

SR 56 2003

国立環境研究所特別研究報告

ISSN 1341-3635

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan

SR - 56- 2003

内分泌かく乱化学物質及びダイオキシン類のリスク評価と管理プロジェクト

内分泌かく乱化学物質及びダイオキシン類の リスク評価と管理プロジェクト

(中間報告)

Endocrine Disruptors and Dioxin Research Project

平成 13~ 14年度

FY 2001~ 2002

平成
13
~
14
年
度

NIES



独立行政法人 国立環境研究所
NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES
<http://www.nies.go.jp/index-j.html>

国立
環境
研究
所

R100

国立環境研究所特別研究報告

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan

SR - 56 - 2003

内分泌かく乱化学物質及びダイオキシン類の
リスク評価と管理プロジェクト
(中間報告)

Endocrine Disrupters and Dioxin Research Project

平成13～14年度

FY 2001～2002

独立行政法人 国立環境研究所
NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

重点特別研究プロジェクト「内分泌かく乱化学物質及びダイオキシン類のリスク評価と管理」
(期間 平成13～14年度)

プロジェクト責任者：森田昌敏
プロジェクト幹事：森田昌敏
報告書編集担当：森田昌敏

序

本報告書は、平成13～17年度の5カ年の予定で実施されている重点特別研究プロジェクト『内分泌かく乱化学物質及びダイオキシン類のリスク評価と管理』の平成13～14年度、前期2年間の研究成果を取りまとめたものです。研究半ばではありますが、中間報告としてこれまでの研究過程とその成果を公表することで、今後の研究を展開するための貴重なご意見を各方面よりいただけることを期待しています。

環境ホルモンが原因と考えられる野生生物の異変や人への健康影響の問題は、我が国では1996年ごろからにわかに社会的な関心を集め、さまざまな調査研究が開始されました。しかし、人への影響や生態系への環境ホルモン作用の影響に関して、その原因物質が必ずしも特定されていないのが現状であります。環境汚染の状況を知ると共に、化学物質と影響の因果関係を明らかとすることが本問題を正しく認識する上で最も重要な点であります。またダイオキシンについては、その影響の徴候を知る手法の開発や対策型の研究が急がれています。このような背景から、微量の化学物質汚染のリスクを評価し、汚染や悪影響の未然防止、そして、汚染の修復等の対策にいたるまで、総合的な研究アプローチをもって研究を展開することをしてきました。

本研究では、4つの主要な柱 1) 内分泌攪乱化学物質・ダイオキシン類の計測法及び生物検定法の開発、2) 内分泌攪乱化学物質・ダイオキシン類の環境動態の解明、3) 内分泌攪乱化学物質のヒトの健康及び野生生物に及ぼす影響に関する研究、4) 内分泌攪乱化学物質・ダイオキシン類の対策技術手法の開発を設定し、総合的に研究を実施してきました。計測法の開発では、イオントラップ質量分析法、負イオン化学イオン化法、液体クロマトグラム質量分析法や免疫化学的測定法を導入し、超微量成分を精度よくしかも簡単に測定できる手法を開発しました。評価法の開発では、*in vitro*の評価系として、受容体結合試験法、酵母two hybridアッセイ法を*in vivo*の評価系として魚類を用いて、バイオマーカー遺伝子やタンパクを計測する試験系を構築しました。また、エストロゲン作用を中心にこれら新たに開発した試験法の適用を試み、環境中における内分泌攪乱物質の分布の状況、生物や底質への移行の状況を解明すると共に、我が国の水域環境におけるホルモン作用の環境挙動について特に霞ヶ浦と東京湾を中心に調査してきています。ヒトの健康および野生生物への影響の研究では、微量ダイオキシンにより誘導されるヒトの曝露指標の開発、臭素化ダイオキシン類による生体影響やビスフェノールAの脳神経系への影響の把握、また、巻貝、魚、鳥類における環境ホルモンの影響についてフィールドを中心とした研究を行ってきました。さらに対策技術・手法の研究としては、生物を用いたあるいは化学プロセスによる分解処理技術に関する研究を行うと共に、情報技術を駆使した総合情報システムの開発研究を行い、コンピューターを用いた暴露や影響評価手法を開発しています。また関連化学物質の物理化学的性状や作用に関わるデータベースの作製を行ってきました。

研究成果の一部は、内分泌攪乱化学物質の実態を解明するための新たな研究手段として、すでにいくつかの研究機関や調査機関で実際に利用され始めています。今後とも、本研究成果が環境中での内分泌攪乱化学物質の挙動解明、影響評価、および対策を進める上で関連する方々のお役に立つならば、幸いとするところであります。

おわりに、研究を進める上で、大学、自治体や民間研究機関の方々に多くのご協力とご助言を頂きました。ここに深く感謝の意を表する次第であります。

平成 15 年11月

独立行政法人 国立環境研究所
理事長 合 志 陽 一

目 次

1 研究の目的と経緯	1
1.1 研究の目的	1
1.2 研究の構成	1
2 研究の成果	2
2.1 内分泌かく乱化学物質・ダイオキシン類の計測法および生物検定法	2
2.1.1 計測法の高度化	2
2.1.2 評価法（生物試験法）の高度化の研究	6
2.2 内分泌かく乱化学物質・ダイオキシン類の環境動態	11
2.2.1 女性ホルモン作用を示す物質群の環境動態	11
2.3 内分泌かく乱化学物質・ダイオキシン類のヒトの健康および野生生物に及ぼす影響に関する研究 ...	15
2.3.1 内分泌かく乱化学物質・ダイオキシン類のヒトの健康に及ぼす影響に関する研究	15
2.3.2 野生生物の生殖に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究	20
2.4 内分泌かく乱物質の対策技術・手法の開発.....	27
2.4.1 内分泌かく乱化学物質の分解処理技術に関する研究.....	27
2.4.2 化学物質のリスク評価の管理と評価のための統合情報システムに関する研究	30
2.4.3 内分泌かく乱化学物質データベース.....	35
2.5 国際共同研究	36
2.6 まとめ	36
引用文献	36
[資 料]	
研究の組織と研究課題の構成	39
1 研究の組織	39
2 研究課題と担当者	41
研究成果発表一覧	45
1 誌上発表（英文）	45
2 誌上発表（和文）	52
3 特 許	55

1 研究の目的と経緯

1.1 研究の目的

現代の我々の生活環境中にはきわめて多くの化学物質が存在しているが、その中に内分泌かく乱物質（Endocrine disruptors; 内分泌かく乱化学物質）と呼ばれる一群の化学物質がある。その影響として人に対しては女性の乳ガンや子宮内膜症の増加，男性の精子数の減少や精巣ガンの増加，あるいは学習能力等知能への悪影響が懸念され，また各種の野生生物において生殖機能障害が内分泌かく乱化学物質の暴露によって引き起こされている指摘がなされており，我が国においても，それらに対する的確なリスク評価と管理の手法に基づく総合的な環境対策の実施が社会的要請となっている。これに対応して，先端的な科学技術を活用して新たな計測手法を用いた問題物質の早期発見，それらの環境動態および環境影響評価，効果的な対策の総合化に関する研究を緊急に実施する必要がある。本重点特別研究プロジェクトでは，内分泌かく乱化学物質とダイオキシン類のリスク評価と管理の研究を行い，その成果の総合により，国民の健康リスクの評価および野生生物への影響の評価，的確な対策立案に資することを目的とする。

1.2 研究の構成

全体の構成は次ページに示されるものであり，その内容は以下の通りである。

内分泌かく乱化学物質およびダイオキシン類の総合的

対策をより高度に実施するため，(i) 高感度・迅速分析技術，高精度分析，一斉分析，簡易化，の各側面において，新規の実用試験法の提案を行い，(ii) 内分泌作用についての生物試験法を確立し，(iii) 環境動態について，特に環境中での分布，生物濃縮，分解性について定量的評価を提示する。また，(iv) ヒトおよび生態系への影響について，実験動物の発生生殖，脳行動，免疫系への影響評価や感受性要因について検討を行い，またヒトの生殖器や脳のMRIによる新たな影響解明技術の提案，野生生物の生殖異常に関するデータの拡充を行う。(v) いくつかの生物種について生殖異常の悪影響の状況を明らかとすると共に，霞ヶ浦，東京湾の2つの場について物質汚染の状況，および生物影響の状況を明らかとする。(vi) 処理技術について，汚染土壌の生物利用分解プロセスを用いた処理システムの適用可能性を確立し，(vii) 未知の関連物質の探索を行うと共に，特に臭素系ダイオキシン類について，分析技術の提案と初期リスク評価を実施する。(viii) 最後に，モニタリングデータ，環境動態，影響評価等の各情報を統合化する情報管理・予測システム，の検討を行い，各個別のリスク評価の統合化評価のためのデータベース等の可能性を提案するとともに，リスク管理のためのシステムの手法を提示する。また合わせて内分泌かく乱物質情報データベース化を行い国内外からの利用に供する。

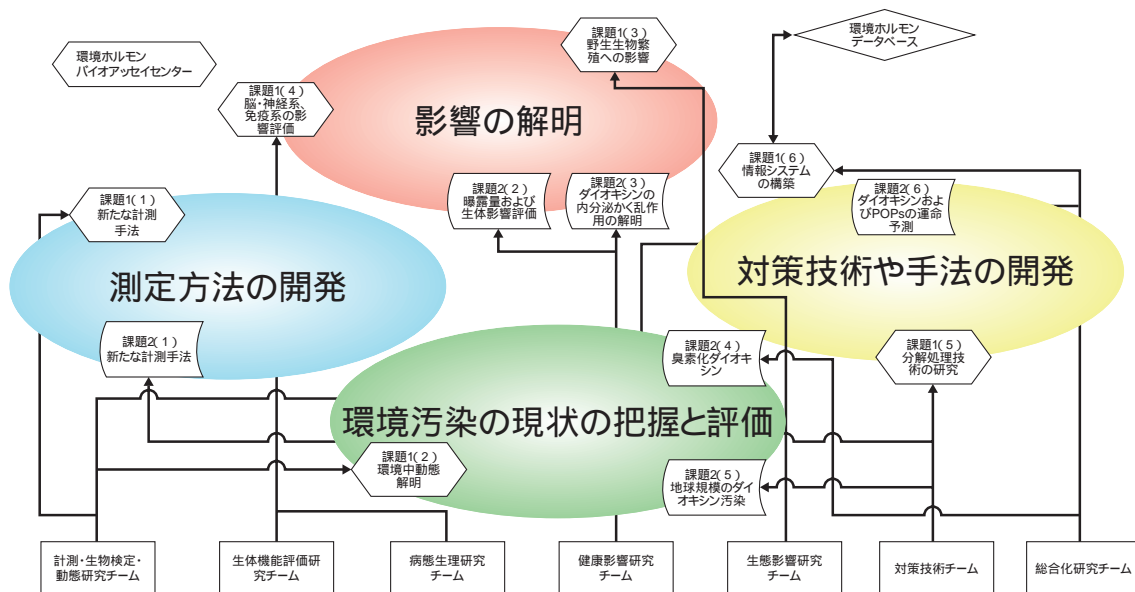


図1 内分泌かく乱化学物質およびダイオキシン類のリスク評価と管理

2 研究の成果

2.1 内分泌かく乱化学物質・ダイオキシン類の計測法および生物検定法

内分泌かく乱化学物質を同定、定量するための新しい分析手法を開発するとともに、内分泌かく乱化学物質の活性を評価するための生物試験法を開発する。これをもとに、内分泌かく乱化学物質の環境調査を行い、環境媒体のホルモン活性と内分泌かく乱化学物質の濃度の関係を明らかにする。未知物質による活性が疑われる場合には、化学物質を同定し、その起源を明らかにする。調査結果や生物検定結果をデ-タベ-ス化し、簡便に検索可能なシステムとして一般に公開する。また、ダイオキシン類については、特別措置法により発生源対策がすすみつつあるが、より効率よく対策をすすめる上で必要な新しい測定法およびリスク再評価にむけてのバイオマーカーの検出法の開発をする。

2.1.1 計測法の高度化

環境省SPEED98' に示された内分泌かく乱物質候補物質としては65物質(群)があり、これらの多くはサンプリング、抽出、クリーンアップを経てガスクロマトグラフ質量分析法で分析されている。本研究では、これらの一般分析法では困難な物質の測定について新たな分析法

の開発を行った。物質としては、エストロゲン作用をもち、かつ高感度分析を必要とするビスフェノールA、ノニルフェノール、エストラジオールと、その関連物質、ダイオキシンおよびその関連物質などがあり、および構造未知のホルモン様化合物の探索である。新たな分析手法として開発した方法を取りまとめると以下の通りである(表1)。また、これらの方法のいくつかは、環境省の全国モニタリングに取り入れられていった。いくつかの個別の分析法例をさらに詳しく記述する。

(1) 負イオン化学イオン化質量分析法によるエストラジオール類の分析

負イオン化質量分析法は、電子親和性の高い化合物を効率よくかつ特異的にイオン化し、検出する方法である。ステロイドホルモン等は、電子親和性の官能器をもたないが、フェノールや、水酸基をもつため、ペンタフルオロベンジル化による誘導体化により、電子親和性をもち、高感度検出が可能となる。

エストラジオール、エストロン、エチニルエストラジオールなどを、固相抽出法により、水より抽出した後、臭化ペンタフルオロジンジル/18 クラウン 6 エーテル

表1 内分泌攪乱化学物質・ダイオキシン類の化学分析法の開発およびその主要研究成果

分析法	応用目的	開発ポイント	主要な成果
GC/MS (低分解能MS)	ダイオキシン分析の簡易化	分析システムの最適化	発生源監視用としての有用性の確立 環境省法として告示へ
GC/MS (高分解能MS)	ダイオキシン分析の簡易化、高感度化	選択的吸着剤の利用 大量注入法の導入	・ブルーキチン利用による生物試料分析の簡易化 ・人血10mlでの分析を可能 ・人尿中のビスフェノールAの測定
GC/MS (高分解能MS)	人尿中のビスフェノールAの分析	前処理法の開発	・正確な天然エストロゲン量の把握
GC/MS (")	水中エストラジオールの分析	前処理法の開発、高感度化	・人体脂肪から初めて臭素化ダイオキシンを検出
GC/MS (高分解能MS)	臭素化ダイオキシン分析	クリーンアップの最適化、高感度イオン源の利用	・底質中の臭素化ダイオキシンの時系列的分布の解明
GC/MS (負イオン化)	負イオンによる選択的高感度検出	分析システムの最適化	環境水中のエストラジオールの高感度分析
LC/ECD	定電位電解による選択的高感度検出	オンラインシステムの最適化	水中のビスフェノールA等の簡易分析に成功
LC/MS	不揮発性環境ホルモンの選択的高感度検出・定量	分離およびイオン化の最適化	・エストラジオール代謝物の定量に成功 ・ノニルフェノールエトキシノートとその分解物・代謝物の定量に成功
LC/NMR	環境ホルモン類の定性	分離システムの最適化	フタル酸エステル等標準物質の分析法
MRI	脳機能の機能への影響解明	システムの最適化	脳の構造、脳内物質の同定、定量

により、ペンタフルオロベンジル化し、さらに残基の水酸基をトリメチルシリルイミダゾールを用いて、トリメチルシリル化することにより、安定したガスクロマトグラフが得られた。イオン化源としてメタンを用いた負イオンモードで選択イオン検出により、エストラジオールの検出下限0.1ppt (ng/l) が達成された。なお、精度よく分析するために、重水素ラベルしたエストラジオールをサロゲートとした同位体希釈分析法となっている。一般環境水中のエストラジオールの濃度は、当所想定されたよりも低く多くの場合 1 ppt以下であるので、本法によりはじめて正確な値として測定できるようになった。

(2) LC/MS/MSを用いた環境水中エストラジオールおよび抱合体の分析法の開発

環境中のエストラジオールの評価には、抱合されていないフリー体のエストラジオール類だけでなくグルクロン酸および硫酸抱合体の情報も必要であることが明らかとなってきた。このためにこれらの一斉分析を検討した。

本研究で対象とした物質は、17b-エストラジオール (17b-estradiol, b-E2), 17a-エストラジオール (17a-estradiol, 17a-E2), エストロン (E1), エストリオール (E3), およびその硫酸またはグルクロン酸抱合体 (E2-3-Sulfate, E2-3-Glucuronide, E2-17-Glucuronide, E-2-3,17-Disulfate, E2-3-Sulfate-17-Glucuronide, E2-3-Glucuronide-3-Sulfate, E1-3-Sulfate, E2-3-Glucuronide, E3-3-Sulfate, E3-3-Glucuronide), エチニルエストラジオール (EE2) の計 15化合物である。試水 1 l に酢酸を加えて pH 3.5 に調整した後 4 種のサロゲート物質 (E2-d3, E1-d4, E2-3S-d4, E1-3S-d4) を 1 ng (10 pg/μl × 100 μl) 添加し、固相抽出カラム (Shodex SPEC EDS-1) に通水した。通水後の固相カラムは 1 時間吸引して脱水し、酢酸エチル 6 ml でフリー体画分を、5 mM トリエチルアミン / メタノール 10 ml で抱合体画分を溶出させた。フリー体画分については、フロリジルカラム (Bond Elut FL, Varian) を用いて精製した。それぞれの溶出液は窒素ガスによる濃縮後、HPLC/MS/MSにより分析を行った。質量分析計は、Quattro Ultima (Micromass, UK) を用い、キャピラリー電圧 3.0 kV, コーン電圧 80 V, コリジョン電圧 40 V, 負イオンモードのエレクトロスプレーイオン化法 ESI で分析を行った。HPLC, カラムは Xterra MS-C18 (1 mm i.d. × 150 mm, 3.5 μm, Waters) を用い、移動相 A: 20 mM トリエ

チルアミン水溶液, 移動相 B: 20 mM トリエチルアミン / アセトニトリルとして, 移動相 B を 0% から 50% まで 12 分で直線グラジエント, その後 5 分間保持した。

分析操作全体を通じた回収率は, 1 l の Milli-Q および 霞ヶ浦湖水に 10 ng の標準物質を添加した場合でいずれの物質についても 75% を超えていた。霞ヶ浦湖水に添加した際の回収率は 57 ~ 116% だった。E3-3S および E2-3S17G の回収率はそれぞれ 57 および 69% と低かったが, 相対標準偏差が低かった (5.1 および 9.6%) ことから, 定量的な分析ができているものと判断した。また, 分析上の定量下限値 (MDL) は, 試水 1 l を分析に用いた場合 0.11 ~ 3.1 ng/l となった。この結果, LC-ESI (-) / MS/MS によってフリー体および抱合体を一度に分析方法を確立することができた。

本法を環境水の分析に適用して得られた濃度はすべてサロゲート物質の回収率で補正した (E2-d3 は b-E2, a-E2, EE2 を, E1-d4 は E1 を, E2-3S-d4 は E2-3S, E2-3G, E2-17G, E2-3S17G, E2-3G17S, E2-3,17diS を, E1-3S-d4 は E1-3S, E1-3G をそれぞれ補正した)。E1-3S および E2-3S は, 下水処理法流水, 河川水, 湖水中に検出限界未満 ~ 2.2 ng/l で検出されたが, グルクロン酸抱合体はすべて検出限界未満だった。グルクロンニダーゼ処理により, エストラジオール濃度に変化が見られないという間接的な測定から, 環境水中ではグルクロン酸抱合体は検出限界未満であったという報告と一致している。一方で, 生体試料中にはグルクロン酸抱合体が大部分を占め, ヒトの尿, 血漿, 羊水中では E3-16G が最も優占的であるとされる。下水処理放流水中には, 硫酸抱合体とフリー体が検出されたが, グルクロン酸抱合体は検出されなかった。このことは, グルクロン酸抱合体は下水処理過程で脱抱合され, フリーのエストロゲンを生成していることを示唆している。

(3) 液体クロマトグラフ一定電位電解検出を用いた水中ビスフェノール A の測定法

ボルタンメトリーを用いた検出方法はフェノール等のような化合物の選択的検出に有利な方法であり, 液体クロマトグラフの一手法である。環境中のビスフェノールの濃度は 1 ppb あるいは, それ以下であり, その検出のためには濃縮が必要である。液体クロマトグラフにおいてカラムスイッチング法と呼ばれる自動濃縮が可能であり, これと電気化学的検出の選択性を加えることにより,

高感度の測定が期待される。

環境水50mlを濃縮カラム(C₁₈シリカゲル又はインプリントポリマー)に通液し、高圧流路の切替により、HPLC系に流して分析を行った。本法による分析下限は0.35ng/lに達した。なお、純水製造装置から得られた水中ビスフェノールAの濃度は2~10ng/lと高く、実験途上の汚染に留意すべきことが明らかとなった。併せて行った霞ヶ浦、および利根川の水系の水分析の結果は4~70ng/lの濃度を示している。

(4) 人尿中のビスフェノールAの分析法

環境ホルモンの人体曝露を推定する上で尿の分析は重要である。ビスフェノールAは低投与量(1µg/kg・体重)で影響がでるとの報告があり、低用量問題として論議を呼んでいる物質であるが、その人体曝露を知る上で、尿の分析は意義がある。ビスフェノールAは体内で代謝をうけグルクロン酸抱合および硫酸抱合をうけて尿中に排泄されるため、これらの形態のビスフェノールAを合わせて測定する必要がある。分析法としては、グルクロニダーゼおよび(又は)スルファターゼにより、抱合体をもとのビスフェノールAに戻し、これを有機溶媒(ジクロルメタン)により、抽出した後、クロマトグラフにより精製し、トリメチル化シリル化剤で誘導体化し、GC/MSにより測定した。測定下限は0.1µg/lであり、分析の下限を決定したのは、分析途上の汚染であった。ビスフェノールAは実験室や実験器具の各所に存在し汚染を最小化することができればさらに高感度で測定することは可能であった。

(5) ダイオキシン類の簡易分析法の開発

低価格の低分解能質量分析計(LRMS)を用いて、感度不足を大量注入法(SCLV)によって補うことにより低コストの分析を可能とすることを目標とした。GCには、Hewlett Packard社製HP6890を用い、SCLV(Solvent Cut Large Volume) Injection System(SGE Japan社製)を装着した。プレカラムおよび分析カラムにはそれぞれSGE社製BPX5(長さ7m、内径0.25mm、膜厚0.25µm)およびBPX5(長さ30m、内径0.15mm、膜厚0.25µm)を用いた。質量分析計は、日本電子製JMS-GCmate IIを用い、分解能500又は3,000にて測定を行った。検討用の試料には、焼却場の排ガス試料を用いた。ダイオキシン類の測定に対してLRMSを用いる場合に注意すべき点は、

SIMクロマトグラムにおける内標準物質、夾雑物、カラム液相等の影響(妨害)である。図2に5塩素化フランと5塩素化ダイオキシンの検量線用データのクロマトグラム部分拡大図(23478-PeCDFと12378-PeCDDの溶出時間付近)を示す。

Native PeCDF/PeCDDは0.1pg/µl、¹³CラベルPeCDF/PeCDDは1pg/µlである。12378-PeCDDのM(m/z353.868、図2中4段目)およびM+2(m/z355.855図2中5段目)のピーク近傍に¹³C-23478-PeCDFのM+4およびM+6が現れている。4~8塩素化ダイオキシンのすべてにおいて同様の影響があるので、試料測定前段階として、それぞれの溶出時間を確認した。また、今回用いた排ガス試料のように、十分なクリーンアップが行われており、ある程度濃度が高い場合には夾雑物の影響は見られなかった。BPX5を用いた今回の系において分解能500ではカラム液相由来と考えられる妨害ピークが見られたが、分解能3,000においては見られなかった。大量注入システムを用いて5µl注入を行った場合の本装置の検出下限(0.1pg/µl標準液の5回繰り返し測定値の標準偏差より求めた)は0.05~0.3pgの範囲であった。排ガス試料を6

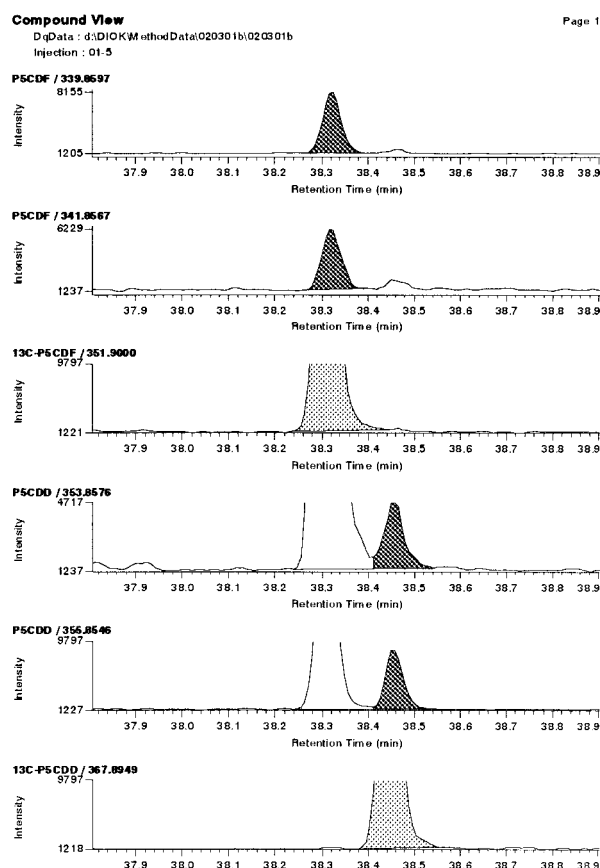


図2 5塩素化フラン・ダイオキシンのSIMクロマトグラム(部分拡大)

回繰返し測定した際の定量値の変動係数は最大でも3.8%とばらつきは少なかった。大量注入法を用いてイオン信号強度を増加させることにより、クロマトグラムのピークの安定性と再現性が向上したものと考えられる。本結果のTotal (PCDDs+PCDFs) TEQは、GC/HRMS (JMS-700D) より得られた値と6.8%の差であり良い一致を示しており、十分な精度をもつことが明らかとなった。

(6) ヒト血液中ダイオキシン測定における少量化に関する研究

血液はダイオキシン含量が少ないことから、その調査において試料量として全血約50g (血清25g) が必要とされる。実際の試料採取 (採血) において、二重測定を含め約100gの採血が行われているのが現状である。血液を試料とする調査において、採血量を減らすことができれば被験者の負担が軽減され、また事前採血が不必要になるなど利点は大きい。そこで、1回に使用する分析試料量を全血10g (血清5g) として測定可能にするために、アットカラム濃縮大量導入 (ALV) を用いた測定方法の確立を試みた。

国立環境研究所の標準血清を用いて、血清5gでの測定を行った。抽出脂質含有量は $n = 3$ で0.45%であり、RSDは1%未満であり、脂肪量測定に際して問題ないことが分かった。またPCDD/PCDFのいずれの同族体においても5mlで測定可能であり、トータルTEQについてRSDも10%未満と精度良く分析できることが明らかとなった。

(7) 臭素化ダイオキシン類、臭素化難燃剤 (PBDE) の分析法の開発

臭素化難燃剤 (BFRs) とその副産物として臭素化ダイオキシン類 (PBDD/Fs) による環境汚染が懸念されている。PBDD/Fsはしばしば臭素化ジフェニールエーテル (PBDE)、4臭素化ビスフェノールA (TBBPA) のような臭素化難燃剤の生産工程、または難燃剤を含む製品の焼却によって生成される。PBDD/Fsは塩素化ダイオキシン類 (PCDD/Fs) のように平面構造を有しながら、より高分子量、高沸点、低蒸気圧、低水溶性を持つなどの物理・化学的性質のために既存のPCDD/Fs分析法に用いた条件と異なることが予想される。しかもPBDD/Fsの分析にはPBDEとの完全な分離が不可欠であるために高分解

