

学会賞受賞研究

## 化学物質による魚類再生産に及ぼす影響評価とその高度化に関する研究

石橋弘志\*

Hiroshi ISHIBASHI\*

Assessment and Advanced Investigations of the Adverse Effects of Environmental Contaminants  
on Fish Reproduction

### Abstract

More than 200 million chemicals have been registered with the Chemical Abstracts Service (CAS) in the United States. However, the ecotoxicity of these chemicals to aquatic organisms remains unclear. Reproductive effects on teleost fish are an important endpoint for ecotoxicity assessments, because they include next-generation adverse effects. Our research group evaluated the potential effects of chemicals on reproduction and subsequent generations using various fish species, including medaka, zebrafish, and goldfish. Estrogenic compounds such as phytoestrogens in fish feed may compete with test chemicals for binding to estrogen receptors (ERs) in *in vivo* assays, potentially influencing the estimation of the estrogenic activity of the test chemicals. In addition, it is known that a signaling pathway originating from ER subtypes is involved in fish reproduction. Therefore, in this paper, we review our recent research on *in vivo* reproductive testing, estrogenicity of dietary phytoestrogens, and *in silico* receptor-ligand docking simulation analysis. Our *in vivo* and *in silico* approaches will contribute to the advancement of the fields of environmental toxicology.

**Key words:** reproduction, vitellogenin, endocrine-disrupting chemicals (EDCs), docking simulation, *Oryzias latipes*

### 1. 日本環境毒性学会進歩賞受賞の経緯

令和5年9月12日に対面・オンラインで開催された「令和5年度日本環境毒性学会総会・研究発表会」において「日本環境毒性学会進歩賞」を受賞した。本賞は、環境毒性学の研究分野で顕著な業績を上げ、環境毒性学の発展と展開に大きく貢献した者に授与される。受賞対象となった「化学物質による魚類再生産に及ぼす影響評価とその高度化に関する研究」に関する一連の業績は、熊本県立大学環境共生学部、長崎大学水産学部、長崎大学環境科学部、有明工業高等専門学校、東京大学大学院農学研究科、基礎生物学研究所、愛媛大学沿岸環境科学研究センターなどとの共同研究によ

り実施したものである。ここでは、その受賞対象となった一連の研究内容について紹介する。

### 2. 魚餌中の植物エストロゲン類とその影響評価

米国 Chemical Abstracts Service (CAS) では2億種以上の化学物質が登録されている。しかし、これら莫大な化学物質の水生生物に対する生態毒性は不明な点が多い。藻類、甲殻類、魚類など水生生物を用いた生態毒性試験では、主に急性毒性影響が評価されているが、繁殖や次世代など再生産に対する慢性毒性影響も有害性評価の観点から重要である。一方で、1990年代に内分泌攪乱物質 (EDCs) 問題が顕在化し (Colborn et al., 1993; Stone, 1994), 特に EDCs のホルモン類似作用による繁殖や次世代への影響が指摘され、我が国でもそれらに関する試験法の開発が行われてきた (環境省, 2022)。我々の研究グループでも、これまでにメダカ (*Oryzias latipes*), ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*),

2024年12月16日受領

2024年12月16日受理

\*愛媛大学農学部生態系保全学教育分野 (責任著者)

