

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 について

1. 背景

EXTEND2010では、これまでExTEND2005のもとで実施してきた、研究課題を公募し、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を基本的に踏襲している。

一方で、より行政施策への活用に適した研究成果を得ることができるよう、

- ・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
- ・必要に応じて「指定研究」の形で課題を設定する

等の見直しを行うとともに、その成果についてはセミナー等を通じて公表している。

2. 昨年度の実施状況（別紙1参照）

平成25年度には野生生物の生物学的知見研究2課題、化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究3課題、フィージビリティースタディー2課題及びその他の関連研究2課題の合計9課題を実施した（表1参照）。

研究課題の成果については、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開催した評価会（平成26年3月17日及び24日開催、非公開）において評価を行った。

3. 今年度の取組（別紙2参照）

（1）野生生物の生物学的知見研究、化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究及びその他の関連研究

平成25年度の研究成果を踏まえ、平成26年度は野生生物の生物学的知見研究として2課題、化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究として2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。

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：第2のエストロゲン受容体 ER β を標的とした内分泌かく乱メカニズムの解明

基盤2：妊馬由来エクイン類の汚染実態解明と生態影響評価

その他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

その他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

(2) フィージビリティースタディー研究

EXTEND2010は平成22年度から5年間程度の期間を念頭において、化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省としての対応の方向性を取りまとめたものであり、今年度からは、これまでの知見を踏まえた新たな枠組みを検討する必要があることから、新規の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. 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、EXTEND2010の今後の展開を踏まえ、両部会において検討する。

表1 平成25年度に実施した研究課題一覧

(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～H26
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～H26
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	岩野英知 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～H25
基盤2	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～H25
基盤3	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～H25
フィージビリティースタディー			
FS1	荒牧弘範 第一薬科大学	第2のエストロゲン受容体 ER β を標的とした内分泌かく乱メカニズムの解明	H25～
FS2	有菌幸司 熊本県立大学	妊馬由来エクイン類の汚染実態解明と生態影響評価	H25～
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検討部会
委員名簿

(敬称略)

氏名	所属・役職
門上希和夫	北九州市立大学 国際環境工学部 教授
川合眞一郎	甲子園大学 栄養学部 フードデザイン学科 特認教授
五箇公一	国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター 主席研究員
田辺信介 (座長)	愛媛大学 沿岸環境科学研究センター 化学汚染・毒性解析部門 特別荣誉教授
椿 宜高	京都大学 名誉教授

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 生命環境研究領域 教授
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長 教授
遠山千春	東京大学大学院 医学系研究科 附属疾患生命工学センター 健康・環境医工学部門 教授
永沼 章 (座長)	東北大学大学院 薬学研究科 教授
山田智也	住友化学株式会社 生物環境科学研究所 研究グループ 上席研究員
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 教授

平成 25 年度 EXTEND2010 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

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。

- ①ボラ・マハゼを調査対象生物とした内分泌かく乱化学物質の汚染実態調査 : これまでにデータ蓄積のある九州北部と東京湾沿岸域を中心に、1) 下水処理施設周辺地域、2) 十分な下水処理施設がなく合併式浄化槽などによる下水処理を行っている地域、3) 様々な家庭排水の処理方法が混在している地域、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。ボラを用いた調査では、これらの地域において捕獲した個体のビテロジェニン (VTG) タンパク質あるいはその遺伝子発現を測定し、化学物質による生理的異常の有無を明らかにするとともに、生殖腺の異常の有無を組織学的に調べた。また、マハゼを用いた調査では、マハゼを入れたケージを調査地点に垂下し、その後、VTGの血中濃度および遺伝子発現を解析した。また、生物採集地の底質および環境水を可能な限り採集し、エストロゲ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ゲ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。
- ②ムラサキイガイを用いた内分泌かく乱化学物質の影響評価 : ムラサキイガイにエストロゲン作用を持つ化学物質 (エストラジオール 17β : E2およびノニルフェノール : NP) を暴露させ、これらの生物蓄積と生物影響を生殖器官における生理異常を中心に明らかにすることをこころみた。本実験の実施は本種の成熟期である1-3月に行った。

研究結果のまとめと考察 :

- 1) 東京湾沿岸域および九州北部沿岸域において、環境水を採集し、エストロゲン様作用を持つ化学物質を測定したところ、各地においてエストロゲン様化学物質が検出された。特に、佃堀、横十間川、港区港南 (以上東京都)、戸町 (女神)、大黒 (以上長崎市)、博多港 (福岡市) においてそれらの値は高かった。検出される主な化学物質は NP であるが、エストロゲン作用強度に影響を及ぼす主な物質は E1 であった。エストロン E1 および E2 は下水処理施設の排水口にあたる長崎市戸町 (女神)、博多港、港区港南で採集した海水中に多く含まれていることから、し尿由来のエストロゲンである。これらの場所では糞便汚染指標となる COP の値も高かった。このことは、現在も下水処理施設が内分泌かく乱化学物質汚染の汚染源の一つであり、その主成分はヒト由来のエストロゲンであることを示している。しかし、下水道が普及していない地域で

もヒト由来のエストロジェンによる汚染は起きている。比較対象として今回調査を行った佐世保市の中原町では、比較的高いE1が検出され、その影響もあってエストロジェン作用強度も高かった。今回調査した佐世保市のこのエリアは、下水道が整備されておらず、単純浄化槽 100%の地域である。そのため、十分に処理されていない生活雑排水やし尿処理排水が河川に流入していると思われる。また、同様の状況にある佐世保市有福川においてケーシングによりマハゼを1週間垂下したところ VTG mRNA 発現が誘導された。この結果は、この河川水中に VTG 遺伝子を誘導するほどのエストロジェン様物質が含まれていることを示すものである。

昨年までの調査では、港区港南と博多港において採集したボラから、異常値 (1000ng/ml) を超える VTG 濃度を示す個体が見つっている。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。本年度の調査においても博多港をはじめ各地で捕獲したボラからは異常値が検出されているが、その値は年々減少する傾向にある。博多港では 10 年前の約 1/50 に、また長崎港の湾奥では、異常値が検出されない個体も多数確認されている。このことから、環境中のエストロジェン様物質が減少しつつあること考えられる。その一方で、一部の下水処理施設周辺では、未だ強度の汚染が続いている。長崎市戸町 (女神) において捕獲したボラでは、VTG 濃度はさほどではないものの、約 54% と極めて高い割合で精巣卵を持つ個体が出現した。これまでに我々が実施した調査において最も高い値である。VTG の誘導と精巣卵の誘導は異なるメカニズムによって引き起こされる。性分化期に低濃度であっても長期にわたってエストロジェン様化学物質に曝されると雌化はおこると考えられる。長崎市戸町 (女神) の下水処理施設から放出されている処理水は、性分化期のボラを雌化することができる程度のエストロジェン活性を有している可能性が高い。この環境水中でマハゼをケーシングすると VTG mRNA の発現が誘導された。この結果も、下水処理水には生物に影響を与える濃度のエストロジェンが含まれていることを示唆する。

