

12月15日 2010

東京大学山上会館

平成22年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー

生物に対する内分泌かく乱作用に関する調査研究の動向と対応の方向性

井口泰泉

自然科学研究機構・基礎生物学研究所・

岡崎統合バイオサイエンスセンター

Journal of Applied Toxicology

- 1. 内分泌かく乱に関するシンポジウム・会議
- 2. 日英共同研究: ローチを用いた研究例
- 3. カナダの湖を用いた研究例
- 4. 複合影響の研究例
- 5. 受容体サブタイプごとの機能解析
- 6. トキシコゲノミクス、メタボロミクス等の化学物質の安全性評価への利用

OECD VMGnon-animal

OECD Molecular Screening and Toxicogenomics

UK-Japan

US-Japan

1. 内分泌かく乱に関するシンポジウム・会議

- **Gordon Research Conference** (Environmental Endocrine Disruptors): Les Diablerets, Switzerland, 2010年5月30日–6月4日
- HESI Workshop on Development of Alternatives to Chronic Ecotoxicity Tests: Predicting Early-Life Stage and Endocrine-Mediated Toxicity in Aquatic Vertebrate Species: Paris, France, 2010年6月7–9日
- OECD Fish Testing Framework Workshop, Syngenta, UK, 2010年9月28–29日
- **e. hormone**: Tulane University, New Orleans, 2010年10月19–23日
- UK-Japan Collaboration Meeting, Newcastle, UK, 2010年11月2–4日
- Toxicogenomics Meeting, Korea, 2010年11月
- What's in Our Water? CSIRO Canberra, **Australia**, 2010年11月10–11日
- OECD VMGnon-animal, Paris, 2010年11月30–12月2日
- OECD Molecular Screening and Toxicogenomics, Washington DC, 12月6–7日
- US-Japan Bilateral Meeting, Tokyo, 2011年2月
- HESI Workshop on Bioaccumulation, Washington D.C., 2011年2月
- **Copenhagen Endocrine Disruptor Meeting**, Denmark, 2011年4月
- **Endocrine Society Meeting**, 2011年6月
- Gordon Research Conference (2012年6月: New Hampshire, USA)

2.日英共同研究からローチを用いた研究例

1980年代半ばから、ローチに**精巢卵**

原因究明を開始ー内分泌かく乱物質問題の走り

ローチの性分化関連遺伝子の解析

ローチのステロイドホルモン合成関連酵素遺伝子の解析

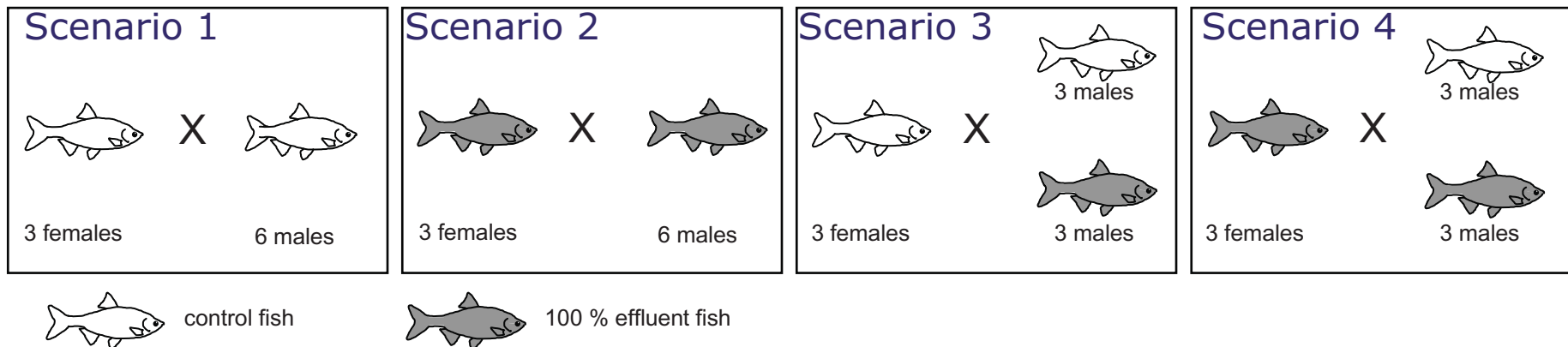
ローチのエストロゲン受容体、アロマターゼ遺伝子の単離

レポーター遺伝子アッセイ

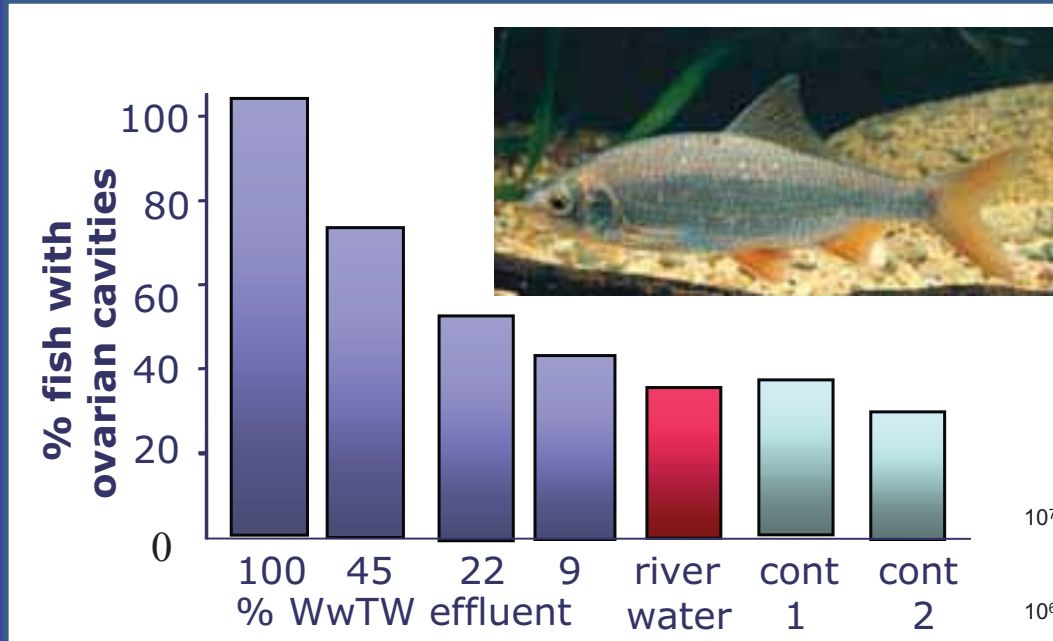
ローチの遺伝子を用いたマイクロアレイの開発・解析



ローチ集団への影響の実験 (3.5年)