能GC/MS運用はもちろん、前処理においてもできるだけ分離が必要とされる。

既存のPCDD/Fsに用いたカラムクリーンアップ方法を基に分画試験を行い、さらにフロリジルカラムクリーンナップも加え、多層シリカゲル・フロリジル・活性炭という組み合わせを構築した。試料としては沿岸部3ヵ所から採取された底質を10g用いた。¹³C-PBDD/Fsおよび¹³C-PBDEsを添加した底質試料をトルエンによるソックスレー抽出後、分画試験条件に従って多層シリカ・フロリジル・銅カラム・活性炭カラムクリーンナップを行った。光分解を防ぐために試料のすべての前処理は遮光下で行った。定性、定量はHRGC-HRMS (HP6890-JEOL JMS700K) でSIM-EI法、分解能>12,000で行った。キャピラリーカラムはDB5-HT (30m, 0.25mm i.d., 0.1μm) を用い、ピークの定量はDioK (日本電子) で行った。

3つの底質試料の分析結果、2つはフロリジルカラムクリーンナップ後のPBDEおよびPBDD/F画分が妨害マトリクスによって十分にシャープなクロマトグラムが得られず、それぞれ活性炭カラムクリーンナップを行った。回収率は55~75%の範囲であり、標準物質を用いた分画試験より下回った。全試料からPBDEsが検出され、その濃度範囲は62~1310 pg/g dry wtであった。3臭素化合物から7臭素化合物まで検出されたが、試料によって主要な異性体は異なった。2378-PBDD/Fsは一部の試料から検出された。本研究で検討した分画条件を環境試料に応用したところ、PBDE異性体の中で濃度が比較的高いBDE 47 (22'44'-Te BDE) のようなものはわずかながらPBDD/F画分に残留することが確認された。SIM-EI法を用いたGC/MS測定中に生成するPBDEとPBDFのフラグメントイオンはほとんど区別ができないため、保持時間と測定チャンネルの組み合わせで解決するしかない。しかしながら、現在入手できる異性体は限られており、非2378-臭素置換体の同定はまだ不可能である。今後も様々な環境試料に対する分析最適化のための工夫を重ねて行かなければならないことが明らかとなった。

(8) 核磁気共鳴分析法 (NMR) を用いた未知内分泌かく乱化学物質分析の同定

1) NMRを用いたBPA中の不純物の同定とエストロゲン活性

BPAがエストロゲン活性を持つことは周知の事実であるが、低用量での作用については試験の再現性に問題が

指摘されるなど科学的な評価が困難な物質である。BPAはアセトンとフェノールの縮合により合成され、理論的には2,2-BPA, 2,4-BPA, 2,3-BPAの構造異性体をはじめ縮合がさらに進んだトリフェノール体などの不純物が存在すると予想されるが、不純物についての分析例はほとんど報告されていない。市販のBPA (Aldrich Co. Purity 97%) 1048 mgをHPLCで分画して、フラクションF1~F7に分画した。各フラクションの乾燥重量(五酸化リン存在下, 真空デシケーターで24時間乾燥)はF1 (1.9 mg; 0.18%), F2 (5.6 mg; 0.53%), F3 (989 mg; 94.4%), F4 (36.5 mg; 3.48%), F5 (<0.1 mg; <0.01%), F6 (<0.1 mg; <0.01%), F7 (1.1 mg; 1.06%)であり、回収率は99.7%であった。各フラクションに主に含まれる不純物7種についてNMR, GC-HRMSを用いて同定した(Table 1)。4,4'-BPAはF3にのみ認められた。不純物には2,4'-BPA, 2,2'-BPA, BPAにさらにアセトンとフェノールが縮合したトリフェノール体, フェノールにアセトンが2分子縮合したものなど, BPAの合成法から予想される化合物が主なものであった。単品が入手困難なため, 各フラクションを0.5 mg/mlとなるように溶解し, これを試料として, 酵母ツーハイブリッドアッセイによるエストロゲン活性, およびER-ELISAキット(TOYOBO)によるエストロゲンレセプター親和性を調べた。酵母ツーハイブリッドアッセイによるエストロゲン活性(ECx10)は, F6 (<65 ng/ml), F5 (<173 ng/ml), F4 (581 ng/ml), F2 (1353 ng/ml), F7 (1411 ng/ml), F3 (1968 ng/ml), F1 (>5000 ng/ml)の順序となった。各フラクションの相対活性は, F3 (86.7%), F4 (10.9%), F7 (1.4%), F2 (0.7%), F6 (0.3%), F5 (0.1%)となり, エストロゲン活性に対するF3以外の寄与が13.3%に上ることが明らかになった。また, エストロゲンレセプター親和性の強さは, IC50を用いて比較したところF5 (<21 ng/ml), F6 (<73 ng/ml), F2 (365 ng/ml), F4 (465 ng/ml), F3 (491 ng/ml), F7 (1446 ng/ml), F1 (8057 ng/ml)の順序となり, また, エストロゲンレセプター親和性に関するF3以外の寄与は5.1%であった。特にF5(含有成分: 2,4,4トリフェノール体)とF6(含有成分: Cumylphenol (約50%))はF3(主成分: PBA)と比較し10倍以上の比活性を示した。不純物として同定されたものの中で単品が入手可能なhydroxyacetophenoneは, 酵母ツーハイブリッドアッセイによるエストロゲン活性は認められず, CumylphenolのEc_x10値は, 1400ng/ml であっ

たためエストロゲン活性の原因物質ではないことが確認されている。また, 他の不純物は合成ができ次第, エストロゲン活性を評価する予定である。まだ同定されていないピークが存在することから, さらに同定を進め, 実験操作や他ロットでの再現性を確認しつつ, 高いエストロゲン活性を示す不純物の有無を慎重に検討する予定である。

2) NMRを用いたヒメタニシ中の甲状腺ホルモン様物質の同定

霞ヶ浦のヒメタニシに性比の異常が認められるという報告がある。霞ヶ浦湖水のエストロゲン活性はE2で1 ppt以下であり, 酵母ツーハイブリッドアッセイでエストロゲン活性がほとんど検出されないなど, エストロゲン作用からはこの報告を説明できないことが示されている。そこで, 他の原因を追求するため, 新たに構築した甲状腺ホルモンアッセイ法を応用した。湖水には甲状腺ホルモン活性が認められないものの, ヒメタニシ抽出物からはT3やT4以外と思われる甲状腺ホルモン活性が認められた。NMRを用い活性物質の同定を検討することとした。活性物質はヒメタニシよりメタノールにより抽出される。活性物質は, HPLC(カラム: 流速: , 溶離液A (0.1%炭酸アンモニウムpH9.0/メタノール; 50/50)と溶離液B(メタノール100%)のグラジエント(B; 0 100%, 0 40分)で, 20~25 minに溶出した。酵母ツーハイブリッドアッセイによると, この物質の甲状腺ホルモン活性はT3の10倍から100倍の活性があると推定され, ¹H NMRスペクトルからreverseT3構造を有すると推定されている。現在精製中であるが, 本物質は極めて微量(μg)であるため, 合成により確認するための検討を行っている。

2.1.2 評価法(生物試験法)の高度化の研究

内分泌かく乱作用の評価法(生物試験法)は, 化学物質のハザード評価の上でもまた環境の状況の評価の上での基本的なものである。このような評価法としては, プレスクリーニング試験, スクリーニング試験, 確定試験と階層的に用いることが実践的である。すなわち価格が安く迅速に結果が出る*in vitro*の手法によりプレスクリーニングを行い, ついでその陽性を示すものに対して動物本体を用いた*in vitro*試験によりスクリーニングを行い, さらに少数にしばられた物質について, 時間とコストのかかる2世代試験等により確定させるというアプローチ

である。一般的にその費用はプレスクリーニング試験で1検体あたり数万円、スクリーニング試験で数十万円、確定試験で数百万円であり、このような階層的な検査システムを用いなければならない理由となっている。

本プロジェクトにおいて、このような生物試験法について、その確立にむけて努力してきた。試みられ、利用可能となった手法は以下の表2に示すものであり、使用目的に応じて使い分けることとした。いくつかの試験法開発については以下にやや詳しく記述する。

(1) 遺伝子組み換え酵母を用いた内分泌かく乱化学物質アッセイ法の開発

1) 酵母Two-Hybrid法の拡張

酵母Two-Hybrid法によりアンドロゲン受容体と甲状腺ホルモン受容体を導入した酵母の開発を行い、それぞれアッセイ系の構築を行った。特にラット甲状腺ホルモン受容体 (rTR) を導入した酵母を用いて300物質のスクリーニングを実施したところ、T3およびT4以外にアンタゴニスト活性を示す化学物質が8種類検出された。

2) エストロゲン受容体の種間およびサブタイプ間の感受性

脊椎動物のエストロゲン受容体遺伝子の相同性は比較的高いと考えられているが、メダカに対してアルキルフェノール類が比較的強いエストロゲン活性を示すことや、*in vitro*結合試験においてヒトエストロゲン受容体 (hER) と比較してメダカER (mER) はアルキルフェノールに対して強く結合することが報告されているなど、内分泌かく乱化学物質のエストロゲン作用に種間差のあることが示唆されている。機能については不明な点が多いが生体内には同一リガンドに対する受容体のサブタイプがいくつかの存在することが報告されている。例えば、メダカでは3つのエストロゲン受容体 (mER₁, mER₂, mER₃) が知られており、サブタイプ間でも感受性に差があることが予測されている。そこで、メダカ、ゼブラフィッシュ、ファットヘッドミノウなどの試験魚やウズラなどの試験生物のERの受容体結合部位をTwo-Hybrid Assay系に導入し、種間差を*in vitro*で評価できるシステムを構築している。メダカERの受容体結合部位、および (ヒトERの247番目のアミノ酸より下流に相当する領域) を酵母Two-Hybrid Assay系に導入し、それぞれについてマイクロプレート法と化学発光測定法を組み合わせた迅速・簡便なアッセイ系の構築を行

表2 内分泌攪乱化学物質の生物試験法

	試験系	生物又はリセプター	ホルモン作用	検出系
プレスクリーニング試験 (<i>in vitro</i>)	Receptor結合 / ELISA	ヒト - E R , E R ヒト - A R	エストロゲン アンドロゲン	UV / 蛍光
	Receptor結合 / 蛍光偏光解消	ヒト - E R	エストロゲン	蛍光 (リアルタイム)
	Receptor Gene Assay / Two Hybrid酵母	ヒト - E R	エストロゲン	化学発光 / 吸光
	Receptor Gene Assay / Two Hybrid酵母	ヒト - A R	アンドロゲン	化学発光 / 吸光
	Receptor Gene Assay / Two Hybrid酵母	ヒト - T H R	甲状腺ホルモン	化学発光 / 吸光
	Receptor Gene Assay / Two Hybrid酵母	メダカ - E R	エストロゲン	化学発光 / 吸光
	細胞増殖	MCF-7 (乳ガン細胞)	エストロゲン	細胞増殖数カウント
スクリーニング試験 (<i>in vitro</i>)	遺伝子発現	マウス ウズラ, ニワトリ M C F - 7	エストロゲン エストロゲン エストロゲン	PCR/N P/WP PCR/N P/WP PCR/N P/WP
	タンパク発現	メダカ	エストロゲン	ELISA (ビテロゲニン)
	子宮重量増加法	ラット	エストロゲン	子宮病理変化
	Hershberger試験法	ラット	アンドロゲン	精巣, 病理変化
	脳投与試験	マウス	神経ホルモン	運動性 (行動)
	母体投与試験	マウス	神経ホルモン	運動性 (行動)
	変態形態異常	アフリカツメガエル	甲状腺ホルモン	病理変化
	形態異常	ヌカエビ, ミジンコ	エストロゲン	病理変化
確定試験 (<i>in vitro</i>)	パーシャルライフサイクル	メダカ	ビテロジェニン等	各種エンドポイント
	2世代試験	ラット	各種	各種エンドポイント

った。

mER 酵母のエストラジオール (E2) に対する感受性は、hER 酵母に比べて、約5分の1と低く、その他のエストラジオール関連物質にも同様に低い傾向があった。mER 導入株は多くの4-Alkylphenolに対してhER 導入株より高いエストロゲン活性を示した。特に4-Nonylphenol, 4-t-Octylphenolに対して高いエストロゲン活性 (E2のエストロゲン活性を100とした時0.2以上) を示した。mER およびmER 導入株は試験したすべての4-Alkylphenolに対して低いエストロゲン活性 (0.05以下) を示した。これらのことから4-Alkylphenolのメダカに対するエストロゲン効果は、主にmER に依存していると考えられた。4-Alkylphenolに対して詳細な検討を行ったところ、4-Alkylphenolはalkyl基の主鎖の炭素数と側鎖の数に依存してmER に対するエストロゲン活性が変化することが示された。一方、他生物のERではmER でみられる程の活性の変化は観察されなかった。4-Alkylphenolに対する選択性の低さは、mER に特徴的であるといえる。Bisphenol A, B, Fを試験物質とし、エストロゲン活性を測定した。Bisphenol A, Fは試験に用いたすべてのERに対して弱いエストロゲン活性 (0.05以下) を示した。Bisphenol BはmER に対して比較的強い (0.11) エストロゲン活性を示した。

植物エストロゲンとされる物質のうち18種類についてmERを用いてエストロゲン活性を測定したところ、Genistein, Coumestrol, Biochanin A, Kaempferol, Apigenin, Equalに強いエストロゲン活性が認められた。alkylphenol類の場合と同様にERのサブタイプにより大きく活性が異なった。特にmER , mER はBiochanin A, Apigenin, Kaempferol, Equalに対してhER , hER より高いエストロゲン活性を示した。逆にmER はGenistein, Coumestrol, Equal以外に高い活性を示さなかった。

アルキルフェノールやエストラジオールについてはメダカの*in vivo*試験でも同様の傾向が認められており、生物種間の化学物質に対する感受性の違いはERの活性に依存する可能性が示された。ヒメダカの3種類のERもそれぞれ化学物質に対して異なる活性を示していることから、各種ERの生体内での機能についてさらに検討する必要があること、また生態系への影響を評価するためにはヒト以外のER受容体を用いた化学物質のエストロゲン作用のスクリーニング試験も必要であることを示し

ている。

(2) その他の*in vitro*試験

ヒトのエストロゲンリセプター , およびアンドロゲンリセプターとの競合結合試験 (ELISA法) や蛍光偏光解消利用した競合結合試験を検討してきた。ELISA法は簡便であり、また、前項のツーハイブリッド法とも若干異なる情報を与えるため、並行活用している。蛍光偏光解消を利用した競合結合試験は、紫外部に強い吸収をもつ物質や蛍光を有する物質には適用が困難なことから実用性にやや欠けることが明らかとなった。MCF-7の増殖は、ヒト細胞という特性をもち、異なる意味で価値がある。

(3) 内分泌かく乱化学物質の魚類 (*in vivo*) 評価法の開発

1) メダカビテロゲニン遺伝子によるエストロゲン様化学物質の評価法

ビテロゲニン (VTG) は卵黄タンパク前駆体でありメス特異的に合成されるが、エストロゲン存在下ではオスでも合成が誘導される。この現象を利用して、魚類雄中のVTGタンパクの定量によるエストロゲン活性の評価法が検討されている。今回、我々はヒメダカの子 (vtg) の全長をクローニングし、その発現をリアルタイムRT-PCR法により定量することによって、短時間でエストロゲン様活性を評価することを試みた。さらにエストロゲンのアンタゴニスト活性の評価も検討した。メダカの雌メダカの肝臓からvtg遺伝子のクローニングを試み、5037塩基からなるvtg遺伝子のクローニングに成功した。クローニングしたメダカVTGを同じ魚類である*F. heterochitus*や*O. mykiss*のVTGとアミノ酸レベルで比較したところ、50%以上の相同性を示した。次に、E2曝露した雄メダカの肝臓におけるvtg遺伝子の発現を調べた。E2を10pt ~ 500ppt曝露した雄ヒメダカでは、血中のVTGタンパクが発現する (約12時間後) より早くvtg遺伝子の発現 (約3 ~ 6時間後) が観察された。エストロゲンのアゴニストである4-Nonylphenol (100, 500ppb), Bisphenol A (500, 1000ppb) の曝露では、それぞれ100ppb, 1000ppb以上の曝露区で24時間以内にvtg遺伝子の誘導が観察された。Tamoxifen (100, 500ppb) を用いたE2アンタゴニスト試験では、100ppbのタモキシフェン曝露によって100pptのE2曝露によるvtg遺伝子

の誘導が顕著に抑制された。以上の結果は、本法によりエストロゲンのアゴニストおよびアンタゴニスト活性を短期間に評価することが可能であることを示している。

2) 抗メダカピテロゲニンモノクローナル抗体の樹立

VTGの定量は一般的にELISA法によって行われているが、ELISA法には抗原に特異性の高い抗体が必要となる。そこで、一般的な試験魚であるメダカのVTGモノクローナル抗体を樹立しその特性を検討した。成魚雄メダカにエストラジオールを投与してVTG合成を誘導後、VTG各分を分離精製した。精製VTGをマウス(BALB/cメス6週齢)に免疫した。このマウスの脾臓細胞を使って、VTGモノクローナル抗体を産生する複数のハイブリドマを樹立した。得られたモノクローナル抗体を使ってウェスタンブロット解析を行った結果、これらの抗体はE2曝露雄あるいは産卵期の雌において血中に誘導されるピテロゲニンおよびその分解物と思われるいくつかのフラグメントと反応すること、また、すべてのモノクローナル抗体のエピトープがリポピテリンの重鎖(VTGのN末端約120kDa)に存在することが示された。これらのモノクローナル抗体を用いたメダカVTGの全自動ELISA法の開発は終了し、全自動化したことでプレート法に比べ大きな精度の向上が達成されている。

(4) メダカを用いた*in vivo*試験法の開発と応用

・メダカパーシャルライフサイクル試験

EE2, BPA, PCP, 2,4-DCP, E2, アミトロールの6物質についてのパーシャルライフサイクル試験を行った。各物質について、卵から3カ月の曝露試験を行い、成長、行動異常、生殖腺の発達、精巣卵の組織学的観察、ピテロジェニン測定などEE2およびBPA曝露個体において精巣卵が確認された。そのほかの化学物質においては、精巣卵は生成されなかった。

・メダカフルライフサイクル試験

本年度は1物質のみ、EE2のフルライフサイクル試験を行った。パーシャルライフサイクル試験の観察項目に加えて、曝露済み成魚の繁殖能力、マターナルトランスファーの影響などの観察を行った。

・メダカピテロジェニン測定法のバリデーション

メダカのピテロジェニン測定法について、その標準化を行った。

1) 環境研究で新たにVTG標準タンパクを作成し、それを日本中に配ることにより、メダカピテロジェニン

の測定が、日本中の研究所で同じ条件下で定量できるようにした。

2) 日本のVTGを測定できる5カ所の研究所に、未知のVTGタンパク質30種類と市販の2種類の測定キットを配り、それらの測定結果を分析することにより、各研究所間のデータのふれ幅および市販のキットの性能比較を行った。

3) メダカのVTGの測定を血液と肝臓で比較し、どちらで測定しても同様の結果が得られることを明らかにした。

・メダカ生殖腺の組織学的観察法の開発

連続縦断組織切片による生殖腺の観察法を開発し提案した。環境省の請負業務は今後すべて連続切片による観察を行うことに決定した(OECD technical workshopで発表済み)。

・メダカ性決定遺伝子を用いたメダカの遺伝的性および組織学的性、外見的性の比較を行った。EE2曝露下で外見的および組織学的性が雌であるにもかかわらず、遺伝的性が雄である個体が存在することを確認した。

(5) アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)を用いた試験法の開発と応用

FETAX試験(Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus)で急性毒性の基礎データを取る一方で、甲状腺機能かく乱を引き起こす可能性のある化学物質の検索のために、アフリカツメガエルを用いた変態アッセイXEMA(*Xenopus* Metamorphosis Assay)を中心に実施した。XEMAはOECDの両生類を用いた環境ホルモン影響試験(EDTA)のタスクフォースにてドイツより提案され各国(機関)間でリングテストを実施しようとしているものであり*Xenopus*のstage48-50という比較的幼若個体を用いて、28日間の試験物質曝露を行い、発達ステージの進行度合の遅延、促進を観察し、試験物質が*Xenopus*の変態過程に及ぼす影響をみる変態アッセイである。FETAXについては、Tetrachlorobisphenol A(TCBPA)、廃棄物処理場浸出水およびその処理水で実施した。TCBPAは、甲状腺ホルモンレセプター結合をみる酵母アッセイでアゴニスト作用が検出されている。XEMAについては、ドイツで提案されたマニュアルにいくつかの変更点を加え前年度より予備試験を開始しており、本年度はThyroxine(T4)をポジティブコントロール、TCBPAを被検物質として実施した。

TCBPA, 塩素化トリクロサン, 廃棄物処理場浸出水およびその処理水で実施した。TCBPAは30~1000ppbで試験を行ったところ, 1000ppbで奇形率が45%を示し, 影響が見られた。奇形パターンについては, 腸管の形態異常, 浮腫, 尾鰭の異常が高い傾向を示した。奇形率, 死亡率共に濃度依存性, および特徴的な奇形は見られなかった。塩素化トリクロサンは10~300ppbで試験を行ったところ, 300ppbでは全長にも影響がみられた。初期胚からの曝露では奇形も多様なパターンを示し, 物質特異的な特定奇形の頻発という現象はこれまでアッセイを行った化学物質からは観察されていない。

XEMAは, ドイツで提案されたプロトコールに簡便化のためのいくつかの変更点を加えて実施したが, 試験は基本的にstage 50の*Xenopus*幼生を曝露水槽(1曝露群: 7個体×4水槽)に入れ, 28日間の曝露を行い, 観察項目としては 発生stage, 体長(全長・頭長・尾長)についてそれぞれ曝露0, 14, 28日目に計測を行った。TCBPAは, 30, 100, 300 $\mu\text{g/l}$ を設定曝露濃度とし, T4(1 $\mu\text{g/l}$) をポジティブコントロールとした。そして, 発生stage, 体長測定の結果について28日間の曝露による各試験群間の差を中心に解析・検討を行った。試験に際しては, 試験物質の濃度減衰等を防ぐために滞留時間が7時間程度の半流水式の曝露装置を作成し, 曝露時の濃度変化を観察した。

XEMA結果では, 0, 14, 28日目に測定した全長, 尾長について, T4群においては, 28日目で変態に伴う体長縮退が観察された。発生stageについて, T4群においては14, 28日目に発生stageの促進が観察されたが, TCBPA群では発生stageの遅延, 促進は観察されなかった。

(6) 淡水無脊椎動物を用いた繁殖影響試験法

甲殻類のうちでヌカエビ(*Paratya compressa improvisa*, 十脚目, 遊泳亜目)を用いた試験

ヌカエビ抱卵メス個体(卵成熟), ならびに産仔後の幼生に内分泌かく乱化学物質として17- β -エストラジオールと甲殻類や昆虫の脱皮に影響を及ぼす- α -エクダイソンとその類縁化合物のポナステロンA(エクダイソンより活性の高い物質で植物エクダイソンの一つ), ならびに殺虫剤カルバリル(内分泌かく乱の疑いのある化学物質)の類縁化合物フェノブカルブ(それぞれ0.1~100 $\mu\text{g/l}$)をそれぞれ1週間曝露することで, 幼生の成長,

抱卵, 死亡など繁殖に及ぼす影響を検討した。まず, ヌカエビ抱卵メス個体に各薬剤を1週間曝露するとすべての濃度区で産仔された幼生のほとんどが30日以内に死亡した。生き残った個体が見られたのは17- β -エストラジオール(全濃度), - α -エクダイソン(100 $\mu\text{g/l}$)とポナステロンA(0.1, 1.0と100 $\mu\text{g/l}$)の各濃度区と対照区であった。- α -エクダイソンとポナステロンAでは, 生き残った個体も最初の成熟(抱卵メス個体の出現)までに要する日数が対照区に比べ長くなり成長が抑制された。

一方, 産仔後24時間以内の幼生に上記の薬剤を曝露すると幼生のほとんどが30~60日以内に死亡した。生き残った個体が見られたのは17- β -エストラジオール(全濃度), ポナステロンA(10と100 $\mu\text{g/l}$)とフェノブカルブ(1.0 $\mu\text{g/l}$ 以下)の各濃度区と対照区であった。ポナステロンAとフェノブカルブでは, 生き残った成体の性比(メス/オス)は, 対照の0.8に比べて1.6~5.5とメスの割合が高まった。最初の成熟までに要する日数は対照に比べポナステロンAで多く, フェノブカルブで少ない傾向がみられた。

チカイエカ(*Culex pipens molestus*)について孵化後24時間以内の1令幼虫に上記の内分泌かく乱化学物質を曝露し, その後の成長や産卵など繁殖に及ぼす影響を検討した。その結果, - α -エクダイソン(0.01~20 $\mu\text{g/l}$)では, 幼虫と蛹で死亡が見られたがメスの産卵塊数には影響が見られなかった。一方, ポナステロンAでは, メス1個体当たりの産卵塊数が各濃度区で0.2~0.7と対照区の0.8に比べて減少した。フェノブカルブでは, 10 $\mu\text{g/l}$ の濃度区で幼虫の死亡はみられないものの産卵塊数は対照の半分になった。0.1と1.0 $\mu\text{g/l}$ の濃度区では影響が見られなかったが, 100 $\mu\text{g/l}$ の濃度区では1令幼虫ですべて死亡した。

(7) ミジンコを用いた内分泌かく乱物質のスクリーニング・試験法開発

昆虫の幼若ホルモン様作用農薬であるフェノキシカルブ, ピリプロキシフェンの2物質では, 10~30 ng/l というきわめて低濃度で産仔数の低下が起き, 100 ng/l では, 試験環境下では通常すべてメスである仔虫中にオスが出現しはじめ, 300~1000 ng/l ではオスの割合はほぼ100%までに達することを明らかにした。なお, フェノキシカルブ曝露によるオス仔虫の出現は, ミジンコ科他属のミ

ジンコ (*Ceriodaphnia reticulata*, *C. dubia*, *Moina macrocopa*, *M. micrura*) においても確認された。またメトプレ (幼若ホルモン様農薬), ジュベニールホルモン (昆虫の幼若ホルモン), メチルファネソエート (エビ・かに類の幼若ホルモン) においても同様にミジンコがオス仔虫を産することを明らかにした。幼若ホルモン様物質以外の物質ではオス仔虫を産するものはなかった。

(8) その他

エストラジオールなどの女性ホルモンによる遺伝子の動きを検知するアプローチをいくつかの系 (マウス, ウズラ等) で試みている。今度の成果が期待される。

ウズラを用いた内分泌かく乱物質のスクリーニング・試験法開発

2.2 内分泌かく乱化学物質・ダイオキシン類の環境動態

内分泌かく乱物質 (ダイオキシンを含む) の環境中の分布, 蓄積, 消長等を知ることは, その影響を知る上で重要である。内分泌かく乱物質と呼ばれるものは数多くあり, その全体を完全に把握することは, 困難であり, 優先度の高い物質 (群) について生物影響の調査と並行しながら調査を行っている。雌性化作用を示す物質群 (ビスフェノール A, ノニルフェノール等), 雄性化を示す有機スズ化合物, 甲状腺ホルモン阻害を示す PCB, ダイオキシン関連化合物が中心となっている。

2.2.1 女性ホルモン作用を示す物質群の環境動態

水生生物の雌性化と関係して, エストラジオールと同様な分子構造を持つフェノール類が注目されている。この仲間で工業的な生産量の多いものはビスフェノール A, ノニルフェノール, オクチルフェノール等であり, また一方で, 人畜由来のエストラジオールおよびエストロン等関連女性ホルモンの寄与が大きいことが指摘されている。前章で記載された新たな分析法を用いることにより, これらの物質の分布の状況, 環境中での分解消失等を明らかとする研究を行った。

