

様式 3

愛媛大学沿岸環境科学研究センター
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」
共同研究報告書

平成 29 年 2 月 22 日

化学汚染・沿岸環境研究拠点 拠点長 殿

申請者（研究代表者）

所属機関 北海道大学大学院獣医学研究科

職 助教

氏名 水川葉月

下記の共同研究について、別紙の通り報告します。

1 研究課題

伴侶動物における有機ハロゲン化合物の代謝機構解明および甲状腺機能への影響評価

2 研究組織

氏名	所属	職	分担研究課題
代表者 水川葉月	北海道大学大学院獣医学研究科	助教	研究の取りまとめ、論文発表および学会での発表
分担者 アクソルンサエンティ エンチャイ	北海道大学大学院獣医学研究科	特任助教	In vivo 試験における飼養、投与および採血
ツェンド・アユス サインノコイ	北海道大学大学院獣医学研究科	特任助教	① In vivo 試験における飼養、投与および採血 ② ネコ糞中 PCBs および OH-PCBs の測定
高居名菜	北海道大学獣医学部	BC6	甲状腺ホルモンの恒常性に関わる遺伝子発現量および酵素活性の測定
拠点対応教員 野見山桂	愛媛大学沿岸環境科学研究センター	准教授	ネコの組織中 PCBs、OH-PBDEs の化学分析

3 研究内容（別紙）

研究課題名: 伴侶動物における有機ハロゲン化合物の代謝機構解明および甲状腺機能への影響評価

共同研究者名: アクソルンサエンティエンチャイ (北海道大学大学院獣医学研究科)、ツェンド-アユス サインノコイ (北海道大学大学院獣医学研究科)、高居名菜 (北海道大学獣医学部)、野見山桂 (愛媛大学沿岸環境科学研究センター)

研究目的

本申請研究では、社会的関心の高いペット動物の化学物質汚染と健康リスクに焦点を当て、とくにネコ体内に残留する有機ハロゲン代謝物の生体内レベルや体内動態、代謝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. *in vitro* および *in vivo* 試験によるネコの異物代謝機構の解明
2. 甲状腺ホルモンに及ぼす影響の検証およびリスク評価
3. 化学物質の体内濃度を生理学的特性により推定する **physiologically based pharmacokinetic (PBPK)** モデルを適用したヒト乳幼児のリスク評価について実施する。

具体的には、他の陸棲哺乳類と代謝能が異なるネコと比較生物として実験動物や野生動物に着目して代謝能を解析し、代謝物のリスクを評価する。また、*in vivo* 投与実験による代謝機構解明を試み、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水酸化代謝物結合タンパクとの結合能を評価し、トキシコキネティクス (吸収・分布・代謝・排泄) を解明する。さらに、上記の手法を用いて甲状腺機能亢進症のみならず他の病気のマーカー物質を探索することで、ペットの健康リスク評価の指針を提示するとともに、ペットと同様に化学物質の暴露を受けていると予想されるヒトの乳幼児にペット動物の研究成果を外挿し、暴露リスク評価を試みる。

研究内容

1) *in vivo* 投与試験によるネコの PCBs、PBDEs 代謝能の解明

ハウスダストからの暴露寄与が大きい PBDEs およびキャットフードからの暴露寄与が大きい MeO-PBDEs、PCBs の体内変化を明らかにするために、実験動物として飼育されているネコにこれらを投与して *in vivo* での動態試験を実施する。既知の PCBs および PBDEs 異性体数種を投与後、経時的に血中および糞尿中水酸化代謝物を分析する。

分析は、愛媛大学のガスクロマトグラフ二重収束型高分解能質量分析装置およびガスクロマトグラフ質量分析装置を使用する。試料数は、血液約 300 サンプル、糞尿約 100 サンプルであり、研究期間を通して随時分析予定である。

