

平成 22 年度 EXTEND2010 野生生物の生物学的知見研究課題、基盤的研究課題、
フイージビリティースタディー及びその他の研究課題の研究成果概要

(敬称略)

区分 番号	代表研究者 所属	研究課題名	実施期間
野生生物の生物学的知見研究			
野生 1	上田哲行 石川県立大学	アカトンボ減少傾向の把握とその原因究明	H18～H22
野生 2	白岩善博 筑波大学	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	H19～H22
野生 3	三枝誠行 岡山大学	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	H21～
基盤的研究			
基盤 1	大迫誠一郎 東京大学	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	H20～
基盤 2	安住 薫 北海道大学	海産無脊椎動物ホヤのトキシコジェノミク ス基盤研究	H20～H22
基盤 3	早川和一 金沢大学	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	H20～H22
基盤 4	古賀 実 熊本県立大学	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	H21～
基盤 5	田中嘉成 国立環境研究所	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	H21～

区分 番号	代表研究者 所属	研究課題名	実施期間
フィージビリティースタディ			
FS 1 (野生)	宇野誠一 鹿児島大学	海底質中エストロゲン様物質経由のばく露とそのリスク評価	H22～
FS 2 (基盤)	鯉淵典之 群馬大学大学院	多動性に関わる内分泌系因子の同定とかく乱物質の影響に関する研究	H22～
FS 3 (基盤)	井上博紀 酪農学園大学	易代謝性化学物質の体内動態と次世代への影響に関する研究	H22～
FS 4 (基盤)	小林 亨 静岡県立大学	魚類生殖能を指標とした化学物質の内分泌かく乱作用機構に関する研究	H22
その他の関連研究			
その他 1	田辺信介 愛媛大学	生物蓄積性内分泌かく乱候補物質によるわが国の野生生物汚染の実態解明	H17～
その他 2	井口泰泉 自然科学研究機構	ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニズムの解析	H17～
その他 3	井口泰泉 自然科学研究機構	トキシコゲノミクスを応用した化学物質の内分泌かく乱作用スクリーニング手法の開発	H22～

野生生物の生物学的知見研究課題(野生1)：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)

宮城大学 食産業学部：神宮字寛

東京農工大学：渡邊裕純

研究概要：この研究は、近年各地で指摘されているアキアカネをはじめ水田依存性アカトンボ類の急激な減少について、定量的にそれを示すこと及び減少原因を明らかにした上で、その対策を検討することを目的として実施してきた。

アカトンボ類の減少傾向については、1989年の定量的なデータがある石川県野々市町の水田からの羽化数調査及び白山山系でのアキアカネの越冬個体群の個体数センサスを2007年から継続的に実施した。急激な減少の主要因と考えられる育苗箱施用剤による生存率の低下を唯一のパラメータとするシミュレーションモデルによるアキアカネ個体数の石川県における経時的な変化は、白山山系での個体数変化の観察値と全体的にかなりよく一致した。また、アキアカネ個体数の地域差については、新潟を含む北陸4県でモデルによる予測値の検証を行い、地域差をかなり正確に説明できた。このような結果は、育苗箱施用剤の普及がアキアカネの広域的な減少の主要な要因であることを示すものである。

育苗箱施用殺虫剤の毒性評価・影響評価を今年度も実施した。ライシメータを使った実験では、新しくジノテフランとカルタップの影響評価を行い、ジノテフランでは、同じくネオニコチノイド系殺虫剤であるイミダクロプリドと同等かそれ以上の生存率低下が観察された。カルタップでは無処理区と変わらないという結果になり、アキアカネにはほとんど影響を与えていないものと推察された。カルタップは、標準試薬を使った毒性試験では、フィプロニルと同程度以上に幼虫の行動障害をもたらしたが、死亡に至る程度は低かった。カルタップ施用水田の田面水を使った曝露実験では、行動への影響も大きくなかった。

イネ苗と一緒に土中に埋め込まれるイミダクロプリド粒剤とフィプロニル粒剤から田面水中に溶出した成分は、いずれも、日中は光分解によって速やかに分解され、フィプロニルからは、**fipronil desulfinyl** や **fipronil surfone** などが生成された。田面水中からは、ほかに **fipronil surfide** も検出されたが、標準試薬を使った毒性試験により **fipronil surfone** と **fipronil surfide** のアキアカネ幼虫に対する毒性は、フィプロニルよりきわめて高いことが明らかになった。**fipronil desulfinyl** の毒性試験は実施できなかった。

育苗箱施用殺虫剤が施用された水田の比率は、1990年代から増加しはじめ、2009年では、全国レベルで55%に達していると推定された。都道府県によってはさらに高い比率を示した。育苗箱施用殺虫剤の中では、初期の頃はイミダクロプリドがほとんどを占め、2000年頃からフィプロニルが大半を占めるようになっていたが、数年前からジノテフランをはじめ、ネオニコチノイド系の新しい殺虫剤の施用水田の比率が高くなっていった。

研究結果のまとめと考察：この研究は、近年各地で指摘されているアキアカネをはじめ水田依存性のアカトンボ類の急激な減少について、定量的にそれを示すこと及び減少原因を明らかにした上で、その対策を検討することを最終的な目的として 4 年半にわたって実施してきた。ここでは本年度の結果を中心に、4 年半の研究期間全体のまとめも行う。

○減少傾向の把握

普通種であるアキアカネについては、過去のセンサスデータが皆無に近く、全国的な減少傾向を定量的に明らかにすることは不可能であった。ただ、各地のトンボ研究者に対するアンケート調査から、ほとんどの地域で、2000 年頃から急激に減少し始めているという傾向が把握できた。2007 と 2008 年に赤とんぼネットワーク会員に依頼して実施した全国的な個体数センサスでは、北海道や本州の一部の地域を除き、アキアカネの個体数が 100m 当たり 1 以下と、きわめて低密度になっている現状が明らかになった。ただし、この密度が以前と比べて著しく低い密度であることは確かだとしても、過去の同様のデータがないため、どの程度減少したかは明らかでない。

減少の程度に関しては、局地的な限られたデータであるが、石川県で上田が過去に実施した、水田からの羽化数調査や夏季の山岳地帯での越夏個体群調査との比較により、少なくとも石川県では、アキアカネが 1989 年当時と比べて、2007 年、2008 年時点で 1/100 から 1/200 程度に減少していることが明らかになった。ただ、局地的で限られた回数データのデータであるため、わずかな羽化数の増減で減少率は大きく変化する点で問題がある。

○個体数の地域差の把握

アキアカネのように移動性が高く、疎密を伴いながら広範囲に分布する種では、その密度を把握するためには、広範囲の調査をくり返し実施する必要がある。そこで、2009 年と 2010 年には、自動車により道路（農道）を横切る連結態のペアをカウントする方法を実施した。この方法では、1 日に 100km 前後の距離をカバーするセンサスが可能であり、局地的な疎密の影響を回避し、全体的な傾向を定量的評価できると思われる。その結果、新潟県西部を含めた北陸 4 県で著しい個体数の地域差があること、2009 年と 2010 年で、その地域差の傾向がほとんど変わらないことが明らかになった。

○育苗箱施用殺虫剤の毒性評価

アキアカネをはじめとした水田依存性アカトンボ類の減少原因としては、育苗箱施用殺虫剤、水稲作付面積の縮小、圃場整備による乾田化、地球温暖化に伴う越夏場所の消失・縮小や競合種の飛来早期化や増加などさまざまな要因が考えられる。そこで問題を、長期的な減少傾向に影響を及ぼす要因とここ 10 年ほどの短期的な急激な減少をもたらす要因にわけて研究を進めた。

短期的な急激な減少をもたらす要因としては、1990 年代から全国的に普及し始めた育苗箱施用殺虫剤に焦点を当てた。1 つには、実験レベルで、アカトンボ類幼虫への毒性を評価することである。主に小型ライシメータを使って水田環境を再現しながら実験を行い、イミダクロプリド、フィプロニル、ジノテフラン、カルタップの影響評価を実施した。その結果、アキアカネ幼虫、ノシメ

トンボ幼虫に対しては、フィプロニルの影響がもっとも大きく、これまで全く羽化が認められていない。イミダクロプリドは無処理区に比べて 30%以下、ジノテフランもほぼ同程度の羽化率に抑制されることが明らかになった。カルタップは無処理区と変わらない羽化率が観察された。このような結果は、2007 年と 2008 年に石川県で実施した、一般農家が管理する水田で得られた羽化調査結果と符合する。なお、同じ水田依存性のアカトンボでも、ナツアカネはフィプロニルやイミダクロプリドに対する感受性が低いことも明らかになった。

田面水中での農薬動態を、フィプロニルやイミダクロプリドについて実施した。その結果、イネ苗の移植直後に高濃度になり、1 週間程度で半減するものの、土中に粒剤として埋められるため、そこから長期間にわたって殺虫剤成分が水中に溶け出し、土壌や田面水での残留期間が長い傾向があった。フィプロニルでは、水に溶け出したフィプロニルそのものは光分解によって低濃度になるが、fipronil surfone や fipronil surfide、 fipronil desulfinyl といった代謝産物が生じていることが確かめられた。アキアカネ幼虫を使った毒性試験により、fipronil surfone はフィプロニルの 16.5 倍、fipronil surfide は 53.8 倍の強い毒性を持つことが示された。

アキアカネ幼虫に対する急性毒性試験で求めたフィプロニルの 48 時間 LC50 は、2010 年の試験では 3,086ppb ときわめて高い値であった。これは石川県野々市町で 2009 年に採卵した卵を使った実験結果であるが、2007 年に埼玉県で採卵された卵からのふ化幼虫を使って 2008 年に行った試験での 48 時間 LC50 は 4.5ppb であり 700 倍近くの開きがある。ただし、2010 年の実験では、48 時間で死亡する個体がほとんど見られなかったため、LC50 の値の信頼性は低い。ただ、72 時間 LC50 としても 177ppb であり、2008 年の 48 時間 LC50 の 30 倍になる。今年度の調査で長岡市のフィプロニルを施用したとされる水田で幼虫や羽化個体が見つかったこと、2004 年にはすでにイネドロオイムシのフィプロニル抵抗性が報告されていることから、アキアカネ幼虫においても抵抗性の出現の可能性を考えるべきかも知れない。

フィプロニルは、実験室レベルでは遅効性であり、48 時間以内に死亡する個体はまれであった。しかし、曝露時間とともに LC50 は指数関数的に低下した。fipronil surfone や fipronil surfide も同様であった。このように LC50 や EC50 が曝露時間とともに指数関数的に減少する理由は不明であるが、上記長岡の例を除いて、フィプロニル施用水田からアキアカネがまったく羽化しないこと、移植からかなり短い時間で幼虫が見られなくなることを、ある程度説明できるのではないかと考えている。

一方、カルタップは標準試薬を使った毒性試験では、フィプロニルと同程度か、むしろ短い時間ではより強い毒性を示した。しかし、死亡率としてみると 72 時間以下の曝露時間での LC50 値はきわめて高い濃度を示し、フィプロニルに比べてアキアカネ幼虫への毒性が低いことが示された。パダン施用水田の田面水を使った曝露実験では、最高濃度の場合でも、行動への影響率も死亡率もいずれも低いという結果になった。毒性実験と曝露実験で食い違いが生じる理由は不明であるが、曝露実験は、パダン施用水田調査、ライシメータを使った実験の結果と符合するものである。

○育苗箱施用殺虫剤の普及によるアカトンボ類の個体数減少

フィプロニルをはじめとした育苗箱施用殺虫剤が幼虫の高い死亡率をもたらすとしても、それはアカトンボ類の死亡要因の 1 つとなりうることが示されただけであり、個体数減少の要因であることが証明されたことにならない。個体数の経時的な減少傾向や地域差に対する育苗箱施用殺虫剤の広範囲での影響評価を行う必要がある。しかし、経時的な減少について実証することはすでに不可能であり、また地域差についても、個々の水田の農薬使用状況を調べながら発生量調査を行うには、多大な時間と人員そして経費が必要となり、きわめて困難である。そこで、都道府県別育苗箱施用殺虫剤の出荷量を集計し、水稻作付面積に対するそれらの農薬の面積比率を年度ごとに求め、ライシメータで明らかにされた、それぞれの農薬処理区でのアキアカネ幼虫期の生存率を組み込んだ個体数減少シミュレーションモデルを作成した。モデルはきわめて単純なものであるが、石川県白山山系で実施された 1989 年以來の個体数変化とかなり良好な一致が見られた。また、新潟県を含めた現時点での地域差もかなり正確に予測できた。農薬流通量に、転作率を組み込んだモデルはさらに精度良く地域差を予測したが、その改善率は 10%程度であり、大部分（60%程度）は 6 種の育苗箱施用殺虫剤の使用面積比率の差として説明できた。現在は都道府県単位で計算を行っているが、同じ県内でも JA が違えば推奨農薬も異なるので、JA 単位での農薬使用量が把握できれば、さらに精度が高くなり、また、育苗箱施用殺虫剤による説明率も高くなると予想される。