本年度は、フィールド調査に加えてケーシングや環境水を用いた暴露試験を実施した。本研究によりこれらの試験法は、環境中のエストロジェン様化学物質の影響をとらえる方法として有効であることが分かった。野生生物は移動・回遊などを行うことから、捕獲された場所の影響だけを表現している訳ではない。ケーシングや環境水暴露試験も併用し、内分泌かく乱化学物質の影響評価を進めることは、汚染の実態を明らかにする上で有効である。

- 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。一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)。本研究では再度エストロジェン類やアルキルフェノール類の体内濃度を調べるとともに、脂肪重量との関係を調べた。その結果、体内における脂肪割合が高いほど化学物質の蓄積量は多くなると考えられたが、ムラサキイガイの脂肪割合に地域差・個体差は少なく、蓄積量に影響を与えるほどの差は認められなかった。しかし、成熟にともない脂肪重量が変化すると考えられることから、この点を考慮した研究が必要である。現在、成熟期のムラサキイガイを E2 および NP に暴露させ、蓄積量と生物影響の評価試験を実施している (成熟期が冬期から春期のため、現在実験中)。フィールド調査に先立ち、実験室内での体内への蓄積および代謝、生物影響について十分な検討を進める必要がある。

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、中山翔太

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した。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した。また、汚染下に起こり得るゲノム変異についても解析した。本研究で高次の陸棲哺乳類に対する内分泌かく乱化学物質のゲノムへの影響、およびゲノムの修飾により起こり得る内分泌かく乱に関する分子疫学的データが明らかとなる。

研究結果のまとめと考察：

■ラットの採集と汚染物質の分析

ラットを全国から採集し、今年度は100匹程度の採集と解剖を行った。蓄積する環境化学物質を分析したところ、多環芳香族、PPCPs、ネオニコチノイドなどの新興化学汚染物質については代謝の速さから肝臓における蓄積は認められなかった。一方で、有機塩素系化合物、金属については蓄積が認められ、特に鉛について高濃度の汚染地域が認められた。そこで、安定同位体分析を行ったところ、その暴露源が地域により異なる可能性が示された。

■化学物質汚染環境下でのゲノムの変化

殺鼠剤汚染環境下における野生ラットのゲノムの変化について解析を行った。殺鼠剤散布地域より野生ラットを採集し、殺鼠剤抵抗性試験を行ったところ、いくつかの地域に生息するラットで抵抗性が認められた。そこで、殺鼠剤の標的遺伝子となるビタミンKエポキシド還元酵素の遺伝子解析を行ったところ、ほとんどのラットでVKORC1に遺伝子変異が認められたが、一部のラットでは変異が認められなかった。次に殺鼠剤を代謝するシトクロムP450酵素系について解析を行ったところ、シトクロムP450全体の代謝活性が上昇していたため、電子を伝達するNADPHシトクロムP450還元酵素について変異を調べたが、抵抗性ラットにおいて遺伝子変異は認められなかった。国内のラットは2遺伝子以上の変化により環境汚染に適応している可能性が考えられた。

基盤的研究課題(基盤1)：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：岩野英知（代表研究者）、横田博、井上博紀

研究概要：ビスフェノールAおよびその関連物質は、体内で高率に代謝解毒(抱合)されながらも、次世代への影響が認められている。このような易代謝性化学物質がどのようなメカニズムで健康影響を引き起こすのか、本研究は2つの切り口から解き明かす。

研究結果のまとめと考察：

ビスフェノールAおよびその関連物質は、体内で高率に代謝解毒(抱合)されながらも、次世代への影響が認められている。このような易代謝性化学物質がどのようなメカニズムで健康影響を引き起こすのか、本研究は2つの切り口から解き明かすことを目指した。

I. 母体が化学物質にばく露を受けた後、化学物質が胎仔に到達するまでの体内動態の解明

II. 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

このテーマに対して成果の概要を記すと以下のようになる。

1. ビスフェノール類の生体内での代謝挙動はそれぞれ異なり、母親肝臓での代謝動態、胎盤通過の動態など異なることが明らかにできた。
2. 胎仔腸においては、脱抱合活性が高いことが明らかとなった。
3. 妊娠期の母親の摂食によっては、ビスフェノールAの影響が大きくなることが示唆された。

以下、各項目別に3年間に明らかにできたデータの詳細を示すとともに最後に今後の課題を整理する。

I. 母体が化学物質にばく露を受けた後、化学物質が胎仔に到達するまでの体内動態の解明

成果

1) 母体内でのビスフェノール類の代謝動態 (H23-24 年度報告)

① ビスフェノール類の構造と代謝について

ビスフェノール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やすい。一方で高分子のブリッジ構造を有する化合物は、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反応は遅くなる。

② ビスフェノール類の肝臓での代謝排泄について

妊娠時には、胆汁側への抱合体排泄量が減少し、静脈側への排泄量が多くなる。結果的に体循環への排泄量が多くなり、卵巣や子宮などの標的臓器が抱合体へ暴露される機会が増す。よって妊娠期のばく露は次世代個体へのリスクを高めることが示唆された。

2) 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 (H24-25 年度報告)

これまで我々は、ビスフェノール A グルクロン酸抱合体がわずかではあるが胎盤を通過し、胎仔側に移送されることを報告してきた。本研究では、ビスフェノール F の代謝物も胎仔側に移送される可能性があることが示された。ビスフェノール F は、グルクロン酸/硫酸抱合体として代謝され、ビスフェノール A より胎盤を通過しやすい傾向があることが分かった (H24-25 年度報告)。ビスフェノール F グルクロン酸/硫酸抱合体の輸送には、MRP が関与していることが明らかとなった (H25 年度報告)。

3) 胎仔腸での脱抱合活性について (H23-25 年度報告)

胎仔腸では、ビスフェノール A グルクロン酸抱合体を腸粘膜上皮に発現している β -グルクロニダーゼにより脱抱合して吸収していることが示唆された (H25 年度報告)。ビスフェノール A の抱合活性より脱抱合活性の方が高いことが示唆された (H23-24 年度報告)。

