

野生生物の生物学的知見研究及び化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究等 について(案)

1. 背景

EXTEND2010では、これまでExTEND2005のもとで実施してきた、研究課題を公募し、有識者により構成される野生生物の生物学的知見研究検討部会及び基盤的研究企画評価検討部会により課題の採択及び研究成果の評価を行うという枠組みを基本的に踏襲している。

一方で、より行政施策への活用に適した研究成果を得ることができるよう、

- ・環境リスク評価の進展に寄与し得る研究課題を優先的に選定する
- ・必要に応じて「指定研究」の形で課題を設定する

等の見直しを行うとともに、その成果についてはセミナー等を通じて公表している。

2. 昨年度の実施状況（別紙1参照）

平成26年度には野生生物の生物学的知見研究2課題、化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究2課題及びその他の関連研究2課題の合計6課題を実施した（表1参照）。

研究課題の成果については、EXTEND2010野生生物の生物学的知見研究検討部会及びEXTEND2010基盤的研究企画評価検討部会により開催した評価会（平成27年3月4日及び6日開催、非公開）において評価を行った。

表1 平成26年度に実施した研究課題一覧

(敬称略)

区分 番号	代表研究者 所属	研究課題名	実施期間
野生生物の生物学的知見研究			
野生1	征矢野 清 長崎大学大学院	ボラ・マハゼ・二枚貝を用いた日本沿岸域における底質蓄積性化学物質の生物影響の解明	H23～H26
野生2	石塚真由美 北海道大学大学院	野生の歩哨動物 <i>Rattus</i> sp.を用いた環境化学物質による野生動物のゲノム・ストレスと適応の検証	H23～H26

化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究			
基盤 1	荒牧弘範 第一薬科大学	第 2 のエストロゲン受容体 ER β を標的とした内分泌かく乱メカニズムの解明	H25～
基盤 2	有菌幸司 熊本県立大学	妊馬由来エクイン類の汚染実態解明と生態影響評価	H25～
その他の関連研究			
その他 1	田辺信介 愛媛大学	生物蓄積性内分泌かく乱候補物質によるわが国の野生生物汚染の実態解明	H17～
その他 2	井口泰泉 自然科学研究機構	ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニズムの解析	H17～

3. 今年度の取組

(1) 化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究及びその他の関連研究

平成 26 年度の研究成果を踏まえ、平成 27 年度は化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究として 2 課題及びその他の関連研究課題として 2 課題を選定した（別紙 2 参照）。

基盤 1：第 2 のエストロゲン受容体 ER β を標的とした内分泌かく乱メカニズムの解明

基盤 2：妊馬由来エクイン類の汚染実態解明と生態影響評価

その他 1：生物蓄積性内分泌かく乱候補物質によるわが国の野生生物汚染の実態解明

その他 2：ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニズムの解析

(2) フィージビリティースタディー研究

EXTEND2010 に基づく野生生物の生物学的知見研究及び化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究の実施につながる研究課題候補として、平成 27 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関するフィージビリティースタディーを公募した（別紙 3 参照）。

応募のあった 10 件の研究課題候補（別紙 4 参照）について、EXTEND2010 野生生物の生物学的知見研究検討部会及び EXTEND2010 基盤的研究企画評価検討部会による合同ヒアリング及び合同評価会（平成 27 年 8 月 10 日開催、非公開）において評価を行い、2 課題を採択した（表 2 参照）。

表2 平成27年度に採択したフィージビリティースタディー研究課題一覧
(敬称略)

区分 番号	代表研究者 所属	研究課題名	実施期間
FS 1	国末達也 愛媛大学	座礁・漂着鯨類における新規 POPs および POPs 代替物質の蓄積特性とリスク評価に関する研究	H27
FS 2	宮川信一 自然科学研究機構	魚類の代謝に関わる内分泌かく乱 (metabolic disruption) の <i>in vitro</i> 評価系構築	H27

3. 今後の進め方 (案)

- ・今年度実施している研究課題については、今年度末に EXTEND2010 野生生物の生物学的知見研究検討部会及び EXTEND2010 基盤的研究企画評価検討部会による研究成果合同ヒアリング (非公開) を開催して成果についての評価を行い、来年度の研究の継続の可否を判断する。
- ・来年度以降に募集する研究課題については、EXTEND2010 の今後の展開を踏まえ、両部会において検討する。

**野生生物の生物学的知見研究検討部会
委員名簿**

(敬称略)

氏 名	所属・役職
門上希和夫	北九州市立大学 国際環境工学部 教授
川合眞一郎	甲子園大学 栄養学部 フードデザイン学科 特認教授
五箇公一	国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター 主席研究員
田辺信介 (座長)	愛媛大学 沿岸環境科学研究センター 化学汚染・毒性解析部門 特別荣誉教授
椿 宜高	京都大学 名誉教授

**基盤的研究企画評価検討部会
委員名簿**

(敬称略)

氏 名	所属・役職
井口泰泉	自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域 教授
小山次朗	鹿児島大学 水産学部 海洋資源環境教育研究センター長 教授
遠山千春	東京大学大学院 医学系研究科 附属疾患生命工学センター 健康・環境医工学部門 教授
永沼 章 (座長)	東北大学大学院 薬学研究科 教授
山田智也	住友化学株式会社 生物環境科学研究所 研究グループ 上席研究員
渡辺知保	東京大学大学院 医学系研究科 国際保健学専攻 人類生態学分野 教授

平成 26 年度 EXTEND2010 野生生物の生物学的知見研究及び
化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究等の研究成果概要

野生生物の生物学的知見研究課題(野生 1) : ボラ・マハゼ・二枚貝を用いた日本沿岸域における底質蓄積性化学物質の生物影響の解明

研究者 : 長崎大学大学院 : 征矢野清(代表研究者)、長江真樹、高尾雄二

研究概要 : 本研究は、人間活動の影響を受けやすい河口域や内湾沿岸域における海洋生物の生理現象に及ぼす底質蓄積性化学物質の影響を把握することを目的とした。環境中の化学物質分析と分子生物学的手法を含む繁殖生理学のアプローチにより、化学物質汚染の変遷と現状を評価するための研究を行った。

- ① ボラとマハゼを調査対象生物とした内分泌かく乱化学物質の生物影響調査 : 平成 25 年度までに実施した調査地点のうち、内分泌かく乱化学物質の局所的汚染が確認された長崎港の南下水処理場周辺において、ボラを捕獲し血中ビテロジェニン (VTG) 濃度および肝臓における VTG mRNA 発現の測定を行うとともに、生殖異常の有無を組織学的に観察した。また、下水処理排水を用いてボラ、マハゼを飼育し、その影響を調べた。1 週間の下水処理水曝露試験の後、実験魚の血中 VTG 濃度、肝臓における VTG mRNA の発現を調べた。また、下水処理水中の総エストロジェン活性を、ヒトエストロジェン受容体 α 導入酵母を用いた Two-Hybrid Assay (酵母アッセイ) によって測定した。その結果、本年度の調査ではボラにおける生殖異常は認められなかった。また、下水処理水曝露試験では、ボラの血中 VTG 濃度に変化は認められなかったが、マハゼでは下水処理によって血中 VTG 濃度と VTG mRNA 発現の増加が確認された。
- ② ムラサキイガイを用いたエストロジェン曝露試験および下水処理水曝露試験 : ムラサキイガイを飼育水にエストラジオール 17 β (E2) を添加して飼育した。また、長崎南下水処理場の下水処理水を用いて曝露試験を行い、エストロジェン受容体 ER1 および ER2 の mRNA 発現を調べるとともに、体内の E2 および化学物質の測定を行った。その結果、ムラサキイガイ体内には E2 が取り込まれることが分かった。E2 曝露によって ER1 が上昇する傾向を示した。しかし、下水処理水を曝露しても、顕著な変化は認められなかった。
- ③ 環境水および下水処理中の化学物質濃度 : 長崎南下水処理場周辺、長崎港奥部とそこに流れ込む浦上川において採水を行った。またこれまで調査を実施してきた、東京都の港南、佃堀、横十間川、福岡県の大牟田と博多港でも採水を行った。加えて、長崎南下水処理場の下水処理水を採集した。これら環境水中の化学物質濃度を測定し、検出された物質のエストロジェン活性を、E2 の活性を 1 とした「E2 比活性値 (OP 0.00222, NP 0.0032, BPA 0.000548, E1 0.438, E3 0.0243)」によって算出した。加えて、環境水中の総エストロジェン活性を、ヒトエストロジェン受容体 α 導入酵母を用いた Two-Hybrid Assay (酵母アッセイ) によって測定した。その結果、下水処理水および下水処理場周辺の環境水のエストロジェン活性が高いことが分かった。