殺虫剤の使用は古い歴史を持ち、おそらく、それらによるアカトンボ類への甚大な影響が過去にもあったと思われる。しかし、それを確かめることは不可能である。育苗箱施用剤は、農業者への健康被害の危険性が小さく、省力化にもなることから急速に普及している。また、粒剤としてイネ苗と一緒に土壌中に埋め込むという施用方法は、周囲の環境への負荷を小さくするという点でも優れているとされている。アカトンボ類への毒性が、従来の殺虫剤に比べてどうなのかは、残念ながら比較できる資料がないが、パダンを除き、育苗箱施用剤に使われている殺虫剤成分は十分に強力である。過去の殺虫剤より毒性がどれだけ強いかわかり、むしろ問題は、その施用時期である。育苗箱施用殺虫剤は、いわば「保険」として害虫が発生する前に施薬するものであるという位置づけ、かつ機械化された水稻栽培の中で省力的に実施するという点で、移植時あるいは播種時に施用される農薬であるという点がアカトンボ類にとって致命的な影響を及ぼしていると言える。また、保険という性格上、害虫が発生するしないにかかわらず施用されるため、その施用面積も従来の農薬よ

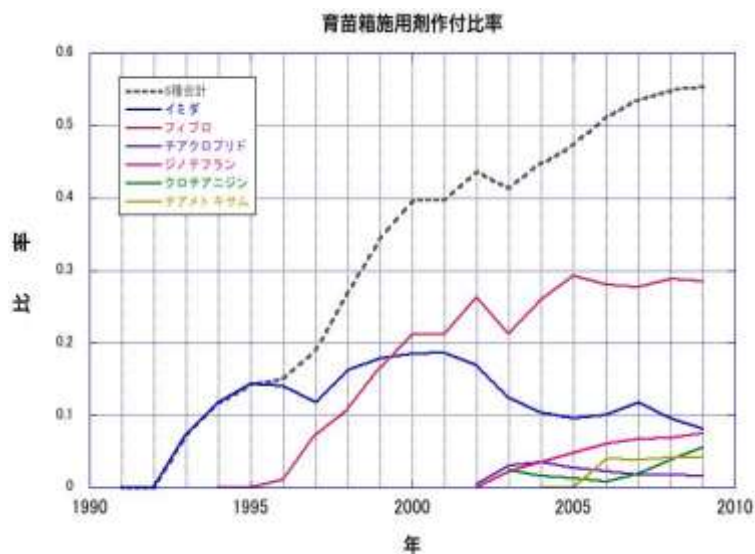


図 20 出荷量から推定した主要 6 種の殺虫剤を成分に含む育苗箱施用剤処理水田の面積比率の推移

りかなり広範囲になっているものと思われる。図 20 は農薬出荷量から推定した主要 6 種の殺虫剤を成分とする育苗箱施用剤が使用された水田の面積比率の経年変化を全国レベルで示したものである。1990 年代前半から右肩上がりに増加し、2009 年時点で 55%ほどの比率を占めている。ここでは、水稻以外の作物にも使用されており、育苗箱施用剤としての出荷量が特定できない薬剤は含めていない。それらを含めると、この比率はさらに増加するものと思われる。育苗箱施用殺虫剤の増加は、ごく初期を除けばフィプロニル施用水田の比率の増加とほぼ平行しており、現在でも 50%ほどを占めている。近年になって頭打ち状態になっているが、それに代わってジノテフランやクロチアニジンなど、新しい殺虫剤が普及し始めており、予断は許されない状況である。

○相対寄与率の推定に向けて

殺虫剤以外の要因が要因がどの程度アカトンボ類の減少に関わっているか、その相対的な減少への寄与率を求めることは重要である。とりわけ、羽化が始まる前に実施されることが多い中干しの影響を評価することは重要であると思われる。しかし、中干しのタイミングや頻度、そしてその程度は、1筆1筆の圃場単位で実施されるため、きわめて多様性が高い。また、土壌の保水力なども隣接した圃場であっても、かなり異なる場合がある。まだ確実なことは言えないが、乾燥に対する耐性は、幼虫の齢によってかなり異なる可能性もある。したがって、アカトンボ類幼虫に対する中干しの影響を広域的に評価することはきわめて困難であると言わざるを得ない。

このような水田の多様性は、中干しの問題に限らない。捕食動物や餌動物の発生量や水温なども多様であり、数筆の圃場で明らかになったことを、一般化することはかなり危険である。

このような状況の中では、精度は粗いものであっても、これまで試みてきたような、数理モデルによる現象把握が有効であるように思われる。これまでは個体数の減少要因のみを組み込むモデルであ

ったが、個体群の増殖率や環境の確率的変動要因も組み込んだモデルを構築し、様々なシナリオでシミュレーションした結果と実際のデータを比較するということを次の段階として考えている。

図 21 はそのような試みの 1 例であり、最初に、産卵数の分布など、いくつかの個体群パラメータを分布として与え、モンテカルロ法によりシミュレーション計算を行う。変動しながらも長期的

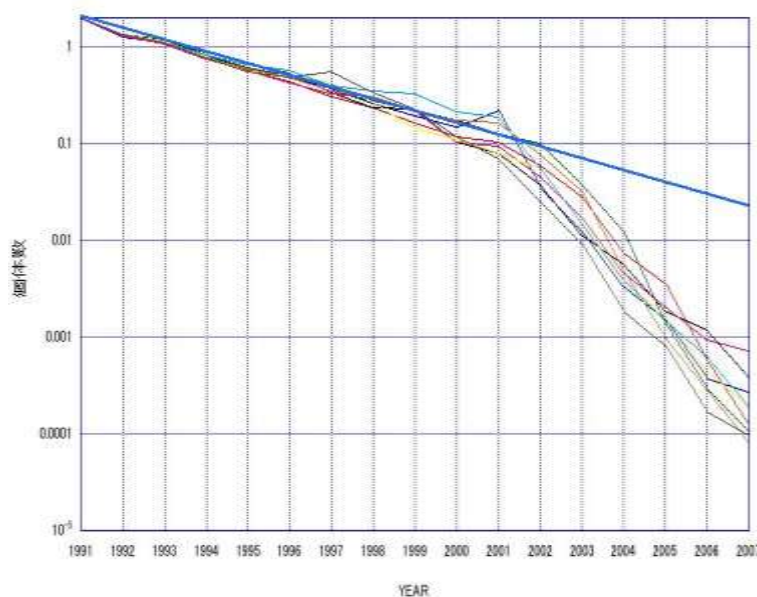


図 21 個体群動態モデルによるシミュレーション結果の一例

にはほぼ一定水準で個体数を維持するようにパラメータを調整した上で、既存の農薬による減少率を組み込むとどう変動するか、さらに、中干しの影響を組み込むとどうなるかという検討を行ったものであり、これは中干しによる幼虫生存率への影響を、各年の6月の降水頻度の逆数として与えた例である。すなわち、中干しが実施されても降水があれば幼虫の生存が可能になり、生存率は降水の頻度と反比例するとしてパラメータを設定した。この例での2000年頃からの急激な減少は、もちろん育苗箱施用殺虫剤によるものであるが、それ以前からの長期的な減少傾向は中干しによるものである。このようなモデル構築はまだ開始したばかりであるが、今後、さまざまな要因を、工夫しながら組み込んでいくことで、相対的な寄与率を明らかにしていくことは可能であると考えている。また、温暖化による繁殖開始時期の遅れなどによる影響、越夏場所の空間的な減少の問題なども、工夫して組み込むことで、将来的な予測も可能になると考えている。もちろん、モデルに組み込むパラメータは、より現実的なものにするために、局地的であっても野外での観察、調査は不可欠である。

野生生物の生物学的知見研究課題(野生2)：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

研究者：筑波大学大学院 生命環境科学研究科：白岩善博(代表研究者)
神戸大学大学院 理学研究科：坂山英俊

研究概要：シャジクモ類は湖沼生態系の健全さの指標となるキーストーン種であるが、1950年代以降急激に衰退している。この野生絶滅種・絶滅危惧種シャジクモ類に関する生物学的知見を集積するために、培養実験による生理学的解析研究を展開し、シャジクモ類に対する内分泌かく乱物質等の環境負荷化学物質の影響について、成長と生殖器官形成(造卵器, 卵胞子形成)に関する長期的影響を解析した。そのため、生殖器官形成の制御が可能な培養系を確立した上で実験を行い、成長と生殖器官形成に対する影響を解析し、シャジクモ類衰退要因を推定した。

内分泌かく乱物質等の環境負荷化学物質として、アトラジン(除草剤として知られているが、アフリカツメガエルの性発達を攪乱する作用があることがUSAで報告された。Hayes et al: PNAS 2010年)及びペンタクロロフェノール(PCP)(光合成阻害剤でExTENDの先行研究によりシャジクモの光合成を阻害することが明らかである。1950年代のシャジクモ類絶滅の原因物質と推定された。白岩他: ExTEND 2008~9年)を用いた。

得られた結果は次のとおりである。

1) 10^{-6} Mのアトラジンは、伸長を促進する作用を示したが、生殖器官の造卵器から卵胞子への成熟を阻害した。 10^{-8} Mでは顕著な影響は見られなかった。

2) 10^{-8} MのPCPは、伸長に影響なく、生殖器形成に影響した。 10^{-7} M以上のPCPは、成長を阻害し、死滅させた。

研究結果のまとめと考察:内分泌かく乱作用を有するアトラジンは生殖器官の成熟を阻害するが伸長をむしろ促進し、光合成阻害作用を有するPCPは成長を阻害するが、生殖器への影響は小さいことが明確になった。さらに本研究により、シャジクモにおいても、アトラジンが生殖器形成を阻害することによって、長期影響を及ぼし、シャジクモ類の衰退に影響する可能性が初めて示唆された。

しかしながら、本実験で影響がみられたアトラジンの濃度(10^{-6} M)は、米国環境基準(3 ppb)700倍、穀類の残留基準値(20 ppb)の100倍程度である。今後は、さらに低濃度で、さらなる長期影響を精査すること、及びその作用機構を明らかにすることによって、アトラジンのシャジクモ類の生殖器形成へのしくみを明らかにする必要がある。

野生生物の生物学的知見研究課題(野生3)：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

研究者：岡山大学 理学部：三枝誠行(代表研究者)、山崎美穂、J. Ubaldo、細川雄平、尾上喬
日本海区水産研究所：高田宜武
岡山県水産試験場：増成伸文
農業生物資源研究所：畠山正統

研究概要：アナジャコ (*Upogebia major*) は泥干潟にすむ甲殻類である。瀬戸内海の他の干潟と比べて、笠岡湾では雄であるにもかかわらず雌に見られる第1腹肢の発現している個体が多く見られる。また、雌雄ともに第1腹節に黒い傷のある個体も数多く採集される。笠岡湾は、1968年から始まった干拓により、著しい軟泥層(ヘドロ)の蓄積が起きた。ヘドロの中には残留農薬、ハロゲン化合物、重金属などが高濃度に蓄積していることが報告されており、雄における異常肢の発現や腹節の傷は、干潟の汚染と関わりがあるのかもしれない。内分泌かく乱という視点からは、雄における第1腹肢の発現は、第2次性徴と関係するかを解明することが望まれた。また、腹部の傷は、脱皮にともなって回復するのか、あるいは汚染された海域では回復が遅延するのかも明らかにする必要があると思われた。

アナジャコ雄に見られる第1腹肢は、脱皮後も消えることがなく、体の成長とともに大きくなった。また、アナジャコの雄の成熟サイズは、体長80~100mmと予想され、異常肢を持つ雄のうち、成熟サイズに達していない個体も多数採集された。このことから、第1腹肢は第2次性徴と関連して発現するのではなく、胚発生か幼若期の段階で発現するものと推察された。形態形成の際に、雄の場合には発現が抑制される機構が、何らかの原因で十分に抑制されないために、異常肢として生えてくるものと思われる。さらに、成熟したと考えられる雄でも、第1腹肢に担卵毛が生えている個体は1例も見当たらなかったことから、第1腹肢は雌の機能までは持っていないことがわかる。第1腹肢を持つ雄は、生殖腺重量や相対成長から見ても明らかに正常な雄とみなすことができる。

一方、第1腹節に見られる傷の発端は、この部分に付着(寄生)しているシタゴコロガニによる食害にある。人工巣穴を作り、採集場所より一層汚染の進んだ海域とそれほど汚染が進んでいない海域に沈めておいたところ、どちらも脱皮すると傷は消失した。このことから第1腹節の傷は、干潟の汚染とは関係せず、笠岡湾ではシタゴコロガニの密度が他の干潟に比べて高いために、傷を持った個体が多いと結論された。

本研究におけるもうひとつの重要な課題は、内分泌かく乱によって生じる‘脱オス化’や‘メス化’を明確に定義し、野外に生息する多くの甲殻類にどの程度それらの現象が見られるかをスクリーニングすることである。本研究では、自然界で見られる脱オス化の例として、フクロムシによるカニ類への寄生を取り上げた。潮間帯や干潟に生息する多くのカニ類は、フクロムシに寄生される。フクロムシに寄生された雄は、精巣、輸精管、さらに造雄腺(androgonic gland)が消失する。雌で

は、卵巣は残るが、輸卵管は消失すると思われる。外部形態に関しては、雌では正常な個体と比べて大きな形態上の違いはみられないが、雄においては腹部の幅が大きく増大した。また、鉗脚の幅も正常な雄に比べて小さくなる傾向があった。一方では、雄の交接器は残り、腹肢も生えておらず、‘オス’の特徴は失われていなかった。これらのことから、カニ類における脱オス化は、内部形態に関しては造雄腺や精巣の消失、外部形態に関しては腹部の幅が正常な雄に比べて明らかに大きくなること、また鉗脚の幅も種類によっては雌に多少近くなるという特徴で表現されることがわかる。

