

スナメリの臓器・組織に適用可能な PFAS 分析法の確立と組織分布の解析

○西岡 咲希¹、田上 瑠美¹、須之内 朋哉¹、野見山 桂¹、
落合 真理²、田島 木綿子³、国末 達也¹

¹愛媛大学 先端研究院 沿岸環境科学研究センター、²麻布大学 生命・環境科学部、³国立科学博物館

ペルフルオロアルキル化合物及びポリフルオロアルキル化合物(PFAS)は撥油・撥水性、耐熱性などの性質を有することから、半導体の製造工程や泡消化剤などに使用されている。一部の PFAS は環境残留性、生物蓄積性、毒性が懸念されることから、既に POPs に指定されている。現在、化学構造から生物蓄積性や毒性が低いと予想される PFAS への代替化が進んでいるが、そのような新興 PFAS も環境媒体からの検出が近年報告されている。しかしながら、国内の野生生物を対象とした PFAS 調査は限定的である。本研究の対象種であるスナメリは、沿岸性が強く人間活動の影響を受けやすい鯨種であり、寿命が長く代謝能力が低いことから塩素系・臭素系 POPs を高濃度蓄積することが知られている。そこで本研究では、スナメリの臓器・組織(肝臓・腎臓・脳・筋肉)に適用可能な PFAS 分析法を確立し、蓄積特性の解明を試みた。臓器・組織試料は、アルカリ分解、シリンジフィルターによる濾過、液液抽出、カートリッジ(Captiva EMR および Strata PFAS)を用いた固相抽出により精製し、精製溶液中の PFAS (PFCA 11 物質、PFSA 7 物質、FTSA 3 物質、FASA 5 物質、PFES 11 物質)は LC-MS/MS を用いて定性・定量した。添加回収試験を実施した結果、補正回収率はすべての PFAS で良好な結果が得られた(70~136%)。確立した分析法を用いてスナメリの臓器・組織を分析したところ、PFAS 濃度は肝臓で最も高値を示した。興味深いことに、FASA や PFES といった新興 PFAS の脳への移行が明らかとなった。

Establishment of analytical method for PFAS applicable to several tissues of finless porpoises and analysis of tissue distribution

Saki Nishioka¹, Rumi Tanoue¹, Tomoya Sunouchi¹, Kei Nomiyama¹,
Mari Ochiai², Yuko Tajima³, Tatsuya Kunisue¹

¹ Center for Marine Environmental Studies, Premier Institute for Advanced Studies, Ehime University,

²Azabu University, ³ National Museum of Nature and Science

Per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) are used in various applications such as semiconductors and Aqueous film-forming foam because of their oil-, water-repellant, and heat-resistant properties. Some PFASs have been listed as persistent organic pollutants (POPs) due to their persistence, bioaccumulation, and toxicity. Although newer alternative PFASs are expected to have lower toxicity and bioaccumulation potential, their detection in environmental media has been reported in recent studies. Research on PFASs contamination in Japanese wild animals remains limited. In this study, we studied PFAS accumulation in the finless porpoise (*Neophocaena asiaeorientalis*), a coastal species sensitive to human activities and known to accumulate high levels of chlorinated and brominated POPs due to its long lifespan and low metabolic capacity. In this study, we established an analytical method for PFASs in multiple tissues (liver, kidney, brain, and muscle) of finless porpoises. Tissue samples were processed through alkaline digestion, filtration, liquid-liquid extraction, and solid-phase extraction using Captiva EMR and Strata PFAS cartridges, followed by LC-MS/MS analysis. The method showed good recoveries (70–136%) for all PFASs. The analysis of finless porpoise tissues revealed the highest PFAS concentrations in the liver. Interestingly, emerging PFASs, such as FASAs and PFESs, accumulated also in the brain.

***Xenopus* 幼生を用いた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 *vgt* 誘導は TH 依存性である**

○小林 亨¹、杉島 友美¹、熊倉 雅彦²、明正 大純¹

¹ 静岡県立大学環境生命、² 日本歯科大学新潟生命歯学部解剖第2

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 (THR) 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。THR 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、甲状腺ホルモン依存的変化と単なる成長遅延が区別できない。最近、私たちはメダカ孵化仔魚における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⁾。変態前期のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) においてもエストロゲンによる *vgt* 発現誘導は TH シグナリング依存性であることを確かめた。今回、*Xenopus* 幼生における *vgt* 発現誘導を指標にして TH かく乱活性を検出できる系を確立したので、こ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) in *Xenopus laevis* tadpoles, contributing the estimation of TH disrupting potential

Tohru Kobayashi, Tomomi Sugishima, Masahiko Kumakura², Taijun Myosho

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

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.

We previously 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⁾. Recently, we demonstrated that estrogen-induced *vgt* expression depended on TH specically in *Xenopus* tadpoles before metamorphosis climax. In this study, we will report here the characteristics of the *Xenopus* tadpole *vgt* induction system.

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

オオミジンコを用いる抗幼若ホルモン(JH)作用スクリーニング試験法の開発： JH 受容体結合阻害剤及び JH 生合成阻害剤の検出に向けた検討

○小田 悠介¹、渡部 春奈¹、酒井 琴和²、石川 英律²、山本 裕史¹

¹国立環境研究所 環境リスク・健康領域、²いであ株式会社

幼若ホルモン (JH) は節足動物の成長・変態・性決定を制御しており、その類似物質である JH 作用物質 (JHAs) は殺虫剤として使用される。ミジンコでは、JHAs がオス仔虫産仔を誘導するため、この応答を活用して JH 作用短期スクリーニング試験法 (JHASA) が開発され、OECD 試験ガイドライン No. 253 として承認されている。一方で、抗 JH 作用のある殺虫剤 (JH antagonists: JHANs) についても開発が進んでいるが、JHANs を検出するための試験法は確立されていない。

JHANs は、JH 受容体への結合や JH 生合成を阻害する影響が想定され、それぞれに対応した検出法が必要である。本発表では、オオミジンコを用いた 2 通りの JHANs 検出法開発の取り組みとして、以下の検討状況について報告する。

- (1) **JH 受容体結合阻害剤**：JHAs との共ばく露では、オス仔虫誘導が抑制されることが想定され、これを検出法に活用できると考えられる。そこで、本検討では候補物質について *in vivo* (JHASA) 及び *in vitro* (JH レポータージーンアッセイ) で JHAs との共ばく露試験を実施し、これを検証した。
- (2) **JH 生合成阻害剤**：JH 生合成が阻害されることで産仔数が低下することが想定され、これを指標に影響を検出する手法が考えられるが、内因性の JH や生合成物質の体内プールにより影響が遅延し、JHASA の通常のばく露期間では検出できない可能性がある。そこで、本検討では候補物質について JHASA のばく露期間を延長した場合の産仔数への影響を評価した。

Development of Anti-Juvenile Hormone (JH) Screening Assay using Daphnia magna: Investigation for detecting JH receptor binding and biosynthesis inhibitors

○Yusuke Oda¹, Haruna Watanabe¹, Kotowa Sakai², Hidenori Ishikawa², Hiroshi Yamamoto¹

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

²IDEA Consultants, Inc.

Juvenile hormone (JH) regulates growth, metamorphosis, and sex determination in arthropods, and its analogs (juvenile hormone agonists: JHAs) are widely used as insecticides. In *Daphnia*, JHAs induce the production of male offspring, and this response has been utilized to develop a short-term screening assay for JH activity (JHASA), which has been adopted as OECD Test Guideline No. 253. Meanwhile, insecticides with anti-JH activity (juvenile hormone antagonists: JHANs) have also been developed; however, no assay for detecting JHANs has yet been established.

JHANs are assumed to include compounds that inhibit either JH receptor binding or JH biosynthesis, and detection methods corresponding to these effects are required. In this study, we report two approaches for developing JHAN detection assays using *D. magna*:

- (1) **JH receptor binding inhibitors**: Co-exposure with JHAs is expected to suppress male offspring induction, which can be used as an endpoint for detecting JH receptor binding inhibitors. To verify this approach, the co-exposure tests for candidate compounds were conducted using both *in vivo* (JHASA) and *in vitro* (JH reporter gene assay) systems.
- (2) **JH biosynthesis inhibitors**: Inhibition of JH biosynthesis is expected to reduce offspring production, which can serve as an endpoint to detect JH biosynthesis inhibitors. Such effects may be delayed due to the presence of internal pool of innate JH and its biosynthetic intermediates, making them difficult to detect under standard exposure duration of the JHASA. Therefore, we evaluated the effect of candidate compounds on offspring production by extending the exposure period in the JHASA.