データアーカイブの構築 : これまでのデータをおよび関連する文献等をまとめ、外部からの利用が可

能なデータアーカイブを構築するため、情報の整理とHPにおける公開の準備を進めた。ただし、現段階では公表を差し控える情報が多いことから、公開時期は今後検討することとした。

研究結果のまとめと考察：

1) 昨年に引き続き、東京湾沿岸域および九州北部沿岸域において、環境水を採集し、エストロジェン作用を持つ化学物質を測定したところ、各地においてこれらが検出された。検出された主な化学物質はNP、続いてBPAであるが、昨年同様、総エストロジェン活性に最も影響を及ぼしていると考えられるのはE1であった。特に、下水処理場周辺では高い値が検出されている（東京都港南、長崎市戸町（女神）、福岡市博多港）。またこれらの地域では糞尿汚染のマーカであるCOP値も高かったことから、下水処理場が内分泌かく乱化学物質汚染の汚染源の一つであり、その主成分はヒト由来のエストロジェンであることが再確認された。長崎港では、港の出口である長崎市戸町（女神）の南部下水処理場からエストロジェン活性の高い物質が環境中に放出されているが、それから2-3kmはなれた長崎市大黒をはじめとする長崎港湾奥では、COPが減少し、下水処理施設の影響は減少している。しかし、その一方でTCSが高い地域があり（長崎港A, B）、ここではNPおよびBPAが下水処理場のそれらよりも高かった。興味深いことに、東京の佃堀、横十間川では、COP、TCSともに比較的高い値を示しており、十分に処理されていない生活雑排水やし尿処理排水が流入していると思われる。ここではNPとBPAが高い値を示した他、E1が下水処理場周辺ほどではないものの、高値を示した。このような汚染状況は4年前の調査から変わっていない。

これまでの調査では、港区港南と博多港において採集したボラから、異常値（1000ng/ml）を超えるVTG濃度を示す個体が見つかった。また、佃堀、横十間川では100ng/ml以上の血中VTG濃度を示すVTG陽性のマハゼが採集されている。本年度は長崎市戸町の南部下水処理場周辺で捕獲したボラの血中VTG濃度を調べたところ、異常値（1000ng/ml）を超える個体はなかったものの、過去に長崎県大瀬戸などの清浄海域で捕獲したボラのそれ（<50ng/ml）に比べると、全ての個体が600ng/ml以上と高い値を示した。昨年までのように精巣卵を持つ雄は見つかっていないものの、この周辺海域におけるエストロジェン作用を持つ化学物質の汚染は改善されているとは言い難い。

本年度は、下水処理場の処理後の放流原水を用いて、飼育試験を試みた。昨年度末の研究計画提出時においては、ケージングによるフィールドでの試験を行う予定としていたが、港湾および河川河口域におけるケージングは許可されなかった、あるいは許可を得るまでに時間がかかることから、環境水を用いた飼育実験に切り替えた。南部下水処理場から提供を受けた処理後の放流原水を用いてボラとトビハゼを飼育したところ、ボラではVTGの合成に変化が認められなかったものの、マハゼでは血中VTG濃度およびVTG mRNAの発現量が、放流原水を用いた場合に増加した。これは、下水処理水にVTGの誘導を促すエストロジェン作用を持つ物質が含まれており、それが、魚類の繁殖に影響を与えていることを示している。この下水処理水にはE1をはじめ、E2、NP、BPA、OPが含まれ

ており、総エストロゲン活性は 25ng/L を超える。今回の飼育試験ではボラにおいて VTG 誘導を確認することはできなかったものの、この地域で捕獲されたボラにおいて、血中 VTG 濃度が高いことと、精巣卵がしばしば確認されることから、下水処理場からの排水に原因があることは明らかであろう。

精巣卵は、VTG の誘導は異なるメカニズムによって引き起こされる。性分化期に低濃度であっても長期にわたってエストロゲン作用を持つ化学物質に曝されると雌化はおこると考えられる。本年度の調査において長崎市戸町（女神）の南部下水処理場から放出されている処理水には、現在でもエストロゲン活性を有する物質が含まれており、長崎港奥部でも弱いながらもその活性は確認されている。長崎港内のボラは移動が少ないことが予想されることから、長崎港内を主な生息場所とするボラは、この海域に存在するエストロジェンの影響を長期にわたり受け続け、その結果として精巣卵を持つようになるのではないかと推測される。

2) ムラサキイガイを用いた E2 曝露試験を行うとともに、下水処理水を用いて飼育実験を行った。その結果、環境水中の E2 はムラサキイガイ体内へ濃度依存的に取り込まれる可能性が高いこと、また、環境中の E2 を速やかに取り込むことが示された。しかし、E2 曝露試験においても、下水処理水を用いた飼育実験においても、エストロジェンの影響の有無を知るバイオマーカーとしての可能性をもつ ER 遺伝子の発現に明確な影響は確認されなかった。ER1 は雄においてその発現が多く、E2 曝露によって増加したものの、個体による発現量に変動が大きく、これをマーカーとするには、より詳細な検討が必要であると思われる。

これまでの研究から、ムラサキイガイは、その化学物質を蓄積しやすいという性質から、化学物質の環境中の動態を把握するためのフィールド調査対象種として適していることが知られている。本研究においてもエストロジェンの蓄積が確認されたことから、これらの環境中の動向を明らかにするうえで、ムラサキイガイは有効な調査対象生物である。しかし、化学物質の繁殖影響を知るための研究対象生物とするには、やはり本種の繁殖に関わる生理メカニズムの詳細な解明が必要である。フィールド調査において、魚類を用いて生物影響を、ムラサキイガイを用いて化学物質の蓄積動態を明らかにすることとし、同一の地域において両者を併用した調査をすすめることが効果的できあると考える。

野生生物の生物学的知見研究課題(野生2)：野生の歩哨動物 *Rattus sp.*を用いた環境化学物質による野生動物のゲノム・ストレスと適応の検証

研究者：北海道大学大学院 獣医学研究科：石塚真由美(代表研究者)、池中良徳、中山翔太

研究概要：野生動物が内分泌かく乱化学物質によって受ける様々なゲノム・ストレスについて、歩哨動物となる野生のラット属を用いて明らかにすることを目的とする。ゲノムのメチル化やDNA付加体、トランスクリプトーム解析を行い、曝露化学物質やそのレベルとの関連性を解析する。また、汚染下に起こり得るゲノム変異についても解析する。平成26年度は、全国よりラットの採集を行い基礎的なデータを得た他、肝臓に蓄積する汚染物質のスクリーニング、精巣を中心に mRNA の網羅的解析を行った。汚染物質は、全国で高い汚染が認められた鉛の安定同位体比を解析し、その汚染源について分析を行った。高濃度の汚染を示す野生ラットの鉛の汚染源はそれぞれ異なることが予測された。また、臭素系難燃剤の野生ラットの肝臓の蓄積について分析した。精巣の mRNA 発現パターンをスクリーニングを行ったところ、臭素系難燃剤の蓄積が比較的高い野生ラットでは CYP17 の発現の変動が認められた。

研究結果のまとめと考察：

野生ラットの分析結果の概要について、下記にまとめる。国内の野生ラットのほとんどはクマネズミであり、蓄積する環境汚染物質（内分泌かく乱化学物質）として、特に問題となる濃度を蓄積しているのは鉛であった。また、一部の地域では高濃度のダイオキシン類を蓄積している個体も見受けられ、スポット的に曝露源が存在することが明らかとなった。鉛汚染土壌を用いてラットを飼育し、精巣ゲノムへの影響を分析したところ、メチル化の亢進とメチル化酵素の発現上昇が認められた。一方で、これに起因すると考えられる明らかなトランスクリプトームの変化は認められなかった。

	研究内容	結論
野生ラットの棲息状況	500匹の野生ラットを全国から採集、種の判別	国内では4:1の割合で <i>Rattus rattus</i> の方が優勢種であった。ただし離島などの地域では <i>Rattus norvegicus</i> の棲息が認められた。北海道の港湾部のクマネズミは <i>Rattus tanezumi</i> ではなく、オセアニア型クマネズミが捕獲されたことから、現在も引き続き海外から

