

令和2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  
2021年2月25日



# 化学物質の内分泌かく乱作用 に関する 国際協力(日英、日米等) 内外研究のトピックス等

井口泰泉

横浜市立大学・大学院・  
生命ナノシステム科学研究科

環境省の国際協力事業である、内分泌かく乱物質に関する日英共同研究、日米二国間協力の概要に加えて、アメリカ環境保護庁・ダルースの研究所で開発されている、SeqAPASS という、動物実験を行わないで、1種類の動物のデータを他の動物にも適用する方法の提案、さらに、EUが、科学研究に巨額の資金を投入してるHORIZON2020 の中の、EURIONの取り組み(8グループに、総額5,000万ユーロ、約63億円)の概要を簡単に紹介します。

## 化学物質の内分泌かく乱作用に関する 日英共同研究

Department for Environment, Food & Rural Affairs (DEFRA), Gov. UK

(環境・食糧・農務省)

1998年(平成11年)3月のG8環境大臣会合において、内分泌かく乱化学物質について日英両国間で共同研究を実施することが合意され、5カ年の日英共同研究事業を開始。

第1期: 1999－2003

第2期: 2004－2009 (下水処理水、遺伝子ツール、試験法、生態影響)

第3期: 2010－2014

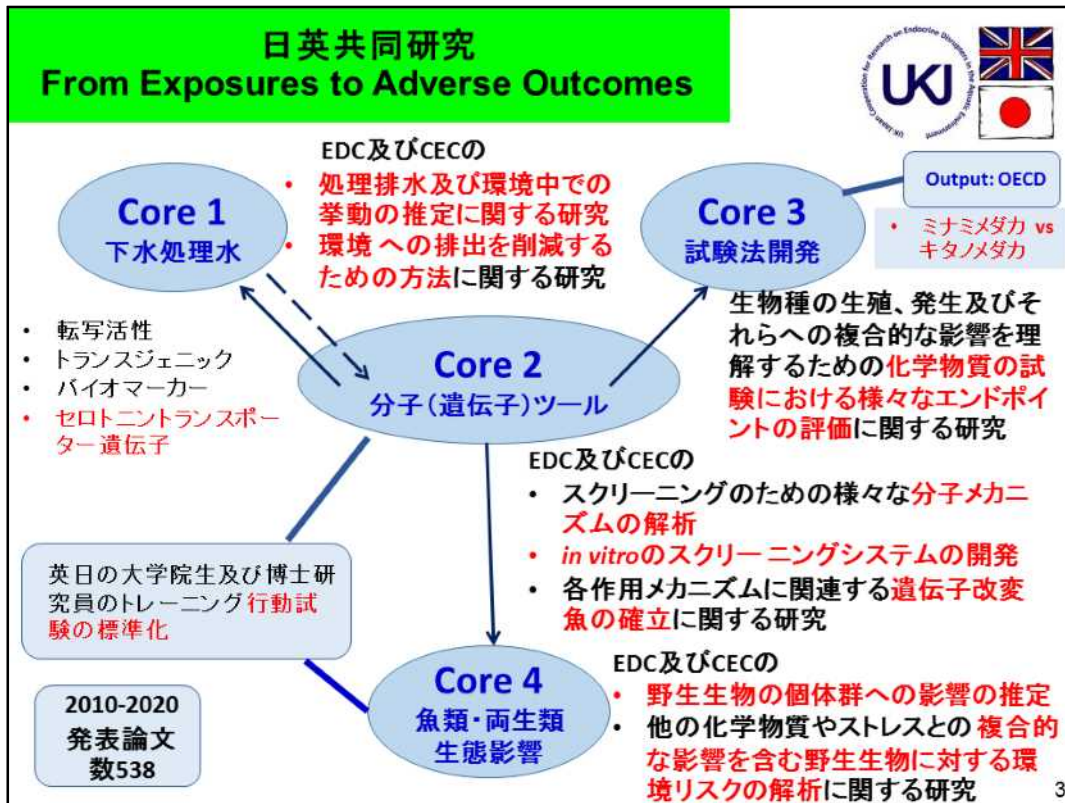
第4期: 2015－2019

第5期: 2020－2024 :対象領域を従来の「化学物質の内分泌かく乱作用を有する物質(EDC)」に、「新たな懸念となる汚染(Contaminants of Emerging Concern (CEC))」を加えることにより拡張し、行政間の連携・協力を強化

2

日英共同研究は、1998年のG8環境大臣会合における、日英両国間の内分泌かく乱物質問題に対する共同研究の合意に基づき、1999年から5年毎に更新して、現在第5期になっています。

第5期では、内分泌かく乱物質に加えて、新たな懸念となる、新興物質の問題も加え、行政間の連携・協力を強化しています。



第2期から4つのコアプロジェクトグループで研究を行ってきました。

現在の研究テーマは、

コア-1: EDC及びCECの処理排水中及び環境中での挙動の推定に関する研究、並びにそれらの環境への排出を削減するための方法に関する研究;

コア-2: EDC及びCECのスクリーニングのための様々な分子メカニズムの解析、*in vitro*のスクリーニングシステムの開発及び各作用メカニズムに関連する遺伝子改変魚の確立に関する研究;

コア-3: 水生生物及びその他の生物種の生殖、発生及びそれらへの複合的な影響を理解するための化学物質の試験における様々なエンドポイントの評価に関する研究;

コア-4: EDC及びCECの野生生物の個体群への影響の推定、並びに他の化学物質やストレスとの複合的な影響を含む野生生物に対する環境リスクの解析に関する研究を行っています。



2015年から2019年までの、日英共同研究参加者の集合写真。  
2019年には第5期の日英共同研究の継続が合意されました。





2020年はイギリスでの会合が予定されていましたが、コロナ禍により、10月26-27日にWebで開催しました。

左上右から3番目のイギリスDEFRAのClaire・Dixsonさんの司会で行われました。

ACCUM FWHI Core Project 1 Centre for Ecology & Hydrology NATURAL ENVIRONMENT RESEARCH COUNCIL

## 水環境における新興化学物質の予測と管理



- ①日英の下水処理水におけるエストロゲン活性を持つ物質の分析、培養細胞を用いたエストロゲン活性、抗エストロゲン活性(多摩川、桂川、テムズ川)
- ②エストロゲン活性物質及び抗エストロゲン活性物質の複合影響
- ③日英のホルモン活性物質使用量のモデル化
- ④日英の下水処理水中の新興化学物質 (Emerging Chemicals) 医薬品、生活関連物質(Pharmaceuticals and Personal Care Products, PPCPs) : 分析法の開発
- ⑤日英の下水、河川水での抗うつ剤などの医薬品濃度調査
- ⑥日英の下水処理施設の比較検討、下水処理排水へのホルモン活性物質、医薬品の低減の試み: 光分解、オゾン処理の有効性 (代謝によりより活性が強くなる物質)
- ⑦ヒトのエストロゲン受容体とメダカのエストロゲン受容体の感度の違い
- ⑧桂川での抗うつ剤などの検出は下水処理水由来、相加的作用
- ⑨GPCR標的薬の活性測定の培養細胞試験
- ⑩下水処理水での医薬品濃度(当量値EQ)、イギリスと日本の比較

6

コア1の研究内容の一部です。

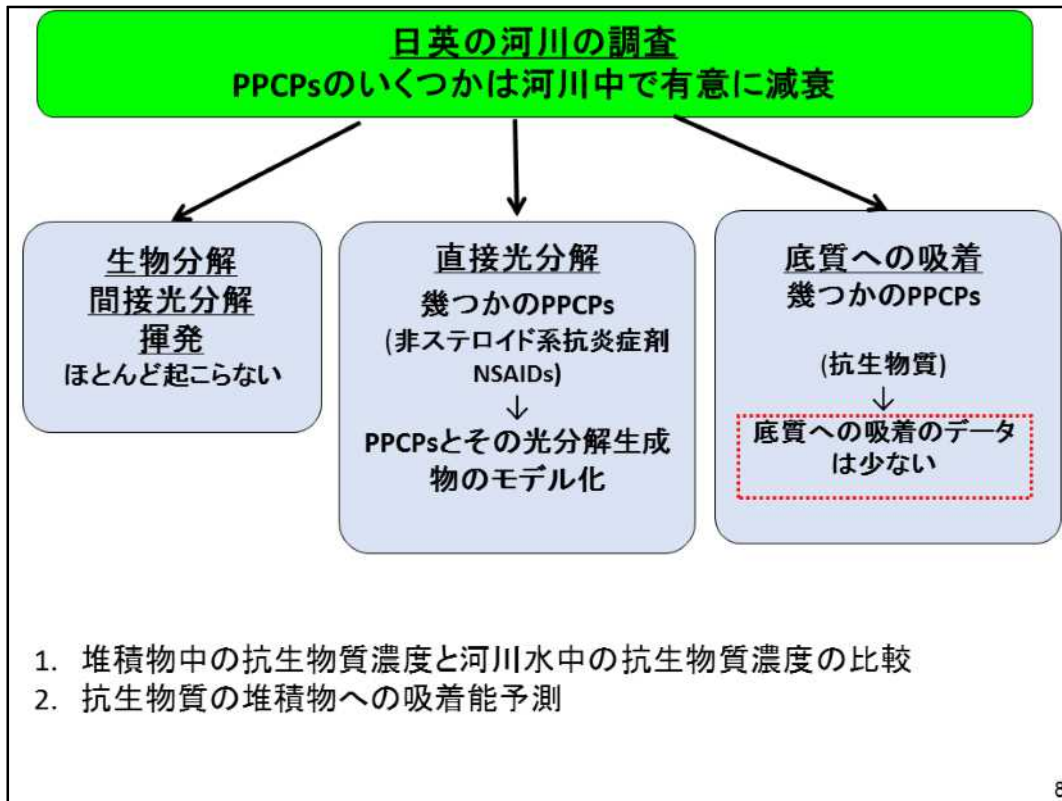
- ①日英の下水処理水におけるエストロゲン活性を持つ物質の分析、培養細胞を用いたエストロゲン活性、抗エストロゲン活性(多摩川、桂川、テムズ川)；
- ②エストロゲン活性物質及び抗エストロゲン活性物質の複合影響；
- ③日英のホルモン活性物質使用量のモデル化；
- ④日英の下水処理水中の新興化学物質 (Emerging Chemicals) 医薬品、生活関連物質(Pharmaceuticals and Personal Care Products, PPCPs) : 分析法の開発；
- ⑤日英の下水、河川水での抗うつ剤などの医薬品濃度調査；
- ⑥日英の下水処理施設の比較検討、下水処理排水へのホルモン活性物質、医薬品の低減の試み: 光分解、オゾン処理の有効性 (代謝によりより活性が強くなる物質)；
- ⑦ヒトのエストロゲン受容体とメダカのエストロゲン受容体の感度の違い；
- ⑧桂川での抗うつ剤などの検出は下水処理水由来、相加的作用；
- ⑨GPCR標的薬の活性測定の培養細胞試験；
- ⑩下水処理水での医薬品濃度(当量値EQ)、イギリスと日本の比較、などです。

