

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460171

研究課題名(和文) ツメガエル発達過程における化学物質の動態変化と環境毒性影響

研究課題名(英文) Toxicological effects by disposition of chemicals during development of *Xenopus tropicalis*

研究代表者

佐能 正剛 (Sanoh, Seigo)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・助教

研究者番号：00552267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：医薬品による水環境汚染は水生生物に毒性影響を与える可能性がある。医薬品アミオダロンはオタマジャクシの自然変態を抑制した。これは、アミオダロンが自然変態を制御する甲状腺ホルモン系を阻害すること、アミオダロンの生体内への高い蓄積性によるものと考えられた。さらにオタマジャクシの発達において、肝臓中の薬物代謝酵素の発現量が変動することが分かり、また一部は甲状腺ホルモンによって制御している可能性も示唆された。これらは、生体内への化学物質の蓄積と毒性を調べる上で重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：Several clinical pharmaceuticals detected in the aquatic environment are concerned to result in unexpected effects on aquatic species. We found that amiodarone, anti-arrhythmic drug suppressed the metamorphosis of tadpoles controlled by the endogenous thyroid hormone. The antagonistic activity of amiodarone for thyroid hormone and its high accumulation in tadpoles could induce the toxicity. Furthermore, the levels of several drug-metabolizing enzyme expression changed during development of tadpoles, which could be partly caused by thyroid hormone. These are important findings to evaluate chemical accumulation and its related toxicity.

研究分野：衛生薬学

キーワード：ネッタイツメガエル 甲状腺ホルモン 薬物代謝酵素 アミオダロン

1. 研究開始当初の背景

多くの農薬や工業化学物質、そして医薬品や化粧品などの生活関連物質による環境や野生生物への影響が懸念されている。臨床で使用される医薬品は低濃度で高い薬理作用を示すものであり、野生生物とヒトとの種差を鑑みる必要はあるものの、野生生物にも予期せぬ毒性影響を与える可能性がある。実際、河川中から医薬品が検出されることが知られ、水生生物に影響を与えることが懸念される。Ghosh et al., (2010) は、インフルエンザ流行時にインフルエンザ治療薬オセルタミビル活性代謝物が河川中から検出され、この状況が続けば、オセルタミビル耐性のインフルエンザウイルスの出現につながる可能性を報告している。また、Brodin et al., (2013)において、向精神薬オキサゼパムを魚に曝露させたところ、摂餌速度などに顕著な行動異常が観察されたという報告もなされた。

医薬品の水環境中への汚染経路として、下水処理場において処理しきれなかったケースや、下水道が整備されていない地域においては、未処理の生活排水の流出による可能性を考える必要がある。また家畜に使用する動物用医薬品も土壌から雨水を介して直接流出する可能性も懸念される。

医薬品による水生生物の毒性影響を考えるには、その毒性ターゲットと曝露濃度を評価する必要がある。さらには、ヒトから排泄される医薬品代謝物、下水処理や水環境中で生成する分解物や、水生生物の中で生成する代謝物の影響も考慮する必要もある。しかしながら、これらに関する報告は少ない。本研究では、両生類のネッタイツメガエルを用いた医薬品の毒性影響について評価した。

2. 研究の目的

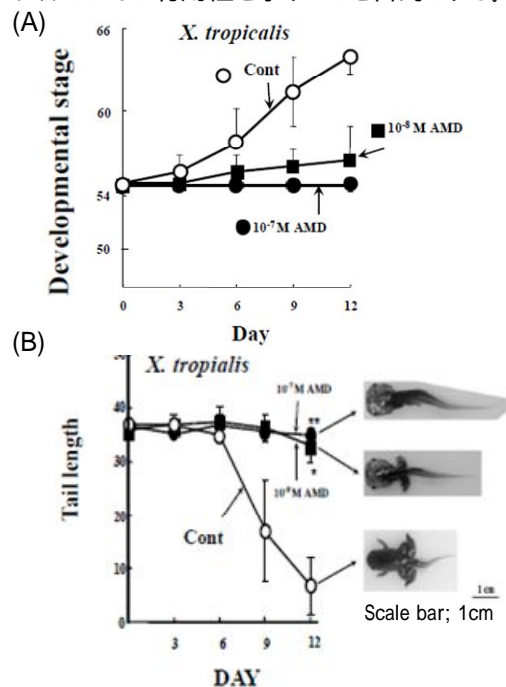
「甲状腺ホルモン」は成長、発達に重要な内分泌ホルモンと言われている。ツメガエルのオタマジャクシにおいては、幼少ステージ(St.40)より甲状腺ホルモン受容体(Thyroid receptor; TR₁、TR₂)が発現しはじめ、発達ステージSt.52には、甲状腺ホルモンが血中に検出され、後肢の伸長が観察されはじめる。その後、カエルへの自然変態が活発となるにつれ甲状腺ホルモン濃度は一過性に上昇する。オタマジャクシの尾部短縮は、筋肉細胞のアポトーシスによるものであり、これは甲状腺ホルモンで制御されているとされている(Kerr et al., 1974; Kashiwagi et al., 2000; Inoue et al., 2004; Heimeier et al., 2010; Miyata wt et al., 2012)。

