

ENDOCRINE DISRUPTER NEWS LETTER

October 2023
Vol. 26 No. 2

Japan Society of Endocrine Disrupter Research
日本内分泌攪乱物質学会(旧 環境ホルモン学会)

<http://www.jsedr.org/>

目次

巻頭言..... 1

INFORMATION.....10

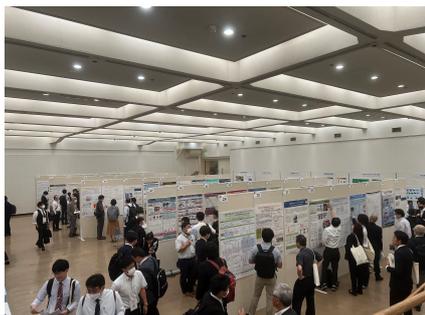
研究最前線 2

第2号

巻頭言



弘前大学大学院
保健学研究科



今年度の第25回研究発表会は、昨年度に引き続き、第2回環境化学物質3学会合同大会として5月29日から6月2日(29日は公開シンポジウムのみ)にかけて徳島で開催されました。本号ならびに次号では、この大会の様子をお届けいたします。

報告に先立ちまして、このたびの合同大会開催にあたり、実行委員としてご参画くださいました先生がた、多くのご助言をくださいました前大会の大会長の征矢野先生、そしてご参加くださいましたすべての会員の皆さまに厚く御礼申し上げます。

第2回大会では、前回の大会の反省点を踏まえて各学会を超えて議論と改善がされました。まだまだ改善の余地はあるものの、おかげさまで大変活発な議論や意見交換の様子が見られ、大会後のアンケートでも合同開催に前向きな意見を多くいただきました。また、私の個人的なテーマとしては「多様性」と「若さ」を意識してのプログラム構成をお願いしていました。プログラム担当の先生がたには大変ご迷惑をおかけしましたが、本学会の「色」を示すことができたのではないかと考えています。研究発表会は、次年度は本学会での単独開催、また、他学会との共同開催の予定などありますが、前回、今回の合同大会を通じて、今後の本学会の活動にも新たな刺激として一定の役割を果たすことができたのではないかと考えております。

さて、本号および次号では、第2回大会で本学会が企画・開催しました2つの特別企画、1つの重要テーマセッションの演者の先生がたからいただきましたご寄稿と、森田賞を受賞された皆さまの記事を紹介いたします。少しでも大会の様子を感じていただけますと幸いです。

Human biomonitoringの必要性

姫野誠一郎
昭和大学薬学部

我が国において大気汚染物質などに関する環境モニタリングは制度化されて継続的に実施されている。一方、日本人の体内にどのくらいの化学物質が蓄積しているのかに関するHuman Biomonitoring (HBM) はほとんど実施されていない。

HBMは、「対象集団の生物学的試料を採取し、その中の汚染物質、代謝物、および生物学的影響に関する指標の濃度を系統的に連続測定、あるいは繰り返し測定することで、対象者における曝露レベルと健康リスクを、基準レベルとの比較によって把握し、必要な場合には、曝露レベルと健康リスクを低減する活動につなげることを目的とする」と定義される¹⁾。最も典型的なHBMの例は米国におけるNHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) である。NHANESでは2年ごとに5,000人以上の性・年齢・人種・地域の異なる対象者について血液中・尿中の300種類以上の化学物質を測定している。

労働衛生の現場でも、作業環境中濃度の測定だけでなく、生体試料を用いた生物学的モニタリングが行われている。鉛やベンゼンを扱う作業者を対象に、古くから血液や尿を用いた曝露レベルと健康影響の把握が行われてきた。自動車排ガスによる鉛の大気汚染が問題となっていた時期に、住民の血液検査を行ったところ、作業現場で懸念されていたのと同様の健康影響が見つかり、これが欧米において環境由来の鉛曝露レベルとその健康影響を血液試料を用いてモニタリングするHBMのきっかけとなったといわれる¹⁾。

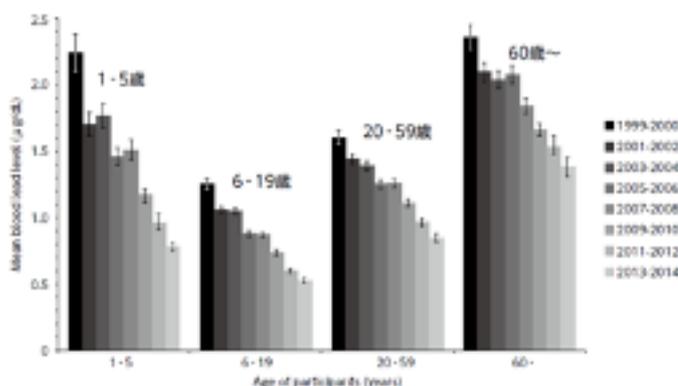


図1 米国における血中鉛濃度の年齢群別経年変化²⁾

自動車排ガスによる鉛の大気汚染がなくなった後、低レベルの鉛曝露と幼児の脳神経系の発達との関係が懸念されるようになった。NHANESのデータにより、確かに2000年前後には、1-5歳の血中鉛濃度が成人よりも2倍近く高かったことがわかる(図1)。しかし、血中鉛濃度はいずれの年齢群でも経年的に低下し、1-5歳群と成人の血中鉛濃度にほとんど差がなくなってきた。では、我が国における状況はどうか? エコチル調査により2015年に測定した母親の血中鉛濃度が報告されているが、それ以外にはほとんど情報がないのである。大規模なHBMを実施して、有害化学物質の体内レベルを継続的にモニタリングしている国と、そのようなデータを持たない国の環境政策は同じものにはなりえないだろう。図1のデータは、何らかの環境政策が実施された際の効果を測るうえでもHBMが有用であることを示す。

