

## 基盤的研究及び野生生物の生物学的知見研究の結果概要

基盤的研究、野生生物の生物学的知見研究、フィージビリティースタディー及びその他の研究として実施された研究課題の成果概要を実施目的ごとにまとめた。

### 1. 野生生物における異常の実態把握

#### 1. 1. 雌雄同体性魚類の性の可塑性と社会構造に関する研究(須之部友基)

魚類における雌雄同体個体の生態系への影響をさぐることを目的とした。

平成 17 年度に野生生物の生物学的知見研究として採択し、平成 18 年度まで実施し、当初予定の研究期限前に終了した。

アオギハゼの生殖腺構造はオキナワベニハゼと同様に卵巣と精巣を同時に有するもので雌から雄、雄から雌への双方向性転換が示唆された。雄は雌に比べサイズが大きかった。

#### 1. 2. 魚食性猛禽類「ミサゴ」の生態とその食物連鎖に関する基礎的研究(千葉啓子)

準絶滅危惧種の魚食性猛禽類ミサゴの生態を明らかにすることを目的とした。

平成 20 年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成 21 年度も実施中。

調査地を含む北上川沿いに生息するミサゴの繁殖状況は現在のところ良好で、年平均 2~3 羽のヒナを巣立たせていた。ダム近傍に生息するミサゴつがいも近年 2~3 羽のヒナを巣立たせた。ダム近傍で繁殖するミサゴつがいの育雛後期から巣立ち以降の行動圏は、もっぱらダム湖面を使っており、ダム湖内に生息する魚類を捕獲していた。

### 2. 野生生物における異常をもたらす原因の解明

#### 2. 1. アカトンボ減少傾向の把握とその原因究明(上田哲行)

アカトンボ類の減少原因を明らかにすることを目的とした。

平成 18 年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成 20 年度から野生生物の生物学的知見研究として実施中。

石川県野々市町で実施した同一水田からのアキアカネ羽化数調査の結果、羽化数は 18 年前の約 1/100 であった。また、同じく石川県白山で行われた夏季のアキアカネ個体数センサスでも 8 年前の調査に比べて著しい減少が確認された。一方で、減少傾向の地域差の存在も明瞭になった。

実際の圃場の水管理を再現したライシメータを使った実験から、フィプロニルとイミダクロプリドを有効成分に含む箱施用浸透性殺虫剤がアキアカネの幼虫生存率及び

羽化に及ぼす影響が明らかになった。特に、フィプロニルを有効成分とする箱施用殺虫剤の使用がアキアカネ幼虫の大きな減少を招くことが示唆されたが、アカトンボ類の減少は長期的にも生じていると考えられ、特定の農薬による単一の要因に帰するには至らなかった。

アカトンボ類の減少には、浸透性殺虫剤以外にも複数の要因が同時に働いている可能性も大きいため、多数の同一水田について1年を通じた継続調査を行ったところ、浸透性殺虫剤に加えて、中干しの影響を示唆する結果が得られた。

## 2. 2. 底生甲殻類の成長や成熟に見られる異常のスクリーニングと環境の影響評価に関する研究(三枝誠行)

底生甲殻類における地域個体群の正常な生殖や成長に関する知見をもとに、正常な範囲を逸脱する生殖や成長の実態を把握し、その原因となる環境因子を究明することで、内分泌変化による形態や発生異常の発現機構を解明することを目的とした。

平成21年度にフィージビリティースタディーとして採択し、実施中。

笠岡湾の干潟に生息するアナジャコ (*U. major*) の‘雄’には、非常に高率で第1腹肢が生えていることを発見した。これら雄の第1腹肢は、雌の第1腹肢のように担卵毛が見られず、形態的にも単純化していることから、奇形の1種とみなしてよいであろう。このような奇形が笠岡湾で有意に高いのは、環境と関連する因子が作用していることを示唆した。

## 2. 3. 東京湾における生態系かく乱の実態解明とその要因解析(堀口敏宏)

内分泌かく乱化学物質の関与が疑われるわが国沿岸の生態系の変化を解明し、その要因について詳細に解析を行うことを目的とした。

平成18年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成20年度に野生生物の生物学的知見研究として実施し、当初予定の研究期限前に終了した。

東京湾の底棲魚介類は、1曳網当りの魚介類の個体数が依然低水準である一方、板鰓類(サメ・エイ類)とスズキが多いために1曳網当りの魚介類(とりわけ、魚類)の重量が大きかった。種別に見るとイッカククモガニとムラサキイガイが顕著に増大し、板鰓類とスズキを除くその他の種で減少が顕著であった。

東京湾の18地点で採取した底質を対象に942種の化学物質を調査した。その結果、120物質を検出した。検出物質を発生源分類した結果、主要な発生源は家庭や商業活動によるもので工業由来の寄与率は1～2割であった。特に、高濃度で検出されたのはステロイド類であり、湾周辺の人口の影響を強く反映した結果と考えられた。