以上のような背景から、本研究における「ネッタイツメガエル」を用いた医薬品の毒性評価においては、甲状腺ホルモン系に与える影響を考慮した。食品用容器の原料で 사용되는ビスフェノール A やブrom化難燃剤に分類されるテトラプロモビスフェノール A は、カエルへの自然変態を抑制させることが報告されている(Kitamura et al., 2005; Goto et al., 2006; Heimeier et al., 2010; Fini et al., 2012)。ビスフェノール A は、TR を介した T3 による転写活性化を抑制すること

テトラプロモビスフェノール A は、T4 の輸送タンパクや T3 の TR への結合を阻害することが報告されており、このような甲状腺ホルモン系のかく乱が、自然変態に影響を与える原因となったものと考えられている(Heimeier et al., 2010; Fini et al., 2012)。

医療用医薬品である抗不整脈薬「アミオダロン」の薬理作用は、心筋のK⁺チャンネル遮断作用による活動電位持続時間、有効不応期の延長であるが、甲状腺機能亢進症、または低下症の副作用を示すことも知られている。アミオダロンの化学構造は、2つのヨウ素を有するベンゾフラン誘導体であり、その部分構造が甲状腺ホルモンと類似している。アミオダロンは、TRと結合し、そのアゴニスト、アンタゴニスト活性を示すことが報告され(Norman et al., 1989; Schriks et al., 2006; Freitas et al., 2011; Matsubara et al., 2012)、甲状腺ホルモン系への副作用の原因となっている可能性がある。

アミオダロンは、病院排水から排出され、強い環境毒性を示す可能性がある医薬品として示唆されており(Escher et al., 2011)、水生生物にアミオダロンの薬理作用、副作用に基づく影響が懸念される。実際、アミオダロンをオタマジャクシに曝露させたところ、オタマジャクシのカエルへの自然変態、尾部短縮、後肢伸長の抑制が観察された(図1)。また、オタマジャクシの肝臓中におけるアミオダロンを測定したところ、水槽中曝露濃度の300-1000倍高い濃度で蓄積されていた。また、カエル成体の肝臓中アミオダロン濃度は、オタマジャクシより低い結果であった(表1)。オタマジャクシ、カエル成体に至るまでの発達過程における環境化学物質の動態(代謝・排泄)変化を調べることは、水環境中に生息する両生類における化学物質の影響を評価する上で重要であると考えられる。本研究では、アミオダロンをベースにネッタイツメガエルにおける体内動態変化と毒性の関係性を調べ、毒性評価モデルとしての有用性を示すことを目的とする。



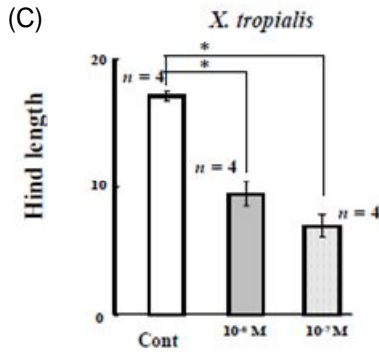


図 1, アミオダロン (10^{-8} , 10^{-7} M) による自然変態 (A)、尾部短縮 (B)、後肢伸長 (C) への影響

表 1, アミオダロンを水槽中より曝露後の肝臓中濃度 (μM)

Conc.	St57 tadpoles	St59 tadpoles	Frogllets	Adult frogs (n ale)
0.01 μM	5.86	2.90	0.15	N.D.
0.1 μM	121.29	39.46	5.48	0.04

(μM)

