D13 ラインではこのような要因で精巣においても AromEGFP が発現していることが考えられた。しかし実際にはアロマターゼ活性およびホルモン濃度には変化が見られなかったことから、この発現は考慮する必要は無く D21 ラインと同様胎盤特異的に導入遺伝子が機能しているといつてよいと考えられた。また胎盤のどの部分に AromEGFP が発現しているのかを検討したところ、Giant cell 層に発現していることが確認された。妊娠期間中の齧歯類においては、ヒトと異なり androstenedione が高値となり、この androstenedione が妊娠維持に重要なプロゲステロン産生などに関わっていると考えられているが、その主要な産生部位は、胎盤の Giant cell であると報告されている。したがって AromEGFP-TG マウスにおいては、Giant cell で産生された androstenedione が効率よくエストロゲンに変換されることで、目的に合致する理想的なモデルマウスになっていると考えられた。

次にこのモデルマウスを用いて、実際にエストロゲンが雌雄生殖機能等に与える影響について、これまでエストロゲン様化学物質により影響が報告されている項目を中心に検討を行った。胎児期エストロゲン曝露によるとされる影響の一つに、体重増加が報告されている。そこで各ラインの雌雄について、出生後から 50 日間の体重増加について検討を行った。その結果 D21 においては、逆に TW 群と比較して 20 日齢までは体重増加が抑制される結果となった。しかしながら D13 ラインではそのような傾向は認められなかった。したがって今回確認された差は、エストロゲン曝露が直接的に関わっているとは考えにくい。特に出生後から離乳期までの体重増加は、母マウスの育児能やその環境に依存するところが大きく、野生型マウスでもそのばらつきは大きい。したがってもし今回確認された体重増加抑制作用がエストロゲン曝露の影響であることを証明するには、相当数の母体を評価する必要があると思われる。

一方で雄性生殖機能への影響として、精巣および精巣上体重量の減少や精子数の減少が報告されている。そこで各ラインの DSP について検討を行ったが、TG と TW の雄について特に差は認められなかった。また雌性生殖機能への影響として、膣開

口および初回発情期到来と性周期の変化について検討を行った。これまでに膣開口の早期化、卵巣重量の減少や子宮重量の増加、初回発情期の早期化および性周期の乱れなど、胎児期におけるエストロゲン様物質曝露が雌性の生殖機能に影響を与えることが数多く報告されている。しかしながら AromEGFP-TG マウスにおいては、何れの項目においても TG-TW 間で有意な変化は認められなかった。

さらに雌雄の生殖器官形成への影響として、AGD への影響についても検討を行った。AGD は精巣機能の発達に伴い Ins1-3 などの時期および性特異的な分子の発現により変動することが報告されており、エストロゲン様物質曝露により短縮することが知られている。また、AGD の伸長は精巣の発達に伴う血中ジヒドロテストステロン (DHT) 濃度に大きく依存していることから、エストロゲン様物質曝露により DHT 合成が阻害されることが考えられている。しかし、AromEGFP-TG マウスにおいてはいずれのラインにおいても AGD に有意な差は認められなかった。実際に胎齢 18 日目における TG と TW の雄性胎児中 DHT 濃度を比較すると、両群間には有意な差は見られない。したがって、過剰量のエストロゲンに曝露しても DHT 合成や AGD には影響がない可能性が示唆された。

以上、AromEGFP-TG マウスは当初の目的を達成する理想的なモデルマウスであることが確認されたが、今回検討した項目についてはエストロゲン曝露の影響は確認できなかった。

2. ERE-MycLUC-TGマウスの作成について

先述の通り、今年度は AromEGFP-TG マウスを用いて、胎児期のエストロゲン曝露の影響と考えられてきた種々の項目について検討を行ってきたが、特に報告されているような影響は確認できなかった。この原因としては2つの可能性が考えられる。一つは、これまでに報告されている現象は、エストロゲンの胎児への直接的影響ではないこと。もう一つは、胎児期の TG マウスに供給されているエストロゲンが不十分である可能性である。特に後者については、胎児血中に存在している α -フェトブロテイン (AFP) がエストロゲンの組織への移行を阻害している可能性がある。

AFP は、胎児の肝臓で産生される糖タンパク質であり、アンドロゲンには結合しないがエストロゲンには高い親和性を有するエストロゲン結合蛋白質である。最近、AFP 欠損マウスを用いた検討から、AFP はエストロゲンの脳への移行を阻害することで、雌性マウスの脳の雄性化を抑制（現在のところ脳の性分化においては、血中に存在しているアンドロゲンが脳内に移行した後、脳のアロマターゼでエストロゲンに変換されて雄性化が起こるという『アロマターゼ仮説』が有力視されている）していることが報告されており、胎児期におけるエストロゲンの組織への移行を制御する重要な分子であると位置づけられている。また AFP は、ジエチルスチルベステロール (DES) などの合成エストロゲンには結合しないことから、内因性エストロゲンである E2 を妊娠動物に投与しても起こらないような内分泌攪乱作用が、わずかな投与量の DES やビスフェノール A では起こるといふ、内分泌攪乱化学物質問題における『低用量問題』を説明するため重要な分子でもある。このような観点から今後は、AromEGFP-TG マウスの胎盤において産生されたエストロゲンが、TG 胎児のどの

組織に移行して ER の転写を活性化しているのか？それともこの程度のエストロゲンは AFP に完全に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。

そこで我々は、ERE-MycLUC-TG マウスを作成することでその解決を試みる。すなわち雄性の AromEGFP-TG マウスに雌性の ERE-MycLUC-TG マウス（この場合はホモマウスにしておく必要がある）を交配させ、AromEGFP-TG 胎児と WT 胎児（レポーター TG マウスをホモマウスにしておくことで、すべての胎児にレポーター遺伝子が発現する）の各組織におけるレポーター遺伝子の発現量を比較検討することで、いつ、どの組織に、どのくらいの強度でエストロゲンシグナルが入っているかを検討できると考えられる。今回、TG 作成のためのコンストラクトを作成したが、レポーター TG マウスにおいては、先述の position effect variegation（位置効果）がデータの解析に多大な影響を与えることから、本 TG マウスの作成にはこのような効果を排除するために、ニワトリ β グロビン遺伝子ドメイン HS4 由来のインスレーターを導入した。インスレーターは、位置効果からの保護活性や、周辺遺伝子からのエンハンサー活性を阻害する作用を有することが明らかになっている。一方で、既にインスレーターと ERE の下流にレポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼを連結したコンストラクトを用いてレポーター TG マウスが作成されている（Mol Endocrinol 15, 1104-1113, 2001; Nat Med 9, 82-86, 2003）が、これらの報告では成熟期や繁殖期におけるエストロゲン応答についてのみの検討であり、果たしてホタルルシフェラーゼが胎児期においても検出できるほど十分に機能するかは不明なままある。そこで我々はホタルルシフェラーゼに Myc タグをつけたルシフェラーゼを作成し、ルシフェラーゼ活性で検出できなくとも抗 Myc タグ抗体を用いた免疫組織染色（または *in situ* hybridization）により、「どの時期に胎児のどの組織で ER の転写が活性化されているか？」を同定できるようにすることを試みた。幸いルシフェラーゼの N 末端に Myc タグを付加してもルシフェラーゼ活性には影響が無かったことから、2xIns -4xERE-miniP-MycLuc-2xIns を用いて、TG マウスを作成した。しかしながら今回は、わずかに 1 ラインしか得ることができなかった。今後は、このマウスについて種々の解析を行うが、これまでの報告にもあるとおり、レポーター TG マウスはいくつかのラインの中からもっとも理想的な反応を示すものを選別することが一般的であることから、今後さらに ERE-MycLUC-TG マウスを追加作成する必要があると思われる。