甲殻類の性は遺伝的に決定され、造雄腺から出されるホルモン（雄性化ホルモン？）によってよりオスらしい特徴が現れると考えられる。一方では、甲殻類における造雄腺の機能は明確ではない。寄生により造雄腺や精巣が完全に消失しても、雄の機能を失い、体の一部（例えば、腹部の幅）に多少の形態的变化が見られるものの、少なくともある程度成長した個体では、完全に雌に移行したり、雌の機能が発現したりすることはないと思われる。カニ類やアナジャコ類で見る限り、内分泌かく乱による‘脱オス化’の解釈には大きな誤解があるように見受けられる。これらの甲殻類を見る限り、雄性化ホルモンの影響により、よりオスらしい特徴が発現する余地は非常に小さいと考えられる。

一方、甲殻類の外部形態（腹部の形態や交接器）を調べてゆくと、明らかに雄であるのもかわらず、雌の特徴を有する個体がいることがわかる。第1腹肢の生えたアナジャコの雄もその典型的な例である。外部形態や生殖腺指数（GI）を見ると、正常な雄と全く変りはなく、おそらく正常な雄として振舞うであろう。しかし、第1腹肢には明らかに雌の特徴が見られる。このような現象は、脱オス化ではなく、‘メス化’と定義できるように思われる。そのように考えてゆくと、干潟に広く分布する甲殻類の中には、メス化の見られる種類はかなりいる可能性は高い。潮間帯に分布するヒライソガニ (*Gaeticus depressus*) もその例である。雄では、鉗脚にある指節 (dactylus) の中央に目立つ歯状突起があるが、雌にはない。しかし、雄の中には相当な割合で、指節に歯状突起の無い個体が混じっている。このような例がメス化であって、瀬戸内海の干潟を詳細に調査すれば、更に多くの例が見つかるであろう。問題は、メス化が個体群の中の正常な範囲の変異なのか、あるいは環境汚染化学物質による影響なのかをまだ判定できる基準が開発されていないことである。本研究では、相対成長を基準として個体ならびに個体群の異常を検定する方法を提示している。なお、本研究で定義した脱オス化とメス化の例は、ヒトでも見られる。

環境汚染化学物質のもうひとつの作用は、環境ホルモンとしてではなく、直接・間接に生体に及ぼす影響が考えられるが、今まで野外の甲殻類に関しては、そのような情報はほとんど無かった。本研究において、アナジャコと同時に採集されたケフサイソガニ (*Hemigrapsus penicillatus*) は、70%エタノールで固定すると、外被の下に数多くの白い斑点（柔らかい顆粒）のある個体が見られることがわかった。白い顆粒が増えることと脱皮との関連は不明であるが、顆粒が多く含まれている個体の割合は、生息場所によって大きく異なるようである。白い顆粒の成分分析を行った結果、カルシウムも含まれているものの微量であること、また炭素数が圧倒的に多いことから有機物の可能性が高い（ニッテクリサーチによる分析結果）。生きている個体にも見られ、アルコールで固定された結果目立つようになるのであろう。本態はまだ不明であるが、体内における異常を示唆する

ような現象である。

ケフサイソガニは、イソガニ (*Hemigurapsus sanguineus*) と同属であるが、外部形態から見間違えることはない。しかし、笠岡湾の一部に生息している個体群には、イソガニとよく似た甲羅の色と模様が現れ、見間違いそうになる時がある。この例も、一部の生息地に限って見られるので、やはり環境因子の影響の可能性が考えられる。一方、飼育個体群下で生じる奇形をモニターするために、数多くのガザミ (*Portus tritberculatus*) を孵化時から成熟まで飼育した。多くの個体で特に鉗脚にさまざまな奇形が現れたが、いずれも脱皮直後の殻の柔らかい時に他個体に攻撃されたり（本種は共食いが激しい）、ケージの隙間に挟まったことなどが原因で起きたと考えられる。脱皮すれば奇形が消失するかは、現在調査中である。

脱オス化現象は、野外ではフクロムシによる寄生の例を除いて発見されていない。しかし、メス化現象は、瀬戸内海に生息する多くの種類の甲殻類で見つかる可能性が高い。さらに、環境汚染による影響と思われる例も多く発見されるように思える。瀬戸内海全域での広範な調査と環境汚染化学物質の影響を把握できる定量化の開発が望まれる。

研究結果のまとめと考察：

○甲殻類における性決定と第2次性徴の発現

甲殻類の性は、遺伝的に決定される。遺伝的な雄個体においては、その表現型の発現には造雄腺が強く関わっており、造雄腺で作られる雄性化ホルモン(?)により、雄への分化が促進される。一方、卵巣の発育や雌らしさの発現が抑制される。遺伝的に雌と決定された個体においては、特別な性ホルモンの作用を必要とせず（雌の性ホルモンは知られていない）、自発的に卵巣の発達が起り、雌らしさを表す特徴が発現する。

アナジャコの造雄腺は、射精管の末端付近（生殖口の近く）の周囲を取り巻くように存在している。アナジャコでは除去するのは難しそうであるが、文献 (Charniaux-Cotton and Payen, 1985) によると造雄腺を取り除くと脱オス化が起こる。若い個体ほど脱オス化の程度は激しいが、2次性徴の発現後でも除去手術によりいくらかの脱オス化が起こる。造雄腺の機能が、卵巣の発育も抑制しているのであるから、幼若個体で造雄腺を除去できれば、おそらく卵巣が大きく発達するのであろう。環境中に存在する汚染化学物質がアナジャコの体内に取り込まれ、造雄腺の機能が抑えられ、その結果として卵巣の発育が促進されるという可能性は大きいように思われる。しかし、遺伝的な性は雄なのだから、雌型に近づくことはあっても、完全に雌になることはなさそうに思われる。しかしながら、本研究では外科的に造雄腺を除去し、その結果起こる卵巣の発育や第二次性徴の変化を調べることはしていない。その代わりに、野外の特性を利用して、脱オス化やメス化の程度を定量的に評価することを考えた。

○フクロムシの寄生による内分泌かく乱

野外の特性を利用した脱オス化やメス化の評価法を確立するためには、フクロムシ (*Sacculina* sp.) による寄生は必要不可欠である。造雄腺を除去しないでも、解剖すれば雄性生殖腺に対する

ダメージの程度がわかることと、それにもなって体のどこに異変が起きるかを定量的に評価できるメリットがある。今まではフクロムシに寄生された個体は非常に少ないと思われていたが、よく調べるとカニ類では多くの種類が寄生を受けており、単なる事例報告を超えて、脱オス化やメス化の程度を定量化できることがわかった。

フクロムシの寄生を受けたカニ類の雄は、雄性生殖腺を破壊される。生殖腺の全面的破壊は、最も激しいレベルの内分泌かく乱を引き起こすであろう。内分泌かく乱の影響は、特に第2次性徴の発現と関係する形態に表れてきた。最も顕著なのが、腹部の形態である。雌と同じ程度の形態にはならないが、雄と雌の間ぐらいの形状になっている例が多いことがわかる。最も顕著なケースであるミナミイワガニでは、腹節線の長さ (AW) は、正常な雄と比べて相当な程度に雌側に偏っている。一方、オオイワガニでは、正常な雄と比べて少しだけ雌に値近づいているだけである。これは、第2次性徴の発現した後では、造雄腺が完全に破壊されたとしても、雌型に戻る程度が種によって異なっていることを示している。一方、鉗脚・掌節の幅 (PW) は、オオイワガニ・ミナミイワガニともに、内分泌かく乱の影響はほとんど受けていないことがわかる (Fig. 16A と 17A)。鉗脚に関しては、これらの2種に限り、雌雄における第2次性徴がほとんど現れないためであろう。

○アナジャコの雄に発現する第1腹肢と内分泌かく乱との関係

アナジャコには、エビヤドリムシやマゴコロガイは多く寄生しているが、フクロムシは寄生しない。エビヤドリムシに寄生されても生殖腺は残るので、フクロムシの寄生ほど激しい内分泌かく乱は起きないと予想される。アナジャコは成熟サイズに達すると、鉗脚・掌節の幅 (PW) に雌雄で明瞭な差が出てくる (Nanri *et al.*, 2010)。エビヤドリムシの寄生を受けた個体と寄生を受けていない個体の鉗脚・掌節の幅 (PW) を比較すると、ほんのわずかな違いがみられるだけであった。

本研究の最も重要な課題は、アナジャコ雄の第1腹肢の発現の原因究明である。第1腹肢の発現した個体の体長 (TL) に対する生殖腺重量、生殖腺指数 (Gonad index) (Nanri *et al.*, 2010)、鉗脚・掌節の幅を比較すると、第1腹肢の生えていない雄と全く違いが無いことがわかる。これらのことから第1腹肢の生えた雄は、野外では恐らく雄としての機能を十分果たしていて、フクロムシの寄生を受けたカニ類のように「脱オス化」していると断言できる状態ではない。第1腹肢にのみ雌型の特徴が表れており、雌的な要素はある訳だから、間性個体 (intersex individual) と言っても、脱オス化しているのではなく「メス化している」と呼ぶのがふさわしいように思われる。

本研究において、アナジャコ雄の第1腹肢は、第2次性徴の発現よりずっと前に生えていることがわかった。どの時期から生えているのか完全には特定できていないが、第1腹肢が生え出すのは幼若個体なので、その頃から生え出すのであろう。アナジャコ場合も雌型が基本で、造雄腺の働きにより、雌型の特徴が抑制されて、雄型の特徴が出現するのであろう。第1腹肢 (Ple) も、本来なら発現が抑制されるはずが、何らかの原因で抑制が十分にかからず、雌型の性質が出現した結果さまざまな長さの第1腹肢が出現してきたものと考えられる。なぜ第1腹肢の発現が抑制されないのかは今後の課題である。

○ケフサイソガニに蓄積する白い粒

ケフサイソガニは、泥干潟に最も広く分布している。その意味では、野外における環境汚染の影響を調べるのに最も適した甲殻類かもしれない。今のところ、寄生による例以外には内分泌かく乱による脱オス化の証拠は無い。メス化が見られるかはこれから明らかにされる。

ケフサイソガニの興味深い特徴は、地域個体群によって体内に蓄積される白い顆粒の数が大きく異なることである。また、一部の生息場所では、生息場所の汚染状況と関わりがあるかもこれから明らかにされるだろう。

○ヒライソガニの鉗脚に見られる間性

野外における甲殻類の間性の例は、ヒライソガニにも見られる。ヒライソガニにおける間性の例は、まだ笠岡湾 f 地点の西側の潮間帯と e 地点でしか調べられていない。雌性と雄性の中間の鉗脚を持つ雄の割合が、地域個体群によって異なるのか、そうだとすればどのような環境因子と係っているのかもこれから明らかにされる。瀬戸内海は、岡山県と広島県の東半分は泥干潟が多いが、広島県の西半分から山口県にかけては、泥ではなく砂質の浜に変る。四国の海岸も泥干潟は非常に少なく、ほとんどが砂浜になっている。このような場所にはヒライソガニは広く分布していると思われる。地域個体群による間性の頻度を明らかにすることができるだろう。

○ガザミに見られる形態異常とその原因

野外における甲殻類の形態異常を始めとして、成長や成熟における異常を把握する場合には、正常とされる形態、成長、成熟を十分に把握しておくことが必要である。ガザミを飼育すると鉗脚に異常をもった個体が多く見られる。異常は小さな個体よりも、大きな個体になるほど頻度が高くなる傾向があった。また、野外で採集した個体にも時々見られる異常である。このような形態異常は、一見したところ環境因子の影響を疑いたくなるが、プラスチック・ケージやカゴを使って個別飼育した個体ではほとんど現れない。

形態異常が多く現れるのは、大きな水槽で集団飼育した個体である。5月中旬に孵化したガザミは、ものすごい勢いで餌を食べ、餌があるのにもかかわらず激しい共食いをする。ガザミの主な死亡原因は、脱皮後に他の個体に襲撃されて食べられることである。うまく逃げられても、殻が柔らかいうちに各所に傷を受けて、硬くなってもそれが残っている。鉗脚については特に被害を受け易く、また大きな個体ほど異常な形態になる傾向があった。鉗脚の形態異常は、野外で採集した個体にも見られる。

個別飼育した個体では、鉗脚の形態異常の起こる頻度は著しく低いので、脱皮後に外被が硬くなるまでに受ける物理的な因子（他の個体による攻撃を防いだり、逃げたりするとき底にぶつかって変形する等）の影響によって生じるものであろう。

○今後の展開

○アナジャコ雄の第1腹肢が発現する時期の特定

体長 1cm 程度の幼若個体における腹肢については、まだ観察が行われていない。雄に見られる第 1 腹肢は、造雄腺から分泌される雄性化ホルモンが十分に機能しない(形態形成を抑制できない)ことから発現する可能性がある。来年度の研究においては、雄における第 1 腹肢の発現時期を特定したい。

○個体群レベルでの間性の有無

環境汚染は単一個体に作用する場合もあるが、一般的には地域個体群全体に作用するであろう。環境汚染による変化なら、地域個体群全体がある程度メス化するはずだからである。そのような中で第 1 腹肢が発現した雄を正常な雄と比較しても、第 1 腹肢以外の器官(生殖腺、鉗脚幅など)には違い出る可能性は低い。しかし、相対成長(TL に対する PL)に焦点を当て、同じ個体群を異なった測定年度で調べてみると、回帰直線に有意差が出てくる可能性がある。

