

## 化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究及び野生生物の生物学的知見研究について(案)

### 1. 背景

EXTEND2010 では、研究課題を公募し、有識者により構成される野生生物の生物学的知見研究検討部会及び基盤的研究企画評価検討部会により課題の採択及び研究成果の評価を行ってきた。

一方で、より行政施策への活用に適した研究成果を得ることができるよう、

- ・環境リスク評価の進展に寄与し得る研究課題を優先的に選定する
- ・必要に応じて「指定研究」の形で課題を設定する

等の見直しを行うとともに、その成果についてはセミナー等を通じて公表してきた。

EXTEND2016 の下では、研究課題の新規採択は行っていないが、EXTENMD2010 の下で着手された研究の評価を行っている。

### 2. 平成 29 年度の実施状況（別紙 1 参照）

平成 28 年度に実施した化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究 2 課題及び野生生物の生物学的知見研究 1 課題の合計 3 課題について、その研究成果について、EXTEND2016 野生生物の生物学的知見研究検討部会及び EXTEND2016 基盤的研究企画評価検討部会により開催した評価会（平成 29 年 3 月 21 日開催、非公開）において評価を行った。その結果として、本年度は表 1 に示した 2 課題を継続して実施することとした。

表 1 平成 29 年度に実施する研究課題一覧

(敬称略)

| 区分<br>番号               | 代表研究者<br>所属       | 研究課題名                                             | 実施期間 |
|------------------------|-------------------|---------------------------------------------------|------|
| 化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究 |                   |                                                   |      |
| 基盤 1                   | 宮川信一<br>和歌山県立医科大学 | 魚類の代謝に関わる内分泌かく乱の <i>in vitro</i> 評価系構築            | H27～ |
| 野生生物の生物学的知見研究          |                   |                                                   |      |
| 野生 1                   | 国末達也<br>愛媛大学      | 座礁・漂着鯨類における新規 POPs および POPs 代替物質の蓄積特性とリスク評価に関する研究 | H27～ |

平成28年度

EXTEND2016 野生生物の生物学的知見研究検討部会委員名簿

(敬称略)

| 氏名           | 所属・役職                                   |
|--------------|-----------------------------------------|
| 門上希和夫        | 北九州市立大学 環境技術研究所<br>特命教授                 |
| 川合眞一郎        | 甲子園大学<br>学長                             |
| 田辺信介<br>(座長) | 愛媛大学 沿岸環境科学研究センター<br>化学汚染・毒性解析部門 特別荣誉教授 |
| 椿宜高          | 京都大学<br>名誉教授                            |

平成 28 年度

EXTEND2016 化学物質の内分泌かく乱作用に関する

基盤的研究企画評価検討部会委員名簿

(敬称略)

| 氏名          | 所属・役職                                 |
|-------------|---------------------------------------|
| 井口泰泉        | 横浜市立大学<br>客員教授                        |
| 小山次朗        | 鹿児島大学 水産学部<br>海洋資源環境教育研究センター センター長 教授 |
| 遠山千春        | 東京大学<br>名誉教授                          |
| 永沼章<br>(座長) | 東北大学大学院 薬学研究科 生体防御薬学分野<br>教授          |
| 山田智也        | 住友化学株式会社 生物環境科学研究所 研究グループ<br>上席研究員    |
| 渡辺知保        | 東京大学大学院 医学系研究科 国際保健学専攻<br>人類生態学分野 教授  |

## 平成 29 年度 EXTEND2010 化学物質の内分泌かく乱作用に関する基盤的研究等の 研究計画概要

### 基盤 1 : 魚類の代謝に関わる内分泌かく乱の *in vitro* 評価系構築

研究者 : 和歌山県立医科大学 : 宮川信一(代表研究者)

研究概要 : 医薬品類や生活日用品等に含まれる化学物質の曝露により引き起こされる、内分泌系や核内受容体を介して発現すると予想される様々な影響に対処する必要がある。日本の代表的な環境指標動物であるメダカをモデルとして、Obesogen 問題で注目されている PPAR $\gamma$  が関わる内分泌かく乱の生体影響を明らかにし、その評価系を開発することを目的とする。本研究は、多様な作用経路をもつであろう様々な化学物質の内分泌かく乱作用を評価していくためのモデルケースとなるものであり、魚類に対する新たな内分泌かく乱作用のエンドポイントの策定、そその作用メカニズムの解明と、短期間で影響予測できるスクリーニング系の開発を目指すものである。

