

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24406008

研究課題名(和文)中国の水環境におけるフィブラート系薬物の残留性調査と水棲生物への影響に関する研究

研究課題名(英文) Occurrence of fibrates and their metabolites in aquatic environments in China and their effects on aquatic organisms

研究代表者

永瀬 久光 (Nagase, Hisamitsu)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40141395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：水循環が乏しい中国大都市の水系環境を対象に、蓄積性が疑われているフィブラート系薬物の存在実態を明らかにした。LC/MS/MSを用いたフィブラート系薬物同時分析法を新たに確立し、上海や浙江周辺の上水場の原水・水道水中の濃度を測定した。全ての検水からほとんどの対象化合物が検出されたが予想に反して低濃度であった(ng/L)。また生物活性ベースでの汚染度を評価するためにPPAR レポーターアッセイ系を構築し、これら対象化合物のアゴニスト活性を測定した。各活性濃度はすべての化合物でmg/Lレベルであり、今回検出された濃度よりはるかに高かった。よって、現在の中国の上水にはさほど問題はないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fibrates, which are widely used as lipidemic-modulating drugs, are poorly removed during typical drinking water treatment, and thus may remain in drinking water after treatment of source water. In this study, we established liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry combined with weak anion exchange solid-phase extraction to simultaneously determine trace levels of 3 typical fibrates and 2 of their metabolites in source water and finished water samples collected from 10 drinking water treatment plants in China. In source water, all target compounds were detected at ng/L concentrations and all compounds except fenofibrate were detected in finished water. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonistic activities of all target compounds were detected at mg/L concentrations by a PPAR reporter assay; therefore, the present results suggest that the fibrate concentrations in drinking water in China have no significant effect on human health.

研究分野：毒性学

キーワード：水環境 フィブラート PPCPs PPAR

1. 研究開始当初の背景

中国は、人口が多い上に降水量が極端に少ないために水の循環が悪く、多くの主要都市で水不足が深刻化している。水の再利用が法制化されているが、急速に水環境汚染が進行しているため、河川水や上下水等の水環境における安全性や環境保全性が懸念されている。一方で近年、医薬品やパーソナルケア製品起源の化学物質 (Pharmaceuticals and Personal Care Products; PPCPs) による水環境汚染が世界的に問題となっており、年間を通して水環境中に放出されていると想定されている。またこれらの多くは鋭敏な生理活性を有する可能性があることから、水圏生態系への影響や、薬剤耐性菌の発生を引き起こすことが懸念されている。さらに PPCPs が水道原水に存在した場合、それが浄水工程で十分に除去処理されなければ、ヒトが飲料水を介して PPCPs を摂取する可能性があり、PPCPs の水環境中での存在実態、浄水処理工程における挙動、ヒトや生態系への影響評価について関心が集まっている。特に中国においては、先述のとおり水資源が乏しいことから、水環境中の PPCPs に関する調査は中国国民にとって緊急性の高い命題であると言える。

最近、世界各国の水環境において、PPCPs の存在実態調査が精力的に行われている。中でもフィブラート系薬物は、もっとも頻繁に検出される PPCPs の一つであり、特に下水においては、検出される濃度が高いところで $\mu\text{g/L}$ レベルにまで達する。またフィブラート系薬物のみならず、その代謝物についても ng/L から $\mu\text{g/L}$ レベルの濃度で検出されることが報告されている。わが国においても、多摩川水系における下水処理水およびその下水処理場の下流域のフィブラート系高脂質血症薬 (Bezafibrate, Fenofibrate) およびその代謝物 (Crofibric acid) の調査が行われており、すべての試料中に何らかのフィブラート系薬物が検出されている¹。しかしわが国においては、水資源が豊富で水循環が十分に行われているため、このような河川水を水道原水としてこれを一生涯摂取したとしても、フィブラート系薬物摂取量は 1 日投与有効作用最小量の 30% 程度であり、幸いに現状ではそれほど緊急性の高い問題ではないことが示されている。また、上下水処理には浄水工程で塩素消毒を行っている国が多く、ほとんどの PPCPs がこの工程で分解されていることも明らかとなっている。しかしフィブラート系薬物やその代謝物は、塩素処理にも安定であり、通常の下水処理や浄水処理ではその残留性が懸念される結果となっている。

