

「内分泌かく乱物質」
平成11年度採択研究代表者

井口 泰泉

(岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター 教授)

「内分泌かく乱物質の動物への発生内分泌学的影響」

1. 研究実施の概要

本研究の主目的は、下記の5項目である。

- (a) 内分泌かく乱物質の多くはエストロゲン作用を示すことから、研究は主として、発生中の脊椎動物、及び成体での生殖系、神経系、嗅覚、及び行動をもとに、哺乳類、鳥類、両生類、魚類にエストロゲンがどのような不可逆的な影響を及ぼすか、作用機構を含めて明確にし、エストロゲンに敏感な発生中の期間を動物種毎に解析する。
- (b) これを元にして、内分泌かく乱物質の環境濃度での発生影響をも明らかにする。
- (c) また、全ての遺伝子が解析され、ヒトの遺伝子との相同性も多く、エストロゲンに反応する*C. elegans*を、発生影響を調べる系として用いる。
- (d) さらに、マウスやサルを用いて、内分泌かく乱物質の胎児影響を調べる科学的な根拠として胎盤透過性を解析する。
- (e) 内分泌かく乱物質の生態系に対する影響を、内分泌かく乱物質の影響が明確な海産巻貝を用いて作用機構を明らかにすると共に、環境影響評価に用いられるミジンコやウニへの発生影響・世代交代に対する影響、及び作用機構を明らかにする。

平成11年度は、ホルモン応答遺伝子を解析するための機器の整備、実験条件を検討し、センチュウ、マウスではDNAマイクロアレイを開始した。魚類や両生類でも、エストロゲン受容体、SF-1、バソトシン受容体をクローニングした。マウス胎仔で形態形成遺伝子の発現がエストロゲンによって影響を受けること、胎盤形成のモデルとなる脱落膜形成に伴う、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体の発現変化、妊娠マウスへのビスフェノールA (BPA) の投与により、短時間で胎仔へ移行すること、ニワトリ卵にエストロゲンを投与すると孵化率の低下と共にシナプス形成の減少が起こることを明らかにした。ラット胎仔脳からのグリア前駆細胞の培養系も確立した。無脊椎動物のイボニシではエストロゲン、アンドロゲン様物質が存在し、アロマターゼ活性も存在することを明らかにした。

以上のように、形態学的影響から遺伝子レベルの影響まで、エストロゲン及び

内分泌かく乱物質の作用機構を明らかにするための基礎データを集積し、これを元に飛躍的な研究の発展をめざす。生殖内分泌学、比較内分泌学、発生内分泌学、神経発生学的知見を総合して、脊椎動物の発生・生殖・行動・神経を標的に、また、無脊椎動物の発生、生殖、行動を標的にし、主にホルモン及び内分泌かく乱物質の不可逆化機構を、遺伝子レベルで解明する事を主目的に研究を展開し、研究の発展とともに、比較生物学的に、脊椎動物と無脊椎動物の研究方向を統合させる。

2. 研究実施内容

I. ホルモン応答遺伝子の解析

- (1) BPAの胎盤透過性を確認するために、マウス及びニホンザルの妊娠期間中にBPAをそれぞれ3000 μ g/30g母体重量、50,000 μ g/kg母体重量を投与し、母体と胎仔の血清、肝臓、脳、及び胎盤、胎仔の子宮、精巣におけるBPA含有量をガスクロマトグラフ質量分析法により調べた。この結果、マウスでは30分後に、ニホンザルでも1時間後には胎仔の各臓器にBPAが存在していた。従って、BPAは胎盤を透過して胎仔の器官に到達しており、胎児に対して影響をおよぼす可能性が示唆された。
- (2) 発生途上の動物の組織には性ホルモン及びホルモン関連物質に対して極めて感受性の高い時期（臨界期）があり、この時期に性ホルモンに曝されると不可逆的な変化が引き起こされる。この不可逆的な変化の機構を解明するために、妊娠マウスに合成女性ホルモンのジエチルstilbestrol (DES) を投与し、遺伝子発現の変化について解析した。胎仔の雄性生殖器官におけるホメオボックス遺伝子 (Hoxa-9、10、11) のmRNAの発現をwhole mount *in situ* hybridizationにより調べたところ、DES処理によってHoxa-9、10、11の発現量及び局在が変化することが明らかとなった。
- (3) マウスの生殖系に着目し、ホルモンおよび内分泌かく乱物質の精子形成障害への影響に関連する遺伝子の検索を行った。ICRマウスの生後5日間にDES (50 μ g)、BPA (0.2 mg) およびゲニステイン (1 mg) を投与し、3カ月後に精巣を摘出し精巣中で発現する遺伝子をDNAチップを用いて解析した。対照に比して発現が誘導もしくは抑制される遺伝子を約100種見いだした。今後、発現変化する遺伝子の機能解析を進め、精子形成への影響を検討し、さらに内分泌かく乱物質曝露におけるマーカー遺伝子の同定を行う。
- (4) 周生期に性ホルモンを投与されたラットは、成熟後無排卵性連続発情となり、子宮機能の恒久的低下が起こる。除卵巢ラットにホルモンを投与することにより、胎盤形成に対するホルモンの影響を調べた。その結果から、子宮上皮細胞におけるプロゲステロン受容体の発現が子宮機能、胎盤形成に重要な役割を

