

ExTEND2005 基盤的研究フィージビリティースタディについて

環境安全課

1. フィージビリティースタディ研究課題の選定

平成 17 年度第 2 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会（平成 17 年 10 月 31 日）の資料 4・2（本検討会資料 3・1）において基盤的研究課題について、「今後の新規研究課題等についても検討を行う。」とされており、これを受けて平成 17 年度基盤的研究 7 課題に加えてフィージビリティースタディを実施することとした。

フィージビリティースタディ研究課題の選定にあたっては、ExTEND2005 基盤的研究企画評価検討会委員及び ExTEND2005 野生生物の生物学的知見検討会委員と環境省環境安全課が持ち回り等によって協議を行い、研究内容及び研究代表者を選定し、ExTEND2005 基盤的研究企画評価検討会座長のご了解を得た。

2. 平成 17 年度基盤的研究フィージビリティースタディ研究課題

課題 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(p2)

課題 2 遺伝子導入メダカを用いた内分泌かく乱物質の影響評価と作用機構の解明(p6)

課題 3 内分泌かく乱物質の生態影響試験法の開発(p9)

課題 4 化学物質の内分泌かく乱作用に対する代謝的活性変動の研究(p15)

課題 5 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(p17)

課題 6 化学物質の胎盤内分泌機能への影響を考慮した生殖発生毒性評価(p20)

課題 7 燃焼排ガスに含まれる多環芳香族炭化水素類の内分泌かく乱作用の評価(p26)

課題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

研究者：新潟大学 理学部 自然科学研究科

濱口 哲（代表研究者）

研究目的：内分泌かく乱現象は本来、ヒトを含め野生生物に見られる「異常現象」を見いだすことが発端となるものであるが、野生生物の性現象、とりわけ性的表現形の揺らぎについての基礎的情報は十分でない。その結果、観察される異変が真に異常なのか、それとも正常な揺らぎの範囲内なのかについての判断は現状では極めて困難である。したがって、野生生物の性現象の実態に関する基礎情報の収集は喫緊の課題である。

本研究は、実験動物としての整備が進み、生物学的な諸技術の適用が可能であり、且つ本州以南の日本各地に野生生物として生息するメダカをモデルとして、正常な揺らぎの範囲と原因を解明して、野生生物での異変判定における基礎的情報を得ることを目的としている。さらに、野生メダカの性的な揺らぎを通じて、メダカの性決定、性分化の分子機構に関わる知見を得て、メダカ以外の動物の性的可塑性に関して一定の判断を下すための基礎情報を提供できるものと考えている。

これまでの取組：

・科学研究費補助金 基盤研究(C)(2) (平成11～13年度)

「メダカを用いた内分泌かく乱物質モニタリングシステムの構築」

メダカを用いた内分泌かく乱物質の影響評価の基礎的情報を得ることを目的に、性転換、第2次性徴の異常、配偶子形成、血清中のビテロゲニン量の諸項目について野生メダカの周年観察を行った。また、近交系メダカを用い、ホルモンによる性転換の誘導、ビテロゲニン誘導能の系統差の有無について検討した。その結果、現時点では野生メダカに顕著な異常は認められないこと、性ホルモンによる性転換能には近交系間に顕著な差が認められること、ビテロゲニン産生を指標としたホルモン感受性には差は認められないことが判明した。また、近交系間で性染色体の一部を組み換えた系統を利用した解析から、性転換能の系統差は主としてY染色体の性決定領域の違いによることが示され、DMYの"雄決定力"に系統差があることが明らかになった。

・日本化学工業協会長期自主研究（LRI）（平成13年9月～14年8月）

「近交系及び野生メダカを用いたエストロゲン誘導ビテロゲニン産生の毒性学的意義の検討」

エストロゲン処理された近交系メダカのビテロゲニン量と精子形成活性

との関係を検討した結果、ピテロゲン量は、ある留保のもとで、生殖能力かく乱の指標たり得ることが確認できた。

・日本化学工業協会長期自主研究（LRI）（平成14年9月～16年8月）

「野生メダカの性的可塑性に関する研究」

内分泌かく乱物質の野生生物(メダカ)への影響モニタリングの基礎データとして、野生メダカの性的可塑性を検討した。平成16年8月までの時点で117地点4012個体の野生メダカから、50個体のXY雌、17個体のXX雄を得ており、遺伝解析を行ったものはDMYの突然変異によるXY雌および未知の遺伝子の突然変異によるXX雄であることが判明している。

・科学研究費補助金 特定領域研究「性分化（略称）」（平成17年-）

「種間雑種・突然変異による性転換を用いたメダカ性決定 / 性分化制御機構の解明」

メダカとハイナンメダカの種間雑種を作成したときに見られる性転換現象に関連する遺伝子を探索している。ハイナンメダカのDMYは、メダカのそれより”弱い”雄誘導活性を持っており、ハイナンメダカのDMYを持つ個体が雄になるか雌になるかについて、常染色体上の遺伝子が関与していることが明らかになりつつある。現在、その遺伝子の染色体上の位置を突き止め、遺伝子そのものを探索中である。また、野生のXY雌から得たDMYもハイナンメダカと同様に”弱い”雄決定機能を有しており、その機能に常染色体上の遺伝子が関与していることが示唆されていることから、その遺伝子の探索も実施ししている。併せて、同じく野生由来のXX雄の原因遺伝子についても探索を行っている。

・環境省地球環境研究総合推進費、課題検討調査研究（平成15-16年）

「地球温暖化に対するメダカの短期的 / 長期応答に関する予備的研究(代表 山平寿智)」

標記の研究の分担課題として、メダカ胚の高温処理による性転換に関わる研究を行い、メダカ胚の 32°C 処理で雌から雄への性転換が誘導されること、また、その性転換誘導率には南日本集団由来の近交系 Hd-rR と北日本集団由来の HNI の間に顕著な差が認められることを明らかにした。現在、この研究で得られた結果を基礎に、両系統間の遺伝的多様性を活用して、温度性転換感受性に関わる遺伝子の探索を行っている。

研究概要：

I. 野生メダカの性転換個体の探索とその原因の解析

これまでに採集した日本各地のメダカに加え、さらに野生メダカをサンプリングし、DMYの有無と個体の性を識別し、遺伝的性と個体の性との不-

致個体の検索を行う。

1) *DMY*の有無の判定

メダカを個体識別できる状態で維持して、各個体から尾鰭の一部を採取し、DNAを抽出する。*DMY*に特異的なプライマーを用いて、PCR法により *DMY*を増幅して、特異的バンドの有無により、*DMY*の有無を判定する。その個体の第2次性徴より表現型としての性を判定して、*DMY*の有無と表現型としての性の一致、不一致を検討する。

2) 不一致個体の原因の検討

不一致個体については、近交系メダカと交配を行い、遺伝解析を行う。不一致個体のF1について、*DMY*の有無と性を検討し、不一致個体の有無を検索する。F1世代で不一致個体が出現すれば、“優性”突然変異による性転換であると推定できる。F1世代で不一致個体が得られない場合、F1個体ともの不一致個体との交配を行い、戻し交配世代を得る。戻し交配個体で不一致個体が見られれば、“劣性”突然変異による性転換であると推定できる。それらの“突然変異”については、原因遺伝子の探索を行う。具体的には戻し交配世代の不一致個体が共通に持つ染色体領域をメダカのゲノム情報を活用して特定し、そこに存在する原因遺伝子を探索する。

同時に、その性決定関連遺伝子の機能の推定を行うために、不一致個体の生殖巣発生過程について発生生物学的解析を行い、性転換がどのような機序で起こるのかについて考察し、原因遺伝子の探索結果と併せて、性決定/性分化の遺伝的制御機構に関わる知見を収集する。

戻し交配世代で不一致個体が見られない場合、少なくとも単純な突然変異を原因と考えることは困難であることから、外因的な(後天的)原因も含め、原因の考察を行う。

3) 不一致個体の動態解析

不一致個体が比較的多数見つかる水域について、複数世代に渡っての不一致個体出現についての解析を行い、性分化関連突然変異遺伝子の世代を超えた動態について考察する。現時点で、新潟市近郊及び愛知県大府市で複数世代に渡っての調査を継続している。