今回調査対象地域である中国においても広州の珠江で調査が行われており、比較的水資源が豊富なこの地域においても、フィブラート系薬物の代謝物である Clofibric acid が他の国と同レベルで検出されている²。近年の経済発展が著しい中国においては、今後益々生活が欧米化することが予想されることから、

それに伴いフィブラート系薬物の使用量・排出量も増えることが予測される。特に莫大な人口を抱え、かつ水資源が乏しい大都市圏での汚染状況に関しては、今から詳細な調査を行い、今後に備える必要があると考えられる。

一方、これら化合物は核内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α のアゴニストとして働くことで薬効を発揮する薬物であり、作用が非常に鋭敏であることから、ヒトを初めとする生物への影響が懸念される。またフィブラート系薬物は環境残留性が高い上に、げっ歯類では PPAR α アゴニストの過剰な摂取により、肝癌などを誘発することが報告されていることから、中国のような特殊な水資源の利用状況下においては、PPCPs による健康影響や野生生物への影響が懸念される。

今回我々は、PPCPs に関するこのような背景と、我々が行ってきた核内受容体リガンド様有害物質に関する研究経験から、本研究を行うに至った。

2. 研究の目的

我々は、水不足が深刻な国や地域において、河川水や上下水等の水環境のヒトに対する安全性確保と、ヒト以外の生物に対する環境保全のために、世界的に汚染が懸念されている PPCPs の水環境中の存在実態を明らかにし、これら水環境からの汚染物質除去策を見出すことを最終目標としている。本研究では、PPCPs の中でも、最近世界各地で環境蓄積性が疑われているフィブラート系薬物とその代謝物に焦点を絞り、水不足が深刻な中国の大都市近郊の上水施設における原水および浄水処理後の水道水を対象に物質ベースと活性ベースの双方での汚染調査を行い、その存在実体を明らかにする。

初めに、水中のフィブラート系薬物を正確に定量することを目的に、液体クロマトグラフィ-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法を用いた高感度測定法を確立する。

さらに、生物活性ベースでのモニタリングを容易にするために、PPAR α アゴニスト活性をハイスループットに測定することが可能な評価系の構築を行い、活性ベースでの汚染評価の迅速化を図る。

3. 研究の方法

(1) 調査対象化合物

中国で承認されているフィブラート系高脂血症治療薬 3 種 (Bezafibrate (BF)、Gemfibrozil (GF)、Fenofibrate (FF)) およびその代謝物 2 種 (Clofibric acid (CA)、Fenofibric acid (FA))

(2) 試料水の採取

2012 年 1 月に、上海および浙江周辺の 10 カ所の上水場から、原水および処理後の水道

水を採水した。4L の褐色ガラス瓶に満水で採水後、冷蔵保存し、できるだけ速やかに分析した。

(3) 水中フィブラート系薬物の定量

試料の前処理

固相カートリッジに試料水 500 mL を通し、蒸留水で洗浄後、窒素気流により乾燥し、ジクロロメタン 8 mL、続いて 0.5% NH₄OH 含有メタノール 6 mL で溶出した。溶出液はそれぞれ褐色ガラス瓶に回収し、窒素気流下で濃縮・乾固後、その残渣をメタノール 0.5 mL に再溶解した。

LC-MS/MS 分析

LC は ACQUITY UPLC system (Waters) を用いた。分離カラムは Waters ACQUITY UPLC BEH C18 カラム (0.7 μm; 2.1 mm × 100mm) を使い、カラム温度 40 °C、流速 0.3 mL/min で行った。サンプルの注入量は 0.5 mL とし、移動相はメタノール (A) と 0.01% 酢酸 (B) を、以下のような濃度勾配の条件で測定した。

A 40% : B 60% A 100% : B 0% (4 分)

