

Understanding the Importance of Endocrine Disruption in Fish

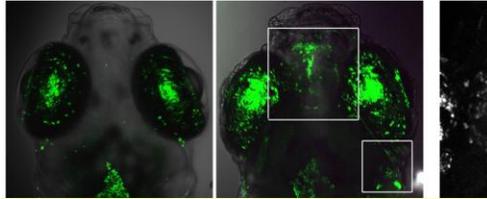
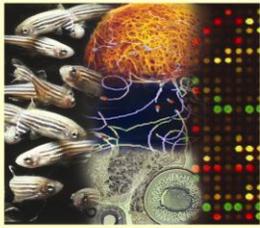


(and the UK-Japan Partnership for Research
on Endocrine Disruptors in the Aquatic Environment)

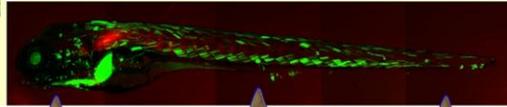
Charles R. Tyler¹, Tetsuhiro Kudoh¹, Anke Lange¹, Patrick Hamilton¹, Amy L. Filby,¹ Aya Takesono¹, Okhyun Lee¹, John Moreman¹, Jon Green¹, Ruth Cooper¹, Shinichi Miyagawa², Taisen Iguchi².

¹Biosciences, College of Life & Environmental Sciences, University of Exeter, Exeter EX4 4QD, United Kingdom.

²Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institute for Basic Biology, National Institutes of Natural Sciences, and Department of Basic Biology, School of Life Science, Graduate University for Advanced Studies, 5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki 444-8787, Japan.



Email: c.r.tyler@ex.ac.uk



UNIVERSITY OF
EXETER



今日の私の話は、主に日本と共同で研究した内容です。「魚類における内分泌かく乱作用の重要性について理解する」という題でお話をしていきたいと思えます。

Presentation Outline

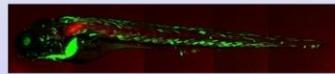
Our Dependence on Chemicals.

Feminisation of Fish in UK Rivers – A Brief Overview



Impacts of Feminisation on Roach Populations

Assessing Wider Health Implications of Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals (Environmental Oestrogens) in Green Glowing Fish



Some Concluding thoughts and Future Prospects



化学物質に依存している私たちの生活について理解し、そして英国河川における魚類の雌化現象の概要を簡潔にお話ししていきたいと思ひます。

また、雌化が魚類（ローチ）個体群に及ぼす影響についてお話をしたいと思ひます。個々の魚ではなくて個体群に及ぼす影響について話をしたいと思ひます。

また、緑色蛍光魚において内分泌かく乱化学物質ばく露による生態影響をより広く評価したいと思っております。

また、結論として言えそうなこと、そして将来への展望ということでお話ししていきたいと思ひます。

Our Dependence on Chemicals

*We use over 80 00 chemicals in products (a \$3 trillion global enterprise)
..... plasticizers, fertilisers, pesticides, pharmaceuticals, etc.*



Most of these enter can enter the bodies of humans through direct application (cosmetics) and/or via the food chain, in our drinking water or as aerosols.

Similarly, these chemicals can enter the bodies of wildlife (and most notably for animals living in, or closely associated with aquatic environments)

Some of these chemicals can build up in our bodies potentially increasing any biological effects they might have.

Pharmaceutical substances (\$800 billion industry) are specifically designed to change physiological function

我々は化学物質に依存して生活をしており、大体8,000種類ぐらいの化学物質を使用しております。可塑剤、肥料、農薬、医薬品等で世界生産約3兆ドルもの化学物質を使用しているわけです。

これらの化学物質のほとんどがヒトの体内に入ってきます。直接的な塗布、これは化粧品の場合、また食物連鎖、飲料水、空気中のエアロゾル等を経由してヒトの体内に入ってくるのです。

同様に、これらの化学物質は、野生生物、特に水環境中あるいは水環境周辺に棲む生物の体内に入ります。

これらの化学物質の中には、その物質特有の生物学的影響を發揮しながら、私たちの体内に蓄積していってしまう物質もあるわけです。

そして意図しない副作用なども出てくる可能性があります。とりわけ医薬品は、生理機能を変化させる意図を持って作り出されており、意図しない副作用なども出てまいりますし、その他の動物にも影響が出てくる場合があります。

Endocrine Disrupting Chemicals - an increasing health concern.

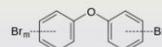
Natural substances: 17 beta-estradiol (E2), plant and fungal oestrogens

Industrial chemicals:

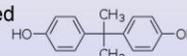
Perfluoro octanoic acid (PFOAs) - found in the blood of 98% blood US citizens associated with elevated cholesterol and chronic kidney disease



Polybrominated diphenyl ethers - Flame retardants associated with thyroid dysfunction



Bisphenol A: Polycarbonate polymers and epoxy resins. Associated with various health disorders (e.g. obesity, reproduction)



Pharmaceutical substances: 17 alpha-ethinyloestradiol (EE2), 17 beta-oestradiol (E2), Diclofenac.

Endocrine Disrupting Chemicals can have many very different effects in the body

内分泌かく乱化学物質、これは我々のトピックになっているわけですが、20年以上我々の関心を得てきました。深まる健康上の懸念という問題があります。多くの化学物質が内分泌系あるいはホルモン系と相互作用を持つことがわかってまいりました。

天然物も存在しております。17β-エストラジオールもそうですし、植物及び糸状菌由来の女性ホルモン様の物質もあります。

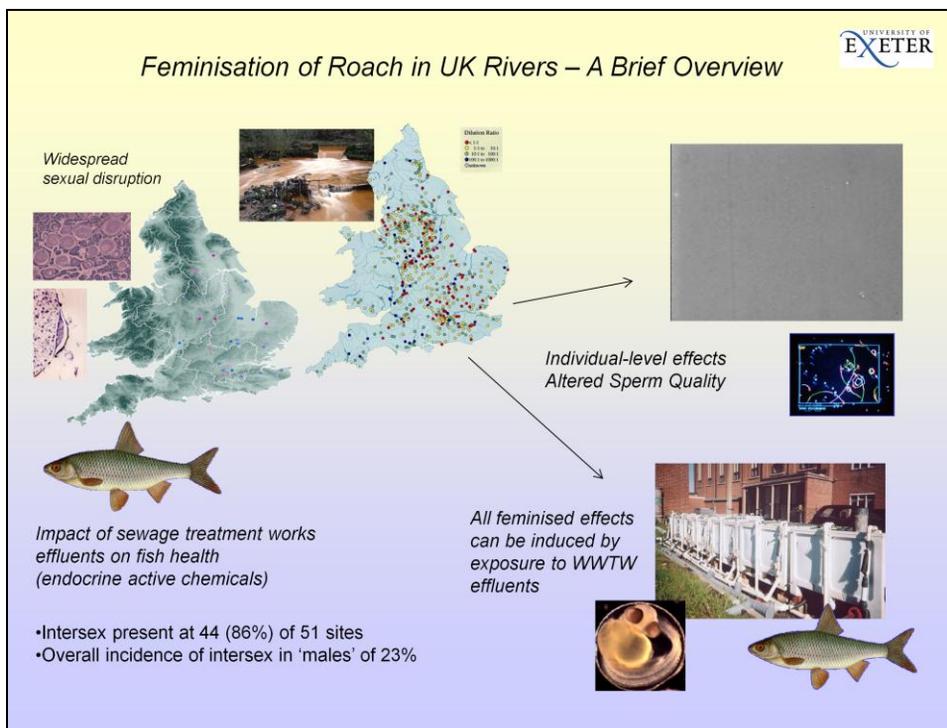
また化成品も存在しております。工業用化学物質であり、非常に多くの物質が含まれております。ペルフルオロオクタン酸（PFOAs）は、米国市民98%の血液中で検出され、コレステロール上昇や慢性腎臓疾患との関連性が疑われております。