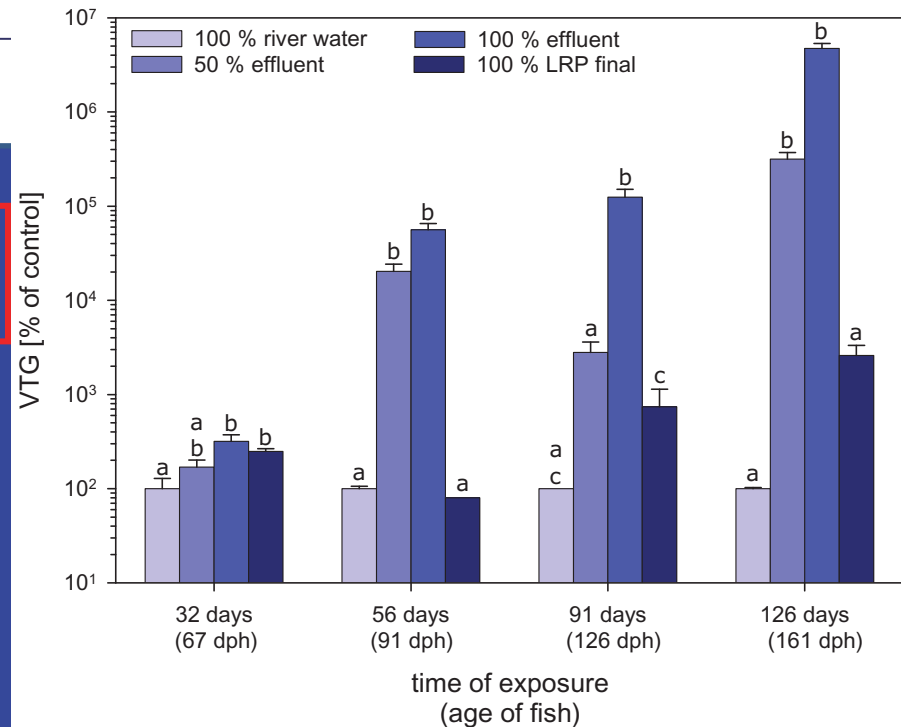
イギリスの下水処理放出水曝露の影響



エストロゲンにより雄の肝臓でも卵黄タンパク (ビテロゲニン) が産生される

- 雄でのビテロゲニン (VTG) 産生
- 1ヶ月暴露: LOEC 排水の25 - 40 %
- 4ヶ月暴露: 10 %

Rodgers-Gray et al., 2000 & 2001
 Liney et al., 2005
 Lande et al., unpublished



下水処理排水からのエストロゲン類似物質の検出

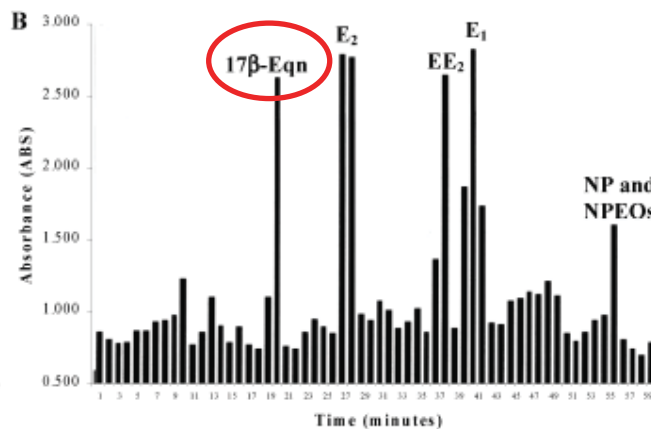
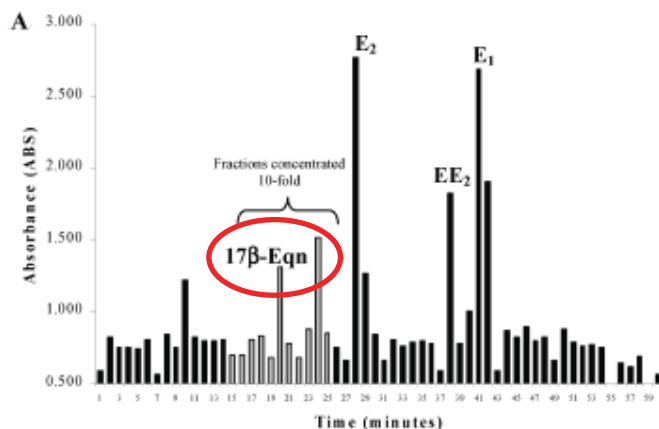
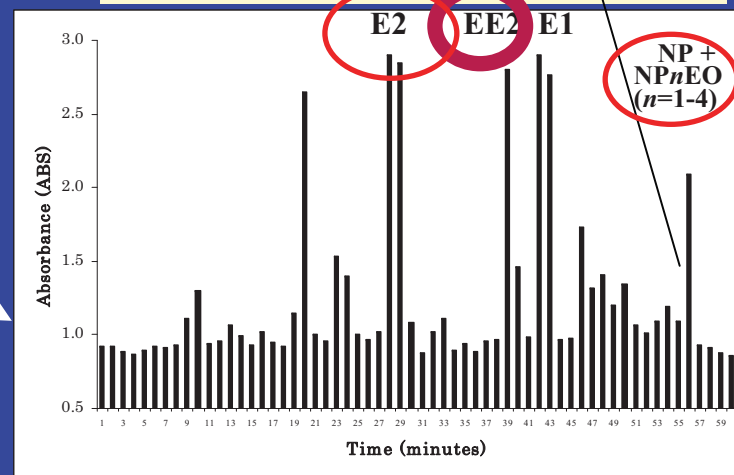
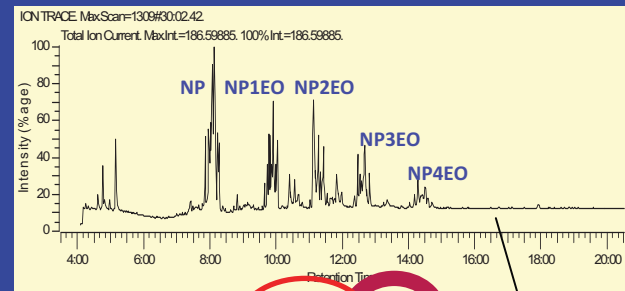