ゼブラフィッシュ胚を用いた PFOA 代替物質(HFPO-DA, HFPO-TA, HFPO-TeA)の 甲状腺ホルモンへの影響評価

○山本 愛依¹、田上 瑠美¹、久保田 彰²、国末 達也¹、野見山 桂

¹愛媛大学先端研究院沿岸環境化学研究センター、

²帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター

Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) の一種である Perfluorooctanoic acid (PFOA) は、2019 年に POPs に指定され、製造・使用・輸出入が原則禁止された。規制に伴い、代替物質として HFPO-DA、HFPO-TA、HFPO-TeA の使用が拡大している。しかしその毒性については未だ明らかではない。本研究では、ゼブラフィッシュ胚に PFOA、HFPO-DA、HFPO-TA、HFPO-TeA を水系曝露し、LC-MS/MS を用いて胚内の THs (T4、T3、rT3、3,3'-T2、3,5-T2、3-T1) 濃度を測定し、PFOA および PFOA 代替物質の曝露が甲状腺ホルモン(THs)恒常性に及ぼす影響を解析した。PFOA 曝露では、T4 レベルは 3 μM 濃度区で、rT3 レベルは 0.3 μM と 30 μM 濃度区で、3,3'-T2 レベルは 0.3 μM と 3 μM 濃度区で、それぞれ対照区と比較して有意に上昇した。一方、T3 濃度には有意な変化が認められなかった。また、30 μM 濃度区で T3/rT3 濃度比が有意に低下しており、脱ヨウ素酵素 (DIO3) 活性の促進が示唆された。一方、HFPO-TeA 曝露では、T4 レベルは 0.03 μM ~1 μM の濃度区で、rT3 と 3,3'-T2 レベルが 0.4 μM 以上の濃度区で有意に上昇した。また、0.03 μM 濃度区において T3/rT3 比が有意に低下し、PFOA よりも極めて低濃度で影響が確認されたことから、HFPO-TeA は PFOA よりも強い甲状腺ホルモン恒常性機能の攪乱作用を有する可能性が示唆された。

The Effects of PFOA Alternatives (HFPO-DA, HFPO-TA, and HFPO-TeA) on Thyroid Hormone Homeostasis in Zebrafish Embryos

Mei Yamamoto¹, Rumi Tanoue¹, Akira Kubota², Tatsuya Kunisue¹, Kei Nomiya¹

¹Center for Marine Environmental Studies (CMES) Premier Institute for Advanced Studies Ehime University;

²Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

Perfluorooctanoic acid (PFOA), a type of per- and polyfluoroalkyl substance (PFAS), was designated under the POPs in 2019, leading to a general ban on its manufacture, use, and import/export. This regulation has led to an increase in the use of alternative substances, such as HFPO-DA, HFPO-TA and HFPO-TeA. In this study, zebrafish embryos were exposed to PFOA, HFPO-DA, HFPO-TA, and HFPO-TeA via waterborne exposure, and the concentrations of thyroid hormones (T4, T3, rT3, 3,3'-T2, 3,5-T2, 3-T1) in the embryos were measured using LC-MS/MS to analyze the effects of PFOA and its alternatives on TH homeostasis. In the PFOA-exposed group, T4 levels significantly increased at 3 μM , rT3 levels at 0.3 μM and 30 μM , and 3,3'-T2 levels at 0.3 μM and 3 μM compared to the control group. In contrast, no significant changes were observed in T3 levels. Additionally, the T3/rT3 ratio significantly decreased at 30 μM , suggesting an increase in DIO3 activity. In the HFPO-TeA exposure group, T4 levels significantly increased in the 0.03–1 μM concentration range, while rT3 and 3,3'-T2 levels significantly increased at concentrations of 0.4 μM and above. These results suggest that HFPO-TeA may have a stronger disruptive effect on thyroid hormone homeostasis than PFOA.

ゼブラフィッシュ胚を用いた内分泌かく乱作用マルチスクリーニング法の確立

○久保田 彰¹、縄司 奨²¹帯広畜産大学獣医学研究部門、²化学物質評価研究機構

近年、化学物質に対する安全性意識の高まりとともに、内分泌かく乱物質に対する規制は世界的に厳格化される傾向にあり、農薬のリスク評価においても内分泌かく乱作用の有無を重要視されるようになってきている。加えて、動物福祉の観点から、実験動物数の削減又はゼロを目的とした代替試験法の研究・開発が活発化している。このような状況の中、2021年に、トランスジェニックゼブラフィッシュ (ZF) 胚を用いてエストロゲン活性を有する内分泌かく乱化学物質を検出可能な *in vivo* スクリーニング法である EASZY アッセイが OECD テストガイドライン 250 (TG250) として採択された。しかしながら、TG250 規定の方法ではエストロゲン活性以外の主要な内分泌かく乱作用を検出することができない。本研究では、野生型 ZF を用いて、エストロゲン活性、(抗) アンドロゲン活性、並びに (抗) 甲状腺ホルモン活性を対象とした内分泌かく乱作用マルチスクリーニング法を確立することを目的とした。被験物質(5 種)の単独ばく露又はホルモン類 [17 β -エストラジオール(E2)、テストステロン(TES)、甲状腺ホルモン(T3)] との共ばく露における *cyp19a1b*、*sult2st3*、*tra* mRNA 発現量の濃度依存性及び最大誘導倍率 (又は最大阻害率) を評価した。結果として、BPA、BPAF、4-*t*-OP では単独ばく露により *cyp19a1b* 発現量の濃度依存的な増加がみられた (ただし最高濃度区で誘導倍率が横ばい又は低下する場合もあった)。また、これら 3 物質とリニュロンでは、TES との共ばく露により *sult2st3* 発現量の濃度依存的な低下がみられた。以上より、BPA、BPAF、4-*t*-OP はエストロゲン活性と抗アンドロゲン活性の両方の性質を有し、リニュロンは抗アンドロゲン活性を有すると考えられた。一方、DEHP による各遺伝子発現への影響は明瞭でなかったことから、本評価系では DEHP の内分泌かく乱活性は陰性と判定された。以上より、本評価系を用いることでエストロゲン作用と抗アンドロゲン作用のマルチスクリーニングが可能と考えられた。

Establishment of multi-screening assay for endocrine-disrupting potentials using zebrafish embryosAkira Kubota¹, Tasuku Nawaji²¹Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,²Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI)

In recent years, growing public concern over chemical safety has led to increasingly stringent global regulations on endocrine-disrupting chemicals (EDCs), and the presence or absence of endocrine-disrupting potential has become an important factor in pesticide risk assessment. In addition, from the standpoint of animal welfare, research and development of alternative testing methods aimed at reducing or eliminating animal use have been actively promoted. Under these circumstances, in 2021, the Estrogenic Activity Screening assay using transgenic zebrafish embryos (EASZY assay) was adopted as OECD Test Guideline 250 (TG250), providing an *in vivo* screening method to detect EDCs with estrogenic activity. However, TG250 cannot detect other major endocrine-disrupting activities. This study aimed to establish a multi-screening assay for estrogenic, (anti-)androgenic, and (anti-)thyroid activities using wild-type zebrafish. Concentration-dependent changes and maximal induction or inhibition rates of *cyp19a1b*, *sult2st3*, and *tra* mRNA expression were evaluated following exposure to five test chemicals, alone or in combination with hormones (E2, TES, T3). *cyp19a1b* expression increased dose-dependently with BPA, BPAF, and 4-*t*-OP, though plateauing or declining at the highest concentrations. Co-exposure to TES and these three compounds or linuron caused a dose-dependent decrease in *sult2st3* expression. Thus, BPA, BPAF, and 4-*t*-OP exhibited both estrogenic and anti-androgenic properties, while linuron showed anti-androgenic activity. DEHP produced no clear transcriptional responses, suggesting a negative result in this system. These findings demonstrate that this assay enables simultaneous screening of estrogenic and anti-androgenic effects.

感熱紙顕色剤・増感剤がヒト乳がん細胞に及ぼす影響

○久留戸 涼子¹、阿部 眞大¹、山田 建太²

¹常葉大学教育学部、²常葉大学社会環境学部

レシートなどの感熱紙には、ビスフェノール A (BPA) の代替品である BPS を始め、様々な顕色剤や増感剤が使用されている。これらは、河川水や下水処理場排水などから実際に検出され、また経皮曝露の可能性も指摘されている。これらは、内分泌攪乱作用があるとの報告もあり、ヒトや生態系への影響が懸念されている。本研究では、顕色剤の BPS、D-8、BPS-MAE、TGSA、PF201、増感剤の DPS について、ヒト乳がん細胞 MCF-7 を用いて、細胞増殖試験や、遺伝子発現解析を行い、どのような影響を及ぼすのか調べることにした。

細胞増殖試験では、BPS では、細胞増殖能が 10^{-4} M まで高まり、ピーク値としてはエストロゲン (E_2) 以上に高まっていた。D-8、BPS-MAE では、やや弱いながら細胞増殖能が 10^{-5} M まで高まる傾向が認められた。TGSA は、 10^{-5} M までは細胞増殖能が高まったが、 10^{-4} M では細胞の変形が認められた。PF201、DPS では、細胞増殖能はほとんど高まらないと考えられた。遺伝子発現解析では、 E_2 は 10^{-10} M、他は 10^{-5} M で 24 時間曝露した細胞から RNA を抽出した。エストロゲン応答遺伝子である pS2 では、BPS では E_2 と同等の発現レベルの上昇が認められた。D-8、BPS-MAE、TGSA、PF201 でも発現上昇が認められた。AhR 標的遺伝子である CYP1A1、炎症マーカーである IL-6 の発現レベルはいずれも高まらなかった。したがって、BPS、D-8、BPS-MAE、TGSA では、強さの違いはあるが、エストロゲン様活性があると考えられた。

