

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た。

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きた。

2. 昨年度の実施状況（別紙 1 参照）

平成 27 年度には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、その他の関連研究 2 課題及びフーズビリティースタディー(FS) 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 28 年 3 月 23 日開催、非公開）において評価を行った。

表 1 平成 27 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
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～H27
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～H27
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～H27
フィージビリティースタディ－(FS)			
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. 今年度の取組

(1) 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

平成 27 年度の研究成果を踏まえ、平成 28 年度は野生生物の生物学的知見研究として 1 課題及び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 課題を選定した(別紙 2 参照)。

野生 1：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

基盤 1：妊馬由来エクイン類の汚染実態解明と生態影響評価

基盤 2：魚類の代謝に関わる内分泌かく乱の *in vitro* 評価系構築

(2) フィージビリティースタディ－

本年度はフィージビリティースタディ－を公募しないこととした。

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 EXTEND2016 野生生物の生物学的知見研究検討部会及び EXTEND2016 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。

EXTEND2016 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 環境技術研究所 特命教授
川合眞一郎	甲子園大学 学長
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

EXTEND2016 化学物質の内分泌かく乱作用に関する

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	横浜市立大学 客員教授
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 センター長 教授
遠山千春	東京大学 名誉教授
永沼章 (座長)	東北大学大学院 薬学研究科 生体防御薬学分野 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 27 年度 EXTEND2010 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

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

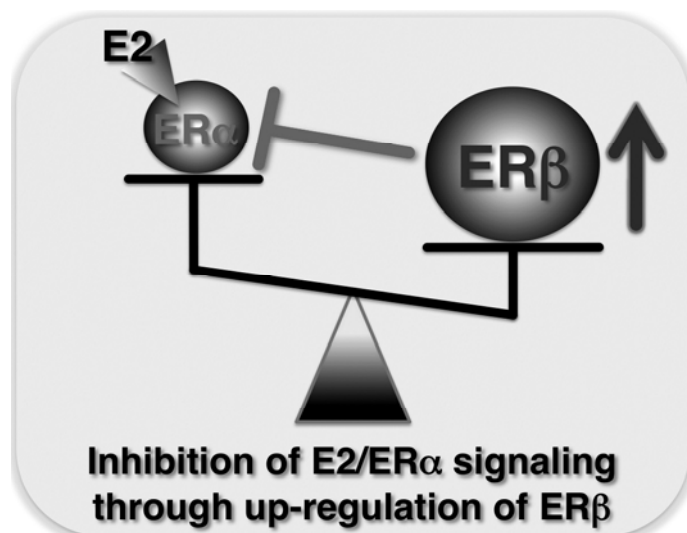
研究者：第一薬科大学：荒牧弘範(代表研究者)、岡崎裕之、原口浩一、広島国際大学：瀧口益史、竹田修三、北陸大学：渡辺和人、九州大学：新藤充

研究概要：申請者らは、EXTEND2010の喫緊課題は、「一般の方々に内分泌かく乱物質について正確な情報を正しく理解してもらうための“基盤整備”」であると考えている。薬物中毒とは異なり、内分泌かく乱物質が与える影響は直ちに出現するのではなく、曝露から長い時間を経てから(あるいは、日常的に曝露されて)表現型として確認できる。したがって、有害作用の現れる時期(エンドポイント)を予測し難いことと、さらには現れた時点では“遅い”ということが問題である。

我々はこれまでに、大麻を中心とした乱用薬物による内分泌かく乱問題について検討を進めてきた。その結果、これまでにない概念、「すなわちエストロゲン(E2)/ER α のシグナルをER β の発現を上昇させることで、抑制する」ということを見出した(Chem. Res. Toxicol., 26: 1073–1079, 2013) (挿入図)。

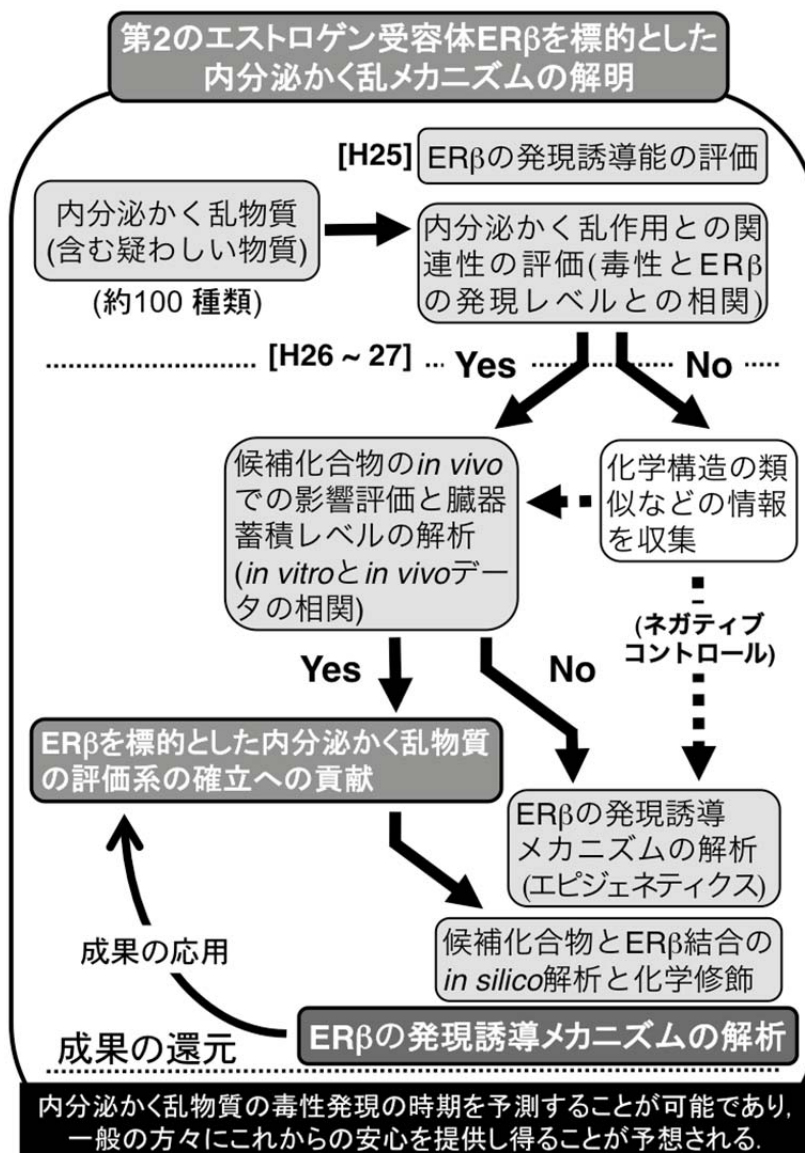
この成果は、これまで長らく不明であった薬物型大麻草主成分である Δ^9 -THCの内分泌かく乱のメカニズムの一部を解明した研究として注目されている(西日本新聞2013年7月19日朝刊)。しかし、 Δ^9 -THCによるER β 発現誘導の分子メカニズムは不明のままであり、さらには巷に氾濫する環境化学物質がER β に与える影響についても不明である。

