

## 内分泌攪乱化学物質等の作用メカニズムの解明等基礎的研究

「内分泌攪乱化学物質等の作用メカニズムの解明等基礎的研究」として実施した項目の実施担当及び研究要旨等概要は、以下のとおりである。

平成 10 年度

### 1 内分泌攪乱物質の作用点に関する考察

東京大学分子細胞生物学研究所 教授 加藤 茂明

内分泌攪乱化学物質の生物化学的（科学的）定義は何か？

内分泌攪乱化学物質は、内分泌を攪乱する人工化合物として一般的には捉えられてきてはいるが、化学的に正確な定義はされていない。定義を明確にするには、既に内分泌攪乱化学物質として認知されている人工化合物の作用点、即ち生体内標的分子を同定することが、絶対先決であると思われる。このような標的分子については、到底一種とは思えず複数存在すると思われるが、その生物活性を考えると無数ではなく、限られた数の分子であると推定される。

このような標的分子群が具体的に同定された時、初めて内分泌攪乱化学物質群のクラス分けが可能となろう。更にこのような標的分子別のクラス分けが最も意味を持つのは、概知の人工化合物ばかりではなく、生物活性未知の人工化合物群の予見的評価であろう。内分泌攪乱活性を有することが既に知られている化合物と類似の化学構造を有する化合物群の危険性を、いち早く予見されることが可能となろう。

それではこのような標的分子群を活性評価系に持ち込む方法論は如何なるものであるか？内分泌攪乱化学物質の作用が性転換に代表されるように遺伝形成を変えるものでもあるため、その標的分子群は遺伝情報を制御する転写制御因子群である可能性が高い。転写制御因子群は DNA 結合能を持つタンパク質であるので、それら cDNA を用いた分子生物学的手法により、簡単に生物活性を保持したタンパク質を大量に作る事が十分量そして迅速に調製することが可能である。同様に分子生物学的手法により、転写制御因子としての機能への影響も短時間で評価が可能である。実際このような手法を用いることで、性ステロイドホルモン誘導体が数多く人工合成され、本来のホルモン活性を増強もしくは阻害する化合物が数多く開発されている。このことからこの系の有効性については実証済みである。従って、このような分子生物学的手法に基づいた評価系を導入することで、初めて内分泌攪乱化学物質候補化合物を短時間に効率良く評価することが可能と考えられる。

## 2 内分泌攪乱化学物質等の生殖毒性物質と精子形成障害との関連 生殖細胞死を中心として

長崎大学医学部解剖学第三講座 教授 小路 武彦

### 緒言

環境中に人為的に放出される種々の化学物質が、ヒトを含めた生物の生命活動や生物生態系に深刻な影響を与え始めている。特に、それらの化学物質の多くがエストロゲン作用や抗アンドロゲン作用を有し内分泌生殖毒性を発揮するため種の維持に不可欠である生殖現象に悪影響を及ぼし種の存続に危機感をもたらした。中でも Carlsen 等 (92) 1) による、最近 50 年間でヒト精子数が半減しているという報告、更には sharp と Skakkebaek (93) 2) による、精子数の減少や精巣がんあるいは男性不妊症などの生殖異常の増加が環境中のエストロゲンによるという仮説の発表に伴い、精子形成過程へのそれら外因性内分泌攪乱化学物質の影響が大きく取り上げられるようになった。しかしながら、哺乳類精子形成過程へのそれらいわゆる環境ホルモン或いは種々の内分泌生殖毒性物質の作用機構に関しての細胞生物学的或いは分子細胞学的な詳細な検討は乏しく、多くの記載は現象論であったり多分に推論を含んだ結論となっており、今や因果関係の化学的根拠の提示が必要不可欠と思われる。

我々は、内分泌生殖毒性物質による精子の減少が、生殖細胞死の異常誘導によるものと考え特に能動的・自発的細胞死であるアポトーシスとの関連で検討を進めている。本報告書では、発生過程も含めた齧歯類雄性生殖細胞の細胞死の特性とその検出方法の確立、内分泌系の人為変化に伴う細胞死の変化、種々の内分泌生殖毒性物質投与に伴う生殖細胞死の誘導並びにその分子機序などについて解説し、最終的に内分泌生殖毒性の信頼できる評価系の一つとしての利用法と更に卵子形成過程も取り込み精巣並びに卵巣に対する影響の包括的な評価系の開発への具体的な提言を行いたい。

## 3 比較胎生病理学からみた内分泌攪乱

名古屋大学環境医学研究所 井上 稔

### 要約

内分泌、自律神経系の中樞である視床下部は、男女の二形性が認められる領域である。視床下部の神経細胞の分化は、妊娠後半の胎児期に起こるが、強力な性ホルモン物質に曝露された場合には性分化が障害される。

視床下部の第三脳室腹側周辺域は、血液脳関門が欠如し、血中の化学物質に直接接触することから、胎児でなくても強いホルモン作用をもつ物質に曝露されれば、視床下部 - 下垂体系での内分泌攪乱が起こる可能性がある。

一方、神経伝達物質グルタミン酸、またはそのアゴニストのような興奮性化学物質は、視床下部の神経細胞を興奮させる。過剰量の興奮毒は神経細胞を興奮死させ、中大量の興奮毒は視床下部 - 下垂体系を刺激し、いずれも内分泌、自律神経を攪乱する恐れがある。

胎児・新生児の視床下部では、血液脳関門を欠く領域は成人より広く、神経細胞も脆弱であり、毒物に曝露されたり、性分化に必要な細胞環境の攪乱にあった場合には、不可逆的な障害が起こる恐れがある。発達中の脳の障害という観点から、外因性化学物質の内分泌攪乱作用を検討する必要性について述べた。

## 4 産業化学物質の生殖毒性に関する文献的研究

名古屋大学大学院医学研究科環境労働衛生学教室 竹内 康浩

### 目的

生殖は生物種の維持にとってもっとも基本的な機能で、化学物質の生殖毒性は子孫に対

して悪影響を及ぼす可能性があり、人類の生存にとって極めて重要な問題である。そのために、最近では化学物質の生殖毒性が世界的に重視されるようになってきた。このような状況の中で、最近、韓国でフロン代替え溶剤として2-ブロモプロパンが使用され、男女の労働者に特異的な生殖障害を生じた中毒事例が報告され、産業化学物質の生殖毒性について大きな関心を引き起こした。ところが、よく使われている数万種の産業化学物質の中で生殖毒性が注目されているものは少ない。最近、Ellenhorn<sup>1)</sup>は多くの生殖毒性情報のある職業因子をまとめているが、男性(雄性)の生殖毒性の評価は主として精巣障害が指標となっており、比較的検出が簡単であるが、女性(雌性)の場合は卵巣機能ばかりでなく、着床、妊娠維持、胎児の発達、子供の発達など生殖毒性の評価は複雑で、曝露と生殖障害との因果関係を明確に示す資料は少ない。また、最近ではダイオキシン、PCBなどの環境化学物質の性ホルモン様作用による生殖障害が関心を集めているが、生殖機能は複雑で、内分泌の攪乱作用、生殖器官への直接作用、中枢神経系を介した間接作用など、多様な作用経路があり、さらにこれらの複合的な作用も考えられ、化学物質による生殖機能障害は多様である。従って、多くの化学物質が多かれ少なかれ生殖毒性を有する可能性があり、生殖毒性の解明も広い視点からの研究が必要である。

## 5 次世代影響としての神経行動毒性評価と今後の研究課題

北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野 岸 玲子

次世代影響評価としての神経行動毒性の重要性

内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)の問題を契機として、ヒトでの次世代影響、発達毒性は世界的に大きな関心と呼んでいる。私達が日常曝露している環境化学物質のうち、65,000物質は何らかの毒性をもつと報告されている<sup>(1)</sup>にもかかわらず、これまで次世代影響については、生殖への影響、催奇形成などの形態的異常、あるいは出生した仔動物の発達や緒機能についてはほとんど系統的には調べられてこなかった。

一方、産業職場で用いられることが多い幾つかの化学物質については、女性労働者を対象とした疫学研究から、不妊や流産、生下時体重の低下などの次世代への影響が報告されている。これまでの中毒学の多くの知見からも、動物実験では胎盤を通過して胎子に移行すること、胎子には排泄器官がなく薬物代謝酵素も未発達なため、母親よりも長く停留蓄積することが報告されている物質もある。さらに環境中に存在する化学物質の中には脂溶性に富み、神経系へ取り込まれ易いものもあることを考えると、中枢神経系の発生に影響を及ぼし、さらに生体の統合機能としての行動にまで影響を与える可能性もありうると考えられる。よって今後はこのような次世代影響を生殖毒性にとどまらず、神経行動発達についても調べることで、あるいはヒトでの実際のリスク評価につながる疫学研究を行うことは重要になってくる。

## 6 魚類の生殖と性ステロイドホルモン(内分泌攪乱化学物質の生殖への影響を解析する研究モデル)

岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所 長濱 嘉孝

はじめに

内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)は、ヒトを含むいろいろな動物の生体内の正常なホルモン作用を攪乱する物質であり、生殖系、免疫系、脳神経に影響を与えることが指摘されている。なかでも、心配されているのが生殖への影響であり、ヒトでも男性における精子数の減少、女性における子宮内膜症の増加などが、内分泌攪乱化学物質によるものではないかと考えられている。野生動物に関しても、鳥類にみられる生殖行動の異常、雄ワニでのペニスの矮小化、コイにおける雌雄同体化、巻貝でのインボセックス等、影響を受けていると考えられる生物種も広範に及んでいる。したがって、内分泌攪乱化学物質の

クリーニングが緊急に必要であり、そのための効果的な方法論の確立が各方面から強く期待されている。一方で、内分泌攪乱化学物質がヒトや野生動物に対して与える影響、さらにはその仕組みについても明らかにすることが大切なことである。しかし、野生動物は言うに及ばず最も研究が多くなされているヒトにおいてさえも、この問題を解決するために活用できる基礎的知見はきわめて少ないというのが現状である。内分泌攪乱化学物質の影響を明らかにするためには、まず「何が正常か」を知る必要があることは言うまでもないことである。

ここでは魚類を取り上げる。この生物群では、内分泌攪乱化学物質の影響を調べた先駆的な報告がイギリスやアメリカでなされてきたが、日本でも多摩川において見出された雌雄異体のコイを始めとして、いろいろな例が報告されている。また、最近にみつかったスウェーデンの例では、産業廃棄物処理場の近くに位置するある湖に生息する Perch の約 70% に生殖腺を持たない個体が出現したとの報告もされており、その影響は益々深刻となってきた。魚類の生殖系にみられるこのような異常の原因としてある種の内分泌攪乱化学物質が疑われているが、スウェーデンもの例を含め本当のところは皆目明らかにされていない。これは生殖現象が複雑で、いろいろな内因的、外因的要因が絡んでいるからであり、ある生殖系の異常を見て、直ぐにその発生原因を指摘することは困難なのである。内分泌攪乱化学物質の問題で忘れてならないことの一つは、その効果（影響）が生物の個体発生時期の違いで大きく異なることである。影響が不可逆的であったり、可逆的であったり、また影響濃度も異なるのである。

我々の研究室ではこれまで、サケ科魚類、ウナギ、ティラピア、メダカ、キンギョ、さらには性転換魚のオキナワベニハゼ、ハワイ産ベラなどを実験材料として、魚類の生殖、特に生殖腺の機能の調節に果たす性ステロイドホルモンの役割に関して分子、細胞レベルの研究を行ってきた。ここでは、これらの研究のうちで特に内分泌攪乱化学物質の研究に有益な基礎的知見を提供すると考えられる研究成果について概説する。さらに、これらの知見から考えて内分泌攪乱化学物質の影響について直ぐに調べてみる必要があると思われる実験（特に、内分泌攪乱化学物質の性分化機構への影響）をいくつか挙げてみる。これらは内分泌攪乱化学物質の作用機構を明らかにするためのごく初歩的なスクリーニング実験と考えられるものであり、これらの予備的実験から得られる結果をもとに、次年度以降にはさらに本格的な細胞、分子レベルの研究プランを構築し、実行できるものと確信している。

## 7 内分泌攪乱化学物質等の環境因子の試験動物モデルとしてのメダカ

名古屋大学生物分子応答研究センター 尾里 建二郎

### 要約

内分泌攪乱化学物質などの環境因子の試験動物モデルとして用いられている、メダカ、ファットヘッド・ミノー、ゼブラフィッシュの3種を対象に、その有用性について調査を行った。調査は文献、動物学的特性、研究基盤の整備を中心としておこなった。メダカは化学物質だけでなく放射線や発がん物質など、さまざまな環境因子の研究に有効であると評価される。とくに生殖関連の試験には高いポテンシャルをもつ。ただ、これらの研究の多くが国外で行われていることおよび試験法の開発では遅れていることを指摘しておきたい。研究基盤においても今後の整備が必要である。

ファットヘッド・ミノーでは化学物質の標準試験法の開発が最も進んでいる。さまざまな試験法に有効であるが、世代時間が長いことから継代を必要とする実験には難点がある。

ゼブラフィッシュはさまざまな試験法に有効であるが、前二者と比べると環境因子の研究では実績が少ない。熱帯性であることから低温下での試験は不可能である。また成長の過程で性転換することから生殖に関連した試験には向いていない。ただ、ゼブラフィッ

シュは基礎生物学の分野で突出した実績と強固な研究基盤を有する。

これらの調査結果を踏まえて、メダカにおける試験法の開発、そのための基盤整備および総合的な環境科学の創生について提言を行った。

## 8 奇形カエルと内分泌攪乱化学物質

広島大学理学部附属両生類研究施設 分化制御機構研究部門 中村 正久

### 序文

最近、世界各地でカエルの絶滅や急減、奇形の発生が報告されている。オーストラリアでは調査種のうち 29%、カナダでは 14%、チリでは 34%にも及ぶ種が絶滅の危機にさらされている。また、奇形の発生は、北米やカナダでも報告されており、日本でも北九州市山田緑地では 10%の出現率で過剰肢のカエルが発見されている。カエルの減少、及び奇形の発生は、人間による自然破壊や活動産物による生息地の減少、オゾン層破壊による紫外線増加、酸性雨、病気、寄生虫などに加え、内分泌かく乱物質などの化学物質が要因として挙げられており、これらの要因が複合的に作用している可能性もある。

カエルなどの両生類は生態系で重要な位置を占めており、世界的な生息数の減少や奇形の多発は必然的に生態系全体に大きな影響を与える恐れがある。さらに、カエルに代表される種の絶滅の危機は人類に環境因子が悪影響を及ぼしているという危険信号に思われ、早急にこの問題を解決する必要がある。このような状況にあって両生類に対する内分泌かく乱物質の影響は殆ど調査されていないのが現状である。

平成 11 年度

## 1 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の分子生物学的機構の解明

千葉大学医学部解剖学第二講座 教授 湯浅 茂樹

### 研究要旨

内分泌攪乱化学物質としてのエストロゲン化合物が精子形成障害を引き起こすことは確立されているが、障害作用の分子細胞生物学的レベルでのメカニズムは不明である。有害物質の検索、障害の予防にはエストロゲン化合物の精巣に対する作用機構を解明する必要がある。最近ではエストロゲン化合物はエストロゲン受容体に結合後、転写制御に関わるだけでなく、チロシンリン酸化酵素を介する細胞内情報伝達系にも作用する可能性が示されるようになった。

本研究では細胞内情報伝達に関わる *fyn* tyrosine kinase 遺伝子ノックアウトマウスにおける精子形成障害の機構と、代表的なエストロゲン化合物である *-estradiol 3-benzoate, diethylstilbestrol (DES)* の精子形成障害作用の機構を生化学、形態学の両面から解析した。その結果、精巣発達過程における生殖細胞の形成障害には、支持細胞であるセルトリ細胞の接着構造 (ectoplasmic specialization) の形成異常が共通して関与しており、この過程には *fyn* tyrosine kinase による制御が必要であることが示唆された。また、成体の精巣に対してはエストロゲン化合物は生殖細胞のうち精子細胞の初期の発達段階に作用して精子の形態形成異常を引き起こすことが示唆された。これらの所見は、精巣内の細胞内情報伝達系と細胞接着構造 細胞骨格システムの接点で、新たにエストロゲン化合物作用の標的の一つとなりうることを示している。さらに、精子形成と神経発生における細胞間相互作用ならびに分子機構の類似性から、内分泌攪乱化学物質の脳形成過程への影響についても検討し考察を行った。

