

平成14年度  
内分泌攪乱化学物質等の作用  
メカニズムの解明等基礎的研究  
研究報告書

平成15年3月

財団法人日本公衆衛生協会

## 目 次

. 目的 .....	1
. 内容 .....	1
-1 . 指定研究 .....	1
-2 . 業務担当者一覧 .....	1
-3 . 指定研究結果 .....	4
( 1 ) 甲殻類 ( ミジンコ ) に及ぼす内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに 関する研究 .....	5
( 2 ) 核内受容体ファミリーを介する化学物質の生体影響に関する研究 .....	1 4
( 3 ) ビスフェノール A 膜受容体の分子生物学的検討と作用機序の 解明に関する研究 .....	3 0
( 4 ) 内分泌攪乱化学物質の性腺ホルモン作用機構の解明に関する研究 .....	4 5
( 5 ) フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価 .....	5 9
( 6 ) TBT によるラット妊娠初期胚の着床不全のメカニズムと生存胚における 生殖細胞での突然変異誘発の可能性に関する研究 .....	7 3
( 7 ) 内分泌攪乱化学物質による雄性生殖器への影響の分子細胞生物学的 メカニズムの解明 .....	9 6
-4 . 平成 13 年度研究結果の評価 .....	1 2 2

## ・ 目 的

人や野生動物の内分泌作用を攪乱し、生殖機能障害、先天奇形等を引き起こす可能性のある内分泌攪乱化学物質による環境汚染は、科学的には未解明な点が多く残されているものの、生物生存の基本的条件に関わる問題であり、世代を越えた深刻な影響をもたらすおそれがあることから環境保全上の重要課題である。

今後、内分泌攪乱化学物質のリスク評価を実施するために、内分泌攪乱化学物質が人や野生動物に影響を及ぼすメカニズムについての知見の蓄積を急ぐ必要があるが、そのための調査研究はこれまでほとんど実施されていない。

そこで、本調査研究では、内分泌攪乱化学物質等の作用メカニズム等に関する実態を解明することを目的とした。

## ・ 内 容

内分泌攪乱化学物質等の作用メカニズムに関する 分子生物学的機構の解明、 バイオマーカーの開発・評価、 胎児期の曝露による影響発現の解明等、各種調査研究及び評価解析について、各研究班毎に、以下 -1.の指定研究を実施した。

### -1. 指定研究

- ( 1 ) 甲殻類 ( ミジンコ ) に及ぼす内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する研究
- ( 2 ) 核内受容体ファミリーを介する化学物質の生体影響に関する研究
- ( 3 ) ビスフェノール A 膜受容体の分子生物学的検討と作用機序の解明に関する研究
- ( 4 ) 内分泌攪乱化学物質の性腺ホルモン作用機構の解明に関する研究
- ( 5 ) フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価
- ( 6 ) TBT によるラット妊娠初期杯の着床不全のメカニズムと生存杯における生殖細胞での突然変異誘発の可能性に関する研究
- ( 7 ) 内分泌攪乱化学物質による雄性生殖器への影響の分子細胞生物学的メカニズムの解明

### -2. 業務担当者一覧

- ( 1 ) 甲殻類 ( ミジンコ ) に及ぼす内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する研究
  - 主任研究者  
渡邊 肇 ( 岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター助教授 )
  - 研究協力者  
鑪迫 典久 ( 独立行政法人国立環境研究所研究員 )  
勝 義直 ( 岡崎国立共同研究機構助手 )  
曾根 宏明 ( 岡崎国立共同研究機構非常勤研究員 )
- ( 2 ) 核内受容体ファミリーを介する化学物質の生体影響に関する研究
  - 主任研究者  
西川 淳一 ( 大阪大学大学院薬学研究科生命情報環境科学専攻  
微生物動態学分野助教授 )
  - 研究協力者  
今川 正良 ( 名古屋市立大学薬学部教授 )

( 3 ) ビスフェノールA膜受容体の分子生物学的検討と作用機序の解明に関する研究

主任研究者

船江 良彦 ( 大阪市立大学大学院医学研究科生体化学分野教授 )