成熟サイズは、鉗脚幅の成長にギャップが見られる 80mm 前後と考え、未成熟個体と成熟個体のそれぞれで回帰直線を引いた。採集年度が違う個体群の回帰直線は、未成熟の個体で少し違っている可能性を示している。つまり、雄らしい特徴の現れる鉗脚の形態は、2007 年から 2008 年にかけて採集された個体群に比べて、2010 年に採集された未成熟個体群の方がやや雌側に偏っていることを示唆している。

まだ回帰直線の有意差検定は行っていないので、アナジャコの場合に本当に違いがあるかはまだわからないが、このような方法で個体群に見られる異常をかなり明確に推定できるように思われる。この方法は、本研究によって始めて開発されたものであり、異常を検出するための現実的な手段であると思われる。

○ケフサイソガニを使った間性個体(intersex male)の判定

ケフサイソガニの鉗脚幅(PW)や腹部の形態は、内分泌かく乱の影響を強く受ける。鉗脚幅は完全に雄から逸脱し、雌の範囲に近づいている。(雌の方は煩雑になるので、ここでは示していない。)また、層特有の鉗脚指節と掌節の基部に生える泥の含まれた毛の束は完全に消失していた。(それでも、雄性交接器はそのまま残っており、異常であっても雄であることに変わりはない。)

このような方法を使えば、間性の性質を持つ個体の中で「超オス化」した個体も検出できる。たまたに体長に比較して鉗脚幅の異常に大きい個体がいる可能性がある。(測定のケアレミスは十分注意する必要がある。メス化については、体長と鉗脚幅の相対成長からは難しい。鉗脚が自切すると小さい鉗脚が再生するからである。しかし、腹部は自切することはないので、腹節線の長さを間違いなく計測すれば、メス化した雄やオス化した雌の存在を定量的に把握できるだろう。

ケフサイソガニは、f 地点のみに分布するアナジャコと違って最も奥の a 地点まで分布する。a 地点から d 地点までは、ヘドロが高く積もっており、汚染された干潟になっていて、そのような干潟に分布する甲殻類は少ないので、海洋汚染の影響をモニターするのに最も適した種類のひとつであろう。

○内湾に広く分布する甲殻類における間性個体と間性化した個体群の探索

本研究の課題として、「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」がある。野外において異常と見られる個体や個体群がどれだけあるかの定量的な把握は、今後の環境問題の改善や生物多様性の保全に向けて重要な基礎的資料となりうる。

来年度は、アナジャコ、ケフサイソガニ、ガザミ、ヒライソガニ加えて、ハクセンシオマネキとヤマトオサガニも調査対象としたい。ハクセンシオマネキとヤマトオサガニも干潟の主要な甲殻類であり、笠岡湾ではケフサイソガニと同様に、f地点からa地点まで広く分布する。このように内湾の奥まで広く分布する種において、瀬戸内海全域にわたり、間性個体と間性化した個体群の探索を行い、環境汚染と異常との関連性を追及する。

なお、イボニシ等の巻貝にも生殖異常が見つかるが、腹足類に関しては見慣れていないので、どこが異常かを見つけ出して定量的に把握することができない。

○ヒライソガニ

ヒライソガニの鉗脚に見られる間性に関しても、笠岡湾だけに見られる現象なのか、瀬戸内海の多くの湾や太平洋岸（あるいは日本海側）の干潟でも見られるのかを明らかにしたい。方法は、ケフサイソガニやアナジャコと同様に、形態、寄生による変化、相対成長などを比較することによって明らかになるだろう。

○ガザミの幼生や幼若個体を使った甲殻類の成長と成熟、及び環境因子の影響解析

本研究は、「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」をするためには、正常な発育や成熟に関する基礎的な情報が必要である。種苗生産後の個体ではあるものの、ガザミを飼育してみて多くの新しい知見が得られ、異常を検出する方法の開発にも結びついた。今年度はうまく行かなかったが、来年度はゾエア幼生やメガロパ幼生の飼育を行いたい。甲殻類の場合には、環境汚染化学物質の影響は、成体よりも幼生期の個体や幼若個体に激しく現れる。環境汚染の影響を定量化できる方法を開発したい。ガザミの研究は、岡山県水産研究所で行われる。

○ケフサイソガニに体内に蓄積する白い顆粒と環境汚染との関係

今のところはケフサイソガニにおいて見られる現象である。外被内側と消化器系の周囲にたくさんの顆粒状になって蓄積する有機物が何か調べたい。今まで多くのカニ類を調べてきた中で、このような事例は始めて見るが、何か異常な感じがする。農薬の影響などは考えられないだろうか？白い顆粒の更なる分析（外注）と、白い顆粒をたくさん持った個体が特定の海域に集中しているかを明らかにする。

○干潟の土壌分析、甲殻類に含まれる TBT や TPT の分析

環境汚染化学物質としては、TBT や TPT 以外にも重金属や農薬もたくさんあるだろう。全部を調べることは費用から考えてもできるものではない。しかも、環境汚染化学物質の蓄積量とある程

度の対応関係がわかったとしても、それ以上の証拠が無ければ単なる推測の域を出ない。本研究では、TBT と TPT に絞って、環境汚染と関係が疑われる事例（甲殻類の方と生息場所の泥）について分析を行いたい。申請者の研究室にはその技術がないので、外注になる。

基盤的研究課題(基盤1)：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

研究者：東京大学 医学系研究科：大迫誠一郎(代表研究者)

麻布大学 獣医学部：山本雅子、坂上元栄

研究概要：本研究は ExTEND2005 研究事業として公募された研究課題「化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究：1) 遺伝子修飾(エピジェネティック)などの新たな内分泌かく乱作用メカニズム解明に関する研究」に対応することを目的にこれまで研究を展開してきた。

近年、いわゆる環境ホルモンと呼ばれる化学物質が、動物実験において胎児期曝露により生後個体の形質に不可逆的变化を誘起することが示された。中でも行政的に胎児期影響の更なる詳細な検討が求められているビスフェノール A (BPA) はその作用が強いことが示されつつある。本研究では、いわゆる環境ホルモンが未知の受容体に結合した後、発生途上の各臓器内でゲノムのエピジェネティックな異常を引き起こすという仮説を実際に立証し、その異常発生機構の解明や病態発症との分子的関連性を検討することを目的とする。

平成 20-21 年度に実施した FS スタディにより網羅的解析による標的遺伝子候補の割り出しに成功したため、これより 3 年の計画ではその再現性確認を行う。また DOHaD モデルとして個体の感受性変化や発生学的機構解明を複数の陽性対象化合物 (TCDD, Diethylstilbestrol (DES)) との比較さらに脳だけではなく肝臓等との比較検討から実施する。本年度は下記の項目に関する研究に特に進捗があった。

1. マウスを用いた化学物質の胎生期曝露によるエピゲノム変動と生後の病態変化に関する解析

TCDD の胎児期曝露が生後の変異原曝露に及ぼす発ガン感受性変化 (DOHaD モデルの検証)

妊娠マウス (C57BL/6J) に TCDD を投与し、成熟後変異原であるベンツピレン (BaP) を投与して前胃の過形成を誘起させたところ、対照群である妊娠中に TCDD に曝露を受けていないマウスより過形成性ポリープの数が有意に増加することがわかった。このことから胎児期にダイオキシン曝露された個体では成熟後の変異原性物質の投与による発ガンリスクが高くなることが示唆された。

2. 高精度でゲノム DNA メチル化頻度を網羅的に解析する独自の手法の開発

上記胎児期 TCDD 曝露マウス肝臓 DNA と対照群マウス DNA を用いて、メチル化特異的フラグメント断片解析を実施した。対照群マウスでのみ確認できたピークのその一部を実際にシークエンスしたところ、Angiogenic factor with G patch and FHA domains 1 (Aggf1) 遺伝子 (NT_039590) のイントロン 12 内にある HinpI サイト (nt 18734-18737) であることがわかった。また、任意の制限酵素組み合わせにより生じるゲノム DNA 断片のデータベース化と情報処理支援システムの開発も一部完了した。

研究結果のまとめと考察：近年 BPA の胎児期曝露によるゲノム DNA の CpG メチル化変動を中心としたエピゲノムへの影響の報告がなされはじめています。Avy マウスに BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を曝露すると agouti 遺伝子内に挿入させたトランスポゾンが低メチル化するために毛色に変化するという報告 (Dolinoy et al., 2007)、ICR/Jcl マウスに BPA 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を曝露すると胎児前脳の遺伝子のメチル化頻度に変化したという報告 (Yaoi et al., 2008)、胎生期 BPA 曝露を受けた SD ラットで Phosphodiesterase Type 4 Variant の遺伝子 DNA 低メチル化により DMBA 投与による前立腺癌発生に対して高感受性になったとする報告 (Ho et al., 2007) がそれに当たる。本研究では海馬の RNA と DNA を用いてそのような遺伝子プロモーターに変動を起こす遺伝子の探索を行った。追試験的意味合いを持つ本研究でも、上記の報告で認められた遺伝子は変動レベル、メチル化解析を実施したが、再現性がなかった。しかし、Tceb2 遺伝子については変動の方向性とメチル化レベルの方向性が一致しており、興味深い遺伝子を検出できたものと言えよう。この遺伝子は中枢神経系の機能や病態に関連することが報告されており、今後詳細に再解析する必要があるため、追試実験によるサンプリングを実施した。また、網羅的メチル化解析の開発を行ったが、これは Tceb2 遺伝子以外のエピゲノム変動遺伝子探索のために今後活用する見込みである。本手法は、次世代シーケンサーを用いた昨今のメチル化 CpG 解析法 (Deep sequencing) に比べて低コストで実施できるため、複数のサンプルを処理できる利点を持ち、今回のような毒性学的解析には適している。

基盤的研究課題(基盤2)：海産無脊椎動物ホヤのトキシコジェノミクス基盤研究

研究者：北海道大学 北大創成研究機構・環境健康科学センター：安住薫(代表研究者)

高知大学 理学部：藤原滋樹

岐阜薬科大学：中西 剛

研究概要：我々は海産無脊椎動物ホヤを用いて、海洋汚染化学物質の影響評価系の構築や作用機構の解明をめざしている。H22年度は以下の知見を得た。

1) 有機スズ汚染マーカー遺伝子の探索に取り組み、人為的な有機スズ曝露ホヤにおいて有機スズに応答する遺伝子を34個明らかにした。有機スズが高濃度蓄積されている韓国産と有機スズが検出されない舞鶴産のカタユウレイボヤを用いてそれらの遺伝子の発現レベルを調べたところ、9個の遺伝子が有機スズ曝露ホヤと同じ発現パターンを示していることを見出した。これら9個の遺伝子は、野生ホヤの有機スズ汚染をモニタリングする上で指標として使える可能性がある。

2) 鉛フリーはんだの代替金属として用いられているビスマスやインジウム等の海産動物に与える影響を調べる目的で、それら金属イオンのホヤ胚発生、変態に対する影響を調べた。鉛及び代替金属はいずれも10ppm以下ではホヤの胚発生や変態に影響を及ぼさなかった。さらに、それらの金属に曝露したホヤサンプルを作製してアレイ解析を行った。現在、データの詳細な解析を実施している。

研究結果のまとめと考察：海産無脊椎動物ホヤは進化的に無脊椎動物から脊椎動物への移行期の動物で、脊椎動物と無脊椎動物の両者に共通の生物学特性を有する。さらに、ホヤは固着型の濾過生活者であるため、ホヤ生息海域の海洋環境を知る上でよい指標動物になりえる。本申請研究では、ホヤを用いて海洋汚染物質が海産動物に与える影響を解明し、かつ、野生ホヤを海洋汚染の指標動物として活用するための総合的な解析基盤の確立をめざしてきた。2年間のフィージビリティスタディ及び1年間の基盤研究の計3年間で下記の成果を得た。

1) ホヤトキシコジェノミクス解析基盤の確立

我々は、ホヤ全遺伝子の7割をカバーできるオリゴDNAマイクロアレイを用いて、網羅的な遺伝子発現の解析を行ってきた。その過程で、カタユウレイボヤの一生(受精卵から老成体まで)における遺伝子の発現変動パターンを解析し、約1万個のホヤ遺伝子を発現パターンの類似性に基づいて49個のクラスターに分類し、さらにそれらを5つのグループ(A:胚発生期に特異的に発現する遺伝子群、B:胚発生中期に発現して成体期も発現が維持される遺伝子群、C:成体期に特異的に発現する遺伝子群、D:発現が大きな変動を示さない遺伝子群、E:母性遺伝子群)にまとめた分類方法を考案した(「安住式ホヤ遺伝子分類法」と命名)。DNAマイクロアレイで検出できる約1万個のホヤ遺伝子の内、塩基配列の相同性から機能が推定できる遺伝子は半分以下しかない。我々が考案した

