

図4 - 11

また、エクソンアレイが出た時点で、スプライシングバリエーションも含めた定量が可能となることが予測される（タイリングアレイを毒性学的に使いこなすには、少し時間がかかると思われる）。プロジェクトが順調に動き始めており、Affymetrix 独占ではなく、異なったプラットフォームのマイクロアレイ、定量PCR も含めて、細胞1個当たりのコピー数で比較できる状況が作られつつある。今後、Percellome 手法を用いたコンソーシアムが構築されることを期待して、研究が進められている。

4.1.2 バイオマーカー及びトランスジェニック魚を用いた海域生物への影響評価手法の開発

有害化学物質の水生生物に対する有害性は、生長抑制、行動異常や致死などを指標として評価される。これらの指標は、生物に対して総合的に現れる影響であり、必ずしも感受性の高い指標ではない。また、これらの指標では、有害化学物質の魚類に対する作用機構を解明することはできず、さらに低濃度の物質の影響を調べるためには、感受性の高い新たな影響評価指標の開発が必要である。水産研究所等では以下の研究を推進してきている。

(1) バイオマーカーの評価指標としての適性評価

ピテロジェニン及びコリオジェニン

卵黄蛋白質の前駆物質(ビテロジェニン、以下 Vg)及び卵膜を構成する蛋白質の前駆物質(コリオジェニン、以下 Cg)は、女性ホルモン様内分泌かく乱物質(以下エストロゲン様 EDCs)の作用により誘導されることが報告されており、エストロゲン様 EDCs の影響評価のための有力な指標である。水産研究所の研究グループは、酵素免疫測定法(ELISA)による Vg 及び Cg の測定系をマコガレイなど複数種について開発した。これらの研究成果により、エストロゲン様 EDCs の影響は大都市周辺海域以外の我が国沿岸域に生息する魚類にはほとんど認められないという影響実態を解明した。

マミチヨグ(北アメリカ大陸東岸の汽水域に生息する魚類)をオクチルフェノール(OP)とエチニルエストラジオール(EE2)に暴露した試験では、OP で 13.5 µg/L、EE2 で 4.6ng/L 以上で Vg の産生が誘導された。性比の偏り(雌の割合が高くなる)は、OP 及び EE2 が、それぞれ、13.5 µg/L 及び 4.6ng/L 以上で認められ、EE2 濃度が 85ng/L 以上では全てが雌になった。また、EE2 濃度が 26ng/L で 5 尾中 4 尾の個体で精巣卵が出現した。これらの結果から、Vg が誘導される濃度では、性比の偏りや精巣卵の形成も引き起こされることが明らかになった。Vg の誘導と精巣卵の形成や性比の偏りとの因果関係は必ずしも明らかにされていないが、Vg を誘導する EDCs 濃度は、魚類の繁殖・再生産にも何らかの影響を及ぼすことが明らかであった。すなわち、Vg の誘導は、繁殖・再生産という魚類の機能に対する影響を評価することができ、エストロゲン様 EDCs の魚類再生産に対する影響評価にも適した指標であることが指摘できた。

精子形成関連蛋白質遺伝子による有機スズ化合物(TBT0)の影響評価

TBT0 は魚類の精巣に著しい影響を及与え、精巣の発達や精子形成を抑制することが報告されているが、その作用機構は不明であった。水産研究所の研究グループは、精巣器官培養及び in vivo 暴露試験により、精巣細胞の壊死(アポトーシス)、生殖細胞の分裂活性及び精子形成関連タンパク質遺伝子の発現を指標として、TBT0 の魚類精巣の発達に対する影響を調べた。この結果から、TBT0 は細胞分裂活性の減少、アポトーシスの増加及び遺伝子発現量の減少を通して、精子形成の減退を引き起こすことを明らかになった。このことから、精子形成関連蛋白質遺伝子の発現量の変化は、TBT0 の精子形成に対する影響を評価するための指標として適性を有することが明らかになった。

(2) トランスジェニック魚による影響評価

有害化学物質の魚類に対する影響やその作用機構の解明においてトランスジェニック魚は有力な手段であり、多くの研究が進められている。熱ストレスによって細胞内に誘発さ

れる熱ショック蛋白質(HSP)は、熱ストレスだけでなく、重金属、化学物質、紫外線等によっても誘導されるためにストレス蛋白質とも呼ばれている。HSP の誘導を観察することによって細胞レベルでのストレスの度合を評価することができる。中央水産研究所の山下らは主要な HSP である HSP70 遺伝子をニジマス及びゼブラフィッシュからクローニ化し、発現調節機構を解析した。HSP70 遺伝子に特有な塩基配列である熱ショックエレメント(HSE)を見出し、ニジマス遺伝子ではプロモ - タ - 領域 3 カ所に存在する HSE の中で転写開始点の 70 塩基上流位置する HSE がストレス誘導性を示すことを明らかにした。

この最小領域のプロモ - タ - の下流に大腸菌 lacZ(- ガラクトシダ - ゼ遺伝子)発現系をゼブラフィッシュに導入し、トランスジェニックゼブラフィッシュを系統化した。このゼブラフィッシュの胚(ふ化仔魚)を通常の飼育温度(28.5)及びそれより高温の 37 に 1 ~ 数時間程度飼育した場合、37 飼育魚において全身が青色に染色され、ガラクトシダ - ゼの発現が見られた(図 4 - 1 2)。特に卵黄周辺部、頭部及びレンズで発色の程度が強かった。すなわち、37 の飼育では、ゼブラフィッシュが熱ショックの影響を受けたことが明らかであった。亜ヒ酸(5 ~ 100 μ M)で処理した場合、発色は一番低い濃度、5 μ M でも認められた。また、発色は卵黄周辺部及び水晶体で特異的に認められ、熱ショックの場合と異なっていた(図 1)。この結果、亜ヒ酸によるストレスは、熱の場合と異なり、一部の組織のみに作用することが解った。さらに、HSP70 遺伝子を誘導する亜ヒ酸濃度は、LC50 濃度の 1/100 ~ 1/1000 濃度であり、トランスジェニックゼブラフィッシュの亜ヒ酸に対する感受性は著しく高く、有害化学物質の有害性評価のツ - ルとしての可能性を秘めていることが明らかになった。今後、各種化学物質に対する応答等さらに検証するとともに、メタロチオネイン遺伝子等を導入した重金属元素等に応答するトランスジェニック魚の系統化の研究も推進する必要がある。



