

飼育培地は次のようにして作製した。水 1 ℓ に、粉末寒天 8 g、砂糖 100 g、とうもろこし粉 40 g、乾燥酵母 60 g を入れて、強火で沸騰するまで煮込む。沸騰したのちは、さらに弱火で 20 分煮沸する。液体培地が冷めたのちに、ボーキニン 5.3 ml、プロピオン酸 2 ml、ペニシリン 6.67 万ユニット、ストレプトマイシン 16.67 万ユニットを入れて十分に攪拌する。これを直径 9.2 mm のシャーレに液体培地を 24 ml 入れて冷蔵保存する。

② 継代テストにおける産卵日の決定

キイロショウジョウバエの 3 系統のうち、最適と判断された種 Canton S について、その雌雄 10 匹ずつを交配させて、交配後 1 日目から 14 日目まで、産卵数を毎日数えた。

③ 交配に用いるショウジョウバエの数の決定

キイロショウジョウバエ Canton S をいくつかの雌雄の組合せで交配させ、産卵数に差があるかを試験した。具体的には、雌雄 10 : 10 匹、10 : 2 匹、2 : 10 匹の 3 組の交配数で交配させた。そして、交配後 8 日目まで毎日の産卵数を数えた。

④ 化学物質のショウジョウバエ産卵数の継代テスト

キイロショウジョウバエ Canton S の継代的な飼育試験において、食餌培地に 17β-エストラジオールとノニルフェノールを加えてその影響を評価した。用いた培地での最終濃度は、ノニルフェノールについては 10⁻³ mol/ℓ、10⁻⁵ mol/ℓ、10⁻⁷ mol/ℓ、17β-エストラジオールでは 10⁻⁵ mol/ℓ になるように調整し、飼育培地を作製した。コントロールとしては、これらの化学物質の溶媒エタノールを用いた。

親世代 (P) は通常の培地で生育し、羽化後これらの化学物質の入った培地に移した。その成虫の産卵数をカウントした。第 1 子世代 (F1) 第 2 世代 (F2) は、培地に生みつけられた卵から孵化し、幼虫時から同じ食餌培地で育った成虫を示す。

化学物質の産卵数への影響を調べるために、3 日目卵から育ったショウジョウバエ Canton S の成虫を雌雄 10 匹ずつ、各化学物質の入った飼育培地に入れ、3 日後まで全ての産卵数を数えた。

また、上記で生まれた卵から育った成虫について、その成体数を数えた。成体数/産卵数を算定して、孵化率を求めた。また、生まれた卵から育った成虫の雌雄それぞれの数をカウントした。雄の数を雌の数で割り、性比を求めた。

⑤ 準超薄切片の作製

キイロショウジョウバエ Canton S の羽、足、伸弁を切除ののち、腹部の背側のクチクラに進展状に切り込みを入れた。これを 2.51% ホルムアルデヒド 3.1 ml、2.51% グルタルアルデヒド 3.1 ml、0.1 M カコジル酸緩衝液 3.3 ml、0.036 M 塩化カルシウム 0.36 ml の合計 9.86 ml を小瓶に移して、固定のため 4℃ で 1 日間インキュベートした。

この後、0.1 M カコジル酸緩衝液で 10 分間、3 回洗浄した。0.1 M カコジル酸緩衝液、4% 四酸化オスミウムを混ぜて、4℃ で 3 時間後固定した。さらに、0.1 M カコジル酸緩衝液で 10 分間、3 回洗浄した後、エタノール系列で脱水した。エポキシ樹脂に包埋して、超薄切片用マイクロトームで 2 ~ 3 μm の厚さの切片にした。

C. 研究結果

① 実験系に適したショウジョウバエ系統の選出

キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の3系統 (Oregon R、Canton S および white) について、適切な系統を選別すべく、12:12 の明暗サイクル、25°Cでこれらを飼育し、羽化後2時間以内のそれぞれについて交配し、交配後1日目から14日目まで、産卵数を毎日カウントした。その結果、12日齢までのそれぞれの産卵数の平均値は、Oregon Rは36.6、Canton Sは32.1、whiteは49.8でCanton Sが一番小さかった。しかしながら、Canton Sの産卵数には、ばらつきが最も少なく、試験系として安定していると判断されたため、この系統で以後の実験を行うことにした。

② 継代テストに用いる産卵日の決定

キイロショウジョウバエ Canton S の雌雄それぞれ10匹ずつを、シャーレ型培地に入れ、交配後1日目から14日目まで毎日産卵数を数えた。その結果、羽化後の3日目と8日目の産卵数が多いことがわかった。産卵数が適度に多く、ばらつきの少ない羽化後3日目に生んだ卵を使用することにした。

③ 交配に用いるショウジョウバエの数の決定

キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* のCanton S系統の雄:雌の個体数(匹)比が10:10および10:2のときの産卵数を比較すると、10:2の組合せの場合の産卵数が減っていた。一方、10:10と2:10を比較すると、両方で大きな差は見られなかった。これらの実験を通して、雄が多いと雌の産卵数が減少すること、逆に雌が多いと雌一匹あたりの産卵数が増え過ぎて正確な産卵数が数えにくくなることが判明した。このため、内分泌かく乱物質の影響以外の外的要因を含まないようにする、あるいは

