

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月12日現在

機関番号：27401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：平成22年度～平成24年度

課題番号：22401008

研究課題名（和文） 中国癌村発生要因としての遺伝毒性物質

研究課題名（英文） The toxic substances as a factor of causing the region of a high risk of cancer incidence in China.

研究代表者 有菌幸司 (Koji Arizono)

熊本県立大学 環境共生学部・教授

研究者番号：70128148

研究成果の概要（和文）：中国「癌村」において、対象地域と癌村の複数場所で環境試料（遺伝毒物含有と思われる生活環境水）を得て、癌村周辺の工業地域の情報をもとに多様な化学物質の濃度を分析したところ、*o,p'*-DDTが環境水中に検出された。そこでその生態影響評価をメダカのDNAマイクロアレイを用いて行った。一方で、カドミウムに特化したイムノクロマトグラフィを活用した環境水や食品汚染調査（農作物および水産物）を中国海南省CDCと協力して実施した。地域住民の健康調査も重金属分析とともに行った。その結果、海南省水産物の鉛汚染は0.005～0.717mg/kg、カドミウム河川汚染は 0.100×10^{-3} ～0.648 mg/kgが検出された。

研究成果の概要（英文）：The environmental samples (living environment water considered to contain toxic substance) were collected from the region and several the provinces which have a high risk of cancer incidence, and were analyzed the concentration of various chemical substances based on the information on the industrial area in China. As a result, *o,p'*-DDT was detected. Therefore, the ecology impact evaluation was performed using the DNA microarray of medaka. On the other hand, environmental water and food (agricultural products and a marine product) contamination of metals study using ICP-MS and the immune-chromatography which specialized in cadmium were cooperated with China Hainan CDC. At the area which conducted metallic pollution investigation of the heavy metal (cadmium and lead). The local resident's health survey was performed with metal analysis. The lead pollution of the Hainan marine products was detected in 0.005 -0.717mg/kg, and River contamination of cadmium was detected 0.100×10^{-3} - 0.648 mg/kg was detected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
平成23年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
平成24年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	12,800,000	3,840,000	16,640,000

研究分野：総合新領域

科研費の分科・細目：環境影響評価、環境政策

キーワード：環境影響評価、環境政策

1. 研究開始当初の背景

河川や湖沼など工場廃水や生活下水由来の環境水の既知化学物質（ダイオキシン類・重金属・内分泌攪乱物質など）については、これまで汚染実態解明や生物影響評価が精力的に行われてきた。しかしながら、これら生活環境水由来の化学物質は多種多様なため、未知化学物質や非意図的生成物などの複合した総体として、化学物質の包括的モニタリングや生物影響評価が必要である。中国「癌村」の遺伝毒物を含有すると思われる生活環境水において、対象地域と癌村の複数場所での試料を対象に遺伝毒物質のインパクト（環境汚染物質の濃度やその曝露量による発癌率の変化）を評価するために多様なバイオマーカーも活用する。

2. 研究の目的

中国では地域の住民に他地域より多くの癌発生がみられる「癌村」の存在が確認されている。一方で、中国では毎年少なくとも120万人の先天性障害児が生まれているという。これらの原因は工業汚染排水に由来すると考えられるが、環境リスクと発癌リスク間の因果関係は未だ不明である。比較的高い発癌の原因を特定するために、癌村の生活環境水を対象として、(1) 化学物質の一斉スクリーニング、(2) DNA マイクロアレイ解析による発現遺伝子変動からの潜在的毒性影響評価を行い、優先的にリスク評価に必要な遺伝有害物質を特定することを試みる。以上本研究では、これまで申請者が開発してきた機器分析手法や多くの発癌のバイオマーカーに危機解析手法を駆使し、癌のリスクアセスメントの新しい手法（環境リスク評価手法）開発することで癌村の原因と考えられるいくつかの要因を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

中国「癌村」の遺伝毒物を含有すると思われる生活環境水において、対象地域と癌村の複数場所での試料を対象に遺伝毒物質のインパクトを曝露に基づくアセスメント（環境試料を得て、癌村周辺の工業地域の情報から遺伝毒物を中心に多様な化学物質の濃度を分析、併せて、職業、居住期間、ライフスタイルなどを考慮し「癌村」と「近隣の対照村」の住民間の化学物質の生体曝露レベルの差を比較）を実施。また、その

曝露量による発癌率の変化を評価するためにバイオマーカー（センチチュウ・酵母。メダカ胚マイクロアレイを活用し、遺伝毒物の環境モニタリング及び生物学的モニタリングを実施。以上、機器分析とバイオアッセイも組み合わせた疫学調査と実験室実証から特異要因分析を試み、典型的な遺伝毒物や発癌物質の分析によって癌が高く発生する要因特定を試みた。

