

「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、ステロイドホルモンや内分泌かく乱物質の、動物に対する発生影響のメカニズムを解明することであり、受容体 - 遺伝子発現 - 何らかの影響、という軸からの研究を展開し、最終的には影響に関連する遺伝子を明らかにすることを目指している。(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、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を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(臨界期)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)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センチュウ(*C. elegans*)を、発生影響を調べる系として用いるとともに、マイクロアレイ法などを用いて、ホルモン応答遺伝子を整理する。(d)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12年度は、マウスおよびセンチュウをもちいてDNAマイクロアレイを開始し、エストロゲン応答遺伝子をはじめ、いくつかの化学物質に反応する遺伝子を解析した。周生期の性ホルモン投与によって誘起されるマウス生殖器官の不可逆化に関連する遺伝子の探索から、いくつかの候補遺伝子を見いだした。また、ラット胎児生殖輸管系でのエストロゲン受容体および細胞分裂に対するホルモンの影響を明らかにした。ビスフェノールA(BPA)の胎盤透過性の結果から、低容量影響を検証し、影響の可能性を指摘した。思春期での一時的な影響の発現と不可逆的な影響との関連に関しては不明である。胎児期のマウスの脳の発達に対しても高用量のBPAは一過性の影響を与える結果を得た。マウス膣の尿道下裂の臨界期およびこの現象を誘起するホルモンの臨界濃度を決定したが、BPAはこの現象を誘起しな

かった。魚類や両生類でも、エストロゲン受容体（ER）、SF-1、バソトシン受容体をクローニングしている。ヒメマスの行動実験から、フタル酸などの多い河川水を避けることが示唆された。両生類の尾の退縮を用いる変態試験が甲状腺ホルモン様物質の評価系として使用できる可能性を指摘した。BPAは甲状腺ホルモンの作用にたいして阻害作用を示すことが示唆された。水棲無脊椎動物のイボニシの性ホルモンの存在を明らかにし、その季節変動を調べるとともに、エストロゲン受容体の部分配列を決定した。ミジンコでは、ポリスチレン容器から溶出するスチレンが生殖に対して阻害作用をする事を明らかにした。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

(1) ホルモン応答遺伝子の解析

胎盤透過性・低容量影響・臨界期：妊娠17日目のマウスにBPAを投与すると、30分後には胎盤、胎仔の血清、肝臓、脳、子宮、精巣にBPAが到達していることを確認し、妊娠150日目のニホンザルにBPAを投与すると、一時間後には胎仔の体内に到達していることを平成11年度に確認した。この結果を受けて、低用量影響を検証するために、妊娠11 - 17日のマウスにジエチルstilbestrol（DES）0.02 - 2 μ g/kgとBPA 2, 20 μ g/kgを投与し（vom Saalによれば、2.4 μ g/kgがヒトの曝露に相当）仔に対する影響を見たところ、雌においては、2 μ g BPAを除いて、膣開口が有意に早くなり、その時点の体重は有意に軽くなった。また、離乳日の体重は有意に軽くなった。Anogenital distance（生殖器から肛門までの長さ）は雌雄ともに差はみられなかった。妊娠10 - 18日にDESあるいはBPAを暴露したマウスでは、DES2 μ g投与群のみ無排卵、卵巢非依存の不可逆的膣の異常が誘起された。BPAおよび2 μ g以外のDES処理では正常雄と交配後は、正常な出産が行われ、産児数にも性比にも差がなかった。出生直後のBPA（150 μ g/pup）、DES（0.3, 3 μ g/pup）投与により、卵巢非依存の不可逆的膣上皮の増殖が起こった。また、出生直後（0日齢）の雌マウスでは、DES投与2日目から3日目にかけて尿道腔から膣への癒合が起きた。尿道上皮とsinus cordではアポトーシス細胞が増加し、膣と尿道の癒合部分でもアポトーシス細胞がみられた。さらに、DES投与開始日を3 - 7日齢とずらしていく

と膣と尿道の癒合部位が下に下がっていき、7日齢では1匹を除いて尿道下裂は認められなくなったことから、臨界期は生後7日頃であろう。また尿道下裂の臨界濃度は、DES 0.003 μ gであった。一方、BPAでは300 μ gでも尿道下裂は起きなかった。

