

「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、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 13 年度は、マウスおよびセンチュウを用いて DNA マイクロアレイを行い、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応答する遺伝子を解析した。合成エストロゲン(DES)刺激によって生殖器官で発現が誘導される遺伝子は、新生児期、生後5日および成熟後で異なることを明らかにした。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(ER)および上皮成長因子(EGF)の経時的な発現および、それらの発現に対するホルモンの影響を明らかにした。Bisphenol-A (BPA)の胎盤透過性の結果から、低用量影響を検証し、影響の可能性を指摘し、思春期での一時的な影響の発現を見出しているが、高用量の BPA 投与では、胎児期のマウスの脳の発達に対しても一過性の影響を与える結果を得ている。さらに、新生児期のマウスへの高用量の BPA 投与は無排卵を誘導することを明らかにするとともに、卵巣非依存の膈上皮細胞の不可逆的増殖を誘導することを見出した。爬虫類のワニの ER、海産メダカのマミチヨグの ER をクローニングした。なお、カダヤシの gonopodium へのアンドロゲンの影響を調べ始めた。両生類ではアマガエルの皮膚からの水分調節に関与するバソトシン受容体・メソトシンの受容体をクロー

ニングした。また、アフリカツメガエルの胚発生過程で発現する遺伝子に対してホルモンおよび化学物質がどのような影響を及ぼすかを調べるために、マイクロアレイを用いて、発現遺伝子を解析する研究を開始した。さらに、ツチガエルのホルモンによる性分化で発現が変化する遺伝子を解析している。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、ER の配列を解析中である。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抑制作用をする事を明らかにした。これを受けて、作用メカニズムを解析することを目的に、ミジンコの遺伝子の配列を読み始めている。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

① 高用量のBPAの新生児マウス雌性生殖器官に対する影響

出世直後から5日間 15,150 μg BPA および 0.3, 3 μg DES を投与し、卵巣摘出時に黄体の有無を調べ、卵巣非依存的な膣上皮の増殖を解析した。無排卵に関しては 15 μg BPA でも 30%のマウスで認められたが、膣上皮の不可逆的増殖は認められなかった。一方、150 μg BPA では 40%のマウスで膣の不可逆的増殖が認められた。DES 投与では 0.3 μg でも無排卵および膣の不可逆的増殖が認められた。視床下部・下垂体系の異常による無排卵の臨界期は生後 10 日であり、DES の臨界濃度は 0.0003 μg であることを明らかにした。

② 特異的遺伝子の解析

マウスの膣は卵巣から分泌されるエストロゲンにより上皮細胞の増殖が制御されている。しかし、エストロゲンによる遺伝子の発現とそれに伴う細胞増殖の制御機構は分かっていない。さらに、出生直後のマウスに Estradiol (E2)や DES を投与した場合、成熟後卵巣を除去しエストロゲン量を減少させても膣上皮の委縮は起らず、エストロゲン非依存の不可逆的増殖を示す。このような膣上皮の不可逆的増殖の分子機構を明らかにするために、ディファレンシャルディスプレイ法 (DD 法)を用いて、膣に発現するエストロゲン応答遺伝子の同定を試みた。その結果、不可逆化した膣で高い発現を示す遺伝子 (DDV10) を同定し、塩基配列の解析から新規の C-type lectin の仲間であることが判明した。予想されるアミノ酸配列から、DDV10 は106 アミノ酸からなる細胞内ドメイン、21 アミノ酸からなる膜貫通領域、113 アミノ酸からなるレクチンドメインをもつ 269 アミノ酸からなる膜タンパク質である。また、DDV10 は最近単離された破骨細胞の形成阻害に関与すると思われる lectin (OCIL) と類似しており 80% の相同性が認められた。しかし、DDV10 と OCIL とは、細胞内ドメインが異なっていた。さらに、転写産物の分析では、DDV10 が卵巣除去による体内のエストロゲン量の減少と共に発現量は減少し、E2 の投与によって増加したが、OCIL は逆に E2 により発現量が減少することから、DDV10 と OCIL は発現様式、機能