## 2 核内転写調節 (PPAR) を介した外因性内分泌攪乱化学物質の生殖毒性作用の機構および安全性の研究

信州大学医学部衛生学 講師 那須 民江

### 研究要旨

di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) の繁殖力への影響とその機構について、野生型の SV/129 マウスと同種の peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) -null マウスを用いて検討した。DEHP は市販の固形試料に混ぜ (0.05%)、全実験期間自由摂食させ、2 世代生殖毒性実験を行った。4 週間 DEHP 食を食べさせた後、雄と雌 (F<sub>0</sub>) を交配させた。誕生した仔の数、16 週間生存した仔 (F<sub>1</sub>) の数、及び性について検討した。F<sub>0</sub> と同じ年齢に達したところで、F<sub>1</sub> の雄、雌を交配し、誕生した仔 (F<sub>2</sub>) について F<sub>1</sub> と同様の観察をした。野生型マウスの DEHP 群は雌雄ともに体重の増加遅延、PPAR 標的酵素蛋白 (脂肪酸酸化系酵素) の誘導が観察され、PPAR が誘導されていることが伺えた。F<sub>1</sub> において、新生仔の死亡率が増加する傾向が、F<sub>2</sub> においては死亡率が明らかに増加し、殆どが誕生 2 日以内の死亡であった。この死亡率の増加は特に雄マウスに顕著であった。一方、PPAR -null マウスにおいては DEHP 曝露による新生仔死亡率の増加はみられなかった。従って、DEHP 曝露による新生仔死亡率の増加は PPAR に依存していることが推察された。F<sub>0</sub> から F<sub>2</sub> までの雄の精巣、雌の卵巣と子宮には形態的異常は認められなかった。野生型マウスの胎仔肝では DEHP による PPAR 標的酵素遺伝子発現 (脂肪酸酸化系酵素) の誘導は観察されず、雄ではむしろ発現が抑制されていた。DEHP は新生仔マウス肝の PPAR 標的酵素遺伝子発現にも影響を与えることはなかった。この結果、DEHP 群の雄における新生仔と胎仔肝の PPAR 標的酵素遺伝子発現の差は対照群より大きく、この違いが DEHP 群の雄新生仔の死亡率の増加の一因かもしれない。

### 3 マウス生殖細胞死への環境毒性物質の影響とその分子機構の解析に関する研究

長崎大学医学部第三解剖学 教授 小路 武彦

#### 研究要旨

平成 11 年度は、特に成熟マウス精子形成過程で生じる生殖細胞アポトーシスの光顕的及び電顕的解析を進めると共に、エストロゲン並びにジエチルstilベステロール (DES) の影響を検討し、精子形成過程精母細胞の減数分裂期前後でのアポトーシスの顕著な誘導を明らかにした。更にその誘導分子機構として Fas/Fas ligand 系の関与を見出した。また平成 12 年度の本格的実験に向けて、ビスフェノール A 等他の環境毒性或いは生殖毒性物質の投与条件の検討、妊娠動物或いは胎仔への投与条件の検討、生殖器系の構造と機能を制御する視床下部 下垂体系への影響の評価系の検討並びにこれら化学物質代謝で発生する活性酸素への防御反応系の評価システム等の検討を行った。

### 4 生殖毒性の早期影響マーカーとしての神経内分泌動態と次世代影響に関する研究

北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野 教授 岸 玲子  
北海道大学医学部総合生理学講座時間生物学分野 教授 本間研一  
北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野 講師 佐田文宏  
北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野 助手 小橋 元  
北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野 片倉洋子

#### 研究要旨

近年内分泌攪乱物質問題が重要視され、その多くは生殖毒性に加え、催奇形性や神経発達の異常など次世代影響が大きいのが特徴である。人では精子数減少、不妊、不育症、子宮内膜症、尿道下裂、停留睪丸などの先天性異常などさまざまな疾患の要因となる可能性もありうるとして検討、報告されている。しかし内分泌攪乱物質の実際の曝露と発症の関連性についてはその因果関係などを明らかにした報告はない。内分泌攪乱物質も含めた環境化学物質曝露による神経内分泌物質の動態と、生殖毒性の発現について知見を得ることが必要と考える。当教室では内分泌攪乱化学物質と生殖毒性について人での疫学的研究を行うと同時に血液などの生体試料中の内分泌攪乱物質の濃度測定、薬物代謝酵素遺伝子の遺伝子多型、NK 細胞の活性化などさまざまな方向から検討、研究を行っている。今年度の研究では因果関係をより明確にするために条件制限を設定しやすい動物実験での解明を試みた。有機溶剤スチレン類は産業的にも種々の用途に広範囲に使用され、日常生活でも食器トレイ、ポリスチレン製食器など多量に使われている。そのため職業上でもスチレン類を取り扱う作業を行う者の数も多い。最近では女性労働者の多業種職場への進出や、妊娠中も職場で働く女性も増加する傾向にある。スチレン類は変異原性や催奇形性についての疑いもあり、人の疫学でも月経障害などへの影響について検討されている。実験的に発生初期から、成長後までそれぞれの時期に対応した鋭敏な次世代影響の検出方法の開発、今まで毒性試験などでも扱われにくい神経行動学的評価にもつながるような次世代影響を引き起こすメカニズムについても考慮し、有機溶剤スチレンモノマーを妊娠ラットへ曝露をおこない、実験的に母ラットの生殖毒性、仔ラットの生理的発達毒性、神経化学物質動態、薬物代謝酵素の変化などの検討を行った。

### 5 生殖発達毒性に関する研究

日本獣医畜産大学獣医畜産学部獣医生理学 教授 鈴木勝士

#### 研究要旨

内分泌攪乱化学物質等の悪影響として懸念されるいくつかの生物作用すなわち、発達過程そのものの遺伝子による制御と環境による修飾というテーマ(生殖過程での本来のプラ

グラムが不可逆的に破壊される現象の解明、生後の免疫系の発達、脳神経系の発達などにかかわる現象の解明)のうち、今年は、特に生殖過程における異常に注目し、遺伝子突然変異に起因する生殖器異常(hgn/hgn ラット)と in utero TCDD 暴露により誘発される生殖器系の異常について、検討した。

hgn/hgn 系統ではその原因遺伝子がBN系との戻し交配とマイクロサテライトリンケージにより、第10染色体にマップされ、完全連鎖する複数のマイクロサテライトマーカがRHパネルにより比較的狭い範囲で配列決定された。マウスの相同な染色体の情報に基づき精巣で発現している遺伝子について調査する必要性が生じた。既知の精巣発生に重要な役割を果たしていると考えられる遺伝子発現が確認され、hgn の正常対立遺伝子が、セルトリ細胞の増殖や機能維持に重要な役割を果たしている可能性が高くなった。精巣発生に関わる遺伝子で環境により影響される遺伝子の検索がよりいっそう重要になると考えられる結果が得られた。

TCDD の発達影響については、予備実験ながら、精巣上体の部分欠損、精子数と運動のうちには異常なしとの既報の成績は再現されるとともに、交尾行動は過剰なのに射精障害があり、精子に受精能がないという新知見が得られた。精巣上体など副生殖器に関する機能異常を解明する必要と、組織特異的な転写調節にかかわる環境影響という新たなテーマが生じた。

## 6 塩素化芳香族による生殖機能への影響評価

九州大学大学院医学研究院 助手 大村 実

### 研究要旨

廃棄物焼却の際にはダイオキシン以外にも様々な塩素化芳香族化合物が発生するが、そのうちのひとつであるポリ塩化ナフタレン類が哺乳動物の生殖機能に与える影響を検討した。体重1 kg あたり 1 μg の 1,2,3,4,6,7 - 六塩化ナフタレン (1,2,3,4,6,7-HxCN) を妊娠14日目-16日目のラットに投与した結果、オスの仔ラットでは精子発生開始時期の早期化が認められた。オスの仔ラットでは血清ゴナドトロピン濃度の上昇開始時期も早まっていたと考えられ、ゴナドトロピン分泌に対する影響が精子発生開始時期早期化の原因ではないかと推定された。

## 7 環境生物の免疫影響に関する研究

国立環境研究所	小林 隆弘
千葉大学海洋バイオシステムセンター	菊池 慎一
日本大学歯学部	小宮山一雄
国立環境研究所	高橋 慎司
国立環境研究所	平野靖史郎
獨協医科大学	古田恵美子
旭川医科大学	吉田 貴彦
埼玉医科大学短期大学	和合 治久

### 研究要旨

生物は免疫機能を発達させ、微生物の侵入を排除し生活している。この免疫機能が低下することは潜在的に病原性のある微生物の侵入を許し、生物にとって致命的な影響を与える可能性がある。バルト海など汚染が進んでいる海域での海棲哺乳動物の大量死は有害化学物質の汚染により免疫機能が低下したことによる感染が原因と推定された。これまで、化学物質が免疫機能におよぼす影響に関する研究のほとんどがマウスなどの実験動物を使ったもので、多様な生物の免疫機能にどのような影響があるかについての検討はほとんど

なされていないといっても過言ではない。生物の免疫機能は共通するものと各生物に特異的なものがあるため化学物質の影響の受けかたが異なってくることが予想される。そこで、本研究では、環境汚染有害化学物質が各種生物の免疫機能にどのような影響を及ぼすかを解明することを目的とし、1)いくつかの指標生物を中心とした生物の免疫機能についての文献調査、2)有害化学物質が各種生物の免疫機能におよぼす影響についての文献調査、および、3)今後の研究について考察した。1)については脊椎動物として哺乳類、鳥類、両生類、魚類、また、無脊椎動物として軟体動物、節足動物、環形動物の免疫機能について検討した。2)についても環境汚染有害化学物質の上記の生物への影響を検討するとともに大量死が見られた海棲哺乳類の知見についてもまとめた。これらの調査結果をもとに3)今後の研究の方向性について考察し、有害化学物質による環境生物の免疫機能におよぼす影響の研究を強力に推進する必要があることを明らかにした。

## 8 鳥類の内分泌攪乱化学物質影響調査

東京医科歯科大学教養部 教授 和田 勝

### 研究要旨

鳥類を用いた内分泌攪乱化学物質の研究をわが国において推進するために、有力な鳥類内分泌学者を糾合し、強力な研究グループを組織した。今後、研究を進められる体制を整える必要がある。一方、鳥類における内分泌攪乱化学物質の評価法を確立するために、ビテロゲニンのかわりに血中 VLDL 量を機器分析し、エストロゲンの肝臓に対する作用を推定する方法を試した。血中 VLDL 量は、雌で高く雄では低かった。雄にエストラジオールを投与すると、雄は雌と同じように血中 VLDL 濃度が著しく上昇した。この方法は評価法のひとつとして有効であると考えられる。

## 9 レポーター遺伝子を導入した細胞培養系の確立

東京大学分子細胞生物学研究所 教授 加藤 茂明

### 研究要旨

各種化合物の性ステロイドホルモン様活性を検索するシステムを構築することを目的に、性ステロイドホルモンリセプター〔ヒトエストロゲンレセプター、(hERa、hERb)及びヒトアンドロゲンレセプター(hAR)〕の安定した発現細胞株を外来遺伝子導入によって樹立することを試みた。

## 10 内分泌攪乱化学物質をはじめとする環境汚染物質の野生動物に対する影響と環境評価

北海道大学大学院獣医学研究科 環境獣医科学講座 教授 藤田正一

### 研究要旨

肝臓の異物代謝酵素 Cytochrome P450 をバイオマーカーとして、環境汚染の野生生物に対する影響を評価できる可能性を検討することとした。まず、先の我々の研究で、シベリアから飛来するオオワシが PCB や DDT に高度に汚染されていることが明らかになったことから、同じ海域で魚を食べているアザラシに同様の汚染を疑った。そこで、PCB によって誘導される Cytochrome P450 分子種 CYP1A1 について、その含量と活性の両面から検討したところ、それらには大きな個体差があり、アザラシの脂肪に蓄積したコプラナー PCB の濃度と正の相関があった。従って、肝臓の酵素 P450 は汚染の指標として有望なバイオマーカーとなり得る可能性が示された。ついで、アザラシおよびクジライルカ類の Cytochrome P450 のクローニングを行い、一次配列から導かれる系統樹と分類学上の系統樹の対応を考

察した。海棲哺乳類間での類縁関係は顕著では無く、鯨類と鰭脚類はそれぞれが独立した群を構成し、鰭脚類は肉食獣であるイヌのそれとの近縁の関係であることが示され、従来の系統樹と一致した。発現系で得られた Cytochrome P450 の活性を比較し、種差についても考察した。

#### 1 1 絶滅が危惧される両生類の国内実態調査と情報ネットワークの作成及び環境汚染モニター動物の作製に関する研究

広島大学理学部附属両生類研究施設 教授 中村正久

##### 研究要旨

本研究は(1)両生類(カエル、イモリ)の分布実態調査とネットワーク作り、(2)北九州市山田緑地における性比異常カエルの原因究明、(3)環境汚染モニター動物としてトランスジェニックカエルの作製の3つのテーマを骨子として行われた。(1)のネットワーク作りについては奇形カエルの情報収集を目的としてホームページを開設(<http://www.ipc.hiroshima-u.ac.jp/~nakamura/>)した。情報も得られている。分布実態調査は、関東地方、北陸地方、東海地方、四国地方、沖縄地方の区域を選び、カエル、イモリの生息状況を調べた。その結果、どの地方もカエルの個体数が減少している様子が窺えた。また、関東地方では短期間の調査にも関わらず、6例の奇形ウシガエルが発見された。(2)では北九州市山田緑地における性比異常カエルの原因究明のため、カエル卵塊のダイオキシン類等化学物質の分析を行った。その結果、カエル体内に蓄積された有機塩素系農薬、PCB、ダイオキシン類が脂肪とともに卵に移行していることが確認された。これらの物質が胚発生時に悪影響を及ぼし、奇形カエルが発生する可能性がある。(3)についてはGEPをレポーターとしてカエル *FTZ-F1* 遺伝子の転写調節領域をアフリカツメガエル卵に導入した。その結果、トランスジェニック胚で部分特異的にGEPが発現していることが確認できた。しかし、胚が死んだため、性腺で *FTZ-F1* 遺伝子が発現するかどうかを確認することができなかった。

#### 1 2 内分泌攪乱化学物質等の試験に用いるメダカ系統の(d-rR改良型および透明メダカ)の開発に関する研究

名古屋大学生物分子応答研究センター 助教授 若松佑子

##### 研究要旨

内分泌攪乱化学物質の生殖への影響を評価する試験動物として従来から用いられてきたd-rR系統を改良し、性の判別が発生の初期に、確実にできる系統を作製した。また初期胚から成魚に至る成長の過程で外部から内臓が透視できる透明メダカを作成した。これらの系統が内分泌攪乱化学物質の試験に有用であるかどうかを検討している。

#### 1 3 魚類を用いた内分泌攪乱化学物質評価法に関する研究

熊本県立大学環境共生学部 教授 有園幸司

##### 研究要旨

これまでお互いに情報交換を行い、それぞれ多摩川や東京湾に生息する魚類においても、不妊の雄、雌雄同体魚、産卵行動の異常魚等の生理現象が起きている可能性を示唆してきた。今回、これまでの研究をもとに河川やそれらの河川流入沿岸域の主に魚類を中心とした野生生物の個体群に生殖異常の現象が起きているか評価手法確立を中心とした基礎研究を行った。