研究計画 : 本研究は、日本の環境指標動物であるメダカ (*Oryzias latipes*) においてほとんど解析が進められていない obesogen (細胞の脂肪分化や体重増加を引き起こす内分泌かく乱物質の総称) に注目し、その内分泌かく乱に関する知見を集積し、Obesogen 活性測定のための評価系構築を目指す。

平成 29 年度は、従来からの *in vivo* の影響解析をさらに推進する。稚魚のアッセイでは、顕著な Obesogen 活性が見られた TBT について、用量反応関係を調べる。特に、環境中の TBT の濃度は現在十分低いと考えられているが、本アッセイによってどの程度の濃度で影響がでるかを明らかにすることは重要である。さらに、肝臓における病理組織学解析を行う。我々は、前年度に凍結切片による組織レベルでの Oil red O 染色を試みたが、メダカ稚魚に凍結切片作成は技術的に困難であり成功に至っていないが、少なくともパラフィン切片による HE レベルの解析は可能と考えている。またゼブラフィッシュで行われている同様のアッセイとの比較することで、それぞれの魚種に対する応答性の違いを議論しながら、メダカを使ったアッセイのメリットについて考察する。なお、このためにゼブラフィッシュでは Obesogen 活性があるとされる TBBPA など他の化学物質についても追加して試験を行う。時期依存性についても調べる必要があるが、孵化後 7 日目以降はホルマウントでの解析が難しくなるため、稚魚の段階で見られた Obesogen 影響を成熟段階で解析する。これにより、Obesogen 影響評価を行うために最も適切な時期が稚魚期か、成魚の段階であるかを見極める。成魚を用いた解析では、TBT を 7 日間曝露したメダカを飼育し続け、成熟後 (2~3 ヶ月) に生殖能力 (総産卵数や多産性) の検討を行う。これにより Obesogen の発生影響がメダカでも見られるかどうかを検討し、Obesogen による生殖への影響の有無を明らかにする。また、遺伝子レベルでの発生影響も解析する。我々は TBT 曝露した稚魚において、細胞外マトリックスタンパク等の遺伝発現変動を明らかにした。このような遺伝子発現変化が恒久的なものかどうかを、定量 RT-PCR などで明らかにする。

昨年度我々は PPAR $\gamma$  の化学物質に対する応答性に関してレポータージーンアッセイの結果を報告したが、一部の化学物質を除いて比較的高濃度でのみしか活性化が見られなかったため、一濃度区のみを用いた結果を報告した。平成 29 年度は、GAL4 の DNA 結合ドメイン及び PPAR $\gamma$  のリガンド結合ドメインの融合タンパクと、GAL4 応答配列をレポーターとする、より化学物質に対する感受性の高い、精度の高いアッセイ系を開発し、濃度依存性の検討を行う。一方で核内受容体は、リガンド結合ドメイン以外の領域も転写活性化に必要な可能性があり、GAL4 と、従来のタンパク全長を使った実験の比較により、魚類の PPAR $\gamma$  の転写活性化分子メカニズムの一端の解明が期待できる。

## 野生 1：座礁・漂着鯨類における新規POPsおよびPOPs代替物質の蓄積特性とリスク評価に関する研究

研究者：愛媛大学：国末達也(代表研究者)、Nguyen Minh Tue、国立環境研究所：磯部友彦、国立科学博物館：田島木綿子

研究概要：本研究では日本沿岸に座礁・漂着した鯨類を対象に、1) POPs 代替物質の分析法開発、2) 新規 POPs および POPs 代替物質による汚染実態と蓄積特性の解明、3) 保存試料を用いた既存 POPs、新規 POPs、POPs 代替物質の蓄積プロファイルの過去復元、4) 鯨類体内に蓄積する未知化学物質の探索と *in vitro* バイオアッセイ法を用いた活性評価、の課題に挑戦し、個体数減少の一要因となり得る内分泌かく乱化学物質のリスク評価を試みる。

