

(資料 1 4) 平成 1 9 年度終了特別研究の実施状況及びその評価

1. 身近な交通の見直しによる環境改善に関する研究
2. 環境化学物質の高次機能への影響を総合的に評価する *in vivo*モデルの開発と検証
3. 鳥類体細胞を用いた子孫個体の創出

1. 身近な交通の見直しによる環境改善に関する研究

課題代表者 小林 伸治（社会環境システム研究領域）

1) 研究の概要

車載機器やシャシーダイナモ設備を用いて、生活に密着した自動車の使用及び走行実態、並びに、自動車技術、運転方法による環境負荷の違いなどを調べ、環境負荷の実態と削減の可能性を把握した。また、統計データおよび走行実態データを元にして、つくば市を対象としたシミュレーション分析を行い、購買行動と通勤の見直しによる削減可能性を把握した。エコドライブからまちづくりにいたる身近な交通の見直し方法とその環境改善効果を提示した。

2) 研究期間

平成17～19年度（3年間）

3) 研究成果

(1) 研究目的・目標の達成度

本研究では、自動車の使い方という観点から、生活に密着した身近な交通の実態とその環境負荷、並びに環境負荷削減可能性を把握し、それらをもとにつくば市を対象としたCO₂削減対策の評価を行い、エコドライブなどの速効性のある対策から、まちづくりなどの削減効果が大きい中長期的な対策まで、実現性の高い削減シナリオを提示した。当初の計画では、大気汚染物質や駐車場における汚染なども研究対象にする計画であったが、自動車から排出される大気汚染物質、特に身近な交通で主流のガソリン車からの排出量は年々改善される傾向にあることから、自動車の環境影響研究としての優勢度を考慮し、本研究では、温暖化対策に特化して研究を進めた。このような理由により、一部、当初の計画に変更はあるが、概ね、研究の目的を達成できたものと考えられる。

(2) 本研究で得られた研究成果と社会・行政、科学技術・学術的な貢献度

【サブテーマ1】：自動車の使い方に着目した環境負荷の定量評価

① 生活に密着した自動車の使用実態とその環境負荷を明らかにした。具体的な成果を以下に示す。

- 道路交通センサスの個票データから、時間帯別の乗用車利用目的別トリップ数を独自に集計し、平日は7～8時台の通勤(7%)と17～18時台の帰宅(28%)、休日は10～16時台の家事・買い物(19%)あるいはレジャー(13%)の利用が多く、主要な移動の目的となっていることを明らかにした。また、10km未満のトリップの頻度は全体の約66%と多い一方、CO₂排出量の寄与は全体の約28%であることを明らかにした。(図1)

- つくば市を対象とした車載機器による交通特性調査によると、10km未満トリップの頻度およびCO₂寄与はそれぞれ92%、63%と高いことがわかった。道路交通センサスによるつくば市の平均トリップ長は全国平均より約2%短いものの、交通特性調査による車両一台あたりのトリップ数は道路交通センサスによるつくば市のトリップ数の約1.6倍と多く、自動車輸送統計の総走行距離は道路交通センサスより約2割多いことから、道路交通センサスでは短距離トリップを正しく把握できていない可能性が高いと考えられた。また、自宅と勤務先間およびその周辺を中心とした日常的な行動からの排出寄与が高いことを明らかにした。(図2)

- つくば市を対象とした同調査の結果では、道路交通センサス対象道路(幹線道路)以外の道路、いわゆる細街路走行は、走行距離の約 37%、走行時間の約 50%、排出量の 44%を占めていることを明らかにした。なお、自動車輸送統計と道路交通センサスによる既存推計では、細街路走行距離は約 31%である。また、細街路走行の速度はこれまで狭幅員幹線道路の速度分布を根拠に設定されていた値と同じ約 20km/h であることを確認した。その際の細街路走行の排出係数は全体平均値の約 19%増しとなった。短距離の移動は、細街路走行部分の寄与が高いため、速度が低く、排出係数が高い傾向にあることも明らかにした。

各家庭から目的地までを含む自動車の使用実態に加えて、特に、これまで未解明であった細街路における走行実態、環境負荷を車載機器を用いた実態調査により明らかにした上記成果は、学術的に有意義な成果であることに加えて、CO₂削減対策を検討する行政にとっても有益であると考えられる。

② ユーザー支援による環境負荷低減策として、効果的なエコドライブ法を理論的に明らかにするとともに、それによる燃費改善効果を明らかにした。さらに、一般の運転者には、エコドライブによる燃費改善の余地が大きいことを示した。具体的な成果を以下に示す。

- 26 人の被験者による路上試験により、エコドライブを行うことで平均 12%の燃費改善となることを明らかにした。エコドライブのポイントは、速度を抑えた走行と前方の交通状況をよく見て早めのアクセルオフを行い、無駄な走行エネルギーを消費しないことであり、改善効果の内訳として、最高速度を抑える効果が大きく、改善分の約 7 割を占めることを明らかにした。

- シャシーダイナモ試験により、被験者による路上試験で使用した車両(排気量 1,300ccCTV 搭載車)以外の車両(排気量 660ccCVT 搭載車、排気量 1,800cc4AT 車、排気量 1,500cc ハイブリッド車)でもエコドライブにより同様の燃費改善効果が得られることを明らかにした。

- 交通特性調査により、幹線道路では、法定速度を超えた運転が 43%見られ、エコドライブ普及の余地が大きいと考えられることを明らかにした。

これまで、感覚的な表現で示されていたエコドライブ法について、理論的な解析を行い、エコドライブに効果的な運転指標を提示したことは、学術的な成果であることに加えて、ユーザーにも分かり易い運転方法を提示でき、社会的貢献も期待できる。

③ 生活に密着した自動車の使用における自動車の環境負荷を実際の使用条件下で評価し、自動車の省燃費技術の効果を定量的に明らかにし、身近な交通における自動車の方向性を示した。具体的な成果を以下に示す。