が異なると考えられ、細胞内ドメインが機能の違いを示していると考えられる。OCIL は調べた全ての組織に発現していたのに対し、DDV10 は胃、目、舌、脾臓、膣で高い発現が認められた。DDV10 の機能は不明であるが、角質化に関与していると推測される。これまで、レクチンが角質化に関与するという報告はないため、新しいレクチンの機能が解明されると期待される。現在、膣における発現領域、発生段階における発現パターンを解析中である。さらに、出生直後の DES 処理により不可逆的な増殖を示すマウスの膣では、卵巣非依存的に Heparin Binding EGF と Amphiregulin のほか、EGF、TGF α 、Epiregulin の発現が上昇していた。

③ マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析

ステロイドホルモン受容体は、核内受容体の一員であり直接遺伝子の転写に関与することから、ステロイドホルモンまたは内分泌かく乱化学物質による遺伝子発現への影響をマウスを用いて転写レベルで解析した。それぞれのホルモンや化学物質が引き起こす遺伝子発現パターンの変化について DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、各々のパターンの変化は必ずしも一致しないことがわかり、内分泌かく乱化学物質は単にエストロゲン様の作用だけでなく別の化学物質に固有の作用を有していることを遺伝子レベルから明らかにした。一方で、エストロゲンにより発現が誘導されるおよそ100の遺伝子群に着目することにより、内分泌かく乱化学物質が内在的に有しているエストロゲン様作用を評価できることを示した。また、新生仔期におけるエストロゲン投与による遺伝子発現変化についても解析を行い、新生仔期における遺伝子発現の変動は成熟マウスに比してはるかに少ないことを明らかにした。新生仔期にエストロゲンにより変動する遺伝子を絞り込めたことで、今後臨界期におけるエストロゲン影響について遺伝子レベルから解明できると思われる。

④ ラット胎児生殖輸管:ラットでは、妊娠 15.5 日からミュー管上皮細胞に弱いながらプロゲステロン受容体(PR)が発現しており、19.5-21.5 日にかけて発現が高まった。エストロゲン投与により間質の PR は発現が増加したが、上皮での発現は変化しなかった。胎児のミュー管上皮に上皮成長因子(EGF)が発現していたが、エストロゲン処理により EGF 発現は低下した。

⑤ 雄マウス生殖器官の発現遺伝子検索:DES、Genistein (G)および BPA の新生仔曝露における、精巣および精巣上体の遺伝子発現への影響について、DNA マイクロアレイ法を用いて検討した。雄マウス生殖器官(精巣、精巣上体)において DES 等によって発現が変化する遺伝子を Incyte 社のマウス cDNA マイクロアレイを用いて検索した。DES (50 μ g)、G (1 mg)あるいは BPA (0.2 mg)を出生後 5 日間投与し、12 週後に精巣で発現が変化する遺伝子を検索した。対照群と比較し、DES 投与では、発現レベルが 2 倍以上になった遺伝子は 2 種、0.5 倍以下になった遺伝子は 32 種であった。G 投与では、発現レベルが 2 倍以上になった遺伝子は 3 種、0.5 倍以下になった遺伝子は 36 種であった。BPA 投与では、発現レベルが 2 倍以上になった遺伝子は 9 種、0.5 倍以下になった遺伝子は 3 種であった。遺伝子発現プロファイルの結果についてクラスター解析を行ったところ、DES と G とは類似の傾向があったが、BPA では少し異なることが示唆された。さらに、この検討でピックアップされた遺伝子を含んだ自作のアレイを作製した。

⑥ サブトラクション法による検索: DES (5 μ g) を出生後 5 日間投与し、8 週後において精巣および精巣上体で発現が変化する遺伝子のうち、精巣では Dynein の発現上昇が、精巣上体では