# 日本側の研究経過



2010年から現在までの、コア1の日本側の研究の状況を示しています。

下水処理施設からの処理水中の内分泌かく乱物質から、医薬品(特に抗うつ薬)の問題に広がっています。



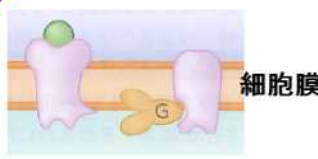
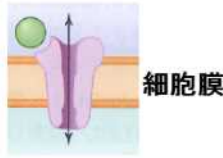
医薬品の中には光分解しやすい物質、光分解はしない物質、底質に吸着するような物質もあることを明らかにしています。



## 医薬品の約半数はGPCR標的薬/抗うつ薬

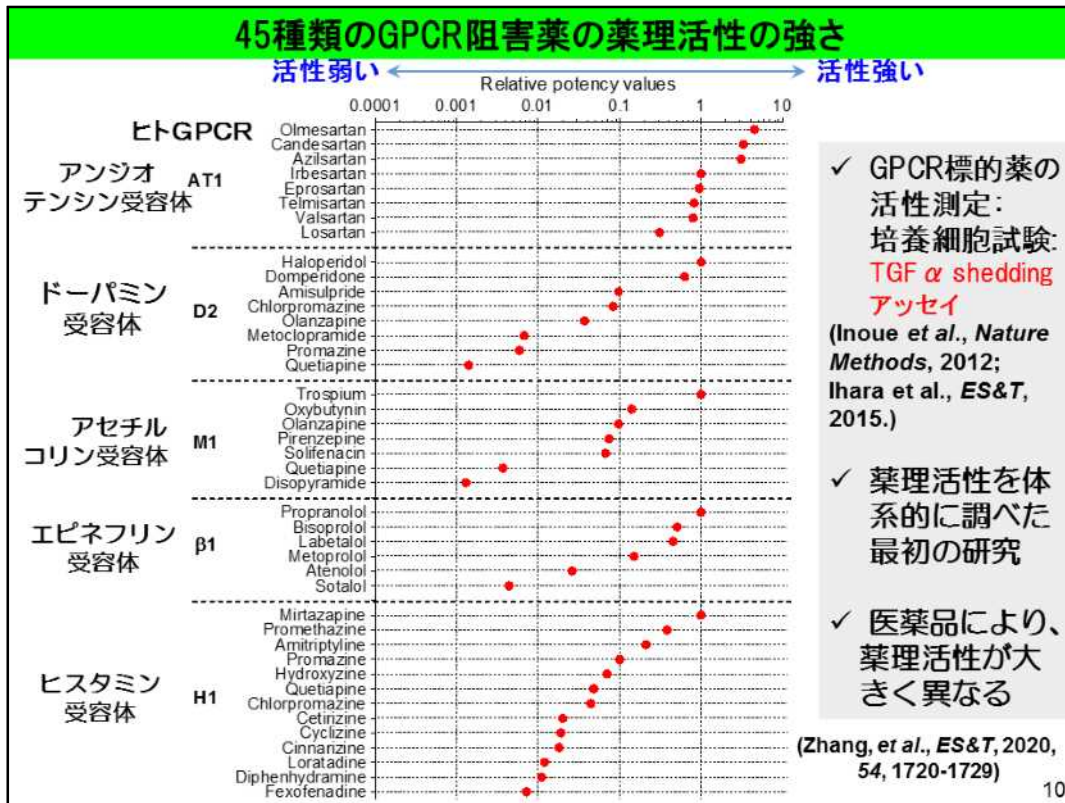
GPCR: G protein-coupled receptor

日本における病院の医薬品処方 (厚生労働省DBより、H28)

ランク	医薬品タイプ	錠剤数(億/年)	細胞内の標的分子	
1	消化性潰瘍用剤	54	 <p>✓ Gタンパク質連結型受容体</p>	
2	糖尿病用剤	47		
3	血圧降下剤	46		
4	血管拡張剤	41		
5	高脂血症用剤	38		
9	その他アレルギー用薬	31		
10	抗うつ薬	29		 <p>✓ モノアミントランスポーター</p>
13	その他中枢神経系用薬	14		
17	気管支拡張剤	3		
18	抗ヒスタミン剤	2		
19, 21	合成抗菌剤/抗ウイルス剤	2/1		

9

厚生労働省の、日本の病院の医薬品についてのデータベースによると、Gタンパク質連結型受容体(GPCR)に作用する薬品は、多種類で、極めて大量に処方されています。



GPCR標的薬の活性は、TGF $\alpha$  shedding アッセイ という培養細胞を用いた試験で測定できます。

それを用いて45種類の医薬品の各種の受容体の活性化を調べた結果を表示しています。

## 下水処理場、河川調査

桂川流域: 上流域、下水処理場放流水、下流域

・採水日: 2014年1月,7月,10月,12月,  
2015年2月,3月,4月,7月,10月,  
2016年1月

採水

放流水、河川水

前処理

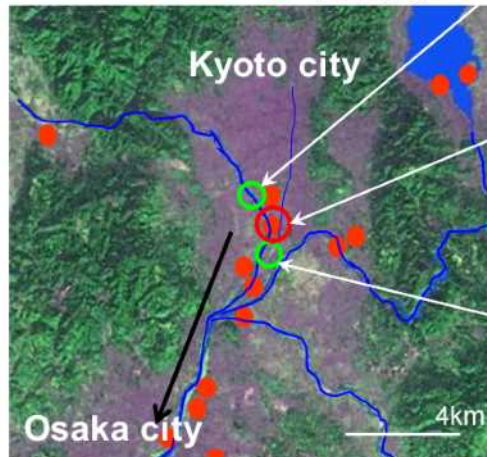
ろ過,  
固相抽出

アッセイ

阻害曲線

当量値  
(Equivalent  
Quantity)

● 下水処理場



桂川上流域



下水処理場



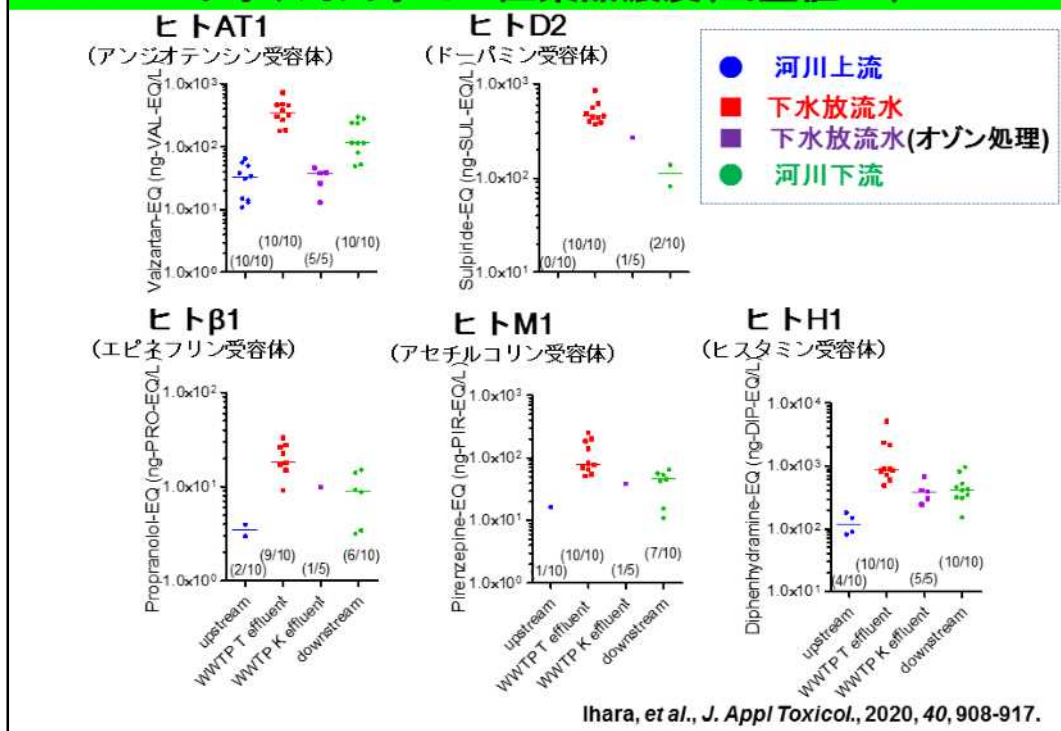
桂川下流域



11

京都から大阪に流れる、桂川の下水処理場の上流域、下水処理場、下流域に分けて、2014年から2016年まで、医薬品の活性を調べました。

## 下水、河川水での医薬品濃度(当量値EQ)



下水処理場の上流では活性が低く、下水処理場では活性が高く、下流では低くなっています。

また、下水放流水をオゾン処理すると活性が低下することが分かります。



## イギリスでの野外調査

2014年から2016年にかけて英国の自治体STPからの排水中に存在するGPCRs作動性医薬品の生物学的活性を測定した(CEH、Andrew、Monikaとの共同研究)

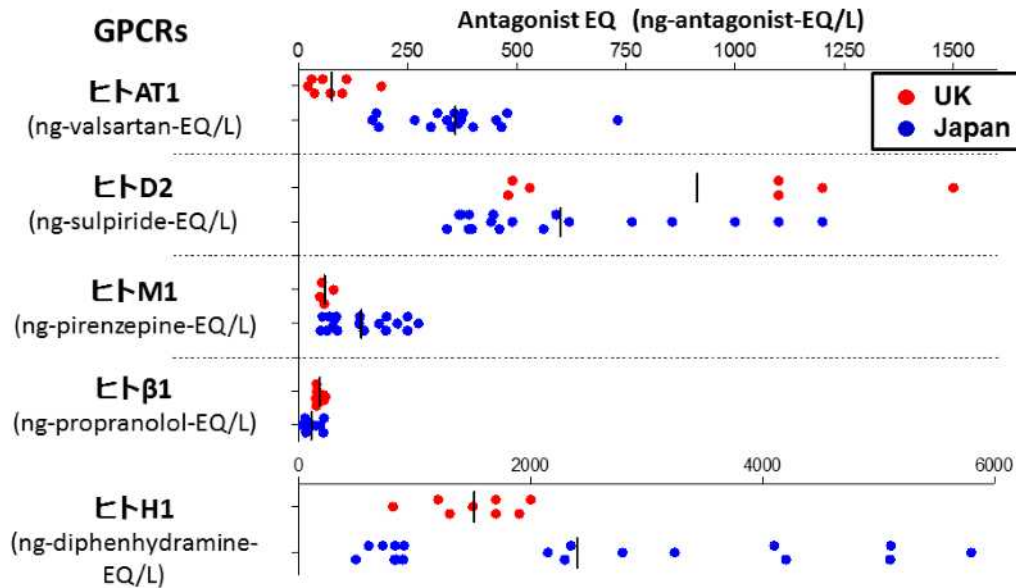
- 2014年8,9月 : Oxford and Didcot STPs
- 2015年1月,夏 : Oxford and Didcot STPs
- 2019年9月 : Oxford, Aylesbury, and Benson STPs



13

イギリスのOxfordの下水処理場の処理水を採取して、GPCR作動性医薬品の生物活性を測定しました。

## 下水での医薬品濃度(当量値EQ)、イギリスと日本の比較



Ihara et al., *Environ. Sci. & Technol.*, 2015.

Zhang et al., *Environ. Sci. & Technol.*, 2018. Ihara, et al., *J. Appl. Toxicol.*, 2020.

