

課題番号： [5RF-1951]

体系的番号： [JPMEERF20195R51]

研究実施期間： 令和元年～令和3年度

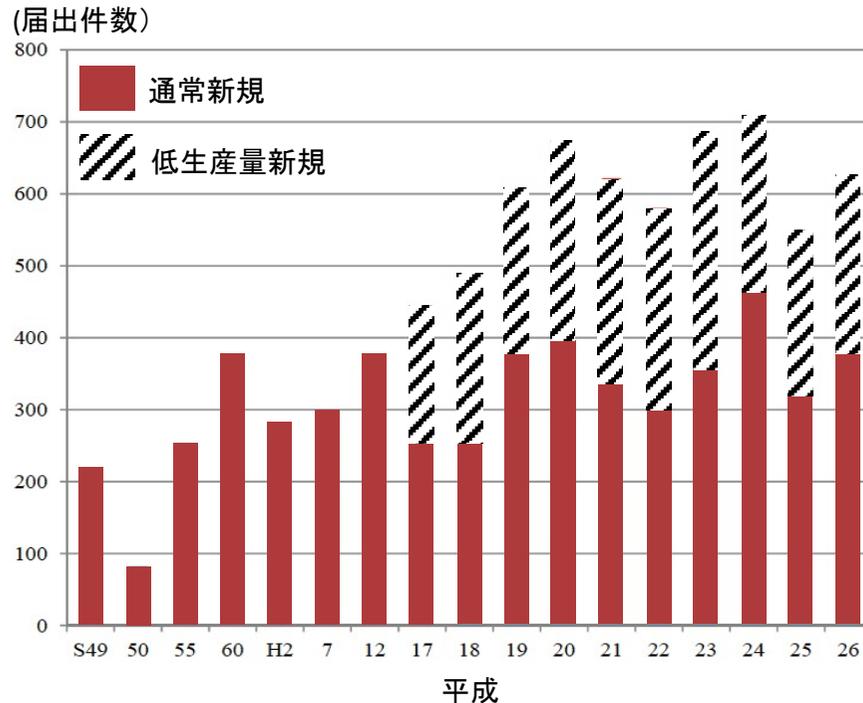
化学物質の内分泌かく乱作用を予測・検出 する新たなスクリーニング法の開発

研究代表者：堀江 好文
(神戸大学 内海域環境教育研究センター)

1. 研究の背景 新規化学物質の届出件数は年々、増加している

●新規化学物質届出件数の推移

新規化学物質の届出件数は年々増加



[出所]「化審法の施行状況と最近の動向について」、平成29年1月経済産業省化学物質管理課(一部加工)

●従来の試験法を用いたリスク管理



化学物質ばく露 (OECD TG 234、試験期間; 約70日間)

精巣卵や性転換の有無



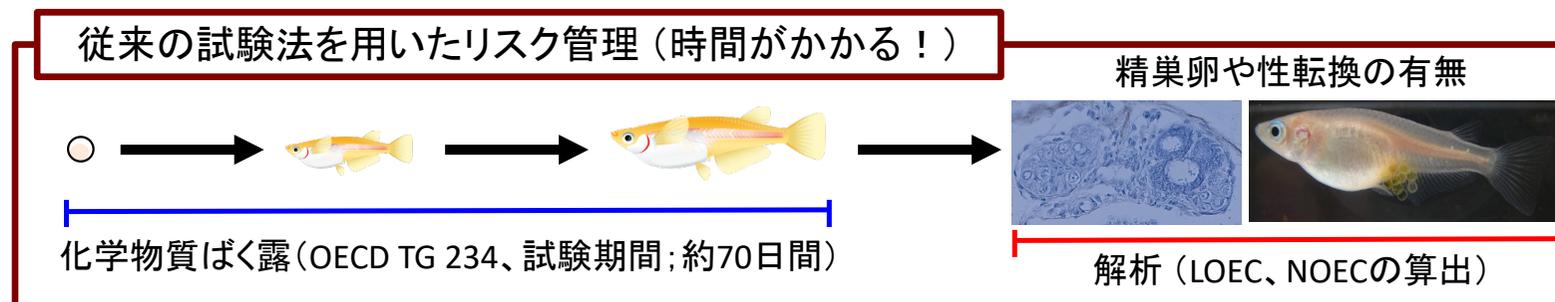
解析 (LOEC、NOECの算出)

従来の生態毒性試験法は、時間がかかる!