特異的遺伝子の解析：出生直後のマウスにDESを投与すると卵巣非依存性に不可逆的に膣上皮の増殖、角質化が起こる。この機構を解明するために、ディファレンシャルディスプレイ法を用いて、不可逆化を起こしている膣で特異的に発現している遺伝子の単離を行った。その結果、セリンプロテアーゼであるニューロプシンと相同の遺伝子が得られた。この遺伝子は卵巣除去していないマウスの膣で発現しているが、卵巣除去により発現が認められなくなった。これらの知見は、本来は卵巣から分泌されるエストロゲンに制御されていたこの遺伝子は、不可逆化によりエストロゲンの制御を受けなくなっている事を示唆している。ニューロプシンの発現位置をin situハイブリダイゼーション法を用いて調べ、膣上皮に発現している事を確認した。膣上皮はケラチンに対する抗体で染色されることから、ニューロプシンは膣上皮における角質化に關与していることが推測される。今後、この遺伝子のホルモンによる発現パターンの変化、発現調節機構の解析により、不可逆化機構を解明する予定である。

マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析：本来のステロイドホルモン受容体は直接的に遺伝子発現に關与する転写因子であることから、内分泌かく乱物質の作用機序を明らかにするためのアプローチの一つとして、遺伝子発現のレベルからの解析を行った。DNAマイクロアレイを用いてマウス子宮における遺伝子の発現状態を調べ、エストロゲンおよび内分泌かく乱物質により変動する遺伝子の解析を行った。子宮においては、調べた約1万の遺伝子のうち約5000の遺伝子が発現しており、エストロゲン投与により約1000の遺伝子発現が変動していることが明らかになった。これら変動した遺伝子の多くはエストロゲン受容体(ER)を欠損したマウスでは変動しないことから、ERを介した遺伝子発現変化であることが確認された。さらにこれらの遺伝子発現パターン変化を内分泌かく乱物質による遺伝子発現パターン変化と比較したところ、両者が必ずしも一致しないことを見出した。すなわちエストロゲンおよび内分泌かく乱物質の双方で変動する遺伝子とそれぞれに特異的に変動する遺伝子が存在することが明らかになった。これらの遺伝子の機能を明らかにすることにより、内分泌かく乱物質の作用について明らかにできると思われる。

視床下部・生殖腺の受容体発現：出生直後のDES投与により、視床下部・下垂体系の変化により、雌マウスは無排卵となる。出生直後にDESを投与されたマウスの視床下部で、ERの発現を免疫組織学的に調べ、ER発現から判断すれ

ば、性的二型が存在する事を見出した。また、無排卵は生後10日目からのDES投与によっても起こりうる事を見出した。一方、ラットでは、妊娠15 5日からミュー管上皮細胞および間質細胞にERが発現していた。この発現は生殖腺付属器官の上部では上皮細胞で、中間部および下部では間質細胞で主に発現しており、胎児の発達に伴って発現が高まった。妊娠21 5日の生殖腺付属器官では妊娠15 5日に比べて約2.5倍のER α mRNAの発現が認められた。ER β についてはER β 1およびER β 2のmRNAがER α と同様に少なくとも妊娠15 5日から発現している事を見出した。

雄マウス生殖器官の発現遺伝子検索:DES 50 μ g、Genistein 1mg、BPA 0.2mgを出生後1 - 5日まで投与し、3ヶ月後に精巣での遺伝子発現変化についてIncyteマウスcDNAマイクロアレイを用いて検討を行った。対照群と比較して、DES投与群で、発現が2倍以上の遺伝子は2種、0.5倍以下の遺伝子は32種。Genistein投与群で、発現が2倍以上の遺伝子は3種、0.5倍以下の遺伝子は36種。BPA投与群で、発現が2倍以上の遺伝子は9種、0.5倍以下の遺伝子は3種を見いだした。これら発現変化した遺伝子について、DES投与とGenistein投与で共通して認められた遺伝子は7種存在したが、BPA投与では共通して認められる遺伝子は認められなかった。さらに、DES 5 μ g/mouseを出生後1 - 5日まで投与し、2ヶ月後に精巣での遺伝子発現変化についてサブトラクション法を用いて検討を行った結果、精巣で発現上昇した遺伝子を3種見いだした。