本研究では、先に示したコンセプトを基盤として、ER β をE2シグナルの抑制因子として確立することを目指す。そのためには、化学物質によるER β の発現誘導メカニズムを解明しなければならない。臓器にもよるが、一般にER β の発現はプロモーター領域のDNAメチル化(=高メチル化)によってその発現が抑えられている。未発表データではあるが、高脂溶性の Δ^9 -THCは、細胞内に蓄積することでER β のプロモーター領域の低メチル化を起こすことを見出している。内分泌かく乱物質は高脂溶性のものが多く、それらの影響が現れるまでには長い時間を要する。我々は、この要因の1つはER β の発現が十分誘導されるまでの時間と考えている。これまでの内分泌かく乱物質のスクリーニングは、ER α などの受容体を標的として、これに作用するリガンドを検出・



評価するものであった。しかし、このアプローチではいつ毒性が発現するのを予測することは困難であり、さらにERβの発現に依存してE2/ERα機能を抑制する化合物を見逃してしまう可能性が考えられる。

本研究では、E2/ERαの機能をリガンドとしてではなく、ERβの発現誘導を来すことで抑制し得る化合物の調査を行い、ERβの発現誘導の分子メカニズム解明することを目指す。このことにより、ERβを毒性指標に内分泌かく乱を予測する評価系の確立に貢献することが予想される。本研究の最終到達目標は、Δ⁹-THCに加えて、既存の環境化学物質がERβに与える影響を解析し、それらによるERβの発現誘導の分子メカニズムを解明することである。将来的には、内分泌かく乱物質の毒性発現の時期をERβの発現の多寡で予測することも可能であり、一般の方々に現在の状況確認とこれからの安心を提供し得るに資することが予想される。以下に「研究の目的・方法・期待される効果の流れ図」を示した。



研究結果のまとめと考察：本研究は平成25年度から平成27年度の3ヵ年の計画で実施され、最終到達目標は「ERβ発現誘導の分子メカニズムを解明する」ことであり、得られた成果を基盤としてERβ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を目指すものであった。平成25年度研究では、ERα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ことに注目した。具体的には、大麻主成分の Δ^9 -THCが「ERαのリガンドとして作用せず、ERβの発現増加を介してエストロゲン(女性ホルモン)/ERαシグナルを抑制する」ことをヒントとして(Chem. Res. Toxicol., 26: 1073–1079, 2013; 西日本新聞2013年7月19日2013朝刊)、このような作用を示す環境化学物質の探索を行うことを目的とした。111種類の環境化学物質を対象としてこれらがERβ発現に与える影響を調査した。その結果、全体の26.1%(29種類)にあたる化学物質が2倍以上のERβ誘導を示した。溶媒コントロール処理群と比較して2倍以上のERβの発現誘導を示した化合物として、BPAF (次世代ビスフェノール)、DPENP (フタル酸エステル類)、2,2'-diOH-BB80 (天然臭素化ビフェニル)、4,4'-DDT (有機塩素系の農薬)などが見出された。予備的検討段階ではあったが、結果の一部は当初の仮説を支持して、これらERβ誘導能を呈した化合物は同時にE2/ERα活性を抑制する傾向を示した。BPAFに注目すると、本化合物はフェノール性水酸基の*o*-位及び*m*-位に置換基がなく、ERαの完全アゴニストであることが報告されている(Environ. Health. Perspect., 118: 1267–1272, 2010)。このことを我々の系に適応して考えると、ERαの完全アゴニストであるE2とbisphenol AFが共存するとERα活性は「増加」することが予想された。しかし、結果はこの予想を支持せず、却ってERαの活性が「抑制」された。従って、環境化学物質の中にはERαの機能を何らかの機構、例えば本研究で注目する「ERβの発現誘導あるいはその活性化を介して抑制しうる」ものが存在することが示唆された。

H26年度研究では、平成25年度研究において候補に挙げたBPAFを中心としてこれら化合物が生体機能に与える影響を解析することを目的とした。次世代ビスフェノールとして注目されているBPAFが幼若マウスの子宮内ERαの発現には影響を与えず、ERβの発現を増加させる傾向が示された。そこで、BPAFがE2誘導性の子宮肥大化に与える影響を解析した結果、BPAFはE2の作用に拮抗した。従って、平成25年度および27年度の*in vitro*スクリーニングで浮上した化合物(BPAF)は生体レベルでE2シグナルを抑制する可能性が示唆された。しかし、これまでに*in vitro*と*in vivo*の関連性が判明した化合物はBPAFのみであり、ここで得られたBPAFに関する実験証左

だけで仮説を結論するには時期尚早であり、さらなる検討の必要性が考えられた。

環境中には無数の化合物が存在し、化合物の数は急速に増加している。また、化合物によってはごく微量で内分泌かく乱作用を示す可能性がある。本研究で用いたMCF-7細胞系は酵母 two-hybrid (Y2H)系よりも高感度であるが、膨大な数の環境化学物質を網羅的に解析するにはさらに高感度なハイスループット測定(HTS)系の確立が必要と考えられる。本研究では、ER β の転写制御領域でかつCpGアイランド(=DNAメチル化部位)を有する部分 (-1683/+442)をpGL4.18(luc2P/Neo) vector (Promega)にクローニングし、MCF-7細胞に遺伝子導入することで安定発現株の単離・構築を行い、 Δ^9 -THCをモデル化合物として検討を行った。低濃度域では十分な活性化が見られたが、ER β の発現誘導を示す25 μ Mでは却って活性が低下する結果となった。現段階では、この原因については不明であるが、本研究で見出されたほかの化合物の影響調査や解析転写領域の見直し等が必要と思われる。