毒性メカニズムを利用した
効率的かつ効果的な生態毒性試験法の開発が必要

2. 研究開発目的、3. 研究目標

1. 内分泌かく乱作用のある化学物質が魚類のモデル生物メダカの性分化に与える生態影響の遺伝子メカニズムを明らかにする。
2. 特定の遺伝子を指標とすることで、実環境中に含まれる魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質のスクリーニング手法を開発する。



本研究の目標(その1)

内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカー 遺伝子を探す

本研究の目標(その2)

より簡便かつ安価にバイオマーカー遺伝子発現変動を解析できる
「化学物質のスクリーニングに用いるメダカ」を作出する

本研究の目標(その2)

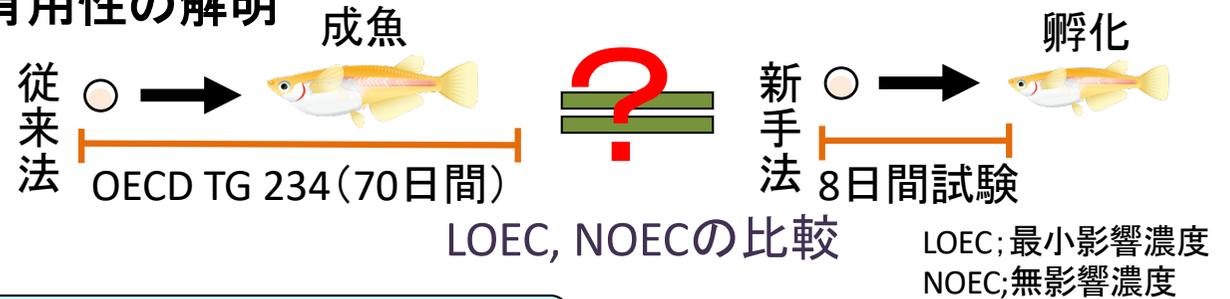
作出した「化学物質のスクリーニングに用いるメダカ」を用いた、
環境水中の内分泌攪乱作用を示す化学物質のスクリーニング

4. 研究開発内容

バイオマーカー遺伝子を指標とした生態毒性試験法の開発(目標 その1)

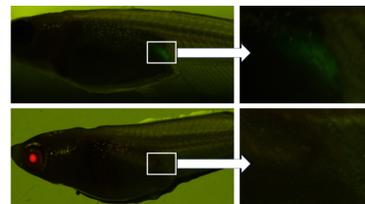
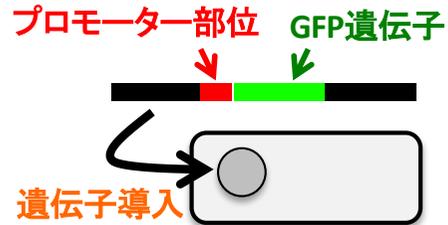
・Gsdf、Cyp19a1a遺伝子マーカーの有用性の解明

- ・ノニルフェノール ・トレンボロン
- ・ビスフェノール
- ・SPEED' 98 medaka試験で実施された化学物質



スクリーニングに用いるメダカの作出(目標 その2)

・遺伝子組換えメダカの作出



・遺伝子組換えメダカの有用性の確認

- ・ノニルフェノール ・ビスフェノール ・β-エストラジオール
- ・トレンボロン ・メチルテストステロン
- ・SPEED' 98 medaka試験で実施された化学物質

環境水中の内分泌攪乱作用を示す物質のスクリーニング手法の構築(目標 その3)