(1) 霞ヶ浦における女性ホルモン作用物質の分布と動態

霞ヶ浦の土浦入りから湖心にいたる 4 地点での湖水の測定を 1999 年 7 月から 2001 年 1 月まで GC/NCI-MS 法によ

り行った。湖心 (ST-9) のエストラジオール濃度は, 最大値が 0.58ng/l , 平均での $0.30 \pm 0.16\text{ng/l}$ であった。エストラジオールの濃度は, 河川や下水等の流入域 (ST-6,7) で散発的に 0.5ng/l を超えることがあったが, ほぼすべての測定において 1ng/l 未満であり, また季節的な濃度変動も 2 年間の観測期間で認められなかった。また GC/MS/MS 法により, ノニルフェノール, オクチルフェノールおよびビスフェノール A の分析を行った。ノニルフェノール, オクチルフェノールおよびビスフェノール A 濃度の平均値は, それぞれ $16.4 \pm 9.1\text{ng/l}$, $2.5 \pm 0.6\text{ng/l}$ および $11.1 \pm 9\text{ng/l}$ であった。これらの物質のエストラジオールに対する比活性は百分の一から千分の一であるため, これらの物質のエストロゲン活性に対する寄与は大きくないと考えられる。魚類の雌化の鋭敏な指標であるピテロゲニンアッセイで, E2 の閾値が 10ng/l 程度と報告されていることから, 今回の結果から, 霞ヶ浦湖水のエストロゲン活性は, 魚類に雌化を起こすレベルにはないと言えるだろう。なお, ワカサギの雄魚でピテロゲニンが認められた諏訪湖のエストロゲン活性は, 湖水の表層, 下層ともに霞ヶ浦と同等に, ほとんど活性はみとめられなかった。エストラジオール類も同様にきわめて微量しか検出されなかった。

(2) 都市河川における女性ホルモン様物質の分布と動態

多摩川などの下水放流水により流量の多い都市河川 (多摩川, 荒川, 中川および坂川などの都市河川中の 2000 年 10 月採水) では, エストラジオール濃度は $1 \sim 2\text{ng/l}$ と測定され, エストロン (E1) 濃度は 20ng/l を超える場合があった。GC/NCI-MS 法で測定された E1 および E2 の濃度から $E2 + E1 \times 0.15$ (0.15 は E1 の酵母アッセイでの比活性) より換算したエストロゲン活性と酵母アッセイによるエストロゲン活性 (E2 換算値) の相関を示した。酵母アッセイが低めの数値を与えているが, 良い相関があった ($y = 0.7984x - 0.5377$, $R^2 = 0.7927$)。下水処理場排水の ELISA 法による E1, E2 の測定を行った。測定された ELISA 法による E2 と E1 濃度から計算される活性は, 酵母アッセイによる総エストロゲン活性と近い値ではあったが, LC/MS/MS による確認を行ったところ, ELISA 法の E2 観測に 2 倍程度の高値が認められた。下水処理場排水のエストロゲン活性がすべて E2 関連物質によるものとは断定できないため, さらに, HPLC による分画を

行ったところ、E1画分にE1濃度から予想されるエストロゲン活性以上の活性が認められた。この結果は、他のエストロゲン活性物質の寄与を示唆しているが、原因物質の同定は、今後の課題である。

(3) エストラジオール関連物質の環境水中での分解性
環境中での化学物質の減衰に影響を及ぼす要因としては、光分解、塩素による分解、微生物分解などが考えられる。本研究では、主に環境水中で検出されたE1, E2, E1-3S, E2-3Sを対象物質とし、実際の環境中での分解速度がどのような要因により影響を受けるか評価を行ったので報告する。微生物分解試験は、それぞれの地点で採水した河川水および湖水にエストラジオール関連物質を添加し、現場で測定された水温に近い温度に設定したインキュベーター内に暗条件で静置して行った。試料は適当な時間間隔でピーカーから採水を行い、孔径0.2 μ mのメンブレンフィルターでろ過後、内部標準を加えてLC-MS-MSで分析を行った。環境水は、2002年6月に多摩川多摩川原橋および霞ヶ浦土浦ヨットハーバー付近で、8月に多摩川中流域7地点および多摩川に放流されている下水処理場放流水2試料を採水し、それぞれの試水について分解試験を行った。

E1, E2, E3については、速度に違いはあるものいずれも分解を受けて減衰することが確認された。半減期はE1が3日前後、E2は多摩川の水では3日、霞ヶ浦の水では12時間程度、E3は多摩川の水で10日、霞ヶ浦の水で3日だった。E2についてはその減衰とともにE1が生成することが確認されたが、他の物質については分解生成物について確認することはできなかった。未滅菌の環境水においてグルクロン酸抱合体(E1-3G, E2-3G, E3-3G)は、いずれも比較的すみやかに分解されてそれぞれE1, E2, E3を生成することが確認された。半減期は多摩川の水を使用した際にはE1-3G, E2-3G, E3-3Gいずれも約8時間前後、霞ヶ浦の水を使用した際には15時間程度であった。それに対し滅菌水中では、一部を除いて7日後も減衰が見られず、分解が微生物活動によるものであることを裏付ける結果が得られた。ただし、霞ヶ浦の水を用いた際には未滅菌水においても4日前後の半減期が観察された。これはおそらく操作中に混入した微生物による分解であろうと思われる。硫酸抱合体(E1-3S, E2-3S, E3-3S)は、未滅菌水中でも明確な減少は認められず、環境中でも安定して存在し続ける可能性が示唆さ

れた。霞ヶ浦の水を用いた際にはE2-3SおよびE3-3Sの分解が観察され、半減期は4日前後であった。多摩川の水では分解が観察できなかったのに対して霞ヶ浦の水では分解された原因としては、水中の微生物の質および量の違いによるものが考えられる。各地点の分解速度の半減期($t_{1/2}$)と標準寒天培地を用いて測定した生菌数との間に相関は認められなかった。各物質の光分解性について調べたところ、7日間の白色蛍光灯照射および5時間の太陽光照射では有意な減少は見られなかった。次亜塩素酸ナトリウムを用いたE2の塩素添加試験では、短時間(1時間)で女性ホルモン様活性が消失し、4-chloro-estradiol, 2,4-dichloro-estradiolおよび2,4-dichloro-estradiol-7-oneの生成が確認された。

(4) 東京湾におけるE2関連化合物, NP, OPおよびBPAの挙動

2002年夏に、予備的検討として、東京湾7地点の夏季の海水サンプルのエストロゲンの測定を行ったところE2, E1+E2, やhER 酵母によるエストロゲン活性は湾奥に近い表層水のみで0.3~0.7pptの活性が認められ、湾口や底層水ではエストロゲンの濃度はきわめて低く活性は認められないことが示された。そこで、2002年12月より、年変動を考慮するためサンプルポイントを東京湾全域をカバーするように選定した20地点において、年4回の表層水と底層水の採水を開始した。調査は開始されたばかりであるが、1回目の分析結果を表および各分析項目間の相関を図に示した。E2とE1+E2には非常によい相関が見られた。E2関連物質の濃度は、夏、冬ともに底層水(最大0.08ng/l)で低く、表層水(最大0.63ng/l)で高く、また、冬に高い傾向がうかがえた。2002年12月の測定値ではノニルフェノールとオクチルフェノールはよい相関関係が見られ、オクチルフェノールはノニルフェノールの1/10の濃度であった。これらも底層水(それぞれ最大24.8ng/l および2.86ng/l)で低く、表層水(それぞれ最大62.3ng/l および6.23ng/l)で高い傾向が見られた。また、E2関連物質とこれらのアルキルフェノールには相関関係が認められ、ともに下水道由来であることが示唆された。ビスフェノールAも、表層が高い傾向が見られるがE2関連物質との相関は必ずしもよくなく、他の進入経路の存在が示唆されている。E2関連物質の東京湾中の濃度は極めて微量であるため正確な解析は困難であるが、E2濃度はE2とE1との比(E1/E2)は湾奥から湾

hER- 酵母に比べてmER- 酵母に対して強く作用するエストロゲン・アゴニスト化学物質の存在が示された。メダカのエストロゲン受容体 導入酵母アッセイ系を用いることで、環境試料のエストロゲン活性が体内ホルモン（エストラジオール関連物質）によるものなのか、工業化学物質（アルキルフェノール類など）によるものなのか、を判定する一つの指標となり、さらには、生態系への影響を評価する上で重要であることが示唆された。

（7）東京湾底質中の臭素化ダイオキシンの分布

日本国内で使用されている代表的な臭素系難燃剤である臭素化ジフェニールエーテル（PBDE）の使用状況は1975年から1987年まで増加傾向は報告されているが、その後の推移は明らかでない。スウェーデン人の母乳の分析結果、PBDE は1972～1997年まで5年ごとに2倍ずつ急増すると報告された後、ヨーロッパやカナダ、アメリカなどで人体曝露の経年的推移に関する研究が行われ、いずれもPBDEの曝露量が増加傾向にあることが明らかとなった。しかし、PBDD/Fに関する経年的推移についてはほとんど報告例がなされていない。本研究では年代が測定されている東京湾のコア底質を用いてPBDEおよびPBDD/Fを分析し、経年的推移を考察した。

PBDEの分析結果、1905～1947年までは11～30.5 pg/g dry wtの範囲であったが、1954年頃から濃度が顕著に上昇し、1997年度の濃度は1962年度の10倍である405.5 pg/g dry wtまで増加していた。また、人体脂肪中のPBDE濃度の経年傾向³では、1970年より2000年度の濃度は中央値で44倍上昇しているが、同時期の底質の濃度は、3倍増加している。これはPBDEの経年的推移は曝露対象による程度のばらつきがあり、PCBと同様にPBDEの生物濃縮性は高いものと判断される。

PBDD/Fの分析結果、PeBDD、HxBDDは検出下限以下であったが、TeBDDは1973年から検出され始めた。TeBDF～HxBDFはPBDEの推移と同様に1905～1962年までは定量下限に近いバックグラウンドレベルであったが、1968年に8.8 pg/g dry wtが検出され、その後、徐々に濃度が増加し、1993年に40.6 pg/g dry wtまで達し、1997年に38.1 pg/g dry wtとなった。この結果から、PBDE およびPBDD/F濃度の経年変動はこれまで報告されているPCDD/F、PCBなど塩素系化合物の濃度傾向⁴とは明らかに異なることが分かった。また、PBDE とPBDFとの濃度相関は $R^2=0.901$ となり、PBDD/Fの給源のひとつとし

てPBDEの可能性が示唆された。低臭素置換体である2,2',4,4'-TeBDE（BDE-47）は1947～1997年間54%から12.7%までに減少したのに対して同時期の2,2',3,4,4',5',6-HpBDE（BDE-183）の組成比は12.6%から47.1%まで経年とともに増加していた。これは日本国内で消費されたPBDE製品の変貌を示唆することである。1988年のPBDE需要ではTeBDEの割合は13%、DeBDEは65%であり、高臭素系ジフェニールエーテルへシフトされる傾向が底質にもよく反映されたものと考えられる。今後、同底質試料についてPCDD/F、PCBの経年変化も調べて比較する予定である。

（8）地球的規模のダイオキシンの分布

イカ肝臓中に蓄積されたダイオキシン類を測定することで、北太平洋のダイオキシン分布の概要を明らかにするための研究を推進した。アカイカ科のイカは北太平洋を含む世界中の外洋域に広く分布しており、食物連鎖の比較的上位に位置し特に肝臓への各種汚染物質の蓄積が進んでおり、生態学的情報の蓄積も進み、寿命が1年で毎年の汚染状況のモニタリングに適切なことなど環境モニタリングのための指標生物に適した多くの特質を有している。その中に蓄積された狭義のダイオキシン類、フラン類（コプラナーPCB類を除く）を測定した結果（図4参照）、

- 1）全般に北半球のイカの方が南半球より高いダイオキシンレベルにある。
- 2）北太平洋の亜寒帯フロント（北緯40度前後）の東西で比較すると、日本周辺が相対的に高く、東に離れるに従って急速に濃度が低下する。
- 3）日本近辺の東経142度付近で南北に比較した結果ではあまり明瞭な差は認められなかった。
- 4）北太平洋アカイカのダイオキシン類の異性体パターンは、焼却起源のものに類似する結果となった。などの結果が得られた。なお、アカイカは北緯20度前後で産卵後、40度付近の亜寒帯フロントまで生長しながら北上し、そこで大きくなって成熟し、1年後にまた南下して次世代を残すとされており、日本付近の南北の試料については基本的に同じ環境で大きく育ったもので南下の早い、遅いの違いを反映するものである可能性も考えられる。一方、一部の試料についてコプラナーPCBの測定も実施したが、北太平洋の場所によって、それほど明瞭な差は認められなかった。

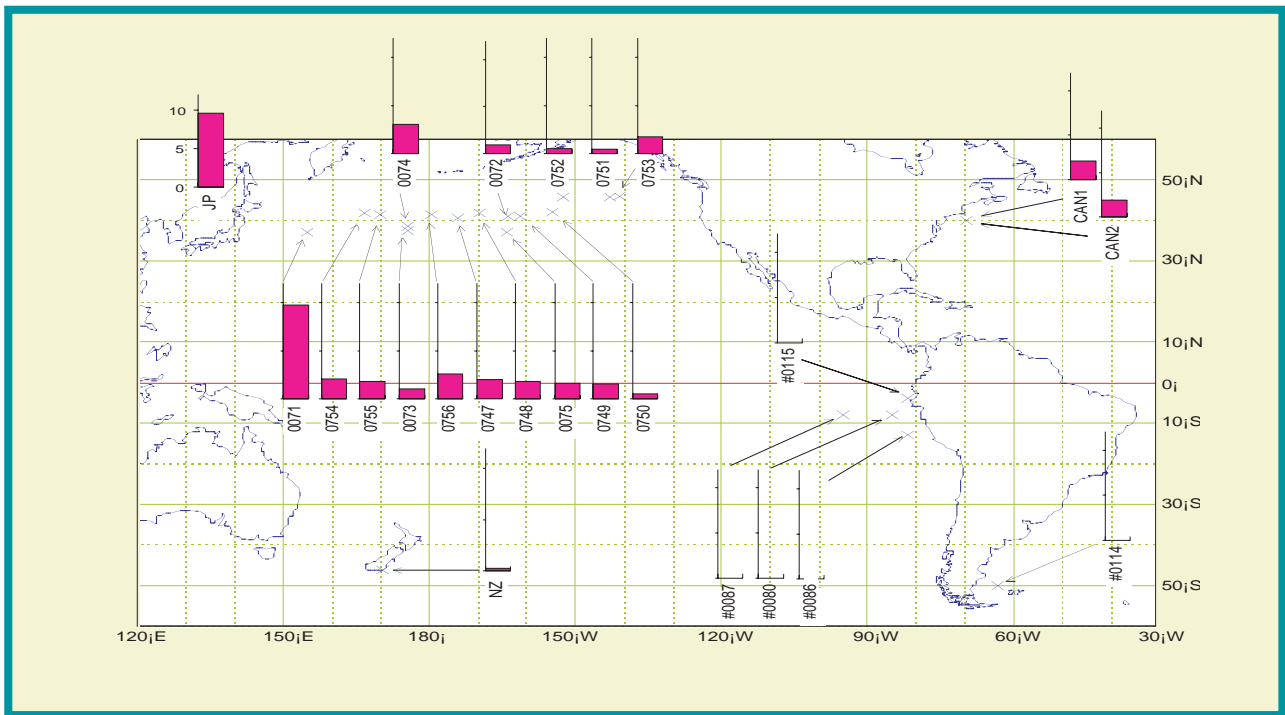


図4 太平洋およびその他の海域におけるアカイカ類肝臓中のダイオキシン類レベル (pgTEQ/g 組織)

2.3 内分泌かく乱化学物質・ダイオキシン類のヒトの健康および野生生物に及ぼす影響に関する研究

2.3.1 内分泌かく乱化学物質・ダイオキシン類のヒトの健康に及ぼす影響に関する研究

(1) ダイオキシン類の曝露量，および生体影響評価に関する研究

ヒトにおけるダイオキシン類の曝露量，体内負荷量，特に感受性の高いと考えられる胎児，新生児の曝露量を評価する一環として，大学の産婦人科学教室と協力して，インフォームドコンセントのもと，羊水，胎脂および母乳を採取し，ダイオキシン類の測定を行った。ダイオキシン類 (PCDD + PCDF) の濃度は，トータルTEQとして，羊水中で中央値0.011pg/g-wet (0.002 -0.066)，胎脂で中央値14.085pg/g-fat (9.187 -35.65) であった。羊水のレベルは成人の血清の1/4程度であり，ある程度，胎盤の障壁があることが示された。母乳中のダイオキシン類濃度は，食事の影響を受けると言われている。そこで食習慣の異なると思われる2地域において母乳中のダイオキシン類を測定した。A地域 (n=25) のTotal PCDD/Fの中央値は8.52 (1.59- 21.84) pg TEQ/g-fat，Total Co-PCBの中央値は5.99 (0.38- 28.66) pg TEQ/g-fat，Total PCDD/F+Co-PCBの中央値は14.4 (2.1- 45.7) pg TEQ/g-fatであった。一方，B地域 (n=25) のTotal PCDD/Fの中央値は3.49 (1.17- 5.6)

pg TEQ/g-fat，Total Co-PCBの中央値は2.75 (1.5- 4.6) pg TEQ/g-fat，Total PCDD/F+Co-PCBの中央値は6.5 (2.6- 10) pg TEQ/g-fatであった。母乳中のダイオキシン類濃度に明らかな地域差が認められた (図5)。

ダイオキシン類の曝露によって鋭敏に動くと考えられる薬物代謝酵素CYP1A1，CYP1B1 mRNAのリアルタイムPCRによる定量を，埼玉 (n=41) と大阪 (n=36) の血液サンプルに対して行った。ダイオキシン類の曝露量 (TEQ) とCYP発現量には埼玉で弱い負の相関が得られた以外は，有意な相関は得られなかった。埼玉においてCYP1A1とCYP1B1発現量との間に相関が見られた。年齢，性差とCYP1A1ならびにCYP1B1発現量との間に相関はなかった。

母乳は血液に比べてダイオキシン類濃度が高く，乳脂肪の産生，貯蔵を行っている乳腺ではダイオキシン類の蓄積および曝露による影響が他の臓器に比べて高いことが推測される。そこで母乳に含まれる乳腺由来の細胞が，ダイオキシン類の生体影響指標の試料としての利用可能性を探る目的で，この細胞の単離法の確立，ダイオキシン関連遺伝子の発現および培養条件下での曝露による反応性について検討した。

母乳中に含まれる細胞 (以下母乳細胞) を遠心操作により，簡便に回収する方法を検討し，ふるい状のホルダーと遠心管を組み合わせによる母乳細胞の精製法を確立

した。母乳細胞は油滴を含んだ浮遊性の球状の細胞が主であり、少量の上皮性角化細胞と思われる付着性細胞が混ざっていた。RT-PCRの結果、ダイオキシンの遺伝子転写に対する反応に不可欠であるAhRとArntのmRNAの発現、CYP1A1およびCYP1B1を確認した。これらの遺伝子の発現はリンパ球ではCYP1B1の発現が高く、CYP1A1はほとんど発現していないのに対して、リアルタイムPCRによるmRNAの定量の結果、母乳細胞ではCYP1A1の発現が高く、CYP1B1の発現が低いことが分かった。培養母乳細胞にTCDDを曝露した結果、CYP1A1は100pMより誘導がかかり、10nMでコントロールの3倍以上のmRNAが検出されたが、これに対しCYP1B1は10nMでも誘導されなかった。一般にCYP1A1はCYP1B1に比べてTCDDへの反応性が高いため、母乳細胞は血球系の細胞よりも曝露影響を調べる上でも都合が良いと考えられる。実際に母乳細胞のダイオキシン類曝露量および曝露形態がCYP1A1を誘導し得るものかどうか、また、母乳の採取時期（出産からの期間）や新鮮なサンプルの入手方法についての検討を進めている。

ダイオキシン曝露の新たな生体指標の検索・開発を目的として、新たなTCDD応答遺伝子を探索するために、

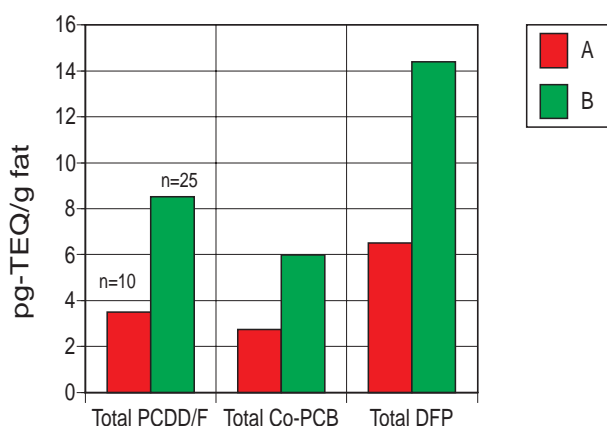


図5 食習慣の異なる2つの地域における母乳中ダイオキシン類濃度（中心値）

DNAマイクロアレイ法を行った。効率良くTCDD応答遺伝子を見つけるために、TCDDがその作用に影響することが知られているエストロゲンに着目し、エストロゲン応答遺伝子がスポットしてあるマイクロアレイを用いた（図6）。MCF-7細胞あるいはRL95-2細胞に0.1, 1あるいは10nMのTCDDを24時間曝露し、発現パターンの変化する遺伝子を調べた。次に、それら遺伝子についてリアルタイムPCRを行い、mRNA発現量の変化を確認した（図7）。その結果、MCF-7細胞で24個、RL95-2細胞で14個の遺伝子の発現量が対照群（DMSO）に比べ増加あるいは減少していた。両細胞ともに、発現の変化した遺伝子数はTCDDの濃度依存的に増加したが、1nMと10nMではほとんど同じだった。

両細胞で共通に増加あるいは減少した遺伝子は12遺伝子で、他は異なる反応を示した（図8 a,b,c）。また、いくつかの遺伝子についてマウス胎児での発現変化を調べた。妊娠12.5日目のC57BL6/Jマウスに5 μg/kgのTCDDを経口投与し、妊娠18.5日目に胎児をとりだした。肝臓・脳・頭蓋骨のRNAを回収し、リアルタイムPCRを行った。その結果、今回調べた遺伝子についてはマウス胎児でもTCDDにより発現が変化していた。しかしながら、雌雄あるいは組織の違いにより発現変化の程度が異なっていた（図9）。

ダイオキシン曝露で鋭敏に動くと考えられているCYP1A1遺伝子には日本人の集団において数カ所の多型が知られ、発がんとの関連が分子疫学研究により示唆されている。ダイオキシンの毒性発現における感受性に、以上の結果から、MCF-7およびRL95-2細胞においてTCDDがこれまで報告されている以上のエストロゲン応答遺伝子の発現パターンを変化させることが明らかになった。また、これらの遺伝子のいくつかはマウス胎児組織中でもTCDDの影響を受けることが明らかになった。このCYP1A1遺伝子の多型が関与している可能性が考え

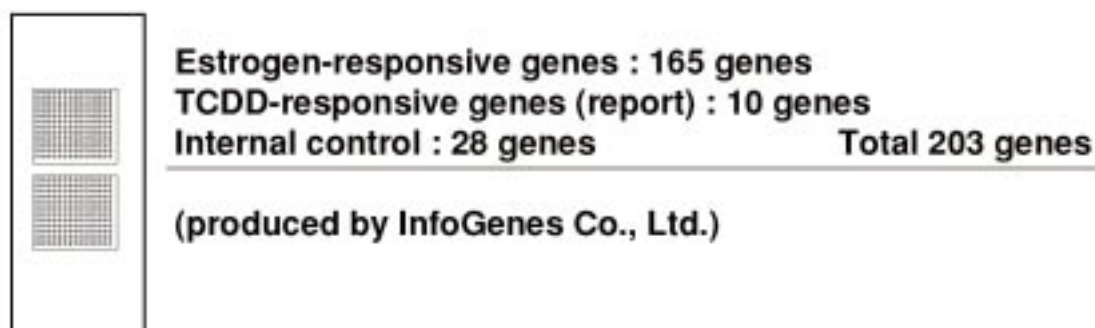


図6 エストロゲン応答遺伝子をスポットしたマイクロアレイ

られる。そこで日本人の集団におけるCYP1A1遺伝子の代表的な多型、Ileu462ValおよびMspI多型を迅速にかつ精度高く検出する方法を検討し、凍結全血からのゲノム抽出方法ならびにallele specific PCR法およびPCR-RFLP法による検出系を確立した。

ダイオキシンの多くの作用はAhRとの結合を介して発現すると考えられている。AhRは結合するリガンドによって活性化する遺伝子とそれに伴って発現する酵素の種類が異なるという性質が示されている。しかしながら、リガンド結合に關与する領域はいまだ明らかとなっていない。リガンド結合に關与する領域の遺伝子の変異は感受性に影響を及ぼす可能性がある。そこでAhRの芳香族アミノ酸をいくつかAla（アラニン）に変えた変異体の転写誘導活性をHeLa細胞にてスクリーニングを行った。その結果、一つの変異体が誘導活性を示さなかった。この位置のアミノ酸について、Ala以外に変えた変異体を

いくつか作って誘導活性を調べてみたところ、Leuに変えたものでは、3MCでは誘導されたが、BNFでは誘導が見られなかった。Ala以外に変えた変異体ではTrp, TyrではBNFによる誘導活性が戻ったが、TCDDではBNFほど誘導活性が戻らなかった（図10）。このことからこの領域がリガンドバインディング領域であると共にリガンドに対する選択性も担っていることが示された。

（2）臭素化ダイオキシソ類による人体曝露

日本ではまだ人体曝露に関する経年変化に関する情報が不足し、特に臭素化ダイオキシソ類に関する一般人の汚染状況については世界的に報告例が極めて稀である。ここでは前年度のPBDE およびPBDD/Fsの分析法に関する報告に引き続き、人体試料（1970年および2000年、10検体）からPBDE, PBDD/Fsの検出を試みた。

分析の結果、異性体と試料によって定量下限を超える

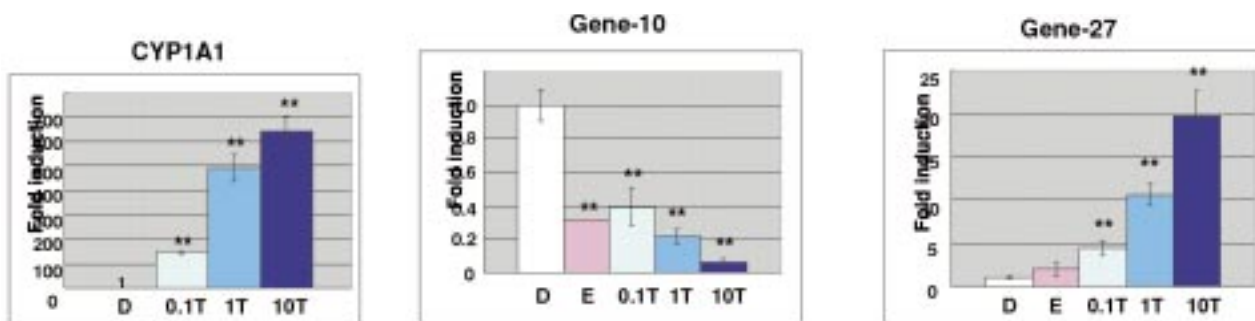


図7 TCDDがestrogen responsive genes に及ぼす影響

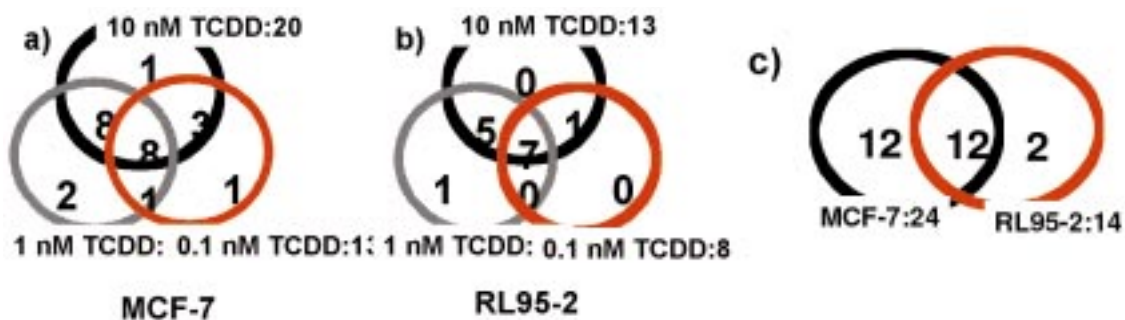


図8 Estrogen responsive gene 発現変化に及ぼすTCDD及びCell typeの影響

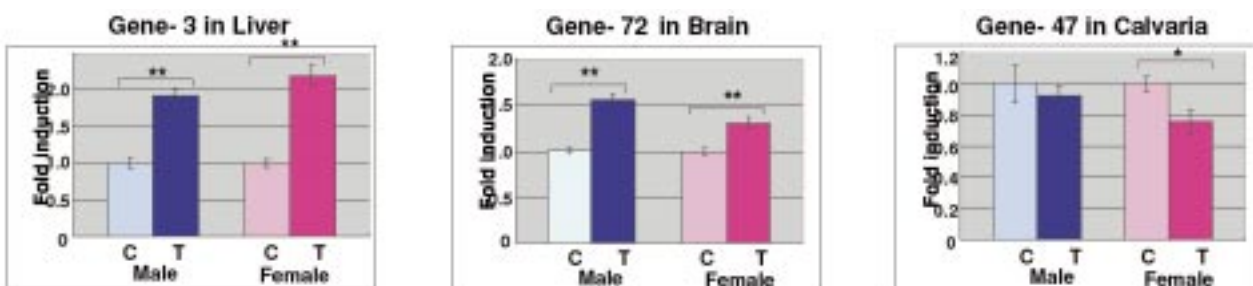


図9 マウス胎児組織においてTCDDが遺伝子発現に及ぼす影響 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