平成 27 年度は、北海道沿岸に座礁したイシイルカとネズミイルカを対象に新規 POPs (PBDEs および HBCDs) の研究を展開した結果、沖合まで回遊するイシイルカの蓄積濃度は沿岸性の強いネズミイルカより高値を示したことに加え、生物環境試料バンク (*es*-BANK) の保存試料の分析から 1980 年以降明らかに濃度上昇していたことが判明した。また平成 28 年度に、北海道沿岸に漂着したナガスクジラ、ザトウクジラ、ミンククジラの脂皮からも PBDEs および HBCDs が検出され、ヒゲクジラに対する新規 POPs の曝露が明らかとなった。さらに、2015 年に集団座礁したカズハゴンドウと *es*-BANK 保存試料の分析から、イシイルカと同様に、近年における HBCDs の濃度上昇が確認された。このように、多様な鯨類が新規 POPs に曝露しており、その汚染は長期化することが示唆された。しかしながら、新規 POPs の規制にともない使用量が増加している代替物質の汚染は不明であるため、その実態調査を展開したいと考えている。

研究計画：これまでの研究から沿岸性だけでなく、沖合を回遊する鯨種にまで新規 POPs の汚染が進行しており、とくに HBCDs 濃度は増加傾向にあることが明らかとなった。継続してストランディングネットワークと連携をとりながら鯨類試料の採集に努め、多種の分析から蓄積特性の種差を解明する。平成 28 年度に POPs 代替物質である PFRs の臓器・組織に適用可能な高精度分析法が確立できたため、まず沿岸性の強いスナメリを対象に曝露実態と蓄積特性の解明を試みる。対象とする PFRs は使用実績と先行研究の室内ダスト汚染から、ハロゲン化体である Tri(2-chloroethyl) phosphate および Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate、そして非ハロゲン化体の Triethyl phosphate, Tributyl phosphate, Tripentyl phosphate, Triphenyl phosphate, Tripropyl phosphate, Tri(2-ethylhexyl) phosphate, 2-ethylhexyl diphenyl phosphate, Tris-(2-butoxyethyl) phosphate, Tricresyl phosphate、計 11 化合物とする。新規 POPs である PBDEs と HBCDs のレベルと比較することで、日本沿岸域における PFRs 汚染の進行を把握する。BFRs については、他海域で報告されているデータとの比較解析から、日本沿岸域の個体群における汚染レベルと蓄積プロファイルの特徴を明らかにする。また、BFRs 曝露によって発現する生体影響の最小毒性量(LOAEL)などを臓器・組織の残留レベルから見積もった先行研究を検索し、スナメ

りの蓄積濃度と比較することでリスク評価を試みる。

POPsのような生物蓄積性や有害性を示す化学物質の法的な監視・管理体制は強化されているが、網羅的な曝露評価は利用されている物質の一部にすぎず、また、それらの代謝・分解産物や不純物、副生成物質等も法的規制の対象外であるため、潜在的な有害物質の種類や排出量は年々増加していることが予想される。とくに、POPs関連物質による生物濃縮性の高い鯨類は、低次生物に比べ多様な化学物質を高蓄積している可能性がある。そこで平成29年度は、鯨類組織に蓄積する化学物質を2次元ガスクロマトグラフ飛行時間型高分解能質量分析計(GC×GC-HRTofMS)により網羅的に解析し、生物蓄積性未知物質を探索する。対象種は、多様な化学物質の曝露が予想されるスナメリとし、脂皮抽出液からマトリックスを最大限除去できるゲル浸透クロマトグラフィー等を用いた精製・分画法の構築を試みる。既知の有機化合物における標準試薬をGC×GC-HRTofMSで分析し、感度・バラツキ・分離能を確認しながら、分析カラムの選定とモジュレーター各パラメーター設定など、一連の条件を最適化する。検討した分析法を鯨類脂皮精製液に適用し、未知有機化合物の探索・同定を試みる。解析には、GC Imageを用い、NISTライブラリーサーチや事前に作成したオリジナルデータベースと比較・照合し、分子構造を推定する。また、2次元クロマトグラムから各化合物のピークを探索・積分するTwo-dimensional peak sentinel (T-SEN) や、ハロゲン化合物を特異的に抽出するClBrExtractorなど、解析プログラムの応用・改良にも着手し、ソフトウェアによる迅速なスクリーニング手法を構築する。

また、研究代表者のグループがこれまでに構築した鯨類ネットワークを継続して活用し、組織試料の採集と解剖ワークショップを実施する。