分類法では、ライフサイクルにおける各遺伝子の発現時期、すなわち遺伝子が機能するライフステージがわかるので、遺伝子の機能を予測することができる。その結果、1) 化学物質等に暴露したホヤ体内で生じる遺伝子発現をホヤオリゴ DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、2) 発現が変動した遺伝子の機能的なカテゴリーを「安住式ホヤ遺伝子分類法」によって同定することによって、化学物質等がホヤに与える影響を予測し、さらに、3) 発生と変態に対する化学物質等の阻害効果を調べるバイオアッセイを行ない、DNA マイクロアレイの結果から予測された影響を実験的に証明する、という3種類の解析を組み合わせることによって、化学物質や金属含有化合物等が海産動物（特に無脊椎動物）に与える影響を評価する方法を構築することができた。

本研究では、この新規影響評価系を用いて、11種類の化学物質及び金属イオンのホヤに対する影響評価を行った。曝露する化学物質、あるいは金属塩化物の種類によってホヤ体内で発現が変動する遺伝子が大きく異なること、アレイ解析データから予測された生物学的影響の内、胚発生及び変態に関してはバイオアッセイの結果とよく一致したこと、他の生物に対してすでに報告されている影響と類似の影響が見出せたことなどから、我々が開発した海洋汚染物質の影響評価系は、化学物質や金属含有物質の開発段階の影響評価系としても有益な情報を提供できると考えている。また、化学物質あるいは金属イオンの種類によって発現が変動する遺伝子が大きく異なることは、ホヤ体内に汚染物質を解毒（代謝）するための複数の作用機構があることを意味しており、それらの作用機構の実態を解明する上でも、我々の解析系はよいツールになりえると考えている。

2) 胚発生と変態阻害の大量スクリーニング系の開発

我々は、ホヤの受精卵と幼生を用いて、化学物質等の影響を一度に多数スクリーニングできるバイオアッセイ系を開発した。カタユレイボヤは1個体から3,000-5,000個の未受精卵が採集できるので、3個体の未受精卵を合わせれば一度に10,000個の受精卵を用いた実験が可能である。しかしながら、従来の顕微鏡下で発生の進行に合わせて受精卵等の計数を行なう方法では、10,000個の受精卵の発生率、固着率を計数することは難しい。そこで、細胞培養用のプラスチックプレートに受精卵を分配して発生、固着がほぼ正常に進行するアッセイ系を構築、各ウェルの顕微鏡画像を撮影して保存し、後日、画像中の各ウェルの受精卵の個数、ふ化せずに残った受精卵の個数、固着した幼若体の個数を数えることによって発生率、固着率を求める方法を考案した。結果として高い発生率、固着率のスクリーニング系が構築でき、化学物質、金属塩化物の添加による阻害効果も再現的に検出できた。その方法を用いて、1) に記した11種類の化学物質等のホヤ胚発生及び変態に対する影響を調べたところ、化学物質等の種類によって発生・変態阻害の程度や異常胚の形態が異なることを見いだした。今後、1) のアレイデータの詳細な解析により、各化学物質等によって特異的に応答する遺伝子の実態が明らかになれば、異常胚の形態の違いも遺伝子レベルで説明ができると考えている。

3) 有機スズ汚染マーカー遺伝子の探索

有機スズ曝露ホヤのアレイ解析結果及び、RT-PCR 解析結果から、有機スズに応答するホヤ遺伝子を34個明らかにした。有機スズが高濃度蓄積されている韓国産と有機スズが検出されない舞鶴

産のカタユレイボヤを用いてそれらの遺伝子の発現レベルを調べたところ、9個の遺伝子が（人為的）有機スズ暴露ホヤと同じ発現パターンを示すことを見出した。これら9個の遺伝子は、野生ホヤの有機スズ汚染をモニタリングする上で指標として使う事ができると考えている。

4) 「内分泌攪乱物質」のホヤに対する影響

ノニルフェノールやオクチルフェノール等の、エストロゲンレセプターに作用する内分泌攪乱物質のホヤに対する影響は、DNA マイクロアレイの解析結果からは、特に発生、変態に対する阻害効果は予測されなかった。バイオアッセイにより阻害効果を調べたところ、いずれも1 ppm以下では胚発生に異常は検出されなかった。しかしながら、ホヤの生殖組織形成に関与する遺伝子の発現が一部変動することから、これらの内分泌攪乱物質がホヤの生殖組織形成に何らかの影響を与える可能性もあり、詳細の解明が今後の課題である。

5) 日本沿岸のホヤ生態調査の実施

Web アンケートを作製し、(社)日本動物学会会員に送付して回答を得た。回答数は少なかったが、ホヤの発生に異常が生じる湾の情報が得られた。

基盤的研究課題(基盤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

研究者：金沢大学 医薬保健研究域薬学系：早川和一(代表研究者)

金沢大学 臨海実験施設：鈴木信雄

京都薬科大学：細井信造

研究概要：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、その間に構造活性相関があることを見出した。

そこで本研究 (フィージビリティースタディー2009-2010 年) では、期間内に次の 1~4 の実験を行い以下の成果を得た。

(実験1) 酵母 two-hybrid 法で、OHPAH 以外の PAH 酸化的代謝物としてキノン体 (PAHQ) のエストロゲン様/抗エストロゲン活性を測定して、いくつかの PAHQ に比較的強い抗エストロゲン活性があることを見出し、さらにその間に、構造活性相関が推定された。

(実験2) 魚の再生ウロコを用いて骨代謝に及ぼす影響を評価できる高感度なシステムを開発した。次いで、この系を用いて、PAH の水酸化体として、特に、酵母 two-hybrid 法で強いエストロゲン様活性を示した 4-Hydroxybenz[a]anthracene (4-OHBaA) の作用を解析した結果、同様にエストロゲン活性を検出した。

(実験3) benz[a]anthracene を投与したキンギョの胆汁中から 4-OHBaP を検出し、PAH 曝露された魚の体内で、OHPAH が生成する事を確認した。

(実験4) ゼブラフィッシュのウロコを用いた GeneChip 解析により、BaA と 4-OHBaA により変化する遺伝子を比較して、4-OHBaA の方が変化する遺伝子が多く、細胞死につながる可能性が示された。

結論：以上の実験結果から、PAH に曝露された魚の体内では、代謝生成する OHPAH が内分泌攪乱作用の本体である可能性が非常に高いことが判明した。

研究結果のまとめと考察：OHPAH に加えて、PAHQ にもエストロゲン様/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。次に E₂ 及び PAHQ の構造パラメータをコンピュータ計算した。O-H distance を比較して、構造活性相関を調べた。その結果、エストロゲン様活性を示す 3 種の PAHQ は、O-H distance, 第 1 イオン化エネルギー, 双極子モーメント, log P のパラメーターがそれぞれ 10.290 から 11.519 Å, 8.526 から 9.029 eV, 4.909 から 5.556 debye, 3.462 から 3.782 の狭い範囲に存在した。抗エストロゲン活性を示す 11 種の PAHQ では、第 1 イオン化エネルギー, log P がそれぞれ 8.526 から 9.201 eV, 2.459 から 3.782 の比較的狭い範囲

に存在し、いずれも構造活性相関が認められた。これらのパラメーターの範囲が活性を示すための要件となる可能性が示唆された。

尚、PAHQの抗エストロゲン活性の強さは、OHPAHの活性と比較して同等レベルである。しかも、生体中ではPAHの代謝的生成物はOHPAHが主であると考えられる。これらを統合すると、魚の体内では、OHPAHを活性本体の第一候補物質として今後の検討を進める。

本研究において、ウロコは再生するという特徴に注目して、再生ウロコを用いた評価システムを構築した。ウロコという非常に優れた骨のモデルを用いて開発された再生ウロコの評価システムは、PAH類に対しても応答性がよく、普通のウロコの系と比較して感度が向上して、 10^{-10} Mの4-OHBaAを検出することに成功した。一方、親物質であるBaAを再生ウロコに曝露させた結果、骨芽細胞活性は有意な差は認められず、破骨細胞活性も短時間の培養では変化しなかった。しかし破骨細胞の活性は、12時間培養で上昇した ($p=0.008$)。したがって、培養期間中にウロコに存在するCyp1A1により水酸化体となり、その水酸化体が破骨細胞の活性を上昇させた可能性がある。

次に、実際にキンギョの体内でBaAから4-OHBaAが生成されるかを解析した。まず4-OHBaAの保持時間を確認した。4-OHBaAのピークはその他のBaAのモノヒドロキシ体のピークから分離しており同定が可能であると判断した。そこで、1-OH Pyr グルクロニドを β -グルクロニダーゼ・アрилスルファターゼを用いて分解して、その分解・回収率を求めた。これはPAHs代謝物が通常、グルクロン酸抱体あるいは硫酸抱合体として存在しており、HPLCで測定するためには酵素で加水分解するが、その操作過程でのロスを補正するためである。その結果、2時間インキュベーションしたものが、最も高い回収率(67.3%)であり、実際の試料も4-OHBaAがあらかじめ67.3%の回収率であると仮定して補正することとした。この基礎検討をもとに、胆汁中の4-OHBaA濃度を測定したところ、腹腔内投与から48時間をピークにして4-OHBaAを確認することができた。

さらにGeneChipにより4-OHBaAの作用を解析すると細胞周期に関与する遺伝子の発現が減少し、細胞死を誘導していることが判明した。

以上のことから、PAHが体内に入り、P450により水酸化された水酸化PAHが毒物の本体であり、魚において内分泌攪乱作用を引き起こしている可能性が高い。

基盤的研究課題(基盤4)：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

研究者：熊本県立大学 環境共生学部：古賀実(代表研究者)、有菌幸司、内田雅也

研究概要：当該研究では、甲殻類(アミ類)の発生・脱皮・生殖に関する内分泌調節機構に着目し、これらに対する影響を形態学的、生化学、分子生物学的アプローチから多角的に評価し、これまで不明な点が多かった甲殻類の内分泌調節機構について基礎的知見を得るとともに、内分泌かく乱作用の疑われている化学物質による影響評価(ミジンコ及び魚類等と比較を含め)を試みることを目的としている。本研究で対象化学物質はノニルフェノール (NP) 異性体とした。NP は、界面活性剤の合成原料、プラスチック酸化防止剤の原料、塩化ビニルの安定剤、エポキシ樹脂等の安定剤、殺虫剤、殺菌剤、抗菌剤などに工業用として使用されている。硬骨魚類において卵黄形成異常(Yokota *et al.*, 2001)、魚類や組換え酵母細胞、乳がん細胞においてエストロゲン様作用が確認されており(Coldham *et al.*, 1997; Soto *et al.*, 1991)、内分泌攪乱物質として認定されている。また、当研究グループの成果でもアミの脱皮に顕著な影響をおよぼすことを報告している。しかしながら、NP のうち熱安定性が高いため、環境中から主に検出される 4-NP (NP 混合物) は、異性体混合物であるにも関わらず、これまでの生体影響評価はそれらすべてを 1 種類の物質として評価したものである。NP は 170 種類以上の異性体混合物である (Bhatt *et al.*, 1992) ため、これまでの 4-NP を対象とした生体影響評価では、生化学的試験における毒性データに幅がみられる原因になると考えられる。このことから、これまで評価されてきた 4-NP は混合物であり、環境中においては異性体の存在比が異なることが予想される。また、海産物など加工食品中での NP 異性体の存在比が異なることなどが報告されており、環境リスクのみならず食の安全性の面からも NP 異性体を評価することは重要であると考えられる。NP 混合物だけの評価結果では NP の環境リスクを評価・予測するには十分ではなく、NP 異性体を用いた毒性評価は少ないため、異性体ごとの影響評価を詳細に検討することはこれまで蓄積されてきたデータを精査する上でも重要であると考えられる。

そこで平成 22 年度は以下の検討項目を検討した。

1) NP 異性体のアミの急性毒性に及ぼす影響の調査

アミに対する急性毒性値は、NP 異性体 5 種 (NP-0、NP-N、NP-Q、NP-I、NP-C) 間では異なることが明らかとなった。それぞれの急性毒性値は、NP-0 が $144 \mu\text{g}/\text{l}$ 、NP-I が $91 \mu\text{g}/\text{l}$ 、NP-C' が $131 \mu\text{g}/\text{l}$ 、NP-N が $72 \mu\text{g}/\text{l}$ 、NP-Q が $89 \mu\text{g}/\text{l}$ であった。毒性学的感受性は、アミの方がヒメダカと比較して 2 ~ 4 倍強く、毒性影響を及ぼす異性体の順位にも違いが確認された。これらのことから、種差における各異性体の生態影響に違いが認められた。

2) NP 異性体の成長・成熟に及ぼす影響の調査

成長成熟試験により、NP-Q、NP-N、NP 混合物は、アミの成長・成熟(脱皮、体長、頭胸甲長、湿重量、性成熟)の遅延を引き起こすことが明らかになった。さらに、NP-Q $0.5 \mu\text{g}/\text{L}$ においては、アミの体型バランスへ影響を及ぼした可能性が示唆された。また、急性毒性では、NP-N の毒性が

最も強かったものの、成長成熟では各エンドポイントで作用する濃度も、各物質での作用点も異なることが確認された。本研究の成長成熟試験の最小作用濃度の結果は、環境中で検出される濃度と同程度もしくはそれ以下であったことから、アミの生態系へ影響を及ぼす可能性が十分にあることが示唆された。また、試験生物であるアミはヒラメ養殖などの餌として用いられることから、我々の水産食糧資源にも直接関わると考えられる。よって、環境中の NP 異性体の存在比は異なることから、存在比を考慮した毒性評価も今後検討していく必要があると考えられた。