2,3,7,8-TeBDD/Fが検出された。1,2,3,7,8-PeBDDはすべて定量下限以下であり，2,3,4,7,8-PeBDFの一部は定量下限以下，検出下限以上であり，これも定量を行った。中央値で示すと，1970年，2000年度の2,3,7,8-TeBDDは1.7 pg/g fatおよび0.51 pg/g fatであり，2,3,7,8-TeBDFの場合は3.3 pg/g fatおよび2.8 pg/g fatであった。

今まで報告された臭素化ダイオキシン類に関する人体曝露データは化学工場の作業人，合成化学者の血液など限られた調査例しかないが，本研究は一般人のPBDD/Fの曝露データとして初報告と判断される。

一方，1970年，2000年度のPBDEの中央値は29.2 pg/g fatおよび1288 pg/g fatであり44倍の濃度差が見られた。国内のPBDE使用の増加傾向と底質，魚類，哺乳類および人体母乳のグローバルな調査結果，PBDEの環境濃度が上昇していることを証明する文献などの状況から，日本人のPBDE曝露は1970～2000年度の間に増加してきたことが示唆された。また，1970年度の試料ではHxBDE，HpBDEが定量下限以下であったことや2,2',4,4'-TeBDE (BDE-47) の外の異性体は中央値が5 pg/g fat以下であったことから，1970年以前のPBDEの使用は少量であったと考えられる。分析した7つのPBDEの異性体中，1970年試料で主なものはBDE-47 (56.2%) に対し

て，2000年度試料ではBDE-47 (35.6%) の外にも2,2',4,4',6-PeBDE (BDE-100)，2,2',4,4',5,5'-HxBDE (BDE-153) の組成比が19.4%，29.7%となり，高臭素化ジフェニールエーテルの比率が高く，OBDE，DeBDEのような化合物の使用が増えていることが示唆された。

一方，本研究で検出されたPBDD/F異性体の給源や原因についてまだ明らかでないが，PBDD/Fの生成源の一つであるPBDE濃度との相関性を調べた。その結果，統計的に有意な傾向は見られなかったが，1970年試料はPBDE濃度がバックグラウンドレベルであるために，また，2000年のPBDD/F曝露はPBDEのような臭素系難燃剤の曝露と関連する可能性は示唆されたものの，まだ不明である。PBDD/Fの人体曝露実態や給源を調べるために今後，母乳や血液などを対象にPBDEを含む臭素系難燃剤の分析を展開していく必要がある。

(3) 脳神経系への影響

環境ホルモン化学物質がヒトの脳・神経系および免疫系に影響を与えるのではないかと懸念がある。本研究はこれらの化学物質の脳・神経系への影響を評価するための測定・解析手法の開発を目的とする。ヒトや実験動物を個体レベルで画像診断を行う超高磁場MRI法の開

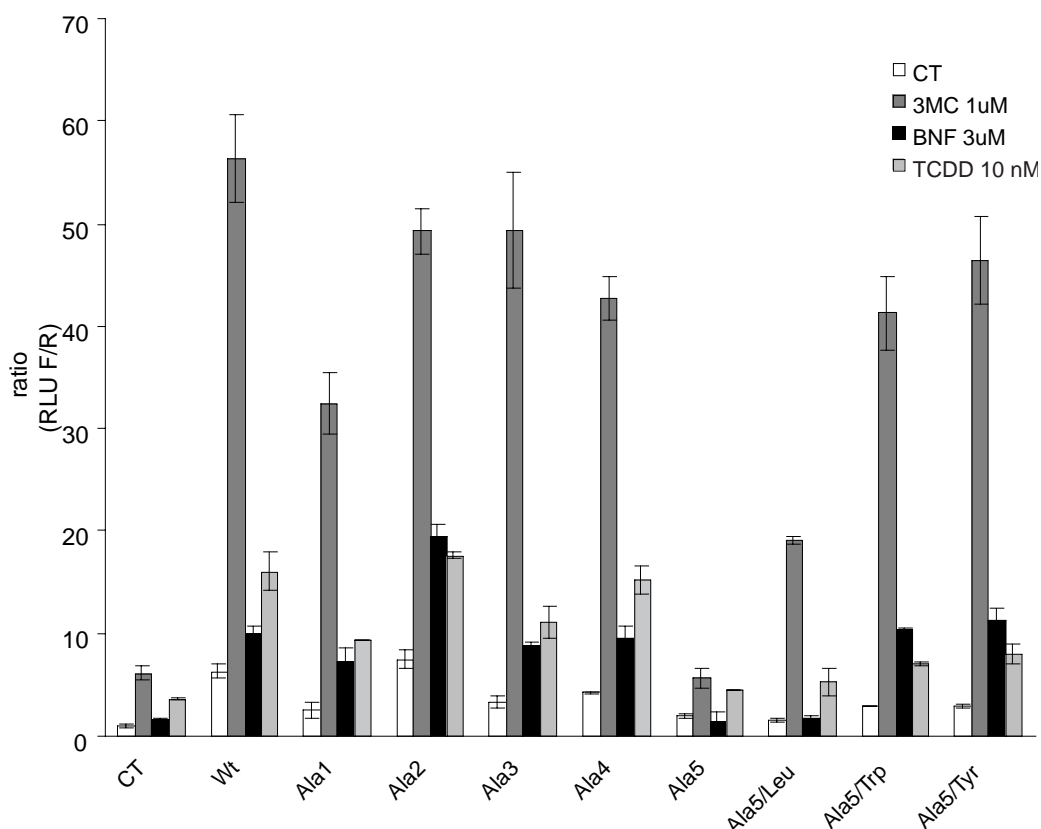


図10 マウス (C57B6) のAhRの芳香族アミノ酸をアラニン (Ala) にかえた変異体の転写誘導活性

発，実験動物を用いる行動試験法，さらに，細胞レベルでの病理・免疫組織化学手法，分子レベルでの神経伝達物質や関連する遺伝子解析の手法開発と整備を目標とした。

1) 脳の超高磁場MRI試験法の開発

我が国では最も高磁場の4.7Tesla人体用MRI装置を立ち上げ，ヒト脳の解剖学的画像や代謝機能を効率よく測定するための手法の研究を行った。脳機能を考える上で重要な灰白質と白質を識別しやすいT1強調画像を用いることとし，従来の2次元法，modified DEFTを利用する2，3次元法について検討した。この結果，3次元MDEFT法では1mmの位置分解能でコントラストの高い精細な画像を得る方法を確立した。3次元データセットを用いて任意の部位，任意の方向の断面の検索が可能である。これは，脳のデータ集積を行う上できわめて有効である。さらに，得られた画像に基づいて脳局所の代謝解析を行うためのスペクトル測定法の開発を行った。図11にラット脳の150 μ lの領域より得た¹H NMRスペクトルを示す。これより脳局所のグルタミン酸等の神経伝達物質の挙動を無侵襲で測定可能となった。

2) 実験動物の行動試験法の研究

プロピオチオウラシルを周産期の母マウスに投与することにより，出生した雄仔マウスをヒトのクレチン病のモデルと考えられる甲状腺ホルモン欠乏動物として作製した。このモデル動物を用いて移所運動活性，シャトル型条件回避反応，受動的回避反応等の行動試験法を適用した。この結果，250ppm以上のプロピオチオウラシル投与で得られたマウスは移所運動活性増加を示すことが分かった。また，多動性障害モデル動物として6-ヒドロ

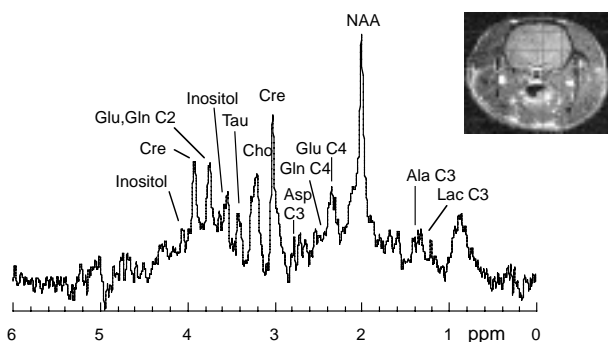


図11 ラット右脳の5×5×6mm(150 μ l)の選択領域で測定された¹H NMRスペクトル
神経細胞の指標となるN-アセチルアスパラギン酸(NAA)や乳酸に加えて神経伝達物質のグルタミン酸(Glu)，グルタミン(Gln)が観測できる。

キシドパミンや，実際の環境ホルモン化学物質と考えられるビスフェノールA(20マイクロg)を生後5日目の雄仔ラット脳の大槽内に直接投与し，4～5週後にラットの自発運動試験を行った。この結果，いずれのラットにおいても同じパターンの運動活性の増加がみられた。これより，ビスフェノールAは運動活性を有意に増加させると考えられ，自発運動試験法は環境ホルモン化学物質のスクリーニング法として使用できる。

3) 組織化学的試験法の研究

発生段階の脳には多機能幹細胞と呼ばれる，神経細胞(いわゆるニューロン)あるいはグリア細胞(神経細胞の移動や生存・維持，また神経情報伝達の調節などの役割を果たしている。また末梢組織の白血球にも相当する)のいずれにも分化できる機能をもつ細胞が存在する。この多機能幹細胞に対して，特定の部位を構成する細胞が特定の時期に特定の数だけ生み出されるしくみが働き，さらには不要な細胞を排除するプログラム細胞死(細胞が自らのDNAや細胞膜を破壊して積極的に死ぬこと。apoptosis(アポトーシス)ともいわれ，外因的作用のみで死ぬ細胞壊死とは区別される)も相まって全体として統合された形態形成が進行する。この幹細胞の分化を促進したり抑制したりするのが細胞周期関連タンパクや成長因子受容体と呼ばれるもので，progenitorと総称される。従来神経細胞は胎生期から生後初期にかけて新生し，成体では新生しないと考えられてきた。しかし近年哺乳動物の脳内海馬(学習記憶機能の統合中枢であり，かつストレス反応系の上位中枢でもある)の一部である歯状回の顆粒細胞層では成体であっても神経細胞が新生することが報告され始めた。これらの報告は何も処置しない実験動物を対象とした知見であり，脳に何らかの障害を惹起した場合を検討した例はまだない。ある種の有機スズ化合物をラットに投与すると海馬障害が引き起こされるが，同障害はグルココルチコイド(いわゆるステロイドホルモン。神経の細胞質にあるグルココルチコイド受容体に結合することにより機能を発現する)を時期により増減させることによって軽減されることを見いだした。さらに申請者らの予備的な知見では同領域において神経細胞のアポトーシスが生じ，さらに成体神経再生と思われる事象が見いだされている。ここで用いた実験動物は視床下部-下垂体-副腎皮質系が賦活されたいわばストレスモデルということができものである。これらのストレス反応由来の海馬障害，アポトーシス，神経再

生およびprogenitorの相互関連に関する知見は全く明らかにされていない。そこで成熟動物の生体に有機スズ化合物を投与して海馬障害を引き起こし、同領域のアポトーシスと神経再生の神経生化学的検出法について検討した。またアポトーシスと神経再生におけるグルココルチコイドの役割についても調べた。

SD系ラットにトリメチルスズ (TMT) 9 mg/kgを6週齢で経口的に一回投与した。内因性グルココルチコイドの海馬障害への関与を検討する目的で副腎 (成体内でグルココルチコイドを産生する臓器) 切除 (ADX) を施した群, 副腎切除とグルココルチコイド受容体アゴニスト (本来生体にあるステロイドホルモンと同様のはたらしをする化学物質) を投与した群およびSham手術群を設定した。TMT投与終了後1, 2, 3, 5, 7および14日目に麻酔下で屠殺し, 脳サンプルを採取する。脳サンプルは脱血したのち固定処理を行い, 病理組織学的検索, 免疫組織化学的および細胞死・成体細胞新生検索試料とした。一部の脳については海馬, 線条体, 嗅球, 梨状皮質および小脳に分離しグリア細胞活性化を観察した。細胞死および成体細胞新生検索: 凍結脳切片サンプルにて行う。アポトーシスは TdT-mediated dUTP-X nick end labeling (TUNEL) 法キットで, 細胞新生は 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) 取り込み法キットによった。また新生細胞の分化については各種progenitor markerの抗体 (例えばPSA-NCAM: 幹細胞が神経に分化したことを示すマーカー) を用いた免疫染色を行った。

その結果, 14日目のサンプルの神経細胞染色により, TMTによる細胞脱落がADXにより増悪し (図12), それでグルココルチコステロン (ラット生体内で産生されるステロイドホルモン) あるいはデキサメタゾン (人工ステロイドホルモン) の投与で軽減されることが観察された。なお, この方法では細胞脱落が壊死であるかアポトーシスであるかは区別できない。次に5日目のサンプルについてアポトーシスと細胞新生を検討した。その結果ADX

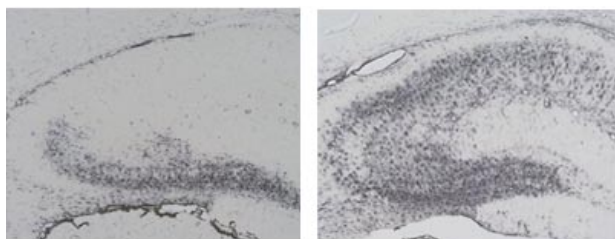


図12 トリメチルスズ投与により引き起こされる海馬障害(左)は副腎切除により増悪される(右)

については海馬歯状回の上層顆粒細胞層に優位にアポトーシスが観察され, TMT投与の場合にその数は下部顆粒細胞層の方が優位であった。TMT+ADX群においてはその数は相乗効果的に増加した。細胞新生はアポトーシスが生じている部位を取り囲むような分布を呈した。全サンプル (1~14日目) を通じてアポトーシスを検討した。定量的な検討にはいたっていないが, TMT投与によりおおむね5日目にアポトーシスを示す細胞の数がピークに達すること, およびADXとTMT投与は相乗的な効果を示すことが観察された。さらに細胞新生と幹細胞の神経分化との関係についてprogenitorの発現を観察しつつ検討した。現在のところきわめて予備的な知見しか得られていないが, 少なくとも歯状回顆粒細胞層で新生している細胞は神経に分化していることは確かなようである。

4) 神経伝達物質および遺伝子レベルでの研究

行動試験法で得られた結果を神経伝達物質レベルで解明するために, 運動活性の亢進した動物脳を分画してHPLCやDNAアレイを用いる解析を行った。甲状腺ホルモン欠乏動物脳の線条体, 側座核等でドパミンやセロトニンの代謝回転の低下が認められた。運動活性の亢進と線条体, 前頭皮質のドパミン代謝回転の間に負の相関が認められた。また, ビスフェノールA投与動物で中脳のドパミントランスポーター遺伝子の発現に変動が見られた。多動性が観察されるヒト注意力欠陥多動性障害の原因の一つと報告されているドパミントランスポーター遺伝子発現変動との関連を検討している。

5) 免疫系への影響に関する研究

平成14年度より開始した本研究では, アトピー性皮膚炎モデルであるNc/Ngaマウスを用いて, フタル酸エステルの皮膚炎に及ぼす影響を検討。再現性を確認中。

2.3.2 野生生物の生殖に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究

我が国に生息する腹足類 (巻貝類), 魚類, 鳥類などの野生生物における個体数減少, 性比の変化あるいは生殖器の奇形などの生殖に関する種々の異常の有無とその程度について多角的に検討し, 何らかの異常が認められる場合にはそれがその種の個体群に及ぼす影響を推定して評価するとともに異常をもたらした原因の究明に努める。

(1) 腹足類(巻貝類)

1) アワビ類: 有機スズ化合物に曝露されたアワビの生殖巣における組織学的変化と生殖への影響

筆者らは1970年代以降のアワビ資源の減少に再生産をめぐる何らかの異変(内分泌かく乱現象)が関与しているとの仮説を立てて1994年から野外調査と移植実験を継続してきた。その結果、漁獲量激減海域(B海域)で漁獲されたマダカアワビとメガイアワビにおいて雌雄間での性成熟盛期の不一致(生殖周期の乱れ)や卵巣での精子形成が見られ、また組織中の有機スズ濃度が対照海域(A海域)のそれよりも有意に高いことが明らかとなった。さらに、A海域のメガイアワビをB海域の造船所近傍に移植して7ヵ月間の*in situ* 曝露試験を行ったところ、組織中有機スズ濃度の顕著な上昇とともに約90%の雌で精子形成などの雄性化が認められた。

これらの知見に基づいて、実験室内でメガイアワビに対するTBTとTPTの2ヵ月間の流水式連続曝露試験を実施した結果、曝露群では曝露したTBTもしくはTPTの有意な蓄積が見られ(TBTについて $p < 0.01$, TPTについて $p < 0.05$)、特に神経中枢である神経節を含む頭部においてその濃度が高かった(TBTおよびTPTについて $p < 0.001$)。またTBTもしくはTPT曝露群において卵巣における精子形成が有意に認められた(TBTおよびTPTについて $p < 0.01$)。本実験期間中、供試個体に疾病によると思われる所見はなく、また対照群では卵巣における精子形成が見られなかった。なお、TBTもしくはTPT曝露群の雄の精巣においては有意な組織学的変化が見られなかった。TBTもしくはTPT曝露によるメガイアワビの卵巣での精子形成は、中腹足類や新腹足類のインボセックスと質的に同等の雌の雄性化現象であると考えられた。腹足類の神経中枢である神経節からは生殖を制御する種々の神経ペプチドが分泌されていることが知られているため、頭部における高濃度の有機スズ(TBTおよびTPT)の蓄積がこれらの神経ペプチドの分泌等にかく乱して上述の組織学的変化に帰結した可能性が示唆された。

上記の諸結果を基に、有機スズ化合物と雌アワビの雄性化との間の用量-反応関係を評価するべく、TBTを用いた流水式連続曝露試験を実施した。またTBTなどの有機スズ曝露による産卵、受精、胚発生、孵化、幼生の生残、着底、成長およびアワビ資源への加入にいたる各過程に及ぼす影響を評価するためのマダカアワビ種苗生産

試験、マダカアワビの胚発生および浮遊幼生に対する有機スズ化合物の毒性試験、フィールドにおけるアワビ幼生の分布と着底稚貝の成長に関する検討を開始した。

2) イボニシ: 日本におけるイボニシのインボセックスと有機スズ汚染に関する全国実態調査

1999年1月から2001年10月までに全国の174地点で採集されたイボニシ試料を用いて既報に準じた解剖学的な観察を行い、各地点におけるインボセックスの出現率、相対ペニス長指数(Relative Penis Length Index; RPL Index)、輸精管順位指数(Vas Deferens Sequence Index; VDS Index)および陰門閉塞個体の出現率を算出した。また一部の試料の生殖巣組織から病理標本を作製(ゲンドル液固定、パラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色)し、顕微鏡で観察した。さらにイボニシの全組織中に含まれる有機スズ(ブチルスズおよびフェニルスズ)化合物の濃度を既報に準じて分析・測定した(プロピル化/GC-FPD法)。また過去の調査結果との比較により、イボニシにおける有機スズ汚染レベルとインボセックス症状の経年推移について検討した。

概して、インボセックスは全国的になお広範に観察されたが、ペニスの発達程度は小さく、RPL Indexは多くの地点で4を下回った。しかしながら、輸精管の形成および発達がペニスのそれに先行して進むため、ペニス小さくても輸精管の形成が完了している個体が多く、VDS Indexが4を上回る地点が多かった。またペニスは短いVDSが5もしくは6と判定される不妊(産卵不能)個体が、低頻度ながら、各地で観察された。イボニシのインボセックスでは輸精管の発達に伴う周辺組織の増成により陰門が閉塞して産卵不能にいたるため、輸精管の発達程度を詳細に観察する必要がある。また造船所や漁港、養殖場の近傍や船舶航行量の多い複数の調査地点でVDSが5を上回る不妊(産卵不能)個体がなお多数観察され、卵巣での精子形成を認める重篤な症状の個体も見られた。イボニシ全組織中のTPT濃度は20 ng/g 湿重を下回る地点が多かったが、長崎港のほか、瀬戸内海や鳴門海峡、関門海峡などの地点で40 ng/g 湿重をなお上回った(最高濃度: 174.2 ng/g 湿重)。イボニシの全組織中TBT濃度も20 ng/g 湿重を下回る地点が多かったが、三浦半島や瀬戸内海、鳴門海峡および関門海峡、長崎港などの比較的多数の地点で40 ng/g 湿重を上回った(最高濃度: 329.0 ng/g 湿重)。また、兵庫や徳島、高知、愛媛、長崎などの一部の地点では局所的にTBTの高レベル

汚染が見られるなど、いわゆる有機スズ汚染の“hot spot”が観察された。またイボニシ全組織中のTPT濃度に関しては、おおむね、各地点で引き続き経年的に減少する傾向が見られたが、TBT濃度に関してはさまざまであり、多くの地点で経年的に緩やかに低減しつつあった反面、ほぼ横這いと見られる地点もあり、2、3の地点では経年的に上昇した。

有機スズの食物網経由での濃縮と体内分布

腹足類の有機スズ汚染と内分泌かく乱現象に関する調査研究の一環として、浅海域の食物網における有機スズ化合物の分布について検討した。すなわち、1996年9月に相模湾のCにおける内湾部および外海部で漁獲された魚類、甲殻類および貝類（内湾産魚類10種、甲殻類2種、貝類6種、外海産魚類11種）の筋肉、鰓および肝臓（もしくは消化腺）、ならびに同海域で採集された海藻類に含まれる有機スズ化合物の含有量をプロピル化/GC-FPD法により分析し、測定した。また内湾産および外海産のそれぞれ数種においては、上述の筋肉、鰓、肝臓（もしくは消化腺）に加えて脳（もしくは神経節）、心臓、消化管、腎臓、鰾、生殖腺および表皮に分別し、それぞれの有機スズ化合物含有量を同法で分析し、測定した。その結果、TBTでは食物網を通じた濃縮が不明瞭であり、その蓄積量は、食性や遊泳範囲などの生態学的特性とともに、代謝能力によって規定されると考えられた。一方、TPTに関しては、魚食性が強い上、遊泳範囲が比較的狭く内湾域に長期に滞留するとみられる種（マゴチやカサゴ等）の濃度が他種に比べて高いことから、定着性で肉食性の種では食物網を通じた濃縮が進む可能性があるとして示唆された。またTBTは鰓や心臓、腎臓に、TPTは腎臓や肝臓、生殖巣あるいは脳において、それぞれ高濃縮が見られた。

韓国におけるイボニシのインボセックス、アワビ類の内分泌かく乱および有機スズ汚染に関する日韓共同研究

日本側研究者（堀口敏宏・独立行政法人国立環境研究所主任研究員）が韓国側受入研究者（趙 顯書・国立麗水大学校副教授）のもとに、平成14年3月1日から14日までの2週間派遣されて滞在し、韓国沿岸域における有機スズ汚染レベルの評価を行った。すなわち、海水（12地点）、表層底質（9地点）、柱状底質（3地点）、ならびに生物試料（巻貝および二枚貝の貝類試料（21地点））の採集を行い、巻貝試料に対する解剖観察とともに上記

の全試料に対する化学分析（プロピル化/GC-FPD法またはGC-MS法）を実施した（結果は現在も解析中）。またエゾアワビ試料を入手し（1地点）、生殖巣組織を検鏡した。その結果、少なくとも一部の地点（例えば、Seodang）では、有機スズ汚染が1995/1996年以降、現在までに進行した可能性が高いと考えられた。また、エゾアワビにおいて生殖周期がかく乱されている可能性が示唆された。これらの結果を基に、今後さらに調査研究を進めていく予定である。

インボセックスのメカニズム解明に関する研究

船底塗料などとして使用されてきた有機スズ化合物がごく低濃度で腹足類に特異的にインボセックスと呼ばれる雌の雄性化を引き起こすことが明らかにされているが、その誘導・発現機構の詳細は明らかでない。筆者らは、現在までに得られた新腹足類および中腹足類のインボセックスと雌アワビ類の雄性化現象に関する知見に基づいて、“腹足類の神経中枢である神経節に有機スズが高濃度に蓄積した結果、神経内分泌系がかく乱され、雌における雄性生殖器官の発達や付属生殖器官の構造の変化、卵巣での精子形成などの内分泌かく乱現象の顕在化に帰結する”との作業仮説を設定した。この作業仮説の検証に向けて、不足している腹足類の生殖生理に関する基礎的知見の獲得と蓄積に努めている。特にステロイドホルモンとその受容体、およびアロマトーゼに代表される性ステロイドホルモン代謝酵素、神経ホルモンとしての神経ペプチド、ならびに生体アミンと神経作用性アミノ酸に焦点を当てて研究を推進しており、平成14年度までに以下の結果を得た。

イボニシにおけるステロイドホルモンとその代謝能および受容体に関する実験的検討

2000年7月と8月に茨城・平磯で採集されたイボニシおよび2000年9月に新潟・寺泊で水揚げされたバイを用いて、それぞれの卵巣および精巣からメタノール抽出画分を得て、精製とシリル化の後、高分解能GC/MSによりステロイドホルモンの同定と定量（内部標準法）を行った結果、イボニシの卵巣から17 β -エストラジオール（E2）、精巣からテストステロン（T）がそれぞれ検出され、同定された。またバイの卵巣からE2、エストロンおよびエチニルエストラジオール（EE2）、精巣からTおよびアンドロステロンがそれぞれ検出され、同定された。このうち、EE2は合成ステロイドであるため、バイが固有に有していたものか、腐肉食性であるために食物網を

通じてあるいは生息域の海水から体内に取り込んだ汚染を示唆する結果であるかの判断が困難であった。なお、EとTについて内部標準法で定量を行った。

また、ELISA法を用いてイボニシの生殖巣中のテストステロンを個別に定量するための測定条件を確立した。抗テストステロン抗体キットの選択および試料の前処理法を詳細に検討することにより、ELISA法で問題となる測定値のばらつきを克服することができ、測定値はGC/MSの値と良い一致を示した。これにより、GC/MSではできなかった個別の定量が初めて可能になった。この方法を用いて有機スズ汚染および非汚染域で採集した雌イボニシを分析した結果、インボセックス個体のテストステロンが高い傾向を示すことが確認され、テストステロンとインボセックスとの何らかの関連性が推察された。