・性転換を指標とした野生メダカの温度感受性の検討

性転換に関わる温度感受性についてメダカに遺伝的多様性があることが明らかになったことから、その系統差の原因遺伝子の探索を通じて、その分子機構解明の糸口を探るとともに、野生メダカの温度感受性の調査を行い、野生メダカの温度による性的可塑性の実態把握を目指す。

1) 温度感受性の系統差に関わる遺伝子の探索

HNI系統とHd-rR系統間の高温度処理による性転換率の差を利用し、両系統

間の交配実験、遺伝解析、さらにDNAマーカーを活用した連鎖解析によって、両系統間の温度感受性に関わる遺伝子の染色体マッピングを行い、系統差原因遺伝子(性的可塑性関連遺伝子)の探索を行う。

2) 野生メダカの温度感受性の系統差の比較

北日本集団に由来する HNI 系統と南日本集団由来の Hd-rR 系統間に温度感受性の差が存在することから、野生メダカには、温度感受性に関わる様々な多様性があることが予想される。その様な観点から、南北日本集団の他の近交系、及び、他集団(東韓国集団、中国-西韓集団)由来の近交系について、温度感受性を検討する。さらに、本学で系統維持している野性メダカ系統についての温度感受性を検討する。それら、野生メダカ系統についての結果を基礎として、現実に各地に生息する野生メダカについての調査方法を検討し、実際の野生メダカの温度性転換感受性の多様性の実態について把握し考察する。

課題2 遺伝子導入メダカを用いた内分泌かく乱物質の影響評価と作用機構の 解明

研究者：京都大学大学院 農学研究科 発生工学 / 水産化学
木下政人（代表研究者） 亀井保博

研究目的：現在、エストロゲン様物質の暴露により野生生物雄個体がその精巣に卵を持つようになることが知られている。しかしながら、この卵の由来細胞や出現誘発メカニズムについては明らかにされていない。この点を明らかにすることは、いわゆる環境ホルモンの作用点を知り、その防御策を講じる上で重要な知見となる。また、作用点を分子的に明らかにすることにより、精巣卵誘起に関して簡便な評価系構築に貢献する。精巣内の卵に変わりうる細胞はどのようなものなのか、どのような生殖細胞の幹細胞があるのかを明らかにする事は、性の可塑性の点から生物学上も非常に関心が高い。加えて、精巣卵の出現が性行動に影響を与えるか否かを検討することで、精巣卵を生じさせるような環境物質が生物種の生殖・存続に対して、本当に影響を及ぼし得るのかを明らかにできる。この知見は、特定物質の生態系への影響評価といった環境行政政策の重要な判断材料となりうると考える。

これまでの取組：本研究代表者は、メダカを用いた遺伝子操作に卓越しており、これまでに多数の遺伝子導入メダカ（TGメダカ）を作出してきた。その結果、内分泌かく乱物質の個体レベルでの影響を簡便に迅速に観察できるメダカ系統を樹立した。代表的な3種を以下に記す。

- 1) vasa-GFP medaka：生殖細胞で特異的に発現している vasa 遺伝子の発現調節領域に制御された緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を用いて生殖細胞が緑色蛍光で標識されたTGメダカを作出した。メダカの生殖細胞の増殖開始は、メスでは孵化時、オスでは孵化後30日前後である。つまり、孵化後10日ぐらいでメダカの生理学的な性は、生殖細胞数で判定できる。通常のメダカでは、この時期の生殖細胞数を検出するのは非常に困難である。しかしながら、本TGメダカでは生殖細胞数の計数が容易（緑色蛍光を持つ細胞を計数）であるため、生理学的性を孵化後わずか10日で見極めることが可能であった。この特徴を利用し、エストロゲン様物質による性転換の早期検出法を開発した。（Hano et al., *Environ. Toxicol. Chem.* 2005）
- 2) ChgH-GFP medaka：エストロゲンに応答して肝臓で合成される卵膜タンパク質の一種、Choriogenin H (ChgH)の発現調節領域を利用し、オス個体又

は、幼魚で飼育水中のエストロゲン様物質濃度依存的に肝臓で GFP を発現するメダカを作出した。(エストロゲンの刺激に対して ChgH の方がピテロゲニンより早期に発現が開始される) 本 TG メダカを用いて測定されたエストロゲン様物質濃度は、他の測定法 (YES アッセイ、ELISA 法、GC/MS 法) と同等であった。また、実際の環境水 (処理下水) からの測定も可能であり、個体レベルでの環境ホルモンモニターとして期待される。(Kurauchi *et al.*, *Environ. Sci. Technol* 2005)

- 3) 42Sp50-GFP medaka : 雌型生殖細胞で多量に発現されている 42Sp50 遺伝子の発現制御領域を利用し、雌型生殖細胞を GFP で標識した TG メダカを作出した。本系統オス個体は、環境ホルモンにより誘発される精巣卵形成メカニズムの解明に大きな力を発揮すると考えられる。(投稿準備中)

研究概要 :

- 1) 精巣卵形成 E 2 暴露条件の検討 (1・2 年目): これまでに作出した雌型生殖細胞に緑色蛍光を有する 42Sp50-GFP medaka 系統は、腹腔膜のグアニン色素のため精巣を生きたまま外部から観察することが困難である。そこで本遺伝子導入系統とシースルーメダカ系統 (体表・腹腔のほとんどの色素を欠くため解剖することなく精巣が観察できる) を交配することにより遺伝子導入シースルーメダカ系統を作成する。この成熟雄個体を用い、精巣卵が出現する E 2 の暴露濃度・時間を検討する。
- 2) 生殖細胞標識遺伝子導入メダカの作出 (1・2 年目): 42Sp50-DsRed2 遺伝子を導入し、雌型生殖細胞を赤色蛍光で標識した遺伝子導入メダカを作出する。また、雄型生殖細胞の増殖が開始される孵化後 30 日の雄生殖巣とそれ以前の生殖巣を用いたサブトラクション法、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、オス型生殖細胞にのみ発現する遺伝子を同定し、オス型生殖細胞にのみ緑色蛍光を発現するメダカ系統を作出する。これらを交配しダブル遺伝子導入メダカを作出する。
- 3) 精巣組織培養法の確立 (2・5 年目): 2 年目から精巣器官培養法の検討を開始する。最終的には、上記のダブル遺伝子導入メダカの精巣全体を数週間培養することを目指す。そこに至るまでに克服すべき多くの課題があると考えられる。そのためまずは、実験系を単純化するためハサミで断片化した精巣片の培養条件の確立から取りかかる。
- 4) 精巣卵由来細胞の決定 (3・5 年目):
 - a) 個体レベルでの観察: 2) で作出したメダカに 1) で決定した条件で飼育し、逐次観察を行い、精巣卵が確認されたら開腹し、その蛍光色を観察する。
 - b) 器官培養での観察: 個体レベルでは、精巣卵形成の進行状態や、細胞レベ

ルでの緻密な観察が困難と考えられるため、精巣の器官培養を行う。2)で作出したメダカの精巣を 3)の条件で培養し、1)で決定した条件でE2暴露を行い、精巣卵の由来細胞を決定する。この培養精巣では、雄型生殖細胞は緑色蛍光タンパク質を持ち、そこに出現する精巣卵は赤色蛍光タンパク質を有するようになる。つまり、もし、雄型生殖細胞が雌型に変化して精巣卵が形成されるなら、その初期に緑と赤の両蛍光タンパク質を持つためオレンジ色の蛍光が観察される。或いは、元々メダカ精巣内に雌型生殖細胞が存在し、これが精巣卵となるのなら正常なオスの精巣に赤色蛍光を発現する細胞が観察されるはずである。また、未分化(雄型でも雌型でもない)生殖細胞が精巣内に存在し、精巣卵となるならば精巣卵形成可能なエストロゲン様物質暴露条件でのみ初めて精巣内に赤色蛍光を発現する細胞が観察されるはずである。

5) 精巣卵形成に引き金となる遺伝子の解明(3・5年目): 遺伝子導入個体または器官培養より、分化段階初期の精巣卵からmRNAを回収し、精巣卵の見られない部位から回収したmRNAとのサブトラクションを行い、引き金となる遺伝子を検索する。遺伝子導入法を用い候補遺伝子を正常雄メダカの精巣で強制発現し、精巣卵の誘発確認を行う。

6) 性行動への影響評価(1・2年目): 1)で作出したメダカを用い、E2暴露を行いながら、経時的に顕微鏡観察による精巣卵の出現をモニターし、点灯時の雌への追尾・交尾行動を観察する。1年目では、使用するメダカ系統がまだ出来ていないので、野生型メダカを用いて追尾・交尾モニター方法を検討する。

