

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名「内分泌かく乱物質の動物への発生内分泌学的影響」

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）

研究代表者 井口 泰泉（自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 教授）

主たる研究参加者

森 千里（千葉大学 大学院医学研究院 教授）
有園 幸司（熊本県立大学 環境共生学部 教授）
太田 康彦（鳥取大学 農学部 教授）
堀口 敏宏（国立環境研究所 主任研究員）
鑪迫 典久（国立環境研究所 主任研究員）
阿相 皓晃（東京都老人総合研究所 研究室長）
佐藤 真彦（横浜市立大学 大学院総合理科学研究科 教授（～平成14年3月））
仁科 行雄（横浜市立大学 大学院総合理科学研究科 助教授（～平成14年3月））
竹内 浩昭（静岡大学 理学部 助教授（～平成14年3月））
菊山 栄（早稲田大学 教育学部 教授（～平成14年3月））

3. 研究内容及び成果：

内分泌かく乱物質のヒト健康影響については未だ未確定であるが、一部の野生生物に対する悪影響に関しては十分な証拠を持って証明されつつある。野生生物への影響は、生態系を攪乱し、ひいてはヒトの生活にも影響する事が想定され、ヒトへの直接的影響推定の為の有用な指標になるものと考えられる。野生生物種の多様性を考慮すれば、同一物質でもその作用、影響が異なる可能性が高く、哺乳動物中心の研究結果をそのまま他の動物種に当て嵌めるのは適切とは言えない。野生生物を対象とした研究は世界的にも少なく、できるだけ広い動物種を含み、各々の種の特異性に配慮した研究が必要である。また、不可逆的な反応を引起す臨界期（感受性の窓）の存在、従来の毒性学の常識を逸脱した低濃度での反応（所謂「低用量」問題）の存在、が知られて来ている。化学物質の影響を適切に評価する為には、其々の動物種で、発生のどの過程で、どの物質がどの程度の濃度で、如何なる機構で作用しているのか、を分子レベルで解明する事が必要である。

これらの背景から、本研究では 遺伝子発現の観点から作用機構を解明する、哺乳類・魚類・両生類・爬虫類・無脊椎動物の正常発生と化学物質の影響を解析する、個体群が構成するエコシステム全体を扱う方法論の基礎を構築する、事を目標とした。

本研究の成果概要は以下の通りである。

(1) ホルモン応答遺伝子解析グループ

1) 井口グループ

DNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現変動解析を行い、遺伝子発現カスケードは機能的に異なる遺伝子群が経時的に交代しながら発現する事に依ってもたらされる事、化学物質のエストロゲン様活性評価が可能である事、変動する遺伝子は化学物質、臓器、曝露時期等に依って大きく異なる事、を明らかにした。エストロゲン応答遺伝子を中心に約900遺伝子を搭載した、エストロゲン様活性評価用DNAマイクロアレイを開発した。市販品に比べ廉価で再現性が高く、エストロゲン様物質スクリーニングへの応用の可能性が示唆された。

生殖器官の細胞増殖・分化には、エストロゲンと成長因子のクロストークが存在する事が知られている。間質を介する上皮細胞増殖・分化の既存概念とは異なり、女性ホルモン受容体(ER)による成長因子(EGF)発現、EGF受容体リン酸化・細胞内情報伝達系の活性化、ERのリン酸化による成長因子の発現、という活性化ループが存在する事を明らかにした。間質組織由来因子に依存せず上皮組織内で完結しており、エストロゲン非依存的な異常な細胞増殖の原因は上皮・間質相互作用の破綻である事が示唆された。

外因性エストロゲン刺激に対する臨界期は器官によって異なる事、同一器官でも形態学的異常毎に臨界期が異なる事、遺伝子発現パターン解析で臨界期を評価出来る事、を明らかにした。エストロゲン応答遺伝子の発現は、組織の発達時期に応じて変化しており、マウスでは生後5日目前後で、新生仔型と成熟型に分れる事を明らかにした。

2) 太田グループ

ビスフェノールA (BPA) のラット新生仔への影響として、遅延性無排卵が起こる事を明らかにした。新生仔期への影響を正しく評価する為には、実験動物による検証が必要と考えられる。