Effects of color developers and sensitizers from thermal papers on human breast cancer cells

Ryoko Kuruto¹, Mahiro Abe¹, and Kenta Yamada²

¹Faculty of Education, Tokoha University, ²Faculty of Social and Environmental Studies, Tokoha University

Thermal papers such as receipts contain various color developers and sensitizers, including bisphenol S (BPS), a substitute for bisphenol A (BPA). These compounds have been detected in river water and wastewater treatment plant effluents, and potential dermal exposure has also been suggested. Some of these chemicals have been reported to show endocrine-disrupting effects, raising concerns about their potential impacts on humans and ecosystems. In this study, the effects of the color developers BPS, D-8, BPS-MAE, TGSA, and PF201, as well as the sensitizer DPS, were investigated using human breast cancer MCF-7 cells through cell proliferation assays and gene expression analyses. In the proliferation assays, BPS enhanced cell proliferation up to 10^{-4} M, with peak activity exceeding that of estrogen (E_2). D-8 and BPS-MAE exhibited weaker but notable proliferative effects up to 10^{-5} M. TGSA promoted proliferation up to 10^{-5} M, but induced morphological alterations at 10^{-4} M. PF201 and DPS showed little proliferative effect. Gene expression analysis revealed that BPS induced pS2 expression at levels comparable to E_2 , and D-8, BPS-MAE, TGSA, and PF201 also upregulated pS2. In contrast, CYP1A1 and IL-6 were not induced. These findings suggest that BPS, D-8, BPS-MAE, and TGSA exhibit estrogenic activity with varying potency.

柑橘フラボノイド・タンゲレチンによる AhR 活性化の抑制作用

○平野 将司¹、野口 七海¹、宮坂 雄暉²、古村 響²、石橋 弘志³

¹東海大学農学部、²東海大学大学院農学研究科、³愛媛大学大学院農学研究科

アリルハイドロカーボン受容体 (AhR) は、環境汚染物質である TCDD などのダイオキシン類や benzo[a]pyrene (B[a]P) などの多環芳香族炭化水素 (PAHs) によって活性化し、免疫抑制、催奇形性、発がん作用といった毒性発現に関わっている。こうした毒性リスクの緩和、さらには疾病を予防する生体調節機能成分としてポリフェノールが期待されている。本研究では、柑橘類由来のポリフェノール類から AhR に結合する化合物を探索し、そのアンタゴニスト作用を評価した。まず、AhR のアンタゴニストである α -naphthoflavone が結合した AhR PAS-B ドメイン (PDB ID: 7VNH) を鋳型としてヒト AhR の立体構造をホモロジーモデリングにより構築した。この PAS-B ドメインに対して 16 種類のポリフェノール類のドッキングシミュレーションを行い、相互作用エネルギーを指標として結合親和性の高い化合物を予測した。その結果、柑橘類に含まれるポリメトキシフラボノイドであるタンゲレチンが最も低値を示し、結合親和性が高いことを見出した。そこで、腸管における AhR アンタゴニスト活性を評価するため、腸管上皮株化細胞である Caco-2 細胞に AhR 応答配列 (XRE) を有したルシフェラーゼレポータープラスミドをトランスフェクションした *in vitro* レポーター遺伝子アッセイを構築した。B[a]P による濃度依存的な転写活性化を確認したことから、タンゲレチン単独および B[a]P との共処理を行ったところ、単独では転写活性に影響しなかったものの、B[a]P との共処理では B[a]P による転写活性化能をタンゲレチン濃度依存的に抑制する結果を得た。さらに、AhR の細胞内局在について抗 AhR 抗体を用いて観察したところ、タンゲレチンは B[a]P による核内移行を強く抑制する作用は観察されなかった。以上のことから、タンゲレチンによるアンタゴニスト作用は AhR の核移行ではなく、転写を抑制することが示唆された。

Inhibition of aryl hydrocarbon receptor (AhR) activation by the citrus flavonoid tangeretin

Masashi Hirano¹, Nanami Noguchi¹, Takeki Miyasaka², Hibiki Furumura², Hiroshi Ishibashi³

¹ School of Agriculture, ² Graduate School of Agriculture, Tokai University, ³ Graduate School of Agriculture, Ehime University

In this study, we searched for citrus polyphenols that bind to AhR and evaluated their antagonistic effects. First, we constructed the three-dimensional structure of the human AhR protein using homology modelling, with the AhR PAS-B domain (PDB ID: 7VNH), which is bound to the AhR antagonist α -naphthoflavone, acting as a template. We then performed docking simulations for 16 polyphenols against this PAS-B domain to predict compounds with a high binding affinity based on interaction energy. Consequently, tangeretin, a polymethoxyflavonoid present in citrus fruits, demonstrated the lowest value, indicating its high binding affinity. Transient transfection assays using the luciferase reporter gene driven by XRE in Caco-2 cell lines showed that treatment with B[a]P, induced AhR-mediated transcriptional activity in a dose-dependent manner. The induction of AhR transcriptional activity by B[a]P was effectively inhibited by co-treatment with tangeretin. Furthermore, the cellular localization of AhR was evaluated. It was found that tangeretin does not influence the translocation of B[a]P-activated AhR into the nucleus. These results suggest that tangeretin inhibits transcription rather than the nuclear translocation of AhR.

神経毒性の共通 Key event への作用を評価するための *in vitro* アッセイ系の構築と 現行農薬類の複合影響評価への応用

○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

現代社会では数万種におよぶ化学物質が日常的に使用されており、近年の疫学研究により複合曝露の実態が明らかになりつつある。しかし、従来の毒性評価は単一化学物質ごとに実施されており、低濃度かつ複合曝露下におけるヒト健康リスクの実態を十分に反映できていない。加えて、曝露しうる化学物質の組み合わせは膨大で、相互作用の予測は極めて困難である。複合リスク評価の方針や手法は未整備であり、新たな評価手法 (New Approach Methodologies: NAMs) の開発が求められている。本研究では、神経毒性に関する共通 Key Event (KE) に基づき、化学物質の作用プロファイルを指標とする効率的な複合リスク評価手法の確立を目的とした。ドーパミン作動性神経細胞モデルである LUHMES 細胞を分化誘導し、各種蛍光プローブを用いることで、化学物質がミトコンドリア膜電位、酸化ストレス、リソソーム活性に及ぼす影響をハイスループットに評価可能な *in vitro* アッセイ系を構築した。このアッセイを用いて、国内で使用量の多い現行農薬類 5 グループ 12 種を評価した結果、類似した作用プロファイルを示す化合物群を抽出した。さらに、神経突起長に対する単独・複合曝露の用量反応性から Combination Index (CI) を算出し、相加・相乗作用を解析した。その結果、多くの現行農薬類はミトコンドリア膜電位の低下、酸化ストレスの上昇、リソソーム活性の低下といった共通 KE に対して類似した作用を示した。とくに有機リン系またはフェニルピラゾール系とピレスロイド系の複合曝露では、CI 値が低値を示す強い相乗作用が認められた。以上より、現行農薬類は単独曝露では影響のない低濃度であっても、複合曝露により神経毒性が顕在化することが示唆された。

Development of *in vitro* assays for common key events in neurotoxicity and assessment of combined effects of current pesticides

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

Traditional toxicity assessments, however, evaluate individual chemicals separately, limiting their applicability to low-dose, mixed exposures relevant to human health. Moreover, the number of possible chemical combinations is vast, making interaction predictions challenging, and there is no established framework for assessing combined risks. In this study, we aimed to develop an efficient assessment method for combined neurotoxic risks based on chemical profiling against common key events in neurotoxicity. Differentiated LUHMES dopaminergic neurons were loaded with fluorescent probes, enabling high-throughput *in vitro* evaluation of chemical effects on mitochondrial membrane potential, oxidative stress, and lysosomal activity and twelve widely used pesticides from five classes in Japan were profiled. Dose-response effects on neurite length under single and combined exposures were quantified using the Combination Index (CI) to analyze additive and synergistic interactions. Many pesticides exhibited similar effects on shared key events, and particularly, combined exposure of organophosphates or phenylpyrazoles with pyrethroids showed pronounced synergistic effects. These results suggest that pesticides elicit neurotoxicity at low concentrations under combined exposures, even when individual chemicals show minimal effects.

