



**International Symposium on Environmental Endocrine Disruptors 2001**

*Saturday, December 15 - Monday, December 17, 2001*

**セッション 4**  
2001年12月17日(月)

**Session 4**  
Monday, December 17, 2001

**野生生物への影響**

---

**Effects on Wildlife**

## 内分泌攪乱と他の毒性機序との相互作用の重要性

マイケル H. デプレッジ

プリマス大学 プリマス環境研究センター

内分泌攪乱の問題は、依然として世界中の環境関連機関と人々の不安の種となっている。実際の原因物質と可能性が疑われる物質の同定および適切なスクリーニングと毒性評価システムの開発のために、懸命な努力がなされている。この問題には前例のない程のリソースが投入されているが、これは広く受け入れられている考え、つまり内分泌系機序を介した生物相への有害作用が、その他の経路に毒性学的損傷が発生する濃度よりもはるかに低い曝露濃度で起こっているのではないかという考えを反映している。本稿ではこの基本的な仮説について再度考察する。ここでは、毒物に曝露した際に、細胞、器官、および生体で起こる生化学的および生理学的応答をより深く理解することにより、毒物の持つ様々な機序を同定するための基準を考えることとする。また、細胞の解毒と排泄のシステムの様々な構成要素の間の相互関係について概説する。内分泌攪乱化学物質に関する文献の多くを考察すると、影響が内分泌攪乱の特定の機序に起因すると考えるのは困難であることが分かる。例えば、成長率、発達、繁殖成功度の変化は内分泌機能の変調した結果生ずる可能性が高いが、代謝毒性（例えば酵素抑制）や遺伝毒性（例えば変調した遺伝子発現）でも類似した結果が生じることが広く知られている。内分泌攪乱化学物質であると証明されているトリブチルスズは軟体動物のホルモン系に影響を及ぼすだけでなく、非常に低濃度では遺伝毒物でもあることを示した新しい証拠を提示する。これらの観察は、様々な毒性機序の全体論的考察と相対的な関与を明らかにしようとする場合には、影響の発生に関与している特定の機序を同定する必要があることを示している。また、これが実用的な管理方法の計画と実施にどのように貢献するかについても考察する。例えば、内分泌機能を攪乱する性質をもつ化学物質が心配されているが、同じ化学物質が同時に遺伝毒物や免疫毒物として作用するのであれば、同じ低曝露濃度であってもさらに強化した管理を実施しなければならないと言える。さらに、モニタリングプログラムに含めるべきエンドポイントの選択にも影響を及ぼすことになる。毒性の生物学的複雑さを考慮した新しいアプローチについても提案する。

## 内分泌攪乱化学物質感受性遺伝子： 野生生物におけるアрил炭化水素受容体の分子生物学的解析とダイオキシン感受性

マーク E. ハーン<sup>1</sup>、ブレンダ A. イェンセン<sup>1</sup>、エウン ヤン キム<sup>1,2</sup>、  
ショーン W. ケネディー<sup>3</sup>、ダイアナ G. フランクス<sup>1</sup>、サイベル I. カーシュナー<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ウッズホール海洋研究所

<sup>2</sup>愛媛大学

<sup>3</sup>カナダ環境省

多くの環境汚染物質は、世界的規模で分布し、野生生物の組織中に蓄積し、動物の生殖と発生を攪乱する可能性をもっている。化学物質への感受性には劇的な種差があるため、野生生物に対する化学物質曝露のリスクの評価は複雑である。これらの環境内化学物質の多くは、ホルモン、成長因子、および他の信号伝達分子に関与する特定の受容体を阻害することによって作用する。我々は、種特異的cDNAクローニングと毒性に関与するタンパク質の特性評価を行うことは、げっ歯類における機械論的な研究を野生生物における疫学的所見に関連づけることができるため、リスクアセスメントに貢献できると提唱する。毒性に種差が見られる受容体の役割を調査するために、我々はリガンドで活性化する転写因子（受容体）であるアрил炭化水素受容体（AHR）に焦点を置いた。この受容体を介して2、3、7、8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン（TCDD）などのプラーナーハロゲン化芳香族炭化水素（PHAH：planar halogenated aromatic hydrocarbon）類は、遺伝子発現に変調を及ぼし、発生／生殖毒性を誘発させる。我々は、魚類、鳥類、海棲哺乳類から得たAHRの分子的特性評価に着手した。

