

## 野生生物の生物学的知見研究、基盤的研究及び関連する研究について

### 1. 昨年度の実施状況

EXTEND2010 では、これまで ExTEND2005 のもとで実施してきた、公募により研究課題を募集し、有識者により構成される野生生物の生物学的知見研究検討部会及び基盤的研究企画評価検討部会により課題の採択及び研究成果の評価を行うという枠組みについては、基本的に踏襲することとしている。但し、研究課題の設定や採択にあたっては、行政としての目標やニーズを明確に反映させた課題を設定し、行政施策の検討に活用することを念頭に置いて、環境リスク評価の進展に寄与し得る研究課題を優先的に選定することとし、必要に応じて「指定研究」の形で課題を設定する等の見直しを行うこととしている。

平成 23 年度には野生生物の生物学的知見研究 2 課題、基盤的研究 5 課題及びフィージビリティースタディー 5 課題及びその他の関連研究 3 課題の合計 15 課題を実施した。その研究成果について、EXTEND2010 野生生物の生物学的知見研究検討部会及び EXTEND2010 基盤的研究企画評価検討部会により合同で開催した評価会（平成 24 年 3 月 23 日開催、非公開）において評価を行った。

その結果を受け、平成 24 年度の野生生物の生物学的知見研究として 2 課題、基盤的研究として 8 課題及びその他の関連研究課題として 2 課題を選定した。

### 2. 今年度の取組

今年度、実施している研究課題について、以下に示す。（詳細は別紙 1 参照）

#### (1) 野生生物の生物学的知見研究及び基盤的研究

平成 23 年度に実施された研究成果の評価を行った上で選定された以下の 10 課題について、研究を実施している。

野生 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

野生 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

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

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

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

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

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

基盤 6：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

基盤 7：ツメガエル変態アッセイを用いた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

基盤 8：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

## (2) フィージビリティースタディー研究

本年度は、継続研究への資源の配分を行ったため、化学物質の内分泌かく乱作用に関するフィージビリティースタディーの公募を行わないこととした。

## (3) その他の関連研究課題

野生生物の生物学的知見研究及び基盤的研究の他に、EXTEND2010を進めるに当たり必要と考えられる2課題について、研究を実施している。

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

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

## 3. 今後の進め方（案）

- ・今年度実施している研究課題については、今年度末に EXTEND2010 野生生物の生物学的知見研究検討部会及び EXTEND2010 基盤的研究企画評価検討部会による研究成果合同ヒアリング（非公開）を開催して、成果についての評価を行い、来年度の研究の継続の可否を判断する。
- ・来年度以降に募集する研究課題については、両部会において検討する。

## 採択した課題の研究概要と平成24年度の実施内容

## 野生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（H23～）

- (1) 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
- (2) 研究概要：沿岸河口域における化学物質の影響調査を、環境特性(人口、下水処理状況、下水処理施設の有無、化学工場等の有無、畑地、水田など)の違いを基準として選定した東京湾、伊勢湾、大阪湾、九州沿岸域の調査地点において実施する。各地においてボラ・マハゼ・ムラサキイガイを採集し、エストロゲン様作用を持つ内分泌かく乱化学物質の影響をビテロゲニン(VTG)などの成熟関連因子をバイオマーカーとして調べる。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―生殖腺軸に及ぼす化学物質の影響を解析する。加えて、生物採集地の底質及び環境水中のエストロゲン様化学物質の定量分析と環境中の総エストロゲン活性の評価を行う。さらに、生殖腺異常、形態異常等を基準として実際の天然環境で起きている環境劣化に伴う異常現象とを関連付けた調査を行う。これらの結果を総合的に考察し、我が国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。
- (3) 平成24年度実施内容：
- ・成熟状態・季節性を含めた内分泌かく乱化学物質の汚染実態と生物影響調査
  - ・ムラサキイガイの成熟関連因子(VTG、ER)遺伝子のクローニング
  - ・内分泌かく乱化学物質データアーカイブバンクの樹立