内分泌攪乱物質スクリーニングのための 高感度アンドロゲン受容体活性評価系

○金崎 康平¹、中村 圭太¹、小野原 永遠¹、梶山 尊¹、荒巻 光汰¹、松島 綾美^{1,2}

¹九州大学大学院理学府化学専攻

²九州大学大学院理学研究院化学部門

ポリカーボネート樹脂等の原料であるビスフェノール A (BPA) に替わり、近年多くの新世代ビスフェノールが使用されているが、その安全性は十分に解明されていない。我々はこれまでに、多くの新世代ビスフェノールがエストロゲン受容体 (ER) に強く結合し、内分泌かく乱作用を持つ可能性を報告した。環境化学物質の標的は ER に限らず、他の核内受容体への影響評価も重要であるため、本研究では男性ホルモンが結合するアンドロゲン受容体 (AR) に着目し、高感度なレポーター遺伝子試験系の構築を目的とした AR の転写活性を高感度に検出する新規のアンドロゲン応答配列 (ARE) として 3 回繰り返し配列 (3xARE) を設計し、ルシフェラーゼレポーターベクターに導入した。この 3xARE ベクターと AR 発現ベクターを細胞に導入し、AR の既知アゴニスト (テストステロン等) およびアンタゴニスト (フルタミド) を作用させて系の評価を行った。その結果、構築した試験系は、アゴニスト添加時に既存のベクターを用いた場合に比べて高い転写活性を示し、アンタゴニストによってその活性が有意に阻害されることも確認できた。このことから、本研究で構築した試験系は AR への作動・拮抗作用をより高感度に検出可能であり、環境化学物質が示す微弱なアンドロゲン受容体かく乱作用の精密な評価に貢献できると期待される。

A highly sensitive androgen receptor activity assay for screening endocrine disruptors.

Kohei Kanazaki¹, Keita Nakamura¹, Towa Onohara¹, Takeru Kajiyama¹, Kota Aramaki¹,
and Ayami Matsushima^{1,2}

¹Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyushu University

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyushu University

The safety of next-generation bisphenols used as alternatives to BPA is a concern. While we previously found they affect the estrogen receptor (ER), their impact on other nuclear receptors is unknown. This study aimed to develop a high-sensitivity reporter gene assay for the androgen receptor (AR). We designed a novel reporter vector with a threefold tandem repeat of the androgen response element (3xARE) to enhance signal amplification. When tested in HeLa cells, this system showed a significantly higher transcriptional response to agonists, testosterone, compared to conventional vectors. This activity was also effectively blocked by the antagonist, flutamide. Our study establishes a robust and sensitive assay, providing a crucial tool for the precise evaluation of weak endocrine-disrupting activities on the AR, which is essential for future risk assessments.

卵巣摘出マウスの子宮肥大試験を用いた 12 化合物の内分泌かく乱作用の スクリーニング評価

○五十嵐 智女¹、横田 理¹、相田 麻子¹、西村 拓也¹、北嶋 聡²、山田 隆志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 安全性予測評価部

げっ歯類の子宮肥大試験 (OECD TG440) は、子宮重量の変化を指標に化学物質のエストロゲン様特性を容易に判定できるスクリーニング試験法である。厚生労働省による内分泌かく乱物質のスクリーニング事業において、*in vitro* 試験でエストロゲン作用または抗エストロゲン作用が疑われた 12 種類の化合物について、卵巣摘出マウスの子宮肥大試験を用いた評価を実施した。各物質を 8 週齢の卵巣摘出マウスに経口または皮下投与にて 7 日間連続投与した。陽性対照物質にはエチニルエストラジオールを用いた。*In vitro* で懸念のあった 12 物質のうち、*in vivo* で活性が認められたのは 5 物質のみであった。このうち、1,1,1-トリス (4-ヒドロキシフェニル) エタン (経口および皮下の両投与経路) のみが、エストロゲン作用を示した。他の 4 物質、具体的にはジベンゾイルメタン、トリクレシルリン酸、トリフェニルシラノール (いずれも皮下投与経路のみ) 及び 4,4'-ブチリデンビス[6-tert-ブチル-3-メチルフェノール] (経口および皮下の両投与経路) は、抗エストロゲン作用を示した。各物質の子宮重量に対する最小影響量 (LOEL) は順に、300、30、30、30、100 (mg/kg 体重) であった。このように、投与経路によって反応性が異なるケースがあることも明らかとなった。エストロゲン作用または抗エストロゲン作用を示した、これらの 5 物質については、内分泌かく乱作用に関する詳細試験 (確定試験) による評価の優先順位について、さらなる検討が必要と考えられた。

Screening evaluation of endocrine disrupting effects of 12 compounds using a uterotrophic bioassay in ovariectomized mice

Toshime Igarashi¹, Satoshi Yokota¹, Asako Aida¹, Takuya Nishimura¹, Satoshi Kitajima², Takashi Yamada¹

¹ Division of Cellular & Molecular Toxicology, Center for Biological Safety & Research, National Institute of Health Sciences, ² Division of Risk Assessment, Center for Biological Safety & Research, National Institute of Health Sciences

In screening for endocrine disruptors, the rodent uterotrophic bioassay is a test method that readily assesses the estrogen-like properties of chemicals based on changes in uterine weight. We used this assay in ovariectomized (OVX) mice to screen 12 chemicals suspected to be estrogenic or antiestrogenic properties by *in vitro* assays in the MHLW's endocrine disruptor screening project. We administered each chemical to 8-week-old OVX mice either orally (po) or by subcutaneous (sc) injection at 24-hr intervals for 7 consecutive days. Ethinyl estradiol was used as reference control. Of the twelve substances of concerns *in vitro*, only five substances exhibited activity *in vivo*. Among these, only 1,1,1-tris(4-hydroxyphenyl)ethane (for both po and sc routes of administration) exhibited estrogenic activity. The other four substances, specifically dibenzoylmethane, tricresyl phosphate, triphenylsilanol (all for sc route only), and 4,4'-butylidenebis[6-tert-butyl-3-methylphenol] (for both po and sc routes of administration), showed antiestrogenic effects. The lowest observed effect levels (LOELs) for uterine weight were 300, 30, 30, 30, and 100 (mg/kg bw), respectively. It was also found that the activity differed depending on the route of administration in some cases. For the five substances that showed estrogenic or antiestrogenic effects, further consideration is needed regarding prioritization for higher-tier toxicity testing related to endocrine disrupting effects.

イミダクロプリドが海産甲殻類アミ *Americamysis bahia* の繁殖に及ぼす影響評価

○池上 歩希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】ネオニコチノイド系殺虫剤（NNI）は、浸透移行性および残効性を有し、哺乳類に対して高い安全性を示すことから、世界的に広く使用されている。しかし、環境中への流出により標的外生物への影響が懸念されている。農薬の用途からも淡水域における汚染調査は進んでいるが、最終的に海域にも流出することを考慮すると、海産生物への影響評価も必要であると考えられる。また、現状では海産生物への急性毒性に関する評価が中心であり、慢性的な影響に関する知見は乏しい。そこで本研究では、NNI の一種であるイミダクロプリド（IMI）が海産甲殻類アミ（*Americamysis bahia*）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】繁殖阻害試験には、1ヶ月齢の成熟個体を使用した。雌雄判別後、雌個体を1週間単独で飼育し、未抱卵状態にした。1試験区あたり雌雄各6個体（計12個体）を用い、対照区（CTL）、アセトン濃度0.01%の溶媒対照区（SC）およびIMI曝露区（0.2~20 µg/L:公比10）をそれぞれn=6で設置し、21日間の半止水式曝露を行った。試験期間中、24時間ごとに生存数、脱皮数、産仔数を記録し、試験最終日には雌個体の育児嚢および卵巣における卵の有無を観察した。

【結果と考察】繁殖阻害試験の結果、IMI濃度が上昇するにつれて産仔数は減少傾向が見られ、20 µg/L曝露区では産仔が確認されなかった。試験最終日においても、雌の育児嚢および卵巣内に成熟卵は認められず、IMIが卵形成過程を阻害することで繁殖阻害を引き起こす可能性が示唆された。試験期間中には同一箇所を巡回する行動異常が雌雄いずれにおいても観察され、繁殖行動への影響の可能性も考えられた。今後は、卵形成阻害の可能性に着目し、育児嚢および卵巣における卵の保持数の変化について濃度依存性を観察することで、IMIの卵形成への影響を評価する。また、行動解析を実施することで、繁殖阻害への行動異常の関与についても検討を進める予定である。

Adverse Effects of Imidacloprid on Reproduction in the Mysid Crustacean, *Americamysis bahia*

Fuki Ikegami¹, 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 and

⁴Graduate School of Agriculture, Ehime University

Neonicotinoid insecticides (NNI) are widely used worldwide due to their systemic translocation properties, residual activity, and high safety for mammals. However, concerns exist regarding their impact on nontarget organisms due to environmental leakage. While contamination surveys in freshwater ecosystems are advancing, considering actual pesticide usage patterns, leakage into marine areas via rivers is possible, necessitating the assessment of the impact on marine organisms. Furthermore, current assessments primarily focus on acute toxicity, with limited knowledge of the chronic effects. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of imidacloprid (IMI), an NNI, on the reproduction of the marine crustacean (*Americamysis bahia*). In the reproduction inhibition test, although no significant differences were observed in the low-concentration exposure group, a concentration-dependent decrease in the number of offspring was observed. In the IMI 20 µg/L exposure group. On the final day of the test, examination of the presence or absence of eggs in the brood pouches and ovaries revealed no mature eggs in either group. This suggests that IMI may inhibit reproduction by disrupting oogenesis. Additionally, abnormal circling behavior was observed in both males and females during the test period, indicating a potential impact on reproductive behaviors. Moving forward, we will focus on the possibility of oogenesis inhibition and evaluate the concentration-dependent effects of IMI by observing the presence or absence of eggs in the brood pouches and ovaries. Furthermore, behavioral analyses will be conducted to elucidate the mechanisms underlying the inhibition of reproductive behaviors.