胎盤形成への影響: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。除卵巣ラットにホルモンを投与することにより、子宮のホルモン感受性を調べた結果、連続発情ラットでは、子宮上皮細胞および間質細胞のホルモン依存性受容体発現(プロゲステロン受容体、ER)が変化しており、これが、性ホルモンに対する内膜細胞の増殖活性に反映していることが示唆された。

センチュウのエストロゲン応答遺伝子群の検索およびタンパクのリン酸化の解析:野生株から回収した受精卵を基本培養液中にて20度の環境温度条件下で一晩培養し、孵化させた後に餌を与えL2/L3幼虫にまで同調培養を行った。エストラジオール(E2)の暴露を5時間行った後、mRNAを精製した後cDNAを合成し、約8500の線虫cDNAがスッポットされたスライドグラスにハイブリダイゼーションさせ、マイクロアレイ解析を行った。タンパクリン酸化解析は、L2/L3幼虫を40 μ M E2を含む培養液中で10分培養後に幼虫を回収し、10% SDS-PAGEによるタンパク分離後に、マウスモノクローナル抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法で行った。マイクロアレイ解析の結果、多数のE2応答

遺伝子群が検出された。これら応答遺伝子群の多くは機能不明であったが、タンパク合成や代謝、低分子化合物輸送、情報伝達、脂肪・ステロール代謝等に関与する遺伝子が含まれていた。発現量増加遺伝子群には、UDP-glucuronosyl transferase protein family、heat shock protein familyと高い相同性を持つ遺伝子が確認され、細胞内での化学物質代謝・排出機構が働いている可能性が示唆された。一方、発現量減少遺伝子群の中には、個体の成長、筋肉構成、神経系発達、生殖細胞の発達に関わる遺伝子の発現に減少傾向が見られた。さらに、これらマイクロアレイ解析の結果に反映し、細胞内情報伝達に不可欠であるタンパクのリン酸化が、ウエスタンブロット解析により検出され、化学物質暴露後の短時間の内に細胞内情報伝達経路が活性化されている可能性が示唆された。以上の結果から、センチュウを生物モデルとし、マイクロアレイを用いたエストロゲンなどステロイドホルモンに対する応答遺伝子群の網羅的検出が可能となった。また、ステロイドホルモン暴露により、個体の成長をはじめとした多岐にわたる生理現象に影響を及ぼしている可能性が示された。今後、各発生段階でのセンチュウを用いて各種ステロイド応答遺伝子群の検索を行い、個体の発生過程におけるステロイドホルモンの作用機構を明らかにする予定である。

マウス初期発生試験のモデル：胚性幹細胞（ES細胞）に類似した性質を持つ embryonic carcinoma (EC) 細胞、F9株を用いて、ホルモン様化学物質の影響を調べた。F9ではER- α 、 β はRT-PCRでは検出感度以下であり、BPA処理後においてもER- α 、 β は検出されなかった。また、BPAではF9細胞の分化は誘導されなかった。マウス初期胚にERが発現しており、初期胚に高濃度のエストロゲンを暴露すると胚の成長が阻害され、低濃度では促進されるなど、その効果が調べられているが、ES細胞株などにおいては、未だ調べられていない。種々のES細胞、EG細胞、EC細胞株を培養し、RNAを抽出し、RT-PCR法にてER- α 、 β の発現を検討した結果、ES、EG細胞など未分化幹細胞株ではER- β の発現が強く、分化した細胞株（TM3、TM4など）ではER- α の発現が強いといった傾向が見られた。今後、これらの発現しているERがどのような生物活性を有しているのか、培養系にエストロゲンなどを添加して、細胞増殖・分化への影響を調べる。

(2) 神経系及び行動への作用解析

マウスの脳：グリア細胞の初期発生に対する内分泌かく乱物質の作用メカニズムを解明するため、妊娠17日齢ICRマウスにBPA；高容量0.9mgあるいは低容量0.009mgを皮下投与した。げっ歯類のグリア前駆細胞の産生は胎生13 - 15日に始まり、そのピークは胎生16 - 17日で、そのあとも出生前（胎生21日）