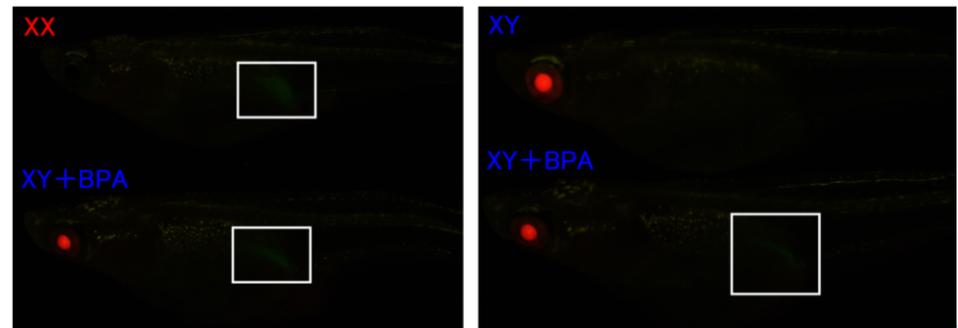


環境水のみ ・スクリーニング

- ・八郎湖
 - ・男潟
 - ・馬場目川
- ばく露

環境水のみ+内分泌攪乱化学物質

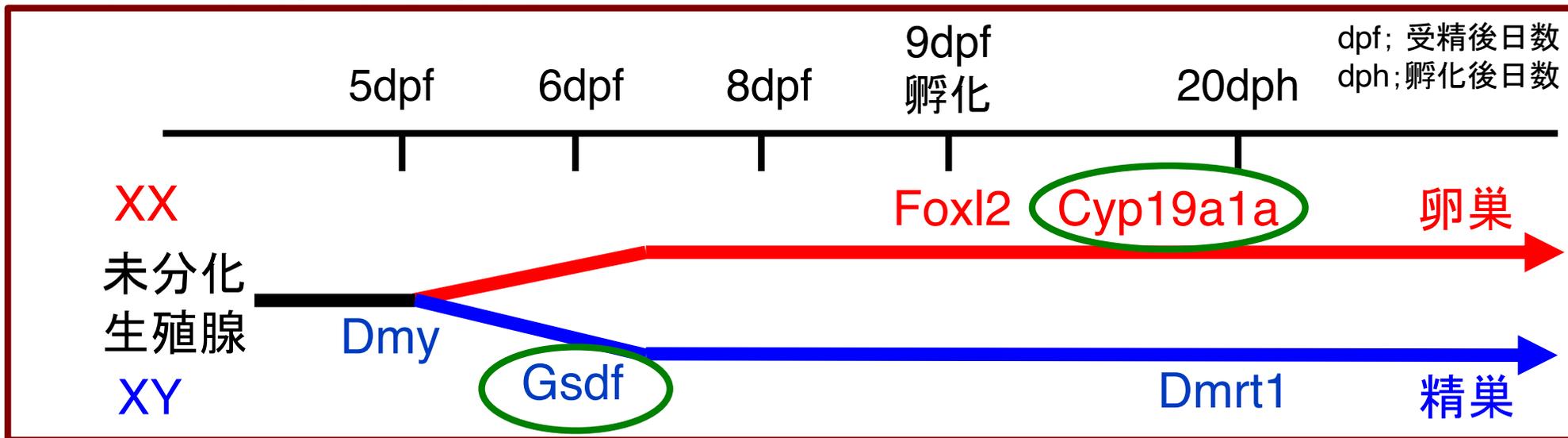
- ・八郎湖
 - ・男潟
 - ・馬場目川
 - ・ビスフェノール
 - ・トレンボロン
- ばく露



5-1. 成果の概要

目標1

●メダカの性別が決まる仕組み



●試験に用いた化学物質

女性ホルモン作用

17beta-Estradiol
Ethinylestradiol
Bisphenol A
p,p'-DDE
4-Nonylphenol
4-*t*-Octylphenol