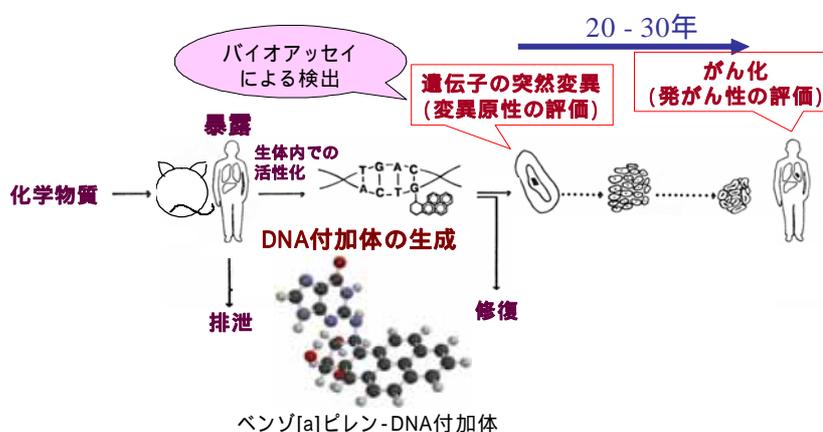
図4-12 HSE-lacZ 導入ゼブラフィッシュ系統における - ガラクトシダ - ゼの発現

対照魚はふ化後 72 時間 28.5 で飼育された。試験魚(Arsenite)はふ化後 64 時間から 72 時間の間 8 時間 100 μ M の亜ヒ酸ナトリウムに暴露された。試験魚(Heat shocked)は、ふ化後 66 時間から 72 時間の間 6 時間飼育水温 37 で飼育された。飼育試験終了後、ゼブラフィッシュはホルマリンで固定され、ガラクトシダ - ゼ活性は X-gal で青色に染色した。青色の濃さが亜ヒ酸や高水温の影響を示す。

4.1.3 突然変異検出用遺伝子導入生物を利用した突然変異原性の検出

化学物質が発がん性を示すメカニズムは比較的良好に調べられている (図4 - 13)

図4 - 13 変異原物質の曝露と遺伝子の突然変異・発がんの関係

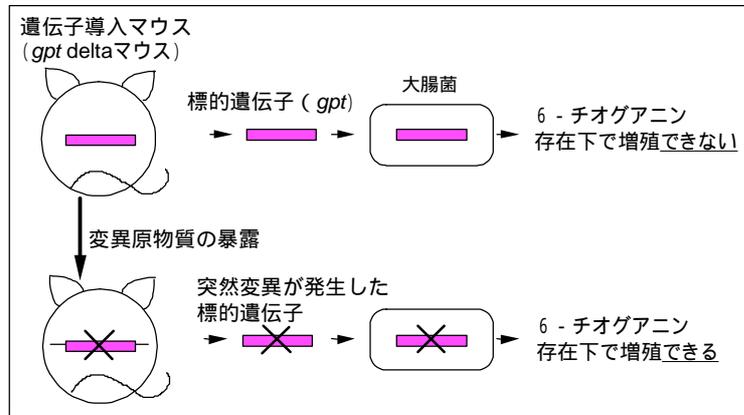


生体に暴露された化学物質の多くは体外に排出されるが、体内に残留した化学物質の一部は活性化されて DNA に結合する。この DNA と結合した化学物質は DNA 付加体と呼ばれ、遺伝子の突然変異の原因となる。細胞の増殖に係わる遺伝子に突然変異が起こると、細胞のがん化が起こることはよく知られる。化学物質が DNA に結合して突然変異を引き起こす性質は変異原性と呼ばれるが、変異原性を示す化学物質の多くが発がん性を示すことが知られている。従って、化学物質が DNA 付加体を生成して、突然変異を引き起こす能力を明らかにすることは、その化学物質の有害性を評価する上で基本的な情報となる。また、環境中に実際に存在する化学物質群が全体として示す変異原性を評価することで、環境からの化学物質暴露による発がんリスクが予測できるものと期待される。

実際の環境からの化学物質暴露により体内で突然変異が発生していることを示唆する知見は、不十分とはいえ幾つか得られている。例えば、わが国でも都市大気を吸わせて長期間飼育した実験動物（ラット）の肺や肝臓で DNA 付加体の生成が確認されている。また、カナダにおいても、都市大気中で飼育した実験動物（マウス）の子孫で、突然変異の発生頻度の上昇が認められている。しかし、これらの研究に用いられている方法では、体内で発生する突然変異の頻度を定量的に測定するには多大な労力が必要である。このため、突然変異検出用遺伝子導入動物の活用を試みている。

突然変異検出用遺伝子導入動物とは、突然変異検出用標的遺伝子を遺伝子工学技術によりゲノム DNA に組み込んだ実験動物のことである。大腸菌のラクトース代謝酵素遺伝子を組み込んだ Muta マウスが 1980 年代後半に作成されたが、Big Blue マウスやラット、及び国立医薬品食品衛生研究所の能美健彦博士により開発された gpt delta マウスなど、これまでに数種類が発表されている。gpt delta マウスには標的遺伝子として大腸菌のグアニン・フォスホリボシルトランスフェラーゼ (gpt) 遺伝子が組み込まれており、動物に化学物質を暴露した後、各器官から抽出したゲノム DNA より gpt 遺伝子を取り出して大腸菌に入れ、この遺伝子上に発生した突然変異を検出するのである（図 4 - 14）。

図4 - 14 突然変異検出用遺伝子導入動物による突然変異検出



大気中にはベンゾ[a]ピレンや1,6ジニトロピレンなど様々な変異原物質が存在する。そこで、大気からの化学物質の暴露の影響を評価することを意図して、気管を通してこれらの変異原物質を肺中に投与した。その結果、投与量に依存して突然変異頻度は上昇し、投与量あたりの肺中での突然変異頻度 (in vivo 変異原性) は1,6ジニトロピレンの方が高かった。その一方、エームス法による試験では、菌株の違い (TA100、TA98) や化学物質の代謝活性化の有無により変異原性が大きく違うことが知られている (図4 - 15)。