A 100% : B 0% (1 分間保持)

A 100% : B 0% A 40% : B 60% (2 分)

(Total run time 7 分)

タンデム質量分析装置 (MS/MS) は Waters Micro mass Quattro Premier XE (triple quadrupole) を使い、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法にて以下の条件で分析した。

イオン化方式 : ESI (-), ESI (+)

測定モード :

選択的イオンモニタリング (SIM) モード
キャピラリー 電圧 : -2.5 kV (-), +3.2 kV (+)

コーン電圧 : -30 V (-), +30 V (+)

イオン源温度 : 110 °C

デソルベーション温度 : 350 °C

デソルベーションガス流量 : 800 L/h

コーンガス流量 : 50 L/h

マルチプライアー電圧 : 650 V

(4) PPAR α アゴニスト活性評価

レポーターアッセイ

PPAR α 発現ベクター (pM-hPPAR α) および PPAR 応答配列下にルシフェラーゼを連結したレポーター遺伝子 (p4×UAS-tk-luc) を導入した Hepal-6 細胞 (マウス肝癌由来細胞株) に、各濃度 (0 ~ 100 μM) の対象化合物を添加し、24 時間培養後のルシフェラーゼ活性を、Dual-Luciferase Reporter Assay System (プロメガ) を用いて測定した。

フェノフィブラート等量 (FF-EQ) の算出
環境中のフィブラート系薬物やその代謝物の影響を複合的に評価するために、対象化合物の PPAR α アゴニスト活性を FF のアゴニスト活性に換算した値 (FF-EQ) を、次式により算出した。

FF-EQ (ng-FF/L)

= 水中の各対象化合物濃度 (ng/L) × FF-EF*

* FF 係数 :

FF の 10% 効果濃度 (EC10) (mg/L) を BF、GF、CA または FA の各 EC10 で除した値

4 . 研究成果

(1) LC-MS/MS を用いたフィブラート系薬物とその代謝物の同時分析法の確立

PPCPs の分析法はこれまでに多く報告されているが、フィブラート系薬物は各化合物により極性や液性等の性質が異なるために、一つの条件ですべての化合物を同時に感度良く分析することは困難であった。そこで、今回調査対象とした 5 種類の化合物を同時定量できる LC-MS/MS 分析法の最適条件を検討した。様々な条件を試みた結果、以下のことが明らかとなった。

- ・ 前処理には、弱イオン交換・逆相カートリッジである Oasis WAX (6 mL, 150 mg, 30 μm) を使い、ジクロロメタンと 0.5% NH₄OH 含有メタノールで溶出することで効率よく目的物が得られた。
- ・ LC のカラムには UPLC BEH C18 逆相カラム (1.7 μm; 2.1 mm × 100 mm) を、移動相にはメタノールと 0.01% 酢酸を用いて勾配をかけることで分離能が向上した。
- ・ MS スペクトルの検出は ESI 法を用い、CF、GF については陰イオンモードで、BF、FF、FA については陽イオンモードで測定すると良好なシグナルが得られた。

以上より、これまで同時測定が困難であった対象化合物を、感度良く定量できる LC-MS/MS 分析法を新たに確立することができた。

(2) PPAR α アゴニスト活性測定法の検討

同じ標的分子に対して作用するフィブラート系薬物は複数存在するため、個々の薬物を定量するだけでは人や野生生物に対する実際のリスク評価を行うには不十分である。よって、複数の物質による曝露影響を想定し、活性ベースでのモニタリングが必要であると考える。そこで、化合物の PPAR α アゴニスト活性をハイスループットに測定することが可能な評価系の構築を試みた。

レポーターアッセイ系の検討

フィブラート系薬物は PPAR α アゴニスト活性を示すものの、その強度は他の核内受容体アゴニストと比較すると弱いため、感度良く検出できる系の構築が難題であった。しかし今回、「3 . 実験方法 (4) 」のように遺伝子を導入したマウス肝癌細胞株 Hepal-6 細胞を用いて最適条件を検討したところ、FF 10 μM で陰性対照群の 5 倍以上、100 μM で

