

平成 12 年度
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

研 究 報 告 書

平成 13 年 3 月

財団法人日本公衆衛生協会

目 次

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 ----- 1
2. 核内転写調節 (PPAR) 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 ----- 14
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 ----- 23
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 ----- 44
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 ----- 50
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 ----- 58
7. PPAR γ 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 ----- 64
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 怜子 ----- 71
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 ----- 81
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 ----- 98

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————— 104
12. 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————— 117
13. 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————— 125
14. 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————— 155

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

研究者 湯浅 茂樹 (千葉大学医学部解剖学第二講座教授)

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で、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。

研究協力者

外山芳郎（千葉大学医学部解剖学第二講座 講師）、前川眞見子（千葉大学医学部解剖学第二講座 助手）、関 直彦（ヘリックス研究所 主任研究員）、古関明彦（千葉大学医学部発生生物学講座 教授）、白澤 浩（千葉大学医学部微生物学第一講座 教授）、八木 健（大阪大学細胞工学センター 教授）

A.研究目的

現在、内分泌攪乱化学物質に関しては生物環境ならびに人の健康に対する脅威が、主に精子数の減少と環境生物の生殖障害の観点から注目されている。今後、これらの物質がなぜ有害であるのかをその作用機構の点から明らかにする努力が、国民の不安を解消し安全な生活の確保を図る上で必要である。

本研究では代表的なエストロゲン様物質で、人体に対する影響も明らかにされている 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・分子生物学の手法を用いて解明することを目的とする。そして、その成果をもとにして内分泌攪乱化学物質の健康障害に関する分子生物学的マーカーならびに障害の分子細胞生物学的レベルでのメカニズムを解明することを目指す。

内分泌攪乱化学物質は内分泌系のホメオスタシスを乱すとともに、精子形成過程で生殖細胞分化の種々の段階、支持細胞への直接的効果も考慮する必要がある。本研究は代表的な内分泌攪乱化学物質の作用の分子レベルでの解明の糸口を作るものとして、作用の本態にもとづいた客観的な体系的検索方法、ひいては障害の予防あるいは治療法の開発に貢献することが期待できる。

B.研究方法

(1) マウス生後発達過程における DES 曝露による精子形成障害とその可逆性

ICR 系の雄新生仔マウスに diethylstilbestrol (DES) 1 μ g を生後 2, 4, 6, 8, 10, 12 日齢に投与した。生後 14 日齢以降、DES 投与マウスとそれに対応する対照群のマウスの光学顕微鏡および電子顕微鏡用試料を作製した。また、一部の標本については凍結切片を作成し、蛍光標識ファロイジンを用いてアクチンフィラメントの標識を行ない、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(2) ラット生後発達過程における DES 曝露に対するエストロゲン受容体アンタゴニスト投与の効果

DES 投与によって引き起こされる精子形成障害が、DES のエストロゲン様作用によるものか、あるいは DES 特有の直接作用によるものかを検討した。このために、DES とともにエストロゲン受容体アンタゴニストである 4-OH-Tamoxifen (Tam) を投与し、Sertoli 細胞障害を防止あるいは軽減する効果があるかどうかを検討した。

グループ 1 の Wistar 系雄ラット新生仔に 1 匹あたり、DES 10 μ g を投与した。グループ 2 の雄ラット新生仔には 1 匹あたり、Tam 20 μ g を投与した。また、グループ 3 には 1 匹あたり、Tam 20 μ g + DES 10 μ g を投与した。各グループについて、生後 14 日齢以降で光学顕微鏡および電子顕微鏡用試料を作成した。

(3) マウス精巣発達過程における DES 曝露による遺伝子発現の変動の解析

胎生期マウス（妊娠 11~16 日）を DES に曝露し、生後 2 ヶ月において DES 曝露精巣と対照マウス精巣からそれぞれの mRNA を調製した。これを逆転写反応によりそれぞれ Cy5、Cy3 で標識し、DNA チップ（胎生 14.5 日マウスの cDNA クローン 2,300 個をのせた cDNA マイクロアレイ）を用いて遺伝子発現頻度解析を行って、DES 投与により発現が変動（増大あるいは減少）する遺伝子の検出を試みた。なお、生後 2 ヶ月において、DES 曝露精巣では組織学的に精子形成障害が認められた。

(4) DES の培養 Sertoli 細胞株に対する分子細胞生物学的作用機序の解析

Sertoli 細胞の cell line である TM4 を用いて、培養

液にDES (10ng/ml)を加えた際にどのような形態変化が起こるか、またその変化の可逆性を電子顕微鏡を用いて観察した。また、対照として、線維芽細胞株NIH3T3にDESを添加した際の形態学的変化の有無も検討した。

さらに、DES添加によって変動する蛋白質を二次元電気泳動により検出した。そして、著明な変動を示すスポットについて蛋白質のアミノ末端のアミノ酸塩基配列の検討を行った。これとともに、DES添加による蛋白質のチロシンリン酸化の変動を二次元電気泳動-Western blottingにより検討した。

(5) DES 曝露による精子形成障害における presenilin-1、Notch-1、TuJ1 の発現変動の解析

上記のマウス生後発達過程での DES 曝露後、精巣の凍結組織切片を作成し、免疫組織化学的に presenilin-1、Notch-1、TuJ1 の発現様式を検討した。

(6) 精巣特異的制御分子の cDNA クローニング

(a) 精巣特異的 presenilin-1 の cDNA クローニングと発現様式

精巣特異的 presenilin-1 分子種は DES 曝露後の生殖細胞の分化能回復の指標となると考えられるため、その cDNA クローニングを行った。

(b) 精巣特異的 actin 制御分子 WAVE 1 および 3 の cDNA クローニングと発現様式

マウス精巣で精粗細胞に発現し、生殖幹細胞の障害の程度を検討するための分子マーカーとして WAVE 1 および 3 の cDNA クローニングを行った。

(c) 新たな Sertoli 細胞マーカーの開発

幼若神経細胞に特異的に発現する細胞骨格蛋白 TuJ1 の精巣における発現を検討した。

(7) 倫理面への配慮

マウス、ラットを用いる動物実験で、灌流固定ならびに組織標本採取に際してはエーテルあるいはネブタールによる深麻酔下で苦痛のない状態で、かつ短時間のうちに操作を行なった。なお、この動物実験手技は千葉大学亥鼻地区動物福祉特別委員会で承認されている。

C. 研究結果

(1) 正常マウスの精巣発達過程における DES 曝露による精子形成障害の機構

(a) 形態学的変化 --- ectoplasmic specialization と blood-testis barrier の形成障害ならびに障害の可逆的回復

精巣重量は DES 投与マウスの 14 日齢以降で、各々の対照に比べて小さく、差が最も大きい時 (35 日齢) では対照の 10% であった。

精子形成の異常 (図 1) : 14 日齢までの DES 投与マウスと対照マウスの精上皮の発達段階は同じであり、精祖細胞および合糸期 (zygotene) までの精母細胞がみられた。21 日齢対照マウスでは複糸期 (diplotene) 精母細胞まで発達した一次精母細胞がみられた。しかし、DES 投与マウスの精上皮には多くの変性した太糸期 (pachytene) 精母細胞がみられた。28 日齢対照マウスでは step11 精子細胞まで分化が進んでいるのに対し、DES 投与マウスでは一次精母細胞の分化が減数分裂中期 (metaphase) でとどまっていた。35 日齢対照マウスでは分化は step16 精子細胞まで進んでいた。これに対し、DES 投与マウスでは step6 精子細胞までしか進んでいなかった。そして、42 日齢以降は両群とも精子形成が認められた。すなわち、対照ラットでは 28 日齢までには減数分裂像およびそれに続く step11 までの精子細胞が現れたのに対し、DES 投与マウスでは 1 週間遅れて 35 日齢になって初めて減数分裂像と step 6 までの精子細胞が現れた。そして、DES 投与マウスにおける発達の遅延は可逆的に回復可能なものであった。

精細管内腔の異常 : 対照マウスでは 18 日齢以降で精細管の内腔が形成されているのに対し、DES 投与マウスでは 32 日齢以降で内腔が形成されていたが、その内腔には正常には認められない絨毛状の Sertoli 細胞突起が無数にみられた。

特殊接合装置 (ectoplasmic specialization) の異常

(図 2) : 対照マウス 14 日齢では ectoplasmic specialization は未発達であるが、21 日齢以降では発達した接合装置が Sertoli 細胞間で Sertoli 細胞の核の高さに認められた。DES 投与マウス 21 日齢から 28 日齢では、未発達で不完全な ectoplasmic

specialization が Sertoli 細胞間で Sertoli 細胞の核の高さにみられた。すなわち、短いもの、片側だけが形成されたもの、actin filament のないものなどである。

この未発達な ectoplasmic specialization が機能的に血液-精巣関門の機能を果たしているかどうかを、血管内投与されたチトクローム C の精細管内腔への移行の有無で調べたところ、血液-精巣関門の機能が破綻していることが明らかになった。DES 投与マウスでは 35 日齢になると、発達した ectoplasmic specialization が Sertoli 細胞間で Sertoli 細胞の核の高さに多数認められるようになった。

(b) マウス精巣発達過程における DES 曝露による遺伝子発現の変動の DNA チップを用いた解析

胎生期に DES に曝露したマウスの生後 2 ヶ月における精巣と対照マウス精巣からそれぞれ調製した mRNA を用いて、DNA チップにより遺伝子発現頻度解析を行った。検索した 2,300 個の遺伝子のうち、DES 曝露により著明に増加するもの 8 個、著明に減少するもの 20 個が検出された。現在、各遺伝子のノザンブロット解析、RT-PCR 解析を開始している。

(2) ラット雄新生仔の DES 曝露による精巣障害に対するエストロゲン受容体アンタゴニスト Tamoxifen (Tam) 投与の効果 (表 1)

ラット雄新生仔に Tam を単独投与した場合、DES 投与と同様に Sertoli 細胞間の特殊接合装置の形成遅延とともに、生殖細胞の減数分裂の進行は対照群に比べると約 10 日間遅延した。Tam 単独投与の場合は、これらの障害は DES 投与の場合と比較して早期に回復し、生後 8 週には対照とほとんど差がなくなった。

Tam と DES の同時投与では、予測された両者の拮抗作用、すなわち DES による精子形成障害の Tam による防止・軽減は認められず、Sertoli 細胞間の特殊接合装置の形成の遅延ならびに生殖細胞の減数分裂の進行の遅延が DES 単独投与と同様に認められた。

さらに意外なことに、Tam と DES の同時投与では、各々の単独投与では認められなかった Leydig

細胞の発達障害と筋様細胞 (myoid cell) の変性が生じた。Leydig 細胞の減少は生後 8 週においても回復しなかった。

(3) DES の Sertoli 細胞株に対する分子細胞生物学的作用の解析 (図 3)

形態学的変化: 細胞株 TM4 を DES 曝露した場合、粗面小胞体内腔の拡大が認められた。この変化は、DES を培養系から除くと可逆的に消失した。線維芽細胞株 NIH3T3 では DES 曝露によってもこのような変化は認められなかった。

生化学的変化: 二次元電気泳動を行うと、DES 曝露した TM4 で分子量 65kD、等電点 6.4 の蛋白群の著明で特異的な減少が認められ、DES-responsive proteins of Sertoli cell (DREPS) と命名した。DREPS は Sertoli 細胞株特異的で NIH3T3 では検出されなかった。この蛋白を二次元電気泳動で単離し N 末端アミノ酸配列の解析を行ったところ D-T-H-K-S-E-I と同定された。さらに、DES 曝露した TM4 で分子量 38kD、等電点 5.9 の蛋白のチロシンリン酸化の著明で特異的な亢進が認められ、DES-induced tyrosine phosphorylation in Sertoli cell (DITYPS) と命名した。このチロシンリン酸化の亢進は NIH3T3 の DES 曝露では認められなかった。

(4) DES 曝露による精子形成障害における精巣分化マーカー presenilin-1 (PS-1)、Notch-1、TuJ1 の発現変動の解析

正常精巣組織では、PS-1 は精子細胞 (step4~8) に発現し、Notch-1 は精母細胞 (pachytene) から精子細胞 (step1~7) に発現していた。また、TuJ1 は早期から Sertoli 細胞の細胞体から突起全体に発現していた。

対照マウス精巣を生後 19 日に免疫組織化学的にしらべると、PS-1、Notch-1 とともに発現が認められ減数分裂が進行していることが明らかに示された。これに対し、新生仔期に DES 曝露された群では PS-1 の発現は認められず、Notch-1 も少数の spermatocyte における発現が認められるのみで、減数分裂の進行に障害のあることが明瞭に示された。また、TuJ1 陽性の Sertoli 細胞は対照群では

突起を放射状に伸長し生殖細胞と全長にわたって接していたが、DES 投与群では生殖細胞の発達障害と対応して、内腔面に多数の Sertoli 細胞由来の葉状突起が充満していた。

(5)生殖細胞特異的制御分子の cDNA クローニング

(a)WAVE-1, 3 cDNA のクローニング

クローニングした cDNA の in situ hybridization より、本分子は脳辺縁系および神経発生過程に発現するとともに、生殖細胞系列においても精祖細胞・精母細胞に特異的に発現することがわかった。

(b)精巣特異的 *prcsenilin-1*cDNA のクローニング

マウス精巣 cDNA ライブラリーのスクリーニングにより単離したクローンの構造解析が現在進行中である。

D.考察

(I)マウス精巣発達過程における DES 曝露による精子形成障害の機構

Sertoli 細胞間接着構造の発達障害と精子形成障害の相関: ectoplasmic specialization は Sertoli 細胞間および Sertoli 細胞と後期精子細胞間にみられる特殊な構造である。Sertoli 細胞間の ectoplasmic specialization は、Sertoli 細胞の細胞膜、その内側に存在するアクチン線維層、さらに内側の滑面小胞体から成る。Sertoli 細胞間の ectoplasmic specialization には更に tight junction が存在し、これは血液-精巣関門 (blood-testis barrier) として働いている。この ectoplasmic specialization は精上皮を管腔領域 (adluminal compartment) と基底領域 (basal compartment) に分離し、生殖細胞が減数分裂を行うためにはこの adluminal compartment の存在が必須である。

本研究では DES の Sertoli 細胞に対する作用について新たな知見が得られた。対照マウスでは 21 日齢で ectoplasmic specialization が完成し adluminal compartment が確立され、21~28 日齢の間に減数分裂と精子細胞への分化の進行がみとめられた。これに対し DES 投与マウスでは 21 日齢から 35 日

までは精母細胞の分化が減数分裂中期で留まっていた。これとともに、DES 投与マウスでは生後 35 日まで ectoplasmic specialization の形成が未発達のままであった。したがって、28 日齢から 35 日齢の DES 投与マウスで、pachytene より後の減数分裂前期が進行しないのは、ectoplasmic specialization の発達が DES の作用によって遅滞し、adluminal compartment が確立されないためと考えられる。

DES の新生仔マウスへの投与が Sertoli 細胞の正常な増殖を抑制するという報告があるが、本研究の所見から、DES は Sertoli 細胞の正常な分化発達をも障害すると考えられる。DES による精子形成障害が可逆的に修復可能であることも明らかになったが、この知見は Sertoli 細胞分化の遅延が可逆的に回復することと良く相関しており、DES 作用の分子機構解明への重要な基盤となる。

DES の作用機序とエストロゲン受容体: これまで、DES を齧歯類雄新生仔に過量投与した場合の作用機序として、DES が gonadotropin (FSH) 分泌を抑制することにより Sertoli 細胞の正常な発育を抑制する可能性や、DES がエストロゲン受容体 (estrogen receptor, ER) を介して Sertoli 細胞へ直接作用する可能性が考えられている。ER については ER α と ER β の 2 つのサブタイプがあることが報告されている。ER α は主に精巣網の上皮細胞の核に存在する。さらに、ER α 遺伝子ノックアウトマウス (α ERKO) に DES を過量投与したときに、同様の処置をした正常マウスでみられるような精巣の異常がみられなかったことから、DES は ER α を介して作用する可能性が示唆されている。ただし、ER α の局在が精細管内には認められず、DES の障害作用機序のすべてを説明できないことも確かである。

これに対し、最近発見された ER β は種々の組織に発現していて、なかでも Sertoli 細胞と A 型精祖細胞の核に発現していることから、DES の作用点としての可能性を示すものと言える。しかし、ER β 遺伝子ノックアウトマウス (β ERKO) の表現型には何の異常もみられず、受精能も正常であったため、ER β が内因性エストロゲンの作用発

現にどう関与しているかは現時点では不明である。しかし、過量のエストロゲン化合物が投与された場合は、ER β と結合して障害作用を及ぼす可能性がある。

現時点ではERとDESとの関係は不明であり、したがってDESがいずれの経路を介してSertoli細胞の障害を引き起こすかについては、ノックアウトマウスを用いたERの研究とともに、本研究におけるERアンタゴニストを用いたDES作用の研究が必要となる。

DES曝露によるSertoli細胞障害に対するエストロゲン受容体アンタゴニスト投与の効果

DES投与によって引き起こされるSertoli細胞の形態と機能の異常、とくに特殊接合装置の形成障害と血液-精巣関門の機能障害が、DESのエストロゲン様作用によるものか、あるいはDES特有の直接作用によるものかを明らかにするために、DESとともにエストロゲン受容体アンタゴニストである4-OH-Tamoxifen (Tam)を投与した。その結果、TamにはDESによるSertoli細胞障害を防止あるいは軽減する効果が認められなかった。したがって、DESはエストロゲン受容体と直接反応しない別の作用機序を介する可能性が示唆された。

さらに、Tamのみの投与によっても、Sertoli細胞の発達障害と精子形成異常が一過性に生じること、DESとTamの同時投与により、各々の単独投与では認められなかったLeydig細胞の発達障害と筋様細胞の形成異常が生じたことは、これらの分子の作用機序がin vitroで観察されたアゴニスト

アンタゴニストの関係だけでは説明できないことを示している。In vivoではむしろ両者は協同的に作用して新たな効果を生じている可能性があり、今後、内分泌攪乱化学物質の複合作用のモデルとなりうる。

マウス精巣発達過程におけるDES曝露による遺伝子発現の変動の解析

DNAマイクロアレイによるDNAチップを用いた遺伝子発現解析により、胎生期のDES曝露により発現が増大あるいは低下する遺伝子を同定した。今後、これらの遺伝子の組織内発現様式や変動パターンの解析を行うとともに、変動する遺伝

子群の間で細胞内シグナル伝達系のような共通の機能的連関についての系統的解析を行ってゆく必要がある。

(2)DESの培養Sertoli細胞株に対する作用機序

二次元電気泳動により検出された、DES曝露によりTM4で特異的に減少する蛋白DES-responsive proteins of Sertoli cell (DREPS)は線維芽細胞株には検出されず、Sertoli細胞に特異的な蛋白である可能性がある。電顕的に観察された小胞体の異常は、小胞体が特殊接合装置(ectoplasmic specialization)の構成要素であることから、特殊接合装置のin vivoにおける形成障害をin vitroで反映している可能性がある。したがって、DREPSは特殊接合装置の構成分子の可能性も考えられ、DESによる発現抑制とin vivoで認められる特殊接合装置の発達障害を結びつける機能をもつことが期待される。

一方、DES曝露によりTM4で特異的に亢進するチロシンリン酸化 DES-induced tyrosine phosphorylation in Sertoli cell (DITYPS)については、DESの細胞膜への作用から引き起こされるSrcファミリーチロシンキナーゼの活性化と、これを介する特殊接合装置の形成制御システムとして機能している可能性がある。マウス精巣においてFynチロシンキナーゼ基質分子の80kDa蛋白のリン酸化がDES投与で亢進することも見出しており、このリン酸化反応がDESによる精子形成障害の指標となることが強く示唆される。現在、これらの蛋白の精製、部分アミノ酸配列の決定からcDNAクローニング、遺伝子構造の決定、ノックアウトマウスの作成をめざしたプロジェクトの実現が必要とされている。

さらに、DES非処理とDES処理を行ったTM4 cell lineからRNAを抽出し、DNAチップによりDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現頻度解析を行って、DES投与によりSertoli細胞特異的に発現が変動する遺伝子の検出、同定のプロジェクトを開始している。

(3)生殖細胞特異的制御分子のDES曝露による変動の解析

PS-1、Notch-1 は精子形成細胞の特定の分化発達段階に発現する。DES 曝露により精子形成細胞の発達障害が起こった精巣におけるこれらの分子の発現様式は、各生殖細胞を形態学的に分類同定した結果とよく対応し、今後、精子形成障害の程度とパターンを容易に同定するための分子マーカーとなることがわかった。

一方、Sertoli 細胞のマーカーとして新たに TuJ1(neuron specific tubulin)が有用であることを見いだした。これを用いることにより、これまで顕微鏡所見と F-actin 標識の組み合わせから Sertoli 細胞の全体像を類推していたが、このマーカーにより、DES 曝露マウス精巣の Sertoli 細胞の構築が明瞭となった。

また、新たにアクチン制御分子 WAVE1、3 の cDNA クローニングにより、これらの遺伝子発現が精粗細胞にみとめられることが明らかとなり、今後、幹細胞の動態も解析可能と考えられる。これとともに、精巣特異的 PS-1 アイソフォームおよび Fyn チロシンキナーゼ基質分子(80kDa 蛋白)の cDNA のクローニングが進行中であり、今後、新たな分化発達段階のマーカーや DES 反応性蛋白の局在と機能が明らかになると考えられる。

E. 結論

内分泌攪乱化学物質の代表的な化合物であるエストロゲン様化合物 diethylstilbestrol(DES)の精子形成障害作用のメカニズムを光学顕微鏡、電子顕微鏡、レーザー顕微鏡による形態学的解析ならびに生化学、分子生物学的解析により検討した。

その結果、発達過程において、支持細胞である Sertoli 細胞が重要な作用点であり、その分化発達障害が主たる作用機構であることが示唆された。これとともに、細胞生物学的レベルでは、Sertoli 細胞間に形成される特殊接合装置(ectoplasmic specialization)の形成障害、発達遅延が生殖細胞の減数分裂の進行に重大な影響を与えていることを明らかにした。DNA チップを用いた遺伝子発現解析からも、DES 投与で変動する遺伝子群が検出できた。さらに、Sertoli 細胞株 TM4 の DES 曝露による形態学的ならびに生化学的反

応から、この細胞株が Sertoli 細胞特有の性質を保持し、DES により特異的な蛋白発現ならびにチロシンリン酸化反応をしめすことが明らかとなった。また、DES の作用はエストロゲン受容体アンタゴニストではほとんど拮抗できないことも明らかにになった。

以上の解析から、DES はチロシンリン酸化酵素を介する細胞内シグナル伝達系を介して Sertoli 細胞の遺伝子発現に影響し、これが Sertoli 細胞間の接着構造の形成異常、ひいては生殖細胞の減数分裂の障害を引き起こすことが強く示唆された。今後、DES に反応して変動する Sertoli 細胞特異的分子の構造、機能の解明は、エストロゲン化合物による生殖細胞障害とその可逆性の機構解明、障害とその修復能の分子マーカーの開発に発展する可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Toyama Y, Iwamoto T, Yajima M, Baba K, Yuasa S.
Decapitated and decaudated spermatozoa in man and pathogenesis based on the ultrastructure.
International Journal of Andrology vol.23, 109-115, 2000

湯浅茂樹

ノックアウトマウスリスト 精巣：精子形成
生体の科学 vol.51, 478, 2000

Kojima S, Hatano M, Okada S, Fukuda T, Toyama Y, Yuasa S, Ito H, Tokuhisa T.
Testicular germ cell apoptosis in Bcl-6-deficient mice.
Development vol.128, 57-65, 2001

Toyama Y, Hosoi I, Ichikawa S, Maruoka M, Yashiro E, Ito H, Yuasa S.

β -Estradiol 3-benzoate affects spermatogenesis in the adult mouse.

Journal of Molecular and Cellular Endocrinology, in press

Toyama Y, Ohkawa M, Oku R, Maekawa M, Yuasa S.
Neonatally administered diethylstilbestrol (DES)
retards the development of the blood-testis barrier in
the rat.

Journal of Andrology, in press

Yuasa J, Toyama Y, Miyauchi T, Maekawa M, Yuasa S,
Ito H.

Specific localization of the basigin protein in human
testes from normal adults, normal juveniles, and
patients with azoospermia.

Andrologia, in press

Yuasa J, Ito H, Toyama Y, Yuasa S, Masai M.

Postnatal development of the testis in Japanese
children.

International Journal of Urology, in press

2.学会発表

(シンポジウム)

湯浅茂樹

環境ホルモンの精子形成と神経発生への障害メ
カニズム:遺伝子欠損マウスからの分子細胞生物
学的アプローチ

日本獣医学会学術集会シンポジウム(2000年
4月4日)

講演要旨集 p.21

Maekawa, M

Fyn tyrosine kinase in the mouse testis:
Morphological and biochemical abnormalities in the
fyn-deficient mouse

XV International Symposium on Morphological
Sciences

(September 18-21, 2000; Kyoto, Japan)

Abstract, p18

前川眞見子

精巣における Fyn チロシンキナーゼの機能 シグ
ナル伝達の観点から

第5回 Wako つくばフォーラム 精子形成の最先

端(2000年9月29日)

要旨集 p6

外山芳郎

生殖細胞 セルトリ細胞間特殊接合装置:環境ホ
ルモンおよび遺伝子ノックアウトからの新局面
生理学研究所「生殖細胞の構造と機能発現に関す
る研究会」(2000年11月24日)

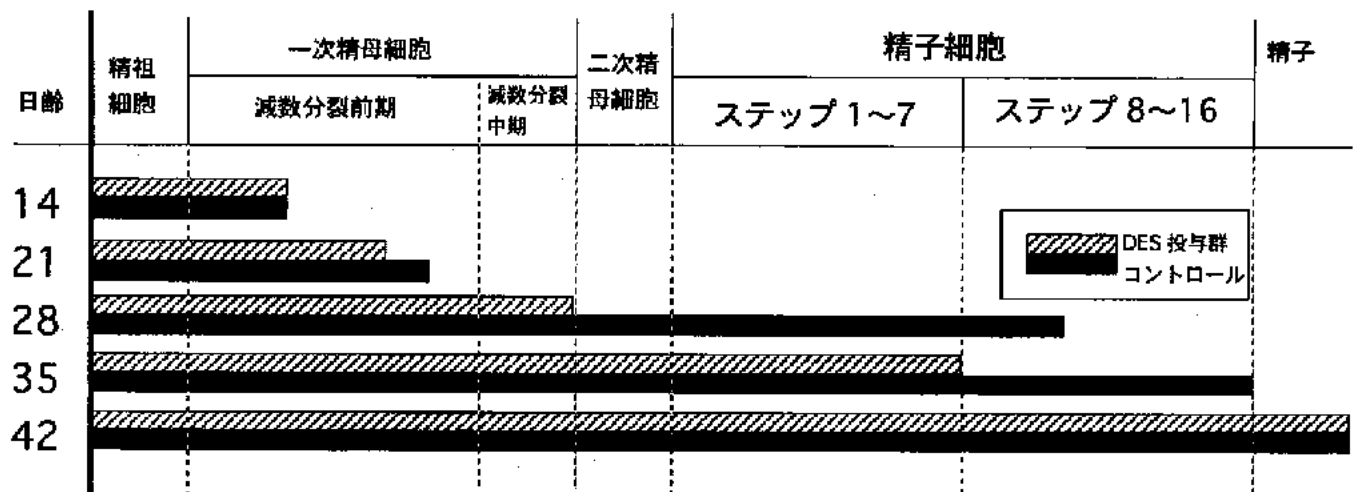
外山芳郎

女性ホルモンと精巣

千葉大学市民公開講座「我々をとりまく内分泌攪
乱化学物質(環境ホルモン)」(2000年12
月20日)

要旨集 p.9-11

図1 新生仔期 DES 投与によるマウス生殖細胞分化の遅延



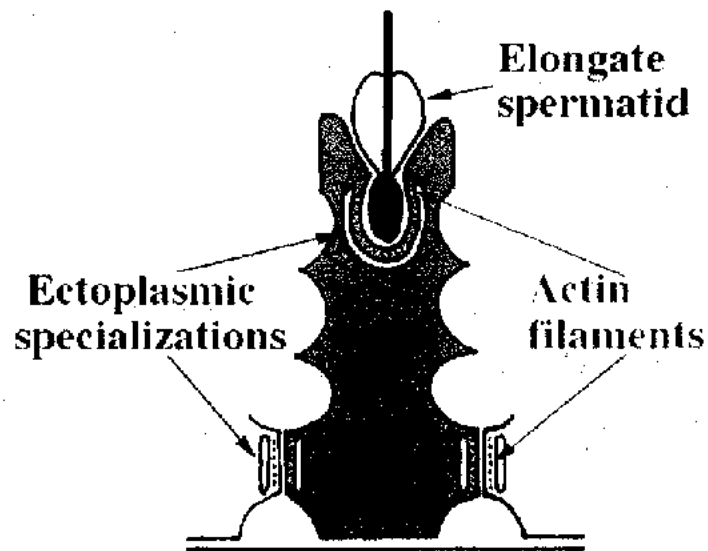
14 日齢までは DES 投与マウスと対照マウスの精上皮の発達段階に差がなかった。21 日齢対照マウスでは一次精母細胞がみられた。DES 投与マウスでは変性した精母細胞が多数みられた。28 日齢対照マウスでは step11 精子細胞まで分化が進んでいるのに対し、DES 投与マウスでは一次精母細胞の分化が減数分裂中期でとどまっていた。35 日齢対照マウスでは分化は step16 精子細胞まで進んでいたが、DES 投与マウスでは step6 精子細胞までしか進んでいなかった。そして、42 日齢以降は両群とも精子形成が認められた。すなわち、DES 投与マウスでは1週間遅れて 35 日齢になって初めて減数分裂の進行、精子細胞の出現が認められ、DES 投与マウスにおける発達の遅延は部分的に回復可能なものであった。

表1 雄ラット新生仔への DES、Tamoxifen (Tam)および DES-Tam 複合投与の作用の比較

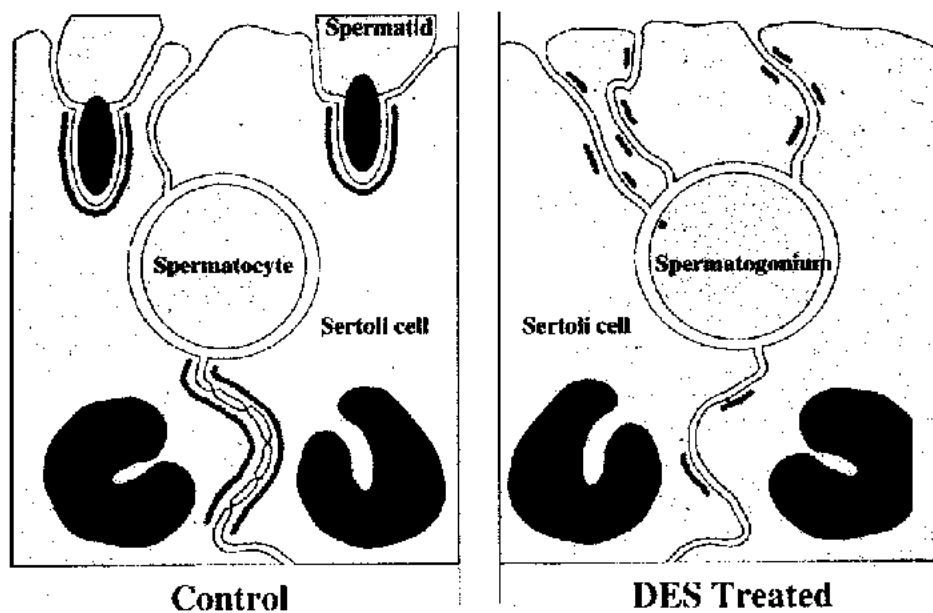
	減数分裂の 阻止	血液・精巣関門の 形成遅延	ライディッヒ細胞の 発生阻害	筋様細胞の 変性
DES 単独	++	++	-	-
Tam 単独	+	+	-	-
DES + Tam	++	++	+	++

DES、Tam 単独投与では生殖細胞分化、Sertoli 細胞発達の遅延が生じるが、両者の複合投与で新たに Leydig 細胞、筋様細胞の形成異常が生じる。DES による精子形成障害に対する Tam の拮抗作用は認められなかった。

図 2 Sertoli 細胞特殊接合装置 (ectoplasmic specialization) の構成と DES 曝露による形成障害

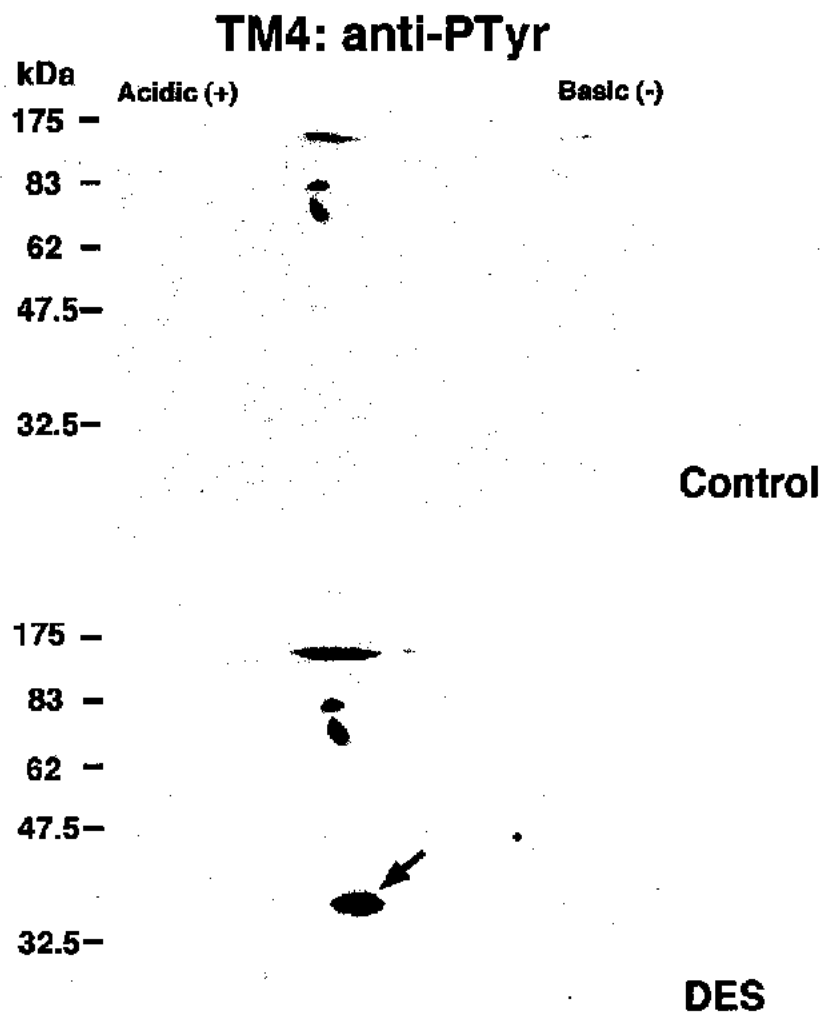


Sertoli 細胞が形成する特殊接合装置(ectoplasmic specialization)の模式図。精子細胞頭部-Sertoli 細胞間、隣接する Sertoli 細胞基底部間に形成され、細胞膜直下にアクチンフィラメント、その直下に小胞体が局在する。



対照ならびに DES 投与マウス精巣における特殊接合装置 (ectoplasmic specialization) の形成と分布。DES 投与精巣では Sertoli 細胞間の特殊接合装置の形成遅延が起こる。また、精子細胞への分化も著明に遅れるため、精細管内腔に面した Sertoli 細胞突起間に異所性の接着構造が形成される。

図 3 DES 処理 TM4 細胞株における特異的蛋白のチロシンリン酸化の亢進



二次元電気泳動—Western blotting により DES 曝露した TM4 で分子量 38kD, 等電点 5.9 の蛋白(矢印)のチロシンリン酸化の著明で特異的な亢進が認められ、DES-induced tyrosine phosphorylation in Sertoli cell line (DITYPS)と命名した。

Molecular and cellular biological mechanisms of the defective spermatogenesis due to the exposure to the endocrine disruptors

Shigeki Yuasa

Chiba University, Graduate School of Medicine, Department of Anatomy and Developmental Biology

Professor and Chairman

Key Words:

diethylstilbestrol, ectoplasmic specialization, blood-testis barrier, estrogen receptor antagonist, tamoxifen, spermatogenesis, tyrosine phosphorylation, signal transduction, endocrine disruptors, Sertoli cell.

Abstract:

It has been established that various estrogenic chemicals affect spermatogenesis as the endocrine disruptors. However, the precise cellular and molecular-biological mechanisms of harmful effects elicited by these endocrine disruptors are not clear at present. It is needed to elucidate the action mechanisms of the endocrine disruptors for the prospective detection of harmful chemicals and prevention of the hazards caused by these chemicals.

In this study, the mechanisms of defective spermatogenesis caused by the neonatal exposure to a typical estrogenic compound, diethylstilbestrol (DES), were investigated morphologically and molecular biologically by using both in vivo and in vitro systems. Consequently, it has been elucidated that DES-induced defective spermatogenesis, especially the arrested meiosis is based on the disruption of blood-testis barrier due to the defective development of ectoplasmic specialization between the Sertoli cells. This DES-induced defect has been revealed to be reversible and not to be prevented by the simultaneous administration of estrogen receptor antagonist, Tamoxifen. Furthermore, the simultaneous administration of DES and Tamoxifen caused the dysgenesis of Leydig and myoid cells, and it has been suggested that the combination of estrogen receptor-related molecules might cause unexpected severe defects. In combination with this result, the profile of the

changed pattern of testicular gene expression following DES exposure at the neonatal stage was examined by DNA microarray.

Subsequently, DES-induced changes in the Sertoli cells were morphologically and biochemically analysed by using Sertoli cell-derived cell line TM4. Electron-microscopically, the enlargement and dilatation of rough endoplasmic reticulum was induced in TM4 cell line. By the two-dimensional electrophoresis and Western blotting analysis of the proteins of Sertoli cell line, DES-induced reduction of specific proteins and DES-induced enhancement of tyrosine phosphorylation of specific protein was revealed. These changes were specific for the TM4 cell line and were not observed in the fibroblast-derived cell line NIH3T3. Thus, these molecular changes should be applied as the molecular markers for DES exposure.

On the other hand, new molecular markers for germ cells and Sertoli cells were developed. Notch-1 and presenilin-1 as the markers for specific stage of germ cell development and TuJ1(neuron-specific tubulin) as the marker for Sertoli cells were applied to examine the effect of DES exposure at the neonatal stage. The mode of expression of these markers correlated well to the degree of defects in the spermatogenesis as judged by the morphological examination.

Estrogenic molecules have been considered to exert the effects through the binding to the nuclear estrogen receptors and the regulation of gene transcription. Recently, another mechanisms of estrogen actions which exert the effects by binding to the membrane estrogen receptors and activating the tyrosine kinase-mediated intracellular signal transduction cascade have been proposed. The findings in this project suggest that the crossover points between the tyrosine kinase-mediated signal transduction system and the cell adhesion-cytoskeletal system (i.e. ectoplasmic specialization between Sertoli cells) might be one of the new targets of harmful estrogenic compounds.

2. 核内転写調節 (PPAR) 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

研究者 那須 民江 (信州大学医学部衛生学講師)

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 α の誘導について、SV/129 雄マウスを用いて、PPAR α -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 α 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) とノニルフェノール (NP) による PPAR α の誘導と生殖障害性について、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 α 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 α 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 α 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) トータルダイエツト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。

研究者協力者

青山 俊文 (信州大学医学部教授)
福嶋 義光 (信州大学医学部教授)
大村 実 (九州大学大学院医学系研究科助手)
佐々木 一敏 (長野県衛生公害研究所主任研究員)
畑 由紀子 (信州大学医学部大学院生)
山ノ下 理 (信州大学医学部研究生)

1. 研究目的

昨年度の研究において、0.05% の di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP, CAS-No. 117-81-7) は野生型マウスの繁殖を低下させるが、PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor) ノックアウトマウスの繁殖には影響を与えないことを明らかにした。この結果は DEHP のマウス繁殖に与える影響が PPAR α に依存していることを示唆する。こ

のような結果を踏まえて、12 年度は以下の研究を行った。

- 1) リスク評価の知見を得るために、DEHP による繁殖影響の量-反応関係を検討
- 2) 一連のフタル酸エステル類による PPAR α の誘導
- 3) 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-DA) の生殖毒性と PPAR α との関連性およびノニルフェノール (NP) の生殖毒性との比較
- 4) 食事中的フタル酸エステル類の濃度を測定し、一日の摂取量を推定 (昨年度からの継続)

2. 研究方法

- 1) 実験動物

動物実験はすべて信州大学中央実験動物施設の動物実験ガイドラインに沿って行われた。雌雄の野生型 SV/129 マウス (Wild-type mice,) と PPAR α -null mice (ノックアウトマウス) を使用した。動物は温度、湿度、明暗が管理されたクリーンルームで市販の固形飼料と水を自由に与えられながら飼育された。

実験 1

5 種のフタル酸エステル (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、ジエチルヘキシルフタル酸, DEHP) およびアジピン酸エステル (ジエチルヘキシルアジピン酸, DEHA) それぞれ 0.6mmol/kg を 16 週齢の雄 129/SV マウスに 1 日 1 回、14 日間投与した。最終投与から 16 時間後に解剖し、肝の PPAR α の誘導ならびに精巣の障害性、血清テストステロン濃度を検討した。

実験 2

12 週齢の ddY マウス (日本 SLC より購入) に、2,4-DA, (0.23, 0.45, 0.68mmol/kg)、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸エステル (2,4DE, 0.21, 0.43, 0.64mmol/kg)、NP, (0.23, 0.91, 1.36, 1.82mmol/kg) をそれぞれ 1 日 1 回、14 日間投与した。最終投与 16 時間後に解剖し、肝の PPAR α の誘導ならびに精巣の障害性、血清テストステロン濃度を検討した。

実験 3

国民栄養調査 (平成 9 年度、関東第 2 ブロック) 結果による「食品群別にみた食品摂取量」に基づき、長野県内の小売店等で購入した約 140 品目の食品を実際の食事形態に従って調理したものを 13 群に大別し、各食品群毎に均一に混合し分析用試料とした食事からのフタル酸エステル類 (DEP, DBP, BBP, DEHP 及びジブチルピルフタル酸, DPP) の摂取量を推定した。分析は外海らの方法に準拠した。

2) 病理的観察

採取された精巣はブアン固定し、所定の

方法で病理標本を作成し、化学物質処理による精巣障害性を顕微鏡下で検討した。

3) 血清性ホルモン

化学物質曝露による精巣障害と性ホルモンレベルとの関係を明らかにするために、血清テストステロンおよびエストラジオールのレベルが測定された (三菱化学ピーシーエルに委託)。

4) PPAR α の誘導

ペルオキシゾームの増殖および脂肪酸 β 酸化系酵素は PPAR α に強く制御されている。投与された化学物質による肝の PPAR α の誘導を確認するために、標的遺伝子産物であるペルオキシゾームおよびミトコンドリアの脂肪酸 β 酸化系酵素の誘導を Western blot 分析により行った。マウスの肝サンプルを電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。各種抗体 (ペルオキシゾーム酵素抗体として、peroxisomal thiolase: PT; peroxisomal bifunctional protein: PH; D-type bifunctional protein: DBF に対する抗体、ミトコンドリア β -酸化系酵素抗体として極長鎖アシル CoA 脱水素酵素: VLCAD と trifunctional protein α subunit: TP α , long chain-specific 3-ketoacyl-CoA thiolase: TP β ; に対する抗体、フタル酸エステル類の代謝酵素である CYP4A に対する抗体) を用いて、それぞれの酵素の発現を調べ、脂質代謝と PPAR α の誘導の指標とした。同時に肝の RNA を抽出し、ABI7700 を用いて PPAR α -mRNA も測定した。

酸化ストレス消去系の指標として、カタラーゼの発現を western blot 分析で、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の活性を BIOXYTECH のキットを用いて測定した。

5) 肝および血清のトリグリセライドの測定

DEHP による PPAR α の誘導、これに伴う脂肪酸 β 酸化系酵素の誘導の肝と血清のトリグリセライドレベルへの影響を評価した。肝のトリグリセライドは脂肪をクロロ

ホルム-メタノールで抽出後、血清は抽出操作なしに、和光のトリグリセライド測定キット（トリグリセライドGテストワコー）を使用して測定した。

3. 研究結果

1) PPAR α 誘導の構造-活性相関

昨年度の結果より DEHP によるマウスの繁殖の低下が PPAR α に関わっていることが明らかとなった。これは PPAR α の誘導の強さが繁殖への影響の一指標となることを示唆する。そこで、一連のフタル酸エステル類とアジピン酸エステルの PPAR α の誘導の強さの構造-活性相関を検討した。PPAR α の誘導は標的酵素蛋白の誘導でみた。表1に示す様に、使用した濃度での DEP による誘導は認められなかった。DBP は弱い誘導剤で、TP α と CYP4A1 の誘導のみが有意であった。誘導は、DBF と VLCAD を除いて、化学物質の分子量が大きくなるにつれ、また疎水性が高くなるにつれ強くなった。最も誘導が強かったのは DEHP であった。検討したアジピン酸エステル(DEHA)も PPAR α を誘導し、その程度は DEHP と同じか、あるいは若干弱かった。DEHA と DEHP はこのようなペルオキシゾーム酵素ばかりでなく、ミトコンドリアの脂肪酸 β 酸化系酵素も誘導した。このようなペルオキシゾーム系酵素、ミトコンドリア系酵素の誘導に対応して PPAR α -mRNA が誘導されており、PPAR α の転写活性化が一連のフタル酸エステルの分子量の増加に応じて起こっていることが推察された。一方、これらの誘導剤は酸化ストレス消去酵素である、カタラーゼや GPx を誘導する事はなく、むしろ低下させていた。これらの結果は使用した PPAR α 誘導剤処理により、肝はより強い酸化ストレスにさらされる可能性を示唆する。

DBP と BBP は血清のテストステロン濃度を低下させたが、他の誘導剤処理による低下は認められなかった。即ち、血清テストステロン濃度への影響は肝の PPAR α 誘導の強さとはあまり関係ないことが明らかとなった。使用した濃度のフタル酸エステル

類およびアジピン酸エステルはマウス精巣に顕微鏡下での明らかな病理的变化をもたらさなかった。使用したフタル酸エステル類およびアジピン酸エステル類はエストラジオール濃度には影響を与えなかった。

2) 2,4-DA, 2,4-DE および NP による PPAR α の誘導と生殖器障害

ddY 系雄マウスを用いて、2,4-DA, 2,4-DE および NP の PPAR α の誘導と生殖器障害性について3つの投与量を用いて検討した。2,4-DA と 2,4-DE は量-反応的に PPAR α 標的酵素 (PT, PH, DBF, CYP4A1) を誘導した (表2)。2,4-DA と 2,4-DE の誘導パターンは殆ど同じであった。これらの結果は 2,4-DA が PPAR α のリガンドであることを示すものである。2,4-DA は PPAR α ノックアウトマウス (129/SV) のこれらの酵素を誘導しないので (データ示さず)、2,4-DA は PPAR α のリガンドであることが証明された。これらの結果とは対称的に、NP は検討した酵素群にわずかな影響を与えたのみであり、PPAR α への結合は 2,4-DA や 2,4-DE に比べると、無視出来る程度に小さいことが明らかとなった。使用した化学物質はカタラーゼを誘導する事はなく、むしろこの酵素の発現を低下させる傾向であった。

2,4DA と 2,4-DE は肝や血清のトリグリセライドに影響を与えなかった。NP の高投与群において肝のトリグリセライドの上昇が認められたが、これは全身状態の悪化が起因していたのかもしれない。

2,4-DE 群において、投与量が増大するにつれ、血清テストステロン濃度が減少したが、2,4-DA や NP 投与後は一定の量-反応関係が認められなかった。高および中程度濃度の 2,4-DE 投与後、マウス精巣において精細管異常が観察されたが、量-反応的な変化ではなかった。

3) フタル酸エステル類の食事からの摂取量

1997 年度国民栄養調査結果を基に、トータルダイエット方式による食品群別にフタル酸エステル類の濃度を測定した。一例で

はあるが、ほとんどの食品群で、測定した5種のフタル酸エステル類の中ではDEHP濃度が高かった。DEHP濃度を食品群別に比較すると、砂糖・菓子類、雑穀・芋類、魚介類で高く、米類及び果実類は検出下限値未満であった。

各食品群別の濃度と一日摂取重量からフタル酸エステル類の食品群別摂取量を算出した。濃度が検出下限値未満の場合、その物質が全く含まれていないとは言いきれないので、検出下限値の1/2の濃度があるものと仮定して摂取量を算出した。フタル酸エステル類の1日当たりの摂取量（各群の合計）はDEHPが他のフタル酸エステル類に比べ圧倒的に多かった。

食品群別にDEHPの摂取量を比較すると雑穀・芋類が最も高く、次いで魚介類群、砂糖・菓子類群の順であり、各群を合計した1日当たりの総摂取量は $166\mu\text{g/day}$ であった。DEP, DPP, DBP, BBPの一日摂取量はそれぞれ、0.94、2.4、8.6、 $4.2\mu\text{g/day}$ であり、DEHPよりはるかに少なかった。

4. 考察

一連のフタル酸エステル類およびアジピン酸エステルのPPAR α の誘導と分子量あるいは疎水性との間には良い正の相関関係が得られた。即ち、フタル酸エステル類およびアジピン酸エステルのうち分子量の大きい化学物質ほど、また疎水性が高いほどPPAR α の誘導性が強いといえる。検討したフタル酸エステル類の中ではDEHPが誘導性が最も強く、従って、PPAR α 依存性の毒性はこの化学物質が最も強いかもしれない。DEHPとDEHAは芳香族ジカルボン酸エステルか脂肪族ジカルボン酸エステルの違いである。この2つの化学物質が類似した、あるいは分子量に依存したPPAR α 誘導作用を示すことに興味を持たれる。即ち、この2種の化学物質に関しては、芳香環と脂肪族の構造上の違いはPPAR α の誘導にはあまり関係していないことになる。

2,4-DAも内分泌攪乱作用の疑いがもたれている化学物質である。この物質もPPAR

α 誘導剤であることが判明した。この化学物質のPPAR α 誘導作用をフタル酸エステルやアジピン酸エステルと比較してみた。使用した動物種が異なるために、直接的な比較は出来ないが、PPAR α の誘導は強い印象を受ける。従って、DEHP投与後に見られたPPAR α を介した生殖毒性は2,4-DAにも見られるかもしれない。一方、NPによるPPAR α の誘導は殆どみられず、この化学物質によるPPAR α を介した生殖毒性はみられないであろう。

食品のフタル酸エステル類による汚染はこれらを可塑剤として使用しているプラスチック製品に由来すると考えられ、特にDEHPは塩化ビニル製の手袋、ラップ等との接触により濃度が上昇すると報告されている。本調査でDEHP濃度が高かった雑穀・芋類、砂糖・菓子類は小麦粉を原料とした麺類、パン類、各種和洋菓子等工場加工された食品類を多く含んでいる。これに対し、濃度が低かった米類、果実類は工場調理加工された食品の割合が少ない。このことは、食品中へのDEHPの混入は加工食品の製造工程において衛生管理上使用される手袋など、塩ビ製品に由来する割合が高いことを示唆していると考えられる。

今回のようなトータルダイエットスタディー的な方式によるフタル酸エステル類の摂取量評価の報告例は少ない。一例ではあるが、食品汚染が最も大きいのはDEHPであった。英国MAFFが行ったトータルダイエットスタディー的な方式による調査ではDEHPの推定一日摂取量は平均 $150\mu\text{g}$ 、高濃度摂取者で $300\mu\text{g}$ と報告されている。本測定結果は、この平均摂取量とほぼ同レベルであった。今後測定例数を重ねて、摂取量の推定を行う予定である。

5. 結論

一連のフタル酸エステル類およびアジピン酸エステルは分子量に比例してPPAR α を誘導する。2,4-DAもPPAR α 誘導剤である。食事中にはDEHPが含まれている。その他のフタル酸エステル類の含有量は少

ない。

6. 研究発表

論文発表

1) 中島民江 PPAR を介した環境ホルモンによる生殖器障害 細胞 31: 239-242, 1999

Nakajima T, Kamijo Y, Usuda N, Liang Y, Fukushima Y, Kametani K, Gonzalez FJ,

2) Aoyama T. Sex-dependent regulation of hepatic peroxisome proliferation in mice by trichloroethylene via peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). Carcinogenesis 21: 677-682, 2000.

学会発表

第 71 回日本衛生学会総会 (2001 年、福島市) で発表予定

表 1 Effects of phthalates on the PPAR α -related hepatic enzymes

Treatment	m.w	log Pow	PT	PH	DBF	VLCAD	TP α	TP β	CYP4A	PPAR α -mRNA
Control			1.00 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.32	1.00 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.31	0.80 $\pm$ 0.10
Diethylphthalate	222.24	2.38	0.98 $\pm$ 0.16	1.02 $\pm$ 0.01	1.63 $\pm$ 0.40	1.04 $\pm$ 0.03	1.32 $\pm$ 0.47	1.18 $\pm$ 0.18	1.08 $\pm$ 0.28	0.96 $\pm$ 0.38
Dibutylphthalate	278.34	4.45	1.04 $\pm$ 0.26	1.20 $\pm$ 0.04	0.92 $\pm$ 0.05	0.92 $\pm$ 0.07	1.64 $\pm$ 0.19 ^a	1.17 $\pm$ 0.07	1.51 $\pm$ 0.27 ^a	1.11 $\pm$ 0.28
Butylbenzylphthalate	312.37	4.59	1.44 $\pm$ 0.04 ^a	1.16 $\pm$ 0.06	1.43 $\pm$ 0.36 ^a	0.95 $\pm$ 0.05	1.90 $\pm$ 0.18 ^a	1.32 $\pm$ 0.06 ^a	1.82 $\pm$ 0.11 ^a	1.36 $\pm$ 0.29 ^a
Dicyclohexylphthalate	330.42		1.25 $\pm$ 0.18	1.08 $\pm$ 0.07	1.94 $\pm$ 0.43 ^a	0.97 $\pm$ 0.04	1.96 $\pm$ 0.33 ^a	1.34 $\pm$ 0.13 ^a	1.56 $\pm$ 0.25 ^a	1.47 $\pm$ 0.24 ^a
Diethylhexylphthalate	390.56	7.5	1.59 $\pm$ 0.14 ^a	1.59 $\pm$ 0.06 ^a	2.14 $\pm$ 0.27 ^a	1.22 $\pm$ 0.01 ^a	2.60 $\pm$ 0.28 ^a	1.73 $\pm$ 0.19 ^a	2.69 $\pm$ 0.54 ^a	1.54 $\pm$ 0.33 ^a
Diethylhexyl adipate	370.57		1.31 $\pm$ 0.18 ^{a,b}	1.37 $\pm$ 0.07 ^{a,b}	1.71 $\pm$ 0.55 ^a	1.34 $\pm$ 0.07 ^a	2.67 $\pm$ 0.19 ^a	1.78 $\pm$ 0.26 ^a	2.24 $\pm$ 0.30 ^{a,b}	1.70 $\pm$ 0.06 ^{a,c,d}
Correlation ^c			*	*			**	*	**	**
Correlation ^f				*					*	*

^aSignificantly different from control(p<0.05)^bSignificant difference between diethylhexylphthalate and diethylhexyladipate treatments^cSignificantly different from diethylphthalate(p<0.05)^dSignificantly different from dibutylphthalate(p<0.05)^eCorrelation between molecular weight and induction of several enzymes^fCorrelation between log Pow and induction of several enzymes

表2 Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and nonylpneol on the PPAR α -related hepatic enzymes

	PT	PH	DBF	CYP4A	Catalase
2,4-dichlorophenoxyacetic acid					
0mmol/kg	1.00±0.15	1.00±0.06	1.00±0.13	1.00±0.78	1.00±0.03
0.23mmol/kg	1.55±0.15 ^a	1.00±0.18	1.44±0.17 ^a	1.35±0.30	1.05±0.03
0.45mmol/kg	2.42±1.00 ^a	1.38±0.36	1.27±0.17 ^a	3.99±0.71 ^{a,b}	1.14±0.06
0.68mmol/kg	4.40±0.70 ^{a,b,c}	3.14±0.30 ^{a,b,c}	2.03±0.29 ^{a,b,c}	17.61±5.38 ^{a,b,c}	1.16±0.04
2,4-dichlorophenoxyacetate					
0mmol/kg	1.00±0.11	1.00±0.25	1.00±0.28	1.00±0.28	1.00±0.07
0.21mmol/kg	2.66±0.82 ^a	1.08±0.02	1.33±0.23	2.38±0.60 ^a	0.92±0.03
0.43mmol/kg	3.63±0.91 ^a	1.49±0.23 ^{a,b}	1.62±0.17 ^a	3.77±0.95 ^{a,b}	0.87±0.03 ^a
0.64mmol/kg	5.53±0.44 ^{a,b,c}	1.58±0.11 ^{a,b}	2.44±0.32 ^{a,b}	7.21±0.68 ^{a,b,c}	0.98±0.09
Nonylphenol					
0mmol/kg	1.00±0.15	1.00±0.14	1.00±0.09	1.00±0.27	1.00±0.12
0.23mmol/kg	0.85±0.09	1.04±0.07	0.91±0.05	1.09±0.28	0.80±0.08
0.91mmol/kg	1.57±0.44	1.25±0.15	0.75±0.04 ^{a,b}	1.18±0.41	0.69±0.08
2.72mmol/kg	1.54±0.45	1.32±0.12 ^a	0.97±0.05	1.51±0.24 ^a	0.83±0.09

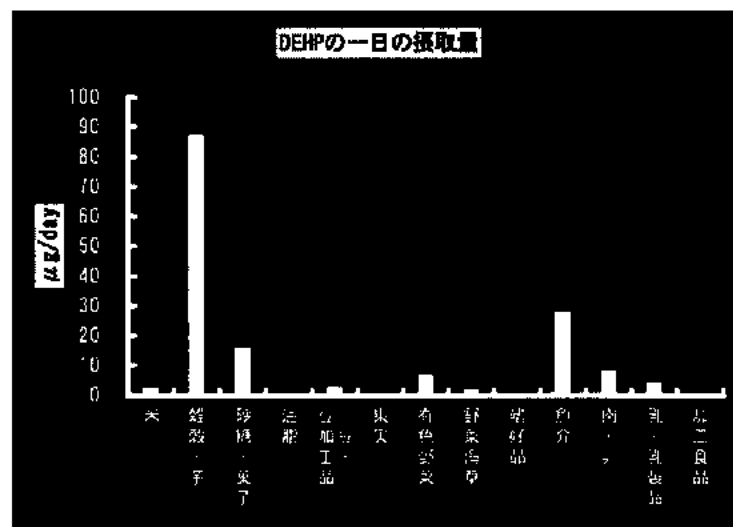
^aSignificantly different from control(p<0.05)^bSignificantly different from low-dose group(p<0.050)^cSignificantly different from medium-dose group(p<0.05)

表3 フタル酸エステル類の食品群別一日摂取量

単位: $\mu\text{g}/\text{day}$

	米	雑穀・芋	砂糖・菓子	油脂	豆・ 豆加工品	果実	有色野菜	野菜海藻	嗜好品	魚介	肉・卵	乳・乳製品	加工食品	総計
DEP	0.22	0.14	0.02	0.01	0.05	0.06	0.05	0.11	0.09	0.06	0.07	0.07	0.00	0.94
DPP	0.22	0.14	0.02	0.01	0.05	1.50	0.05	0.11	0.09	0.06	0.07	0.07	0.00	2.38
DBP	1.94	1.26	0.22	0.08	0.41	0.58	0.43	0.98	0.80	0.50	0.60	0.59	0.20	8.61
BBP	0.82	0.36	1.10	0.15	0.33	0.06	0.20	0.11	0.09	0.59	0.07	0.07	0.24	4.19
DEHP	3.02	87.78	15.42	1.27	3.29	0.91	7.23	2.34	0.93	28.55	8.53	4.66	0.89	165.79

注) 表2において濃度が検出下限値未満の場合は検出下限値の1/2の濃度と仮定して算出した



Reproductive toxicity of endocrine-disrupting chemicals and the mechanism via peroxisome proliferator-activating receptor in relation to the risk assessment
Tamie Nasu (Nakajima), Department of Hygiene, Shinshu University School of Medicine, Lecturer

Key words: phthalates, adipate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, nonylphenol, reproductive toxicity, testosterone, triglyceride, oxidative stress, food contamination

Abstract

- 1) The induction of hepatic PPAR α , a nuclear receptor, by phthalates (diethyl phthalate, DEP; dibutyl phthalate, DBP; butylbenzyl phthalate, BBP; dicyclohexyl phthalate, DCP; diethylhexyl phthalate, DEHP) and an adipate (diethylhexyl adipate, DEHA) was examined with the expression of the target gene products as well as the level of PPAR α -mRNA in SV/129 male mice. DEP dose used could not induce any gene product investigated and the mRNA. The other phthalates were shown to be the inducer of PPAR α , and the strength was dependent on their molecular weight; DEHP was the strongest inducer. DEHA also induced PPAR α , but not so much as DEHP.
- 2) The effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-DA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid methyl ester (2,4-DE) and nonylphenol (NP) treatment on the reproductive organ was examined in relation to the induction of hepatic PPAR α in ddY male mice. 2,4-DA and 2,4-DE induced the nuclear receptor dose-dependently, whereas the induction by NP could be disregarded in comparison to that by 2,4-DA or 2,4-DE. The highest dose of 2,4-DE decreased serum testosterone level. However, no dose-dependent morphological changes in testes were observed.
- 3) The PPAR α inducers used could not induce oxidative stress-scavenging enzymes such as catalase and glutathione peroxidase, but rather lowered, suggesting that mice are exposed to greater oxidative stress after treatment of PPAR α inducers.
- 4) The concentration of phthalates (DEP, DPP, DBP, BBP and DEHP) in the commercial foods was measured, and each daily intake was estimated using total diet study method. Of the phthalates, DEHP was contained most, and the other phthalates were detected with only a marginal content.

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

研究者 小路 武彦 (長崎大学医学部第三解剖学教授)

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 (Fas L) 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種に関しても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 α 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 α サブユニットが有意に減少し、抑制方向に作用するGi α 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。

研究協力者 (所属施設名及び所属施設における職名)

菱川善隆 (長崎大学医学部第三解剖学講師)、
和泉伸一 (長崎大学医学部第三解剖学助手)、
石丸忠之 (長崎大学医学部産婦人科学教授)、
佐藤 浩 (長崎大学医学部実験動物施設教授)

進正志 (長崎大学医学部第三解剖学助手)、
近藤宇史 (長崎大学医学部病態生化学教授)、
植田弘師 (長崎大学薬学部分子薬理学教授)、

A. 研究目的

「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」(環境省)でも指摘されているように、内分泌攪乱物質或いは環境毒性物質の作用に関する多くの知見が、科学的な因果関係の直接的証明がないためしばしば一つの可能性として語られている。既に約70種類以上の化学物質が内分

泌攪乱作用が疑われる物質と指摘されており、特にこれらの物質が生殖細胞障害や生殖器系異常を誘発することから、人類に対し世代を越えた深刻な影響をもたらす可能性が高く、それらの危険性の科学的な評価は現在最も急務な内分泌学並びに生殖生物学上の問題である。そこで本研究に於いては、胎仔期から成

熟期に至るマウス発生・成長の様々な過程で環境毒性物質を投与し雌雄生殖細胞死特に精子形成過程への影響を検討すると共にその分子機構の解明を行うことを目的とする。

実際、我々はこれまでに哺乳類精子形成過程並びに卵子形成過程に於いて特にその生殖細胞死に関する詳細な検討を重ねてきた。それらの結果を基に、内分泌攪乱作用が疑われている DES をはじめポリ塩化ビフェニル、BPA、DDT 並びにアンドロゲン作用を攪乱する DDE 等のマウス生殖細胞死並びに生殖腺機能及び生殖器官への影響を発生初期より個体レベルで検討し、これら環境毒性物質の有害性を EB の影響と比較しながら個体レベルで判定できる評価系の確立を目指す。同時に本研究では、分子組織細胞化学的手法を駆使して形態学的知見と分子生物学の接点に於いて環境毒性物質の作用メカニズムを明らかにすることも目的としており、大きな社会的興味を喚起しているヒトでの精子数の半減や精巣がんの増大、子宮内膜症の誘発といった医学的事象に対する科学的洞察を試みる予定である。尚、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りスク評価優先物質 8 種に関しても鋭意検討を進める。

本年度の具体的な研究標的は以下のものであった。

1) 種々の環境毒性物質について、特に成熟雄マウスに広範囲の濃度領域で皮下投与を行い、生殖細胞死への影響を形態観察と分子組織化学的方法により検討する。同時に、細胞死誘導機構として関与の認められた Fas/Fas L 及び関連分子として Bcl-2 や Bax の発現を免疫組織化学的に検討する。2) 決定したプロトコルに従って、妊娠マウスへ環境毒性物質を腹腔内投与し、新生仔及び成熟期での生殖腺及

び生殖細胞動態(細胞死と増殖活性)を検討する。3) これら毒性物質の第一作用点として、エストロゲン受容体 α と β 、アンドロゲン受容体並びにプロゲステロン受容体の発現状態を 1)、2) の組織切片に於いて解析する。4) 環境毒性物質による活性酸素障害に対する生殖細胞防御機構への作用を検討するため、決定されたプロトコルに従って、上記処理組織での活性酸素代謝関連物質及び抗酸化酵素の発現を生化学的及び分子生物学的に検討する。5) 決定したプロトコルに従って、脳膜標品での $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合活性に対する種々の内分泌攪乱化学物質の影響を、上記組織について検討する。6) 本年度は、マウス子宮内膜症モデルを作製し、種々の環境毒性物質と共に特にダイオキシン類投与による異所性子宮内膜増殖への影響を検討する。

B. 研究方法

1) 成熟マウス並びに妊娠マウスへの生殖毒性物質投与プロトコル

特に本年度は成熟 ICR 雄マウス(6週令)へのこれら生殖毒性物質の広範囲の濃度での影響を検討するため、以下のような投与量(kg 体重あたり)で最終的に 5% エタノール/corn oil に溶解後、5日ごとに皮下投与した。最初の投与から 20 日に組織採取を行った。

EB: 1 ng - 100 μg , 2mg, 4 mg/kg 体重、DES: 1 mg, 10 mg, 20 mg, 100 mg/kg 体重、BPA: 4 μg - 40 mg, 200 mg/kg 体重、DDE: 10 mg, 50 mg/kg 体重。新たなリスク評価優先物質 8 種に関しては、4-*t*-オクチルフェノール(OP): 10 ng - 10 mg/kg 体重、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP): 1.2 mg - 1.2 g/kg 体重、オクタクロロスチレン(OCS): 0.12 mg - 120 mg/kg 体重、ベンゾフェノン(BP): 200 mg/kg

体重、4-ノニルフェノール(NP): 80 mg/kg 体重、トリブチルスズ(TBT): 32.6 mg/kg 体重、フタル酸ジ-n-ブチル(DBP): 1.25 g/kg 体重、フタル酸ジシクロヘキシル(DCHP): 1 g/kg 体重、で検討した。

対照群としては、5% エタノール/corn oil を同様に投与した。各実験群では、最低3匹ずつのマウスを用いた。

妊娠マウス処理に関しては、昨年度の結果を参考にしてEB並びにDESを妊娠第7日目から2日おきに第19日目まで腹腔投与し、出産後2週令、4週令及び6週令にて安楽死させ組織を採取した。投与量は、EBが3.3 μ g及び33 μ g/kg 体重、DESでは3.3 μ g、33 μ g及び330 μ g/kg 体重で検討した。対照群としては、5% エタノール/corn oil を用いた。

採取した組織は、一部は4%パラホルムアルデヒド/PBS固定後、パラフィンに包埋し、一部は凍結試料として保存した。パラフィン切片(5-6 μ m)は、シラン処理スライドグラスに拾い、ヘマトキシリン/エオシン染色並びに以下の種々の分子組織細胞化学的検索に使用した。

2) アポトーシス細胞の同定と関連遺伝子産物の発現検討

昨年度の結果に基づき、アポトーシス細胞の同定には、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼによるピオチン-16-dUTPの取り込みによりDNA二本鎖切断部位を視覚化するTUNEL法を行った。マウスFas並びにFas Lの発現は、これらに対するウサギポリクローナル抗体(自作)を用いて免疫組織化学により検討した。またBcl-2並びにBax発現は、市販抗体により同様に検索した。

3) ステロイドホルモン受容体の発現検討

エストロゲン受容体(ER) α と β 、アンドロ

ゲン受容体(AR)並びにプロゲステロン受容体(PR)の発現動態の解析には、免疫組織化学とin situ hybridization法を用いて検討する必要があるが、特に精巣での発現検討を有効に行うためには、実験条件の至適化が必要であった。免疫組織化学に関しては、ER β に対する抗体(埼玉医大・松村正實教授より供与)を除いて全て市販のものを利用し、抗原の賦活化を中心として至適化した。ARとPRについては、ヒト抗原に対する抗体であり、交差反応の検討を行った。シグナルは最終的に、ペルオキダーゼ標識抗体を用いて視覚化した。Insitu hybridizationに関しては、本年度は特にマウスER α 並びにER β に対する合成オリゴDNAを作成し、チミン二量体或いはジゴキシゲニン標識法にて非放射性プローブとし、前処理条件等の至適化を試みた。

4) 活性酸素代謝関連物質及び抗酸化酵素の発現の検討

マウス臓器の分離調整: 実験マウスの臓器を分離し、即時に液体窒素で凍結後生化学の実験まで-80℃で保存した。実験直前に凍結標本を湿重量約0.12gの小片に分けた。9倍量の融解緩衝液(10mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 0.137 M NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, pepstatin 2 μ g/ml, leupeptin 2 μ g/ml)に浸し融解した。その後4℃中でポリトロンホモゲナイザーを用いて30秒間処理した後15,000回転で10分間、4℃にて遠沈を行い上清を試料とした。

グルタチオン濃度の測定: 昨年度の結果に従って、DTNB酵素リサイクリング法で測定した。

抗酸化酵素の活性測定: グルタチオン過酸化酵素(GPX)、GST、Cu、Zn-SOD、Mn-SODらの酵素活性を昨年度記述の手法に則して測定し

た。検体液中の蛋白濃度を BCS 法で分光光度計を用いて測定し、各活性は mg 蛋白あたりで表現した。

5) G 蛋白発現の検討

本年度は、特に DES 処理した成熟雄マウス脳を cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus, amygdala に分離して採取し、昨年度決定した条件に従って $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合活性より G 蛋白の発現量の変化を検討すると共に、更に各 G 蛋白質の α サブユニット発現量を特異抗体を用いてのウェスタンブロット法にて検討した。ウェスタンブロット法は、12% SDS-PAGE にて抽出蛋白を分離後、セミドライブロットにより PVDF 膜に転写し、各 G 蛋白質の α サブユニットに対する抗体を作用させた。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体反応後、化学発光法によりシグナルを X 線フィルム上に検出した。バンドの定量は、NIH-Image を用いて測定した。

6) 異所性子宮内膜症モデルの作成

マウス腹腔内へ片側子宮細切片を移植し、マウス子宮内膜症モデルを作成した。一週後に、ダイオキシン活性を示す 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-furan (TCDF) を 0, 1, 3, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重で一週間おきに 1 ヶ月間経口投与し、腹腔子宮片への影響を検討した。組織の増殖能については、PCNA の免疫染色により、また $\text{ER}\alpha$ の発現に関しては上記と同様に特異抗体を用いた免疫組織化学によって検討した。

尚、これら環境毒性物質の研究の施行に当たり、長崎大学医学部動物実験施設動物実験委員会より安全面と倫理面での審査が行われ、専用飼育室の開設と共に本動物実験計画の実行許可を与えられている。

C. 研究結果

1) 成熟マウスに於けるエストロゲン並びに種々の生殖毒性物質投与による精巣への影響

EB 投与により濃度依存的に生殖細胞アポトーシス頻度は増大し、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重で対照群との差が有意となり、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重投与群では対照群に対し約 60% の増大を示した。2 mg - 4 mg/kg 体重群では、更にアポトーシスを増大させたが精粗細胞への影響は顕著ではなかった。一方 DES では、20 mg/kg 体重までは濃度依存的にアポトーシス頻度を増大 (約 1.9 倍) させたが、100 mg/kg 体重では逆に頻度を低下させる傾向のあることが判明した。DDE 投与では、DES と同様に low-dose effect が見られ、10 mg/kg 体重投与でアポトーシス頻度は約 2.2 倍となったが、50 mg/kg 体重投与では対照群レベルであった。BPA では更に驚くべきことに、その低濃度は対照群で見られる恒常的な生殖細胞アポトーシスの出現を約 50% まで抑制することが判明した (図 1)。

2) 成熟マウス精巣に於ける EB 並びに DES のアポトーシス関連遺伝子発現への作用

正常成熟マウス精巣では、Fas は Leydig 細胞に Fas L は Sertoli 細胞に特異的に発現しており、恒常的に生じるアポトーシスとは無関係であった。Bcl-2 は殆どの精子形成細胞に陽性であり、Bax は時折強く発現する細胞を認めるが、TUNEL 陽性細胞とは必ずしも一致しなかった。一方、EB を投与すると明らかに TUNEL 陽性細胞の増大と共に Fas 陽性生殖細胞が増大し、EB による Fas 誘導とアポトーシス増大の因果関係が認められたが、Bcl-2/Bax の関与は明らかではなかった。DES 投与に於いては、Fas の陽性頻度は 20 mg/kg 体重投与で最大となり、100 mg/kg 体重群では逆に対照レベルに低下した。Fas L は Sertoli

細胞のみに陽性であるが、20 mg/kg 体重群ではその染色強度が増大した。興味深いこと、Bax 発現の顕著な増大が DES 20 mg/kg 体重で観察され、低濃度及び高濃度では Bcl-2 発現の抑制が認められた (図 2)。

3) 成熟マウス精巣に於ける EB 並びに DES のステロイド受容体発現への作用

正常精巣では、ER α 発現は Leydig 細胞に、また ER β は精粗細胞並びに精母細胞に認められた。また用いた抗体群では AR と PR は、陰性であった。これらの発現の EB 並びに DES の明白な効果は現在の所認められていないが、リガンドの存在下でこれら蛋白の安定性 (半減期) が変化するので、mRNA レベルでの発現検討の必要性が生じた。In situ hybridization による ER α mRNA と ER β mRNA の発現検討には、前処理条件の至適化等予備的検討が必要であるので、マウス並びにラットで共通に利用できる 45 塩基の部位を複数選択し、各々合成後ハプテン化しマウス精巣並びに卵巣切片において前処理条件等の検討を行った。その結果、最もシグナル/ノイズ比が高いセンス及びアンチセンスプローブの組み合わせが決定され、プロトコルの至適化が行われた。

4) 妊娠マウスへの EB 並びに DES 投与に伴う次世代個体精巣での生殖細胞動態への影響

胎仔暴露を受けた生後 2 週令、4 週令、6 週令の雄マウスに関して、一見判別可能な形態変化は認められず体重並びに精巣重量等にも対照群と比較して有意な変化は見られなかった。しかしながら、精巣の組織学的検討を行ったところ、EB 及び DES 暴露 2 週令マウスに於いて明らかな精子形成早熟反応が認められた。

5) 成熟マウス肝並びに精巣に於ける抗酸化機

構への DES の影響

マウス肝に於いては、10 mg/kg 以上の DES 投与によってグルタチオン (GSH) の有意な増加が認められたが、GPX 活性には変化が認められなかった。また GST 活性は DES 投与によって有意に低下し、SOD 活性に関しては Cu, Zn-SOD 依存性に 20 mg/kg 以上の DES 投与で低下した (図 3)。

一方、マウス精巣では 100 mg/kg の DES 投与によって、GSH 並びに GPX 活性の低下が認められた。GST 活性と SOD 活性は、20 mg/kg 以上の DES 投与により低下していた (図 4)。

6) 成熟マウス脳組織での G 蛋白発現への DES の影響

DES 処理した成熟雄マウス脳の cerebral cortex, hippocampus, thalamus, amygdala 各部位に於ける G 蛋白質の発現への効果を検討したところ、cortex では Gi α サブユニットの DES 濃度依存的な増大が見い出された (図 5)。Hippocampus では、Gq α サブユニットの有意な減少と Gi α サブユニットの増加傾向が認められた (図 6)。Thalamus では Gq α サブユニットの有意な減少が、amygdala では Gi α サブユニットの減少傾向が見られた。一方、Gs 及び Go α サブユニットに関しては有意な変化を認めなかった。

7) 異所性子宮内膜症モデルでのダイオキシン類の影響

本モデルでは移植片は移植後 4-6 週間に渡って成長し、腸管膜上に内溶液を有する嚢胞性腫瘍を形成した。組織は、内膜腺上皮と間質からなり異所性内膜症と酷似した。この移植片で、細胞増殖への TCDF 投与の効果を検討したところ、TCDF の濃度依存的に管腔線上皮における PCNA 陽性細胞の増大を引き起こした。同時に、管腔線上皮における TUNEL 陽

性細胞数の濃度依存的低下も認められた。更に、ER α の発現を検討した所、10 μ g/kg 体重投与群で極大を示し、20 μ g/kg 体重投与群では逆に発現量の低下を引き起こした。

D. 考察

種々の内分泌攪乱化学物質の示す生殖毒性がしばしばそのエストロゲン類似作用によって引き起こされることから、我々はエストロゲンを示準物質とした生殖障害性の評価基準を設定することを目的として特に、マウス精子形成細胞死への効果に注目して検討を進めてきた。本年度は、精子形成細胞死誘導毒性の示準物質としてエストロゲンであるEBを1 ng/kg 体重という低濃度から順次高濃度まで投与し、生殖細胞アポトーシス頻度への影響を詳細に検討した。その結果、1 μ g/kg 体重 (1 ppb に相当) で既に有意な精子形成細胞死が検出されその後濃度依存的にアポトーシス頻度が増大した。この結果を基にして DES、DDE や BPA による精子形成細胞死への影響を比較検討した所、DES と DDE では最も障害程度が大きくなる投与量が存在し、それ以上では逆にアポトーシス頻度は減少することが明らかとなった。このような現象は子宮内膜症モデルでの ER α 発現へのダイオキシン類の影響でも見られたものであり、内分泌攪乱化学物質各々の濃度依存的毒性効果の変化を広範囲できめ細かく検討する必要性を示唆している。また BPA は高濃度では生殖細胞死を誘導するが、驚くべきことに低濃度では逆に恒常的に生じるアポトーシスを抑制した。これらの結果は、内分泌攪乱化学物質の作用は多様であり、その毒性評価には様々なパラメーターからの検索が必要であることも示している。

これら生殖毒性物質による生殖細胞死誘導への分子機構を検討する目的で、昨年度は EB について、更に本年度はより低投与量での EB 及び DES 処理精巣での Fas/Fas L 系と Bcl-2/Bax 系の関与を検討した。これらの結果は、TUNEL 陽性細胞の出現頻度の増大と共に Fas 陽性生殖細胞の増大を示し、EB 並びに DES による生殖細胞死誘導への Fas 系の積極的な関与が示された。更に、DES 投与の場合特に、TUNEL 陽性細胞頻度の極大濃度で Bax の強発現が見られ、二重のシステムによって細胞死をより確実に誘導している現実が明らかとなった。今後 BPA 及び DDE の作用との関連を明らかにする必要がある。

昨年10月にリスク評価優先物質8種に選択された、OP、DEHP、OCS、BP、NP、TBT、DBP、DCHP に関しても同様の実験プロトコルによる生殖細胞毒性をマウス精巣にて検討し始めている。

既に示したように、多くの内分泌攪乱化学物質は、精子形成過程において生殖細胞死を積極的に誘発することにより生殖能力の低下をもたらす一因となっている可能性が明らかとなってきた。生殖細胞死が特定の遺伝子発現を介する能動的細胞死であるアポトーシスによるものであって、その際 Fas/Fas L 系並びに Bcl-2/Bax 系の遺伝子並びに細胞内シグナル伝達系が関与していることが判明した訳であるが、特にエストロゲン様作用を有する生殖毒性物質の精巣への直接的影響を解析する上で、作用点としてその受容体である ER α と ER β 発現動態を明かにすることが必要である。そのために、免疫組織化学並びに非放射性 in situ hybridization による検索を開始し、ER α は Leydig cells に ER β は精粗細胞並びに精母細胞等に発現することが明らか

となった。この事は、エストロゲンの精子形成細胞への作用は嘗てより知られていた下垂体を介した系と共に、ER β を受容体とする精子形成細胞への直接作用も存在することを示すもので興味深い結果と思われる。ER β は c-Jun/c-Fos 複合体と共に細胞増殖や癌化と関係する転写調節因子結合 DNA 部位である AP-1 site に結合し下流にある遺伝子発現に影響を与えることが知られていることから、今後これら生殖毒性物質との関係調査を詳細に進めていく必要がある。

今年度の研究では、胎仔期にこれら化学物質に暴露されたことによる成熟後の生殖腺機能への影響を検討するため、妊娠時に環境生殖毒性物質として EB と DES を投与し、特に雄性生殖腺に於ける生殖細胞の分化状態を形態的に評価した。昨年度の検討で、高濃度の DES 投与では胎仔奇形を頻発し高頻度で流産を生じることが判っているので、LD50 の 1/100 以下の濃度で検討した。その結果、これら物質の投与により生後 2 週で明かな精子形成早熟効果を見い出した。現在この早熟現象が精子形成過程開始時期の若令化によるものか、或いは精子形成過程そのものの短縮によるものなのかは明かではないが、次世代への影響を考える上で早急に解決される問題と考える。また雌マウスでの性早熟の有無も重要な来年度の検討課題であると思われる。

本研究では DES のような生殖毒性物質が細胞の抗酸化機構を低下させることを明らかにした。活性酸素障害を防御する抗酸化機構はストレスに暴露されると速やかに活性酸素を消去するばかりでなく恒常的に生理機能を維持しており、その機能低下は細胞障害を促進する。抗酸化分子の中では SOD と共に GSH が中心的役割を果たしているため、還元型の

GSH の変動は環境因子による障害の鋭敏な指標と考えられる。今回肝に於いては DES で GSH はむしろ増加し、抗酸化機構の活性化が認められたが、精巣では逆に DES 投与が GSH を低下させた。精巣における GSH の役割はまだ解明されていないが、GSH 濃度の低下によるレドックス制御の破綻が精子形成細胞死誘導に関与する可能性もあり、この観点からの検討も今後の課題と思われる。

本研究に於いて、hippocampus では Gq と Gi が逆方向への挙動を示すことが見い出された。この事は、神経系に対して Gq は興奮方向へ、Gi は抑制方向に作用する可能性を考慮すると、DES の 10mg/kg 体重処理マウスでは G 蛋白質レベルでは神経系に対して抑制方向にシフトしていることが考えられる。従って、今後 DES 投与に伴う行動異常の観察・評価が必要になるものと思われる。

E. 結論

・本研究に於いて、内分泌攪乱作用が疑われている物質はしばしば強力な生殖毒性物質として働き、精子形成過程の様々な段階に於いて生殖細胞アポトーシスを誘導し、精子数の減少をもたらしている事が判明した。更にこれら種々の化学物質の生殖毒性の客観的な評価基準を策定する上で、マウス精巣は有効な哺乳類での検定システムを提供することも明らかとなった。

・今後更に、EB、DES、BPA 等の生殖毒性様式に差のあるものを示準物質としながらその作用メカニズムを明らかにするために、種々のステロイド受容体発現動態への影響並びにアポトーシス関連遺伝子群の発現検索を進める必要があり、新たに危険性の喚起された物質のリスク評価を広範囲に行い、包括的な生殖

毒性評価検定システムに発展させることが重要である。我々は、昨年10月に選定されたリスク評価優先8物質についても検定試料作成を行ってきたが、今後示準毒性物質で行った検討項目に関する詳細な検索が必須である。

・また ER β 発現と環境生殖毒性物質との関係は、増殖や発癌と密接に関与することが知られている遺伝子の転写調節領域へ作用するものとして注目に値するものであり、精巣及び卵巣のみならず雌雄付属生殖器官での発現動態を検討する必要がある。子宮内膜症モデルでのダイオキシン等の作用に関する検討も同様に受容体レベルからの更なる検討を要する。

・環境生殖毒性物質の作用機構解明と共に重要視されるべきは、如何にして毒性物質を生体内で中和し、生じた障害を最小限度に抑ええられるかということであろう。生体防御機構としての抗酸化機構にDES等が影響を与えることは、これら機構を外部から支援することによる中和療法の開発の可能性を示唆するものであり、示準毒性物質並びにリスク評価優先8物質の抗酸化機構への影響の検討を更に邁進させる必要がある。

・生殖能力の低下は、生殖腺及び付属器官への障害ばかりでなく生殖行動の障害も視野に入れた解析が必要である。その点で、本研究によるG蛋白質の動態解析から、DESが行動や記憶の中枢である海馬で神経細胞興奮に対し抑制方向への反応を強めることが明らかとなり、今後これらの結果と実際の行動学的研究との協調の必要性が認識された。

F. 研究発表

1. 論文発表

・ Koji, T. Ed. (2000) Molecular Histochemical Techniques (Springer Lab Manuals), Springer-Verlag, Heidelberg.

