

日本内分泌攪乱物質学会 第26回研究発表会

原点回帰 - What has been stolen? -

内分泌攪乱問題のきっかけとなった「Our stolen future」から約25年。
その間に我々は何を失い何を護ったか？

プログラム・抄録集



開催日：2024年**12月6日**(金)・**7日**(土)
会場：東京大学弥生キャンパス
中島董一郎記念ホール(東京都文京区)
実行委員長：鑓迫 典久 (国立大学法人愛媛大学)

<https://jsedr.org/A.html>



日本内分泌攪乱物質学会

日本内分泌攪乱物質学会 第 26 回研究発表会

開催概要

テ ー マ : 『原点回帰 - What has been stolen? - 』
開 催 日 : 2024年12月6日(金)・7日(土)
会 場 : 東京大学 弥生キャンパス 中島董一郎記念ホール
実行委員長 : 鑑迫 典久 (国立大学法人愛媛大学)

抄録集は Web でご欄いただけます。

<https://jsedr.org/abstract/>

ID: jsedr2024

Password: nakajimahall120607

日本内分泌攪乱物質学会第 26 回研究発表会 ご挨拶

「日本内分泌攪乱物質学会 第 26 回研究発表会」にご発表、ご参加いただいた皆様、誠にありがとうございます。本年も無事に開催できたことはひとえに、会員の皆様、ならびに関連分野でご活躍の研究・教育・行政・産業関係の方々のご支援の賜物と、心より感謝申し上げます。

本学会は発起から約 4 半世紀継続しておりますが、今回は 2 度の合同発表会を挟んで 3 年ぶりの単独開催となります。本年は場所、時期を東京近郊での 12 月に開催といった旧来の姿に拘り、テーマを『原点回帰 – What has been stolen? –』としました。昨年、鯉淵会長の下で、学会名を、『日本内分泌攪乱化学物質学会（通称：環境ホルモン学会）』から、『日本内分泌攪乱物質学会』に変更になりましたが、日本で唯一の内分泌攪乱物質に特化した学会として、改めて内分泌攪乱物質に関する科学的知見の深化と社会への貢献について見直してみたいという意図が込められています。そこで本分野の学術基盤の確立に多大な貢献をされた井口泰泉先生に基調講演をお願いしております。一方で内分泌攪乱物質に関連する課題は、多様な学術分野や産業・行政と深く関わりを持っております。またその作用機序が明らかではないが人類の健康や生態系に及ぼす新興物質の影響についての理解を深めることは、我々の責務であり、未来の世代により良い環境を引き継ぐための重要な使命でもあります。

本発表会では、この分野における最新の研究成果、アイデアや技術が一堂に会し、活発な議論を通じて新たな知見や課題解決の可能性が生まれることを期待しております。

最後に、本発表会の開催にあたり、多大なるご協力を賜りました関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

日本内分泌攪乱物質学会第 26 回研究発表会

実行委員長 鑓迫 典久

国立大学法人愛媛大学

日程表

12月6日(金)

12月7日(土)

9:30	9:30
10:00	受付開始
	10:00-10:10 開会あいさつ
10:30	10:10-11:10
	基調講演 『内分泌かく乱研究の33年： 歴史的背景と今後の方向性』 井口 泰泉先生
11:00	11:10-11:40 特別講演 1
11:30	高田 秀重先生
12:00	11:40-12:10 特別講演 2 『内分泌かく乱を今の視点からみる』 小林 亨先生
	12:10-13:10
13:00	ランチ
	13:10-14:22
13:30	一般演題1 『魚類への影響、毒性評価試験』 座長：宮川 信一先生 石塚 真由美先生
14:00	
14:30	休憩
	14:30-15:30
15:00	一般演題2 『毒性発現メカニズム 1』 座長：富永 伸明先生 川口 真以子先生
15:30	15:30-16:00
	ポスターセッション
16:00	16:00-18:00
16:30	シンポジウム 『日米の小児環境保健コホート 調査から見えること』 座長：戸高 恵美子先生 アイツバマイ ゆふ先生
17:00	

18:30- 懇親会 @玻璃家

9:15 開場	
9:30-12:00	セッション 『ヒト影響』 座長：菅野 純先生
12:00-13:00	ランチ
13:00-13:30	ポスターセッション
13:30-14:30	一般演題3 『毒性発現メカニズム 2』 座長：長江 真樹先生 池中 良徳先生
14:30-15:30	休憩
14:40-15:52	一般演題4 『次世代・継世代影響』 座長：渡部 春奈先生 江口 哲史先生
16:00-16:48	一般演題5 『話題提供』 座長：鯉淵 典之先生 宮崎 航先生
16:50-17:05	森田賞発表/閉会

プログラム

12月6日(金)

■基調講演 10:10-11:10

「内分泌かく乱研究の33年：歴史的背景と今後の方向性」

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)

■特別講演 1 11:10-11:40

「プラスチック条約とプラスチック関連化学物質」

○高田 秀重、水川 薫子(東京農工大学農学部)

■特別講演 2 11:40-12:10

「内分泌かく乱を今の視点からみる」

小林 亨(静岡県立大学食品栄養環境科学研究所)

■一般演題 1 「魚類への影響、毒性評価試験」 13:10-14:22

座長:宮川 信一(東京理科大学)

石塚 真由美(北海道大学大学院)

01-1 「メダカ拡張一世代繁殖試験(MEOGRT)によるリン酸トリフェニルの内分泌かく乱作用の評価」

○河合 兆治¹、三野 美都里¹、森田 隼平¹、佐藤 裕美¹、梅北 さあや¹、高橋 明歩¹、新倉 良之¹、大久保 博充¹、新野 竜大^{1,2}

(¹株式会社三菱ケミカルリサーチ ²三菱ケミカル株式会社)

01-2 「メダカを用いた魚類短期繁殖試験(FSTRA)による化学物質の内分泌かく乱作用の評価」

○三谷 郁佳¹、三野 美都里¹、森田 隼平¹、佐藤 裕美¹、河合 兆治¹、皆川 優作¹、高橋 明歩¹、新倉 良之¹、大久保 博充¹、新野 竜大^{1,2}

(¹株式会社三菱ケミカルリサーチ ²三菱ケミカル株式会社)

01-3 「メダカを用いた TRIAC の甲状腺ホルモンかく乱活性の in vitro、in vivo 評価」

○明正 大純^{1,2}、小林 亨^{1,2}

(¹静岡県立大学食品栄養科学部学部環境生命科学科、²静岡県立大学院薬食生命学府生態発生遺伝学研究室)

01-4 日本産メダカ 2 種雄の二次性徴発現比較～試験法利用種検討のための基礎的知見集積～

○長江 真樹¹、羽田 龍史²、小林 亨³、征矢野 清⁴、鑓迫 典久⁵、井口 泰泉⁶

(¹長崎大学総合生産科学研究科、²長崎大学環境科学部、³静岡県立大学食品栄養科学部、⁴長崎大学海洋イノベーション機構、⁵愛媛大学農学部、⁶横浜市立大学)

01-5 「Identification of ESR subtypes associated with testis-ova in male medaka」

○Kiwako Sato¹, Shuhei Murota¹, Hiraku Nakashima¹, Suika Shimizu¹, Yukiko Ogino², Taisen Iguchi³, Shinichi Miyagawa¹

(¹Department of Biological Science and Technology, Tokyo Univ. of Science, ² Attached Promotive Centre for International Education and Research of Agriculture,

Faculty of Agriculture, ³ Graduate School of Nano bioscience, Yokohama City Univ.)

- 01-6 「Risk assessment of killer whale (*Orcinus orca*) estrogen receptor signaling disruption by environmental pollutants: Application of *in vitro* approach」
○Dave Arthur R. Robledo¹, Takahito Kumagawa¹, Mari Ochiai¹, Hisato Iwata¹
(¹Laboratory of Environmental Toxicology, Center for Marine Environmental Studies (CMES), Ehime Univ., Matsuyama, Ehime, Japan)

■一般演題 2 「毒性発現メカニズム 1」 14:30-15:30

座長: 富永 伸明 (有明工業高等専門学校)
川口 真以子 (明治大学)

- 02-1 「授乳期におけるペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) 曝露は中年期オスマウスの脳機能に対する潜在的なリスクとして残存する」
○二ノ宮 彩音¹、天野 出月¹、鈴木 啓¹、藤原 悠基¹、薮島 旭²、鯉淵 典之¹
(¹群馬大学医学系研究科応用生理学分野、²京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設)
- 02-2 「PFOS および PFOA による Neuro-2a 細胞の神経突起形態への影響評価」
○太田 莉々香¹、藤原 悠基²、二ノ宮 彩音²、勅使河原 芳三郎¹、天野 出月²、鯉淵 典之²
(¹群馬大学医学部医学科、²群馬大学大学院医学系研究科応用生理学)
- 02-3 「PFOS は甲状腺ホルモン変換酵素 DI02 を介して神経突起形成を阻害する」
○藤原 悠基¹、宮坂 勇平²、二ノ宮 彩音¹、天野 出月¹、宮崎 航³、鯉淵 典之¹
(¹群馬大学大学院医学系研究科応用生理学、²群馬大学重粒子医学センター、³弘前大学大学院保健学研究科生体検査科学領域)
- 02-4 「メダカに対する PFAS のエストロゲン様作用: *in silico* および *in vivo* による評価」
○石橋 弘志¹、松原 健太¹、長谷川 拓人¹、内田 雅也²、富永 伸明²、有薊 幸司³、平野 将司⁴ (¹愛媛大学農学部、²有明高専創造工学科、³熊本大学薬学教育部、⁴東海大学農学部)
- 02-5 「アユの遊泳に及ぼす環境医薬品の影響」
○中井 さくら¹、小田 紗帆¹、薮平 裕次²、井原 賢²、中田 典秀³、宮川 信一⁴、
長江 真樹¹、村田 良介^{1,5}、天谷 貴史⁵、征矢野 清^{1,5}
(¹長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科、²高知大学農林海洋科学部、³神奈川大学化学生命学部、⁴東京理科大学先進工学部、⁵長崎大学海洋未来イノベーション機構)

■シンポジウム 「日米の小児環境保健コホート調査から見えること」

16:00-18:00

座長: 戸高 恵美子 (千葉大学予防医学センター)

アイツバマイ ゆふ (北海道大学 環境健康科学研究教育センター)

- SY-1 「子どもの健康と環境に関する全国調査 (エコチル調査)」
山本 緑 (千葉大学予防医学センター)

- SY-2 「胎児期の有機フッ素化合物曝露による子どもの健康影響を考える

アイツバマイ ゆふ（北海道大学 環境健康科学研究教育センター）

SY-3 「父方の健康と疾病の起源 (POHaD) と環境化学物質への曝露との関連性」
坂部 貢（千葉大学予防医学センター山田養蜂場寄附研究部門特任教授）

SY-4 「US Children's Environmental Health Cohort Studies and their Contributions」
レベッカ・J・シュミット教授
（カリフォルニア大学デービス校医学部 MIND 研究所公衆衛生科学部）

12月7日(土)

■セッション「ヒト影響」 9:30-12:00

座長：菅野 純（国立医薬品食品衛生研究所）

SS-1 「ネオニコチノイド-ヒトへの影響の現状と今後」
平 久美子（東京女子医科大学附属足立医療センター 麻酔科）

SS-2 「自閉スペクトラム症関連遺伝子 AUTS2 によるクロマチン修飾、遺伝子発現、および
神経細胞発達の制御」
○星野 幹雄、嶋岡 可純（国立精神神経医療研究センター神経研究所 病態生化学研究部）

SS-3 「無毒性量 (NOAEL) に潜む農薬類による高次脳機能攪乱と発達神経毒性」
平野 哲史（富山大学 研究推進機構 生命科学先端研究支援ユニット/富山大学 学術研究部
薬学・和漢系）

SS-4 「周産期の甲状腺ホルモン系の攪乱による発達神経毒性」
天野 出月（群馬大学大学院医学系研究科 応用生理学分野）

SS-5 「周産期マウスへの化学物質曝露による遅発性情動・認知行動毒性の検出」
齊藤 洋克（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部）

■一般演題3「毒性発現メカニズム2」 13:30-14:30

座長：長江 真樹（長崎大学）
池中 良徳（北海道大学院）

03-1 「フィプロニル代謝物が誘導するミクログリアの活性化とニューロンとの相互作用の
攪乱機序の解析」
○平野 哲史¹、池中 良徳²、星 信彦³、田渕 圭章¹
（¹富山大学 研究推進機構 生命科学先端研究支援ユニット、²北海道大学 One Health リサ
ーチセンター、³神戸大学大学院 農学研究科 応用動物学講座 動物分子形態学分野）

03-2 「The Challenge of Evaluating Neurotoxicity Using High-Resolution Mass
Spectrometry」
○Yoshinori IKENAKA^{1, 2}, Tomoya KOIKE², Akifumi EGUCHI³, Kei NOMIYAMA⁴, Collins
NIMAKO^{1, 2}, Yared BEYENE^{1, 2}, Shouta M.M. NAKAYAMA², Mayumi Ishizuka²
（¹One Health Research Center Hokkaido Univ., ²Faculty of Veterinary Medicine,
Hokkaido Univ., ³Division of Environmental Preventive Medical Sciences Chiba Univ.,

⁴ Center for Marine Environmental Studies Ehime Univ.)

- 03-3 「iPS 細胞、ゼブラフィッシュ胚を用いた BPA によるレチノイン酸シグナル促進効果の解析」
○高田 達之¹、西江 友美¹、田屋 智貴¹、大森 駿一¹、澤部 美咲¹、高橋 美羽¹、日比 正彦²、上野 賢也³、平澤 明³ (¹立命館大学薬学部・創薬科学科、²名古屋大学大学院理学研究科・生命理学、³京都大学大学院薬学研究科・薬理ゲノミクス)
- 03-4 「レチノイン酸シグナルが制御する精上皮周期に着目した精巣毒性評価」
○横田 理^{1,2}、齊藤 洋克¹、若山 友彦²、北嶋 聡¹
(¹国立医薬品食品衛生研究所・毒性部、²熊本大学大学院・生命科学研究部)
- 03-5 「エピジェネティックなメカニズムを介した発生毒性発現機構：
ヒト多能性幹細胞を用いた bisphenol A と thalidomide の比較解析」
○大塚 悟史¹、曾根 秀子²
(¹東京大学大学院医学系研究科、²横浜薬科大学大学院薬学研究科)

■一般演題 4「次世代・継世代影響」

14:40-15:52

座長：渡部 春奈（国立研究開発法人国立環境研究所）
江口 哲史（千葉大学予防医学センター）

- 04-1 「ネオニコチノイドなど農薬再評価の進捗状況について」
木村一黒田 純子（環境脳神経科学情報センター）
- 04-2 「クロチアニジン父性曝露による精子 microRNA の発現変動と神経行動学的な次世代影響」
○伊藤 慎子¹、布引 沙利香¹、吉本 彩乃¹、万谷 洋平¹、横山 俊史¹、平野 哲史²、池中 良徳³、星 信彦¹ (¹神戸大学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座、²富山大学生命科学先端研究支援ユニット、³北海道大学 One Health リサーチセンター)
- 04-3 「ネオニコチノイド系農薬クロチアニジンの無毒性量 (NOAEL) 曝露による母性行動への継世代影響」
○布引 沙利香¹、伊藤 慎子¹、吉本 彩乃¹、森下 理奈子¹、万谷 洋平¹、横山 俊史¹、平野 哲史²、池中 良徳³、星 信彦¹
(¹神戸大学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座、²富山大学生命科学先端研究支援ユニット、³北海道大学 One Health リサーチセンター)
- 04-4 「マウスにおけるフェニルピラゾール系農薬フィプロニルの胎子・新生子期曝露の次世代影響」
○吉本 彩乃¹、伊藤 慎子¹、布引 沙利香¹、万谷 洋平¹、横山 俊史¹、平野 哲史²、池中 良徳³、星 信彦¹
(¹神戸大学大学院 農学研究科 応用動物学講座、²富山大学生命科学先端研究支援ユニット、³北海道大学 One Health リサーチセンター)
- 04-5 「Comparison of Analytical Methods for Assessing the Combined Exposure Effects of Chemical Mixtures」
○Akifumi Eguchi¹、Kohki Takaguchi¹、Takayuki Kawashima²、Hiroko Nakaoka¹、Kayo Yoda-Tsumura¹、Keiichi Shimatani¹、Yoshitake Nakayama¹、Chisato Mori¹、Norimichi Suzuki¹ (¹Center for Preventive Medical Sciences, Chiba Univ., Chiba ²School of Computing, Institute of Science Tokyo, Tokyo)
- 04-6 「有機フッ素化合物による肝線維化誘導メカニズムの解明」
○宮崎 航^{1,2}、佐藤 詩織³、武内 春花³、近江 穂香³、櫻木 青¹、宮崎 光江^{1,2}

(¹弘前大学大学院保健学研究科生体検査科学領域、²弘前大学大学院保健学研究科生体応答科学研究センター、³弘前大学医学部保健学科)

■一般演題 5「話題提供」 16:00-16:48

座長：鯉淵 典之（群馬大学大学院）
宮崎 航（弘前大学大学院）

05-1 「因果推論の科学の手法の適用により、小・中・高校生の暴力行為の発生は、
ネオニコチノイド系農薬が主要原因であることを示す事を試みる。」
○橋本 正則（MS パフォーマンス研）

05-2 「エピジェネティック毒性学の確立を目指して」
○澁谷 徹¹、堀谷 幸治¹、藤野 紘² (¹環境エピジェネティクス研究所, ²水俣協立病院)

05-3 「継世代エピジェネティック遺伝と CCCTC 結合因子」
○堀谷 幸治、澁谷 徹（環境エピジェネティクス研究所）

05-4 「環境ホルモン学会（正称：日本内分泌攪乱物質学会）の歴史：設立期からの覚書」
黒田 洋一郎（環境脳神経科学情報センター）

プログラム(ポスター)

コアタイム：12月6日(金) 15:00-15:30

12月7日(土) 13:00-13:30

-
- P-1 pGL4.23 はアンドロゲン受容体のレポーターベクターとして機能する
○梶山 尊、金崎 康平、中村 圭太、香西 丈一郎、松島 綾美
(九州大学大学院理学研究院化学部門)
- P-2 Does an AhR antagonist cause changes in maternal behavior?
Nobuki Murata¹, Kazutoshi Sugita¹ Wataru Yoshioka¹
(¹Department of Veterinary Medicine, Azabu University)
- P-3 マウス外生殖器のホルモン環境と形態学的変化との関連
是永 悠貴¹、石川 真湖¹、溝口 ひかり¹、田中 恒星¹、豊田 賢治²宮川 信一¹
¹東京理科大学・大学院先進工学研究科、²広島大学・大学院統合生命科学研究科
- P-4 Toxics of sulfoxaflo to testis in mice
Hayato Terayama^{1, 2}, Kou Sakabe¹, Daisuke Kiyoshima², Kenta Nagahori²,
Tsutomu Sato^{2, 3}, Akifumi Eguchi⁴, Midori Yamamoto⁴, Miyuki Tonna¹, Emiko Todaka^{4, 5},
Kenichi Sakurai⁴, Chisato Mori^{4, 5}
(¹Department of Environmental Preventive Medicine, Yamada Bee Company, Inc.,
Centre for Preventive Medical Sciences, Chiba University, ²Department of Anatomy,
Division of Basic Medical Science, Tokai University School of Medicine, ³Louis
Pasteur Center for Medical Research, ⁴Centre for Preventive Medical Sciences,
Chiba University, ⁵Department of Bioenvironmental Medicine, Graduate School of
Medicine, Chiba University)
- P-5 3-methyl-4-nitro-phenol の新生仔期曝露が雌ラットの性選好性・生殖能力に与える影響
○中村 優大¹、岩田 汐央¹、前田 侑輝拓²、林 実里²、金丸 颯²、武藤 里加子²、堤 恋
結²、渡辺 元^{1, 3}、近藤 保彦⁴、柳澤 利枝⁵、川口 真以子^{1, 2}
(¹明治大学大学院農学研究科、²明治大学農学部、³明治大学研究・知財戦略機構
⁴帝京科学大学生命環境学部、⁵国立研究開発法人国立環境研究所環境リスク・健康領域)
- P-6 内分泌かく乱化学物質のスクリーニング評価における子宮肥大試験の継続的な取り組み
○五十嵐 智女¹、相田 麻子¹、横田 理¹、西村 拓也¹、高橋 祐次¹、桑形 麻樹子^{1, 2}、
北嶋 聡¹
(¹国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部、²帝京平成大学 健康
医療スポーツ学部)
- P-7 紫外線吸収剤がヒト乳がん細胞の遺伝子発現に及ぼす影響
○久留戸 涼子¹、玉井 朝陽¹、桑原 良汰²、山田 建太³、大浦 健⁴
(¹常葉大学教育学部、²磐田市立神明中学校、³常葉大学社会環境学部、⁴名城大学農学部)
- P-8 カプセル化された内分泌攪乱物質の生態影響評価
○兼藤 亮太郎¹、岡崎 友紀代²、鎌迫 典久² (¹愛媛大学農学部、²愛媛大学大学院農学研究科)
- P-9 ケーシング手法を用いた愛媛県内の河川における内分泌かく乱物質の実態調査

○小滝 優弥¹、岡崎 友紀代²、石橋 弘志²、高橋 真²、鑓迫 典久²
(¹愛媛大学農学部、²愛媛大学農学研究科)

P-10 エストロゲン第 I 相代謝物の鶴見川流域における存在実態把握
○天野 来紀¹、野本 大輔²、村瀬 渉³、小島 弘幸³、高田 秀重⁴、中田 典秀⁵
(¹神奈川大学大学院工学研究科、²神奈川大学工学部、³北海道医療大学薬学部、⁴東京農工大学農学部、⁵神奈川大学化学生命学部)

P-11 甲状腺ホルモンかく乱化学物質による新規有害影響の探索：
両生類における雌雄性への影響
○熊倉 正彦¹、明正 大純²、小林 亨²
(¹日本歯科大学新潟生命歯学部解剖第2、²静岡県立大学環境生命)

P-12 化学物質の甲状腺ホルモン (TH) かく乱活性の *in vivo* 検出：
エストロゲンによる vtg 誘導は TH 依存性である—メダカと *Xenopus*—
○小林 亨¹、杉島 友美¹、明正 大純¹(¹静岡県立大学環境生命)

P-13 TRIAC とエストロゲンのメダカ胚への共曝露は脊椎骨の異常な形成を誘導する
明正 大純^{1,2}、○加藤 柚月¹、小林 亨^{1,2}
(¹静岡県立大学食品栄養科学部学部環境生命科学科、²静岡県立大学院薬食生命学府生態発生遺伝学研究室)

P-14 「マイクロカプセルを用いたメダカへの経口曝露の評価」
○米山宙舞¹、岡崎友紀代²、鑓迫典久²
(¹愛媛大学農学部、²愛媛大学大学院農学研究科)

P-15 メダカ胚による高感度エストロゲン作用評価法
○岩切 悠¹、内田 雅也¹、有菌 幸司²、富永 伸明¹
(¹有明工業高等専門学校創造工学科、²熊本大学薬学教育部)

P-16 環境医薬品のメダカに対する分子応答解析
○西村 優佳¹、宮川 信一¹ (¹東京理科大学大学院 先進工学研究科)

P-17 メダカ TR における甲状腺ホルモンかく乱の影響評価
○中村 文音¹、國行 亜紀¹、鈴木 潮音²、豊田 賢治³、井口 泰泉⁴、宮川 信一^{1,2}
(¹東京理科大学 大学院先進工学研究科、²東京理科大学 先進工学部、³広島大学 大学院統合生命科学研究科、⁴横浜市立大学 大学院生命ナノシステム科学研究科)

P-18 Analysis of the effects of environmental pharmaceuticals on aquatic organisms
Renji Kaneko, Ayaka Morinaga, Yuka Nishimura, Honda Kikuko, Shinichi Miyagawa
(Graduate School of Advanced Engineering, Tokyo University of Science)

P-19 ミルタザピンとクロルプロマジン塩酸塩がボラの行動と遺伝子発現に与える影響
○高山 師温¹、亀飼 耕平²、長江 真樹¹、征矢野 清^{1,2}
(¹長崎大学大学院水産・環境総合研究科、²長崎大学海洋未来イノベーション機構)

P-20 未成熟アユにおける 17- α メチルテストステロンによる黒色素胞への影響
國岡 遼、○蒔平 裕次 (高知大学農林海洋科学部)

- P-21 ネオニコチノイド系農薬が海産甲殻類アミ *Americamysis bahia* の繁殖に及ぼす影響評価
 ○井上 綾乃¹、内田 雅也¹、平野 将司²、富永 伸明¹、有菌 幸司³、石橋 弘志⁴
 (¹有明工業高等専門学校創造工学科、²東海大農学部食生命科学科、³熊本大学薬学教育部、⁴愛媛大学大学院農学研究科)
- P-22 オオミジンコを用いた抗幼若ホルモン作用スクリーニング試験法の開発
 ○小田 悠介¹、渡部 春奈¹、山本 裕史¹(¹国立環境研究所 環境リスク・健康領域)
- P-23 オオミジンコの脱皮数およびキトビアーゼ活性を用いた脱皮ホルモン作用の検出
 ○渡部 春奈¹、阿部 良子、小田 悠介¹、山本 裕史¹
 (¹国立環境研究所 環境リスク・健康領域)
- P-24 アミ類における有機ハロゲン化合物の毒性影響と QSAR モデルによる毒性評価
 ○平野 将司¹、内田 雅也²、有菌 幸司³、石橋 弘志⁴
 (¹東海大学農学部、²有明高専創造工学科、³熊本大学薬学教育部、⁴愛媛大学大学院農学研究科)
- P-25 New approach methodologies (NAMs) for assessing killer whale (*Orcinus orca*)
 estrogen receptor activation by environmental pollutants
Dave Arthur R. Robledo, Takahito Kumagawa, Mari Ochiai, Hisato Iwata
 (*Laboratory of Environmental Toxicology, Center for Marine Environmental
 Studies (CMES), Ehime University, Matsuyama, Ehime, Japan*)
- P-26 鯨類線維芽細胞を用いたダイオキシン曝露による CYP1A1 誘導能の種差の評価
 ○濱元 明来¹、落合 真理¹、森田 浩平¹、山中 陽なた¹、岩田 久人¹
 (¹愛媛大学 沿岸環境科学研究センター)

基調講演 12 月 6 日(金) 10:10-11:10

特別講演 1 12 月 6 日(金) 11:10-11:40

特別講演 2 12 月 6 日(金) 11:40-12:10

シンポジウム

『日米の小児環境保健コホート調査から見えること』

12 月 6 日(金) 16:00-18:00

セッション 『ヒト影響』

12 月 7 日(土) 9:30-12:00

内分泌かく乱研究の 33 年：歴史的背景と今後の方向性

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

Colborn によるウイングスプレッド会議(1991)に続き、内分泌かく乱物質への対処を話し合う会議(1996, 1997)が開催され、各国および WHO、UNEP、OECD でも取り組みが始まった。歴史的には、妊馬の尿からのエストロゲン(1928)、女性ホルモン (E1) の発見 (1929)、DES の合成 (1938)、カビ毒 (1928) やクローバーなどからのエストロゲン類似物質(1946)による家畜の不妊、DES 混入餌によるマウスの不妊や DES のビタミン剤への混入(1950)、DES の経胎盤暴露によるヒトの膣癌の発見(1971)、McLachlan による「環境エストロゲン会議」(1979, 1985, 1994)が知られている。日本の環境庁ー環境省は 1998 年から、“内分泌かく乱物質”と思われる物質の環境濃度の測定に続き、魚類(メダカ)、両生類(アフリカツメガエル)、無脊椎動物(オオミジンコ)を用いた内分泌かく乱物質の試験法を OECD の試験法として作成してきた。環境省では日本の環境調査で検出された物質について、文献調査を行い、信頼できる文献から、ホルモン作用(エストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン、脱皮ホルモン、幼若ホルモン)、ホルモン合成への影響の有無などを整理し、試験を行う物質を選定し、*in vitro*試験、OECD の短期 *in vivo*試験の結果の総合判断により、長期 *in vivo*確定試験を行っている。33 年に渡る内分泌かく乱研究の流れ、問題点を簡単に概観する。面白そうな研究のヒントが得られれば幸いです。

33 Years of Endocrine Disruption Research: Historical Background and Future Directions

Taisen Iguchi

Graduate School of Nonobioscience, Yokohama City University

Following the Wingspread Conference (1991) organized by Colborn, conferences were held (1996, 1997) to discuss how to deal with endocrine disruptors (EDs), and efforts were started in various countries, WHO, UNEP, and OECD. Historically, some well-known events include the discoveries of estrogen in pregnant mares' urine (1928), estrone (E1) (1929), the synthesis of DES (1938), livestock infertility by 'mycoestrogen' (1928) and phytoestrogen from clover (1946), mouse infertility by DES-contaminated feed and DES contamination in vitamins (1950), the discovery of vaginal cancer in women by transplacental exposure to DES (1971). The "Estrogens in the Environment" Conferences (1979, 1985, 1994) were held by McLachlan. In 1998, the Environment Agency/MOE measured suspected "EDs" in the environment, and started to establish test methods for EDs using *Oryzias latipes*, *Xenopus laevis*, and *Daphnia magna* as OECD test methods. The MOE is selecting substances detected in the environmental surveys using the information from the reliable literatures concerning hormonal actions (estrogen, androgen, thyroid hormone, molting hormone, juvenile hormone), and effects on hormone synthesis, and performing long-term *in vivo* definitive tests based on a comprehensive judgment of the results of *in vitro* screening and short-term *in vivo* tests. This is a brief overview of the trends and problems in EDs research over the past 33 years.