課題3 内分泌かく乱物質の生態影響試験法の開発

研究者：北海道大学大学院地球環境科学研究院

蔵崎正明（代表研究者）、岩熊敏夫、田中俊逸

研究目的：発展途上国およびわが国を対象とした内分泌かく乱化学物質を含む環境汚染化学物質の水域における実態調査はこれまでほとんど行われていない。従来、発展途上国の多くが存在している熱帯地域特有の動植物の生態調査は頻繁に行われているが、工業廃水および生活廃水による水環境中の汚染を明らかにするための調査は、未だ手付かずに近い状況にある。さらに内分泌かく乱化学物質を含む環境汚染化学物質の生体濃縮等を考慮した研究はまったくと言っていいほど行われておらず、生態あるいは生体影響を考える上で極めて重要なポイントであると思われる。また、我々がこれまで行って来た内分泌かく乱化学物質の影響評価法の開発および環境修復法の開発を応用する場としての意義も十分に期待できる。

来年度以降の課題として、本フィージビリティスタディの成果をもとに水界生態系の食物網を構成する藻類、底生動物、底質そして魚類などへの汚染物質の蓄積量と移行経路を調査・分析すると同時に、底生動物については種類組成や水生昆虫の頭部の形態異常などを指標に汚染との対応付けを試みて行きたい。またさらに、われわれが現在行っている培養細胞を用いた内分泌かく乱化学物質の生体影響評価法開発の研究に加え、人工胎盤様膜を構築し、内分泌かく乱化学物質の母体から胎児への影響の評価を可能にしたいと考えている。この系が有効に動けば内分泌かく乱化学物質を含む環境汚染化学物質の次世代影響評価法として用いることが可能となる。以上、本調査研究では内分泌かく乱化学物質を含む環境汚染化学物質の生態系に対する影響と、人体に対する影響を同時に評価する点に特色がある。

これまでの取組：研究代表者はこれまで、環境中に数多く存在する化学物質の生体内における輸送と作用に興味を抱き、主として、それらの化学物質の生体取り込みに対する生体防御機構を担う生体内高分子の機能に関する研究を行ってきた。また近年は、これまでの研究の知見を生かし環境汚染化学物質の生体影響評価法の開発や遺伝子工学的手法を用いた環境汚染化学物質のバイオレメディエーションにも取り組んでいる。具体的な成果としては、これまでに船体塗布剤として使用されていたトリブチルスズが極めて低濃度でアポトーシスを抑制する効果があること、洗剤の原材料でもあるノニルフェノールが低濃度から高濃度曝露でトリブチルスズとは逆にアポトーシ

スを促進する効果があることを見出し報告している。またポリカーボネートの原材料であるビスフェノールAが低濃度曝露で神経分化に影響を及ぼしている結果も得ている。

フィールド調査においては研究分担者として、インドネシアの中央カリマンタンを中心に、河川流域とその河川により灌漑される水田を対象として、環境汚染の実態の解明、汚染物質の生態系への影響を把握することを目的として調査を行って来た。

カリマンタンの泥炭湿地の地下水、河川水および湖水中の有機塩素系化合物やPAHの存在量を調べ、環境中の移動性を決めている因子として腐植物質、全有機炭素、溶存有機炭素などを検討し、さらにこの地域の河川・湖沼水の金属分析により予想通り、鉛などの検出が確認された。また、この地方の土地は酸性土壌で河川水の多くも高い酸性を示し、その原因が海生の硫酸イオンによるものであることが示された。

次に西ジャワ島ボゴール近郊の水銀汚染河川における調査からは肉食魚類、エビ、そして底生動物であるトビケラ幼虫に高濃度の総水銀およびメチル水銀が蓄積されていることが確認された。冷温帯域湖沼の食物連鎖過程におけるメチル水銀の濃縮の研究では、これまで、動物プランクトン・魚・魚食魚という過程が主に研究され、動物プランクトンへのメチル水銀の濃縮が余り高くないのに魚食魚への蓄積が高いことや、熱帯域の汚染の強度に関わらず魚食魚において水銀蓄積量が高いという疑問点が提示されてきている。前者については底質から魚類への経路を仲介する底生動物を考慮すると、魚への高い水銀蓄積機構が予測できる。また後者については、過去の火山活動などにより土壌や底質に蓄積してきた水銀の集水域に於けるメチル化と雨期・高水位期における水界への移送の過程が重要であると考えられる。この調査研究により、インドネシアでの不法金採掘がかなり広範囲に行われ、小規模精錬に伴う水銀等の汚染が深刻に進行していることが明らかになった。（統計では小規模金鉱山はインドネシアで77,000箇所、従事者は30万～50万人といわれている）。さらに我々によるジャワ島ボゴール近郊における予備的検討では環境ホルモン様物質も検出されている。このことから河川への生活廃水や工場からの廃水の流入による環境汚染化学物質特に内分泌かく乱化学物質等の広範囲な汚染が予測された。

研究概要：平成 17 年度計画

1) 内分泌かく乱化学物質の環境中濃度および有害汚染物質の生物及び人体への移行・濃縮過程の解明

本調査は主として西ジャワ地方、すなわちジャカルタ近郊のジャワ海流

入河川水域、ポゴール、チビノンおよび中央ジャワのジョグジャカルタ周辺の河川湖沼で行いすでに河川水等のサンプルの収集は行っている。これら地域は開発が十分行われ人口も密集している。ポゴールは大統領の別邸もある郊外都市で農業も盛ん、その河川下流はジャカルタ工業地域も含まれている。チビノンは新興の工業都市、バンドンは古くからの工業都市として有名である。ジョグジャカルタはインドネシアの古都としてやはり多くの人口を抱えている。これらの開発地域の対照地域として、これまでの調査実績のある中央カリマンタン（ボルネオ島）のカハヤン川、セバングウ川およびそれらの流域を選択した。またさらに北海道札幌市近郊の汚染が進んでいると思われる茨戸川、創成川、汚染がほとんど無いことが予想される日本第二の清流である尻別川のサンプルも採集している。サンプルの前処理はすでに北海道大学の当該研究室で行われ、サンプルの溶存態有機炭素濃度(DOC)、pH、電気伝導度、溶存酸素濃度、陰イオン濃度、酸化還元電位等および混入大腸菌測定などはすでに分析を終え、データのとりまとめ中である。今後サンプルの内分泌かく乱化学物質濃度の化学分析を進めて行く予定である。

また同時に採取した魚類、水生昆虫およびプランクトン等の生体試料の内分泌かく乱化学物質の濃度分析にも着手し、水界生態系の食物網を構成する動物プランクトン、底生動物、魚類などの種組成を調べるとともに、魚類、底生動物および動物プランクトン等の食性解析から食物網を解明する。汚染河川に特有の底生動物について形態異常の有無を検討し、フィールド調査結果を総合して内分泌かく乱化学物質の生態影響評価法構築に努める。

2) 内分泌かく乱化学物質の生態・生体影響評価の文献調査

過去の論文調査を行い、内分泌かく乱化学物質の性ホルモンかく乱作用以外の生体への影響の報告、あるいはフィールド調査等で明らかにされた環境中および生物体内において検出された内分泌かく乱化学物質の濃度等に関する報告を調査し、本フィージビリティスタディの主目的である食物連鎖等を考慮し、水質、底質、水生昆虫、魚類等の生物試料中の内分泌かく乱物質の濃度について数多くの報告データの収集に努めたい。また生活に密着した河川水等における内分泌かく乱化学物質の濃度については環境法が整備された先進国と整備されていない発展途上国に分けその違いを明らかにしたい。

また、内分泌かく乱化学物質の性ホルモンかく乱作用以外の作用にも着目し、論文調査を進める予定である。ラット脳室内投与により多動性障害様作用を示すビスフェノールなどの例があるため、様々な作用機序に関する論文が検索されることが期待される。さらに重金属は、現在内分泌かく乱化学物質のリストには入れられてないが、すでに内分泌かく乱作用に関する報告

がいくつも出されており、我々のフィールド調査で得た検出濃度との関連に注目している。以上のとりまとめにより、現実には河川水等で検出された内分泌かく乱化学物質が、生態および生体に影響を与える可能性があるのか否かの判定に資することが可能かどうかを検討し、併せて今後の内分泌かく乱化学物質の生態・生体影響評価法構築に向けた研究動向の指針となるものを見出すように努める。