HBMが満たすべきと考えられる要件を列挙する。

1. 対象者の地域性や年齢構成が集団全体の状況を網羅的に反映している
2. 曝露レベルを経年的に追跡している
3. 健康・疾病情報も収集し、曝露情報との関連性を解析できる
4. 栄養素の摂取状況も把握し、環境汚染物質との複合影響を解析できる
5. 研究者や行政の担当者がデータを利用できる

エコチル調査はHBMの一種で特に上記の3が優れているが、母親と子供を対象としているため、性・年齢別構成の網羅性を欠く。エコチル調査で何らかの興味深いデータが出たときに、非妊娠女性ではどうか、男性や他の年齢群ではどうかを比較するレファランスとなるデータがないのである。実は、環境省がダイオキシン類や重金属についてHBMを実施しているが、n数が100前後と少ない。現在、先進国で大規模なHBMを実施していないのは日本だけである。我が国においても、大規模なHBMが実施されることが望まれる。

1) J. Angerer et al., Int. J. Hyg. Environ. Health, 210, 201-228 (2007)

2) M. F. Tsoi et al. Am. J. Med., 129, 1213-1218 (2016)

リポドミクスを応用したアレルギー性疾患の病態解明と診断・治療への応用

村田幸久

東京大学大学院農学生命科学研究科

獣医薬理学研究室・放射線動物科学研究室・食と動物のシステム科学研究室

【背景】

食物アレルギーや花粉症、アトピー性皮膚炎、喘息などのアレルギー性疾患を患う患者さんの数は年々増加しており、現在では国民の3分の1が何らかのアレルギー性疾患にかかっていると言われております。これらの疾患の増加要因として、生活環境の変化が挙げられます。具体的には、幼少期の微生物への暴露の減少（衛生仮説）や、食生活の近代化による腸内細菌叢の乱れなどが考えられています。しかし、まだ解明されていない点も多く、患者数を減らすための新たな方法の提案が求められています。

細胞膜などから切り出される脂肪酸によって代謝・産生され、生理活性を持つ脂質代謝物を「生理活性脂質」と呼びます。代表的な生理活性脂質としては、炎症反応を引き起こすプロスタグランジンやロイコトリエンが知られていますが、私たちの体には、まだ明らかにされていない生理活性脂質も含めて非常に多くの脂肪酸代謝物が存在することが明らかになってきました。これらの産生過程を観察することで、いつ、どこで、どのような生体反応が起こっているのかを把握することができます。質量分析装置は環境分析にも広く利用されており、生体内で産生される生理活性脂質の網羅的な濃度測定（リポドミクス）にも応用することができます。

【研究発表内容】

私たちの研究室では、アレルギー性疾患の増加原因に加えて、適切な診断・管理技術の開発や「食べて直す」アプローチを実現するため、生理活性脂質の探索にリポドミクス技術を応用した研究を進めてきました。本講演では、以下の項目について紹介しました。

i) 新規の抗炎症作用を持つ生理活性脂質の探索

まず、抗炎症作用を持つ生理活性脂質を見つけるために、薬物誘発性の腸炎モデルマウスを作成し、その結腸組織中に産生される脂質メディエーターを、質量分析装置を用いて網羅的に解析しました。その

結果、EPA（エイコサペンタエン酸）の代謝産物である5,6-dihydroxy-8Z,11Z,14Z,17Z-eicosatetraenoic acid（5,6-DiHETE）という脂質の組織中濃度が、腸炎の回復期に上昇していることがわかりました[1]。この脂質の生理活性を探索した結果、5,6-DiHETEの投与が非選択的なカチオンチャネルであるTRPV4の活性を抑制することにより、血管内皮細胞へのカルシウム流入を抑制し、炎症における血管透過性の亢進を抑えることを発見しました[2][3]。さらに、*in vivo*の実験において、5,6-DiHETEの投与が腸炎の回復を促進したり、アレルギー性結膜炎を抑制することが明らかになってきました[4]。

ii) 尿を用いたアレルギー診断技術の開発

さらに、小さな子供からの採血を回避し、食物アレルギーの診断を可能にするために、尿中の脂質代謝物をバイオマーカーとして探索しました。まず、マウスを用いた食物アレルギーモデルを作成し、尿中に排泄される脂質メディエーターを、質量分析装置を用いて網羅的に解析しました。その結果、アレルギーを引き起こす肥満細胞が大量に産生するProstaglandin D2の代謝産物であるtetranor-PGDMの濃度が、食物アレルギーの症状の程度に依存して上昇することを発見しました[5]。さらに、他のアレルギー疾患や化学物質誘発性の腸炎のモデルマウスではこの尿中濃度が上昇しないことや、ヒトの食物アレルギー患者の尿中のtetranor-PGDM濃度が健常者や他のアレルギー疾患の患者と比較して有意に高いことがわかりました[6][7]。このため、現在ではこのバイオマーカーを実用化するための研究を進めています。

【参考文献】

1. Hamabata T, et al. *J Lipid Res.* 2018 59(4):586-595.
2. Hamabata T, et al. *J Lipid Res.* 2018 59(10):1864-1870.
3. Kobayashi K, et al. *FASEB J.* 2021 35(4):e21238.
4. Takenouchi S, et al. *Int J Mol Sci.* 2021 22(17):9295.
5. Maeda S, et al. *Sci Rep.* 2017 15;7(1):17687.
6. Inagaki S, et al. *J Allergy Clin Immunol.* 2018 142(5):1634-1636.e10.
7. Inagaki S, et al. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021 (11):4164-4166.e2.