4. 研究成果

1. 環境化学物質・金属群の網羅的一斉分析

GC/MS で分析可能な多成分の化学物質を一斉に分析できるデータベース「GC/MSD 精度管理・相対定量ソフトウェア Naginata」を活用し、環境水（河川や湖沼など）の化学物質を一斉スクリーニングする手法を確立した。本データベースは、標準物質を使用することなく、短時間に約700—800物質のスクリーニングが可能である。対象とする化合物は、多環芳香族・PCBなどの化合物（160種類）、フェノール類などの含酸素化合物（81種類）、芳香族アミン・ニトロ化合物などの含酸素化合物（75種類）、含硫黄化合物（8種類）、含リン化合物（6種類）、殺虫剤・除草剤・殺菌剤などの農薬（253種類）に加え容器包装添加剤も追加した。一方、カドミウムに特化したイムノクロマトグラフィを活用した環境水や食品汚染調査を中国海南省CDCと協力して、地域住民の健康調査および水質および農作物の重金属（カドミウムおよび鉛）と水産物の金属汚染調査を行ったところ、カドミウムの河川汚染ならびに海南省水産物の鉛汚染は0.005~0.717mg/kg、カドミウム汚染は 0.100×10^{-3} ~0.648 mg/kgが検出された。

2.

DNA マイクロアレイ解析による遺伝子発現変動やエピジェネティクス変動と潜在的毒性影響評価

既存の機器分析や種々の生物を用いたバイオアッセイだけでは、種々の化学物質が混在した環境水の有害性評価は不十分と考えられる。早期アラームシステムとして遺伝子レベルでのバイオアッセイを活用することは、環境リスク評価に極めて有効である。本研究では、多数の遺伝子発現変動を

網羅的に解析できるメダカおよびアミ DNA マイクロアレイを活用して、遺伝子発現変動やエピジェネティクス変動を検出手法を用い未知化学物質や非意図的生成物などの複合した総体として、化学物質の包括的リスク評価を試みた。その結果、POPs に指定され、使用が禁止されていたが、近年では、マラリア対策などの特定条件下で使用が推奨され、発展途上国などの環境中で検出されている *o,p'*-DDT が環境水中に検出されたためその生態影響評価をメダカの DNA マイクロアレイを用いて行ったところ、choriogenin 遺伝子などの発現量増加が確認された。また、仔魚においてガン関連遺伝子(ガン遺伝子及びガン抑制遺伝子)や発生に関与する遺伝子の発現量増加も確認され、発がん要因としての *o,p'*-DDT のガン化の可能性や発生への影響(奇形発生など)が示唆された。さらに、甲状腺ホルモン受容体関連の遺伝子で甲状腺受容体、エストロゲン受容体及びガン遺伝子と相互作用を持つことが知られている *med16* 遺伝子の発現量増加を顕著に検出され、*med16* 遺伝子変動により、*o,p'*-DDT 曝露は発がん要因の1つになり得ることが示唆された。

一方で、薬用石鹼などに多く使用され、我々の生活に大変身近な抗菌剤である TCS と TCC の生体への影響についてアミの DNA マイクロアレイを用いて評価を行ったところ、vitellogenin 遺伝子と生体防御に関連している遺伝子(clottable protein 遺伝子や clotting protein 前駆体遺伝子)の発現量増加を確認できた。vitellogenin 遺伝子の発現量増加より、生体内における卵成熟などが促進されている可能性が示唆され、脱皮の抑制など成長・成熟への阻害も確認された。このことは、TCS や TCC は短期曝露で、卵成熟など内分泌系に影響を及ぼし、長期曝露では、TCS や TCC が発がん要因を増大させる可能性が推測された。

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 13 件)

①Ninagawa M, Takemoto N, Ji H, Miyasaka H, Okuhata H, Ishibashi Y, Arizono K., Removal of bisphenol A related compounds by *Portulaca oleracea* (in Japanese) Environment and safety, 査読あり vol. 2(1) 23-29 2011.

②Ji H, Kawakami S, Inokuchi A, Shinohara R, M. Koga, Uchiyama, T, Katase T, Arizono K. Study on GC/MS analytical methods for branched nonylphenol isomers, (in Japanese) Environment and safety, 査読あり vol. 2(1) 31-37 2011.

③Tahara M, Nakashima S, Sugimoto N, Arizono K., Nishimura T., Uncertainty depended on standard solution preparation for water quality examination and influence on accuracy of quantitative analysis. Journal of Japan Water Works Association 査読あり Vol181 (5) 10-16 2012.

④Yamagami T, Nakashima S, Ono Y, Ishibashi Y, Arizono K., Kadokami K., The applicability of GC/MS detection and quantification using a database for the determination of pesticides in river water, (in Japanese), Environment and safety, 査読あり vol. 2(2) 159-169 2011.

