

ExTEND2005 に基づく平成 18 年度基盤的研究課題、野生生物の生物学的知見 研究課題及びフィージビリティースタディの研究成果概要

基盤的研究課題(基盤1): 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と新たな内分泌かく乱メカニズムの検証

研究者：(財)残留農薬研究所：青山博昭(代表研究者)、佐藤旭、北條仁、清水直子

理化学研究所バイオリソースセンター：阿部訓也、吉木淳、目加田和之
農業生物資源研究所：後藤英夫、須藤淳一

研究概要：内分泌かく乱物質には極低用量域(従来の毒性試験で無毒性量とされる用量より低い用量域または環境濃度近傍の用量域)における作用が指摘されているため、環境省プロジェクトとして実施した「ラットを用いた改良型1世代試験」では様々な化合物を環境中で検出される濃度を基に算出したヒトが暴露される可能性のある濃度で投与して、被験物質の低用量域における生殖・発生毒性を評価した。その結果、約半数の試験ではいずれの指標においても対照群と化合物を低用量で暴露した群(低用量群)の間で統計学的に有意な差は検出されなかったものの、残る約半数の試験では種々の指標に対照群と1~2の低用量群の間で有意な差が検出され、それらの差が投与した化合物により誘発されたものであるか偶発性の変化であるかの判定はしばしば困難であった。

一般的な毒性試験では、ヒトの集団が遺伝的には不均一(ヘテロ性に富む)であることから、そのモデルとして一定の割合でヘテロ性を維持するアウトブリード系統の実験動物が好んで用いられる。しかし、自然発生異常を引き起こす遺伝子座や暴露した化合物に対する感受性を支配する遺伝子座に多型が存在するアウトブリード系統の動物を実験に用いた場合、変異型個体(遺伝的異常を持つ個体や高感受性個体)が偶然ある特定の群に偏ることがしばしばある。通常の毒性試験では、それらの結果が用量相関性を考慮して解釈される(仮に低用量群である種の変化がみられても、中間用量群や高用量群でそのような変化が認められない場合は用量相関性のない偶発性の変化として被験物質の暴露とは無関係に起こったものと判断される)ため、このような場合であっても大きな問題は起こり難い。しかし、内分泌かく乱物質の低用量影響に関しては用量相関性を伴わないことが特徴であるとの指摘もあるため、環境省で実施した一連の試験においても、幾つかの事象についてその解釈が今後の課題とされた。そのような

例の一つに、試験に用いたWistar Hannoverラットにしばしば出現することが知られている甲状腺肥大が挙げられる。

今年度の研究では、昨年度の研究で明らかになったWistar Hannoverラット集団に低頻度ながら維持されているthyroglobulin遺伝子の突然変異について、動物を殺処分しないままその遺伝子型を診断する手法の確立に取り組んだ。その結果、変異型と野生型の塩基配列にそれぞれ特異的なプライマーを設計して、PCRにより突然変異遺伝子をヘテロに有する表現型正常な個体を遺伝子レベルで診断することが可能となった。さらに、環境省プロジェクトとして引き続き実施したブチルフェノールの1世代試験においては、この手法を用いて突然変異遺伝子をヘテロに持つ親動物を確定診断し、野生型の動物のみを用いた生殖・発生毒性評価を実施することができた。一方、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は、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。これら一連の研究成果については、基礎的な研究基盤として還元するため、論文をとりまとめ中である。

生殖・発生毒性学の分野では、アウトブリード系統としてWistarラットも広く実験に用いられている。したがって、この系統(Wistar)のラットについても、市販のコロニー中に見出された遺伝性の自然発生奇形に関して原因遺伝子を特定し、遺伝子診断技術を確定して、毒性試験結果を正しく評価する基盤を整備する必要があると考えられる。また、これらのコロニーに見出された突然変異に内分泌系の機能に関与する可能性が指摘された場合は、これらの突然変異を積極的に利用して、内分泌かく乱作用を解析する際のモデル動物として使用することも可能である。そこで、今年度は、その表現型からEGF/EGFRシグナル伝達系に何らかの異常を持つと推測されるCV系統と、レチノイン酸受容体を介したシグナル伝達系に何らかの異常を生じている可能性が指摘されるPD系統について、それぞれ原因遺伝子の探索に着手した。ポジショナルクランディング法によるこれまでの解析の結果、CV系統に関しては原因遺伝子が第8染色体のセントロメア近傍およそ10Mbの範囲内(D8Got1 - D8Got13の範囲)に存在することが判明した。一方、PD系統に関しても同様の手法を用いた解析が進行中であり、現在までにおよそ30匹のF2個体からゲノムDNA抽出用のサンプルを採取し終えた。これらの突然変異に関しては、必要なサンプルの追加、マイクロサテライトマーカーを用いた詳細マッピングの実施、ゲノムデータベース情報やmRNA発現解析結果に基づく候補遺伝子の絞込みを経て、原因遺伝子を特定したいと考えている。

一方、エストロゲンを始めとする様々なホルモンやホルモン様作用物質(内分泌かく乱作用が疑われる物質)の暴露に対する感受性には種差や系統差が存在することが知られており、環境省の検討会においても、比較的感受性が高いと思われるマウスを使用した試験の実施を考慮することや、種差、系統差あるいは個体差を生ずる要因についての解析の必要性などが指摘されてきた。そこで、今年度はこのような指摘にも対応して、理化学研究所バイオリソースセンター(

理研 BRC)で維持されている様々な近交系マウスとRecombinant Inbred系マウス(RI系統)を用いて、エストロゲンおよびアンドロゲンに対する感受性を支配する遺伝子(群)のQTL(Quantitative Trait Loci)解析に着手した。まず、C3H/J(C3H)、C57BL/6J(B6)および129S2/SvPas(129)の3系統を選択し、これらの系統から得られた雌離乳児に0、0.3、1.0または3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の用量のエチニルエストラジオール(EE)を5日間(21日齢から25日齢まで)皮下投与して、子宮と膈の反応を調べた。現在のところ、B6とC3Hを用いた実験に関してはF1個体を育成中であり、129XB6 RI系統群を用いた実験に関しては順調にデータを採取中である。アンドロゲンに対する感受性を支配する遺伝子(群)の解析には、B6、129および129XB6 RI系統群を用いた。これらの系統から得られた雄離乳児に0または3.0 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ の用量のテストステロンプロピオネート(TP)を26日齢から5日間皮下投与して、精巣、副生殖器および肛門挙筋の重量に及ぼす影響を調べた。この実験についてもすべてのデータを採取できていないが、これまでに採取されたデータのみを限り系統間に精巣や精囊・凝固線の重量に明瞭な差が認められ、生殖器官の重量に差が生じる原因となる遺伝子(群)に系統間多型が存在する可能性が示唆される。今後は、雌雄とも十分な数までデータを積み上げると共に、必要に応じてB6と129の交配から得られるF2個体についても同様のデータを採取して、解析ソフトを用いて候補遺伝子の存在領域を特定する。

内分泌かく乱作用が疑われる物質群については、そのような作用が疑われながら毒性発現機序が不明なために、観察された変化の解釈が困難な事例もしばしばみられる。また、種々の内分泌かく乱物質には相加効果や相乗効果が疑われているものの、そのような作用を効率よく検出する実験系が確立されているとは言い難い。そこで、エストロゲン受容体(ER)との結合性は認められないものの、子宮内膜上皮細胞(マウスの子宮およびヒト子宮癌細胞に由来するIshikawa cell)におけるER- α の発現を特異的に増加させることが知られているプロモエタン(BE)をモデルとして、エストロゲン様作用物質とこのような物質(ER-upregulator)との相乗効果を高感度に検出する実験系の確立に着手した。手始めに、まずBEの作用に細胞特異性が存在するか否かを、子宮由来ながらER- α を発現しないHeLa細胞を用いて検討することとし、この細胞株の培養条件を検討した。予備的検討により培養条件が整ったので、今後はなるべく早い時期にHeLa細胞に対するBEの影響を検討する。また、*in vivo*におけるBEの作用の検討にも着手の予定である。具体的には、種々の濃度のBEを加えた培養液を用いてHeLa細胞を培養し、ER- α 発現誘導の有無をタンパクおよびmRNAレベルで確認する。ER- α の発現誘導が観察された場合は、さらに種々の濃度のE2を培養液に添加して、BEとE2の相加または相乗作用を検討する。一方、HeLa細胞ではBEによるER- α の発現誘導が起こらない場合は、IshikawaまたはMCF-7細胞を用いてBEとE2の相加または相乗作用を検討する。

研究結果のまとめと考察：Wistar 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。また、動物を屠殺することなくこのSNPを簡便に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。これらの成果は、このシステムを用いて実施される今後の毒性試験において、試験結果を正しく評価するための基盤技術として応用されることが期待される。

市販のWistarラットに見出された2つの突然変異に関しては、ポジショナルクローニング法による解析が順調に進行している。今後は、データベースの利用と分子生物学的な実験により、原因遺伝子を同定したいと考えている。これらの突然変異に関しては、いずれもが内分泌系の変化を介して胎児または新生児に異常形質が発現すると推測されることから、研究が進展すれば内分泌かく乱作用を研究する上でも有用なモデル動物になるものと期待される。

マウスを用いたステロイドホルモンに対する感受性を支配する遺伝子(群)の解析に関しては、現在のところデータ数が不足して統計学的な評価ができていないものの、雌では系統間でエストロゲンに対する反応性が大きく異なること、雄では精巣重量が異なることから内因性のテストステロン濃度に系統差が存在する可能性のあることが明らかになりつつある。今後は、不足しているデータを補うと共に必要に応じて系統間交配に由来するF2個体の反応性を調べて、QTL解析によりこれらの差を生ずる原因となる遺伝子座を明らかにする予定である。これらの研究が進展すれば、アウトブリード系統のマウスを用いた実験でしばしば報告されている低用量影響に関して、遺伝的変異の介在する現象であるか否かをより厳密に評価する基盤が整備できるものと期待される。

基盤的研究課題 (基盤 2) : 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

研究者：金沢大学大学院 自然科学研究科：早川和一(代表研究者)、鳥羽陽、亀田貴之、唐寧

研究概要：ディーゼル排ガスや石炭、木材などの燃焼煙、タバコ煙などの内分泌かく乱作用を明らかにする研究の一環で、申請者らは平成17年度に、酵母two-hybrid法を用いて、多環芳香族炭化水素(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、しかも一連のPAH同属体及び異性体は、その物理化学的特性の類似性から同一の作用発現機序による可能性が大きいことを見出した。そこで本研究では、PAHのジヒドロキシ体、ケトン体、ヒドロキシケトン体及びキノン体合計31化合物について、酵母two-hybrid法を適用してエストロゲン様活性、抗エストロゲン活性の有無と構造との関係を調べた。

その結果、benzo[a]pyrene-3,6-quinone、benzo[a]pyrene-7,8-quinone、4,4-biphenolにエストロゲン様活性が認められた。このうち、4,4-biphenolの活性が最も強かったが、OHPAHの中で最も強いエストロゲン様活性を示した4-hydroxybenz[a]anthraceneより弱かった。

一方、1,4-phenanthrenequinone、1,4-chrysenequinone、benzo[c]pyrene-5,6-quinone、benzo[a]pyrene-1,6-quinone、benzo[a]pyrene-4,5-quinone、benzo[a]pyrene-7,8-quinone、benzo[a]pyrene-11,12-quinone、2-hydroxy-9-fluorenone、9,10-dihydroxyphenanthreneに抗エストロゲン活性が認められた。このうちbenzo[c]pyrene-5,6-quinoneの活性が最も強く、OHPAHの中で最も強い抗エストロゲン活性を示した3-hydroxybenzo[c]pyreneに近い活性を示した。

