

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12828

研究課題名（和文）新たな生態毒性試験法の開発 ～生態毒性学と分子生物学の融合～

研究課題名（英文）Development of EDC activity detection assay in Japanese medaka

## 研究代表者

堀江 好文 (Horie, Yoshifumi)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：60785137

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）：本研究では、男性ホルモン作用のある化学物質のばく露によって魚類の「胚期」にその発現が誘導され、かつ、性決定遺伝子カスケードである特定の遺伝子を指標とすることで、化学物質の「性別」への影響を予測する、高解像度かつ簡便な新たな生態毒性試験法の開発を目的とした。その結果、メチルテストステロンばく露によってGsdF遺伝子の発現が誘導されたXX個体は遺伝的メスから機能的オスへと性転換していた。以上の結果から、GsdF遺伝子は化学物質の内分泌かく乱作用を予測する有効な遺伝子マーカーとなる可能性が示唆された。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の化学物質のリスク管理は、OECD TGなどに基づいて行われているが、新規化学物質の届出件数は年々増加しており、従来の方法だけでは管理しきれないのが現状である。本研究で開発する新たな試験法は、GsdF遺伝子を指標とすることで、化学物質の内分泌かく乱作用を予測することが可能である。これにより、試験期間が8日間（従来法では約70日間の試験期間が必要）という短期間で化学物質の生態リスクを評価できるため、今後の多種多様な新規化学物質のリスク管理に対応することが可能となる。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we examined whether gsdF expression at the embryo stage is useful for predicting EDC impact on gonadal sex differentiation.

When fertilized medaka eggs were exposed to methyltestosterone (MT), sex reversal from genetic female to phenotypic male were observed. At hatching, MT exposure induced gsdF expression in XX embryos. The MT concentration at which gsdF expression was induced was equal to that at which sex reversal was induced. These results indicate that expression of the gsdF gene at the embryonic stage in medaka is a useful biomarker for predicting the impact of EDCs on sexual differentiation.

研究分野：生態毒性学

キーワード：メダカ GsdF バイオマーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

化学物質は、食品や農薬、医薬品、化粧品などあらゆる所で使用されており、人類の生活に必要不可欠である。しかし、その半面で化学物質の流出汚染による自然環境や生態系の破壊をもたらしてきたことも事実である。我が国において、化学物質やその混合物の生態毒性の評価を目的とした生態毒性試験では、化学物質の「致死影響」、「生殖影響」、「性への影響」など、種の保全に直接係る影響を明らかにすることを目的としており、経済協力開発機構(OECD)で国際的に同意された試験法(OECDテストガイドライン)に基づいて行われている。

最近の OECD の国際会議では、魚類を用いた OECD テストガイドラインにおいて供試魚数の制限や実験動物の取り扱い方に関する議題など、動物愛護に関する議題が多く扱われている。また、ヨーロッパでは、魚類の「胚期」は生物ではなく、胚期を用いた試験は *in vitro* 試験として定義されていることから、OECD の国際会議においても動物愛護の観点から魚類の「胚期」のみを用いた試験が強く推奨され始めている(EU, 2010)。しかし、現状の「胚期」のみを用いた試験法では化学物質の「致死影響」を評価する試験法しか確立されておらず、そのため、「生殖影響」や「性への影響」などを評価する新たな試験法の開発が強く望まれている(図1)。

近年、申請者は性ホルモンによる「性」への影響は、Gsdf という精巣分化決定遺伝子が鍵遺伝子であり、Gsdf は「胚期」からその発現が誘導されることを、世界で初めて見出した。Gsdf の発現が「性への影響」のための鍵遺伝子として働くという新たな発見は、生態毒性学と分子生物学を融合した 21 世紀の新たな生態毒性試験の開発に繋がることが期待される。