持つことが明かとなった。

- (5) *C. elegans* をモデルとした内分泌かく乱のメカニズムについての基礎知見を得る事を目的として、*C. elegans* の生育における性ホルモンの影響について解析した。まず、培地中に性ホルモンを加えることにより *C. elegans* の生殖、発生、生育における影響を解析した。低濃度のコレステロールを含む培地にエストラジオール (E_2) を加えても、産卵、発生に影響を与えなかったのに対し、テストステロン (T) を加えた培地は有意に産卵数を減少させた。また、生育に必要なコレステロールを培地から取り除いた場合、 E_2 存在下では生育できたのに対し、T 存在下では生育できなかった。これらのことから、*C. elegans* は各々の性ホルモンに対して特異的な応答をしている事実が明らかになった。
- (6) EC細胞F9の培養系に、 E_2 、T及び、DES、BPA、ノニルフェノールを 10^{-4} ~ 10^{-9} M加え、影響を調べた。その結果、分化への影響は見られなかったが、 10^{-4} ~ 10^{-5} Mにおいて増殖抑制が見られた。増殖抑制の見られたF9細胞のDNAを調整し、断片化の解析を行ったところ、DNAラダーが観察されたことから、アポトーシスの誘導が示唆された。またF9細胞におけるエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体の発現は見られなかった。以上より、これらホルモンおよびホルモン様化学物質は、F9細胞において高濃度でアポトーシスを誘導し、そのシグナル系にはステロイドホルモン受容体以外の受容体の関与が示唆された。

II . 神経系及び行動への作用解析

- (1) 哺乳類の脳の発生と形態形成時における内分泌かく乱物質の影響とその作用機構を明らかにするために、神経系の初期発生に与える影響、とりわけグリア細胞の発生・分化とその機能異常発生の機構解明について、マウスおよびラット胎仔の神経前駆細胞およびグリア前駆細胞を用いて調べ、中枢神経系におけるミエリン形成担当細胞であるオリゴデンドロサイトの起源が神経上皮細胞であることを明らかにした。ラット胎仔脳よりグリア前駆細胞を選択的に取り出す方法を開発し、この細胞から発達段階特異的オリゴデンドロサイトを採取する方法を確立した。さらにこれらの細胞とニューロンの共培養系でミエリン形成を可視化観察出来るシステムを考案した。さらにこの時期に細胞が受ける内分泌かく乱物質の影響とその作用機構を解析中である。
- (2) ニワトリ卵・初生雛を用いて、卵の孵化率や孵化した雛の奇形発生率、行動(特に学習行動) 脳内のシナプス形成、などに与える内分泌かく乱物質影響を調査した。その結果、 E_2 やDES、BPAを孵卵前に投与すると、孵化率の低下や奇形個体の増加だけでなく、本来なら学習に伴ってシナプスが増える大脳の一部(IMHV領域とLPO領域)で対照群よりもシナプス(シナプス小胞膜蛋白シナ

プトレブリンの免疫陽性反応)が少なくなる傾向が認められた。従って、エストロゲン様物質が発生初期に存在すると、学習に伴う中枢神経系のシナプス形成や神経回路新生が阻害され、学習障害や記憶障害が誘発されることも考えられる。