特別講演 1

プラスチック条約とプラスチック関連化学物質

○高田秀重¹、水川薫子¹

¹ 東京農工大学農学部

大量に生産されたプラスチックの大部分は埋立地に埋められるか、野外に放置されている。埋めた立てられている廃プラスチックはポリマーやモノマーと添加剤の汚染源となり、河川や地下水の内分泌攪乱化学物質汚染を招いている。野外に放置された廃プラスチックは紫外線による微細化を受けながら土壌、大気、水域の汚染を招いている。これらの環境中に漏出したプラスチックを直接・間接的に摂食することから人間も含む生物のプラスチック汚染が深刻化している。このような状況を改善するため、国際プラスチック条約が制定されようとしている。国際プラスチック条約制定に向けて、廃棄物管理、資源循環、気候変動の視点と共に、化学汚染の観点、特に人への影響の観点から議論が行われている。マイクロ/ナノプラスチックについては、ポリマーの分子量と疎水性から考えて生体組織中や組織間での移動性は低く、食物連鎖を通じた生物濃縮は限定的である可能性ある。一方、プラスチック関連化学物質（添加剤、非意図的反応産物、モノマー）については、人体前から検出例も多く、疫学調査のメタ解析、さらにそれらをまとめたレビューから、フタル酸エステル、ビスフェノール A、臭素化ジフェニルエーテル等のプラスチック関連化学物質が人間の健康に悪影響を与えていると結論づけている。しかしこれらの疫学調査では、異なるホルモン受容体との結合能を持つ化学物質が複合的に作用する機構については議論されていない。異なる作用機序を持つ複数の化学物質の低濃度曝露による複合影響を、総合的に評価する手法の開発が求められる。

The Plastic Treaty and Plastic Chemicals

Hideshige Takada¹, Kaoruko Mizukawa¹

¹*Laboratory of Organic Geochemistry (LOG), Faculty of Agriculture,
Tokyo University of Agriculture and Technology*

Because of wide-spread pollution with plastics and associated chemicals (monomer, additives, processing aids, and non-intentionally added substances) in the environments, wild life and human being have been impacted by plastics and plastic chemicals. To mitigate and reduce their pollution, the Plastic Treaty was proposed in 2022 and has been under international negotiation processes. Plastic issue has been discussed in terms of impacts of plastic chemicals on organisms, especially on human health as well as resource-circularity, waste-management and climate change. Bioaccumulation of micro-/nano-plastics through food-web might be limited due to their less movability within/among biological tissues because of their higher molecular weight. On the other hand, bioaccumulation of plastic chemicals has been widely demonstrated and most recent review (An Umbrella Review of Meta-Analyses Evaluating Associations between Human Health and Exposure to Major Classes of Plastic-Associated Chemicals by Symeonides et al. (2024) concluded that exposure to plastic-associated chemicals (i.e., phthalates, bisphenol A, and polybrominated-diphenyl ethers : PBDEs) is associated with adverse outcomes across a wide range of human health domains. Mechanistical approach to integrate adverse outcomes of different classes of chemicals (e.g., chemicals with different binding affinity to different hormone receptors) should be developed in future studies.

特別講演 2

内分泌かく乱を今の視点からみる

○小林 亨

静岡県立大学食品栄養環境科学研究所

内分泌かく乱とは、大別すると化学物質が以下に示すような作用を示すことをいう：ホルモン様作用（促進作用、アゴニスト）、ホルモン阻害作用（阻害作用、アンタゴニスト）、ホルモンの合成・代謝を促進・阻害、受容体の数に影響、ホルモン量の調節に影響（フィードバック阻害）。これらは、ホルモン量、ホルモン作用による表現型、合成・代謝系の遺伝子発現・遺伝子産物の活性、受容体遺伝子・タンパク量、を指標（エンドポイント）として化学物質の量（濃度）との相関性から、そのポテンシャルが評価されてきた。さらに、そのポテンシャルともたらされる表現型との相関性から、有害性の影響評価をしてきている。

内分泌かく乱が認識されてから四半世紀を過ぎ、物質や分子生物学的情報の蓄積から、化学物質が複数のホルモン作用のエンドポイントに影響を示す場合や、受容体のサブタイプの存在、さらに別の受容体によるシグナリングの存在等が明らかになり、評価の方法も再検証する時期なのかもしれない。また、最近のゲノム編集技術により、哺乳類以外の動物でも容易に遺伝子欠損変異体の解析ができることになったことから、ホルモンシグナリングの欠損からその影響を明らかにし、それを基に評価系の再構築も可能となっている。このような観点から明らかになりつつある最近の事例について紹介したい。

A Current Perspective on Endocrine Disruption

Tohru Kobayashi

Institute for Environmental Sciences, University of Shizuoka

Endocrine disruption broadly refers to the following effects of chemical substances: hormone-like effects (agonists), hormone-disrupting effects (antagonists), promoting or inhibiting hormone biosynthesis and metabolism, affecting the number of receptors, and affecting the regulation of hormone levels (feedback). The potential of chemicals has been evaluated based on their correlation with the amount (concentration) of the chemical substance, hormone levels, hormone-dependent phenotype, mRNA and protein activity of the gene involved in the synthesis and metabolism system, and receptor gene and protein levels as indicators (endpoints). In addition, adverse effects have been evaluated based on the correlation between the potential and phenotype caused by the chemical.

Since a quarter of a century has passed since endocrine disruption was first recognized, information, including new evidence, has accumulated, for example, a chemical substance affects multiple hormonal action endpoints and the existence of other receptors in addition to receptor subtypes. Therefore, it is necessary to reconsider the evaluation methods for endocrine disruption. Additionally, genome editing has made it possible to easily analyze non-mammalian animals, including aquatic vertebrates. Consequently, it is possible to clarify the effects of hormone signaling from defects and to reconstruct an evaluation system based on these findings. Here, I talk about some recent examples that are becoming clear from this perspective.

シンポジウム

『日米の小児環境保健コホート調査から見えること』

12月6日(金) 16:00-18:00

シンポジウム

シンポジウム「日米の小児環境保健コホート調査から見えること」

戸高恵美子¹、山本緑¹、アイツバマイゆふ²、坂部貢³、レベッカ・シュミット⁴

¹千葉大学予防医学センター、²北海道大学環境健康科学研究教育センター、

³千葉大学予防医学センター山田養蜂場寄附研究部門、⁴米国カリフォルニア大学デイビス校

日本の環境省による「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」は、胎児期及び小児期の環境要因、特に化学物質への曝露が子どもたちの健康や発達にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした出生コホート調査である。2011年～2014年に10万組の母子と約半数の父親を登録し、追跡を続けている。現在、調査参加児の年齢は9歳～13歳で、参加継続率は90%を超える。全体調査では、質問票調査、医療機関診療記録、および生体試料（血液、尿、臍帯血、母児の毛髪、母乳、乳歯）により、生活環境、生活習慣、社会経済、遺伝要因に関する情報を収集し、小学2年・6年時の対面式調査で身体発育と発達の評価、尿等の収集を行っている。5%の参加児を対象とする詳細調査は、室内外の環境調査のほか、医学的検査、精神神経発達検査を対面で実施している。米国のMARBLES（Markers of Autism Risk in Babies: Learning Early Signs）研究は、自閉症スペクトラム障害（ASD）の児の弟妹に関する前向きコホートとして2006年に始まった。550人以上の妊娠を登録し、妊娠中、出産時、出生後のフォローアップ中に定期的に28,000を超える生物学および環境標本を収集し、環境曝露、病歴、食事、ライフスタイルに関する包括的なデータを取得し、メチル化、発現、免疫、栄養素、および汚染物質マーカーを測定する。また、US National ECHO（Environmental influences on Children's Health Outcomes）Programは、国立衛生研究所が資金提供する大規模コホート研究であり、周産期、呼吸器、肥満、神経発達、および子供の良好な健康に焦点を当てた、共通の研究データと生物試料収集プロトコルに従って、新しい妊娠を含む50,000人以上の子供を登録する予定である。本シンポジウムでは、日米の小児環境保健コホート調査を比較し、将来世代の健康増進のために何を明らかにしどう協働できるかを探る。

プログラム

座長：戸高恵美子、アイツバマイゆふ

講演1：子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）

山本緑

講演2：出生前PFAS曝露による健康影響

アイツバマイゆふ

講演3：父方の健康と疾病の起源（POHaD）と環境化学物質への曝露との関連性

坂部貢

講演4：US Children's Environmental Health Cohort Studies and their Contributions

Professor Rebecca J. Schmidt

パネルディスカッション

子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）

○山本 緑¹

¹ 千葉大学予防医学センター

環境省が実施する「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」は、胎児期及び小児期の環境要因、特に化学物質への曝露が子どもたちの健康や発達にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした出生コホート調査である。2011年～2014年に10万組の母子と約半数の子どもの父親を登録し、追跡を続けている大規模調査として国際的にも注目されている。現在、調査参加児の年齢は9歳～13歳で、参加継続率は90%を超える。当初の基本計画では12歳までの調査を計画していたが、専門家会合において40歳程度まで続ける必要性が提言され、13歳以降も調査を継続することとなった。国立環境研究所（コアセンター）が国立成育医療研究センター（メディカルサポートセンター）および全国15地域の大学等に置かれるユニットセンターと共同で調査を実施している。全体調査では、質問票調査、医療機関診療記録、および生体試料（血液、尿、臍帯血、母児の毛髪、母乳、乳歯）により、生活環境、生活習慣、社会経済、遺伝要因に関する情報を収集し、小学2年・6年時の対面式調査で身体発育と発達の評価、尿等の収集を行っている。5%の参加児を対象とする詳細調査は、室内外の環境調査のほか、医学的検査、精神神経発達検査を対面で実施している。エコチル調査の原著論文数は400編を超え、化学物質曝露やそれ以外の環境要因と児の健康に関する成果が多数発信されている。本発表では、エコチル調査の概要とともに、妊娠中の化学物質曝露の児への影響に関する成果をいくつか紹介する。

The Japan Environment and Children's Study (JECS) – Background, Updates, and Future Perspectives

Midori Yamamoto

Center for Preventive Medical Sciences, Chiba University, Japan

Led by the Ministry of the Environment, the Japan Environment and Children's Study (JECS) is a birth cohort study, aiming to elucidate environmental factors, particularly early-life chemical exposures, and their impact on children's health and development. JECS boasts over 100,000 mother-child dyads and about half of their fathers registered in its Main Study between 2011 and 2014. The children are now aged 9-13, and the retention rate exceeds 90%. The Ministry now extended the follow-up period from age 13 to around 40 years old. The Program Office and the Medical Support Center collaboratively oversee 15 Regional Centers throughout Japan, conducting the study in their respective region. The Main Study involves biospecimen collection (blood/urine/cord blood/hair/breast milk/baby teeth), medical records, and questionnaires to collect environmental, genetic, social, and lifestyle information. Medical examination, developmental assessments, and blood/urine collection are conducted in the face-to-face check-ups at age 6 and 12 years. The Sub-Cohort Study, comprising 5% of the Main Study participants, involves environmental sampling and medical and developmental assessments. The JECS Group has contributed to the publication of over 400 papers, investigating various topics including the association between maternal/child health and chemical exposures and other environmental factors. This presentation will introduce an overview and some findings of JECS.

SY-2

胎児期の有機フッ素化合物曝露による子どもの健康影響を考える

○アイツバマイ ゆふ¹

¹北海道大学 環境健康科学研究教育センター

有機フッ素化合物 (PFAS) は撥水・撥油性に優れ日用品や産業用に汎用される合成化学物質である。しかし、分解されにくく環境や人体への蓄積が懸念されることから「Forever Chemical」と呼ばれている。動物実験では、PFOS と PFOA のげっ歯類への免疫調節効果が示唆され、疫学研究では、アレルギー罹患リスクやワクチン抗体価との負の相関、また、感染症リスクとの正の関連が報告され、PFAS の免疫系への影響が示唆されている。しかし、動物実験は高濃度の曝露レベルであることや、疫学研究が非常に限定限られていることから、免疫抑制効果を結論づけるには科学的知見が不十分であるとされている。環境省「エコチル調査」は、2011 年に始まった日本最大規模の出生コホート研究である。PFAS は新興化学物質「chemical of emerging concern」としてその影響が世界的に懸念されているものの、日本人集団における PFAS に関する科学的知見は未だ限られている。エコチル調査では、約 25,000 人の妊婦を対象に 2011 年から 2014 年に採取された母体血漿から計 28 種類の PFAS 濃度を測定した。現在は、母の妊娠中の PFAS 濃度と子どもの健康アウトカムとの関連について解析が進んでおり、主に 1 歳から 4 歳までの調査票や一部は医師による診断に基づき収集した 4 歳までの健康アウトカム（子どもの成長、神経発達、アレルギーなど）との関連が既に発表されている。本発表では、エコチル調査で明らかになった胎児期の PFAS 曝露と子どもの健康影響に関する最新の知見を紹介する。

Prenatal exposure to PFAS and health outcomes among Japanese children

Yu Ait Bamai¹

¹ Center for Environmental Health Sciences, Hokkaido University

Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) are synthetic chemicals that are widely used in many industrial and household products. Several epidemiological studies have reported that exposure to PFAS was associated with the immune system, such as the prevalence of asthma, allergies, infectious diseases, and levels of cytokines and vaccine antibodies. However, the current evidence was considered insufficient to conclude immuno-suppressive effects of PFAS due to very high exposure levels in *in vitro* experiments and unclear findings as endpoints for the risk assessment. Japan Environment and Children's Study (JECS) is the largest nationwide birth cohort study in Japan, that was established in 2011. Very limited scientific evidence on PFAS in the Japanese population has been reported, despite PFAS being a chemical of emerging concern. In JECS, we investigated exposure levels of PFAS among approximately 25,000 pregnant women. Total 28 PFAS were measured from maternal plasma collected from 2011 to 2014. Prenatal exposure to PFAS was investigated in association with birth outcomes, child growth, neurodevelopment, asthma and allergies, and infectious diseases up to 4 years old. Information on children including health outcomes were mainly collected by guardian-self-reported questionnaires from 1 year to 4 years old. Some specific diseases such as Kawasaki Disease (KD) was further evaluated by confirming diagnoses with physicians.

SY-3

父方の健康と疾病の起源 (POHaD) と環境化学物質への曝露との関連性

坂部 貢

千葉大学予防医学センター山田養蜂場寄附研究部門特任教授

母親側の種々の環境要因と小児発達期の健康障害との関連性 (DOHaD) については国内外で広く研究されているが、一方で、父親側の健康と環境化学物質曝露 (POHaD) との関連性については、これまであまり注目されて来なかった。最近の研究では、父親の高齢化が、主に精子の DNA メチル化に変化を与え、エピジェネティックな影響を通じて、小児の発達遅延や自閉症スペクトラム障害 (ASD) に関連していること等が示唆されている。しかしながら、日常的に遭遇する環境化学物質への父親の曝露がもたらす影響については、まだ十分に解明されていない。一部の研究では、父親の職業性曝露が先天異常や小児がんのリスク増加と関連していることが示されているが、これらの研究は主に毒性学的レベルでの影響に焦点を当てている。そこで我々は、ここ数年来、ネオニコチノイド系殺虫剤の低用量曝露に着目し、たとえ低用量であってもネオニコチノイドへの曝露が精子機能やテストステロンレベルに影響を与えることを動物実験によって示している。今回の発表では、これまでの動物実験の結果を振り返り、環境省子どもの健康と環境に関する全国調査 (エコチル調査) 追加調査で進めている約 100 名の父親の血液中のネオニコチノイド濃度の測定結果をもとに、次世代の健康に及ぼす可能性について議論したい。

The association between Paternal Origin of Health and Disease (POHaD) and exposure to environmental chemicals.

Kou Sakabe

¹Department of Environmental Preventive Medicine (Yamada Bee Company, Inc.),
Center for Preventive Medical Sciences, Chiba University, Japan

The association between paternal health and exposure to environmental chemicals (POHaD) has received less attention compared to maternal factors, which are extensively studied in the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) framework. Recent studies suggest that advanced paternal age is linked to developmental delays and autism spectrum disorder (ASD), primarily through epigenetic changes such as altered sperm DNA methylation. However, the effects of paternal exposure to environmental chemicals, particularly those encountered in everyday life, remain largely unclear.

While some research has connected paternal occupational exposures to an increased risk of congenital abnormalities and childhood cancers, these studies mostly focus on toxicological effects. Our current investigation centers on neonicotinoid pesticides, given that previous studies have shown that even low-dose exposure can affect sperm function and testosterone levels. As part of a JECS adjunct study, we measured neonicotinoid concentrations in the blood of about 100 fathers to explore their potential impact on the health of the next generation.

SY-4

US Children's Environmental Health Cohort Studies and their Contributions

レベッカ・J・シュミット教授

カリフォルニア大学デービス校医学部 MIND 研究所公衆衛生科学部

MARBLES (赤ちゃんの自閉症リスクマーカー：きざしの研究)は、自閉症スペクトラム障害(ASD)の子どもの弟妹を対象とした前向きコホートとして 2006 年に始まった。その参加登録は、ASD やその他の神経発達障害が始まると想定される妊娠中および妊娠前に開始された。ASD の有病率は増加しており、ASD リスクの原因とメカニズムを特定する研究が重要である。MARBLES 研究では、北カリフォルニアの社会人口統計学的に多様な家族で 550 人以上の妊娠を登録し、妊娠中、出産時、出生後のフォローアップ中に定期的に 28,000 を超えるバイオサンプルおよび環境試料を収集し、曝露、病歴、食事、ライフスタイルに関する包括的なデータを取得し、メチル化、発現、免疫、栄養素、および汚染物質マーカーを測定し、臨床評価を活用して 3 歳時の神経発達状況を調べた。

また、US National ECHO (Environmental influences on Children's Health Outcomes) Program は、国立衛生研究所が資金提供する大規模なコホート研究であり、周産期、呼吸器、肥満、神経発達、および小児のより良い健康に焦点を当てた、共通の研究データとバイオサンプル収集プロトコルに従って、新規の妊娠を含む 50,000 人以上の小児を登録する予定である。ECHO の使命は、次世代の子どもたちの健康を増進することである。両研究から得られた知見をハイライトして紹介する。

“US Children's Environmental Health Cohort Studies and their Contributions”

by Professor Rebecca J. Schmidt

Dept of Public Health Sciences, MIND Institute, School of Medicine, University of California Davis

The MARBLES (Markers of Autism Risk in Babies: Learning Early Signs) Study was launched in 2006 as the first epidemiologic prospective cohort of younger siblings of children with autism spectrum disorders (ASD) to enroll during (and before) pregnancy when ASD and other neurodevelopmental conditions are likely to originate. Given increasing prevalence of ASD, studies identifying factors responsible for increasing ASD risk and the mechanisms underlying their etiology, are critical. The MARBLES study has enrolled over 550 pregnancies in sociodemographically diverse families of Northern California, collected over 28,000 biological and environmental specimens periodically throughout pregnancy, at delivery, and during postnatal follow-up, obtained comprehensive data on exposures, medical history, diet, and lifestyle, measured methylation, expression, immune, nutrient, and contaminant markers, and conducted rich characterization of neurodevelopmental outcomes of children at 3 years of age using gold-standard clinical assessments. MARBLES children are now being followed at older ages as part of the US National ECHO Program.

US National ECHO (Environmental influences on Children's Health Outcomes) Program is a large US cohort study funded by the National Institutes of Health that plans to enroll over 50,000 children, including new pregnancies, that follow a common research data and biospecimen collection protocol, with a focus on perinatal, respiratory, obesity, neurodevelopment and positive health outcomes of children. Highlighted findings will be presented from both studies.

セッション 『ヒト影響』

12月7日(土) 9:30-12:00

ネオニコチノイド-ヒトへの影響の現状と今後

○平 久美子¹

¹東京女子医科大学附属足立医療センター 麻酔科

ネオニコチノイド系殺虫剤（ネオニコチノイド）は、農林業や公衆衛生分野の害虫駆除に世界的に用いられてきた。アセチルコリン受容体に対しアゴニスト/アンタゴニスト/受容体変調作用を有し、標的外の無脊椎動物、両生類、爬虫類、鳥類、微生物、哺乳類に負の影響をおよぼす。イミダクロプリド、アセタミプリド、チアクロプリド、ニテンピラム、チアメトキサム、ジノテフランに加え、2016年以降に農薬登録された同様の作用機序と毒性をもつフルピラジフロン、スルホキサフロル、トリフルメゾピリム、フルピリミンが日本では農薬登録されている。

最近の研究によれば、イミダクロプリド、アセタミプリド、チアクロプリド、クロチアニジン（チアメトキサムの活性一次代謝物）は、ヒト細胞の $\alpha 7$ および非 $\alpha 7$ -ニコチン受容体にアゴニスト作用を有し、中枢神経、自律神経節、副腎髄質、神経筋接合部、皮膚立毛筋、汗腺、免疫細胞、表皮角質細胞、気管支上皮、血管内皮細胞、心房心内膜、膀胱、肝細胞、膵島 β 細胞、腎尿細管、精巣、精子、卵胞、羊膜、胎盤に負の影響を与えうる。この5種の国内使用は年間230トン以上、人体からの排泄は遅い。原体と代謝物の脂溶性は低いものの、タンパク質と結合し長期間体内に保持される。長年の使用により生態系だけでなくヒトにも蓄積と同じ状態が生じていて、生態系と公衆衛生および次世代への影響への懸念は年々増大する一方である。

ヒトに対するネオニコチノイドの負の影響について今後も情報発信を続けていく必要がある。本シンポジウムがそのきっかけとなることを期待している。

Neonicotinoids-The Impact on Human Health and Our Future

Kumiko Taira¹

¹*Department of Anesthesiology, Adachi Medical Center, Tokyo Women's Medical University*

Neonicotinoid insecticides (neonicotinoids) are widely used in agriculture, forestry and public health in the world. Neonicotinoids (imidacloprid, acetamiprid, thiacloprid, nitenpyram, thiamethoxam, and dinotefuran) and other insecticides categorized into IARC Category 4 (flupyradifurone, sulfoxaflor, triflumezopyrim, and flupyrimin) are agonists/antagonists/modulators of acetylcholine receptors and have adverse effects on non-target species, such as invertebrates, amphibians, reptiles, birds, microbes and mammals.

Recent evidence suggested some neonicotinoids i.e. imidacloprid, acetamiprid, thiacloprid, clothianidin (an active metabolite of thiamethoxam) were true agonists for human $\alpha 7$ and non- $\alpha 7$ nicotinic receptors, and might have negative effects on CNS as well as autonomic ganglion, adrenal medulla, neuromuscular junctions, skin arrector pili muscles, sweat glands, immune cells, epidermal keratinocytes, atrial endocardium, bladder, hepatocytes, pancreatic β cells, renal tubules, testis, sperms, follicles, amnion, and placenta. Use of the five toxic neonicotinoids is still continuing in Japan, 230 tons or more every year. The elimination from human body is not always rapid. Neonicotinoids and metabolites with modest lipophilicity could accumulate not only in hair but also in nervous systems by their protein binding ability. Population level accumulation seems to have occurred already. We should continue every action to protect next generation from the negative effect of neonicotinoids.

自閉スペクトラム症関連遺伝子 **AUTS2** による クロマチン修飾、遺伝子発現、および神経細胞発達の制御

○星野 幹雄¹、嶋岡 可純¹、

¹国立精神神経医療研究センター 神経研究所 病態生化学研究部

脳の発達は段階的なプロセスで起こる。まず、神経細胞が前駆細胞から生成され、最終目的地へと移動する。その後、これらのニューロンは軸索と樹状突起を伸ばして標的を探し、シナプスを形成し、適切に刈り込まれるこの過程がうまくいかないと、さまざまな脳神経疾患の原因となりうる。AUTS2 遺伝子の機能障害によってもたらされる AUTS2 症候群では、多くの場合小頭症を呈し、さらに自閉症スペクトラム障害 (ASD)、統合失調症、てんかんなどが認められる。本シンポジウムでは、AUTS2 が神経細胞の段階的発達（神経細胞の産生、神経細胞の移動、軸索と樹状突起の成長、シナプスの形成と刈り込み）に関わること、その機能異常によって様々な疾患病態が引き起こされることを示す。特に、AUTS2 が細胞核内で PRC2 複合体と共にクロマチン修飾を介して遺伝子発現を制御し、大脳皮質浅層神経細胞の産生に関わること、その機能異常によって小頭症が引き起こされることについて、詳述する。さらに、外因性化学物質による AUTS2 の発現への影響についても考察する。

Regulation of chromatin modification, gene expression, and neuronal development by the autism spectrum disorder-related gene AUTS2

Mikio Hoshino¹, Kazumi Shimaoka²

¹*Department of Biochemistry and Cellular Biology, National Institute of Neuroscience, NCNP*

Brain development occurs in a step-by-step process. First, neurons are generated from progenitor cells and migrate to their final destination. If this process goes wrong, it can lead to a variety of psychiatric disorders, epilepsy, etc. AUTS2 syndrome, caused by dysfunction of the AUTS2 gene, often results in microcephaly. In addition, autism spectrum disorders (ASD), schizophrenia, and epilepsy are also observed. In this symposium, I will assess the mechanisms by which AUTS2 is involved in the step-by-step development of neurons and that various disease pathologies are caused by functional abnormalities of AUTS2. In particular, we will discuss in detail how AUTS2, together with the PRC2 complex, regulates gene expression via chromatin modification in the cell nucleus, and how it is involved in the production of neurons in the shallow layers of the cerebral cortex, and how a functional abnormality in this process can cause microcephaly. We will also consider the effects of exogenous chemical substances on the expression of AUTS2.

無毒性量（NOAEL）に潜む農薬類による高次脳機能攪乱と発達神経毒性

○平野 哲史^{1,2}

¹富山大学 研究推進機構 生命科学先端研究支援ユニット

²富山大学 学術研究部 薬学・和漢系

現行の化学物質のリスク評価において、動物を用いた複数の毒性試験から決定される「無毒性量（No Observed Adverse Effect Level: NOAEL）」はヒトにおける一日摂取許容量や残留基準値の算出に最も重要な役割を果たしている。しかしながら、とくに中枢神経系に対する神経毒性試験は、げっ歯類の肉眼行動観察や脳の病理組織学的変性を指標としているためスループットや検出感度が低いという問題点が指摘されている。さらに発達神経毒性はリスク評価の必須とされていないことから、現状の無毒性量が次世代の高次脳機能を守るために十分かについて懸念は拭いきれない。

我々はこれまでにネオニコチノイド系農薬が哺乳類の高次脳機能に及ぼす影響評価に取り組み、従来の毒性試験で決定された無毒性量レベルでの曝露が引き起こす神経行動学的影響を明らかにしてきた。ネオニコチノイド系農薬の1種であるクロチアニジン（CLO）を単回曝露したマウスにおいては、新規環境における不安様行動やストレス応答の活性化がみられた。さらに、CLOの急性曝露が及ぼす行動影響においては、加齢（高齢＞成獣）や雌雄（雄＞雌）によって感受性差が存在することを初めて明らかにした。発達神経毒性を検証する上で重要な母体－産子間への移行レベルを検討した結果、妊娠期において母体に投与された CLO およびその代謝物の血中濃度は母体および胎子でほぼ同等であること、授乳期においては母体血中濃度より乳汁中濃度の方が高い、すなわち乳汁への濃縮が起きた上で産子への曝露が起きることが明らかになった。実際に、胎子期・授乳期にかけて CLO を曝露した産子は成獣期においては、単回曝露とは異なる行動影響がみられることを見出した。

以上を踏まえると、化学物質による脳機能攪乱を検出・評価するにあたっては、化学物質の受容体への作用を起点としたシグナル毒性の概念に加え、Adverse Outcome Pathway (AOP)のフレームワークに基づいてメカニズムを理解した上で、新たなエンドポイントや試験法の整備が重要となると考えられる。

Disturbance of brain function and developmental neurotoxicity caused by pesticide exposure at NOAEL level

Tetsushi Hirano^{1,2}

¹*Life Science Research Center, University of Toyama,*

²*Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama*

In the current risk assessment of chemicals, the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL), which is determined from multiple toxicity tests using animals, plays the most important role in the calculation of the daily intake tolerance and residue limits for humans. However, neurotoxicity testing has long been problematic due to low throughput and detection sensitivity, which raises concerns about whether current NOAEL doses could be efficient to protect the higher brain functions of future generations. Our data showed that acute exposure of mice to clothianidin (CLO), a neonicotinoid pesticide, resulted in anxiety-like behavior and activation of stress responses in a novel environment. Furthermore, we found that susceptibility differences exist between ageing (older > adult animals) and sex (male > female) in the behavioral effects of acute exposure to CLO. The blood concentrations of CLO and its metabolites administered to the mother during gestation were similar in the mother and fetus, while during lactation, the concentrations in milk were higher than those in maternal blood. The littermates exposed to CLO during the fetal and lactation periods showed behavioral effects in adulthood that were different from those of acute exposures. Taken together, it is important to develop new endpoints and testing methods based on an understanding of mechanisms based on the Adverse Outcome Pathway (AOP) framework, in addition to the concept of signal toxicity.

SS-4

周産期の甲状腺ホルモン系の攪乱による発達神経毒性

天野 出月

群馬大学大学院医学系研究科 応用生理学分野

先天性甲状腺機能低下症で知られるように、甲状腺ホルモンは中枢神経系の発達に必須のホルモンの一つである。甲状腺ホルモンは神経細胞の新生・成長、神経回路の構築に必要な遺伝子発現調節の一端を担い、不足により不可逆的な神経発達障害を引き起こす。それ故、周産期における環境化学物質による甲状腺ホルモン系の攪乱は児の正常な発育・発達への懸念となる。しかし、視床下部－下垂体－甲状腺系により制御されている甲状腺機能を、日常生活で曝露される濃度の環境化学物質が攪乱するとは考えにくい。懸念すべきは、甲状腺ホルモンの標的臓器における、脱ヨウ素酵素を介した甲状腺ホルモンの代謝や、細胞内に取り込む際に必要となる輸送体や、受容体レベルでの阻害である。実際にこれらの遺伝子異常は、以前より知られていた甲状腺ホルモン受容体異常（不応症（RTH β ））だけでなく、RTH α やトランスポーター異常症といった疾患を引き起こし、神経発達異常をはじめとした様々な異常に繋がることが注目されている。我々のグループは、近年社会的に問題となっている有機フッ素化合物（PFAS）の一つであるペルフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）が脱ヨウ素酵素の活性を阻害することにより、非活性型甲状腺ホルモン（T₄）から活性型甲状腺ホルモン（T₃）への変換を妨げ、神経細胞における甲状腺ホルモン作用を減弱することを報告した。本発表では中枢神経系における甲状腺ホルモンの役割から、環境化学物質による攪乱の影響まで我々の知見を踏まえつつ概説したい。

Developmental neurotoxicity caused by perinatal disruption of thyroid hormone function

Izuki Amano

Department of Integrative Physiology, Gunma University Graduate School of Medicine

As evidenced by congenital hypothyroidism, thyroid hormones (TH) are essential for the development of the central nervous system (CNS). TH plays a crucial role in neurogenesis, neuronal growth, and the formation of neural circuits through the regulation of gene expression. TH deficiency led to irreversible neurodevelopmental disorders. Therefore, disruption of the TH system by environmental chemicals during the perinatal period raises concerns regarding the normal growth and development of children.