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

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、杉原数美

日本薬科大学 健康薬学科：北村繁幸

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。本研究では、この時期に注目し環境化学物質や薬物等による影響を薬物代謝酵素との関連で検討している。これまで、ラット胎仔期・新生仔期はほとんど肝薬物代謝酵素 cytochromeP450 (CYP) 活性が認められないが、成長に伴い徐々に活性が上昇し5～6週齢頃に adult レベルに達することを明らかとした。さらに、胎仔期・新生仔期でも化学物質曝露により肝薬物代謝酵素が誘導されることも見出している。CYP 分子種の中でも AhR が誘導に関与している CYP1A は、特に離乳期に顕著な活性上昇がみられたため、食餌成分の影響を調査した。その結果、妊娠時より精製飼料 (AIN-93G: 日本クレア社) で飼育したラットは、通常飼料 (MF: オリエンタル酵母社) 飼育群より肝 CYP 活性が全般的に低く、さらに離乳期の著しい活性上昇が認められないことを見出した。食餌中の成分が AhR をはじめとする核内転写因子のリガントとなり、肝薬物代謝酵素の活性誘導に働いていると考えられる。

新生仔期の化学物質曝露に関して、成長後における不可逆的な影響の有無を調べるため、生後1日 (PND1) のラットに化学物質を投与し、成長後 (PND14) の脳および生殖腺におけるエストロゲン受容体 (ER α 、ER β)、アンドロゲン受容体 (AR) の変動を調べた。生後1日齢 (PND1) にE2あるいはbisphenol A (BPA) を投与したところ、PND14の脳で、コントロールと比較してER α の発現抑制傾向がみられる部位があった。現在、本影響に関して精査中である。

研究結果のまとめと考察：胎児、新生児期に内分泌かく乱作用を有する化学物質に曝露されることにより、成長後にも不可逆的な影響が残ることが現在懸念されている。主要な薬物代謝酵素である肝の CYP および aldehyde oxidase (AO) は、ラットでは胎仔期および PND3 頃までほとんど活性が認められないが、5～6週齢頃まで徐々に上昇していることを明らかにしている。また、新生仔期 (PND1-3) でも MC、PB、DEX のような CYP 誘導剤や、DDT やフタル酸エステル類で CYP 分子種が誘導されることも見出している。以上により、胎仔期・新生仔期は adult と異なり、薬物代謝能が低く化学物質曝露の影響を受けやすいことが考えられる。

また、薬物代謝酵素発現は食餌の影響も大きく受けることを今回明らかにした。妊娠時より精製飼料 (AIN-93G) で飼育したラットは有意に CYP 活性が低く、特に AhR を介して誘導される CYP1A1/2 活性の上昇が低いことより、食餌中に含有される AhR リガンドあるいはリガンド前駆物質の影響が大きいものと考えられる。CYP1A1/2 だけでなく、CYP3A、2C などの活性も精製飼料飼育群で低下しており、食餌成分中にこれらの誘導に関与する核内受容体のリガントとなるものが含まれているものと考えられる。ヒトは食物が均一ではないため、成長発達段階の食事成分による影響は重要と考えられる。

胎児期、新生児期は、ホルモン受容体をはじめとして種々の受容体の発現が、発生・成長段階により変動していることが報告されている。成人では影響が認められていない化学物質や内分泌かく乱作用を示さない暴露量であっても、薬物代謝酵素活性の低いこの時期の暴露により、成長後不可逆的な影響が生じることが懸念される。また、化学物質の内分泌かく乱作用として、直接ホルモン受容体に作用するだけでなく、ホルモン受容体の発現に影響を与える作用も考えられる。今回、生後 1 日齢 (PND1) で E2 あるいは BPA を投与し、PND14 での脳および生殖器での ER および AR の変動を調べたところ、脳の部位により ER α 、ER β 発現に抑制傾向が認められている。本研究は、今後も精査を行う予定である。

最後に、継続している化学物質の代謝的内分泌かく乱作用の（不）活性化についての検討は、保存料パラベン類で行い、代謝による AhR リガンド活性、エストロゲン活性の不活性化を見出した。

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

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

研究概要：昨年までのExTEND2005基盤的研究により、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レポーターアッセイ等のインビトロ実験系を用いて解析してきた。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。これらを用いて次のような研究を計画した。

1. レポーターアッセイ等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
2. Liquid Chemiluminescent 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
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

1、2については主に臭素化化合物を用いて甲状腺ホルモン受容体を中心とする核内受容体を介する転写に及ぼす作用を解析する。また、実験動物についてはトランスジェニックマウスやミュータントマウスなど用いて、化学物質投与による生体影響を中枢神経系を中心に解析する。

本研究により、従来毒性が確認されていなかった物質の毒性が判明するとともに、環境化学物質の新たな作用機構が解明される。また、従来より簡便で効率の良いスクリーニング系が確立できる。

研究結果のまとめと考察：レポーターアッセイでは数種の臭素化化合物がTR作用の抑制を示した。作用機構の解析は終了してはいないが、抑制を示した物質のほとんどがLiquid Chemiluminescent DNA Pull Down AssayでTRとDNAとを解離させており、PCBと類似の作用機構で抑制を示していると考えられた。しかし、PCBでは物質によっては 10^{-10} Mから50%近い抑制を示すものがあつたことと比べると最大でも 10^{-8} Mで45%の抑制であり毒性は低いかもしれない。しかし、日本においてPCBが化審法によって特定化学物質に指定されているのに比べ、日本ではPBDEやPBBに関する規制の法律がない。ヨーロッパではWEE指令やRoHS指令により規制が行なわれており、日本でも何らかの規制を行なう必要を感じる。

作用機構という点では、臭素化化合物に限らず、以前から我々が用いているPCBについてもDNAから解離した後の挙動についてはまだ明らかではない。これが一過性のものなのか、細胞内での局在自体が変化するのかはまだ明らかではない。この点については昨年度予算で顕微測光システムを改善したので、本年度中に実施した

い。

今後の課題としてもう一点重要なのは臭素化化合物のエンドポイントである。現在実施している研究は線維芽細胞由来の細胞で、我々の最終的な目標による神経細胞内での作用は明らかではない。今後は初代培養細胞を用いて細胞形態にどのような異常が生ずるのか、および動物モデルを用いて甲状腺ホルモン標的遺伝子の動態を調べると共に最終的にはリアルタイムで神経伝達物質の挙動を解析したい。

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

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

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）や物質輸送に関わる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。

研究結果のまとめと考察：今年度の結果は以下のようにまとめられる。

- 1) カワウの AHR1 遺伝子を用いて構築した *in vitro* レポーター遺伝子アッセイ系により、琵琶湖に生息するカワウ個体群の半数で、肝臓に蓄積したダイキシン類は AHR1 を介して CYP1A5 を誘導していることが示唆された。この結果は、琵琶湖のカワウ個体群で肝臓中の CYP1A5 mRNA 発現量がダイオキシン類蓄積量と有意な正の相関関係を示した我々の過去の報告と矛盾しなかった。
- 2) バイカルアザラシ AHR が CYP1A を転写活性化する TCDD-EC₅₀ 値より、本種のダイオキシン類に対する潜在的な感受性は高いと推定された。また、バイカルアザラシ野生個体群の肝臓中ダイオキシン類蓄積濃度は、AHR を介して CYP1A1 が誘導されるレベルに達していることを示唆した。またこの結果は、バイカルアザラシ野生個体群で、肝臓中の CYP1A1 mRNA の発現量がダイオキシン類蓄積量と有意な正

の相関関係を示した我々の過去の報告と一致した。さらに我々の研究結果は、各野生生物種の AHR 遺伝子を用いて構築した *in vitro* レポーター遺伝子アッセイ系により、対象種固有のダイオキシン類のリスクが評価できる可能性を示している。

- 3) バイカルアザラシに高蓄積している有機塩素化合物は、*in vitro* レポーター遺伝子アッセイ系で本種 PXR を活性化しなかったことから、野生個体群で PXR シグナル伝達系攪乱の可能性は低いと考えられた。
- 4) バイカルアザラシ肝臓では PPAR α を介して CYP4A が誘導されていること、さらに肝臓に蓄積している PFNA や PFDA などの PFCs は PPAR α -CYP4A シグナル伝達系に影響することが示唆された。
- 5) 表面プラズモン共鳴センサーグラムを用いて CAR-SRC-1 の相互作用を測定する系は、CAR の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法として有用であると考えられた。