キンギョ (*Carassius auratus*) などの魚類を用いて、繁殖や次世代に及ぼす内分泌攪乱作用の疑われる化学物質の有害性評価を行ってきた。

魚類の繁殖にはエストロゲン受容体 (ER) を起点としたシグナル伝達系が関与することが知られている。魚類 ER は、核内受容体スーパーファミリーに属し、これまで3種類のサブタイプ (ER $\alpha$ , ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2) が同定されている (Boyce-Derricott et al., 2009; Chakraborty et al., 2011)。EDCs は、これら ER サブタイプにアゴニストあるいはアンタゴニストとして作用するが、魚類などの飼育に使用される飼料などに含まれる天然由来の植物エストロゲン類も ER に作用する。このことは、飼料中に含まれる植物エストロゲン類と評価対象の EDCs が ER に相互作用することを意味しており、結果として EDCs の影響評価が正確に行えない可能性がある。そこで我々の研究グループでは、液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて、魚類飼料中の植物エストロゲン類 (ゲニステイン, タイゼイン, イクオールおよびクメストール) の含有量の定性・定量を試みた。その結果、市販のマス・コイ用飼料には、ER の標的分子である雌特異タンパク質ビテロジェニン (Vtg) (Sumpter and Jobling, 1995) 産生を誘導する量の植物エストロゲン類を含むことが明らかになった (Ishibashi et al., 2002)。また、ER $\alpha$  あるいは ER $\beta$  を導入した酵母 two-hybrid 法により、 $\beta$ -グルクロニダーゼおよびスルファターゼ酵素処理前後の飼料抽出物についてエストロゲン活性を測定したところ、酵素処理後に活性が検出された (Miyahara et al., 2003)。このことから、飼料中の植物エストロゲン類は主に配糖体 (ゲニステイン・ダイジン) として存在しており、魚類の生体内で代謝 (脱抱合) されることにより非配糖体のアグリコン (ゲニステイン・タイゼイン) となり、魚類 Vtg 産生を誘導することが示唆された。さらに我々の研究グループでは、企業との共同研究により、植物エストロゲン類をほとんど含まない低エストロゲン飼料を開発した (Kobayashi et al., 2006)。その飼料をばく露試験に適用することにより、ノニルフェノール (NP) によるキンギョ肝臓中 Vtg 産生や血中ステロイドホルモン分泌量に及ぼす影響を短期間で検出・評価できることを明らかにした (Ishibashi et al., 2004b)。

### 3. 魚類再生産への影響評価とバイオマーカー発現

NP は、フェノールとプロピレン 3 量体との反応で合成され、4-異性体が最も多く生成するが 2-異性体や 3-

異性体も生成する。NP はノニル期の分岐や置換位置の違いにより、理論上 211 種の異性体が存在する。NP は非イオン界面活性剤 (洗剤) であるノニルフェノールエトキシレート (NPEO) の原料となり、商品の多くは 4-NP を主とした異性体混合物で、環境中からも主に 4-NP の異性体混合物が検出されている。そこで雌雄メダカに対して、実測濃度 5.4, 16.5 および 61.2  $\mu\text{g/L}$  の 4-NP を 21 日間ばく露し、繁殖および次世代影響を評価した (Ishibashi et al., 2006)。その結果、61.2  $\mu\text{g/L}$  区では、産卵数および受精率が有意に低下した。また、5.4, 16.5 および 61.2  $\mu\text{g/L}$  区では、雄魚の肝臓中 Vtg タンパク濃度が有意に増加した。さらに F1 世代では、61.2  $\mu\text{g/L}$  区において胚の孵化率および孵化までの時間が有意に低下し、卵中の化学分析から 2~7  $\mu\text{g/g}$  の 4-NP が検出された (生物濃縮係数: 30~100)。以上のことから、4-NP ばく露によるメダカの産卵数および受精率の低下に加え、産卵した卵中の 4-NP 含有量が胚の孵化率を低下させ、次世代影響が明らかになった。

トリクロサン (TCS) は、繊維製品、石鹸、シャンプー、液体歯磨き粉、化粧品などの様々な工業製品の抗菌剤として広く使用されてきた。米国地質調査所 (USGS) は、米国 30 州にわたる水環境の調査において、最も検出される物質の一つとして TCS (最大濃度: 2.3  $\mu\text{g/L}$ ) をリストアップした (Kolpin et al., 2002)。そこで雌雄メダカに対して、実測濃度 12.8, 60.8 および 136.9  $\mu\text{g/L}$  の TCS を 21 日間ばく露し、繁殖および次世代影響を評価した (Ishibashi et al., 2004a)。その結果、いずれの濃度区においても産卵数や受精率、次世代への影響は確認されなかった。しかし、12.8 および 60.8  $\mu\text{g/L}$  区では、雄魚の肝臓中 Vtg タンパク濃度が有意に増加した。以上のことから、TCS のエストロゲン様作用が明らかになったが、今回のばく露濃度において、繁殖や次世代への影響はないことが示唆された。

我々の研究グループでは、前述の化学物質以外に、医薬品原料および牝馬由来のエクイン (Eq) (Ishibashi et al., 2018)、PFOA の潜在的前駆物質であるフッ素テロマーアルコール類 (8:2 FTOH)、合成香料 (Yamauchi et al., 2008)、植物エストロゲン類の高含有飼料 (Inudo et al., 2004) などについて、メダカの繁殖 (産卵数・受精率) や Vtg 発現に及ぼす影響を調査してきた (表 1)。エストロゲン様作用のバイオマーカーである Vtg 発現が増加した魚類では、産卵数の低下など繁殖影響が観察され、繁殖影響 (阻害) の予測において Vtg 発現解析は有用であることが示唆された。