・ He, C., Nonaka, M., Tada, T., Koji, T., Li, W., Okada, N. and Okada H. (2000) Decay accelerating factor (DAF) in guinea pig reproductive organs: significant expression on elongated spermatids and seminal vesicle epithelium as well as on cilia. *Immunology*, 100(1); 91-98.

・ Ejima, K., Nanri, H., Araki, M., Koji, T., Shibata, E., Kashimura, M. and Ikeda, M. (2000) Expression of mitochondria thioredoxin-dependent antioxidant protein, SP-22, in normal human and inflammatory mouse placentas. *Placenta*, 21(8); 847-852.

・ Matsumi, H., Yano, T., Osuga, Y., Kugu, K., Tang, X., Xu, J. P., Yano, N., Kurashima, Y., Ogura, T., Tsutsumi, O., Koji, T., Esumi, H. and Taketani, Y. (2000) Nitric oxide as a cytostatic factor in ovarian follicle development. *Biol. Reprod.*, 63; 141-146.

・ Nakamura, H., Kawakami, A., Yamasaki, S., Nakashima, T., Kamachi, M., Nigita, K., Kawabe, Y., Nakamura, T., Koji, T., Hayashi, Y. and Eguchi, K. (2000) Expression and function of X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein in Sjogren's syndrome. *Lab. Invest.*, 80(9); 1421-1427.

・ Ito, M., Izumi, S., Uemura, M., Baba, N., Suyama, K., Kuga, Y., Mizuno, A., Nakane, P.K. and Koji, T. (2000) Prevention of death of axotomised hypoglossal neurons and promotion of regeneration by chitin

grafting. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 20(5); 529-540.

• Shibata, Y., Fujita, S., Takahashi, H., Yamaguchi, A. and Koji, T. (2000) Assessment of decalcifying protocols for detection of specific RNA by nonradioactive in situ hybridization in calcified tissues. *Histochem. Cell Biol.*, 113(3); 153-159.

• Yamamoto, T., Shibata, Y., Hishikawa, Y., Shin, M., Yamaguchi, A., Kobayashi, T., and Koji, T. (2001) Effects of various decalcification protocols on detection of DNA strand breaks by terminal dUTP nick end labeling. *Histochem. J.*, 32(11); 697-702.

• Tsukazaki, S., Miyazaki, M., Koji, T., Abe, K., Furuu, A., Shin, M., Suzuki, D., Harada, T., Ozono, Y., Sakai, H. and Kohno, S. (2000) Semi-quantitative non-radioactive in situ hybridization and its clinical application. *Acta Histochem. Cytochem.*, 33(1); 39-47.

• Kawakami, A., Matusoka, N., Tsuboi, M., Koji, T., Urayama, S., Sera, N., Hida, A., Usa, T., Kimura, H., Yokoyama, N., Nakashima, T., Ishikawa, N., Ito, K., Kawabe, Y. and Eguchi, K. (2000) CD4+ T cell-mediated cytotoxicity toward thyrocytes: The importance of Fas ligand interaction inducing apoptosis of thyrocytes and the inhibitory effect of thyroid-stimulating hormone. *Lab. Invest.*, 80(4); 471-484.

• Okada, K., Komuta, K., Hashimoto, S., Matsuzaki, S., Kanematsu, T. and Koji, T. (2000)

Frequency of apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes induced by Fas counterattack in human colorectal carcinoma and its correlation with prognosis. *Clin. Cancer Res.*, 6(9); 3560-3564.

• Choi, Y., Baranowska-Daca, E., Nguyen, V., Koji, T., Ballatyne, C., Sheikh-Hamad, D., Suki, W. N. and Truong, L. D. (2000) Mechanism of chronic obstructive uropathy: Increased expression of apoptosis-promoting molecules. *Kidney Int.*, 58(4); 1481-1491.

• Abe, K., Ozono, Y., Miyazaki, M., Koji, T., Shiohita, K., Furuu, A., Tsukazaki, S., Matsuya, F., Hosokawa, N., Harada, T., Taguchi, T., Nagata, K. and Kohno, S. (2000) Interstitial expression of heat shock protein 47 and α -smooth muscle actin in renal allograft failure. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 15; 529-535.

• Izumi, S., Kimura, M., Kimura, T., Wada, A., Hirayama, T., Ichinose, A. and Koji, T. (2000) Induction of active invagination of plasma membranes by *Helicobacter pylori* cytotoxin, VacA, in cultured gastric cells: An immunoelectron microscopic study. *Acta Histochem. Cytochem.*, 33(2); 89-94.

• Shiohita, K., Miyazaki, M., Ozono, Y., Abe, K., Taura, K., Harada, T., Koji, T., Taguchi, T. and Kohno, S. (2000) Expression of heat shock proteins 47 and 70 in the peritoneum of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Int.*, 57; 619-631.

• Isomoto, H., Miyazaki, M., Mizuta, Y.,

- Takeshima, F., Murase, K., Yamasaki, K., Inoue, K., Koji, T. and Kohno, S. (2000) Expression of NF- κ B in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa detected by southwestern histochemistry. *Scand. J. Gastroenterol.*, 35;247-254.
- ・小路武彦 (2000) In situ hybridization の原理。病理と臨床 18 (臨時増刊) ; 226-232.
 - ・菱川善隆、小路武彦 (2000) 放射性プローブと非放射性プローブの比較。病理と臨床 18 (臨時増刊) ; 252-257.
 - ・進正志、小路武彦 (2000) Southwestern histochemistry. *細胞* 32(1); 31-35.
 - ・小路武彦 (2000) 3.4 アポトーシス。[基礎生化学実験法第2巻生体試料] (日本生化学会編)、東京化学同人、東京、pp. 118-127.
 - ・Kondo, H., Mori, S., Takino, H., Kijima, H., Yamasaki, H., Ozaki, M., Iida, T., Urata, Y., Abe, T., Sera, Y., Yamakawa, K., Kawasaki, E., Yamaguchi, Y., Kondo, T. And Eguchi, K. (2000) Attenuation of expression of γ -glutamylcysteine synthetase by ribozyme transfection enhance insulin secretion by pancreatic β -cell line, MIN6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 278; 236-240.
 - ・ Shimizu, K., Naito, S., Urata, Y., Ichinose, Y., Ogawa, F., Sekine, I., Katayama, I., Kondo, T. (2000) Expression of superoxide dismutase in basal cell carcinoma. *Acta Med. Nagasaki.*, 45; 9-13.
 - ・ Morikawa, T., Kadota, J., Kohno, S., Kondo, T. (2000) Superoxide dismutase in alveolar macrophages from patients with diffuse panbronchiolitis. *Clinical Investigations*, 67;546-551.
 - ・Mori, K., Tani, M., Kamada, K., Kawamura, H., Urata, Y., Goto, S., Kuwano, M., Shibata, S. and Kondo, T. (2000) Mitogen-activated protein kinase, ERK1/2, is essential for the induction of vascular endothelial growth factor by ionizing radiation mediated by activator protein-1 in human glioblastoma cells. *Free Rad. Res.*, 33; 157-166.
 - ・Ueda, H. and Inoue, M. (2000) In vivo signal transduction of nociceptive response by kyotorphin (tyrosine-arginine) through Gail and inositol trisphosphate-mediated Ca^{2+} influx. *Mol. Pharmacol.*, 57; 108-15.
 - ・ Inoue, M., Mishina, M. and Ueda, H. (2000) Enhanced nociception by exogenous and endogenous substance P given into the spinal cord in mice lacking NR2A/e1, an NMDA receptor subunit. *Br. J. Pharmacol.*, 129; 239-241.
 - ・Maruo, J., Yoshida, A., Shimohira, I., Matsuno, K., Mita, S. and Ueda, H. (2000) Binding of [35 S]GTP γ S stimulated by (+)-pentazocine, sigma receptor agonist, is abundant in the guinea pig spleen. *Life Sci.*, 67; 599-603.
 - ・ Inoue, M. and Ueda, H. (2000) Protein kinase C-mediated acute tolerance to peripheral m -opioid analgesia in the bradykinin-nociception test in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 293; 662-669.
 - ・Renback, K., Inoue, M., Yoshida, A., Nyberg, F. and Ueda, H. (2000) V α 1/lysophosphatidic acid-receptor involved in peripheral pain transmission. *Mol.*

Brain Res., 75; 350-354.

• Ueda, H., Inoue, M., Welltrowska, G. and Schiller, P.W. (2000) An enzymatically stable kyotorphin analog induces pain in subattomol doses. *Peptides*, 21; 717-722.

• Hamabe, W., Fukushima, N., Yoshida, A. and Ueda, H. (2000) Serum-free induced neuronal apoptosis-like cell death is independent of caspase activity. *Mol. Brain Res.*, 78; 186-191. n the guinea pig spleen. *Life Sci.*, 67; 599-603.

• Kohno, M., Fukushima, N., Yoshida, A. and Ueda, H. (2000) G11 and GoA differentially determine kinetic efficacies of agonists for κ -opioid receptor. *FEBS Lett.*, 473; 101-105.

• Yoshida, A., Tokuyama, S., Iwamura, T. and Ueda, H. (2000) Opioid analgesic-induced apoptosis and caspase-independent cell death in human lung carcinoma A549 cells. *Int. J. Mol. Med.*, 6; 329-335.

• Ye, Xun, Inoue, M. and Ueda, H. (2000) Botulinum toxin C3 inhibits hyperalgesia in partial sciatic nerve injury mice. *Jpn. J. Pharmacol.*, 83; 161-163.

• Ueda, H., Matsunaga, S., Inoue, M., Yamamoto Y. and Hazato, T. (2000) Complete inhibition of purinoceptor agonist-induced nociception by spinorphin, but not by morphine. *Peptides*, 21; 1215-1221

• Ueda, H., Inoue, M., Takeshima, H. and Iwasawa, Y. (2000) Nociceptin/orphanin FQ-involvement in morphine tolerance and dependence. *J. Neurosci.*, 20; 7640-7647.

• Hamabe, W., Fujita, R., Yasusa, T., Yoneda, F., Yoshida, A. and Ueda, H. (2000)

(-)-1-(Benzofuran-2-yl)-2-

propylaminopentane, [(-)BPAP] shows survival effect on cortical neurons under serum-free condition through sigma receptors. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 20; 695-702.

• Hamasaki, T., Masuzaki, H., Miyamura, T., Yoshimura, S., Hamaguchi, N. and Ishimaru, T. (2000) High concentrations of serum inhibin in pre-eclampsia. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 71(1); 7-11.

• Yamasaki, K., Hayashida, S., Miura, K., Masuzaki, H., Ishimaru, T., Niikawa, N. and Kishino, T. (2000) The novel gene, gamma2-COP (COPG2), in the 7q32 imprinted domain escapes genomic imprinting. *Genomics*, 68(3); 330-335.

• Yoshimura, S., Masuzaki, H., Miura, K., Moriyama, S., Fujishita, A. and Ishimaru, T. (2000) Histological and immunohistochemical analysis of fetal hypoplastic Lungs: preliminary study. *Acta Med. Nagasaki.*, 45; 61-66.

• Gotoh, H., Masuzaki, H., Yoshida, A., Yoshimura, S., Miyamura, T. and Ishimaru, T. (2000) Predicting incomplete uterine rupture with vaginal sonography during the late second trimester in women with prior cesarean. *Obstet. Gynecol.*, 95(4); 596-600.

• Yoshimura, S., Masuzaki, H., Miura, K., Gotoh, H., Moriyama, S., Fujishita, A. and Ishimaru, T. (2000) Effect of epidermal growth factor on lung growth in experimental fetal pulmonary hypoplasia. *Early Hum. Dev.*, 57(1); 61-69.

2. 学会発表

- ・ Koji, T. (2000) Ribosomal RNAs as a multi-potential control for in situ localization of specific RNAs. Fifth China-Japan Joint Histochemistry and Cytochemistry Seminar, Shanghai, China. Chinese Journal of Histochem. and Cytochem., 9(Suppl); 17-18. (Workshop)
- ・ Hishikawa, Y., Shin, M., Izumi, S., Inoue, S., Muramatsu, M. and Koji, T. (2000) Molecular histochemical localization of estrogen receptor alpha and beta in mouse testis. Fifth China-Japan Joint Histochemistry and Cytochemistry Seminar, Shanghai, China. Chinese Journal of Histochem. and Cytochem., 9(Suppl); 143.
- ・ Izumi, S., Shin, M., Hishikawa, Y. and Koji, T. (2000) Co-localization of nuclear Pit-1, a prolactin gene transcription factor, and cytoplasmic prolactin family proteins in differentiated trophoblasts. Fifth China-Japan Joint Histochemistry and Cytochemistry Seminar, China. Chinese Journal of Histochem. and Cytochem., 9(Suppl); 144.
- ・ Koji, T. (2000) Autonomous and induced germ cell death in fetal, neonatal and adult mouse testes: Possible involvement of Fas/Fas ligand. XV International Symposium on Morphological Sciences, Kyoto. (Symposium)
- ・ 小路武彦 (2000) 哺乳類雌性生殖器官に於けるエストロゲン受容体発現の分子組織細胞化学的解析. 第32回日本臨床電子顕微鏡学会総会(北九州). (シンポジウム)
- ・ 小路武彦 (2000) 生殖腺に於けるアポトーシスと分子組織細胞化学. 第56回日本解剖学会九州支部総会(福岡). (特別講演)
- ・ 和泉伸一・進正志・菱川善隆・小路武彦 (2000) ラット胎盤における Pit-1 の発現とプロラクチン関連遺伝子の転写調節: 電顕的サウスウエスタン組織化学の応用. 日本臨床電子顕微鏡学会誌 33(suppl); S88. (ワークショップ)
- ・ 菱川善隆・進正志・和泉伸一・井上聡・村松正實・小路武彦 (2000) マウス精巣における estrogen receptor (ER) , b の発現動態の検討. 日本臨床電子顕微鏡学会誌 33(suppl); S134.
- ・ 進正志・菱川善隆・和泉伸一・小路武彦 (2000) マウス新生児精巣における CREB の発現. 第56回日本解剖学会九州支部学術集会(北九州).
- ・ 小路武彦 (2000) 遺伝子発現局在化法としての In situ hybridization 法. 第41回日本組織細胞化学学会総会・学術集会(高知). (シンポジウム)
- ・ 菱川善隆・小路武彦 (2000) アポトーシスの光顕的組織細胞化学: 雄性生殖細胞死を中心として. 第41回日本組織細胞化学学会総会・学術集会(高知). (ワークショップ)
- ・ 和泉伸一・安倍邦子・進正志・菱川善隆・小路武彦 (2000) ラット胎盤および副腎における副腎皮質刺激ホルモン受容体の免疫組織化学による局在. 第41回日本組織細胞化学学会総会・学術集会(高知).
- ・ 青木大勇・山本智美・菱川善隆・酒井英樹・金武洋・小路武彦 (2000) ヒト前立腺癌組織における keratinocyte growth factor (KGF) およびその受容体 (KGF-R) の発現検討. 第41回日本組織細胞化学学会総会・学術集会(高知).
- ・ 菱川善隆・和泉伸一・進正志・小路武彦

(2000) マウス雄性生殖細胞アポトーシスへの
diethylstilbestrol (DES) の影響。日本内分泌
攪乱化学物質学会第3回研究発表会(横浜)。

Effects of environmental endocrine disruptors upon mouse spermatogenic cell death and their possible molecular mechanisms

Takehiko Koji

Department of Histology and Cell Biology, Nagasaki University School of Medicine

Professor and Chairman

Key words: endocrine disruptor, germ cell death, Fas/Fas ligand, Bcl-2/Bax, steroid hormone receptors, mouse testis

Abstract:

For a better understanding of the effects of various environmental toxic compounds including endocrine disruptors (ED) on mammalian reproduction, the direct study on germ cell death in fetal, neonatal and adult animals would be required. In the project of this year, we focused on the effect of estradiol-3-benzoate (EB; 1 ng - 100 μ g, 2 mg, 4 mg/kg BW), diethylstilbestrol (DES; 1, 5, 10, 20 and 50 mg/kg BW), bisphenol A (BPA; 4 μ g - 4 mg, 20 mg, 200 mg/kg BW) and dichlorodiphenyl dichloroethene (DDE; 10 mg, 50 mg/kg BW) upon germ cell apoptosis in a short term protocol, where ICR male mice were injected subcutaneously with a compound dissolved in 5% ethanol/corn oil in every 5 days and killed on 20 days after the first injection. When germ cell apoptosis was examined by TUNEL, the number of TUNEL positive cells were increased in a dose-dependent fashion with EB. DES and DDE increased the number of TUNEL positive germ cells to a maximum at a dose of 20 mg/kg BW and 10 mg/kg BW, respectively, and thereafter declined to the control level, indicating a "low-dose effect". BPA also increased the number of TUNEL positive germ cells at a dose of higher than 400 μ g/kg BW. Very interestingly, however, BPA significantly inhibited spontaneously occurring apoptosis at a dose of 4 - 40 μ g/kg BW. These results indicated that ED has wide-ranging effects on germ cell apoptosis depending upon each chemical nature. To analyze the molecular mechanism underlying the induction of germ cell apoptosis, we investigated the involvement of Fas/Fas ligand and Bcl-2/Bax in EB and DES treated testes immunohistochemically. In both cases, the expression of Fas was increased in parallel with an increase of TUNEL positive spermatocytes and the expression of Fas ligand in Sertoli cells was kept nearly constant. Unlike EB, DES also increased markedly the expression of Bax at 20 mg/kg. Thus, the induction of spermatogenic cell death by DES can be mediated through both Fas and Bcl-2 systems. Since estrogenic compounds are supposed to affect cells expressing

estrogen receptor (ER) α and β , we examined the expression of ER α and β in EB- and DES-treated testes by immunohistochemistry. Our results revealed that ER α is expressed in only Leydig nuclei, while ER β is in the nuclei of spermatogonia and spermatocytes, suggesting the direct action of these compounds upon germ cells through ER β . And the expression level of ER proteins was not changed so much by the treatments with EB and DES. Finally, to analyze the late effect of fetal exposure to ED, we performed histological examination of mouse testes on 2, 4 and 6 weeks after birth, which were exposed to EB or DES in fetal periods at various doses, and found that the onset of spermatogenesis might be occurred earlier. These accumulated results indicate that various environmental toxic compounds may affect the states of germ cell proliferation, differentiation and death in different ways. Further study to categorize these environmental toxic compounds, based on germ cell toxicity, would be helpful for prediction of reproductive risks of unanalyzed suspicious compounds.

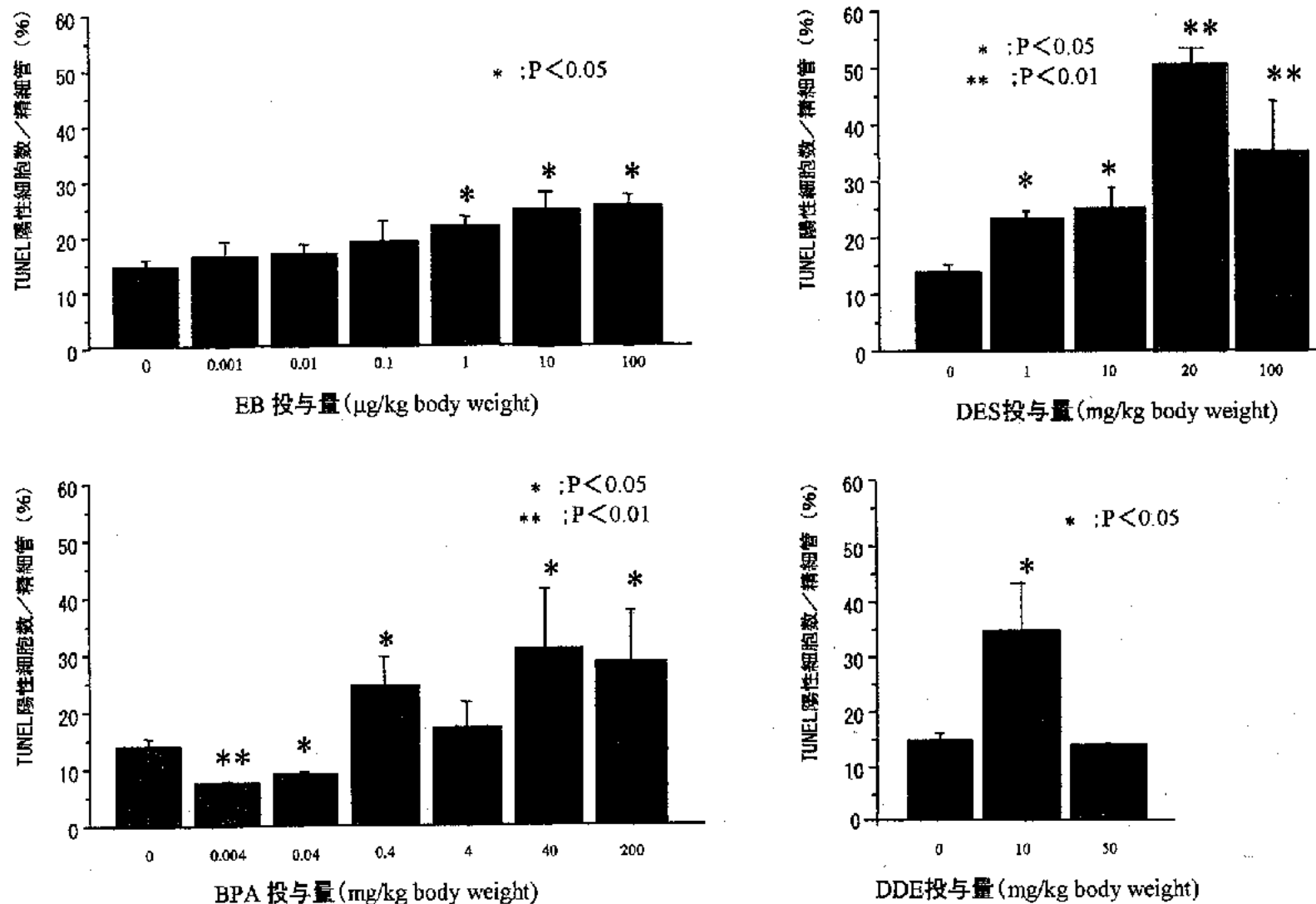


図1：精子形成細胞アポトーシスへの種々の内分泌攪乱物質の影響

成熟雄マウスに種々の濃度でEB、DES、BPA及びDDEを5日毎に皮下投与し、初回投与から20日目に精巣を採取し、そのパラフィン切片を用いてDNA二本鎖切断部位を検出するTUNEL染色を行い、アポトーシス細胞を検出したもの。アポトーシス頻度は、精細管円形断面当たりのTUNEL陽性細胞数を%として示した。対照としては、5%エタノール/コーンオイルを投与した。

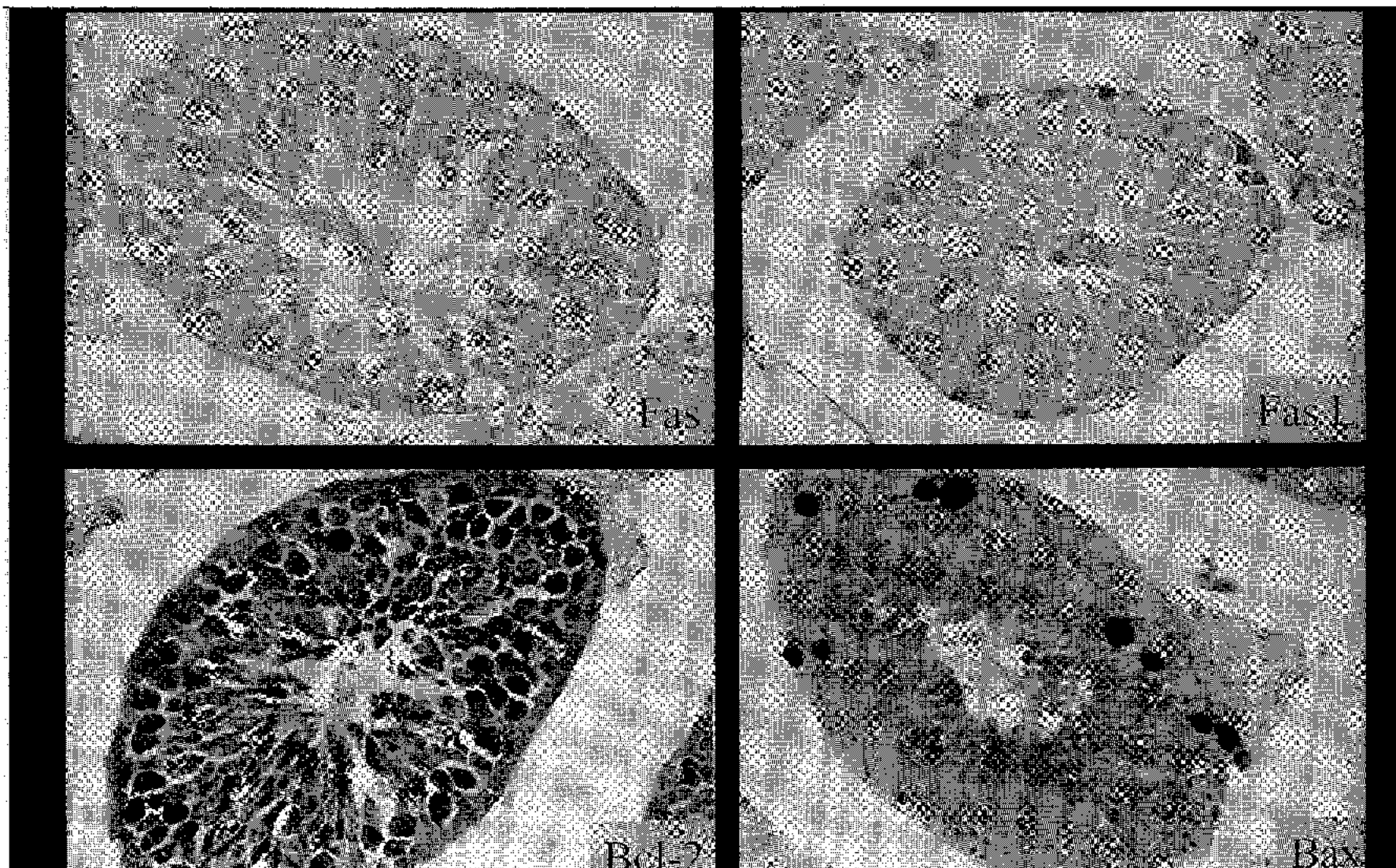


図2：DES 投与精巣におけるアポトーシス関連遺伝子発現

成熟雄マウスにDES を 20 mg/kg 体重で5日毎に皮下投与し、初回投与から20日目に精巣を採取しパラフィン切片を作製した。アポトーシス関連遺伝子としてFas、Fas L、Bcl-2 及びBax 蛋白の発現を免疫組織化学的に検討した。本投与量では、TUNEL 陽性細胞数が極大を示しているが、その結果と一致して、Fas の生殖細胞での顕著な発現誘導とBax 発現の増大が認められた。また、Fas Lは正常精巣と同様にSertoli 細胞に特異的に発現していた。

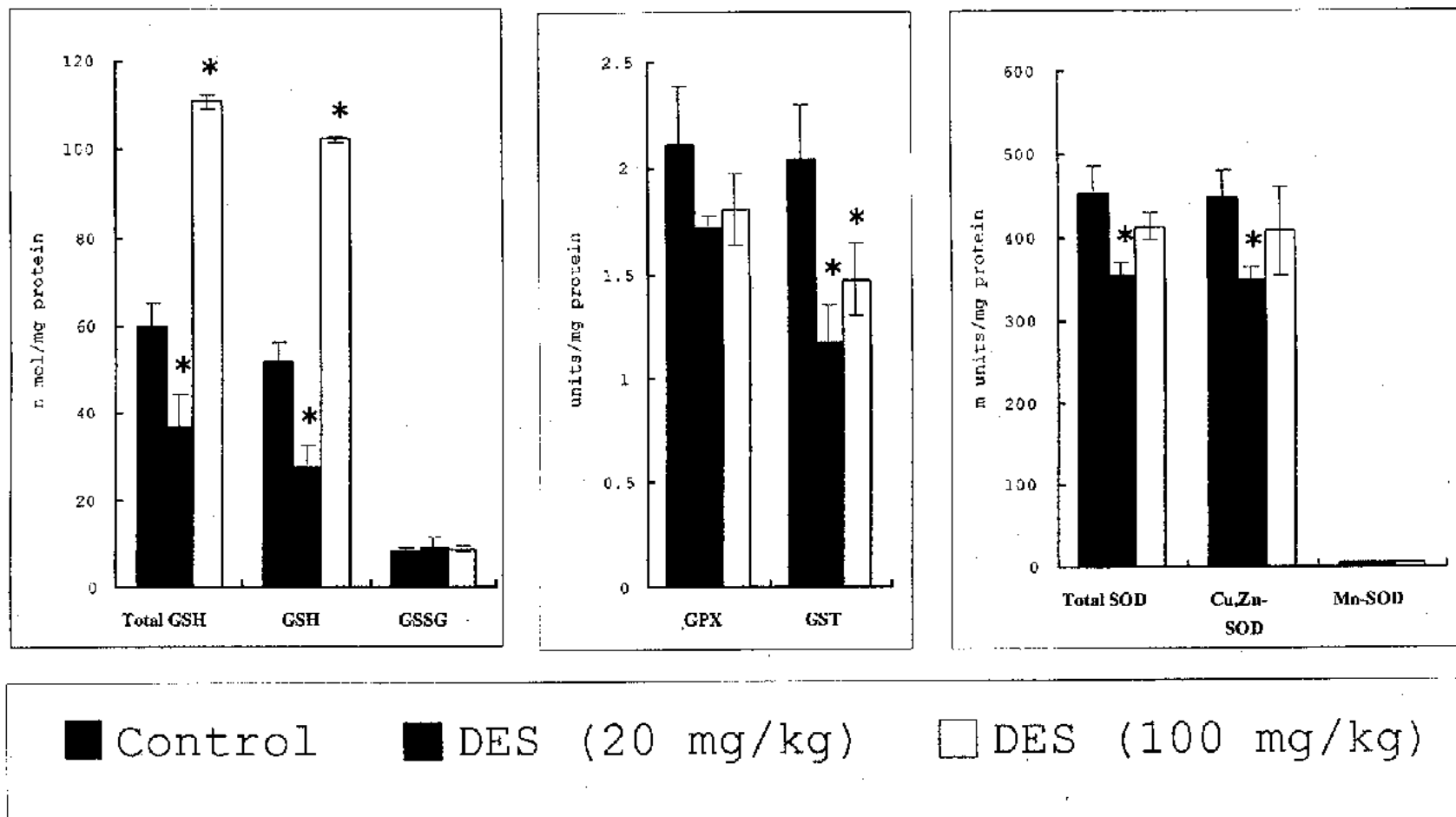
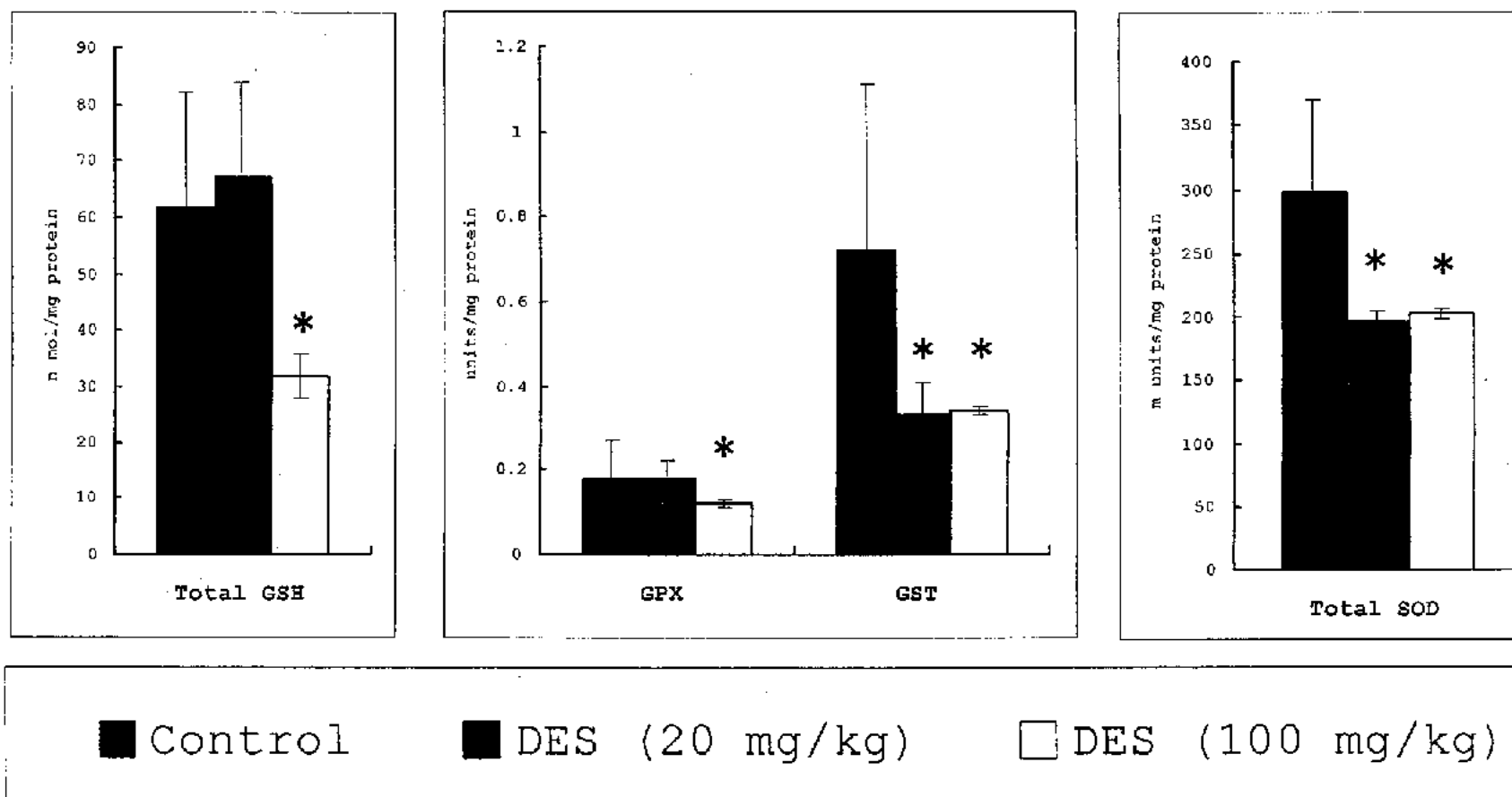


図3：DES投与によるマウス肝における抗酸化機構の変化

成熟雄マウスにDESを20 mg及び100 mg/kg体重で5日毎に皮下投与し、初回投与から20日目に肝組織を採取し、抗酸化機能に關与する物質並びに酵素活性の測定を行った。対照としては、5%エタノール/コーンオイルを同様に投与したものを用いた。ここで、total GSH:還元型と酸化型グルタチオンの総和、GSH:還元型グルタチオン、GSSG:酸化型グルタチオン、GPX:グルタチオン過酸化酵素、GST:グルタチオンS-トランスフェラーゼ、SOD:スーパーオキシドディスムターゼ、total SOD:Cu, Zn-スーパーオキシドディスムターゼ活性とMn-スーパーオキシドディスムターゼ活性の総和、であった。*: P < 0.05



* P<0.05

図4: DES投与によるマウス精巣における抗酸化機構の変化

成熟雄マウスにDESを20 mg及び100 mg/kg体重で5日毎に皮下投与し、初回投与から20日目に精巣を採取し、抗酸化機能に関与する物質並びに酵素活性の測定を行った。対照としては、5%エタノール/コーンオイルを同様に投与したものを用いた。ここで、total GSH:還元型と酸化型グルタチオンの総和、GPX:グルタチオン過酸化酵素、GST:グルタチオンS-トランスフェラーゼ、total SOD:Cu, Zn-スーパーオキシドディスムターゼ活性とMn-スーパーオキシドディスムターゼ活性の総和、であった。*: P < 0.05

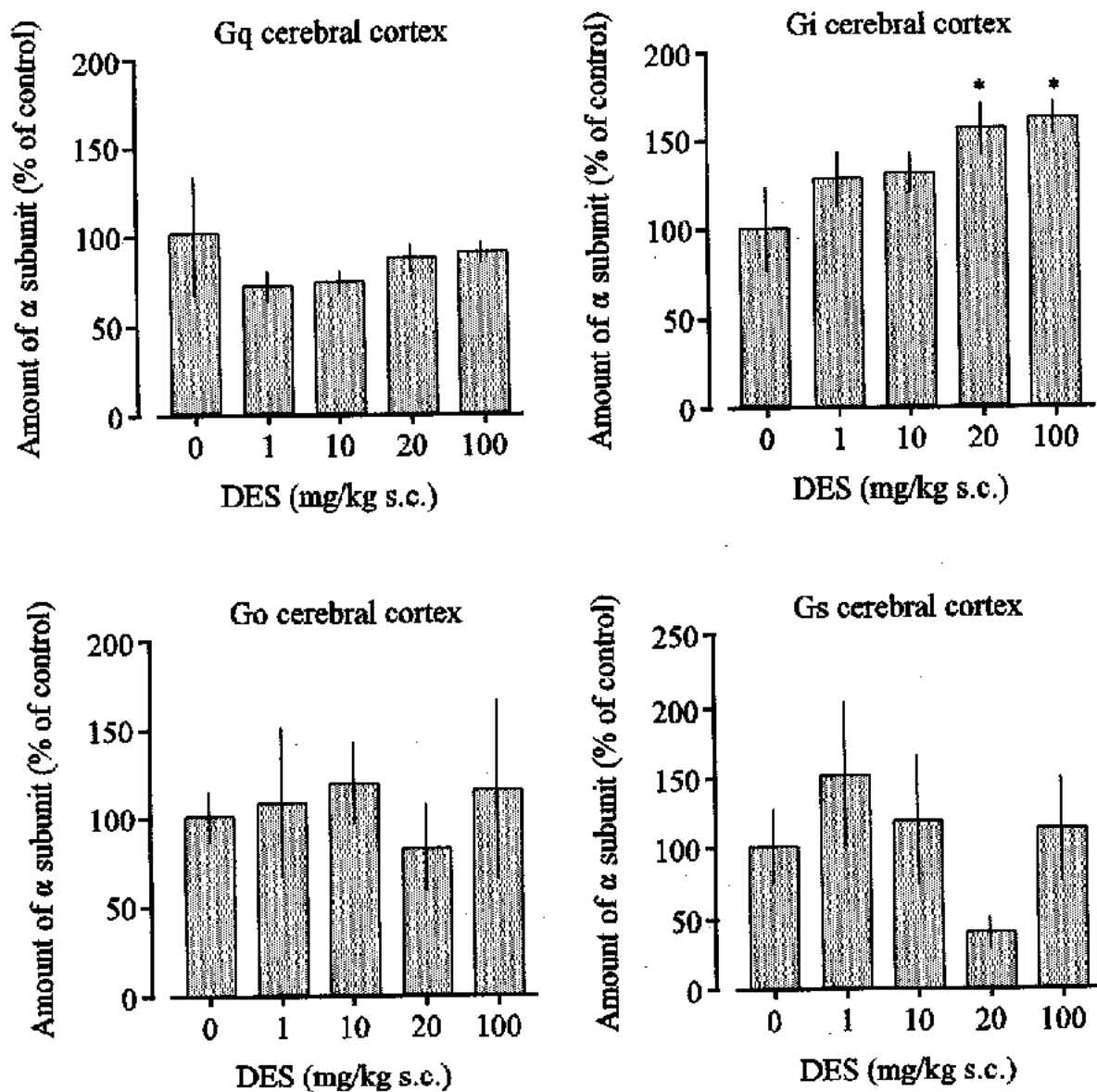


図5：DES投与による大脳皮質における各種G蛋白質 α サブユニット量の変化

成熟雄マウスにDESを1 mg、10 mg、20 mg及び100 mg/kg体重で5日毎に皮下投与し、初回投与から20日目に大脳皮質部位を摘出し、各種G蛋白質 α サブユニット量を測定した。*： $P < 0.05$

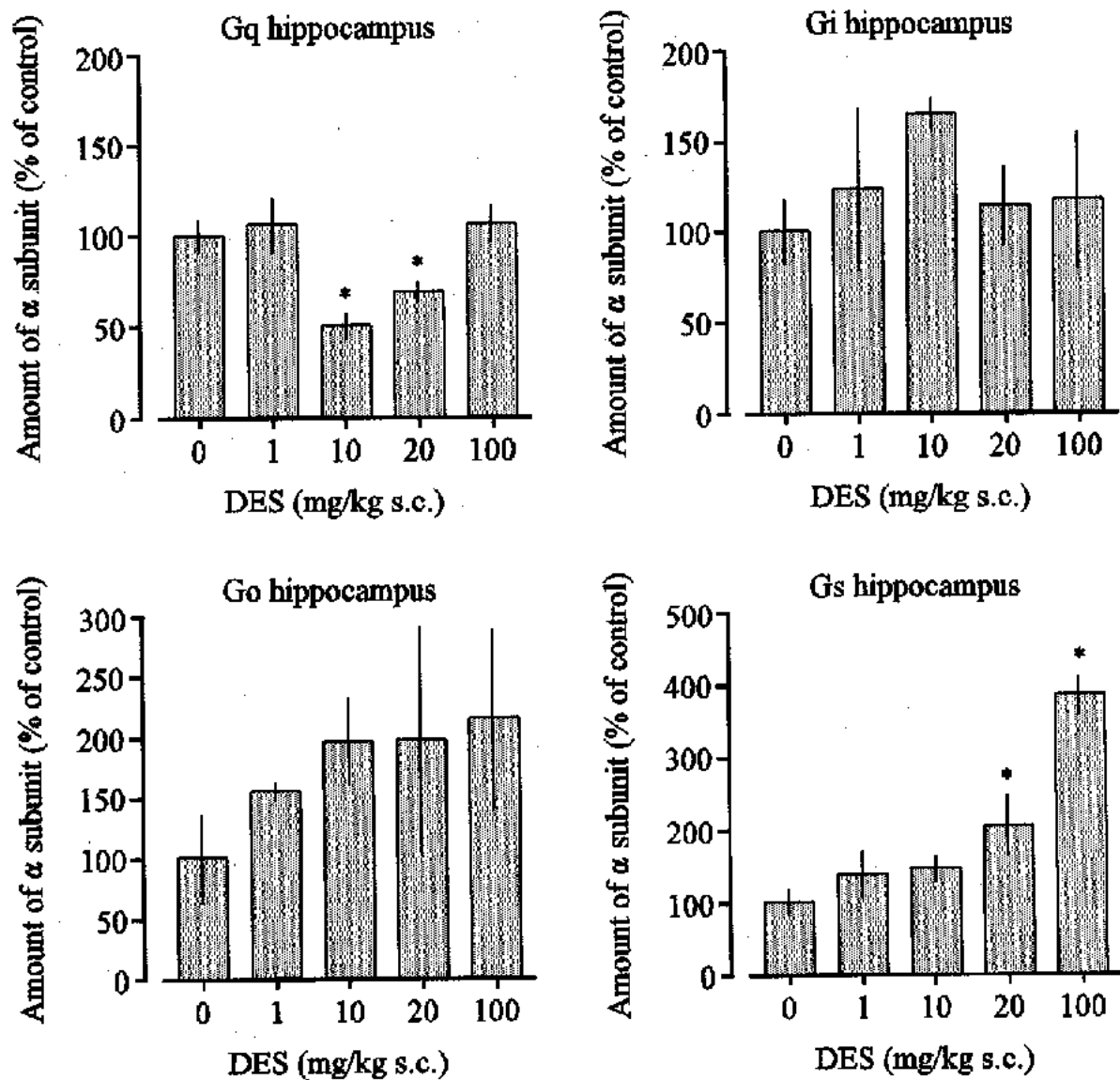


図6: DES 投与による海馬における各種G蛋白質 α サブユニット量の変化

成熟雄マウスにDESを1 mg、10 mg、20 mg及び100 mg/kg体重で5日毎に皮下投与し、初回投与から20日目に海馬部位を摘出し、各種G蛋白質 α サブユニット量を測定した。*: $P < 0.05$

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

研究者 加藤茂明（東京大学分子細胞生物学研究所 教授）

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 α 、 β （hER α 、hER β ）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既知オーファンレセプターリガンド応答系の確立、新規転写共役因子群の同定を行なった。

【研究協力者】

柳澤 純 東京大学分子細胞生物学
研究所 助手

武山健一 東京大学分子細胞生物学
研究所 助手

【研究目的】

低分子量の脂溶性生理活性物質をリガンドとする核内ステロイドレセプター群（核内レセプタースーパーファミリー）は、最も内分泌攪乱物質の作用する標的分子としての可能性が高い。そこで本研究では、既知性ステロイドホルモンレセプターの高発現細胞株を樹立する。この細胞株を用いることで、性ステロイドホルモン様活性物質を検索するシステムを構築することを目的とする。また、更に高感度検出法の確立を目的に、核内レセプターの転写促進機能に必須な転写共役因子群の同定を試みた。同時に、リガンド未知の核内オーファンレセプターに対して内分泌攪乱物質がリガ

ンドとして作用するか否かを検討することにある。

【研究方法】

1. 核内レセプターを用いたステロイドホルモン様活性物質の検索：

性ステロイドホルモンレセプターの転写促進能に及ぼす内分泌攪乱物質の影響を検索するシステムを構築する。具体的には、恒常的に性ステロイドホルモンレセプターを発現する細胞株を樹立する。

実験方法：1）ヒト女性ホルモンレセプター（hER α ）、及びヒト男性ホルモンレセプター（hAR）cDNA を transfect させた後、薬剤耐性クローンを選択する。2）更にクローンのいくつかに、同様の手法により、レポーター遺伝子（ルシフェターゼ）が染色体 DNA に組み込まれた 2 重の stable transformant を作成する。

2. 既知オーファンレセプター機能に

対する内分泌攪乱物質の影響：

核内レセプターは転写制御因子であるので、オーファンレセプター群を cDNA クローニング後、GAL4DNA 結合領域と置換したキメラタンパクを作製、各種内分泌攪乱作用を検討する。

3. 新たな転写共役因子の検索：

核内レセプターには、2つの転写促進領域 (AF-1、AF-2) を有するが、現在知られている転写共役因子群は、AF-2 に作用するものがほとんどで、AF-1 に関しては不明のままである。

現在核内受容体の転写には2段階の反応が必要とされている。これはまずヒストンアセチラーゼなどの機能を持つ転写共役因子 (p300, SRC-1 など) が機能し、クロマチン構造をほぐし、続いて DRIP/TRAP complex などの別の転写共役因子群が結合し、基本転写因子群との橋渡しをするというものである。既に核内受容体の AF2 に関してはいくつかの受容体でこのメカニズムが証明されている。しかし AF1 に関してはそのメカニズムは分かっていないため、AF1 転写共役因子の同定を行い、そのメカニズムに迫ることを考えている。

そこで AF-1 に作用する転写共役因子複合体を HeLa 核抽出液から生化学的に精製・同定し、これら因子を用いた新たなアッセイ系を検討する。

【研究結果】

1. hER α 、hER β 、hAR cDNA を取り込んだ stable transformant が数クロー

ン取得され、更に、高発現するクローンを選択した。これら高次発現クローンはいずれも当該ホルモンに良く応答した。そこで外来リポーター遺伝子導入株の確立を試している。

2. hER α 、hER β 、hAR に加え、RAR α 、RAR β 、RAR γ 、RXR α 、RXR β 、RXR γ 、VDR、TR α 、PPAR γ のリガンド結合領域 (LBD) を酵母 GAL4DNA 結合領域と融合したキメラタンパクを作製し、リガンド応答系を確立した。また、オーファンレセプター PNR についても同様の系を作成したが、応答するリガンドを見出せなかった。

3. 転写共役因子は、単独で作用することなく、複合体として機能することから HeLa 細胞核抽出液から複合体の精製を行なった。方法としては、ヒト ER α のリガンド結合領域 (AF-2) をエストロゲン存在で下で、ブローブタンパクとして、いくつかの吸着カラムを用いて巨大複合体の単離を行なった。その結果、既知の2つの転写共役因子複合体に加え、第3の転写共役因子複合体が存在することを見出した。またこの複合体はヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性を有することも確かめ、またいくつかの構成成分も同定した。

現在この複合体の他の構成成分を同定しているところである。

4. MRAP1 の存在領域として N 末端の 1-169a. a. と 450-600a. a. の 2 つの領

域を同定した。さらに既知の AF2 転写共役因子の内 p300 は以上 2 つの領域両方の転写を活性化したが、TIF2 は後者の転写活性のみを上昇させた。そこで AF1 の新規転写共役因子は前者に結合する可能性を考え、1-169a. a. の GST fusion protein を baculovirus 発現系を用いて作成する。それをプローブとして MR の活性がある HeLa 細胞の核抽出液から結合因子群を抽出し、SDS-PAGE にて展開し、in gel digestion を行い、MALDI-TOF-MS を用いて MS fingerprinting によってそれらの同定を試みている。

【考察及び結論】

hER α 、hER β 、hAR を高発現する細胞種が樹立できれば、同一クローン由来の細胞を用いることで、数多くの化学物質のホルモン活性を一度に評価することが可能である。しかしながら核内レセプター高発現細胞においては、本来の細胞機能が損なわれるため、本課題の目的に合致する細胞系樹立には到っていない。

【研究発表】

論文発表

1. Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Arao, Y., Suzawa, M., Kobayashi, Y., Ogawa, S., Yano, T., Yoshikawa, H., Masuhiro, Y., Kato, S.: A subfamily of RNA binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor α coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J.*, 20, 1341-1352, 2001.
2. Masuyama, R., Nakaya, Y., Tanaka, S., Tsurukami, H., Nakamura, T., Watanabe, S., Yoshizawa, T., Kato, S., Suzuki, K.: Dietary phosphorus restriction reverses the impaired bone mineralization in vitamin D receptor knockout mice. *Endocrinology*, 142, 494-497, 2001.
3. Sasagawa, S., Kato, S.: A nuclear receptor screening method using a steroid receptor coactivator-1 fragment in a yeast two-hybrid system. *Anal. Biochem.*, 289, 295-297, 2001.
4. Kato, S.: Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer*, 8, 3-9, 2001.
5. Li, M., Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Messaddeq, N., Kato, S., Metzger, D., Chambon, P.: Skin abnormalities generated by temporally-controlled RXR α mutations in adult mouse epidermis. *Nature*, 407, 633-636, 2000.
6. Adachi, M., Takayanagi, R., Tomura, A., Imasaki, K., Kato, S., Goto, K., Yanase, T., Ikuyama, S., Nawata, H.: Androgen-insensitivity syndrome as a possible coactivator disease. *N. Engl.*

J. Med., **343**, 856-862, 2000.

7. Kodera, Y., Takeyama, K., Murayama, A., Suzawa, M., Masuhiro, Y., Kato, S.: Ligand-type specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators. *J. Biol. Chem.*, **275**, 33201-33204, 2000.

8. Suzuki, K., Yamanishi, K., Mori, O., Kamikawa, M., Andersen, B., Kato, S., Toyoda, T., Yamada, G.: Defective terminal differentiation and hypoplasia of the epidermis in mice lacking the Fgf 10 gene. *FEBS Lett.*, **481**, 53-56, 2000

9. Ohuchi, H., Hori, Y., Yamasaki, M., Harada, H., Sekine, K., Kato, S., Itoh, N.: FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **277**, 643-649, 2000.

10. Yamamoto, A., Hashimoto, Y., Kohri, K., Ogata, E., Kato, S., Ikeda, K., Nakanishi, M.: Cyclin E as a coactivator of the androgen receptor. *J. Cell Biol.*, **150**, 873-879, 2000.

11. Arao, Y., Kuriyama, R., Kayama, F., Kato, S.: A nuclear matrix-associated factor, SAF-B, interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D. *Arch. Biochem. Biophys.*, **380**, 228-236,

2000.

12. Kato, S., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kobayashi, Y., Takeyama, K., Endoh, H., Yanagisawa, J.: Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways. *Genes to Cells*, **5**, 593-601, 2000.

13. Kato, S.: The function of vitamin D receptor in vitamin D action. *J. Biochem.*, **127**, 717-722, 2000.

14. Haraguchi, R., Suzuki, K., Murakami, R., Sakai, M., Kamikawa, M., Kengaku, M., Sekine, K., Kawano, H., Kato, S., Ueno, N., Yamada, G.: Molecular analysis of external genitalia formation: the role of *fibroblast growth factor (Fgf)* genes during genital tubercle formation. *Development*, **127**, 2471-2479, 2000.

15. Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J., Kato, S.: p300 Mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor α and β by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J. Biol. Chem.*, **275**, 15645-15651, 2000.

16. Fuse, H., Kitagawa, H., Kato, S.: Characterization of transactivational property and coactivator mediation of

- rat mineralocorticoid receptor AF-1. *Mol. Endocrinol.*, **14**, 889-899, 2000.
17. Kinuta, K., Tanaka, H., Moriwake, T., Aya, K., Kato, S., Seino, Y.: Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology*, **141**, 1317-1324, 2000.
18. Endre, B., Kato, S., DeLuca, H. F.: Metabolism of $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 in vitamin D receptor-ablated mice in vivo. *Biochemistry*, **39**, 2123-2129, 2000.
19. Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Mori, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: p300/CBP Acts as a coactivator of the cone-rod homeobox transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **269**, 410-414, 2000.
20. Tai, H., Kubota, N., Kato, S.: Involvement of nuclear receptor coactivator SRC-1 in estrogen-dependent cell growth of MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **267**, 311-316, 2000.
21. Hasegawa, Y., Fujii, K., Yamada, M., Igarashi, U., Tachibana, K., Tanaka, T., Onigata, K., Nishi, Y., Kato, S., Hasegawa, T.: Identification of novel human *CH-1* gene polymorphisms that are associated with growth hormone secretion and height. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 1290-1295, 2000.

【英文のアブストラクト】

Establishment of stable transformants expressing nuclear receptor and search for novel receptors for endocrine disruptants

Shigeaki Kato, Professor

Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo

Key Word:

nuclear receptor, sex steroid hormone, stable transformant, co-factor, luciferase assay

Abstract:

Establishment of assay systems to assess sex steroid hormone-like activity of chemical compounds is under trial. Stable transformants expressing hER α , hER β and hAR have been established, and transactivation assay for orphan receptors and search for novel coactivators were performed.

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

研究者 姫野 誠一郎(北里大学薬学部助教授)

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。

研究協力者

四條裕香子 (北里大学薬学部助手)

星埜 梓 (北里大学薬学部大学院生)

A. 研究目的

現在、多くの化学物質による内分泌攪乱作用が注目されており、わが国においても、環境省による「環境ホルモン戦略計画 SREED'98」の中で、内分泌攪乱作用を持つと疑われる 65 物質がリストされており、うち約 40 物質についてミレニアムプロジェクトにより平成 12 年度より 3 年計画でリスク評価を開始している。65 物質の中に、トリブチルスズ、トリフェニルスズなどの有機スズ化合物が含まれており、イボニシ貝などの巻貝において、メスの生殖器の雄化現象を起こすことが報告されている。しかし、その作用機序はいまだに不明であり、また、哺乳類を含む他の生物でこのようなオス化が起こるのかも十分に検討されていない。

また、上記の 65 物質以外に内分泌攪乱作用が疑われる物質として Cd, Hg, Pb が追記されているが、これらの金属化合物について、内分泌攪乱作用に注目してその量-影響関係や作用機

序について系統的に検討した研究は行われていない。

そこで、本研究はまず、オス化作用、メス化作用を検出する in vitro の系を確立し、金属化合物が内分泌攪乱作用を示すかどうかを検討した。その結果、androgen に応答して増殖する細胞株である LNCaP 細胞を tributyltin (TBT), triphenyltin (TPT) が増殖させることを見いだした。そこで、本年度は、TBT, TPT が LNCaP 細胞を増殖させる機構を解明するため、様々な解析を行った。

B. 研究方法

1. in vitro screening 系の確立

ヒト乳癌由来の MCF7 細胞、及びヒト前立腺癌由来の LNCaP 細胞を、活性炭処理した fetal calf serum を 10% 含む RPMI 1640 培地で培養した。また、androgen response element (ARE) の下流に luciferase を連結した plasmid を LNCaP 細胞に導入して stable transformant (LA16) を樹立した。同様に、MCF7 に estrogen response element-luciferase を導入した stable transformant (ME1) を樹立した。上記の LA16 細胞、及び

ME1 細胞の培地に 26 種類の金属化合物を様々な濃度で添加し、細胞増殖と androgen receptor (AR)、あるいは estrogen receptor (ER) を介した転写活性に及ぼす影響を調べた。細胞増殖は MTT 法により計測した。AR あるいは ER の転写活性は luciferase 遺伝子転写産物の化学発光により計測した。positive control として、ME1 には estradiol、LA16 には dihydrotestosterone (DHT) を作用させた。

2. 有機スズ化合物による AR 依存的転写活性の検討

2-1. Thymidine の取り込み

LA16 細胞の培地に TBT (100 nM), TPT (1 nM), DHT (10 nM) を添加して 52 時間培養後、培地に ³H-thymidine を添加し、さらに 20 時間培養後、細胞を溶解し、細胞への thymidine の取り込みを ³H の放射活性として計測した。

2-2. AR の発現に及ぼす影響

TBT, TPT が AR の発現そのものに影響を与えているかどうかを検討するため、LA16 細胞を TBT (100 nM), TPT (1 nM), DHT (10 nM) で 72 時間処理した後、total RNA を抽出し、Northern blot 分析により AR の mRNA レベルを調べた。

2-3. AR の下流の遺伝子の発現

LA16 細胞を TBT (100 nM), TPT (1 nM), DHT (10 nM) で 72 時間処理した後、total RNA を抽出し、Northern blot 分析により AR によって転写活性化されることが知られている prostate specific antigen (PSA) の mRNA レベルを調べた。

2-4. TBT, TPT と DHT の相互作用

LA16 細胞の培地に DHT (10 nM) と TBT (100 nM), DHT と TPT (1 nM) を同時に添加し、それぞれを単独で添加したときの luciferase の活性化と比較した。

2-5. TBT, TPT の代謝

LA16 細胞の培地に TBT (100 nM), TPT (1

nM) を 72 時間添加後、細胞を回収し、GC/MIP/AED 法により TBT, TPT の各代謝物の濃度を分別定量した。

3. LNCaP 以外の前立腺癌細胞株を用いた検討

LNCaP 細胞の内在性 AR は 1 アミノ酸変異 (877Thr→877Ala) を有する mutant (mut) AR であることが報告されている。一方、ヒト前立腺癌由来の PC3 細胞および DU145 細胞においては内在性 AR の発現が認められないことも分かっている。そこで、PC3 細胞および DU145 細胞に ARE-luciferase と同時に、mut AR 発現 plasmid あるいは wild type (wt) AR 発現 plasmid を導入した後、AR を介した転写活性化に対する TBT の影響を、TBT 単独処理の場合と DHT と併用した場合のそれぞれについて検討した。

C. 研究結果

1. in vitro screening の結果

26 種類の金属化合物を ME1 細胞の培地に添加し、細胞増殖、ER の転写活性に及ぼす影響を検討した結果、いずれの金属化合物も促進的な効果を示さなかった(表1)。一方、LA16 細胞に金属化合物を作用させた場合、Zn, As, Sb, Pb が AR を介した転写を活性化した(表2)。しかし、これらの金属は LA16 細胞の増殖を起こすことはなかった。これに対し、TBT (100 nM), TPT (1 nM) は、AR を介した転写を活性化するとともに、細胞を増殖させた(図1)。その程度は、1 nM の DHT による作用とほぼ同じレベルであった。

2. 有機スズ化合物による AR 依存的転写活性に対する影響

TBT, TPT を LA16 細胞に作用させると、thymidine の取り込みが増加することから、TBT, TPT は確かに LA16 細胞の DNA 合成を促進することにより細胞増殖を起こしていることが確認された。TBT, TPT が AR の発現を亢進させることにより AR 依存的な転写を活性化している可能性もあるので、AR の mRNA レベルに及ぼす TBT, TPT の影響を検討した。その結果、細胞増殖を起こす濃度の TBT, TPT を培地に添加し

ても、AR の mRNA レベルは変化しないことがわかった。また、TBT, TPT 添加によって reporter gene である luciferase の活性化のみならず、PSA の mRNA レベルが上昇していたことから、これらの化合物が AR を介した内在性の遺伝子の転写も活性化していることが確認できた。

dibutyltin (DBT), diphenyltin (DPT) は LA16 細胞の増殖も luciferase の活性化も起こさなかった。一方、TBT, TPT を取り込ませた LA16 細胞の有機スズ化合物の化学形を調べた結果、それぞれ TBT, TPT 以外の代謝物はほとんど検出されなかったことから、AR を介した転写を活性化する作用は、トリアルキル体の有機スズによるものと考えられる。

一方、DHT と TBT, DHT と TPT を同時に培地に添加した場合、それぞれの化合物を単独で添加した場合より、さらに AR 依存的転写活性が増強された。また、AR に ligand が結合するのを阻害する antagonist である flutamide は、DHT による AR 依存的転写活性を阻害したが、TBT, TPT による AR の転写活性には影響を及ぼさなかった(図2)。

3. LNCaP 以外の前立腺癌細胞株に対する影響

LNCaP 細胞の内在性 AR と同じ変異をもつ mut AR を強制発現させた LNCaP 細胞に TBT を添加すると、TBT の濃度依存的に AR を介した転写が活性化された。またそのとき DHT を共存させると、TBT は DHT による転写の活性化をさらに増大させた。しかし、wt AR を発現させた LNCaP 細胞では、DHT 存在下で TBT 処理をした場合にのみ TBT による転写活性化作用が認められた。一方、PC3 や DU145 を用いて同様の検討を行ったが、wt AR あるいは mut AR のいずれの plasmid を発現させた場合にも TBT 単独処理による AR の転写活性化、及び DHT との併用による転写活性化の増強作用は観察されなかった。

D. 考察

本研究で確立した ME1, LA16 の両細胞株は、性ホルモン依存的な細胞の増殖と転写の活性化を同じ細胞で検討することができる。この細胞

株を用いて、オス化、あるいはメス化作用を示す金属化合物を検索した結果、すでにイボニシ貝のオス化を誘発することが報告されている有機スズ化合物である TBT と TPT が前立腺癌由来の LA16 細胞を増殖させ、AR 依存的な転写を活性化することがわかった。この作用は、DBT, DPT では認められず、また、TBT, TPT を取り込ませた細胞に DBT, DPT は検出されなかったことから、トリアルキルスズ化合物に特異的な作用と考えられる。LA16 細胞はトリアルキルスズを脱アルキル化する作用が弱い可能性があるが、逆に言えば、そういう性質を持つ細胞株を用いたために、TBT, TPT の AR に対する作用を検出できた可能性がある。

また、TBT, TPT は、AR の発現そのものには影響を与えないこと、luciferase だけでなく、PSA の mRNA レベルも上昇させることを確認した。従って、TBT, TPT は AR を介した転写を活性化することにより、LA16 細胞の増殖を誘発しているものと考えられる。

ところで、TBT, TPT の作用が flutamide によって阻害されなかったことから、TBT, TPT が AR の ligand binding domain 以外に作用している可能性が示唆された。また、DHT の作用を TBT, TPT が相乗的に増加させたことから、異なる作用点の存在が示唆される。これまで報告されている内分泌攪乱物質は、そのほとんどがホルモン受容体に直接結合することで、作用するものであった。もし、TBT, TPT による AR を介した転写の活性化機構を明らかにすることができれば、内分泌攪乱物質の新しい作用点を見いだすことにもなり、新たな screening 系の開発にもつながる。この点については、今後の検討課題である。

一方、LNCaP の AR には変異が存在することが知られており、その変異のために ligand に対する反応性が変化していることも報告されている。そこで、LNCaP に mut AR と wt AR を ARE-luciferase とともに transient に導入し、TBT の影響を検討したところ、mut AR を導入したときのみ TBT 処理による AR の転写活性化が起こった。一方、wt AR を導入した場合には、DHT の作用を TBT が増強したが、TBT 単独での作用は認められなかった。従って、TBT が AR の転写活

性を増大させる際に、AR のアミノ酸変異が何らかの関与をしているものと考えられる。しかし、DHT の作用を TBT が増強する場合には、AR の変異は関係していないと考えられ、複雑な作用機序が推定された。

また、PC3, DU145 に ARE-luciferase とともに mut AR を導入しても、TBT による AR の転写活性化は観察されなかった。従って、TBT による AR を介した転写の活性化及び細胞増殖の促進は LNCaP 細胞に特異的な現象であり、LNCaP 細胞には TBT が標的とする細胞特異的因子が存在する可能性が示唆された。この因子を同定することができれば、有機スズ化合物の作用点の解明にもつながるものと考えられ、今後検討を行う予定である。

これまで、有機スズによる内分泌攪乱作用は、androgen を estrogen に変換する aromatase に対する阻害作用によるものと推測されてきた。しかし、巻貝の imposex などの現象がそれだけで説明できるかどうかいまだに明らかではない。また、巻貝以外の動物、特に哺乳類に対する有機スズ化合物の内分泌攪乱作用は十分には検討されていない。本研究は、有機スズ化合物が哺乳動物に対してもオス化作用を示す可能性があることを初めて示したものである。その機構として、TBT, TPT が AR を介した転写活性を増大させることを示した。しかし、その機構を解明するには、さらに詳細な検討が必要と思われる。

E. 結論

金属化合物のうち、TBT, TPT が前立腺癌由来の細胞株 LA16 の細胞増殖を促進した。これは LA16 細胞の AR を介した転写を活性化しているためである。しかし、TBT, TPT の作用点は、AR と ligand 結合部位とは異なっている可能性が高い。また、TBT が AR 依存的な転写を活性化する際、LNCaP 特異的な因子が必要であることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Y. Yamabe, A. Hoshino, N. Imura, T. Suzuki and S. Himeno, Enhancement of androgen-

dependent transcription and cell proliferation by tributyltin and triphenyltin in human prostate cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 169, 177-184 (2000)

2. 学会発表

・ヒト前立腺癌細胞 LNCaP における金属化合物のアンドロゲン様作用の解析。四條裕香子、星埜 梓、井村伸正、姫野誠一郎。日本薬学会第 120 年会。

・ヒト前立腺癌細胞におけるトリブチルスズの AR 依存的転写活性化作用の解析。星埜 梓、四條裕香子、井村伸正、姫野誠一郎。日本内分泌攪乱化学物質学会第 3 回研究発表会。

・有機スズ化合物によるアンドロゲンレセプター活性化作用の解析。星埜 梓、四條裕香子、井村伸正、姫野誠一郎。日本薬学会第 121 年会。

Study on Endocrine Disruption by Metal Compounds --- with Special Reference to Androgenic Action of Organotin Compounds

Seiichiro Himeno, (Kitasato University, School of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor)

To investigate endocrine disruption by metal compounds, we have established two cell lines; ME1 that stably expresses estrogen-responsive luciferase reporter gene and proliferates in response to estrogen, and LA16 that stably expresses androgen-responsive luciferase reporter gene and proliferates in response to androgen. ME1 and LA16 cells were derived from human breast cancer cell line, MCF7, and human prostate cancer cell line, LNCaP, respectively. Among 26 metal compounds examined, tributyltin (TBT, 100 nM) and triphenyltin (TPT, 1 nM) enhanced both AR-dependent transcription of luciferase gene and cell growth of LA16 cells to the same extent as those by 1 nM dihydrotestosterone (DHT). TBT or TPT also enhanced the DNA synthesis and expression of endogenous AR target gene such as prostate specific antigen, but not the expression of AR itself. However, an androgen antagonist, flutamide, did not inhibit the TBT- or TPT-induced AR activation. On the other hand, simultaneous treatment of LA16 cells with DHT and TBT or TPT caused highly enhanced effects on AR activation. These results indicate that trialkyltin compounds have an ability to activate AR-mediated transcription in mammalian cells, and suggest that a novel target site other than the ligand-binding site of AR is involved in this activation. Furthermore, we investigated androgenic effects of TBT in other human prostate cancer cell lines, PC3 and DU145. We transfected both androgen-responsive luciferase reporter plasmid and wild type (wt) or mutant (mut) AR expression plasmid in these cell lines and measured luciferase activity after treatment with TBT in the presence or absence of DHT. TBT activated AR-dependent transcription and stimulated DHT-induced transcription in LNCaP cells transfected with mut AR expression plasmid. However, AR-dependent transcription with or without DHT was not activated by TBT, when wt or mut AR expression plasmid was transfected in PC3 or DU145 cells. These results suggest that TBT activated AR-mediated transcription in LNCaP cells via a specific target factor(s) which may not be expressed in PC3 or DU145 cells.