殆どの実験動物用飼料がエストロゲン様活性を示すが、原料の大豆及びアルファルファ由来である事、活性は飼料間、ロット間で大きく変動する事、内分泌かく乱物質換算量(例えばBPA換算では2mg/kg/dayに相当)は相当量になる事、低用量実験の実施施設間差の重要な因子となる事、を明らかにした。

3) 森グループ

新生仔期合成女性ホルモン(DES)曝露で、精巣や精巣上体において、発現が長期的に変動する遺伝子群が存在する事を明らかにした。新生仔期DES投与マウスでは、濃度依存的に、DNAメチル化状態が変化することを明らかにした。DNAメチル化状態の変化は、長期的に遺伝子発現に影響を及ぼし、精巣上体の発生・分化への影響や長期・晩発的影響を引き起こす可能性が示唆された。植物エストロゲンの遺伝子発現への影響を解析し、女性ホルモンに類似する事を明らかにした。

ヒト臍帯血への化学物質曝露と遺伝子発現変化を解析し、曝露量により遺伝子発現プロファイルが異なる事を明らかにした。新生児期曝露で、成長後の雄性生殖器において、多数の遺伝子の発現が変動する事を明らかにした。化学物質はDNAメチル化状態にも影響を及ぼし、長期的・晩発的影響の原因となる可能性が示唆された。BPAは脂肪細胞の糖代謝に影響を及ぼし、生活習慣病にも関与する可能性が示唆された。

4) 有園グループ

無脊椎動物への影響評価用として、センチュウを用いた致死影響試験法、成長・成熟影響試験法、繁殖影響試験法を確立し、環境化学物質のクラスタリングが可能である事を明らかにした。薬物代謝に係る遺伝子群等を搭載したDNAアレイを開発し、化学物質の影響評価に有用である事を明らかにした。化学物質の影響は世代を経る毎に低濃度側に移行する事が明らかになり、多世代曝露影響を考慮する必要性が示唆された。

(2) 神経系・行動解析グループ(阿相グループ)

BPAは、甲状腺ホルモン受容体発現を抑制し、オリゴデンドロサイト前駆細胞のミエリン形成担当細胞への分化を抑制する事、中枢神経系では神経細胞よりもグリア細胞、とりわけミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトの発生・分化に大きな影響を与える事、を明らかにした。ミエリン形成不全(脱髄)は、脳機能障害を引き起こし重度の精神・神経障害を呈するが、原因不明で有効な治療法が無い。ミエリン形成不全機構解明は、脱髄疾患発症機構解明、治療法・予防法確立に繋がるものと期待される。

(3) 爬虫類・両生類発生・生殖解析グループ(井口グループ)

化学物質評価用DNAマイクロアレイの開発、爬虫類の温度依存性性決定機構解明、両生類の性転換機構解明、等を目的として遺伝子発現変動解析、関連遺伝子同定を行い、ワニER遺伝子、カエル後葉ホルモン受容体遺伝子等を単離すると共に、内分泌かく乱物質曝露により発現が変動する遺伝子を多数同定した。

(4) 水棲動物生殖グループ

1) 井口グループ

マミチヨグER遺伝子を単離し、アルキルフェノールに対する親和性がヒトERより高い事を明らかにした。メダカも同様であり、ヒトERを利用した評価系のみで判断すると、魚類への影響を見誤る可能性が高い事が示唆された。幼時雌雄同体性を示すゼブラフィッシュの性分化は、卵巣様組織からの卵母細胞の消失、精原細胞の増殖・分化へと進む事を明らかにした。英国河川に棲息するコイ科魚ローチの雌化機構解明を目的として、ステロイドホルモン受容体、ステロイドホルモン合成関連酵素、性分化関連遺伝子を単離した。米国河川に棲息する魚類カダヤシの雄化機構を解析

し、尿尿を通して河川に流入した牛肥育ホルモン(トレンボロン)が、交接器分化時期を早め、卵巢中に精細胞を分化・誘導する事を明らかにした。

無脊椎動物の内分泌系は脊椎動物とは大きく異なり、脊椎動物の評価結果を適用するのは不適切である。

無脊椎動物での内分泌かく乱物質評価系は未開発なため、化学物質曝露によるミジンコ遺伝子発現変動解析・評価法構築を目的に、200弱の遺伝子を搭載したプロトタイプDNAマイクロアレイを作成した。

