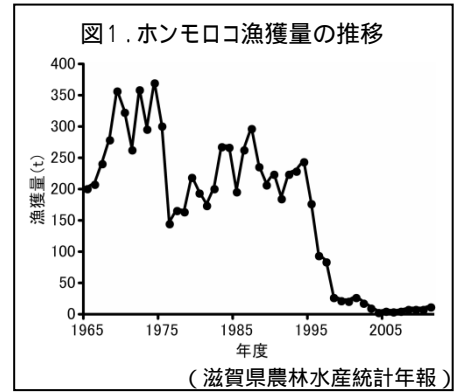


1. 琵琶湖固有魚種（ 1 ）の生息数減少

琵琶湖は世界で3番目に古い古代湖であり、50種類以上の固有種の生息が確認されている。魚類では、亜種を含め17種の固有魚種が生息しているが、そのうち9種が絶滅危惧種に指定されている。特に、代表的固有魚であるホンモロコは、1983年から資源量回復のための本格的な放流事業が行われているものの、個体数減少に歯止めがかかっていない（図1）。

ここ二十数年の生息数の急激な減少は、主として1992年から始まった琵琶湖水位操作に伴う卵の大量干出、産卵・育成場所である内湖やヨシ帯の喪失と劣化、肉食性外来魚の増加などが考えられているが、微量化学物質による水質汚染も無視できない。



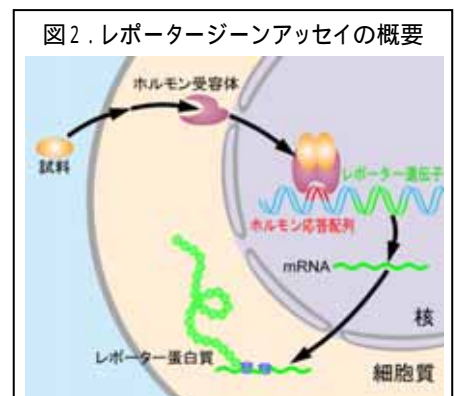
2. 内分泌攪乱物質（ 2 ）と現在使用されている分析法

1998年、旧環境庁により、外因性内分泌攪乱物質（以下、環境ホルモン）問題についての基本的な考え方や、進めていくべき具体的な対応方針をまとめた「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」が発表された。これに伴い、全国で水質調査が行われ、琵琶湖流入河川からも複数種の内分泌攪乱作用の疑われる物質が検出された。それらの中には、詳細なメカニズムは不明であるものの、魚類精巣内での卵子形成や、精子形成の障害、受精率の低下や次世代の性分化異常を引き起こしうる、ノニルフェノール（NP）（ 3 ）やビスフェノール A（BPA）（ 4 ）も含まれていた。

理化学的な分析手法では、化学物質の同定や濃度測定はできるものの、内分泌攪乱作用等の生物学的な影響についての評価は困難である。そこで、生物学的な影響について評価可能なバイオアッセイ（生物試験）（ 5 ）として、メダカを用いたピテロジェニン産生試験（ 6 ）などが行われている。しかし、生体を用いた実験系は、作用メカニズムの解明には不適であり、毎年新しく登録される1000万種以上の化学物質を調べるにはコスト的にも時間的にも困難である。そこで、近年は化学物質の内分泌攪乱作用のスクリーニングとして、細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイ法（ 7 ）が注目されている。

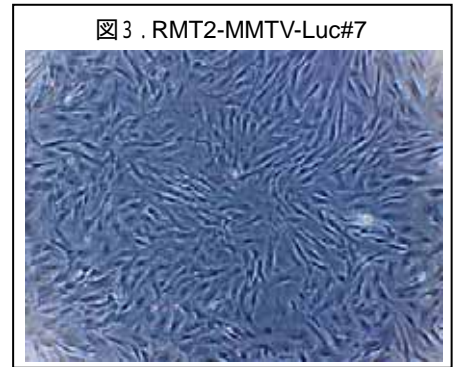
レポーター遺伝子アッセイ法は、ホルモンなどの生理活性物質の作用を、レポーター遺伝子の活性化を指標として検出する方法である（図2）。当初、環境ホルモンにはエストロゲン（女性ホルモンの一種）に似た作用を持つ物質が多く認められたことから、現在までに開発されているレポーター遺伝子アッセイ法は女性ホルモン様物質の検出に重点が置かれたものが多く、主としてヒトの女性ホルモン受容体を哺乳類細胞あるいは酵母に発現させたアッセイ系が用いられており、他の（抗）ホルモン様作用についてはあまり研究されてこなかった。

