

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006 ～ 2008

課題番号：18380089

研究課題名（和文）野生アカネズミを生物指標に用いたダイオキシンによる内分泌攪乱作用の影響評価

研究課題名（英文）Evaluation of endocrine disruption action in wildlife, using Japanese field mice, *Apodemus speciosus* as a bio-indicator of Dioxins contamination

研究代表者

氏 名：関島 恒夫 (Sekijima Tsuneo)

所 属：新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：10300964

研究成果の概要：アカネズミにおけるダイオキシン汚染の影響は、個体レベルではダイオキシンによる毒性発現が認められ、精子数の減少など繁殖機能の低下が起きていることが明らかとなった。一方、ダイオキシン汚染に有利なダイオキシン受容体のアリルを同定し、その頻度を指標とした個体群レベルでの評価を行ったところ、汚染範囲が小規模で周辺からの個体の移出入が頻繁に行われることにより、有利なアリルが集団に固定できないことが明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総 計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・森林工学

キーワード：森林生物

## 1. 研究開始当初の背景

環境ホルモンとは、環境中に偏在し、生体内であたかもホルモンのように振る舞い内分泌系を攪乱することにより、野生生物やヒトに様々な異常をもたらす化学物質と定義される。環境ホルモンの影響が生物にとって極めて深刻なのは、個体や細胞の死を引き起こすような従来の化学物質の影響とは異なり、内分泌攪乱作用が生殖器官の破綻を通じ、種あるいは地域個体群の消失を導く潜在的危険性をはらんでいるためである。環境ホルモンとして取り上げられている様々な物質の中でも、ひととき毒性が高く、生体内に容易に侵入し、長期間にわたり体内にとどまるダイオキシン類は、人類が作り出した最も厄介な化学物質

といえる。

野生生物におけるダイオキシン類の汚染は、従来、海棲哺乳類や両生・爬虫類など水系に依存し、その影響が顕在化していた動物を中心に解析が進められてきたが、近年、中山間地の荒廃した森林に産業廃棄物処分場が乱立したことにより、私達の身の回りにごく普通に生息する森林棲野生動物においても、ダイオキシン類の汚染が広く浸透しつつあることが明らかとなってきた。それらの動物種の中でも特に、日本に広く分布し、森林や草地に生息するアカネズミは、食物網の上位に位置するキツネやタヌキよりもダイオキシンが高濃度で生体内に蓄積されていることが近年報告され、生物指標としての有効

性が注目されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、日本固有種のアカネズミをダイオキシン汚染の生物指標として位置づけ、個体レベルで生じる毒性発現から、進化学的視点による個体群レベルでのダイオキシン汚染の影響を明らかにすることを最終目的とし、その達成のために以下の4つのサブテーマを掲げた。

(1)ダイオキシン汚染が野生アカネズミに及ぼす影響、では、野生アカネズミに対するダイオキシン汚染の現状を評価するために、ダイオキシンの生体内蓄積レベルとダイオキシン暴露によって誘導される特異的遺伝子の発現量、及び生殖異常との関連性を明らかにする。

(2)アカネズミにおけるダイオキシン受容体(Aryl hydrocarbon Receptor;AhR)の多型解析と機能評価、では、ダイオキシンによる毒性発現に深く関与し、感受性を決定するダイオキシン受容体(AhR)に着目し、アカネズミにおけるAhR遺伝子の多型解析と、見出されたアリルの機能的差異について*in vitro*での検証を行う。

(3)アカネズミへのダイオキシン投与による毒性影響と高感受性・低感受性タイプにおける反応性の違い、では、(2)で明らかにされたAhRアリルの間に存在する生理的応答特性の差異を比較検証するために、アリルを特定したアカネズミに対してダイオキシン溶液を経口投与し、その効果を評価する。

(4)ダイオキシン汚染がアカネズミ個体群に及ぼす影響、では、(2),(3)で明らかにされたダイオキシン汚染に対し反応性が異なるAhRアリルを指標として、ダイオキシン汚染地域と非汚染地域におけるアカネズミ個体群のAhRアリルの遺伝子頻度を比較することで、ダイオキシン汚染が個体の生殖機能低下・異常を通して、人為的に作り出された新たな選択圧として個体群レベルで及ぼす影響を評価する。