スズキの可食部(筋肉)の重金属濃度には経年変化は認められず、また非必須金属と考えられるHg及びCd濃度は、従来の報告値と比べて大きな差が認められなかった。

## 2. 4. 両生類の性ホルモン様物質ばく露による精巣卵形成についての研究(高瀬稔)

地方により野外トノサマガエルに見られる精巣卵の出現率の違いが、遺伝的な地方変異によるのか、化学物質の影響に起因しているのか、もしくはその両方を反映して

いるのか、を確かめることを目的とした。

平成 19 年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成 20 年度まで実施し、終了した。

富山県の野外トノサマガエルに観察される精巣卵の形成には、化学物質を含めた何らかの環境要因が起因していることが考えられた。また、生殖腺の異なる発達過程において、テストステロン・プロピオネート(TP)及びビスフェノール A(BPA)、ノニルフェノール(NP)が精巣卵形成を誘導することが明らかになった。

エストラジオール・ベンゾエイト(EB)処理では精巣卵形成は誘導されなかったことから、両生類における精巣卵形成の誘導における BPA 及び NP の作用は、エストロゲン様作用によるものではなく、アンドロゲン様作用、もしくは独自の作用によることが考えられた。

## 2. 5. 農薬がシャジクモ類減少の一因である可能性に関するフィージビリティースタディー(山室真澄)

1950 年代半ばに使用されていた除草剤がシャジクモ類の衰退の要因である可能性を検討するとともに、それ以外の要因や、シャジクモ類衰退以前の繁茂状況の復元や、生態系に与えた影響について検証することを目的とした。

平成 18 年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成 18 年度に実施し、終了した。

シャジクモ類の一種 *Nitella flexilis*(ヒメフラスコモ)を材料に、CO<sub>2</sub>を基質とする光合成酸素発生速度に対する農薬 2,4-D、PCP(Pentachlorophenyl sodium salt)、MCP(A) (4-chloro-2-methylphenoxy acetic acid) 及びそれらの誘導体の影響を調べた結果、いずれの阻害剤も 10<sup>-6</sup>M までは影響が無かった。しかし、それ以上の濃度では、いずれの阻害剤も濃度依存的に阻害効果が現れ、水田における当該農薬の濃度に比較して 100~1,000 倍程度高いと考えられる 10<sup>-5</sup>M においては、2,4-D 及び MCP においては阻害 0%、PCP では 60%、ジウロン(DCMU)では 100%の阻害効果が見られた。10<sup>-3</sup>M においては、MCP、2,4-D、PCP において、それぞれ 75%、65%及び 25%の阻害効果が見られた。

## 2. 6. シャジクモ類の衰退要因解明に向けた環境負荷化学物質の影響に関する生理・生態学的研究(白岩善博)

生理実験並びにフィールドでの生態・生育状況の調査の結果を総合して、シャジクモ類衰退の原因、原因物質を特定することを目的とした。

平成 19 年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成 21 年度から野生生物の生物学的知見研究として実施中。

シャジクモの衰退要因の一つとして、1950 年代に多く使用されていた PCP が低濃度でシャジクモの光合成を阻害し、それが生育障害を引き起こし、その結果、シャジクモ類の衰退要因の一つとなった可能性が十分考えられた。環境の改善やシャジクモ類衰退の要因となった農薬の使用停止により、生育に適した環境が復元され、いくつかのフィールドでシャジクモ類の復元に繋がった可能性が高いことが認められた。

実験室における培養試験結果として、ビスフェノールA、フタル酸ジ-n-ブチル及びフタル酸ジエチルは、シャジクモの成長を阻害しなかった。

### 3. 野生生物における異常をもたらすメカニズムの解明

#### 3. 1. 沿岸域を中心とした湖沼生態系かく乱の実態とそのメカニズムの解明(花里孝幸)

諏訪湖流入河川水中において、水生生物に影響を及ぼしている毒性物質の流出源とその流出特性を解明することを目的とした。

平成17年度に野生生物の生物学的知見研究として採択し、平成19年度まで実施し、当初予定の研究期限前に終了した。

諏訪湖湖心と諏訪湖の流入河川で水中の農薬濃度の季節変化を調べた結果、数種類の殺虫剤、除草剤、殺菌剤が検出されたが、その濃度は、多くの場合、ppbレベルよりも低かった。ミジンコを用いて環境水の毒性を調べた結果、初夏と秋に毒性のピークが観察された。初夏のピークは農薬の濃度ピークとほぼ一致したが、秋の毒性ピーク時には農薬の濃度は高くなかった。湖心よりも沿岸域の濃度が高く、農薬が沿岸から沖帯にかけて拡散していることが示唆された。しかし、沿岸域の水草帯の中は濃度が低く、他の水界と環境が異なることがわかった。

河川水中の農薬の流出源や特性を諏訪湖流入河川で調査し、河川水の毒性をミジンコを用いて推定した結果、農薬の流出量は、耕地面積の広さに依存したが、流出水のミジンコに対する毒性は顕著には見られなかった。