- 車載機器による調査により、広く普及している AT 車を基準として、実使用時において、CVT (Continuous Variable Transmission) 車は 20%以上、内燃機関・電気ハイブリッド(IC-HEV) 車は 40%以上エネルギー効率が高いことを確認した。

- 自動車の燃費に大きな影響を及ぼす走行に要するエネルギーは、軽量で空気抵抗等の小さい車両ほど少なく、軽乗用車は小型乗用車よりも 20%少ないエネルギーで走行できるため、効率の良い動力システムと組み合わせることで、更なる燃費向上が期待できることがわかった。また、試験に供した IC-HEV 車は、通常的小型乗用車より 26%重い一方、空気抵抗等が小さいため小型乗用車と同等のエネルギーで走行でき、燃費向上の要因になっていることを確認した。CO₂ 排出削減のためには、軽量で空気抵抗の小さい燃費の良い車両の開発普及を促す支援策が望まれる。

- 身近な交通に適した自動車として、市販の小型電気自動車(BEV)の実使用条件下での環境負荷を評価した。BEV は、ガソリン車に比べ、平均速度の低い領域でも効率が 45% (走行エネルギー/充電量) 以上と高く、短距離で平均速度の低い、生活に密着した使用に適していることがわ

かった。しかしながら、エアコン等の使用により効率が約半分に低下するなど性能悪化が大きいことに加え、BEVの性能は、バッテリーの性能に強く依存し、高性能バッテリーの価格が高価であることから、当面、電動車両は、エアコンを使わず容量の小さいバッテリーで駆動できる超軽量の車両（例えば、電動アシスト自転車、電動車椅子、パーソナルモビリティなど）に適しているものと考えられた。

CVTやハイブリッド車等、省燃費車と言われる車両の燃費を実際の使用条件下で評価したことは、工学的にも意義有ることであることに加えて、今後の温暖化物質の排出量予測を行うために、行政的にも貴重なデータであると考えられる。

④ 人口動態を考慮した自動車交通需要の将来予測を行い、国土交通省予測は過大評価になる恐れがあることを示した。具体的な成果を以下に示す。

- 将来予測において、免許保有率の高い年齢層が高齢者となるため、人口が減少に転じた後もしばらく免許保有者数が延びることを確認した。一方で、運転者一人あたり走行量と総交通量は減少しており、2005年度には、国土交通省による交通需要予測値のトレンドを約4%下回っていることを明らかにした。

【サブテーマ2】：モデル地域を対象とした運輸部門の環境改善シナリオ

⑤ モデル地域としてつくば市を選定し、自動車の使い方による環境負荷を明らかにするとともに、2050年頃のCO₂大幅削減に向けた地域の特性を考慮した環境改善シナリオを提示した。具体的な成果を以下に示す。

- 交通対策の整理を行い、短期的にはエコドライブや公共交通利用促進が重要であるが、中期的には小型軽量かつ低燃費車への切り替えや公共交通等の利用しやすい場所への住み替え等が効果的であること、さらには、制度やまちづくりを見直すことも、身近な交通の見直しから2050年CO₂半減等の大幅削減につながる対策であることを示した。（特に、公開シンポジウム講演や施設公開、地球センターニュース「ココが知りたい温暖化」等のアウトリーチ活動に積極的に用いた）

- 購買行動に着目した調査から、平均的には、スーパーマーケットは3日に1回、共同購入・宅配は月に1回の利用であるが、大都市は地方都市に比べて購買行動の回数が多く、共同購入・宅配の購入金額が高いことを示した。また、スーパーマーケットへの交通手段は、人口60万人以上の大都市では徒歩・自転車が7割、人口5万人未満の町村部では自動車が8割と大幅に異なることを把握した。人口20万人のつくば市等で自動車利用を減らす対策は、主にこの両極端の中間に位置する規模の都市に適用可能と考えられる。

- つくば市を例に、物流センターから各戸までの範囲で、宅配利用とショッピングセンター利用等の買い物によるCO₂排出量を交通特性調査のデータを取り入れたシミュレーションで比較した。商業施設と住戸との距離によって差はあるが、一般的に自家用車利用による排出量の寄与が極めて大きく、宅配利用によるCO₂削減余地が大きいことを明らかにした。また、通勤に伴うCO₂排出量をシミュレーションで求め、路線バス活用による削減余地および、今後の開発方針による削減余地の違いを明らかにした。

- 公共交通等の利用しやすいまちづくりの将来像を具体的に議論する材料を提示するため、中心市街地、住宅地、農村等の土地利用状況と各々に適した交通システムを示したイメージ図を作成した。（図3）

モデル地域としてつくば市を選び、生活に密着した自動車の使用によるCO₂排出の削減対策について、速効性のある対策から削減効果が大きい中長期的な対策まで、実現性の高い削減シナリ

オと削減に至る道筋を提示したことは、行政・社会的に意義の有る成果と考えられる。

⑥ その他、本研究に関連したものとして、以下の成果を得た。

- つくば市に立地する研究機関等を対象とした交通実態調査の分析を行い、つくばエクスプレス開通前後で通勤交通手段の自動車分担率が4ポイント低下したことを明らかにした。国立環境研究所の施設公開イベントの来場者への働きかけ（自動車来場自粛のお願いと無料バスの運行等）を2カ年続け、来場者の約1割を自動車利用から無料バス利用に転換させることに成功した。

4) 評価結果（総合評価）

	5	4	3	2	1	合計
年度評価	3	3	1			7
（平成20年5月）	42.9%	42.9%	14.3%			100%

注) 上段：評価人数、下段 [%]

年度評価基準（5：大変優れている、4：優れている、3：普通、2：やや劣る、1：劣る）
外部研究評価委員会による事後評価の平均評点 4.3点

5) 評価結果の概要

[現状評価]