研究協力者

今岡 進 ( 関西学院大学理工学部教授 )

廣井 豊子 ( 大阪市立大学大学院医学研究科講師 )

( 4 ) 内分泌攪乱化学物質の性腺ホルモン作用機構の解明に関する研究

主任研究者

那須 民江 ( 名古屋大学大学院医学研究科環境労働衛生学教授 )

研究協力者

市原 学 ( 名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学助教授 )

上島 通浩 ( 名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学講師 )

山田 哲也 ( 名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学 )

系原誠一郎 ( 名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学 )

古橋 功一 ( 名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学 )

山ノ下 理 ( 信州大学医学部社会予防医学 )

( 5 ) フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価

主任研究者

岸 玲子 ( 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学教授 )

研究協力者

佐田 文宏 ( 北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野講師 )

玉置 淳子 ( 北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野助手 )

近藤 朋子 ( 北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野研究員 )

梅村 朋宏 ( 北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野大学院生 )

倉橋 典絵 ( 北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野大学院生 )

馬 明月 ( 北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野大学院生 )

大村 実 ( 九州大学大学院医学研究院衛生学助手 )

( 6 ) TBT によるラット妊娠初期杯の着床不全のメカニズムと生存杯における生殖細胞での突然変異誘発の可能性に関する研究

主任研究者

鈴木 勝士 ( 日本獣医畜産大学獣医畜産学部教授 )

研究協力者

鈴木 浩悦 ( 日本獣医畜産大学獣医学部講師 )

斉藤 賢一 ( 日本獣医畜産大学獣医学部助教授 )

竹中 基郎 ( 日本獣医畜産大学獣医学部大学院生 )

八木 美央 ( 日本獣医畜産大学獣医学部大学院生 )

( 7 ) 内分泌攪乱化学物質による雄性生殖器への影響の分子細胞生物学的メカニズムの解明

主任研究者

森 千里 ( 千葉大学大学院医学研究院環境生命医学教授 )

## 研究協力者

外山 芳郎（千葉大学大学院医学研究院形態形成学講師）

小宮山政敏（千葉大学大学院医学研究院環境生命医学講師）

前川眞見子（千葉大学大学院医学研究院形態形成学助手）

足立 哲也（千葉大学大学院医学研究院環境生命医学助手）

深田 秀樹（千葉大学大学院医学研究院環境生命医学助手）

-3. 指定研究結果

## (1) 甲殻類(ミジンコ)に及ぼす内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する研究

研究者 渡邊 肇(岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター助教授)

### 研究要旨

甲殻類は地球上の生物において大部分を占めているにもかかわらず、その知見は限られている。内分泌攪乱化学物質影響を生態系全体で捉えた場合、甲殻類への影響を考慮する必要があるが、甲殻類の内分泌系は脊椎動物とは大きく異なっており現在までの知見から類推することは困難である。本研究では、生態系においても重要な位置を占めているミジンコをモデルとしてその内分泌攪乱物質の評価と作用メカニズムを解明することを目的としている。この目的のために、ミジンコの化学物質に対する感受性を増殖試験を中心に解析すると同時に、ほとんど知見のなかったミジンコの遺伝子の解析を行った。さらに化学物質により発現が変動する遺伝子についての予備的な解析を行った。

### 研究者協力者

鑑迫 典久(国立環境研究所研究員)

勝 義直(岡崎国立共同研究機構助手)

曾根 宏明(岡崎国立共同研究機構非常勤研究員)

### A. 研究目的

地球上に生息する生物のうち95%が無脊椎動物と言われ、その中の大部分を甲殻類が占めていることから、甲殻類の研究とその保護は地球上の生命環境の維持と密接に結びついている。ところが、内分泌攪乱化学物質影響については、広範な生物種における影響が懸念されているにもかかわらず、甲殻類についてはほとんど研究がなされていないのが現状である。甲殻類の内分泌系は脊椎動物のそれと大きく異なることから、脊椎動物を対象としたリスク評価により影響が無いとされた化学物質が甲殻類において重篤な影響を及ぼし生態系を乱す可能性がある。従って、生態系全体を考慮した場合には脊椎動物に偏らない評価が必要であり、この点からも甲殻類を対象としたリスク評価系の確立とそのメカニズムの解明は急務である。特に水棲甲殻類の一つであるミジンコは食物連鎖の下位に位置することから、生態系全体を保護し環境を維持する観点から重要である。本研究では、ミジンコを用いた内分泌攪乱化学物質影響を評価する系を確立し、その作用メカニズムを遺伝子レベルから解明することを目的とする。

