

平成22年5月6日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20760362
 研究課題名 (和文) 環境レチノイドによる水環境汚染の実態把握とその原因物質の特定
 研究課題名 (英文) Elucidation of contamination with environmental retinoids in the aquatic environment and identification of causative compounds
 研究代表者
 井上 大介 (INOUE DAISUKE)
 大阪大学・工学研究科・特任研究員
 研究者番号：70448091

研究成果の概要 (和文)：本研究では、レチノイン酸 (RA) 受容体 (RAR) にアゴニスト作用を示し、多様な脊椎動物に生体影響をもたらす可能性のある環境レチノイドによる水環境汚染とそれに伴う生態リスクの可能性を明らかにするため、汚染実態調査と原因物質の特定を試みた。その結果、①環境レチノイド汚染は水環境中に普遍的に存在していること、②下水中の環境レチノイドは天然の RA 類とその代謝物であること、③現在の汚染レベルでは野生動物に悪影響が生じる可能性は高くないことが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：Environmental retinoids can exhibit the RAR agonistic activity and consequently cause adverse effect on various vertebrates. To clarify the contamination with environmental retinoids in the aquatic environment in Japan and its possible ecological risks, this study investigated the current status of the contamination and identified the causative compounds. Results of this study revealed that the contamination with environmental retinoids occurs commonly in aquatic environments, and that major causative compounds in municipal wastewater are retinoic acids and their oxidative metabolites. Furthermore, it was suggested that the current level of environmental retinoids contamination do not appear to be high enough to exert RAR-mediated deleterious effects on wild animals.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2009年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：レチノイン酸受容体、アゴニスト作用、環境レチノイド、水環境、河川水、下水

1. 研究開始当初の背景

生体内に多数存在する核内受容体は、特異

的なリガンドの結合を通じて、生体内での種々の組織特異的な生理作用の発現を調節している重要な生体因子である。内分泌攪乱化学物質は、天然のリガンドを真似て核内受容体に結合することによって、生体内の内分泌機能を乱し、人や野生生物の健康に重篤な悪影響を及ぼす可能性があることから、そのリスクの適正な評価と制御戦略の確立が急務の課題とされている。

脊椎動物が有する核内受容体の一つであるレチノイン酸 (RA) 受容体 (RAR) は、ビタミン A の代謝物である RA の結合を介して、視覚や形態形成、発生、細胞分化、組織の恒常性に重要な役割を果たしている。一方、RA は強力な催奇形性作用を有することも知られており、RAR への結合を介したレチノイドシグナル伝達系が過剰に発現した場合には、人を含む多様な生物種に重篤な健康被害を引き起こす可能性がある。

近年、北米で多数発見された奇形カエルの原因究明研究において、RA と類似の作用を示し、RAR を介したレチノイドシグナル伝達系を攪乱することによって生態影響を引き起こす化学物質“環境レチノイド”が水環境中に存在することが明らかにされた。また、中国・北京および日本国内において実施した予備調査により、中国や日本の水環境でも環境レチノイド活性を確認し、環境レチノイド汚染が北米に限定された問題ではなく、世界的な問題である可能性を見出した。レチノイドシグナル伝達系攪乱は重篤な健康影響を及ぼし得ることから、環境レチノイドの存在は将来の深刻な問題の発生を危惧させるものである。現在までに、少数の研究グループによって環境化学物質の環境レチノイド活性の評価が試みられているが、いずれの研究においても、自然界で生体影響を発現するような高レベルの活性を示す物質は確認されておらず、環境レチノイドによる水環境汚染の実態に関する知見は世界的に見ても皆無に等しいのが現状である。

2. 研究の目的

このような背景から、環境レチノイドという新たな内分泌攪乱化学物質を介した未知のリスクを正しく評価し、制御戦略を確立するための予見的研究が重要である。そこで本研究課題においては、日本国内の水環境における環境レチノイド汚染に伴う生態リスクの可能性を評価することを最終的な目標とし、①RAR 結合活性を指標とした、環境レチノイドによる水環境汚染の実態把握、②水環境中に存在する環境レチノイド物質の化学構造の推定、③構造推定した環境レチノイド及び構造類似物質の環境レチノイド活性の評価に取り組み、水環境中における環境レチノイド汚染の実態を解明することを目的と

