

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11655

研究課題名(和文)メダカ尻鰭の二次性徴形質を用いた化学物質の内分泌かく乱作用検出法の開発

研究課題名(英文)Development of method to evaluate endocrine-disrupting potency of chemicals using secondary sex characteristics of anal fin rays in medaka

研究代表者

長江 真樹 (NAGAE, Masaki)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(環境)・教授

研究者番号：00315227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：目的：化学物質の持つ内分泌かく乱作用、特に男性ホルモン作用および女性ホルモン作用の両方を、同一生物(メダカ)を用いて外部形態から比較的簡便に検出可能な試験法を確立すること、およびその基礎的知見を得ること。

結果：メダカ尻鰭の雌特異的二次性徴形質である「鰭条先端分枝」に着目し、本形質が女性ホルモン特異的に形成誘導され、その形成数および形成進行の女性ホルモン濃度依存性が認められた。

結論：既に知られている、メダカ尻鰭の雄特異的二次性徴形質(乳頭状小突起)との併用により、上記目的を達成するメダカを用いた新規な生物試験法確立の目処が立つとともに、それを支持する基礎的知見が整備された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水環境における化学物質汚染の深刻化・多様化により、それが生態系に及ぼすリスクが増大している。化学物質の排水規制や環境中濃度規制に向けて、生物影響の把握が求められている。

本研究では、化学物質の持つ生物影響のうち、内分泌かく乱作用に焦点を絞り、試験生物として有用なメダカの二次性徴形質に着目し、それらを利用した新たな化学物質の性ホルモンかく乱作用を検出するための試験法確立を目指して基礎的知見を集積した。得られた結果は、試験法確立の基盤となり得る有効性を保持しており、新規試験法確立の目処が立った。本研究の成果は、化学物質の生物リスク評価分野に貢献できる点で学術的および社会的意義を備えるものである。

研究成果の概要(英文)：[Objective]: Research objective is to develop new in vivo experimental method to detect endocrine-disrupting potencies, especially in both androgenic and estrogenic potencies of chemicals, using morphological biomarkers of medaka (*Oryzias latipes*).

[Results]: In this research, "fork formation of anal fin ray", that is one of the secondary sex characteristics of female medaka, was used morphological biomarker for the detection of estrogenic potency of chemicals. Results of this research suggested that a number and the developing degree of this morphological feature increased by estrogenic stimulation in a dose-dependent manner.

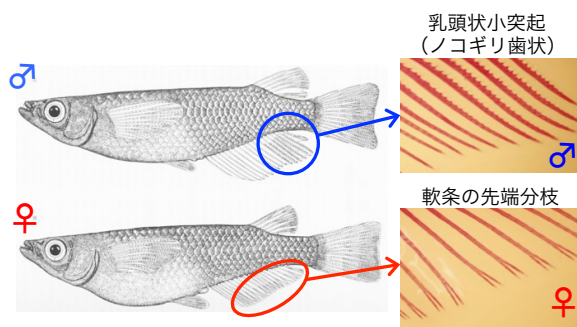
[Conclusion]: By the use female specific estrogenic biomarker "fork formation of anal fin ray" together with male specific secondary sex characteristics, papillary processes on anal fin rays of male medaka, a novel in vivo experimental method to detect both androgenic and estrogenic potencies of chemicals using same experimental animals (medaka) was developed.

研究分野：環境毒性学

キーワード：環境ホルモン 内分泌かく乱 バイオマーカー 二次性徴 メダカ

1. 研究開始当初の背景

メダカ (*Oryzias latipes*, ミナミメダカ) の成熟個体の尻鰭には、右の染色写真に見られるように、雌雄それぞれに特異的な形質が認められる。これら形質は、成熟個体にのみ認められ、未熟個体には存在しない。そのため、それぞれの性特異的な形質の形成には、男性ホルモンおよび女性ホルモンが関わっていると考えられる。



雄の尻鰭に形成される「乳頭状小突起」については、これまでも研究対象となっており、男性ホルモン誘導性であることが分かっている (Egami, 1954, Hamaguchi, 1978)。一方、雌の尻鰭に形成される「軟条先端分枝」について、その形成に関わる生理学的側面からの研究は、これまで皆無である。女性ホルモン誘導性か否かも不明である。

(話は転じて)・・・化学物質の中には、生物の内分泌機能に介入し、生態系全体に広く影響を及ぼすと考えられる「内分泌かく乱化学物質」が存在する。その中でも、分子構造上の類似性から、性ホルモン (女性ホルモンおよび男性ホルモン) 機能のかく乱を介して生物に悪影響を引き起こす可能性のある化学物質が見出されつつある。そのため、それら化学物質が起こしうる環境リスクを評価・推定するための *in vivo* 試験法の開発が求められている。