3) アミの DNA マイクロアレイ作製

アミの DNA マイクロアレイ作製においては、24,556 リードの遺伝子を搭載した DNA マイクロアレイを作製し、DNA マイクロアレイの実証試験として脱皮ホルモン様物質：20E(20-hydroxyecdysone)を 500 $\mu\text{g}/\text{l}$ の濃度で 8 時間及び 24 時間曝露し、発現変動する遺伝子を確認した。これら発現変動が見られた遺伝子を中心に脱皮に関わるアミの内分泌調節機構に特化したフォーカスタイプの DNA マイクロアレイを作製する。今後環境化学物質の評価に適用する試験を実施し、環境化学物質がアミの内分泌調節機構へ及ぼす影響をより詳細に調査していく。

研究結果のまとめと考察：本研究では、アミ *Americamysis bahia* をモデル生物として、NP 異性体の異性体ごとに異なる急性毒性影響及び成長・成熟への影響を示すことを明らかにした。

アミに対する急性毒性値は、NP 異性体 5 種 (NP-0、NP-N、NP-Q、NP-I、NP-C)間では異なることが明らかになり、毒性学的感受性は、アミの方がヒメダカと比較して 2 ~ 4 倍強く、毒性影響を及ぼす異性体の順位にも違いが確認された。これらのことから、種差における各異性体の生態影響に違いが認められた。

成長成熟試験により、NP-Q、NP-N、NP 混合物は、アミの成長・成熟(脱皮、体長、頭胸甲長、湿重量、性成熟)の遅延を引き起こすことが明らかになった。さらに、NP-Q 0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ においては、アミの体型バランスへ影響を及ぼした可能性が示唆された。また、急性毒性では、NP-N の毒性が最も強かったものの、成長成熟では各エンドポイントで作用する濃度も、各物質での作用点も異なることが確認された。本研究の成長成熟試験の最小作用濃度の結果は、環境中で検出される濃度と同程度もしくはそれ以下であったことから、アミの生態系へ影響を及ぼす可能性が十分にあることが示唆された。また、試験生物であるアミはヒラメ養殖などの餌として用いられることから、水産食糧資源にも直接関わると考えられる。今後、環境中の NP 異性体の存在比は異なることから、存在比を考慮した毒性評価も今後検討していく必要がある。

アミの DNA マイクロアレイ作製においては、24,556 リードの遺伝子を搭載した DNA マイクロアレイを試作し、DNA マイクロアレイの実証試験として脱皮ホルモン様物質：20E(20-hydroxyecdysone)を 500 $\mu\text{g}/\text{l}$ の濃度で 8 時間及び 24 時間曝露し、変動する遺伝子を確認を試みた。現在、発現変動が見られた遺伝子を中心に脱皮に関わるアミの内分泌調節機構に特化したフォーカスタイプの DNA マイクロアレイを作製準備中である。また環境化学物質の評価に適用する試験を実施し、環境化学物質がアミの内分泌調節機構へ及ぼす影響をより詳細に調査していく予定である。

基盤的研究課題(基盤5)：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

研究者：国立環境研究所 環境リスク研究センター：田中嘉成(代表研究者)、鎌迫典久

研究概要：ミジンコの繁殖阻害試験（OECD TG211）のデータを基にして生態系におけるポピュレーションダイナミクスを解析した例は多数あるが、母系からの影響、産仔性比の影響、スパイク曝露と連続曝露の違い、回復性試験などの結果について数理的考察を加えて生態リスクを解析した例はほとんどない。試験法の条件設定の妥当性及びその解析法を融合させた、環境リスク評価に有効な新規手法を検討する。数理モデルによるシミュレーションに必要となる繁殖毒性試験データの収集を行う。幼若ホルモン作用をもち、すでにミジンコ雄仔虫生産誘導効果が確認されている昆虫成長制御剤をモデル化学物質として用いて OECD TG 211 に準拠した繁殖毒性試験を行い、繁殖開始時期、産仔数、仔虫性比、試験個体の生死等のデータを得る。また曝露シナリオの違いが産仔数や仔虫性比へどのように影響してくるのかを調べるために、平均曝露濃度は同じであるが一定濃度曝露の場合とパルス曝露の場合の2通りの曝露デザインで、OECD TG 211 をベースとした実験を行う。生態リスク評価のため、性比攪乱作用を組み込んだミジンコ個体群変動モデルを作成し、内分泌攪乱作用とその他の一般化学物質の個体群レベル影響を比較評価できる生態リスク評価法を開発する。

研究結果のまとめと考察：定常曝露による繁殖毒性試験の結果、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曝露では、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。また、パルス状の曝露では性比かく乱と総産仔数に対する作用の出方が異なる。化学物質曝露のタイミング・頻度・強度などの要因とともに、生物の質と数への影響が個体群レベルではどのような違いとして反映されてくるかを予測・評価するために、性比かく乱及び繁殖毒性の生理的発現機構をある程度考慮に入れた生態毒性モデルを構築し、ベイズ統計法によってパラメータ推定する方法を考案した。今後、モデルをさらに改良するとともに裏付ける実証データの収集を行い、化学物質の新規生態毒性評価手法の確立を目指したい。

フィージビリティースタディー研究課題(F S 1) : 海底質中エストロゲン様物質経由のばく露とそのリスク評価

研究者：鹿児島大学 水産学部：宇野誠一(代表研究者)

北里大学 海洋生命科学部：天野春菜

研究概要：これまで海域ではボラあるいはマコガレイの雄個体中血中に高濃度のビテロゲニン (Vtg) が検出されている。これらからは精巣卵も観察されていることから、その影響はエストロゲン様物質によって引き起こされた可能性がある。現在、下水処理場近辺を除けば、沿岸域の水中エストロゲン様物質濃度は低いことから、水中溶存態のエストロゲン様物質が上記の高濃度血中 Vtg や精巣卵を引き起こす原因になるとは考えにくく、エストロゲン様物質の主たるルートや由来を明らかにすることが早急に求められる。我々は大阪湾をフィールドとして研究を進めてきた。大阪湾底質の内分泌攪乱の可能性を調べたところ、底質中の 17β -エストラジオール (E2)、エストロン (E1) 及びノニルフェノール (NP) などが、魚類の内分泌攪乱を引き起こす原因となり得ると示唆される結果を得ている。しかし、底質中エストロゲン様物質が底質からベントス、さらには魚類に移行して、魚類の内分泌攪乱を促すということを確認した例はない。

本研究では、底質中エストロゲン様物質の食物連鎖経由での移行と、それに伴う魚類の内分泌攪乱の検証を行い、底質の内分泌かく乱リスクを明らかにする。底質中エストロゲン様物質が食物連鎖「底質-ベントス-魚類」によって移行し、魚類内分泌を攪乱することを検証することによって、海産魚の内分泌攪乱の原因を明らかにすることができる。この結果をもとに、既存の底質中エストロゲン様物質分析結果を用いて、従来全く明らかにされていない底質内分泌攪乱リスクを解明する。

平成 22 年度は底質からゴカイへのエストロゲン様物質の移行について検証した。またこれに付随するものとして、大阪湾内で採取されたゴカイ及び貝中エストロゲン様物質のモニタリングを行い、実環境における魚類の餌生物のエストロゲン様物質汚染を明らかにした。さらに、次年度の魚類を用いた影響試験のための基礎データとして、マコガレイの Vtg サブタイプの探索を行った。

研究結果のまとめと考察：底質からベントスへのエストロゲン様物質の移行を明らかにするため、イソゴカイを用いた暴露試験を実施した。その結果、イソゴカイに投与したエストロゲン様物質の内、E1 を除くいずれの物質ともゴカイ体内に移行することが明らかとなった。イソゴカイ体内濃度が餌濃度に比較して低く、これらの物質が食物連鎖経由で生物濃縮されず、移行するのみであった。しかし、ppm オーダーの NP や ppb オーダーの E2 あるいは E1 が野外サンプルから検出されたことから、海域に生息するベントス食魚類は、比較的高濃度のエストロゲン様物質に食物連鎖経由で暴露されていることが考えられた。

フイージビリティースタディー研究課題(F S 2) : 多動性に関わる内分泌系因子の同定とかく乱物質の影響に関する研究

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)、下川哲昭、岩崎俊晴、高鶴裕介

研究概要：ヒト注意欠陥多動性障害(ADHD)病因は未だ明らかではない。先天性内分泌機能障害や環境化学物質曝露で多動となることから内分泌系や環境化学物質と多動性発現には何らかの関連が示唆されるが、詳細は明らかではない。そこで本研究では、本申請者らが作製した多動症モデルマウスと、多動性を示す甲状腺機能低下症ラットを用いて多動性発現における内分泌系の関与と環境化学物質の影響を解析する。本研究により、ADHD の発症における内分泌系の関与と環境化学物質の神経毒性メカニズムの一端が解明されることが期待できる。

研究結果のまとめと考察：多動症モデル動物(CIN85 ノックアウトマウス、rdw 甲状腺機能低下症ラット)に対する環境化学物質曝露の影響を評価するために、まず野生型動物における環境化学物質曝露の影響を解析した。その結果、野生型マウスは新生仔期における低用量の水酸化PCBの曝露によって新規環境下においても概日行動量においても明らかな「多動性」を示した。さらに、協調運動も障害されている可能性が強く示唆された。これらのマウスの線条体ではドーパミン受容体の発現増加が認められた。

これらの成果自体、環境化学物質曝露が多動性発現にかかわることの一つの証左である。今後、これらの成果を基にしてさらに注意欠陥多動性障害(ADHD)発症に関わる内分泌系因子の同定とかく乱物質の影響を解析していきたい。

培養細胞を用いた実験では既に培養系が確立している小脳初代培養細胞(分散培養系、凝集顆粒細胞系)を用いて、環境化学物質の影響のみならず、神経発達に関与するBDNFや多動性に直接関与するドーパミンの作用についての解析を始めた。ドーパミンの作用については例数が少なく、また、アゴニストやアンタゴニストを用いていないのでどの受容体が関与しているのか、環境化学物質による修飾作用はどうか、など詳細な解析をまだ行っていない。今後、ドーパミン系と甲状腺ホルモン系とのクロストークや環境化学物質による修飾作用について、より詳細に調べていきたい。

フィージビリティースタディー研究課題(F S 3) : 易代謝性化学物質の体内動態と次世代への影響に関する研究

研究者：酪農学園大学：井上 博紀(代表研究者)、横田 博、岩野 英知

研究概要：本研究では、妊娠中に経口ばく露を受けた化学物質が引き起こす健康影響について、特に体内で高率に代謝解毒(抱合)されることが分かっているが、次世代への影響が懸念されるビスフェノール A を取り上げ、1) 母体が化学物質にばく露を受けた後、これらの化学物質が胎児に到達するまでの体内動態の解明、ならびに、2) 化学物質ばく露が引き起こす代謝変化の解析及びそれによって生ずる健康影響の予測の 2 点に照準を絞り研究を開始した。また、この 2 つの研究アプローチを他の内分泌攪乱作用が疑われる化学物質に応用し、その健康影響をリスク評価できる新たな手法として提案することを、長期的な研究計画のゴールに定めた。

- 1) 母体が化学物質にばく露を受けた後、これらの化学物質が胎児に到達するまでの体内動態の解明
母体によって経口的に暴露された化学物質が標的臓器(胎仔)に到達するまでは、a) 母体の腸管での吸収、b) 肝臓での代謝、3) 全身循環を介した胎盤への流入と胎仔側への移送の 3 点について詳細に吟味しなければならない。これらの臓器における化学物質の挙動を薬物動態学的に調べるためには、丸ごとの摘出臓器を用いたより生体に近い実験モデルが適切である。そこで本研究では、反転腸管または臓器灌流モデルを作成し、ビスフェノール A の経口摂取から、標的臓器への到達までの一連の道のりを解明した。
- 2) 化学物質ばく露が引き起こす代謝変化の解析及びそれによって生ずる健康影響の予測
エストロゲン様作用を有することで知られるビスフェノール A は、妊娠期のばく露によって特に次世代の高次機能に影響を及ぼすことが懸念されている(FDA 2008)。しかしこの化合物のエストロゲン活性はきわめて低く、この作用のみで生体影響のすべてを説明することについて疑問の声が上がっていた。古典的な環境ホルモン研究で、エストロゲン様作用が認められた化学物質の多くについては、同様の問題点が指摘されており、健康影響を説明する新たなメカニズムの解明が必要である。そこで本研究ではビスフェノール A が胎仔の高次機能に及ぼす影響に着目し、この化学物質が引き起こす諸現象を広範囲かつ多角的に捕らえる研究を試みた。本研究ではメタボロミクス技術を使用した網羅的解析によって、ビスフェノール A が引き起こす新たな毒性を見いだした。

研究結果のまとめと考察：ラット及びマウスの臓器灌流モデルを用いた本研究の結果、経口的に摂取されたビスフェノール A は腸管と肝臓を通過する間に高率にグルクロン酸抱合されることから、血中を流れるビスフェノール A はほとんどがグルクロン酸抱合体であることが考えられた。血中に流入したビスフェノール A グルクロン酸抱合体はやがて腎臓から体外へと排泄される。しかし、全身循環の過程で胎盤を通過する際、ビスフェノール A グルクロン酸抱合体は胎仔側へと取り込まれ、胎仔組織中に移行することが分かった。さらに、胎仔組織中で脱抱合され、未抱合のビスフェノール

