

平成23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	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～H23
野生2	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～H23
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	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3	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～
基盤4	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～
基盤5	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～
フイージビリティースタディー			
FS1 (野生)	征矢野 清 長崎大学大学院	ボラ・マハゼ・二枚貝を用いた日本沿岸域における底質蓄積性化学物質の生物影響の解明	H23～
FS2 (野生)	石塚真由美 北海道大学大学院	野生の歩哨動物 <i>Rattus</i> sp.を用いた環境化学物質による野生動物のゲノム・ストレスと適応の検証	H23～

区分 番号	代表研究者 所属	研究課題名	実施期間
FS 3 (基盤)	小川園子 筑波大学大学院	内分泌かく乱作用を持つ化学物質の行動 影響評価とその脳内作用機序解析に關する 基盤研究	H23～
FS 4 (基盤)	柏木昭彦 広島大学	脳神経発達へ影響を及ぼす甲状腺ホルモ ンかく乱化学物質のスクリーニングシス テム開発	H23～
FS 5 (基盤)	仲山 慶 愛媛大学	医薬品等糖質コルチコイド様物質による 環境汚染レベルの把握と生態影響評価	H23～
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～H23

野生生物の生物学的知見研究課題(野生1)：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、西川聡史、尾上喬、三好洋輝、大森彩、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、十脚甲殻類 (Decapoda) の1種であり、干潟の泥の中に深い巣穴を作って生活している。瀬戸内海には内湾が多く、干潟も多くみられるので、アナジャコは広く分布している。アナジャコの雌雄は、次の3つの特徴によって見分けることが可能である。1) オスの鉗脚はよく発達するが、メスのそれは雄に比べて細長い。2) 生殖口は、オスでは第5歩脚の付け根に開口するが、メスでは第3歩脚の付け根に開口する。さらに、3) メスの腹部には5対の付属肢(腹肢)があり、遊泳と抱卵の機能を合わせ持つ。一方、オスの場合には、第2腹節から第5腹節にかけて1対の腹肢が生えるが、第1腹節には見られない。

アナジャコの第2次性徴の発現に関する内分泌かく乱(endocrine disruption)があるとすれば、いくつかの指標によってそれを把握することができると考えられる。体長に対する鉗脚幅(propodus width: PW)を計測すれば、その個体が成熟しているかどうか推定できる。

アナジャコにおける内分泌かく乱の指標になりうるかもしれない特徴が、もうひとつ存在する。それは、雄であるにもかかわらず、第1腹肢を持つ個体がいることである。雄における第1腹肢が、個体の成長段階のどの時期に発現するかはまだわかっていない。第1腹肢は、一度生えたとその後の脱皮によって失われず、ずっと生え続けることが示唆された。オスの第1腹肢は、形態から見るとメスのそれと同一の構造であるが、メスのように担卵毛が生えることはない(平成22年度報告書)。平成23年度の研究では、1) メスでは、左右の第1腹肢の長さは個体の大きさに比例して大きくなって行くが、オスでも同様な傾向を示すのか、2) メスでは左右の腹肢は、常にほぼ同じ長さで生えているが、間性個体のオスではどのような生え方になるかを調べた。

平成23年度における研究では、甲殻類の“マドカアナジャコヤドリムシ”に寄生されたアナジャコのオスとメスについての相対成長を調べ、(第2次性徴に関する)内分泌かく乱の明確な証拠を得ることができた。この証拠に基づき、今まで間性個体とされたアナジャコのオスについて、内分泌かく乱が起きた結果そうなったのか、あるいはもっと別な原因でメスの特徴である形態が発現したのかを考察することができた。

第1腹肢を持つアナジャコのオスの割合は、瀬戸内海の多くの干潟と比べて、笠岡湾の干潟に有意に高かった(Nanri et al, 2011)。笠岡湾だけにその割合が高いとすれば、環境汚染よりもむしろそれぞれの地域個体群の持つ固有の性質という可能性も残る。この問題に答える一つの方法として、ひとつの干潟の中で、いくつかの場所を選定し、それぞれの場所ごとに出現率を比較することが考えられる。平成23年度は、一つの干潟を選んでいろいろな場所で採集を行い、第1腹肢の生えた

オスの出現率を比較した。この研究を進めて行くうちに、雌雄ともに今まで知られていなかった腹肢の異常を持つ個体や、腹節に異常を持つ個体(ともに“形態異常個体”とする)が多く発見された。本研究は、腹肢に関して新たに見つかった異常とともに、腹節の異常についても報告している。

笠岡湾における形態異常個体の出現頻度が、泥干潟のどこに生息しているかで大きく異なることから、形態異常は泥干潟の中に不均一に分布する環境因子と関係していることが示唆される。形態異常は、潮位の低い場所に住んでいるアナジャコに多くみられ、陸側に近いところでは極めて少ないことから、船の通り道に近いところに多く残留している環境汚染化学物質があると思われる。そのような環境汚染化学物質として、重金属や有機スズ化合物が疑われた。本研究では、現在は使用が禁止されている有機スズ化合物 (TBT と TPT) が、干潟の多くの場所でどの程度残留しているかを調べ、形態異常個体の出現との関係を議論した。

最後の課題として、笠岡湾では、雌雄ともに第 1 腹節の腹側に黒やブドウ色の傷 (cuticular lesion) のある個体 (傷個体) が多く採集されることである (Nanri et al, 2011)。傷のある個体を人工巣穴に入れて汚染の進んだ海域に置き、脱皮した後に傷の状態を見ると、ほとんど回復していた (平成 22 年度の研究報告)。この結果から、腹部やその周辺の傷は干潟の汚染とは関係がないと思われる。

一方、干潟の多くの場所でどのようなところにいるアナジャコが被害を受けやすいのかを明らかにするために、平成 23 年度はひとつの干潟の中における傷個体の出現率と地形との関係を調べた。その結果、傷個体の出現頻度も、形態異常個体が多く採集される地点とほぼ一致していることがわかった。傷そのものは、シタゴコロガニの食害を受けてできるものであろうが、形態異常が多発する場所では、それが少ない場所に比べて、傷の治りが遅延している可能性が示唆された。

研究結果のまとめと考察：

1. 腹節に見られる黒色の傷の原因と環境汚染との関係

笠岡湾では、雄と雌の両方で、第 1 腹節に黒かブドウ色の傷のある個体が非常に多く発見された。これらの傷は、外被 (クチクラ) にできた傷が原因と考えられ、自然治癒する過程で発生する生体防御反応と考えられる。傷の深さは黒い斑点から、腹節全域がひどく侵されている個体まで、さまざまな程度があった。笠岡湾で傷を持った個体が多発する原因については、2 つの可能性が考えられる。ひとつの可能性は、笠岡湾の干潟には食害によって発生した腹節の傷を直りにくくする環境因子が存在することであり、もうひとつの可能性は、笠岡湾には、他の干潟と比べてシタゴコロガニの生息密度が非常に高いことである。

これらの 2 つの可能性のどちらが高いかは、1) 腹節に傷のある個体を隔離し、個別飼育することで、脱皮の際に傷が消えるかを調べることで、および 2) シタゴコロガニの分布密度を干潟ごとに比較することで、ある程度は判別できると思われる。ただ、シタゴコロガニは採集時にアナジャコからすばやく離れ、逃げてしまうため、分布密度の推定は難しいけれども、今まで瀬戸内海の多くの干潟を調査したときには、傷のある個体はほとんどいなかったことと、シタゴコロガニもまず見つけることができなかった。一方、笠岡湾においては、採集の際にシタゴコロガニが腹部にくっついていたり、採集したアナジャコの付近に落ちていたりすることがあった。これらのことから、