また難燃剤とか、その中で使われている物質もあります。甲状腺疾患との関連性が言われております。

また、よく研究されている、それからいろいろ異論がある化学物質などもあります。これがビスフェノールA、つまりポリカーボネート重合体やエポキシ樹脂、健康上の様々な問題との関連性が言われております。これは肥満、生殖への影響等が言われております。

また医薬品に関して様々な意見が出されております。これは17α-エチニルエストラジオールも含まれます。

生理学的なプロセスを変化させるようにデザインされているということがあります。また、野生生物においてもその影響がみられるということであって、内分泌かく乱化学物質は極めて多様な影響を体内で多々持つ可能性が考えられます。



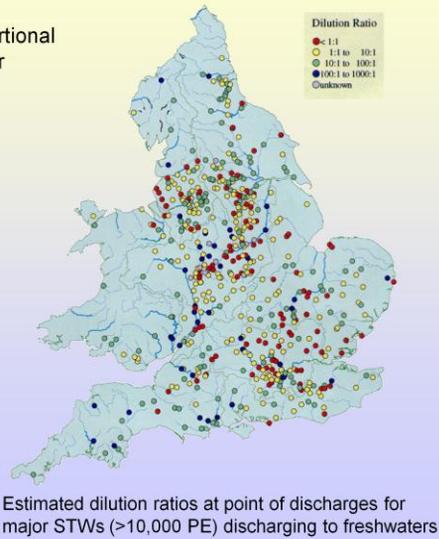
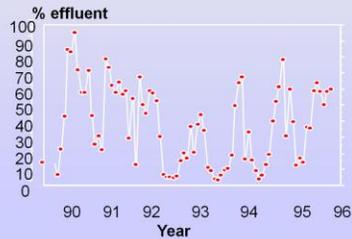
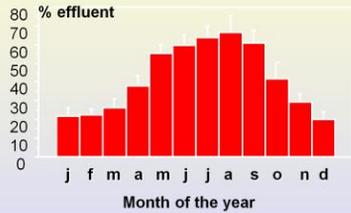
そして体内にどのくらい蓄積されてしまうのかということが重要なところ。10年ぐらい前から英国河川における魚類の雌化現象が問題になってまいりました。広域化している性的なかく乱がみられています。精巣が卵巣になってしまい、雌の特徴が出てくるということです。河川における淡水魚を51地点で調べてみました。そして、すべての地点で雌化現象がみられています。

ここですが、雄の精子を調べました。軽度ではありますが雌化しているということで、少し変化がもたれているということです。また、繁殖力に関連しても、雄性の場合、ヒトの場合と同じように、魚類でもこのように変化が出てくるということです。

魚類は下水処理場の排水にばく露されているわけです。ばく露によってすべての個体が雌化してしまうほどの影響が起きる可能性があるということで、雌性の蛋白質が出てくる。それから精巣の中で卵母細胞がみられています。雄が雌に変わってきてしまう、あるいは間性が確認されています。

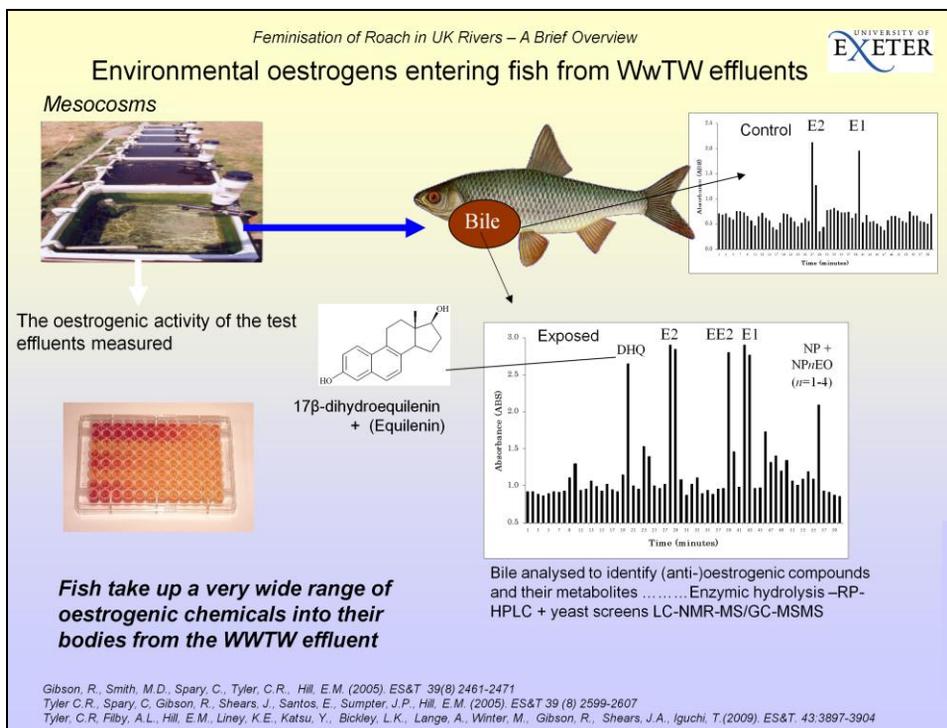
Wastewater Treatment Works effluent discharges into English Rivers: The scale of the issue

Seasonal and annual variations in the proportional flow of STW effluent in an English river



この黄色の地点より赤の地点で、下水処理水の割合がより多くなっています。どのくらいの量の排水があるかということですが、季節変動、経年変動がここでみられております。河川ですが、かなりの流量があるということでありまして、下水処理場排水がここに集まっているということです。1月から12月までということでも見ております

。



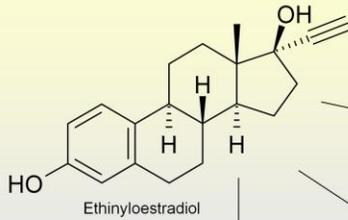
世界の様々なグループが、どのような雌化ホルモンの影響があるかということで、日本でも米国でも英国でも研究されております。Sussex大学との共同で我々も行っておりますが、この排水からどのような化学物質が検出されるかを調査しました。魚類の中に入っていき、ばく露する物質は何かということです。

この研究では胆汁を調査しております。すべての化学物質で70%ぐらいが排泄する前に胆汁を通るということで、クロマトグラフィー技術を使って調査しました。その分画をスクリーニングしております。エストロゲンを含んでいる分画が示されております。個々のエストロゲンを同定する目的のために行いました。何千倍もの濃度がみられている分画もありました。

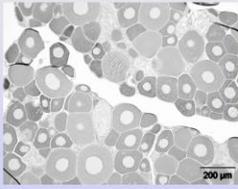
エストラジオールなども示しております。これは、妊娠を避けるためのピルの中に入っている物質ですが、天然の物質もあります。日本でも研究されるということで大変にすばらしいと思います。

ノニルフェノールポリエトキシレート、これは工業用の物質であります。多くの化学物質が女性ホルモン様で体内あるいは魚類の体内に蓄積されているということ、また、多くの組み合わせで体内に入ってきています。

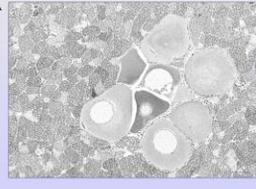
Environmental steroidal oestrogens can induce all the feminised phenotypes seen in wild roach.....