ミナミメダカ繁殖機能に及ぼすヒト医薬品（抗うつ薬・抗精神病薬）の複合曝露影響

猿渡 侑司¹、高濱 要資¹、山下 綾乃²、中田 典秀³、井原 賢⁴、薙平 裕次⁴、
宮川 信一⁵、天谷 貴史⁶、村田 良介⁶、征矢野 清⁶、○長江 真樹¹

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神奈川大学化学生命学部、⁴高知大学教育研究部自然科学系農学部門、⁵東京理科大学先進工学部、⁶長崎大学海洋未来イノベーション機構

近年、膨大な種類と量の医薬品が使用されており、それらが環境水中で容易に検出される現状となっている。医薬品はその性質上、極めて生物活性が高いことから、野生生物への影響が懸念されている。抗うつ薬および抗精神病薬は、中枢神経シナプス間の種々の神経伝達物質レベルを調節することによりヒト精神疾患を改善する治療薬であるが、同様の神経構造を有する野生生物に対しても作用し、種々の生理学的影響を引き起こすことが解明されつつある。著者らは 2023 年度の本大会において、2 種の抗うつ薬・抗精神病薬の複合曝露がミナミメダカの繁殖機能低下（産卵数の有意な低下）を誘起することを報告した。本発表では、より複数の医薬品が混在する天然環境を想定し、5 種の抗うつ薬・抗精神病薬の複合曝露の繁殖影響を調査した。

5 種の抗うつ薬・抗精神病薬（アミトリプチリン、フルオキセチン、デュロキセチン、ミルタザピン、クロルプロマジン）についてはそれぞれ、単独曝露においてミナミメダカ産卵数を有意に低下させる LOEC および NOEC 値を以前に明らかにしている。今回、5 種医薬品それぞれの LOEC および NOEC 値での複合曝露-ミナミメダカ繁殖試験を 21 日間の流水式曝露により実施した。その結果、5 種医薬品それぞれの NOEC 値での複合曝露において産卵数の顕著かつ有意な低下が誘起された。このことから、同様の薬効を持つ医薬品の複合曝露がメダカ繁殖機能に対して少なくとも相加効果を示すことが明らかとなった。

Combined exposure effects of human medicine on medaka reproduction

Yushi Saruwatari¹, Yousuke Takahama¹, Yukino Yamashita², Norihide Nakada³, Masaru Ihara⁴, Yuji Mishirobira⁴, Shinichi Miyagawa⁵, Takafumi Amagai⁶, Ryosuke Murata⁶, Kiyoshi Soyano⁶, Masaki Nagae¹

¹Graduate School of Integrated Science and Technology, Nagasaki Univ, ²Faculty of Environmental Science, Nagasaki Univ, ³Faculty of Chemistry and Biochemistry, Kanagawa Univ, ⁴Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi Univ, ⁵Faculty of Advanced Engineering, Tokyo Univ of Science, ⁶Organization for Marine Science and Technology, Nagasaki Univ

In recent years, an enormous variety and volume of pharmaceuticals are used, and they are readily detectable in environmental waters. Due to their inherent high biological activity, concerns exist regarding their impact on wildlife. Antidepressants and antipsychotics are therapeutic agents that improve human psychiatric disorders by regulating levels of various neurotransmitters at central nervous system synapses. It is increasingly understood that they also act on wildlife possessing similar neural structures, causing various physiological effects. At the 2023 conference, the authors reported that combined exposure to two antidepressants and antipsychotics induced impaired reproductive function (a significant reduction in egg production) in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). This presentation investigates the reproductive effects of combined exposure to five antidepressants and antipsychotics, simulating the mixed pharmaceutical environment found in nature.

For each of the five antidepressants/antipsychotics (amitriptyline, fluoxetine, duloxetine, mirtazapine, chlorpromazine), LOEC and NOEC values causing significant reductions in medaka egg production under single exposure had been previously determined. This study conducted a 21-day continuous flow exposure test on Japanese medaka at the LOEC and NOEC values for each of the five drugs. The results showed a marked and significant reduction in egg production at the NOEC values for each drug combination. This indicates that combined exposure to drugs with similar pharmacological effects exhibits at least an additive effect on medaka reproductive function.

メチルフェニデート曝露によるミナミメダカ胚発生および仔魚行動への影響評価

立岡 綾奈、○庭平 裕次
高知大学農林海洋科学部

メチルフェニデート (Mph) は注意欠陥・多動性障害 (ADHD) の治療薬であり、中枢神経系のモノアミン輸送体に作用する。一方、妊娠中の Mph 使用は心臓奇形などの先天異常リスクを高める可能性があり、ゼブラフィッシュ幼魚を用いた曝露試験では、抗不安作用や運動亢進などの行動変化が報告されている。本研究では、Mph が魚類に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、モデル生物であるミナミメダカを用い、胚発生および仔魚の行動への影響を評価した。

Mph は飼育水に 10、100、1000 $\mu\text{g/L}$ で希釈し、対照区には飼育水のみを使用した。受精卵は 48 ウェルプレートに 1 個ずつ配置し、ふ化後 3 日目まで半止水条件下で曝露を行った。胚発生はふ化まで毎日撮影し、奇形の有無と発生過程を観察した。ふ化後は仔魚の行動を毎日動画撮影し、1 分間の最高速度、総移動距離、ウェル中央部および周辺部の滞在時間を解析した。

胚発生においては、いずれの Mph 濃度区でも奇形は認められず、発生過程にも有意な差は見られなかった。一方、仔魚の行動では、曝露 1 日目に 100 $\mu\text{g/L}$ 区で最高速度が対照区と比較して有意に上昇し、曝露 2 日目には 1000 $\mu\text{g/L}$ 区で中央部滞在時間が有意に増加した。ただし、これらの変化は試験期間全体を通して一貫した傾向を示さず、他の指標でも有意差は認められなかった。

以上の結果から、今回の試験濃度では Mph はミナミメダカの胚発生には影響を及ぼさないことが示された。一方で、仔魚の行動に対する影響については、濃度依存性や曝露期間との関連を含め、今後さらなる詳細な検討が必要である。

Effects of methylphenidate exposure on embryogenesis and larval behavior in medaka (*Oryzias latipes*)

Ayana Tatsuoka, Yuji Mushirobira

Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University

Methylphenidate (Mph) is a psychostimulant commonly prescribed for attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD), acting on monoamine transporters in the central nervous system. While effective in humans, prenatal exposure to Mph has been associated with increased risks of congenital abnormalities, including cardiac defects. Behavioral alterations such as anxiolytic effects and hyperactivity have also been reported in zebrafish larvae. This study aimed to evaluate the effects of Mph on embryonic development and larval behavior in medaka (*Oryzias latipes*).

Fertilized eggs were exposed to Mph at concentrations of 10, 100, and 1000 $\mu\text{g/L}$ under semi-static conditions until three days post-hatching. Embryonic development was monitored daily for malformations and progression. Larval behavior was recorded via video, and parameters including maximum velocity, total distance moved, and time spent in central versus peripheral areas of the well were analyzed.

No malformations or significant differences in embryonic development were observed across all treatment groups. However, larval behavior showed transient changes: increased velocity on day 1 at 100 $\mu\text{g/L}$ and increased central area occupancy on day 2 at 1000 $\mu\text{g/L}$. These effects were not consistent throughout the exposure period.

Overall, Mph did not affect embryogenesis at the tested concentrations, but potential behavioral impacts warrant further investigation.

環境医薬品によるメダカの脳の神経活動への影響

○大泉 貴絵、宮川 信一

東京理科大学大学院 先進工学研究科

ヒトが使用した医薬品の一部は、下水処理場で完全には除去できず、薬効を持ったまま環境中に流出している。特に抗うつ薬や抗精神病薬などの中枢神経系に作用する薬は河川中で多く検出されており、水生生物への悪影響が懸念されている。実際に、魚類をはじめとする水生生物に、これらの医薬品を曝露すると行動異常や生殖異常を誘導することが報告されている。本研究では、神経活動の活性化を可視化できるメダカを用いて、医薬品を曝露したメダカの神経活動の変化を調べた。具体的には、脳内にカルシウムインジケーターである GCaMP を導入したメダカに三環形抗うつ薬 Amitriptyline や抗精神病薬 Chlorpromazine を曝露し、カルシウムイメージングを行い、取得した画像データから各薬剤処理群の神経活動レベルを定量化した。本研究は、魚類の神経活動に影響を与える環境医薬品を効率よくスクリーニングする実験系に応用可能である。

The effects on neural activity in medaka fish exposed to environmental pharmaceuticals

Kie Oizumi, Shinichi Miyagawa

Department of Biological Science and Technology, 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. Of those environmental pharmaceuticals, antidepressants and antipsychotics, which act on the central nervous system are of great concern.