さらに、2002年4月に茨城・平磯で採集されたイボニシを実験室内で人工海水を用いて2ヵ月間飼育した後、摘出された卵巣もしくは精巣と消化腺の混合部ホモジェネートにテストステロンとNADPHを添加して37℃で30分間インキュベートし、ジエチルエーテル抽出画分を得てE2を測定し、その生成割合を対照（テストステロン非添加のホモジェネート）と比較した結果、イボニシの生殖巣/消化腺混合部においてTからE2が生成することが確認された。なお、雌雄間で有意差は見られなかった。したがって、イボニシの生殖巣/消化腺混合部にアロマターゼ様活性を有する酵素の存在が示唆され、脊椎動物と類似のステロイドホルモンと代謝酵素を有する可能性が高いと考えられた。なお、種特異的なステロイドホルモンおよび代謝酵素の存在については今後さらに検討が必要である。

また2001年4月と5月に茨城・平磯および神奈川・城ヶ島で採集されたイボニシの卵巣、精巣およびペニス形成部位に対するアンドロゲン受容体（AR）、エストロゲン受容体（ER）およびアロマターゼ（P450_{Arom}）の各抗体による免疫組織化学染色（中和抗原処理を含む）を行った結果、生殖巣ではARとERに対する特異的染色が、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。さらに、2001年7月に上記の平磯で採集されたイボニシの卵巣/消化腺混合部からcDNAライブラリーを作製し、これをテンプレートとしたPCR断片を得て、3'および5'

RACE法により増幅し、ERのクローニングを試みた。そして、そのアミノ酸配列の解析と他種との相同性（homology）の比較、検討を行った結果、イボニシのERにおけるアミノ酸配列の相同性は、脊椎動物のERと比較して、DNA結合ドメインで84~89%と比較的高かったが、リガンド結合ドメインでは39~40%と低いことが明らかとなった。

これらの結果から、イボニシなどの前鰓類においても脊椎動物のそれと部分的に類似したARやERの存在が示唆されるものの、その構造の相同性は比較的低いと推察される。またP450_{Arom}についても存在が示唆されるが、脊椎動物のそれとは相同性が低いと考えられる。今後、ステロイドホルモン産生細胞の探索とともに受容体の構造解析やインボセックス発症との関連を含めたステロイドホルモンの機能解析に向けて、さらに研究を進める必要がある。

イボニシのインボセックスに及ぼすアロマターゼ阻害剤とアンドロゲン、神経ペプチドの影響

船底塗料等として世界各地で使用されてきた有機スズ（トリブチルスズ（TBT）およびトリフェニルスズ（TPT））化合物が前鰓類（海産腹足類）のうち、新腹足類と中腹足類に対し、ほぼ特異的にかつごく低濃度でインボセックスを引き起こすことが知られており、インボセックスの誘導機構について現在までに5つの仮説が提出されているが、前鰓類の生殖生理に関する基礎的知見の不足のため、現時点ではいずれの仮説がもっとも合理的であるかを判断することが難しい。ここでは、インボセックスの誘導機構解明の一環として、イボニシのインボセックスの誘導や発達に及ぼすアロマターゼ阻害剤とアンドロゲン、ならびに数種の神経ペプチドの効果を検討するために筋肉注射試験を実施した。

2002年1月に茨城県ひたちなか市平磯で採集したイボニシから、雌のみを選び出して20個体ずつの6グループ（対照、FMRFamide、LSSFVRamide、APGWamide、5 β -ジヒドロテストステロン（DHT）およびTBTCI）に分けて、それぞれのエタノール溶液をMgCl₂/6H₂O溶液で麻酔したイボニシの足部に注射した。注射量は、 10^{-10} mol/個体の神経ペプチドについてはいずれも 10^{-10} mol/個体、DHTとTBTCIについては約1 μ g/g体重とした。またエタノールとし、他の実験区における最大注射量となるようにした。注射後のイボニシは実験区ごとに2リットルビーカーに収容し、人工海水を10 l /

日として通水した流水環境下で飼育した。餌は、平磯で採集したムラサキイコガイを与えた。実験開始1ヵ月後にすべてのイボニシを取り上げて解剖し、インボセックス症状を精査した。インボセックス出現率は²検定により、またペニス長と輸精管順位(VDS)は一元配置の分散分析により、それぞれ対照区との有意差検定を行った。また繰り返し実験(陽性対照はTBTCIとTPTCI)を行い、結果の再現性を検討した。

その結果、インボセックス出現率は、陽性対照として用いた有機スズ区では有意な増加(TBTCIおよびTPTCIともに $p<0.01$)であったが、他の実験区では、いずれでも有意な増加ではなかった。またペニス長は個体差が大きかったが、陽性対照の有機スズ区で有意(TBTCI($p<0.05$), TPTCI($p<0.001$)), 他の実験区では有意差なしであった。一方、輸精管順位(VDS)は、有機スズ(TBTCI, TPTCI)のほか、DHTおよびAPGWamideの各区で有意に増加した(TBTCIおよびTPTCIともに $p<0.001$, DHTおよびAPGWamideはいずれも $p<0.01$)。

2002年5月に上述の平磯で採集したイボニシから、雌のみを選び出して20個体ずつの4グループ(対照, 塩酸フアドロゾール(Fad), Fad+テストステロン(Test)およびTPTCI)に分けて、それぞれのエタノール溶液を $MgCl_2/6H_2O$ 溶液で麻酔したイボニシの足部に注射した。注射量は、Fadが約 $5\mu g/g$ 体重、FadおよびTestが、それぞれ、約 $5\mu g/g$ 体重および約 $0.1\mu g/g$ 体重、またTPTCIは約 $1\mu g/g$ 体重とした。またはエタノールとし、他の実験区における最大注射量となるようにした。以後同様に、飼育、解剖観察した後、インボセックス出現率とペニス長およびVDSについて、それぞれ対照区との有意差検定を行った。

その結果、インボセックス出現率が対照区より有意に高かったのはTPTCI区($p<0.01$)のみであり、Fad区およびFad+Test区では対照区と有意差なしであった。またペニス長は個体差が大きく、Fad区では対照区との間に有意差が認められた($p<0.05$)ものの、Fad+Test区ではペニス形成が認められなかった。TPTCI区では対照区より有意に伸びた($p<0.001$)。一方、VDSについては、Fad区およびFad+Test区で対照区との有意差が認められず、TPTCI区で有意であった($p<0.001$)。

これらの結果から、神経ペプチドのうち、少なくともAPGWamideと、テストステロンの還元型代謝物であるDHTはイボニシに対する微弱なインボセックス促進能

を有することが示唆された。一方、FadおよびFad+Testがイボニシに対してインボセックス促進能を有することはほとんどないか、きわめて微弱な効果にとどまると推察された。FadおよびFad+Test(3濃度)を流水式曝露試験装置によりイボニシに72日間連続曝露させた実験においてもインボセックス促進能が観察されず、したがって、アロマターゼ阻害剤およびそれにテストステロンが付加した場合のイボニシにおけるインボセックス症状の促進はほとんど見られないと言えよう。本実験結果は、Bettin *et al.*¹⁾の結果とは対照的な結果である。両者において使用されたアロマターゼ阻害剤に構造上の差があり、実験に用いられた種も異なっているとはいえ、類似の曝露方法によって対照的な結果が生じたことは興味深く、アロマターゼ阻害剤やテストステロンがインボセックスに及ぼす影響について、種差を含めて、さらに詳細に検討する必要がある。

イボニシにおける生体アミンおよび神経作用性アミノ酸の同定

イボニシの中樞神経系である神経節(脳)から、高速液体クロマトグラフ-電気化学検出器(HPLC-ECD)により、セロトニン、ドーパミン、エピネフリン、オクトパミンが検出された。いずれも非汚染・汚染海域双方のイボニシから検出され、検出レベルの雌雄差は明らかでなかった。

また、検出された物質と脳の湿重量との間に有意な相関関係はみられなかった。概して、汚染海域の個体で非汚染海域の個体に比べて脳内アミン量が少なく、とりわけセロトニンの前駆・代謝物質(トリプトファン、5-ヒドロキシインドール酢酸)が汚染海域の個体で少なかった。全個体で共通に検出された物質はトリプトファンのみであった。生体アミン量とインボセックスとの関係について、さらに実験的検討を進めている。

3) ヒメタニシ

霞ヶ浦の沿岸部全域をカバーするように13の採集定点を選抜し、2001、2002年の両年とも4~10月に毎月1回のペースで採集を行った。各定点では3~4人で10~15分間採集を行い、各地点で約50~60個体のヒメタニシを採集した。ヒメタニシは、少なくとも通年で水際から水深1m程度の葦原の基部やテトラポットなど、極沿岸部に分布しており、特に春季から夏季にかけては水深30cm程度の浅瀬にも分布することが判明した。

調査において採集したヒメタニシは殻の各部の計測と

重量を測定し、解剖後に生殖腺の形態から雌雄判別および生殖腺重量の測定を行った。霞ヶ浦全体の採集された性比の季節変化について観察したところ、両年ともに6月に雌の割合が高かった。全体的な傾向としては、春から初夏に雌の割合が高くなり、その後、減少することが明らかになった(図13)。

各定点の性比については年間の総計、季節変動ともに大きくばらついたが、地理的な偏りは見られなかった(図14)。全体的には、採集定点の77%で雌のほうが雄よりも多い傾向を示し、霞ヶ浦全体でも2001年は55.2%、2002年は54.3%の個体が雌であった。同じように、雌に性比が偏る現象は、先述の西脇からも7月に採集した性比で報告しているが(1998年: 63%、1999年: 68%)、調査結果でも同様に雌に性比が偏ることが示されたことから、霞ヶ浦においてヒメタニシの性比は雌に偏っており、「内分泌かく乱化学物質によるメス化」が起こっている可能性は否定できない。しかし性比が雌に偏る原因として、内分泌かく乱化学物質の影響ばかりであるとは言えない。交接後に湖岸で雌が放貝行動をとっているなど雌雄の生活圏の違いや、繁殖加入年齢や寿命の雌雄差などの生活史特性によって、採集された個体群の性比が偏ってくる可能性もある。よって、現時点では一面的な性比の偏りだけで内分泌かく乱化学物質の影響の有無を論じるには情報が少なすぎるというのが実状である。

霞ヶ浦産のヒメタニシのサイズ組成の季節変化について殻付重量をもとにして調べたところ、採集した月すべてにおいて、雌のほうが大型であるという結果が得られた。この結果から、雌雄間でヒメタニシの成長速度に差

がある(雌の方の成長が早い)か、または、寿命に雌雄差がある(雌の寿命が長い)可能性が示唆された。つぎに、生殖腺体指数(Gonadosomatic Index: GSI)の季節変化は雌雄間で大きく異なり、雌よりも雄で大型となる結果を示した(図15)。季節変化について検討すると、雌雄ともに、5月に上昇し、その後、6~7月には減少することが明らかになった。6月のGSIの減少は交接に伴う雄の放精と雌の産卵・放貝によるものと考えられ、ヒメタニシの繁殖盛期は6~7月であると推定された。

これまでの調査によってヒメタニシでは性比、生殖腺体指数、精巣の色彩変異のそれぞれにおいて、季節変動が見られた。野生生物の調査を行う場合、このように形態的・生態的特徴に季節変動が見られるものを影響評価の指標として用いる場合には、対象となる生物種の詳細な生理・生態学的基礎知識の裏づけが必要である。

樽松は雄の寿命は2~3年、雌の寿命は4~5年と「タニシ」に記載している。この記載の根拠となるデータは概書中に示されていないが、もし本当であれば、ヒメタニシの性比の雌への偏りは、寿命の違いに因るところが大きいと思われる。現在、我々はタニシの成長速度の違い、雌雄による寿命の違いについて、年齢査定方法の検討などを含めて飼育実験を継続中である。

(2) 斧足類(二枚貝類)

アサリ等の二枚貝類における内分泌かく乱現象の顕在化または潜在的影響に関する調査を新たに開始し、全国的に試料収集を行っている。

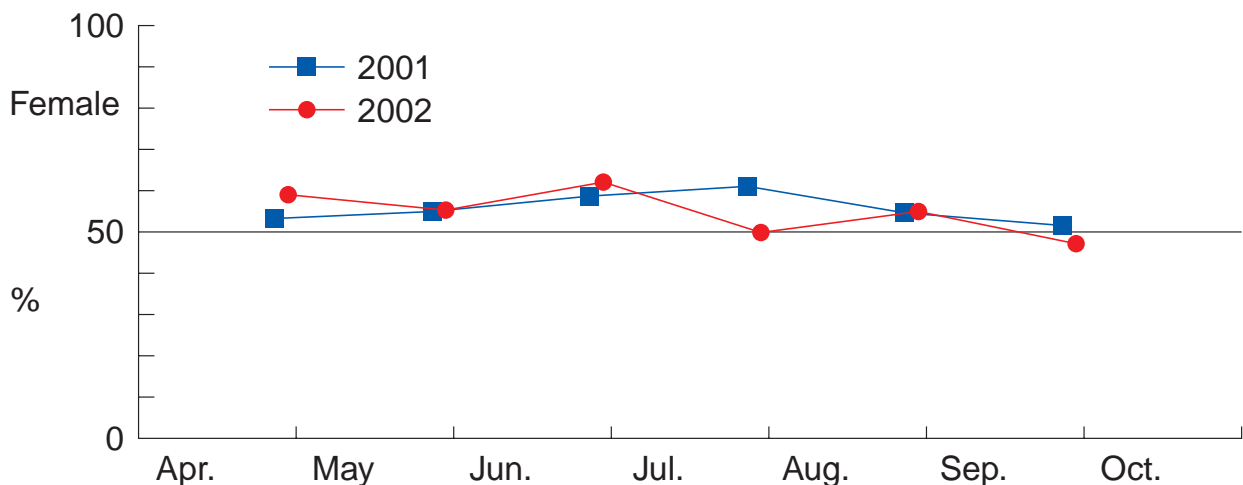


図13 霞ヶ浦(西浦)全体におけるヒメタニシの性比(雌の割合)の季節変動

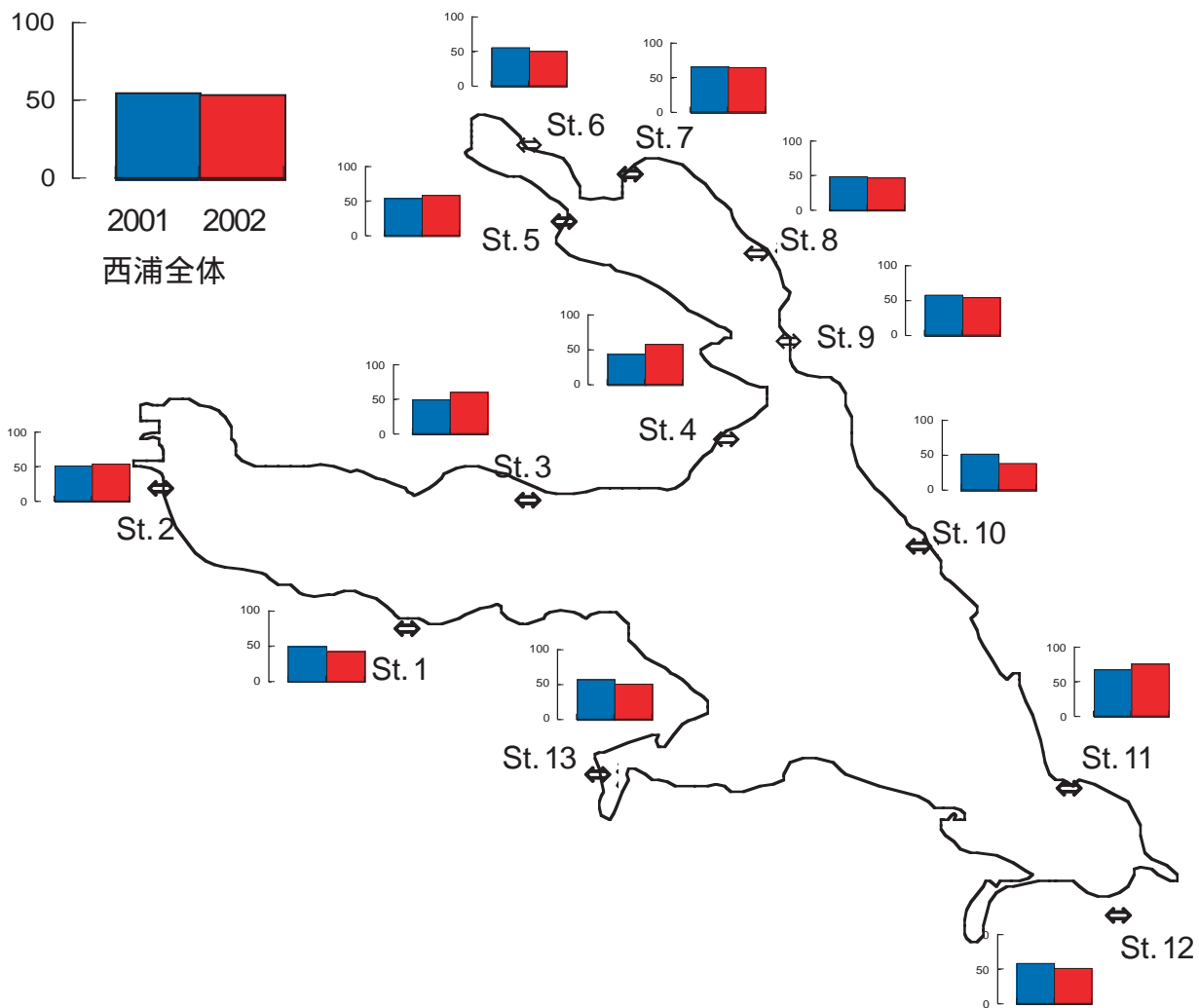


図14 霞ヶ浦（西浦）沿岸部におけるヒメタニシの性比（雌の割合，各採集定点での年間総計による割合）

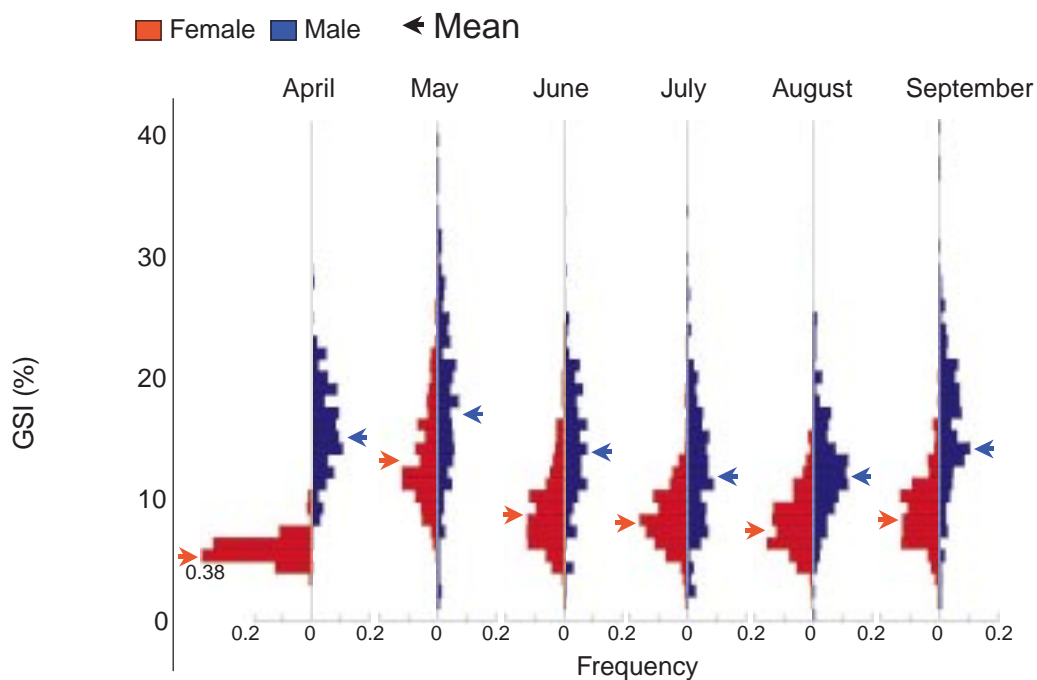


図15 西浦におけるヒメタニシの生殖腺体指数（GSI）の変化（2002年, n=3630）

(3) 魚類

閉鎖性水域や湖沼等に生息する魚類における内分泌かく乱の実態解明

霞ヶ浦や諏訪湖等のワカサギ、東京湾のコノシロ等に対する内分泌かく乱の実態解明を目指したフィールド調査を実施し、生殖巣組織標本の作製および検鏡、種々の試料に含有されるピテロゲニンや性ホルモン、内分泌かく乱化学物質に関する化学分析を行った。

このうち、東京湾の羽田沖で2000年3月に漁獲されたコノシロでは、雄73個体中の3個体で精巣卵が観察された。東京湾でも富津沖で漁獲されたもの(41個体)や相模湾の逗子沖(34個体)あるいは浜名湖(62個体)産のコノシロでは精巣卵が観察されなかった。これまでの調査の結果、東京湾産マコガレイの一部の個体において精巣卵が観察されてきたことから、内湾域の雄の魚類に組織異常を伴う内分泌かく乱現象が発生してきた可能性がある。

東京湾における環境ホルモン汚染とその潜在的な生物影響を明らかにするために、平成14年10月から東京湾をフィールドとする包括的な調査を開始した。清水 誠・東京大学名誉教授が1977年から東京湾で実施してこられた生物調査をベースに、水・底質試料の採集も加えた拡大版のサンプリング調査を実施する。すなわち、東京湾内に20定点を設けて、毎年2月、5月、8月および11月に各定点で水質および底質試料を採集する(それぞれ、GO/FLO型採水器およびスミスマッキンタイヤー型採泥器による)。また底質に関して、すでに採取した柱状底質試料の年代測定を行う。これらの水・底質試料に含有される環境ホルモンの化学分析およびホルモン活性のバイオアッセイを行う。また上記の20定点において、網口幅約5.5m、高さ約60cmのビームトロールを約2ノットで10分間曳網し、漁獲物から魚類・甲殻類・頭足類およびウニ類を採集する。採集された生物試料は種の査定を行い、個体数と種別の重量を計測する。またマコガレイについては個体別に体長・体重を測定し、耳石による年齢査定、胃内容物調査や生殖巣組織の病理標本の作製と観察、血中ピテロゲニンおよびE2等のステロイドホルモン濃度の測定、環境ホルモン含有量の化学分析・定量を行う予定である。

(4) 鳥類

鳥類における影響研究として、東京湾を中心としてカ

ワウにみられる汚染と影響の実態把握を開始した。

カワウについては、東京湾に生息するカワウと琵琶湖に生息するカワウについて甲状腺の過形成について差があることが報告されており、東京湾カワウには汚染物質の影響が考え得る。これに対応して、カワウの肝臓および卵中のコプラナーPCB、塩素化ダイオキシン類、臭素化ビフェニル、臭素化ダイオキシン、臭素化ビフェニルエーテル等の分析を実施した。

1988年に東京都台東区の第六台場から採取したカワウ卵と、2000年に神奈川県厚木市の相模川で食性調査のために捕殺されたカワウ肝臓を分析に供した。PBDD/Fsの卵および肝臓中2378置換体PBDD/Fsは、肝臓の2個体を除いてすべてnd以下(2~20pg/g)であり、非2378置換体PBDD/Fsがそれぞれ平均95pg/g fat, 111pg/g fatであり、卵と肝臓における有意な濃度差はみられなかった。PBDEsにおいても卵(平均1400ng/g fat)と肝臓(1400ng/g fat)に濃度差はみられなかった。同族体の比較では、TeBDEs > HxBDEs > PeBDEsの順に高濃度でみられ、DeBDEsは卵と肝臓で2.8~22ng/g fatであった。PBBsが生物試料から初めて検出され、22'44'55'-HxBBが高く(卵:平均13ng/g fat, 肝臓:平均9.8ng/g fat), Fire Master(商品名)の特徴を示しており、輸入品に起因していると考えられた。

(5) その他

米国フロリダ州の湖でワニの脱雄性化が報告されている。これに対応する研究として西オーストラリアのアーガイル湖の周辺で同様なことが見いだされるかどうかについての予備的な検討を開始した。

2.4 内分泌かく乱物質の対策技術・手法の開発

本研究においては、ハード的な処理技術、ソフトな情報に基づく対策手法の研を行うこととしている。

2.4.1 内分泌かく乱化学物質の分解処理技術に関する研究

内分泌かく乱化学物質の環境インパクトを低減するために微生物あるいは植物を用いた処理技術を開発する。

(1) ビスフェノールAの植物による分解

環境動態の研究から、植物がビスフェノールAを良く吸収することが明らかとなった。これに着目して、植物による分解の可能性を検討した。タバコ 液体培養細胞

BY-2 にBisphenol A (BPA) を与え、その代謝物が2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propane-O- β -D-glucopyranoside (略BPAG)であることを同定し、かつ、BPAGがBPAよりestrogen活性が減少していることを確認した。またタバコ植物体によりタバコ培養細胞で起こっているのと同様の代謝がタバコ実生でも行われていることを確認した。次に27品種の栽培植物について、BPAの根からの吸収量、および生体内のBPA配糖化酵素 (BPAGase) の比活性を測定した。その結果、植物により、BPAを吸収しやすいもの (ホテイアオイ、キャベツ、ササゲ等) とし難いもの (ニンジン、イネ、ゴマ等) があった。また、ほとんどの植物は吸水量にBPA吸収量が依存していると考えられた。しかし、BPAGase比活性が他の植物より著しく高い値を示したアブラナ科の植物は、BPAGase比活性にBPAの吸収量が依存している傾向がみられた。

(2) 微生物を用いた内分泌かく乱物質の分解

室温の条件下において新規にフタル酸エチルヘキシルを単一炭素源として利用する微生物を単離し、16srDNAの塩基配列の相同性より*Mycobacterium* sp.と同定した。*Mycobacterium* sp.はコリネ型のグラム陽性の微生物で、いわゆるパチルス等の細菌と放線菌の中間的な位置づけの微生物である。これには病原菌である結核菌が含まれているが、相同性の高い菌体には結核菌は存在せず、PAHs、アルカンの分解菌あるいはTCE分解菌等に近い菌体であった。本菌株は30 $^{\circ}$ Cの好気的な条件下において0.1%のフタル酸エチルヘキシルを18時間で完全に分解する。また幾つかのフタル酸エステルを分解するが、その分解速度はフタル酸エステルの分子量の低下と共に遅くなる傾向にある。応用的な見地から、ホームセンターで市販されている農業用の塩化ビニール (厚さ、0.1, 0.2, 0.3mm) を用いて直接菌体と培養して、酢酸エチルに抽出されてくるフタル酸エチルヘキシルの量を定量した。農業用塩化ビニール中のフタル酸エチルヘキシルは厚さ0.1mmの物で約30%、0.2, 0.3mmでは約15%程度であった。これを0.1g切り取り、培地 2 ml に加えて30 $^{\circ}$ Cで好気的に培養を行ったところ、3日間の培養で約60%減少した。分解代謝物については、現時点では同定していない。しかしながら培養液を酢酸エチルで抽出した物のTLCを行ったところ、デッドエンドと思われる代謝物のみが存在しており、これはHPLCのODSカラム上でフタル酸エチルヘキシルのピークのテールにあたる位置に

吸着ぎみに溶出されていた。おそらく、主な代謝は菌体内で行われていると推測される。

PCB分解菌の探索を行った。またさらに、数種のリグニンを脱色分解するカビを単離し、これとKC600を0.1% (w/v) 培地に加え反応した。これは現在ECDの感度が上がるのを待っているところである。並行して行っている超高温菌はゲノムDNAのバンド確認を行っている。

(3) ダイオキシン類の分解処理技術に関する研究

本研究では、ダイオキシン類やPCBなどの有機塩素化合物で汚染された土壌などを対象として、以下の手法によるこれらの化学物質の効率的な分解処理技術の開発を行った。高温・高圧の熱水による抽出・分解、OHラジカルなどによる分解、微生物による分解。