Key words: tributyltin, triphenyltin, androgen receptor, LNCaP

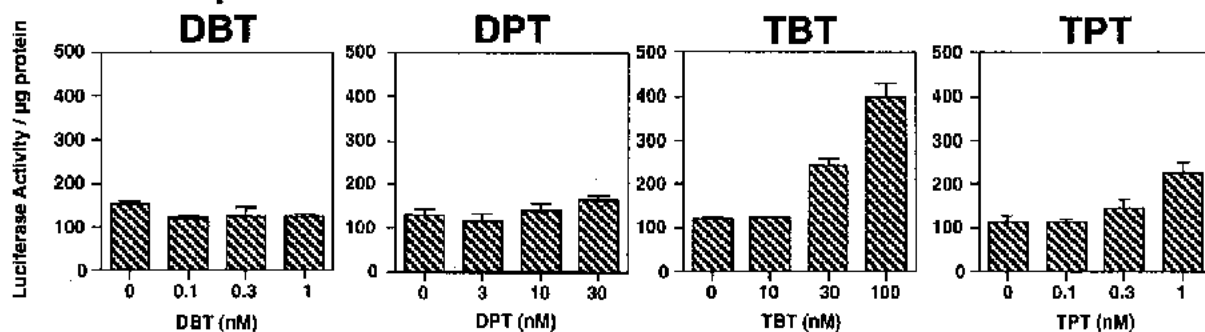
表 1 Effects of metals on ER-mediated transcription in ME1 cells

	Conc.	Luciferase Activity (% of Control)			Conc.	Luciferase Activity (% of Control)	
Control		100	± 31				
E2	1nM	295	± 21				
Li	10μM	137	± 3	100μM	136	± 22	
Al	10μM	96	± 11	100μM	91	± 18	
V	0.3μM	108	± 32	3μM	100	± 32	
Cr (III)	10μM	82	± 18	100μM	73	± 16	
Cr (VI)	0.1μM	119	± 7	1μM	68	± 11	
Mn	1μM	80	± 13	10μM	75	± 21	
Fe	10μM	69	± 12	100μM	79	± 19	
Co	10μM	89	± 14	100μM	65	± 12	
Ni	10μM	71	± 4	100μM	41	± 13	
Cu	1μM	72	± 2	10μM	74	± 17	
Zn	10μM	108	± 7	100μM	134	± 19	
As	1μM	112	± 9	10μM	30	± 9	
Se	0.1μM	108	± 17	1μM	101	± 22	
Mo	3μM	134	± 15	30μM	139	± 30	
Ag	1μM	63	± 17	10μM	59	± 20	
Cd	1μM	54	± 25	10μM	68	± 10	
Sn	1μM	147	± 14	10μM	131	± 29	
Sb	1μM	219	± 18	10μM	146	± 2	
Hg	1μM	72	± 5	10μM	89	± 12	
Tl	1μM	106	± 6	10μM	99	± 32	
Pb	10μM	107	± 4	100μM	106	± 14	
MeHg	1μM	75	± 21	10μM	32	± 6	
DBT	1nM	87	± 9	3nM	31	± 9	
DPT	30nM	53	± 11	100nM	45	± 10	
TBT	30nM	59	± 9	100nM	49	± 13	
TPT	0.3nM	127	± 16	1nM	73	± 24	

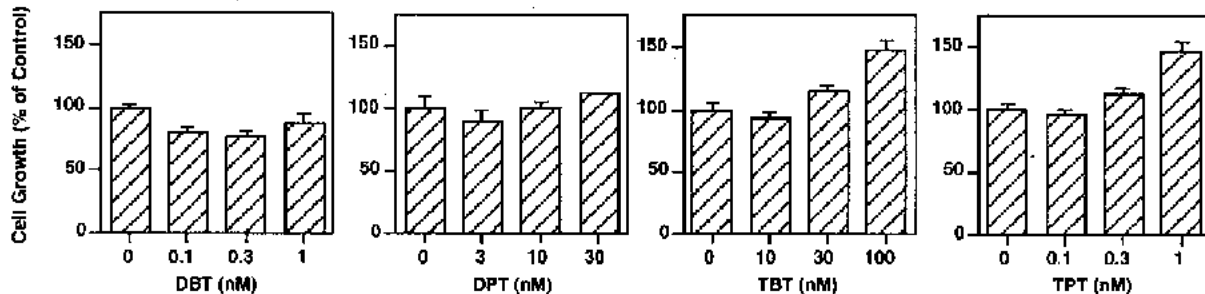
**表 2 Effects of metals on AR-mediated transcription
in LA16 cells**

		Luciferase Activity (% of Control)					Luciferase Activity (% of Control)		
Conc.					Conc.				
Control		100	±	10					
DHT	10nM	460	±	16					
Li	10μM	92	±	11	100μM	83	±	4	
Al	10μM	96	±	5	100μM	85	±	8	
V	0.3μM	102	±	10	3μM	86	±	8	
Cr (III)	10μM	81	±	13	100μM	81	±	12	
Cr (VI)	0.1μM	80	±	22	1μM	63	±	5	
Mn	1μM	92	±	8	10μM	95	±	6	
Fe	10μM	107	±	5	100μM	99	±	20	
Co	1μM	98	±	17	10μM	126	±	12	
Ni	1μM	95	±	5	10μM	105	±	2	
Cu	1μM	111	±	8	10μM	125	±	6	
Zn	10μM	97	±	5	100μM	191	±	42	
As	0.1μM	121	±	11	1μM	229	±	7	
Se	0.1μM	105	±	12	1μM	101	±	14	
Mo	3μM	108	±	10	30μM	106	±	6	
Ag	1μM	92	±	2	10μM	98	±	6	
Cd	1μM	120	±	10	10μM	211	±	73	
Sn	1μM	94	±	15	10μM	148	±	51	
Sb	1μM	177	±	14	10μM	291	±	11	
Hg	1μM	111	±	21	10μM	135	±	13	
Tl	10μM	110	±	15	100μM	66	±	7	
Pb	10μM	158	±	21	100μM	198	±	45	
MeHg	0.1μM	95	±	4	1μM	132	±	18	
DBT	1nM	83	±	3	3nM	83	±	9	
DPT	30nM	127	±	6	100nM	140	±	12	
TBT	30nM	192	±	13	100nM	298	±	36	
TPT	0.3nM	118	±	14	1nM	176	±	18	

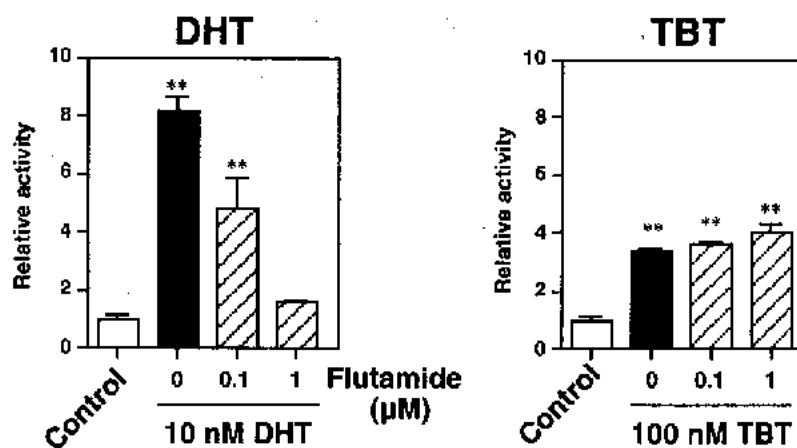
< Transcription >



< Growth >



1 Effects of Alkyltin Compounds on AR-mediated Transcription and Proliferation of LA16 Cells



2 Effects of flutamide on AR-mediated transcription induced by DHT and TBT in LA16 cells

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

研究者 中堀 豊 (徳島大学医学部公衆衛生学教授)

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。

研究協力者氏名

新家利一 (徳島大学医学部公衆衛生学助手), 笹原賢司 (徳島大学医学部公衆衛生学助手), 田村隆教 (徳島大学医学部公衆衛生学講師), 黒木陽子 (徳島大学医学部公衆衛生学 CREST 研究員), 香川征 (徳島大学医学部泌尿器科学教授), 奈路田拓史 (徳島大学医学部泌尿器科学大学院生), 松本孝澄 (福井医科大学法医学教授)

A. 研究目的

近年、内分泌攪乱化学物質のヒトへの影響が懸念されており、性決定・性分化や生殖細胞形成に与える影響は特に重大な関心を呼んでいる。実験動物を使つての研究はあるが、ヒトについての研究はほとんど行われていない。我々は従来より、ヒトY染色体のゲノム解析を行っているが、Y染色体には精巣決定因子や精子形成に必須の遺伝子領域が存在するため、疾患としては性分化異常症、無精子症などを研究してきた。このようなヒトの性分化、精子形成についての知識と実績を生かして、内分泌攪乱化学物質のヒトへの影響を研究する。

B. 研究方法

内分泌攪乱化学物質のヒト生殖細胞に対する影響について我々は、① 生殖腺の形成 (性決定・分化)、② 生殖細胞の分

化・維持・死滅、③ 生殖細胞の腫瘍化、の3つの観点からアプローチを行っている。本研究においては主として①と③について研究を行っているが、以下に我々の研究の下地になっている事実と知識について簡単に述べる

① 生殖腺の形成

現在までの分子生物学的知見からは、性決定の機序は生物間で異なっていると考えざるを得ない。その中で、肝腎のヒトに関する知見がほとんど得られていない。1991年にY染色体上の精巣決定遺伝子 SRY (Sex determining region on Y) が発見され、ヒトの性分化に関する研究は大きな進展を期待されたが、残念なことにその後ほとんど進歩がない。SRY 遺伝子は DNA 結合蛋白と推定されるが、その標的となる配列が7塩基の配列であり、ゲノムのどこにでもあるような DNA 配列であること。SRY 遺伝子の構造の中で、ほ乳類で共通して保存されている領域は、HMGbox と呼ばれる DNA 結合部位だけだと考えられること。同様の DNA 結合部位を持つ似たような遺伝子がヒトには20個以上もあり、なぜ SRY が精巣決定因子でなくてはならないかという必然性が不明であることなど、極めて研究しづらい性格の遺伝子であるという問題が根底にある。なにより、ヒトにおける解析を困難にしている最も大きな原因は適切な実

驗系がないことにある。

本研究では、ヒト生殖腺形成に関与する遺伝子を明らかにすること、および、それらの発現に影響する化学物質の作用を *in vitro* で検出できるような系を確立することを目的としている。このため、いくつかの細胞において、既知の生殖腺形成関連遺伝子発現の有無を解析した。

② 生殖細胞の分化と維持

性決定とは異なり、生殖腺における生殖細胞の形態変化（＝精子になる過程、卵になる過程）は、全ての生物でおおよそ共通している。ヒト女性の卵は胎生期には700万個程度存在するが、胎生後期には apoptosis によってその数を減らし、出生時には数万のオーダーまで減少している。思春期を過ぎるとこの中から、性周期毎に1個ずつ排卵される。胎生期の apoptosis の機序は不明であるし、全部が死滅しないで一部が生き残る機序も、生き残ったうちの1個ずつが排卵される機序もそのほとんどの部分は不明である。いずれにせよ何らかの物質が最終的に apoptosis にいたる減数分裂を止めていると考えられる。過去に 2-プロモプロパンを扱う作業所で女性が無月経になったという報告があり、この物質が生殖細胞の維持に関わる機構に異常を生じた可能性を考えた。本年度は、このテーマに関する実験的アプローチは行わなかったが、このような病態に対応する疾患として、女性においては早期閉経、男性においては Sertoli cell only の無精子症が考えられるので、本大学の産婦人科、泌尿器科と共同（このような研究においては、各科より病院小倫理委員会へ申請し承認を得ている）で疾患の収集を行うと共に、男女とも生殖細胞の維持に関与することが示唆されている DAZ、DAZH 遺伝子の解析を行った。

③ 生殖細胞の腫瘍化

Y染色体成分をもつ Turner 症候群患者（女性）に性腺腫瘍が好発することが知られており、Y染色体上には性腺を腫

瘍化する遺伝子があるとされている。最近、我々はY染色体のDNA多型によって日本人男性を分類し、男性の系統と個体の精子数との間に関連があること、無精子症になりやすさも男性の系統によって異なることを示した。Y染色体の多様性によってこのような表現型の違いがあり、また、Y染色体上に性腺腫瘍化遺伝子があるならば、男性の系統によって腫瘍化のリスクが違うのではないかという仮説が成り立つ。精巣腫瘍にはいくつかの組織型があるが、Malignant Lymphoma等の造血系細胞に由来する腫瘍やその他の稀にみられる由来不明の腫瘍以外は、生殖細胞が腫瘍化したものである考えられている。ホルモンと関連した腫瘍もあり、その発症には環境因子が大きく関わっているものと考えられる。そこで男性の系統によって腫瘍の頻度や種類に違いがないかどうか検討した。

C. 研究結果

● 生殖腺の形成（性分化）についての研究

今までに試した性腺由来細胞のうちで我々が注目しているのは、ヒト精巣由来の embryonal cell carcinoma から樹立された NT2/D1 細胞株である。本年の研究で NT2/D1 細胞株は、SRY 遺伝子や SOX9 などヒト男性の性決定および分化過程に重要な役割を担う遺伝子群を発現している貴重な細胞株であることが分かった。

一方、我々は MIS 遺伝子が性分化過程での1つの鍵となる遺伝子であるという仮説をもっており、性分化カスケードの中で SRY 遺伝子や SOX9 遺伝子の下流にあたると考えている。そこで、MIS 遺伝子プロモータ領域をレポーター遺伝子の upstream に挿入したプラスミドを作成、NT2/D1 細胞に導入し、内分泌攪乱作用を疑わせる物質の存在下でレポーター遺伝子の活性を測定できるような系の作成を試みている。

● 生殖細胞の腫瘍化についての研究

精巣腫瘍の患者検体を本大学泌尿器科と共同で収集した。Seminoma とそれ以外の性腺由来腫瘍に分類し、発症年齢、転移の有無、予後などと共にY染色体のDNA多型について検討した。まだ、予備的なデータであるが、特定の腫瘍が特定の男性の系統に集中する傾向があるように思われる。

これが事実であれば、それぞれの系統の男性個体から適当な細胞株を樹立し、内分泌攪乱化学物質と疑われる物質に対する反応の差違を調べる方向に研究を進めたい。

D. 考察

本研究の初年度に当たり、研究の方向性をはっきりとさせておきたい。まず、我々は、「ヒト」または（実験生物においても）「ヒトと共通性をもつメカニズム」にこだわって研究を進めたい。

性のシステムは、ヒトにおける社会的性役割や動物の求愛行動まで考えると、それぞれの生物種がそれぞれの種に極めて特殊な固有のシステムを持っている。動物の卵の大きさを見ても、ダチョウの卵から、サケの卵、ヒトの卵まで、皆同じ機能を持ったものであるが、これらの形成が全く同じ機序に支配されていると考えるには無理がある。雌雄同体は動物にも植物にも見られる現象であるが、同じ雌雄同体システムを採用しているからといって、トウモロコシとカタツムリの先祖が共通であると主張する人はいないであろう。

内分泌攪乱化学物質の作用を語るためには、まず、動物（または植物）における「性」というシステムの根本的な理解が必要である。それはすなわち、生物多様性とそれを作りだしてきた「性」に対する理解であって、この点が十分に理解されないまま、さまざまな生物における内分泌攪乱作用がごちゃ混ぜに語られていることに危惧を抱いている。性のシステムは進化の偶然の上に形成されており、表向きは同様の機能を持つ（表現型コピ

ー）ように見えても、その分子的機序は全く異なることがあるという可能性を常に認識している必要がある。

残念なことに、ヒトの性分化についての研究は、この10年間ほとんど進んでいない。さまざまな研究者が、さまざまなアプローチはしてきたが、ヒトの性分化を解明するための十分な方法論がなかった。ゲノム解読が終わろうとしている今、さまざまな分野でプロテオミクスの方法論が発展しつつある。このような方法論を駆使して、ヒトにおける性分化の機構を明らかにしていきたいというのが、我々の目指す一つの方向性である。同時に、性分化機構に影響を及ぼす化学物質について検討していきたい。

一方で、ヒト多様性を基盤にした研究を行うことが、我々のもう一つの方向性である。遺伝学的に「適応度（fitness）」という概念がある。これは子孫を残す率であるが、適応度の高い個体が次世代の子を多く作り、適応度の低い個体はあまり子を残さないとすると、集団としては適応度の高い個体の表現型が進化していく。

ヒトはそういった進化の上で成立してきた種の一つであることは言を待たないし、現在も集団の変化は進行しているはずである。それどころか、ヒトは自らその居住する環境や社会環境を猛烈なスピードで変更してきたゆえ、それに適応する個体も次々と変化してきたことが考えられる。すなわち、時代や社会環境が変われば適応個体も変化していることを認識すべきである。

Y染色体の多様性と男性表現型に関しては、我々が精子形成能力の違いを示した後、世界のさまざまなグループが研究を開始している。精子形成能力が違ってくるのが適応度にどのように影響するかどうか分からないが、少なくとも精子濃度が薄いことが利点であるとは考えにくい。それなら、それを補う別の表現型があるのかも知れないという考えに簡単に行き着く。どのような男性が現在の日本社会

で適応度を高めているのか興味深い問題である。ただ、男性間の表現型の違いをY染色体の違いに求めるためには、常染色体上の遺伝子の影響が十分に少なくなくてはならない。日本人はその成り立ちから約2000年が経過し、常染色体に関して各人の持つ遺伝子はよく混ざりあっているとと思われること、環境が表現型に与える違いが諸外国に比べて比較的少ないであろうことなど、研究に有利な条件があると考えられる。

以上のように、「ヒトにおける生殖腺形成(性分化)、維持のメカニズム」と「ヒト集団における多様性」に重点を置き、次年度以降の内分泌攪乱化学物質の影響についての研究を進めていきたいと考えている。

E. 結論

内分泌攪乱化学物質のヒト生殖細胞に対する影響について①生殖腺の形成(性決定・分化)、②生殖細胞の分化・維持・死滅、③生殖細胞の腫瘍化、の3つの観点からアプローチを行っている。本年は、研究の方向性について述べるとともに、ヒト生殖腺の形成(性分化機構)、生殖細胞の腫瘍化についての予備的データについて報告した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Tomomasa, H., Adachi, Y., Iwabuchi, M., Oshio, S., Umeda, T., Iino, Y., Takano, T., Nakahori, Y.: Pericentric inversion of the Y chromosome of infertile male. *Archives of Andrology*, 45: 181-185, 2000.
- ② Lee, J.W., Kotliarova, S.E., Ewis, A.A., Hida, A., Shinka, T., Kuroki, Y., Tokunaga, K., Nakahori, Y.: Y-chromosome

compound haplotypes with the microsatellite markers DXYS265, DXYS266 and DXYS241. *J Hum Genet*, 46: 80-84, 2001.

- ③ Shinka, T., Naroda, T., Tamura, T., Sasahara, K., Nakahori, Y.: A rapid and simple method for sex identification by analysis of a heteroduplex using denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). *J Hum Genet*. In press.
 - ④ Ewis, A.A., Kondo, K., Juwon, L., Tsuyuguchi, M., Hashimoto, M., Yokose, T., Mukai, K., Kodama, T., Shinka, T., Monden, Y., Nakahori, Y.: Occupational cancer genetics: Infrequent ras oncogenes point mutations in lung cancer samples of chromate workers. *Amer. J. Industrial Med*. In press.
- ### 2. 学会発表
- ① 中堀豊: ヒトゲノム計画の現状—ヒト多様性解明に向けて、第70回日本衛生学会ワークショップ、2000年3月28日、大阪
 - ② 足立陽一、友政宏、岩渕正之、押尾茂、梅田隆、飯野好明、高野貴子、中堀豊: 不妊を主訴としたY染色体腕間逆位の症例、第122回日本不妊学会関東地方部会、2000年6月24日、山梨
 - ③ 中堀豊: 遺伝医学の現状、221回徳島医学会学術集会、2000年8月6日、徳島
 - ④ 新家利一: ゲノム創薬、遺伝子治療、第221回徳島医学会学術集会、2000年8月6日、徳島
 - ⑤ 中堀豊: 遺伝医学が公衆衛生に果たす役割、第13回中国・四国地区保健婦教育機関協議会教育講演、2000年8月

8日、徳島

- ⑥ 中堀豊：臨床遺伝専門医到達目標について。第3回家族性腫瘍研究会、2000年8月26日、尼崎
- ⑦ 新家利一：ヘテロデュプレックス法を用いたY染色体の分子遺伝学的解析。2000年9月13日、大阪
- ⑧ 近藤妙子、西谷範子、佐藤純子、中村秀喜、中堀豊：健診データからみた喫煙対策に関する検討ー基本健康審査と一般クリニックの比較ー。第59回日本公衆衛生学会総会、2000年10月20日、群馬
- ⑨ 多田敏子、中村秀喜、新家利一、中堀豊：徳島県内の保健・福祉施設の教育体制についてーCare Mac 徳島による調査研究ー。第59回日本公衆衛生学会総会、2000年10月20日、群馬
- ⑩ 中堀豊：Y染色体から見た日本人男性の繁殖戦略。第21回関西アンドロロジーカンファランス特別講演、2000年10月21日、大阪
- ⑪ 新家利一、李周遠、黒木陽子、田村隆教、笹原賢司、中堀豊：DHPLCシステムを用いたY染色体多様性の解析。日本人類遺伝学会第45回、2000年10月27日、福岡
- ⑫ 松木孝澄、坪田悦子、飯田礼子、黒木陽子、中堀豊：Y染色体特異多型マーカーの発見。日本人類遺伝学会第45回、2000年10月27日、福岡
- ⑬ 中堀豊：遺伝相談。第72回徳島周産期症例検討会、2000年11月10日、徳島
- ⑭ 中堀豊：遺伝医学と人権。人権啓発フェスティバル、2000年12月9日、徳島

The study on the effect of the endocrine disrupting chemicals on human sex determination, sexual differentiation and the germ cell maturation control

Yutaka Nakahori, MD

Professor, Department of Public Health, The University of Tokushima

We are trying to elucidate the role of the human Y chromosome and its genes on the human sex determination, sexual differentiation and germ cell maturation control, which is essential to understand the mechanisms of endocrine disrupting chemicals on human beings. An attempt is forwarded to develop the in vitro system analyzing the effect of chemicals that works on the promoter region of MIS (Mullerian inhibiting substance). On the other hand, we previously demonstrated that the Japanese males in different Y chromosome lineage show different sperm concentration. We are attempting to investigate the phenotypical difference of these males and the possible difference of the reaction to ED in each male lineage.

7. PPAR γ 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

研究者 今川 正良 (名古屋市立大学薬学部教授)

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 γ (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 γ の DNA への結合配列の選択性を決定した。その結果、RXR α が少ない条件下では、PPAR γ /PPAR γ 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 γ 発現遺伝子を導入し、恒常的に PPAR γ 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。

研究協力者

山口 良 (名古屋市立大学薬学部助教授)

塚本喜久雄 (名古屋市立大学薬学部講師)

A. 研究目的

近年、脂肪細胞分化に関わる転写因子の解析が進み、転写因子 PPAR γ が同定された (1, 2)。PPAR γ はリガンド結合性の核内受容体スーパーファミリーの一員であり、エストロゲンやアンドロゲン受容体と類似した構造を有する (3)。PPAR 自身もファミリーを形成しており、現在のところ、PPAR α , PPAR γ , PPAR δ が知られている。これらは、リガンドによって活性化されると考えられているが、その機能は大きく異なる。すなわち、PPAR α と PPAR δ が肝臓などで重要であるのに対し、PPAR γ は脂肪細胞の分化過程において特に重要な役割を果たしており、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターといわれている (図 1)。実際、その発現は、前駆脂肪細胞の分化に必須であるとともに、通常では脂肪細胞に分化できないマウス NIH-3T3 細胞が PPAR γ の強制発現により分化能を獲得することが知られている (4)。また、PPAR γ は糖尿病や動脈硬化に密接に関連し、その遺伝子多型の影響も指摘されている (5)。 それでは環境化学物質

(内分泌攪乱化学物質) が、脂肪細胞の分化ひいては肥満を誘発する可能性はあるのか？糖尿病を引き起こす可能性はあるのか？このように、これまで全く指摘されていない内容を課題とし、内分泌攪乱物質の作用メカニズムについて、

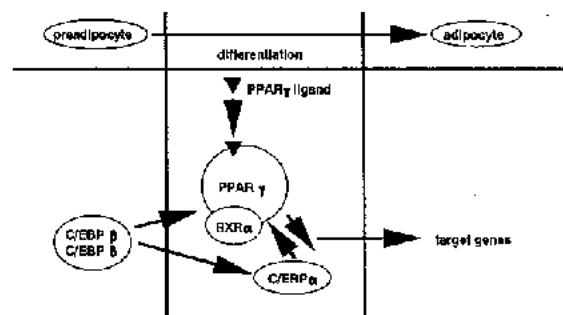


図1. 脂肪細胞分化における PPAR γ の役割

新たな視点から検討することを目的とした。その第一段階として本研究では、以下の 4 つの項目について検討を行った。

- 1) PPAR γ の DNA 結合配列の同定
- 2) PPAR γ を恒常的に発現する培養細胞の構築
- 3) 上記 PPAR γ 発現細胞における、リガンドの有無による各種発現遺伝子の差異の検討
- 4) 上記 PPAR γ 発現細胞の脂肪細胞分化に及ぼす環境化学物質の影響および各種遺伝子発現の変化の検討

B. 研究方法

1) PPAR γ の DNA 結合配列の同定

パキウイルスシステムを用いて、FLAG タグ融合蛋白質として PPAR γ および RXR α を Sf9 細胞内に発現後、抗 FLAG-M2 抗体を用いて精製した。これらを用いて、ランダムセレクション法 (図 2) により PPAR γ /RXR α ヘテロダイマーおよび PPAR γ /PPAR γ ホモダイマーが結合する DNA 塩基配列の同定を行った。さらに、ゲルシフト法を用いて結合親和性の差異について検討した。

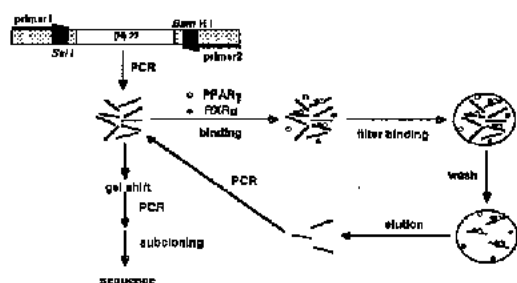


図2. ランダムセレクション法によるDNA結合配列の同定

2) PPAR γ を恒常的に発現する培養細胞の構築

マウス NIH-3T3 細胞は、通常の培養条件下では脂肪細胞に分化しない。この細胞にレトロウイルスを用いて、恒常的に PPAR γ を発現する安定細胞株を構築した。すなわち、PPAR γ 遺伝子を挿入したレトロウイルスベクター pDON-AI をリン酸カルシウム法により PT-67 パッケージング細胞に導入した。一過性に発現したウイルス液を回収し、マウス NIH-3T3 細胞に感染させた。さらに 10 日間培養後、PPAR γ 遺伝子が染色体に組み込まれた安定細胞株を単離した。

3) 上記 PPAR γ 発現細胞における、リガンドの有無による各種発現遺伝子の差異の検討

構築した PPAR γ 発現細胞にリガンドである BRL49653 を添加すると、この細胞は脂肪細胞に分化する。その過程において発現の変化す

る遺伝子群を、PCR 法を組み合わせた cDNA サブトラクション法により単離解析した。また、2 次元電気泳動法によりタンパク質の発現パターンの変化を解析した。

4) 上記 PPAR γ 発現細胞の脂肪細胞分化に及ぼす環境化学物質の影響および各種遺伝子発現の変化の検討

上記 3) において、BRL49653 のかわりに種々の環境化学物質を添加して、分化に対する影響を検討した。また、培養過程における脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現をノザンプロット法により検討した。さらに、一部の化学物質について、上記 3) と同様に 2 次元電気泳動法によりタンパク質の発現パターンの変化を解析した。

C. 研究結果

1) PPAR γ の DNA 結合配列の同定

パキウイルスシステムを用いて、PPAR γ および RXR α を Sf9 細胞内に発現後、抗体を用いて精製した。これらを用いて、ランダムセレクション法により DNA 塩基配列の同定を行った。得られたクローンの塩基配列を決定し、その一覧を図 3 および表 1 に示した。等量の PPAR γ および RXR α 存在下では、得られた全てのクローンの塩基配列は、AGGTCA が 1 塩基のスペーサーの後に繰り返す、DRI (ダイレクトリピート 1) 配列を有しており (図 3A, 表 1)、この結果は従来から報告されている配列と良く一致した (6)。一方、RXR α が非常に少ない条件下においては、AGGTCA が 3 塩基を隔てて回文状に並んだ、Pal3 (パリンドローム 3) 配列が優先的に得られた (図 3B, 表 1)。すなわち、RXR α の存在量に応じて PPAR γ の結合様式が変化する結果が得られた。最終的に得られたコンセンサス配列を表 2 にまとめた。また、ゲルシフト法による、DNA 結合実験より、DRI には PPAR γ /RXR α ヘテロダイマーが、また Pal3 には PPAR γ /PPAR γ ホモダイマーが結

A) DR1 motif

TACA AGGTCA A AGTTCA	CACA AGGTCA A AGGTCA CA	TATA AGGTCA A AGGTCA CC
CAAA GGGTCA A AGGTCA GACA	ACAG GGGTCA A AGGTCA CTG	CCCA AGGTCA A AGGTCA TGCA
CTAA AGGTCA A AGGTCA ACGA	GGAG GGGTCA A AGGTCA TGGG	TGAG GGGTCA A AGGTCA TAAG
TCTG AGGTCA A AGGTCA CTAG	GTTA AGGTCA A AGGTCA CCA	AAAG AGGTCA A AGGTCA CC
TCAA AGGTCA A AGGTCA AGAG	CGGG AGGTCA A AGGTCA TAGA	G GGGTCA A AGGTCA TGCG
TCGT AGGTGA A AGGTCA	CCAA AGGTCA A AGGTCA AAGG	ATAG GGGTCA A AGGTCA TCTT
CAAA AGGTCA A AGGTCA AAGT	GGTG AGGTCA A AGGTCA	TTAG GGGTCA A AGGTCA TGA
AGTG GGGTCA A AGGTCA CAGA	G GGGTCA A AGGTCA TGGG	GCTT GGGTCA A AGGTCA
CG GGGTCA A AGGTCA ACCT	TAG GGGTCA A AGGTCA CGCT	GAAA GGGTCA A AGGTCA A
CCAG GGGTCA A AGGTCA ACCC	TAAG GGGTCA A GGGTCA	CATA AGGTCA A AGGTCA CACA
G GGGTCA A AGGTCA C	ACGG GGGTCA A AGGTCA CCGA	G GGGTCA A AGGTCA CATA
GAAA AGGTCA A AGGTCA	CTAG GGGTCA A AGGTCA	CTTG GGGTCA A AGGTCA CAC
AGGTCA A AGTTCA TACT	TTTG GGGTCA A AGGTCA TCTA	CAG GGGTCA A AGGTCA AGTT
CGAG GGGTCA A AGGTGA	GGAG GGGTCA A AGGTCA	CCAC AGGTCA A AGGTCA CC
GGTG GGGTCA A AGGTCA TGCG	ACAG AGGTCA A AGGTCA CC	GGGTCA A AGGTCA ACAA
TCAA AGGTCA A AGGTCA ACCA	CATG GGGTCA A AGGTCA TG	ATTG GGGTCA A AGGTCA GATT
CTAG GGGTCA A AGGTCA CCGG	ACGC GGGTCA A AGGTCA AA	TCAA AGGTCA A AGGTCA TCTT
GCTG GGGTCA A AGGTCA ACTG	TGTG GGGTCA A AGGTCA CACG	TCGG AGGTCA A AGGTCA
AATG GGGTCA A AGGTCA CGCG	AGCG GGGTCA A AGGTCA ACTT	GGGT AGGTCA A AGGTCA
TTGG AGGTCA A AGGTCA TAGT	G AGGTCA A AGGTCA TCCG	ATAG GGGTCA A AGGTCA TCTA
AACG AGGTCA A AGGTCA AATA	ACGG GGGTCA A AGGTCA	TTTG GGGTCA A AGGTCA CGAT
GCAA AGGTCA A AGGTCA TCGG	CCAA AGGTCA A AGGTCA TGG	GGAG GGGTCA A AGGTCA AATT
ACAG AGGTCA A AGGTCA TTCA	G GGGTCA A AGGTCA AGTG	TTCG GGGTCA A AGGTCA TCAG
TGAA AGGTGA A AGGTCA	GTGA AGGTCA A AGGTCA CGTC	TGTA GGGTCA A AGGTCA

B) Pal3 motif

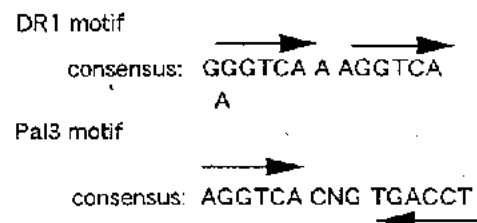
AACT AGGTCA TGG TGACCC ACTT	TAGT AGGTCA GCG TGACCT CAAT
ATTT GGGTCA CTG TGACCT ACT	TAT AGGTCA CGG TGACCC AGTA
ACT GGGTCA CGA TGACCT AGTT	ATGT GGGTCA CGG TCACCC AGAT
AACT AGGTCA TGG TGACCC ATTT	AAGT AGGTCA CAG TGCCCT ACT
AACT AGGTCA TCG TGACCC AGT	AAAT GGGTCA CCA TGACCT AGTT
CAGT AGGTCA CGG TTACCT ACTT	AACT AGGTCA TGG TGCCCC ACTT
AGT AGGGCA CTG TGACCT ACTT	ATGT AGGTAA CAG TGGCCT ACTT
ATAT AGGTCA GAG TGACCC AGTT	AATT GGGTCA CAC TCACCT ACTT
AGT AGGGCA CTG TGACCT ACTT	AAGA AGGTGA CGT TCACCC ACTT
CAGC AGCTGA ATC TACCCCT T	CAGT AGGTCA AAG TCACCT ACAT
AAGT AGGGCA CCA TGACCC AAAT	AACT GGGTCA CTC TGACCT ATAT
AAGT AGGTGA GTG TGACCC AATT	AACT AGGTCA CCG TGACCC TAGT
AAGT GGGTGA ACG TCACCT ACTT	ATGT AGGTCA ACG TAACCT ACTA
TAGT AGGTCA CGT TGACCT ACAT	T AGGTCA CAT TGACCT ACAT

図3. クローニングしたDNA結合塩基配列のアライメント

表1. ランダムセレクション法により単離されたオリゴヌクレオチドのタイプ分け

Receptors	Types selected		
	DR1	Pal3	other motifs
PPAR γ /RXR α			
30ng/30ng	72	0	0
30ng/1ng	6	28	25

表2. コンセンサス配列の決定



合することが明らかとなった。さらに Scatchard Analysis により、PPAR γ /RXR α ヘテロダイマーのDR1配列への親和性と、PPAR γ /PPAR γ ホモダイマーのPal3配列への親和性はほぼ同等であることが明らかとなった(表3)。

表3. PPAR γ /RXR α , PPAR γ /PPAR γ のDR1およびPal3に対する結合親和性の評価

Receptor	Kd (nM)	
	DR1	Pal3
PPAR γ /RXR α	2.0	7.9
PPAR γ /PPAR γ	—	2.4

2) PPAR γ を恒常的に発現する培養細胞の構築

PPAR γ の作用を解析する目的、およびPPAR γ に対する環境化学物質の影響を検討する目的で、PPAR γ を発現する細胞を構築した。細胞としては、通常条件下では脂肪細胞には分化しない、マウス NIH-3T3 細胞を使用した。この細胞にレトロウイルスベクターを用いて、PPAR γ を恒常的に発現する stable transformant を作製した。この細胞に PPAR γ のリガンドである、BRL49653 を添加すると、脂肪滴を有する脂肪細胞に分化した。このように、PPAR γ リガンドに依存して分化する安定細胞株を確立できた(図4)。

3) PPAR γ 発現細胞における、リガンドの有無による各種発現遺伝子の差異の検討

上記2)において作製した、PPAR γ 発現細胞を用いて、リガンド添加時に発現が変化する遺伝子群を、サブトラクション法により単離した。その結果、リガンド添加により発現が増加する遺伝子と減少する遺伝子を単離できた。いくつかの例を図5に示した。その中に

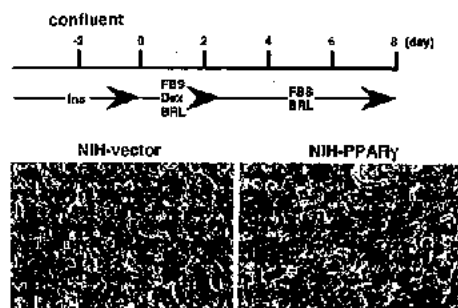


図4. PPAR γ を恒常的に発現するマウス NIH-3T3細胞の作製

リガンド存在下において、分化誘導剤の添加により、脂肪滴を蓄積した脂肪細胞へと分化した

(A) 発現が上昇する遺伝子群



(B) 発現が減少する遺伝子群



図5. PPAR γ 発現細胞における、リガンドの有無による遺伝子群の発現の差異

は未知遺伝子も複数含まれており、既知遺伝子においてもリガンド以外の誘導剤の影響など、発現の変化に与える影響については今後の課題である。

本法により、osteoblast specific factor 3 (OSF-3) が単離された。OSF-3 はリガンド依存的に発現量が増大し、さらにマウス 3T3-L1 細胞の、脂肪細胞への分化過程においても発現が上昇するため非常に興味深く、今後の解析が待たれる。

また、上記 PPAR γ 発現細胞と PPAR γ 非発現細胞を用いて、2次元電気泳動法により発現タンパク質の違いについて検討したところ、複数のタンパク質において発現量に差が観察された。今後は差の見られたタンパク質(スポット)について、質量分析計を用いて同定を

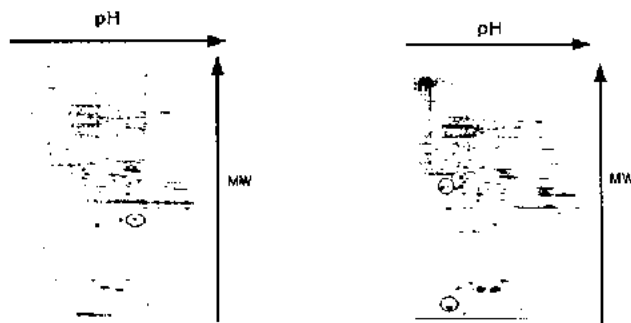
試みる予定である。

4) PPAR γ 発現細胞の脂肪細胞分化に及ぼす環境化学物質の影響および各種遺伝子発現の変化の検討

上記2)において作製した、PPAR γ 発現細胞を用いて、リガンドの代わりに環境化学物質を添加し、脂肪細胞への分化の有無を観察した。化学物質として、トリブチルスズ、4-オクタフルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、ベンゾフェノン、オクタクロロスチレン、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、ノニルフェノールの8種類を用いた。その結果、PPAR γ のリガンドであるBRL49653と比較してはるかに弱いものの、ベンゾフェノン、ノニルフェノールにおいて、わずかながら脂肪細胞への分化が観察された。また、ベンゾフェノンを添加した時には、脂肪細胞分化のマーカである、aP2の発現が培養の経過とともにわずかながら増加した。さらに、ノニルフェノール添加群と対照群から調製した核抽出液を用いて、2次元電気泳動法によるタンパク質の発現パターンの変化を解析した。その結果、明確な差は見られないものの、いくつかのタンパク質において、発現の変動が観察された(図6)。本稿で得られた結果は、差が僅差であることから、最終的な結論を得るためにはより詳細な解析が必要である。

D. 考察

PPAR γ は、通常RXR α とヘテロダイマーを形成し、DR1に結合するが、RXR α が少ない条件下では、PPAR γ /PPAR γ ホモダイマーが形成され、エストロゲン受容体(ER)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。RXR α は、他の核内受容体ファミリーの多くに共通して結合して機能しているため、RXR α が少なくなった状態



分化誘導後の核抽出液：化学物質濃度は 5×10^{-7} M

図6. 2次元電気泳動法によるタンパク質の発現パターンの変動

では、PPAR γ /PPAR γ ホモダイマーがERと拮抗する可能性も予想された。すなわち、細胞内におけるRXR α の存在量によっては、PPAR γ がERの機能に影響を与える可能性が示唆された。今回の検討では、コファクターの存在について全く考慮していないため、その存在比やコファクターの種類については今後検討する必要がある。

また、環境化学物質のPPAR γ を介した内分泌攪乱作用の有無を検討するため、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 γ 発現遺伝子を導入し、恒常的にPPAR γ を発現する安定細胞株を作製した。この細胞株にPPAR γ のリガンドであるBRL49653を添加すると脂肪細胞に分化した。本株を用いて、数種類の環境化学物質について、予備実験的に脂肪細胞分化への影響を検討したところ、ベンゾフェノン、ノニルフェノールにおいて、わずかながら脂肪細胞への分化誘導作用が観察された。また、ノニルフェノール添加群と対照群では、その核抽出液中のタンパク質群の発現が変動していることを示唆する結果が2次元泳動の結果より推察された。しかし、その作用は非常に弱いことから、今後さらに詳細な検討が必要と思われた。

E. 結論

- 1) RXR α の存在量により、PPAR γ の DNA への結合配列は変化し、ER と同じ配列を認識することが明らかとなった。
- 2) 恒常的に PPAR γ を発現するマウス安定細胞株を作製した。
- 3) PPAR γ 発現細胞を用いて脂肪細胞への分化に対する環境化学物質の影響を検討したところ、ベンゾフェノンおよびノニルフェノール添加により、わずかな分化誘導が観察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okuno, M., Arimoto, E., Ikenobu, Y., Nishihara, T., and Imagawa, M. (2001) Dual DNA-binding specificity of peroxisome proliferator-activated receptor γ controlled by heterodimer formation with retinoid X receptor α . *Biochem. J.*, 353: 193-198.

2. 学会発表

奥野正顕、有元絵美、池信由紀子、西原 力、今川正良、PPAR γ の活性化により発現が誘導される cDNA の単離、第 23 回日本分子生物学会年会、2000.12. 神戸

G. 参考文献

1. Tontonoz, P., et al., (1994) mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Develop.*, 8: 1224-1234.
2. MacDougald, O. A., and Lane, M. D., (1995) Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Ann. Rev. Biochem.*, 64: 345-373.
3. Mangelsdorf, D. J., et al., (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83: 835-839.
4. Rosen, E. D., et al., (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Develop.*, 14: 1293-1307.

5. Kersten, S., Desvergne, B., and Wahli, W., (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, 405: 421-424.

6. Juge-Aubry, C., et al., (1997) DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. *J. Biol. Chem.*, 272: 25252-25259.

Study on the effect of the endocrine disrupting chemicals on adipocyte differentiation through peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)

Masayoshi Imagawa

Department of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Nagoya City University

Professor

Key Word: nuclear receptor, peroxisome proliferator-activated receptor γ ,
adipocyte differentiation, DNA-binding specificity

Abstract:

The peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) is a member of the steroid/thyroid nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcription factor. PPAR γ forms heterodimer with the retinoid X receptor α (RXR α). By using the method of polymerase chain reaction-mediated random site selection, the DNA sequence preferences for PPAR γ binding were examined. Interestingly, we have demonstrated that PPAR γ has dual DNA-binding specificity; binding to both direct repeat of two hexanucleotides spaced by one nucleotide (DR1) motif and palindrome with three bases spacers (Pal3) motif. Pal3 sequence is a target sequence of estrogen receptor. Therefore, it seems that the DNA-binding specificity of PPAR γ could be altered by the heterodimer formation with RXR α and in some cases PPAR γ binds to estrogen receptor binding site and influences estrogen function.

We transformed PPAR γ to mouse NIH-3T3 cells, which does not differentiated to adipocyte, and established the stable transformant which constitutively expresses PPAR γ . This transformant differentiates to adipocyte in the existence of the ligand such as BRL49653. Using this transformant, the effect of endocrine disrupting chemicals on adipocyte differentiation was determined, and the differences of patterns of expressing protein were also studied by two-dimensional gel electrophoresis.

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

研究者 岸 玲子(北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野教授)
佐田文宏(北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野講師)
片倉洋子(北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野)
梅村朋弘(北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野)
倉橋典絵(北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野)

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暴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）の暴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の一端を明らかにした。

研究協力者

那須民江（信州大学医学部衛生学講座講師）

A 研究目的

スチレンモノマーの産業分野での用途の広さ、また日常的にも食品用容器とし

での使用量の多さにともない、スチレンモノマーの取り扱い作業者の数も多い。最近では女性労働者の進出により、妊娠

中でも職場で働く女性も増加する傾向にある。スチレンモノマーは変異原性や催奇形性についての疑いもあり、疫学でも月経障害などの影響について検討されている。生殖への影響を考える上で生殖を司る上位の中樞である神経内分泌動態と血中ホルモンの変化、さらには雌雄による代謝能の差、妊娠・非妊娠時の差の変化を知ることは重要である。本年度は昨年度の次世代影響実験のデータを裏付ける基礎的検討として、スチレンモノマー曝露による血清中のホルモン動態の変化を観察するとともに、成熟ラットと同じような活性が低週齢でも認められるか、性差がみられるのか、また、妊娠中におけるスチレンモノマーの代謝酵素活性が非妊娠時と異なっているかについて *in vitro* で検討を行った。

B 研究方法

1) 内分泌動態の変化

動物は 8 週齢の雌系ラットを各群 8 匹ずつ用いた。スチール製の吸入暴露チャンバーを用い、100ppm スチレンモノマーを 9:00~17:00、8 時間/日、2 週間曝露した。餌、水は暴露中も自由摂取とした。2 週間の曝露後、直ちに採血し、血漿成分を分離して、血漿中のプロラクチン (PRL)、黄体形成ホルモン (LH)、成長ホルモン (GH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH) レベルを、酵素結合免疫測定法 (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) で測定した。

皮下投与群は 8 週齢雌雄ラットを用い、皮下連続投与 (Alzet 浸透圧ポンプ背中央部皮下埋め込み、10mg/kg) を 1 週間行

い、採血をした。吸入暴露群と同じように、PRL、LH、GH、TSH について ELISA で測定した。

2) スチレンモノマー代謝における性差、週令差、妊娠による代謝酵素活性の変化

新生仔として (0 日、誕生後 12 時間以内)、離乳直後 (誕生後 21 日目)、および 18 週目成熟ラットを使用した。妊娠ラットは、プラグ確認日を妊娠 0 日とし、各妊娠時期として妊娠中期は妊娠 10 日目、妊娠後期は妊娠 21 日目とした。各週齢と各妊娠日にそれぞれ雌雄共にと殺を行い、肝と肺を切除し液体窒素中で凍結し、ミクロソームの調整に用いるまで -80℃ で保存、各群 5 匹、または 7 匹を試料とした。肝臓は新生仔ラット以外は 1 固体ごとに肝重量の 3 倍 1.15% KCL 溶液中でホモジナイズし、10,000g×10 分で冷却遠心を行い、沈査を 105,000g×60 分で遠心をした。調整したミクロソーム画分は -85℃ で酵素アッセイまで凍結保存を行った。ミクロソーム蛋白は Lowry et. al (1951) の方法で測定した。チトクローム P450 量の測定は (Omura & Sato 1964) の方法で行った。

酵素活性アッセイ：肝のスチレンモノマー代謝酵素活性はミクロソーム画分にスチレンモノマーを加えて、代謝物スチレングリコールの生成量の測定を行った。スチレンモノマー基質は 0.085mM (low-K_m 酵素用 P450IIE1)、1.85mM (high-K_m 酵素用 P450IIC11/6) 濃度を加えた。薬物代謝酵素活性の測定はバイアルー平衡法 (Sato & Nakajima 1979) でおこなった。

モノクロナール抗体反応：性、年齢、妊娠期間によるスチレンモノマー代謝変

化と薬物代謝酵素 P450 との関係はモノクロナール抗体を使用して行った。今回使用したのは anti-P450IIC11/6 MAb (clone 1-68-11)、anti-P450IIE1 MAb (clone 1-91-3)。

統計解析は ANNOVA、t-test、paired T-test を行った。

(札幌医大動物実験倫理委員会、北海道大学倫理委員会の指針に従って実験を行った)

C 研究結果

1) 内分泌動態の変化について

吸入暴露群では雌のみ曝露したが、PRL レベル、LH レベルともに有意な増加を示した。TSH、GH レベルでは有意差は見られなかった。

皮下投与群では、雄で LH レベルが有意に増加し、TSH が有意に減少した。一方、雌では、LH レベルと GH レベルが有意に増加した。雌雄ともに PRL の変化は見られなかった (表 1)。

2) スチレンモノマー代謝における性差、週令差、妊娠による代謝酵素活性の変化

①ミクロソーム蛋白量と P450 量の性差、週令差 (表 2、表 3)；3 週令 (21 日目) ではミクロソーム蛋白量は雄で雌に比較して有意に多かった。チトクローム P450 量に差は見られなかった。しかし成熟ラット (18 週令) ではミクロソーム蛋白量に雌雄間で差がなく、チトクローム P450 量が雄で多く有意であった。18 週令の成熟ラットでは明確にチトクローム P450 量に性差が現れた。

週令差について、雄では 3 週令 (21 日目) に比べ 18 週令 (成熟ラット) でミ

クロソーム蛋白量、チトクローム P450 量が有意に増加した。新生仔では全く検出できなかった。雌ではミクロソーム蛋白量は成熟ラット (18 週令) と若令ラット (新生仔、3 週令) の差は有意であった。チトクローム P450 量は 21 日目で成熟ラットと同じレベルであったが新生仔ラットでは少なかった。

妊娠に伴う変化を見るとミクロソーム蛋白量については妊娠各期で大きな変化は見られなかったが、チトクローム P450 量は妊娠後期 (妊娠 21 日目) は妊娠前期、妊娠中期 (妊娠 10 日目) と比べて有意に減少していた (表 4)。

②スチレンモノマーの P450 代謝酵素活性についてスチレングリコール生成量は 18 週令の成熟ラットで性差がみられ、雄のほうが有意に高い活性があり、成熟ラットは 3 週令ラットに比べ、倍近かった。雌では週令による差は見られなかった。しかし妊娠後期になると有意に非妊娠時より低い活性であった (表 5)。

③モノクロナール抗体によるスチレンモノマー代謝抑制 (表 6)；スチレングリコール生成抑制の割合について求めた。抗 P450IIC11/6 モノクロナール抗体で処理をした場合、P450IIC11/6 は、特に雄で影響を強く受け、成熟ラット (18 週令) で未熟ラットに比べ、有意に強く抑制された。また、雌では妊娠後期 (妊娠 21 日目) で有意に減少していた。P450IIE1 は 3 週令では雌雄とも同程度発現しており、雄 3 週令で 60%、雌 3 週令で 66% の抑制が見られた。その後雄では減少しているが雌では減少程度は小さく、妊娠後期で発現量は減少した。

D 考察

1) 内分泌動態の変化について

Bergamaschi (1996) らの疫学的な報告によると、スチレンモノマーを暴露された労働者では、プロラクチンレベルが有意に増加していた。Mutti (1998) からも同様の報告をしている。我々の動物実験で実際に 100ppm /日、2週間曝露でプロラクチンレベルが有意に増加し、過去の疫学的報告を裏付ける結果となった。また、全てのスチレンモノマー暴露群、雌雄の差なく、LH の増加が認められた。つまり、いわゆる、エストロゲン分泌を調整する LH (黄体形成ホルモン) に作用することで内分泌系に影響を及ぼす可能性が考えられる。

今後の課題として、

1. 今回は匹数が1群8匹と少なく予備的実験であったため、匹数を増やして検討する必要がある。暴露濃度も一点 (100ppm) のみの測定であったので、暴露濃度を変え、神経内分泌ホルモン系への影響を生じない閾値を推定するための用量反応関係も観察する。
2. プロラクチンや LH 上昇の機序やプロラクチン抑制作用があるといわれるドーパミン、GABA についても検討し、スチレンモノマーが神経細胞の構造や生化学的にどのような変化をおよぼしているかを明らかにする。具体的には海馬、視床下部、脳下垂体でのドーパミンなどの神経伝達物質の定量、ホルモン産生細胞、受容体の発現を細胞への抗体染色を行い MCID で定量的に検討を行う。
3. 生殖器官、機能そのものへの影響、特に、精巣重量、子宮重量、精子数、精

子形態、交尾率、着床率、妊娠率などの測定と各組織の形態学的変化を免疫組織染色を用いて、蛍光顕微鏡下で観察する。
4. 同時に重要なことは妊娠ラットに曝露した場合、母親の神経内分泌ホルモン系の変化が胎児にどのような組織学的、解剖学的 (停留精巣、尿道下裂など)、神経内分泌的な変化を生じさせるかについても検討しなければならない。

2) スチレンモノマー代謝の性差、週令差、妊娠による代謝酵素活性の変化

昨年度のスチレンモノマーの妊娠中暴露による生殖、胎仔への影響検討ではスチレンモノマー高濃度暴露で次世代影響を認めた。大抵の動物では肝ミクロソーム酵素活性のレベルは発達段階によって異なり未成熟な時期では活性は低い、しかし生後急速に増加し、外来性化学物質に対する代謝も行われる。チトクローム P450 はその isozyme によっては性特異性をもち、発達に伴って調整されている。スチレンモノマーの場合も酵素活性は未成熟ラットで低く、その後活性が高いのが認められた。今回の実験からこれは雄特異的チトクローム P450 IIC11/6 の発現によるものと見られる。18週齢では未熟期の数10倍の誘導がみられ、また雌では雄よりも18週令では低い発現量であった。今回スチレンモノマーで認めた性差は芳香族炭化物、トルエンで見られたが、トリクロールエチレンでは認められていない。(Nakajima 1992) このような性差は雄特異的チトクローム P450 IIC11/6 の分子種に対する親和性の違いによる体内分布によると考えられる。こ

の分子種は性ホルモンの代謝にも関連していることから、今後、性ホルモン動態との関連も検討する必要がある。

妊娠にともなう代謝酵素誘導への影響についてはまだそのメカニズムはよく解明されていない。また、P450IIE1は性差による影響はそれほど受けていなかった。しかし、妊娠後期では発現量が減少し、酵素活性が低かった。P450isozymes全体が妊娠にともなって減少するといわれているが、妊娠のような身体的要因が明らかにスチレンモノマーなどの炭化水素の代謝に影響を与えることから同じ環境濃度下の曝露でも雄と雌あるいは妊娠時・非妊娠時では異なる。従って、胎子への影響は成熟動物（雄・雌それぞれ）とは異なる影響、強さを考える必要があると思われる。このことは次世代影響を考える上で重要である。

E 結論

- ・スチレンモノマーは、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る。スチレンモノマー曝露は雌雄ともにLHに作用する。スチレンモノマーによる健康影響の指標としてプロラクチン、LHは有効と考えられる。
- ・スチレンモノマー代謝酵素活性は成熟ラットでは雌雄差が見られた。チトクローム P450IIC11/6 は成熟雄では雌より活性が高かった。
- ・スチレンモノマーの薬物代謝動態が妊娠中は非妊娠時とは異なり、酵素活性が減少していた。

参考文献

- Bergamaschi E. et. al Peripheral markers of neurochemical effects among styrene-exposed workers. Neurotoxicology: 753-9, 1996
- Mutti A. et. al Exposure to hydrocarbons and renal disease: an experimental animal model. Ren Fail :369-85, 1999
- Nakajima et.al Sex-, age- and pregnancy-induced changes in the metabolism of toluene and trichloroethylene in rat regulation of cytochrome P450IIE1 and P450IIC11 content. J.Pharm. Exp.Thera.: 869-74, 1992

F 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 片倉洋子；第71回日本衛生学会 総会ワークショップ「衛生学における生殖毒性研究の現状と展望」 2001年4月27～30日（福島）（予定）
- 2) 梅村朋弘、倉橋典絵、片倉洋子、佐田文宏、岸玲子；第4回環境ホルモン学会 2001年（予定）

Investigation of early effect markers on reproduction and developmental toxicity in rats exposed to styrene.

Kishi R., Sata F., Katakura Y., Umemura T., Kurahashi N.

Department of public health Hokkaido university school of medicine

Key word: styrene, LL, PR, prenatal, sex difference, developmental effects, CYP P450IIC11/6, CYP P450IIE1

Abstract:

It is reported that styrene exposure increased the level of prolactin, while also reported that styrene exposure had no effects on the level of prolactin, the effects of styrene exposure to endocrine system is still obscure. Therefore, we investigated that how styrene exposure affect on various hormone (prolactin, leuteinizing hormone, growth hormone and thyroid stimulating hormone) levels of Wistar rats.

Sex, age and pregnancy induced changes in the metabolism of styrene in rat liver were investigated in relation to the regulation of cytochrome P450IIC11 and P450IIE1 content using monoclonal antibodies. Immature male rats had a higher level of microsomal protein than females, and this increased with development. No differences by sex was found at 18 weeks. No differences in cytochrome P450 content was seen between immature male and female rats. Pregnancy decreased the metabolism of styrene. Monoclonal antibody-directed analysis showed that the level of P450IIE1 decreased in late pregnant rat, than in no pregnant rat. P450IIC11/6 increased dramatically with development in male rats and only slightly in female rats, so that much higher levels were found in adult males than in adult females.

表1 スチレン曝露、皮下投与による内分泌ホルモン動態の結果要約

(n=8, 予備的データ)

	PRL	LH	GH	TSH
曝露群 (雌)	↑ (p < 0.05)	↑ (p < 0.05)	差なし	差なし
皮下投与群 (雌)	差なし	↑ ↑ (p < 0.01)	↑	差なし (p < 0.01)
皮下投与群 (雄)	差なし	↑ (p < 0.01)	差なし	↓ (p < 0.01)

↑ : コントロール群より有意に増加

↓ : コントロール群より有意に減少

表2 ミクロソーム蛋白量とチトクローム P450 量の性差

Age	Sex	Microsomal protein (mg/ g liver)	Cytochrom P450 (nmol/ mg protein)
21st day	Male	25.2 ± 3.0*	0.597 ± 0.022
	Female	18.4 ± 1.5	0.600 ± 0.023
Adult	Male	30.7 ± 1.8	0.739 ± 0.073**
[18w]	Femal	28.4 ± 3.4	0.584 ± 0.046

表3 ミクロソーム蛋白量とチトクローム P450 量の週令差

Age	Male		Female	
	Microsomal protein	cytochrom P450	Microsomal protein	cytochrom P450
	[mg/g liver]	[nmol/mg protein]	[mg/g liver]	[nmol/mg protein]
Newborn	ND	ND	17.96 ± 1.9	0.094 ± 0.01
21st day	25.2 ± 3.0	0.597 ± 0.022	18.4 ± 1.5	0.60 ± 0.023
Adult [18w]	30.7 ± 1.8*	0.739 ± 0.073*	28.4 ± 3.4**	0.584 ± 0.046**

ND: Not determined

*: p<0.05

** : p<0.01

表4 ミクロソーム蛋白量とチトクローム P450 量の妊娠に伴う変化

gestation period	Microsomal protein (mg/ g liver)	Cytochrom P450 (nmol/ mg protein)
Non-pregnant	28.4 ± 3.4	0.584 ± 0.046
10th day	28.2 ± 1.9	0.592 ± 0.045
21st day	26.3 ± 1.8	0.489 ± 0.018**

** : $p < 0.01$

表5 スチレン酵素代謝活性の性差、週令差、妊娠による変化

	styrene glycol
Male, 3 w	50.7 ± 6.6
Male, 18w	92.5 ± 7.1 ^a
Female, 3 w	41.5 ± 3.4
Female, 18w	38.2 ± 3.8
Pregnant (10 d)	29.0 ± 8.2
Pregnant (21 d)	22.1 ± 4.9 ^b

(nmol/ g liver/ min)

a: $p < 0.01$, significantly different from 18Weeks of female group
and 3weeks of male group

b: $p < 0.05$, significantly different from non-pregnant group

表6 2種のモノクローナル抗体によるスチレングリコール生成の抑制

	Hy-Hel	Anti-P450IIE1	Anti-P450IIC11/6
Male, 3 w	1.70(100)	0.45(40)	1.53(91)
Male, 18w	5.53(100)	1.89(87)	1.35(25)
Female, 3 w	1.58(100)	0.34(34)	1.38(88)
Female, 18w	1.44(100)	0.28(44)	0.88(56)
Pregnant (day 10)	1.36(100)	0.36(71)	1.01(74)
Pregnant (day 21)	1.05(100)	0.26(90)	0.81(77)

(nmol/mg protein/ min)

() : mean of percentage of remaining activity expressed as activity
MAbs/activity with Hy-Hel $\times$ 100

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

研究者 藤田 正一（北海道大学大学院獣医学研究科・環境獣医科学講座・教授）

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。

研究協力者

数坂昭夫（北海道大学・大学院獣医学研究科・助教授）、石塚真由美（北海道大学・大学院獣医学研究科・助手）、岩田久人（愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・助教授）

A. 研究目的

シトクロム P450 (P450) による酸化反応は、地球上に棲息する殆ど全ての生物種において、環境汚染物質などの外来異物に対して働く主要な防御機構の一つであり、同時に、ステロイドホルモン、甲状腺ホルモ

ン、ビタミン類、エイコサノイドなど、生体内の様々な生理活性物質の重要な合成経路でもある。我々は、これまで、実験動物をはじめ、モクズガニやエゾヤチネズミを用いた研究から、環境汚染物質への曝露が P450 分子種の発現量を変動させること、また、環境汚染のインパクトを評価する方法として P450 の発現量及び活性の測定が有効なツールであることを明らかにしてきた。一方で、これまでの研究から、P450 の発現量が増加すると、汚染物質の種類によってはその代謝排泄が促進され、生体における汚染物質の残存量が減少することが示唆された。従って、生体に蓄積する汚染物質濃度の測定だけでは、環境汚染レベルのモニタリングを行うことは難しい可能性、および、環境汚染に耐性のある生物種は P450 をはじめとする異物の代謝・排泄機構が発達している可能性が考えられ、生体に残存する環境汚染物質と異物代謝能との関係について、より詳細な検討が必要であることがわかった。そこで、本研究では、陸圏及び水圏に棲息するさまざまな野生生物を採集し、野生生物における肝異物代謝能の解析や、蓄積する環境汚染物質を分析する。

前回の報告では、魚食性でかつ食物連鎖の頂点に立つ哺乳類のアザラシに関して、有機塩素系化合物の濃度分析を行い、同時に、肝臓におけるシトクロム P450 依存の異物代謝活性や蛋白発現量について分析を行った。そして、シトクロム P450 分子種のひとつ、CYP1A サブファミリー依存の代謝活性や発現量と、生体に蓄積するコプラナーPCB との間に相関が見られることを見出した。従って、肝臓の酵素 P450 は汚染の指標として、有効なバイオマーカーである可能性を示すことができた。しかし、一方で、これら環境汚染物質の蓄積が、野生動物の生体にどのような毒性影響をもたらしているのかは、明らかにされていない。今回、我々は、甲状腺ホルモンなどの内分泌系を攪乱することが指摘されている PCB

類の詳細な異性体ごとの蓄積を分析するとともに、甲状腺ホルモン機能への影響について調べたので報告する。

また、我々は、上記の海棲哺乳類と同じく魚食性で、食物連鎖の頂点に立ち、高濃度の環境汚染物質の生体蓄積が予想される鳥類のオオワシやオジロワシに関して、生体に蓄積する有機塩素系化合物について解析を行ってきた。これらの猛禽類は、絶滅危惧種や絶滅危急種に指定されており、日本に飛来する過程で、内分泌攪乱作用を持つ有機塩素系化合物に高濃度のレベルで曝露されていることがこれまでの研究から分かってきた。今回、これら猛禽類において、難分解性で脂溶性の高い有機塩素系化合物の蓄積パターンに関して、興味深い知見が得られたので報告したい。

さらに、環境汚染が進んでいる棲息域として、ダイオキシンの汚染水域より魚類であるコイを収集し、その肝臓における P450 依存の代謝活性を測定し、生体への影響を調べた。1992 年から 2000 年にかけて、(株)荏原製作所藤沢工場より引地川水系に排出されたダイオキシン類は、トータルで TEQ 値に換算すると、3.0g にも上ると推定される。これまでに発表されているデータはダイオキシン類の濃度の測定値が主であり、実際に周辺の棲息生物に対してどのような影響が出ているのかは明らかにされていない。我々は、汚染水域の上流・下流におけるコイの異物代謝能の変動や生殖腺への影響など、棲息生物にどのような生体影響が見られるのかを検討したので報告したい。

エゾヤチネズミは北海道を始めとして中国北部、朝鮮、サハリンからフィンランドまで広範囲に棲息するタイリクヤチネズミの一種である。これまでの研究で我々は、エゾヤチネズミに、内分泌攪乱物質であり、P450 分子種の一つ CYP1A を誘導する多環芳香族類(PAH)や、CYP2B 誘導剤のフェノバルビタール(PB)を投与し、肝臓の P450

の発現量や代謝活性がどのように変動するかを分析した。そして、エゾヤチネズミでも、ラットなど実験動物と同様の異物代謝酵素誘導能を有していることを見出した。北海道北東部ではエゾヤチネズミは3-4年の周期をもって個体数が変動し、南西部では比較的不規則にかつ緩やかに個体数が変動していることが、森林総合研究所・斎藤ら(1998)によって報告されている。そこで、我々は今回の研究において、1996年および2000年に、北海道の森林・都市・都市近郊・農村地帯など、棲息環境の異なる地点からそれぞれエゾヤチネズミを捕獲し、肝臓の異物代謝活性について測定し、棲息環境の違いや変化と異物代謝能との関わりについて調べた。

B. 研究方法

(a) アザラシにおける PCB を始めとする有機塩素系化合物と甲状腺機能の攪乱

1997年冬に北海道沿岸で害獣駆除のために捕獲されたゴマフアザラシ、クラカケアザラシの成獣を資料として用い、血液、脂肪組織、犬歯を採集した。脂肪組織については GC/ECD によって有機塩素系化合物である PCB 類、ヘキサクロロベンゼン、ヘキサクロロシクロヘキサン類、クロルダン類、DDT 類の蓄積量について解析した。血液は、ラジオイムノアッセイ法によって、総サイロキシン (total T4)、フリーサイロキシン (free T4)、総トリヨードサイロニン (total T3)、フリートリヨードサイロニン (free T3) について分析を行った。また、アザラシの犬歯を用いて各個体の年齢鑑定を行った。

(b) 猛禽類における環境汚染物質の異性体蓄積パターンの解析

オジロワシ、およびオオワシは1998年から1999年にかけて回収した死体を保存し、胸筋について化学分析の資料とした。GC/ECDを用いて、ヘキサクロロベンゼン、

ヘキサクロロシクロヘキサン類、クロルダン類、DDT 類、PCB 類の蓄積量を、GC/MS(SIM)を用いてコプラナ PCB 類の濃度について分析を行った。

(c) ダイオキシン汚染水域に棲息するコイの肝臓の P450 依存代謝活性の測定と生殖腺への影響

2000年にダイオキシン類を含む排水のあった(株)荏原製作所藤沢工場の上流域、下流域、リファレンスとして境川よりそれぞれコイの採集を行った。常法によって肝臓からミクロソームを精製し、P450含有量や、依存の代謝活性について測定した。また、HE染色によって生殖腺への影響を調べ、ELISA法によって、血液中のエストロゲン(17βエストラジオール、エストリオール、エストロン)濃度を測定した。

(d) エゾヤチネズミの棲息環境による P450 依存の活性の変動

1996年及び2000年のサンプル収集は表に示す地点より行った(Table 1, Figure 1)。

捕獲したエゾヤチネズミは麻酔下において肝臓を採取し、常法にしたがってミクロソーム画分を調製し、P450含有量、アミノピリン N 脱メチル化、イミプラミン 2 位水酸化、エトキシレゾルフィン O 脱エチル化 (EROD) 活性、そして、テストステロンを基質とした P450 依存の代謝活性を測定した。

C. 研究結果

(a) アザラシ

各アザラシに蓄積している有機塩素系化合物の濃度について表に示す (Table 2)。PCB は今回分析した脂肪組織に蓄積する有機塩素系化合物の中では最高値を示した。以下、DDT、クロルダン類、ヘキサクロロシクロヘキサン、ヘキサクロロベンゼンの順で、高濃度の蓄積を示した。PCB 類の中では、平面構造をもち、ortho 位に塩素が一

個配位する mono-ortho PCB 類が、non-ortho 体に比べ、さらに高濃度に蓄積していることがわかった。

次に、血中における甲状腺ホルモン濃度と、蓄積する有機塩素系化合物との相関について表に示す。ほとんどの有機塩素系化合物と T3 の血中濃度の関しては、負の相関を示す傾向が得られた (Table 3)。特に、PCB170、PCB180 と、total T3 濃度との間には、有意な負の相関が見られた (Figure 2)。

(b)ワシ

オオワシ、オジロワシにおける有機塩素系化合物の胸筋における蓄積濃度を表に示す (Table 4、Table 5)。PCB 類は 0.12-38 mg / g wet wt.、DDT 類は 0.068-15mg / g wet wt.と、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。PCB 類の中では PCB153 がもっとも高濃度でこれら猛禽類の胸筋に蓄積していることが明らかとなった。また、今回の分析結果では、日本にて採集されたオオワシ、オジロワシの PCB、DDT 類の汚染度はアメリカのスベリオル湖域に棲息するハクトウワシから検討されたもの (1991 年) と同程度であることが分かった。non-ortho 体や mono-ortho 体の PCB 類の蓄積による毒性影響度を TEQ 値に換算したところ、9.2-740 pg / g wet wt.であり、non-ortho PCB 類の比率は 70%以上を占めた。

また、成鳥だけではなく、各年齢ステージにおける PCB 異性体の蓄積パターンについても分析した (Figure 3)。幼鳥においてもっとも高いレベルで蓄積していたのは 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。また、それぞれのステージにおいて 4 塩素化 PCB の総 PCB 量に対する割合は、幼鳥 10.3%、成鳥 1.6-2.4%であった。また、6 塩素化 PCB の総 PCB 量に対する比率は幼鳥で 36.5%であったのに対し、成鳥では 52.8-55.2%と、高い値を示した。

(c)コイ

引地川の藤沢工場上流域より採集した雌のコイでは、下流域棲息群に比べて、P450 量が増加していた (Figure 4)。また、肝臓におけるエトキシレゾルフィン O 脱エチル化は、同様に、工場より下流域に棲息する群において高活性を示した。また、抗ラット CYP1A 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、工場下流域のコイの肝臓では、CYP1A 抗体に反応する蛋白発現が増加していることが明らかとなった (Figure 5)。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 (Figure 6)。また、卵巣中の一次卵母細胞と二次卵母細胞の比率を調べたところ、汚染されていると考えられている群の個体では、二次卵母細胞の割合が少なかった。

(d)エゾヤチネズミ

1) 1996 年度のエゾヤチネズミにおける棲息域と肝異物代謝能との関係

エトキシレゾルフィン代謝は、ラットの肝臓では CYP1A サブファミリーが担っている。CYP1A サブファミリーはダイオキシン類、多環芳香族類など、平面構造を有する環境汚染物質に曝露されることによって、発現が誘導されることが知られている。EROD 活性は、1996 年捕獲の個体では、石狩由来群で最も高い値を示し、以下、札幌、中川と続いた (Figure 7)。また、中川由来のエゾヤチネズミは、1996 年度では、エリスロマイシン、イミプラミン、アミノピリン、アニリン代謝など、測定した全ての基質の代謝活性において、札幌・石狩由来の個体に比べて顕著に低い値を示した (Figure 7)。

2) 2000 年度のエゾヤチネズミにおける棲息域と肝異物代謝能との関係

(1) EROD

2000 年に捕獲したエゾヤチネズミでは、EROD 活性は、蘭越 (R)、石狩 (I) 由来群で最も高い値を示し、以下、札幌 (S)、

中川 (N) と続いた。M はオス、F はメス個体を示している (Figure 8)。

(2) テストステロン

テストステロン代謝は、ラットにおいては各部位の水酸化反応を表に示した P450 分子種が担っていることが報告されている (Table 6)。エゾヤチネズミに存在する P450 分子種はクローニング及び精製されていないが、これまでの我々の抗体を用いた研究から、CYP1 ファミリー、CYP2 ファミリーに関してはラットと同様の基質特異性を持っていることが分かっている。

2000 年度に捕獲したエゾヤチネズミのテストステロン代謝活性をグラフに示した (Figure 9)。蘭越由来の個体はいずれの部位の代謝に関しても最も低い値を示し、札幌、石狩由来のサンプルでは高活性を示した。特に、石狩由来のサンプルでは、農薬曝露で誘導されることが分かっている、テストステロン 16 α 水酸化や 16 β 水酸化活性について、高い値を示した。

D. 考察

(a) アザラシ

PCB170、PCB180 は 7 塩素化 PCB であり、これらの異性体は PCB 類の中でも難代謝性の異性体である。そのため、これらの物質の蓄積量は、その個体がそれまでに受けた PCB 類の総曝露量の指標となる化学物質である。

PCB77 などの異性体が甲状腺ホルモン分泌抑制を持っているという報告があるが、今回の結果はそれを支持するものとなった。今回の結果では、もっとも PCB 影響を受けている個体で T3 量が、70% 程度まで減少していると考えられ、成長や繁殖などの面で影響が出ている可能性が考えられた。甲状腺ホルモンは加齢に伴い減少するが、年齢との相関よりも PCB 蓄積量との相関の方が顕著であった。

(b) オオワシ、オジロワシ

これまで、年齢過程を考慮して環境汚染物質の蓄積パターンの分析を行った報告は、野生生物に関してはあまりない。今回の分析から、発達過程により、生体に蓄積する PCB 異性体は、成長するに従って塩素数の多い PCB 異性体の蓄積濃度が高くなっていることが分かる。極東アジアを飛来するこれら猛禽類の、PCB の汚染源と考えられる Sovol の PCB 塩素数の組成は図に示す通りである。幼鳥から成鳥になるに従って、蓄積組成は Sovol の組成よりも、高塩素側の PCB 類の割合が増加していくことが明らかとなった。従って、成長過程の中で、難分解性の多塩素化 PCB 類が P450 を始めとする異物代謝酵素によって代謝されることなく蓄積されてしまっていることが考えられる。

また、PCB 類と、DDT 類・クロルダン類の蓄積レベルにそれぞれ相関が見られたことから、

① 同一地域内で曝露されている

② 曝露されている地域は異なるが、

それらの汚染化学物質の比率が同じとの可能性が考えられた。

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。

(c) コイ

今回の分析結果から、ダイオキシンの汚染が考えられる引地川に棲息するコイでは、ダイオキシン曝露によって肝臓の異物代謝能が増加している可能性が考えられる。一方、HE 染色によって生殖腺を調べたところ、生殖腺の発達は、雌では、EROD 値や CYP1A サブファミリーの発現量と負の相関を示すことが今回の結果から明らかとなった。

た。雌の血中のエストロゲン濃度に関して、CYP1A サブファミリーの発現量とは同じく負の相関を示した。汚染個体群で卵母細胞の発育が十分でなかったことから、調査することができなかったものの、ダイオキシン類の曝露が産卵数や繁殖率などへ影響を及ぼしている可能性は考えられる。また、雌個体の体内で、エストロゲンが CYP1A によって代謝排出されている、もしくは、エストロゲンレセプターと Ah レセプターの相互作用の可能性が考えられた。しかし、その一方で、雄では、CYP1A 発現量や EROD と、生殖腺の発達には相関が見られなかった。従って、これらの結果から、ダイオキシン曝露によって CYP1A の増加と、性ステロイドホルモンの中でもエストロゲン量及びその作用の抑制が認められることを示唆する結果となった。

(d) エゾヤチネズミ

以前の我々の実験から、エゾヤチネズミもラット同様、多環芳香属類による P450 の誘導機構を有していることが分かっている。従って、1996 年度捕獲個体において EROD 活性の低い森林地帯の中川では、平面構造を持つ環境汚染物質による汚染レベルが比較的低いことが考えられた。また、蘭越、石狩群は同じ農村地帯ではあるが、石狩は札幌都市近郊に位置し、付近を流れる河川について環境汚染度を調査したところ、石狩群では PCB や DDT などによる有機塩素系化合物の汚染が顕著であることが我々の分析から分かっている。これらの有機塩素系化合物もまた、農薬によって誘導される P450 と同じ分子種を誘導することが知られている。2000 年に捕獲した石狩由来のエゾヤチネズミでは、テストステロン代謝について高活性を示した。従って、石狩では蘭越に比べ、農薬など平面構造を持たない環境汚染物質による汚染が進んでいる可能性が考えられる。

E. 結論

コイに蓄積するダイオキシン類の分析はまだ検討中であるが、アザラシやオオワシ、オジロワシなどでは、高濃度の有機塩素系化合物の蓄積が認められた。アザラシでおこっている甲状腺ホルモン濃度の低下が、これらの汚染物質への曝露によるものである可能性は十分に考えられる。今後は、実際にシトクロム P450 が PCB 各異性体を代謝し、それらが生体に及ぼす影響について、アザラシまたは実験動物の肝培養細胞を用いて調べていく予定である。

エゾヤチネズミの EROD 活性は、1996 年度捕獲、2000 年捕獲のいずれの個体も、石狩由来群で最も高い値を示し、以下、札幌、中川と続いた。また、中川由来のエゾヤチネズミは、1996 年度では、エリスロマイシン、イミプラミン、アミノピリン代謝など、測定した全ての基質の代謝活性において、札幌・石狩由来の個体に比べて顕著に低い値を示した。特に、ラットにおいて CYP2C11、CYP2B の担うアミノピリンの N 脱メチル化代謝は農薬に曝露されることで活性が上昇することが報告されている。

しかし、一方で、1996 年度と異なり、2000 年度に中川で捕獲したエゾヤチネズミでは、同じく CYP2C11、CYP2B が担い、農薬曝露などで増加するテストステロン 16 α 水酸化や 16 β 水酸化活性について、札幌や石狩由来の個体と変わらない高い活性値を示した。中川演習林では、毎年、殺鼠剤散布や林道工事を行っている。従って、薬剤曝露によって P450 の発現量が増加した可能性、棲息域が変動することで食性が変わった可能性、あるいは異物代謝に関して高活性を持つ個体が、淘汰され、生き残った可能性などが考えられた。

F.研究発表

1.論文発表

Chiba I., Sakakibara A., Goto Y., Isono T., Yamamoto Y., Iwata H., Tanabe S., Shimazaki K., Akahori F., Kazusaka A., Fujita S. Negative correlation between plasma thyroid hormone levels and chlorinated hydrocarbon levels accumulated in seal from the coast of Hokkaido, Japan. (Environ Toxicol Chem. in press)

Fujita S., Chiba I., Ishizuka M., Hoshi H., Iwata H., Sakakibara A., Tanabe S., Kazusaka A., Masuda M., Masuda Y., Nakagawa H. P450 in wild animals as biomarker of environmental impact. Biomarkers 2001 6(1):13-25

Teramitsu I., Yamamoto Y., Chiba I., Iwata H., Tanabe S., Fujita S., Kazusaka A., Akahori F., Fujita S. Identification of novel cytochrome P450 1A genes from five marine mammal species. Aquat Toxicol. 2000 Dec 1;51(2):145-153.

Yamamoto H., Watanabe T., Mizuno H., Endo K., Fukushima J., Hosokawa T., Kazusaka A., Fujita S. The antioxidant effect of DL- α -lipoic acid on copper-induced acute hepatitis in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats. Free Radic Res. 2001 Jan;34(1):69-80.

Yamamoto H., Watanabe T., Mizuno H., Endo K., Hosokawa T., Kazusaka A., Gooneratne R., Fujita S. In vivo evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in liver of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats with acute hepatitis. Free Radic Biol Med. 2001 Mar 1;30(5):547-54.

Maruyama Y., Teraoka H., Iwata H., Kazusaka A., Fujita S. Inhibitory effects of endogenous dopaminergic neurotoxin, norsalsolinol on dopamine secretion in PC12 rat pheochromocytoma cells. Neurochem Int. 2001 Jun 1;38(7):567-572.

Yoon S., Kazusaka A., Fujita S. FTIR spectroscopic and HPLC chromatographic studies of carbon tetrachloride induced acute

hepatitis in rats: damage in liver phospholipid membrane. Biopolymers. 2000;57(5):267-71.

Yoon S., Maruyama Y., Kazusaka A., Fujita S. Application of FT-IR and ESR spectroscopic techniques to the study of CCl₄-induced peroxidation in rat liver microsomes. Jpn J Vet Res. 2000 Feb;47(3-4):151-4.

Yoon S., Maruyama Y., Kazusaka A., Fujita S. Accumulation of diacylglycerol induced by CCl₄-derived radicals in rat liver membrane and its inhibition with radical trapping reagent--FT-IR spectroscopic and HPLC chromatographic observations. Jpn J Vet Res. 2000 Feb;47(3-4):135-44.