### 4. 環境中濃度の実態把握及びばく露の測定

#### 4. 1. 魚介類におけるダイオキシン類蓄積量の比較(門上希和夫)

魚類体内に蓄積されたダイオキシン類濃度の把握を目的とした。

平成17年度に野生生物の生物学的知見研究として採択し、平成17年度に実施し、終了した。

ギンブナのダイオキシン類のTEQ濃度は、湿重量換算で0.059~1.2 pg-TEQ/g wet(平均:0.57 pg-TEQ/g wet)、脂肪換算では7.0~81 pg-TEQ/g fat(平均:47.5 pg-TEQ/g fat)であった。リモート地のTEQ濃度は、他より有意に低かったが、大都市、中小都市及び農業地域ではグループによる差は見られなかった。

#### 4. 2. POPs及び候補物質による日韓沿岸及び近海の野生生物汚染の実態解明(田辺信介)

既存のPOPs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臭素系難燃剤など新たな環境化学物質の汚染実態・ばく露量調査・蓄積特性等の把握を目的とした。

平成17年度に野生生物の生物学的知見研究として採択し、平成18年度からその他の研究として実施中。

日本産カキ及びイガイのポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)濃度は国際的に比較すると低いレベルであり、北米や韓国と比べ5~10倍低い濃度であった。北米及び

韓国で検出された高濃度のPBDEsはこれら地域におけるPBDEs製剤の継続的使用を示しており、日本の低いPBDEsのレベルは業界の自主規制により約10年前から使用量が減少していることを反映していると考えられた。ヘキサブロモシクロドデカン(HBCDs)濃度は、これまで報告されている中で最も高い値(0.3~10 ng/g 湿重当たり)であった。このHBCDs濃度はそれに続く韓国産イガイやオランダ産イガイより10~100倍高値であった。日本は、アジア地域における年間HBCDs需要量の半数(約2,000t)を使用していることが報告されており、わが国でHBCDs汚染が顕在化していることを裏付けていた。

分析したすべてのカワウ試料からBFRsおよびPCBsが検出され、雛鳥、幼鳥、成鳥、胃内容物ともにPCBs > HBCDs > PBDEsの濃度順位であった。本研究により初めて、日本の鳥類のHBCDs汚染を明らかにした。すべての物質で体長増加にともなう濃度上昇がみられ、年齢蓄積性が示唆された。胃内容物の濃度と胸筋濃度から生物濃縮係数(BMF)を算出した結果、PCBs(13) > PBDEs(8) > HBCDs(3)の順であった。

## 5. 試験生物に悪影響をもたらすメカニズムの解明

### 5. 1. ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニズムの解析(井口泰泉)

化学物質ばく露からオス産生に至るまでの作用メカニズムを解明することにより、enhanced TG211を分子レベルからサポートすることを目的とした。

平成17年度に基盤的研究として採択し、平成18年度からその他の研究として実施中。

幼若ホルモン様化学物質をばく露したミジンコにおける遺伝子の発現量を網羅的に解析することにより、幼若ホルモン様化学物質により発現が変動する遺伝子群を明らかにした。また、これらの遺伝子をショウジョウバエなど他種の生物の遺伝子と比較し、一連のオス化への分化を誘導する基幹遺伝子を同定した。