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

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)、B. Paul-Prasanth

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）や生殖系列系の異常がどのような分子、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分子、細胞レベルで解析する。すでに、我々の研究室では、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。また、メダカ性分化関連遺伝子を解析するためのマイクロアレイ系についても独自に開発、作製している。本研究では、これらを駆使して、性ホルモンや内分泌かく乱化学物質を含む種々の化学物質で処理した稚魚や成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。また、本研究の後半期には、上記の研究を脳についても実施する。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できると期待される。昨年度までに性ホルモンと4-Nonylphenol（ノニルフェノール）、ジエチルスチルベストロール（DES）の影響を解析してきたが、平成19年度は、DESについてさらに詳細な研究（処理の濃度や期間）を行い、DESの影響と作用の分子メカニズムについて考察を行った。また、雌雄生殖腺のそれぞれに発現する性特異的遺伝子マーカーを自身で作製したマイクロアレイを駆使して探索した。

研究結果のまとめと考察：本年度の研究から、XY 稚魚は、1) ジエチルスチルベストロール（DES）に対して高い感受性を示すこと、XY 稚魚における DES の影響は、2) 先ず雄型遺伝子の発現を完全に抑制すること、3) 次いで、雌型特異的遺伝子の発現を誘導することにより、生殖腺は卵巣となり、性転換して正常な雌として機能すると推察される。この際に、DES が雌特異的遺伝子の発現を直接誘導するのか（例えば、DES が芳香化酵素遺伝子の^{上流域}に結合して芳香化酵素遺伝子の発現を誘導し、さらに促進する）、或いは、雄特異的遺伝子（例えば、*dmrt1* 遺伝子）の発現が DES により抑制されることによって、間接的に雌特異的遺伝子（例えば、芳香化酵素遺伝子）の発現が誘導されるのか現在のところ不明である。この点に関して、雄特異的遺伝子発現の抑制が雌特異的遺伝子の発現誘導より時間的に早く起こることが注目され、この時間的なずれから後者の可能性が示唆される。実際に我々が行

った哺乳類の培養細胞を用いたプロモーター解析により。メダカとティラピアで雄特異的遺伝子である *dmrt1* が雌特異的である芳香化酵素遺伝子の発現を強く抑制することを見出している。その場合には、*dmrt1* は転写因子として作用すると考えられるので、この時期の生殖腺で *dmrt1* を発現する細胞と芳香化酵素遺伝子を発現する細胞が同一の細胞でなければならない。

一方、DES の XX 稚魚に及ぼす影響については処理期間の違いで生殖腺の形態が大きく異なった。孵化後 10 日までの処理でも生殖細胞数の減少と雌特異的遺伝子の発現の抑制はわずかに認められたが、孵化後 30 日まで処理されたグループでの生殖細胞数の減少は顕著で、また雌特異的遺伝子の発現も強く抑制された。さらに、この DES の稚魚期における処理時間の長短により、その後 DES を含まない飼育水中で 3 ヶ月飼育した際の卵巢の状態が大きく違っていた。すなわち、いずれの生殖腺も卵巢ではあるが、孵化後 10 日までの処理では正常の雌魚とほぼ同様な性行動を示し、毎日産卵を繰り返した。また、得られた受精卵も正常に発生した。一方、孵化後 30 日まで DES 処理を行った XX 個体の生殖腺は卵巢であるものの、性行動は起こらず、産卵も認められなかった。GSI はきわめて高い値を示し、卵巢中には大型の透明卵が多数認められた。まだ、これらの卵巢の雌特異的遺伝子の発現を解析していないので正確なことはわからないが、おそらく卵形成、卵成熟、排卵、産卵のいずれかの過程が正常に働いていないのではないかと推察される。この点に関し我々は、キンギョとゼブラフィッシュの成熟雌魚で DES が魚類の卵成熟誘起ホルモン (17 β -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン) と同じ作用メカニズムで卵成熟を誘起することを *in vitro* の実験により明らかにしている。このような DES の卵成熟誘起作用が、今回 DES 処理雌個体に見つかった肥大卵巢の出現と何らかの関係があるのかもしれない。

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

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

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。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。

研究結果のまとめと考察：支持細胞の標識化は、難航しているが、新たな対策を講じて進行中である。遺伝子導入メダカの透明系統化は順調に進行している。生殖巣に未分化生殖細胞（始原生殖細胞）が存在す可能性が示唆された。今後、詳細に調査し、真偽のほどを明らかにする必要がある。また、透明メダカ系統を用い、内分泌かく乱化学物質に暴露された、この未分化生殖細胞の運命の検討に興味を持たれる。

Ⅱ. 野生生物の生物学的知見研究

1. 野生生物の生物学的知見研究について

元来生態系に存在する正常範囲の変動や各生物種での正常の状態等についての生物学的知見蓄積は、野生生物の観察において認められた事象を、異変と判断する際に必須である。

よって、化学物質対策の原点である野生生物における異変把握の際に必要な、野生生物に関する基盤的な知見の蓄積を目的とし、「野生生物の生物学的知見研究」を実施した。

生態系への影響を実験によって検証することは困難である。また、わが国では継続的な野生生物の観察が十分行われていないとの指摘がある。このため、まず継続的に生物個体(群)の観察により変化を捉えることが重要である。そこで国内での継続的な野生生物の観察を推進することにより生物個体(群)の変化を捉え、生態系への影響を推定することとした。

2. 平成 19 年度野生生物の生物学的知見研究採択課題及び研究成果

平成 19 年度については下記 2 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

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

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

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。平成17年度までにこれまでに、野生メダカ約6,000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、さらに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、これまでに得られた不一致個体および、新たに得られるもの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。

研究結果のまとめと考察： 本年度の結果から以下のことが明らかになった。

- 1) 野生集団中からはXX雄、XY雌が一定程度存在しているという、従来からの知見が追認された。それらのうちに従来とは異なるタイプの変異体が存在するか否かについては、現在、遺伝解析を進めている。

- 2) 新潟市白根由来の XX 雄の原因遺伝子が sox9 であることを示唆する結果を得た。Sox9 はほ乳類を始め多くの動物で雄分化過程に関与する可能性が示されている遺伝子であるが、多くの例では雄の生殖巣での発現の増強が認められている。しかし、今回の結果は雄に分化する XX 個体の生殖巣で発現の低下が認められている。発現低下後にどのような機構で雄への分化が誘導されるかについてさらに検討が必要である。

- 3) 過去の研究で、メダカで胚時期での高温処理により XX 雄が出現し得ることが確かめられ、また、近交系間で XX 雄の出現率に差があることが判明し、XX 雄の出現については遺伝因子が関与する可能性が示唆されていた。そこで、今回、いろいろな系統のメダカ胚を温度処理し、XX 雄の出現頻度に明確な差が存在することが確かめられ、高温条件により雄への性転換が起こることに関連する遺伝因子について、メダカの種内に多型性が存在することが明らかになった。また、自然状態で XX 雄を生じる近交系である HNI 系統の XX 雄出現に関する遺伝因子を探索して、連鎖群 2, 12 に関連遺伝因子が存在することが示唆された。
つまり、我々が認めている野生集団中の XX 雄の出現に、どの程度温度などの後天的要因が影響を及ぼしているかはさらに検討が必要であるが、少なくとも性決定に関連した遺伝子について、メダカ野生集団内にはかなりの多型性が保持されていることが実験的に示された。温度感受性に関わる遺伝子の所在については今後の課題である。

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

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

研究概要：諏訪湖の湖心と沿岸域で農薬濃度の季節変化を調べたところ、湖心よりも沿岸域の濃度が高く、農薬が沿岸から沖帯にかけて拡散していることが示唆された。しかし、沿岸域の水草帯の中は濃度が低く、他の水界と環境が異なることがわかった。

ミジンコを用いた諏訪湖水のバイオアッセイは、湖を汚染する農薬がミジンコの遊泳を顕著には阻害していないことが示された。しかし、その一方で、農薬濃度の低い夏期の湖水に曝したミジンコの遊泳阻害率が高くなった。このことから、農薬以外のもので、ミジンコの遊泳阻害を起こすような要因が存在することが示唆された。

ミジンコ個体群が増殖期、ピーク期、安定期にあるときに産み出された仔虫の殺虫剤耐性を調べた結果、ピーク期の仔虫が最も殺虫剤耐性が低かった。母個体の状態が個体群の趨勢に応じて変化し、それが仔虫に影響したものと考えられた。また、個体群のピーク時は、個体群が最も殺虫剤影響を受けやすい状態にあることが示唆された。