男性ホルモン作用

Trenbolone
Methyltestosterone

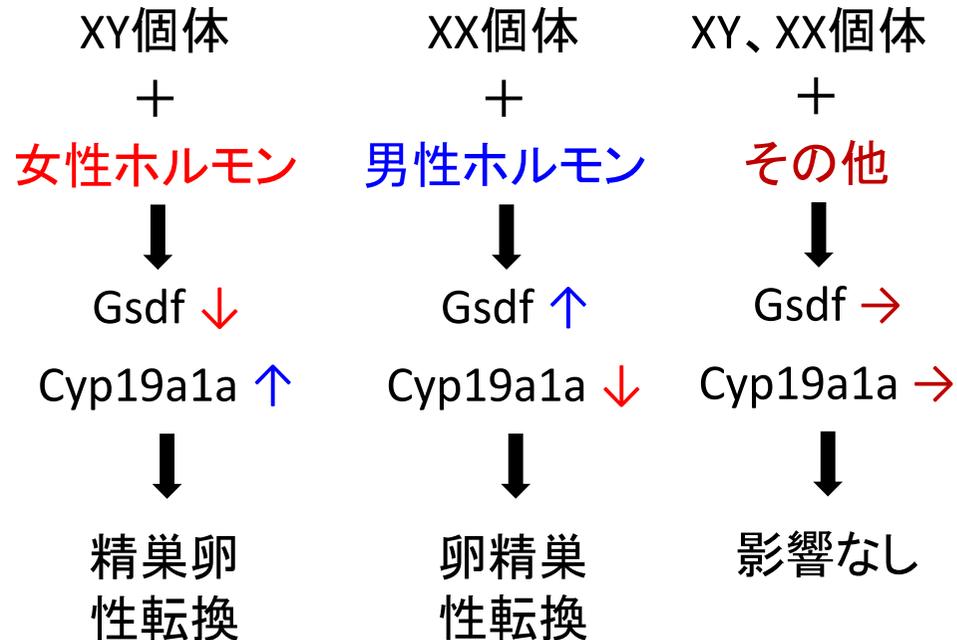
抗男性ホルモン作用

Fenitrothion
Flutamide

その他

Tributyltin chloride
Triphenyltin chloride
Amitrole
Endrin

●期待される遺伝子の発現変動パターン



5-1. 成果の概要 バイオマーカー遺伝子の発現変化のまとめ

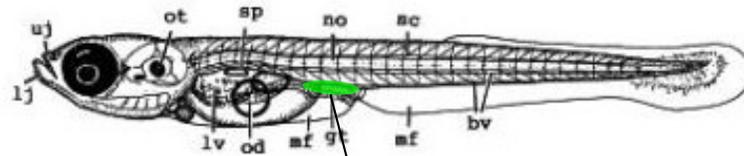
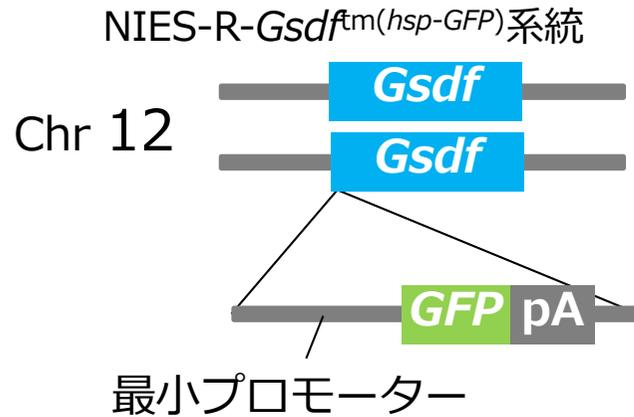
	Gsdg遺伝子の発現変化		Cyp19a1a遺伝子の発現変化	
	XX	XY	XX	XY
女性ホルモン作用のあるEDCs	→	↓	↑	↑
男性ホルモン作用のあるEDCs	↑	→ ↓	↓ ↑	ND
性ホルモン作用のないEDCs	→	→	→	→
抗男性ホルモン作用のあるEDCs	→	→	ND	→ ↓
EDCsではない化学物質	→	→	→	→

Gsdg 遺伝子と *Cyp19a1a* 遺伝子は魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカー

5-1. 成果の概要

目標2

長浜バイオ大学 竹花 祐介 准教授との共同研究

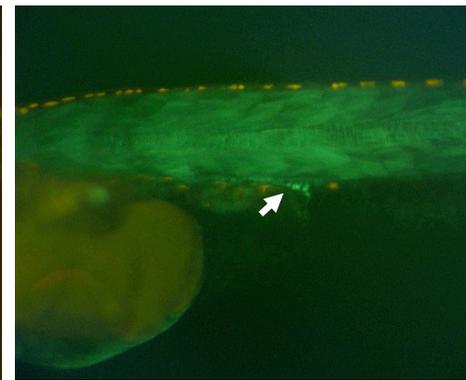
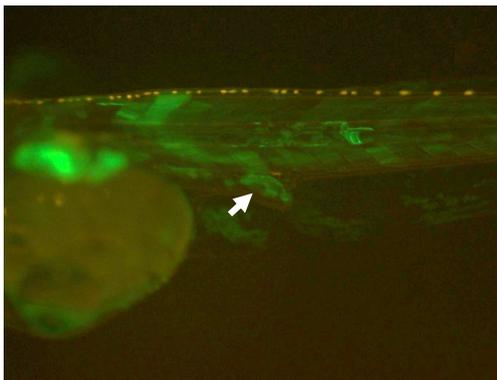


GSDF発現を
GFP蛍光で再現

Inj. Date	Host	sgRNA	Plasmid conc.	Injected	7dpf survival	Gonad GFP+
2020/5/29	NIES-R	<i>Gsdf</i> _sg1	10 ng/ul	80	10	0
2020/6/1	NIES-R	<i>Gsdf</i> _sg1	5 ng/ul	182	46	2
2020/6/2	NIES-R	<i>Gsdf</i> _sg2	5 ng/ul	178	30	1

*Gsdf*_sg1

*Gsdf*_sg2



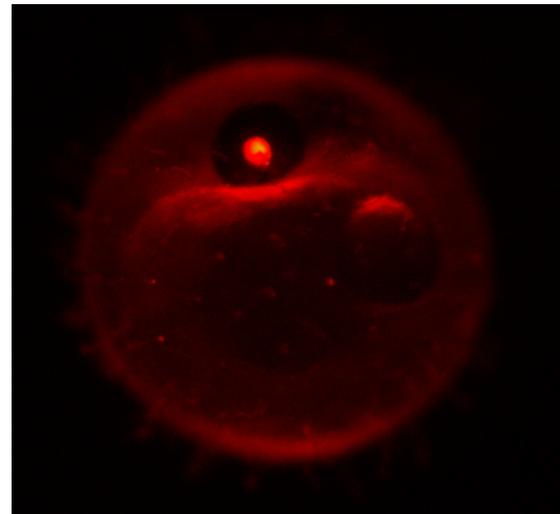
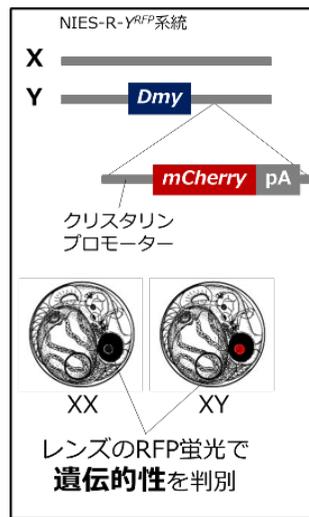
G1世代でGFP
発現を示す個
体は得られず、
系統化できない