Chiba I., Sakakibara A., Goto Y., Isono T., Iwata H., Tanabe S., Shimazaki K., Akahori F., Kazusaka A., Fujita S. Correlation between plasma thyroid hormone levels and chlorinated hydrocarbon levels accumulated in Steller seallions from the coast of Hokkaido, Japan. (Mar Pollut Bull. submitted)

Chiba I., Sakakibara T., Iwata H., Tanabe S., Kazusaka A., Fujita S. Hepatic microsomal P450s and chlorinated hydrocarbons in Larga and Ribbon seals from Hokkaido, Japan. (Environ Toxicol Chem. submitted)

Shen, Y.B., Kazusaka A., Fujita S., Sasaki I. The effect of the water-miscible solvent acetone on the cytochrome P450 system in rat liver microsomes and its mediated reaction. (Journal of molecular catalysis. submitted)

2.国際会議予稿その他

Sakamoto, K., Nakai, K., Aoto, T., Ishizuka, M., Kazusaka A., Fujita S., Comparison of contents and activities of carp cytochrome P450 upstream and downstream to the site of accidental dioxin release at the Hikijiri River, Fujisawa--Risk assessment for environmental pollution caused by the Hikijiri River dioxin accident~. Environmental Sciences (in press)

Tateishi, Y., Kim, E.Y., Iwata, H., Shimamoto, Y., , Seok-Joo, Y., Maruyama, Y., Chiba, I., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S. Alterations in the differentiations and the developments of the central nervous system and reproductive organs of neonatal male rats following prenatal and lactational exposure to bisphenol A. Environmental Sciences (in press)

Shen, Y.B., Terasawa, M., Kazusaka, A., Fujita, S.: Preventive properties of birch sap against oxidative stress in rats. Proceedings of the 2 nd International Symposium on Sap Utilization in Bifuka'2000, pp.149 - 1153 (2000)

3.学会発表

坂本健太郎、数坂昭夫、藤田正一、国末達也、渡部真文、岩田久人、田辺信介、増田泰、北海道産オオワシおよびオジロワシにおける残留性有機塩素化合物の蓄積特性とその毒性影響、第6回バイオアッセイ研究会、日本環境毒性学会合同研究発表会

寺光郁子、千葉一成、岩田久人、田辺信介、藤瀬良弘、数坂昭夫、藤田正一、海棲哺乳類シトクロム P450 遺伝子の同定と蛋白機能解明、第129回獣医学会学術集会

鈴木裕子、丸山 豊、数坂昭夫、藤田正一、Ah レセプターを介した薬物代謝酵素誘導に対するエストロゲンレセプターの関与、第130回獣医学会学術集会

坂本健太郎、中井清貴、青戸隆博、石塚真由美、数坂昭夫、藤田正一、横山愛子、牛越亮子、広瀬一美、引地川水系におけるコイの異物代謝酵素 P450 活性の比較、第3回環境ホルモン学会

立石陽子、Eun-Young Kim,岩田久人、嶋本義則、Yoon Seok-Joo 丸山豊、千葉一成、石塚真由美、数坂昭夫、藤田正一、Alterations in the differentiations and the developments of the central nervous system and reproductive

organs of neonatal male rats following prenatal and lactational exposure to bisphenol A、第3回環境ホルモン学会

Effect of environmental endocrine disruptors and other environmental pollutants on wild animals and its evaluation

Shoichi FUJITA^{1*}, Akio KAZUSAKA¹, Mayumi ISHIZUKA¹, Hisato IWATA²

¹Graduate school of veterinary medicine, Hokkaido University, ² Ehime University

*Corresponding Author: (Professor)

Chlorinated hydrocarbon (CHCs) levels in the blubber of Larga seals and Ribbon seals collected from the coastal waters of Hokkaido, Japan were determined in order to assess the hormonal effects of CHC exposure in free-ranging pinnipeds. Plasma thyroid hormone levels, including total thyroxine (T4), free T4, total triiodothyronine (T3), and free T3 were also measured. Spearman rank correlation analyses showed that in Larga seals, plasma total T3 and free T3 levels negatively correlated with levels of all the CHCs analyzed, although there was no such correlation between total or free T4 levels and CHC concentrations. In Ribbon seals, total T3 levels significantly decreased with an increase of di-ortho PCB (PCB170 and 180) residues. These findings indicated that the plasma T3 deficiency could be associated with some CHC exposure in Larga and Ribbon seals, and that the responses of plasma thyroid hormones may be useful biomarkers for CHC exposure in Ribbon seals.

Stellar's sea eagle and White-tailed sea eagles are suspected to be endangered. We aim to determine the levels of CHCs in the breast muscle of these eagles migrating to Hokkaido, Japan, and to evaluate the ecotoxicological risk base on the obtained data. PCBs and DDTs were the most commonly found compounds, with concentrations 1-2 orders of magnitude higher than the other compounds; i.e., from 0.12 to 38 and from 0.068 to 15 mg / g wet wt., respectively. The residual PCBs were found to change their

compositions with growth stage. It is striking that relatively higher levels of lower chlorinated PCBs were observed in the juvenile than in mature specimens.

Dioxin-containing waste had been released into the Hikiji River from EBARA Co. in Fujisawa for seven and one-half years from November 1992 to March 2000. The released dioxins during this period amounted to 3.0 g-TEQ. We investigated alterations in cytochrome P450 enzymatic activities in the hepatopancreas of carp caught upstream and downstream from the site of dioxin release in the Hikiji River. The significantly high levels of P450 contents, dependent activity and CYP1A isozyme contents were observed in the female carp caught at polluted site. Furthermore, plasma estrogen levels negatively correlated with levels of CYP1A contents and dependent activity. These results indicate that the Hikiji River dioxin accident affected xenobiotic-metabolizing activities in common carp with apparent sign of alteration in reproductive systems.

We have also determined the metabolism of xenobiotics and steroid hormones in the liver of *Clethrionomys rufocanus*, which is one of the wild voles. We corrected *Clethrionomys rufocanus* from sites as follows; Nakagawa, where is a rural area, mountain villages; Rankoshi, where is an agricultural area; Ishikari, where is a suburban agricultural area; and Sapporo, where is an industrial, agricultural, domestic, urban areas. We examined the P450-dependent enzyme activities in liver microsomes of wild voles, corrected in 1996 and 2001, using aminopyrine, imipramine, ethoxyresorufin and testosterone as substrates. The P450 dependent enzyme activities of wild voles corrected from Sapporo and Ishikari in 1996 were higher than those of Nakagawa vole. However, in animals corrected in 2000, the vole from Nakagawa has a high ability of testosterone metabolism. Although both of Rankoshi and Ishikari were agricultural area, the activities of testosterone hydroxylation in Ishikari vole were higher than those of vole from Rankoshi area. We have examined and reported that organochlorinated pesticides polluted the Ishikari area. From the results of present study, it has been suggested that the P450 enzyme activities in wild voles are altered depend on the levels of pollution in habitat environment.

Table1. エゾヤチネズミ採集場所及び数

採集地	棲息環境	1996 年 捕獲個体数		2000 年 捕獲個体数	
		オス	メス	オス	メス
蘭越	農作地帯	0	0	11	7
石狩群	都市近郊、農作地帯	13	15	6	14
中川演習林	北海道大学農学部附属演習林・山林	6	10	3	1
札幌市	都市	6	10	3	1

Table 2. Age, body length, blubber chlorinated hydrocarbon levels (ng/g wet weight) and plasma thyroid hormone levels in Larga and ribbon seals. n.a.: data not available, Figures represent mean±SD.

Species Sex	Larga seal		Ribbon seal	
	Male	Female	Male	Female
<i>n</i>	0	0	3	9
Age (yr)	n.a.	n.a.	3.7±0.58	6.7±3.5
<i>n</i>	2	2	3	9
Body length (cm)	96, 145	100, 147	127±7.5	139±15
<i>n</i>	2	2	1	6
PCB77	0.11, 0.50	0.066, 0.11	0.15	0.11±0.027
PCB126	0.20, 0.55	0.15, 0.18	0.25	0.12±0.073
	<0.021,	<0.021,		
PCB169	<0.021	<0.021	<0.021	<0.021
PCB105	25, 58	8.8, 19	8.2	10±5.3
PCB118	52, 140	23, 45	34	42±21
PCB156	13, 18	3.1, 6.2	3.3	5.9±3.2
PCB170	18, 24	4.9, 9.1	5.9	13±5.7
PCB180	43, 83	19, 29	17	40±20
Total PCB	2400, 2600	500, 1100	650	885±435
TEQ	0.034, 0.084	0.020, 0.028	0.031	0.021±0.011
HCB	28, 37	14, 15	19	19±4.8
alpha-HCH	67, 190	3.2, 81	22	43±15
beta-HCH	160, 420	25, 130	2.1	53±9.3
gamma-HCH	3.9, 8.8	0.65, 4.5	<0.10	2.5±1.8
oxychlordane	250, 370	38, 170	9.6	55±23
trans-chlordane	<1.0, 7.1	<1.0, 2.1	<1.0	22±23
cis-chlordane	7.0, 11	4.6, 4.8	<1.0	23±5.3
trans-nonachlor	210, 460	76, 100	140	225±56
cis-nonachlor	13, 34	4.9, 7.3	2.5	34±3.4
<i>p,p'</i> -DDE	960, 2300	270, 690	460	580±133
<i>p,p'</i> -DDD	15, 72	11, 21	43	31±7.1
<i>p,p'</i> -DDT	160, 200	60, 130	92	122±22
Fat (%)	75, 87	92, 93	88	92±1.4
<i>n</i>	2	2	3	10
Total T3 (ng/ml)	0.59, 0.64	0.83, 0.87	0.31±0.060	0.24±0.099
Free T3 (pg/ml)	1.5, 1.6	1.7, 1.8	n.a.	n.a.
Total T4 (ng/ml)	6.3, 7.3	4.8, 10	19±17	16±7.7
Free T4 (pg/ml)	2.9, 4.3	3.0, 5.1	n.a.	n.a.

Table 3. Spearman rank correlation analyses between plasma thyroid hormone levels and blubber chlorinated hydrocarbon levels (on a fat-weight basis) or age in Larga and ribbon seals.

Sample		Total T3		Free T3		Total T4		Free T4	
		r_s	p -value	r_s	p -value	r_s	p -value	r_s	p -value
Larga seal	PCB77	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	PCB126	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	PCB105	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	PCB118	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	PCB156	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	PCB170	-1.0	0.08	-0.60	0.30	0.20	0.73	-0.40	0.49
	PCB180	-1.0	0.08	-0.60	0.30	0.20	0.73	-0.40	0.49
	TEQ	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	HCB	-1.0	0.08	-0.60	0.30	0.20	0.73	-0.40	0.49
	beta-HCH	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	oxychlordane	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	<i>trans</i> -nonachlor	-1.0	0.08	-0.60	0.30	0.20	0.73	-0.40	0.49
	<i>p,p'</i> -DDE	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	Age	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribbon seal	PCB77	-0.29	0.51	-	-	-0.46	0.30	-	-
	PCB126	-0.09	0.84	-	-	-0.12	0.80	-	-
	PCB105	-0.74	0.10	-	-	0.06	0.90	-	-
	PCB118	-0.65	0.15	-	-	0.12	0.80	-	-
	PCB156	-0.85	0.06	-	-	0.06	0.90	-	-
	PCB170	<u>-0.88*</u>	0.04	-	-	<0.01	>0.99	-	-
	PCB180	<u>-0.88*</u>	0.04	-	-	<0.01	>0.99	-	-
	TEQ	-0.21	0.65	-	-	-0.23	0.60	-	-
	HCB	-0.21	0.61	-	-	-0.31	0.45	-	-
	beta-HCH	0.06	0.89	-	-	0.67	0.10	-	-
	oxychlordane	-0.77	0.06	-	-	-0.02	0.96	-	-
	<i>trans</i> -nonachlor	-0.23	0.58	-	-	0.11	0.79	-	-
	<i>p,p'</i> -DDE	0.23	0.58	-	-	-0.09	0.82	-	-
	Age	-0.46	0.13	-	-	0.05	0.87	-	-

Figures represent Spearman coefficient (r_s). * r_s significant at $p < 0.05$.

Table 4. Concentration (ng/g wet wt.) and 2,3,7,8-TCDD toxic equivalents (TEQs) of coplanar PCBs (pg/g wet wt.) in breast muscles

Sample	PCBs	<non-orth coplaner>			<mono-orth coplaner>			TEQ(WHO)
		77	126	169	105	118	156	
HP1	120	0.090	0.042	0.040	2.7	7.7	0.67	9.2
HP2	30000	1.6	3.3	1.4	800	2400	360	550
HP3	39000	1.7	4.7	1	1100	3300	390	740
HP4	11000	1.6	2.6	0.71	280	780	90	390
HA1	23000	2.0	2.6	1.4	500	1900	330	460
HA2	1900	0.57	0.38	0.17	47	140	11	74

Table 5. Concentrations of organochlorine pesticides in breast muscles of steller's sea eagles and White-tailed sea eagles (ng/g wet wt.)

Sample	Fat (%)	<i>p,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDD	<i>p,p'</i> -DDE	DDTs	<i>a</i>	<i>b</i>	HCHs	<i>t</i> -ch	<i>c</i> -ch	<i>t</i> -nona	<i>c</i> -nona	oxy	CHLs	HCB
HP1	4.3	1.2	10	57	68	ND	2.5	2.5	0.9	3.5	8.6	1.7	1.6	16	6.1
HP2	1.1	23	440	14000	15000	1.6	640	640	19	68	2800	270	910	4100	400
HP3	2.7	23	350	15000	15000	1.3	530	540	17	63	3000	240	920	4200	95
HP4	0.81	29	310	5200	5500	0.6	310	310	40	40	750	89	400	1300	47
HA1	7.6	40.0	560	10000	11000	ND	320	320	4.6	28	560	110	350	1000	170
HA2	2.3	8.6	110	1200	1300	0.1	33	33	4.2	36	200	32	47	320	56

Table6.ラット肝臓においてテストステロン代謝するP450分子種	
水酸化部位	P450分子種
7 α	CYP2A1
6 β	CYP3A2
16 α	CYP2C11,CYP2B
16 β	CYP2B
2 α	CYP2C11
2 β	CYP3A2

Figure1: サンプルング場所

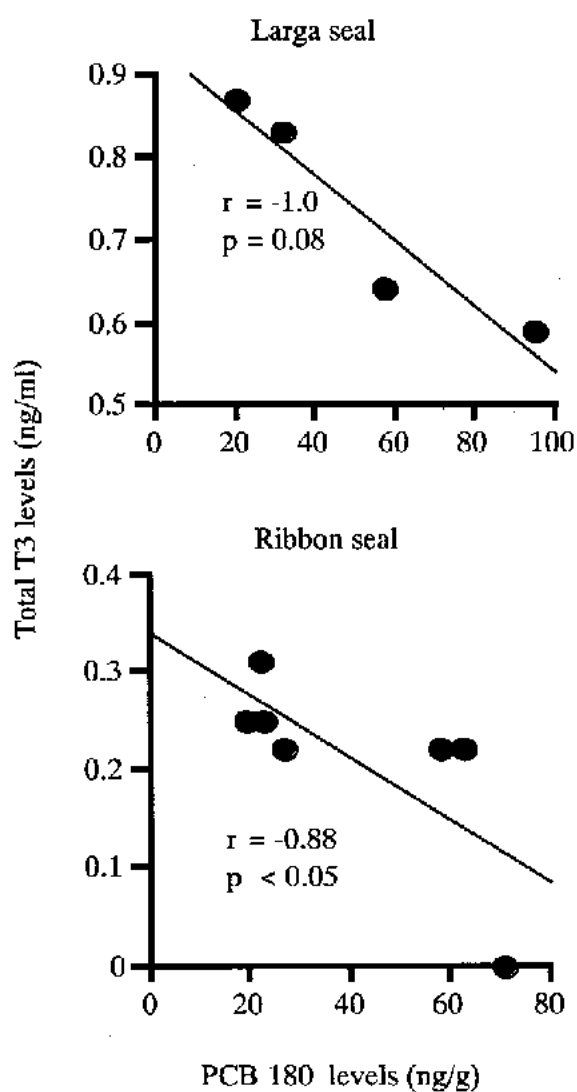
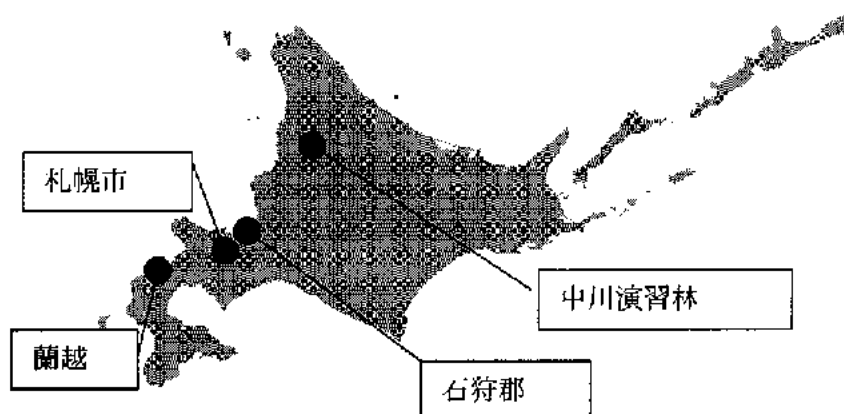


Figure2

Relationship of blubber PCB180 levels (on a fat-wight basis) and plasma total T3 levels in Larga and ribbon seal. Spearman rank correlation coefficients are shown.

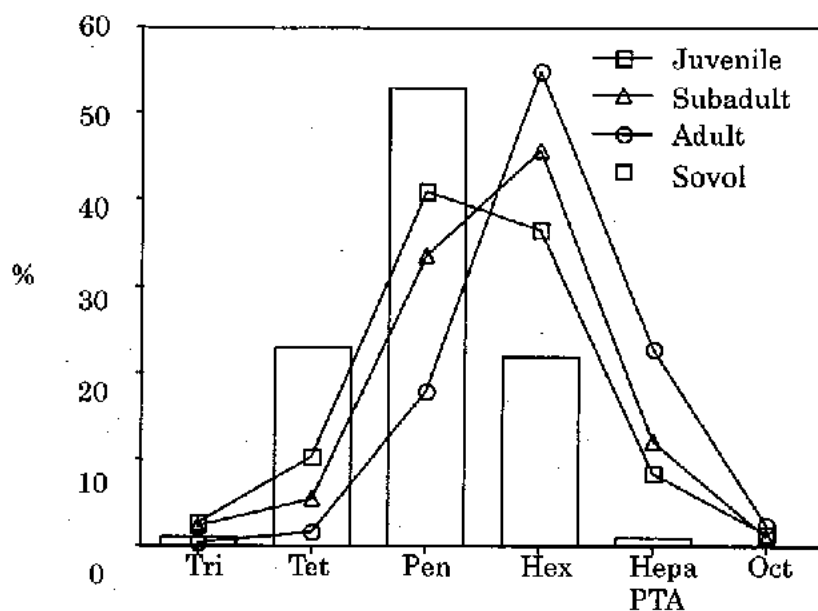


Figure 3. The change of residual PCB congener compositions with growth stage

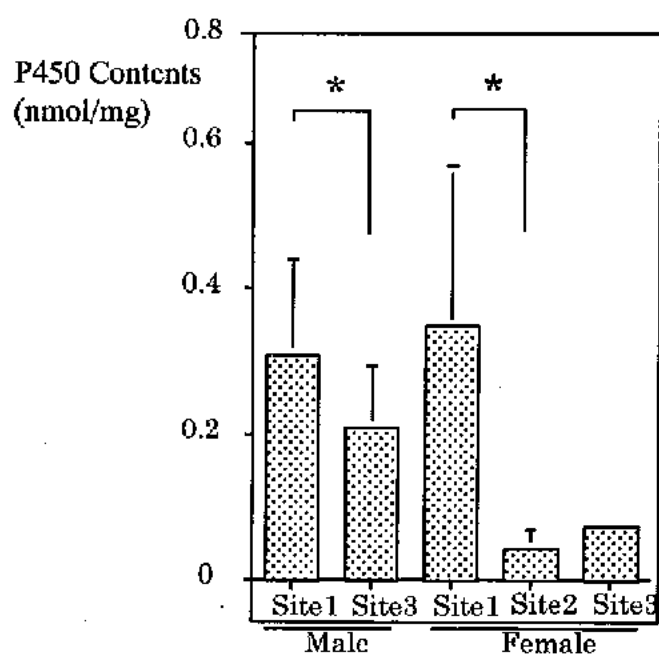


Figure 4. Alterations of cytochrome P450 contents in hepatopancreas of carp
Site1:Hikiji River (downstream),
Site2:Hikiji River (upstream), Site3:Sakai River (reference)

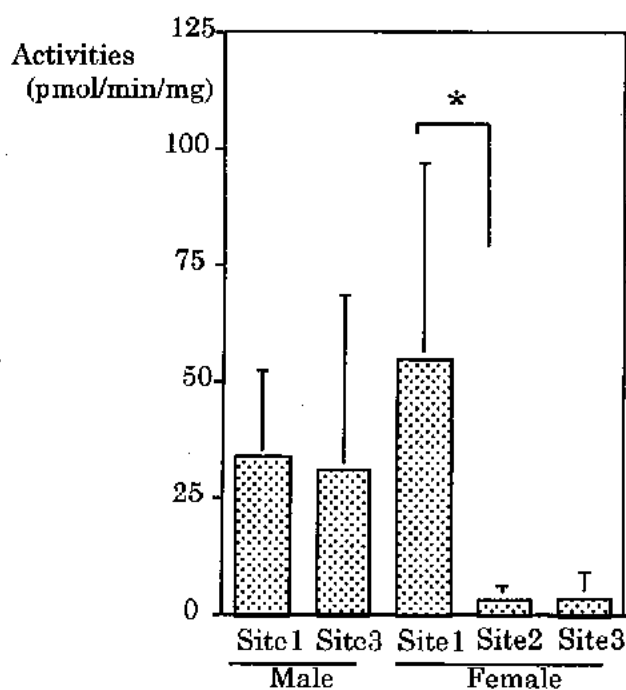
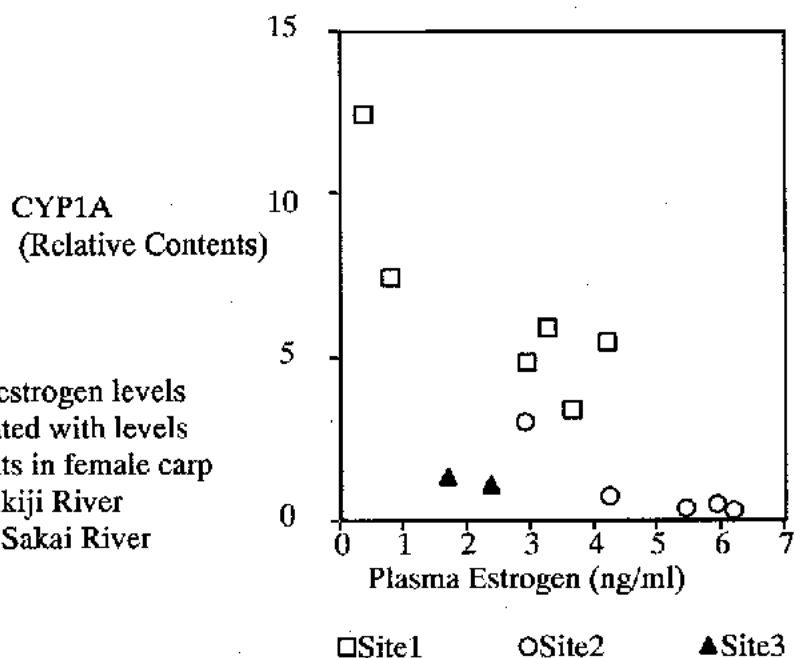


Figure 5. Alterations of EROD activity in hepatopancreas of carp
Site1:Hikiji River (downstream), Site2:Hikiji River (upstream), Site3:Sakai River (reference)

Figure 6. Plasma estrogen levels negatively correlated with levels of CYP1A contents in female carp $p<0.013$, Site2:Hikiji River (upstream), Site3:Sakai River (reference)



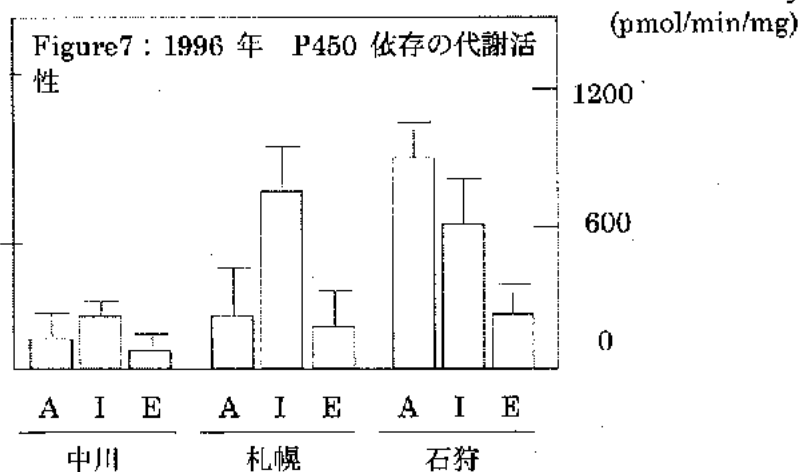
Activity
(nmol/min/mg)

12

6

0

Figure7: 1996 年 P450 依存の代謝活性



A:アミノピリンN脱メチル化
I:イミプラミンN脱メチル化
E:EROD

Figure8 : 2000 年 EROD 活性

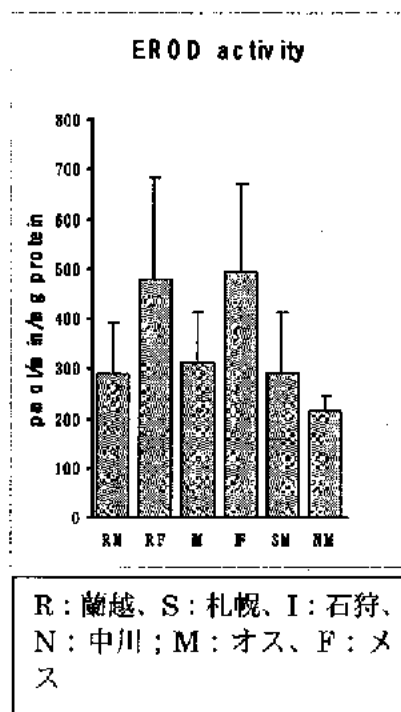
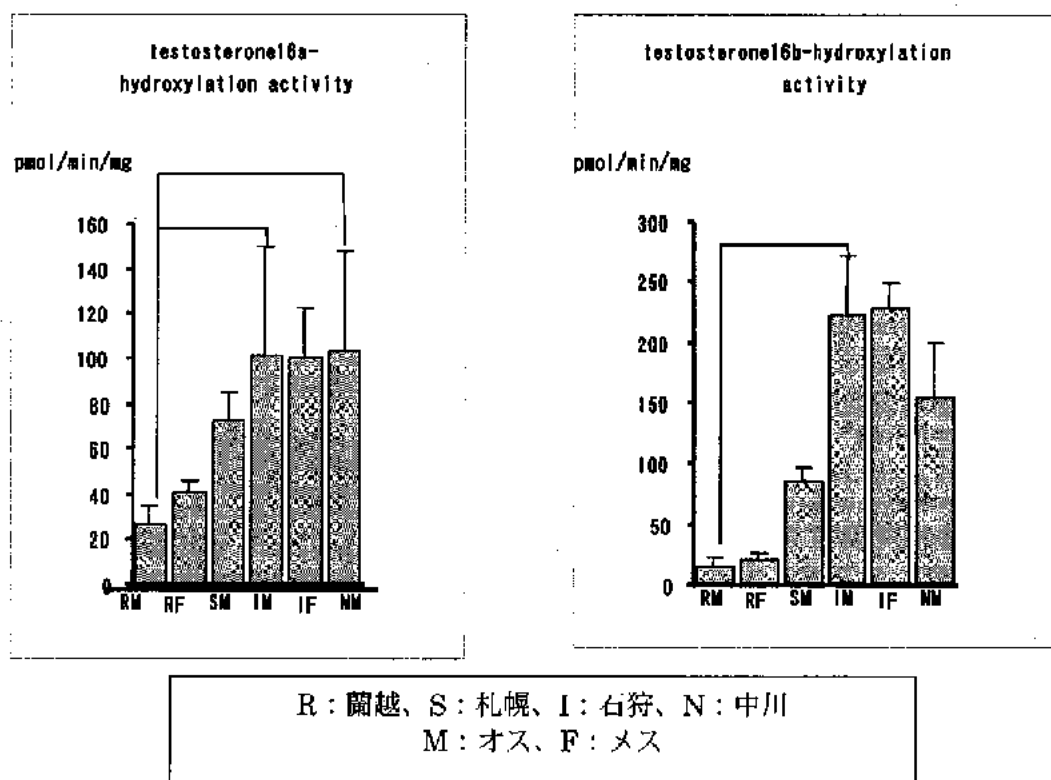


Figure9 : 2000 年 テストステロン代謝活性



10. 生殖発達毒性に関する研究

研究者 鈴木 勝士（日本獣医畜産大学教授）

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年以上前にクロズ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できれば、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。

研究協力者名

鈴木浩悦（日本獣医畜産大学 助手）

斎藤賢一（日本医科大学医療技術専門学校
助教授）

A. 研究目的

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、初期発生に対する影響、胎生期および生後初期の生殖腺発生過程に対する影響、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る他、生殖細胞系列自体への突然変異誘発性が憂慮されている。そこで本研究では、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、生殖発達攪乱の有用な解析方法の検討、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る。精巣形成不全症（HGN）では、胎生後期から生後初期にかけての精巣セルトリ細胞の増殖低下とアポトーシスにより精巣形成不全を生じ、生後初期に始原生殖細胞が精粗細胞に分化できずに死滅する。骨軟骨形成不全症（OCD）では、骨軟骨の形成不全から長骨の短縮を主

徴とし、体躯、頭部、四肢、および尾の短縮、全身性の水腫、口蓋裂、突舌などを呈して、出生直後に呼吸困難により死亡する。矮小ラット（LDE）では、生後の体成長遅延、発作性癲癇、生殖障害を示し、生後45日前後で死亡する。これらのラットの突然変異は当教室で維持していた原種クロズドコロニーにおいて、何らかの環境影響により生殖細胞系列ゲノムに生じたと考えられる。また、それぞれの病態は、同様な異常が胎生期あるいは生後の化学物質などの環境影響によっても生じる可能性があり、それらの作用の解析モデルとして有用である。

B. 研究方法

1. 精巣形成不全症ラット（HGN）に関する研究

精巣形成不全症ラット（hgn/hgn）の原因遺伝子はラット第10染色体に存在し、生殖腺の発達および生殖細胞の分化にとって重要な因子をコードしていると考えられる。本年度は、原因遺伝子の同定を目指して、hgn遺伝子座周辺の詳細なリンケージマップ、病因遺伝子を含む領域のRadiation Hybrid map、さらにマウスの第

11 染色体上の相同領域での *hgn* 遺伝子座の位置を明らかにするために、マウス-ラットの comparative map を作成した。さらに *hgn* 存在領域を含むラット YAC をスクリーニングするとともに、マウス第 11 染色体上の相同領域にマップされているいくつかの候補遺伝子について、正常および発症の精巣と腎臓でその発現を調査した。連鎖解析のために作成した Brown Norway (BN) 系統とのバッククロスで 1000 匹以上のバッククロス個体を作成したが、その雌個体は精巣形成不全症としての原因遺伝子 (*hgn* 遺伝子座) のマッピングには使用できない。それらを用いて *hgn* 遺伝子座周辺のマイクロサテライトの詳細なリンケージマップを作成すると共に、雄において *hgn* 遺伝子座と完全連鎖するマーカーを用いて、雌の *hgn* に関する遺伝子型を推定し、表型特性を比較することで、マップされた *hgn* 遺伝子の雌体成長や生殖性に対する影響を評価した。*hgn* の系において、*hgn* と連鎖するマーカーにより遺伝子の発現は胎生期既に開始していると考えられるが、精巣と腎臓の大きさでの遺伝子型判定では、胎生期のより早期に遡って、発症と非発症とを判別し、比較することは困難である。そこで外交配-バッククロスの遺伝子型を判定し、胎生期発生過程に対する *hgn* 遺伝子の影響を調査した。

2. 骨軟骨形成不全症 (OCD) に関する研究

本症の病因遺伝子 *ocd* は染色体に当てはめられていなかった。そこで HGN 系統と同様にリンケージ解析により *ocd* 遺伝子座のマッピングを行った。本症は致死性であるため、連鎖解析には雑種第一代 (F1) 同士の交配により得られた F2 の発症個体を用いた。また、交雑群で病因遺伝子と連鎖する複数のマイクロサテライトにおいて OCD の系統内多型が見られたため、系統内の 100 匹の発症個体と RH パネルを用いて病因遺伝子存在領域のより詳細なリンケージマップを作成した。また、系統内多型の由来に関して、当教室で維持している系統と外来系統に関して調査をした。外交配の系で得られた発症個体に関して表型を調査した。外貌観察、腹腔内臓器の観察、骨格系の観察、各臓器の組織観察を行った。

3. 癲癇を伴う矮小ラット (LDE) に関する研究

本系統は系統確立過程であるため、系統内での発症率から遺伝様式を決定した。体成長、死亡日齢、各種臓器の成長と組織観察、下垂体機能 (特に成長ホルモンについて、SDS-PAGE および免疫染色) に関して評価を行った。

(倫理面への配慮)

動物の取り扱いと管理に関する NIH のガイドラインに準拠して実験を行った。

C. 研究結果

精巣形成不全症 (HGN) に関して

連鎖解析により、*hgn* 遺伝子座は、*D10Rat161*、*D10Rat211*、*D10Rat195*、*D10Rat130* と *D10Rat168* との間の 0.36cM の領域にマップされた。さらに、*hgn* 遺伝子座は、*Whn*、*D10Rat169*、*D10Arb9* (*Aldo3*) の 3 個の遺伝子座と総計 565 匹の雄の戻し交配仔でもなお完全連鎖することが判明した。RH パネルにより、*D10Rat161*、*D10Rat211*、*D10Rat195*、*D10Rat130* の並びが決定され、*hgn* 遺伝子座の位置は *D10Rat195* および *D10Rat130* から *D10Rat168* の間の 22.6cR の範囲に位置することが判明した。ラットの YAC のスクリーニングでは、この範囲を網羅する単一の YAC を見出すことはできなかった。新規にこの領域にマップされたマウスの EST を調査したが、有力な候補は見いだせなかった。バッククロスの雌 468 匹について、*hgn* 遺伝子座周辺の連鎖地図を作製したところ、雄で得られた結果を裏付ける詳細な連鎖期間、離乳後、成熟までの体重は有意に軽かった。また、腎臓についても、ホモ型の腎重量は、ヘテロ型に比べて有意に小さかった。地図が作製された。雄で *hgn* 遺伝子座と強固に連鎖するマーカーにより、総別した雌のバッククロスにおいては、マーカーホモ型はヘテロ型に比べ体成長が全体的に遅延し、哺育性周期に関しては、ヘテロ型は 100~225 日では 100% の個体が正常な性周期を示したが、ホモ型では 131 日齢までに持続的発情を示すものが 43% 存在し、225 日までには持続的無発情を示すものが 17% 見られ、*hgn/hgn* の雌が早期不妊症を引き起こすことが確認された。卵巣組織で持続的発情を示した *hgn/hgn* 個体は、ヘテロ型と比較して明らかに卵胞数が少なかった。持続的無発情を示した個体の卵巣には、比較的多くの卵胞

が見られたが、いずれも成熟卵胞に至る前に閉鎖していた。正常性周期を示すホモ型の個体においても、卵巣および子宮重量はホモ型で有意に軽く、これらの臓器に対して *hgn* 遺伝子の影響があることが考えられた。BN とのバッククロスから得られた胎生 17.5、19.5、および 21.5 日齢のホモ個体は、同腹ヘテロ個体に比べて、体重、胎盤、腎重量において、明らかに低下していた。精巣および腎臓の発生に関しては、胎齢 19.5 および 21.5 日のホモ型において、生後の *hgn/hgn* の病理発生の前段階と考えられる形態学的変化を確認することができた。

骨軟骨形成不全症 (OCD) に関して

F2 において、発症の見られた腹では正常 33 匹、発症 14 匹が得られ、 χ^2 検定で 3:1 の分離比に適合していた。発症の 14 匹を使用して、各染色体のマイクロサテライトマーカーでタイピングを行ったところ、*ocd* 遺伝子座が D11Mgh3 と完全に連鎖していることが判明した。さらに OCD 系統内で D11Mgh3 近傍のマイクロサテライトに関して多型が存在することが判明し、33 匹の intercross で *ocd* 遺伝子座と完全連鎖を示す D11Rat93、D11Rat94、D11Arb4、D11Rat3、および D11Mgh3 ならびに *ocd* 遺伝子座のごく近傍のマーカーに関して RII パネルを用いて配列すると共に、系統内の *ocd/ocd* を 100 匹のゲノミック DNA を用いて、これらのマーカーをタイピングした結果、*ocd* 遺伝子座は、D11Rat64 と D11Rat95 との間の 28.1cR の範囲に存在することが判明した。また、この領域に相同なマウスの第 16 染色体においては、*ocd* 遺伝子座は D16Mit57 から *Mox2* との間に存在する。F2 発症個体の表型解析では、すべての発症個体で、頭部、四肢、体軀および尾の短縮、腹部膨満、全身性皮下水腫、口蓋裂および突舌を認め、全身骨格の骨標本ではすべての発症で長骨の短縮がみられた。腎臓の異常としては水輸尿管症が 63.2% の個体で認められた。大腿骨頭の矢状断、腎臓の長軸断面、甲状腺および気管の断面、心臓、肺、胸腺、皮膚に関して病理学的観察を行い、OCD 系統での発症個体と同様な異常所見を認めた。

癩癰を伴う致死性の矮小症 (LDE) について

発症と非発症とが約 3:1 に分離し、 χ^2 検定の結果、本症が常染色体性単純劣性で遺伝する可能性が示唆された。*lde/lde* は、3 日齢以降体成長が有意に遅延していた。平均死亡日齢は *lde/lde* 雌で 46.20 ± 18.80 日、*lde/lde* 雄で 44.30 ± 20.50 日であった。病理学的検査では、*lde/lde* の精巣で精細管の萎縮、生殖細胞の精細管内腔への脱落などの変化が見られたが、精巣以外の臓器では、光学顕微鏡観察のレベルではあきらかな病理学的異常は見られなかった。下垂体抽出液の SDS-PAGE では、雌雄両方の表現型正常 (+/?) および *lde/lde* でラット GH の分子量 (約 22,000) に相当する位置に明瞭なバンドが確認された。さらに Western blotting 法により、+/? および *lde/lde* の両方で、このバンドが GH であることを確認した。さらに +/? および *lde/lde* ラットの両方で細胞質が抗 GH 抗体に明瞭に染色される細胞が検出され、その数は +/? および *lde/lde* ラットで同程度であった。また ELISA での血漿 GH の測定では、+/? と *lde/lde* ラットとの間で有意差は見られなかった。行動学検査では、*lde/lde* ラットにおいて、四肢姿勢、よろめき歩調、異常歩調および握力に明らかな異常が見られた。

D. 考察

性腺形成不全症ラットに関して

今回の実験で *hgn* 遺伝子座は、約総数 1000 匹以上のラットバッククロス、RII パネル、100 匹のマウスバッククロスなどを用いた検討により、D10Rat195 および D10Rat30 から D10Rat68 の間の 0.36cM (22.6cR) の範囲に存在することが判明した。この情報をもとにラットの YAC (WI/MIT) ライブラリーをスクリーニングしたが、この領域を網羅する単一のクローンを見出すことはできなかった。今後、複数のクローンによるコンティグを作成すると共に、他の YAC、BAC、あるいは PAC ライブラリーをスクリーニングする必要性がある。マウスではいくつかの EST に関して調査を進めたが、*hgn* の病因遺伝子として有力なものは見いだせなかった。*hgn* 遺伝子座は 565 個体のバッククロスでも、ヌードマウスおよびヌードラットの原因遺伝子である *whn* (winged helix of nude) と完全に連鎖しているため、*whn* の極近傍に存在すると考えられる。ヌードマウスに

においては、病因遺伝子 *whn* の同定の過程で、周辺に多数のマイクロサテライトや EST がマップされており、コンディグも作成されている。今後、これらのマーカーの中からラットに應用できるものを選抜して、マウスラット間のより詳細な比較地図を作成すれば、この領域のマウスの情報から *hgn* 遺伝子を見いだせる可能性がある。以上の遺伝解析とは別に、BN とのバッククロスの系で *hgn* 遺伝子座と連鎖するマーカーを利用することにより、雌の表現型特性や胎生期の発生に対する *hgn* 遺伝子座の影響を調査することができた。*hgn* 遺伝子はしても、雄だけでなく雌においても、遺伝的背景の変更された外交配の系で、体成長や繁殖性に影響を及ぼすことが確認された。また、胎生期においては、精巣および腎臓の発生だけでなく、胎生期の体成長や胎盤の成長に対しても影響を及ぼすことが判明した。

骨軟骨形成不全症 (OCD) に関して

遺伝解析により *ocd* 遺伝子座をラット第 11 染色体上にマップすると共に、RH パネルおよび系統内多型の存在を利用して、*ocd* 遺伝子座周辺の比較的詳細なマップを作成することができた。*ocd* 遺伝子座周辺の多型性は、当教室で維持していたクローズドコロニーにもともと存在していたものであり、本症が致死であるために、OCD 系統が *ocd*/+ 同士の交配で維持されてきたために、*ocd* 周辺の多型性が系統内で保持されてきていたと思われる。いずれにしても系統内で遺伝子型を判別できるマーカーが見出されたため、効率的な動物生産と胎生期に遡っての病態解析が可能となった。これまでのところ、*ocd* が存在すると考えられるマウスおよび人の相同領域に *ocd* で見られる異常をうまく説明しうる有力な候補はマップされていない。今後、*ocd* に関しても *hgn* と同様に詳細なリンケージマップの作成と候補遺伝子検索を行っていく必要がある。本症は、見かけ上単一の遺伝子で、様々な臓器の器間発生に対して多様な異常を引き起こす。外交配の系で得られた発症個体でも系統内のものと同様な異常が見出されており、*ocd* 遺伝子が様々な臓器の形態形成に対してクリティカルな役割を果たしていることは明らかである。

癲癇を伴う致死性の矮小症 (LDE) に関して

LDE に関しては、本研究でその遺伝様式が上記の 2 系統と同様に常染色体性単純劣性であることが判明した。次のステップでは外交配の系を用いた連鎖解析を行い、病因遺伝子を染色体上に当てはめて、候補遺伝子を検索する必要がある。表型に関しては、本症が体成長の重度の遅延を示して、早期死亡することが判明した。今回は成長ホルモンに関して調査を行ったが、SDS-PAGE、ブロッティング、免疫染色、ELISA の結果から本症では成長ホルモンの産生はあると考えられる。今後、レセプター以降のホルモンに対する応答性、細胞内カスケード、IGF などの成長因子、それ以外のホルモン (甲状腺ホルモンなど) に関して調査を進める必要がある。

本症ラットは特に精巣組織に異常を呈することから、FSH、LH、PRL などの血中ホルモンレベルの調査が必要である。矮小系統はラットやマウスでは多数報告されているが、本症のように、歩行異常や癲癇を伴うものは報告されていない。マッピングの結果、ある程度染色体領域を絞ることができたならば、矮小や神経異常の原因遺伝子としての候補遺伝子を調査することが有効であると考えられる。

E. 結論

当教室で維持している複数ミュータントラットについてその遺伝解析および病態解析を行った。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生殖発達機構の広範な部分についてその病態解析モデルとして利用できると思われる。これらのミュータントの異常の起源は、30 年以上前にクローズ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る。さもすれば、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を示すものであろう。今後、病因遺伝子とその異常が確定されれば、遺伝子自体のヒットポイントとして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での突然変異解析を実験に加えたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki, H., M. Kokado, K. Saito, T. Kunieda and K. Suzuki (1999). A locus

responsible for hypogonadism (hgn) is located on rat Chromosome 10. Mammalian Genome 10(11): 1106-1107.

2. Akimoto, T., H. Suzuki, Y. Arai, K. Nakama and K. Suzuki (2000) Locus of dominant hairless gene (Hl) causing abnormal hair and keratinization maps to rat chromosome 10. Experimental Animal 49(2): 137-140.

3. Suzuki H., S. Fukaya, K. Saito and K. Suzuki (2000) A locus responsible for osteochondrodysplasia (ocd) is located on rat Chromosome 11. Mamm. Genome. 11(6): 464-465.

4. Uchibori, M., K. Saito, S. Yokoyama, T. Tsuji, H. Suzuki and K. Suzuki (2000) Monitoring and analysis of the EEG spikes frequency in El mice during sleep: A new application of wavelet transform. Physiol. Behav. (in submission).

5. 鈴木勝士、他 13 名 (著) (2000) XIII. 遺伝性疾患、内藤喜久、浜名克己、元井霞子編、生産獣医療における牛の生産病の実際、p207-216、文永堂、東京

6. 鈴木勝士、他 83 名 (訳) (2000) 第 114 章、臓腑内分泌部の外科的疾患、高橋貢、佐々木信雄監訳、スラッター小動物の外科手術: (Slatter, D: Textbook of Small Animal Surgery (2nd Ed.), WB Saunders Co., Philadelphia 1993)、文永堂、東京、p1667-1678.

7. 鈴木勝士、他 44 名 (2000) 2.2.3. 子宮内暴露試験、2.2.4. 一世代繁殖試験、井上達監、今井清、長村義之、加藤正信、菅野純編、内分泌化学物質の生物試験研究法、シュプリンガー・フェアラーク東京、東京、p85-106.

8. 鈴木勝士 (2000) ナイトセッション Dose-response. 森田昌敏、緊急企画内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム'99-各座長による包括報告-、資源環境対策 36(2):156-157.

9. 高須正規、高橋純子、斎藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士 (2000) マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位 (第 2 報)、電子情報

通信学会技術研究報告 MBE99-152:43-47

2. 学会発表

1. 斎藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士 (2000) 電磁場照射がマウスの繁殖と成長におよぼす影響について 第 19 回宇宙エネルギーシンポジウム (p. 75-79)

2. 高須正規、高橋純子、斎藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士 (2000) マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位 (第 2 報)、電子情報通信学会、ME とバイオサイバネティクス研究会、p. 43

3. 小川実幸、岩間良子、日比佐知子、尼崎肇、鈴木浩悦、鈴木勝士、孫偉勇、塩田邦郎 (2000) マウス口蓋ヒダ形成位置とプラコード形成・細胞増殖・アポトーシス・細胞周期関連因子の発現分布の関係、第 52 回日本動物学会、関東地方部会

4. 徳力剛、太田千春、高須正規、鈴木浩悦、斎藤賢一、鈴木勝士 (2000) 腎低形成症ラットにおける慢性腎不全進行過程の基礎的評価、第 129 回日本獣医学会

5. 八木美央、鈴木浩悦、岡田美香、千葉純子、醍醐久美、中宮英次郎、尼崎肇、斎藤賢一、鈴木勝士 (2000) 精巣形成不全症ラットの生後初期精巣の病理発生に関する調査: 細胞の増殖と細胞死の観点から、第 129 回日本獣医学会

6. 田村啓、三森国敏、小野寺博志、高木久宜、森安真津子、鈴木勝士、広瀬雅雄 (2000) ラット甲状腺二段階発癌における下垂体除去の影響と外来性 TSH の修飾作用、第 129 回日本獣医学会

7. 日比佐知子、岩間良子、小川実幸、尼崎肇、鷹巣雅峰、鈴木浩悦、鈴木勝士、孫偉勇、塩田邦郎 (2000) マウス口蓋ヒダ形成位置とプラコード形成・細胞増殖・アポトーシス・細胞周期関連因子の発現分布の関係、第 129 回日本獣医学会

8. 秋元敏雄、鈴木浩悦、仲間一雅、鈴木勝士 (2000) WBN/11a-Ht rat のヘアレス遺伝子 (Ht) のラット第 10 染色体上へのマッピングおよびヌードラットとの相補性試験、第 47 回日本実験動物学会

9. 鈴木勝士 (2000) 動物の疾患の遺伝子、

第 26 回日本比較臨床血液学会

10. 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、竹中基郎、八木未央(2000)エストロン投与による鶏胚での発生攪乱、第 40 回日本先天異常学会

11. 斉藤賢一、内堀雅隆、横山修一、辻 隆之、鈴木浩悦、鈴木勝士(2000)先天性癲癇モデル動物(EI Mouse)における睡眠時脳波の解析、第 40 回日本先天異常学会

12. 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、竹中基郎、八木未央、岡田美香(2000)エストロン投与による鶏胚での発生攪乱について、第 130 回日本獣医学会

13. 秋元敏雄¹⁾、鈴木浩悦²⁾、仲間一雅¹⁾、鈴木勝士(2000)Hairless rat(WBN/IIa-13 Ht)の原因遺伝子 Ht とヌードラットとの相補性試験。(F1 および F2 の表現型について)、第 130 回日本獣医学会

14. 丸ひろみ、鈴木浩悦、高橋純子、井出雅子、大村 彰、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)骨軟骨形成不全症ラット病因遺伝子の探索：外交配系での表型調査と病因遺伝子座周辺の連鎖地図の作成、第 130 回日本獣医学会

15. 竹中基郎、鈴木浩悦、石坂みゆき、斉藤賢一、鈴木勝士(2000) Wistar-Imamichi ラットクローズドコロニーで発見された神経症状を伴う矮小ラット、第 130 回日本獣医学会

16. 高橋純子、斉藤賢一、高須正規、鈴木浩悦、鈴木勝士(2000)EI および ddY マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発反応(ABR)の解析、第 130 回日本獣医学会

17. 鈴木浩悦、高橋純子、丸ひろみ、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)骨軟骨形成不全症ラット病因遺伝子の探索：RH パネルでの連鎖マーカーの配列と系統内多型を用いたファインマップの作成、第 130 回日本獣医学会

18. 千葉純子、中宮英二郎、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)ウイスターイマミチラット由来近交系統間での ocd 遺伝子座周辺の多型性、第 130 回日本獣医学会

19. 尼崎 肇、小川美幸、日比佐知子、岩間良子、鈴木浩悦、鈴木勝士、孫 偉男、塩田邦郎(2000)マウス口蓋ヒダ形成配列に関連する PAL31 の mRNA の発現分布、第 130 回日本獣医学会

20. 岡田美香、鈴木浩悦、千葉純子、醍醐久美、中宮英二郎、八木未央、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)ラット精巢形成不全症(hgn / hgn)の胎生期病態発生に関する検討、第 130 回日本獣医学会

21. 鈴木勝士(2000)期鶏胚に及ぼすエストロジェンの発生障害作用を中心にして、第 130 回日本獣医学会

22. 田村 啓、三森国敏、小野寺博志、那須昌弘、高木久宜、安原加壽雄、上田誠、鈴木勝士、広瀬雅雄(2000)ラット甲状腺二段階発癌モデルにおける塩酸イニシエーション期投与の影響、毒性病理学会

23. 斉藤賢一、醍醐久美、横山修一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2000)直流磁場のマウス胎子におよぼす影響、第 32 回成長談話会(p. 21)

24. 秋元敏雄、鈴木浩悦、仲間一雅、鈴木勝士(2001)ヘアレスラット(WBN/IIa-Ht rat)の病態解析と原因遺伝子のマッピング、ラット研究者会議

25. 鈴木勝士(2001)牛の遺伝性疾患「畜産現場における遺伝病の重要性」日本産業動物獣医学会平成 12 年度年次大会(奈良)、シンポジウムⅣ

26. 斉藤賢一、横山修一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2001)直流磁場照射がマウス胎子におよぼす奇形作用、第 20 回宇宙エネルギーシンポジウム

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし。

2. 実用新案登録
なし。

3. 実用新案登録
なし。

11. 塩素化芳香族による生殖機能への影響評価

研究者 大村 実（九州大学大学院医学研究院 助手）

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1 kg あたり0.05-5.0 μ g 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体尾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 はメスの生殖器系に対しては明らかな影響を認めず、その生殖器系への影響には雌雄差がある可能性が示された。

研究協力者

松浦俊明（九州大学大学院医学研究院大学院生）
尾方里香（九州大学大学院医学研究院大学院生）
田中昭代（九州大学大学院医学研究院講師）
平田美山紀（九州大学大学院医学研究院助手）

A. 研究目的

ミレニアム・プロジェクトとして採用された環境省による内分泌攪乱化学物質の疑いがある化学物質についての有害性評価がついにスタートし、“ホルモン様作用による悪影響があるか否か”を問う段階に入った。我々もここ数年来、性内分泌系のかく乱による化学物質の性的発育・生殖機能への影響についての動物実験による検討を続けており[1-4]、昨年度の本研究では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）の胎仔期-授乳期曝露によるオスラットの性的発育・生殖機能への影響について検討を行った[4]。ポリ塩化ナフタレン類はダイオキシン類と同じく廃棄物焼却由来の塩素化芳香族化合物である。その発生量はダイオキシン類よりも一桁あまり多いとされており[5]、ヒトの脂肪中からも1-10 ppb

程度の濃度で検出されている[6-8]。ポリ塩化ナフタレン類はその作用機序[9-12]も生体影響[13-16]もダイオキシンと類似しているされていたことから、胎仔期から授乳期にかけて曝露を行った場合は1,2,3,4,6,7-HxCN でも2,3,7,8-TCDDと同様に[17-23]オス動物で精子数の減少が予想された。しかし、実際には精子数の減少は見られず、性成熟前のラットでは逆に精子数の増加が認められ、さらに若いラットでは精巣の精細管内に正常よりも発生段階の進んだ精子が認められた[4]。これは、1,2,3,4,6,7-HxCN への胎仔期-授乳期曝露によってオスラットで精子発生開始時期が早期化したものと解釈できた。また、1,2,3,4,6,7-HxCN を投与された母ラットの脂肪中の投与物質の濃度は上述したヒトのデータと比較して5-10倍程度の値であり[4]、この実験での曝露条件は現実のヒトの曝露状況に近いものと考えられた。

本年度の研究では、昨年度の研究では曖昧なままに残された、又は、調べられなかった以下の3つの項目について検討を行った。

1. 1,2,3,4,6,7-HxCN への胎仔期-授乳期曝露による影響は、本当に胎仔期-授乳期に引き起こされたものなのか？

昨年度の実験で、1,2,3,4,6,7-HxCN への胎仔期-授乳期曝露を受けたラットでは、生後 89 日目でもかなりの量の投与物質が脂肪中に見出されていた [4]。これは、この動物が胎仔期および授乳期だけでなく、離乳後も持続的に 1,2,3,4,6,7-HxCN に曝露されていたことを示すものである。昨年度の研究では 1,2,3,4,6,7-HxCN による影響を胎仔期から授乳期にかけての性内分泌系のかく乱が原因であると推定したが、上記の理由から、その原因が離乳後に求められる可能性も否定できなかった。

そこで、本年度の研究では離乳直後の動物に対して 1,2,3,4,6,7-HxCN の投与を行い、昨年度の実験結果と比較することで上記の点を明確にすることとした。

2. 1,2,3,4,6,7-HxCN は、より少ない投与量でも影響を引き起こすか？

昨年度の実験では、妊娠ラットに対して体重 1 kg あたり 1 μ g の 1,2,3,4,6,7-HxCN を投与した [4]。投与を受けたラットの脂肪中の 1,2,3,4,6,7-HxCN の濃度はヒトのデータに近いものではあったが、それでもヒトの脂肪中の濃度と比較すると 1 桁あまり高い値であった。

また、2,3,7,8-TCDD では体重 1 kg あたり 50 ng の妊娠ラットへの投与という極低負荷で精子数の減少を認めた Gray らの報告もあり [22]、1,2,3,4,6,7-HxCN においてもさらに低い負荷量で影響の有無を調べる必要があった。

そこで、本年度の研究では投与量によって三群の 1,2,3,4,6,7-HxCN 投与群を設定し、より低負荷量での 1,2,3,4,6,7-HxCN の影響についても検討した。

3. 1,2,3,4,6,7-HxCN はメス動物の性的発育・生殖機能にも影響を与えるだろうか？

昨年度の実験では、母ラットおよびメスの仔ラットは 1,2,3,4,6,7-HxCN の母動物から仔動物への移行および脂肪への蓄積を検討するのに用いたため、1,2,3,4,6,7-HxCN のメスラットへの影響については調べなかった。

そこで、本年度の研究では 1,2,3,4,6,7-HxCN がメスラットの性的発育・生殖機能に与える影

響についても詳細に検討した。

B. 研究方法

1. 被験物質、実験動物および飼育条件

被験物質としては 1,2,3,4,6,7-HxCN (Cambridge Isotope Laboratories, Woburn, MA) を使用した。実験動物としては Wistar 系ラット (Kud:Wistar) を使用した。1 週間の馴化期間を確保するため、ラットは生後 14 日目の時点で授乳中の母ラット付で購入した (1 母仔あたりの仔ラット数は、出生直後にオス 5 匹・メス 4 匹ずつに調整済)。生後 21 日目で離乳させた仔ラットはオス・メスとも 1 腹あたり 1 or 2 匹ずつランダムに 4 群に分けた。動物は 2 匹ずつポリプロピレン製ケージに入れ、室温 20-24℃、湿度 30-60% に保持した部屋で飼育した。飲料水 (水道水) および飼料 (CE-2、日本クレア) は自由摂取とした。

2. 1,2,3,4,6,7-HxCN の投与

1,2,3,4,6,7-HxCN はコーンオイルに溶解し、生後 21-23 日目の 3 日間、16:00-17:00 の間に強制経口投与した。購入した 1,2,3,4,6,7-HxCN は n-ノナンに溶解されていたので、対照群には等量の n-ノナン (体重 1 kg あたり 1 日 0.01 ml. 純度 >99%, 東京化成) をコーンオイルに溶解して同様に投与した。

実験群は、対照群 1 群と、体重 1 kg あたりの投与量で 0.05 μ g、0.5 μ g、5 μ g の 1,2,3,4,6,7-HxCN 投与群 3 群を設定した。1,2,3,4,6,7-HxCN の投与量は体重 1 kg あたり 0.5 μ g を基準投与量として、その両側に公比 10 で残りの 2 群を設定したものである。

基準投与量を体重 1 kg あたり 0.5 μ g としたのは以下のような理由である。

(1) 昨年度の研究では、妊娠ラットに体重 1 kg あたり 1 μ g の 1,2,3,4,6,7-HxCN を 3 日間連続で投与した場合、離乳直後の仔ラットでの脂肪中の 1,2,3,4,6,7-HxCN の平均濃度は 9.78 ppb (= 9.78 μ g/kg) であった [4]。

(2) ラットにおいて体重に占める脂肪の割合は離乳時では 3-6% とされていることから [24-27]、離乳直後のメスラットでの全脂肪組織中の 1,2,3,4,6,7-HxCN 量は体重 1 kg あたり 0.29-0.59 μ g となる。

(3) 昨年度の研究から、経口的に投与した

1,2,3,4,6,7-HxCN の 30-50%が脂肪組織に移行するということが分かっている。つまり、体重 1 kg あたり 0.58-1.96 μg の 1,2,3,4,6,7-HxCN を投与すれば、脂肪中の投与物質の濃度は(2)の推定値になると考えられる。

(4) 本実験では 1,2,3,4,6,7-HxCN は 3 日間にわけて投与するので、1 回あたりの投与量は体重 1 kg あたり 0.19-0.65 μg となり、その平均値はほぼ 0.5 μg (正確には 0.42 μg) である。

(5) よって、離乳直後のラットに体重 1 kg あたり 0.5 μg の 1,2,3,4,6,7-HxCN を 3 日間連続で経口投与すれば、その体内負荷量は妊娠ラットに体重 1 kg あたり 1 μg の 1,2,3,4,6,7-HxCN を 3 日間連続で投与した場合の離乳直後の仔ラットの体内負荷量にほぼ等しいと考えられる。

3. 影響評価

(1) オスラット

1) 観察期間中

体重と摂餌量は毎週 1 回測定した。オスラットの性的発育は prepuital separation で評価した。prepuital separation は生後 35 日目以降に評価を行い、その完了時期および完了時点での体重を記録した。

2) 生殺時

ラットは生後 62 日目に炭酸ガスによって安楽死させた。生後 62 日目を生殺時期としたのは、昨年度の研究で 1,2,3,4,6,7-HxCN への胎仔期-授乳期曝露による精子発生開始時期の早期化の推定根拠となった、精巣上体尾部の精子数の明らかな増加が見られた時期であるとともに、もう一つの影響である血清テストステロン濃度の明らかな上昇(前立腺腹葉重量の増加を伴う)も認めた時期であったからである。安楽死の際に後大静脈から採取した血液から血清を分離し、-80℃で保存した。また、安楽死の際に精巣、精巣上体、前立腺腹葉、精嚢を摘除し、計量した。生殺時の評価項目を以下に示す。

- ・精巣、精巣上体、前立腺腹葉、精嚢の重量
- ・精子の量的・質的指標(破碎抵抗性精巣精細胞数・精巣上体尾部精子数、精子運動率、異常精子出現頻度)
- ・精巣の病理組織学的変化
- ・血清テストステロン・ゴナドトロピン濃度

(2) メスラット

1) 観察期間中

体重と摂餌量は毎週 1 回測定した。メスラットの性的発育は膣開口で評価した。膣開口は生後 30 日目以降に評価を行い、その完了時期および完了時点での体重を記録した。また、生殖機能の指標として性周期を評価した。生後 70 日目以降の 3 週間にわたって午前中の同じ時間帯に膣スミアの細胞診を行い、発情前期、発情期、発情後期のいずれに該当するかを記録した。

2) 生殺時

ラットは生後 91 日目以降の発情期に炭酸ガスによって安楽死させた。安楽死の際にはオスラットと同様に採血を行い、卵巣と子宮を摘除し、計量した。生殺時の評価項目を以下に示す。

- ・卵巣、子宮重量
- ・卵巣と子宮の病理組織学的変化
- ・血清 17 β -エストラジオール・ゴナドトロピン濃度。

4. 統計学的解析

血清テストステロン濃度は正規分布ではなく対数正規分布を示したので、対数変換値を解析に用いた。その他の評価項目では測定値を解析に用いた。統計学的な有意性は ANOVA + Fisher's PLSD で検定し、危険率 5% で有意差を判定した。

(倫理面への配慮)

この実験は、九州大学医学部動物実験倫理委員会の審査を受け、「九州大学医学部における動物実験に関する指針」、「動物の保護および保管に関する法律」(法律第 105 号)および「動物実験の飼養および保管に関する基準」(総理府告示第 6 号)の規制に基づいて行われた。

C. 研究結果

1. オスラット

(1) 体重増加、摂餌量、prepuital separation

表 1 に観察期間中のオスラットの体重増加、摂餌量および prepuital separation の完了時期・完了時体重を示す。1,2,3,4,6,7-HxCN への離乳後曝露による体重増加や摂餌量に対する影響は見られず、また、性的発育の指標である prepuital separation も影響を受けなかった。

(2) 生殺時（生後 62 日目）の生殖器・副生殖器重量

表 2 に生後 62 日目に生殺した時点での精巣、精巣上体、前立腺腹葉、精嚢重量を示す。胎仔期・授乳期の曝露では精巣上体、前立腺腹葉、精嚢重量が 1,2,3,4,6,7-HxCN 群で有意差 or 傾向差を伴って重くなっていたが（昨年度の研究）、離乳後曝露では前立腺腹葉だけが全ての 1,2,3,4,6,7-HxCN 投与群で重くなっていた（傾向差あり）。

(3) 生殺時（生後 62 日目）の破碎抵抗性精巣精細胞数、精巣上体尾部精子数、異常精子出現率、精子運動率

表 3 に生後 62 日目に生殺した時点での破碎抵抗性精巣精細胞数、精巣上体尾部精子数、異常精子出現率、精子運動率を示す。胎仔期・授乳期の曝露では 1,2,3,4,6,7-HxCN 群で精巣上体尾部の精子数が対照群の 2 倍近い値にまで増加したが（昨年度の研究）、離乳後の曝露ではいずれの 1,2,3,4,6,7-HxCN 投与群でも精巣上体尾部の精子数の増加は認められなかった。また、その他の精子関連指標についても投与物質による影響を認めなかった。なお、精子発生開始後間もない時期の精子であるためか、無尾精子が対照群でも高い頻度で出現した。

(4) 生殺時（生後 62 日目）の血清テストステロン・ゴナドトロピン濃度

図 1 に生後 62 日目に生殺した時点での血清テストステロン、LH、FSH 濃度を示す。なお、テストステロンについては対数変換値によって評価を行った。胎仔期・授乳期の曝露では、1,2,3,4,6,7-HxCN 投与群の血清テストステロン濃度が対照値の約 2 倍にまで上昇していた（ただし、対数変換値による検定で有意な差ではなかった）が（昨年度の研究）、離乳後の曝露でも全ての 1,2,3,4,6,7-HxCN 投与群で血清テストステロン濃度が対照値の 2-3 倍にまで上昇しており、対数変換値による比較では対照値との間に有意な差が認められた。一方、血清ゴナドトロピン濃度については投与物質による影響を認めなかった。

(5) 生殺時（生後 62 日目）の精巣の病理組織学的変化

胎仔期・授乳期の曝露の場合（昨年度の研究）と同じく、離乳後の曝露によっても 1,2,3,4,6,7-HxCN 群で精巣の病理組織学的変化の明らかな増加は認められなかった。

2. メスラット

(1) 体重増加、摂餌量、膣開口

表 4 に観察期間中のメスラットの体重増加、摂餌量および膣開口の完了時期・完了時体重を示す。1,2,3,4,6,7-HxCN への離乳後曝露による体重増加や摂餌量に対する影響は見られず、また、性的発育の指標である膣開口も影響を受けなかった。

(2) 性周期の長さおよび規則性

表 5 に 3 週間の性周期の評価期間中での、一周期の長さの平均値および規則的な性周期の割合を示す。性周期の長さは 1,2,3,4,6,7-HxCN 5 μ g 投与群で延長傾向が見られ、また、規則的な性周期の割合は 1,2,3,4,6,7-HxCN の投与量に比例して低下する傾向が見られたが、有意な変化ではなかった。

(3) 生殺時（生後 91 日目以降の発情期）の卵巣・子宮重量

表 6 に生後 91 日目以降の発情期に生殺した時点での卵巣重量および子宮重量を示す。いずれの臓器重量についても、1,2,3,4,6,7-HxCN 投与による影響を認めなかった。

(4) 生殺時（生後 91 日目以降の発情期）の卵巣・子宮の病理組織学的変化
これについては現在評価中である。

(5) 生殺時（生後 91 日目以降の発情期）の血清 17 β -エストラジオール・ゴナドトロピン濃度

表 7 に生後 91 日目以降の発情期に生殺した時点での血清 17 β -エストラジオール、LH、FSH 濃度を示す。1,2,3,4,6,7-HxCN はオスラットの血清テストステロン濃度には影響を与えたが、メスラットの血清 17 β -エストラジオールには影響を与えなかった。また、いずれのゴナドトロピンの血清濃度も投与物質の影響を受けなかった。

D. 考察

昨年度の研究では、妊娠ラットに対して妊娠 14-16 日目の 3 日間にわたって体重 1 kg あたり 1 μ g の 1,2,3,4,6,7-HxCN を経口投与することで、性成熟前の仔ラットで精子数の増加が、さらに若い仔ラットでは精巣の精細管内に正常よりも発生段階の進んだ精子が認められ [4]、これを 1,2,3,4,6,7-HxCN への胎仔期-授乳期曝露によってオスラットで精子発生開始時期が早期化したものと解釈した。また、1,2,3,4,6,7-HxCN を投与された母ラットの脂肪中の 1,2,3,4,6,7-HxCN の濃度は上述したヒトのデータと比較して 5-10 倍程度の値であり [4]、この実験での曝露条件は現実のヒトの曝露状況に近いものと考えられた。しかし、昨年度の研究では、(1) 1,2,3,4,6,7-HxCN への胎仔期-授乳期曝露による影響は、本当に胎仔期-授乳期に引き起こされたものなのか？（離乳期以降の影響である可能性はないのか？）、(2) 1,2,3,4,6,7-HxCN は、より少ない投与量でも影響を引き起こすか？、(3) 1,2,3,4,6,7-HxCN はメス動物の性的発育・生殖機能にも影響を与えるだろうか？、という三点が明らかにされないままであった。そこで、本年度の研究ではオス・メスの両方を対象として、複数の投与量を設定して 1,2,3,4,6,7-HxCN の離乳後曝露実験を行い、昨年度の胎仔期-授乳期曝露実験の結果と比較した。その結果、上記の疑問に対してどのような解答が得られたのであろうか？

1. 1,2,3,4,6,7-HxCN への胎仔期-授乳期曝露による影響は、本当に胎仔期-授乳期に引き起こされたものなのか？（離乳期以降の影響である可能性はないのか？）

昨年度の胎仔期-授乳期曝露実験で認められた 1,2,3,4,6,7-HxCN の影響は大きく二つに分けられた。すなわち、(1) 性成熟前の仔ラットで精子数の増加などの精子発生開始時期の早期化を示唆する所見、(2) 血清テストステロン濃度の上昇や副生殖器重量の増加といった男性ホルモンの産生（もしくは代謝・排泄）への影響を示唆する所見、である。本年度の離乳後曝露実験では生後 62 日目に影響を評価した。昨年度の胎仔期-授乳期曝露実験ではこの時点で 1,2,3,4,6,7-HxCN 群の精巣上体尾部の精子数

が約 2 倍増加し、また、血清テストステロン値が約 2 倍増加するとともに前立腺腹葉と精囊の重量も有意に増加していた。これに対して、本年度の離乳後曝露実験では、いずれの 1,2,3,4,6,7-HxCN 投与群でも精巣上体尾部の精子数には対照値との間に差を認めなかった（表 3）。つまり、1,2,3,4,6,7-HxCN 曝露動物における生後 62 日目の時点での精巣上体尾部の精子数の増加は、胎仔期-授乳期に引き起こされた現象に起因するものであることが確認されたのである。これは、昨年度の研究での性成熟前の仔ラットでの精子数の増加などを、1,2,3,4,6,7-HxCN による精子発生開始（胎仔期-授乳期に起きる現象）の時期の早期化によって引き起こされたものであるとした我々の推論を追証するものであった。一方、本年度の離乳後曝露実験でも 1,2,3,4,6,7-HxCN 投与群では血清テストステロン濃度の上昇（図 1）や前立腺腹葉重量の増加（表 2）が認められた。テストステロンを産生する Leydig 細胞は胎仔期や授乳期だけでなく、離乳後もしばらくの間は Sertoli 細胞を介して FSH の影響下にもあり、Leydig 細胞の LH に対する反応性を決定づけると考えられている [28]。脳下垂体を切除した離乳前後のラット（生後 20-30 日目）に FSH を投与すると Leydig 細胞の LH 受容体の数が増加し、LH 刺激によるテストステロン産生量が増加するのはこの為だと考えられている [29-34]。昨年度の実験では生後 31 日目で 1,2,3,4,6,7-HxCN 群のラットの血清 FSH 濃度は約 50% 上昇しており、胎仔期-授乳期曝露による血清テストステロン濃度の上昇（およびその結果としての副生殖器重量の増加）は、この高濃度の FSH によって引き起こされたのかもしれないと考えていた（対照値が低かったため artifact かかもしれないとも考えていたが、本年度の実験でも再現されたので artifact とは考えにくい）。ただ、昨年度の段階では、生後 31 日目の時点での血清 FSH の高値は 1,2,3,4,6,7-HxCN によってゴナドトロピンの分泌開始時期が早まったのが原因であり、離乳後に 1,2,3,4,6,7-HxCN によって引き起こされた影響ではないと考えていた。しかし、本年度の実験で 1,2,3,4,6,7-HxCN への離乳後曝露によっても血清テストステロン濃度の上昇が認

められたことは、昨年度の実験での血清テストステロン濃度の上昇ではゴナドトロピンの分泌開始時期が早まったことが一因であった可能性を否定するものではないが、少なくとも昨年度の段階での推論のうち後半部分は正しくないことを示すものであった。離乳後の1,2,3,4,6,7-HxCN 曝露によって血清テストステロン濃度が上昇した原因としては、同物質がFSH 分泌を促し、Leydig 細胞のテストステロン産生能を高めた可能性が考えられるが(LH を介した影響は、昨年度の実験で血清 LH 濃度が正常化した後も血清テストステロンの高値が持続したことから否定的)、同物質がLeydig 細胞に持続的に直接作用してテストステロン産生を促した可能性なども考えられる。しかし、1,2,3,4,6,7-HxCN への離乳後曝露による血清テストステロン濃度の上昇の原因については、現時点では不明である。

2. 1,2,3,4,6,7-HxCN は、より少ない投与量でも影響を引き起こすか？

昨年度の研究では、妊娠期間中に3日間連続で体重1 kg あたり1 μ g の1,2,3,4,6,7-HxCN の経口投与を受けた母ラットの、仔ラット離乳直後の脂肪中の投与物質の平均濃度は5.75 ppb であった [4]。これまで報告のある1,2,3,4,6,7-HxCN のヒトの脂肪中の濃度は0.5 ppb 前後であり [6, 7]、昨年度の実験での曝露条件は現実のヒトの曝露状況に近いとはいえ、その負荷量はまだ一桁あまり高いものであった。一方、今年度の実験では体重1 kg あたり0.05 μ g の1,2,3,4,6,7-HxCN を離乳後に与えた場合でも、前立腺腺重量の増加を伴った血清テストステロン濃度の上昇を認めた。体重1 kg あたり0.05 μ g (= 50 ng) というのは、Gray らが2,3,7,8-TCDD の胎仔期-授乳期曝露で精子数減少を認めた投与量 [22] と同じ極めて少ない投与量である。また、B. 研究方法で示したように、離乳直後の3日間、体重1 kg あたり0.5 μ g を1,2,3,4,6,7-HxCN を投与した場合と、妊娠ラットに3日間、体重1 kg あたり1 μ g の1,2,3,4,6,7-HxCN を投与した場合とで、離乳直後の時点での脂肪中の1,2,3,4,6,7-HxCN 濃度はだいたい等しくなるものと推定される。つまり、体重1 kg あたり0.05 μ g の

1,2,3,4,6,7-HxCN を離乳後に3日間投与した場合と少なくとも同程度の影響が、体重1 kg あたり0.1 μ g の1,2,3,4,6,7-HxCN を妊娠ラットに3日間投与した場合でも認められるのではないかと考えられる。体重1 kg あたり0.1 μ g というのは昨年度の実験での投与量よりも一桁低い値であることから、この場合の仔ラット離乳直後の母ラットの脂肪中の1,2,3,4,6,7-HxCN 濃度はヒトで報告されている濃度と同程度の値になることが推定される。今回の研究により、1,2,3,4,6,7-HxCN は現実のヒトの曝露状況と同程度の負荷量でラットの生殖機能に影響を与える可能性が示された、と考える。

3. 1,2,3,4,6,7-HxCN はメス動物の性的発育・生殖機能にも影響を与えるだろうか？

今回の研究では、メスラットの性的発育への影響を膣開口で、生殖機能への影響を性周期への影響、生殖臓器の重量および病理組織学的変化、17 β -エストラジオールおよびゴナドトロピンの血清濃度で評価した。生殖臓器の病理組織学的変化については評価途上であるが、それ以外のいずれの評価指標に対しても1,2,3,4,6,7-HxCN 曝露による影響を認めなかった。つまり、1,2,3,4,6,7-HxCN のラット生殖系への影響には雌雄差がある可能性が今回の研究からは示唆された。ただ、現時点ではオス動物での精子の発生や精子産生量の指標に相当する、卵胞の分化や排卵数についての評価が完了していない。2,3,7,8-TCDD ではメス動物のこれらの指標に対する影響が報告されており [35, 36]、1,2,3,4,6,7-HxCN についても現在調べているところである。

E. 結論

1,2,3,4,6,7-HxCN への離乳後曝露実験を行い、昨年度実施した胎仔期-授乳期曝露実験の結果と比較した。そして、以下の結論が得られた。

1. 1,2,3,4,6,7-HxCN が胎仔期-授乳期に作用することで精子発生開始時期の早期化が発生することが追証されたが、血清テストステロン濃度の上昇については1,2,3,4,6,7-HxCN 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が示された。
2. 1,2,3,4,6,7-HxCN への離乳後曝露による血

清テストステロン濃度の上昇は、体重 1 kg あたり 50 ng という少量の経口投与でも認められた。これは、妊娠ラットへの経口投与では体重 1 kg あたり 0.1 μ g に相当する量であり、ヒトの曝露状況と同程度の負荷量と考えられた。

3. 1,2,3,4,6,7-HxCN のラット生殖系への影響には雌雄差があり、オスの方が感受性が高い可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

・大村 実：生殖毒性研究における in vivo 実験の意義 ----- ポリ塩化ナフタレンおよびトリブチルスズに関する研究から。第 71 回日本衛生学会総会ワークショップ「衛生学における生殖毒性研究の現状と展望」。2001 年 4 月 27-30 日。福島（予定）。

G. 参考文献

1. 栗生修司、久保和彦、尾方里香、大村 実、大嶋雄治、島崎洋平、堀 哲郎：有機スズ二世代長期曝露の行動学的影響。Biomedical Research on Trace Elements 11 : 253-258, 2000.

2. Ogata R, Omura M, Shimasaki Y, Kubo K, Oshima Y, Aou S, Inoue N : Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in female rats. Journal of Toxicology and Environmental Health (in press).

3. Omura M, Ogata R, Kubo K, Shimasaki Y, Aou S, Oshima Y, Inoue N : Tributyltin is a possible aromatase inhibitor in male rats. Environ Sci (in press).

4. Omura M, Masuda Y, Hirata M, Tanaka A, Makita Y, Ogata R, Inoue N : Onset of Spermatogenesis Is Accelerated by Gestational Administration of 1,2,3,4,6,7-Hexachlorinated Naphthalene in Male Rat Offspring. Environ Health Perspect 108 : 539-544, 2000.

5. Takasuga T, Inoue T, Ohi E, Ireland P, Suzuki T, Takeda N : Determination of halogenated aromatic and polycyclic

aromatic hydrocarbons formed during MSW incineration. Organohalogen Compounds 19 : 41-44, 1994.

6. Takeshita R and Yoshida H : Studies on environmental contamination by polychlorinated naphthalenes (PCN). III. Contamination of human body by PCN. Eisci Kagaku 25 : 24-28, 1979 (in Japanese).

7. Williams DT, Kennedy B, LeBel GL : Chlorinated naphthalenes in human adipose tissue from Ontario municipalities. Chemosphere 27 : 795-806, 1993.

8. Haglund P, Jakobsson E, Masuda Y : Isomer-specific analysis of polychlorinated naphthalenes in Kanechlor KC 400 Yusho rice oil, and adipose tissue of a Yusho victim. Organohalogen Compounds 26 : 405-410, 1995.

9. Campbell AM, Bandiera S, Robertson L, Parkinson A, Safe S : Octachloronaphthalene induction of hepatic microsomal aryl hydrocarbon hydroxylase activity in the immature male rat. Toxicology 22 : 123-132, 1981.

10. Campbell AM, Bandiera S, Robertson L, Parkinson A, Safe S : Hepta-, Hexa-, Tetra- and dichloronaphthalene congeners as inducers of hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes. Toxicology 26 : 193-205, 1983.

11. Engwall M, Brunstrom B, Jakobsson EX : Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) and aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH)-inducing potency and lethality of chlorinated naphthalenes in chicken (Gallus domesticus) and eider duck (Somateria mollissima) embryos. Arch Toxicol 69 : 37-42, 1983.

12. Hanberg A, Waern F, Asplund L, Haglund E, Safe S : Swedish dioxin survey: Determination of 2,3,7,8-TCDD toxic equivalent factors for some polychlorinated biphenyls and naphthalenes using biological tests. Chemosphere 20 : 1161-1164, 1990.

13. Tindall JP. Chloracne and chloracnegens : J Am Acad Dermatol 13 : 539-558, 1985.

14. McConnell EE : Comparative toxicity of PCBs and related compounds in various

species of animals. Environ Health Perspect 60 : 29-33, 1985.

15. Ward EM, Ruder AM, Suruda A, Smith AB, Fessler-Flesch CA, Zahm SH : Acute and chronic liver toxicity resulting from exposure to chlorinated naphthalenes at a cable manufacturing plant during World War II. Am J Ind Med 30 : 225-233, 1996.