(最近の知見では成体の脳でも認められている)までつづくこととされていることから、グリアの初期発生に与える影響を調べるため(即ち標的細胞のもっとも危険な時期を特定するため)に胎生15日齢から17日齢マウスが最も適当であると考え実験を行った。神経発生およびミエリン形成担当細胞/ミエリン形成の初期過程におよぼす影響を脳全体で調べるために投与群と対称群の脳で生後10日目、50日目の組織切片を作製し、ニッスル染色とミエリン関連糖蛋白(MAG)に対する抗体を用いて調べた。BPA高用量投与群で生後10日目の大脳皮質が著しく薄くなっていたが、生後50日目では対照群のレベル(正常厚)まで回復していた。また投与群では生後10日目のオリゴデンドロサイト活性及び初期ミエリン形成能も著しく低下していた。しかし、BPA低容量投与した場合には脳実質の大きさに変化は認められないだけでなく、MAG陽性の未成熟オリゴデンドロサイトの蓄積が見られ、しかもミエリン形成は活発化していた。このことはBPA濃度がグリア細胞の初期発生に大きな影響を及ぼしていることを示唆しており、今後BPAのグリア前駆細胞/ミエリン形成担当細胞におよぼす発生異常のメカニズムを直接検証するために胎児脳(E17)よりオリゴデンドロサイトの前駆細胞を採取し、ホルモンレセプターファミリーの解析を計画している。

ニワトリの発生影響: 孵卵前に投与したBPAが孵化率や雛の奇形発生率、学習行動、脳内のシナプス形成にどのような影響を与えるか調べた。BPA(卵の重さ1gあたり5, 50, 250 ng)をインキュベーター前(Day 0)の鶏卵の卵黄内に投与した結果、孵化率: 溶媒のみを投与した対照群に比べ、BPA群では低くなる傾向が見られた(58% vs 33~45%)。外部形態の奇形: 股関節の奇形が、BPA群において多く見られた。記憶力: BPA群に記憶保持率の低下傾向が見られた(79% vs 40~50%)。脳内シナプス量: BPA群で大脳LPO領域(摂食忌避学習に関わる部位)のシナプス量に低下傾向が見られた(395 μm^2 vs 183~253 μm^2)。これらの結果から、BPAがニワトリの発生に影響を及ぼし、孵化率の低下や形態形成の異常を誘発するだけでなく、脳内シナプス形成を阻害して記憶力の低下をもたらすことを示唆する。従って、BPA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にも悪影響を受け、出生後に学習障害や記憶障害が現れる可能性がある。

魚への発生影響: 水系環境におけるエストロゲンの発生影響を調べるため、海産メダカであるマミチヨグ(*Fundulus heteroclitus*)を用い、受精卵からエストロゲン曝露を行った。その結果、形態異常、骨形成異常、性分化率の変化及び生殖腺の異常が引き起こされた。以上のことより、エストロゲンが初期発生段階のどの時期から影響を及ぼすのかを調べるためERのクローニング及び、

ERmRNAの発現解析を行った。その結果、アミノ酸の比較より、alpha型に近くメダカ (*Oryzias sp.*, *Oryzias latipes*) のERと81%の相同性を持つ約2 Kbの配列を得た。また、現在約400bpのER beta型に近い配列を得ており、全長の同定を行っている。哺乳類で性分化に関与すると考えられているFTZ-F1、Ad4 BP/SF-1遺伝子のクローニング及び、各器官における発現の解析を行った。RT-PCR法により、メダカFTZ-F1遺伝子と高い相同性を持つ825bpのcDNA断片を得た。この断片から予想されるアミノ酸配列を解析した結果、FTZ-F1サブファミリーに特異的な構造を含んでいることが分かった。また、この配列を元にRT-PCRサザンプロット法により各器官での発現を調べたところ、脳やステロイドホルモン産生組織である卵巣、精巣で発現が見られた。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。

魚の行動：大型Y迷路を用いることにより異なる2つの河川水の間で、ヒメマスは明瞭な選択行動を示すことが分かった。ヒメマスが殆ど遡上しない河川から、フタル酸エステル類、アルキルフェノール類、ノニルフェノール、BPAなどが検出された。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、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。