図4 - 15 In vivo変異原性と微生物による変異原性試験 (エームス法) 結果の比較

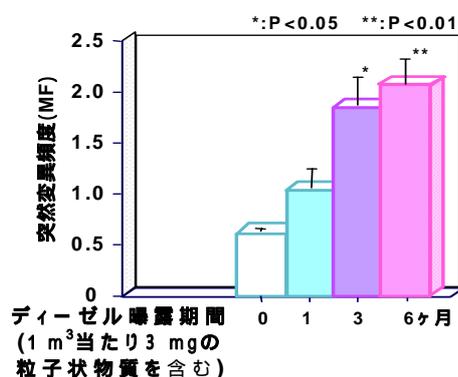
	In vivo変異原性*	微生物による試験 (エームス法)**			
		TA100		TA98	
		代謝活性化有	無	代謝活性化有	無
1,6-ジニトロピレン	3.1	2.6	5.10	4.70	4.100
ベンゾ[a]ピレン	1.7	8.6	nd	7.0	nd
* MF/mg x 10 ⁵		** Rev./μg x 10 ⁻⁵ nd = not detectable			

化学物質の暴露による発がんリスクを評価するには、化学物質が体内で示す変異原性 (突然変異頻度) を明らかにすることが有効である。

前述のように、大気中には多種多様な化学物質が存在する。これらの化学物質が複合的

に体内で示す変異原性を評価することは、環境からの化学物質暴露による発がんリスク評価に必要である。変異原性検出用遺伝子導入動物を利用すると、大気中に存在する化学物質の標的臓器（肺）での突然変異が容易に検出できる。そこで、環境中に存在する変異原物質群のモデルとしてディーゼル排気を暴露し、肺中の突然変異頻度を測定した。その結果、暴露期間に依存して突然変異頻度は増加した（図4 - 16）。

図4 - 16 ディーゼル排気のin vivo変異原性



この結果から、変異原物質単独の影響ばかりでなく、実際の環境試料を遺伝子導入動物に暴露することにより、環境試料中に含まれる化学物質総体が示す変異原性を評価できることが明らかになった。化学物質が体内で示す変異原性から発がん性への予測はこれからの課題である。発がんが細胞の突然変異と突然変異が発生した細胞の増殖促進の二段階で成立することは、発がんのメカニズムとして広く受け入れられている考え方（発がんの二段階説）である。この二段階説をはじめとした発がんメカニズムに準拠した様々の発がん数理モデルが構築されており、これらの発がん数理モデル等を活用して変異原性から化学物質暴露の発がん性リスクが評価できるものと考えている。

変異原物質検出用遺伝子導入ゼブラフィッシュの開発

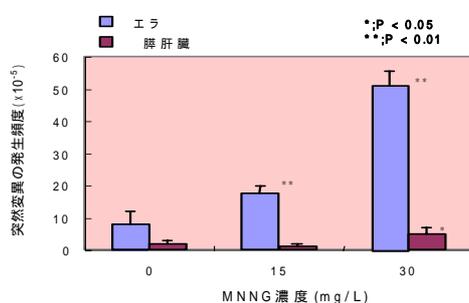
河川や湖沼など水環境中には多くの変異原物質が存在することが知られている。実際、環境省等の調査研究により、京都・桂川水系から新規の変異原物質がエームス法により見出されたが、アゾ色素に由来することが明らかになっている。また、肉の焼け焦げに含ま

れる変異原物質であるメチル IQx も河川水から検出されている。このように水環境中にはしばしば変異原性をもつ非意図的生成物が存在するが、これを検出するにはバイオアッセイに頼る必要がある。

これら河川水中などに存在する化学物質群が生体内で複合的に発揮する変異原性を明らかにすることは、人への健康影響ばかりでなく、生態影響を評価する上で重要である。その最もシンプルな発想として、突然変異検出用遺伝子導入ゼブラフィッシュ (Tg-zf) の開発を進めた。この Tg-zf のゲノム DNA には標的遺伝子として大腸菌のストレプトマイシン感受性遺伝子 (rpsL 遺伝子) が導入されている。魚の体内で発生した突然変異を検出するには、変異原物質を含む水中で飼育した Tg-zf の各器官から抽出したゲノム DNA から、gpt del ta マウスの場合と同様に rpsL 遺伝子を取り出して大腸菌に入れ、この遺伝子上の突然変異を検出する。

Tg-zf の胚を N-メチル-N -ニトロ-N-ニトロソグアニジン (MNNG) などのアルキル化剤で処理すると、ゲノム DNA 上の突然変異頻度が増加していた。また、ベンゾ[a]ピレンやメチル IQx など実際の河川水中に検出される変異原物質の処理によっても突然変異頻度の増加が観察された。Tg-zf を用いて河川からサンプリングした試料についてバイオアッセイを行うには、その成魚を用いて体内に発生した突然変異を検出できる必要がある。MNNG を暴露した結果、Tg-zf 成魚のエラと脾臓では暴露濃度に依存して突然変異頻度が増加した (図4 - 17)。

図4-17 遺伝子導入ゼブラフィッシュ成魚を用いた MNNG の変異原性の検出



突然変異は多くの場合 DNA 塩基の置換により発生する。標的遺伝子の DNA 配列を決定す

ることで、各々の変異原物質の作用によりどのような DNA 塩基置換(突然変異スペクトル)が発生するかを明らかにできる。例えば、MNNG や ENU といったアルキル化剤によって G:C (グアニン:シトシン) 対から A:T (アデニン:チミン) 対への置換が主に起こるのに対して、ベンゾ[a]ピレンなどで主に発生する DNA 塩基置換は G:C (グアニン:シトシン) 対から T:A (チミン:アデニン) 対への置換であった(図4-18)。標的遺伝子上の塩基置換から、暴露した変異原物質の種類が推定できると期待される。