16. Popp W, Korphoth K, Vahrenholz C, Hamm S, Balfanz E, Theisen J : Polychlorinated naphthalene exposures and liver function changes. Am J Ind Med 32 : 413-416, 1997.

17. Mably TA, Bjerke DL, Moore RW, Gendron-Fitzpatrick A, Peterson RE. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.

3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. Toxicol Appl Pharmacol 114: 118-126 (1992).

18. Bjerke DL and Peterson RE : Reproductive toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male rats: different effects of in utero versus lactational exposure. Toxicol Appl Pharmacol 127 : 241-249, 1994.

19. Bjerke DL, Sommer RJ, Moore RW, Peterson RE : Effects of in utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on responsiveness of the male rat reproductive system to testosterone stimulation in adulthood. Toxicol Appl Pharmacol 127 : 250-257, 1994.

20. Gray LE Jr, Kelce WR, Monosson E, Ostby JS, Birnbaum LS : Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. Toxicol Appl Pharmacol 131 : 108-118, 1995.

21. Sommer RJ, Ippolito DL, Peterson RE : In utero and lactational exposure of the male Holzman rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Decreased epididymal and ejaculated sperm numbers without alterations in sperm transit rate. Toxicol Appl Pharmacol 140 : 146-153, 1996.

22. Gray LE Jr, Ostby JS, Kelce WR : A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring. Toxicol Appl Pharmacol 146 : 11-20, 1997.

23. Faqi AS, Dalsenter PR, Merker HJ, Chahoud I : Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. Toxicol Appl Pharmacol 150 : 383-392, 1998.

24. Deuel HJ Jr, ed : The occurrence of lipids in the animal as a whole. In: The lipids. Vol. II: Biochemistry. New York: Interscience Publishers Inc., 1955 ; 521-706.

25. Ferrell CL and Koong J : Influence of plane of nutrition on body composition, organ size and energy utilization of Sprague-Dawley rats. J Nutr 116 : 2525-2535, 1986.

26. Clark RG and Tarttelin MF : Some effects of ovariectomy and estrogen replacement on body composition in the rat. Physiol Behavior 28 : 963-969, 1980.

27. Shoeffner DJ, Warren DA, Muralidhara S, Bruckner JV : Organ weights and fat volume in rats as a function of strain and age. J Toxicol Environ Health, Part A 56 : 449-462, 1999.

28. Sharpe RM: Regulation of spermatogenesis. In: The Physiology of Reproduction (Knobil E and Neill JD, eds-in-chief). New York: Raven Press, Ltd, 1994; 1363-1434.

29. Odell ED, Swerdloff RS, Jacobs HS, Hescox MA : FSH induction of sensitivity to LH : One cause of sexual maturation in the male rat. Endocrinol 92 : 160-165, 1973.

30. Odell ED and Swerdloff RS : The role of testicular sensitivity to gonadotropins in sexual maturation of the male rat. J Steroid Biochem 6 : 853-857, 1975.

31. Chen YDI, Payne AH, Kelch RP : FSH stimulation of Leydig cell function in the hypophysectomized immature rat. Proc Soc Exp Biol Med 153 : 473-475, 1976.

32. Chen YDI, Shaw MJ, Payne AH : Steroid

and FSH action on LH receptors and LH-sensitive testicular responsiveness during sexual maturation of the rat. *Mol Cell Endocrinol* 8 : 291-299, 1977.

33. Hsueh AJW, Dufau ML, Gatt KJ : Direct inhibitory effect of estrogen on Leydig cell function of hypophysectomized rats. *Endocrinol* 103 : 1096-1102, 1978.

34. Selin LK and Moger WH : The effect of FSH on LH induced testosterone secretion in the immature hypophysectomized male rat. *Endocrine Res Commun* 4 : 171-182, 1977.

35. Giavini E, Prati M, Vismara C : Embryotoxic effects of 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin administered to female rats before mating. *Environ Res* 31 : 105-110, 1983.

36. Gao X, Terranova PF, Rozman KK : Effects of polychlorinated dibenzofurans, biphenyls, and their mixture with dibenzo-p-dioxins on ovulation in the gonadotropin-primed immature rat: support for the toxic equivalency concept. *Toxicol Appl Pharmacol* 163 : 115-24, 2000.

Risk assessment of the effects of polychlorinated naphthalenes on reproduction

Minoru OMURA, Department of Hygiene, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Instructor

Key word: Polychlorinated naphthalenes, 1,2,3,4,6,7-hexachlorinated naphthalene, post-weaning exposure, male reproductive toxicity, female reproductive toxicity, testosterone, rats

Abstract

To post-weaning rats, 0.05 - 5.0 μ g/kg of 1,2,3,4,6,7-hexachlorinated naphthalene (1,2,3,4,6,7-HxCN) was given by gavage on postnatal days 21 to 23. The effects on the reproductive system were examined on postnatal day 62 in males and on the first day of the estrous stage from postnatal day 91 in females and were compared with the effects by in utero- and lactational exposure to 1,2,3,4,6,7-HxCN in our previous study. In male rats, sperm count in the cauda epididymidis did not increase in the 1,2,3,4,6,7-HxCN groups, although in utero- and lactational exposure to 1,2,3,4,6,7-HxCN had increased the sperm count in our previous study. This result reconfirmed our estimation that the onset of spermatogenesis is accelerated by 1,2,3,4,6,7-HxCN. Serum testosterone concentration and the ventral prostate weight had increased by in utero- and lactational exposure to 1,2,3,4,6,7-HxCN in our previous study and increased by the post-weaning exposure in this study, too. This result indicated that the effect of 1,2,3,4,6,7-HxCN on testosterone is caused by not only its effects during in utero- and lactational periods but also its effects after weaning. Increase in serum testosterone concentration was observed even in the low dose group (0.05 μ g 1,2,3,4,6,7-HxCN group). 1,2,3,4,6,7-HxCN did not affect the female reproductive system and there may be a sexual difference concerning the reproductive effects of 1,2,3,4,6,7-HxCN in rats.

表1 オスラットの体重増加、摂餌量、prepuital separation 完了時期・完了時体重

		Control	1,2,3,4,6,7-HxCN (/100g 体重)		
			0.05 μ g	0.5 μ g	5 μ g
体重 (g)	生後 21 日目	57.5 $\pm$ 3.5	56.9 $\pm$ 5.0	56.6 $\pm$ 3.8	57.3 $\pm$ 3.6
	28 日目	96.9 $\pm$ 5.7	96.2 $\pm$ 6.3	97.4 $\pm$ 4.8	96.7 $\pm$ 3.8
	42 日目	206.5 $\pm$ 10.9	207.1 $\pm$ 10.1	209.3 $\pm$ 16.6	211.1 $\pm$ 11.4
	56 日目	309.9 $\pm$ 15.4	312.6 $\pm$ 12.7	317.1 $\pm$ 24.1	319.5 $\pm$ 19.6
摂餌量 (g/kg 体重)	生後 28 日目	50.8 $\pm$ 5.0	49.9 $\pm$ 1.2	50.5 $\pm$ 4.1	52.0 $\pm$ 3.4
	42 日目	41.0 $\pm$ 2.9	41.3 $\pm$ 1.4	43.3 $\pm$ 1.5	43.6 $\pm$ 2.4
	56 日目	46.3 $\pm$ 2.0	48.4 $\pm$ 5.3	49.1 $\pm$ 2.4	49.8 $\pm$ 2.9
Prepuital Separation	完了時期 (生後日数)	41.0 $\pm$ 1.6	40.6 $\pm$ 1.3	41.0 $\pm$ 1.1	40.8 $\pm$ 2.3
	完了時体重 (g)	194.4 $\pm$ 13.1	188.1 $\pm$ 16.2	194.9 $\pm$ 13.5	192.4 $\pm$ 17.0

動物数は 1,2,3,4,6,7-HxCN 5 μ g 投与群は 16、他の群は 8。

統計学的有意差は ANOVA+Fisher's PLSD で検定。

表2 生殺時 (生後 62 日目) のオスラットの体重および生殖器・副生殖器重量

	Control	1,2,3,4,6,7-HxCN (/100g 体重)		
		0.05 μ g	0.5 μ g	5 μ g
体重 (g)	345.6 $\pm$ 20.0	349.6 $\pm$ 18.1	356.0 $\pm$ 27.6	352.9 $\pm$ 22.6
精巢 (g)	1.651 $\pm$ 0.085	1.611 $\pm$ 0.082	1.625 $\pm$ 0.135	1.646 $\pm$ 0.085
精巢上体 (g)	0.332 $\pm$ 0.032	0.317 $\pm$ 0.025	0.332 $\pm$ 0.035	0.346 $\pm$ 0.030
前立腺腺葉 (g/100 g 体重)	0.079 $\pm$ 0.009	0.092 $\pm$ 0.017\$	0.096 $\pm$ 0.008\$	0.090 $\pm$ 0.016\$
精囊 (g/100 g 体重)	0.098 $\pm$ 0.005	0.098 $\pm$ 0.007	0.105 $\pm$ 0.104	0.105 $\pm$ 0.017

動物数は 1,2,3,4,6,7-HxCN 5 μ g 投与群は 16、他の群は 8。

統計学的有意差は ANOVA+Fisher's PLSD で検定。\$ p<0.10。

表3 生殺時 (生後 62 日目) のオスラットの精子関連指標値

		Control	1,2,3,4,6,7-HxCN (/100g 体重)		
			0.05 μ g	0.5 μ g	5 μ g
破碎抵抗性精巣精細胞数 (×10 ⁶ /精巣)		132.5±15.1	126.9±11.2	125.5±10.6	135.1±18.6
精巣上体尾部精子数 (×10 ⁶ /尾部)		44.6±12.0	38.0±10.5	45.4±9.5	52.3±15.2
異常精子出現率	%頭部奇形	1.6±0.9	1.8±1.1	1.7±1.5	1.4±1.1
	%尾部奇形	1.6±1.5	1.8±2.2	0.9±0.6	1.6±1.2
	%無尾精子	13.4±13.4	9.8±7.5	16.2±23.6	10.8±8.2
精子運動率	%運動精子	81.3±14.3	78.4±7.4	83.2±6.4	76.6±9.8
	%前進運動精子	59.9±16.8	63.7±18.6	63.2±19.1	61.8±12.8

動物数は 1,2,3,4,6,7-HxCN 5 μ g 投与群は 16、他の群は 8。

統計学的有意差は ANOVA+Fisher's PLSD で検定。

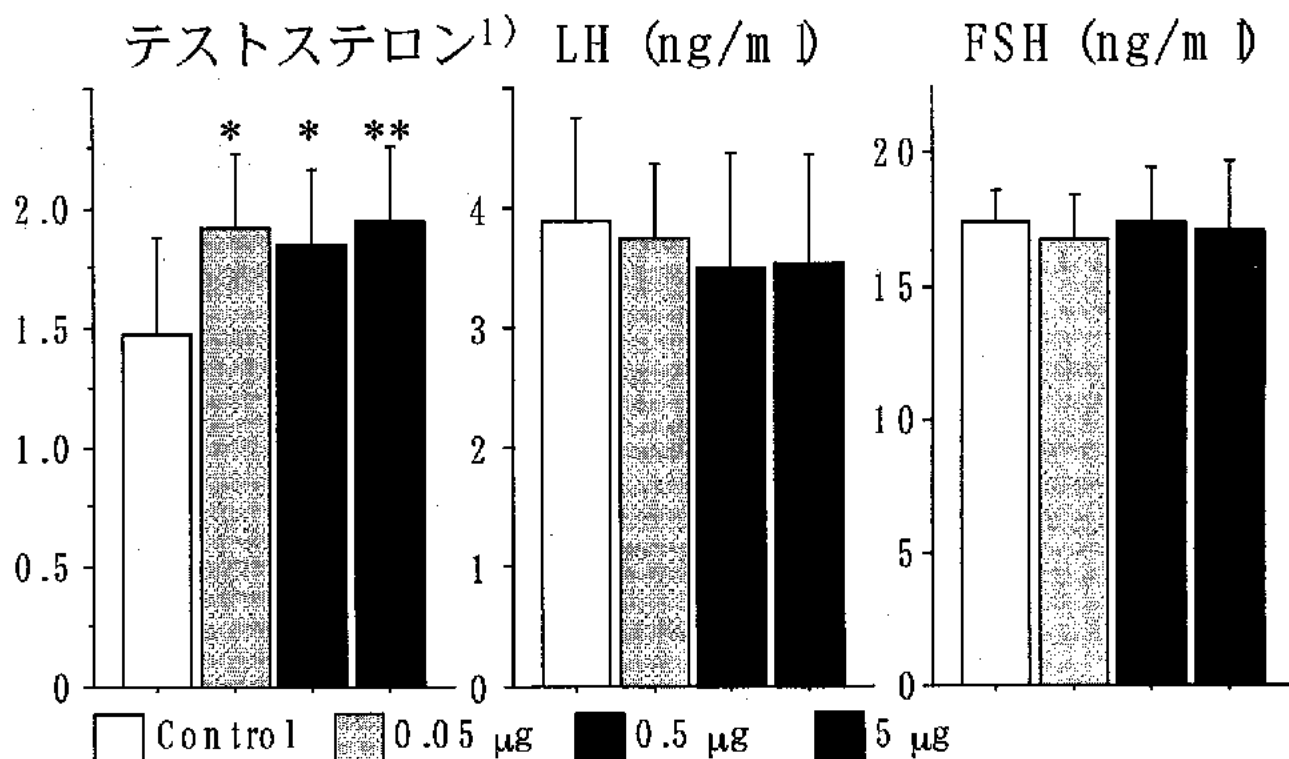


図1 生殺時（生後62日目）のオスラットの血清テストステロンおよびゴナドトロピン濃度
動物数は1,2,3,4,6,7-HxCN 5 µg 投与群は16、他の群は8。統計学的有意差はANOVA+Fisher's PLSDで検定。* p<0.05, ** p<0.01。◇テストステロン濃度（ng/dl）は対数変換値で表示。

表4 メスラットの体重増加、摂餌量、膣開口完了時期・完了時体重

		Control	1,2,3,4,6,7-HxCN (/100g 体重)		
			0.05 μ g	0.5 μ g	5 μ g
体重 (g)	生後 21 日目	55.0 $\pm$ 6.4	51.8 $\pm$ 6.1	53.9 $\pm$ 4.0	52.3 $\pm$ 3.4
	35 日目	124.5 $\pm$ 12.5	125.1 $\pm$ 9.8	128.3 $\pm$ 9.2	124.1 $\pm$ 9.2
	56 日目	202.7 $\pm$ 16.0	201.8 $\pm$ 17.8	210.2 $\pm$ 18.0	203.9 $\pm$ 15.2
	77 日目	241.6 $\pm$ 20.5	242.0 $\pm$ 15.1	251.8 $\pm$ 18.9	244.6 $\pm$ 26.0
摂餌量 (g/kg 体重)	生後 35 日目	25.9 $\pm$ 1.7	26.5 $\pm$ 2.3	26.1 $\pm$ 1.8	29.0 $\pm$ 3.1
	56 日目	30.7 $\pm$ 3.4	32.1 $\pm$ 2.9	33.4 $\pm$ 4.2	35.6 $\pm$ 3.7
	77 日目	33.6 $\pm$ 1.8	33.2 $\pm$ 6.1	36.0 $\pm$ 0.6	35.1 $\pm$ 2.2
膣開口	完了時期 (生後日数)	32.4 $\pm$ 1.8	31.6 $\pm$ 1.8	31.8 $\pm$ 2.0	32.1 $\pm$ 2.4
	完了時体重 (g)	109.8 $\pm$ 15.0	104.9 $\pm$ 12.0	107.8 $\pm$ 11.3	108.7 $\pm$ 18.5

動物数は全群で8。

統計学的有意差はANOVA+Fisher's PLSDで検定。

表5 メスラットの性周期の長さおよび規則性

	Control	1,2,3,4,6,7-HxCN (/100g 体重)		
		0.05 μ g	0.5 μ g	5 μ g
一周期の長さ (日)	4.4 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 0.4	4.3 $\pm$ 0.5	4.9 $\pm$ 2.1
規則的な性周期の割合 (%)	91.7 $\pm$ 15.4	84.4 $\pm$ 35.2	78.3 $\pm$ 31.0	75.0 $\pm$ 35.4

動物数は全群で8。

統計学的有意差はANOVA+Fisher's PLSD で検定。

表6 生殺時 (生後91日目以降の発情期) のメスラットの体重および卵巣・子宮重量

	Control	1,2,3,4,6,7-HxCN (/100g 体重)		
		0.05 μ g	0.5 μ g	5 μ g
体重 (g)	255.4 $\pm$ 24.9	254.8 $\pm$ 14.8	267.5 $\pm$ 25.6	262.2 $\pm$ 30.6
卵巣 (g/100 g 体重)	0.045 $\pm$ 0.012	0.038 $\pm$ 0.007	0.040 $\pm$ 0.007	0.036 $\pm$ 0.005
精巣上体 (g/100 g 体重)	0.206 $\pm$ 0.042	0.214 $\pm$ 0.030	0.176 $\pm$ 0.038	0.188 $\pm$ 0.066

動物数は全群で8。

統計学的有意差はANOVA+Fisher's PLSD で検定。

表7 生殺時 (生後91日目以降の発情期) のメスラットの血清17 β -エストラジオール、LH、FSH濃度

	Control	1,2,3,4,6,7-HxCN (/100g 体重)		
		0.05 μ g	0.5 μ g	5 μ g
17 β -エストラジオール (pg/ml)	12.1 $\pm$ 9.5	8.4 $\pm$ 1.8	7.2 $\pm$ 1.6	15.1 $\pm$ 18.0
LH (ng/ml)	5.7 $\pm$ 2.5	4.9 $\pm$ 1.2	4.3 $\pm$ 1.4	5.0 $\pm$ 1.7
FSH (ng/ml)	16.5 $\pm$ 5.1	14.4 $\pm$ 4.7	15.7 $\pm$ 3.7	16.4 $\pm$ 4.9

動物数は全群で8。

統計学的有意差はANOVA+Fisher's PLSD で検定。

12. メダカに対する内分泌攪乱化学物質の短期暴露に関する研究

研究者 若林明子（東京都環境科学研究所基盤研究部長）

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暴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暴露によるビテロジェニンの誘導について検討し、これらの物質の暴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。

研究協力者

森 真朗 東京都環境科学研究所主任研究員

A. 研究目的

水生生物、特に魚類に対する性ホルモンや内分泌攪乱化学物質の影響が懸念されている。例えば、人畜由来ホルモンや一部の女性ホルモン様物質の暴露によってオスのコイやファットヘッドミノーの血液中にビテロジェニンが誘導されることが報告され、魚の繁殖との関連についての検討が急がれている。そこで、本研究では、メダカ（*Oryzias latipes*）の血液及び肝臓中のビテロジェニン濃度の測定法の確立を第一の目的とした。次いで、開発した測定法を用いて水環境中での検出レベルの高い人畜由来女性ホルモンや数種の化学物質にメダカを短期暴露し、ビテロジェニンの誘導と繁殖率との関係やこれらの物質の暴露濃度と血液や肝臓中のビテロジェニン濃度との関係について検討することを第二の目的とした。

B. 試験方法

ビテロジェニンの測定法の検討

抗メダカビテロジェニンモノクローナル抗体とピオオン標識抗メダカポリクローナル抗体を作製した後、精製メダカビテロジェニンはメダカ腹水

から調製した。これらを用いてビテロジェニンの測定法を検討した。

メダカへの物質の暴露

メダカ成魚に17βエストラジオール（E2）、エストロン、エストリオール、4-ノニルフェノール（NP）及びビスフェノールA（BPA）を4日、1週間又は2週間暴露した。暴露時の希釈水は活性炭処理した水道水を用い、物質はアセトンに溶解後希釈水に溶解した。その際のアセトン溶液の濃度は100mg/l以下とし、対照水にもアセトンを加えた。暴露は半止水式で行い、暴露水は原則として毎日交換したが、1回目の2週間暴露では2日に1回交換した。水温は24±1℃、光周期は16時間明、8時間暗条件とし、餌は水交換の1～2時間前にテトラミンを与えた。暴露後メダカを氷を用いて麻酔状態に保って、尾の付根付近の動／静脈血と肝臓を採取し、今回開発した手法でそれぞれのビテロジェニン濃度を測定した。

（倫理面での配慮）

試験に用いるメダカは必要最小限の数とした。暴露終了後、麻酔状態に保って採血及び解剖を行い、薬剤で安楽死させた後に土中に埋葬した。

C. 結果と考察

ビテロジェニンの測定

血液及び肝臓中のピテロジェニン濃度の測定は下記の方法で測定可能であった。まず、抗メダカピテロジェニンモノクローナル抗体を固相化ブロッキングした ELISA プレートに、各濃度に希釈した精製メダカピテロジェニン及び測定検体の血清又は肝臓に PBS-Tween-BSA を加えてホモジネートした上清を添加し、2 時間固相化抗体と反応させた。その後、ビオチン標識抗メダカ抗体を添加し 1 時間反応させた。洗浄後、HRP 標識ストレプトアビジンと 1 時間反応させた。最後に、オルトフェニレンジアミン溶液と 5 分間反応させ、硫酸溶液で反応を停止し、490nm の吸光度を測定し、標準曲線からメダカ血清中のピテロジェニン濃度を算出した。任意に希釈したピテロジェニン陰性血清に精製ピテロジェニンを添加して回収率を求める方法で求めた検出下限は血清では $20 \mu\text{g/ml}$ 、肝臓抽出液では $0.04 \mu\text{g/ml}$ (肝重量が 4mg とすると $0.002 \mu\text{g/mg}$) であった。

オスメダカでのピテロジェニンの誘導と繁殖能力との関係

血清中のピテロジェニン濃度は対照のメスでは $1100 \sim 83000 \mu\text{g/ml}$ であったのに対して、オスでは全て $20 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。

E 2 に 2 週間暴露したオスでは、 0.01nmol/l 群では $20 \mu\text{g/ml}$ 以下、 0.03nmol/l 群では $<20 \sim 400 \mu\text{g/ml}$ 、 0.1 nmol/l 群では $<20 \sim 16000 \mu\text{g/ml}$ 、 1 nmol/l 群で $16000 \sim 500000 \mu\text{g/ml}$ 、 10nmol/l 群で $100000 \sim 240000 \mu\text{g/ml}$ 、 100nmol/l 群で $60000 \sim 88000 \mu\text{g/ml}$ であった (図 1～5)。

また、BPA $10 \mu\text{mol/l}$ 暴露群では、1 例を除いて $26000 \sim 110000 \mu\text{g/ml}$ 、NP $0.3 \mu\text{mol/l}$ 暴露群では $327 \sim 31600 \mu\text{g/ml}$ であった (図 6)。

我々が行った成熟メダカへの性ホルモンや内分泌攪乱作用が疑われる化学物質の繁殖に及ぼす影響を調べる試験では、オスのみを 2 週間 E2 に暴露し、その後メスと一緒にして産卵数や孵化率を調べた。その試験での影響濃度を今回の結果と比較すると、他の魚種での試験と同様に、ピテロジェニンは繁殖に影響の出る濃度に比較して非常に低い濃度で誘導が見られ、感度の高い指標であることが実証できた。対照に比較して繁殖に有意の差が見られた 3 nmol/l 暴露群でのピテロジェニン濃度は平均で $10000 \mu\text{g/ml}$ 以上であり、メスでのレベルに近いピテロジェニン濃度であっ

た。また、繁殖に有意の差が見られた BPA $10 \mu\text{mol/l}$ 暴露群でもメスと同様のレベルのピテロジェニンが血液中被見られた。しかし、孵化率が対照に比較して減少したものの、有意の差は見られなかった NP 暴露群のメダカのピテロジェニン濃度は平均で $1000 \mu\text{g/ml}$ 程度であった。

このように、我々が前回行った繁殖試験で影響の現われた濃度レベルで暴露されたオスのメダカの血清中のピテロジェニン濃度は対照に比較して著しい上昇が見られた。

女性ホルモンの暴露濃度とオスでのピテロジェニンの誘導

E 2 では、繁殖に影響の見られなかった 0.03nmol/l に 2 週間暴露したメダカの血液中でピテロジェニンは有意に誘導され、 1nmol/l まで暴露濃度に従って上昇した。1週間暴露でピテロジェニンの誘導が見られた最低暴露濃度は、 0.1nmol/l であった。また、4日暴露では 0.1 nmol/l 暴露群でピテロジェニンの上昇が見られた。2週間暴露で有意のピテロジェニン上昇の見られた濃度は E 2 約 10ng/l に相当し、わが国の汚染された水域で測定される濃度レベルであり、下水処理水のみではなく、環境水の評価に本試験が適用できることが示唆された。

なお、予備試験的に行った都内の下水処理場の処理水に同様の条件で 1 週間暴露したオスメダカで 6 尾中 2 尾に検出限界上のピテロジェニンが検出された。

また、エストロンでは 0.3nmol/l 、エストリオールでは 2.5nmol/l から、これらの女性ホルモンに 1 週間暴露したメダカの血液中で、対照に比べてピテロジェニンの有意な誘導が見られた (図 5)。

このように、E 2 に比較してエストロンは約 10 倍、エストリオールでは約 100 倍の濃度でピテロジェニンが誘導された (図 6)。

化学物質の暴露とメスメダカ血液中ピテロジェニン濃度の関係

NP では $0.3 \mu\text{mol/l}$ 暴露群で、BPA では $3 \mu\text{mol/l}$ 暴露群でピテロジェニンの有意な誘導が見られた (図 6)。これらの濃度は E 2 に比較してそれぞれ約 10000 倍、100000 倍濃度が高かった。すなわち、これらの化学物質は、内分泌を攪乱する可能性が強いものの、その作用は天然のホルモ

ンに比較して非常に弱いものであることが分かった。

肝臓中のピテロジェニン濃度も血液中の濃度とほぼ同じような傾向が見られた。

女性ホルモンの暴露濃度と血液及び肝臓中のピテロジェニン濃度の関係

肝臓中のピテロジェニン濃度と血液中のピテロジェニン濃度の間にはある程度の相関があり、相関係数は約0.45であった(図7)。そのため、血液あるいは肝臓の一方の試料についてピテロジェニンを測定することにより、メダカへの女性ホルモンの影響を評価できる。

暴露期間毎の相関係数を比較して見ると、2週間暴露より1週間暴露で相関係数は高く、4日暴露で最も相関係数は高かった。

男性ホルモンの暴露とメスメダカ血液中ピテロジェニン濃度の関係

男性ホルモンであるテストステロンを暴露したメスメダカでは、ピテロジェニンの誘導の抑制が期待された。しかし、予想に反してテストステロン濃度の上昇に従って、上昇の度合いは、女性ホルモンの暴露されたオスメダカに比較して小さい

ものの、血液中ピテロジェニンは上昇した(図8)。

D. 結論

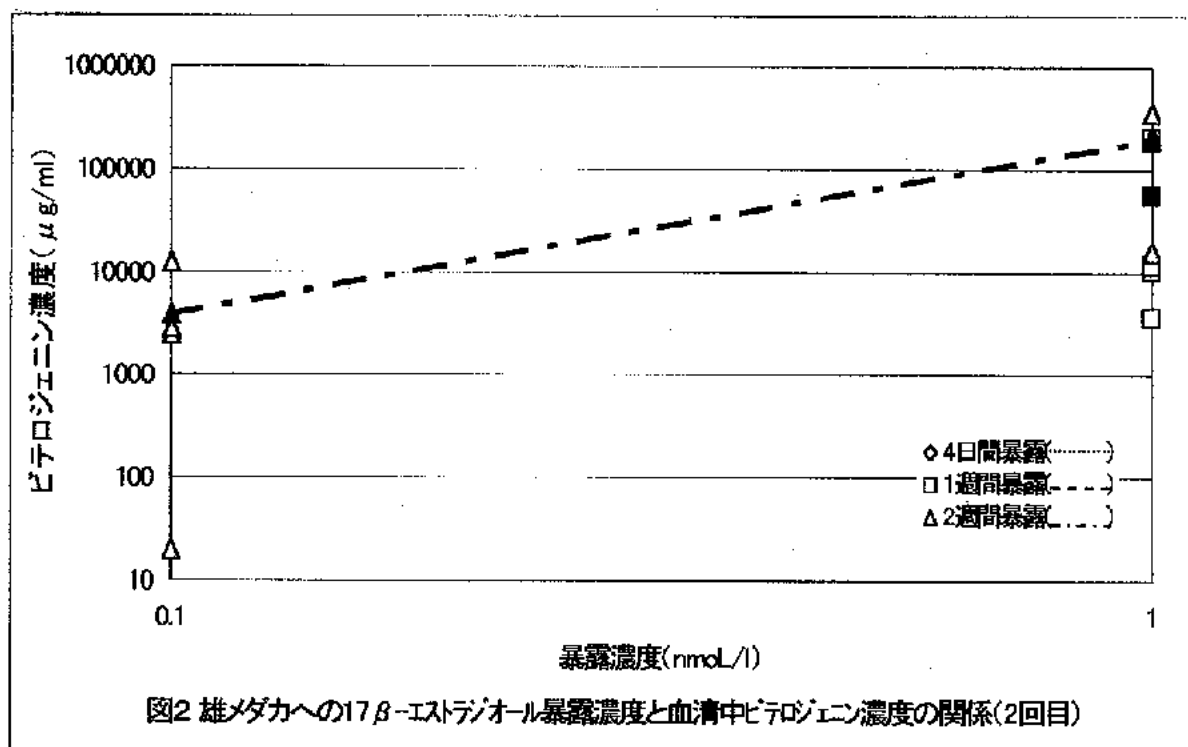
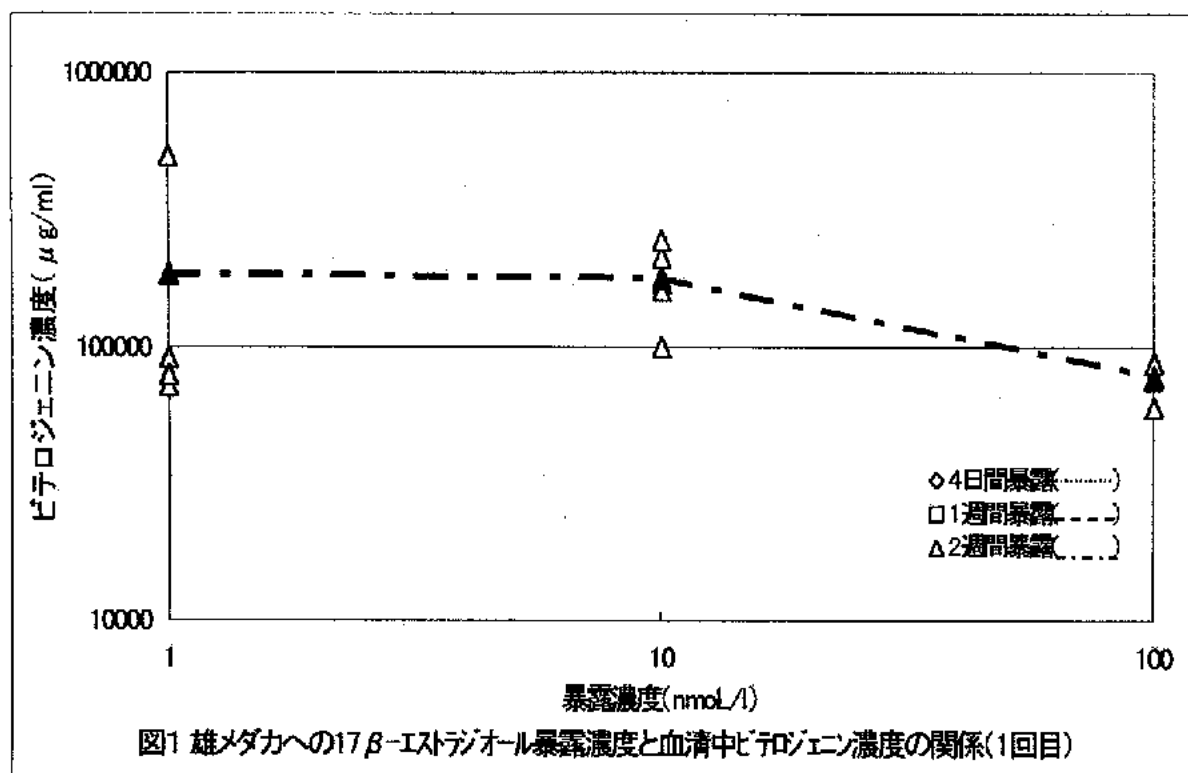
メダカの血液及び肝臓中ピテロジェニンの濃度測定法を開発し、その方法を用いて性ホルモンなどに暴露してメダカ中のピテロジェニン濃度を測定し、ホルモンなどの暴露とピテロジェニンの誘導の関係を明らかにした。

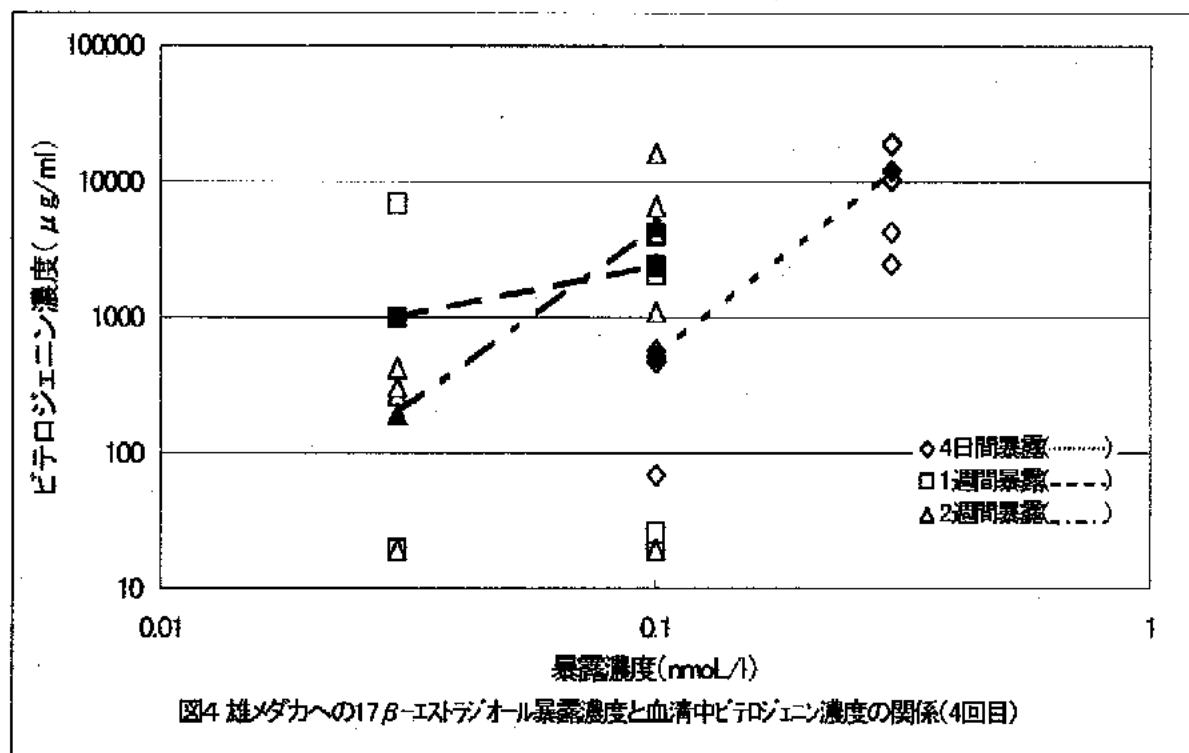
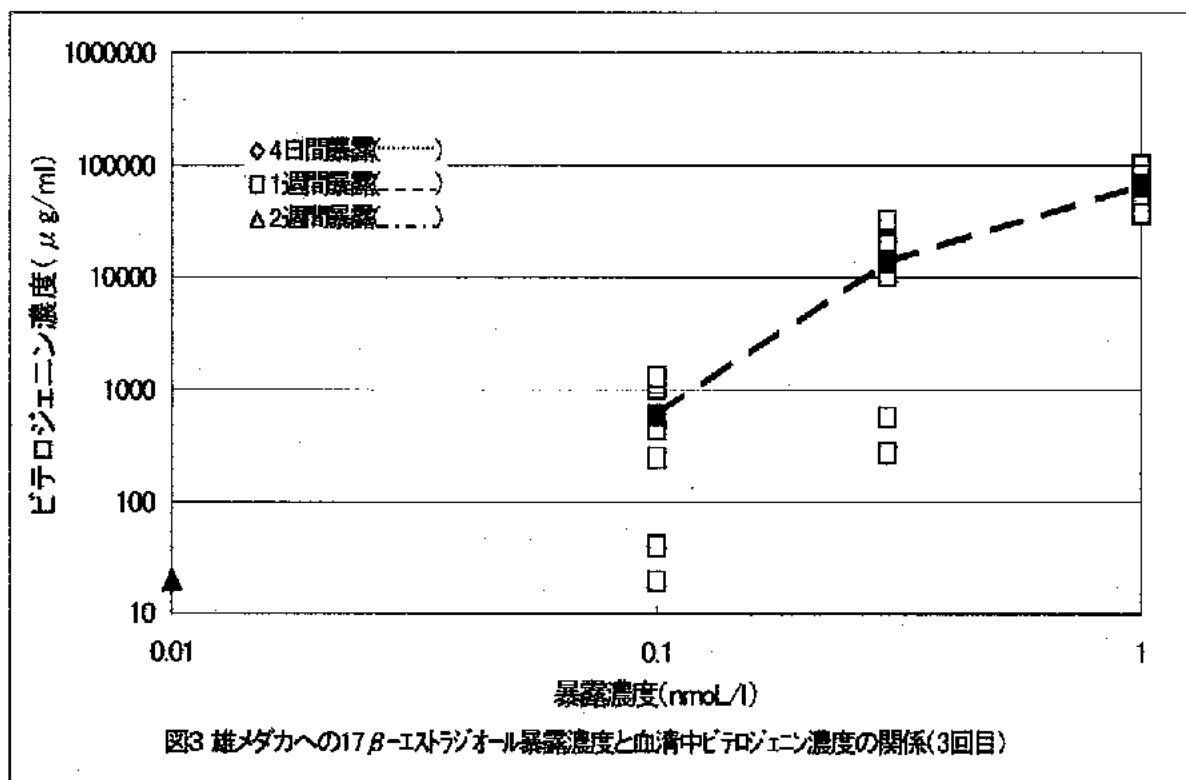
E. 研究発表

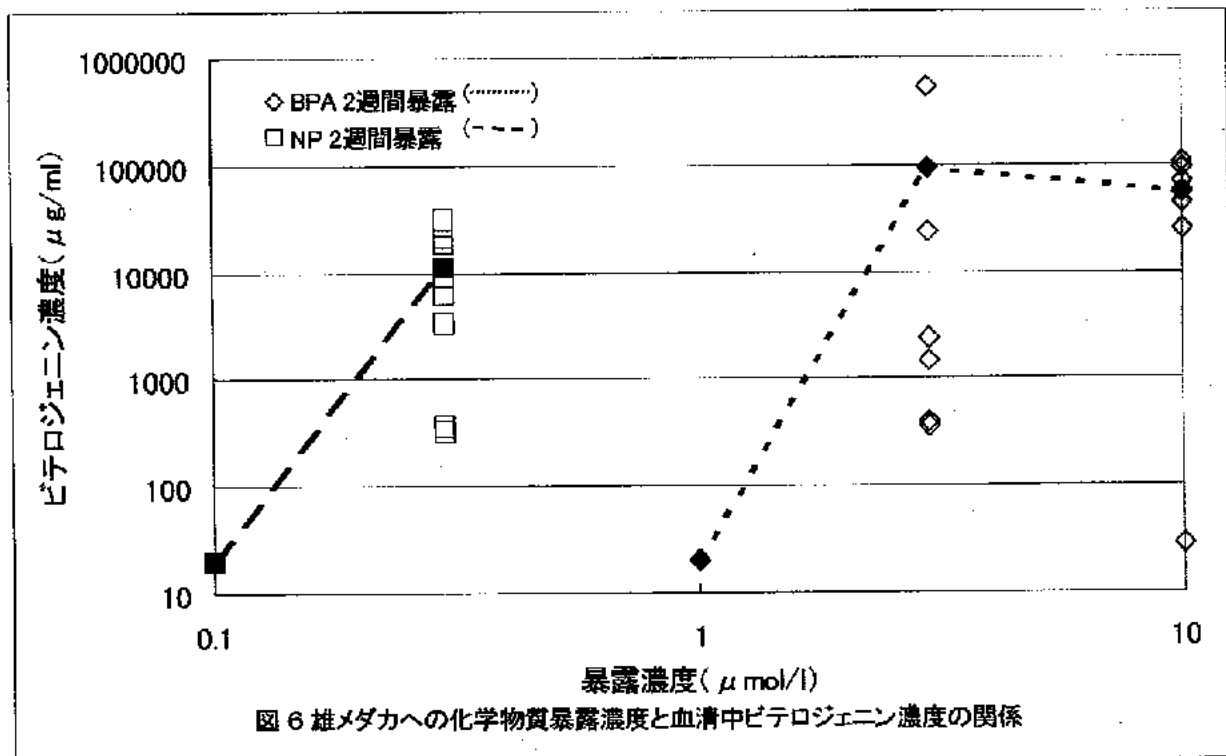
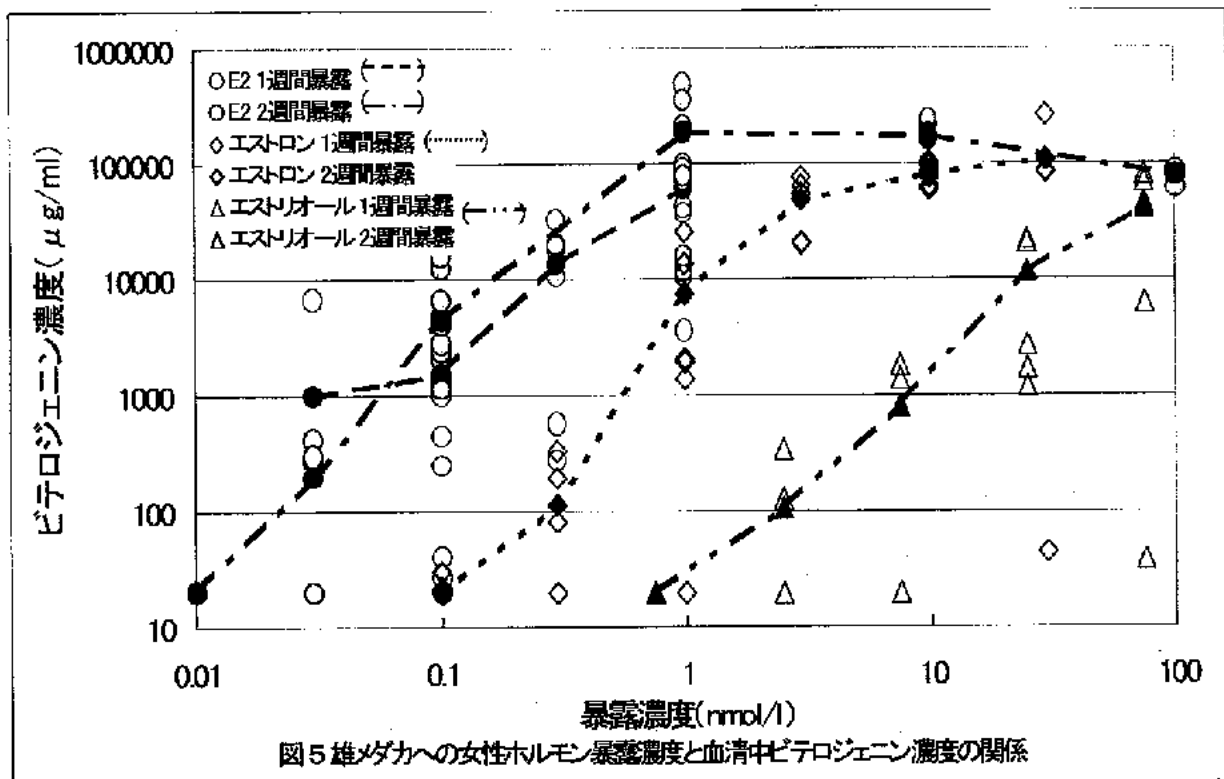
若林明子、中野菜穂子：メダカの性ホルモンの暴露によるピテロジェニンの誘導、第35回日本水環境学会年会、2001年3月、岐阜

G. 参考文献

1. Shioda, T., Wakabayashi, M.: Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*), *Chemosphere*, 239-243 (2000)
2. Shioda, T., Wakabayashi, M.: Evaluation of reproductivity of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to chemicals using 2-week reproduction test, *Water Sci. Technol.* 42, 53-60(2000)







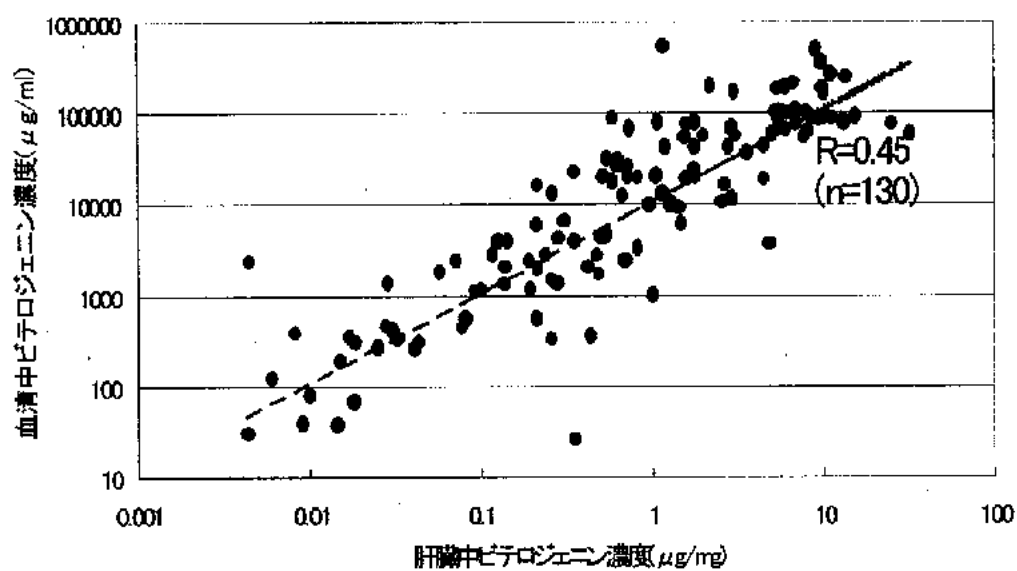


図7 血清中と肝臓中のビテロジェニン濃度の相関

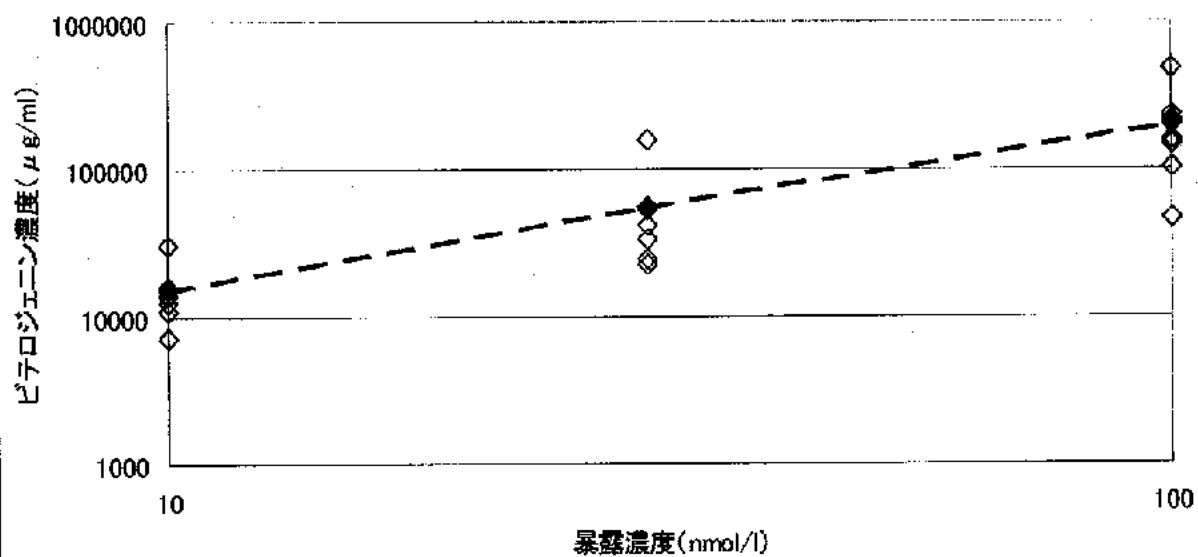


図8 雌メダカへのテストステロン暴露濃度と血清中ビテロジェニン濃度の関係

Research on short term exposure of endocrine-disrupting chemical on medaka(*Olyzias latipes*)

Meiko Wakabayashi, Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection

Abstract

Influence on fishes by natural hormones and endocrine-disrupting chemicals has been concerned. Therefore, it is necessary to establish the test method to examine the influence on fishes with these materials. In this research, medaka was exposed to these materials for a short term and influence of the exposure was examined by induction of vitellogenin in blood and liver. First, analytical method of vitellogenin in blood and liver of medaka was developed. Next, induction of vitellogenin by the short term exposure of sex-hormones or endocrine disrupting chemicals on medaka was examined by using the method developed in this study and the relationship between the induction level of vitellogenin and the exposure concentration of hormone was compared. Materials and methods used in this study is considered to be applicable for screening test methods of endocrine disrupting chemicals.

1.3. 環境生物の免疫影響に関する研究

小林 隆弘 (国立環境研究所 環境健康部)
菊池 慎 (千葉大学海洋バイオシステムセンター)
小宮山 一雄 (日本人学歯学部病理)
高橋 慎司 (国立環境研究所 地域環境研究グループ)
平野 靖史郎 (国立環境研究所 地域環境研究グループ)
古田 恵美子 (獨協医科大学)
吉田 貴彦 (旭川医科大学)
和合 治久 (埼玉医科大学短期大学)

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 $\text{TNF}\alpha$ 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 CD4low 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、マクロファージの食食能、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。マクロファージの食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 の食細胞の食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・対照群ともにエリプソイド (莢動脈) 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 , 5×10^3 , 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、 5×10^3 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 (cytochrome P450)、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 のミミズ皮膚への暴露後、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、 $1\text{ng}/20\text{g}$ 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。

研究協力者

Edwin Cooper (南カリフォルニア大学医学部)	遠藤 直紀 (筑波大学医科学)
岡上 真裕 (日本大学歯学部)	小山 卓美 (家畜衛生試験場)
清水 佐良子 (東京大学生命科学研究科)	菅谷 芳雄 (国立環境研究所地域環境研究グループ)
瀬尾 直美 (東京医科大学生物学)	間中 研一 (獨協医科大学医学総合研究所)
三浦 克洋 (家畜衛生試験場)	山口 恵一郎 (獨協医科大学医学総合研究所)
中村 弘明 (東京歯科大学生物学)	

A. 研究目的

多環式芳香族化合物(PAH)の一つであり、有害環境汚染物質であるベンゾ[a]ピレン(BaP)は大気、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 α やIL-1の産生を低下させることなどが報告されている。また、海域において二枚貝であるアコヤガイやカキなどの大量斃死があり、大量斃死では原虫、細菌、ウイルス、などの微生物の感染が確認されているが、このような多くの微生物に対する易感染性が起こる場合、高等動物では日和見感染と言いつい生体の防御能の低下が基礎にある場合が多い。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。しかしながら、BaP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が、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以下を指標として検討した。

マウス 新生仔における胸腺細胞への影響

ウズラ 免疫細胞(マクロファージ、TおよびB細胞)の活性、感染抵抗性への影響

金魚 腹腔内投与が腎臓、脾臓など免疫関連器官の組織および体腔に注入されたカーボン粒の、腎臓、脾臓への取込みへの影響

アコヤガイ 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、食作用、凝集素価への影響を検討した。

ナメクジ 短期間曝露による体表粘液の粘性、体液中マクロファージの貪食能への影響を検討した。

ミミズ 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こと、および環境汚染物質の細

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の分子病理学的検討。

カイコ 経皮投与が血球のカイネティクス、食作用、メラニン色素形成、抗菌活性並びにレクチン活性への影響を及ぼすかの解析。

B. 研究方法

1) マウスの免疫機能におよぼす影響

・動物および投与方法 9週齢の雌雄BALB/cを交配させて新生仔を得た。出生した日を1日目とし、7日目まで雌親に対して1日1回10または100mg/kg・dayのBaPをip.投与し母乳を介して薬物を仔に作用させた。対照群はOlive oilのみを投与し、7日目の新生仔の胸腺細胞を表面抗原解析に用いた。

・細胞表面抗原の解析 表面抗原の解析にはFACSscaliburを使用した。1 $\times$ 10⁶cells/mLの胸腺細胞懸濁液にCD4標識、CD8標識及びCD25標識の細胞表面抗原標識用マウス抗体を使用した。

2) 鳥類の免疫機能におよぼす影響

・動物 選抜54世代の♂・♀計62羽二ホンウズラの近交系(NIES-L₂系)を用いた。

・BaP投与 : 100mg/ml/kg, 30mg/ml/kg, 10mg/ml/kg および 0mg/ml/kg (対照群)のBaPを投与し免疫細胞の活性および感染抵抗性を検討した。

・BaPによるT, B細胞活性への影響 2回目のBaP投与から5日目に採血をおこなった。Percollを用いた密度勾配遠心にて、末梢血からリンパ球を分離し、RPMI培地(10% FCS添加)に懸濁した。無刺激あるいはConA(最終濃度1 μ g/ml, 10 μ g/ml)またはLPS(最終濃度5 μ g/ml, 10 μ g/ml)刺激したリンパ球を、5% CO₂インキュベーターにて39℃、2日間培養後細胞増殖をCell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) kitを使用し測定した。

・BaPによる抗体産生能への影響 2回目の

BaP 投与から 5 日目に 40% SRBC 100ul/羽を 3 日間隔で、2 回続けて静脈内投与して免疫をおこなった。2 回目の免疫から 5 日目に採血をおこない、得られた血液を遠心し、血漿を分離し補体の非動化処理 (56℃, 30 分インキュベーション) をおこなった。96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに希釈液 (0.05% BSA/PBS) を添加後、各血漿を連続的に段階希釈をおこなった。そこへ、2% SRBC を各ウェルに添加し振とう混和後、プレートを加湿チャンバー内にて 37℃、90 分インキュベーションをおこない、赤血球凝集力価より抗体価の測定をおこなった (抗体価は $\log_2$ で表す)

・BaP によるマクロファージ貪食能への影響
2 回目の BaP 投与から 5 日目に 3% チオグリコレート培地を腹腔内投与し、それから 4 日目に誘導された腹腔マクロファージを回収した。採取した腹腔液の洗浄・遠心を繰り返し得られた細胞の数を血球計算盤にて算定した。細胞を RPMI 培地 (10% FCS 添加) に懸濁し、カバーグラスを敷いたプラスチックシャーレにマクロファージ数 4×10^5 cells/シャーレずつ添加し、5% CO_2 インキュベーターにて 39℃、2 時間培養した。インキュベート後、PBS でシャーレを洗浄し非付着細胞を除去し、新たに RPMI 培地を加えて一晚培養した。2 日目に、再度シャーレを PBS で洗浄後、蛍光ラテックスビーズ (10um) を浮遊させた RPMI 培地 (1×10^6 ビーズ/シャーレ) を添加し、5% CO_2 インキュベーターにて 39℃、3 時間培養した。シャーレを洗浄後、顕微鏡下でカバーグラスに付着した細胞をランダムに 200 個数え貪食したマクロファージの割合 (貪食率)、程度 (貪食度) を算定した。

・BaP 投与後のラウス肉腫 (RSV) 抵抗力の比較 (BaP 投与群 (20mg/ml/kg のみ) 各群、全てゾンデにて食道内投与を 3 日間隔で続けて 2 回おこなった。2 回目の BaP 投与から 8 日目に RSV または PBS を左右の翼下皮内 (wing web) に接種し、肉腫の肥大化と退化を測定した。最終的には、死亡率の有意性を検定する。RSV は、

PBS で 30,000FFU (focus forming units)/ml となるように調整し、各左右に 100ul (3,000FFU 相当) を接種した。

3) 金魚の免疫機能におよぼす影響

金魚 (当歳魚 Body Weight, BW 10-14g) の腹腔内に corn oil に溶かした BaP 100 mg/kg, 30 mg/kg, 0mg/kg を各群 3 匹に注射した。

実験 1 では 7 日後に、実験 2 では 7 日後にさらに生理食塩水 100 倍希釈 Indian ink (0.04ml/gBW) を腹腔内注射し、その 3 日後 (BaP 注射から 10 日後) に、金魚を解剖し、リンパ器官 (脾臓、腎臓、肝臓、胸腺など) を摘出、4% パラフォルムアルデヒド (0.1M リン酸緩衝液, pH7.2) で 7-8 時間固定、洗浄、水溶性樹脂 (JB-4) で包埋、組織切片 (2-3 μm 厚) 作製、スライドガラスに伸展貼付、ベルオキシダーゼ染色; ジアミノベンチジン (DAB) 反応液に浸漬、ヘマトキシリン核染色、封入、光顕で観察した。

4) アコヤガイの免疫機能におよぼす影響

・アコヤガイ 長崎県壱岐郡の日本産真珠母貝 (3 年輪) のアコヤガイを用いた。7 日間の馴化飼育を行い、輸送によるダメージを受けた個体を排除した。対照群 1 1、低濃度曝露群 1 1、高濃度曝露群 1 2 貝で実験を開始した。

・飼育海水 飼育海水は、人工海水「マリンアートハイ」を用時に適量のチオ硫酸ナトリウムにて塩素を中和した水道水にて作成し用いた。水温は馴化期間および有害物質曝露期間をとおして 20~21℃で行った。

・飼育および BaP 曝露 飼育は 20 リットル、ステンレス製水槽中にて無給餌で行った。BaP を DMSO に溶解し海水中に溶解し曝露を行った。DMSO 最終濃度は 0.01% であり、対照群にも同濃度の DMSO のみを溶解した。BaP 曝露濃度は低濃度群 5 ppm、高濃度群 50 ppm とし、14 日間曝露を行った。飼育海水は 2 日おきに交換した。

・貝の採血と処置 曝露終了後、開口器にて開口し閉殻筋を露出させ、綿棒にて海水、体表面の粘液等を清拭し、27G 針を装着したツベル

クリンシリンジにて採血した。採血後、血球を均一化し各種の検索に用いた。採血後の貝は閉殻筋を殻より離断し、体表面の肉眼的観察を行った後、各群から3貝ずつホルマリン固定し病理標本として保存した。

・免疫学的検索事項

a) 血リンパ球遊走能の測定 30 分間、室温 (20℃) の培養中に、10%大腸菌培養濾液を遊走誘因物質として、ポアサイズ5マイクロメートルのニトロセルロース・フィルター中を移動した距離を測定して、当該アコヤ貝の30分当たりの血リンパ球遊走距離とし血リンパ球遊走能を評価する。計測にはヘマトキシリン染色した細胞核を顕微鏡にて400倍率で観察した。

b) 総血リンパ球数の測定 人工海水にて2倍に希釈後、チュルク液を等量混合し染色の上、100倍率にて血算板の大視野について顕微鏡で計測した。

c) NBT還元能の測定 人工海水にて2倍に希釈した血リンパ液をシランコート・スライドガラス上に塗布して、人工海水にて3倍希釈した0.1%NBT (nitroblue tetrazolium) -PBSを3倍量添加混合の上、遮光・湿潤したボックス内にて室温 (20度) で5時間培養した。培養後に顕微鏡下に青染した細胞を顕微鏡にて400倍率で観察しNBT還元能陽性細胞と判定し全体の細胞に対する比率を計測した。

d) 血球分画の測定 シランコート・スライドガラス上に人工海水にて2倍希釈した血リンパ液を塗布し2.5%ホルムアルデヒドで固定後、エタノールにて脱水、風乾した血リンパ球塗沫標本につきメイ・ギムザ染色を行い、顆粒球と無顆粒球を顕微鏡にて400倍率で観察し計測した。

e) 食作用の観察 人工海水にて2倍希釈した血リンパ液をシランコート・スライドガラス上に塗布し、人工海水にて4倍に希釈したりチウムカルミン液を3倍量添加混和のうえ、湿潤したボックス内にて室温 (20℃) で3時間培養した。培養後、2.5%ホルムアルデヒド海水液で細胞を固定後、エタノールにて脱水、風乾し、

リチウムカルミン粒子を貪食しピンク色を呈する細胞を顕微鏡にて400倍率で観察し、貪食能を有する細胞と判定し全細胞に占める比率を計測した。

f) 凝集素価の測定 2倍希釈血リンパ液から分離した希釈血清につき、96穴丸底マイクロプレートにて人工海水にて2段階希釈系列を作成し生理食塩水で調整した同容量の0.5%保存ヒツジ赤血球 (SRBC) を凝集対象血球として用い、SRBCが凝集し沈降リングが形成されない最大の血清希釈倍率をもって、その個体の凝集素価として計測した。

5) ナメクジの免疫機能におよぼす影響

・実験動物 福岡県八女市にて採集した、陸棲軟体動物フツウナメクジ (*Incilaria bilineata*) を使用した。実験開始時の体重は $1.0 \pm 0.2g$ であった。

・曝露剤 BaP濃度がそれぞれ 10^1 , 10^2 , 10^3 , 5×10^3 , $10^4 ppm$ になるように、99.5%アセトンに溶かして、5段階の曝露剤を調製し、それぞれをペーパータオルに染み込ませた後、真空ポンプにてアセトンを吸引して乾燥させた。この方法により、一定濃度のBaPが乾燥したペーパータオルに均等に付着した。

・曝露方法 内径125 mm、深さ50 mmのすり合わせ蓋付シャーレの中をBaPが付着したペーパータオルを敷きつめた。各シャーレに3個体のナメクジを移し、さらに細切ペーパータオルで覆い、汲置き水道水を霧吹きでペーパータオルを湿らせて飼育を行った。BaP濃度が 10^1 , 10^2 , $10^3 ppm$ については、10日間、 5×10^3 , $10^4 ppm$ については5日間を曝露期間とした。

・貪食能測定 一定期間飼育後、ナメクジを $100 \times 70 mm$ のファスナー付ポリ袋に入れ、 CO_2 を充満させて、7-10分間 CO_2 麻酔を行った。ナメクジから体液を採取し、カバーガラスに滴下後、BSSで2%にしたヒツジ赤血球を加えて0.05%になるようにした。1時間静置後、乾燥、メタノール固定、ギムザ染色を経て観察した。

5) ミミズ (*E. fetida*) の免疫機能におよぼす

影響

飼育容器内で人工土壤中に一定濃度のBaP、ジメチルベンゾアントラセン (DMBA) を混入し、5日間、暴露する。(BaP;100pg-100ng/20g) (DMBA;100ng-100mg/20g)

曝露したミミズから coelomocytes を分離 および組織を採取。

組織材料を免疫組織化学的手法により検索 (cytochromeP450, HSP60, 90, 70)

coelomocytes の免疫機能検索 (蛍光ビーズ食能およびH2O2 活性を FACS で測定、NK 活性を chromium release 法で測定)。

6) カイコの免疫機能におよぼす影響

・ベンゾピレン (BaP) の経皮投与法 人工飼料を用いて約22℃で育てたカイコ (*Bombyx mori*, J106 X DAIZO strain)の終齢幼虫 (5齢) 並びに前蛹2日目の個体 (抗菌活性とレクチン活性が誘導される発生段階) を使用した。BaP をアセトンに0.1%になるように溶解し、カイコ終齢幼虫の1日目から6日間にわたり1日1回、背側皮膚に絵筆を用いて塗布した。また1回のBaP 暴露実験では終齢4日目の幼虫を使用し同様にBaP を塗布した。なお、塗布対照群としてアセトンだけの経皮投与を同様に行った。

・総血球数及び血球比の測定 総血球数はカイコ幼虫の尾角を切除して得られる最初の体液を2滴採取し、タタイ式血球計算盤を用いて直接カウントした。また、血球比については、この血球計算盤で観察される顆粒細胞 (球状で細胞内顆粒があり糸状突起を有する血球) とプラズマ細胞 (採血後約2分間以内は紡錘形をしている血球) の占める割合を、全部で300個の血球を観察して調べた。

・食食活性の測定 0.5%のヒツジ赤血球浮遊液をリン酸緩衝食塩液 (PBS, pH7.2) で作製しこれを第1腹脚の符節より後部側の体腔内に注入した後、注入部位をワックスで封じた。60分後に尾角を切除して体液を10mM のフェニルチオウレアの入ったカイコ用生理的食塩水 (150mM NaCl, 5mM KCl) に採取して、プリリアントクレ

ジルブルー染色して、食食率を観察した。全部で300個の顆粒細胞をカウントして、ヒツジ赤血球を1個以上取り込んでいる顆粒細胞を食食陽性細胞とカウントした。

・メラニン形成の観察 終齢6日目のカイコ幼虫より尾角を切除して得られる体液を1.5ml 用マイクロチューブに採取して2000回転5分間遠心後、その5μlを0.5%ドーパを含む1.2%アガロースゲル (昆虫生理的食塩水で作製) のウェルに添加して黒色のメラニン色素の形成を室温で24時間放置後に観察した。

・抗菌活性の測定 セエリプロテアーゼ阻害剤結晶を用いて前蛹2日目のカイコより得られた体液20μlと普通ブイヨンを用いて1晩37℃で培養した大腸菌浮遊液20μlをマイクロチューブに入れて混合し、37℃で60分インキュベートした。その後、普通寒天培地を用いて混合希釈培養を37℃で24時間行い、生じた大腸菌コロニーをカウントした。

・レクチン活性の測定 前蛹2日目のカイコより得られた体液中のヒトO型赤血球に対するレクチン活性を凝集反応によって調べるため、0.5%ヒトO型赤血球浮遊液をPBSで作製し、U底型96穴マイクロプレートを用いて体液を2倍階段希釈した後、赤血球浮遊液を加えて凝集力価を室温2時間後に観察した。

・生体外での血球の形態観察 終齢4日目の正常カイコ幼虫の体液をフェニルチオウレア含有生理的食塩水に採取した後、乾燥を防止しながら、30分間氷冷下でスライドガラス上に血球を付着させた。上清を捨て2回昆虫生理的食塩水で洗浄し、BaP液を添加して22℃で60分間インキュベートした。その後ギムザ染色して血球形態を光学顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

1) マウスの免疫機能におよぼす影響 BaPを低用量で投与した新生児の体重、胸腺の体重比、胸腺細胞の胸腺重量比の変化については体

重、胸腺の体重比いずれもあまり変化は見られなかった。一方で胸腺細胞の胸腺重量比は有意な増加が見られた(図1)。投与量を増やすと体重に有意な減少が見られた。胸腺細胞の胸腺重量比について有意な増加が見られた(図2)。CD4CD8の発現は、10mg/kg BaP投与のマウスにおいて、CD4+CD8-及びCD4+CD8+ T細胞の割合に増加傾向が見られたが有意な差には至らなかった。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。100mg/kgのBaPを投与群では有意な影響は見られなかった。

CD4CD25抗原のT細胞の発現については10mg/kg BaP投与したマウスではCD4+CD25+サブセットのCD4^{high}およびCD4^{low}の領域は減少傾向が見られた(図3)。100mg/kg BaP投与群ではCD4+CD25+サブセットのCD4^{low}の領域において有意な減少が見られた。highの領域には変化は見られなかった(図4)。

2) ウズラの免疫機能におよぼす影響

・BaPに対するT、B-細胞活性の変化 BaP(0, 10, 30, 100 mg/kg)投与後のCon AおよびLPSに対するウズラリンパ球のMitogen活性を検討した。Con Aに対するMitogen活性は、1ug/ml添加では対照群(無刺激)と同じとなり活性化されなかったが、10ug/ml添加では10および30 mg/kg投与群で有意な刺激効果(stimulation index = 1.5~2.5)が得られた($p < 0.05$) (図5)。この刺激効果(S.I.)を、BaP濃度別に比較すると10>30>100 mg/kgの順となり、量反的に抑制されることが示唆された。すなわち、BaP投与によりT-細胞活性は抑制されることが示唆された。

一方、LPSに対するS.I.は、BaP投与群が5および10 ug/ml添加区とも有意に上昇した(S.I. = 1.5~2.5, $p < 0.05$)。これを、BaP濃度別に比較すると10および100 mg/kg投与群での刺激効果は高いものの、30 mg/kg投与群では、逆に

S.I.が低下したため、量依存的な反応性は有意なものではなかった(図5)。以上のことから、BaPに対しては、T-細胞活性が低下し、B-細胞活性は上昇する傾向にあることが示唆された。

・BaPに対する抗体産生能への影響 図6はBaPのSRBCに対する抗体産生能への影響を示している。抗体産生能(SRBC-HA価, log₂)は、対照群:6.8±1.6(5羽)・10 mg/kg投与群:6.8±1.6(5羽)・30 mg/kg投与群:7.0±3.0(5羽)・100 mg/kg投与群:6.0±2.9(5羽)となり、何れも有意性は認められなかった。しかしながら、30および100 mg/kg投与群では各1羽にSRBC-HA力価が低い個体(共に2以下)が認められた。この現象は、抗体産生能に攪乱を起こしたという可能性も否定できないので、現在確認をおこなっている。

・マクロファージの食食能 図7はBaPがマクロファージの食食能に及ぼす影響について示している。ピーズの食食率は、BaP投与量に依存して低下し、有意な量反応曲線が得られた。以上より、マクロファージ活性は、BaP投与量に従って抑制されることが示唆された。

・ラウス肉腫(RSV)に対する抵抗力の比較 BaP 30 mg/kg投与下においては、ラウス肉腫の形成時期や肥大化の速度および退化の速度を指標として抵抗力を比較したところ、両群の間で有意な差は見られなかった(図8)。

3) 金魚の免疫機能におよぼす影響

・実験水槽内での金魚の行動観察 100 mg/kg BW, 30 mg/kg BWのBaPを注射された金魚は、対照群(0 mg/kg BW)の金魚と比較して、特に変化が見られず、外見上はまったく健康で行動も活発であり、無処理の金魚と何ら変わりがないようであった。7日後にIndian inkを注射した個体においても、対照群あるいは無処理の金魚との違いは見られなかった。

・腎臓と脾臓のペルオキシダーゼ反応 実験群と対照群の腎造血組織内には、多くのペルオキシダーゼ反応陽性細胞が観察された。陽性細胞

の数、密度などについては、個体数が少なく確定的なことはいえないが、両者の間に大きな違いは認められなかった。泌尿器系組織については、100 mg/kg BW 投与群の尿細管に若干の変性像と新たな細胞新生はみられた(図9、10)。脾臓の細網組織内には、100 mg/kg BW 投与群においてペルオキシダーゼ反応陽性の顆粒を豊富に持つ細網様細胞が多く出現する個体がみられたが、これについても、今後実験個体数を増やして検討する必要があると考えている。

・Indian ink の取り込み 実験群と対照群の Indian ink の取り込みを比較すると、実験群において若干の取り込みの低下がみられた。脾臓において、実験群・対照群ともにエリブノイド(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った(図11、12)。腎臓の取り込みには、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。

4) アコヤガイの免疫機能におよぼす影響
曝露飼育期間中に各群において目立った変化はなかった。曝露終了日に、低濃度 BaP 曝露群の1貝の状態が悪く検索から除外した。鰓構造の破壊と反応性(刺激を加えることにより反射的な閉殻)の低下が軽度に見られた。

・血リンパ球遊走能 血リンパ球の遊走能の比較では、対照群に比して BaP 曝露群で小さい値となる傾向があったが、個体差が大きく有意差は認められなかった。

・総血リンパ球数の測定 総血リンパ球数には 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(図13)。

・NBT還元能測定 いずれの細胞においても BaP 曝露による差はなかった(図14)。

・血リンパ球分画の測定 血リンパ球分画は、無顆粒球と顆粒球の比率がほぼ2:1であり、従来の諸報告と同じであったが、個体差が大きかった。また、BaP 曝露の影響は認められなかった(図15)。

・食作用の観察 リチウムカルミンの食食能は高濃度 BaP 曝露群で低値を示したが、個体差が見られた(図16)。

・遊走能の測定 血リンパ球の遊走能は各群間に有意差は認められなかった(図17)。

・凝集素価の測定 凝集素価には各群間に差はなかった。

今回の BaP 曝露の最も大きな影響は、血リンパ球の食食能であった。血リンパ球の食食作用は生体外から侵入する異物に対して即対応できる生体防御機構の一つであり、免疫学的な進化の遅れた生物の生体防御にとっては重要な機能を担っている。さらに体内に取り込んだ栄養素の利用の課程でも細胞の食作用が関与するのでさらに有用な機能である。この他の指標には BaP 曝露の影響は認められなかった。使用した貝の個体差の大きさも影響が検出できなかった要因と考えられるが、低濃度、高濃度ともに対照群との間に差がある傾向もなかったため、今回採用した BaP 曝露条件ではアコヤガイに対して血リンパ球食食能の低下といった弱い免疫学的異常をのみ与えたものと結論できよう。

5) ナメクジの免疫機能におよぼす影響

・粘液の性質 正常状態におけるナメクジの粘液は薄褐色を呈する透明なしょう液性である。10³ppm までの BaP の曝露では粘液の性状に変化が起きないが、5×10³ppm 以上では白色の粘液性に変換することが観察された。しかしながら、粘液の分泌量は BaP 濃度によって異なることはなかった。

・マクロファージ食食能 *In vitro*においてマクロファージの食食能を調べたところ、正常なナメクジ血球マクロファージの食食能に比して、10²ppm 以上では明らかな低下がみられた。10⁴ppm では正常時の 1/7 までに低下することが分かった。マクロファージの周囲に SRBC が多数あるのにもかかわらず、食食数が少ないことによるものであった(図18)。

6) ミミズの免疫機能におよぼす影響

・食食能に及ぼす影響 BaP への暴露が、血球細胞の蛍光ビーズ食食能にあたえる影響を測定した結果、暴露後同様に経時的に低下した。5 日目の血球細胞を測定すると、汚染土壌中の濃度が $1\text{ ng}/20\text{ g}$ から濃度依存的に抑制された。食食能は $100\mu\text{g}/20\text{ g}$ で、約 70% の低下した (図 19)。しかし $100\text{ pg}/20\text{ g}$ 以下では影響を与えなかった。

血球細胞の H2O2 活性は、暴露後同様に経時的に低下した。5 日目の血球細胞を測定すると、 $100\text{ pg}/20\text{ g}$ ですでに、活性の低下が見られ、 $100\text{ ng}/20\text{ g}$ では、対照群に比べ半減した。

DMBA の暴露は、上記の免疫能の低下には、より高濃度が必要であった。

・代謝酵素への影響 *E. foerlida* を BaP および DMBA 汚染人工土壌中で、1 日から 5 日まで暴露させ、血球細胞の酵素活性と食食能を FACS で、および P450、HSP60、70、90 の発現動態を免疫組織学的に検討した。

P450 (CYP1A1, 2E1) 発現は、皮膚上皮細胞 (図 20)、血球細胞で著明に増加した。HSP60、70、90 の発現も、経時的に増加を示した。また、CYP1A1 は遺伝子発現レベルでも発現増加を確認した。

7) カイコの免疫機能におよぼす影響

・総血球数及び血球比に及ぼす影響 終齢 1 日目から 6 日間、BaP を塗布した結果、総血球数が著しく減少した (図 21)。また血球比を調べて見ると、BaP 塗布群では顆粒細胞の占める割合が減少し、プラズマ細胞の割合が増加した (図 22)。

一方、1 回の BaP 暴露を終齢 4 日目の正常幼虫に行い、総血球数及び血球比を観察した結果、BaP 塗布後 2 時間目で総血球数が増加するのが観察された。しかし、その後は対照群よりも低下した (図 23)。一方、塗布後 60 分目に顆粒細胞とプラズマ細胞の占める割合は、BaP 塗布によって顆粒細胞比が減少し、プラズマ細胞比が増加するのが観察された (図 24)。

・生体外での BaP 処理が顆粒細胞及びプラズマ

細胞の形態に及ぼす影響 終齢 4 日目の正常カイコ幼虫から得た血球に生体外で BaP を添加し 60 分間処理して形態への影響を観察した。BaP 添加群の顆粒細胞の形態と伸展は対照群の顆粒細胞と比較して糸状突起の伸展も抑えられる傾向が見られた。しかし、プラズマ細胞の形態と伸展は BaP 添加群でも対照群と同じであった。

・顆粒細胞による食食活性に及ぼす影響 終齢 1 日目から 6 日間、BaP の塗布は、顆粒細胞によるヒツジ赤血球の食食率を低下させた (図 25)。

・メラニン色素形成に及ぼす影響 終齢 1 日目から 6 日間、BaP 塗布が体液メラニン色素形成に及ぼす影響をドーバ反応により観察した結果、BaP 塗布はメラニン色素形成にほとんど影響はを与えなかった。

・抗菌活性に及ぼす影響 終齢 1 日目から 6 日間の BaP 塗布が、幼虫が前蛹 2 日目になったときの体液の示す抗菌活性に及ぼす影響を検討した結果、BaP 塗布は体液の抗菌活性を低下させ、生菌数が対照群よりも多く観察された (図 26)。

終齢 1 日目から 6 日間の BaP 塗布が、幼虫が前蛹 2 日目になったときの体液の示すレクチン活性に及ぼす影響を検討した結果、BaP 塗布は体液のレクチン活性を低下させることが観察された (図 27)。

D. 考察

マウス BaP は煙草やディーゼルエンジンの排ガスに含まれる発ガン性を有する PAH である。この PAH に属す物質は Ah-receptor を介して胸腺細胞の委縮を引き起こし、その結果 B 細胞や T 細胞の免疫反応を抑制するという報告がある。また、胎仔の胸腺や肝臓に対して PAH がその細胞数に影響を与えるというデータも報告されている。そこで、BaP が胸腺細胞の CD25 を発現する CD4 T 細胞のサブセットに何らかの影響を与える可能性について検討した。10mg/kg・day を 1 週間投与した系において胸

腺細胞の分化段階については CD4+CD8⁻、CD4⁻CD8⁺のサブセットの割合の有意な増加が見られた。CD4⁻CD8⁻、CD4+CD8⁺のサブセットに有意な変化が見られなかった。本実験に用いた投与量の BaP では CD4 T 細胞のサブセットの分化、成熟におよぼす影響は小さいものと考えられた。BaP が Ah-receptor を介し分化成熟段階に影響を及ぼすかについては胸腺細胞の総数と胸腺重量にあまり変化が見られなかったことも考慮すると今回の結果からでは不明であり、今後の検討課題である。一方、100mg/kg・day 投与したところ、体重が大きく減少した。また、脾臓重量が大きく減少した。また、胸腺の cellularity が対照群に比べ大きく増加したが、これは胸腺重量の BaP を投与した群での減少の割合が、胸腺細胞数の総計における BaP の減少の割合よりも大きかったからと考えられた。高濃度の BaP を投与した系において CD4、CD8 T 細胞の発現はほとんど変化が見られなかった。しかし、CD4+CD25⁺ T 細胞については低濃度の投与時は CD4 high の領域で減少が見られたのに対し、高濃度では low の領域で大きく減少が見られた。抑制性 T 細胞のサブセットは CD4+CD8⁻CD25⁺であるとの報告があり、今後さらに検討を加える余地がある。また、本研究 BaP 投与の系で組織の変化についての評価は進行中である。自己免疫疾患の発症への関与については今後の検討する課題である。また、BaP が親の体内で分解、排出されてしまい、新生仔マウスに取り込まれたものが少ないの可能性もある。従って、新生仔に直接投与し影響を評価することについても検討する必要がある。

ウズラ 鳥類の免疫機能に及ぼす有害化学物質の影響については、特に有機塩素化合物が問題であると報告されている。今回の BaP は、発ガン性のある有機塩素化合物として古くから注目されており、また最近では内分泌攪乱化学物質として問題視されている。しかしながら、これまでの報告例は野鳥の調査が主体であり、免疫毒性の文献の占める割合が少ないため、BaP が

鳥類の免疫機能に及ぼす影響を実験的に検証する必要が生じていた。NIES-L₂系ウズラでの BaP 投与後の免疫細胞の変化では、T-細胞とマクロファージには制御的に働き、一方、B-細胞には促進的に作用することが示唆された。しかしながら、抗体産生能 (SRBC-HA 力価) 及び感染抵抗性 (RSV 肉腫形成) には、BaP の 10・30・100mg/kg 投与では影響が明らかではなかった。

このように、近交系ウズラを用いた免疫機能への BaP の投与は、細胞レベルで攪乱されるものの、最終的な感染抵抗力を低下させるまでに至らなかったと考えられる。

金魚 金魚は哺乳動物と比較して、BaP に対して強い抵抗性を示し、高濃度の腹腔内注射を行っても、目立った病的(病理的)変化を起こさなかった。これには今回の投与方法 (corn oil に溶かして腹腔内に注射するという方法)、投与量、アッセイ系 (組織学的観察) の妥当性をすこし検討する必要があるだろう。Walczak ら (J.Fish.Biol.,supplA 251-253, 1987)は、ニジマスに BaP を腹腔内注射し、12ヶ月後に血球採取を行い、単球の食作用の低下を報告している。このように食作用の増減の判定は、単離した細胞でのアッセイ系が有用で、今回用いた組織切片法は量的観察には不向きである。今後、血清学的検査を含めて、単離した血球を用いたアッセイが必要と考えている。

ナメクジ 陸棲軟体動物ナメクジを用い、環境汚染物質の一つである BaP に短期間曝露した時の生体防御系の変化について検索し、ナメクジ類が、環境汚染の指標動物として、最適ではないかとの結論を得た。ナメクジの体表は、単層円柱上皮細胞及びその所々に存在する多数の粘液細胞で覆われている。円柱細胞は体表側に微絨毛を突出させ、その基部には多数の pinocytic vesicle が観察され、あたかもヒト消化管上皮様を呈している。また体表に分泌される粘液は、二種類の粘液細胞(round mucous cell, tubular mucous cell)から放出され、その放

出機構は体表面に感覚毛を持つ感覚細胞によってコントロールされている。このことは、ナメクジにとって不快な、又は有害な物質が存在する時には、粘液分泌が変化することが予想される。さらに、上皮細胞の構造の上から、容易に環境物質が取り込まれることも考えられる。体内についてみると、ヘモシアニンを血色素にもつ血液(体液)中に、血球(マクロファージ)が存在し、異物の認識・食食を行っている。

我々は、BaP 濃度を5段階に分け、短期間曝露におけるナメクジ生体を組織学的に観察した。 5×10^3 ppm 以上の濃度では、体表粘液の分泌が変化し、通常時に見られないきわめて粘性の高い白濁した粘液を分泌することが分かった。また、マクロファージの食食能をヒツジ赤血球を注入することで観察計量したところ、血球数は増加するものの、 5×10^3 ppm 以上の濃度では、明らかに食食能が減少することが分かった。この結果はBaP 単独汚染の場合ですら、ナメクジの生体防御系に明らかなダメージを与えること、またさらに、粘液の分泌が変化することから、この動物を観察することによって、肉眼的に汚染土壌を見分け得るものと考ええる。

無脊椎動物でも、近年 C-反応性蛋白質(C-reactive protein, CRP)の存在が報告されている。しかし、それらの報告によると、急性期蛋白質ではなく、常時高レベルで見られると述べられている。このことは無脊椎動物の住環境から推測してみると、理解し得るレベルであると考えられるが、無菌的状态ではどうかの報告はみられない。我々は今後、生体防御系の攪乱によって引き起こされるであろう日和見感染の機序についてさらなる実験を継続すべきであると考ええる。

アコヤガイ BaP 曝露の最も大きな影響は、血リンパ球の食食能であった。血リンパ球の食食作用は生体外から侵入する異物に対して即対応できる生体防御機構の一つであり、免疫学的な進化の遅れた生物の生体防御にとっては重要な機能を担っている。さらに体内に取り込んだ栄

養素の利用の課程でも細胞の食作用が関与するのでさらに有用な機能である。この他の指標にはBaP 曝露の影響は認められなかった。使用した貝の個体差の大きさも影響が検出できなかった要因と考えられるが、低濃度、高濃度ともに対照群との間に差がある傾向もなかったため、今回採用したBaP 曝露条件ではアコヤガイに対して血リンパ球食食能の低下といった弱い免疫学的異常をのみ与えたものと結論できよう。今回のBaP 曝露条件は、5および50ppb ($\mu\text{g/L}$)の低濃度であり、かつ2週間という短期間であった。にもかかわらず、1項目ではあるものの僅か2週間のBaP 曝露によって免疫機構の一部が障害されることは問題であるとも言える。アコヤガイに関して全国各地で環境汚染物質が原因と考えられる日和見感染症の発症が、その原因の一つであると考えられている大量斃死が起こっている。日和見感染症は免疫機能が低下した結果として、あらゆる微生物に対しての抵抗力が失われて発症するものである。これら大量斃死の事実は、アコヤガイなどの野生生物が環境汚染物質の影響によって免疫機構が障害されていることを示すものである。

ミミズ 土壌中にしみ込んだ化学汚染物質のBaP やDMBA は、ミミズの皮膚を介して、取り込まれ、ミミズの免疫能の低下をきたすことが明らかとなった。

食色や H2O2 産生能といった基礎的な生体防御機能への影響は、ミミズの致死量以下でもおこることが確認され、その生存に重大な障害をもたらすことが明らかになった。このことは、ミミズの体内にこれらの物質が蓄積する可能性を示しており、長期投与の影響とともに検索が必要であると考ええる。本研究の結果、FACS を用いた簡便な検査法により、食色や H2O2 産生能の変化をモニターすることで生物学的測定が可能となることが示唆された。

カイコ 昆虫は体液内に存在する顆粒細胞とアメーバ状のプラズマ細胞が関与する細胞性防御反応、並びに抗菌蛋白質(セクロピン、アタシ

ン、ディフェンシン、高グリシン含有抗菌性蛋白質など)、異物細胞凝集性のレクチン、メラニン色素形成に係るフェノールオキシダーゼ系などに依存する液性防御反応によって、生体内に侵入する病原体などの異物細胞を排除することができる。この生体防御反応が正常に作動することが、昆虫の生存と健康維持にきわめて重要であると考えられる。昆虫はまた、人間の生活空間に常に存在しているため、人間活動によって放出される種々の化学物質の影響を直接に受ける存在でもある。したがって自然界に放出される有害汚染物質に常にさらされる運命にあるが、昆虫の生体防御機能にその物質がいかなる影響を及ぼしているかについては不明である。本研究では、有害物質であり発ガン性の強い BaP がカイコの皮膚から吸収された場合、どんな影響が免疫学的にもたらされるかを解明する一環として、人為的に BaP をカイコ幼虫の皮膚に塗布して、生体防御因子に及ぼす影響を調べた。

BaP の連続的な経皮投与により、1) 総血球数と顆粒細胞比が減少、2) 顆粒細胞による食食作用が低下、3) 抗菌活性とレクチン活性が低下することなどが判明した。また生体外での BaP 処理は顆粒細胞の形態にも影響することもわかった。1 回の BaP 暴露も総血球数や血球比に影響したので、環境有害物質である BaP は、昆虫の生体防御機能を抑制することが強く示唆される。したがって自動車の排気ガスやタバコのタールなどに含まれている BaP は免疫学的に昆虫の健康に悪影響を与える可能性があると思われる。

昆虫類では、殺虫剤であるパラチオンや馬拉チオンの処理で総血球数が減少することや顆粒細胞やプラズマ細胞の形態が変化し縮小化すること、さらに摂食阻害剤の処理でノジュール作用などの細胞性防御反応と抗菌蛋白質の産生が抑制されることが報告されているので、今回得られた BaP による同様の抑制作用がこれらの物質による抑制作用と同じ作用機序で生じてい

るかを今後追究することが必要と思われる。

E. 結論

今回用いた環境生物においては BaP の曝露によりマクロファージなど食食細胞の機能低下が観察された。免疫機能の低下が日和見感染などにつながっていく可能性が示唆された。今後より低い濃度での影響についての検討が必要とされる。動物種による感受性の違いや各免疫担当細胞機能や免疫に関わる物質群の活性に与える影響にも違いが観察された、その要因についてもさらに検討する必要がある。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

1. Selgrade, M.J., Daniels, M.J., Dean, J.H., Correlation between chemical suppression of natural killer cell activity in mice and susceptibility to cytomegalovirus: rationale for applying murine cytomegalovirus as a host resistance model and for interpreting immunotoxicity testing in terms of risk disease. *J. toxicol. Environ. Health*, 37, 123-137 (1992).
2. Blanton, R.H., Lyte, M., Myers, M.J., Bick, P.H., Immunomodulation by polyaromatic hydrocarbons in mice and murine cells. *Cancer Res.* 46, 2735-2739 (1986).
3. Selgrade, M.J., Daniels, M.J., Bueleson, G.R., Lauer, L.D., Dean, J.H., Effects of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, benzo[a]pyrene and cyclosporin A on murine cytomegalovirus infection: studies of resistance mechanisms. *Int. J. immunopharmacol.* 10, 811-818 (1988).
4. Selgrade, M.J., Daniels, M.J., Dean, J.H., Correlation between chemical suppression of natural killer cell activity in

mice and susceptibility to cytomegalovirus: rationale for applying murine cytomegalovirus as a host resistance model and for interpreting immunotoxicity testing in terms of risk disease. *J. toxicol. Environ. Health*, 37, 123-137(1992).