大規模血液メタボロミクスによる健康評価・疾患解析への取り組み

北 芳博

東京大学大学院医学系研究科 ライフサイエンス研究機器支援室

脂質は生体の構成成分やエネルギー源として重要であるだけでなく、脂質メディエーターなどの情報伝達物質としての役割など様々な形で生理機能に関わっており、疾患の発症や進展にも関係が深い。疾患リポドミクスは生体内に含まれる脂質や関連物質を網羅的に検出・解析することにより病態の解明やバイオマーカー、予測モデルの開発などを目指そうとする研究分野である。

我々はこれまで、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS) システムを用いて微量の脂質メディエーター類を高感度に一斉定量するワイドターゲット解析法の開発を行ってきた。この計測技術はリン脂質類や中性脂質などの解析にも応用することが可能で、現在はより広範囲の脂質代謝物を標的として臨床検体などの解析を行っている。大規模な臨床検体の解析を成功させるためには、測定により得られた膨大なデータを効率的に処理・解析する技術も重要である。我々はワイドターゲット測定により得られる膨大なデータを効率的に処理するための独自のソフトウェア、TRACESを開発した¹⁾ (図1)。発表の前半では、分析法の技術的な背景とともに疾患解析への応用例について紹介した。

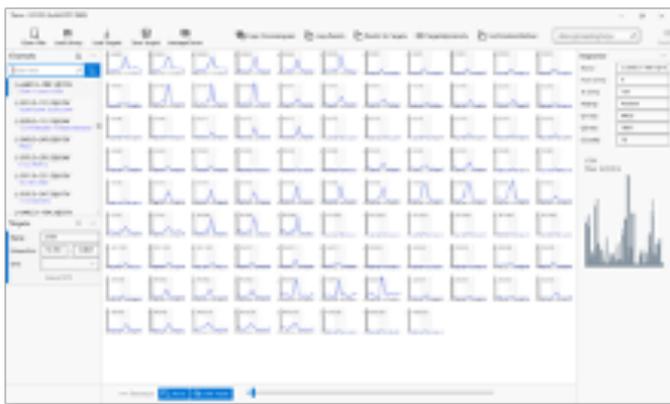


図1. LC-MRM-MSデータブラウザ「TRACES」

臨床検体を用いた疾患オミクス解析においては、解析規模 (データ数) は極めて重要である。様々な患者背景の影響を受ける臨床検体の解析データにおいて真に疾患に関連した情報を抽出するためには、多くの症例を含むデータセットが必要となるが、必ずしも容易ではない。実際に解析可能な検体数は解析

スループットにより制約を受ける。また、特定の疾患を対象とする場合、例数が数十ないし百程度しか入手できないことも多い。

スループット向上を目指して、我々は検体あたり3分の高速グラジエントクロマトグラフィーにイオンモビリティ-Q-TOF型質量分析計を組み合わせた測定系を構築し、プロファイリングや差分解析における有効性を検証した。その結果、スループットと情報量は緩やかなトレードオフの関係にあり、ハイスループットなディファレンシャル解析が可能であることが確認できた。

検体数の問題については、特定の疾患に限定せず、多数の検体を測定することで、幅広い臨床的背景を有する大規模な母集団を標的とするデータセットの解析に取り組んでいる。このアプローチでは電子カルテ上の曖昧さを含む情報を利用する点などに注意が必要であるが、疾患横断的に解析することで、各種疾患や健康状態を相対的に評価できる可能性があることが期待される。我々は、クロマトグラフィー分離を行わず (ダイレクト注入)、1検体1分のスループットで1万検体以上のイオンモビリティマススペクトルを取得している (図2)。

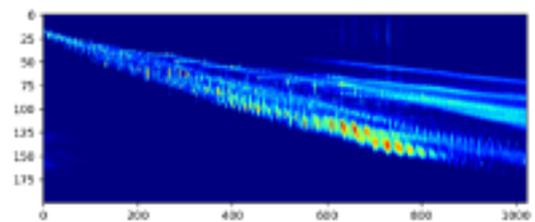


図2. イオンモビリティマススペクトルの例

大規模なスペクトルデータセットの解析方法として機械学習は重要なアプローチの一つである。予備的な解析では、例えば性別のような比較的簡単な患者属性については比較的シンプルな畳み込みニューラルネットワークを用いてモデル化可能であるという感触が得られていることを紹介した。疾患の解析はより複雑であるが、今後さらに多くのデータを用いることで、スペクトルから疾患や健康状態を読み取ることができるようになるかもしれない。