平成18年度以降の計画

1) 試料中の内分泌かく乱化学物質の定量

内分泌かく乱化学物質を含む環境汚染化学物質の定量はHPLCを用いて行う。内分泌かく乱化学物質に関しては研究代表者が開発したレポーターアッセイ系を用いて測定し、環境サンプルでの有効性を検証する。特に汚染が予想されるビスフェノールおよびアルキルフェノールに関してはイムノアッセイ系をも併用して、感度と精度の向上を期す。

2) 内分泌かく乱化学物質の環境中濃度および有害汚染物質の生物及び人体への移行・濃縮過程の解明

昨年度のデータをもとに新たに採取した魚類、水生昆虫およびプランクトン等の生体試料の内分泌かく乱化学物質の濃度分析にも着手し、水界生態系の食物網を構成する動物プランクトン、底生動物、魚類などの種組成を調べるとともに、魚類、底生動物および動物プランクトン等の食性解析から食物網を解明する。また18年度同様に汚染河川に特有の底生動物について形態異常の有無を検討し、フィールド調査結果を総合して内分泌かく乱化学物質の生態影響評価法構築に努める。

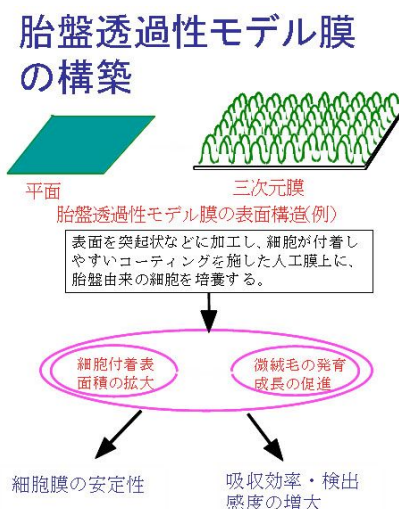
さらに水中および低質中、さらに採取した生物試料の重金属については硝酸による灰化、その他の試料中の重金属については過塩素酸法で灰化を行い、ICPマスをを用いてZn, Cu, Pb, Cd, Fe等濃度の測定を行う。有機および無機水銀測定は我々によって確立された方法で行う。

3) 内分泌かく乱化学物質の生態・生体影響評価の文献調査

18年度も引き続き過去の論文調査を行い、内分泌かく乱化学物質の性ホルモンかく乱作用以外の生体への影響の報告、あるいはフィールド調査等で明らかにされた環境中および生物体内において検出された内分泌かく乱化学物質の濃度等および食物連鎖を考慮した水質、底質、水生昆虫、魚類等の生物試料中の内分泌かく乱物質の濃度もあわせてとりまとめる。また、今後の内分泌かく乱化学物質の生態・生体影響評価法構築に向けた研究動向に沿った内容の論文があれば本実験計画に取り入れ有効な生態影響評価法構築を試みる予備的な検討を行う。

4) ヒト胎盤細胞を用いた胎盤様膜の構築

内分泌かく乱化学物質による母体から胎児への影響を評価するための方法は現在残念ながらほとんど無い。我々は、以前、科学技術庁（現文部科学省）の研究事業においてヒト胎盤細胞を利用した人工胎盤膜の作成に携わった経験を持つ。この膜を利用・改良することにより胎盤モデルの構築とそれを応用した胎児への影響評価法構築が可能であると考えている。胎盤モデル膜構築のためにヒト胎盤 Bewo 細胞を用いる。膜素材は前回成績の良好だった2種を用いる予定である。膜透過性は既に確立している胎盤透過性薬剤およびデキストランを用いて評価し、実際の胎盤膜透過性に近い値を得るために、細胞培養の条件検討、膜素材の検討等を行う。



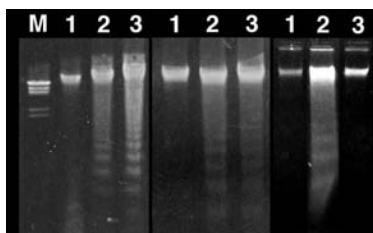
5) アポトーシス因子を用いた内分泌かく乱化学物質影響評価法の開発

アポトーシスは遺伝子の上で定められた細胞死として認識されているが、発生段階で正常な発育と器官形成が行われるためには必要不可欠な過程である。PC12 細胞はラット副腎髄質腫細胞であり、この細胞を培養中に、栄養因子である牛胎児血清を抜くと簡単にアポトーシスを誘導することができる。われわれの研究により、この PC12 培養細胞を用いた系で内分泌かく乱化学物質であるトリブチルスズと 2,4,5-T が極めて低い曝露濃度で、無血清培地により PC12 細胞に誘起したアポトーシスを抑制し、ノニルフェノールがアポトーシスを増強することが明らかにされている。この細胞にアポトーシスを起こす条件化で化学物質を曝露する系を1つの評価系とし

て用いる。今回さらにアポトーシスシグナルの伝達系の因子、酵素などの動態を調べて、さらに精密でかつ新しい影響評価系を構築したい。

電気泳動による影響評価

(-)(-)NP (-) (-) BPA(-) (-)TBT
FBS(+)(-)(-) (+) (-) (-)(+) (-)(-)



アポトーシスに対する影響

ノニルフェノール：増強

ビスフェノールA：影響無し

トリブチルスズ：阻害

BHC:影響なし

課題4 化学物質の内分泌かく乱作用に対する代謝的活性変動の研究

研究者：広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 神経化学、衛生薬学、薬物代謝、環境衛生
太田 茂（代表研究者）、北村繁幸、古武弥一郎、杉原数美

研究目的：化学物質の内分泌かく乱作用のスクリーニング法が各種開発されてきているが、化学物質は生体内で容易に代謝変換されることより、本来内分泌かく乱作用を示さない物質が活性体に代謝されることが考えられる。特に、内分泌かく乱作用の場合、微量の代謝物でも高い活性を発現する可能性があるため、代謝による活性変動を調べる必要がある。また、発生時期における内分泌かく乱作用が特に懸念されていることより、胎児期、新生児時期における薬物代謝酵素活性についても調べる。本研究では、生体内での化学物質の代謝活性化を主眼として、内分泌かく乱作用をスクリーニングすることにより、内分泌かく乱作用を示す前駆化学物質を検索し、リスク評価の基礎となる研究結果を集積することを目的とする。

これまでの取組：これまでに、化学物質の内分泌かく乱活性のスクリーニング系として、エストロゲン、アンドロゲンおよび甲状腺ホルモン受容体結合試験法、さらに組み換え酵母を用いたエストロゲン活性試験法を導入している。また、動物細胞を用いたホルモン受容体レポーター試験法として（抗）エストロゲンおよび（抗）アンドロゲン活性測定法を確立している。エストロゲン受容体レポーター試験法では、エストロゲン受容体を有しないCHO細胞にヒトエストロゲン受容体あるいはを発現させ、受容体と受容体への結合活性の違いを検出できる試験系も作成し、種々の環境化学物質で活性を調べている。さらに、*in vivo*試験として子宮肥大試験やハーシュバガーアッセイを行い*in vitro*試験との相関の確認も行っている。

化学物質の代謝活性化では、既にスチレンオリゴマー、ジフェニール、スチルベン等で、エストロゲン活性あるいは抗アンドロゲン活性が代謝されることにより発現あるいは増強されることを明らかにしている。また、原因となる代謝物の同定も行っている。

さらに、キングヨおよびオタマジャクシなどの実験動物を用いた*in vivo*試験法の開発、改良も行っている。

研究概要：今年度の研究計画として、以下の項目の実験を予定している。

1. 化学物質の内分泌かく乱作用の代謝的活性発現検出

これまで、*in vitro*内分泌かく乱作用検出試験法である受容体結合試験、

動物細胞あるいは酵母のレポーター試験系を用い、化学物質のエストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモンの受容体およびAh受容体結合活性の調査を行っている。これに加え、代謝による化学物質の内分泌かく乱作用活性化を調べるため、被検化学物質をラット肝酵素液と*in vitro*で反応させ、反応後の活性変動を*in vitro*試験法を用いて調べる予定である。活性変動の認められた物質についてはHPLC、LC/MSなどで分析を行い、被検化学物質の残存量および代謝物の同定を行う。同定した主要代謝物の活性を調べることにより、強活性物質の特定を行う。*In vitro*代謝で代謝的活性化を示した被検物質につき、*in vivo*試験として子宮肥大試験 (Uterotropic Assay) やハーシュバガーアッセイを行い*in vivo*での代謝活性化影響の発現を確認する。