5. Kong, L.-Y., Luster, M.I., Dixon, D., O'Grady,

J., Rosenthal, G.J., Inhibition of lung immunity after intratracheal instillation of benzo[a]pyrene. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 150, 1123-1129(1994).

Takahiro Kobayashi¹, Shinichi Kikuchi², Kazuo Komiyama³, Shinji Takahashi¹, Seishiro Hirano¹, Emiko Furuta⁴, Takahiko Yoshida⁵, Haruhisa Wago⁶

¹National Institute for Environmental Studies, ²Chiba University, ³Nihon University, ⁴Dokkyo University School of Medicine, ⁵Asahikawa Medical School, ⁶Saitama Medical School Junior College

Key words: benzo[a]pyrene, mice, quail, goldfish, pearl oyster, slug, earthworm, silkworm, phagocytosis

There is little information whether hazardous chemicals in the environments may affect the immune system in diverse species. Most studies on the effects of benzo[a]pyrene (BaP) on immune functions have been done with using experimental animals such as mice and rats not with other diverse species. Therefore, in the present study, the effect of BaP on immune functions of diverse species, such as, mice, quail, goldfish, pearl oyster, slug, earthworm, and silkworm.

Mice: Neonates were fed milk from their mothers administered with BaP intraperitoneally (10-100mg/kg day) for 7 days. On day 7, thymocytes were analyzed by flow-cytometry. Neonates from mother administered with 10 mg/kg, body weight and cellularity of thymocytes decreased. CD4-CD8- and CD4-CD8+ T-cells decreased significantly at 10 mg/kg. CD4+CD25+ T-cells decreased significantly at 100 mg/kg in low CD4+ region. These results suggested that the immune disruption occurs in mice.

Quail: Japanese quails were exposed to BaP (10, 30, 100 mg/kg) by oral administration. Mitogen activity to ConA in peripheral lymphocytes was suppressed dose dependently. Mitogen activity to LPS increased in high concentration. There was no significant differences in average SRBC-HA titer and resistance against infection challenged with Raus sarcoma virus between BaP-group and control group. These results suggested that the immune disruption in avian species occurs in cell levels and the host defence function might be changed,

Goldfish: BaP was injected into the peritoneal cavity of goldfish *Carassius auratus*, (0, 30, 100 mg/kg) and 7 d after the injection, the spleen and kidney was examined histologically/histochemically. For evaluation of phagocytic activities, carbon particles were injected 7d after BaP injection, and on the 3 d of the carbon injection, the spleen and kidney were examined by light microscopy. Degeneration caused by BaP injection on splenic and renal hemopoietic tissues was not distinct, however, in the spleen, minute decrease of phagocytic activities was histologically observed. Depressive effect on leucocytic phagocytosis in fish by BaP was suggested.

Pearl oyster: Pearl oysters were acclimated in stainless tanks with artificial seawater for 6 days. Following acclimation, five or 50 ppb BaP was solved with 0.01% DMSO to the seawater and exposed to pearl oysters for 2 weeks. Haemolymph was withdrawn from muscle and used for immunological evaluations. Agglutinin titer and haemocyte density of haemolymph, ratio of agranular cells in haemocytes, and NBT reduction activity, phagocyte activity and chemotaxis of haemocytes were evaluated. BaP exposure slightly affected phagocyte activity and chemotaxis of haemocytes but not significantly. These results suggest that BaP may induce immunosuppression on pearl oysters.

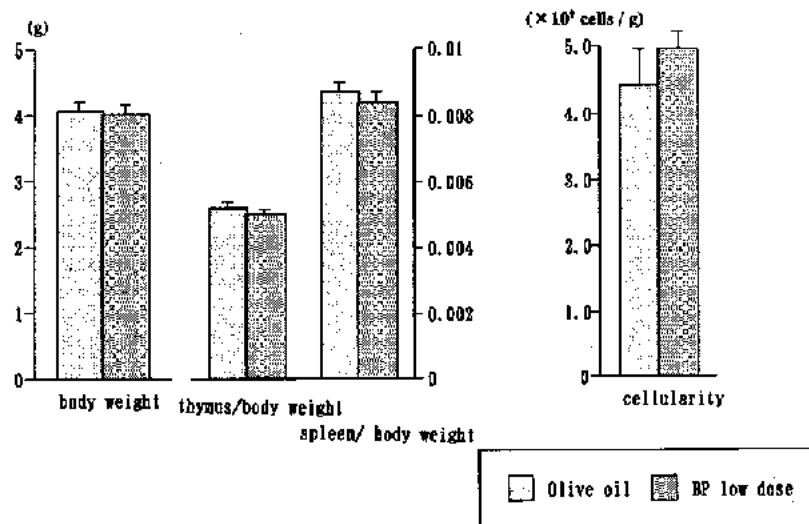
Slug: Filter papers for the slug breeding were soaked with the acetone solution of BaP at the following

concentrations (ppm) and were dried up. After five days of exposure at 5×10^3 and 10^4 ppm or 10 days at 10^1 , 10^2 and 10^3 ppm, the skin state for mucus secretion was observed and macrophages (blood cells) and some organs (the digestive, the hepatopancreas and the gonad) were removed. BaP over 10^3 ppm was decreased phagocytosis of slug's macrophages and changed drastically secreted mucus to be viscous and white, while the body mucus was usually serous and brownish. These results suggest that BaP possibly affects the internal defense mechanisms of terrestrial slugs.

Earthworm: *E.fetida* keep in the cellulose tips with 100pg to 100mg of BaP at 15°C for 1-5 days. Phagocytosis, H₂O₂ production, expression of AH receptor, estrogen receptor, cytochrome P 450, and heat shock proteins were examined. Coelomocyte was classified as large (LC) and small cell (SC) in these sizes. *E.fetida* exposed BaP for five days, clearly decreased phagocytosis and H₂O₂ activity. Immunohistochemical analysis of the *E.fetida* revealed that staining intensity was increased in P450 and HSPs, while AH receptor showed no staining. ER positive cell was not co-localized with those P450 and HSP positive cells. These results indicated that immune functions of *E.fetida* were down regulated by BaP exposure even in sub-lethal dose. The levels of immune function of the coelomocyte might be useful for the indicator of environmental chemical contaminant to soil.

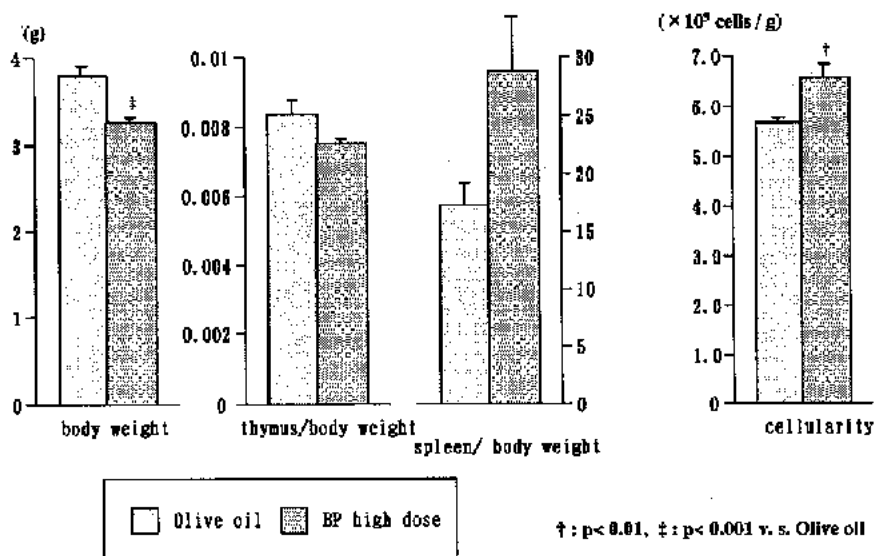
Silkworm: The consecutive application of 0.1% BP in acetone to the skin from the final 5th instar larvae once a day for 6 days resulted in a reduction of the number of total hemocytes and the proportion of granulocytes and in an increase of the proportion of plasmatocytes. In addition, erythrophagocytosis by granulocytes was also suppressed, although the formation of melanin pigment was not inhibited. Natural anti-bacterial substance and lectin molecules produced at a 2-day-old prepupal stage were investigated after an application of BP for 6 days in the 5th instar. Results with *E.coli* and human type - O blood cells showed the decrease of anti-bacterial substance and lectin levels in the hemolymph by BaP. On the other hand, the numbers of total hemocytes and immunocytes were similarly affected by only once exposure of BaP, and the in vitro treatment with BaP had an influence on the morphology of granulocytes but not of plasmatocytes leading to their round-up shape. Therefore, it is suggested that the BaP has a suppressive effect on the insect immunity, probably causing the weakness of insect health.

These results suggested that there is a possibility that BaP has the immune disrupting effects in diverse species.



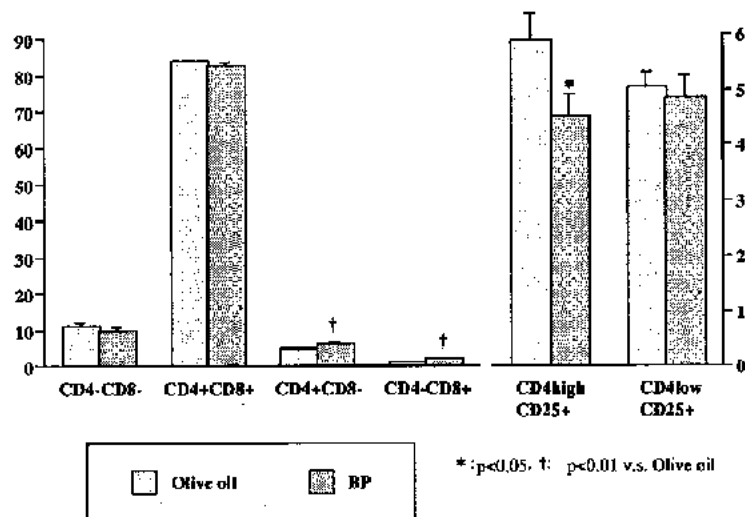
Effects of low dose BP on body weight, thymus and spleen in neonatal mice

図1. 低用量 BPがマウス新生仔の体重および免疫担当臓器に及ぼす影響



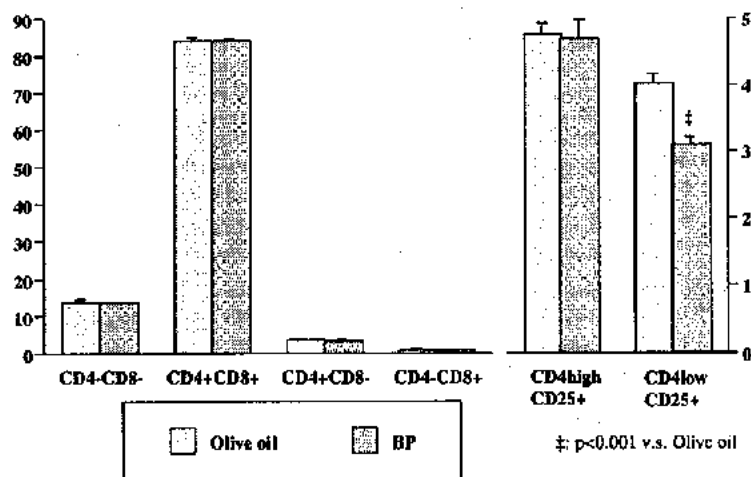
Effects of high dose BP on body weight, thymus and spleen in neonatal mice

図2. 高用量 BPがマウス新生仔の体重, 免疫担当臓器におよぼす影響



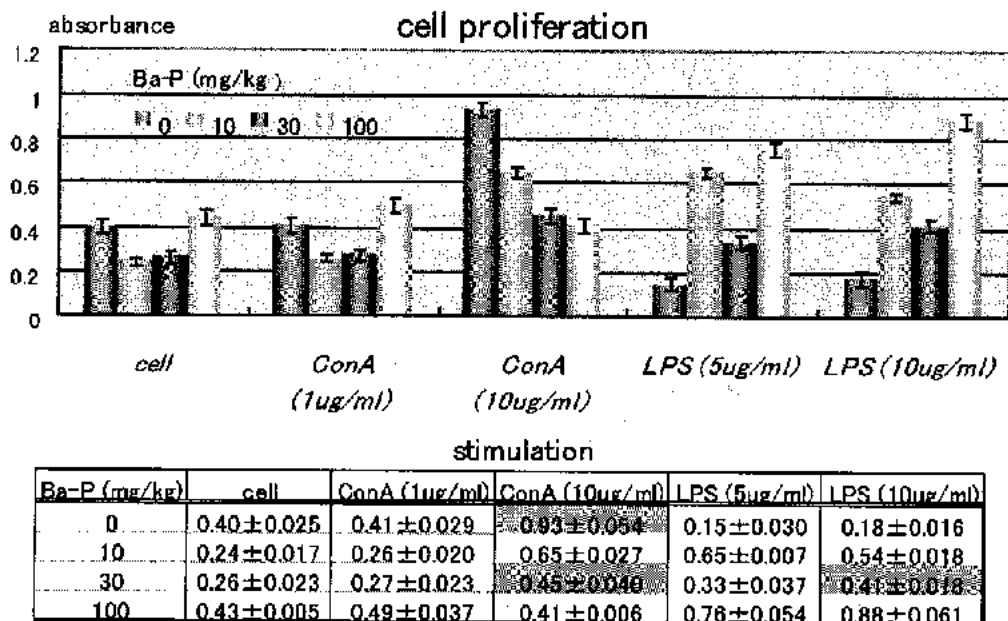
Effects of BP low dose on subsets of thymocytes in neonatal mice

図3. 低用量 BPが新生仔マウスの胸腺細胞サブセットに及ぼす影響



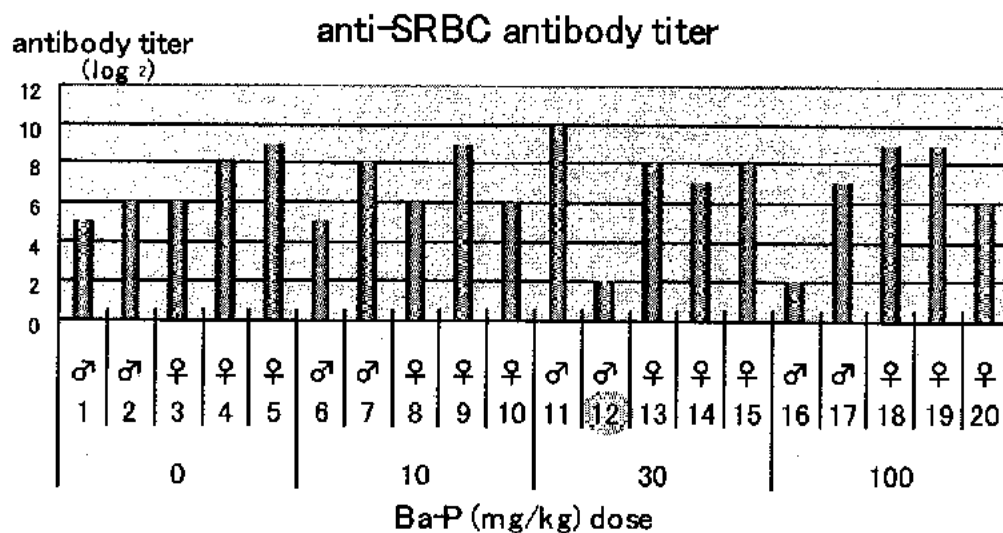
Effects of BP high dose on subsets of thymocytes in neonatal mice

図4. 高用量 BPが新生仔マウスの胸腺細胞サブセットに及ぼす影響



Change of cell proliferation to mitogens (ConA & LPS) after BP exposure

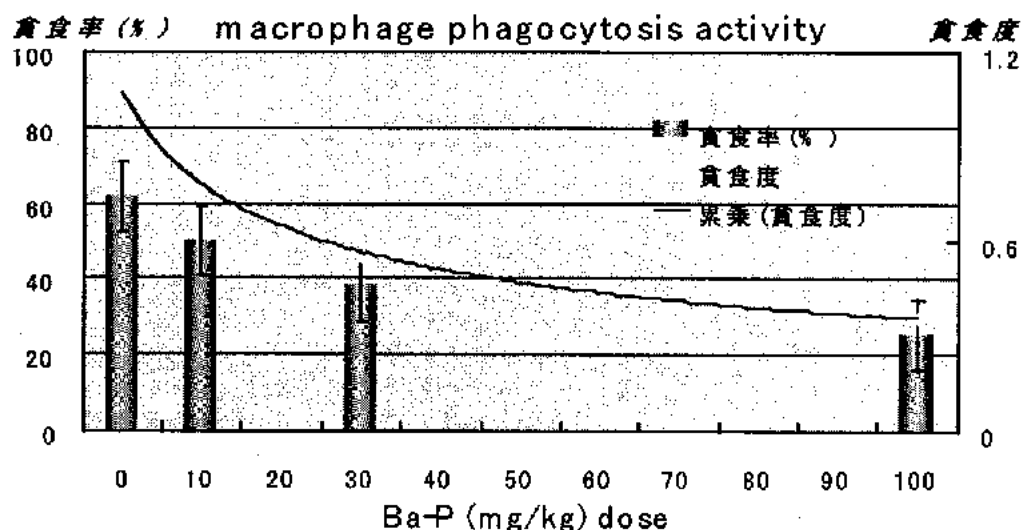
図5. Ba-P投与後のConA・LPS刺激に対するウズラリンパ球活性の変化



Ba-P (mg/kg)	0	10	30	100
antibody titer	6.8±1.64	6.8±1.64	7.0±3.00	6.6±2.88

Antibody production to SRBC after Ba-P exposure

図6. Ba-P投与後の羊赤血球に対する抗体産生能の影響



Ba-P (mg/kg)	0	10	30	100
貪食率 (%)	61.8±8.61	50.2±11.52	38.1±8.59	25.5±8.09
貪食度	1.08±0.238	0.77±0.267	0.55±0.184	0.36±0.109

Phagocytosis of *ip.* Mφ after Ba-P exposure (各 N = 5)

図7. Ba-P 投与後の腹腔内マクロファージの貪食能

RSV injection

R: right wing web L: left wing web

+: level of tumour size ±: trace

	Qual	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18 day
Ba-P+ /RSV+	Q1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	Q2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	Q3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	Q4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Ba-P+ /RSV-	N=5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Ba-P- /RSV+	Q1'	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	Q2'	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	Q3'	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	Q4'	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Ba-P- /RSV-	N=5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Comparison of RSV tumour size in wing web after BaP exposure

図8. BaP 投与後のラウス肉腫形成の比較

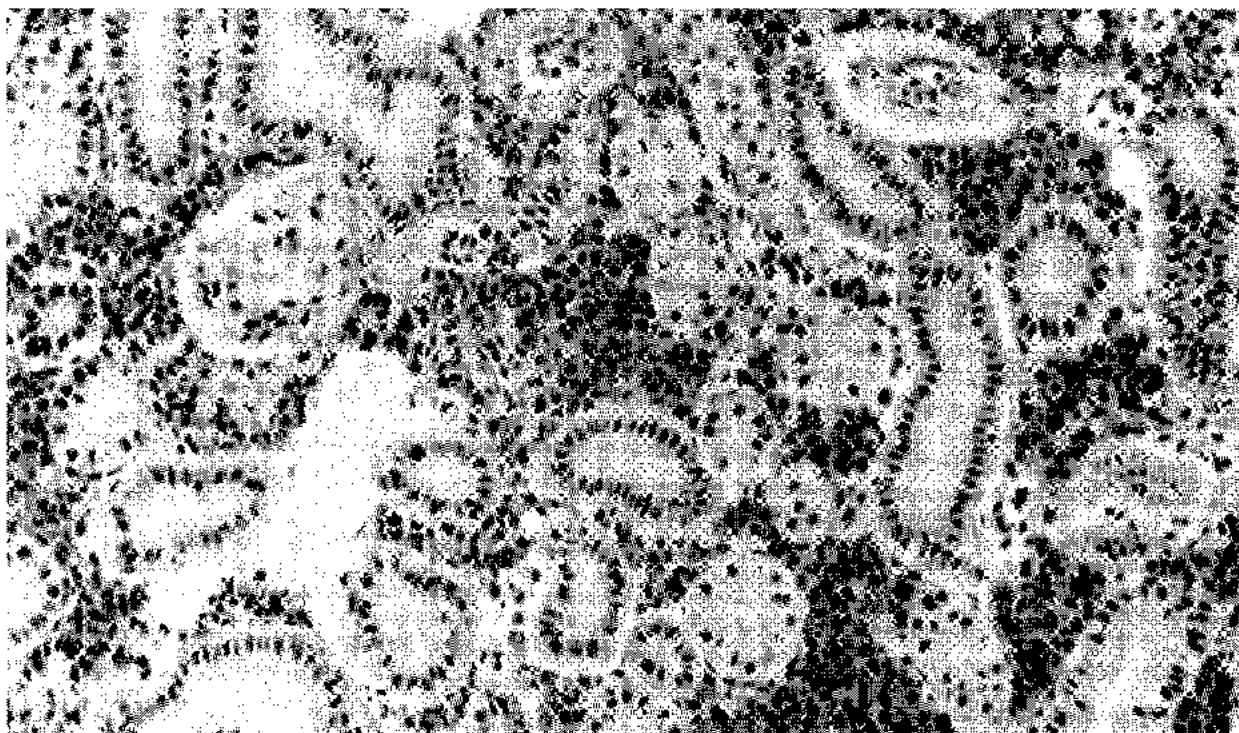


図 9. 腎造血組織内ペルオキシダーゼ反応陽性細胞 (対照群)

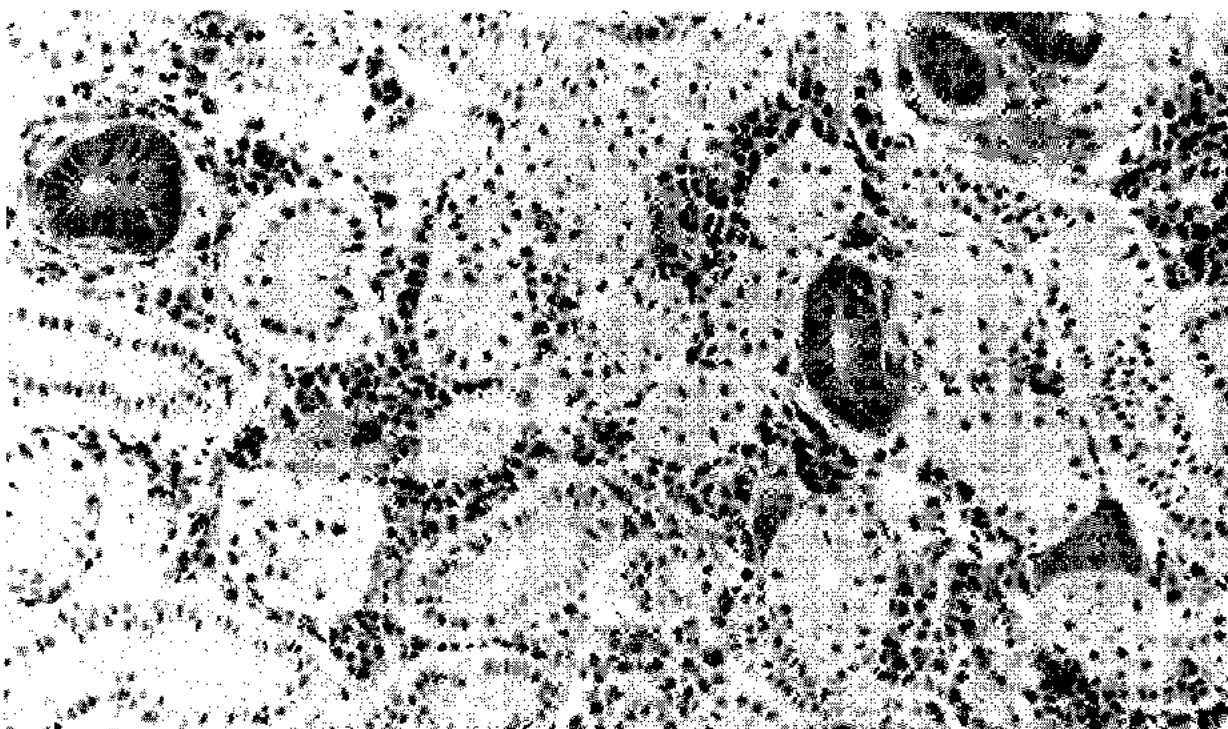


図 10. 腎造血組織内ペルオキシダーゼ反応陽性細胞 (BP群)

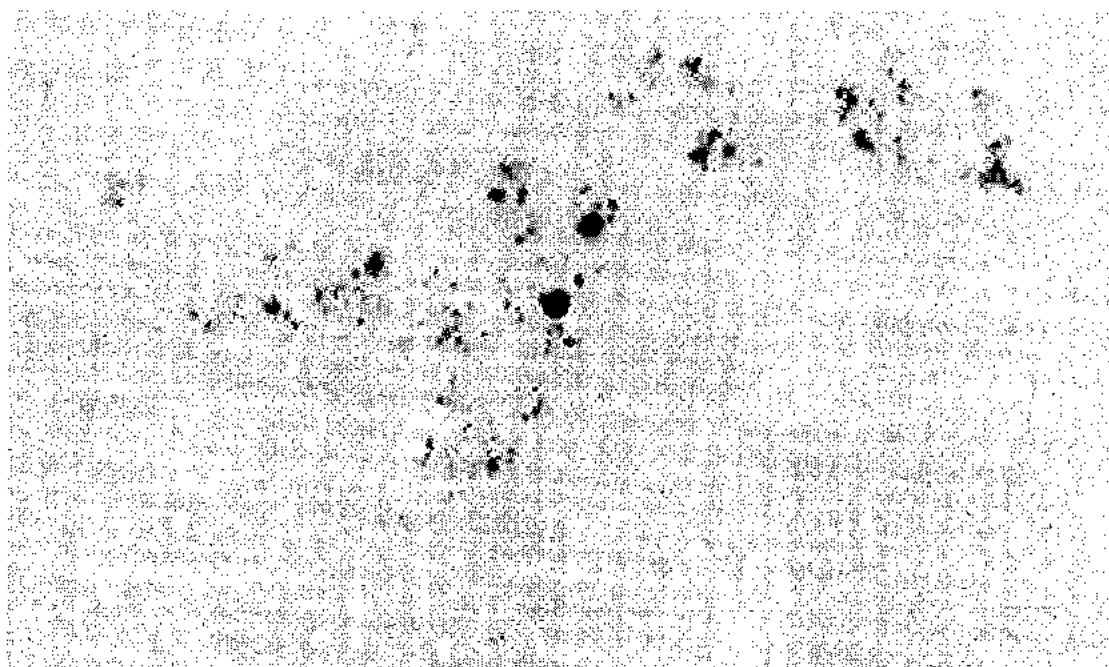


図11. 脾臓にけるエリプソイド（莢動脈）周囲のIndian inkの
取り込み（対照群）

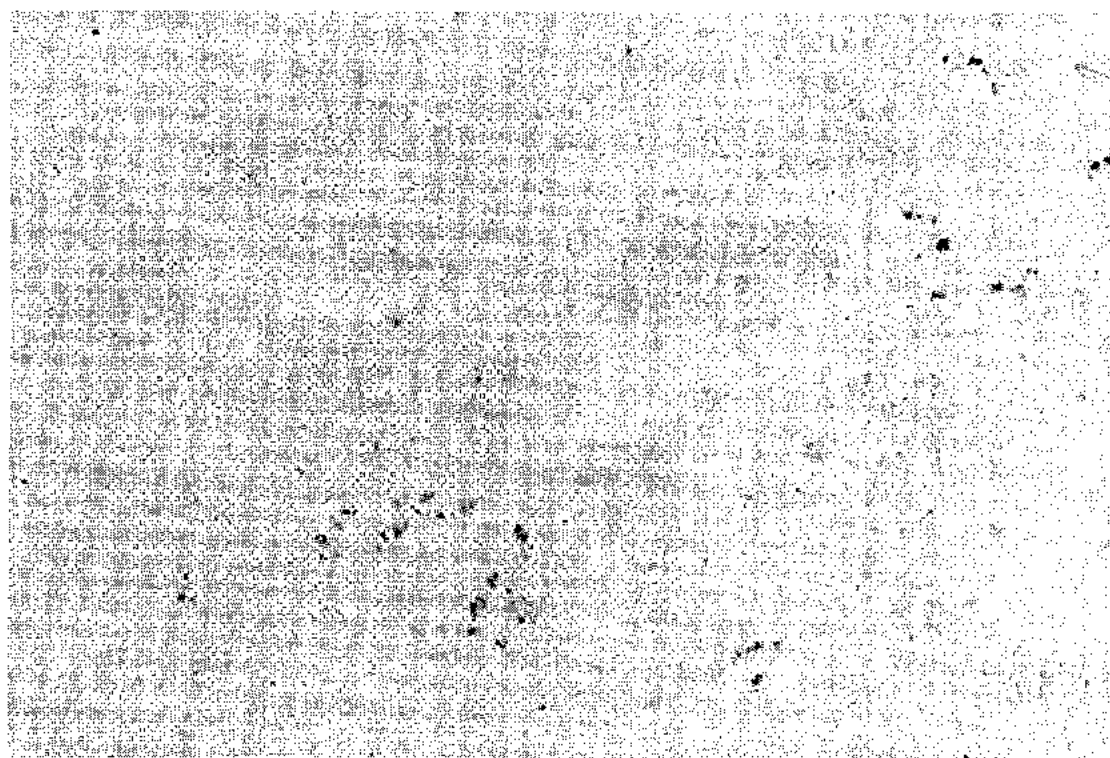


図12. 脾臓にけるエリプソイド（莢動脈）周囲のIndian inkの
取り込み（BP群）

図13. 総リンパ球数に及ぼすBP曝露の影響

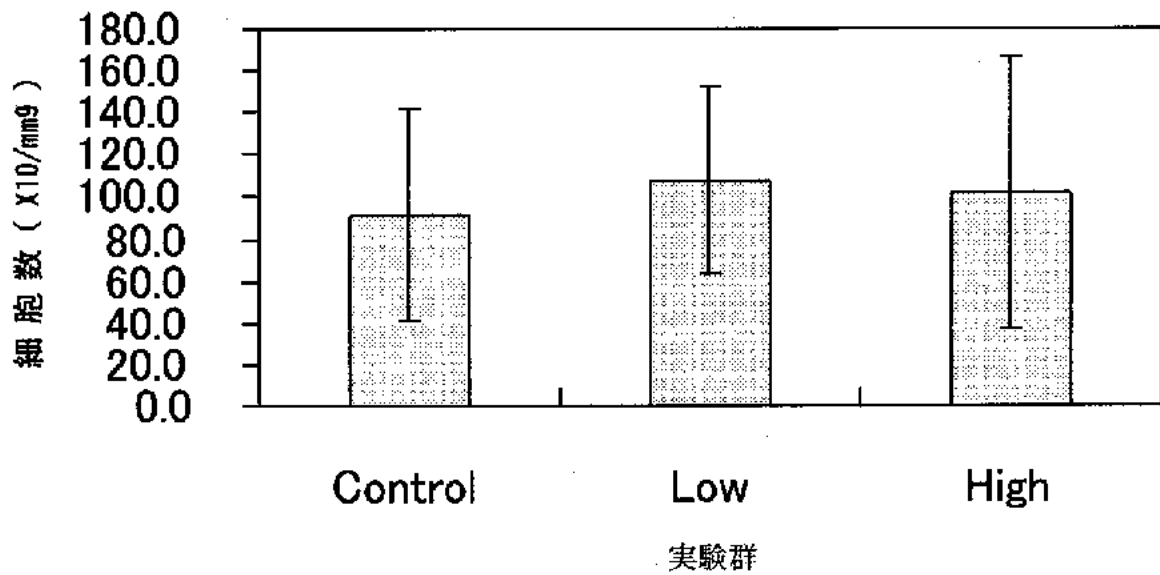


図14. 血リンパ球のNBT還元能に及ぼすBP曝露の影響

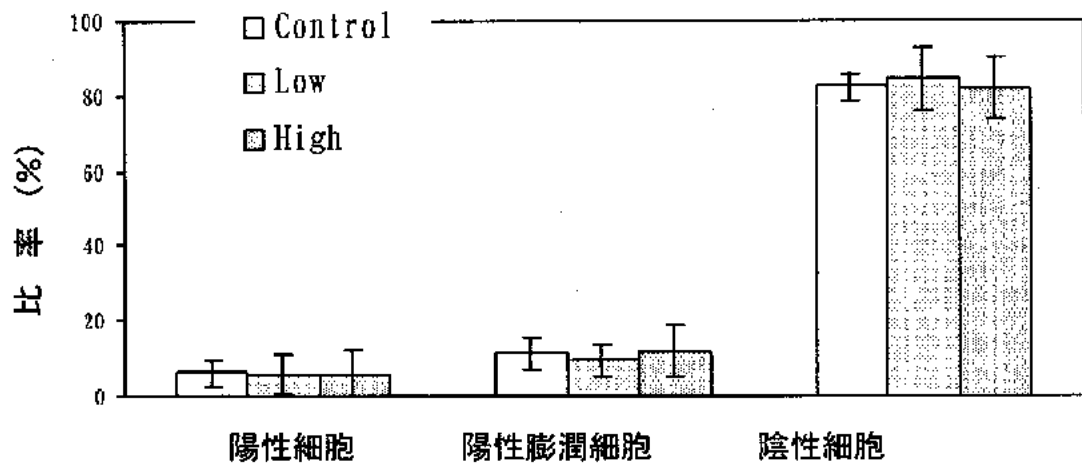


図15. 血リンパ球分画に対するBP曝露の影響

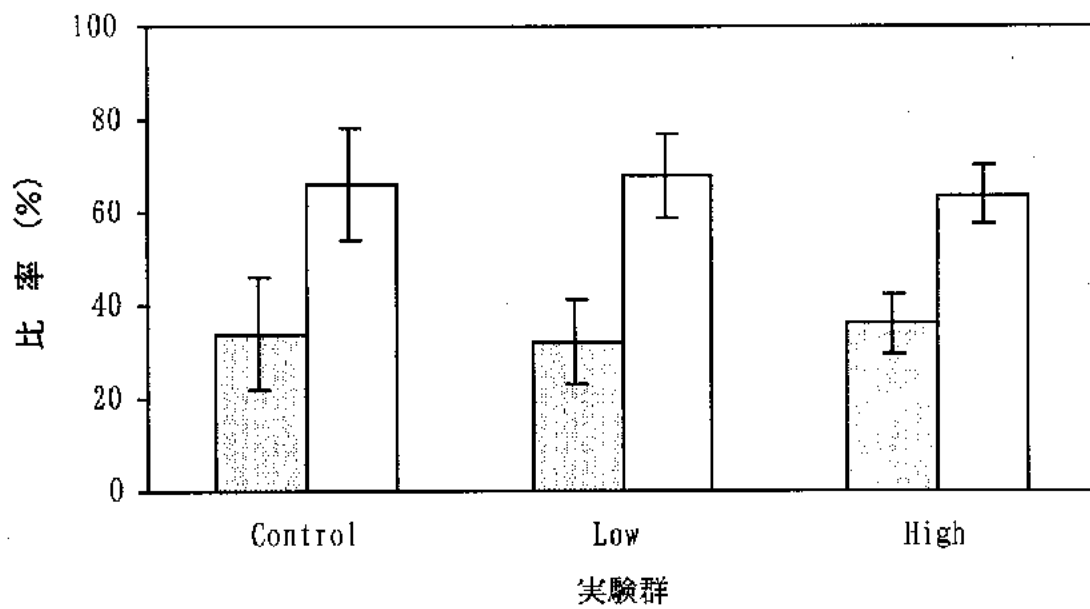


図16. 血リンパ球の貪食能陽性細胞率に及ぼすBP曝露の影響

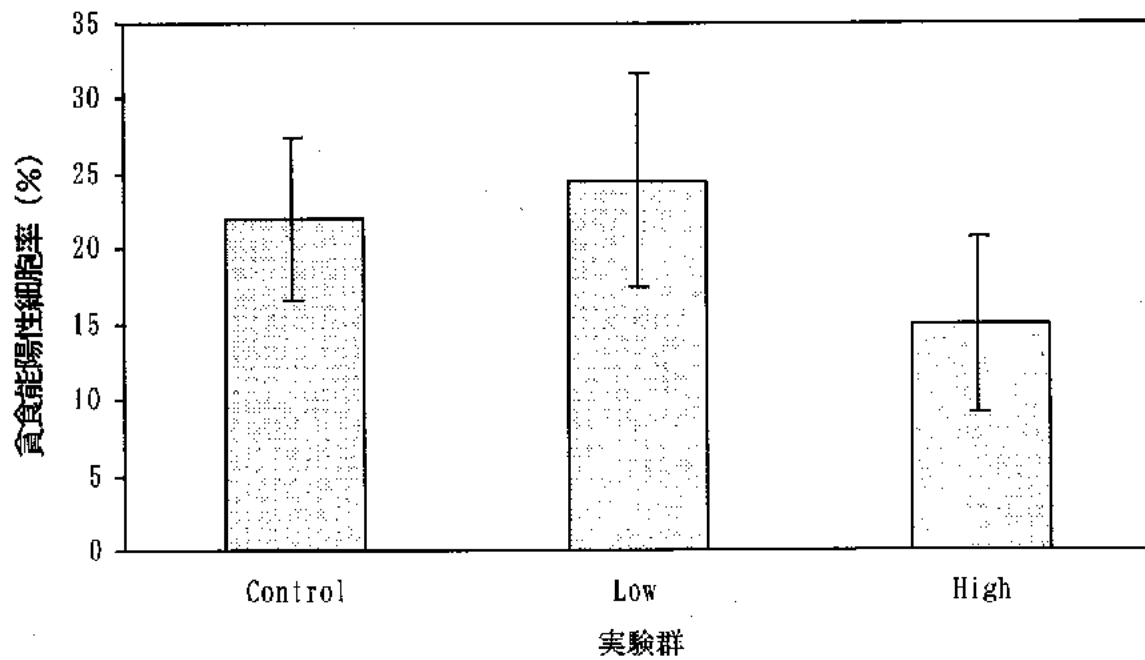


図17. 血リンパ球の遊走能に対するBP曝露の影響

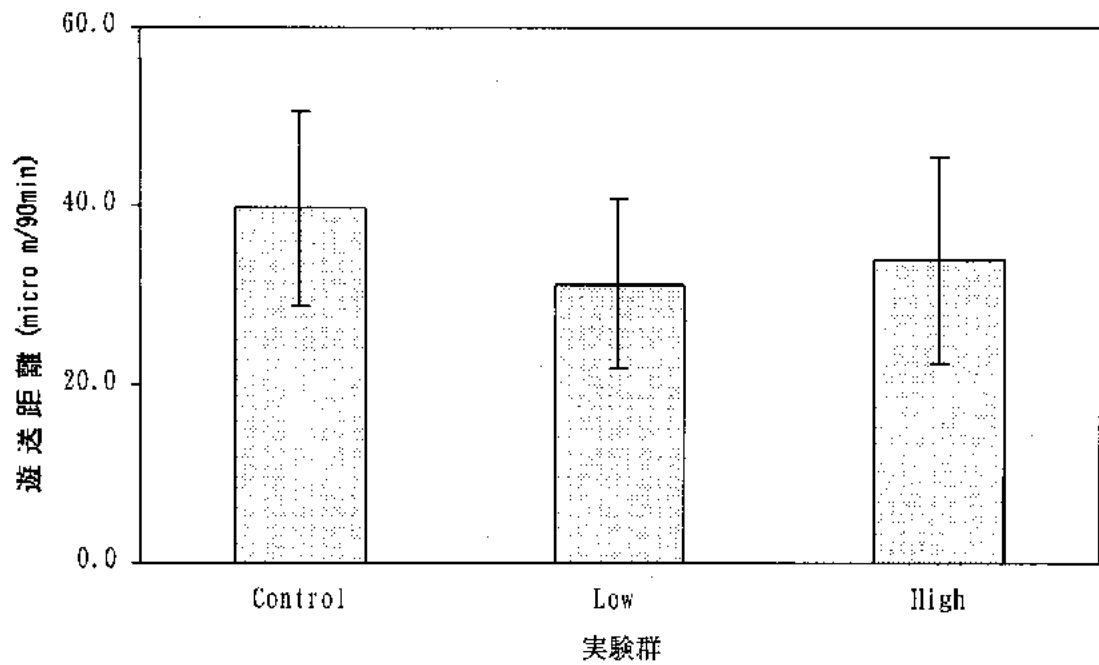
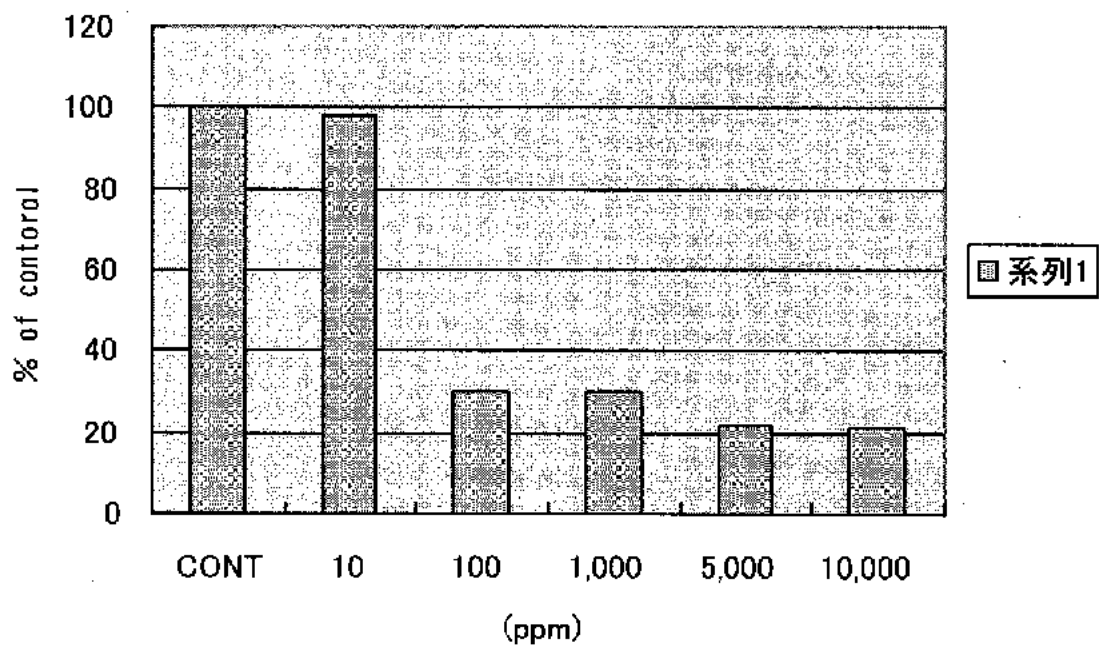


図18. ナメクジの食食機能に及ぼすBPの影響



BaP exposing effects Phagocytic activity coelomocyte

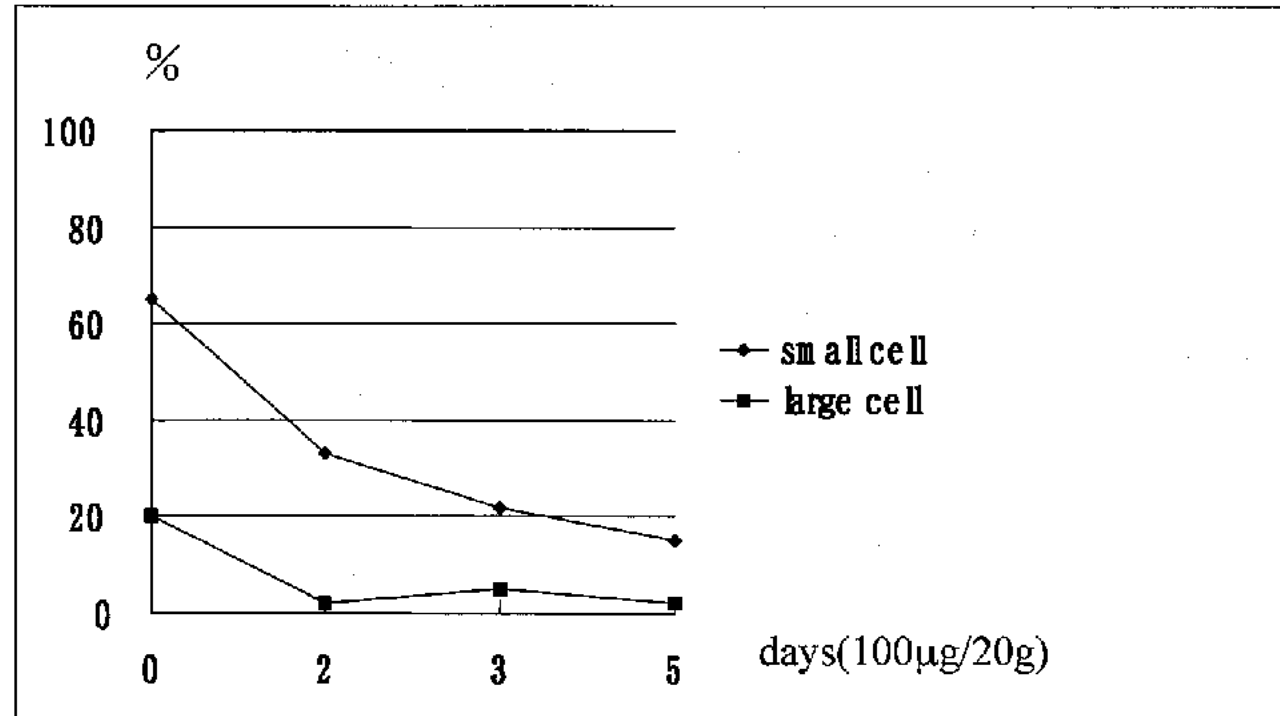


図 19. BP 曝露が貪食機能に及ぼす影響

Bap (100 μ g)暴露5日後のミズ皮膚におけるP450の発現



図20. 皮膚の上皮細胞におけるチトクロームCの発現が著明に亢進する

図21. 総血球数

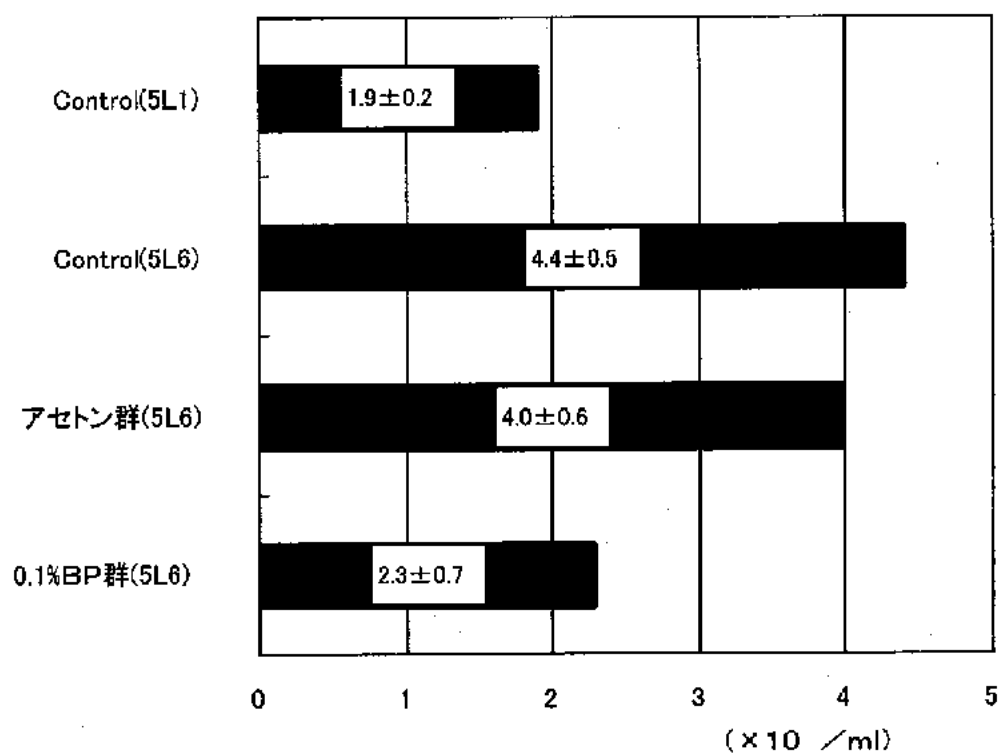


図22. 血球比

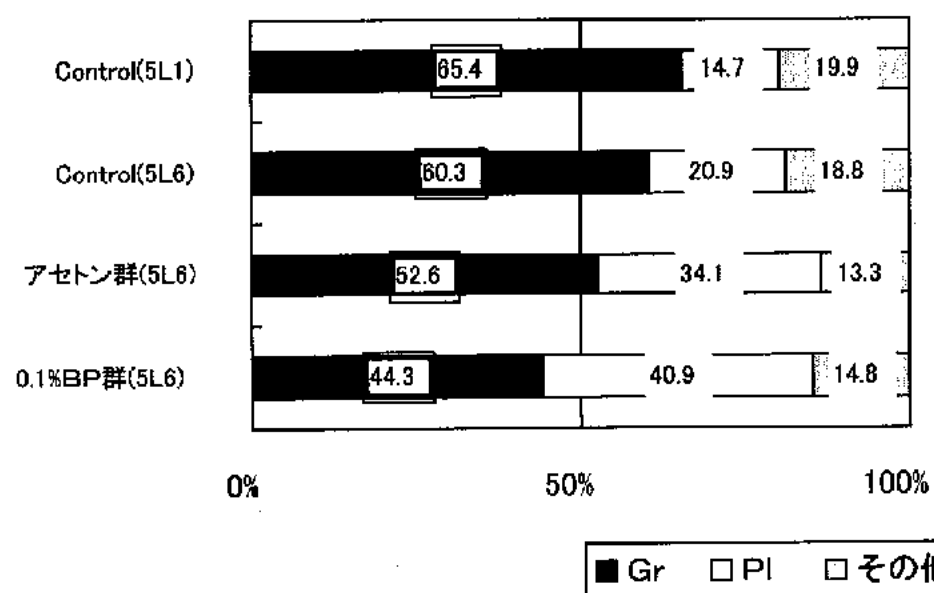


図23. 総血球数の経時的変化

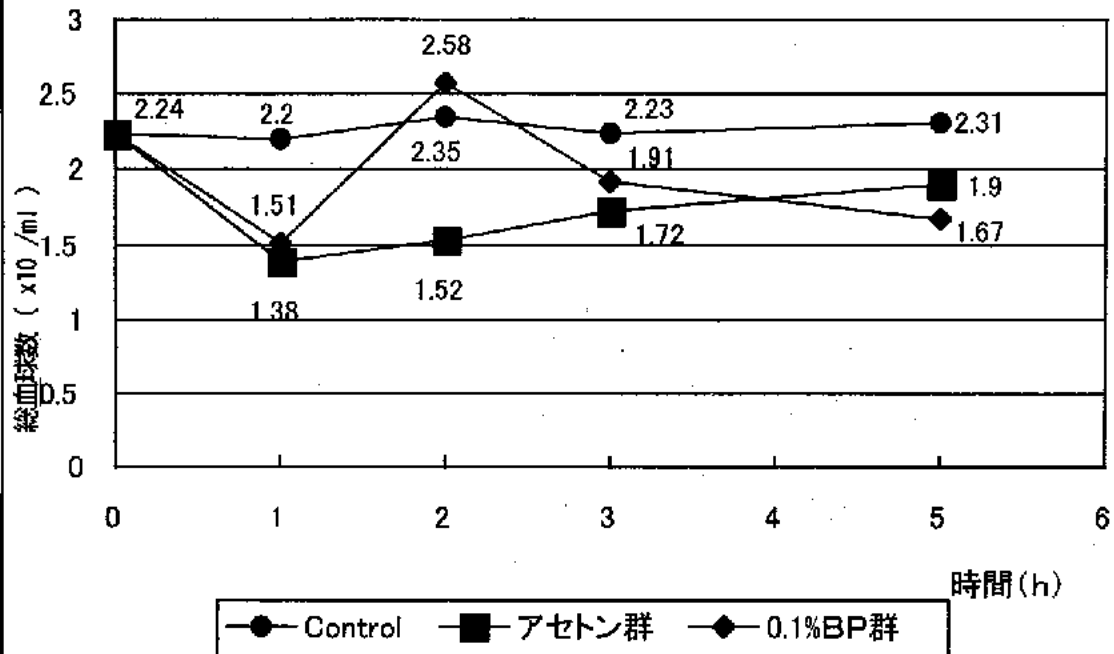


図24. 血球比(60分後)

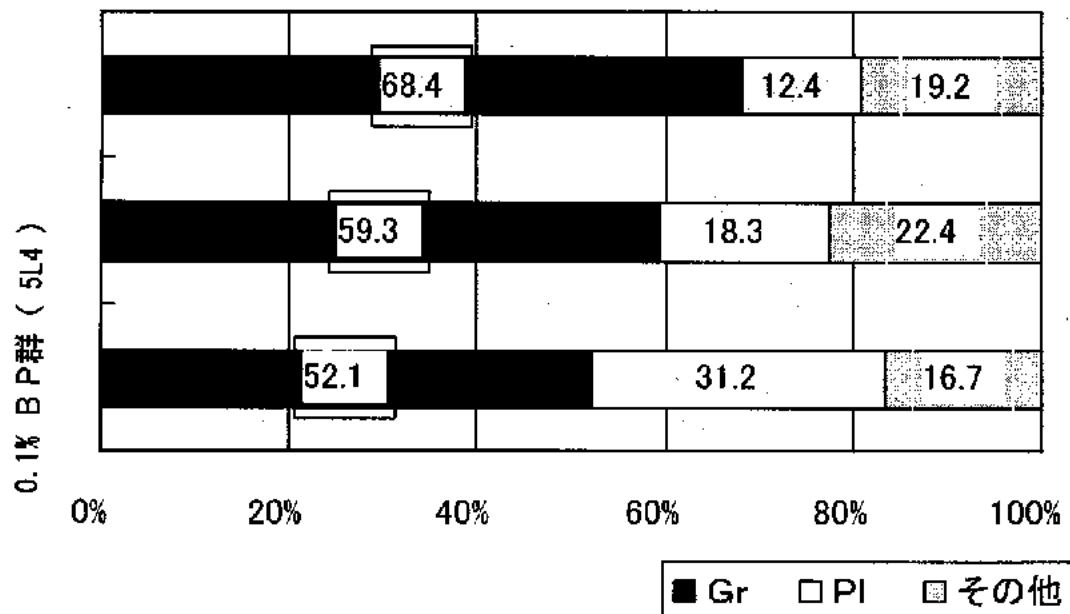


図25. 食食率(60分後)

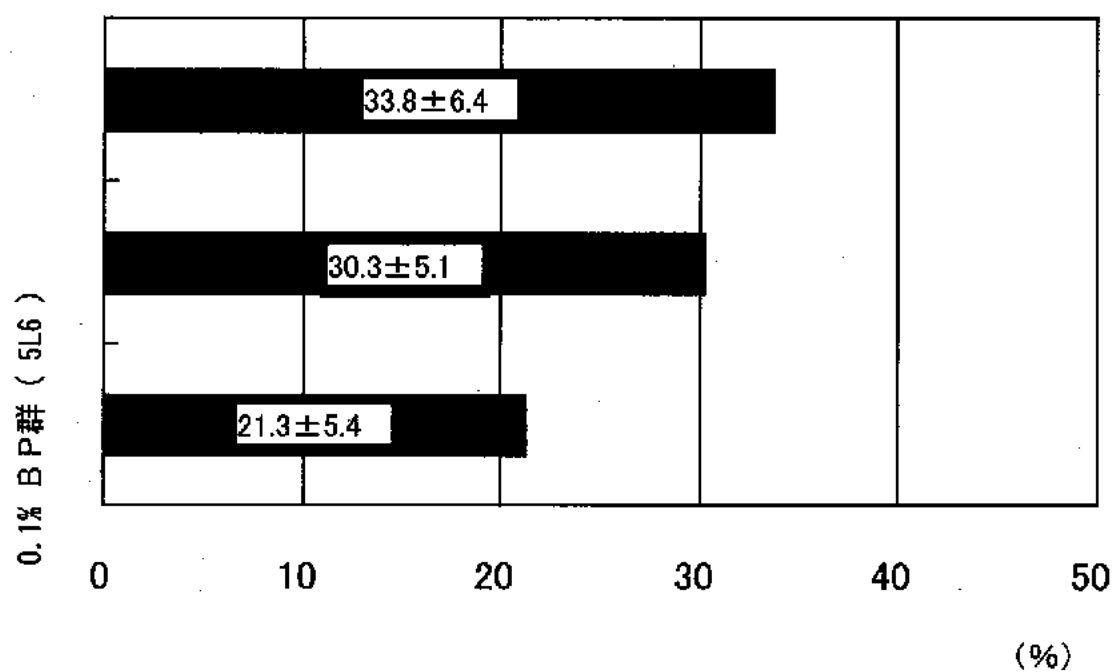


図26. 抗菌活性(混釈平板培養法)

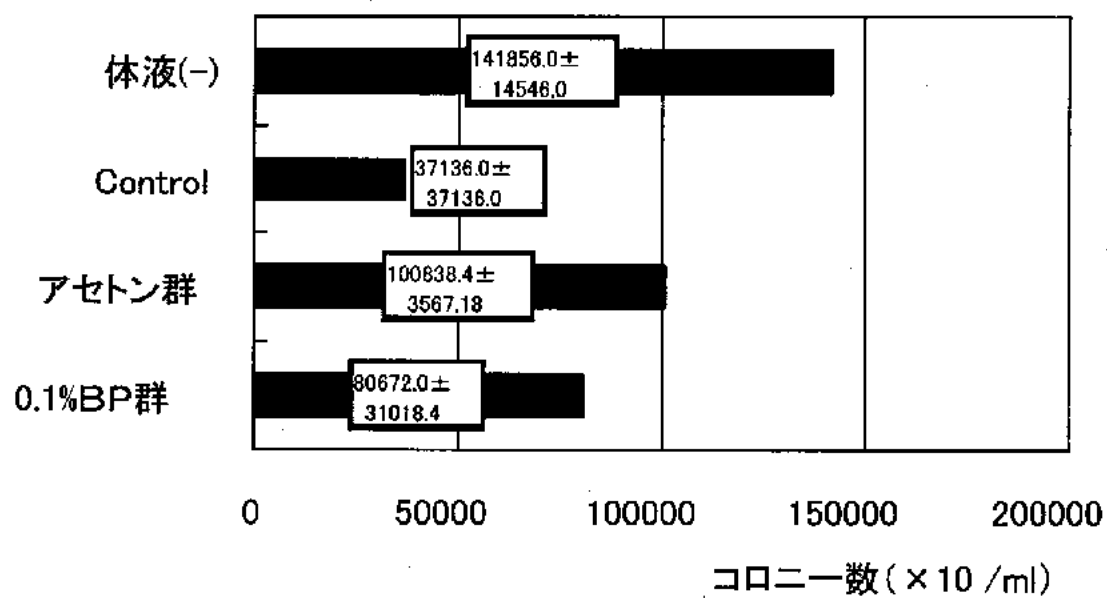
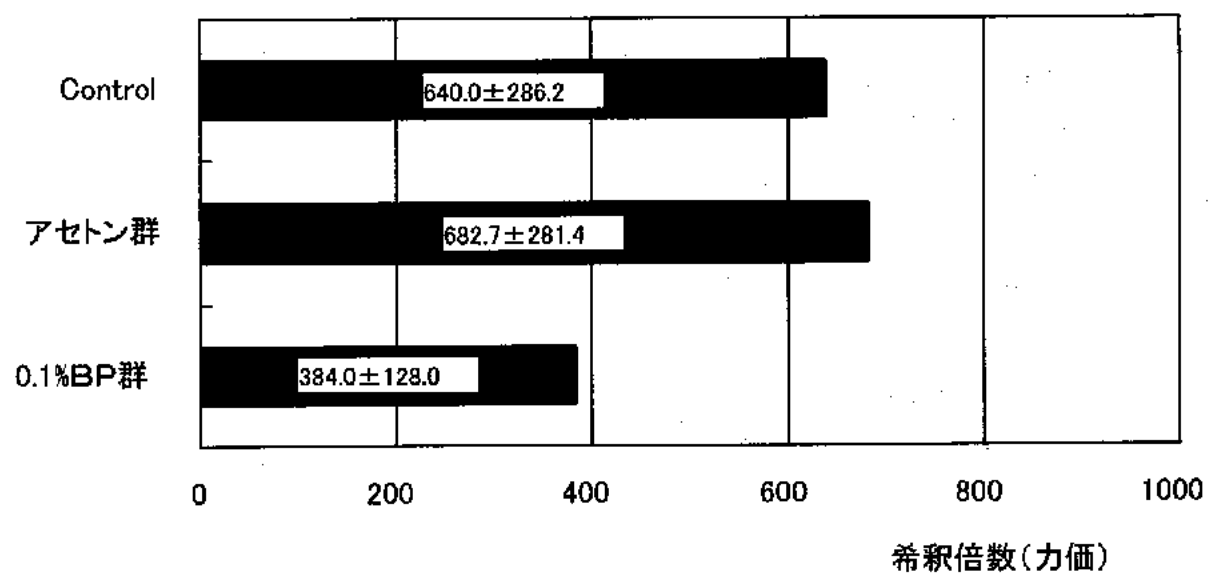


図27. レクチン活性(マイクロプレート法)



14. 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

研究代表者：中村正久（早稲田大学・教育学部・教授）

研究協力者：

田中滋康（静岡大学・理学部・教授）

弓削昌弘（福岡女子大学・人間環境学部・講師）

高瀬 稔（広島大学・理学部・助手）

門上希和夫（北九州市環境科学研究所・水質管理係長）

千木良芳範（沖縄県教育庁文化課・課長補佐）

大内 一夫（埼玉県三郷市・自営業）

武石全慈（北九州市立自然史博物館・学芸員）

倉本 満（福岡教育大学・名誉教授）

小野勇一（九州大学・名誉教授）

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）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。

A. 研究目的

〔1〕両生類（カエル）の実態調査とネットワーク作り

近年、地球環境の悪化によって生息地が狭まくなり、貴重な動物の種の急減及び絶滅が危惧されている。両生類も例外ではなく、国内外で学術的に貴重なカエルが急減している。カエルの急減の要因に、人間による自然破壊や産業廃棄物の蓄積、オゾン層破壊による紫外線の増加、病気、寄生虫、酸性雨などが挙げ

られているが、これらの要因が複合的に作用している可能性もある。従来、国内における両生類（カエル）の実態調査は限られた小区域で個別に行われており、広範囲の組織的な調査は行われていなかった。また、カエルの動態に関する情報ネットワーク作りも遅れていた。国内のカエルの現状を把握するためには、組織的な実態調査並びに情報ネットワーク作りが必要である。ここでは、環境汚染と両生類に対する影響を把握するため、国内の数カ所をモデル地区として選び、両生類（カエル及びイモリ）の実態調査を行う。調査区域は、昨年度と同様、関東、東海、信越、中国、沖縄地方とし、両生類の生息状況、奇形カエルの発生調査を行う。

〔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

平成7年に北九州市小倉北区の山田緑地において発見された過剰肢ヤマアカガエルの原因究明は、これまで内分泌攪乱化学物質やダイオキシン類などに注目して行われてきた。その結果、山田緑地の土壌、カエル及びその卵が、ダイオキシン類やDDT等の有機塩素系物質によって比較的高濃度に汚染されており、さらに母ガエルから卵への移行により、卵中の濃度は親の数倍に達することが確認された。また、山田緑地の土壌からは、有機塩素系物質以外に2,4,6-トリニトロトルエン(TNT)も検出された。しかし、過剰肢の原因としては遺伝も考えられ、平成10年に確保した過剰肢を持つ幼生を成体まで飼育し、平成12年に種々の交配試験を行った。その結果、過剰肢をもつ親からのみ、過剰肢の幼生が得られ、過剰肢は遺伝的であることが確認された。そこで、12年度の調査は、遺伝毒性に注目して山田緑地の環境及び検出物質の遺伝毒性を調査した。具体的には、微生物を用いたバイオアッセイ試験により、TNTなどの検出物質及び山田緑地土壌抽出液の遺伝毒性の有無、及びその強度を求めて、山田緑地におけるカエルの生殖細胞を変異させる物質の存在（または、過去に存在した）を検討した。

〔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

自然破壊及び環境汚染化学物質によるカエルの稀少種の急減や絶滅は、それらの影響が確実に人類に及んでいる警告である。環境汚染化学物質、特に内分泌攪乱化学物質に起因する動物の性分化異常は、どの動物でも発生することが懸念され、ヒトを含めた脊椎動物の生殖機能不全による種の絶滅を引き起こす可能性があるため、早急にこの問題を解決しなければならない。それには、内分泌攪乱化学物質の汚染状況を正確に把握する必要があるため、汚染モニター動物の作製が必要である。性腺で特異的に発現する遺伝子をモニターとして、その遺伝子の発現異常を指標とすることができれば、汚染の拡散状況を測ることができ、それによって汚染の拡散を防止することが可能になる。当研究班は昨年度の研究で、カエル性腺で発現する遺伝子（*FTZ-F1*）のプロモーター領域の下流に蛍光緑色蛋白（GFP）をレポーター遺伝子として繋ぎ、そのDNAコンストラクトをアフリカツメガエル卵内に注入してトランスゲニックカエルの作製を試みた。本年度はモニター遺伝子に*Sf-I*遺伝子を加え、*FTZ-F1*及び*Sf-I*遺伝子をモニターとするトランスゲニックカエルの完成を目指した。

B. 研究方法

〔1〕両生類（カエル）の実態調査とネットワーク作り

（A）インターネットによる国内の奇形カエルの発生情報の収集

インターネットを通じ全国から奇形カエルの情報を得る目的で、昨年度、ホームページ（<http://faculty.web.waseda.ac.jp/nakamura/>）を開設した。本年度もインターネットを通じて得られた情報と実態調査から国内の奇形カエルの発生状況を知った。

(B) 両生類（カエル）の国内実態調査

実態調査（１）：関東地方

昨年度の関東地方の実態調査 6 例の奇形ウシガエルを発見した。本年度も同様にウシガエルを中心として奇形カエルの発生調査を行った。

１）奇形ウシガエルの発生調査

実態調査（２）：東海地方

昨年度の静岡県内の実態調査で 11 種のカエルの生息を確認した。本年度も同様の調査を行い、2 年間にわたる両生類の種類、数、及び奇形カエルの発生などの調査を行った。

実態調査（３）：信越地方

本年度、長野県飯田市売木地区の小中学校のプールで飼育したヤマアカガエルのオタマジャクシの 18% に奇形（尾部形態異常）が発生した。この形態異常の原因の解明を目指した。

１）交配実験による遺伝的解析用奇形カエルの飼育

実態調査（４）：中国地方

中国地方の数カ所に生息するダルマガエルは、昔、西日本では多数生息していた。しかし、現在、広島県では、双三郡吉舎町で少数が生息しているにすぎない。本年度はその実態を調査した。

１）広島県双三郡吉舎町におけるダルマガエルの実態調査

実態調査（５）：沖縄地方

沖縄県沖縄本島北部（山原：やんばる）には、県の天然記念物に指定されている地方固有種（イシカワガエル、ナミエガエル、ハナサキガエル、ホルストガエルなど）が、また、宮古島には地方固有種（ミヤコヒキガエル）が生息している。沖縄群島は自然が多く残されているとはいえ、観光や米軍基地の移転のための土地開発が進行している。その結果、これらの動物の生息地が奪われつつあり、種の急減、及び絶滅が危惧されている。昨年度、当研究班は宮古島、南大東島におけるミヤコヒキガエルとオオヒキガエルの実態調査を行った。本年度は両島と、原生林が残されている沖縄本島北部、降雨量が多く地形的に宮古島、南大東島とは大きく異なる八重山諸島（石垣島、西表島）を新たに加え、カエルの実態を調査した。

１）宮古島、南大東島におけるカエルの実態調査

２）沖縄本島北部におけるカエルの実態調査

３）石垣島、西表島におけるカエルの実態調査

C. 研究結果、及びD. 考察

〔１〕両生類（カエル）の実態調査とネットワーク作り

(A) インターネットによる国内の奇形カエルの発生情報の収集

昨年度、国内の奇形カエルの発生に関する情報を得る目的でホームページ (<http://faculty.web.waseda.ac.jp/nakamra/>) を開設した。送られてきたメールの中に、市内の中学校のプール（図 A-1）で飼育したヤマアカガエルのオタマジャクシに 18.3% の奇形が出現したという情報があった。そこで、現地（長野県飯田市売木）に行き、プールから奇形オタマジャクシ（尾部屈曲、図

