

ExTEND2005 に基づく平成 20 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 20 年度基盤的研究採択課題及び研究成果

平成 20 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。研究内容については、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、決定したものである。

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

基盤 2：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

基盤 3：胎仔期、新生仔期の食餌による環境化学物質代謝・排泄機能への影響調査

基盤 4：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

基盤 5：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

基盤 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

## 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となる、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 20 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 20 年度については下記 3 課題について採択し、調査研究を実施した。研究内容については、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、決定したものである。

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

野生 2 : 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

野生 3 : アカトンボ減少傾向の把握とその原因究明

## 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 年度及び平成 20 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 20 年度については、平成 19 年度に採択した下記 4 課題(19FS 1～4)及び平成 20 年度に採択した下記 5 課題(20FS 1～5)の合計 9 課題について調査研究を実施した。研究内容については、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、決定したものである。

- 19FS 1 (基盤) : 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
- 19FS 2 (基盤) : 精子に存在するホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 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
- 19FS 3 (野生) : 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
- 19FS 4 (野生) : 両生類の性ホルモン様物質暴露による精巣卵形成についての研究
- 20FS 1 (野生) : 魚食性猛禽類「ミサゴ」の生態とその食物連鎖に関する基礎的研究
- 20FS 2 (基盤) : 化学物質誘発性のエピジェネティック修飾による DOHaD モデルの検証
- 20FS 3 (基盤) : メダカの再生産に及ぼす化学物質及びその代謝物の影響とトキシコゲノミクスによる作用機序の解明
- 20FS 4 (基盤) : 海産無脊椎動物ホヤのトキシコゲノミクス基盤研究と生態調査
- 20FS 5 (基盤) : 多環芳香族炭化水素類の内分泌かく乱作用の構造活性相関に基づく魚鱗の化学物質スクリーニング法に関する研究



## 研究成果の概要

### ○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)、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

②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たアウトブリード動物を用いた実験では、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が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の存在することが強く示唆される。しかし、マウスを用いた研究では約33%で、ラットを用いた研究では実にその約85%でアウトブリード動物が用いられながら(Chia *et al.*, 2005)、これらの動物には遺伝的要因に基づく個体差が存在する可能性を考慮した上で結果が解釈されている場合はむしろ稀であり、我々が知る限り、動物集団に潜在する遺伝学的問題を系統的かつ詳細に解析した研究も過去にはほとんど例がない。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毒性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遺伝子多型に着目し、性ステロイド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すると共に、これらの変異や多型を遺伝子レベルで診断する技術を確立して、毒性実験に使用され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ものである。

今年度は、性ホルモンに対する感受性を修飾する遺伝子(群)の解析にテーマを絞り、雌雄の生殖器官(雌の子宮及び膈と、雄の精巣、精巣上体、前立腺、精囊、カウパー腺など)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(性ホルモンに対する感受性を修飾する遺伝子)のクローニングに努めた。

これまでに実施した129xB6 Recombinant Inbred系統群(RI系統群)マウスを用

いたQTL(Quantitative Trait Loci)解析から、マウスではエストロゲン又はアンドロゲンに対する感受性を修飾する遺伝子が複数存在することが示唆されている。また、マウスの近交系間(C57BL/6JとC3H/HeNの2系統間)でエストロゲン及びアンド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るとともに、エストロゲンに対する感受性を修飾する遺伝子(群)については遺伝学的解析の第一歩であるQTL解析に用いるF2集団が得られている。そこで、今年度は得られたF2個体(B6xC3F2雌)についてマイクロサテライトマーカーの遺伝子型を判定してQTL解析を実施したところ、エストロゲンに対する感受性(子宮の反応性)を修飾する有意なQTL遺伝子座を第1及び第18染色体上に検出することができた。現在、責任遺伝子をDNAレベルで同定すべく、検出されたQTL遺伝子座にある候補遺伝子群の発現解析を実施中である。

アンドロゲンに対する感受性を修飾する遺伝子(群)については、B6xC3F2個体を用いたQTL解析のため、F2個体の表現型(70日齢における生殖器官重量)を確認し終え、ゲノムDNAを用いてマイクロサテライトマーカーの遺伝子型を判定中である。

- ③研究結果のまとめと考察：B6及びC3H系統の雌マウスを用いた解析では、エストロゲンに対する反応性を修飾する有意なQTL遺伝子座が少なくとも2箇所検出され、mRNAの発現解析やデータベースの調査といった2次スクリーニングにより、それぞれ有力な候補遺伝子が絞られつつある。子宮肥大反応の生理学的意義については未だ不明な部分が多く、特に子宮内への水分移動に関するメカニズムについては殆ど研究がなされていないことから、本研究の進展により、生殖・発生毒性研究分野に貴重な情報が得られるものと期待される。これら2系統の雄マウスを用いた解析では、精巣と副生殖器官の重量を支配する遺伝子群がそれぞれ異なることが示唆されており、そのような現象に関連するQTL遺伝子座が予想以上に多い可能性が示された。雄の解析では、これらのQTL遺伝子座を漏れなく検出するのに十分な数と考えられるおよそ200匹のF2個体が準備できたので、雌で実施した解析を上回る精度でQTL遺伝子座の存在領域を推定できるものと考えられる。さらに、RI系統群のマウスを用いた解析においても、遺伝子発現解析や細胞増殖活性に関するデータが得られつつあり、先に述べた方法により候補遺伝子を絞り込むことができるものと予測される。

今後はさらに解析を進め、エストロゲンやアンドロゲンに対する反応性の個体差を規定する遺伝子群を明らかにすることにより、内分泌かく乱物質などを検出するための生殖・発生毒性試験の結果に影響を及ぼす因子を特定できるものと期待され

る。また、検出された QTL 遺伝子座について簡便な遺伝子診断法が確立できれば、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リー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上で有用な情報を提供できるものと考えられる。

#### ④研究課題に関連する主な発表業績

- 青山博昭 (2006) 哺乳動物に対する生殖毒性の評価. *日本農薬学会誌*, 31:452-456.
- Tamura H., Y. Ishimoto, T. Fujikawa, **H. Aoyama**, H. Yoshikawa, and M. Akamatsu (2006) Structural basis for androgen receptor agonists and antagonists: interaction of SPEED 98-listed chemicals and related compounds with the androgen receptor based on an *in vitro* reporter gene assay and 3D-QSAR. *Bioorg. Med. Chem.*, 14:7160-7174.
- Hojo H., **H. Aoyama**, K.L. Takahashi, N. Shimizu, M. Araki, Y. Takizawa, K. Sakasai, M. Kuwahara, M. Saka, and S. Teramoto (2006) A two-generation reproduction toxicity study in rats with 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (*p,p'*-DDT). *Cong. Anom.*, 46:105-114.
- Matsuura T., Y. Kodama, K. Ozaki, S. Shirai, T. Hirasawa, **H. Aoyama** and I Narama (2006) A newly established mutant strain with mild-type ocular coloboma (retinochoroidal coloboma without microphthalmia) in albino mice. *Birth Defects Research (Part A)* 76: 266-271.
- Aoyama H.**, J.F. Couse, S.C. Hewitt, J.K. Haseman, H. He, X. Zheng, S. Majstoravich, K.S. Korach and D. Dixon (2005) Upregulation of estrogen receptor expression in the uterus of ovariectomized B6C3F1 mice and Ishikawa cells treated with bromoethane. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 209: 226-235.
- Aoyama H.**, H. Hojo, K.L. Takahashi, N. Shimizu, M. Araki, M. Harigae, N. Tanaka, N. Shirasaka, M. Kuwahara, N. Nakashima, E. Yamamoto, M. Saka and S. Teramoto (2005) A two-generation reproductive toxicity study of 2,4-dichlorophenol in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 30 (Special Issue): 59-78.
- 青山博昭 (2005) 哺乳類における内分泌かく乱作用に関する試験法の実際と限界, *保健医療科学* 54: 29-34.
- 鈴木勝士、青山博昭 (2005) 「環境ホルモン」問題の科学論的本質を問う, *ILSI Japan*, 82: 20-32.

○基盤2：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：岐阜薬科大学 毒性学：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ているのかを解明し、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。これまでに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するためのモデル動物である、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 マウスを作製し、検討を行ってきた。今年度は、胎児期エストロゲン曝露が与えるエストロゲン感受性への影響について検討を行うために、雌性 AromEGFP-TG 仔マウスについて子宮肥大試験を行った。9週齢の雌性 AromEGFP-TG マウスから卵巣を摘出し、その後エストロゲン感受性について子宮重量の変化を指標に検討を行ったところ、同腹の野生型(TW)マウスと TG との間に有意な差は見られなかった。また、AromEGFP-TG マウスのエストロゲン曝露による次世代への影響として、母体のエストロゲン曝露歴が雄性仔マウスの生殖系に与える影響について検討を行った。雌性 TG マウス(F2 世代；fTG-F2)と雄性野生型マウス(mWT)を交配させて得られた仔マウス(F4 世代)の精巣重量と精子数を調べたところ、fTG-F3 マウスと同世代の雌性野生型マウス(fTW-F2)を mWT マウスと交配させて得られた仔マウスとの間に有意な差は認められなかった。このことから、雌性マウスの胎児期エストロゲン曝露は、子宮のエストロゲン感受性やその雄性仔マウスの生殖系には影響を与えない可能性が示唆された。

一方、AromEGFP-TGマウスにおいて、過剰に産生されたエストロゲンが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ために、昨年度、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)の作成を試みたが、解析が可能なTGマウスは雌1匹(ラインA)しか得られなかった。そこで、今年度はこのTGマウスを繁殖し、17 $\beta$ -エストラジオール(E2)の投与前後でのエストロゲン応答



性を検討することによりcharacterizationを行うとともに、追加で新たなTGマウスを作製した。その結果、ラインAの雄においてE2投与群はコントロール群と比較すると、肝臓や腎臓、生殖器で高い活性上昇が認められた。一方、雌においてもE2投与群はコントロール群と比較して雄ほどではないが活性の上昇が認められた。また、新たに解析が可能なファウンダーTG雄マウスを1匹とTG雌マウスを1匹得ることができた。

さらに、これまでエストロゲンやアンドロゲン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(子宮位置影響)についても考慮する必要があると提唱されている。しかしながら、現在までに齧歯類の胎盤や胎児で明確な解剖学的データは示されていないことから、昨年度に引き続きエストロゲンを高産生するAromEGFP-TGマウスの胎児を利用し、子宮位置影響の真偽について検討を行った。その結果、2TG(TGに挟まれたTW)雄と2TG雌胎児においてそれぞれエストロゲン濃度とアンドロゲン濃度の若干の上昇が認められたものの、0TG(TWに挟まれたTW)との間においては有意な差は認められなかったことから、隣接するTGマウスであっても野生型マウスの胎児のエストロゲンやアンドロゲン濃度には影響を及ぼすことはないことが明らかとなった。

### ③研究結果のまとめと考察：

#### 1. AromEGFP-TGマウスのエストロゲン感受性と次世代影響の検討について

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、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、初回発情期到来日及び性周期の変化について検討を行ってきた。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を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。一方で、胎児期にDESや農薬であるメトキシクロルに曝露すると低濃度曝露では、7-8ヶ月齢の雌性マウスの子宮肥大試験において対照群よりも子宮重量が増加し、高濃度曝露では子宮重量が低下すると報告されている。また別のグループからは、胎児期に低濃度

のビスフェノールAに曝露すると、4週齢の雌性マウスの子宮肥大試験において対照群よりも子宮重量が増加すると報告されており、胎児期のエストロゲン曝露がエピジェネティックな影響を与えることで、成熟マウスのエストロゲン感受性を変化させる可能性が示唆されている。そこで今年度は、AromEGFP-TGマウスのエストロゲン感受性と胎児期エストロゲン曝露による次世代への影響について検討を行った。AromEGFP-TG雌マウスのエストロゲン応答性について子宮肥大試験を用いて検討を行ったが、子宮重量に特に有意な差は認められなかった。この結果はこれまでの報告とは異なっているが、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、ERを介した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。胎児血中には $\alpha$ フェトプロテイン(AFP)が存在しており、E1やE2が容易に組織に移行できないように働いているが、特に後者については、このAFPが胎盤で過剰産生された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。これに関しては、後述のERE-MycLUC-TGマウスを用いた解析を行うことにより、明確な結論を得ることができるものと考えている。

一方で、これまでに胎児期エストロゲン様化学物質曝露により、世代を超えて雄の生殖器系に影響を及ぼすという報告がされている。しかし、今年度の我々の胎児期エストロゲン曝露による次世代への影響についての検討では雌の胎児期エストロゲン曝露歴の有無は世代を超えて、雄の精巣重量や精子数に特に影響を及ぼさないことが明らかとなった。また、今回の検討では、雌の胎児期エストロゲン曝露歴の有無による影響を検討したが、先述したエピジェネティックな変異は雌ではなく雄の生殖細胞系を介して起こることが示唆されている。しかし、昨年度の報告で我々は雄のエストロゲン曝露歴の有無は次世代に影響を及ぼさないことを示した。したがって、このことからAromEGFP-TGマウスを用いた検討では、雌雄ともに胎児期のエストロゲン曝露歴は次世代の雄の生殖器系に影響を及ぼしていないことが確認された。今回の検討では、直接的な胎児期エストロゲン曝露の影響を評価するTGとTW間においても生殖器系に変化は認められていないことから、AromEGFP-TGマウスで見られたエストロゲン濃度の上昇は、生殖器形成異常やDNAのメチル化などのエピジェネティックな変異に影響を与えない程度であった可能性も考えられた。

