

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

1. 背景

EXTEND2010 では、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ってきた。

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。

EXTEND2016 の下では、研究課題の新規採択は行っていないが、EXTENMD2010 の下で着手された研究の評価を行っている。

2. 平成 28 度の実施状況（別紙 1 参照）

平成 28 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 課題及び野生生物の生物学的知見研究 1 課題の合計 3 課題を実施した（表 1 参照）。

研究課題の成果については、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り開催した評価会（平成 29 年 3 月 21 日開催、非公開）において評価を行い、その結果を本年度末までに取りまとめ、来年度の研究の継続の可否を判断する予定である。

表1 平成28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	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～H28
基盤2	宮川信一 和歌山県立医科大学	魚類の代謝に関わる内分泌かく乱の <i>in vitro</i> 評価系構築	H27～
野生生物の生物学的知見研究			
野生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～

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

(別紙1)

平成28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)：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、北海道大学大学院：池中良徳

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・影響に関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。

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・新ひだか町の河川(日高目名川、静内川)から2016年7月4日～5日に採取した水試料を対象として、エクインエストロゲン類の存在実態と濃度組成、季節変動を明らかにした。

諸外国の先行研究では、下水処理水などから1あるいは2種類のエクインエストロゲン類の検出が報告されている(Iparraguirre et al., Anal. Bioanal. Chem., 2012; Iparraguirre et al., Anal. Bioanal. Chem., 2011; Suri et al., Environ. Monit. Assess., 2012; Andaluri et al., Environ. Monit. Assess., 2012; Tyler et al., Environ. Sci. Technol., 2009)。今回、昨年度の我々の調査結果と同様に、すべての調査地点から6種類のエクインエストロゲン類が同時に検出された。また、ST1のEq濃度のみ他の調査地点と比較して高値を示したが、その他の調査地点におけるエクインエストロゲン類の濃度に大きな変動はみられなかった。これらのことから、本調査対象河川におけるエクインエストロゲン類の遍在性が明らかとなった。

河川中のエクインエストロゲン類濃度の季節変動を明らかにするため、今回(2016年7月)および2015年6月に採取した河川水の濃度とその組成を比較した。2016年7月に採取した河川水のエクインエストロゲン類濃度は、2015年6月に採取した河川水の濃度より低値を示し、両採取時期における濃度組成も異なっていた。このように季節変動を示した要因として、妊娠した牝馬の数や尿排泄量などの関与が考えられる。また、これまで 17β -E2は河川中の底質に吸着・脱離することが知られており、化学構造の類似したエクインエストロゲン類でも同様の現象が考えられる。これら複合的な要因によりエクインエストロゲン類濃度は季節変動したと考えられる。

エクインエストロゲン類の排出源を推定するために河川流域の馬牧場を探索した。ST5より下流域付近には多数の馬牧場の存在が確認され、これらの牧場からのエクインエストロゲン類の排出が示唆された。一方、ST4から上流域付近に馬牧場はほとんど存在していなかった。しかし、馬以外の動物として、ST1付近の森林には野生のシカの生息が確認されており、シカによる影響かどうかについては不明であるが、ST1ではEq濃度のみ他の調査地点と比較して高値を示していた。また、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牛牧場が存在した。アメリカの先行研究では、牛糞肥料から17 α -Eqの検出が報告されている (Andaluri et al., Environ. Monit. Assess., 2012)。今回、我々は牛尿由来の試料からエクインエストロゲン類の探索を試み、同定には至らなかったものの存在する可能性を示唆した。これらのことから、馬以外の家畜由来のエクインエストロゲン類が河川へ流入した可能性があり、今後さらなる調査が必要である。