14

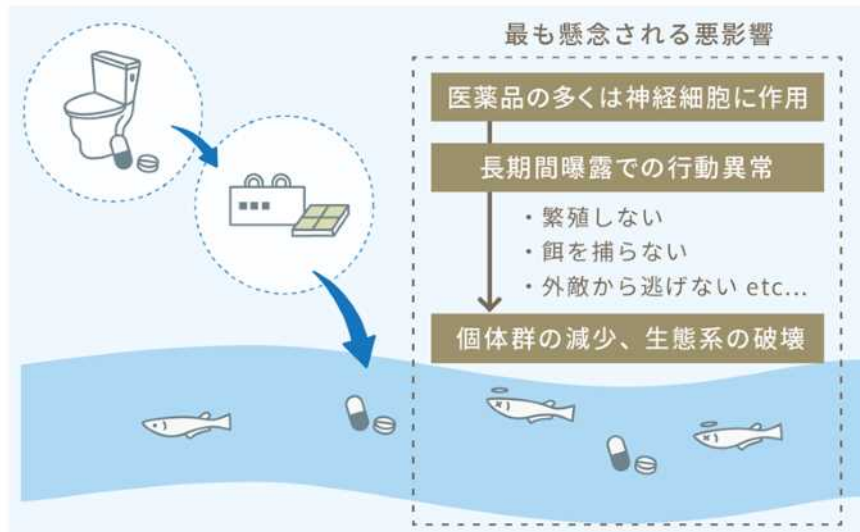
処理水での医薬品のGPCRの活性化を元に、日英での下水での医薬品の濃度を比較した結果です。

日英で使用されている医薬品の量が異なるものがあることが明らかです。

GPCR阻害薬と抗うつ薬の処方量が多い

*In vitro*アッセイは、医薬品の薬理活性の測定に有用

ヒト受容体に加え、メダカ/ゼブラフィッシュ受容体も医薬品によって阻害される  
水生生物の行動や繁殖への影響の解明が今後の課題



15

下水処理水からの医薬品はGPCR阻害薬と抗うつ薬が多いことを明らかにしています。

これらの医薬品が、特に魚類に対してどのような影響を与えているかを明らかにするために、すべてのコアと連携して、メダカなどを利用して、医薬品の受容体の活性化や行動試験、生殖試験を開始しています。

## Core 2: イギリスの河川から実験へ エチニルエストラジオール(EE2)のローチへの影響



日英共同研究 (宮川、勝、井口、A. Lange, C.R. Tyler)

1980年代半ばから、イギリス河川のローチ(コイ科の魚)に精巣卵が見いだされ、原因究明を開始 — 内分泌かく乱物質問題の始まり

- ①ローチの性分化関連遺伝子・性特異的遺伝子、ステロイドホルモン合成関連酵素遺伝子、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、マイクロアレイの開発・解析
- ②毒性試験に用いられる魚類のエストロゲン受容体の感受性の種差
- ③メダカの精巣卵のバイオマーカー遺伝子の単離 (ZPA, ZPB, ZPC3, ZPC5)
- ④エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体の進化
- ⑤アンドロゲンによる乳頭状小突起形成のメカニズムの解明
- ⑥アンドロゲン、エストロゲン作用を可視化するトランスジェニックメダカの作成
- ⑦エストロゲン受容体ノックアウトメダカ、アンドロゲン受容体ノックアウトメダカの作成
- ⑧遺伝子情報やバイオマーカーを全てのコアに供与

16

コア2では、イギリスでの内分泌かく乱問題の始まりである、コイ科のローチの精巣卵の調査などに加えて、

- ①ローチの性分化関連遺伝子・性特異的遺伝子、ステロイドホルモン合成関連酵素遺伝子、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、マイクロアレイの開発・解析;
- ②毒性試験に用いられる魚類のエストロゲン受容体の感受性の種差;
- ③メダカの精巣卵のバイオマーカー遺伝子の単離 (ZPA, ZPB, ZPC3, ZPC5);
- ④エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体の進化;
- ⑤アンドロゲンによる乳頭状小突起形成のメカニズムの解明;
- ⑥アンドロゲン、エストロゲン作用を可視化するトランスジェニックメダカの作成;
- ⑦エストロゲン受容体ノックアウトメダカ、アンドロゲン受容体ノックアウトメダカの作成;
- ⑧遺伝子情報やバイオマーカーを全てのコアに供与、  
などに取り組んでいます。



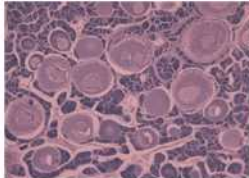
## イギリスの河川の魚類のメス化とその原因

### イギリスの河川のローチ (*Rutilus rutilus*) の性のかく乱

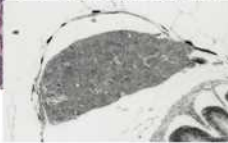
51か所の調査で44か所  
(86%) で間性



23%の雄で間性



メス化した生殖管

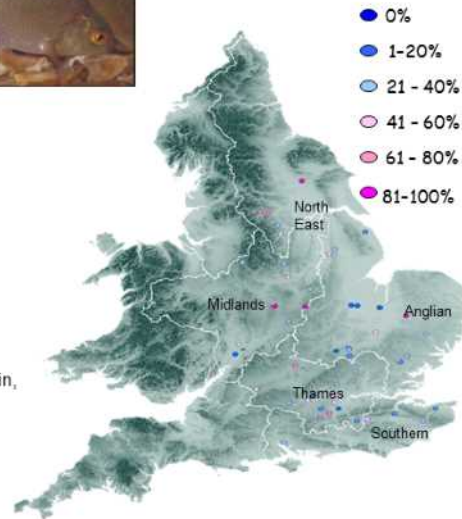


精巣中の卵子  
精巣卵

Jobling, S., Williams, R., Johnson, A., Taylor, A., Gross-Sorokin, M., Nolan, M., Tyler, C.R., van Aerle, R., Santos, E.M., and Brighty, G. (2006). Environ Health Perspectives 114: 32-29

メダカの精巣卵の遺伝子マーカー  
(*ZPA*, *ZPB*, *ZPC3*, *ZPC5*, *Fig $\alpha$* , *42Sp50*)の同定  
Hirakawa *et al.*, Chemosphere, 2012.

調査地点での  
性のかく乱率



17

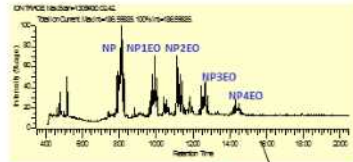
イングランドの河川のローチの精巣卵の再調査が行われ、間性(86%)、精巣卵(間性の23%)、生殖管のメス化などが見られました。

メダカで精巣卵を判定する遺伝子マーカー(卵膜タンパク遺伝子、雌生殖細胞特異的遺伝子)も見出しました。

## 魚類への影響: 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

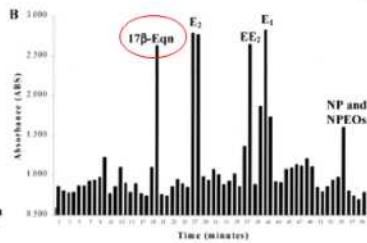
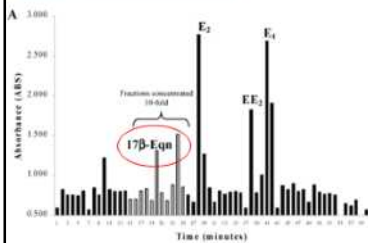
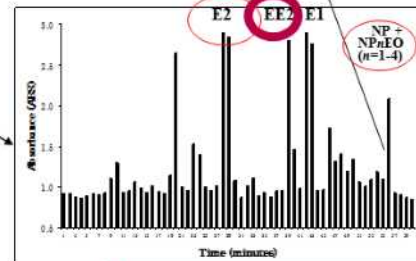


下水排水からのエスト  
ロゲン類似物質の活性



エストロゲン時類似  
物質、抗エストロゲン  
物質及びそれらの代  
謝物質

yeast screens,  
LC-NMR-  
MS/GC-MSMS



- E1 エストロン
- E2 エストラジオール
- 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

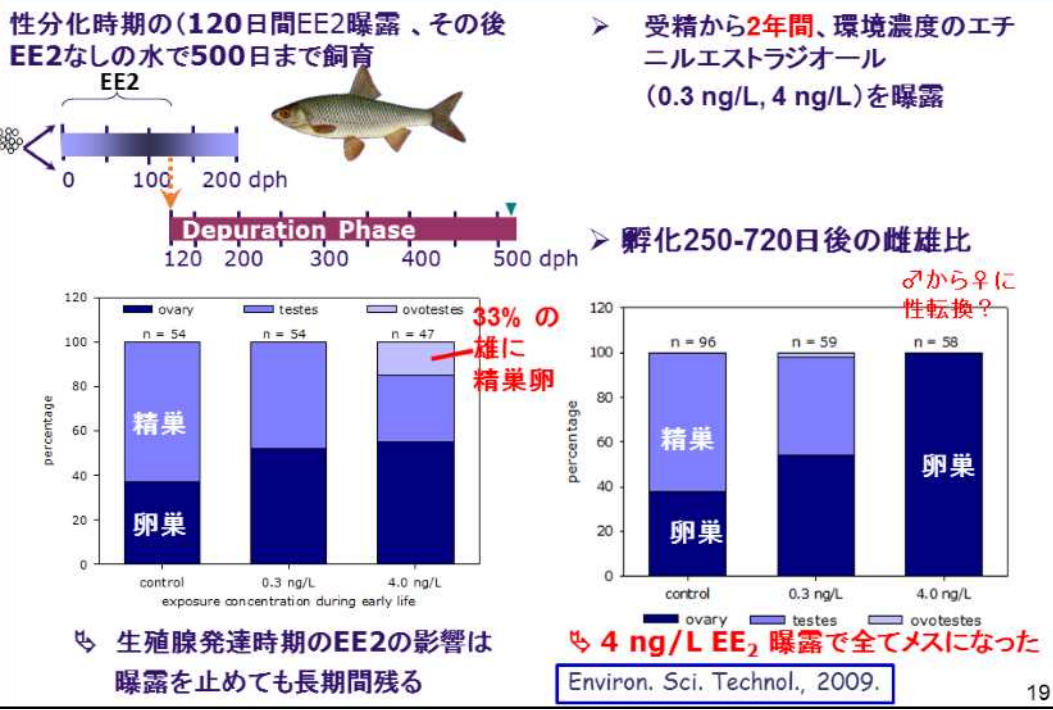
ホルモン補充療法に用いら  
れたウマのエストロゲン

Tyler et al. ES & T, 2009.