暴露・飼養期間終了後に各臓器・組織を採取し、親化合物および水酸化代謝物を分析し、PCBs、PBDEs と水酸化代謝物の体内分布を解析するとともに、近年海外を中心に汚染物質のリスク評価に用いられている PBPK モデルを構築し、ネコの代謝クリアランス解明を試みる。さらに、これらの結果から、ヒト乳幼児への適用も検討する。また、血中甲状腺ホルモン濃度の経時変化も検証する。臓器組織の分析に関しても、愛媛大学のガスクロマトグラフ二重収束型高分解能質量分析装置およ

びガスクロマトグラフ質量分析装置を使用する。試料数は、肝臓や腎臓等約 30 サンプルを予定し、研究期間を通して随時分析を実施する。

2) ネコおよび実験動物、野生動物の生体組織中に残留する抱合体化物の分析および第I相、第II相酵素活性測定

In vivo 投与試験後のネコの肝臓や胆汁、尿中の抱合体化物を分析し、親化合物や水酸化代謝物との関係を解析して代謝能力を検証し、PCBs および PBDEs の代謝排泄能を評価する。PBDEs の抱合体化物は、北海道大学の蛍光検出器や高速液体クロマトグラフィー・質量分析計 (HPLC-MS) を用いて分析する。ヒト尿中から PBDEs の代謝物として考えられるブロモフェノール抱合体 (グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体) を分析した研究が報告されており²⁾、ペットの組織中抱合体化物の分析には既報を適用する。さらに、ネコおよび実験動物、野生動物の新鮮肝を供試して第 I 相、第 II 相反応に関わる薬物代謝酵素 (CYPs) や抱合酵素 (UDP-GT、GST、SULT) の活性測定や遺伝子を抽出・クローニングして配列を決定し、代謝機構を解明するとともに、甲状腺機能攪乱メカニズムの解明とリスク評価のための科学的根拠を提示する。酵素活性は薬物代謝酵素のアッセイ法として公知の AROD 法や、抱合酵素の UDPGT、GST 活性測定キット (UGT Glo assay や GST assay kit) を用いて算出する。野生動物の新鮮肝は愛媛大学沿岸環境科学研究センターの生物環境試料バンク es-BANK (*) に保存されているタヌキやイヌ、鯨類および北海道立総合研究機構中央水産試験場、北海道水産研究所の協力のもと採取したトド、キタオットセイなどを供試する。

(*) es-BANK のマイナス 80℃保存試料および液体窒素にて保存されている肝臓試料の中から食肉目の試料を中心に選定し、代謝能解析などの実験に供試したいと考えている。

研究成果

1) *in vivo*投与試験によるネコのPCBs、PBDEs代謝能の解明

本研究では、ネコを用いた PCBs 短期投与試験及び BDE209 長期投与試験を実施し、経時的に血清、糞尿および飼養終了時に肝臓や腎臓等合計 34 臓器・組織を採取した。PCBs 曝露個体の血清、糞、肝臓、脂肪、胆汁、脳は愛媛大学とともに化学分析を行い、経時的な血中動態や生体内挙動について明らかにした。その結果、生体内に取り込まれた PCBs の一部、とくに低塩素化 PCBs は水酸化代謝物 (OH-PCBs) へ代謝され、血中や脳に残留していることが明らかとなった。さらに、排泄量を調べるため、糞中 PCBs、OH-PCBs を測定したところ、平均 PCBs 濃度は 27,000 ng/g 乾重量、平均 OH-PCBs 濃度は 3,700 ng/g 乾重量であった (Fig. 1)。また、PCBs 濃度は個体によりばらつきがあり、排泄能の個体差が明らかとなった。一方、OH-PCBs は PCBs と比べ低濃度であり、糞での排泄は少ないことが確認できた (Fig. 1)。PCBs の体内負荷量は血中で 10,000 ng、肝臓で 34,000 ng であり、それぞれ投与量のわずか約 0.04%、約 0.14% であった。対して、糞では投与期間中に合計 2,227,000 ng が検出され、投与量 (24,000,000 ng) の約 9.3% が排出されていることが明らかとなった (Fig. 2)。今後は、OH-PCBs への代謝率や他の臓器への分布などを調査する必要がある。

