

資料 1 - 2

平成24年度 野生生物の生物学的知見研究及び  
化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究等の研究成果概要

(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	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～
野生2	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～
化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究			
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～H24
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～H24
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～H24
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～H24
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～
基盤6	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	H23～H24
基盤7	柏木昭彦 広島大学	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～

基盤 8	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～

## 野生生物の生物学的知見研究課題(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

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：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おいて、底質蓄積性化学物質が海洋生物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。本年度は以下の取り組みを行った。

ボラおよびマハゼを調査対象生物として、東京湾、伊勢湾、および九州北部沿岸域において、下水処理施設、工業施設、港湾施設、生活排水流入域など人間活動の影響を受けやすい場所、および下水処理施設や工業施設の影響の少ない場所を調査地点に設定し、環境特性の異なる地域毎の内分泌かく乱化学物質の生物影響評価を実施した。捕獲した上記生物のビテロジェニン (VTG) タンパク質濃度を測定し、化学物質による生理的異常の有無を明らかにした。

また、生物採集地の底質および環境水を採集し、エストロジェン様作用を持つ化学物質の定量分析を行うとともに、酵母 Two-Hybrid Assay 法により環境中の総エストロジェン活性の評価を行った。これを基に、環境中の化学物質と生物影響の関連を推定した。

また、ムラサキイガイを用いた内分泌かく乱化学物質影響を調べる為に、各地で採集した本種体内の化学物質を測定するとともに、化学物質暴露や環境変動によって変動すると予測されるエストロジェン受容体(ER1およびER2)、カタラーゼ (CAT) およびグルタチオ-S-トランスフェラーゼ (GST) 遺伝子がバイオマーカーなりうるかを検討した。

研究結果のまとめと考察：

- 1) 東京湾沿岸域、伊勢湾沿岸域、九州北部沿岸域において、環境水を採集し、エストロジェン様作用を持つ化学物質を測定したところ、東京湾沿岸域において高濃度の環境エストロジェンが検出された。特に、佃堀、横十間川、港区港南においてそれらの値は高かった。伊勢湾沿岸域、九州北部沿岸域における環境エストロジェン濃度は、東京湾沿岸域のそれに比べ低かった。各地で検出された環境エストロジェンは、下水処理施設からの排水口が近隣にない都市エリア (佃堀、横十間川、庄内川、那珂川) や工業エリア (千鳥運河、衣浦港) では、アルキルフェノール類の値が高かった。しかし、東京湾沿岸域や九州北部では NP が高いのに対し、伊勢湾沿岸域では BPA の値が高い傾向を示した。下水処理施設近隣の採集地 (港区港南、博多港) では、E1 を中心とするエストロジェンの値が高かった。これは、下水処理水に含まれる人由来のエストロジェンであると考えられる。一方、底質中の環境エストロジェンは、環境水中のそれらとほぼ同じ傾向をしましたが、環境水から E1 が検出された港区港南では、底質中から E1 はほとんど検出されず、むしろ NP が高濃度で検出された。また、環境水中から E1 がほとんど検出されなかった那珂川や千鳥運河では、E1 や E3 が高濃度で検出された。このような違いは地域特性と大きく関連していると思われるが、今回の調査から推

測することは難しい。

環境水中の化学物質の値は、採集日によってかなりの変動を示した。それに対して底質はほぼ同じ傾向を示したことから、環境水中の化学物質には日による違いがあるものの、底質に蓄積された化学物質は、その場所の特徴をよく表していると思われる。

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値を比べると、この2つの算出法によって得られた結果には相関が認められた。しかし、いずれの場所でも酵母アッセイによるエストロゲン活性が理論値より高いことから、検出対象とした物質以外に、エストロゲン活性に影響を与える物質が存在する可能性がある。両者の差が何に由来するのか、他にエストロゲン活性を持つ物質が存在するとした場合、それが何であるのかについて検討する必要がある。

港区港南と博多港において採集したボラにおいて、異常値と判断できる 1000ng/ml の VTG 濃度を示す個体が検出された。また、佃堀、横十間川、庄内川、那珂川では 100ng/ml 以上の血中 VTG 濃度を示す VTG 陽性のマハゼが採集されている。これらの地域では、生物の生理現象に変化を惹き起こす程度の環境エストロゲンが存在すると考えられる。そこで、環境水中および底質の環境エストロゲン活性（あるいはエストロゲン様作用強度）と VTG 濃度の相関を調べたところ、ボラでは底質のエストロゲン活性とまたマハゼでは環境水中のエストロゲン活性と相関が見られた。これはボラが底質に、マハゼが環境水に含まれる化学物質の影響を受けていることを示唆する。

これらの関係に地域的な特性も加え、化学物質濃度、生物影響、採集地の特徴の関連性を調べてみると、底質中の化学物質濃度より環境水中の化学物質濃度が魚類の VTG 産生量とよく相関すること（ただし、ボラの VTG 産生は底質中の環境エストロゲンとも強い相関を示す）、また、環境エストロゲン活性は人口密集地域との相関高いことが分かる（図9）。これまでの調査では、工業地帯の情報および下水処理施設の整備状況の異なる地域の情報が不足していることから、これらの情報を得ることが必要である。

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、ムラサキイガイを調査対象生物とした調査を開始した。昨年度の予備試験において確立した化学物質測定技術を用いて、各地において採取したムラサキイガイの生体内化学物質を測定したところ、NP が高い値で検出されたが、環境中の濃度との間に相関は認められなかった。これまでに、PCB などムラサキイガイに蓄積されることが報告されている（田辺 2006、津野ら 2007）。しかし、本研究ではエストロゲン類やアルキルフェノール類の環境濃度に依存した蓄積は認められなかったことから、化学物質の性質によって、取り込まれた後の蓄積性が異なると考えられる。これまでも化学構造と蓄積性について検討された例はあるが、エストロゲン類やアルキルフェノール類におけるこれらの検討はなされていない。ムラサキイガイにおける化学物質の代謝能と併せてこの検討を進める必要がある。

本種における内分泌かく乱物質に応答するバイオマーカーの検討を昨年より開始した。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、エストロゲンに対する反応性が調べられている。しかし、この情報を基にムラサキイガイの VTG 遺伝を改めて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、ER など他にマーカーとなる遺伝子を用いて、環境影響の生物影響評価を行う取り組みを始めた。

本研究では ER、CAT、GST 遺伝子を指標として、環境変動の影響を調べることを試みた。

ER1 では多少のばらつきはあるもの、暴露期間全体を通して変化が見られなかったため、ER1 はエストロジェンの影響を受けないことが推測された。ER2 の低濃度曝露群において遺伝子発現量が有意に減少した。しかし、エストロジェン曝露量と ER2 発現量の間に関連学的に説明可能な相関性は無いため、このような変化は、EE2 のホルモン作用と関連はないと思われる。しかし、ER1 と ER2 の mRNA 発現量は ER1 の方が高く、非曝露群の平均は ER2 の 6.3 倍、にもなったことから、ER1 が生殖巣において何らかの重要な役割を持つことが示唆された。