ル A として例えば神経系等の標的臓器に到達することが推察された。これらの知見を総合し、易代謝性の化学物質であっても、未抱合体として標的臓器に到達する経路が存在すること、またそのような体内動態が存在することから易代謝性であることを理由に一概に安全と結論づけることは危険であり、代謝動態学的な視点から健康影響を熟考する必要があることが証明できた。

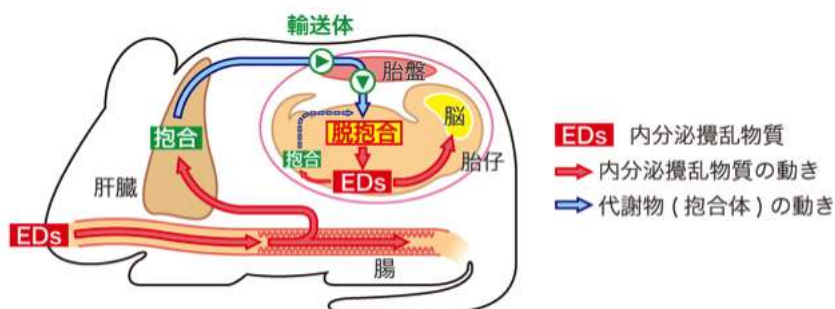


図 2 ビスフェノール A をモデル物質とした易代謝性内分泌攪乱物質の体内動態予想図

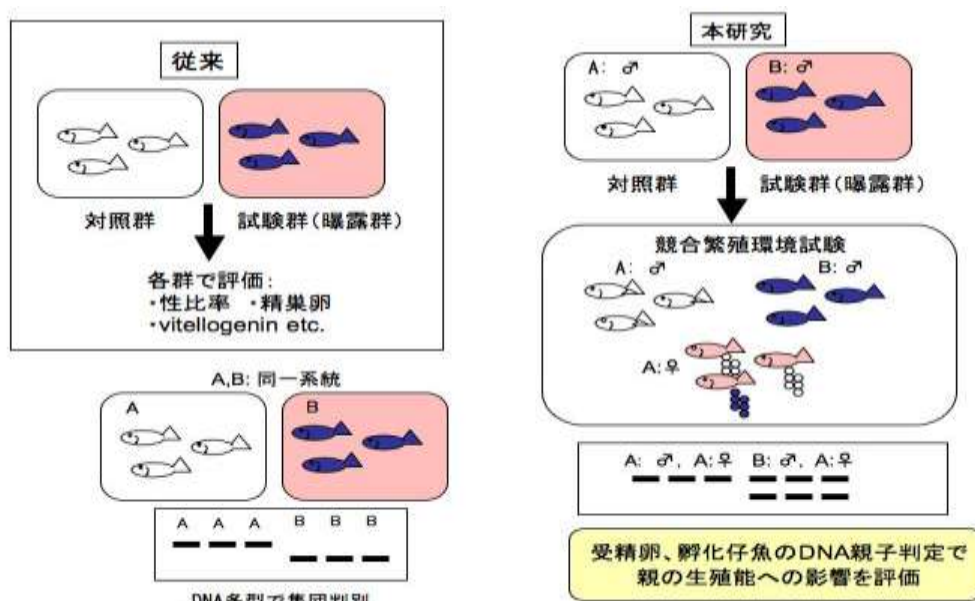
メタボロミクス解析の結果からは、プリン塩基合成系とピリミジン塩基合成系に、それぞれ中間代謝物の減少と増加を認めた。プリン塩基合成系とピリミジン塩基合成系は起点となる化合物が異なり、プリンヌクレオチド合成にはメチル基供与体として機能するテトラヒドロ葉酸が必要とされる。この葉酸代謝系はメチオニン回路に対してもメチル基供与体として機能していることから、葉酸代謝系の減退はプリン塩基合成を減少させるとともに、メチオニン回路全体の中間代謝物量を減少させるだろう。本研究で得られたデータは前述の仮説に一致することから、おそらくビスフェノール A はこの葉酸代謝系に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。

プリンヌクレオチドとピリミジンヌクレオチドはいずれも同じヌクレオシドリン酸キナーゼによるリン酸化を受けるため、プリンヌクレオチドの減少に対する代償作用は、結果的にピリミジンヌクレオチドの増加を引き起こす。この核酸合成系の異常は正常な組織の分化を妨げることが予想され、高次機能への影響を説明できる一つのメカニズムと言える。また、ヌクレオシドリン酸キナーゼは多機能タンパクとして知られ、細胞の分化や増殖を制御していると考えられており、神経ネットワークの構築への影響が懸念される。一方、メチオニン回路の s-アデノシルメチオニンは、DNA のメチル化におけるメチル基ドナーであり、ビスフェノール A はエピジェネティック調節機構の攪乱をも引き起こすことが予想される。この発見は、胎児期の環境が成熟後の健康状態に悪影響をもたらすという、いわゆる「胎児期起源の病態発症学説 (DOHaD)」を裏付けるものであり、内分泌かく乱物質による新たな生体影響機序を説明できるものである。

フイージビリティースタディー研究課題(F S 4)：魚類生殖能を指標とした化学物質の内分泌かく乱作用機構に関する研究

研究者：静岡県立大学：小林 亨(代表研究者)

研究概要：本研究は、内分泌かく乱作用を示す化学物質の影響を個体群レベルで評価するために、水圏の代表的な脊椎動物である魚類の生殖能（生殖行動、受精能を含めた）を指標とした影響評価系を確立することを目的とする（図1）。遺伝的背景の影響を除外するため、既に多くの地方集団が系統化されているメダカ(*Oryzias latipes*)を用いて、今年度は同一集団内において DNA 多型性によって個体判別可能なサブグループを検索し、候補について競合繁殖環境条件下で生殖能への影響を試験可能であるか、検討した。その結果、競合繁殖環境条件において次世代への貢献を DNA 多型性から判定できるメダカ系統を見出すことができた。



研究結果のまとめと考察：今回の結果から、化学物質に暴露されたメダカの生殖能への影響を評価するために競合繁殖環境条件において次世代への貢献を恒常的に DNA 多型性から判定できるメダカ系統を見出すことができた。これまでは、試験に供する魚について、毎回、DNA 多型性を検討した後に初めて評価が可能であるため、多大な労力、時間を費やさなければ試験の解析ができなかった。今回の結果により、労力、時間の省力化だけでなく、常に再現可能な体系化されたシステムにおいて実際に化学物質に暴露されたメダカの生殖能への影響を、次世代への貢献という視点から評価することが初めて可能となった。

その他の研究課題(課題1): 生物蓄積性内分泌かく乱候補物質によるわが国の野生生物汚染の実態解明

研究者：愛媛大学 沿岸環境科学研究センター：田辺信介(代表研究者)、高橋真、磯部友彦

研究概要：本研究の目的は、既存の POPs (Persistent Organic Pollutants: 残留性有機汚染物質) 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に注目し、わが国の野生生物における汚染実態、曝露量調査・蓄積特性等について解明することにある。

最近になって、有機臭素系難燃剤など新たな環境化学物質が登場し、既存の POPs と類似の内分泌かく乱作用や生態系の汚染が危惧されている。本研究では、生物蓄積性の有機臭素系難燃剤として知られる PBDEs (ポリ臭素化ジフェニルエーテル) 及び HBCDs (ヘキサブROMシクロドデカン) に注目し、琵琶湖を中心に魚食性鳥類カワウをモデル生物として汚染の実態・曝露量調査・蓄積特性・母卵間移行・経年変化等のサブテーマに取り組む。カワウは愛媛大学の生物環境試料バンクに冷凍保存されている試料を活用するが、一部試料を新たに捕獲・収集する。PBDEs については、化学構造が類似している PCBs (ポリ塩化ビフェニール) と対比し、その蓄積特性の相違を詳細に解析する。HBCDs が検出されその地域分布特性や経年変化等が明らかになれば、鳥類で初めての汚染実態報告となる。

なお、当該年度は、昨年度の計画(曝露量調査及び成長に伴う濃度変動や生物濃縮などの蓄積特性)に続き、汚染の地域比較、母卵間移行、経年変化等について研究を展開した。

研究結果のまとめと考察: 本研究では滋賀県琵琶湖及び三重県に棲息するカワウの胸筋及び卵黄を供試し地域差、母子間移行、経年変動の解明を試みた。その結果、分析に供試した全ての試料から BFRs (PBDEs、HBCDs) 及び PCBs が検出された。

琵琶湖と三重県のカワウに残留する BFRs 濃度に有意な地域差は認められなかった。一方 PCBs 濃度には有意な差が認められ、琵琶湖の検体は相対的に高い値を示した。また汚染の国際比較を試みたところ、カワウの HBCDs と PCBs 濃度は相対的に高いレベルにあることが判明した。母子間移行については、BFRs 及び PCBs ともにメス成鳥より卵で有意に高い濃度が認められ、またその母卵間の濃度差は既存の鳥類の報告に比べ大きいことから、カワウの母卵間移行率は高いことが示唆された。さらに BFRs は PCBs と同等の母卵間移行を有することが示唆された。経年変化については、PBDEs は 1993 年～2010 の間低減傾向を示し対策の効果が認められたが、HBCDs と PCBs の濃度には明瞭な減少パターンがみられなかった。また、HBCDs の残留レベルは 2003 年以降 PBDEs を上回り、汚染の顕在化が示唆された。すなわち HBCDs 汚染の拡大と PCBs 汚染の継続が懸念され、これら物質に対する環境施策の速やかな履行が必要と考えられた。

以上、昨年度及び本年度の研究により、カワウにおける有機ハロゲン化合物汚染実態の詳細が判

明した。カワウの PCBs 汚染レベルは依然として高いこと、及び BFRs 汚染、とくに HBCDs の汚染動向が危惧されることから、監視の継続とリスク評価の必要性が提言される。また、BFRs は PCBs とは異なる生物蓄積性、すなわち、特異な代謝・排泄メカニズムがカワウでみられたことから、このような傾向を他の高等動物で検証することも今後の課題であろう。

なお、平成 22 年 9 月 17 日（金）に開催された第 6 回薬事・食品衛生審議会薬事分科会化学物質安全対策部会化学物質調査会化学物質審議会、第 98 回審査部会、第 103 回中央環境審議会環境保健部会化学物質審査小委員会において、臭素系難燃剤の一種、ヘキサブロモシクロドデカン (HBCD) の第一種特定化学物質審議審査に本研究結果の一部（鳥類汚染モニタリングデータ）が資料として提示され、審議に活用された（URL：<http://www.env.go.jp/council/05hoken/y051-103-1b.html> の参考資料 8）。

その他の研究課題(課題2)：ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニズムの解析

研究者：自然科学研究機構 基礎生物学研究所 岡崎統合バイオサイエンスセンター：井口泰泉(代表研究者)、宮川信一、加藤泰彦、平川育美、小林かおる

研究概要：日本の提案により、オオミジンコでは生まれた仔虫の性比をみることで化学物質の幼若ホルモン類似作用が検出できる点を、従来のオオミジンコを用いた性殖試験である OECD の TG211 に Annex として追加されている。OECD では内分泌かく乱物質の試験法として無脊椎動物では、オオミジンコその他、アミ、コペポッド、ユスリカを用いた試験法が開発されつつあり、さらに巻貝を用いた試験法の提案も行われている。これらの無脊椎動物では遺伝子情報や内分泌系の情報も乏しい。我々は、オオミジンコの遺伝子情報の集積、マイクロアレイの開発し、RNA 干渉法、遺伝子導入法の開発、脱皮ホルモン受容体を用いたレポーターアッセイ系の開発も行ってきた。これらのオオミジンコの分子生物学的な成果は、OECD Validation Management Group の無脊椎動物会議で成果発表を行い、他の無脊椎動物試験のモデルとなっている。さらに、2010 年 12 月のワシントンでの OECD VMG Molecular Screening 会議において、野生生物の遺伝子情報を用いた毒性評価を開発してゆく Ecotoxicogenomics グループが設立され、日本も、オオミジンコ及びメダカのマイクロアレイを用いた手法を用いて協力することとした。また、日米二国間協力においても、内分泌かく乱物質の試験法の開発とともに、遺伝子情報やタンパク発現情報の解析についても情報を共有することとしている。

平成 22 年度は、1) 幼若ホルモン類似物質の影響の可逆性、不可逆性の確認。2) 数種類の幼若ホルモン類似物質曝露による発現変動遺伝子のマイクロアレイによる解析。3) 甲殻類の幼若ホルモンと考えられているメチルファーネゾエイト曝露による発現変動遺伝子のマイクロアレイによる解析。4) オオミジンコの性決定機構の研究を行った。

1) 幼若ホルモン類似物質のフェノキシカルブの曝露により、産卵数の低下とともにオスの産仔が起こるが、この現象は可逆的か、不可逆的化を調べ、可逆的であることを確認した。

2) 幼若ホルモン類似物質がオスを誘起する臨界期である、排卵後 52-53 時間を含む 6 時間、幼若ホルモン(メチルファーネゾエイト)及びフェノキシカルブを曝露した親の卵巣を摘出して、マイクロアレイにより発現変動遺伝子を解析している。