本研究では、自動車に依存せざるを得ない社会構造にあって、自動車の使い方に依存した環境負荷を定量的に評価し、科学的な解析を実施し、細街路走行の実態把握と排出量推計、エコドライブによる燃費改善効果の実証等、貴重かつ興味深い実証的データが得られている。これらの結果を用いて交通需要を予測した上で、低炭素社会における交通構造とそれに依存する都市構造にコミットしており、高く評価できる。特に、今回の成果の一つである運輸業や住民の間でも関心の高いエコドライブが定量的に環境負荷を低減するという結果は、今後の市民のCO₂削減行動に有効であると考えられる。

一方で、対象がつくば市に限定されていたため、現時点では得られたデータを一般化してわが国の施策として提示するまでの途中段階であると思われる。

[今後への期待、要望]

今回のエコドライブという研究成果を、国民に積極的に幅広く情報発信して頂きたい。今回の研究の対象が生活用途に多用される乗用車であった。今後、本研究を進めることが可能であるならば、以下のような期待をしたい。すなわち、都市代謝の物流を配慮すれば貨物車についても環境負荷を求められ、地域全体の環境負荷を示すことができるのではないだろうか。これにより一層良い結果となることが期待できる。また、高齢化などの社会構造の変化も含めて検討し、かつ公共交通へのシフトに関して一層の検討を進めることで、交通を通じた日本の近未来都市を提言して頂きたい。交通・自動車関連省庁や企業と連携し、地域特性を考慮した進め方も期待したい。

6) 対処方針

エコドライブの普及促進については、本研究で得られたエコドライブの要点を学会や国立環境研究所のホームページで情報提供するとともに、研究所の一般公開や市民を対象とした講演会などの機会を利用して、幅広く情報発信を行う予定である。

本研究の継続については未定であるが、現在実施中の地球環境研究総合推進費 S-3-5 において、貨物輸送の負荷把握および削減策についての研究を行っており、これらの研究をもとに、地域の物

流対策についても検討を急ぎたい。

本研究で提案した低炭素地域における交通の将来像は、十分とは言えないが、背景となる社会情勢や産業構造の将来想定を反映させつつ、現況土地利用から見て実現可能性の高い地域構造を提示するように配慮している。今後は、こうした背景状況を明示しつつ、交通関連省庁、地方自治体、企業等の反応も踏まえて、環境改善に資する地域像を提言していきたい。さらに、本研究では、つくば市以外の地域においても、自動車の使用実態データを取得しており、これらのデータを活用して、より多くの地域類型への展開とわが国全体への一般化を図りたいと考えている。

2. 環境化学物質の高次機能への影響を総合的に評価する *in vivo* モデルの開発と検証

課題代表者 高野 裕久（環境健康研究領域）

1) 研究の概要

化学物質のアレルギー増悪作用の有無を皮膚炎病態により判定することが可能な *in vivo* スクリーニングモデルを用い、複数の環境化学物質のアレルギー増悪影響を評価した。一部のフタル酸エステル類、キノン類、ビスフェノール A、ベンゾピレン等、検討対象とした物質の一部が、既報告の No Adverse Effect Level (NOAEL) 近傍、もしくは、より低用量でアレルギー増悪作用を発揮することを明らかにした。さらに、DNA マイクロアレイを用いた短期スクリーニング手法と樹状細胞、脾細胞等を利用した *in vitro* スクリーニング手法の有用性を検討し、より簡易で汎用性に富み、*in vivo* スクリーニングを反映する有望な *in vitro* スクリーニング手法を提案することができた。

2) 研究期間

平成17～19年度（3年間）

3) 研究成果

(1) 研究目的

環境化学物質は年々増加しており、その健康影響を速やかに明らかにする必要がある。また、環境汚染物質の健康影響については、大量曝露による古典的な毒性発現という観点ではなく、低濃度曝露による免疫・アレルギー、内分泌、神経・行動等を主軸とする高次機能への影響という観点から再評価する必要性が増している。本研究課題は、「免疫・アレルギー系に焦点を当て、環境化学物質の高次機能への影響をより簡易・迅速に、総合的に評価することが可能な *in vivo* スクリーニングモデル、*in vitro* スクリーニングモデルを開発し、その短期化、簡便化を一層図るとともに、複数の環境化学物質を対象としてその有効性を検証する。」ことを目的とした。

(2) 研究成果の概要

- ① 環境ストレスに対し高次機能影響（免疫・アレルギー影響等）が出現しやすい動物を用い、これらに環境化学物質を投与することにより、短期、かつ、簡便に、環境化学物質の高次機能影響を評価することが可能な *in vivo* スクリーニングシステムを開発・検証することができた。
- ② 多くの環境化学物質について、*in vivo* におけるアレルギー増悪作用の有無を短期間で評価することができた。
- ③ 全ての環境化学物質が非特異的にアレルギーを増悪することはないが、ある種の化学物質は、既存の NOAEL に匹敵する濃度、あるいは、より低用量でアレルギー増悪影響を発揮しうることが明らかになった。
- ④ DNA マイクロアレイの併用や *in vitro* スクリーニング手法の導入により、より、短期、かつ、簡便に環境化学物質のアレルギー増悪影響を推定することができるスクリーニングシステムを提案することができた。
- ⑤ これにより、より多数の環境化学物質を対象とし、様々な濃度における高次機能影響を評価することがより可能になった。

(3) 研究の波及効果

- ① 古典的な毒性ではなく、【高次機能影響】、あるいは、【quality of life に密接に関与し、生命・生体システムのかく乱に基づく健康影響】という新たな健康影響の評価軸を提言することにより、また、この影響が既存の NOAEL 近傍、あるいは、より低い濃度でも惹起されうることを世界で初めて明らかにしたことにより、科学的なインパクトと共に、化学物質規制のための環境政策の方向性に新たな指針を与えることができた。
- ② 簡便かつ短期間で影響評価が可能なスクリーニング手法を提案することができたことにより、環境政策に資する基礎データの蓄積を加速することができた。
- ③ 早期影響指標を検出・活用することにより、化学物質の高次機能影響の未然防止に資する可能性を提供することができた。