### 2. 研究の目的

最近、生態毒性学分野では、動物愛護の観点から魚類を用いた生態影響試験を行う際、ふ化前の「胚期」のみを用いた試験を行うよう強く推奨されている。しかし、「胚期」のみを用いた試験法はほとんど確立されていないのが現状である。本研究では、化学物質ばく露によって「胚期」にその発現が誘導される Gsdf 遺伝子に着目することで、従来の生態毒性学に分子生物学的手法を融合した、より簡便かつ高精度となる 21 世紀の新たな生態毒性試験法の開発を目的とする。Gsdf 遺伝子の発現パターンに着目することで、化学物質の「性への影響」を予測することが可能となり、動物愛護に配慮した 21 世紀の新たな生態毒性試験として世界中で広く用いられる試験法となることが期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 従来の生態毒性試験(試験生物:メダカ)

既に、Gsdf 遺伝子の発現が誘導されることが判明しているメチルテストステロン(男性ホルモン作用)を用いて、「生殖影響」、「性への影響」を明らかにする。

・「最高濃度の設定」 : 魚類の胚・仔魚期における短期毒性試験(OECD TG No.212、生物試験期間; 14 日)を行い、メチルテストステロンの半数致死濃度を明らかにすることで、生態毒性試験に用いる濃度設定を調査する。(OECD, 1998)。

・「性への影響」 : メダカを用いた魚類性発達試験(OECD TG No.234、生物試験期間; 2 ヶ月)を行うことで、メチルテストステロンの性への影響の最小影響濃度と無影響濃度を算出する(OECD, 2011)。

本試験では、メチルテストステロンばく露されたメダカの生殖腺の組織学的観察を行い、卵精巣や性転換の発生の有無を明らかにする。

#### (2) Gsdf 遺伝子の発現パターンの検討

・「遺伝的性判別」 : メチルテストステロンばく露したメダカ胚(stage. 38; ふ化直前)を、PCR 法を用いて遺伝的な性判別を行う。

・「Gsdf 遺伝子発現」 : Total RNA 抽出・cDNA 合成後、リアルタイム PCR 法を用いて Gsdf 遺伝子の発現誘導の最小影響濃度と無影響濃度を算出する。

#### (3) 新たな生態毒性試験法の開発検討

従来の生態毒性試験で得られた各観察項目の最小影響濃度・無影響濃度と Gsdf 遺伝子の発現誘導の最小影響濃度・無影響濃度を関連解析することにより、Gsdf 遺伝子を指標とした生態影響試験の開発を検討する。

### 4. 研究成果

魚類の胚・仔魚期における短期毒性試験の結果から、メダカを用いた魚類性発達試験の試験濃度は、対照区、32、100、320、1000、3200 ng/L に設定した。生物試験に使用した試験水は、毎週、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて定量した。その結果、平均実測濃度は 26、63、200、736、2620 ng/L であった。対照区は検出下限以下であった(表1)。

表 1 試験液中の被験物質濃度

/

試験期間中の死亡率について検討した結果、全ての濃度区で対照区と比べて有意な死亡率の増加は認められなかった。

次に、生殖腺の組織学的観察を行い、卵精巢や性転換(遺伝的メス 機能的オス)の発生の有無について検討した結果、26 ng/L 濃度区においても全ての個体が遺伝的メスから機能的オスへと性転換していた(図1)。対照区では、異常な生殖腺を有していた個体は認められなかった(図1)。