18

イギリスの下水処理水で飼育したローチやニジマスの胆汁から、魚自体のエストロゲンの他に、合成女性ホルモンのエチニルエストラジオール、界面活性剤の代謝物のノニルフェノールに加えて、ホルモン補充療法に使われている、馬のエストロゲンである、エクイリンも検出されました。

# エチニルエストラジオール(EE2)の性発達への長期影響

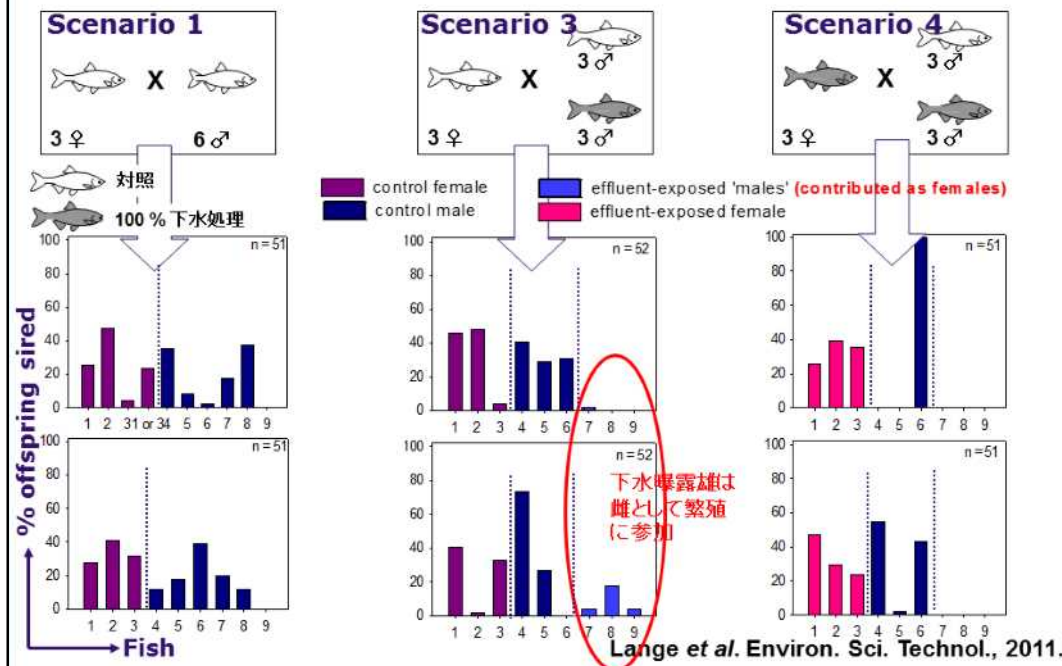


ローチを受精卵から120日間、0.3あるいは4 ng/Lのエチニルエストラジオール(EE2)中で飼育した後、EE2を含まない水で500日齢まで飼育した結果、4 ng/L EE2で飼育したオスの33%に精巣卵が認められました。

また、受精から2年間、0.3 あるいは4 ng/L EE2で飼育すると、4 ng/L EE2で飼育した場合には、すべての個体に卵巣が認められたので、メスへの性転換が考えられました。この時点では、遺伝的なオスを証明するための遺伝子がありませんでしたので、オスからメスへの性転換が考えられる、としか言えませんでした。

# 交配実験(親の解析)

実験期間: 3. 5年



シナリオ3のように正常♀3匹に正常♂3匹、下水処理水で飼育した♂3匹を一緒に飼育して、育った子供の父親の、親子鑑定を行いました。その結果、下水処理水で飼育した♂が♀に性転換して卵を産んだことが明らかになりました。

また、シナリオ4では、下水処理水中で飼育した♀は正常に産卵し、その卵は受精することも分かりました。



## ローチの遺伝的な性を検出できるマーカー遺伝子を同定

- Restriction site Associated DNA Sequencing (RADseq)
- 2か所の汚染されていない場所で採取した雌雄のローチの遺伝子配列を解析

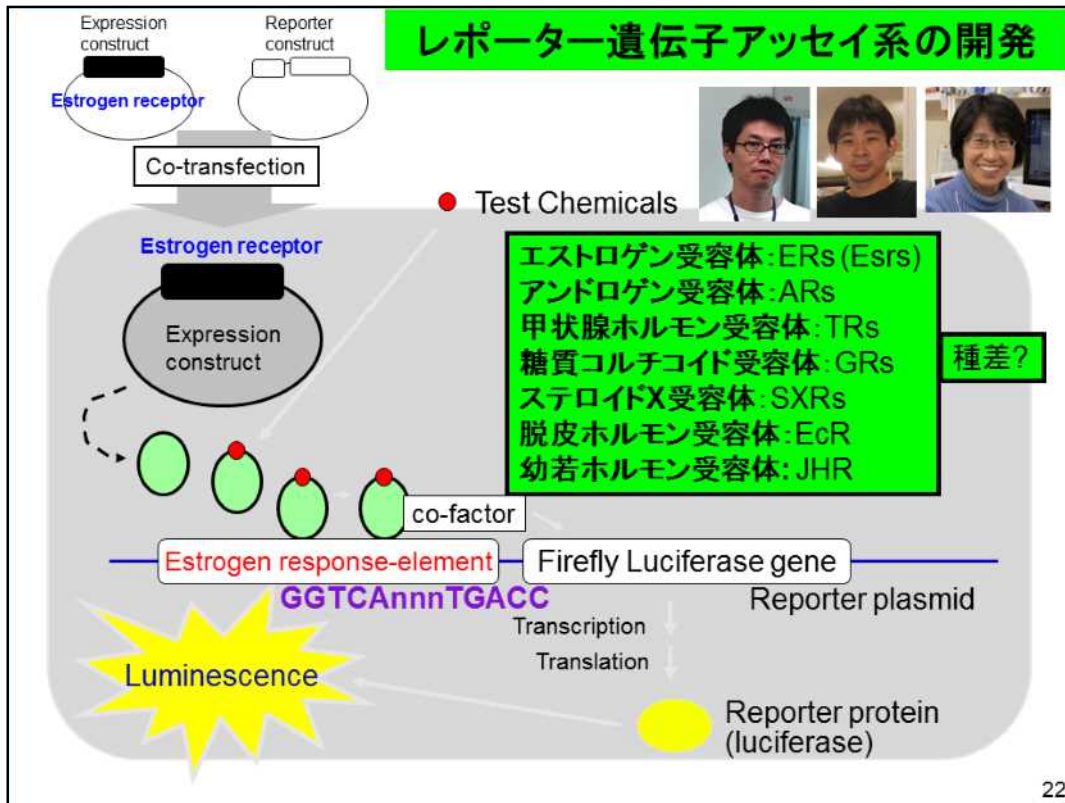


- 3種類のマーカー遺伝子の候補
- そのうちの1種類は性特異的(雄のみで発現)
- 性特異的遺伝子の有効性は確認済み

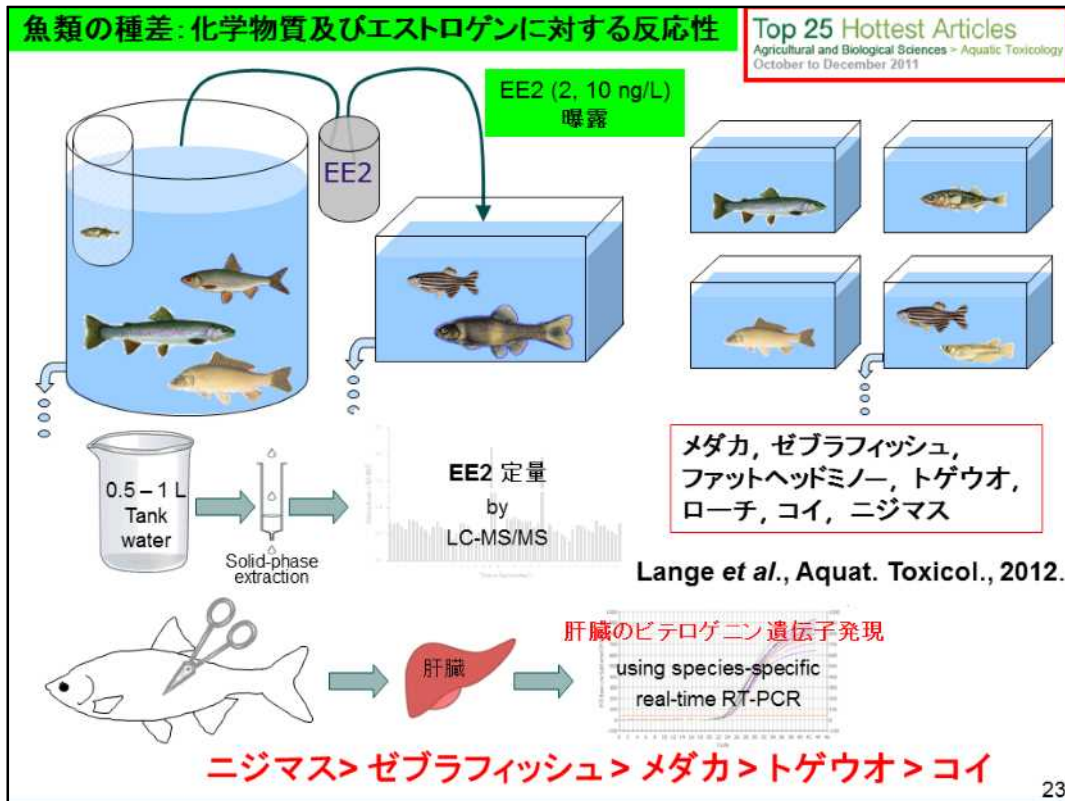


Lange et al., Mol. Ecol. Res., 2020. 21

2020年に、♂のローチだけに発現する遺伝子を見出しましたので、今後は遺伝的な♂の判定が利用できるようになりました。

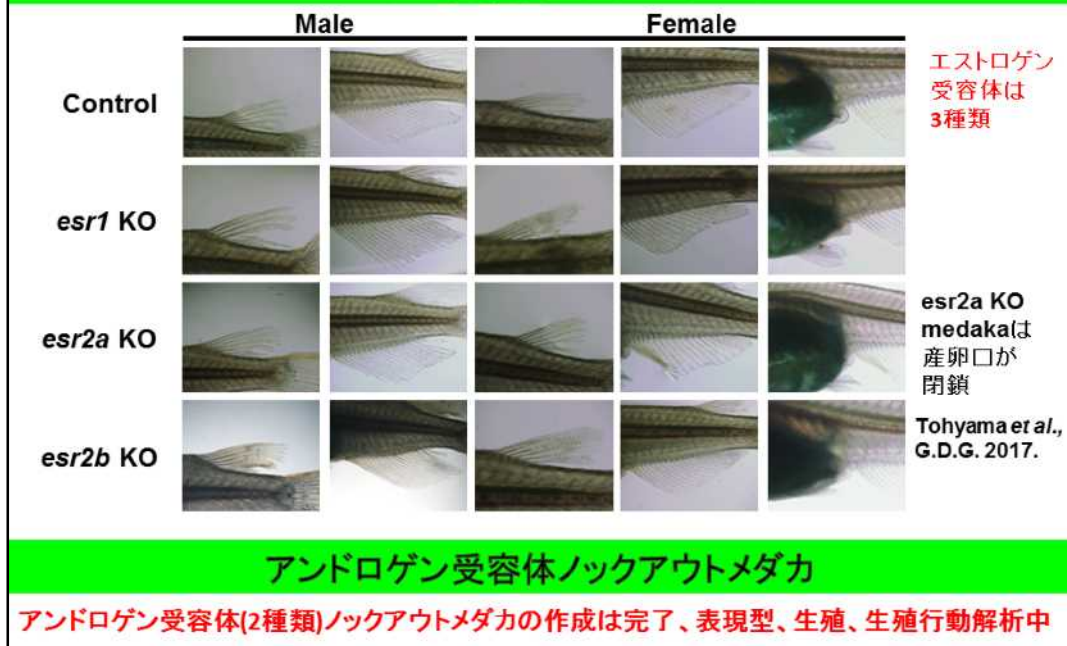


環境省の内分秘かく乱物質の取り組みに資するために、メダカのエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、アフリカツメガエルの甲状腺ホルモン受容体、ミジンコの脱皮ホルモン受容体、幼若ホルモン受容体遺伝子をクローニングし、培養細胞に受容体遺伝子と蛍光タンパクの遺伝子を組み込んだレポーター遺伝子アッセイ系を確立し、EXTEND2016で利用されています。



