

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25892001

研究課題名(和文) ペットのネコにおける有機ハロゲン代謝物の分析法開発と代謝機構解明およびリスク評価

研究課題名(英文) Development of analytical method for the organohalogen metabolites elucidation of metabolic capacities and risk assessment in the pet cat

研究代表者

水川 葉月 (Mizukawa, Hazuki)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・助教

研究者番号：60612661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ペットのネコに着目し、研究報告例の少ない液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いた有機ハロゲン化合物であるポリ塩化ビフェニル(PCBs)およびポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDEs)の代謝物の分析法を開発した。さらに、第I相、第II相代謝活性を測定しネコにおける有機ハロゲン化合物に対する代謝能評価を試みた。

研究成果の概要(英文)：This study was develop the analyzing method for hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs) and the glucuronidation compounds of OH-PCBs using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Moreover, it was measured the glucuronidation activities using the liver microsomes of the cats. I also attempted the evaluation of metabolic capacities of PCBs and PBDEs in the cats.

研究分野：環境化学

キーワード：ネコ 有機ハロゲン化合物 血清 環境分析 水酸化代謝物 ペット 第I相反応 第II相反応

1. 研究開始当初の背景

有機ハロゲン化合物であるポリ塩化ビフェニル (PCBs) やポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) は、環境や野生生物、ヒトから広く検出され、その生体リスクが危惧されている。とくに、PBDEs は家具やカーペット、カーテンなどに難燃目的で大量に添加されており、室内環境の汚染が深刻化している。近年、ペットとして飼育されているネコの PBDEs 高蓄積が明らかとなり、米国で増加する甲状腺機能亢進症と PBDEs およびその水酸化代謝物 (OH-PBDEs) との関連性が強く疑われている。申請者はこれまでに、ペットのイヌ・ネコ血中およびペットフード中有機ハロゲン化合物を分析し、ネコ血中 OH-PBDEs 濃度はイヌに比べ高値であることを明らかにした。また、海産物を原材料とするキャットフード中には、海洋天然生成物であるメトキシ PBDEs (MeO-PBDEs) が OH-PBDEs よりも高濃度で残留していた。近年の研究では、MeO-PBDEs は哺乳類や魚類の生体内で脱メチル化され OH-PBDEs へ変化することが報告されており、ネコの血中 OH-PBDEs の起源の一部分は、餌から摂取した MeO-PBDEs が代謝によって脱メチル化され血中に残留したものと推察された。近年、OH-PBDEs は神経伝達物質や甲状腺ホルモンに影響を及ぼすことが指摘されており、代謝による化学物質の生体内変化がより毒性を増し、健康に影響を及ぼしているのではないかと懸念され、リスク評価が求められている。

さらに、申請者のこれまでの研究では、多様な陸棲哺乳類の血中 PCBs、PBDEs および代謝物である水酸化 PCBs (OH-PCBs) や OH-PBDEs を分析し、残留レベルや蓄積特性を明らかにしてきた。その結果、親化合物である PCBs の残留組成に生物種間には認められないが、代謝物である OH-PCBs の異性体組成には種差が認められ、生物種特異的な代謝能が関与した結果と推察された。なかでも、ネコの OH-PCBs 残留パターンは他種と大きく異なり、本種は特異な代謝機能を有することが示唆された。

一方、ネコはフェノール化合物の代謝を担うグルクロン酸抱合能を欠損していることが知られている。そのため、グルクロン酸抱合で代謝・排泄されるフェノール類の代謝能は低く、水酸化代謝物のハイリスクアニマルであると考えられる。

しかしながら、イヌやネコなどペットの PCBs、PBDEs 汚染実態解明に関する研究は開始されたばかりであり、暴露量や代謝能、リスクなど不明な点が多い。とくに、ペット動物は化学物質に高濃度暴露していると考えられるが、分析技術の難しさからその暴露実態、代謝能や残留傾向、生体内動態の解明に関する研究は極めて少なく、水酸化代謝物を分析した研究はわずかしかない。