CAT 遺伝子は低濃度曝露群および高濃度曝露群の両曝露群において、曝露開始 3 日目に発現量が増加した。更に 7 日目の発現量は 3 日目と比較して有意に減少した。これはエストロジェンが異物としてムラサキイガイ体内の酸化ストレスを一時的に上昇させ、その後エストロジェンに曝され続けることによって順化し、発現量が元のレベルに戻ったものだと考えられた。

また、GST でも 3 日目に発現量が増加し、7 日目は 3 日目に比べて減少した。これは、CAT と同様にエストロジェンを異物と判断しての反応であると考えられ、エストロジェンを代謝するために一時的に発現量が増加し、その後エストロジェンに曝露された状態に順化して発現量が元に戻ったものであると推測した。

本研究ではエストロジェンと ER の明確な相関関係は見られなかったことから、ムラサキイガイにおいて ER1 および ER2 をエストロジェンのバイオマーカーとして使用することは難しいという結論に至った。また実際、これらの結果から、イガイがエストロジェンをホルモンとして利用していない可能性も示唆された。

CAT は化学物質による汚染が進んでいる水域で非汚染水域と比較して酵素活性が高いことや (Vlahogianni et al., 2007)、汚染物質の曝露で CAT の酵素活性が上がったという報告があること (Akcha et al., 2000)、GST は生体内に蓄積される有毒物質の曝露によりその酵素活性が上がることなどから (Vasconcelos et al., 2007)、バイオマーカーとしての利用が期待された。実際、CAT および GST はエストロゲン曝露によって発現量の増加が見られたことから、エストロジェンのバイオマーカーとして利用できる可能性がある。しかし、今回の曝露実験において反応が一過性のものであったことや、エストロジェン濃度と CAT および GST に相関性が見られなかった。そのため、これら酵素の発現をバイオマーカーとして用いるには、エストロジェンとの関係をより明確にしていくことが必要である。しかしながら、これら酵素の発現制御はエストロジェン物質特異的に行われる訳ではないので、その利用に関しては基礎的知見の更なる集積を含めて慎重に行われるべきである。

本種の成熟関連遺伝子および環境応答遺伝子の情報は、これまでいくつか報告されているものの、本課題に利用できる遺伝情報は今のところない。現在、未熟個体、成熟雄個体、成熟雌個体を用いて、生殖現象に関連する遺伝子の解析を次世代シーケンサーを用いて解析中である (ムラサキイガイの生殖関連遺伝子探索は、本課題以外の自己収入による研究)。今後この研究によって得られた遺伝子を利用し、新たなバイオマーカーの探索とそれを利用した解析を進めなければならない。

## 野生生物の生物学的知見研究課題(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

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を用いて明らかにすることを目的とする。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、曝露化学物質やそのレベルとの関連性を解析する。また、汚染下に起こり得るゲノム変異についても解析する。

平成24年度は、全国よりラットの採集を行い基礎的なデータを得た他、肝臓に蓄積する汚染物質のスクリーニング、精巢を中心にメチル化解析、mRNAの網羅的解析を行った。都市部と離島ではラットの栄養段階のポジションが異なること、PCBなどの蓄積パターンが異なることが分かった。また、実際の汚染土壌を用いた semi-field 実験では、鉛汚染土壌の飼育ラットでメチル化が亢進し、メチル化酵素の発現が上昇していること等が明らかとなった。

研究結果のまとめと考察：平成24年度の研究では、予定通り、全国のラットの採集を行い、栄養段階のデータや金属類、有機塩素系農薬やPCB、多環芳香族類などの汚染物質の基礎的なデータを得た。マイクロサテライト解析は一部のラット個体を用いてその方法を確立した。また、精巢を中心にゲノムの修飾やトランスクリプトーム解析を行った。

### (1) *Rattus* 属における汚染物質の蓄積とその影響

- 国内に棲息する *Rattus* 属において、特に金属類の蓄積（鉛やヒ素）が多いことが明らかとなった。  
一方で、栄養段階と金属蓄積に関しては明らかな相関は認められなかった。
- また、金属曝露のバイオマーカーとしてメタロチオネインの発現レベルを調べたところ、野外採集個体では金属濃度依存的にその発現が上昇し、野生のげっ歯類では金属曝露の生化学的な影響が表れていることが明らかとなった。

### (2) フィールドにおける結果の検証のための semi-field 実験

- semi-field 実験として、金属、特に鉛やカドミウムの汚染が高い地区から土壌を採集し、実験室内においてラットを飼育して、その影響を調べた。1年間の曝露試験の後、ラットを解剖し、そ

の影響を解析した。バイオマーカーとしてもちいたメタロチオネインはその発現が上昇していた。網羅的な mRNA 解析では、直接的に内分泌かく乱を疑わせるような遺伝子の変動は認められなかったが、さらに詳細な解析が必要である。

- また、金属類ではゲノムのメチル化を変動させることが報告されていることから、汚染地区の土壤に1年間曝露したラットの精巣におけるメチル化レベルを解析したところ、全体的にゲノムのメチル化レベルが上昇していることが明らかとなった。一方で、肝臓や腎臓ではそのような変動は認められなかった。そこで、精巣においてメチル化酵素の発現量の変化を調べたところ、Dnmt 3a/b の mRNA 発現量が上昇していることが分かった。従って、今後、精巣におけるメチル化亢進の原因やその影響をさらに調べる必要がある。

### (3) 国内に棲息する *Rattus* 属の汚染との海外のげっ歯類との比較

- 日本における *Rattus* 属の環境汚染物質の蓄積パターンは、海外各国におけるげっ歯類の環境汚染物質の蓄積パターンの報告やモデル地区から採集したラットとの蓄積パターンと比較すると、有機塩素系化合物に関しては比較的汚染度が低いことが明らかとなった。
- 一方で金属類、特に鉛に関しては海外の鉱床近くの汚染域と同程度の鉛濃度を蓄積する個体が多く、バイオマーカーであるメタロチオネインの上昇や semi-field 試験で明らかとなりつつあるメチル化の変動など、*Rattus* 属以外の野生動物においても同様の金属類の曝露およびその影響を受けている可能性が示唆された。

## 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、内分泌かく乱物質(EDs)が胎児期曝露により生後個体の形質に不可逆的変化を誘起することが動物実験で示されつつある。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、EDs が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。

最終年度、これまで実施してきた BPA や TCDD による胎児期曝露、ならびに独自開発のメチル化網羅解析を使用して BPA の DNA メチル化に対する影響を検討し各々結論を得た。