高温・高圧の熱水による抽出・分解の研究では、水蒸気態から亜臨界状態の水を汚染された土壌試料に通じることによって汚染物質を除去することを目指した。この方法では、超臨界水酸化法ほどの高温高圧条件を必要とせず、消費エネルギー、コスト面で有利であり、また有害な添加物等を加えない「水のみによる環境にやさしい処理」を実現できる。以下に成果の概要を示す。

1) 抽出・除去率を左右する実験パラメーターの検証

実験パラメータとして温度、圧力、時間、実験装置を変え、土壌からのダイオキシン類の抽出・除去率を測定し、実験パラメーターとの関係について検討した。

実験には、すべて共通の土壌試料および水を用い、日本分光社製の超臨界反応装置SCW- を改造した装置を使用した。セルに試料を充填した後、各種条件で水を通し、時間を区切って回収した抽出液および残渣中のダイオキシン類を測定した。実験装置の系外への漏出は認められなかった。

測定の対象は、4-8塩素置換のポリクロロジベンゾパラジオキシン (polychlorodibenzo-*p*-dioxin; PCDD)、ポリクロロジベンゾフラン (polychlorodibenzofuran; PCDF) の全異性体および14種類のコプラナーPCBとし、抽出水溶液についてはTOCを、抽出前試料および抽出残差は、CHNと各種元素も測定した。

この実験で、水だけで汚染土壌からダイオキシン類を除去できることが確認できた。温度は、除去率を左右する最も重要な因子であり、温度に比例して除去率が上がることを確認した。350 $^{\circ}$ C以上での抽出が効果的であり、99%以上のダイオキシン類が除去された。しかしながら、

150 においても約50%のダイオキシン類の試料からの消失が確認された(図16)。

加圧によって、除去を促進できることも確認できた。ただ無加圧の状態であっても、ダイオキシン類の除去は可能であり、圧力は熱水抽出における副次的な因子であることが判明した。

また、300 の場合では、最初の30分の抽出で80%程度が除去され、240分で95%以上の除去が確認できたが、150 では土壤中のダイオキシン類濃度の減少は緩やかであった。しかし、比較的低温でもダイオキシン類の除去効果が認められたことは、さらなる省エネルギー化の可能性のあることを意味しているといえる。

2) ダイオキシン類の除去機構に関する検討

各化合物を構成する同族体の組成の変化について、各種条件との関係について検討したところ、高温条件において、高塩素化物は速やかに減少するのに対し、低塩素化物の減少割合は小さく、場合によっては、増加する現象がみられた。このことから、土壤中のダイオキシン類は熱水によって単に抽出除去されるのではなく、脱塩素反応が起きていると推測された。また、観察された脱塩素反応の速度は、温度に依存することも観測された。

分解経路を調べるため、鹿沼土、赤玉土、黒土の3種の土壤にOCDDを添加し、同様の熱水抽出実験を行った。土壤ごと流失したものを結果から差し引き考察をした。

この実験では、処理後のPCDFやCo-PCBの増加やPCDDからPCDFやPCBへの変化は観察されず、ダイオキシン分解の主経路は脱塩素反応であった。

また、残さ土壤から検出される異性体濃度には大きな

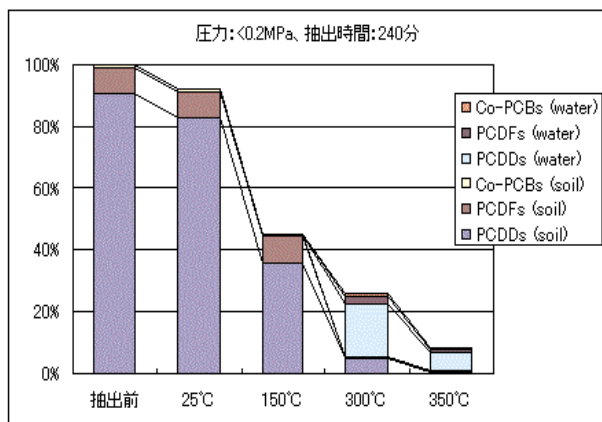


図16 温度による抽出前後の土壤および抽出液中ダイオキシン類相対濃度の変化
抽出前土壤濃度を100とした場合洗浄水濃度は土壤濃度に換算

変化がみられた(図17)。例えば、鹿沼土では室温(25)抽出後には、残さから検出されるTCDD濃度は低く、その異性体組成は、一般土壤や大気、一般廃棄物焼却飛灰試料でよく観察されるものと似ていたのに対し、300 抽出後にはTCDDが非常に増加し、すべての異性体が検出された。検出された異性体は一般環境試料に多くみられる1,3,6,8-および1,3,7,9-TCDDの割合が少なく、2,3,7,8-TCDDが比較的多いという特徴的な組成を示した。このような異性体組成は産業廃棄物焼却施設由来の試料に時折観測される。この特徴的な異性体組成は、赤玉土、黒土におけるOCDD添加試験でも観察され、すべて同様な機構により形成されたと推測される。

OCDDから一つの塩素が水素に置換することにより生成するHpCDDには、2つの異性体が存在するが、熱水抽出後の土壤では、1,2,3,4,6,7,9-HpCDDが別の異性体1,2,3,4,6,7,8-HpCDDよりも生成量が若干多かった。このことから、2,3,7,8のいずれかの位置における脱塩素(塩素と水素の置換)が、残りの1,4,6,9の位置よりもやや速いことが確認された。また、他の異性体割合を調べたところ、1,2,3,4の位置のすべてに塩素が置換した異性体の生

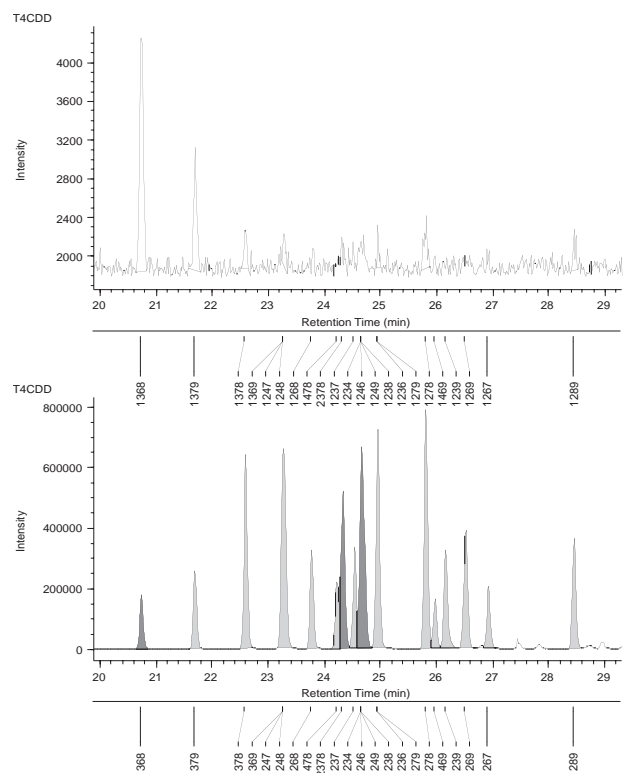


図17 熱水抽出後に検出されるTCDD異性体の変化
上段: 25 , <0.2MPa, 240分抽出後の鹿沼土のSIMクロマトグラム
下段: 300 , <0.2MPa, 240分抽出後の鹿沼土のSIMクロマトグラム

成割合が少ないことも分かった。

一般に、光分解やラジカル反応による有機相中のPCDDの分解では、2,3,7,8の位置の塩素が優先的に脱塩素することが知られており、この熱水抽出による分解経路はそれに近いといえる。しかしながら、2,3,7,8-位塩素置換異性体も多く確認され、分解経路は単純ではないことが分かる。土壌の成分により複雑な反応が起こされている可能性は否定できない。この反応をコントロールし、2,3,7,8の位置を優先的に脱塩素させることが可能であれば、処理途中におけるダイオキシン類によるリスクを最小限に抑えることが可能になり、この手法を万全なものにすることが期待できる。

3) 土壌の構成成分との関係

添加試験の結果より半減期を算出したところ、黒土が最短で45分、鹿沼土が最長で158分と計算されたが、このようなOCDD半減期や前述の異性体組成の違いが生じる原因を考察するために、土壌の構成成分との関係を比較検討した。有機物量が多いほど、1,3,6,8-TCDDの量が減少していることを示した。また抽出液中のTOC濃度とダイオキシン類濃度およびTEQの間には正の相関が見られた。PCDD、PCDF、Co-PCBはTOCと同様に増減していることが分かった。

4) 土壌に含まれるダイオキシン類の同族体組成の違いによるTEQ変化の試算

この研究で、熱水抽出により汚染された土壌からダイオキシン類を効果的に除去できることが分かったが、脱塩素反応の過程で、高いTEFを持つ低塩素化異性体を生じることも確認された。この手法を、より安全に運用するためには、どのような場合にリスクを上昇させる危険性があるかを把握しておくことが重要であった。そこで、試料中のPCDDの同族体組成に着目し、処理時間によるTEQの変化を実験データに基づき計算した。

問題となるのは、高塩素異性体が脱塩素することにより低塩素化物を生じる場合であった。

想定したのは、以下の2つのケースであった。

ケース1：ダイオキシン類のすべてがOCDDの場合。

ケース2：4～8塩素化PCDD同族体の割合がすべて等しい場合。

ケース1では、TEQは処理後しばらくは増加し、80分をピークにその後は減少する様子が計算された。このケースでは、TEQを処理開始前のレベルまで下げるためには、400分を超える処理時間が必要であることが示され

た。

ケース2では、TEQは処理直後より減少し、処理前より増加するようなことはなかった(図18)。PeCDDの減少が緩やかなため、TEQ全体の低減にはやや時間を要すようであったが、処理をすればするだけTEQを下げる効果があることが分かった。ケース2は、平均的な環境試料を代表すると考えられ、熱水抽出の有効性が裏付けられた。

以上、この研究で検討した水熱反応を利用した手法によって、土壌からダイオキシン類を効率よく除去できることと、処理において注意すべき点を明らかにすることができた。付加的な処理や添加剤などを必要とせず、水だけでダイオキシン類などの汚染物質を除去できるこの手法は、適切に運用すれば、画期的で環境にやさしい処理技術であることを示すことができた。

OHラジカルによる分解については、いくつかの方法を試みたが顕著な成果を得るまでにはいかなかった。また、微生物、特に100以上の温度域で活躍する超好熱菌を探索して、塩素系有機物を分解する試みについては、超好熱菌と思われる微生物を探索することには成功したが、分解効率は予想ほど高くはなかった。

また、分解処理における環境汚染防止のための簡易分析法の開発も平行して進めており、当初の目標を達成しつつある。

2.4.2 化学物質のリスク評価の管理と評価のための統合情報システムに関する研究

化学物質のリスク評価と管理のための統合情報システム(“Virtual World”, 以下VW)は、「輸送・循環システムに係る環境負荷の定量化と環境影響の総合評価手法に

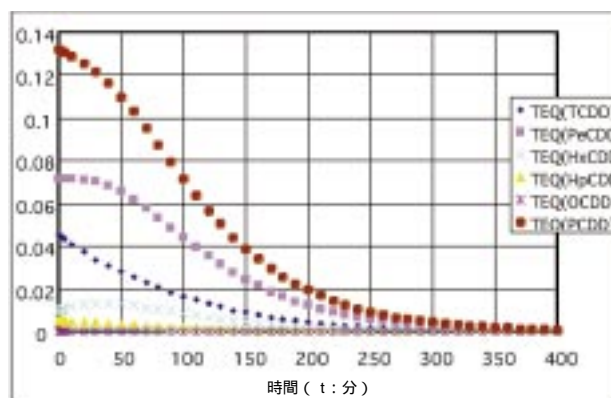


図18 時間に伴う土壌中TEQの変化の試算
ケース2：4～8塩素化PCDD同族体の割合がすべて等しい場合半減期はすべて等しく $t_{1/2}=45$ 分で計算

関する研究」(代表 森田昌敏 幹事 森口祐一,平成8~10年度)より概念化が開始され,「環境ホルモン等の多様な環境リスクの評価と管理のための統合情報システムの構築に関する研究」(代表 森田昌敏,運営幹事 田邊潔,森口祐一,平成11~13年度)より現在まで継続して研究が行われてきたものである。化学物質のリスク評価と管理にかかわる排出量(インベントリ)および推定モデル,環境動態モデル,モニタリングデータ,ハザードデータ,人および生態系へのリスク評価機能または情報,影響評価および政策評価に関連する社会経済統計等,化学物質のリスク評価と管理に係る情報を地理情報システム(GIS)上に統合し,環境負荷・影響・対策・政策オプション等化学物質のリスク評価と管理にかかわる統合的な情報を与えるよう構成することを目標としたシステムである。

統合情報システムに関連する研究課題は多岐にわたるため,総合化研究チームでは,併任先に化学物質環境リスク研究センターまた,一部はPM2.5・DEP研究プロジェクトにおいて実施中の課題をあわせて総合的にアプローチしてきた。2001~2002年度において達成した成果を表3に示す。

内分泌かく乱化学物質の環境動態およびリスク評価と管理に資するための総合的な情報を与え,また,情報技術的アプローチによって実験的データとともに内分泌かく乱化学物質のリスク評価と管理に資する情報システムと方法論を構築するための方法としてVWシステムを基盤として,主に内分泌かく乱化学物質の動態解析および情報技術に関連する研究的課題を実施した。2001~2002年度については,(1)GIS上の環境モデルシステムG-CIEMSの開発,(2)モニタリングデータを用いた地理統計解析手法の検討,(3)ダイオキシンに対する環境動態解析のケーススタディー,の3点を主課題として研究を実施した。(1)については,河川情報データベースおよび河川水質予測モデル(G-CIEMS-River)の開発,グリッド・流域複合多媒体モデル(G-CIEMS-Multi)の開発,統合インベントリシステムの開発(PMとの共同研究課題)をテーマとして実施した。(2)については,ダイオキシンモニタリングデータを用いた空間補間処理の検討を実施した。(3)については,関東+信濃川流域において,ダイオキシン類の焼却起源および農薬起源双方による過去40年間の動態を解明することにほぼ成功した。

(1) グリッド・流域複合多媒体モデル(G-CIEMS)の開発およびダイオキシンに対する環境動態解析のケーススタディー

多媒体運命予測モデルとして,大気・水・土壌・底質等の媒体からなる多媒体環境における化学物質の動態を予測するモデルが既に広く利用されているが,これらのモデルは一般に,多媒体の複雑な挙動を詳細に記述する代わり,地理的分解能については,ごく限られた能力しか持たないモデルが一般的である。本研究では,(a)現状において全国規模で利用可能は最大分解能を有する地上媒体として河川水質予測モデルの基盤とする単位流域(全国で約40,000流域)および大気は5kmグリッド(全国で約20,000グリッド)および沿岸海域を計算領域とする多媒体モデルを開発した(グリッド・流域複合多媒体モデル(G-CIEMS: Grid-Catchment Integrated Environmental Modeling System))(図19)。本モデルは,従来の多媒体モデルの持つ媒体間挙動のプロセスをすべて含みながら,同時に現在国内において統一的に利用可能なものとしては最小の地理情報単位の一つである単位流域を基盤とすることにより,従来の多媒体運命予測モデルの能力を大幅に強化することを目標としたものである。本モデルは,日本全域に渡って約5kmの空間分解能を全媒体について,実際の河川・流域・湖沼等の地表形態に対応する形で有しており,一般環境からの曝露評価においてはほぼ必要十分と考えられる分解能を有するとともに,例えば土壌・底質等の二次排出源から沿岸魚への移行など,モデル的解析が当面求められる目標あるいは曝露シナリオに対して,ほぼ完全に対応することができると考えている。モデルは,河川のみを取り扱う河川水質予測モデル(G-CIEMS-River)と,多媒体予測モデル(G-CIEMS-Multi)の2組で構成される。前者は水質についてのみより迅速な評価を,後者は全媒体を含む包括的な評価を可能にするが,いずれも同一の河川構造データベース(リスクセンター成果)を使用しVWシステムをプラットフォームとして動作する。

現時点では,モデル構造がほぼ完成し,以下に示す関東+信濃川流域でなおけるケーススタディーを実施した段階であるのでこれについて報告する。今後,年間の降雨・流出・気象の年間パターン等の導入による変動への対応,生物濃縮モデルの追加(底質シミュレーター研究と対応させる計画),計算結果による動態解析および曝露解析等の手法の整備,曝露モデルの追加などを順次実

表3 環境ホルモンプロジェクト/総合化研究チームおよび化学物質環境リスク研究センター併任研究テーマに関する総合成果

主要課題	サブテーマ	2002年度までの成果	主な研究実施場所
統合化インベントリおよび技術の開発	VOC等の統合化インベントリ技術の開発	VOCインベントリ開発（PM・DEP成果として発表）	PM
統合情報システム開発	統合解析のためのシステムおよびユーザーインターフェースの開発	データベースの階層化概念の整理とこれに基づくシステム整備を実施。これにより、複数PC間を通じた柔軟な統合解析を可能にすることを目標として開発中	環境ホルモン・リスク
	空間データ変換に基づく統合化情報処理技術の開発	異種の地理属性を有する情報間の相互変換による統合解析手法の開発を目標として実施中	全て
統合情報システム（GIS）上に適合する空間・時間分解能を有する環境動態モデルの開発	グリッド/流域複合多媒体モデル（G-CIEMS）の開発	GIS上の空間分解能を有する河川水質予測モデル（G-CIEMS-River）および大気から沿岸海域までの諸要素を複合した多媒体モデル（G-CIEMS-Multi）の開発をほぼ完了	環境ホルモン
	河川構造データベースの開発	上記G-CIEMS各モデルの基盤となる河川構造データベースを全国規模で構築	リスク
	地理統計手法によるモニタリングデータの解析	ダイオキシン類モニタリングデータにより、全国の存在状況を地理統計手法により検討し、空間分布状況を明らかにした。	環境ホルモン
GISモデルを用いるケーススタディーの実施	G-CIEMSモデルを用いたダイオキシン類の環境挙動解析	G-CIEMS多媒体モデルにより、関東地域でのダイオキシン挙動と底質コアデータの関連を解析	環境ホルモン
	G-CIEMSモデルの結果による暴露評価への試行	多媒体予測モデルによる大気経路暴露計算を実施	リスク

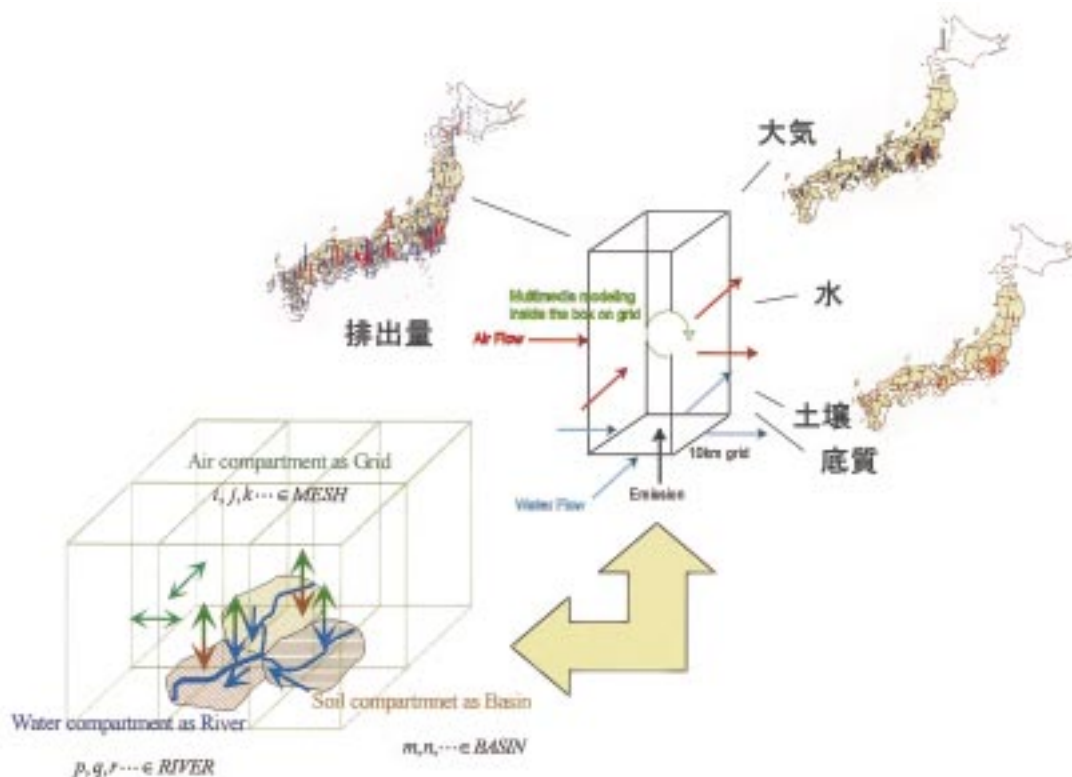


図19 グリッド・流域複合多媒体モデル（G-CIEMS）の構造概念図

行する予定である。

なお、当面はVWシステムを基盤として実行されるが、モデル計算ライブラリ・データベース・ユーザーインターフェースは構造的な独立したモジュール的設計であり、将来の拡張性を十分に配慮するよう努力した。

(2) G-CIEMS-Multi多媒体予測モデルの構造

1) 計算要素

大気：上下2層のオイラー的モデル、水：河川、湖沼、海域をそれぞれ地理空間要素に対応させて取り扱う。水とSSを含む分配・沈降・埋没・揮発・分解等の要素を記述、底質：水要素の下方に設定。土壌：水田、森林、都市等7種の土地利用区分を設定。森林区分では植生被

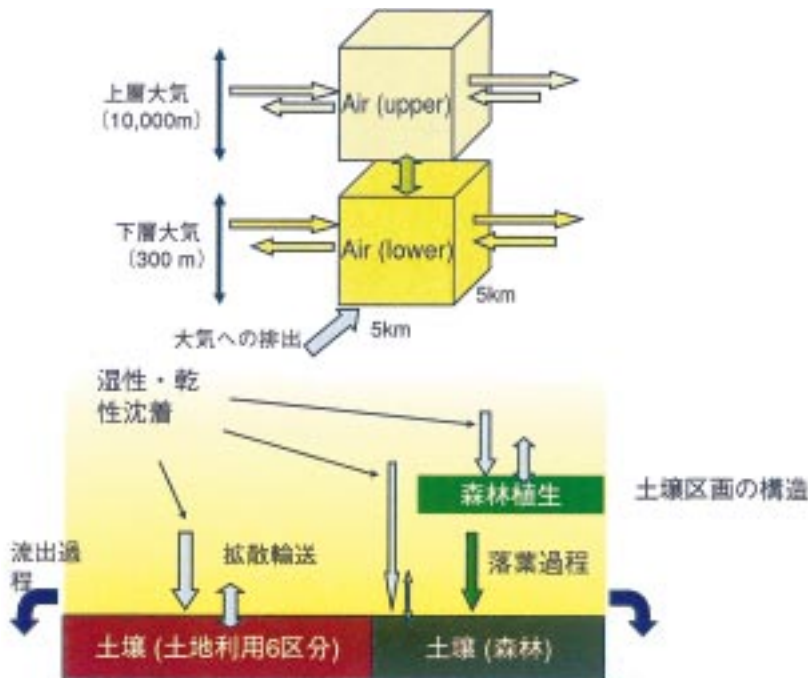


図20 G-CIEMS多媒体モデルの大気・土壌区画の計算要素の構造

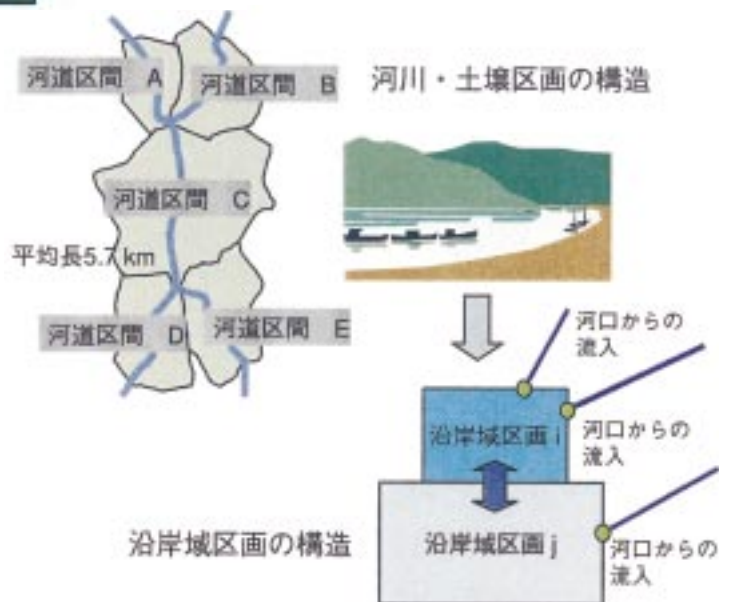


図21 G-CIEMS多媒体モデルの河川・土壌区画および沿岸区画の計算要素の構造

覆を考慮したモデル構造とする。モデル構造の概要を図20, 21, 22に示す。

2) 入力データ

各地理空間要素ごとに排出量を設定。水文データはリスクセンター成果の河川構造データベースを共用。

3) 出力データ

各地理空間要素内のサブ媒体ごとの予測濃度を出力する。

4) 計算単位

計算期間内の定常入力に対する非定常解導出を計算単位とする。この計算単位期間は任意であり、単位期間を必要に応じ時組み合わせて実行することで任意の計算期間あるいはシナリオに基づく非定常あるいは定常的解法



図22 G-CIEMS-River 河川水質予測モデルの概念図

に対応する。

(3) G-CIEMS-River河川水質予測モデルの構造

図22に示すように、単位河道に対して一つの計算モジュールを適用して水系単位での計算を実行する。希釈・指数減少・コンパートメントの3レベルを作成した。いずれも指定流量における定常解を算出する。

(4) ケーススタディーの設定

ダイオキシン類を対象として、過去の農業起源のダイオキシン類と焼却起源ダイオキシン類をあわせた経年的インベントリに基づき、1960～1999年の40年間を計算期間とする長期環境動態を推定した。

計算対象領域

関東地方+富士川水系+信濃川水系：38,600km², 27水系4241単位流域, 1,600大気グリッド。土地利用等の情報は3次メッシュデータよりVW空間配分機能を用いて設定。

対象物質およびシナリオ

ダイオキシン類について、都市ごみ焼却, PCP不純物, CNP不純物由来の排出を、1960年より1999年まで作成。計算はTotal-TEQをPeCDFで代表させた仮想的設定によっているが、一部異性体個別の計算も実施した。この設定による40年間の経時変化を計算した。各媒体ごとの計算結果、また関東地方の環境動態の結果としての東京湾底質コアの再現計算の結果の例を図23, 24および25に示