#### 14 メダカに対する内分泌攪乱物質の短期暴露に関する研究

東京都環境科学研究所基盤研究部長 若松明子

##### 研究要旨

魚類に対する人畜由来ホルモンや内分泌攪乱化学物質の繁殖への影響を明らかにする目的で、メダカ (*Oryzias latipes*) のオスを 17 $\beta$ -エストラジオールや内分泌攪乱作用が疑われている数種の化学物質に暴露し、メスと合わせた後の産卵数と孵化数、及び暴露終了時のオス血液中のビテロジェニン濃度を調べた。その結果、17 $\beta$ -エストラジオールでは nmol/l オーダーで、いくつかの化学物質では  $\mu$ mol/l オーダーで産卵数や孵化数が対照と比較して減少した。また、これらの群のオスメダカでは血漿中のビテロジェニン濃度も同時に上昇した。

平成12年度

## 1 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の分子生物学的機構の解明

千葉大学医学部解剖学第二講座 湯浅 茂樹

### 研究要旨

エストロゲン様作用を示す分子が内分泌攪乱化学物質として精子形成障害を引き起こす分子細胞生物学的レベルでのメカニズムは不明である。有害物質の検索、障害予防の基盤構築にはこれらの分子の作用機構を解明する必要がある。

本研究では代表的なエストロゲン様作用分子である diethylstilbestrol(DES)の精子形成障害作用の機構を、in vivo、in vitro の両系において形態学ならびに生化学・分子生物学の両面から解析した。その結果、in vivo の精巣発達過程における生殖細胞の形成障害、特に減数分裂の障害には、支持細胞である Sertoli 細胞間の接着構造(ectoplasmic specialization)の形成異常による血液-精巣関門の破綻が基盤となっていることを明らかにした。この障害は可逆的であり、また、エストロゲン受容体アンタゴニストの Tamoxifen 同時投与では予防できないことも明らかになった。さらに、意外なことに、DES と Tamoxifen 同時投与によって、各々の単独投与では生じない Leydig 細胞ならびに筋様細胞の形成異常が引き起こされ、エストロゲン関連分子の複合により新たな障害が発生することが示唆された。これとともに、DNA チップを用いた遺伝子発現解析により、DES により変動する遺伝子のプロフィールも明らかになった。

ついで DES の精巣内作用点として Sertoli 細胞に注目し、in vitro で Sertoli 細胞株 TM4 の DES 曝露による分子細胞生物学的変動を解析した。電顕的には粗面小胞体の拡大が認められ、この変化は可逆的であった。これとともに、二次元電気泳動により、DES 曝露で特定の蛋白が著明に減少すること (DES-responsive proteins of Sertoli cell: DREPS と命名)、また特定蛋白のチロシンリン酸化が著明に亢進すること(DES-induced tyrosine phosphorylation in Sertoli cell: DITYPS と命名)を見いだした。これらの変化は細胞株 TM4 に特有であり、線維芽細胞系の NIH3T3 では認められず、DES 関連分子の検出系となりうる。

さらに、生殖細胞ならびに Sertoli 細胞分化の新たな分子マーカーとして、Notch-1、presenilin-1、TuJ1 を用いて DES 曝露精巣における発現様式を解析し、精子形成障害、Sertoli 細胞障害と分子発現動態がよく相関することを明らかにした。また、新たなマーカーとして、精巣特異的 presenilin-1、actin 制御分子 WAVE1、3 の cDNA クローニングを行い、精巣内での発現様式を検討し、特定細胞群の分化の新たな分子マーカーとなりうることを明らかにした。

エストロゲン様作用分子はエストロゲン受容体に結合後、転写制御に関わるだけでなく、チロシンリン酸化酵素を介する細胞内情報伝達系にも作用する可能性が示されるようになった。本研究の知見は、精巣内の細胞内情報伝達系と細胞接着構造—細胞骨格システムの接点が、新たにエストロゲン様作用物質の標的の一つとなりうることを示しており、精子形成障害の分子機構と分子マーカーの開発への新たな局面を示唆するものと考えられる。

## 2 核内転写調節 ( P P A R ) を介した内分泌攪乱化学物質の生殖毒性作用の機構及び安全性の研究

信州大学医学部衛生学 那須 民江

### 研究要旨

1) フタル酸エステル類 (ジエチルフタル酸: DEP、ジブチルフタル酸, DBP、ブチルベンジルフタル酸, BBP、ジシクロヘキシルフタル酸, DCP、ジ-2-エチルヘキシルフタル

酸,DEHP)およびアジピン酸(ジ-2-エチルヘキシルアジピン酸,DEHA)によるPPARの誘導について、SV/129雄マウスを用いて、PPAR mRNAと標的遺伝子産物の発現から検討した。DEPによる誘導は殆どみられなかった。誘導は分子量が大きい程強く、最も誘導が強かったのはDEHPであった。DEHAもPPARの誘導剤であることが判明した。その強さはDEHPと同じか、あるいは若干弱かった。

2)2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-DA)およびそのメチルエステル(2,4-DE)とニルフェノール(NP)によるPPARの誘導と生殖器障害性について、ddY雄マウスを用いて検討した。2,4-DAと2,4-DEは量-反応的にPPARを誘導したが、これに比べると、NPによる誘導は無視できる程度であった。高投与量の血清2,4-DEはテストステロン濃度を低下させたが、精巣の量-反応的病理変化は認められなかった。

3)検討したPPAR誘導剤は酸化ストレス消去酵素(カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ)を誘導せず、むしろ低下させた。これらの結果により肝はPPAR誘導剤投与後、より強い酸化ストレスにさらされることを示した。

4)トータルダイエツスタディ方式によりフタル酸エステル類(DEP, DPP, DBP, BBP, DEHP)の食品群中の濃度を測定し、一日摂取量の推定を行った。最も濃度が高く検出されたのはDEHPで、その他のフタル酸エステル類はわずかに検出されたのみであった。

### 3 マウス生殖細胞死への環境毒性物質の影響とその分子機能の解析

長崎大学医学部解剖学第三講座 小路 武彦

#### 研究要旨

平成12年度に於いては、昨年度の検討結果を踏まえ、マウス精子形成細胞アポトーシス誘導へのエストラジオール-3-ベンゾエート(EB)、ジエチルスチルベストロール(DES)、ビスフェノールA(BPA)、並びにジクロロジフェニルジクロロエテン(DDE)皮下投与の影響をTUNEL法を中心として検索すると共に、アポトーシス誘導の分子機構としてFas/Fasリガンド(FasL)系及びBcl-2/Bax系の発現変動を検討した。その結果、EBは濃度依存的に精子形成細胞アポトーシスを誘導し、その際Fas発現の関与が認められた。一方、DES及びDDEはいずれも低濃度で精子形成細胞死を増大させたが、逆に高濃度ではアポトーシス誘導効果を低下させた。BPAは生殖細胞アポトーシスを高濃度で増大させたが、むしろ低濃度では正常に生じるアポトーシスを顕著に抑制した。DESのアポトーシス誘導には、FasばかりでなくBaxの発現の関与が明らかとなった。更に、平成12年10月に内分泌攪乱化学物質問題検討会により選定されたリスク評価優先物質8種に関する同様の検討を押し進めつつある。妊娠期での環境毒性物質への暴露による胎仔マウスへの影響については、EBとDESを妊娠期投与後、生後2週、4週と6週の雄マウス精巣を検討したところ、生後2週に於いて明らかな精子形成早熟効果を認めた。特に顕著な催奇性と生殖障害を引き起こすDESに注目して、活性酸素障害に対する生殖細胞防御機構への作用をマウス精巣で検討した所、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)及びCu, Zn-スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)活性の顕著な低下を見出した。更に、生殖行動との接点を見出す意味で、マウス脳組織でのG蛋白質サブユニット発現へのDESの効果を検討した所、特に海馬で神経系に対し興奮方向へ作用するGqサブユニットが有意に減少し、抑制方向に作用するGiサブユニットの増大が認められた。

これらの結果は、各々の環境毒性物質の生殖細胞死誘導の多様な作用点並びに細胞死誘導の分子機構の多様性を示すと共に、毒性作用の違いによる環境毒性物質のグループ化を進める上でこれら分子メカニズム解明への多面的な解析の必要性を示している。

#### 4 新たな核内内分泌攪乱化学物質レセプターの同定及びレポーター遺伝子を導入した細胞の培養

東京大学分子細胞生物学研究所 加藤 茂明

##### 研究要旨

各種化合物の性ステロイドホルモン様活性を検索するシステムの構築を目的とする。性ステロイドホルモンレセプター[ヒトエストロゲンレセプター、(hER、hER)及びヒトアンドロゲンレセプター(hAR)]の安定発現細胞株の概知オーファンレセプターリガンド応答系の確立、新規転写因子群の同定を行った。

#### 5 重金属化合物による内分泌攪乱作用の機序に関する研究

北里大学薬学部公衆衛生学 姫野 誠一郎

##### 研究要旨

重金属化合物が内分泌攪乱作用を示すかどうかを検討するため、ヒト乳癌由来細胞であるMCF7にestrogen response element-luciferaseを導入したME1細胞、及びヒト前立腺癌由来細胞であるLNCaPにandrogen response element (ARE)-luciferaseを導入したLA16細胞を樹立した。検討した26種類の重金属化合物のうち、tributyltin (TBT)、triphenyltin (TPT)がandrogen receptor (AR)を介した転写を活性化することによりLA16細胞を増殖させることを見いだした。また、TBT、TPTはdihydrotestosterone (DHT)によるARの転写活性化をさらに増強した。従って、TBT、TPTは哺乳動物細胞に対してもオス化作用を示す可能性が示唆された。しかし、TBT、TPTの作用はARとligandとの結合に対するantagonistであるflutamideによっては阻害されなかったことから、ARのligand binding domainとは異なる作用点にTBT、TPTが作用している可能性が示された。一方、LNCaP以外の前立腺癌由来細胞株であるPC3、DU145にAR発現plasmid及びARE-luciferaseを導入した後、TBT、TPTを作用させた場合には、ARを介した転写の活性化が起こらなかったことから、LNCaP特異的に存在する何らかのfactorがTBT、TPTによるARの転写活性化を促進している可能性が示唆された。

#### 6 ヒト生殖細胞の形成・維持に及ぼす内分泌攪乱化学物質の影響についての研究

徳島大学医学部公衆衛生学 中堀 豊

##### 研究要旨

Y染色体研究の立場より、ヒトの性決定・性分化や生殖細胞の形成・維持におよぼす内分泌攪乱化学物質の影響を明らかにしようと試みている。性決定についてはミューラー管抑制因子遺伝子(MIS)プロモータ部位につないだレポーター遺伝子の発現を指標とし、化学物質が性決定・性分化に及ぼす影響を検知しうるシステムの開発をめざして研究を進めた。一方、精子濃度は男性の系統によって異なることを既に明らかにしたが、この現象はそれぞれの男性が持つY染色体の違いに基づく。ヒトにおいてY染色体の個体毎の違いが化学物質への反応性を規定している可能性もあり、生殖細胞の形成・維持に及ぼすY染色体の役割の解明を進めた。

#### 7 PPAR を介した内分泌攪乱化学物質の毒性発現メカニズムの解明

名古屋市立大学薬学部微生物薬品学 今川 正良

##### 研究要旨

エストロゲン受容体やアンドロゲン受容体と同じ核内受容体スーパーファミリーに属するPPAR (ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体)を介した内分泌攪乱化学物質の作用

機序を解明する第一段階として、PPAR の DNA への結合配列の選択性を決定した。その結果、RXR が少ない条件下では、PPAR /PPAR ホモダイマーが形成され、エストロゲン受容体が認識する DNA 塩基配列と同じパリンドローム構造を認識することが明らかになった。

また、通常条件では脂肪細胞に分化できないマウス NIH-3T3 細胞に PPAR 発現遺伝子を導入し、恒常的に PPAR を発現し、リガンド存在下で脂肪細胞に分化する安定細胞株を作製した。本株と非発現細胞との発現遺伝子の差異をサブトラクション法（遺伝子側）および 2 次元電気泳動 - 質量分析法（蛋白質側）により検討した。この細胞株を用いて、数種類の環境化学物質について、脂肪細胞分化への影響を検討した。

## 8 生殖毒性の早期マーカーとしての神経内分泌動態と次世代影響に関する研究

北海道大学大学院医学研究科 岸 玲子

### 研究要旨

近年内分泌攪乱化学物質問題が重要視されているため、環境化学物質暴露による神経内分泌物質の動態と、生殖毒性の発現について知見を得ることを目的とした。疫学調査で女性労働者の月経障害や低体重児出産などの報告もあることから、有機溶剤スチレンモノマーを使い、本年度はスチレンモノマー曝露による神経内分泌動態（ホルモン変化）について検討を行った。その結果、予備的データではあるが、比較的低濃度（100ppm）で短期間（2週間）の曝露でもラットのプロラクチンレベルを上昇させ、雌雄ともに LH に作用することが認められた。このことはプロラクチン、LH はスチレンモノマーによる健康影響の指標としても有効と考えられる。また、同時に生殖毒性を考える際に重要な基礎的な実験としてスチレンモノマー代謝酵素の妊娠時と非妊娠時の差、雌雄差、週令による差の検討を行った。スチレンモノマー代謝酵素活性は成熟ラットでは雌雄による性差、週令による差が見られ、スチレンモノマーの薬物代謝動態が妊娠中は非妊娠時より酵素活性が低くなっていた。幼若期の雄では酵素活性が全く認められなかった。今回の内分泌動態の変化、薬物代謝酵素活性の妊娠・非妊娠時の差についての実験結果から次世代影響を引き起こす要因となるメカニズムについて的一端を明らかにした。

## 9 内分泌攪乱化学物質を始めとする環境汚染物質の野生生物に対する影響と環境評価

北海道大学大学院獣医学研究科 藤田 正一

### 研究要旨

DDT や PCB などの有機塩素系化合物は、環境中において安定で脂溶性に富むため、食物連鎖の上位に立つ生物に高濃度の濃縮されることが知られている。以前、我々は、アザラシやイルカ等の海棲哺乳類に、生物濃縮によって高濃度のこれら有機塩素系化合物が蓄積されていること、平面構造を持つコプラナーPCB類と、肝臓におけるシトクロム P450 依存の酵素活性や蛋白発現量との間に相関が見られたことを報告した。今回、我々は、高濃度に PCB 類などの有機塩素系化合物を蓄積しているアザラシの甲状腺ホルモンへの影響について検討した。PCB170 や PCB180 と血中の甲状腺ホルモンレベルは負の相関を示し、PCB による野生生物の汚染が内分泌系を攪乱している可能性が考えられた。

一方で、同じく食物連鎖の頂点に立ち、高濃度の環境汚染物質の曝露されていることを指摘してきたオジロワシ、オオワシについて、その成長過程と生体に蓄積する環境汚染物質の残量パターンを解析し、興味深い結果が得られたので報告する。PCB類、DDT類は、胸筋において他の有機塩素系化合物に比べて10倍から100倍高い蓄積濃度を示した。また、幼鳥においてもっとも高いレベルで蓄積していた PCB 異性体は 5 塩素化 PCB であった。亜成鳥や成鳥においてもっとも高い蓄積割合を示したのは 6 塩素化 PCB であった。さらに、TEQ 値に占める non-ortho PCB が関与する割合と、総 TEQ 値との間には負の相関が見られ

た。従って、コプラナーPCBによってP450、特にAh受容体を介して発現誘導を受けるCYP1ファミリーが誘導され、生体に残存する環境汚染物質の排泄に関与している可能性が示唆された。

さらに、今回、ダイオキシン類による汚染が問題となった藤沢市の引地川水域に棲息するコイを採集した。肝臓における異物代謝能や生殖腺への影響の有無を汚染水域の上流に棲息するコイとの比較から検討した。引地川の藤沢工場下流域より採集した雌のコイでは、上流域棲息群に比べて、P450量、CYP1A発現量、CYP1A依存の代謝活性が増加していた。また、雌個体においては、生殖腺重量や血中エストロゲン量について、下流域のコイでは減少が見られた。

また、当研究室では1996年度より野生げっ歯類のエゾヤチネズミを捕獲し、肝臓におけるP450依存の異物代謝活性の変動を調べてきた。個体数変動周期より、棲息数がほぼ同じと思われる1996年及び2000年度に採集したエゾヤチネズミについて、棲息域の変化と異物代謝能の変動について考察を行ったので、報告する。