ニジマス、ゼブラフィッシュ、メダカ、トゲウオ、コイを同じ濃度のEE2で飼育し、卵黄タンパク(ビテロゲン)の発現を元に、エストロゲンに対する感受性を比べたところ、ニジマスが最も感度が高く、コイの感度が低い、種差があることが分かりました。

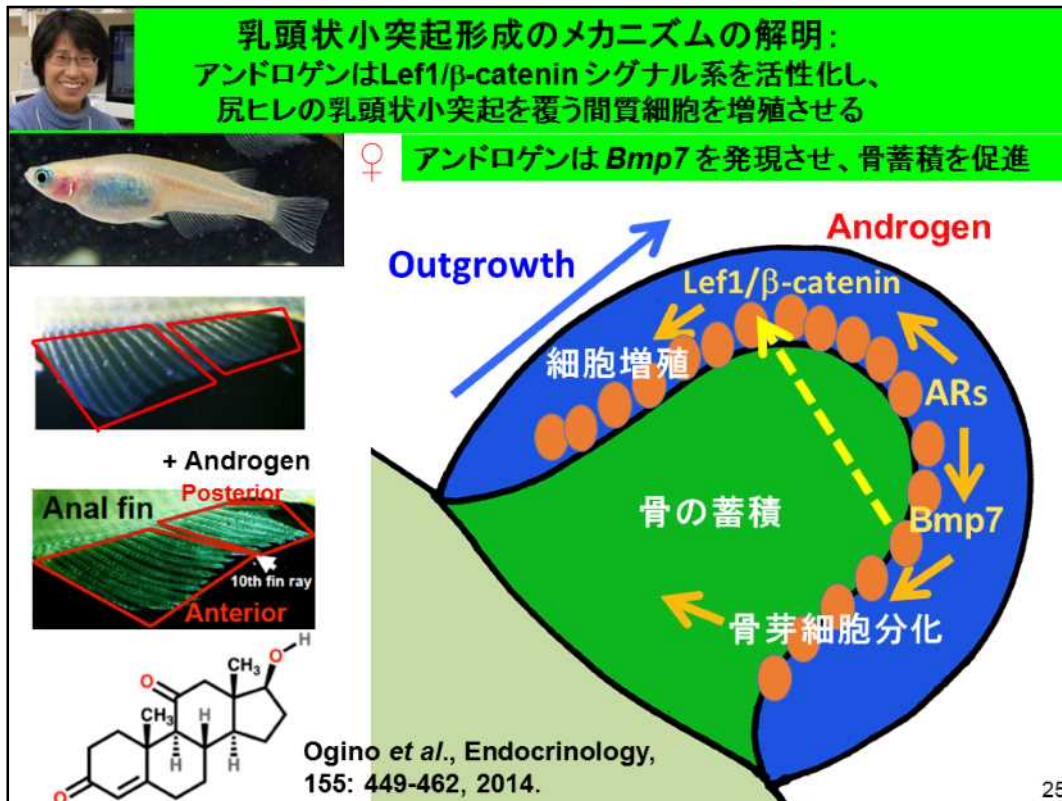
### エストロゲン受容体ノックアウトメダカ



エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体の進化の研究も行いました。真骨魚類では全ゲノムの重複が起こっており、エストロゲン受容体は3種類、アンドロゲン受容体は2種類あります。

3種類あるメダカのエストロゲン受容体の、どのエストロゲン受容体が重要であるかを調べるために、1種類の受容体を発現できないノックアウトメダカを作成して、エストロゲンに対する応答や、産卵に対する影響を調べたところ、*Esr2a*をノックアウトすると、産卵孔口が閉鎖しており、産卵できないことが明らかとなりました。2種類あるメダカのアンドロゲン受容体の発現ができない、ノックアウトメダカを作成して、アンドロゲン受容体の機能を調べています。







アンドロゲン応答性遺伝子を同定するために、♂の乳頭状小突起が発達している尻鰭の前部及び後部からRNAを抽出しました。アンドロゲン処理した尻鰭と対照の尻鰭の間で遺伝子発現プロファイルを比較し、尻鰭の前部と後部間でも比較しました。

2つの遺伝子がアンドロゲン応答性を示し、Lef1/β-カテニンが乳頭状小突起の間質細胞を増殖させ、Bmp7は骨芽細胞を分化させ、骨の蓄積に関与していることを明らかにしました。


**トゲウオのSpiggin 1 (4.2Kb)-eGFPをメダカ(Oryzias latipes)の受精卵に導入し  
アンドロゲン作用を可視化したトランスジェニックメダカ(Oryzias latipes)の作成**



**Anthony Sébillot**

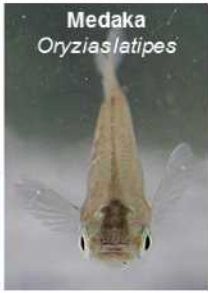


**RADAR アッセイとして OECDに提案中**

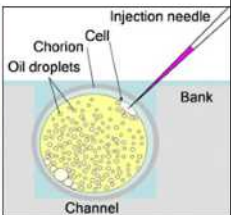



1200 injected eggs with Spg1  
300 eggs GFP positive on mesoderm and yolk

**73 ALIVE FOR SCREENING**

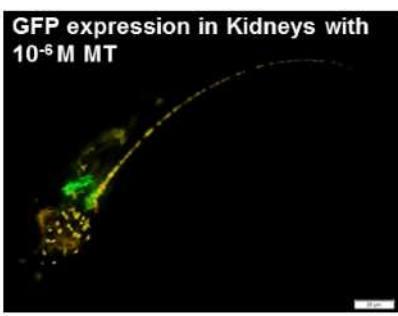


**Medaka**  
*Oryzias latipes*

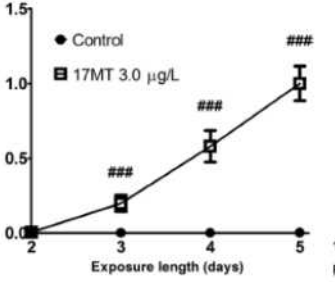




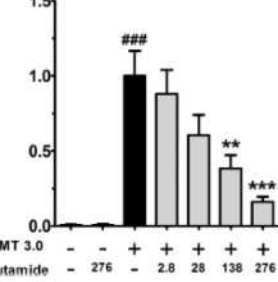
**Three-spined stickleback**  
*Gasterosteus aculeatus*



**GFP expression in Kidneys with  
10<sup>-6</sup>M MT**



**Rapid Androgen Disruption Adverse outcome Reporter Assay in Spiggin-GFP Medaka (RADAR)**



**Environ. Sci. Technol., 2014.**

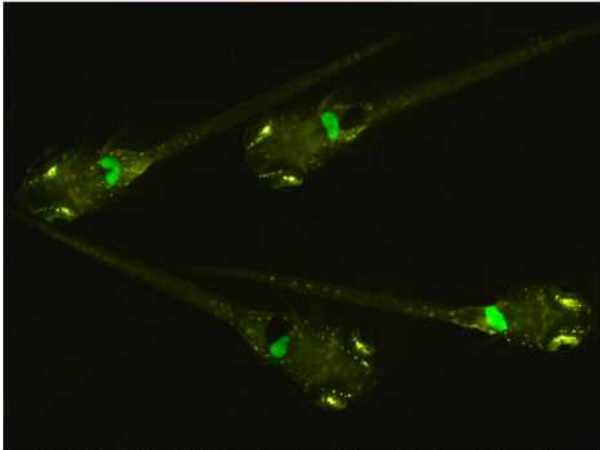
フランスのベンチャー企業のWatchFrog社と共同で、メダカの受精卵にアンドロゲンに  
 応答するイトヨのスピギン遺伝子を導入したところ、アンドロゲン刺激に応答して、孵化  
 後の稚魚の腎臓が光ることを示しました。

このトランスジェニックメダカは、化学物質のアンドロゲン作用を短時間に検出するこ  
 とができるので、アンドロゲン作用を検出するためのRADARアッセイとして、OECDに提  
 案しています。

## ■ エストロゲンにより肝臓が光るメダカの作成 (choriogenin-GFP)

Rapid Estrogen ACTivity *In Vivo* (REACTIV) Assay with Choriogenin-GFP  
Medaka (OECDに提案中)

Choriogenin H → GFP



48-hour exposure from dph 0

WatchFrog France

Spirhanzlova P, Leleu M, Sébillot A, Lemkine GF, Iguchi T, Demeneix BA, Tindall AJ  
*Comp. Biochem. Physiol. C*, 179, 64-71, 2015.

27

同じく、WatchFrog社と共同で、メダカの受精卵に卵膜タンパクのコリオジェニン遺伝子にGFPを繋いだ遺伝子を導入し、エストロゲン刺激で、肝臓が光るトランスジェニックメダカを作成しました。

化学物質のエストロゲン作用を検出するための簡便な手法となります。REACTIV AssayとしてOECDに提案しています。

## Core 3 OECD試験への対応



コア3は、主に魚類試験の開発を目的として、イトヨとメダカに対するアンドロゲン作用の比較、メダカの尻鰭を用いた、アンドロゲン作用及びエストロゲン作用の基礎研究、現在問題となっている、ミナミメダカとキタノメダカのホルモンに対する感受性の差異、メダカを用いた行動試験の開発などを行っています。

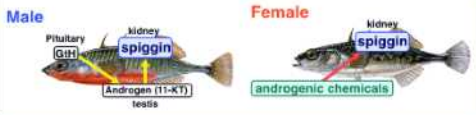


## ① イトヨとメダカにおける化学物質の男性ホルモン作用及び抗男性ホルモン作用検出感度の比較

### Research background (stickleback)

#### Merit for test animal

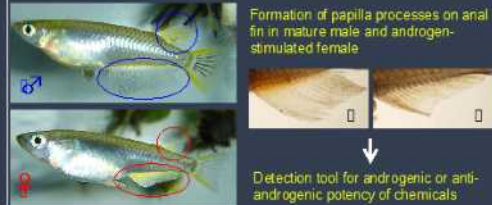
- Small and easy to keep
- Good model fish for behavioral biology, genetics, reproductive physiology, etc.