- (3) 水系環境におけるエストロゲンの影響を調べるため、海産メダカであるマミチョグを用い、受精卵からエストロゲン暴露を行うと、形態異常、骨形成異常、性分化率の変化等の異常が引き起こされたことから、エストロゲンが初期発生段階からエストロゲン受容体(ER)を介して作用する可能性が示唆された。そこでER遺伝子のクローニングを行ったところ、メダカのERと81%の相同性を持つクローンを得ることができた。次に初期発生の経時的なERの発現変化についてRT-PCR法を用い解析を行ったところ、発生段階により発現量が異なり、また、エストロゲン処理により初期神経胚での発現の増加が認められた。
- (4) 隣接する2つの河川の色々な地点から採取した河川水で嗅上皮を刺激し、嗅球からの脳波応答を記録・解析した。また、人工的Y迷路の2つのアームに異なる河川水を導き、ビデオ装置を用いて選択行動を観察・記録した。その結果、(a)河川の色々な地点で、匂い刺激の構成成分が異なることが示唆された。また交差順応テストから、ヒメマスが異なる河川の匂いを互いに識別していることが示された。(b)行動学的検討の結果、一方の河川水を選択すること、また、嗅上皮を破壊すると河川水を識別できなくなることが判明した。

Ⅲ．両生類の発生・生殖・行動への作用解析

- (1) カエルは水を飲まず、腹側皮膚からのみ水分を吸収している。ニホンアマガエルの腹側皮膚の水分吸収量は雄の方が雌より多く、女性ホルモンは抑制、男性ホルモンは促進的に作用した。また、BPA、メトキシクロールも抑制作用を示した。さらに、この水分吸収を促進するバソトシンの受容体は、雄で雌より強く発現していた。これらの雌雄差を指標として内分泌かく乱物質の作用機構の解明、検出などに寄与できる。
- (2) 両生類の変態に対する内分泌かく乱物質の影響を調べるための前段階として、ウシガエルTSH およびPOMCのcDNAのクローニングに成功したので、プロラクチンを含め、三種の下垂体ホルモン関連mRNAの測定が可能になった。またイモリの雌誘引フェロモンの含量とmRNAレベルに及ぼす内分泌かく乱物質の影響を調べるため、シリケンイモリのフェロモン(前駆体)cDNAクローニングとフェロモンの免疫測定法を確立した。これによって内分泌かく乱物質のフェロモン合成に及ぼす影響を調べる基礎を確立した。

Ⅳ．水棲動物の生殖への作用メカニズムの解析

- (1) イボニシにおけるインボセックス発症機構解明の一環として、インボセック

スの発症に関連すると考えられる臓器についてステロイドホルモン様物質の存在量と、アロマターゼ様活性の測定を試みた。雄の消化腺ではT様物質とE₂様物質が検出されたが、雌ではT様物質が検出限界以下であった。また、消化腺のミクロソーム画分にアロマターゼ様活性が検出され、雌の活性は雄より高かった。

- (2) ミジンコはプランクトンの補食者であり、魚に対する被捕食者として、上下階層生物の量を調整しており、自然界で化学物質の生物濃縮が行われる上で重要な役割をもっている。さらにウニ胚も化学物質に対する感受性が高く、初期発生における化学物質の作用を調べる試験系となる。現時点までに分かっていることは、(a) 成長ホルモンのアナログであるポナステロンAにおいて、ごく微量では成長促進/産仔数増加をひき起こすが、ある濃度からは逆に不妊になり、さらに濃度を高くすると死に至る。また似たような現象が、ある種の木材抽出成分に於いても観察された。(b) ある種の昆虫農薬は成長ホルモンのアナログとなっており、成長スピードを速めることによって脱皮不全を起こす作用のあることが知られているが、ミジンコにも同様の作用を及ぼした。(c) あるプラスチック容器から滲出した成分が、ミジンコの短命化、不妊、白体化をひき起こすことを発見した。現在その物質を同定中である。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Seiwa, C., Sugiyama, I., Yagi, T., Iguchi, T., and Asou, H., Fyn tyrosine kinase participates in the compact myelin sheath formation in the central nervous system. *Neurosci. Res.*, 23: 1-11(2000).

M. Huruno and M. Satou (2000). Long-term potentiation and olfactory memory formation in the carp olfactory bulb. In: *Frontiers of the Mechanisms of Memory and Dementia*, ed. by T. Kato, Elsevier Science, Amsterdam, pp25-26.

R. Hoshikawa, Y. Sato and M. Satou (2000). An in vitro study of long-term potentiation in the carp olfactory bulb. In: *Frontiers of the Mechanisms of Memory and Dementia*, ed. by T. Kato, Elsevier Science, Amsterdam, pp27-28.