5-1. 成果の概要

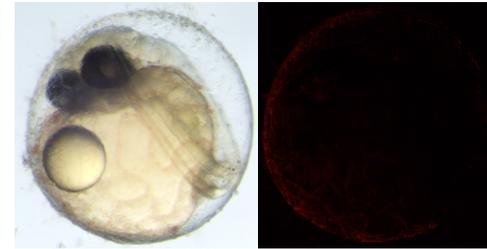
目標2の計画変更

長浜バイオ大学 竹花 祐介 准教授との共同研究

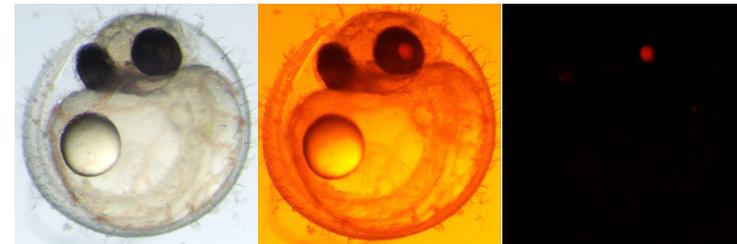
- **Y^{RFP}系統** (遺伝子型の性を赤色蛍光タンパク質(RFP)の有無によって判別できる)



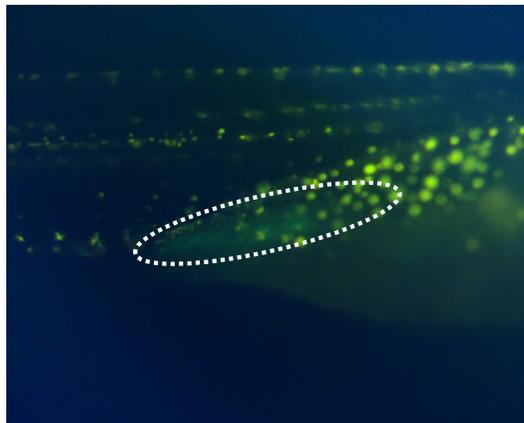
XX



XY

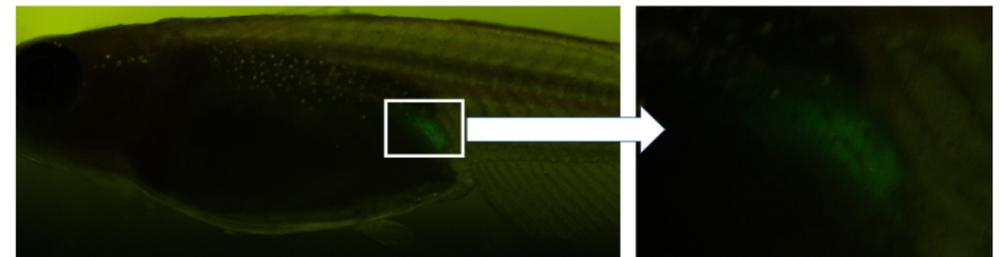


- **Cyp19a1a-GFP系統** (Cyp19a1aの発現を緑色蛍光タンパク質によって検出できる)

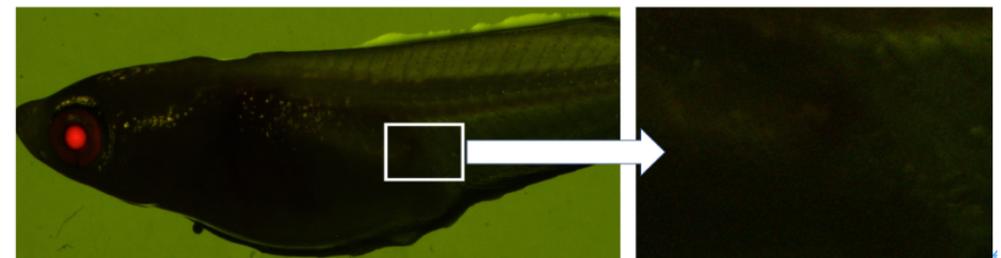


Cyp19a1a-GFP系統の生殖腺における GFP 蛍光 (孵化後4週齢)

XX



XY



5-1. 成果の概要

スクリーニングの実施

- Y^{RFP}系統
- *Cyp19a1a*-GFP系統

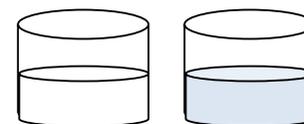
採水日 ; 2021年8月2日

	八郎湖	男潟	馬場目川
気温 (°C)	32	34	32
水温 (°C)	31.3	31.9	31.1
pH	7.92	9.7	8.92
DO (mg/L)	5.05	8.77	6.64
EC (mS/cm)	135.2	124.2	114.2