近年、環境ホルモンの抗男性ホルモン作用が注目されているものの、魚類細胞を用いたアッセイ系は開発されておらず、また、他種細胞での発現系は細胞本来の反応を調べるには不適であると考えられたことから、本研究では、魚類細胞を用い、内在性のホルモン受容体を利用した抗男性ホルモン作用を検出可能なレポーター遺伝子アッセイ法の開発を行った。



3. 琵琶湖固有魚種細胞株を用いたバイオアッセイ系の開発

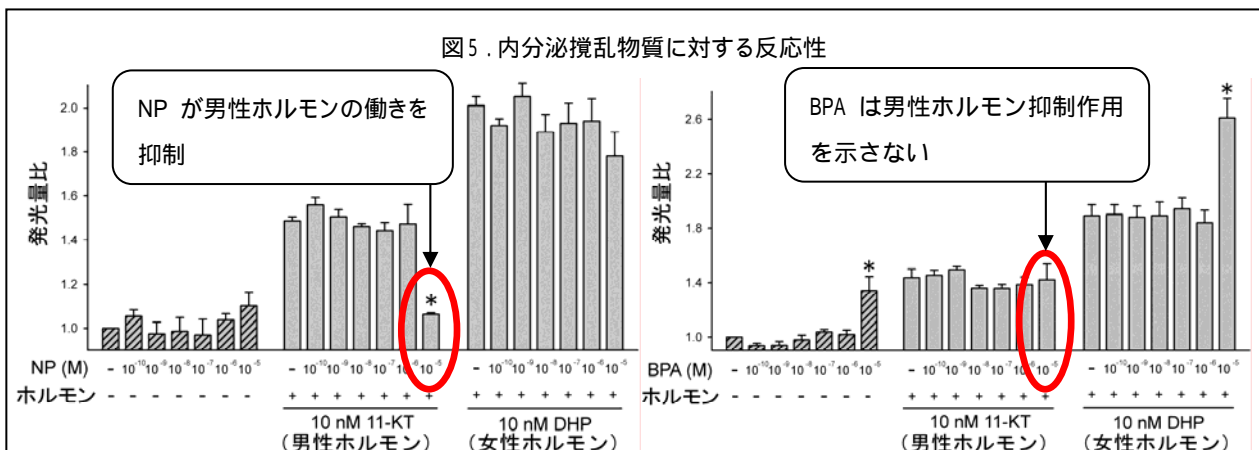
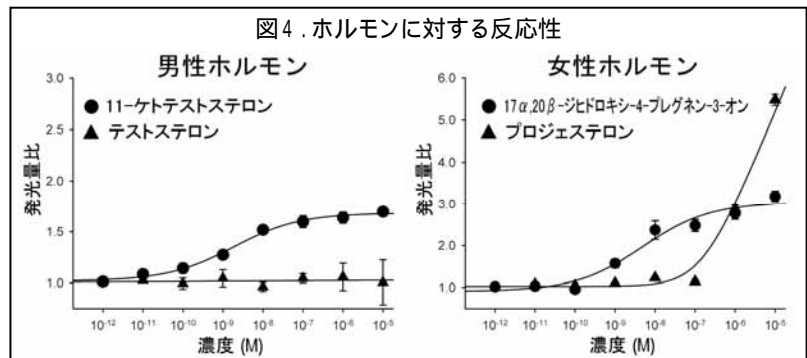
環境ホルモンが琵琶湖固有魚種の生殖巣に与える影響を調べるため、ホンモロコいの精巣からセルトリ細胞株（8、9）（RMT2細胞株）を樹立した。この細胞は様々な内在性のホルモン受容体を発現していたため、ホルモンに反応して蛍ルシフェラーゼを発現する新たな細胞株を樹立した（RMT2-MMTV-Luc#7）（図3）。



様々なホルモンへの反応性を調べた結果、生理的な濃度下（ 10^{-7} M以下）では、魚類特異的なホルモン（11-ケトテストステロン、 $17\alpha,20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン）に反応性を示す一方、哺乳類等でも見られるホルモン（テストステロン、プロジェステロン）には反応性を示さなかった（図4）。これは、従来の哺乳類細胞や魚類細胞に受容体を発現させた実験系では認められなかった結果であり、本細胞株が魚の生体におけるセルトリ細胞のホルモン応答性を反映していることを示すものである。