### B. 研究方法

環境省が選定した優先してリスク評価に取り組む化学物質の内分泌攪乱作用の作用メカニズムを解明するために、ミジンコをモデル動物とし主に影響評価と遺伝子解析の両面からの解析を行う。これにより、最終的に遺伝子レベルからの内分泌攪乱作用の作用メカニズムの解明を目指す。

#### 1. 化学物質からのアプローチ

ミジンコにおける化学物質の内分泌攪乱影響評価を繁殖阻害試験にもとづいて行った。研究材料

としては、比較的広く使用されているダフニアマグナ (*Daphnia magna*) を用いた。試験温度  $24 \pm 1$  または  $21 \pm 1$ 、 $1 \text{ pH}7 \pm 0.5$ 、半止水式、週 3 回換水の条件下で試験を行った。飼育水は活性炭でろ過したものを、100m l の容器に 80m l の水を用いて飼育した。水の硬度は 80mg/L、溶存酸素濃度は 80-90% であった。エサはクロレラを用い、一日当りおよそ  $2 \times 10^7$  のクロレラを与えた。ダフニアマグナの発生 24 時間後から内分泌攪乱を疑われる化学物質に曝露し、約 10 日後から産まれる仔虫の数をカウントした。給餌、換水、観察を続け、21 日後にそれまでの全産仔数、脱皮数を統計処理した。コントロールと有意差が生じた濃度を影響濃度 (LOEC) とする。これらの影響について脱皮ホルモンや幼若ホルモン影響と比較検討した。

暴露試験では、環境省のリスク評価に関する 20 物質の中から代表的な化学物質について繁殖阻害影響などについて評価した。試験法は OECD テストガイドラインの TG 211 に従って行った。一つの濃度あたり通常 10 回の反復実験を行い、6 濃度について実験を行った。環境省が指定した優先してリスク評価に取り組む物質の中から、ノニルフェノール、ビスフェノール A、トリブチルスズ、オクタクロロスチレンについて、ミジンコの繁殖阻害試験を行った。コントロールと有意差が生じた濃度を影響濃度とした。また甲殻類における主たるホルモンである脱皮ホルモンや幼若ホルモンが繁殖におよぼす影響を評価するために、環境省のリスク評価に関する 20 物質以外の化学物質としてダフニアマグナを脱皮ホルモンや幼若ホルモン (フェノキシカルブ、ピリプロキシフェン、エクダイソン) 添加した水環境中で生育させ、繁殖と用量の関係についても明らかにした。

## 2. 遺伝子からのアプローチ

GenBank に登録されている *Daphnia magna* の遺伝子のうち、タンパク質をコードしているものはわずかに 6 種類にすぎない。そこで、まずホルモンレセプターや代謝メカニズム解明のための基盤となる遺伝子情報の取得を行った。

具体的には、下記の手順でダフニアマグナで発現している遺伝子の EST 情報を取得した。ダフニアマグナから mRNA を調整し、cDNA ライブラリーを作製する。ライブラリー作製には、cDNA の方向をそろえるために、ファージ由来の ZAP II をベクターとして用いた。従来の遺伝子情報が極端に少ないことから、まずライブラリーから任意に選択したクローンの遺伝子配列を解析することにより、ダフニアマグナに関する遺伝子情報を取得した。この配列解析に関しては 3000 程の遺伝子に関して行った。

解析した遺伝子情報から、発現している遺伝子の概要を把握するとともに、近縁種との遺伝子配列の比較を行うことにより、遺伝子レベルでの解明の基盤を構築する。これらの情報は、ダフニアマグナのホルモンレセプターの解析や内分泌攪乱化学物質による遺伝子発現変化の解析のための基礎的な情報として利用する。