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。

研究結果のまとめと考察：昨年度のOHPAH及びPAHの測定結果と合せると、エストロゲン様活性の発現にはヒドロキシ基が必須であり、強い活性を示すOHPAHは4環構造を有するPAH誘導体に限られている。4,4-BPが比較的強

い活性を示したが、これは 2 つの芳香環が離れており、両端のヒドロキシ基間の距離が活性を有する 4 環構造の OHPAH(例えば、4-OHBaA)の O-H 距離に近似する、即ち両分子の長さが近似するためと推察される。さらに、L/B 比と O-H 距離とヒドロキシ基の部分電荷も狭い範囲に限られることがわかった。

一方、抗エストロゲン活性の発現にはヒドロキシ基は必須ではなく、活性は PAH ケトン体 PAH キノン体 OHPAH の順に強くなり、キノン体も比較的強い活性を示した。さらに、4 環だけでなく 5 環の PAH キノン体も比較的強い活性を呈することが明らかになった。また、抗エストロゲン活性においては、比較的広範囲の L/B 比と O-H 距離を有する PAH キノン体が強い活性を示すことがわかった。

以上より、エストロゲン様活性を有する PAH 誘導体の構造と活性との間に見出される強い構造活性相関は、アゴニストが hER の本来の結合サイトに結合できる要件を満たすことを示している。これに対して、抗エストロゲン活性を有する PAH 誘導体の構造と活性との間にそのような強い関係が見出されない事実は、アンタゴニストが hER の本来の結合サイトにしなくとも、E2 の正しい結合を阻止できることを示唆している。

基盤的研究課題(基盤3): 胎児期におけるエストロゲンシグナルの gain of function とその性分化の可塑性

研究者: 大阪大学大学院 薬学研究科: 中西剛(代表研究者)、吉田一郎

研究概要: 昨今の内分泌攪乱化学物質問題においては、エストロゲンレセプター(ER)に対する化学物質の親和性や転写活性化能に関する知見は集積しつつあるものの、ERを介した哺乳類の発生過程への影響に関しては不明な点が多々残されている。これは、哺乳類の胎児期(性分化)におけるエストロゲンシグナルの生理的意義の解明が、未だ不十分であるところに最大の原因があると考えられる。しかし哺乳類以外の生物種の場合は、受精卵に直接被験物質を投与することでその影響を検討することが可能であるが、哺乳類については被験個体が母体-胎盤-胎児複合体であり、化学物質の毒性発現部位が複雑で多岐に渡る可能性があることから、エストロゲンの胎児に対する直接的な影響の評価は困難であるのが現状である。胎児に対する化学物質の曝露は母体を介して行われるため、その毒性評価は妊娠母体に投与して検討することが基本ではあるが、上記問題を解決するためには、哺乳類の胎児期におけるエストロゲンシグナルの直接的影響を評価するためのシステムの構築が必要不可欠となる。このような背景のもと本研究では、トランスジェニックマウス(TGマウス)を作成し、哺乳類の胎児期(性分化)におけるエストロゲンシグナルの生理的意義の解明を試みている。今年度は、作成したTGマウスのラインの選別とその発現やホルモン濃度に関するcharacterizationを行った。各ラインの雄性TGマウスを野性型(WT)の雌性BDF1マウスと交配させて胎児を回収し、発現について検討を行ったところ、特異的な発現を示すいくつかのラインが確認された。その中で高発現しているD13とD21ラインについて、発現時期について検討したところ、その発現は分娩直前まで上昇した。これらの結果を反映して、TG由来の胎児においては、エストラジオール(E2)濃度がWTの胎児よりも、雄の場合で約6~14倍、雌の場合で約4~8倍程度高くなっていた。一方で、母体血中のE2濃度についても検討を行ったが、有意な差は認められなかった。以上の結果から、TGマウスは胎児期のエストロゲン曝露の影響を検討できる有用なモデルとなる可能性が示唆された。TGマウスを用いて、これまでにエストロゲン様化学物質により影響を受けると報告されている雌雄のフェノタイプについて解析を行う予定である。

研究結果のまとめと考察: これまでの実験系では、妊娠母体にエストロゲンを外来的に投与することで胎児に対する影響が検討されてきたが、この際に大きな問題となるのが被験物質の母体への影響である。一般的に胎児に被験物質を十分量到達させるためには、被験物質を大量に投与する必要があるが、エストロゲンなどのホルモンを投与した場合には、母体内分泌系へのフィードバック等が問題となる。すなわちエストロゲンを投与した母体と、コントロールの母

体では明らかに子宮内環境が異なるため、この方法ではエストロゲンの胎児への直接的な影響は評価できない。また、エストロゲンに暴露した母体から出る母乳には過剰量投与されたエストロゲンが含まれている可能性があるため、胎児期のみでの暴露影響を厳密に検討するためには、分娩後はエストロゲンに暴露していない里親のもとで育てる必要がある。

一方で、これまでも ER 欠損マウスやアロマターゼ欠損マウスを用いてエストロゲンの生理的意義に関する検討がなされてきたが、このような単純な遺伝子改変動物では胎児期のみエストロゲンの影響を検討することは不可能である。例えば ER 欠損マウスでは、ヘテロ欠損マウスの雌雄を交配させ、分娩直後のホモ欠損子マウスのフェノタイプを解析すれば、胎児期におけるエストロゲンシグナルの loss of function の影響を検討できるが、分娩後も生涯にわたってエストロゲンシグナルがないため、成熟期や繁殖期のマウスの生殖行動や生殖効率等について、胎児期のみでのエストロゲンシグナルの影響を検討できない。また ER 欠損マウスでは、雄マウスで血中のアンドロゲン濃度が高くなることなども報告されており、ER 欠損の影響なのか、またはアンドロゲン濃度の上昇の影響なのかを見極めることも困難である。その他にも、アロマターゼ欠損マウスを用いた検討もなされているが、このマウスにおいても胎児期のエストロゲンシグナルの生理的意義を検討するには ER 欠損マウスと同様の問題がつかまとう。

今回我々は、このような問題を解決するために TG マウスの作成を試みた。我々が作成した TG マウスのシステムは、当初の目的をほぼ満足するものであると考えられた。

TG マウスは、器官形成期や性分化の時期のみでのエストロゲン暴露の影響を検討できる優れたモデルマウスであると考えられる。このように我々は、TG マウスの特性をうまく利用することで、世界で初めて胎児期のみでのエストロゲン曝露の影響を検討できるモデルマウスの構築に成功した。

基盤的研究課題（基盤4）：胎仔期、新生仔期の代謝機能と内分泌かく乱作用発現

研究者：広島大学大学院 医歯薬学総合研究科：太田茂(代表研究者)、古武弥一郎

日本薬科大学 健康薬学科：北村繁幸

広島大学 薬学部：杉原数美

研究概要：化学物質による内分泌かく乱作用でもっとも懸念されているのが胎児期、新生児期における影響である。本研究では、この時期に注目し環境化学物質や薬物などの影響を薬物代謝酵素との関連で検討を行った。薬物代謝酵素としては cytochrome P450 (CYP)分子種と aldehyde oxidase (AO)を測定した。その結果、ラットでは胎仔期、新生仔期にはほとんどこれら酵素活性が認められず、生後より徐々に活性が上昇し、CYP 分子種にもよるが生後約 4、5 週で adult レベルに達することを明らかとした。また、これまで知られている薬物代謝酵素誘導剤の前処置により胎仔期、新生仔期でも酵素誘導が認められ、酵素はほとんど発現していないが誘導能を有することを明らかとした。さらに、残留塩素系農薬 DDT やフタル酸エステル類による誘導も確認された。内在性 AhR リガンド候補物質である indirubin は adult では代謝により AhR を介する酵素誘導能が低いことを既に報告しているが、新生仔期では高い誘導能を示すことより、これまで adult では影響が低いとされていた化学物質でも新生仔では重大な影響及ぼすことが示唆された。

成長発達段階での食餌による影響を調べるため、ラット妊娠時より精製飼料 (AIN-93G)を与えたところ、新生仔は成長後も薬物代謝酵素活性が全般的に低く、中でも AhR を介して誘導される CYP 分子種の活性が顕著に低く食餌成分による影響が大きいことが明らかとなった。

また、環境化学物質の代謝と内分泌かく乱作用のスクリーニングを行い、臭素化難燃剤の代謝物である水酸化臭素化ジフェニルエーテル類での甲状腺ホルモン受容体結合作用、(抗)エストロゲン作用の他、カルバメート系およびピレスロイド系農薬での(抗)エストロゲン、抗アンドロゲン作用を検出した。

研究結果のまとめと考察：現在化学物質の内分泌かく乱作用で注目されている胎児、新生児期での影響を調べる上で考慮しなければならない代謝的活性化、およびこの時期における薬物代謝酵素変動に関する研究を行った。その結果、主要な薬物代謝酵素である肝 CYP および肝可溶性酵素である AO はラットでは胎仔期および 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。また、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。以上の結果より胎仔期、新生仔期に化学物質に曝露された場合、代謝能が低いため adult より影響を受けやすく、さらに生体内に残留する時間も延長すると考えられる。また、この時期は脳血液関門も未形成とされており、脳への影響も懸念される。

薬物代謝酵素は食餌の影響も大きく受けることを今回明らかにした。妊娠時より精製飼料で飼育したラットでは有意に CYP 活性が低く、特に AhR を介して誘導される CYP1A1/2 活性の上昇が低いことより、食餌成分として含有されているフラボノイド類などの影響が大きいものと考えられる。CYP1A1/2 だけでなく、CYP3A、2C などの活性も精製飼料飼育群で低下しており、食餌成分中にこれらの誘導に関与する核内受容体のリガンドとなるものが含まれているものと考えられる。ヒトは食物が均一ではないため、成長発達段階の食成分による影響調査は重要と考えられる。

環境化学物質およびその代謝物の内分泌かく乱作用の *in vitro* スクリーニング試験を継続して行った。今回、臭素化難燃剤である polybromodiphenyl ether (PBDE) 類および tetrabromobisphenol A (BBPA) の甲状腺ホルモン受容体結合活性を検出した。既に水酸化 PCB 類の作用を報告しているが、環境中にも存在し生体内からも検出されている PBDE 類の代謝物である水酸化体、3-OH-BDE-47, 4OH-BDE-90 で結合活性を見出した。また、カルバメート系農薬 methiocarb、carbaryl、ピレスロイド系農薬 permethrin などの代謝とエストロゲン、抗アンドロゲン作用の発現あるいは減少などを見出した。今後、これら物質の *in vivo* での影響、新生児期での影響の検討が必要と考えられる。

基盤的研究課題（基盤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

研究概要：内分泌系に作用する環境化学物質の多くは、ステロイドや甲状腺ホルモン等脂溶性ホルモンの核内受容体に作用し、疑似リガンドとして内因性ホルモンと競合的にリガンド結合領域へ結合し、ホルモン類似、または拮抗作用を生ずると考えられてきた。しかし、PCBなど一部の物質は、リガンド結合領域以外に作用して受容体をDNAから解離させる。また、神経細胞などの興奮性細胞の細胞膜に作用し、細胞機能に影響する物質も存在する。しかし、作用機構については不明な点が多い。

従来より化学物質の核内ホルモン受容体への作用機構解析にはレポーター転写アッセイが多用されている。一見簡便な手法に見えるが、個々の細胞で発現している転写共役因子は異なり、種差も大きく、ヒトへの外挿は簡単ではない。また、上述のような新たな作用機構を考慮したスクリーニング系構築も必要である。