3. 研究の方法

(1) ネットイツメガエル

ネットイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) は、広島大学両生類研究センターにて維持管理されたものである。オタマジャクシには、SERA Micron をカエルにはサケ固形餌、もしくはコウロギ (*Gryllus bimaculatus*) を餌として与えた。水槽中に評価化合物を曝露し、自然変態の評価、もしくは肝臓を採取し、以下の実験を行った。

(2) 肝臓中における mRNA 発現

肝臓から SV total RNA isolation system (Promega) を用いて RNA を抽出した。SuperScriptIII Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA を作成した。KAPA SYBR FAST qPCR master mix kit (Nippon Genetics) を用い、PikoRealTM real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) において PCR 反応を行った。内部標準遺伝子として rPL8 発現量により補正し、相対定量を行った。

(3) 薬物代謝活性評価

肝臓ホモジネートを調製し、9000 x g 遠心後の上清画分を用いた。代謝基質プローブは、Luciferin-IPA および luciferin-Multi CYP (Promega) を用い、NADPH と反応させ、代謝物 luciferin の生成を発光強度として測定した。

(4) 細胞培養

アフリカツメガエル腎由来細胞株 A6 細胞を播種し、各種評価化合物を曝露後の代謝活性の変動を Luciferin-IPA および luciferin-Multi CYP (Promega) を用いて調べた。

(5) レポーターアッセイ

各種評価化合物の甲状腺ホルモン様活性を調べる目的で、Thyroid responsive element (TRE)-レポーターアッセイ系を構築した。pGL3-TRE、RXR、TR or TR および pRL-CMV をトランスフェクションし、評価化合物

を曝露後、Dual luciferase kit (Promega) を用いて発光強度を測定した。

4. 研究成果

(1) アミオダロンによるネットイツメガエル *in vivo* 影響

ネットイツメガエルオタマジャクシ (St.42) にアミオダロンを 10^{-10}M ~ 10^{-6}M の水槽中濃度で 9 日間曝露した際の生存と成長を調べたところ 10^{-7}M 、 10^{-6}M 曝露後の生存率は、それぞれ 41.7%、0%であった。また 10^{-8}M 曝露群では、生存率は 96.7%であったが、体長は対照群に比べ有意に小さい値となった (表 2)。これらは、オタマジャクシ肝臓中においてアミオダロン濃度は高い値であったことも要因のひとつと考えられた。

表 2, アミオダロン曝露による生存率、成長に与える影響

Solution Conc.	Survival rate (%)	Grow th	
		Body length (mm)	Tail length (mm)
Control	98.3	2.7 \pm 0.05	4.7 \pm 0.11
10^{-10}M	95.0	2.6 \pm 0.09	4.8 \pm 0.11
10^{-9}M	98.3	2.5 \pm 0.09	4.9 \pm 0.09
10^{-8}M	96.7	*2.4 \pm 0.08	*4.5 \pm 0.15
10^{-7}M	**41.7	*2.4 \pm 0.07	*4.4 \pm 0.09
10^{-6}M	0	**2.3 \pm 0.07	**4.1 \pm 0.13

また、アミオダロンを曝露時のオタマジャクシ、カエル肝臓中の甲状腺ホルモンの代謝に関わる I 型脱ヨウ素化酵素の発現が減少傾向にあり、甲状腺ホルモン系をかく乱させている可能性も考えられた (data not shown)。

(2) アミオダロンの甲状腺ホルモン受容体を介した転写活性への影響

ネットイツメガエル由来の甲状腺ホルモン受容体、レチノイド受容体、甲状腺ホルモン応答配列のプラスミドを導入した A6 細胞にアミオダロンを曝露したところ、アミオダロン単独でアゴニスト活性、T3 と共曝露で TR に対してアンタゴニスト活性を示した (図 2)。オタマジャクシの自然変態の過程では甲状腺ホルモン濃度が増加することを考えると、実際の *in vivo* でのアミオダロンの影響は、後者のアンタゴニスト作用を反映している可能性があり、これが甲状腺ホルモン依存性の自然変態の抑制作用につながっているのではないかと考えられた。