2) 鑑迫グループ

ミジンコは種々の化学物質に鋭敏に反応するため、古くから試験生物として利用され、急性毒性データも充実しており、OECD、米国、カナダ、日本(改正化審法)等で広く採用されている。内分泌かく乱物質評価用として、ミジンコを用いた、幼若ホルモン様物質簡易スクリーニング法を開発した。

3) 堀口グループ

船底塗料等を使用した有機スズ化合物は、極低濃度で巻貝類に特異的に、インボセックス(雌の雄性化)を引起すが、その機構は不明である。海産巻貝類にも高等動物と同様のステロイドホルモンと合成経路が存在する事が示唆された。“アロマターゼ阻害によるアンドロゲン蓄積”説が主流であるが、有機スズ化合物が核内受容体RXRを介してインボセックスを発症させる可能性が示唆された。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

「内分泌かく乱物質問題」に真正面から取り組み、胎児(胎仔)移行性、ホルモン感受性の臨界期、ホルモン感受性の臓器特異性、等々の重要課題に対し数多くの貴重な成果を挙げている。野生生物への影響に関する研究は、個別の問題を取扱うものが多く、生態系を構成する広範の生物種を対象としたものは世界的にも殆ど無いと言っても過言では無い。広範な野生生物への影響に関する貴重な新知見を数多く得ている事は高く評価される。

生態系への毒性影響を遺伝子発現の観点から解析する新しい研究分野である、エコトキシコジェノミクス(Ecotoxicogenomics)の確立に大きく貢献した。内分泌かく乱物質研究へのインパクトが極めて大きい上に、この分野の研究は今後国際的に大きく発展・拡大するものと予想され、その基礎・基盤整備を行ったリードサイエンティスト、またこの分野での「日本の顔」の一人、として高く評価される。

研究成果は環境関連、内分泌関連の質の高い国際誌を中心に多数(国際誌118報、国内誌67報)報告されている。学会発表も国際学会108件、国内学会189件と極めて活発に行われている。国内外での招待講演も数多く、影響力の強さを示すものと言える。また、この分野の一流研究者との国際共同研究も多数実施されており、今後のさらなる発展が期待される。研究の性格から特許出願は無い。

4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

内分泌かく乱物質の影響を考える場合、哺乳類を中心にした検討結果をそのまま他の動物種に当て嵌めるのは不適切と考えられる。多様な動物種を対象とし、各生物種に特有な影響を解析する端緒を開いた本研究は、今後野生生物への影響を考察する上で大きな示唆を与えるものとして極めて重要である。総花的に過度に戦線を拡大したきらいが無い訳では無いが、生物界の横断的内分泌学の基盤を飛躍的に引き上げたものとして高く評価したい。化学物質曝露による遺伝子発現変動は、曝露物質に依るばかりでなく、臓器や、曝露時期に依っても大きく異なる事を明らかにしている。遺伝子発現変動の詳細な解析により、内因性ホルモンと内分泌かく乱物質との異動が明らかにされるものと期待される。また、共通した遺伝子群、特徴的な遺伝子群の解析から、各々の内分泌かく乱物質の作用機構の解明が可能となる。

本研究の成果及び新規開発した各種評価系は、経済協力開発機構(OECD)や日米欧の環境

行政にも数多く採り入れられている。また、研究代表者、共同研究者らは、OECDや世界保健機構化学物質安全性プログラム(WHO/IPCS)等の国際調整機関及び日米欧環境行政当局の専門的助言者として貢献している。これらは、レギュラトリー・サイエンスの観点から見ても高く評価されるべきものと言えよう。

4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

岡田晃宜、佐藤友美、太田康彦、井口泰泉ら各氏は、2000年7月、JTS優秀発表奨励賞を受賞した。

多数の大学院生が研究に参加したが、博士号を取得し、各々進路を見出しており(京都大学、北海道大学等の職員、外国大学の博士研究員、基礎生物学研究所の研究員等々)、若手研究員育成にも貢献している。

チーム(グループ)主催の国際シンポジウムを2回、ワークショップを2回開催した。また、一般市民向けとして市民講座を4回開催した。