

学会賞受賞研究

動物福祉に配慮したメダカ胚および仔魚を用いた

内分泌かく乱化学物質のエストロジェン様作用の評価に関する研究

石橋 弘志*

Hiroshi ISHIBASHI

Choriogenin in Medaka Embryos and Larvae as an Alternative Model
for Screening Estrogenic Endocrine-Disrupting Chemicals

Abstract

The present study assessed the mRNA expression levels of choriogenins (ChgL and ChgH), vitellogenins (Vtg1 and Vtg2), cytochrome P450 aromatase (CYP19a1b), and ER subtypes (ER α , ER β 1, and ER β 2) in embryos and larvae of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to estrogenic endocrine-disrupting chemicals (EDCs), such as 17 β -estradiol (E2), *p*-*n*-nonylphenol (NP), and bisphenol A (BPA). In E2 (0.10–222 nM)-treated 7 days-post-fertilization (dpf) embryos and 9 or 12 dpf larvae, ChgL and ChgH expression was up-regulated in a concentration-dependent manner. By contrast, interestingly, Vtg1 and Vtg2 expression was not induced in E2-treated 7 dpf embryos but was significantly induced in 9 and 12 dpf larvae, suggesting a developmental-stage-specific regulatory mechanism underlying Vtg expression. The exposure of maximum concentrations of NP (0.09–1.5 μ M) and BPA (1.8–30 μ M) up-regulated Chg expression in 9 or 12 dpf larvae. The relative estrogenic potencies (REPs) of E2, NP, and BPA were 1, 2.1×10^{-4} , and 1.0×10^{-5} , respectively. These results suggest that Chg transcription in medaka embryos and larvae can be used as a sensitive biomarker for screening potential estrogenic EDCs. Our assay system using independent feeding stages (e.g., embryonic and early larval stages) can be used as an *in vivo* suitable alternative model for evaluating EDCs.

Key words: choriogenin, vitellogenin, endocrine-disrupting chemicals (EDCs), embryos, larvae, *Oryzias latipes*

1. 日本水環境学会中国・四国支部研究奨励賞受賞の経緯

令和3年5月28日に開催された日本水環境学会中国・四国支部総会において「令和2年度日本水環境学会中国・四国支部研究奨励賞」を受賞した。本賞は、水環境に関する優れた研究・調査成果を発表し、将来が期待される個人に贈呈される。受賞対象となった論文「Choriogenin transcription in medaka embryos and larvae as an alternative model for screening estrogenic

endocrine-disrupting chemicals」(Ishibashi et al., 2020)は、本学農学部の中満柚来氏、有明工業高等専門学校の内田雅也先生・富永伸明先生、熊本高等専門学校(現東海大学)の平野将司先生、熊本県立大学(現熊本大学)の有菌幸司先生との共同研究により実施したものである。ここでは、その受賞対象となった論文の研究内容について紹介する。

2. 内分泌かく乱化学物質とその評価の現状

内分泌かく乱化学物質(EDCs)は、ヒトや野生生物などの生体内に微量取り込まれ、ホルモン疑似作用やホルモンかく乱作用などを引き起こすことにより、生殖系や免疫系などへの影響、発がん、肥満および心血管疾患など疾患への関与、さらに次世代影響などが指

2022年12月23日受領

*愛媛大学農学部生態系保全学教育分野(責任著者)

摘されている (Colborn et al., 1993; Stone, 1994). EDCs は、我々の生活環境において微量かつ複合して存在するため、ヒトや野生生物は慢性的に曝露される。そのため、EDCs の健康・環境リスクを適切に評価し、必要に応じて管理していくことが重要である。我が国では、EDCs 問題の提起された 1990 年後半から、世界でもいち早く研究が実施されてきた (環境省, 2022)。

生体内に取り込まれた EDCs は、エストロゲン (女性ホルモン) 受容体 (ER), アンドロゲン (男性ホルモン) 受容体 (AR), 甲状腺ホルモン受容体, レチノイド受容体などの核内受容体を介して作用・影響すると考えられている (Diamanti-Kandarakis et al., 2009)。そこで、核内受容体に対する EDCs の直接的な結合親和性や転写活性化能をスクリーニングするため、環境省などを中心に、受容体結合試験やレポーター遺伝子アッセイなどの試験管内試験 (*in vitro* 試験) が開発されている。また、ER や AR などを経たエストロゲン/アンドロゲン様作用などの関与した生殖・繁殖影響などを評価するための短期曝露の生物試験 (*in vivo* 試験) や、より長期曝露 (1 世代/多世代) の生物影響を評価するための *in vivo* 試験も開発されている。環境省は、これら開発した試験法を用いた EDCs の作用・影響の評価に加えて、EDCs の環境中濃度の実態把握および曝露評価、化学物質の内分泌かく乱作用に関する知見の収集などからリスク評価およびリスク管理を実施している。また、開発された試験法の一部は経済協力開発機構 (OECD) テストガイドライン (TG) にも採用され、国際協力および情報発信の推進にも貢献している。なお、これらの取組は「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応-EXTEND2022-」として公表されているので、そちらも参照いただきたい (環境省, 2022)。