表1 メダカ短期繁殖試験による影響評価

試験物質	試験濃度	繁殖影響*	Vtg <sup>†</sup>
4-NP	5.4 <sup>†</sup> , 16.5 <sup>†</sup> , 61.2 <sup>*†</sup> (µg/L)	あり	増加
TCS	12.8 <sup>†</sup> , 60.8 <sup>†</sup> , 136.9 <sup>†</sup> (µg/L)	なし	増加
Eq	10, 100 <sup>†</sup> , 1000 <sup>*†</sup> (ng/L)	あり	増加
8:2 FTOH	250, 500 <sup>*†</sup> , 1000 <sup>*†</sup> (µg/L)	あり	増加
市販飼料	体重の1%相当量 <sup>†</sup>	なし	増加

#### 4. *In silico*ケミカルスクリーニング系の確立

*In silico* 解析は、生体内 (*in vivo*) や試験管内 (*in vitro*) での実験に対して、コンピューターや情報技術を用いたデータ分析・シミュレーションなどを指す言葉として用いられる計算科学による評価法である。創薬分野における *in silico* スクリーニングでは、活性を有する既知リガンドの構造活性相関情報に基づく Ligand-Based Drug Design (LBDD) と標的タンパク質の立体構造に基づく Structure-Based Drug Design (SBDD) が用いられている。一方で、化学物質の種類は多様化し、その数も膨大であることから、網羅的な毒性影響の予測・評価は世界的な潮流となっている。また EDCs は、主に ER などの核内受容体を標的とすることから、SBDD による活性評価が広く行われている。

我々の研究グループでは、メダカ ER サブタイプ (ER $\alpha$ , ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2) リガンド結合領域 (LBD) のタンパク質立体構造について、ホモロジーモデリング (相同性の高い結晶構造を鋳型として標的タンパク質の立体構造モデルを予測する手法) によるモデル構築を行ってきた (図1)。また近年では、タンパク質立体構造予測プログラム AlphaFold2 が開発され、アミノ酸配列から高精度な構造モデルの構築も予測可能となっている (Jumper et al., 2021)。

メダカの ER サブタイプに加えて (Yamaguchi et al., 2015; Ishibashi et al., 2021), メダカおよびゼブラフィッシュのアンドロゲン受容体 (AR) (Ogino et al., 2016), アメリカアリゲーターの AR (Miyagawa et al, 2015), バイカルアザラシのペルオキシソーム増殖剤応答性受容体  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) (Ishibashi et al., 2019), 甲殻類ミジンコの幼若ホルモン受容体 (JH) (Hirano et al., 2020) やアミの脱皮ホルモン受容体 (EcR) (Uchida et al., 2023) など多種多様な生物種の細胞内受容体について、タンパク質立体構造のホモロジーモデリングとそれらを活用した *in silico* ケミカルスクリーニング系を確立し、多様な化学物質との相互作用を解析してきた。なお

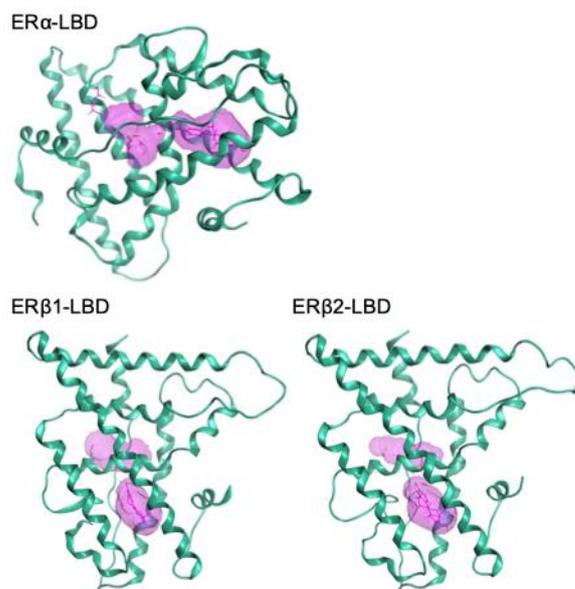


図1 メダカ ER サブタイプ (ER $\alpha$ , ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2) のリガンド結合領域 (LBD) タンパク質の立体構造。ピンク領域：リガンド結合ポケット (LBP)。