ミジンコの仔虫や成体の密度を変えて飼育し、その飼育水（ミジンコの情報化学物質が含まれている）を用いて新たなミジンコ仔虫を飼育し、その生活史特性を調べ、また実験個体が産んだ仔虫の殺虫剤耐性を調べた。その結果、高密度の飼育水で育てたミジンコの成長が遅延した。その個体から生まれた仔虫の殺虫剤耐性は、仔虫水飼育個体で低下し、成体水個体で上昇した。個体群密度が高いときのミジンコ個体から放出される情報化学物質が、ミジンコに影響を与えたものと考えられる。

耐久卵から生まれたミジンコ個体（両性生殖雌）と、自由遊泳個体のミジンコから生まれた個体（単為生殖雌）の体成長と殺虫剤耐性を調べた。その結果、耐久卵孵化個体は単為生殖個体よりも小さく生まれ、大きく育つことが示された。一方、殺虫剤耐性は単為生殖個体よりも低く、耐久卵孵化個体は殺虫剤の影響を受けやすいことが示された。

研究結果のまとめと考察：8月に諏訪湖の流入河川水中の農薬濃度を調べた結果、殺虫剤、除草剤、殺菌剤が検出されたが、優占農薬、およびその濃度は川によって大きく異なった。一方、諏訪湖湖心と沿岸域の湖水中の農薬濃度の季節変動を追ったところ、濃度は、流入河川の有無に関わらず沿岸域の方が湖心よりも高かった。このことは、沿岸域の生物群集がより高い農薬濃度に曝されていることを示唆する。しかし、沿岸域に発達した水草帯（ヒシ帯）では、濃度は湖心よりも低かった。これには、水草帯で水が滞留していること、また農薬が分解されやすい環境がつけられていることが影響していると考えられた。湖沼の沿岸域は、水草が分布すること

によって、汚染農薬の濃度分布がかなり不均一になっているものと思われる。これまでの研究で、水草帯には、水草という構造物があることで様々な微環境がつくられ、またそれに依存して様々な生物種が生息していることが明らかにされてきた。一方で、沖帯と水草帯に分布するミジンコを用いた毒性試験では、水草帯のミジンコが明らかに高い殺虫剤耐性を持っていることが示された。このことは、沿岸帯の生物は沖帯の生物よりも高濃度の、または高頻度で、有毒物質に曝されていることを示唆している。今後、水草帯における有害化学物質と生物群集との関わりの解明が重要な課題となりそうだ。

これまでの研究では、ミジンコが捕食者の放出する情報化学物質に反応して食われ難くなるように形態変化をするなど、捕食者—被食者間のケミカルコミュニケーションを解明し、そのケミカルコミュニケーションに及ぼす殺虫剤の影響を調べてきた。今回の研究では、ミジンコが同種個体間でケミカルコミュニケーションを行っており、それがミジンコ個体の殺虫剤耐性に影響を与えることが示された。湖水中の生物たちは、個体群内（同種個体間）、捕食者—被食者間、競争者間、等々、様々な生物間でケミカルコミュニケーションを行っている様子が見えてきた。そして、そこに殺虫剤などの有害化学物質が影響を与えている可能性が示唆された。今後は、生物群集の維持要因としてのケミカルコミュニケーションの解明と、それを攪乱する有害化学物質の影響評価をさらに進める必要があるだろう。

本研究では、耐久卵孵化個体の方が単為生殖個体よりも殺虫剤耐性が低いことが実験的に示された。これは、耐久卵孵化個体は春先の環境条件の良い時期に現れ、急速に個体群を大きくするという戦略をとっているため、ストレス耐性を犠牲にしていると理解できるだろう。そうであるとすると、人間活動によって、春先に湖沼が有害化学物質で汚染されることになると、ミジンコ個体群に大きなダメージを与える可能性が考えられる。越冬した個体が春になって個体群を大きくする生物は多いので、これはミジンコ個体群だけではなく、多くの生物個体群にあてはめられることかもしれない。また、ミジンコ個体群の増殖時期、ピーク時期、安定期と、異なる個体群趨勢のときに、その個体群を構成する個体の殺虫剤耐性が変化することが示された。これらのことを総合すると、野外に生息する生物は、環境の変化に応じて個体群の状態が変化しており、それに伴って有害化学物質に対する個体群の耐性が変化しているといえる。それを明らかにしていくことで、生態系の中での生物個体群、さらには生物群集に及ぼす有害化学物質の影響をより良く評価できるようになると期待される。

Ⅲ. フィージビリティースタディー

1. フィージビリティースタディーについて

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した。

2. 平成 19 年度フィージビリティースタディー採択課題及び研究成果

平成 19 年度については下記 6 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. (FS 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

課題 2. (FS 2) アカトンボ減少傾向の把握とその原因究明

課題 3. (FS 3) ステロイド膜受容体を標的とした化学物質の内分泌かく乱作用に関する研究

課題 4. (FS 4) 精子に存在するホスホリパーゼ A₂ 活性の阻害を介した環境化学物質の新たな内分泌かく乱作用機構に関する研究

課題 5. (FS 5) シャジクモ類の衰退要因解明に向けた環境負荷化学物質の影響に関する生理・生態学的研究

課題 6. (FS 6) 両生類の野外および室内飼育における精巣卵の消長

基盤的研究フーズ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

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、李政勳
北九州市立大学大学院 国際環境工学研究科 : 門上希和夫

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、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。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 (サメ・エイ類) とスズキは増加しているが、それはなぜか、の3つが着眼点である。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。その一環として、昨年度と同様に、今年度も東京湾 20 定点調査を継続し、底棲魚介類の代表種 (シャコ及びマコガレイ) の生活史特性の解析と、貧酸素水塊の影響解析を行なった。

2007 年の 20 定点調査の結果は、総じて、前年までと変わりがなかった。すなわち、CPUE について、個体数ベースでは依然として低水準、重量ベースでは大型魚類の寄与による高水準が続いた。また、近年、種数の経年的減少傾向が窺われた。アズマニシキガイの顕著な増加が見られたものの、漁業者による自主的な禁漁が 2 年以上続いているシャコの回復が弱く、甲殻類の減少が目立った。軟体動物も、総じて低水準であった。魚類は、板鰓類とスズキ、テンジクダイを除いて、前年よりもさらに減少するなど低水準のままであった。板鰓類では、ホシザメが減少傾向にあるかもしれない。また、従来、内湾南部から湾外にかけて生息していたコモンカスベが内湾全域に分布を拡大させている可能性がある。多変量解析による期間区分の結果、近年、東京湾の底棲魚介類相が大きく変化したことが強く示唆された。

2005 年の 20 定点調査データを用いて、底棲魚介類群集の空間分布および水質項目の季節変化を明らかにし、両者の関係を多変量解析により調べた。底棲魚介類の種数、個体数、重量、多様度指数はいずれも、2 月から 5 月にかけて高く、8 月に低下するという季節的なパターンがみられた。個体数 ($P < 0.05$) と重量 ($P < 0.01$) において、5 月と 8 月の間に有意差が認められた。生物の空間分布に影響する環境因子を BIO-ENV 解析 (Clarke & Ainsworth 1993) で調べた結果、8 月においては底層 D0 のみ、10 月には底層塩分、底層 D0、水深が抽出された。また、Classification and

regression tree (CART)解析により、生物が存在する底層酸素濃度の閾値は $1\sim 2\text{ml L}^{-1}$ と推定された。

東京湾産シャコ *Oratosquilla oratoria* について、雄の成熟段階を定義した上で、雌雄の生殖周期および交尾期について明らかにした。その結果、雄は着底後体長 4 cm 以上に達した当歳の個体から成熟を開始した。一方、雌は産まれた翌年に体長 7 cm 以上に達した個体から成熟を開始した。雄はほぼ周年成熟状態にあるが、交尾は雌が成熟して産卵可能となる期間にのみ行われることが示唆された。一方、加入の成否を規定する生活史段階を明らかにすることを目的として、初期生活史（産卵、幼生、着底）に関するフィールド調査を実施した。その結果、浮遊幼生期から着底までの間の生残が、着底量を規定すると示唆された。