は抑えるためには、雄雌の比が10:10のとき最も適正な産卵数を与えると判断された。したがって、以後の実験においては雄:雌 = 10:10匹として検討した。

④ 化学物質のショウジョウバエ産卵数への影響

キイロショウジョウバエ Canton S の親世代Pから子第1世代F1に継代した場合、その3日齢成虫の産卵数をエタノール培地での食餌に対して比較すると、ノニルフェノール 10^{-3} mol/l および 10^{-5} mol/l、 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/l において10~40%減少することが判明した。しかしながら、非常に興味深いことに、ノニルフェノール 10^{-7} mol/l で食餌した場合、産卵数は逆に80%増加した。

子第1世代F1から子第2世代F2に継代した場合、同様に3日齢成虫の産卵数を比較すると、ノニルフェノール 10^{-3} mol/l および 10^{-5} mol/l、 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/l において50~70%減少した。この場合もノニルフェノール 10^{-7} mol/l で食餌した場合、産卵数は約50%増加した。

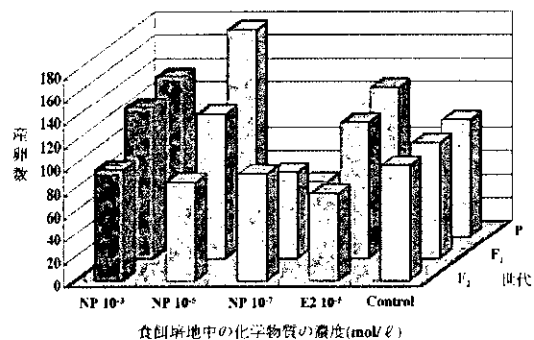


図1 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* のCanton Sの産卵数の化学物質食餌投与による影響

P から F2 まで継代した時の産卵数の平均値を比較すると、ノニルフェノール 10^{-3} mol/ℓ および 10^{-5} mol/ℓ、 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/ℓ において 30 ~ 60% 減少した。ノニルフェノール 10^{-7} mol/ℓ で食餌した場合、産卵数は約 60% 増加した。

⑤ 化学物質の孵化率および性比への影響

キイロショウジョウバエ Canton S の親世代 P から子第 1 世代 F1 に継代した場合、産卵された卵の孵化率をエタノール培地での食餌（コントロール）に対して比較すると、ノニルフェノール 10^{-3} mol/ℓ および 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/ℓ において 40 ~ 80% 増加した。しかし、ノニルフェノール 10^{-5} mol/ℓ および 10^{-7} mol/ℓ で食餌した場合、孵化率は 10 ~ 60% 減少した。

F1 から F2 に継代した時、 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/ℓ の培地で飼育した Canton S の孵化率は、32.2% 増加した。ノニルフェノール 10^{-5} mol/ℓ において 19.4% 増加した。一方、ノニルフェノール 10^{-3} mol/ℓ および 10^{-7} mol/ℓ の培地で飼育したときの孵化率は、それぞれ 33.2%、11.8% 減少した。

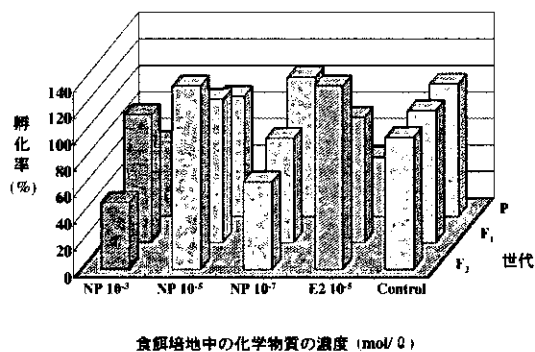


図2 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の Canton S の産卵数の化学物質食餌投与による影響

P から F2 まで継代した時の孵化率の平均値を比較すると、 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/ℓ の培地で飼育した Canton S の孵化率は、約 25% 増加した。一方、ノニルフェノール 10^{-3} mol/ℓ において孵化率はほとんど変化せず、 10^{-5} mol/ℓ においてでは若干増加することが分かった。ノニルフェノール 10^{-7} mol/ℓ で食餌した場合、孵化率の平均値は約 15% 減少した。

なお、性比について比較したところ、P から F2 まで継代した時、ノニルフェノール 10^{-5} mol/ℓ、Canton S はオスの比率の平均値が約 10% 増加した。一方、ノニルフェノール 10^{-3} mol/ℓ および 10^{-7} mol/ℓ の培地で飼育した Canton S はメスの比率の平均値がそれぞれ 6.7%、6.3% 増加した。 β -エストラジオール 10^{-5} mol/ℓ の培地で飼育した場合はほとんど差がなかった。