## 2. ERE-MycLUC-TGマウス(ラインA)のcharacterizationについて

昨年度までの成果報告により、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(特に生殖器に与える影響)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。この原因の一つとしては先述のとおり、胎児血中に存在している 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考えられる。すなわち胎児期の 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ため、過去に報告されているフェノタイプが確認できていない可能性が考えられる。そこで、胎児期におけるエストロゲンシグナルを検出するために、昨年度は ERE の下流に Myc タグとルシフェラーゼ遺伝子をつなげた ERE-MycLUC-TG マウスを作成した。しかし、1匹のファウンダーTG マウスしか得ることができなかった。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、今年度は新たに ERE-MycLUC-TG マウスを作成しつつ、この1匹の TG マウス(ライン A)の成体におけるエストロゲン応答性について検討することにより **characterization** を行った。まず、ライン A の成体を用い、エストロゲンによりルシフェラーゼ遺伝子が機能し、活性の上昇が認められるかをルミノメーターにより検討した結果、雄ではエストロゲン投与により比較的肝臓や生殖器を中心に高い活性が認められたが、雌においてはエストロゲン投与前後で雄ほどの活性の上昇は認められなかった。そこで、さらに IVIS を用いた *in vivo* イメージングにより生体内のルシフェラーゼタンパク質の挙動をリアルタイムにモニタリングした結果、肝臓周辺で発光の増強が認められた。さらに、この ERE レポーター TG マウスはこれまでに報告された ERE の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したレポーターTG マウスのような尾部や鼻、肉球等でのエストロゲン非特異的なルシフェラーゼの発光は認められなかった。これは **chicken  $\beta$ -globin** の 5'末端の 1.2 kb インスレータ配列のうち染色体環境の遮断に重要なコア配列の 250 bp のみをタンドムに 2 つ連結した 500 bp を導入している(10-12)こと、さらにルシフェラーゼ遺伝子には非特異的な転写が抑制され、優れたシグナル・ノイズ比を示す **Luc2** 遺伝子を用いていること、またバックグラウンドが高く、ダイナミックレンジの狭い点が改良された遺伝子の転写開始に必要な **TATA box** を含む最小プロモータである **Minimal promoter** を用いているためであると考えられる。今回の検討ではまだ 1 ラインのみの検討であるけれども、我々が作製した ERE-MycLUC-TG マウスはこれまでに報告された ERE レポーターTG マウスとは異なり、非特異的な発光を完璧に遮断した上でエストロゲンシグナルを検出するレポーターTG マウスとしてより良いモデルであることが明らかとなった。

したがって、このマウスの雌と雄性の **AromEGFP-TG** マウスを交配させることで

、AromEGFP-TGの胎児に供給されたエストロゲンがどの程度ERを活性化しているかを検討できると考えられることから、AromEGFP-TGで確認されたフェノタイプがERを介したものであるかどうかを判断できる。また一方で、極低濃度で突発的に内分泌かく乱作用を示すといった低用量効果は内因性のエストロゲンでは認められず、エストロゲン様化学物質のみに認められる現象であると報告されているが、これにはAFPが関与していることが提唱されている。すなわちE2などの内因性エストロゲンはAFPによって中和されてしまうが、ビスフェノールAなどのエストロゲン様化学物質にはAFPが結合できないため、たとえエストロゲン活性が微弱であっても影響を与えるというものである。このような問題を解決すべく、さらに雌性ERE-MycLUC-TGに野生型の雄性マウスを交配させて得られた妊娠マウスにBPAなどを投与し、ルシフェラーゼ活性をAromEGFP-TGの胎児と比較することで、本当にエストロゲン様化学物質の低用量効果はあり得るのかという疑問にも決着を付けられるかもしれない。

### 3. AromEGFP-TGマウスを用いた子宮位置影響の検証

これまでエストロゲンやアンドロゲンの齧歯類の胎児期における影響については、子宮位置影響についても考慮する必要があると提唱されているが、我々は平成18年度の検討において、WTの雌雄マウスを掛け合わせてできた妊娠マウスを用いて、子宮位置によるステロイドホルモン濃度への影響についての予備的な検討を行った。その結果、いずれの子宮位置においてもホルモン濃度にはあまり違いがない傾向が認められた。子宮位置影響とは、胎児で産生された性ステロイドホルモン(雄の胎児であればアンドロゲンが、雌の胎児であればエストロゲン)が、隣接する性別の異なる胎児のステロイドホルモン濃度に影響を与え、少なからず齧歯類の発生過程に影響を与えるというものである。しかし子宮位置影響は、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に議論が進められているが、現在までに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。一方で、我々が作成したAromEGFP-TGマウスは、この問題を解決するための理想的なモデル動物になる可能性を秘めている。AromEGFP-TGマウスでは、導入したAromEGFPの入ったアレルを1つだけ持つヘテロマウスでも十分にエストロゲン産生が上昇していることから、雄性のAromEGFP-TGマウスと雌性の野生型マウスとを交配させることで、同腹内にエストロゲン濃度が高いAromEGFP-TG胎児とエストロゲン産生がほとんどない野生型胎児を混在させることが可能である。すなわちヘテロ接合体である雄のTGマウスを野生型の雌マウスと交配させること

で、完全な野生型の母体に同腹胎児でありながら、エストロゲン曝露の影響を、野生型胎児と比較検討できるという利点を有している。今年度の検討により、我々は AromEGFP-TG マウスと交配させた WT 雌性マウスの検討において、雄の 2TG の胎児ではエストロゲン濃度が高く、雌の 2TG の胎児ではアンドロゲン濃度が高い傾向を示した。しかし、どの項目も 1 サンプルのみ値が高かったので有意な差であるとは言えない結果となった。さらに、雄の 2TG の胎盤においてプロゲステロンの減少傾向が認められたが、これは基質として利用されたためであると考えられる。また、プロゲステロンの主な産生部位は黄体であるために、隣接する TG 胎盤の影響であるとは考えにくい。今回の検討からエストロゲン産生が高い TG 胎盤や胎児と隣接する WT の胎盤や胎児のエストロゲン濃度は、必ずしも高くなるわけではないということを明らかにした。これまで発生段階における化学物質の内分泌かく乱作用においては、元来マウス胎児の性ステロイドホルモン濃度は非常に低く、また『子宮位置効果』によるホルモン濃度の変動も微妙なものあることから、本当にそのような効果があるのかについてはその真偽が定かではなかったが、本検討により、エストロゲン濃度に子宮位置影響が無関係であることを確認することができた。

#### ④研究課題に関連する主な発表業績

Hiromori Y, Nishikawa J, Yoshida I, Nagase H, **Nakanishi T**, Structure-dependent activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  by organotin compounds, *Chem-Bio. Interact.*, in press.

Wu X, Iguchi T, Itoh N, Okamoto K, Takagi T, Tanaka K, **Nakanishi T**, Ascorbic acid transported by sodium-dependent vitamin C transporter 2 stimulates steroidogenesis in human choriocarcinoma cells, *Endocrinology*, 149, 73-83, 2008.

Castro LF, Lima D, Machado A, Melo C, Hiromori Y, Nishikawa J, **Nakanishi T**, Reis-Henriques MA, Santos MM, Imposex induction is mediated through the Retinoid X Receptor signalling pathway in the neogastropod *Nucella lapillus*, *Aquat. Toxicol.*, 85, 57-66, 2007.

Wu X, Iguchi T, Hirano J, Fujita I, Ueda H, Itoh N, Tanaka K, **Nakanishi T**, Upregulation of sodium-dependent vitamin C transporter 2 expression in adrenals increases norepinephrine production and aggravates hyperlipidemia in mice with streptozotocin-induced diabetes, *Biochem. Pharmacol.*, 74, 1020-1028, 2007.

**Nakanishi T**, Potential Toxicity of Organotin compounds via nuclear receptor signaling in mammals (REVIEW), *J. Health Sci.*, 53, 1-9, 2007.

**中西 剛**, 齧歯類を用いた発生毒性評価の問題点とその将来展望 (総説), *薬学雑誌*,

127, 491-500, 2007.

中西 剛, 若手が切り開く Molecular Toxicologyへ毒性学領域における分子メカニズム解明のアプローチ (総説), *薬学雑誌*, 127, 449, 2007.

Hayashi A, Wakita H, Yoshikawa T, Nakanishi T, Tsutsumi Y, Mayumi T, Mukai Y, Yoshioka Y, Okada N, Nakagawa S, A strategy for efficient cross-presentation of CTL-epitope peptides leading to enhanced induction of in vivo tumor immunity, *J. Control. Release*, 117, 11-19, 2007.

Harada M, Kondoh M, Masuyama A, Fujii M, Nakanishi T, Utoguchi N, Yagi K, Watanabe Y, Effect of forskolin on the expression of claudin-5 in human trophoblast BeWo cells, *Pharmazie*, 62, 291-294, 2007.

Nakanishi T, Nishikawa J, Tanaka K, Molecular targets of organotin compounds in endocrine disruption: do organotin compounds function as aromatase inhibitors in mammals? (REVIEW), *Environ. Sci.*, 13, 89-100, 2006.

Nakanishi T, Organotin-induced toxicity and nuclear receptor signaling (REVIEW), *Biomed. Res. Trace Elements*, 17, 373-381, 2006

中西 剛, 有機スズ化合物の内分泌攪乱作用とその分子メカニズム (総説), *ファルマシア*, 42, 690-694, 2006.

Komiya E, Kondoh M, Mizuguchi M, Fujii M, Utoguchi N, Nakanishi T, Watanabe Y, Characteristics of transcription-regulatory elements for gene expression from plasmid vectors in human trophoblast cell lines, *Placenta*, 27, 934-938, 2006.

Koizumi N, Mizuguchi M, Kondoh M, Fujii M, Nakanishi T, Utoguchi N, Watanabe Y, Efficient gene transfer into differentiated human trophoblast cells with adenovirus vector containing RGD motif in the fiber protein, *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 1297-1299, 2006.

Nakanishi T, Hiromori Y, Yokoyama H, Koyanagi M, Itoh N, Nishikawa J, Tanaka K, Organotin compounds enhance 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type I activity in human choriocarcinoma JAr cells: potential promotion of 17 $\beta$ -estradiol biosynthesis in human placenta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1349-1357, 2006.

Asano N, Kondoh M, Ebihara C, Fujii M, Nakanishi T, Utoguchi N, Enomoto S, Tanaka K, Watanabe Y, Induction of zinc transporters by forskolin in human trophoblast BeWo cells, *Reprod. Toxicol.*, 21, 285-291, 2006.

Nakanishi T, Nishikawa J, Hiromori Y, Yokoyama H, Koyanagi M, Takasuga S, Ishizaki JI, Watanabe M, Isa SI, Utoguchi N, Itoh N, Kono Y, Nishihara T, Tanaka K, Trialkyltin compounds bind retinoid X receptor to alter human placental endocrine functions., *Mol. Endocrinol.*, 19, 2502-2516, 2005.

Itoh N, Shibayama H, Kanekiyo M, Namphung D, Nakanishi T, Matsuyama A, Odani T,

- Tanaka K, Reduced bactericidal activity and nitric oxide production in metallothionein-deficient macrophages in response to lipopolysaccharide stimulation., *Toxicology*, 216, 188-196, 2005
- Koizumi N, Kondoh M, Mizuguchi H, **Nakanishi T**, Masuyama A, Ida F, Fujii M, Hayakawa T, Nakashima E, Tanaka K, Watanabe Y, Comparison of transgene expression mediated by several fiber-modified adenovirus vectors in trophoblast cells, *Placenta*, 26, 729-734, 2005
- Kanayama T, Kobayashi N, Mamiya S, **Nakanishi T**, Nishikawa JI., Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  / retinoid X receptor (RXR) pathway, *Mol. Pharmacol.*, 67, 766-774, 2005.
- Oshima Y, Fujio Y, **Nakanishi T**, Itoh N, Yamamoto Y, Negoro S, Tanaka K, Kishimoto T, Kawase I, Azuma J, STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart, *Cardiovasc. Res.*, 65, 428-435, 2005.
- Osada S, Nishikawa J, **Nakanishi T**, Tanaka K, Nishihara T, Some organotin compounds enhance histone acetyltransferase activity, *Toxicol. Lett.*, 155, 329-335, 2005.

### ○基盤3：胎仔期、新生仔期の食餌による環境化学物質代謝・排泄機能への影響調査

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、杉原数美、日本薬科大学 健康薬学科：北村繁幸

②研究概要：昨年度までの研究により、ラットは成長に従いCYP活性が上昇し、特に離乳期におけるCYP1A発現上昇が顕著であるが、精製飼料(pure diet:AIN-93G)で妊娠時より飼育すると成長後もCYP活性が低値を継続することより、ラット発達期におけるCYP発現は一般飼料(normal diet)中の成分によって誘導を受けていることを明らかにした。そこで、本年は近交系マウスを用い、飼料の影響が肝薬物代謝酵素活性に変動を与える影響の再現性を確認したところ、ラットと同様の結果が得られた。さらに、妊娠前より一般飼料あるいは精製飼料で飼育したラットを親とする新生仔ラットに、臭素化難燃剤、 $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ -NF) あるいはindirubin (Idb)を投与し、食餌成分の違いが肝薬物代謝酵素変動へ与える影響を検討した。normal diet群、pure diet群ともにcontrolでは極めて低いEROD活性を示し、母ラットが摂取する飼料の影響は認められなかったが、臭素化難燃剤、 $\beta$ -NFあるいはIdb投与群では、normal diet群よりpure diet群で著しく高いEROD活性上昇とCYP1A1 mRNA発現上昇が観察され、飼料による差が認められた。原因として、胎盤あるいは母乳を介して一般飼料中の成分が仔に移行し、CYP発現誘導調節に影響していることが考えられる。

③研究結果のまとめと考察：昨年度、ラットを用い、胎仔期、新生仔期の飼料成分が肝薬物代謝酵素活性発達に著しく影響することを明らかとしている。本年度は、動物種をかえての再現性の確認のためマウスを用い、妊娠前より一般飼料と精製飼料で飼育を行ったところ、ラットと同様の結果を得た。近郊系マウス(C57BL/6J)を用いているので、今後薬物代謝系以外の遺伝子、タンパク質発現の比較を網羅的に検討するのに適していると考えている。

さらに、ラット新生仔期において化学物質が肝薬物代謝酵素変動に与える影響を検討した。臭素化難燃剤 BDE-47、BDE-85、BDE99 投与により、ラット新生仔肝各CYP分子種活性及びCYP mRNA発現が顕著に増大した。特にBDE-85によるCYP1A1の誘導は強力であり、代表的CYP誘導剤の $\beta$ -NFを大きく上回る誘導効果が認められた。また、生体サンプルから高濃度で検出されるBDE-47、BDE-99においてもCYP



1 A、CYP 2 B、CYP 3 A の誘導作用が認められた。

飼料の違いがラット新生仔の肝 CYP 活性に影響を与えることが示されたことより、化学物質暴露による CYP 誘導に対する飼料の影響を検討した。PBDEs を用いて検討したところ、BDE-85 投与群では normal diet 群のほうが pure diet 群よりも高い CYP 活性値及び CYP mRNA 発現量を示したのに対し、BDE-47 及び BDE-99 では CYP 活性値及び mRNA 発現量に飼料による差が認められなかった。また一方では、Idb 投与においては pure diet 群のほうが高い CYP 活性及び CYP mRNA 発現が検出された。このように、化学物質の構造的特性、潜在的誘導活性、あるいは代謝的構造変化に伴う誘導活性の変動といった様々な要因により、飼料の影響が現れることが示唆された。ただし、いずれの場合も vehicle に対する誘導比率は pure diet 群のほうが高くなっており、化学物質暴露による CYP 発現変動が pure diet 群で大きいことが明らかとなった。

また、母体飼料の相違が、新生仔の肝 CYP 誘導能に与える影響を検討したところ、pure diet 飼育の母から出生した仔は、normal diet と比較して CYP 誘導剤 $\beta$ -NF の CYP 1 A 誘導効果が高かった。母体から、胎盤あるいは乳汁を介して新生仔に移行した飼料成分が、CYP 誘導調節機構に何らかの影響を与えた可能性が示唆された。

以上のように、新生仔期における CYP 発現は低いながらも、その酵素誘導機構が備わっており、母体の飼料成分、成長発達時の飼料成分の違いにより、化学物質類による影響の効果が異なってくることが示唆された。

#### ④研究課題に関連する主な発表業績

K.Sugihara, T.Okayama, S.Kitamura, K.Yamashita, M.Yasuda, S.Miyairi, Y.Minobe, S.Ohta,

Comparative study of aryl hydrocarbon receptor ligand activities of six chemicals *in vitro* and *in vivo*. Archives of Toxicology, 82, 5-11 (2008).