Exposure to EE2 (0.3ng/L) can induce vitellogenin synthesis



Life-long exposures to EE2 can complete sex reversal (4ng/L)



Exposure to EE2 (0.3ng/L) can induce ovarian cavity formation and intersex

Lange, A. Katsu, Y., R. Ichikawa, Greg Paull, Laura L. Chidgey, Tobias S. Coe Iguchi, T. and Tyler, C.R. (2009). *Toxicological Sciences* 106(1), 113–123
Lange, A. Katsu, Y., R. Ichikawa, Chidgey, L. Iguchi, T. and Tyler, C.R. (2009). *Environmental Science and Technology* 43 (4), 1219-1225.

この雌化をもたらした物質が何であるのかということで、避妊ピルの中に入っている物質が考えられます。Roberts先生も言いましたが、英国においてよく使われている避妊薬の中にそのような物質が入っています。

また、ローチのすべての個体で雌化現象が起きる可能性があります。これは河川の中の魚類で雌化反応がみられているということです。雌性蛋白質が雄の中でみられます。より高濃度にさらされるとということになりますと、これも最もばく露量で大きいものであります。このように高濃度にさらされると、精巣が卵巣に変化してしまうということがあります。

Mixtures of hormone affecting chemicals that enter into testes of fish exposed to wastewater effluents (and their effects)



NSAIDs (diclofenac, ibuprofen, naproxen, mefenamic acid)

SSRIs (fluoxetine, norfluoxetine, paroxetine, sertraline, nortriptyline, citalopram, venlafaxine)

EDCs (bisphenol A, triclosan, chlorophene, propiconazole)

Other xenobiotics (nordiazepam, clozapine, norclozapine, quetiapine, norquetiapine, warfarin, carbamazepine, propranolol, gemfibrozil, clopidogrel)

Collectively these chemical can affect steroid hormone, serotonin (well being hormone) and prostaglandin biosynthesis

Detected using novel nanoflow ultraperformance liquid chromatography-nanoelectrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry (nUPLC-nESI-TOFMS)

David A, Abdul-Sada A, Lange A, Tyler CR, Hill EM. 2013. Advanced purification combined with nanoUPLC-nanoESI-TOFMS to perform untargeted (xeno)metabolomics profiling of plasma samples. Submitted to Anal Chem.

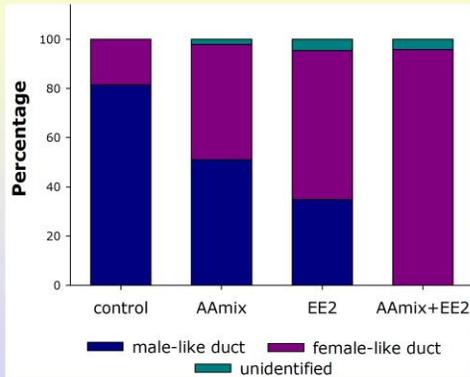


Links to Core Project 1

下水処理場排水にばく露した魚の体内に取り込まれてホルモン影響を及ぼす化学物質及び混合物（及びその影響）ということで、Sussex大学でこのような研究が行われました。様々な測定をしておりますが、これは胆汁中ではありませんで、精巣の中で、ジクロフェナク、イブプロフェン等の測定を行っております。セロトニン取り込み阻害剤もそうでありますし、その他のEDC、これは抗生物質のトリクロサン等も測定しております。

これらの個々の化学物質ということではなくて、これらの魚類は、多種類の化学物質にばく露されていますので、また化学物質自体が相互作用をもたらしているということも考えられます。

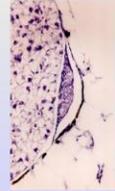
Anti-androgens can contribute to the feminising effects of oestrogen: Effect on gonadal ducts in Roach



n=50

Dosing: Ethinylloestradiol – 1.5ng/L
(measured) Chlorophene 22µg/L, Triclosan,
5µg/L, Abeitic Acid 3.5µg/L

Exposure : From 3 days prior to hatch to 185
days post hatch.



Antiandrogen mixture in combination with ethinylloestradiol resulted in feminisation of the reproductive duct in ALL males in the exposed population.

Lange et al., unpublished data



Core Project 3

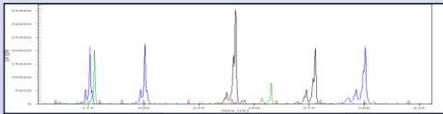
もう一つ、英国・日本パートナーシップ研究で取り上げた内容ですが、これはアンチアンドロゲン、抗男性ホルモン類が女性ホルモンによる雌化影響を増長している可能性があるという内容です。これはエチニルエストラジオールを投与してみた試験です。そして抗男性ホルモン類を追加した研究を行いました。このくらいの濃度で雌化し、化学物質自体が共働して更に増長しています。個々の化学物質ではなくて組み合わせで影響を及ぼしていることが考えられます。

Breeding Impacts of Feminisation (Intersex) in Male Roach



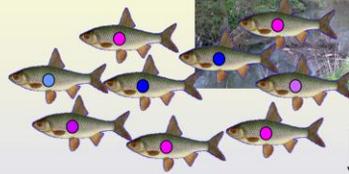
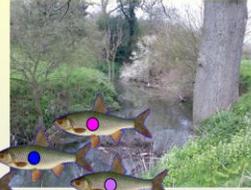
Multiple tanks with 3 female and 6 'male' wild-caught roach (13 tanks)

100% parentage achieved using exclusion



7 highly variable primers were developed and applied for parentage analysis (100% success)

Breeding trials with wild roach



Genotyped all parents and offspring (50-104 fry from each tank)

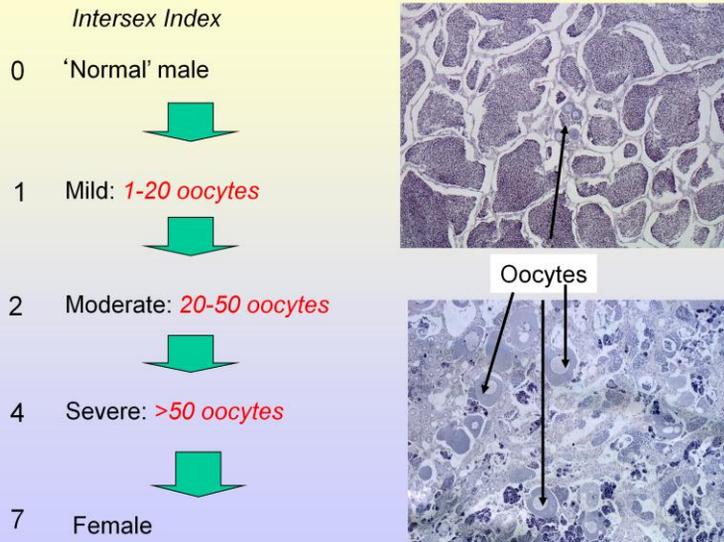


では、ヒトに対しての影響がどうかということです。個体のレベルでどうなっているのかということを見ております。個体群の影響はどうなのかということで我々が研究したものです。