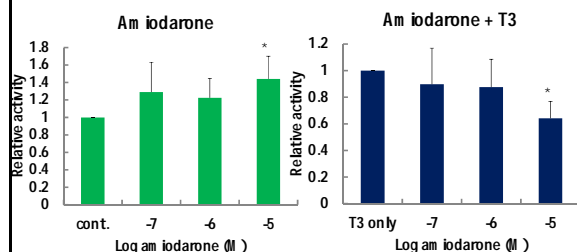


図 2, アミオダロンの甲状腺ホルモン受容体 TR を介した転写活性 (左; アミオダロン単独曝露群, 右; アミオダロンと T3 の併用曝露群)

(3) カエル発達過程における薬物代謝酵素の変動

アミオダロンをオタマジャクシ、仔カエル、成体カエルに曝露後の肝臓中濃度は、オタマジャクシ > 仔カエル > 成体カエルの順であったが、この要因としてアミオダロンを解毒排泄させる薬物代謝酵素の発達変動によるものと考えられた。カエルにも薬物代謝酵素のチトクローム P450 (CYP) 等の遺伝子があることは知られている。その発現をヒトと同様に制御していると考えられる核内受容体 AhR, CAR, PXR, および PPAR の mRNA 発現量を評価したところ、AhR, PXR, PPAR はオタマジャクシよりカエル成体の方で発現量が高いことが分かった (図 3)。

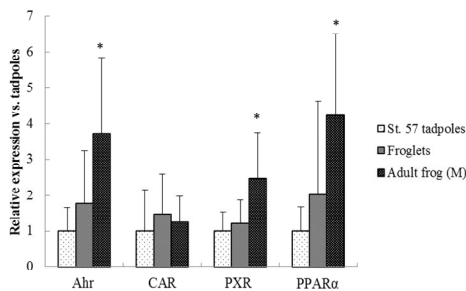


図 3, オタマジャクシ (St.57)、仔カエル、成体カエル肝臓中の薬物代謝酵素の発現に関わる核内受容体の発現変動

また、CYP1A, CYP2D20, CYP3A12、および NADPH-P450 reductase (NPR)、flavin mono-oxygenase (FMO) の発現量変化を調べたところ、CYP3A12、NADPH-P450 reductase や FMO でオタマジャクシよりカエル成体の方で発現量が高いことが分かった。この生理学的機構については不明であるが、カエルも成長に応じて薬物代謝酵素の発現量が増加するものがあることが明らかとなった (図 4)。

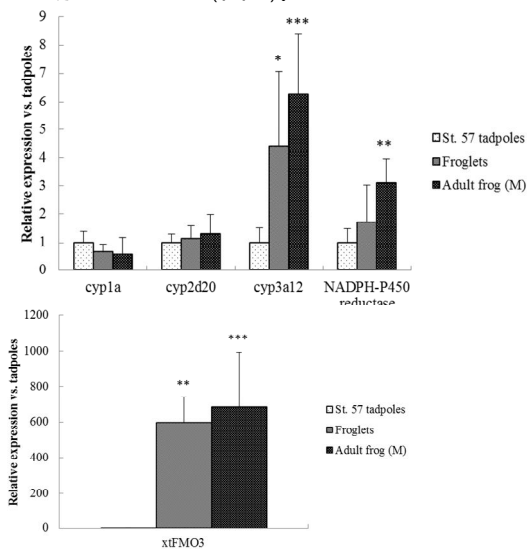


図 4, オタマジャクシ (St.57)、仔カエル、成体カエル肝臓中の薬物代謝酵素の発現変化

また、代謝プローブ、luciferin-Multi CYP や luciferin-IPA を使って代謝活性変化を調べたところ、luciferin-IPA の方でカエル成体の代謝活

性が高い傾向が観察された。Luciferin-IPA は CYP3A の基質プローブであることから、カエルにおいても CYP3A によって代謝されたものと考えられる (図 5)。

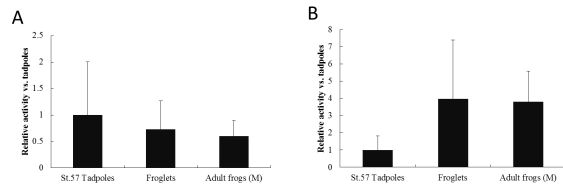


図 5, オタマジャクシ (St.57)、仔カエル、成体カエル肝臓中の薬物代謝酵素活性変化 (A; luciferin-Multi CYP の比活性, B; luciferin-IPA の比活性 (対オタマジャクシ St57))