Y.Nakamura, K.Sugihara, T.Sone, M.Isobe, S.Ohta, S.Kitamura, The *in vitro* metabolism of a pyrethroid insecticide, permethrin, and its hydrolyzed products in rats. Toxicology, 235, 176-184 (2007).

T.Suzuki, N.Fujimoto, S.Kitamura, S.Ohta, Effects of environmental antiandrogenic chemicals on expression of androgen-responsive genes in rat prostate lobes. Journal of Health Science, 53(4), 401-405 (2007).

Y.Tayama, A.Moriyasu, K.Sugihara, S.Ohta, S.Kitamura, Developmental Changes of Aldehyde Oxidase in Postnatal Rat Liver. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 22(2),

119-124 (2007).

Y.Tayama, K.Miyake, K.Sugihara, S.Kitamura, M.Kobayashi, S.Morita, S.Ohta, K.Kihira, Developmental changes of aldehyde oxidase activity in young Japanese children. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 81(4), 567-572 (2007).

T.Suzuki, N.Fujimoto, S.Kitamura, S.Ohta, Quantitative determination of lobe specificity of mRNA expression of androgen-dependent genes in the rat prostate gland. *Endocrine Journal*, 54(1), 123-132 (2007).

#### ○基盤4：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：我々は、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。本年も引き続き臭素化化合物を中心に解析を行った。また、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確立したのでこのシステムを用いて更にインビトロでの解析を進めるとともに、動物を用いた解析にも着手した。具体的には次のようである。

1. 本教室で開発した高感度レポーターアッセイとLiquid Chemiluminescent DNA Pull Down Assay 法を用いて臭素化ジフェニルエーテルを中心とする環境化学物質の核内ホルモン受容体への作用を網羅的に解析した。そして、作用が生じた物質について、pull down やmammalian two hybrid 法などを用いて受容体内での作用部位と作用機構の解析を行った。
2. 甲状腺ホルモン受容体とグルココルチコイド受容体のキメラタンパクを作成し、臭素化化合物の甲状腺ホルモン受容体への作用部位を同定した。
3. 顕微測光装置を用いて細胞内での受容体や共役因子の動態をリアルタイムで解析するためのシステムの開発に着手した。
4. 実際の神経細胞での作用機構を調べるため、小脳プルキンエ細胞初代培養細胞を用いて環境化学物質による形態変化を調べるためのシステム開発に着手した。
5. 動物個体を用いて、環境化学物質投与による発達期小脳におけるホルモン受容体の標的遺伝子発現変化を解析するため先天性甲状腺機能低下ラット(rdw)の繁殖系の確立に成功した。

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。特に臭素化化合物の作用機構については情報が限られており、本研究により新たに重要な知見が得られた。PCBと比較して、臭素化化合物は少なくとも甲状腺ホルモン受容体への有効作用濃度が高く、また、抑制の度合いも強くない事がわかった。今後更に動物実験を追加し、分子レベルから行動レベルまでの作用について解析したい。

③研究結果のまとめと考察：本年度で臭素化ジフェニルエーテルによる TR への作用のインビトロでの解析はほぼ終了した。我々の実験系においては、臭素化ジフェニルエーテルの一部は、TR の作用を抑制した。解析した物質の中では、抑制の程度は BDE209 の  $10^{-9}M$  における 45%が最大で、また、抑制を示した物質も限られていた。さらに、生体から比較的多く検出される水酸化 BDE については、TR への影響は見られなかった。以前から我々が用いている PCB では、水酸化 PCB の一部に非水酸化 PCB よりも強い反応が見られたが、臭素化ジフェニルエーテルについては、少なくとも今回調べた物質に限っては、水酸化により活性が増加するという傾向は見られなかった。また、臭素化ジフェニルエーテルの作用機構であるが、Liquid chemiluminescent DNA Pull Down Assay、mammalian two hybrid assay、そしてキメラタンパクを用いた解析を総合すると、PCB と同様に TR の DNA 結合領域に作用し、TR を TRE から解離させて転写を抑制していると考えられた。ただし、BDE100 と BDE153 についてはレポーターアッセイの結果と Liquid Chemiluminescent Assay の結果が一致しておらず、更なる解析が必要であろう。

今後の課題は、臭素化ジフェニルエーテルにより TR の作用が抑制された結果として細胞レベル、個体レベルでどのような影響が生ずるのかを調べることである。そのため、いくつかの新たなアッセイ系を立ち上げた。ひとつは細胞内でのタンパクの局在変化をリアルタイムで調べるシステムである。今年度は、システム自体はほぼ完成したので、今後これを用いて環境化学物質による影響を解析していきたい。また、小脳プルキンエ細胞の形態変化を指標にして、神経細胞への影響を解析するシステムも現在開発が進んでいる。上に示したように、すでに PCB を用いてモデル実験を一部開始しており、再現性を確認次第、臭素化ジフェニルエーテルを用いて実験を実施する予定である。

rdw の繁殖系についても、なんとか確立する事ができた。まだ大量繁殖は難しい状態であるが、丁寧なハンドリングにより、母体のストレスも減ったせいか、新生仔の死亡数も低下した。今後の予定としては、ホモ接合体のオスに出生時から甲状腺ホルモンを投与し、繁殖能力を獲得させて、ヘテロ接合体のメスと交配させ、ヘテロ：ホモを 1：1 で生産するようなシステムを開発し、実験用ラットの安定供給を目指したい。そして、行動解析や甲状腺ホルモンの標的遺伝子の発現変化等を調べたいと考えている。

④研究課題に関連する主な発表業績

- Koibuchi N. Animal models to study thyroid hormone action in cerebellum. *Cerebellum* (in press)
- Sajdel-Sulkowska EM, Koibuchi N. Sexually-dimorphic nature of PCB effects on the developing animal CNS. In: Kestler L, Lewis M (eds) American Psychological Association, APS Books, Washington (in press)
- Rokutanda N, Iwasaki T, Odawara H, Nagaoka R, Miyazaki W, Takeshita A, Koibuchi Y, Horiguchi J, Shimokawa N, Iino Y, Morishita Y, Koibuchi N. Augmentation of estrogen receptor - mediated transcription by steroid and xenobiotic receptor. *Endocrine* 33: 305-316, 2008.
- Koibuchi N. The role of thyroid hormone on cerebellar development. *Cerebellum* 7:530-533, 2008.
- Miyazaki W, Londono MB, Iwasaki T, Shimokawa N, Koibuchi N. Possible mechanisms of PCB action, which are not mediated by AhR. In: M. Morita (ed). *Persistent Organic Pollutants (POPs) Research in Asia*. pp. 289-291, 2008.
- Koibuchi N, Kimura-Kuroda J, Ikeda Y, Tsutsui K. Cerebellum, a target for hormonal signaling. *Cerebellum* 7: 499-504, 2008.
- Iwasaki T, Miyazaki W, Rokutanda N, Koibuchi N. Liquid chemiluminescent DNA pull-down assay to measure nuclear receptor-DNA binding in solution. *BioTechniques* 45: 445-448, 2008.
- Koibuchi N. Hormonal regulation of cerebellar development and plasticity. *Cerebellum* 7: 1-3, 2008.
- Miyazaki W, Iwasaki T, Takeshita A, Tohyama C, Koibuchi N. Identification of the functional domain of thyroid hormone receptor responsible for polychlorinated biphenyl-mediated suppression of its action in vitro. *Environ Health Perspect* 116: 1231-1236, 2008.
- Miyazaki W, Iwasaki T, Koibuchi N. 2007. PCB affects on DNA binding domain of thyroid hormone receptors. *Organohalogen Compounds* 69: 1773-1775.
- Londono MB, Shimokawa N, Miyazaki W, Iwasaki T, Koibuchi N. 2007. Low dose hydroxylated PCB disrupt Ca<sup>2+</sup> homeostasis and plasma membrane potential. *Organohalogen Compounds* 69: 1776-1778.
- Qiu C-H, Shimokawa N, Iwasaki T, Parhar IS, Koibuchi N. 2007 Alteration of cerebellar neurotrophin messenger ribonucleic acids and the lack of thyroid hormone receptor augmentation by staggerer- type retinoic acid receptor-related orphan receptor-a mutation. *Endocrinology* 148: 1745-1753.
- Nagaoka R, Iwasaki T, Rokutanda N, Takeshita A, Koibuchi Y, Horiguchi J, Shimokawa N, Iino Y, Morishita Y, Koibuchi N. 2006. Tamoxifen activates CYP3A4 and MDR-1 genes

- through steroid and xenobiotic receptor in breast cancer cells. *Endocrine* 30: 261-268.
- Koibuchi N, Iwasaki T. 2006. Regulation of brain development by thyroid hormone and its modulation by environmental chemicals. *Endocrine* 153: 295-303. .
- Takeshita A, Inagaki K, Igarashi-Migitaka J, Ozawa Y, Koibuchi N. 2006. The endocrine disrupting chemical, diethylhexyl phthalate, activates MDR1 gene expression in human colon cancer LS174T cells. *J Endocrinol* 190: 897-902.
- Iwasaki T, Takeshita A, Miyazaki W, Chin WW, Koibuchi N. 2006 The interaction of TR $\beta$ 1-N-terminus with SRC-1 serves a full transcriptional activation function of SRC-1. *Endocrinology* 147: 1452-1457.
- Shimokawa N, Miyazaki W, Iwasaki T, Koibuchi N. 2006 Low dose hydroxylated PCB induces c-Jun expression in PC12 cells. *Neurotoxicology* 27: 176-183.
- Iwasaki T, Koibuchi N, Chin WW 2005 Synovial sarcoma translocation (SYT) encodes a nuclear receptor coactivator. *Endocrinology* 146: 3892-3899.
- Igarashi-Migitaka J, Takeshita A, Koibuchi N, Yamada S, Hirata K. 2005 Differential expression of p160 steroid receptor coactivators in the rat testis and epididymis. *Eur J Endocrinol* 153: 595-604.
- Shimokawa N, Kumaki I, Qiu C-H, Ohmiya Y, Takayama K, Koibuchi N. 2005 Extracellular acidification enhances DNA binding activity of MafG-FosB heterodimer. *J Cell Physiol* 205: 77-85
- Okada J, Shimokawa N, Koibuchi N. 2005 Polychlorinated biphenyl (PCB) alters acid-sensitivity of cultured neurons derived from the medulla oblongata. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 1368-1374.
- Yousefi B, Jingu H, Ohta M, Umezu M, Koibuchi N. 2005 Postnatal changes of steroid receptor coactivator-1 immunoreactivity in rat cerebellar cortex. *Thyroid* 15: 314-319

## ○基盤5：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。

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。本研究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研究結果のまとめと考察：

- 1)本研究により、ダイオキシン類に対するハシブトガラスの感受性の一端が明らかになった。また本研究の結果は、各野生生物種の AHR 遺伝子を用いて *in vitro* アッセイ系を構築すれば、対象種固有のダイオキシン類のリスクが簡便・迅速に評

価できる可能性を示している。

2)本研究により、核内レセプターリガンド候補物質のハイスループットスクリーニング法の目処がついた。本研究の結果は、*in vitro* タンパク発現系で合成した各野生生物種の核内受容体タンパク質を用いて SPR センサーチップが作製できれば、より簡便・迅速かつ網羅的にリガンド候補物質が探索できる可能性を示している。

#### ④研究課題に関連する主な発表業績

Watanabe, M.X., Jones, S.P., Iwata, H., Kim, E.Y. and Kennedy, S.W. (2009): Effects of co-exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and perfluorooctane sulfonate or perfluorooctanoic acid on expression of cytochrome P450 isoforms in chicken (*Gallus gallus*) embryo hepatocyte cultures, *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology*, in press.

Imaeda, D., Kunisue T., Ochi, Y., Iwata, H., Tsydenova, O., Takahashi, S., Amano, M, Petrov E.A., Batoev V. B. and Tanabe, S. (2009): Accumulation features and temporal trends of PCDDs, PCDFs and PCBs in Baikal seals (*Pusa sibirica*), *Environmental Pollution*, 157(3), 737-747.

Kubota, A., Kim, E.Y. and Iwata, H. (2008): Alkoxyresorufin (methoxy-, ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyresorufin) *O*-dealkylase activities by *in vitro* expressed cytochrome P450 1A4 and 1A5 from common cormorant (*Phalacrocorax carbo*), *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology*, in press.

Ishibashi, H., Iwata, H., Kim, E. Y., Tao, L., Kannan, K., Tanabe, S., Batoev, V. B. and Petrov, E. A. (2008): Contamination and effects of perfluorochemicals in Baikal seal (*Pusa sibirica*). 1. Residue level, tissue distribution, and temporal trend. *Environmental Science and Technology*, **42(7)**, 2295-2301.

Ishibashi, H., Iwata, H., Kim, E. Y., Tao, L., Kannan, K., Tanabe, S., Batoev, V. B. and Petrov, E. A. (2008): Contamination and effects of perfluorochemicals in Baikal seal (*Pusa sibirica*). 2. Molecular characterization, expression level, and transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ . *Environmental Science and Technology*, **42(7)**, 2302-2308.

Nakayama, K., Kitamura, S. I., Murakami, Y., Song, J. Y., Jung, S. J., Oh, M. J., Iwata, H. and Tanabe, S. (2008): Toxicogenomic analysis of immune system-related genes in Japanese flounder (*Paralichthya olivaceus*) exposed to heavy oil. *Marine Pollution Bulletin*, **57(6-12)**, 445-452.