ローチ・ニジマス
を下水処理排水
で飼育



エストロゲン時類似
物質、抗エストロゲン
物質およびそれらの
代謝物質
**yeast screens,
LC-NMR-
MS/GC-MSMS**

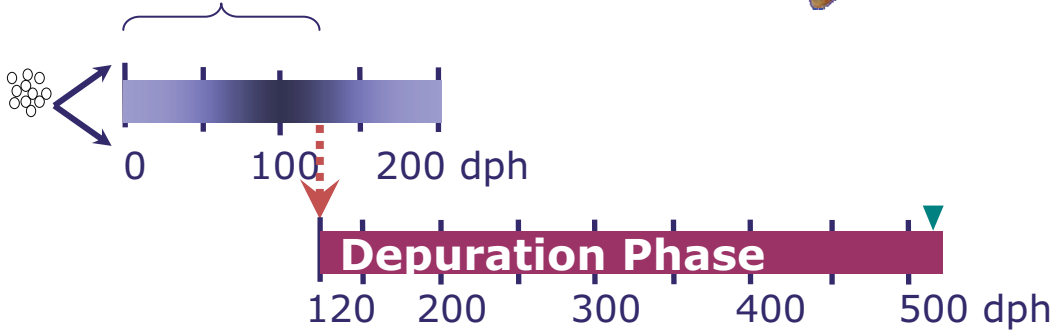
下水排水からのエスト
ロゲン類似物質の活性



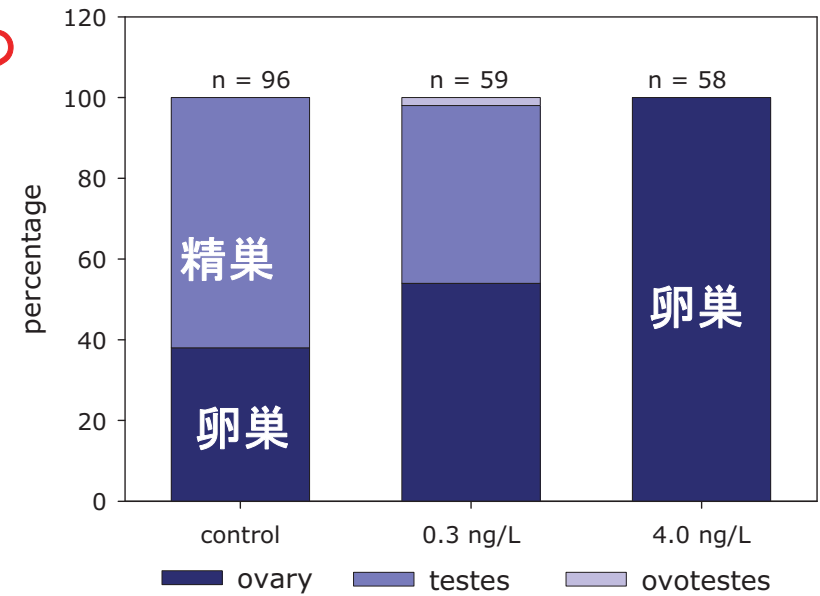
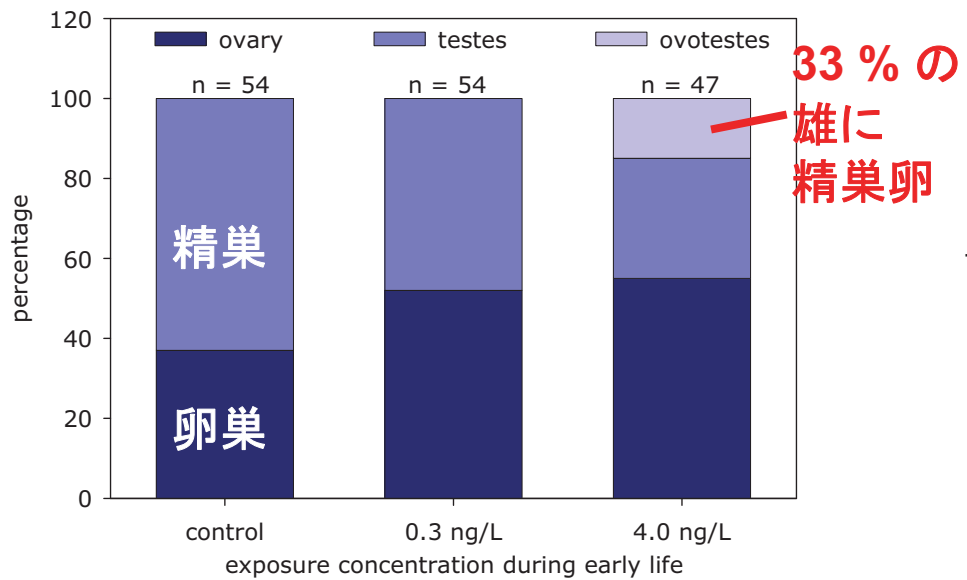
E2 女性ホルモン
EE2 合成女性ホルモン
NP ノニルフェノール
17β-Eqn エクイリン

