

## 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。

本年度実施した研究成果について 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 30 年 3 月 1 日開催、非公開）において評価を行った。評価結果について現在とりまとめ中である。

表1 平成29年度に実施する研究課題一覧

(敬称略)

区分 番号	代表研究者 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 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 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29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 特命教授
川合眞一郎	甲子園大学 甲子園大学栄養学部フードデザイン学科 特任教授
田辺信介 (座長)	愛媛大学 特別栄誉教授／名誉教授
椿宜高	京都大学 名誉教授

平成 29 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 特任教授
小山次朗	鹿児島大学 名誉教授
遠山千春	筑波大学 客員教授
永沼章 (座長)	東北大学 名誉教授
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 上席研究員

## 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 研究計画及び研究結果概要

### 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)

1. 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。

2. 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。

### 3. 研究結果概要：

#### 1. メダカ稚魚へのObesogen影響

##### 【実験方法】

##### 1) 実験動物

メダカ (*Oryzias latipes*) は基礎生物学研究所メダカバイオリソースから入手した Cab ラインを使用した。全ての動物実験及び遺伝子組換え実験に関しては、所属する大学の動物実験委員会及び構組換え DNA 実験安全委員会の承認のもと、関連する法令に従い、動物愛護の精神をもって行った。

##### 2) 曝露実験

採卵した卵を 6 well プレートに移し、孵化直後から 1 nM、0.1 nM、0.01 nM の TBT 及び 0.1  $\mu$ M、1  $\mu$ M の TBBPA、TCBPA、となるように調整した飼育水 (0.65% NaCl、0.25% KCl、0.03% CaCl<sub>2</sub>、0.02% NaHCO<sub>3</sub>) を 1 日おきに交換し、7 日間曝露した。コントロールには、飼育水 1 ml あたり DMSO を 1  $\mu$ l 添加した溶液を使用した。1  $\mu$ M の Ciglitazone 及び nTZDpa のデータは昨年度のものを使用した。餌 (KilliMin; Tetra 社) は毎朝一回添加した。最後の添加から 24 時間後にサンプリングし、各種解析に供した。ゼブラフィッシュ

0.01nM, 0.1nM, 1nM TBT  
0.1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M TBBPA, TCBPA, Rosiglitazone  
1 $\mu$ M Ciglitazone, nTZDpa (昨年度に実施)

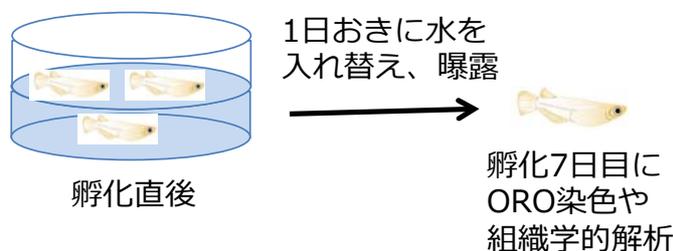


図1-1. 曝露実験のスキーム

では孵化後短期間の Obesogen 曝露 (受精後 3 日目から 11 日目までの曝露) により、コントロール群よりも早期に脂質蓄積が確認されることが報告されている (Riu *et al.*, *Toxicol Sci* 139:48-58, 2014)。本研究ではゼブラフィッシュとメダカの発生段階の違いを考慮し、孵化直後のメダカに化学物質を 7 日間曝露し、直後に Oil red O 染色を行った。

##### 3) Oil red O 染色

生後 7 日目の稚魚を 4%パラホルムアルデヒド (PFA) で 2-4 時間固定した。0.1% Tween20 を含む PBS で洗浄後、0.3% Oil red O (WALDECK GmbH & Co KG 社) 中で 3 時間インキュベートした。Oil red O は、100%イソプロパノールで 0.5%としたストック溶液を、水で 60%イソプロパノール (すなわち 0.3% Oil red O 溶液) となるように使用毎に希釈し、激しく攪拌して 10 分静置後に濾過したものを使用した。0.1% Tween20 を含む PBS で洗浄後、試料を 90%グリセリンに移し、通常の実体顕微鏡下で写真撮影を行った。染色スコアは、Riu *et al.*, *Toxicol Sci* 2014;139:48-58 と同じ、以下のクライテリアを採用した。

- (-) No staining
  - (+) Mildly staining: ORO staining appeared in the liver, anterior intestine, gut region and jaw
  - (++) Moderately staining: additional staining in the heart and major blood vessels (dorsal aorta and posterior cardinal vein)
  - (+++)
- Strong staining: extended to the whole vasculature, including the intersegmental vessels, and the brain.

#### 4) 化学物質

以下に使用した化学物質について記載した (図 1-2)。これらは DMSO に溶解し、その後-30°C で保存した。

- Tetrabromobisphenol A (TBBPA) (>98%; 東京化成社) 臭素化難燃剤
- Tetrachlorobisphenol A (TCBPA) (>98%; 東京化成社)
- Ciglitazone (>97%; 和光ケミカル社) チアゾリジン系ヒト PPAR $\gamma$ アゴニスト
- Rosiglitazone (>98%; 和光ケミカル社) チアゾリジンジオン系(TZDs)リガンド
- Tributyltin (IV) Chloride Standard (TBT) (>97%; 和光ケミカル社)
- nTZDpa (>98%; Sigma 社) 非チアゾリジン系ヒト PPAR $\gamma$ パーシャルアゴニスト