4) 主要代謝物の精製と標準物質ライブラリーの作製 (H24 年度報告)

ビスフェノール類の主要代謝物の標準品を肝臓組織灌流と HPLC 精製により作製した。作製した物質は、ビスフェノール A グルクロン酸抱合体、ビスフェノール F グルクロン酸/硫酸抱合体、ビスフェノール F グルクロン酸抱合体、ビスフェノール AF グルクロン酸抱合体を分離・精製した。

II. 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

これまで報告された論文では、ビスフェノール A の作用点の一つとして葉酸代謝のかく乱、メチル化制御のかく乱などが考えられており、我々の実験でもそれを支持するデータを得ていた。また BPA は、次世代に行動異常を引き起こすことが報告されているが、脳内でのどのような変化を引き起こしているのか明らかではない。本研究では、そのメカニズムを検証するため、代謝物の網羅的解析であるメタボロミクス解析を行った (H23-24 年度報告)。通常餌においては多量の葉酸が含まれている (標準餌: 260ug/100g)。厚生労働省の指針では、妊娠時には 0.4mg/day の葉酸を取る必要があるとしている。これを基に体重あたりにして比較すると、標準餌を摂取しているラットでは、人の 50 倍以上の葉酸を取っている事になる。そこでなるべく少なくした低葉酸餌を作製し、BPA を投与する事で、影響が出やすくなるのではないかと考え、実験を計画した。実験は、葉酸代謝系代謝物のメタボローム解析、さらに脳内の遺伝子発現影響をマイクロアレイ解析にて網羅的に調べた (H23-25 年度報告)。

1) ビスフェノール A が葉酸代謝系に及ぼす影響に関する研究～メタボローム解析～

ビスフェノール A により葉酸代謝系のかく乱が生じると予想した実験では、数回のメタボロミクス解析において代謝中間体の量的変化は、一定の明確な影響が見られなかった。核酸代謝に若干の影響が出やすい傾向にあり、低葉酸餌給餌においても通常餌におけるビスフェノール A ばく露と同様な傾向が見られたため、今後さらなる精査が必要である。

2) 遺伝子発現解析からのビスフェノール A の影響解析

① 葉酸代謝系への影響

ホルモン調節の中枢である視床を含む間脳において、ビスフェノール A の投与により妊娠後期の胎仔の遺伝子発現への影響があるのかをマイクロアレイ解析にて精査した。通常餌給餌においては、大きな影響は見られなかった (H24 年度報告)。

② 低葉酸餌摂取時のビスフェノール A の影響

低葉酸餌摂取時にビスフェノール A 暴露の影響がいくつかの遺伝子発現を乱すことが分かった。標準餌では大きな影響は見られなかった。また、メスに影響が見られやすい事が明らかとなった。

まとめ

総括して、ラットにおいてビスフェノール A 類はいずれもグルクロン酸抱合またはグルクロン酸/硫酸抱合体へと容易に代謝されることが予想された。この代謝能は文献的に、ほ乳類で不変であり、ヒトやマウスにおいても類似する。これらの抱合体は概して低活性で水溶性が高く、尿または糞中にすみやかに排泄されるため、抱合活性はビスフェノール A 類へのばく露によって生ずる健康影響と直接的に関係する。すなわち、抱合活性の乏しい新生児では、ビスフェノール A 類が体内に侵入することによって、標的臓器がこれら化学物質にばく露される可能性が考えられる。また、妊娠時には、全身循環に流入した抱合体が経胎盤性に胎仔側に移行し、また脱抱合されることが予想できるため、妊娠時の動物がこれらの化学物質にばく露されることは、ハイリスクである。これに対し、高い抱合活性を有する成人、成獣ではビスフェノール A 類に対する代謝的バリア機構が、これらの化学物質の侵入を阻止できるため、故に環境中から経口的侵襲を受け得るレベルでのばく露では、健康影響を生ずる可能性は低いと推察できる。

これまでビスフェノール A の毒性については、エストロゲン様活性から神経毒性まで、さまざまな報告が行われてきた。その中においても同様の実験に関わらず、研究者間におけるデータの違いがあることがあり、精査されないままできている点もある。その理由には、ビスフェノール A の影響は非常に小さいこと、さらに今回の研究で明らかになったように餌に含まれる成分の差で影響が異なってくることなどが考えられる。本研究にて得られた低葉酸餌におけるビスフェノール A の影響は、人の葉酸摂取量を考えても十分に考慮しなければならない可能性がある。さらに人の胎盤構造はラットやマウスより細胞層が少ないため、胎仔への薬物の移行はしやすい可能性もある。胎仔期の環境、化学物質の影響は、その後の発達、また成人病発症に深く関わっているとされる DOHaD (Developmental Origine of Health and Disease) 仮説が重要視されてきている。つまり胎仔期に一度影響を受けてしまうと一生それを背負うことになる。今後もさらなる研究により、胎仔期の化学物質影響のメカニズムを深く解明していく必要がある。

基盤的研究課題(基盤2): 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、花田秀樹、鈴木賢一

研究概要：本年度は最終年度であり、以下の項目について研究を行った。

1) レポータートランスジェニックツメガエルを用いた変態アッセイ：申請者らが樹立した甲状腺ホルモン(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*)幼生を用い、THかく乱作用が疑われる化学物質をレポーター活性(EGFP蛍光)により個体レベルで簡便かつ定量的に評価するプロトコルを開発した。アゴニストやアンタゴニストの評価に最適なプロトコルの条件(暴露期間、対照コントロールや処理個体数等)を整備した。まず、鰓及び後肢をエンドポイントとして、T3、T4、及びその誘導体であるTRIACを用いて、THアゴニスト活性の評価をEGFP活性にて行い、その有用性を示すことができた。また、抗不整脈薬アミオダロンや臭素系難燃剤であるヘキサブロモシクロドデカン(HBCD)の変態抑制効果(THアンタゴニスト活性)も後肢をエンドポイントとしてEGFP活性にて行い、評価することができた。

2) ネットイツメガエルを用いた変態アッセイ：ネットイツメガエル(*X. (Silurana) tropicalis*)を用いた変態アッセイについて、先ず抗TH作用を持つアミオダロンを評価した。幼生への暴露実験により、アミオダロンは自然変態及びT3誘導変態を抑制する活性(アンタゴニスト活性)を持つことを示した。また、暴露した個体の肝臓を用いて質量分析により解析した結果、化学物質の肝蓄積能や代謝能が幼生及び成体で異なる事実を明らかにした。さらに、甲状腺濾胞細胞の組織学的解析を行い、評価を行った。HBCDに関しては、自然変態及びT3誘導変態を阻害するデータを得ることができた。