EDCs の *in silico* 解析については総説を公表しているので、そちらも参照いただきたい (石橋・平野, 2024)。

#### 5. おわりに

本稿では、水環境中に存在する化学物質による魚類再生産影響について、市販の魚類飼料中の植物エストロゲン類との相互作用、エストロゲン様作用のバイオマーカー Vtg 発現との関係、さらに *in silico* 解析による作用予測の可能性について紹介した。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ホルモン類似作用のスクリーニング・ハイスループット化や魚類再生産への影響評価の高度化に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環境毒性学会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。

#### 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.
- 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-.
- Hirano M, Toyota K, Ishibashi H, Tominaga N, Sato T, Tatarazako N, Iguchi T. (2020) Molecular insights into structural and ligand binding features of methoprene-tolerant in Daphnids. *Chemical Research in Toxicology*. 33: 2785–2792.
- Inudo M, Ishibashi H, Matsumura N, Matsuoka M, Mori T, Taniyama S, Kadokami K, Koga M, Shinohara R, Hutchinson TH, Iguchi T, Arizono K. (2004) Effect of estrogenic activity, and phytoestrogen and organochlorine pesticide contents in an experimental fish diet on reproduction and hepatic vitellogenin production in medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Medicine*. 54: 673–680.
- Ishibashi H, Kobayashi M, Koshiishi T, Moriwaki T, Tachibana K, Tsuchimoto M, Soyano K, Iguchi T, Mori C, Arizono K. (2002) Induction of plasma vitellogenin synthesis by the commercial fish diets in male goldfish (*Carassius auratus*) and dietary phytoestrogens. *Journal of Health Science*. 48: 427–434.
- 石橋弘志・平野将司 (2024) ”奪われ史未来”の今 -内分泌かく乱物質の評価・管理の現状と課題「分子生物学的なアプローチによる内分泌かく乱作用の評価」. *水環境学会誌*. 46A : 127–131.
- Ishibashi H, Hirano M, Kim EY, Iwata H. (2019) *In vitro* and *in silico* evaluations of binding affinities of perfluoroalkyl substances to Baikal seal and human peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ . *Environmental Science and Technology*. 53: 2181–2188.
- 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. (2004a) 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, Tachibana K, Tsuchimoto M, Soyano K, Tatarazako N, Matsumura N, Tomiyasu Y, Tominaga N, Arizono K. (2004b) Effects of nonylphenol and phytoestrogen-enriched diet on plasma vitellogenin, steroid hormone, hepatic cytochrome P450 1A, and glutathione-S-transferase values in goldfish (*Carassius auratus*). *Comparative Medicine*. 54: 54–62.
- 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, 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.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 596: 583–589.
- Kobayashi M, Ishibashi H, Moriwaki T, Koshiishi T, Ogawa S, Matsumoto T, Arizono K, Watabe S. (2006) Production of a low-estrogen goldfish diet for *in vivo* endocrine disrupter test. *Environmental Sciences*. 13: 125–136.
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB Buxton HT. (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*. 36: 1202–1211.
- Miyahara M, Ishibashi H, Inudo M, Nishijima H, Iguchi T, Guillette LJJr, Arizono K. (2003) Estrogenic activity of a diet to estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in an experimental animal. *Journal of Health Science*. 49: 481–491.
- Miyagawa S, Yatsu R, Kohno S, Doheny BM, Ogino Y, Ishibashi H, Katsu Y, Ohta Y, Guillette LJJr, Iguchi T. (2015) Identification and characterization of the androgen receptor from the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *Endocrinology*. 156: 2795–2806.
- Ogino Y, Kuraku S, Ishibashi H, Miyakawa H, Sumiya E, Miyagawa S, Matsubara H, Yamada G, Baker ME, Iguchi T. (2016) Neofunctionalization of androgen receptor by gain-of-function mutations in teleost fish lineage. *Molecular Biology and Evolution*. 33: 228–244.
- 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.
- Uchida M, Mizukawa H, Hirano M, Tominaga N, Arizono K, Ishibashi H. (2023) Adverse effects of contamination by fipronil and its derivatives on growth,

- molting, and gene expression in the mysid crustacean, *Americamysis bahia*, in Japanese estuaries. *Science of the Total Environment*. 892, 164595.
- Yamauchi R, Ishibashi H, Hirano M, Mori T, Kim JW, Arizono K. (2008) Effects of synthetic polycyclic musks on estrogen receptor, vitellogenin, pregnane X receptor, and cytochrome P450 3A gene expression in the livers of male medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*. 90: 261–268.
- 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.