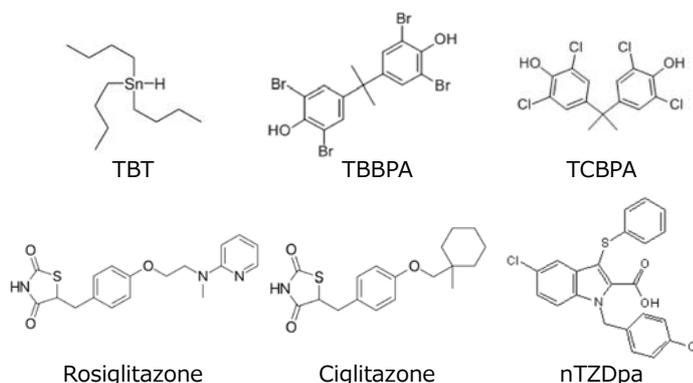


図1-2. 本解析で使用した化学物質の構造

#### 【実験結果と考察】

メタボリックシンドローム/肥満は、糖尿病や心脈管系異常等、健康に対する Adverse effect を誘導する要因であり、他にも様々な生活習慣病に関連する一方、発生段階での栄養状態等を含む発生プログラム異常との関連も疫学的に示唆されている。動物実験では、発生期の環境化学物質曝露と肥満及び脂質代謝異常との関連性が示されている。例えば TBT は PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ 複合体を活性化し、脂肪細胞分化及び脂質異常を誘導し、例えばカエルとマウスへの発生期曝露によって脂肪組織の蓄積を促進する (Grün *et al.*, Mol Endocrinol 2006;20:2141-2155)。このような発生影響は魚類でも報告されており、ゼブラフィッシュでは孵化後短期間の Obesogen 曝露により、コントロール群よりも早期に脂質蓄積が確認されることが報告されている (Riu *et al.*, Toxicol Sci. 139:48-58, 2014)。この手法では、化学物質曝露によって顕れる異常な脂肪細胞分化促進や脂肪の蓄積等の生体影響を検出する。我々は昨年度、孵化直後から7日間化学物質を曝露したメダカ稚魚を用いて Oil red O 染色を行うことで、*in vivo* での Obesogen 活性をもつ化学物質の評価法を構築した。本年度は、用量反応関係を調べるために、TBT を用いて濃度依存性を検討した。TBT は、過去の様々な知見から Obesogen 活性が最も強い化学物質の一つであり、昨年度の我々の行ったアッセイでも、1 nM の曝露で Obesogen 活性が見出された。この濃度は、過去の知見から、卵あるいは成体において毒性が顕れる可能性が限りなく低いが (「トリブチルスズ (TBT) が魚類に与える内分泌攪乱作用の試験結果に関する報告 (案)」環境省総合環境政策局環境保健部、平成 13 年 8 月参照)、本年度はさらに低濃度の 0.1 nM、0.01 nM で試験した。また、試験する化学物質を増やすために、本年度は Rosiglitazone、Tetrabromobisphenol A (TBBPA) 及

び Tetrachlorobisphenol A (TCBPA) について調べた。Rosiglitazone は最も代表的な TZD 試薬であり、2 型糖尿病の治療薬（製品名アバンディア）としても用いられている強力なヒト PPAR $\gamma$  のアゴニストである。ハロゲン化ビスフェノール A である TBBPA や TCBPA は難燃剤として広く使用されている。PPAR $\gamma$  を介して 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化を促進するほか、ゼブラフィッシュの脂肪細胞分化を促進することが報告されている（Riu *et al.*, *Toxicol Sci* 2014;139:48-58、Riu *et al.*, *Environ Health Perspect* 2011;119:1227-1232）。

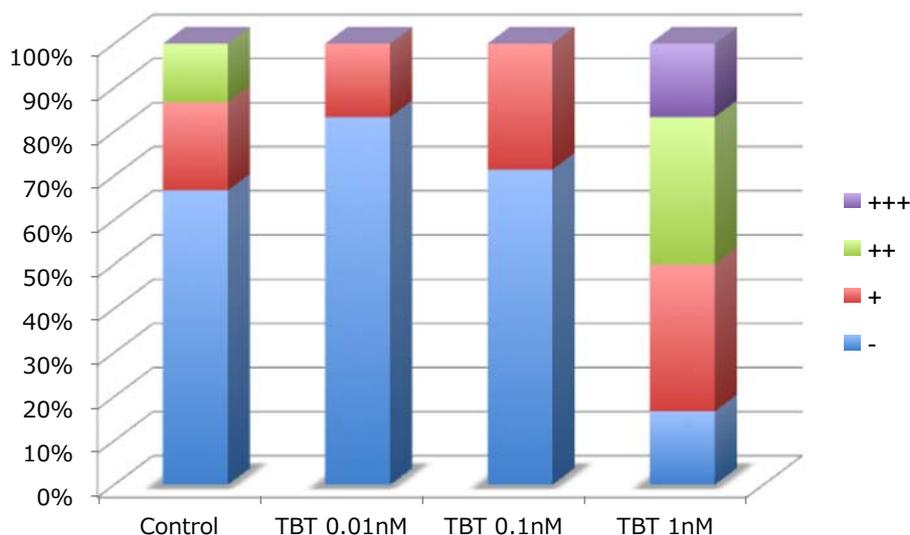


図1-3. Oil-red-O染色のスコアリングによるObesogen活性評価（TBT）

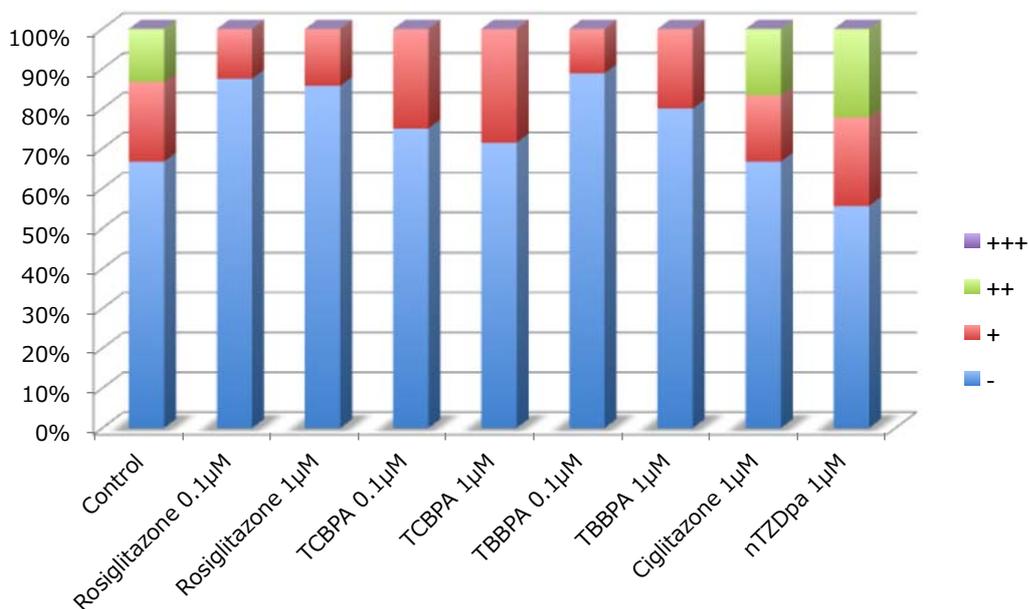


図1-4. Oil-red-O染色のスコアリングによるObesogen活性評価（化学物質）

Oil red O 染色後の各化学物質曝露群のスコアリング（染色の強さを4段階で評価）を図1-3、および図1-4に示した。TBTは、1 nM 曝露群では Oil red O 染色に強く反応する個体があったが、0.1 μM 及び 0.01 μM 群ではコントロール群とほぼ変化がなかった（図1-2）。また、今回調べた Rosiglitazone、TBBPA、TCBPA は Oil red O 染色に強く反応する個体数は少なかった（図1-3）。Rosiglitazone はゼブ