Nakayama, K., Iwata, H., Tao, L., Kannan, K., Imoto, M., Kim, E. Y., Tashiro, K. and Tanabe,



- S. (2008): Potential effects of perfluorinated compounds in common cormorants from Lake Biwa, Japan: an implication from the hepatic gene expression profiles by microarray. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **27(1)**, 2378-2386.
- Lee, J.S., Kim, E.Y. and Iwata, H. (2008): Dioxin activation of CYP1A5 promoter/enhancer regions from two avian species, common cormorant (*Phalacrocorax carbo*) and chicken (*Gallus gallus*) : Association with aryl hydrocarbon receptor 1 and 2 isoforms. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **234**, 1-13.

○基盤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

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)

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)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。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20年度は、DESについてさらに詳細な研究(BrdUの取り込みを指標とした細胞分裂活性の解析、さらには*in situ hybridization*による遺伝子発現解析)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。

③研究結果のまとめと考察：メダカの 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。

本年度の研究で新しく示されたことは、XY 個体の生殖腺で *gsdf* が受精後 8 日(孵

化当日)で非常に強く発現していることである。これまでの研究から、メダカの性決定遺伝子 *dmy* は孵化直前に精巢のセルトリ細胞で発現が開始し、その 10 日以降に *dmrt1* が同じセルトリ細胞で発現することから、*dmrt1* が性決定遺伝子 *dmy* の下流に働く主要な遺伝子であるとされてきた。しかし、今回の *in situ hybridization* による体細胞で発現する遺伝子群の結果から、*gsdf* が *dmy* の直下に働く重要な標的遺伝子である可能性が高まったといえる。

性決定遺伝子 *dmy* の発現は DES 処理後にもまったく変わらなかった。したがって、これまでの PCR などによる発現解析の結果と同様に、DES は *dmy* の発現に影響を与えないと結論される。一方、本研究の *in situ hybridization* による発現解析の結果から、*gsdf* の発現は DES 処理によって著しく影響されることが明らかになった。受精後 8 日の XY 生殖腺で強い発現量を示した *gsdf* はその後 DES 処理の日数が増すにつれて著しく減少し、受精後 18 日では発現はほぼ完全に消失した。*dmrt1* の発現も *gsdf* と同様な傾向を示したが、発現変動は遅れて起こり、また変動幅も小さかった。一方、これらの雄特異的遺伝子とは異なり、XY 生殖腺の *cyp19a1* に関しては、対照群では実験期間ではまったく発現が認められなかったが、*gsdf* の発現の減少にともなって発現が起こり、処理期間の後半には明らかに上昇した。

本年度における、1)生殖細胞への BrdU の取り込み、及び、2)生殖腺体細胞での *in situ hybridization* による遺伝子発現解析、との結果を総合すると、XY 生殖腺の体細胞では *dmy* が発現することで *gsdf* の発現が誘導され、その後さらに *dmrt1* が発現し、これらの働きで精巢が形成され、精子形成が徐々に進行する。XY 生殖腺では、体細胞で *gsdf* がつくられることで、*foxl2/cyp19a1* の発現は抑制される(卵巣分化カスケードの抑制)と推察される。一方、XY 生殖腺でも DES が作用することで、*gsdf*(*dmy* の発現は抑制されない)の発現が急激に抑制され、その結果、*foxl2/cyp19a1* 遺伝子群の抑制が解除され、それにより XY 生殖腺でエストロゲンが合成され、本来精巢が形成されるはずの XY 生殖腺で卵巣が形成されると推察される。

#### ④研究課題に関連する主な発表業績

Paul-Prasanth, B., Matsuda, M., Lau, E.L., Suzuki, A., Sakai, F., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2006). Knock-down of DMY initiates female pathway in the genetic male medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 351, 815-819.

Matsuda, M., Shinomiya, S., Kinoshita, M., Suzuki, A., Kobayashi, T., Paul-Prasanth, B., Lau, E.L., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. and Nagahama, Y. (2007). DMY induces male development in XX medaka fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 3865-3870.

Paul-Prasanth, B., Matsuda, M., and Nagahama, Y. (2007). Effects of diethylstilbestrol on the

early sex differentiation of genetically male and female medaka larvae. 6th Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE). December 10-14, 2007, Sliguri, Darjeeling, West Bengal, India.

Paul, B., Matsuda, M., Suzuki, A., Zhou, L.Y. and Nagahama, Y. (2008). Diethylstilbestrol acts differentially on the early events during sex determination and differentiation of genetically male and female medaka. International Symposium on Sex Determination and Gametogenesis in Fish. May 31, 2007, Honolulu, USA.

Ngamniyom, A., Magtoon, W., Nagahama, Y. and Sasayama, Y. (2009). Expression levels of hormone receptors and bone morphogenic protein in fins of medaka. *Zool. Sci.* 26: 74-79.

Cui, J.Z., Shen, X.Y., Yan, Z.W., Zhao, H.B. and Nagahama, Y. (2009). Homology-modeled ligand-binding domains of medaka estrogen receptors and androgen receptors: a model system for the study of reproduction. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 380, 115-121.

## ○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

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)を調べて、個体の性との異同について検討を行ってきた。研究発足の平成17年度までに、約6,000個体の野生メダカを調べた結果、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、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順次検討行っているが、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、得られた不一致個体及び、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を検討する。また、後天的要因として、昨年度は高温暴露の検討を行ったが、本年度はエストロゲンによる雄から雌への性転換現象に着目し、近交系間の系統差の原因となる遺伝子の探索を行う。また、並行して、野生メダカのエストロゲン感受性について、地域(系統)差の有無等を検討する。それらの結果から、性ステロイドによる性転換現象に関わる遺伝的多型性について考察する。

③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。また、昨年度の研究で見いだされた仙台の XY 雌は Y 染色体に連鎖した性転換であることは確かめられたが、従来見いだされているものと異なるタイプの変異である可能性が示唆された。

2) 性転換を指標とした E2 感受性の Hd-rR 系統と HNI 系統との間の違いを生じている遺伝因子の一つは *DMY* そのものの多型性に由来していることが明らかになった。また、E2 処理が *DMY* の発現量の低下を誘導せず、*DMY* 下流で雄特異的に発現が上昇する遺伝子である *GSDF* の発現は E2 処理によって低下することが明らかになったことから、XY 個体の雄化は、*DMY* の直下で E2 が *DMY* の働きをキャンセルすることによって起こることが推察された。

3) 野生メダカ卵の E2 暴露による性転換率の比較から、野生集団中には E2 に対する性転換を指標とした感受性について多様な個体が生息していることが示唆された。

#### ④研究課題に関連する主な発表業績

Otake H., Shinomiya A., Kawaguchi A., Hamaguchi S., Sakaizumi M. The medaka sex-determining gene *DMY* acquired a novel temporal expression pattern after duplication of *DMRT1*. *Genesis* 46:719-723 (2008)

Otake H., Hayashi Y., Hamaguchi S., Sakaizumi M. The Y chromosome that lost the male-determining function behaves as an X chromosome in the medaka fish, *Oryzias latipes*. *Genetics* 179:2157-2162 (2008)

Nagai T., Takehana Y., Hamaguchi S., Sakaizumi M. Identification of the sex-determining locus in the Thai medaka, *Oryzias minutillus*. *Cytogenet. Gamete Res.* 121:137-142 (2008)

Sato T., Suzuki A., Shibata N., Sakaizumi M., Hamaguchi S. The novel mutant *scl* of the medaka fish, *Oryzias latipes*, shows no secondary sex characters. *Zool. Sci.*, 25:299-306 (2008)

Tanaka K., Takehana Y., Naruse K., Hamaguchi S., Sakaizumi M. Evidence for different origins of sex chromosomes in closely related *Oryzias* fishes: Substitution of the master sex-determining gene. *Genetics* 177:2075-2081 (2007)

Takehana Y., Demiyah D., Naruse K., Hamaguchi S., Sakaizumi M. Evolution of different Y chromosomes in two medaka species, *O. dancena* and *O. latipes*. *Genetics* 175:1335-1340 (2007)

- Matsuda M., Shinomiya A., Kinoshita M., Suzuki A., Kobayashi T., Paul-Prasanth B., Lau E., Hamaguchi S., Sakaizumi M., Nagahama Y. *DMY* gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. PNAS 104:3865-3870 (2007)
- 濱口 哲 メダカの性的可塑性と環境中での内分泌かく乱現象の評価 日本農薬学会誌 31(4):457-460 (2006)
- Shinomiya A., Kato M., Yaezawa M., Sakaizumi M., Hamaguchi S. Interspecific hybridization between *Oryzias latipes* and *Oryzias curvinotus* causes XY sex reversal. J. Exp. Zool. 305A:890-896 (2006)
- Otake H., Shinomiya A., Matsuda M., Hamaguchi S., Sakaizumi M. Wild-derived XY sex-reversal mutants in the medaka, *Oryzias latipes*. Genetics 173:2083-2090 (2006)
- Sato T., Endo T, Yamahira K., Hamaguchi S., Sakaizumi M. Induction of female-to-male sex reversal by high temperature treatment in Medaka, *Oryzias latipes*. Zool. Sci., 22:985-988(2005)
- Iwamatsu T., Kobayashi H., Hamaguchi S., Sagegami R., Shuo T. Estradiol-17 $\beta$  content in developing Eggs and induced sex reversal of the medaka (*Oryzias latipes*) J. Exp. Zool. 303A:161-167(2005)

## ○野生2：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、李政勲、北九州市立大学大学院 国際環境工学研究科：門上希和夫

②研究概要：本研究は、内分泌かく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、殊に魚介類の個体群及び群集レベルで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(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。

その一環として、今年度は、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(1993年～2001年)を用いて、そこに含有される重金属の分析・測定を行う予定で、現在も引き続き分析中である。分析結果に基づき、当該期間の東京湾における重金属汚染の経年推移の復元を図る予定である。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予定である。

また、2)の観点から、東京湾20定点調査で2008年8月に採取された底質(表層泥)試料を用いて、誘導結合プラズマ質量分析計(ICP/MS)による多元素同時分析を行い、東京湾の底質(表層泥)における重金属の空間分布を明らかにした。すなわち、東京湾内の20定点における表層底質中の重金属濃度を測定し、最近の東京湾における重金属汚染の実態を示した。また、公表されている底質ガイドライン値と本研究で検出された重金属濃度を比較し、底棲魚介類に対する重金属の潜在的な影響の



評価を試みた。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重金属の探索を試みた。

- ③研究結果のまとめと考察：東京湾と有明海の比較、また東京湾内の比較から、東京湾の底質、特に湾央部の底質には、人間活動由来の重金属が相当蓄積していると推察された。

検出濃度と底質ガイドライン値を比較した結果、Hg、Cr、Ni、Cu、Zn、As、Cd、Pb の8金属がいずれかの定点で ERL を超え、また、Hg、As、Zn、Cu、Ni の5金属の平均値が ERL を超えていた。さらに Hg、Zn、Ni の最大値が ERM を超えていた。

この結果が生態毒性学的に意味するものは、今後、注意深く解析していく必要がある。例えば、マコガレイでは、資源量が高水準であった 1980 年代と比較して、近年では胃内容物重量(摂餌量)が有意に減少し、ほとんどが多毛類で占められるなどの餌生物の単相化が見られる(李ほか、未発表データ)。にもかかわらず、近年の東京湾産マコガレイの成長速度は、1980 年代よりも上昇している(李ほか、未発表データ)。そうかと思えば、成熟年齢の遅延傾向も認められ(李ほか、未発表データ)、資源量水準が低下した近年の東京湾産マコガレイの生活史特性変化に関して、原因を含めて十分な生態学的解釈あるいは説明ができない。一方、減耗が激しいと考えられている生活史初期の量的関係を東京湾のマコガレイを対象に 2006 年～2008 年の3年間調べた結果、産卵量と浮遊仔魚密度に相関がみられず、浮遊仔魚密度と着底稚魚密度には相関がみられた(李ほか、未発表データ)。浮遊仔魚の生息密度が極めて低かった 2007 年には、その密度が高かった 2006 年と 2008 年よりも 1 月から 2 月の平均水温が約 3℃高かったため、このことが受精卵の孵化率や浮遊仔魚の生残率に影響した可能性がある(李ほか、未発表データ)。研究代表者らによる予備実験の結果、これを支持すると見られる結果も得られているが、南日本においてもマコガレイは繁殖しているなど、矛盾すると考えられる事実もある。したがって、初期生活史における生残率が当該期間の水温によってのみ決定されるかどうか、依然として不明である。一方、沈性の付着卵であるマコガレイは受精卵が海底の底質に付着していると考えられる。代表研究者らによるこれまでのデータは、稚魚の体内ダイオキシン類濃度が、稚魚の採集された海域の底質中ダイオキシン類濃度と相関することを示している(堀口ほか、未発表データ)。これより、稚魚の生息海域の底質中に蓄積している化学物質が稚魚に移行・蓄積していることが示唆されるが、それによる仔魚の生残や成長、後の性成熟に対する影響については未だ明らかでない。

いずれにしても、底質中重金属などの有害物質による魚介類への潜在的な影響については、種別に生活史特性を考慮して調査・実験を行うことが必要である。その際、底質中重金属がその種の生残、成長、生殖などに及ぼす直接影響だけでなく、餌生物への重金属影響が、捕食者である当該種に及ぶ間接影響についても精査すべきであろう。

#### ④研究課題に関連する主な発表業績

第43回日本水環境学会年会（平成21年3月山口市）において、昨年度調査した東京湾底質の化学物質について、その結果概要を報告した。化学物質分析結果および重金属分析結果などをまとめて論文発表を行う予定である。

### ○野生3：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 農生態学：日鷹一雅、国立環境研究所：五箇公一、京都教育大学 動物生態学：松良俊明、東京農工大学：渡邊裕純

②研究概要：この研究は、近年各地で指摘されているアキアカネをはじめ水田依存性のアカトンボ類の急激な減少について、定量的にそれを示すこと及び減少原因を明らかにした上で、その対策を検討することを最終的な目的としている。