ADAM7 の発現減少が認められた。ADAM7 について *in situ* ハイブリダイゼーションにて発現分布を検討したところ、精巣上体体部における発現減少が認められた。

- ⑦ ヒト臍帯中の内分泌かく乱物質と薬物代謝酵素等の発現:ヒト胎児への内分泌攪乱物質の移行の調査および影響を検討するため、胎児環境の指標となる臍帯を用いて、臍帯中の内分泌攪乱物質と薬物代謝酵素等の発現の検討を行った。臍帯中にダイオキシン、PCB、DDT、植物エストロゲンの存在が認められた。また一部では薬物代謝酵素(CYP1A1)のタンパクおよび mRNA の発現が認められた。
- ⑧ 胎盤形成への影響:周生期の雄性ホルモン処理により連続発情となり、子宮機能が恒久的に低下したラットを用いて、子宮への内因性女性ホルモンの継続的曝露の影響を妊娠初期を模したホルモン環境で調べた。出生直後の性ホルモン投与で不妊としたラットに着床初期のホルモン環境を模した 3 mg Progesterone (P)および 0.2 μ g E2 を投与して、内膜細胞における ER, PR の局在を免疫組織化学的に追究した。更に母性胎盤形成における、EGF、TGF- α 、EGFR の内膜内動態をタンパク質・遺伝子レベルで検討するとともに、連続発情不妊ラットで得られた成果を用いて出生直後に投与した BPA の影響を評価した。正常ラット子宮上皮および間質の PR 発現は、P 投与 3 日後に低下するが、投与 3 日目に E2 を加えると、発現が回復した。これに対して連続発情ラットでは、PR 発現が低下しており、E2 により上皮の PR 発現が殆ど消失した。また、正常ラット子宮上皮の ER 発現は 3 回の P 投与により消失したが、連続発情ラット子宮上皮では発現は抑制されなかった。EGF、TGF- α と EGF-R 発現は、性ホルモン投与に対して大きな変動を示さず、定量的リアルタイム PCR によるこれらの成長因子の遺伝子発現は、免疫染色の結果同様にホルモン処理による有意な変動は示さなかった。出生直後に投与した BPA の子宮内膜への影響を、ER と PR の発現から追究した。出生日より 7 日間 0.01、0.1、1mg BPA を投与されたラットは、60 日齢で性周期の乱れが無く、黄体形成も認められた。しかし、卵巣重量は BPA で有意に低く、子宮重量は逆に増加していた。さらに卵巣除去後に与えた黄体ホルモン-発情ホルモンに対する内膜細胞の反応性は、性ホルモン受容体発現、細胞分裂活性は、正常ラットとの間に差は認められなかった。以上の結果から、連続発情ラットの子宮は、上皮および間質細胞のホルモン依存性受容体発現が変化し、着床能に影響すると考えられる。出生直後の BPA 処理は、視床下部・下垂体系の雄化誘導には到らなかったが、成熟後の卵巣および子宮重量に影響した。しかし、これらのラットの性ホルモンに対する子宮内膜の反応性は、正常ラットに近く、検索した生後 60 日齢における周生期 BPA 処理の持続効果は少ない。
- ⑨ 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:センチュウを用い、簡便かつ再現性の高い評価方法(致死影響試験、成長・成熟影響試験)の確立を行い、E2、BPA、Nonylphenol (NP)、カドミウムの生殖に及ぼす影響を調べた。センチュウを大量に培養し受精卵を採集した後、NGM プレート上で L1 幼虫まで同調培養を行い、その後、幼虫を洗浄・回収し、各濃度の化学物質を含む試験溶液に幼虫を入れ、24 穴培養プレートに各穴 10 匹となるよう幼虫を分注した。致死影響試験:餌を含まない条件で飼育し、24 時間後の生存率を算出した。成長・成熟影響試験:餌を含む条件で約 50 時間飼育し、体長を測定すると共に、受精卵を体中央部に有する個体の割合を算出した。各種化学物質において成長と成熟に及ぼす影響濃度が異なっており、特に、E2 曝露では幼虫に成長遅延が認められた。また、体長は増加し