### 5. 2. 無脊椎動物幼若ホルモン受容体の探索と作用機構の解明(鏑迫典久)

ミジンコを用いて幼若ホルモンレセプターの探索を行い、精製単離し、分子構造を明らかにすることを目的とした。

平成18年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成18年度に実施し、終了した。

核内タンパク質の中には幼若ホルモンと結合するものは検出できなかった。

### 5. 3. 無脊椎動物(アミ類)における生殖・発生異常とその発生メカニズム(古賀実)

内分泌かく乱作用の疑われている化学物質による甲殻類(アミ類)の発生・脱皮・生殖に関与する内分泌調節機構に対する影響を評価することを目的とした。

平成21年度にフィージビリティースタディーとして採択し、実施中。

環境中存在濃度に近い濃度(1 µg/l以上)のノニルフェノール(NP)はアミの成長阻

害を引き起こした。NP 曝露によりアミの脱皮が顕著に抑制され、それに伴い環境中存在濃度に近い濃度において成長及び成熟の遅延が誘起されることが示唆された。

#### 5. 4. メダカの生殖内分泌系に及ぼす化学物質の内分泌かく乱作用の作用メカニズムに関する研究(長濱嘉孝)

化学物質にばく露されることによって起こる性転換(個体レベルの変化)がどのような分子、細胞メカニズムによるものであるのかをメダカを用いて解析することを目的とした。

平成 17 年度に基盤的研究として採択し、平成 21 年度まで実施する。

メダカの XY 稚魚は、ジエチルスチルベストロール (DES) に対して高い感受性を示すこと(性転換を起こし機能的な卵巢を形成させる)、さらに、XY 稚魚における DES の影響は、1) 雄型遺伝子の発現を完全に抑制すること、2) DES は生殖腺に直接作用して卵巢の分化と形成を促進する、と推察された。一方、XX 稚魚では、DES 処理は卵巢分化、形成には大きな影響は及ぼさないが、1) DES は内因性の芳香化酵素遺伝子 (*Cyp19a1*) の発現を抑制すること、2) DES は生殖腺に直接作用して卵巢の分化と形成を促進する、ことが明らかになった。また、DES は *dmy* の発現に影響を与えないと結論された。一方、*gsdf* の発現は DES 処理によって著しく影響されることが確認された。XY 生殖腺の体細胞では *dmy* が発現することで *gsdf* の発現が誘導され、その後さらに *dmrt1* が発現し、これらの働きで精巢が形成され、精子形成が徐々に進行すると推察された。*gsdf* と *dmy* が同一の体細胞(セルトリ細胞)で発現することが明らかになったことから、*gsdf* は *dmy* 直下に働く重要な標的遺伝子である可能性が高まった。また、*gsdf* の精巢形成における重要性は、この遺伝子のノックダウンにより XY 個体でも卵巢が形成されたことから明確に示された。一方、XY 生殖腺でも DES で処理することで、*gsdf* (*dmy* の発現は抑制されない) の発現が急激に抑制され、また飼育水中に DES が存在することで、本来精巢が形成されるはずの XY 生殖腺で卵巢が形成されると推察された(DES 存在下では *Cyp19a1* の発現はまったく認められない)。XX 個体でみられる DES 処理の顕著な影響は、本来ならみられる筈の *gsdf* の発現が認められないことである。DES は稚魚期の雌雄生殖腺に作用して内因性の *Cyp19a* の作用は介さずに雌性化作用を促進することが明らかになった。DES は、XY 稚魚での *gsdf* の発現、及び XX 稚魚では *Cyp19a1* の発現を、それぞれ抑制した。

ノニルフェノールに関しては、生殖細胞への影響はほとんど認められず、一部の XY 個体で生殖細胞数にわずかな増加が観察された程度であった。マイクロアレイ解析では、XY 個体の生殖腺でいくらかの遺伝子の発現が促進されたが、その場合にも、エストラジオール-17 $\beta$  処理や DES 処理の際に認められる雌特異的遺伝子(*Figa*、*Zona pellucida genes*、*Scp3*、*42Sp43*、*42Sp50*)は含まれていなかった。

#### 5. 5. ステロイド膜受容体を標的とした化学物質の内分泌かく乱作用に関する研究(徳元俊伸)

化学物質のノンゲノミック作用がどの程度の危険性をもったものなのか明らかにす

ることを目的とした。

平成 19 年度にフィージビリティスタディーとして採択し、平成 20 年度まで実施し、終了した。

内分泌かく乱作用を有すると疑われる 64 物質についてステロイドホルモンの結合阻害実験を行った。フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジヘキシル、シペルメトリン、ニトロフェン、*p, p'*-DDD 及びメトキシクロルの 6 物質が有為な結合親和性を示した。特に *p, p'*-DDD 及びメトキシクロルの 2 物質については天然のホルモンである 17, 20  $\beta$ -DHP に匹敵する強い結合親和性をもつことが明らかになった。

キンギョ mPR $\alpha$  に親和性を示した 6 物質について卵母細胞を用いた影響評価を行った。シペルメトリンを除く 5 物質に有為なキンギョ卵成熟阻害活性がみられた。この内、ステロイド結合実験で強い結合親和性を示した *p, p'*-DDD 及びメトキシクロルの 2 物質についてはこの試験でも最も強い阻害活性を示した。

*p, p'*-DDD 及びメトキシクロルについて、ゼブラフィッシュ生体を用いた影響評価を行った。*p, p'*-DDD は卵成熟誘起ホルモンと同時に添加した場合にも *in vivo* の卵成熟・排卵に対する阻害効果を示した。卵成熟は阻害されなかったものの終濃度 1 nM においても排卵が顕著に抑制され、産卵も抑制された。一方、メトキシクロルはホルモンと同時に添加した場合は影響がみられなかったものの 24 時間前処理した場合には終濃度 10 nM において卵成熟・排卵が顕著に阻害され、産卵が抑制された。

## 5. 6. 野生生物のリスク評価を目指した核内受容体リガンドの網羅的解析法の開発(岩田久人)

野生生物の核内レセプターを潜在的に活性化・不活化する化学物質を調査すること及び多種多様な化学物質の野生生物に対する潜在的なリスクを評価するため、野生生物より単離した核内レセプター遺伝子を用いたリガンド解析法の開発を目的とした。

平成 18 年度にフィージビリティスタディーとして採択し、平成 20 年度から平成 21 年度まで基盤的研究として実施する。

バイカルアザラシ AHR が CYP1A を転写活性化する TCDD-EC<sub>50</sub> 値より、本種のダイオキシン類に対する潜在的な感受性は高いと推定された。また、バイカルアザラシ野生個体群の肝臓中ダイオキシン類蓄積濃度は、AHR を介して CYP1A1 が誘導されるレベルに達していることを示唆した。バイカルアザラシに高蓄積している有機塩素化合物は、*in vitro* レポーター遺伝子アッセイ系で本種 PXR を活性化しなかったことから、野生個体群で PXR シグナル伝達系かく乱の可能性は低いと考えられた。バイカルアザラシ肝臓では PPAR $\alpha$  を介して CYP4A が誘導されていること、さらに肝臓に蓄積している perfluorononanoic acid (PFNA) や perfluorodecanoic acid (PFDA) などの有機フッ素化合物 (PFC s) は PPAR $\alpha$ -CYP4A シグナル伝達系に影響することが示唆された。

