

日本における妊馬由来エクインエストロゲン類の 存在実態と生態影響評価

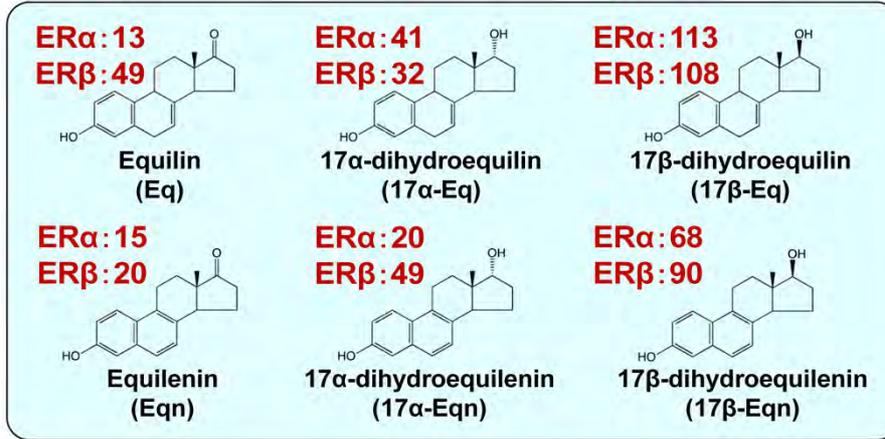
熊本県立大学環境共生学部
有菌幸司

熊本県立大学の有菌でございます。今日は、環境省の御支援をいただきながらここ5年ぐらいやってまいりましたエクインの仕事の概要を皆様に説明させていただきます。今回こういう機会をいただきまして、環境省、関連の皆様方に感謝したいと思います。どうもありがとうございます。

なぜ有菌がエクインかという話なんですけど、以前、先ほどのお話にもあったのですが、日本とイギリスとの共同研究の中で、井口先生なども入られて、イギリスの研究者のグループで Charles Tyler 先生のグループを中心に、エストロゲンの作用を見つけるのに下水の中にヒトのエストラジオール (E2) とは違うエストロゲン様物質があるよという話がありました。これは有名な仕事で、EPAのPPCPs、エストロゲン等の化学物質を測った原点みたいな論文ですが、その中でも河川中のエクイン濃度を調べておられました。これまで普通のエストロゲンの話を私たちが幾つかの化学物質のエストロゲン活性をメダカでやったり、*in vitro*でもやったりという調査をしてまいりましたが、エクインというものについて少し調査してみようということで始めさせていただきました。

エクインエストロゲン類 (Equine estrogens)

- ◆ 妊馬の尿中に含まれ、子宮拡張や胎児の発育促進などに重要な役割
- ◆ これまでの報告によると、equilin (Eq)、equilenin (Eqn)およびこれら代謝物の存在が確認 (Bhavnani, 1998; Berrodin, 2009)



エストロゲン受容体(ER)に対する結合親和性
ER α : 100
ER β : 100

- ◆ 内因性ステロイドホルモンである17 β -エストラジオール(17 β -E₂)と構造が類似しているため、ヒトなどの生物に対して強いエストロゲン様作用を示す (Bhavnani et al., 2008)
- ◆ このことから、更年期障害のホルモン補充剤の医薬品(プレマリン)として使用

こういうものです。この2つの基本骨格の物質ですが、見ていただくと、エストラジオールと比較しますと、2番目のここが、ここはそのままですが、ここに二重結合が入っているエクイリンの系、ここが芳香族2つつながっているエクイレニンの系ということです。ここがOHになって17 α 、17 β というエクイン、エクイレニンの物質ができるということです。事前の研究でビトロの試験法の中で調べると、かなり強いエストロゲン作用をもっているのではないかという予測がありました。そこで、少し私たちのほうでやってみようかというお話を提案させていただいて始めました。

これは実際にエストロゲン受容体 (ER) に対するエストロゲン活性という結合活性をちょっと調査してみますと、E₂に比べて、親化合物の方はこんなものですが、ものによってはかなり強い結合能をもっていたりすることがあります。実際にこの辺の物質は環境中にどれぐらい出ているのか。実際には妊馬の尿の中に含まれるという話なんですけど、オリジナル、すなわち、どこから流れ出て日本の環境中にあるもののでしょうか、ということもあまして、調査を始めました。私は薬学系の人間でありますけど、医薬品の中に、もともとイギリスのお仕事の中で、河川中に出てきたということは、実際には更年期障害のホルモン治療で使われていたお薬ということで、この薬がある程度使われているということです。

医薬品プレマリン (Premarin)

- ◆ 1942年に米国で承認後、日本を含め世界20か国以上で販売
- ◆ 2001年における世界売上高は10億ドル以上(うち1位は米国)
- ◆ また、2009年にはホルモン補充用医薬品の売上の主要7か国における総売上高の37%以上を占めたという報告



主成分(top 10)	%
Estrone (E1)	48
Eq	24
17α-Eq	15
Δ 8,9-Dehydroestrone	4.3
17 α -E ₂	3.8
17 β -Eq	1.8
Eqn	1.1
17 β -E ₂	0.68
17 α -Eqn	0.45
17 β -Eqn	0.30

Berrodin et al., 2009.

- ◆ 主にエストロン(E1)硫酸エステルナトリウム、エクイリン(Eq)硫酸エステルナトリウム、17 α -ジヒドロエクイリン(17 α -Eq)硫酸エステルナトリウムからなる混合物(医薬品インタビューフォーム)



**妊馬由来だけでなく、
医薬品プレマリン由来としての
エクインエストロゲン類による
生態影響を考慮する必要**

結構日本でも使われているということ。事前調査で大学病院や町の病院でどれくらい使われているかという調査もしました。日本であまり使われていないようですが、使われていないわけではないということです。ただ、外国では途上国も含めていろいろなところで使われているということです。

前置きが長くなって申し訳ないのですが、この医薬品プレマリンというのは、実は馬のおしっこを集めてきて、天然由来ということですので、それを精製してその成分だけを抽出して製剤にしているものなんです。ですから、実際にいろいろなものを配合してつくったものではなくて、妊馬のおしっこから抽出してつくっているということで、なぜ熊本かという話なんです。熊本は馬の肉を食べるところでもありますけれども、実は飼ってもあるわけです。ですから、実際に県とお話をして、獣医の先生方ともお話をし、実際にそれをやっている畜産の企業の方々、馬肉、馬刺しをつくっていらっしゃる人たちともお話をしまして、こういうことなんだけど、ちょっと調べさせてもらえませんか、あるいはちょっと気になるので、今妊娠しているウマがいるのであれば、おしっこをちょっと調べさせてもらえませんかとまず直接相談に行きました。それでお話をしたところ、ウマのおしっこを直接採るわけにはいかない状況もあったものですから、床敷きに敷いているわらをいただきまして、そのわらの中から抽出して、入っているかということを確認する仕事から始めました。そういうことをやっている間に、熊本の阿蘇の農家の方と話をする機会がありましたら、なんとそこの方々が、「そういえば、昔、ウマのおしっこを製薬会社の人が買いに来ていましたよね」とおっしゃったのです。ですから、明らかにそういうふうな製剤のつくり方をされているのだろうなということです。

成分的には、ここにありますように、ヒトのE1に相当するものの硫酸抱合体、それからエクイリン、その代謝物の硫酸抱合体。最初私はアプローチのところでもちょっとしたミスをしてしまいました。それは何かというと、自分の頭の中で、エクイリンとかエストラジオールの抱合体といったときにグルクロン酸抱合と最初から思い込んでおりました。なので、グルクロン酸抱合を切ればいいよねという話で、グルクロン酸抱合を切る酵素でまず切って、それでももの確認しようとしたのです。ところが、ウマの場合、おしっこは硫酸抱合体だったんです。それで最初うまくいかないなと思っていたのですが、たまたまラッキーなことに、グルクロン酸抱合を切る酵素が実は硫酸抱合も切る作用をもっていて、それでちょっと多めに使うことで硫酸抱合を切るということで、実際にこのものがあるということでありました。

私たちの仕事は、この後、この薬とは離れていくのですが、きっかけでこういう情報を先にいただいてきたということで、例えばこのお薬の中の成分は、私たちが環境中のデータをみていく中で参考にさせていただきました。

世界各地で検出されたエクインエストロゲン類

	Sample	Eq	Eqn	17 α -Eq	17 α -Eqn	17 β -Eq	17 β -Eqn
USA ^a (Kolpin et al., 2002)	Streams	147	140	-	-	-	-
USA ^a (Suri et al., 2012)	Influent in WWTPs	ND	-	20.4 \pm 1.1	-	-	-
	Effluent in WWTPs	ND	-	11.9 \pm 0.5	-	-	-
UK ^a (Tyler et al., 2009)	Influent in WWTPs	ND	2.14 \pm 0.26	ND	ND	ND	0.30 \pm 0.10
	Effluent in WWTPs	ND	0.43 \pm 0.11	ND	ND	ND	0.10 \pm 0.03
Spain ^a (Iparraguirre et al., 2011)	Galindo influent	14 \pm 17	<MDL	-	-	-	-
	Galindo effluent	18 \pm 0	<MDL	-	-	-	-
Spain ^a (Iparraguirre et al., 2012)	Gernika effluent	53 \pm 11	<MDL	-	-	-	-
	Galindo effluent	58 \pm 17	ND	-	-	-	-
	Bakio effluent	27 \pm 4	ND	-	-	-	-
	Ibaizabal river water	<MDL	<MDL	-	-	-	-
	Gernika estuarine water	ND	<MDL	-	-	-	-
USA ^b (Andaluri et al., 2012)	Municipal biosolids	ND	-	152.1	-	-	-
	Poultry manure	ND	-	ND	-	-	-
	Cow manure	ND	-	27.4	-	-	-

a: ng/L; b: ng/g. MDL: method detection limit. ND: not detected. -: not measured.