東京湾におけるマコガレイの資源量水準低下に伴う摂餌生態と成長の変化を調べた。その結果、資源が低水準の 2000 年代は、80 年代の資源高水準期より成長がよくなった。一方、近年の胃内容物重量指数は、80 年代よりも有意に低下していた。空胃率に有意差はなかった。また、摂餌生態の指標である %W、%F ならびに RI について、80 年代と顕著な差が見られた。80 年代には環形動物が優占したものの軟体動物や棘皮動物も観察されたが、近年はほとんど環形動物のみで占められ、軟体動物や棘皮動物が顕著に減少した。

一方、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、942 種の化学物質の同定と定量を行なった。その結果、120 物質を検出した。総検出濃度は、乾重量換算で $5.22\sim 49.9\text{mg/kg dry wt}$ (平均 20.8mg/kg dry wt) と地点間で最大 10 倍の差があり、湾口が低かった。検出濃度と TOC には正の関係がみられ、TOC 換算では $661\sim 2,108\text{mg/kg TOC}$ (平均 $1,031\text{mg/kg TOC}$) と地点間の差は 3 倍まで縮まったが、東京港から袖ヶ浦にかけて高い傾向が見られた。検出物質を発生源分類した結果、主要な発生源は家庭や商業活動によるもので工業由来の寄与率は 1~2 割であった。特に、高濃度で検出されたのはステロイド類であり、湾周辺の人口の影響を強く反映した結果と考えられた。

研究結果のまとめと考察：東京湾の 18 地点で採取した底質を対象に 942 種の化学物質を調査した。その結果、120 物質を検出した。総検出濃度は、乾重量換算で $5.22\sim 49.9\text{mg/kg dry wt}$ (平均 20.8mg/kg dry wt) と地点間で最大 10 倍の差があり、湾口が低かった。検出濃度と TOC には正の関係がみられ、TOC 換算では $661\sim 2,108\text{mg/kg TOC}$ (平均 $1,031\text{mg/kg TOC}$) と地点間の差は 3 倍まで縮まったが、東京港から袖ヶ浦にかけて高い傾向が見られた。検出物質を発生源分類した結果、主要な発生源は家庭や商業活動によるもので工業由来の寄与率は 1~2 割であった。特に、高濃度で検出されたのはステロイド類であり、湾周辺の人口の影響を強く反映した結果と考えられた。

基盤的研究フーズ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

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)

京都教育大学 動物生態学：松良俊明

宮城大学 食産業学部：神宮字寛

愛媛大学 農生態学：日鷹一雅

国立環境研究所：五箇公一

研究概要：近年、アキアカネをはじめ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考えられる。しかし、アキアカネなど水田依存性の高いアカトンボ類は一般に移動性が高く、広い範囲を飛び回る傾向が強いため、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定量的に明らかにすることを目的とする。また、市民、農民、トンボ研究者によるモニタリング体制を構築し、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とともに、アカトンボ類保全のための普及啓発活動を行う。

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。水稻に使われる育苗箱施用殺虫剤類は浸透した植物での残留性は高いが、水・土壌などでの分解速度が大きいので、環境への負荷が少ない理想に近い農薬であると考えられている。しかし、長期間にわたる効果を持続させるため使用量が多く、一時的に田面水中で高濃度になる可能性がある。アカトンボ類については（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（間接効果）、（３）ミジンコ類、ユスリカ類など餌生物に対する殺虫効果による餌不足（間接効果）などによって影響を及ぼす可能性がある。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。

さらに、これら複数の要因が同時に働いている可能性も大きいいため、さまざまな条件の圃場における年間を通じた調査を行うことで、それぞれの要因のアカトンボ類減少に対する相対的寄与率を明らかにする。

研究結果のまとめと考察：

1. 減少傾向の把握と個体数モニタリング法の確立

石川県野々市町で実施した同一水田からのアキアカネ羽化数調査の結果、羽化数は18年前の約1/100であった。また、同じく石川県白山で行われた夏季のアキアカネ個体数センサスでも8年前の調査に比べて著しい減少が確認された。もちろん、2008年以降も同様の調査を行い、個体数減少が2007年に限ったものでないことを示す必要があるが、今回の結果は、昨年度報告したトンボ研究者の印象によって得られた傾向を、定量的に裏付けるものである。赤とんぼネットワーク会員による全国的な調査では、100m当たりのアキアカネ個体数が0か1以下であることという結果が大半を占めた。比較する過去のデータはないが、多くのトンボ研究者にとっては信じがたい密度であることは間違いない。また、この調査により、アキアカネの減少の程度に地域差があり、北陸地方で現象が著しいことが明らかになった。いっぽうで京都市では、熱心な会員の継続的な調査によりある程度の密度のアキアカネが確認され、必ずしも減少していないことを伺わせる結果が得られた。また東京都日野市では1996年以降大きな個体数の減少がないことも会員の津吹卓の調査によって示された（津吹卓、2008 Symnet 10:13-14）。今のところ稲作地帯である北陸などで減少が著しく、東京や神奈川、京都など都市部での減少が目立たないという大まかな傾向が浮かび上がってきているが、今後データの蓄積が進めば、よりいっそう地域差が明瞭になってくるものと期待される。2000年以前の過去の定量的データの発掘は今後も進めて行く予定であるが、その成果はあまり期待できそうもなく、現時点での地域差を明瞭にすることが、減少原因の特定の手がかりになると考えている。

全国トンボ市民サミットのアカトンボ調査への2007年度の参加数はあまり芳しいものではないとのことである。全国トンボ市民サミットでは、今後も普及啓発活動に力を入れていく方針であり、アカトンボ類の減少傾向が全国的に明らかになり、市民に周知されていくに従い、調査参加者も増加していくものと期待される。そのためにも、調査方法の改善などは今後も協力して進めていきたいと考えている。学校プールを使ったモニタリング調査の試みも、残念ながら順調にいったいとは言い難い。学力低下が指摘され、ゆとり教育の見直しがされるなど、教育現場の情勢の変化が、一時ほどヤゴ救出活動に参加する学校が増えない理由の1つと考えられる。また、学校現場でのヤゴ救出活動は特定の教師に依存することが多く、その教師の転勤などで取り組みが中止になる例も多いとのことである。このように現状では、同一小中学校での長期的・継続的なモニタリング調査はあまり期待できないように思われる。また、経験者からの情報によると、プールでアカトンボ幼虫が多数確認されるにもかかわらず、秋にプールで産卵している成虫を見ることは非常に稀であるという。これが事実であれば、アカトンボ類の1回の産卵数は比較的多い方であることから、プールで発見される幼虫は、ごく少数の成虫が産卵した結果である可能性が高い。そうであるならば、学校プールの幼虫数からその地域のアカトンボ類の個体数をモニタリングすることは難しいことになる。このように、学校プールを使ったモニタリングについてはさまざまな問題があり、今後どうするか対応を検討中である。学校プールのアカトンボ幼虫は、とりわけ都市部の児童生徒にとってア

カトンボ類に触れる数少ない機会であることから、モニタリング調査という当初の目的は別として、今後もヤゴ救出ネットワークなどの活動をサポートしていく必要があるのではないかと考えている。

農家によるトンボ調査は、減少原因の究明という点でも期待した以上の成果を上げることができたと理解している。現時点で、昨年参加した農家のほとんどから2008年度も参加する意志を確認しており、現在、その準備を行っている。全国的な展開としては、今年度は神宮字が宮城県でもJAの協力により実施する予定で準備を進めている。

アカトンボ類の減少原因としての農薬の影響が明らかになったとしても、農民の協力が得られなければ、実行力のある対策を講じることはできない。それゆえ、農家によるトンボ調査を通じて農民自身の意識を高めていくことは必要であり、全国的な展開になるよう普及啓発を行っていききたい。ただ、個別の農家との対応は、多大な時間と人力を必要とするため、経費的な裏付けが得られない状態では全国的に規模を拡大することが難しいのが現状である。