In order to investigate the effects of such pharmaceuticals, we measured the neural activity in the brain of medaka larvae exposed to amitriptyline and chlorpromazine (antidepressants and antipsychotics), taking advantage of medaka that expressed the calcium sensor protein (GCaMP) in whole neurons. We found the significant increase in fluorescence intensity in the brain of medaka exposed to amitriptyline compared to the controls. It has been therefore suggested that amitriptyline may act on fish similar to those in humans.

3-methyl-4-nitrophenol (MNP)の幼若期曝露が雌ラットの春機発動及び性特異的行動に及ぼす影響

○前田 侑輝拓¹、金丸 颯²、堤 恋結²、武藤 里加子²、江口 凜²、竹田 桜瑛²、渡辺 元³、近藤 保彦⁴、柳澤 利枝⁵、宇田川 理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 (OSRI)、⁴帝京科学大学 生命環境学部、⁵国立環境研究所 環境リスク・健康領域

3-methyl-4-nitrophenol (MNP) はディーゼル排気に含まれる化学物質で、農薬 fenitrothion の分解産物としても知られており、エストロゲン受容体への親和性を有する。本研究では、エストロゲンが発達期の脳の性分化に寄与することに着目し、新生仔期 MNP 曝露が雌ラットの膣開口、性行動および性選好性に及ぼす影響を検討した。Wistar-Imamichi 系雌ラットに MNP (1 mg/kg/day、MNP 群) あるいは溶媒 (corn oil、対照群) を post-natal day (PND) 1~5 に経口投与し、陽性対照としては 17 β -estradiol (E2, 20 mg/kg) を PND1 に皮下投与し、膣が開くまで観察を継続した。また 7 週齢で卵巣を摘出し、発情誘起処理を施した上で性選好性試験および性行動試験を実施した。昨年我々は発情前期における性選好性試験の結果を発表したが、今回は MNP の卵巣への影響を排除し、外因性エストロゲンへの脳の反応性を評価した。その結果、膣開口の早期化は E2 群のみで見られ、MNP は対照群に対して有意な影響を及ぼさなかった。性選好性について、対照群では異性である相手雄を、相手雌に比べ有意に多く鼻先で探索する選好性を示したのに対し、MNP 群と E2 群では鼻先での探索における性別間の選好性が消失した。性行動では、MNP 群と対照群の間で差は認められず、E2 群のみロードーシス商が低下した。以上より、新生仔期 MNP 曝露は雌ラットの性的嗜好性を減弱させるが、春機発動と雌特異的性行動には影響を及ぼさないことが示唆された。今後は用量依存性を含むさらなる検討が必要である。

Effects of Neonatal Exposure to 3-Methyl-4-nitrophenol (MNP) on Pubertal Onset and Sex-Specific Behaviors in Female Rats

Yukihiro Maeda¹, Hayato Kanamaru², Rei Tsutsumi², Rikako Muto², Rin Eguchi², Sae Takeda², Gen Watanabe³, Yasuhiko Kondo⁴, Rie Yanagisawa⁵, Osamu Udagawa⁵, Maiko Kawaguchi^{1,2}

¹Graduate School of Agriculture, Meiji University ²School of Agriculture, Meiji University ³OSRI, Meiji University, ⁴ Faculty of Life & Environmental Science, Teikyo University of Science, ⁵Health and Environment Risk Division, National Institute for Environmental Studies (NIES)

3-Methyl-4-nitrophenol (MNP), found in diesel exhaust and known as a degradation product of the pesticide, fenitrothion, has been reported to possess affinity for estrogen receptors. In this study, we focused on the contribution of estrogenic substances to brain sexual differentiation during development. We investigated the effects of neonatal MNP exposure on sexual behavior and partner preference in female rats. Wistar-Imamichi female rats received oral administration of MNP (1 mg/kg/day) from postnatal day (PND) 1 to 5. Corn oil was administered to the control group, and 17 β -estradiol (E2, 20 mg/kg, single SC on PND1) was administered as a positive control, and we monitored the onset of vaginal opening of the animals. After sexual maturation, the rats were ovariectomized, primed with estrogen and progestin, and subjected to partner preference and sexual behavior tests. In the present study, excluded the effects of MNP on ovarian function, we evaluate the responsiveness of the brain to exogenous estrogen. In terms of sexual preference, the control group showed a significant preference to stimulus males over stimulus females for nose-to-nose exploration, whereas this sex-specific preference was abolished in both the MNP and E2 groups. In the sexual behavior test, no difference was observed between the MNP and the control groups, while only the E2 group showed a reduction in lordosis quotient. These findings suggest that neonatal exposure to MNP attenuates sexual preference in female rats without affecting female-specific sexual behavior. Further investigations, including dose-dependent effects, are required.

α -ナフトフラボン曝露は妊娠マウスで巣作り“速度”を低下させるのか？

○村田 信喜、杉田 和俊、吉岡 亘
麻布大学獣医学部

フラボノイドは植物由来ポリフェノールの一類で、抗酸化作用や抗腫瘍作用が期待され、食品やサプリメントに含まれており、「有益な成分」と認識されている。なかでも α -ナフトフラボン (ANF) はマウスにおいて脂肪肝や肥満を抑制することが報告されている。これらの報告では ANF の代謝改善作用を示し、医薬品としての応用可能性が議論されているが、妊娠個体での安全性は不明であった。我々は抗肥満・脂肪肝抑制効果を示す条件で妊娠マウスの母性行動に及ぼす影響を検証した。C57BL/6J 妊娠マウスに、妊娠 12 日目 (GD12) を曝露 0 日目 (ED0) とし、ED3 まで ANF 含有率 0% (対照群)、1% (A-L)、2% (A-H) の飼料を投与し、巣の高さ (NHI)、位置、行動パターンを本研究では母性行動の指標とした。血漿中の ANF は LC-MS/MS 法で定量した。既存の研究では巣について段階評価が用いられてきたが、巣作り速度を評価する方法としては不十分であるため、我々は定量的評価法を開発した。ED0-1 における巣作り速度は、CNT で 23.4 ± 9.8 mm/日、A-L で 6.9 ± 7.4 mm/日、A-H では、 5.7 ± 5.4 mm/日であった。このことから ANF が妊娠マウスによる巣作り速度を低下させることが明らかになった。A-H は ED2-3 で巣外滞在が増加し、懸垂や登攀など対照群にない非典型行動が頻繁に観察された。これらの結果は ANF が妊娠マウスの母性行動を変化させたと考えられた。巣内で静穏さを保つことは子の生存に重要であり、母性行動は哺乳動物の生存にとって不可欠な行動である。そのため、ANF の母性行動への潜在的影響は深刻なリスクとなり得る。本研究はフラボノイドの多面的作用、とりわけ行動毒性の可能性を示し、健康影響評価における慎重な検討が必要である。

Does α -Naphthoflavone exposure decrease Nest building “Rate” in Pregnant Mice?

Nobuki Murata, Kazutoshi Sugita, Wataru Yoshioka

Department of Veterinary Medicine Azabu University

Flavonoids are plant-derived polyphenols, expected to have antioxidant and antitumor effects, and recognized as beneficial components in foods and supplements. Among them, alpha-naphthoflavone (ANF) has been shown to suppress fatty liver and obesity in mice, suggesting metabolic benefits and potential as a pharmaceutical drug. However, its safety during pregnancy remained unknown. We investigated the effects of ANF on maternal behavior in pregnant C57BL/6J mice under conditions that produced anti-obesity and fatty liver suppression. Mice were fed diets containing 0% (CNT), 1% (A-L), or 2% (A-H) ANF from gestation day 12 (ED0) to ED3. Maternal behavior was assessed using nest height index (NHI), mouse position, and behavioral patterns. Plasma ANF was quantified by LC-MS/MS. Previous studies used grade scoring, but since it is insufficient to assess nest-building rate, we developed a quantitative method. Nest-building rates during ED0-1 were 23.4 ± 9.8 mm/day in CNT, compared with 6.9 ± 7.4 mm/day in A-L and 5.7 ± 5.4 mm/day in A-H, clearly demonstrated suppression nest building rate by ANF. On ED2-3, A-H mice spent more time outside nests and frequently displayed atypical behaviors such as hanging and climbing, which were absent in CNT. Maintaining calmness in the nest is vital for offspring survival, and maternal behavior is essential for mammalian survival. Therefore, the potential impact on ANF's maternal health could pose a serious risk. This study demonstrates the multiple effects of flavonoids, particularly their potential behavioral toxicity, necessitating careful consideration in health risk assessments.