本申請課題から得られた結果が、今後、ツメガエルを使った化学物質のTHかく乱作用を評価する上で、重要な知見となることを期待している。

研究結果のまとめと考察：

- ・ 種々のレポータートランスジェニック・アフリカツメガエルを用いて、TH作用化学物質の評価系の検討を行った。
- ・ ネットイツメガエルを用いたTH作用化学物質の評価条件の検討も行った。
- ・ ツメガエル幼生と成体において、肝代謝能の違いが明らかになった。
- ・ ツメガエル変態において、HBCDには変態(後肢発達)抑制作用があることが判明した。

本研究で得られた結果は、両生類を用いたTHかく乱作用の評価をする上で重要な知見となることが期待される。

基盤的研究課題(基盤3): 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: 今年度も、愛媛県、京都府、大阪府の下水処理場中に含まれる天然および合成糖質コルチコイド (Glucocorticoids: GCs) のモニタリングを実施した。愛媛県内でのGCsの通年モニタリングの結果から、検出されるGCsの濃度には明瞭な季節変動が存在することが明らかとなった。具体的には、プロピオン酸クロベタゾールが春季に、吉草酸ベタメタゾンが秋季にそれぞれ比較的高濃度で検出され、夏季にはデキサメタゾンの検出頻度が低下することが示された。しかし、バイオアッセイで検出したGC受容体 (GR) アゴニスト活性には、機器分析でみられたような明瞭な季節変動はなく、1月にやや活性値が上昇する程度であった。また、下水処理場の放流水の抽出液を、逆相カラムを用いて分画したところ、主要なGRアゴニスト活性はプロピオン酸クロベタゾールが溶出する画分で検出され、包括活性に対する同化合物の寄与が大きいことが示された。一方で、本試験の分析対象GCs以外の化合物に起因すると予想される活性も検出され、未同定のGRアゴニストの存在が示唆された。さらに、細菌を感染させたコイに対して1 µg/Lのプロピオン酸クロベタゾールを暴露したところ、細菌感染によって生じる斃死や白血球数の増加などの応答が顕著に抑制され、同濃度のプロピオン酸クロベタゾールはコイに対して免疫抑制を引き起こさず、むしろ細菌感染によって生じる過剰な炎症反応を抑制し、斃死率を下げたと考えられた。本試験と既報の研究結果から、我が国における医薬品由来のGCsによる生態リスクは低いと考えられた。

研究結果のまとめと考察: 松山市内の下水処理場で実施した通年モニタリングの結果、検出されるGCの種類および濃度には季節変動があることが明らかとなった。春季にはプロピオン酸クロベタゾールが、秋季には吉草酸ベタメタゾンが比較的高濃度で検出され、夏季にはデキサメタゾン/ベタメタゾンの検出頻度が低くなった。この季節変動の一因として、水温に依存した下水処理場での分解率の変化が考えられた。実際、水温が20°C以下になる時にプロピオン酸クロベタゾールや吉草酸ベタメタゾンが高濃度で検出されている。その一方で、コルチゾルやプレドニゾロンの濃度は温度に依存した変動を示さなかった。このことは、分析対象GCsの季節変動は水温に依存した分解率の変動に因るものと言うよりも、むしろ医薬品としての使用量の季節間での違いを反映しているのではないかと推察された。月別の各医薬品の出荷量等に関する情報が得られていないため、現時点ではこの仮説を立証することはできないが、処理前の流入下水中のGC濃度を分析することで、下水中GC濃度の季節変動の要因を明らかにすることができると考えている。

京都府および大阪府でのモニタリングの結果、今年度の調査で検出されたGCsの濃度は昨年度の

調査結果よりやや高い傾向にあるものの、濃度範囲は概ね同レベルであった。大阪府にて3月と11月に実施した調査結果を比較すると、吉草酸ベタメタゾンの濃度が11月において比較的高いことが明らかになった。この結果は、松山市内での通年モニタリングの結果を類似しており、おそらく医薬品の使用量を反映するものと考えられた。

機器分析の結果とバイオアッセイの結果を比較すると、機器分析でみられたGCs濃度の明瞭な季節変動は、バイオアッセイではほとんどみられない結果であった。この一因として、季節間でその濃度が大きく変動した吉草酸ベタメタゾンのGRアゴニストとしての活性は低く、同化合物の濃度の変化は検出されるGRアゴニスト活性にはほとんど影響しなかったことが考えられた。

下水処理場放流水中のGRアゴニストのプロファイリングから、処理水中のGRアゴニスト活性に最も寄与する化合物はプロピオン酸クロベタゾールであると推定された。今後、同化合物が含まれると推定される画分を分析し、プロピオン酸クロベタゾールが検出されるかを検証する。また、松山市と大阪府での調査で共通してGRアゴニスト活性が検出された画分が明らかとなったため、今後それらの画分に含まれるアゴニストを同定する予定である。

GCの生物影響を評価するために、GCが有するとされている免疫抑制作用に着目した。免疫系は病原体の感染によって著しく誘導され、その役割を發揮する。そのため、我々は病原体の感染による免疫系の誘導に対して、化学物質がどのように影響するのかを評価したいと考えた。そこで、実験対象魚種とそれに感染する病原体の組み合わせを検討した。当初、実験モデル生物であるゼブラフィッシュを対象魚種とするよう病原体の選択を行ったが、我々が所有する病原体ウイルスではゼブラフィッシュに感染症を誘発するに至らず、本研究期間での同種の使用を断念した。その代替として、エロモナス症を発症しているコイより単離・培養したエロモナス菌を用いることで、人為的にコイに感染症を発症させることにした。コイを用いる利点として、免疫系の評価に欠かすことのできない血液が十分に採取できることと、主要な免疫担当器官である頭腎が体腎と分かれて存在するため、頭腎における免疫系の評価が可能であることの二点が挙げられる。したがって、本研究では実験対象魚種としてコイを、病原体としてエロモナス菌を選択した。

エロモナス菌を感染させたコイでは斃死や頭腎における白血球数の増加など、明らかな病原体による影響が観察された。しかしながら、エロモナス菌に感染させたコイに1 µg/Lのプロピオン酸クロベタゾールを暴露したところ、それらの影響は観察されなくなった。また、1 µg/Lのプロピオン酸クロベタゾールの暴露のみを行った個体ではすべてのエンドポイントにおいて対照区と違いは無かった。これらのことから、1 µg/L程度のGCsであれば、病原体の感染によって生じる炎症反応を抑制する抗炎症薬として作用し、感染症による影響を軽減するものと推察され、免疫毒性を生じさせるような過剰な免疫抑制を引き起こさないと考えられた。