## 3. 研究の方法

(1)ダイオキシン汚染がアカネズミに及ぼす影響

調査地及びアカネズミの捕獲；調査地はダイオキシン類の発生要因別に選定し、焼却処理場跡地として三和(新潟県)・くぬぎ山(埼玉県)、産廃埋立地として長岡(新潟県)・筑穂(福岡県)、農薬流入として佐潟(新潟県)、非汚染地域として角田山(新潟県)・温身平(山形県)に設定した。アカネズミの捕獲はシャーマン型ライブトラップを用い、本種の繁殖期とされる初春から初秋にかけて行われた。

ダイオキシン測定；各調査地で採取した土

壤、及び捕獲されたアカネズミ肝臓中のダイオキシン濃度を高分解能ガスクロマトグラフ(GC/MS)を用いて分析・定量した。

薬物代謝酵素 CYP1A1 RNA 発現量の定量；アカネズミ肝臓から抽出した RNA を鋳型に、CYP1A1 の発現量を Real-Time PCR を用いて測定した。インターナルコントロールとして actin を使用した。

生殖機能の評価；活性精子数は右精巣上体尾部を BWW 培養液内で培養し、精巣上体尾部から流出する活動能を持つ精子の抽出を行い、ヘモサイトメーターを用いて一定溶液中の精子数をカウントすることにより求めた。

(2)アカネズミにおけるダイオキシン受容体(AhR)の多型解析

供試動物；ダイオキシン汚染地域(三和・くぬぎ山・長岡・佐潟)及び非汚染地域(角田山・温身平)において捕獲されたアカネズミ 63 頭を用いた。

AhR 配列の決定；アカネズミ肝臓から mRNA を抽出し、ダイレクトシーケンシング法によって各個体の AhR 配列を決定した。

多型の機能評価；検出された変異を含む各アリルの AhR タンパクを細胞内で強制発現させ、レポーターアッセイを用いて機能評価を行った。

(3)アカネズミへのダイオキシン投与による毒性影響と高感受性・低感受性タイプにおける反応性の違い

調査地及びアカネズミの捕獲；ダイオキシン汚染が皆無である阿賀町及び当間山(新潟県)において、シャーマン型ライブトラップを用いてアカネズミの捕獲を行った。捕獲されたアカネズミは飼育室内で維持された。

AhR アリル(高感受性・低感受性)の特定；アカネズミの尾から採取したゲノム DNA を鋳型に PCR-RFLP 法により、アリルの特定を行った。

ダイオキシン投与；投与実験には で特定された高感受性・低感受性アリルをホモ接合体で有する個体を供試した。アリル毎に高濃度群から低濃度群の 4 群に分け、それぞれ 2000ng/kg, 200ng/kg, 2ng/kg, 0ng/kg の TCDD をセサミオイルに溶解し、胃ゾンテを用いた経口投与を行った。その後、1 週間間隔に 1/5 量(維持量)を 3 週間投与した後、4 週目に投与を終了して解析項目に従い、試料を採材した。

CYP1A1 RNA 発現量の定量；(1)- を参照。

染色体分析；脾細胞の短期培養により、染色体標本作製し、染色体の数的変異と構造異常(染色体切断(Break)、Gap、フラグメント、ロバートソン型動原体融合)の評価を行った。

(4)ダイオキシン汚染がアカネズミ個体群に及ぼす影響

調査地及びアカネズミの捕獲；ダイオキシ

ン汚染地域（三和・くぬぎ山）及び非汚染地域（角田・温身平）において、ライブトラップを用いたアカネズミの捕獲を行った。

AhR アリルの特定；(3)- を参照。

#### 4. 研究成果

##### (1)ダイオキシン汚染が野生アカネズミに及ぼす影響

土壤中ダイオキシン蓄積量は、焼却場跡地である三和・くぬぎ山において高い値を示した（図1）。アカネズミ肝臓中のダイオキシン蓄積量は、焼却場跡地である三和・くぬぎ山において高い値を示した（図2）。一方、筑穂や佐潟では土壤中濃度が低いにもかかわらず、高濃度の蓄積が認められた。このような蓄積の違いは各調査地における土壤からアカネズミへと食物連鎖を通して濃縮されるプロセス、すなわち食物連鎖を構成する餌生物種及び食物網構造の違いを反映しているものと考えられた。