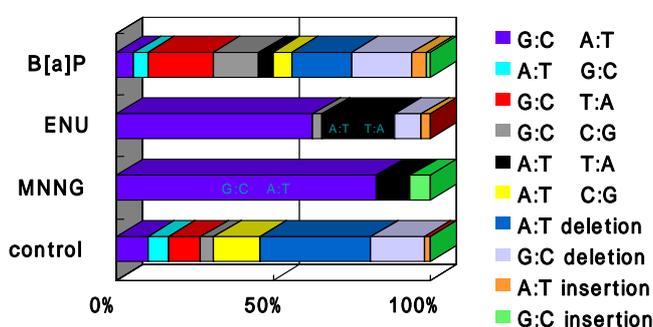


図4-18 変異原物質による DNA 塩基置換の違い

以上のように Tg-zf を用いれば、典型的な変異原物質が体内で引き起こす突然変異を検出できる。試料水の中で Tg-zf を飼育することで、水中に低濃度に存在する変異原物質を検出し、長期曝露の影響も評価できると考えている。さらに、胚を用いれば環境水ばかりでなく、底質中に含まれる変異原物質の検出が期待される。また、ゼブラフィッシュの胚や稚魚を用いた場合は数 ml の試料水で変異原物質の検出が可能である。化学品の変異原試験への活用も期待される。

4.1.4 内分泌かく乱作用の評価手法及び作用メカニズムに関する研究

内分泌かく乱作用の評価手法及び、作用メカニズム解明に関する研究として、酵母ツーハイブリッドアッセイ法　ダイオキシン類の甲状腺ホルモン低下作用のメカニズム
有機スズによるインポセックスメカニズムについて国立環境研究所での研究を記述する。

酵母ツーハイブリッドアッセイ法を用いた化学物質の内分泌かく乱作用の評価

内分泌かく乱物質のハザード評価、リスク評価のためにはまず、これらのホルモン作用

を示す物質を検出することが必要であり、スクリーニング法として作用（活性）を検出できる簡便な方法を開発することが必須である。このような要件をみたす試験法として、レセプターとの結合後の転写活性化情報を測定する invitro のバイオアッセイがあげられる。これらの invitro のバイオアッセイとしてヒト培養細胞を用いた細胞増殖性試験（E スクリーン）、動物培養細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ、酵母を用いたバイオアッセイなどがある。E スクリーンは必要な培養期間が長いこと、必ずしも感度が高くないといった欠点がある。培養細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイは、レセプターとレポーター遺伝子を一過性に培養細胞に導入する方法と、形質転換した安定株を用いる方法がある。一過性に形質転換する系では、試験の都度、形質転換させなければならず、煩雑である。形質転換安定株を用いる方法は簡便であるが、遺伝子発現が不安定になりやすい欠点がある。酵母は培養細胞に比べて遺伝子の導入や取り扱い操作が容易であることから、ホルモン受容体遺伝子とレポーター遺伝子を組み込んだアッセイ系がモニタリングやスクリーニングのために種々開発されている。酵母ツーハイブリッドアッセイ系は、二種類の遺伝子の相互作用をレポーター遺伝子の発現で調べる「酵母 Two-Hybrid System」という米国のクロンテック社が開発した試験法をホルモンの検出に応用したものである。酵母ツーハイブリッドアッセイはホルモン受容体の結合領域遺伝子と遺伝子を活性化するのに必要な補助因子（コアクチベーター）とを酵母にいっしょに組み込み、被験化学物質とホルモン受容体が結合するとコアクチベーターを介して転写活性化を促しレポーター遺伝子により-ガラクトシダーゼが作られるという仕組みである（図4 - 19）。ホルモン受容体とコアクチベーターの両者の存在は、生体内でのホルモンによる活性システムと類似しており、酵母のレポーター遺伝子への迅速、かつ強い転写活性化を引き起こし、酵母ツーハイブリッドアッセイ系を高感度でかつ迅速な検出系としている。酵母を用いるアッセイ系は、培養細胞に比べて取り扱いが容易なこと、細胞毒性に強いことなどから環境試料のモニタリングに適用しやすい。

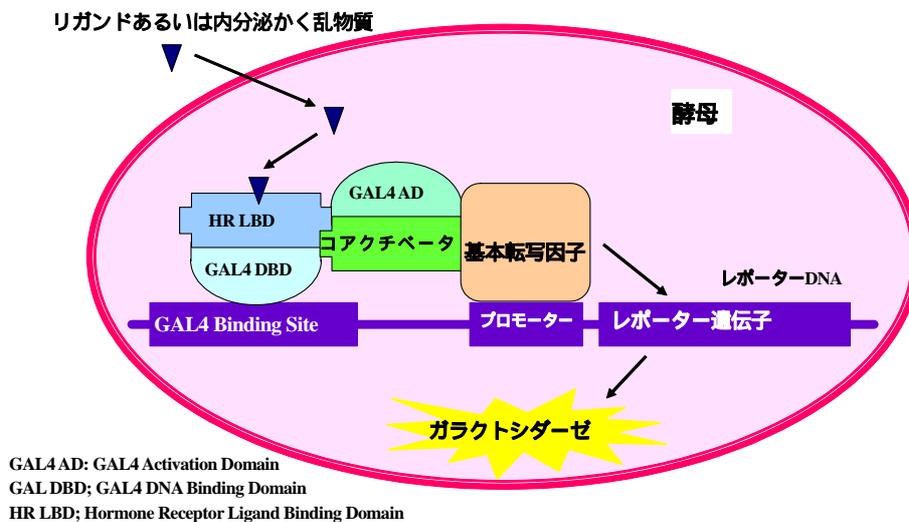


図4 - 19 酵母ツーハイブリッドアッセイ法

種々のホルモン受容体とコアクチベーターを酵母 Two-Hybrid System でレポーター遺伝子の組み込まれている酵母 (Y190 株) に導入すれば、様々なホルモンの試験系が作れる。大阪大学の西川らは、ラット由来のエストロゲン受容体を初めとして、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体などを導入した酵母を作成した。それらはそれぞれのリガンド (本来のホルモン) に対して高い感受性を示し、エストロゲン活性試験において環境ホルモンと疑われている物質に対しても顕著な応答を示した。彼らの試験法はマイクロチューブ内で酵母と試料を 4 時間培養し、遠心後、集めた酵母の細胞壁を融解するなどの操作を経て、それぞれ溶液を 96 ウェルプレートに手作業で移し、 β -ガラクトシダーゼを呈色反応で測定するという操作を必要とする。そのため迅速性、簡便性に問題がある。白石らは、酵母ツーハイブリッドアッセイ法の培養時間が短くてすむという利点に着目し、すべての操作と培養を 96 ウェルマイクロプレート上で行い、 β -ガラクトシダーゼを化学発光法により測定する方法を取り入れることで簡便化、高感度化を達成した。これまで、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体、レチノイドX受容体を導入した酵母の開発を行い、それぞれについてマイクロプレート法と化学発光測定法を組み合わせた迅速・簡便なアッセイ系を構築した。そして、これらのアッセイ系を用いて化学品や環境試料のスクリーニングを行い、酵母ツーハイブリッドアッセイ法がプレスクリーニング法として有用であることを示してきた。酵母ツーハイブリッドアッセイ法を用いた系統