環境水のみ

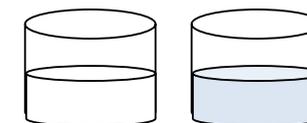
- 八郎湖
- 男潟
- 馬場目川



ばく露

環境水のみ + 内分泌攪乱化学物質

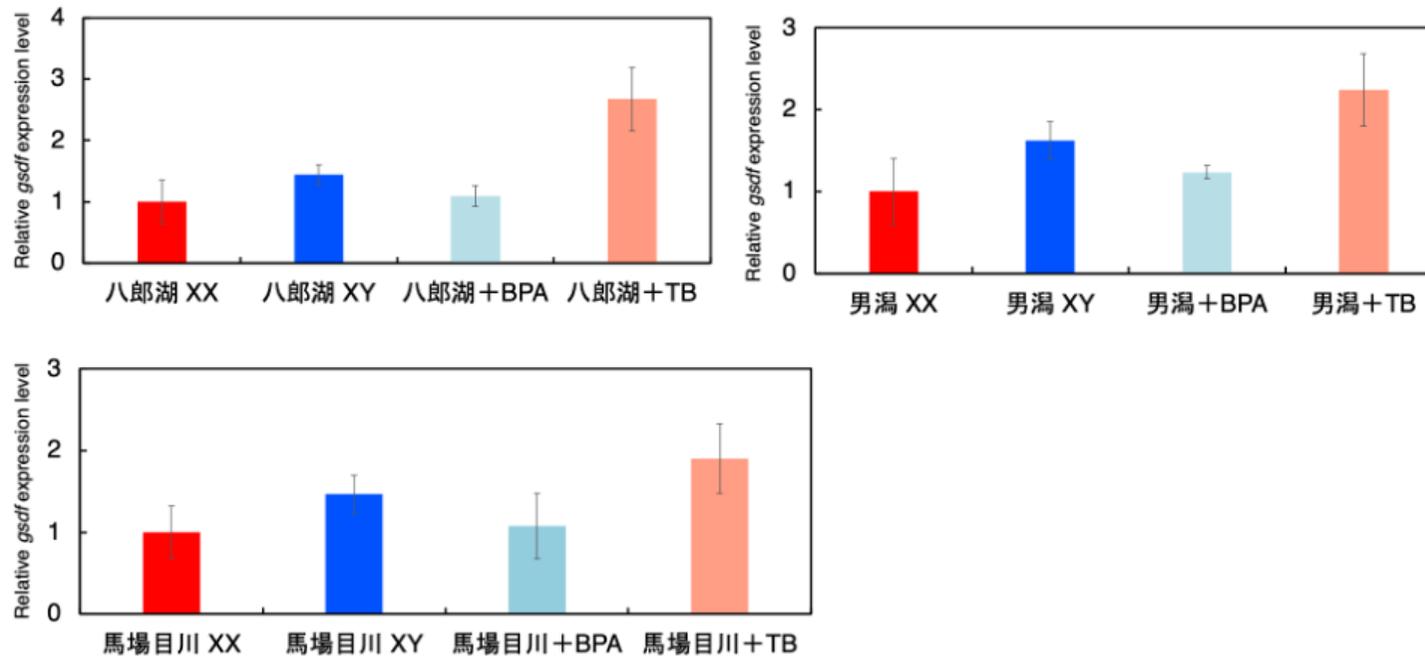
- 八郎湖
 - 男潟
 - 馬場目川
- +
- ビスフェノール
 - トレンボロン