ダイオキシン摂取に対して鋭敏に反応し、発現する薬物代謝酵素CYP1A1に関し、アカネズミ肝臓中の発現量を調べたところ、焼却場跡地である三和・くぬぎ山において高い発現量が観察された（図3）。CYP1A1発現を制御するダイオキシン受容体(AhR)は特に燃烧由来ダイオキシンに含まれる低塩素異性体と強い親和性を示すことが知られており、アカネズミにおけるCYP1A1発現の有無がダイオキシン発生源を決定するバイオマーカーとして機能する可能性が本研究により示唆された。また、各地域における活性精子数とCYP1A1との関係を調べたところ、焼却場跡地である三和・くぬぎ山においてCYP1A1と活性精子数に有意な負の相関が認められた（三和； $r=-0.651$ ,  $p=0.030$ 、くぬぎ山； $r=-0.829$ ,  $p=0.042$ ）。三和・くぬぎ山に代表される焼却由来の汚染地域では、AhRを介したシグナルカスケードによって生殖機能に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

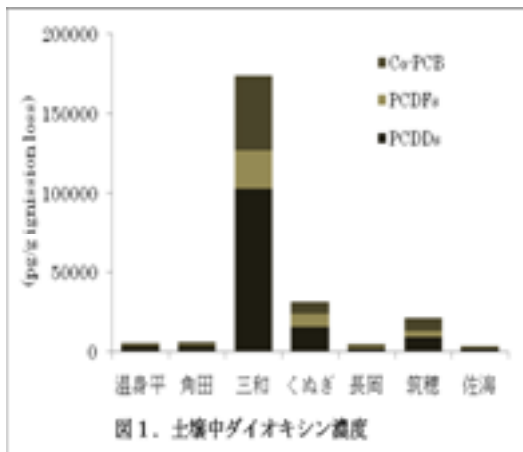


図1. 土壤中ダイオキシン濃度

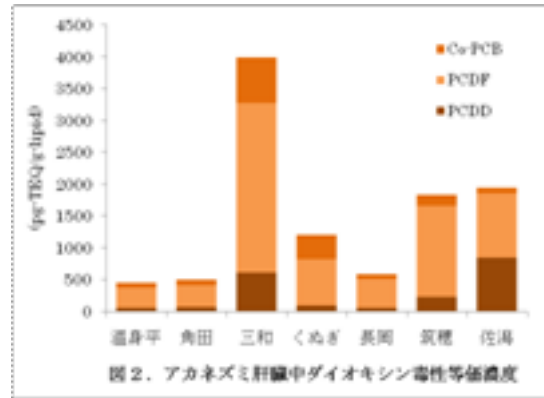


図2. アカネズミ肝臓中ダイオキシン毒性等価濃度

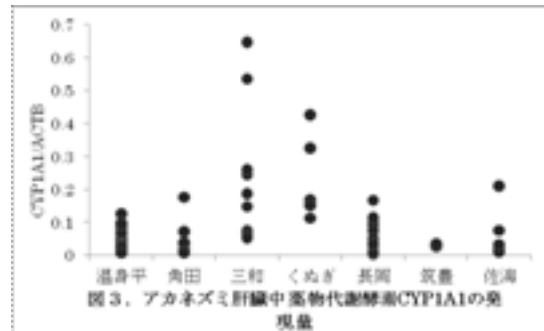


図3. アカネズミ肝臓中薬物代謝酵素CYP1A1の発現量

##### (2)アカネズミにおけるダイオキシン受容体(Aryl hydrocarbon Receptor; AhR)の多型解析と機能評価

アカネズミのAhRは多型に富んでおり、総長2550塩基対の71カ所にSNPが発見され、そのうち27カ所が非同義置換であった。アミノ酸置換は25カ所で認められ、さらにグルタミン(Q)のリピート数多型(8から23リピート)の存在が明らかになった。AhR配列では、49アリルが63個体に含まれていることが明らかとなった。

次にそれぞれのアリル及びアミノ酸置換についてAhRタンパク質の機能評価をルシフェラーゼアッセイによって行った。その結果、遺伝子転写の役割を担うAhRの転写活性化領域(TAD)では、多型によって様々な活性が観察され、中でもコドン799におけるグルタミン(Gln)とアルギニン(Arg)の変異が転写活性化能に著しい差異をもたらし、配列のバ