(倫理面への配慮) 研究に用いる動物の種類上、倫理面に問題は生じない。

## C. 研究結果

### 1. 化学物質からのアプローチ

幼若ホルモンのアナログであるフェノキシカルブやエクダイソンを飼育水中に添加し、増殖試験を行った。その結果、フェノキシカルブ、ピリプロキシフェン、エクダイソンは、ppt のオーダー



ーで増殖に影響を及ぼすことが明らかになった(図1)。

一方、ノニルフェノールは300 ppbまでの濃度範囲ではほとんど増殖に影響はなく、ビスフェノールAは10 ppmの高濃度において増殖阻害がおきることが明らかになった。この阻害濃度は、幼若ホルモンやそのアナログが影響を及ぼす濃度とは非常に離れていた(図1)。脊椎動物に対してエストロゲン作用を有すると考えられているこれらの化学物質の影響は数百 ppb から ppmの濃度で見られるが、この作用機構については不明であり、今後解析を行う必要がある。またさらに優先してリスク評価に取り組む化学物質の影響を明らかにしていく必要がある。

## 2. ミジンコの遺伝子情報の解明

ダフニアマグナから全 RNA を調整し、オリゴdTセルロースにより mRNA を精製した。この mRNA をもとにオリゴdTをプライマーとした cDNA を合成した後に、ZAPII をベクターとしてライブラリーを構築した。

従来の遺伝子情報が極端に少ないことから、まずライブラリーから任意に選択したクローンの遺伝子配列を解析することにより、ダフニアマグナに関する遺伝子情報を取得した。この配列解析をランダムに抽出した5212遺伝子に関して行い、正確に読めた3755遺伝子についてさらに配列が重複している遺伝子などをクラスタリングにより整理し、独立な1639遺伝子を同定した(図2)。これらはデータベースと比較することにより、相同性のある遺伝子を検索した。これらのデータは、GeneBank に登録予定である(表1)。

また現在、ディファレンシャルディスプレイ法の原理に基づいた遺伝子発現変化の解析を進めており、フェノキシカルブ処理により多数の遺伝子の発現が変動していることを見出している(図3)。この方法は、通常のディファレンシャルディスプレイ法とことなり電気泳動をキャピラリーで行うことにより、そのピークの面積比から相対的な遺伝子の発現量の比に関して解析が可能となる。ミジンコの遺伝子に関するデータベースが未整備なために、どのような遺伝子の発現が変化しているのか網羅的に解析するのは現在のところ困難であるが、上記のデータベース構築と並行して解析を進めることにより、今後種々の化学物質影響を示すマーカー遺伝子の探索が可能になるとと思われる。

## D. 考察

増殖試験の結果から、フェノキシカルブなどの幼若ホルモンのアナログに対して非常に感受性が高いことが示された。これは、幼若ホルモンのアナログとしてある面予測される結果ではあるが、それぞれの化学物質についての反応性は異なっていた。またミジンコにおける真の幼若ホルモンの構造も知られていないことから、予想外の化学物質に対して高い感受性を示す可能性も考えられる。

こうした問題を明らかにするには、ホルモン受容体を用いたレポーターアッセイ系などを用いた系の確立が必要である。この系の確立によって、化学物質が特定の受容体に結合し影響を及ぼす可能性があるのかについて、評価することが可能となる。しかし、こうしたレポーターアッセイ系は、すでに脱皮ホルモン受容体など仮想的な標的分子を設定していることになる。

全く未知、あるいは無関係と思われる生体分子がこうした化学物質によって影響を受けている可能性を考慮した場合には、必ずしもレポーターアッセイ系が有用な手段とはなりえない。実際に幼若ホルモンの受容体については、ショウジョウバエなど比較的研究の進んでいる昆虫などを含めて必ずしも明確なコンセンサスが得られていないのが現実である。