(4) 具体的研究成果

① *in vivo* スクリーニングによる化学物質のアレルギー増悪影響評価

前出の *in vivo* スクリーニングモデルを利用し、ビスフェノール、ノニルフェノール、スチレン、トリブチルスズ、アルキルフェノール、ベンゾピレン、ナフトキノ、フェナントラキノ、ペルフルオロオクタン酸、ペルフルオロオクタンスルホン酸、フタル酸ジイソノニル、アジピン酸イソノニル、トリメット酸エチルヘキシル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジブチル、アクリルアミド等の環境化学物質に関し、アレルギー増悪影響の有無を評価した（表 1）。その結果、フタル酸ジイソノニル、ビスフェノール A、ベンゾピレン、ナフトキノ、フェナントラキノ、スチレン（モノマー）、4-*t*-オクチルフェノールといった複数の環境化学物質物質がアレルギー増悪影響を示した。注目すべきこととして、一部の物質のアレルギー増悪影響は、既報告の NOAEL 近傍、あるいは、より低濃度においても発揮されることが示された。他の結果においても、いわゆる inverted U タイプの量-反応関係が得られている知見が存在し、アレルギー増悪作用と内分泌かく乱作用の類似性も示唆された。一方で、アレルギー増悪影響の存在しない物質や、アクリルアミドやペルフルオロオクタン酸のように抑制効果が示唆される物質も複数存在した。フタル酸ジエチルヘキシルによるアレルギー増悪影響のメカニズムとしては、病変局所（耳介組織）におけるケモカイン発現亢進とそれに基づくと考えられる好酸球性炎症の増悪および肥満細胞の脱顆粒が重要な役割を演じていると考えられた。フタル酸ジエチルヘキシルについて、曝露時期による影響発現の特異性を詳細に検討したところ、授乳期における曝露の増悪影響が雄動物において顕著であることが明らかになった。

② アレルギー増悪影響のより簡易なスクリーニング手法の開発

1) DNA マイクロアレイを用いた短期スクリーニング手法の開発

前出の *in vivo* スクリーニングモデルにおける遺伝子発現変動を、DNA マイクロアレイを用いて経時的（病態潜在期、病態早期、病態進行期、病態完成期）、かつ、網羅的に解析し、短期スクリーニング手法への応用の可能性について検討した。対象物質は、既に増悪影響を確認しているフタル酸ジエチルヘキシルを、対象組織は、アレルギーを投与し病態の局所である耳介組織を用いた。その結果、病態の進行に伴い、発現変動遺伝子数は増加傾向を示した。また、radical S-adenosyl methionine domain containing 2, chemokine (C-C motif) ligand 4, serum amyloid A 3 などが病態の潜在期から完成期に至るまで共通して発現変動を示した。しかし、対象とした耳介組織では、病態の進行や重症化に従い RNA の分解が進み、解析および定量性などに若干の問題が残った。より汎用性の高いスクリーニング手法の可能性を検討するために、次に、顎下リンパ節組織における遺伝子発現変動の解析を試みた。病態完成期に、フタル酸ジエチルヘキシル曝露によって特異的に変動を示した遺伝子として、chemokine (C-C motif) ligand 24, tumor

necrosis factor alpha induced protein 6、Immunoglobulin heavy chain 6 といった炎症や免疫応答に関わる因子が含まれており、DNA マイクロアレイによる影響指標の検索が可能であることが示された。病態早期における検知・予測という観点からは、今後さらなる検討が必要と考えられたが、RNA の安定性や定量性に関してはよりすぐれていると考えられた。一方、本スクリーニングモデルと DEP によるアレルギー性気管支喘息増悪モデルにおける遺伝子発現の経時的変動結果を参考に、変動の著しい遺伝子を約 429 個選抜して影響指標として利用することにより、環境化学物質のアレルギー増悪作用を短期間で判定することを可能とするチップを開発した（他予算による研究を含む）。

2) 培養細胞系を用いた簡易スクリーニング手法の開発

免疫・アレルギー反応や疾患に深く関わる樹状細胞、リンパ球、脾細胞の単独、あるいは、複合培養系を用い、*in vivo* スクリーニングの結果をよく反映する *in vitro* スクリーニング手法の開発が可能か否か検討し、その簡便性、普及性を含め、総合的に有用性を検討した。具体的には、NC/Nga マウスや ICR マウスより、骨髄由来樹状細胞、脾細胞、脾臓由来 T 細胞を採取し、あるいは、株化 T 細胞 (Jurkat 株) を、対象として用いた。抗原提示細胞については MHC class II、CD80、CD86、CD11c、DEC205 等の発現を、T 細胞については TCR、CD3、CD28、IL-4R 等の発現やサイトカイン・ケモカインの産生を環境化学物質の存在下、非存在下で比較検討した (表 2)。対象とする環境化学物質としては、*in vivo* スクリーニングモデルにおいてアレルギー増悪影響が認められた DEP やフタル酸ジエチルヘキシル、フタル酸ジイソノニル、ビスフェノール A を先導的に選択した。総じて、樹状細胞における CD86 の発現増加、脾細胞における TCR の発現および IL-4 産生増加、抗原刺激による細胞増殖の増強は、*in vivo* におけるアレルギー増悪影響をよく反映し、*in vitro* スクリーニング系、及び、指標として有用であると考えられた。

4) 評価結果 (総合評価)

	5	4	3	2	1	合計
年度評価	2	6	1			9
(平成 20 年 5 月)	22.2%	66.7%	11.1%			100%

注) 上段：評価人数、下段 [%]

年度評価基準 (5：大変優れている、4：優れている、3：普通、2：やや劣る、1：劣る)

外部研究評価委員会による事後評価の平均評点 4.1 点

5) 評価結果の概要

[現状評価]