## 10 生殖発達毒性に関する研究

日本獣医畜産大学 獣医畜産学部 鈴木 勝士

### 研究要旨

生殖腺発達過程に対する内分泌攪乱化学物質の影響に関しては、初期発生、胎生期および生後初期の生殖腺発生過程、生後の生殖機構成立過程における内分泌および神経系の発達に対する影響等が考えられている。他方、生殖細胞系列自体への突然変異誘発性も憂慮されている。本研究では、当教室で発見維持されている、これらの生理的過程に異常を示す複数の突然変異ラットの系統(hgn: ocd: lde)をモデルとして、その病態解析と遺伝解析を通じて、生殖発達攪乱の解析に有用な方法の検討、毒性マーカーとして有用な機能分子の検索、環境要因によって生じたと考えられる遺伝的変異の同定を目指して研究を進めてきた。遺伝解析と病態解析の結果、体節形成、泌尿生殖器等のこれらのラットの異常は、環境因子への暴露によって生じると考えられる広範な生殖発達機構の異常について、モデルとして利用できることが判明した。これらのミュータントの異常の起源は、30年以上前にクロードコロニーの維持過程で器具機材の消毒に使用されていた化学物質による可能性があり、そうであれば、環境要因により生殖系列に生じた劣性突然変異が世代を越えて維持された例に相当する。今後、病因遺伝子とその異常が確定されれば、化学物質による遺伝子のヒットポイントの共通性を見出させる可能性がある。今後、正常ラットの生殖系列に対する薬物誘発突然変異の解析を実験に加える予定である。

## 11 塩素化芳香族による生殖機能への影響評価

九州大学大学院医学研究院 大村 実

### 研究要旨

廃棄物焼却由来の塩素化芳香族化合物であり、ポリ塩化ナフタレン類の異性体の一つである1,2,3,4,6,7-六塩化ナフタレン(以下、1,2,3,4,6,7-HxCNと省略)のラットへの離乳後曝露実験を行い、胎仔期-授乳期曝露実験の結果と比較した。体重1kgあたり0.05-5.0µgの1,2,3,4,6,7-HxCNを生後21-23日目のラットに投与し、オスでは生後62日目、メスでは生後91日目以降の発情期に評価した。その結果、胎仔期-授乳期曝露では認められた精巣上部精子数の増加は認められなかった。これは、1,2,3,4,6,7-HxCNがラットでは胎仔期-授乳期に起こる精子発生開始の時期を早めることを追証するものであった。一方、血清テストステロン濃度の上昇ならびに前立腺重量の増加は、胎仔期-授乳期曝露だけでなく、離乳後の曝露でも認められた。これは、1,2,3,4,6,7-HxCN

のテストステロンへの影響には同物質の胎仔期-授乳期の作用だけでなく、離乳後の作用も関与していることを示唆するものであった。なお、1,2,3,4,6,7-HxCN はメスの生殖器官系に対しては明らかな影響を認めず、その生殖器官系への影響には雌雄差がある可能性が示された。

## 1 2 メダカに対する内分泌攪乱化学物質の短期曝露に関する研究

東京都環境科学研究所基盤研究部 若林 明子

### 研究要旨

人畜由来ホルモンや内分泌攪乱化学物質による魚類への影響が懸念されている。そのため、これらの物質による魚類への影響を調べる試験方法を早急に確立する必要がある。そこで、メダカを用いてこれらの物質の短期曝露の影響を血液や肝臓中のビテロジェニン濃度の上昇によって調べることを目的に研究を実施した。

まず、メダカの血液や肝臓中のビテロジェニン濃度を精度よく測定する方法を開発した。次に、その方法を用いて性ホルモンや内分泌攪乱作用が疑われている化学物質のメダカの短期曝露によるビテロジェニンの誘導について検討し、これらの物質の曝露濃度とビテロジェニンの誘導の程度を比較した。

また、今回用いた手法は内分泌攪乱化学物質の魚類に与える影響を調べるスクリーニング手法として有効であることが示唆された。

## 1 3 環境生物の免疫影響に関する研究

国立環境研究所環境健康部 小林 隆弘

### 研究要旨

有害環境汚染物質であるベンゾ[a]ピレン (BaP) は多環式芳香族化合物(PAH)の一つであり、大気、水、底質、土壌のいずれにも含まれており発ガンを含めた生体影響が問題となっている。BaP が免疫機能に及ぼす影響については、主にマウスやラットを使用した実験において感染抵抗性、抗体産生、ナチュラルキラー細胞の細胞傷害活性、マクロファージの TNF $\alpha$  や IL-1 の産生を低下させることなどが報告されている。これらのことは、環境中の BaP などにより生物は免疫機能を攪乱される可能性があることを示しているが、マウスやラット以外の生物の免疫機能におよぼす影響についてはほとんど検討されていないのが現状である。そこで、BaP により、マウス、ウズラ、金魚、アコヤガイ、ナメクジ、ミミズ、カイコの免疫機能に影響を及ぼす可能性があるかについて検討し以下の結果を得た。

**マウス**：出生直後 7 日間母親マウスに BaP (10 または 100mg/kg·day) を腹腔内投与し、7 日目に新生仔マウスの胸腺細胞をフローサイトメトリーを用いて解析した。100mg/kg では体重、胸腺、脾臓がそれぞれ有意な減少、減少傾向、増加傾向が見られた。胸腺細胞の胸腺重量比は有意な増加が見られた。10mg/kg BaP 投与のマウスにおいて、CD4-CD8- T 細胞及び CD4-CD8+ T 細胞の割合は有意な減少が見られた。CD4+CD25+ サブセットは 10mg/kg BaP 投与では影響は見られなかったが、100mg/kg BaP 投与群では CD4<sup>low</sup> の領域で有意な減少が見られた (小林隆弘、平野靖史郎、遠藤直紀)

**ウズラ**：近交系ウズラに BaP を食道内投与 (10, 30, 100mg/kg) し、リンパ球の増殖能、マクロファージの貪食能、羊赤血球 (SRBC) に対する抗体産生能および病原体 (ラウス肉腫) の感染抵抗性を指標に実験をおこなった。T 細胞の ConA 刺激による増殖反応は抑制され、B 細胞の LPS 刺激に対する増殖反応は亢進する傾向が認められた。また、抗体産生能への影響は認められなかった。マクロファージの貪食能は投与量に依存した抑制された。ラウス肉腫に対する感染抵抗性は、30mg/kg の投与量では影響はなかった。(高橋慎司、小

山卓美、清水佐良子、三浦克洋)

**金魚**：BaP を金魚の腹腔内に 30 , 100 mg /kg BW 注入し、7 日後の脾臓、腎臓を組織学的に観察した。また、7 日後にインディアンインクを注入し、3 日後に脾臓、腎臓のカーボンの取り込みを組織学的に観察し、BaP の食細胞の貪食能への影響を評価した。

造血組織に BaP の影響と思われる目立った変性は観察されなかったが、脾臓では実験群・対照群ともにエリブソイド(英動脈)周囲に Indian ink の取り込みがみられたが、その取り込みは、実験群においてより明瞭であり BaP による食細胞の貪食能の低下が示唆された。腎臓への取り込みは、実験群・対照群ともに顕著でなく、大きな差異はみられなかった。

(菊池慎一、中村弘明、菅谷芳雄)

**アコヤガイ**：アコヤガイに 5、50ppm の BaP を 14 日間曝露を行った。血リンパ球遊走能、総血リンパ球数、NBT 還元能、血リンパ球分画、凝集素価には BaP 曝露の影響は見出されなかった。各群とも個体差が極めて大きかった。リチウムカルミンの血リンパ球貪食能は高濃度 BaP 曝露群で低値を示した(吉田貴彦)。

**ナメクジ**：陸棲軟体動物のフツウナメクジ(*Incilaria bilineata*)を BaP を濃度、 $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $10^4$ ppm を染み込ませたペーパータオル上で飼育した。BaP の短期間曝露により、 $5 \times 10^3$ ppm 以上の濃度で体表粘液の粘性が増し、体液から取り出したマクロファージの貪食能が低下を示した。これらの結果は陸棲軟体動物が環境指標動物として適していることを示唆する。(古田恵美子、瀬尾直美、山口恵一郎、間中研一)

**ミミズ**：ミミズ免疫機能を(1) coelomocyte 異物貪食能、H2O2 活性、NK 活性、溶血活性など生体防御機能に対する障害を検索する。(2) 環境汚染物質の細胞表面レセプター(AhR およびエストロゲンレセプター)、代謝酵素(cytochromeP450)、核内移行の cofactor(HSP60,90,70)の発現に与える影響を分子病理学的に検討した。BaP のミミズ皮膚への曝露後、P450 (CYP2E1 および CYP3A4) は、皮膚で著しく増加した。HSP60,90,70 においてもその発現し増加した。P450 の発現は、RT-PCR により、CYP1A1 のサブファミリーを確認した。エストロゲンレセプターは皮膚には分布がなく、AhR レセプターは、確認できなかった。BaP の蛍光ビーズ貪食能に与える影響は、1ng/20g から濃度依存的に減少した。H2O2 活性も、濃度依存的に低下した。(小宮山一雄、Edwin Cooper、岡上真裕)

**カイコ**：5 齢のカイコに 6 日間背側皮膚に 0.1%BaP を塗布し、6 日目に総血球数、顆粒細胞数、プラズマ細胞数、ヒツジ赤血球への貪食率、メラニン色素形成、抗菌活性とレクチン活性への影響を検討した。総血球数、全血球に占める顆粒細胞比、ヒツジ赤血球への顆粒細胞による貪食率、大腸菌に対する抗菌活性が減少すること、全血球に占めるプラズマ細胞比が増加すること、メラニン色素形成には影響がないこと、さらに 5 齢 4 日目の免疫細胞の形態と伸展に及ぼす BaP の影響を生体外で調べた結果、BaP 存在下では顆粒細胞の伸展が抑制されるが、プラズマ細胞の伸展は影響されないこともわかった。以上の結果より、BaP は昆虫の免疫機能を抑制することが示唆された。(和合治久)

これらの結果から BaP により貪食能などの免疫機能の低下が起きることや、動物種や各免疫担当細胞により感受性の差の違いがあることが明らかになった。

#### 1.4 絶滅が危惧される両生類の国内実態調査と情報ネットワークの作成及び環境汚染モニター動物の作製に関する研究

早稲田大学教育学部生物学 中村 正久

##### 研究要旨

本研究は(1)両生類(カエル)の実態調査とネットワーク作り、(2)北九州市山田緑地の検出物質及び土壌の遺伝毒性調査、(3)環境汚染モニター動物(トランスゲニックカエル)の作製、の3つのテーマを骨子として行われた。(1)については、奇形カエルの情報収集を目的としてホームページ(<http://faculty.web.waseda.ac.jp/nakamra/>)を開設

し、いくつかの情報が寄せられていた。また、関東、信越、東海・北陸、中国、沖縄地方で、カエル、イモリの実態調査を行った。どの地域においても両生類の生息環境が年々、厳しくなっていることが窺えた。関東地方では昨年と同様、奇形ウシガエルを8例発見した。また、東海地方並びに沖縄地方でも奇形カエルを発見した。(2)については、北九州市山田緑地におけるカエルの過剰肢が遺伝的であることが判明したため、山田緑地における検出物質及び土壌の遺伝毒性調査を行った。既検出物質のトリニトロトルエン(TNT)及びベンゾ(a)ピレン(B(a)P)は、共に遺伝毒性を有することが分かった。また、他の検査区に比べ、山田緑地の土壌試料抽出液に高濃度のTNTを検出したので、umu試験を行ったが、高い遺伝毒性はなかった。(3)については、蛍光蛋白(GFP)をレポーターとしてカエル FTZ-F1 遺伝子の転写調節領域をアフリカツメガエル卵に導入したトランスジェニックカエルの作製に成功した。これによってカエル性腺で発現する遺伝子のカエル卵への導入が可能になった。

本年度の研究では多くの成果が得られた。しかし、調査結果の信頼性を高めるために継続して調査を行う必要がある。

平成13年度

## 1 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の分子細胞生物学的メカニズムの解明

千葉大学大学院医学研究院 湯浅 茂樹

### 研究要旨

内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の機序として、精巣発達過程におけるエストロゲン様作用物質に対する曝露が関与することが示唆されているが、これまで精巣発達過程に対するエストロゲン自体の作用が明確にされていなかった。本研究では、まず、齧歯類新生仔期に $\beta$ -estradiol 3-benzoate, 17 $\beta$ -estradiol を投与すると、精巣が発達して精子細胞が分化する段階になってはじめて造精細胞の中で精子細胞の特異的形態異常が起こることを明らかにした。形態異常の代表的なものとして、尖体顆粒の位置異常や尖体の変形、核の変形、精子細胞-セルトリ細胞間接着構造の異常が高率に認められた。このような異常精子細胞は精子まで発達せず死滅してしまうと思われる。これらのモデル化合物の精子形成阻害機構をもとに、内分泌攪乱作用が疑われる優先12物質中、エストロゲン受容体との親和性の高いアルキルフェノール(nonylphenol, 4-octylphenol)と親和性の低い tributyltin、さらにエストロゲン受容体との親和性が高いが精子形成に対する作用が明確でなかった bisphenol A について精巣発達過程における曝露が及ぼす影響を調べた。その結果、アルキルフェノール、tributyltin では精巣発達に対する障害作用を見いだせなかったが、bisphenol A は $\beta$ -estradiol 3-benzoate, 17 $\beta$ -estradiol と同様に、精子細胞が分化する段階になってはじめて精子細胞の特異的形態異常を引き起こすことを明らかにした。

bisphenol A は基本的にエストロゲン投与と同様の精子細胞の形成障害を示し、エストロゲン受容体を介した効果であると考えられる。bisphenol A のエストロゲン受容体への結合能はエストロゲンの1,000分の1と言われているが、in vivo では予想されるよりはるかに強い障害作用を持っていた。さらに、この異常は生後5日から11日という特定の期間の曝露で引き起こされた。

$\beta$ -estradiol 3-benzoate, 17 $\beta$ -estradiol と bisphenol A の作用は、強力なエストロゲン様作用物質と考えられる diethylstilbestrol (DES) による精子形成における減数分裂過程遅延作用(昨年度の本研究成果)とは全く異なる生殖細胞発達段階で検出された。いずれにおいてもセルトリ細胞の特殊接合装置の形成障害が見出され、両グループの化合物の共通な作用点の一つはセルトリ細胞にあると考えられた。また、tamoxifen はエストロゲン受容体の antagonist であるが弱い agonist の作用も持ち、精巣に対しては弱い DES 様の作用を示した。特筆すべき点は、それ自体では効果のない低濃度の DES と tamoxifen を同時に投与すると、DES の作用が相乗的に増強され Leydig cell の発達が著明に阻害されたことである。

セルトリ細胞株 TM4 に DES を作用させると、形態学的変化とともに分子量 38kDa の蛋白(p38)のチロシンリン酸化が特異的に亢進するが、DES を除去し形態学的変化が回復した後も p38 のチロシンリン酸化は持続した。また、上記 bisphenol A、 $\beta$ -estradiol 3-benzoate, 17 $\beta$ -estradiol、アルキルフェノール、tributyltin のいずれもが p38 のチロシンリン酸化を誘導した。

以上の結果から、内分泌攪乱作用が疑われる候補化合物の多くはセルトリ細胞に作用して生殖細胞の分化、発達に影響を及ぼすが、各物質はエストロゲン受容体との結合だけでなく、細胞内情報伝達系に多様な効果を及ぼして、場合によっては複数の作用の弱い化合物が相乗的に働いて特有の精巣機能障害作用を示すと考えられる。

2 前鰓類（海産巻貝類）の性及び生殖に関わる内分泌機構の解明に関する基礎的研究  
独立行政法人国立環境研究所 堀口 敏宏

研究要旨

海産巻貝類のインボセックス（生殖器異常/生殖機能障害）に及ぼす有機スズ汚染の影響を知るために、巻貝類のうちイボニシ（*Thais clavigera*）とバイ（*Babylonia japonica*）を対象に、GC/MSによるステロイドホルモンの同定を行った。その結果、イボニシについては、精巣からテストステロンとアンドロステロン、卵巣から17 $\beta$ -エストラジオール、エストロン及びエチニルエストラジオールの存在を初めて確認した。更に、GC/MS測定のための前処理（抽出・精製）法を検討し、サロゲート物質を用いた添加回収実験から良好な回収率を得ることができた。その結果、イボニシ及びバイ中のテストステロンと17 $\beta$ -エストラジオールを定量できた。