However, it is unlikely that exposure to environmental chemicals at concentrations encountered in daily life would significantly disrupt thyroid function, which is regulated by the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. Of greater concern is the inhibition of TH metabolism, transport, or receptor binding at target organs, where TH functions are regulated by enzymes such as deiodinases and transporters necessary for intracellular uptake. In fact, abnormalities in these pathways have been linked not only to previously recognized TH resistance syndromes, such as resistance to thyroid hormone beta (RTH β), but also to newer conditions like RTH α and transporter defects. These abnormalities can result in various disorders, including neurodevelopmental impairments.

Our research group recently reported that perfluorooctane sulfonate (PFOS), a type of perfluoroalkyl substance (PFAS) that has become a societal concern, inhibits the activity of deiodinase enzymes. This inhibition impairs the conversion of the inactive TH (T₄) into its active form (T₃), thereby weakening the effects of TH on neuronal cells. In this presentation, we aim to provide an overview of the role of TH in the CNS and discuss the potential impacts of environmental chemical disruptions on TH functions.

周産期マウスへの化学物質曝露による遅発性情動・認知行動毒性の検出

○齊藤 洋克

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部

発生-発達期は化学物質の曝露に対して最も感受性の高い時期である。近年、急性毒性を引き起こさないレベルの曝露量であっても、化学物質が胎児や小児の中枢神経系に及ぼす影響が注目されている。この時期の脳は外的環境要因の影響を受けやすく、特に外因性の神経作動性化学物質によって正常な神経回路網の形成が妨げられることで、結果として成熟後の脳高次機能に遅発的かつ長期的な影響を及ぼすおそれがある。そのため、化学物質に対して高感受性を持つ発生-発達期の脳の特性を考慮し、従来の神経毒性試験では検出し難い遅発性の脳高次機能への影響について慎重に検討する必要がある。

我々は、実験動物としてマウスを用い、化学物質曝露が脳高次機能に与える影響を客観的かつ定量的に検出するため、自発運動量、情動行動、学習記憶能などに着目したバッテリー式の行動試験評価系を構築し、行動影響の検出と、その発現メカニズムの解明に向けた神経科学的物証の収集を進めている。今回は、ネオニコチノイド系農薬をモデル化学物質として用いた解析結果を中心に報告する。妊娠期から授乳期の雌マウスにネオニコチノイド系農薬を飲水投与し、得られた雄産仔において成熟後に行動試験を行った結果、学習記憶異常を主とする行動影響が認められた。また、組織学的解析により、神経幹細胞の分化様式のかく乱が観察された。

上記結果を一例として、本シンポジウムでは、現在までに取り組んでいる遅発性の神経行動毒性、特に情動・認知といった脳高次機能への影響を検出するための実験的取り組みについて紹介し、その意義や課題についても議論したい。

Detection of delayed emotional and cognitive behavioral toxicity due to chemical exposure in perinatal mice

Hirokatsu Saito

Division of Cellular and Molecular Toxicology, Center for Biological Safety and Research, National Institute of Health Sciences

The developing brain is susceptible to the effect of environmental factors, including exogenous neuroactive chemicals, which can hinder the formation of the normal neural circuit and potentially have adverse effects on higher brain functions in adulthood. Therefore, it is important to consider the characteristics of the developing brain, which is highly sensitive to neuroactive chemicals, and carefully examine late effects on higher brain functions that are difficult to detect by conventional neurotoxicity tests. To analyze the effects of neuroactive chemicals on higher brain functions objectively and quantitatively using mice, we develop a behavioral test battery and collect neuroscientific evidence.

In this symposium, we mainly report the results using neonicotinoid pesticides as a model chemical substance. Neonicotinoid pesticides were administered to female mice during the gestation and lactation periods. Male pups were conducted behavioral tests after maturation and mainly observed learning and memory abnormalities. In addition, histological analysis showed that the differentiation pattern of neural stem cells was disturbed. Based on the above results, we would like to provide our current experimental efforts to detect delayed neurobehavioral toxicity, especially effects on higher brain functions such as emotion and cognition, and discuss the significance and challenges of these efforts.

一般演題（口頭発表）

一般演題 1 『魚類への影響、毒性評価試験』

12 月 6 日（金） 13:10-14:22

一般演題 2 『毒性発現メカニズム 1』

12 月 6 日（金） 14:30-15:30

一般演題 3 『毒性発現メカニズム 2』

12 月 7 日（土） 13:30-14:30

一般演題 4 『次世代・継世代影響』

12 月 7 日（土） 14:40-15:52

一般演題 5 『話題提供』

12 月 7 日（土） 16:00-16:48

O1-1

メダカ拡張一世代繁殖試験 (MEOGRT) による

リン酸トリフェニルの内分泌かく乱作用の評価

○河合 兆治¹、三野 美都里¹、森田 隼平¹、佐藤 裕美¹、梅北 さあや¹、高橋 明歩¹、
新倉 良之¹、大久保 博充¹、新野 竜大^{1, 2}

¹株式会社三菱ケミカルリサーチ ²三菱ケミカル株式会社

難燃剤および可塑剤として、ポリマーや化粧品等で使用されているリン酸トリフェニル (TPP) は、メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験および魚類短期繁殖試験 (FSTRA, OECD TG229) においてエストロゲン作用や抗エストロゲン作用、ステロイド合成阻害作用を有することが示唆されている (環境省, 2012)。本研究ではメダカ拡張一世代繁殖試験 (MEOGRT, OECD TG240) に準拠し、TPP を 0.501、1.62、4.54、15.2、48.4 $\mu\text{g/L}$ (実測値) の濃度で、3 世代にわたるメダカ (*Oryzias latipes*) に 19 週間ばく露し、その内分泌かく乱作用の有無を評価した。その結果、死亡 (F1 胚のふ化率の有意な低値) が認められなかった 4.54 $\mu\text{g/L}$ 未満の濃度範囲で、雌の肝臓中ビテロゲン濃度の有意な低値が認められ、抗エストロゲン作用またはステロイド合成阻害作用が示唆された。また、48.4 $\mu\text{g/L}$ のばく露群においては、総産卵数、受精卵数、生存率 (4 週齢、雄の成熟個体) の有意な低値が認められ、メダカの繁殖に対する有害性が示唆された。また、総産卵数、受精卵数、生存率の有意な低値が認められた 48.4 $\mu\text{g/L}$ と、繁殖に対する有害性が示唆されなかった 15.2 $\mu\text{g/L}$ は、2017 年の環境実態調査で測定された最高濃度 0.024 $\mu\text{g/L}$ のそれぞれ約 2,017 倍、約 630 倍であった。これらの結果より、TPP はメダカに対して内分泌かく乱作用を示すが、国内の実環境中においては、メダカの繁殖に対して影響を及ぼしている可能性は低いことが考えられた。謝辞：本試験は、令和元年度及び令和 2 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する第二段階生物試験 (リン酸トリフェニル) 実施業務 (環境省) として行った。

Medaka Extended One-Generation Reproduction Test (MEOGRT) Evaluating the Endocrine Disrupting Effects of Triphenyl Phosphate

Choji Kawai¹, Midori Mino¹, Jumpei Morita¹, Yumi Satou¹, Saaya Umekita¹, Akiho Takahashi¹,
Yoshiyuki Niikura¹, Hiromitsu Okubo¹, Tatsuhiko Niino^{1, 2}

¹ Mitsubishi Chemical Research Corporation, ² Mitsubishi Chemical Corporation

Triphenyl phosphate (TPP), commonly used as a flame retardant and plasticizer in polymers and cosmetics, has been suggested to exhibit estrogenic, anti-estrogenic, and steroid synthesis inhibition effects based on results from medaka estrogen receptor α reporter gene assay and Fish Short-Term Reproduction Assay (OECD TG229) (MOE, 2012). In this study, in accordance with the Medaka Extended One-Generation Reproduction Test (OECD TG240), Japanese medaka (*Oryzias latipes*) was exposed to TPP at actual concentrations of 0.501, 1.62, 4.54, 15.2, and 48.4 $\mu\text{g/L}$ over 19 weeks across three generations to evaluate its endocrine disrupting effects. Significant decreases in vitellogenin levels in female livers were observed at concentrations below 4.54 $\mu\text{g/L}$, without a significant reduction in hatching rates of F1 embryos, suggesting potential anti-estrogenic effects or steroid synthesis inhibition. At 48.4 $\mu\text{g/L}$, significant reductions in the total number of eggs, fertilized eggs, and survival rates of F1 adult males at four weeks were observed, indicating reproductive toxicity. The 48.4 $\mu\text{g/L}$ concentration, which showed harmful effects on medaka reproduction, and the 15.2 $\mu\text{g/L}$ concentration, which did not, were approximately 2,017 times and 630 times higher, respectively, than the highest concentration of 0.024 $\mu\text{g/L}$ detected in the Results of the Environmental Survey and Monitoring of Chemicals in FY2017. These results suggest that TPP exhibits endocrine disrupting effects on medaka, but it is considered unlikely that TPP influence the reproduction of medaka in the aquatic environment.

O1-2

メダカを用いた魚類短期繁殖試験 (FSTRA) による化学物質の内分泌かく乱作用の評価

○三谷 郁佳¹、三野 美都里¹、森田 隼平¹、佐藤 裕美¹、河合 兆治¹、皆川 優作¹、
高橋 明歩¹、新倉 良之¹、大久保 博充¹、新野 竜大^{1,2}
¹株式会社三菱ケミカルリサーチ ²三菱ケミカル株式会社

環境省では、「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応」(EXTEND 2016、2022)に基づき作用・影響評価の実施等が進められている。本発表ではその一環で実施した第一段階生物試験であるメダカを用いた魚類短期繁殖試験 (FSTRA, OECD TG229) の結果を報告する。対象物質は内分泌かく乱作用等が示唆されるリン酸トリクレジル、4-*t*-ブチルフェノール (BP)、クロルピリホス、ペルメトリン (PM)、2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP) とした。試験濃度はメダカを使った急性・亜急性毒性試験で確認された毒性症状の有無等に応じて、公比 3.2~7.0 で 3 濃度区を設定し、各濃度区には繁殖可能な雌雄の成魚 12 ペアを用意した。ばく露は水温 25±2℃、16 時間明/8 時間暗の条件下で、アルテミアふ化幼生を 2~3 回/日飽食量を給餌しながら、21 日間連続流水式で行った。観察項目は暴露期間中の産卵数および受精率、暴露終了後の肝臓中ビテロゲニン濃度および二次性徴 (乳頭状小突起) とした。その結果、BP では雄の肝臓中ビテロゲニン濃度が高値を示し、エストロゲン作用を持つことが示唆された。PM では雌の肝臓中ビテロゲニン濃度および総産卵数の統計学的に有意な低値を示し、抗エストロゲン作用を持つことが示唆された。さらに 2,4-DCP で受精率の有意な減少と雌の生殖腺体指数に有意な増加を示し、繁殖への影響が示唆された。これらの物質はいずれも内分泌かく乱作用あるいは繁殖への影響を持つことが示唆されたが、水環境中で検出された濃度よりも低濃度で影響を及ぼす物質はなかった。

謝辞：本試験は、令和 2~5 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する第一段階生物試験実施業務 (環境省) として行った。

Evaluation for the Endocrine Disrupting Effects of Chemicals by Fish Short-term Reproduction Assay (FSTRA) Using Japanese Medaka

Fumika Mitani¹, Midori Mino¹, Jumpei Morita¹, Yumi Satou¹, Choji Kawai¹, Yusaku Minagawa¹,
Akiho Takahashi¹, Yoshiyuki Niikura¹, Hiromitsu Okubo¹, Tatsuhiko Niino^{1,2}
¹Mitsubishi Chemical Research Corporation, ²Mitsubishi Chemical Corporation

The Ministry of the Environment of Japan has been conducting action and effect assessments under the "Further Actions to Endocrine Disrupting Effects of Chemical Substances" (EXTEND2016, 2022). We report the results of in vivo screening conducted as part of the program, Fish Short Term Reproduction Assay (FSTRA, OECD TG229) using Japanese medaka (*Oryzias latipes*). The test substances were tricresyl phosphate, 4-*t*-butylphenol (BP), chlorpyrifos, permethrin (PM), and 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), all of which have been implicated in endocrine disrupting effects. Three test concentrations were set at a spacing factor ranging between 3.2 and 7.0, depending on the presence or absence of toxicity signs observed in acute or sub-acute toxicity tests using Japanese medaka. 12 pairs of reproductive adult male and female fish were prepared for each concentration. The exposures were conducted for 21 days using a continuous flow-through system. The fish were fed a satiating amount of live brine shrimp nauplii (newly hatched *Artemia* sp.) 2-3 times a day under 16-h light and 8-h dark conditions at a water temperature of 25±2℃. Observations were the total number of eggs and fertility rate during the exposure period, vitellogenin (VTG), and secondary sex characteristics (anal fin papillary processes) at the end of the exposure. The results showed that in BP, liver VTG were high, suggesting that it has estrogenic effects. PM showed statistically significant low levels of liver VTG and total number of eggs in females, suggesting an anti-estrogenic effect. Additionally, 2,4-DCP showed a significant decrease in fertility rate and a significant increase in female gonadosomatic index, suggesting an effect on reproduction. It was suggested that these substances have endocrine disrupting or reproductive effects, but none had effects at concentrations lower than those detected in the aquatic environment.

O1-3

メダカを用いた TRIAC の甲状腺ホルモンかく乱活性の *in vitro*、*in vivo* 評価

○明正 大純^{1,2}、小林 亨^{1,2}

¹静岡県立大学食品栄養科学部学部環境生命科学科、

²静岡県立大学院薬食生命学府生態発生遺伝学研究室

経済協力開発機構（OECD）は、両生類を用いた *in vitro* および *in vivo* 試験（AMA）により、化学物質の甲状腺ホルモン（TH）かく乱活性を評価しているが、*in vivo* 試験は感度の点では十分とは言えない。我々は最近、エレウテロ期のメダカ孵化仔魚（*Oryzias latipes*）をモデルとし、エストロゲン（E）によるビテロゲニン（*vtg*）の発現誘導が TH に依存することを見出し、この系を用いて、化学物質の TH かく乱活性を高感度で検出できることを明らかにした¹。

最近、甲状腺ホルモンアナログであるトリヨードチロ酢酸（TRIAC）下水処理過程で生成される可能性が報告され、生態系への影響が懸念されている。本研究では、TRIAC の TH かく乱活性の評価を、*in vitro* 甲状腺ホルモン受容体転写活性試験および、既述した *in vivo* の *vtg* 応答試験を用いて検討した。その結果、両試験において TRIAC の TH かく乱活性が確認された。

さらに、新たな TH かく乱活性の有害影響として、TH かく乱活性を持つ化学物質とエストロゲンの共曝露による XY 雌への雌雄性への影響について検討した。その結果、TU、PFOA、T4、T3 を含む全ての化学物質で、XY 雌への性転換率が上昇することが明らかとなった。本研究の結果は、TRIAC の TH かく乱活性を実証するとともに、新たな TH かく乱による有害影響評価法の有力な候補となることが示唆される。1) Myosho et al. *ES &T*, 56, 6479-6490. (2022)

In vitro and in vivo Evaluation of the Thyroid Hormone Disrupting Activity of TRIAC in Medaka

Taijun Myosho^{1,2}, Thoru Kobayashi^{1,2}

¹ Graduate School of Pharmaceutical and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan, ² Laboratory of Molecular Reproductive Biology, Institute for Environmental Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan

The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) evaluates the thyroid hormone (TH)-disrupting activity of chemicals using *in vitro* and *in vivo* tests in the anuran amphibian, *Xenopus laevis*. However, the sensitivity of these conventional *in vivo* methods is not sufficient, because the estimation has been determined mainly by the measurement of the body parts. Recently, we developed a high-sensitive method for detecting TH-disrupting activity by using eleutheroembryos of medaka (*Oryzias latipes*), based on the evidence that estrogen (E)-induced *vitellogenin* (*vtg*) expression is TH-dependent (*in vivo vtg* assay)¹.

In this study, we assessed the TH-disrupting activity of triiodothyroacetic acid (TRIAC), a TH analog, which was reported to be produced during wastewater treatment and posing a concern for ecological impact. We evaluated TRIAC using an *in vitro* thyroid hormone receptor transcription assay and an *in vivo vtg* assay. In both tests, TRIAC was confirmed to exhibit TH-disrupting activity as a TH agonist.

Additionally, as a candidate for a new adverse effect test of TH-disrupting activity, we examined the effects of co-exposure to TH-disrupting chemicals and estrogen on sex differentiation in medaka. The results indicated that all chemicals tested, including TU, PFOA, T4, and T3, significantly increased the rate of XY females, suggesting that co-exposure to TH-disrupting chemicals with estrogen accelerates XY sex reversal, feminization. 1) Myosho et al. *ES &T*, 56, 6479-6490. (2022)

O1-4

日本産メダカ 2 種雄の二次性徴発現比較～試験法利用種検討のための基礎的知見集積～

○長江真樹¹、羽田龍史²、小林亨³、征矢野清⁴、鑑迫典久⁵、井口泰泉⁶

¹長崎大学総合生産科学研究科、²長崎大学環境科学部、³静岡県立大学食品栄養科学部、

⁴長崎大学海洋イノベーション機構、⁵愛媛大学農学部、⁶横浜市立大学

日本産メダカは化学物質影響評価のための OECD 試験法等にリストされている有用標準生物である。一方で、約 10 年前にミナミメダカ (*Oryzias latipes*) とキタノメダカ (*Oryzias sakaizumii*) の 2 種に分類された。そのため、「何れの種が試験法に適しているのか？」といった疑問が浮上している。そのような疑問を解消するためには、化学物質に対する両種の感受性の比較はもとより、両種の基礎的知見を集積する必要がある。そこで本研究では、男性ホルモン刺激によって臀鰭上に形成される雄の二次性徴形質である「乳頭状小突起」の成長に伴う形成過程を比較した。

その結果、ミナミメダカ雄では全長 23mm 前後からその形成が認められ、成長に伴いその数が増加した。一方、キタノメダカ雄では全長 23mm 前後ではその形成は全く認められず、全長 27mm 前後で初めてその形成が認められた。両種雄の個体の成長に伴う精巣発達には大きな差が認められなかった。そのため、両種雄における臀鰭での二次性徴発現（乳頭状小突起）の違いは、臀鰭での男性ホルモン応答性の違いによるものと推察された。

Comparison of male secondary sexual characteristics expression between two Japanese medaka

Masaki Nagae¹, Ruji Hada², Tohru Kobayashi³, Kiyoshi Soyano⁴, Norihisa Tatarazako⁵, Taisen Iguchi⁶

¹Graduate School of Integrated Science and Technology, Nagasaki University, ²Faculty of Environmental Science, Nagasaki University, ³School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, ⁴Organization for Marine Science and Technology, Nagasaki University, ⁵Faculty of Agriculture, Ehime University, ⁶Yokohama City University

Japanese medaka is a useful standard organism that is also listed in OECD test guidelines for assessing the effects of chemical substances. On the other hand, about 10 years ago it was classified into two species, *Oryzias latipes* and *Oryzias sakaizumii*. This raises the question, “Which species are suitable as test organisms?” In order to resolve such questions, it is necessary not only to compare the sensitivity of the two species to chemicals, but also to accumulate basic knowledge about both species. Therefore, in this study, we compared the formation process associated with the growth of papillary processes, which are male secondary sexual characteristics that are formed on the anal fin by androgen stimulation.

As a result, the formation of papillary processes was first observed in male *Oryzias latipes* when the total length was about 23 mm, and their number increased with growth. On the other hand, in the male *Oryzias sakaizumii*, no formation was observed at all at about 23 mm in total length, and its formation was first observed at about 27 mm in total length. No significant differences were observed in testicular development during the growth of males of both species. Therefore, it was speculated that the difference in the expression of secondary sexual characteristics (papillary processes) in the anal fin of the two male medaka species was due to differences in the responsiveness of the anal fin to androgens.

O1-5

Identification of ESR subtypes associated with testis-ova in male medaka

Kiwako Sato¹, Shuhei Murota¹, Hiraku Nakashima¹, Suika Shimizu¹, Yukiko Ogino², Taisen Iguchi³,
Shinichi Miyagawa¹

¹*Department of Biological Science and Technology, Tokyo University of Science,* ²*Attached Promotive Centre for International Education and Research of Agriculture, Faculty of Agriculture,* ³*Graduate School of Nano bioscience, Yokohama City University*

Disruption of the endocrine system is of concern globally for wildlife. Exposure to estrogenic endocrine disrupting chemicals (EDCs) induces a range of adverse effects including reproductive and developmental disorders such as the prevalence of development of oocytes in the testis (testis-ova), however, induction mechanisms of the testis-ova are not elucidated. Estrogens and EDCs act through estrogen receptors (ESRs), members of the nuclear receptor superfamily, and regulate reproduction and sexual differentiation. Three ESR subtypes (esr1, esr2a, and esr2b) have been identified in teleosts, but the functions of each subtype are still largely unknown. To investigate which ESR subtypes mediate testis-ova induction, each esr1, esr2a and esr2b knock out (KO) medaka were exposed to nominal concentration of 250 ng/L 17 β -estradiol (E2) for 6 weeks. Estrogen exposure induces testis-ova in control medaka, but not in either esr1 or esr2a KO testis. Esr2b KO male medaka exhibited testis-ova in 2 of 6 medaka. Thus, we provide an evidence for the functionalization of ESR subtypes in terms of testis-ova induction. Our findings will also benefit to understand the mechanism of molecular initiating events of adverse effects induced by estrogenic EDCs.

Risk assessment of killer whale (*Orcinus orca*) estrogen receptor signaling disruption by environmental pollutants: Application of *in vitro* approach

Dave Arthur R. Robledo¹, Takahito Kumagawa¹, Mari Ochiai¹, Hisato Iwata¹

¹Laboratory of Environmental Toxicology, Center for Marine Environmental Studies (CMES),
Ehime University, Matsuyama, Ehime, Japan

Killer whales (*Orcinus orca*), as long-lived apex predators, are highly susceptible to the bioaccumulation of environmental pollutants such as dichlorodiphenyltrichloroethane and its analogs (DDTs), as well as polychlorinated biphenyls (PCBs) and their hydroxylated forms (OH-PCBs). These compounds are known endocrine disruptors that act through the estrogen receptor alpha (ER α), which regulates key reproductive and physiological processes. Sampling large whales remains an ethical and logistical challenge. However, by investigating the transactivation of killer whale ER α (kwER α) by contaminants *in vitro*, we can assess species-specific sensitivities and risks. Thus, this study aimed to assess the transactivation potency of kwER α in response to seven DDTs (*p,p'*-DDT, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDE, and *p,p'*-DDOH), three PCBs (PCB77, PCB153, and PCB180), and 18 OH-PCBs using an *in vitro* approach. We constructed an *in vitro* kwER α -expressed reporter gene assay and measured the transactivation potencies of test chemicals as the 10% effective concentration (REC₁₀) relative to the maximum response to 17 β -estradiol exposure. Risk assessment was performed by calculating the total estrogenic equivalency quantity (*o,p'*-DDT- Σ EEQ) based on the estrogenic equivalency factor (EEF) of each compound relative to *o,p'*-DDT, using the blubber and blood serum concentrations from Irish and Canadian Arctic killer whales. The *o,p'*-DDT- Σ EEQ was then compared to the *o,p'*-DDT-REC₁₀ to evaluate the potential estrogenic risks. *In vitro* results revealed that *o,p'*-DDT was the most potent among the tested chemicals, with REC₁₀ = 0.022 μ M, followed by *o,p'*-DDE (0.043 μ M) and *o,p'*-DDD (0.14 μ M). Moreover, OH-PCBs with hydroxyl groups in the *para* position and fewer adjacent chlorine atoms showed higher transactivation potency. Conversely, *p,p'*-DDE and PCBs exhibited no estrogenic activities. The risk assessment revealed that the body concentrations of *o,p'*-DDT, *o,p'*-DDE, and *p,p'*-DDD detected or extrapolated in Irish and Canadian Arctic killer whales were equal to or exceeded their *in vitro* transactivation thresholds (REC₁₀). This finding suggests a significant risk of disrupting kwER α -mediated estrogenic signaling in these populations. Notably, *o,p'*-DDT- Σ EEQs in the blubber of both populations surpassed the REC₁₀ for *in vitro* kwER α transactivation by *o,p'*-DDT, indicating amplified estrogenic risks from combined effects of DDTs, greater than individual compounds. This study highlights the potential endocrine-disrupting effects of pollutants on killer whales and the urgent need for conservation efforts to protect their endocrine and reproductive health.

O2-1

授乳期におけるペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) 曝露は
中年期オスマウスの脳機能に対する潜在的なリスクとして残存する

○二ノ宮 彩音¹、天野 出月¹、鈴木 啓¹、藤原 悠基¹、薮島 旭²、鯉淵 典之¹

¹群馬大学医学系研究科応用生理学分野、²京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) は、若年層の神経発達に有害な影響を与えることが知られている。幼少期における PFOS 曝露によって、後年にアルツハイマー病などの加齢に関連する神経変性疾患を発症するリスクが増加する可能性が示唆されている。しかし、動物モデルを用いた研究による知見は乏しく、幼少期の PFOS 曝露がもたらす認知機能への長期的な影響やその分子機構は不明である。本研究では、授乳期の PFOS 曝露が認知機能に与える影響を、1 歳のマウスを用いて検討した。母マウスに対して授乳期間中に PFOS (1 mg/kg 体重) を強制経口投与し、オスの仔マウスを用いて行動テストバッテリーを実施し、認知機能を評価した。また、アルツハイマー病の病態形成に関連するタンパク質の発現レベルを測定するために、海馬組織を用いてウェスタンブロット解析を行った。行動学的解析より、PFOS 曝露群のマウスにおいて社会的認知の低下が見られた。海馬においては、Tau タンパク質の発現が有意に増加していた。これらの結果は、発達期における PFOS 曝露が中年期において認知機能および神経変性に軽度の影響を与えることを示唆している。本研究は、幼少期の PFOS 曝露が中年期においても長期的な影響を及ぼす可能性を示し、その潜在的な後遺症の重要性を指摘している。

**Lactational exposure to perfluorooctane sulfonate remains
a potential risk in brain function of middle-aged male mice**

Ayane Ninomiya¹, Izuki Amano¹, Hiraku Suzuki¹, Yuki Fujiwara¹, Asahi Haijima², Noriyuki Koibuchi¹

¹Department of Integrative Physiology, Gunma University Graduate School of Medicine, ² Institute of Laboratory Animals, Graduate School of Medicine, Kyoto University

Perfluorooctane sulfonate (PFOS) exerts adverse effects on neuronal development in young population. Limited evidences have shown that early-life PFOS exposure holds a potential risk for developing age-related neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease later in life. The present study investigated the effects of lactational PFOS exposure on cognitive function using one-year-old mice. Dams were exposed to PFOS (1 mg/kg body weight) through lactation by gavage. Male offspring were used for the behavior test battery to assess cognitive function. Western blot analysis was conducted to measure the levels of proteins related to the pathogenesis of Alzheimer's disease. PFOS-exposed mice displayed a mild deficiency in social recognition. In the hippocampus, the expression of tau protein was significantly increased. These results underline a mild effect of developing PFOS exposure on cognitive function and neurodegeneration. The present study presents the long-lasting effects of PFOS in middle-aged period and warrants a potential aftermath.

O2-2

PFOS および PFOA による Neuro-2a 細胞の神経突起形態への影響評価

○太田 莉々香¹、藤原 悠基²、二ノ宮 彩音²、勅使河原 芳三郎¹、天野 出月²、鯉淵 典之²

¹群馬大学医学部医学科、²群馬大学大学院医学系研究科応用生理学

ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) およびペルフルオロオクタン酸 (PFOA) は、かつて様々な工業製品に利用されていたフッ素化合物であり、その化学的安定性から環境中で長期間残留することが知られており、主に飲料水を介してヒトに曝露されることが報告されている。特に PFOS は、ヒト周産期における中枢神経系の発達に悪影響を与える可能性が指摘されているが、そのメカニズムは明らかではない。本研究では、マウス神経芽細胞腫由来 Neuro-2a 細胞を用いて、PFOS および PFOA 曝露が神経突起形成に与える影響とそのメカニズムを解明することを目的とした。Neuro-2a 細胞を all-trans レチノイン酸により分化誘導を行い、PFOS および PFOA を 10^{-12} M ~ 10^{-4} M の濃度で 3 日間曝露し、細胞増殖試験および RT-PCR と免疫染色法を用いて、 β III-tubulin および MAP2 の発現を解析した。その結果、PFOS および PFOA は共に 10^{-4} M 濃度で細胞死を誘導する結果が得られた。PFOS 曝露群では RT-PCR において β III-tubulin 発現が濃度依存的に低下傾向を示した。一方で、免疫染色では有意な変化は認められなかった。また、PFOA 曝露群では有意な変化は認められなかった。以上の結果より、PFOS は神経細胞への毒性は PFOA より強い傾向を示し神経突起形成に影響を与える可能性が示唆された。

Effects of PFOS and PFOA on Neurite Outgrowth in Neuro-2a Cells

Ririka Ota¹, Yuki Fujiwara², Ayane Ninomiya², Michisaburou Tesigawara¹,
Izumi Amano², Noriyuki Koibuchi²

¹Gunma University Faculty of Medicine School of Medicine ,

² Gunma University Graduate School of Medicine

Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) are fluorinated compounds formerly used in various industrial products. Due to their high chemical stability, they persist in the environment for extended periods. PFOS, in particular, has been suggested to impact the development of the human central nervous system during the perinatal period, but the mechanisms remain unclear. This research aimed to investigate the effects of PFOS and PFOA on neurite outgrowth using mouse neuroblastoma-derived Neuro-2a cells. Cells were differentiated with all-trans retinoic acid and exposed to PFOS and PFOA at concentrations ranging from 10^{-12} M to 10^{-4} M for 3 days. A cell proliferation assay was conducted, and β III-tubulin and MAP2 expression were analyzed using RT-PCR and immunostaining. The results showed that both PFOS and PFOA significantly reduced cell proliferation at a concentration of 10^{-4} M. In the PFOS-exposed group, RT-PCR revealed a dose-dependent decrease in β III-tubulin expression, although no significant changes were observed in immunostaining. No significant changes were observed for PFOA. These findings suggest that PFOS may affect neurite outgrowth.