本研究では、明確な目標設定の下での着実なアプローチにより、ユニークなモデルを作り、遺伝子を指標とする簡便な評価モデルや培養細胞を使った簡便かつ短期間で実施可能なアッセイ系を確立した点で高く評価できる。具体的には、アレルギー増悪影響を判定する *in vivo* スクリーニング系、*in vitro* スクリーニング系が開発されている。簡易スクリーニング系については、DNA マイクロアレイ、培養細胞の二つのアプローチが取られているが、人の健康影響のスクリーニング系としてより有効なものとするための吟味が行われており、高く評価できる。今後の更なる改良、バリデーション、データの蓄積等により、信頼性の高い確立したスクリーニング手法となることが期待される。また、培養細胞系において、極低濃度でアレルギー作用を引き起こすという結果は興味深い。

一方で、アレルギー増悪化学物質の確定とアレルギーの種類という実用化の可能性につい

て不明瞭な点が伺えた。

[今後への期待、要望]

今後の化学物質政策や対策にも、この成果を十分に活かしていく必要があると思われるため、定量的な評価法の開発へと持っていけるように研究を今後も進め、発展させて頂きたい。また、ヒト培養細胞を用いるなど、ヒトを対象とした研究へと移行されることを期待したい。

6) 対処方針

今後、スクリーニング系の簡便性、汎用性、信頼性をより高め、一層の改良と検証を進めてゆく必要があると考えている。また、対象とする環境化学物質を増やし、スクリーニング間の相関性をより厳密に検証していくことが望ましいとも考えている。具体的には、現在、免疫反応の起点である樹状細胞を用いた *in vitro* スクリーニングシステムの改良と検証について研究を進行しつつある。この系は、人を対象とした研究への移行を念頭に置いたものである。また、簡便性、汎用性の観点からは、脾細胞を用いた *in vitro* スクリーニングシステムの改良と検証も必須で一層進展してゆく必要が高いものと認識しており、何らかの予算措置を得るべく努力したいとも考えている。将来的には、多数の環境化学物質について *in vitro* スクリーニングを実行し、増悪作用が示唆される化学物質の *in vivo* における増悪影響を *in vivo* スクリーニングモデルにおいて確認し、定量的に評価し、大規模疫学における検討対象化学物質として提案すると共に、環境政策の今後の方向性の設定に示唆を与え、国民の健康の保持（安全と安心）と環境影響の未然防止に役立てていきたい。

3. 鳥類体細胞を用いた子孫個体の創出

課題代表者 桑名 貴（環境研究基盤技術ラボラトリー）

1) 研究の概要

- ・鳥類始原生殖細胞（PGC）の大量培養法を開発した。
- ・長期培養後の PGC 由来細胞が細胞特性を保持して PGC と全く同じように子孫個体を作成することを実証した。
- ・異種間生殖巣キメラ個体では種を越えて精子、卵が生殖巣内で分化することが確認できた。
- ・細胞融合による始原生殖細胞が、ホスト始原生殖細胞の生殖巣への移動能を確保しながら細胞核を不活化する UV 照射量を確定できた。
- ・ホスト始原生殖細胞と体細胞との融合は低率ながら成功した。
- ・融合始原生殖細胞が生殖巣へと到達することが確認できた。

2) 研究期間

平成 17～19 年度（3 年間）

3) 研究成果

(1) 研究目的

希少野生鳥類の体細胞から始原生殖細胞（PGC；将来の精子、卵のもとになる細胞）を創り出す。この PGC を用いて生殖巣キメラ個体を作成、性成熟の後に体細胞由来の子孫個体を得る。希少野生鳥類の体細胞の採取は生殖細胞を得るよりは遙かに容易で、加えて増殖培養も可能になった（Kuwana et al.、1996）。そのために、最も採取が容易な皮膚の一部から体細胞を取りだして培養し、これをもとに PGC を創り出すことができれば体細胞をもとに希少野生鳥類の個体増殖も可能となる。なぜならば PGC さえあれば、PGC の増殖培養、PGC を用いた生殖巣キメラ個体作製し、生殖巣キメラ個体を経て、移植した PGC 由来の子孫を得ることが可能である。つまり、体細胞核を持つ PGC を創り出すことができれば、体細胞由来の子孫個体も作出可能である。

(2) 研究成果

本研究の目標を達成し、野生希少鳥類の子孫個体を創出するために、以下のサブテーマと体制によって研究を推進した。

生殖巣キメラ個体による子孫作出

本サブテーマは、培養体細胞核を導入した融合 PGC を用いて作製する異種間生殖巣キメラ個体から得るための基盤技術となる異種間生殖巣キメラ個体作成法を開発、確立することを目的とした。

ア フィーダー細胞上での始原生殖細胞の in vitro 培養

本研究全体の基盤技術を確立するために、ドナー PGC の in vitro 培養系の開発を行った。これは、希少鳥類では始原生殖細胞を採取する機会が極端に少なく、その採取可能な細胞数も少ないためである。効率的な始原生殖細胞培養を可能とすることによって、一度採取した始原生殖細胞を用いた子孫個体作出を効率よく行うことが可能となる。

ここでは白色レグホーン系のニワトリ胚を用いて孵卵 2 日目の循環期にある始原生殖細胞（PGC）を単離し、予めマイトマイシン C（MMC）処理によって細胞増殖を阻止したフィーダー細胞上で培養を行った。KAv-1 培養液を用いて約 2 週間後には PGC は増殖してフィーダー細胞上で ES 細胞様の細胞塊を形成した。この培養 PGC はアルカリフォスファターゼ活性陽性、PAS 染色陽性、SSEA-1 陽性であり、元々の PGC と同様の細胞特性を保持していた。この細胞を更

に長期継代し、PGC としての細胞特性を保持していることを確認するために、羽毛色が異なる横斑プリマスロック系のニワトリ胚（孵卵 2 日目）の血流中に注入移植して生殖巣キメラ個体を作成、性成熟を待って戻し交配によるキメラ率の検定を行った。その結果、長期に継代培養を行って増殖した培養 PGC は次世代を作出する能力において無処理 PGC と全く同様の能力を示し、高率に移植した培養 PGC 由来の子孫個体を得ることが出来ることを実証できた。