また、ELISA法を用いてイボニシの生殖巣中のテストステロンを個体別に定量するための測定条件を確立した。抗テストステロン抗体キットの選択及び試料の前処理法を詳細に検討することにより、ELISA法で問題となる測定値のばらつきを克服することができ、測定値はGC/MSの値と良い一致を示した。GC/MSではできなかった個体別の定量が初めて可能になった。この方法を用いて、有機スズ汚染及び非汚染域で採集したイボニシ（メス）を分析した結果、インボセックス罹患個体のテストステロンが高い傾向を示すことが確認された。これにより、海産巻貝類においても高等動物と同様のステロイドホルモンと生合成経路が存在することが示唆され、テストステロンとインボセックスとの何らかの関連性が推察された。

一方、イボニシの中樞神経系である神経節（脳）から、セロトニン、ドーパミン、エピネフリン、オクトパミンが検出された。いずれも非汚染・汚染海域双方のイボニシから検出されたが、概して、汚染海域の個体では非汚染海域の個体に比べて脳内アミン量が少ない傾向がみられた。なかでも、セロトニンの前駆・代謝物質（トリプトファン、5-ヒドロキシインドール酢酸）が汚染海域個体で少なかった。全実験個体で共通に検出された物質はトリプトファンのみであった。また、検出された物質質量と脳の湿重量との間に相関関係はみられなかった。巻貝類の一種である有肺類（陸貝）にテストステロンを曝露するとTBTほど顕著ではないが雄性化が生じるとの報告があり、性ホルモンによって生殖器官の発達が示唆されていることから、非汚染海域と汚染海域での脳内アミン量の差が脳による性ホルモン産生の調節に影響をおよぼし、インボセックス発症に帰結した可能性がある。

また、二枚貝類ではセロトニンが卵母細胞の分裂誘導に関与しており、セロトニンが性ホルモンの生合成・代謝経路に作用する可能性が示唆されているが、イボニシにおいてもセロトニンとその前駆物質と代謝物質の存在が明らかになった。汚染海域の個体は非汚染海域の個体に比べてセロトニンとその前駆物質、代謝物質の量が他の物質より著しく減少していたことから、有機スズ汚染がイボニシの脳におけるセロトニン生合成系を抑制し、それが性ホルモンの生合成・代謝経路に関与している可能性がある。

さらにドーパミンは、非汚染海域では6個体中5個体から検出されたのに対し、汚染海域では9個体中1個体しか検出されなかった。TBTがドーパミンの生合成系に強く関わっていると考えられる。ドーパミンの生合成系にTBTが関与し、雄性化を引き起こすメカニズムに何らかの形で関与している可能性もあると考えられる。

一方、巻貝類の脳に存在することが知られている3種の神経ペプチド（APGWamide, FMRFamide, LSSFVRamide）について筋肉注射試験によりイボニシのインボセックスに及ぼす影響を調べた結果、APGWamideとFMRFamideが有意に輸精管形成を促進した（それぞれ、 $p < 0.001$ と $p < 0.05$ ）。またテストステロンの還元型である5 $\alpha$ -DHTにおいても有意な輸精管形成が観察された（ $p < 0.01$ ）。

以上を総合すると、巻貝類の脳に高濃度で蓄積する傾向がある有機スズ化合物の影響によって脳内アミン量が変化し、それが性ステロイドホルモンの生合成系及び代謝経路に影

響を与え、卵母細胞の発達抑制やインポセックスの発症に帰結する可能性が考えられる。しかしながら、テストステロンや5 $\alpha$ -DHTのインポセックス促進能は微弱であるため、これだけではインポセックス発症を十分に説明できない。一方、脳から分泌されているとされるAPGWamideとFMRFamideにおいても微弱なインポセックス症状の促進が観察されたことから、神経ペプチドのインポセックス発症に対する関与についても新たな可能性が示唆された。

### 3 臭素化芳香族系難燃剤による内分泌系のかく乱に関する研究

九州大学大学院医学研究院 大村 実

#### 研究要旨

臭素化芳香族系難燃剤の内分泌かく乱性評価のための動物実験用飼料としての妥当性を closed-formula 飼料と open-formula 飼料について検討するとともに、臭素化芳香族系難燃剤（およびその代謝物）の体内負荷量を評価するための抽出・分析方法の開発を行った。closed-formula 飼料と比べて open-formula 飼料による飼育では性ホルモン系・甲状腺ホルモン系・免疫系への影響の感度が上昇することが示されたことから、同飼料は臭素化芳香族系難燃剤の内分泌かく乱性評価用の飼料として適していると考えられた。また、添加型の代表的な臭素化芳香族系難燃剤であるデカブロモジフェニルエーテル（DecaBDE）およびその関連臭素化体の高感度の抽出・分析方法の開発を行うことに成功し、closed-formula 試料からは0.61ppbの濃度でDecaBDEを検出した（open-formula 飼料からはDecaBDEは検出されなかった）。この方法を応用することで臭素化芳香族系難燃剤（およびその代謝物）の体内負荷量の評価が可能になることが期待された。

### 4 フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの代謝の種差に関する検討

名古屋大学大学院医学系研究科 那須 民江

#### 研究要旨

フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)の代謝の種差を検討するために、ラット、マウス、マーモセットの肝、肺、腎、小腸、および精巢の代謝酵素の発現およびDEHP投与による誘導を検討した。

- 1) Lipase-mRNA はマーモセットの肝以外の臓器において検出された。即ち、Lipase-mRNAの量とDEHPによる誘導に種差が認められた。マーモセットの肝の量は検出限界以下であり、DEHPによる誘導が観察されたのはラット肝のみであった。
- 2) MEHPのグルクロン酸抱合活性は検討した動物種の臓器では検出できなかった。UDPglucuronyltransferase 1A, 2Bファミリーの代表としてそれぞれ1-ナフトールとビスフェノールAを基質として活性測定を行った。これらの活性、DEHPによる誘導性にも種差がみられた。特にビスフェノールAの活性はマーモセットにおいて高いことが注目された。DEHP投与によりラットとマウス肝およびマーモセット腎における1-ナフトールの抱合活性が誘導された。
- 3) アルコール脱水素酵素(ADH)とアルデヒド脱水素酵素(ALDH)活性にも種差が認められた。ADHの活性はマーモセット肝において最も高かったが、DEHPによる誘導はラット肝においてのみ観察された。ALDHの活性は基質により異なり、ラットあるいはマーモセットにおいて高かった。DEHPの影響を受けるのは低分子量のアルデヒドで、ラットとマウスの肝において観察された。

PPARalpha-mRNA量にも種差がみられ、マーモセットの検討したすべての臓器において低い値が得られた。ラットの腎と小腸ではDEHP投与によりmRNA量は明らかに減少していた。

## 5 マウス生殖細胞死への環境毒性物質の影響とその分子機構に関する研究

長崎大学医学部 小路 武彦

### 研究要旨

哺乳類雄性生殖細胞に於ける細胞死への環境毒性物質の影響に関する知見は、未だ散発的である。我々は、確立したマウスの実験系を用いて種々の環境ホルモンの生殖細胞死への影響を検討してきた。平成 13 年度は、マウス精子形成細胞死誘導に対するエストラジオール-3-ベンゾエート (EB)、ジエチルスチルベストロール (DES)、ビスフェノール A (BPA) 及びジクロロジフェニルジクロロエテン (DDE) の影響をより低濃度領域から広範囲の濃度 (1 ng/kg 体重 - 1 mg/kg 体重) で検討し、その結果 DES では高濃度での細胞死誘導と共に 100 ng/kg 体重投与での有意な細胞死のピークを見出した。一方、BPA では高濃度での細胞死誘導の他に 4-40 µg/kg 体重で細胞死誘導阻害が認められた。今回エストロゲン対照として、エチニルエストラジオール (EE) の効果も検討したところ、EB とは異なり検討範囲内で全く生殖細胞死誘導活性を認めなかった。これらの結果は、EB もまた生殖毒性物質として作用することを示している。哺乳類雄性生殖細胞死の分子機構には不明な点が多々あるが、生殖細胞死誘導機構として Fas/Fas リガンド系の関与に注目して検討した所、EB、DES、BPA の高濃度では関与が認められたが、低濃度の DES や DDE でのアポトーシス細胞での Fas 発現は認められなかった。一方、何れの場合にも生殖細胞アポトーシス像にはミトコンドリア由来である Bax の顕著な分布変化を伴っており、生殖細胞死誘導へのミトコンドリアの関与が強く示唆された。更に低濃度の BPA による細胞死阻害は、Bax 機能を中和する Bcl-2 の発現増大によることが新たに発見された。エストロゲン受容体である ER $\alpha$  と ER $\beta$  の発現を検討したところ、ER $\alpha$  は Leydig 細胞に特異的に発現していたが、これら環境ホルモンの影響は認められなかった。一方 ER $\beta$  は Leydig 細胞と共に精粗細胞及び精母細胞に発現しており、その発現動態がこれらの環境ホルモンにより影響を受けることから重要な作用点の一つと考えられた。ER $\beta$  ノックアウト (ERKO) マウスでの検討では、一般に生殖毒性の増大が観察されたが、正常精巣の場合と同様に DES 処理により精母細胞での ER $\beta$  の消失が認められるなど、生殖細胞死誘導への ER $\beta$  の関与が更に強く示唆された。

## 6 TBT によるラット妊娠初期胚の着床不全に関わるメカニズムの解明

日本獣医畜産大学獣医畜産学部 鈴木 勝士

### 研究要旨

塩化トリブチルスズ (TBT) 0, 4, 8, 16 mg/kg およびメチルメタン sulfon 酸 50 mg/kg をウイスターイマミチラット近交系の妊娠動物に妊娠 0 日から 3 日までの 4 日間強制経口投与し、着床前の胚に子宮内暴露を行い、分娩保育させて、生後 6 日までの出生児から肝臓と性腺由来の DNA を抽出し、20 個のマイクロサテライトマーカーを用いて変異が生じるか否か検討した。その結果合計 8 個のマーカーにおいて、TBT と MMS 投与群で、性腺由来の DNA に 1/64 ~ 5/101 程度の頻度で変異が検出された。MMS 投与群では外表奇形が 2/76 で検出されたが、TBT 群では奇形は検出されなかったため、これらの変異は劣性の突然変異であると結論された。母親、父親の肝臓、陰性対照群での肝臓と性腺からの DNA では変異は検出されず、近交系として斉一な遺伝的背景をもっていることが確認された。今回性腺でのみ変異が検出された事に関して、その機序等は不明であるが、生殖細胞での劣性の突然変異が生じる可能性は否定できないと結論された。また、今回の結果から、従来知られていた TBT による着床阻害には、初期胚の障害が関与している可能性があることが示唆された。

## 7 内分泌攪乱化学物質のアンタゴニスト活性の評価とその作用メカニズムに関する研究

独立行政法人国立環境研究所

環境ホルモン・ダイオキシンプロジェクト総合研究官 白石寛明

### 研究要旨

内分泌化学物質のレセプターを介した作用メカニズムの中で、レセプターに結合するが mRNA の転写が起こらず、結果的にその働きを減少させるアンタゴニスト活性による作用メカニズムがあるが、その試験法はあまり開発されていない。酵母 Two-Hybrid System による改良エストロゲンアッセイ (YMCE test) を用いるアンタゴニスト試験と酵母毒性試験を組み合わせたアッセイシステムを、化学物質のエストロゲン・アンタゴニスト作用の検出に適用したところ、試験した化学物質のうち、トリフェニルスズ (TPT)、フタル酸ジシクロヘキシル、及びトリブチルスズ (TBT) は酵母によるアッセイにおいて代謝化なし (-S9 test) でアンタゴニスト作用を示した。また、4-ノニルフェノール、p-t-オクチルフェノール、及びビスフェノール A は酵母によるアッセイにおいて代謝化 (+S9 test) によりアンタゴニスト作用を示した。酵母によるアッセイでアンタゴニスト活性を示した化学物質は、すべてバイディングアッセイ試験で受容体結合能を示した。YMCE test によるアンタゴニスト試験で TBT 及び TPT などはエストロゲン・アンタゴニスト活性を持つ可能性があることが示されたが、メダカを用いた *in vivo* ビテロジェニン誘導抑制試験において TPT 及び TBT が *in vivo* でビテロジェニン誘導を抑制すること、すなわち、17 $\beta$ -エストラジオール (E2) に対するアンタゴニスト活性を示すことが示唆された。試験物質の毒性によるものでないことは、グルタチオン-S 転フェラーゼ (GST) 活性を指標として確認された。また、メダカへの TPT 及び TBT の曝露によって E2 曝露による b-Actin の抑制効果を抑制する、すなわち TPT 及び TBT は、E2 のアンタゴニストとして機能している可能性が示唆された。

## 8 化学物質のエストロゲン様作用における種間差の解明に関する研究

財団法人 化学物質評価研究機構・安全性評価技術研究所

主任研究員 中井 誠

### 研究要旨

ゼブラフィッシュ (*Brachydanio rerio*) エストロゲン受容体 (ER) リガンド結合ドメイン (LBD) をメス肝臓から単離し、既報の塩基配列と同一のものであることを確認した。得られた ER の大腸菌を用いた大量発現系を構築した。SDS-PAGE により、アフィニティ樹脂による目的受容体タンパク質の精製が確認された。発現受容体のリガンド結合性を確認するために、リガンドの受容体に対する 17 $\beta$ -エストラジオールの特異的結合性を測定し、競合結合試験系への適用性を確認した。4-t-オクチルフェノール及び 4-ノニルフェノールの発現受容体への結合性を測定した結果、それぞれエストラジオールの約 0.3% 及び約 0.2% の結合強度で受容体に結合することがわかった。また、マダイ (*Pagrus major*) ER LBD をメス肝臓から単離し、ゼブラフィッシュと同様に発現系を構築した。

## 9 エストロゲン様物質曝露によるメダカ精巣卵発現の精子形成に及ぼす影響の解明

財団法人 化学物質評価研究機構久留米事業所

主任研究員 横田 弘文

### 研究要旨

エストロゲン様物質の曝露により生じるオスメダカ精巣の精巣卵と精子形成能との関

係を解明する第一段階として、精巣卵の発現程度をスコアリングするための分類基準を作成した。次いで、この分類基準を用いて 4-ノニルフェノール及びオクチルフェノールに暴露されたオスメダカの精巣卵の程度をスコアリングにより解析した。その結果として、いずれの物質においても暴露濃度が高くなると共に精巣卵のスコアの上昇が認められた。従って、エストロゲン暴露によって発現するオスメダカの精巣卵の程度（重篤さ）は暴露濃度と相関し、暴露濃度が低い場合には精巣卵の程度も低く、精子形成も認められるが、高濃度区においてスコアが 4 以上の個体では精巣卵が顕著に発現し、精子形成が抑制されている可能性が示唆された。また、メダカの精子形成に主要な役割を果たすと考えられる P450 11 $\beta$ -hydroxylase 及び Activin $\beta$  の mRNA の発現レベルを測定する手法を確立するため、これら遺伝子の cDNA クローニングを行った。その結果、P450 11 $\beta$ -hydroxylase に関しては、degenerate polymerase chain reaction(PCR) 及び rapid amplification of cDNA ends(RACE)により、1741bp の DNA フラグメントが得られた。このフラグメントは、26bp の 5'非転写領域、1626bp のオープンリーディングフレーム、89bp の 3'非転写領域を有し、このオープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列はウナギ及びニジマスの配列と高い相同性を示した。この結果から、得られた DNA フラグメントはメダカ P450 11 $\beta$ -hydroxylase の完全長 cDNA であると判断された。Activin $\beta$  については、3'-RACE により既報の塩基配列を含む約 900bp の部分配列を得た。