野生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（H23～）

- (1) 研究者：北海道大学大学院：石塚真由美(代表研究者)、池中良徳
- (2) 研究概要：野生動物が内分泌かく乱化学物質によって受ける様々なゲノム・ストレスについて、歩哨動物となる野生のラット属 *Rattus sp.*を用いて明らかにする。ゲノムのメチル化やDNA付加体、トランスクリプトーム解析を行い、ばく露化学物質やそのレベルとの関連性を解析する。また、化学物質の環境汚染下に棲息する野生ラットの個体群について、化学物質の汚染によって起こり得るゲノム変異についても解析する。
- (3) 平成24年度実施内容：
- ・野生ラットに蓄積する環境汚染物質のスクリーニングと安定同位体の分析

- ・環境汚染物質がフィールドで起こす野生ラットのゲノム修飾・変異への影響
- ・環境汚染物質がフィールドで起こす野生ラット生殖器の変化の解析

**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 (H20～H24)**

- (1) 研究者：東京大学大学院 医学系研究科：大迫誠一郎(代表研究者)
- (2) 研究概要：胎児期ダイオキシン(TCDD)ばく露により生後の肝臓中 DNA の低メチル化が生じるが、このエピゲノム変化の分子機構を主に遺伝子組み換え動物(コンディショナル DnmtKO マウス)やクロマチン免疫沈降法(ChIP アッセイ)を用いて解析する。引き続き、網羅的 DNA メチル化解析法の開発を継続する。開発中のインターフェースで遺伝子の予想を行い予測性の確認をする。また、ビスフェノール A(BPA)ばく露マウスの脳組織の解析を完了させる。
- (3) 平成 24 年度実施内容：
- ・ TCDD の肝細胞 DNA 低メチル化機構の解析
  - ・ 網羅的 DNA メチル化解析法の開発

**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 (H21～H24)**

- (1) 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、小林淳、株式会社エコジェノミクス：内田雅也
- (2) 研究概要：ノニルフェノール(NP)及び脱皮ホルモン様物質：20E(20-hydroxyecdysone)について生殖試験を実施する。これら生殖試験から得られた結果をもとに NP や 20E がアミに及ぼす内分泌かく乱作用について検討し、ミジンコや魚類の結果とも比較をすることでアミを使用した海域における内分泌かく乱作用について知見を得る。また、生殖試験で得られた結果とこれまで実施してきた脱皮を指標とした成長・成熟試験の結果を比較することで再生産と脱皮の関連性についても明確にする。
- (3) 平成 24 年度実施内容：
- ・ NP の生殖試験
  - ・ 20E の生殖試験
  - ・ 再生産と脱皮の関連性の検討

**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 (H21～H24)**

- (1) 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)、鑪迫典久
- (2) 研究概要：平成 23 年度までの研究の進展によって、内分泌かく乱化学物質の作用によってミジンコが示す性比かく乱と長期繁殖阻害の影響を生態毒性試験データから解析し、予測できるモデルがほぼ完成した。平成 24 年度では、これらを統合化してミジンコの個体群増殖率などによって個体群レベルの効果を評価できるシステムの開発を目指す。作成された計算法を、GUI(graphical user interface)上でデータの入力と評価結果を出力できるソフト化を目指す。
- (3) 平成 24 年度実施内容：
- ・性比かく乱モデルと繁殖毒性モデルの統合化による生態毒性データ解析手法の開発
  - ・性比かく乱作用を組み込んだミジンコ個体群動態モデルによる生態リスク評価
  - ・オオミジンコ実験個体群を用いた試験法の開発と生態リスクモデルの検証実験

#### 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 (H22～H24)

- (1) 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)、下川哲明、岩崎俊春、高鶴祐介、薮島旭
- (2) 研究概要：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 ADHD 発症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。
- (3) 平成24年度実施内容：
- ・多動症発症メカニズムの解析と環境化学物質ばく露の影響
  - ・神経/内分泌機能における内分泌かく乱化学物質の作用メカニズムの解析

#### 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 (H22～)

- (1) 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
- (2) 研究概要：ビスフェノールA を含む類似の易代謝性ポリマー系素材を対象として、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、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。
- (3) 平成 24 年度実施内容：
- ・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