O2-3

PFOS は甲状腺ホルモン変換酵素 DIO2 を介して神経突起形成を阻害する

○藤原 悠基¹、宮坂 勇平²、二ノ宮 彩音¹、天野 出月¹、宮崎 航³、鯉淵 典之¹

¹群馬大学大学院医学系研究科応用生理学、²群馬大学重粒子医学センター、

³弘前大学大学院保健学研究科生体検査科学領域

パーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) は、さまざまな工業製品や商業製品に使用されており化学的な安定性を有することから環境中に蓄積し、ヒトに曝露されることが報告されている。PFOS による曝露影響において発達中の脳神経系への PFOS の毒性影響が大きな懸念となっている。しかし、PFOS が脳神経系発達に及ぼすメカニズムは明らかとなっていない。そのため、幼少期の PFOS 曝露が脳神経系の発達に及ぼす影響とそのメカニズムを明らかにすることを目的に研究を実施した。研究方法は、新生児ラット小脳の初代培養細胞を用いて、甲状腺ホルモン (TH) 誘発性のプルキンエ細胞の樹状突起分枝への影響、甲状腺ホルモン受容体レポーター遺伝子アッセイ、2 型ヨードサイロニン脱ヨード酵素 (D2) アッセイを行った。その結果、PFOS 曝露群において、T₄ 存在下でプルキンエ細胞の樹状突起分枝は抑制され、T₃ 存在下ではプルキンエ細胞の樹状突起分枝は抑制されなかった。レポーター遺伝子アッセイでは、PFOS は CV-1 細胞における hTR α 1 および hTR β 1 の転写活性には影響を及ぼさないことが示された。RT-PCR では、PFOS は初代培養小脳細胞において T₄ の有無に関係なく D2 mRNA 発現を抑制することが示された。C6 神経膠腫由来細胞でも D2 活性は PFOS によって抑制された。以上の結果より、幼少期の PFOS 曝露が D2 活性および/または mRNA 発現の阻害を介し TH を介した小脳発達を阻害し、小脳機能障害を引き起こす可能性があることが示された。

PFOS Inhibits Neurite Formation via DIO2

Yuki Fujiwara¹, Yuhei Miyasaka², Ayane Ninomiya¹, Izuki Amano¹, Wataru Miyazaki³, Noriyuki Koibuchi¹

¹ *Department of Integrative Physiology, Gunma University Graduate School of Medicine,*

² *Gunma University Heavy Ion Medical Center, ³Department of Bioscience and Laboratory Medicine,*

³ *Hirosaki University Graduate School of Health Science*

Perfluorooctane sulfonate (PFOS) is widely used in various industrial and commercial products and has been reported to accumulate in the environment due to its chemical stability, leading to human exposure. The neurotoxic effects of PFOS on the developing brain are of significant concern, yet the mechanisms by which PFOS affects neural development remain unclear. Therefore, this study aimed to elucidate the effects of early-life PFOS exposure on neural development and its underlying mechanisms. Primary cultures of neonatal rat cerebellum were used to evaluate the effects of PFOS on thyroid hormone (TH)-induced neurite outgrowth in Purkinje cells, and thyroid hormone receptor reporter gene assays as well as DIO2 enzyme activity assays were conducted.

Our results showed that PFOS exposure inhibited neurite outgrowth in Purkinje cells in the presence of thyroxine (T₄), but no inhibitory effect was observed in the presence of triiodothyronine (T₃). Reporter gene assays indicated that PFOS did not affect hTR α 1 or hTR β 1 transcriptional activity in CV-1 cells. Additionally, RT-PCR revealed that PFOS suppressed DIO2 mRNA expression in primary cerebellar cells regardless of T₄ presence, and DIO2 activity was similarly inhibited by PFOS in C6 glioma cells.

These findings suggest that early-life PFOS exposure impairs thyroid hormone-dependent cerebellar development through DIO2 activity and mRNA expression inhibition, potentially leading to cerebellar dysfunction.

O2-4

メダカに対する PFAS のエストロゲン様作用：*in silico* および *in vivo* による評価

○石橋弘志¹、松原健太¹、長谷川拓人¹、内田雅也²、富永伸明²、有菌幸司³、平野将司⁴

¹愛媛大学農学部、²有明高専創造工学科、³熊本大学薬学教育部、⁴東海大学農学部

ペル及びポリフルオロアルキル化合物 (PFAS) は、撥油・撥水性、耐熱性、耐化学反応性などの特徴から多くの工業用途や消費者製品に使用されてきた。しかし、難分解性や有害性などを有することから、PFOS や PFOA など数種については残留性有機汚染物質 (POPs) に関するストックホルム条約等で世界的に規制がなされている。一方で、これまで1万種以上の既存あるいは代替及び新規 PFAS の存在が指摘されており、これらはさまざまな用途で使用され最終的に水環境中に流入することから、水生生物への影響評価は喫緊の課題である。しかし、PFOS や PFOA 以外の PFAS の水生生物に対する影響は不明な点が多い。本研究では、USEPA がリスト化している約 7,000 種の PFAS について、メダカエストロゲン受容体 (ER α) に対する結合親和性をスクリーニングするため、*in silico* ドッキングシミュレーション解析を実施した。その結果、メダカ ER α に高親和性を示す PFAS 群が予測できた。次に、高結合親和性が予測された PFOA 前駆物質 FTOHs や PFOA 代替物質 HFPOs の作用を *in vivo* で評価するため、これらを単独ばく露あるいは 17 β -estradiol と共ばく露したメダカ胚・仔魚のエストロゲン応答遺伝子 (ビテロゲニン、コリオゲニン) の発現解析を行った。その結果、FTOHs のエストロゲン様作用や HFPOs の抗エストロゲン様作用が示唆された。

【謝辞】本研究は JSPS 科研費 20H00634 および 23H03562 の助成を受けて実施された。

In silico and in vivo evaluations of estrogenic potentials of PFAS to medaka estrogen receptor alpha

Hiroshi Ishibashi¹, Kenta Matsubara¹, Takuto Hasegawa¹, Masaya Uchida², Nobuyuki Tominaga²,
Koji Arizono³, Masashi Hirano⁴

¹ Faculty of Agriculture, Ehime University, ² Department of Creative Engineering, National Institute of Technology, Ariake College, ³ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,

⁴ School of Agriculture, Tokai University

Per- and polyfluoroalkyl compounds (PFAS) have been used in many industrial applications and consumer products owing to their oil and water repellency, heat resistance, and chemical reaction resistance. However, because of their persistent and toxic properties, several species, such as PFOS and PFOA, are regulated worldwide under the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs). Since more than 10,000 existing, alternative, and new PFASs have been identified, which are used in various applications and ultimately enter the aquatic environment, evaluation of their effects on aquatic organisms is an urgent issue. However, the effects of PFAS, other than PFOS and PFOA, on aquatic organisms remain unclear. In this study, we conducted an *in silico* docking simulation analysis to screen the estrogenic potentials of approximately 7,000 USEPA-listed PFAS on the medaka estrogen receptor (ER α). The results revealed a group of PFAS with high affinity for medaka ER α . To evaluate the effects of the PFOA precursors, FTOHs and PFOA substitutes HFPOs *in vivo*, we analyzed the expression of estrogen-responsive genes (*vitellogenin* and *choriogenin*) in medaka embryos and larvae exposed to these substances. Our result suggested the estrogenic effects of FTOHs and anti-estrogenic effects of HFPOs in medaka.

O2-5

アユの遊泳に及ぼす環境医薬品の影響

○中井 さくら¹, 小田 紗帆¹, 荻平 裕次², 井原 賢², 中田 典秀³,

宮川 信一⁴, 長江 真樹¹, 村田 良介^{1,5}, 天谷 貴史⁵, 征矢野 清^{1,5}

¹長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科, ²高知大学農林海洋科学部, ³神奈川大学化学生命学部, ⁴東京理科大学先進工学部, ⁵長崎大学海洋未来イノベーション機構

【目的】環境医薬品は魚類の神経系を攪乱することによって、正常な行動や生理現象を阻害する。これは、次世代生産に影響を与え、個体群の減少や生態系の攪乱を招く一因となる可能性が高い。本研究では、重要な水産資源であるアユ *Plecoglossus altivelis* を対象魚として、環境医薬品の行動への影響を明らかにするため、神経伝達系のセロトニントランスポーターに作用するミルタザピン(Mir)及びクロロプロマジン(Chp)、アレルギー抑制作用を持つフェキソフェナジン塩酸塩(Fex)、心臓の過敏な応答を抑えるビソプロロール fumarate(Bis)を用いた曝露試験を実施した。

【方法】アユの飼育水に溶媒としてジメチルスルホキシドに溶解したMir、Chp、Fex、Bisを添加し、4日間半止水で水曝露を行った。Mirでは5、50、500、1000 µg/Lの濃度、Chpでは、5、50、250 µg/Lの濃度、FexとBisでは、100、1000 µg/Lの濃度で曝露試験を行った。溶媒のみを添加した群を対照群とした。曝露期間中、朝と夕方に15分間ビデオ撮影を行い、撮影開始から7分後から8分後までの1分間の行動を解析した。観察された異常遊泳を、上層遊泳、縦泳ぎ、体の反覆、底での停滞に分け、その時間を計測した。さらに、解析を行った1分間から異常遊泳が見られた時間を引くことで通常遊泳時間を求めた。

【結果】Mirの500、1000 µg/LとChpの250 µg/Lにおいて上層遊泳や底での停滞などの異常遊泳が観察され、通常遊泳時間が有意に減少した。しかし、FexとBisの曝露群では、異常遊泳がほとんど観察されなかった。

Effects of environmental pharmaceuticals on swimming behavior in ayu

Sakura Nakai¹, Saho Oda¹, Yuji Mushiobira², Masaru Ihara², Norihide Nakada³, Shinichi Miyagawa⁴,
Ryosuke Murata^{1,5}, Masaki Nagae¹, Takafumi Amagai⁵ and Kiyoshi Soyano^{1,5}

¹Graduate School of Fisheries and Environmental Sciences, Nagasaki University, ²Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University, ³Faculty of Chemistry and Biotechnology, Kanagawa University, ⁴Faculty of Advanced Engineering, Tokyo University of Science, ⁵Organization for Marine Science and Technology, Nagasaki University

【Purpose】 Environmental pharmaceuticals (EPs) inhibit normal behavior and physiological functions by acting on the nervous system of fish. The effect of such EPs may affect next generation production, resulting in decrease in population and disruption of ecosystem. The aim of this study was to clarify the effects of EPs on the behavior of the ayu *Plecoglossus altivelis*, an important target species of fisheries. In this study, the exposure tests were conducted using Mirtazapine (Mir) Chlorpromazine Hydrochloride (Chp), fexofenadine hydrochloride (Fex), bisoprolol fumarate (Bis).

【Methods】 Mir, Chp, Fex, and Bis dissolved in dimethyl sulfoxide as a solvent were added to the rearing water of ayu. The exposure tests were conducted for 4 days, replacing the water in half while maintaining the exposure concentration. The exposure concentrations were 5, 50, 500, and 1000 µg/L for Mir; 5, 50, and 250 µg/L for Chp; and 100 and 1000 µg/L for Fex and Bis. The group that only added the solvent was used as the control group. Each tank was videotaped for 15 minutes in the morning and evening during the exposure period, and the behavior was analyzed during the 1-minute period from 7 to 8 minutes after the start of the recording. The abnormal swimming was divided into the following categories: upper layer swimming, stagnation at the bottom, vertical swimming, and lying at the bottom overturning, and the time each behavior was measured. The normal swimming time was calculated by subtracting the time when the abnormal swimming was observed.

【Results】 Abnormal swimming such as upper layer swimming and stagnation at the bottom were observed at 500 and 1000 µg/L of Mir and 250 µg/L of Chp, and normal swimming time was significantly reduced. In the Fex and Bis exposure groups, abnormal swimming was rarely observed, and no significant decrease in normal swimming time was found.

O3-1

フィプロニル代謝物が誘導するミクログリアの活性化と ニューロンとの相互作用の攪乱機序の解析

○平野 哲史¹、池中 良徳²、星 信彦³、田渕 圭章¹

¹富山大学 研究推進機構 生命科学先端研究支援ユニット、

²北海道大学 One Health リサーチセンター、

³神戸大学大学院 農学研究科 応用動物学講座 動物分子形態学分野

グリアの活性化に伴って生じる脳内の炎症応答、すなわち神経炎症は種々の神経疾患の発症要因として注目を集めている。前回大会にて、我々はフェニルピラゾール系農薬フィプロニル (Fip) の主要代謝物であるフィプロニルスルホン (FipS) がミクログリアの活性化を引き起こし、さらに分泌されたエクソソームが分化中のニューロンに対して神経保護的な作用を示すことを明らかにした。本研究では、活性化ミクログリアとニューロンとの相互作用の攪乱に関する新たなメカニズムの解明を目的として、細胞内の代謝状態を反映するミトコンドリア機能の評価やエクソソームに含まれる microRNA の網羅的解析を行った。ヒト不死化ミクログリア HMC3 に対して Fip および FipS (1–100 μ M) を曝露し、JC-10 蛍光色素および細胞外フラックスアナライザーを用いてミトコンドリア膜電位および代謝機能を評価した。超遠心法により培養上清から精製したエクソソームを用いて small RNA-seq 解析および標的として予測された mRNA との統合ネットワーク解析を行った。

ミトコンドリア膜電位は Fip および FipS の曝露により濃度依存的に低下し、FipS では原体に比べてより強い作用がみられた。さらに FipS の曝露により、ミトコンドリア最大呼吸および予備呼吸能の低下に伴ってプロトンリーク量の増加がみられた。さらに FipS 曝露により発現上昇した microRNA に加え、それらの標的として発現低下が予想される mRNA から構成された神経分化に関する機能的ネットワークにおいて制御的な役割を果たす miR-106a-5p や miR-665 を明らかにした。本研究により、化学物質により活性化したミクログリアがエクソソームの分泌を介してニューロンの分化に影響を及ぼす新たな相互作用メカニズムの一端が明らかになった。

Fipronil metabolite-induced microglial activation and disturbance mechanisms of its interaction with neurons

Tetsushi Hirano¹, Yoshinori Ikenaka, Nobuhiko Hoshi⁵, Yoshiaki Tabuchi²

¹Life Science Research Center, University of Toyama,

²One health research center, Hokkaido University,

³Laboratory of Animal Molecular Morphology, Department of Animal Science,
Graduate School of Agricultural Science, Kobe University

The inflammatory response in the brain that occurs with glial activation, neuroinflammation, has attracted attention as a pathogenic factor in various neurological diseases. At the last congress, we showed that fipronil sulphone (FipS), a major metabolite of the phenylpyrazole pesticide fipronil (Fip), induces microglial activation and that the secreted exosomes exert neuroprotective effects on differentiating neurons. In the present study, we aimed to elucidate a new mechanism for the disturbance of the interaction between activated microglia and neurons. Mitochondrial membrane potential was reduced in a concentration-dependent manner by exposure to Fip and FipS, with stronger effects in FipS than in the original. Furthermore, FipS exposure caused an increase in proton leakage with a decrease in mitochondrial maximal respiration and pre-respiratory capacity. In addition to the microRNAs up-regulated by FipS exposure, miR-106a-5p and miR-665 were identified as their targets, playing a regulatory role in the functional network related to neuronal differentiation, consisting of mRNAs that are expected to be down-regulated. This study reveals a novel interaction mechanism whereby microglia activated by chemicals influence neuronal differentiation via exosome secretion.

The Challenge of Evaluating Neurotoxicity Using High-Resolution Mass Spectrometry

Yoshinori IKENAKA^{1,2}, Tomoya KOIKE², Akifumi EGUCHI³, Kei NOMIYAMA⁴, Collins NIMAKO^{1,2},
Yared BEYENE^{1,2}, Shouta M.M. NAKAYAMA², Mayumi Ishizuka²

¹One Health Research Center Hokkaido University, ²Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University,

³Division of Environmental Preventive Medical Sciences Chiba University, ⁴Center for Marine
Environmental Studies Ehime University

Background: In recent years, mental disorders are thought to be caused in part by disturbances in higher brain functions due to exposure to certain chemicals. Current neurotoxicity testing is evaluated primarily on the basis of gross findings, but there may be toxic effects that do not appear in the gross findings. Therefore, it is necessary to establish new methods that can detect them. Quantifying biomarkers using mass spectrometry is more sensitive, specific, objective, and high-throughput testing methods. In this study, Neonicotinoid insecticide (NN), which has been reported to cause neurological symptoms, was used as a neurotoxicant. This study was to discover potential biomarkers of neurotoxicity by lipidomics analysis of the cerebral cortex of mice after NN administration.

Method: Acetamiprid (ACE), an NN, was administered orally to C57BL/6 mice at 65 mg/kg and 130 mg/kg, respectively, while mice in the control group received distilled water containing 5 % DMSO orally. After 30 minutes, brain samples were collected and non-targeted lipidomics analysis of the cerebral cortex was performed using LC/Q-TOF/MS(Agilent 6546).

Result: A total of 321 compounds were annotated; although PCA analysis did not show a clear separation, 46 compounds exhibited a p-value of less than 0.05 and a fold change greater than 2.0. Correlation analysis revealed a strong association between 7 of the 46 lipids and ACE, with an absolute correlation coefficient greater than 0.7. Among these 7 compounds were ACar, FAHFA, LPE, and TG, all of which demonstrated an area under the curve (AUC) greater than 0.8 in the receiver operating characteristic (ROC) analysis.

O3-3

iPS 細胞、ゼブラフィッシュ胚を用いた BPA によるレチノイン酸シグナル促進効果の解析

○高田達之¹、西江友美¹、田屋智貴¹、大森駿一¹、澤部美咲¹、高橋美羽¹、日比正彦²、
上野賢也³、平澤明³

¹立命館大学薬学部・創薬科学科、²名古屋大学大学院理学研究科・生命理学、

³京都大学大学院薬学研究科・薬理ゲノミクス

プラスチックなどの化学物質が生物の発生に多様な影響を及ぼすことが報告されてきたがその因果関係、作用メカニズムに関しては不明な点が多く残されている。その一因として発生過程は多数の受容体、シグナル伝達経路が関与し、実験条件、解析方法も多様であることから、これまでの知見の統合が困難であることがあげられる。これまで化学物質影響はエストロゲンに代表されるステロイドホルモンレセプターへの作用を中心に研究されてきたが、化学物質がもたらす症状の多様性は、生物のより根本的プロセスへの作用を連想させる。

我々は ES 細胞を用いて代表的な化学物質ビスフェノール A (BPA) がレチノイン酸 (RA) と共存すると RA シグナルを促進することを見出し、その細胞分化、個体発生への影響を研究してきた。今回、ヒト iPS 細胞およびゼブラフィッシュ胚を用いて BPA などの化学物質が遺伝子発現に与える影響に関し、RA シグナルに注目して両者の比較を試みた。その結果、BPA と RA を同時に添加すると *HOX* 遺伝子を介して RA シグナルを促進することが両者に共通して確認された。特にゼブラフィッシュで神経形成、頭蓋軟骨形成への影響が確認された。RA シグナルは細胞の増殖、分化、神経発生、体軸形成、生殖、免疫、視覚、恒常性維持など多様な生物機能を調節しているためその影響は多岐にわたると考えられる。また、この結果は RA シグナルへの影響評価方法としてヒト iPS 細胞の有効性を示唆している。

BPA enhanced RA signaling in iPSC and zebrafish embryo

Tatsuyuki Takada¹, Tomomi Nishie¹, Tomoki Taya¹, Syunichi Omori¹, Misaki Sawabe¹, Miu Takahashi¹,
Masahiko Hibi², Kenya Ueno³, Akira Hirasawa³

¹ Department of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University, ² Graduate School of Science, Nagoya University, ³ Department of Genomic Drug Discovery Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Chemicals, including plastics, have been reported to have various effects on animal development. However, the causal link and the mechanism are not fully understood. One of the reasons is that the developmental process is complicated involving multiple receptors and signaling pathways. In addition, experimental conditions and analytical methods vary widely, making it difficult to integrate experimental results to deduce the mechanisms of their action. Various effects of chemical exposure seem to imply the disruption of the signaling which plays a key role in fundamental biological processes. We found that co-exposure of bisphenol A (BPA) and RA stimulates retinoic acid (RA) signaling in ES cells and have been investigating its effect on cell differentiation and development. In this study, we analyzed the effect of BPA on gene expression using human induced pluripotent cells (iPSC) and zebrafish embryos, focusing on RA signaling. Co-exposure of BPA and RA enhanced the expression of genes regulated by RA signaling such as *HOX* genes. Impairment of neurogenesis and craniofacial development was observed in zebrafish embryos. Since RA signaling is involved in cell proliferation, differentiation, neurogenesis, body axis formation, reproduction, immunity, vision, and homeostasis, this finding may explain the diverse effects of chemicals. This study also suggests that human iPSC is a useful tool for evaluating chemicals on RA signaling.

O3-4

レチノイン酸シグナルが制御する精上皮周期に着目した精巣毒性評価

○横田 理^{1,2}、齊藤 洋克¹、若山 友彦²、北嶋 聡¹

¹ 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部、² 熊本大学大学院・生命科学研究所

内分泌かく乱作用の毒性作用機序の一つとして、レチノイン酸 (RA) シグナルがあげられる。ビタミン A (VA) 欠乏により RA シグナルが枯渇すると、未分化型精粗細胞は分化型へ移行することができず、精子形成初期の段階で停止してしまう。そこに VA を補給すると精子形成は再開する。しかし、VA 過剰による RA シグナルかく乱が精子形成にどのような影響を及ぼすのかは明らかにされていない。本研究では、RA シグナルが制御する精上皮周期に着目した精巣毒性評価法を新規に開発し、その影響評価を行うことを目的とした。遺伝子発現解析により、先行で確立した VA 過剰マウス (250 IU/g diet) 精巣内の RA 合成・代謝・受容体関連のレチノイドシグナルの発現変動が認められた。そこで、RA シグナルが制御する精上皮周期を明らかにするため、精巣組織の薄切切片を作成し、蛍光標識 PNA レクチンによるマウス精上皮周期の高感度検出法を開発した。さらに、PLZF や SCP3 抗体との多重染色により、精子形成過程の全ての生殖細胞系列を同定することに成功した。PNA レクチン抗体と細胞マーカー抗体による免疫染色法を組み合わせることにより、精上皮ステージ VII, VIII において、VA 過剰群では減数分裂開始に重要な役割を担うプレレプトテン期精母細胞数が減少することを見出した。これらの結果から、本研究で開発した精上皮周期に着目した精巣毒性評価は RA シグナルかく乱の鋭敏な評価指標となることが期待される。

Seminiferous epithelium cycle regulation via retinoic acid signal as an index of testicular toxicity evaluation

Satoshi Yokota¹, Hirokatsu Saito¹, Tomohiko Wakayama², Satoshi Kitajima¹

¹National Institute of Health Sciences, ²Kumamoto University

In mice, spermatogenesis takes place in the seminiferous epithelium which cycle is regulated by retinoid signal. It is well known that vitamin A deficiency arrest spermatogenesis, however it is unknown that the effects of vitamin A excess (VAE) on spermatogenesis. The aim of the present study was to develop a novel method of testicular toxicity evaluation focusing on seminiferous epithelium cycle. To the best of our knowledge, few studies after that by Oakberg have performed a quantitative analysis of the cellular composition in mouse seminiferous tubules. We succeeded in demonstrating that lectin histochemistry and immunohistochemistry using fluorescent dye-conjugated molecules appears to achieve a rapid and quantitative evaluation of testicular toxicity. As a results, the percentage of seminiferous tubules in stages VII and VIII was significantly lower in the VAE mice than in the control using PNA-lectin histochemistry. We also showed that chronic VAE exposure influenced preleptotene spermatocyte initiating meiosis. In addition, retinoid signal was disrupted as confirmed by quantitative gene expression analysis. These results suggest that this evaluation method of testicular toxicity is usefulness to predict retinoid signal disruption.

O3-5

エピジェネティックなメカニズムを介した発生毒性発現機構： ヒト多能性幹細胞を用いた bisphenol A と thalidomide の比較解析

○大塚 悟史¹、曾根 秀子²

¹東京大学大学院医学系研究科、²横浜薬科大学大学院薬学研究科

DNA のメチル化やヒストンタンパク質の化学修飾といったエピジェネティックな遺伝子発現制御機構は、遺伝子発現プロファイルが大きく変化する胎生期において重要な役割を果たしている。胎生期における化学物質などの外的因子の曝露がエピジェネティックなメカニズムを介して生殖・発生異常を引き起こすことが示唆されており、初期発生における化学物質のエピジェネティック毒性の評価およびその作用機序の解明が求められている。

本研究では、動物実験および疫学研究で広く報告されている環境化学物質である bisphenol A と、医薬品である thalidomide をモデル物質として用い、細胞分化、遺伝子発現および、エピジェネティックマーカーのひとつである H3K27ac の修飾状態に与える影響を評価した。細胞分化への影響を評価した結果、thalidomide は内胚葉および中胚葉への分化を抑制し、外胚葉への分化を顕著に促進した。一方、bisphenol A の分化影響は thalidomide に比べて弱いことが分かった。網羅的遺伝子発現解析の結果、両化学物質が、各々、特有の遺伝子発現プロファイルを示すことが分かった。遺伝子発現の制御に関わる複数のタンパク質と DNA との複合体形成を調べるエンハンセオソーム解析では、bisphenol A または thalidomide によって、特定の遺伝子のエンハンサー領域で H3K27ac 修飾が増え、エピジェネティックな変化を介して遺伝子発現が変化したことが示された。

これらの結果から、bisphenol A と thalidomide がエピジェネティックなメカニズムを介して発生過程に影響を及ぼしうることが示唆された。本研究は、発生毒性の新たな発現機構の理解を深め、医薬品および環境化学物質のリスク評価アセスメントの改善に寄与する可能性がある。

Epigenetic Mechanisms of Developmental Toxicity: Comparative Analysis of Bisphenol A and Thalidomide in Human Pluripotent Stem Cells

Satoshi Otsuka¹, Hideko Sone²

¹Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, ²Graduate School of Pharmacy, Yokohama University of Pharmacy

Epigenetic regulations of gene expression, such as DNA methylation and histone modifications, play an important role during the embryonic period, when gene expression profiles change substantially. Exposure to external factors like drugs or environmental chemicals during this period has been reported to lead reproductive and developmental abnormalities through epigenetic mechanisms. Therefore, there is a pressing need to evaluate the epigenetic toxicity of chemicals during early development and to elucidate their mechanisms of action.

In this study, we used bisphenol A and thalidomide as model substances due to their extensive documentation in animal and epidemiological studies and analyzed their effects on cellular differentiation, gene expression, and epigenetic modification. Thalidomide notably shifted differentiation toward ectodermal lineages at the expense of endodermal and mesodermal ones, while bisphenol A had milder effects. Transcriptome analysis revealed distinct gene expression profiles for each chemical, with thalidomide inducing more pronounced changes. Enhanceosome analysis revealed increased H3K27ac modifications at enhancer regions of genes upregulated by bisphenol A or thalidomide, indicating epigenetic alterations as a key mechanism.

These findings offer novel insights into the epigenetic mechanisms by which bisphenol A and thalidomide influence developmental processes. Our study enhances the understanding of developmental toxicity mechanisms and may inform improved risk assessment strategies for medicinal and environmental chemicals.

O4-1

ネオニコチノイドなど農薬再評価の進捗状況について

木村一黒田 純子

環境脳神経科学情報センター

農薬取締法改正（2018 年）に伴い、農薬再評価が開始した。同法 8 条 4 項には、「再評価においては、最新の科学的知見に基づき、・・・農薬の安全性その他の品質に関する審査を行うものとする。」と明記されており、申請企業が提出する試験成績と合わせて、公表文献が安全性評価に活用されることになった。これまで日本の農薬登録では、一旦登録されると 3 年毎に形式的な再登録が行われてきたが、公表文献はリスク評価に使われてこなかった。再評価において、最新の科学情報を提供する公表文献は、専門的知識を持った第三者が公平、透明性をもって収集、選択、評価を行い、情報提供することが必要とされる。農水省・農業資材審議会農薬分科会（2021 年 9 月 22 日付け、2023 年 7 月 27 日付け一部改正）から提示された「公表文献の収集、選択等のためのガイドライン」（以下、ガイドライン）によれば、公表文献の収集、選択等を行う主体は、再評価を受ける当事者である農薬企業とされている。また、公表文献の情報募集は 2023 年 11 月 1 日より、一般からも情報を提供するシステムを導入した。現在このシステムで、農薬再評価が農水省、食品安全委員会、環境省で進みつつあるが、公平、透明性をもって適切に進んでいるのだろうか。農薬再評価の進捗状況や問題点について、報告する。

Progress in Re-evaluation of Neonicotinoids and Other Pesticides

Junko Kimura-Kuroda

Environmental Neuroscience Information Center

With the revision of the Pesticide Control Law (2018), the re-evaluation of pesticides has begun. Article 8(4) of the law states, "In the re-evaluation, ... the safety and other characteristics of the pesticide shall be evaluated based on the latest scientific knowledge." This means that published literature and test results submitted by the applicant company will be used in the safety evaluation. Previously, pesticide registration in Japan included a formal re-registration process every three years after registration, but published literature was not used for risk assessment. In re-evaluation, published literature that provides the latest scientific information must be collected, selected, evaluated, and provided by a third party with expertise in an impartial and transparent manner. According to the "Guidelines for Collection and Selection of Published Literature" (hereinafter referred to as the "Guidelines") issued by the Agricultural Chemicals Subcommittee of the Agricultural Materials Council of the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (dated September 22, 2021, partially revised on July 27, 2023), the entity responsible for the collection and selection of published literature is the agricultural chemical company that is the subject of the re-evaluation. The Guidelines also state that the collection and selection of published literature should be conducted by the agrochemical companies that are parties to the reevaluation. In addition, a system for soliciting information on published literature was established on November 1, 2023, to allow the public to provide information as well. Under this system, the re-evaluation of pesticides at MAFF, the Food Safety Commission and the Ministry of the Environment is currently proceeding, but is it proceeding properly, with fairness and transparency? The following is a report on the progress of pesticide re-evaluation.