こうした問題点を解決するには、遺伝子発現変化を解析することにより、その変化がホルモン様

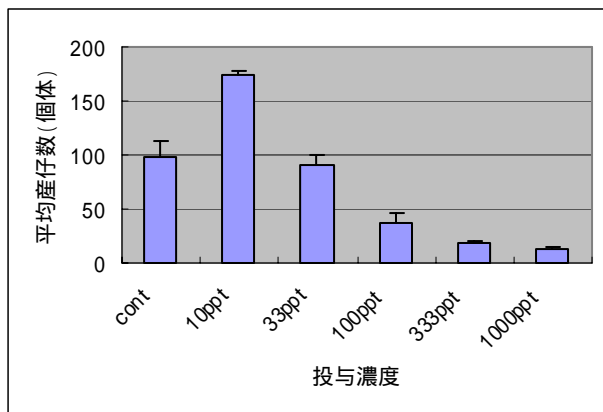
の遺伝子発現の変化が、別の反応による変化によるものかを見極める必要があるであろう。実際に遺伝子発現に着目した場合には、実際の生殖影響が見られる濃度よりも低濃度で、大きな遺伝子変動が確認された。従って今後、どのような種類の遺伝子がどのようなホルモンや化学物質で発現が変化するのかについて明らかにしていく事により、的確なリスク評価が可能になっていくと思われる。

## E . 結論

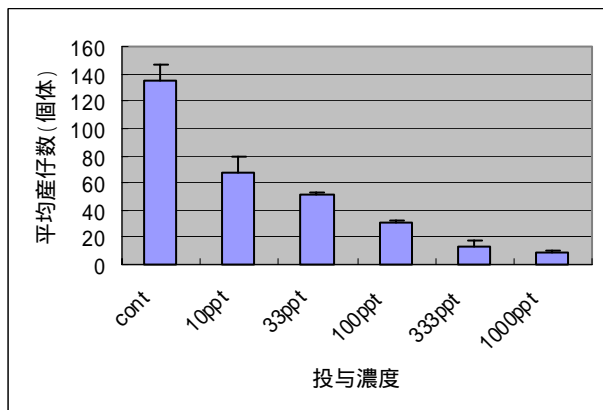
ミジンコへの影響を解析する手法として古くから増殖試験が行われてきたが、遺伝子レベルで発現を解析することにより、鋭敏にその影響を評価できる糸口がつかめた。

今後、遺伝子情報をさらに充実させるのと同時に、遺伝子レベルでの評価系を構築することにより、既知のレセプターに依存しない統括的な影響評価と機構解明のシステムの構築が可能になると思われる。

### A . Pyriproxyfen



### B . Fenoxycarb



### C . BisphenolA

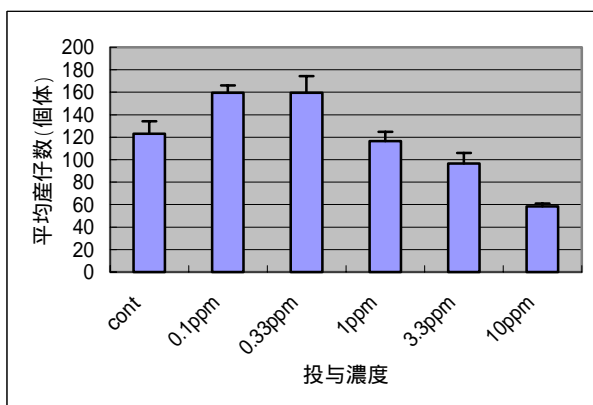
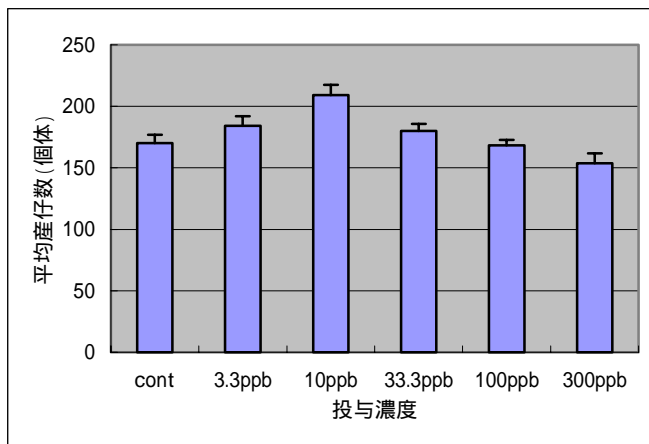