3) ヒトからセンチウまで性決定機構が理解されている動物種及びミジンコと同じ節足動物に属する昆虫の性決定遺伝子及びその下流にある精巣形成に重要な遺伝子に着目し、オオミジンコにおけるオーソログの単離及び発現解析を進めてきた。その結果、doublesex (DSX) 遺伝子のオーソログである DSX1、DSX2 遺伝子が胚発生時期からオスで高発現することを見出した。さらに、我々が開発した RNA 干渉法を用いてオスでの DSX1 の mRNA レベルを減少させることで、メス化の現象が生じることを明らかにした。一方で、メスで DSX1 遺伝子を過剰発現させるとオス化が生じる

ことも見出した。以上の結果から、DSX1 遺伝子がオオミジンコにおけるオスの性決定遺伝子であり、幼若ホルモン類似物質によるオス産生の責任遺伝子であることを証明した (Kato et al., PLoS Genetic, in press)。また、オオミジンコの RNA 干渉の手法を確立した (Kato et al., Development, Genes and Evolution, in press)。これまで単離した遺伝子の機能解析を行うための第一段階として、遺伝子導入法を開発したが (Kato et al., Ecotoxicology, 2010)、よりよい方法も引き続き開発している。

研究結果のまとめと考察:我々は通常は単為生殖をするミジンコにおいて、幼若ホルモン様化学物質を曝露した場合にオスの産生が誘導されることを見出している。また DM ドメイン遺伝子の解析と、性決定関連遺伝子の解析によって以下のことが明らかになってきた。

研究の流れは以下の通りである。

1) ミジンコにフェノキシカルブを 1 µg/L の濃度で曝露することにより、通常の条件ではメスしか生まないミジンコが 100%オスを産むようになる。

2) 曝露直後に産まれた個体は、化学物質の影響を受けずに全てメスとして産まれるが、2 回目に産まれる個体は化学物質の影響を受けており全てオスとして産まれてくる。

3) 一連の曝露による解析から、フェノキシカルブのみならず、ピリプロキシフェン、メトプレンなど、昆虫、甲殻類の幼若ホルモン様化学物質がオスの産生を誘導することが可能である。

4) こうした幼若ホルモン様化学物質によるオス産生は、*Daphnia magna* のみならず、*Daphnia* 属以外の、*Ceriodaphnia reticulata*, *Ceriodaphnia dubia*, *Moina macrocopa*, *Moina micrura* などにおいても誘導されることを確認し、比較的広範囲のミジンコにおいて共通に生じる現象である。

5) ミジンコが幼若ホルモン様化学物質によって性決定に影響を受けるのは、卵成熟の比較的後期、排卵の 8-7 時間前の非常に限られた時間 (臨界期) である。

6) 多くの生物種において保存されている DM ドメインをもつ遺伝子がミジンコにも存在する。

7) これら DM ドメインをもつ遺伝子には、性特異的な遺伝子発現をする遺伝子が存在する。

8) DM ドメイン遺伝子を制御する遺伝子は、生物種間で異なり、ミジンコにおいては、ショウジョウバエなどとは別のメカニズムによって DM ドメイン遺伝子の性特異的な発現が制御されている。

9) DM ドメインを持つ 5 種類の遺伝子の雌雄の発生に伴う発現解析から、2 種類についてはオスの発現が高く、メスでの発現は極めて低い。これらの遺伝子を *doublesex1*, *doublesex2* と名付けた。

10) オオミジンコの卵での RNA 干渉法 (RNAi) を確立した。

11) *doublesex1* 及び *doublesex2* のダブルストランド RNA (dsRNA) を調整して、幼若ホルモンを曝露したメスの産卵直後の卵 (100%オスに発生する) にマイクロインジェクションしたところ、*doublesex1* の dsRNA のみで表現型 (第一触角、腹肢のフック、生殖腺) がメスに発生した (loss of function)。

1 2) 通常のオオミジンコが産んだ卵 (100%雌に発生する) に doublesex1 の遺伝子をマイクロインジェクションすると、20%で第一触角はオスタイプに発生した (gain of function)。

オオミジンコにおいては、無脊椎動物試験で用いているアミ、コペポッド、ユスリカとは異なり、オオミジンコの EST データベース、アメリカで終了したオオミジンコの近縁種ミジンコ (*Daphnia pulex*) のゲノム配列や、現在進行中のオオミジンコのゲノム解読のデータベースを効率よく利用できるようになっており、マイクロアレイ法によるゲノミクスも可能となった。ところが、他のモデル生物とは異なり、遺伝子機能解析実験を *in vivo* で行う方法が全く開発されておらず、本研究課題を進める上での大きな問題の1つとなっている。今年度における進展の1つは、オオミジンコへの遺伝子導入とオオミジンコ体内で外来遺伝子を異所的に発現させる方法を開発したことである。未だ改善する点が多いが遺伝子導入法によりトランスジェニックオオミジンコを作製することもできる可能性があり、本研究期間で明らかにしてきた性決定関連遺伝子などの機能解析を *in vivo* で行うことが可能となると考えられる。また将来的には、環境変化に応答するレポーター遺伝子をもつトランスジェニックミジンコを作製することで、*in vivo* での毒性評価を遺伝子レベルで行うことも可能となる。

本研究課題を進める上でのもう1つの問題点は、幼若ホルモンの受容体が未だ昆虫類においても解明されておらず、幼若ホルモンの多様な生理作用も相まって、その作用機序がほとんど明らかにされていないことである。そこで、幼若ホルモン作用の分子メカニズムの解明の基礎として、マイクロアレイを用いた幼若ホルモン応答遺伝子の網羅的解析を行った。本研究により、幼若ホルモン様化学物質の遺伝子レベルの作用点は、物質間で共通性、特異性が認められ、ミジンコ類特異的な幼若ホルモンのシグナル伝達経路が存在することが示唆された。また、オスの産仔のための幼若ホルモン曝露の臨界期に幼若ホルモンを曝露し、卵巢のみを摘出してマイクロアレイを行った。本研究で明らかとなてくるであろう幼若ホルモン応答遺伝子のプロモーター領域を解析することで、幼若ホルモン応答配列を明らかにすることができる。これは、今後幼若ホルモン受容体の探索につながるものである。また、幼若ホルモン応答性の顕著な遺伝子については、幼若ホルモン活性を示す化学物質のスクリーニングのためのマーカー遺伝子として利用可能である。本解析系を用いることで、2日で化学物質の幼若ホルモン活性を測定することができ、21日間を必要とする拡張版 TG211 よりもさらに迅速な評価系となり得る。

一方で、前年度に引き続き性決定関連遺伝子の探索を進め、センチウ、ショウジョウバエ、メダカなどで性決定に関わる DM ドメインを有する遺伝子がオオミジンコにおいて発生初期からオス特異的に高発現すること、さらに精巣や第一触角などオスにのみ顕著に発達している器官で発現していることを見出した。これらは、一見多様に見える生物の性決定に共通性が認められることを示唆して

いるのかもしれない。今後我々が開発している遺伝子導入法を用いて遺伝子操作を *in vivo* で行い、*doublesex1* 遺伝子がオオミジンコのオス決定・分化に関与することを明らかにした。幼若ホルモン様化学物質によるオオミジンコの性決定のかく乱の作用メカニズムの分子基盤になることが期待される。

その他の研究課題(課題3)：トキシコゲノミクスを応用した化学物質の内分泌かく乱作用スクリーニング手法の開発

研究者：自然科学研究機構 基礎生物学研究所 岡崎統合バイオサイエンスセンター：井口泰泉(代表研究者)、宮川信一、平川育美

研究概要:環境中に放出された化学物質などにより、河川に生息している魚類への悪影響が懸念され、多くの調査・研究が行われている。そのために、様々な化学物質の水生動物への影響評価法などに関し国際的な議論が多くなされ、OECDでもVMG Molecular Screening and Toxicogenomicsのグループができ、遺伝子発現などを化学物質の影響評価に利用すべく、話し合いとともに、実際のデータの取得が行われている。日本ではメダカを用いた化学物質の試験が行われている。雄メダカでは女性ホルモン作用により精巣卵や、肝臓でのビテロゲニン(卵黄タンパク質)発現が誘導されることがよく知られている。

本研究は、主としてメダカを用いて、イギリスの河川でコイ科の魚のローチに悪影響を及ぼしている可能性のある代表的な女性ホルモン様物質であるエチニルエストラジオール(EE2)を曝露し、肝臓及び生殖線での発現変動遺伝子に関して、マイクロアレイを用いて解析し、発現変動遺伝子のデータベースを作成するとともに、影響のエンドポイントとなるビテロゲニン発現につながる発現変動遺伝子のパスウェイを解析する基礎データを蓄積することを目的とする。すなわち、様々な化学物質の水生生物への影響評価を行う際に利用可能な発現遺伝子データベースの構築を目指す。

研究結果のまとめと考察：メダカでは、環境濃度に近い低濃度エチニルエストラジオール(EE2) 20 ng/L 曝露 6 週目に、成体雄メダカ 6 匹中 2 匹に精巣卵が発症した。精巣卵発症に伴い、正常な精巣には発現していない、卵膜タンパクの ZP 遺伝子(ZPA, ZPC1 など)の発現が確認された。また、肝臓では EE2 曝露により、ビテロジェニン及びコリオジェニンの発現は、曝露 1 週間で大きな発現変化が認められた。予備実験からは、これらの遺伝子の発現は曝露 6 時間でも発現しており、エストロゲン作用をみるための早期のマーカーとして使用できる。

一方、精巣卵出現メカニズムと、表現型の重篤さとマーカー遺伝子との相関を調べるために、高濃度 EE2 100 ng/L 曝露メダカで解析した結果、高頻度で精巣卵が出現した。精巣でのマイクロアレイ解析では ZP 遺伝子群の発現変動が大きく、さらに雌の生殖細胞特異的遺伝子(female germ cell-specific gene, 42Sp50)の発現変動も検出できた(低濃度 EE2 曝露群では 42Sp50 は RT-PCR でその発現が検出できるレベルである)。したがってこれらの遺伝子発現変動は、精巣卵の表現型の重篤さと相関があるといえ、マーカー遺伝子として使用することができる。また、低濃度群では、Izumo や Sperm acrosome membrane associated protein 4、Sperm associated antigen 6 などの遺伝子は、EE2 曝露時間に依存して発現が減少しており、組織学的に影響を与えない低濃度のエス

エストロゲン曝露でのマーカーになり得ると思われる。一方で、高濃度曝露群で発現が低下していた、アポトーシス関連遺伝子や細胞周期関連遺伝子の BCL2-like 13、caspase-8、p21/Cdc42 は、高濃度のエストロゲン曝露でのマーカーになり得ると思われる。一方の脳では、遺伝子発現と表現型との関係を明確にすることはできなかったが、今後のエストロゲン応答遺伝子の基礎データを得た。

平成 22 年度 研究成果合同ヒアリング
 プログラム

(開場 10:00)

(開会・概要説明 10:30~10:40)

(敬称略)

発表時間 区分	代表研究者 代理発表者	所属	研究課題名
10:40~11:00 基盤 1	大迫誠一郎	東京大学 医学系研究科	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
11:00~11:20 基盤 2	安住 薫	北海道大学大学院 薬学研究院	海産無脊椎動物ホヤのトキシコジェノミクス基盤研究
11:20~11:40 基盤 4	古賀 実 (代理) 内田雅也	熊本県立大学 環境共生学部 熊本県立大学大学院	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
11:40~12:00 基盤 5	田中嘉成	国立環境研究所 環境リスク研究センター	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
12:00~12:20 FS 4 (基盤)	小林 亨	静岡県立大学 環境科学研究所	魚類生殖能を指標とした化学物質の内分泌かく乱作用機構に関する研究
12:20~12:25	意見交換		
12:25~13:10	昼食		
13:10~13:30 FS 2 (基盤)	鯉淵典之 (代理) 下川哲昭	群馬大学大学院 医学系研究科	多動性に関わる内分泌系因子の同定とかく乱物質の影響に関する研究
13:30~13:50 FS 3 (基盤)	井上博紀	酪農学園大学	易代謝性化学物質の体内動態と次世代への影響に関する研究

*発表時間には質疑 5 分を含む。

発表時間 区分	代表研究者 代理発表者	所属	研究課題名
13:50～14:10 その他の関連 研究課題 2	井口泰泉	自然科学研究機 構 基礎生物学 研究所	ミジンコにおける内分泌かく乱作用メ カニズムの解析
14:10～14:30 その他の関連 研究課題 3	井口泰泉	自然科学研究機 構 基礎生物学 研究所	トキシコゲノミクスを応用した化学物 質の内分泌かく乱作用スクリーニング 手法の開発
14:30～14:50 基盤 3	早川和一	金沢大学 医薬保健研究域 薬学系	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
14:50～14:55	意見交換		
14:55～15:10	休憩		
15:10～15:30 その他の関連 研究課題 1	田辺信介	愛媛大学 沿岸環境科学研 究センター	生物蓄積性内分泌かく乱候補物質によ るわが国の野生生物汚染の実態解明
15:30～15:50 FS 1 (野生)	宇野誠一 天野春菜	鹿児島大学 水産学部 北里大学	海底質中エストロゲン様物質経由のば く露とそのリスク評価
15:50～16:10 野生 1	上田哲行 (代理) 神宮字寛	石川県立大学 宮城大学	アカトンボ減少傾向の把握とその原因 究明
16:10～16:30 野生 2	白岩善博	筑波大学大学院 生命環境科学研 究科	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
16:30～16:50 野生 3	三枝誠行	岡山大学 理学部	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
16:50～16:55	意見交換		

*発表時間には質疑 5 分を含む。