P-17

ポリネーター保護と農薬評価制度：ミツバチ・野生ハナバチへの影響の現状と課題

○遠山 千春

東京大学、環境健康科学技術国際コンサルティング

ミツバチや野生ハナバチなどのポリネーター（花粉を運ぶ動物）は、野菜や果物の受粉に欠かせない存在である。日本国内でも、セイヨウミツバチによる受粉の経済的価値は年間 1,000 億円以上（2013 年時点）と試算されている。しかし近年、農薬によるミツバチの被害が世界各地で報告されており、ポリネーターの減少が農業や生態系に深刻な影響を及ぼすことが懸念されている。

本発表では、農林水産省および環境省の資料（蜜蜂影響評価書、生活環境動植物の被害防止に係る農薬登録基準値）をもとに、制度の仕組みと課題について検討する。

特に以下の 4 点に焦点を当てる。①ネオニコチノイド系殺虫剤に対して、ハチ類（益虫モデル）はハエ（害虫モデル）よりも高い感受性を示すこと。②現行制度が致死毒性（LD₅₀）に偏重していて、致死用量よりも低い用量で生じる行動異常や帰巢障害などの非致死性影響が軽視され、結果として蜂群への悪影響が見過ごされるおそれがあること。③複数の農薬成分による同時曝露が現場で生じているにもかかわらず、制度上は単剤評価が前提となっていること。④ OECD ガイドラインに準拠した毒性試験データの信頼性が一部損なわれている可能性があること。

今後は、神経・行動・免疫系への影響を含む非致死性毒性データや、分子レベルから野外レベルにまでの多層的な最新の科学的知見を制度に反映させるとともに、複合曝露を前提とした評価手法の整備が求められる。ミツバチを守るためには、現場の実態に即した制度の見直しと、科学的根拠に基づくリスク管理が不可欠である。

Pollinator Protection and Pesticide Risk Assessment: Current Status and Challenges for Honey Bees and Wild Bees

Chiharu Tohyama

The University of Tokyo / Health, Environment, Science and Technology International Consulting

Pollinators such as honey bees and wild bees play an essential role in crop pollination, with an estimated annual economic value exceeding 100 billion yen in Japan (as of 2013). However, recent reports of pesticide-related bee mortality have raised concerns about the decline of pollinators and its impact on agriculture and ecosystems.

This presentation examines Japan's pesticide registration system, focusing on the required toxicity tests using honey bees and the regulatory framework for evaluating their results. Four key issues are addressed: (1) honey bees exhibit higher sensitivity to neonicotinoid insecticides than pest species like flies; (2) current assessments rely heavily on lethal toxicity (LD₅₀), overlooking sublethal effects such as behavioral abnormalities and homing failure; (3) real-world exposure often involves multiple pesticide compounds, yet the system assumes single-agent toxicity; and (4) the reliability of OECD-guideline-based toxicity data used in official evaluations may be compromised. Recent studies show that bees suffer neural impairment at concentrations far lower than those affecting pests, and Japanese honey bees are even more vulnerable. To protect pollinators, it is essential to incorporate multi-layered novel scientific evidence—including sublethal and synergistic effects—into regulatory protocols and to revise evaluation methods to reflect actual field conditions.

P-18

メダカにおける TRIAC とエストロゲン共曝露が脊椎骨形成に及ぼす影響

明正 大純^{1,2}、岡部 佑太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）では、両生類変態現象を用いた試験（AMA、LAGDA）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* 試験の検出感度は十分とはいえない。本研究は、TH かく乱活性による新たな形態学的影響指標とその発現過程の解明を目的とした。前回大会では、下水処理過程で生成される可能性があるトリヨードチロ酢酸（TRIAC）とエストロゲン（E）の共曝露により、孵化後 30 日(30 dph)および成魚で脊椎骨の奇形が生じ、体長が短縮することを報告した。今回、脊椎骨の形成過程における異常が起こる時期を特定するため、同条件下で、時系列での解析（0、10、15、20 dph）を行った。透明化および骨染色標本を解析したところ、0 dph で脊椎骨の前駆的支持構造である脊索の短縮が起こること、10 および 15 dph では未硬骨化部位の小型化や配列不整が見られた。20 dph では多くの個体で硬骨化が完了しているが、共曝露群では顕著な脊椎骨奇形が観察された。この結果から、脊椎骨の奇形は硬骨化の進行に伴って表在化・固定化されることが示唆され、TH かく乱活性の新たな早期指標となる可能性が示された。

Mechanistic Analysis of Vertebral Malformation Induced by Co-exposure to TRIAC and Estrogen in Medaka

Taijun Myosho^{1,2}, Yuta Okabe¹, 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) currently evaluates the thyroid hormone (TH)-disrupting activity of chemical substances using amphibian-based assays such as the Amphibian Metamorphosis Assay (AMA) and the Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA) as test guidelines. However, the detection sensitivity of these *in vivo* tests remains insufficient. This study aimed to identify a novel morphological endpoint of TH disruption and to elucidate its developmental onset. In our previous report, we demonstrated that co-exposure to triiodothyroacetic acid (TRIAC)—a potential byproduct of wastewater treatment—and estrogen (E) induced vertebral malformations and reduced body length at 30 days post-hatching (dph) and in adult fish. To determine the timing of abnormal vertebral formation, we analyzed specimens exposed under the same conditions at 0, 10, 15, and 20 dph. Tissue clearing and bone staining revealed shortening of the notochord, a precursor-like axial support structure of the vertebrae, at 0 dph. At 10 and 15 dph, unossified regions exhibited size reduction and misalignment. By 20 dph, ossification was largely complete in most individuals, and the co-exposure group displayed pronounced vertebral deformities comparable to those observed at 30 dph and in adults. These findings indicate that vertebral malformations become apparent and fixed as ossification progresses, suggesting their potential as an early morphological marker of TH-disrupting activity.

内分泌攪乱作用に関与するメダカエストロゲン受容体サブタイプの同定

○清水 慧花、室田 修平、中島 啓、宮川 信一

東京理科大学大学院 先進工学研究科

多くの内分泌攪乱物質はエストロゲン活性を持ち、核内のエストロゲン受容体 (Estrogen receptor; ESR) を標的として作用する。内分泌攪乱物質は水系に入ることが多いため、特に魚類をはじめとする水棲生物への生殖や性分化への影響が強く懸念されている。現生魚類の多くが属する真骨魚類には、3 つの ESR サブタイプ (*esr1*、*esr2a*、*esr2b*) が存在するが、各サブタイプのそれぞれの生理機能や役割についてはほとんどよく分かっていない。本研究では、メダカ (*Oryzias latipes*) を用いて、外因性エストロゲンによって誘導される内分泌攪乱作用に関与する ESR サブタイプの同定を目指した。

代表的なエストロゲン様化学物質であるビスフェノール A (BPA)、ノニルフェノール (NP)、4-プロピルパラベン (4-PP)、オクチルフェノール (OP) のエストロゲン活性を、レポーターアッセイで評価した。各 ESR サブタイプは、内在性エストロゲンである E2 に対しては同じように活性化されたが、化学物質に対して異なる反応を示し、特に ESR2a はほとんど転写活性化されなかった。また、野生型のオスメダカに BPA、NP、4-PP を曝露して肝臓の遺伝子発現解析を行ったところ、本来メスしか発現していないコリオジェニン (*chg*) やビテロジェニン (*vtg*) の発現が誘導された。発表では、各 ESR サブタイプのノックアウトメダカにおける *chg* や *vtg* の発現について議論する。

Identification of estrogen receptor subtypes responsible for endocrine disrupting effects

Suika Shimizu¹, Shuhei Murota¹, Hiraku Nakashima¹, Shinichi Miyagawa¹

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

Many endocrine disrupting chemicals (EDCs) adversely affect aquatic organisms by mimicking endogenous estrogens via estrogen receptors (ESRs). Most EDCs readily enter the aquatic environment, and consequently fish are especially at risk of exposure. Most teleost fish exhibit three *esr* subtypes (*esr1*, *esr2a*, and *esr2b*), however, functional differences in mediating EDC effects remain unclear. This study aims to identify the primary ESR subtype responsible for adverse effects of EDCs in medaka (*Oryzias latipes*).

In vitro reporter gene assay using medaka ESRs revealed that while all medaka ESRs responded to the endogenous estrogen E2, they exhibited distinct responses to EDCs (BPA, NP, 4-PP, and OP). In particular, ESR2a exhibited lower transcriptional activities in response to these EDCs. Furthermore, *in vivo* exposure of these EDCs to male medaka resulted in the ectopic induction of estrogen-responsive genes such as choriogenin (*chg*) and vitellogenin (*vtg*). To identify the contribution of each ESRs, we utilized *esr* knockout medaka lines. In this presentation, the findings from these knockout studies, which clarify the functional roles of each ESR subtype in mediating EDC effects, will be discussed.