- ・化学物質ばく露が引き起こす代謝変化の解析及び健康影響の予測

**基盤6：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（H23～）**

- (1) 研究者：筑波大学：小川園子(代表研究者)、京都橘大学：坂本敏郎、長崎大学大学院：西谷正太
- (2) 研究概要：エストロゲン様作用が確立している Diethylstilbestrol と Bisphenol A に加えて、新たに甲状腺ホルモン様作用物質である Hydroxy-polychlorinated biphenyl と Polybrominated diphenyl ether について、妊娠期(妊娠 11～18 日目)での経口投与が後の行動発現に及ぼす影響を、雌雄の C57BL/6 マウスにおいて検討する。特に、思春期から若成体期における社会行動について、社会行動バッテリーテスト(社会探索・嗜好性行動テスト、社会認知行動テスト、ホームケージ飼育環境での個体間行動測定、長期的社会的嗜好・反応性テスト、集団飼育環境での行動テスト等)を用いて、解析を行う。行動影響評価後には、脳標本を採取して、神経組織学的検索(ステロイドホルモン受容体、神経ペプチド等)を実施する。
- (3) 平成 24 年度実施内容：
  - ・エストロゲン様作用物質への周生期ばく露が、雌雄マウスの思春期での社会行動発達と若成体期での発現調節に及ぼす影響の検討
  - ・甲状腺ホルモン様作用物質への周生期ばく露が、雌雄マウスの思春期での社会行動発達と若成体期での発現調節に及ぼす影響の検討
  - ・エストロゲン様及び甲状腺ホルモン様作用物質への周生期ばく露が、社会行動関連物質の脳内発現に及ぼす影響の検討

**基盤7：ツメガエル変態アッセイを用いた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～）**

- (1) 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、愛媛大学沿岸環境科学研究センター：鈴木賢一
- (2) 研究概要：甲状腺ホルモン(TH)応答性レポータートランスジェニックツメガエル(*Xenopus laevis*)個体を用いて、THかく乱作用が疑われる化学物質をレポーター活性(ルシフェラーゼ活性やGFP蛍光)により個体レベルで簡便かつ定量的にスクリーニングするシステムを開発する。OECDのツメガエル変態アッセイ(TG231)をベースとし、ばく露期間、対照群や処理個体数等、プロトコール設定に必要な条件を検討する。これまで用いられている組織形態学的所見に加え、レポーター活性及び変態現象に重要なTH応

答性遺伝子群の発現変動をエンドポイントとして導入する。上記のプロトコールやエンドポイントを用いて、簡便な個体レベルでのスクリーニング法を開発する。加えて、ゲノム解析が終了しているネッタイツメガエル(*Xenopus tropicalis*)を用いた変態アッセイの開発(トランスジェニックラインの開発や変態アッセイの条件検討)も同時に行う。評価する化学物質として、臭素系難燃剤であるTBBPA、PBDE(水酸化BDE)、トリクロサン等をばく露実験に用いる。

(3) 平成24年度実施内容：

- ・ レポーター活性を指標とした*in vivo*スクリーニングのプロトコール条件の検討
- ・ 変態に重要な TH 応答性遺伝子の発現解析とエンドポイントとしての妥当性の精査
- ・ ネッタイツメガエルトランスジェニックラインの開発と変態アッセイの条件検討

#### 基盤 8：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～)

(1) 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

(2) 研究概要：糖質コルチコイド様物質(GCs)について、分析法の改善とサンプリング法の最適化を行い、下水処理場由来GCsの放出量を把握し、環境動態を明らかにする。また、環境中GC受容体(GR)アゴニスト包括活性に対する対象物質の寄与率を把握するとともに非対象物質の探索を試みる。さらに、GCsの分解性や濃縮性の解析、魚類及び低次生態系への影響評価を行う。