## 1 0 フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価に関する研究

北海道大学大学院医学研究科 岸 玲子

### 研究要旨

フタル酸エステル類は、動物実験で、内分泌攪乱作用、生殖毒性、発達毒性、組織障害などが報告されている。様々な環境中から検出されることから、人への影響が懸念されている。しかし、多くの報告は、経口摂取による影響であり、人でのより自然な摂取経路である吸入曝露による影響についての報告はほとんどない。本研究では、揮発性の低いフタル酸エステルを発生する曝露装置を完成させた。曝露チャンバー内の濃度の検討を行った結果、3.6mg/m<sup>3</sup> から 18mg/m<sup>3</sup> までの濃度の安定性が確認出来た。今後、動物への吸入曝露による生体への影響を検討し、リスク評価を行うことが可能になる。

## 1 1 脳及び生殖腺の性分化に対する内分泌攪乱作用評価法に関する研究

宝酒造(株)バイオ研究所 主任研究員 近藤昭宏

### 研究要旨

内分泌攪乱化学物質のヒトおよび野生生物の健康への影響についてはこれまでも数々の研究が行われてきたが、攪乱作用のメカニズムについては不明な点が多い。理由としては、伝統的な毒性学に基づいた解析方法には限界があり、最近問題となっている低用量の内分泌攪乱化学物質の攪乱作用について、研究者によっては測定不能であったり、他の研究者には追試が困難であったりするからである。そこで我々は、内分泌攪乱化学物質の攪乱作用を遺伝子発現への影響という観点で捉え、そのデータに基づいた内分泌攪乱化学物質の評価法開発を目標とした。

本研究では、マウス胎仔の凍結組織切片を用いて脳（特に下垂体）および生殖腺の分化しつつある個々の細胞を採取し、内分泌攪乱化学物質の影響により発現量の変化する遺伝子を特定し、それらに注目した攪乱作用の評価方法開発への応用を検討することとした。妊娠 10 日目 (GD10.5) の BALB/c マウスに皮下で 1  $\mu$ g/kg のエチニルエストラジオール (EE) および 150  $\mu$ g/kg のビスフェノール A (BPA) を与え、GD11.5

および GD12.5 の胎仔を摘出し凍結切片を作成した。免疫染色法、in situ RT-PCR などを行い下垂体および生殖腺を同定した。次に、LCM (Laser Capture Microdissection : レーザーマイクロダイセクション) 法を用いて目的細胞を組織切片から選択的に取得した。この方法で得られた細胞から抽出される mRNA は微量であるが、T7-based RNA 増幅法を用いて aRNA (Antisense amplified RNA) を作製することにより、DNA チップ解析に充分量の RNA を得ることができた。

生殖腺細胞の DNA チップ解析の結果、GD11.5 の場合  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  の EE の投与によってコントロールに比べて 2 倍以上に発現量が亢進した遺伝子数は 32、1/2 以下に発現量が抑制された遺伝子は 11 であった。一方、 $150 \mu\text{g}/\text{kg}$  の BPA の投与によってコントロールに比べて 2 倍以上に発現量が亢進した遺伝子数は 4、1/2 以下に発現量が抑制された遺伝子数は 28 であった。また、GD12.5 の場合  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  の EE の投与によってコントロールに比べて 2 倍以上に発現量が亢進した遺伝子数は 97、1/2 以下に発現量が抑制された遺伝子数は 28 であった。一方、 $150 \mu\text{g}/\text{kg}$  の BPA の投与によってコントロールに比べて 2 倍以上に発現量が亢進した遺伝子数は 11、1/2 以下に発現量が抑制された遺伝子数は 5 であった。

脳下垂体の DNA チップ解析の結果、GD11.5 の場合  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  の EE の投与によってコントロールに比べて 2 倍以上に発現量が亢進した遺伝子数は 15、1/2 以下に発現量が抑制された遺伝子数は 258 であった。一方、 $150 \mu\text{g}/\text{kg}$  の BPA の投与によってコントロールに比べて 2 倍以上に発現量が亢進した遺伝子数は 0、1/2 以下に発現量が抑制された遺伝子数は 155 であった。また、GD12.5 の場合  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  の EE の投与によってコントロールに比べて 2 倍以上に発現量が亢進した遺伝子数は 5、1/2 以下に発現量が抑制された遺伝子数は 7 であった。一方、 $150 \mu\text{g}/\text{kg}$  の BPA の投与によってコントロールに比べて 2 倍以上に発現量が亢進した遺伝子数は 15、1/2 以下に発現量が抑制された遺伝子数は 70 であった。

平成14年度

1 TBTによるラット妊娠初期胚の着床不全のメカニズムと生存胚における生殖細胞での突然変異誘発の可能性に関する研究

日本獣医畜産大学 鈴木 勝士

**研究要旨**

昨年、塩化トリブチルスズ(TBT)0、4、8、16mg/kg およびメチルメタンスルホン酸20mg/kg をウィスターイマミチラット近交系の妊娠動物に妊娠0日から3日までの4日間強制経口投与し、着床前の胚に子宮内暴露を行い、分娩保育させて、生後6日までの出生児から肝臓と性腺由来のDNAを抽出し、20個のマイクロサテライトマーカの電気泳動パターンに比較的高率で変異が検出された。今年度は16mg/kgTBTとMMSによるサンプルをさらに増やすとともに、昨年のゲノムサンプルを用いて、より詳細にマイクロサテライト電気泳動パターンの変化を調べた。個々のバンドパターンの変動、父親、母親、子供での垂直的伝搬のより詳細な比較を実施しているが、今までのところ妊娠初期の胚にTBTによって遺伝性の突然変異が生殖細胞に確実に生じるとの証拠が得られるに至っていない。この実験系が、もっと変異原性の強い環境物質により、初期胚の内部細胞塊に生じる可能性のある劣性の変異を効率的に検出できる可能性もっていることを示すことが、生物集団の遺伝性突然変異の起源を解明し、そうしたリスクを防ぐ上で重要である。

2 内分泌攪乱化学物質による雄性生殖器への影響の分子細胞生物学的メカニズムの解明  
千葉大学大学院医学研究院環境生命医学 森 千里

**研究要旨**

Bisphenol A (BPA)、flutamide (Flu) は新生仔マウスに投与すると、そのマウスが成長して精子形成を行なう過程で精子細胞の核、尖体に奇形を起こすことが判った。またこの精子細胞に接するセルトリ細胞の特殊接合装置にも形成不全、一部欠損などの異常が認められた。これらの異常は、動物種(マウス、ラット)や投与時期(新生仔投与、成獣投与)によらず認められた。BPAは、我々が日々曝露されているだけに、さらなる詳細な研究を必要とする。また、E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B投与でも同じ作用が見られたので、BPA、Fluは、ラット、マウスに対してエストロゲン作用あるいはエストロゲン作用の相対的増強作用があると思われる。一方、di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) はこれらとは作用が異なり、マウスにおいてはセルトリ細胞の早熟化を促していると考えられた。また、di-(n-butyl) phthalate (DBP) は精巣に何の変化も引き起こさなかった。

セルトリ細胞由来である細胞株TM4を用いたin vitro実験において、特定のタンパク質のチロシンリン酸化がDEHPの代謝産物であるmono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) 投与で亢進することがわかった。またプロテオーム解析により、複数のタンパク質のスポットが化学物質投与により変化していることが明らかになった。今後これらのタンパク質について解析を進めることにより、内分泌攪乱作用が疑われる物質の作用機構の解明、また内分泌攪乱化学物質曝露の有用な指標となりうるバイオマーカーの検索が可能となると思われる。

3 前鰓類(海産巻貝類)の性及び生殖に関わる内分泌機構の解明に関する基礎的研究  
独立行政法人国立環境研究所化学環境研究領域 堀口 敏宏

**研究要旨**

本研究で明らかとなった内容を要約すると、以下のとおりである。

- 1) 前鰓類における有機スズ化合物の体内分布には、ブチルスズ化合物とフェニルスズ化合物で差異があり、概して、ブチルスズ化合物は消化腺や卵巣もさることながら、むしろ鰓や嗅検器などの外套膜周辺組織において高く、一方、フェニルスズ化合物は消化腺の他、卵巣や神経節を含む頭部において高い傾向が見られた。
- 2) イボニシにおいては、インボセックス症状のごく初期の段階では、輸精管形成がペニス様隆起形成とほぼ同時期に起こる。また輸精管は陥入した表皮が結合して形成され、陥入部位は 3-4 箇所であり、ペニス様隆起形成に伴ってペニス基部の輸精管が進入する。さらにペニスは表皮の細胞塊から形成される。またイボニシのインボセックスの場合、ヨーロッパチミボラの場合と少し異なり、卵嚢腺側に輸精管形成が生じるのは右触角後部のペニス形成部位にペニスの隆起と表皮の陥入による輸精管の形成が始まってからであると推察された。
- 3) 雄イボニシから 6 種のペプチド ((a) KCSGKWAHACWGGNa, (b) KCYGKWAMHACWGGNa, (c) PIAYGQFGKWa, (d) SSLFRFa, (e) GSLFRFa, (f) LRDFVa) が単離・精製され、構造決定された。これらはすべて C 末端がアミド化しており生理活性ペプチドである可能性が高い。それらのうち、(a), (b), (f) は用いた抗体の抗原ペプチドの同族体と思われ、(d) と (e) は抗原ペプチドとは構造的な関係はないが、すでに他の軟体動物 (コナガニシやアメフラシ) で同じペプチドが知られており、これらはいずれも筋収縮の抑制・弛緩作用を示す。一方、(c) はタンパク質・ペプチドデータベースで相同性検索 (BLAST および FASTA) を行っても相同性の高い配列が見つからず、これまでに同族体が知られてない新規ペプチドである可能性が高い。
- 4) 雄イボニシから単離・精製された上記の 6 種のペプチドを用いて筋肉注射試験を実施した結果、ペニスの伸長に象徴されるインボセックス症状の増進は観察されなかった。
- 5) イボニシのインボセックス増進効果の点で、APGWamide 注射量 (想定体内濃度) とインボセックスの程度を表す指標 (出現率、ペニス長及び輸精管順位) との間に正の用量 - 反応関係は認められなかった。昨年度と今年度とでは実験実施時期 (季節) が異なるため供試したイボニシの生理的状态に差異があると考えられ、単純比較は適切でないかもしれないが、APGWamide のインボセックス増進効果は小さいと推察される。
- 6) 有機スズ汚染海域と非汚染海域で採集されたイボニシの脳内生体アミンを測定し、比較を行った結果、インボセックス個体の脳内セロトニン (5-HT) とトリプトファン (Trp) 量が、正常な雌個体に比べて有意に多いことがわかった。このような 5-HT の脳内における分布の違いは、有機スズ化合物によって 5-HT の生合成系や代謝系の異常、あるいはシナプス前終末への再回収システムの異常が引き起こされた結果を反映していると考えられるものの、脳内 5-HT 量の増大が有機スズ曝露の結果引き起こされた現象であるかどうか、また有機スズ化合物によって脳内の 5-HT 量の増大が引き起こされたとしても、それがインボセックスの発症に帰結するかどうかを現時点で判断することは困難であった。
- 7) 12 週間に及ぶ TPT 流水式連続曝露試験によって TPT 曝露区の供試個体におけるインボセックス症状の経時的な進行が観察された。このときの生体アミン量の経時変化を測定して解析した結果、5-HT が 3 週目に上昇した後、6 週目及び 12 週目に一貫して減少する傾向が観察された。しかし、5-HT などの生体アミン量の変動と、TPT 曝露によるインボセックス発症との関係は不明瞭であった。
- 8) 国立環境研究所の環境ホルモンプロジェクト研究において、本研究に関連する興味深い実験結果が得られたため、参考情報として記述する。9-cis-レチノイン酸 ~ 体内濃度として約 1ppm となるように筋肉注射 ~ により、雌イボニシのインボセックス症状が顕著に増進した。すなわち、インボセックス出現率は 50% で対照区 (FBS) の 10% に対して有意差がなかったが、ペニス長及び輸精管順位 (VDS) において、それぞれ、1% 及び 0.1% 危険率で対照区と有意差が見られた。ペニス伸びた個体では、最長で 6mm を超えるなど伸長が著しく、これほど明瞭にペニス伸長を引き起こした物質は、TBT や TPT などの特定の有機

スズ化合物以外では、RA が初めてである。筆者らの知る限り、TBT などの有機スズ化合物以外の物質でペニス伸長をこれほど明瞭に引き起こした物質は文献にも見当たらず、9-cis-レチノイン酸 (RA) は世界規模で見ても、初めて確認された有機スズ以外のインボセックス増進作用を持つ物質である。

9) 大阪大学薬学部の西川淳一助教授の研究グループは、TBT や TPT がヒト RXR に対して、RXR の本来のリガンドである 9-cis-レチノイン酸 (RA) と同等の強いアゴニスト活性を有していることを観察している。西川助教授グループの *in vitro* 試験結果と、6) で示した *in vivo* 実験結果を通覧すると、RXR に対する TBT や TPT のアゴニスト活性が、ペニスや輸精管の形成及び発達に象徴されるインボセックス現象の誘導の引き金であることが強く示唆される。

#### 4 内分泌かく乱化学物質の性腺ホルモン作用機構の解明に関する研究

名古屋大学大学院医学系研究科 那須 民江

##### 研究要旨

フタル酸ジエチル (DEP)、フタル酸ジブチル (DBP)、フタル酸ブチルベンジル (BBP)、フタル酸ジシクロヘキシル (DCHP)、フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP)、アジピン酸ジエチルヘキシル (DEHA) (それぞれ 2.25mmol/kg)、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)、ノニルフェノール (それぞれ 0.6mmol/kg) の精巣ライディッヒ細胞のテストステロン産生系に与える影響を検討した。これらのうち、血清のテストステロン濃度を低下させたのは、DEHP、DEHA、2,4-D であった。しかし、これらの3種の化学物質のライディッヒ細胞のテストステロン合成に与える影響は若干異なっていた。DEHP と DEHA は CYP17-mRNA を抑制したのみであったが、2,4-D は CYP17-mRNA に加えて、HMG-CoA synthase と reductase の mRNA も抑制し、内因性のコレステロール合成をも抑制していることが判明した。2,4-D、DEHP、DEHA はペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体のサブユニットのリガンドであるが、血清テストステロン合成系への作用機序は異なっているようである。

#### 5 フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価

北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 岸 玲子

##### 研究要旨

フタル酸エステル類は動物実験で、内分泌攪乱作用、生殖毒性、発達毒性、組織障害などが報告されている。大気、水、土壌など様々な環境中から検出されることから、人への影響が懸念される。しかし、多くの研究報告には、経口摂取による生体影響であり、人におけるより自然な摂取経路である吸入曝露による影響についての報告は殆どないことから、吸入曝露実験とそれに基づくリスク評価が必要である。そこで、本研究ではフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) 吸入曝露を行い、(1) 体内動態、(2) 生殖毒性、(3) 次世代影響の検討を行った。

(1) DEHP 25 mg/m<sup>3</sup> 吸入曝露により、血清からは DEHP とその代謝物であるフタル酸モノエチルヘキシル (MEHP) は検出されなかった。DEHP が検出されたのは肺のみであった。その他の臓器では DEHP の代謝物である MEHP が検出された。特に DEHP の代謝器官とされる小腸、肝臓で検出されたが、同時に精巣でも検出された。また、対照群でも、肺、腎臓、小腸、脳でも検出された。MEHP の群間での差が認められたのは小腸、肝臓、精巣であった。

(2) DEHP 吸入曝露により、精巣重量/体重の増加、成熟した精巣組織像が見られた。また、血漿テストステロン濃度も有意に高かったが、精巣におけるテストステロン合

成酵素 mRNA の発現量や、血漿 LH に差は見られなかった。幼若ラットへの DEHP 吸入曝露により、精巣へ影響を与えることが示唆された。

- (3) 妊娠初期から後期までの DEHP 吸入曝露により、胎児の体重の有意な増加が認められた。また、メス胎児での胎盤重量、AGD / 体重の値の減少が見られた。その他の影響は母、胎児共に認められなかった。