2. 減少原因の究明

実際の圃場の水管理を再現したライシメータを使った実験から、フィプロニルとイミダクロプリドを有効成分に含む箱施用浸透性殺虫剤がアキアカネの幼虫生存率および羽化におよぼす影響が明らかになった。特にフィプロニル区での幼虫個体数の減少は著しく、羽化個体はまったく確認できず、フィプロニルを有効成分とする箱施用殺虫剤の使用がアキアカネ幼虫の大きな減少を招くことが示唆された。また、その減少がごく初期に生じていることから、餌不足などの間接効果ではなく、直接的な致死効果によるものと推察される。イミダクロプリド区では、若齢幼虫初期の死亡率がフィプロニル区と比較して小さく、羽化に至る個体も確認できた。しかし、羽化数は無処理区の半数であり、幼虫の平均成長率および成虫の後翅長が無処理区よりも低下し、羽化異常を示す個体の割合が無処理区に比べて有意に大きい値を示した。ミニ水田を使った実験からイミダクロプリドはミジンコ類などに対して強い殺虫効果を持ち、いわばドミノ倒し的な相互作用によって生態系全体に大きな影響を及ぼすことが五箇公一らによって示されており (Sanchez-Bayo, F., and Goka. K 2006 *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25**, 1677-1687)、フィプロニルとイミダクロプリドでは、アカトンボ類幼虫に対する作用の仕方がかなり異なる可能性がある。フィプロニルについても、水田生態系に対する影響の仕方を明らかにする必要はあるが、これは今後の課題である。

実際の水田においても、石川県で実施した農家によるトンボ調査の結果、育苗箱施用浸透性殺虫剤を使用した水田からのトンボ類の羽化が著しく減少することが明らかになった。石川県ではフィプロニルが主に使われており全体の8割を占めた。フィプロニルを使用した水田からも、ごく少数の水田でトンボの羽化が見られたが、いずれもウスバキトンボであった。ウスバキトンボは日本では越冬できず、毎年南方から移入してくることが知られている。幼虫期間は1、2ヶ月と非常に短いことが知られており、今回の調査では7月に羽化が見られたが、これらの個体は、田

植え後に産卵された卵からかえった幼虫（すなわち高濃度のフィプロニルに暴露されなかった幼虫）が羽化したものと考えられる。一部の農家はパダン粒剤（カルタップ）を箱施用剤として使っていたが、フィプロニルより多い17%の水田からトンボの羽化が認められた。羽化殻が確認されたのは上記ウスバキトンボに加えて、オオシオカラトンボも含まれていた。この種は幼虫で越冬することから、幼虫がカルタップの暴露に耐えて生き残ったものと考えられる。また、調査期間中には確認できなかったが、調査開始以前にカルタップ使用田からアキアカネの羽化が認められており（写真による判定）、アカトンボ類も羽化していた可能性が高く興味深い。この点については、2008年に1週間調査開始時期を早めて確認する予定である。実験室内での試験報告（嶋田ほか 2003 埼玉県環境科学国際センター報 3:94）によれば、アキアカネ幼虫に対してカルタップはフィプロニル以上の殺虫効果を示しており、アキアカネが羽化していたとすれば、室内実験だけでは予測できない現象が実際の圃場では生じている可能性があり、そのような観点から詳しい調査を進める必要性のあることを示唆している。

これまでの調査研究からアカトンボ類の最近の急激な減少において育苗箱施用浸透性農薬、とりわけフィプロニルの影響が大きいことが徐々に明らかになってきたが、アカトンボ類の減少は長期的にも生じていると考えられ、特定の農薬による単一の要因に帰するわけにはいかない。また、フィプロニルを使用しない水田であってもアカトンボが羽化しない水田も多くあり、考えられる要因について総合的に検討していくことが必要だと考えている。そのため、秋の産卵から羽化に至る水田利用の全課程を、個別の水田の特徴を把握しながら詳細に追跡していく試みを昨年からは始めている。圃場整備に伴う乾田化の影響もその一環として捉えることを試みている。また、繁殖場所である水田以外の環境変化も考えていく必要があり、とりわけ夏季に高地へ移動する習性があるアキアカネについては、地球温暖化に伴う越夏場所の縮小・消失も検討する必要がある。この問題については、すでに別プロジェクトで検討している所である。また、温暖化に伴ってアカトンボ類の羽化時期が早くなっている可能性もあり、農家によるトンボ調査でのアカトンボ類の羽化数が過小評価になっている可能性は否定できない。その点については、2008年度に早急に確認したい。それとともに、ウスバキトンボの水田利用が早期化している事実も、これまでの調査から浮かび上がってきており、水田生態系における強力な競争種、捕食種として、アカトンボ類に及ぼす影響を把握する必要があるという課題も明確になってきた。

基盤的研究フーズビリティースタディー研究課題 (F S 3) : ステロイド膜受容体を標的とした化学物質の内分泌かく乱作用に関する研究

研究者：静岡大学 理学部：徳元俊伸(代表研究者)

研究概要：魚類の最終卵成熟過程においては、まず黄体形成ホルモン (LH) が卵濾胞組織に作用し、ステロイド性の卵成熟誘起ホルモン (17, 20 β -DHP) が作られる。17, 20 β -DHP の作用により、卵成熟が誘起され、受精可能な卵へと成熟する。17, 20 β -DHP は、通常の核内受容体に作用するステロイドホルモンとは異なり、卵膜上に局在するステロイド膜受容体分子に作用し、比較的短時間でおこるノンゲノミック反応を誘導する。

代表研究者らは内分泌かく乱物質の一種であるジエチルスチルベストロール (DES) が魚類の卵成熟を誘起することを発見し、さらにその標的分子が、ステロイド膜受容体であることを明らかにした。さらに、DESをサカナの生体に作用させた場合にも卵成熟を誘起することを示した。これらの結果は、内分泌かく乱物質の新しい作用を示したばかりでなく、その標的分子を明確にした点で注目すべき知見である。従来までの多くの研究により内分泌かく乱物質が核内受容体を介したゲノミック作用を引き起こすことが明らかにされてきたが、これらの結果はノンゲノミックな急性的作用をもかく乱することを示している。これまでプロゲステロンの麻酔作用の発見に始まり、性ステロイドがノンゲノミック反応を起こすことは多くの報告がなされてきたものの膜受容体の分子同定がなされてこなかったため、基礎研究としてもノンゲノミック反応はほとんど進められていない。よって、この反応に対する内分泌かく乱物質の影響評価はほとんど報告が無い。膜受容体が明確になり、また、それを標的とした内分泌かく乱作用の実例が示された今、より広範な解析が進められるべきである。本研究では既に確立された培養細胞を用いた実験系により、多くの化学物質群について膜受容体を介したノンゲノミック反応に与える影響を評価する。一方、より実用的な試験法として膜受容体分子を用いた新たな方法の確立を目指す。本研究により化学物質のノンゲノミック作用がどの程度の危険性をもったものなのか明らかになる。さらに、簡便な評価法が確立されれば、日々増え続ける化学物質の中からより安全な物質を選定できるようになると期待される。

研究結果のまとめと考察：本年度の研究により内分泌かく乱作用を有すると疑われる 65 物質の中にも mPR、mER に作用するものが存在することが明らかになった。mER についてはより詳細な解析はまだ実施できていないが、mPR については天然のホルモンとほぼ同等の濃度で作用するものも見つかった。これらの物質については今後、インビボの実験により、短期暴露や長期暴露した場合の環境中での作用濃度を検証してその危険性の評価を目指す。mPR、mER に作用する物質群の内、同じ物質は 1 物質のみでほとんど重複が見られなかったことから、これらの受容体分子のステロイド選択性と同様、作用する化学物質も異なることがわかった。今後は作用の明らか

になった物質の構造からステロイド膜受容体の結合部位を推定するなどしてどのような化学物質がこれらの膜受容体をターゲットとするのか予想を立てながら 65 物質以外の化学物質についても活性評価を行い、作用物質群を選定する。

基盤的研究フーズビリティースタディー研究課題 (F S 4) : 精子に存在するホスホリパーゼ A₂ 活性の阻害を介した環境化学物質の新たな内分泌かく乱作用機構に関する研究

研究者：昭和大学 薬学部：原俊太郎(代表研究者)、桑田浩
昭和大学 遺伝子組み換え実験室：武富芳隆

研究概要：本研究では、環境化学物質が、精子に存在するホスホリパーゼA₂ (PLA₂) を阻害することにより、精子の受精能を抑制し、その結果、内分泌かく乱作用を示す可能性を明らかとすることを目的とする。