昨年度に実施した21日間のメダカ繁殖・次世代試験（曝露区：10, 100および1000 ng/L）により、Eqの繁殖・次世代影響に対する最小作用濃度LOECは100 ng/Lであることが示唆された。そこで本年度は、その繁殖影響のみられた雌雄メダカの肝臓試料を用いて遺伝子発現解析を行った。まず内部標準遺伝子を選択するために、エストロゲン様作用の評価における遺伝子発現解析で広く使用されているRPL-7遺伝子に加え、 β -actin遺伝子の発現解析を行った。1000 ng/L曝露区では、これら遺伝子発現量は減少しており、21日間の曝露による毒性影響の関与が示唆された。そこで、18S rRNA 遺伝子の発現量を測定したところ、各曝露区で変化がなかったため、18S rRNAを内部標準遺伝子として各遺伝子発現量との相対比を算出した。その結果、100 ng/LのEqを曝露した雄魚の肝臓では、Vtg1・2、Chg1・H、ER α 、PXR遺伝子の発現量が増加し、Eqのエストロゲン様作用が再確認された。また、1000 ng/LのEqを曝露した雄魚の肝臓では、Vtg1・2遺伝子の発現量は増加したのに対し、Chg1・H遺伝子の発現量は変化せず、CYP1AおよびCYP3A遺伝子の発現量は減少した。同曝露区では昨年度の成果により産卵数の減少が確認されていることから、21日間曝露によって毒性発現し、それらが関与して繁殖阻害を惹起したと考えられた。一方、雌魚の肝臓では、Vtgs、ChgsおよびER β s遺伝子の発現量に変化はみられず、雌魚の高い17 β -E2など内因性ホルモン類濃度が影響したと考えられた。以上のことから、Eqによる繁殖阻害メカニズムの一端が明らかとなり、肝臓中エストロゲン応答遺伝子の発現は雌雄で異なると考えられた。また、複数の内部標準遺伝子の発現量を調査することで、毒性発現の関与した繁殖阻害かどうかを推測できる可能性が示唆された。

本研究では、日本の河川においてエクインエストロゲン類を初めて検出し、その季節変動を明らかに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、遺伝子発現解析からそれら作用メカニズムの一端を明らかにした。これらの成果は、エクインエストロゲン類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。

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

研究者：和歌山県立医科大学：宮川信一(代表研究者)

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。

研究結果のまとめと考察：ヒトの肥満の要因はカロリー過多と運動不足によるところが大きく、野生動物ではそれに起因する肥満は常識に考えて起こりづらいであろう。しかしながら、野生動物において Obesogen によって肥満が誘導される可能性について検討を有することは、その健康に対する有害性に対処するためにも必要である。本年度は、Obesogen として知られている TBT によって、メダカにおいても脂肪蓄積が促進されることを見出した。したがって TBT は、これまで報告のあるようにカエルやマウスに対してだけでなく、脊椎動物全般において広く Obesogen として脂質代謝異常を引き起こしうるということが示唆された。一方で、Ciglitazone や nTZDpa のメダカに対する *in vivo* での Obesogen 活性は、傾向こそあれ、対照群と有意な変化は確認できないものであった。これは下に述べるとおり、メダカの PPAR γ とのリガンド結合能によるところが多いと推測されるが、曝露時期や曝露時間等の実験条件にも依存していることは留意を要する。今後、TBT の発生期曝露による発生影響を成長後に解析していく予定である。

遺伝子発現解析では、これまで哺乳類で報告されていた PPAR γ 標的遺伝子の発現変動は見られなかった。メダカの稚魚は小さく、全身を使つてのトランスクリプトーム解析であったこともあるが、それよりも脂質代謝や発生が、哺乳類と魚類では大きく異なることも要因の一つである。例えば、魚類では、哺乳類では脂質・エネルギー代謝を制御する褐色脂肪細胞はない。今後、本実験で得られたトランスクリプトームをもとに、メダカの脂質代謝に関わる経路解明が期待される。

本実験で影響がみられた TBT 濃度は、これまでメダカで報告されている毒性や生殖への影響が出ないとされる低濃度であった。生殖への影響に関しては第一に性ステロイドホルモン受容体を介した経路が想定されるが、本研究で推定されるように異なる経路が存在する場合、従来影響が出ないとされた濃度よりさらに低い濃度で影響が顕在化する可能性がある。これまでの野生動物への化学物質作用は、生殖影響の結果のみを見て議論がおこなわれてきたが、本研究成果は化学物質影響の“Molecular initiating event”を正しく理解することの重要性を改めて示すものとなった。従って本研究は、OECD 等が現在推進している Adverse Outcome Pathway (AOP) 構築の重要性に関するモデル研究になるかもしれない。