本研究では、環境化学物質による女性ホルモン作用のかく乱の作用点としてER α ではなく、ER β に注目して研究を展開した。111種類にも及ぶ環境化学物質を調査した。BPAFやDPENPなどがER β 誘導能および女性ホルモンスIGNAL(E2/ER α)の抑制を来す傾向を示した。我々が先に見出した Δ^9 -THCはER α には作用せず、ER β の発現誘導とその活性化を来すことで抗エストロゲン作用を示した。このコンセプトを応用すべく他のER β 誘導性の化合物を調査した結果、驚いたことに Δ^9 -THCと全く同様のメカニズムで抗エストロゲン作用を示した化合物は存在しなかった。例えば、BPAFは、ER α 単独系ではそのアクチベーターとして作用し、ER α とER β が共存する系ではER β の発現誘導とその活性化を来した。

Δ^9 -THCをモデル化合物として、本化合物によるER β の発現制御にDNAメチル化の修飾が関与している可能性が示唆された。しかし、他の化合物での検討は今後の課題となった。加えて、ER β の誘導における化合物の構造要求性に関する知見を得ることはできなかった。従って、上述の課題も含めて本研究成果から当初のコンセプトに対する結論を導くことはできず、今後さらなる研究が強く切望される。

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、愛媛大学：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

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、我が国の水環境における汚染実態や環境中動態を明らかにする。また、魚類のエストロゲン受容体を用いた*in silico*, *in vitro*及び*in vivo*実験系により、エクインエストロゲンのエストロゲン様作用を詳細に評価する。これらについて、ヒト由来エストロゲンと家畜由来エクインエストロゲンとの比較をし、魚類に対する内分泌かく乱作用の可能性を探り環境リスク評価を試みる。

研究結果のまとめと考察：本研究では、繁殖牝馬（軽種馬）の飼養牧場数・生産頭数が全国トップレベルである北海道地区を対象としてEQsの汚染実態を明らかにした。諸外国の先行研究では、これまで下水処理水などから1あるいは2種類のEQsが検出されているが、本研究ではほとんどの調査地点から4種類以上のEQsが同時に検出された。また、 Σ EQs濃度は、ST5から下流域で急激に増加し、実際ST5からその下流域付近には多くの牧場が分布していた。一方、ST1を除き、ST2からST4の Σ EQs濃度は低く、実際ST4から上流域付近に牧場はほとんど存在しなかった。これらのことから、主に馬由来のEQsが牧場から排出され、河川に流入していると考えられた。さらに興味深いことに、ST5の直上流域付近には約900頭のホルスタイン種を飼養している牧場が存在していた。過去のアメリカの報告では、牛糞肥料から 17α -Eqの検出が報告されている（Andaluri et al., 2012）。今後は牛由来の試料についてもEQsの探索・同定を行う必要があるだろう。

各EQs濃度の関係から汚染源の推定を試みるため、スピアマン順位相関係数による相関解析を行ったところ、ほとんどのEQs濃度間で関係は見られなかった。また、主成分分析でも各調査地点に明瞭な関係性は見いだせなかった。これらのことから、河川へのEQsの流入は、単独のEQs排出源からではなく、複数の異なるEQs排出源からの関与が示唆された。さらに、これまで哺乳類では、EqおよびEqnは生体内で代謝され、 17β -Eqおよび 17β -Eqnを生成することが報告されている（Bhavnani et al., 2014）。また、 17β -E2抱合体などは河川中で脱抱合されることが知られている。これらの化学物質は、水温などの影響を受けながら河川中の底質で吸着・脱離していると考えられることから、今後はEQs代謝物や抱合体の生成・脱抱合メカニズム、底質へのEQsの吸着・脱離とそのメカニズムなども明らかにする必要がある。

本研究では、21日間のメダカ繁殖・次世代試験によってEqの影響を評価し、繁殖・次世代影響に対するLOECは100 ng/Lであることを明らかにした。これまで21日間の繁殖試験によって、実測濃度463 ng/Lの 17β -E2はメダカの産卵数および受精率を有意に減少させることが報告されている

(Kang et al., 2002)。一方、我々の昨年度の研究成果では、3日間の短期曝露による雄メダカ肝臓中ビテロゲニン遺伝子の発現増加に対する LOEC は、Eq が 10 ng/L、17β-E2 が 30 ng/L であり、Eq は 17β-E2 より強いエストロゲン様作用を示すことを明らかにした。これらのことから、Eq は 17β-E2 より低濃度で繁殖阻害や次世代孵化率の低下を引き起こすことが示唆された。

本研究では、北海道の河川から数 ng/L (最大 20 ng/L) の Eq を検出し、昨年度の研究成果では、10 ng/L の Eq 曝露によって雄メダカ肝臓中ビテロゲニン遺伝子の発現が増加することも明らかにした (Ishibashi et al., 2016)。さらに本研究で明らかになった Eq の繁殖・次世代影響の LOEC 100 ng/L と合わせると、河川に棲息する魚類等に対する Eq の内分泌かく乱作用が示唆され、今後早急にリスク評価を行う必要があると考えられた。また、国立環境研究所の報告によると、エストロンの 21 日間メダカ繁殖試験における LOEC は 1000 ng/L であったが、多世代試験では LOEC は 91.4 ng/L となり、影響濃度は 1/10 程度になることが明らかにされている (Nakamura et al., 2015)。Eq はエストロンと同様に ERs を介した作用機序を示すことから、多世代試験などではさらに低濃度で影響する可能性がある。今後は多世代試験などによる Eq を含めた EQs の影響評価、さらにはリスク評価が必要であろう。

メダカでは 3 種類の ER サブタイプ (ERα, ERβ1, ERβ2) の存在が知られているが、機能・役割について不明な点が多い。本研究では、物質特異的な ERs 遺伝子発現の増加・抑制や、ERs 遺伝子発現と *Vtg*・*2* および *ChgL*・*H* 遺伝子発現の正・負の相関関係を明らかにした。これらの知見は、エストロゲン様物質に対する ERs 遺伝子発現の異なる応答や、*Vtg*・*Chg* などエストロゲン応答遺伝子の発現制御に対する ERs の関与を示唆している。今後、本研究の成果に加え、ERs 改変メダカなどを用いた ERs の機能解析により、内分泌かく乱作用の ERs を介した作用機序の解明が期待される。

本研究は、日本の河川において EQs を検出した初めての報告である。さらにメダカ繁殖・次世代影響試験により LOEC を明らかにし、河川で検出された Eq 濃度や先行研究との比較から、Eq の内分泌かく乱作用を示唆した。これらの成果は、EQs のリスク評価において極めて有益な情報を提示し、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：本研究の目的は、既存の POPs (Persistent Organic Pollutants: 残留性有機汚染物質) と類似の内分泌かく乱作用や生態系の汚染が懸念されている有機ハロゲン代謝物に注目し、わが国における野生生物の汚染状況と蓄積の態様、毒性発現の可能性等について検証することにある。本研究では、生物蓄積性の POPs 代謝物として知られる水酸化 PCBs (OH-PCBs)、水酸化 PBDEs (OH-PBDEs) および関連代謝物に注目し、海洋および陸域生態系の高次動物をモデル生物として、汚染実態・曝露量調査・蓄積特性等の解明とリスク評価の課題に取り組むたいと考えている。