笠岡湾における傷個体の割合が高い原因は、やはりこの干潟は、瀬戸内海の他の干潟と比べてシタゴコロガニの密度が高い可能性が考えられた。

また、傷個体を濾過海水中で個別飼育したときにも、一匹ずつ人工巣穴に入れて富栄養化が進んだ笠岡湾の栈橋においたときにも、脱皮すると消失することがわかった。しかしながら、傷個体が採集される頻度は、第 1 腹肢を持ったオスが採集される頻度とよく対応している。第 1 腹肢を持ったオスが多いところでは、傷個体の頻度も高く、第 1 腹肢を持ったオスが少ないところでは、傷個体の割合も少なかった。第 1 腹肢を持ったオスの多い地点には、シタゴコロガニの密度も高いということは考えにくいので、第 1 腹肢を持つオスの頻度が高い地点では、シタゴコロガニによって食害を受けた場合に、他の地点よりも、傷の回復が遅くなる、つまり後者では 1 回の脱皮により完全に傷が回復するが、前者の地点では数回の脱皮の結果完全に回復するか、あるいは次の脱皮までの期間（脱皮間隔）が長くなってしまうような異常が起きている結果と考える方が良いと思われる。腹節にできた黒い傷も、環境汚染との関連が疑われる。

2. 甲殻類におけるメス化（feminization）の証拠：アナジャコヤドリムシによる寄生の例

オスのアナジャコのメス化については、今までははっきりした証拠がなかった。メスの特徴である第 1 腹肢の発現、雄性生殖口と同時に雌性生殖口の開口、オスにある卵巢という状況的な証拠を集めて推定したに過ぎなかった。アナジャコには、フクロムシの寄生はほとんど見られない。しかしながら、アナジャコヤドリムシに寄生されている個体は非常に多くみられた。マドカアナジャコヤドリムシは、フクロムシのように腹部に寄生するのではなく、アナジャコの鰓室（gill chamber）に寄生する。この甲殻類が寄生するのは、まだ未成熟の個体（オスもメスも）が圧倒的に多いが、成熟サイズに達した個体でも、数は少なくなるが、寄生を受けている。

アナジャコヤドリムシに寄生されても、鉗脚幅がオスと変わらないオスも少しは見られるが、多くのオスでは、鉗脚幅はメスのそれとほとんど変わらない値になっており、明らかにメス化が起きていると結論できるだろう。鰓室に寄生することで、生殖口の開口部付近にある雄性腺に直接、もしくは雄性ホルモンの分泌抑制を通して、メス化を促すのであろう。

また、アナジャコヤドリムシに寄生されたメスでは、体長が 80 mm 以上で成熟しているサイズとみなされる個体でも腹肢には担卵毛が生えていなかった。アナジャコヤドリムシに寄生されると、オスだけでなく、メスの場合にも成熟が抑制されることが考えられる。しかしながら、実際にはそのような個体は少なく、成熟サイズに達すると、アナジャコヤドリムシの寄生を受けていないアナジャコが非常に多くなっている。

3. オスに生える異常肢（第 1 腹肢）の原因

平成 23 年度の研究により、寄生によるメス化の証拠から、アナジャコにおける内分泌かく乱の有無を評価することが可能になった。もし第 1 腹肢が生えたオスに内分泌かく乱があるとすれば、相対成長の指標となる体長（TL）に対する鉗脚幅（PW）の関係は、オスのパターンよりもメスのパターンに近づいてくるだろう。実際には、第 1 腹肢の生えたオスの相対成長のパターンは、寄

生を受けていないオスのそれと完全に一致している。従って、オスにおける第 1 腹肢の発現は、少なくとも性に関する内分泌かく乱が原因で起きているのではないと結論できる。

メスの第 1 腹肢の長さは、個体の大きさと正の相関がある。個体が大きいくほど、第 1 腹肢も長くなっていることがわかる。一方、オスの第 1 腹肢の長さは、個体の大きさに直接比例している訳ではなく、大きな個体であっても短い（小さな）第 1 腹肢しか持たないこともある。このことは、オスの第 1 腹肢は、メスと違って幼個体の時に発現するとは限らず、成長段階のいろいろな時期に脱皮にともなって発生する可能性が高いことを示唆している。本来なら完全に発現が抑制されるはずの第 1 腹肢が、何らかの原因で抑制が解除されて、脱皮の際に生えてくるものと考えられる。

4. 脱皮に関する内分泌かく乱を誘発する環境汚染化学物質

オスのアナジャコに発現する第 1 腹肢について、今までに行ってきた研究 (Nanri *et al.*, 2011) は、その頻度を瀬戸内海の多くの干潟で比較することであった。このような研究では、出現頻度が笠岡湾で異常に高かったとしても、アナジャコの地域個体群に固有な性質としてある割合で発現するという可能性を否定できなかった。平成 23 年度の研究では、アナジャコのオスに見られる第 1 腹肢の出現頻度は、笠岡湾の泥干潟の中でも異なっていることが示された。その結果は、第 1 腹肢の発現割合が個体群固有の性質である可能性を否定し、干潟の中にある環境因子の影響によって生じる可能性を強く示唆していた。

野生生物の生物学的知見研究課題(野生2)：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) およ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、魚類の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。この結果を元に、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 年度には底質から魚類の餌生物の一種であるゴカイへのエストロゲン様物質の移行を確認した。この結果をもとに、平成 23 年度は餌からエストロゲン様物質を経口暴露し、餌生物から魚類 (マコガレイ) へのエストロゲン様物質の移行について検証し、それに伴った Vtg の誘導の有無を調べた。そして、野外において餌からエストロゲン様物質を魚体中に取り込んだときの内分泌攪乱の Vtg 誘導および内分泌攪乱の可能性について探索した。

研究結果のまとめと考察：本研究では餌を経由したエストロゲン様物質の暴露により、暴露濃度依存的なエストロゲン様物質の取り込みは観察されなかったが、どのエストロゲン様物質に対してもマコガレイ体内で明らかな Vtg の誘導が認められた。その誘導は、E1 のように体内から検出されなかった暴露区からでさえも観察され、また、その他の全ての対象物質でも、体内中で低濃度しか残留していなかったものの、その誘導が観察された。このことから餌を介して取り込まれたエストロゲン様物質に対してマコガレイの Vtg は極めて鋭敏に反応、誘導されることが分かった。

各暴露区の最低濃度は、大阪湾で採取したベントス中エストロゲン様物質の最高濃度と同等の

濃度であったことから、現状の大阪湾でも高濃度のエストロゲン様物質が残留しているベントスなどの餌生物をマコガレイが継続的に摂取すれば、高濃度の Vtg の誘導を引き起こす可能性が考えられる。また、コントロール区と同じ餌に切り替えてエストロゲン様物質を排泄させても、少なくとも 1～2 週間程度は高濃度の Vtg が誘導され続けることも明らかとなった。このことから、汚染海域から非汚染海域に移動し、高濃度のエストロゲン様物質を含むベントスなどの餌生物を摂取しなくなっても、しばらくの間、高濃度の Vtg が誘導され続けることが考えられる。

エストロゲン様物質はエストロゲン受容体に結合して様々な内分泌攪乱作用を引き起こすが、攪乱作用の大きさはエストロゲン様物質がどれだけ受容体と結合したか、ということに依存する。Vtg 誘導は、体内へのエストロゲン様物質の取り込み、受容体との結合の結果として引き起こされるものであり、この一連の反応をモニターする上で優れたバイオマーカーとなる。今回、餌からエストロゲン様物質を取り込むことによるマコガレイの Vtg 誘導が確認されたが、これは継続的にエストロゲン様物質が残留している餌生物を接餌し続ければ、何らかの内分泌攪乱作用を引き起こす可能性があることを示唆するものであり、今後、野外でのエストロゲン様物質のモニタリングや内分泌攪乱の調査を行う上で重要な知見となる。

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：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な変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 Developmental Origins of Health and Disease (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(ダイオキシン類(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
①TCDD の胎児期曝露が生後の肝臓 DNA メチル化頻度に及ぼす用量依存性試験

胎生期 TCDD 曝露によって観察される *Cyp1a1* プロモーター領域の低メチル化に関して用量依存性を検討するため、胎生期に一連の用量の TCDD を単回投与して生後 35 日齢になった時点で肝臓のメチル化頻度を測定したところ、TCDD 曝露による DNA 低メチル化の ED50 は 382 ng/kg だった。