ラフィッシュの脂肪滴の蓄積を誘導する (Tingaud-Sequeira *et al.*, *J Lipid Res.* 2011;52:1765-1772)。また TBBPA、TCBPA はゼブラフィッシュの脂肪細胞分化を促進する (Riu *et al.*, *Toxicol Sci* 2014;139:48-58)。しかしこれらの化学物質は、本アッセイ系ではメダカの脂肪細胞分化を促進しなかったことから、魚種間でもメダカとゼブラフィッシュでは **Obesogen** として作用する化学物質の特異性が異なることがわかった。なお、TBT はメダカにおいても **Obesogen** として作用し、稚魚期の曝露によって早期の脂肪分化と脂質蓄積が促進することから、動物種を問わず強力な **Obesogen** として作用することが示された。

#### 【今後の研究と課題】

本解析では、我々が昨年度開発したメダカ稚魚に対する **Obesogen** 活性を持つ化学物質のスクリーニング手法、すなわち、**Oil red O** 染色によって染色段階をスコアリングする手法を用いて、TBT の濃度依存性及び複数の化学物質の **Obesogen** 活性の有無を測定した。この結果、ゼブラフィッシュでは **Obesogen** 活性をもつ Rosglitazone、TBBPA、TCBPA はメダカ生体に対しては **Obesogen** としては作用しないことが明らかとなった。また、0.1  $\mu\text{M}$  以下の TBT もほとんど **Obesogen** 作用を有さないことも明らかとなった。一方で、今回用いた染色スコアによる評価では、わずかな差を有意に見出すことが難しく、定量的に **Obesogen** 活性を測定することは従来からの課題であった。我々は、名古屋大学・田中実教授らの協力を得て、**Oil Red** 染色後の稚魚からイソプロパノールにより **Oil red O** を再抽出し、それを測定することでどれだけ **Oil red O** を取り込んだかを測定する手法を検討している。これによりメダカ稚魚の脂肪の蓄積を定量化できるようになることが期待される。

## 2. 稚魚期にTBTを曝露したメダカ成魚の解析

### 【実験方法】

#### 1) 生殖能に関するテスト

実験項目 1. に述べた方法に則り、孵化直後から 1 nM の TBT で 7 日間曝露したメダカを、8 日目以降は通常の飼育水で飼育した成魚を使用した (図 2-1)。合計 21 日間、オス及びメス個体 (孵化後 5 ヶ月以上の成魚を用いた) を 1 対 1 のペアで飼育し、毎朝卵を回収し、産卵数と受精率、孵化率を測定した。各群最低 3 ペア以上を実験に供した。なお、遺伝学的な性は *dmy* 遺伝子の有無をゲノム DNA の PCR によって確認している (data not shown)。有意差検定は、single factor analysis of variance (ANOVA) の後 Bartlett test を行い、 $p < 0.05$  である場合に有意とした。

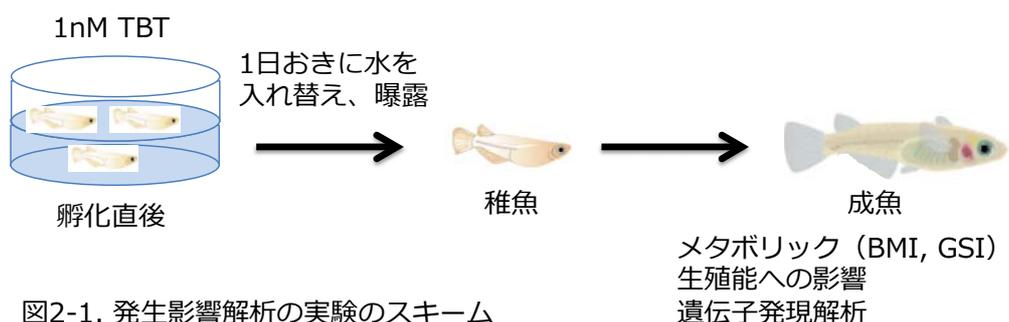


図2-1. 発生影響解析の実験のスキーム

#### 2) 組織学的解析

生殖腺組織はブアン液で固定し、脱水後にパラフィン中に包埋し、5  $\mu\text{m}$  厚の組織切片を作成した。作成した切片はヘマトキシリン-エオシン染色に供した。

#### 3) 遺伝子発現解析

上記と同様、孵化直後から 1 nM の TBT で 7 日間曝露したメダカを、8 日目以降は通常の飼育水で飼育し、約 3 ヶ月後に肝臓を摘出した。最後の給餌から 8 時間後にサンプリングした。各群 3 個体以

上ストックし、mRNA を抽出した。ライブラリー作製後 (Total RNA-Seq Kit v2 及び Ion One Touch System (Hi-Q OT2 Kit); Thermo Scientific 社)、Ion PGM System (Hi-Q Sequencing Kit; Thermo Scientific 社) に供した。遺伝子発現解析には CLC Genomics Workbench (Qiagen 社) を用いた。レファレンス シークエンスは NCBI genbank の “Bonyfish” RefSeq データベースを利用した。

【実験結果と考察】

上記実験項目で得られた稚魚の段階での Obesogen の影響が、一過的なのか成熟後まで続く影響なのかを検討する必要がある。そこで稚魚期に TBT を曝露したメダカの成熟後の段階での肥満へ影響 (肝臓や生殖腺の組織重量) 及び生殖への影響 (産卵数、受精率、孵化率) を解析した。その結果、組織重量を指標とした肥満影響、及び産卵数、受精率、孵化率を指標とした生殖への影響は、コントロール群と TBT 稚魚期曝露群で有意な差は認められなかった (図 2-2、2-3)。