AHR を介した CYP1A 転写活性化能に関して、クロアシアホウドリはニワトリに比べて低感受性の鳥種であると推測された。

表面プラズモン共鳴センサーチップの作製に成功した。

## 5. 7. 胎仔期、新生仔期の代謝機能と内分泌かく乱作用発現(太田茂)

胎児期、新生児期での化学物質ばく露による毒性影響を食物成分との関連で調べることを目的とした。

平成 17 年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成 18 年度から平成 21 年度まで基盤的研究として実施する。

主要な薬物代謝酵素である肝 CYP 及び肝可溶性酵素である A0 はラットでは胎仔期及び PND3 頃までほとんど活性が認められず、さらに約 4～5 週齢まで徐々に上昇していることを明らかにした。新生仔期(PND1-3)でも MC、PB、DEX のような CYP 誘導剤や、残留性塩素系農薬 DDT やフタル酸エステル類で CYP の特異的誘導が認められたが、誘導率は adult より低かった。

ラット及び近交系マウスは成長に従い CYP 活性が上昇し、特に離乳期における CYP1A 発現上昇が顕著であるが、精製飼料(pure diet:AIN-93G)で妊娠時より飼育すると成長後も CYP 活性が低値を継続することより、発達期における CYP 発現は一般飼料(normal diet)中の成分によって誘導を受けていることを明らかにした。

臭素化難燃剤である polybrominated diphenylether (PBDE)類及び生体内から検出されている水酸化 PBDE 類が甲状腺ホルモン受容体結合活性を示すことを見出した。動物用医薬品 biothirol ( $IC_{50}: 2.7 \times 10^{-7} M$ )及び closantel ( $9.8 \times 10^{-7} M$ )は、水酸化 PBDE より結合活性が高かった。

## 5. 8. 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(鯉淵典之)

核内受容体を介する転写に及ぼす環境化学物質の作用機構の解析、多種類の環境化学物質を効率よくスクリーニングするシステムの開発及び神経細胞膜に及ぼす環境化学物質の作用の解析を目的とした。

平成 17 年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成 18 年度から平成 21 年度まで基盤的研究として実施する。

臭素化化合物(ポリ臭素化ジフェニルエーテル、PBDE)をモデルに主にインビトロ実験系を用いて解析し、(1)低用量で TR 作用を抑制すること、(2)この効果は TR-DNA 結合解離によること、(3)TR の DNA 結合領域を介して作用することを明らかにした。

## 5. 9. 胎児期におけるエストロゲンシグナルの gain of function の影響(中西剛)

哺乳動物の胎児期におけるエストロゲン受容体(ER)を介したシグナルが、性分化や出生後の発育等に如何なる影響を与えるのかを解明し、エストロゲン様化学物質の胎児期ばく露によって引き起こされる発生毒性に、どの程度エストロゲン受容体を介したシグナルが関わっているのかを解明することを目的とした。

平成 17 年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成 18 年度から平成 21 年度まで基盤的研究として実施する。

ヒト胎盤細胞では RAR、RXR アゴニスト及び有機スズ化合物によりエストロゲン産生が有意に上昇したが、ラットの胎盤ステロイドホルモン産生にはほとんど影響を与え



なかった。

AromEGFP-TG マウス(器官形成期や性分化の時期のみのエストロゲンばく露の影響を検討できるモデルマウス)の構築に成功した。

エストロゲン濃度に子宮位置影響が無関係であることを確認することができた。

胎児期における過剰な ER シグナルは体重増加や生殖器官形成には本質的な影響を与えない可能性が示唆された。

## 5. 10. アラキドン酸代謝変動への影響からみた環境化学物質の内分泌かく乱作用機構の解析(原俊太郎)

アラキドン酸代謝変動への影響から環境化学物質の内分泌かく乱作用機構の解明を試みることを目的とした。

平成18年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成18年度に実施し、終了した。

PLA<sub>2</sub>活性を阻害する MEHP (Mono (2-ethylhexyl) phthalate) が、用量依存的に精子の受精能を抑制すること、異常卵割を誘導することが示された。また、DEHP (Di (2-ethylhexyl) phthalate) 処理した精子も異常卵割を引き起こした。

## 6. 新たな作用メカニズムの把握

### 6. 1. 精子に存在するホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 活性の阻害を介した環境化学物質の新たな内分泌かく乱作用機構に関する研究(原俊太郎)

環境化学物質が、精子に存在するホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) を阻害することにより、精子の受精能を抑制し、その結果、内分泌かく乱作用を示す可能性を明らかにすることを目的とした。