ばく露

5-1. 成果の概要

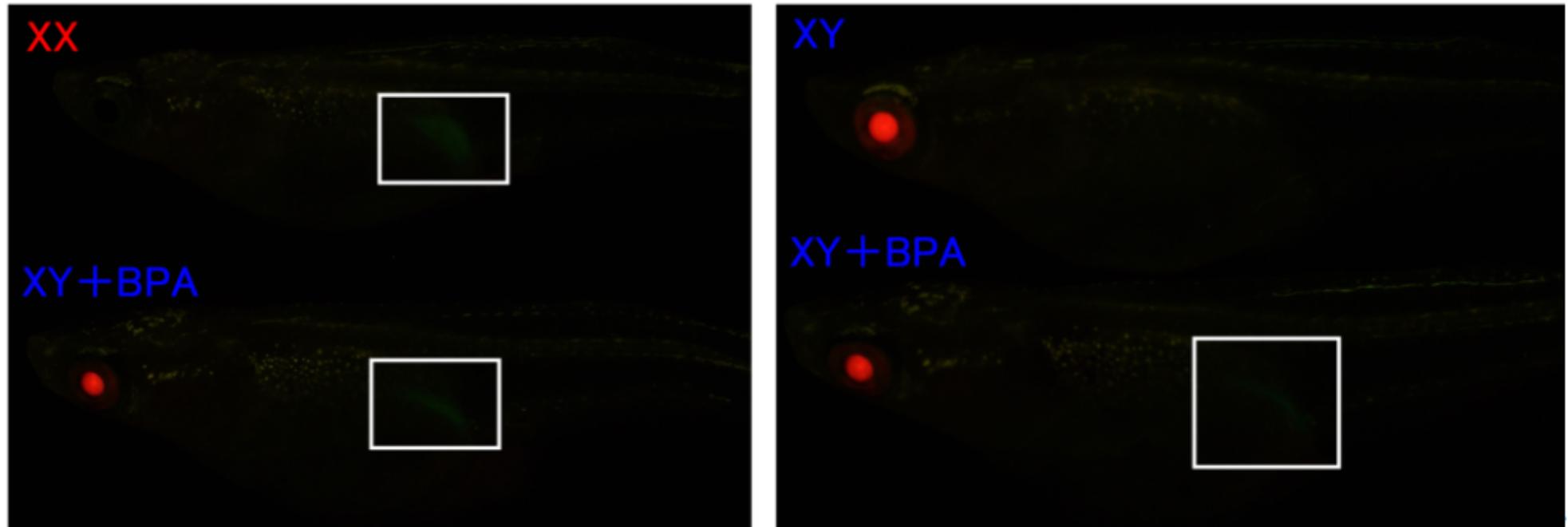
Y^{RFP}システムを用いた場合



- ・ 八郎湖、男潟、馬場目川の環境水を用いた結果、*Gsdf* 遺伝子の発現に変化なし。
→ 八郎湖、男潟、馬場目川の環境水には魚類の性分化に影響を与える濃度で内分泌かく乱作用を示す化学物質は含まれていない。
- ・ **BPA**を環境水に加えて試験を行なった結果、XY個体の *Gsdf* 遺伝子の発現は低下。
→ 仮に、環境水中に女性ホルモン作用を示す化学物質が含まれていた場合、Y^{RFP}システムで反応を検出できる。
- ・ **TB**を環境水に加えて試験を行なった結果、XX個体の *Gsdf* 遺伝子の発現は増加。
→ 仮に、環境水中に男性ホルモン作用を示す化学物質が含まれていた場合、Y^{RFP}システムで反応を検出できる。

5-1. 成果の概要

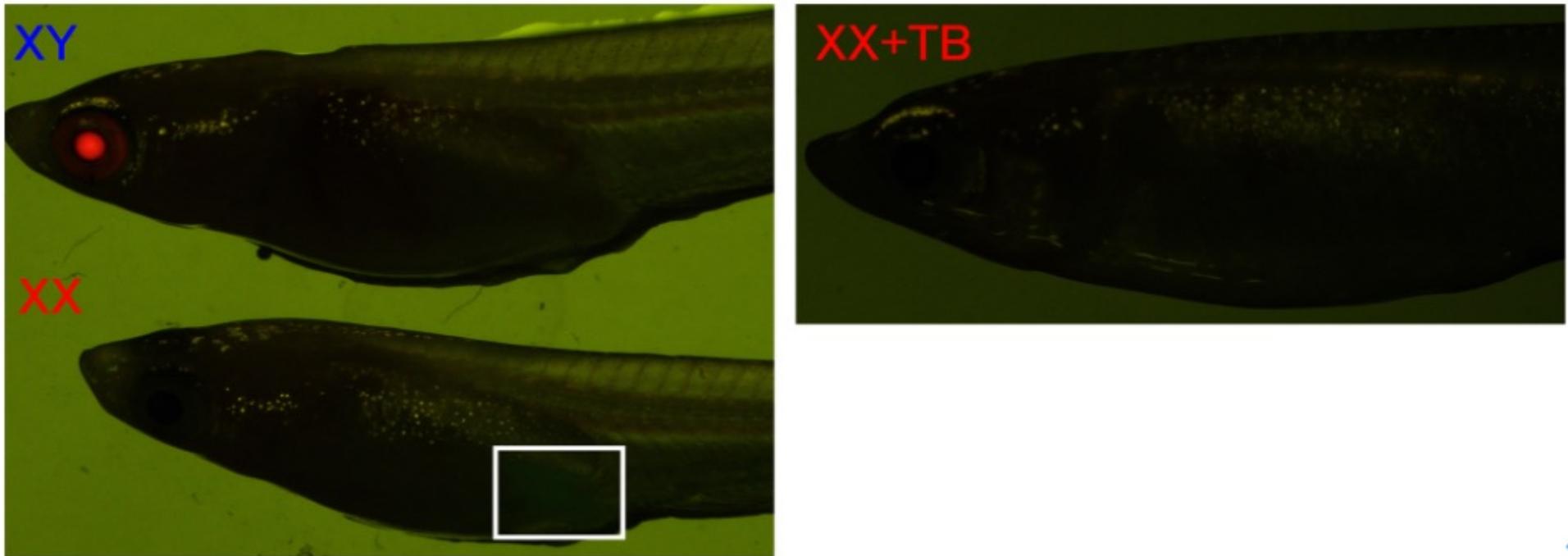
Y^{RFP}システムを用いた場合



- ・ 八郎湖、男潟、馬場目川の環境水を用いた結果、GFP蛍光に変化なし。
→ 八郎湖、男潟、馬場目川の環境水には魚類の性分化に影響を与える濃度で内分泌かく乱作用を示す化学物質は含まれていない。
- ・ **BPA**を環境水に加えて試験を行なった結果、XY個体の生殖腺でGFP蛍光を確認。
→ 仮に、環境水中に女性ホルモン作用を示す化学物質が含まれていた場合、*Cyp19a1a*-GFPシステムで反応を検出できる。