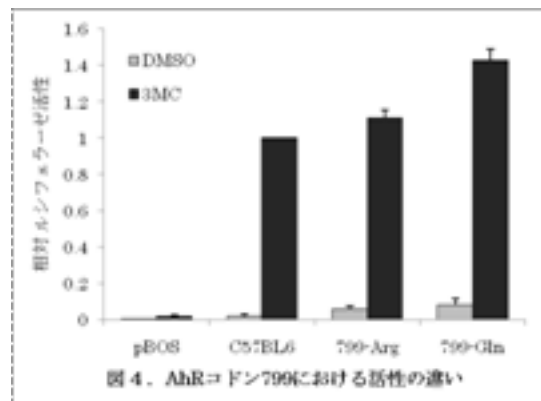


図4. AhRコドン799における活性の違い

ックグラウンドを同一にしたコドン799の1アミノ酸、GlnとArgによる機能評価を行ったところ、有意な機能差が見られた(図4 ; t-test,  $p=0.015$ )。

本研究により、アカネズミは多くのAhR多型を有し、それらによってダイオキシン感受性の異なる個体が野生集団中に存在していることが明らかとなった。

### (3)アカネズミへのダイオキシン投与による毒性影響と高感受性・低感受性タイプにおける反応性の違い

ダイオキシン投与に対する生体への反応を評価するために、コドン799のアミノ酸を指標とした高感受性(799-Gln)タイプと低感受性(799-Arg)タイプのアカネズミにTCDD投与を行った。

薬物代謝酵素CYP1A1の発現量については、全ての投与量に関して高感受性タイプが低感受性タイプより高い値を示し、Glnを有する高感受性個体はダイオキシンに対する影響を受けやすいことが生体を用いた実験においても明らかとなった(図5)。

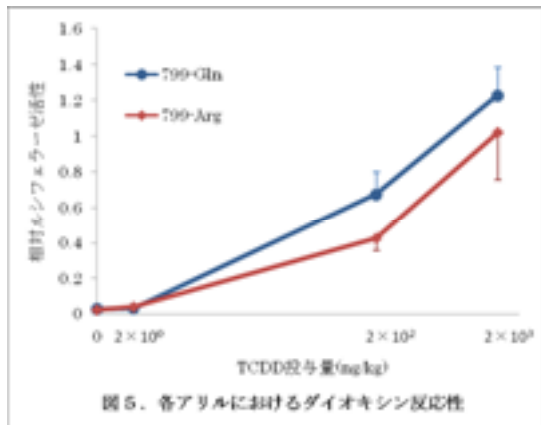


図5. 各アレルにおけるダイオキシン反応性

染色体分析では、両タイプともにTCDD投与による正常染色体率の低下や染色体損傷の増加は認められなかった(表1)。ダイオキシンと染色体との因果関係は未だ完全に解明されておらず、本研究で行われた投与量及び投与期間では、TCDDがアカネズミ染色体の損傷に影響を及ぼすことは無いと考えられる。

表1. ダイオキシン投与と個体における染色体分析

投与濃度 (ng/kg)	アレル	正常染色体数率 (n)	染色体損傷		
			Breaks (個数)	Gaps (個数)	その他 (個数)
0	QQ	9324 ± 1.34	1.9 ± 1.0	7.2 ± 4.4	22 ± 1.6
	RR	9233 ± 0.95	1.0 ± 0.4	1.3 ± 0.7	0.3 ± 0.3
2	QQ	9467 ± 0.61	5.5 ± 1.6	2.0 ± 0.5	1.5 ± 0.9
	RR	9029 ± 1.19	0.6 ± 0.4	1.1 ± 0.6	0.6 ± 0.4
200	QQ	9500 ± 1.11	1.6 ± 0.5	1.4 ± 0.2	0.7 ± 0.3
	RR	8886 ± 0.96	0.9 ± 0.6	0.3 ± 0.3	0.6 ± 0.4
2000	QQ	9383 ± 0.60	1.0 ± 0.4	1.8 ± 0.5	1.5 ± 0.5
	RR	8914 ± 1.06	0.3 ± 0.3	0.6 ± 0.4	1.1 ± 0.6

