

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

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ク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ぼさないが、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, Minori 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える。

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

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 Ohura⁴

¹Faculty 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²

¹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.

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こらなかったことから、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、外因性の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、外因性の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.

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 (R²=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 (R²=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¹

¹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 fibroblasts

HAMAMOTO Akari¹, OCHIAI Mari¹, MORITA Kohei¹, YAMANAKA Hinata¹, IWATA Hisato¹

¹Center 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.