10 倍以上の活性上昇を示す条件を見出すことができた。

大腸菌 two-hybrid 系の検討

培養細胞を用いた上記のようなレポーターアッセイはスループット性に欠けるため、多くの検体を測定することが難しく、測定コストも高いという欠点を有している。

一方で、近年このような問題を解決するために、細胞内における蛋白質間相互作用を調べる手法として開発された酵母 two-hybrid 法を応用した方法が用いられている。我々も既にこの手法を用いて、各種核内受容体のリガンド活性の 1 次スクリーニングを行っている。しかし、PPAR α 、 β 、 γ に関しても同様の手法で系の構築を試みてきたが、バックグラウンド値が非常に高く、リガンド依存的な反応がみられる系の構築には至っていない。この理由として、真核生物である酵母には酵母自身の PPAR を有しており、またそのリガンドとなるような脂肪酸類が豊富に存在している。すなわち、酵母内に内在しているこの PPAR リガンド(脂肪酸類)が恒常的に PPAR を活性化するため、外来的にリガンドを添加しても、その反応を見ることはできないと考えられる。そこで本研究では、宿主細胞を原核細胞である大腸菌に変更し、大腸菌 two-hybrid 法を応用して PPAR α のリガンドスクリーニング系の構築を行った。しかし大腸菌を用いた評価系では、予備検討として既に酵母を用いた評価系で良好に機能している PPAR 以外の核内受容体を発現させて、アゴニストを作用させても酵母ように良好な応答が得られなかったことから、大腸菌 two-hybrid 系は核内受容体リガンドスクリーニング系には不向きである可能性が示唆された。

研究計画ではフィブラート系薬物を生物活性ベースで迅速に検出するために、大腸菌 two-hybrid 系を用いた PPAR α リガンド評価系を構築する予定であったが、今回の検討結果から、残念ながら現状では難しいことが判明した。しかし今回、Hepal-6 を用いたレポーターアッセイ系において、 μ M レベルで検出できる評価系を確立することができた。

(3) 中国の環境水中フィブラート系薬物調査
上海および浙江周辺の上水場(10カ所)から原水および上水処理後の水道水をサンプリングし、対象化合物について調査した。

試料水中フィブラート系薬物の定量

今回の検討で確立した上記「4. 研究成果(1)」に示す LC-MS/MS 分析法を用いて、上水場の原水および水道水中の対象化合物濃度を測定した。全 10 カ所の上水場で、今回の対象化合物全てが原水より検出された。また、上水処理後の水道水からは FF を除くすべての化合物が検出されたが、その濃度は 0.06

ng/L (GF) から 0.80 ng/L (CA) と予想に反してかなり低かった。

PPAR α アゴニスト活性での評価

生物活性ベースでの汚染度を評価するために、「4. 研究成果(2)」で構築したレポーターアッセイ系を用いてこれら対象化合物の PPAR α アゴニスト活性を測定し、これを元に各検水中の FF 等量 (ng-FF/L) を算出した。今回サンプリングした 10 カ所の施設の水道水における総 FF 等量(すべての対象化合物の FF 等量の和)の平均値は 0.94 ng-FF/L であり、これはドイツをはじめとするヨーロッパ数カ国の水道水中総 FF 等量 (0.95–61 ng-FF/L: 既報告のフィブラート系薬物濃度から算出)と比較して低い値であった。また今回対象とした化合物が PPAR α アゴニスト活性を示した濃度は mg/L レベルであり、水道水中に検出された濃度 (ng/L レベル) はこれに比べてはるかに低かった。

以上の結果より、2012 年現在での中国の上水場における原水および水道水は、生物活性ベースを考慮しても、大きな問題はないことが明らかとなった。

<引用文献>

1. 久保田領志、鈴木俊也、田原麻衣子、清水久美子、西村哲治、水環境中の PPCPs のモニタリングと浄水工程を想定した処理性評価、**水環境学会誌**、31 巻、2008、634–649
2. Peng X, Yu Y, Tang C, Tan J, Huang Q, Wang Z., Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China., *Sci Total Environ.* 397 巻, 2008, 158–166.