**魚類** 魚類の多くはPHAH類に非常に感受性が高い。しかし、単一のTCDD結合AHRを発現する哺乳動物と異なり、海産メダカのマミチヨグ (*Fundulus heteroclitus*) および他の硬骨魚類および軟骨魚類は2つのAHR遺伝子（AHR1とAHR2）を発現する（1-3）。AHR1、AHR2の両方とも高い親和性でTCDDを結合するが、これらの2種類のAHRには著しい多様性があり、組織特異的な発現に様々なパターンを示し、特異的な機能があることを示唆している。魚に見られる進化したダイオキシン耐性におけるAHR多塑性の役割については現在調査中である（4）。

**鳥類** 鳥類におけるPHAH類に対する感受性には劇的な種差がある（5）。例えば、アジサシのPHAH類の影響に対する感受性は最大でニワトリの80倍である（5、6）。差が大きいPHAH感受性の分子的特徴を調査するため、我々は白色レグホン種のニワトリ (*Gallus gallus*) と一般のアジサシ (*Sterna hirundo*) から得たAHR cDNAのクローンを作成し、その配列構造を調べた。白色レグホンのAHR cDNAは858アミノ酸（96.2 kDa）、アジサシのAHRは859アミノ酸（96.3 kDa）のタンパクをコードしている（7）。ニワトリとアジサシのAHRは、全体では93%のアミノ酸に相同性が見られ、リガンド結合ドメインでは98%に相同性が見られた。ニワトリとアジサシのAHRは、*in vitro* 転写で合成し、翻訳では [<sup>3</sup>H] TCDDの特異的な結合が示された。しかし、飽和結合分析（0～10 nM [<sup>3</sup>H] TCDD）では、アジサシのAHRの結合親和性はニワトリのAHRの7分の1であることが示された。我々は、アジサシのAHRに見られるTCDDの結合親和性およ

び他の特性の差は、PHAHの影響に対しアジサシの感受性が低いことに起因するものと結論する。

**海棲哺乳類** 海棲哺乳類の一部は、組織中に非常に高濃度のPHAH類を蓄積しているが、これらの化学物質に対する海棲哺乳類の感受性はあまり知られておらず、直接調べることができない。生化学的データから海棲哺乳類の感受性を推定するために、我々は歯鯨類の一種であるシロイルカ (*Delphinapterus leucas*) と鰭脚類の一種であるアザラシ (*Phoca vitulina*) から得たAHRのクローンを作成した。シロイルカのAHR cDNAは845アミノ酸タンパクをコードしており、ヒトAHRとは85%の相同性、マウスAHR<sup>h1</sup>対立遺伝子とは75%の相同性が見られる (8)。*in vitro*合成したシロイルカのAHRタンパクは、少なくともマウスAHRと同等の親和性かつヒトAHRよりも高い親和性で [<sup>3</sup>H] TCDDと結合した。シロイルカのAHR親和性をシロイルカ組織のAHRリガンド (TCDD-EQs) の濃度と比較すると、受容体占有レベルは影響が起るに十分であることを示唆している。一連のPHAH類について競合的AHR結合親和性の測定を行うと、シロイルカに特異的な相対的力価 (“TEFs”) の試算が得られる。アザラシのAHRは843アミノ酸を含んでおり、シロイルカAHRとは82%、ヒトAHRとは79%の相同性が見られる (9)。シロイルカのAHRと同様、アザラシのAHRは高い親和性で [<sup>3</sup>H] TCDDと結合し、アザラシがPHAHの作用に感受性が高い可能性があることを示した実験研究と一致している。