### 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 ① TCDD 胎児期曝露による DNA 低メチル化機構の解明

胎生期 TCDD 曝露による肝臓 *Cyp1a1* プロモーター領域の低メチル化機序を解明するため、3種の DNA メチル転移酵素(Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b)に関して解析した。E12.5 で TCDD 投与し、E16.5、E18.5、PND1、PND3 でサンプリングしたところ PND3 でメチル化に変化が生じ始めることがわかった。各ステージで Dnmts 発現と酵素活性に TCDD による差は観察されなかったが、*Cyp1a1* プロモーターへの Dnmt1 結合量が PND1 で、Dnmt3b 結合量が PND1 および PND3 で有意に減少していた。Dnmts のうち特に *de novo* メチル化転移酵素の結合が低下したことから、TCDD による低メチル化は能動的脱メチル化ではなく、受動的脱メチル化の可能性が高いと思われる。

### 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

#### ① 組織間比較を例にした精度確認

新しく開発した MSD-AFLP は、マウスにおいて約 10 万のメチル化 CpG サイトを検出した。これはマウスゲノム中のすべての CpG の約 0.5%、すべてのメチル化 CpG の約 10%である。メチル化頻度を示すピーク高は個体が異なっても一致し、極めて再現性の高い解析法であることがわかった。本手法は、次世代シーケンサーを用いた他の解析に比べて低コストで実施できるため、多検体比較を必要とする毒性学研究に特に適していると思われる。

#### ② BPA によるメチル化変動の網羅解析

上記独自開発の MSD-AFLP を応用し、BPA 処理マウスの網羅的解析を実施した。妊娠マウス(C57BL/6J)に BPA を連続経口投与、雄産仔の脳海馬を全選択的プライマーセットで解析した。検出された総メチル化 CpG (ピーク数)は 102,745 で、このうち、BPA 群と Vehicle 群で有意差があったのは 3163、うち 2 倍以上の変動を示したものは 630 であった。したがって、BPA によるメチル化変動は海馬においては極めて少ない領域に限定されると考えられる。

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。しかし、BPA により果たしてどのような特徴を持った遺伝子集団がエピゲノムの変化を起こすのかの知見は少ない。したがって、網羅的エピゲノム解析は BPA の毒性影響を研究する上でも求められている課題である。

一般に網羅的 DNA メチル化解析には RLGS 法 (Hayashizaki et al., 1994) や HELP 法 (Khulan et al., 2006)、抗メチル化 CpG 抗体を用いた MeDIP 法 (Weber et al., 2005)、あるいはバイサルファイト処理 DNA サンプルを次世代シーケンサーで解析する方法 (Meissner et al., 2008) などが報告されている。しかし、いずれの手法もメチル化の有無を定性的に判断するには有効だが、サンプル間で微弱に変動する特定の CpG メチル化頻度を定量するには難点の多い解析法である。また上記 RLGS 法や HELP 法などメチル化感受性制限酵素を使用した場合、isoschizomer による反応で非メチル化 CpG サイトを持つ断片との差異により検出を行うため、1 サンプルに対する解析が煩雑であった。

本研究では独自の網羅的メチル化解析の開発を行ったが、本手法は、次世代シーケンサーを用いた上記のようなメチル化 CpG 解析法 (Deep sequencing) に比べて低コストで実施できる利点をもつ。そのため、複数のサンプルを比較的簡単に処理でき、今回のような毒性学的研究には特に適している。解析できる CpG 数も全 CpG (約 2000 万) の 10% (約 10 万 CpG) をカバーしていると考えられ十分なプロファイリング能を持つ。今後 BPA のみならず他の環境汚染物質による影響やヒトサンプルを用いる研究に応用が可能であると思われる。

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。Dnmts のうち特に新規メチル化転移酵素の DNA 領域への結合が低下することを見出した。これは、DNA の低メチル化の分子機構のうち近年報告された能動的脱メチル化ではなく、TCDD による新生児の低メチル化は受動的脱メチル化である可能性が高いことを示している。なお、能動的脱メチル化機構を解明したとされ Nature 誌に報告された Kato らの論文 (Kim MS, et al., DNA demethylation in hormone-induced transcriptional derepression. Nature 461, 1007-1012, 2009) はデータの信憑性の問題から撤回され、化学物質やホルモンによる低メチル化機構の未解明の研究領域と言っている。

極微量の環境汚染化学物質による不可逆的メチル化変動の分子機構をさらに解明する上で、本研究で得られたいくつかのデータは重要な知見であると思われる。

## 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：本研究では、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、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、内分泌かく乱作用が疑われている化学物質による影響評価(ミジンコおよび魚類等と比較を含め)を試みることを目的としている。本研究での主な対象物質である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、NPやNP異性体が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。

今年度は、NPについてアミの生殖試験を実施した。生殖試験を実施することで産仔数などにおよぼすアミの再生産に関わる知見を得ることが出来る。これら生殖試験から得られた結果をもとにNPがアミにおよぼす内分泌かく乱作用(特に生殖機能)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ことを目的とした。また、ミジンコに関しては繁殖阻害試験も実施しアミの影響と比較した。最後に今年度は最終年度であり、昨年度までの結果と今年度の結果の取りまとめを行った。

今年度実施した研究内容の概要は以下の通りである。

### 1)アミ多世代試験によるNPの影響評価

NPがアミの成長・成熟および産仔数におよぼす影響についてアミの2世代間(F0、F1)において検討することを目的とした。F0世代では、S.C.(DMSO 0.01%)、6.25、12.5、25  $\mu\text{g/L}$ の濃度範囲で曝露を行い、成長・成熟および産仔数におよぼす影響を調べた。F1世代では、F0世代の各曝露群から産まれた仔虫を海水中で飼育し、F0世代への曝露がF1世代におよぼす影響について検討した。試験の結果、F0世代では、総脱皮数、体長、頭胸甲長および湿重量において有意な減少が確認され、総産仔数においても有意に減少していた。これらの事より、NPはアミの成長・成熟に加え、産仔数の減少(生殖への影響)をおよぼすことが確認された。F1世代においては、成長・成熟に有意な影響は確認されなかった。しかしF1世代では、F0世代では確認されなかった異常遊泳が確認された。以上のことより、NPはアミの成長・成熟および生殖に影響を及ぼし、次世代にも影響をおよぼす可能性が示唆された。

### 2)NPがミジンコの繁殖へおよぼす影響の把握

NPがミジンコの生殖に及ぼす影響について検討することを目的とした。曝露濃度はS.C.(0.01 % EtOH)およびNPが37.5、75、150  $\mu\text{g/L}$ に設定し、21日間半止水式曝露を行った。試験には孵化後24時間以内の個体を用いた。100 mLビーカー中に試験溶液を80 mL加え、各ビーカーに1匹入れ、各濃度4セット準備した。試験中は24時間毎に死亡数、脱皮数、産仔数、放出卵数を観察した。曝露終了

後の生存率は、S.C.で90%、37.5 µg/L曝露群で50%、75 µg/L曝露群で80%、150 µg/L曝露群20%であった。体長および湿重量では75 µg/L曝露群において有意に減少していることが確認された。また抱卵数は、本研究の曝露濃度では、有意な差は確認されなかった。また、曝露期間中の産仔については助剤対照区と各曝露区との間に有意差が見られなかった。