アカトンボ類の現状把握については、赤とんぼネットワーク会員、石川県農家の協力を得て調査を実施した。調査した石川県の水田でアカトンボ類の羽化が確認されたのは、昨年とほぼ同様でわずか4%の水田であった。石川県野々市町の水田からのアキアカネの羽化数は1989年に比べて1/150であり、昨年の1/100からさらに減少していた。秋季の成虫センサスや夏季の高地での成虫センサスでは、アキアカネの100m当たり個体数が1以下というきわめて低い密度の地域が多いことが、昨年に引き続き明らかになった。白山山系三方岩岳では1989年のセンサスで100mあたり平均64.2(最大166.7)個体が確認されていたが、2008年8月の4日間の同一ルートでのセンサスでは1個体も発見されなかった。一方で、減少傾向の地域差の存在も明瞭になった。たとえば、北陸地方では石川県と富山県の減少が著しく、福井県と新潟県上越市付近ではそれほどではないことが明らかになった。特に上越市の秋季調査ではかなり高密度で存在することが示された。しかし、アキアカネの高い移動性や夏季の高地への長距離移動を考慮すると、このような地域差がなぜ生じるのかが問題になる。つまり、地域差が、それぞれの地域からの発生数の差に起因するものかどうかを確認することが次の重要な課題となる。

アカトンボ類減少の原因としては、ライシメータや実験圃場、実際の農家の水田調査によって育苗箱施用浸透性殺虫剤、とりわけフィプロニル(プリンス)による壊滅的影響が昨年に引き続き示された。田面水中の農薬濃度を測定したところ、田植え直後にもっとも濃度が高く、その後は急激に減少するものの、低濃度ながら長く維持されることが明らかになった。検出した最高濃度は1.4ppb程度であり、きわめて低い濃度でアカトンボ幼虫に対する殺虫効果を示すと考えられる。農薬流通量を元に、いくつかの仮定をおいた簡単なシミュレーション計算から、主要3種の育苗箱施用浸透性殺虫剤の影響だけで、それらの農薬が使われる以前に比べて、多くの

都道府県でアキアカネが1/100から1/1,000に減少している可能性や地域差が生じることが示唆された。施用時期を移植時より先の播種時にすることでフィプロニルによるインパクトを軽減する可能性を検討するために圃場実験を行った。播種時処理区でごくわずかな羽化が見られるなど若干の改善が伺われたが、明瞭な効果は認められなかった。育苗方法や移植方法の改良などの検討も必要と思われる。現在流通している箱施用殺虫剤の中にも、カルタップ(パダン)のように、実験室での毒性は強いが、実際の圃場ではアカトンボに対する影響が小さいと思われるものも存在することが昨年来明らかになっている。今後は各種殺虫剤の水田内での動態も含めた特性を把握しながら、アカトンボ類に対する影響が小さい農薬を明らかにしていくことも重要だと考えられる。

アカトンボ類の減少には、浸透性殺虫剤以外にも複数の要因が同時に働いている可能性も大きい。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ことを目的に、多数の同一水田について1年を通じた継続調査を行っているが、浸透性殺虫剤に加えて、中干しの影響を示唆する結果が得られた。

### ③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

石川県農家の協力を得て調査を実施した水田でアカトンボ類の羽化が確認されたのは、昨年とほぼ同様でわずか4%の水田にすぎなかった。石川県野々市町の水田からのアキアカネの羽化数は1989年に比べて1/150であり、昨年の1/100からさらに減少していた。白山山系三方岩岳では1989年のセンサスで100mあたり平均64.2(最大166.7)個体が確認されていたが、2008年8月の4日間の同一ルートでのセンサスでは1個体も発見されなかった。富山県での根来ほか(Symnet11、印刷中)の立山弥陀ヶ原及び平野部での調査でも、石川県とほぼ同様の結果であった。このように石川県と富山県ではアキアカネはきわめて低密度であることが明らかになってきたが、同じ北陸でも新潟県上越市付近ではかなりの高密度で存在することが今回の調査で判明した。福井県でも少なくとも勝山市、鯖江市ではある程度の密度が確認されており、北陸地方という空間的広がり範囲でも地域差が存在することが明らかになってきた。もちろん石川県でも個々の水田レベルでは、たとえば農家による調査で1筆から約3万頭が羽化したと推定される水田が存在したように、多数のアキアカネが発生する水田が無いわけではない。しかし、上記4%という値が示すように、大多数の水田からはアキアカネを初めとしたアカトンボ類が発生していないことが、地域として非常に低密度な状態を生じさせていると考えられる。

ちなみに、先に推定した小松市の水田(面積 1,200m<sup>2</sup>)の約 3 万頭は非常に大きい数字に思えるが、1978 年 6 月上旬に埼玉県大宮市の 2 枚の水田では、それぞれ約 5 万頭(水田面積 920m<sup>2</sup>)と約 3 万頭(水田面積 1,000m<sup>2</sup>)の幼虫が生息していたと推定されており(浦辺ほか 1986)、1970 年代であれば、1 枚の水田からの発生数として必ずしも大きい数字ではないことがわかる。実際、アキアカネは 1 回の産卵で多い場合は 3,000 卵を産む(上田 未発表)。仮に 1 回に 1,000 卵だとして 9 月中旬から 11 月上旬にかけての繁殖シーズンに、雨の日を除く 60 日間にわたって 1 日平均 50 ペアが産卵すると仮定すると、300 万個の卵が 1 筆に産みつけられることになる。仮にその 1%が成虫になるとして 3 万個体の成虫が羽化する計算になる。これらの数字はいずれも低く見積もったものであり、現実にはあり得ない数字ではないことがわかる。

これまでの 3 年間の調査で、少なくともアキアカネに関しては多くの地域で著しい減少が生じていることが、ある程度定量的にも明らかになってきたと思われる。しかし、過去の定量的なデータがほとんど存在しないため、原因を特定することにつながる広範囲な地域での減少傾向の時間的パターンを検出することは不可能であることもほぼ明らかになってきたように思われる。ただ、幸いなことに減少傾向の地域差、すなわち空間的パターンが存在する可能性がこれまでの研究で明らかになってきたので、その空間パターンを利用して、広範囲な減少傾向をもたらしている要因を追求することは可能だと考えられる。今回はそのような試みの 1 つとして、減少原因と考えられる箱施用殺虫剤の流通量と、我々が行ってきた実験で得た生存率から簡単なシミュレーション計算をして減少率の年変化や地域差を量的に推定することを試みた。もちろんここで使用したモデルは非常に単純なものであり、ほかの要因を組み込んだモデルを作る必要があることは確かであるが、いずれにしても、そのようなモデルから予想される個体数の地域差を、実際のフィールドワークで検証していくことが可能になると考えられる。

モデル構築の上でもっとも問題になるのはアキアカネの高い移動性である。アキアカネは水田から羽化した後、本州中部地方であれば 1,000m を超える高地へ移動して夏を過ごすことが知られているが、その移動のために、百キロを超えて移動する場所があると想像されている。もちろんこのような移動を追跡した例は無いが、たとえば 1,000m を超える高地が存在しない千葉県のアキアカネが越夏するためにはそれくらいの距離を移動する必要があることは明白である。実際、越夏場所で標識した個体の再捕獲地点までの直線距離から 70km 以上移動していることは、栃木県の調査で確認されている。この調査の場合は、調査範囲が栃木県にほぼ限定され

ており、再捕獲地点が県境近くであることから、実際にはもっと長距離を移動すると見なければならぬと思われる。今回のモデルでは都道府県間の移動はないものと仮定したが、これはかなり厳しい仮定であると言わざるを得ない。

また別の問題として、水田からの発生数が農薬の使用量などの違いによって地域差が生じたとしても、越夏場所からの移動方向がランダムであれば、そのような地域差が生じないことになる。したがって、地域差が見られると言うことは移動方向がランダムでない可能性を示唆するものであろう。羽化した地域に戻る傾向があるならば、水田からの発生数を左右する要因によって地域差も生じることになる。しかし、移動方向が地形や気象条件などによって決まっているならば、必ずしも水田からの羽化数と秋季の成虫個体数が一致するとは限らないことになる。この問題を明らかにするために、比較的広範囲な地域において、初夏の水田からの羽化数、越夏場所となる高地での個体数、そして秋季の繁殖個体数の地域差、すなわち空間的パターンを明らかにすることが必要だと思われる。

これまでは、減少傾向の把握と個体数モニタリング法の確立というテーマで実施してきたが、これ以上に減少の経時的な変化を解明することを試みることはあまり意義がないと思われる。むしろ、これまでの研究の過程で明確になってきた減少傾向の地域差を把握すること、地域差が生じるプロセスの解明を目的とした研究にシフトしたいと考えている。また、個体数モニタリング方法としては、赤とんぼネットワーク会員を主体に、個別に研究者に依頼する方法を取っていくことを考えており、市民参加によるモニタリング法の確立は主要な目的から外すことにしたい。農家によるトンボ調査は、石川県では一定の成果を上げることができたと考えている。今後は、地域差の解明のために、石川県以外の地域での展開を主体として実施したい。

## 2. 減少原因の究明

アカトンボ類減少の原因としては、ライシメータや実験圃場、実際の農家の水田調査によって育苗箱施用浸透性殺虫剤、とりわけフィプロニル(プリンス)による壊滅的影響が昨年引き継ぎ示された。田面水中の農薬濃度を測定したところ、田植え直後にもっとも濃度が高く、その後は急激に減少するものの、低濃度ながら長く維持されることが明らかになった。検出した最高濃度は1.4ppb程度であり、きわめて低い濃度でアカトンボ幼虫に対する殺虫効果を示すと考えられる。実際、アキアカネ幼虫に対するフィプロニルの毒性試験では、1ppbでも死亡率の増加が認められている(中原・五箇・神宮字・上田 未発表)。とくに注目されるのは、ほかの殺虫剤と違い24時間後での影響がきわめて小さく、48時間後に影響が大きく出始めるこ

とである。同様の傾向は嶋田ほか(埼玉県環境科学国際センター報 3:94、2003)の実験結果からも伺われる。明らかにフィプロニルは遅効性であり、通常の毒性試験の方法では過小評価になると考えられる。昨年も検討したように、実験室では毒性の高いカルタップ(上記、嶋田ほか2003)施用水田からアキアカネの羽化が多く認められており、室内実験だけから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。フィプロニルの代謝産物に強い毒性があるとの報告もあり、そのような点も含めて来年度以降に研究を進めていく必要があると考えている。

施用時期を移植時より先の播種時にすることでフィプロニルによるインパクトを軽減する可能性を検討するために圃場実験を行ったが、その結果は、播種時処理区でごくわずかな羽化が見られるなど若干の改善が伺われたが、明瞭な効果は認められないというものであった。移植直後の水中農薬濃度は2つの処理区でほとんど差がないことから、播種時から1ヶ月を経ても、土中のフィプロニル濃度がほとんど変化しないまま、その土ごと移植されたためこのような結果になったと推察される。イネミズゾウムシの食害調査では両処理区に差が認められなかった。このことは、1ヶ月の育苗期間中に農薬が十分に植物体に移行浸透していることを示唆しており、そうであれば、移植時に土と共に本田に移動するフィプロニルは明らかに余分なものである。播種時に使用する場合は、農薬のコスト面からも、使用量を減ずるなどの工夫も必要なのではないかと考えられる。

先述したように、現在流通している箱施用殺虫剤の中にも、カルタップ(パダン)のように、実験室での毒性は強いが、実際の圃場ではアカトンボに対する影響が小さいと思われるものも存在することが昨年来明らかになっている。一方で、イミダクロプリドに代わるネオニコチノイド系の新しい農薬も普及し始めている。新しい農薬は、主に病害虫の抵抗性に対抗して開発されるのであろうが、病害虫の発生状況は地方により、あるいはもっと狭い地域により、様々であり、そのような点も考慮しながら、アカトンボ類も含めた生物多様性への影響という点で、これら多様な殺虫剤のどれが、それぞれの地域にふさわしいかを検討するために必要なデータを収集するという研究も重要だと考えられる。

複数の要因の相対寄与率を求めることが望ましいという評価委員からのご指摘もあり、大学近くの水田群で年間を通しての継続的な調査を実施した。その結果、多数の産卵が見られ、フィプロニルの使用が無かったにもかかわらず、翌年の羽化が認められない水田がいくつもあり、6月前半の羽化前の中干しの影響を示唆する結果が得られた。このように、ある水田からアカトンボ類が羽化するかないか、

どれだけ羽化するかは、産卵から羽化までの全プロセスを詳細に追跡していくことが重要であることが明らかになった。今後は、今回不十分にしか実施できなかった幼虫密度の推定、産卵数の推定方法を開発することで、相対寄与率の推定を可能にしたいと考えている。

#### ④研究課題に関連する主な発表業績

神宮字 寛・上田哲行・五箇公一・日鷹一雅・松良俊明(2009). フィプロニル, イミダクロプリドを成分とする浸透移行性殺虫剤がアキアカネの幼虫と羽化に及ぼす影響. 農業農村工学会論文集77(2)



○19F S 1 : 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

①研究者：静岡大学 理学部：徳元俊伸(代表研究者)

②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 $\beta$ -DHP)が作られる。17,20 $\beta$ -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 $\beta$ -DHPは、通常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、比較的短時間で起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stilbestrol(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を魚類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。この試験管内アッセイで反応性が示された物質群について卵細胞を用いたアッセイやさらに代表者らが開発した小型熱帯魚ゼブラフィッシュを用いた生体内反応による評価法を用いてこれらの物質が環境水中に溶解した場合の魚類の卵成熟、排卵に与える影響を明らかにする。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評価法の確立を目指す。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。

③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可能性が疑われる 65 物質の中にもステロイド膜受容体に作用するものが存在することが明らかになった。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卵母細胞を用いた *in vitro* の卵成熟誘起実験、ゼブラフィッシュ生体を用いた *in vivo* の実験により、ステロイド膜受容体をターゲットとしたノンゲノミック反応に与える影響を調べたところ *in vitro* のアッセイのみならず *in vivo* のアッセイにおいても卵成熟、排卵の阻害効果を示した。これらの結果は環境水中にこれらの物質が存在した場合、魚類の産仔数の減少を引き起こすことを意味している。本研究では物質群への暴露は最長でも一日に留まったがさらに長期間暴露した場合は環境中での作用濃度がさらに下がる可能性も考えられる。今後検証すべきポイントである。本研究によりステロイドのノンゲノミック反応をターゲットとする内分泌かく乱物質が存在することが示された。本研究で用いた培養細胞のリコンビナント膜受容体を用いた実験系、卵母細胞の培養系、ゼブラフィッシュ生体を用いた評価系に加えて本研究で確立を開始した受容体分子を用いたハイスループットなアッセイ系を早期に完成させ、多くの化学物質について活性評価を行い、ステロイド膜受容体に作用する化学構造の特定が望まれる。

④研究課題に関連する主な発表業績

Toshinobu Tokumoto (2008) **Cell cycle regulation in fish oocytes-identification of a membrane progestin receptor as a key mediator of steroid non-genomic action.** “Cell Cycle and Development in Vertebrates“(J.Kubiak, M.Ciemerych and L.Richard-Parpaillon ed), *in press*.