2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえ、本研究課題では、先ず、未だ不明のままである「メダカ尻鰭軟条の先端分枝が女性ホルモン誘導性であるか否か？」を明らかにし、基礎的知見を十分に集積した後、「メダカ尻鰭形質を用いた化学物質の性ホルモン作用評価系」の構築を目指す。また、雌の尻鰭での軟条先端分枝の分子メカニズム解明の端緒として、分枝が起こる際に特異的に発現する遺伝子群の探索を行う

前述したように、化学物質の持つ性ホルモン作用評価において、これまで有効なバイオマーカーを利用した幾つかの方法が確立されてきたが、その殆どが簡便ではなく、かつ、男性ホルモン作用と女性ホルモン作用の影響を、異なった試験生物を用いて行わなければならない現状にある。そこで本研究課題は、「同一生物種 (メダカ)」を用いて、両方の性ホルモン作用を「形態レベル」で評価可能な点において独創的であり、これを用いた評価法の利用価値は高いと考えた。

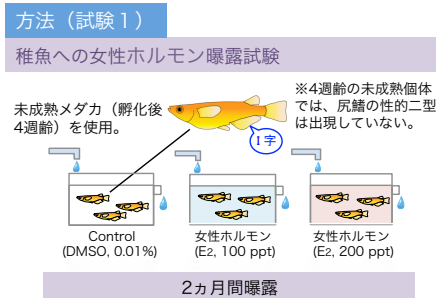
3. 研究の方法

・メダカ尻鰭軟条の先端分枝形成の女性ホルモン支配を明らかにするための曝露試験

以下の 2 つの曝露試験により、メダカ尻鰭軟条の先端分枝が女性ホルモン支配的に誘導されるか否について、明らかにした。

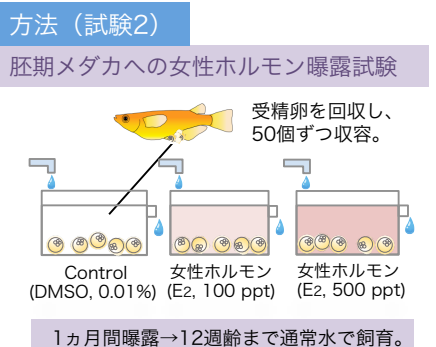
【試験 1】

尻鰭での性的二型 (乳頭状小突起および先端分枝) が認められない未熟なメダカ (孵化後 4 週齢) に対して女性ホルモン曝露を長期間 (約 2 ヶ月) 行い、本来は乳頭状小突起を形成し得る遺伝的雄の尻鰭で、軟条の先端分枝形成が誘導されるか否かを検証した。なお、遺伝的雄の判定は、DMY 遺伝子の PCR 法による検出により実施した。



【試験 2】

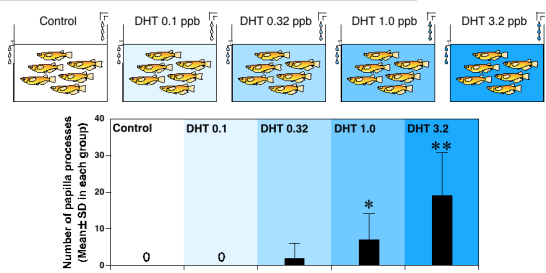
受精直後の卵に対して、4 週間の女性ホルモン曝露を行い、その後は通常水で約 2 ヶ月間飼育し、成魚となった段階で、何れの性特異的な形質が発現するのかを観察した。受精直後からの 4 週間には、メダカの性分化期が完全に含まれているため、適切な濃度の女性ホルモンの曝露により、遺伝的性に関わらず、多くの個体を機能的雌にすることが可能である。この際、遺伝的性と関係なく、女性ホルモン曝露により、軟条先端分枝形成がどのように起こるのかを調査した。



・尻鰭上の性特異的形質を用いた化学物質の性ホルモン作用検出法開発のための検討

尻鰭軟条の先端分枝が、女性ホルモンによって形成誘導されることが判明したため、それをバイオマーカーに用いた、化学物質の女性ホルモン作用を評価することが可能な *in vivo* 試験法開発の検討に着手した。