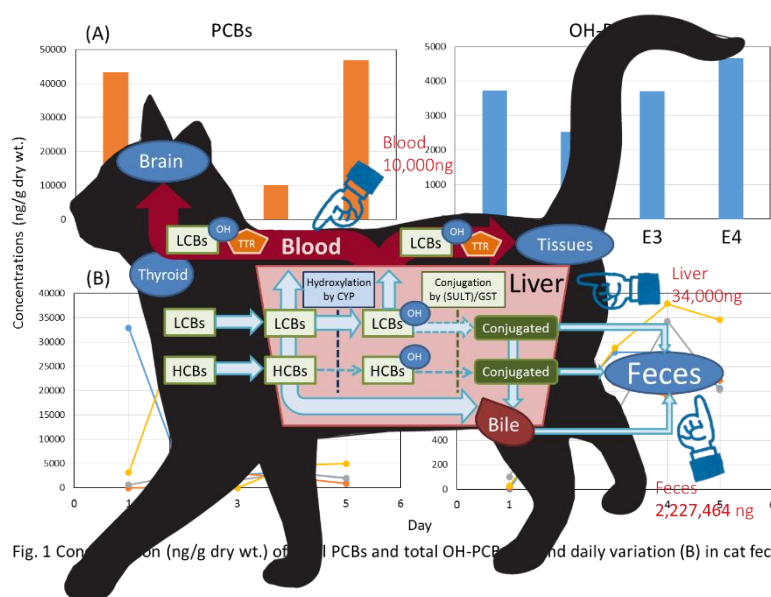


Fig. 1 Concentration (ng/g dry wt.) of total PCBs and total OH-PCBs and daily variation (B) in cat feces.

Fig. 2 Predicted behavior and body burden of PCBs in cat.

2) 甲状腺ホルモンに及ぼす影響の検証およびリスク評価

PCBs 曝露により、ヒトやげっ歯類では血中 THs 濃度が減少することが報告されており、これらの先行研究から、PCBs がネコの THs 恒常性においても何らかの影響を持つことが考えられ、増加するネコの甲状腺機能亢進症との関連も疑われる。本研究では、甲状腺機能に対する影響を解析するため、ネコに PCBs を腹腔内投与し、血中の THs 濃度を解析した。

全ての甲状腺ホルモン (総 T4、総 T3、遊離 T4、遊離 T3、リバーズ T3) を測定したところ、対照群と曝露群の間に有意な差は見られなかったが、血中総 T3 濃度のみ曝露群で減少傾向 ($p=0.09$) にあった。また、THs の恒常性に関与する遺伝子発現量や酵素活性を調べるため、PCBs 投与したネコの肝臓中甲状腺ホルモンレセプター (TR α 、TR β)、脱ヨード酵素タイプ 1 (DI type1) の遺伝子発現量の変化およびグルクロン酸抱合酵素 (UGT1A1) 活性を調べたところ、DI type1 発現量のみ曝露群で上昇傾向にあったが ($p=0.07$)、その他で対照群と曝露群の間に有意な差は見られなかった (Fig. 3)。さらに、UGT1A1 活性と血中 THs 濃度の相関を調べたところ、いずれの間にも有意な相関は見られなかった。

今回の実験でネコに曝露した PCBs 濃度は、0.5mg/kg と日常的な曝露で考えられ

るよりも高濃度であるが、血中 THs 濃度の減少がみられた先行研究と比較して低濃度であった。さらに単回、短期暴露であり、投与後 5 日目に安楽殺、サンプリングを行っていることから、PCBs、OH-PCBs の体内滞在期間は短かったと考えられ、甲状腺機能亢進症のような甲状腺に関する疾病もなかった。このことは、今回解析したネコの血中 THs 濃度、遺伝子発現、酵素活性に対して影響が見られなかった主な理由の一つではないかと考えられる。