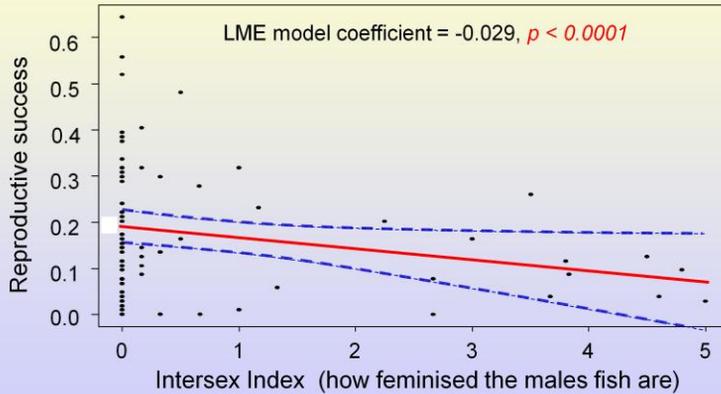
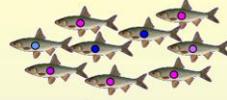
過去7～8年ぐらいの間で英国河川のローチ類での研究を行いました。雄ローチの雌化が繁殖に及ぼす影響はどうかを研究しました。他大学との共同で行った研究です。また、井口先生と協力して日英パートナーシップの研究を行いました。

間性がみられたので、タンクの中に野外採取した雌3匹、雄6匹を入れました。水槽の中で雄は競争して繁殖をしようとします。遺伝子的に同定を行い、そして産まれた仔も遺伝子的に類型化して調べて、どれが父親で、どれが母親なのかということ調べたものです。

Breeding Impacts of Feminisation (Intersex) in Male Roach



交配をさせまして、次に生殖腺を調べました。正常なのか、あるいは雌化がどの程度進んでいたのかを調べました。これは間性係数で示しました。精巣の中にある卵母細胞が多ければ多いほど雌化が進んでいます。

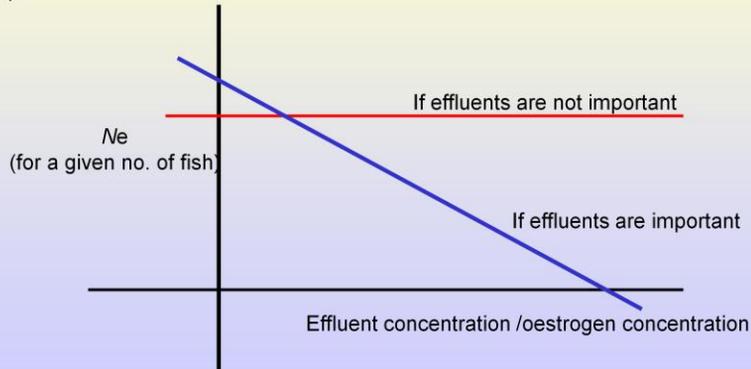
Reproductive Success of Feminised Male (Intersex) Roach under
Competitive Breeding

There was a significant negative relationship between intersex and reproductive success

間性がかなり多いところで、競合交配試験における雌化ローチの繁殖成功率を推定しました。はっきりとした関係がここではみられておりません。個々の雄であってかなり雌化しているということになりますと、遺伝子を次に伝える可能性が少なくなってしまう。最も大きく影響を受けたものは、75%ほど繁殖力に欠けるということがわかったわけです。

Do Oestrogenic Wastewater Treatment Works Effluent affect the Sustainability of Wild Roach Populations – Looking into their Genetics

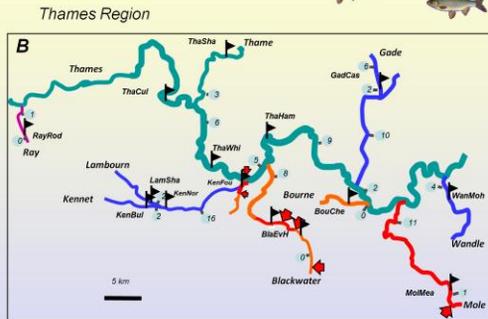
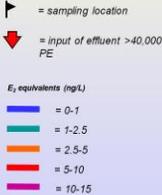
Populations of roach from more polluted sites may have smaller breeding population sizes (N_e) than those from clean sites, because a higher proportion of fish will be reproductively compromised.



これによって、遺伝子を詳しく調べますと、全体像は変わってくるかどうかです。より汚染された地域のローチ個体群は、より多くの個体数が生殖に失敗するので、清浄地域の集団よりも小さな繁殖個体サイズとなっている可能性があるわけです。その変化に順応しているという段階であって、ローチの繁殖個体群サイズが変化しています。

効果的な個体群サイズが存在しているのかどうか、そして、それは排水が重要であるのかどうかということを推定しました。排水が重要でない場合が赤線、排水が重要な場合は青い線で書いております。

Do oestrogenic effluents affect size of the breeding population size in wild roach ?



Minimum of 30 fish (10 microsats) have been characterised from each of 37 sites

Quantifying **Breeding Population Size** (N_e) using Linkage Disequilibrium - the non-random association of alleles at two or more loci, not necessarily on the same chromosome

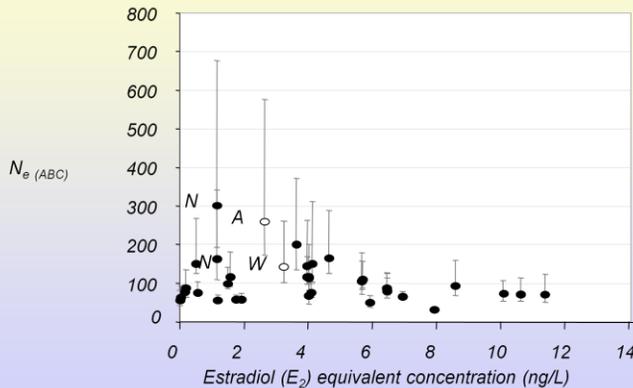
Performing multiple comparisons of effective (breeding) population sizes at sites classified as clean, intermediate and highly polluted with oestrogenic WWTW effluent.

Patrick B. Hamilton · Elizabeth Nicoll, Eliane S. R. De-Bastos · Richard J. Williams · John P. Sumpter, Susan Jobling, Jamie, R. Stevens · Charles R. Tyler · Populations of a Cyprinid Fish are Self Sustaining Despite Widespread Feminisation of Males. *BMC Biology* In review

最近結果が出たものですが、これは英国でロンドン近くの10の地域で研究した内容です。37地点それぞれについて30匹以上の魚について試験をしました。赤はエストロゲンが多い、ブルーはそのレベルが低い地点です。ローチの個体群を調査しております。この河川にはバリアが存在しておりまして、魚類が次の領域に移ってしまうのを避けるようにしております。そのところの個体群を調べられるようにしております。

DNAマイクロサテライトで研究を行っております。ここでは触れませんが、御関心があればお知らせしたいと思います。効果的な繁殖個体群サイズということで研究しております。

Oestrogenic effluents do not significantly reduce the effective breeding population size in wild Roach.