これらを踏まえ、4項目を計画した。ヒトへの外挿を目標に、細胞は極力ヒト又は霊長類の細胞を用いる。また、導入遺伝子もヒト由来cDNAを用いる。

1.レポーターアッセイによる環境化学物質作用のスクリーニング

レポーターアッセイ系によりポリ臭化ビフェニル、臭化フェノールなど臭素化合物の甲状腺ホルモン受容体系を中心とした核内受容体への作用を調べる。

2.キメラタンパクを用いた化学物質作用領域の同定

昨年度に引き続き、甲状腺ホルモン受容体と糖質コルチコイド受容体のキメラタンパクを作製しレポーター転写アッセイにより、結合領域を同定する。

3.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の開発

昨年度に引き続き、インビトロで、簡便に化学物質の受容体-転写共役因子または受容体-DNA間の結合を測定するためのスクリーニング系の完成を目指す。

4.環境化学物質の神経細胞膜への作用の解析

膜電位感受性色素およびカルシウム感受性色素を用いて神経細胞膜に及ぼす化学物質の作用を解析する。

5.必要に応じてラット、マウスなど動物個体を用いた毒性評価実験も考慮する。

本研究により、従来毒性が確認されていなかった物質の毒性が判明するとと

もに、環境化学物質の新たな作用機構が解明される。また、従来より簡便で効率の良いスクリーニング系が確立できる。

研究結果のまとめと考察：本研究は、我々が PCB をモデルに開発したシステムによる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、そして神経細胞膜に及ぼす環境化学物質の作用の解析する事を主目的としている。

今回、PCP、PBB、PBDE などの化学物質の核内受容体に対する作用を甲状腺ホルモン受容体を対象として解析した。その結果、PBDE については統計学的に有意な変化が甲状腺ホルモン受容体に及ぼす作用については統計学的に優位な抑制が見られた。ここに示したのは DE71 の結果で、penta-BDE を中心と下混合物であり、今後さらに解析の必要があると考えられる。まだ予備実験の段階だが、deca-BDE ではさらに低用量での抑制が観察されている。今後、甲状腺ホルモン受容体に関しては、PBDE 類を中心に解析を進めていくつもりである。今後、生体内代謝に重要で環境化学物質の標的として重要な核内受容体として我々は SXR への影響の解析も考えており、こちらについても解析を進めていきたい。レポーターアッセイのみならず、キメラタンパクを用いた解析についても応用のめどをつける事が出来た。作用点の詳細な解析にこのキメラタンパクのシステムも応用したい。

Liquid fluorescent DNA pull down assay についてはシステム完成に近づいている。今後は TR 系以外でもこのシステムが作用する事、また、PCB 以外でも使用する事が出来る事を確認したい。

神経細胞膜に及ぼす環境化学物質の作用は、まだ新しい分野で、世界的にも研究者は限られる。しかし、環境化学物質が神経細胞に何らかの影響を及ぼす可能性は以前から示唆されており、核内受容体を介するシステム以外の作用経路を同定する事は重要である。PCB は細胞内カルシウムを増加させる事が明らかになった。しかし、細胞内カルシウムが細胞外由来なのか、それとも小胞体などの細胞内のカルシウム貯蔵部位からの放出なのかは明らかではない。今後は分子レベルでこの作用を調べていきたい。

また、神経細胞に対する化学物質の作用を分子レベルで同定しても、動物実験で最終的な出力系を解析する事は当然必要となる。しかし、単に物質を投与し、行動のみを調べても作用機構を詳細に解析する事は難しい。従って動物個体を用いる場合でも極力物質レベルの動きを並行して追う事が出来るようなシステムの構築が必要である。そのために、今後は *in vivo* microdialysis システムの構築を考慮したい。

基盤的研究課題 (基盤 6): 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

研究者：自然科学研究機構 基礎生物学研究所：長濱嘉孝(代表研究者)、松田勝、鈴木亜矢、B. Paul-Prasanth

研究概要：発生初期の脊椎動物の生殖腺は化学物質の暴露に対して高い感受性を示す。その顕著な例としてあげられるのが、発生初期の魚類や両生類が内分泌かく乱作用を有する化学物質に暴露されたときに起こる不可逆的な機能的性転換である。本研究では、化学物質に暴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。すでに、我々の研究室では、メダカの正常性分化時のXX/XY生殖腺での遺伝子発現パターンを解析することによりいくつかの性特異的遺伝子が同定できているので、これらは遺伝子マーカーとして本研究の遂行には非常に有益である。また、メダカ性分化関連遺伝子を解析するためのマイクロアレイ系についても独自に開発、作製している。そこで、本研究ではこれらを駆使して、エストラジオール-17 β 、メチルテストステロン、DES等で処理した稚魚の雌雄生殖腺における遺伝子発現パターンを解析する。さらに、処理魚の生殖腺で特徴的に発現変動する遺伝子を同定して、その遺伝子の発現細胞や経時的発現パターンをRT-PCRや*in situ* hybridizationなどにより詳しく調べる。このような正常時および性ステロイドホルモン処理時における遺伝子発現パターンに関する基礎的知見は化学物質の影響を正確に評価する上で非常に重要である。次いで、同じアレイ系を用いて、環境中でも検出され、魚類に対する内分泌かく乱作用によると考えられる有害性(受精率の低下)が示されているノニルフェノール、オクチルフェノール、ビスフェノールAなどの化学物質を処理された稚魚の生殖腺における遺伝子発現パターンを解析する。また、本研究の後半期には、上記の稚魚を用いた研究を成魚についても実施する。このような解析を通して、個々の化学物質や性ホルモンの影響や作用の分子、細胞メカニズムを明らかにすることができるばかりでなく、それぞれの化学物質間における作用メカニズムの違いをも明確にできるものと期待される。最終的には、各種化学物質の影響に関する分子、細胞レベルでの解析結果と有害性との関連について評価する。

研究結果のまとめと考察：本年度の研究から、DES は稚魚期の雌雄生殖腺に著しい影響を及ぼすことが明らかになった。遺伝的 XY 個体に関しては生殖細胞(精原細胞)の増殖の促進、さらには減数分裂期への移行を著しく促進した。DES はまた、XX 個体に関しては逆の影響を、すなわち卵原細胞の増殖と減数分裂期への移行を著しく抑制した。マイクロアレイによる解析からも、DES 処理後の生殖腺の遺伝子発現パターンはエストラジオール-17 β 処理とは大きく異なって

おり、また、雌雄(XX、XY)生殖腺における遺伝子発現パターンも著しく異なっていた。すなわち、XY 個体では雌特異的遺伝子の発現が促進されるが、XX 個体ではそれら遺伝子の発現は明らかに抑制された。しかし、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。一方、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 β 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。

本研究におけるこれまでのマイクロアレイ解析から、個々の性ホルモンや内分泌かく乱物質で処理された後の雌雄生殖腺における遺伝子発現パターンはそれぞれ固有の変動パターンを示すことが明らかになった。今後これら各々の遺伝子発現変動パターンを詳細に解析することにより、それぞれの性ホルモンや内分泌かく乱作用を示す化学物質の作用メカニズムを明らかにしたいと考えている。特に、DES に関しては、XX 個体と XY 個体に対して逆の作用を示すこと、またマイクロアレイのパターンでも両者で大きく異なることを見出したことは非常に興味あることである。この点に関しては現在、XX 個体と XY 個体の生殖腺における遺伝子発現パターンをより詳しく解析するとともに、これら雌雄個体の生殖腺に及ぼす DES 処理の長期間処理の影響(生殖細胞数や減数分裂への移行に対する)についても引き続き実験を継続中である。これらの研究を通して、メダカの生殖システムの異常(不可逆的性転換を含めて)をもたらす「鍵」遺伝子群を見つけ出し、それらの遺伝子の作用を調べることで、魚類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を明らかにしたいと考えている。

基盤的研究課題 (基盤7): 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

研究者：京都大学大学院 農学研究科：木下政人(代表研究者)
京都大学 放射線生物研究センター：亀井保博
信州大学 理学部：柴田直樹

研究概要：本研究では、研究期間中(5年間)に、1)生殖細胞に存在する各種細胞を生きの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する、2)これを用い内分泌かく乱物質の影響を細胞レベル・個体の行動レベルで検討する、ことを目指している。

18年度は、主に遺伝子導入メダカ系統の作出に必要な特異的遺伝子発現領域の同定と単離を中心に以下の研究を行った。

1)生殖巣に存在する細胞の標識化：ターゲットとなる細胞種は、精原細胞、卵原細胞、および、始原生殖細胞(以上、生殖細胞)、また、セルトリ細胞、および、顆粒膜細胞(以上、支持細胞)である。

1・1)生殖細胞の場合：これまでに申請者らは、生殖細胞の標識化を行っているが、精原細胞、卵原細胞、および、始原生殖細胞のそれぞれに特異的な標識化は完成されていない。標識化された既存の系統からFACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) を用いて厳格に特定の生殖細胞のみを分取し、標的細胞特異的発現調節領域の単離を目指している。そのために、まず、生殖巣の細胞を分離する(バラバラにする)必要があり、18年度は、その条件検討を行った。その結果、卵原細胞では、卵巣を摘出しピンセットで卵巣膜を破った後、0.5g/Lのトリプシン溶液で、20、10分間の震とう加温が適当であることが明らかになった。現在、これらの細胞をFACSに供する準備を進めている。一方、精原細胞に関しては、42Sp50-GFPメダカ系統では蛍光強度が弱く、効率的な分離は不可能であった。そのため、Cre-loxP system (下記参照)を用いることとし、42Sp50-Cre plasmid を作成した。加えて、精原細胞は脆弱でトリプシン処理方法をさらに検討する必要があった。また、始原生殖細胞(olvas-GFPで標識化された細胞)に関しては、現在のところ、成魚の生殖巣中に存在するのか、否か不明である。つまり、サンプリングする個体は、成魚がよいのか、ふ化前後の稚魚がよいのか決定できない。そこで、18年度はこの問題を明らかにすることとした。(詳細は、2)の項)

1・2)支持細胞の場合：まず、既報の細胞種特異的発現調節領域(セルトリ細胞ではDMY、顆粒膜細胞ではFoxl2の発現調節領域)にGFP遺伝子を連結したプラスミド(基礎生物学研究所長濱先生・松田先生より供与)をメダカ卵に注入し、同

ベクターの有効性を検討した結果、いずれもその発現量は低値であり、「生きたまま容易に観察」するには不十分であった。

1・3)メダカ生殖巣におけるCre-loxP systemの有効性：上記支持細胞でのGFP遺伝子発現量を増幅するためCre-loxP systemの使用を考えた。これまでに、メダカにおいてCre-loxP systemの有効性を示した報告がないため、まず、メダカ生殖細胞におけるCre-loxP systemの有効性をolvas-Cre遺伝子導入メダカ系統と actin-loxP:X:loxP:GFP遺伝子導入メダカ系統を用いて検討した。その結果、メダカ生殖細胞でもCre-loxP systemが有効であることが明らかとなったが、同一個体内でも細胞間でCreによるDNAの切り出しにバラツキがあることが判明した。この点を改良するため、Cre遺伝子に核移行シグナル(NLS)を付加したNLS-Cre遺伝子を作製した。続いて、DMY-NLS-Cre および FoxL2-NLS-Cre人工遺伝子を作製し、これをメダカ卵にマイクロインジェクション法により導入した。現在、これらを系統化するため飼育中である。