1) Kita, et al. *Metabolites* 12, 354 2022. doi:10.3390/metabo12040354

バイオモニタリングにおける化学分析

上山 純

名古屋大学大学院医学系研究科総合保健学

ヒトのバイオモニタリング(Human biomonitoring, HBM)あるいはバイオリジカルモニタリングは、ヒトの尿や血液中から化学物質やその代謝物、関連する付加体等を定性・定量することで、化学物質の曝露レベルを評価する手法である。食事や環境中の化学物質量から曝露量を評価する方法と比べて、HBMではさまざまな経路(経口、経気道および経皮的曝露)から実際に人体に吸収された化学物質量を個人レベルで推定できることが特徴の一つである。特に尿によるHBMは対象者への負担も少ない点でより有益な方法である。今後、測定法の高感度化、簡便化および低コスト化がさらに進めば、さらに多くの疫学研究および労働衛生学研究に応用されることが予想され、化学物質への曝露に起因する健康影響のリスク評価やその管理に大いに貢献できる可能性がある。

いわゆる農薬は、農業現場で病虫害予防に使用されているほか、衛生害虫や不快害虫の防除に汎用される化学物質群であり、身近な化学物質として生活環境中に存在している。これらの物質は、職業的な曝露、事故時の曝露、環境由来の曝露、製品由来の曝露によって人体に吸収された場合、いくつかのバイオマーカーの化学分析により、その曝露量や影響の大きさを推定できる。図1に示すように化学物質と生体分子との反応という視点からバイオモニタリング(あるいはバイオマーカー)を分類することができる。a) 生体試料中化学物質やその代謝物をモニタリングする場合、b) 化学物質がヘモグロビンやアルブミン等に結合した付加体をモニタリングする場合、c) 直接的あるいは間接的な化学物質の影響によるタンパク質や遺伝子等の機能異常をモニタリングする場合に分けられる。我々はこれまでにa)を主な測定対象として農薬曝露のHBMに関わる研究を進めてきた。

世界中で汎用されている殺虫剤(農薬および医薬品)の一つに有機リン系殺虫剤がある。近年、測定機器の性能やアプリケーションの向上により尿中に排泄される有機リン系殺虫の代謝物ジアルキルリン酸(DAP)を高感度に測定できるようになり、小児や妊婦を含む一般生活者集団からも殺虫剤曝露レベルをモニタリングできるようになった。この技術を疫学調査における曝露評価に応用し、近年では低濃度の有機リン系殺虫剤曝露と各種疾患(精神・神経疾患、代謝疾患等)との関連を示唆する証拠も蓄積されつつある(Bouchardら, 2010; Dingら, 2023)。

尿中DAP測定の歴史をさかのぼると、世界に先駆けて国内試薬メーカーが1980年代初めに dimethylphosphate, diethylphosphate, dimethylthiophosphate, diethylthiophosphateの塩類を合成・標準物質として市販化し、これを利用して尿中測定法の確立と職業的曝露評価に成功している(Saito et al., 1984)。当時はGC-FPDを用いた分析であり、その感度は1 mg/L程度であったが、質量分析計の普及、分離カラムの高性能化、各種分析工程における吸着の低減等によって、現在では1 mg/L以下の検出下限値となっている。

今後蓄積される測定データをより有効に利用するためには、データ比較可能性についての国内、ひいては国際的な検討が必要である。これらの問題については、HBMの精度保証・管理に関する最新の知見をまとめたKobayashiら(2017)の報告を参照されたい。

私が考えるHBMの喫緊の課題の一つとして、「測定コスト」があり、安くHBMを市民に提供するための革新的な測定技術の開発が必要である。近年、腸内細菌叢解析のコストが劇的に安くなり、その結果として一般市民の意思での受検が実現したのと同じように、一般市民のHBM受検は、環境化学物質への曝露を予防・軽減に役立つ取り組みである。

- Bouchardら, Pediatrics. 2010. 125. e1270-7.
- Dingら, EHP. 2023. 131. 47009
- Saitoら, Sangyo Igaku. 1984. 26. 15-21.
- Kobayashiら, JSBMS Letters. 2017. 42. 5-15.

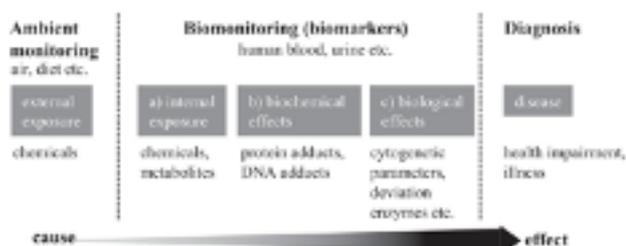


図1 化学物質の体内曝露とバイオマーカー類の関係[Angererら, 2002]

発達神経毒性に関わるOECD試験法ガイドライン改定の道筋と課題

小島 肇夫^{1,2,3}¹ 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部、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、³ 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

昨今、世界的にも発達障害の幼児や児童が増えており、化学物質や農薬による発達神経毒性の懸念が示唆されている。経済協力開発機構（OECD）でも本件を重要な課題として位置づけている。とはいえ、欧米を中心に進む動物福祉の影響を鑑み、新たな動物実験の開発や試験法ガイドライン（TG）であるTG426発達神経毒性試験¹⁾の改良を行うという提案は難しい状況にある。主に、有害性発現機構（AOP）に準じた発達神経毒性試験の代替試験法（ヒト細胞を用いた*in vitro*試験やゼブラフィッシュを用いた試験など）を開発し²⁾、スクリーニングや作用機構の解明に利用しようとする試みが進んでいる。