エチニルエストラジオール(EE2)の性発達への長期影響

性分化時期でのEE2曝露



- 受精から**2年間**、環境濃度のエチニルエストラジオールを曝露
- 孵化250-720日後の雌雄比



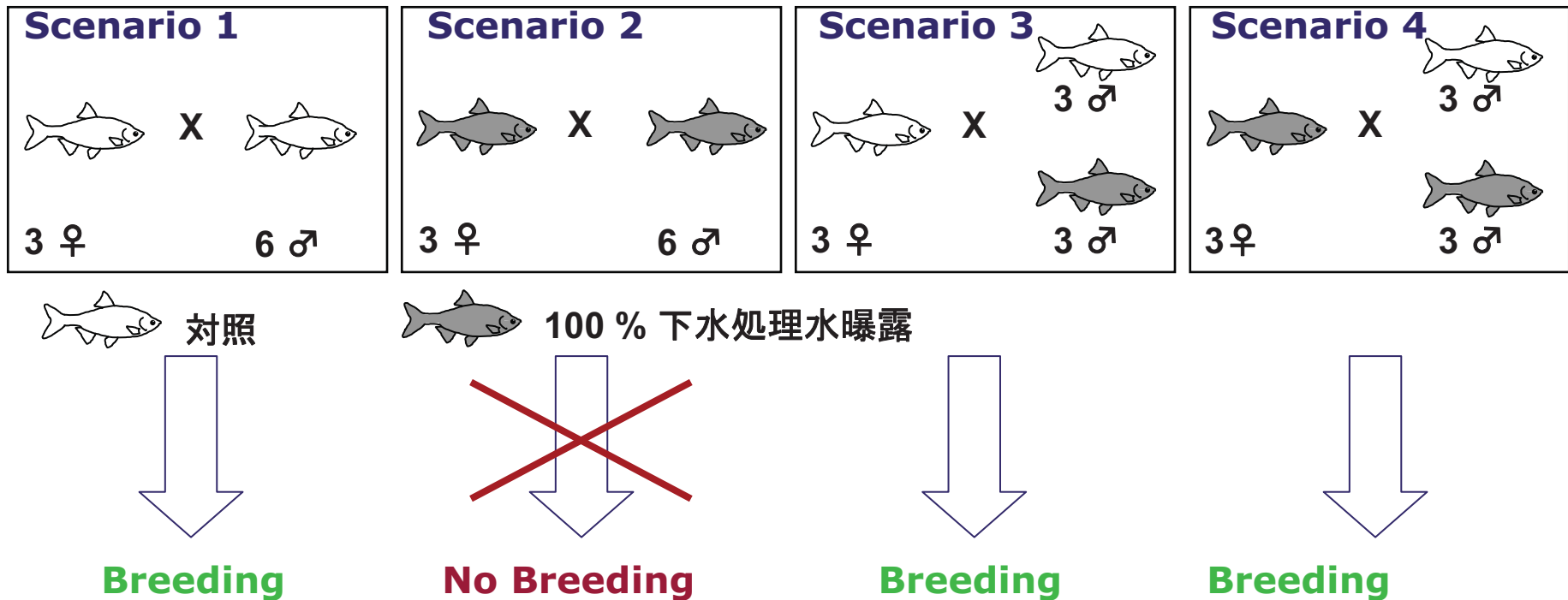
生殖腺発達時期のEE2の影響は

Lange et al. 曝露を止めても長期間残る

➤ **4 ng/L EE₂ 曝露で全てメスになった**



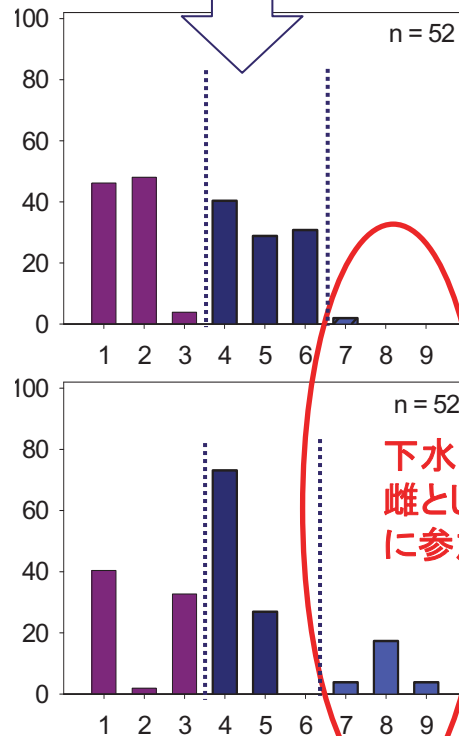
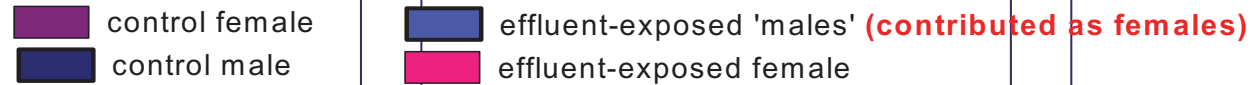
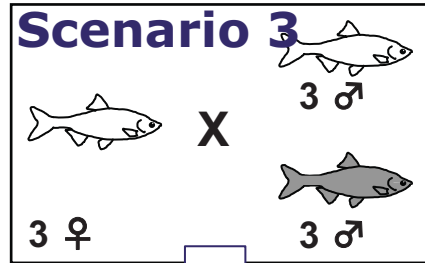
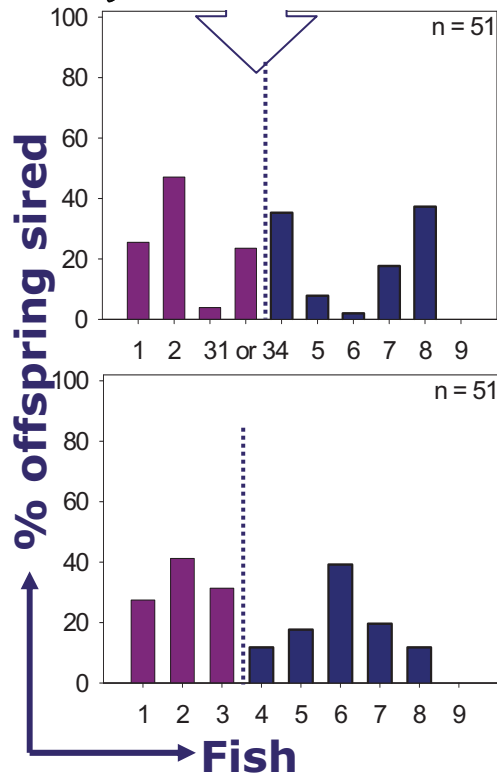
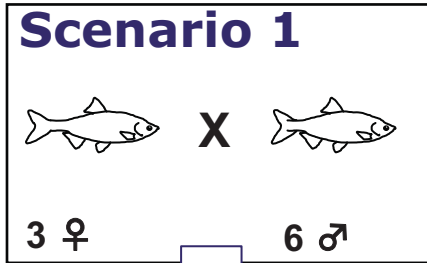
交配の結果