A-2) を捕獲し、室内で飼育した。変態後のカエルは外見的に正常（図 A-3）であった。

(B) 実態調査

実態調査（1）：関東地方における奇形ウシガエルの発生調査

平成11年度の実態調査で関東地方において6例の奇形ウシガエルを確認した（図B-1、△印）。平成12年度も奇形カエルの発生調査を行ったところ8例の奇形ウシガエルを発見した（場所、図B-1、○印；奇形部、図B-2～4）。関東地方では他種の奇形カエルは確認されなかった。昨年度の研究報告書に1929年から1998年の70年間に29例の奇形カエルが報告されていることを述べた。下記のデータで分かるように、当研究班の調査によってこの2年間に14例の奇形ウシガエルを発見した。この結果から判断すると、国内における奇形カエルの発生頻度はかなり高いと思われる。今後は奇形カエルの発生原因を明らかにし、それに内分泌攪乱化学物質が深く関わっているかどうかを解明する必要がある。

平成12年度に発見した奇形ウシガエル

①採集年月日：2000年10月 8日

採集場所： 茨城県麻生町

異常の位置：右後肢異常

②採集年月日：2000年11月12日

採集場所： 群馬県館林市

異常の位置：右後肢異常

③採集年月日：2000年12月10日

採集場所： 千葉県野田市

異常の位置：左後肢指欠損

④採集年月日：2001年 1月30日

採集場所： 茨城県土浦市

異常の位置：右前肢欠損

⑤採集年月日：2001年 1月30日

採集場所： 茨城県土浦市

異常の位置：左後肢欠損

⑥採集年月日：2000年 7月27日

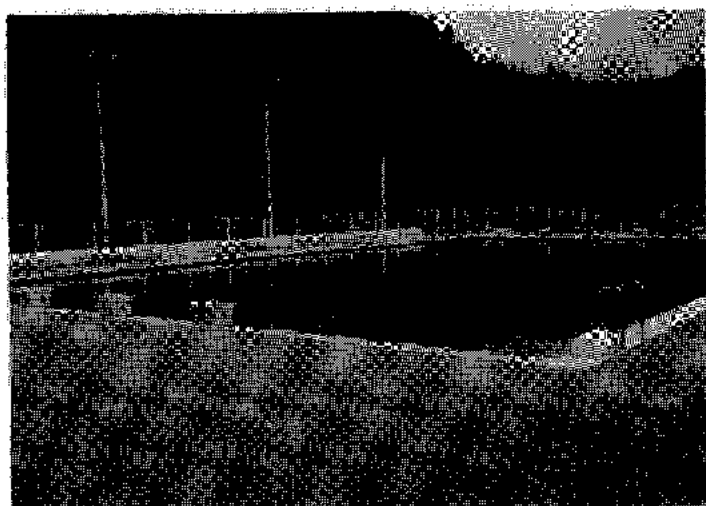
採集場所： 千葉県関宿町

異常の位置：左後肢欠損

⑦採集年月日：2001年 2月 5日

採集場所： 茨城県玉造町

インターネットによる国内の奇形カエルの発生情報の収集



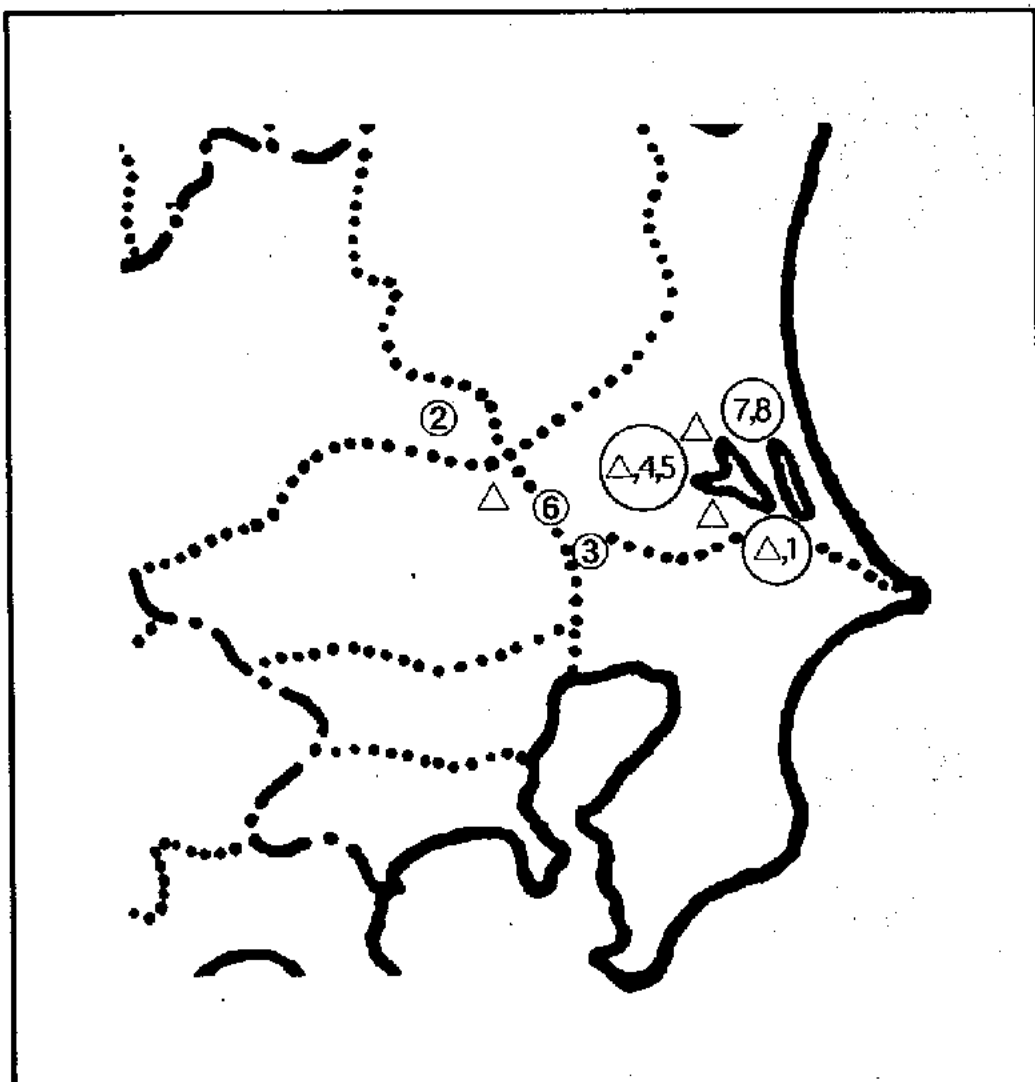
図A-1 奇形オタマジャクシが見つかった長野県飯田市売木小中学校のプール



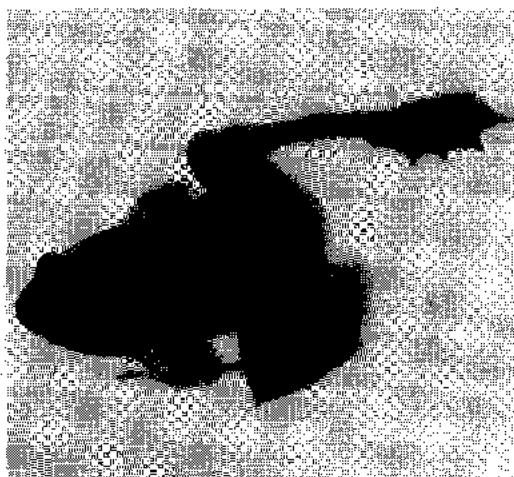
図A-2 捕獲した奇形オタマジャクシ



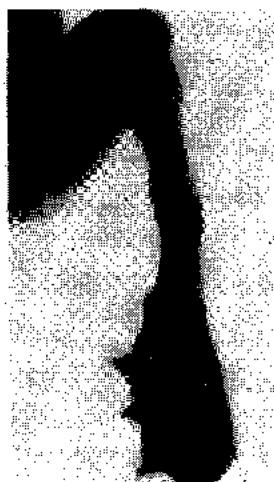
図A-3 アカガエル奇形オタマジャクシの変態後



図B-1 関東地方における奇形ウシガエルの発生地



個体No.1



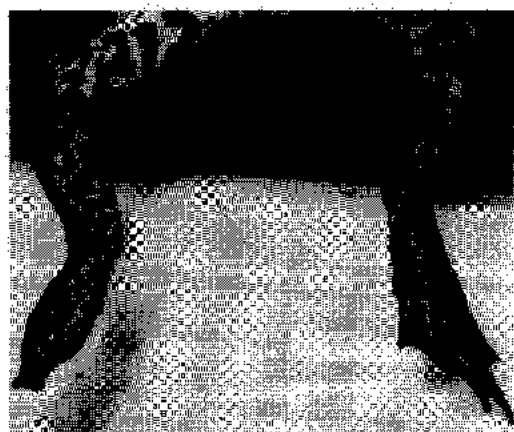
奇形部拡大



個体No.2



奇形部拡大



個体No.3



奇形部拡大

図B-2 関東地方で発見された奇形ウシガエル



個体No.4



奇形部拡大



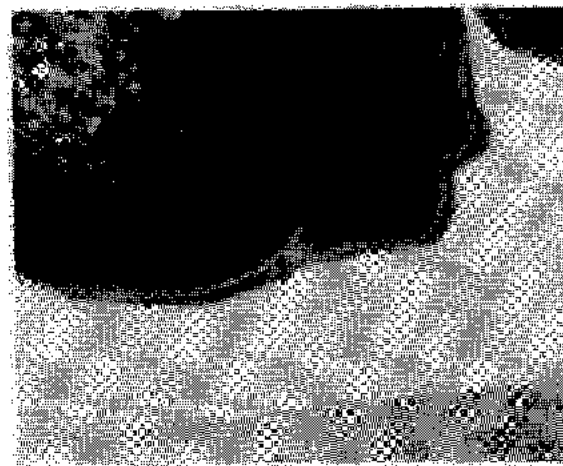
個体No.5



奇形部拡大

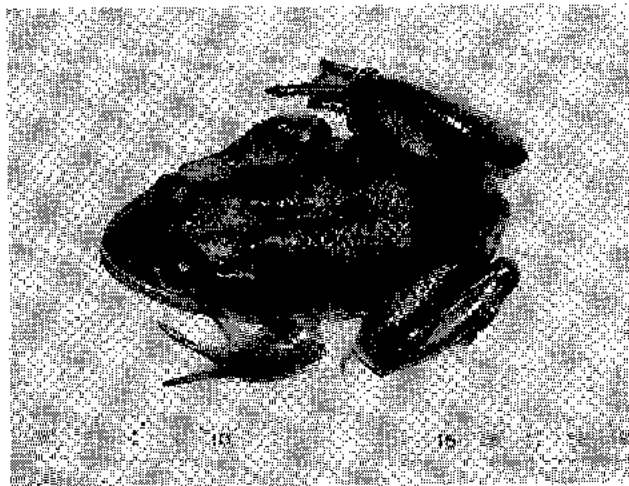


個体No.6



奇形部拡大

図B-3関東地方で発見された奇形ウシガエル



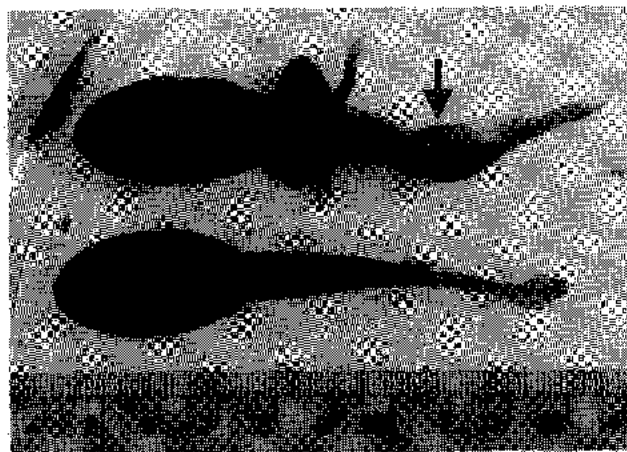
個体NO.7



左後肢（奇形）



右後肢（正常）



奇形幼生（尾部）

幼生（正常）

個体No.8

図B-4 関東地方で発見された奇形ウシガエル

異常の位置：左後肢指欠損（亜成体）

⑧採集年月日：2001年 2月 5日

採集場所：茨城県玉造町

異常の位置：尾部屈曲（幼生）

[考察]

本年度は、8例の奇形ウシガエル（成体、亜成体、幼生）を発見した。従って、全国ではかなりの奇形ウシガエルが発生しているものと思われる。早急に全国規模の奇形カエルの実態調査を行う必要があると結論するに至った。

実態調査（2）：東海・北陸地方

昨年度は静岡県内で11種のカエルの棲息を確認した。本年度も静岡地区、愛知地区、新潟県村上市越後早川で調査を行い（図1、2）、カエルの種類、観察数、並びに奇形カエルの発生等について調べた。

（A）東海地方

（a）調査地区と結果

1）静岡地区

前年度に引き続き、両生類の分布調査を行った。基本的には、前年と同じ所を中心に調査し、前年確認された両生類の種類と比較した。また、過剰肢などの異常が見られるかどうかも確認した。異常のあるものについては記述した。

（1）環境省メッシュ番号：5237-0480

湖西市神座地区。前年度の調査で、ダルマガエル、ニホンアマガエルなどが確認されたが、今年度の夏の調査でも、同じ種類が見られた。ただ、今年の1月の調査では、両生類は確認できなかった。

（2）環境省メッシュ番号：5237-0731

太田川水系占川。昨年度の調査で、アマガエル、トノサマガエル、ウシガエルが確認された。今年度の調査でも、池の周辺の草むらで同じ種類が確認された。トノサマガエルは、草刈りのため一時減ったが、再び草が生えてくるにしたがって、回復したようである。また、今回ヌマガエルが新たに確認された。昨年度の調査でこの場所に生息していたウシガエルのオタマジャクシの中に、後肢に奇形が見られる個体が1個体見られたが、今年度の調査では、ウシガエルの幼生を同じ個体数（100個体）捕獲したが、奇形個体は確認されなかった。

（3）環境省メッシュ番号：5237-0780-81

磐田市桶ヶ谷沼。昨年度の調査では、アマガエル、ヌマガエルなどが見られた。2000年4月29日に行われた調査でも同じ種類が確認され、さらにニホンアカガエルも新たに確認された。2000年11月12日にも、同じ場所で調査が行われたがこの時には、両生類は確認されなかった。

(4)環境省メッシュ番号：5237-1586, 87, 77, 76 の境界

都田川水系、天竜浜名湖鉄道浜松大学前駅周辺

6 月中旬に浜松市都田町の天竜浜名湖鉄道浜松大学前駅の周辺で両生類の分布調査を行った。1 時間ほどの採集を行ったところ、ダルマガエルと思われるカエル 11 個体、トノサマガエル 3 個体、イモリ 3 個体、ツチガエル 4 個体、ヌマガエル 1 個体が採集された。採集されたものは以上の通りであるが、周辺の水田にはまだ多くのカエルが確認された。その個体数は多く、歩くたびにカエルがはねるといった感じであった。

(※ツチガエル、ヌマガエルは数百単位、イモリ、ダルマガエル、トノサマガエルも数十単位)その調査場所は、周囲が水田であり、水が豊富に存在する。水田の中心には農業用水もひかれている。さらに、水田の水路がコンクリートで固められておらず、水路の周辺には草も生え、両生類の生息に適した環境が残されている印象を受けた。

この場所で後肢に異常のある個体(トノサマガエル)が確認された(図3)。

また、冬に調査場所を訪れたところ、コンクリートで固められていないところでイモリ(アカハライモリ)を確認した。冬は、農業用水が水田にひかれられないため、水のある環境がなくイモリの生息に適さないところが多いが、コンクリートでおおわれておらず、また近くに都田川が流れているこの場所では、冬でも水のある環境が残されていた。

(5)環境省メッシュ番号：5237-1647

天竜川左岸の 33 番池。昨年度の調査では、ウシガエル、アマガエル、ヌマガエル、トノサマガエルが確認された。今年度の調査では、アマガエル、ヌマガエルが草むらで見られたが、環境が変わっていないことから、ウシガエル、トノサマガエルも同様に生息しているものと思われる。ただ、33 番池の水質はよくないので、奇形などが見られる可能性も否定できず、引き続き調査を継続したい地点である。

(6)環境省メッシュ番号：5237-2738

掛川市の西ノ谷川の中西之谷地区では、昨年度 7 月の調査で、カジカガエルをはじめ、アマガエル、ツチガエル、トノサマガエルなどさまざまなカエルが確認された。今年度の調査は行われていないが、環境の変化もなさそうであるし、周囲にもよい環境があるので、引き続き生息しているものと思われる。

(7)環境省メッシュ番号：5237-4239

美和小学校の近くの水路。洗剤が混入しているらしく、泡立っている。昨年の調査では、冬季でも 50 個体くらいのイモリが確認され、指が分かれている個体が発見された地区である。今年度の冬(2000 年 12 月)に、調査したところ、イモリは 1 個体も確認できなかった。イモリの移動も考えられるが、水路の深くなっている部分に昨年あった落ち葉が、今年はなかったもので、その影響も考えられる。

(8)環境省メッシュ番号：5238-3039-29

大井川水系の身成川沿いの一色地区。昨年の調査で、ヤマアカガエルが確認されたが、今年は調査が行われなかった。しかしながら、環境が変わっていないということ、同じような環境が、流域に広がっているので、ヤマアカガエルは生息していると考えられる。

(9)環境省メッシュ番号：5238-3264-74

藁科川右岸、飯間地区。昨年、カジカガエルが目撃されたが、今年も、藁科川の川原で見られた。付近一帯にいて考えられる。また、今年新たに行った、支流の上流にあるわらしな学園の近くでの調査では、イモリ、アマガエル、ヌマガエル、トノサマガエルが確認された。ヌマガエルは、10 個体程度採集され、うち 1 個体で後肢が 3 本ある、過剰肢の奇形が見られた（図 3）。

(10) 環境省メッシュ番号：5238-3343

静岡市にある登呂遺跡。今年新たに調査を行ったところ、アマガエル、ヌマガエル、ツチガエルが確認された。ここで地元の人から過剰肢のカエルを見たという情報を得て、2000 年 7、8 月に 2 回調査を行ったが、過剰肢のカエルは見られなかった。ただ今後も調査を継続していく必要のある地点である。

(11) 環境省メッシュ番号：5238-3354-55

昨年、静岡大学の裏山でカジカガエルの鳴き声が聞かれた。自然環境に人の手が入っていないので、姿は確認できなかったが、生息していると思われる。また、今年度、裏山の水辺には、モリアオガエルが確認され、卵塊も見られた。モリアオガエルの幼生数は、100 個体以上であり、いくつかのペアが産卵場所として使用しているようである。

また、大谷地区の田圃には沢山のアマガエルが生息し、その中に図 3 に示すような左後肢先端が欠如し、さらに左前肢が短縮している個体が発見された。

(12) 環境省メッシュ番号：5238-3376

日本平の平沢観音の周辺では、アマガエル、ヌマガエル、イモリ、シュレーゲルアオガエルが確認されたが、今年度も同様に見られた。

(13) 環境省メッシュ番号：5238-3792

狩野川支流の山田川の流域の山田地区では前年度アマガエルが見られたが、今年度の調査は行われていない。ただ、環境の変化はあまり無いように思われる。

(14) 環境省メッシュ番号：5238-3794

狩野川水系地蔵淵の水路。ジュズダマが多く生え、湿生植物の種類が豊富なところで、前年度の調査でアマガエルが多数確認されたが、今年は夏に調査は行われていない。今年(2001 年)の 2 月に調査を行ったが、両生類は見られなかった。

(15) 環境省メッシュ番号：5238-5178(68)

大間にある福養滝では、昨年度、カジカガエルが 1 対確認された。地元の話では、夜うるさいくらいの声がするとのこと。今年度は、調査は行われなかったが、環境の変化はないようである。

(16) 環境省メッシュ番号：5238-5266

奥池ヶ谷の中河内川近くで、カジカガエルがたくさん見られた。ここでは、昼も鳴くくらい一帯に生息しているようである。今年度は、同地区に行っていないが、例年同じ場所で見られることから、今年も同じように生息しているものと思われる。

(17)環境省メッシュ番号：5238-5295

前年度の調査で、湯野地区の中河内川近くにおいて、モリアオガエルのもと思われる卵塊5個が観察された。その場所は、道路の山側の沢が出てきているところである。その後は同場所に行っていないが、工事などは行われていないようである。

(18)環境省メッシュ番号：5238-5380(70)

平野の黒部沢の出会いでは、イモリがたくさん生息している。カジカガエルも10個体ほどは容易に確認できる。モリアオガエルの卵塊も見られた。ヒキガエルも成体が1個体確認された。卵も確認された。今年は見に行っていないが、毎年見られるようである。

(19)環境省メッシュ番号：5238-4248

諸川池。昨年度の調査では、トノサマガエル、ツチガエル、イモリなどが採集された。これらは、今年度の調査でも確認された。さらに、今回ヌマガエル、アマガエルも見られた。また、この近くを流れる川の岸辺では、トノサマガエルが1個体確認された。

(20)環境省メッシュ番号：5238-4311

麻機遊水地の水路では、昨年の調査で、成体になったばかりのヌマガエルが確認されていた。しかし、今年調査を行ったところ、その水路の上がコンクリートでふたをされ、個体数が減ったという地元の人の意見も聞かれた。またこの地区では、ウシガエル、アマガエルも確認された。

(21)環境省メッシュ番号：5238-4322-23

同じく遊水地の水路であるが、ヌマガエルが多い。また、山際の水路にはわずかであるが、イモリの生息が確認されているが、今年度は調査が行われていない。

(22)環境省メッシュ番号：5238-4344

北沼上にある細い水路。昨年の調査では、イモリ、アマガエル、ツチガエルなどが確認されていたが、昨年の秋の調査では、その水路が工事され、水路そのものが壊されていた。ただ、近くにある井戸のところでは、今年もツチガエルが確認されたが、他の種類のカエルは見られなかった。しかし、草むらが多いので、これらのカエルは他の水環境で生き残っている可能性も考えられる。

(23)環境省メッシュ番号：5238-4352

麻機遊水地の北側の山では、タゴガエルの鳴き声が聞かれる。また、地元の人によって交接しているところがビデオカメラでおさめられている。今年度の調査でも、タゴガエルは、確認されている。

(24)環境省メッシュ番号：5238-6169

井川にある民家の池では、昨年度の調査によって、ヒキガエルとヒダサンショウウオが確認されていたが、今年度の調査で、ヒキガエルが5対以上見られ、池が卵でいっぱいになった。産卵は3月に行われ、5月の初旬には孵化するらしい。このヒキガエルの産卵は、毎年続いている。ヒキガエルの孵化するころにイモリも多数現れ、ヒキガエルの幼生を捕食しているようだ。ヒダサンショウウオも、前年度に引き続き確認されたが、同じメッシュにある別の池には、ハコネサンショウウオの生息も確認された。

[考察]

上述したように、昨年確認された場所では同じ種類が確認されるとともに、新しく、ハコネサンショウウオやアズマヒキガエルを見つけた。正確な分布を得るには、継続した調査が望まれる。また、新しい調査地点を増やすことも考えなければならないのかもしれない。足に異常のある個体が確認された場所（*磐田市古川、静岡市美和、わらしな学園前）があったので、その場所は定期的な調査をする必要があると思われる。また、奇形個体は確認されなかったが、水質がよくない地点（*天竜川水系 33 番池、静岡市麻機遊水地周辺）もある。内分泌攪乱化学物質という観点からすると、その場所の水質も合わせて調査することが必要と思われる。

2) 愛知地区

調査地：愛知県中島郡祖父江町祖父江地内

調査期間：平成12年4月～12月

調査方法：実地調査と写真撮影

[結果]

祖父江町は愛知県尾張地方西部、木曾川の東岸に位置しており、対岸は岐阜県である。人口は約2万3000人、面積は2,212ヘクタールで、市街化区域は150ヘクタールである。主な土地利用は水田550ヘクタール、畑地470ヘクタール、住宅地・工業用地450ヘクタール、その他、雑木林、河川敷緑地などである。調査地点は町内でもっとも住宅が密集している地域であるが、水田や用水路も見られ（図3）、無尾類が生息している。今回の調査では10箇所を調査地点に選び、多少に関わらず生息しているカエルの種類を明らかにすることに重点を置いた。

最もよく見られたのはアマガエルで、水田を中心に比較的多く生息していると思われる（鳴き声は一昨年は11月19日、昨年は11月27日まで聞かれた）。しかし、周囲の宅地化が進んだためにコンクリートの壁に囲まれて一枚だけ取り残されたような水田では、アマガエルが日中を過ごす場所がないためか、他の水田と比べてカエルの数は目立って少なかった。シュレーゲルアオガエルはほとんど見られなかった。

アマガエルに次いでよく確認されたのはダルマガエルであった。愛知県、岐阜県を含む東海地域はトノサマガエル、ダルマガエル、トウキョウダルマガエルの3種とも生息しているが、この調査地ではほとんどがダルマガエルであった（図4）。この調査地のダルマガエルの中にはいわゆる「名古屋種のダルマガエル」として報告されてきた特徴を持つものよりはトノサマガエルに近いものも多い（図4）。後肢は短い、背中の斑紋は独立性が低く、背中の隆条が比較的発達しており、明確な背中線が認められるものが大部分で、腹は白い。これらのことから、この調査地ではトノサマガエルとダルマガエルの交雑が進んでいるとも考えられ、自然が比較的残っているように見えるこの地域でも生息域の狭小化による自然雑種の増加が危惧される。このほかに確認されたカエルはヌマガエルとウシガエルであった。調査期間中、外見から奇形あるいは異常が認められる個体はなかった。また、雨の日の夜にはアマガエルやダルマガエルが道路上で轢死しており、人間の活動がカエルの生息数減少の大きな原因となっていることが窺われた。

[考察]

今回もっともよく確認されたアマガエルでさえその数は「散在している」程度で、決して「多い」とは

言えない。今後はこの調査をさらに継続してカエルの生息状況と生息数の減少状況をより明らかにするとともに、内分泌攪乱化学物質等の影響が生殖系や甲状腺系に及んでいるかどうかを調査し、生息数の減少を防ぐための提言をまとめる必要がある。また、トノサマガエルとダルマガエルとの交雑の状況はこれらの種の個体数の減少に直接影響を及ぼすだけに、今後精力的に調査する必要がある。

(B)北陸地方

1)新潟県村上市

昨年に続き、村上市周辺地区でイモリの生息状況を調査した。越後早川地区では、極端にイモリ生息数が減少している。この原因は水路をコンクリートで固めたこと、一年を通して採集が可能であるため研究用に頻繁に採集されたことによると思われる。図5に1980年代と現在の状況を示した。一方、村上市から少し山の中に入った中継、大毎、高根、大栗田地区などの田圃あるいは用水路にはイモリも多く生息していることが確認された。これは、これらの地区が人為的な影響を余り受けていないことによると思われる。

表1：本年度の調査（東海・北陸地方）で生息が確認された両生類のリスト

両生類

有尾目

サンショウウオ科

ヒダサンショウウオ *Hynobius kimurae*

ハコネサンショウウオ *Onychodactylus japonicus*

イモリ科

アカハライモリ *Cynops pyrrhogaster*

無尾目

アマガエル科

ニホンアマガエル *Hyla japonica*

ヒキガエル科

アズマヒキガエル *Bufo japonicus formosus*

アカガエル科

ニホンアカガエル *Rana japonica*

ヤマアカガエル *Rana ornativentris*

タゴガエル *Rana tagoi*

トノサマガエル *Rana nigromaculata*

ツチガエル *Rana rugosa*

ウシガエル *Rana catesbeiana*

ダルマガエル *Rana brevipoda*

ヌマガエル *Rana limnocharis limnocharis*

アオガエル科

シュレーゲルアオガエル *Rhacophorus schlegelii*

モリアオガエル *Rhacophorus arboreus*

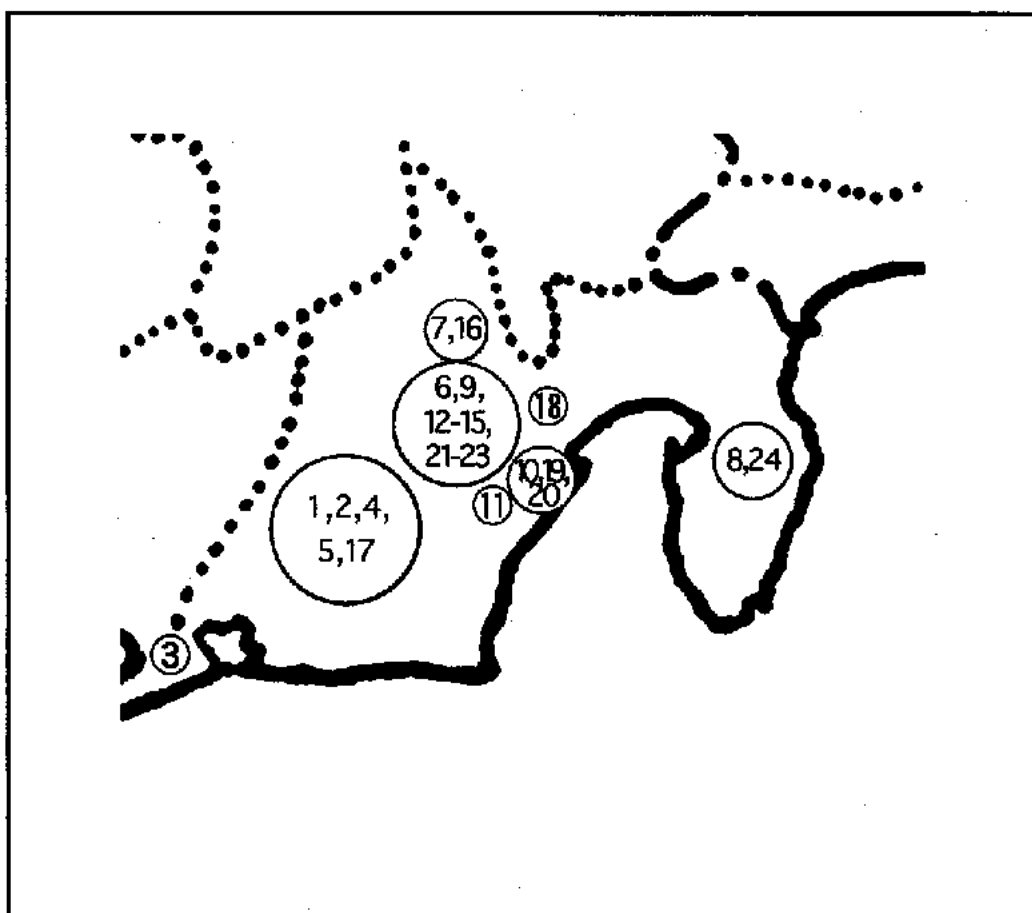


図1 静岡県における本年度の調査場所

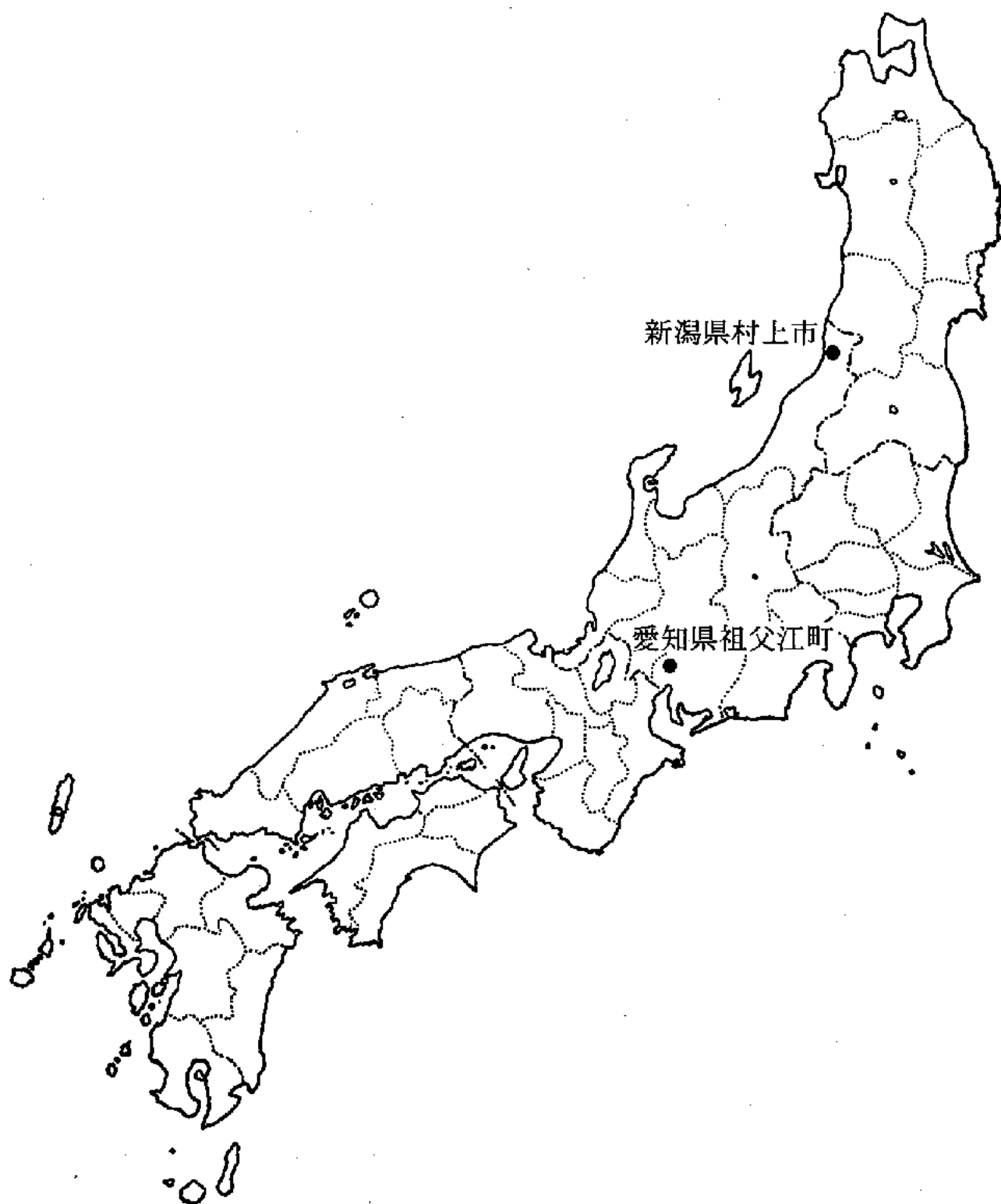


図2 東海・北陸地方における本年度の調査場所

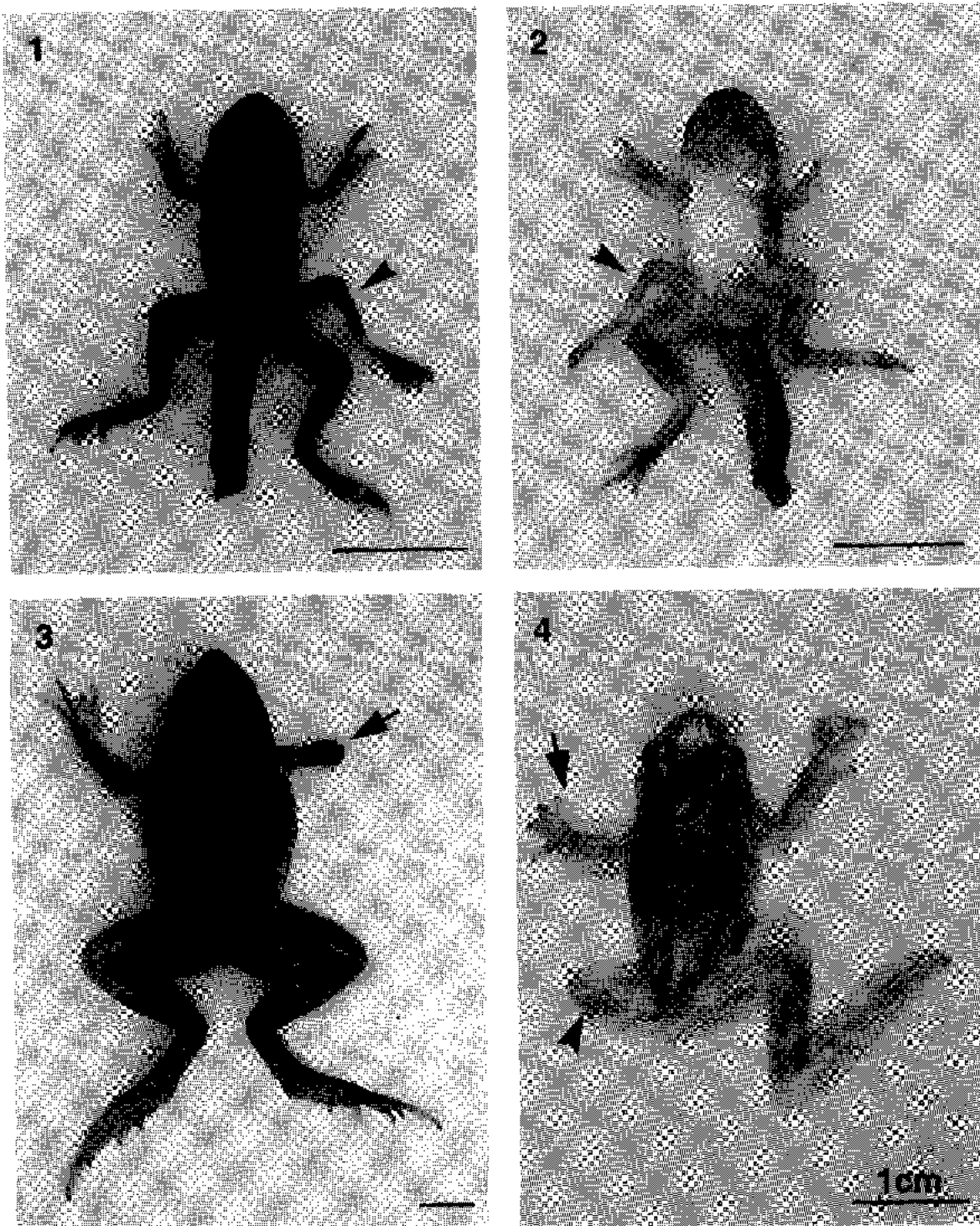


図3. 今年度の静岡地区の調査によって発見された奇形カエル
 (1)、(2) 藁科川右岸、飯間地区で発見された過剰肢ヌマガエル
 (3) 右前肢に異常が見られたダルマガエル
 (4) 大谷内区で発見された前後肢奇形ニホンアマガエル

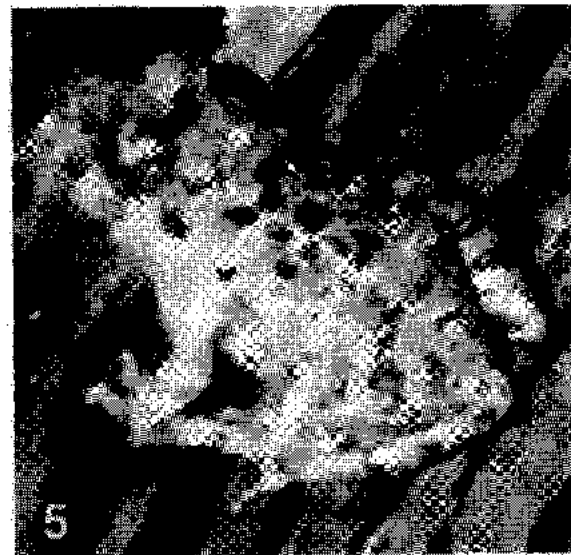
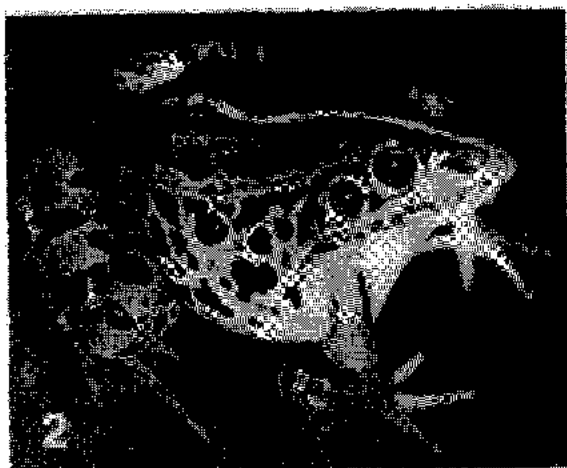
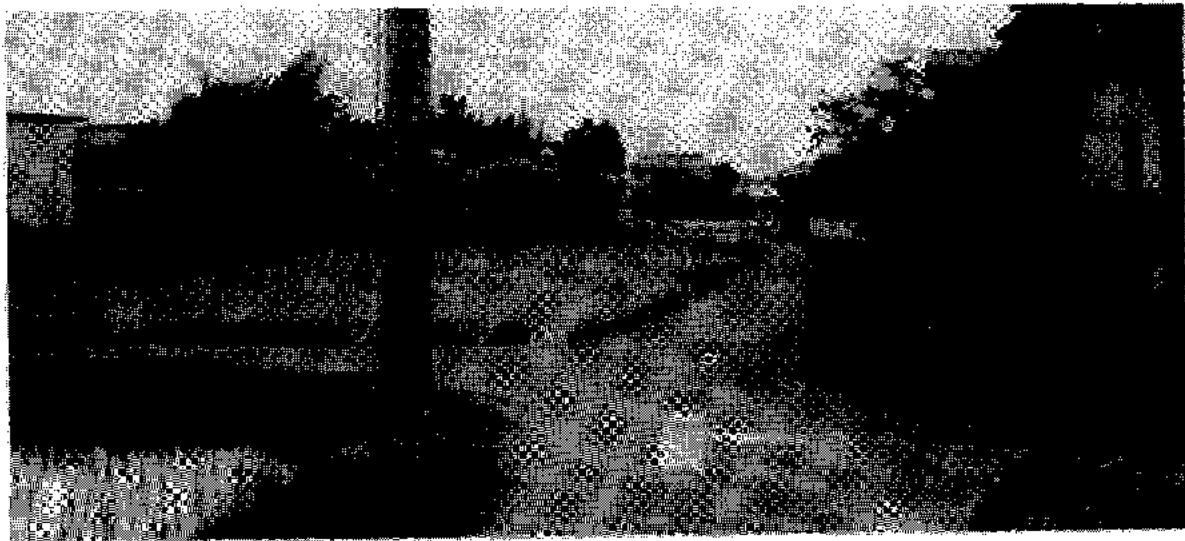


図4. 愛知地区に生息するカエルたち

(1) 調査地点の風景、(2) ダルマガエル、(3) 変態中のダルマガエル、(4) 名古屋種 ダルマガエルを示す。

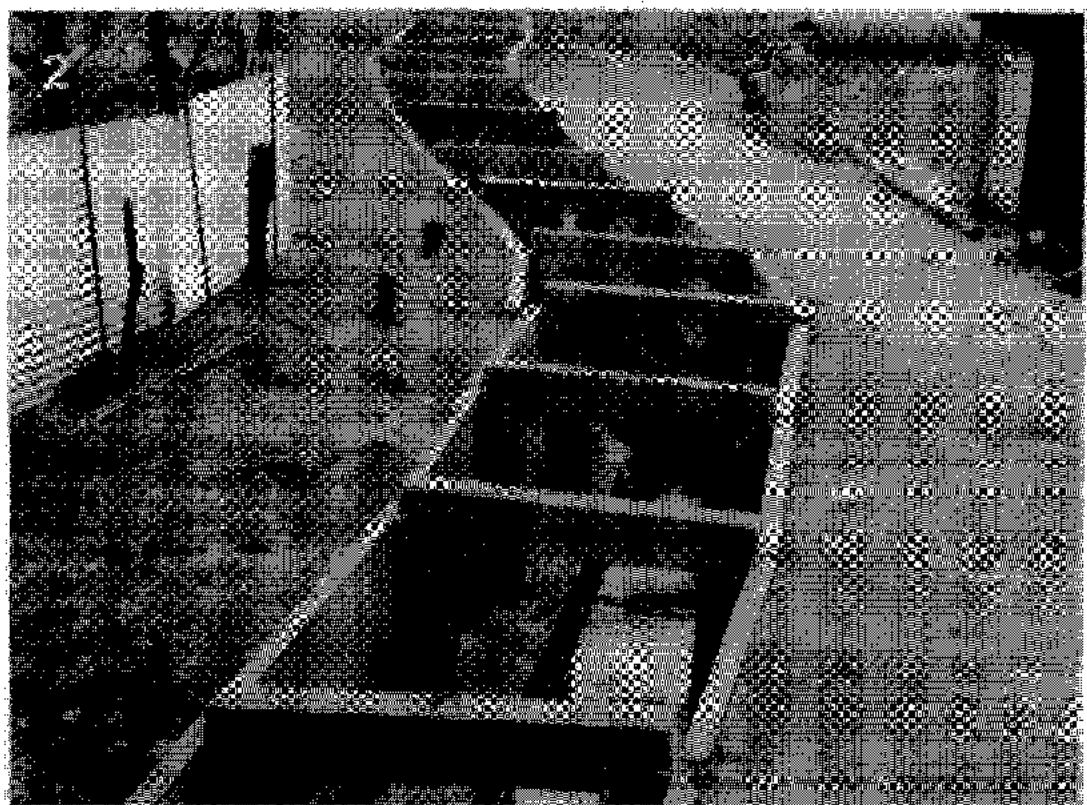


図5. 新潟県村上市周辺のイモリ生息地の過去(1)と現在(2)の風景
ほぼ同じ場所を示す。

実態調査(3): 信越地方

長野県飯田市売木地区の中学校のプール(図 A-1)で飼育したアカガエルの奇形幼生が見つかった([1]
- (A) 参照)。

調査(1): 長野県飯田市売木

採集年月日: 2000年8月6日

採集場所: 長野県飯田市売木小中学校プール

異常部: 背骨及び尾部の屈曲

[考察]

この奇形が遺伝的要因によるものかどうかを究明するため、交配実験を行う目的で飼育を続けている。しかし、交配実験を行うには個体の成熟を待つ必要があり、それには2年を要する。交配実験の結果、その奇形が遺伝的であると結論されれば、奇形誘因物質を同定し、その作用機序を解明する必要がある。奇形幼生の発生要因としてプールの表層塗料が考えられるため、現在、プールの製造会社が水質検査中である。

実態調査(4): 中国地方

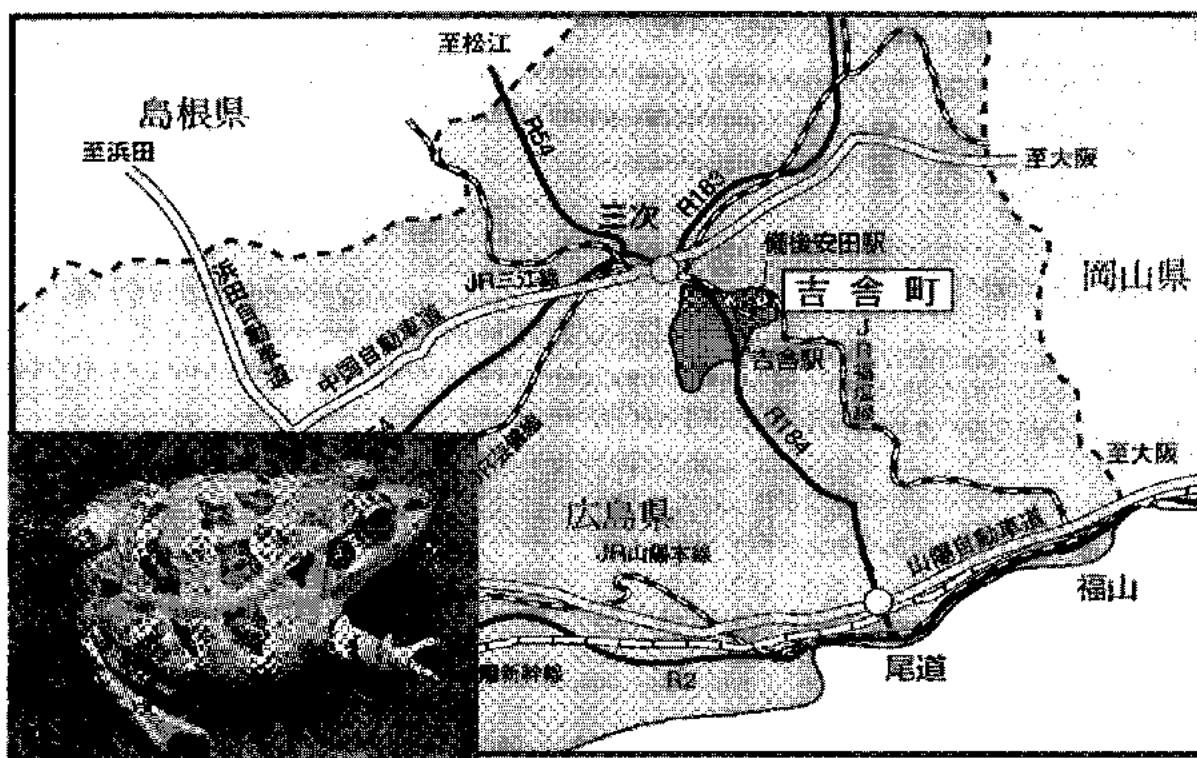
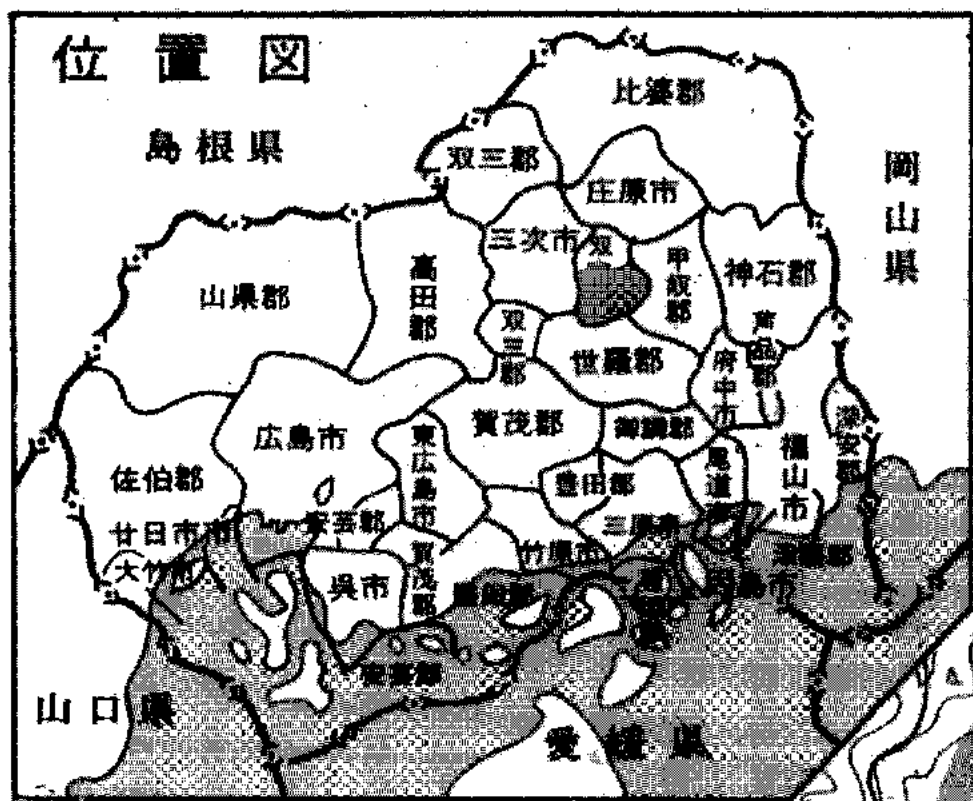
ダルマガエルはトノサマガエルと近縁で、茶褐色から緑色である。しかし、トノサマガエルと異なり、背中線を欠き後肢は短く、体はややずんぐりしている。背面には独立した黒く丸い斑紋がある(図4-1)。このカエルは東海・近畿・瀬戸内海東部沿岸の低湿地や水田、蓮田に生息しており、東京、名古屋、岡山の3地方種族がある。東京、名古屋種族は個体数が著しく減少し、岡山沿岸部のものも生息数は極めて少ない。広島県のは西限でもあり学術的にみても貴重な存在である。かつて、広島県では、福山市周辺(福山市、神辺町、府中市、三原市)で広く生息していたが、市街化のため絶滅したと考えられ、現在、生息が確認できるのは双三郡吉舎町だけである。吉舎町は広島市から北東に向かって90km、四方を山で囲まれた人口6000人の小さな町で(図4-1)、町内には400基もの古墳がある。歴史が古く小さな町であったため、平成3年までは町内安田地区を中心に多くのダルマガエルが生息していた。しかし、平成4年に灰塚ダム建設に伴う周辺諸事業や水田の基盤整備事業が開始され、生息環境が激変したため(図4-2、3)、現在では生息数が極めて少ない絶滅に近い状態だと考えられている。その実態を調査する。

調査(1): 広島県双三郡吉舎町

調査年月日: 2000年11月24日

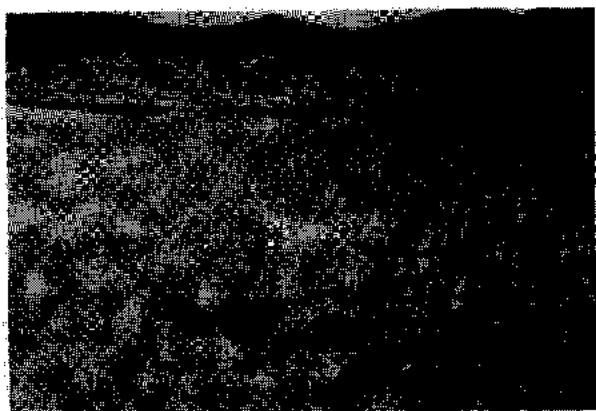
[考察]

吉舎町安田地区の調査では、時期が少し遅かったせいか、ツチガエル亜成体1個体を確認しただけで、ダルマガエルは1個体も確認できなかった。安田地区は平成3年以前は、ダルマガエルの生息に適した水田が多く残っていた(図4-2)。しかし、平成4年、安田地区中山間地域農村活性化総合整備事業が開始され、圃場整備が行われたため、水田の溝はコンクリート化され、周りの土も硬く固められてしまった

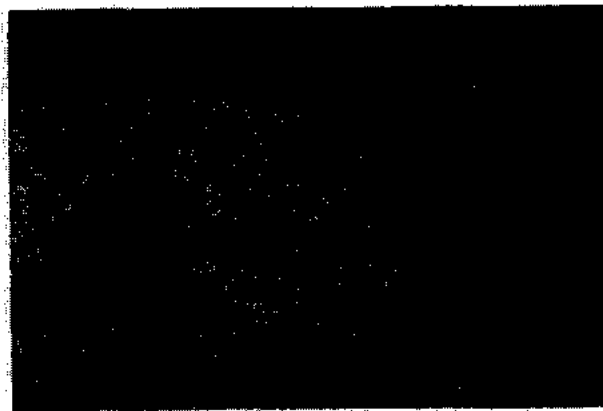


ダルマガエル

図 4-1 広島県双三郡吉舎町の位置



(1)

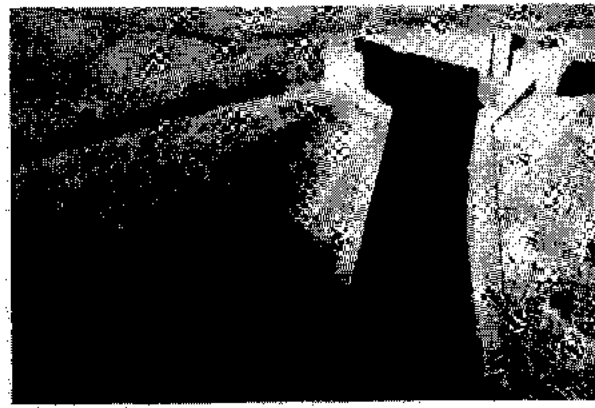


(2)

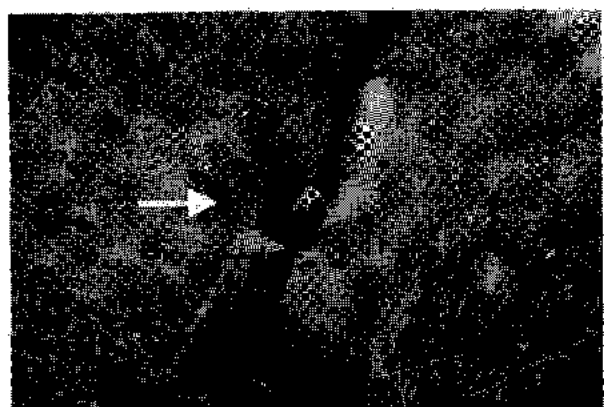
平成3年 整備着工前の田圃



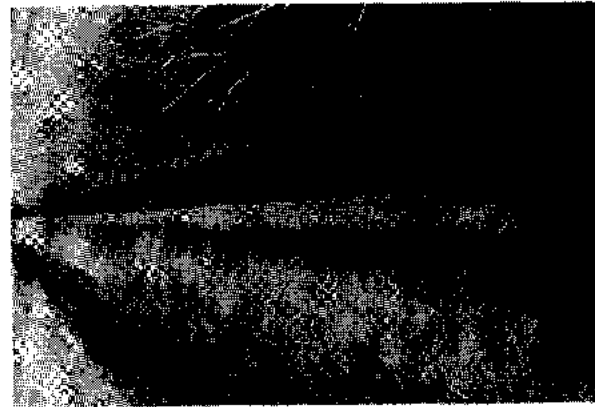
(3)



(4)



(5)



(6)

矢印は脱出スロープを指す

平成12年 整備後の田圃（溝はコンクリート化されている）

図4-2 区画整備前後の吉舎町の水田

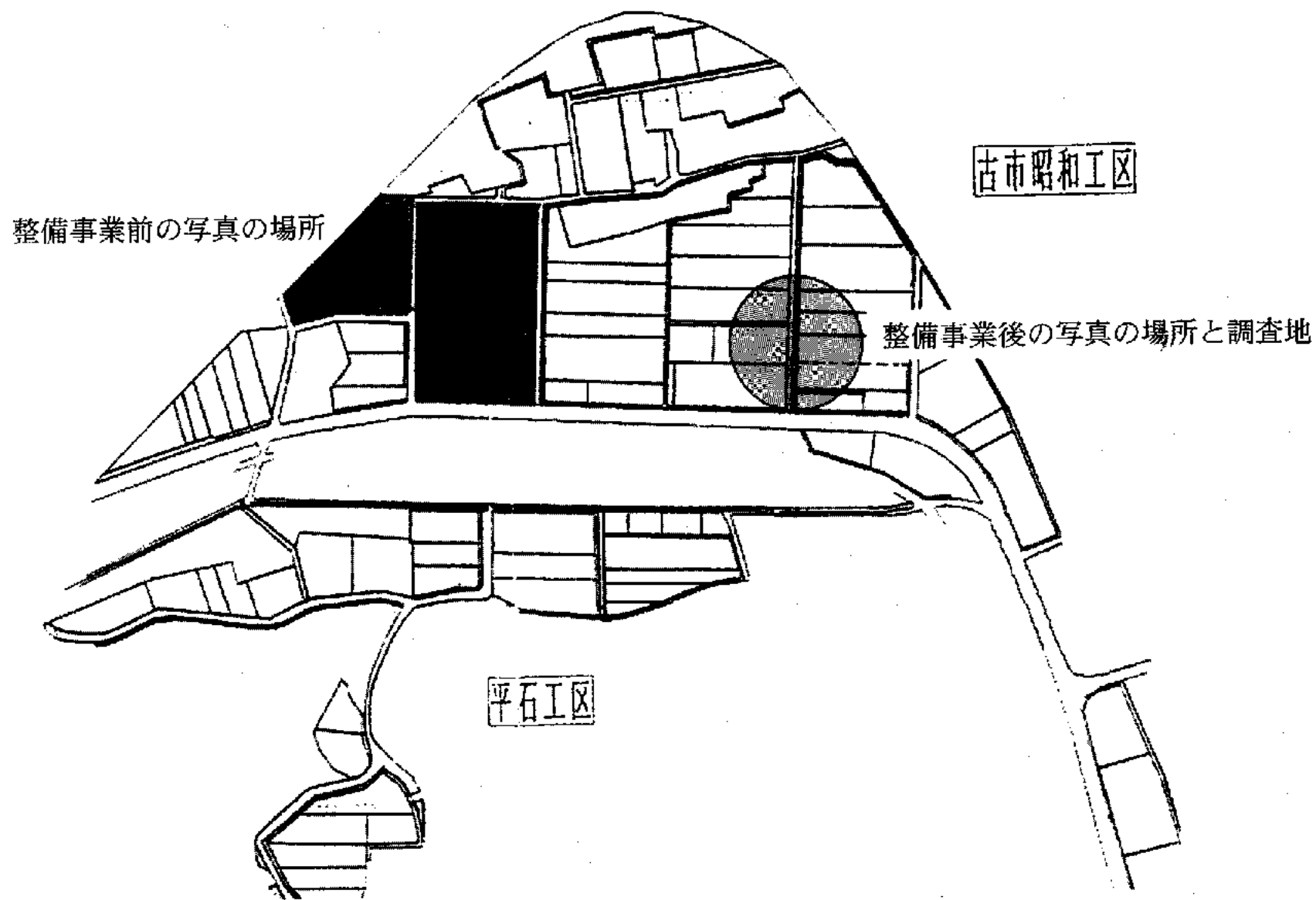


図4-3 平成4年度着工安田地区中山間地域農村活性化総合整備事業平面図

(図4-2、3)。そのため、カエルの冬眠に不適な環境になったと思われる。また、晩秋の農閑期には上を耕すためにトラクターが入っている。従って、水田の土中にカエルが冬眠していたとしてもトラクターの刃の犠牲になってしまう可能性が極めて高い。平成3年の灰塚ダム水没地域・動植物調査で安田地区にダルマガエルが生息していることが確認され、平成7年に「広島県の絶滅の恐れのある野生動物（絶滅危惧種）」に選定された。平成5年には149個体が茨城県つくば市（爬虫両生類情報交換会）に移され、広島「おおの自然観察の森」とともに幼生の人工孵化、放流が開始された。吉舎町教育委員会は、積極的に保護活動を行ない、毎秋に安田小学校児童の協力を得て生息状況調査を実施している。その調査結果（ダルマガエルの幼生放流数と秋の生息数）は次の通りである。

ダルマガエルの幼生放流数と秋の生息数（吉舎町教育委員会資料による）

	放流	生息数
平成 7年	約2,000匹	20匹
8年	1,280匹	143匹
9年	約2,000匹	258匹
10年	219匹	182匹
11年	269匹	99匹

吉舎町に生息するダルマガエルの保護に吉舎町教育委員会、県森林保全課、三次農林林務課、並びに多くの研究員が全力をあげて取り組んでいる。ダルマガエルは成体になるのに3年を要する。前年度に放流したカエルが生存しているとすれば、毎年、生息数の増加が見込まれるが、平成10、11年の生息数は減少している。この結果は、カエルが成体になって繁殖活動を行う前に死んでいることを示している。その原因として、溝のコンクリート化による生息場所及び産卵場所の狭小化、冬眠場所の消滅などが考えられる。カエルがコンクリートの溝に落ちた場合、溝から出られるように脱出スロープ（図4-2(5)、矢印）を数カ所に設置しているが、広く長い溝でカエルがそのスロープに到達するのは極めて困難であろう。

広島県でダルマガエルの唯一の生息地、吉舎町でこの種の保存のため、多くの方々が努力されているので、この地で再びにぎやかなダルマガエルの鳴き声を聞くことができるかもしれない。ダルマガエルを更に増やすには、放流数をもっと増加すること、加えて、安田地区とは別の近接地区にも放流する必要がある。もし、近郊に溝がコンクリート化されていない休耕田があればその土地を何年か借り、そこにカエルの成体及び幼生を放流することも考えてよいのではないか。いずれにしても、ダルマガエルの保護で直面している問題は、他の絶滅危惧種の保護で直面している問題と共通している部分がかなりあると思われる。それらの問題を早急に解決することが絶滅危惧種を保護することになる。

実態調査（5）：沖縄地方

①南大東島

南大東島は沖縄本島や小笠原諸島と同緯度にあり、沖縄本島から東に約400kmにある周囲20.6km、人口約1500人の小さな島である（図5-1）。この島は地質学的に、大陸や日本列島と一度もつながったこ

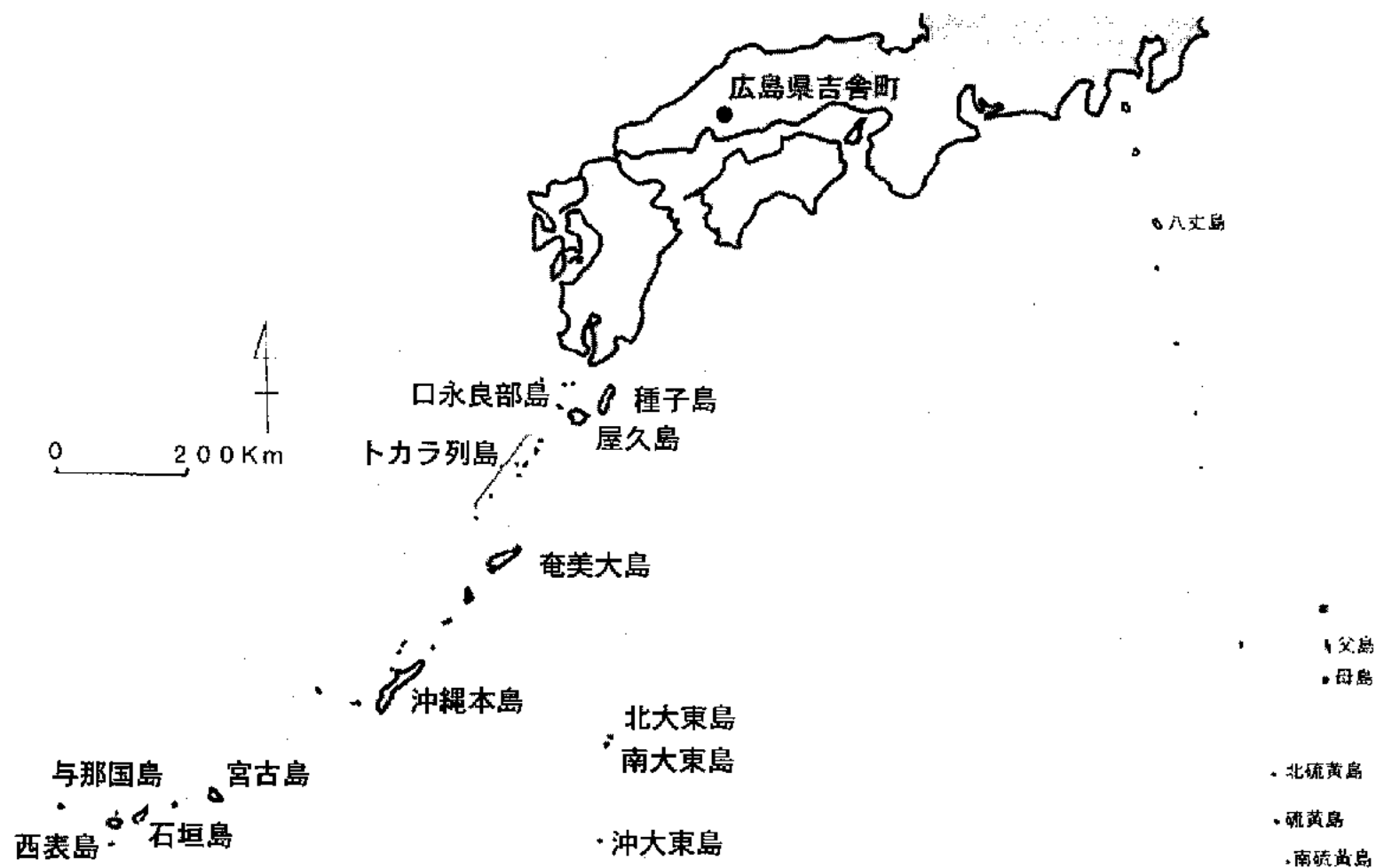


図 5-1 西日本の調査地

とがないので、さまざまな固有の生き物が豊富に見られる。南大東島と北東に約 8km 北にある北大東島、そして南に約 160 km 離れた沖大東島を含めた 3 島を大東諸島と呼んでいる。南大東島は 3 つの島の中では最も大きい、南北 26.54km、東西 5.78km、周囲 20.8km の楕円形で面積は 30.6km² にすぎない。

この島の気候は亜熱帯の海洋性気候で、年平均気温は東京が 15.6℃であるのに対し、22.9℃で年間を通して温暖である。年間降水量は東京の 1405.3mm より少し多く 1629mm で沖縄本島 (2036.8mm) よりやや少ない。しかし、年間の降水量は夏から秋にかけてやってくる台風 (年平均 4 個) の通過状況によって大きく変わる。島は周りが高く、一番高いところで標高 75.8m で中がへこんでいる地形、即ち、小さな盆地を海に浮かべたような形をしている。飲料水は海水を淡水化しており、作物用には島の中央部にあるいくつかの湖沼に溜まった雨水を利用している。主産業はサトウキビの栽培で島の中心部に製糖工場がある。サトウキビの栽培地以外は殆どが住宅地である。

昔、この島には両生類がいなかった。しかし、現在は、1940 年代にサトウキビの害虫駆除のため導入されたオオヒキガエルとミヤコヒキガエルがいる。従って、これら 2 種のガエルは島の固有種ではないが、殆ど工場化されておらず、また、外敵の蛇がいない環境で生息するガエルの実態を調査するには最適の場所と考えてこの島を選んだ。場所は昨年度と同様、大東神社境内と神社に近接する小さな溜め池を調査地とした (図 5-2、3)。

調査(1)：大東神社境内の池、約 400m² (図 5-2)

調査日時：平成 13 年 1 月 25 日

天候：晴、微風、25℃

観察個体数：1 成体及び幼生多数 (内訳：ミヤコヒキガエル)

調査(2)：大東神社境内の池、約 400m² (図 5-2)

調査日時：平成 13 年 1 月 25 日

天候：晴、微風、24℃ (水温 20.8℃)

観察個体数：ミヤコヒキガエル 成体 280 個体 (抱接 5 対)

オオヒキガエル 成体 8 個、亜成体 2 個

調査(3)：大東神社境内の池、約 400m² (図 5-2)

調査日時：平成 13 年 1 月 26 日

天候：曇り、微風、24.6℃ (水温 21℃)

観察個体数：ミヤコヒキガエル 成体 132 個、亜成体 1 個

オオヒキガエル 成体 8 個、亜成体 2 個

サキシマヌマガエル 成体 2 個

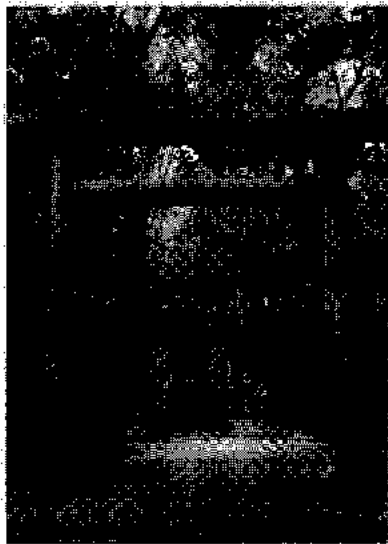
調査(4)：大東神社に近接する小さな池 (直径約 8m) (図 5-3)

調査日時：平成 13 年 1 月 25 日

天候：晴、微風、25℃

観察個体数：変態直後のミヤコヒキガエル幼体及び幼生多数

調査(5)：大東神社に近接する小さな池 (直径約 8m) (図 5-3)



大東神社



境内内池



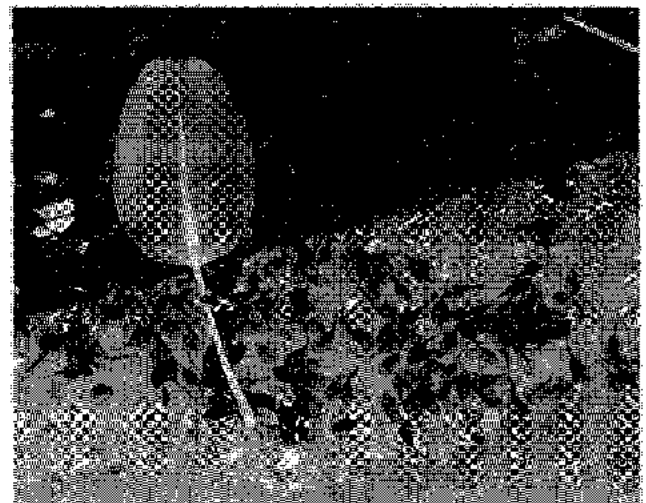
ミヤコヒキガエル



ミヤコヒキガエル (抱接中)

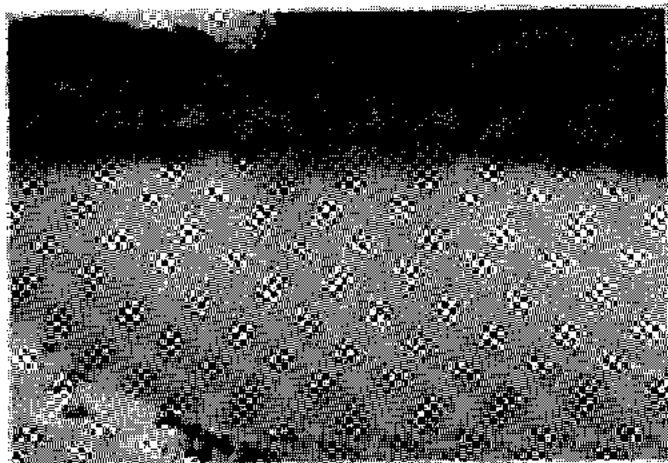


オオヒキガエル



幼生の群集

図 5-2 南大東島大東神社



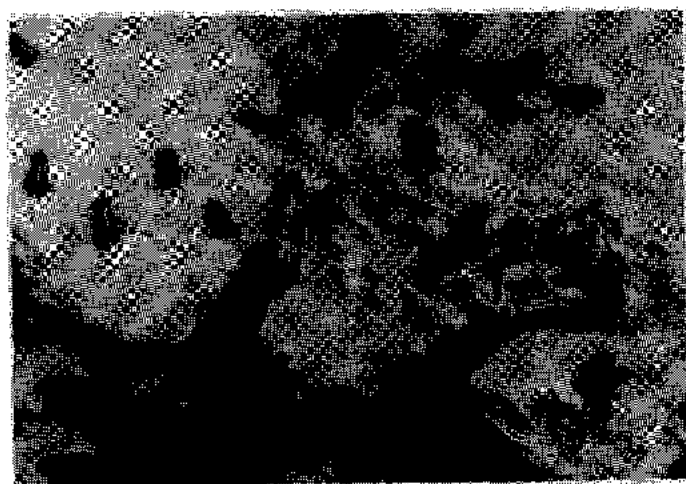
大東神社に近接する小さな池



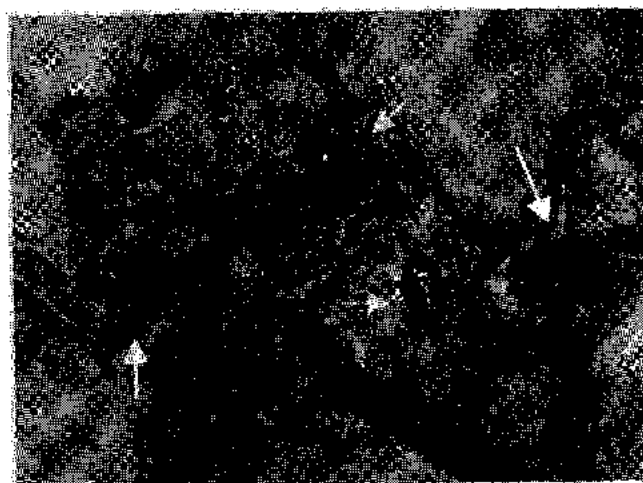
オオヒキガエルとミヤコヒキガエル（抱接）



水辺の幼生群



変態幼体の群



変態幼体（拡大図）

図5-3 大東神社に近接する小さな池

調査日時：平成13年1月26日

天候：曇り、微風、24.6℃（水温21℃）

観察個体数：ミヤコヒキガエル 成体13個、変態直後の幼体及び幼生多数
ミヤコヒキガエル（左後肢欠損1個体）（図5-4、矢印）

調査(6)：大東神社に近接する小さな池（直径約8m）（図5-3）

調査日時：平成13年1月25日

天候：晴、微風、24℃（水温20.8℃）

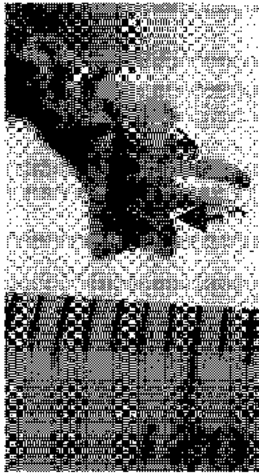
観察個体数：ミヤコヒキガエル 33個体（抱接2対）
オオヒキガエル 5個体

[考察]

南大東島における本年度の調査は昨年度より1週間早い時期、1月末に行った。従って、時期的には殆ど同じである。昨年度の調査（大東神社境内の池）では、オオヒキガエル3個体とミヤコヒキガエル53個体、合計56個体を観察したのに対し、本年度の調査では、オオヒキガエル8個体、ミヤコヒキガエル280個体を観察した。数字では生息数が増加したように見えるが、必ずしもそうではないと思われる。何故ならば、オオヒキガエルやミヤコヒキガエルが成体になるには数年を要するからである。観察数が増加した原因として、気温が昨年に比べて3℃高かったこと、更に観察後、夜中に雨が降ったため、カエルが現れる条件が揃ったことが挙げられる。ここ1年間に島内では大きな工事や台風による被害もなく環境が殆ど変化しなかったこと、昨年及び今年の野外調査、並びに島民との聞き取り調査から判断して、南大東島のミヤコヒキガエルの棲息数が急増したとは考えにくい。オオヒキガエルについては、昨年度と同様、個体数がミヤコヒキガエルのそれに比べるとかなり少ないことから、オオヒキガエルの急増はないと思われる。しかし、今年の調査でオオヒキガエルの亜成体2個体が観察されたことから、この種が急滅すること考えられない。ただ、今回の調査でオオヒキガエルの奇形後肢の亜成体（図5-4）が1匹見つかったことは、南大東島においても、徐々に環境汚染が広がっている可能性がある。言うまでもなく、他の要因による突然変異の可能性もあり、今後も継続して調査を行う必要があると判断した。