的なスクリーニングの一例として、環境汚染が問題になっている水酸化PCB 91種類についてのスクリーニング結果を示す。

ヒトエストロゲンレセプターhER・遺伝子導入酵母によるアッセイにおいては91物質中27物質がエストロゲン活性を示し、メダカエストロゲンレセプターmER・遺伝子導入酵母によるアッセイでは64物質がエストロゲン活性を示した。特に2,2,4,6-tetrachlorobiphenyl-4-olは、mER・遺伝子導入酵母アッセイの-S9試験において本来のリガンドである17 β -estradiolよりも強い活性を示した。hER・、mER・遺伝子導入酵母のどちらの-S9試験においても、水酸基が4位に位置し、なおかつ水酸基の両側には塩素が存在しない物質が強い活性を示す傾向が認められた。甲状腺ホルモン（TH）活性については、91物質のうち24種がTH活性を示した。もっとも強いTH活性を示した物質は2,4,5,6-tetrachlorobiphenyl-2-olであり、その強さはT3の約4%であった。表1に水酸化PCBの水酸基のないベンゼン環（非フェノール環）の塩素数とフェノール環の塩素数とTH活性との関係を示す。非フェノール環に塩素が2個結合する物質群で活性を示す割合が高い傾向が見られた。レチノイドX受容体については、20種類の化合物がアゴニスト活性を示し、最も強い化合物はリガンドである9-cis-レチノイン酸との相対活性（%）で比較すると5.6%を示した。活性を示した20化合物のうち、最も強い活性を示す8種を含む13種がortho-フェノールで、4種がmeta-フェノール、3種がpara-フェノールであった。その他にも構造と活性との間に何らかの関連が示唆された。

表4 - 1 甲状腺ホルモン活性に及ぼす水酸化PCBの非フェノール環とフェノール環の塩素数の関係

chlorine in non-OH ring	chlorine in OH ring							
	0 (active:non)	% of active	1 (active:non)	% of active	2 (active:non)	% of active	3 (active:non)	% of active
0	0 : 0	-	0 : 3	0	0 : 1	0	0 : 0	-
1	0 : 0	-	0 : 0	-	4 : 6	20	0 : 0	-
2	2 : 3	40	5 : 15	25	8 : 14	36.4	4 : 4	50
3	0 : 3	0	0 : 3	0	1 : 1	50	0 : 0	-
4	0 : 6	0	0 : 6	0	0 : 2	-	0 : 0	-
Total	2 : 12	17	5:27	19	13 : 24	23	4 : 4	50

ダイオキシン類の甲状腺ホルモン低下作用のメカニズムに関する研究

ダイオキシン類（ダイオキシン、ジベンゾフラン、コプラナーPCB）のリスク評価には、

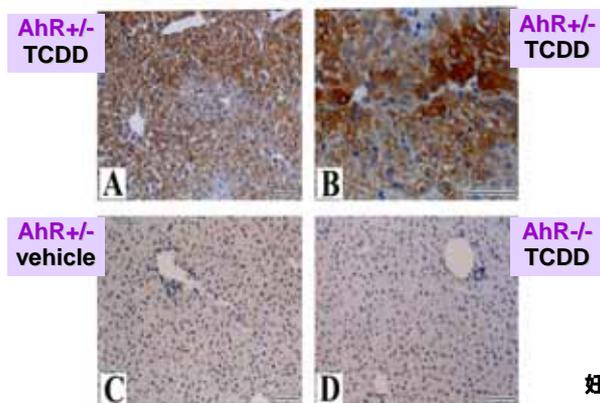
毒性等価係数(TEF)コンセプトが用いられている。ダイオキシン類の甲状腺ホルモン低下作用のメカニズムを探ることにより、TEF コンセプトの妥当性を検討した。TEF コンセプトは Ah レセプター(AhR)へのアゴニスト活性に基づいている。そこでラット、AhR ノックアウトマウス、甲状腺ホルモン T4 の輸送タンパクであるトランスサイレチン(TTR)をノックアウトした TTR ノックアウトマウスを用いて種々の検討を行った。

妊娠 15 日のラットに TCDD(1 μ g/kg)を 1 回投与すると、出生仔の生後 21 日の甲状腺ホルモン T4 が対照に比べ有意に低下した。この甲状腺ホルモン低下作用が胎児期曝露によるものか授乳による曝露によるものかを明らかにする目的で、出産後 1 日に投与群と対照群の腹(litter)を交換するクロスフォスタリングを行い、クロスフォスタリングにより生じた胎児期+授乳期曝露群(T/T)、胎児期のみ曝露群(T/C)、授乳期のみ曝露群(C/T)、対照群(C/C)について、生後 21 日の甲状腺ホルモン T4 を調べた。その結果、甲状腺ホルモン T4 の低下は T/T、C/T 群でのみ認められ、妊娠期 TCDD 投与による生後 21 日の甲状腺ホルモン T4 の低下は授乳期曝露によることが明らかとなった。

次に、AhR ヘテロ(AhR+/-)マウスの妊娠 12 日に TCDD (10 μ g/kg)を投与し、出生仔の生後 21 日の甲状腺ホルモン T4 を調べた。その結果、AhR(+/-)マウスでは T4 の減少、肝における CYP1A1 mRNA、UDP-glucuronosyltransferase-1A6 (UGT1A6) mRNA の誘導が認められた。これに対し、AhR ノックアウト (AhR-/-)マウスでは T4 の減少も肝における CYP1A1 mRNA、UGT1A6 mRNA の誘導も認められなかった(図 4 - 20)。これらのことから、TCDD による T4 低下は、AhR を介した T4-glucuronidation の促進によることが示唆された。