被検物質としては、これまで研究を進めている stilbene, diphenyl, styrene oligomer類以外に、UV吸収剤として日焼け止め剤、プラスチック類に多用されている benzophenone類、保存料として食品、化粧品類にも使用されている parabene類、衣料から建築資材にも使われているブロム化難燃剤である tetrabromobisphenol A (TBBPA) および polybromodiphenyl ether類を予定している。さらに、殺虫剤、農薬として今も使用されている pyrethroid類、carbamate系農薬、また製造は禁止されたが今も食物を通しての摂取が続いている PCB、およびその代謝物で生体内での蓄積が認められている水酸化PCB類は調査が急務である。

2. 胎仔期・新生仔の代謝機能と内分泌かく乱作用発現

内分泌かく乱作用が最も大きな影響を示すのが発生、成長段階であると予想されている。そこで、本研究ではまだ余り研究されていない胎仔期・新生仔期における薬物代謝酵素の活性および発現の変動についてラットを実験動物として用い調べる。また、胎仔期・新生仔期に特異的な薬物代謝酵素を用い、化学物質の内分泌かく乱作用の代謝活性化につき、成熟ラットとの比較を行う。

3. 薬物代謝酵素を発現させた細胞を用いた*in vitro*レポーター試験系の作成

これまで*in vitro*レポーター試験に用いられている細胞はほとんど薬物代謝活性を持たない。そこで、主要な薬物代謝酵素であるチトクロームP450とその関連酵素であるチトクロームP450還元酵素遺伝子を含むプラスミドを細胞に組み込み、薬物代謝活性を有する細胞の作成を行う。この薬物代謝酵素を強制発現させた細胞を用いて*in vitro*レポーター試験を行うことにより、簡便に化学物質の代謝活性化を調べることが可能になると考えられる。

課題5 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

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

研究目的：本研究の目的はPCBにおいて明らかとなった環境化学物質の新たな作用機構の解明とその機構を考慮にいたしたスクリーニング系の確立である。我々の近年の研究により、PCBなど環境化学物質の一部が従来とは全く異なった機構で受容体へ作用することが明らかとなった。作用機構の詳細はまだ不明で、解明の必要がある。詳細が明らかになることで、今後の環境化学物質の作用機構研究に全く新しい方向性を示すことができる。さらに、新たな作用機構は従来のスクリーニング系では考慮されておらず、作用機構に対応したスクリーニング系を構築する必要がある。本スクリーニング系は一度に多サンプルを簡便に処理できるシステムにすることも考慮に入れており、確立すれば、従来のスクリーニングで漏れていた物質の毒性の同定や多サンプルの処理が可能となり、今後の環境政策にも役立てることができる。

これまでの取組：我々は甲状腺ホルモン受容体を中心とする核内ホルモン受容体の作用機構、及び環境化学物質による修飾作用について研究している。特に中枢神経系における甲状腺ホルモン作用機構とその修飾作用の分子基盤について重点的に解析している。

中枢神経系において、核内ホルモン受容体を介するホルモン作用には、明確な臨界期（感受性が特に強い時期）がある。臨界期は脳発達期の特定の時期に存在する。臨界期に環境化学物質などによりホルモン環境がかく乱されると、脳に非可逆的な障害が生ずることになる。臨界期の形成機構は明らかではない。ホルモン受容体の発現は成体の方がむしろ多く、受容体の量的な変化では臨界期は説明できない。また、ホルモンの標的遺伝子の中には臨界期以降もホルモンに感受性を持ち続けるものもある。我々は臨界期の形成機構についてげっ歯類小脳などを実験モデルとして研究を続けている。

我々の一連の研究により脳におけるホルモン感受性変化は転写共役因子の発現や作用変化が原因のひとつである可能性が高いことが明らかになりつつある。たとえば、脳で最も発現量の多い促進型転写共役因子SRC-1の発現は甲状腺ホルモン感受性の最も強い時期に標的細胞に限定的に増加する。SRC-1はリガンドが存在しない時でも甲状腺ホルモン受容体の転写調節領域とは別の領域と結合し、リガンド結合に即応して転写が開始できるように備えている。SRC-1以外にも我々は中枢神経系において臨界期に強く発現する転写共役因子を同定し、解析を勧めている。

また、上述のように、低用量のPCBが甲状腺ホルモン受容体を介する転写

を抑制し、転写共役因子と受容体との結合を修飾するのではなく、受容体をDNAから解離させることにより生じていることを明らかにした。転写抑制作用は神経細胞において他の細胞よりも強かった。細胞による作用の差異は、何らかの転写共役因子の関与によるものではないかと考えている。

一方、PCBは甲状腺ホルモン受容体を介さずに神経細胞膜に直接作用し、脱分極を生じ、細胞内カルシウム濃度の一過性上昇を介しC-Junなど他の転写因子の発現を促進する作用もあることを明らかにした。本実験系では、細胞外pH低下に伴う脱分極を細胞外刺激として用い細胞外刺激に対する反応性の变化も検討した。その結果、PCB自体は細胞を脱分極させるが、細胞外刺激に伴う脱分極は抑制することが判った。これらの結果はPCBが甲状腺ホルモン系を介さずに神経細胞の機能に影響を及ぼす場合もあることを示している。(本申請では時間的制約から甲状腺ホルモン系への作用に限定して実験を行う)

研究概要：

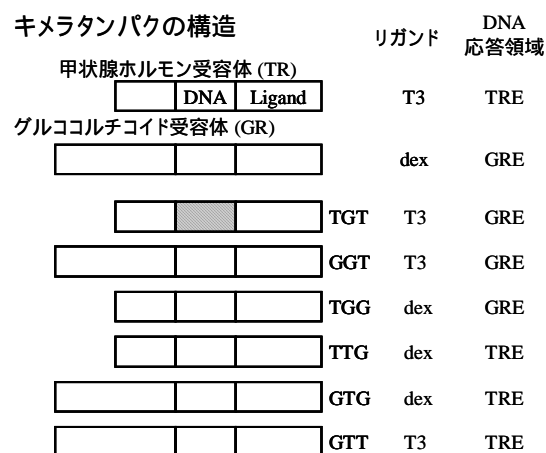
1. キメラタンパクを用いた化学物質作用領域の同定

右に用いるキメラタンパクの構造とリガンド、及び各キメラが結合するDNA応答配列を示す。核内受容体は、N末端より転写活性決定領域、DNA結合領域、リガンド結合/転写活性化領域の3つの機能的ドメインに大別される。PCBは甲状腺ホルモン受容体(TR)に作用し転写を抑制するが、グルココルチコイド受容体(GR)には作用しない。

PCBがどの領域に結合し、各機能を修飾するのか調べるためには少なくとも6種のキメラタンパクが必要である。例えば、TRのDNA結合領域に作用しているのであれば、TTG、GTG、GTTのキメラに対しては転写を抑制し、TGT、GGT、TGGについては転写には影響しないはずである。

そこで、これらの発現ベクターを、対応する応答配列を持つルシフェラーゼレポータープラスミドと共に培養細胞に導入し、各リガンドと共にPCBを投与し、転写活性がPCBにより修飾されるか解析する。大まかな同定により領域を確定したあとは、アミノ酸配列を細かく変化させた変異タンパクを作製し、PCBの作用部位を決定する。

2. DNA-受容体-共役因子結合に及ぼす化学物質の作用測定のためのスクリーニング系開発

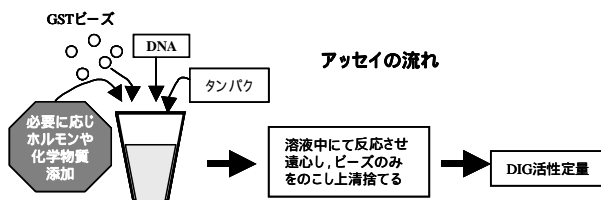


dex: dexamethazone, TRE: 甲状腺ホルモン応答配列, GRE: グルココルチコイド応答配列

従来、タンパク間やタンパク・DNA間の結合測定のために、ゲルシフトやプルダウンと呼ばれる方法が用いられてきた。これらはいずれも試験管内で検体を結合させた後、アクリルアミドなどで泳動させ、放射性同位元素で結合を測定していた。しかし、この方法は放射性同位元素を用いること、結果までに数日かかること、多サンプルの処理が難しいこと、安定してデータを得るには熟練を要することなどの欠点がある。さらに、環境化学物質の場合、内因性のリガンドと異なりタンパクやDNAの立体構造は不安定で、ゲルの中でタンパクやDNAの結合が解離してしまう可能性もある。そこで全反応を簡便に試験管内で行う方法を開発する。

