

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 30年 3月 23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 帯広畜産大学

職 准教授

氏名 久保田 彰

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

*In vivo* および *in silico* 法による有機リン系難燃剤の生体影響評価と作用機序解明

2 研究組織

氏名	所属	職	分担研究課題
代表者 久保田 彰	帯広畜産大学	准教授	受精卵を用いた有機リン系難燃剤の影響評価および研究総括
分担者 森田友理	帯広畜産大学	学部生	受精卵を用いた有機リン系難燃剤の影響評価
芳之内結加	愛媛大学	大学院生	エストロゲン受容体と有機リン系難燃剤の <i>in silico</i> 相互作用解析
拠点対応教員 岩田久人	愛媛大学	教授	エストロゲン受容体と有機リン系難燃剤の <i>in silico</i> 相互作用解析

3 研究内容（別紙）

## 研究課題

*In vivo* および *in silico* 法による有機リン系難燃剤の生体影響評価と作用機序解明

研究代表者 久保田 彰（帯広畜産大学獣医学研究部門）

共同研究者 森田 友理（帯広畜産大学獣医学研究部門）

芳之内結加（愛媛大学沿岸環境科学研究センター）

岩田 久人（愛媛大学沿岸環境科学研究センター）

## 研究目的

有機リン系難燃剤 (OPFRs) は、使用規制が進む臭素系難燃剤の代替として世界中で使用が増加している。一方で、OPFRs は揮発性が高く室内空気汚染物質として問題視され、化学物質過敏症との関連も疑われてきた。最近では魚類胚や鳥類胚に対して発生毒性を示すことも報告されている。さらに一部の OPFRs では親化合物よりも代謝物でエストロゲン活性が高いことも *in vitro* 試験で報告されている。従って、OPFRs が臭素系難燃剤の代替物質として適しているかどうかは不明な点が多く、化合物を含む OPFRs による発生毒性とその分子機構について詳細に検討する必要がある。そこで本研究では、ゼブラフィッシュをモデルとして、OPFRs およびその代謝物の発生毒性と分子機構を明らかにすることを試みた。

## 研究内容

受精後 72 時間 (72 hpf) の胚に triphenyl phosphate (TPP)、tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP)、tricresyl phosphate (TCP)、tris(2-chloroethyl)phosphate (TCEP) および TPP、TDCPP の代謝物である HO-*p*-TPP、HO-*m*-TPP、BDCPP を 24 時間水性曝露し、96 hpf で体幹血流、心臓周囲面積および全長を評価した。また、96 hpf の曝露胚から全 RNA を抽出し、cDNA 合成を行った後、リアルタイム PCR 法で *cytochrome P450 19A1b (CYP19A1b)*、*vascular endothelial growth factor Aa (vegfaa)*、*growth hormone 1 (gh1)*、*insulin-like growth factor 1 (igf1)* の mRNA 発現量を測定した。また、分子シミュレーションソフト (Molecular Operating Environment) を用いてゼブラフィッシュ核内受容体の 3D ホモロジーモデルを構築し、OPFRs や代謝物との相互作用エネルギーを *in silico* 解析で算出した。

## 研究成果

受精後 72 時間のゼブラフィッシュ胚に OPFRs およびその代謝物を曝露したところ、TPP および HO-*p*-TPP が *CYP19A1b* の発現量を有意に増加させた (Fig. 1)。こ

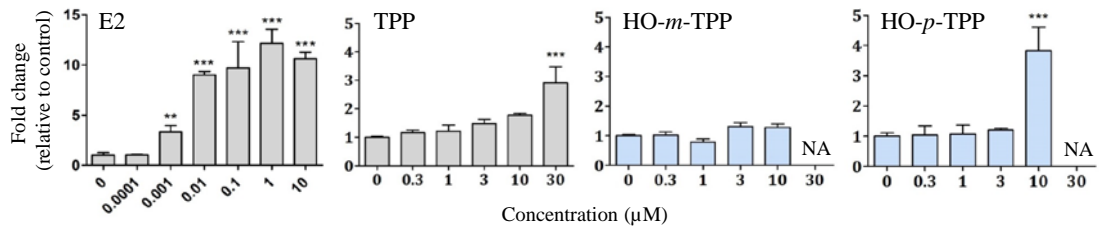


Fig. 1. Concentration-response relationships for effects of E2 and OPFRs and their primary metabolites on *CYP19A1b* mRNA expression in developing zebrafish. Statistically significant differences in gene expression between the OPFR-exposed groups and the control group were determined by one way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test, and are shown by asterisks (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). N=4. NA denotes no data available due to mortality at the highest concentration tested.