本研究で対象としたGCsの環境中への流入は、それらが医薬品として使用されることを考慮する

と下水処理場の放流水が最大のソースであると考えられる。放流水中における各 GC の濃度は高くても数 ng/L～十数 ng/L 程度であった。またそれらの包括活性としての GR アゴニスト活性は、最大で 140 ng Dex-EQ/L であった。活性値で比較するとその 10 倍以上となる 1 µg/L のプロピオン酸クロベタゾールまたは酪酸クロベタゾンの暴露は、コイの成長や末梢血中の血球数に影響を及ぼさなかった (Nakayama et al., in press)。また、1 µg/L のプロピオン酸クロベタゾールはコイの免疫機能に負の影響を及ぼすことはなく、むしろ病原体の感染によって生じる過剰な炎症反応を抑制し、斃死率を下げる効果をもたらした。これ以外の GC 暴露による魚類への影響として、デキサメタゾンによるファットヘッドミノーの再生産への影響を評価した研究で、500 µg/L の濃度ではデキサメタゾンは再生産を低下させるが、50 µg/L では影響しないことが明らかにされている (LaLone et al., 2012)。以上のことを考慮すると、我が国においては、医薬品由来の GCs による生態影響のリスクは低いと結論づけられる。ただし、医薬品以外の化合物で GC 様作用を有するものの有無については検討していないため、これについては別途検討する必要がある。

フィージビリティースタディー(FS1):第2のエストロゲン受容体 ERβ を標的とした内分泌かく乱メカニズムの解明

研究者：第一薬科大学：荒牧弘範(代表研究者)、池田恵理子、広島国際大学：瀧口益史、竹田修三、北陸大学：渡辺和人、九州大学：新藤充

研究概要：エストロゲン受容体α(ERα)に直接作用しないメカニズムで内分泌かく乱作用を示す天然物及び環境化学物質が存在する。我々は、大麻主成分のΔ⁹-テトラヒドロカンナビノール(Δ⁹-THC)がERα及びERβのリガンドとして作用せず、ERβの発現増加を介してエストロゲン(女性ホルモン)/ERαシグナルを抑制することを見出した。本概念はこれまでになく、極めて独創性が高い研究といえるが、この現象がΔ⁹-THC特異的に生起するのか、さらにはERβの発現誘導メカニズム及びほかの環境化学物質がERβの発現に与える影響は不明であった。本研究は3カ年の計画(H25~27年度)で実施され、最終目標はERβ発現誘導の分子メカニズムを解明することであり、得られた成果を基盤としてERβを分子標的とした内分泌かく乱の評価系の確立に資することを旨とする。

本年度(H25年度)は解析対象化合物を約100種類まで増やし、ERβの誘導能を示す化合物の探索を網羅的に行い、構造特性などの情報を得ることを主たる目的とした。

研究結果のまとめと考察：本年度(H25)、当初の研究計画通り 111 種類の環境化学物質が ERα陽性細胞内で休眠状態にある ERβの再発現に与える影響を調査した結果、2 倍以上の ERβの発現誘導を示したものは 29 種類であった。我々は環境化学物質が「ERαに対して、そのリガンドとしてではなく ERβの発現誘導を来すことで ERα機能を抑制する」という可能性を考えている。Bisphenol AF は、フェノール性水酸基の *o*-位及び *m*-位に置換基がなく、ERαの完全アゴニストであることが報告されている(*Environ. Health. Perspect.*, **118**: 1267–1272, 2010)。このことを我々の系に適応して考えると、ERαの完全アゴニストである E2 と bisphenol AF が共存すると ERα活性は増加することが予想される。しかし、結果はこの予想を支持せず、却って ERαの活性(1.0)が抑制された(0.19)。従って、環境化学物質の中には ERαの機能を ERβの発現誘導を介して抑制し得るものの存在が示唆される。臭素系難燃剤の tetrabromobisphenol A (TBBPA)は、ERβの発現誘導を示さないにも関わらず、ERαの活性(1.0)が抑制された(0.55)。本化合物は、フェノール性水酸基の *o*-位に原子半径の大きい Br が 2 つ結合しており、ERαには作用できない、あるいは作用し難いことが考えられる(*Toxicol. Sci.*, **84**: 49–62, 2005; *Toxicol. Sci.*, **84**: 249–259, 2005)。詳細な議論は、ERαに対する結合アッセイや *in silico* 解析の結果を待たなければならないが、既存の ERαのリガンド(E2 や bisphenol A など)との構造類似性はない。さらに、臭素系難燃剤の影響は複雑であり、昨年 POPs 条約にて規制された HBCD は ERβを誘導したにも関わらず ERα活性を促進した唯一の化合物であった。その他の代表的な臭素系難燃剤 2,4,6-tribromophenol(TBP)、TBBPA、並びに 2,2',4,4',5,6'-hexabromodiphenylether (PBDE-154)についても併せて結果を示した。これらの不一致性については不明な点が多いが、次年度以降も解析を継続

していく予定である。また、HBCD にはいくつかの異性体が存在することから、各異性体に注目した調査も実施する。

環境中には無数の化合物が存在し、化合物の数は急速に増加している。また、化合物によってはごく微量で内分泌かく乱作用を示す可能性がある。本研究で用いたMCF-7細胞系は酵母two-hybrid (Y2H)系よりも高感度であるが、膨大な数の環境化学物質を網羅的に解析するにはさらに高感度なハイスループット測定(HTS)系の確立が必要と考えられる。本研究では、次年度研究も視野に入れ、ERβの転写制御領域でかつCpGアイランド(=DNAメチル化部位)を有する部分(-1887/+227)をpGL4.18(luc2P/Neo) vector (Promega)にクローニングし、MCF-7細胞に遺伝子導入することで安定発現株の単離・構築を行っている。pGL4.18/ERβ plasmidコンストラクトの作製は既に終えている。