- ②TCDD 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、成熟期 BaP 曝露 48 時間後において、*In utero* TCDD における DNA アダクト形成率が *In utero* Vehicle と比較して有意に増加していた。胎生期 TCDD 曝露によって成熟後の変異原による BaP-DNA アダクト形成に対する感受性が上昇することが示された。

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ケンスしたところ、複数の遺伝子のメチル化が変動することがわかった。

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 µg/kg を曝露すると agouti 遺伝子内に挿入したトランスポゾンが低メチル化するために毛色が変わるという報告 (Dolinoy et al., 2007)、ICR/Jcl マウスに BPA 20 µg/kg を曝露すると胎児前脳の遺伝子のメチル化頻度が変わったという報告 (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 低メチル化によりジメチルベ

ンズアントラセン(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。

また、これまで詳細に検討してきた TCDD の胎生期曝露による生後肝臓の低メチル化現象に関して、病態との関連性を検討してきた。これはエピゲノム変化が成人の病態感受性に直接関連するののかという DOHaD 仮説の検証と言える。本研究で使用したモデルで、生後の変異原物質による化学発癌 (前胃過形成) ならびに DNA アダクト形成率の上昇が明らかとなった。しかし問題点はこれらの病態としての現象を修飾した遺伝子の中に、はたして Cyp1a1 があるのか現状では断定できない点である。今後のエピゲノムの変動する遺伝子の網羅的解析、そのうち有力なものの特異的エピゲノム改変動物の創出が必要となるだろう。

基盤的研究課題(基盤2)：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・生殖に関与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、生化学的、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4-ノニルフェノール(4-NP)、トリクロサン(TCS)及びトリクロカルバン(TCC)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、4-NPやNP異性体がアミの脱皮に顕著な影響を及ぼすことを報告している。

TCS及びTCCなどの抗菌剤は、薬用石鹼、シャンプー、洗剤、化粧品、練り歯磨き粉、防臭剤等に広く使用されており(McAvoy *et al.*, 2002)、我々の生活に欠かせないものになっている。しかしながら、抗菌剤として使用されるこれらの化学物質は、ダイオキシン等と比較すると自身の毒性は低いが、使用量が大量であるため環境への排出量も大量である。そのため、抗菌剤の多くは、産業排水や生活排水にも含まれ河川を通じて湖沼や海洋に広がり、水圏に棲息する野生生物に多大な影響を及ぼす可能性が考えられ、生物の生息数減少や分布の変化など生態系への影響や漁業資源の減少などをもたらす恐れがあり、水産物への依存性が高い日本においては安全な食糧資源の確保という問題としても捉える必要がある。また、TCS及びTCCは海産甲殻類に対する影響の知見が少なく、その知見を得ることは必須であると考えます。

更に今年度は、4-NP、TCS及びTCCがアミに及ぼす影響を遺伝子レベルで把握し、早期にリスクを予測することも必要を考え、DNAマイクロアレイを用いた解析も実施することとした。

以上の事から平成23年度は以下の項目について検討した。

1)TCS及びTCC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、それぞれTCSが70.3 µg/l、TCCが12.3 µg/lであった。同様の抗菌作用を持つ2物質であっても急性毒性に大きな違いがあり、TCCがTCSよりも強い毒性を持っていることが明らかとなった。

2)TCS及びTCCのアミの成長・成熟に及ぼす影響の調査

成長成熟試験により、TCS及びTCCは、アミの成長・成熟(脱皮、体長、頭胸甲長、湿重量及び性成熟)に影響を及ぼすことが明らかになった。また、成長・成熟試験では各エンドポイントで作用する濃度もそれぞれの物質で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、TCS及びTCCは環境中の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。またTCSとTCCは、それぞれの混合や、界面活性剤との混合で使用されることもあり、これら複合毒性に関しても影響を調べる必要性が考えられた。

3) 4-NP、TCS及びTCCのアミDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析

アミのDNAマイクロアレイ解析においては、24,556リードの遺伝子を搭載したDNAマイクロアレイを使用した。DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析は、4-NP(1及び10 µg/l)、TCS(0.5 µg/l)、TCC(0.5 µg/l) をアミの孵化後7日齢の仔虫に24時間曝露し、発現変動する遺伝子を確認した。その結果、4-NPではvitellogenin遺伝子等のメス特異的生理作用に関わる遺伝子の発現変動は確認されなかったが、TCS及びTCCではvitellogenin遺伝子の顕著な発現量増加が確認された。

研究結果のまとめと考察：これまでの研究において、4-NP、NP異性体5種(NP-O、NP-N、NP-Q、NP-I、NP-C)、TCS及びTCCのアミへの急性毒性と成長・成熟への検討を実施してきた。その結果、これらの化学物質はいずれもアミの成長・成熟への影響を及ぼすことを明らかにした。各化学物質ともに環境中濃度程度で成長・成熟に影響を及ぼしており実環境中における影響が懸念された。またこれらは実環境中において単独で存在するとは考えがたく、環境水や複合での曝露試験を行い、その影響についても検討する必要性が示唆された。

またアミのDNAマイクロアレイを本研究において初めて作製し、その有用性について検討を行うとともに、4-NP、TCSおよびTCCに関しては遺伝子発現解析を実施した。4-NP曝露ではvitellogenin遺伝子の発現量に変化は確認されなかったが、TCS及びTCC曝露ではvitellogenin遺伝子の発現量が顕著に増加していることなどが確認された。これらの事は、成長・成熟に同様な影響を与えている化学物質であっても生体内への影響は異なると考えられ、今後より多くの化学物質に関して遺伝子発現解析を実施し、成長・成熟に影響を及ぼす遺伝子群について知見を得る必要性があると考えられた。

基盤的研究課題(基盤3)：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およ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な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：内分泌かく乱効果を持つ化学物質の生態リスクを個体群レベルでとらえるためには、曝露濃度と曝露レジーム（定常曝露、パルス曝露など）と性転換確率との関係、産仔数（メスの繁殖能力）との関係をそれぞれ明らかにし、個体群動態モデルによってそれらの影響を統合化する必要がある。本研究ではそれぞれの過程を性比かく乱モデル、繁殖毒性モデル(DEB モデル)に基づく繁殖影響モデルとして定式化し、ベイズ統計法によるマルコフ連鎖モンテカルロシミュレーションによって推定する手法を開発した。さらに、ミジンコの産仔数及び性転換を組み込んだ年齢構成個体群動態モデルを作成し、性転換効果と産仔数減少（繁殖阻害）の相対的重要さを個体群増加率として比較評価できる枠組みを構築した。今年度の予備的な計算結果からは、性比かく乱効果が繁殖阻害効果より個体群増殖能力への影響が大きいことが示唆された。

また、オオミジンコの多世代繁殖試験からは、性比かく乱効果に経世代的效果が検出された。この結果は、まだピリプロキシフェンによる単一の実験結果なので、一般化はできないが、反復実験や他の内分泌かく乱作用のある物質で検証されたなら、経世代効果も評価できるようにモデルを改変する必要があるだろう。

毒性データ解析に基づくモデルの予測が可能になってきたので、これをミジンコの実験室個体群を用いて検証することが必要である。また、ユーザーフレンドリーなソフト化、マニュアル作成によって、内分泌かく乱化学物質の高精度な生態リスク評価法としての普及に努めたい。

基盤的研究課題(基盤4)：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、
薮島旭

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 欠損マウス、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ポリ塩化ビフェニール(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およびドーパミン受容体の発現増加が認められた。

一方、多動症モデル動物である CIN85 欠損マウスにおける環境化学物質曝露では、野生型に比べ、体重の減少と行動量の変化が観察された。これらの成果は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とともに、個体の脆弱性は環境化学物質に対する影響を受けやすいことを示している。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より詳細に解析していきたい。