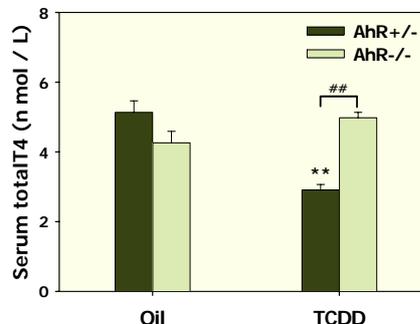
一方、T4 輸送タンパク、トランスサイレチン(TTR) の T4 低下作用への関与を探る目的で、TTR ノックアウトマウスに TCDD (10 μ g/kg)、PCB77 (50mg/kg)、PCB126 (1 μ g/kg)、PCB114 (50 mg/kg)、PCB118 (50 mg/kg)を投与し、7 日後に甲状腺ホルモン T4 を調べた。TTR(+/-) マウスでは、TCDD、PCB126、PCB77、PCB118 投与により T4 が低下した。PCB114 は、この濃度(50 mg/kg) では有意な影響は認められなかった。TTR(-/-) マウスでも TCDD、PCB126 は T4 を低下させたが、PCB77 では低下の割合は低く、PCB118 では変化が認められなかった。肝における CYP1A1 mRNA、UGT1A6 mRNA の誘導は、TCDD、PCB126、PCB114 で認められたが、PCB77、PCB118 ではほとんど認められなかった。これらの結果から、PCB77、PCB118 の T4 低下には TTR が関与していることが考えられ、コプラナーPCB の毒性評価には、AhR 非依存性の毒性も考慮する必要性が示唆された。

ダイオキシン投与したAhR^{-/-}およびAhR^{+/-}マウスの肝CYP1A1の免疫染色



Bar = 50 μm

ダイオキシン投与したAhR^{-/-}およびAhR^{+/-}マウスの血中甲状腺ホルモンレベル



妊娠12.5日目の AhRヘテロ型マウスに 10μg TCDD/kg BW を一回経口投与した。生後21日齢の仔マウスの血清中T4をRIA法で測定した。

図4 - 20 TCDD の甲状腺ホルモン、肝 CYP1A1 mRNA 誘導は AhR に依存する

有機スズによる巻貝のインポセックス誘導のメカニズム

尚、巻貝類のインポセックス誘導メカニズムの解析が進み始めたインポセックスが引き起こされる詳細なメカニズムは、アロマトラーゼ阻害説などの4つの仮説が提出されてきたものの、不明のままであった。国立環境研究所ではこれらの4つの仮説の検証を行ってきたが、いずれも十分に再現されず、これら4つの仮説とは異なるインポセックス誘導メカニズムとして新たに核内受容体 RXR の関与を明らかとした。

有機スズ化合物、特に TBT と TPT はヒトの核内受容体の一種であるレチノイド X 受容体 (RXR) に対して高い親和性を有し、RXR の本来のリガンドである 9-cis レチノイン酸 (9-cis RA) のアゴニストとして作用することが見出された。またその本来のリガンドである 9-cis RA をイボニシに投与した場合、インポセックス出現率の有意な増大とペニスの有意な伸長が観察された (いずれも $p < 0.01$; 図4 - 21)。さらにイボニシから RXR のクローニングが行われ、そのアミノ酸配列をヒトなどの脊椎動物の RXR と比較したところ、DNA 結合領域だけでなくリガンド結合領域においても高い相同性が認められた。イボニシ RXR は 9-cis RA と濃度依存的に結合し、またイボニシ RXR に対する 9-cis RA と TBT 及び TPT との競合阻害試験の結果、TBT 及び TPT が 9-cis RA のイボニシ RXR に対する結合を阻

害することも明らかとなった。なお、ヒト RXR に対して弱い親和性を有する all-trans レチノイン酸 (ATRA) はイボニシ RXR にはほとんど結合しないことも明らかとなった。

イボニシのインポセックスに及ぼす 9-cis レチノイン酸の効果

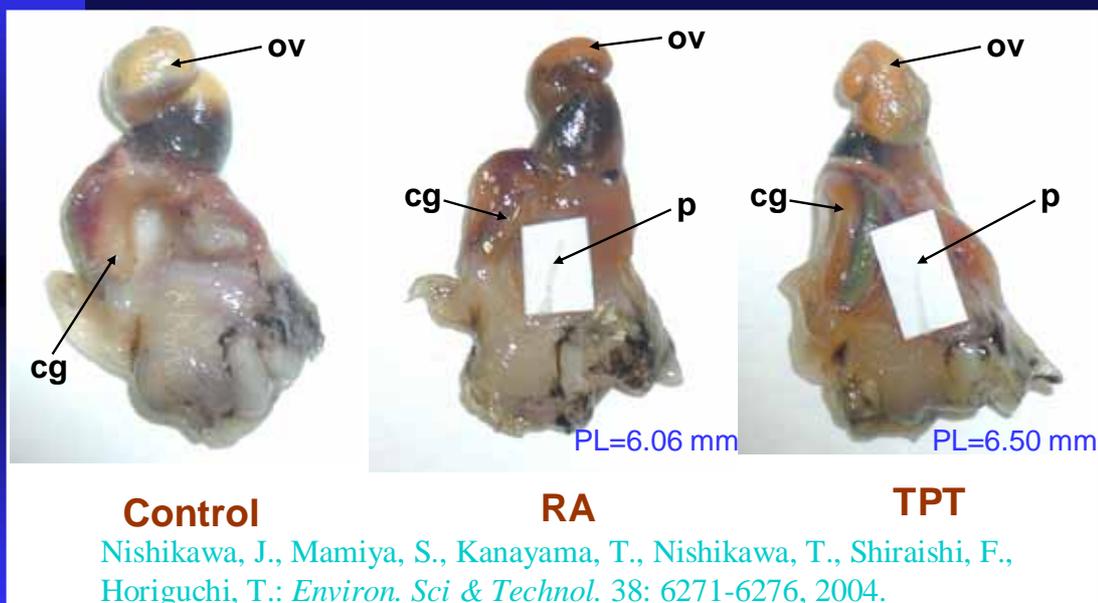


図4 - 21 イボニシに対する筋肉注射1ヵ月後のペニスの伸長

4.1.5 内分泌かく乱物質による生態影響のフィールド研究の例

環境科学の分野ではこれまでほとんどの場合において、個体を観察対象に据えて実験室での研究やフィールド調査がなされてきた。“生態影響”という場合、これまでは個体レベルもしくは個体を構成する細胞以下のレベルでの影響を指すことが多かったのである。そこでは、ある種の異常を引き起こす化学物質の量や濃度が明らかにされてきた反面、それが実環境中では存在しない高濃度であり、また個体群レベルの影響に外挿できない等の点で生態学的妥当性 (ecological relevance) に欠けるものであった。“生態影響”が生態系への影響を指す言葉であるならば、概念として捉えにくい生態系レベルでの解析が困難であるとしても、群集レベルあるいは個体群レベルでの影響の解析・評価が必要である。