### Research background (medaka)

#### Merit for test animal

- Small and easy to keep
- Daily spawner (usefulness for reproductive physiology)
- Sexual difference in fin shape
- Sex-determining gene (*DMY*)

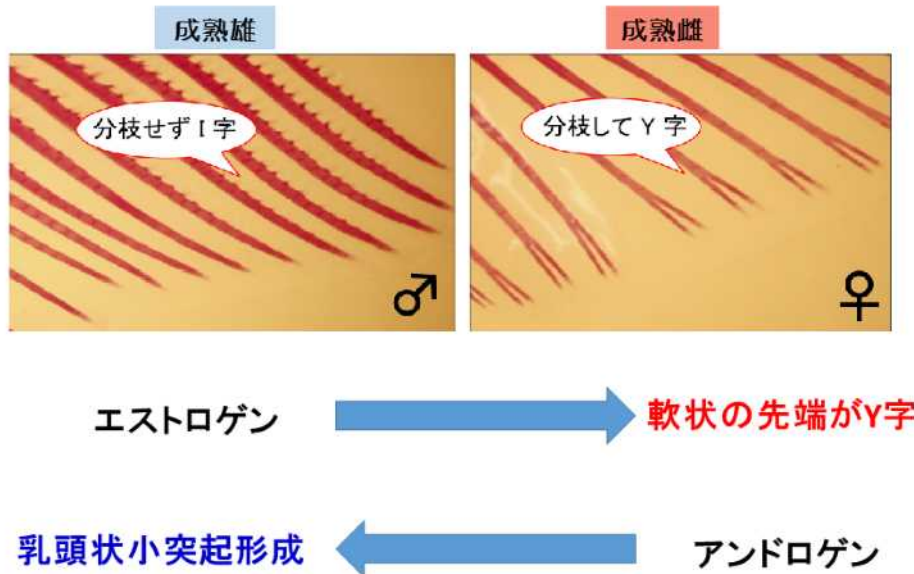


化学物質の抗男性ホルモン作用を検出するための生物種としてのイトヨ(スピギン遺伝子発現)、メダカ(尻ヒレの乳頭状小突起形成)の検出感度の比較。

29

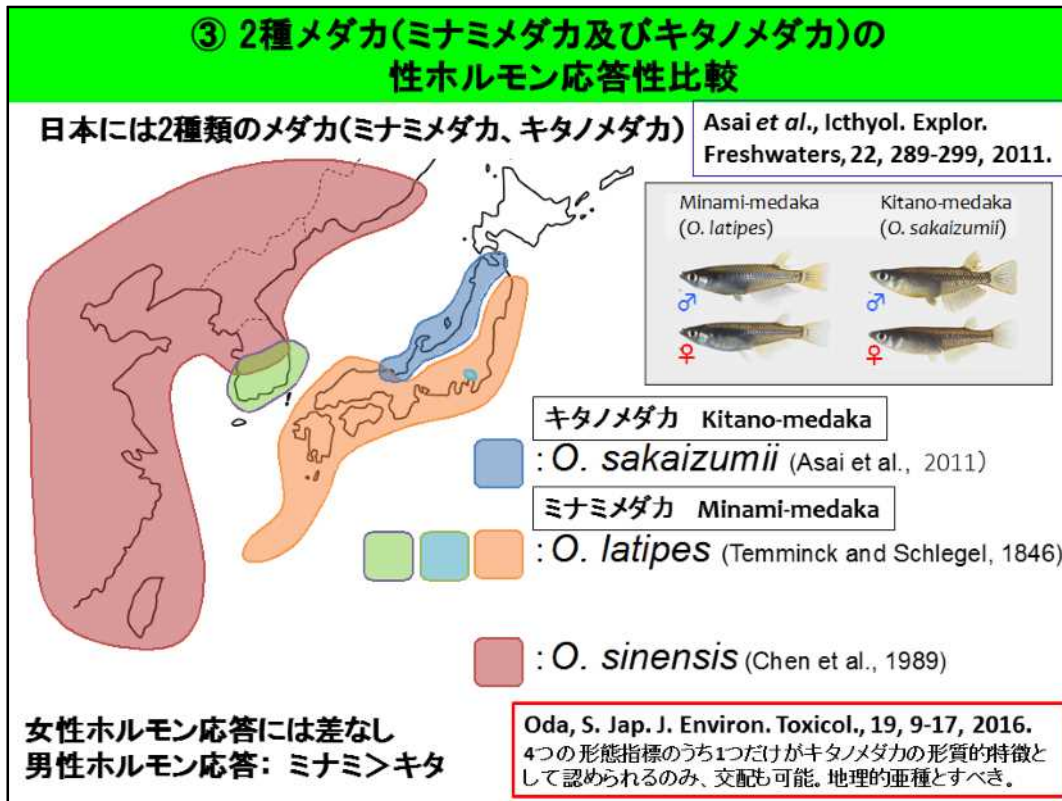
アンドロゲン及び抗アンドロゲン物質に対する反応性を、イトヨの腎臓での接着タンパクのスピギンの発現、メダカの尻ヒレの乳頭状小突起の形成を比較して、イトヨの方が感度が高いことを見出しています。

② メダカ臀鰭の性特異形態を利用した化学物質の性ホルモン作用検出のための基礎研究



30

♀メダカにアンドロゲンを曝露すると、尻鰭に乳頭状小突起ができます。♂メダカにエストロゲンを曝露すると、尻鰭の軟状の先端が♀と同じようにY字状になることから、エストロゲン作用の判定に使える可能性があります。



日本のミナミメダカとキタノメダカの分布図です。

Asaiらは2011年に、メダカは、ミナミメダカとキタノメダカの2種類に分けるべきと、キタノメダカを新種として登録し、今までのメダカはミナミメダカとする、という論文を出しています。

これに対しては、Oda は2016年に、キタノメダカを新種とするのは反対との意見を論文として出しています。4種類の形態的特徴の違いがあるとの意見に対して、1つは違うが、3つは変異の範疇にあるとし、交配も可能なのでキタノメダカは新種とは言えない、としています。

OECDの試験法ガイドラインには*Oryzias latipes*(ミナミメダカ)となっていますので、試験に使用しているメダカがミナミメダカであることを簡便に区別する方法の開発や、ミナミメダカとキタノメダカのホルモンや化学物質に対する反応性の相違も明らかにすることが求められています。

### Core 3 研究のまとめ

- ① イトヨとメダカにおける化学物質の男性ホルモン作用及び抗男性ホルモン作用検出感度の比較 OECD
- ✓ イトヨとメダカにおける抗男性ホルモン作用検出感度を比較した結果、メダカの乳頭状小突起をバイオマーカーに用いた検出が、イトヨのスビギンをバイオマーカーに用いた検出に対して、感度の面でやや勝ることが示唆された。
  - ✓ また、メダカを用いた試験法では、繁殖機能への影響も厳密に評価可能と判断された。
- ② メダカ腎臓の性特異形態を利用した化学物質の性ホルモン作用検出のための基礎研究 OECD
- ✓ 既知のメダカ腎臓の男性ホルモンに対する形態的バイオマーカーである乳頭状小突起に加えて、メダカ腎臓軟条の「先端分枝」が女性ホルモンの形態的バイオマーカーとして利用可能であることを示した。
  - ✓ メダカ腎臓のこれら形態的バイオマーカーを利用することで、個体を解剖（殺傷）することなく、化学物質の性ホルモン作用を検出可能であることを示唆した。
- ③ 2種メダカ（ミナミメダカ及びキタノメダカ）の性ホルモン応答性比較 OECD
- ✓ 日本に生息する2種のメダカにおいて、女性ホルモン応答性はほぼ同等であったが、男性ホルモンに対しては、ミナミメダカの応答性が高いことが示唆された。
- ④ メダカを用いた医薬品の行動試験の開発（全てのコアとの共同研究）

32

コア3の研究をまとめると、

- ① イトヨとメダカにおける化学物質の男性ホルモン作用及び抗男性ホルモン作用検出感度の比較；
- ② メダカ腎臓の性特異形態を利用した化学物質の性ホルモン作用検出のための基礎研究；
- ③ ミナミメダカ及びキタノメダカの性ホルモン応答性比較、に加えて；
- ④ メダカを用いた医薬品の行動試験の開発（全てのコアとの共同研究）を進めています。

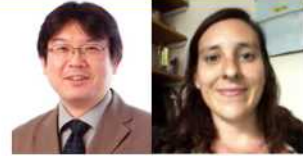


**Core 4 内分泌かく乱作用が疑われる物質の集団レベルへの影響: 日英両国での環境リスクの解析に向けて**  
**Core 4-1 トノサマガエルの精巣卵**



**トノサマガエルの精巣卵**

- 新潟、富山、岐阜
- 調査地点での物質の探索
- 内分泌かく乱作用を可視化するためのトランスジェニックメダカの作成

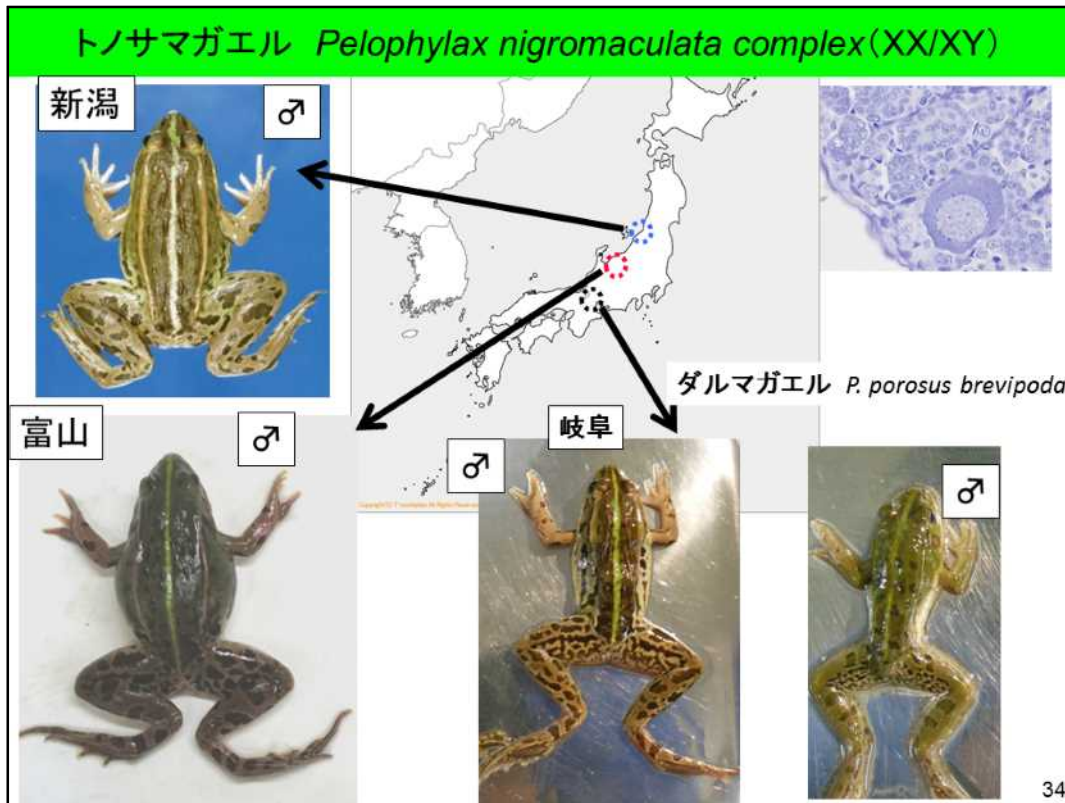


**ボラの卵黄タンパク発現、精巣卵、精巣異常**

- 東京湾、大阪湾、福岡港、長崎港、函館港、大牟田
- 医薬品の魚類の行動への影響



コア4は、生態影響が中心で、日本では、トノサマガエルの精巣卵とボラの精巣卵、ピテロゲン発現、精巣異常の調査を行っています。



新潟大学の岩沢先生のグループは、1970年代からトノサマガエルの精巣卵の調査を行なっていました。弟子でもある、小林先生が引き続きカエルの精巣卵の調査を行っています。