本研究の最終到達目標は「第2のエストロゲン受容体ERβを標的とした内分泌かく乱メカニズムの解明」である。この解明には、分子生物学的研究もさながら、H25年度研究で候補に挙げられた化合物による“生体影響”を明らかにしなければならない。我々は、 Δ^9 -THCをはじめとする顕著なERβ誘導を呈した化合物が、同時にmatrix metalloproteinase-1 (MMP-1)の発現増加を来していることを見出している。ERβとMMP-1の共発現は、子宮内膜症の発症・進展に密接に関与していることが知られている。子宮内膜にはERαとERβが共発現しているが、病態の進行に伴ってERβの発現が優勢になることが報告されている(Biol. Reprod., 77: 681-687, 2007)。この発現バランスの変動メカニズムは不明であるが、環境化学物質の恒常的な曝露によって、バランスの破綻が惹起されている可能性は否定できない。未だ仮説の域を出ないが、 Δ^9 -THCに関しては、子宮内膜症の発症との関連性が示唆されている。研究の詳細はH26年度研究申請書に記載しているが、H26年度以降の研究では子宮内膜症の発症との関連性を含めた生体影響も考慮した*in vivo*研究を実施する計画である。

フィージビリティースタディー(FS 2)：妊馬由来エクイン類の汚染実態解明と生態影響評価

研究者：熊本県立大学：有菌幸司(代表研究者)、石橋康弘、尚絅大学短期大学：石橋弘志、株式会社
エコジェノミクス：内田雅也、有明工業高等専門学校：富永伸明

研究概要：更年期障害のホルモン補充用の医薬品として使用され、妊馬の尿中に含まれるエクインエストロゲン(エクイリン・エクイレニン及びそれらの代謝物)を対象として、GC/MS及びQ-TOF LC/MSによる分析法の確立を試みた。両分析法によるエクインエストロゲンの環境水への適用を試みたところ、いくつかの下水処理場関連試料でequilinあるいはequileninのピークが確認され、我が国の水環境中におけるエクインエストロゲンの存在が確認できた。メダカエストロゲン受容体 α を用いた*in silico*及び*in vitro*実験系により、エクインエストロゲンのエストロゲン様作用が示唆された。また、雄メダカへの暴露試験(17 β -estradiol, equilinあるいはequilenin)を行い、DNAマイクロアレイで解析したところ、17 β -estradiol及びequilin暴露では雄肝臓中エストロゲン応答遺伝子群の発現が増加し、これらの*in vivo*におけるエストロゲン様作用が示唆された。また、equilenin暴露ではガン化に関連する遺伝子群の発現変動がみられた。

研究結果のまとめと考察：本年度は、選択性の高い負イオン化学イオン化(NCI)測定が可能なPFB誘導体化とTMS誘導体化を併用したGC/MSによりエクインエストロゲンの分析法の確立を試みた。本法を環境水へ適用したところ、いくつかの試料において定量はできなかったもののエクインエストロゲンの存在が確認された。今後、多様な環境試料分析のための前処理法などの検討を行う。また、本年度実施できなかった牧場直下や放牧地域の環境水などのフィールドや病院排水など、さまざまな地域・種類の環境水を測定対象とすることで、エクインエストロゲン汚染の実態を明らかにしていきたい。本年度は抱合体の測定は行わなかったため、次年度以降はこれらの分析法も追加すべきであると考えている。一方、本年度は、生態影響評価の予備検討として、いくつかの手法によりエクインエストロゲンのエストロゲン様作用を評価した。*In silico*ドッキングシミュレーション解析では、エクインエストロゲンはmER α と相互作用(代謝物 > 親化合物)し、メダカ及びヒトER α において相互作用に明瞭な種間差はないことが示唆された。*In vitro*酵母two-hybridアッセイでは、hER α に対するエクインエストロゲンのエストロゲン様作用が明らかとなり、*in silico*解析の結果と併せて考えると、mER α に対するエストロゲン様作用が示唆された。今後、mER α の導入された酵母株を用いたtwo-hybridアッセイにより明らかにする必要がある。メダカを用いた*in vivo* DNAマイクロアレイ解析では、今回E2、Eq、Eqnの3物質しか実施できなかったが、E2の11遺伝子に対し、Eqで5遺伝子、Eqnで35遺伝子の発現変動遺伝子を検出することができた。これら遺伝子の中でエストロゲン様作用に関与する遺伝子に着目したところ、EqではE2よりも発現変動幅が小さいもののコリオゲニンやビテロゲニンのエストロゲン応答遺伝子の発現量の増加が確認され、Eq

のエストロゲン様作用が示唆された。Eqn ではこれら遺伝子の顕著な発現変動は確認できなかった。しかし、Eqn では med16、RAB15 及び RAB32 などガン化に関わる遺伝子の発現変動が確認され、Eqn 暴露はメダカへのガン化の可能性を示唆していると考えられたが今後も詳細な検討が必要である。今後、今回実施できなかったエクインエストロゲンに対しマイクロアレイ解析を実施し、発現変動がみられた遺伝子群について定量的リアルタイム PCR により測定を行う必要がある。また、暴露試験を成魚または胚に実施し、再生産や発生への影響を調べるとともに、それらの遺伝子発現解析を実施することで Eq や Eqn のエストロゲン作用やその作用機序について詳細に検討を行っていく予定である。また、環境リスクを考える上で、環境中で検出される濃度を基に暴露試験を実施し、環境影響を調べる必要もある。

その他の研究課題(その他 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)、磯部友彦、野見山桂

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系難燃剤 (BFRs) のポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) やヘキサブプ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。これらの物質は、ヒトや生態系における曝露リスクが懸念されているが、最近その生体内変化物も注視されはじめた。水酸化ポリ塩化ビフェニル (OH-PCBs) や水酸化ポリ臭素化ジフェニルエーテル (OH-PBDEs) など PCBs や PBDEs の生体内変化物 (代謝物) は、甲状腺ホルモン輸送タンパク (トランスサイレチン：TTR) と結合し、甲状腺ホルモン (T_3 、 T_4) の恒常性をかく乱することが指摘されている。甲状腺ホルモンは脳神経系の発達に必須であり、*in vitro* 試験では極低濃度の OH-PCBs でもマウス小脳神経細胞 (プルキンエ細胞) の発達や脳内の遺伝子発現に影響を及ぼすことが知られている。これまでにラット胎仔やホッキョクグマの脳から OH-PCBs が検出されており、水酸化代謝物による中枢神経系への影響が懸念される。

しかし、これら物質による海洋生態系の化学汚染に関する情報は不足しており、とくに国内の沿岸性高次生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。そこで本研究では、瀬戸内海、大村湾、有明海に分布する沿岸性小型鯨類スナメリの体内に残留する OCs (PCBs・DDTs・CHLs・HCB・HCHs)、BFRs (PBDEs・HBCDs) および代謝物の OH-PCBs, OH-PBDEs を分析し、汚染の実態、蓄積特性、脳移行の態様解明とリスク評価を試みた。