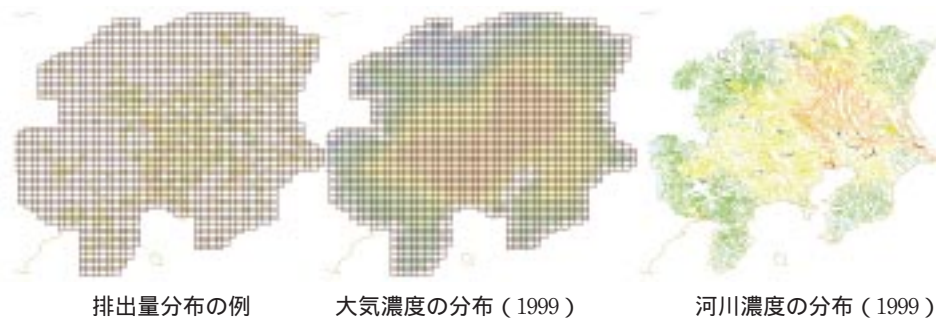


図23 排出量, 大気, 河川濃度の分布計算結果の例

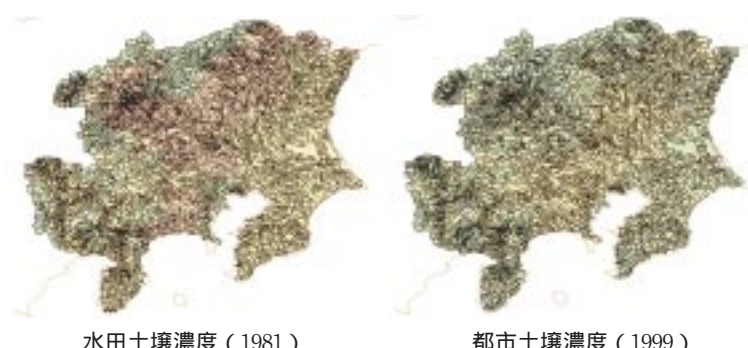


図24 土壌濃度の計算結果の例

す。

(5) ダイオキシンモニタリングデータを用いた空間データ解析

ダイオキシン類については、多数のモニタリングデータが測定されているが、従来より測定値は対象地域の基準超過・非超過の確認等を主な目的として取り扱われてきており、空間分布の詳細な解析手法は現在まであまり整備されていない。特に近年、POPs条約に関連して汚染物質の空間存在量の削減がひとつの目的として考えられるにいたっているが、このためには、インベントリに基づくモデル的手法とは対極の手法としてモニタリングデータの空間補間等の統計手法によるアプローチを検討していく必要があると考える。局所回帰によるダイオキ

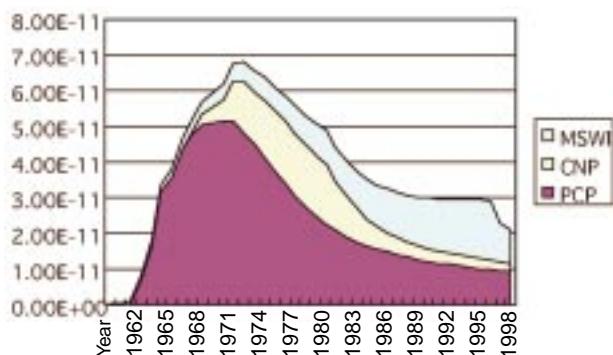


図25 関東地方の環境動態予測による東京湾底質コア濃度の再現計算結果

シン類の地理空間補間を試みた結果を図26に示す。特にモニタリングデータ等の離散的点データを用いる空間補間はなお十分手法が整備されているとは言いがたく、今後とも研究を進める必要がある。

2.4.3 内分泌かく乱化学物質データベース

化学物質の内分泌かく乱作用を中心に文献を調査してデータベースの作製を行った。国内外への公開の予定である。また酵母ツーハイブリッドアッセイデータは本研究所のオリジナルデータから成り立っており、作用の有無を含めて価値があると考えている。

酵母ツーハイブリッドアッセイデータベースの構築

構築したアッセイ系による化学物質の評価を進めており、hER 酵母では、SPEED '98に掲載された化学物質も含めて約300物質のスクリーニングを実施した。この中で約30% (88物質/291物質、この内+S9試験(体内での薬物代謝を考慮する試験法)でのみ陽性のものが24物質)にエストロゲン・アゴニスト活性が認められている。hER を用いた試験結果はデータベース化されインターネット上で公開している。さらに、他の系の試験結果も順次追加していく予定である。新たに集積されたデータには、PCBの代謝物である水酸化PCB約100化合物について、ヒト甲状腺ホルモン受容体 (hTR)酵母とhER 酵母によるアゴニスト試験がある。ある種の3, 4, および5 塩素置換PCB水酸化体に甲状腺ホルモン活性およ

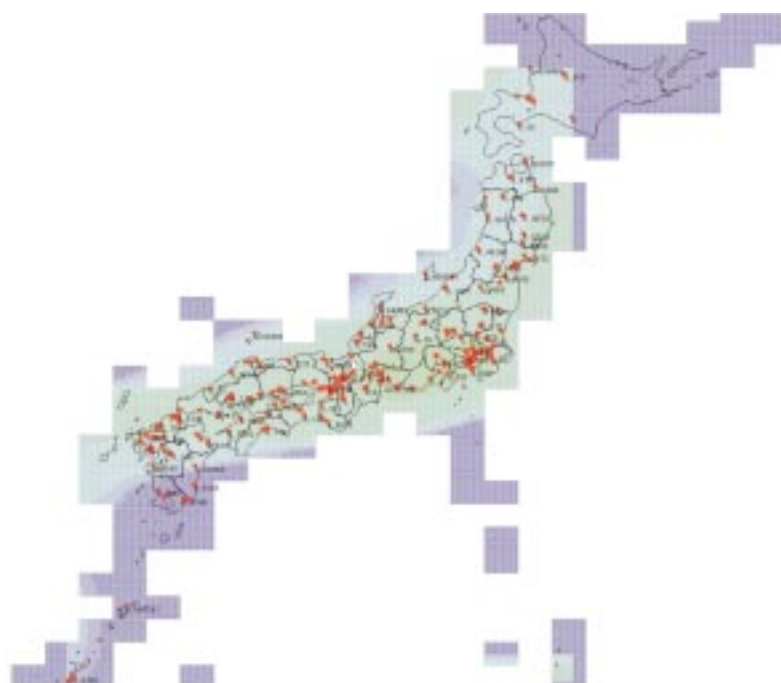


図26 局所回帰による大気中ダイオキシン類濃度の空間補間計算

びエストロゲン活性を示すものが認められている。

2.5 国際共同研究

国際共同研究を、日英、日韓、日米の2国間協定に基づき、あるいは国連大学におけるアジア8カ国との共同の調査研究体制のもと共同研究を実施している。

2.6 まとめ

これまでの研究成果の概要

ダイオキシン・環境ホルモン研究として以下の成果が得られた。

(1) ビスフェノールA、ノニルフェノールあるいはエストラジオール等の女性ホルモン作用を有する物質の高感度分析法を開発した。これらを用いて、霞ヶ浦や東京湾流入河川など水域のエストロゲン活性および化合物の測定を行い、またエストラジオールやその代謝産物およびその抱合体の安定性を調査し、環境中の動態を明らかとした。また核磁気共鳴法を用いた未知のホルモン様物質の同定を行った。ダイオキシンについては10ml 血液の超微量の測定や臭素化ダイオキシンの微量分析法を確立した。さらにダイオキシン類分析の信頼性向上と測定の効率化を図るため、ダイオキシン類標準物質の作成と濃度検定の実施、ダイオキシン類の新たなスクリーニング手法の設計と前処理の簡易化の検討、ダイオキシン類のリアルタイムモニタリング機器の概念設計を行った。

(2) 酵母ツーハイブリッド法をはじめとする各種のバイオアッセイ系のラインアップをそろえ、女性ホルモン作用、男性ホルモン作用、甲状腺ホルモン作用の評価システムを構築した。これらを用いて実際の環境水等の評価に着手し、霞ヶ浦などの湖水、都市河川、東京湾などにおけるエストロゲン作用の強さについての知見を得た。また市場にまわっている化学物質が内分泌かく乱作用を有するかどうかについてのスクリーニングを開始し、いくつかの物質にそのような作用があることを認められた。

(3) 巻貝についての調査を行うとともに、新たにアワビ類の内分泌かく乱に関する全国規模の実態調査を実施した。各地から収集した試料の生殖巣組織標本の作製と観察を行うとともに、有機スズ化合物(トリブチルスズおよびトリフェニルスズ)のアワビ類に対する流水式連続曝露試験を実施し、神経節を含む頭部への有機スズの高濃縮と雌の卵巣内での精子形成に代表されるいくつか

の組織変化を観察した。また霞ヶ浦のヒメタニシと東京湾のコノシロ等に対する内分泌かく乱の実態解明に関する調査を行い、雌化の現状についての知見を得ると共に、ヒメダカ、ヌカエビ、ウズラ等に対する室内実験も実施し、雌化にかかわる濃度の情報を整理しつつある。

(4) ヒト用超高磁場MRIの画像ノイズ低減により機能MRIの測定を可能とした。動物を用いる脳代謝試験法の研究、甲状腺ホルモン阻害剤や環境ホルモンを投与した実験動物の行動試験、有機スズを投与した実験動物の神経細胞死および再生に関する研究を実施し、脳神経系への影響評価法を準備した。

(5) ダイオキシン曝露の生体影響指標(例えばCIP1A1)について、ヒト血液サンプルでの測定法を確立し、血液サンプルでの化学測定値との比較を行った。ダイオキシンによって鋭敏に動く遺伝子の探索をDNAマイクロアレイを用いて開始した。また、ビスフェノールAとその代謝物の尿中濃度を決定するための分析法を確立し、通常人における曝露量についての知見を得た。

(6) 熱水による土壌中ダイオキシン類の抽出・分解についてその有効性を確認した。超音波照射分解については、ダイオキシン類含有排水を試料とした実験を行い、有効性に乏しいと結論づけた。一方、植物はビスフェノールAをよく吸収し、不活性化させることを見いだした。微生物分解については、実験装置を作製し、超好熱菌の探索を行った結果、180℃を最適増殖温度とする新規微生物の存在を示すデータを得た。

(7) 臭素化ダイオキシンについて、分析法を確立し、底質コアの分析を行うと共に人体脂肪組織中あるいは野鳥に存在することを初めて明らかとした。

(8) 内分泌かく乱化学物質のリスク評価と管理のための統合情報システムをGIS上に構築し、システム基盤の整備とモニタリングデータのGIS上における解析手法の検討を行うとともに、GIS上の高詳細環境モデルの開発をほぼ完了し、内分泌かく乱化学物質の高詳細環境動態解析を可能にした。また内分泌かく乱物質の作用データベースを作成した。

引用文献

- 1) Bettin, C., Oehlmann, J. & Stroben, E. (1996): Helgolander Meeresuntersuchungen, 50, 299-317.

[資 料]

研究の組織と研究課題の構成

1 研究の組織

[A 研究担当者]

環境ホルモン・ダイオキシン研究プロジェクトグループ

グループリーダー	森田昌敏
サブリーダー	遠山千春
計測・生物検定・動態研究チーム	白石寛明
	白石不二雄
	John S. Edmonds
	高木博夫
	柴田康行
NIESポスドクフェロー	西川智浩
	磯部友彦
	山本裕史
	寺崎正紀
NIESアシスタントフェロー	近藤卓哉
	小宇田智子
	芹沢滋子
	能町真実
	諸星佳織
	今井裕恵
生体機能評価研究チーム	三森文行
	梅津豊司
	渡邊英宏
	黒河佳香
NIESアシスタントフェロー	高屋展宏
病態生理研究チーム	高野裕久
	今井秀樹
	石堂正美
NIESポスドクフェロー	川口真以子
NIESアシスタントフェロー	柳澤利枝
健康影響研究チーム	米元純三
	曾根秀子
	西村典子
NIESポスドクフェロー	田中順子
	Poonam Sarkar
NIESアシスタントフェロー	座波ひろ子
	椎崎一広
	横井千紗子
	竹内陽子

生態影響研究チーム	森田昌敏 多田 満 高橋慎司 堀口敏宏 菅谷芳雄 鎌迫典久
NIESポスドクフェロー	久米 元 Anke Treuner 橋詰和慶 井関直政 鎌田 亮 平井慈恵
NIESアシスタントフェロー	小塩正朗 小田重人 後藤晃広
非常勤職員	河辺 聖 嘉屋美由紀
対策技術チーム	安原昭夫 伊藤裕康 橋本俊次
NIESポスドクフェロー	中宮邦近 北村公義
NIESアシスタントフェロー	荒波一史
非常勤職員	大島幸子
総合化研究チーム	鈴木規之 桜井健郎
NIESポスドクフェロー	南齋規介
化学環境研究領域	田邊 潔 崔 宰源
社会環境研究領域	森口祐一
循環型社会形成・廃棄物研究センター	酒井伸一
PM2.5・DEP研究プロジェクト	松橋啓介
化学物質環境リスク研究センター	中杉修身

[B 客員研究官]

西川淳一	(大阪大学)	(平成13年度～)
橋本伸哉	(静岡県立大学)	(平成13年度)

丸尾直子	(東ソー株式会社)	(平成13年度～)
笹井春雄	(長岡県衛生公害研究所)	(平成13年度～)
小口文子	(長岡県衛生公害研究所)	(平成13年度～)
細井要一	(長岡県衛生公害研究所)	(平成13年度～)
深澤 均	(静岡県環境衛生研究所)	(平成13年度～)
渡辺雅之	(静岡県環境衛生研究所)	(平成14年度～)
中嶋智子	(京都府保険環境研究所)	(平成13年度～)
高橋 悟	(岩手県環境保健研究センター)	(平成13年度～)
板井悠二	(筑波大学臨床医学系)	(平成14年度)
中田 力	(新潟大学脳研究所)	(平成14年度)
能勢忠男	(筑波大学臨床医学系)	(平成14年度)
福田 寛	(東北大学加齢医学研究所)	(平成14年度)
堤 治	(東京大学)	(平成13～14年度)
宮原裕一	(信州大学)	(平成13～14年度)
丹野恵一	(神戸市立看護大学)	(平成14年度)
池田雅彦	(静岡県立大学)	(平成13年度)
吉田 緑	(佐々木研究所)	(平成13年度)
増尾好則	(産業総合技術研究所)	(平成13年度～)
渡邊 泉	(東京農工大学農学部)	(平成13年度～)
鮫島正浩	(東京大学大学院農学生命科学研究科)	(平成15年度～)
園部浩之	(甲南大学理工学部生物学科)	(平成15年度～)
松村 徹	(国土環境株式会社)	(平成13～14年度)
宮田秀明	(摂南大学薬学部)	(平成13～14年度)

2 研究課題と担当者

2.1 内分泌かく乱化学物質・ダイオキシン類の計測法および生物検定法

2.1.1 計測法の高度化

(1) 負イオン化学イオン化質量分析法によるエストラジオール類の分析

白石寛明・芹沢滋子・高木博夫

(2) LC/MS/MSを用いた環境水中エストラジオールおよび抱合体の分析法の開発

白石寛明・磯部友彦・高木博夫・芹沢滋子

(3) 液体クロマトグラフィー定電位電解検出を用いた水中ビスフェノールAの測定法

白石寛明・近藤卓哉

(4) 人尿中のビスフェノールAの分析法

今井裕恵

(5) ダイオキシン類の簡易分析法の開発

伊藤裕康・高澤嘉一・大塚紀一郎・上田祥久・藤巻 奨・江崎達哉・大橋 眞・崔 宰源
・北村公義・橋本俊次・森田昌敏・藤峰慶徳・望月あゆみ・松村 徹・宮田秀明

(6) ヒト血液中ダイオキシン測定における少量化に関する研究

伊藤裕康・北村公義

(7) 臭素化ダイオキシン類，臭素化難燃剤(PBDE)の分析法の開発

崔 宰源・北村公義

- (8) 核磁気共鳴分析法 (NMR) を用いた未知内分泌かく乱化学物質分析の同定
 - 1) NMRを用いたBPA中の不純物の同定とエストロゲン活性
 - 2) NMRを用いたヒメタニシ中の甲状腺ホルモン様物質の同定
 白石不二雄・John S. Edmonds・寺崎正紀・能町真実

2.1.2 評価法 (生物試験法) の高度化の研究

- (1) 遺伝子組み換え酵母を用いた内分泌かく乱化学物質アッセイ法の開発
 - 1) 酵母Two-Hybrid法の拡張
 - 2) エストロゲン受容体の種間およびサブタイプ間の感受性
 白石不二雄・西川淳一・西川智浩・白石寛明
- (2) その他の *in vitro* 試験
 白石不二雄
- (3) 内分泌かく乱化学物質の魚類 (*in vivo*) 評価法の開発
 - 1) メダカピテロゲニン遺伝子によるエストロゲン様化学物質の評価法
 - 2) 抗メダカピテロゲニンモノクローナル抗体の樹立
 白石寛明・西川智浩・高木博夫・丸尾直子
- (4) メダカを用いた *in vivo* 試験法の開発と応用
 鑑迫典久, 平井慈恵, 小塩正朗, 河辺 潔
- (5) アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) を用いた試験法の開発と応用
 鑑迫典久・河辺 潔
- (6) 淡水無脊椎動物を用いた繁殖影響試験法
 多田 満・渡邊 泉・掛川洋次
- (7) ミジンコを用いた内分泌かく乱物質のスクリーニング・試験法開発
 鑑迫典久・小田重人
- (8) その他
 高橋慎司・清水 明・井関直政

2.2 内分泌かく乱化学物質・ダイオキシン類の環境動態

2.2.1 女性ホルモン作用を示す物質群の環境動態

- (1) 霞ヶ浦における女性ホルモン作用物質の分布と動態
 白石不二雄・白石寛明・高木博夫・磯部友彦・芹沢滋子・丸尾直子
- (2) 都市河川における女性ホルモン様物質の分布と動態
 白石不二雄・白石寛明・磯部友彦・芹沢滋子・丸尾直子
- (3) エストラジオール関連物質の環境水中での分解性
 白石寛明・磯部友彦
- (4) 東京湾におけるE2関連化合物, NP, OPおよびBPAの挙動
 白石不二雄・白石寛明・磯部友彦・芹沢滋子・丸尾直子
- (5) 植物によるビスフェノールAの吸収
 中嶋信美・大嶋幸子
- (6) 酵母エストロゲンアッセイ法による事業所排水試料中のホルモン活性の調査
 白石不二雄・白石寛明・丸尾直子・笹井春雄・小口文子・細井要一・深澤 均・渡辺雅之・中嶋智子・高橋 悟
- (7) 東京湾底質中の臭素化ダイオキシンの分布

崔 宰源・鈴木規之・橋本俊次・酒井伸一

(8) 地球的規模のダイオキシンの分布

橋本俊次・柴田康行

2.3 内分泌かく乱化学物質・ダイオキシンのヒトの健康に及ぼす影響に関する研究

2.3.1 (1) ダイオキシン類の曝露量，および生体影響評価に関する研究

米元純三・曾根秀子・西村典子・兜 眞徳・遠山千春・田中順子・Poonam Sarkar・
座波ひろ子・椎崎一広・横井千紗子・竹内陽子・堤 治・宮原裕一・丹野恵一・
池田雅彦・吉田 緑

(2) 臭素化ダイオキシン類による人体曝露

(3) 脳神経系への影響

三森文行・梅津豊司・渡邊英宏・黒河佳香・高屋展宏
高野裕久・今井秀樹・石堂正美・川口真以子

1) 脳の超高磁場MRI試験法の開発

2) 実験動物の行動試験法の研究

今井秀樹・川口真以子

3) 組織化学的試験法の研究

4) 神経伝達物質および遺伝子レベルでの研究

石堂正美・増尾好則

5) 免疫系への影響に関する研究

2.3.2 野生生物の生殖に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究

(1) 腹足類 (巻貝類)

1) アワビ類

2) イボニシ 堀口敏宏・白石寛明・Anke Treuner・後藤晃広・嘉屋美由紀

3) ヒメタニシ 鑓迫典久・小田重人・小塩正朗・河辺 潔

(2) 斧足類 (二枚貝類)

堀口敏宏・橋詰和慶

(3) 魚類

堀口敏宏・久米 元・後藤晃広

(4) 鳥類

井関直政

(5) その他

John Edmonds・鎌田 亮

2.4 内分泌攪乱物質の対策技術・手法の開発

2.4.1 内分泌攪乱化学物質の分解処理技術に関する研究

(1) ビスフェノールAの植物による分解

大島幸子・John Edmonds

(2) 微生物を用いた内分泌攪乱物質の分解

安原昭夫・中宮邦近

(3) ダイオキシン類の分解処理技術に関する研究

1) 抽出・除去率を左右する実験パラメーターの検証

2) ダイオキシン類の除去機構に関する検討

3) 土壌の構成成分との関係

4) 土壌中に含まれるダイオキシン類の同族体組成の違いによるTEQ変化の試算

橋本俊次・伊藤裕康・安原昭夫・北村公義・荒波一史・中宮邦近

2.4.2 化学物質のリスク評価の管理と評価のための統合情報システムに関する研究

鈴木規之・桜井健郎・田邊 潔・森口祐一・松橋啓介・中杉修身

2.4.3 内分泌攪乱化学物質データベース

白石不二雄・白石寛明

2.5 国際共同研究

白石寛明・堀口敏宏・鑓迫典久

研究成果発表一覧

1 誌上発表 (英文)

発表者・題目・掲載誌・巻(号)・頁・刊年

- Ishido M., Masuo Y., Oka S., Kunimoto M., Morita M. : Application of Supermex system to screen behavioral traits produced by tributyltin in the rat, *J. Health Sci.*, **48** : 451-454, 2002
- Masuo Y., Ishido M., Morita M., Oka S. : Effects of neonatal 6-hydroxydopamine lesion on the gene expression profile in young adult rats, *Neurosci. Lett.*, **335** : 124-128, 2002
- Pramanik R., Ishido M., Kunimoto M. : Methylmercury-mediated down regulation of mtHSP70 and phospholipase A2 mRNA expression in human neuroblastoma NB-1 cells identified by cDNA macroarray analysis, *J. Health Sci.*, **48** : 381-384, 2002
- Adachi T., Takanaga H., Sakurai Y., Ishido M., Kunimoto M., Asou H. : Influence of cell density and thyroid hormone on glial cell development in primary cultures of embryonic cerebral hemisphere, *J. Neurosci. Res.*, **69** : 61-71, 2002
- Pramanik R., Ishido M., Kunimoto M. : Effects of cadmium chloride on neurite outgrowth and gene expression in human neuroblastoma NB-1 cells, *J. Health Sci.* **47** : 583-586, 2001
- Ishido M., Kunimoto M. : Regulation of cell fate by cadmium and zinc, *J. Health Sci.*, **47** : 9-13, 2001
- Han J-Y., Adachi T., Ishido M., Kunimoto M. : Effect of dominant-negative expression of L1 cytoplasmic domain on the localization of brain ankirins in human neuroblastoma NB-1 cells, *J. Health Sci.*, **47** : 478-482, 2001
- Han J-Y., Adachi T., Ishido M., Kunimoto M. : Effect of dominant-negative expression of L1 cytoplasmic domain on the localization of brain ankirins in human neuroblastoma NB-1 cells, *J. Health Sci.*, **47** : 478-482, 2001
- Ishido M., Ohtsubo R., Adachi T., Kunimoto M. : Attenuation of both apoptotic and necrotic actions of cadmium by Bcl-2, *Environ. Health Perspectives.*, **110** : 37-42, 2002
- Pramanik R., Ishido M., Kunimoto M., Umezawa Y. : DNA array analyses of gene expression of human neuroblastoma NB-1 cells exposed to endocrine disruptors, *Environ. Sci.*, **8** : 157, 2001
- Ishido M., Masuo Y., Oka S., Kunimoto M., Morita M. : Effects of intracisternal administration of endocrine disruptors on spontaneous motor activity in the developing rats, *Environ. Sci.*, **9** : 173, 2002
- Masuo Y., Ishido M., Morita M., Komatsu Y. : Analysis of hyperkinetic child model rats: gene expression profiling by DNA array, *Neurosci. Res.*, **26** : S51, 2002
- Isobe T., Shiraishi H., Yasuda M., Shinoda A., Suzuki H., Morita M. : Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **984** : 195-202, 2003
- Isobe T., Shiraishi H., Yasuda M., Shinoda A., Suzuki H., Morita M. : Determination of Estrogens and Their Conjugates in Water Using Solid Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **984**, 195-202, 2003
- Imai H., Nishimura T., Sadamatsu M., Liu Y., Kabuto M., Kato N. : Type II glucocorticoid receptors are involved in neuronal death and astrocyte activation induced by trimethyltin in the rat hippocampus, *Exp. Neurol.*, **171** : 22-28, 2001
- Tsutsumi S., Akaike M., Arimitsu H., Imai H., Kato N. : Circulating corticosterone alters the rate of neuropathological and behavioral changes induced by trimethyltin in rats, *Exp. Neurol.*, **173** : 86-94, 2002
- Umezu T., Sakata A., Ito H. : Ambulation-promoting effect of peppermint oil and identification of its active constituents, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **69** : 383-390, 2001
- Umezu T., Ito H., Nagano K., Yamakoshi M., Oouchi H., Sakaniwa M. Morita M. : Anticonflict effects of rose oil and identification of its active constituents, *Life Sci.*, **72** : 91-102, 2002
- Umezu T., Morita M. : Evidence for the involvement of dopamine in ambulation promoted by menthol in mice, *J. Pharmacol. Sci.*, **91** : 125-135, 2003
- Umezu T. : Behavioral pharmacology of plant-derived essential oils, *Research Trends*, (in press).