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9件)

- Hiromori Y, Yui H, Nishikawa JI, Nagase H, Nakanishi T, Organotin compounds cause structure-dependent induction of progesterone in human choriocarcinoma Jar cells, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 査読有り, 2014, in press
DOI: 10.1016/j.jsbmb.2014.10.010
- Imai S, Tokumoto M, Fujiwara Y, Honda A, Hasegawa T, Seko Y, Lee JY, Nagase H, Satoh M, Gene expression differences in the duodenum of 129/Sv and DBA/2 mice compared with that of C57BL/6J mice, *The Journal of Toxicological Sciences*, 査読有り, 39 巻, 2014, 173–177
DOI: 10.2131/jts.39.173
- Gutierrez-Mazariegos J, Kumar Nadendla E,

Lima D, Kane M, Nishikawa J, Hikomori Y, Nakanishi T, Santos MM, Castro LFC, Bourguet W, Schubert M, Laudet V, A mollusk retinoic acid receptor (RAR) ortholog sheds light on the evolution of ligand binding, *Endocrinology*, 査読有り, 155 巻, 2014, 4275-4286

DOI: 10.1210/en.2014-1181

Tokumoto M, Ohtsu T, Imai S, Honda A, Nagase H, Satoh M: DNA microarray analysis of hepatic gene expression in mice exposed to cadmium for 30 days, *The Journal of Toxicological Sciences*, 査読有り, 38 巻, 2013, 155-157

DOI: 10.2131/jts.38.155

Ido A, Ishihara S, Kume A, Nakanishi T, Monguchi Y, Sajiki H, Nagase H, Practical method for PCB degradation using Pd/C-H₂-Mg system, *Chemosphere*, 査読有り, 90 巻, 2013, 57-64

DOI:10.1016/j.chemosphere.2012.06.074

Onodera A, Tani M, Michigami T, Yamagata M, Min KS, Tanaka K, Nakanishi T, Kimura T, Itoh N, Role of megalin and the soluble form of its ligand RAP in Cd-metallothionein endocytosis and Cd-metallothionein-induced nephrotoxicity *in vivo*, *Toxicology Letters*, 査読有り, 212 巻, 2012, 91-96

DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.05.012

Kobayashi R, Nakanishi T, Nagase H, Trichloroethylene enhances TCR-CD3-induced proliferation of CD8⁺ rather than CD4⁺ T cells, *The Journal of Toxicological Sciences*, 査読有り, 37 巻, 2012, 381-387

DOI: 10.2131/jts.37.381

Sawada K, Inoue D, Wada Y, Sei K, Nakanishi T, Ike M, Detection of retinoic acid receptor agonistic activity and identification of causative compounds in municipal wastewater treatment plants in Japan, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 査読有り, 31 巻, 2012, 307-315

DOI: 10.1002/etc.741

Ishihara S, Ido A, Monguchi Y, Nagase H, Sajiki H, Pd/C-catalyzed dechlorination of polychlorinated biphenyls under hydrogen gas-free conditions, *Journal of Hazardous Materials*, 査読有り, 229-230 巻, 2012, 15-19

DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.05.005

[学会発表](計29件)

松田健志、大塚佑基、青木 明、中西 剛、永瀬久光、成熟期マウスの性腺機能によるトリフェニルスズの毒性発現性修飾、日本薬学会第135年会、2015年3月25-28日、神戸学院大学(兵庫県神戸市)

大塚佑基、青木 明、中西 剛、永瀬久光、卵巣機能によるTPT毒性発現修飾、第4回

メタロミクス研究フォーラム、2014年11月7-8日、武蔵野大学(東京都西東京市)
Nakanishi T, Hikomori Y, Nishikawa J, Nagase H, Organotin compounds cause structure-dependent induction of progesterone in human choriocarcinoma Jar cells, EuroTox 2014: 50th Congress of the European Societies of Toxicology, 2014年9月7-10日、Edinburgh (UK)