する。

3. 研究の方法

(1) RAR 結合活性を指標とした環境レチノイドによる水環境汚染の実態調査

環境レチノイドによる水環境汚染の実態を調査するため、近畿地方の淀川、猪名川、大阪湾、および大阪府下の 4 か所の下水処理場より環境水試料を採取した。河川においては表層水、下水処理場においては最初沈殿池越流水 (流入水)、各生物反応槽越流水、最終沈殿池越流水 (処理水) を採取した。各環境水試料は、それぞれ Oasis HLB カートリッジ (500mg/6cc, Waters) を用いた固相抽出によって極性物質を濃縮した後、酵母 two-hybrid 法によりヒト RAR α に対するアゴニスト活性を測定した。各試料の活性は、RAR の内因性リガンドである all-*trans* RA (atRA) の最大活性を 100% とし、相対活性値として求めた。また、相対活性値 10% を基準として、供試試料の atRA 当量濃度 (atRA-EQ) を算出した。なお、河川における調査では、RAR α に加えて、エストロゲン受容体 (ER) α と甲状腺ホルモン受容体 (TR) α に対するアゴニスト活性、RAR α に対するアンタゴニスト活性も測定した。

(2) 環境レチノイド物質の特定

水環境中に存在する主要な環境レチノイド物質を特定するため、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて、顕著な RAR アゴニスト活性を示した環境水試料に含まれる化学物質を分画し、環境レチノイド物質を分取・精製した。HPLC 分画は、LC-10A vp HPLC システム (株式会社島津製作所) あるいは LC-20A HPLC システム (株式会社島津製作所) を用い、様々な分析条件で実施した。分析中は、溶出液を 0.5-2 分間隔で分画を分取し、濃縮・乾固させた後、酵母 two-hybrid 法により RAR アゴニスト活性を測定した。顕著な活性が検出された画分は、さらに HPLC 分画に供し、顕著な活性を示すピークを特定し、化学構造分析に供した。化学構造分析は、高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC/MS) および高速液体クロマトグラフ-イオントラップ-飛行時間型質量分析計 (LC/MS-IT-TOF) を用いて行った。なお、LC/MS には株式会社島津製作所製の LC-20A HPLC システムと LCMS2010EV シングル四重極 MS を組み合わせたシステム、LC/MS-IT-TOF には株式会社島津製作所製の LC/MS-IT-TOF システムを使用した。

(3) 環境レチノイド物質および構造類似物質の環境レチノイド活性の評価

(2) において同定した環境レチノイドおよび構造類似物質の環境レチノイド活性を評価するため、酵母 two-hybrid 法を用いてヒ

ト RAR α に対するアゴニスト活性の用量反応性を調査した。ここで得られた結果を基に、毒性指標として、半影響濃度 (EC50) を推算し、各物質の環境レチノイド活性を比較・評価した。

4. 研究成果

(1) RAR 結合活性を指標とした環境レチノイドによる水環境汚染の実態調査

環境レチノイドによる水環境汚染の実態を把握するため、淀川、猪名川、大阪湾および大阪府下の下水処理場において、RAR α アゴニスト活性を調査した。淀川、猪名川および下水処理場においては、ER α 、TR α へのアゴニスト活性、ならびに RAR α へのアンタゴニスト活性も調査した。ER アゴニスト活性、TR アゴニスト活性および RAR アンタゴニスト活性は一部の試料においてのみ検出された。一方、RAR アゴニスト活性は、いずれの試料においても検出され、相対活性値も他の受容体に比べて非常に高かった。

平成 20 年 4 月に調査した猪名川(20 地点)、平成 20 年 10 月に調査した淀川 (20 地点) においては、いずれも有意水準 1% の下で有意な RAR アゴニスト活性が検出された。また、その相対活性値 (濃縮倍率 100 倍) は、淀川では 5.6~26.2%、猪名川では 2.4~26.6% であった。atRA-EQ を推定した結果、淀川では 1.2~7.0ng-atRA/L、猪名川では 1.1~23.5ng-atRA/L に相当する環境レチノイドが含まれていることが明らかになった。図 1 には猪名川における汚染分布を示している。RAR アゴニスト活性は、いずれの河川においても、上流部に比べて下流部で高く、特に、下流部の特定の地点において大幅に上昇する傾向を示した。さらに、ER アゴニストや TR アゴニストによる汚染の分布とは異なり、RAR アゴニスト活性は下水処理場の直下に位置する採水地点においてその上流地点よりも低くなることが認められた。