分析の結果、供試したすべての地域のスナメリ脂皮試料から有機ハロゲン化合物が検出され、その広域汚染と遍在化が確認された。オスの検体を用いて、脂皮中有機ハロゲン化合物濃度の経年変化 (2000 年—2011 年) を解析したところ、PCBs と HBCDs の濃度低減はきわめて遅いことが判明し、PCBs 含有電気機器廃棄物の分解処理の遅れや、HBCDs の継続的な使用が原因と推察された。また、代謝物の OH-PCBs と OH-PBDEs も分析したすべての血液および脳組織から検出され、その脳移行と残留が明らかとなった。さらに脳の部位別分析を試みたところ、これら代謝物は脳下垂体に集積する傾向が認められた。脳下垂体は甲状腺ホルモンを含む内分泌系調節の中核であるため、水酸化代謝物の特異的な移行・残留がもたらす内分泌攪乱作用が懸念される。本研究により得られた成果は、有機ハロゲン化合物および水酸化代謝物の曝露リスクを予測・軽減するための有用な基礎情報と考えられる。

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）およびヘキサブロモシクロドデカン（HBCDs）に注目し、海洋および陸域生態系の高次動物をモデル生物として、汚染実態・曝露量調査・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 および ExTEND2010 の分担課題として開始・遂行した。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の保存試料を活用して汚染の過去を復元し、BFRs の汚染が近年急速にすすんだことを指摘した。こうした海洋汚染の研究成果はその起源である陸域汚染の実態解明研究へと発展し、カワウを生物指標とした陸域汚染の実態解明調査を平成 21 年度より開始して、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。こうした曝露調査の成果から、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、ヒトの生活圏で曝露があること、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、その分析結果からわが国沿岸域の汚染が広域化していること、また PCBs や HBCDs は汚染の低減がきわめて遅いことを明らかにした。さらに、PCBs および PBDEs の生体内変化物（代謝物）がスナメリの血液や脳に残留していること、また脳下垂体に集積していることを発見し、甲状腺ホルモン介在の脳神経系への影響が危惧されることを指摘した。水酸化代謝物の生体汚染は、内分泌攪乱の新たな曝露リスクとして懸念されることから、包括的・体系的な汚染モニタリングを展開する必要がある。したがって、平成 26 年度は、陸棲の高等動物について曝露モニタリングを展開し、本年度得られた海棲哺乳動物の知見を参照しながら比較生物学的な解析を試みたいと考えている。

その他の研究課題(その他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、荻野由紀子

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25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を確立するとともに、ミジンコ類における幼若ホルモン受容体を甲殻類で初めて同定した。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」への糸口となるものであり、この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進めている。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を明らかにするためにも、

環境要因のみでオスを誘導するメカニズムの解明が必須である。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の解明により深くせまることが可能となる。さらに、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が、**JHRE** の配列を明らかにし、レポーター遺伝子アッセイ系の確立を行わなくてはならない。この取り組みを行っているが、**JHRE** の配列は未だ解明されていない。**TG211** を改良することにより、産仔後 24 時間の幼若個体ではなく成体のメスを用いることにより、化学物質曝露後の 2 回目の産仔の性比を観察することで、化学物質のオス誘導能についてスクリーニングする簡便な試験系を確立した。この *in vivo* 系と *in vitro* のレポーターアッセイ系の組み合わせで、短期間でオスを誘導する物質のスクリーニングおよび幼若ホルモン活性を持つ物質のスクリーニングが可能となる。

資料 1

平成 25 年度 基盤的研究企画評価検討部会
研究成果ヒアリング
プログラム

日時：平成 26 年 3 月 17 日 10:00~15:00

場所：日本エヌ・ユー・エス(株) 本社

発表会場：大会議室

発表者控室：中会議室

(開会・概要説明 10:00~10:10)

発表時間 区分	代表研究者	所属	研究課題名
10:10~10:40 基盤 1	岩野 英知	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
10:40~11:10 基盤 2	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
11:10~11:40 その他の関連 研究課題 2	井口 泰泉	自然科学研究機構 基礎生物学研究所	ミジンコにおける内分泌かく乱作用メカニズムの解析
11:40~11:50	意見交換		
11:50~12:30	昼食		
12:30~13:00 基盤 3	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
13:00~13:30 FS 基盤 2	有菌 幸司	熊本県立大学 環境共生学部	妊馬由来エクイン類の汚染実態解明と生態影響評価
13:30~14:00 FS 基盤 1	荒牧 弘範	第一薬科大学	第 2 のエストロゲン受容体 ERβ を標的とした内分泌かく乱メカニズムの解明
14:00~14:50	「基盤」関連課題の評価会		

*発表は 15 分、質疑応答は 15 分。

資料 1

平成 25 年度 野生生物の生物学的知見研究検討部会
研究成果ヒアリング及び評価会
プログラム

日時：平成 26 年 3 月 24 日 15:00~17:00

場所：日本エヌ・ユー・エス(株) 本社

発表会場：大会議室

発表者控室：中会議室

(開会・概要説明 15:00~15:10)

発表時間 区分	代表研究者 代理発表者	所属	研究課題名
15:10~15:40 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
15:40~16:10 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 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
16:10~16:40 その他の関連 研究課題 1	田辺信介	愛媛大学 沿岸環境科学研究 センター	生物蓄積性内分泌かく乱候補物質によるわが国の野生生物汚染の実態解明
16:40~17:00	「野生」関連課題の評価会		

* 発表時間は 15 分、質疑応答は 15 分。

採択した課題の研究概要と平成26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～H26)

- (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：東京湾沿岸域および九州北部沿岸域において、下水処理施設周辺、生活排水流入地域など、環境特性の異なる地域毎に内分泌かく乱化学物質の生物影響評価を実施する。また、長崎港をモデルとして、人口集中域を流れる一般河川流入域と下水処理施設周辺地域において調査を実施し、内分泌かく乱化学物質の環境動態とその生物影響を明らかにする。また、環境中にケージに入れた魚を1週間垂下させ、ビテロジェニン (VTG) の発現に及ぼす影響を調べる。これらの調査では、ボラ・ムラサキイガイを調査対象生物とし、VTGや成熟関連因子をバイオマーカーに用いて内分泌かく乱化学物質の影響を評価する。また、環境水と底質中の化学物質の定量分析を実施し、環境中のエストロゲン活性の評価を行う。これらの結果を総合的に判断し、我が国の河口域・内湾域における内分泌かく乱化学物質の汚染の現状を把握する。また、これらの研究を通して、化学物質による海洋汚染の長期的モニタリングに向けた新たな調査基盤の確立を目指す。
- (3) 平成26年度実施内容：
- ①沿岸域における内分泌かく乱化学物質の影響調査
 - ②長崎港をモデルとした内分泌かく乱化学物質の局所汚染の実態解明
 - ③ムラサキイガイを用いた内分泌かく乱化学物質の影響評価