A word of caution- because of the variation in the data, it is possible that a reduction in N_e of 60% could occur without being statistically significant

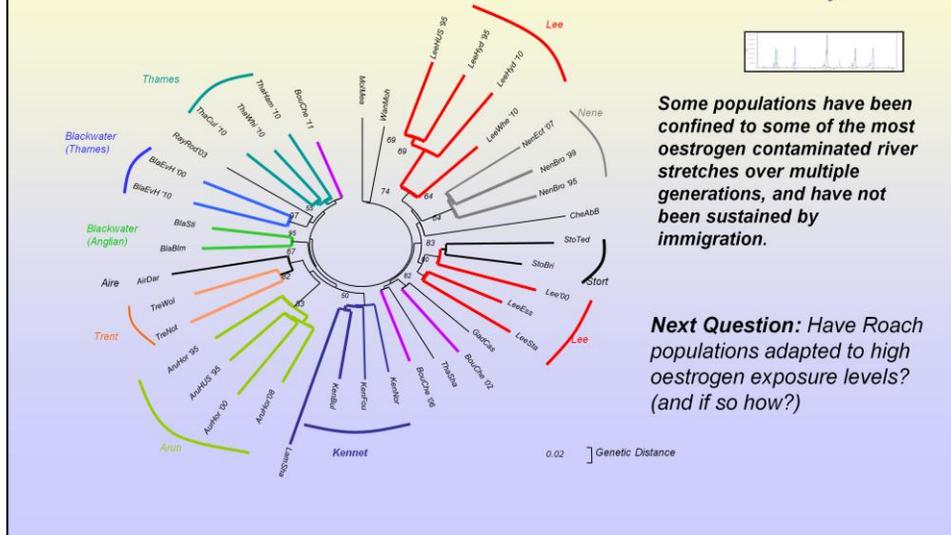
Plot of effective population size (N_e), calculated using the Approximate Bayesian Computation (ABC) method in the program ONeSAMP, versus predicted estradiol (E_2) concentration for 37 populations of *Rutilus rutilus*. In cases in which more than one population had similar values, data points overlaid each other; thus, individual data points are not always visible. Error bars are 95% confidence limits.

得られたデータですが、まず繁殖個体群の大きさを示しています。そして、それぞれの調査地点においての大きさをみていますが、まずこれをみますと、特に N_e 、濃度の高いところでは個体群の大きさは小さいように思われます。しかしながら、エストロゲンの濃度が低いところにおいて今度はいろいろばらつきがみられます。高いものも出ているわけです。しかし、統計的にみたところ、両者の間には相関はなかったということです。ですから、少なくとも有害な影響が、それぞれの汚染された環境の中で生きている魚に関して、繁殖個体群の大きさには影響がないということがわかりました。これはいいことです。

しかし、1つ条件を付け加えたいと思います。問題は、こういった野生生物の個体群に関してみると、どうしてもデータのばらつきがある。しかも、そのばらつきが大きいために、これほど大規模な研究を行って2,000匹以上の魚を対象にしたとしても、どうしても60%ぐらい個体群の量が減ったとしても、統計的な有意差ということまではいかないということがあられるわけです。ですから、この点は注意しなければなりません。

Analysis of the population structure of Roach

Neighbour-joining phylogenetic tree for the 39 roach population samples (14 microsatellite loci using chord distance).



Some populations have been confined to some of the most oestrogen contaminated river stretches over multiple generations, and have not been sustained by immigration.

Next Question: Have Roach populations adapted to high oestrogen exposure levels? (and if so how?)

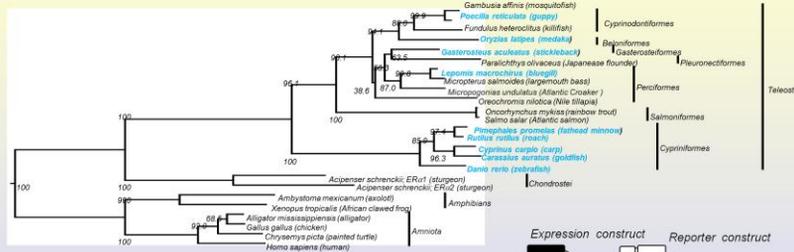
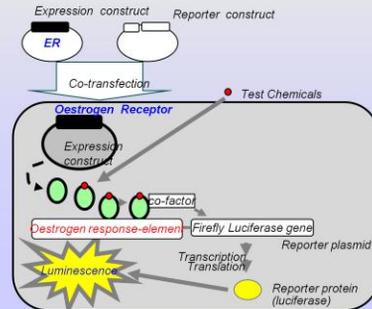
これはちょっと複雑でわかりにくいかもしれませんが、基本的には、こういった研究において、その調査地点においてDNAマイクロサテライトを使って、それによって魚の分類を図りました。この樹状図というか、これは系統樹であります。つまり、ローチが様々な流域においてどれくらい違っているか、あるいは近いかを示しました。重要なのは、河川の中で10の流域、リー川、テムズ川の一部です。それからここ、こういったところは他と違っているように思われます。

つまり、この研究のいいことは、特にエストロゲンの濃度が高いところですが、ここの個体群はそれ自体で維持しているようであると。ですから、エストロゲンの量は多いけれども、そこで個体群を維持できているということは、他からの回遊とか、あるいは濃度が希釈しなくてもそれ自体でその個体群はもっているということです。

そこで問題は、果たしてこういったローチが実際にこのような環境の中でも流域の中で生きていけるのであれば、まず何と云っても、エストロゲン濃度が高い中で適応できたのか、もし適応できたなら、どうやって適応したのかということです。つまり、こういった個体群の持っている強靱性というのを内分泌かく乱化学物質に関しても理解していかなければなりません。

Not all fish species are the same!

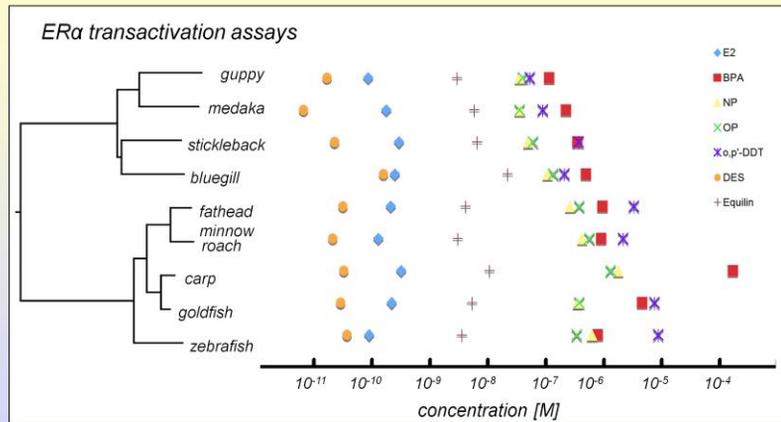
Fish species can differ in their responsiveness to Oestrogens

ERs cloned for species studied across wide evolutionary scale**Reporter Assay**

そこで1つ付け加えたいのは、こういった研究において、数種の魚類において検討しました。特にその中でローチに注目したわけですが、いろんな問題が提起されました。つまり、これで十分他の魚の代表と言えるかということです。率直に申し上げて、もちろんノーです。というのも、26,000~27,000種も魚類がある中で、その脆弱性とか感受性というのは、それに関して違うと思われます。この感受性リストということでは、ローチというのはたぶん真ん中あたりで、最も感受性が高いとは言えません。魚種の中には、特に日本などにおいては、どれが一番魚種の中でも感受性が高いか、つまり弱いかというのを調べようと思いました。

これは井口先生が日本で研究されたわけですが、エストロゲンに対してどのような形で体の中の部位で反応がみられたかをみました。ここでは、遺伝子配列に関して、様々な魚種の受容体に関してこれを単離しました。そして、これをレポーターアッセイという中に入れました。そうすることでエストロゲンとの相互作用をみて、どの魚種に関しては感受性が高いか低いかを知ろうと思いました。

Responses to 'Environmental Oestrogens' in Different Fish Species



Chemicals show similar relative potencies across the different species

BUT responses to some chemicals between species can vary by as much as 100-fold.