ているにも関わらず受精卵が体内に観察されない成虫が E2 暴露により観察された。これらの事実は、各種化学物質に対して生体内でそれぞれの異なった代謝・排出機構が存在していることを示唆している。今回、センチウにおいて成長・成熟機構にはエクジステロイド様物質(内分泌系)が関与していることが推定されたが、これら環境化学物質の成長・成熟影響はセンチウの内分泌系のかく乱に起因しているかは不明である。

(2) 神経系及び行動への作用解析

① マウスの脳

妊娠 17 日齢 ICR マウスに BPA(高用量 0.9 mg あるいは低用量 0.009 mg)を皮下投与し、投与6時間後にオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)を採取し、*in vitro*で A キナーゼ系のカスケードおよび分化マーカー(p27, TR β 1, Id4)を調べた。マウスのグリア(オリゴデンドロサイト)前駆細胞産生は胎生 13-15 日目頃に始まり、そのピークは胎生 16-17 日目であり、出生前後(最近の知見では成体脳でも認められている)まで続くことからグリアの初期発生に与えるもっとも感受性の高い時期を免疫組織化学的手法で特定し、17 日齢であることを明らかにした。BPA 投与群由来の OPC は形態的にも、発現しているマーカータンパクも対照群由来のものと同一であったが、膜透過性 cAMP に対する反応はコントロールの OPC と異なり、オリゴデンドロサイトの分化マーカーに変化がなかった。また CREB の活性化も低下していた。以上の結果より BPA のマウスオリゴデンドロサイトの初期発生に影響を及ぼす作用機構を詳細に解明するために、BPA が甲状腺ホルモン様の作用を示すのか、あるいは ER を介して作用するのかについて RT-PCR で検討し、シグナル伝達系の解析も行う予定である。

② ニワトリへの発生影響

中枢への化学物質の作用メカニズムを調べるために、ニワトリ卵・初生雛を用いて神経行動学的解析を行った。BPA: 0.5ng \sim 25 μ g/g egg (0.5ppb \sim 25ppm); E2: 5pg/g egg; DES: 5pg/g egg; propylthiouracil (PTU): 0.4ng/g egg; tamoxifen (TMX): 1 μ g/g egg; TMX+BPA: TMX 1 μ g/g egg+BPA 5ng/g egg。インキュベート前 (Day0)の鶏卵の卵黄内に投与し、孵化した初生ヒナにおける記憶保持率(摂食忌避学習トレーニング 24 時間後の記憶保持率)と摂食忌避学習後の脳内シナプス量(シナプス小胞膜タンパク質 VAMP2 の免疫陽性反応)を調べた。その結果、記憶保持率は、BPA5ppb 群や E2 群, DES 群が対照群より有意に低かった。また、他の BPA 群や PTU 群, TMX 群, TMX+BPA 群において記憶保持率が低い傾向が見られた。左右の脳 LPO \cdot IMHV 領域(摂食忌避学習に関わる部位)のシナプス量は、全ての BPA 群や E2 群, DES 群, PTU 群が対照群より有意に低かった。全実験群で記憶保持率の低下傾向がみられたことから、記憶保持には ER を介したエストロゲン系のかく乱作用、甲状腺ホルモン系のかく乱作用、BPA 独自のレセプターを介した作用など複数の経路を介した阻害作用が考えられる。脳内シナプス量への影響については、学習後の VAMP2 陽性顆粒面積が溶媒群に比べ、BPA 群や E2 群, DES 群, PTU 群に少なかったのは、行動実験同様、いくつかの系が脳内シナプス形成に関与していると考えられる。また、記憶保持率のグラフと同じ傾向をもつのは、記憶保持率と VAMP2 陽性顆粒面積に相関関係があることを強く示唆する。従って、用いた化学物質は脳内のシナプス形成を阻害することによって、記憶保持率の低下をもたらしうると考えられる。