3. EDCs 評価のための魚類バイオマーカー

我々が生産・使用・廃棄した EDCs の多くは、産業排水や生活排水に含まれ、河川を通じて湖沼や海洋に広がるため、特に水圏の野生生物に影響を及ぼす可能性がある。環境省では、メダカ (*Oryzias latipes*) やゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) など魚類の核内受容体を介して引き起こされる EDCs の生体影響を評価しており、特に ER を介したエストロゲン様作用に関する生体影響評価については多くの研究がある (環境省, 2022)。魚類 ER は、核内受容体スーパーファミリーに属し、3 種類のサブタイプ (ER α , ER β 1, ER β 2) が同定されている (Boyce-Derricott et al., 2009; Chakraborty et al., 2011)。ER はリガンドと結合し活性化され ER 二

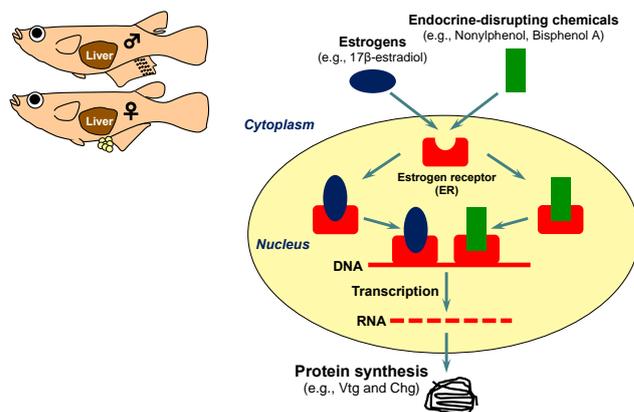


図 1 EDCs による Vtg および Chg 発現制御の模式図

量体となり、卵黄タンパク質前駆体のビテロジェニン (Vtg) や卵膜タンパク質前駆体のコリオジェニン (Chg) などの発現を制御する (原, 2013)。魚類を含めた卵生脊椎動物では、これら雌特異タンパク質は女性ホルモンである 17 β -エストラジオール (E2) の作用により肝臓で合成され、血液中に分泌されるが、未熟魚や雄魚ではほとんど検出されない。しかし、エストロゲン様作用を持つ EDCs の曝露によって、雄魚や未成熟魚で発現誘導されることから (図 1), Vtg や Chg は EDCs 曝露に対する有用なバイオマーカーと考えられている (Sumpter and Jobling, 1995)。我々の研究グループでは、これまで Vtg や Chg をバイオマーカーとして、様々な化学物質のエストロゲン様作用を明らかにした (Ishibashi et al., 2004; 2006; 2018, Yamaguchi et al., 2015)。また、エストロゲン様作用を示した一部の化学物質は、繁殖阻害 (産卵数の減少や受精率の低下など) や次世代胚の孵化率の低下・奇形発生なども引き起こし、これら有害影響におけるエストロゲン様作用の関与を示唆した (Ishibashi et al., 2006; 2018)。

4. 魚類の胚および仔魚を用いた EDCs の評価

前述のように、魚類に対する EDCs のエストロゲン様作用の評価において、雌特異タンパク質である Vtg や Chg は有効なバイオマーカーとして用いられてきた。また、これらバイオマーカーの発現解析は、主に未熟魚や雄魚を対象に行われてきたが、胚ではほとんど知見がない。一方、近年 3R の原則のような動物福祉・倫理問題の観点から、実験動物の削減や代替試験法の開発が求められている。3R の原則とは「Replacement (代替法の利用)」、「Reduction (使用動物数の削減)」、「Refinement (苦痛の軽減)」である。「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(化審法) などでは、藻類、甲殻類および魚類などの水生生物を用いた生態毒性試験が実施されており、例えば、魚類急性毒性試