日本の水環境におけるエクインエストロゲン類の存在実態は不明

それで過去の論文をみますと、こういうデータがあるということですし、あと、私たちの中でも直接的な河川とか下水し尿の他にもうちょっと気になったのがここなんですが、コンポストですね。コンポストからも若干出ている例があるみたいということがありました。ですから、たぶんこの辺のデータというのは、大都市の下水処理場だとお薬でしょうが、都市部とかはかなりのものが埋まっているということです。

私が米国でポスドクをしていた頃、アイオワのあたりでもものすごくウマのし尿が多くてすごく臭う場所があって、そこを通して買い物に行っていた覚えがありまして、そういうことを考えると、かなりウマのおしっこというのはそのまま出されているということが心配で、現在、これは国内の話ですが、米国とか中国あたりはかなり直接ウマのおしっこが流れているのではないかと思います。

エクインエストロゲン類による魚類への影響

- ◆ Eqnは4.2 ng/L以上で、17β-Eqnは0.6 ng/L以上の濃度で、未成熟ニジマス血中ビテロゲニン (VTG) 産生を誘導
- ◆ ローチERαを用いた*in vitro*レポーター遺伝子アッセイ系では、17β-Eqは17β-E₂と比較して約35倍強いエストロゲン様作用

	Endpoint	Eq	Eqn	17α-Eq	17α-Eqn	17β-Eq	17β-Eqn
<i>In vivo</i> 系 21日間曝露試験 (ng/L)	ニジマス 血中VTG 産生誘導		>4.2				>0.6
<i>In vitro</i> 系 ERα活性化試験 (17β-E ₂ =100に対する 相対活性)	ローチERα	25.6	2.35	2.88	6.45	3490	8.24
	ヒトERα	15	7	7	2	77	25

Tyler et al., 2009.

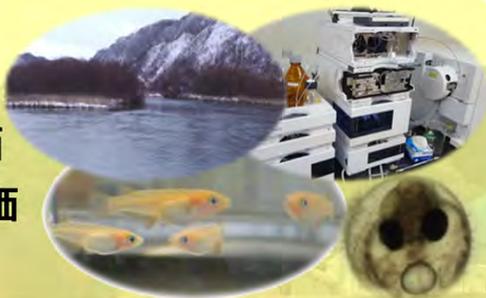


エクインエストロゲン類による生物影響は不明な点が多い

さて、内容の話です。これは一番最初のきっかけとなった井口先生などのグループも含めてのデータです。Tyler先生のデータですが、エストラジオールとほぼ同等、試験法によってはちょっと高いデータも出る場合があるというものです。私たちはこの6種の代謝物を含めてビトロの試験、河川中の濃度のチェック等を行いました。

妊馬の尿中に含まれ医薬品として使用される**エクインエストロゲン類**を対象に...

- ◆ 北海道の河川中における存在実態の解明
- ◆ ヒメダカに対するエストロゲン様作用の評価
- ◆ ヒメダカに対する有害性(繁殖・次世代)評価



エクインエストロゲン類の生態リスク評価

ここなんですが、これは、この仕事をするにあたって熊本から始めましたと言っていたのですが、実際に仕事をさあ始めようといったときに、ベースは熊本の阿蘇で始めたのですが、実際にホットスポットで妊馬がいっぱいいるところで実験して、おしっこを採って、環境省の会議の中でも指導していただいたりして、実際のホットスポットから下流までずっと流れて行って、どこで消えるかとか、その辺の基礎的なデータもとった方がいいというお話もありました。そこで、どこかホットスポットになりそうなところを探しておりましたところ、たまたま北大の獣医の石塚先生のグループとの共同研究の打合せの際お話ししましたところ、「北大のウマの牧場があるから、そこから追いかけてみたら？」と、話をいただきました。これが北大の牧場のおウマさんたちです。ここは実際に繁殖もされているので、雌馬がある時期全部妊娠している状況というのはあるよということでした。で、ここを中心に調査を始めたということです。

1. 北海道の河川中における存在実態の解明



具体的な場所、ST4が北大の獣医の牧場です。その上位のところ、上水のところからずっと流れ出して下水のところまでという河川。ですから、このウマのおしっこから検出されるだろうエクインがどのように減っていった、ここではゼロになるかというのを調査するというのが最初でした。本流はこちらの方でST2-1にダムがあったりしています。1年目は日高目名川をやりましたが、2年目からは静内川のコントロールサイトもやったということです。

サンプリング風景



これが実際にサンプリングしているところの写真です。これが上流のところですか。これがおうマさんがいる牧場の中ですか。これを9月とか、冬の1月、2月、また次の7月とかにやったのですが、これが2月の状況で、ものすごく厚くて、ハンマーで叩いても氷が割れないようなところを穴を開けて水を採取しました。

サンプリング器具



ここが冬場は水に閉ざされる場所で、年に1~2回ずつ3年にわたって調査をしました。

サンプリング風景



これが河口です。冬場はこんな状態になっています。

サンプリング風景

ST2-1 静内ダム



ST2-2 静内川御園橋



ST2-3 静内川中流



ST2-4 静内川合流地域



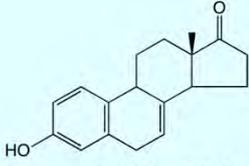
ST2-4近く 静内神森浄水場



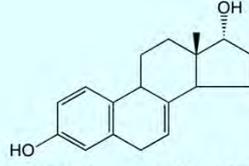
場所は静内という地域なんですが、近くに浄水場もありまして、この水ないしは地下水を使って皆さんの飲料水をつくっていらっしゃるということです。測定はこれらの物質の濃度を測っていくということをやりました。

測定対象物質

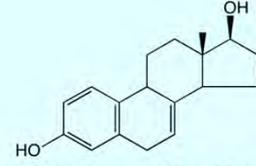
エクインエストロゲン類



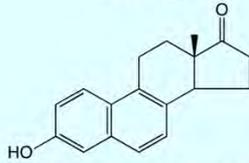
Equilin (Eq)
 $C_{18}H_{20}O_2$



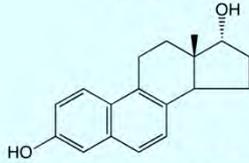
17α-dihydroequilin (17α-Eq)
 $C_{18}H_{22}O_2$



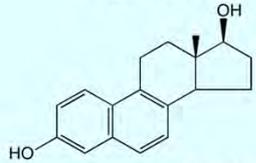
17β-dihydroequilin (17β-Eq)
 $C_{18}H_{22}O_2$



Equilenin (Eqn)
 $C_{18}H_{18}O_2$

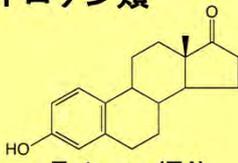


17α-dihydroequilenin (17α-Eqn)
 $C_{18}H_{20}O_2$

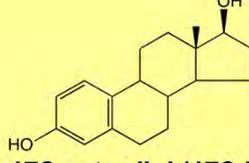


17β-dihydroequilenin (17β-Eqn)
 $C_{18}H_{20}O_2$

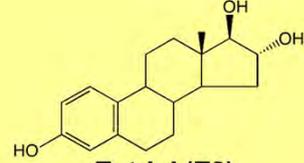
エストロゲン類



Estrone (E1)
 $C_{18}H_{22}O_2$



17β-estradiol (17β-E2)
 $C_{18}H_{24}O_2$



Estriol (E3)
 $C_{18}H_{24}O_3$

前処理とLC-MS/MSによる分析

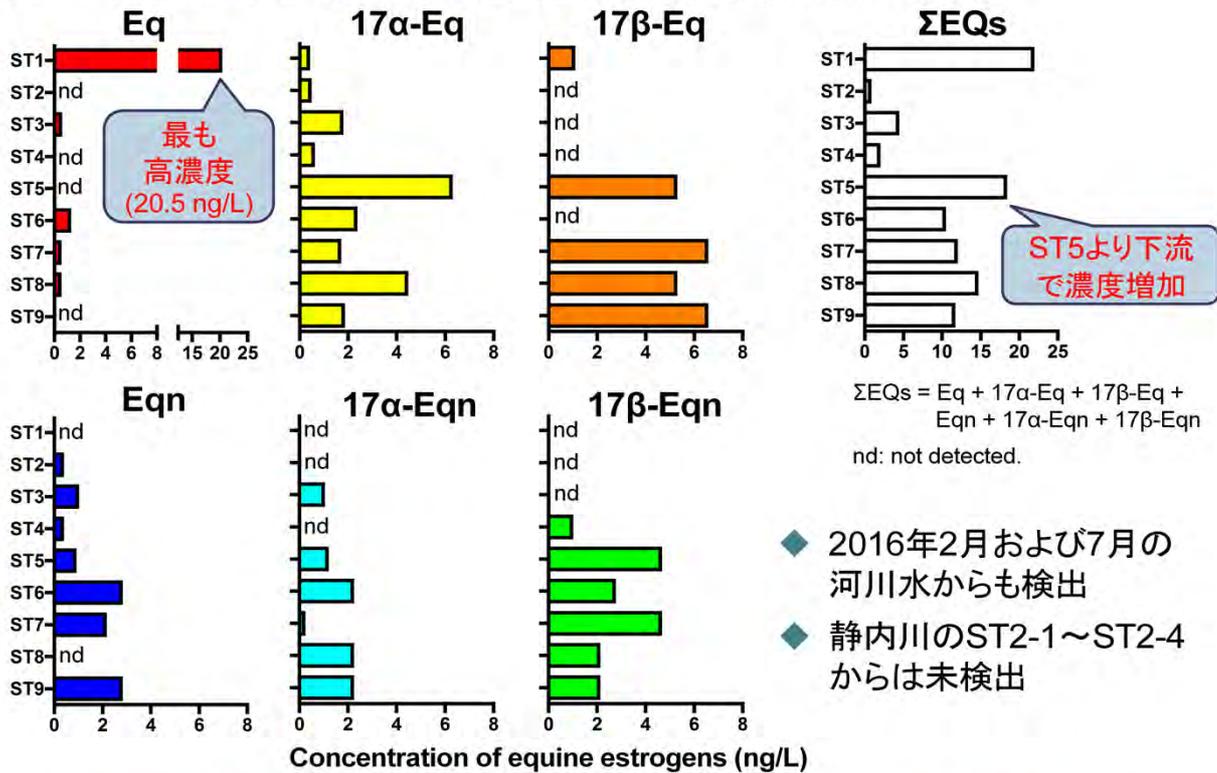
- ◆ 0.05～100 ng/mLの範囲で検量線を作成し、 $R^2 \geq 0.999$ と良好な直線性