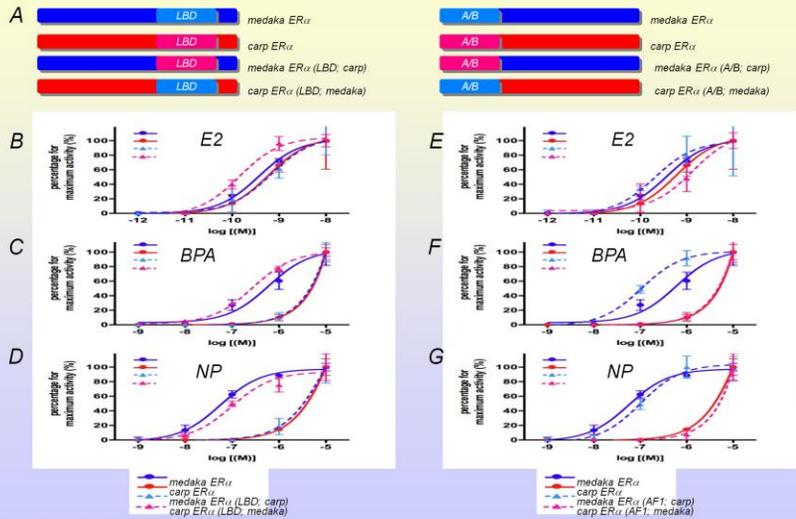


Core Project 3

Miyagawa et al (data in prep)

これがそのまとめと言えるものですが、実はこの背景には、井口先生の研究室での2年間の研究があるわけです。様々な魚種を対象として、そこでそれぞれの内分泌かく乱化学物質の濃度の中で、その中でもエストロゲンの力価について調べていきますと、まず最初にわかるのは、自然由来のエストロゲン、エストラジオールがあって、それに関しては様々な魚種が同じような反応をしていることがわかります。しかし、他の環境の中にあるいろいろな物質をみていきますと、そこで反応が2桁違う物質があります。最も感受性が高い魚種と低い魚種との間で2桁の違いがあるわけです。ということは、この結果に関しては、1つの魚種だけをもって総体的なハザードやリスクはこれくらいだと断定できないということです。

Understanding why different fish species differ in their responsiveness to 'Environmental Oestrogens' – The Oestrogen Receptor

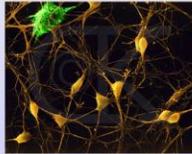
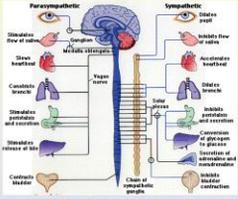


Miyagawa et al., et al (data in prep)

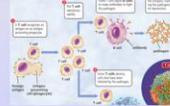
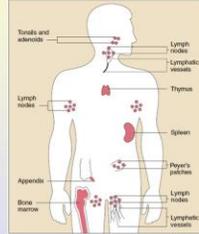
これは詳しくは申し上げませんが、日本が主導となって、世界でも主導的な研究と言えますが、今なぜ魚類の中で弱い魚種とそうでない魚種があるのか明らかにしようと思いました。井口先生の研究所では、受容体の中で、様々な魚種の中でも変わっているものに注目して、受容体の中のどの部分とその感受性に関連しているかを知ろうと思いました。様々なエストロゲン様の物質に関して、リガンドのバインディングドメインに注目して行っています。

Communication pathways in the Body

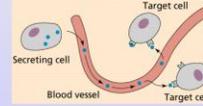
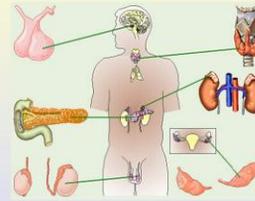
The nervous, endocrine and immune systems make up the body's major signalling pathways in animals:



Nervous- telephone network



Immune system



Endocrine- postal system
A hormone is a chemical message that instructs a specific response

...and they are interconnected

最後にお話ししたいのは、もう少し違った内容です。私は今まで1つの内分泌かく乱化学物質に関して調べてきました。そして、その繁殖に対する影響を知ろうとしました。しかし、我々の体の機能とか、あるいはヒトであれ、あるいは他の脊椎動物であれ、魚までいったとしても、そのコミュニケーションの経路があります。まず神経系、もちろんこれはすごく速い系です。言ってみれば、電話網のような系です。デジタル化されていて暗号化された情報が受容体から脳へ、そして脊椎を通して、そして実際の器官へと伝わり、いろいろな活動が起こります。

それから病原菌などに対して対応する免疫系があり、いわゆる内分泌系というのがあります。

さて、こういったシステムがどのように機能するかといいますと、研究においてもよくやりがちですが、我々はそれぞれのシステムを別々に把握しがちです。しかし、これらはみな密接に関連し合っています。例えばホルモンですが、これが免疫系の作用と関わっていたり、あるいはホルモンと神経の機能とか神経の発達にも関連しているわけです。そこで、このスライドをなぜ出したかといいますと、もしこういったホルモン系に何かかく乱が起こったら、もしかするとそれは内分泌系にとどまらず、免疫系にも影響があるかもしれないし、更には神経系にも何か影響があるかもしれないということです。

Roles of Oestrogens in the body

Oestrogens mediate:

Growth
Various developmental processes
Female (and male) reproduction
Bone development
Calcium Homeostasis
Defence (Immune function)

Oestrogens signalling:

Via specific receptors
(3 subtypes in fish)
(+ membrane receptors?)
Cross talk

Every cell in the body probably has an oestrogen receptor!

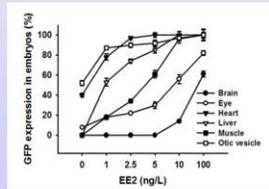
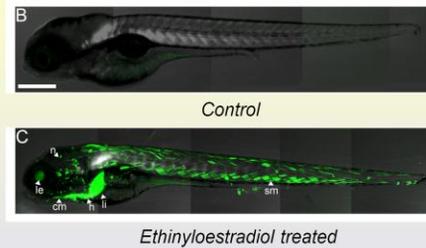
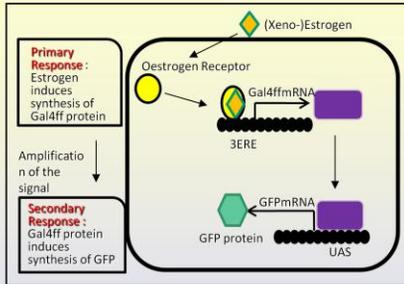
For exposures to chemical that mimic oestrogens there are much wider potential health effects than those on reproduction.