基盤的研究課題(基盤5)：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：妊娠動物が化学物質ばく露によって引き起こされる次世代への影響は、憂慮される環境問題の一つであり、そのメカニズムは早急に解明されるべき課題と言える。しかしながら、この健康影響を説明する上で不可欠な、1)母体が経口的に摂取した化学物質がどのような過程を経て胎児へと移行するのかについては未だ明確な結論が得られていない。さらに、化学物質が胎児に与える影響については、生殖器等に対するエストロゲン様作用への関心が先行し、2)幅広い視点から恒常性変化を捕らえようとする研究に乏しい。本課題は、EXTEND2010 で評価対象とされる化学物質を視野に入れ、1)臓器灌流モデルによる薬物動態学的手法と、2)メタボロミクス技術を主軸においた代謝機能変化の網羅的解析によって、前述の2点の課題を補い、化学物質による次世代への影響発生メカニズムを総合的に解明する。また併せて化学物質のリスク評価を行うためのデータを提供する。

研究結果のまとめと考察：

- 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
ラット反転腸管を用いた研究によって、腸管に流入したビスフェノール F は腸管組織からの吸収の過程で主としてグルクロン酸抱合され、腸管の粘膜側および漿膜側に排泄されることがわかった。さらに、肝臓に流入したビスフェノール F はほとんどがグルクロン酸/硫酸抱合体(ジコンジュゲート)に代謝され、主として胆汁中に排泄されることから、腸と肝臓による一連の抱合反応が、ビスフェノール A 関連物質に対するバリア機構として重要な役割を担っていることが考えられた。ビスフェノール F 動態は、ビスフェノール A とおおむね同じであるが、ビスフェノール A は肝臓でモノ・グルクロン酸抱合体とジコンジュゲートにおよそ 7:3 で代謝されるのに対し、ビスフェノール F はもっぱらグルクロン酸/硫酸抱合体へと代謝された。ビスフェノール A とビスフェノール F の化学構造の違いは、4-ヒドロキシフェニル基の間に挟まれたブリッジ構造にあり、メチル基がつながるビスフェノール F に対し、ビスフェノール A ではより分子量の大きいプロピル基がブリッジをなす。さらに複雑な分子構造を持つビスフェノール AF を代謝実験に供したところ、代謝物はモノ・グルクロン酸抱合体のみとなったことから、ビスフェノール A 関連物質については、よりブリッジの小さいものはグルクロン酸抱合された後に加えて硫酸抱合されることが推察される。さらに、ビスフェノール AF は肝臓からの抱合体の排泄量が相対的に少ないことから、易代謝性化学物質とはいえ、ブリッジの複雑な分子については、代謝・解毒は決して良いとは言えないことが予想される。他のブリッジの異なるビスフェノール A 関連物質を用いた代謝実験を行い、この仮説を検証する必要がある。

肝灌流モデルを用いた本研究では、ジコンジュゲートは主として胆汁側に排泄された。胆汁側へ

の抱合体の輸送は MRP2 が担うことが良く知られており、ジコンジュゲートも同じ系で輸送されている可能性は高い。しかし、この輸送体は妊娠時に大きく発現量を減じ、静脈側への抱合体排泄がその代償を担う。これらの点から、妊娠時のビスフェノール F 動態についてもデータを得ておく必要がある。とくに、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胎盤で取り込まれ、胎仔組織へと移行することが分かっている。胎盤に発現する薬物輸送体(Oatp、MRP)は、本来グルクロン酸抱合体よりも硫酸抱合体を基質にすることが知られているため、妊娠時のジコンジュゲートの挙動は、次世代への影響と密接にリンクする。

2.化学物質ばく露が引き起こす代謝変化の解析およびそれによって生ずる健康影響の予測

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おり、メタボロミクス解析のデータは、これら一連の中間代謝物の減少も示した。これらのことから、ビスフェノール A は葉酸代謝系の基部に影響を及ぼしている可能性が考えられたため、葉酸代謝系の第一段階と言えるジヒドロ葉酸レダクターゼに焦点を絞り、ビスフェノール A の影響を評価したが作用部位とは言えなかった。

葉酸代謝系は、核酸原料の供給のみならず、DNA のメチル化におけるメチル基ドナーとしても重要であることから、ビスフェノール A による一連の作用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⁸を説明できるものである。今後の展開として、ビスフェノール A の作用部位を特定することと併せて、この新しい仮説を裏付けるための再実験、併せて健康影響として生ずる表現系を掴む必要がある。また、そのいくつかを指標とした化学物質の新しいリスク評価指標の策定は、本研究課題の最終的なゴールとして、引き続き掲げておく。

フィージビリティースタディー研究課題(F S 1): ボラ・マハゼ・二枚貝を用いた日本沿岸域における底質蓄積性化学物質の生物影響の解明

研究者：長崎大学大学院：征矢野清(代表研究者)、長江真樹、高尾雄二

研究概要：野生生物に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響実態を継続的に把握することは、極めて重要である。しかし近年、野生生物における内分泌かく乱化学物質の影響調査はほとんど行われていない。本研究は、人間活動の影響を受けやすい河口域や内湾沿岸域に着目し、底質蓄積性化学物質が魚類の生理現象に及ぼす影響を、環境中の化学物質分析と分子生物学的手法を含む繁殖生理学的アプローチにより正確に把握することを目的とする。また、過去に実施されたフィールド調査の結果と比較検討し、化学物質汚染の変遷と現状の評価を行う。さらに、これらのデータアーカイブバンクを構築し広く情報の発信を行う。具体的には以下の取り組みを行う。

魚類としてボラ・マハゼを、二枚貝としてイガイ類を調査対象生物として、日本沿岸域における内分泌かく乱化学物質の生物影響評価を実施する。全国各地で捕獲した上記生物のビテロジェニン(VTG) タンパクあるいはその遺伝子発現を測定するとともに、生殖腺組織の異常の有無を調べる。またホルモン受容体と生殖腺刺激ホルモン遺伝子の発現を解析し、視床下部～脳下垂体～生殖腺系に及ぼす化学物質の影響を解析する。生息地の底質および環境水を採集し、エストロゲン活性を有する化学物質の定量分析を行う。これらの結果を総合的に考察し、日本沿岸域の内湾河口域における内分泌かく乱化学物質の汚染の現状把握を進める。また、本研究を通して、中長期的環境モニタリングに向けた基盤を確立する。さらに、日本がイニシアチブを取った国際共同研究の基盤を構築する。

研究結果のまとめと考察：

- 1) 東京湾沿岸域、大阪湾沿岸域、九州北部沿岸域において、環境水と底質を採集し、エストロゲン様作用を持つ化学物質を測定するとともに、エストロゲン活性を機械分析値より求めた理論値と酵母アッセイによって算出したところ、2つの算出法によって得られた結果には高い相関が認められた。環境水および底質のエストロゲン活性が高かった場所は、横十間川、佃堀（東京）、神崎川（大阪）であった。武庫川では環境水中のエストロゲン活性は低いものの、底質中のそれは高い値を示した。今回調査を行なった場所で確認されたエストロゲン活性の主要因はE1 およびE2 の生物由来の天然エストロゲンであった。このほかNP はいずれの場所でも比較的高い値で検出されており、エストロゲン活性への寄与率は高いようである。しかし、BPA やE3 の寄与は少ないと判断される。また、EE2 は河川によって検出量が異なり、地域差が特に大きいと思われる。

マハゼを採集し100ng/ml 以上の血中VTG 濃度を示すVTG 陽性雄個体の検出を行なったところ、横十間川（東京）と新淀川（大阪）においてVTG 陽性雄個体が確認された。マハゼ雄VTG 陽性個体が確認された横十間川ではエストロゲン活性が高いことから、この地区のマハゼは環境中

のエストロジェン様物質の影響を受けているものと思われる。これまでの報告によると、10ng/L 以上のエストロジェン活性はコイ雄に1 μ g/ml 以上のVTG を誘導できるという。1 μ g/ml とは通常雄個体で検出される濃度をはるかに超えた値である。今回調査した地点のエストロジェン活性はこの濃度を超過しており、特に、佃堀、横十間川、神崎川はヒト由来のエストロジェンを含む内分泌かく乱化学物質による汚染を受けていると思われる。今後、多くの地域において調査を継続すると共に、採集する生物の検体数を増やし、詳細な生物影響の有無を明らかにする必要がある。