水質試料

↓
ろ過 (GF/D 47mm)
↓
固相抽出 (Oasis HLB plus)
流速: 10～20 mL/min
↓
脱水 (減圧吸引15min)
↓
溶出 (バックフラッシュ法)
ジクロロメタン／メタノール
[9:1, v/v] 5 mL
↓
脱水 (無水硫酸ナトリウム)
↓
濃縮・乾固 (N₂パージ)
↓

↓
溶解 (ジクロロメタン1 mL)
↓
クリーンアップ (LC-Si SPE tube)
↓
溶出
アセトニトリル／ジクロロメタン
[2:98, v/v] 10 mL
↓
濃縮・乾固 (N₂パージ)
↓
溶解
アセトニトリル／水 [1:1, v/v] 1 mL
↓
定量 (LC/MS/MS)

エクインエストロゲン類の濃度(2015年9月の河川水)

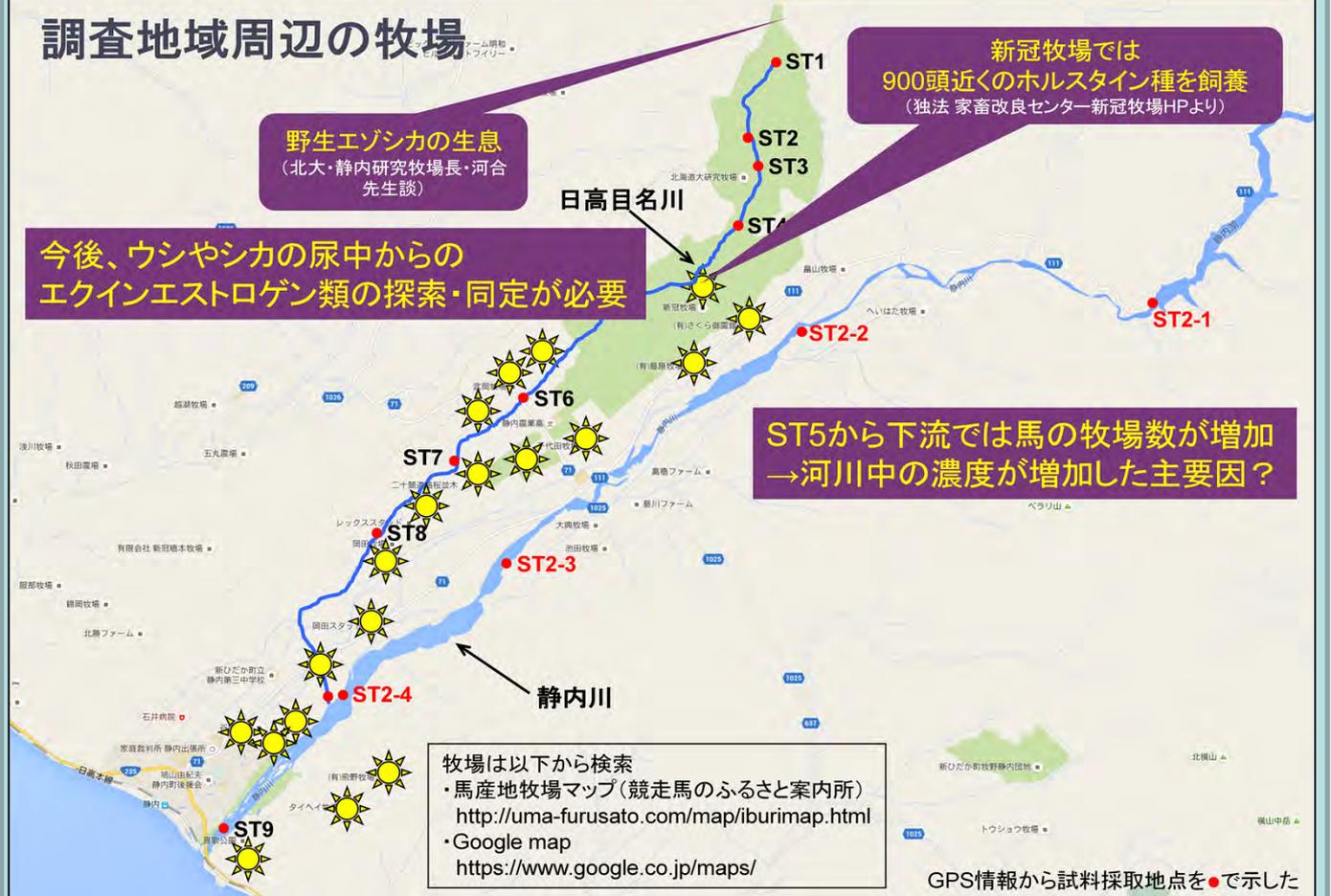


◆ 日本(北海道)の河川(日高目名川)から初めてエクインエストロゲン類を検出

これが最初のときのエツというデータなんですけど、これは9月ですので、妊娠が確認されて、種付けをしてというのが5月、6月からやったとして、この時期が結構おなかが大きくなり始めている時期で、おなかに胎仔がいるということです。エクインエストロゲンのオリジナルはどこなの？ということなんですけど、妊娠しておなかに胎仔がいる状態がエクインが出始める時期なんです。ですので、胎仔の保護であったり、あるいは胎仔由来のものであったり、そういうところでエクイン、エクイレニンの産生があるみたいです。

この図を見ていただいて、2カ所ほどあれっと思われかと思いますが、まずこのST1ポイントですね。最上流が結構高く出たんです。何回やっても高い濃度が出てきます。そして最後の下流のところST9ですが、ここでも実は減少しなかったんです。私たちはずっと減っていくものと思っていたのです。ところが、減っていかなかったんです。トータルがここに書いていますが、減っていかなかったんです。エツということで、最後まで減っていかないよということでした。

調査地域周辺の牧場

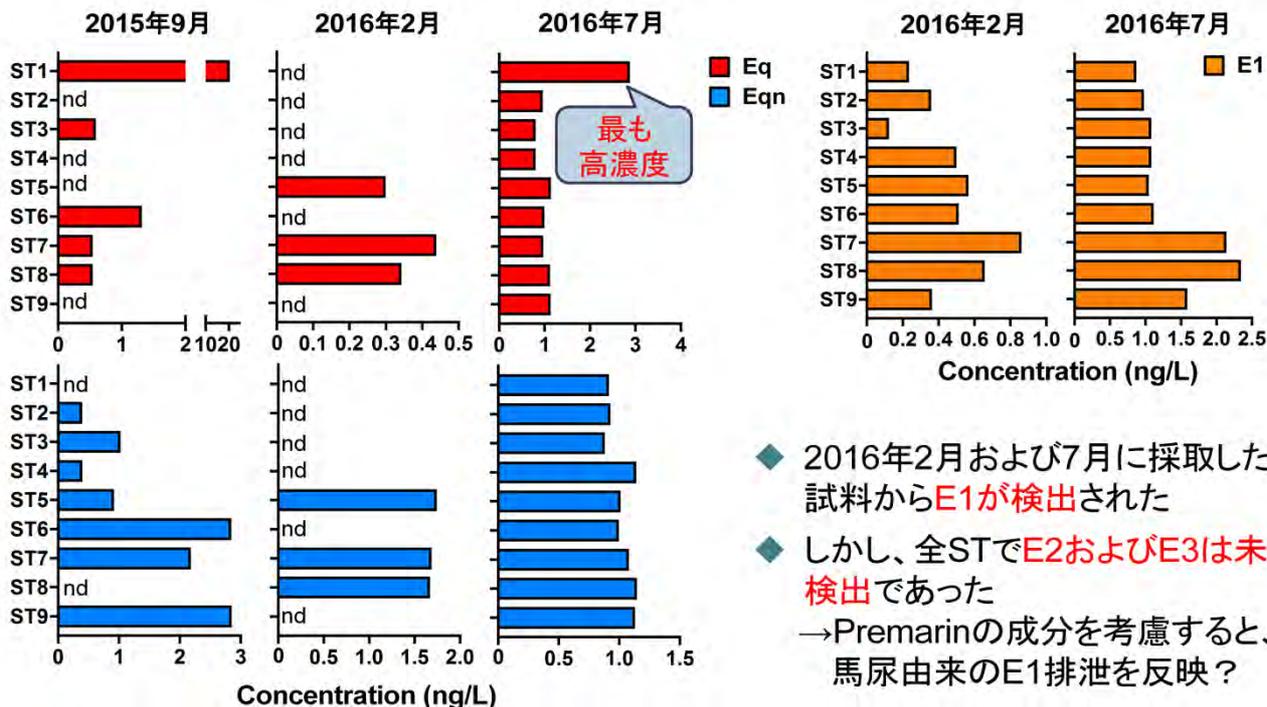


調査した結果と図をもう一ぺん確認します。ここは新ひだか町というところです。競馬が好きな方は「ぴん」とこられたかもしれませんが、サラブレッドを繁殖させているところなんです。全国のサラブレッドはほぼここで生産されている。その後いろいろなところでトレーニングをするわけです。星のところは全部牧場です。なので、結局最後までこの辺の牧場からずっとおしっこは流れ込んでいたのです。それで、特にこの河川なんですが、結局、最終のST9まで減少しなかった理由が実はこの辺にもあったということですね。