②宮古島

宮古島は面積225.86km²で伊良部島と同緯度にあり、沖縄本島から南西に約290kmの位置にある（図5-1）。気候は亜熱帯の海洋性気候（年平均気温、約23℃）で、1年を通じて温暖である。年間平均降水量は2247mm、降水日数が148日以上で雨が多い。周囲約102.9kmの島は平坦で低い台地状を呈しており、標高113mである。島にはほとんど池がなく、穴を掘った溜め池に雨水を作物用に蓄えている。飲料水は自然雨と海水を淡水に換えて使用している。島の人口は55,735人（平成7年国勢調査）でサトウキビの栽培や観光が主な産業である。この島には南大東島とは異なり、両生類及び爬虫類の固有種がいる。沖縄群島の有名な爬虫類であるハブは宮古島にはいないが、無毒のヘビ（アオカナヘビ、サキシママダラ、ヒメヘビなど）が生息していてカエルの天敵となっている。両生類ではヒメアマガエル、サキシマヌマガエル、それに宮古固有亜種のミヤコヒキガエルがいる。毒蛇がいない島であること、また、ミヤコヒキガエルの生息状態を他の島と比較・検討する必要があるため、この島を選んだ。



左後肢（異常）



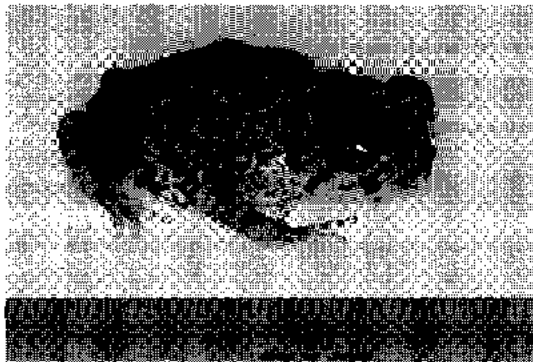
右後肢（正常）



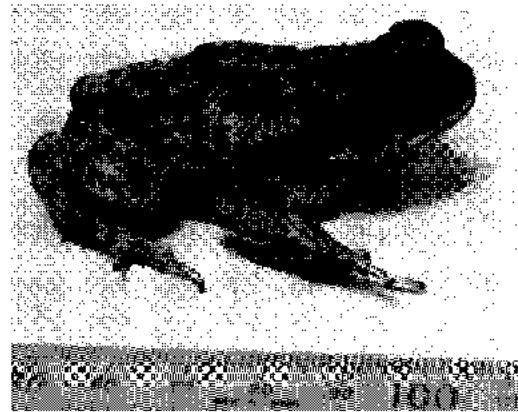
左後肢（正常）



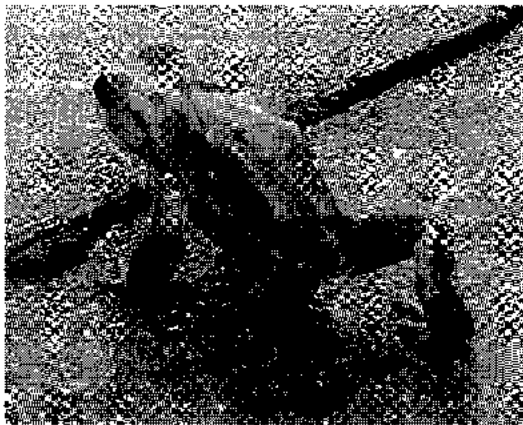
右後肢（正常）



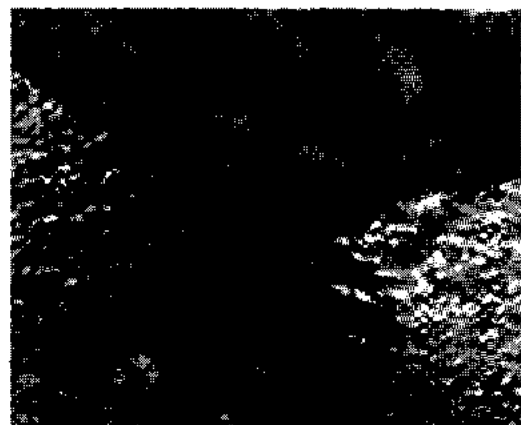
オオヒキガエルの奇形亜成体
（左後肢指骨奇形）



オオヒキガエルの正常亜成体



左後肢欠損の
ミヤコヒキガエル



拡大図

図5-4 南大東島で見られた奇形ガエル

調査(1)：平良市久松地区サトウキビ畑横の溜め池(図5-5)

調査日時：平成13年1月29日

天候：晴、微風、気温19℃(水温18℃)

観察個体数：ミヤコヒキガエル 成体3個体、変態直後100個体以上、幼生多数

調査(2)：平良市熱帯植物園内の人工池(図5-5)

調査日時：平成13年1月29日

天候：晴、微風、気温15.5℃(水温17℃)

観察個体数：ミヤコヒキガエル 成体4個体(抱接1対)、幼生20個体

調査(3)：平良市久松地区サトウキビ畑横の溜め池(図5-5)

調査日時：平成13年1月30日

天候：晴、微風、気温20℃(水温18℃)

観察個体数：ミヤコヒキガエル 成体1個体、変態直後100個体以上、幼生多数

調査(4)：平良市熱帯植物園内の人工池(図5-5)

調査日時：平成13年1月30日

天候：晴、微風、気温20℃(水温17℃)

観察個体数：ミヤコヒキガエル 成体0個体、幼生20個体

調査(5)：城北町マイダービーチ脇の人工池(図5-6)

調査日時：平成13年1月30日

天候：晴、微風、気温20℃(水温17℃)

観察個体数：なし

調査(6)：平良市長間地区の溜め池(図5-6)

調査日時：平成13年1月30日

天候：晴、微風、気温22℃(水温18.5℃)

観察個体数：ミヤコヒキガエル 成体0個体、変態直後2個体、幼生30匹、
卵塊多数(尾芽胚期)

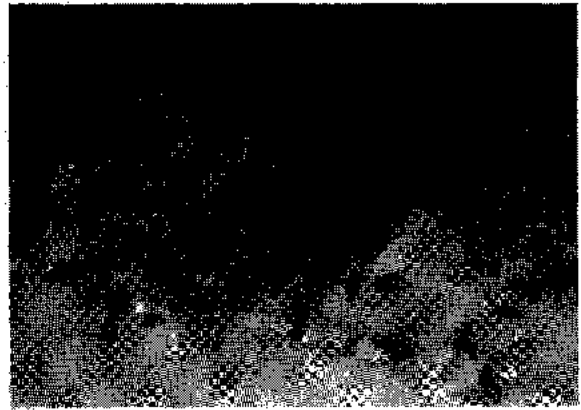
[考察]

宮古島における本年度の調査では昨年と同様、平良市熱帯植物園内の人工池でミヤコヒキガエル4個体(昨年度は3個体)を観察した。平良市久松地区では気温が低く、晴れていたこともあって観察した個体数は少なかった(今年/昨年=1/26)。しかし、変態直後の個体数は昨年と同様に多かったのも、この地区における個体数は減っていないと思われる。この池の所有者の方によれば、池の水は現在、農業水に使用しないで放置しているとのことであった。従って、池の環境が変わっていないことが多くの変態直後の個体を観察した理由と思われる。とはいえ、宮古島におけるカエルの生息環境は必ずしも良好ではない。今回、新しく城北町マイダービーチ脇の人工池と長間地区の溜め池を調査したが、前者の池にはカエルが全く生息していなかった。また、後者の池は、雨水を溜める目的で地面を掘った小さな池であったが、

平良市久松地区



小さな溜め池



ミヤコヒキガエルの幼生群

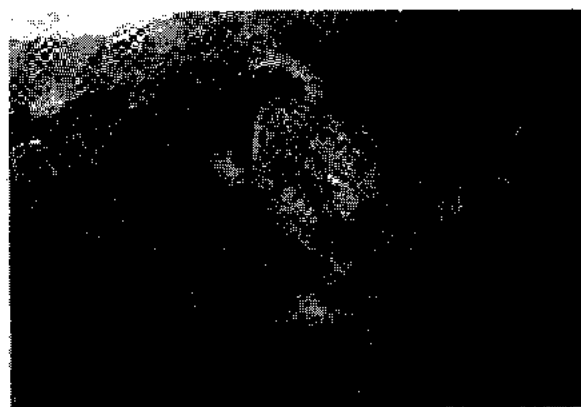


変態後のミヤコヒキガエルの幼体群



拡大図

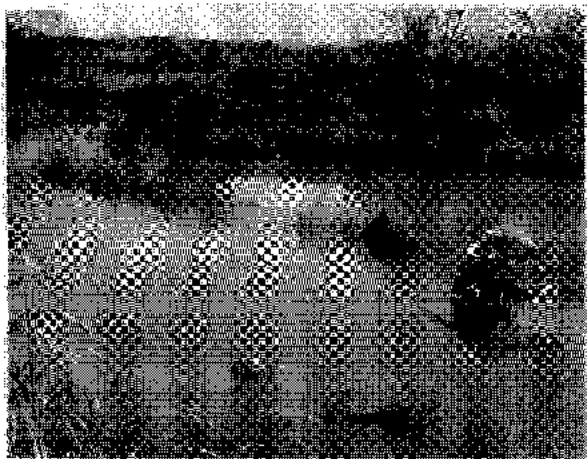
平良市熱帯植物園



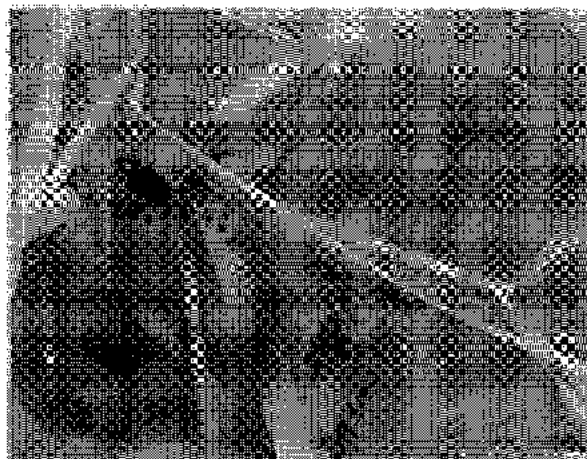
ミヤコヒキガエル（抱接中）

図 5-5 宮古島における実態調査

平良市長間地区



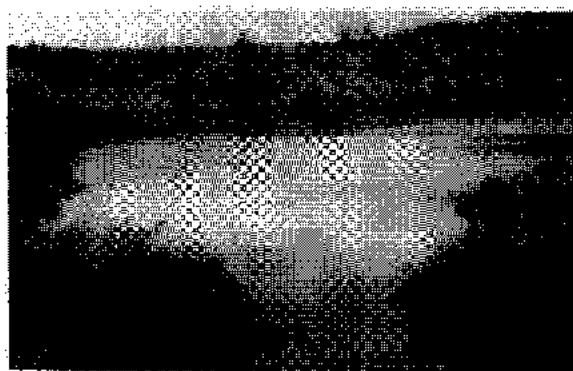
小さな溜め池



卵塊（尾芽胚期）



ミヤコヒキガエルの幼体



城北町マイダービーチの小さな池

図5-6 宮古島における実態調査

この池にミヤコヒキガエルの多くの卵塊を見つけた。このことは、一見、どこにでも卵を生むだけのカエルが生息していると考えられるが、逆に、そのような池にも産卵しなくてはならない状況にあるとも考えられる。宮古島は雨が多いものの湖沼がほとんどなく、雨水が溜まった小さな池を利用してカエルが産卵し、幼生は変態するまでそこで水中生活を送ると思われる。従って、雨不足で水が干上がってしまうと幼生が死滅することは明らかで、宮古島のカエルの生息数は降雨量に大きく左右されるものと推測される。宮古島の固有亜種であるミヤコヒキガエルは、この島ではかなり厳しい環境の中で生きていると考えられるが、南大東島では天敵もいなく、工業化や宅地化も進んでいないことから、環境はかなり恵まれている。宮古島に比べ南大東島は稀少種を残すひとつの方法を提示しているのかもしれない。

③沖縄本島北部

沖縄本島北部、やんばる（山原）にはスタジイを優占種とする常緑広葉樹林が広がっている。この地はスタジイ自然林と米軍北部演習場があり、中央山脈西側には自然林がわずかしかない。中央山脈東側には樹齢30年以上のスタジイの自然林があるが、その殆どが米軍北部演習場となっている（図6-1）。幸運なことに北部自然林が米軍演習場と重なっているため、稀少動物の生息場所が観光土地開発などによる環境破壊から免れてきた。しかし、米軍基地の移転に伴う土地開発、並びに沖縄本島の住民のための貯水ダム建設や工事用の大規模な林道建設が計画されている。やんばるの森には世界で唯一この地域だけに棲む固有種（例えば国天然記念物のヤンバルクイナやノグチゲラ）がいる。環境省レッドデータブック（1997年）によれば、やんばるに棲む絶滅危惧種・危急種は、哺乳類では14種中3種、鳥類では54種中5種、爬虫類・両生類では9種中4種、昆虫類では38種中2種となっている。爬虫類では国天然記念物のリュウキュウヤマガメと県天然記念物のイボイモリ、両生類では県天然記念物のイシカワガエル、ホルストガエル、ハナサキガエル、ナミエガエル等の絶滅が危惧されており、動物がやんばるの小さな生態系の中で生きている。特に両生類は日本に39種いるうち、日本の面積の0.1%のやんばるに10種が棲んでおり、ヌマガエルを除く9種は琉球列島固有種である。その中で、ナミエガエルは、やんばる固有種である。また、日本のカエルで最も美しいと言われるイシカワガエルも奄美大島と本島北部の固有種である。従って、この森でこれらの稀少種が死滅すれば地球上から消滅することになり、これらの種が学術的に極めて重要であることが分かる。沖縄本島北部では、これらの動物が自然の破壊によって一挙に絶滅する可能性がある。稀少種の実態を自分の目で見ることが極めて重要と考え、本年度の調査地に加えた。

調査 (I) : 沖縄本島北部やんばる地区 (図6-2)

調査日時 : 平成13年1月27日

天候 : 晴、微風、気温 18℃ (水温 17℃)

観察個体数 : 両生類 (カエル、成体)

ハナサキガエル	37 個体
イシカワガエル	6 個体
リュウキュウアカガエル	1 個体
ナミエガエル	4 個体

両生類 (カエル、幼生)

ホルストガエル	3 個体
リュウキュウアカガエル	18 個体

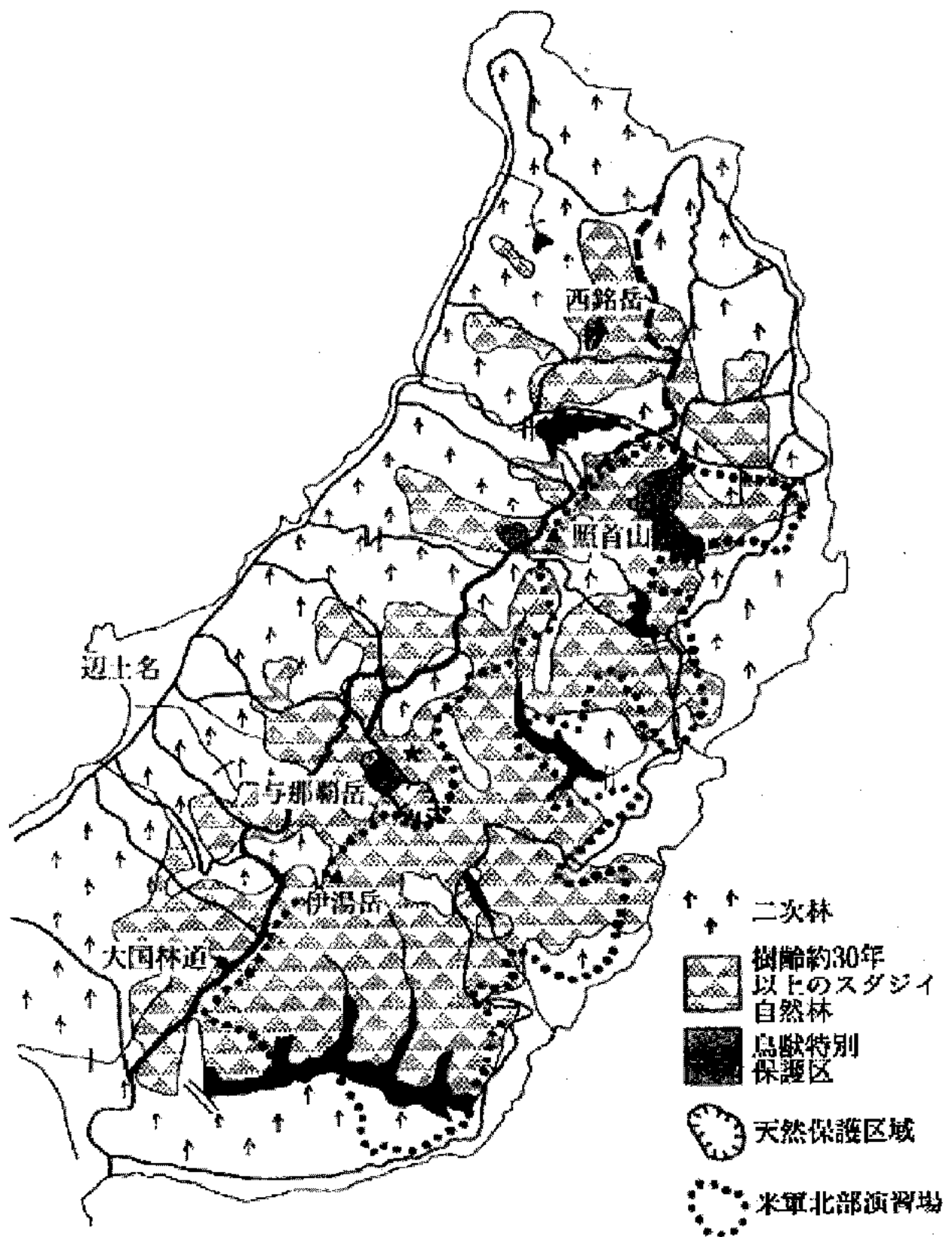
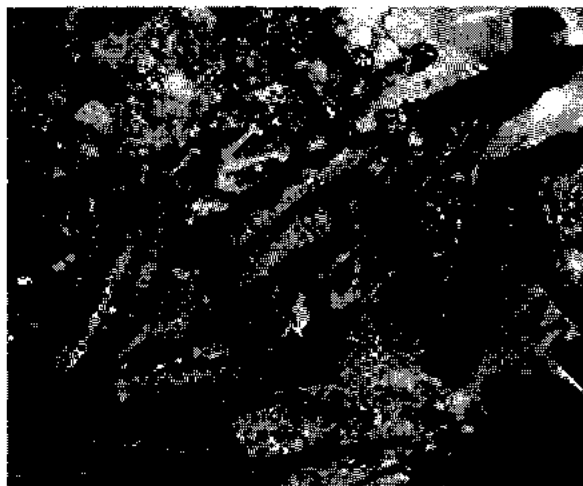


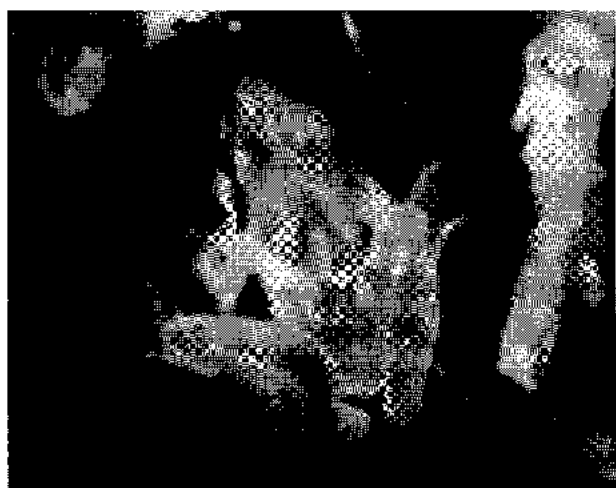
図6-1 沖縄本島北部やんばるのスタジオ自然林と米軍北部演習場（「沖縄やんばる・亜熱帯の森」平良，伊藤共著 高文研；より抜粋）



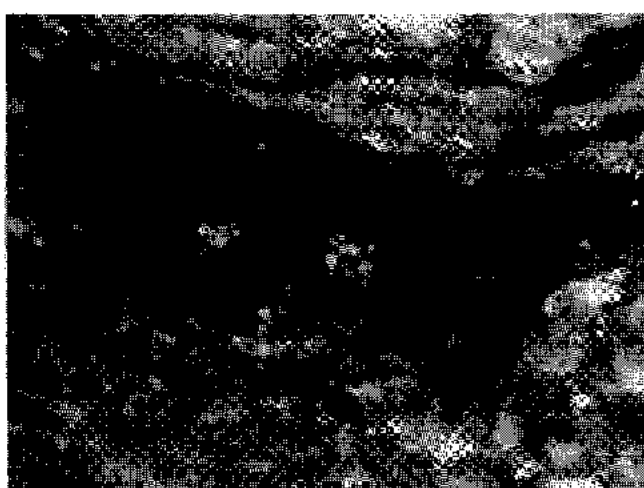
イシカワガエル



ハナサキガエル



リュウキュウアカガエル



ナミエガエル



リュウキュウアカガエル
(幼生)



ホルストガエル
(幼生)

図 6-2 沖縄本島北部やんばるで観察した稀少種のカエル

[考察]

本年度の6時間に及ぶ夜間調査において、学術的に貴重な4種のカエルを確認できた(図6-2)。これらの稀少種は自然条件が非常に厳しい場所に生息していた。1晩の調査でこのような稀少種4種を観察することができたことは極めて幸運であると思われる。調査は1月末であったにもかかわらず、ヒメハブ4個体を確認した。これらのヒメハブは、産卵にきたハナサキガエルを獲物として狙って水辺にきたもので、この時期にこれだけの数を確認したことは、夏期には相当数のハブが出没し、多数のカエルが捕食されているものと思われる。やんばるではカエルの生息場所が限られており、個体数もそう多くはないと考えられることから、僅かな環境変化によって生態系が一気に崩れ、稀少種が絶滅する可能性が極めて高い。沖縄本島北部のような極めて貴重な種が多く生息している地域において、正確なカエルの棲息数と種類の確認には長年の継続調査が必要である。しかし、夏には多数のハブが出没する。従って、やんばるの調査には地理に詳しい経験豊富な同伴者が必要である。沖縄本島北部のやんばる地区は日本にとって、また世界にとって学術的に極めて貴重な種が多く生息している場所である。我々は一度失うと二度と取り戻せない自然と貴重な固有種をなんとしても守らなければならない。

④石垣島

沖縄本島、西表島に次ぐ第3の島、石垣島は、琉球列島の最南端部に位置し、宮古島と台湾の間に散在する大小31の島々からなる八重山諸島のうちのひとつで、八重山諸島の政治・経済・教育・交通の中心である(図5-1)。島はマンドリン形で、北半分は山地が多く、沖縄県最高峰の於茂登岳(526m)がある。南は低平な地形で、石灰岩台地や沖積平野が広がり、宮良川という大きな川がある。総面積は221.24km²で、周囲139.22km、人口は約4万4千人である。位置的には東京から1957km、台湾から277kmの地点にあり、緯度的にはハワイ州のホノルルやフロリダ州のマイアミとほぼ同じである。従って、亜熱帯気候で、我が国では最も暖かい(年平均気温23.5℃)。雨は年間を通して降るが、とくに梅雨期と台風期に多く(年平均降水量2252mm)、年平均湿度も76%と非常に高い、本土のように、はっきりとした四季はなく、熱帯系動植物が豊富に見られる島として知られている。石垣島の山間地を流れる川は鬱蒼とした低木に覆われており上空から確認するのが難しいほどである。

1～3月は、東シナ海に低気圧が発生し、東進するため、強風と小雨の連続で悪天候の続く時期であるが、他島における調査と時期を合わせるため、2月(月平均気温18.3℃)に行なった。

調査(1): 石垣市真栄里地区水田(400m x 300m)及び隣接する放牧地にある小さな池
(図7)

調査日時: 平成13年2月22日

天候: 曇り、微風、25.2℃(水温24℃)

観察個体: ヒメアマガエル 3個体(成体)

調査(2): 同地区(図7)

調査日時: 平成13年2月23日

天候: 曇り、微風、24℃(水温23℃)

観察個体: サキシマヌマガエル 53個体(成体)

オオヒキガエル 18個体(成体)

調査(3)：同地区（図7）

調査日時：平成13年2月24日

天候：小雨、微風、23℃（水温23℃）

観察個体：オオヒキガエル 41個体（変態直後幼体）

ヒメアマガエル 2個体（成体）

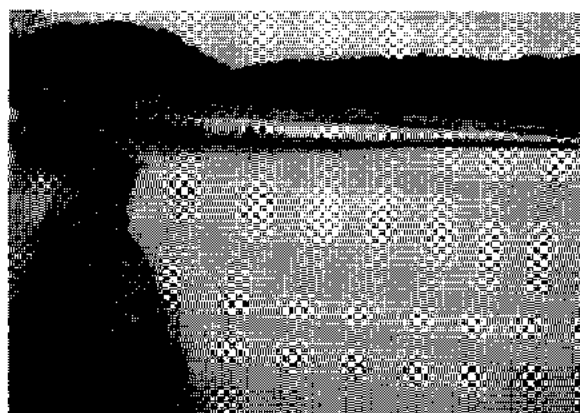
[考察]

石垣島における調査は1年を通して最も寒い時期に行われたが、調査日の気温は、月平均気温より約5度高かった。この島の低平地は限られており、水田は少ないが、中国地方の調査地、広島県吉舎町吉田地区の水田のように区画整理されていない。従って、水田は自然状態に近い（図7）。調査結果から分かるように、ヒメアマガエルは昼間だけに見られ、夜は、サキシマヌマガエルやオオヒキガエルが見られた（図7）。この理由として、時期が少し早かったため、出沒していたサキシマヌマガエルやオオヒキガエルの数が少なかったこと、また、これら2種のカエルは、夜に行動することが多いことから、このような結果になったものと思われる。特に、オオヒキガエルの場合には、夜間調査で成体を、昼間調査で変態後の幼体を多く観察したので、この地域には数多くのオオヒキガエルが生息しているものと推測される。この調査で、多くのサキシマヌマガエルやオオヒキガエルを観察できた。それとは逆に、南大東島の調査では、これらのカエルは少なかった。この結果は、南大東島と石垣島の気象や地形の違いによるものと考えられ、非常に興味深い。また、ヒメアマガエルは極めて敏捷なカエルで夜間は鳴き声はよく耳にするが本体を観察することは稀である。今回の調査で、昼間に小さな池で3個体のヒメアマガエルが見られたことは、このカエルも数多く生息しているものと思われる。今回の調査で観察できなかったヤエヤマオガエル、アイフィンガーガエルなどについては明らかではない。しかし、山間部の原生林が多く残されていることから、これらのカエルも数多く生息していると考えられる。

石垣島では限られた低平地や水田を生息地とするカエルがいる。しかし、これらのカエルは、吉舎町吉田地区の水田のように区画整理されてしまえば、一挙に数が減る可能性がある。また、島民の方の話によればウシガエルが移入されているため、捕食によって、最近、固有種のカエルが少なくなっているということであった。無論、移入種ウシガエルが原因で、固有種のカエルが減ったと考えるのは極論的である。石垣島は観光産業が盛んでホテルなどの建設のために自然が徐々に破壊されつつある。生息場所の狭小化によってカエルが減っている可能性も高い。

⑤西表島

日本の最西南端、八重山諸島に属する西表島（図5-1）は、台湾の台中市とほぼ同緯度にあり、あと100km南下すれば北回帰線にぶつかる。気候は亜熱帯降雨林気候で、年平均気温が23.4℃、最低月平均気温（1～2月）が17-18℃と四季を通じて温暖である。更に、島の周囲を流れる黒潮の影響で温暖多湿な亜熱帯海洋性気候の特徴をもつ。1日の気温差は小さく、1年を通して5度前後である。年平均降雨量は2500mm前後で、特に5月、6月の梅雨期と7～10月の台風期に多い。梅雨期は湿度85-100%と極めて高いが、冬の11月下旬～2月は季節風の影響で北東の強い風の吹く日が多く、晴天の日は少ない。この島は、沖縄県では沖縄本島に次いで2番目に大きい島で、面積は284.4km²、新潟県佐渡島の3分の1ほどの大きさである。島は殆どが山岳地帯で古見岳を最高峰（470m）として300-400mの山が幾重にも重なった複雑な地形を呈している。この島には八重山諸島の他島と異なり、大小あわせて約40本の河川があり、



石垣市真栄里地区の水田



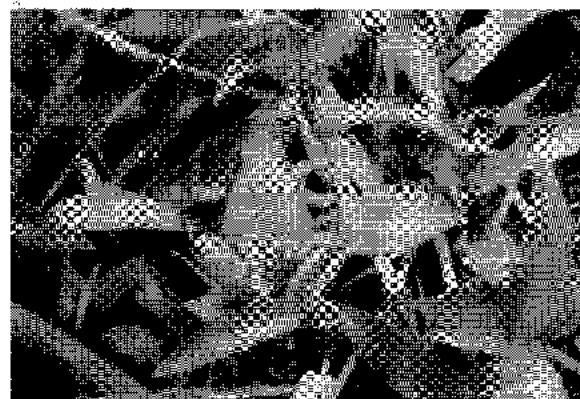
サキシマヌマガエル



オオヒキガエル



真栄里地区の水田に近接した
放牧地の小さな池



ヒメアマガエル

図7 石垣市における実態調査

豊富に降る雨水を海に運んでいる。平地は極めて少なく、大きな川の河口や海岸線付近の一部にあるだけで、水田、畑、牧畜、住宅地に利用されている。この島のもう一つの特徴は、1972年に日本で24番目に国立公園に指定されていることである。それ故、島の90%を占める亜熱帯の原生林が保護されており、学術的に貴重なイリオモテヤマネコやカエル（ヤエヤマアオガエル、アイフィンガーガエル、リュウキュウカジカガエル、ヒメアマガエル、ヤエヤマハラブチガエル、オオハナサキガエル、コハナサキガエル、サキシマヌマガエルなど）が生息している。しかし、移入種のオオヒキガエルやウシガエルはいない。

調査(1)：八重山郡竹富町美原地区水田(図8)

調査日時：平成13年2月24日

天候：曇り、強風、22℃(水温22℃)

観察個体：なし

[考察]

西表島の調査は1年を通して最も寒い時期に行った。今回は単独調査であったため、原生林の多い山間部に入るのは危険と思われ、水田を調査区とした。調査日の気温は、月平均気温より約4度高かったが、強風で、体感温度はかなり低く感じた。そのためか、水田は田植えが終わっていたが(図8)、成体のカエル、幼生、卵塊を全く観察することができなかった。この島には多種のカエルが生息しているので、気象条件がよければ水田でも多くのカエルを観察することができると思われる。原生林については、案内者なしで入山するにはハブが多く危険なため、カエルの実態を詳細に調べるには時間と経験が必要である。水田における夜間調査もかなりの危険をとまうが、次回の調査では行ってみたい。この島は国立公園内に位置することから、沖縄群島の他島に比べ自然が多く残っており、しかも訪島するには船を使用しなければならない。このため、観光客の数が限られ、また、土地開発も自由にできないので、カエルの保護条件は揃っている。ただ、道路整備工事が盛んに行われているので、交通の便が良くなることによって車の犠牲になるカエルが多くなるとされる。石垣島や沖縄本島などにはウシガエルが移入されており、このカエルに捕食されるカエルの数は少なくない。しかし、この島ではそれがなく、カエルを保護するには都合がよい。自然条件がよければ貴重種が生き延びられるよい見本となっている。

[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

(1) 目的

平成7年に北九州市小倉北区の山田緑地において発見された過剰肢ヤマアカガエルの原因究明は、これまで内分泌攪乱化学物質やダイオキシン類などに注目して行われてきた。その結果、山田緑地の土壌、カエル及びその卵が、ダイオキシン類やDDT等の有機塩素系物質によって比較的高濃度に汚染されており、さらに母ガエルから卵へ移行して、卵中の濃度は親の数倍に達することが確認された。また、山田緑地の土壌からは、有機塩素系物質以外の2,4,6-トリニトロトルエン(TNT)も検出されている。

一方、過剰肢の原因としては遺伝も考えられ、平成10年に確保した過剰肢を持つ幼生を成体まで飼育して、平成12年に種々の交配試験を行った。その結果、過剰肢を持つ親からのみ、過剰肢の幼生が得られ、過剰肢が親から子へと遺伝することが確認された。

そこで、12年度からは、遺伝毒性(変異原性)に関しても調査を実施することとした。平成12年度は遺伝毒性に関する調査の初年度ということもあり、1)遺伝毒性を検出するための微生物を用いたバイ

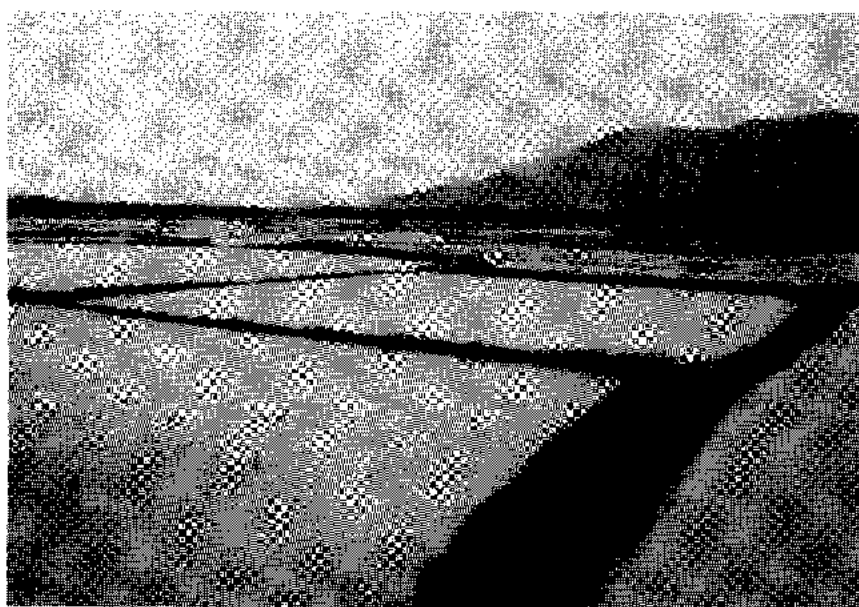
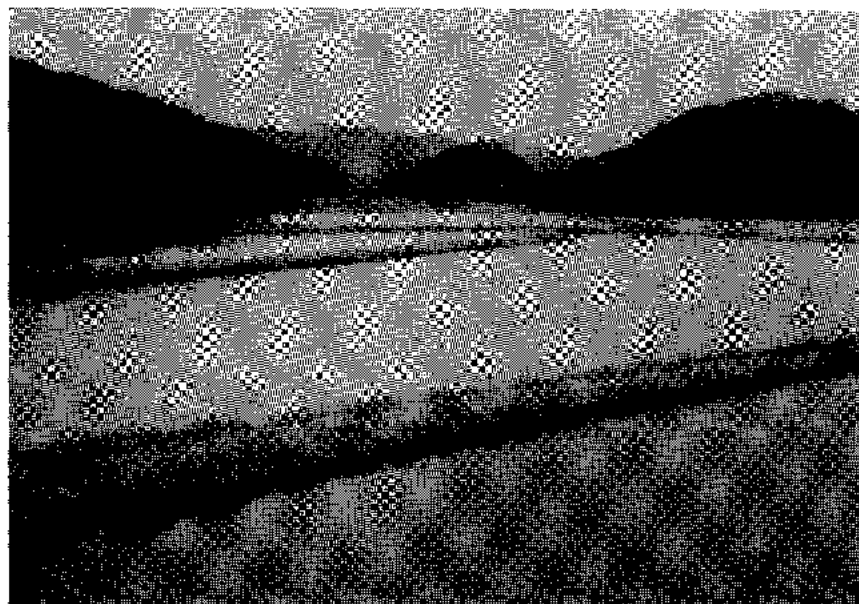


図 8 西表島竹富町美原地区の水田

オアッセイ試験法（発光 umu）の検討、2）発光 umu 試験及び代表的な遺伝毒性試験法である Ames 試験の二法を用いて TNT などの検出物質及び山田緑地土壌抽出液の遺伝毒性の有無、及び強度の調査を行い、山田緑地におけるカエルの生殖細胞を変異させる物質の存在（または、過去に存在した）を検討することとした。

（2）TNT 毒性の文献調査

山田緑地の環境から検出された物質の中で、最も特徴のある物質は TNT である。TNT 以外にも前述した有機塩素系物質やベンゾ(a)ピレン（B(a)P）など多数の物質が検出されているが、それらは一般環境からも通常検出される物質であり、また山田緑地での検出濃度も一般環境と比較して際だって高濃度ではない。一方、TNT は爆薬というその用途から、日本での検出例は山田緑地を除いて報告されていない。さらに、TNT の毒性は比較的高く、発ガン性（US EPA では、人に発ガンの可能性がある C に分類。IARC（国際ガン研究機関）では、動物実験においてのみ発ガンの証拠がある Group3 に分類）も指摘されている。

そこで、平成 12 年度は TNT に焦点を当て、TNT とその代謝物の遺伝毒性の調査を行った。文献調査の結果を表 1 及び 2 に示すが、遺伝毒性があるという報告と無いという報告が共にあり、結論が出ていない状況である。そこで、独自に発光 umu 試験及び Ames 試験を実施して TNT の遺伝毒性を調査した。

（3）発光 umu 試験による遺伝毒性調査

文献調査では、TNT 及びその代謝物の遺伝毒性に関しては、完全に結論が出ていない状況である。そこで、発光 umu 試験を用いて TNT の遺伝毒性を調査した。umu 試験は、損傷を受けた DNA を修復する時の SOS 応答を遺伝毒性物質の検索に応用した試験法であり、Ames 試験とほぼ同様の結果が得られることが知られている。我々は、通常の umu 試験法を一部改良し、遺伝毒性に対応して蛍光を発生する菌株を用いた発光 umu 試験法を採用して、既検出物質及び環境試料抽出液の遺伝毒性を調べた。試験法の詳細を参考 1 に示す。

〔結果〕

1）既検出物質の試験結果

TNT 及び B(a)P を対象に、薬物代謝酵素（S9 mix）存在・非存在下における遺伝毒性の有無及びその強さを試験した。その結果、S9 mix 存在下では TNT 及び B(a)P 共に遺伝毒性を有することが確認された。また、TNT の毒性強度は、B(a)P の約 1/20 であった。S9 mix が存在しない条件、即ち代謝されていない場合は、TNT だけが遺伝毒性を示した。しかし、その強度は、陽性対照とした 1,6-ジニトロピレンの 1/11,000 であった。

2）土壌試料抽出液の試験結果

実際の環境試料として、山田緑地では最も高濃度の TNT が検出された地点の土壌（3 試料）、カエル調査の対照地 2 地域（2 試料）、及び高濃度の化学物質染地域である洞海湾の底質（1 試料）を対象に umu 試験を行った。試料は参考 2 に示す前処理を行い、Fr. 1（無極性）、Fr. 2（中極性）、Fr. 3（高極性）に分画し、それぞれを S9 mix 処理・未処理の条件で試験した。その結果を図 1 に示す。薬物代謝酵素 S9 mix を添加しない場合は、全試料の全分画において遺伝毒性が検出されなかった。一方、S9 mix 処理を行った場合は、全ての試料で遺伝毒性が検出された。しかし、検出された毒性の強度は、試料及び分画により異なり、洞海湾＞山田緑地＝対照地 1＞対照地 2 の順であった。以上から、umu 試験の結果からは、

表1 TNT 及びその代謝物の変異原性(Ames 試験)

物質名	Mutagenicity				単位	Ref
	Ames TA98		Ames TA100			
	-S9	+S9	-S9	+S9		
TNT	409	260	No	No	復帰数/mg	Honeycutt et al (1996)
	5400	380	6600	2000	復帰数/プレート/mg	Tan et al (1992)
	4350	報告なし	16200	報告なし	復帰数/mg	Padda et al (2000)
	0.5-10	No	No	No	ug/ml overlay	Won et al (1976)
4-Hydroxyamino-2,6-diNT	587	報告なし	4330	報告なし	復帰数/mg	Padda et al (2000)
2-Hydroxyamino-4,6-diNT	1320	報告なし	10200	報告なし	復帰数/mg	Padda et al (2000)
2,4-Dihydroxyamino-6NT	17400	報告なし	127000	報告なし	復帰数/mg	Padda et al (2000)
2-Amino-4,6-diNT	270	No	402	513	復帰数/mg	Honeycutt et al (1996)
	500	125	2300	1233	復帰数/プレート/mg	Tan et al (1992)
	No	No	No	No		Won et al (1976)
4-Amino-2,6-diNT	No	No	218	No	復帰数/mg	Honeycutt et al (1996)
	1000	275	500	200	復帰数/プレート/mg	Tan et al (1992)
	No	No	No	No		Won et al (1976)
2,4-Diamino-6NT	No	No	No	No	復帰数/mg	Honeycutt et al (1996)
	0	報告なし	0	報告なし	復帰数/プレート/mg	Tan et al (1992)
2,6-Diamino-4NT	325	報告なし	750	報告なし	復帰数/プレート/mg	Tan et al (1992)
4,4',6,6'-TetraN-2,2'-azoxyT	No	No	No	No	復帰数/mg	Honeycutt et al (1996)
2,2',6,6'-TetraN-4,4'-azoxyT	No	No	1460	1769	復帰数/mg	Honeycutt et al (1996)

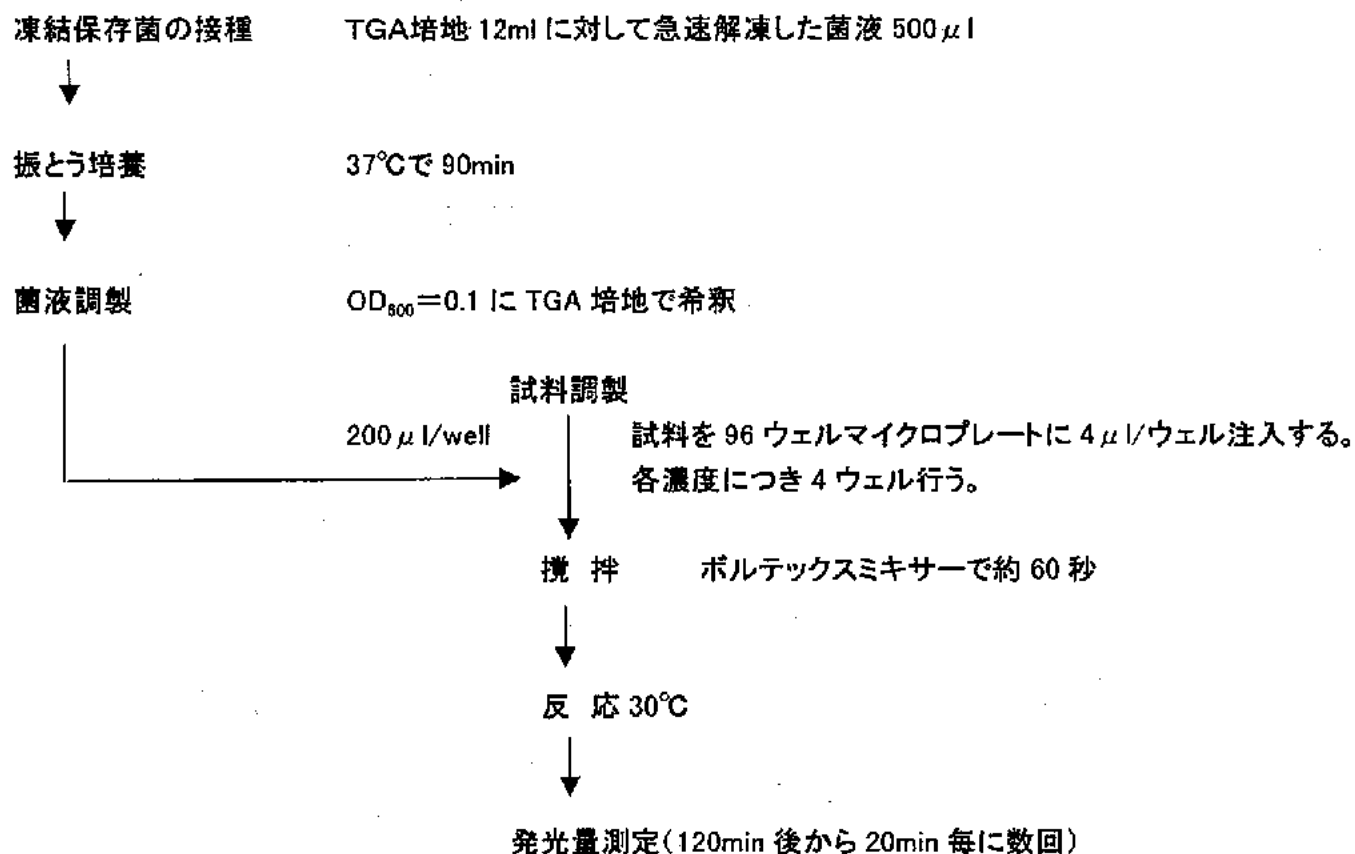
表2 TNT 及びその代謝物の変異原性(Mutatox)

物質名	Mutagenicity	
	Mutatox	
	-S9	+S9
TNT	0.25-0.50	No
4-Hydroxyamino-2,6-diNT	報告なし	報告なし
2-Hydroxyamino-4,6-diNT	報告なし	報告なし
2,4-Dihydroxyamino-6NT	報告なし	報告なし
2-Amino-4,6-diNT	3.9-15.6	1-3.9
4-Amino-2,6-diNT	2-15.6	0.5-7.8
2,4-Diamino-6NT	7.8-31.6	15.6-62.5
2,6-Diamino-4NT	報告なし	報告なし
4,4',6,6'-TetraN-2,2'-azoxyT	良好な結果得られず	良好な結果得られず
2,2',6,6'-TetraN-4,4'-azoxyT	良好な結果得られず	良好な結果得られず

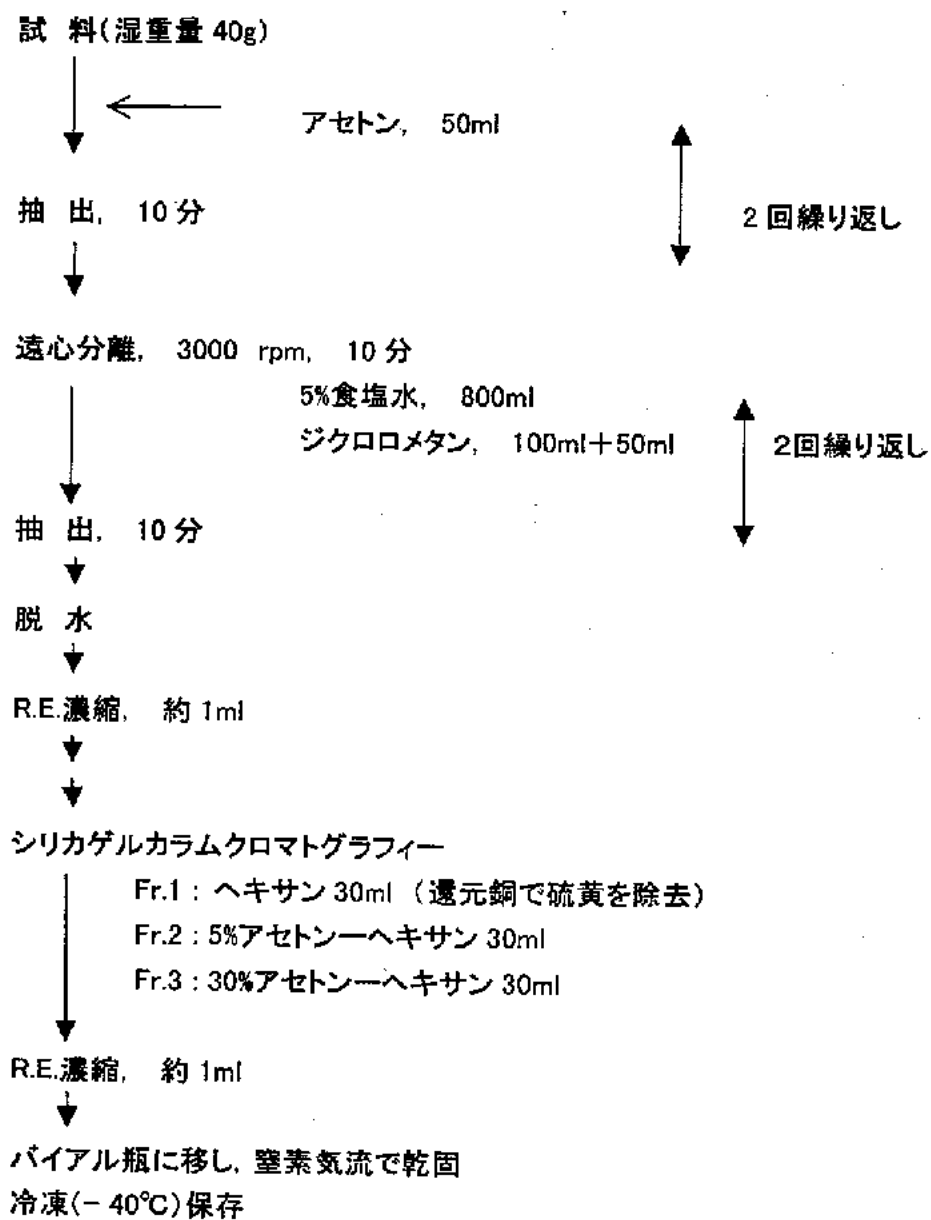
単位: ug Ref: Honeycutt et al (1996)

試料調製 : 前処理で冷凍保存した試料を DMSO 0.4ml に溶解し、さらに DMSO で 2 倍率希釈操作を行い、6 段階濃度試料を調製する。

使用菌液 : サルモネラ菌 TL210 株。遺伝毒性物質に暴露されると発光する様に形質転換された菌。発光量を測定することで遺伝毒性の有無を調べる。

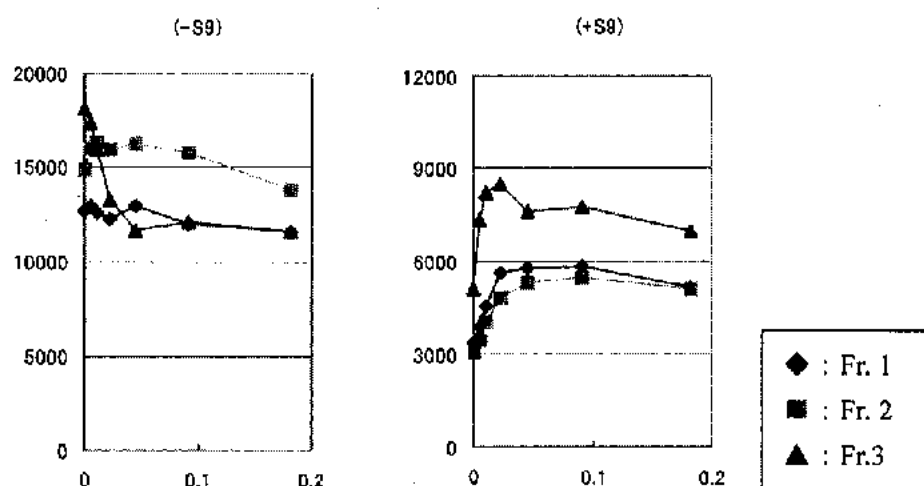


参考 1 umu 試験のフローチャート

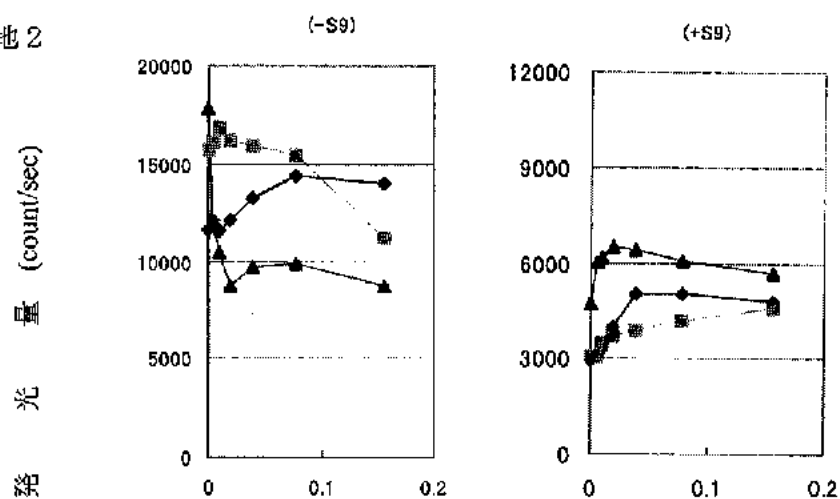


参考2 umu 試験用試料の前処理フローチャート

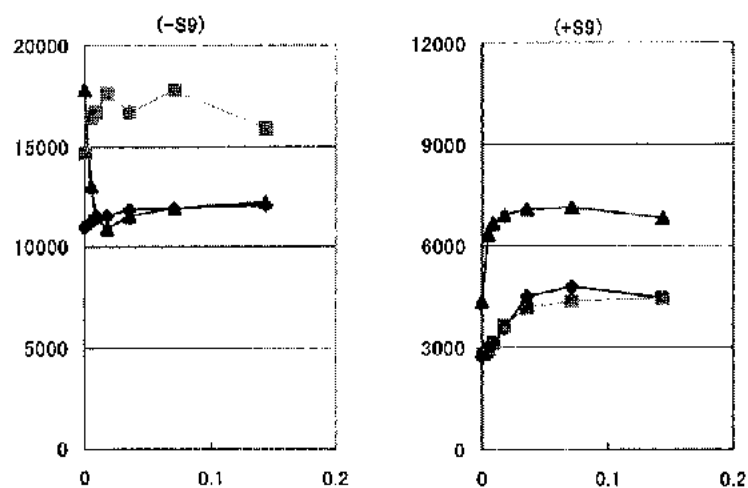
山田緑地 1



山田緑地 2



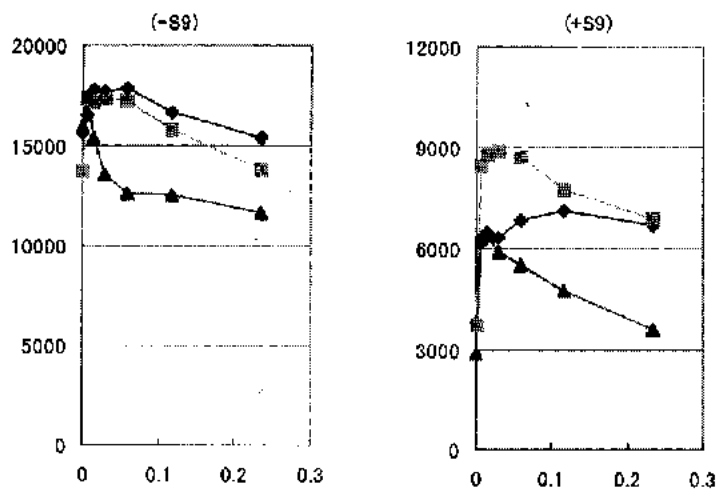
山田緑地 3



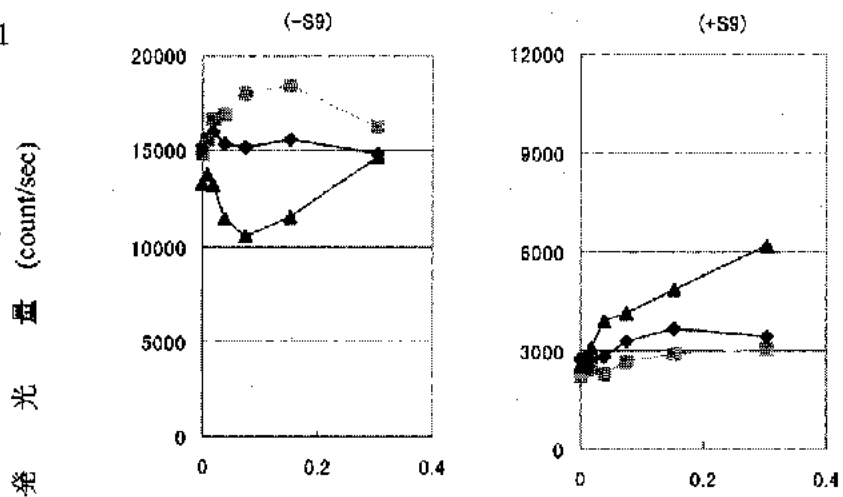
Dose (g dry/well)

図 1 - 1 環境試料の遺伝毒性

洞海湾



对照地 1



对照地 2

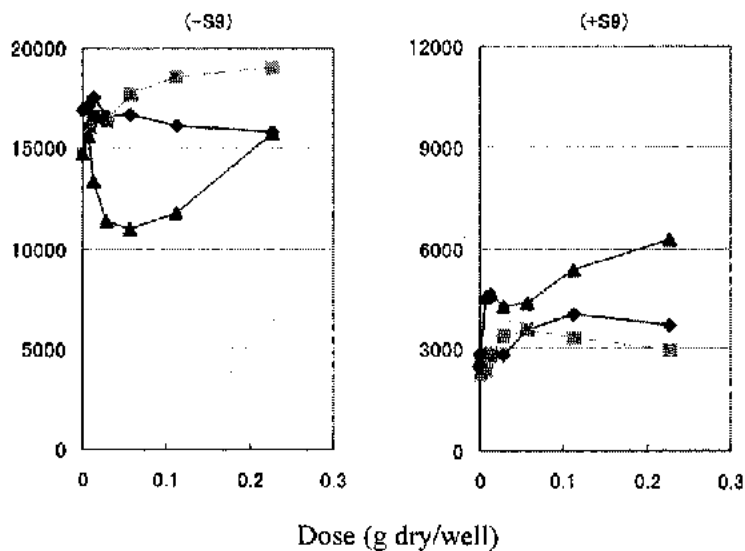


図 1 - 2 環境試料の遺伝毒性

山田緑地の土壌の遺伝毒性が特に高いという結果は得られなかった。

(4) Ames 試験による TNT 及びその代謝物の遺伝毒性

前述したように TNT 及びその代謝物の遺伝毒性の有無に関しては、文献データでは結論が得られなかったものの、発光 umu 試験結果からは遺伝毒性があることが示唆された。そこで、化学物質の遺伝毒性試験として最も信頼され、また公定法でも採用されている Ames 試験により遺伝毒性の最終確認を行った。試験は、(財)化学物質評価研究機構に依頼し、「有害性の調査の基準」(労働省告示第77号、労働省告示第67号)及び「微生物を用いる変異原性試験の具体的手法及び試験結果の評価方法について」に準拠して行った。

試験結果を表3に示すが、TNT 及び代謝物(2種)のすべてに遺伝毒性(突然変異誘発能)があることが確認された。また、試験した3物質の中で遺伝毒性が最も高かったのは、S9 mix 無添加時の TNT であった。

表3 TNT 及びその代謝物(2種)の Ames 試験結果

物質名	S9 mix	TA100	TA1535	WP2	TA98	TA1537	比活性 Revertants/mg
				<i>uvrA</i>			
TNT	添加	+	-	+	+	+	2,370(TA100)
	無添加	+	-	+	+	+	6,957(TA100)
2-Amino-4,6-diNT	添加	+	+	+	+	+	1,853(TA100)
	無添加	+	+	+	+	+	1,591(TA100)
4-Amino-2,6-diNT	添加	+	-	-	+	-	757(TA100)
	無添加	+	-	-	+	-	496(TA100)

S9mix：ラット肝臓の薬物代謝酵素溶液、試験物質の代謝に使用

TA100, TA1535：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌変異株、塩基対置換型の変異原物質に反応

WP2 *uvrA*：トリプトファン要求性の太陽菌変異株、塩基対置換型の変異原物質に反応

TA98, TA1537：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌変異株、フレームシフト型の変異原物質に反応

[考察]

平成12年度の調査において得られた結果は、次の2点である。

- ①Ames 試験及び発光 umu 試験の結果から、TNT 及びその代謝物2種(2-Amino-4,6-dinitrotoluene 及び 4-Amino-2,6-dinitrotoluene)に遺伝毒性があることが確認された。
- ②山田緑地の土壌中からは、特に高い遺伝毒性は検出されなかった。

今後は、①については、引き続き発光 umu 試験を用いて TNT 以外の検出物質の遺伝毒性を調査する。さらに、実際のカエルや卵に TNT を暴露してどのような影響が出るのかを検討する。②では、今回試験した試料が山田緑地の一部を代表しているにすぎないため、さらに試料数を増やして、山田緑地全体の遺伝毒性を評価する。

なお、遺伝毒性としては、現在検討している遺伝子の障害「ポイントミューテーション」の他に、生殖細胞の染色体そのものに障害を与える「染色体障害」がある。今後は、「過剰肢ガエルの染色体調査」、白

血球を用いた TNT など検出物質の「染色体障害能調査」を行うと共に、山田緑地と近傍地のカエルの遺伝子配列を比較して山田緑地カエルの遺伝子に変異が生じているかどうかを直接判定する「遺伝子比較調査」などを実施する予定である。

〔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

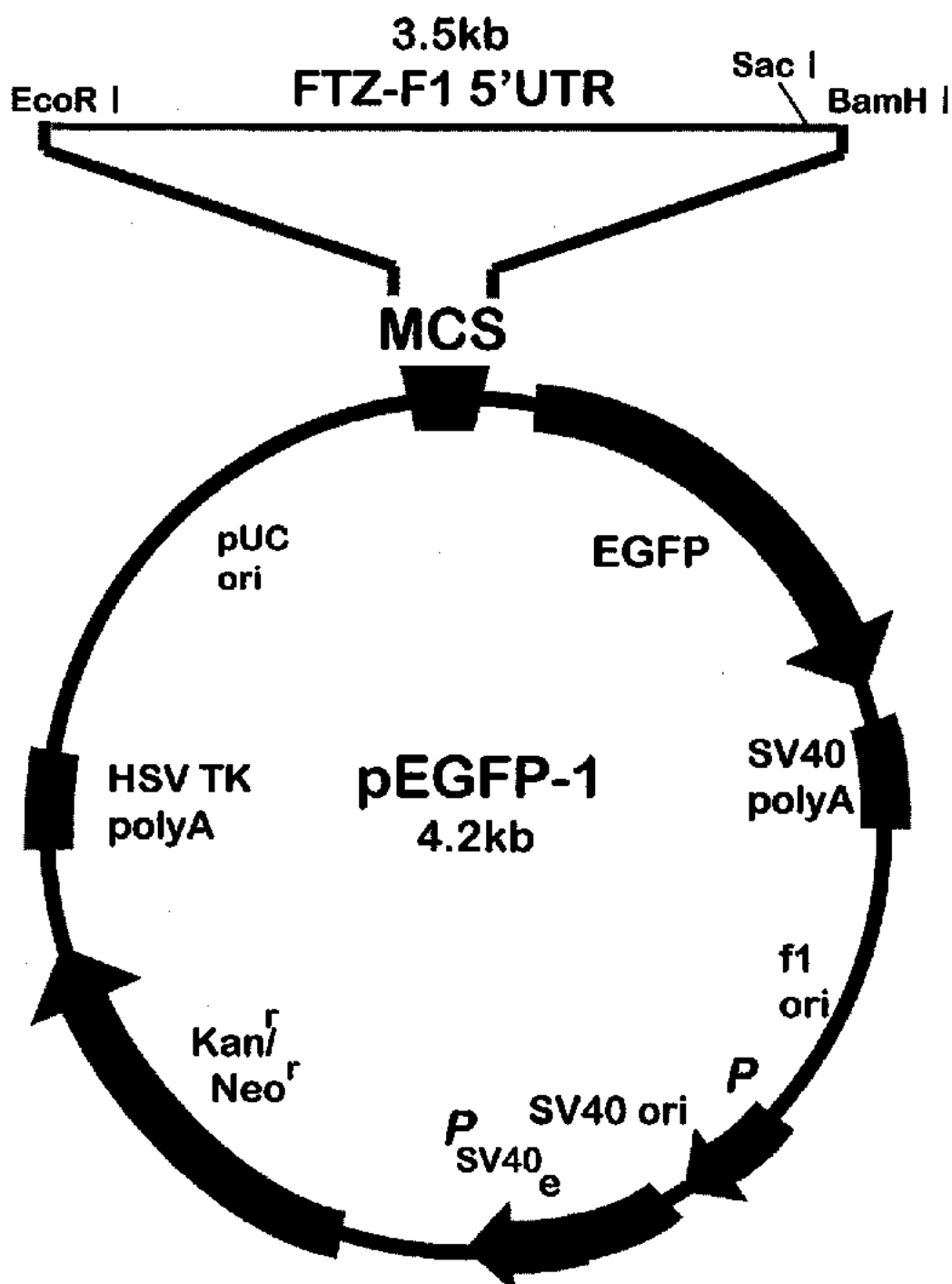
〔結果〕

我々が単離した両生類の性腺で発現する *FTZ-F1* 遺伝子（中嶋ら, Gene 2000）を用いてトランスゲニックカエルを作製した。*FTZ-F1* 蛋白は、ショウジョウバエの体節形成に関わる *fushi tarazu* 遺伝子の転写調節因子として発見され、脊椎動物でも類似遺伝子が単離されていたが、その発現場所や機能は不明であった。しかし、我々の研究によって、次のことが判明した。*FTZ-F1* 遺伝子は、変態2ヶ月後、ツチガエル（亜成体）の卵巢の初期卵細胞で発現することを *in situ* ハイブリダイゼーション法によって確認した（高瀬ら, BBA 2000）。また、この蛋白の存在を *FTZ-F1* 蛋白に対する抗体を用い蛍光抗体免疫染色法で確認した（高瀬等, GCE 2001）。これらの結果を基に、*FTZ-F1* 遺伝子の転写調節領域（3.5-kbp；中嶋ら, Gene 2000）を GFP ベクターに挿入し、DNA コンストラクトを作成した（図1-1）。この DNA コンストラクトを制限酵素を用いて直線化した後、Kroll & Amaya の方法（Development, 1996；図1-2）でアフリカツメガエルの未受精卵に注入して発生させた。その結果、*FTZ-F1* 遺伝子の転写調節領域がプロモーターとして働き、変態2ヶ月後のアフリカツメガエル卵巢内の卵細胞で GFP 遺伝子が発現して蛋白が作られることが分かった（図1-3）。即ち、ツチガエルの卵巢内で発現する遺伝子をアフリカツメガエル卵にそのプロモーター領域を注入することによって変態3ヶ月後の卵巢内の卵細胞で GFP 蛋白を合成させることに世界ではじめて成功した。*Sf-I* をモニター遺伝子とするトランスゲニックカエルの作製については、現在、幼生を飼育しており（図1-3）、近日中に解析する予定である。

〔考察〕

今回の実験でツチガエルの性腺で発現する遺伝子の転写調節領域をアフリカツメガエル卵に注入し、トランスゲニックカエルの作製に成功した。現在、カエルの変態に関与する甲状腺刺激ホルモンやその受容体遺伝子などを導入したトランスゲニックカエルが作製されている。内分泌攪乱化学物質の作用機序を解明するには、カエルの生殖系とは別の遺伝子（例えば変態に関与する遺伝子）が発現するトランスゲニックカエルを用いるよりも、生殖腺で発現する遺伝子を導入したトランスゲニックカエルを用いた方がよい。従って、我々が作製に成功したこのトランスゲニックカエルを使用すれば、その遺伝子の発現異常を指標として内分泌攪乱化学物質の性分化に対する影響を調べることができる。加えて、*Sf-I* 遺伝子の転写調節領域を導入したトランスゲニックカエルを作製することができれば、*Sf-I* 遺伝子が脳・生殖腺系列で非常に重要な役割を果たしていることから、複数の遺伝子をモニターとして、内分泌攪乱化学物質の生殖腺及び脳の性分化に対する影響を解析することが可能となる。我々が作製した汚染モニター動物（トランスゲニックカエル）は、今後、内分泌攪乱化学物質の作用機序を解明するうえで大きく貢献することになる。

図1-1 トランスジェニック用DNAコンストラクト



トランスジェニックカエルの作製法

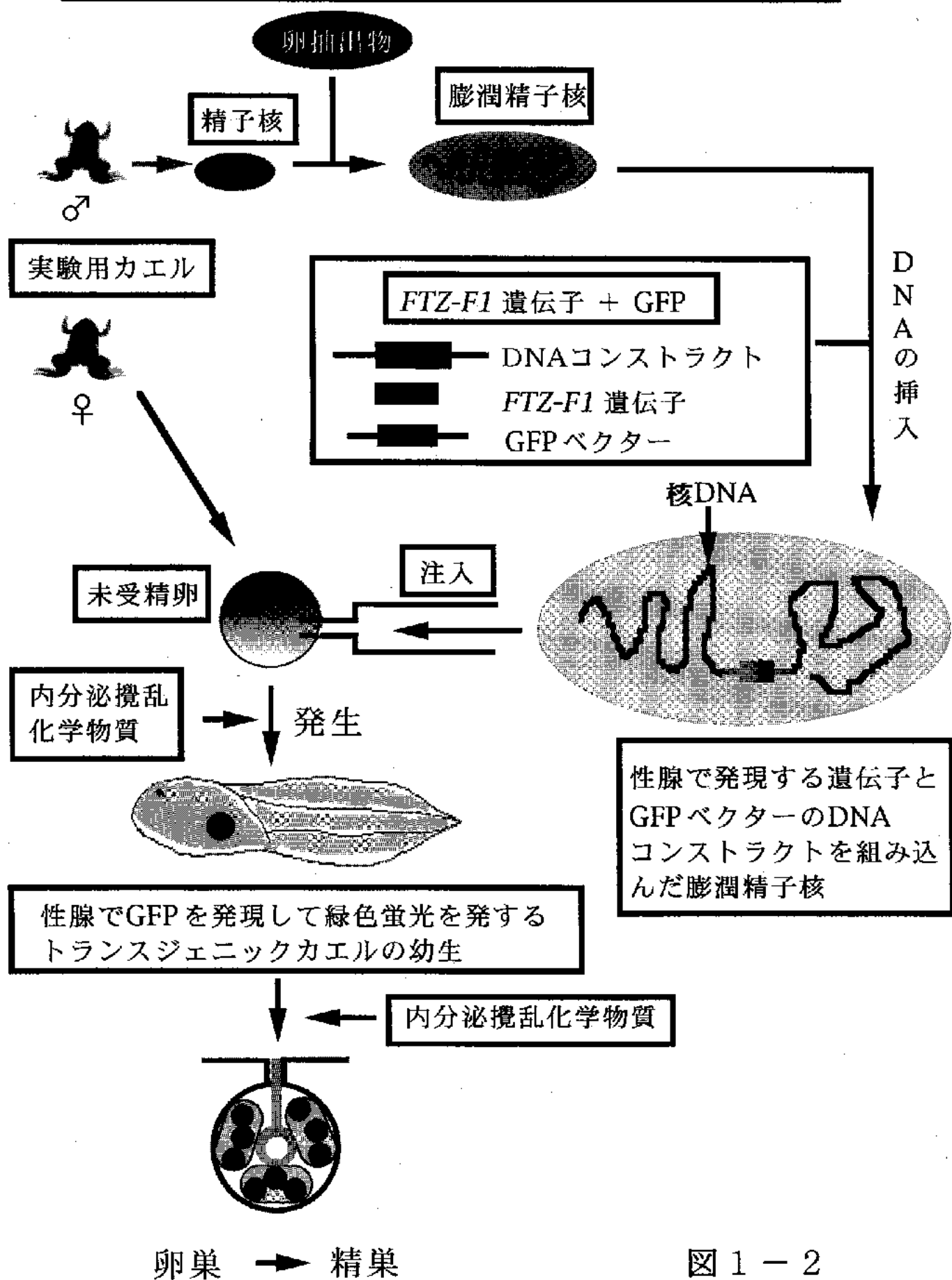
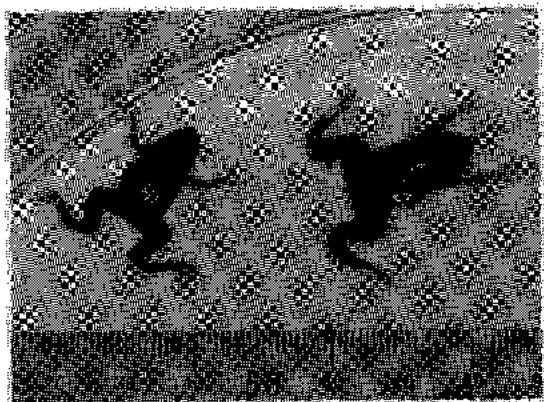


図 1 - 2



変態後2ヶ月のFTZ-F1トランスゲニックカエル

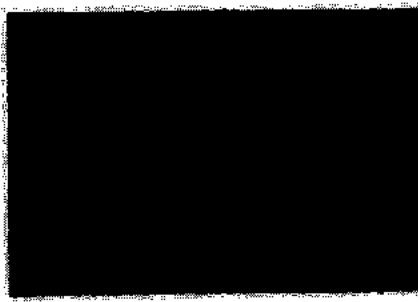
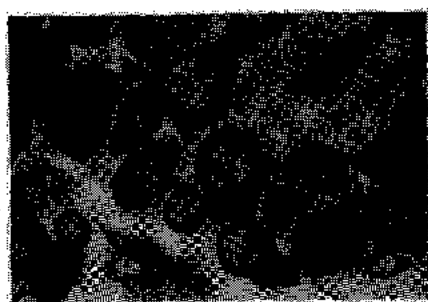


変態後6ヶ月のFTZ-F1トランスゲニックカエル

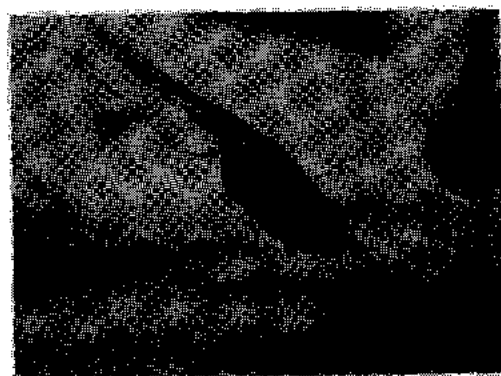
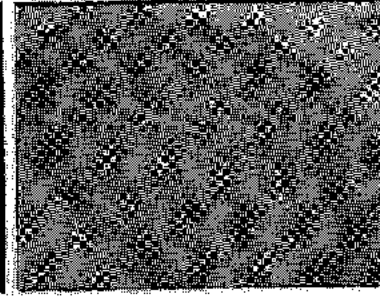
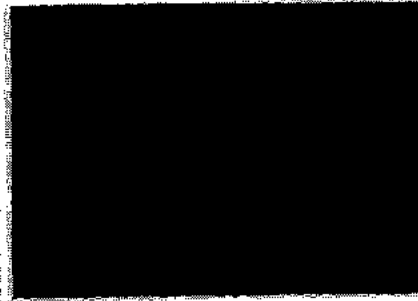
トランスゲニックカエル変態2ヶ月後の卵巣

in situ ハイブリダイゼーション 蛍光免疫染色 (抗FTZ抗体) ABC免疫染色 (抗GFP抗体)

実験群



対照群



SF-1トランスゲニックツメガエル幼生

図1-3 トランスゲニックカエルにおけるFTZ-F1遺伝子の解析

参考文献

1. Minoru Takase, Satoru Noguchi and Masahisa Nakamura.
Two *Sox9* messenger RNA isoforms: isolation of cDNAs and their expression during gonadal development in the frog *Rana rugosa*.
FEBS Letters 466 (2000) 249-254.
2. Takeshi Nakajima, Minoru Takase, Ikuo Miura and Masahisa Nakamura.
Two isoforms of *FTZ-F1* messenger RNA: molecular cloning and their expression in the frog testis. Gene 248 (2000) 203-212.
3. Minoru Takase, Takeshi Nakajima and Masahisa Nakamura.
FTZ-F1 α is expressed in the developing gonad of frogs.
Biochim. Biophys. Acta 91465 (2000) 1-6.
4. Minoru Takase, Takeshi Nakajima and Masahisa Nakamura.
Expression of *FTZ-F1 α* in frog testicular cells.
Journal of Experimental Zoology. 2001. In press.
5. Ki-ichiro Kawano, Shuichi Furusawa, Haruo Matsuda, Minoru Takase and Masahisa Nakamura.
Expression of steroidogenic factor-1 in frog embryo and developing gonad.
General and Comparative Endocrinology 2001. In press.

Investigation of the actual circumstances of amphibians in danger of extermination and making a Web site to gather informations of amphibian malformations in Japan, and production of transgenic frogs to monitor the environmental pollution

Masahisa Nakamura, Department of Biology, School of Education, Waseda University, Professor

Key words: actual circumstances, amphibians, malformation, toxic-test, TNT, transgenesis, model animal

The research consists of 3 parts: 1) Investigation of the actual circumstances of amphibians, and collection of information of amphibian malformations in Japan through a Web site. 2) The test for the toxicity of substances extracted from the soil in the Yamada-Ryokuchi area in the city of Kita-Kyushu on the life of frogs. 3) Production of transgenic frogs to monitor the environmental pollution.

We successfully collected information of deformed amphibians through the Web site which might be caused by chemical compounds such as EDC and dioxins. Investigation was also carried out to see the actual circumstances of amphibians (frogs and newts) in selected areas in the districts of Kanto, Hokuriku, Tokai, Shin-etsu, Chugoku and Okinawa. The investigation showed that amphibians are living in the severe natural circumstances. Interestingly, 10 malformed frogs (*Rana catesbeiana*) were found in the Kanto are, and also the Tokai and Okinawa areas by this investigation.

The previous study revealed that amphibian malformations are inherited through generations. Thus, we examined whether TNT and B(a)P extracted from the soil in the Yamada-Ryokuchi area in the Kita-Kyushu city have the toxicity on the frog life. The results indicated that they are toxic to the frog life. However, the soil in the Yamada-Ryokuchi area had no toxicity to damage the genomic DNA.

Finally, we succeeded to produce transgenic frogs to monitor environmental pollution by injecting a DNA construct of the 5'-untranslated region (5'-UTR) of the frog FTZ-F1 gene, which is expressed in immature oocytes in the frog ovary, and a pEGFP vector into the eggs of *Xenopus laevis*. The expression of green fluorescence protein (GFP) was tissue-specific in the transgenic embryos. As far as our knowledge concerns, this is the first report showing that transgenesis was carried out successfully using the promoter region of a specific gene, and that the 5'-UTR of the FTZ-F1 gene functioned in the ovary of transgenic frogs..

In this study, we have successfully obtained many results, but this research was performed in two years. Based on the findings obtained in this study, we conclude that investigation of the actual circumstances of amphibians in danger of exterminationfor should be continued, otherwise we would not be able to elucidate why the number of amphibians are declining and why frogs are deformed.