このような背景と経緯から、ペット動物に対する毒性が懸念される PCBs と PBDEs の代

謝物に着目し、暴露実態と代謝メカニズムの解明およびリスクを包括的に評価する研究を実施した。

2. 研究の目的

社会的関心の高いペット動物の化学汚染と健康リスクに焦点を当て、とくにネコの血液に残留する有機ハロゲン代謝物の残留レベルや体内動態、排泄能の解明を目的とし、甲状腺機能障害に及ぼす影響の検証を試みる。すなわち、1. 液体クロマトグラムタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた代謝物の分析法開発とネコ血中に残留する有機ハロゲン化合物と水酸化代謝物の分析、2. 肝ミクロソームを用いた代謝機構の解明、3. 甲状腺ホルモンに及ぼす影響の検証およびリスク評価、等の課題に取り組む。具体的には、他の陸棲哺乳類と代謝能が異なるネコに着目して、甲状腺機能亢進症と化学物質の因果関係を解析し、代謝物のリスクを評価する。また、CYPs による第 I 相反応と抱合酵素による第 II 相反応を含む代謝経路およびトキシコキネティクス (吸収・分布・代謝・排泄) を解明する。

3. 研究の方法

液体クロマトグラフトンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた有機ハロゲン化合物の水酸化代謝物 (OH-PCBs、OH-PBDEs) および抱合体化合物 (グルクロン酸抱合、グルタチオン抱合、硫酸抱合) の分析法を開発し、北海道大学付属動物病院の協力を得て採取したペットのネコを対象に、血中に残留するこれら代謝物を分析する。また、血中の甲状腺ホルモン濃度を測定し、これらの代謝物が甲状腺機能亢進症に与える影響について統計学的に解析するとともに、メタボローム解析を構築して疾病に関わるバイオマーカーの検索を試みる。さらに、イヌ・ネコの肝ミクロソームを作成し、第 I 相・第 II 相反応のバイオマーカーである薬物代謝酵素 (CYPs) や抱合酵素の活性も測定する。

4. 研究成果

【液体クロマトグラムタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた代謝物の分析法開発とネコ血中に残留する有機ハロゲン化合物および水酸化代謝物の分析】

標準溶液を用いて OH-PBDEs の測定条件を検討したところ、分離が困難である 4 臭素化体の分離に成功した。また、分析に供試するペットネコの血清試料は、研究協力者により約 70 検体の血清を採取することができた。今後は前処理も含めた分析法を確立し、ペットネコ血清に残留する OH-PBDEs の分析が急務である。

【肝ミクロソームを用いた代謝機構の解明】
ネコの有機ハロゲン代謝物 (OH-PCBs、OH-PBDEs) の第 II 相抱合能を明らかにする

ため、肝ミクロソームを用いた代謝実験 w p 検討した。実験動物であるイヌやウシの肝ミクロソームに OH-PCBs を添加し、第 II 相抱合酵素の一つであるグルクロン酸抱合の代謝実験を行ったところ、親化合物の減少が認められるとともに、グルクロン酸抱合体と推察される化学物質の定性に成功した。

また、硫酸抱合活性およびグルクロン酸抱合活性を測定したところ、ネコでは他の実験動物より低いことが明らかとなった。

今後はネコの肝ミクロソームへの適応を検討し、ネコにおける第 II 相抱合能の評価と OH-PCBs の代謝機構解明を実施する。

【甲状腺ホルモンに及ぼす影響の検証およびリスク評価】

OH-PBDEs と甲状腺ホルモンの競合が指摘されている甲状腺ホルモン輸送タンパク (TTR) について、ネコの肝細胞から TTR 遺伝子を抽出・クローニングし、遺伝子配列の一端を明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Saengtienchai A, Ikenaka Y, Darwish WS, Nakayama SMM, Mizukawa H, Ishizuka M. Characterization and tissue distribution of conjugated metabolites of pyrene in the rat. J Vet Med Sci. Accepted, 査読有

Mizukawa H, Nomiyama K, Kunisue T, Watanabe MX, Subramanian A, Iwata H, Ishizuka M, Tanabe S. Organohalogen and their hydroxylated metabolites in the blood of pigs from an open waste dumping site in south India: Association with hepatic cytochrome P450. Environ Res, 138:255-263 (2015), 査読有
DOI: 10.1016/j.envres.2015.02.012.