Toshinobu Tokumoto, Katsutoshi Ishikawa, Tsubasa Furusawa, Sanae Ii, Kaori Hachisuka, Mika Tokumoto, Huai-Jen Tsai, Shigeo Uchida, Akinori Maezawa (2008) **Sonophotocatalysis of endocrine-disrupting chemicals.** *Marine Environmental Research* 66,372-377.

徳元俊伸 魚類卵成熟の研究から発見された新規ステロイド膜受容体 日本生殖内分泌学会雑誌、13,49-51 (2008) .

徳元俊伸、筒井和義 ステロイドのnon-genomic action 日本臨床、66,70-76,(2008).

○19F S 2 : 精子に存在するホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 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

①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

②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A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)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。

PLA<sub>2</sub>は膜リン脂質より脂肪酸及びリゾリン脂質を生成する酵素であり、PLA<sub>2</sub>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PLA<sub>2</sub>のアイソザイムはその構造や性状により、分泌性PLA<sub>2</sub>(sPLA<sub>2</sub>)、細胞質型PLA<sub>2</sub>(cPLA<sub>2</sub>)、カルシウム非依存性PLA<sub>2</sub>(iPLA<sub>2</sub>)に大別されるが、精子にはこのうちsPLA<sub>2</sub>の多くのアイソザイムが高濃度存在し、これらが受精反応に深く関与することが示唆されている。最近になり代表研究者らは、ヒト血小板のPLA<sub>2</sub>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用量依存的に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PLA<sub>2</sub>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sPLA<sub>2</sub>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sPLA<sub>2</sub>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sPLA<sub>2</sub>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sPLA<sub>2</sub>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、昨年度は、精子に存在するsPLA<sub>2</sub>アイソザイムのうちX型sPLA<sub>2</sub>が受精の過程で重要な役割を果たしており、MEHPは、このX型sPLA<sub>2</sub>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、*in vitro*における精子の受精能を阻害することを明らかにした。本年度はさらに、環境化学物質の1つ、ビスフェ

ノールAも、MEHP同様に、*in vitro*における精子の受精能、X型sPLA<sub>2</sub>活性を抑制すること、X型sPLA<sub>2</sub>に加え、精子に存在するIII型sPLA<sub>2</sub>も受精の過程で重要な役割を果たしていること、を明らかにした。

今後は、フタル酸エステル類、ビスフェノールA、ノニルフェノール以外の代表的な環境化学物質の、X型sPLA<sub>2</sub>阻害活性及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、種々の環境化学物質がIII型sPLA<sub>2</sub>の酵素活性に及ぼす影響についても検討する。さらに、X型及びIII型sPLA<sub>2</sub>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、これらのsPLA<sub>2</sub>阻害活性の測定が毒性評価に応用できないか、検証を行う。

③研究結果のまとめと考察：マウス精子には、膜リン脂質より脂肪酸及びリゾリン脂質を生成するPLA<sub>2</sub>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、本研究では、これまでに、このうちX型sPLA<sub>2</sub>が受精の過程で重要な役割を果たすことを明らかにし、このX型sPLA<sub>2</sub>が環境化学物質の雄性生殖毒性の標的となる可能性を示してきた。昨年度までの研究では、フタル酸エステル類の代謝産物の1つMEHPが、このX型sPLA<sub>2</sub>活性の阻害を介して受精能に影響を及ぼす可能性を示唆されたが、本年度はビスフェノールA、ノニルフェノールについて検討し、MEHPに比較すると弱いものの、ビスフェノールAにもX型sPLA<sub>2</sub>活性を阻害し、*in vitro*における精子の受精能を抑制する作用があることを明らかにした。ビスフェノールAの雄性生殖に対する影響としては、これまでにマウスに投与した際に、精巣上体、精囊の重量低下、精子数の低下傾向が見られるという報告があるが、生殖毒性としては大きな問題とはならないレベルであるとされている。今回見られた*in vitro*における精子の受精能に対する影響については、濃度依存性を含め、より詳細な検討が必要である。また、今後さらに、様々な環境化学物質について、X型sPLA<sub>2</sub>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sPLA<sub>2</sub>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。

一方、本年度において遺伝子欠損マウスを用いた解析により、X型sPLA<sub>2</sub>のみならず、III型sPLA<sub>2</sub>が精子の機能において極めて重要な役割を果たすことが明らかとなった。すなわち、III型sPLA<sub>2</sub>遺伝子欠損マウス由来の精子は運動能が低下しており、受精能が著しく低いことが示された。この遺伝子欠損マウス由来の精子のアクロソーム反応には異常が認められなかったことから、III型sPLA<sub>2</sub>は精子の受精過程よ

り、精子の成熟や分化といった過程に深く関わることが予想される。III 型 sPLA<sub>2</sub> も X 型 sPLA<sub>2</sub> 同様に、環境化学物質の雄性生殖毒性の標的となる可能性が考えられ、今後は III 型 sPLA<sub>2</sub> の活性に及ぼす物質についても検索を行う必要が考えられた。

#### ④研究課題に関連する主な発表業績

本年度において、本研究成果の一部を衛生薬学・環境トキシコロジー フォーラム 2008（10月）において発表した。現在、本研究の成果の一部については、Journal of Clinical Investigation誌に投稿準備中である。

○19F S 3 : 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

①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 生命理科学研究科：新免輝男、国立環境研究所：笠井文絵

②研究概要：

- 1.野生絶滅種・絶滅危惧種シャジクモ類に対する農薬、富栄養化をもたらす栄養塩、  
内分泌かく乱物質等の環境負荷化学物質の影響について、光化学系 II 活性、光合  
成酸素発生活性(以上、短期的影響)、長期の成長、精子、卵胞子形成(以上、長期  
的影響)について解析する。
- 2.現存するシャジクモ類の生態観察及び生育状況の調査を行なう。そして、生息が  
確認されたフィールドと生息が見られないフィールドにおいて、環境要因、周  
辺環境の変化、水質及び農薬濃度の化学分析を行う。それらの結果を比較し、  
その影響について解析する
- 3.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を総合して、シャジ  
クモ類衰退の原因、原因物質を特定する。

③研究結果のまとめと考察：生理実験並びにフィールドでの生態・生育状況の調査結  
果を総合して、シャジクモ類衰退の原因及び原因物質についてまとめ、考察する。

- 1)1950 年代に使用されていた PCP の純度は低く、混在する成分がシャジクモ衰  
退の原因であるとする推測もなされてきたが、光合成活性に対する阻害実験か  
ら、PCP 自身が非常に低濃度でシャジクモの光合成光化学系活性を阻害するこ  
とが明らかとなった。
- 2)シャジクモの生理学的研究の第一人者 Lucas(1978)は無機炭素の同化には膜電  
位が必要であることを報告している。しかし、本解析を行った pH(約 7.5)では、  
アルカリバンドの形成が著しく阻害されたにもかかわらず、PCP、BX 処理細胞  
のいずれにおいても、少なくとも 2 時間は膜電位が維持された。すなわち、両  
農薬は膜電位に影響する前に、光合成による無機炭素同化を阻害していると結

論できる。これらの結果は、FluoroCam、光合成酸素発生、遅延発光現象を応用した生物微弱光発光計測技術による光合成活性に対するそれら農薬の影響の結果を支持するものである。

- 3)クロロフィル量と懸濁物量(SS)、全リン濃度(TP)との間には、シャジクモ類が生育する池でもない池でも有意な正の相関が見られた。つまり富栄養化に関係する要因は互いに相関し、シャジクモ類の生育の有無を決める要因になっていると考えられる。
- 4)特に、クロロフィル量の多い低地の大きな池では、富栄養化と同時に除草剤が検出された。これらの池のほとんどは、かつてはシャジク藻類が生育していたが、現在は消滅してしまった地点である。このことから、今後暴露量と毒性に関する検討が必要であるが、除草剤もシャジクモ類の生育の有無に影響を及ぼす要因になっている可能性が考えられる。
- 5)特に、富栄養化などで透明度が下がった池における唯一の生育場所となり得る浅い沿岸域は、周辺の水田から流入する除草剤の影響を直接受ける可能性がある。
- 6)PCP の農薬としての使用を禁止されて以降、徐々に水田におけるシャジクモ類の生育が報告される傾向にある。
- 7)水田におけるシャジクモの生育は、毎年、卵胞子から発生し繁茂することを繰り返していることを確認した。

以上より、シャジクモの衰退要因の一つとして、1950年代に多く使用されていたPCPが低濃度でシャジクモの光合成を阻害し、それが生育障害を引き起こし、その結果、シャジクモ類の衰退要因の一つとなった可能性が十分考えられる。さらに、環境の改善やシャジクモ類衰退の要因となった農薬の使用停止により、生育に適した環境が復元され、いくつかのフィールドでシャジクモ類の復元に繋がった可能性が高いことを重要視しなければならない。

シャジクモ類生育が優良環境の指標となることは文献が示しており、今後さらに、シャジクモ類の光合成、生育及び卵胞子形成などの生殖に悪影響を及ぼす要因を特定することによって、シャジクモ類の復元とその生育を可能とする環境の復元が可能となるものと考えられる。

したがって、シャジクモ類の衰退へ導いたと考えられる環境負荷化学物質(農薬など)とシャジクモ類の生理活性との関連性をさらに一層科学的に明らかにする必要がある。そしてその結果を踏まえて必要な対策を講じるためには、少なくとも以

下に述べる生態調査や生理実験と培養実験が必要と考えられる。

- 1) シャジクモ類の光合成活性に対するさらに幅広い環境負荷化学物質の影響の評価
- 2) それら環境負荷化学物質の作用機序の解明
- 3) シャジクモ類生育分布に関する生態調査と水質や農薬の存在量に関する環境調査
- 4) 培養実験による農薬その他の環境負荷化学物質の長期的影響の解析
- 5) 生殖器官形成に対する影響を調べるために、精子や卵胞子の形成を人工的に制御するための条件を明らかにし、それらの実験系を利用する環境負荷化学物質の影響の解析

#### ④研究課題に関連する主な発表業績

Sakayama, H., et al. Taxonomic reexamination of *Chara globularis* (Charales, Charophyceae) from Japan based on oospore morphology and rbcL gene sequences, and the description of *C. leptospora* sp. nov. *Journal of Phycology* (In press).

Sakayama, H. Taxonomy of *Nitella* (Charales, Charophyceae) based on comparative morphology of oospores and multiple DNA marker phylogeny using cultured material. *Phycological Research* 56: 202–215 (2008).

Kato, S., Sakayama, H., et al.: Morphological variation and intraspecific phylogeny of the ubiquitous species *Chara braunii* (Charales, Charophyceae) in Japan. *Phycologia* 47: 191–202 (2008).

Higa, A., Sakayama, H.(4<sup>th</sup>) et al.: Seasonality of gametophyte occurrence, maturation and fertilization of the freshwater red alga *Thorea okadae* (Thoreaales, Rhodophyta) in the Kikuchi River, Japan. *Phycologia* 46: 160–167 (2007).



## ○19F S 4 : 両生類の性ホルモン様物質暴露による精巣卵形成についての研究

①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

②研究概要：これまでに野外両生類において精巣卵が報告されている。両生類の精巣卵形成は、実験的に誘導されることが報告されているが、ある種の両生類では、正常な性分化過程においても見られる。そこで、野外両生類に見られる精巣卵が、環境に存在する化学物質により誘導されるのか、それとも正常な現象であるのかを知るための初期的な実験として本研究は行われた。

精巣卵を持つ個体の割合(出現率)が地域により異なるトノサマガエルに着目し、環境を操作しやすい室内飼育における精巣卵の消長を調べた。精巣卵の出現率が高い富山県産トノサマガエルを用いて、野外採集時及び室内飼育後のそれぞれの精巣卵について組織学的に調べた。その結果、出現率に差は認められなかったが、室内飼育後では精巣当たりの精巣卵数が減少する傾向が見られ、精巣卵の細胞質が濃染されたことから、精巣卵が退化傾向にあることが考えられた。一方、精巣卵の出現率がほとんど認められない広島県産トノサマガエルでは、人工媒精により得られた生殖腺の発達過程にあるステージX及びステージXXV(変態完了期)の幼生に対して、テストステロン・プロピオネート(TP)又はエストラジオール・ベンゾエイト(EB)、ビスフェノールA(BP-A)、ノニルフェノール(NP)の投与を2~4ヶ月間行い、精巣卵について組織学的に調べた。その結果、溶媒処理及びEB処理では精巣卵が認められなかったが、TP処理及びBP-A処理、NP処理では精巣卵が認められた。以上から、野外トノサマガエルの精巣卵形成及び維持に対して化学物質などの環境要因が関係していることが考えられた。

さらに、飼育環境における性ホルモン様物質の存在を調べるためのレポーター遺伝子アッセイ系を構築するために必要な性ホルモン受容体の全長 cDNA の単離も計画した。

③研究結果のまとめと考察：本研究は、野外両生類に見られる精巣卵が、環境に存在する化学物質により誘導されるのか、それとも正常な現象であるのかを知るための初期的な実験として行われた。

精巣卵の出現率が高い富山県産トノサマガエルを6月に野外採集し、室内環境下

にて飼育を行ったところ、4ヶ月後の10月における精巣卵出現率は飼育開始時期の精巣卵出現率と比べて変化が見られなかったものの、精巣当たりの精巣卵数に減少傾向が見られた。さらに、精巣卵を囲む体細胞との間に隙間が見られ、細胞質も濃染されたことから、室内飼育4ヶ月後の精巣卵は退化傾向にあることが考えられた。10月における富山県の野外トノサマガエルにおいては、精巣卵出現率は低く、室内飼育と同様に精巣当たりの精巣卵の数は少なく、細胞質も濃染された。従って、富山県の野外トノサマガエルに観察される精巣卵の形成には、化学物質を含めた何らかの環境要因が起因していることが考えられた。