値は平均 ± 標準誤差を示す。その他: フラグメント、ロバートソン型動原体融合

### (4)ダイオキシン汚染がアカネズミ個体群に及ぼす影響

野外においてアカネズミが集団レベルで

被るダイオキシン汚染の影響を明らかにするために、AhR コドン 799 でのアレル(Gln, Arg)をマーカーとした遺伝子頻度評価をダイオキシン汚染地域・非汚染地域で行った。

ダイオキシン汚染地域及び非汚染地域におけるアレルGlnとArg頻度に差は認められず、ダイオキシン汚染を選択圧とした集団構造の変化は見られなかった(表2 .カイ二乗,  $p>0.05$ )。個体レベルではアレル Arg がダイオキシン汚染に対して有利であることが研究成果(2), (3)で明らかとなったが、個体群レベルについては、日本におけるダイオキシン汚染地域が小規模にとどまっていること、対してアカネズミは移動分散性が比較的高く、周辺からの移出入が頻繁に行われているために、アレル Arg は集団内に固定できないと考えられる。

表2. AhRコドン799におけるアレル頻度

調査地	(n)	アレル頻度		
		Q	R	
汚染地域	三和	(18)	0.81	0.19
	くぬぎ	(18)	0.75	0.25
非汚染地域	角田	(32)	0.64	0.36
	温身平	(31)	0.65	0.35

総じて野生アカネズミにおけるダイオキシン汚染の影響は、個体レベルではAhRを介したダイオキシン作用機序によって様々な影響を受けていることが明らかとなった。一方、個体群レベルでは、アカネズミが種として持つ移動分散性と小規模範囲にとどめられる日本での汚染特性によって、ダイオキシン汚染による集団構造の変化は検出することができなかった。

本研究成果は陸棲野生動物のダイオキシン汚染の現状を評価した希少な例となった。陸棲野生動物は汚染源近郊においてダイオキシンを摂取して毒性を発現させるが、水生生物とは異なり、非汚染域への移出入も可能である。そのため、個体レベルにおいても毒性発現には大きなばらつきが生じており、また個体群レベルでの影響検出にもいたらなかった。しかし、このように汚染域・非汚染域を行き来することで、ダイオキシンを蓄積した個体が広範囲に移動分散し、結果的に生物を媒介とした広範囲のダイオキシン汚染がひそかに進行している可能性が考えられる。今後は、生物の遺伝子流動など行動範囲を考慮した評価を行い、それを基盤とした陸棲野生動物における化学物質のリスク評価法を確立する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### [雑誌論文](計6件)

Tanida, T., Warita, K., Ishihara, K., Fukui S, Mitsuhashi, T., Sugawara, T., Tabuchi, Y., Nanmori, T., Qi, W.-M., Inamoto, T., Yokoyama, T., Kitagawa, H. and Hoshi, N. (2009): Fetal and neonatal exposure to three typical environmental chemicals with different mechanisms of action: Mixed exposure to phenol, phthalate, and dioxin cancels the effects of sole exposure on mouse midbrain dopaminergic nuclei. *Toxicology Letters*, in press. Peer-reviewed.

Obara, Y., Kyoya, T., Yamamoto, D., Ito, S., Hagiwara, S. and Tamura, K. (2009): Genotoxic assessment of small mammals at an illegal dumpsite at the Aomori-Iwate prefectural boundary. *Zool. Sci.* 26: 139-144. Peer-reviewed.

Kyoya, T., Obara, Y. and Nakata, A. (2008): Chromosomal aberrations in Japanese grass voles in and around an illegal dumpsite at the Aomori-Iwate prefectural boundary. *Zool. Sci.* 25: 307-312. Peer-reviewed.

Warita, K., Okamoto, K., Mutoh, K., Hasegawa, Y., Yue, Z-P., Qi, W-M., Kitagawa, H., Sugawara, T. and Hoshi, N. (2008): Activin A and eCG recover reproductive dysfunction induced by neonatal exposure to estrogenic endocrine disruptor in adult male mice. *Biology of Reproduction*, 78: 59-67. Peer-reviewed.

Ishihara, K., Warita, K., Tanida, T., Sugawara, T., Kitagawa, H. and Hoshi, N. (2007): Does paternal exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) affect the sex ratio of offspring? *Journal of Veterinary Medical Science*, 69: 347-352. Peer-reviewed.