⑤Matsuo H, Sakamoto H, Arizono K., Shinohara R, Behavior of pharmaceuticals in waste water treatment plant in Japan. Bull Environ Contam Toxicol., 査読あり 87(1) 31-35 2011

⑥Uchida M, Nakamura H, Kagami Y, Kusana T, Arizono K. Gene expression analysis of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to *o,p'*-DDT using DNA microarray, Organohalogen Compounds 査読あり 73, 484-487 2011

⑦Ishibashi Y, Arizono K., Nakamichi T, Takemoto N, Kai H, Shimase H, Takemasa T, The Research on the Generation Control of Dioxines from the Small Incinerator, Organohalogen Compounds 査読あり 73, 1788-1791 2011.

⑧ Uchida M, Takumi, S, Tachikawa K, Yamauchi R, Goto Y, Matsusaki H, Nakamura H, Kagami Y, Kusano T, Arizono K, Toxicological effects of glyphosate formulation in Japanese medaka (*Oryzas Latipes*), The Journal of Toxicological Sciences, 査読あり Vol. 37 (2) 245-254 2012

⑨ Okuhata H, Ninagawa M, Takemoto N, Ji H, Miyasaka H, Ishibashi Y, Arizono K, Phytoremediation of various bisphenol derivatives by *Portulaca oleracea* cv Bioengineerin, 査読あり Vol 115(1), 55-57, 2012

⑩ Matsuo H, Morodome A Sankoda K, Kobayashi J, Koga M, Ishibashi Y, Arizono K, Shinohara, R Evaluation of triclosan degradation process using pulse discharge in pure water (in Japanese). Environment and safety, 査読あり vol. 3 27-31 2012.

⑪ Nakashima S, Ji H, Ishitobi S, Yamagami T, Asai K, K, Kadokami K, Musuga M, Kawamura Y, Koga M, Shinohara R, Ishibashi H, Tominaga N, Arizono K. Development of a novel GC/MS database for the determination of additives for containers and packaging and its application to processed foods' analysis, Japanese Journal of Food Chemistry, 査読あり 12(1), 42-51 2013.

⑫ Nakashima S, Ono Y, Yamagami T, Koga S, Shinohara R, Arizono K, Hayashi Y. Theoretical estimation of measurement precision for materials in database of GC/MS

Environment and safety, 査読あり vol. 4(1) 3-8 2013.

⑬ Kobayashi J, Sun C, Ji H, Ishibashi Y, Shinohara R, Koga M, Arizono K Acute toxicity of 4-nonylphenol isomers to larval medaka *Oryzias latipes* Environment and safety, 査読あり 4(1), 9-14 2013.

[学会発表] (計 30 件)
国内 18 件

① 井口綾子、有蘭幸司他 9 名 線虫 *C. elegans* におけるナノシリカの生体影響及び遺伝子発現変動解析 第 37 回 日本トキシコロジー学会学術年会

② 内田雅也、有蘭幸司他 6 名 グリホサート製剤がヒメダカにおよぼす影響 第 37 回 日本トキシコロジー学会学術年会

③ 有蘭幸司、竹本直道、川上茂樹、内田雅也、吉嚇哲 最終処分場由来の浸出水中有機フッ素化合物のリスク評価 第 19 回 環境化学討論会

④ 吉嚇哲、川上茂樹、竹本直道、内山武人、片瀬隆雄、有蘭幸司 下水処理場の処理過程におけるノニルフェノール異性体の挙動 第 19 回 環境化学討論会

⑤ 桑原和子、有蘭幸司他 8 名 沖縄本島の漁港底質中の有機スズ化合物濃度および他地域との比較 第 19 回 環境化学討論会

⑥ 中川理緒、鏑迫典久、有蘭幸司 タイヤチップに対するユスリカを用いた毒性試験法の検討 第 16 回日本環境毒性学会・パイオアッセイ研究会

⑦ 内田雅也、有蘭幸司他 6 名 メダカ DNA マイクロアレイを用いたグリホサート製剤の生体影響評価 第 16 回日本環境毒性学会・パイオアッセイ研究会

⑧ 渡辺郁子、井口綾子、本田栄子、有蘭幸司 熊本県における大豆、大豆製品の

Roundup Ready Soybean 混入状況

第 100 回 日本食品衛生学会

⑨上田亜紀、吉嚇哲、田崎幸美、高橋まどか、白土英樹、有菌幸司 ICP-MS による飼料米鶏卵中重金属類の一斉分析 第 100 回日本食品衛生学会

⑩Ishibashi H, Arizono K and Iwata H, Effects of endogenous and xenobiotic compounds on DNA binding and transactivation of the crustacean ecdysteroid receptor. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 13 回研究発表会