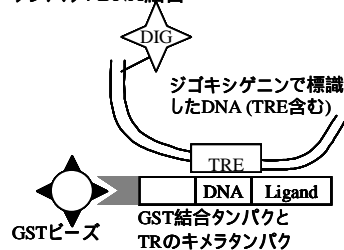
測定原理を右に示す。GST結合タンパクと受容体や共役因子のキメラタンパクを作製し、GSTビーズに吸着させる。ここへDNAやタンパクを結合させる。タンパクやDNAの標識はジゴキシゲニンで行い、化学発光法によって定量的にジゴキシゲニンを検出する。上述のように、化学物質が受容体に作用すると、タンパク間結合のみならずタンパク-DNA結合にも影響するが、このシステムであればいずれの作用にも対応できる。また、短時間で多量のサンプルの処理も可能である。

アッセイ流れを簡単に下に示した。右のようなタンパク間やタンパク・DNA結合に及ぼす化学物質の作用は、反応液中に化学物質を添加することにより簡単に調べることができる。物理的に強い刺激を加えないため、結合がたとえ脆弱であっても検出が可能である。

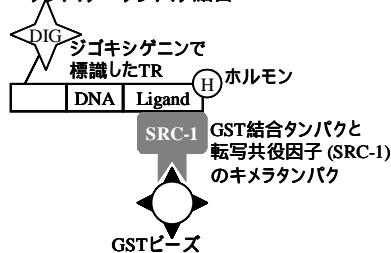


スクリーニング系の原理

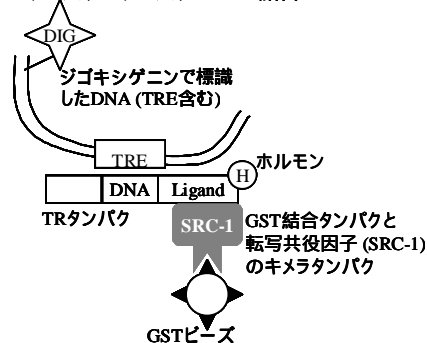
タンパク-DNA結合



タンパク-タンパク結合



タンパク-タンパク-DNA結合



課題6 化学物質の胎盤内分泌機能への影響を考慮した生殖発生毒性評価

研究者：大阪大学大学院 薬学研究科

中西 剛（代表研究者）

研究目的：*in vivo*生殖発生毒性評価は、主に齧歯類などの実験動物を用いて行われているが、齧歯類とヒトでは妊娠期間が異なる上、毒性の対象が母体-胎盤-胎児複合体といった多様な作用部位であることから、他の毒性試験よりもヒトへの毒性の外挿が困難である。中でも妊娠期間のみに存在する臓器である胎盤は、胎児の器官形成等に必要不可欠な種々のホルモン等を供給する第二の視床下部・下垂体・性腺複合体としての機能を有していることから、化学物質の生殖発生毒性における標的臓器になる可能性が考えられる。特にヒトにおいて胎盤は、妊娠期間中の主要なエストロゲン産生臓器であり、妊娠の維持や胎児へのローカルなエストロゲン供給に必要不可欠な臓器であるが、このことは化学物質のヒトにおける内分泌かく乱作用を議論するにあたり、胎盤がその標的臓器として無視できないことを示唆している。現に、胎盤からのエストロゲン供給が行われない胎盤性アロマターゼ（アンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素）欠損症の女児においては、仮性半陰陽（女児にペニスが形成される症状）を誘発することからも、その重要性が窺える。その一方で、齧歯類の胎盤はアロマターゼを有しないために、エストロゲン合成を行うことができない。齧歯類のエストロゲン産生は非妊娠時と同様に卵巣で行われ、胎児へのエストロゲンの供給はエストロゲンが卵巣から母体血に移行した後に、胎盤を経由して供給される。また齧歯類の胎盤は、ヒトのそれとは逆に妊娠期間中の主要なアンドロゲン産生臓器であり、また齧歯類の妊娠維持には胎盤からのアンドロゲン産生が重要であるとも報告されている。アンドロゲン合成酵素であるCYP17（ヒトの胎盤には存在しない酵素）のホモ欠損マウスは妊娠初期に胎生致死となることから、齧歯類においては胎盤でのアンドロゲン産生が重要であることが窺える。このように発生段階において、胎盤の内分泌機能が非常に重要であることは哺乳動物で共通してはいるものの、その機能や産生されるホルモンは種によって全く異なっている。特に内分泌かく乱化学物質問題においては、『女性化か？男性化か？』、また『エストロジェニックな作用か？アンドロジェニックな作用か？』というホルモン作用の二極化が議論の焦点になることから、化学物質の生殖発生毒性評価においては、胎盤への影響についてはもちろんのこと、その種差についても十分に考慮する必要がある。そこで本研究では、化学物質の生殖発生毒性における標的臓器として胎盤に焦点を絞り、胎盤機能修飾が与える胎

児への影響を検討することで、生殖発生毒性に関する上記問題の解決を試みる。

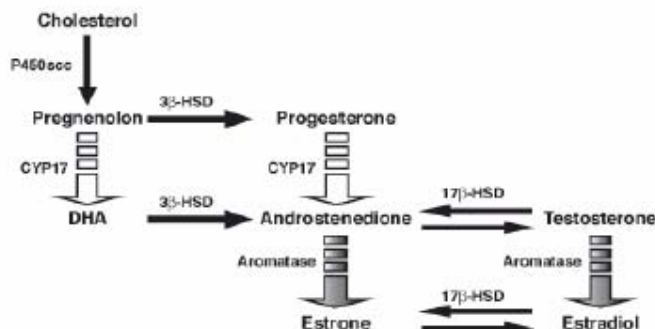


図1: コレステロールからエストロゲンまでの合成経路

齧歯類を用いた *in vivo* 生殖発生毒性評価には、前項で述べたような問題があると考えられるが、実際はこれらの動物実験の結果に安全係数を掛けることで、ヒトにおける被験物質の安全性領域を算出しているのが現状である。しかしながら、被験物質の標的部位が胎盤の内分泌機能であった場合には、動物実験の結果から得られた結論は、必ずしもヒトにおける安全性を保証しているとは言い難い。すなわちヒトの胎盤には存在せず、齧歯類の胎盤に存在するような機能（アンドロゲン産生能など）に影響を与えるような化学物質では、毒性が過大評価される可能性があり、逆に齧歯類の胎盤には存在しないが、ヒトの胎盤には存在する機能（エストロゲン産生能など）に影響を与える化合物においては、毒性が過小評価される可能性が考えられる。さらに化学物質によっては、齧歯類の胎盤ではアンドロゲン産生を上昇させる作用を有するが、ヒトの胎盤ではエストロゲン産生を亢進させるといった、全く逆の影響を与えるものも存在するかもしれない。一方で、核内受容体は、リガンド誘導性転写因子であり、ステロイドホルモン等の脂溶性リガンドの情報を受け、特定の標的遺伝子群の発現を転写レベルで制御する。またこれらの内因性脂溶性リガンドは、それぞれの産生及び代謝をお互いに制御し合うことによって、ホメオスタシスを維持していると考えられる。このことは胎盤の内分泌機能にも核内受容体が関与し、化学物質がERやARのリガンドとして作用しなくとも、他の核内受容体リガンドとして作用すれば、結果的にエストロゲンやアンドロゲンの産生に影響を与えることで内分泌かく乱作用を示す可能性を示唆している。しかしながら、核内受容体のヒトおよび齧歯類胎盤の内分泌機能に対する作用機構は、不明な点が多い。そこで当該年度は、さまざまな核内受容体リガンドのヒトおよびラット胎盤内分泌機能