2)成魚生殖巣に始原生殖細胞が存在するか否かの検討。

昨年度、作出した卵原細胞に強く、精原細胞には弱く赤色蛍光を発現する42Sp50-RFPメダカ系統と始原生殖細胞および生殖細胞において緑色蛍光を発現するolvas-GFPを交配し、そのF1から両導入遺伝子を持つ個体(double transgenics)を選別した。現在これらを成魚にするため飼育中である。

3)Foxl2 in situ

Foxl2-GFP メダカの GFP の発現が、正常個体での Foxl2 遺伝子の発現を反映しているかを確認するための予備実験として、*in situ* hybridization により、卵巣での Foxl2 mRNA の発現を解析した。Foxl2 は前卵黄形成期のろ胞から卵黄形成期のろ胞まで一貫してろ胞細胞、おそらく顆粒膜細胞で発現が検出された。一方、卵成熟期のろ胞では発現はまったく検出されなかった。

4)行動観察システム構築の準備

遺伝子導入メダカの性行動に体する内分泌かく乱物質の影響を評価するための準備を始めた。メダカの性行動は早朝の薄明かりの状態でも開始される。そこで、赤外線カメラによる行動追跡を試みた。その結果、夜間(照明のない状態)でも個体を追跡できた。

研究結果のまとめと考察：生殖細胞の分離：卵原細胞の分離条件が決定でき、今後は、処理個体数を増やし FACS に供する。精原細胞に関しては、今回良好な分離条件が見つからなかった。今後は、コラーゲナーゼの使用などよりマイルドな処理方法を検討し、分離条件を決定する必要がある。始原生殖細胞については、olvas-GFP/42Sp50-RFP double transgenic 系統で孵化後10日個体において生殖巣に始原生殖細胞と分化した生殖細胞が混在することが示唆された。

この系統を生殖巣が成熟するまで飼育し、蛍光観察により「成熟した生殖巣には始原生殖細胞が存在するのか否か」という点を明らかにできる。また、孵化後10日前後の始原生殖細胞と分化した生殖細胞が混在する時期に蛍光色を指標に分離すれば、始原生殖細胞のみを間違えなく効率的に分離できると考えられる。

支持細胞の標識化：顆粒膜細胞に関しては、Foxl2 プロモーターを用いることで標識化が可能であると判断した。しかし、同プロモーターで直接レポーター遺伝子を発現させるのでは、発現量が少なく増幅する必要があると考えられた。また、セルトリ細胞の標識化の候補として使用した DMY プロモーターは、今回精巣組織でのレポーター遺伝子の発現が観察できなかった。DMY 遺伝子がセルトリ細胞に発現していることは既に報告されていることから、今回の結果は、その発現量が極めて低いためであると考えられた。Foxl2 同様 DMY プロモーターも発現を増幅する工夫が必要であると考えられる。今回、導入した DMY プロモーターが卵巣組織でも発現を誘導した。メダカは、原理的には、XY 型の性決定であり、DMY は Y 染色体上にある。よって通常、XX 雌では、遺伝子そのものを有していない。しかしながら、DMY プロモーターは潜在的には卵巣の支持細胞でも発現誘導活性を持つことが示された。細胞の標識化という点では、不都合であることから、今後、常染色体上に存在するセルトリ細胞特異的発現遺伝子を単離する必要がある。

遺伝子発現増幅システムの検証：上記の遺伝子発現増幅方法として Cre-loxP system を検証した。その結果、メダカ生殖細胞においても Cre-loxP system が働くことが示された。しかし、その効率は細胞間においてバラツキが大きく、今後改良する必要がある。改良方法としては、Cre 遺伝子のコドンにメダカのものに置き換える、核以降シグナルを融合し効率的に核に Cre タンパク質が移行するようにするなどである。

行動観察システム構築：赤外線カメラを使用することにより、照明の有無にかかわらず行動を追跡できることが明らかとなった。

野生生物の生物学的知見研究課題（野生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：新潟大学大学院 自然科学系：濱口哲(代表研究者)、酒泉満

研究概要：メダカは、ほ乳類以外の脊椎動物で唯一性決定遺伝子 *DMY* が同定されている生き物である。我々は野生メダカを採集し、*DMY* の存否を指標に当該個体の遺伝的性(*XX* か *XY*)を調べ、個体の性との異同について検討を行った。野生メダカ約 6,000 個体を調べた結果、約 1%程度の頻度で、遺伝的性と個体の性が不一致個体(性転換個体)を見いだした。これまでの遺伝解析の結果からは、*XY* 雌の全てと、一地点の *XX* 雄個体の性転換は、遺伝的要因による事が判明している。

XY 雌個体の遺伝的要因が、*DMY* そのもの突然変異か、*DMY* 以外の関連遺伝子の突然変異によるのかについて検討を行っているが、これまでに得られた結果は、全ての例が *DMY* の変異によるものであること、但し、*DMY* の変異によっては雌雄両方の *XY* 個体が現れるものについては、各個体が雌になるか雄になるかに常染色体上の別の遺伝子が関与している可能性があることが判明している。また、*XX* 雄個体についても、その性転換に関与している遺伝子の探索を進めているところである。さらに、発生過程で高温に曝すと雌から雄への性転換個体(*XX* 雄)が現れることを見いだしたことから、後天的要因による *XX* 雄出現の可能性も示唆されている。

本研究では、さらに野生メダカを得て、遺伝的性と個体の性の異同を調べるとともに、未解析の性転換個体について遺伝解析を行い、その原因の解析を行う。また、過去に不一致個体が認められた水系について継続的調査を行い、不一致個体出現の経年的な状況把握を行い、性転換を引き起こす遺伝的要因が個体群の中でどのように挙動するのかについての基礎的情報を収集する。また、後天的要因として、性ステロイドに加えて温度の影響の可能性を検討する目的で、温度性転換現象について性転換機構の検討を行うとともに、近交系間の系統差の原因遺伝子の探索を行う。また、並行して、野生メダカの温度性転換感受性について、水温など気候条件を異にする地域(系統)差の有無等を検討する。得られる知見から、野生メダカの性がどの程度可塑的であるのかについて考察する。

研究結果のまとめと考察：野生集団中の性転換個体の探索について、本年度は新たに 24 地点、1638 個体について調査した。その結果、4 地点から *XY* 雌 12 個体、5 地点から 7 個体の *XX* 雄が得られた。本年度の遺伝解析結果は、従来までの、*XY* 雌はすべて Y 染色体連鎖の突然変異(おそらくは *DMY* の変異)に因るものであるという結果を追認した。つまり、現時点では、*DMY* 以外の遺伝子の突然変異によると思われる性転換 *XY* 雌個体は見いだされていない。一方、*XX* 雄は各地から散発的に見いだされているが、そのうちの新潟市白根由来のものについては、原因遺伝子が常染色体上に存在することがほぼ確かなものになっている。つまり、これまで得られている性転換個体の中で、白根の *XX* 雌が唯

一常染色体上の突然変異によるものであることになる。

これまでに得られた*DMY*の変異は約1~2%程度である。*DMY*は一つだけある遺伝子でホモ接合は通常あり得ないことから、その変異は優性の遺伝様式を示す。したがって、機能欠損型(低下型)の突然変異率が1%程度であれば、そこからはそのまま1%の出現頻度で性転換個体が得られことになる。しかし、常染色体上の性決定関連遺伝子の場合、ホモにならないと表現型として現れることは期待しにくいことから、仮に*DMY*と同様の変異率であったとした場合でも、性転換個体が得られる確率は 10^{-4} 程度になる。したがって、通算の調査個体が7000程度の現時点で、常染色体上の突然変異による性転換個体が白根XX雄に限られており他に得られていないとしても、それはそれほど奇異な結果とは言えない。今後、さらに野生集団調査を継続することにより、白根のXX雄の原因遺伝子以外の常染色体上の遺伝子の変異による性転換を見いだすことは十分期待できると考えている。

一方、本年度は機能欠損型の*DMY*をもつXY雌が高頻度に出現した愛知県大府市の野生集団について、それら変異遺伝子が集団の中で世代を越えてどのように挙動するかを集中的に検討した。その結果、大府集団においては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。つまり、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る。また、そのような状況の下では、個体数減少などを契機として、大府集団のように高頻度でXY雌をふくむ集団が生じる可能性がある。これまでの研究において、比較的高頻度でXY雌が出現している場所が複数箇所あることから、それらについて確認を行うとともに、今後新たな場所についても探索を継続する必要がある。

各地から散発的に見いだされるXX雄についての遺伝解析の結果は、新潟市白根から見いだされたもの以外については、ある程度遺伝的な要因が関与していることを示唆する結果は得られているものの、その原因を少数の遺伝子の突然変異に帰することには困難があることを示している。我々は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。つまり、温度感受性に関わる多型が集団中に蓄積されており、その結果として生じる個体差が散発的に見いだされるXX雄の原因に関与している可能性がある。その観点から、今後、野生メダカを含めたメダカの高温条件による性転換現象のさらなる解析と、性転換に関与する遺伝的背景の検討を進める予定である。

野生生物の生物学的知見研究課題（野生2）：野生状態における魚類の雌雄同体現象に関する研究

研究者：東京海洋大学 水圏科学フィールド教育研究センター：須之部友基(代表研究者)

鹿児島大学 水産学部：四宮明彦

鹿児島純心女子短期大学：櫻井真

横須賀市立博物館：萩原清司

研究概要：約3万種といわれる魚類の内、約400種で雌雄同体現象が報告されている。これまで知られている機能的な雌雄同体現象は

同時的雌雄同体： 精巣と卵巣が同時に機能する

隣接的雌雄同体

雄性先熟： 雄から雌への性転換

雌性先熟： 雌から雄への性転換

双方向性転換： 雄から雌、雌から雄への性転換

に分類される。

魚類は多くの種が体外受精のため、哺乳類等の他の脊椎動物に比べ生殖腺の構造が単純で性の転換が起こりやすいと思われる。そこで繁殖戦略の一環として性転換をすることが多くの種で進化してきたと推測される。1970年代になり自然選択がかかる単位が集団ではなく個体あるいは遺伝子であり、自己の遺伝子をより多く残す形質が進化する、という行動生態学の理論が広く受け入れられ、婚姻システムと性転換の方向性を関連づける「体長-有利制モデル」が提案された。すなわち、雌がより大きな雄と配偶関係を結ぶような一夫多妻社会では雌性先熟が進化し、雌の配偶者選択が無くどの雄の繁殖成功度が同じような乱婚社会では雄性先熟が進化する。機能的な性転換をする種は珊瑚礁に生息するベラ科、スズメダイ科、ハゼ科などで知られるが、1980年代以降、SCUBAダイビングの普及とあいまってモデルを支持する多くの野外研究の報告が蓄積されてきた。

その一方で、多摩川のコイや東京湾のマコガレイの精巣で本来現れるはずのない卵母細胞が見つかり、化学物質による内分泌かく乱作用との懸念がある。また汚染の度合いが低いと思われる沖合で漁獲されたトラフグでも雌雄同体現象が報告されている。しかし、このような現象に関する報告は断片的でまとまった研究はまだない。さらに生態学的な観点から非適応的な異常なのか、適応度に全く影響しない偶発的なものなのか、それとも適応的なものなのか検討されたことはない。

そこで本研究では次の内容を骨子として実施する。

1)これまで双方向の性転換をするハゼ科ベニハゼ属オキナワベニハゼの社会構

造について詳しく研究してきた。今後は同属他種が雌雄異体か同体か、といういわゆる雌雄性について研究する。その中で雌雄同体と異体のそれぞれの種の社会構造を比較し、いかに適応しているのかを示す。