O4-2

クロチアニジン父性曝露による精子 microRNA の発現変動と神経行動学的な次世代影響

○伊藤 慎子¹, 布引 沙利香¹, 吉本 彩乃¹, 万谷 洋平¹, 横山 俊史¹,
平野 哲史², 池中 良徳³, 星 信彦¹

¹神戸大学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座,

²富山大学生命科学先端研究支援ユニット, ³北海道大学 One Health リサーチセンター

【背景と目的】 父親の様々な環境要因が精子にエピジェネティックな変化を引き起こし、それが子の疾患リスクに影響を与えることが示唆されている。ネオニコチノイド系農薬クロチアニジン (CLO) は、母マウスへの曝露を介して子の情動行動に影響を及ぼすことが知られているが、父性曝露による次世代影響はほとんど調べられていない。本研究では、父マウスへの CLO 曝露が精子と次世代の行動に及ぼす影響を検証した。

【材料と方法】 雄マウス (C57BL/6N, 9 週齢) に CLO (50 mg/kg/day : 雄マウス無毒性量を参考) を 6 週間曝露した。〈実験 1〉非曝露の雌と交配させて得た雄産子 (F1) に対して、9-10 週齢時に 2 種類の行動試験、海馬・線条体のモノアミン濃度測定、および海馬 RNA シーケンス解析を行った。〈実験 2〉精巣上体尾部から成熟精子を採取し、microRNA (miRNA) シーケンス解析を実施した。

【結果と考察】 〈実験 1〉 CLO に曝露された父マウス由来の F1 は、対照群と比較して自発運動量が有意に低下した。線条体においてドーパミン、ヒスタミンは有意に減少し、トリプタミンは有意に増加した。セロトニンには減少傾向がみられた。海馬 RNA シーケンス解析からは、神経系に関連する遺伝子発現の変化が明らかとなり、「軸索誘導」、「シナプス形成」、「カルシウムシグナリング」などへの顕著な影響が示唆された。〈実験 2〉 CLO 曝露群は、対照群と比較して 22 個の miRNA が発現上昇し、28 個の miRNA が発現低下した。発現が変動した miRNA の標的遺伝子は「軸索誘導」や「神経発達」などに強く関連することが示唆された。以上の結果から、CLO 曝露による精子 miRNA の発現変動は神経発達を制御する遺伝子発現を乱し、次世代の行動変化に寄与した可能性が考えられた。

Paternal exposure to clothianidin alters sperm miRNA expression and induces neurobehavioral changes in male offspring mice

Makiko Ito¹, Sarika Nunobiki¹, Ayano Yoshimoto¹, Youhei Mantani¹, Toshifumi Yokoyama¹,
Tetsushi Hirano², Yoshinori Ikenaka³, Nobuhiko Hoshi¹

¹Lab. Anim. Mol. Morphol., Dept. Anim. Sci., Grad. Sch. Agri. Sci., Kobe Univ.;

²Life Sci. Res. Center, Univ. Toyama; ³One Health Res. Center, Hokkaido Univ.

Accumulating evidence suggests that paternal environmental factors have epigenetic effects on sperm and influence offspring. Neonicotinoid pesticides, which are widely used around the world, are known to affect offspring phenotypes through maternal exposure in mice, but the effects of paternal exposure remain unknown. We examined the neurobehavioral effects on offspring mice resulting from paternal exposure to the neonicotinoid pesticide clothianidin (CLO) and explored microRNA (miRNA) expression in sperm—an epigenetic aspect—to elucidate the relationships between sperm miRNA and intergenerational effects. Male mice (C57BL/6N, 9 weeks old) were exposed to a no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) dose of CLO (50 mg/kg/day) for 6 weeks. Male offspring from CLO-exposed fathers showed decreased levels of spontaneous locomotor activity, accompanied by changes in monoamine levels in the hippocampus and striatum. Hippocampal RNA sequence data revealed that paternal CLO exposure altered the expression of genes related to the nervous system in male offspring, affecting pathways such as those for axonal guidance signaling, synaptogenesis signaling, and calcium signaling. Sequence analysis of sperm miRNA revealed 22 upregulated and 28 downregulated miRNAs in the exposed group, with the target genes were involved in annotations such as axon guidance and nervous system development. These results suggest that perturbations in sperm miRNA content due to CLO exposure disrupt the expression of genes that regulate neurodevelopment, leading to behavioral abnormalities in the offspring. This study provides novel insights into the impact of paternal exposure to NNs on offspring via sperm.

O4-3

ネオニコチノイド系農薬クロチアニジンの
無毒性量(NOAE)曝露による母性行動への継世代影響

○布引 沙利香¹, 伊藤 槇子¹, 吉本 彩乃¹, 森下 理奈子¹, 万谷 洋平¹,
横山 俊史¹, 平野 哲史², 池中 良徳³, 星 信彦¹

¹神戸大学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座,

²富山大学生命科学先端研究支援ユニット, ³北海道大学 One Health リサーチセンター

【背景と目的】我々の既報では、胎子・授乳期にネオニコチノイド系農薬 (NN) クロチアニジン (CLO) に曝露されたマウスにおいて、母親になると育子放棄や食殺の増加することが示された。オキシトシン分泌減少と母性行動悪化の関連性から、CLO はオキシトシン分泌を減少させることが原因の一端と示唆されたが、それを明確に示した報告はない。本研究では CLO がオキシトシンおよび母性行動（親の不十分な養育行動）にどのような影響を及ぼすのか、またその影響が継代的に引き継がれるのか検証した。

【材料と方法】 C57BL/6N 妊娠マウスに CLO を妊娠日から離乳日まで摂取（65 mg/kg/day: 農薬評価書の無毒性量）させた（F0 母獣）。その子（F1 母獣）、孫（F2 母獣）および曾孫（F3 母獣）に対して、妊娠中の巣作り行動試験および分娩後の産子のリトリートング試験を行った後、血中ホルモン量を LC/ESI-MS/MS を用いて測定し、母性行動を評価した。

【結果と考察】 F0 世代の CLO 投与群では、産子のリトリートングの開始が遅れ、6 匹中 1 匹しか産子全匹のリトリートングを完了せず、離乳時の血中オキシトシン量が低値傾向だった。F1 世代の CLO 投与群では、巣作り行動試験スコアが有意に低く、全く巣作りをしないものもいた。F2 世代の CLO 投与群においても、9 匹中 5 匹しか産子全匹のリトリートングを完了せず、このうち、2 番目の産子をリトリートングする秒数が有意に短かった。F3 世代の CLO 投与群では、血中アルドステロン量が減少し、血中テストステロン量が増加した。以上のことから、CLO は次世代以降の母性行動にも悪影響を及ぼし、CLO のエピゲノム毒性が示されたが、その影響は世代を経ると減弱することが推察された。

Transgenerational effects of exposure to a no-observed-adverse-effect-level (NOAE) dose of neonicotinoid pesticide clothianidin on maternal behavior

Sarika Nunobiki¹, Ayano Yoshimoto¹, Makiko Ito¹, Rinako Morishita¹, Youhei Mantani¹,
Toshifumi Yokoyama¹, Tetsushi Hirano², Yoshinori Ikenaka³, Nobuhiko Hoshi¹

¹Lab. Anim. Mol. Morphol., Dept. Anim. Sci., Grad. Sch. Agri. Sci., Kobe Univ.;

²Life Sci. Res. Center, Univ. Toyama; ³One Health Res. Center, Hokkaido Univ.

Our previous reports showed that exposure to the neonicotinoid pesticide clothianidin (CLO) during fetal development and lactation in mice led to higher rates of maternal neglect and infanticide. Although the demonstrated association between reduced oxytocin secretion and diminished maternal parenting behavior implies a correlation with declining oxytocin levels, concrete evidence linking this association to CLO exposure has not yet emerged. This study investigated CLO's effects on maternal behavior and oxytocin in C57BL/6N mice exposed during pregnancy and lactation (F0 mothers) as well as in the adult female offspring exposed while they themselves were pregnant and lactating (F1, F2 & F3 mothers). The results showed a decrease in oxytocin secretion and a marked decrease in pup retrieval behavior among the F0 mothers in the CLO exposure group compared to those in the control group. Their offspring, the F1 mothers, showed significantly lower nest-building scores during pregnancy. In the F2 mothers, only 5 of 9 mothers retrieved all 4 pups, with a significantly shorter latency to retrieve the second pup. The F3 mothers showed a decrease in plasma aldosterone levels and an increase in plasma testosterone levels. These findings suggest that CLO affects the maternal behavior of the next generation. In other words, CLO exhibits epigenetic toxicity, but these effects were suggested to weaken with each passing generation.

O4-4

マウスにおけるフェニルピラゾール系農薬フィプロニルの胎子・新生子期曝露の次世代影響

○吉本 彩乃¹, 伊藤 慎子¹, 布引 沙利香¹, 万谷 洋平¹, 横山 俊史¹,
平野 哲史², 池中 良徳³, 星 信彦¹

¹神戸大学大学院 農学研究科 応用動物学講座,

²富山大学生命科学先端研究支援ユニット, ³北海道大学 One Health リサーチセンター

【背景と目的】 γ -アミノ酪酸(GABA)は、興奮抑制、精神安定作用を有する抑制性神経伝達物質であり、受容体は中枢神経系に広く分布する。フェニルピラゾール系殺虫剤のフィプロニル(FPN)は、GABA-Cl チャネルを阻害し、神経の過剰興奮を引き起こす。近年、哺乳類に対する安全性に懸念が高まっている。本研究では、胎子・新生子期の FPN 曝露による発達神経毒性を検証した。

【材料と方法】《実験 1: 胎子》妊娠マウス(C57BL/6N)に胎齢 1.5 日から離乳まで FPN(0.43 mg/kg/日: 農薬評価書の亜慢性無毒性量)を曝露し、採血した。《実験 2: F0 世代》4 週齢雄マウスに 10 週齢まで投与し、行動試験を実施した。《実験 3: F1 世代》妊娠マウスに離乳まで投与して得た雄産子に対し、3 および 10 週齢時に行動試験を実施した。試験後、採血した。

【結果と考察】実験 1: 投与群の胎子は母獣よりも FPNS が高濃度であった。FPN は血液胎盤関門を介して胎子に移行し、高濃度の FPNS として体内に留まることが示された。実験 2: 自発運動量の増加傾向、血中ヒスタミン量の増加傾向がみられた。実験 3: 両週齢の投与群で自発運動量の増加、不安様行動の減少、短期記憶力の低下が観察された。また、3 週齢の投与群ではヒスタミン量の増加がみられた。ステロイドホルモンについては、3 週齢と 10 週齢の投与群で異なる変化を示した。以上の知見から、母獣の FPN や FPNS は化学物質に対して感受性の高い胎子・新生子の体内へ移行後、高濃度で滞留することが示された。曝露を終了した後も内分泌機能の攪乱を引き起こし、次世代でも神経行動学的影響を及ぼす可能性がある。

Next-generation effects of fetal and neonatal exposure to the phenylpyrazole pesticide fipronil in mice

Ayano Yoshimoto¹, Makiko Ito¹, Sarika Nunobiki¹, Youhei Mantani¹,
Toshifumi Yokoyama¹, Tetsushi Hirano², Yoshinori Ikenaka³, Nobuhiko Hoshi¹

¹Lab. Anim. Mol. Morphol, Dept. Anim. Sci., Grad. Sch. Agri. Sci., Kobe Univ.,

²Life Sci. Res. Center, Univ. Toyama, ³One Health Res. Center, Hokkaido Univ.

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is an inhibitory neurotransmitter with stimulant and tranquilizing effects, with receptors distributed widely in the central nervous system. The phenylpyrazole insecticide fipronil (FPN) and its metabolite fipronil sulfone (FPNS) inhibit GABA-Cl channels, leading to nerve overexcitation. Recently, the safety of FPN and FPNS in mammals has been called into question. In Experiment 1 of this study, FPN was administered to mothers to determine the amount transferred to fetuses. The concentrations of FPN and FPNS were found to be higher in fetuses than in mothers. Experiment 2 involved behavioral tests and blood sampling of male mice administered FPN at 4 to 10 weeks of age, revealing heightened locomotor activity and histamine levels in the fipronil group. In Experiment 3, we conducted a behavioral test and blood sampling in male litters of pregnant mice treated from day 1.5 until weaning. The results showed increased locomotor activity, decreased anxiety-like behavior, and decreased short-term memory in the fipronil group. Histamine levels increased at 3 weeks of age and steroid hormone levels changed inversely between 3 and 10 weeks of age. FPN and FPNS are transferred at high concentrations from mother mice to the fetus and neonates, potentially leading to endocrine disrupting and neurobehavioral effects even after the cessation of exposure.

Comparison of Analytical Methods for Assessing the Combined Exposure Effects of Chemical Mixtures

Akifumi Eguchi¹, Kohki Takaguchi¹, Takayuki Kawashima², Hiroko Nakaoka¹, Kayo Yoda-Tsumura¹, Keiichi Shimatani¹, Yoshitake Nakayama¹, Chisato Mori¹, Norimichi Suzuki¹

¹ Center for Preventive Medical Sciences, Chiba University, Chiba, Japan. ² School of Computing, Institute of Science Tokyo, Tokyo, Japan

There are various chemical substances in the environment, some of which can have detrimental effects on human health. While epidemiological studies primarily focus on assessing the impacts of exposure to individual chemical substances, the reality is that numerous chemicals coexist in the environment. Consequently, there is a growing demand for methodologies capable of evaluating the complex, combined health effects of these substances. In this study, we used Volatile Organic Compounds (VOCs) as a model to compare multiple analytical approaches.

Comprehensive screening of VOCs identified 1701 chromatographic peaks, which after data, yielded 160 peaks for data analysis (annotated 102, unknown 58). Clustering of BRSs resulted in the classification of subjects into four groups (Group 1: control, Group 2: various symptoms, Group 3: nasal congestion and cough, and Group 4: fatigue).

In the gWQS, the association between chemical exposure and outcomes was not significant in any of the clusters, and qgcomp did not converge with the algorithm. The AUC values for each model ranged from 0.6 to 0.7 for Feature-Weighted Elastic Net and 0.5 to 0.6 for ecpc, indicating that the accuracy of the predictive models was not sufficient. Hexanal was associated with Group 2 outcomes, 2-butoxyethanol with Group 3, and 36 peaks (including 21 unknowns) with Group 4. However, VOC effect sizes were three orders of magnitudes were significantly less pronounced compared to sociodemographic variables such as age and tobacco consumption.

O4-6

有機フッ素化合物による肝線維化誘導メカニズムの解明

○宮崎航^{1, 2}, 佐藤詩織³, 武内春花³, 近江穂香³, 櫻木青¹, 宮崎光江^{1, 2}

¹弘前大学大学院保健学研究科生体検査科学領域

²弘前大学大学院保健学研究科生体応答科学研究センター

³弘前大学医学部保健学科

有機フッ素化合物(PFASs): ペルフルオロオクタン酸(PFOA)、ペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)のばく露は、ヒトにおいて、生殖機能障害やがん、肝疾患、甲状腺機能異常などを引き起こすことが報告されている。しかし、PFASs によるこれらの毒性発現機構の解明は十分になされていない。我々はこれまで、胎盤合体化における、特に cyclic AMP シグナル伝達経路における PFASs の作用機序について検証してきた。本研究では、このほかの細胞内シグナル伝達経路における PFASs の作用について、肝線維化に着目し、肝細胞ならびに肝星細胞における TGF- β を介する経路における PFASs の作用について解析を行った。

不死化ヒト肝星細胞株 TWNT-1 にさまざまな濃度の PFOS をばく露し、肝線維化に関するマーカー遺伝子(PAI-1, α -SMA など)の mRNA 発現を確認したところ、PFOS によりマーカーの一部に有意な発現増加が見られた。また、PFOS ばく露により TGF- β -Smad 経路を介する転写活性がわずかに亢進した。一方、ヒト肝がん細胞株 HepG2 にさまざまな濃度の PFOS をばく露し、TGF- β 発現量を測定したところ PFOS ばく露により TGF- β の発現量が増加していることを確認した。HepG2 における TGF- β の発現増加が星細胞における TGF- β -Smad 経路の転写を促進するか検証したところ、PFOS ばく露 HepG2 の培養上清により転写が活性化された。

以上から、PFOS による肝臓における線維化は、星細胞における PFOS の部分的な作用と、PFOS ばく露により HepG2 で産生される TGF- β による TGF- β -Smad 経路の活性化により引き起こされる可能性が示唆された。今後は PFOS の直接的な作用と、HepG2 における TGF- β 誘導メカニズムについて、更なる検証を進める予定である。

The Induction of Liver Fibrosis by PFASs

Wataru Miyazaki^{1, 2}, Shiori Satoh³, Haruka Takeuchi³, Honoka Ohmi³, Joh Sakuragi¹, Mitsue Miyazaki^{1, 2},

¹ Hirosaki University Graduate School of Health Sciences

² Hirosaki University Research Center for Biomedical Science

³ Hirosaki University School of Health Sciences

Perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctane acid (PFOA) are widely used in several products. The exposure and accumulation of these compounds induce several toxic effects in humans. PFOS and PFOA may affect hepatic cells, such as hepatocytes and satellite cells, resulting in hepatic dysfunction and several diseases, including cancer and fibrosis. Understanding how to induce the toxicities is essential, but the mechanisms are still unknown. In this study, to clarify the mechanism of the toxicities in the liver, we investigated the effects of PFOS using a hepatocarcinoma cell line, HepG2, and an immortalized hepatic satellite cell line, TWNT-1.

TGF-beta activates the TGF-beta-Smad cellular signaling pathway and induces liver fibrosis in the hepatic satellite cells. First, we exposed PFOS and measured the expression levels of liver fibrosis markers and the transcriptional activities in TWNT-1. The levels and activities were up-regulated partially. Moreover, the supernatant from PFOS-exposed HepG2 also augmented the transcriptional activities through the TGF-beta-Smad pathway. These results suggest that PFOS may induce liver fibrosis by disrupting the TGF-beta-Smad signaling pathway.

O5-1

因果推論の科学の手法の適用により、小・中・高校生の暴力行為の発生は、
ネオニコチノイド系農薬が主要原因であることを示す事を試みる。

○橋本 正則¹、
¹MS パフォーマンス研

マウスへの無毒性量以下のネオニコチノイド系農薬の投与により怯えが発生するとの報告があった。強い武器を持たない動物は攻撃性に歯止めがかからないことがローレンツによって報告されている。従い、低濃度のネオニコチノイド系農薬であっても怯えた人が暴力的になる事が懸念される。

そこで、永年に渡って統計がとられている文部科学省の「児童生徒の問題行動・不登校等生徒指導上の諸問題に関する調査結果について」中の「学校の管理下における暴力行為発生率の推移」に対してネオニコチノイド系農薬の出荷量と暴力行為発生率との関連を、因果ダイアグラムを用い検討した。

ネオニコチノイド系農薬の体内摂取濃度を算出し、併せて各農薬の毒性強度比を一日摂取許容量(ADI)及び急性参照用量(ARfD)を参照して定め、摂取された農薬の等価摂取濃度を算出した。

解析の結果、両者の間に高い相関係数が得られた。暴力行為発生率の急激な上昇がネオニコチノイド系農薬の国内使用開始年度である 1993 年から生じていることを併せて考慮すると、小中高校生の暴力行為の発生は、ネオニコチノイド農薬が主要な原因であるとするのが合理的であると考えられる。

更に反事実の手法を用い、暴力行為の発生率の抑制に及ぼす法的規制の抑制効果を推定する。

**By applying The New Science of Cause and Effect, we attempt to show that
neonicotinoid pesticides are a major factor in the occurrence of violent behavior
among elementary, middle, and high school students.**

Masanori Hashimoto¹,

¹MS Performance Lab.

It has been reported that administration of neonicotinoid pesticides below the non-toxic dose to mice causes fear. Lorenz has reported that animals without strong weapons cannot control their aggression. Therefore, it is feared that even low concentrations of neonicotinoid pesticides may cause frightened animals to become violent.

We therefore used a causal diagram to examine the relationship between the shipping amount of neonicotinoid pesticides and the incidence of violent acts in the "Trends in the incidence of violent acts under school supervision" in the "Survey results on various problems in student guidance such as problem behavior and school absenteeism among children and students," which has been compiled by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology over the years.

We calculated the internal intake concentration of neonicotinoid pesticides, and also determined the toxicity intensity ratio of each pesticide with reference to the acceptable daily intake (ADI) and acute reference dose (ARfD), and calculated the equivalent intake concentration of the ingested pesticide.

As a result of the analysis, a high correlation coefficient was obtained between the two. Considering that the sharp increase in the incidence of violent acts has occurred since 1993, the year neonicotinoid pesticides began to be used in Japan, it seems reasonable to conclude that neonicotinoid pesticides are the main cause of violent acts among elementary, junior high, and high school students.

Furthermore, using counterfactual methods, we estimate the inhibitory effect of legal regulations on reducing the incidence of violent acts.

エピジェネティック毒性学の確立を目指して

○澁谷 徹¹, 堀谷幸治¹, 藤野 紘²

¹環境エピジェネティクス研究所, ²水俣協立病院

演者らは、これまで内分泌かく乱物質（EDCs）のほとんどが、生体のエピジェネティクスをかく乱することによって、「エピジェネティック毒性：EpiTox」を発現することをさまざまな文献などによって確認してきた。また EDCs の多くは、動物実験において、生殖細胞を経由する「継世代エピジェネティック遺伝：TEI」を誘発することが知られてきている。

TEI は暴露世代の生殖細胞のエピ変異を介して、継代的な影響を与えることも実証されつつある。一般に毒性学では、当該世代のみをその対象とすることが多いが、「Epi-Tox」では継世代についても推定することが可能であり、さらに、それらの結果をヒトの継世代継承に外挿することも可能である。

我々はこれまで、カネミ油症が、「EpiTox」によって誘発されていること、およびその世代間継承問題は、TEI によるものとの仮説を立てて考察を行ってきた。さらに「水俣病」の一因にも MeHg による「EpiTox」が関与していることを示唆してきた。

さらに、これまで日本で起きたさまざまな公害・薬害問題である、四日市ぜんそく問題、森永ヒ素ミルク事件、イタイイタイ病、サリドマイド事件などにおいても、その毒性作用には「EpiTox」が関与している可能性が考えられており、これらの問題についても議論したい。

また、今後問題となる可能性がある PFAS やマイクロ・ミクロプラスチックによる毒性問題においても、「EpiTox」が関与して可能性が推測されている。

以上のさまざまな観点から、これからの毒性学においては、「EpiTox」：エピジェネティック毒性学」の確立が急務であることを提唱したい。

Establishing of Epigenetic Toxicology: Implications for environmental health

Tohru shibuya¹, Yukiharu Horiya¹, and Tadashi Fujino²

¹ Laboratory of Environmental Epigenetics, ² Minamata Kyoritsu Hospital

It is well establishing that most of endocrine disrupting chemicals (EDCs) exhibit epigenetic toxicity, which can alter the epigenetic profiles of exposed cells of organisms. Furthermore, EDCs have the potential to induce transgenerational epigenetic inheritance (TEI) in animals by the epigenetic modifications of germ cells treated.

This TEI could lead to transgenerational effects on future human generations due to exposure to various environmental substances. In our study, we investigated the toxicity in “Kanemi Yusho” particularly on its generational effects.

We hypothesize that these issues may be linked to the epigenetic toxicity: EpiTox of polychlorinated dibenzofurans. additionally we speculated that “Minamata Disease” also in part may be attributed to effects of EpiTox from methylmercury.

We further suggest that various environmental pollution-related problems in Japan, such as Yokkaichi asthma, arsenic-containing milk of Morinaga, “Itaiitai disease” in Toyama, and congenital anomalies induce by thalidomide might be the result of EpiTox. Current toxicological concerns, inducing per- and polyfluoroalkyl substances and microplastic are also thought to be induced by EpiTox.

Therefore, establishing “EpiTox” in toxicology is an urgent necessary for the near future.

O5-3

継世代エピジェネティック遺伝と CCCTC 結合因子

○堀谷幸治, 澁谷 徹
環境エピジェネティクス研究所

TCDD などのダイオキシン類が動物実験において親世代のばく露が生殖細胞のエピゲノム変異を介して直接曝露を受けていない子孫の世代に毒性影響を及ぼす、継世代エピジェネティック遺伝 (TEI) を起こすことは多くの報告(Anway et al., 2005, Manikken et al., 2012) がある。人における TEI もカネミ油症 (Shibuya & Horiya, 2023) やベトナム戦争での枯れ葉剤散布 (Kelsey et al., 2019) などで可能性が指摘されている。その機構は未解明であるが、Bisphenol A がマウスで食欲中枢にかかわる Fto 遺伝子領域の CCCTC 結合因子 (CTCF) を介して TEI を誘発することが報告された (Jung et al., 2022) ことから、我々は、ダイオキシン類などの芳香族炭化水素化合物受容体 (AhR) リガンドにおいても、AhR 活性化を介して生殖細胞のゲノムインプリンティング遺伝子 *IGF2/H19* の CCCTC 結合因子 (CTCF) によるエピジェネティック制御を攪乱し、TEI を誘発するのではないかという作業仮説を立てている。

**Transgenerational epigenetic inheritance
and CCCTC-binding factor**

Yukiharu Horiya, Tohru Shibuya
Laboratory of environments/Epigenetics,

There are many reports (Anway et al. 2005, Manikken et al. 2012, etc.) that dioxins such as TCDD cause transgenerational epigenetic inheritance (TEI) in animal experiments, in which exposure of the parental generation has toxic effects on offspring generations not directly exposed via germline epigenomic mutations. The possibility of TEI in humans has also been pointed out in cases such as “Kanemi Yusho”(Shibuya & Horiya, 2023) and defoliant spraying during the Vietnam War (Kelsey et al., 2019). Although the mechanism is not yet understood, it was reported that Bisphenol A induces TEI in mice via the CCCTC binding factor (CTCF) in the Fto gene region involved in the appetite center (Jung et al., 2022), and we hypothesized that aryl hydrocarbon receptors (AhR) ligands such as dioxins may also disrupt the epigenetic regulation by CCCTC binding factor (CTCF) of the germline genomic imprinted gene *IGF2/H19* via AhR activation, thereby inducing TEI, is our working hypothesis.

O5-4

環境ホルモン学会（正称：日本内分泌攪乱物質学会）の歴史：設立期からの覚書

黒田洋一郎

環境脳神経科学情報センター

環境ホルモン学会は、1998年6月に発足し26年を過ぎた。学会設立時とその後の歴史は、日本社会との関係で、波瀾万丈であった。世界では、1996年3月、環境ホルモン問題を啓発した書として、米国でシーア・コルボーン等の「Our Stolen Future」が世界で有名になり、日本にも伝わった。「環境ホルモン」という表現は1997年5月のNHK総合「サイエンスアイ」で、横浜市立大・井口泰泉教授と村松秀ディレクターが、よりわかりやすい用語として使われた。ダイオキシン/PCB問題を、国立環境研で研究されてきた故森田昌敏統括研究官が初期から関わっていたため、環境化学学会からも企業の人々が多数「環境ホルモン学会」に入り学会は数千人で始まった。環境ホルモン問題は、世界では大きく研究が進んだが、日本では経済界、経産省を中心に反発が出た。なかでも「市民のための環境学ガイド」個人ブログが広まり、世界の情勢を知らず事実を反し、非科学的な「環境ホルモンには毒性が無い」などの情報が広まり、ネット社会では安井-遠山論争と騒がれた。拙いことに、これで「環境ホルモン問題は無視出来る」といった、日本の一部の風潮が生まれ、環境ホルモン学会は会員数も減少した。その後関係学会との共催や、臨床系や基礎系の医師も参加し今に至っている。世界では環境ホルモンについては疫学研究も進み、生態系や子どもへの悪影響が明らかになっている。内分泌攪乱物質については、国際・各国政府機関により法的な規制も始まっているが、日本国内では規制が進んでいない。国内での規制強化が必要と考える。村松秀『生殖に何が起きているか：環境ホルモン汚染』NHK出版、1998年を参照。

History of the Japanese Society of Environmental Hormone Research (formally known as the Japanese Society of Endocrine Disruptors): A Memorandum from the Founding Years

Yoichiro Kuroda

Environmental Neuroscience Information Center

The Society of Environmental Hormone Research, Japan was founded in June 1998 and has passed 26 years since its foundation. The history of the society at the time of its founding and thereafter has been checked in relation to Japanese society. In 1996, “Our Stolen Future” became famous in the United States as a book that enlightened the world about the environmental hormone problem and was also introduced to Japan. The term “environmental hormone” was used by Professor Taisen Iguchi of Yokohama City University and Director Shu Muramatsu in NHK broadcast in May 1997 to make the term easier to understand. Dr. Masatoshi Morita, who had studied the dioxin/PCB problem at the National Institute for Environmental Studies, was involved from the beginning, and many people from the Society of Environmental Chemistry, as well as from companies, joined the Environmental Hormone Society, which started with several thousand members. While research on the environmental hormone issue made great progress worldwide, there was opposition in Japan, particularly from the business community and the Ministry of Economy, Trade, and Industry. The member’s number of the Society for Environmental Hormone Research declined. The Society has since co-sponsored the conference with related academic societies. Scientific research on environmental hormones is advancing, and their adverse effects on ecosystems and children are becoming clearer. International and national government agencies have begun to legally regulate environmental hormone substances, but regulations have not progressed in Japan. We believe that regulations need to be strengthened in Japan.