①材料と方法

a) PGC の単離精製

白色レグホーン系の受精卵を 38°C で 50~54 時間孵卵し、st12-15 を得た。この胚の血液を採取し、50ml 遠沈管に 5ml ずつ重層した 11%、5.5% ナイコデント溶液の上に PGC 約 1,000 個の PGC を含む胚血液分散液を重層した。4°C・400×g・15 分遠心し、11%と 5.5%の境界周辺部分を回収し、これを KAv-1 培養液で洗浄した後に PGC のみを双眼顕微鏡下で回収した。

b) フィーダー細胞の調整と PGC 培養

SPF ニワトリ受精卵を孵卵し、St16 胚を得る。予定生殖巣部域と頭部、心臓部域を切除した後に、残りを細切して KAv-1 培養液を用いて継代培養を開始した。30 代以上継代し、継代間隔が 36-48 時間になったものをフィーダー細胞として使用した。

フィーダー細胞として使用する 12-18 時間前に、予め 1%ゼラチンコートした 48 穴プレート・1 ウェルあたり $8.0-12.0 \times 10^4$ となるように播種し、培養用密閉フィルムを用いて密閉して培養した。80-90%コンフルエントの状態、10ug/ml MMC で 3.0-3.5 時間処理し、その後 KAv-1 で 3 回洗浄した。

単離精製した PGC を 1 ウェルあたり 500 から 1,000 個で播種した。その後は、PGC 細胞塊が大きくなる約 2 週間に 1 回継代を行った。継代の際にはピペッティングにより PGC 細胞塊を回収し、顕微鏡下で細胞塊のみを回収した。トリプシン処理により単細胞の PGC あるいは小さなクラスターの状態になるまで分散し、PGC 数を計測した後に、準備しておいた新しいフィーダー上に PGC を播種するという操作を繰り返した。

c) PGC の組織化学的同定ほか

アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色の際には、培養細胞塊を PBS で洗い、10%ホルマリンで 10 分間固定し、超純水で洗浄後に市販の ALP 染色キットを用いて染色した。また、PAS 染色を行うために、培養細胞塊を PBS で洗い、10%ホルマリンで 10 分間固定し、超純水で洗浄後に 0.5%過ヨウ素酸水溶液で室温・5 分間処理した。超純水洗浄後にシッフ試薬で室温・5 分間処理した。亜硫酸水で室温・1 分処理後、超純水で洗浄し顕微鏡観察を行った。どう用に PGC の免疫組織学的同定法である SSEA1 免疫染色のため、培養細胞塊を PBS で洗い、ブアン固定液で 20 分間固定した。その後 PBS 洗浄、超純水を経て 0.3%過酸化水素水で 30 分間処理し、超純水洗浄後 PBS に 5 分浸した。抗 SSEA1 抗体を 3%BSA/PBS で 1/100 に希釈し、これを 4°C で一晩試料に反応させた。最終的に PBS 洗浄後に ABC キットと DAB キットで呈色反応を行い SSEA1 の存在を確認した。

d) 培養 PGC を用いた生殖巣キメラ個体作出と後代検定

継代培養開始後 16 日、45 日、93 日、106 日、218 日、及び 207 日培養後に凍結保存した白色レグホーン系ニワトリ PGC 由来の細胞を雛の羽毛が黒色の横斑プリマスロック系の胚（孵卵 52 時間）の周縁静脈に注入移植した。継代培養した PGC 由来細胞塊をトリプシン・EDTA/PBS(-)処理を行い単細胞にまで分散し、KAV-1 培養液で洗浄後に 200 細胞/胚で注入移植を行って生殖巣キメラ個体を作成した。

②結果と考察

PGC は培養開始後 2 日目に 3-4 細胞の細胞塊を形成し始め、日ごとに大きくなった。最も

大きな細胞塊では4日目で8個、6日目で14個、8日目で36個、10日目で50個、12日目で70個、14日目で120個のPGCから形成されていた。細胞塊が120個以上になると死滅したため、約2週間でリプシン処理により細胞塊を分散して継代して長期培養を行った。

各継代操作でのPGC数を培養0日のPGC数で割り、増殖率を求めたところ、培養当初はゆるやかだった増殖率が最初の継代後に増加し、2回目の継代後はさらに増加した。最も増殖率が高いものでは、培養40日で1,000~2,500倍となった。

また、これらのPGC由来細胞はいずれの段階でもPAS染色陽性、SSEA1免疫染色陽性であったが、ALP染色に関しては陽性又は陰性を示し不安定であった。

上記の各培養期間のPGC由来細胞を用いて生殖巣キメラ個体を作成し、これらの生殖巣キメラ個体を性成熟まで飼育し、横斑プリマスロック系との戻し交配の結果、継代培養16日では18-27%、45日では50%、93日では64%、106日では50%、218日では44%、更に207日培養後に凍結保存していた細胞由来の子孫は33%であった。

これによって、本研究の培養条件で長期培養したPGCはその細胞特性を保持し、生殖巣キメラ個体を介して培養PGC由来の子孫個体を作成する能力を持っていることを実証できた。通常はPGCを長期培養するとEG細胞もしくはES細胞のようなより未分化な細胞へと脱分化を起こすと考えられていたことから、本研究の成果は細胞特性を変化させることなくPGCを長期培養出来た世界初の成果である。

この他にも無細胞系でのPGC培養系を開発したものの、この条件での培養PGCから子孫個体を得ることが出来ないために、何らかの分化が起こってPGCとしての細胞特性が失われた可能性がある。今後は遺伝子解析等の詳細な検討の予定。

イ 異種間生殖巣キメラ作製法の開発研究

鳥類間での異種間生殖巣キメラ個体を、ニホンキジ、ライチョウのPGCをニワトリ胚とウズラ胚に、ニワトリPGCをウズラ胚へ移植して異種間生殖巣キメラ個体を作製し、それらの性成熟を待って、後代検定を行い、受精卵、発生停止胚、雛のDNAを調整し、キメラ効率を調べた。