2)雌雄異体と考えられる種の生殖腺を幅広く観察し、雌雄同体現象が出現する現状について網羅的に調査を行う。特にある種の個体群については研究期間を通じて継続的なサンプリングを実施し、雌雄同体個体の出現頻度・大きさ・年齢・季節・食性等を示し、このような個体が出現する原因を生態学的な視点から明らかにする。また雌雄同体個体について配偶行動や繁殖成功について観察し、適応的なのか、あるいは異常な現象ととらえるべきなのかをテストする。以上の結果を統合し、雌雄同体個体の生態系への影響をさぐるための基礎研究とする。

研究結果のまとめと考察：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。このことから本種は多くの場合、雌から雄に性転換すると考えられる。また、1つの群れから複数の雄が出現することからオキナワベニハゼのようなハレム社会とは異なる社会構造を持つことが予想される。

マイワシ、サッパの雌雄同体個体、雄、雌の体長を比べると有意差がなかった。アオギハゼのような機能的な性転換をする多くの種では、雌雄のサイズには有意差が見られる。このことからマイワシ、サッパが機能的な性転換はしないものと考えられる。カタクチイワシの雄と雌では有意差がみられたが、体長分布が大きく重なっていた。また、本種は水産重要種でこれまで多くの研究があるにもかかわらず性転換については報告がない。このことから性転換の可能性はきわめて低いと思われるが、慎重な検討をしたい。

3種の雌雄同体個体と雄のGSIを比べても有意差はなかった。また雌雄同体個体でも精子が形成されていることから、機能的には雄と思われる。

宮城県万石浦産のニシン目ニシンでは多いときで10%近い雌雄同体個体が出現する(児玉、1997)。鹿児島県では同じニシン目のキビナゴでは1700個体中1個体で成熟した精巣と卵巣を同時に有する個体が発見された(高橋・他、準備中)。カタクチイワシ、マイワシ、サッパはニシン目魚類であるが、この目ではこれまで機能的な性転換をする種は見つかっていない。ニシン目では原因は不明だが非機能的な雌雄同体現象が発生しやすいと思われる。

本研究では高い頻度で雌雄同体個体が出現したが、先に述べたように機能的な性転換が起きる可能性は低く、適応的な現象とは考えにくい。実験的にメダカにビスフェノールAあるいはエチルパラペンを投与すると雌雄同体の生殖

腺が出現する(Kang et al., 2002; 畠山・他、2003).また, 精巢卵が発見された多摩川のコイや東京湾のマコガレイでは内分泌かく乱物質の影響が示唆されている(中村・井口、1998; Hashimoto et al., 2000)。この3種でも何らかの化学物質の影響の可能性がありこの点を検討する必要がある。

メダカとマコガレイの雌雄同体個体の生殖腺では卵母細胞と精母細胞が混在した状態であったので、その起源は同じ生殖腺内の可能性が高い。一方でカタクチイワシ、マイワシ、サッパでは卵母細胞の出現場所が精巢の外側であった。このことからこれらの卵母細胞の起源は精巢とは異なる可能性がある。

雌雄同体個体では精子の形成が行われていたが、放精が可能なのかどうか不明である。今後は外洋域に生息する個体群との比較、生活史の解明、雌雄同体個体の生殖腺構造のさらに詳しい観察を通じて雌雄同体個体が出現する原因、生態系に及ぼす影響について詳しく検討して行きたい。

野生生物の生物学的知見研究課題(野生3): 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

研究者：信州大学 山岳科学総合研究所：花里孝幸(代表研究者)、宮原裕一
茨城大学 広域水圏環境科学教育研究センター：中里亮治

研究概要：諏訪湖の沈水植物(ササバモ、クロモ)上に生息する生物の分布を調べ、その要因を解析した。水草上には匍匐性のミジンコやユスリカが多く棲息し、その密度は水草上部に比べ下部で高く、また付着藻類量と正の相関があることが示された。したがって、水草帯の動物の分布を決める要因として付着藻類が重要な役割を果たしていることが示唆された。

霞ヶ浦で増加している外来魚、チャンネルキャットフィッシュの食性を調べた結果、イサザアミを多く捕食しており、イサザアミ個体群の動態に影響を与えていることが示唆された。イサザアミは動物プランクトンの重要な捕食者であることから、チャンネルキャットフィッシュはイサザアミ個体群を制御することによって動物プランクトン群集を変え、それが水質に影響を与える可能性があると考えられた。

諏訪湖水草帯に設置した隔離水界内にコイを放流し、水質と生物群集に及ぼす影響を調べた。コイを放流した隔離水界で付着バクテリアが増える傾向がみられたが、コイの影響は顕著に見いだすことができなかった。水草帯でのメソコスム実験の難しさが示された。それとともに、底質の違いが水質に大きな影響を与えていることが示唆された。

水草クロモに及ぼす除草剤シメトリンの影響を実験的に調べた。その結果、600ppbで枯葉の割合が顕著に増加した。一方、この実験を行った水槽中の植物プランクトン量は、60ppbで大きく減少した。この結果から、除草剤影響は水草よりも植物プランクトンに強く及ぶことが示された。

湖沼に生息する様々なミジンコ種に対する殺虫剤(カルバリル、ダイアジノン)の毒性試験を行った。その結果、ミジンコの殺虫剤耐性にはミジンコの体長と正の相関があることが見いだされた。しかしながら、その相関は沖帯種と沿岸帯種ではっきりと分かれた。すなわち、沖帯種より沿岸帯種の方が高い殺虫剤耐性を持っていることがわかった。このことは、沿岸帯の生物が常に有害な物質に曝されていることを示している。

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。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はなかった。環境水中には生物に毒性を及ぼす農薬以外の物質が含まれている可能性が示唆された。

ミジンコ個体群がピークになった時に、有性生殖を行うことが知られており、その生殖の開始を誘導する要因として急激な餌不足とともにミジンコの放出するフェロモンの存在が示されている。そのフェロモンがミジンコの殺虫剤耐性に与える影響を実験的に調べた。その結果、フェロモンはミジンコの生活史特性を変え、ミジンコ仔虫の殺虫剤耐性を低下させることが示された。

研究結果のまとめと考察：ミジンコを用いて湖水の毒性を調べた結果、明らかに湖水の毒性が比較的高くなる時期があった。しかし、その時期は、湖水中の農薬濃度変動とは必ずしも一致していない。しかも、湖心で検出された農薬濃度は低いものだった。湖水中でミジンコに毒性を示した物質を明らかにすることが今後の課題である。また、その物質は、集水域から流入するものと考えられる。もしそれが正しいとすると、湖心に生息する生物よりも、沿岸域に生息する生物の方が毒性物質の影響を強く受けていると考えられる。

湖に生息する様々なミジンコを用いて殺虫剤に対する耐性を調べたところ、それはミジンコの種の枠を超えてミジンコの体長に依存していることがわかった。ただし、ミジンコの薬剤耐性と体長との関係には、沖帯の種と沿岸帯の種で異なり、後者の方が前者よりも薬剤耐性が高かった。このことは、沿岸種は頻繁に有害物質にさらされており、そのために、耐性を獲得しているものと考えられる。

沿岸域水草帯の微小動物群集を調べたところ、水草上に多くの生物が生息し、それらの分布には水草上の付着藻類量との関わりがあることが示された。したがって、水草帯の動物群集の種組成や現存量の制御において、付着藻類が重要な役割を担っていることが示唆された。

水草を用いて除草剤に対する耐性を実験的に調べたところ、少なくとも短期間の除草剤影響試験では、水草はかなり高い耐性を持っていることが示された。その実験では、水中の植物プランクトンの方が水草よりもはるかに低い濃度で除草剤の影響を受けた。高等植物である水草よりも単細胞生物である植物プランクトンの方が、有害化学物質の影響を受けやすいのだろう。すると、植物プランクトンと同じ単細胞藻類である付着藻類も薬剤に対する感受性が水草よりも高いと考えられる。もし、沿岸域水草帯が、集水域から流入した有害化学物質にさらされたなら、そして、もしその物質が除草剤のように植物に強い毒性影響を持つものなら、水草帯の付着藻類群集に影響を与える可能性があるだろう。すると、その影響は、付着藻類に依存している多くの微小動物に及ぶ恐れ

がある。今後は、河川や湖沼に流入する化学物質の、付着藻類への影響を評価することがひとつの重要な課題となる。

これらのことから、人工化学物質の生態系影響を評価するのに、水草帯が重要な場所であると言えそうだ。その評価のためにも、水草帯生態系の構造とそれを制御している要因の解明が必要であると考えられる。本研究では、それをめざして隔離水界実験を行ったが、明瞭な結果を得ることができなかった。それだけ水草帯は複雑であり、その生態研究は難しいものであるといえる。しかし、チャレンジはすべきであろう。

また、ブラックバスをはじめとして外来魚の繁殖が多くの湖で問題視されているが、その際に問題となることの多くが在来魚群集への悪影響である。霞ヶ浦で問題を起こしているチャンネルキャットフィッシュは、魚食魚であるが、大型動物プランクトンのイサザアミを選択的に捕食していることがわかり、そこから生物間相互作用を介して複雑に生態系構造に影響を与えている可能性が示された。生態系の理解には、このような生物間相互作用の役割を理解する必要があるだろう。

生物間相互作用のひとつとして、近年、生物が水中に放出するにおい物質を介したもの(ケミカルコミュニケーション)が注目されている。例えば、捕食者の出すにおい物質に餌生物が反応して、食われにくい形態を持ったり、捕食回避行動をとる。そして、近年の研究で、この形態変化に微量の殺虫剤が影響を与えることが示された。本研究では、これまでの食う-食われる関係ではなく、ミジンコ個体群内での仲間が出すにおい物質、いわゆるフェロモンがミジンコの殺虫剤耐性を低下させている可能性が示された。このことは、生物たちは様々なレベルで様々なスタイルのケミカルコミュニケーションを行っており、農薬などの有害化学物質が、それに複雑な影響を及ぼしていることを示している。この、人工の化学物質が、天然の化学物質を介した生物たちのケミカルコミュニケーションを攪乱することの実態とそのメカニズムを明らかにすることが、重要な課題である。

基盤的研究フーズビリティースタディ研究課題 (F S 1) : 日本沿岸における生態系かく乱の実態解明とその要因解析

研究者：(独)国立環境研究所 環境リスク研究センター：堀口敏宏(代表研究者)、櫻井健郎、児玉圭太
長崎大学大学院 生産科学研究科：李政勳

研究概要：本研究は、内分泌攪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進める研究の一環として、内湾生態系の変化に着目したFSである。特に、多数の人口を抱える首都圏に隣接し、種々の人間活動の影響を長年にわたって被ってきたと考えられる東京湾を対象に据えて、東京湾における底棲魚介類群集の質的及び量的な変化をフィールド調査によって追跡し、解析した。一方、複数の種が1980年代後半から1990年代初頭にかけて同調的に減少した点、また同時期に東京湾においてPCBsをはじめとする種々の化学物質の濃度が上昇に転じた点に着目すると、貧酸素水塊とともに有害化学物質(内分泌攪乱化学物質を含む)などの複数の環境要因の影響解析を進め、底棲魚介類群集の縮小や種組成の変化をもたらした要因を明らかにする必要がある。そこで本研究では、貧酸素条件下で化学物質などに連続曝露させるための装置(貧酸素-有害物質流水式連続曝露試験システム)を試作し、予備実験を行なった。これにより、以下の知見が得られた。