トノサマガエルの仲間は、富山や岐阜など、地理的に新潟地域から隔離された他の地域にも生息しています。これは、富山と岐阜が新潟とは遺伝的に異なることを意味しています。

未発表のデータなので、文章のみでの調査結果の概要です。

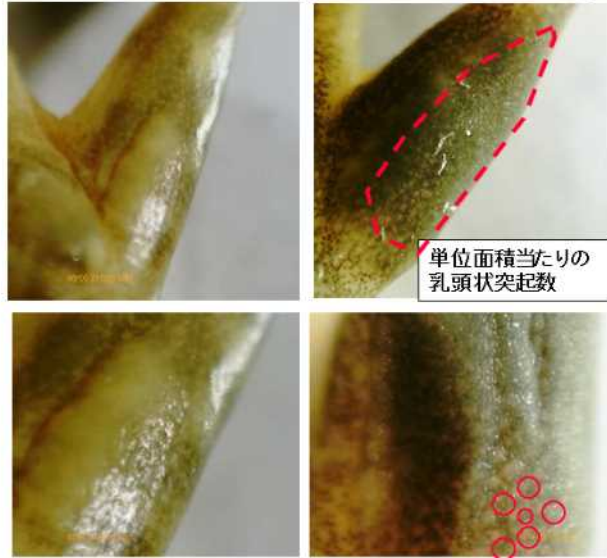
- 新潟では、1970年代の調査では、成熟卵の約50%に大きな精巣卵が観察されていました。この8年間では、成熟卵の20～40%に精巣卵が認められていますが、精巣卵の大きさは小さめです。
- 富山でも、精巣卵は新潟と同様の割合で観察されています。この2年間では、新潟の70年代と同様に精巣卵を持つ個体の頻度が高いことが分かりました。精巣卵のサイズは1970年代の新潟のカエルよりも小さかったのですが、1970年代と同様に、1つの卵巣で、10個以上の精巣卵が認められました。
- 今回は、トノサマガエルに加えて、新潟地域ではアマガエルの精巣卵を観察しました。将来的には、トノサマガエルに加えて、アマガエルの精巣卵の発生も観察する予定です。

35

トノサマガエルの調査結果の概要です。

母指隆起 Nuptial pad (アンドロゲン作用で形成される)  
イギリスの湖沼のカエルに利用：解剖不要

乳頭状突起のある面積



成熟♀

成熟♂

36

カエルの雌雄は母指隆起を比べて、大きいのが♂です。母指隆起の大きさ(面積)および母指隆起に形成されている乳頭状突起数が、雌雄判定の目安になります。

イギリスのカエルにも応用すれば、カエルを殺さずに雌雄の調査ができるので、イギリス側に情報を提供しています。



## 野生のトノサマガエルの個体群における精巣卵

- ・精巣は性成熟期と生殖周期の間に成長を続け退化する。
  - ・2010年代には、70年代に比べて精巣卵を持つカエルの割合が減少した。
  - ・精巣卵の大きさは、70年代に比べて2010年代には小さくなっている。
  - ・幼生への低用量エストロゲンの曝露により、精巣卵様分化を誘導できる。
- 評価のためには、精巣卵を持つカエルの割合(%)に加えて、カエルの精巣中の精巣卵数も重要。
- ・ 調査地区の水中の化学物質の分析を計画。
  - ・ ホルモン作用を可視化するためのトランスジェニックメダカの開発を計画。

37

まとめです。

1970年代に比べて、2010年代では精巣卵を持つカエルの割合が減少し、精巣卵の大きさも小さい。実験的にはオタマジャクシへのエストロゲン曝露で精巣卵を誘導できます。調査地区の水中の化学物質の分析を計画しています。また、ホルモン作用を可視化できるトランスジェニックメダカの開発を計画しています。

## Core 4-2 ボラの精巣卵・卵黄タンパク発現の調査



福岡港 (2016-2018)  
長崎港 (2016-2018)  
唐津 (2016-2018)



38

今まで、函館港、東京湾、大阪湾、名古屋港などで、ボラを対象にして精巣卵、卵黄タンパク質(ビテロゲニン)の発現を調べてきました。

2016年からは福岡港、長崎港、唐津などで調査を行い、沖縄での調査も視野に入れています。

## 2016年からの野外調査



未発表のため、文章のみで紹介します。

捕獲した♂のボラの肝臓のピテロゲン遺伝子発現を調べたところ、福岡港で、ピテロゲン遺伝子の高発現個体が見出されている。福岡港のボラよりも低値ではあるが、長崎港でもピテロゲン遺伝子の発現が高い個体が捕獲されている。


このことから、福岡港と長崎港ではエストロゲン類似作用を持つ物質が存在していることが推定される。

39

2016年からの、九州各地でのボラの調査の結果です。


福岡港と長崎港では、肝臓のピテロゲン遺伝子の発現が高いオスが見つかっていません。

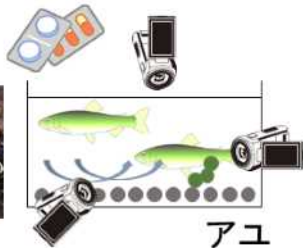
## 医薬品の魚類への行動影響・脳の遺伝子発現解析



メダカ

行動解析






アユ

医薬品 A  
暴露1日後


CN1CC2C(C1)c3ccccc3N2

ノルアドレナリン・  
セロトニン作動性抗うつ剤

A




B



流れに向かって定位

C



流れに向う定位できない

産卵行動、産卵

40

ボラの精巣卵やビテロゲニン遺伝子発現の調査に加えて、すべてのコアと共同で、医薬品のアユの生殖行動に対する影響の研究を始めています。

## 化学物質の内分泌かく乱作用に関する 日米二国間協力に

2004年(平成16年)1月に開催された第12回日米合同企画調整委員会において、化学物質の内 分泌かく乱作用問題に関して日米二国間の協力を進めることが合意され、この合意に基づき、化学物質の内分泌かく乱作用に関する日米二国間会議が開催されることとなった。

2004年9月に第1回日米二国間協力会議

41

日米二国間協力は2004年1月に合意され、2004年9月に最初の会合が開かれました。





日米2国間協力の少し前、2002年のお話をします。

アメリカ環境保護庁のミネソタ・ダルースの研究所から、試験魚としてのメダカの利点を知りたいとの要請で、ワークショップに出席した時の写真です。

このワークショップを契機として、アメリカは、内分泌かく乱物質の試験に用いる魚をファットヘッドミノーからメダカに変更しました。



2013年から2019年までの、日米二国間協力の集合写真です。主に、ワシントンのEPA本部で開催されていました。

2020年度は、大統領選挙もあり、コロナ禍でもあり、2021年5月へと予定変更されています。

2004年9月、2005年6月：化学物質の内分泌かく乱作用による生態影響評価に関する情報交換

2006年以降：主に生物の繁殖(生殖)への影響等を評価する試験について、日米両国が協力して技術的な課題の検討等を行い、試験法の開発及びOECDでのテストガイドライン化に向けた取組を進めるとともに、内分泌かく乱作用を含む化学物質の生態影響評価に関する情報交換

魚類試験、両生類試験：メダカ多世代試験 Medaka Multigeneration Test:  
2009年4月に、メダカ及びアフリカツメガエルを用いた新たな試験法のテストガイドライン化に関するプロジェクトの提案書(SPSF)を日米共同でOECDに提案し、日米両国が共同で試験法の開発及び標準化を進め、2014年9月に開催した第10回日米会議で、テストガイドライン案をとりまとめ、日米共同でOECD事務局へ提出。OECDでの一連の審議を経て、2015年4月のOECDのナショナルコーディネーター会合(WNT会合)において Medaka Extended One-generation Reproduction Test (MEOGRT:メダカ拡張1世代繁殖試験) (OECD TG240)、Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA: 幼生期両生類成長発達アッセイ) (OECD TG241)としてテストガイドラインが承認され、2015年7月に公表された。

近年は、米国の内分泌かく乱物質スクリーニングプログラム(EDSP)と日本のEXTEND2016のそれぞれにおける評価の考え方、手法、進捗状況等について情報を共有しつつ、日米それぞれにおいて実施された試験のデータ等の相互提供を行っている。これらを通じて、日米双方の評価事業の円滑化、効率化を図っている。

2004、2005年は生態影響評価に関する情報交換、2006年以降は繁殖への影響評価試験、特にメダカとアフリカツメガエルを用いた試験のOECDへの提案に向けての協議が行われ、2009年には、メダカの多世代試験とアフリカツメガエルの試験の提案書(SPSF)を提出し、その後、この2つの試験を中心にデータを持ち寄り、試験法の内容も精査しながら、2014年にOECDに提出するためのテストガイドラインの作成を行い、2015年に承認されて、メダカ拡張1世代繁殖試験(MEOGRT, OECD TG240)、幼生期両生類成長発達アッセイ(LAGDA, OECD TG241)が公表されました。

その後は米国の内分泌かく乱物質スクリーニングプログラム(EDSP)と日本のEXTEND2016の評価について、手法、進捗状況等について情報を共有しています。



Japan Ministry of the Environment-US Environmental Protection Agency  
Bilateral Meeting on Endocrine Disruption Test Methods Development

2005年内分泌かく乱物質の試験法開発に関する日米二国間協力  
魚類(メダカ)を用いた確定試験法の開発 (OECD TG240, 2015)  
魚類短期繁殖試験にメダカを入れる (OECD TG230, TG229, 2012)  
両生類変態アッセイ試験法の開発  
アフリカツメガエル vs ネットイツメガエル (OECD TG231, 2009)  
両生類のビテロゲンアッセイ系の開発、培養肝細胞の利用  
エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン  
受容体 (環境省 EXTEND 2016)  
鳥類を用いた試験法開発(ニホンウズラ) (中止)  
無脊椎動物の試験法開発  
オオミジンコ(日本、幼若ホルモンによるめの産仔)  
(OECD TG211 Annex 7, 2012)  
アミ(アメリカ、中止)、コペポッド(北欧、カナダ)

45

日米で協議したOECDの試験法です。

今まで話していないものでは2012年に、TG229にメダカを入れ、TG211のミジンコの生殖試験に性比を入れました。

また、ニホンウズラの多世代試験の開発は中止、アミの多世代試験の開発も中止になりました。

2009－2010:

魚類試験:

短期生殖試験にメダカを入れるための試験物質の選定 (OECD TG229, 2012)

メダカのフルライフサイクル試験と多世代の比較、多世代試験のOECDへのSPSFについて議論、試験物質についての議論: 拡張1世代繁殖試験として MEOGRT OECD TG240 (2015) (ETC, 36, 3387-3403, 2017).