また、平成 20 年 12 月に調査した生物処理

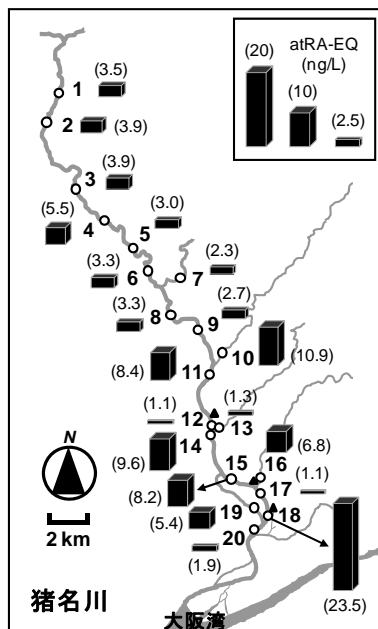


図 1 猪名川における atRA-EQ(2008 年 4 月)

方式の異なる 4 つの下水処理場では、流入水において、有意水準 5% の下で有意な RAR アゴニスト活性が検出され、その相対活性値は濃縮倍率 10 倍で 9.4~14.2%、濃縮倍率 1 倍で 3.5~5.9% であった (図 2)。下水の RAR アゴニスト活性は、処理方式によらず、生物処理に伴って低下することが確認された。しかし、いずれの処理場の処理水においても、濃縮倍率 100 倍で有意な活性 ($p < 0.05$) を示し、環境レチノイドは一部残存していることが確認された。

以上の調査結果から、環境レチノイド汚染は調査地域の水環境において普遍的に存在しており、ER アゴニストや TR アゴニスト、RAR アンタゴニストによる汚染よりも重大な問題である可能性が示唆された。また、下水処理場に流入する下水中には環境レチノイドが含まれているが、それらの大部分は下水処理場において除去されており、下水処理場は自然環境中に存在する環境レチノイドの重要な排出源にはなっていないことが示唆された。

(2) 水環境中の環境レチノイド物質の特定

(1) の調査において顕著な RAR アゴニスト活性が検出された下水試料および河川水試料から環境レチノイド物質の特定を試みた。

4 か所の下水処理場の流入水試料を HPLC 分析に供した結果、いずれも同一の 2 画分において顕著な RAR アゴニスト活性を示した。それぞれの画分を HPLC でさらに精製した結果、最終的に 4 つのピークが RAR アゴニスト活性を有することが明らかになった。そこで、これらのピークを分取して LC/MS-IT-TOF 分析に供し、得られた MS データを標準物質の MS

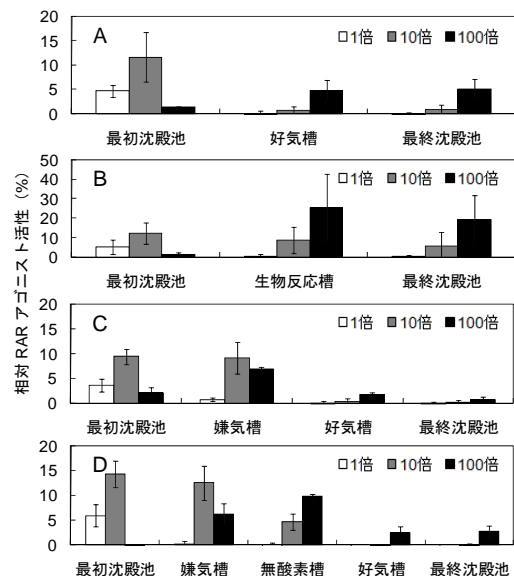


図 2 下水処理場における RAR アゴニスト活性. A: 標準活性汚泥法, B: 擬似嫌気好気法, C: 嫌気好気法, D: 嫌気無酸素好気法.