右図は、申請者らが過去に、メダカ尻鰭の乳頭状小突起数をバイオマーカーに、男性ホルモン作用を検出するための *in vivo* 試験を行った結果である。その際、メダカを用いた OECD テストガイドラインに定められた試験条件に準じて行い、グラフが示すような男性ホルモン濃度の増加と乳頭状小突起数の増加に、良好な相関関係が認められた。本項においても、同様の試験条件を適用し、軟条先端分枝数の女性ホルモン濃度依存性についてデータを収集し、本バイオマーカーを用いた検出における最適な女性ホルモン濃度範囲や曝露条件等を明らかにしたうえで、試験法としての利用を模索した。



・尻鰭軟条先端分枝形成の関連遺伝子群のクローニング

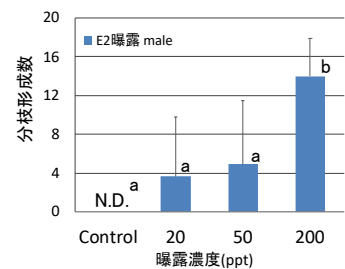
成熟メダカ雄の尻鰭では、男性ホルモンの刺激により、軟条上に乳頭状小突起が形成されるが、男性ホルモンにより、尻鰭細胞内で *Ief1* および *Bmp7* 遺伝子の転写が活性化されることが明らかとなっている (Ogino et al., 2014)。それら新生タンパク質の相互作用により、乳頭状小突起の形成が促進されることが示唆されている。

女性ホルモンにより形成誘導される軟条の先端分枝においても、女性ホルモンによって転写活性化が起こる特徴的な遺伝子が存在すると予想される。そのような「女性ホルモン特異的に尻鰭で新たに発現する遺伝子」の探索を行った。

4. 研究成果

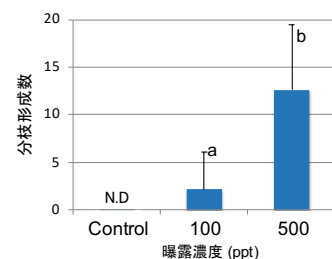
・メダカ尻鰭軟条の先端分枝形成の女性ホルモン支配を明らかにするための曝露試験

【試験1】二次性徴発現前の孵化後4~5週目のミナミメダカに対し、女性ホルモン(17β-エストラジオール, E2)を20, 50 および 200ppt の濃度で流水曝露により8週間曝露し、鰭条先端分枝形成と曝露したE2濃度の関係を明らかにした。その結果、E2を曝露された遺伝的雄における臀鰭鰭条の先端分枝数は、E2濃度依存的に増加し、最高濃度区である200pptでは、通常の遺伝的雌の成熟個体が持つ分枝形成数と同程度であった(右図)。また、E2を曝露された遺伝的雄における臀鰭鰭条の乳頭状小突起数は、E2濃度依存的に減少した。



E2曝露濃度と遺伝的雄の鰭条先端分枝数の関係【試験1】

【試験2】受精直後の卵にE2を100および500pptの濃度で4週間流水曝露し、その後は二次性徴発現が完了する孵化後12週齢まで通常飼育水で飼育し、臀鰭鰭条先端の分枝数をカウントした。その結果、E2 500pptで曝露した遺伝的雄は機能的雌に性分化・成熟し、臀鰭の先端分枝数は対照群である通常雄に比べて有意に高い値を示し、その数は通常の遺伝的雌の成熟個体が持つ分枝形成数と同程度であった。

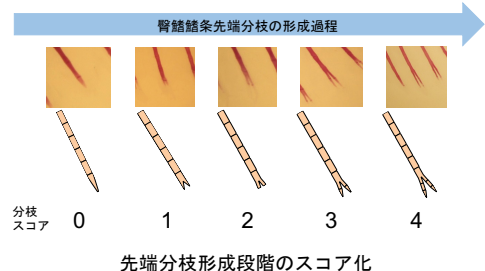


E2曝露濃度と遺伝的雄の鰭条先端分枝数の関係【試験2】

・尻鰭上の性特異的形質を用いた化学物質の性ホルモン作用検出法開発のための検討

メダカを用いた既存の OECD 試験法(OECD TG234 Fish Sexual Development Test)にほぼ準じて、受精卵から10週間、異なる濃度のE2を曝露し(50, 100 および 200ppt)、本試験法に記載された試験方法が、臀鰭鰭条先端分枝数をバイオマーカーに用いた女性ホルモン影響評価に適用可能か検討した。その結果、曝露したE2の濃度依存的に臀鰭鰭条先端分枝数の増加が認められ、OECD TG234の試験条件、特に10週間の曝露期間が本バイオマーカーの検出に十分有効であることが示唆された。