		のラット属の移入が起こっているか、移入後に繁殖している可能性が示唆された。
	窒素炭素の安定同位体比により食性の比較	国内の <i>Rattus norvegicus</i> は <i>Rattus rattus</i> に比べて $\delta^{15}\text{N}$ 値が高いことが分かった。また同じ種内でも離島に棲息する <i>Rattus</i> 属では $\delta^{15}\text{N}$ 値が高く、海鳥などの捕食を行っている可能性が考えられた。
蓄積する環境 汚染物質	重金属類 (Cr、Co、Ni、Cu、Zn、As、Sr、Cd、Pb)	鉛については全国で採集したラットの3割以上の個体で、3.0 ppm を超える腎蓄積量を示した。
	鉛安定同位体 (208Pb, 207Pb, 206Pb, 204Pb)	安定同位体の比較から、低濃度暴露群では安定同位体比は同じパターンを示したが、高濃度汚染群の汚染源は地域ごとに異っていた。
	有機塩素系農薬 (HCB、r-HCH、Oxychlordane、trans-Chlordane、trans-Nonane、cis-Chlordane、pp-DDE、cis-Nonachlor、pp-DDD、pp-DDT)	有機塩素系化合物は全体的にその蓄積は低く、HCB は 0~0.7 ng/g-ww、r-HCH は 0~1.6 ng/g-ww、Oxychlordane は 0~0.3 ng/g-ww、trans-Chlordane は 0~0.6 ng/g-ww、trans-Nonane は 0~0.5 ng/g-ww、cis-Chlordane は 0~7.2 ng/g-ww、pp-DDE は 0~9.2 ng/g-ww、cis-Nonachlor は 0~1.4 ng/g-ww、pp-DDD は 0~1.5 ng/g-ww、pp-DDT は 0~1.4 ng/g-ww の範囲であった。
	PCBs	離島の <i>Rattus</i> 属は PCB153 や PCB138 等の蓄積濃度が高いことが分かった。東京及び大阪地区でも高濃度を示す PCB はそれぞれ異なっており、都市間でも差が認められることが分かった。
	ダイオキシン類	埋立場棲息のドブネズミは燃焼由来の汚染物質への曝露が考えられた。一部の都市では高濃度に蓄積するラット個体が検出され、スポット的な汚染が予想された。肝臓に蓄積するダイオキ

		シン類の濃度はコプラナーPCB>PCDD≧PCDFであった。
	臭素系難燃剤 (BDE3, 7, 15, 17, 28, 49/71, 47, 66, 77, 100, 119, 99, 155, 126, 85, 154, 153, 138, 166, 183, 181, 190, 202, 201, 197+204, 203, 196, 205, 194, 195, 208, 207, 206, 209)	地域による蓄積量の差は観察されなかったが、ドブネズミに比べ、クマネズミへの蓄積が高い傾向が見られた。その組成では、10 臭素化物である BDE209 がΣ34BDE の50%以上を占めた。埋立地棲息の野生ラットは他の地域よりも比較的高い濃度の DBE を蓄積していた。
	PAHs	ピレンなど、環境中濃度が高い PAHs については野生ラットの肝臓でも検出されたが、発がん性の高い PAHs は検出限界以下であった。
	PPCPs (43 種類)	棲息近くの河川水中からは抗うつ剤や抗生物質などの PPCPs は検出されるが、陸圏に棲息する野生ラットの肝臓からは検出されなかった。
	ネオニコチノイド (nitenpyram, thiamethoxam, clothianidin, acetamiprid, imidacloprid, thiacloprid, N-desmethyl-acetamiprid)	野生ラットの肝臓において親化合物の検出はなかった。しかし同地域のヒトの尿からは代謝物が検出されていることから、ヒト生活圏でのネオニコチノイドの曝露が予想される。
ゲノムストレスによる影響 (field 採集ラット)	肝臓のトランスクリプトーム解析	室内飼育ラットと比較すると、フィールド採集のラットでは CYP1A1、CYP1A2 などの一部のシトクロム P450 分子種のほか、酸化ストレスなどで発現が上昇する熱ショックタンパク質 (HSP) やヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)、メタロチオネイン (metallothionein) の発現が上昇していた。
	精巣のトランスクリプトーム解析	室内飼育ラットと比較すると、埋立場より採集したラットでは CYP17 の発現が 2 倍以上増加していた。野生ラットの肝臓に蓄積する総 PBDE 濃度と精巣における CYP17 (R=0.79, p<0.05) 発現量との間に正の相関が見られた。

ゲノムストレスによる影響 (semi-field 試験：金属による汚染土壌 曝露)	精巢のゲノムメチル化 (LUMA 法)	鉛汚染土壌で飼育したラットでは、精巢のゲノムのメチル化が上昇していた。 鉛汚染土壌で飼育したラットのメチル化酵素 (Dnmt 1、Dnmt 3a、Dnmt 3b) の発現を調べたところ、Dnmt 3a および Dnmt 3b の発現量は有意に増加していた。
	精巢のトランスクリプトーム解析	2次性能動輸送型の SLC (solute carrier transporter) などのトランスポーターなどが変動したが、これらは毒性学的変化というよりも生化学的な順応反応であると考えられた。

1) 野生ラットの棲息

■国内に棲息する野生ラットの種について

ゲノムタイピングを行ったところ、国内では約 4:1 の割合でクマネズミが優位に捕獲された。一部、家畜舎や離島などではドブネズミが捕獲されることがあったが、都市部ではほぼ 100% の割合でクマネズミが捕獲された。一方で、北海道の港湾部のクマネズミは *Rattus rattus tanezumi* ではなく、オセアニア型クマネズミが捕獲されたことから、現在も引き続き海外からのラット属の移入が起きているか、移入後に繁殖している可能性が示唆された。

Rattus 属において系統地理的解析方法は、国内レベルの比較的狭い閉鎖空間では確立された方法がない。そこで、由来を明らかにするために試験的に AFLP による解析を行った。selective PCR を行った結果、各プライマー対から、トータルで 375 のフラグメントピークを得られた。このフラグメントピークの結果を用いてクラスター解析を行ったところ、*Rattus norvegicus* と *Rattus rattus* は明確な clade を形成したが、*Rattus rattus* 個体群に関しては、地域性的変異パターンについて明確な clade の形成は見られなかった。

■国内に棲息する野生ラットの食性について

同位体質量分析 (Fisons NA1500-Finnigan MAT 252) を用いて、 $\delta^{13}\text{C}$ および $\delta^{15}\text{N}$ の同位体比の解析から国内に棲息する *Rattus* 属の食性を解析したところ、*Rattus norvegicus* は *Rattus rattus* に比べて $\delta^{15}\text{N}$ 値が高いことが分かった。また同じ種内でも離島に棲息する *Rattus* 属では $\delta^{15}\text{N}$ 値が高く、海鳥などの捕食を行っている可能性が考えられた。

2) 野生ラットに蓄積する環境汚染物質

■ 重金属類

全国から採集されたラットの肝臓に蓄積する重金属類を解析したところ、鉛、ヒ素は高濃度の蓄積を示す地域が認められた。特に、Pbは全国で採集したラットの3割以上の個体で、3.0 ppmを超える腎蓄積量を示した。一方、いずれの金属類も食性との間に明らかな相関関係は認められなかった。カドミウムは食性との相関が報告されているが、今回分析した個体群では、 $\delta^{13}\text{C}$ や $\delta^{15}\text{N}$ 値との関連性は認められなかった。

また、日本に棲息する *Rattus* 属の金属蓄積パターンを海外のモデル汚染地区（鉱床、都市部など）に棲息する *Rattus* 属に蓄積する金属パターンと比較したところ、日本の都市部の *Rattus* 属は、殆どの地域で海外都市部と同じ蓄積パターンを示した。東京で捕獲されたラットでは、無人島（渡島大島）で捕獲されたラットに比べ、数種の元素(Cu, Co, Pb, Zn)が有意に高い事が明らかになった。

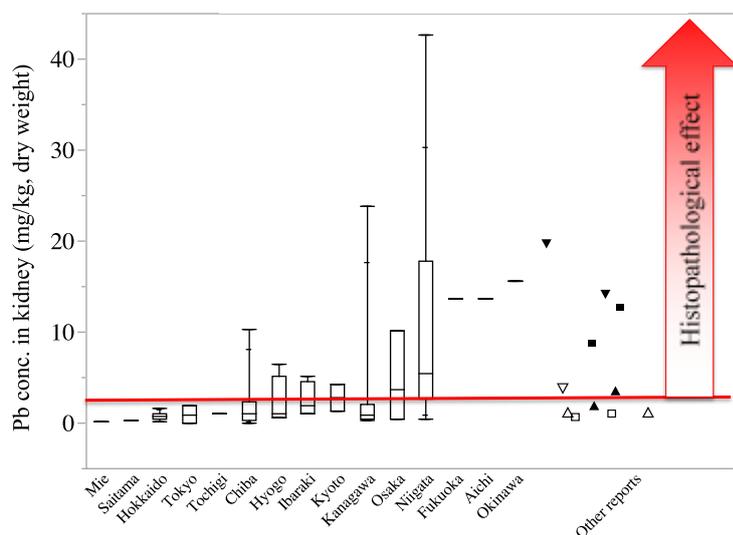


Fig. Pb levels in kidney of rat from various regions in Japan and other countries. The red line indicates the previously reported renal Pb level above which should be expected histopathological changes. Black and white inverted triangle = rat from polluted and control area in Poland, black and white square = rat from polluted and control area in Italy, black and white triangle = rat from polluted and control area in Belgium.