Mizukawa H, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Sakamoto KQ, Fujita S, Ishizuka M. Testis alterations in large Japanese field mouse (*Apodemus speciosus*) of contaminated areas with low levels of co-planar polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, and dichlorodiphenyltrichloroethane. The Japanese Journal of Veterinary Research. 62:107-115 (2014), 査読有
DOI: 10.14943/jjvr.62.3.107

水川葉月、魚類の BDE-209 低濃度暴露による甲状腺シグナル伝達の攪乱、ファルマシア、50 巻、250 項、(2014), 査読有
DOI:なし

Saengtienchai A, Ikenaka Y, Nakayama M.M.S, Mizukawa H, Kakehi M, Bortey-Sam N, Darwish

W, Tsubota T, Terasaki M, Poapolathep A, Ishizuka M. Identification of inter-specific differences in phase II reactions: Determination of metabolites in the urine of 16 mammalian species exposed to environmental pyrene. Environmental Toxicology and Chemistry, 33:2062-2069 (2014), 査読有
DOI: DOI: 10.1002/etc.2656

〔学会発表〕(計 18 件)

筧麻友、池中良徳、中山翔太、水川葉月、渡邊研右、坂本健太郎、和田 昭彦、服部薫、田辺信介、野見山桂、石塚真由美、食肉目におけるグルクロン酸抱合酵素の遺伝子解析、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日~27 日、横浜パシフィコ、神奈川

筧麻友、池中良徳、中山翔太、水川葉月、渡邊研右、坂本健太郎、和田 昭彦、服部薫、田辺信介、野見山桂、石塚真由美、齧脚類においてグルクロン酸抱合酵素が担う異物代謝、第 20 回日本野生動物医学会つくば大会、2014 年 9 月 16~19 日、つくば国際会議場、茨城

Mayu Kakehi, Yoshinori Ikenaka, Shouta MM Nakayama, Hazuki Mizukawa, Kensuke P Watanabe, Kentaro Sakamoto, Akihiko Wada, Kaoru Hattori, Shinsuke Tanabe, Kei Nomiyama, Mayumi Ishizuka, Species differences of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in Carnivores, 12th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, 24th-28th September, 2014, Conference Hall of the Kyoto International Foundation, Kyoto, Japan

Hazuki Mizukawa, Kei Nomiyama, Susumu Nakatsu, Akira Kubota, Hisato Iwata, Yoshinori Ikenaka, Shouta M.M. Nakayama, Shinsuke Tanabe, Mayumi Ishizuka, Contamination status and biotransformation of organohalogen compounds in cats and dogs, 12th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, 24th-28th September, 2014, Conference Hall of the Kyoto International Foundation, Kyoto, Japan

Saya Tamura, Jean Yoo, Hazuki Mizukawa, Tetsuro Agusa, Masashi Hirano, Kei Nomiyama, Shinsuke Tanabe, Eun-young Kim, Hisato Iwata, EFFECTS OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS ON THE EXPRESSION OF CYTOCHROME P450S IN BEAGLE DOGS, 34th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (DIOXIN 2014), 31st August-5th September, 2014, Madrid, Spain

Hazuki Mizukawa, Kei Nomiyama, Miyuki Yamamoto, Yoshinori Ikenaka, Shouta M.M.

Nakayama, Shinsuke Tanabe, Mayumi Ishizuka, Contamination status of organohalogen compounds and their metabolites in the blood of pet dogs and cats, 6th International Toxicology Symposium in Africa, 29th August, 2014, Johannesburg, South Africa

筧麻友、池中良徳、中山翔太、水川葉月、渡邊研右、坂本健太郎、和田昭彦、服部薫、田辺信介、野見山桂、石塚真由美、食肉目におけるグルクロン酸抱合酵素の解析および種差、第 28 回北海道薬物作用談話会、2014 年 7 月 19 日、北海道大学、札幌

水川葉月、野見山桂、中津賞、池中良徳、中山翔太、田辺信介、石塚真由美、ペット動物における有機ハロゲン化合物の汚染実態解明と水酸化代謝物の動態解析、第 28 回北海道薬物作用談話会、2014 年 7 月 19 日、北海道大学、札幌