今後、幼若ラットから精巣の形成が完成する時期まで吸入曝露期間を延長し、精巣成熟に与える影響を明らかにする。次世代影響に関しては、体重増加への影響、その影響の性差に繋がるメカニズムを明らかにするために、出生後の仔の内分泌系（成長ホルモン、テストステロン、エストロゲン分泌）への影響を検討する。また、現在、胎児期 DEHP 曝露による精巣形成への影響として、胎児の精巣内テストステロン濃度とテストステロン合成酵素 mRNA 発現量の検討を開始している。

## 6 核内受容体ファミリーを介する化学物質の生体影響に関する研究

大阪大学大学院薬学研究院助教授 西川 淳一

### 研究要旨

ステロイドや甲状腺ホルモンなどの脂溶性低分子ホルモンの受容体である核内受容体群は、多細胞生物の内分泌調節系の主要な部分を担っている。内分泌攪乱物質は、この核内受容体を介して生体内システムを攪乱し、生物の発生や分化、恒常性の維持に深刻な影響を及ぼすと考えられている。これら内分泌攪乱物質の潜在的なターゲットと考えられる核内受容体ファミリーはリガンド作動性の転写調節因子であり、N 端側に Zn フィンガーを含む DNA 結合領域、C 端側に転写活性化領域とリガンド結合領域を有するという一次構造上の特徴がある。近年のゲノムプロジェクトの進展によりヒトゲノムのほとんどの塩基配列が決定されたが、このような特徴を持つ核内受容体ファミリーの遺伝子はヒトゲノム上には 48 種類存在した。48 種類の内訳は、リガンド既知の受容体が 23 種類、リガンド未知のオーファン受容体が 25 種類であった。本研究では、すべてのヒト核内受容体について網羅的に内分泌攪乱化学物質との結合性を調べ、疫学調査や動物実験で得られたデータと比較・検討することにより、新たな内分泌攪乱物質の作用点を明らかにすることを目的とするが、本年度はまずアッセイ系の検証が可能なりガンド既知の 23 種類の受容体について検討した。

受容体をコードする遺伝子を RT-PCR により増幅後、塩基配列を決定したところ、23 種類の受容体はすべて GenBank に登録されている配列と同じであった。これらの遺伝子を用いて酵母 two-hybrid 法によるアッセイ系を構築し、それぞれのリガンドに対する応答性を検証した。その結果、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、AR、PR、GR、MR、RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 、RAR $\gamma$ 、TR $\alpha$ 、TR $\beta$ 、VDR、RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、RXR $\gamma$ 、FXR、CAR の 17 種類については良好なりガンド応答性が認められたが、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ 、LXR $\alpha$ 、LXR $\beta$ 、SXR の 6 種類の受容体については、リガンドを加えない状態でも高い活性を示し、信頼性のあるアッセイ系とはいえなかった。次に、構築したアッセイ系を用い、環境省が優先的にリスク評価に取り組む 20 物質について結合性を調べたところ、多くの化学物質が複数の受容体に作用することがわかった。

以上の結果から、内分泌攪乱作用が疑われる候補物質の多くはエストロゲン受容体との結合だけでなく、複数の核内受容体に影響を及ぼし、これらの複合した作用が内分泌攪乱物質としての毒性につながるものと考えられた。

## 7 ビスフェノールA膜受容体の分子生物学的検討と作用機序の解明に関する研究

大阪市立大学大学院医学研究科教授 船江 良彦

### 研究要旨

胎児期・乳児期においてビスフェノール A (BPA) に暴露されたマウスの中樞神経系への影響について、脳内モノアミン量の変化を検討した。脳におけるモノアミンは、運動・感情・情動発現・脳報酬系に関与していると考えられている神経伝達物質である。暴露実験の結果、親マウスへの BPA 投与によって胎仔期・乳仔期に間接的に暴露を受けた仔マウスの脳では、ドパミン (DA) の減少が見られた。また、離乳後 3 週間、BPA の暴露を解除した後も DA の減少は継続しており、この減少が何らかの不可逆的な変異によって引き起こされる可能性が示唆された。この様に、BPA は DA の減少を引き起こす事で中樞神経系に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた事から、脳神経細胞に BPA 結合タンパク質が存在する事と考えた。脳シナプトソーム画分に BPA の結合活性が見られたので、この BPA の結合タンパク質の単離・精製を試みた。可溶化、イオン交換カラムクロマトグラフィー、BPA-Sepharose アフィニティークラムクロマトグラフィーによって本タンパク質を SDS-PAGE 上でシングルバンドとして精製する事に成功した。N 末端アミノ酸配列の分析により、このタンパク質が protein disulfide isomerase (PDI) と相同性を示す事が明らかとなった。PDI は甲状腺ホルモン結合タンパク質としても知られている。大腸菌内で大量発現させたヒスチジン融合 PDI を用いて競合的結合実験を行ったところ、BPA は甲状腺ホルモンの結合を阻害する事が明らかとなった。

以上の結果より、BPA の中樞神経系への作用は PDI に結合する甲状腺ホルモンに影響を与えた結果起こる事が推察された。そこで、PDI への親和性を指標に、平成 12-13 年度にリストアップされた「優先してリスク評価に取り組む物質」の 20 種類の化合物についてスクリーニングを行った。その結果、4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、BPA、ペンタクロロフェノール、2,4-ジクロロフェノールが甲状腺ホルモンの結合を阻害する事が明らかとなった。

これらの物質は、PDI を介して甲状腺ホルモンの働きを模倣する事によって、内分泌攪乱作用を示すことが示唆された。

## 8 甲殻類 (ミジンコ) に及ぼす内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する研究

岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター助教授 渡邊 肇

### 研究要旨

甲殻類は地球上の生物において大部分を占めているにもかかわらず、その知見は限られている。内分泌攪乱化学物質影響を生態系全体で捉えた場合、甲殻類への影響を考慮する必要があるが、甲殻類の内分泌系は脊椎動物とは大きく異なっており現在までの知見から類推することは困難である。本研究では、生態系においても重要な位置を占めているミジンコをモデルとしてその内分泌攪乱物質の評価と作用メカニズムを解明することを目的としている。この目的のために、ミジンコの化学物質に対する感受性を増殖試験を中心に解析すると同時に、ほとんど知見のなかったミジンコの遺伝子の解析を行った。さらに化学物質により発現が変動する遺伝子についての予備的な解析を行った。

## 9 内分泌攪乱化学物質に係る遺伝子技術を用いた試験法開発

岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター助教授 渡邊 肇

### 要旨

本事業は、内分泌攪乱物質の評価手法を開発する目的で平成 12 年度より行っており、主目的は従来の毒性試験法のみでは十分な評価ができない極微量の化学物質の影

響や微量長期摂取の影響を遺伝子発現の亢進や抑制を指標として評価しようとするものである。平成12年度は、乳癌細胞と精巣由来細胞を用いてトリブチルスズ(TBT)、4-オクチルフェノール(OP)、ノニルフェノール(NP)、フタル酸ジ-n-ブチル(DBP)、オクタクロロスチレン(OCS)、フタル酸ジシクロヘキシル(DCHP)、ベンゾフェノン(BP)の7化合物について研究した。平成13年度は、正常細胞に前記7化合物に加えてフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)、トリフェニルスズ(TPT)、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DOA)、フタル酸ブチルベンジル(BBP)、フタル酸ジエチル(DEP)の12化合物を被験物質とし試験を行った。また、エストロゲンをマウスに投与し、子宮肥大にみられる生物活性と遺伝子発現の相関についても解析した。平成14年度は、基本的にこれら12化合物について試験を行い、これまでのデータの再現性と信頼性を検証する。さらに、これらのデータについてデータベースを作成して公開することを目標とする。

*in vitro* 試験としては、ヒト乳癌細胞株 MCF-7 および T-47D、マウス精巣由来樹立細胞株でセルトリ細胞の TM4 およびライディッヒ細胞の TM3 を用いた。また、*in vivo* 試験としては、これら被験物質をマウスに投与した後、子宮からそれぞれ RNA を抽出して DNA チップの解析に供した。その結果、これまでの報告書の中で大きな発現変動がみられた遺伝子については、再現性があることが確認された。これらの遺伝子については、別の確認方法であるリアルタイム PCR を用いて信頼性について検証を行った。

また、子宮肥大試験は個体としての生物におけるエストロゲン作用を解析するための数少ない方法の一つであり、古くから用いられているだけでなく OECD による試験法にも取り入れられている。従って内分泌攪乱化学物質に係る遺伝子技術を用いた試験法の確立のためには、こうした従来の試験法を踏まえた上で開発する必要がある。そこで従来の子宮肥大試験と遺伝子技術を用いた新試験法とを関連付けを評価するために、子宮肥大試験法に準じた方法でエストロゲンまたは被験物質を投与し、DNA チップを用いて遺伝子発現の変化について解析した。その結果、化学物質の有するエストロゲン活性について子宮肥大試験法による評価と同等の評価を遺伝子発現レベルから評価することが可能になった。さらに、化学物質が遺伝子発現において固有の影響をおよぼすことも明らかになったことから、DNA チップを用いた遺伝子発現解析によって、化学物質の評価が可能になることが示唆された。

## 10 内分泌攪乱化学物質のアンタゴニスト活性の評価とその作用メカニズムに関する研究

国立環境研究所 化学環境研究老いき化学研究室主任研究員 鑑迫 典久

### 研究要旨

内分泌攪乱の作用メカニズムのなかで、レセプターに結合してホルモン作用を促進するアゴニスト活性の場合と、レセプターに結合するが、結果的にその働きを減少させるアンタゴニスト活性の場合がある。前者の研究は盛んに行われているが、後者についての試験法はあまり開発されていない。本研究では、昨年度に *in vitro* 試験として酵母 Two-Hybrid System による改良エストロゲンアッセイ (YMCE test) を用いてエストロゲン・アンタゴニスト作用試験をしたところ、試験した化学物質のうち、トリフェニルスズ (TPT)、及びトリブチルスズ (TBT) はアンタゴニスト作用を示した。さらに新たに考案したメダカを用いたアンタゴニスト作用検出試験により TPT 及び TBT が *in vivo* でも 17 $\beta$ -エストラジオール (E2) に対するアンタゴニスト活性を示すことが示唆された。

今年度はまず YMCE test 試験を用いて 37 化学物質の *in vitro* でのアンタゴニスト作用物質のスクリーニングを行った。その結果ペンタクロロフェノール、クロルデン、トキサフェンは代謝化なし (-S9 test) でアンタゴニスト作用を示し、ベンゾ(a)ピレンは代謝化すること (+S9 test) によりアンタゴニスト作用を示した。また、水酸化 PCB 類は塩素置換数が 4 個以上になるとほとんどが

酵母アッセイでアンタゴニスト活性を示し、4-ヒドロキシタモキシフェンより活性の強い異性体も存在した。

次に昨年度行ったYMCE testにおいて弱いエストロゲンアゴニストであるアルキルフェノール類(4-ニルフェノール(NP)、*p-t*-オクチルフェノール(OP)、及びペンチルフェノール(PP))が代謝化(+S9 test)することによりアンタゴニスト作用を示し、またそれらの化学物質は、すべてバインディングアッセイ試験で受容体結合能を示したことから、これらの物質について、メダカを用いた*in vivo*試験でアンタゴニスト活性を持つかどうかを調べた。さらにE2に比べると弱いエストロゲンアゴニストとして代表的なビスフェノールA (BPA)についても同様の*in vivo*試験を行った。その結果アルキルフェノールのすべての物質において、単独で存在する場合にはアゴニスト活性を示したが、E2との複合曝露においては、NPとPPはVtg誘導の抑制作用を示し、OPは加算的なVtg誘導作用のみを示した。BPAは単独では弱いVtg誘導作用を示したが、E2との複合曝露においては強いVtg誘導の促進効果が見られた。当初弱いエストロゲンアゴニストとE2と混在させることにより、レセプターに対して分子レベルで競争的に作用して、結果的にアンタゴニスト作用を示すのではないかと推理していたが、予想していた結果とは違い、物質によってさまざまな結果が得られることが判明した。特にNPとBPAは複合曝露によりまったく逆の作用を示したことから、これらの物質のエストロゲン作用メカニズムはまったく違ったものであることが示唆された。このことは新たな知見であり、さらに環境中、特に下水処理場などのようにE2と化学物質がともに存在する可能性がある場合には、E2作用の抑制や促進などさまざまな現象が起こることが予想された。

平成15年度

## 1 ラット生殖腺の器官培養系におけるトリブチルスズの影響の評価

日本獣医畜産大学獣医畜産学部獣医生理学

鈴木 勝士

### 研究要旨

トリブチルスズ(TBT)は、船底塗料として世界的に用いられ、その曝露によってイボニシなどの貝類にインボセックスを引き起こし、雌の産卵能力を障害すると言われている。作用機序に関してはアロマトラーゼの阻害が示唆されているが、哺乳動物の生殖器官形成に対して、どのような影響があるかは明らかにされていない。そこで、本実験は、ラットの生殖腺 - 中腎器官培養系を用いて TBT の直接的な影響を調査した。動物は、Wistar Imamichi ラット近交系を用い、交配翌日を胎齢 0.5 日として、胎齢 15.5 日で帝王切開し、胎仔を摘出した。摘出した胎仔を実体顕微鏡下で解剖し、中腎と生殖腺を摘出し、CMRL 培地のフィルター上のドロップの中で培養した。TBT(0.05、0.2、0.5、1 および 2  $\mu$ M)、テストステロン(T; 2  $\mu$ M)、およびアロマトラーゼの阻害剤(塩酸ファドロゾール、F; 0.1、1、および 10  $\mu$ M)をそれぞれ培地に加え、4日間培養しその影響を調べた。培養後、生殖腺 - 中腎組織を Bouin 液で固定し組織学的検索を行った。

TBT 曝露によって、雄の精巣発達に対しては明らかな影響は見られなかったが、用量依存性に中腎ウォルフ管の先端が著しく膨化した。雌ではウォルフ管が後期まで残存した。T、Fの曝露では、ウォルフ管の膨化はみられなかったが、雌では TBT と同様に後期までウォルフ管が残存していた。組織学的検索においても、雄においてはウォルフ管の膨化が確認され、雌では薬物処置した方の中腎でより頭側までウォルフ管が残存していた。以上の結果から、ラットの生殖腺 - 中腎培養系において、TBT がアロマトラーゼ阻害作用を示す可能性が示された。また、雄で見られたウォルフ管の膨化は、TBT に特異的な機序によって生じている可能性がある。

## 2 内分泌攪乱化学物質による雄性生殖器への影響の分子細胞生物学的メカニズムの解明

千葉大学大学院医学研究院環境生命医学

森 千里

### 研究要旨

(1)  $\beta$ -estradiol 3-benzoate ( $E_2B$ ) や flutamide (Flu) の単独投与では精子形成や造精サイクルの乱れなどが現れない低量であっても、これらを複合投与すると、その作用が見られるようになった。一方、化学物質の組み合わせによっては互いの作用を打ち消しあうこともわかった。今後さらにメカニズム研究を進めることにより、内分泌攪乱化学物質の影響を回避する方法の開発につながるものと考えられる。

(2)  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ),  $E_2B$ , bisphenol A (BPA), Flu, diethylstilbestrol (DES) 投与動物と不妊である 2 系統のノックアウトマウスおよび 1 系統の突然変異ラットとを微細形態的に比較した。 $E_2$  等を投与した動物は両ノックアウトマウスと同じような精子細胞の尖体と核およびセルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置に形態変化が見られた。アクチン結合蛋白の局在も同じようだった。突然変異ラットにこれら薬剤を投与しても表現型に変化はなかった。このことは  $E_2$  等の作用点と突然変異ラットの表現型をもたらす要因は同じであることを示唆している。

(3) GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子組み込みマウスを用いた移植実験から、DES の影響は生殖細胞そのものというよりも精子形成を支える体細胞系に現れると考えられた。