PLA₂は膜リン脂質より脂肪酸およびリゾリン脂質を生成する酵素であり、PLA₂としてこれまでに20種類以上のアイソザイムが同定されている。哺乳類のPLA₂のアイソザイムはその構造や性状により、分泌性PLA₂ (sPLA₂)、細胞質型PLA₂ (cPLA₂)、カルシウム非依存性PLA₂ (iPLA₂) に大別されるが、精子にはこのうちsPLA₂の多くのアイソザイムが高濃度存在し、これらが受精反応、特にアクロソーム反応に深く関与することが示されている。最近になり代表研究者らは、PLA₂活性を阻害することが報告されていた、フタル酸エステル類の代謝産物の1つ、MEHP (mono(2-ethylhexyl)phthalate) が*in vitro*における精子の受精能を抑制することを見出した。環境化学物質の中には脂溶性が高く、脂質代謝酵素であるPLA₂の活性に影響を与えると考えられるものが少なくない。そこで、本研究では、精子に存在するsPLA₂が、環境化学物質の内分泌かく乱作用の標的となる可能性を考え、この可能性を実証することを目的とする。環境化学物質のsPLA₂の各アイソザイムに対する阻害活性ならびに*in vitro*の精子の受精能への影響の間に、相関が見られるかについて解析し、精子に存在するどのsPLA₂アイソザイムが標的になりうるかについて検討する。環境化学物質のsPLA₂に対する阻害活性が受精能への影響と相関を示せば、より簡便な新たな内分泌かく乱物質のスクリーニング系の構築にもつながる。環境化学物質の雄性生殖に対する影響は、主に*in vivo*における精巣の形態や産仔数への影響から従来検討されてきたが、本研究では、従来の方法で見落とされてきた物質の毒性の発見につながることも期待できる。

以上のことをふまえ、本年度は、MEHPが*in vitro*における精子の受精能を抑制するメカニズムについて検討した。その結果、

- 1) 精子に存在するsPLA₂アイソザイムのうち、X型sPLA₂が受精の過程で重要な役割を果たすこと
- 2) MEHPは、このX型sPLA₂によるリゾホスファチジルコリンの産生を阻害することで、受精段階のアクロソーム反応を抑制し、その結果*in vitro*の受精能に影響を及ぼすこと

を明らかにした。

今後は、本年度に引き続き、フタル酸エステル類以外のPCBやビスフェノールA、ノニルフェノールといった代表的な環境化学物質の、X型sPLA₂阻害活性およびマウス

精子の受精能への影響を検討し、阻害活性と受精能への影響との関係に相関が見られるか、検討するとともに、X型sPLA₂が精子の受精能を調節する機構についてもより分子のレベルで解析し、X型sPLA₂阻害活性の測定が毒性評価に応用できないか、検証する。さらに、精子においてヒト型PLA₂を発現するマウスの作製を行い、ヒトにおける毒性の予測も行う予定である。

研究結果のまとめと考察：これまでの解析により、マウス精子には、膜リン脂質より脂肪酸およびリゾリン脂質を生成するPLA₂の多くのアイソザイムが存在することが示されてきたが、X型sPLA₂に対する抗体やX型sPLA₂の阻害剤が*in vitro*における精子の受精能を抑制することから、これらアイソザイムの中でも、精子先端のアクロソーム部位に局在するX型sPLA₂が受精反応において重要な役割を果たすことが示唆された。また、この抗体や阻害剤による受精能の抑制がリゾホスファチジルコリン添加により回復すること、阻害剤がアクロソーム反応を抑制することから、X型sPLA₂が触媒する酵素反応により生成するリゾホスファチジルコリンが受精段階のアクロソーム反応を正に制御している可能性が考えられた。X型sPLA₂はその一次構造からプレプロ配列をもつことが予想され、チモーゲンとして分泌されプロテアーゼで切断されることにより活性化されると考えられる。一方、アクロソーム反応の過程ではアクロシンをはじめ様々なプロテアーゼが精子より分泌されることが知られている。おそらくアクロソーム反応の過程で、不活性型で分泌されたX型sPLA₂がプロテアーゼにより分解され活性化され、リゾホスファチジルコリンの生成を介し、他の様々な酵素と協調的に作用するものと考えられる。今後は、アクロソーム反応におけるX型sPLA₂の活性化機構、活性化されたX型sPLA₂がアクロソーム反応を制御する機構について、より詳細に解析する計画である。

さらに、本研究において、フタル酸エステル類の代謝産物の1つMEHPが、このX型sPLA₂活性の阻害を介して、*in vitro*における精子のアクロソーム反応および受精能に影響を及ぼす可能性が示唆された。フタル酸エステル類の雄性生殖に対する影響は、これまで*in vivo*における精巣の形態への影響について解析が進められてきた。MEHPの代謝前駆体であるDEHPについても、ラットやマウスといったげっ歯類に高濃度投与すると精巣が萎縮するものの、霊長類であるマーモセットに投与しても影響がなかったという報告がある。しかし、これまでの方法ではその雄性生殖毒性が見落とされてきた環境化学物質も存在する可能性も考えられる。実際にMEHPの雄性生殖毒性についての報告はこれまでほとんどなかった。本研究の結果から、環境化学物質の安全性を考えられる上では、*in vitro*における精子の受精能に対する効果を検討する必要があることが示唆された。

また、MEHP以外の環境化学物質の中にも、このX型sPLA₂活性の阻害を介して受精能に影響を及ぼす物質が多数存在する可能性が考えられる。今後、様々な環境化学物質について、X型sPLA₂の阻害活性と*in vitro*における精子の受精能への影響との関連を示すことができれば、X型sPLA₂の阻害活性を指標とした新たな雄性生殖毒性の評価系の構築につながる可能性が期待できる。

基盤的研究フェージビリティースタディー研究課題 (F S 5) : シャジクモ類の衰退要因解明に向けた環境負荷化学物質の影響に関する生理・生態学的研究

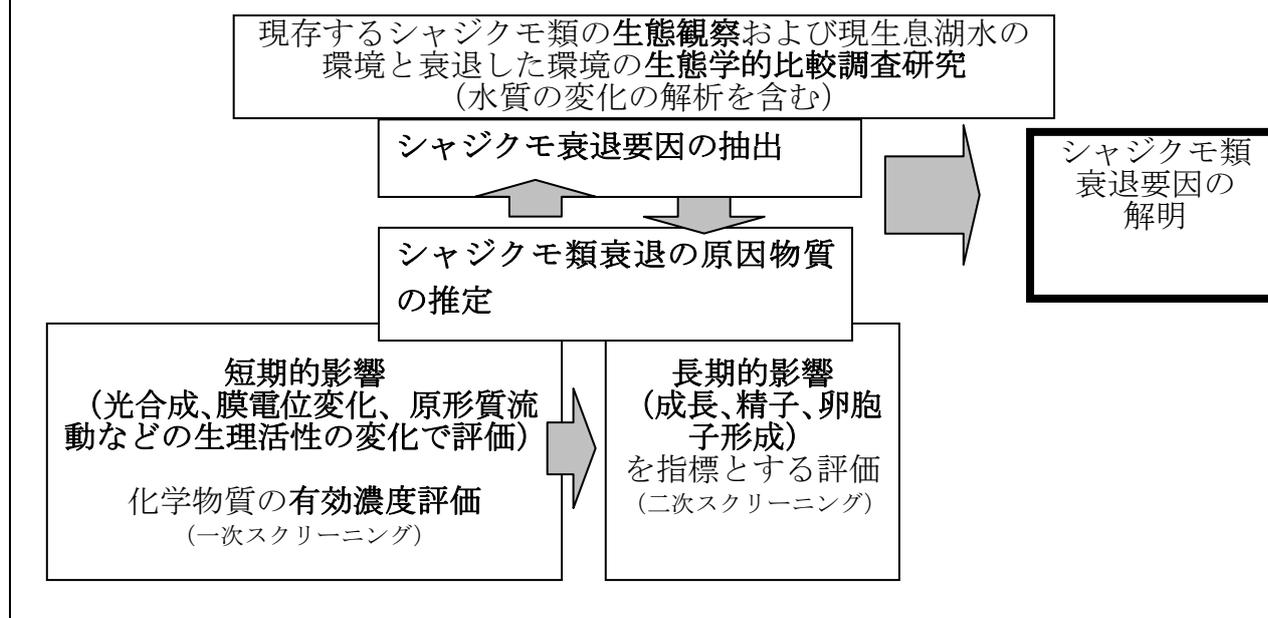
研究者：筑波大学大学院 生命環境科学研究科：白岩善博(代表研究者)

