

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 レポータージーン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,
Izuki 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,* ³ *Department 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の評価した。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.