イボニシを対象とした調査では、有機スズ化合物によって引き起こされるインポセックスの個体群レベルでの影響を解析・評価するために、毎月、一定のエリア及び時間内に見出される全ての個体を採集し、その殻高組成解析を併せて行うことにより、いわゆる年齢

構成を調べ、年齢群ごとのインボセックス症状と体内有機スズ濃度を明らかにして、有機スズ汚染とインボセックス症状の経年推移と加入量に関する解析を行っている。現在までに、有機スズ汚染域においてもイボニシ個体群に対する加入が見られるものの、若齢個体では高齢個体よりも体内有機スズ濃度が相対的に高く、インボセックス発症率が既に 100%に達し、高率で不妊（産卵不能）となっていることが明らかとなった。この個体群では産卵行動も岩肌に産み付けられる卵嚢もほとんど見られず、個体群としての繁殖能力が著しく阻害されていると結論される。にもかかわらず、表面上、個体群が維持されているのは、湾外からの浮遊幼生の流入があるためと推察された。湾外から流入する浮遊幼生に依存した個体群の維持は不健全であり、有機スズ汚染の低減による繁殖能力の回復が必要である。

商業的価値がほとんどないイボニシと異なり、重要漁獲対象種であるアワビ類を対象とする調査では、漁業による個体群動態への影響の解析・評価も必要である。1970 年代以降、とりわけ、1980 年代半ば以降のアワビ類の資源量減少は明らかな事実であるが、アワビ類の再生産機構のどこで何が原因でどの程度損なわれているかを明らかにするためには、漁業による影響解析の他、親貝の繁殖能力の評価、幼生や稚貝の分布量、生残率及び成長速度の解析、またこれまでの予備的検討の結果、阻害要因として最も疑われている有機スズ化合物の影響をフィールド観測と室内実験によって明らかにする必要がある。そうした観点から、現在、親貝の性成熟に関する毎月の病理組織学的検査（体内有機スズ濃度に関する化学分析を含む）の他、種苗生産試験（親貝による放卵量、受精率、孵化率、着底率、成長速度などの追跡）、実海域での浮遊幼生の分布量と着底量に関する観測、着底初期稚貝の生残と成長に関する追跡調査（潜水調査）、受精卵、浮遊幼生及び着底初期稚貝を用いた実験室での有機スズ曝露試験を実施している。また、関連情報の収集のため、市場調査による全水揚げ個体に占める天然個体と人工放流個体の割合（混獲率）の調査もなされている。現在までに得られた知見により、有機スズ化合物が親貝、特に雌の性成熟を阻害し、浮遊幼生の発生・発達や生残の他、着底稚貝の生残・成長に対して実在濃度レベルで影響を与えることが示唆され、また有機スズ汚染が進行していた海域では天然アワビ個体群の再生産が 1991 年以降、ほぼ消滅した事実から、有機スズによる海洋汚染がアワビ資源の減少に一定程度寄与してきたと推察される。

同様の考え方がマコガレイを対象とした調査にも適用されている。東京湾ではマコガレイを含む種々の有用水産生物が 1980 年代後半以降、減少傾向にある。マコガレイについて内分泌攪乱を指摘する文献があるが、その程度は比較的軽微であり、それが個体群減少の

主因であるとは考えにくい。そこで、卵黄前駆タンパク・ビテロゲニンの誘導と精巣卵に象徴される組織学的異常を指標として内分泌攪乱の有無と程度を改めて明らかにするとともに、資源生物学的パラメータ（分布、年齢と成長、食性、成熟と産卵など）の推定を目指した調査を行うこととした。すなわち、個体群レベルで動態解析を行いつつ、個体レベルでの潜在的影響を精査するためのいくつかの手法を併用した調査・研究計画を立案して実行している。

被影響海域と推定される東京湾と対照海域としての北海道・知内沖においてマコガレイ成魚に対する毎月のサンプリング調査とサンプル処理（血清中のビテロゲニン及び性ステロイドホルモンの測定、生殖腺組織標本の作製と検鏡、胃内容物解析、耳石による年齢解析、肝臓及び筋肉の化学分析）を行い、併せて、年4回の東京湾20定点調査とそこで得られたサンプル処理（同上）、東京湾における毎月2回のマコガレイ稚魚調査とサンプル処理（耳石による日齢解析、胃内容物解析、魚体の化学分析）、マコガレイ稚魚を用いた飼育実験を行って、得られたデータを解析した結果、1)近年のマコガレイ資源の減少は顕著であるが、過剰な漁獲圧力に因らない（乱獲とは考えにくい）、2)1980年代の東京湾におけるマコガレイ資源の高水準期と比べて、近年のマコガレイは1歳魚の成長が悪いものの2歳魚以上の成長が良化している、3)にもかかわらず、雌の成熟開始年齢が遅れている、4)マコガレイの雄の成魚において若干の内分泌攪乱現象（卵黄前駆タンパクであるビテロゲニンの誘導）が観察されるものの重篤ではない、5)マコガレイの産卵場と稚魚の成育場は東京湾奥東部（千葉県市原市沖）である、6)湾奥東部の底泥中には環境ホルモンをはじめとする有害化学物質が高濃度に蓄積している、等の知見が得られた。

以上を換言すれば、環境ホルモンによって内分泌攪乱が生じ、それに伴う成魚の繁殖能力低下によってマコガレイ資源が減少したという単純な図式で捉えることはできないものの、それは化学物質による影響が無視できるほど小さいことを意味しない。なぜなら、資源（個体群豊度）の減少による成長速度の上昇は水産資源学ではよく知られた現象であるが、なぜ、定説とは逆に1歳魚の成長が80年代より悪化したのか、また、2歳魚以降の成長がよくなっているにもかかわらず、なぜ、雌の成熟開始年齢が遅くなったのか、について、現時点では十分に説明できないためである。すなわち、現在の東京湾のマコガレイを巡って進行している現象はもっと複雑なものと考えられ、表面的な現象把握では本質を見誤る恐れがある。こうして、マコガレイの受精卵～稚魚に至る初期生活史に底泥経由で化学物質曝露を受け、それが当歳魚の成長悪化や雌の性成熟の遅延をもたらしたとの作業仮