### 3)NPがおよぼす影響の生物種間の比較

各NOECを比較すると、比較できる全ての項目においてオオミジンコよりもアミのNOECが低かった。湿重量指標のNOECでは5倍以上の差が見られた。また総脱皮数や総産仔数のNOECにおいては10倍以上の差が見られた。以上の事より、アミはミジンコよりも高い感受性を持っていることが確認できた。生殖試験においては、単為生殖のミジンコと比べると、両性生殖のアミはペアを組むなどの労力がかかるが、アミの生殖試験も高い感受性が確認されたことからアミの生殖試験は、甲殻類の繁殖への影響を調べる試験として有効であると考えられた。

研究結果のまとめと考察：これまでの研究において、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。

続いて、アミの生殖試験を実施し、NP がアミの生殖におよぼす影響について検討を行った。また生殖試験で得られた F1 世代の成長・成熟試験を実施し、F1 世代への影響も検討も行った。これら生殖試験の結果は、ミジンコの繁殖試験の結果との比較も実施した。その結果、アミの生殖試験では、成長・成熟への影響に加え、NP 濃度 6.25 および 25 µg/L 曝露群において総産仔数が有意に減少していることが確認され、NP はアミの生殖機能に影響を及ぼすことが示唆された。しかし今回の試験では限られたペアしか作ることが出来なかったため産仔数の変化がペアに依存する可能性も否定できなかった。今後は、ペアの数を増やすなどの対応も検討する必要があると考えられた。また、ミジンコの繁殖試験と比較するとミジンコよりも約 20 倍低い NOEC が算出され、アミの方がミジンコよりもこう感受性であり、甲殻類の生殖への影響を調べるのに適した試験生物種であることが確認された。また F1 世代試験に十分量のアミを供試出来ず、F1 世代の産仔数までを調べる事が出来なかった。今後の課題としては、F1 世代での産仔数の評価を実施するために、より多くの産仔数を望めるような FO 試験を実施することが望ましいと考えられた。

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、NP、TCS および TCC に関しては遺伝子発現解析を実施した。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・成熟と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た。また、アミの産

仔数に影響をおよぼした濃度で NP 曝露をおこない、産仔数への影響に関連している遺伝子の探索も必要である。

本研究で実施した、アミの成長・成熟および生殖を指標とした試験法はミジンコよりも高感受性であり、海域における評価手法としては非常に有用であると考えられた。しかし、両性生殖であることによる産仔数がペアに依存する点の改善などを早急に進める必要性が考えられた。具体的には供試数を増やして実施することが望ましいと考えられる。また、アミの DNA マイクロアレイを作製できたことで更に詳細な影響評価(産仔数に影響をおよぼす遺伝子群の把握など)にも応用可能であると考えられる。影響が未知である新規化学物質などについて、生殖・成熟および生殖試験など詳細な評価を行うことは大変重要であるが、それには時間と労力を要する。化学物質によって遺伝子の発現が変動した後、タンパク質の合成や表現型に影響が確認されることで、初めて生体へのリスク(ハザード)として考えることができるため、遺伝子の発現変動のみを生体へのリスク(ハザード)としては決定できない。しかし、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子の発現変動をもとに化学物質の生物への影響を予測することは可能であり、その結果に基づいて詳細な影響評価試験を適用する優先順位のスクリーニング手法としても応用可能であり、化学物質の環境リスク評価手法において重要な役割を果たせると考える。

本研究において実施したアミを用いた成長・成熟試験および生殖試験に遺伝子発現解析を加えた総合的な評価は、海域における甲殻類を用いた評価手法として極めて有用である。今後、精力的に報告等を行い国内外でも広めていきたい。

### 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)、鏑迫典久

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、産仔仔虫性比の影響、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、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。

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代的効果が検出された。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が、今回の研究期間では、実験個体群によるモデル予測の検証までは実施できなかった。

今後、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生態リスク評価の改善と普及に努めたい。

## 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)の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、行動異常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：

### I. 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

1. 多動症モデル動物 (CIN85 欠損マウス) や甲状腺機能低下症ラット (*rdw* ラット) を用いた解析により、行動量の増減は黒質—線条体系におけるドーパミンシグナルの変動が原因であることが判明した。
2. ラットを用いた実験から、低用量の水酸化PCB 曝露はこの黒質—線条体系におけるドーパミンシグナルの増強を介して多動性をもたらすことがわかった。
3. 多動症モデル動物 (CIN85 欠損マウス) の概日環境における多動性は、水酸化PCB 曝露によって上昇する。しかしこの上昇では遺伝子欠損とPCB 曝露との相乗性は認められなかった。
4. 多動症モデル動物 (CIN85 欠損マウス) の新奇環境における多動性は、水酸化PCB 曝露によって影響を受けなかった。

以上の結果は、環境化学物質(水酸化PCB)の曝露が多動症の発症原因の可能性の一つであることを強く示唆している。

### II. 環境化学物質の神経突起伸展に対する影響

1. 臭素系難燃剤であるヘキサブロモシクロドデカン(HBCD)は、甲状腺ホルモン(thyroxine:T4)による小脳プルキンエ細胞樹状突起の伸展を阻害することを明らかにした。
2. HBCD は、甲状腺ホルモン(triiodothyronine; T3)による小脳顆粒細胞神経突起の伸展を阻害することを明らかにした。

以上の結果は、環境化学物質(HBCD)の曝露は甲状腺ホルモンによる小脳神経細胞の正常な発達を阻害することを示している。

## 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、これら化学物質が胎児に到達するまでの体内動態の解明 ビスフェノール A 関連化合物の抱合反応について

これまでの研究によって、易代謝化学物質のビスフェノール A 類は、主としてグルクロン酸抱合体またはグルクロン酸/硫酸抱合体に代謝されることが予想されていた。今年度の研究を経て、ラットにおけるビスフェノール A 関連化合物の代謝経路を以下のように予想できた。

#### a) ブリッジ構造と代謝経路について

ビスフェノール A 類のブリッジ構造が低分子の場合、グルクロン酸抱合された後、さらに硫酸抱合されることが予想される。一方、高分子のブリッジを有する化合物はグルクロン酸抱合が主要な代謝経路となるが、ブリッジが高分子化するほど抱合速度は遅くなると思われる。

#### b) 4-ヒドロキシフェニル基の修飾と代謝経路について

4-ヒドロキシフェニル基が修飾されたビスフェノール A 関連物質は抱合速度が遅くなると推測される。

#### c) 抱合体動態についての雌雄差および妊娠時の変化について

雌は雄よりもビスフェノール A 類の硫酸抱合活性は低い。また、妊娠時には胆汁側への抱合体排泄量が減少し、代償的に静脈への抱合体排出量が増す。これは循環に流入する抱合体量の増加を意味し、結果的に尿中への抱合体排泄量を増やすことが予想されるが、同時に卵巣や子宮などの標的臓器が抱合体へ曝露される機会も増すことになる。