①材料と方法

a) 異種間生殖巣キメラ作出

ライチョウPGCをニワトリ(チャボ)胚へ生殖巣キメラ作出法に則り移植した。移植胚10のうち4羽孵化した。1羽が雛の時期に死亡し、DNAから♂であった。現在、残る3羽(♂1と♀2羽)で後代検定を行った。

ニホンキジPGCをニワトリ胚78(白色レグホン12、チャボ66)へ移植し、白色レグホン4羽チャボ17羽が孵化した。現在、14羽(雄10、♀4)で後代検定を行った。

ニホンキジPGCをウズラ胚85へ移植、32羽が孵化し、現在20羽(♂13、♀7)で後代検定中。

ニワトリ(白色レグホン)PGCをウズラ胚41へ移植、8羽が孵化(♂4、♀4)で、後代検定中。

b) 異種間生殖巣キメラ個体の後代検定

異種間生殖巣キメラ個体を飼育して性成熟させた。キメラ個体が雄の場合は、ドナー種の雌にキメラ個体の精液を用いて人工授精あるいは自然交配にて受精卵を得、これを孵化させてキメラ個体のキメラ効率を評価した。また、キメラ個体が雌の場合は同じくドナー種の雄からの精液を用いて人工授精、自然交配を行い、受精卵を得、これを孵化させてキメラ効率を評価した。

c) DNA配列による異種間生殖巣キメラの評価

作出した異種間生殖巣キメラ個体の性成熟を待つまではその精液内の精子、♀では放卵した種卵を孵卵し雛を得た。孵化しなかった卵について、未受精卵、発生停止胚、死籠もり胚などから DNA を調整し、ドナー寄与率を検定した。DNA による種判別法は、同じ遺伝子の DNA 配列二種特異的な相違点を PCR によって増幅して検知するものである。遺伝情報としては、ゲノム DNA と、ミトコンドリア DNA に大別されるが、ゲノム DNA の Met proto-oncogene の一部配列と、mtDNA の ND2 配列の全長を決定、比較して種特異的と考えられる配列に基づき、プライマーを設計作製した。これを用いて生殖巣キメラ個体の精液中のドナー精子を PCR で識別した。同様に、卵巣に関しても識別を行ってドナーPGC 由来の卵細胞の存在を評価した。

②結果と考察

ライチョウ PGC をニワトリ(チャボ)へ移植したキメラ胚のうち死亡胚4例から遺伝子を調整して調べたところ、4胚中の3胚がキメラであった。生存している♂キメラ精液ではライチョウ遺伝子を検知できなかった。♀キメラ2羽のうち1羽はこれまで264個産卵し、238個からDNAを調整、PCRの結果、すべてからライチョウ遺伝子を検知することができなかった。ニホンキジPGCをニワトリ(チャボ)へ移植し作成したキメラ♂14羽の精液からのDNAから、7羽にニホンキジのDNAを検知した。キメラ♀4羽のうち3羽が産卵している。61個のうち24個からDNAを調整、PCRを実施したが、ニホンキジDNA派遺地できなかった。ニホンキジPGCをウズラに移植したキメラ♂での精液の検査はまだ行っていない。キメラ♀7羽では、それぞれがすでに100個以上の産卵をみている。このうちの6羽について各ほぼ半数の40~50個を調べた結果、これまでにキジの遺伝子を検知することができなかった。

精液中の精子は、億単位の細胞数があるため、キメラ検定が1回のサンプルリングでも評価することは可能であるが、♀では産卵数はよくて毎日1個(細胞)であるため、キメラ率の検定は困難とおもわれる。

③DNA 配列による異種間生殖巣キメラの検出・評価

上記①で作製する異種間生殖巣キメラ個体の性成熟段階で精子、卵巣のドナー寄与率を検定する。具体的にはドナーとホスト側のゲノムDNA (Met proto-oncogene) の一部配列と、mtDNA の ND2 配列の全長を決定、比較して特異的プライマーを作製した。これを用いて生殖巣キメラ個体の精液中のドナー精子を PCR で識別した。同様に、卵巣に関しても識別を行ってドナーPGC 由来の卵細胞の存在を検出・評価した。

また、異種 PGCs は微量に生殖巣内に存在しない可能性があるため、通常の PCR 法より高感度・確実な方法として、種特異的に増幅した配列内部に種特異的なプライマーを設計した 2nd PCR による入れ子式の PCR 法を用いた判別も試みた。

この様な検出手法を用いて生殖巣キメラ個体の評価を行った結果、雌雄共に精子、卵巣にドナー細胞の存在が証明された。また、一部ではあるがドナーPGC 由来の細胞が大量に含まれることを示唆するデータ燃えることが出来た。

ドナー体細胞の増殖培養と標識遺伝子の導入

モデルとして、ニワトリの体細胞(st27胚由来)を選び、特に単離した際に細胞径が小さい(10 μ m 程度)となるものを選抜した。この細胞に非ウイルスベクターを用いて GFP 遺伝子を導入し、GFP 発現によって pEGFP-N1 をリニアで使用し、リポフェクションを行った。試薬はリポフェクトアミン 2000、Fugene6 を使用した。試薬と遺伝子の混合比は最終的には 2:3 とした。細胞数は 10^5 と 10^6 を検討し、生存数の多い 10^6 個を用いて遺伝子導入を行った結果、使用した試薬による導入効率に特に差はなかった。薬剤耐性による選別で細胞系統の樹立が困難であったために、結局は蛍光顕微鏡下で GFP 陽性細胞を選別して 2 系統の細胞株を樹立することができたため、そ