EDC、内分泌かく乱化学物質、エストロゲンが体内でどのような作用をするかということ、生殖以外にもいろいろな作用があります。もちろん女性における生殖だけでなく、男性においても同様です。あるいは皆さんの中で、また不妊でないためには、男性であったとしてもエストロゲンが必要なわけです。それから骨の発達、カルシウムの恒常性、そして免疫機能、防御機能などもあります。

井口先生の研究室からのデータをみれば、受容体の多型というのがあります。それによって反応が異なっているということがわかりました。

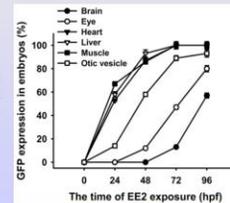
体の中でこういったエストロゲン様の化学物質に環境の中でばく露されると、どうしても我々は生殖に注目しがちですが、それだけではなく、他のプロセスに影響はないかもみる必要があります。しかし、これは実はなかなかわかりにくい内容です。

A New Transgenic Fish Model for Assessing Environmental Oestrogens (ERE-GFP zebrafish)



Sensitivities in responding body tissues (96h)

Okhyun Lee, Aya Takensano, Masa Tada, Charles R. Tyler and Tetsuhiro Kudoh (2012) *Environ Health Perspect.* **120**, 990-996



Temporal dynamics in responding body tissues

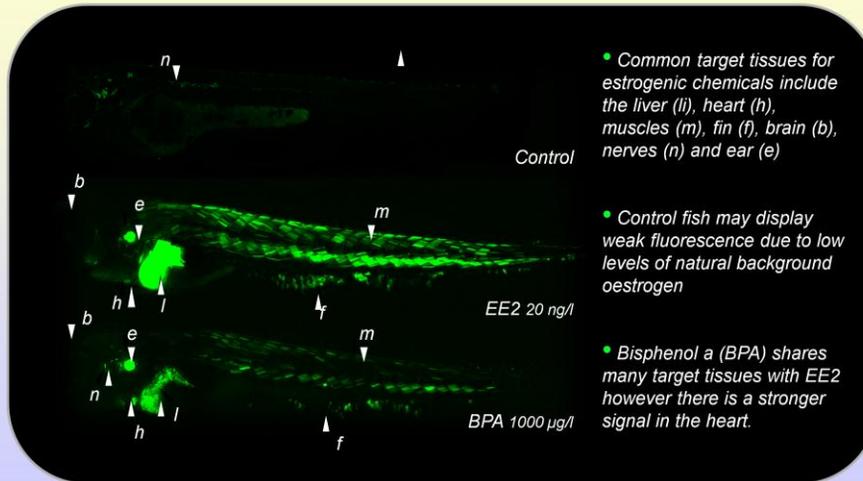
Provides a highly sensitive, whole body systems tool for assessing interaction of environmental oestrogens in real time for more intelligent targeted health effects analysis.

環境の中にある化学物質、内分泌かく乱化学物質がどういう形で我々の体に影響を与えるのかを考えたとき、そこで今開発中のシステムで最も総合的で最も多くの情報を提供してくれるのは、どこで、どういう形で化学物質が体と作用するかということです。ここではトランスジェニック魚というのはあまり作られていません。日本、アメリカ、ヨーロッパなどをみても、他の哺乳動物などで若干こういった試みは行われていますが、トランスジェニック魚を使って体内における状況を見ようと思いました。

これはエストロゲンですが、時間がありませんので詳しいことは申し上げません。しかし、これは二重の抗生物質で4つの遺伝子エレメントがあって、それが受容体と結合する。そうすると、カスケード的な反応が起こって、その結果として、いわゆる緑に蛍光するような蛋白質になる。例えばクラゲなどでもあるものです。

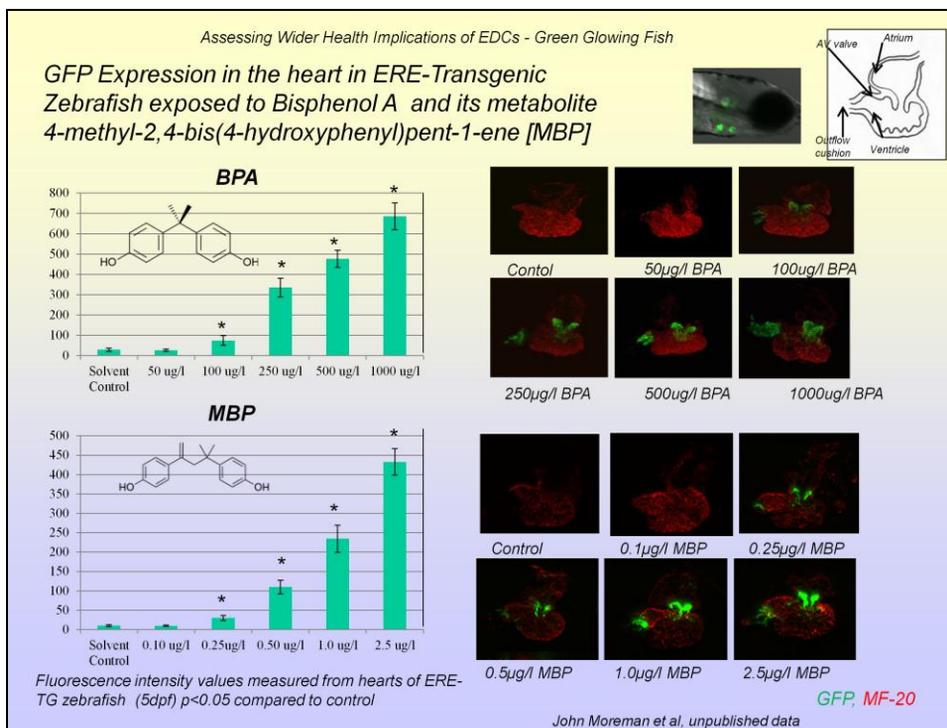
エストラジオールを使って、体の中のどこで活性があるかがわかるわけです。肝臓の場合もそうですし、筋肉あるいは他の部分で作用しているというのがわかるわけです。井口先生のところの研究で、こういった化学物質が体の中でどのように作用しているかを検討しようと思いました。この濃度を把握し、そして反応を画像を使って検討し、様々な組織の中でどこに影響が出ているか、また、時系列的にどういう反応があるかということを知ろうと思いました。これはとてもデリケートな、感受性の高いシステムで、体の中における作用がわかるようになっています。

*Different Oestrogenic Chemicals induce different response patterns
(different target tissues) in ERE-Transgenic Zebrafish*



Okhyun Lee, Aya Takensano, Masa Tada, Charles R. Tyler and Tetsuhiro Kudoh- EHP. 2012

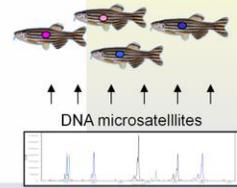
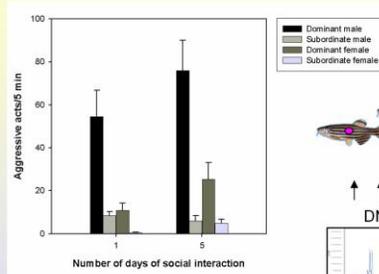
異なった環境エストロゲン様物質に関して、これは大変濃度が高い例ですが、ここで申し上げたいのは、これはコントロール、対照群です。エストラジオール、こちらはBPAです。化学物質の中には、特定のプロフィールとして、いかに様々な組織と相互作用するかということが違うわけですが、ここでBPAに関しては、これが常に心臓で活性があることがわかります。



そこで、これを更に進めて、BPAと、これが更に分解されたMBPに注目しました。これは抗体が染色されることで、心臓の中でどうなっているかわかるわけです。これは赤くなっています。濃度を高めました。そうすると、緑のところ、これはGFP、緑蛍光のタンパクですが、これは心臓全体がBPAによって影響を受けているというよりも、むしろ心臓の弁とか、外に血液が流れているところのクッションが影響を受けているということがわかります。