両生類:

発達、成長、生殖試験法のOECDのSPSFの提案について議論、試験物質についての議論: アフリカツメガエルを用いた、幼生期両生類成長発達アッセイとして LAGDA OECD TG241 (2015) (JAT, 36, 1651-1661, 2016).

無脊椎動物:

ミジンコ、アミ、コペポッドを用いた試験の比較: ミジンコのオス産仔をエンドポイントにした、Annex 7を作成、OECD TG211 Annex 7 (2012)

短期試験、バイオアッセイや遺伝子発現などから、長期試験を行う物質の選定についての考え方の整理、病理組織変化の判定の基準

46

2009－2010年のまとめです。



日米会議	魚類		両生類	無脊椎動物
	TG240 (MEOGRT)	TG229 (FSTRA)	TG241 (LAGDA)	TG211 Annex 7
1. 2004. 9	拡張1世代繁殖試験	魚類短期繁殖アッセイ	幼生期両生類成長発達	ミジンコ生殖試験
2. 2005. 6				
3. 2006. 12				
4. 2008. 2				
5. 2008. 12				
2009. 4	SPSF (MMT)	TG229 (Fathead minnow)	SPSF	
6. 2010. 1				
7. 2011. 2			プロトコル変更	
8. 2012. 2				
2012. 10		medaka, zebrafishを追加		Annex 7 を追加
9. 2013. 10				
10. 2014. 9	MEOGRT草案		ガイドライン草案	
2015. 7	MEOGRT公表		LAGDA公表	
11. 2015. 9				
12. 2017. 3				
13. 2019. 10	統計手法の改訂	協議継続		
14. 2021. 5	予定			



日米二国間協力で進めてきたOECD試験法開発の歴史です。

また、これらの試験法については、写真にある2018年出版のOECD TG150にまとめられています。




**遺伝子配列を用いて種を超えた感受性を予測：**

**種を超えて毒性情報を外挿**

Cross-species Extrapolation of toxicity information using the **Sequence Alignment to Predict Across Species Susceptibility (SeqAPASS) tool**

物質のヒトの受容体への活性化作用を元に、野生生物の受容体の活性化を推定し、リスク評価に利用することにより、動物実験をしなくて、試験コストを削減し、リスク評価を促進する。(種特異性や種差は無視されている。)

**Carlie A. LaLone, Ph.D.**  
Office of Research and Development  
U.S. Environmental Protection Agency

**Estrogen receptor**  
**Androgen receptor**  
**Thyroid hormone receptor**  
**Ecdysone receptor**  
**Juvenile hormone receptor**



**Glucocorticoid receptor**  
**PPARY**  
**RXR**  
**PXR**

環境保護庁・Mid-Continent Labのラローンさんにより提案された感受性の予測です。

動物実験を減らすためにも、1種類の動物の受容体を用いた物質のスクリーニング試験があれば、それを元に、他の種での影響を類推することが可能となるという提案です。



## 動物から試験管内・インシリコへの毒性試験の転換 Transformation of Toxicity Testing

### US Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP):

#### Tier 1 Screening Assays (スクリーニング)

- 両生類変態アッセイ
- 試験管内受容体結合アッセイ
- 試験管内アロマトラーゼアッセイ
- ハーシュバーガーアッセイ
- 思春期ラット
- ステロイド産生
- 子宮肥大

#### Tier 2 Testing Assays (確定試験)

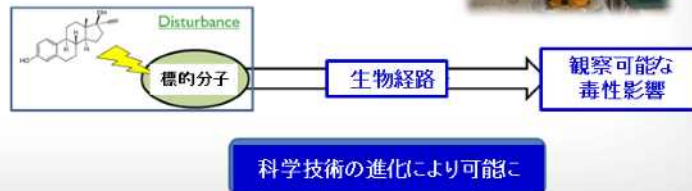
- 両生類生殖発達試験
- 鳥類2世代試験
- 魚類拡張1世代試験
- 無脊椎動物多世代試験
- 哺乳動物拡張1世代試験



### Toxicity Testing in the 21<sup>st</sup> Century:

#### • In vitro and in silico methods

- パスウェイ(作用経路)に基づいたアプローチ
- 生物経路のかく乱に着目
- 観察可能な毒性影響の予測



49

現在行われている、Tier 1 スクリーンでは、1物質20万-40万ドル、Tier 2 確定試験では1物質100万ドル必要と試算されています。

21世紀の毒性試験では作用経路のかく乱に着目することが可能となると考えられます。

- 遺伝子標的に関連するすべてのアッセイを特定する
- 460の遺伝子標的
- タンパク質の標的を特定する(例:受容体、酵素、トランスポーター)

• アッセイに使うモデル生物

- Human
- Rabbit
- Domestic guinea pig
- Cattle
- Mouse
- Chimpanzee
- Pig
- Sheep



**SeqAPASS:**

Level 1 評価: アミノ酸の位置配列

Level 2 評価: 機能ドメイン

**種を超えた保全の理解:**

スクリーニングデータから種の外挿

より多くの資源を集中的に使用する毒性試験

460種類の遺伝子を標的として、タンパク質の標的(受容体、酵素、トランスポーター)を特定する、という考えで整備を進めています。

# EURION Cluster Projects

European Commission's Horizon 2020  
Research and Innovation Programme

€50 million

Meeting  
2021.01.28-29

甲状腺ホルモン軸のかく乱

代謝のかく乱

Athena  
SCREENED  
ERGO

GOLIATH  
OBERON  
EDCMET

EURION

Freia

ENDpoiNTs

女性の生殖毒性

発達神経毒性

GOLIATH athena edcmet ENDpoiNTs OBERON freia ERGO SCREENED

51

EUとして、科学分野に資金を投入するという、Horizon 2020 が始まり、内分泌かく乱物質についての研究である、EURION Cluster Projectsに5,000万ユーロ(約63億円)が配分されています。

EURION Clusterには8つのグループがあり、甲状腺ホルモン軸のかく乱、代謝のかく乱、発達神経毒性、女性の生殖毒性、の大きな4つのくりにまとめられています。研究内容の詳細は、次のスライドに示しています。



**EURION**  
European Cluster to Improve Identification of Endocrine Disruptors

**ATHENA:** Assays for the identification of Thyroid Hormone axis-disrupting chemicals: Elaborating Novel Assessment strategies  
甲状腺ホルモン軸かく乱化学物質の同定のためのアッセイ: 新規評価戦略の精緻化

**EDCMT:** Metabolic effects of Endocrine Disrupting Chemicals: novel testing METHODS and adverse outcome pathways  
内分泌かく乱性化学物質の代謝影響: 新しい試験方法と有害性発現経路

**ENDPOINTS:** Novel Testing Strategies for Endocrine Disruptors in the Context of Developmental NeuroToxicity  
発達神経毒性を考慮した内分泌かく乱物質の新しい試験戦略

**ERGO:** Breaking down the wall between human health and environmental testing of endocrine disrupting chemicals: Endocrine Guideline Optimisation  
内分泌かく乱化学物質のヒト健康と環境生物試験の壁を壊す: 内分泌系ガイドラインの最適化

**FREIA:** Female Reproductive toxicity of EDCs: a human evidence-based screening and Identification Approach  
EDCsの女性への生殖毒性: ヒトの証拠に基づいたスクリーニングと同定アプローチ

**GOLIATH:** Generation Of Novel, Integrated and Internationally Harmonised Approaches for Testing Metabolism Disrupting Compounds  
代謝かく乱物質を試験するための新しい統合的で国際的に調和のとれたアプローチ

**OBERON:** An integrative strategy of testing systems for identification of Endocrine Disruptors related to metabolic disorders  
代謝障害関連内分泌かく乱物質の同定のための検査システムの統合的戦略

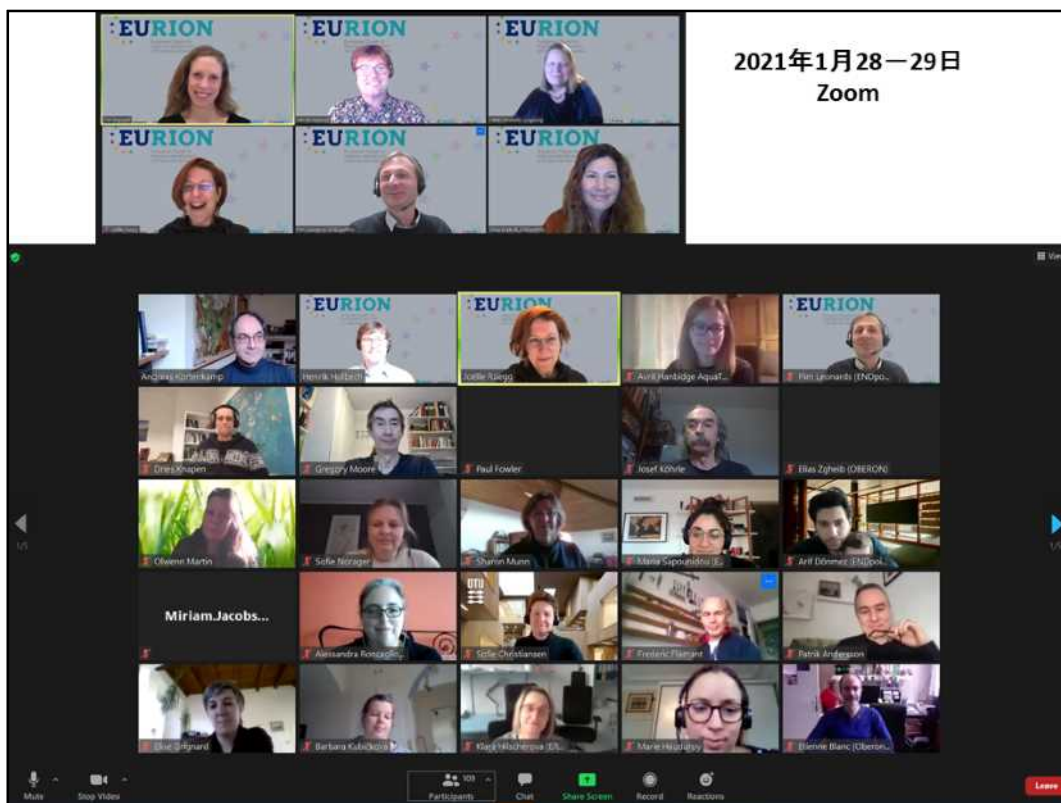
**SCREENED:** A multistage model of thyroid gland function for screening endocrine disrupting chemicals in a biologically sex-specific manner  
生物学的性特異的な方法で内分泌かく乱化学物質をスクリーニングする甲状腺機能の多段階モデル

These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 225544 (ATHENA), No. 825762 (EDCMT), No. 825758 (ENDPOINTS), No. 825753 (ERGO), No. 825400 (OBERON), No. 825493 (FREIA), No. 825768 (GOLIATH), No. 825752 (SCREENED). This content reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster www.eurion-cluster.eu 52

EURION Clusterの8つのグループの研究対象リストです。今後の研究の進展が期待されます。

ちなみに、井口はERGOグループに参加していますが、EUではないため、研究資金の配分はありません。



2021年1月28-29日に開催された、EURION ClusterのZoom会議の参加者の一部の写真です。  
ポスター発表も多くあり、活発な議論が行われました。総勢200人弱が参加しました。  
今後の研究の進展に注目してください。