D. 考察

以上のように、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の Canton S 系統を用いた食餌による化学物質の継代的な影響評価を実施したところ、産卵数と孵化率の変動について化学物質の濃度依存的な影響が顕著であり、増減の特徴的なプロファイルが得られることが判明した。現在、影響の顕著な化学物質濃度群の動物個体について、遺伝子やタンパク質の変動を調べる生化学的な測定も試みている。

ショウジョウバエのゲノムプロジェクトが完成して、その中でヒト・エストロゲン受容体と相同な遺伝子が確認され、*Drosophila* ERR (ショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体) と呼ばれている。ショウジョウバエ ERR はヒト・エストロゲン受容体と非常に類似しており、ショウジョウバエにもエストロゲン受容体があると強く示唆される。現在は、この受容体のリガンドは明らかになっていな

いが、*in vivo* での内分泌かく乱作用の評価法を確立する意義は高い。ショウジョウバエは、約 10 日で卵から成虫になる。したがって、高等動物に比べると短い期間で何代もの経過を見ることができる。例えば、我々ヒトで 10 代の経過を見るのに約 200 年かかるのに比べ、ショウジョウバエは約 100 日で経過を見ることができる。このため、ショウジョウバエによる評価法を確立することは重要な意味があると考えられる。

現在、F2 までの実験を実施したが、興味深い結果とともに、いくつかの問題点も明らかとなった。結果をまとめると、コントロールと比較して、 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/l とノニルフェノール 10^{-3} mol/l、 10^{-5} mol/l で育てた個体群は産卵数が増加する傾向がある。逆に、ノニルフェノール 10^{-7} mol/l で育てた個体群は産卵数が減少する傾向にある。

孵化率について見ると、コントロールに比べて 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/l とノニルフェノール 10^{-5} mol/l で育てた個体は、世代を重ねるごとに孵化率が高くなる傾向がある。ノニルフェノール 10^{-7} mol/l で育てた個体群は孵化率が世代を重ねるごとに減少する傾向がある。しかし、この傾向は産卵数の減少のためなのか、雄の生殖能力によるものなのかは判然としない。雄の生殖能力に及ぼす内分泌かく乱作用の影響の評価法を確立して、両者を比較して解析する必要があると考えられる。例えば、雌、ある

いは雄のどちらかのみを化学物質に暴露させた個体群を用い、正常培地で飼育した個体群と交配して、継代実験を行うことが考えられる。

E. 結論

本研究により、ショウジョウバエ雌の産卵能力に及ぼす化学物質の影響についての評価法を確立した。野生型 Canton S は、産卵数にばらつきが少ないため、継代飼育による評価法に適している。雌 10 匹：雄 10 匹の交配数は、雌の産卵能力を反映している。 17β -エストラジオール 10^{-5} mol/l とノニルフェノール 10^{-3} mol/l、 10^{-5} mol/l を含む培地で飼育すると世代を重ねるごとに産卵数が減少する傾向が顕著であった。今後の課題として、雄の生殖能力を反映する交配数を決定する必要がある。

F. 健康危険情報

現在のところ特に、該当する情報は無い。

G. 研究発表

研究開始直後であり、発表するまでの成果が現在のところ特に得られていない。

H. 知的財産権の出願・登録状況

研究開始直後であり、出願・登録するまでの成果が現在のところ特に得られていない。

別添6

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
H. Urushitani, M. Nakai, H. Inanaga, Y. Shimohigashi, A. Shimizu, Y. Katsu, and T. Ujiguchi	Cloning and characterization of estrogen receptor α in mummichog, <i>Fundulus heteroclitus</i>	<i>Mol. Cell. Endocrinol</i>	203	41-50	2003
T. Nose	Structure-function studies on the ligand-receptor π interactions	<i>Peptide Science 2002</i>	2002	9-12	2003
D. Asai, O. Koizumi, S. Mohri, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Tokunaga, T. Nose and Y. Shimohigashi	Biochemical evaluation of hormonal activity of endocrine disruptors by sensing the estrogen receptor conformation changes	<i>Peptide Science 2002</i>	2002	127-130	2003
T. Tokunaga, M. Otani, A. Matsushima, T. Nose, M. Shimohigashi, S. Aimoto, and Y. Shimohigashi	The structure-activity studies of <i>Drosophila</i> FMRFamide-related peptides	<i>Peptide Science 2002</i>	2002	265-268	2003
H. Ishimori, D. Asai, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Nose and Y. Shimohigashi	The effect of the peptide corresponding to the No.12 α -helix on the conformation change in the estrogen receptor activation	<i>Peptide Science 2002</i>	2002	437-438	2003
A. Matsushima, S. Sato, Y. Chuman, Y. Takeda, S. Yokotani, T. Nose, Y. Tominaga, Y. Shimohigashi and M. Shimohigashi	cDNA Cloning of the Housefly Pigment-dispersing Factor (PDF) Precursor Protein and Its Peptide Comparison among the Insect Circadian Neuropeptides	<i>J. Pept. Sci.</i>	10	82-91	2004

20031278

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。