5-1. 成果の概要

Y^{RFP}システムを用いた場合



- ・ TBを環境水に加えて試験を行なった結果、XX個体の生殖腺でGFP蛍光を確認できず。
→ 仮に、環境水中に男性ホルモン作用を示す化学物質が含まれていた場合、*Cyp19a1a*-GFPシステムで反応を検出できる。

5-2. 環境政策等への貢献

OECD試験法への応用

- メダカ拡張1世代繁殖試験(MEOGRT)(OECD TG 240)

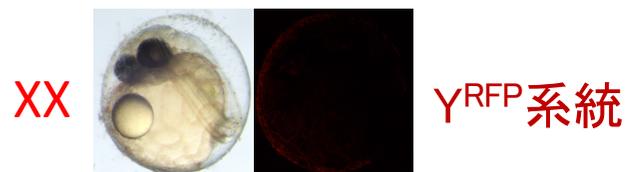
受精後9~10週目(Test Day 78-85)に、生存した全個体についてメダカの性決定遺伝子であるDMYの保有有無を解析する事で、各個体の遺伝的な性別を判別する必要がある(DNA抽出・PCR法を用いた遺伝的性判別)。

- 魚類性発達試験(OECD TG 234)

化学物質の性への影響を調べる試験。試験終了後、メダカの性決定遺伝子であるDMYの保有有無を解析する事で、各個体の遺伝的な性別を判別する必要がある

- 抗男性ホルモン作用スクリーニング試験(JMASA)(OECD 改訂作業中)

化学物質の抗男性ホルモン作用の有無を調べる試験。遺伝的雄個体(XY個体)のみを使って試験を行う必要があるが、試験期間中は遺伝的性別が分からないためXX/XY個体が混ざった状況で試験を実施する。試験終了後、メダカの性決定遺伝子であるDMYの保有有無を解析する事で、各個体の遺伝的な性別を判別し、XY個体のデータのみ使用する。



受精卵の段階で遺伝的な性別を判別できる

→必要以上の個体数をばく露試験に使用する必要がなくなる。

→DNA抽出やPCRをする必要がなくなり、分析の大幅な簡略化が期待される。

5-3. 研究目標の達成状況

目標を上回る成果をあげた

本研究の目標(その1)

内分泌かく乱化学物質の検出に有用なバイオマーカー遺伝子を探す

精巣分化を誘導する *Gsdf* 遺伝子と *Cyp19a1a* 遺伝子が、魚類の性分化に影響を与える内分泌かく乱作用を示す化学物質の検出に有用なバイオマーカーであることを明らかにした。

本研究の目標(その2)

より簡便かつ安価にバイオマーカー遺伝子発現変動を解析できる「化学物質のスクリーニングに用いるメダカ」を作出する

Y^{RFP} 系統 と *Cyp19a1a*-GFP 系統 の2系統の遺伝子組み換えメダカを作出した(当初の計画より1系統多く作出)。

本研究の目標(その3)

作出した「化学物質のスクリーニングに用いるメダカ」を用いた、環境水中の内分泌攪乱作用を示す物質のスクリーニング

Y^{RFP} 系統 と *Cyp19a1a*-GFP 系統 の2系統とも、環境水中に女性 or 男性ホルモン作用を示す化学物質が含まれていた場合、反応を検出

6. 研究成果の発表状況

<査読付き論文>

- 1) Horie, Y., Kanazawa, N., Takahashi, C., Tatarazako, N., Iguchi, T: Environmental Toxicology and Chemistry, in press, (2022) (IF: 3.742) Gonadal soma-derived factor expression is a potential biomarker for predicting the effects of endocrine-disrupting chemicals on gonadal differentiation in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)
- 2) Horie, Y., Kanazawa, N., Takahashi, C., Tatarazako, N., Iguchi, T: Journal of Applied Toxicology, Vol.41, No.3, pp. 399–409 (2021) (IF: 3.446) Exposure to 4-nonylphenol induces a shift in the gene expression of gsdf and testis-ova formation and sex reversal in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)
- 3) Horie, Y., Kanazawa, N., Takahashi, C., Tatarazako, N., Iguchi, T: Journal of Applied Toxicology, Vol.40, No.6, pp. 804–814 (2020) (IF: 3.446) Bisphenol A induces a shift in sex differentiation gene expression with testis-ova or sex reversal in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)

<口頭発表>

- 1) Horie Y. 2021. Impact of Environmental pollution on fish. Kobe University Academic Research and Education Forum Co-organized with The University of Western Australia Opening Commemorative Event for Kobe University Liaison Office in Perth, Online, 4 November, 2021.