ボラを用いた調査はH24 年度より本格実施となるが、本年度は東京、福岡では下水処理施設付近、また長崎では生活排水が流れ込む湾岸の小河川において、大牟田では生活排水および工業排水が流れ込む河川河口域において予備調査を実施し採集地点を決定した。またVTG 遺伝子と共にバイオマーカーとして利用可能なER のエストロジェン反応の検討を行なったところ、2 種のER のうち、ER α がマーカーとして利用可能なことが明らかとなった。

- 2) 二枚貝を調査対象生物とした内分泌かく乱化学物質の影響調査に向け、対象生物種の選定とバイオマーカーの検討を開始した。本研究では分布を含む生物学的特徴からムラサキイガイを調査対象種として選定した。これまでにヨーロッパイガイにおいてVTG 遺伝子がクローニングされており、エストロジェンに対する反応性が調べられている。しかし、ヨーロッパイガイのE2 に対する反応性は明確にされておらず、ビテロジェニンがバイオマーカーとして適しているか不明である。そこで、ムラサキイガイのVTG 遺伝子を改めてクローニングすることとした。ヨーロッパイガイの遺伝情報を元にプライマーを設計し、ムラサキイガイのVTG 遺伝子クローニングを試みたが、目的とする産物が得られなかった。そこで、PCR 条件やプライマーの設計を見直し、研究を継続している。

フィージビリティスタディー研究課題(F S 2): 野生の歩哨動物 *Rattus* sp.を用いた環境化学物質による野生動物のゲノム・ストレスと適応の検証

研究者：北海道大学大学院 獣医学研究科：石塚真由美(代表研究者)、池中良徳

研究概要：野生動物は環境化学物質に慢性的に曝露されており、内分泌攪乱を起こす化学物質の蓄積は野生動物でもゲノムへの修飾を起こすことが徐々に分かりつつある。また、環境ストレスがゲノムに及ぼすエピジェネティックな変化は一部、次世代にも引き継がれることが最近の研究で明らかになり、内分泌攪乱を引き起こす環境化学物質が野生動物のゲノムにどのようなストレスを与えているのかは、内分泌かく乱作用を明らかにする上で重要な課題となりつつある。

しかし、野生動物の試料における内分泌かく乱作用をゲノムレベルの毒性学的反応として検出する際には、その生物種の生理的な背景や生態が十分に明らかにされている必要があり、アノテーションに乏しい野生動物種では、試料の不均一性、特に個体差及び地域差によって多くの場合検出が困難である。

一方、野生ラットは実験動物であるドブネズミの野生群であり、その遺伝的なデータベース、生理的な反応や毒性データも十分に実験が進み、また室内実験における検証も可能となっている。

野生ラットは都市型だけではなく、農村地域、工業地、ヒトの生活圏のない離島に至るまで幅広い生息域を持つ。また生態系では無脊椎動物に対するトッププレデターであると同時に、哺乳類の中では捕食対象となり、陸棲の生態系をつなぐインターフェースとなっている。

本研究では、内分泌かく乱化学物質の生体影響、特にゲノムへの修飾的影響について、野生ラットにおけるサーベイランスを行うこと、そして室内実験への逆フィードバックによって、フィールドにおける野生動物への作用を明らかにすることを目的としている。

平成 23 年度は、野生ラットの小規模スクリーニングにおけるバイオマーカーの検索とトランスクリプトーム解析、ゲノム修飾(特にメチレーション)にフォーカスを当てて検証を行った。また、ゲノム変異の影響を調べる方法を野生ラットで確立する為に、ミトコンドリア解析の他、ゲノム DNA を用いたマイクロサテライト法を試験した。

全国に棲息する野生ラットを採集し、蓄積する環境汚染物質を分析したところ、有機ハロゲン化合物のスポット汚染や、全国的に高い鉛汚染が認められた。汚染物質の生体影響として、有機ハロゲン化合物ではCYP1A をはじめとする異物代謝酵素群の誘導の他、鉛汚染についてはゲノムのメチル化の減少を起こしている可能性が見出された。

研究結果のまとめと考察：金属汚染の中でも、日本国内では、全国的に鉛は比較的高濃度の蓄積が認められた。そこで土壌の鉛汚染地域から土壌を採集し、実際に実験室ラットを飼育したところ、鉛は骨で多く蓄積し、肺にも移行が認められた。精巣では、ゲノムのメチレーションレベルの低下が

認められ、フィールドの現象が再現された。今後、各臓器におけるメチル化変動の影響について、トランスクリプトーム解析等により明らかにする必要があると考えられた。

有機ハロゲン化合物のうち、都市部に棲息する野生ラットではダイオキシン類の蓄積はスポット型の大きな地域差が存在することが分かった。都市型の野生*Rattus* 属とヒトの生活環が密接していることから、ヒトの生活圏内で同様の汚染源に接触する可能性が考えられた。また、食性を考慮すると、現在離島で繁殖しているドブネズミ群は、都市棲息群とは異なる化学物質の蓄積パターンを示すことが考えられ、実際に臭素化難燃剤や有機塩素系農薬の組成比は、多地域棲息群と異なるパターンを示した。

汚染亢進地域に棲息する野生ラットでは、CYP1A1をはじめとするシトクロムP450の発現上昇、および金属や酸化ストレスで発現が上昇するメタロチオネイン等のマーカー遺伝子の発現レベルが上昇し、実際に環境化学物質の影響を受けていることが示唆された。モノ汚染地域以外の複合汚染地域では、今後、一般化線形モデルなどの多変量解析による解析を行う予定である。

マイクロサテライト解析により、*Rattus* 属の種内におけるゲノム変化を追跡することができることが分かった。そこで今後、汚染とゲノム変異の「速さ」との関係について明らかにする予定である。

フィージビリティースタディー研究課題(F S 3): 内分泌かく乱作用を持つ化学物質の行動影響評価とその脳内作用機序解析に関する基盤研究

研究者：筑波大学：小川園子(代表研究者)、坂本敏郎、長崎大学大学院：西谷正太

研究概要：本研究の目的は、エストロゲン様内分泌かく乱作用の疑われている化学物質の中樞作用について、行動指標に基づく評価法を確立し、脳内作用機序の解明にむけての基盤を確立することである。初年度の研究では、化学物質の周生期曝露によって、思春期や成体期における情動・社会行動の表出がどのように影響されるかについて評価する方法論を確立することを目指した。そのために、先行研究においてエストロゲン様作用が確立している、Diethylstilbestrol（4microgram/kg/day；DES 群）と Bisphenol A（40microgram/kg/day；BPA-L 群と 400microgram/kg/day；BPA-H 群）の妊娠期（妊娠 11-18 日目）経口投与が社会行動に及ぼす影響を検討した。その結果、(1)「ホームケージ飼育環境での個体間行動測定」では、すべての化学物質曝露群において、統制群（溶媒投与）とくらべてホームケージ内での同居個体との接触時間の低下が見られること、特に、BPA-L 群では、離乳後 1 週間の思春期初期における接触時間に顕著な低下がみられること、(2)「社会的探索行動テスト」では、統制群とは対照的に BPA-L 群のマウスでは刺激個体に対する社会的探索行動が極端に低下していること、(3)「オープンフィールドテスト」では、雌雄のマウスにおいて、DES 処置群では活動性の低下、BPA-L 群では活動性の亢進が見られること、が明らかとなった。これらの結果は、社会性の発達において胎仔期化学物質曝露が大きく影響する可能性を示唆するものであり、他の化学物質の影響についても検討していくことが重要であると結論される。