新生仔期 DES 曝露によるマウス生殖器官への DNA メチル化解析

○松橋 愛理、山崎 翔、宮川 信一

東京理科大学大学院 先進工学研究科

子宮や膣などの雌性生殖器官の上皮細胞の増殖と分化は、通常エストロゲンにより調節されている。一方、新生仔期に合成エストロゲンである Diethylstilbestrol (DES) を投与したメスのマウスでは、成長後に膣上皮がエストロゲン非依存的に細胞増殖するようになる。この現象は、エストロゲンの発達段階にある個体に対する発生影響として古くから知られており、DOHaD のモデル実験系である。新生仔期 DES 投与マウスの膣では、エストロゲン非依存的に細胞増殖因子等の遺伝子発現が誘導されている。しかし、このような恒久的な遺伝子発現変化がどのようにして起きているかは不明である。

本研究では、新生仔期 DES 投与マウスおよび成熟後に DES を投与したコントロールマウスの膣上皮を単離し、RNA-seq 解析で遺伝子の発現を、Reduced Representation Bisulfite Sequencing(RRBS)解析で DNA のメチル化状態を網羅的に解析した。その結果、新生仔期 DES 投与マウスにおいて低メチル化を示した遺伝子の中に、癌化に関係するパスウェイに該当する遺伝子を見出した。また、新生仔期 DES 投与マウスでは、Wnt シグナルや細胞増殖因子に関連する遺伝子の発現とメチル化には相関がみられることが明らかになった。

Epigenetic alterations in mouse vagina induced by neonatal DES exposure

Airi Matsuhashi, Sho Yamazaki, Shinichi Miyagawa

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

The cell proliferation and differentiation of female reproductive tracts are normally regulated by estrogens. However, neonatal diethylstilbestrol (DES) exposure can induce estrogen-independent epithelial cell proliferation in mouse vagina, resulting in tumors later in life. This phenomenon is a classic model for the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) concept. In the vaginae of mice exposed to DES neonatally, genes encoding growth factors are induced in an estrogen-independent manner. However, the molecular mechanisms underlying these persistent changes in gene expression remain unclear.

In this study, we isolated vaginal epithelium from mice exposed to DES neonatally and from control mice treated with DES in adulthood. We comprehensively analyzed gene expression by RNA-seq and DNA methylation status by reduced representation bisulfite sequencing (RRBS). We found several genes involved in carcinogenesis-related pathways were hypomethylated in the neonatal DES group. we also found a correlation between the expression and methylation of genes related to Wnt signaling and growth factors in these mice.

P-21

妊娠中のカドミウム曝露が子どもの発達に与える影響：エコチル調査より

○増本 年男¹、天野 宏紀¹、大谷 眞二¹、上島 通浩²、山崎 新³、小林 弥生³、黒沢 洋一¹
¹鳥取大学医学部、²名古屋市立大学 大学院医学研究科、³国立環境研究所 環境リスク・健康領域

カドミウムは、土壌、空気、食物、水などに含まれる重金属である。動物実験において胎児期にカドミウムへ曝露されると、子どもの精神神経発達に影響を及ぼすことが示唆されているが、ヒトでの影響は統一した見解が得られておらず、よくわかっていない。そこで、本研究では胎児期におけるカドミウム曝露が出生後の精神神経発達に影響を与えるかどうかを調べるために、環境省「子どもの環境と健康に関する全国調査（エコチル調査）」のデータを用いて解析を行った。妊娠中後期の母親から血液を採取し、カドミウム濃度を誘導結合プラズマ質量分析法により測定した。子どもの発達は、日本語版 Ages and Stages Questionnaire を用いて評価した。カドミウムと子どもの発達の関連は、二項ロジスティック回帰分析、多項ロジスティック回帰分析、一般化線形混合モデルにより検討した。説明変数を四分位でカテゴリー化したカドミウム濃度、目的変数を子どもの発達遅延として二項多項ロジスティック回帰分析を行った結果、0.5 歳、1 歳、1.5 歳における子どもの発達遅延と高濃度のカドミウム濃度との間に有意な関連が認められた。しかし、その関連は低濃度でのカドミウム曝露や 2 歳以降で消失した。この発達遅延は、個人差を調整したとしても、カドミウム濃度との有意な相関が見られた。これらの結果により、出生前のカドミウム曝露が子どもの発達に初期段階では影響を与えるが、発達に伴ってその効果は消失するものであることが示唆された。

Association between prenatal cadmium exposure and child development: The Japan Environment and Children's study

Toshio Masumoto¹, Hiroki Amano¹, Shinji Otani¹, Michihiro Kamijima², Shin Yamazaki³,
Yayoi Kobayashi³, Youichi Kurozawa¹

¹Faculty of Medicine, Tottori University, ²Department of Occupational and Environmental Health, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, ³ Health and Environmental Risk Division, National Institute for Environmental Studies

Cadmium is a heavy metal that can be found in soil, air, food, and water. Cadmium has toxic effects on the kidneys, bones, and respiratory system. Prenatal exposure to cadmium has been found to affect the mental development of children, but inconsistent results have been found in different studies. Therefore, it is unknown that prenatal cadmium exposure associated with child development after birth. To elucidate whether cadmium affect the child development or not, we analyzed nation-wide cohort study data, the Japan Environment and Children's Study. Prenatal cadmium concentrations in blood from mothers in the second or third trimester were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry. Child development was evaluated using "Ages and Stages" questionnaires. The association between cadmium and child development were investigated by performing logistic regression analyses, multinomial logistic regression analyses and generalized linear mixed model using the child development parameters as dependent variables and the cadmium concentrations in maternal blood as the independent variable. There were significant associations between the cadmium concentration and child development at 6 months, 1 year, and 1.5 years after birth. However, the effect had disappeared at 2 years after birth or later. The number of developmental delays was positively associated with the cadmium concentration after adjusting individual difference. The results indicate that prenatal exposure affects child development, but the effect decreases with age.

P-22

妊娠中の室内化学物質複合曝露が子どもの出生時体格に及ぼす影響

高口 倅暉¹、○江口 哲史¹、川島 孝行²、鈴木 規道¹
¹千葉大学予防医学センター、²東京科学大学情報理工学院

胎児発育の遅延や過成長は成人期からの生涯にわたる心血管疾患、神経発達障害、肥満、代謝異常などに関連している。現在の生活においてヒトは一日の大半を室内で過ごすことが多く、継続的かつ長期的に揮発性有機化合物（VOCs）や半揮発性有機化合物（SVOCs）の曝露を受けている。先行研究では、妊娠期母親への VOCs や SVOCs 曝露が胎児の発達に影響を及ぼすことが示唆されている。曝露影響を推定する際には、化学物質の複合曝露影響について評価を行う必要があるが、先行研究において、VOCs と SVOCs の複合曝露影響を評価した研究は少ない。そこで本研究では、妊娠初期の母親が棲む住宅の室内空気中 VOCs およびハウスダスト中 SVOCs を測定し、複合曝露の人体への影響を統計的に推定する新たな手法として提案された Sparse Group Least Absolute Shrinkage and Selection Operator Weighted Quantile Sum regression (SG LASSO WQS)を用いて、妊娠中の室内化学物質複合曝露と子どもの出生時体格（体長、体重、頭囲）の関係を調査した。SG LASSO WQS の結果、体長および頭囲において、VOCs・SVOCs とともに関連が認められ、体重では VOCs のみ予測に寄与する因子として選択された。体長との正の関連において、VOCs では高級アルデヒドと Ethyl acetate、SVOCs では TPHP が比較的高い寄与を示した。負の関連では、VOCs は Decamethyl cyclopentasiloxane (D5) および炭化水素類、SVOCs では塩素化有機リン系難燃剤の寄与が高かった。体重では、正の関連においては高級アルデヒドの寄与、負の関連においては *n*-Hexane および Decane の寄与が高い割合を占めていた。頭囲において、正の関連では、Decanal、Ethyl acetate、Tris(methylphenyl) phosphate、負の関連では D5、Undecane、2-Ethyl-1-hexanol、Tris(2-butoxyethyl) phosphate の寄与が高かった。

Association between birth size and maternal exposure to indoor chemicals during early pregnancy

Kohki Takaguchi¹, Akifumi Eguchi¹, Takayuki Kawashima², Norimichi Suzuki¹
¹ Center for Preventive Medical Sciences, Chiba University, ² Institute of Science Tokyo

Fetal growth retardation and overgrowth were associated with lifelong cardiovascular diseases, neurodevelopmental disorders, obesity, and metabolic abnormalities from adulthood onward. We spend most of their day indoors, resulting in continuous and long-term exposure to volatile organic compounds (VOCs) and semi-volatile organic compounds (SVOCs). Previous studies have suggested that maternal exposure to VOCs and SVOCs during pregnancy affects fetal development. Few studies have reported association between birth size and combined exposure to VOCs and SVOCs. Therefore, this study measured VOCs in indoor air and SVOCs in house dust from residences of mothers in early pregnancy, and investigated the relationship between mixed indoor chemical exposures during pregnancy and children's birth size (body length, body weight, and head circumference) using Sparse Group Least Absolute Shrinkage and Selection Operator Weighted Quantile Sum regression (SG LASSO WQS). As a result of SG LASSO WQS, VOCs and SVOCs were associated with body length and head circumference, while only VOCs were selected as contributing factors for predicting birth weight. For positive associations with body length, higher aldehydes and ethyl acetate among VOCs, and TPHP among SVOCs showed relatively high contributions. For negative associations, decamethylcyclopentasiloxane (D5) and hydrocarbons among VOCs, and chlorinated organophosphate flame retardants among SVOCs exhibited high contributions. For birth weight, higher aldehydes contributed to positive associations, while *n*-hexane and decane accounted for large proportions in negative associations. For head circumference, positive associations showed high contributions from decanal, ethyl acetate, and tris(methylphenyl) phosphate, while negative associations showed high contributions from D5, undecane, 2-ethyl-1-hexanol, and tris(2-butoxyethyl) phosphate.