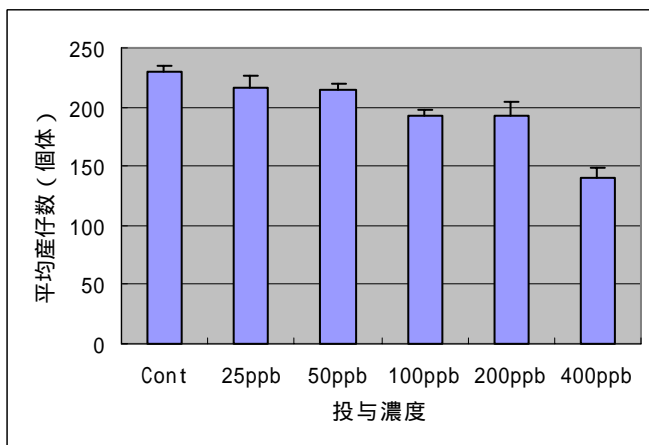
図1 脱皮ホルモンおよび幼弱ホルモンアナログによる増殖阻害試験

研究方法に記載した曝露条件で、それぞれの化学物質を曝露し、産仔数を計算した。

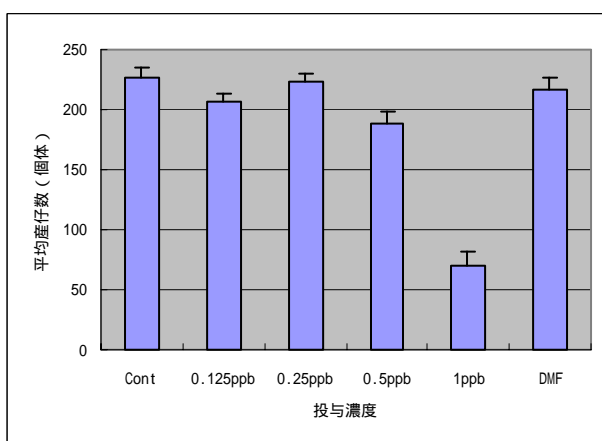
### D . Noprylphenol



### E . Octachlorostyrene



### F . Tributyltin



2ppb で親がすべて死亡

図1 脱皮ホルモンおよび幼弱ホルモンアナログによる増殖阻害試験 (続)