**無脊椎動物** センチュウ (*Caenorhabditis elegans*) (2, 10)、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) (11)、セイヨウオオノガイ (*Mya arenaria*) (12) のAHRホモログを同定し、クローンを作成した。しかし、*in vitro*転写と翻訳で発現させた際に、これらのAHRホモログは [<sup>3</sup>H] TCDDまたは [<sup>3</sup>H] b-ナフトフラボン (BNF) と結合する能力に欠けていた (12)。原型としたAHRリガンドTCDDとBNFには特異的な高い親和性が欠如していることが、無脊椎動物のAHRホモログを脊椎動物のAHRと区別することとなっており、従って多くの無脊椎動物がPHAH類に対する感受性が低い可能性があることを示唆している。

全体として、これらの結果は、*in vitro*で発現させたタンパク質を野生生物におけるPHAH毒性の分子的基础の理解や予測に使用することは有望な方法であることを示している (米国国立衛生研究所の助成金 ES06272および米国海洋大気庁の助成金NA46RG0470 (R/P-58) とNA86RG0075 (R/P-64) の支援を受けた)。

#### 参考文献

1. Karchner, S. I., Powell, W. H. and Hahn, M. E. (1999) Identification and functional characterization of two highly divergent aryl hydrocarbon receptors (AHR1 and AHR2) in the teleost *Fundulus heteroclitus*. Evidence for a novel subfamily of ligand-binding basic helix-loop-helix Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS) factors., *J. Biol. Chem.* **274**:33814-33824.
2. Hahn, M. E., Karchner, S. I., Shapiro, M. A. and Perera, S. A. (1997) Molecular evolution of two vertebrate arylhydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**:13743-13748.
3. Hahn, M. E. (2001) Dioxin Toxicology and the Aryl Hydrocarbon Receptor: Insights from fish and other non-traditional models, *Mar Biotechnol.* **3**:S224-S238.

4. Bello, S.M., Franks, D.G., Stegeman, J.J. and Hahn, M.E. (2001) Acquired resistance to aryl hydrocarbon receptor agonists in a population of *Fundulus heteroclitus* from a marine Superfund site: *In vivo* and *in vitro* studies on the induction of xenobiotic-metabolizing enzymes., *Toxicol. Sci.* **60**: 77-91.
5. Kennedy, S.W., Lorenzen, A., Jones, S.P., Hahn, M.E. and Stegeman, J.J. (1996) Cytochrome P4501A induction in avian hepatocyte cultures: a promising approach for predicting the sensitivity of avian species to toxic effects of halogenated aromatic hydrocarbons, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **141**: 214-230.
6. Lorenzen, A., Shutt, L. and Kennedy, S.W. (1997) Sensitivity of common tern (*Sterna hirundo*) embryo hepatocyte cultures to CYP1A induction and porphyrin accumulation by halogenated aromatic hydrocarbons and common tern egg extracts, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **32**: 126-134.
7. Karchner, S.I., Kennedy, S.W., Trudeau, S. and Hahn, M.E. (2000) Towards a molecular understanding of species differences in dioxin sensitivity: Initial characterization of Ah receptor cDNAs in birds and an amphibian. *Mar. Environ. Res.* **50**: 51-56.
8. Jensen, B.A. and Hahn, M.E. (2001) cDNA cloning and characterization of a high affinity aryl hydrocarbon receptor in a cetacean, the beluga, *Delphinapterus leucas*, *Toxicol. Sci.* **64**: 000-000.
9. Kim, E.-Y. and Hahn, M.E. (2001) cDNA cloning and characterization of an aryl hydrocarbon receptor from the harbor seal (*Phoca vitulina*): A biomarker of dioxin susceptibility?, *Aquat. Toxicol.* (in press).
10. Powell-Coffman, J.A., Bradfield, C.A. and Wood, W.B. (1998) Caenorhabditis elegans orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 2844-2849.
11. Duncan, D.M., Burgess, E.A. and Duncan, I. (1998) Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by spineless-aristapedia, a homolog of the mammalian dioxin receptor, *Genes Dev.* **12**: 1290-1303.
12. Butler, R.B., Kelley, M.L., Powell, W.H., Hahn, M.E. and Van Beneden, R.J. (2001) An Aryl Hydrocarbon Receptor Homologue from the Soft-Shell Clam. *Mya arenaria*: Evidence that invertebrate AHR homologues lack TCDD and BNF binding. *Gene* (in press).