平成 17 年度～20 年度の間は、東アジアに分布する魚介類や鯨類・鰭脚類を生物指標にしてモニタリングを実施し、PCBs などの POPs に加え、POPs 候補物質 (PBDEs や HBCDs などの有機臭素系難燃剤[BFRs]) によるわが国近海と外洋汚染の特徴を明らかにした。平成 21-22 年度は陸域の鳥類生態系に注目し、琵琶湖に棲息する魚食性鳥類カワウの汚染実態解明研究に取り組んだ。平成 23 年度は鳥類生態系の頂点に位置する猛禽類に注目し、カワウで展開した研究課題と類似の内容、すなわち汚染実態と蓄積特性を解明しリスクを評価した。さらに平成 24 年度は、陸棲の高等動物 (ハクビシン・ホンダタヌキ・アライグマ) とその胃内容物を供試して POPs 候補物質による汚染の実態や体内分布・生物濃縮の態様等を明らかにした。平成 25 年度は沿岸域の海棲哺乳動物スナメリに注目し、POPs 候補物質の蓄積特性を解明するとともに、水酸化代謝物の残留を発見し、その脳移行や脳内分の特徴から甲状腺ホルモン介在のリスクが懸念されることを指摘した。平成 26 年度は、ニホンザルを対象に胎盤を介した母仔間移行の実態解明を試み、初期胎仔発達段階における胎盤を介した母仔間移行を明らかにするとともに、発達の極初期段階から胎仔の脳に移行・残留することを示した。平成 27 年度以降は、陸棲哺乳類の中でも代謝能が強いイヌやネコなどの食肉目に注目し、PCBs や PBDEs の水酸化代謝物による汚染実態の解明とリスクについて評価した。さらに平成 25 年度に得られた海棲哺乳動物の結果と対比しながら、比較生物学的な解析を深め、野生生物全体における代謝物研究の包括的な整理も試みたい。

研究結果のまとめと考察：

1. 食肉目を対象とした有機ハロゲン代謝物による汚染実態解明

本研究では、多様な陸棲哺乳類の血中有機ハロゲン化合物とその水酸化代謝物を分析し、食肉目の生物種間で OH-PCBs の残留傾向に種差があることを明らかにした。中でも、ネコの OH-PCBs 残留傾向は他種と大きく異なり、低塩素化 OH-PCBs の高蓄積が顕著であったことから、本種は特異な代謝機能を有することが示唆された。さらに、ネコの OH-PBDEs 濃度は他種に比べ高値を示し、異性体組成のパターンから、天然起源の OH-PBDEs を取り込んでいることが推察された。ネコはフェノール化合物の代謝を担うグルクロン酸抱合能(1A6)遺伝子が偽遺伝子化しているため⁸⁾、他種と異なる残留代謝物のパターンを示したものと推察される。そのため、グルクロン酸抱合で代謝・排泄されるフェノール化合物の毒性に対してネコの感受性は高いことが予想され、本種は水酸化代謝物のハイリスクアニマルであることが示唆された。

2. イヌ・ネコにおける PCBs および水酸化代謝物の脳移行

イヌ・ネコの脳中から検出された OH-PCBs 異性体に注目すると、イヌからは 4OH-CB187、4OH-CB199、4OH-CB146、ネコからは 4'OH-CB18、4'OH-CB72、4OH-CB101/120 の低塩素化 OH-PCBs が主要異性体として検出された。イヌから検出された 4OH-CB187 は、抗エストロゲン作用および抗

グルココルチロイド様作用を示すことが報告されている¹⁸⁾。また、ネコ脳中から検出された低塩素化OH-PCBsは、エストロゲン活性や甲状腺ホルモン活性を示すことから¹⁷⁾、イヌ・ネコともに核内受容体を介した内分泌攪乱作用が懸念された。そこで、本研究で検出された脳中OH-PCBs濃度と既報の*in vitro*試験においてOH-PCBsが脳神経細胞へ影響を与えた濃度を比較し、リスク評価を試みた(Fig. 6)。その結果、イヌでは半数、ネコでは1検体を除くほぼすべての検体において、4OH-CB106がマウス小脳神経細胞の発達を抑制した濃度(50 pM: 15.6 pg/g)を超過した¹⁴⁾。また、イヌ2検体、ネコ4検体は、4OH-CB106がT3を介した遺伝子発現の抑制濃度¹³⁾(100 pM: 31.2 pg/g)を超えており、さらにネコ1検体は4'OH-CB159がマウス小脳神経細胞の発達を抑制したレベル¹²⁾(500 pM: 171 pg/g)を超えていた。このことから、脳に移行したOH-PCBsはイヌ・ネコの脳発達に影響を及ぼしている可能性がある。

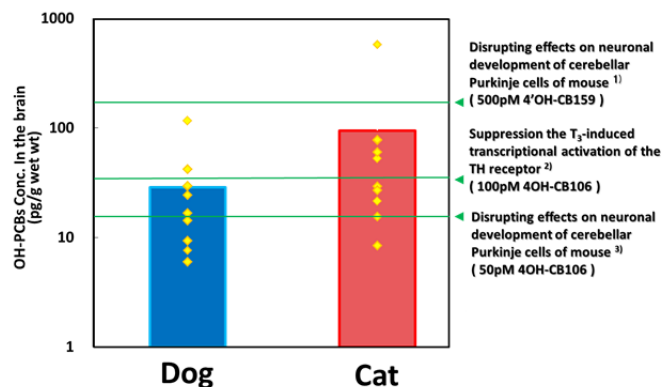


Fig. 6. Concentrations of OH-PCBs in the brain of dogs and disrupting levels of TH indicated by the *in vitro* assays.