東京湾内湾部に設定した20定点で10分間の試験底曳き調査を行い、漁獲物から魚類、甲殻類、軟体動物及びウニ類を選び出し、種別に個体数と総重量を計測して解析した。また、1977年から2005年まで(但し、1996年から2002年まで欠測)の同種のデータと比較した。その結果、東京湾の底棲魚介類は、2006年も、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。

ハタタテヌメリ調査の結果、2006年には、貧酸素水塊は主として湾奥～中央部において5～11月の期間に継続的に発生しており、マクロベントスの種数・豊度は湾南部で調査期間を通して高かったものの、湾奥～中央部では種数は少なく、豊度は貧酸素水塊の発生に伴い激減した。特に8月と9月には湾奥～中央部は無生物域となった。また、貧酸素水塊は、ハタタテヌメリの湾内での空間分布を制限するだけでなく、大量斃死をもたらしている可能性も示唆された。さらに、2006年のハタタテヌメリの成長及び成熟を調べ、資源量水準が高かった時と比較した結果、資源量水準が低い近年において平均体長の低下と初回成

熟体長の低下が生じていることが明らかとなった。ハタタテヌメリの着底個体も貧酸素水塊が縮小・解消する 11 月以降に出現し、シャコと同様に、これらは夏(8 月前後)に孵化したものと推測された。夏以前に孵化した個体の着底が見られない現象については、貧酸素水塊の存在が着底を妨げていた可能性もあるが、2006 年には春(4、5 月)産卵由来の浮遊仔魚が見られず、春の産卵資源量が著しく低いことも大きな要因であると考えられた。

2005 年 5 月の東京湾 20 定点調査で得られたマコガレイ稚魚を用いて、全組織中ダイオキシン類(PCDDs、PCDFs 及び Co-PCBs)を高分解能 GC/MS で測定・定量した結果、湾北部の個体中濃度が湾南部の個体中濃度よりも明らかに高濃度であり、着底稚魚の体内ダイオキシン類濃度は着底・生息場の底泥中濃度を反映すると考えられた。

貧酸素条件下で有害化学物質による長期曝露を受けた際の影響を調べるため、貧酸素-有害物質流水式連続曝露試験システムを試作し、溶存酸素(DO)濃度の経時変化等に関する予備的検討を行なった。その結果、母水槽及び曝露槽のいずれにおいても、概ね、設定した低酸素状態を再現し、維持できた。引き続き、マコガレイ稚魚を用いて予備実験を実施した結果、低酸素状態の再現法、収容密度(供試数)及び測定・観察項目を定めるとともに、長期の曝露実験の実施に向けた見通しを立てることができた。

以上の結果から、東京湾における底棲魚介類群集の質的及び量的な変化をもたらしてきた環境要因の特定と評価に向け、今後 3 年間、一層詳細に調査・実験・解析を進めることで十分な成果を挙げることができるとの見通しが得られた。

研究結果のまとめと考察：東京湾の底棲魚介類は、1980 年代末以降、著しく減少し、近年、低水準のまま推移して増加の兆しが見られず、種組成の変化も著しい。一方、夏季を中心に湾奥部から湾中央部にかけて形成される貧酸素水塊が、底棲魚介類の分布や生残、成長、性成熟に影響を及ぼしていると推察される。しかしながら、1980 年代末から 1990 年代初頭の、複数の底棲魚介類の同調した減少を貧酸素水塊の影響だけで説明することは困難である。同時期の東京湾では PCBs をはじめとする種々の化学物質が比較的高濃度であったことが明らかとなっており、複数の底棲魚介類が同調して減少した背景に貧酸素水塊と有害化学物質の複合影響が関与していた可能性を排除できない。この点を明らかにするため、本 FS では、低酸素濃度(貧酸素)-有害物質流水式連続曝露試験システムを試作し、予備実験を基に、本格的な長期曝露実験への展望を持つことができた。また、底質が汚染されていると、そこで孵化、成育した稚魚に底質中の汚染物質が移行・蓄積することも強く示唆された。以上により、今後、フィー

ルド調査による底棲魚介類の質的及び量的変化の追跡、低酸素濃度(貧酸素)-有害物質流水式連続曝露試験システムを用いた長期曝露実験の実施とデータの蓄積、さらに、より現実的な曝露形態と考えられる底質経由の曝露による影響評価などが必要である。

基盤的研究フーズビリティースタディ研究課題 (FS2): 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ーズビリティースタディ

研究者：東京大学大学院 新領域創成科学研究科：山室真澄(代表研究者)
筑波大学大学院 生命環境科学研究科：白岩善博
埼玉大学大学院 理工学研究科：浅枝隆

研究概要：シャジクモ類の衰退・消滅が平野部の湖沼では開発が遅れた地域も含めて1950年代半ばを中心に全国的にほぼ同時期に生じていることから、当時使用されていた除草剤が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ためのFS的研究を行った。

1. 除草剤が湖沼におけるシャジクモ類消滅および復活阻止の要因である可能性の実験による検討

1950年代当時登録され広く使用されていた除草剤を中心に、実験室実験によって、そのシャジクモ類に与える影響を検討した。本研究期間がシャジクモ類の栄養体が枯死する期間にあたることから、実験室実験の主要な確認事項は、培養株による光合成活性に与える影響の有無とした。

2. シャジクモ類衰退以前の繁茂状況の復元法の検討

1950年代以前にシャジクモ類がどの程度繁茂していたかは、この植物が通常は観測されにくい、湖沼における植物帯の最も深いところを占めていたこともあって、記録が残っている湖沼は限定されている。島根県の宍道湖ではかつて、シャジクモ類を肥料目的で大量に採取していたが、1950年代半ばに除草剤を大量に使い始めた頃に、急速に消滅したことが明らかになっている。またこの湖沼での堆積速度も、代表者らの研究で明らかになっている。そこで、宍道湖から柱状堆積物試料を採取し、植物の種子や卵胞子などから古環境を復元するPaleocarpologyの手法によって、1950年代以前の水草類、特にシャジクモ類の繁茂状況を復元する方法を検討した。

3. 除草剤が湖沼におけるシャジクモ類消滅および復活阻止の要因である可能性の野外調査による検討

1950年代当時に使用されていた除草剤は一部、もしくは全形態において失効になっているものもあることから、1950年代半ばに全国的に減少した原因と、現在も復活しない原因は別である可能性がある。この点について、農薬が散布されている区域とそうでない区域とで、シャジクモ類の繁茂状況が異なるかどうかを、シャジクモ類が分布する地域、もしくはシャジクモ類が最近生えてきた水田や溜め池などで分布の状況を把握し、その生態特性や、農薬以外の影響

因子との関係について、野外調査の結果から推定できるかを検討した。本研究を行った10月～3月に枯死するシャジクモ類が多いことから、今回の調査は、次年度以降の本研究で、定量的な調査を行う上で適切なフィールドを選定することを主な目的とした。

研究結果のまとめと考察：従来、湖沼においてシャジクモ類が消滅した原因とされて来た要因(富栄養化、護岸、ソウギョの導入)のうち、ソウギョの導入については、単独で特定湖沼のシャジクモ類を衰退させた原因となり得た。しかしソウギョの導入はシャジクモ類が衰退した全ての湖沼で行われたのではないことから、全国的な衰退要因としては別の原因を考える必要がある。しかし富栄養化も護岸も、それだけでシャジクモ類が衰退したと考えるには、反証例が多く認められた。このことから除草剤がシャジクモ類衰退を招いた可能性が浮上するとともに、いくつかの要因が複合して湖沼においてシャジクモ類が衰退した可能性も考えられた。

湖沼におけるシャジクモ類の生息範囲は、最大水深については概ね維管束植物より深いところにまで生息するものの、最小生息水深は維管束植物の最大生息水深よりも浅かった。そのため、シャジクモ類生息域の深い部分は維管束植物の生息限界よりも深い場所に存在し、シャジクモ類と維管束植物とが競合することはなかった。湖沼における水草帯の最深部に大規模なシャジクモ帯が形成されていたのは、このような最低必要光量の違いによっていたと考えられる。今回の現場調査では、十和田湖の水深7m以深がこのようなシャジクモ帯形成域に相当すると考えられた。

それより浅い水深帯においては、シャジクモ類と維管束植物が混在することになる。両者が光条件を巡って競合した場合、形態が匍匐型であるシャジクモ類の方が、直立する形態の維管束植物より不利になる。そのため、維管束植物群落が高密度に混在する場合、シャジクモ類による群落は形成されにくくなることが予想される。実際、青森県や島根県の「ため池」では、維管束植物群落が密生している場合にシャジクモ群落がほとんどみられなかったり(例えば青森県屏風山湖沼群、小川原湖)、維管束植物の群落が局所的に欠落した場所の小規模な群落に限られていた例が観察された(青森県小田内沼、島根県24南池、沢池)。

湖沼における富栄養化による透明度の低下は上記のようなメカニズムで、沈水植物全体が衰退しない場合でも、深い湖底に繁茂するシャジクモ類に不利な状況をもたらすことで、維管束植物との競争に敗れて衰退したと考えられる。

Havens et al. (2004)は、水位が低下した湖で攪乱を受けた沈水植物の回復状

況を調査し、水位低下の2ヶ月後にシャジクモ類が大繁殖したと報告している。パイオニア種としてのシャジクモ類の出現は、今回の「ため池」の調査でも、香川県薬池や広島県芦田川上流の八田原浄化施設でも観察された。水深の浅い「ため池」においては、そのままシャジクモ類の優占状態が継続する場合(例えば島根県・沢池南ため池)と、維管束植物のみが繁茂している場合が観察された。後者については、土地利用の検討から、市街地面積の広さと農業排水の流入がシャジクモの減少の主要な要因であると考えられた。従って、市街地面積の広さと農業排水の流入により、浅い水域でも、パイオニア種として進入したシャジクモ類に不利になる何らかの状況がもたらされていると予測される。

一方、シャジクモ類に与える影響を試験した各種除草剤については、その種類に応じて *Nitella flexilis*(ヒメフラスコモ)の光合成酸素発生(除草剤暴露時間は15 - 120分)に対して、濃度依存的な阻害効果を有することを示していた。阻害効果が見られた濃度は、水田における当該農薬の濃度に比較して100-1000倍程度高いと考えられるが、シャジクモ類衰退が全国的に進んだ1950年代半ばからの10年間当時の濃度が、シャジクモ類には多少不利に働き他の維管束植物にはほとんど影響が無かった場合には、競争において不利になることでシャジクモ類だけが衰退する状況になり得たと考えられる。

以上より、平成19年度研究での除草剤曝露実験においてはまず、衰退が進行した当時の水田における除草剤濃度を、文献などを用いてより正確に推定する手法開発が必要である。また、今回の実験では、除草剤暴露時間は15 - 120分と比較的短時間であった。低濃度の除草剤がもたらす影響は、今回実験した光合成酸素発生(CO₂固定)活性に対する影響のような短時間曝露条件に因るものだけではなく、長期曝露によりシャジクモ細胞へ除草剤が透過してからの影響や、1ヶ月単位での連続曝露が与える影響などを検討する必要がある。例えば成長、生殖などの発生物学的生理作用に対しては、低濃度の除草剤であっても高い阻害活性や影響が見られる可能性がある。また、今回のFS研究での現地調査から予測されたように、競合する維管束植物と同時に曝露したときに、シャジクモ類がより不利になるかどうかという観点からの検討も必要であり、これらの検討によって、日本におけるシャジクモ類衰退に除草剤がどのような影響を与えたかを具体的に解明できると考える。