それで5月の結果をもとに、牧場があるから減らないんだねと思ったのです。ただ2つほど気になるところがありました。1つは、ST1がなぜ高いのだろうということですね。山の中ですのでウマはいないはず。それで真ん中のこの辺からちょっと多めに出てきているということがありまして、そこで少し考えていたのが、実はここに家畜改良センターの牧場でかなりの数いるところがあったというのが1つ。

それと、これは今確認中なんですけど、今日間に合えばよかったのですが、らしきもののピークの確認はできていても、本当にそうかという同定のところで私たちも慎重になっていまして、お持ちできなかったのですが、もしかしたらシカが同じエクインを出すかもしれないねということも少し考えています。

E_q、E_{qn}およびE₁濃度の季節変動



- ◆ 2016年2月および7月に採取した試料からE₁が検出された
- ◆ しかし、全STでE₂およびE₃は未検出であった
→Premarinの成分を考慮すると、馬尿由来のE₁排泄を反映？

◆ 各STにおけるEqおよびEqn濃度は季節変動を示した

nd: not detected.

これが代表的なところ3回分です。9月が一番高かった。2月は冬場、雪の中やったものです。そして7月まだ妊娠がはっきりしてなかった頃です。見てのとおりで、やはり妊娠した時期がホットスポットのホットシーズンであったということがはっきりしたということです。2月は雪に閉ざされていますので、水もほとんど流れていないのですが、とりあえずその下に手を突っ込んで採水したのですが、ここの値を見ていただくと、かなり低いということがわかると思います。こちら辺もそうです。

E₁も測っています。この辺はそれなりに出ているわけですが、7月でも出ているわけですが、エクインの方は7月はこの辺に比べたらトータルの濃度が減ってきているということで、繁殖期に雌の妊馬由来の影響が河川中に出ているということがわかったということです。

ただ、冬場2月の話がちょっと気になるころではあるのですが、この後少し新ひだか町の役場の方とも何回もお話をさせていただきました。一ぺんお話をした後、後でまとめのところでもお話ししますが、行政指導も少しやっていただくということになりました。ここはたぶん冬場ですので、直接おしっこが流れ込んでいるのではなくて、もしかすると小屋の中でおしっこしたりしていますが、外でおしっこしたりしてもそのまま地下水の方に流れ込んでいる可能性がある。これは後でコメントします。という可能性がありました。

平成25年度 化学物質環境実態調査 調査結果報告書

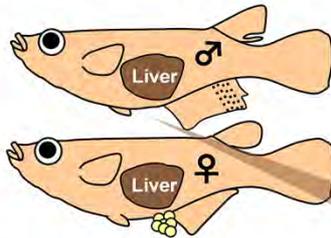


これは念のため、環境省の方でも全国調査の中にエクイン系も測っていただく系を入れていただきましたところ、これはすべて下水処理のところ、あるいは関連の処理場のところということですが、すべて未検出です。1カ所出ていますといいますがけれども、これは検出感度がこれ以下なのということで、これは無視できる値で、データが出ていましたということなんです。ですから、先ほどのイギリスのデータに比べてこちらのデータはほとんど出ないということは、京都大学、田中先生のグループが日本とイギリスの下水処理の仕方とかという共同研究でいろいろされているところでもおっしゃっていますが、処理方法が全然違うのです。日本だときれいに処理されているし、それとE2の問題がありましたので、その辺も意識してそれぞれの下水処理場はやられていますので、E2の処理のところで大体とれちゃっているんですね。なので、一般のところに出てくるということはずまないということです。ただ、静内川のようなホットスポットで季節的にこの物質が影響するかもしれないということです。

2. ヒメダカに対するエストロゲン様作用の評価

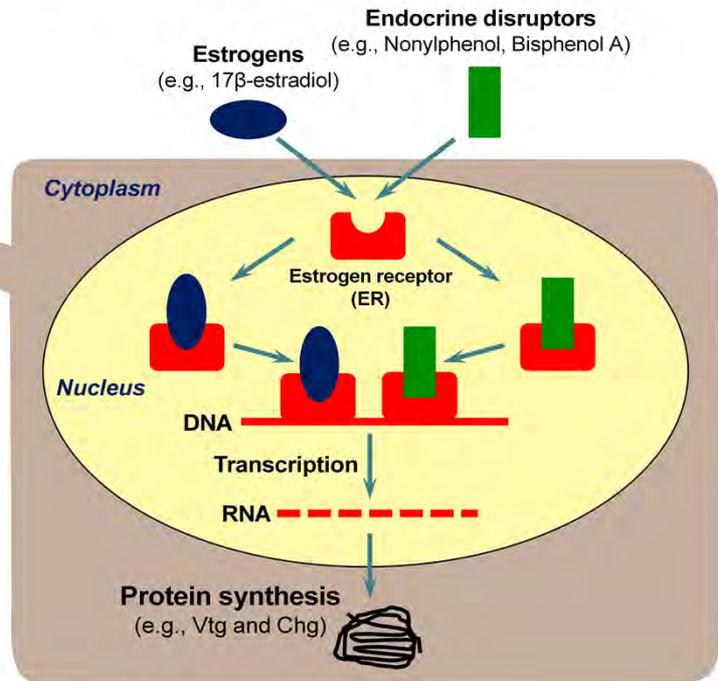
雌特異卵黄タンパク前駆体ビテロゲニン (Vtg)

- ◆ 内因性エストロゲン類の刺激によりERを介して肝臓で合成された後、血中を通じて卵巣に取り込まれることで卵成熟等に重要な役割→雌特異卵黄タンパク前駆体



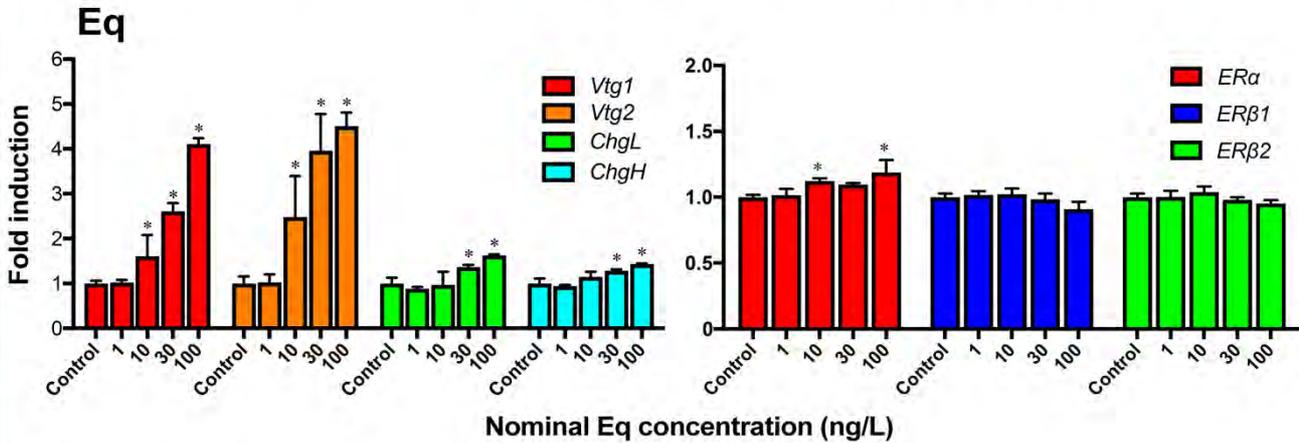
- ◆ 通常、未成熟および雄魚では検出されない
- ◆ しかし、ERに結合親和性を示す内分泌かく乱物質に曝露されることによって、未成熟および雄魚でも産生が誘導

**エストロゲン様物質曝露の
バイオマーカー**



雄ヒメダカ肝臓中エストロゲン応答遺伝子の発現

- ◆ 6種のエクインエストロゲン類と17β-E2について、雄ヒメダカ成魚への3日間の曝露試験を実施し、肝臓中エストロゲン応答遺伝子の発現に及ぼす影響を評価



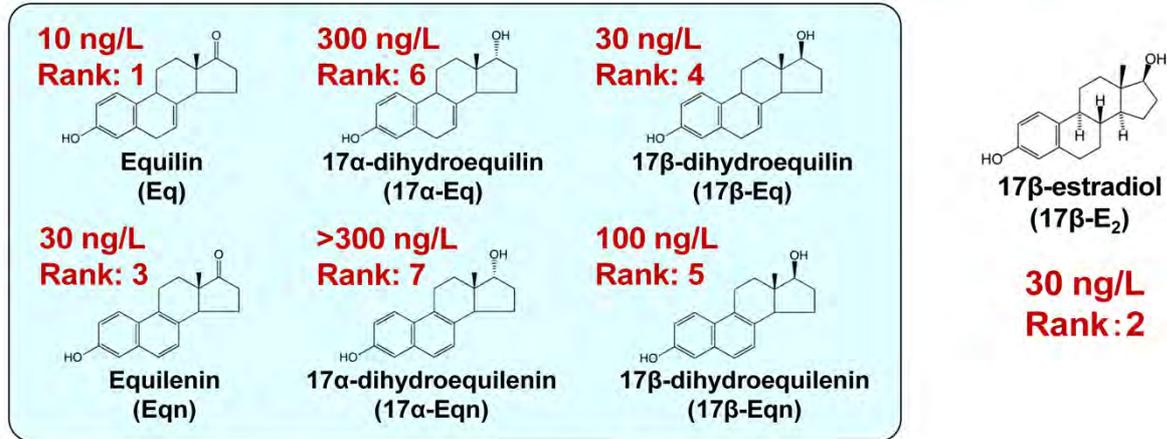
- ◆ Eqは曝露濃度依存的に肝臓中のVtgs遺伝子の発現を増加
- ◆ また、他のエストロゲン応答遺伝子 (Chgs、ERα遺伝子)の発現も増加
- ◆ 最小影響濃度 (LOEC)は10 ng/Lと算出

Ishibashi et al., J Appl Toxicol, 2016.