一般演題(ポスター)

コアタイム： 2024 年 12 月 6 日(金) 15:30 - 16:00
2024 年 12 月 7 日(土) 13:00 - 13:30

P-1

pGL4.23 はアンドロゲン受容体のレポーターベクターとして機能する

○梶山 尊、金崎康平、中村圭太、香西丈一郎、松島綾美
九州大学大学院理学研究院化学部門

エストロゲン受容体やアンドロゲン受容体は、性ホルモンを受容し、生殖系や骨格系、脳神経系といった生理作用に深く関与する核内受容体である。これらの核内受容体は DNA に直接結合し、遺伝子の転写翻訳を調節する転写因子である。核内受容体が結合する応答配列と呼ばれる塩基配列には、応答配列がタンデムに繋がったダイレトリピート型と逆向きに繋がったインバースリピート型が存在する。我々は有害環境化学物質がアンドロゲン受容体の転写活性へ与える影響を解析する過程において、比較対象として用いた既知のアンドロゲン受容体応答配列を含まない pGL4.23 レポーターベクターでも、アンドロゲン受容体の転写活性が非常に強く検出されることを見出したので報告する。ところで、ベクターに含まれているマルチクローニングサイトの制限酵素認識部位は、パリンδροーム型の配列である。アンドロゲン受容体の典型的な応答配列は、GGTACAnnnTGTCT であり、核内受容体のインバースリピート型の応答配列と特徴が似ているため、核内受容体応答配列として機能する可能性がある。そこで、我々は pGL4.23 に含まれるマルチクローニング部位周辺にアンドロゲン受容体の応答配列として機能しうる配列が存在すると考えた。転写因子結合配列データベース JASPER により解析したところ、アンドロゲン応答配列として機能しうると考えられる部位が複数検出された。各種核内受容体のレポーター遺伝子アッセイの試験系構築においてはベクター内の制限酵素認識部位に留意する必要がある。

pGL4.23 can function as a reporter vector for androgen receptor

Takeru Kajiyama, Kohei Kanazaki, Keita Nakamura, Joichiro Kozai, Ayami Matsushima
Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Kyushu University

Estrogen receptors and an androgen receptor (AR) are nuclear receptors that bind to sex hormones and are involved in physiological processes such as the reproductive, skeletal, and nervous systems. Nuclear receptors are transcription factors that directly bind to DNA and regulate gene transcription. Nuclear receptors bind to two types of response sequences: direct repeat sequences, linked in tandem, and inverse repeat sequences, linked in the opposite direction. In analyzing the effects of toxic environmental chemicals on AR transcriptional activity, we found that AR activity was strongly detected even in the pGL4.23 reporter vector, which lacks known AR response sequences. Incidentally, the restriction enzyme recognition sites in the multicloning sites of the vector are palindromic sequences. The typical AR response sequence is GGTACAnnnTGTCT, which is similar to the inverse repeat-type response sequence of nuclear receptors and may function as a nuclear receptor response sequence. We hypothesized that a sequence around the multicloning site in pGL4.23 could function as an AR response sequence. By analyzing the transcription factor binding sequence database JASPER, we identified several sites that could function as androgen-responsive sequences. When constructing a test system for reporter gene assays of various nuclear receptors, it is necessary to consider the restriction sites in the vectors.

Does an AhR antagonist cause changes in maternal behavior?

○Nobuki Murata¹, Kazutoshi Sugita¹ Wataru Yoshioka¹

¹*Department of Veterinary Medicine, Azabu University,*

【Preface】 The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-dependent transcription factor. Upon ligand binding, AhR is activated to increase the expression of target genes including those encoding drug-metabolizing enzymes. Recently, we found that α -naphthoflavone (ANF), an antagonist of AhR, causes alterations in the behavior of pregnant mice. In this study, we developed quantitative methods for assessing the nest height and movement of the pregnant mice to characterize the altered behavior by ANF-exposure.

【Methods】 Pregnant mice of the C57BL/6J strain were housed and habituated from gestational day 7 (GD 7) and were fed an ANF-containing diet (0%: CNT, 1%: A10 group[A10], or 2%: A20 group[A20]) from GD 12. The height of the bedding was measured and used as an index for the nest height. The observed behaviors were classified into four levels depending on the intensity of the movement. The location of the mice (inside or outside of the nest) was recorded. On day 21, parturition was confirmed, and blood was collected for the analysis of plasma ANF concentration by LC-MS/MS.

【Results】 The A20 had significantly lower nest height than the CNT on GD13-15. In contrast, the A10 had significantly lower nest height only on GD13. A20 exhibited significantly more hanging and climbing behavior on G13-15, which was not observed in the CNT or A10. A20 but not A10 had a significantly higher frequency of being outside the nest from GD14. No pups survived in A10 and A20, although evidence of birth was observed in day 21. ANF in plasma is currently being measured.

【Discussion】 The pregnant mice exposed to ANF exhibited altered behaviors in that the nest height was decreased and intense movement was increased, suggesting that ANF exposure alters maternal behavior. Since ANF is an antagonist of the AhR, this effect of ANF may be involved in the inhibition of the AhR. These findings suggest that AhR activation is involved in the regulation of maternal behavior.

マウス外生殖器のホルモン環境と形態学的変化との関連

是永 悠貴¹、石川 真湖¹、溝口 ひかり¹、田中 恒星¹、豊田 賢治²
宮川 信一¹

¹東京理科大学・大学院先進工学研究科、²広島大学・大学院統合生命科学研究科

哺乳類の外生殖器は、胎児期に精巣から分泌されるアンドロゲンシグナルに依存してオス化し、明確な雌雄差を形成する。その一方で、抗アンドロゲン作用やエストロゲン作用をもつ内分泌攪乱化学物質が作用すると、発達中の外生殖器のオス化が阻害される。そのため、外生殖器の形態学的な性分化状態は、内分泌攪乱化学物質によるホルモンバランスの異常を評価するモデル系として用いられる。マウスの外生殖器は出生後にも性分化と形態形成が続くが、これまでの外生殖器の性分化に関する先行研究の多くは、胎生期のホルモン環境のみに着目し、出生直後の仔マウスの外生殖器の形態の評価に留まっていた。そこで、成体マウスの外生殖器の形態学的な性分化状態を、さまざまな表現型パラメーターをとって定量的に評価する系を構築するとともに、発生及び成長段階のいつのホルモン環境の異常が、外生殖器の性分化にどのように影響するかを調べることにした。本研究では胎生期のホルモン環境は胎生 14.5 日と 15.5 日に合成アンドロゲンやアンドロゲン受容体阻害剤の曝露によって、出生後のホルモン環境による影響は、出生直後にアンドロゲン曝露や精巣摘出によって調節し、各処理群のマウスの性成熟後の外生殖器の形態学的な性分化状態を CT スキャンによって定量化した。

The effects of hormonal environment on mouse external genitalia development

Yuki Korenaga¹, Mako Ishikawa¹, Hikari Mizoguchi¹, Kosei Tanaka¹, Kenji Toyota²
Shinichi Miyagawa¹

¹Graduate School of Advanced Engineering, Tokyo University of Science, ²Department of Integrated Science for Life, Hiroshima University

Masculinization of external genitalia (ExG) depends on androgens secreted from testes during development. Hence, defects of the hormonal environment caused by endocrine disrupting chemicals impair sexually dimorphic development of mouse ExG. However, evaluation methods to quantitatively assess the degree of defects of sexual differentiation of ExG have not been established. In this study, we identified that several parameters that prescribe hormone-dependent development of ExG by computed tomography (CT) scan analysis, in order to quantitatively evaluate the phenotype of the mouse ExG. We showed that synthetic androgen exposure during the embryonic period induced male-like morphology in the female ExG. In addition, the male ExG that was castrated at birth showed a small penile bone. In this presentation, we provide several parameters that depend on the hormonal environment during prenatal and postnatal development.

Toxics of sulfoxaflor to testis in mice

Hayato Terayama^{1,2}, Kou Sakabe¹, Daisuke Kiyoshima², Kenta Nagahori², Tsutomu Sato^{2,3}, Akifumi Eguchi⁴, Midori Yamamoto⁴, Miyuki Tonna¹, Emiko Todaka^{4,5}, Kenichi Sakurai⁴, Chisato Mori^{4,5}

¹Department of Environmental Preventive Medicine, Yamada Bee Company, Inc., Centre for Preventive Medical Sciences, Chiba University, ²Department of Anatomy, Division of Basic Medical Science, Tokai University School of Medicine, ³Louis Pasteur Center for Medical Research, ⁴Centre for Preventive Medical Sciences, Chiba University, ⁵Department of Bioenvironmental Medicine, Graduate School of Medicine, Chiba University

Sulfoxaflor is an insecticide that acts on nicotinic acetylcholine receptors. It has a similar functional group to neonicotinoid insecticides, which are feared to be testicular toxicants, but bind to a different site of action. Recently, sulfoxaflor has been reported to have adverse effects on the testes when administered to rats. However, because there are no reports of sulfoxaflor administration to mice and its effects on the testes, the present study was conducted. 10-week-old ICR mice were treated ad libitum with four different concentrations of sulfoxaflor for 4 and 8 weeks, and histological analysis and real-time RT-PCR were performed. Testis weight relative to body weight was increased in the high concentration treated of sulfoxaflor group compared to the normal group. Furthermore, more interstitial edema of testes was observed in the high concentration treated of sulfoxaflor group than in the normal group. However, expression of mRNA levels was no significant difference in pituitary gonadotropin markers, Leydig cell marker, testosterone synthesis markers, Sertoli cell markers, proliferating cell marker, meiotic cell marker, pachytene spermatocyte markers, round spermatid markers, apoptotic cell markers, antioxidant enzyme markers, oxidative factor marker, mitochondrial factor markers compared to the normal group. Sulfoxaflor administration may not adversely affect intratesticular cells, although interstitial edema increases testicular weight. The present results may not affect the testes of the same mammal, the human.

3-methyl-4-nitro-phenol の新生仔期曝露が雌ラットの性選好性・生殖能力に与える影響

○中村優大¹、岩田汐央¹、前田侑輝拓²、林実里²、金丸颯²、武藤里加子²、堤恋結²、渡辺元^{1, 3}、
近藤保彦⁴、柳澤利枝⁵、川口真以子^{1, 2}

¹ 明治大学大学院農学研究科、² 明治大学農学部、³ 明治大学研究・知財戦略機構

⁴ 帝京科学大学生命環境学部、⁵ 国立研究開発法人国立環境研究所環境リスク・健康領域

世界的に不妊症が増加しており、喫緊の課題となっている。一方、性的マイノリティの増加が報告されている。これらの原因として環境中の化学物質が影響している可能性が指摘されている。今回の研究では、農薬 Fenitrothion の分解産物であり、ディーゼル排ガスにも含まれる 3-methyl-4-nitro-phenol (MNP) の新生仔期曝露の影響について検討する。MNP はエストロゲン様作用および抗アンドロゲン作用を持ち、鳥類の性腺への影響が報告されており、発達期の脳の性分化や生殖能力に影響する可能性が指摘されている。しかし、MNP が哺乳類の行動や性選好性に与える影響については報告がない。そこで本研究では、Wistar-Imamichi 系の雌ラットに出生直後から 5 日間にわたり、MNP (1 mg/kg/day, 0.01 mg/kg/day)、または溶媒の Corn Oil (5 ml/kg/day) を経口投与し、8 週齢で性選好性試験(雌雄刺激動物を同時提示して探索時間を測定)を行った。さらに生殖能力の評価のために同じ曝露群の雄ラットと交配し、妊娠率、妊娠期間、産子数や仔の性比、体重、着床痕、生殖器官重量等を比較した。また、交配させなかった個体で排卵数・生殖器官重量を測定した。Oil 群の性選好性は、雌刺激動物より雄刺激動物への探索時間が有意に長かったのに対し、MNP 曝露群では雌雄刺激動物への探索時間に差がなくなり、性選好性が消失していた。一方生殖能力や臓器重量については、いずれの群においても Oil 群と比較して有意差は認められなかった。これらの結果から、本投与量での MNP 新生仔期曝露は、生殖能力への明らかな影響は及ばないが、雌ラットの脳の性分化過程を傷害し、成熟後の性選好性を消失させることが示された。

Neonatal Exposure to 3-Methyl-4-Nitrophenol Disrupts Sexual Preference in Female Rats Without Affecting Reproductive function

Yudai Nakamura¹, Shio Iwata¹, Yukihiro Maeda², Minoru Hayashi², Hayato Kanamaru², Rikako Muto², Rei Tsutsumi², Gen Watanabe^{1, 3}, Yasuhiko Kondo³, Rie Yanagisawa⁴, Maiko Kawaguchi^{1, 2}

¹Graduate School of Agriculture, Meiji University, ²School of Agriculture, Meiji university,

³OSRI, Meiji University, ⁴Faculty of Life & Environmental Sciences, Teikyo University of Science,

⁵Health and Environmental Risk Division, National Institute for Environmental Studies

It has been reported that 3-methyl-4-nitrophenol (MNP), a degradation product of the pesticide Fenitrothion, which is also found in diesel exhaust, exhibits estrogenic and anti-androgenic effects, such as influencing the avian gonads. However, little is known about its impact on mammalian reproduction. In this study, we investigated the effects of neonatal exposure to MNP on the sexual preference and reproductive ability of female rats. Neonatal female rats were orally administered MNP (0, 0.01 or 1.0 mg/kg/day) dissolved in corn oil for five consecutive days. Sexual preference, measured by comparing the time spent with sexually active males versus estrous females, was assessed at 8 weeks old. The females were then mated with males who had undergone the same MNP exposure to evaluate their reproductive capacity. Control females (0 mg MNP) exhibited a normal preference, spending significantly more time exploring stimulus males than stimulus females, whereas females exposed to both doses of MNP showed no preference. No significant differences in reproductive ability or organ weights were observed among the groups. These results demonstrate that neonatal exposure to MNP, at least in these doses, disrupts normal sexual differentiation of the brain, resulting in the loss of sexual preference without any apparent effects on reproductive organs.

P-6

内分泌かく乱化学物質のスクリーニング評価における子宮肥大試験の継続的な取り組み

○五十嵐 智女¹、相田 麻子¹、横田 理¹、西村 拓也¹、高橋 祐次¹、桑形 麻樹子^{1,2}、北嶋 聡¹

¹国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部、

²帝京平成大学 健康医療スポーツ学部

化学物質のヒト健康影響に関する厚生労働行政の支援事業として、当研究所・毒性部では、内分泌かく乱作用について検討することを目的に、*in vivo* 短期スクリーニング試験を継続的に実施してきた。2001 年度から 2023 年度までの 23 年間に実施した物質数は約 140 に及ぶ。このうち、エストロゲン作用については、卵巣摘出マウスを用いた皮下投与および経口投与による子宮肥大試験 (OECD TG440) を実施し検討しており、ここではその結果の一部を紹介する。hER α のレポーター遺伝子アッセイにてエストロゲン活性が認められた 91 物質について、子宮肥大試験を実施したところ、皮下投与では 35 物質、経口投与では 19 物質、両投与経路を合わせると 37 物質 (40%) が *in vivo* でもエストロゲン作用を示した。この内、皮下投与での 13 物質、経口投与での 9 物質は、エストロゲン及び抗エストロゲン、双方の作用を有していた。また、皮下投与と経口投与の間で結果の異なる物質を見出し、2 種類の投与経路で *in vivo* 試験を実施する有用性が示された。本事業により、同一プロトコルによる一定の水準を満たした 91 物質の子宮肥大試験の貴重なデータセットを取得することができた。今後、本事業の成果は将来的に高次試験 (確定試験) を実施する際に参照し得る「化学物質優先リスト」の策定に繋がるものと考えられる。

Systematic study of uterotrophic bioassay in screening evaluation of endocrine disrupting chemicals

Toshime Igarashi¹, Asako Aida¹, Satoshi Yokota, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi¹,
Makiko Kuwagata^{1,2}, Satoshi Kitajima¹

¹ Division of Cellular & Molecular Toxicology, Center for Biological Safety & Research, National Institute of Health Sciences, ² Faculty of Health Care and Medical Sports, Teikyo Heisei University

As a support project for the Health, Labour and Welfare, the Division of Cellular & Molecular Toxicology in our institute has been continuously conducting *in vivo* short-term screening studies to investigate endocrine disrupting effects. From 2001 to 2023, *in vivo* studies were conducted on approximately 140 substances. Of these, estrogenic effects were examined in the uterotrophic bioassay (OECD TG440) using ovariectomized mice by subcutaneous (sc) and oral administration (po), and some of the results are introduced here. In the uterotrophic bioassay of 91 substances that were found to have estrogenic activity in a reporter gene assay for hER α , estrogenic effects were observed in 35 substances by sc, in 19 substances by po, and in 37 substances (40%) by sc and/or po. Among these, 13 substances by sc and 9 substances by po had both estrogenic and anti-estrogenic effects. The fact that some substances had different results between sc and po indicated the utility of conducting *in vivo* studies with two different routes of administration. This project obtained a valuable dataset of 91 substance uterotrophic studies that meet certain quality and reliability standards using the same protocol. In the future, these results will contribute to the development of a "priority list of chemical substances" that can be referred to when conducting higher-level definitive studies.

紫外線吸収剤がヒト乳がん細胞の遺伝子発現に及ぼす影響

○久留戸 涼子¹、玉井 朝陽¹、桑原 良汰²、山田 建太³、大浦 健⁴¹常葉大学教育学部、²磐田市立神明中学校、³常葉大学社会環境学部、⁴名城大学農学部

近年、紫外線吸収剤(UV stabilizers: UVSs)は、紫外線によるプラスチックの劣化の防止や、日焼けなど皮膚障害の化粧品による防御などの用途で、世界的に使用されている。環境中にも検出され、内分泌攪乱作用があるとの報告もあり、安全性が危惧されている。これまで、ベンゾトリアゾール系 UVSs の UV-326、UV-328、UV-P、ベンゾフェノン系 UVSs の BP-1 について、ヒト乳がん細胞 MCF-7 を用いて、細胞増殖試験や、エストロゲン応答遺伝子である pS2、AhR 標的遺伝子である CYP1A1、炎症マーカーである IL-6 の遺伝子発現解析を行ってきた。本研究では、PCR アレイを用いて網羅的に遺伝子発現解析を行い、UVSs が遺伝子発現にどのような影響を及ぼすのか調べることにした。

エストロゲン(E₂)(10⁻¹⁰ M)、UV-326、UV-328、UV-P、BP-1(いずれも 10⁻⁵ M)の 5 種での Estrogen Receptor Signaling の PCR アレイでは、細胞増殖能が高まることが認められた BP-1 で、E₂ と似た遺伝子発現の変動が認められた。また、UV-326、UV-328、UV-P の 3 種で似た傾向が認められ、変動した遺伝子は少なかった。E₂ と BP-1 の両者において、CTSD、PGR、TFF1(pS2)などのエストロゲン応答遺伝子を含む 17 遺伝子の発現が上昇した。両者とも低下した遺伝子は、17 遺伝子だったが、E₂ では IGF1 で低下したが、UV-P でも同様だった。BP-1 では FOS が低下した。NR0B2 は 5 種で減少した。一方、UV-326 では、E₂ や BP-1 で低下していた CYP1A1 が上昇した。E₂ と BP-1 で上昇した FST は、UV-328 と UV-P では低下した。UV-326、UV-328、UV-P の 3 種については、Cancer Drug Resistance の PCR アレイも行ったが、以前報告した benz[a]anthracene(BaA)より変動した遺伝子が少なかった。UV-326 では、CYP1A1 と同様に、CYP1A2 でも上昇したが、UV-328、UV-P では低下した。以上のことから、遺伝子発現において、BP-1 は E₂ と同様の作用を示し、他の 3 種は異なることがわかった。

The effects of UV stabilizers on gene expression in human breast cancer cells

Ryoko Kuruto¹, Asahi Tamai¹, Ryota Kuwabara², Kenta Yamada³, and Takeshi Ohura⁴¹Faculty of Education, Tokoha University, ²Shinmei Junior High School, ³Faculty of Social and Environmental Studies, Tokoha University, ⁴Faculty of Agriculture, Meijo University

UV stabilizers (UVSs) are widely used in cosmetic products and plastic materials to prevent UV light damage. They are detected in the environment and have been reported to show estrogenic effects. We focused on four UVSs, that is UV-326, UV-328, UV-P, and BP-1. The effects of four UVSs on cell proliferation and gene expression of pS2, CYP1A1, and IL-6 have been investigated using human breast carcinoma MCF-7 cells. In this study, we conducted a comprehensive gene expression analysis using PCR arrays to investigate how UVSs affect gene expression. In the PCR array of Estrogen Receptor Signaling conducted on E₂ (10⁻¹⁰ M) and four UVSs (10⁻⁵ M), BP-1, which was shown to enhance cell proliferation, exhibited gene expression changes similar to those of E₂. In both E₂ and BP-1, 17 genes, including estrogen-responsive genes such as CTSD, PGR, and TFF1 (pS2), showed increased expression. Similar trends were observed in UV-326, UV-328, and UV-P, and few genes showed variation. In UV-326, UV-328, and UV-P, the PCR array of Cancer Drug Resistance was also conducted. The number of genes that showed variation in them was smaller than that in BaA previously reported. In UV-326, CYP1A2 expression increased similarly to CYP1A1, while in UV-328 and UV-P, it decreased.

カプセル化された内分泌攪乱物質の生態影響評価

○兼藤 亮太郎¹, 岡崎 友紀代², 鑓迫 典久²¹愛媛大学農学部, ²愛媛大学大学院農学研究科

マイクロカプセル (MC) は、壁材で包埋することにより芯材となる化学物質に対して抗酸化力、水分散性、水中安定性の向上など新たな性質を付加することができる技術である。MC 化技術はすでに、医薬、農薬、香料など幅広い分野に応用されており、香料をカプセル化して数週間持続させた芳香剤などが有名である。しかし、カプセル剤が環境に流出した際に、生態系への影響は明らかになっていない。そこで、本研究では MC の生物に及ぼす悪影響の有無や環境中の動態を調べることを目的とした。市販の MC を入手することは困難なので、自ら MC を合成した。合成法は既報の合成法 (植田ら, 2024 環境化学会にて発表) に従った。壁材として、ドラッグデリバリー素材としてよく使われており、無害とされる生分解性の PLGA (ポリ乳酸) を使用し、芯材は甲殻類の内分泌かく乱物質 (昆虫の幼若ホルモン様物質) を選択した。オオミジンコ (*Daphnia magna*) を被験生物として幼若ホルモンによるミジンコのオス仔虫の発生を観察した。芯材として使用する幼若ホルモンとして今回はピリプロキシフェンを物質として選択した。まず通常の急性毒性試験 (OECD TG202) をおこない 48 時間以内に親個体が死亡しない濃度を確認した。次に、ミジンコ幼若ホルモン簡易スクリーニング試験 (JHASA、ミジンコオス発生試験) を実施し、生まれてくる仔ミジンコの性比を観察した。その後カプセル化したピリプロキシフェンでも同様の試験をおこない、カプセル化剤による影響発現の違いを比較した。

Ecological impact assessment of encapsulated endocrine disruptors

Kanefuji Ryotaro¹, Okazaki Yukiyo², Tatarazako Norihisa²

Faculty of Agriculture, Ehime University, Graduate School of Agriculture, Ehime University

Microcapsules (MCs) are a technology that can be used to add new properties to core chemicals, such as improved antioxidant properties, water dispersibility and stability in water, by enclosing them in a wall material. MC technology is already being used in a wide range of fields, including pharmaceuticals, agricultural chemicals and fragrances, and is well known for its use in encapsulating fragrances to make them last for several weeks, for example in air fresheners. However, the impact on the ecosystem when the capsule agent is released into the environment has not yet been clarified. Therefore, the aim of this study was to investigate the presence or absence of the impact of MC on living organisms and its dynamics in the environment. Since it is difficult to obtain commercially available MC, we synthesized MC ourselves. The synthesis method followed the previously reported synthesis method (Ueta et al., presented at the 2024 Environmental Chemistry Society). We used biodegradable PLGA (polylactic acid), which is often used as a wall material and as a drug delivery material and is considered to be harmless, and selected an endocrine disruptor (insect juvenile hormone-like substance) from crustaceans as the core material. We observed the development of male *Daphnia* larvae due to juvenile hormone using *Daphnia magna* as the test organism. We selected pyriproxyfen as the juvenile hormone to be used as the core material. First, we conducted a standard acute toxicity test (OECD TG202) to confirm the concentration at which the parent individuals would not die within 48 hours. Next, we conducted a simplified screening test for juvenile hormone in *Daphnia* (JHASA, *Daphnia* male development test) and observed the sex ratio of the newly born *Daphnia* larvae. We then conducted a similar test using encapsulated pyriproxyfen, and compared the differences in the effects of the encapsulating agent.

We report on our findings, which provide new insights into the environmental impact of encapsulating agents.

P-9

ケージング手法を用いた愛媛県内の河川における内分泌かく乱物質の実態調査

○小滝 優弥¹、岡崎 友紀代²、石橋 弘志²、高橋 真²、鏑迫 典久²

¹愛媛大学農学部、²愛媛大学農学研究科

水環境中に存在する複数の有害化学物質が水生生物に与える影響について適切に把握することは難しい。例えば、内分泌かく乱物質に関しては、ごく微量で影響する可能性があるうえ、その有害影響の表現型が現れるのは次世代の可能性も考えられる。環境中化学物質の生態影響を計測する方法として、従来の機器分析は、個々の化学物質量を検出するには有効であるが、複合影響を含めた環境中化学物質群の実態影響把握にはバイオアッセイのほうが有効である。また、WETのような環境水をサンプリングして被験生物に曝露する手法は、水生生物に対する化学物質の複合的な影響を評価することが可能であるが、サンプリング時の環境水の影響しか観察できず、時間・日・季節変動の大きい排水の場合には適切な評価が行われていない可能性がある。

そこで、本研究では、ラボ実験とフィールド調査の中間的手法となるケージングを愛媛県内の河川および用水路で行うことにした。ケージングとは、生物をケージ（籠）に入れて環境水に一定期間曝露し、その間に発生する異常を観察する。具体的には実験室内の清浄な水で飼育した試験生物（メダカ若魚）を約5L容のケージに6尾入れ、1週間曝露後に回収し、生死、外見異常および肝臓中の様々なマーカー遺伝子の測定を行う。調査対象としては生活排水が流れ込む用水路や下水処理場付近の河川等とし、周辺の水生昆虫、魚類、植生などの状況については目視で観察する。マーカー遺伝子としては、薬物代謝、重金属代謝などが考えられるが、今回は女性ホルモン様内分泌攪乱の指標として知られているビテロジェニンおよびコリオゲニンのmRNA発現レベルを計測した。

本手法は国内での実績が殆どなく独創性が高いため、その実施可能性についてパイロット的に行ったのでその結果を報告する。

Field survey on Endocrine-Disrupting Chemicals in Rivers of Ehime Prefecture using the Caging method

Manaya Kotaki¹, Yukiyo Okazaki², Hiroshi Ishibashi², Shin Takahashi², Norihisa Tatarazako²

¹Department of Agriculture, Ehime University, ²Graduate School of Agriculture, Ehime University

To assess the impact of adverse chemicals on aquatic organisms is challenging. For instance, endocrine-disrupting chemicals (EDCs) can have effects even at very low concentrations, sometimes manifesting in future generations. Traditional methods, such as instrumental analysis, are effective for measuring individual chemicals, but bioassays are more effective for understanding the combined effects of multiple substances. While Whole Effluent Toxicity (WET) can evaluate the combined effects of chemicals on aquatic organisms, it often reflects only the conditions at the time of sampling and may not accurately assess the variety of effluent conditions, such as time and day, season.

To address these issues, we conducted Caging method, an intermediate method between laboratory method and field study, in rivers of Ehime Prefecture. In this method, caged organisms are exposed to environmental water for a certain period and are observed the abnormalities. In our experiment, we used juvenile Japanese medaka (*Oryzias latipes*), were kept in clean laboratory water. Six test organisms were released in a cage of about 5 L, and after one week, they were measured survival and death, external abnormalities, and various marker genes. The survey places were chosen irrigation channels receiving domestic wastewater and sewage treatment plants, and the surrounding aquatic insects, fish, vegetation, etc. were visually observed. In this study, we measured the mRNA expression levels of vitellogenin and choriogenin, which are known as indicators of female hormone-like endocrine disruption.

As this method is highly original, we report a pilot study to examine its feasibility.