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。本年度はBPA, E2, DESを用いた。卵の重さ1gあたりBPA 5, 50, 250 ng, 2.5, 25 μ g; E2 0.5 pg; DES 0.5 pgをインキュベート前の鶏卵の卵黄内に投与した。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。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: E2, DES, BPA群に記憶保持率の低下傾向が見られた。脳内シナプス量: E2, DES, BPA群で脳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。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を含む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。

③ 魚のエストロゲン受容体(ER)

海産メダカのマミチヨグ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、メダカ(*Oryzias latipes*)のER α と81%の相同性を持つ約2Kbの配列を得た。また、ER α 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、Ad4BP/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。

④ ワニのエストロゲン受容体

ワニは温度により性が決定される動物であり、性決定の分子機構を解析するため有用な系である。しかしながらSOX9やSF-1などの哺乳類で性決定や性分化に関与する遺伝子は最近クローニングされたばかりであり、さらにステロイドホルモン受容体に関する研究はなされていない。従って、性決定・性分化におけるステロイドホルモン受容体の働きを解析するためにアメリカシシピワニのER、PR、アンドロゲン受容体(AR)の遺伝子のクローニングを試みた。その結果、607塩基対のER α の遺伝子断片、596塩基対のER β の遺伝子断片、440塩基対のARの遺伝子断片、284塩基対のPRの遺伝子断片をそれぞれ得た。全ての遺伝子断片において哺乳類、魚類よりも鳥類であるニワトリの受容体遺伝子との相同性が最も高いことが判明した。このことは、進化のうえで、鳥類と爬虫類はより近い仲間であり、鳥類は爬虫類から分かれてきたという通説を指示するものである。

(3) 両生類の発生・生殖への作用解析

① 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。バソシン受容体(VTR) cDNA、及びメソシン受容体(MTR) cDNAをアマガエル皮膚から単離した。両者とも、皮膚、腎臓、膀胱、直腸というカエルにとって体液浸透圧調節に重要な機能を果たす器官で発現しており、体液浸透圧調節に重要な役割を果たしていると推察される。特に、VTRは細胞内cAMP濃度の変化を誘起することから、V₂タイプのVTRであり、バソシンの水分吸収作用を仲介するタンパク質である。また、このVTRはすべての動物で未同定の新規のタンパク質であり、これを指標とした今後の研究の発展が期待できる。

② アフリカツメガエルへの発生影響

アフリカツメガエルを用いて、BPA及びNPの胚発生に及ぼす影響を明らかにするとともに、これ

までの遺伝子レベルでの知見に基づき、環境中に存在するエストロゲン様化学物質の作用機序を解明することを目的として解析をすすめている。受精 3 時間後、発生が正常に進行していることを確認した胚を選定し、23°Cで培養した。培地中に 2×10^{-5} M BPA を入れると、生存率は4日後に 22.2%に低下した。また NP では 4×10^{-5} M では4日後に生存率が 5.6%に低下した。 2×10^{-5} M の BPA もしくは NP を含む培地中で培養することにより、被検物質が形態形成に及ぼす影響を検討した。受精後 96 時間後のオタマジャクシ(ステージ, St..45)で、BPA 処理区では眼の形成異常を示す割合が最も高く、また NP 処理区では胴部の屈曲を示す割合が最も高かった。眼の形成異常に関しては、BPA または NP 処理区で同程度の割合で認められたが、特に胴部の屈曲において、両被検物質間で差が顕著であり、NP 処理区に高頻度で認められた。さらに、アフリカツメガエルのマイクロアレイを用いて、発現が変化する遺伝子の解析に着手している。