次に、肝臓の組織レベルでの影響を解析した。まず、稚魚期 (7 日齢) の組織像を HE 染色によって解析した。コントロール群の肝臓ではグリコーゲンを含む液胞様の構造 (glycogen vacuolation) を特徴とした組織像が観察された (図 2-4) (魚類では孵化前後の発生期に糖新生が起きる; Takahashi *et al.*, Tohoku J Agric Res 1978;29:98-109、Boulekbache, Am Zool 1981;21:377-389)。TBT 曝露群の稚魚の肝臓もコントロール群と同じ構造が見られたが、一部の稚魚では液胞様構造がほとんどないものもいた。これは TBT によるエネルギー代謝の異常あるいは肝臓への何らかの毒性によるものと考えられた。次にメスの成魚の肝臓を解析したところ、コントロール群と TBT 曝露群ともに細胞内にグリコーゲンの貯蔵と思われる、色素に染まらない領域が観察されたが、TBT 曝露群の肝臓の細胞のほうがその領域が小さく、結果として肝細胞が小さく観察された (図 2-5; コントロール群と TBT 処理群の 2 個体分の組織像を示した)。顕著な脂肪の蓄積は、この解析からは認められなかった。

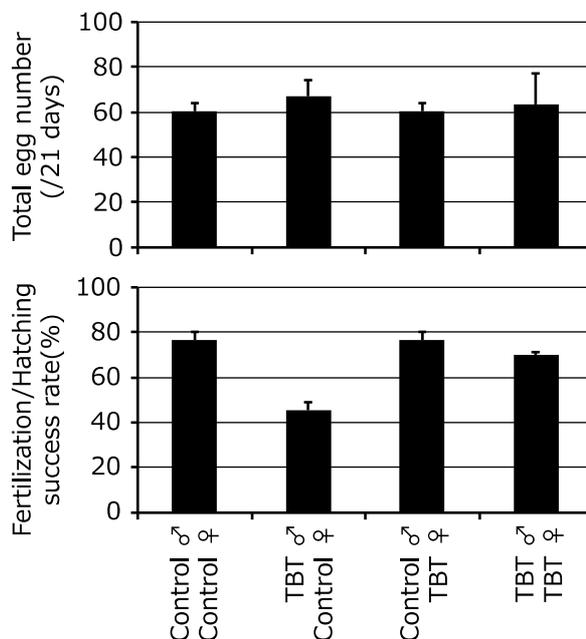


図2-2. 稚魚期にTBT曝露したメダカ成魚の生殖能

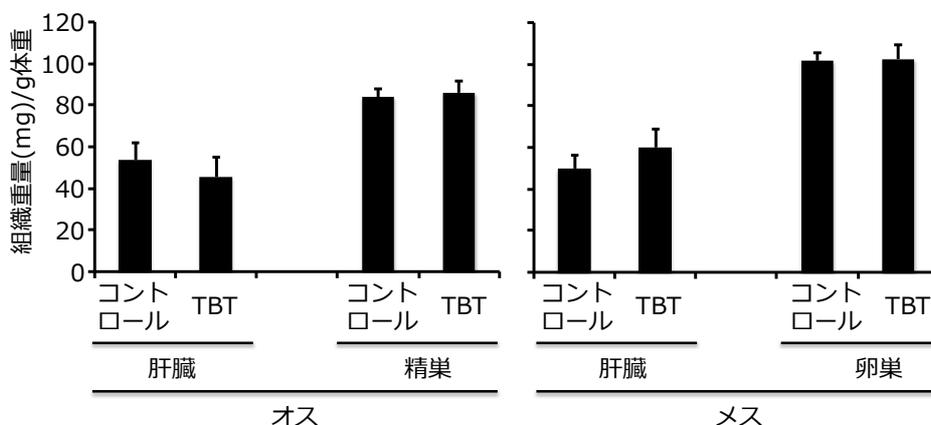


図2-3. 稚魚期にTBT曝露したメダカ成魚の組織重量

以上のように稚魚期に TBT 曝露したメダカの成魚は、組織重量や生殖能への有意な差は認められ

なかったが、肝臓の組織像からはエネルギー代謝の変化等、何らかの影響があることが示唆された。そのような変化を遺伝子レベルで明らかにするため、さらに稚魚期 TBT 曝露による長期にわたる影響のメカニズムを明らかにするためにトランスクリプトーム解析を行った。この解析では肝臓に加え、卵巣も解析に供した。コントロール群と比べて転写活性化あるいは抑制されるものを 10 番目までリスト化した(表 1-1)。コントロール群、TBT 群ともに total gene reads が 10 以上で、どちらかの RPKM が 10 以上の値を示すものを抽出した。この条件では、肝臓で、2 倍以上発現が上昇した遺伝子は 511 個、減少した遺伝子は 187 個、卵巣で 2 倍以上発現が上昇した遺伝子は 106 個、減少した遺伝子は 245 個であった。また、スキャタープロット解析からも、発現変動する遺伝子数は肝臓の方が多く、また大きく発現変化する遺伝子数も多い(図 2-6)。以下、発現変動が見られたいくつかの遺伝子について、肥満等との関連について既に報告のある文献などを参考に記述した。括弧内の数値は対照群に対する稚魚期 TBT 曝露群の発現変動を表している。