それを担うOECDのDevelopmental Neurotoxicity (DNT) *in vitro* battery testing (IVB) 専門家委員会はスクリーニング試験として17種の*in vitro*試験を挙げ、これらの試験法を用いたDNT評価法のinitial guidance document (GD)を作成した³⁾。2023年7月、OECDがこの文書を公開したことを受けて、DNT-IVBの専門家委員会において今後のステップについて協議されている。特に、17種にもわたる*in vitro*試験の再現性をどう確保して、医薬品開発業務受託機関（CRO）等に技術移転すればいいのか、施設間差が認められるゼブラフィッシュの位置づけをどうするのかなどが議論され、以下のような今後の具体的な活動計画が決まった。

- ・試験法の施設間再現性確保のための方向性を示す。
- ・神経前駆細胞（NPC）アッセイに用いる細胞に懸念があることから、ヒトiPS由来神経前駆細胞、あるいは不死化したヒト神経前駆細胞の利用を検討する。
- ・DNTに対する薬物動態（PBPK）モデルの利用可能性を検討する。
- ・各試験法の技術移転を念頭に置いて、DNT陽性対照、陰性対照となる化学物質リスト（それぞれ5種類程度）を作成する。
- ・ゼブラフィッシュ試験は施設間差が認められるため、現状では、GDに記載されていない。今後、施設間再現性と物性との関連、*in vitro*試験との比較などを実施する。

発達神経毒性の代替試験法における評価検討は始まったばかりであり、かつ仮に何らかの*in vitro*試験が成立したとしても、有害性の同定しかできない。現状解決に必要な種々の化学物質発達神経毒性のリスク評価にはほど遠い未来が想定される。

このような状況下、TG426発達神経毒性試験の見直しに関するシンポジウム「動物行動研究の先端から発達神経毒性試験の未来を考える」が環境化学物質学会合同大会2023(令和5年5月、徳島)にて企画されたことを高く評価したい。繰り返しになるが、OECDでは動物実験数の削減を目標に掲げており、世界が有用と認めない限りは、問題が多いとされているTG426の改定でさえ、簡単には容認しない方針である。

しかし、今一度、TG426の問題点の検証を含め、動物実験の在り方を再検討する必要がある。そのためには、科学的かつ行政的にも有用であるとの結果と論理構築をもとにした国際的な情報発信が重要であると考えている。

【参考文献】

1. OECD (2007), Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study
2. OECD, Adverse Outcome Pathways, Molecular Screening and Toxicogenomics, available at: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/adverse-outcome-pathways-molecular-screening-andtoxicogenomics.htm#:~:text=The%20AOP%20framework%20is%20a%20collaborative%20tool%20that,sources%20that%20can%20eventually%20support%20chemical%20safety%20assessment.>
3. OECD (2023), Guidance Document No.377, Inical Recommendations on Evaluation of Data from the Developmental Neurotoxicity (DNT) In-Vitro Testing Battery

謝辞

OECD DNT IVBに日本を代表して参加しておられる国立医薬品食品衛生研究所 諫田泰成先生および栗形麻樹子先生からの情報提供に感謝いたします。

集団飼育型全自動行動記録解析装置の発達神経毒性評価への活用

前川 文彦

国立環境研究所 環境リスク・健康領域 生体影響評価研究室

動物個体を用いた発達神経毒性評価は、発達段階に応じて異なった脆弱性が存在するため検討項目が膨大であり、影響の後発的な顕在化をカバーする必要性から評価が長期間に亘ることがある等、多大な労力を要する。また現行のテストガイドラインで使用されている各種行動試験法には様々な問題点が指摘されており、代替手法の確立が望まれている（詳しくは現代化学（東京化学同人）2022年9月号「[発達期の脳への化学物質の影響を科学する～不可能と言う勿れ](#)」参照）。

我々の研究グループは上記の問題点を一挙に解決する手段として、マウスを用いた化学物質の発達期曝露影響評価に集団飼育型全自動行動記録解析装置IntelliCageを活用してきた。IntelliCage内部には4隅に「コーナー」と呼ばれる小部屋が設置されており、マウスの背中に予め植え込んだRFIDタグをコーナーに設置されたセンサーで読み取ることで1ケージ16匹までのマウスの行動を自動で記録できる。また、コーナー内部では窓を通して給水瓶にアクセスできるが、その窓の開閉をプログラムし、水が飲めるコーナーを限定することで水を報酬とした空間学習課題や、更に報酬を与えるコーナーを連続的に変化させることでその変化に対応する適応能力を調べる行動柔軟性課題をマウスに課することができる。

本稿では、我々がこれまでに評価を行ってきたダイオキシン類、金属類を例に挙げて、簡便にかつ再現性良く評価を行うために効果的であった行動課題および影響評価エンドポイントについて紹介する。

ダイオキシン類の影響評価例 環境研究総合推進費「非意図的に副生成する臭素系ダイオキシン類の包括的なリスク管理とTEF提示」（代表：鈴木剛、平成29年度～令和元年度）のサブテーマとして、胎仔期に臭素化ダイオキシン類を曝露されたマウスの行動影響評価を行った。最初に、代表的な塩素化ダイオキシンである2,3,7,8-TCDDを陽性対照として用いて影響評価エンドポイントの探索を行った。妊娠12.5日目の母体に経口投与を行い、産仔が成長した後、溶媒を投与した対照群、低用量群（0.6 μg/kg体重）、高用量群（3.0 μg/kg体重）の3群間で比較を行った。特定の行動課題を課さない条件で基盤的活動のデータを2週間取得し、判別分析で高用量群において一般的なコーナーへの侵入回数の低下が認められた。更にその内訳を詳しく解析した結果、IntelliCageに導入した