1) Kimura-Kuroda et al., 2007 Chemosphere 67, 412-420; 2) Miyazaki et al., 2004 J. Biol. Chem., 279, 18195-18202; 3) Kimura-Kuroda et al., 2005

3. ペットのイヌ・ネコにおける有機ハロゲン化合物および水酸化代謝物の曝露実態と甲状腺ホルモン恒常性へ及ぼす影響

ヒトと生活圏を共有するペット動物のネコは、PBDEsを高蓄積しており、甲状腺機能障害に対するPBDEsおよび代謝物の関与が強く疑われている¹⁶⁾。PBDEsは家屋内の家具・家電に難燃目的で大量に添加されており、室内環境の汚染が深刻化している⁹⁾。そこでペットのイヌ・ネコの血中PCBsとPBDEsおよびその水酸化代謝物を分析したところ、ネコの血中OH-PBDEs、MeO-PBDEs濃度はイヌに比べ2~3桁高値であることが判明した。その異性体組成に注目すると、イヌ・ネコともにDecaBDEが全体の6割以上を占めていた。国内におけるPBDEs製剤の使用はDeca製剤が主体であり⁹⁾、既報のペットフードやハウスダストも同様の組成を示していることから¹¹⁾、ペット動物汚染はDeca製剤の曝露が主体と考えられる。

次に、ネコ血清中DecaBDEの曝露レベルとTHs濃度についてスピアマンの順位相関係数を求めた結果、T₄、T₃、rT₃およびFT₃の間に有意な負の相関関係が得られた。一方で、FT₄とTSHに対しては相関関係が認められなかった。そこで、THsへの影響が強く示唆されたDecaBDEsの作用機序を推測した(Fig. 6)。血液中のTHsの約99%はタンパク質結合型として存在するため、血中THs濃度はタンパク質濃度に依存することが知られている。ヒトではPCBs曝露により血中TBG濃度の減少が報告されている¹⁹⁾。本研究においてネコ血中T₄、T₃、rT₃はDecaBDEと有意な負の相関関係($p < 0.01$)を示したことから、血中のTHs輸送タンパクの減少が示唆された。一方で遊離型のTHsは血液中のタンパク質濃度に依存せず、基本的に血中で一定値を示すことが知られている。本研究では、FT₄とDecaBDEの間に有意な相関関係は認められなかったが、FT₃に対して有意な負の相関関係がみられた。T₃は80%がT₄の脱ヨウ素化によって生成されるホルモンであるため、本研究におけるFT₃の減少は、T₄

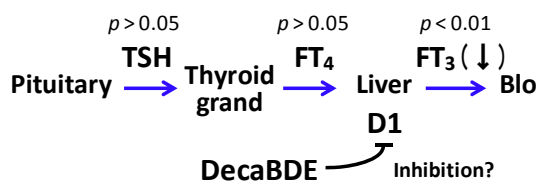


Fig. 2. Proposed pathways of the disruptions of THs homeostasis by the DecaBDE. *In parenthesis indicates effect on THs.

ヒトではPCBs曝露により血中TBG濃度の減少が報告されている¹⁹⁾。本研究においてネコ血中T₄、T₃、rT₃はDecaBDEと有意な負の相関関係($p < 0.01$)を示したことから、血中のTHs輸送タンパクの減少が示唆された。一方で遊離型のTHsは血液中のタンパク質濃度に依存せず、基本的に血中で一定値を示すことが知られている。本研究では、FT₄とDecaBDEの間に有意な相関関係は認められなかったが、FT₃に対して有意な負の相関関係がみられた。T₃は80%がT₄の脱ヨウ素化によって生成されるホルモンであるため、本研究におけるFT₃の減少は、T₄

に対する脱ヨウ素化阻害が要因だと推察される。THsの脱ヨウ素化酵素(Thyronine deiodinase enzyme)には1型(D1), 2型(D2), 3型(D3)の3種類が存在し、このうち血中のT₃濃度に関与するのは肝臓においてT₄からT₃への代謝を担うD1である²⁰⁾。マウスの肝ミクロソームを用いたPCBs曝露試験では、D1活性の低下が報告されており²¹⁾、本研究でみられたFT₃の減少はDecaBDEによる脱ヨウ素化酵素の阻害が要因の一つと考えられた。

これまでペット動物を対象に有機ハロゲン化合物による汚染の実態とTHsへの影響を解析した報告例は少なく、とくにT₃, rT₃, FT₃に対する影響に注目した事例は皆無であることから、本研究は初の成果と考えられる。甲状腺ホルモン作用を示すFT₃に対するDecaBDEの影響がペットネコの生体内で実際に確認されたことから、恒常的なDecaBDE曝露が甲状腺機能へ及ぼす影響について、ネコ生体用いた*in vivo*投与試験で解析を深めることが今後の課題である。

引用文献

- 1) Purkey et al., 2004, *Chem. & Biol.*, 11, 1719–1728.
- 2) Hamers et al., 2006, *Toxicol. Sci.*, 92, 157–173.
- 3) Mizukawa et al., 2013, *Environ. Pollut.*, 174, 28–37.
- 4) Gebbink et al., 2008, *Environ. Pollut.*, 152, 621–629.
- 5) Nomiyama et al., 2010, *Environ. Sci. Technol.*, 44, 3732–3738.
- 6) Nomiyama et al., 2011, *Environ. Pollut.*, 159, 3364–3373.
- 7) Nomiyama et al., 2010, *Environ. Sci. Technol.*, 44, 2890–2896.
- 8) Kakehi et al., 2015, *Toxicol. Sci.*, 147, 360–369.
- 9) Takigami et al., 2009, *Chemosphere*, 76, 270–277.
- 10) Wan et al., 2009, *Environ. Sci. Technol.*, 43, 7536–7542.
- 11) Mizukawa et al., 2016, *Environ. Sci. Technol.*, 50, 444–452.
- 12) Kimura-Kuroda et al., 2007, *Chemosphere*, 67, 412–420.
- 13) Miyazaki et al., 2004, *J. Biol. Chem.*, 279, 18195–18202.
- 14) Kimura-Kuroda et al., 2005, *Chemosphere*, 67, 412–420.
- 15) Eguchi et al., 2014, *Talanta*, 118, 253–261.
- 16) Dye et al., 2007, *Environ. Sci. Technol.*, 41, 6350–6356.
- 17) Kunisue et al., 2011, *Environ. Sci. Technol.*, 45, 10140–10147.
- 18) Takeuchi et al., 2011, *Toxicology*, 289, 112–121.
- 19) Dallaire et al., 2009, *Environ. Health Perspect.*, 117, 1380–1386.
- 20) Larsen and Zavacki, 2012, *Eur. Thyroid J.*, 1, 232–242.
- 21) Hood and Klaassen, 2000, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 163, 240–248.