それでは、出てきている量はどれぐらいの量かということなんですが、河川中に10ng/mlというのが一つの基準かと思うのですが、実際に雄に曝露でやっていると、これぐらいの濃度、10ng/Lというのでは雄ではビテロゲニンの誘導が起きる。レセプターはそれほど動いていません。これより高くなると、毒性が出てくる量だと思います。

雄ヒメダカ肝臓中エストロゲン応答遺伝子の発現

- ◆ 6種のエクインエストロゲン類および17β-E2がエストロゲン応答遺伝子の発現に及ぼすLOEC (上段)を算出し、エストロゲン様作用の強弱 (Rank, 下段)を比較



- ◆ 17β-E2と比較して、Eqは強い、Eqnは同等のエストロゲン様作用
- ◆ ヒトERsに対するEqおよびEqnの結合親和性は弱いことが報告 (Bhavnani et al., 2008)
- ◆ このことから、EqおよびEqnは代謝されることにより強い活性を示す構造に変化？

Ishibashi et al., J Appl Toxicol, 2016.

10ngというところでエクインなどが確かにエストロゲン作用はもっている。エストラジオールに匹敵する量があるのですが、LOECの量的にはこういうレベルです。

ですから、実際に日本の河川水中にこの作用がどれぐらい影響があるかということ、結構、そのままダイレクトに流れ出している夏場のウマ牧場の直後ぐらいの人たちは気をつけてくださいということになります。新ひだか町の方々とお話をしましたときに、原因として、彼らの方で指導しますとおっしゃっていたのが、大きな牧場は屋根付きのちゃんとしたところに全部し尿処理だったり、わらを集めたりしているのですが、小さなところではし尿処理ができていないということでした。雨が降ったりすると流れ出すということでしたので、そこをきちんとこれから指導しますと言っていました。改良されてきていると思います。それで、このようにエクイン、エクイレニンのエストロゲン作用は、ということで見ますと、やはりE2とほぼ同じぐらいの作用をもつということが私たちの結果でもありました。

In silicoによるER α リガンド結合領域の構築と エクインエストロゲン類とのドッキングシミュレーション解析

統合計算化学システムMolecular Operating Environment (MOE) 2012 (Chemical Computing Group Inc.) を使用

1. メダカER α タンパク質の立体構造予測

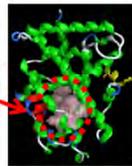
- ヒトER α (Protein Data Bank 1A52) を鋳型
- メダカER α : DDBJ accession no. BAA86925



2. リガンド結合ポケットの探索

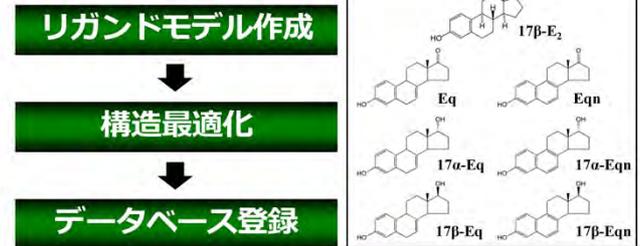
(Alpha Site Finder使用)

リガンド結合
ポケット

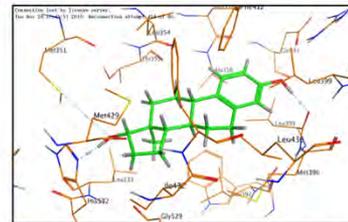


3. リガンドの化学構造の作成

(17 β -E $_2$ およびエクインエストロゲン6種)



4. ドッキングシミュレーション解析

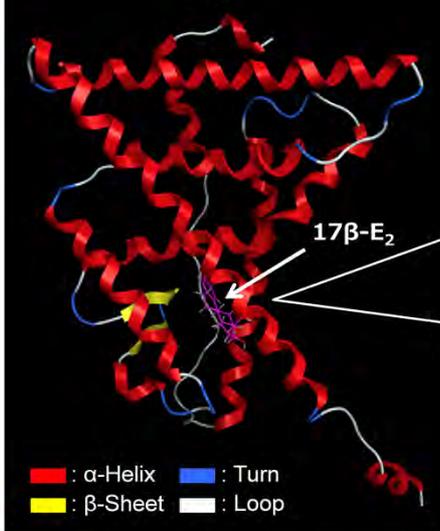


メダカER α タンパク質と
17 β -estradiolのドッキング例

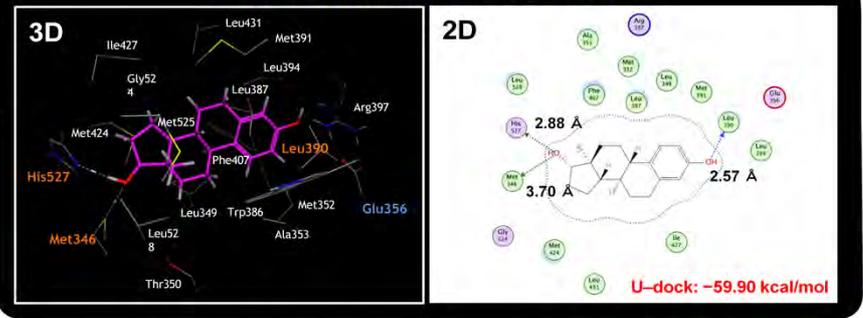
ASEDockを用いたER α とリガンドの結合解析
(相互作用ポテンシャルエネルギー: U-dockの算出)

Uchida et al., J Appl Toxicol, 2016.

これはコンピュータサイエンスで*in silico*の実験をやったものですが、これは具体的なことは略しますが、ここを見ていただくと、ドッキングシミュレーションしてもそれなりですね。このあたりにマイナスの値が近ければ近いほどエストロゲン作用はこれに近いということです。

メダカER α と17 β -E $_2$ のドッキングシミュレーション解析メダカER α と17 β -E $_2$ のドッキングポーズ

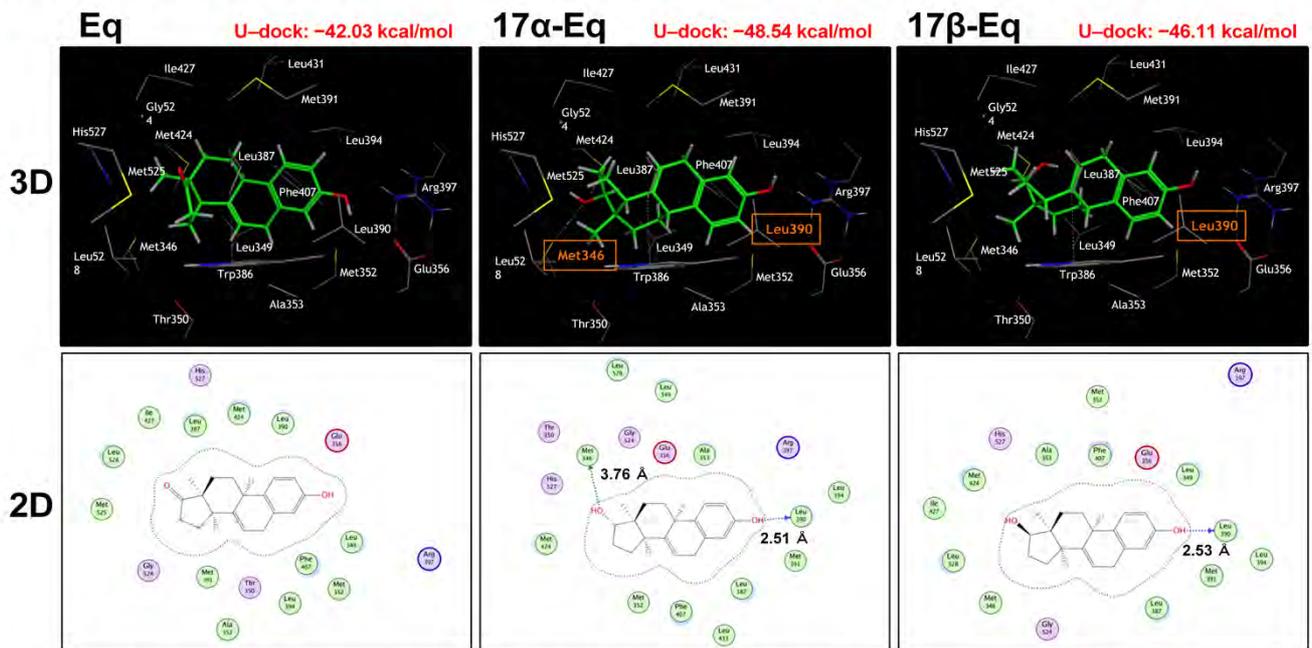
- ◆ 本研究で構築したメダカER α とすでにX線結晶構造が報告されているヒトER α のタンパク質立体構造を比較したところ、RMSD (root-mean-square distance) は0.570 Åだった
- ◆ このことから、本研究手法によりメダカER α タンパク質の立体構造を正確に予測できたことが示唆

メダカER α と17 β -E $_2$ のドッキング部位の拡大図

- ◆ メダカER α に対する17 β -E $_2$ の相互作用エネルギー (U-dock) は-59.90 kcal/mol
- ◆ このことから、既報と同様に17 β -E $_2$ はメダカER α に対して高親和性を示すことが示唆
- ◆ また、17 β -E $_2$ はメダカER α のMet346・Leu390・His527と水素結合しており、ヒトER α で水素結合に関与することが報告されているGlu356も17 β -E $_2$ の近傍に位置 (Tanenbaum *et al.*, 1998)
- ◆ これらのアミノ酸は17 β -E $_2$ とメダカER α の分子間相互作用に特に重要であることが示唆

Uchida *et al.*, J Appl Toxicol, 2016.