(3) 平成 24 年度実施内容：

- ・ GCs 分析法の改善、サンプリング法の最適化及び下水処理場からの GCs 放出量の把握
- ・ GR アゴニスト相対活性評価と環境中 GR アゴニスト包括活性に対する対象物質の寄与の把握と非対象物質の同定
- ・ 環境中での GCs の挙動、モニタリングで検出された GCs 濃度及び包括活性レベルでの魚類及び低次生態系に及ぼす影響の解析

#### その他の関連研究課題 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 (H17～)

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

(2) 研究概要：既存のPOPsに加え生物蓄積性の有機臭素系難燃剤として知られるポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)及びヘキサブROMシクロドデカン(HBCDs)に注目し、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・蓄積特性等の解明に取り組んでいる。平成24年度は、小型陸棲哺乳類の汚染実態と蓄積特性(被捕食動物との関連を含む)、リスク評価等に関わる研究計画を遂行して陸上高等動物の汚染研究をまとめるとともに、その成果を海棲哺乳類の汚染モニタリングに発展させ、今後数年間で野生生物全体の包括的な整理を試みる。

(3) 平成 24 年度実施内容：

- ・汚染の実態解明
- ・蓄積特性の解明
- ・リスク評価

#### その他の関連研究課題 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 (H17～)

(1) 研究者：自然科学研究機構 基礎生物学研究所：井口泰泉、宮川信一、荻野由紀子、宮川一志、平川育美

(2) 研究概要：幼若ホルモン類似物質のばく露により、単為生殖のオオミジンコがオスを産む現象に関与する遺伝子及び生殖腺分化に関連する遺伝子を探索する。さらに、幼若ホルモンや幼若ホルモン類似物質などを用いて、TG211 に準拠し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、その知見を集積する。オオミジンコの内分泌系を理解するために、幼若ホルモン及び脱皮ホルモン合成系・分解系の経路を明らかにし、両ホルモンの合成系・分解系に関わる酵素群の遺伝子の単離・同定を進める。また、これら酵素の発現する器官を *in situ hybridizaion* 法などにより同定を試みる。さらに、未だ明らかとなっていない幼若ホルモン受容体系について、受容体候補遺伝子の同定とその機能解析を行う。

(3) 平成 24 年度実施内容：

- ・オオミジンコにオスを産生させる幼若ホルモン様物質のばく露による発現変動遺伝子のマイクロアレイによる解析
- ・オオミジンコの幼若ホルモン及び脱皮ホルモン合成系・分解系遺伝子の同定を進め、発現部位を決定する手法・条件を決定
- ・オオミジンコの幼若ホルモン受容体候補遺伝子の同定とその機能解析

野生生物の生物学的知見研究検討部会  
委員名簿

(敬称略)

| 氏名    | 所属・役職   |
|-------|---|
| 五箇公一  | 国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター<br>主席研究員                         |
| 門上希和夫 | 北九州市立大学 国際環境工学部 エネルギー循環化学科<br>大学院 国際環境工学研究科 環境システム専攻 教授 |
| 川合眞一郎 | 甲子園大学 栄養学部<br>特任教授                                      |
| 田辺信介  | 愛媛大学 沿岸環境科学研究センター<br>教授                                 |
| 椿 宜高  | 京都大学 生態学研究センター<br>教授                                    |
| 村田幸雄  | 財団法人 世界自然保護基金ジャパン<br>シニアオフィサー                           |

基盤的研究企画評価検討部会  
委員名簿

(敬称略)

| 氏名   | 所属・役職                                    |
|------|--|
| 井口泰泉 | 自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター<br>生命環境研究領域 教授 |
| 奥野泰由 | 社団法人 日本化学工業協会 新規課題対応ワーキンググループ 主<br>査     |
| 小山次朗 | 鹿児島大学 水産学部 海洋資源環境教育研究センター<br>教授          |
| 遠山千春 | 東京大学 医学部附属疾患生命工学センター 健康・環境医工学部門<br>教授    |
| 永沼 章 | 東北大学大学院 薬学研究科 生体防御薬学分野<br>教授             |
| 渡辺知保 | 東京大学大学院 医学系研究科 国際保健学専攻 人類生態学分野<br>教授     |