(4) 薬物代謝酵素の発現制御

前述のように、カエルへの自然変態の過程において内在性の甲状腺ホルモンが増加することが知られている。哺乳類において、甲状腺ホルモンが薬物代謝酵素を制御する報告は少ないものの、その可能性を考え、A6 細胞に T3, T4 を曝露後の CYP 酵素活性の変化を評価した。

CYP1A 活性を増加させることが知られる 3-methylcholanthrene (3-MC) を曝露させたところ、代謝基質 Luciferin-Multi CYP の代謝活性を有意に上昇させた。Luciferin-Multi CYP は幅広い CYP 分子種の代謝基質であるもの、その中で CYP1A の基質特性が高いものであり、そのプロファイルを反映した。さらに T3, T4 を曝露したところ、両方においてその酵素活性は増加した。一方で、PXR による転写活性化により CYP3A 活性を増加させることが知られる dexamethasone (DEX) 曝露では、A6 細胞においても CYP3A の代謝基質 luciferin-IPA の酵素活性を増加させた。しかしながら、T3, T4 曝露において、酵素活性は増加しなかった。以上から、CYP1A については甲状腺ホルモンに依存して酵素活性が増加する可能性があることが示唆された (図 6)。

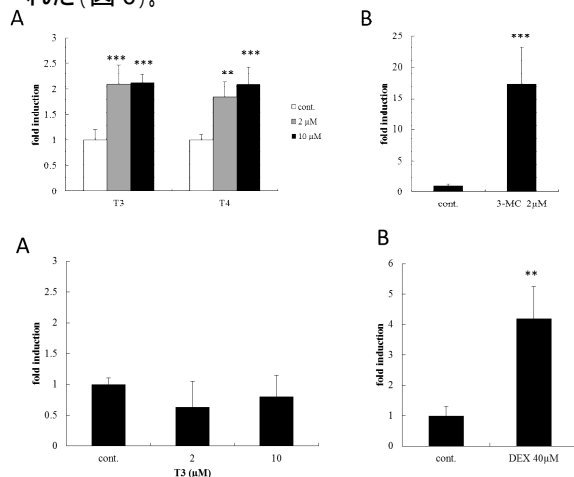


図 6, 甲状腺ホルモンによる薬物代謝酵素酵素活性変化 [上段; luciferin-Multi CYP の比活性, A 左; T3, 右; T4 曝露 (Cont, 2, 10 μM), B 3-MC (2 μM), 下段; luciferin-IPA の比活性, A; T3 (Cont, 2, 10 μM), B; DEX (10 μM)]

(5) アミオダロンの蓄積と薬物代謝酵素活性との関係

アミオダロンはヒトにおいて、CYP1A1、CYP2D6、およびCYP3A4によってデスエチルアミオダロンに代謝されることが報告されている (Ohyama et al., 2000; Elsherbiny et al., 2008)。アミオダロンはカエルにおいてもヒトと同様にCYPで代謝されるか確認した。

肝臓ホモジネート 9000g 上清画分と NADPH 添加において反応させてところ、アミオダロンの濃度減少が確認されたこと、CYP 活性の阻害剤 (ABT) でデスエチルアミオダロンの生成が抑制されたことから、CYP の寄与が示唆された。しかしながら、オタマジャクシ、仔カエル、成体カエルでの代謝活性に顕著な差が見られなかったことから、これまでの薬物代謝酵素の発現変化の結果だけでは、アミオダロンの蓄積差を説明できず、他の因子によるも考慮に入れる必要があった (図 7)。

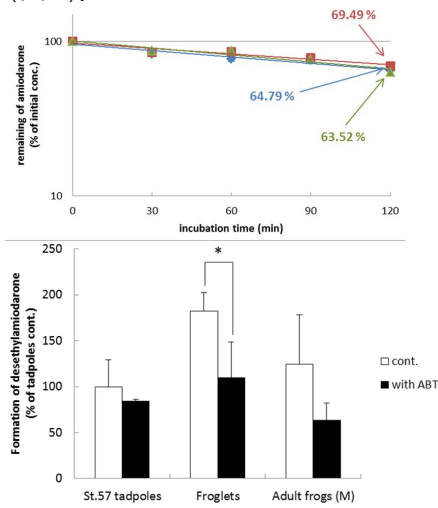


図 7, オタマジャクシ、仔カエル、カエル成体の肝臓 S9 画分におけるアミオダロン代謝活性 (上図; アミオダロンの減少プロファイル, 下図; デスエチルアミオダロンの生成活性と ABT 添加時の活性変化)