次に、環境ホルモンの一つであるノニルフェノール（NP）とビスフェノールA（BPA）の（抗）ホルモン作用を調べた結果（図5）、NPを 10^{-5} Mという高濃度で与えた時、細胞株の発光が抑制され、NPの抗男性ホルモン作用が検出された。NPは魚類体内で最大で約1000倍に濃縮されることが知られており、琵琶湖に流入する河川では 10^{-8} MのNPが検出されていることから、環境中のNPがホンモロコイに対し環境ホルモン作用を有する可能性が示された。すなわち、魚類セルトリ細胞に対し、NPが男性ホルモンの作用を抑える働きをすることが初めて明らかとなった。これは、魚類体内においてNPが視床下部-脳下垂体-性腺軸を介してではなく、セルトリ細胞に直接影響を及ぼしている可能性を示唆するものである。一方BPAは抗男性ホルモン作用を示さなかった。高濃度においては単独でホルモン作用を示したが河川におけるBPAの濃度、生体濃縮度はNPより低いため、環境中のBPAがホンモロコイに対し、環境ホルモン作用を持つ可能性は低いと考えられた。

以上の様に、魚類特異的なホルモンおよび環境ホルモンの抗男性ホルモン作用を検出できたことから、調査対象の特定魚類（固有魚種）におけるホルモンおよび環境ホルモンの作用を、細胞レベルで検出・解析が可能な実験系が確立できたと考えられる。



4. 本アッセイの応用

本法は、男性ホルモンおよび環境ホルモンの抗男性ホルモン作用を検出可能な初めての魚類細胞を用いたアッセイ系（センサー）であり、固有魚種のセルトリ細胞に及ぼす環境ホルモンの影響を直接評価可能な唯一の方法である。

魚類細胞を使用する利点として、特殊な培養装置を必要としない点がある。すなわち魚類細胞は室温、大気下での培養が可能であり、哺乳類の細胞培養のように 37℃、5%二酸化炭素という特殊な条件を必要としない。また、本細胞株は、アンドロゲン受容体だけでなく他の受容体も発現しているため、様々なホルモン作用が疑われる物質（フェニトロチオンやリニユロンなどの殺虫剤や除草剤）が、固有種にあたる影響を直接検出することが可能であると考えられる。

琵琶湖には約 460 本の流入河川が有り、その多くで微量化学物質に対する水質検査は行われていない。本アッセイ系を用いれば、調査対象の河川水、排水等を培養液に添加することによりそれらのホルモン作用を容易にスクリーニング可能であると考えられる。今後は、固有魚類におけるホルモン活性を指標とした、河川汚染の評価方法（カスタマイズドセンサー）としての応用展開も試みる予定である。

5. 参考文献

Higaki S, Koyama Y, Shirai E, Yokota T, Fujioka Y, Sakai N, Takada T (2013) Establishment of testicular and ovarian cell lines from Honmoroko (*Gnathopogoncaerulescens*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 39; 701-711.

Higaki S, Koyama Y, Shimada M, Ono Y, Tooyama I, Fujioka Y, Sakai N, Ikeuchi T, Takada T (2013) Response to fish specific reproductive hormones and endocrine disrupting chemicals of a Sertoli cell line expressing endogenous receptors from an endemic cyprinid *Gnathopogoncaerulescens*. *General and Comparative Endocrinology*, 191; 65-73.

用語説明

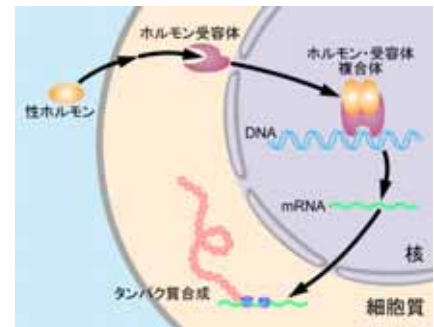
1 固有種

特定の地域に分布が限られる動植物の種。(デジタル大辞泉)

2 内分泌攪乱物質(環境ホルモン)

環境中に存在する化学物質のうち、生体にホルモン作用をおこしたり、逆にホルモン作用を阻害するもの。2003年5月の政府見解では、「内分泌系に影響を及ぼすことにより、生体に障害や有害な影響を引き起こす外因性の化学物質」と定義されている。