■ 鉛安定同位体

国内より採集した野生ラットには、特に鉛の黄土の高い個体が見受けられたため、安定同位体解析を行い、その汚染源の分類を行った。特に高濃度の鉛蓄積が認められた地域は、それぞれ同位体比が異なり、異なる汚染源の可能性が考えられた。

■有機塩素系農薬

採集したラットのうち、東京、大阪、離島（北海道）地域のラットについて、有機塩素系化合物（HCB、*r*-HCH、Oxychlordane、*trans*-Chlordane、*trans*-Nonane、*cis*-Chlordane、*pp*-DDE、*cis*-Nonachlor、*pp*-DDD、*pp*-DDT）の蓄積濃度を調べた。有機塩素系化合物は全体的にその蓄積は低く、HCBは0～0.7 ng/g-ww、*r*-HCHは0～1.6 ng/g-ww、Oxychlordaneは0～0.3 ng/g-ww、*trans*-Chlordaneは0～0.6 ng/g-ww、*trans*-Nonaneは0～0.5 ng/g-ww、*cis*-Chlordaneは0～7.2 ng/g-ww、*pp*-DDEは0～9.2 ng/g-ww、*cis*-Nonachlorは0～1.4 ng/g-ww、*pp*-DDDは0～1.5 ng/g-ww、*pp*-DDTは0～1.4 ng/g-wwの範囲であった。

■PCBs

離島の *Rattus* 属は PCB153 や PCB138 等の蓄積濃度が高いことが分かった。東京及び大阪地区でも高濃度を示す PCB はそれぞれ異なっており、都市間でも差が認められることが分かった。

Rattus 属の肝臓の PCB の蓄積パターンをクラスター解析および PCA 解析 (principal component analysis) により分類したところ、都市部と離島棲息個体で明らかに異なる異性体の蓄積パターンを示した。

■ダイオキシン類

Rattus 属の肝臓に蓄積するダイオキシン類は、東京、大阪、北海道、離島より採集した *Rattus* 属を用いて分析を行ったところ、最高で 21,000pg-TEQ/g(lipid)であり、東京都など、都市部のゴミ捨て場で高度に汚染された個体が一部検出され、廃棄物によるスポット的な汚染が予測された。ヒトの活動が低い離島では、実験室ラットとほぼ同等の蓄積レベル(1,000pg-TEQ/g(lipid)以下)を示した。肝臓に蓄積するダイオキシン類の濃度はコプラナー-PCB>PCDD≧PCDFであった。

■臭素系難燃剤

全国から採集した野生ラットの肝臓の分析の結果、臭素系難燃剤の地域による蓄積量の差は観察されなかったが、ドブネズミに比べ、クマネズミへの蓄積が高い傾向が見られた。また、埋め立て地などの地域では比較的他の地域よりも高い蓄積量を示した。一方、臭素化ジフェニルエーテルの組成では、10 臭素化物である BDE209 が Σ 34BDE の 50%以上を占め、次いで 9 臭素化物である BDE207 と BDE206 がそれぞれ 14%、12%であった。

■PAHs

ラット肝臓に蓄積する多環芳香族濃度は低く、ベンゾピレンをはじめとする変異原性を有する多くの多環芳香族は殆どの個体において検出限界以下であった。ただし、ピレンなど、比較的環境中の濃度が高い多環芳香族に関しては、肝臓での検出が認められた。

■PPCPs (Pharmaceutical and Personal Care Products; PPCPs)

採集した野生ラット属について、43種類のPPCPsをLC/MS/MSにより分析したが、いずれも検出されなかった。

■ネオニコチノイド

国内から採集した野生ラット属について、ネオニコチノイド類（親化合物）は検出されなかった。一方、同地域に住むヒトの尿からはネオニコチノイドの代謝物が検出されており、ヒト生活圏での日常的な曝露が懸念されている。今回の野生ラットのスクリーニングでは、ネオニコチノイドの親化合物のみを対象としたため、今後はネオニコチノイドの代謝産物の臓器中分析方法の確立と共に、そのスクリーニング調査が求められる。

3) 精巢のゲノムおよびトランスクリプトーム変化

■野生ラットの精巢のトランスクリプトーム解析

ドブネズミの肝臓に蓄積する総PBDE濃度と精巢におけるCYP17 ($R=0.79, p<0.05$)、CYP11A ($R=0.81, p<0.05$)、StAR ($R=0.83, p<0.05$) 発現量との間に正の相関が見られた。ポリ臭素化ジフェニルエーテルの中でも、特に、#47-TeBDE蓄積とCYP11Aの発現との間に有意な正の相関が認められた。

■金属汚染の土壌曝露ラットの精巢のトランスクリプトーム解析

金属（鉛、カドミウム）で汚染されたフィールドの土壌曝露したラットを用いて、DNAマイクロアレイにより精巢に発現するmRNAの変動を調べた。肝臓に比較すると精巢では発現変動の大きな遺伝子は少なく、精巢の約15000種の遺伝子の中で変動した遺伝子としては、2次性能動輸送型のSLC (solute carrier transporter) などのトランスポーターが含まれていた。これらは毒性学的変化というよりも生化学的な順応反応であると考えられた。

一方で、内分泌かく乱に関わるステロイド合成酵素やステロイド受容体などの発現量には変化は認められなかった。

■金属汚染の土壌曝露ラットの精巣のメチル化解析

金属（鉛、カドミウム）で汚染されたフィールドの土壌曝露したラットを用いて、精巣のメチル化解析を行った。パイロシークエンサーにより、LUMA によって精巣のメチレーションレベルを調べたところ、鉛汚染土壌で飼育したラットでは、精巣のゲノムのメチル化が上昇していることが明らかとなった。一方、肝臓および腎臓ではメチル化レベルの変動は認められなかった。

そこで、メチル化酵素（Dnmt 1、Dnmt 3a、Dnmt 3b）の発現を調べたところ、メチル化酵素の発現量は有意に増加していた。LUMA 法での精巣のゲノムメチル化レベルの上昇の原因として、ゲノムワイドにメチル化に関与する DNA メチルトランスフェラーゼである Dnmt 3a および Dnmt 3b の発現量の上昇が考えられた。

PCA 解析では、これらのメチル化酵素は、鉛や亜鉛、ヒ素、カドミウムと同様のベクトルを示し、これらの元素が変動の原因となっている可能性が明らかとなった。

※フィールド調査と室内実験の相違点

フィールドにおける野生ラットのステロイド合成酵素の発現量と臭素系難燃剤の蓄積については、細胞を用いて検証したところ、細胞を用いた曝露試験では再現することができなかった。また、フィールドから採集したラットのマイクロアレイ解析を実施し、同じ土壌を用いた室内曝露実験と比較を行った。PCA 解析では、semi-field の室内実験と field における野生個体では、遺伝子の変動パターンに関して異なるベクトルを示し、野外での曝露による生体影響を室内において一部再現できるが、網羅的な mRNA の変動の動きを解析すると相違点が認められることが明らかとなった。

基盤的研究課題(基盤1)：第2のエストロゲン受容体 ER β を標的とした内分泌かく乱メカニズムの 解明

研究者：第一薬科大学：荒牧弘範(代表研究者)、池田恵理子、原口浩一、広島国際大学：瀧口益史、竹田修三、北陸大学：渡辺和人、九州大学：新藤充

研究概要：1. エストロゲン受容体 α (ER α)に直接作用しないメカニズムで内分泌かく乱作用を示す天然物及び環境化学物質が存在する。

2. 我々は、大麻主成分の Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール(Δ^9 -THC)がER α 及びER β のリガンドとして作用せず、ER β の発現増加を介してエストロゲン(女性ホルモン)/ER α シグナルを抑制することを見出した(EXTEND2010基盤的研究への応募の契機となった知見)。

3. 本概念はこれまでになく、極めて独創性が高い研究といえるが、この現象が Δ^9 -THC特異的に生起するのか、さらにはER β の発現誘導メカニズム及びほかの環境化学物質がER β の発現に与える影響は不明であった(H25年度研究で検討)。

4. 本研究は3カ年の計画(H25~27年度)で実施される計画であり、最終目標はER β の発現増加及びER α の発現(機能)抑制が与える負の影響を生体レベルで検証することにある。得られた成果は、ER β を分子標的とした内分泌かく乱の評価系の確立に資することが予想される。

5. 本年度(H26年度)は、これまでに*in vitro*でER β の発現誘導能を示した化合物(H25年度研究)が生体機能に与える影響を*in vivo*で解析することを目指す。