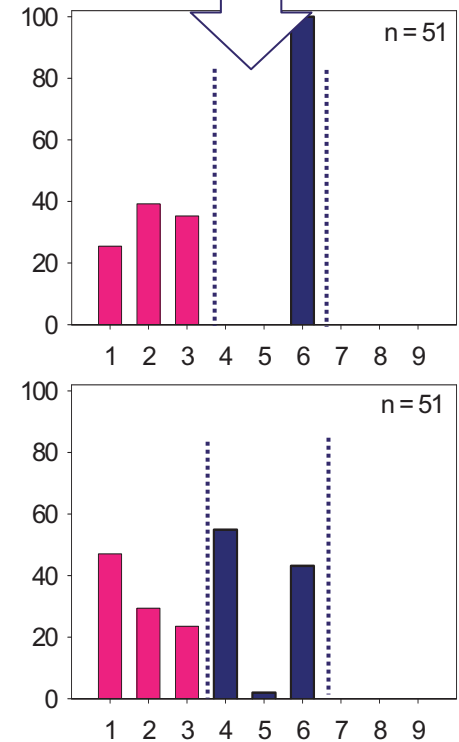
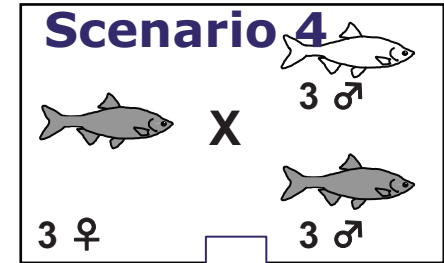
⇒ 雌雄ともに下水処理水曝露では繁殖しなかった。

⇒ 下水処理曝露の雄は対照の雄とどのくらい張り合えるか？

親の解析



下水曝露雄は雌として繁殖に参加



- 希釈していない下水処理水に3年間曝露するとオスがメスに性転換。
- 野生の魚は希釈された下水処理水に曝露されているが、イギリスの河川のいくつかは50%以上（特別なところでは100%）の下水処理水に曝露されている。
- 下水処理放出水の曝露で、オスの90%以上に精巣卵がみられる河川もある。
- 下水処理水の影響で性転換したオスがメスとして生殖しているが、正常なメスと比べると性転換したメスの繁殖寄与率は低い。

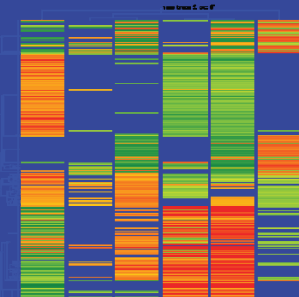
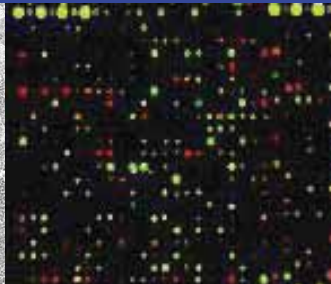
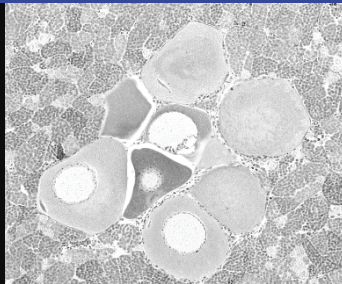
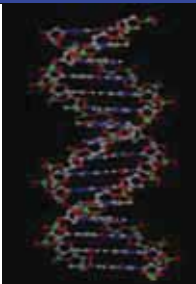
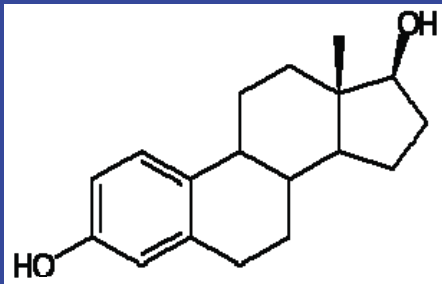
↳ 集団への影響？

ローチの分子ツールの開発

- 2003年 - ローチの遺伝子など分子ツールはなかった(5つの遺伝子がNCBI GenBankに登録されていただけ)



- 2010年 - 41 遺伝子がGenBank に登録
 - さらに、性分化関連遺伝子を37 クローニング済み
 - 30 以上のqRT-PCR assaysデータあり
 - cDNA マイクロアレイを開発(18471 expressed sequence tags available at GenBank)
 - ER α と ER β 2のレポーター遺伝子アッセイ系の開発