メダカERαとEq, 17α-Eqおよび17β-Eqのドッキングシミュレーション解析



- ◆ Eqと比較して、17α-Eqと17β-EqのU-dockは低値を示し、メダカERαに対して高い結合親和性
- ◆ また、17α-Eqと17β-Eqは、メダカERαとそれぞれ2つ (**Met346・Leu390**)と1つ (**Leu390**)の水素結合を形成 (Eqは水素結合なし) → **これらのアミノ酸は17α-Eqおよび17β-Eqとの親和性に重要**であることが示唆
- ◆ Eqn, 17α-Eqnおよび17β-Eqnについても同様に解析 (data not shown)

Uchida et al., J Appl Toxicol, 2016.

In silicoによるメダカER α -エクインエストロゲン類の分子間相互作用解析

化学物質	U-dock (kcal/mol)	水素結合に関与した アミノ酸とリガンドとの距離(Å)	親和性順位
17 β -E ₂	-59.90	Met346(3.70)・Leu390(2.57)・His527(2.88)	
Eq	-42.03	水素結合なし	4
17 α -Eq	-48.54	Met346(3.76)・Leu390(2.51)	2
17 β -Eq	-46.11	Leu390(2.53)	3
Eqn	-39.27	水素結合なし	6
17 α -Eqn	-42.03	Glu356(3.37)	4
17 β -Eqn	-50.79	Glu356(2.45)	1

赤:極性アミノ酸、青:非極性アミノ酸

- ◆ リガンドの構造に加え、メダカER α との水素結合の有無やアミノ酸の種類(極性・非極性)、アミノ酸とリガンドの距離が親和性の違いに影響することが示唆
- ◆ メダカER α に対するEqおよびEqnの結合親和性は弱く、ヒトERsに対する結合親和性の結果と同様の傾向

Uchida et al., J Appl Toxicol, 2016.

ヒトとメダカERには、ほとんど似たような作用をもっていることがわかりました。

エクインエストロゲン類のエストロゲン様作用:まとめ

- ◆ メダカER α を用いた*in vitro*レポーター遺伝子アッセイ系により6種のエクインエストロゲン類の活性を測定 (data not shown)

In silico, *in vitro*および*in vivo*評価系による活性順位の比較

化学物質	<i>In silico</i> 系 (U-dockから算出)	<i>In vitro</i> 系 (EC50から算出)	<i>In vivo</i> 系 (LOECから算出)
17 β -E ₂	1	1	2
Eq	5	5	1
17 α -Eq	3	4	6
17 β -Eq	4	2	4
Eqn	7	6	3
17 α -Eqn	5	7	7
17 β -Eqn	2	3	5

- ◆ *In vitro*系の結果は、*in silico*系の結果と概ね一致→*In silico*評価系の有用性が示唆
- ◆ *In vivo*系の結果から、EqおよびEqnのエストロゲン様作用は強いことが示唆され、これらは生体内代謝による構造変化が関与している可能性

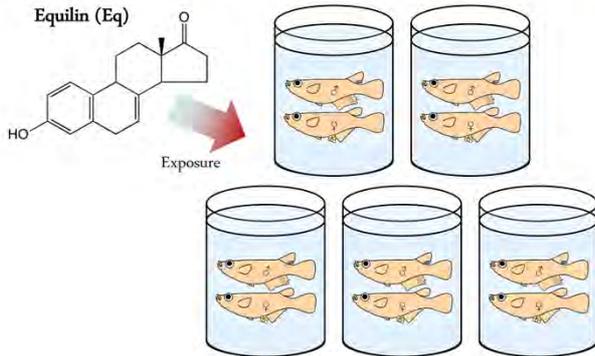
***In silico*, *in vitro*および*in vivo*系によって、
6種のエクインエストロゲン類のエストロゲン様作用を網羅的に評価した初めての報告**

これが*in silico*の実験であったり、*in vitro*のレセプターアッセイとか、いろいろなものの話、それから*in vivo*のデータをまとめたものです。よくビスフェノールAなどでも、ビスフェノールAはビトロでやるとそんなに作用は強くないけれども、*in vivo*でやるとそれなりに作用が出ますよねということがありますが、それと同じような感じで、もしかすると、エクイン、エクイレニンも体の中に入った後はもう少し何かの作用が代謝された、あるいは代謝されるところで起きてくる可能性があるかなと思っています。

ここですね。*in vivo*でも結構強い。*in vitro*でそれがE2に対してちょっと弱めに出ているというので、何か生体内における構造変化が原因になっているのではないかということで、この辺のところを気にしています。

3. ヒメダカに対する有害性(繁殖・次世代)評価

雌雄メダカを用いた21日間繁殖および次世代影響評価試験



曝露試験は以下の方法に準じて実施
 ・Ishibashi *et al.*, *Aquat. Toxicol.*, 2004.
 ・Ishibashi *et al.*, *Chemosphere*, 2006.

曝露濃度(合計4群)

- ・対照群: 0.01% ジメチルスルホキシド(DMSO)
- ・Eq曝露群: 初期設定濃度10, 100, 1000 ng/L

曝露条件

- ・半止水式(試験液は24時間毎に交換)
- ・試験魚: 雌雄メダカ成魚(5ペア/群)
 *1000 ng/L曝露区で1個体死亡
- ・光条件: 明=16時間: 8時間
- ・水温: 25±1°C
- ・給餌: アルテミア・粉末飼料
- ・曝露期間: 21日間

繁殖影響

毎日採卵し、顕微鏡下で受精卵を確認したのち、**産卵数および受精率**を算出

成魚 ↓ 21日後

全長・体重を測定し、**肝臓等**の組織を採取

遺伝子発現解析

肝臓(HSI)および生殖腺対指数(GSI)の算出

次世代影響 胚 ↓ 7日おきに採取

胚飼育液で14日間飼育(Eqフリー)

14日間

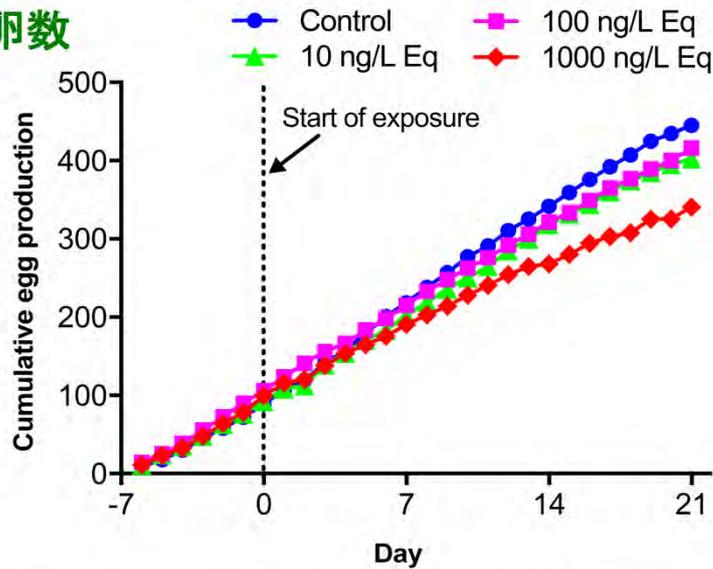
生死・奇形の観察と**孵化率**の算出

メダカを用いまして次世代影響とか、産卵数とか受精率も調査しました。

雌雄メダカを用いた21日間繁殖試験

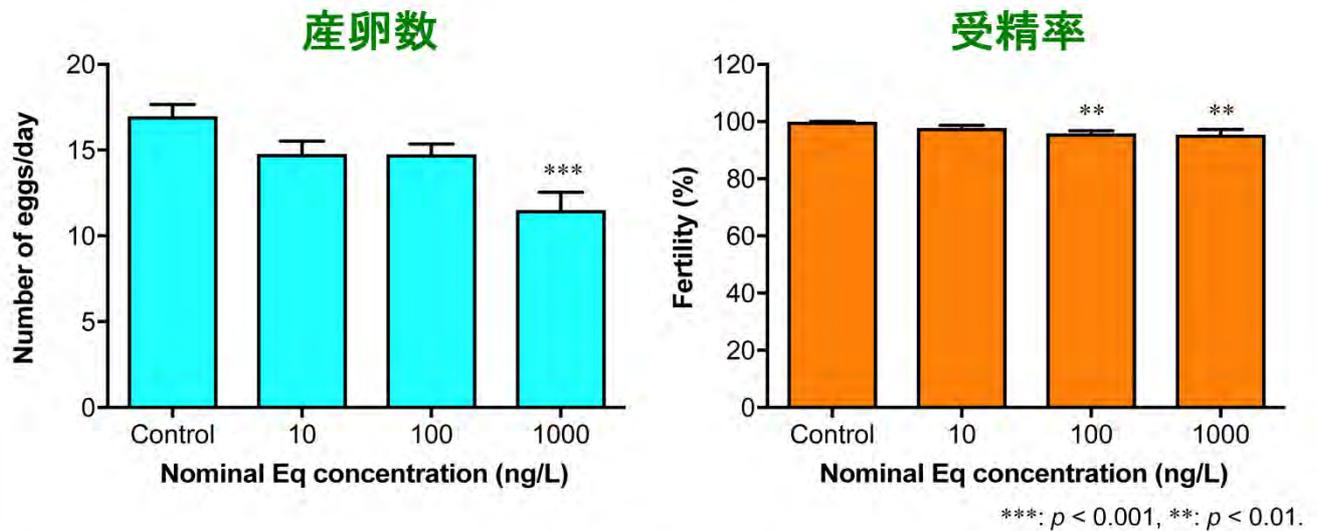
- ◆ 曝露期間中、雌雄メダカの全長、体重、HSIおよびGSIに対する影響は確認されなかった