③ ツチガエルの性分化に関連する遺伝子の探索

ツチガエルの性転換機構を明らかにすることを目的にした。アンドロゲン(Testosterone propionate, TP)1回の腹腔内注射による性転換の臨界期、臨界濃度は、ステージ(St.)XXVへ変態後 1.5 ヶ月、0.001~0.01 μ g/匹であった。エストロゲン(Estradiol benzoate, EB)腹腔内注射では顕著な性転換効果は認められなかった。飼育水へ曝露した場合、St.III~V、0.1~1.0 μ g/l、5~10 日間がそれぞれ投与時期、投与量、投与期間の臨界点であった。St.25~St.I までに未分化生殖腺から卵巣または精巣への分化が始まる。十分に卵巣が発達した St.XVII の幼生に TP 投与後 16 日目には肥大卵母細胞の退化と精巣構造の出現が観察された。処理後 32 日目には精巣への分化転換が完了した。孵化後 13 日目(St.25)から EB を投与した。正常な性腺分化よりも遅れながら、未分化生殖腺は卵巣と精巣の中間型を経て、卵巣へ分化転換することが観察された。さらに、AR の断片と ER 断片を単離した。アフリカツメガエルの性ホルモン受容体 cDNA の塩基配列と比べた場合、それぞれ 82.5%および 81.4%の相同性を示した。正常な性腺分化・発達過程では常に受容体遺伝子の発現が認められ、性転換過程における遺伝子発現レベルの顕著な変化は認められなかった。TP 処理によって発現が変化する 221 個の遺伝子のうち 27 遺伝子については既知の遺伝子と高い相同性を示した。また、いくつかの遺伝子は正常な肥大卵母細胞、退化している肥大卵母細胞、または精巣細胞において発現が認められた。一方、EB 処理によって発現が変化する 15 個の遺伝子のうち 6 遺伝子については既知の遺伝子と高い相同性を示した。

(4) 水棲無脊椎動物の生殖への作用メカニズムの解析

① 巻き貝

イボニシ生殖巣及びペニス形成部位に対する AR、ER 及びアロマターゼ(P450_{Arom})の各抗体による免疫組織化学染色を行うと共に、イボニシの cDNA ライブラリーを作製した。ER 及び P450_{Arom} のクローニングを行っている。イボニシの生殖巣組織及びペニス形成部位を固定、薄切(4 μ m)して、種々の市販抗体を用いて免疫組織化学染色を行うとともに、中和抗原による処理も行った。その結果、生殖巣では AR と ER に対する特異的な染色が、またペニス形成部位では AR に対する特異的染色が、それぞれ認められたのに対し、P450_{Arom} に対してはいずれの組織においても特異的染色が認められなかった。2)イボニシの cDNA ライブラリーと Total RNA を用いて、ER 及び P450_{Arom} のクローニングに関する実験を継続中である。

② ミジンコ

Daphnia magna を用いて、内分泌かく乱作用を明らかにできると思われる試験系を構築した。脱皮ホルモン (β エクダイソン)、幼若ホルモン (III) による脱皮数の変化は認められなかったが、幼若ホルモン (III) により、0.1~1ppb 付近で有意に産仔数の増加が認められた。この現象は幼若ホルモンのアゴニストであるメトプレンおよびピリプロキシフェンでも観察された。同じ幼若ホルモンのアゴニストであるフェノキシカルブではこのような現象は観察されていない。 β エクダイソンでは産仔数の増加は認められない。幼若ホルモンの濃度 1ppb とは、昆虫の体内で検出されるホルモンの最大濃度と近い値を示しており、幼若ホルモンがビテロジェニンの誘導に関与していることから、この現象は幼若ホルモンの作用を支持するものと考えられる。ピリプロキシフェン、フェノキシカルブを曝露した結果については 100ppt より雄の仔虫が発生し、333ppt 以上投与区ではほとんど全て雄の仔虫が生まれた。両物質とも 100、333、1000ppt の各連続投与区において 21 日後に投与を止め、飼育水のみにてさらに飼育を継続したところ、6 日経過後には産仔される仔虫は雌が増え、雄の発生は化学物質による可逆的に引き起こされることがわかった。脱皮ホルモン、幼若ホルモン (III)、メトプレンにおいては雄が発生しなかった。E2、BPA では、脱皮数、低濃度 (100ppb 以下) での産仔数の減少、雌雄発生比などに異常は認められなかった。Testosterone、NP およびスチレンダイマーについては、現在試験を継続中である。さらに、メカニズム解析に寄与するために、ミジンコの cDNA ライブラリーを作成し、約4000クローンの配列を読んだ。