直後約1日間の（マウスにとっては）新奇環境となる条件でのコーナー侵入回数低下が有力な影響評価エンドポイントであることが判明した。実環境中で検出される臭素化ダイオキシン2,3,7,8-TeBDFの影響評価にそのエンドポイントを適用した結果、有意なコーナー侵入回数の低下を検出することができた（[Kimura et al. Environment Int. 2020](#)）。

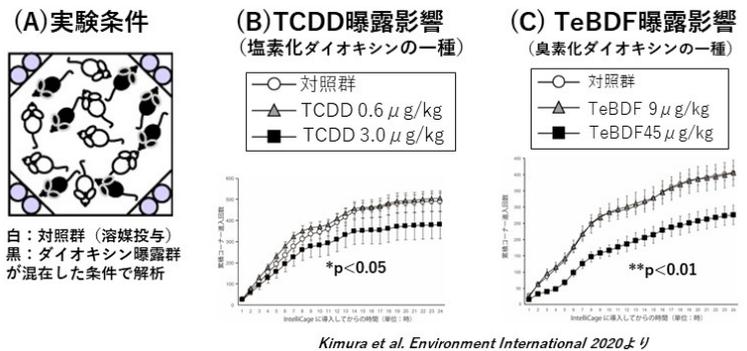


図. IntelliCageを用いたダイオキシン類の曝露影響評価

(A) 実験条件、(B) TCDD曝露影響、(C) TeBDF曝露影響

金属類の影響評価例 無機ヒ素（亜ヒ酸ナトリウム、85 ppm）を妊娠8～18日目の間、飲水経路で母体に投与され、胎仔期曝露を受けたマウスの基盤的活動量の評価を行ったが、対照群と曝露群間で有意差は得られなかった。一方、行動柔軟性課題を課した場合には、課題反転直後の成績が曝露群で有意に低下することが明らかになった（[Aung et al. Front. Neurosci. 2016](#)）。メチル水銀に関しては、環境省 重金属等による健康影響に関する総合的研究「複数機関・統一試験法で取り組むメチル水銀の脳高次機能への影響評価」（代表：前川文彦、平成31年度～令和3年度）の枠組みの中で、胎仔期にメチル水銀曝露されたマウスを2機関で同時に評価した結果、行動抑制に関わるパラメータが重要な影響評価エンドポイントであることが明らかになった（未発表データ）

まとめ 集団飼育下での基盤的活動の計測と、行動柔軟性等の脳高次機能の評価する行動課題を組み合わせることで、ダイオキシン類全般や金属類の曝露影響を簡便に再現性良く評価する方法を構築することができた。

カドミウム曝露細胞由来細胞外小胞の骨系細胞における影響評価

櫻木 青

弘前大学大学院 保健学研究科

私は、2023年5月30日から6月2日にかけて徳島市で開催された第2回環境化学物質3学会合同大会において、演題「カドミウム曝露細胞より分泌された細胞外小胞の骨系細胞における毒性発現経路の検討」を発表しました。本稿では、発表概要と学会を通しての所感を述べさせていただきます。

【発表概要】

細胞外小胞(Extracellular Vesicles: EVs)は、核酸やタンパク質を内包する微小な膜小胞で、標的細胞に取り込まれることで生理機能に影響を与える、細胞間の重要な伝達機能を担います¹。我々は、イタイイタイ病の原因物質として知られるカドミウム(Cd)を曝露した肝臓由来細胞より分泌されたEVsが骨分化を抑制することを示しましたが、原因やメカニズムについては明らかになっていません。本研究では、Cd曝露細胞から分泌されたEVsが、骨形成の誘導に不可欠なBMP/Smadシグナル経路²に影響を与える可能性を検討しました。

本実験では、Cd曝露肝がん細胞株HepG2由来EVsがBMP/Smadシグナル経路に与える影響を、分化させたヒト胎児骨芽細胞株hFOB1.19内のシグナル伝達に関する遺伝子発現及びタンパク発現変化から評価しました。さらに、HepG2及びHepG2由来EVs内のmiRNAを抽出し、Cd曝露によるmiRNA発現変化に対し定量的解析を実施しました。

Cd曝露HepG2由来EVsの添加により、分化を誘導したhFOB1.19内骨形成マーカーの遺伝子発現が抑制されていることと合わせて、BMP/Smadシグナル経路内のBMP4及びR-Smadの遺伝子発現が抑制されていたことから、Cd曝露HepG2由来EVsが本経路を阻害する可能性が示唆されました。Cd曝露HepG2及びHepG2由来EVs内では、骨形成関連遺伝子群をターゲットとするいくつかのmiRNA発現量がCdの曝露により変化しました。さらに、Cd曝露HepG2由来EVs添加群でのみ発現が低下したSmad1は、Cd曝露HepG2及びHepG2由来EVs内において変化が確認されたmiR-30dの標的遺伝子であったことから、BMP/Smadシグナル経路の阻害にはmiRNAが関与する可能性が示唆されました(図)。