エストロゲン第 I 相代謝物の鶴見川流域における存在実態把握

○天野 来紀¹、野本 大輔²、村瀬 渉³、小島 弘幸³、高田 秀重⁴、中田 典秀⁵

¹ 神奈川大学大学院工学研究科、² 神奈川大学工学部、³ 北海道医療大学薬学部、

⁴ 東京農工大学農学部、⁵ 神奈川大学化学生命学部

エストロゲンは、数 ng/L という低濃度で水生生物に影響を与えることから、1990 年代より環境汚染物質として関心を集め、様々な対策が講じられてきたが、依然として河川水からの検出が継続している。近年では、エストロゲン第 I 相代謝物である 16 α -hydroxy estrone (16 α OHE1) が中国の河川で最大 14.4 ng/L (エストロゲン様活性の理論値に対する寄与率 31 %)、イギリスの河川で最大 5.8 ng/L (同 4.8 %) で検出されたと報告された。しかし、これまで日本では第 I 相代謝物の調査事例が無い。そこで、鶴見川にてエストロゲン類とその第 I 相代謝物の存在実態調査を行うとともに、鶴見川におけるエストロゲン類の河川水中濃度の経年変化を考察した。鶴見川流域にて、河川水と 4 箇所の下水処理場において採水し、ろ過、固相抽出後、LC-MS/MS により同定・定量を行った。各定量値と、検出成分の 17 β -estradiol (E2) に対する比活性値から、16 α OHE1 のエストロゲン様活性の理論値への寄与を評価した。その結果、鶴見川では 16 α OHE1 が最大 0.93 ng/L で検出され、理論活性値への寄与率は 1.9 %程であり、既報と比較して低い値であった。16 α OHE1 は、下水処理場流入水中では 18.8 ng/L で検出されたが、生物処理 (活性汚泥法) により濃度が低下し、放流水中では定量下限値 (<0.80 ng/L) 以下であった。一方、16 α OHE1 の親物質である estrone と E2 は、河川水中でそれぞれ最大 24.4 ng/L、1.53 ng/L で検出され、過去 20 年の検出濃度と比較すると明らかな変化が見られず、水環境への流出が継続していることが確認された。

Occurrence of phase I estrogen metabolites in the Tsurumi River basin

Raiki Amano¹, Daisuke Nomoto², Wataru Murase³, Hiroyuki Kojima³, Hideshige Takada⁴,
Norihide Nakada⁵

¹Grad. Sch. Eng., Kanagawa Univ. (KU), ²Fac. Eng., KU, ³Dep. Pharm. Sci., Health Sci. Univ. Hokkaido, ⁴Fac. Agr., Tokyo Univ. Agri. Tech., ⁵Fac. Chem. Biochem., KU

Abstract

Estrogen is an endocrine disrupting chemical that affects aquatic organisms at several ng/L. Recently, 16 α -hydroxy estrone (16 α OHE1), a phase I metabolite of estrogen, was reported to be present in rivers in China and England at up to 14.4 ng/L and 5.8 ng/L, contributing 31 % and 4.8 % to theoretical estrogenic activity, respectively. However, environmental monitoring of the metabolites has not been conducted in Japan until now. We therefore investigated the occurrence of estrogens and their phase I metabolites in the Tsurumi River basin. Surface water samples were collected from the river and raw and treated wastewaters were collected from four wastewater treatment plants in the basin. The analytes in the water samples were analyzed by LC-MS/MS. The results showed that a maximum of 16 α OHE1 was detected at 0.93 ng/L in river water and 18.8 ng/L in influent, but below the quantification limit (<0.80 ng/L) in the final effluent. On the other hand, estrone and E2 were detected in river water at a maximum of 24.4 ng/L and 1.53 ng/L, respectively, which are comparable to the concentrations detected over the past 20 years, implying the continuous discharge of these compounds into the aquatic environment.

甲状腺ホルモンかく乱化学物質による新規有害影響の探索： 両生類における雌雄性への影響

○熊倉 正彦¹、明正 大純²、小林 亨²

¹ 日本歯科大学新潟生命歯学部解剖第2、² 静岡県立大学環境生命

化学物質の甲状腺ホルモン（TH）かく乱活性とその発達に及ぼす有害影響に関して、経済協力開発機構（OECD）では *in vitro* カエル甲状腺ホルモン受容体（TR）転写試験と *in vivo* 両生類変態試験（TG231, AMA）、TH かく乱有害影響は幼生期両生類成長発達試験（TG241, LAGDA）による単独物質の TH 様、抗 TH 作用の評価をテストガイドライン（TG）化しており、日本においても、これらの検証を行なっている。TR 転写試験は受容体と直接作用する化学物質の検出力は高いが、生体における TH かく乱は代謝・分解物活性や TH 合成系への影響も含むことから、*in vivo* 試験による活性評価は必須である。現行法では変態過程で見られる外部形態変化を指標としているため、TH かく乱に依存しない発生遅延による影響との区別は難しい。最近、私たちは、TH かく乱化学物質とエストロゲンとの共曝露が性比に影響する予備知見を得た。本研究では、アフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）の NF St. 45/46～St.57/58 において TH かく乱物質として TH（T4）とエチニルエストラジオール（EE2）の共曝露を行い、その雌雄性への影響を検討した結果、TH 単独曝露では影響は見られないが、EE2 との共曝露により、濃度依存的に EE2 による雌化の増強が見られた。

Effects of thyroid hormone disrupting chemicals on sex differentiation in an anuran amphibian, *Xenopus laevis*

Masahiko Kumakura¹, Taijun Myosho², Tohru Kobayashi²

¹Department of Histology, School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University, ²Laboratory of Molecular Reproductive Biology, Institute for Environmental Sciences, University of Shizuoka

The Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) has developed test guidelines (TGs) for the evaluation of thyroid hormone (TH)-disrupting activity of chemical substances and their adverse effects on the development of TH, such as *in vitro* frog thyroid hormone receptor (TR) transcription and *in vivo* amphibian metamorphosis tests (TG231, AMA) and TH disrupting effects in the larval amphibian growth and development. Although the TR transcription test is highly sensitive to chemicals that directly interact with the receptor, TH-disrupting chemicals can be not evaluated only by *in vitro* tests because *in vivo* TH-disrupting chemicals have the possibility that their metabolic/degradant activity and TH synthesis systems. Therefore, *in vivo* evaluation of the activity is essential. In AMA and LAGDA, the external morphological changes observed during metamorphosis are used as an indicator, making it difficult to distinguish between the effects of delayed development independent of TH disturbance. Recently, we have obtained preliminary findings that co-exposure to TH-disrupting chemicals and estrogens affects sex ratios. In the present study, we examined the effects of co-exposure to TH (T4) and 17 α -ethinylestradiol (EE2) as TH disrupting chemicals in the African clawed frog (*Xenopus laevis*) NF St. 45/46 to St. 57/58 and their effects on the sex ratio, and found no effects when exposed to TH alone but the results indicated that co-exposure to T4 and EE2 as TH alone had no effect, but co-exposure to EE2 enhanced feminization in a dose-dependent manner.

化学物質の甲状腺ホルモン (TH) かく乱活性の *in vivo* 検出:
エストロゲンによる *vtg* 誘導は TH 依存性である—メダカと *Xenopus*—

○小林 亨¹、杉島 友美¹、明正 大純¹

¹ 静岡県立大学環境生命

化学物質の甲状腺ホルモン (TH) かく乱活性とその発達に及ぼす有害影響に関して、経済協力開発機構 (OECD) では *in vitro* カエル甲状腺ホルモン受容体 (TR) 転写試験と *in vivo* 両生類変態試験 (TG231, AMA)、TH かく乱有害影響は幼生期両生類成長発達試験 (TG241, LAGDA) による単独物質の TH 様、抗 TH 作用の評価をテストガイドライン (TG) 化しており、日本においても、これらの検証を行なっている。TR 転写試験は受容体と直接作用する化学物質の検出力は高いが、生体における TH かく乱は代謝・分解物活性や TH 合成系への影響も含むことから、*in vivo* 試験による活性評価は必須である。現行法では変態過程で見られる外部形態変化を指標としているため、TH かく乱に依存しない発生遅延による影響との区別は難しい。魚類においても TH かく乱による影響が検討されているが、これまでその影響が TH 依存性であることが確かめられた例はない。最近、私たちは、メダカ孵化仔魚に置いてエストロゲンによるビテロゲニン誘導が TH 依存性であることを見出し、この系において化学物質の TH かく乱活性を高感度に検出できることを報告した¹⁾。今回、メダカ (*Oryzias latipes*) 孵化仔魚 *vtg* 応答系の特性における知見を紹介するとともに、最近、変態前期のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) においても同様な現象を見出したので、併せて *Xenopus vtg* 応答系の特性についても紹介したい。

1) Myosho et al.: ES&T, 56, 6479-6490. (2022)

Estrogen-induced vitellogenin expression depends on thyroid hormone (TH), and is available for estimation of TH disrupting potential
— *Oryzias latipes* and *Xenopus laevis* —

Tohru Kobayashi, Tomomi Sugishima, Taijun Myosho

Laboratory of Molecular Reproductive Biology, Institute for Environmental Sciences, University of Shizuoka

The Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) has developed test guidelines (TGs) for the evaluation of thyroid hormone (TH)-disrupting activity of chemical substances and their adverse effects on the development of TH, such as *in vitro* frog thyroid hormone receptor (TR) transcription and *in vivo* amphibian metamorphosis tests (TG231, AMA) and TH disrupting effects in the larval amphibian growth and development. Although the TR transcription test is highly sensitive to chemicals that directly interact with the receptor, TH-disrupting chemicals can be not evaluated only by *in vitro* tests because *in vivo* TH-disrupting chemicals have the possibility that their metabolic/degradant activity and TH synthesis systems. Therefore, *in vivo* evaluation of this activity is essential. In AMA and LAGDA, the external morphological changes observed during metamorphosis are used as an indicator, making it difficult to distinguish between the effects of delayed development independent of TH disturbance. Although the effects of TH disruption have been studied in fish, it is not demonstrated whether these effects are really TH-dependent. Recently, we reported for the first time that estrogen induction of *vitellogenin* in medaka hatched fry, the eleutheroembryonic stage, is TH-dependent and that the TH-disrupting activity of chemical substances can be detected with high sensitivity in this system¹⁾. In this study, we will report here about our findings on the characteristics of medaka (*Oryzias latipes*) *vtg* induction system. Additionally, we will report here the characteristics of the *Xenopus vtg* induction system, as we recently found a similar phenomenon in the African clawed frog (*Xenopus laevis*) during the early phase of metamorphosis.

1) Myosho et al.: ES&T, 56, 6479-6490. (2022)

TRIAC とエストロゲンのメダカ胚への共曝露は脊椎骨の異常な形成を誘導する

明正 大純氏^{1,2}、○加藤 柚月¹、小林 亨^{1,2}

¹静岡県立大学食品栄養科学部学部環境生命科学科、

²静岡県立大学院薬食生命学府生態発生遺伝学研究室

経済協力開発機構（OECD）は、両生類を用いた *in vitro* および *in vivo* 試験（AMA、LAGDA）によって、化学物質の甲状腺ホルモン（TH）かく乱活性、有害影響を評価しているが、*in vivo* 試験の検出感度は十分ではない。本研究の目的は、新たな TH かく乱活性の有害影響評価を探索することである。今回、下水処理過程で生成される可能性が報告され、生態系への影響が懸念されている甲状腺ホルモンアナログであるトリヨードチロ酢酸（TRIAC）と E との共曝露を行い、メダカ発生・発達過程における影響を調べた。TRIAC をエレウテロ期に単独曝露し発達した成魚では、全長が極端に短く、体高との比率が異常な「ダルマメダカ」のような奇形個体が低頻度ながら見られた。TRIAC を E と共曝露することにより、上述の奇形発生頻度が大きく上昇した。また、同様の現象は、T3 および T4 と E との共曝露においても確認された。これらの奇形個体を透明化処理し、脊椎骨を染色したところ、各脊椎骨が小型化していることが明らかとなった。

本研究の結果は、TH かく乱活性による新規の有害影響指標となることを示唆している。

Both TRIAC and estrogen exposed to medaka embryos causes abnormal vertebral bone formation

Taijun Myosho^{1,2}, Yuzuki Kato¹, Thoru Kobayashi^{1,2}

¹ Graduate School of Pharmaceutical and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan, ² Laboratory of Molecular Reproductive Biology, Institute for Environmental Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan

The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) evaluates the thyroid hormone (TH) disrupting activity of chemicals using *in vitro* and *in vivo* tests in an anuran amphibian, *Xenopus laevis*. However, the sensitivity of conventional *in vivo* methods is not sufficient, because the estimation has been determined mainly by measurement of the body parts.

The aim of this study was to find the new incidence of adverse effect for TH disruption. In the present study, we focused on clarifying the *in vivo* TH-disrupting potential of triiodothyroacetic acid (TRIAC), a thyroid hormone analog reported to potentially be produced during wastewater treatment and poses a concern for its ecological impact. The effects of co-exposure of medaka embryos to TRIAC and estrogen on development were examined. As a result, exposure to TRIAC alone during the eleutheroembryo stage caused deformities resembling "Daruma Medaka," characterized by extremely short total body length relative to body height, were observed at a low frequency in some mature fish. Co-exposure to estrogen significantly increased the frequency of these deformities, with similar effects observed for T3 and T4. The vertebrae of the deformed medaka were stained and transparent, indicating that each vertebra was smaller in size.

Together, the present findings suggest that TH agonist causes inhibition of vertebral bone development, and it is a possible indicator of new adverse effects.

マイクロカプセルを用いたメダカへの経口曝露の評価

○米山宙舞¹、岡崎友紀代²、鑓迫典久²

¹愛媛大学農学部、²愛媛大学大学院農学研究科

化学物質の安全性試験として、マウスなど哺乳類を用いた試験が用いられていたが、動物福祉の3Rの原則から最近では哺乳類は使われない傾向にある。その中で「代替法の活用 (Replacement)」として、魚類の使用が注目されているが、魚類は難水溶性などある種の化学物質の曝露が難しい点や、経口曝露ではなく鰓吸収が曝露経路である点など哺乳類との違いが指摘されている。

そこで、化学物質をマイクロカプセル化して魚類に曝露することにより魚類でも哺乳類と同じように経口曝露が出来る可能性が出てきた。カプセルに包埋することにより難水溶性物質、揮発性物質、易加水分解物質などの曝露も可能になる。しかし、カプセル剤だとどれだけ化学物質を曝露されたかわからない（何粒食べたか）ため、現時点では定量的な判断が難しく、定性的に毒性作用を調べることはできない。そのために、本研究では、マウスの経口曝露に代わる魚類を用いた新しい経口曝露手法の有効性・評価法について検討している。今回の実験は、ビテロジェニンへの毒性を示す毒性値が異なるエストラジオール、ノニルフェノール、ビスフェノールAの3つの化学物質を濃度曝露とマイクロカプセル曝露の2種類の方法でメダカの稚魚に曝露し、ビテロジェニンへの誘導をmRNAの発現量で確認した。今回の報告では、濃度曝露とマイクロカプセルの経口曝露の比較を行うことで、マイクロカプセルによる魚類への経口曝露が実際に行われている確認や曝露経路の差で影響の現れ方が異なるのかを確認した。今後、カプセル曝露する化学物質の量と影響値の関係について考察していきたい。

Evaluation of oral exposure to *Oryzias latipes* using microcapsules.

Soramu Komeyama¹, Yukiyo Okazaki², Norihisa Tatarazako²

¹Department of agriculture, Ehime University, ² Ehime University, Graduate School of Agriculture

Mammals such as mice used to be used for safety testing of chemical substances, but recently, mammals tend not to be used due to the principle of 3Rs of animal welfare. However, fish are difficult to expose to certain chemical substances because of their water insolubility, and their gill absorption is the route of exposure rather than oral exposure, which is different from that of mammals.

Therefore, there is a possibility that fish can be exposed orally in the same way as mammals by microencapsulating chemical substances and exposing them to fish. Encapsulation also makes it possible to expose fish to water-insoluble, volatile, and easily hydrolyzed substances. However, since we do not know how much of the chemical substance was exposed to the capsule formulation (how many capsules were eaten), it is difficult to make quantitative judgments at this time, and we can only investigate toxicological effects qualitatively. For this reason, this study examines the efficacy and evaluation methods of a new oral exposure method using fish as an alternative to oral exposure in mice. In this experiment, three chemicals, estradiol, nonylphenol, and bisphenol A, which have different toxicity values for vitellogenin, were exposed to juvenile medaka fish by two different methods, concentration exposure and microcapsule exposure, and their induction to vitellogenin was confirmed by the expression level of mRNA. In this report, by comparing concentration exposure and oral exposure of microcapsules, we confirmed whether oral exposure of fish to microcapsules actually takes place and whether the effects appear differently depending on the exposure route. In the future, we would like to discuss the relationship between the amount of chemicals exposed to the capsules and the effect values.

メダカ胚による高感度エストロゲン作用評価法

○岩切 悠¹、内田雅也¹、有菌幸司²、富永 伸明¹
¹有明工業高等専門学校創造工学科、²熊本大学薬学教育部

【目的】多くの化学物質が、生物に対して様々な影響を及ぼすことが分かり、簡易な影響評価法の必要性が高まっている。エストロゲン活性は、魚類がオスからメスへの性転換を引き起こすことが明らかになり、その作用は、核内エストロゲン受容体(ESR)を介した E2 応答遺伝子の発現が上昇するとされる。そこで、*in vivo* 試験ではなく、ESR を用いた酵母 two-hybrid 法やレセプターアッセイ等の *in vitro* 試験による評価が行われているが、ESR 分子種の複合的な作用は不明な点が多く、十分な評価法とは言えない。我々は、高電界エレクトロポレーション法を用いて、化学物質をメダカ胚に狭いウィンドウで物質を導入する技術を開発している。そこで、本研究では、発生中のメダカ胚における ESR 分子種の発現状況を調査し、ESR 分子種の発現量と応答遺伝子の発現誘導の関係を検討した。

【実験方法】受精後、2, 4, 6, 8 日目の卵から RNA を抽出し、cDNA 溶液を作成した。ESR サブタイプ (*ERα*, *ERβ1*, *ERβ2*) のプライマーを用いて qPCR により、発現状況を調べた。また、6 日目の卵に高電界エレクトロポレーション法により、0.1 nM~1 μM エストラジオール(E2)溶液の曝露を行った。8 日目で卵を回収し、cDNA 溶液を作製した。4 種類の E2 応答遺伝子(*vtg1*, *vtg2*, *chgh*, *chgl*)の発現状況を qPCR により調べた。

【結果と考察】*ERα*, *ERβ1* の発現量は 4 日目で最も高く、6, 8 日目では減少した。一方、*ERβ2* の発現量は発生が進むにつれて増加し、8 日目で 2 日目の約 10 倍であった。すべての ESR 分子種の発現が増加する 6 日目で E2 曝露すると応答遺伝子の発現量は低濃度の E2 暴露でも増加する傾向を示し、特に *chgh*, *l* の発現量は 10 nM で大きく上昇した。0 日目暴露では同濃度で誘導が起きなかったことから、ESR の発現量の増加に伴って E2 への応答性が高まったことが示唆される。本方法は、生物個体の応答を利用した *in vivo* 試験であるが、胚を使った *in vitro* 試験に限りなく近いものである。現在、エストロゲン様作用を持つ化合物の評価を行っている。

Highly sensitive evaluation method for the estrogenic action by medaka embryo

Yu Iwakiri¹, Masaya Uchida¹, Koji Arizono², Nobuaki Tominaga¹

¹Department of Creative Engineering, National Institute of Technology, Ariake College

²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

Many chemicals have been found to exert various effects on living organisms. Therefore, there is an increasing need for simple methods to evaluate these effects. Estrogenic activity has been shown to cause sex changes from male to female in fish, and this effect is due to the increased expression of responsive genes through nuclear estrogen receptors (ESRs). Thus, *in vitro* studies, such as yeast two-hybrid assay and receptor assay using ESRs, have been conducted instead of *in vivo* studies. However, these are not sufficient methods for evaluation. We are developing a technique to introduce chemical substances into medaka embryos in a narrow window using a high electric field electroporation method. In this study, we investigated the expression levels of ESR molecular species in developing medaka embryos and examined the relationship between the expression levels of ESR molecular species and induction of response genes.

The expression levels of *ERα* and *ERβ1* were highest on day 4 and decreased on days 6 and 8, respectively. In contrast, the expression level of *ERβ2* increased as development progressed, and was approximately 10-fold higher on day 8 than on day 2. Exposure to E2 on day 6, when the expression of all ESR molecular species increased, the expression levels of response genes increased in a concentration-dependent manner. In particular, the expression levels of *chgh* and *l* significantly increased at 10 nM. Compared with day 0 exposure, induction occurred at sufficiently low concentrations, suggesting that the response to E2 increased with the level of expression of the ESRs. This method is an *in vivo* study using the response of an individual organism but is as close as possible to an *in vitro* study using embryos.

環境医薬品のメダカに対する分子応答解析

○西村 優佳¹, 宮川 信一¹

¹東京理科大学大学院 先進工学研究科

現代社会において医薬品の重要性は増す一方であり、それに伴い使用量も増大している。ヒトが使用した様々な医薬品の一部は、下水処理場において全ては処理できずに河川等に流出している。このような環境中に存在する医薬品由来の化学物質を環境医薬品という。日本で処方される医薬品は、抗うつ薬や抗精神病薬など、モノアミントランスポーターやGタンパク共役型受容体を標的として神経系に作用するものが多い。そのため、環境医薬品は水生生物の行動や生理機能に影響を及ぼす可能性があるが、水生生物に及ぼす影響の有無や作用は明らかにされていない。そこで、日本の河川に広く生息するメダカ (*Oryzias latipes*) における環境医薬品に対する分子応答メカニズムを解明するために、抗うつ薬などの標的であるセロトニン、ノルエピネフリン、ドーパミン各トランスポーター遺伝子について調べた。魚類とヒトのアミノ酸配列を比較したところ、トランスポーター活性に重要とされるアミノ酸が保存されていた。さらに、脳内におけるこれらのトランスポーターの局在を、*in situ* hybridization 法によって明らかにした。これらの結果から、メダカにおいて医薬品の標的となるモノアミントランスポーター遺伝子とタンパク質は保存されており、実際に医薬品に応答することが示唆された。

Analysis of target molecules and their downstream events of environmental pharmaceuticals in medaka

Yuka Nishimura¹, Shinichi Miyagawa¹

¹Department of Biological Science and Technology, Graduate School of Advanced Engineering, Tokyo University of Science

Large amount of pharmaceuticals are consumed and they are processed in sewage treatment plants after being discharged into the sewerage system. However, due to their diverse molecular properties, not all of them can be effectively removed during treatment processes, resulting their discharge into the aquatic environment. Consequently, pharmaceutical residues have been detected in environmental water samples, raising concerns about their potential impacts on aquatic organisms inhabiting rivers. Of those environmental pharmaceuticals, antidepressants and antipsychotics, which act on the central nervous system are of great concern. In this presentation, we report the molecular basis on potential targets of environmental pharmaceuticals such as antidepressants and antipsychotics in fish, with a particular focus on monoamine transporters. We cloned serotonin, norepinephrine and dopamine transporter genes from several fish. Comparative analysis of amino acid sequences between fish and human revealed that amino acids considered important for transporter activity were well conserved. We also identify gene expression analysis for these transporters in medaka brain. Our results suggest that environmental pharmaceuticals are possibly act on fish monoamine transporters and induce adverse effects in aquatic organisms.

メダカ TR における甲状腺ホルモンかく乱の影響評価

○中村 文音¹、國行 亜紀¹、鈴木 潮音²、豊田 賢治³、井口 泰泉⁴、宮川 信一^{1,2}

¹東京理科大学 大学院先進工学研究科、²東京理科大学 先進工学部、

³広島大学 大学院統合生命科学研究科、⁴横浜市立大学 大学院生命ナノシステム科学研究科

日用品や医薬品などに由来する化学物質が環境中に流出し、動物の内分泌系や成体系に悪影響を及ぼすことが報告されている。これらの化学物質の中には、甲状腺ホルモン系をかく乱して、動物の発生、変態、代謝、恒常性維持などに作用するものが多く報告されている。特に水系動物は、これらの化学物質に直接曝露されているために大きな影響があると考えられている。しかし、日本で広く生体評価に用いられているメダカ (*Oryzias latipes*) の発生や成長における甲状腺ホルモンの作用や、甲状腺ホルモンかく乱の実体はほとんど明らかになっていない。そのためメダカにおける甲状腺ホルモン作用の分子メカニズムの一端を解明するとともに、環境中に存在する化学物質の甲状腺ホルモンかく乱作用の評価系を確立することを目指した。本研究では、メダカの甲状腺ホルモン受容体 (TR) の転写活性能を指標として、化学物質の甲状腺ホルモン系への影響をレポーターアッセイにより評価した。本研究の成果は、メダカをはじめとする水生生物における内分泌かく乱作用のメカニズム解明に貢献することが期待される。

Evaluation of Thyroid Hormone Disruption in Medaka TRs

Ayane Nakamura¹, Aki Kuniyuki¹, Shion Suzuki², Kenji Toyota³, Taisen Iguchi⁴, Shinichi Miyagawa^{1,2}

¹Graduate School of Advanced Engineering, Tokyo University of Science, ²Faculty of Advanced Engineering, Tokyo University of Science, ³Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University, ⁴Graduate School of Nanoscience, Yokohama City University

Recent studies have reported that pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) released into the environment have adverse effects on endocrine systems of animals. Many of these chemicals have been shown to disrupt the thyroid hormone system, affecting animal development, metamorphosis, metabolism, and homeostasis. However, the mechanisms of thyroid hormone disruption in medaka (*Oryzias latipes*), a widely used model organism for bioassessment, remain largely unknown. In this presentation, we elucidate the molecular mechanisms underlying thyroid hormone disruption in medaka and establish an evaluation system for the thyroid hormone-disrupting effects of PPCPs. In this study, we focused on transcriptional activities of thyroid hormone receptors (TRs) in medaka, and evaluated the effects of several chemicals using a reporter gene assay. Our results will contribute to the understanding the mechanisms of endocrine disruption in aquatic organisms.

***Analysis of the effects of environmental pharmaceuticals
on aquatic organisms***

Renji Kaneko, Ayaka Morinaga, Yuka Nishimura, Honda Kikuko, Shinichi Miyagawa

Graduate School of Advanced Engineering, Tokyo University of Science

A large amount of pharmaceuticals are prescribed and consumed by humans and domestic animals. Most of them are processed in sewage treatment plants, but not all of them can be effectively removed during the treatment processes due to their diverse properties. As a result, some pharmaceuticals including antidepressants and antipsychotics, which are prescribed in large amounts worldwide, are proportionally detected in the environment. These pharmaceuticals have been reported to induce behavioral abnormalities in aquatic organisms, raising concerns about their adverse effects on the ecosystem.

In order to investigate the mechanisms of pharmaceuticals-induced behavioral abnormalities, we have conducted gene expression analysis in the brain of medaka exposed to mirtazapine, chlorpromazine and amitriptyline (antidepressants and antipsychotics). We found that several genes related to circadian rhythms were differentially expressed by these pharmaceutical exposure. It has been therefore suggested that antidepressants and antipsychotics may disturb circadian rhythms in aquatic organisms, resulting in behavioral abnormalities.

ミルタザピンとクロルプロマジン塩酸塩がボラの行動と遺伝子発現に与える影響

○高山 師温¹、亀飼 耕平²、長江 真樹¹、征矢野 清^{1, 2}

¹長崎大学大学院水産・環境総合研究科、²長崎大学海洋未来イノベーション機構

【緒言】環境医薬品（医薬品及びそれに由来する化学物質）は魚類の神経系に作用し、行動に影響を与えることが明らかになりつつあるが、その知見は十分ではない。本研究では、向精神薬であるミルタザピンとクロルプロマジン塩酸塩を用いて、ボラ *Mugil cephalus* の遊泳行動と遺伝子（血液脳関門の薬物排出を担うトランスポーター *abcg2*）発現に及ぼす影響を調べた。

【方法】実験①：10 L 水槽 4 基に長崎近郊で捕獲した稚魚を 5 尾ずつ収容し、3 日間馴致後、0, 200, 400, 600 $\mu\text{g/L}$ に調整したミルタザピン（Mir）を 72 時間曝露した。また、飼育水の半分を毎日交換した。交換する水には曝露と同濃度の医薬品をあらかじめ溶解したものを用いた。実験②：異なる日程で、0, 5, 50, 250 $\mu\text{g/L}$ のクロルプロマジン塩酸塩（Chp）を用いて同様の曝露試験を行った。いずれの試験でも、10 時と 16 時に 60 分間行動を撮影し、30-31 分の間でボラが滞在した位置のフレーム数を確認した。これを水槽内の滞在位置の遊泳時間とした。また、試験終了後、本種から脳を摘出し、*abcg2* の発現量を測定した。

【結果】ボラは表層遊泳するが、その頻度は低い。しかし、いずれの曝露群でもそれは増加した。また、高濃度のミルタザピン曝露では 54 時間後に水底へ移動し密集する行動が観察された。*abcg2* の発現量は 200 $\mu\text{g/L}$ のミルタザピン曝露群で有意に増加したが、400 および 600 $\mu\text{g/L}$ では変化が見られなかった。クロルプロマジン曝露群では、いずれの濃度でも有意差は確認されなかった。

Effects of the psychotropic drugs mirtazapine and chlorpromazine hydrochloride on behavior and gene expression in grey mullet

Shion Takayamai¹, Kouhei Kamegai², Masaki Nagae¹, Kiyoshi Soyano^{1, 2}

¹Graduate School of Fisheries and Environmental Sciences, Nagasaki University, ²Organization for Marine Science and Technology, Nagasaki University

【Introduction】: The effects of pharmaceuticals that act on the nervous system of fish are not well understood. In order to investigate these effects, exposure experiments were conducted using the psychotropic drugs mirtazapine (Mir) and chlorpromazine hydrochloride (Chp) on the grey mullet (*Mugil cephalus*). In this experiment, changes in swimming behavior due to exposure were analyzed. In addition, the expression of *abcg2*, a transporter that is responsible for drug efflux across the blood-brain barrier, was analyzed.

【Methods】: Experiment 1: Prior to the experiment, juvenile mullets were acclimated in 10 L tanks for 3 days. They were exposed to 0, 200, 400, and 600 $\mu\text{g/L}$ of Mir for 72 hours. The rearing water was replaced half every day while maintaining the exposure concentration. Experiment 2: The mullet were exposed to 0, 5, 50, and 250 $\mu\text{g/L}$ of Chp by the same method. Behavioral analysis was conducted for 60 minutes at 10:00 and 16:00 daily, and swimming between 30 and 31 minutes was recorded. Brain tissue was collected after exposure to measure *abcg2* expression.

【Results】: Surface swimming increased in all exposed groups, however, in the group exposed to high concentrations of Mir, a gathering of fish at the bottom were observed. Expression of *abcg2* was significantly increased in the mullet exposed 200 $\mu\text{g/L}$ Mir. On the other hand, no significant changes were observed in fish exposed Chp.

