

## 日英共同研究の平成21年度の成果概要

## (1) 排水由来エストロゲン作用の削減効果の評価に関する研究 (コアプロジェクト-1)

- ①下水処理でのエストロゲンの挙動に関し、処理プロセスに重点を置いた実態調査を実施し、下水処理法と化学物質除去の関係について物質収支面から把握するとともに、除去機構について検討を加えることを目的とし、今年度は下水処理レベルが成魚と仔魚の雌性化に及ぼす影響について調べた。
- ②放流先水域でのエストロゲン挙動に関する実態調査を行い、日英の水環境における遊離及び抱合体化エストロゲンの濃度レベルを比較した。また、環境中運命予測モデル化に供するため、下水処理過程及び河川における遊離及び抱合体化エストロゲンの挙動を解明した。
- ③英国Johnson博士らが開発した河川中の運命予測モデルを導入し、日本での実用に向け最適化することを目的とし、淀川流域にて過年度に実施された調査結果を元に、河川流域でのエストロゲン濃度の推定モデルを構築した。構築したモデルをもとに、淀川の2地点におけるエストロゲン濃度を推定し、実測値との比較を行ったところ、良好な相関関係が確認され、モデルの有効性が確認された。

## (2) イトヨによる内分泌かく乱作用の評価手法の研究 (コアプロジェクト-2)

- ①化学物質のアンドロゲン作用評価として、イトヨアンドロゲン受容体を用いた試験管内試験 (*in vitro*) とばく露試験 (*in vivo*) を比較するため、イトヨアンドロゲン受容体 (AR $\alpha$  及び  $\beta$ ) を培養細胞で発現させ、レポーター遺伝子アッセイ系による化学物質 (MT、Tre 及び 11-KT) に対する転写活性の強さについて調査するとともに、個体を用いたばく露試験のデータを比較した。各試験法の検出感度及び個々の男性ホルモン様物質に対する応答特性について検証した。
- ②試験魚であるイトヨを安定して供給するために、飼育環境下での繁殖方法について検討した。その結果、実験室内の小規模な飼育設備でも、生体毒性試験等に必要個体数のイトヨを自家繁殖により安定的に確保できることが示唆された。
- ③スピギンの高感度検出のための *in vivo* ばく露試験条件最適化の検討においては、スピギン遺伝子の転写を効率的に誘起し、高感度なアンドロゲン作用評価を達成するために、*in vivo* ばく露試験条件 (水温及び光周期) の影響を調べ、それら物理的要因

の最適化を図った。

- ④アンドロゲンばく露時（スピギン産生時）の腎臓での2種AR（ $\alpha$ と $\beta$ ）の発現変化について、*in situ* ハイブリダイゼーション法により腎臓組織切片上で検出し、その比較解析を行った。その結果、スピギン遺伝子の転写は、腎細管細胞で行われること、また同一細胞でAR $\alpha$ 及び $\beta$ が発現していることが明らかとなった。さらに、スピギン合成にはAR $\alpha$ が主に介在していることが示唆された。

### （3）魚類エストロゲン受容体の種特異性の調査（コアプロジェクトー3）

- ①魚類6種（メダカ、ゼブラフィッシュ、ファットヘッドミノー、イトヨ、ローチ、コイ）のエストロゲン受容体 $\alpha$ を培養細胞に発現させ、化学物質（ゲニステイン、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル及びフェニルフェノール）に対する転写活性の強さについて調査した。
- ②エチニルエストラジオールを用いて、*in vitro* レポータージーンアッセイと*in vivo* でのばく露によるビテロゲニン遺伝子発現を比較した。その結果、トゲウオ、ローチ、ファットヘッドミノーでは、10 ng/L でビテロゲニン遺伝子発現の有意な誘導が認められたが、コイでは有意差が認められなかったことから、エチニルエストラジオールに対する反応に種差が存在することが明らかとなった。

### （4）両生類の生態影響評価手法の研究（コアプロジェクトー4）

- ①繁殖試験法の試験生物種であるニツメガエルについて、甲状腺ホルモン受容体 $\beta$ を培養細胞で発現させるレポータージーンアッセイ系を構築した。また、この系で甲状腺ホルモン（トリヨードサイロニン、サイロキシン）及び化学物質（テトラブロモビスフェノールA(TBBPA)、トリブロモフェノール(TBP))に対する転写活性の強さについて調査した結果、トリヨードサイロニン及びサイロキシンによる濃度依存的な転写活性を観察することができた。一方、TBBPA、TBPについては、転写活性が誘導されなかった。
- ②両生類の野外における生態影響評価手法について、英国から情報を収集して検討した。両生類が生息する環境中の化学物質を捕捉する方法として、英国で使用している装置（PAD）を用いる方法はフィールド調査において非常に有用であることがわかった。