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～H26)

- (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、中山翔太
- (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を用いて明らかにする。全国のラットに蓄積する様々な環境汚染物質をスクリーニングする。また、これらの化学物質が引き起こすゲノムのメチル化の変化やその原因を明らかにするとともに、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。本研究で高次の陸棲哺乳類に対する内分泌かく乱化学物質のゲノムへの影響、およびゲノムの修飾

により起こり得る内分泌かく乱に関する分子疫学的データが明らかとなる。

(3) 平成26年度実施内容：

- ①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
- ②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
- ③環境汚染物質の野生ラットへの毒性学的影響に関する semi-field 実験による双方向の検証

基盤1：第2のエストロゲン受容体 ER β を標的とした内分泌かく乱メカニズムの解明 (H25～)

- (1) 研究者：第一薬科大学：荒牧弘範(代表研究者)、池田恵理子、岡崎裕之、原口浩一、広島国際大学：瀧口益史、竹田修三、北陸大学：渡辺和人、九州大学：新藤充
- (2) 研究概要：H25年度の研究で、111種類の環境化学物質がER β の発現に与える影響を解析した。その結果、29化合物(26.1%)がER β の発現誘導を示した。このER β 誘導と女性ホルモンシグナル(E2/ER α)の抑制とが符合する傾向が示された。このように、ER β は内分泌かく乱予測の一つの指標となり得る可能性が示唆されたわけであるが、i) 環境化学物質によるER β の発現誘導メカニズム及びii) ER β の発現増加によるER α の機能抑制が生体機能に与える影響の詳細は不明である。これら未解決の課題に挑戦する本研究は、環境化学物質による内分泌かく乱作用の軽減やその予防法の構築に資することが可能と考えられる。H26年度研究では、以下の実施項目の内容で検討を推進する計画である。
- (3) 平成26年度実施内容：
 - ①環境化学物質による ER β の発現誘導メカニズムの解明
 - ②環境化学物質による ER β による ER α の機能抑制が生体機能に与える影響の解析

基盤2：妊馬由来エクイン類の汚染実態解明と生態影響評価 (H25～)

- (1) 研究者：熊本県立大学：有菌幸司(代表研究者)、石橋康弘、尚絅大学短期大学：石橋弘志、株式会社エコジェノミクス：内田雅也、有明工業高等専門学校：富永伸明、立命館大学：一川暢宏
- (2) 研究概要：平成25年度の本助成金によりGC/MSによる6種のエクインエストロゲンの一斉分析法の確立を試みた。平成26年度は本手法をさらに改良し、河川、下水処理場及び病院などと汚染源把握のために馬飼育及び肥育場付近の環境水を対象にエクインエストロゲンを測定する。同時にヒト由来のエストロゲン類も測定・比較し、家

畜由来のエストロゲン類の寄与などから包括的にエストロゲン汚染の実態解明を試みる。また、エクインエストロゲン抱合体類についても分析法の確立・測定を試みる。一方、魚類を対象として、*in silico*, *in vitro*及び*in vivo*実験系を駆使してエストロゲン様作用を明らかにする。これまでほとんど知見のないエクインエストロゲンの汚染実態と生態影響（特にエストロゲン様作用）を明らかにすることで、畜産業と環境の共存に向けた具体的な対応策の提案に繋げたい。

(3) 平成26年度実施内容：

- ①水環境における汚染実態の解明
- ②魚類等に対する影響評価

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(代表研究者)、国末達也、野見山桂

(2) 研究概要：最近になって有機臭素系難燃剤など新たなPOPs（Persistent Organic Pollutants: 残留性有機汚染物質）が登場し、既存のPOPsと類似の内分泌かく乱作用や生態系の汚染が危惧されている。また、POPsの生体内変化物（代謝物）も内分泌系（甲状腺ホルモン）や神経系を攪乱することが指摘され、ヒトや野生生物の曝露実態と健康リスクが危惧されている。本研究では、昨年度の調査で沿岸性の小型歯鯨類スナメリが、POPs代謝物を相当濃度で蓄積していることを発見するとともに、その脳移行と脳下垂体における特異な残留を明らかにした。類似の蓄積と分布は陸生の高等動物でも予想されることから、本年度は小型陸棲哺乳類の汚染実態と蓄積特性の解明研究に取り組みたい。得られる成果は、活性代謝物のリスク評価に発展させ、野生生物に対する甲状腺ホルモン介在の内分泌攪乱作用を今後数年間で体系化したいと考えている。

(3) 平成 26 年度実施内容：

- ①汚染の実態解明
- ②蓄積特性の解明
- ③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(代表研究者)、宮川信一、荻野由紀子、宮川一志、平川育美
- (2) 研究概要：平成25年度のEXTEND2010 基盤研究（その他）において、「ミジンコ類の幼若ホルモン受容体の同定」、「MetとSRCの部分配列を用いたTwo hybrid assayの確立」および「オス誘導の短期試験系の確立」を達成した。本年度は前年度の結果をふまえ、幼若ホルモン受容体分子を用いた迅速で簡便な幼若ホルモン作用をスクリーニングする*in vitro*アッセイ系の確立を目指す。このアッセイ系は特殊な設備を必要としないため様々な研究機関で実施することが可能であり、これまでのTG211試験法を補完するものとして有効であると期待される。一方、本年度では、前年度に確立した日照条件操作によるオス誘導系を用いて幼若ホルモンの上流で働く因子の探索も引き続きおこなう。これら上流因子には幼若ホルモン合成経路関連遺伝子やそれと相互作用する脱皮ホルモン経路関連遺伝子などが含まれると予想されるが、その解析は、従来の幼若ホルモン類似物質曝露によるオス誘導系では不可能であった。本研究によってミジンコにおける内分泌系への理解と、そのかく乱メカニズムの解明が期待される。
- (3) 平成 26 年度実施内容：
- ①幼若ホルモン作用をスクリーニングする *in vitro* アッセイ系の検討
 - ②自然条件下におけるオス誘導時に発現する遺伝子の探索
 - ③幼若ホルモンおよび脱皮ホルモン経路関連遺伝子群の同定と解析