累積産卵数



- ◆ 曝露開始前7日間の累積産卵数は全ての群で安定(受精率もほぼ100%、データは示していない)
- ◆ しかし、曝露開始7日後以降から、**1000 ng/L Eq曝露群の産卵数は低下**
- ◆ そこで、21日間の曝露期間中の産卵数および受精率を算出

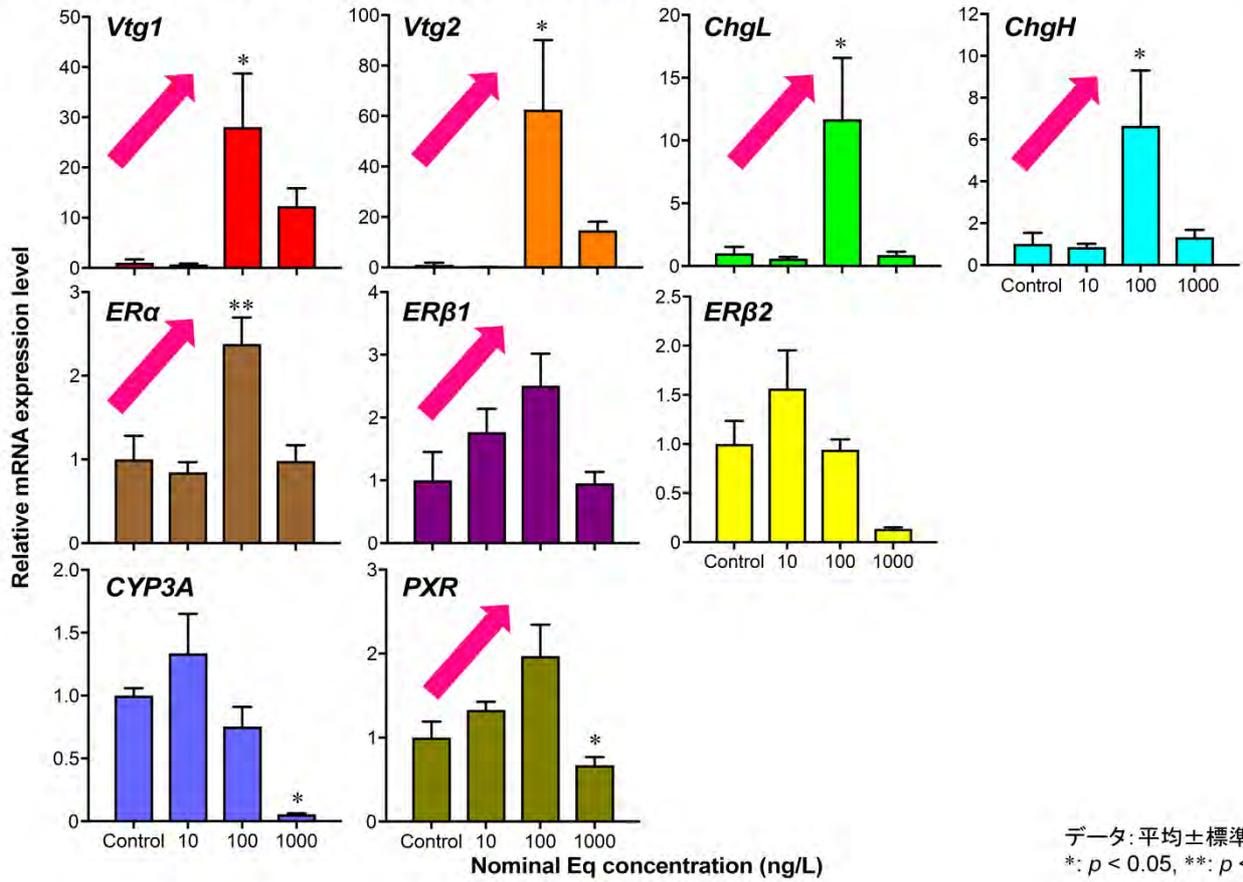
雌雄メダカを用いた21日間繁殖試験



- ◆ 21日間の曝露期間中の産卵数は、1000 ng/L E2曝露群で有意に低下
- ◆ 受精率は、100および1000 ng/L E2曝露群で有意に低下。しかし、95%以上を維持していたため影響なしと判断 → 繁殖影響に対するE2のLOECは1000 ng/L

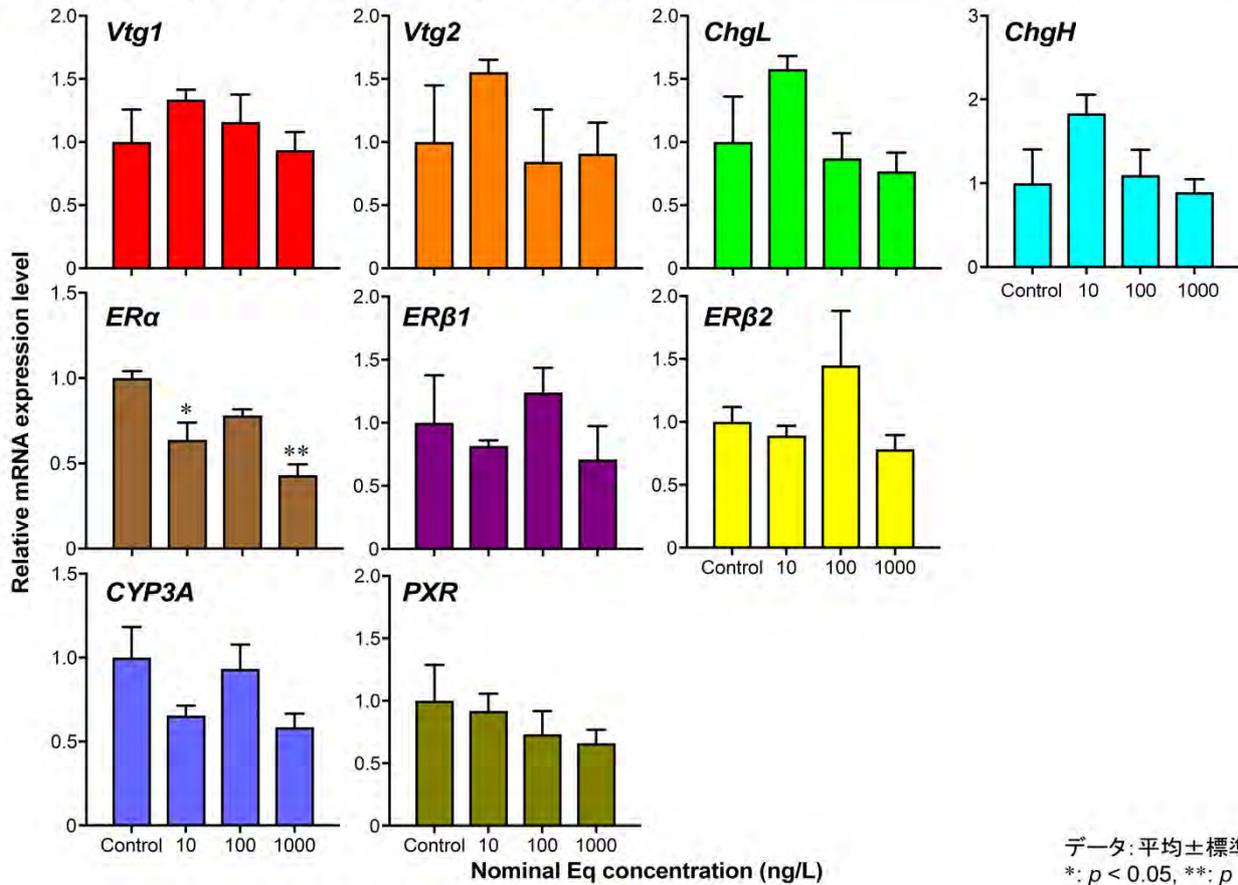
そこで出てきたのが100ng用途の用量、これぐらいの量が産卵に影響するみたいということです。