広くここ 20 年間の核内受容体研究は、生殖のほか、代謝（肥満や糖尿病）、癌、脳神経系への影響及び疾患との関連についての精力的に研究が行われてきた (Gustafsson, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016 157:3-6)。代謝に関するシグナルパスウェイやエネルギー/脂質ホメオスタシスをかく乱することで、肥満や脂肪分化の促進を誘導する内分泌かく乱物質のグループを Obesogen (Grün *et al.*, *Mol Endocrinol.* 2006 20:2141-2155)、あるいは metabolic disruptor (Casals-Casas *et al.*, *Int J Obes (Lond).* 2008 32:Suppl 6:S53-61) という。その主たる標的は PPAR であり、とりわけ PPAR γ と RXR α のヘテロダイマーが化学物質の Obesogen 活性をメディエイトされているとされている。本年度は、メダカ PPAR γ のオルソログ (PPAR α 1、PPAR α 2、PPAR β) のレポーターアッセイ系を確立し、その

応答性に対する比較解析を行った。その結果、メダカの PPAR オルソログのリガンド特異性・応答性はヒトとはかなり異なることが分かった。また、ヒト PPAR γ 特異的なアゴニストである Rosiglitazone に対して、メダカ PPAR γ の応答性は低い。ドッキングシミュレーションを用いた解析により、H12/AF12 周辺を中心とするリガンド結合ポケットの親水性及び疎水性の違いが、この応答性の違いに寄与していることが示唆された。メダカの PPAR γ のリガンド特異性・応答性はヒトとはかなり異なり、ヒトの PPAR オルソログのリガンド特異性の情報を、直ちにはメダカに外挿することができないことが明らかになった。

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

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：1. 北海道沿岸に座礁したヒゲクジラにおける POPs の汚染実態と蓄積特性

2008～2012 年にかけて北海道沿岸に漂着したナガスクジラ、ザトウクジラ、ミンククジラの脂皮から有機塩素系化合物だけでなく臭素系難燃剤である PBDEs および HBCDs が検出され、新規 POPs によるヒゲクジラの汚染が明らかとなった。3 種の POPs 濃度を比較したところ、ミンククジラが他の 2 種より相対的に高値を示した(Fig. 1)。北半球に生息するミンククジラは主に、アンチョビなどの小型魚類を摂餌することが知られている一方、ザトウクジラやナガスクジラはオキアミ類やカイアシ類などのプランクトン食性である。このように餌生物の栄養段階が高いため、ミンククジラの POPs 蓄積濃度は高値を示したものと考えられる。実際に、昨年度分析した魚食性ハクジラのイシイルカやネズミイルカに蓄積していた POPs 濃度は、ヒゲクジラより高値を示した(Fig. 2)。しかしながら DDTs 濃度は、ヒゲクジラとハクジラで有意差が認められなかった。北半球系群の場合、ヒゲクジラは北半球海域で大規模な回遊をしており、マラリア駆除として使用が継続している途上地域の DDTs 汚染を反映した可能性がある。

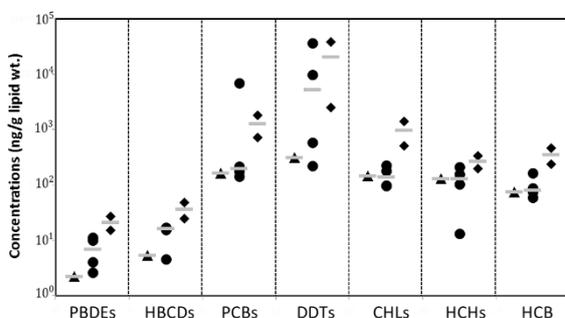


Figure 1. Organohalogen concentrations in finback (▲), humpback (●), and minke (◆) whales stranded at coastal waters of Hokkaido