兵庫県立大学 生命理学研究科：新免輝男

国立環境研究所：笠井文絵

研究概要：

- ・ 野生絶滅種・絶滅危惧種シャジクモ類に対する農薬、栄養塩、内分泌かく乱物質等の環境負荷化学物質の影響を、光化学系 II 活性、光合成酸素発生活性、細胞膜電位の測定、原形質流動、長期の成長、精子、卵胞子形成について解析する。
- ・ シャジクモ類の生態観察および生育状況の調査を行ない、環境要因、周辺環境の変化に伴う影響について解析する
- ・ 生理実験並びにフィールドでの生態・生育状況の調査の結果から、シャジクモ類衰退の原因、原因物質を特定する。



研究結果のまとめと考察：本年度の研究は、1) 光合成光化学活性に対する多種の農薬の影響を網羅的に調べる生理学的研究、2) 原形質流動を指標としてプロモキシニルという特定の農薬・除草剤の影響を調べその作用機作を解明する生理学的研究、3) シャジクモ類の生育状況の調査と農薬使用、生育環境について研究する環境科学的研究を同時進行させ、環境変化に対するシャジクモ類の応答についての解析を行った。シャジクモ類衰退原因の解明にはこのような複合的な研究連携が必要であり、徐々に成果が出ているものと考えられる。

シャジクモの光合成 (光化学 II 活性) に対する各種農薬の影響は、その阻害効果を発揮するのに非常に高い濃度 (野外の農薬の濃度の 1,000 倍以上) を必要とする

ことが3種のシャジクモ種において確認された。これらの結果は、シャジクモの成長阻害に対して、今回試験した一般的に使用される農薬が短期的に阻害効果を示す可能性は低いことを示している。しかし、今回新たに見出されたこととして、野外採取のカタシャジクモ個体の農薬感受性が実験室での培養株より高まり、その1/100低い濃度でも光合成が阻害されることが明らかとなった。

FluoroCamによる蛍光測定による光化学測定は、極短時間での光合成に対する農薬影響をより多くの農薬に対してスクリーニングするための方法として導入したものである。したがって、今後、この方法によって影響がみられたシャジクモ類と農薬との組み合わせについて、光合成のCO₂固定系を含む活性（光合成酸素発生速度としてモニターする）、実験室での培養実験による成長や孢子形成に対する長期的影響について試験する必要がある。これらの影響に対する農薬の濃度効果を調べることによって、長期的な側面から農薬がシャジクモ類の衰退に対して与えた影響についての考察が可能となる。

除草剤は文字通り植物を駆除する薬剤であるが、除草作用、すなわち植物体の死、をどのようにして判定するのかについては明らかではない。実際に高等植物を用いて除草剤の効果を報告している論文においても、植物体が死んだという判定基準は明らかではない。生物の単位は細胞であり、細胞レベルで解析することが勧められる。シャジクモ類は細胞が大きく、いろいろな解析に有利である。事実、膨圧の消失ということで、明確に細胞死を判定できる。さらに、シャジクモ類において、原形質流動の研究が最も進んでいる。原形質流動の速度を解析することにより、細胞内ホメオスタシスの状態を容易に、しかも定量的に把握できる。その利点を活かし、短時間でプロモキシニルの影響を定量的に解析できた。今回の解析において、プロモキシニルが細胞内酸性化により、細胞死を誘導することが示された。細胞内酸性化を介した除草剤による細胞死誘導の報告はこれが初めてであると思われる。

過去の生育記録や、地形、周囲の土地利用などの整理から、特に平野に位置する大規模ため池では、過去にシャジクモ類の生育記録があるが、現在は生育していない地点が多いことがわかった。また、現時点では、何がシャジクモ類の衰退原因か推測できないが、SS、クロロフィル量、栄養塩濃度に差がないにも係らず、シャジクモ類の生育の有無が分かれるため池があり、それらは、他の環境要因がシャジクモ類の有無に係っている可能性が示唆される。これらに化学物質が含まれる可能性があるかどうかについて、今後、現場の除草剤濃度を測定し、検討する必要がある。

基盤的研究フーズビリティースタディー研究課題 (F S 6) : 両生類の野外および
室内飼育における精巣卵の消長

研究者：広島大学大学院 理学研究科：高瀬稔(代表研究者)
横浜市立大学 内分泌学：佐藤友美

研究概要：環境省の平成11～15年度「内分泌かく乱化学物質による野生生物影響実態調査結果」によると、トノサマガエルおよびトウキョウダルマガエル、ツチガエルにおいて精巣卵が報告されている。世界標準の両生類実験動物であるアフリカツメガエルの幼生への暴露実験では、生殖腺分化に対する内分泌かく乱化学物質影響が精巣卵形成として認められることが報告されている (Kloas *et al*, 1999; Levy *et al*, 2004)。しかし、影響が見られないとの反証もある (Pickford *et al*, 2003)。また、トノサマガエル成熟個体に内在性エストロゲンを投与した場合、精巣卵形成の誘導が抑制されることが報告されている (佐藤と岩沢、1969)。さらに、両生類では種により正常な発生・分化過程において、精巣卵が見られることが知られている。従って、両生類の精巣卵は環境影響評価指標としてまだ確立したものではなく、正常な生殖腺の分化・発達および精巣卵形成への性ホルモン関与の有無など、精巣卵に関する基礎的な知見をさらに蓄積する必要がある。本研究は、野外環境および性ホルモン様物質の人為的暴露による両生類の精巣卵形成への影響について調べることを目的としている。先の環境省による実態調査において、地方により精巣卵の出現率が異なるトノサマガエルに注目した。そこで最初に、先の報告書において精巣卵が観察されなかった広島県の野外トノサマガエルを採集し、化学物質影響が少ないと思われる室内飼育環境に置いたときの精巣卵の消長を調べる。次に、ホルモン様物質を異なった発達段階 (受精卵および幼生期、未成熟期、成熟期) から投与し、精巣卵形成の有無を組織学的に解析し、対照群と比較する。さらに、飼育環境における性ホルモン様物質の有無を評価するための手法を検討する。そのためのツールとして、アンドロゲン様物質に対しては、アンドロゲン受容体遺伝子の単離および拇指隆起細胞の培養を行い、エストロゲン様物質に対しては、エストロゲン受容体遺伝子およびビテロゲニン遺伝子の単離、肝細胞の培養を行う。

研究結果のまとめと考察：両生類の精巣卵形成が何らかの環境物質によって誘導されるのかを知るために、野外環境から室内環境に移して飼育したところ、4ヶ月間の飼育では精巣卵は認められず、出現率に差はなかった。しかし、同じ条件下で1年半～4年間室内飼育された個体の中には、精巣卵が観察された。また、受精卵から室内飼育したところ、変態完了後約1年までは精巣卵が観察されなかった。従って、室内飼育期間が長い程、精巣卵の出現率が高くなることから、精巣卵形成は室内の環境要因に起因することが考えられる。今後、飼育環境における性ホルモン様物質の有無を調べる必要がある。さらに、性ホルモン様物質を人為的に暴露し、精巣卵形成への影響を調べる必要がある。

ラナ属の雄の拇指隆起はアンドロゲンの標的器官であることが知られている。そして、拇指隆起におけるアンドロゲン受容体遺伝子発現が体内のアンドロゲン量により変化することが知られている。また、肝臓で合成されるビテロゲニン量が体内エストロゲン量に依存することは、魚類および両生類において広く知られている。また、魚類ではエストロゲン受容体の遺伝子発現が外因性エストロゲンによって誘導されることが知られている。そこで、アンドロゲン様物質およびエストロゲン様物質の存在を調べるためのツールとして、アンドロゲン受容体遺伝子およびエストロゲン受容体遺伝子、ビテロゲニン遺伝子に着目した。今年度の研究では、トノサマガエルそれぞれの遺伝子断片の単離に成功した。今後、その塩基配列を基にプライマーを設定し、雄の拇指隆起および肝臓の培養細胞を用いて、濃縮した環境水および飼育水を暴露した時の各遺伝子発現量を RT-PCR 法により解析する予定である。