## 内分泌攪乱化学物質が魚類の成熟・再生産に及ぼす影響 —農林水産省における取り組みを中心として—

藤井 一則

独立行政法人水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所

1. はじめに. 化学物質が魚類に及ぼす内分泌攪乱作用として、諸外国では雄のローチやカレイの卵精巢、雌のカダヤシなどの雄性生殖器官の発達、サケ科魚類の甲状腺肥大などが報告されており、成熟・再生産に対する悪影響が危惧されている。一方、わが国における内分泌攪乱化学物質の水生生物への影響は、多摩川のコイ、東京湾のマコガレイなどで断片的には報告されているが、影響実態の詳細は未だ明らかではない。また、魚類の性分化、生殖腺の発達、行動等に対する作用機構、再生産への影響も不明である。さらに、内分泌攪乱化学物質が食物連鎖を通して水産生物に生物濃縮され、食品としての安全性を損なうことも危惧されている。

以上のような背景から、「農林水産業における内分泌かく乱物質の動態解明と作用機構に関する総合研究（環境ホルモン研究）」・水域チームでは、水域生態系を構成する種々の水生生物の内分泌系、生殖機能や再生産過程に対する影響の解明と、食物連鎖を通じた生物濃縮など水環境における化学物質の挙動解明の両面から研究を推進するため、①影響実態、②環境動態、③作用機構の3つのサブチームを編成し、24課題（各8課題）の研究を推進している。ここでは、表題のとおり魚類の成熟・再生産に関連した影響を中心に、プロジェクト研究過去2年間の研究成果を紹介する。

2. ビテロジェニンアッセイ. これまでに、ウグイ、コイ、トビハゼ、マハゼ、ボラ、シロギス、イシガレイ、メイタガレイ、マガレイ、コウライアカシタビラメのELISAによるビテロジェニン（Vg）測定系が確立された（北海道区水産研究所・松原ら、中央水産研究所・伊藤ら、西海区水産研究所・塚本ら）。これまでにコイやウグイ、トビハゼ等の血中Vg濃度が周年にわたって測定され、雄にも季節的な変化があることが明らかになった。また、魚種によってベースとなる雄の血中Vg濃度が異なり、北海道のマハゼでは100ng/ml、ウグイでは10 $\mu$ g/ml以上を閾値とすることが提案されている。

3. コリオジェニンアッセイ. わが国で最初に内分泌攪乱化学物質の影響が示唆された海産魚であるマコガレイに注目し、Vgと同様にエストロゲンにより産生が誘導されるコリオジェニン（Cg）の測定系を開発すると共に、化学物質による誘導を確認した（瀬戸内海区水産研究所・藤井ら）。その結果、CgはVgよりも低濃度のエストロゲン様物質により産生が誘導されることが示唆されている。

4. リセプターアッセイ. ニジマス肝細胞質蛋白及びユーロピウム標識E2を用いたリセプターアッセイを開発し、化学物質のエストロゲン活性を*in vitro*で評価する系を確立した（養殖研究所・生田ら）。本アッセイによりビスフェノールA及びノニルフェノールの結合能を測定した結果、各々E2の1/67、1/3094であった。

5. **性行動.** 性行動に対する影響は、サクラマスを用いて調べられている（養殖研究所・生田ら）。去勢雄にサイラスティックチューブを用いて各種ステロイドを投与した結果、去勢により抑制された性行動（寄り添い行動、産卵促進行動）が、男性ホルモン（T、11KT）により回復したがE2では効果が認められなかった。また、早熟雄にE2、ノニルフェノールあるいはビスフェノールAを投与した結果、E2は顕著な影響を示さなかったのに反し、ノニルフェノールやビスフェノールAはこれらの雄性行動を抑制する傾向を示した。このことは、これらの化学物質が脳内で男性ホルモンに対するアンタゴニストとして作用している可能性を示唆している。