⑪井口綾子、有菌幸司 線虫をモデル生物としたナノシリカの生態影響評価 日本薬学会年会

⑫竹本直道、吉嚇哲、石橋康弘、大場和彦、有菌幸司 最終処分場由来浸出水のリスク評価-多元素分析からのアプローチ- 第 20 回 環境化学討論会

⑬郡山千早、有菌幸司 他 10 名 乳がんおよび良性乳腺症例における脂肪組織中の有機塩素系化合物レベル 第 20 回 環境化学討論会

⑭三浦嘉仁、有菌幸司 他 5 名 使用方法の異なる PPCPs をマーカーとして用いた河川水の生活排水等による汚濁パターンの分類法の開発 第 20 回 環境化学討論会

⑮富永伸明、山口明美 有菌幸司 高電界パルスを用いた化学物質の初期発生影響評価法の開発-パルス印加およびタンパク合成阻害剤曝露によるメダカ卵の遺伝子発現変動の調査- 日本内分泌攪乱化学物質学会第 14 回研究発表会

⑯Hirano M, Arizono K, Iwata H, In vitro and in silico analyses of the interaction of environmental chemicals with the mysid ecdysteroid receptor 日本内分泌攪乱化学物質学会第 14 回研究発表会

⑰内田雅也 有菌幸司 他 6 名 アミ DNA マイクロアレイを用いた DDT の生態影響評価 水環境学会九州支部会

⑱荒巻愛世、富永伸明、有菌幸司 液体合成培地を用いた線虫の in vivo 評価系による Cu の影響評価 第 17 回日本環境毒性学会・パイオアッセイ研究会

⑲Ishibashi H, Arizono K, Iwata H Transactivation potencies of the Baikal Seal peroxisome proliferator-Activated receptor by brominated flame retardants 日本内分泌攪乱化学物質学会第 15 回研究発表会 □

国際学会 12 件

①Ishibashi Y, Nakamichi T, Arizono K, The Research on the Generation Control of Dioxines from the Small Incinerator. Dioxin 2011

②Uchida M, Nakamura H, Kagami Y, Kusano T, Arizono K, Gene expression analysis of Japanese medaka exposed to o,p'-DDT using DNA microarray. Dioxin 2011

③Arizono K, Ji H, Construction of Chemical Toxicity Prediction Model by Using Experiment Data— Mainly on Branched Nonylphenol Isomers —SETAC North America 2011

④Arizono K, Uchida M, Koga M, Toxicity of triclosan and triclocarban in mysid crustacean, Dioxin 2012

⑤Hirano M, Ishibashi H, Kim EY Arizono K, Iwata H, Functional analyses of the mysid ecdysteroid receptor: DNA binding ability, ligand-induced transactivation and in silico modeling. SETAC Asia Pacific 2012

⑥Kai H, Nakamichi T, Takemoto N, Kamohara S, Arizono K, Ishibashi Y, Life Cycle Assessment Evaluation of

dairy farming by input-output balance.

⑦Katsumata M, Arizono K etc (12) First results from a ring study of a new rapid alga test estimating chemical influence on algal growth. SETAC Asia Pacific 2012

⑧Tominaga N, Furukawa R, Yamashita S, Yamaguchi A, Arizono K, Effects of PFOA and fluorotelomer alcohol on *Caenorhabditis elegans* reproduction. SETAC Asia Pacific 2012

⑨Nakashima S, Yamagami T, Ogawa Y, Kadokami K, Arizono K, GC/MS Software and Database for Screening Analysis: Mechanism and Evaluation Using River Water Samples. SETAC Asia Pacific 2012

⑩Oshima S, Takagi Y, Sawadaishi K, Kataoka C, Arizono K, Rapid analytical method for surfactant in wastewater using biosensor. SETAC Asia Pacific 2012

⑪Uchida M, Takumi S, Nakamura Y, Kagami Y, Kusano T, Arizono K, Evaluation of ecological toxicity of glyphosate agrochemical components in Japanese medaka. SETAC Asia Pacific 2012

⑫Arizono K, Takemoto N, Okuhata H, Miyasaka H, Removal of bisphenol A related compounds by *Portulaca oleracea* root and horse radish peroxidase. SETAC North America 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有菌幸司 (Koji Arizono)
熊本県立大学環境共生学部
研究者番号 : 70128148

(2) 研究分担者

渡辺 知歩 (Chiho Watanabe)

東京大学・医学系研究科
研究者番号 : 70220902

石橋弘志 (Hiroshi Ishibashi)
尚絅大学短期大学部
研究者番号 : 90403857

吉田 佳督 (Hoshitoku Yoshida)
名古屋大学医学研究科
研究者番号 : 90506635

石橋康弘 (Yasuhiro Ishibashi)
熊本県立大学環境共生学部
研究者番号 : 00212928