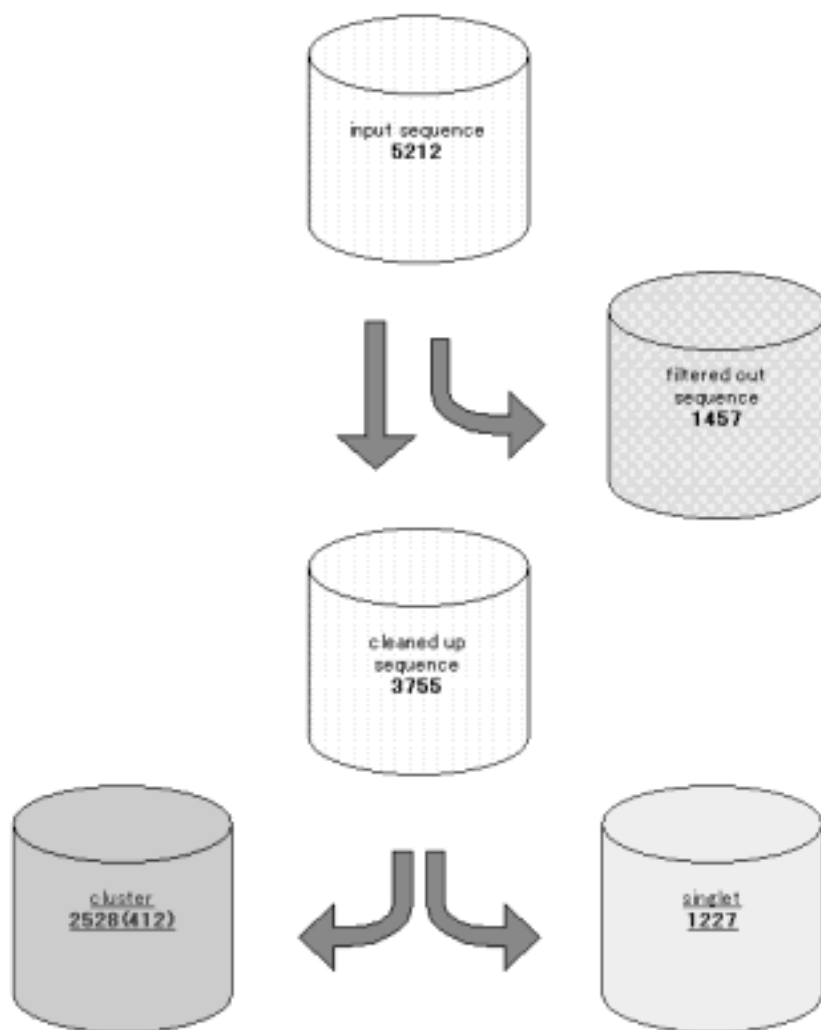


図2 EST 解析の概略

5212 遺伝子をピックアップし塩基配列を解析。一定のクオリティを満たした遺伝子が3755 遺伝子。重複があった遺伝子は2528 遺伝子あり、これらは412 遺伝子のグループに分類された。一方重複のなかった遺伝子は1227 遺伝子存在した。

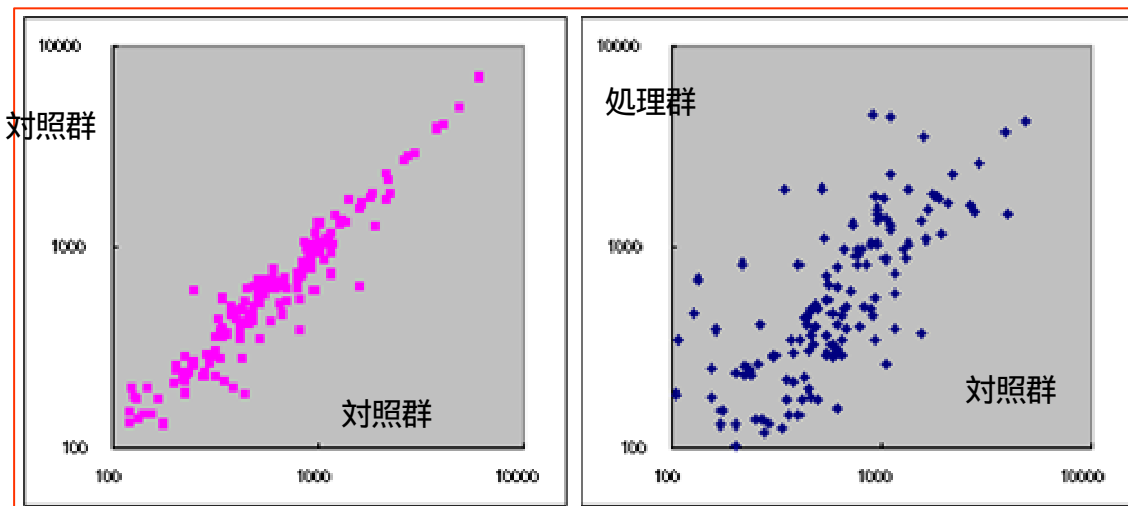


図3 遺伝子発現パターンの変化

ミジンコを2 ppbのフェノキシカルブ処理した後にRNAを抽出、精製し発現量について対照群と比較した。左のパネルは同一実験の比較で再現性の確認をしている。1つの点はそれぞれ遺伝子をあらわし、それぞれの軸の値がその遺伝子の発現レベルを示す。右のパネルは、処理群(Y軸)と対照群(X軸)との比較で、フェノキシカルブ処理により大きく遺伝子の発現が変動していることがわかる。