に対する影響を検討し、ステロイドホルモン産生に対する影響の違いについて検討を行う。また、既にヒト胎盤でエストロゲン産生を亢進することが明らかとなっている、retinoic acid receptor (RAR) リガンド (レチノイン酸など)、およびPPAR / RXRのデュアルリガンドである有機スズ化合物などを妊娠ラットに投与し、ステロイドホルモン産生系への影響について比較検討を行う。レチノイン酸は、既に齧歯類およびヒトの双方において催奇形成が認められている化学物質であるが、レチノイン酸の胎盤内分泌機能に対する影響の違いにより、そのフェノタイプも異なる可能性が考えられる。一方で有機スズ化合物は、雄性化を引き起こす疑いのある代表的な化学物質であるが、申請者らの研究成果により、ヒト胎盤のアロマターゼ発現を上昇させることで、エストロゲン産生を亢進する作用を有することが明らかとなっている。また先述の通り齧歯類の胎盤にはアロマターゼが存在しないことから、齧歯類の胎盤内分泌機能に対する有機スズ化合物の作用も、ヒトとは異なる可能性が考えられる。このように本研究では、核内受容体リガンドや既知の内分泌かく乱化学物質を用い、これらの動物種の胎盤に対する作用の違いを検討することで、申請者が警鐘している *in vivo* 生殖発生毒性評の問題点をより明確に示すことが出来るものと期待している。

これまでの取組：これまでに申請者は、ヒト絨毛細胞株を用いて、様々な化学物質による胎盤内分泌機能への影響について検討を行ってきた。その結果、アロマターゼ活性を阻害することで雄性化を引き起こすとされていた有機スズ化合物が、ヒトの胎盤においてはアロマターゼなどのエストロゲン合成酵素のmRNA発現を上昇させることで、エストラジオール産生を亢進することを明らかにした。本結果は、腹足類で予測されてきた作用とは全く逆であったことから、NHKのニュース7や新聞等にも取り上げられて社会的にも注目を集めた。さらに申請者は、有機スズ化合物がビタミンAの代謝物をリガンドとする核内受容体RXRのリガンドとして作用することで、先述の作用が誘導されることを明らかにした。また申請者は、有機スズ化合物がアロマターゼの他に齧歯類には存在しない性腺刺激ホルモンであるヒト絨毛性ゴナドトロピンの産生を上昇させる上、脂肪細胞分化や胎盤形成に重要な核内受容体であるPPAR のリガンドになることも明らかにした。以上の結果は、ヒトと齧歯類の間に存在する種差の部分に影響を与える化合物が現に存在することを示しており、有機スズ化合物のような作用点を有する化学物質の *in vivo* 発生毒性評価は、齧歯類を用いた検討では不十分であることを示唆するものである。このような背景から、申請者は、胎盤でのアロマターゼ発現上昇に伴う影響を検討するため、齧歯類の胎盤特異的プロモーター制御下で

アロマターゼを発現するトランスジェニックマウスを現在作成中である。本マウスの解析については、次年度以降、鋭意遂行していく予定である。しかしながら、トランスジェニックマウスは、すべてのラインが胎盤でのみ目的遺伝子が発現するわけではなく、胎盤以外の臓器でも発現する場合（発現のリーク）がある。さらにトランスジェニックマウスの解析は、多大な労力と時間を要するため、本研究の目的を達成できるほど、多種多様な分子の発現変動に伴う胎児のフェノタイプを解析することは不可能である。したがって、本研究の究極的な目的達成のためには、*in vivo*において確実かつ簡便に胎盤だけに遺伝子発現をさせる手法を開発し、化学物質によって変動が認められた任意の遺伝子が発現させることで、その影響を検討できる評価法の確立が必要不可欠である。これについては、アデノウイルスベクターやレンチウイルスベクターを用いた手法を模索中である。以上、このように胎盤の種差を十分かつ系統的に考慮した検討は、今後の生殖発生毒性学研究に大いに貢献できるものと確信している。

研究概要：

<平成17年度>

当該年度は、胎盤内分泌機能の種差による生殖発生毒性評価の問題点とその作用機構を明確に証明するために、レチノイン酸を初めとする核内受容体リガンドや、既に、ヒト胎盤のエストロゲン産生を亢進することが明らかとなっている有機スズ化合物であるTBTおよびTPTを用い、これらの化合物による胎盤ステロイドホルモン産生への影響について以下の検討を行う。また実験材料としては、代表的なヒト胎盤モデル細胞でヒト絨毛細胞株であるJEG-3細胞と、代表的な齧歯類の胎盤モデル細胞でラット絨毛細胞株であるRcho-1細胞を用いる。*in vivo*における検討には、妊娠マウスまたはラットを用いる。

ヒト絨毛細胞株のホルモン産生系に与える核内受容体リガンドの影響

先述のとおり核内受容体は、ステロイドホルモン等の内因性脂溶性リガンドの産生及び代謝をお互いに制御し合うことによって、ホメオスタシスを維持していると考えられる。したがって任意の化学物質が、ERやAR以外の核内受容体を介する作用を有する場合には、それらの化学物質により少なからず内分泌かく乱作用が誘導される可能性が考えられる。しかしながら、核内受容体のヒトおよび齧歯類胎盤の内分泌機能に対する作用機構は、未だ不明な点が多い。そこでまず各種核内受容体リガンドを用いて、胎盤ステロイドホルモン産生系に対する核内受容体の影響について検討を行う。各種核内受容体リガンドをJEG-3細胞に作用させて、図1に示すようなステロイドホ

ホルモン合成酵素のmRNA発現変動に与える影響をリアルタイムRT-PCRにより検討を行う。次に、顕著な変動が認められた化学物質について、mRNA変動がホルモン産生に与える影響について検討を行う。この際に検討するステロイドホルモンは、プロゲステロン、アンドロステンジオン、テストステロン、エストロン、エストラジオールである。

ラット絨毛細胞株のホルモン産生系に与える核内受容体リガンドの影響

動物実験で*in vitro-in vivo* 相関を確認する際には、その実験動物の細胞における変化を確認しておく必要がある。そこでラットの胎盤細胞についても同様の検討を行う。

in vivo における変動遺伝子群の検出

の結果を踏まえ、Rcho-1 細胞で変動が確認された遺伝子群が、*in vivo* においても変動するかを、および で変動が確認されたりガンドやレチノイン酸などを妊娠動物に投与して検討する。投与経路は、胎盤での直接的な影響を検討するため子宮内投与を予定している。また代表的な環境化学物質として有機スズ化合物についても同様に検討を行うが、こちらについては体内動態を検討した上で、投与経路を決定する予定である。

in vivo におけるステロイドホルモン産生への影響

の結果を踏まえ、胎盤において確認された遺伝子発現変動が、*in vivo* におけるステロイドホルモン産生に及ぼす影響を検討するために、有機スズ化合物を投与した妊娠動物の母体血、胎盤、胎児等を回収し、各ステロイドホルモン濃度を測定する。なお各ステロイドホルモン濃度の測定は、帝国臓器製薬メディカル株式会社に委託し、LC/MS を用いて測定する予定である。

<平成18年度以降>

前項でも述べたとおり、申請者らは有機スズ化合物やレチノイン酸などの胎盤内分泌機能への影響が、ヒトと齧歯類で異なることを想定し、既に胎盤におけるローカルなエストロゲン産生を亢進させたモデル動物（胎盤特異的にアロマターゼを発現するトランスジェニックマウス；Arom-Tg マウス）の作成に着手している。平成18年度以降は、本マウスについて胎盤形成や胎児の器官形成のみならず、成体マウスの生殖能や、神経系への影響、免疫系への影響や発ガン物質に対する感受性など、これまでに胎児期にエストロゲンを曝露することでその影響が表れていると考えられてきた毒性について、検討を行って行く予定である。

またArom-Tg マウスは、現在その影響が賛否両論であるエストロゲンの低用量問題をも解決出来る可能性がある。現在のところ、エストロゲン様化学物質の胎児期曝露影響の検討は、妊娠母体に外来的にエストロゲンもしくは