3. 研究実施体制

ホルモン応答遺伝子解析グループ I

- ① 研究分担グループ長名 井口泰泉(岡崎国立共同研究機構・教授)
- ② 研究項目 ホルモンおよび内分泌かく乱物質がマウスの雌性生殖器官におよぼす影響について、遺伝子発現レベルから DNA マイクロアレイを用いた網羅的な解析を行う。臨界期とよばれる新生仔期におけるエストロゲン暴露による影響も同様な手法で解析を行うことにより、遺伝子レベルから内分泌かく乱物質の作用について明らかにする。

ホルモン応答遺伝子解析グループ II

- ① 研究分担グループ長名 森 千里(千葉大学・教授)
太田康彦(鳥取大学・教授)
有菌幸司(熊本県立大学・教授)
仁科行雄(横浜市立大学・助教授)
- ② 研究項目 ホルモンおよび内分泌かく乱物質の、胎盤形成、及び胎盤透過性を解析するとともに、マウス雄生生殖器官に及ぼす影響について DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析する。またセンチュウでのホルモン応答遺伝子の探索を行い、環境指標生物としての可能性を探ると同時に哺乳類の遺伝子解析に寄与する。

神経系・行動解析グループ

- ① 研究分担グループ長名 竹内浩昭(静岡大学・助教授)

佐藤真彦(横浜市立大学・教授)

阿相皓晃(東京都老人総合研究所・研究室長)

井口泰泉(岡崎国立共同研究機構・教授)

② 研究項目 神経系及び行動への作用解析

鳥類の発生・行動、魚類の発生・嗅覚・行動および哺乳動物の神経系への作用を解析する。

両生類発生・生殖解析グループ

① 研究分担グループ長名 菊山栄(早稲田大学・教授)

井口泰泉(岡崎国立共同研究機構・教授)

② 研究項目 両生類の発生・生殖への作用解析

カエルの発生・カエル皮膚からの水分調節への作用を解析する。

水棲動物生殖グループ

① 研究分担グループ長名 堀口敏宏(独立行政法人国立環境研究所)

鎌迫典久(独立行政法人国立環境研究所)

② 研究項目 水棲動物の生殖への作用メカニズムの解析

ミジンコ、海産巻貝でのステロイドホルモンの有無の解析、および内分泌かく乱物質の不可逆的作用を解析する。

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Watanabe, H., D.L.Buchanan, H. Handa and T. Iguchi: Global analysis of gene expression induced by environmental endocrine disruptors. *Perspective in Comparative Endocrinology: Unity and Diversity*, Goos, H.J.Th., Rastogi, R.K., Vaudry, H. and Pierantoni, R. (eds.), Monduzzi Editore, pp.147-151, 2001.
- Yamamura, Y., Y. Ohta, T. Iguchi and A. Matsuzawa: Metallothionein expression and apoptosis in pregnancy-dependent and -independent mouse mammary tumors. *Anticancer Res.*, 21: 1145-1150, 2001.
- Yamamura, Y., M. Tamano, T. Iguchi and Y. Ohta: Methallothionein expression and tumor growth in the transplantable pregnancy-independent mouse mammary tumor. *J. Vet. Med. Sci.*, 63: 687-689, 2001.
- Okada, A., T. Sato, Y. Ohta, D. L. Buchanan and T. Iguchi: Effect of diethylstilbestrol on cell proliferation and expression of epidermal growth factor in the developing female rat reproductive tract. *J. Endocrinol.*, 170:539-554, 2001.
- Iguchi, T., H. Watanabe and Y. Katsu: Developmental effects of estrogenic agents on mice, fish and frogs: a mini review. *Horm. Behav.* 40: 248-251, 2001.
- Shibayama, T., H. Fukata, K. Sakurai, T. Adachi, M. Komiyama, T. Iguchi and C. Mori: Neonatal exposure to genistein reduces expression of estrogen receptor α and androgen

receptor in testes of adult mice. *Endocr. J.*, 48: 655-663, 2001.