こういった化学物質が体内でどこで作用しているかがわかるわけですが、これは影響の大きいBPAの高い濃度で調べていますが、これが代謝され、そしてMBPが体内でどうなっているか。これは環境の中にある物質です。

Endocrine Disrupting Chemicals can alter Behaviour



Summation of behavioural acts by individuals towards the same sex in a 2 X 2 breeding colony ('chase', 'spar', 'repel'; Paull et al. 2010)

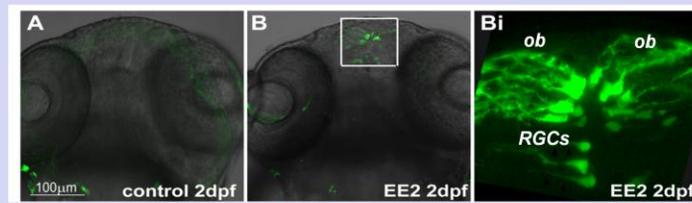
Some findings from our work:

- As occurs in roach populations, there is a breeding hierarchy in zebrafish populations, with dominant males and females that sire proportionally more of the offspring
- Endocrine disrupting chemicals (oestrogens) can alter that dominance structure and change the breeding outcome (affecting population genetics)

Dominant behaviours result in siring more offspring

さて、内分泌かく乱化学物質に関して、動物の生理に対する影響について注目されていますが、最近の研究においては、行動に対する影響はどうかということに注目し、繁殖群、ローチであっても、ゼブラフィッシュでも、メダカでも、どういう行動、特にその中でも攻撃性というのが重要です。特に繁殖行動においては攻撃性ということが重要です。つまり、繁殖群の中にはヒエラルキーがあるわけです。エストロゲンにばく露することでこのような優性なヒエラルキーが影響を受けるかどうか、また、どの個体が残るかを検討しようと思いました。この研究において化学物質によって行動が変わるということです。その結果として繁殖の結果も変わります。

Oestrogen Responding Cells in Brain in ERE-TG Zebrafish



Confocal microscope images of control (A) and 100ngEE2/L treated ERE-TG zebrafish embryo/larvae (B,). Bi : high magnification image of the area indicated by white square in EE2 images. OB: olfactory bulb, RGCs: radial glia cells.

Telencephalic neural cells responding to EE2 include **radial glia cells (RGCs)**.

RGCs are fundamental in brain development and function, including brain repair

Life stage specific responses

Takesono, et al, unpublished data

ここでもトランスジェニックモデルを使いました。これを使うことでいかにこういった効果が出てくるかがわかります。つまり、その機序として、化学物質がどういう影響が出るかをみているわけですが、これもトランスジェニック魚で、ここでEE2にばく露させました。そして嗅球、つまり嗅覚についての影響をみました。

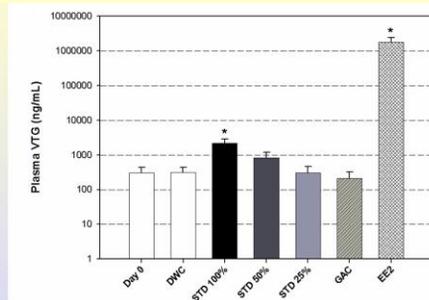
ここで放射状グリア細胞があるのですが、これは脳の機能で様々なニューロンが発達する。特に脳の修復に関わっている細胞です。トランスジェニックモデルを使うことで、これにより更に化学物質の体内における作用の理解を深めることができるかもしれません。

The UK Endocrine Disruption Demonstration Programme

Various Treatment Technologies can Remediate for the Oestrogenic Effects in Fish.



Activated Carbon
(Ozonation, Chlorine dioxide)



Biological effects of 21 days exposure of sexually-mature male fathead minnows to treated WWTW effluent, dilution water (DWC), or the oestrogen control

Other technologies that are less costly - Titanium dioxide, Sand Filters, Improved hydraulic retention times etc.

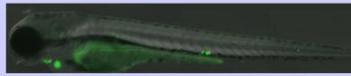
Uptake will depend on cost balanced against environmental health benefits

最後に、この問題を修正することはできるのかということです。こういった化学物質が排水とか、いろいろな形で環境の中に流れています。様々な形でこの問題に取り組もうとしているわけですが、例えば化学物質の規制が行われたり、あるいは処理システムを考えて、その中で環境に放出するかということで、4,000万ポンドをかけたイギリスでのプロジェクトがあります。ここではエストロゲンを除去するという事業です。ステロイドもありますが、しかし、それ以外にも対象となっている物質があります。

技術の中でもとてもうまく効果的に使える技術があります。活性炭の使用、あるいはオゾン酸化や二酸化塩素といったような技術であっても、こういったシステムを使うということは、今度はまた環境に対する影響が言われておりますが、ただ問題は、CO2の排出につながることで、それからコストがかかることです。Roberts先生の方で先ほど英国におけるコストがどれくらいになり得るかという数字が出てきましたが、こういったシステムの中で、特に砂濾過とか、あるいは水圧的にリテンションタイムを維持する、それによって排水の質を高めるということも考えられています。こういった方法がうまくいくかどうかというのは、コスト対環境面でのメリット、そのバランスにかかるといえることになるでしょう。

Some Concluding thoughts and Future Prospects

- *Feminised male fish are widespread in English rivers, induced by exposure to WWTW effluents, and oestrogens appear to be the main causative agents (lots of different chemicals enter their bodies that can affect their hormone systems)*
- *The feminised condition in males (medium to severe) affects the ability of individuals to breed, but genetic analysis suggest the size of the roach breeding populations (N_e) in UK rivers is not unduly affected (accepting limitations of the analyses).*
- *A major question is whether wildlife can adapt to EDCs and what the fitness consequences of such adaptations are – this should help provide insight into population resilience in their contaminated world.*
- *Molecular technologies are playing a major role in unravelling how EDCs affect the physiology in wildlife (and humans) and consequences in wildlife (here fish) populations.*



最後にまとめてみたいと思います。

雌化した雄というのは、イギリスの川の中でもそういった魚がたくさん見つかっています。これは英国の河川においてエストロゲン様の物質が排水の中に含まれていることに関連しており、こういった雌化の中でもエストロゲン様の化学物質が大きな役割を果たしていますが、それ以外の化学物質もあるのかもしれませんが。

そして、雌化した行動によって、それは繁殖能力に影響を与えますが、遺伝子解析によれば、少なくとも今のところ、遺伝変異ということであまり大きな影響は出ていないようです。

しかし、エストロゲン以外の化学物質もまた環境の中に放出されているわけであり、そうなりますと、それがどんな影響を及ぼすかということも考えなければなりません。特に重要なのは、野生生物の個体群がどれくらい環境に対する耐える力があるかということについて考えていかなければなりません。

一方で、最後に申し上げましたが、世界中でも、特に日本においても研究が行われておりますが、技術開発によって、いかにこういった内分泌かく乱化学物質が個体に対して、また個体群全体に対してもどのような影響があるのかということの理解を深めていくことができるかと思えます。

Sponsors and Collaborators of the work presented:



最後に、この研究に関して支援をくださった機関をここにリストアップしておきます。特に日本とイギリスの間では日英のプログラムの下で協力が行われてまいりました。



皆様、御清聴いただきましてどうもありがとうございます。最後に1つスライドを残しておきました。イギリスの川がすべて汚染しているわけではありません。このようなきれいな川もあるということを最後に申し上げます。ありがとうございました。