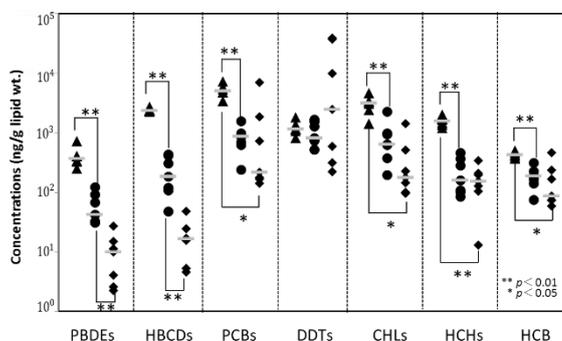


Figure 2. Comparison of organohalogen concentrations in Dall's (▲) and Harbour (●) porpoises with those in baleen whales (◆).

2. 集団座礁したカズハゴンドウにおける POPs の蓄積特性 (経年変化)

2015年に集団座礁したカズハゴンドウの脂皮中 POPs 濃度は、DDTs ≈ PCBs > CHLs > HBCDs > PBDEs > HCB > HCHs の順であった。es-BANK に冷凍保存されていた 1982~2011 年の座礁個体を分析し経年変化を解析した結果、既存 POPs である PCBs, DDTs, CHLs, HCHs, HCB の濃度は 2000 年以降明らかな低減を示しており、1970~1980 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。一方、新規 POPs である PBDEs 濃度は定常状態であり、HBCDs 濃度は有意に増加していることが判明した(Fig. 3)。同様の傾向は、昨年度分析したイシイルカでも観察されており、両種が沖合まで回遊することを考

慮すると、Fig. 3 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。しかしながら、カズハゴンドウの脂皮から検出された PBDEs の主要異性体における経年変化に着目したところ、BDE100 と BDE154 の濃度は定常状態であったが、BDE47,

BDE99, BDE153 の 3 異性体は低減傾向を示した(Fig. 4)。BDE47, BDE99, BDE153 が Tetra-および Octa-BDE 製剤に含まれることを考慮すると、これら製剤における生産・使用の規制が濃度低減の一要因と推察されるが、濃度低減を示さなかった BDE100 と BDE154 も両製剤に含まれており、また BDE99 と BDE100、そして

BDE153 と BDE154 の物理化学特性は類似している。このことから、カズハゴンドウは餌生物を介して相対的に高いレベルの BDE100 と BDE154 に曝露している、もしくはこれらの BDE 異性体が生体内で安定な可能性が考えられる。実際に、カズハゴンドウの主要な餌生物である頭足類の調査では、BDE100 と BDE154 がそれぞれ BDE99 と BDE153 より高濃度で検出されている。海水魚における以前の汚染調査、そして昨年度分析したイシイルカとネズミイルカでも同様な蓄積プロファイルが観察されており、海洋生物は BDE100 や BDE154 を特異的に蓄積していることが推察され、汚染実態に関する継続調査が必要である。

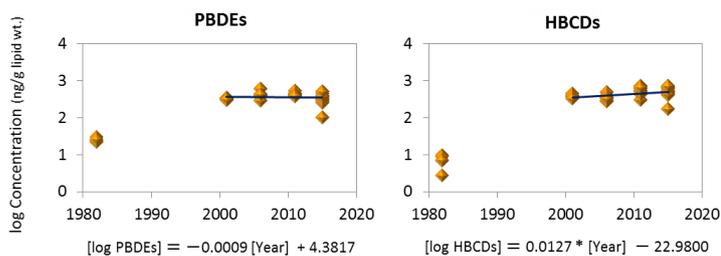


Figure 3. Temporal trends of PBDE and HBCD concentrations in the blubber of melon-headed whales.