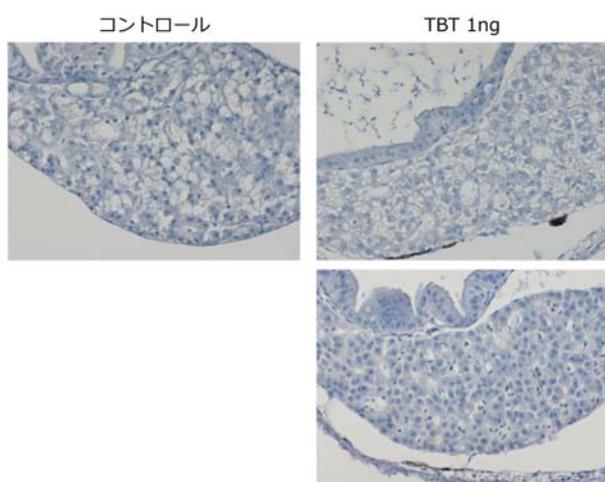


図2-4. TBT曝露した稚魚期のメダカの肝臓の組織像

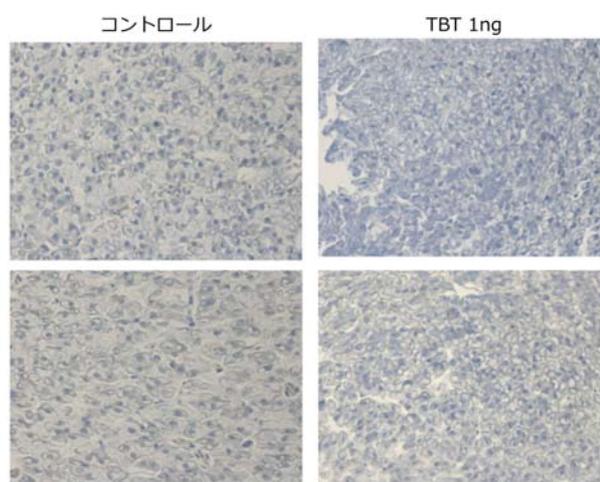


図2-5. 稚魚期にTBT曝露したメダカ成魚のメスの肝臓組織像

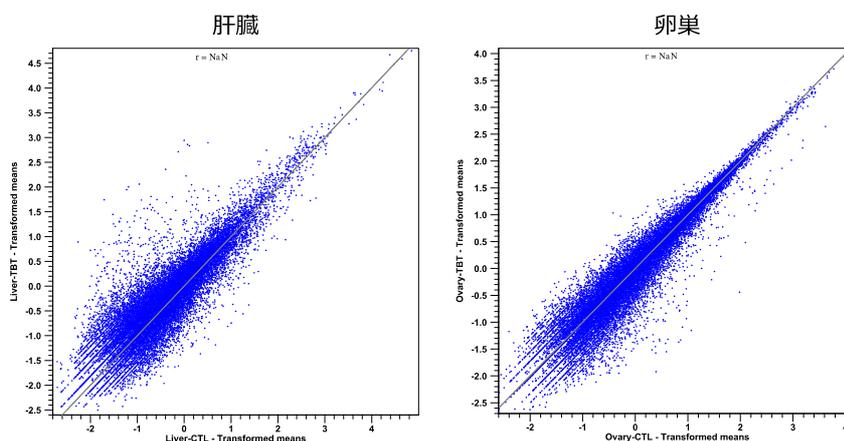


図2-6. 肝臓及び卵巣のトランスクリプトームのスキャタープロット

※ 考察の文章の一部、表 2-1～表 2-2、図 2-7 については非公開とする。

### 【今後の研究と課題】

TBT を稚魚期に曝露したメダカ成魚では、肥満度と生殖能に関しては、個体重量・組織重量あるいは生殖能の差異に有意差を与えるほどの顕著な影響は観察されなかったが、遺伝子発現レベルでは発生期 TBT の曝露の長期的な影響が見出された。したがって、TBT は稚魚に対して *Obesogen* として作用し、一過的な脂質蓄積に関与するだけでなく、成熟後にエネルギー代謝を修飾する作用をもつ可能性が明らかとなった。特に、糖新生に関わる遺伝子発現が、稚魚期に TBT に曝露された成魚の肝臓で上昇していたことから、長期的な TBT の健康影響が示唆される。

最近の論文によると、胎生期に低濃度の TBT を曝露されたマウスの孫世代 (F4) においても遺伝子発現パターン及び DNA メチル化パターンが恒久的に変化し、儉約型表現型 (エネルギー消費を節約し、肥満や糖代謝異常などを発症し易くなる表現型) をとることが示された (Chamorro-Garcia *et al.*, *Nat Commun* 2017; 8:2012)。この論文では、50 nM TBT を交配前 7 日間のみ母親に飲水曝露しており、このような低濃度では肥満や生殖能という重篤な表現型は顕れないにも関わらず、その孫世代まで遺伝子/ゲノムレベルに影響を及ぼすことを明らかにしたものである。したがって、メダカにおいてもこのような継世代影響が遺伝子発現レベルで顕れるかどうかを調べる必要がある。

## 3. GAL4-PPAR $\gamma$ -LBD融合タンパク質を利用したアッセイ系の開発と検討

### 【実験方法】

#### 1) GAL4-PPAR $\gamma$ -LBD 融合タンパク質コンストラクトの作製

ヒト及びメダカの PPAR $\gamma$  の cDNA を鋳型として、ヒンジ及びリガンド結合ドメイン (D/E/F ドメイン) を、PrimeStar GxL (タカラバイオ社) で増幅し、pCR-Blunt II-TOPO ベクター (Thermo Scientific 社) にクローニング後、シークエンスを確認した。その後、適切な制限酵素を用いて pBIND ベクター (Promega 社) にサブクローニングした。使用したプライマーは、それぞれ 5'-GGA TCC GGA TGT CTC ATA ATG CCA TCA GGT-3'; 5'-ACG CGT ACA AGT CCT TGT AGA TCT CCT GC-3' (ヒト PPAR $\gamma$ ) 及び 5'-GGA TCC GGA TGT CGC ATA ACG CCA TCC G-3'; 5'-ACG CGT ACA AGT CCT TCA TGA TTT CCT GC-3' (メダカ PPAR $\gamma$ ) である。