れら化合物による *CYP19A1b* 誘導の potency (用量効果) および efficacy (最大効力) は E2 と比較してともに低値を示した。また、HO-*p*-TPP は TPP よりも用量効果が高値を示した。一方、1 μM 以上の TDCPP 曝露により、有意な *CYP19A1b* 発現量の減少がみられた (data not shown)。BDCPP、HO-*m*-TPP、TCP、TCEP の曝露では有意な *CYP19A1b* 発現量の変化はみられなかった (data not shown)。

続いて、TPP とその代謝物である HO-*p*-TPP で認められた *CYP19A1b* mRNA 誘導の用量効果の差が各物質のエストロゲン受容体サブタイプ (zfERα/ERβ1/ERβ2) に対する結合性の差に起因するか否かを *in silico* 解析により検討した。また、各物質と zfERs との結合状態を Fig. 2 に示した。*in silico* 解析の結果から、代謝物である HO-*p*-TPP では E2 同様、zfERs のリガンド結合ドメインに存在するグルタミン酸と水素結合を有し、その相互作用エネルギーも低値を示した。また、OH 基をもたない TPP では、グルタミン酸との水素結合はいずれも示唆されず、相互作用エネルギーは相対的に高値を示した。

TDCPP、BDCPP、TPP、OH-*p*-TPP、OH-*m*-TPP、TCP は 96 hpf の胚に心臓周囲浮腫や全身血流の低下を誘発した (Fig. 3)。TDCPP および TPP 曝露により体躯の矮

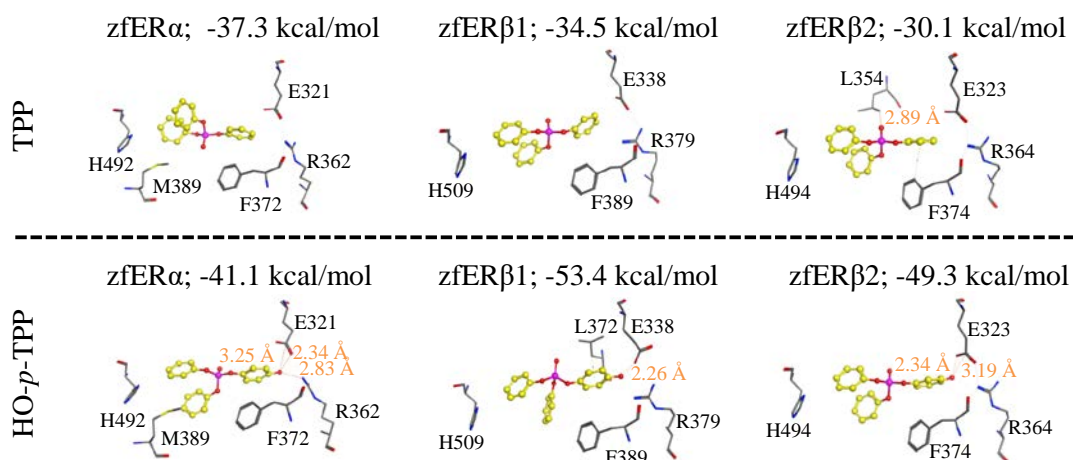


Fig. 2. Binding modes TPP and HO-*p*-TPP in zebrafish estrogen receptors (zfERs).

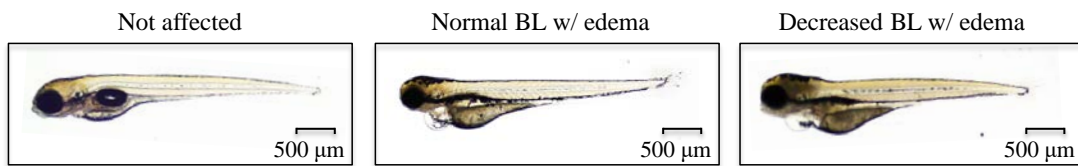


Fig. 3. Representative pictures of 96 hpf zebrafish larvae exposed to OPFRs. BL denotes body length.