研究結果のまとめと考察：本研究では、エストロゲン様作用が確かめられている2種の化学物質の胎仔期曝露が思春期から性成熟に至る発達段階での社会行動に及ぼす影響を、複数の社会性テストパラダイムを用いて明確に示すことに成功した。特に、低濃度のBPA曝露を受けた雄マウスにおいて、同居他個体とのinteractionばかりでなく、未知の刺激個体に対する社会的探索行動の低下と不安行動の亢進が見られたことは注目に値する。本研究では、オープンフィールドテストも合わせて行い、これらの社会性への影響が自発活動性や、非社会的場面での反応性とどの様に関係しているのかについて検討することを試みた。BPA-L群のマウスでは、総移動距離や中央区画滞在時間に増加傾向がみられたことから、社会的場面と非社会的場面での行動表出の違いに着目しながら、化学物質曝露の影響を評価していくことの重要性も明らかとなった。また、発達初期の環境要因や経験が後の社会行動に及ぼす影響にはしばしば性差が見られることから、現在、雌マウスにおいても同様な解析を進めている。さらに、本研究では思春期から性成熟に至る発達段階に着目した解析を進めたが、成体期での社会行動への影響を検討することも必要であると言える。本研究の結果は、社会性の発

達において胎仔期化学物質曝露が大きく影響する可能性を示唆するものであり、他の化学物質の影響についても検討していくことが重要であると結論される。

フィージビリティスタディー研究課題(F S 4):脳神経発達へ影響を及ぼす甲状腺ホルモンかく乱化学物質のスクリーニングシステム開発

研究者：広島大学大学院：柏木昭彦(代表研究者)、太田茂、山本卓、柏木啓子

研究概要：本研究課題の目的は以下の通りである。甲状腺ホルモン(TH)に対する応答性を高感度に検出するルシフェラーゼトランスジェニックツメガエルを用いて、THかく乱作用を*in vivo*で試験評価するためのプロトコルを確立する。さらに動物愛護の観点とハイスループット化を視野に入れ、トランスジェニック個体由来の細胞株を用いた*in vitro*評価系も新たに開発する。加えて、TH応答性遺伝子や発生関連遺伝子の発現を解析し、分子及び細胞レベルでのエンドポイントとしての妥当性を精査する。得られた結果やツールを基に、一次スクリーニング(*in vitro*)から確定試験(*in vivo*)までを包含した、ツメガエルにおけるTHかく乱化学物質作用の総合的な試験評価システムを完成させる。上記の目的を達成するため、本年度は、簡便な*in vivo*プロトコルの確立に向けて、以下の基礎データを取得した。①TH合成阻害剤メチマゾール処理群とコントロール群における、TH濃度依存的なルシフェラーゼ活性誘導の解析と各50%効果濃度(EC50)値の算出。②臭素系難燃剤テトラブロモビスフェノールA(TBBPA)による抗TH作用の*in vivo*評価。さらに、TH誘導変態及び自然変態におけるルシフェラーゼ発光イメージング解析により、THに高い反応性を示す器官や組織の同定を行った。加えて、*in vitro*試験系の開発に向けたトランスジェニック個体からの細胞株樹立を開始した。

研究結果のまとめと考察：本研究で用いたTRb/Luc Tg 幼生において、T3 濃度に応答してレポーター活性(ルシフェラーゼ活性)の誘導が観察された。興味深いことに、溶媒コントロール群に比べ、TH 合成阻害剤であるメチマゾールに暴露された個体群はT3 に対する感受性が増加した(EC50 値が低くなった)。この理由として、内在性のTH(約6nM)の合成抑制が影響した可能性が考えられる(Krain and Denver,2004)。高濃度のT3 処理個体においてルシフェラーゼ活性の個体間差(ばらつき)が大きくなる傾向が確認された。この原因として、高濃度TH に対する反応性やネガティブフィードバック調節の個体差が考えられる。また、今回のアッセイはOECD のTG231 プロトコルに準じたが、TH に対する反応性は発生ステージの違いも反映することから、この点も考慮した新しいプロトコルを検討しなければならない。先に代表者らによりアフリカツメガエル幼生においてTBBPA は強い抗TH 作用を示すことが明らかにされている(Goto et al., 2008)。今回、TRb/Luc Tg 幼生においても同様に、TBBPA 処理によるT3 依存的なレポーター活性の抑制が示されたことから、この*in vivo* 評価システムの有用性が示されたと考えている。自然変態個体のルシフェラーゼ発光イメージング解析の結果から、脳、特に嗅覚器官はTH かく乱作用の新たなエンドポイントになる可能性が強く示された。嗅覚器官は脊椎動物において摂食や行動に重要な感

覚器官であるため、TH やTH かく乱作用の影響を様々なバイオマーカー遺伝子の発現や組織学解析によって精査する必要があると考える。

個体レベルで簡便にアッセイできるこのシステムは、TH かく乱物質の評価に有用であることが期待される。個体を用いた*in vivo* レベルのアッセイは、得られる情報が多く、内分泌かく乱作用の評価には必要不可欠である。一方、動物愛護の観点や膨大な数に上る化学物質に対応するためには、*in vitro* アッセイも必須である。本研究課題で用いているルシフェラーゼツメガエルは様々な試験評価法への応用を可能にする貴重な実験動物と考えている。本年度で得られた結果や問題点を考慮しながら、次年度の研究を展開し、TH かく乱物質のスクリーニングシステムやプロトコルを構築する予定である。

フィージビリティスタディー研究課題(F S 5):医薬品等糖質コルチコイド様物質による環境汚染レベルの把握と生態影響評価

研究者：愛媛大学 沿岸環境科学研究センター：仲山慶(代表研究者)、磯部友彦、国立環境研究所：鈴木剛

研究概要：本研究課題では、11種類の天然および合成糖質コルチコイド（Glucocorticoids: GCs）の分析法を確立した。同分析手法を用いて、愛媛県内または東京都内の下水処理場から放出される処理水および河川水におけるGCsのモニタリングを実施した。その結果、医薬品として使用されているプロピオン酸クロベタゾールをはじめとした6種類の合成GCsおよび天然GCsであるコルチゾルが数ppt～数百pptレベルで検出されることを明らかにした。また、河川水においても数ppt以下と低濃度ではあるものの数種類のGCsを検出した。さらに、同じ水試料からの抽出液を用いて*in vitro* バイオアッセイを実施したところ、下水処理水および一部の河川水からGRアゴニスト活性（デキサメタゾン等量で、最大25 ppt）が検出され、機器分析の検出濃度順位とほぼ一致する結果が得られた。また、一部河川水（荒川、中川）では、機器分析で対象としたコルチゾルが検出されていないにもかかわらず、GRアゴニスト活性（数pptレベル）が検出され、対象外のGCs様物質の存在が推測された。これらのデータを用いて、環境水中のGRアゴニスト活性における医薬品の寄与を求めるための実験を継続実施している。

研究結果のまとめと考察：本研究は我が国において環境水中のGCs濃度およびGRアゴニスト活性を明らかにした初めての研究である。下水処理場の放流水から最大で数百pptレベルのGCs（250 ppt プロピオン酸クロベタゾール）が検出されることが明らかとなった。また、相対的に濃度は低いものの、河川水からも数ppt～数十pptレベルのGCsが検出されることが示された。これらのことは、環境中に存在するGCs、とくに合成GCsの主要な放出源は下水処理場であると考えられるが、都市域には下水処理場以外の放出源が存在し、GCsによる環境汚染は広範囲に及ぶことが推察された。

愛媛県松山市における調査の結果、下水処理水および都市河川水のGCs濃度は2012年2月の方が2011年10月に比べて圧倒的に高く、最大50倍程度の濃度差があった。また、検出されるGCs化合物種にも違いがあり、環境中のGCs濃度および種類は季節間で異なることが予想された。GCsを含有する外用薬（軟膏）は夏および冬に最もよく処方されとの情報から（薬剤師への聞き取り）、環境中のGCs濃度は医薬品の使用量を反映した季節変動を示すことが予想された。また、家庭における水使用量を反映した日内変動や、雨水合流式の下水処理場からの雨天時越流の影響など、より詳細なモニタリングが必要である。