次に、精巣卵の出現率が低い広島県産のトノサマガエルを室内繁殖させ、得られた幼生に化学物質を投与したところ、生殖腺の異なる発達過程において、TP及びBP-A、NPが精巣卵形成を誘導することが明らかになった。無尾両生類のラナ属の多くでは、幼生期のアンドロゲン処理により雌から雄への性転換が誘導されることが知られている。今回、ステージXからTP処理を開始した群において、雄に性比が偏っている事から、TP処理により雌から雄への性転換が誘導されたと考えられる。ステージXの卵巢ではすでに肥大卵母細胞の分化が見られるため、ステージXからのTP処理群に精巣卵が観察されたのは、卵巢に作用し、性転換が誘導される過程において肥大卵母細胞が残ったことが原因として考えられる。しかし、ステージXXVからのTP処理群では、性比の偏りが見られなかったが、精巣卵形成が高率に誘導されたことから、TPは精巣に作用し精巣卵形成を誘導したことが考えられた。BP-A処理及びNP処理でも性比には影響を与えずに精巣卵出現率は高かったことから、ステージXXVからのTP処理と同じように、BP-A及びNPは精巣に作用し精巣卵形成を誘導したことが考えられた。しかし、EB処理では精巣卵形成は誘導されなかったことから、両生類における精巣卵形成の誘導におけるBP-A及びNPの作用は、エストロゲン様作用によるものではなく、アンドロゲン様作用、もしくは独自の作用によることが考えられた。

本研究の結果は、今後さらに詳しく両生類における精巣卵形成能及び精巣卵形成メカニズムを解明するための大変有用なモデルになると思われる。

#### ④研究課題に関連する主な発表業績

高瀬稔（広島大学）、佐藤友美（横浜市立大学）：室内飼育における野外トノサマガエル精巣卵の消長．平成20年度環境ホルモン学会第8回研究発表会、12月、東京．

## ○20F S 1：魚食性猛禽類「ミサゴ」の生態とその食物連鎖に関する基礎的研究

①研究者：岩手県立大学 総合政策学部：由井正敏(代表研究者)、平塚明、千葉啓子、岩手大学 工学部：海田輝之、岩手医科大学 医学部：世良耕一郎

②研究概要：本研究は準絶滅危惧種の魚食性猛禽類「ミサゴ」を対象とした生態調査である。近年、食物である魚類が農薬汚染で減少するなどの生育環境の悪化によりその数が減少し、内陸部の河川や湖沼に進出するなど生息域にも変化がみられるが、本種の生息状況の実態調査、ことに生息環境との関連を調査した研究や記録は殆んどないことから本研究に着手した。本県内陸部のダム湖近傍を生息地とするミサゴを対象に、その生息状況、繁殖状況及び採餌行動等の情報の収集を実施するとともに、ミサゴの生息環境中に存在する内分泌かく乱作用を有する化学物質が捕食対象魚類から食物連鎖を介し、高次捕食者であるミサゴに生物濃縮するか否かを観察することにより、ミサゴの生息状況や繁殖行動に及ぼす環境中の有害化学物質による影響を検討する。本年度の研究開始がミサゴの離巢、避寒地への移動期に入ったため、サンプリングは次年度にも継続する。

これまでの観察から、①ミサゴはこの10～15年の間に沿岸部から北上川一帯に進出しており、調査地域では1998年に繁殖が確認されている。本年度は3月～11月の間にミサゴが滞在し、冬期は暖地に漂行した。ただし、本県南部では最近越冬する個体が見られる。②営巣位置及び繁殖成績では、北上川沿いに生息するミサゴの繁殖状況は良好で、年平均2～3羽のヒナを巣立たせている。調査地近傍に生息するミサゴつがいもこの3年間にそれぞれ2、3、3羽のヒナを巣立たせたことが明らかになった。③調査地近傍で繁殖するミサゴつがいの育雛後期から巣立ち以降の行動圏は、もっぱらダム湖面を使っており、ダム湖内に生息する魚類を捕獲していることが観察された。現在、捕食対象となった魚類を採捕し、可食部及び内蔵等における内分泌かく乱作用を有する化学物質定量のための前処理方法及び分析項目の選定、精度管理について検討中である。

③研究結果のまとめと考察：調査地ダム近傍では3月～11月の間、ミサゴが滞在し、冬期は暖地に漂行する。調査地を含む北上川沿いに生息するミサゴの繁殖状況は現在のところ良好で、年平均2～3羽のヒナを巣立たせている。ダム近傍に生息するミサゴつがいも近年2～3羽のヒナを巣立たせた。ダム近傍で繁殖するミサゴつが

いの育雛後期から巣立ち以降の行動圏は、もっぱらダム湖面を使っており、ダム湖内に生息する魚類を捕獲している。これらの観察から、営巣地ではミサゴの羽毛類やペリットを、またダム湖内の魚類を採取し、内分泌かく乱作用を有する化学物質の分析に供する試料を確保し、現在分析面での検討を実施している。

ミサゴが河川に進出する傾向は国内で広く見られており、ダム湖近傍でのミサゴ繁殖も同様の現象の一環と考えられるが、これらの直接的間接的要因についてはまだ解明されていない。今後、本研究結果が要因解明のための知見となれば、ミサゴの生態と環境変化の関連の解明に意義あるものとする。

#### ④研究課題に関連する主な発表業績

由井正敏, 平塚明, 山田一裕, 千葉啓子, 海田輝之: 北上川水域をモデルとした生態系影響評価の試み, 全学環境研究プロジェクト報告書, pp.54-56(別添資料pp.1-12), 2008.

千葉啓子, 山田一裕, 平塚明, 海田輝之, 渡辺孝男, 世良耕一郎, 由井正敏: 北上川水域をモデルとした生態系影響評価の試み-四十四田ダム周辺の生態系試料の分析, 第57回東北公衆衛生学会口頭発表, 2008.

## ○20F S 2 : 化学物質誘発性のエピジェネティック修飾による DOHaD モデルの検証

①研究者：東京大学 医学系研究科：大迫誠一郎(代表研究者)

②研究概要：近年、いわゆる環境ホルモンと呼ばれる化学物質が、動物実験において胎児期曝露により生後個体の形質に不可逆的変化を誘起することが示された。中でも行政的に胎児期影響の更なる詳細な検討が求められているビスフェノールA(BPA)はその作用が強いことが示されつつある。本研究では、いわゆる環境ホルモンが未知の受容体に結合した後、発生途上の各臓器内でゲノムのエピジェネティックな異常を引き起こすという仮説を立証するため、ChIP解析を中心とした網羅的解析でその標的遺伝子を割り出し、さらにこの実験系をDOHaD(Developmental Origins of Health and Disease)モデルとして個体の感受性変化の発生的機構を明らかとすることを目的とする。

③研究結果のまとめと考察：本研究ではEDsとして、Bisphenol-A(BPA)及びフタル酸エステル類の一種Di(*n*-butyl)phthalate(DBP)を使用している。特にBPAは胎児期曝露で不可逆的変化を誘起することが示され、標的は生殖機能異常や脳高次機能である。BPAに関しては次の2つのエピゲノム関連の報告がある。胎生期曝露を受けた個体でPhosphodiesterase Type4 Variant4のDNA低メチル化により前立腺癌に対して高感受性になる<sup>1)</sup>という報告と、Agouti yellow mouseの変異Agouti遺伝子のintracisternal A particleトランスポゾン配列の低メチル化により体毛色が変異型の黄色に偏る<sup>2)</sup>という報告である。

しかし、如何なる分子的变化が引き起こされてエピゲノムに変化をもたらし、発生影響を示すのか全く不明である。本研究によるエピゲノムの網羅的解析から標的遺伝子を同定していきたい。

- 1). Ho SM, Tang WY, Belmonte J, Prins GS. Developmental exposure to estradiol or bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase 4. *Cancer Res.* 2006;66:5624-32.
- 2). Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

2007;104:13056-13061.

④研究課題に関連する主な発表業績

Wu Q., Suzuki J.S., Zaha H., Lin T-M., Peterson R.E., Tohyama C., and **Ohsako S.**  
Differences in gene expression and benzo[a]pyrene-induced DNA adduct formation in the liver of three strains of female mice with identical *AhRb2* genotype treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and/or benzo[a]pyrene. *J Applied Toxicol* 28, 724-733, (2008).

○20F S 3 : メダカの再生産に及ぼす化学物質及びその代謝物の影響とトキシコゲノミクスによる作用機序の解明

①研究者：熊本県立大学 環境共生学部：有菌幸司(代表研究者)、愛媛大学 沿岸環境科学研究センター：石橋弘志

②研究概要：本研究課題では、有機フッ素化合物の潜在的汚染源であるフッ素テロマーアルコール(FTOHs)及びその代謝物PFOAを対象として、メダカの再生産に及ぼす影響を評価し、トキシコゲノミクスによる作用機序の解明を目指すことを目的としている。平成20年度はエストロゲン作用を有する環境化学物質を中心に以下の検討を行った。

- 1) 8:2 FTOH及びPFOAを対象として、メダカ胚及び孵化仔魚に対する急性毒性試験を実施し致死作用を調査した。胚(受精後12時間以内の受精卵)を用いた14日間の孵化阻害試験の結果、8:2 FTOHは0.25～250  $\mu\text{M}$ の曝露濃度範囲で致死作用は認められず、孵化率への影響も認められなかった。一方、PFOA曝露では250  $\mu\text{M}$ 曝露区において曝露開始1日目に全ての胚の死亡が観察された。また、孵化仔魚を用いた96時間急性毒性試験を行ったところ、8:2 FTOH、PFOAともに0.25～250  $\mu\text{M}$ の曝露濃度範囲で致死作用は認められなかったものの、8:2 FTOH曝露により活動度低下などの行動異常個体が観察された。
- 2) 既にエストロゲン様作用が明らかとなっている化学物質を対象として、雌雄メダカ成魚の肝臓における遺伝子発現変動をDNAマイクロアレイで解析し、エストロゲン応答遺伝子を中心にこれらの化学物質の作用を明確にとらえる遺伝子群を探索・同定することを試みた。E2、OP及びBPAを用いた繁殖試験を実施し、産卵数及び受精率を指標としてLOEC及びNOECをそれぞれ算出し、これらの結果及び1)で明らかにした致死影響濃度を基に、E2、OP、BPA、 $\alpha, p'$ DDT及び8:2 FTOHの3日間曝露試験を行った。摘出した肝臓から調製したRNA試料を用いて、DNAマイクロアレイ(エコジェノミクス社製)による遺伝子発現解析を行い、現在、これらの化学物質により応答する遺伝子の発現変動を階層的クラスタリングによる系統化や遺伝子ネットワーク間のパスウェイ解析などを実施しており、魚類の再生産への影響にどのようなカスケードで遺伝子発現の変化が関与するか予測を試みている。

我々は最近、雄メダカに対するFTOHsのエストロゲン様作用を*in vitro*及び*in vivo*系において明らかにし、8:2 FTOHのエストロゲン様作用濃度はBPAよりも強いことを示唆した。しかしながら、それ以外の8:2 FTOHの生体影響については不明であった。そこで、核内受容体プレグナンX受容体(PXR)に着目し、PXR-チトクロームP450(CYP)3Aシグナル伝達系への影響を解析した。8:2 FTOH曝露した雄メダカの肝臓中PXR及びCYP3A38/40遺伝子発現量を定量的real-time PCRにより測定したところ、PXR遺伝子の発現変化は認められなかったものの、CYP3A38及びCYP3A40 遺伝子の発現が増加していることを明らかにした。メダカのCYP3A38/40はステロイドホルモン代謝に関与することから、8:2 FTOHは雄メダカに対してステロイドホルモン代謝の亢進あるいはかく乱を誘起するものと考えられた。さらに、プロスタノイドの生成過程における律速酵素であり、生殖・生理に関与するcyclooxygenase(COX)に着目し、8:2 FTOH及びPFOAによる遺伝子発現解析を行った。メダカ肝臓由来cDNAからこれらのサブクローニングを試み、メダカゲノムデータベースの解析から、COX-1a、1b及び2の3つのアイソフォームを確認した。8:2 FTOH及びPFOAを曝露した雄メダカの肝臓中COXs遺伝子の発現解析を行ったところ、両物質ともにCOX-2遺伝子の発現を増加させることを明らかにした。以上の結果から、8:2 FTOH及びその代謝物PFOAは生殖・生理やステロイドホルモン代謝に関与する遺伝子群の発現に影響することが明らかとなり、それら潜在的な作用機序に関する知見を集積することができた。今後、さらに長期の曝露試験により繁殖及び次世代影響などを明らかにする予定である。

- ③研究結果のまとめと考察：本研究では、メダカをモデル生物とし、8:2 FTOH 及びその代謝物 PFOA が胚や孵化仔魚など初期生活段階に対する急性毒性影響を明らかにした。一方で、BPA や OP などの内分泌かく乱作用が指摘されている化学物質をモデルとして、DNA マイクロアレイを中心にトキシコゲノミクス手法と生態毒性評価を共用した解析手法を活用して基礎データを蓄積し、その内分泌かく乱作用機序の評価手法開発を試みた。さらに、内分泌かく乱物質の作用点としてエストロゲン受容体(ER)を起点とした情報伝達機構以外で再生産に関与する可能性が考えられる細胞内シグナル伝達系に及ぼす影響を調査した。

メダカ初期生活段階を用いた急性毒性試験の結果から、8:2 FTOH は仔魚に対する毒性が強く、一方、PFOA は胚に対する毒性が強いことから、両物質の毒性発現には異なる作用機序があることを明確化できた。また、すでにエストロゲン作用が明らかになっている化学物質(E2、OP、BPA)を対象物質に繁殖試験を実施するこ



とで繁殖阻害を引き起こす作用濃度を明確にし、これらに関与する遺伝子発現解析を DNA マイクロアレイにより評価した。現在解析中ではあるが、エストロゲン応答遺伝子を中心にこれらの化学物質の作用を明確にとらえる遺伝子群を探索・同定し、遺伝子発現プロファイルからパスウェイ解析を行い、エストロゲン作用物質による再生産への影響について潜在的な作用機序の予測を試みている。マイクロアレイ解析により発現変化がみられた遺伝子については、定量的 real-time PCR 法により発現量の測定を行う予定である。さらに、再生産に関与するシグナル伝達系に着目し、8:2 FTOH 及び PFOA は CYP3As 及び COX-2 遺伝子の発現を増加させることを明らかにした。これらの酵素類は生殖・生理やステロイドホルモン代謝など再生産に関与していることから、再生産への影響を予測する新たなバイオマーカーとしての活用が期待された。以上の解析から、残留性有機汚染物質(POPs : Persistent Organic Pollutants)候補物質である有機フッ素化合物の潜在的な汚染源として憂慮される FTOHs の生体影響に関する知見を集積し、トキシコゲノミクス解析により、メダカの再生産と次世代に及ぼす作用機序の一端を明らかにした。また、親化合物だけでなく代謝物を含めた化学物質の総体として影響評価を試みる本研究は、生体内代謝を考慮した化学物質のリスク評価に重要な情報を提供することが可能である。

#### ④研究課題に関連する主な発表業績

金 俊佑, 石橋弘志, 山内良子, 平野将司, 有菌幸司 : ヒメダカ cyclooxygenase (COX) 遺伝子発現に及ぼす NSAIDs の影響, 第11回環境ホルモン学会 (日本内分泌攪乱化学物質学会) 2008