雄メダカ肝臓中の遺伝子発現解析



もちろんビテロゲニンの誘導は結構低い用量でも上がりますが——

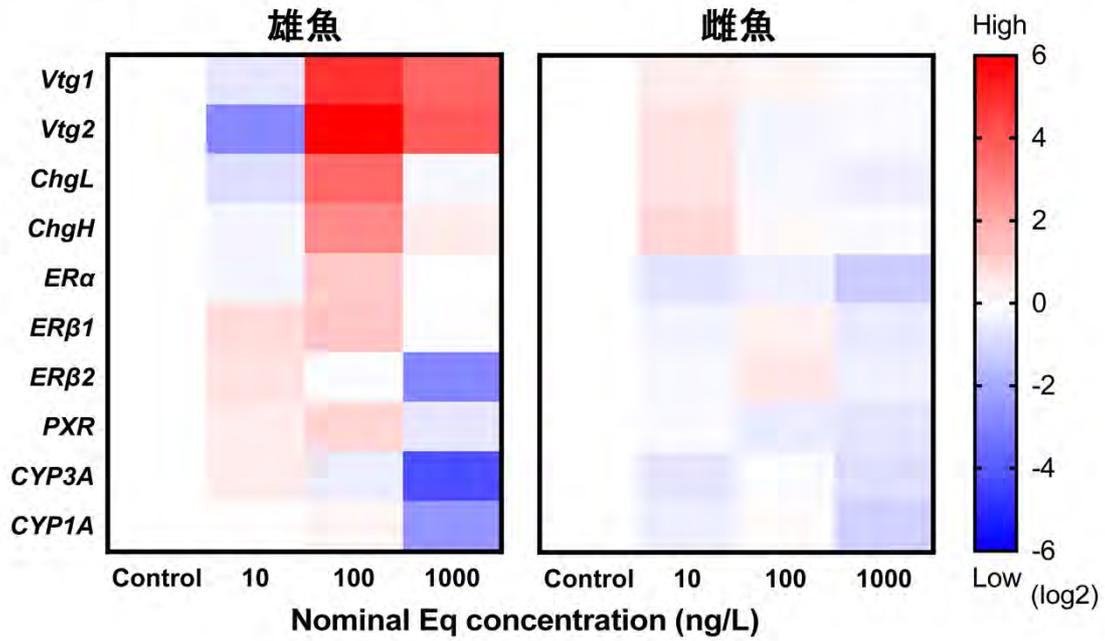
雌メダカ肝臓中の遺伝子発現解析



産卵影響は100ngぐらいのところでは。

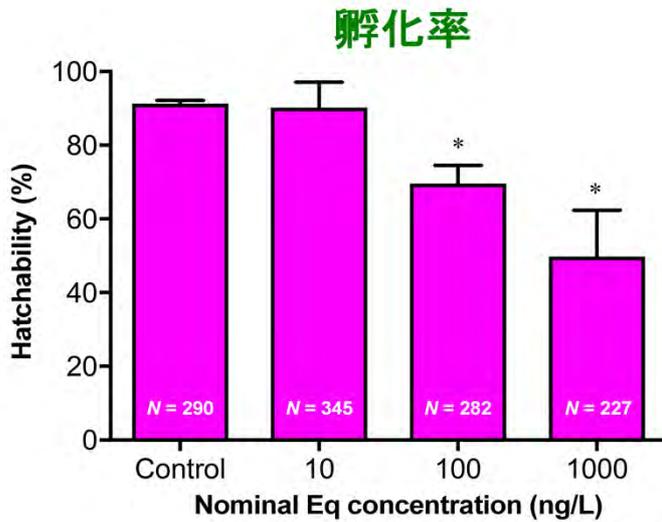
これは魚への、もし夏場のメダカが繁殖するところであれば、その生態が、ということになりますが、少しこういう骨の異常とか、発育に関する毒性影響があるみたいということがあります。これは私どもが初めてこれを見つけたのではなくて、エクインの関連のお仕事をされている、既に報告されている研究でも一部こういうものを示唆するような遺伝子の改変などのことを指摘している論文もあります。

ヒートマップ解析による雌雄肝臓中の遺伝子発現量の比較



- ◆ 雄魚においてE₂のエストロゲン様作用が再確認
- ◆ また、エストロゲン応答遺伝子の発現応答には明らかな性差が確認

21日間繁殖試験により親魚から産卵された次世代胚への影響



*: $p < 0.05$.

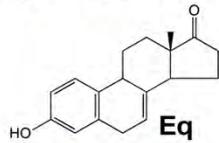
異常(奇形)個体



1000 ng/L曝露群

- ◆ Eq曝露された親魚から産卵された胚の孵化率は、100/1000 ng/L曝露群で有意に減少
- ◆ 1000 ng/L曝露群の孵化仔魚において、背骨の湾曲や遊泳阻害などの異常個体が出現
- ◆ 次世代胚の孵化率に対するEqのLOECは100 ng/L

Eq濃度の比較 –水環境中濃度 vs メダカに対するLOEC–



Japan
(This study)

USA
(Kolpin et al., 2002)

Spain
(Iparraguirre et al., 2011)

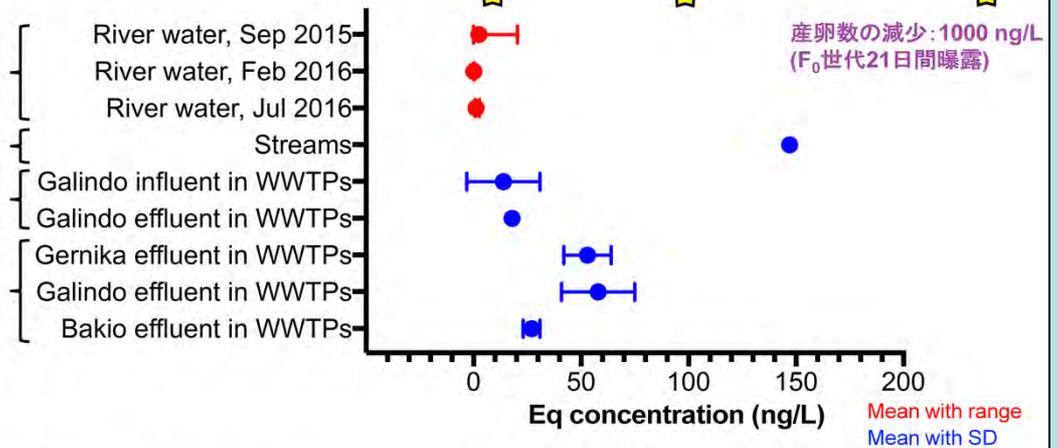
Spain
(Iparraguirre et al., 2012)

メダカに対するLOEC
(This study)

遺伝子発現増加: 10 ng/L
(3日間曝露した雄肝臓Vtg)

胚の孵化率低下: 100 ng/L
(F₁世代)

産卵数の減少: 1000 ng/L
(F₀世代21日間曝露)



- ◆ 20 ng/L (北海道の河川水最大濃度) < 100 ng/L (次世代胚の孵化率低下: LOEC) → **5倍の差**
- ◆ 諸外国の水環境中濃度を考慮すると、さらに**メダカに対するLOECとの差は近似**
- ◆ E1の21日間繁殖試験LOEC (1000 ng/L)は、多世代試験で約1/10 (91.4 ng/L)へ (Nakamura et al., 2015)

調査地域を拡大した存在実態の解明や長期曝露/複合影響試験による評価が必要

今回のデータと環境中の濃度、ホットスポットの話ではありますが、もしかすると少しホットスポットのところは気をつけた方がいいのかなという、この辺のところ。多世代試験になりますと、環境省の方で開発されている試験法であったり、二世帯影響に関する井口先生、鑪迫先生のデータを見ると、多世代にすると感受性が少しずつ上がっているようなので、それなりのデータに比べてこっちの方はデータがもう少し注意する必要があるのかなというところです。

まとめ

1. 北海道の河川中における存在実態の解明

- ◆ 北海道(新ひだか町)の河川水を対象として、エクインエストロゲン類の存在実態を明らかにした
- ◆ 全ての試料採取地点(ST1~ST9)から、いずれかのエクインエストロゲン類が検出され、ST5から下流域にかけてそれらの濃度は増加傾向
→ST5付近から下流では牧場数が増加したことにより、排出源が増加したことが影響?
- ◆ エクインエストロゲン類濃度の季節変動を明らかにした→ホットスポットである可能性
→**我が国の水環境におけるエクインエストロゲン類の存在を初めて明らかにした報告**

2. ヒメダカに対するエストロゲン様作用の評価

- ◆ *In silico*, *in vitro*および*in vivo*系によって、6種のエクインエストロゲン類のエストロゲン様作用を網羅的に評価→EqやEqnは生体内代謝により強エストロゲン様作用を示す可能性

3. ヒメダカに対する有害性(繁殖・次世代)の評価

- ◆ 21日間の繁殖試験においてEqは産卵数や次世代胚の孵化率に影響→LOECは100 ng/L
- ◆ 本研究および先行研究における水環境中濃度との比較から、魚類への有害影響濃度と近似
→**ヒメダカに対するEqの内分泌かく乱作用が示唆**

まとめです。このように北海道でホットスポットのところがあるなということで、そういうところはきちっと調べないといけませんということです。値としては、やはりエストロジオールに相当する値。多世代試験というのも気をつけた方がいいということです。

そこで、実は浄水を少し調べたのですが、浄水でも、汚染というレベルではありませんが、先ほどの名古屋のデータと一緒に、検出はされました。ということで、浄化とか浄水の浄化とかというところに少しこういうのを考えていただいて、逐次情報を出して、住民あるいは農家の方々の心配がなくなるようなデータを蓄積していけたら、あるいは指導していただければと思います。

大体時間だと思しますので、ここでお話を終わらせていただきます。ありがとうございました。

謝辞

本研究は、以下の支援によって行われました。

- ・環境省委託業務EXTEND2010に係る基盤的研究(研究代表者:有菌幸司)
「妊馬由来エクイン類の汚染実態解明と生態影響評価」



Thank You!