基盤的研究フーズビリティースタディ研究課題 (F S 3) : アカトンボ減少傾向の把握とその原因究明

研究者：石川県立大学 生物資源環境学部：上田哲行(代表研究者)
京都教育大学 動物生態学：松良俊明
宮城大学 食産業学部：神宮字寛

研究概要：近年、アキアカネをはじめとしたアカトンボ類の急激な減少が各地で指摘されている。その原因として、浸透性殺虫剤、耕地整備による乾田化などが指摘されている。しかし、アカトンボ類の高い移動力や広い生息場所選択性などにより、その個体数を定量的に把握することはきわめて難しく、減少傾向の指摘も印象の域を脱していない。この研究は、既存資料を収集分析して減少傾向を抽出するとともに、学校プールから発見されるアカトンボ類幼虫を定量的に把握することで、アカトンボ類の個体数変動を広域的・長期的にモニタリングする方法の可能性を検討する。また、アカトンボ類減少の原因として、主に浸透性殺虫剤の影響と圃場整備による乾田化の影響に焦点を当てて究明する。水稻に使われる浸透性殺虫剤類は植物への残留性は高いが水・土壌などの環境中での分解速度が大きいので、イネを食害する昆虫だけを殺し長期間の効果を発揮する理想に近い農薬であるとされている。アカトンボ類はイネを食害することはないが、水田に依存した生活様式をもつため、次のような形で浸透性殺虫剤の影響を受ける可能性がある。

(1) 薬剤耐性の低い若齢幼虫期と田植えの時期が重なるため、分解前の殺虫効果によって死亡率が高まる(直接効果)、(2) イネ枯死部-菌類-ミジンコ-アカトンボ類幼虫の腐食性食物連鎖を介した生物濃縮がおきる(間接効果)などである。これらの可能性について圃場実験と室内実験を組み合わせた検討を行う。一方、圃場整備による乾田化は、(1) 非灌漑期の田面水の滞留時間を短くし、アキアカネなどの産卵場所供給量を減少させる、(2) 中干し時の乾燥度合を強化し、幼虫の死亡率を高くするなどによって個体数の減少を招く可能性がある。この点について、主に圃場整備前後の水田調査により検討する。

研究結果のまとめと考察：1. 個体数モニタリング法の確立

ヤゴ救出ネットの主宰者の協力は確約できたが、ネット自体が停止していたため、活発な状態に回復するには時間がかかると思われる。ただ、このプロジェクトでは、このプロジェクト終了後を含めた長期的、広域的モニタリング体制を確立することを目指しており、このプロジェクトの期間中に、ほかのネッ

トワークも含めて、柔軟な体制づくりが実現できるのではないかと考えている。その点で、今年 18 年目を迎える「全国トンボ市民サミット」の協力が得られることは大変意義がある。学校プールを利用したモニタリング以外の長期的広域的モニタリング調査として根付く可能性もあるからである。また、赤とんぼネットワークの会員の多数からも協力の申し出があり、これらのネットワークを有効に活用する方法について、さらに詳細に、かつ柔軟に検討していきたい。また、農水省が全国で展開する農地・水・環境保全向上対策事業の一環として、水田からのアカトンボの羽化数調査を地域住民によって行うというプランも検討している。研究の継続が認められれば、まず石川県において試行し、全国に広める予定で、現在石川県の関係機関と実施に向けて協議中である。

石川県内では予想以上にアカトンボ類(とりわけアキアカネ)の個体数の減少が著しく、樹木センサスによりカウントできたアカトンボ類はごく僅かであった。そのため、センサスの標準化を図るという初期の目標は達成できなかった。全国一律に同じ方法でセンサスを行うことが望ましいことは言うまでもないが、それには限界があり、個体数レベルの地域間比較は困難であると考えられるので、むしろ地域の特性に応じてセンサス方法を実施者が選択し、ある地域については、同じ調査者が同じ範囲を、同じ方法でセンサスを実施することで、その地域の個体数の変化傾向を把握し、その変化傾向の地域間比較を行うことが現実的ではないかと考えるに至った。学校プールによるモニタリング調査も、そのような全国的なモニタリング調査の中に位置づけて、個体数変化傾向について同調性を把握することを目指したい。

2. 浸透性殺虫剤の影響評価

アンケート結果から、アキアカネの減少傾向に地域性があるらしいこと、減少している地域では 2000 年頃からアキアカネが急激に減少しているらしいことが明らかになった。これは石川県における上田の印象ともほぼ一致する。印象をたずねるアンケート調査は曖昧な面があることは否定できないが、いっぽうでアカトンボ、とりわけアキアカネのように人目に付きやすく、また広範囲を移動するため時間空間的に個体数変動が激しいものでは、局地的に行う定量的な個体数センサスより、ある地域(市町村レベル)についての全体的な傾向を正確に反映すると考えられ、今回の結果はかなり信頼することが出来ると思われる。

育苗箱施用農薬の成分流通量調査から、イミダクロプリドとフィプロニルが近年になって増加し、それ以外のベンフラカルブ、カルボスルファン、カルタップはむしろ減少傾向にあることが明らかになった。アキアカネの急激な減少が 2000 年頃からのことであるならば、それ以前から大量に流通しているベンフラカルブ、カルボスルファン、カルタップが減少の原因とは考えにくく、近年

になって登録され、流通量が増加したイミダクロプリドとフィプロニルとの関連が疑われる。さらに言えば、1994年からは流通量が横ばいになっているイミダクロプリドより、1996年に登録され急増しているフィプロニルとの関連が疑われる。また、個体数減少の地域差もフィプロニルの流通量の地域差ともほぼ対応していた。イミダクロプリドとフィプロニルの2種を使った圃場実験により、フィプロニルを育苗箱に施用した水田ではアカネ類幼虫がほとんど生存しないとの報告もあり(宮城県古川農業試験場)、減少原因の有力な候補の1つとしてフィプロニルが強く示唆されているように思われる。いっぽう、イミダクロプリドについては、ミニ水田を使った実験的研究により生物多様性を低下させるとの報告もあり(五箇公一氏)、少なくとも間接的な影響を無視することは出来ない。

以上のように、予想通りアドマイヤー、プリンスという商品名で出回っているイミダクロプリドとフィプロニルの関連を強く示唆するものであるが、直接的な検証はこれからである。今回は取り上げることが出来なかったが、最近出回りはじめたスタークル(ジノテフラン)や今後出回ることが予定されているアドマイヤーとプリンスの混合剤のことを考慮すると、緊急の課題として取り組むべきであることは間違いないと思われる。ただ、農薬それぞれの流通量にかなりの地域差があり、その点も踏まえて、農法の地域差も考慮しながら、より詳細な検討が必要であろう。また、イミダクロプリドなどを使ったミニ水田での実験では、種々の生物に直接的な影響ばかりでなく、間接的な影響を及ぼすことが明らかになって来つつあり、直接的な致死効果ばかりでなく、水田生態群集の一員との視点からアカトンボ類の減少傾向と農薬との関連を調べていくことが重要であることがあらためて浮き彫りになってきた。下記2名の新規参加予定者は、この点を踏まえて参加要請した次第である。

3. 圃場整備による乾田化の影響

田面水の残留率については、直接たまり水の面積を測ることも試みたが非常に時間がかかるため、目視による10段階評価を採用した。精度は落ちるが、多様な数多くの水田を調査することが可能であるため、ある地域の大まかな状況を把握するには適していると考えられる。しかし、人力による地上からの調査には限界があるので、空中写真を使って測定することも検討していきたい。田面水の残留度は、仮説として考えている圃場整備のほかにも、立地条件などの影響が強いことも示唆された。それらの要因も含めた総合的な評価を行うためのモデルの構築が必要である。また、同一地域における圃場整備前後の乾燥度合いの比較を行うことの必要性もあらためて明らかになった。

田面水の残留度と産卵ペア利用度との間に高い相関があることが今回の予備的調査で明らかになった。このことから、少なくともアキアカネに関しては、

田面水残留度を計測することで、それぞれの地域での、それぞれの水田での産卵ペア利用度を推定するモデルを構築出来る可能性が出てきた。ただし、残留度 10(これは湛水水田であり必ずしも残留度ではない)の水田は必ずしも多くのアカトンボ類を誘引するというわけではないようである。また、誘引される種も異なっており、コノシメトンボは誘引されるが、アキアカネやナツアカネ、ノシメトンボはまず誘引されない。一方、残留度 1 の水田でも多数のペアが高密度で産卵している場合もあり、今回の結果がそのままほかの地域にも適用できるとは限らない。田面水の残留度から産卵ペア利用度を高い精度で推定するには、産卵場所選択の各プロセスにおいてはたらく要因を明らかにするなど、野外実験も交えてさらに詳細な調査を行う必要がある。

基盤的研究フィージビリティースタディ研究課題 (F S 4) : 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

研究者：愛媛大学 沿岸環境科学研究センター：岩田久人(代表研究者)、金恩英

研究概要：鳥類や水棲哺乳動物を含む野生生物の個体数減少の一要因として、化学物質による環境汚染の関与が指摘されているが、多くの種について適切なリスク評価は依然として実施されていない。リスク評価が困難な理由として、現在使用されている化学物質が多種多様であり、安全性試験に時間がかかることが挙げられる。また、すでに数種のモデル動物で明らかのように、化学物質に対する毒性発症の感受性はモデル動物種・系統間でさえも大きく異なり、このことは野生生物種にも該当すると予想される。

申請者は、化学物質の潜在的なリスクを評価するため、核内レセプター(受容体)を介する生体反応に着目した。核内レセプターの機能は通常、内因性物質(ステロイド・甲状腺ホルモン・レチノイドなど)によって制御されているが、PCB・環境ホルモンなどの化学物質によって活性化(もしくは不活化)されると、代謝酵素であるチトクローム P450 (CYP) や物質輸送に関わるトランスポーター等の遺伝子発現レベルを変調させる。つまり、核内レセプターは体内生理環境のホメオスタシスに関与しており、核内レセプターを起点とする情報伝達機構は化学物質によってかく乱されるのである。

そこで申請者は化学物質による核内レセプターを介した情報伝達機構のかく乱について、比較生物学的に検討することを考えた。生物種特異的な毒性影響について評価するためには、毒性発現に関与する遺伝子産物の遺伝情報や機能を系統的・生態学的に重要な生物種間で比較検討することが不可欠である。本申請では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、核内レセプターを指標とした敏感種・鈍感種の探索と感受性を決定する分子機構について解明することを計画した。

研究結果のまとめと考察：本研究の結果より、核内受容体を介した基本的な細胞内情報伝達機構は多様な生物種で保存されているものの、そのアイソフォームの存在やリガンド選択性・応答性には明確な種差があり、このことは核内受容体のリガンド結合ドメインにおけるアミノ酸配列の相溶性が相対的に低いことに起因していると考えられた。鳥類 AHR1 に関しては、その TCDD 活性化能は一部のアミノ酸配列の差で説明できることが示唆された。

また本研究によって、過去にラットやマウスなどのモデル動物で得られた化学物質による核内受容体活性化能に関する結果は、水棲哺乳類・鳥類などの野生生物に単純に外挿できないことが明らかになった。したがって、化学物質に対する生物種固有のリスクや影響を正確に評価するためには、核内受容体の種特異的機能特性の解明が不可欠である。

基盤的研究フーズビリティースタディ研究課題 (F S 5): 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