上述の機器分析に供した水試料の抽出液を用いて *in vitro* バイオアッセイを実施したところ、下水処理水および一部の河川水から GR アゴニスト活性（デキサメタゾン等量で最大 25 ppt）が検出された。この GR アゴニスト活性値の順位は機器分析の検出濃度順位とほぼ一致する結果であった。今後、環境水中の GR アゴニスト活性に対する医薬品の寄与を算出する予定であるが、おそらく下水処理水においては医薬品の寄与が高いと予想された。一方で、機器分析によって GCs が検出されていない地点においても GR アゴニスト活性が検出された。このことは、今回は対象としなかった GCs を含む医薬品または、GCs とは全く異なる化合物による寄与であろうと推察される。プロゲステロン（Kontula et al., 1983）や有機スズ化合物（Gumy et al., 2008）など GR アゴニストとして作用する化合物が存在するため、これらの化合物による GR アゴニスト活性に対する寄与についても今後さらに検討する必要がある。

本研究によって、11種類の同時分析が可能となった。しかし、デキサメタゾンとベタメタゾンのピークが分離できなかったことから、これらのGCsは総濃度としてのみ測定可能であった。両物質を個別に定量するための分析法の改善が今後の課題である。検出感度としては既存の報告

（Chang et al., 2009）と比較して一桁程度低かったが、本研究で確立した分析法は夾雑物質を全く精製しておらず、今後抽出や精製を改良することでバックグラウンドノイズを低減し、相対感度を向上させることが可能と考えられる。また、環境水への添加回収試験において一部のGCsの相対標準偏差（RSD）が高い値を示したのは、これらの物質がLC-MS/MS分析の際のイオン化モードがクリーンアップスパイク（コルチゾル-*d*₄）と異なるため、マトリクスエフェクトによるイオン化効率の変化がクリーンアップスパイクと異なったために補正できなかったことが原因と考えられる。今のところこれらの物質の重水素化または炭素安定同位体標識試薬は入手不可能であるが、マトリクスエフェクトの受け方の類似した内部標準品の探索は分析精度向上に不可欠であり、今後の課題である。

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：ポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)およびヘキサブロモシクロデカン(HBCDs)は家具、建材、電気電子製品等に防燃目的で添加される臭素系難燃剤(BFRs)で、今なお広域利用されている。PBDEs は環境残留性、生物蓄積性が指摘されたことから規制が進み、生産・使用量は減少傾向にある。それに対して HBCDs の需要は増大しており、PBDEs と同様に生態リスクが懸念されている。鳥類の一種である猛禽類は食物網の高次に位置する捕食者であり、残留性の汚染物質を高蓄積すると考えられているが、BFRs による汚染とリスクに関する情報はきわめて少ない。そこで本研究では栃木県で収集された猛禽類を用い、臭素系難燃剤(PBDEs、HBCDs)およびポリ塩化ビフェニル(PCBs)の汚染実態と蓄積特性の解明を試みた。試料は栃木県内で家屋等への衝突により死亡した猛禽類、トビ($n=4$)、オオタカ($n=19$)、ハイタカ($n=5$)、ツミ($n=1$)、クマタカ($n=1$)、サシバ($n=2$)、ノスリ($n=2$)、ハヤブサ($n=1$)、フクロウ($n=7$)の計 9 種 60 個体の胸筋($n=42$)、肝臓($n=40$)、胃内容物、および餌生物を分析に供試した。分析したすべての試料から PBDEs および PCBs が検出され、また胸筋 36/42 検体、肝臓 31/40 検体に HBCDs の残留が認められた。本研究によりこれら物質による猛禽類の広域汚染が判明するとともに、国内の猛禽類から初めて HBCDs を検出した。BFRs はトビを除く全ての猛禽類で PBDEs が HBCDs より高濃度で検出された。この結果は PBDEs の累積生産量が HBCDs を大きく上回っていること、および PBDEs の生体内半減期が HBCDs に比べ長いと考えられた。一方で、トビは PBDEs に比べ HBCDs が高濃度で検出され、本種がヒトの生活圏に近い環境で HBCDs に曝露されたことや、代謝力が弱いことに起因すると推察された。また、安定同位体比を計測したところ種内で大きな差が認められ、ハビタット内の餌生物の構成の違いが化学物質の蓄積レベル個体差の要因と考えられた。胸筋濃度から算出した猛禽類の卵中 PBDEs 予測濃度は、オオタカとハヤブサで孵化率低下の閾値を超える個体が認められ、PBDEs による繁殖リスクの検証が必要と考えられた。

研究結果のまとめと考察：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汚染が懸念されている有機臭素系難燃剤(BFRs) など新たな環境化学物質に注目し、わが国における野生生物の汚染状況と蓄積の態様、毒性発現の可能性等について検証することにある。本研究では、生物蓄積性の BFRs として知られるポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) およびヘキサブロモシクロデカン (HBCDs) に注目し、海洋および陸域生態系の高次動物をモデル生物として、汚染実態・暴露量調査・蓄積特性等の解明とリスク評価の課題に取り組んでいる。

本研究グループは、平成 17 年度より、内分泌かく乱候補物質として知られる有機臭素系難燃剤の汚染実態解明研究を **ExTEND2005** の分担課題として開始した。まず、二枚貝のムラサキイガイとマガキを指標生物にして日本沿岸域の汚染実態解明調査を実施し、**PBDEs** のみならず **HBCDs** の汚染が顕在化していることを明らかにした。また、カツオを指標生物とした近海・外洋汚染のモニタリング調査も行い、東シナ海の **PBDEs** 汚染および日本近海の **HBCDs** 汚染が進行していることを究明した。さらに、東京湾の堆積物や三陸沖で捕獲したキタオットセイの保存試料を活用して汚染の過去を復元し、**BFRs** の汚染が近年急速にすすんだことを指摘した。こうした海洋汚染の研究成果はその起源である陸域汚染の実態解明研究へと発展し、カワウを生物指標とした陸域汚染の実態解明調査を平成 21 年度より開始した。その結果、**PBDEs** および **HBCDs** 汚染の遍在化に加え年齢蓄積性や生物濃縮性があることを突きとめるとともに、世代を超えた汚染や過去の汚染の復元も試み、**BFRs** の汚染がさらに継続することを指摘した。こうした暴露調査の成果から、汚染と影響が最も顕在化しやすい生態系のトップ動物に関心が集まり、猛禽類の汚染実態と蓄積特性の解明およびそのリスク評価が新たな課題となったため平成 23 年度の課題として調査・研究を展開し、高次鳥類に **BFRs** の汚染が拡大したこと、ヒトの生活圏で暴露があること、繁殖リスクが懸念されること等を明らかにした。

平成 24 年度以降は、陸棲や沿岸の高等動物（例えばタヌキ、イヌ、ネコやスナメリなど）を供試して比較生物学的な解析を深め、今後数年間で野生生物全体の包括的な整理を試みたいと考えている。

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、宮川一志、平川育美

研究概要：内分泌かく乱作用については科学的に未解明な点が多いことから、その影響に関連した作用メカニズムを細胞・遺伝子・分子レベルで解明していくことが重要である。中でも内分泌かく乱化学物質により引き起こされる一連の遺伝子の発現変化と、それにより引き起こされる細胞レベルでの変化などを明らかにすることは、内分泌かく乱作用のメカニズムの解明への糸口となる。こうした試みは従来、実験動物や魚類を中心として進められてきた。しかし、生態系への影響を明らかにしていくためには、研究対象を生態系を構成する生物種に広げて解析を進めていく必要がある。特に無脊椎動物においては様々な影響が報告される中で、作用メカニズムを解明するための基礎的な知見は非常に限られている。OECD(経済協力開発機構)EDTA(内分泌かく乱タスクフォース)VMGeco では、無脊椎動物(アミ、コペポッド、ユスリカ、オオミジンコ、マキガイ)を用いた試験法の開発を行っている。これらの生物においては生殖試験を内分泌かく乱作用の検出試験と位置付けており、個体レベルへの影響に主眼がおかれている。我々は、殺虫剤として使用されている幼若ホルモン類似物質が単為生殖でメスしか生まないオオミジンコにオスを産ませることを見出した。この知見に基づいて日本はTG211生殖試験に、性比をエンドポイントとして追加することを提案して承認された。さらに、我々は現在までに、オオミジンコの遺伝子を整理し、マイクロアレイを開発した。OECD で用いているアミ、ユスリカ、コペポッドでは遺伝子情報も得られていないため、オオミジンコを用いた化学物質の作用メカニズムの理解が国際的に期待されている。