平成19年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成20年度まで実施し、終了した。

精子に存在する sPLA<sub>2</sub> アイソザイムのうち X 型 sPLA<sub>2</sub> が受精の過程で重要な役割を果たしており、フタル酸エステル類の代謝産物の1つ MEHP (Mono (2-ethylhexyl) phthalate) は、この X 型 sPLA<sub>2</sub> によるリゾホスファチジルコリンの産生を阻害することで、*in vitro* における精子の受精能を阻害することを明らかにした。ビスフェノール A、ノニルフェノールについても検討し、MEHP に比較すると弱いものの、ビスフェノール A にも X 型 sPLA<sub>2</sub> 活性を阻害し、*in vitro* における精子の受精能を抑制する作用があることを明らかにした。

### 6. 2. 化学物質誘発性のエピジェネティック修飾による DOHaD モデルの検証(大迫誠一郎)

胎生期の内分泌かく乱化学物質ばく露によるエピジェネティックな変化を各種の網羅的解析で実施、その結果からどのような環境要因に対して高感受性になりうるか予測し、さらに予測された環境要因刺激を加えて検証することで環境化学物質ばく露により引き起こされる次世代影響との因果関係を解明することを目的とした。

平成20年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成21年度も実施中。得られたデータでは、ビスフェノール A(BPA)の胎児期ばく露による生後のエピゲノムへの影響が残ったか否かは断定することができなかった。

## 7. 試験法開発に資する基礎的研究の実施

### 7. 1. 遺伝子導入メダカを用いた内分泌かく乱物質による生殖巣初期変化の把握と回復能力の検討(木下政人)

生殖細胞に存在する各種細胞を生きたまま容易に観察するために、それぞれの細胞種が蛍光タンパク質で標識化されたメダカ系統を作出し、これを用い内分泌かく乱化学物質の影響を細胞レベル・個体の行動レベルで検討することを目的とした。

平成17年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成18年度から平成19年度まで基盤的研究として実施し、当初予定の研究期限前に終了した。

*Foxl2-Cre* 遺伝子のマイクロインジェクション法による導入を200個のメダカ受精卵に行った。しかし、生殖細胞に同遺伝子が組み込まれた個体は得られなかった。

*DMY-Cre* 遺伝子のマイクロインジェクション法による導入を200個のメダカ受精卵に行った。しかし、上記と同様に系統化できなかった。

雌性生殖細胞標識メダカ及び生殖細胞標識メダカの透明化が完了した。

### 7. 2. メダカアンドロジェン受容体結合性試験の確立(中井誠)

化学物質の代謝を考慮したメダカアンドロジェン受容体結合性試験系を構築することを目的とした。

平成17年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成17年度に実施し、終了した。

メダカ肝細胞は増殖速度が極端に遅く、代替としてHepG2細胞(ヒト肝がん由来)を用いた試験系構築を検討したが、安定したデータは得られなかった。

### 7. 3. 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(早川和一)

ディーゼル排ガスや石炭、木材などの燃焼煙、タバコ煙などに含まれる多環芳香族炭化水素(PAH)の内分泌かく乱作用を明らかにすることを目的とした。

平成17年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成18年度から平成19年度まで基盤的研究として実施し、当初予定の研究期間満了により終了した。

酵母 two-hybrid 法を用いて、PAH はエストロゲン様活性、抗エストロゲン様活性のいずれも示さないが、その水酸化体(OHPAH)のいくつかはエストロゲン様活性あるいは抗エストロゲン活性を示すこと、強いエストロゲン様活性あるいは抗エストロゲン活性を有する OHPAH は、(1)母核が4環 PAH である、(2)長軸と短軸の長さの比が 1.28~1.73 の範囲に入る長方形の平面構造を有する、(3)ヒドロキシ基が最も遠い水素原子から 8~12 Å の範囲にある、(4)エストロゲン様活性を示す構造条件は、抗エストロゲン活性を示す条件より狭い、ことを明らかにした。

エストロゲン様活性については OHPAH のみが活性を示し、しかも強い構造活性相関が認められたが、抗エストロゲン活性については OHPAH のみならず、キノン体及びカルボニル体の中にも比較的強い活性を示すものがあり、弱い構造活性相関はあるものの、OHPAH の構造とエストロゲン活性の関係ほど明確な関係は認められなかった。

動物培養細胞系の一つとして、キンギョのウロコの培養システムを開発した。

酵母 two-hybrid 法で強いエストロゲン様活性を示した 4-OHBaA、3-OHBaA は共に、魚類のウロコの破骨・骨芽細胞の活性抑制作用があり、魚類においてこれらの水酸化 PAH は抗エストロゲン作用が認められた。4-OHBaA は、破骨及び骨芽細胞のマーカー遺伝子の発現も抑制し、細胞の活性と同様の変化を確認できた。

酵母 two-hybrid 法でエストロゲン様活性を示さなかった 1-OHpy は、魚類のウロコの破骨・骨芽細胞のいずれにも作用を示さなかった。

#### 7. 4. 内分泌かく乱物質の生態影響試験法の開発(蔵崎正明)

我が国及び発展途上国における内分泌かく乱化学物質の環境中濃度を詳細に測定し、食物連鎖等を通じた生態系全体への影響を評価する方法の開発を目的とした。

平成 17 年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成 17 年度に実施し、終了した。

目的に合致した成果が得られなかった。

### 8. 試験結果の解釈と評価のための試験生物に関する知見の集積

#### 8. 1. 改良型ミジンコ繁殖毒性試験を用いた新たな数理生態学的解析手法の検討(田中嘉成)

ミジンコをモデルとして、TG211 試験をベースとしてばく露条件を様々に変化させて実験を行い、得られたデータを数理的解析手法によって従来の生態リスクの指標の概念についての基本的な再考察を行うことを目的とした。