## ビスフェノール A 関連化合物の胎盤における挙動について

ビスフェノール A グルクロン酸抱合体を用いたこれまでの研究から、微量ではあるがグルクロン酸抱合体が胎盤で輸送され胎仔側に移送されることが分かっていた。本研究では、ビスフェノール F をモデル物質として、グルクロン酸/硫酸抱合体の胎盤における動態を調べたところ、この代謝物も胎盤で輸送され、胎仔循環に流入することが示された。また、その過程で硫酸基が脱抱合され、グルクロン酸抱合体に代謝されることが予想された。子宮灌流で、動脈から流入させた基質のうち、静脈側に流出する量はビスフェノール A グルクロン酸抱合体の場合はおよそ 99%であるが、ビスフェノール F グルクロン酸/硫酸抱合体は 88%に過ぎない。仮にこの差分を胎仔循環への移行とみなすならば、グルクロン酸/硫酸抱合体は、モノ-グルクロン酸抱合体に比べてより胎盤で輸送されやすい化合物だと考えられる。この仮説は、胎盤に発現するトランスポーターが概して硫酸抱合体に高い基質親和性を有することからも裏付けされる。今後の展開として、実際に胎仔組織に流入したグルクロン酸/硫酸抱合体量を定量すること、またビスフェノール A 類の抱合過程で生ずるモノ-硫酸抱合体についての胎盤での挙動を調べる必要があると言える。

## 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

本研究では、ビスフェノール A 曝露による影響が生ずることが予想されていたホモシステイン代謝系ならびに核酸合成系の代謝中間体量を調べ、これまでのデータの再現性について吟味した。実験の結果、核酸合成系およびそれに付随するサルベージ経路に、データの再現性が確認できた。このことから、ビスフェノール A の新たな作用として核酸合成系への影響が提案できる。その作用機序について、核酸合成原料を供給するホモシステイン代謝系のかく乱を予想したが、代謝中間体量の変化に、一貫したデータが得られなかった。この理由として、この代謝を仲介する酵素群の代償的な誘導によって、代謝中間体量の変化が認められなかった可能性が指摘できる。しかし、今回の研究では酵素群の発現量を定量していないため、この代償機能の関与について断定はできない。ホモシステイン代謝系はメチル基ドナーである s-アデノシルメチオニンの供与元でもあり、ビスフェノール A がエピジェネティックな変化を引き起こすという、多くの研究結果をサポートする上でも重要な鍵を握る。平成 23 年度の研究では、ホモシステイン代謝系の入り口に当たる葉酸に着目し、食餌性に葉酸欠乏を引き起こすことによって、ビスフェノール A 曝露に類似した代謝中間体の変化が生じることを確認した。これらのデータを踏まえて、この不明瞭なビスフェノール A の作用点を明らかにするために、葉酸を起点とする一連の代謝中間体を網羅的に検出できる系の開発が必要と言える。同時にこの系は、化学物質のリスク評価を行う上で、重要な指標となり得るものであり、本研究の最終的なゴールとして、引き続き掲げておくべき課題である。

## 基盤的研究課題(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

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、内分泌かく乱作用が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。2年目となる24年度の研究では、エストロゲン様および甲状腺ホルモン様の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した。研究1では、23年度の予備研究で明らかとなった、Diethylstilbestrol (4microgram/kg/day ; DES群) と Bisphenol A (40microgram/kg/day ; BPA-L群と 400microgram/kg/day ; BPA-H群) のエストロゲン様作用物質の、妊娠期(妊娠11-18日目)の母親への経口投与が社会行動を変容させるという知見について、個体数を増やして更に検討した。その結果、「社会的探索行動テスト」における社会的探索行動は、DESの曝露によって、雌マウスでは溶媒処置した統制群に比べて亢進するのに対して、雄マウスではむしろ低下するという、明確な性差がみられることがわかった。一方、Bisphenol Aの曝露は、雌雄問わず、低用量では、社会的探索行動を減少させるのに対して、高用量では、溶媒処置との間に差がないという、低用量効果が明確に見られた。研究2および研究3では、甲状腺ホルモン様作用が指摘されている4-Hydroxy-2',3,3',4',5'-pentachlorobiphenyl (PCB) を、授乳中(出産後4-12日目)の母親(研究2)、あるいは妊娠期(妊娠12-16日目)および授乳期の母親(研究3)へ経口投与することによって、思春期および成体期での仔の社会行動に及ぼす影響について検討した。研究2の結果、雌雄を問わず、社会的場面での不安様行動が低用量(20microgram/kg/day)のPCB曝露で低下するが、高用量(200microgram/kg/day)では、影響がないという傾向が見られた。従って、社会性の発達において周生期化学物質曝露が、性特異的、用量依存的に影響することが明確となり、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た。

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(DiethylstilbestrolとBisphenol A)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、我々の研究室で新たに開発した社会行動テストパラダイムを用いて明確にすることに成功した。なかでも、周生期化学物質曝露が、性特異的、用量依存的に社会性発達に影響することを見出したことは、特筆に値する。すなわち、社会的探索行動は、Diethylstilbestrol (DES)の曝露によって、雌マウスでは溶媒処置した統制群に比べて亢進するのに対して、雄マウスではむしろ低下することが見出された。また、Bisphenol A (BPA)の曝露では、雌雄を問わず、低用量では、社会的探索行動を減少させるのに対して、高用量では、溶媒処置との間に差がないという、低用量効果が明確に見られた。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。総移動距離は、DESの曝露によって、雌マウスでは溶媒処置した統制群に比べて有意に低下し、雄では亢進する傾向にあった。BPAの曝露では、総移動距離は影響されず、中央区画滞在時間について、雌マウスでのみ亢進の効果が見られた。このような結果から、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。更に、本年度の研究では、甲状腺ホルモン様作用が指摘されている4-Hydroxy-2',3,3',4',5'-pentachlorobiphenyl (PCB) の、授乳中あるいは妊娠期および授乳期の母親へ経口投与が、思春期および成体期での仔の社会行動に及ぼす影響について検討した。予備解析の段階ではあるが、社会的場面での不安様行動が低用量 (20microgram/kg/day) のPCB曝露で低下するが、高用量 (200microgram/kg/day) では、影響がないという傾向が見出された。本研究の結果は、社会性の発達において周生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、25年には、更に、神経毒性の指摘されている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。

## 基盤的研究課題(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

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：本研究は、ツメガエル属のオタマジャクシや成体を用いて、環境化学物質の変態に対する影響（甲状腺かく乱作用）を個体レベルで明らかにするための試験系開発を主目的として行った。従来用いられているアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)に加え、ゲノム配列が解析され性成熟が短いというモデル動物としての利点を兼ね備えたネッタイツメガエル(*Xenopus tropicalis*)を用いた試験系の開発も試みた。