昆虫を中心とした無脊椎動物においては、脱皮ホルモンと幼若ホルモンが個体発生や成長に関わっていることが知られている。脱皮ホルモンについては、ショウジョウバエなどを中心としてその受容体や関連遺伝子の解析が進んでいる。我々も、オオミジンコの脱皮ホルモン受容体のクローニングおよび脱皮ホルモン遺伝子を組み込んだレポーターアッセイ系を確立してきた。一方、幼若ホルモンについては、その受容体についてすら明らかになっておらず、不明な点が多い。両ホルモンの生合成過程や、内分泌系の発生、生殖へ関与を理解することは、内分泌かく乱作用のメカニズムの解明に不可欠である。本研究では、このオオミジンコのオス産生の誘導をモデルとして、無脊椎動物における内分泌かく乱作用の分子レベルでのメカニズムの解明を目指す。これにより、本研究は拡張版 TG211 生殖試験を分子レベルからサポートすると同時に、オオミジンコにおける内分泌系と性決定・性分化についての基礎的な知見を得ることを目的とする。また、OECD VMGnon-animal の Toxicogenomics, Molecular Screening グループの要請に対応する実験も行うこととしている。これらの知見を用いて、OECD の AOP (Adverse Outcome Pathway) プロジェクトに貢献する。

研究結果のまとめと考察: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。さらに遺伝子機能解析実験を *in vivo* で行う RNAi 解析を我々は開発しているほか、未だ改善する点はあるものの、過剰発現系も利用できる。将来的には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ホルモン合成・分解系関連遺伝子や、性決定関連遺伝子などの機能解析を *in vivo* で効率よく行うことが将来的に可能となることが期待される。また幼若ホルモン関連遺伝子のプロモーターが同定できた場合、幼若ホルモン曝露を含む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問題点は、オオミジンコの主要な内分泌系、すなわち脱皮ホルモン及び幼若ホルモンについての知見が乏しい点である。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、幼若ホルモン作用を持つとされる Diofenolan をマイクロアレイを用いて、遺伝子発現解析を行った。従来の幼若ホルモン応答遺伝子の解析と比較することにより、幼若ホルモン様化学物質の遺伝子レベルの作用点が明らかになると思われる。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。さらに我々はオオミジンコの内分泌系の理解を目指す研究の一端として、両ホルモンの合成・分解に関与する遺伝子の単離・同定を開始した。今後性決定期のミジンコ生体内におけるホルモン濃度の分析測定や、それを制御している両ホルモンの生合成・分解関連遺伝子群の単離・同定を進め、さらにその発現定量解析や両ホルモンの内分泌器官の同定する必要がある。これらの研究は、ミジンコ類本来の内分泌系や性決定・性分化機構、そして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。

今年度は、幼若期のニシツメガエルの生殖線を用いて、長期の化学物質曝露(エチニルエストラジオール)による悪影響を短期間で予測するために、マイクロアレイ手法を用いて発現変動遺伝子を解析した。一方でこうした化学物質の影響評価手法については現在まで、エストロゲン作用を持つ物質の研究が中心となっている。本研究では抗アンドロゲン作用物質(フルタミド)をもちいて、メダカへの影響をマイクロアレイによる遺伝子発現解析で評価した。さらに、アンドロゲン応答遺伝子群について、その基礎データを得た。このように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基礎を構築した。これら取り組みから、将来的な長期の化学物質曝露による悪影響を短期間で予測する手法の確立が期待できるものと思われる。また、OECDのAOP(Adverse Outcome Pathway)プロジェクトにも貢献することが可能である。

研究結果のまとめと考察:環境中に放出された化学物質などにより、水系に生息している魚類や両生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。我々はこれまで、日米二国間協力やOECDのFSDTなどで用いられる化学物質の曝露による影響について、発現変動遺伝子の解析を行ってきた。昨年度はメダカの肝臓およ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発現変動遺伝子を解析し、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マーカー遺伝子を明らかにしてきた。今年度は、幼若期のニシツメガエルの生殖線を用いて、長期の化学物質曝露(エチニルエストラジオール)による悪影響を短期間で予測するために、マイクロアレイ手法を用いて発現変動遺伝子を解析した。

Testis-ovaが検出されたカエルでは、対照区オスに比べて42Sparticle構成タンパク、Figalpha、Zp遺伝子群の発現が増加しており、メダカ同様、これらが精巣卵検出の遺伝子マーカーとなり得ることが示唆された。一方でこうした化学物質の影響評価手法については現在まで、エストロゲン

作用を持つ物質の研究が中心となっている。本研究では抗アンドロゲン作用物質（フルタミド）をもちいて、メダカへの影響をマイクロアレイによる遺伝子発現解析で評価した。本実験では、EE2 曝露のように精巣卵出現などの、組織学的に顕著な表現型が認められなかったが、Figalpha や、いくつかの Zp 遺伝子群の発現減少が明らかとなり、これらの遺伝子は高感度な抗アンドロゲン作用の遺伝子マーカーとしての候補となりうるものと考えられる。さらに、アンドロゲン応答遺伝子群について、カダヤシの交接鰭およびメダカの尻鰭乳頭状突起形成を指標として、実際アンドロゲン投与によって誘導される遺伝子を得た。これらの基礎データをもとに、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子解析を行うことによって、アンドロゲンの生物応答に則したより適切なマーカー遺伝子(すなわちエストロゲン応答遺伝子としてのビテロジェニンやコリオジェニンなどに相当する遺伝子) が得られるものと確信している。これら取り組みから、将来的な長期の化学物質曝露による悪影響を短期間で予測する手法の確立が期待できるものと思われる。さらには、物質毎の AOP についてもより詳細に理解することが可能になり、OECD に対しても大きな貢献が可能である。

平成 23 年度 研究成果合同ヒアリング

開催日時：平成 24 年 3 月 23 日（金） 10:00～17:00

開催場所：LMJ 東京研修センター 5 階 大会議室

プログラム

（開会・概要説明 10:00～10:10）

（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
10:10～10:30 F S 1（野生）	征矢野 清	長崎大学大学院	ボラ・マハゼ・二枚貝を用いた 日本沿岸域における底質蓄積性 化学物質の生物影響の解明
10:30～10:50 F S 2（野生）	石塚真由美	北海道大学大学 院	野生の歩哨動物 <i>Rattus sp.</i> を用 いた環境化学物質による野生動 物のゲノム・ストレスと適応の 検証
10:50～11:10 野生 1	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
11:10～11:30 野生 2	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
11:30～11:50 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
11:50～12:30	意見交換（「野生」の課題の評価会を実施）		
12:30～13:10	昼食		
13:10～13:30 基盤 2	古賀 実 内田雅也 小林 淳	熊本県立大学 環境共生学部	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

発表時間 区分	代表研究者 代理発表者	所属	研究課題名
13:30～13:50 F S 3 (基盤)	小川園子	筑波大学大学院	内分泌かく乱作用を持つ化学物質の行動影響評価とその脳内作用機序解析に関する基盤研究
13:50～14:10 F S 4 (基盤)	柏木昭彦	広島大学	脳神経発達へ影響を及ぼす甲状腺ホルモンかく乱化学物質のスクリーニングシステム開発
14:10～14:30 F S 5 (基盤)	仲山 慶 鈴木 剛	愛媛大学 国立環境研究所	医薬品等糖質コルチコイド様物質による環境汚染レベルの把握と生態影響評価
14:30～14:50 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
14:50～14:55	意見交換		
14:55～15:10	休憩		
15:10～15:30 基盤 5	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
15:30～15:50 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
15:50～16:10 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
16:10～16:30 基盤 3	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
16:30～16:50 基盤 4	鯉淵典之	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
16:50～16:55	意見交換		

* 発表時間には質疑 5 分を含む。