- Choi J.-W., Fujimaki S., Kitamura K., Hashimoto S., Ito H., Suzuki N., Sakai S., Morita M. : Polybrominated Dibenzop-dioxins (PBDDs), Dibenzofurans (PBDFs) and Diphenyl Ethers (PBDEs) in Japanese Human Adipose Tissue, *Organohalogen Compounds*, **58** : 169-172, 2002
- Kitamura K., Nagao M., Choi J.-W., Hashimoto S., Ito H., Morita M. : Combination of Solid Phase Extraction and Blue-Chitin Column for Dioxin Congeners in Human Serum, *Organohalogen Compounds*, **55** : 49-52, 2002
- Choi J.-W., Fujimaki S., Kitamura K., Hashimoto S., Ito H., Suzuki N., Sakai S., Morita M. : Polybrominated Dibenzop-dioxins, Dibenzofurans and Diphenyl Ethers in Japanese Human Adipose Tissue, *Environ. Sci. Technol.*, **37** : 817-821, 2003
- Kitamura K., Nagao M., Choi J.-W., Hashimoto S., Ito H., Morita M. : Combination of Solid Phase Extraction and Blue-chitin Column for Dioxin Congeners in Human Serum, *Organohalogen compounds*, **55** : 49-52, 2002
- Kitamura K., Nagao M., Morita M. : Anatomical Variation Levels of Dioxin Congeners in Human Sebum, *Organohalogen compounds*, **55** : 311-314, 2002
- Choi J.-W., Fujimaki S., Kitamura K., Hashimoto S., Ito H., Suzuki N., Sakai S., Morita M. : Polybrominated dibenzop-dioxins (PBDDs), dibenzofurans (PBDFs) and diphenyl ethers (PBDES) in Japanese human adipose tissue, *Organohalogen compounds*, **58** : 169-171, 2002
- Koda T., Soya Y., Negishi H., Shiraishi F., Morita M. : Improvement of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for screening estrogen receptor binding activity, *Environ. Toxicol. Chem.*, **21** (12) : 2536-2541, 2002
- Koda T., Soya Y., Negishi H., Shiraishi F., Morita M. : Improvement of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for screening estrogen receptor binding activity, *Environ. Toxicol. Chem.*, **21** (2) : 2536-2541, 2002
- Sakurai T., Suzuki N., Morita M. : Examination of dioxin fluxes recorded in dated aquatic-sediment cores in the Kanto region of Japan using multivariate data analysis, *Chemosphere*, **46** : 1359-1365, 2002
- Hanada Y., Tanizaki T., Koga M., Shiraishi H., Soma M. : Quantitative analysis of triphenylboron in environmental water samples by liquid chromatography/mass spectrometry, *Anal. Sci.*, **18** (4) : 445-448, 2002
- Hanada Y., Tanizaki T., Koga M., Shiraishi H., Soma M. : LC/MS studies on characterization and determination of N, N'-ethylenedithiocarbamate fungicides in environmental water samples, *Anal. Sci.*, **18** (4) : 441-444, 2002
- Hanada Y., Imaizumi I., Kido K., Tanizaki T., Koga M., Shiraishi H., Soma M. : Application of a pentafluorobenzyl bromide derivatization method in gas chromatography/mass spectrometry of trace levels of halogenated phenols in air, water and sediment samples, *Anal. Sci.*, **18** (6) : 655-659, 2002
- Sang-Man Cho, Kurihara R., Carlos Augusto Strussmann, Uozumi M., Yamakawa H., Yamasaki T., Soyano K., Shiraishi H., Morita M., Hashimoto S. : Histological Abnormalities in the Gonads of Konosiro Gizzard Shad (*Konosirus punctatus*) from Coastal Areas of Japan, *Environ. Sci.*, **10**(1) : 25-36, 2003
- Fukazawa H., Watanabe M., Shiraishi F., Shiraishi H., Shiozawa T., Matsushita H., Terao Y. : Formation of chlorinated derivatives of bisphenol A in waste paper recycling plants and their estrogenic activities, *J. Health Sci.*, **48** (3) : 242-249, 2002
- Nomura Y., Ishibashi H., Miyahara M., Shinohara R., Shiraishi F., Arizono K. : Effects of dental resin metabolites on estrogenic activity *in vitro*, *J. Materials Sci.: Materials in Medicine*, **14** : 307-310, 2003
- Shiraishi F., Okumura T., Nomachi M., Serizawa S., Nishikawa J., Edmonds J. S., Morita M. : Estrogenic and thyroid hormone activity of a series of hydroxy-polychlorinated biphenyl, *Chemosphere*, (in press).
- Kameda H., Ohta S., Sakiyama T., Sakurai T., Suzuki N., Nakano T., Matsueda T., Hashimoto S., Matsuda M., Watanabe I., Okimine K., Nezu T. : Detection system of unusual data for dioxins, *Organohalogen Compounds*, **50** : 251-254, 2001
- Nakajima N., Ohshima Y., Serizawa S., Kouda T., Edmonds J.S., Shiraishi F., Aono M., Kubo A., Tamaoki M., Saji H., Morita M. : Processing of bisphenol A by plant tissues : Glucosylation by cultured BY-2 cells and glucosylation/translocation by plants of *Nicotiana tabacum*, *Plant Cell Physiol.*, **43** (9) : 1036-1042, 2002
- Nakajima N., Ohshima Y., Serizawa S., Kouda T., Edmonds J.S., Shiraishi F., Aono M., Kubo A., Tamaoki M., Saji H. and Morita M. : Processing of bisphenol A by plant tissues: glucosylation by cultured BY-2 cells and glucosylation/translocation by plants of

- Nicotiana tabacum, *Plant Cell Physiol.*, **43** : 1036-1042, 2002
- Sone H., Yonemoto J. : Interaction between dioxin signaling and sex hormones. *J. Health Sci.*, **48** (5) : 385-392, 2002
- Ikeda M., Inukai N., Mitsui T., Sone H., Yonemoto J., Tohyama C., Tomita T. : Changes in fetal brainaromatase activity following in utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure in rats, *Environ. Toxicol. Pharm.*, **11** : 1-7, 2002
- Nohara K., Fujimaki H., Tsukumo S., Inouye K., Sone H., Tohyama C. : Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on T cell-derived cytokine production in ovalbumin (OVA)-immunized C57Bl/6 mice, *Toxicol.*, **172** : 49-58, 2002
- Takeyama M., Sone H., Tohyama C. : Changes in expression of the NMDA receptor subunit mRNA in the neocortex and hippocampus by perinatal exposure to dioxin, *Neuro Report*, **12** (18) : 4009-4012, 2001
- Inoue K., Takano H., Yoshikawa T. : Fatty fish supplementation and risk of prostate cancer, *Lancet*, **358** (9290) : 1367, 2001
- Takano H., Inoue K., Katada K., Yoshikawa T. : Stenosis of pyloric antrum in a patient with systemic lupus erythematosus., *Endoscopy*, **34** (10) : 846, 2002
- Ochiai J., Takano H., Ichikawa H., Naito Y., Yoshida N., Yanagisawa R., Yoshino S., Murase H., Yoshikawa T. : A novel water-soluble vitamin E derivative, 2-(α -D-glucopyranosyl) methyl-2,5,7,8-tetramethylchroman-6-ol, protects against acute lung injury and mortality in endotoxemic rats, *Shock*, **18**(6) : 580-584, 2002
- Sadakane K., Ichinose T., Takano H., Yanagisawa R., Sagai M., Yoshikawa T., Shibamoto T. : Murine strain differences in airway inflammation induced by Diesel exhaust particles and house dust mite allergen, *Int. Arch Allergy Immunol.*, **128** : 220-228, 2002
- Inoue K., Takano H., Yamada T., Tsuchida Y., Yoshikawa T. : Nasogastric tubes in patients with dysphagia., *Lancet*, **359** : 81, 2002
- Ichinose T., Takano H., Miyabara Y., Sagai M., Sadakane K., Shibamoto T. : Diesels exhaust particles enhance antigen-induced eosinophilic inflammation in the airway of mast cell deficient mice, *Toxicol.*, **180** : 293-301, 2002
- Sadakane K., Takano H., Ichinose T., Yanagisawa R., Shibamoto T. : Formaldehyde enhances mite allergen-induced eosinophilic inflammation in the murine airway, *J Environ. Pathol. Toxicol. & Oncol.*, **21** : 267-276, 2002
- Tatarazako N., Takigami H., Koshio M., Kawabe K., Hayakawa Y., Arizono K., Morit M. : New Measurement Method of P450s Activities in the Liver Microsome with Individual Japanese Medaka (*Oryzias latipes*), *Environ. Sci.*, **9** (6) : 2002
- Tatarazako N., Takigami H., Koshio M., Kawabe K., Hayakawa Y., Arizono K., Morita M. : New Measurement Method of P450s Activities in the Liver Microsome with Individual Japanese Medaka (*Oryzias latipes*), *Environ. Sci.*, **9** (6) : 451-462, 2002
- Tada M. : Dynamics of benthic communities in the upper region of the River Hinuma in relation to residual pesticides, *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, **5** (1) : 1-12, 2002
- Ohsako S., Miyabara Y., Nishimura N., Kurosawa S., Sakaue M., Ishimura R., Sato M., Aoki Y., Sone H., Tohyama C., Yonemoto J. : Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive organs of male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of 5 α -reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate, *Toxicol. Sci.*, **60** : 132-143, 2001
- Nishimura N., Miyabara Y., Sato M., Tohyama C. and Yonemoto J. : Alterations in Thyroid Function in Holtzman Rats Following Gestational and Lactational Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *Organohalogen Compounds*, **53** : 14-16, 2001
- Nishimura N., Miyabara Y., Suzuki J. S., Sato M., Aoki Y., Satoh M., Yonemoto J., Tohyama C. : Induction of metallothionein in the livers of female Sprague-Dawley rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *Life Sci.*, **69** : 1291-1303, 2001
- Nishimura N., Miyabara Y., Sato M., Yonemoto J., Tohyama C. : Immunohistochemical localization of thyroid stimulating hormone induced by a low oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in female Sprague-Dawley rats, *Toxicol.*, **171** : 73-82, 2002
- Kurachi M., Hashimoto S., Obata A., Nagai S., Nagahata T., Inadera H., Sone H., Tohyama C., Kaneko S., Kobayashi K., Matsushima K. : Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-responsive genes in mouse liver by serial analysis of gene expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292** (2) : 368-377, 2002
- Hashimoto S., Yasuhara A., Sakai S., Morita M. : Preliminary studies for reduction of dioxins from polluted waste and environmental samples by hot water, *Organohalogen Compounds*, **54** : 247-250, 2001

- Hashimoto S., Yasuhara A., Sakai S., Morita M. : Preliminary studies for reduction of dioxins from polluted waste and environmental samples by hot water, *Organohalogen Compounds*, **54** : 247-250, 2001
- Takazawa Y., Ueda Y., Higuchi T., Hashimoto S., Ito H., Morita M. : Determination of 2,3,7,8-chlorinated dibenzo-*p*-dioxin and -furans based on pre-column separation technique, *Organohalogen Compounds*, **50** : 154-157, 2001
- Choi J. W., Hashimoto S., Suzuki N., Onodera J., Ito H., Morita M. : Clean-up method for PBDD, PBDF and PBDE by active carbon column -- and its application to sediments, *Organohalogen Compounds*, **52** : 53-57, 2001
- Arulmozhiraja S., Fujii T., Morita M. : Density functional theory studies on radical ions of selected polychlorinated biphenyls, *J. Phys. Chem. A*, **106** : 10590-10595, 2002
- Arulmozhiraja S., Selvin P. C., Fujii T. : Structures, potential energy curves, and torsional barrier heights for selected polychlorinated biphenyls (PCBs) : A density functional theory study, *J. Phys. Chem. A*, **106** : 1765-1769, 2002
- Arulmozhiraja S., Fujii T., Sato G. : Density functional theory-based reactivity descriptors for dioxins, *Mol. Phys.*, **100** : 423-431, 2002
- Arulmozhiraja S., Fujii T. : Torsional barrier, ionization potential, and electron affinity of biphenyl - A theoretical study, *J. Chem. Phys.*, **115** : 10589-10594, 2001
- Funabashi T., Kawaguchi M., Kimura F. : The Endocrine Disruptors Butyl Benzyl Phthalate and Bisphenol A Increase the Expression of Progesterone Receptor Messenger Ribonucleic Acid in the Preoptic Area of Adult Ovariectomized Rats. *Neuroendocrinol.*, **74** : 77-81, 2001
- Horiguchi T. : Imposex in gastropods: endocrine disruption as irreversible masculinization of females, caused by tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPhT) from antifouling paints, *Proceeding of the 1st U.S.-Japan Workshop on Endocrine Disrupting Chemicals and Their Toxicological Evaluation*, 74-78, 2001
- Horiguchi T. : Studies on Masculinization of female gastropods: Induction mechanism of imposex caused by organotin contamination, *UK-Japan Research Cooperation on Endocrine Disrupting Chemicals*, Edited by Overseas Environmental Cooperation Center Japan, Ministry of the Environment of Japan, 9-10, 2001
- Horiguchi T., Cho H. S., Shiraishi H., Morita M., Shimizu M. : Contamination of organotin compounds and endocrine disruption in gastropods, *Otsuchi Marine Research Center, Ocean Res. Inst., Univ. Tokyo*, **26** : 61-63, 2001
- Horiguchi T., Cho H. S., Shiraishi H., Kojima M., Kaya M., Morita M., Shimizu M. : Contamination by organotin (tributyltin and triphenyltin) compounds from antifouling paints and endocrine disruption in marine gastropods, *RIKEN Review / Focused on New Trends in Bio-Trace Elements Research*, **35** : 9-11, 2001
- Horiguchi T., Cho H.S., Shiraishi H., Kojima M., Kaya M., Morita M., Shimizu M. : Environmental Monitoring of Organotin(Tributyltin and Triphenyltin) Pollution in Japanese Coastal Waters with Special Reference to Imposex in Gastropods, *Proceeding of the International workshop on Marine Pollution by Persistent Organic Pollutants (POPs)* : 81-86, 2001
- Horiguchi T., Uno S., Shimizu M., Shiraishi H., Morita M. : Contamination of organotin compounds and imposex in molluscs from Vancouver, Canada , *PICES SCIENTIFIC REPORT*, **16** : 53-56, 2001
- Cho H. S., Horiguchi T. : Endocrine disruption in mollusks: case studies on the rock shell, the ivory shell and the giant abalone, linking with organotin contamination in Korea and Japan, *Int. Symp. Environ. Endocrine Disrupters*, **2000** : 179-184, 2001
- Lu M., Horiguchi T., Shiraishi H., Shibata Y., Abo M., Okubo Y., Yamazaki S. : Discrepancy of analytical values of steroid hormones in marine gastropods between GC/MS and ELISA, *Anal. Sci.* **17** (Suppl.), i1619-i1622, 2001
- Horiguchi T., Kojima M., Kaya M., Matsuo T., Shiraishi H., Morita M., Adachi Y. : Tributyltin and triphenyltin induce spermatogenesis in ovary of female abalone, *Haliotis gigantea*, *Mar. Environ. Res.*, **54** : 679-684, 2002
- Mitsumori F., Kumagai M. : Pharmacological fMRI method for animal brain based on Mn²⁺-induced activity specific contrast, *Proc. 9th. Int. Soc. Magn. Reson. Med.*, 2001 : 1328, 2001
- Mitsumori F. : fMRI method for animal brain based on Mn²⁺-induced activity specific contrast, *Proc. Int. Symp. Med. Imag.*, 58-59, 2002

- Miyabara Y., Ohsako S., Nohara K., Tohyaa C., Yonemoto J. : Fetal and infant body burden of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin causing a short anogenital distance and immunotoxicity in male Holtzman rats, *Organohalogen Compounds*, **53** : 54-56, 2001
- Ishimura R., Ohsako S., Miyabara Y., Sakaue M., Kawakami T., Aoki Y., Yonemoto J., Tohyama C. : Increased glycogen content and glucose transporter 3 mRNA level in the placenta of Holtzman rats after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **178** : 161-171, 2002
- Ishimura R., Ohsako S., Miyabara Y., Sakaue M., Kawakami T., Aoki Y., Yonemoto J., Tohyama C. : Increase of glycogen content and glucose transporter 3 (GLUT3) mRNA level in placenta of Holtzman rats after exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **185** : 197-206, 2002
- Ohsako S., Miyabara Y., Sakaue M., Ishimura R., Kakeyama M., Izumi H., Yonemoto J., Tohyama C. : Developmental stage-specific effects of perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on reproductive organs of the male rat offspring, *Toxicol. Sci.*, 2002
- Choi J. W., Miyabara Y., Hashimoto S., Suzuki N., Morita M. : Time trends of PCDD/F and coplanar PCB concentrations in Japanese human adipose tissue -- comparison of 1970-71, 1994-96 and 2000, *Organohalogen Compounds*, **52** : 314-316, 2001
- Choi J. W., Miyabara Y., Hashimoto S., Morita M. : Comparison of PCDD/F and coplanar PCB concentrations in Japanese human adipose tissue collected in 1970-1971, 1994-1996 and 2000, *Chemosphere*, **47** : 591-597, 2002
- Choi J. W., Miyabara Y., Hashimoto S., Morita M. : Comparison of PCDD/F and coplanar PCB concentrations in Japanese human adipose tissue collected in 1970-71, 1994-96 and 2000. *Chemosphere*, **47** : 591-597, 2002
- Choi J. W., Morita M. : Comparison of Analytical Methods for PCDD/Fs and Coplanar PCBs between Japan and Korea. *S Environ. Chem.*, **12** : 563-569, 2002
- Matsuura N., Uchiyama T., Tada H., Nakamura Y., Kondo N., Morita M., Fukushi M. : Effects of Dioxins and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) on Thyroid Function in Infants Born in Japan : Report from Research on Environmental Health : *Clin Pediatr Endocrinol* 2001, **10** (1) : 1-6, 2001
- Matsuura N., Uchiyama T., Tada H., Nakamura Y., Kondo N., Morita M., Fukushi M. : Effects of Dioxins and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) on Thyroid Function in Infants Born in Japan-the second report From research on environmental health : *Chemosphere*, **45** : 1167-1171, 2001
- Choi J. W., Morita M. : Comparison of Analytical Methods for PCDD/Fs and Coplanar PCBs between Japan and Korea : *J. Environ. Chem.*, **12** (3) : 563-569, 2002
- Arulmozhiraja S., Fujii T., Morita M. : Density Functional Theory Studies on Radical Ions of Selected Polychlorinated Biphenyls : *J. Phys. Chem. A*, **106** (44) : 10590-10595, 2002
- Kawata K., Ibaraki T., Tanabe A., Yagoh H., Shinoda A., Suzuki H., Yasuhara A. : Gas chromatographic-mass spectrometric determination of hydrophilic compounds in environmental water by solid-phase extraction with activated carbon fiber felt, *J. Chromatogr. A*, **911** : 75-83, 2001
- Tanabe A., Mitobe H., Kawata K., Yasuhara A., Shibamoto T. : Seasonal and spatial studies on pesticide residues in surface waters of the Shinano River in Japan, *J. Agric. Food Chem.*, **49** : 3847-3852, 2001
- Oda J., Nomura S., Yasuhara A., Shibamoto T. : Mobile sources of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in a roadway tunnel, *Atmos. Environ.*, **35** : 4819-4827, 2001
- Mitobe H., Ibaraki T., Tanabe A., Kawata K., Yasuhara A. : High performance liquid chromatographic determination of pesticides in soluble phase and suspended phase in river water, *Toxicol. Environ. Chem.*, **81** : 97-110, 2001
- Yamamoto T., Yasuhara A. : Chlorination of bisphenol A in aqueous media: formation of chlorinated bisphenol A congeners and degradation to chlorinated phenolic compounds., *Chemosphere*, **46** : 1215-1223, 2002
- Yasuhara A., Katami T., Okuda T., Ohno N., Shibamoto T. : Formation of dioxins during the combustion of newspapers in the presence of sodium chloride and poly (vinyl chloride), *Environ. Sci. Technol.*, **35** : 1373-1378, 2001

Katami T., Yasuhara A., Okuda T., Shibamoto T. : Formation of PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs from polyvinyl chloride during combustion in an incinerator, Environ. Sci. Technol., **36** : 1320-1324, 2002

Yasuhara A., Katami T., Okuda T., Shibamoto T. : A role of inorganic chlorides in formation of PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs from combustion of plastics, newspaper, and pulp in an incinerator, Environ. Sci. Technol., **36** : 3924-3927, 2002

Sakaue M., Ohsako S., Ishimura R., Kurosawa S., Korohmaru M., Hayashi Y., Aoki Y., Yonemoto J., Tohyama C. : Bisphenol-A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose, J. Occup. Health, **43** (4) : 185-190, 2001

Yonemoto J., Nishimura N., Yokoi C., Takeuchi Y., Tohyama C. : Hypothyroxinemia at weaning of Holtzman rats is caused by lactational but not in utero exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Organohalogen Compounds, **56** : 57-59, 2002

2 誌上発表(和文)

発表者・題目・掲載誌・巻(号)・頁・刊年

- 磯部友彦, 中田典秀, 間藤ゆき枝, 西山 肇, 熊田英峰, 高田秀重: プラスチック製食器等からのノニルフェノールの溶出, 環境化学, 12(3): 621-625, 2002
- 網島浩一, 今井秀樹, 劉 影, 定松美幸, 加藤進昌: ストレスと脳機能障害, 現代医療(特集「精神疾患の分子医学」加藤進昌編), 33: 145-151, 2001
- 今井秀樹: ストレスと海馬 有機スズ化合物投与による実験動物のストレスモデル, 医学のあゆみ, 197: 286-287, 2001
- 定松美幸, 今井秀樹, 加藤進昌: ストレスと神経再生, 分子精神医学, 2: 232-235, 2002
- 梅津豊司: 植物精油の中樞作用, AROMA RESEARCH, 12(1): 16-22, 2001
- 梅津豊司: 植物精油の中樞作用, AROMA RESEARCH, 3(4): 376-382, 2002
- 梅津豊司: マウスにおける精油成分メントールの移所運動活性増加作用へのドパミンの関与, AROMA RESEARCH, 13: 27-34, 2003
- 鎌田 亮, 森田昌敏: 内分泌攪乱化学物質と鳥類の繁殖障害, 環境化学, 12: 23-31, 2002
- 川口真以子, 船橋利也, 美津島大, 貴邑富久子: 雌性ラットの生殖機能調節中枢におよぼす, 胎生期から授乳期にかけての内分泌攪乱物質ビスフェノールA曝露の影響, 横浜医学, 52: 115-126, 2001
- 小林隆弘, 菊地真一, 小宮山一雄, 高橋慎司, 平野靖史郎, 吉田恵美子, 吉田貴彦, 和合治久: 環境生物の免疫影響に関する研究, 平成12年度内分泌攪乱化学物質等の作用メカニズム報告書(日本公衆衛生協会): 125-154, 2001
- 柴田康行, 堀口敏宏: 有機スズの環境残留性, 季刊化学総説, 内分泌かく乱物質研究の最前線(日本化学会編, 学会出版センター, 224p.), 50: 193-198, 2001
- 藤井恒男, 藤縄克之, 花里孝幸, 白石寛明, 国本 学, 鈴木富雄, 笹井春雄, 福島和夫, 赤羽貞幸, 青山俊文, 富所五郎, 他: 環境ホルモンを中心とする環境化学物質の循環・変換過程とヒト・生態系への影響およびその対策に関する研究, 平成13年度信州大学環境科学年報(信州大学環境科学研究会編, 156p.): 33-43, 2002
- 白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 曾家義博, 佐野友春, 彼谷邦光, 西原 力, 森田昌敏: 酵母を用いたエストロゲン・アンタゴニストアッセイ系の開発と有機スズへの応用, 環境化学, 11(1): 65-73, 2001
- 白石不二雄: 内分泌攪乱物質の環境計測手法としてのバイオアッセイ, 全国環境研会誌, 27(4): 214-219, 2002
- 鈴木規之, 桜井健郎: ダイオキシン類の現在および将来の環境残留, 季刊化学総説(日本化学会編, 学会出版センター, 224p.), 50: 174-179, 2001
- 高澤嘉一, 上田祥久, 樋口哲夫, 比毛 浩, 橋本俊次, 伊藤裕康, 森田昌敏: プレカラム分離導入システムを用いたダイオキシン類の測定, 環境化学, 11: 245-251, 2001
- 高野裕久, 柳澤利枝, 遠藤 敦, 吉川敏一: 臨床におけるフリーラジカスカベンジャー, 食品機能素材 , シーエムシー, 東京, 53-63, 2001
- 高野裕久, 柳澤利枝, 遠藤 敦, 吉川敏一: 急性肺障害と酸化ストレス, 別冊・医学のあゆみ, 医歯薬出版, 東京, 278-281, 2001
- 高橋慎司: 鳥類による生態影響評価試験; 畠山成久 編, 生態影響評価試験ハンドブック, 朝倉書店, 東京, 282-288, 2003
- 石橋弘志, 鎌迫典久, 有菌幸司: 水環境におけるエストロゲン作用評価手法としてのピテロゲニン, 環境技術, 31(8): 604-609, 2002
- 鎌迫典久: 内分泌攪乱作用の計測手法としての水生生物(メダカ)を用いる *in vivo* バイオアッセイ, 全国環境研会誌, 27(4): 8-14, 2002
- 石橋弘志, 鎌迫典久, 有菌幸司: メダカを利用したモニタリング, エンバイオ, 02 Sep. 39-44, 2002
- 多田 満: 回転流水式水槽を用いたシマトビケラ幼虫の営巣個体に対する殺虫剤の影響, 環境毒性学会誌, 5(1): 13-

19, 2002

多田 満：ヌカエビを用いた17 β -エストラジオールの繁殖影響，水環境学会誌，26(11)：707，2003

柏平伸幸，亀田 洋，根津豊彦，田邊 潔，森田昌敏：ダイオキシン類の毒性等量の算出方法による誤差とその評価，環境化学，10：319-329，2000

小野寺潤，上田祥久，崔 宰源，橋本俊次，鈴木規之，森田昌敏，佐藤寿邦：高分解能ガスクロマトグラフィー/質量分析法による臭素化ダイオキシン類の分析における臭素化ビフェニルエーテルの影響，分析化学，52(3)：205-213，2003

崔 宰源，森田昌敏：臭素化難燃剤による環境汚染：近年の傾向，環境化学，11：773-783，2001

堀口敏宏：内分泌攪乱の発現メカニズムの解明に関する研究(1) 分子レベルでの内分泌攪乱の発現メカニズムの解明 巻貝の性転換の機構の解明，内分泌攪乱化学物質による生殖への影響とその作用機構に関する研究 成果報告書，356-368，2001

堀口敏宏：生物界における内分泌攪乱物質の実態の解明に関する研究(1) 野生生物等における内分泌攪乱の実態の解明 巻貝等における内分泌攪乱の実態の解明，内分泌攪乱化学物質による生殖への影響とその作用機構に関する研究 成果報告書，444-455，2001

堀口敏宏：環境ホルモンが生態系に及ぼす影響(1) 巻貝類のインボセックス：有機スズ化合物がどのように引き起こすか～新たな仮説の提唱～，環境ホルモン 文明・社会・生命，2：219-226，2001

堀口敏宏：巻貝類に見られる生殖異常，環境ホルモン 文明・社会・生命，1：12-29，2001

堀口敏宏：雌の腹足類の雄性化に関する研究，有機スズ汚染によるインボセックスの誘導機構，平成12年度内分泌攪乱化学物質問題に関する日英共同研究報告書，10-13，2001

多田富雄，市川定夫，岩井克人，井上泰夫，貴邑富久子，松崎早苗，堀口敏宏，綿貫礼子，吉岡 斉：<雑誌『環境ホルモン』創刊記念シンポジウム> 近代文明と環境ホルモン，環境ホルモン 文明・社会・生命，2：122-189，2001

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(4)：247-255，2001

綿貫礼子，阿部照男，上見幸司，貴邑富久子，堀口敏宏，松崎早苗，吉岡 斉，白木博次：<座談会> いま，環境ホルモン問題をどうとらえるか，環境ホルモン 文明・社会・生命，1：111-163，2001

堀口敏宏：アワビ類における内分泌攪乱と有機スズ化合物の影響，月刊海洋，34(7)：522-528，2002

堀口敏宏：第2章内分泌攪乱化学物質問題に関する日韓共同研究の実施 2.1環日本海における有機スズによる海洋汚染と巻貝類への影響，平成13年度内分泌攪乱化学物質問題に関する日韓共同研究報告書，6-12，2002

堀口敏宏：内分泌かく乱の生物影響：貝類への影響，報告書 東京湾の水質管理と環境ホルモン「東京湾統合沿岸管理研究」をめざして，6-7，2002

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：ELISA法によるイボニシ中のテストステロンの個体別分析，分析化学，51(1)：21-27，2002

三森文行：MRIで脳機能を見る，Endocrine disrupter news，3(4)：7，2001

三森文行：環境科学と*in vivo* NMR，分光研究，51：297-309，2002

高橋保雄，小野寺祐夫，森田昌敏，寺尾良保：水質試料中のフタル酸エステル類，環境化学，11：27-32，2001

三好久美子，西尾建彦，森田昌敏，安原昭夫：K-Na合金によるPCB混合物(KC600)の脱塩素化，環境化学，12：799-808，2002

岡本研作，安原昭夫，村山真理子，中野 武，劔持堅志，太田壮一，八木孝夫，鶴田 暁，松村 徹，竹内正博，木田孝文，松本保輔，柿田和俊，小野昭紘，坂田 衛：ダイオキシン類及びポリ塩化ビフェニル同族体分析用河川底質標準物質の開発，分析化学，51：1049-1062，2002

岡本研作，安原昭夫，中野 武，劔持堅志，松村 徹，八木孝夫，柿田和俊，小野昭紘，坂田 衛：河川底質中ポリ

塩化ビフェニルの分析におけるアルカリ分解条件等条件の比較検討, 分析化学, 52 : 61-66, 2003

安原昭夫: 最終処分場の内分泌攪乱化学物質等の挙動と処理, 環境技術, 31(8) : 635-638, 2002

米元純三: 「奪われし未来 - 増補改訂版 - 」書評, 廃棄物学会誌, 24 : 267, 2001

米元純三: 知っておきたい用語の解説 - 環境ホルモン, 小児科臨床, 55(11) : 104-107, 2002

3 特許

- (1) 平成12年 8月24日提出 名称 抗不安剤 特願2000 - 253393
- (2) 平成13年 7月30日提出 名称 抗ストレス食品 特願2001 - 229888
- (3) 平成14年10月 7日提出 名称 抗不安剤 特願2002 - 293360

REPORT OF SPECIAL RESEARCH FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所特別研究報告
SR - 56 - 2003

平成15年11月28日発行

編 集 国立環境研究所 編集委員会
発 行 独立行政法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川16番2
電話 029-850-2343 (ダイヤルイン)

印 刷 朝日印刷株式会社
〒309-1117 茨城県真壁郡協和町向川澄82-1

Published by the National Institute for Environmental Studies
16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan
November 2003

無断転載を禁じます