(3) 両生類の発生・生殖・行動への作用解析

カエルの水分吸収：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速度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。また高湿度条件下では、この雌雄差は見られなくなったが、女性ホルモンは同様に抑制作用を示した。さらに水分吸収を促進するバソトシンの受容体は、腹側皮膚で強く発現していたが、雌雄で発現量の差は見られなかった。これらの皮膚の水分吸収を指標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。

カエルの変態試験：内分泌攪乱物質の化学構造は、ER以外にも、スーパーファミリーである甲状腺ホルモン受容体 (TR) やレチノイン酸受容体、その他のステロイドホルモン受容体への結合能を十分に予測させるものが多い。BPAについて、両生類を材料に、変態 (甲状腺ホルモン、T3様はたらき) の有無を検討した。変態前期ウシガエル幼生 (TKステージXVI) を48個の容器にそれぞれ1匹ずつ飼育した。E α (10 μ g) 腹腔内投与、BPA (50 μ g) 投与、T α (3 $\times 10^{-8}$ M)

を含む飼育水で飼育、T4を含む飼育水で飼育しつつE2(10 μ g)投与、T4を含む飼育水で飼育しつつBPA(50 μ g)投与群に分けた。対照群の幼生の尾は変化しなかった。しかし、T4中で飼育したウシガエル幼生の尾長および尾巾はともに、実験最終日では実験開始時の長さの約60%が退縮した。BPAまたはE2の投与はT4による尾巾および尾長の退縮を、それぞれ42%および67%抑えた。しかし、BPAあるいはE2を単独投与した幼生尾の長さは対照群と変わらなかった。両生類の変態は、甲状腺ホルモンであるT3の支配を受け、T3を外的に投与することで、完全な変態を誘導することができる。これはT3がその受容体タンパク質であり、さらに転写調節因子でもあるTR β タンパク質に結合し、種々のDNAに結合して転写を活性化することで行われることが知られている。ゼノパス幼生(NFステージ52-54)の尾部を器官培養しBPAを加えたところ、10⁻⁴Mで、TR β 遺伝子の発現は、抑制されることがわかった。また、成体オスウシガエル下垂体細胞を酵素処理により解離し、培養液中にDESおよびE2を10⁻⁷~10⁻⁵M、およびpositive controlとしてPRLの場合TRH(10⁻⁸M)を、LH、FSHの場合GnRH(10⁻⁶M)を含む70%M199液中で培養し、24時間に放出されるPRL、LH、FSHをRIAにより測定した結果、DES、E2ともにいずれのホルモン放出にも顕著な効果を示さなかった。

(4) 水棲無脊椎動物の生殖への作用メカニズムの解析

巻き貝:イボニシの各種臓器におけるステロイドホルモン様物質の季節変動:有機スズ汚染が軽微であることが報告されている茨城県ひたちなか市平磯海岸で2000年4月、5月、7月、8月、10月、11月及び2001年2月に採集したイボニシの消化腺、卵巣、精巣のホモジネートを試料としてエストラジオールあるいはテストステロンに対する抗体を用いたEIA法によるステロイドホルモン様物質の予備的測定を行った。消化腺の湿重量は年間を通して大きな変化がなかったが、精巣と卵巣の湿重量は4月から7月にかけて10倍以上に、また雄のペニス形成部位は2倍に、それぞれ増加した。消化腺では、雄のエストラジオール様物質("E2")の比含量が4月~7月に約2倍に、テストステロン様物質("T")の比含量が5月~7月に2倍以上に増加し、結果として"E2"/"T"比が5月から7月にかけて40%低下した。雌の"E2"は4月に雄の2倍以上であったが、5月には30%にまで低下し雄と逆の反応を示した。"E2"/"T"比は、雄雌共に7月~10月には変化しなかった。精巣では、"E2"/"T"共に4月で高く、卵巣に対して10倍以上であったが、5月には11%にまで低下し、その後共に増加した。"E2"/"T"比は、4月から7月に27%にまで低下した。卵巣では、"E2"/"T"共に大きな変化が認められなかったが、"E2"/"T"比は4月で高く以後わずかに低下した。これらのデータは臓器タンパク質当たりの比含量で示し