6. **配偶子形成.** 配偶子形成に関しては、生殖を支配している視床下部（生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンGnRH）-脳下垂体（生殖腺刺激ホルモンGTH）-生殖腺（ステロイドホルモン）系への影響が調べられている（養殖研究所・香川ら）。未熟期及び精子形成期の雄マダイに各種ステロイドを投与した場合、未熟期のマダイではE2あるいはTの投与により精子形成が抑制されたが、精子形成期には影響は認められていない。また、これらの何れの時期にもGnRH前駆体遺伝子やGTHサブユニット遺伝子の発現には影響は認められていない。これらの結果から、環境ホルモンは精子形成初期に影響を与えること、その作用はGnRHやGTHの生成ではなく、これらホルモンの分泌もしくは精巣に直接作用していることが考えられる。

7. **性分化.** 全雄及び全雌ティラピアを用い、性分化にともなうステロイド代謝酵素のコレステロール側鎖切断酵素、17 $\alpha$ -水酸化酵素、3 $\beta$ -水酸基脱水素酵素、アロマターゼの発現が調べられた（琉球大学・中村）。その結果、雌の生殖腺ではこれらの酵素群が性分化以前から発現し、性分化に伴い急速に活発化することから、E2の合成が起これら雌への分化を誘導していると考えられた。一方、雄では性分化前や性分化期にも、これらの酵素の発現が認められていない。また、アロマターゼ阻害剤（ファドロゾール）を性分化期の全雌ティラピアに投与した結果、雄へと転換した。さらに、性分化期の全雄アマゴを用いた暴露実験では、10ng/LのEE2、20ng/LのE2、20 $\mu$ g/Lのノニルフェノール、1mg/LのビスフェノールAにより雌化が誘導された。また、暴露時期の違いにより雌化の誘導率が異なることも明らかにされており、性分化期への影響が特に大きく現れることが明らかにされている。

8. **わが国における影響実態.** これまでに得られた結果では、ごく一部の水域で雄魚Vgのやや高い値が見られているが、生殖腺の異常などは報告されていない。しかし、*in vitro* バイオアッセイで高いエストロゲン活性が見られている水域もあり、今後さらに詳細に調べる予定である。魚類には、年齢、水温などの物理環境、群の性比などによって性が転換する種があり、ほ乳類に比べ、性が極めて不安定である。また、VgやCgについても魚種による差、水温等の物理環境による差などが明らかになっており、これらが検出された場合も、どこまでが許容範囲であるかを現時点で明言することは出来ない。

本プロジェクト研究の前半2年は、評価手法の開発あるいは異常を検出するための正常な姿の解明など、わが国における影響実態を正確に把握するための道具を揃えることに主眼をおいた期間であった。今後は早急に魚種別の閾値（VgあるいはCg濃度など）を明らかにすると共に、わが国の影響実態を出来る限り調査し、異常が検出された場合には、その原因物質究明にも取り組む予定である。

## アトラジンによるカエルの雌雄同体：室内研究と野外研究との連携

タイロン B. ヘイズ

カリフォルニア大学バークレー校

我々は近年、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の幼生が0.1ppbという微量のアトラジンに曝露することで雌雄同体が現われることを示した。場合によっては、3個の卵巣と3個の精巣を持つ個体も出現した。また、この種のカエルの喉頭はアンドロゲン依存性であり、雄は雌よりも大きな喉頭と大きな喉頭筋を有する。1ppb以上の用量のアトラジンによって雄に脱雄性化が起こり、その結果、喉頭の大きさが減少した。曝露した幼生を、その後曝露させずに2ヶ月間成長させても、喉頭の大きさは元に戻らなかった。また、変態後にアトラジンに曝露させると、喉頭の大きさがさらに減少した。すなわち、この作用は恒久的であった。若齢個体では、アトラジン曝露によって生殖腺の発達が低下し、雌性型である総排泄腔の発達の出現率が増大した。後者の作用は、この物質が脱雄性化作用だけでなく雌性化作用も有することを示している。*X. laevis*の成体をアトラジンに曝露させると、アンドロゲン濃度が10分の1に減少し、曝露した雄個体で見られるこの濃度は、雌における濃度に同等であった。ステロイドホルモン濃度のこうした変化に基づき、観察された作用のメカニズムが想定される。すなわち、アトラジンはアンドロゲン濃度を低下させるものである（同時にエストロゲンを増大させる可能性もある）。すべての実験例および全ての発生段階において、雌には影響が無く、雄が障害を受けやすい、と考えられる。