#### ・細胞培養及びレポーターアッセイ

細胞はヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞 (DS バイオファーマ社) を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。培地はチャコールデキストラン処理した血清 (Hyclone 社) を 10% 添加した Dulbecco's Modified Eagle's medium (Thermo Scientific 社) を用いた。レポーター遺伝子アッセイでは、この細胞を 96-well のマルチプレートに植え継ぎ (1×10<sup>5</sup> 細胞/well)、翌日コンストラクトを細胞に導入した。導入試薬は Fugene HD (Promega 社) を用い、1 well 当たり、GAL4-PPAR $\gamma$ -LBD 融合タンパク質 (あるいはコントロールとしての pBIND ベクター; Promega 社) 40 ng、レポーターコンストラクト (pGL4.35[luc2P/9XGAL4UAS/Hygro] ベクター; GAL4 応答配列がタンデムに 9 つ並列したレポーターコンストラクト; Promega 社) 80 ng、Fugene HD を 0.42  $\mu$ l とした。トランスフェクション後 4-6 時間の後に、測定するリガンドを含む培地と交換した。我々のこれまでの経験から、10<sup>-4</sup> M 以上の濃度のホルモンや化学物質処理は、細胞に対して毒性を示し、受容体の転写活性を評価できないことが多いため、本研究では最高濃度を 10<sup>-5</sup> M とした。ただし TBT に関しては、10<sup>-7</sup> M より濃い濃度で明らかに細胞が剥離し、死んでしまうため 10<sup>-7</sup> M とした。溶媒は DMSO (ナカライ社) を使用し、培地に対しその終濃度が 0.1% を超えないようにした。化学物質添加 24 時間後に細胞を処理し、ホルモン作用の結果としてでてくるルシフェラーゼ活性の測定を行った。細胞溶解液の調製及び測定は、Dual-Luciferase Assay System (Promega 社) を用い、そのプロトコールに従った。ルシフェラーゼの発光測定は、GloMax-Multi+ Detection System (Promega 社) を用いた。データの解析は、エクセル (マイクロソフト社) を用いた。

### 【実験結果と考察】

我々はこれまで PPAR $\gamma$  の化学物質に対する応答性に関してレポーター遺伝子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。しかし審査では濃度依存性を調べるべきだというコメントをいただいた。そこで、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質を作製し(GAL4-PPAR $\gamma$ -LBD)、GAL4応答配列をレポーターとするレポーターアッセイで、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の開発を試みた(図3-1)。

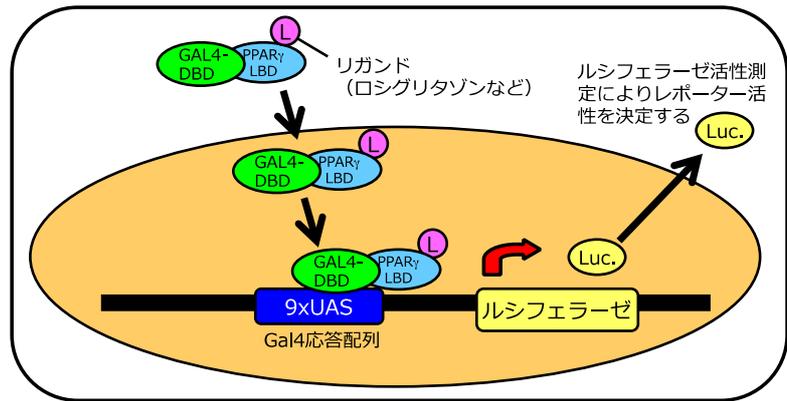


図3-1. GAL4-PPAR $\gamma$ -LBD融合タンパク質を利用したアッセイ系

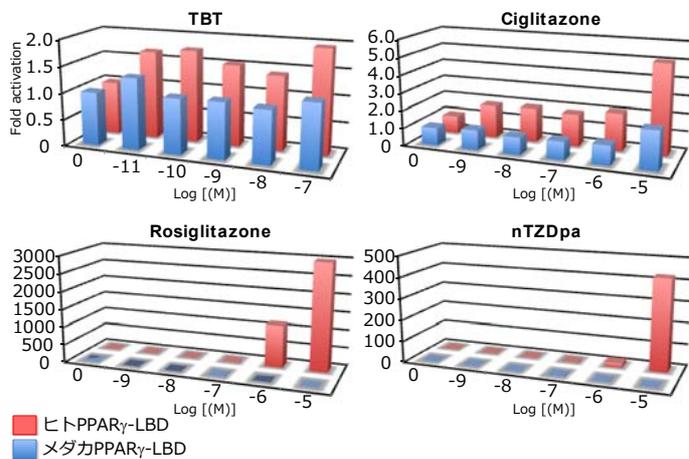


図3-2. GAL4-PPAR $\gamma$ -LBD融合タンパク質を利用した化学物質のPPAR $\gamma$ -LBDの活性化

倍であった(図3-2)。昨年度までに実施したヒト PPAR $\gamma$ -ヒト RXR $\alpha$ を用いた従来のアッセイ系では、Ciglitazoneは2.03倍、Rosiglitazoneは2.11倍、nTZDpaは1.30倍であったことから(いずれも $10^{-5}$ M)、GAL4-PPAR $\gamma$ -LBDを利用したアッセイ系のほうがコントロールとの相対活性が大きい値が得られることがわかった(図3-3)。TBTに関しては、ヒト PPAR $\gamma$ -LBDは1.95倍とごくわずかに活性化された(図3-2)。従来得られていたPPAR-RXRのアッセイ系では2.02倍であり、ほとんど変わらなかった(図3-3)。

Ciglitazoneはメダカ PPAR $\gamma$ -LBDは $10^{-5}$ Mで2.17倍、Rosiglitazoneは $10^{-5}$ Mで2.23倍、メダカ PPAR $\gamma$ -LBDは $10^{-5}$ Mで2.23倍、nTZDpaはほとんど活性化されなかった( $10^{-5}$ Mで1.01倍)(図3-2)。昨年度までに実施したメダカ PPAR $\gamma$ -メダカ RXR $\alpha$ 1またはメダカ PPAR $\gamma$ -メダカ RXR $\alpha$ 2(RXR $\alpha$ 1とRXR $\alpha$ 2はRXR $\alpha$ のサブライシングバリエーション)を用いた従来のアッセイ系では、Ciglitazoneは1.89倍/2.08倍、Rosiglitazoneは1.69倍/1.68倍、nTZDpaは2.68倍/2.56倍であった(いずれも $10^{-5}$ M)(図3-3)。このようにメダカでは、GAL4-PPAR $\gamma$ -LBDとPPAR-RXRのアッセイ系では相対活性の点で大きく変わらず、さらにnTZDpaにおいては、PPAR-RXRの系では2.68倍/2.56倍という相対活性が得られたものの、