研究結果のまとめと考察：本研究の最終到達目標は「第2のエストロゲン受容体ER β を標的とした内分泌かく乱メカニズムの解明」である。この解明には、これまでの*in vitro*研究で候補に挙がった化学物質による生体への影響を実証しなければならない。本研究では、環境化学物質による生体影響の標的として子宮に注目して解析を行った。子宮内膜症とは、元々子宮内腔にしか存在しない子宮内膜や子宮内膜様の組織が、子宮以外の場所にできる病気である。子宮内膜にはER α とER β が共発現しており、病態の進行に伴ってER β の発現が優勢になることが報告されている(*Biol. Reprod.*, **77**: 681–687, 2007)。したがって、これまでの*in vitro*の結果を併せて考察すると、BPAFや Δ^9 -THCは子宮内組織のER β の発現を優位にし、その制御下にある細胞の浸潤・転移に関するMMP-1のレベルを増加させる可能性がある。その結果、異所性に生起する病態である子宮内膜症を惹起するメカニズムが推察される。子宮内膜症の原因は、現在までに完全に解明されていないが、本研究で見いだされたBPAFをはじめとするER β の誘導能を示す化合物は子宮内膜症の病態を惹起する可能性がある。研究成績は提示していないが、 Δ^9 -THCのアナログであるHU-210(合成カンナビノイド)は*in vivo*においてER β の発現増加を示さなかった。したがって、少なくとも Δ^9 -THCによる作用はカンナビノイド受容体以外のメカニズムを介して生起している可能性があり、 Δ^9 -THCはBPAFと共通のメカニズムを介してER β のレベル増加を来しているものと考えられる。現在、*in vitro*でER β の誘導を示した

dipentyl phthalate (DPenP)についても、投与後のマウスの子宮肥大及び子宮内ERβの発現の有無について解析を行っている。

本研究で、BPAFが*in vivo*(マウス)において**女性ホルモン様作用**を示すことがはじめて明らかになった(図4)。これまでにラット子宮を肥大化させることが報告されているが、そのメカニズムは不明であった(Yamasaki et al., *Toxicology*, **183**: 93–115, 2003)。BPAFと Δ^9 -THCの物理的性質を比較すると、 Δ^9 -THCはその脂溶性のため(log P=6.970 >6.0: 非極性)、曝露後生体に蓄積し持続的悪影響を及ぼす可能性がある。一方、BPAFのlog Pは2.818(<6.0)であり極性が比較的高い。また、BPAFの生物濃縮係数は～80と算出されている。現在までに、BPAFの生体(子宮)蓄積量は不明であるが、我々の身の回りにはビスフェノール類を原料とした様々な製品が存在しており、蓄積という観点よりも恒常的曝露による生体への悪影響が懸念される。

最終年度(H27年度)では、ビスフェノールAの代替として近年使用量が増加しているBPAFの生体影響についてさらなる検討を行う計画である(参照：H27年度研究計画書)。H26年度研究にて明らかになったように、BPAFが子宮内ERβの発現に与える影響は、性成熟期を迎える以前の曝露、すなわち**幼若期で顕著**であった(図4及び5)。したがって、BPAFを含めた環境化学物質の影響について、特に周産期(妊娠～授乳期)曝露影響に焦点を当て、さらには出生後の影響についても解析を行う計画である。図6に示すように、BPAFは性成熟後のマウスの卵巣に特徴的な形態変化を与えた。発見率は～25%であり、すべてのマウスで見いだせなかった。この個体差の原因については不明である。本検討では♀マウスを用いており、胎児期の子宮内ホルモン環境などの差異「Saalらによる子宮内体位現象」を想定している。したがって、最終年度は、環境化学物質の卵巣影響を併せて解析する。

基盤的研究課題(基盤2)：妊馬由来エクイン類の汚染実態解明と生態影響評価

研究者：熊本県立大学：有菌幸司(代表研究者)、石橋康弘、尚絅大学短期大学：石橋弘志、瑞輝科学
生物株式会社：内田雅也、有明工業高等専門学校：富永伸明、一川暢宏；立命館大学薬学部

研究概要：更年期障害のホルモン補充用の医薬品として使用され、妊馬の尿中に含まれるエクインエストロゲン（エクイリン・エクイレニン及びそれらの代謝物）を対象として、LC/MS/MSを用いた分析法を開発した。本法を環境試料に適用したところ、馬飼育場の試料から高濃度のエクイリン(Eq)とエクイレニン(Eqn)が検出され、我が国におけるエクインエストロゲンの存在が確認された。*In vivo*及び*in vitro*メダカ試験系を用いてエクインエストロゲンのエストロゲン様作用を詳細に調査したところ、*in vivo*試験系では親化合物であるEqやEqnの活性は強く、*in vitro*試験系ではこれらの物質の活性は弱く、生体内代謝物が肝臓中エストロゲン応答遺伝子（ビテロゲニン及びコリオゲニンアイソフォーム）の発現の増加に関与することが示唆された。また、17 β 体のエクインエストロゲンの活性は17 α 体と比較して強く、*in silico*-ER α 試験系の結果からもER α に対する結合親和性の違いが示唆されたが、エストロゲン応答遺伝子発現にはERサブタイプの影響評価が重要であると考えられた。以上、本研究で得られた成果は、エクインエストロゲンの環境リスク評価において極めて有益な情報を提示するだけでなく、国際社会のニーズや生態系保全を考慮した医薬品としてのエクインエストロゲンの安全性評価・利用指針の構築にも貢献し、その学術的・社会的意義は極めて大きいものである。

研究結果のまとめと考察：本研究では、LC/MS/MS/を用いて、Eq, 17 α -Eq, 17 β -Eq, Eqn, 17 α -Eqn 及び 17 β -Eqn のエクインエストロゲン類の分析法の開発を試み、これらの物質に加え E1, E2 及び E3 のエストロゲン類との同時定量が可能となった。本分析法を環境試料に適用したところ、馬飼育場の試料から 2,907 ppb の Eq、557 ppb の Eqn、26,250 ppb の E1 がそれぞれ検出され、馬飼育場はエクインエストロゲン類の汚染源のひとつになる可能性が示唆された。しかしながら、本年度は抱合体の測定は実施できなかったため、次年度以降はこれらの分析を追加するとともに、さらに多様な環境試料についても検討することで、より詳細なエクインエストロゲンの汚染実態を明らかにする必要がある。

本研究では、*in vivo*, *in vitro* および *in silico* メダカ試験系を用いて、エクインエストロゲンのエストロゲン様作用を詳細に調査した。*In vivo* 試験系では、親化合物である Eq や Eqn の活性は強かったが、*in vitro* 試験系ではこれらの物質の活性は弱かった。一方、*in vitro* 試験系では、Eq および Eqn の代謝物である 17 β -Eq および 17 β -Eqn の活性は強かった。これまで哺乳類では Eq および Eqn は生体内で代謝され、17 β -Eq および 17 β -Eqn を生成することが報告されている (Bhavnani *et al.*, 2014)。これらのことから、メダカでも同様の代謝反応が起こり、Eq および Eqn 曝露によって 17 β -Eq および 17 β -Eqn が生成され、これらが肝臓中エストロゲン応答遺伝子の発現の増加に関与することが示唆さ

れた。

本研究の *in vivo* および *in vitro* 試験系では、エクインエストロゲンの 17β 体の活性は 17α 体と比較して強いことが確認された。これまでのヒト ER α および ER β を用いた研究によると、 17β 体は 17α 体と比較して両 ERs により強く結合することが報告されている (Bhavnani *et al.*, 2008)。また、雄メダカを用いた報告では、 17α -E2 (1~10,000 ng/L) と 17β -E2 (0.1~1,000 ng/L) を 21 日間曝露し、qPCR により *Vtg1*、*ChgH* および ER α mRNA の発現量を測定した結果、いずれの遺伝子も 17α -E2 では 1,000 ng/L 以上で、 17β -E2 では 100 ng/L 以上で有意な発現量の増加が確認され、 17β 体の方が 17α 体よりもエストロゲン活性が強いことが示唆されている (Chong *et al.*, 2010)。これらのことから、 17β 体の方が 17α 体よりもエストロゲン活性が強いことには、メダカ ER とエクインエストロゲンの結合親和性の違いが関与している可能性がある。

メダカでは少なくとも 3 種類の ER (ER α 、ER β 1 および ER β 2) が存在することが知られているが、エクインエストロゲンとの直接的相互作用については知見がない。そこで本研究では、*in silico* 試験系を用いて、これら ERs に対するエクインエストロゲンのドッキングシミュレーション解析を試みた。メダカ ER α に対しては、 17β -Eq は最も強く相互作用し、*in vitro* 試験系でも同様であった。しかしながら、 17β -Eqn の相互作用エネルギーは比較的高く、*in vitro* 試験系の強いエストロゲン様活性を示した結果と矛盾した。一方、メダカ ER β 1 および ER β 2 に対しては、 17β -Eqn の相互作用エネルギーは最も低く、強い相互作用を示した。これらのことから、*in vivo* 試験系において 17β 体の方が 17α 体よりもエストロゲン様活性が強かったことに関しては、メダカ ER サブタイプに対する結合親和性の違いが関与することが示唆された。今後、ドッキングシミュレーション解析の妥当性の検証も含め、組換え ER タンパク質を合成し、*in vitro* 結合試験系の構築やエクインエストロゲンとの結合親和性、メダカ ER β 1 および ER β 2 の転写活性化能などを明らかにする必要がある。