### (1) ツメガエル自然変態をエンドポイントとした化学物質影響評価系の開発

モデル化学物質として、臭素系難燃焼剤ヘキサブロモシクロドデカン(HBCD)やパーソナルケア医薬日用品(PPCPs)である抗不整脈薬アミオダロンの評価を行った。両生類の変態現象の中で最も目覚しいのは尾部短縮であるが、HBCD やアミオダロンによって抑制されることがわかった。また、変態時期の正常発生や後肢伸長も阻害された。以上の結果は、HBCD やアミオダロンは甲状腺ホルモンアンタゴニストとして変態を抑制する可能性を示唆している。また、アミオダロンで処理したネッタイツメガエルのオタマジャクシと成体の血漿および肝臓内のアミオダロン濃度と生物濃縮を分析したところ、オタマジャクシ肝臓ではアミオダロン濃度が著しく増え生物濃縮も高いことが判明した。この結果は、ツメガエルのオタマジャクシが化学物質を体外に排出しにくい代謝機能を持つこと、その性質により環境化学物質の影響を強く受ける可能性が示唆された。

### (2) 遺伝子組換えツメガエルを用いた化学物質影響評価系の開発

甲状腺ホルモン応答プロモーターによりルシフェラーゼ遺伝子を発現する、遺伝子組換えツメガエル(TH-Luc Tg)のオタマジャクシを用いて、甲状腺かく乱作用を感度良く検出する試験評価系の開発を試みた。先に作製しているアフリカツメガエルの TH-Luc Tg の F1 子孫幼生（発生段階54）に甲状腺ホルモン合成抑制剤であるメチマゾールと甲状腺ホルモンを曝露した結果、高い誘導倍率が得られ、化学物質の甲状腺ホルモンアンタゴニスト活性を評価する上でよいツールとなることが示された。また、今後、当該分野におけるネッタイツメガエルの重要性が増すことから、ネッタイツメガエル TH-Luc Tg の作製も行った。

### (3) 甲状腺かく乱の作用機序解明に関する研究

化学物質による甲状腺かく乱の作用機序を解明し、新たなバイオマーカーを供するため、甲状腺ホルモン合成抑制阻害剤メチマゾールと甲状腺ホルモンを曝露したネッタイツメガエル幼生のトランスクリプトーム解析をマイクロアレイ法により行った。その結果、これまでに報告の無い甲状腺ホルモン応答遺伝子を多数同定した。

以上、年度得られた研究結果は、両生類を用いた甲状腺かく乱物質の試験評価系の確立に向けて、重要かつ有用な知見となるであろう。

研究結果のまとめと考察:両生類の変態現象は甲状腺ホルモンや副腎皮質ホルモンにより厳密に制御されているため、環境化学物質、特に甲状腺かく乱作用を持つ化学物質の生物影響を評価する上で重要かつ有用なモデル生物である。特に、古くから発生生物学、生理学、内分泌学等に用いられているアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)は、OECDの内分泌かく乱試験評価系(TG231)として採用されている。近年、ゲノムデータを基にした生命科学研究が主流となり、アフリカツメガエルの近縁種であるネッタイツメガエル(*Xenopus tropicalis*)のゲノム配列も解読されている。この種は二倍体であり、性成熟が早い利点も兼ね備えているため、内分泌かく乱研究の分野において有用なモデル生物となることが期待されている。現在OECDはパーシャルライフテストの開発を行っている。しかしながら、ネッタイツメガエルを使った当該分野の研究はおろか、生命科学分野全体を見渡しても、導入がなかなか進んでいない。我々はこれまで培った経験を基に、様々なアドバンテージを持つネッタイツメガエルを用いた内分泌かく乱研究を立ち上げるべく、本年度からネッタイツメガエルを用いた研究も行った。PPCPsの一つと考えられているアミオダロンや臭素系難燃剤の一つであるHBCDは、ツメガエルの変態に対して強い抑制効果が確認された。アミオダロンはその化学構造が甲状腺ホルモンに類似しているため、TRを介した甲状腺かく乱作用(抑制)が強く示唆されている。また、代謝物解析から、ネッタイツメガエル幼生は成体よりアミオダロンを排出しにくい(体内にとどめやすい)ことが判明した。このことは、幼生と成体で薬物毒物代謝システムが違うことを意味している。化学物質によっては幼生と成体では化学物質に対する感受性や毒性が異なることが考えられる。一方、HBCDの化学構造は甲状腺ホルモンと似ていないため、TRへの直接的影響以外に、その他の作用機序を介した甲状腺かく乱作用も予想される。甲状腺かく乱作用機序の詳細な解明は、膨大な数の化学物質の生体影響を評価する上で重要な知見となるため、当該分野において必要な研究分野である。今回、甲状腺ホルモン応答性遺伝子をマイクロアレイ解析により多数同定することに成功した。最終年度は、これらの遺伝子をバイオマーカーとして、新たなエンドポイントを開発し、作用機序に基づいた甲状腺かく乱の評価が可能な試験系の開発を目指す。

昨年から続いている、甲状腺ホルモン応答性プロモーターとルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだアフリカツメガエルLuc-Tgによるスクリーニングシステムは、甲状腺かく乱作用の評価に有用であることを示すデータが多数得られている。しかし、残念ながら本年度の途中でアフリカツメガエルLuc-Tgの親系統が病気で死に絶えたため、現在F1の性成熟待ちである。ネッタイツメガエルは性成熟が六ヶ月であるため、今年度作製したLuc-Tg個体の性成熟も待って、両種のLuc-Tgを用いて試験系の開発を最終年度に行いたい。

## 基盤的研究課題(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

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: 今年度は、昨年度までに構築した天然および合成糖質コルチコイド(Glucocorticoids: GCs)の分析法を改良し、分析精度、検出感度、スループットを向上させた。同分析手法を用いて、愛媛県内(1地点)または京都府(4地点)、大阪府(4地点)、兵庫県(1地点)内の下水処理場から排出される処理水中のGCsのモニタリングを実施した。その結果、天然GCであるコルチゾルのみならず、吉草酸ベタメタゾン(≤4.7 ng/L)やプロピオン酸クロベタゾール(≤3.0 ng/L)をはじめとした医薬品として使用されている合成GCsが、京都府内の1地点を除くすべての地点から検出された。また、同じ水試料からの抽出液を用いて*in vitro*バイオアッセイを行ったところ、機器分析で合成GCsが検出されたすべての水試料においてGRアゴニスト活性(デキサメタゾン等量で最大55 ng/L)が検出され、この活性値は検出濃度の順位とほぼ一致する結果であった。しかしながら、各水試料のGRアゴニスト活性値は今回検出されたGCsのみでは説明できず、定量下限値未満のGCsの寄与や、測定対象外のGRアゴニストの存在が考えられた。さらに、プロピオン酸クロベタゾールおよび酪酸クロベタゾンを1 μg/Lの濃度で21日間コイに暴露したところ、先行研究で観察されたような白血球数の減少や血中グルコースレベルの上昇は生じなかった。その一方で、血清中の遊離アミノ酸の濃度が上昇しており、血中のグルコース濃度を上昇させるほどではないものの、糖新生の亢進に伴うタンパク質の分解が促進されたと考えられた。