(6) アミオダロンが薬物代謝酵素に与える影響

アミオダロンを水槽中に介してオタマジャクシ、仔カエル、および成体カエルに曝露し、CYP1A と CYP3A12 mRNA 発現量変化を評価したところ、オタマジャクシ (St.57) において発現量が有意に減少した。これは、アミオダロンの甲状腺ホルモン系に与える影響が関連している可能性もある。これは、オタマジャクシの肝臓で高い蓄積濃度であったことを支持する結果であった (図 8)。

(A)

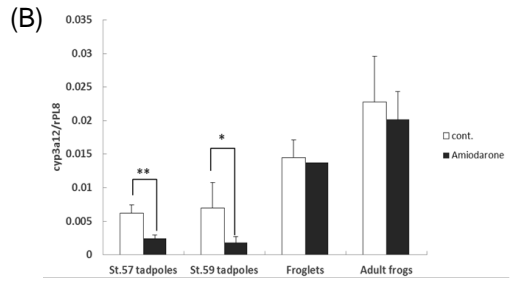
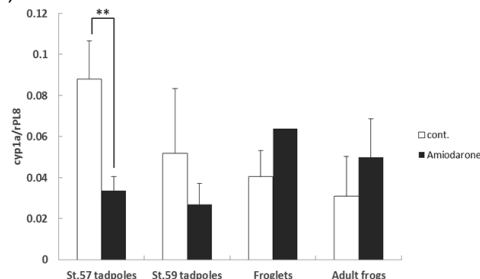


図 8, アミオダロンを水槽中に曝露後のオタマジャクシ (St57, 59)、仔カエル、成体カエル肝臓中の薬物代謝酵素発現量変化 (A; cyp1a mRNA, B; cyp3a12 mRNA)

(7) 化学物質のカエル甲状腺ホルモン受容体を介した転写活性スクリーニング

甲状腺ホルモンの化学構造のように芳香環にハロゲン基が導入された化学物質を選択し、カエル甲状腺ホルモン受容体を介した転写活性スクリーニングを行った。評価化合物は、プロム化難燃剤 hexabromocyclododecane (HBCD)、動物用医薬品 bithionol、bromofenofos、closantel、nitroxynil、rafoxanide、tribromosalane、benzbromarone、flutamide や除草剤 bifenoxy、ioxynil、acifluorfen、および bromoxynil をレポーターアッセイ系に曝露し、TR α 、TR β に対するアゴニスト、アンタゴニスト活性を評価した。

その結果、HBCD は TR β に対して T3 共添加でアゴニスト作用を示した (図 9, 表 3)。

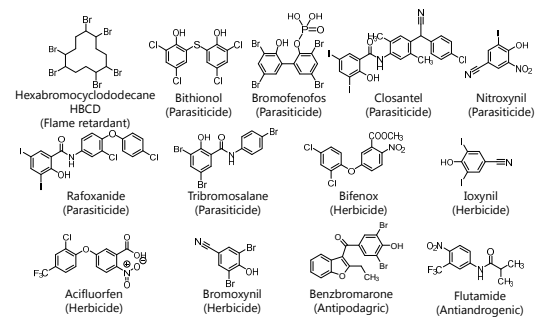


図 9, 評価化合物の化学構造式

表 3, 甲状腺ホルモン受容体を介した転写活性

	without T3		with T3	
	TR α	TR β	TR α	TR β
Amiodarone	agonist	-	antagonist	-
HBCD	N.S.	-	agonist	-
Bithionol	agonist	N.S.	N.S.	N.S.
Bromofenofos	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Closantel	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Nitroxynil	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Rafoxanide	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Tribromosalane	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Acifluorfen	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Bifenox	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Bromoxynil	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Ioxynil	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Benzbromarone	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Flutamide	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

(N.S.; 有意な活性変化なし)

(8) HBCD によるネッタイツメガエルオタマジャクシの自然変態への影響

水槽中を介して HBCD をオタマジャクシ (St.57) に曝露させたところ、自然変態の抑制、尾部短

縮の抑制、後肢伸長の抑制が観察された。これは、アミオダロンと同様のプロファイルであったが、前述のレポーターアッセイ系ではアゴニスト作用を示し、*in vivo* の現象を説明できなかった(data not shown)。