さらに、日本のペットネコにおけるモニタリング調査では、血中の THs 濃度と PCBs 濃度との間に負の相関が見られており、フィールドレベルでも化学物質による THs かく乱が懸念されている。これらの結果より、ネコは長期的かつ慢性的に化学物質に暴露されることで、甲状腺機能に影響が現れることが予想される。本実験結果では、ネコにおいて PCBs 短期暴露による THs への影響が見られなかったが、長期的な暴露が起こった場合、甲状腺機能への影響が現れる可能性は否定できない。また、PCBs のみならず、同様の構造を持つ PBDEs に関しても、悪影響が心配される。甲状腺機能亢進症のネコにおいて、血清中 PBDEs が有意に高い濃度で検出されており、PBDEs 暴露による甲状腺機能亢進症の誘発が予想される。このことから、PCBs、PBDEs の甲状腺機能に対する影響を解明するために、さらなる調査が必要である。

今後の課題

THs 恒常性の維持には様々な要因が関わっており、今回調査した endpoint 以外にも、PCBs による影響が起こっていると考えられる。とくに、本研究では暴露群の TT3 濃度が減少傾向を示したことから、DI type1 以外にも DI type2 や DI type3 も THs 濃度に関与していると考えられ、今後の解析が必要である。また、これらの酵素については、PCB 暴露によって活性が低下することや、type 特異的な発現組織が存在することから、肝臓以外の様々な臓器・組織において遺伝子発現量のみならず活性についても調べる必要がある。さらに、PCBs 投与により TTR を介した T4 輸送の阻害や、TSH 分泌量の変化、THs の排泄能などについても今後は調査する必要がある。

また、PCBs による甲状腺への影響は、甲状腺における THs 生成にも及んでいる可能性がある。甲状腺において、TSHR に TSH が結合すると、血中から NIS を介して甲状腺濾胞細胞へのヨードの取り込みが促進され、濾胞細胞内における Tg の生成が促進、その後 T4 または T3 が生成される。

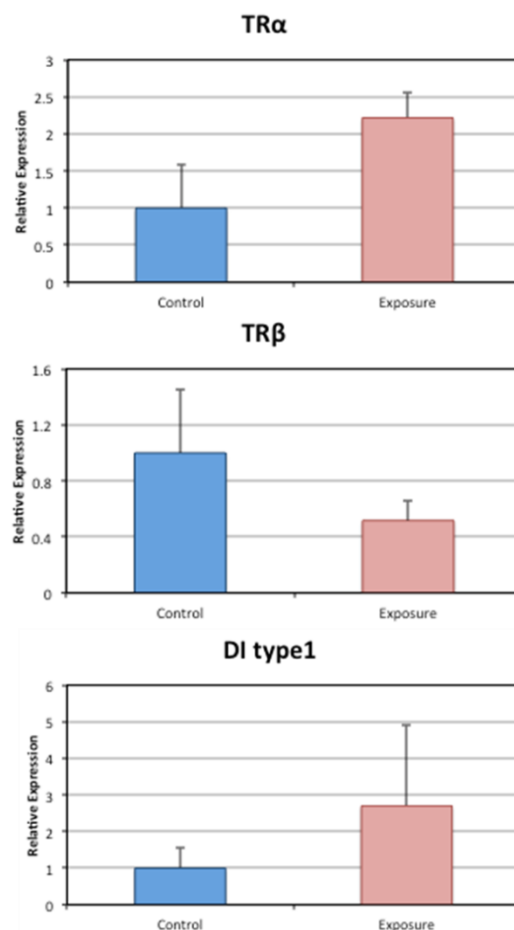


Fig. 3 Gene expression of TRα, TRβ and DI type1 in PCB exposure group and control group.

ラットにおける PCBs 暴露実験では、暴露群での血中 T4、T3、TSH 濃度の減少が報告されており、これらの原因として、NIS、Tg 発現量の低下が考えられる。このように、PCBs による甲状腺機能への影響を調べるにあたって、TSH の分泌やそのレセプターへの影響も考慮する必要がある。

ネコの化学物質暴露に対するリスクを評価、解明することは、ヒトとペットのより良い共存を可能にし、安心・安全な生活に繋がる事が出来る。以上より、ヒトがネコと共に健康的な生活を営むにあたって、ネコの化学物質暴露へのリスク解明は重要であると考えられる。