- Miyagawa, S., D.L. Buchanan, T. Sato, Y. Ohta, Y. Nishina and T. Iguchi: Characterization of diethylstilbestrol-induced hypospadias in female mice. *Anat. Rec.* 266: 43-50, 2002.
 - Buchanan, D.L., S. Ohsako, C. Tohyama, P.S. Cooke and T. Iguchi: Dioxin inhibition of estrogen-induced mouse uterine epithelial mitogenesis involves changes in cyclin and transforming growth factor- β expression. *Toxicol. Sci.* 66: 62-68, 2002.
 - Mori, C.: Possible effects of endocrine disruptors on male reproductive function. *Acta Anat. Nippon* 76: 361-368, 2001.
 - Rockett, J.C., F.L.Mapp, J.B. Garges, J.C. Luft, C. Mori and D.J.: The effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression and fertility in adult male mice. *Biol. Reprod.* 65: 229-239, 2001.
 - 井口泰泉:環境ホルモンの野生動物への影響と研究の状況. *かんきょう*, 27(3): 15-17, 2002.
 - 井口泰泉:内分泌かく乱物質問題について. *歯界展望増刊号*, 180-183, 2001.
 - 原彰彦、有菌幸司、井口泰泉、大島雄治、井出剛、財団法人熊本県起業化支援センター:メダカのビテロジェニンのみを認識するモノクローナル抗体. 特許平 11-345484.
 - 井口泰泉:解説, 奪われし未来. 増補改訂版, 翔泳社, pp.435-466, 2001.
 - 井口泰泉:環境ホルモンの実態と21世紀の選択. *農林年金*, (3): 10-18, 2001.
 - 井口泰泉:溢れる化学合成物質. *Scientia*, No.3: 5-7, 2001.
 - 井口泰泉:書評、がんと環境. *科学*, 71: 659-660, 2001.
 - 井口泰泉:環境ホルモン(内分泌攪乱化学物質)の最新事情. 教育出版高等学校理科ニューズレター, 教育出版, 1-6, 2001.
 - 井口泰泉:生命と環境. 妊娠の生物学. 永井書店、29-35, 2001.
 - 井口泰泉、鷺見 学、有菌幸司:内分泌攪乱化学物質研究の最新動向. *生活と環境*, 46: 11-19, 2001.
 - 足立哲也、櫻井健一、深田秀樹、小宮山政敏、芝山孝子、井口泰泉、森千里:植物エストロゲンおよび内分泌攪乱物質の精子形成への影響評価に対する DNA マイクロアレイを用いた判定法の開発. *千葉医学*, 77: 151-158, 2001.
 - 井口泰泉:環境ホルモン(内分泌攪乱化学物質)問題からみた科学. *科学*, 71: 1567-1569, 2001.
 - 渡邊 肇、井口泰泉、諸橋憲一郎:内分泌攪乱物質の生体内作用発現にかかわる性-ステロイド受容体の役割. *日本臨床*, 60: 397-403, 2002.
 - 井口泰泉、鷺見 学:野生生物の変異と解明された機序. *最新医学*, 57: 221-228, 2002.
 - 陸 明、堀口敏宏、白石寛明、柴田康行、安保 充、大久保明、山崎素直:ガスクロマトグラフィー/質量分析法による海産巻貝類におけるステロイドホルモンの同定と定量. *分析化学*, 50: 247-255 2001.
- (2) 特許出願
なし