桑山 隼、廣森洋平、西川淳一、中西 剛、永瀬久光、酵母 two-hybrid 法を用いたヒトおよびマウス PXR アゴニスト活性評価系の構築、第41回日本毒性学会学術年会、2014年7月2-4日、神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

廣森洋平、中西 剛、永瀬久光(招待講演)、核内受容体を介した有機スズ化合物の毒性、第41回日本毒性学会学術年会、2014年7月2-4日、神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

大塚佑基、青木 明、中西 剛、永瀬久光、成熟期雌性マウスにおけるトリフェニルスズの毒性試験、日本薬学会第134年会、2014年3月27-30日、熊本大学(熊本県熊本市)

Nakanishi T(招待講演)、Structure activity relationships in organotin-induced toxicity via retinoid X receptor signaling pathway, International Society of Trace Element Research in Humans 2013, 2013年11月18-22日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

廣森洋平、中西 剛、永瀬久光(招待講演)、核内受容体を介した有機スズ化合物の毒性、メタルバイオサイエンス研究会 2013、2013年9月26-27日、静岡県立大学(静岡県静岡市)

中西 剛、廣森洋平、山口寿之、永瀬久光、附着生物の核内受容体と有機スズ化合物の防汚作用との関係に関する研究、日本マリンエンジニアリング学会(JIME)海洋環境研究委員会第3回ワークショップ「船底塗料と海洋環境に関する最新の話題」、2013年9月20日、神戸大学(兵庫県神戸市)

桑山 隼、廣森洋平、西川淳一、中西 剛、永瀬久光、酵母 two-hybrid 法を用いたヒトおよびマウス PXR アゴニスト活性評価系の構築、フォーラム 2013: 衛生薬学・環境トキシコロジー、2013年9月13-14日、九州大学(福岡県福岡市)

Nakanishi T, Hikomori Y, Nishikawa J, Nagase H, Structure-activity studies on the RXR agonist activity of organotins, EuroTox 2013: 49th Congress of the European Societies of Toxicology, 2013年9月1-4日、Interlaken (Switzerland)

中西 剛(招待講演)、核内受容体としての有機スズ化合物とその毒性、第39回日本毒性学会学術年会、2012年7月17-19日、

仙台国際センター（宮城県仙台市）
廣森洋平、酒井紀行、小林亮、上代大地、
中西 剛、永瀬久光、トリフェニルスズの
全身免疫系に対する加齢化促進作用の検
討、第 39 回日本毒性学会学術年会、2012
年 7 月 17-19 日、仙台国際センター（宮城
県仙台市）

中西 剛（招待講演）核内受容体を介し
た有機スズ化合物の生体影響に関する研
究、第 23 回日本微量元素学会学術集会、
2012 年 7 月 5-6 日、シェーンバッハ・サボ
ー（東京都千代田区）

Nakanishi T, Hiromori Y, Sakai N, Kobayashi
R, Jodai D and Nagase H, Triphenyltin
promotes thymic aging via PPAR γ signaling
pathway, EuroTox 2012: 48th Congress of the
European Societies of Toxicology, 2012 年 6 月
17-20 日, Stockholm (Sweden)

中西 剛、PPAR β/δ リガンドのスクリー
ニング法、BIO tech 2012、2012 年 4 月 25-27
日、東京ビックサイト（東京都江東区）

6．研究組織

(1) 研究代表者

永瀬 久光（NAGASE, Hisamitsu）
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：4 0 1 4 1 3 9 5

(2) 研究分担者

中西 剛（NAKANISHI, Tsuyoshi）
岐阜薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：5 0 3 0 3 9 8 8

井戸 章子（IDO, Akiko）
岐阜薬科大学・薬学部・助手
研究者番号：0 0 3 3 6 6 2 9

(3) 連携研究者

廣森 洋平（HIROMORI, Youhei）
金城学院大学・薬学部・助教
研究者番号：6 0 5 1 5 9 5 6

(4) 研究協力者

楊 敏（YANG, Min）
胡 建英（HU, Jianying）