- ( 4 ) *in-house* cDNA マイクロアレイ解析により、新生仔マウスへの DES あるいは E<sub>2</sub> 投与により精巣上体において発現変化した遺伝子が 2、4、8 週齢のすべてにおいて検出された。これらの遺伝子は、DES あるいは E<sub>2</sub> の新生仔期における投与による精巣上体機能の低下に関与していることが示唆された。
- ( 5 ) *in vivo* の妊娠前からの慢性的低濃度イソフラボン摂取は、雄性新生仔の性発達に長期的な影響は及ぼさないが、一過的な影響がある可能性が示された。また、*in vitro* のプロテオーム解析から、植物エストロゲンを含めた化学物質の精巣細胞への影響について、遺伝子発現および遺伝子産物の網羅的解析により、化学物質の分類分けができることが示された。

### 3 . 内分泌攪乱化学物質の性腺ホルモン作用機構の解明に関する研究

名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学 那須 民江

#### 研究要旨

マウスライディッチ腫瘍細胞を用いて、種々の化学物質のテストステロン合成に与える影響の機序の解明を行った。

- ( 1 ) 低濃度領域でプロゲステロンやテストステロンの合成を抑制した化学物質はなかった。
- ( 2 ) 高濃度の化学物質曝露においては、すべての化学物質によりプロゲステロン濃度は上昇した。テストステロン濃度も上昇傾向を示したが、用いた最高濃度においては元のレベルに戻る場合が多かった。
- ( 3 ) ビスフェノール A を除いて、曝露濃度の上昇に伴い、プロゲステロンに対するテストステロンの濃度が低下した。即ち、高濃度領域ではプロゲステロンに至る過程よりもプロゲステロンからテストステロンに至る過程の合成抑制が強いことが予想された
- ( 4 ) ビスフェノール A は 0.033mM の曝露濃度でプロゲステロンに対するテストステロンの合成を誘導していた。
- ( 5 ) MEHP によるテストステロン合成には CYP11A、CYP17 および 3βHSD の遺伝子発現が、ビスフェノール A 曝露によるテストステロン合成の誘導には StAR と 17βHSD の遺伝子発現が関与していることが推測された。
- ( 6 ) コレステロールの *de novo* 合成に関わる遺伝子は化学物質投与の影響を受けやすいが、テストステロン濃度には大きな影響を与えないことが推測された。

### 4 . フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価

北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学 岸 玲子

#### 研究要旨

フタル酸エステル類は動物実験で、内分泌攪乱作用、生殖毒性、発達毒性、組織障害などが報告されている。大気、水、土壌など様々な環境中から検出されることから、人への影響が懸念される。しかし、多くの研究報告は、経口摂取による生体

影響であり、人におけるより自然な摂取経路である吸入曝露による影響についての報告は殆どないため、吸入曝露実験とそれに基づくリスク評価が必要である。本研究ではフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) 吸入曝露を行い、(1) 精巣毒性、(2) 次世代影響の検討を行った。

- (1) DEHP 吸入曝露により、コントロール群と曝露群で体重の差は見られなかったが、4週間曝露と8週間曝露で血漿テストステロン濃度も有意に高く、精巣重量は、4週間曝露では有意ではないが曝露群で重い傾向に、8週間曝露で有意に重かった。精巣におけるテストステロン合成酵素 mRNA の発現量や、血漿 LH に差は見られなかった。4週間曝露雄ラットの精巣組織像では、個体差が多く、明らかな差は見られなかったが、曝露群でも成熟増が観察された。8週間曝露ではコントロール群と曝露群で差は見られず、成熟した組織像が見られた。4週齢幼若ラットへの DEHP 吸入曝露により、内分泌への影響が示唆された。
- (2) 妊娠初期から後期までの DEHP 吸入曝露により、妊娠19日目での雄仔ラットの精巣組織テストステロン濃度は、有意ではないが、減少傾向に、精巣合成酵素 mRNA 発現量は、曝露濃度依存性に、有意に減少した。母には有意な影響は見られなかった。生後2, 7, 14日目の雄仔ラットの体重、AGD、AGD/体重には、成長に伴う変化が認められた。この変化が成長に伴う変化なのか、DEHP による変化なのか、今後、成長後の精巣、テストステロン濃度などを検討し、評価する予定である。

## 5. 核内受容体ファミリーを介する化学物質の生体影響に関する研究

大阪大学大学院薬学研究科生命情報環境科学 西川 淳一

### 研究要旨

近年のゲノムプロジェクトの進展によりヒトゲノムのほとんどの塩基配列が決定され、核内受容体ファミリーの遺伝子はヒトにおいては48種類存在することが明らかとなっている。核内受容体ファミリーの中で、これまで知られている内因性のリガンドは、ステロイドホルモンや脂溶性ビタミンなどの脂溶性で低分子の生理活性物質である。一方、内分泌攪乱化学物質と疑われている化学物質も、環境中に放出されやすく、残留性の高い脂溶性低分子物質であり、これらの物質が核内受容体に作用して、アゴニストやアンタゴニストとして働く可能性が考えられる。これまで、内分泌攪乱化学物質のターゲットとしてはエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体が注目されてきたが、その他の受容体も同様に内分泌攪乱化学物質の標的となる可能性が高い。本研究課題では、このような観点のもと、網羅的にヒト核内受容体ファミリーに対する内分泌攪乱化学物質の結合性を調べてきた。前年度までに、環境省が優先的にリスク評価に取り組む20物質について網羅的に核内受容体ファミリーに対する影響を調べたところ、ノニフェノールやオクチルフェノール等のアルキルフェノール類はエストロゲン受容体だけでなくビタミンA受容体にも強いアゴニスト活性を持つこと、トリブチルスズやトリフェニルスズ等の有機スズ化合物はレチノイドX受容体に内因性リガンドの9-cis retinoic acidと同等かそれより強いアゴニスト活性を示すことを発見した。有機スズ化合物は、海産性巻貝類の雌の雄性化(インボセックス)を引き起こすとして大きな社会問題となっていることから、今年度はこれらをさらに進め、海産性巻貝類からのレチノイドX受容体のクローニング、得られた受容体への有機スズ化合物の影響を中心に検討した。

## 6. ビスフェノールA膜受容体の分子生物学的検討と作用機序の解明に関する研究

大阪市立大学大学院医学研究科生体機能解析学 船江 良彦

### 研究要旨

化学物質による内分泌攪乱作用は、生殖器系だけでなく中枢神経系へも影響を及ぼしている事が憂慮されており、この影響は甲状腺ホルモン作用を攪乱する事により引き起こされる事が報告されている。脳機能の正常な発達に必須な甲状腺ホルモンの作用が化学物質によって攪乱される機序を解明する事は、行動異常や学習障害との関連性を明らかにする上で重要な課題である。我々はこれまでに、ビスフェノール A(BPA)の標的タンパク質としてプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)を単離・精製し、PDI に対するトリヨードサイロニン( $T_3$ )の結合が BPA をはじめとするフェノール基含有化合物によって阻害される事を明らかにしてきた。これらの化学物質は PDI を介して甲状腺ホルモン作用に影響を及ぼしている事が考えられた。

本年度は、PDI に対する結合性と甲状腺ホルモン作用への影響との関係を、ラット下垂体由来 GH3 細胞を用いて比較・検討した。GH3 細胞は甲状腺ホルモン応答性の細胞増殖及び成長ホルモン(GH)生産が誘導される事から、これらの化学物質による甲状腺ホルモン依存的な反応への影響を評価する上でよいモデルになりうると考えた。その結果、BPA、4 - オクチルフェノール、 $p$ -ノニフェノール、が GH3 細胞の細胞増殖促進性を、また 4 - オクチルフェノールは促進・阻害の両活性を示す事が明らかになった。一方、GH 産生への影響について検討したところ、BPA、4 - オクチルフェノール、ペンタクロロフェノールが GH 生産阻害性を示した。

これらの事から、PDI に対して  $T_3$  の結合阻害活性を示す化学物質は、 $T_3$  依存的な生体反応に影響をもたらしている事が明らかになった。従って、PDI に対する  $T_3$  の結合阻害活性を指標にスクリーニングする事により、様々な甲状腺ホルモン作用への影響を網羅でき得ると考えられた。

## 7. 甲殻類 (ミジンコ) におよぼす内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する研究

自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター 渡邊 肇

### 研究要旨

甲殻類は地球上の生物において大部分を占めているにもかかわらず、その知見は限られている。内分泌攪乱化学物質影響を生態系全体で捉えた場合、甲殻類への影響を考慮する必要があるが、甲殻類の内分泌系は脊椎動物とは大きく異なっており現在までの知見から類推することは困難である。本研究では、生態系においても重要な位置を占めているミジンコをモデルとしてその内分泌攪乱物質の評価と作用メカニズムを解明することを目的としている。この目的のために、ミジンコの化学物質に対する感受性を増殖試験を中心に解析すると同時に、ほとんど知見のなかったミジンコの遺伝子の解析を行った。

## 8. 内分泌攪乱化学物質問題に係る遺伝子技術を用いた試験法開発

自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター 渡邊 肇

### 研究要旨

本事業は、従来の毒性試験法のみでは十分な評価ができない極微量の化学物質の影響や微量長期摂取の影響を遺伝子発現の亢進や抑制を指標として評価する試験法の開発を目的としている。平成 12、13、14 年度において、乳癌細胞と精巣由来細胞と正常細胞に対して被験 12 化合物の影響を遺伝子発現レベルにおいて検証した。また、マウスの子宮肥大に及ぼすエストロゲンの遺伝子発現への影響を解析した。しかし、各

化学物質によって遺伝子発現変動する共通の遺伝子群を選択し、今後の試験法を開発していくためには、そのデータの解釈や技術向上に多くの時間と労力が必要であることが明らかとなった。平成 14 年度までの成果をもとにして、15 年度からはエストロゲン様作用を有する化学物質の試験法の構築に焦点をしばり検討を行なった。ヒト乳癌細胞 MCF7 を使用した試験法構築のために、17 $\beta$ -エストラジオール ( $E_2$ ) をモデル化合物として検討を行なった。その結果、化学物質への曝露時間は、従来の 6 時間より 12 時間が、より安定した試験法となることが明らかとなった。さらに、化学物質の処理濃度は細胞増殖の見られる濃度が適切と考えられるが、数段階の検討が望ましいことが明らかとなった。この試験条件に基づいて、エチニルエストラジオール、ジエチルstilbestrol、ビスフェノール A、フタル酸ベンジル-n-ブチル、ベンゾフェノン、4-オクチルフェノールについて試験を行い、これらの化学物質により発現変動する遺伝子は、 $E_2$  処理において変動する遺伝子と共通するものも存在したが、各化学物質に対して独自の反応を示す遺伝子群も存在した。これらの結果から、エストロゲン様化学物質を評価するために必要な遺伝子群を選択できた。さらに、DNAチップを用いた試験法により各化学物質を個別に評価できる可能性も示唆された。

#### 9. 無脊椎動物への内分泌攪乱化学物質作用に関するスクリーニング試験開発のための基礎的研究

独立行政法人国立環境研究所 化学環境研究領域生態化学研究室 鎌迫 典久

##### 研究要旨

小型甲殻類ミジンコの仔虫の性が幼若ホルモンによって左右されるという現象は、無脊椎動物への内分泌攪乱作用の検出系として有望視されている。本研究ではメカニズム解明へ向けての端緒として、水晶発振子マイクロバランスによる生体分子間相互作用定量装置を用いることによって、幼若ホルモンに特異的に結合する蛋白質の検出をミジンコ蛋白質粗抽出液について試みた。その結果、幼若ホルモン様作用物質に特異的に結合する蛋白質の存在が示された。

#### 10. 前鰓類(海産巻貝類)の性及び生殖に関わる内分泌機構の解明に関する研究

独立行政法人国立環境研究所 化学環境研究領域生態化学研究室 堀口 敏宏

##### 研究要旨

##### 研究要旨

本研究で明らかとなった内容を要約すると、以下のとおりである。

- (1) イボニシのレチノイド X 受容体 (RXR) ホモログに対してアゴニスト作用を有すると考えられるトリプルチルスズ (TBT) 及びトリフェニルスズ (TPT) と同様に、RXR の本来のリガンドである 9-cis-レチノイン酸 (RA) の *in vivo injection* によって、用量依存的にインポセックスが誘導され、その症状が進行することが観察された。
- (2) イボニシにおける RXR の遺伝子の部位別 (卵巣または精巣、消化腺、ペニスまたはペニス形成部位、神経節及び鰓) 発現量を調べた結果、雄及びインポセックスのペニスで顕著に高く、また雌のペニス形成部位で他の部位よりも高かった。またそれに次いで神経節において、生殖巣や消化腺及び鰓よりも高かった。
- (3) 雄イボニシのペニス及び輸精管に対して RXR 市販抗体を用いた免疫染色を施した結果、輸精管上皮、筋層、間質及び表皮細胞の核が染色された。またウェスタンブロッティングにより、この RXR 市販抗体はイボニシ RXR ホモログとクロスした。なお、イボニシ RXR ホモログに対する抗体を、作製中である。

- (4) イボニシを用いて、TPT injection による RXR 遺伝子発現の経時変化を観察した結果、雌の卵巣、神経節及び鰓で RXR 遺伝子発現量が 24 時間後に有意に増加し、また 72 時間後に有意に減少することが明らかとなった。またペニス形成部位では同様の傾向が観察された。これは RXR 遺伝子が TPT に応答した結果と推測される。
- (5) フィールドで採集したイボニシ(雄、雌及びインボセックス：小型個体を含む)及び室内実験(TBT 流水式連続曝露試験及び 9 - cis-RA の in vivo injection) で用いたイボニシのペニス及び輸精管に対し、顕微鏡による組織像並びに電顕による超微形態を精査して比較した結果、雄及びインボセックスのペニスと輸精管は組織学的には同等であった。また小型個体ではペニス様突起は明瞭であったが、筋層や輸精管上皮などの発達点で未熟さが観察された。
- (6) イボニシ雄個体からの生理活性ペプチドの探索に続いて、雌個体からの生理活性ペプチドの探索を試みた。今回の探索では、雄個体での探索の際に有効であった、抗神経ペプチド抗体を用いたドットプロットアッセイによるスクリーニングに加え、生理活性の有無に基づく生物検定によるスクリーニングも併用することにより、より多くの生理活性物質の単離を目指した。その結果、42 個の最終精製物が得られ、そのうちの 16 種についてアミノ酸配列が明らかとなった。また、そのうちの 7 種については、質量分析の結果がアミノ酸配列から予想される質量と一致した。
- (7) 上記のペプチドを合成し、順次、精製物と化合物の HPLC 上での挙動比較している。現在までに、APGWa、Gwa、FMRFa、APFSVWaa、GFRVNAAGRVAHGYa、VPSFGHRFVa、RSFFTHRFa、FLRFa、PMGMLRLa 及び FHPSAFFGSRa について、構造を確認できた。
- (8) 構造を確認できた、もしくは推定されたペプチドについて、概知ペプチドと全く同じ構造を持つもの (APGWa / Gwa、FMRFa、FLRFa)、概知ペプチドの一部のアミノ酸が置き換わった同族体ペプチド (GFRVNAAGRVAHGYa、WKSMSVWaa、VPSFGHRFVa、PMGMLRLa) 及び 軟体動物では新規のペプチド (APFSVWaa、FHPSAFFGSRa、SPPVWVPTPYHP (少なくとも 3 個のプロリンが水酸化：推定) 及び WIFTAGGPGFPRa (推定)) に分類された。また、その生理活性を検討中である。なお、APGWa に対する抗体を、現在、作製中である。
- (9) イボニシのアンドロゲン受容体 (AR) についてクローニングを継続しているが、現在までに有効な結果が得られていない。また、イボニシ卵巣の免疫染色で陽性染色が観察されたエストロゲン受容体 (ER) 市販抗体は、ウェスタンブロットティングの結果、イボニシ ER ホモログとクロスしなかった。なお、イボニシ ER ホモログに対する抗体を、現在、作製中である。
- (10) イボニシの神経中枢である神経節とペニス形成部位の器官培養系が確立された。今後、この器官培養系を用いて TBT や TPT、生理活性ペプチド、9 - cis-RA 及びテストステロンなどの曝露試験を実施し、それらの影響を解析する予定である。