説が設定された。この作業仮説は、従来の生態毒性学的手法では導くことができなかったであろう。この作業仮説の検証を通じて、真の原因を明らかにする研究を推進している。

国立環境研究所では環境ホルモン・ダイオキシン研究の一環として、東京湾における環境の変化とそれに起因する生物相の変遷を克明に記録し、解析するための大掛かりな調査研究を2002年度（平成14年度）から開始した。本調査研究を通じて、東京湾における環境ホルモンの汚染実態の時空間的解明、東京湾の水・底質試料におけるホルモン活性の測定、ホルモン活性を有する主要成分の推定による魚介類の曝露量評価、東京湾の魚介類における環境ホルモンの影響実態の解明（個体レベルではバイオマーカー（ピテロゲニン等）の測定と病理組織的検討（マコガレイについて前述））、個体群レベルでは量的変化及び質的变化（性比、年齢組成等）の解析（マコガレイについて前述）、群集・生態系レベルでは量的変化（総生物量等）及び質的变化（種組成）の解析（後述）を行い、東京湾の魚介類に対する環境ホルモンの生態リスク評価を試みるべく、研究を展開中である。

2002年12月から東京湾内湾部（神奈川県観音崎と千葉県富津岬とを結ぶ線以北の水域）に設けた20定点において、原則として年4回（春：5月、夏：8月、秋：10月末、冬：2月）、傭船による10分間の試験底曳き調査を行い、漁獲物から魚類、甲殻類及び軟体動物を選び出して種を同定し、種別の個体数と重量を記録している。東京湾20定点調査は、1977年から1995年まで東京大学農学部水産学第一講座（清水誠教授（当時））によって行われた調査であり、年に2~7回、合計75回実施された。2002年12月から国立環境研究所がこれを再開し、年4回の試験底曳き調査とともに水・底質試料の採取も併せて行う包括的な環境調査として実施している。ここでは2002年12月から2004年10月に行われた9回分のデータを使用して底棲魚介類の種組成と生物量の経年変化を解析した結果の一部を述べる。

2002年12月12日から2004年10月28日までの9回の調査で漁獲された種の個体数と重量のデータを解析した結果、特筆すべきは、重量の上位10種のうち、5種を板鰓類（サメ・エイ類）が占めていた点である。1977年から1995年までの東京大学農学部水産学第一講座による合計75回の調査データと比較すると、採集された魚類総個体数103,548に対し、板鰓類の個体数は337個体で0.3%に過ぎなかったのに対し、2002年から2004年のデータでは、たった9回で671個体も採集され、魚類総個体数の7.6%も占めていることが明らかとなった。近年、板鰓類が著しく増加した、といえる。このことはCPUE（単位努力量当りの漁獲量：ここでは1曳網当りの漁獲量）の経年変化の解析でも明らかであった。

結果の一部を表4 - 2に示す。1977年から1995年までと比較して2003年と2004年では、上位を占める種が、シャコ、マコガレイ及びハタタテヌメリからアカエイ、ホシザメ、スズキなどの大型種へと変化した。

また夏季には湾奥に発達する貧酸素水塊のため、湾奥ではほとんど無生物の状態となり、底棲生物の分布が湾南部に偏ることが改めて確認された。さらにクラスター解析により1977年から1995年までの期間と2003年から2004年の期間におけるCPUEの経年変化の期間区分を行なった結果、第1期（1977～1983年：資源増加期）、第2期（1984～1988年：資源高水準期）、第3期（1989～1995年：資源減少期）及び第4期（2003～2004年：資源低水準・大型種増加期）の4つの期間に区分できることが示唆された。

今後、種間関係や環境因子の変動との関連性を多角的に解析することにより、東京湾の底棲魚介類群集の質的及び量的な変化の原因を探る予定である。

表4 - 2 1977～2004年における重量CPUE（1曳網当りの漁獲量）の上位5種

	1	2	3	4	5
1977	シログチ	マコガレイ	シャコ	アカエイ	イシガレイ
1978	マコガレイ	アカエイ	シャコ	イシガレイ	コウイカ
1979	シャコ	アカエイ	スズキ	シログチ	マコガレイ
1980	アカエイ	マコガレイ	シャコ	スズキ	トビエイ
1981	アカエイ	シャコ	ホシサメ	マコガレイ	スズキ
1982	アカエイ	シャコ	シログチ	マコガレイ	ハタタテヌメリ
1983	ウマツラハキ	アカエイ	アスマニシキガイ	マコガレイ	シャコ
1984	シャコ	ハタタテヌメリ	ホシサメ	シログチ	マコガレイ
1985	ハタタテヌメリ	マコガレイ	シャコ	ショウサイフグ	トリガイ
1986	シャコ	マコガレイ	ハタタテヌメリ	シログチ	ホシサメ
1987	シャコ	ハタタテヌメリ	マコガレイ	ウマツラハキ	イシガレイ
1988	シャコ	ハタタテヌメリ	ウマツラハキ	ホシサメ	マコガレイ
1989	ハタタテヌメリ	シャコ	アカエイ	マコガレイ	スズキ
1990	シャコ	ハタタテヌメリ	マコガレイ	スズキ	アカエイ
1991	シャコ	マダコ	ハタタテヌメリ	スズキ	カワハキ
1992	ハタタテヌメリ	マコガレイ	シャコ	ホシサメ	シログチ
1993	ハタタテヌメリ	シャコ	マコガレイ	アカエイ	シログチ
1994	スズキ	ハタタテヌメリ	アカエイ	マコガレイ	シログチ
1995	シャコ	マコガレイ	スズキ	ハタタテヌメリ	ホシサメ
2003	アカエイ	ホシザメ	スズキ	ツバクロエイ	シログチ
2004	ホシザメ	アカエイ	スズキ	コモンカスベ	シャコ

Control: 牛胎児血清 (FBS); RA: 9-*cis* レチノイン酸 (RA); TPT: 塩化トリフェニルスズ (TPTCl)

イボニシに9-*cis* RAの筋肉注射を行った結果、1ヵ月後にインポセックス出現率がControlよりも有意に増大し、またペニスも有意に伸長した(いずれも $p < 0.01$)。