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、豊田賢治

研究概要：内分泌かく乱作用には科学的に未解明な点が多く、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の発現変化と、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一方で、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。そのため、OECD(経済協力開発機構)EDTA(内分泌かく乱タスクフォース)VMGeco では、無脊椎動物(アミ、コペポッド、ユスリカ、オオミジンコ、マキガイ)を用いた試験法の開発を行っている。これらの生物においては生殖試験を内分泌かく乱作用の検出試験と位置付けており、個体レベルへの影響に主眼がおかれている。

我々は、殺虫剤として使用されている幼若ホルモン類似物質が単為生殖でメスしか生まないオオミジンコにオス産生を誘導することを見出した。この知見に基づいて日本はTG211生殖試験に、性比をエンドポイントとして追加することを提案して承認された。さらにその後の研究によって、この幼若ホルモン類似物質によるオスの誘導は近縁の様々なミジンコ類でも同様に起こる現象であることが明らかとなり、幼若ホルモン類似物質がミジンコ類に共通した発生・性分化メカニズムの根幹に深刻な影響を与えていることが懸念された。

我々は現在までに、オオミジンコの遺伝子を整理し、またモデル生物で確立されている数々の分子生物学的手法をオオミジンコに導入することで、幼若ホルモン類似物質によるオス誘導の詳細な分子メカニズムに切り込むための基盤を築いてきた。さらに近年、我々も参画するミジンコゲノムコンソーシアムが中心となり、オオミジンコの近縁種であるミジンコの全ゲノム配列が決定された。OECDで用いているアミ、ユスリカ、コペポッドでは遺伝子情報も得られていないため、オオミジンコを含むミジンコ類は化学物質の作用メカニズムの解明に貢献する次代のモデル生物として国際的に期待されている。

このような背景のもと、本研究ではまず拡張版TG211生殖試験を分子レベルからサポートすべく、ミジンコ類のオス産生の誘導をモデルとして、無脊椎動物における内分泌かく乱作用の分子レベルでのメカニズムの解明を目指す。さらに、化学物質による内分泌かく乱作用のターゲットとなりうる幼若ホルモン経路や脱皮ホルモン経路といった昆虫類で知られている主要な内分泌経路がミジンコ類ではいまだに整理されておらず、これらの経路に関連する多くの因子が未同定であるため、これらを明らかにすることでミジンコ類におけるホルモンと性決定・性分化についての基礎的な知見を得ることを目的とする。

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、平成 27 年度は平成 26 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暴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こともできた。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。

フィージビリティースタディー(FS1): 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

研究者：愛媛大学：国末達也(代表研究者)、Nguyen Minh Tue、国立環境研究所：磯部友彦、国立科学博物館：田島木綿子

研究概要：これまでの研究で、海洋生態系の頂点に位置する鯨類は既存 POPs を体内に高蓄積することが知られており、その健康影響が懸念されている(Colborn and Smolen, 1996)。しかしながら、鯨類における新規 POPs の蓄積特性に関する研究は、申請者のグループが報告した事例(Tanabe et al., 2008)を除けば、依然として少なく、POPs 代替物質については皆無である。PCBs 汚染地帯の一つであるバルト海沿岸域に棲息するネズミイルカの研究では、免疫機能に重要な役割を果たす胸腺や脾臓の形態異常と PCBs レベルの間に有意な相関が認められている(Beineke et al., 2005)。近年、既存 POPs の汚染レベルは経年的な減少傾向を示している報告が多いが、POPs の最終的な「溜まり場」となる外洋の汚染は低減がきわめて緩やかであり、鯨類の死亡漂着や座礁の報告件数は減少していない。また、新規 POPs や POPs 代替物質をはじめとする未知汚染物質による毒性寄与が近年上昇した可能性も考えられるが、これら物質による鯨類のリスクを評価した研究は存在しない。

本研究は、日本沿岸に座礁・漂着した多様な鯨類における新規 POPs および POPs 代替物質の蓄積特性を包括的に解析するだけでなく、組織の抽出液を用いて *in vitro* アッセイ (CALUX アッセイ) により内分泌かく乱作用のリスクを評価することに特色がある。また、愛媛大学生物環境試料バンク (*es*-BANK) に冷凍保存されている鯨類試料を活用して、新規 POPs や POPs 代替物質の過去から現在に至る汚染と毒性寄与の歴史変遷を明らかにする課題は、*es*-BANK を所有する当研究グループのみが達成できる独創的研究と言える。

研究結果のまとめと考察1. 北海道沿岸に座礁したハクジラにおける POPs の汚染実態と蓄積特性

2013~2014年にかけて北海道沿岸に座礁したイシイルカとネズミイルカの脂皮中 POPs 濃度を測定した結果、DDTs を除くすべて物質でネズミイルカよりイシイルカが高蓄積していた(Fig. 1)。この主要因として食性の違いが挙げられる。ネズミイルカがニシンやイカナゴのように比較的小型の魚種を食すのに対し、イシイルカはイカやタコなどの頭足類に加え、イワシなどの中型の魚種を摂餌する。このように餌生物の栄養段階が高いため、イシイルカの POPs 蓄積濃度は高値を示したものと考えられる。種間で濃度差が認められなかった DDTs は移動拡散性が低いことから、その汚染が未だ北海道沿岸域に偏在しており、生息域がより沿岸性であるネズミイルカへの曝露が継続していると推察された。

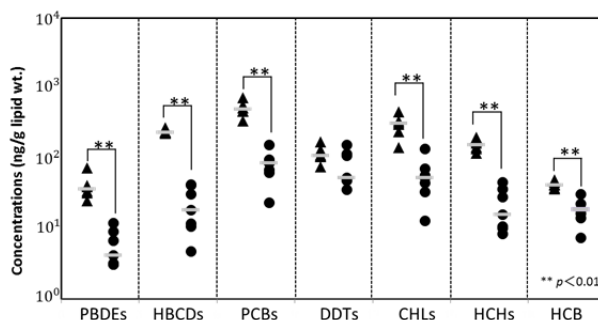


Fig. 1 Organohalogen concentrations in Dall's (▲) and harbor (●) porpoises stranded in coastal waters of Hokkaido

興味深いことに、イシイルカのHBCDs濃度はPCBsより低値であったが、他のPOPsと比べ相対的に高く、近年の曝露が示唆された。そこで、es-BANKに冷凍保存されていた1980～2013年の座礁個体を分析し経年変化を解析した結果、イシイルカのHBCDs濃度は明らかに増加していることが判明した(Fig. 2)。また、イシイルカではPBDEs濃度も有意に増加していた一方で、ネズミイルカのBFRs濃度は明らかな変動を示さなかった(Fig. 2)。同様の傾向は、POPsの中で移動拡散しやすいHCHsでも観察された。イシイルカが沖合まで回遊する鯨種であることを考慮すると、Fig. 2の結果はPBDEsおよびHBCDsが沖合へ移動拡散していることを示唆している。一方、PCBsとDDTs濃度は両種で低減傾向を示しており、1970年代における生産・使用の禁止を反映したものと考えられた。本研究結果から、外洋のBFRs汚染は進行していることが予想され、多様な外洋性鯨類の汚染実態調査が今後の課題となった。