はエストロゲン様化学物質を投与することで行われている。しかしながらその場合には、必然的に母体血中のエストロゲン（またはエストロゲン様化学物質）濃度上昇をも伴ってしまうため、少なからず脳下垂体などに負のフィードバックや正のフィードバックがかかる。その結果、性腺刺激ホルモンやプロゲステロン等の産生が抑制され、妊娠維持におけるホルモンのホメオスタシス自体に影響が表れる結果、純粋なエストロゲンの胎児期曝露の影響を検討できない可能性が考えられる。その一方で、非常に低用量の被験物質を与えた場合には、十分量の被験物質が胎児に到達しない可能性がある上、元来食餌に混入している植物性エストロゲンなどの影響もあることから、その影響を判断し難いという問題もある。また低用量問題に付随して、子宮内位置による胎児への影響も提唱されているが、この問題についても賛否両論である。このような問題は、Arom-Tg マウスと胎盤が胎児由来臓器であることを利用して解決できると考えている。すなわちArom-Tg マウスにおいては、Tgの胎児の胎盤にのみエストロゲンを供給することから、野生型の雌マウスに、Arom-Tg 雄マウスを交配させることで検討可能であると考えられる。つまり母体は野生型であり、その同腹で野生型胎児（胎盤）とArom-Tgの胎児（胎盤）が存在することから、これらを比較検討することで、先述の問題を検証できると考えている。これまでにエストロゲンの胎児期における曝露影響は、エストロゲン受容体のトランスジェニックマウスや欠損マウスなどの遺伝子改変動物が用いられてきたが、おそらくArom-Tg マウスは、このような問題を最もクリアーに解決できる唯一のモデル動物になり得るものと期待している。しかしながらトランスジェニックマウスは、すべてのラインが胎盤でのみ目的遺伝子を発現するわけではなく、成体になるにつれて胎盤以外の臓器でも発現する場合（発現のリーク）がある。さらにトランスジェニックマウスの解析は、多大な労力と時間を要するため、今後アロマターゼ以外の多数の遺伝子発現変動について検討することは現実的に難しい。このような技術的問題を解決するために、今後はウイルスベクターの応用についても検討していく予定である。

課題7 燃烧排ガスに含まれる多環芳香族炭化水素類の内分泌かく乱作用の評価

研究者：金沢大学大学院 自然科学研究科 環境衛生化学、環境化学
早川和一（代表研究者）、鳥羽 陽、唐 寧

研究目的：これまで専ら発がん性が論じられてきた PAH および NPAH について、最近エストロゲン様/抗エストロゲン作用や抗アンドロゲン作用を有することが明らかになってきた。本研究では、PAH、NPAH、およびこれらから環境中であるいは体内で代謝されて生成する関連化合物について、それぞれの活性の強さと大気環境やヒト曝露量を求め、これらから活性等価係数や活性等量の試算することにより、内分泌かく乱作用の観点から PAH、NPAH のリスクを評価する。ヒトの呼吸による PAH、NPAH 曝露量はダイオキシン類の1万倍以上と推定されるが、その内分泌かく乱作用のリスクは不明である。本研究により、この点から初めて PAH、NPAH のリスク評価がなされ、今後の環境施策に有用な知見が提供できる。

これまでの取組：

1 . PAH、NPAH の内分泌かく乱作用

ディーゼル粉塵の可溶性分画がエストロゲン様/抗エストロゲン作用、抗アンドロゲン作用を示すことを発見。これらの作用を示す本体として、ディーゼル粉塵などの燃焼粉塵に含まれる PAH およびその水酸化体がエストロゲン様/抗エストロゲン作用、NPAH およびその還元体（アミノ体、ニトロソ体）類が抗アンドロゲン作用を示すことを見出した。これらの作用発現における構造活性相関を解析した。

2 . PAH、NPAH の分析法

PAH および NPAH の超高感度分析法を世界に先駆けて開発した。これを用いてこれまでに PAH、NPAH およびこれらが吸着する浮遊粒子の発生源と大気内挙動に関する多くの事実を明らかにした。排出粉塵中の PAH に対する NPAH の濃度比（ $[NPAH]/[PAH]$ ）が燃焼温度依存的に増加し、この値から主要発生源の同定と寄与率の推定が可能なことを見出した。これを用いて、わが国の都市大気中 PAH、NPAH の主要排出源は自動車であり、中国、ロシア沿海州地方の都市の主要排出源は石炭燃焼施設であることを明らかにした。殆ど自動車（ディーゼル車）から排出される 1-ニトロピレン

の代謝物である 1-ヒドロキシニトロピレンを対象に、HPLC/化学発光検出法を用いた超高感度分析法を開発し、NPAH 代謝物をヒト尿から測定することに世界ではじめて成功した。このことは、1-ニトロピレン代謝物がディーゼル排ガスの特異的なバイオマーカーであり、ヒトに対するディーゼル排ガス曝露量の現在唯一の評価法であることを示している。

3 . PAH、NPAH の代謝物分析法

ヒト代謝物として尿中の PAH 水酸化体 10 種類を同時測定可能な高感度分析法を開発した。PAH 代謝物の排泄量パターンにより曝露量だけでなく、曝露起源の特定や寄与率の測定もできる可能性が示された。

4 . PAH、NPAH の個人曝露評価

2-ヒドロキシフルオレンが喫煙の特異的なバイオマーカーであることを見出した。タイ山村住民に、尿中 PAH 代謝物濃度がタイの都市域住民や欧米人に比べてはるかに高い例が多く見られ、換気設備のない室内で薪を燃やすことによる深刻な室内空気汚染によることを見出した。これより、先進国だけでなく、発展途上国における曝露評価の重要性も明らかになった。

研究概要：

[平成17年度]

1 . PAH、NPAH 類の活性等価係数の測定

これまでに行ってきた研究結果に基づき、次の計画で研究を進める。

2~7 環構造を有する PAH (約 30 化合物) およびその代謝関連化合物 (水酸化体、キノン体: 約 80 化合物) について、主に酵母 two-hybrid 法および MCF-7 培養細胞 E-スクリーンテストを用いて、エストロゲン様/抗エストロゲン作用の強さを測定する。エストロゲン様および抗エストロゲン作用の陽性対象はそれぞれエストラジオールとタモキシフェンを用い、測定対象化合物の作用の強さを表す相対値 (活性等価係数) を求める。

2~6 環構造を有する NPAH (約 30 化合物) およびその代謝物 (アミノ体、アセチルアミノ体、ニトロソ体) について、主に酵母 two-hybrid 法および PC3/AR 培養細胞を用いてアンドロゲン様/抗アンドロゲン作用の強さを測定する。アンドロゲン作用の陽性対象としてジヒドロテストステロン、抗アンドロゲン作用の陽性対象としてサイプロテロンアセテートをそれぞれ用い、作用の強さを表す相対値 (活性等価係数) を求める。

2~7 環構造を有する PAH の代謝物 (水酸化体: 約 70 化合物) について、上記と同様な方法で、アンドロゲン様/抗アンドロゲン作用の強さを表す相対値 (活性等価係数) を求める。

[平成18年度以降]

1. PAH、NPAH 類の活性等価係数の測定

前年度の研究を継続して、対象とする PAH、NPAH および関連化合物全てについて、エストロゲン様、抗エストロゲン作用およびアンドロゲン様、抗アンドロゲン作用の基づく活性等価係数を求める。

試験した PAH、NPAH および関連化合物の構造と物理化学的特性をコンピュータソフト (CACHe) で計算し、これら試験化合物およびレセプターの構造と活性の相関を解析し、構造活性相関のシミュレーションを行う。

2. ヒトの PAH、NPAH 類の曝露量測定

標準大気・室内空気環境ならびに特殊環境、排出ガス中の PAH、NPAH を HPLC/蛍光検出、HPLC/化学発光検出を用いて開発した方法で測定する。

(尚、これまでの研究で得られた高 PAH 大気例として中国瀋陽の大気、高 NPAH 大気例として札幌の大気、また室内汚染例として煙草煙などの測定結果を利用する。)

現在開発中の、ヒトの PAH、NPAH 曝露量を尿中排泄代謝物量から測定する方法を完成させる。但し、PAH については水酸化 PAH10 化合物を、NPAH については 1-ニトロピレンの 3-、6-、8-水酸化体を測定対象とする。上記で完成した測定法を用いて、大気・室内空気中 PAH、NPAH 濃度と住民の尿中排泄量との相関性を明らかにし、尿中排泄量から曝露量を推定する式を求める。

3. PAH、NPAH 類の活性等量とリスク評価

PAH、NPAH 類の活性等価係数と PAH、NPAH のヒト曝露量、若しくは大気・室内空気中濃度の積から PAH、NPAH 類の仮想活性等量を算出する。

上記の結果より、大気・室内空気環境中の PAH、NPAH のリスク評価を行うとともに、主要排出源の寄与を明らかにする。