平成 21 年度にフィージビリティースタディーとして採択し、実施中。

ピリプロキシフェンは昆虫や甲殻類の幼若ホルモン及びその類似化学物質である昆虫成長制御剤のなかではフェノキシカルブと同程度の濃度で産仔数、オス仔虫生産誘導に影響があることが確かめられた。またピリプロキシフェンばく露では、他の大部分の幼若ホルモン様作用を持つ昆虫成長制御剤と同様にまず総産仔数に影響が出て、それより高濃度でオス仔虫生産が誘導されることが示された。

#### 8. 2. 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(濱口哲)

野生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た。

平成 17 年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成 18 年度から平成 21 年度まで野生生物の生物学的知見研究として実施する。

中国、韓国を含む野生メダカの約 98%の個体については *DMY* を持つ XY 個体が雄、*DMY*

を持たない XX 個体が雌であり、*DMY* がメダカに普遍的な雄決定遺伝子であることを支持した。野生メダカのおおよそ 1 % 程度、遺伝的性と個体の性が一致しない個体(性転換個体)が存在することを見いだした。

XY 雌の出現は遺伝的な変異(*DMY* の変異)によること、変異を持つ個体が雌に分化するのに常染色体上の因子が関与する可能性があること、XX 雄の出現の多くも遺伝的要因と考えられ、それらの因子のうちの一つの候補遺伝子が *Sox9* であることを明らかにした。

機能欠損型の *DMY* をもつ XY 雌が高頻度に出現した野生集団には 2 種類の機能欠損型の *DMY* が存在し、それらは集団中に数世代にわたって維持されていることが明らかになった。変異 Y 染色体は集団から顕著な淘汰は受けておらず、それらは X 染色体とほぼ同等の機能を果たしている可能性が高いことが明らかになった。このことは、野生集団においては *DMY* の変異は蓄積されており、各集団ごとに一定程度の XY 雌が出現する可能性があることを示していた。

メダカ胚を高温条件におくことにより、雌から雄への性転換が誘導されることを見だし、また、温度への感受性がメダカの近交型の間で顕著に異なることを明らかにした。

性転換を指標とした E2 感受性の Hd-rR 系統と HNI 系統との間の違いを生じている遺伝因子の一つは *DMY* そのものの多型性に由来していることが明らかになった。また、E2 処理が *DMY* の発現量の低下を誘導せず、*DMY* 下流で雄特異的に発現が上昇する遺伝子である *GSDF* の発現は E2 処理によって低下することが明らかになったことから、E2 ばく露による XY 個体の雄化は、*DMY* の直下で E2 が *DMY* の働きをキャンセルすることによって起こることが推察された。

### 8. 3. 哺乳類を用いた毒性実験の結果に影響を及ぼす実験動物の遺伝的要因解析(青山博昭)

種々の化合物の内分泌かく乱作用を含む生殖・発生毒性を調べるための実験に多用されるアウトブリードストックの動物集団に保持される様々な劣性突然変異や遺伝子多型を遺伝子レベルで簡便に診断する技術を確立することにより、アウトブリードストックに由来する実験動物の遺伝学的基盤を整備することを目的とした。

平成 17 年度に基盤的研究として採択し、平成 21 年度まで実施する。

Wister Hannover(BrlHan:WIST@Jcl[GALAS])ラットに見出された矮小症と甲状腺の腫大を引き起こす突然変異に関して、その原因が thyroglobulin 遺伝子のアクセプターサイトにおける 1 塩基置換(SNP)にあることを明らかにした。ケルセンの 1 世代試験において低用量群の母動物に観察された甲状腺重量の有意な増加について、ホルマリン固定された肝臓から抽出したゲノム DNA を試料としてシーケンシングによる遺伝子型の診断を試み、少なくとも一部の個体については thyroglobulin 遺伝子の突然変異に起因する異常であったことを確認した。また、動物を屠殺することなく簡便にこの SNP を検出する方法を開発し、遺伝子型を確定診断する手法を確立した。この遺伝子型の診断方法を生産業者に開示することにより、動物の供給体制の整備にも貢献した。

雌の子宮重量（実質重量の体重比）を修飾する第1染色体上の QTL 遺伝子座については、有力な候補の一つである *Aqp12* 遺伝子にアミノ酸置換（グリシン>グルタミン酸）を伴う SNP を見出すことができた。