研究者：(独)国立環境研究所 環境リスク研究センター：鑪迫典久(代表研究者)
自然科学研究機構 岡崎統合バイオセンター：渡邊肇

研究概要：人間の経済活動に伴い環境中に放出される化学物質がヒトや野生生物の内分泌を攪乱する問題に関する多くの研究は、これまで脊椎動物を対象としていた。一方、無脊椎動物の内分泌メカニズムは脊椎動物とは異なることから、その内分泌を攪乱する化学物質も脊椎動物とは当然異なり、別のアプローチが必要である。地球上に生息する生物種の約95%は無脊椎動物であり、さらにその大部分は昆虫やエビ・カニ類など甲殻類からなる節足動物であることを考えると、内分泌攪乱化学物質の野生生物への影響、さらには生態影響あるいは環境影響を明らかにする上で、無脊椎動物の内分泌攪乱作用メカニズムを解明することは重要な研究課題である。

昆虫・甲殻類のホルモンとしてはテルペン系のアラタ体ホルモン(幼若ホルモン)とステロイド系の前胸腺ホルモン(脱皮ホルモン)およびペプチド系ホルモンが知られている。ペプチドホルモンは形が多種多様であり、生物種ごとに異なることが知られているため、逆にある種の(人工)共通化学物質によって攪乱される可能性は低い。脱皮ホルモンはドイツのButenandtらによってカイコガ(*Bombyx mori*)の蛹500kgからホルモンの抽出と精製がすすめられ、1954年に25mgの結晶としてエクダイソンが単離されている。その後漸く1991年にKoelleらによってショウジョウバエのエクダイソンレセプター(DmEcR)が脊椎動物のステロイドホルモン受容体とDNA結合領域とリガンド結合領域が高度に類似したドメイン構造と比較することによって同定された。一方、幼若ホルモン(JH)については1937年にフランスのBounhiolらによって幼虫形質の保持に必要なホルモンの存在が明らかにされ、1956年にアメリカのC.M.Williamsらによってセクロピアガ(*Hyalophora cecropia*)という巨大な蛾からその有効成分が抽出され、1967年にアメリカのH.Rollerによってその成分の化学構造が明らかにされた。しかしその後、その作用メカニズムのキーとなる受容体の解明が進んでおらず、USP(ultra spiracle)またはRXR(レチノイン酸レセプター)がJHレセプター(JHR)ではないか、といった諸説はあるが未だ確定されておらず、それらを否定する説も出ている。JHはセスキテルペンであり、他の生物でもセスキテルペンの受容体は知られていないため、脱皮ホルモンのようなリガンド結合部位の相同性に着目した同定方法を用いることができない。

JHは昆虫では現状維持ホルモン(幼虫が幼虫であり続けること、蛹が蛹であり続けること)として知られているが、成虫になると逆に成熟促進ホルモンとして働く。雌成虫の脂肪体ではビテロジェニンの合成および卵巣への取り込み促進にも関与している。また胚発育の促進、成虫原基の発達抑制、偽成虫化阻止、エクジステロイド分泌刺激、体色変化、社会性昆虫(ハチ、蟻など)のカースト分化、幼虫休眠の維持、性ホルモンの合成誘導など多様な作用が知られている。そしてJHおよびその類縁化学物質は昆虫体内のホルモンバランスを攪乱させ、上記作用を逆に利用した害虫防除農薬としても使用されている。つまり正常な成虫への変態が阻害されたり、過齢脱皮を起こしたりする。上記の様々は発現系ネットワークの頂点にはJHRが存在していることはほぼ間違いないと思われるが、なぜ表現形が多様であるのかについては、初期転写遺伝子からのカスケードに様々な因子が影響しているのではないか、エクダイソンのように受容体がヘテロダイマーを構成していてカウンターパートによって転写開始部位が変化するのではないか、複数のコファクターを使い分けて表現形を変化させているのではないかといった様々な仮説が存在するに過ぎない。

昆虫では、種、成長段階、分泌量の違いによって多彩な作用を示す事が知られているJHだが、最近になって、昆虫や甲殻類のJHおよびその類似物質によってミジンコの仔虫の性がオスに偏る現象が確認された。ミジンコは甲殻類の一種で、その幼若ホルモン物質として知られているメチルファルネソエートは、エビやカニと同じであり、昆虫等のホルモンであるJH IやJH IIと化学構造式が非常に類似している。よってそれらの受容体のリガンド認識部位は似ている可能性が高いと考えられている。よって甲殻類における内分泌攪乱のメカニズムを解明する上で、ミジンコのホルモン体系やホルモン受容体についての基礎的研究をおこなうことは非常に有効な手段であり、その結果は甲殻類や昆虫類の内分泌攪乱メカニズムの解明にも寄与できると考えられる。ただし他の甲殻類と異なりミジンコの仲間は、特殊な繁殖体系を持ち、通常実験環境下ではメスだけで無性生殖を行う。片方の性に偏っているため、性分化に関与する性ホルモン系の攪乱の研究には不向きであるとされてきた。しかし逆に、通常は存在しない雄が現れるという現象は検出手法としてはドラスティックでかつ明確であり、また今まで明らかにされたミジンコ仔虫の性を左右する化学物質はすべてJH様物質に限られていてかつフォールスネガティブが無くきわめて高いスペシフィシティを持つ事、極低濃度(フェノキシカルブで100ng/L)の幼若ホルモンでミジンコ仔虫の雄発生との因果関係が強く示唆されることなどから、研究対象として決して不向きではなく、どちらかといえば有利である。ミジンコは昆虫に比べると、変態をしないためステージが単調でありかつ産仔周期が短い(約48時間)ため、昆虫のようにある種のステージの時にJHRが発現し、その時特

異的にJHが作用しているのではないかと懸念する必要性が少ない。また我々の研究から6時間のJH投与により雄仔虫が発生することが判明している。つまりランダムにミジンコを収集しても何割かは必ずJHRを発現していると考えられる。

内分泌攪乱メカニズムの解明に先立ち、まず化学物質の生体内における挙動を解明することが、様々な反応メカニズムの解明の端緒になると考えられ、一般的には幼若ホルモン様化学物質がミジンコの体内に入ったときに起こる最初の反応の一つとして、レセプターも含めてその化学物質にある種のタンパク質が結合することが予想されるため、幼若ホルモンに結合する蛋白質を解明する事は攪乱メカニズム解明のために有効な手段である。

よってミジンコを研究材料として用いて幼若ホルモンレセプターの探索を行い、それを精製単離し、その分子構造を明らかにすることは、充分に実現可能性が高く、ミジンコ以外の節足動物における幼若ホルモン作用機構の解明にも貢献できると考えられる。

研究結果のまとめと考察：今回、幼若ホルモン結合タンパク質が細胞質に多く存在していることが確認された。細胞質には幼若ホルモンのキャリアタンパク質なども存在しているはずであるから当然の結果である。また、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が、この結果のみから幼若ホルモンレセプターが核内レセプターで無いという結論にはならない。未知のレセプターであるためあらゆる可能性を考慮して漏れが無いようにしながら精製を進めていきたい。

現在の問題点として精製を進めていくことによってカラム溶液に含まれるタンパク質の幼若ホルモンとの結合活性をAFFINIX Qを用いて測定しようとする、塩濃度が高くさらに他のリガンドが共存しているためそのままではAFFINIX Qによって検出することが出来ないことが判明した。AFFINIX Qによる測定に供するためには一度リガンドとタンパク質間の結合をはずし、さらに透析などで塩を除く必要があると考えられる。操作数が増えることによって極微量のタンパク質を途中でロスする可能性が高く、現在効率的な測定方法を検討しているところである。

またリガンド結合蛋白質を絞り込んだ後で、レセプターの選別を行う必要があり、遺伝子のレセプター様配列を基にしてレセプターとバインディング蛋白の区別を考えているため、共同研究で行っているESTライブラリーの効率的な利用を考えている。

基盤的研究フーズビリティースタディ研究課題 (F S 6): 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

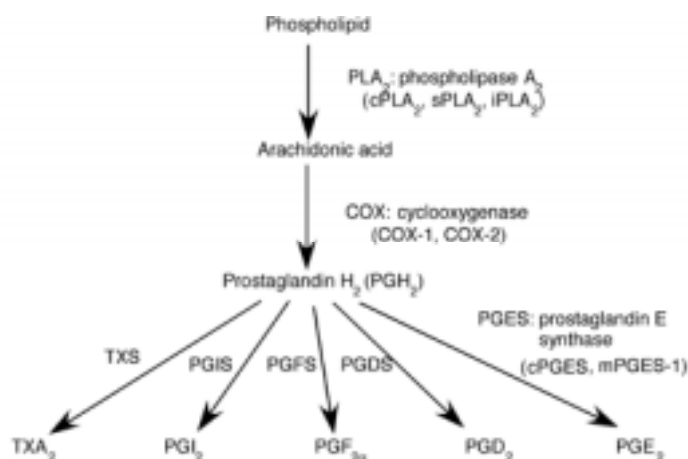
研究者：昭和大学 薬学部：原俊太郎(代表研究者)、工藤一郎、中谷良人、桑田
浩

昭和大学 遺伝子組み換え実験室：武富芳隆

研究概要：プロスタグランジン (PG) 産生などのアラキドン酸代謝系は、排卵、受精、個体発生、分娩といった生殖生理系で重要な役割を果たす。本研究では、環境化学物質の生体内標的として、このアラキドン酸代謝系に注目し、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。

アラキドン酸代謝系に関わる酵素としては、その初発酵素であるホスホリパーゼA₂ (PLA₂)、アラキドン酸からPGH₂への変換を触媒するシクロオキシゲナーゼ (COX)、PGE合成酵素 (PGES) などの各々のPGの最終合成酵素があり、さらに、PLA₂、COX、PGESには各々多数のアイソザイムが存在する (右下图)。

本研究では、環境化学物質が PLA₂、COX、PGESの各アイソザイムに与える影響について、それぞれの酵素の組み換えタンパク質を用いた分子レベルの解析 (酵素活性や他のタンパク質との相互作用に対する影響の検討)、過剰発現・ノックダウン細胞を用いた細胞レベルの解析 (細胞からのアラキドン酸遊離やPG産生に及ぼす影響の検討)、過剰発現・遺伝子欠損マウスを用いた個体レベルの解析 (受精、個体発生等の表現型への影響の検討) を行い、環境化学物質の内分泌かく乱作用の新たな標的の同定を試みる。



研究結果のまとめと考察：マウス精巢の精子形成細胞にその存在が見出された sPLA₂ のアイソザイムの中には、精子先端のアクロソーム部位に局在するものがあり、これらは受精の重要な段階であるアクロソーム反応に関与する可能性が考えられた。実際に、sPLA₂ 阻害剤が受精能を抑制したことから、精子に存在する sPLA₂ の各々のアイソザイムが協調的に作用することが、精子が正常

に受精するために重要であると考えられる。sPLA₂ はグリセロリン脂質の 2 位のアシル基を加水分解し、脂肪酸とリゾリン脂質を産生する。脂肪酸あるいはリゾリン脂質そのもの、またはこれらの代謝産物がアクロソーム反応を正に制御していると考えられる。

さらに、本研究では、PLA₂ 活性を阻害する MEHP が、用量依存的に精子の受精能を抑制すること、が示された。この機構についてはさらに詳細な検討が必要であるが、これらの結果から、PLA₂ 活性を阻害する環境化学物質やその類縁物質については、その安全性を考える上で、精子の受精能に対する効果を検討する必要があることが示唆された。

また、その遺伝子欠損マウスが出生直前後に死に至ってしまう cPGES は、胎生期の肺における PGE₂ 産生を亢進させる一方で、組織や細胞によっては PGE₂ の不活化系を調節することにより PGE₂ 産生を逆に低下させている可能性が示唆された。環境化学物質の生体内 PGE₂ 系への効果を考える上では、その不活化系への関与も検討する必要があると思われる。