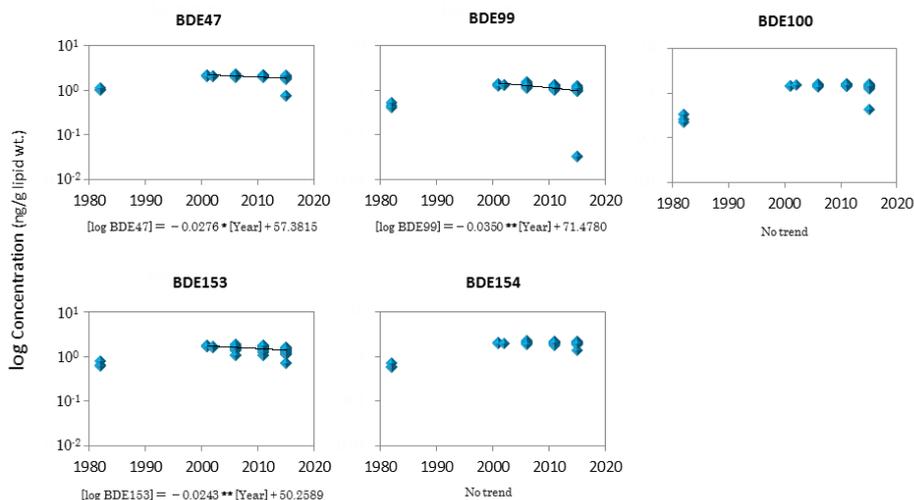


Figure 4. Temporal trends of PBDE congener concentrations in the blubber of melon-headed whales.

3. 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などが存在する一方、動物の臓器・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。初年度は、Supel™ QuE Z-Sep (ZrO₂ 化学修飾シリカゲル) を用いた前処理法を検討したが、肝臓で良好な回収率が得られず、夾雑物によるイオン化阻害がみられた。そこで本年度は前処理法として、性質の異なる担体を用いた固相抽出(SPE)法を検討した。環境試料を対象とした有機リン系化合物の前処理法として報告例のある Sep-Pak C18 と OASIS HLB を検討した結果、分析した 11 種の PFR 化合物のほとんどが 60%以下と低い回収率を示した。次に、生物組織の前処理として報告例のある ISOLUTE NH₂ を用いて溶媒ベースの PFRs 回収率を確認したところ、比較的良い値が得られたが、カートリッジ由来と考えられるブランクピークおよび一部の物質ピークに干渉が認められた。そこで、活性炭とアミノプロピルの二層で構成される ENVI-Carb II/PSA を用いて、ブランクおよび干渉ピークの軽減を試みた。その結果、ブランクピークの軽減が認められ、添加した Native 11 種の PFR 化合物における補正回収率は 77–122% と良好な値を示した。実際に、スジイルカの肝臓 0.5 g を用いて 3 連で分析したところ、内部標準 7 物質の *d* 体における回収率と変動係数はそれぞれ 70–108% および 0.65–6.0% であり (Fig. 5)、ピークの干渉もみられない高精度分析法の開発に成功した。

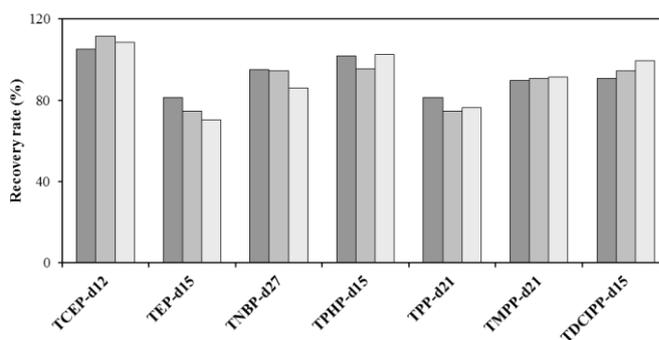


Figure 5. Recovery rates of PFR internal standards for triplicate analyses of a striped dolphin liver sample.

4. 座礁・漂着鯨類の試料採集

平成 28 年度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：2016 年 8 月 19~21 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：2 種（スジイルカ、スナメリ）17 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）：19 種 38 検体 271 試料

北海道大学（松石教授：協力者）：10 種 23 検体 113 試料

長崎大学（天野教授：協力者）：3 種 6 検体 37 試料

海響館（原田研究員：協力者）：2 種 12 検体 39 試料

海遊館（石川研究員：協力者）：1 種 7 検体 11 試料