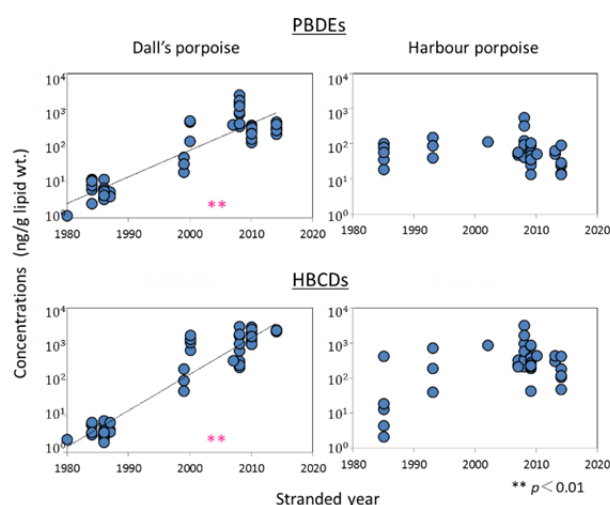


Fig. 2 Temporal trends in PBDE and HBCD concentrations in the blubber of Dall's and harbor porpoises stranded in coastal waters of Hokkaido

2. リン酸エステル系難燃剤(PFRs)の分析法開発

PFRsの分析としては室内ダストや環境水などが存在する一方、動物の臓器については報告されていない。臓器・組織の場合、脂質などの生体に由来するマトリックス除去が高精度分析には不可欠となる。そこで、GPCによる脂質など高分子マトリックスの除去を検討した結果、シクロヘキサン:酢酸エチル(3:1)の移動相 100 mL(第一画分)で脂質の90%以上を除去できたが、対象としたPFRsのうち4化合物において30～40%の溶出が明らかとなった。第一画分を95 mLにした場合、PFR化合物は溶出されず第二画分に100%回収されたが、脂質の16%が共溶出した(Fig. 3)。第二画分を濃縮後、PFRsの内部標準を添加しLC-MS/MSによりクロマトグラムを確認したところ、ピーク形状に明らかなマトリックス効果が認められ、さらなる前処理工程の必要性が判明した。

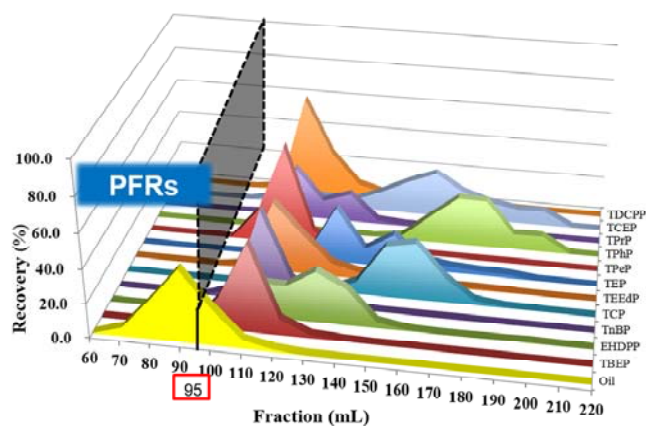


Fig. 3 Elution patterns of oil and PFRs by GPC

近年、食品の化学分析における前処理として QuEChERS 法が提唱されており、Supel™ QuE Z-Sep (ZrO₂ 化学修飾シリカゲル) が脂質の除去(吸着)に有効であったことが報告されている。前述した GPC の第二画分を Supel™ QuE Z-Sep で前処理し PFRs のクロマトグラムを確認したと

ころ、ピーク形状が改善した。そこで、スジイルカの脂皮と肝臓の抽出液を GPC および Supel™ QuE Z-Sep で前処理し、PFRs の分析精度を検証した。添加回収試験を実施した結果、脂皮では大部分の PFRs で 60~80%の回収率が得られたが、2つの化合物が 30~50%と低く、溶出時間の重なる夾雑物によりイオン化が阻害されていると考えられた。さらに、肝臓では5つの PFR 化合物の回収率が 60%を下回り、分析精度の低下が認められた。これらの結果から、Supel™ QuE Z-Sep を用いた QuEChERs 法は脂質の除去に有効であるが、肝臓などの臓器に由来する一部のマトリックス除去は困難であることが示唆された。今後、性質の異なる担体を用いた前処理法を検討する予定である。

3. 座礁・漂着鯨類の試料採集

2015年8月以降に実施した解剖ワークショップおよび鯨類ネットワークを活用した外部機関からの受入れ実績は以下の通りで、貴重な鯨類試料を es-BANK に保管することができた。今後、これら試料の使用も検討し、研究を深化させる予定である。

・解剖ワークショップ

実施日：2015年8月28~31日

主催：愛媛大学沿岸環境科学研究センター（国末：研究代表者）

解剖数：4種（カズハゴンドウ、ハナゴンドウ、スジイルカ、スナメリ）14頭

実施日：2015年11月13~16日

主催：国立科学博物館（田島：研究分担者）

解剖数：1種（カズハゴンドウ）9頭

実施日：2016年2月26~28日

主催：長崎大学（天野教授：研究協力者）

解剖数：1種（スナメリ）23頭

・外部機関からの受け入れ

国立科学博物館（田島：研究分担者）：11種 28検体 272試料

北海道大学（松石教授：協力者）：10種 17検体 89試料

山口大学（栗原助教：協力者）：1種 2検体 21試料

海響館（原田研究員：協力者）：1種 6検体 19試料

フィージビリティースタディー(FS2)：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

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：宮川信一(代表研究者)

研究概要：日本の代表的な環境指標動物であるメダカをモデルとして、医薬品類や生活日用品等に含まれる化学物質の曝露により引き起こされる、内分泌系や核内受容体を介して発現すると予想される様々な影響に対処するため、PPAR γ などのレポータージアッセイを開発することを目的とする。これにより、多様な作用経路をもつであろう様々な化学物質の内分泌かく乱作用について、新たな作用メカニズムの解明と、短期間で予測できるスクリーニング系の開発が期待される。