研究結果のまとめと考察: 今年度は水試料の前処理法および分析手法を大幅に改善した。液-液抽出を固相抽出に変更したことや内部標準物質を追加したことでスループットが飛躍的に向上し、再現性および分析精度を高めることに成功した。ただし、Difluprednateなど一部の化合物については、現在使用している内部標準物質で回収率やマトリクスエフェクトを補正しきれないことが明らかとなったため、今後適切な内部標準を選択するなどの改良を予定している。また、検出器を変更したことで検出感度が向上し、分析に要する試料量を1.5 Lから100 mLへと減少させることができた。本分析手法の構築により、サンプリングも効率化され、高精度なモニタリングの実施が可能となった。

松山市内で実施した36時間連続モニタリングの結果、天然糖質コルチコイドであるコルチゾルは常に検出されたが、合成糖質コルチコイドは主に12時~18時にかけて検出されることが明らかとなった。この濃度変化は入浴など人間の生活サイクルに依存すると予想された。また、合成糖質コルチコイドが6時間程度は連続して検出されたことから、24時間周期で濃度が変動すると

仮定すると、合成糖質コルチコイドを検出するためには約6時間間隔で3回の採水が必要となる。本結果は松山市内の一ヶ所の下水処理場で得られたものではあるが、24時間のうち6時間間隔で3回の採水が最小の労力で最適化されたサンプリングスキームであると考え、2012年12月以降のサンプリングでは本スキームを適用した。

京都府、大阪府、兵庫県でのモニタリングの結果、吉草酸ベタメタゾンが最大4.7 ng/L、プロピオン酸クロベタゾールが最大3.0 ng/Lの濃度で検出された。昨年度、本研究にて実施した神奈川県および東京都の環境水を対象としたモニタリング結果と比較すると、両化合物とも大幅に濃度が低いが、分析法が大幅に改良されたことを考慮すると、今年度の調査結果の信頼性が高いと考えられる。しかし、現時点ではモニタリング事例が少ないため、地域間差である可能性も否定できず、今後も継続的にモニタリングを実施する必要があると思われる。

検出された糖質コルチコイドの濃度を下水処理場ごとに比較すると、KE-01、KE-06、KE-07で高く、KE-03で低かった。バイオアッセイで検出されたGRアゴニスト活性の順位も同様であった。この違いは各処理場の処理人口に依存していると考えられた。例外的にKE-04で処理人口が最大であるにも関わらず検出濃度が相対的に低かったのは、1日あたりの処理能力が他の処理場と比較して卓越しているためと考えられた(表1-1)。

7月と12月の調査結果を比較すると、各糖質コルチコイドの検出濃度はほぼ同レベルであった一方で、検出頻度は12月の方が明らかに高かった。また、バイオアッセイの結果では、京都府内の処理場では明瞭な違いは無いものの、大阪府および兵庫県内の調査結果では12月のGRアゴニスト活性値が7月のものと比較して2倍以上高かった。この原因として、季節による医薬品の使用量の違いや、温度による処理場での微生物による分解能の違いが考えられたが、いずれも確たる根拠は得られていない。今後、検出濃度の季節変動を精査し、その原因を解明する必要がある。

各糖質コルチコイドの、機器分析より得られた濃度データとバイオアッセイで得られた相対活性値より、デキサメタゾン等量を求め、その値をバイオアッセイによって得られたGRアゴニスト活性値と比較したところ、両者には相関関係はなく、ほぼすべてのケースでアゴニスト活性値が濃度ベースのデキサメタゾン等量を上回っていた。この原因として、機器分析では定量下限値未満の化合物がGRアゴニスト活性に寄与している可能性が考えられる。また、別の原因として、測定対象外のGRアゴニストの存在が考えられる。今後、この両者間のギャップがいずれの原因に依るものかを解明し、測定対象外のGRアゴニストの存在が明らかとなった場合には、それらの定性および定量を実施する予定である。

コイを用いた暴露試験の結果、酪酸クロベタゾンは100倍程度濃縮されたのに対し、プロピオン酸クロベタゾールの体内濃度は検出下限値未満であった。一方、GRアゴニストとしての相対活性値はプロピオン酸クロベタゾールの方が酪酸クロベタゾンより5倍程度高い結果であった。両

化合物の血清中遊離アミノ酸に対する影響では、アミノ酸濃度の上昇幅は酪酸クロベタゾンでやや高い傾向にあった。この差異は各糖質コルチコイドの濃縮性と GR アゴニスト活性の積で説明可能であり、アゴニスト活性では 5 倍程度低い酪酸クロベタゾンが、体内濃度では少なくとも 7 倍以上高かったことに起因すると考えられた。したがって、GR アゴニスト活性が相対的に低くても、濃縮性の高い化合物は *in vivo* で強く作用するため、各化合物の濃縮性に関する情報を集積する必要があると考えている。

本研究で実施した暴露試験では、酪酸クロベタゾンおよびプロピオン酸クロベタゾールともに血球数を変化させることはなく、血清中のグルコース濃度を上昇させることもなかった。先の研究で、1 µg/L のプレドニゾンまたはベクロメタゾンを 21 日間ファットヘッドミノーに暴露したところ、血しょう中のグルコース濃度が上昇し、白血球の数が減少することが報告されている (Kugathas & Sumpter, 2011)。この既報との違いは魚種による感受性の差が一因として考えられる。また、暴露物質が異なることから、先に述べたように濃縮性の違いに依るものかもしれない。今後、GR アゴニスト活性値と濃縮性の両方を考慮した評価系の構築を目指す。

本年度実施した本研究課題では、先行研究で報告されている GC 暴露による影響は観察されなかった。しかしながら、GCs が抗炎症作用や免疫抑制作用を有するという知見から、GCs への慢性的な暴露による免疫系への影響が懸念される。そこで、比較的低濃度の GCs が魚類の免疫系に及ぼす影響を評価するために、病原体の感染実験を応用し、感染症の発症をエンドポイントとした評価系の構築を試みた。予備実験として、1 µg/L のプロピオン酸クロベタゾールを 21 日間暴露したヒラメにウイルス性出血性敗血症ウイルスを感染させたところ、対照区と比較して暴露区で早く死亡個体が出現し、GCs の暴露が感染症の発症を早める可能性があることが示された。本手法を改良することで、病原体感染時の免疫応答に及ぼす化学物質の影響を評価することが可能となると確信しており、次年度以降に取り組む予定としている。