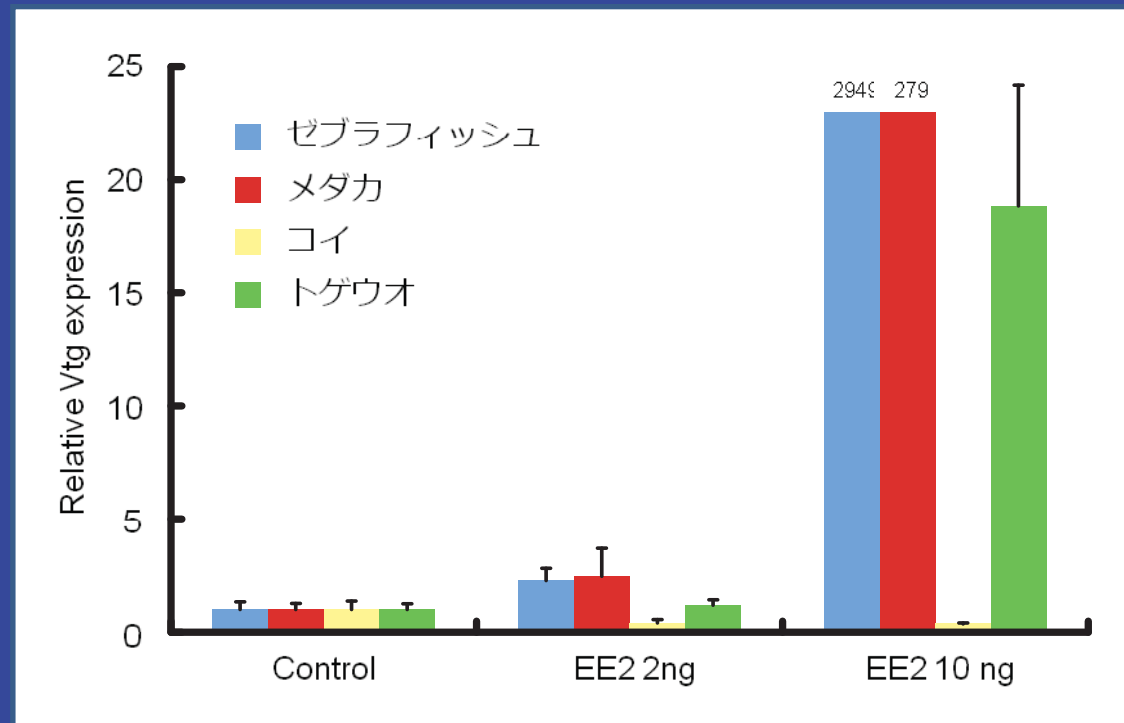
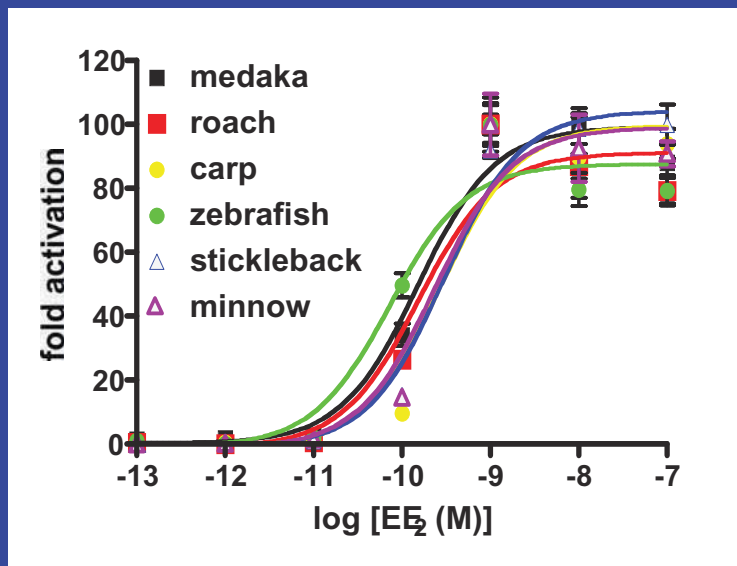


in vitro での転写活性と*in vivo*での反応性の差をどう比べるか?

試験管内から個体へ

➤ エチニルエストラジオール曝露によるビテロゲニン遺伝子発現

➤ *in vitro*と*in vivo*の比較



ゼブラフィッシュ > メダカ > トゲウオ > コイ

3. カナダの湖(Lake 260)を用いた エチニルエストラジオール(EE2)の生態影響

- 湖全体にエストロゲンを暴露して生態影響を調べる
 - 環境濃度の低用量
 - 魚類への影響
- 淡水魚への影響の推定



イギリスの川の例を参考

Environ. Sci. Technol. **1998**, *32*, 241

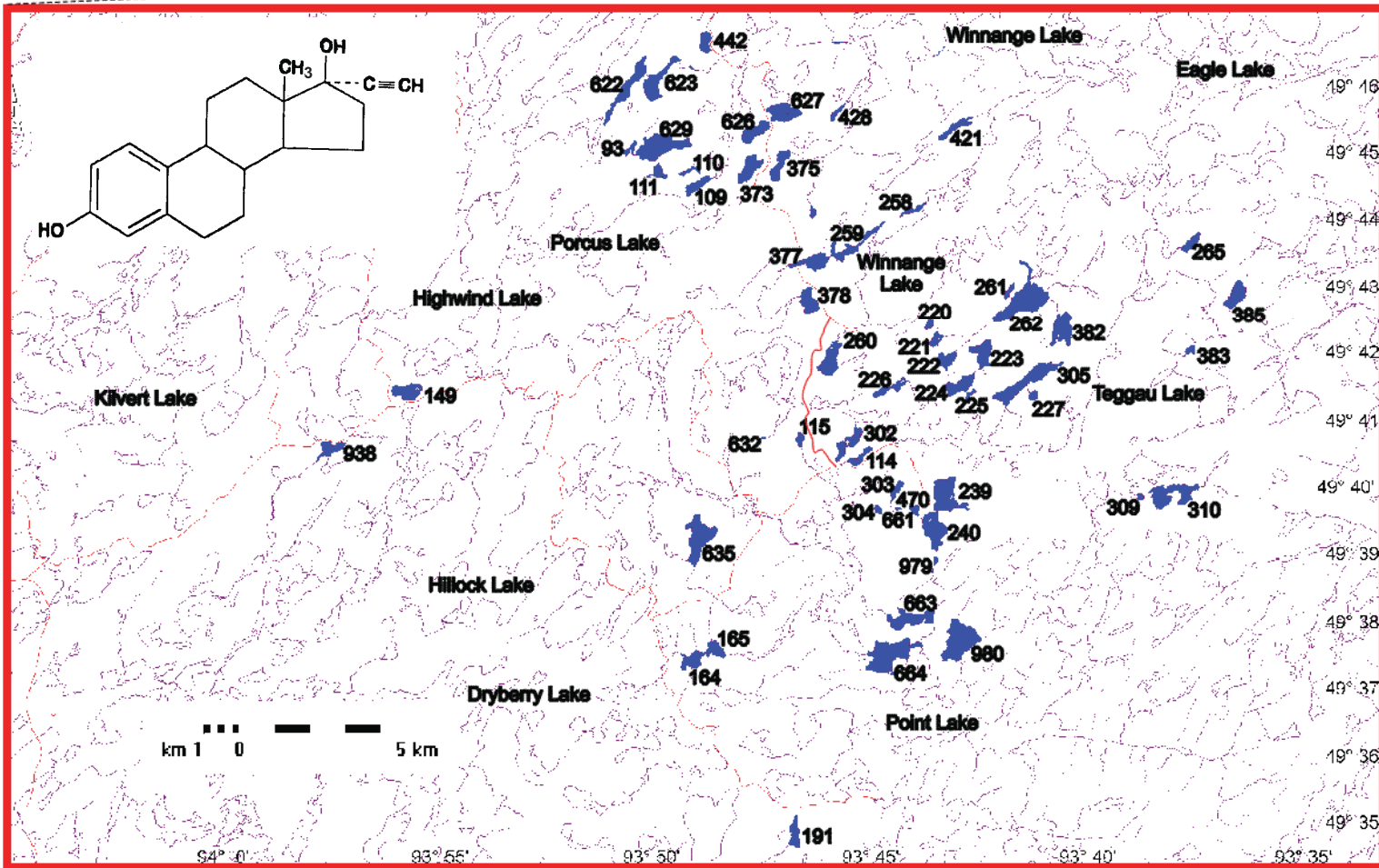
Widespread Sexual Disruption in Wild Fish