研究結果のまとめと考察：近年、性ホルモン類似物質だけでなく、低濃度で水棲動物に影響を与える物質として生活排水に含まれる医薬品や日用品由来の化学物質が注目されている。これらの化学物質は性ホルモン作用をもつものだけでなく、さまざまな核内受容体を介して生物に作用し、代謝など、我々の目には見えにくい影響を及ぼす可能性が考えられる。PPAR γ は脂肪酸やその派生物（プロスタグランジン等）のほかに、II型糖尿病改善薬として作用する合成化合物をリガンドして標的遺伝子の転写を調節し、脂肪細胞分化や、糖・脂肪代謝関連酵素の制御など、さまざまな生命現象に関与している。本研究ではメダカ (*Oryzias latipes*) からolPPAR α 1、olPPAR α 2、olPPAR β 、olPPAR γ をクローニングし、メダカにおけるPPAR系の遺伝子構造を整理するとともに、olPPAR γ に関するレポーターアッセイを構築した。本研究では、PPAR γ とRXR α を同時にトランスフェクションすることで、いくつかの化学物質（特にGW1929、Ciglitazone、TBT、nTZDpa）に対して比較的高い反応性を確認できた。一方で、今回行った条件では、バックグラウンドが高く、ばらつきもやや大きい結果となった。濃度設定を 10^{-5} Mとして行ったことから細胞そのものに何らかの毒性影響を及ぼした可能性なども考慮する必要がある。また、ヒトPPAR γ とのリガンド特異性の著しい差異があることは、注意すべきである。本研究では、魚類では性ホルモン類似物質に比べて、これまであまり顧みられてこなかったPPAR系の内分泌かく乱作用を解析するための分子基盤を整えた。PPAR γ を介した生体への悪影響として最もよく知られ、懸念されている現象は、発生途上の未熟な個体に対する脂肪の蓄積増加である。来年度は、このような現象がメダカ生体でも起きうるかどうか、そして生体影響へのアッセイ系として適当であるかを、本年度得られた結果を参考に検討する予定である。

採択した課題の研究概要と平成 28 年度の実施内容

野生 1：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～)

(1) 研究者：愛媛大学：国末達也(代表研究者)、Nguyen Minh Tue、国立環境研究所：磯部友彦、国立科学博物館：田島木綿子

(2) 研究概要：本研究では日本沿岸に座礁・漂着した鯨類を対象に、1) POPs代替物質の分析法開発、2) 新規POPsおよびPOPs代替物質による汚染実態と蓄積特性の解明、3) 保存試料を用いた既存POPs、新規POPs、POPs代替物質の蓄積プロファイルの過去復元、4) 鯨類体内に蓄積する未知化学物質の探索と*in vitro*バイオアッセイ法を用いた活性評価、の課題に挑戦し、個体数減少の一要因となり得る内分泌かく乱化学物質のリスク評価を試みる。

平成 27 年度は、北海道沿岸に座礁したイシイルカとネズミイルカを対象に新規 POPs (PBDEs および HBCDs) の研究を展開した結果、沖合まで回遊するイシイルカの蓄積濃度は沿岸性の強いネズミイルカより高値を示したことに加え、生物環境試料バンク(*es*-BANK)の保存試料の分析から 1980 年以降明らかに濃度上昇していたことが判明した。このことから、外洋における新規 POPs の汚染は進行していることが予想されるため、多様な外洋性鯨類の汚染実態調査を展開したいと考えている。

(3) 平成 28 年度実施内容：

- ①POPs 代替物質である PFRs の前処理および機器設定の検討をおこない、臓器・組織に適用可能な高精度分析法を確立する。
- ②沿岸性の強いスナメリを対象に曝露実態と蓄積特性の解明を試みる。
- ③組織試料の採集と解剖ワークショップを実施する。

基盤 1：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、愛媛大学：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、北海道大学大学院：池中良徳

(2) 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）に着目して、我が国の水環境中における分布・動態から汚染実態を明らかにする。また、魚類に対する内分泌かく乱作用とその作用機序の解明を試みる。これら家畜由来エクインエストロゲンの汚染実態や生態影響をヒト由来エストロゲンと比較することで、水環境中エストロゲンの汚染・影響に關与するエクインエストロゲンの寄与を試算し、包括的なエストロゲン汚染の実態及び内分泌かく乱作用の解明を行う。

(3) 平成28年度実施内容：

- ①水環境における汚染実態および生態影響の解明
- ②研究総括と畜産業および環境の共存に向けた具体的対策の提案

基盤2：魚類の代謝に関わる内分泌かく乱の *in vitro* 評価系構築（H27～）

(1) 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：宮川信一(代表研究者)

(2) 研究概要：医薬品類や生活日用品等に含まれる化学物質の曝露により引き起こされる、内分泌系や核内受容体を介して発現すると予想される様々な影響に対処する必要がある。日本の代表的な環境指標動物であるメダカをモデルとして、**Obesogen** 問題で注目されている **PPAR γ** が関わる内分泌かく乱の生体影響を明らかにし、その評価系を開発することを目的とする。本研究は、多様な作用経路をもつであろう様々な化学物質の内分泌かく乱作用を評価していくためのモデルケースとなるものであり、魚類に対する新たな内分泌かく乱作用のエンドポイントの策定、その作用メカニズムの解明と、短期間で影響予測できるスクリーニング系の開発を目指すものである。

(3) 平成28年度実施内容：

- ①メダカ **PPAR γ** に特異的に反応する化学物質を用いて、メダカ稚魚に対する脂肪細胞分化に与える影響を、**Oil red O** 染色などで明らかにする。
- ②昨年度行ったレポータージーンアッセイの結果と比較することで、**PPAR γ** を介する生体影響との関連付けを行う。
- ③全てのメダカ **PPAR** サブタイプ(4分子種)のレポーターアッセイ系を確立し、化学物質に対する反応性の差異を検討する。

資料 1

EXTEND2010

平成 27 年度 野生生物の生物学的知見研究検討部会、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 28 年 3 月 23 日（水） 14:00~18:00

場所：日本エヌ・ユー・エス(株) 本社

発表会場：大会議室

(開会・概要説明 14:00~14:10)

発表時間* 区分	代表研究者 代理発表者	所属	研究課題名
14:10~14:40 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
14:40~15:10 野生 (FS)	国末 達也	愛媛大学 沿岸環境科学研究 センター	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
15:10~15:25	意見交換及び「野生」関連課題の評価会		
15:25~15:35	休憩		
15:35~16:05 基盤 1	荒牧 弘範	第一薬科大学 薬学部	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
16:05~16:35 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
16:35~17:05 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
17:05~17:35 基盤 (FS)	宮川 信一	自然科学研究機構 岡崎統合バイオサ イエンスセンター	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
17:35~18:00	意見交換及び「基盤」関連課題の評価会		
18:00	閉会		

*発表は 15 分、質疑応答は 15 分。