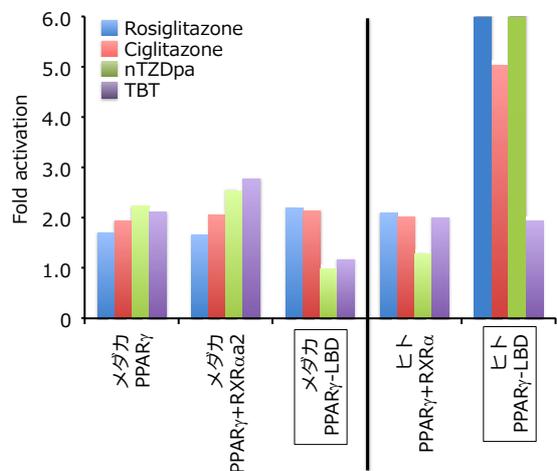


図3-3. Obesogenに関わるレポーターアッセイ系の比較

GAL4-PPAR $\gamma$ -LBD の系ではヒトで 2.02 倍、メダカではほとんど転写活性化がみられなかった(図 3-3)。TBT に関しては、コントロールとの相対活性として、メダカ PPAR $\gamma$ -LBD は 1.19 倍とほとんど活性化されなかった(図 3-2)。従来の PPAR-RXR のアッセイ系では、メダカでは 3.27/2.80 倍であった(図 3-3)。

TBT は非常に強い **Obesogen** 活性を持つものの、これまで既知の PPAR $\gamma$ 及び RXR のいずれのリガンドとも構造が大きく異なり、TBT がどのように PPAR $\gamma$ -RXR ヘテロダイマーを活性化するか、その作用機構はまだ不明な点が多い。TBT は、RXR $\alpha$ に結合するとともにその転写を大きく活性化する一方、PPAR $\gamma$ には結合するものの転写活性化能は非常に弱い (Grün *et al.*, *Mol Endocrinol* 2006;20:2141-2155)。le Maire らは、TBT はヒト RXR とヘリックス 11 番目にある Cys432 を介して結合することにより PPAR $\gamma$ -RXR を活性化するが、PPAR $\gamma$ とはヘリックス 3 番目に位置する Cys285 を結合するため転写活性にほとんど寄与しないことを示した (le Maire *et al.*, *EMBO Rep* 2009;10:367-373)。中西らも同様に、TBT の PPAR $\gamma$ に対する転写活性化は限定的であることを示している (Nakanishi *et al.*, *Sci Rep* 2015;5:8520)。一方で、例えば脂肪細胞分化は RXR 選択的アゴニスト単独では誘導されず、また TBT はレチノイン酸パスウェイの遺伝子発現を活性化しないことから、**Obesogen** の作用は PPAR $\gamma$ -RXR のヘテロダイマーを介すると考えられる (Grün *et al.*, *Mol Endocrinol* 2006;20:2141-2155, Nakanishi *et al.*, *Mol Endocrinol* 2005;19:2502-2516)。本研究でも TBT はヒト PPAR $\gamma$  をわずかに転写活性化し、また、メダカ PPAR $\gamma$ をほとんど転写活性化しなかった(なお、メダカ PPAR $\gamma$  はヒト PPAR $\gamma$ の Cys432 に相当するアミノ酸残基 (Cys339) は保存されており、結合はできると推察される)。したがって、メダカにおいても、TBT は主として RXR に結合することで PPAR $\gamma$ -RXR のヘテロダイマーを活性化することが示唆された。

以上のように、ヒトでは TBT を除き、PPAR $\gamma$ に直接的に結合する化学物質に対しては PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$  の系よりも GAL4-PPAR $\gamma$ -LBD の方が感度と転写活性の強さという点で優れていることが明らかとなった。一方、メダカの系では必ずしもそうとは言えない結果を得た。興味深い点は、メダカでは、主として PPAR $\gamma$ を直接的に活性化する化学物質と、主として RXR を介して活性化される化学物質がはっきりと二分されるという点である。例えば、Rosiglitazone や Ciglitazone のチアゾリジンジオン系の化学物質はメダカ PPAR $\gamma$ を直接的に活性化することが示唆される。一方で、nTZDpa と TBT は、主として RXR を介して活性化されるか、あるいは活性化には RXR が必要である。nTZDpa はヒト PPAR $\gamma$ -LBD を活性化することから、PPAR $\gamma$ を直接的に転写活性化することと対照的である。さらに、nTZDpa はメダカ RXR $\alpha$ を単独では活性化しない点で TBT と異なる(図 3-3)。このことは、nTZDpa は、メダカ PPAR $\gamma$ が全長のときのみ転写を活性化することを示唆する。このようにメダカに対する化学物質の **Obesogen** 活性は、ヒトとは異なる作用機構で作用し、さらに化学物質によって様々な経路をとることが示唆された。

#### 【今後の研究と課題】

**Obesogen** に対する *in vitro* レポーターアッセイ系をさらに発展させることは、単に PPAR $\gamma$ -RXR を活性化する化学物質のスクリーニングのみならず、**Obesogen** の内分泌かく乱の作用メカニズムに対する作用機序解明に向けて必要である。性ステロイドホルモン受容体のようにホモダイマーで作用する核内受容体と異なり、RXR をヘテロダイマーパートナーとして作用する核内受容体の作用機序は一般的に不明な点が多い。本研究では、さまざまなコンストラクト、様々なリガンドを用いた解析により、**Obesogen** の作用メカニズムの一端を明らかにすることができた。今後、PPAR $\gamma$ 、RXR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ と GAL4-PPAR $\gamma$ -LBD を組み合わせ、複数カテゴリーの化学物質を試験に供することにより、メダカに対する **Obesogen** 活性化物質のスクリーニングだけでなく、その作用メカニズムについても新たな示唆が得られることが期待できる。

## 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

1. 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。

2. 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 dipheynyl phosphate, Tris-(2-butoxyethyl) phosphate, Tricresyl phosphite、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、スナメリ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。

### 3. 試験結果概要：

#### 1. PCBおよびPBDE主要異性体の経年変化

##### 【実験方法】

昨年度(平成28年度)、温暖外洋域に棲息するカズハゴンドウ(*Peponocephala electra*)の脂皮中PBDEs濃度における経年変動を解析した結果、主要異性体による傾向は異なることが判明した。しかしながら、PCBsの主要異性体における解析が未実施であることに加え、他種の汚染レベルの動向は不明であった。そこで、平成27年度に調査した沿岸性種のネズミイルカ(*Phocoena phocoena*)と沖合寒冷域を回遊するイシイルカ(*Phocoenoides dalli*)を対象に、近年(2015~2017年)生物環境試料バンク(es-BANK)に保存された検体を化学分析に供試し、新たなデータを補足することでPCBおよびPBDE主要異性体の経年変動を解析した。化学分析は既法に従い、高速加熱溶媒抽出装置を用いて抽出し、ゲル浸透クロマトグラフィーおよび活性化シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製後、GC-MSで定性・定量した。経年変化の解析には、対数変換したPCB・PBDE異性体濃度Log[C]を目的変数として、採取年Y(西暦)と体長(cm)を説明変数として重回帰式を求め、有意に低減したものは傾きから半減期を算出した。近年の傾向を把握するため、2000年以降のデータも解析した。