成果発表リスト

【論文】

1. **Mizukawa H**, Nomiyama K, Nakatsu S, Iwata H, Yoo J, Kubota A, Yamamoto M, Ishizuka M, Ikenaka Y, Nakayama S, Kunisue T, Tanabe S. Organohalogen compounds in pet dog and cat: Do pets biotransform natural brominated products in food to harmful hydroxylated substances? *Environ. Sci. Technol.* 50(1):444-52 (2016)
2. Saengtienchai A, Ikenaka Y, Bortey-Sam N, Jermnark U, **Mizukawa H**, Kawai YK, Nakayama SMM, Ishizuka M. The African hedgehog (*Atelerix albiventris*): low phase I and phase II metabolism activities. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol.* 190: 38-47 (2016)

他 11 件

【学会発表】

1. 水川葉月、前原美咲、横山望、市居修、滝口満喜、野見山桂、西川博之、池中良徳、中山翔太、高口倅暉、田辺信介、石塚真由美、ネコにおけるポリ塩化ビフェニル (PCBs) の異物代謝機構解明と甲状腺ホルモンへの影響評価、第 25 回環境化学討論会、2016 年 6 月 8 日～10 日、朱鷺メッセ、新潟 (口頭発表)
2. 水川葉月、前原美咲、横山望、市居修、滝口満喜、野見山桂、西川博之、池中良徳、中山翔太、高口倅暉、田辺信介、石塚真由美、ポリ塩化ビフェニル (PCBs) の *in vivo* 暴露によるネコの異物代謝解明と甲状腺ホルモンへの影響評価、第 43 回日本毒性学会学術年会、2016 年 6 月 29 日～7 月 1 日、ウイנקあいち、愛知 (口頭発表、ポスター発表)
3. **Hazuki Mizukawa**, Kei Nomiyama, Shinsuke Tanabe, Misaki Maehara, Nozomu Yokoyama, Osamu Ichii, Mitsuyoshi Takiguchi, Yoshinori Ikenaka, Shouta M.M. Nakayama, Mayumi Ishizuka, Metabolic capacities of polychlorinated biphenyls (PCBs) in cats and dogs, 8th International Toxicology Symposium in Africa, 29th-31st August, 2016, Giza, Egypt (Poster)
4. Tsend-ayush Sainnokhoi, **Hazuki Mizukawa**, Misaki Maehara, Nozomu Yokoyama, Osamu Ichii, Mitsuyoshi Takiguchi, Kei Nomiyama, Aksorn Saengtienchai, Shinsuke Tanabe, Yoshinori Ikenaka, Shouta M.M. Nakayama, Mayumi Ishizuka. The effect of environmental pollutants to pet animals ~Level and effects of Persistent organic pollutants (POPs) to domestic cat~. The 4th Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH), 20th-21st September, 2016, Sapporo, Japan (Poster)
5. **Hazuki Mizukawa**, Misaki Maehara, Nozomu Yokoyama, Osamu Ichii, Mitsuyoshi Takiguchi, Kei Nomiyama, Hiroyuki Nishikawa, Kohki Takaguchi, Aksorn Saengtienchai, Tsend-ayush Sainnoxoi, Yoshinori Ikenaka, Shouta M.M. Nakayama, Shinsuke Tanabe, Mayumi Ishizuka. *In vivo* analysis of PCB metabolic capacities and

effects on the thyroid hormone in cats. The 9th International PCB Workshop, Oct. 9th-13th, 2016, Kobe International Conference Center, Kobe, Japan (Oral)

6. **Hazuki Mizukawa**, Misaki Maehara, Nozomu Yokoyama, Osamu Ichii, Mitsuyoshi Takiguchi, Kei Nomiya, Hiroyuki Nishikawa, Yoshinori Ikenaka, Shouta M.M. Nakayama, Kohki Takaguchi, Shinsuke Tanabe, Mayumi Ishizuka, Characteristic for biotransformation of polychlorinated biphenyls in cats. The 7th SETAC World Congress/37th SETAC North America Annual Meeting, Nov 6-10th, 2016, Rosen Shingle Creek, Orlando, FL, USA (Poster)

他 43 件