## 9. 試験対象物質の選定手法の開発、試験対象生物と他の生物との種差の検討

### 9. 1. 海産無脊椎動物ホヤのトキシコジェノミクス基盤研究と生態調査(安住薫)

ステロイドホルモン受容体を持たない無脊椎動物に共通の化学物質の影響及び作用機構を解明すること並びに日本沿岸のホヤの生息状況を明らかにすることを目的とした。

平成20年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成21年度も実施中。

16ppb トリブチルスズ及び4.8ppb トリフェニルスズは、カタユレイボヤの胚発生と固着に異常を生じさせた。1,000ppb ノニルフェノール、1,000ppb オクチルフェノール及び1,000ppb ビスフェノールAは、カタユレイボヤの胚発生を阻害しなかった。

### 9. 2. メダカの再生産に及ぼす化学物質及びその代謝物の影響とトキシコゲノミクスによる作用機序の解明(有菌幸司)

有機フッ素化合物の潜在的汚染源であるフッ素テロマーアルコール(FTOHs)及びその代謝物ペルフルオロオクタン酸(PFOA)を対象として、メダカの再生産に及ぼす影響を評価し、トキシコゲノミクスによる作用機序の解明を目指すことを目的とした。

平成20年度にフィージビリティースタディーとして採択し、平成21年度も実施中。

メダカ初期生活段階を用いた急性毒性試験の結果から、8:2 FTOH は仔魚に対する毒性が強く、一方、PFOA は胚に対する毒性が強いことから、両物質の毒性発現には異なる作用機序があることを明確化できた。また、すでにエストロゲン様作用が明らかになっている化学物質(E2、オクチルフェノール:OP、ビスフェノールA:BPA)を対象物質に繁殖試験を実施することで繁殖阻害を引き起こす作用濃度を明確にし、これらに加え *o,p'*-DDT 及び8:2 FTOH の5物質についてDNAマイクロアレイにより網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、雌雄メダカともに各化学物質ばく露により共通してエストロゲン様作用のバイオマーカーとして知られるコリオゲニン(CHG)・エストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ )及びビテロゲニン(VTG)遺伝子の発現が誘導され、ERを介してCHG・VTGを誘導するという過去の報告と矛盾しない結果を得ることができ、今回評価した5物質はエストロゲン様作用を示すと考えられた。

メダカの繁殖に及ぼす8:2 FTOHの最小影響濃度(LOEC)は500 $\mu$ g/L、最大無影響濃度(NOEC)は250 $\mu$ g/Lと算出された。1,000 $\mu$ g/Lばく露群の受精卵において孵化率の減少が確認された。

### 9. 3. 多環芳香族炭化水素類の内分泌かく乱作用の構造活性相関に基づく魚鱗の化学物質スクリーニング法に関する研究(早川和一)

内分泌かく乱性スクリーニング法としての魚鱗培養システム系の評価を行い、PAH

類のリスクを考察することを目的とした。

平成20年度にフィージビリティスタディーとして採択し、平成21年度も実施中。

長軸長/短軸長比(L/B比)と水酸基等の官能基と最離水素間の距離(O-H距離)の2つの値について比較すると、エストロゲン様活性が確認された3-ヒドロキシベンゾ[a]ピレン(3-OHBaA)は、既に強いエストロゲン様活性を示すことがわかった4-ヒドロキシベンゾ[a]ピレン(4-OHBaA)に近い範囲にあり、エストロゲン様活性が確認されたビスフェノールA(BPA)も比較的近い範囲に位置した。これに対して、エストロゲン様活性/抗エストロゲン活性のいずれも観察されなかった1-ヒドロキシピレン(1-OHPy)の値はこれらより離れていた。一方、オクチルフェノールOPは4-OHBaAや3-OHBaAの値が含まれる範囲に近かったが、ノニルフェノールNPは大きく離れていた。

多環芳香族炭化水素の水酸化体(OHPAH)に加えて、多環芳香族炭化水素のキノン体(PAHQ)においてもエストロゲン様/抗エストロゲン活性があることが酵母 two-hybrid アッセイにより判明した。

#### 9. 4. 魚類エストロゲン受容体を用いた種特異性・リガンド特異性の *in vitro* スクリーニング系の開発(井口泰泉)

化学物質の影響評価を行うための物質選定の際に利用可能な、魚類のエストロゲン受容体を用いた化学物質のスクリーニング系の開発を目的とした。

平成19年度にフィージビリティスタディーとして応募され、平成20年度からその他の研究として実施中。

9種類の魚種(メダカ、ゼブラフィッシュ、ファットヘッドミノー、トゲウオ、ローチ、コイ、キンギョ、ブルーギル、グッピー)のエストロゲン受容体 $\alpha$ は、エストラジオールに関してはほぼ同じ反応を示すが、DDT関連物質に対しては、種差があることを示した。グッピーやメダカは感受性が高いが、コイやキンギョなどは、感受性が低い事があげられた。

#### 9. 5. 構造活性相関に基づくステロイド膜受容体作用物質群の同定(徳元俊伸)

培養細胞を用いた実験系により、化学物質の膜受容体を介したノンゲノミック反応に与える影響を評価し、構造活性相関により作用構造の同定を進め、より実用的な試験法として膜受容体分子を用いた新たな方法の確立を目的とした。

平成21年度にフィージビリティスタディーとして採択し、実施中。

ステロイド膜受容体アッセイの開発に着手した。