このように 3 種類のメダカ ER サブタイプ (ER α 、ER β 1 および ER β 2) に対するエクインエストロゲンの影響評価の重要性が考えられたが、メダカ ER サブタイプの基礎生物学的な機能や役割については知見が不足している。また、内分泌かく乱作用の観点からは、*Vtg* や *Chg* などのエストロゲン応答遺伝子の発現制御と ER サブタイプの関与についても興味を持たれるところであろう。本研究で実施したレポーター遺伝子アッセイ系では、エストロゲンレスポンスエレメント (ERE) の 4 コピーを有するレポーターベクターを用いたが、今後、エストロゲン応答遺伝子の上流域を導入したレポーターベクターによるレポーター遺伝子アッセイ系の開発や各 ER サブタイプの発現ベクターを同時にトランスフェクションしたアッセイなども行う必要がある。

本研究は、日本におけるエクインエストロゲン類の検出、また *in vivo*、*in vitro* および *in silico* メダカ試験系を用いて、多角的にエクインエストロゲンのエストロゲン様作用を詳細に解析した最初の報告である。本年度の研究において、検出された濃度以下で雄メダカに対する Eq および Eqn のエス

トロゲン様作用が示唆されており、環境中濃度によるリスクが懸念される。これらの成果は、エクインエストロゲンの環境リスク評価において極めて有益な情報を提示するだけでなく、国際社会のニーズや生態系保全を考慮した医薬品としてのエクインエストロゲンの安全性評価・利用指針の構築にも貢献し、その学術的・社会的意義は極めて大きいものである。

その他の研究課題(その他1): 生物蓄積性内分泌かく乱候補物質によるわが国の野生生物汚染の実態解明

研究者：愛媛大学 沿岸環境科学研究センター：田辺信介(代表研究者)、国末達也、野見山桂

研究概要：PCBs のヒトや生態系における曝露リスクが懸念されているが、最近その生体内変化物も注視されはじめた。水酸化 PCBs (OH-PCBs) は、甲状腺ホルモン輸送タンパク (トランスサイレチン：TTR) と結合し、甲状腺ホルモン (T_3 、 T_4) の恒常性をかく乱することが指摘されている。また OH-PCBs は TTR と結合することで血液胎盤関門を通過して胎仔へ移行し、血液脳関門を通過して脳神経系へ移行・到達することが推察される。とりわけ胎仔・乳仔期は脳神経系の発達が著しいことに加え、化学物質に対して高い感受性をもつことから、脳内甲状腺ホルモンの攪乱による神経発達への悪影響が懸念されている。近年、ヒトでは学習障害・注意欠陥多動性障害など脳発達障害の増加が危惧されており、脳神経系発達が著しい胎児・幼児期での OH-PCBs 曝露は、その原因の一つとして指摘されている。そのため、胎児・幼児期における OH-PCBs の体内挙動解明とリスク評価が求められている。しかしながら胎児に関する OH-PCBs の分析事例は少なく、霊長類ではヒト臍帯血の報告例があるものの、胎児組織を対象とした OH-PCBs 研究の報告は皆無である。

本研究ではニホンザルを対象に、多様な発達段階の胎仔の脳・肝臓、母獣の胎盤・肝臓・血液に残留する PCBs および OH-PCBs を分析し、霊長類における胎盤を介した母仔間移行の実態解明を試みた。分析に供試した全ての試料から PCBs および OH-PCBs が検出され、ニホンザルの胎盤を介した母仔間移行が明らかとなった。胎仔肝臓に注目すると、PCBs および OH-PCBs 濃度はともに後期胎仔個体よりも胚・中期胎仔個体で高値であり、成長にともなう減少傾向が示された。胎仔の発達段階別に肝臓中総負荷量を計算した結果、PCBs、OH-PCBs とともに胚仔期から中期胎仔期の間で負荷量の著しい上昇が認められ、初期胎仔発達段階における化学物質の特異的な移行期間の存在が示唆された。脳についても全ての試料から OH-PCBs が検出され、発達の極初期段階から脳に移行・残留することが明らかとなった。

以上の結果から、感受性が高く発達の著しい初期発生段階の胎仔に対する OH-PCBs の潜在的なリスクが懸念される。ニホンザルで得られた本研究の結果は、ヒト胎児においても類似の移行・蓄積が起きていることを示唆しており、脳神経系へ及ぼす曝露評価が求められる。

研究結果のまとめと考察：本研究ではニホンザルを対象に様々な発達段階の胎仔の脳・肝臓、母獣の胎盤・肝臓・血液に残留する PCBs および OH-PCBs を分析し、本種霊長類における胎盤を介した母仔間移行の実態解明を試みた。

分析に供試した全ての試料から PCBs および OH-PCBs が検出され、ニホンザルの胎盤を介した母仔間移行が明らかとなった。とくに、胚仔期の脳からも OH-PCBs が検出され、発達の極初期段階から脳に移行・残留することが判明した。胎仔の発達段階別に肝臓負荷量を計算した結果、PCBs・OH-PCBs とともに胚仔期～中期胎仔期の間で負荷量の著しい上昇が認められ、化学物質の特異的な移行期間(初期胎仔発達期)の存在が示唆された。異性体組成に注目すると、4OH-CB187 は分析した全ての組織から主要異性体として検出された。この結果は 4OH-CB187 が TTR に高親和性を示し、長い血中半減期を有するため、特異的に胎仔へ移行・残留することを示している。本研究では、初めて霊長類の胎仔組織から OH-PCBs を検出した。この結果はヒト胎児においても類似の移行・蓄積が起こることを示唆している。

その他の研究課題(その他2)：ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニズムの解析

研究者：自然科学研究機構 基礎生物学研究所 岡崎統合バイオサイエンスセンター：井口泰泉(代表研究者)、宮川信一、宮川一志、荻野由紀子

研究概要：内分泌かく乱作用については科学的に未解明な点が多いことから、その影響に関連した作用メカニズムを細胞・遺伝子・分子レベルで解明していくことが重要である。中でも内分泌かく乱化学物質により引き起こされる一連の遺伝子発現変化と、それにより引き起こされる細胞レベルでの変化などを明らかにすることは、内分泌かく乱作用のメカニズムの解明への糸口となる。こうした試みは従来、実験動物や魚類を中心として進められてきた。しかし、生態系への影響を明らかにしていくためには、研究対象を生態系の主要な構成生物種に広げて解析を進めていく必要がある。特に無脊椎動物においては様々な影響が報告される中で、作用メカニズムを解明するための基礎的な知見は非常に限られている。

昆虫を中心とした無脊椎動物においては、脱皮ホルモンと幼若ホルモンが個体発生や成長に関わっていることが知られている。脱皮ホルモンについては、ショウジョウバエなどを中心としてその受容体や関連遺伝子の解析が進んでいる。我々はミジンコ類において、幼若ホルモンが単為生殖と有性生殖とのスイッチングに関与しているということを見出しており、これは無脊椎動物における内分泌系の、発生、生殖への関与を理解する上で興味深いモデルとなると期待される。このモデルを利用してこれまでに我々はミジンコにおける内分泌かく乱作用の分子メカニズムの解明を目指して研究をしており、平成25年度においては、「ミジンコ類の幼若ホルモン受容体の同定」、「Met と SRC の部分配列を用いた Two hybrid assay の確立」および「オス誘導の短期試験系の確立」を達成した。本年度は前年度の結果をふまえ、これまでの TG211 試験法を補完するより実用的な *in vitro* アッセイ系の整備を目指す。一方、本年度では、前年度に確立した日照条件操作によるオス誘導系を用いて幼若ホルモンの上流で働く因子の探索も引き続きおこなう。これら上流因子には幼若ホルモン合成経路関連遺伝子やそれと相互作用する脱皮ホルモン経路関連遺伝子などが含まれると予想されるが、その解析は、従来の幼若ホルモン類似物質曝露によるオス誘導系では不可能であった。本研究によってミジンコにおける内分泌系への理解と、そのかく乱メカニズムの解明が期待される。