SUSAN JOBLING,^{*,†} MONIQUE NOLAN,[‡]
CHARLES R. TYLER,[†]
GEOFF BRIGHTY,[§] AND
JOHN P. SUMPTER[†]

The Fish Physiology Research Group, Department of Biology and Biochemistry, Brunel University, Uxbridge, Middlesex UB8 3PH, U.K., Environment Agency, National Fisheries Laboratory, Bromholme Lane, Brampton, Cambs PE18 8NE, U.K. and Environment Agency, National Centre for Ecotoxicology and Hazardous Substances, Hawberry Park, Wallingford, Oxon OX10 8BD, U.K.

mented, by
(8–14). M
many orde
counterpar
exposure v
standing th
of endocri
present in
even syne
unknown
known to
toxicologic
The critica
endocrine-
environment
and/or hur
the basis o
environme
Wildlife

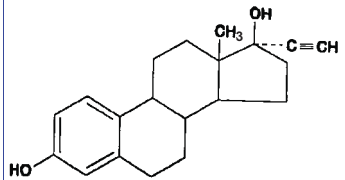
58 Designated Research Lakes and their Watersheds Detailed Monitoring since 1969



Experimental Lakes Area

**Boreal
Shield of
northwestern
Ontario**

Lake 260 – 合成エストロゲンを添加した実験湖

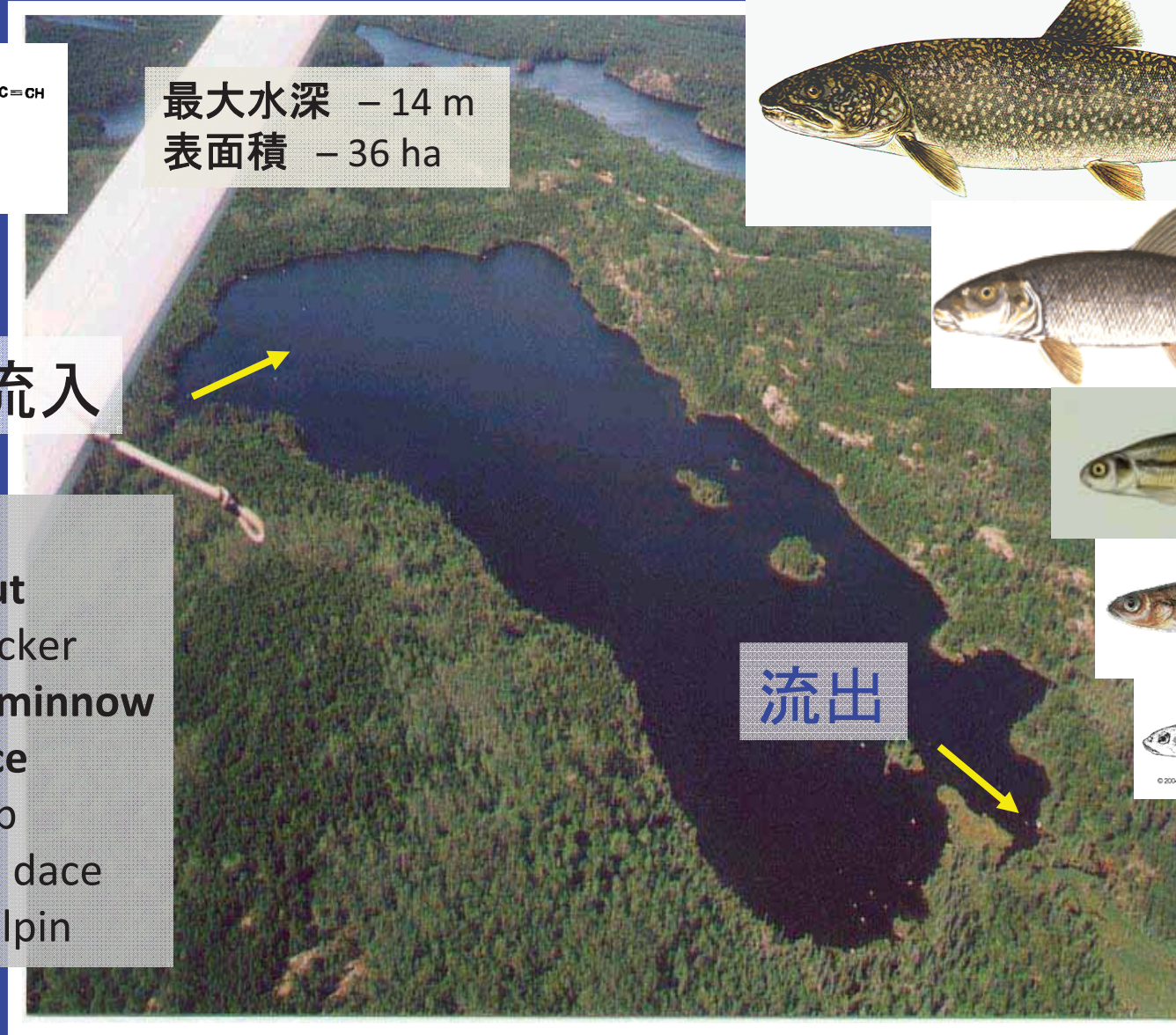


最大水深 – 14 m
表面積 – 36 ha

流入

魚種
Lake trout
White sucker
Fathead minnow
Pearl dace
Lake chub
Finescale dace
Slimy sculpin