データと比較した。その結果、下水中に含まれている環境レチノイド物質は atRA、atRA の異性体である 13-*cis* RA (13cRA)、atRA と 13cRA の酸化代謝物である 4-oxo-atRA と 4-oxo-13cRA であることが明らかになった (図 3)。本研究で調査した下水処理場には主に生活廃水が流入していることから、これらの環境レチノイドはヒト由来であると考えられる。生体内で食物由来のプロビタミン A から生成する RA とその代謝物は、RAR アゴニスト活性をもたないグルクロン酸抱合体となって体外に排泄される。グルクロン酸抱合体は微生物によって容易に脱抱合化されることから、抱合体の形態で排泄された RA 類および 4-oxo-RA 類が下水処理場に流入する過程で脱抱合化され、活性を有する元の物質に変換されたものと考えられた。

また、淀川および猪名川の河川水試料を HPLC 分画し、活性画分の特定を試みたところ、いずれの試料においても同一の画分において最も高い活性が検出された。また、幾つかの試料では別の画分でも顕著な活性が検出された。このことから、河川水中にも複数の環境レチノイド物質が存在していることが示唆された。そこで、河川水中に普遍的に存在する活性画分について、下人物質の特定を試みた。まず、下水中で特定された環境レチノイドであるか否かを調べた結果、上述の調査結果から予想された通り、それらとは異なる物質であることが明らかになった。そのため、活性画分を HPLC でさらに精製し、活性を示すピークを特定した。そのピークを LC/MS 分析に供した結果、*m/z* 101 (ネガティブイオンモード) および 442 (ポジティブイオンモード) のフラグメントイオンが特異的に検出されたが、構造同定には至らなかった。

(3) 環境レチノイド物質および構造類似物質の環境レチノイド活性

下水中より同定された環境レチノイド物質 (atRA、13cRA、4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA) およびそれらの構造類似物質である 9cRA、4-oxo-9cRA の RAR アゴニスト活性を調べた。その結果、いずれの物質も RAR アゴニスト活性の明確な用量反応性を示し、環境レチノイド活性を有することが明らかになった。また、図 4 に atRA、13cRA、4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA

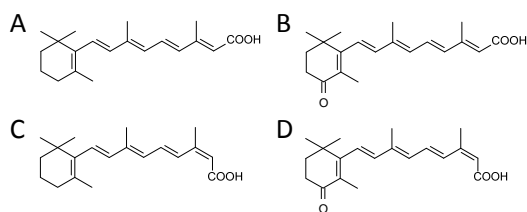


図 3 下水中から同定された主要な RAR アゴニスト。A: atRA、B: 4-oxo-atRA、C: 13cRA、D: 4-oxo-13cRA。

の用量反応曲線を示しているが、これに基づいて EC50 値を算出したところ、それぞれ $1.6 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $2.4 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $5.8 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $4.2 \times 10^{-9} \text{M}$ であり、atRA 等価係数はそれぞれ 1、0.0066、2.7、0.39 であった。このことから、これら 4 物質の環境レチノイド活性は 4-oxo-atRA > atRA > 4-oxo-13cRA > 13cRA であることが明らかになった。

(4) 環境レチノイド汚染に伴う生態リスクの評価

本研究で検出された環境レチノイド汚染に伴う生態リスクの可能性について検討した。自然環境で検出された RAR アゴニスト活性に基づいて算出した最大の atRA-EQ は、猪名川で検出された 23.5ng-atRA/L であった。また、下水処理水については、同定された 4 種の環境レチノイドの定量結果と atRA 等価係数に基づいて推定された最大 atRA-EQ は 1ng/L 程度以下であり、活性に基づいて推定した最大 atRA-EQ は 67.5ng/L であった。一方、既往研究においては、600ng/L の atRA によって RAR を介してアフリカツメガエルの子供に生体影響が生じることが確認されている。このことから、自然環境や下水処理水で検出された汚染レベルは生体影響発現レベルに比べて十分に低いことが明らかとなり、現在の汚染レベルで野生生物に生体影響が生じる可能性は高くないものと推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- ① Daisuke Inoue, Kazunari Sei, Michihiko Ike, Disruption of retinoic acid receptor signaling by environmental pollutants, Journal of Health Science, 査読有、印刷中
- ② Daisuke Inoue, Koki Nakama, Kazuko Sawada, Taro Watanabe, Mai Takagi, Kazunari Sei, Min Yang, Junji Hirotsuji,