研究結果のまとめと考察：幼若ホルモンとその類似物質は昆虫類や甲殻類に内分泌かく乱作用を引き起こす代表的な化学物質である。我々は、これまでの基盤研究の成果をさらに発展させた平成26年度の研究を通して、幼若ホルモン作用を示す化学物質を Two-hybrid 法を用いて *in vitro* で迅速にスクリーニングする手法を確立した。今回我々は、この手法を用いることによって新規の幼若ホルモン作用を持つ化学物質ジオフェノランを同定した。したがって本手法は新規の幼若ホルモン活性物質の探索において非常に効果的であり、今後更なる応用が期待できる。さらに本年度は、課題であった Two-hybrid 法に頼らないレポーターアッセイ系の構築にを検討し、コクヌストモドキの JHRE を使用することで良好な結果を得ることができた。アッセイ系として実用可能な検出感度を達成するためには今後のさらなる検討が要求されるものの、より生体内の条件に近いアッセイ系の構築に向けた発展が期待できる。

また、本年度は昨年度の基盤研究で確立した「日長条件操作による幼若ホルモン曝露を必要としないオス誘導系」を利用してミジンコ類がオスを産生する際に実際に体内で働く分子メカニズムの

解明にも取り組み、多くの成果を挙げる事ができた。中でも、NMDA型グルタミン酸受容体は、本研究によって新たに明らかとなったオス誘導にかかわる因子であり、幼若ホルモン経路の上流で働くと予想される。NMDA型グルタミン酸受容体アゴニストは非常に感度良くオスを誘導することから、NMDA型グルタミン酸受容体はミジンコにおける内分泌かく乱メカニズムのターゲットとなり得る分子であり、今後も継続して詳細な研究を行う必要がある。

採択した課題の研究概要と平成27年度の実施内容

基盤1：第2のエストロゲン受容体 ER β を標的とした内分泌かく乱メカニズムの解明 (H25～)

- (1) 研究者：第一薬科大学：荒牧弘範(代表研究者)、池田恵理子、岡崎裕之、原口浩一、広島国際大学：瀧口益史、竹田修三、北陸大学：渡辺和人、九州大学：新藤充
- (2) 研究概要：H25、26年度の研究で、111種類の環境化学物質がER β の発現に与える影響を解析した。その結果、29化合物(26.1%)が2倍以上のER β の発現誘導を示した。このER β 誘導と女性ホルモンシグナル(E2/ER α)の抑制とが符合する傾向が示された。また、*in vivo*研究で、ビスフェノールAF(BPAF)はER β を誘導し、さらに、E2による子宮肥大を抑制した。しかし、実際にこのBPAFによる生体影響が「ER α を介さずER β に作用(発現増加)する」ことで生じたのか否かについては不明である。申請者らが提唱する仮説を基盤とした生体影響を解明するには、細胞レベルでさらなる検討を実施し、十分な知見を蓄積する必要があることが判明した。本研究は3カ年の計画(H25～27年度)であり、最重要到達目標は「ER β の発現変動の意義とそのメカニズムを解明することで環境行政に貢献し得るプラットフォームを確立すること」である。H27年度研究では、以下の実施項目の内容で検討を推進する計画である。
- (3) 平成27年度実施内容：
- ①ER α に直接作用せずER β を誘導する化合物の同定と、これらの用量相関性をはじめとする定量的なデータを蓄積する。
 - ②環境化学物質によるER β の発現誘導メカニズムの解明

基盤2：妊馬由来エクイン類の汚染実態解明と生態影響評価 (H25～)

- (1) 研究者：熊本県立大学：有菌幸司(代表研究者)、石橋康弘、尚絅大学短期大学：石橋弘志、瑞輝科学生物株式会社：内田雅也、有明工業高等専門学校：富永伸明、立命館大学：一川暢宏
- (2) 研究概要：昨年度の本助成金によりLC/MS/MSによる6種のエクインエストロゲンの分析手法を開発した。本年度は環境試料の種類や採取地点・時期をさらに拡大し、水環境中エクインエストロゲンの汚染実態の解明を試みる。また昨年度と同様に、ヒト由来のエストロゲンも測定対象とし、包括的なエストロゲン汚染の実態解明を試みる。また、エクインエストロゲンの内分泌かく乱作用を確認するため短期繁殖試験など

を実施し、水環境中濃度との比較からリスク評価を試みる。また本年度は、エクインエストロゲンのERサブタイプ（ER α , ER β 1, ER β 2）に対する影響を詳細に明らかにするため、ERサブタイプ遺伝子の発現解析、ERサブタイプとの結合親和性や転写活性化能の評価、エストロゲン応答遺伝子のプロモーター解析などを実施する。これまでエクイン類について報告されている文献情報を収集し、今年度までの3年間で得られた知見と併せてエクイン類のリスクを明確化する。また、これらの知見を基に畜産業と環境の共存に向けた具体的な対応策について検討する。これら検討は最終的にリスク軽減のための提案として報告できるように準備する。

(3) 平成27年度実施内容：

- ①水環境における汚染実態の解明
- ②魚類等に対する影響評価

その他の関連研究課題 1：生物蓄積性内分泌かく乱候補物質によるわが国の野生生物汚染の実態解明（H17～）

(1) 研究者：愛媛大学 沿岸環境科学研究センター：田辺信介(代表研究者)、国末達也、野見山桂

(2) 研究概要：ポリ塩化ビフェニル (PCBs) やポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) などの有機ハロゲン化合物は、多様な野生生物から検出されており、今なお高次生態系の汚染が顕在化している。近年、有機ハロゲン化合物は親化合物だけでなく代謝物の毒性も問題視され、とくに甲状腺ホルモンや脳神経系への影響が危惧されており、生物の行動異常に関わる物質として高い学術的関心を集めている。しかし、野生生物に残留する代謝物の曝露実態や蓄積の態様はほとんど明らかにされていない。これまでの研究により、イヌやネコ、キツネなど食肉目の PCBs 代謝能は相対的に強いことが示唆されるが、本種を対象とした研究事例は少なく、代謝・排泄機構の種間差は不明である。本研究では、食肉目を対象に、血液・脳・肝臓などの臓器組織に蓄積する有機ハロゲン代謝物 (OH-PCBs、OH-PBDEs) の実態を明らかにすることを目的とする。また、海・陸の動物種で認められる蓄積濃度・異性体組成パターンとの差異を調査することにより、OH-PCBs や OH-PBDEs の生成および脳移行の態様を比較生物学的に解明し、ハイリスクアニマル特定のための道筋を開拓する

(3) 平成 27 年度実施内容：

- ①汚染の実態解明
- ②蓄積特性の解明
- ③ハイリスクアニマルを特定するための評価法の構築

その他の関連研究課題 2 : ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニズムの解析 (H17 ~)

- (1) 研究者：自然科学研究機構 基礎生物学研究所：井口泰泉(代表研究者)、宮川信一、荻野由紀子、宮川一志、平川育美
- (2) 研究概要：平成26年度のEXTEND2010 基盤研究（その他）において、「ミジンコ類の幼若ホルモン受容体のMetとSRCの部分配列を用いたTwo hybrid assay」、および「ミジンコを用いた日照の変化によるオス誘導系」を確立した。さらに、「ミジンコの幼若ホルモンはメチルファーネゾエイト（MF）であること」および「イオンチャネル型グルタミン酸受容体(特にNMDA型受容体)が幼若ホルモン経路の上流制御に関与している可能性が高いこと」を明らかにした。本年度は前年度の結果をふまえ、幼若ホルモン受容体分子のMetを用いた迅速で簡便な幼若ホルモン作用をスクリーニングする*in vitro*アッセイ系の確立を目指す。また、前年度に確立した日照条件操作によるオス誘導系を用いて幼若ホルモンの上流で働く因子の探索も引き続きおこなう。これら上流因子には幼若ホルモン合成経路関連遺伝子やそれと相互作用する脱皮ホルモン経路関連遺伝子などが含まれると予想されるが、その解析は、従来の幼若ホルモン類似物質曝露によるオス誘導系では不可能であった。さらに、ミジンコの幼若ホルモンおよび脱皮ホルモンの測定手法について引き続き検討する。本研究によってミジンコにおける内分泌系への理解と、そのかく乱メカニズムの解明が期待される。
- (3) 平成 27 年度実施内容：
- ①幼若ホルモン作用をスクリーニングする *in vitro* アッセイ系の検討
 - ②幼若ホルモン受容体および脱皮ホルモン受容体を用いた化学物質の構造活性相関の精緻化の検討
 - ③幼若ホルモンおよび脱皮ホルモン経路関連遺伝子群の同定と解析およびホルモン測定法の検討

資料 1

平成 26 年度 野生生物の生物学的知見研究検討部会
研究成果ヒアリング及び評価会
プログラム

日時：平成 27 年 3 月 4 日（水） 13:00~15:00

場所：日本エヌ・ユー・エス(株) 本社

発表会場：大会議室

発表者控室：中会議室

(開会・概要説明 13:00~13:10)