の後はこの細胞系統を研究に使用した。

体細胞核を持つ PGC の創出

本サブテーマでは、PGC 核の不活化条件の検討と細胞融合条件の検討を行って体細胞核を導入した PGC の創出法の開発にあたった。

PGC 核の不活化条件の検討と細胞融合条件の検討

①材料と方法

条件設定の再現性の高い紫外線照射処理による PGC 細胞核の不活化条件（波長及び線量条件）を検討して、細胞質及びミトコンドリアへの損傷を最小限に留めながら細胞核を不活化するための条件を検討した。

始生殖細胞（PGC）の核が細胞質に対して大きく、PGC の平均直径が約 $16\mu\text{m}$ 前後と哺乳類細胞と比較しても小さいために、マニピュレーターを用いた物理的除核は困難で、生存生の面からも非現実的である。また、ミトコンドリア DNA の不活化も期待するために、物理的除核以外の方法の検討が必要であることから、本課題では紫外線照射による除核条件を検討・確立する。この条件検討に際しては、PGC 細胞核の DNA 損傷度を SCG 法（コメットアッセイ）を用いて評価した。

また、*in vivo* での判定のために、白色レグホーン 2.5 日胚から血液を採取し、血液循環期の PGC（cPGC）を単離した。UV 照射装置は、PGC の位置で $1\mu\text{W}/\text{cm}^2$ あるいは $200\mu\text{W}/\text{cm}^2$ となるように設置し、UV 照射時間 10 秒と 120 秒を照射した。また、対照群として UV 未照射の PGC を用いた。

未照射あるいは照射した cPGC は、いずれも PKH67 で蛍光染色を行った後、白色レグホーン 2.5 日胚の血管中に注入移植して 3 日間孵卵した。5.5 日胚の時期に胚を採り出し、蛍光実体顕微鏡下で観察した。

②結果と考察

UV 照射を行って後に SCG 法で DNA 不活化を判定したところ、明らかに細胞死が起きるはずの照射量でも細胞死を捉えることが出来なかった。これは照射直後では DNA の破壊が未だ進んでいないためと考えられたために、生殖巣への到達能および細胞の生死判定を以下のように、*in vivo* で行うことにした。

In vivo での判定では、移植後 1 日目での観察では各実験群共に対照群との相違は認められず、いずれも蛍光を発する移植 PGC が生殖巣に到達していた。

移植後 3 日目での生殖巣の観察を行うと、 $1\mu\text{W}/\text{cm}^2$ の強さで 10 秒照射群と未照射群では、蛍光を発する移植 cPGC の生殖巣への能動的移動能に違いは認められず、多くの細胞が生殖巣内へ移動していた。これに対して、照射秒数を 120 秒とした場合、 $200\mu\text{W}/\text{cm}^2$ の強さで 120 秒照射群と同様に、蛍光を放つ移植 cPGC は生殖巣とその近傍にはほとんど認めることができなかった。このことから、cPGC の生殖巣への移動能を保持しつつ細胞核の機能を破壊する条件は $1\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 、120 秒照射条件で十分であることが判明した。

細胞融合条件の検討

まず、血球（体細胞系）と PGC の電気融合の条件検討を行って低率ながら成功しており、この条件を更に改良することで線維芽細胞と PGC との効率的融合条件を開発するとともに、PEG（ポリエチレングリコール）による細胞融合条件も合わせて検討して融合 PGC を作製した。

体細胞由来 PGC の生体内移動能の評価

融合 PGC の細胞学的特性を検討するために、少数ではあるが得ることの出来た融合 PGC を用いて胚への注入移植実験を行い、生殖巣原基への到達を観察したところ、数例ではあるが移植融合 PGC が生殖巣原基に到達していることが確認できた。体細胞では生殖巣原基への移動は起こ

らないことから、融合 PGC でも PGC としての細胞特性を保持していると考えられる。

体細胞由来の生殖巣キメラ個体の創出

融合 PGC をホスト鳥類胚に移植することによって生殖巣キメラ個体を作成する予定であったが、融合 PGC の作出効率が極めて低いために現状では生殖巣キメラ個体を作成するに至っていない。早急に融合 PGC 作出効率を向上させて生殖巣キメラ個体を作成予定である。

4) 評価結果 (総合評価)

	5	4	3	2	1	合計
年度評価		8				8
(平成 20 年 5 月)		100%				100%

注) 上段: 評価人数、下段 [%]

年度評価基準 (5: 大変優れている、4: 優れている、3: 普通、2: やや劣る、1: 劣る)
外部研究評価委員会による事後評価の平均評点 4.0 点

5) 評価結果の概要

[現状評価]

本研究は、希少種の保存・再生に向けた、世界に先駆けた鳥類の増殖培養手法の開発として高く評価でき、一定の成果があげられたと評価できる。狭義の環境問題を越えた、科学的ポテンシャルの高い研究課題および研究手法であると思われる。また、最近の鳥インフルエンザの爆発的広がりを防止するために役立つ期待が持てる成果であると言える。

[今後への期待、要望]

本研究は、希少種の保存・再生のための技術に留まらず、極めて応用性の高い成果であると思われるため、今後、大型の外部資金を獲得するなどして研究を継続できるように検討して頂きたい。今回の基礎研究の成果をもとにして、どのような応用研究をすれば生物多様性の中で重要なテーマである種の保存問題に貢献できるのかを検討して頂きたい。

6) 対処方針

全く新規の希少鳥類増殖法を開発し、基盤的な研究技術を開発・整備するための本研究は当初予想の 80% 程度の達成率と自己評価している。未達成の原因は、研究期間に対して達成目標が高すぎた可能性も否定できない。仮に本研究が同程度の予算規模で継続できた場合、重要な研究成果は本中期計画内で達成可能であり、更に成果を実際の希少鳥類個体増殖に応用するためには、その後三年程度であると予想している。

ただ、特別研究の継続申請及び 2 件の外部競争的研究資金の新規申請が不採択となり、本研究の継続は基礎研究、応用研究共に困難な状況にある。今後は、技術、ノウハウ、人的資源を含めた研究の継続の手立てについて、外部研究組織への移転も視野にいれて模索することとなる。