現在考えられている、化学物質が内分泌を攪乱する仕組みは、「受容体に結合してホルモン類似の作用をする」、「受容体に結合してホルモンが受容体に結合するのを阻害する」、「受容体の数を増加/減少させる」、「ホルモンの生合成や代謝を促進/阻害する」などが考えられている。(Official Endocrine Disruption Website - 化学物質の内分泌かく乱作用に関する情報提供サイト - 参照)



3 ノニルフェノール(NP)

NPは、主に界面活性剤やフェノール樹脂用積層板の原料として、また、エポキシ樹脂の安定剤や殺虫・殺菌剤、抗カビ剤にも用いられる。またプラスチック製食器や食品の包装材料であるラップフィルムの酸化防止剤として使用されるトリスノニルフェニルフォスファイト(TNPP)が分解してノニルフェノールを生成することも知られており、食品中へ溶出する可能性が指摘されている。魚類を用いた生殖・発生毒性試験の結果、精子形成の阻害、受精率の低下、次世代の性分化異常や、精巣卵を引き起こすことが報告されている。水棲生物における生物濃縮性が大きい物質とされ、1260倍という報告もある。「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」でリストアップされた67物質に含まれ、その後の環境省の調査・研究(「化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について - ExTEND2005 - 」)において内分泌攪乱作用が強く疑われる物質である。国土交通省の行った、全国109水系140地点における実態調査の結果、45%で検出されている。(有害性評価書 - ノニルフェノール - 、新エネルギー・産業技術総合開発機構など)

4 ビスフェノールA(BPA)

BPAは、主に電気機器等に用いられるポリカーボネートや金属の防蝕塗装等に使用されるエポキシ樹脂の原料として使用されている。ポリカーボネートやエポキシ樹脂は、プラスチック製食器や哺乳瓶、缶詰類の内部コーティング剤としても使用されており、樹脂中に残留しているビスフェノールAが食品中へ溶出する可能性が指摘されている。魚類を用いた生殖・発生毒性試験の結果、精子形成の阻害、精巣卵の出現、孵化日数の遅延、性比の偏りを引き起こすことが報告されている。水棲生物における生物濃縮性が小さい物質とされ、数十倍とされる。「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」でリストアップされた67物質に含まれ、ExTEND2005において内分泌攪乱作用が強く疑われる物質である。国土交通省の行った、全国109水系140地点における実態調査の結果、60%で検出されている。(ビスフェノールAリスク評価管理研究会中間報告、製品評価技術基盤機構など)

5 バイオアッセイ

生物材料を用いて生物学的な応答を分析するための方法。生物材料としては、生体や細胞などが用いられる。

6 ビテロジェニン産生試験

ビテロジェニンは、肝臓で合成される卵黄タンパク前駆体であり、繁殖期の雌成魚で特に産生されるもので、通常、雄魚および未成熟な魚では検出されないが、エストロゲン様物質に曝露された雄の肝臓でも産生される。これを用い、ビテロジェニン試験では、雄に試験物質を暴露し、ビテロジェニンの産生を観察することで女性ホルモン様作用を検出する。(内分泌攪乱化学物質の生態系影響評価のための試験体系の概況、環境省など)

7 レポーター遺伝子アッセイ

レポーター遺伝子アッセイは、試料が受容体へ結合したときに生体内のリガンド(特定の受容体に特異的に結合する物質、ホルモンなど)と同様のメカニズムで起こる遺伝子の転写活性化能を測定する試験法である(図2)。細胞内に受容体活性化作用を持つ試料が取り込まれると、受容体に結合し、その受容体が特定の遺伝子の上流に存在する応答配列に結合する。これにより、下流に位置している遺伝子の転写が促進される。

本研究ではレポーター蛋白質として蛍ルシフェラーゼの遺伝子をレポーター遺伝子として人工的に導入した細胞を使用する。応答配列として MMTV-LTR(マウス乳癌ウイルスの繰り返し配列部分)で、雄性ホルモンおよび黄体ホルモン受容体応答領域を含んでいる。(レポーター遺伝子アッセイ、化学物質評価機構など)

8 セルトリ細胞

魚類の精子形成は哺乳類と似ており、精原細胞が精母細胞、精細胞を経て精子へと分化する。哺乳類と異なる点はこれらの発達がセルトリ細胞で囲まれたシスト内で起こることであり、魚類精子の分化過程にセルトリ細胞は中心的な働きをすると考えられている。

9 細胞株

生体から単離した細胞や、遺伝子などに何らかの手を加えた細胞が、一定の性質を保ったまま、長期間にわたって安定的に増殖・培養できる状態になったもの。(デジタル大辞泉)