水川葉月、ペットのネコは化学物質のハイリスクアニマルか？、第 1 回未来設計 FS「化学的不均衡を乗り越えるために」研究会、2014 年 7 月 29 日、総合地球環境学研究所、京都府（招待講演）

筧麻友、池中良徳、中山翔太、水川葉月、渡邊研右、坂本健太郎、和田昭彦、服部薫、田辺信介、野見山桂、石塚真由美、鰭脚類におけるグルクロン酸抱合酵素の解析、第 41 回日本毒性学会学術年会、2014 年 7 月 2 日～4 日、神戸コンベンションセンター、兵庫

筧麻友、中山翔太、水川葉月、池中良徳、渡邊研右、坂本健太郎、和田昭彦、服部薫、田辺信介、野見山桂、石塚真由美、鰭脚類を中心とした食肉目において異物代謝を担うグルクロン酸抱合酵素の特徴、第 41 回日本毒性学会学術年会、2014 年 7 月 2 日～4 日、神戸コンベンションセンター、兵庫

水川葉月、池中良徳、野見山桂、田辺信介、宇根有美、伊藤真輝、高江洲昇、長野靖子、中山翔太、石塚真由美、ネコ科動物における有機ハロゲン化合物の代謝能解析、第 23 回環境化学討論会、2014 年 5 月 14 日～16 日、京都大学、京都

江口哲史、野見山桂、落合真理、水川葉月、長野靖子、神原千佳、中川勝博、田中幸樹、宮川治彦、田辺信介、GC-ECNI/MS による脳・肝臓中水酸化 PCBs の一斉分析法開発、第 23 回環境化学討論会、2014 年 5 月 14 日～16 日、京都大学、京都

山本 恭央、野見山桂、水川葉月、長野靖子、田辺信介、ペットネコにおける有機ハロゲン化合物および水酸化代謝物の汚染実態と曝露源の推定、第 23 回環境化学討論会、

2014 年 5 月 14 日～16 日、京都大学、京都

野見山桂、長野靖子、水川葉月、中津賞、田辺信介、イヌ・ネコに残留する PCBs の代謝・排泄能とその種間比較、第 23 回環境化学討論会、2014 年 5 月 14 日～16 日、京都大学、京都

高口倅暉、野見山桂、長野靖子、水川葉月、落合真理、中津賞、田辺信介、イヌ・ネコにおける PCBs および水酸化代謝物の脳移行、第 23 回環境化学討論会、2014 年 5 月 14 日～16 日、京都大学、京都

寶來 佐和子、中北 有里子、水川葉月、野見山桂、渡邊泉、田辺信介、岡本 芳晴、国末達也、イヌ・ネコにおける微量元素レベルの特性とその暴露起源の探索、第 23 回環境化学討論会、2014 年 5 月 14 日～16 日、京都大学、京都

石井千尋、池中良徳、中山翔太、水川葉月、齋藤慶輔、渡邊有希子、田辺信介、野見山桂、林光武、増田泰、坂本健太郎、石塚真由美、日本に生息する猛禽類における鉛汚染状況の解析、第 23 回環境化学討論会、2014 年 5 月 14 日～16 日、京都大学、京都（優秀学生賞受賞）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ
北海道大学大学院獣医学研究科毒性学教室
<http://tox.vetmed.hokudai.ac.jp/>

フェイスブック
北海道大学大学院獣医学研究科毒性学教室

<https://www.facebook.com/tox.vetmed.hokudai>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水川 葉月 (MIZUKAWA Hazuki)
北海道大学・大学院獣医学研究科・環境獣
医科学講座・助教
研究者番号：60612661

(2) 研究協力者

石塚 真由美 (ISHIZUKA Mayumi)
北海道大学・大学院獣医学研究科・毒性学
教室・教授

池中 良徳 (IKENAKA Yoshinori)
北海道大学・大学院獣医学研究科・毒性学
教室・准教授

中山 翔太 (NAKAYAMA Shouta)
北海道大学・大学院獣医学研究科・毒性学
教室・助教

滝口 満善 (TAKIGUCHI Mitsuyoshi)
北海道大学・大学院獣医学研究科・内科学
教室・教授

野見山 桂 (NOMIYAMA Kei)
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター
化学汚染・毒性解析部門・准教授