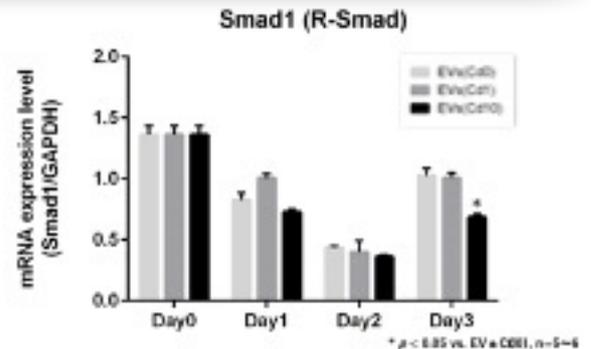


図 HepG2由来EVs添加によるSmad1発現変化

【学会を通して】

私は、初めて口頭での演題発表をさせていただきました。オンラインでの発表とは異なる緊張感がありましたが、研究内容について直接意見や質問をいただけたことは私にとって代えがたい経験となりました。今回、森田賞を受賞させていただけたことは、大変励みになったとともに身が引き締まる思いです。今回の発表では、研究、発表面ともに改善しなければならない点が多くありました。本学会での経験を糧に、今後もより一層研究活動に精進いたします。

また、私は本学会での自由集会、交流会にも参加しました。若手研究者、学生に向けた自由集会での交流では、将来の進路に悩んでいた私にとって、今後の指針を明確にする非常に有意義な時間を過ごすことができました。交流会は、環境化学物質を専門に扱う研究者、学生の方々とお酒を交え交流することで、研究者の方々と研究以外のお話も聞くことができ、オンサイトの学会でしか得られない貴重な経験をさせていただきました。

末筆ではございますが、本研究を遂行するにあたり、多岐にわたりご指導いただいた宮崎航教授をはじめ、有益な御助言・御協力を賜った皆様に厚く御礼申し上げます。

1) Valadi, Hadi, et al. "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." *Nature cell biology* 9.6 (2007): 654-659.

2) Beederman, Maureen, et al. "BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation." *Journal of biomedical science and engineering* 6.8A (2013): 32.

***In vivo* and *in silico* assessments of estrogenic potencies of zearalenone and its metabolites using zebrafish (*Danio rerio*)**Ahmed Rehab^{1,2}, Yoshitaka Tachibana¹, Masashi Hirano³, Yusuke K. Kawai¹, and Akira Kubota¹¹Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine²Department of Poultry Diseases, Aswan University³Department of Food and Life Sciences, School of Agriculture, Tokai University

Zearalenone (ZEN) is a nonsteroidal estrogenic mycotoxin produced by *Fusarium graminearum*. ZEN enters the aquatic environment via agricultural run-off from *F. graminearum*-infested agricultural products. In addition to agricultural fields, ZEN has been detected in soils, drainage water, and wastewater influent and effluents in several countries worldwide^{1,2}, as well as in flowing river waters³. Because of its pronounced estrogenicity, it is a major concern in aqueous environments, even at very low levels of nanograms per liter⁴. Furthermore, the toxin has been found in commercial fish feeds and feed materials⁵. ZEN undergoes two biotransformation pathways by enterocytes; the first pathway is based on hydroxylation, producing α - and β -zearalenols, presumably catalyzed by 3α - and 3β -hydroxysteroid dehydrogenases, respectively⁶. However, there are limitations in the data available for the estrogenic potency of ZEN analogs (ZENs) in fish. This study aimed to evaluate the estrogenic potentials of ZEN and its analogs, α -zearalenol (α -ZEL), α -zearalanol (α -ZAL), β -zearalenol (β -ZEL), β -zearalanol (β -ZAL), and zearalanone (ZAN), using zebrafish-based *in vivo* and *in silico* assays.

At 72 hours post-fertilization (hpf), zebrafish embryos were subjected to exposure to either DMSO or varying concentrations of ZEN and its analogs. At 96 hpf, exposed embryos were collected for gene expression analysis to investigate the concentration-response relationships for mRNA expression of an estrogen receptor (ER) target gene, *CYP19A1b*. *In silico* analyses were performed using the Molecular Operating Environment as reported previously⁷. Briefly, a homology model of ligand binding domains (LBDs) of zebrafish ER subtypes (i.e., zfER α , zfER β 1, and zfER β 2) were constructed based on the crystal structures of human ER α and ER β proteins. Molecular docking simulations of ligands to zfER subtypes were performed using ASEDock

program in the MOE. The scoring value calculated with ASEDock was based on the ligand-protein interaction energy. The most stable binding mode of the ligand with each zfER LBD was determined based on the lowest U_dock value (kcal/mol)

Exposure of zebrafish embryos to ZENs resulted in the induction of *CYP19A1b* expression in a concentration-dependent manner by all tested chemicals. Based on the half maximal effective concentration (EC₅₀), the estrogenic potencies were ranked as α -ZEL (24 nM) > α -ZAL (35 nM) \approx ZAN (38 nM) > β -ZAL (51 nM) > ZEN (87 nM) > β -ZEL (163 nM). *In silico* docking simulations of ZENs with zfER subtypes revealed that all ZENs formed a hydrogen bond with Leu355 in zfER α LBD except for β -ZEL, Leu372 in zfER β 1 LBD except for ZAN, and Leu357 in zfER β 2 LBD except for β -ZEL. The interaction energy of ZENs to each of the zfER subtypes showed positive correlations with EC₅₀ for *in vivo* *CYP19A1b* induction by these compounds (Fig. 1).