たが、臓器の量が4月から7月にかけて10倍以上に増加したことを加味すると臓器当たりの総量は100倍以上に増加したと考えられる。生殖腺の発達する時期に卵巣では“E2”、精巣では“T”の割合が大きくなっていたと見られることから、卵巣と精巣の発達初期に各々“E2”/“T”比の増加と低下が起こることが示され、生殖腺の発達に本実験で測定したステロイドホルモン様物質が関与している可能性が示唆された。しかしながら、本実験で採用された試料の前処理方法にはなお改善の余地があり、一方、これとは別途、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計を併用してEIA法の前処理方法を検討したので、次年度以降、改めてステロイドホルモン量の季節変動について検討する予定である。

性特異的遺伝子の検索：インポセックス発症機構を解明するためには、イボニシの性成熟に関する基礎的知見の集積が欠かせない。そこで、性成熟期を中心に採集したイボニシについて性特異的に発現する遺伝子の検索を行った。4月から10月にかけて約40日おきに採集したイボニシから神経節、ペニス形成部位、卵巣、精巣、および消化腺を分離し、抽出したRNAを用いてRT-PCR法により性特異的に発現する遺伝子断片の検索を行った結果、ペニス形成部位、神経節、精巣、卵巣及び消化腺から性特異的に発現している可能性のある遺伝子断片を分離した。卵巣と精巣から得られた遺伝子断片は、発現量が季節的に変動する可能性が示された。さらに、精巣特異的な遺伝子断片は、ノーザンブロット分析により、精巣と雄のペニス形成部位に特異的に発現していることが明らかとなり、インポセックス発症の指標となる可能性が示された。

核内受容体（ER）遺伝子の単離：インポセックスの発症にERが関与するという仮説に立った研究も進めた。茨城県平磯海岸にて採集した雌イボニシの神経節からRNAを抽出し、DNase処理後の全RNAを鋳型としてRT-PCR法を用いて核内受容体のDNA結合領域を増幅した。その後、3'RACE法、および、5'RACE法を用いて全長 cDNAのクローニングを試みた。得られた核内受容体のアミノ酸配列について最尤法を用いて他の生物の核内受容体の配列と比較し、分子系統樹を作成した。雌イボニシの神経節から脊椎動物のエストロゲン受容体のオルソログ遺伝子が2種類単離された。また、エストロゲン関連受容体、甲状腺ホルモン受容体、レチノイン酸X受容体のオルソログを含めた10種類の核内受容体遺伝子の断片が単離された。これらの結果から、軟体動物に属する腹足類は脊椎動物のエストロゲン受容体のオルソログ遺伝子を有することが示唆される。今後、各種ステロイドホルモンや内分泌攪乱物質とイボニシのERとの親和性を決定するとともに、インポセックス発症への関与について検討する。

ミジンコ：昆虫の脱皮ホルモン、脱皮ホルモンのアナログ、幼若ホルモンのアナログを用いて、ミジンコ*Ceriodaphnia dubia*を用いた繁殖阻害試験を行っ

た結果、IC25は0.27 - 4.53 ppbであった。使い捨てのポリエチレン製の飼育カップ (Plastic Inc., USA) からミジンコの繁殖を阻害する物質、1,2ジフェニルシクロブタン (スチレン 2 量体) を検出した。ガラスカップを用いた新しいシステムを完成させ、1,2ジフェニルシクロブタンおよび1,3ジフェニルプロパンを用いて、ミジンコの繁殖阻害試験をおこなった結果、1,2ジフェニルシクロブタンのIC25は3.89ppb, 1,3ジフェニルプロパンは1.75ppbであった。スチレンダイマーは*Daphnia magna*の21日間繁殖阻害試験ではIC25が30ppbで産子数の減少を示したが、3.125 - 12.5ppbで有為に脱皮回数が増えた。このように、スチレンがミジンコの生殖に影響を与えることが明らかとなった。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Iguchi, T. and T. Sato : Endocrine disruption and developmental abnormalities of female reproduction. *Am. Zoologist*, 40 : 402-411, 2000.

Mori C. : Endocrine disruptors and human health : a minireview. *千葉医学*76 : 209-218, 2000.

櫻井健一、森 千里 : ヒト胎児への内分泌攪乱化学物質曝露の状況 *日本臨床* 58 ; 2508-2513、2000年