未成熟アユにおける 17- α メチルテストステロンによる黒色素胞への影響

國岡 遼、○莚平 裕次
高知大学農林海洋科学部

魚類の体色は体表に存在する色素胞によって調節され、アユ (*Plecoglossus altivelis*) の雄は繁殖期に体色が黒く変化する。これはアンドロゲンが黒色素胞に作用することで誘導されると考えられる。非繁殖期では、黒色素胞は背景に応じてメラニン色素の収縮と拡散によって体色を調節しており、外因性アンドロゲンはアユの体色応答へ影響を及ぼす可能性がある。本研究では人工アンドロゲンの 17- α メチルテストステロン (MT) が未成熟アユの黒色素胞へ及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

未成熟な雌雄アユを 500 L 水槽 4 基に 40 匹ずつ収容した。MT を 0、0.1、1、および 10 $\mu\text{g/g}$ body weight/day (対照群、低濃度群、中濃度群、および高濃度群) となるように餌経由で曝露させ、曝露 0、5、15、および 30 日後の計 4 回サンプリングした。標準体長、体重、および生殖腺重量を測定し、生殖腺体指数 (GSI) を算出した。鱗はリアルタイム定量 PCR によりアンドロゲン受容体 (*ar*) 発現量を、画像解析により黒色素胞の専有面積を計測した。

GSI は雌雄ともに 30 日後の MT 曝露群で有意に上昇したが、生殖腺は未熟な状態であった。黒色素胞の専有面積では、雌雄ともに中濃度群と高濃度群では 15 日後の段階で有意に上昇した。しかし、*ar* 発現量では曝露群で有意な上昇は見られなかったことから、MT は鱗上ですでに発現していた AR を介して黒色素胞の拡散を誘導したと考えられた。以上のことから、外因性アンドロゲン様物質はアユの体色へ影響を及ぼすことが示唆された。

Effects of 17-alpha methyltestosterone on melanophores in immature ayu

Ryo Kunioka, Yuji Mushirobira

¹Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University

Body coloration of fish is regulated by chromatophores on the body surface, and ayu (*Plecoglossus altivelis*) males change their body color to black during the breeding season. This is thought to be induced by androgens acting on the melanophores. During the non-breeding season, the melanophores regulate body color by contraction and diffusion of melanin pigment in response to background, and exogenous androgens may affect the body color response of the ayu. The aim of this study was to clarify the effects of an artificial androgen, 17-alpha methyltestosterone (MT), on the melanophores in immature ayu.

Immature males and females were kept in four 500 L tanks with 40 fish each, exposed to MT via food at 0, 0.1, 1, and 10 $\mu\text{g/g}$ body weight/day (control, low, middle, and high concentration groups) and sampled four times at 0, 5, 15, and 30 days after exposure. Standard length, body weight, and gonad weight were measured, and gonad somatic index (GSI) was calculated. Scales were measured for androgen receptor (*ar*) expression by real-time quantitative PCR and for exclusive area of melanophores by image analysis.

GSI was significantly increased in both sexes in the MT groups at 30 days after exposure, but the gonads remained immature. In terms of exclusive area of melanophores, both males and females were significantly increased in the middle and high concentration groups at 15 days after exposure. However, no significant increase was observed in the exposed group in terms of *ar* expression, suggesting that MT induced the diffusion of melanophores via AR that was already expressed on the scales. These results suggest that exogenous androgen-like substances affect body color in ayu.

ネオニコチノイド系農薬が海産甲殻類アミ *Americamysis bahia* の繁殖に及ぼす影響評価

○井上綾乃¹、内田雅也¹、平野将司²、富永伸明¹、有菌幸司³、石橋弘志⁴

¹有明工業高等専門学校創造工学科、²東海大農学部食生命科学科、³熊本大学薬学教育部、

⁴愛媛大学大学院農学研究科

【目的】世界で普及しているネオニコチノイド系農薬(NNP)は、浸透移行性や残効性を持つ農薬で、神経伝達物質に結合し神経系を攪乱させることで殺虫効果を示す。近年日本では、農薬取締法改正により農薬の再評価制度を導入し、慢性影響評価の実施が進められている。その際の慢性影響評価に用いる甲殻類は「オオミジンコに限る」と定められている。しかしオオミジンコはアセチルコリン受容体に作用する殺虫剤への感受性が低く、農薬登録において感受性の高いユスリカを用いた毒性試験結果が要求されており、オオミジンコは慢性影響の再評価に適した種であるとは言い難い。さらに農薬の用途から、淡水域の汚染実態調査がなされているが、河川を通じ、海域にも流出することを考慮すると海産生物への影響も評価することが必要である。そこで本研究では、NNP が海産甲殻類アミの繁殖に及ぼす影響を評価することを目的とした。

【実験方法】繁殖阻害試験は、1 試験区あたりオス：メス=6：6 の計 12 匹のアミを投入し、対照区(CTL)と曝露区(DINO：0.05-5 µg/L、IMI：0.02-20 µg/L)を n=6 用意し、21 日間の曝露を行った。なお IMI では、CTL とは別に溶媒対照区(SC)を設けた。試験期間中は 24 時間毎に生存数、脱皮数及び産仔数を計測し最小影響濃度(LOEC)を求めた。

【結果と考察】DINO 繁殖阻害試験の結果、平均総産仔数に濃度依存的な減少傾向がみられ 0.5 及び 5 µg/L 曝露区では有意な減少が確認された。これらのことより DINO の繁殖阻害に対する LOEC は 0.5 µg/L であると考えられた。本研究で得られた LOEC と環境中濃度(海域：1.06 µg/L、汽水域：6.25 µg/L)を比較すると環境中濃度よりも低い値で繁殖が阻害されることが明らかとなり、DINO がアミの繁殖に及ぼすことが懸念された。また、IMI についても産仔数の減少が確認されており、IMI もアミの繁殖に影響を及ぼすことが懸念された。以上の結果より、NNP のアミの繁殖阻害についての環境リスクが懸念された。アミは生態毒性試験に使用されるオオミジンコと比較して農薬などの化学物質に対する感受性が異なる。NNP の海域での検出も考慮すると、海域生態系への影響を把握するため、アミなどの海産生物を用いた農薬再評価が重要と考えられる。

Evaluation of the Effects of Neonicotinoid Pesticides on the Reproduction of the in Mysid Crustacean, *Americamysis bahia*

Ayano Inoue¹, Masaya Uchida¹, Masashi Hirano², Nobuaki Tominaga¹, Koji Arizono³, Hiroshi Ishibashi⁴

¹Department of Creative Engineering, National Institute of Technology, Ariake College, ²School of Agriculture, Tokai University, ³Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,

⁴Graduate School of Agriculture, Ehime University

Neonicotinoid pesticides have penetrating and residual effects, binding to neurotransmitters and disrupting the nervous system to produce insecticidal effects. Other residual and persistent pesticides are used in many cases, leading to the introduction of pesticide reevaluation systems. However, most of these evaluations are acute effect evaluations, and because there is a lack of knowledge of chronic effect evaluations, they are being conducted in Japan. The crustacean species used in this study are limited to *Daphnia magna*, but it is important to evaluate the effects of pesticides on marine organisms because they are less sensitive to insecticides that act on acetylcholine receptors and because pesticides may be released into the ocean. In this study, a 21-days exposure test of dinotefuran and imidacloprid to the mysid (*Americamysis bahia*) was conducted as a reproductive inhibition test. The results of the reproductive inhibition test showed a concentration-dependent decrease in the average total number of offspring. The lowest observed effect concentration (LOEC) for dinotefuran was estimated to be 0.5 µg/L. Comparing the obtained LOEC with the environmental concentration, it was clear that reproductive inhibition occurred at lower values than the environmental concentration, raising concerns about the environmental risk posed by dinotefuran to mysid reproduction.

オオミジンコを用いた抗幼若ホルモン作用スクリーニング試験法の開発

○小田 悠介¹、渡部 春奈¹、山本 裕史¹

¹国立環境研究所 環境リスク・健康領域

節足動物の成長・変態・性決定は、幼若ホルモン(juvenile hormone: JH)により制御されている。JH と類似構造を持ち、昆虫の成長や変態を阻害する JH 作用物質 (JH agonists: JHAs) が殺虫剤として多く開発・使用されているが、JHAs はミジンコの性決定にも影響し、オスの仔虫を誘導することが明らかにされている。この応答を利用して、オオミジンコ (*Daphnia magna*) 幼若ホルモン作用短期スクリーニング試験法 (JH activity screening assay: JHASA) が開発され、2024 年 4 月には OECD 試験ガイドライン No. 253 として新たに承認された。

一方で、JH 受容体や JH 生合成経路を選択的に阻害する抗 JH 作用を持つ殺虫剤 (JH antagonists: JHANs) も開発・研究が進められているが、ミジンコを用いて抗 JH 作用を検出するための試験法については確立されていない。JH 受容体を阻害する JHANs の場合は、オオミジンコでは JHAs と共ばく露すると、オス仔虫誘導が抑制されると期待される。JH 生合成を阻害する JHAs の場合、JH 生合成を誘導する物質との共ばく露によってオス仔虫誘導が抑制されると考えられるが、JH 生合成誘導剤および試験物質が JH 生合成のどの経路に作用するかによってはオス仔虫誘導の抑制を検出できない可能性がある。本発表では、2 通りの JHANs を検出可能な試験法開発の取り組み状況を報告する。検証物質として、昆虫で JH 受容体阻害作用が確認されている物質や、これまで実施した JHASA や JH 受容体レポータージーンアッセイで得られた知見に基づき、JH 受容体結合阻害剤と JH 生合成阻害剤が想定される候補物質を選定した。各候補物質について、適切な JH 陽性対照物質と共ばく露し、オス仔虫誘導抑制が検出できるかを検証した。

Development of screening assay using *Daphnia magna* for detecting anti-juvenile hormone activity

Yusuke Oda¹, Haruna Watanabe¹, Hiroshi Yamamoto¹

¹Health and Environmental risk division, National Institute for Environmental Studies

Juvenile hormone (JH) plays a crucial role in regulating the growth, metamorphosis, and sex determination of arthropods. JH agonists (JHAs), which have a similar structure to JH and inhibit insect growth and metamorphosis, have been widely developed as insecticides. These JHAs also affect sex determination in *Daphnia*, inducing the production of male offspring. Using this response, short-term juvenile hormone (JH) activity screening assay using *Daphnia magna* (JHASA), was developed and newly approved as OECD Test Guideline No. 253 in April 2024.

In contrast, although insecticides with anti-JH activity (JH antagonists: JHANs) that inhibit JH receptors or biosynthesis are also under development, no standardized assay currently established to detect JHANs. In the case of JH receptor antagonists, co-exposure with JHAs (JH receptor agonist) is expected to suppress male offspring production induced by JHAs in *Daphnia*. In the case of JH biosynthesis inhibitors, co-exposure with a substance that induce JH biosynthesis could suppress male offspring production, however, dependent on which pathway of JH biosynthesis is disrupted by JH biosynthesis inducer and a test substance, it may fail to detect decrease in male offspring production. This presentation will report the progress of development of a screening assay for detecting both types of JHAN. JHANs candidate substances were selected based on the previous study that suggested JH receptor inhibitors in insect and findings from previously conducted JHASA and *Daphnia* JH reporter gene assays. Then, each candidate substances was co-exposed with the appropriate JH activity positive control substance to examine whether inhibition of male offspring production could be detected.

P-23

オオミジンコの脱皮数およびキトビアーゼ活性を用いた脱皮ホルモン作用の検出

○渡部 春奈¹、阿部 良子、小田 悠介¹、山本 裕史¹

¹ 国立環境研究所 環境リスク・健康領域

環境省が実施している、化学物質の内分泌かく乱作用に係る2段階の試験・評価枠組みにおいて、ミジンコを用いた脱皮ホルモン作用を検出するための第1段階生物試験の開発が必要とされてる。脱皮ホルモンはミジンコの胚発生や脱皮を制御しているが、成熟後の脱皮は産仔周期にも影響を受けるため、脱皮回数を脱皮ホルモン作用に特異的なエンドポイントとして用いるには注意が必要である。脱皮ホルモンが分泌されると、脱皮ホルモン受容体の活性化により、新しい外殻を作るキチン合成酵素と古い外殻を分解するキチン分解酵素（キトビアーゼやキチナーゼ）などが誘導されて脱皮が生じる。よって、キチン分解酵素を脱皮阻害に特有なバイオマーカーとして活用できる可能性があり、中でもキチナーゼは脱皮によって水中に放出されたものを非侵襲的に測定できるという利点がある。そこで本研究では、オオミジンコの産仔までの脱皮回数と水中キトビアーゼ活性をエンドポイントとして、脱皮ホルモン作用短期スクリーニング試験を開発するための検討を行った。陽性対照物質の脱皮ホルモン受容体アゴニストやアンタゴニストに加えて、キチン合成阻害剤や幼若ホルモン類似剤、一般毒性物質の3,5-ジクロロフェノール等について試験し、脱皮数とキトビアーゼ活性への影響や両者の相関関係について、作用機作の異なる物質間での違いを評価した。

Detection of ecdysone activity using the number of molts and chitinase activity in *Daphnia magna*

Haruna Watanabe¹, Ryoko Abe, Yusuke Oda¹, Hiroshi Yamamoto¹

¹Health and Environmental Risk Division, National Institute for Environmental Studies

Under the two-tiered framework on testing and assessment of endocrine disrupting effects of substances implemented by the Ministry of Environment, development of a Tier 1 in vivo assay for ecdysone activity using *Daphnia* is required. Ecdysone regulates embryo development and molting in *Daphnia*; however, reproductive cycle also affects molting in matured daphnids so that we should carefully use the number of molts as an endpoint specific to ecdysone activity. When secreted ecdysone activates ecdysone receptor, enzymes involved in molting, such as chitin synthesis enzymes producing a new exoskeleton and chitin degrading enzymes (chitinase and chitinase) breaking down the old exoskeleton, are induced to cause molting. Therefore, chitin degrading enzymes could be used as biomarkers specific to molting inhibition and especially chitinase has the advantage that it can be noninvasively measured as it is released with the molting fluid into the water. The objective of this study is to develop a *Daphnia magna* short-term ecdysone activity screening assay using the number of molts before reproduction and chitinase activity in the water as endpoints. In addition to ecdysone receptor agonists and antagonists as positive control substances, chitin synthesis inhibitors, juvenile hormone analog, and general toxicants such as 3,5-dichlorophenol were investigated and the effects on the two endpoints and the correlation between them were evaluated for differences among the substances with different mode of action.

アミ類における有機ハロゲン化合物の毒性影響と QSAR モデルによる毒性評価

○平野 将司¹、内田 雅也²、有菌 幸司³、石橋 弘志⁴¹東海大学農学部、²有明高専創造工学科、³熊本大学薬学教育部、⁴愛媛大学大学院農学研究科

人為・天然由来の有機ハロゲン化合物が沿岸域において広域的に存在することが報告されている。このようなハロゲン系化合物は、二枚貝や甲殻類においても検出され蓄積がみられるものの、これら無脊椎動物に対する毒性リスク評価の知見は限られている。本研究では、汽水産アミ類 (*Americamysis bahia*) を対象として、有機ハロゲン化合物の急性毒性および成長・成熟試験を実施した。ハロゲンを含む農薬類としてハロゲン系殺虫剤の急性毒性試験を実施したところ、*p*-クロロアニリン、イソキサフルトール、テンボトリオンの LC50 値は、それぞれ 1,690、24 および 81 µg/L と算出された。また成長・成熟試験の結果、*p*-クロロアニリンでは成長抑制がみとめられ、LOEC は 3 µg/L と見積もられた。一方、ハロゲン系殺虫剤ではないものの、脱皮異常を介する昆虫成長制御剤であるブプロフェジンの成長・成熟試験では、最大 150 µg/L の濃度まで成長や成熟に対する影響は認められなかった。また、これまで本研究グループが実施してきたアミ類を用いた急性毒性試験の結果から LC50 値が得られた 45 化合物を対象として QSAR 解析を行い、毒性に寄与する物理化学的特性を予測した。これら対象物質について 209 種類の記述子を算出し、LC50 値を活性値として AutoQSAR 解析した結果、良好な QSAR 式 ($R^2=0.99$) を得た。相関マトリックスにより、構造の電子的特性の他、XlogP が高いと毒性が強い傾向にあり、水素結合供与体原子数が少ない構造は毒性が弱くなる傾向が推測された。

Toxic effects of organohalogen compounds in mysids and toxicity assessment by QSAR modelMasashi Hirano¹, Masaya Uchida², Koji Arizono³, Hiroshi Ishibashi⁴¹ School of Agriculture, Tokai University, ² Department of Creative Engineering, National Institute of Technology, Ariake College, ³ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,⁴ Graduate School of Agriculture, Ehime University

This study investigated the potential toxic effects of organohalogen compounds on estuarine mysids (*Americamysis bahia*). Acute toxicity tests were conducted for halogenated pesticides, including *p*-chloroaniline, isoxaflutole, and tembotrione, and the LC50 values were calculated to be 1,690, 24, and 81 µg/L, respectively. Growth and fecundity tests showed that *p*-chloroaniline inhibited growth with an estimated LOEC of 3 µg/L. In contrast, growth and maturation tests with buprofezin, a non-halogen insecticide but an insect growth regulator via molting abnormalities, showed no effect on growth or maturation up to concentrations of 150 µg/L. In addition, QSAR analysis was performed on 45 compounds for which LC50 values were obtained from the results of acute toxicity studies with mysids conducted by our group to predict physicochemical properties that contribute to toxicity. For these target substances, 209 descriptors were calculated, and AutoQSAR analysis using the LC50 value as the activity value resulted in a good QSAR equation ($R^2=0.99$). The correlation matrix indicated that the electronic properties of the structures and higher XlogP tended to be more toxic, whereas structures with fewer hydrogen bond donor atoms tended to be less toxic.

【謝辞】本研究は JSPS 科研費 23K27045 及び 24K01899 の助成を受けて実施されました。

New approach methodologies (NAMs) for assessing killer whale (*Orcinus orca*) estrogen receptor activation by environmental pollutants

Dave Arthur R. Robledo, Takahito Kumagawa, Mari Ochiai, Hisato Iwata

Laboratory of Environmental Toxicology, Center for Marine Environmental Studies (CMES),
Ehime University, Matsuyama, Ehime, Japan

New approach methodologies (NAMs), such as *in vitro* assays and *in silico* approaches, offer significant tools for evaluating biological processes in a species-specific and non-invasive manner. Killer whales (*Orcinus orca*), as marine apex predators with high fat reserves, are susceptible to the bioaccumulation of environmental contaminants such as dichlorodiphenyltrichloroethane and its analogs (DDTs) and polychlorinated biphenyls (PCBs), and their hydroxylated metabolites (OH-PCBs) have been also detected. These chemicals disrupt the endocrine system by activating the estrogen receptor alpha (ER α), which governs reproductive and physiological functions. This study aimed to assess the transactivation potency of killer whale ER α (kwER α) in response to seven DDTs (*p,p'*-DDT, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDE, and *p,p'*-DDOH), three PCBs (PCB77, PCB153, and PCB180), and 18 OH-PCBs by employing NAMs. We constructed an *in vitro* kwER α -expressed reporter gene assay and assessed the transactivation potencies of test compounds using the 10% effective concentration (REC₁₀) relative to the maximal response from 17 β -estradiol. To further explore the molecular mechanisms of kwER α transactivation, *in silico* analyses were performed, including molecular docking, electrostatic potential (ESP) analysis, protein-ligand network analysis (PLNA), rotamer analysis, and molecular dynamics (MD) simulation. *In vitro* results revealed that *o,p'*-DDT was the most potent among the tested chemicals, with REC₁₀ = 0.022 μ M, followed by *o,p'*-DDE (0.043 μ M) and *o,p'*-DDD (0.14 μ M). Furthermore, OH-PCBs with hydroxyl groups in the para position and fewer adjacent chlorine atoms showed higher transactivation potency. *p,p'*-DDE and PCBs exhibited no estrogenic activity. These findings may be explained by the strong negative charge around the chlorine atoms in DDTs and hydroxyl groups in OH-PCBs, as identified through ESP analysis. MD simulations and PLNA revealed agonist-induced conformational changes in kwER α 's Helix-12, with Glu³⁵³ and Phe⁴⁰⁴ playing critical roles in ligand interaction. Rotamer analysis highlighted Glu³⁵³ as the most flexible and Phe⁴⁰⁴ as the most rigid residue within the binding pocket. There was a significant correlation between *in vitro* REC₁₀ levels and docking scores ($r^2 = 0.54$, $p = 0.007$), suggesting a structure-activity relationship among the test chemicals. Overall, these findings demonstrate that NAMs can effectively assess species-specific endocrine disruption risks in killer whales and highlight the necessity to strengthen conservation strategies and pollutant regulations for vulnerable species.

鯨類線維芽細胞を用いたダイオキシン曝露による CYP1A1 誘導能の種差の評価

○濱元 明来¹、落合 真理¹、森田 浩平¹、山中 陽なた¹、岩田 久人¹¹愛媛大学 沿岸環境科学研究センター

鯨類は海洋食物連鎖における高次捕食者で、残留性有機汚染物質 (POPs) を高濃度に蓄積する。POPs の一種であるダイオキシン類は、芳香族炭化水素受容体 (AHR) の活性化を介して異物代謝酵素であるシトクロム P450 1A1 (CYP1A1) 等の発現を誘導するとともに、発生毒性や免疫抑制を惹起する。そのため、AHR の活性化や CYP1A1 の誘導は、ダイオキシン類曝露による毒性影響の指標として有用である。一方、ダイオキシン類に対する感受性には種差がある。したがって、野生生物を対象に AHR の活性化能や CYP1A1 の誘導能を評価することは、ダイオキシン類曝露のリスクを評価するために不可欠であるが、鯨類などの野生動物を研究に用いることは倫理的・法的な問題が伴う。これらの背景から、鯨類を対象に化学物質の用量-応答関係を比較した研究は依然として少ない。これまでに我々は、死亡漂着した鯨類由来の線維芽細胞を用いた *in vitro* 試験法を確立した。本研究では、鯨類 5 種 15 個体とヒト 2 個体の線維芽細胞を用いて、2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 曝露による CYP1A1 の誘導能を測定し、ダイオキシン類に対する感受性の種差を評価した。その結果、鯨類の細胞はヒトより低い EC₅₀ 値を示し、鯨類がダイオキシン類に対して高い感受性を持つことが明らかになった。さらに、鯨種間でも EC₅₀ 値に差があり、種間での感受性の違いが示唆された。また、鯨類細胞より抽出した RNA を用いて AHR のリガンド結合ドメインのアミノ酸配列を解析した結果、特異的なアミノ酸配列を有する種が確認された。この結果から、鯨種間のダイオキシン類感受性の差は、AHR のアミノ酸配列の違いに起因する可能性が示唆された。

Assessment of species differences in CYP1A1 induction potency by dioxin exposure using cetacean fibroblastsHAMAMOTO Akari¹, OCHIAI Mari¹, MORITA Kohei¹, YAMANAKA Hinata¹, IWATA Hisato¹¹Center for Marine Environmental Studies (CMES), Ehime University

Cetaceans, as apex predators in the marine food chain, accumulate high concentrations of persistent organic pollutants (POPs), such as dioxins. These dioxins activate the aryl hydrocarbon receptor (AHR), thereby inducing the expression of xenobiotic-metabolizing enzymes such as cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), leading to developmental toxicity and immunosuppression. AHR activation and CYP1A1 induction are key toxicity indicators, though sensitivity to dioxins varies significantly among species. Investigating AHR activation and CYP1A1 induction in wildlife is therefore essential for understanding the risks associated with dioxin exposure. Despite its importance, research on wild animals like cetaceans poses significant ethical and legal challenges. Consequently, there are still limited studies on the dose-response relationships of chemicals in cetaceans, and even fewer comparing these responses among different whale species. To address this gap, we developed an *in vitro* fibroblast model using stranded cetaceans. This study evaluated the induction potency of CYP1A1 following exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in fibroblasts obtained from 15 individuals representing five cetacean species as well as from two human individuals. The results revealed that cetacean fibroblasts had lower EC₅₀ values compared to human cells, indicating high sensitivity to dioxins in cetacean cells. Furthermore, EC₅₀ values differed among the cetacean species, suggesting that there are species-specific differences in dioxin sensitivity even within cetaceans. Further analysis of the amino acid sequences of the ligand-binding domain of the AHR, using RNA extracted from the fibroblast cells, revealed unique sequences in some cetacean species. These findings suggest that the observed differences in dioxin sensitivity among cetacean species may be attributed to variations in the amino acid sequence of AHR.

謝 辞

本研究会開催に際しまして多大なるご支援を賜りました。
ここに厚くお礼申し上げます。

いであ株式会社

MDPI Japan

公益財団法人中辻創智社

山口内分泌疾患研究振興財団



Aims and Subject Areas of *JCM*

Journal of Clinical Medicine (ISSN 2077-0383) is an international, peer-reviewed, open access journal on clinical and pre-clinical research. It publishes article types including Research Papers, Reviews, Editorials, Communications, etc. Our aim is to encourage scientists to publish their experimental and theoretical results in as much detail as possible. The full experimental details must be provided so that the results can be reproduced.

There is, in addition, a unique feature of this journal: it accepts studies showing meaningful but negative results. While there are many journals that focus on clinical studies, only a few of them actively accept negative results. As a result, most negative data end up not being in the public domain even if the data were meaningfully negative and the study well designed. By accepting those negative results, our journal encourages scientists to share those data so that they would not need to repeat the experiments that somebody else has already carried out.

This journal covers all topics related to clinical and pre-clinical practices. Topics of interest include (but are not limited to):

- Cardiology
- Gastroenterology & Hepatopancreatobiliary Medicine
- Clinical Neurology
- Oncology
- Orthopedics
- Endocrinology & Metabolism
- Nephrology & Urology
- Epidemiology & Public Health
- Stomatology
- Pulmonology
- Ophthalmology
- Obstetrics & Gynecology
- Immunology
- Hematology
- Clinical Psychology & Psychiatry
- Otolaryngology
- Dermatology
- Clinical Pharmacology



Aims and Scope of *Toxics*

Toxics (ISSN 2305-6304) is an international, peer-reviewed, open access journal, which provides an advanced forum for studies related to all aspects of toxic chemicals and materials. It publishes reviews, regular research papers, and short communications. Our aim is to encourage scientists to publish their experimental and theoretical results in detail. There is, therefore, no restriction on the maximum length of the papers, although authors should write their papers in a clear and concise way. *Toxics* is covered by SCIE (Web of Science), Scopus, PubMed, PMC, Embase, CAPlus/SciFinder, AGRIS, and other databases. The Impact Factor is 3.9, ranking Q1 in "Toxicology" and Q2 in "Environmental Sciences" and CiteScore: 4.5, Q2 (Chemical Health and Safety).

The Journal accepts papers describing work that furthers our understanding of the exposure, effects, and risks of chemicals and materials in humans and the natural environment as well as approaches to assess and/or manage the toxicological and ecotoxicological risks of chemicals and materials. *Toxics* accepts papers covering:

- The occurrence, transport, and fate of chemicals and materials in different systems (e.g., food, air, water, soil);
- Exposure of humans and the environment to toxic chemicals and materials as well as modelling and experimental approaches for characterizing the exposure in, e.g., water, air, soil, food, and consumer products;
- Uptake, metabolism, and effects of chemicals and materials in a wide range of systems including in-vitro toxicological assays, aquatic and terrestrial organisms and ecosystems, model mammalian systems, and humans;
- Approaches to assess the risks of chemicals and materials to humans and the environment;
- Methodologies to eliminate or reduce the exposure of humans and the environment to toxic chemicals and materials.

Editorial Office
toxics@mdpi.com

MDPI
Grosspeteranlage 5
4052 Basel, Switzerland
Tel: +41 61 683 77 34
mdpi.com



Aims and Scope of *Biomedicines*

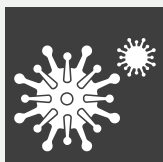
Biomedicines (ISSN 2227-9059) is an open access journal devoted to all aspects of research on human health and disease, the discovery and characterization of new therapeutic targets, therapeutic strategies, and research of naturally driven biomedicines, pharmaceuticals, and biopharmaceutical products. Topics include pathogenesis mechanisms of diseases, translational medical research, clinical studies and applications, biomaterial in biomedical research, natural bioactive molecules, biologics, biosimilar, vaccines, gene therapies, cell-based therapies, targeted specific antibodies, recombinant therapeutic proteins, nanobiotechnology-driven products, targeted therapy, bioimaging, biosensors, biomarkers, biosimilars, and nano-biosimilars.

Biomedicines publishes high-quality papers that address the challenges in bringing biological agents or novel targeted strategies through identification, development, and, ultimately, to clinical use. Therefore, laboratory medicine research, translation medical research, comprehensive preclinical studies, and most clinical studies focused on development and early phase clinical trials are all within the scope of the journal. Some topics include the following:

- Pathogenesis and mechanisms of diseases
- Cardiovascular diseases
- Biomaterial in biomedical research
- Novel targets in various therapeutic areas: cardiovascular, vascular, hematology, oncology, neurology, orthopedics, dermatology, ophthalmology
- Biomarker discovery and early diagnosis research
- Drug discovery and development, pharmacotherapy
- Basic and clinical pharmacology
- Biopharmaceutical biomedicine: biologics and biosimilars
- Nanobiotechnological advances in biomedicine: nanomedicine, nanoscaffold implants (synthetic vascular graft), biosensors, bioimaging, gene therapy, vaccine, cell therapy, and tissue engineering
- Neurobiology and clinical neuroscience
- Neuromodulation

Editorial Office
biomedicines@mdpi.com

MDPI
Grosspeteranlage 5
4052 Basel, Switzerland
Tel: +41 61 683 77 34
mdpi.com



Aims and Scope of *Diseases*

Diseases (ISSN: 2079-9721) provides an advanced forum for studies related to human diseases and conditions. It publishes original research, reviews, communications, and short notes as well as Special Issues on particular subjects.

The aim of *Diseases* is to encourage scientists to publish their experimental and theoretical results in as much detail as possible. Therefore, the journal has no restriction on the maximum length of the papers. Full experimental details should be provided so that the results can be reproduced.

- Cardiovascular diseases
- Gastrointestinal and urological diseases
- Endocrine diseases
- Nutritional diseases
- Infectious diseases
- Neurodegenerative diseases
- Chronic diseases
- Hereditary diseases
- Cancer
- Neuropsychiatric conditions and mental disorders
- Immunology
- Rare syndromes
- Pathology, therapy and pathogenesis of human diseases
- Diseases and society, including patient care

Editorial Office

diseases@mdpi.com

MDPI
Grosspeteranlage 5
4052 Basel, Switzerland
Tel: +41 61 683 77 34
mdpi.com