clusterID	contigID	fragments	homology search result	score	E-value	consensus length
0	contig1	12	embLA_058875.1 PF0326875 Bana acidothermus mRNA for acidic ribosomal protein 1 (psr1 gene)	71.9	1e-09	920
0	IGU001_S_C_000013_E12r	1	ref NC_000900.1  <i>Methanococcus jannaschii</i> complete genome	42.1	0.42	487
1	contig1	2	ref NC_003074.1  <i>Arabidopsis thaliana</i> chromosome 3, complete sequence	43.1	2.2	584
2	contig1	43	ct AF083984 AF083984 Drosophila melanogaster cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	127	1e-24	972
2	contig2	2	ct AF083984 AF083984 Simulium aureum NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	3e-17	468
2	IGU001_S_C_000001_A12r	1	ct AF083984 AF083984 Simulium aureum NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	4e-17	518
2	IGU001_S_C_000001_C08r	1	ct AF083984 AF083984 Simulium aureum NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	4e-17	526
2	IGU001_S_C_000002_B01r	1	ct AF083984 AF083984 Simulium aureum NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	4e-17	475
2	IGU001_S_C_000002_B09r	1	ct AF083984 AF083984 Simulium aureum NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	4e-17	545
2	IGU001_S_C_000002_E11r	1	ct AF083984 AF083984 Simulium aureum NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	3e-17	462
2	IGU001_S_C_000004_A01r	1	ct AF208954.1 Drosophila simulans isolate MDW86 mitochondrial complete genome	81.8	4e-13	385
2	IGU001_S_C_000004_A11r	1	ct AF208954.1 Drosophila simulans isolate MDW86 mitochondrial complete genome	81.8	6e-13	518
2	IGU001_S_C_000004_B11r	1	ct AF083984 AF083984 Simulium aureum NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	4e-17	501
2	IGU001_S_C_000004_C01r	1	ct AF083984 AF083984 Simulium aureum NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	4e-17	506
2	IGU001_S_C_000004_G05r	1	ct AF147119 AF147119 Drosophila guttifera strain 1908-1971.1 cytochrome oxidase II (COII) gene, partial cds, mitochondrial gene for mitochondrial product	85.7	2e-14	228
2	IGU001_S_C_000004_H05r	1	ct AF083984 AF083984 Simulium aureum NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	4e-17	490
2	IGU001_S_C_000005_E07r	1	ct AF147119 AF147119 Drosophila guttifera strain 1908-1971.1 cytochrome oxidase II (COII) gene, partial cds, mitochondrial gene for mitochondrial product	85.7	3e-14	453
2	IGU001_S_C_000005_F03r	1	ct AF083984 AF083984 Simulium aureum NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	4e-17	528

表1 EST配列のBlast検索結果(一部)

得られた配列情報をもとに、Blast検索を行い、類似した塩基配列がデータベース上に登録されているか確認した。

# Evaluation of chemicals as endocrine disruptors on crustacean

Hajime Watanabe, Ph.D.

Center for Integrate Bioscience, Okazaki National Research Instituts

Hajime Watanabe, Yosihnao Katsu, Hiroaki Sone and Norihisa Tatarazako

## **Abstract :**

The water fleas, *Daphnia magna*, reproduce by cyclic parthenogenesis as a predominant strategy and environmental stimuli such as light cycle, population, induce organisms to switch from parthenogenesis to gamogenetic reproduction. During the gamogenetic period, they produce male daphnia and dormant resting eggs, which can survive prolonged periods of environmental adversity. However, little is known about the mechanism(s) associated with the switch from parthenogenesis to gamogenetic reproduction. In addition to the life-cycle switching, molecular structures and functions of well known hormones such as ecdysone and juvenile hormone are not well known.

In the present study, we investigated the effect of chemicals on reproduction and compared with the effect of juvenile hormone agonists such as pyriproxyfen and fenoxycarb, on neonatal development in *Daphnia*. We found that juvenile hormone agonists affect on reproduction at ppt level whereas bisphenol A affects at ppm level. We also analyzed expression sequence tags from wild type daphnid and difference of gene expression pattern between fenoxycarb treated and control daphnid were examined by differential display. Combination of gene expression analysis and traditional reproduction assay will be helpful for evaluation of chemicals on reproduction of invertebrates.