発表時間 区分	代表研究者 代理発表者	所属	研究課題名
13:10~13:40 その他の関連 研究課題 1	田辺信介 野見山桂	愛媛大学 沿岸環境科学研究 センター	生物蓄積性内分泌かく乱候補物質によるわ が国の野生生物汚染の実態解明
13:40~14:10 野生 1	征矢野清	長崎大学大学院	ボラ・マハゼ・二枚貝を用いた日本沿岸域 における底質蓄積性化学物質の内分泌かく 乱作用の生物影響の解明
14:10~14:40 野生 2	石塚真由美	北海道大学大学院	野生の歩哨動物 <i>Rattus sp.</i> を用いた環境化 学物質による野生動物のゲノム・ストレス と適応の検証
14:40~15:00	意見交換及び「野生」関連課題の評価会		

*発表時間は 15 分、質疑応答は 15 分。

資料 1

平成 26 年度 基盤的研究企画評価検討部会
研究成果ヒアリング及び評価会
プログラム

日時：平成 27 年 3 月 6 日（金） 10:00~12:20

場所：日本エヌ・ユー・エス(株) 本社

発表会場：大会議室

発表者控室：中会議室

(開会・概要説明 10:00~10:10)

発表時間 区分	代表研究者 代理発表者	所属	研究課題名
10:10~10:40 その他の関連 研究課題 2	井口泰泉	自然科学研究機構 基礎生物学研究所	ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニ ズムの解析
10:40~11:10 基盤 1	荒牧弘範	第一薬科大学	第 2 のエストロゲン受容体 ER β を標的と した内分泌かく乱メカニズムの解明
11:10~11:40 基盤 2	有菌幸司	熊本県立大学 環境共生学部	妊馬由来エクイン類の汚染実態解明と生態 影響評価
11:40~12:20	意見交換及び「基盤」関連課題の評価会		
12:20~13:00	昼食		

*発表は 15 分、質疑応答は 15 分。

平成 27 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する
フィージビリティースタディーマ募要綱

I. 化学物質の内分泌かく乱作用に関するフィージビリティースタディーマの実施

環境省では、平成 22 年 7 月に、化学物質の内分泌かく乱作用に関するこれまでの取組及び諸外国の動向等を踏まえ、環境省の今後 5 年間の対応の方向性として「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応—EXTEND2010—」*を取りまとめ、これに基づき、野生生物の生物学的知見研究及び化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究を推進してきました。

今般、今後の新規研究課題の候補として、平成 27 年度に実施するフィージビリティースタディーマを公募します。フィージビリティースタディーマについては、平成 27 年度研究計画承認後から平成 27 年度末までの成果を踏まえ、平成 28 年度以降の研究の実行可能性を検証することとしております。

* http://www.env.go.jp/chemi/end/extend2010/extend2010_full.pdf

1. 研究内容

EXTEND2010 に即した研究であること。

(1) 野生生物の生物学的知見研究

- 1) 野生生物において認められた個体(群)の変化やその前兆(行動の変化を含む)について化学物質ばく露の関連性を把握する研究
- 2) 化学物質ばく露がその原因として疑われる野生生物における異変のメカニズムを実験的に検討・検証する研究

※ 対象生物としては、生態毒性試験の対象生物種やその近縁種など、生態系に対するリスクの評価において要となる生物のほか、食物連鎖を通じて化学物質の蓄積が進みやすいほ乳類・鳥類などの高次捕食動物等を優先します。

(2) 化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究

- 1) 個体レベルでの有意な変化と細胞・分子レベルでの変化との関連性を把握する研究

2) 化学物質による内分泌かく乱作用を(既存の、または新たな)リスク評価及びリスク管理手法に組み込むことを目的とした研究

2. 研究費の規模

1 課題当たり 250 万円程度(平成 27 年度)。

3. 採択予定課題数

野生生物の生物学的知見研究及び化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究を合わせて、2 課題程度。

4. 研究期間

野生生物の生物学的知見研究検討部会及び基盤的研究企画評価検討部会による研究計画承認後～平成 28 年 3 月 24 日(木)。

5. 研究成果

今年度の研究成果及び来年度以降の計画案については野生生物の生物学的知見研究検討部会及び基盤的研究企画評価検討部会の研究成果合同ヒアリング(平成 28 年 3 月、東京にて開催予定。非公開。発表者 1 名分の旅費を支給いたします)にて発表することとします。発表の内容について、野生生物の生物学的知見研究検討部会及び基盤的研究企画評価検討部会で審査を行い、実行可能性が高いと判断された研究については、野生生物の生物学的知見研究または化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究として平成 28 年度以降も研究を継続することが可能です。

II. 応募要件

1. 提出物

(1) 平成 27 年度 化学物質の内分泌かく乱作用に関するフィージビリティースタディー研究応募票

(参考：記載例)

なお、研究応募票には、応募した課題が「野生生物の生物学的知見研究」または「化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究」のどちらの研究内容に対応するものかを記載してください(応募票に記載する欄があります)。

(2) 研究概要を説明するパワーポイント資料(スライド 6～8 枚程度、発表時間として 10 分程度)

2. 応募受付期間

平成 27 年 6 月 9 日(火)～7 月 31 日(金)

3. 提出先

(事務局)

日本エヌ・ユー・エス株式会社

平澤 京子 宛

E-mail: EXTEND.01@janus.co.jp

〒160-0023 東京都新宿区西新宿 7-5-25 西新宿木村屋ビル 5 階

TEL: 03-5925-6740 (代表)、FAX: 03-5925-6745

※メールタイトルは「フィージビリティースタディー応募 (所属・氏名)」としてください。また、メールの容量が 5 MB を越える場合は、パワーポイント資料を CD-R に記録し郵送してください (7 月 31 日 (金) 消印有効)

III. 研究課題の採択

応募要件を満たした研究課題について、野生生物の生物学的知見研究検討部会及び基盤的研究企画評価検討部会の研究計画合同ヒアリング(平成 27 年 8 月 10 日(月)に東京にて開催予定。非公開。発表者 1 名分の旅費を支給いたします)において審査を行いますので、応募者には、この場でヒアリングを受けていただきます。ヒアリングの詳細については、別途メールにて連絡します。なお、応募者が参加できない場合には、代理人の参加も可能です。さらに、応募者多数の場合は、応募提出物を基に一次選考を行います。

検討委員による審査の後、採択する研究課題を決定し、結果を応募者に通知します。

IV. 研究課題採択後の流れ

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

V. その他

平成 26 年度には、EXTEND2010 に基づき、野生生物の生物学的知見研究、基盤的研究、及びその他の関連研究として別添の研究課題を実施しました。

応募された研究課題

応募された研究課題について、研究区分及び研究内容（テーマ）に従って分類し、以下に示した。

(1) 野生生物の生物学的知見研究課題及び応募研究課題名（計3課題）

1) 野生生物において認められた個体(群)の変化やその前兆(行動の変化を含む)について化学物質ばく露の関連性を把握する研究

* 応募研究課題名

野2 海産メダカ胚による底質影響試験法を用いた東京湾底質リスク評価と底質中 PAHs の蓄積寄与に関する研究

野3 座礁・漂着鯨類における新規 POPs および POPs 代替物質の蓄積特性とリスク評価に関する研究

2) 化学物質ばく露がその原因として疑われる野生生物における異変のメカニズムを実験的に検討・検証する研究

* 応募研究課題名

野1 琵琶湖固有種ホンモロコの *in vitro* 精子分化系を用いた内分泌かく乱作用の検出とそのメカニズム解析

(2) 化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究課題及び応募研究課題名（計7課題）

1) 個体レベルでの有意な変化と細胞・分子レベルでの変化との関連性を把握する研究

* 応募研究課題名

基1 軟体動物前鰓類におけるエクダイソン受容体(EcR)様遺伝子を介した内分泌かく乱作用に関する研究

基4 鳥類・哺乳類を用いた環境化学物質に起因する環境遺伝子発現変化と疾患との関連性の検証

基5 農薬およびディーゼル排ガスに由来するニトロフェノール類のストレス抵抗性に与える影響に関する研究

基6 神経内分泌かく乱化学物質によるラット多動性障害の分子機構の解明に関する研究

2)化学物質による内分泌かく乱作用を(既存の、または新たな)リスク評価及びリスク管理手法に組み込むことを目的とした研究

*応募研究課題名

- 基2 魚類の代謝に関わる内分泌かく乱 (metabolic disruption) の *in vitro* 評価系構築
- 基3 魚類エストロゲン受容体サブタイプを用いた化学物質の内分泌かく乱作用のハイスループットスクリーニング系の開発
- 基7 化学物質の代謝および体内動態に基づいた、妊娠時曝露のリスク評価に関する研究