験 (OECD TG203) では化学物質に 96 時間曝露した際の魚類に及ぼす影響を半数致死濃度 (LC₅₀) として評価している。供試魚としてゼブラフィッシュやメダカなどの小型魚類のモデル生物の使用が推奨されている。しかし、OECD は EU 指針の動物保護に規制されない (化学的目的で用いる動物の保護において卵や胚などの摂餌前ステージは規制外) 魚類胚急性毒性試験 (Fish embryo toxicity test: FET 試験) を OECD TG236 として開発している。FET 試験では、供試魚としてゼブラフィッシュを推奨しているが、ゼブラフィッシュ以外の魚種を適用した例は少ない。また、FET 試験では急性毒性を評価しており、エストロゲン様作用は評価対象としていない。そこで、FET 試験にメダカを適用し、急性毒性に加えてエストロゲン様作用の評価も可能な試験系の確立を試みた。モデル化合物として、E2, *p-n*-ニルフェノール (NP), ビスフェノール A (BPA) を用いた。

4.1. FET 試験による評価

メダカ FET 試験において、4.6 および 9.2 μM E2, 2.8 および 5.7 μM NP, 54.8 μM BPA に 14 日間曝露した受精卵では、孵化率の有意な減少が見られた。また、4.6 および 9.2 μM E2 曝露区では、孵化までの時間が有意に遅延した。18.4 μM E2, 11.3 および 22.7 μM NP, 110 および 220 μM BPA に 14 日間曝露した受精卵は、発生遅延のため孵化できず、すべての胚は 14 dpf (受精後の日数) 以内に死亡した。2.3 μM 以上の E2, 2.8 μM 以上の NP, 110 μM の BPA を曝露した 7 dpf 胚の心拍数は有意に減少した。胚の生存率、孵化率および心拍数に対する E2, NP および BPA の LC₅₀ および最小影響濃度 (LOEC) を表 1 に示した。一方、仔魚 (孵化後 24 時間以内を供試) に対する E2, NP および BPA の 96 時間 LC₅₀ 値は、それぞれ 9.4 μM (95%信頼区間 [CI] = 8.5–10.4 μM), 2.0 μM (95%CI=1.9–2.1 μM), 58 μM (95%CI=53–64 μM) であった (表 1)。

4.2. エストロゲン様作用の評価

発生段階におけるバイオマーカー遺伝子の発現変動を明らかにするため、E2 (2 μM) を受精卵 (<受精後 5 時間) に受精後 1~8 日後 (dpf) まで曝露し、各 dpf 胚の Vtg1, Vtg2, ChgL, ChgH, アロマトラーゼ (CYP19a1b) および ER サブタイプ (ERα, ERβ1, ERβ2) 遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR で測定した。その結果、2 μM E2 を曝露した 3~8 dpf 胚の ChgL および ChgH の発現は対照区と比較して有意に増加した。しかし、Vtg など他の遺伝子の発現に変化は見られなかった。

表 1 メダカ胚および仔魚に対する EDCs の影響濃度

	影響濃度 (μM)		
	E2	NP	BPA
生存率			
14 日間 LC ₅₀ (胚)	3.4	2.7	60
96 時間 LC ₅₀ (仔魚)	9.4	2.0	58
孵化率			
LOEC (14 dpf 胚)	4.6	2.8	55
心拍数			
LOEC (14 dpf 胚)	2.3	2.8	110
エストロゲン様作用			
LOEC (7 dpf 胚)	≤0.00091	> 1.5	> 30
LOEC (9 dpf 仔魚)	≤0.00031	1.5	30
LOEC (12 dpf 仔魚)	0.00031	> 1.5	30
REP	1	2.1 × 10 ⁻⁴	1.0 × 10 ⁻⁵

E2, 17β-エストラジオール; NP, *p-n*-ニルフェノール; BPA, ビスフェノール A; LC₅₀, 半数致死濃度; LOEC, 最小影響濃度; REP, エストロゲン様作用の相対値。

次に、受精卵に各濃度の E2, NP, BPA をそれぞれ曝露し、7 dpf 胚、9 および 12 dpf 仔魚について遺伝子発現解析を行った。その結果、E2 (0.10–222 nM) に曝露した 7 dpf 胚、9 および 12 dpf 仔魚では、ChgL および ChgH 遺伝子の発現は濃度依存的に増加した。一方、Vtg1 および Vtg2 遺伝子の発現は、E2 曝露した 7 dpf 胚では変化が見られなかったものの、9 および 12 dpf 仔魚では有意な増加が見られ、Vtg の発生段階特異的な発現制御機構が示唆された。また、NP (0.09–1.5 μM) および BPA (1.8–30 μM) の最大濃度を曝露した 9 および 12 dpf 仔魚では、Chg 遺伝子発現の増加が見られた。これらの結果から、E2, NP および BPA の各遺伝子発現応答に及ぼす LOEC の最小値と、エストロゲン様作用の相対値 (REP) を算出したところ、それぞれ 1, 2.1 × 10⁻⁴, 1.0 × 10⁻⁵ となった (表 1)。これら REP は、既報 (Yamaguchi et al., 2005; Ishibashi et al., 2016) の雄メダカ成魚と同等であった。