References

- 1) Hartmann N, et al. 2008. Environ Sci Technol 42, 5455-5460.
- 2) Maragos CM, et al. 2012. Food Addit Contam Part B 5, 55-64.
- 3) Schenzel J, et al. 2010. J Agric Food Chem 58, 11207-11217.
- 4) Laranjeiro CSM, et al. 2018. Mycotoxin Res 34, 77-83.
- 5) Pietsch C, et al. 2013. Toxins 5, 184-192.
- 6) Pfeiffer E, et al. 2009. Mol Nutr Food Res 53, 1123-1133.
- 7) Hirano M, et al. 2015. Environ Sci Technol 49, 3795-3804.

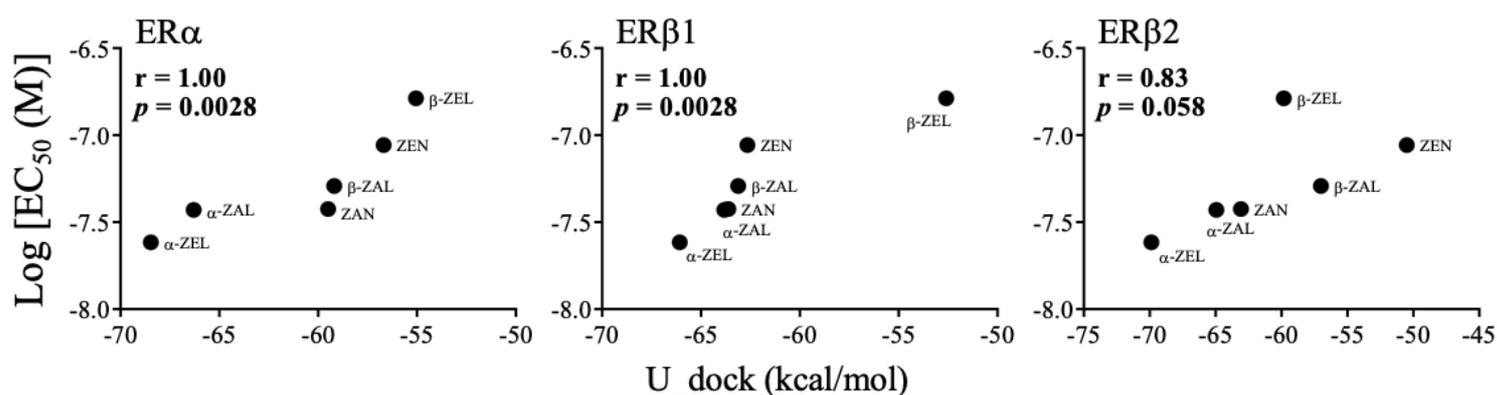


Fig. 1. Correlation between EC₅₀ values of *CYP19A1b* expression *in vivo* and interaction energies of compounds to each of zfER subtypes *in silico*.

Information

■第26回日本内分泌攪乱物質学会研究発表会

開催日時：2024年12月6日(金)・7日(土)

開催会場：東京大学本郷キャンパス内(予定)

大会実行委員長：鑑迫 典久(愛媛大学)

開催形態：本会単独開催

開催方法：オンサイトおよび一部オンライン(予定)

■第32回環境化学討論会

(2024年環境化学物質2学会合同大会)

会期：2024年7月2日(火)～5日(金) 予定

会場：JMSアステールプラザ

(〒730-0812 広島市中区加古町4番17号)

主催：一般社団法人日本環境化学会(JEC)、
日本環境毒性学会(JSET)

第51回日本毒性学会学術年会

主催：一般社団法人日本毒性学会

年会長 上原 孝(岡山大学学術研究院医歯薬学
域)

副年会長 西田 基宏(九州大学大学院薬学研究院)

会期 2024年7月3日(水)～5日(金) (3日間)

会場 福岡国際会議場

<https://www.jsot2024.jp/>

■「海外学会の理事長・会長等になりすまし」詐欺メールにご注意ください。

最近、海外学会の理事長・会長等になりすまし、資金詐取を狙うEメールが送付されるケースが発生しております。複数の海外学会名の事例が既に確認されており、メールアカウントの乗っ取りが世界各地で発生している模様です。既に、アカウントが乗っ取られ、過去のメールからこちらの情報が把握され、その情報に合ったメールが送られてくるといった大変巧妙な手口も発生しています。

本学会関係者にも類似のメールが届いた事例が確認されており、被害も発生しているとの連絡を受けております。国内外問わずやり取りされるメールの内容には十分注意をお払い頂き、特に相手方からの資金提供の要請等については慎重に対応を頂くようお願い申し上げます。

編集後記

現在、本学会を含めた多くの学会が「会員数の減少」と「会の存続」という問題を抱えているなか、昨年度、今年度の合同大会開催を契機に、改めて、本学会でも独自性と方向性の議論が多くされています。哲学の世界ではしばしば自己と他者についての議論がありますが、多様性に触れることも大切なことのひとつではないかと思う今日このごろです。末筆になりますが、ご多忙の中、ニュースレターにご寄稿くださいました先生がたに心より感謝申し上げます。合わせて、編集くださいました江口先生、事務局の蓮池さんにも感謝いたします。

日本内分泌攪乱物質学会事務局：〒141-0022 東京都品川区東五反田1-10-4 エムアイビル4F
Tel: 03-6277-0095 Fax: 03-6277-0118 E-mail: secretariat@jsedr.org