## 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: PCBs や DDTs などの有機塩素化合物(OCs)の生産・使用は、国内では 1970 年代以降に禁止・規制されたが、依然として環境・生態系の汚染が継続している。さらに、防燃目的で使用される臭素形難燃剤(BFRs)のポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)やヘキサブロモシクロドデカン(HBCDs)は、環境残留性や生物蓄積性が指摘され最近になって使用規制が開始された。PBDEs・HBCDs の規制に伴い代替難燃剤の需要増大が予測されていることから、本研究では塩素系難燃剤のデクロンプラス(DP)にも着目した。DP は、主に電線やケーブルの被膜・コンピュータ端子に使用される難燃剤であり、高生産量化合物(US EPA)に指定されている。これら物質による陸上生態系の化学汚染に関する情報は不足しており、とくに国内の陸棲哺乳動物の汚染レベルや蓄積パターンを調査した例はほとんどない。そこで本研究は、東京・神奈川・栃木・大阪・高知・愛媛でハクビシン・ホンダタヌキ・アライグマを採取し、肝臓・筋肉および胃内容物の OCs (PCBs・DDTs・CHLs・HCB・HCHs)、BFRs (PBDEs・HBCDs)、DP を分析し、汚染実態・蓄積特性、および摂餌を介した暴露実態の解明を試みた。

分析に供試したほとんどの肝臓・筋肉・胃内容物試料から有機ハロゲン化合物が検出され、日本の陸上野生生物の広域汚染が確認された。ハクビシン(東京・高知)およびタヌキ(神奈川・高知)について肝臓中ハロゲン化合物蓄積レベルの地域差を解析したところ、ほとんどの物質が地方(高知)に比べ都市域(東京・神奈川)の個体に高蓄積していた。これは、人工・産業・化学物質の使用が都市に集中し、汚染が顕在化したためと考えられる。また、ハクビシン(東京)・タヌキ(神奈川)・アライグマ(大阪)の有機ハロゲン化合物蓄積レベルを比較したところ、ハクビシン(東京)は DDTs・CHLs・PCBs・PBDEs・DP を高蓄積していた。さらに、ハクビシンの肝臓と筋肉の有機ハロゲン化合物濃度比を求めたところ、DDTs・CHLs・PCBs・PBDEs の肝臓集積が認められた。3 生物種の胃内容物と筋肉中の汚染物質濃度をもとに生物濃縮係数(BMF)を算出したところハクビシンは DP(BMF=4.2)・PBDEs(1.8)・HCHs(1.3)を、タヌキは PBDEs(7.1)・CHLs(2.9)・PCBs(1.9)を、アライグマは PCBs(2.9)を生物濃縮(1>BMF)していた。本研究により、陸棲哺乳類の化学物質蓄積レベルは、暴露の地域差に加え、食性や分解・排泄能力の種差等の影響を受けることが示唆されたため、今後は対象とする種・物質・地域を拡大したモニタリング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の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 BFRs など新たな環境化学物質が登場し、

その一部は既存の 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 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ROMシクロドデカン(HBCDs)に注目し、海洋及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 年度より開始して、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 年度の研究課題として実施し、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。さらに平成 24 年度は、陸棲の高等動物(ハクビシン・ホンダヌキ・アライグマ)とその胃内容物を供試して BFRs による汚染の実態や体内分布・生物濃縮の態様等を明らかにした。平成 25 年度は沿岸域の海棲哺乳動物スナメリに注目し、陸棲および外洋性高等動物の知見を参照して比較生物学的な解析を深め、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、研究対象を生態系の主要な構成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、マキガイでは遺伝子情報も不十分であるため、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受容体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。特に幼若ホルモンが単為生殖と有性生殖とのスイッチングに関与しているという現象は従来知られておらず、無脊椎動物における内分泌系の、発生、生殖への関与を理解する上で興味深いモデルとなる。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ホルモンと性決定・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。

研究結果のまとめと考察：ミジンコ類でみられる幼若ホルモン曝露によるオス産生の誘導は、甲殻

類における最も顕著な内分泌かく乱作用の例の1つである。我々は、平成24年度の研究を通して、日長条件操作による幼若ホルモン曝露を必要としないオス誘導系の確立、およびミジンコ類における幼若ホルモン受容体の同定に成功した。前者はこれまでの幼若ホルモン曝露によるオス誘導系では不可能だった「環境シグナルが幼若ホルモン経路に作用するメカニズムの解明」へのアプローチを可能とするものであり、今後、確立した実験系を用いてトランスクリプトームやメタボローム解析をおこなうことで、幼若ホルモン類似物質による内分泌かく乱のメカニズムのみならずミジンコ類の性決定・性分化システムの解明にもつながると期待される。また後者においては、本研究は昆虫以外の節足動物において幼若ホルモン受容体を初めて報告するものであり、今後、受容体に転写制御される下流の因子を探索することで幼若ホルモン経路から性分化に至るシグナルカスケードにより深くせまることが可能となる。さらには、本研究で開発した **Two-hybrid Luciferase assay** による *in vitro* での幼若ホルモン作用の検出系は、今後ミジンコ個体の飼育を必要としない簡便で迅速な幼若ホルモン作用のアッセイ系として発展可能であると期待される。

平成 24 年度 研究成果合同ヒアリング  
 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 分担研究者	所属	研究課題名
10:10～10:30 その他の関連 研究課題 2	<u>井口泰泉</u>	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
10:30～10:50 基盤 2	古賀 実 小林 淳 <u>内田雅也</u>	熊本県立大学 環境共生学部 株式会社エコジ ェノミクス	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
10:50～11:10 基盤 3	<u>田中嘉成</u>	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
11:10～11:20	意見交換		
11:20～11:40 基盤 4	<u>鯉淵典之</u> <u>下川哲昭</u>	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
11:40～12:00 基盤 5	<u>井上博紀</u>	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
12:00～12:20 基盤 6	<u>小川園子</u>	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
12:20～12:30	意見交換		
12:30～13:10	昼食		

\*発表時間には質疑 5 分を含む。発表者に下線を付した。

発表時間 区分	代表研究者 代理発表者 分担研究者	所属	研究課題名
13:10～13:30 基盤 7	<u>柏木昭彦</u> 鈴木賢一	広島大学 愛媛大学 沿岸 環境科学研究セ ンター	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
13:30～13:50 基盤 8	<u>仲山 慶</u>  鈴木 剛	愛媛大学 沿岸 環境科学研究セ ンター 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
13:50～14:10 基盤 1	<u>大迫誠一郎</u>	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
14:10～15:00	「基盤」関連課題の評価会		
15:00～15:10	休憩		
15:10～15:30 野生 1	<u>征矢野 清</u>	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
15:30～15:50 野生 2	<u>石塚真由美</u>	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
15:50～16:10 その他の関連 研究課題 1	<u>田辺信介</u>	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
16:10～16:30	「野生」関連課題の評価会		

\*発表時間には質疑5分を含む。発表者に下線を付した。