(9) まとめ

本研究において、アミオダロンの臨床で報告される甲状腺ホルモンに対する副作用が、カエルにも影響が観察された。特にヒトでは新生児期に甲状腺ホルモン濃度が上昇することが知られている。カエルを用いた評価は、水環境毒性の評価にとどまらず、ヒト新生児期の化学物質毒性影響評価にもつながる可能性が示唆された。

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1件)

佐能正剛, 木村朋紀 (2017), ヒトや野生生物における医薬品、環境化学物質の安全性評価の精度向上にむけて 代謝的活性化, 種差, エピジェネティクスの観点から 薬学雑誌 137(3) 247 248. doi: 10.1248/yakushi.16-00230-F. (査読有)

(学会発表) (計7件)

佐能正剛, 森淳平, 鈴木賢一, 柏木啓子, 花田秀樹, 重田美津紀, 山本卓, 杉原数美, 北村繁幸, 柏木昭彦, 太田茂, 「ネットイツメガエルの成長・発達過程における肝臓中薬物代謝酵素の変動とアミオダロンの蓄積」, 平成 28 年度内外環境応答・代謝酵素研究会, 2016 年 9 月 17 ~ 18 日, 静岡県立大学薬学部(静岡市)

森淳平, 佐能正剛, 鈴木賢一, 柏木啓子, 花田秀樹, 重田美津紀, 山本卓, 杉原数美, 北村繁幸, 柏木昭彦, 太田茂, 「ツメガエル発達過程におけるアミオダロンの代謝活性変動とその原因因子の探索」, フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2016 年 9 月 10 ~ 11 日, 昭和大学薬学部(東京都)

佐能正剛, シンポジウム「医薬品、一般化学物質の体内動態を考慮に入れたヒトおよび野生生物におけるリスク評価」, 日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月 26 日 ~ 29 日, パシフィコ横浜(横浜)

Seigo Sanoh, Junpei Mori, Ken-ichi T. Suzuki, Keiko Kashiwagi, Hideki Hanada, Mitsuki Shigeta, Takashi Yamamoto, Kazumi Sugihara, Shigeyuki Kitamura, Akihiko Kashiwagi, Shigeru Ohta, Invited Symposium "Development Changes of Drug-metabolizing Enzymes Related to Accumulation of Chemicals in Tadpoles and Adult Frogs." International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research Mar 18-19, 2016, Okazaki Conference Center, Okazaki

佐能正剛, 森淳平, 鈴木賢一, 柏木啓子, 花田秀樹, 重田美津紀, 山本卓, 杉原数美, 北村繁幸, 柏木昭彦, 太田茂, 「ネットイツメガエルの発達過程における肝臓中薬物代謝酵素の変動」, フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2015 年 9 月 17 日 ~ 18 日, 神戸学院大学(神戸市)

佐能正剛, 中村直樹, 鈴木賢一, 柏木啓子, 花田秀樹, 山本卓, 新海正, 杉原数美, 藤本成明, 北村繁幸, 柏木昭彦, 太田茂, 「環境化学物質におけるカエル甲状腺ホルモン作用のアゴニストおよびアンタゴニスト活性」, フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2014 年 9 月 9 日 ~ 20 日, つくば国際会議場(つくば市)

中村直樹, 佐能正剛, 松原加奈, 杉原数美, 浦丸直人, 北村繁幸, 藤本成明, 太田茂, 「甲状腺ホルモンかく乱活性におけるポリ臭素化ジフェニルエーテル類の培養細胞系による比較」, 第 53 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2014 年 11 月 8 日 ~ 9 日, 広島国際会議場(広島市)

(その他)

広島大学薬学部/大学院医歯薬保健学研究科生体機能分子動態学研究室ホームページ
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/ohtalab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐能正剛 (SANOH SEIGO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(薬)・助教

研究者番号: 00552267

(2) 研究分担者

太田茂 (OHTA SHIGERU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(薬)・教授

研究者番号: 60160503

柏木昭彦 (KASHIWAGI AKIHIKO)

広島大学・両生類研究センター・特任教授

研究者番号: 50106796

(3) 連携研究者

柏木啓子 (KASHIWAGI KEIKO)

広島大学・両生類研究センター・研究員

研究者番号: 00467763

花田秀樹 (HANADA HIDEKI)

広島大学・両生類研究センター・助教

研究者番号: 50228508

鈴木賢一 (SUZUKI KEN-ICHI)

広島大学・大学院理学研究科・特任准教授

研究者番号: 90363043