山内良子, 石橋弘志, 金 俊佑, 平野将司, 高尾雄二, 有菌幸司 : フッ素テロマーアルコールによるメダカ PXR および CYP3As 遺伝子発現変化, 第11回環境ホルモン学会 (日本内分泌攪乱化学物質学会) 2008

## ○20F S 4：海産無脊椎動物ホヤのトキシコジェノミクス基盤研究と生態調査

①研究者：北海道大学大学院 薬学研究院：安住薫(代表研究者)

②研究概要：海産実験動物として用いられているホヤは無脊椎動物から脊椎動物への移行期の動物であることがゲノム解読の結果からも明らかになっている。現在、化学物質の影響評価の対象生物としてメダカ(脊椎動物)とミジンコ(無脊椎動物)が用いられているが、ミジンコだけで無脊椎動物全般への化学物質の影響を評価するのは無理がある。無脊椎動物は前口動物と後口動物に分かれて進化してきたが、前口動物のミジンコに加えて、後口動物のホヤを試験生物として用いることにより、無脊椎動物全般に対する化学物質の影響をより確実に検出することができる。また、海洋生物の多くは無脊椎動物であり、無脊椎動物はエストロゲン受容体(ER)やアンドロゲン受容体(AR)をゲノム中に持たない。しかしながら、無脊椎動物も生物種ごとに独自の内分泌システムを有していると予想される。したがって、ERやARを介して内分泌かく乱作用を示す化学物質だけを「内分泌かく乱物質」として規制するだけでは、海洋生態系に対するリスクを減らすことにはならない。無脊椎動物の内分泌をかく乱する化学物質をスクリーニングできる試験系を確立するのは必須の課題といえる。

本申請研究では、申請者らが作製したホヤ全ゲノムの7割を検出できる大規模DNAマイクロアレイを用いてホヤのトキシコジェノミクス解析基盤を確立し、ホヤの受精卵及び幼生を用いた生物試験と併用して、海産無脊椎動物に対する化学物質の影響を評価する試験系を確立する。同時に海洋の化学物質汚染の指標となるホヤ遺伝子を探索する。また、最近、食用ホヤの原因不明の疫病が韓国及び日本の東北地方で問題になっているので、日本沿岸に生息する代表的な3種類のホヤについてアンケート形式の生態調査を行ない、生息場所や規模、病気や奇形、個体数減少に関する情報を収集する。さらに、野生ホヤ体内に蓄積している汚染物質の化学分析を実施し、日本沿岸におけるホヤの化学物質汚染状況を調べる。

③研究結果のまとめと考察：本研究は平成20年12月に開始し、すでに興味深い成果が得られている。まず、脊椎動物の内分泌かく乱物質が海産無脊椎動物のホヤの生体機能にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするため、200 ppb NP、200 ppb 4-t-OP、500 ppb BPA、500 ppb SDS 及び 0.01%EtOH(溶媒コントロール)3日間

暴露ホヤを作製した。いずれの化学物質暴露においてもこの濃度と期間内では外見上の異常は見られなかった。現在、mRNA を調製しており、今後、ホヤオリゴ DNA アレイを用いた遺伝子プロファイル解析を行ない、発現が変動した遺伝子の機能的なカテゴリーを「安住式ホヤ遺伝子分類法」を用いて同定し、これらの化学物質がホヤの生体機能に与える影響を予測する予定である。また、5～6月の産卵期のホヤを用いて、これらの化学物質のホヤの受精、発生、変態に対する影響を調べる予定である。それにより、これらの内分泌かく乱物質のホヤに対する影響を評価することができる。

また、10 ppb TBT、及び 5 ppb TPT 3 日間暴露ホヤのアレイ解析を行ない、既存の 100 nM TBT 24 時間暴露ホヤのアレイデータとの比較から、人為的な有機スズの暴露によってホヤ体内で発現が亢進あるいは低下する遺伝子をそれぞれ約 30 個抽出することに成功した。さらに、高濃度の有機スズに汚染されている韓国野生ホヤと有機スズ汚染の全くない舞鶴湾養殖ホヤ(化学分析により確認済み)を用いた解析により、舞鶴ホヤに比べて韓国ホヤで有意に発現が亢進している遺伝子、及び発現が低下している遺伝子を数種類ずつ見いだすことができた。これらの遺伝子の中には、ストレス応答遺伝子や解毒や代謝に関与する酵素が含まれていた。これらの遺伝子は野生ホヤにおける有機スズ汚染のマーカー遺伝子になりうると考えている。今後、内分泌かく乱物質暴露ホヤのアレイ解析を実施し、同様の方法で各種内分泌かく乱物質に特異的に応答するホヤ遺伝子を抽出する予定である。

さらに本研究では日本沿岸に生息するホヤの生態調査の準備をすすめているが、全国レベルのホヤの生態調査は初めてと思われる。韓国沿岸では 10 年以上前から、東北地方沿岸においては近年、食用ホヤの原因不明の病気が発生しており、両国の水産業に打撃を与えている。来月実施予定の全国規模のホヤの生態調査によって、食用ホヤ以外の種類のホヤにおいても病気や個体数の減少等に関する情報の収集が期待される。

食用ホヤの原因不明の病気が蔓延している韓国沿岸は有機スズや重金属の汚染度が高く、海洋環境の悪化もホヤ疾病の蔓延の要因のひとつと考えられている。我々はこれまでの解析により、脊椎動物に対しては毒性が低いと考えられてきた亜鉛イオンがホヤに対しては銅イオンと同程度の毒性を示すことを見いだしている。亜鉛イオンの毒性はホヤだけでなく、他の海産無脊椎動物においても報告されている。現在、犠牲亜鉛防食や電気防食が施された海洋構造物周辺では高濃度の亜鉛イオンが海洋中に溶出されており、それらの構造物の周辺ではホヤを含む海産無脊椎動物はその生体機能に様々な影響を受けていることが予想される。亜鉛イオンだけ

でなく、脊椎動物と無脊椎動物では、重金属や化学物質に対する感受性及びそれらの物質の生物体内における作用機構が大きく異なることが考えられるので、日本沿岸の海洋環境の保全を考える際には、海洋生物の大多数を占める海産無脊椎動物に対する各種汚染物質の影響評価をきちんと行ない、リスク管理を実施することが重要である。進化的に無脊椎動物と脊椎動物の中間に位置し、かつ固着動物で遊泳しないホヤは、汚染物質の影響評価の試験動物として有益なだけでなく、日本沿岸の環境汚染状況を把握する上でもよい指標動物になりえると考えている。

④研究課題に関連する主な発表業績

安住薫. ホヤを用いた海洋汚染化学物質の新規影響評価系, 環境毒性学会誌 (Jpn. J. Environ. Toxicol.), 11(2):95-98, 2008

Kaoru Azumi, Shinjiro Amano, Sorin V. Sabau, Akiko Kamimura, Nori Satoh, and Ryo Koyanagi. Application of ascidian DNA microarray analysis for risk assessment of marine chemical pollutants. Biological Responses to Chemical Pollutants—Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry Vol. 1, Eds., Y. Murakami, K. Nakayama, S. Kitamura, H. Iwata and S. Tanabe, TERRAPUB, Tokyo, pp107-110, 2008

○20F S 5：多環芳香族炭化水素類の内分泌かく乱作用の構造活性相関に基づく魚鱗の化学物質スクリーニング法に関する研究

①研究者：金沢大学 医薬保健研究域薬学系：早川和一(代表研究者)、鈴木信雄、九州保健福祉大学：細井信造

②研究概要：これまで、酵母two-hybrid法を用いて、一連の多環芳香族炭化水素(PAH)とその誘導体類のエストロゲン様活性/抗エストロゲン活性を調べてきた。PAH自体にはエストロゲン様活性はなく、活性発現には水酸基(OH基)が必須であり、構造パラメータ(環数、L/B比、及びO-H距離等)と活性の強さとの間に強い相関があることが判明した。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おり、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、魚類にとっては骨とウロコがカルシウムの貯蔵庫であるが、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(<sup>45</sup>Ca)を用いた実験で証明されている。そこで、種々の化学物質がヒトの骨に及ぼす影響を調べるための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。

本年度は、これまでに酵母two-hybrid法で強いエストロゲン様活性が観察されたOHPAH類を含む内分泌かく乱が疑われている数種の化合物について、これまでに検討してきた構造パラメータを計算して、酵母two-hybrid法によるエストロゲン様活性の強さを推定した。さらに、魚(キンギョ)鱗評価法による活性の実測値を求め、これらの化合物の構造パラメータと魚(キンギョ)鱗評価法による活性の間の相関性を調べた。

その結果、酵母two-hybrid法を用いたときに、OHPAHの中で最も強いエストロゲン様活性を示した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) ( $10^{-5}$  M)にも、4-OHBaAより弱い抗エストロゲン活性がみられた。また、ビスフェノールA<sup>1)</sup> ( $10^{-5}$  M)にも弱い抗エストロゲン活性が認められた。

哺乳類では、エストロゲン受容体の $\alpha$ -タイプが主に発現している。これに対して、魚類のウロコを含む硬組織においては、エストロゲン受容体の $\beta$ -タイプの発現が $\alpha$ -タイプの発現量よりも多い<sup>2)</sup>。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、エストロゲン様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明らかになった<sup>3)</sup>。これらのことが、OHPAHやビスフェノールA(BPA)の作用に種差を生じた理由として考えられる。

ノニルフェノール(NP)は、キンギョ鱗評価システムに適用すると、検討した濃度範囲で抑制作用は確認されなかった。今後、極めて弱い活性をも検出するためにはアッセイ系の感度を向上させることが有効である。そこで、そのための一つの手段として、従来のウロコの重量当たりの酵素活性ではなく、ウロコを超音波破壊した後の上清中のタンパク質当たりの酵素活性を測定したところ、感度の向上が確認できた。来年度はこれらの方法を用いて、内分泌かく乱が疑われているいくつかの化合物を加えて、再度、解析していく予定である。

#### 参考文献

- 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) Yoshikubo, H., Suzuki, N., Takemura, K., Hosoi, M., Yashima, S., Iwamuro, S., Takagi, Y., Tabata, M.J. and Hattori, A.: Osteoblastic activity and estrogenic response in the regenerating scale of goldfish, a good model of osteogenesis. *Life Sci.*, 76: 2699-2709 (2005).
- 3) Hayakawa, K., Onoda, Y., Tachikawa, C., Hosoi, S., Yoshida, M., Chung, S. W., Kizu, R., Toriba, A., Kameda, T., and Tang, N., 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.

#### ③研究結果のまとめと考察：

- 1) 4-OHBaP、3-OHBaA、1-OHPy、BPA、NP、OP の環数は、それぞれ 4、4、4、2、1、1 と大きく異なる。しかし、L/B 比と O-H 距離の 2 つの値について比較すると、エストロゲン様活性が確認された 3-OHBaA は、既に強いエストロゲン様活性を示すことがわかった 4-OHBaA に近い範囲にあり、エストロゲン様活性が確認された BPA も比較的近い範囲に位置した。これに対して、エストロゲン様活性/抗エストロゲン活性のいずれも観察されなかった 1-OHPy の値はこれらより離れていた。一方、OP は 4-OHBaA や 3-OHBaA の値が含まれる範囲に近かったが、NP は大きく離れていた。
- 2) エストロゲン受容体との結合に van der Waals 力も作用する要素の一つと考えられている。NP では L/B 比や O-H 距離の値が活性を有する 4-OHBaA や 3-OHBaA などの OHPAH 類の値から大きく離れており、魚のウロコを用いる改良法でも活

性が観察されなかった結果と一致し、魚のウロコを用いる方法の有効性を示す結果と判断される。

- 3) 酵母 two-hybrid 法では、 $\alpha$ -タイプのエストロゲン受容体を使用している。エストロゲン受容体の  $\alpha$ -タイプが主に発現している哺乳類とは異なり、魚類のウロコを含む硬組織においては、エストロゲン受容体の  $\beta$ -タイプの発現量の方が多い。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これより広いことも、酵母 two-hybrid assay で明らかになった。これらのことが、OHPAH の作用の種差を導いた可能性がある。
- 4) 今回の試験では、ウロコの重さ当たりのマーカー酵素の比活性で評価した。しかし、上述したように NP は検出できなかった。そこで、測定法の感度を向上させるために、ウロコの重量ではなく、ウロコを超音波破壊した後の上清中のタンパク質当たりの酵素の比活性を用いたところ、感度が向上することが判明した。この方法をゼブラフィッシュのウロコを用いた系に適用すると、重量法では  $10^{-7}$  M が検出限界であった 4-OHBaA の毒性を  $10^{-7}$  M 以下でも検出できる可能性が示された。来年度は、この方法を用いて再度評価する予定である。

#### ④研究課題に関連する主な発表業績

Hayakawa, K., Onoda, Y., Tachikawa, C., Yoshita, M., Toriba, A., Kameda, A., Tang, N., Interaction of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons to estrogen receptor, *Polycycl. Aromat. Comp.*, **28** (4), 382-391 (2008).

Shizu, M., Itoh, Y., Sunahara, R., Chujo, S., Hayashi, H., Ide, Y., Takii, T., Koshiko, M., Chung, S. W., Hayakawa, K., Miyazawa, K., Hirose, K., Onozaki, K., Cigarette smoke condensate up-regulates the gene and protein expression of proinflammatory cytokines in human fibroblast-like synoviocyte line, *J. Interf. Cytok. Res.*, August **28** (8), 509-522 (2008).

Yonekubo, J., Hayakawa, K., Sajikic S., Concentrations of bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and derivatives in canned foods in the Japanese market, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 2041-2047 (2008).

Kakimoto, K., Toriba, A., Ohno, T., Ueno, M., Kameda, T., Tang, N., Hayakawa, K., Direct measurement of the glucuronide conjugate of 1-hydroxypyrene in human urine by using liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **867**, 259-263 (2008).

戸次加奈江, 唐 寧, 鳥羽 陽, 早川和一, PAH, NPAH, 変異原性および活性酸素種

生成能から見た北九州と鉄嶺の大気汚染の比較, 産業医科大学雑誌, **30**, 39-45 (2008).

Kameda, T., Akiyama, A., Toriba, A., Tachikawa, C., Yoshita, M., Tang, N., Hayakawa, K., Evaluation of endocrine disrupting activities of monohydroxylated derivatives of 1-nitropyrene by yeast two-hybrid assay, *J. Health Sci.*, **54**, 18-122 (2008).