我々は一連の研究の中で、ヒョウガエル (*Rana pipiens*) と北米アマガエル (*Hyla regilla*) に対するアトラジンの作用について調べた。この2つの種におけるアトラジンの作用の特性の解明は現在進行中だが、性分化に対する作用の可能性に加えて、*R. pipiens*では変態を抑制する。ただし、*H. regilla*ではその作用はない。

ここで述べている作用を発現する用量は、生態系で見られる量に相当する。アトラジンは、農業流出水や、両生類繁殖域においてppmのレベルで見つかる。地下水、地表水、さらには雨水の中にも、1ppbを超えるアトラジンが見つかることがある。すなわち、野生の両生類はリスクに曝されている可能性がある。特に、アトラジンは広範囲に存在するために（米国では40年以上にわたって使用されており、使用国家も80を超える）、こうした影響に関する懸念が強まってきている。アトラジン（および農薬一般）が全地球的な両生類の減少に関わっている可能性についても、重要な懸念事項である。

野生におけるアトラジンの作用を調べるために、我々は米国全体の10箇所から動物を採取した。採取箇所は、アトラジンの使用報告がない箇所と、アトラジン使用量が最大規模である箇所である。採取対象となった生息地は、農業流出水の直接的な流入箇所、レクリエーション地域（ゴルフ場）、野生生物保護区、放牧地、河川、湖沼、灌漑用水路にわたった。現在我々は、これらの箇所の水におけるアトラジン濃度を分析し、発生異常とアトラジン濃度との相関関係を調べているところである。また我々は、研究室においてバイオアッセイをする目的で、野生環境から水を収集した。このように室内研究と野外研究とを組み合わせることで、アトラジン作用の影響とメカニズムに関する厳密な評価と、野生の両生類にアトラジンが及ぼす影響の大きさの評価が可能になるものと考えられる。



## エストロゲンを超えて—内分泌攪乱をもたらす複数の機序

ルイス J. ジレット Jr.、マーク P. グンダーソン、マシュー R. ミルン、テア M. エドワーズ、  
ディエルドリヒ S. ベルムデス、タマサ T. バーボー、テレサ A. ブライアン  
フロリダ大学

野生生物集団およびヒト集団は自然環境中の汚染物質の影響を受けている。この問題は、様々な環境内化学物質が内分泌器官、細胞、および標的組織の発達と機能を変調することが分かり、この10年間に大きく取り上げられるようになった。既に確認されている野生生物集団の生殖活動、形態、および生理の攪乱あるいは変調は、汚染物質により誘発された内分泌系機能の変調と関連づけられている。内分泌系の変調は複雑であり特定の器官や分子機序のみに限定されない。例えば、汚染物質によって (1) 内分泌供給源におけるホルモン生産の変調、(2) 脳下垂体または視床下部からの刺激ホルモンおよび抑制ホルモン放出の変調、(3) 肝酵素の生体内変化の変調、(4) 血清結合タンパクの濃度および機能の変調という現象のうちいずれかまたは全てが起こり、血清中のフリーなホルモンの濃度の変調が生じることが確認されている。我々の研究室で得られた新しいデータは、これらの変調のうち、ホルモン合成の変調と肝酵素の生体内変化の変調の2つを示している。さらに、我々はアメリカワニを含むいくつかの種における硝酸塩/亜硝酸塩曝露の内分泌攪乱作用に関する調査を開始した。これらのデータは、10ppm (米国で承認されている飲用水の上限値) という低濃度の硝酸塩が幼若なアメリカワニの性腺のステロイド産生を変調することがあることを示唆している。野生生物における内分泌攪乱がもたらす発達の結果を理解することによって、曝露に関する新しい指標を得られるとともに、最も感受性が高いライフステージについての理解を深めることができる。さらに、工業用化学物質や殺虫剤以外の環境汚染物質が内分泌を攪乱する可能性を理解することにより、野生生物に対する環境汚染の真のリスクを計算できるようになるものと考えられる。本調査はUS EPAの助成金 (#R824760-01-0;CR826357-01-1) による支援を一部受けた。