以上のことから、メダカ胚および仔魚の FET 試験を用いて、EDCs の急性毒性に加えエストロゲン様作用も評価できる試験系を確立することができた。

5. おわりに

本稿では、エストロゲン様作用を示す EDCs の評価におけるメダカ胚および仔魚の Chg の有用性について紹介した。我々の最近の研究では、本評価系を妊馬由来で医薬品原料に使用されているエクインエストロゲン類に適用し、エクイリン、エクイレニンおよび

それら代謝物はメダカ胚 Chg 遺伝子発現を増加させ、エストロゲン様作用を示すことを明らかにした (Ishibashi et al., 2021) . これらの研究成果は、水環境中に存在する EDCs を含めた化学物質のエストロゲン様作用のスクリーニング評価系の高度化に加え、非摂食発達段階である胚／仔魚の適用により毒性試験における動物愛護・福祉にも貢献することが期待される。

最後に、共同研究者の皆様および本受賞の選考にあられた日本水環境学会中国・四国支部の関係各位にこの場をお借りして深く感謝申し上げます。

本研究は科研費（17H01914, 18K19884）の助成を受けたものである。

引用文献

- Boyce-Derricott J, Nagler JJ, Cloud JG. (2009) Regulation of hepatic estrogen receptor isoform mRNA expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*. 161: 73–78.
- Chakraborty T, Shibata Y, Zhou LY, Katsu Y, Iguchi T, Nagahama Y. (2011) Differential expression of three estrogen receptor subtype mRNAs in gonads and liver from embryos to adults of the medaka, *Oryzias latipes*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 333: 47–54.
- Colborn T, Vom Saal FS, Soto AM. (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*. 101: 378–384.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. (2009) Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*. 30: 293–342.
- 原彰彦 (2013) 魚類の卵形成タンパク質に関する免疫生化学的研究. *日本水産学会誌*. 79 : 300–310.
- 環境省 (2022) 化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応. -EXTEND 2022-.
- Ishibashi H, Hirano M, Matsumura N, Watanabe N, Takao Y, Arizono K. (2006) Reproductive effects and bioconcentration of 4-nonylphenol in medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*. 65: 1019–1026.
- Ishibashi H, Matsumura N, Hirano M, Matsuoka M, Shiratsuchi H, Ishibashi Y, Takao Y, Arizono K. (2004) Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquatic Toxicology*. 67: 167–179.
- Ishibashi H, Uchida M, Koyanagi A, Kagami Y, Kusano T, Nakao A, Yamamoto R, Ichikawa N, Tominaga N, Ishibashi Y, Arizono K. (2016) Gene expression analyses of vitellogenin, choriogenin and estrogen receptor subtypes in the livers of male medaka (*Oryzias latipes*) exposed to equine estrogens. *Journal of Applied Toxicology*. 36: 1392–1400.
- Ishibashi H, Uchida M, Hirano M, Hayashi T, Yamamoto R, Kubota A, Ichikawa N, Ishibashi Y, Tominaga N, Arizono K. (2021) *In vivo* and *in silico* analyses of estrogenic potential of equine estrogens in medaka (*Oryzias latipes*). *Science of the Total Environment*. 767: 144379.
- Ishibashi H, Uchida M, Temma Y, Hirano M, Tominaga N, Arizono K. (2020) Choriogenin transcription in medaka embryos and larvae as an alternative model for screening estrogenic endocrine-disrupting chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 193: 110324.
- Ishibashi H, Uchida M, Yoshimoto K, Imamura Y, Yamamoto R, Ikenaka Y, Kawai M, Ichikawa N, Takao Y, Tominaga N, Ishibashi Y, Arizono K. (2018) Occurrence and seasonal variation of equine estrogens, equilin and equilenin, in the river water of Japan: implication with endocrine-disrupting potentials to Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Pollution*. 239: 281–288.
- Stone R. (1994) Environmental estrogens stir debate. *Science*. 265: 308–310.
- Sumpter JP, Jobling S. (1995) Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*. 103: 173–178.
- Yamaguchi A, Ishibashi H, Arizono K, Tominaga N. (2015) *In vivo* and *in silico* analyses of estrogenic potential of bisphenol analogs in medaka (*Oryzias latipes*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 120: 198–205.
- Yamaguchi A, Ishibashi H, Kohra S, Arizono K, Tominaga N. (2005) Short-term effects of endocrine-disrupting chemicals on the expression of estrogen-responsive genes in male medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*. 72: 239–249.