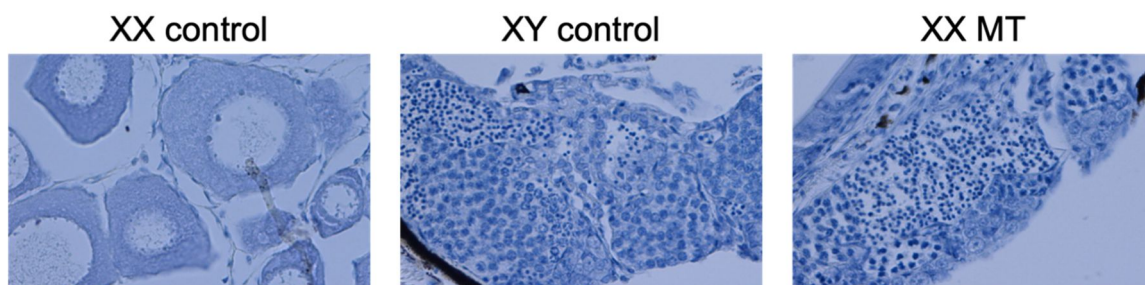


図1 生殖腺の組織学写真

*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて *gsdf* 遺伝子の発現パターンを調べた結果を図2に示す。その結果、遺伝的メスから機能的オスへと性転換が誘導される際、精巢分化に重要な遺伝子である *Gsdf* 遺伝子の発現が誘導されることが明らかとなった(図2)。

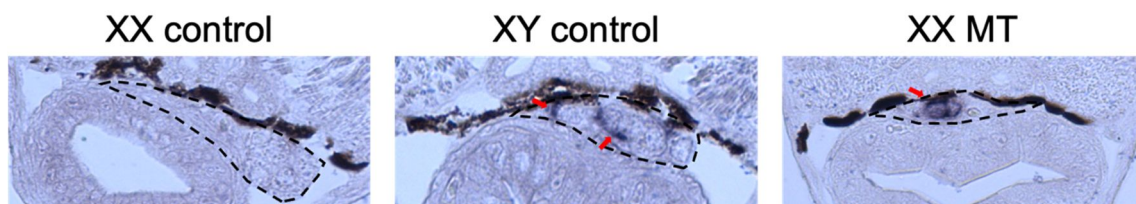


図2 *gsdf* mRNA の *in situ* ハイブリダイゼーションの生殖腺の組織学写真

本研究によって、内分泌攪乱作用のある化学物質をメダカ胚にばく露した場合、*Gsdf* 遺伝子の発現パターンが動くことが確認されている。この驚異的なデータは、胚期の *Gsdf* 遺伝子を指標とすることで、化学物質の内分泌攪乱作用や最小影響濃度、無影響濃度を正確に予測できる生態毒性試験法開発の初の成功例となることを示している。本研究で開発した新たな生態毒性試験法は、分子生物学的手法を利用したこれまでに成功例のない最先端の試験法となり、今後の多種多様な新規化学物質のリスク管理に対応できる新たな手法となる。さらに、内分泌攪乱物質を感度よく検出でき、かつ *Gsdf* 遺伝子の変動を簡便かつ安価に解析できるバイオモニタリングメダカを作成することで、環境水中に含まれる内分泌攪乱物質の有無を簡便に判定できるスクリーニング手法を構築することができる。その結果、生物の生息環境を多種多様な化学物質汚染などから守ることができ、将来の生物多様性(種)の保全に役立つことができる。そのため本試験法は、次世代の新たなスクリーニング手法として世界的に広く用いられることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Horie Yoshifumi, Yamagishi Takahiro, Yagi Ayano, Shintaku Yoko, Iguchi Taisen, Tatarazako Norihisa	4. 巻 39
2. 論文標題 The non steroidal anti inflammatory drug diclofenac sodium induces abnormal embryogenesis and delayed lethal effects in early life stage zebrafish ( Danio rerio )	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 622 ~ 629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jat.3752	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 該当する

1. 著者名 Horie Yoshifumi, Kanazawa Nobuhiro, Yamagishi Takahiro, Yonekura Kei, Tatarazako Norihisa	4. 巻 101
2. 論文標題 Ecotoxicological Test Assay Using OECD TG 212 in Marine Java Medaka ( <i>Oryzias javanicus</i> ) and Freshwater Japanese Medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology	6. 最初と最後の頁 344 ~ 348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00128-018-2398-1	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 該当する

1. 著者名 Horie Y, Yamagishi T, Shintaku Y, Iguchi T, Tatarazako N.	4. 巻 203
2. 論文標題 Effects of tributyltin on early life-stage, reproduction, and gonadal sex differentiation in Japanese medaka ( <i>Oryzias latipes</i> ).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 418-425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemosphere.2018.03.135.	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----