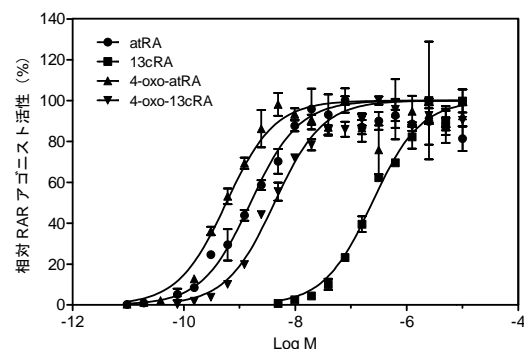


図 4 atRA、13cRA、4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA のヒト RAR α アゴニスト活性。各物質の最大活性値を 100%とした相対活性値で標記している。エラーバーは標準偏差 (n=3) を表す。

- Jianying Hu, Jun-ichi Nishikawa, Tsuyoshi Nakanishi, Michihiko Ike, Contamination with retinoic acid receptor agonists in two rivers in the Kinki region of Japan, Water Research, 査読有, Vol. 44, No. 8, 2010, 2409-2418
- ③ Daisuke Inoue, Hisae Matsui, Kazunari Sei, Jianying Hu, Min Yang, Jun Aragane, Junji Hirotsuji, Michihiko Ike, Evaluation of effectiveness of chemical and physical sewage treatment technologies for removal of retinoic acid receptor agonistic activity detected in sewage effluent, Water Science and Technology, 査読有, Vol. 59, No. 12, 2009, 2447-2453
- ④ 井上大介, 中間公規, 清和成, 池道彦, 酵母 two-hybrid 法を用いた河川水中の各種核内受容体アゴニスト活性の評価ーレチノイン酸受容体アゴニストによる汚染に焦点をあててー, 用水と廃水, 査読有, 51 巻, 5 号, 2009, 405-413
- ⑤ Daisuke Inoue, Koki Nakama, Hisae Matsui, Kazunari Sei, Michihiko Ike, Detection of agonistic activities against five human nuclear receptors in river environments of Japan using a yeast two-hybrid assay, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 査読有, Vol. 82, No. 4, 2009, 399-404

[学会発表] (計 6 件)

- ① 井上大介, 澤田和子, 和田祐一郎, 清和成, 中西剛, 池道彦, 下水中のレチノイン酸受容体アゴニストの特定とその下水処理系における挙動の解析, 第 44 回日本水環境学会年会, 2010 年 3 月 15 日, 福岡大学七隈キャンパス (福岡県福岡市)
- ② 井上大介, 崔英民, 澤田和子, 清和成, 池道彦, 酵母 two-hybrid 法を用いたレチノイン酸受容体アンタゴニストによる水環境汚染の実態調査, 日本水処理生物学会第 46 回大会, 2009 年 11 月 13 日, 高知市文化プラザかるぽーと (高知県高知市)
- ③ 澤田和子, 井上大介, 渡辺太郎, 中間公規, 清和成, 中西剛, 池道彦, 下水中のレチノイン酸受容体アゴニスト汚染の調査と原因物質の特定, 日本水処理生物学会第 46 回大会, 2009 年 11 月 12 日, 高知市文化プラザかるぽーと (高知県高知市)
- ④ 井上大介, 渡辺太郎, 澤田和子, 中間公規, 清和成, 中西剛, 池道彦, 酵母 two-hybrid 法による水環境中の各種核

内受容体アゴニスト活性の評価, 第 43 回日本水環境学会年会, 2009 年 3 月 18 日, 山口大学吉田キャンパス (山口県山口市)

- ⑤ 澤田和子, 渡辺太郎, 中間公規, 井上大介, 清和成, 中西剛, 池道彦, 酵母 two-hybrid 法による河川水中の環境レチノイド汚染の実態調査, 第 43 回日本水環境学会年会, 2009 年 3 月 18 日, 山口大学吉田キャンパス (山口県山口市)
- ⑥ 井上大介, 渡辺太郎, 澤田和子, 中間公規, 清和成, 中西剛, 池道彦, 猪名川におけるレチノイン酸受容体アゴニスト活性の分布調査, 日本水処理生物学会第 45 回大会, 2008 年 11 月 14 日, 秋田市文化会館 (秋田県秋田市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 大介 (INOUE DAISUKE)
大阪大学・工学研究科・特任研究員
研究者番号: 70448091

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者