流出



実験計画

- 2001-2003年にかけて週3回、20-21週間添加
- 毎週5か所で水サンプルを取得し、RIA および GC/MS/MSで定量
- 目標5 ng/L
- 2001 - 2003年の季節平均 4.8 - 6.1 ng/L

回復?

個体および集団への影響

エストロゲン添加

基礎データ

1999

2000

2001

2002

2003

2004

2005

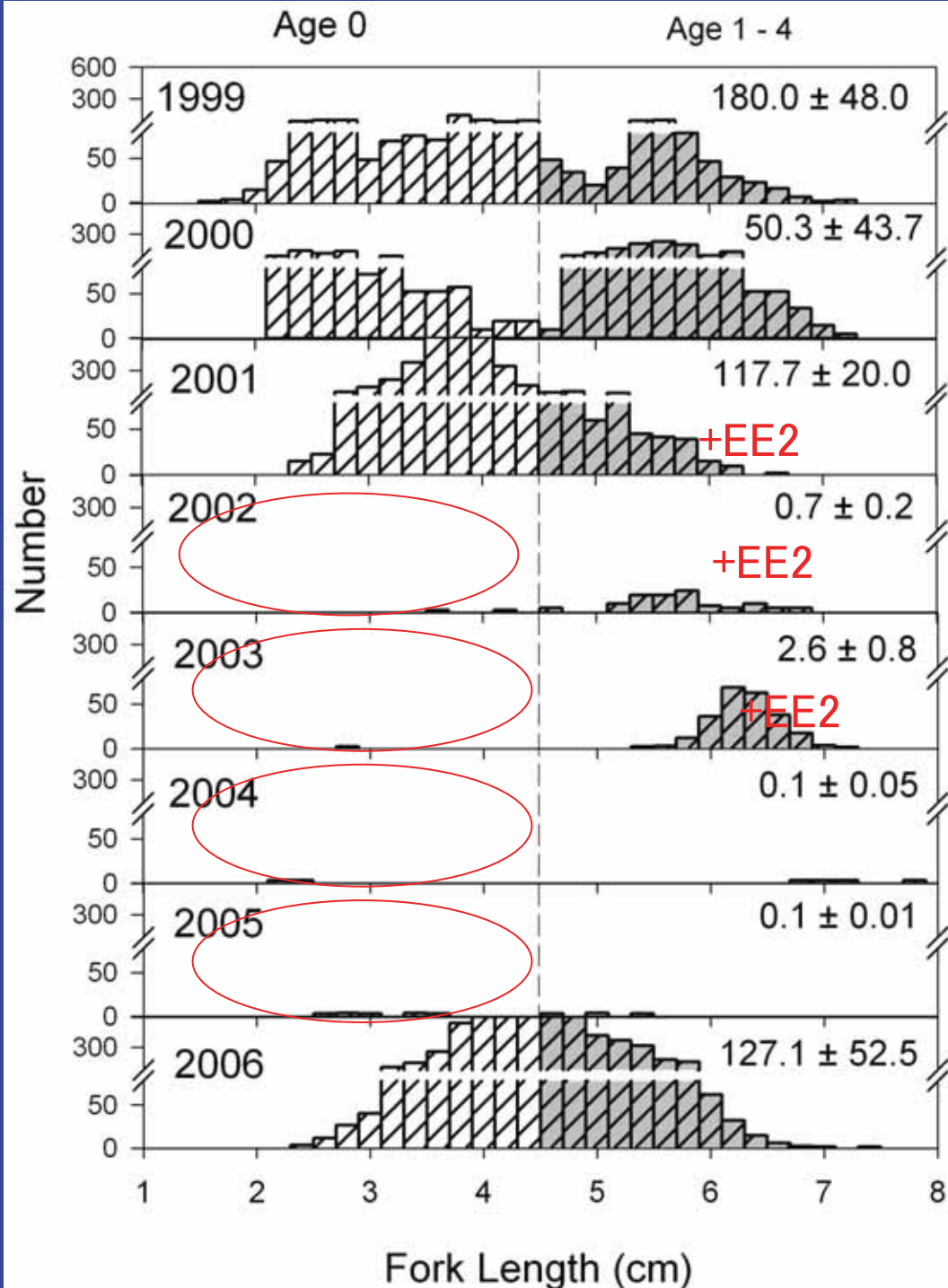
2006

対照とする湖のデータ把握

ファットヘッドミノー の捕獲数 Lake 260 - Fall



- ・EE2 曝露により
ポピュレーションの減少
- ・精子形成の減少、精巣卵
- ・卵巢未発達
- ・ファットヘッドミノーを
捕食する魚も減少
- ・曝露をやめると、回復



ローチ 野生の魚への影響

- 下水処理水および表層水のエストロゲンはup to 42 ng/L, typically <0.5 to 5 ng/L (e.g. Zhou et al. ES&T 2007)
- 下水処理水の総エストロゲン活性(EEQ) は up to 150 ng/L (Tilton et al. Aquat. Toxicol. 2002)
- 2次、3次処理により効果的に除去できる可能性がある (Servos et al. STOTEN 2005)
- 未処理下水曝露あるいはオーバーフローした原水曝露の影響、あるいは希釈率が低い処理水曝露のリスクが高い