Warita, K., Sugawara, T., Yue, Z-P., Tsukahara, S., Mutoh, K., Hasegawa, Y., Kitagawa, H., Mori, C. and Hoshi, N. (2006): Progression of the dose-related effects of estrogenic endocrine disruptors, an important factor in declining fertility, differs between the hypothalamo-pituitary axis and

reproductive organs of male mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68: 1257-1267. Peer-reviewed.

### [学会発表](計7件)

石庭寛子, 関島恒夫:アカネズミ個体群はダイオキシン汚染耐性を獲得しているのか? -遺伝子型頻度から見た汚染の影響評価. 第56回日本生態学会大会, 2009年3月18日(岩手)

石庭寛子, 高橋敬雄, 梶原秀夫, 関島恒夫:野生アカネズミにおけるダイオキシン類の蓄積と生体への影響. 第11回日本環境ホルモン学会研究発表会, 2008年12月14日(東京)

石庭寛子, 石原加奈, 田阪健, 須谷真巳, 星信彦, 横山俊史, 安元研一, 十川和博, 関島恒夫:アカネズミにおけるダイオキシン受容体(AhR)の多型とその機能評価 - バイオマーカーを用いたダイオキシン汚染影響評価を目指して -. 日本哺乳類学会2008年度大会, 2008年9月13-14日(山口)

割田克彦, 菅原照夫, 田淵圭章, 三觜友子, 松本由樹, 三木崇範, 石原可奈, 谷田任司, 横山俊史, 竹内義喜, 北川 浩, 星 信彦:外因性エストロゲン様化学物質が Leydig 細胞株 TTE1 の StAR および P450scc 遺伝子発現に与える影響とアセチル化ヒストンの変化. 第145回日本獣医学会学術集会, 2008年3月28日(神奈川)

石原可奈, 割田克彦, 谷田任司, 三觜友子, 青木香保里, 横山えりか, 田阪 健, 横山俊史, 北川 浩, 大迫誠一郎, 遠山千春, 星 信彦: TCDD 雄親直接曝露による次世代性比変動メカニズムの解明. 第48回日本先天異常学会学術集会, 2008年6月28日(東京)

石原可奈, 割田克彦, 谷田任司, 三觜友子, 青木香保里, 横山えりか, 田阪 健, 横山俊史, 北川 浩, 大迫誠一郎, 遠山千春, 星 信彦:雄親への TCDD 曝露による次世代性比変動時期の特定. 第27回日本アンドロロジー学会, 2008年7月4日(京都)

石庭寛子, 十川和博, 安元研一, 関島恒夫: Evaluation of dioxins contamination using AhR as a marker of sensitivity to dioxins -polymorphism and function of AhR in Japanese field mice, *Apodemus speciosus*-. シンポジウム「内・外環境と生物応答」, 2006年7月27日(福岡)

〔図書〕(計2件)

Hoshi, N., Handa, Y., Nishi, S., Yamada, H., Kishida, T., Sagawa, T., Warita, K., Sakuragi, N. and Fujimoto, S. (2009): Molecular cytogenetic aspects of sex differentiation anomalies in the field of obstetrics and gynecology, In: Singh, J.R. and Gandhi, G. (Eds.). Perspectives in Human Genetics, India. (in press)

星 信彦(2008)：第3章 前肢，カラーアトラス獣医解剖学編集委員会編/監訳，カラーアトラス獣医解剖学上巻，チクサン出版社，東京(414頁)

6. 研究組織

(1)研究代表者

関島 恒夫 (Sekijima Tsuneo)  
所属 新潟大学・自然科学系・准教授  
研究者番号：10300964

(2)研究分担者

小原 良孝 (Obara Yoshitaka)  
所属 弘前大学・農学生命科学部・教授  
研究者番号：90003673

星 信彦 (Hoshi Nobuhiko)  
所属 神戸大学・農学研究科・教授  
研究者番号：10209223

十川 和博 (Sogawa Kazuhiro)  
所属 東北大学・生命科学研究科・教授  
研究者番号：80175421

高橋 敬雄 (Takahashi Yukio)  
所属 新潟大学・自然科学系・教授  
研究者番号：70134955

(3)連携研究者

酒井 美月 (Sakai Mizuki)  
所属 (独)農業環境技術研究所・有機  
化学物質研究領域・特別研究員  
研究者番号：50418688