また上記試験結果から、鰭条分枝の進行の判定に際して「分枝スコア」を導入することで、より定量性の向上が見込まれたため、その導入を検討した。尻鰭形態の詳細観察により、鰭条分枝の進行を最大で5段階に分類可能であることを見出した(右図)。それまでは



先端分枝形成段階のスコア化

「分枝形成数」のみでの女性ホルモン作用評価に留まっていたが、より定量性の高い数的評価が可能となり、女性ホルモン作用強度の多少について、詳細な比較・差別化が可能となった。

・尻鰭軟条先端分枝形成の関連遺伝子群のクローニング

尻鰭軟条先端での分枝形成関連遺伝子を検索する目的で、遺伝的雄個体への女性ホルモン曝露により尻鰭で新たに発現する遺伝子の検出をサブトラクション法などにより試みたが、分枝形成に深く関連すると思われる遺伝子の検出には至っていない。

今後の課題

本研究課題により、メダカ雌雄の尻鰭軟条に形成される二次性徴形質の性ホルモン特異的誘導性を明らかにした。また、それらをバイオマーカーとして利用する、*in vivo* 曝露試験による化学物質の性ホルモン作用検出法を確立した。今後、本検出法の検出感度向上および曝露試験期間の短縮化のために、これら二次性徴発現に深く関連する遺伝子を見出し、遺伝子発現レベルでの定量化を達成することが極めて有効となり得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Song J, Nagae M, Soyano K	4. 巻 38
2. 論文標題 Standardization of plasma vitellogenin level for surveying environmental estrogen pollution using the Japanese common goby <i>Acanthogobius flavimanus</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Appl Toxicol	6. 最初と最後の頁 1018-1025
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jat.3610	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Song J, Nagae M, Takao Y, Soyano K	4. 巻 258
2. 論文標題 Field survey of environmental estrogen pollution in the coastal area of Tokyo Bay and Nagasaki City using the Japanese common goby <i>Acanthogobius flavimanus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Pollution	6. 最初と最後の頁 113673
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.envpol.2019.113673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加島未奈子、飯野大輔、今西颯、柴田南、高尾雄二、長江真樹
2. 発表標題 メダカ臀鰭二次性徴形質のEDCs/バイオマーカーへの利用
3. 学会等名 環境ホルモン学会・第21回研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minako Kajima, Daisuke Iino, Tatsuru Imanishi, Minami Shibata, Masaki Nagae
2. 発表標題 Application of morphological sexual differentiation on anal fin rays in medaka (<i>Oryzias latipes</i>) for EDCs biomarker
3. 学会等名 The 15th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaki Nagae, Daisuke Iino, Madoka Moriwaki, Kanako Yamashiro, Yuji Takao, Norihisa Tatarazako and Taisen Iguchi
2. 発表標題 Comparison of response sensitivity to steroid hormones between two species of medaka, Minami-medaka (<i>Oryzias latipes</i>) and Kitano-medaka (<i>Oryzias sakaizumii</i>)
3. 学会等名 The 21th UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyoshi Soyano, Masaki Nagae
2. 発表標題 Influence of environmental estrogens on fish reproduction in Japanese coastal waters
3. 学会等名 The 21th UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長江真樹、柴田南、征矢野清、高尾雄二
2. 発表標題 下水処理後の排水に含まれる粒子状物質による性ホルモン遮断効果
3. 学会等名 第28回環境化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長江真樹、柴田南、西哲平、征矢野清、高尾雄二
2. 発表標題 魚類の外因性性ホルモン取り込みに及ぼす下水処理排水中粒子状物質の遮断効果
3. 学会等名 第22回環境ホルモン学会研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Nagae, Daisuke Iino, Madoka Moriwaki, Kanako Yamashiro, Yuji Takao, Norihisa Tatarazako and Taisen Iguchi
2. 発表標題 Comparison of response sensitivity to steroid hormones between two species of medaka, Minami-medaka (<i>Oryzias latipes</i>) and Kitano-medaka (<i>Oryzias sakaizumii</i>)
3. 学会等名 The 22th UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kiyoshi Soyano and Masaki Nagae
2. 発表標題 Continuous field survey of environmental estrogens (EEs) pollution and study on combined effects of EEs and pharmaceuticals on fish reproduction
3. 学会等名 The 22th UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	高尾 雄二 (TAKAO Yuji) (20206709)	長崎大学・水産・環境科学総合研究科(環境)・教授 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------