##### 【実験結果】

1) PCB異性体の経年変化：PCBsの主要8異性体であるCB52, CB99, CB101, CB118, CB138,

CB153, CB180, CB187 の脂皮中濃度は 1980 年代から低減傾向にあったが、沖合寒冷域を回遊するイシイルカについては定常状態を示す異性体も存在した。一方、2000 年以降の解析では、ネズミイルカに低減傾向がみられたが、外洋性 2 種については定常状態を示した(Fig. 1)。

2) PBDE 異性体の経年変化: PBDEs の主要 5 異性体である BDE47, BDE99, BDE100, BDE153, BDE154 の濃度は 1980 年代から上昇もしくは定常状態を示したが、2000 年以降の解析では異性体によって異なる傾向が認められた(Fig. 2)。BDE47 の濃度は 3 種ともに有意な低減を示したが、BDE154 はネズミイルカとカズハゴンドウで低減はみられず、イシイルカについては有意な濃度上昇を示した。その他の異性体濃度は、ネズミイルカとカズハゴンドウで低減傾向にあったが、イシイルカでは上昇もしくは定常状態を示した。

## 2. リン酸エステル系難燃剤(PFRs)の曝露実態

### 【実験方法】

昨年度確立した PFRs の分析法を用いて、2014～2016年に瀬戸内海に漂着したスナメリ (*Neophocaena phocaenoides*) の肝臓( $n = 5$ )中 PFRs 濃度を測定した。肝臓試料を超音波抽出し、ENVI-Carb II/PSA (担体: 活性炭+アミノプロピル) カートリッジを用いて前処理をおこなった。11種の PFR 化合物 (TEP, TNBP, TPP, TPEP, TPHP, TMPP, TBOEP, EHCPP, TEHP, TCEP, TDCIPP) を LC-MS/MS により定量した。

### 【実験結果】

1) PFRs の汚染実態: 分析したスナメリの肝臓試料すべてから塩素化 PFRs である TCEP および TDCIPP が検出されたが、9 種のノンハロゲン系 PFRs は検出下限値以下であった。また、検出された塩素化 PFRs の濃度は、漂着地点により異なる傾向が認められた(Fig. 3)。

## 3. GC×GC-HRToFMSを用いた網羅的スクリーニング

### 【実験方法】

鯨類の脂皮に蓄積する多様な有機ハロゲン化合物の網羅的スクリーニングを実施するため、2次元ガスクロマトグラフ-高分解能飛行時間型質量分析計 (GC×GC-HRToFMS) の分析条件を設定した。質量校正物質(PFK)により HRToFMS の測定パラメーターを最適化し、有機ハロゲン化合物の分析に適した GC×GC カラム選定と POPs の分離能を検証した。また、POPs を含む多様な有機ハロゲン化合物の標準品を GC×GC-HRToFMS で測定し、それらの保持時間、精密質量、ハロゲンクラスターの同位体比、そしてフラグメント情報をすべてライブラリー化した。本年度は、2008年に瀬戸内海沿岸に漂着したスナメリのオス( $n = 1$ )から採取した脂皮を対象に、構築した機器分析条件でスクリーニングをおこなった。脂皮中の化合物を可能な限り網羅分析するため、クリーンアップはゲル浸透クロマトグラフィーによる脱脂のみとし、得られた最終溶液を GC×GC-HRToFMS 分析に供試した。

### 【実験結果】

1) 機器分析条件の最適化：質量校正物質 (PFK) をイオン源に直接導入して、HRTofFMS の測定パラメーターを最適化した結果、モニターイオン ( $m/z$  280.9824) の精密質量誤差は $\pm 10$  ppm の範囲内に収まり、プロファイルピークの質量分解能は 5000 以上を示した。また、サンプリングレートを装置上限の 25 Hz に設定し、高質量分解能モード ( $R > 5000$ , FWHM) で PFK を高速フルスキャン測定したところ、 $m/z$  100–700 で観測された各フラグメントイオンの質量確度および分解能はきわめて良好であることが確認された。

2) GC カラムの選定と分離能の検証：BPX5 (30m, 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m film thickness) と BPX50 (2 m, 0.1 mm i.d., 0.1  $\mu$ m film thickness) を連結した GC $\times$ GC カラムが最も良好な分離能を示した。実際に POPs 標準溶液 (25–50 ppb) を測定した結果、OCPs (HCHs, CHLs, DDTs)、PCBs (2–10Cl)、そして PBDEs (1–7Br) が同一の 2次元トータルイオンクロマトグラム (2D TIC) に溶出し、一部の PCB 異性体を除くすべての成分が分離することを確認した。また、検出された各ピークの溶出時間をもとに、モジュレーションピリオドを最適化した結果、2次元カラムの最大保持時間を 5 秒に制御した場合、最も良質な 2D TIC が認められた。

3) 網羅的スクリーニング：スナメリの脂皮抽出液を GC $\times$ GC–HRTofFMS で分析した結果、得られた 2D TIC から 1000 成分を超える多様なピークが検出された (Fig. 4)。そこで各ピークの保持時間、精密質量、ハロゲンクラスターの同位体比、そしてフラグメント情報をもとに解析したところ、スナメリは約 200 種の有機ハロゲン化合物 (異性体を含む) に複合曝露されていることが判明し、その大半は PCB 異性体や OCPs (CHLs, DDTs 類縁化合物) などの有機塩素化合物で占められていた。興味深いことに、異なる溶出パターンを示す 2 種類の有機ハロゲン化合物が 2D TIC 上で観測され、マススペクトルを詳細に解析したところ、組成式が  $C_{16}H_{19}Br_3O$  および  $C_{16}H_{18}Br_4O$  である PBHDs (polybrominated hexahydroxanthene derivatives) であると推定された (Fig. 5)。