小が認められたが (Fig. 3)、各代謝物では体躯のサイズに影響はみられなかった。TPP、TDCPP、TCP の高濃度曝露は *vegfaa* 発現量を有意に増加させた (data not shown)。TDCPP 曝露は *gh1* 発現量を顕著に低下させ、TPP、TCP 曝露は *igf1* 発現量を有意に低下させた。TDCPP と  $\beta$  受容体遮断薬プロプラノロールとの共処置により、*gh1* mRNA 発現量は TDCPP の単独処置と比較して有意な変化はみられなかったが、体躯矮小化の緩和傾向がみられた (Fig. 4)。

TPP よりも HO-*p*-TPP において *CYP19A1b* 誘導が顕著であったことから、TPP の代謝はエストロゲン様作用を増強すると考えられた。さらに OPFRs だけでなく一部の代謝物も胚に心血管毒性を誘発することが明らかとなった。また OPFRs の心血管毒性は、*vegfaa* 発現量が増加したことから血管透過性亢進と関連している可能性が示唆された。一方で、TDCPP でみられた胚の成長阻害は、プロプラノロールとの共処置により緩和されたことから、遺伝子発現以外の過程で化合物の影響を受けた GH/IGF 系のホルモン分泌低下に起因すると推察された。

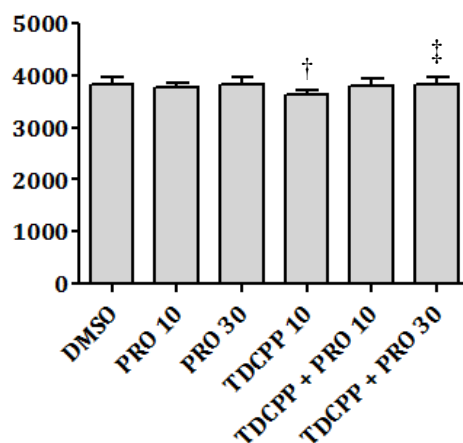


Fig. 4. Effect of propranolol (PRO) on TDCPP-induced reduction in body length in developing zebrafish. A single dagger indicates significant ( $p < 0.05$ ) difference between DMSO and TDCPP 10  $\mu$ M, whereas a double dagger denotes significant ( $p < 0.05$ ) difference between TDCPP 10  $\mu$ M and TDCPP + PRO 30  $\mu$ M.

## 成果発表

(論文)

1. 川島千帆, 久保田彰 (2018): 十勝の台風被害による飼料用トウモロコシサイレージおよび牧草サイレージのかび毒汚染の実態. *北海道畜産草地学会報* **6**, 29-33.
2. 久保田彰 (2017): 野生鳥類におけるダイオキシン類のエコトキシコロジー. *野生動物医学会誌* **22**, 63-67.
3. Yin, G., Cao, L., Du, J., Jia, R., Kitazawa, T., Kubota, A., Teraoka, H. (2017): Dexamethasone-induced hepatomegaly and steatosis in larval zebrafish. *The Journal of Toxicological Sciences* **42**, 455-459.

(学会発表)

### 【国際学会】

1. Kubota, A., Wakayama, Y., Nakamura, M., Kawai, Y., Yoshinouchi, Y., Iwata, H., Hirano, M., Nakata, H. (2018): *In silico* prediction and *in vivo* measurement of estrogenic activity of bisphenol analogues in zebrafish. Society of Toxicology 2018 annual meeting, San Antonio, USA, March, *The Toxicologist: Late-Breaking Supplement*, p. 6.
2. Wakayama, Y., Nakamura, M., Morita, Y., Yoshinouchi, Y., Iwata, H., Hirano, M., Nakata, H., Kawai, Y., Kubota, A. (2017): *In vivo* and *in silico* assessment of estrogen-like effects of bisphenol analogues in zebrafish. 19<sup>th</sup> International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms, Matsuyama, Japan, July, p. 164.
3. Kawai, K. Y., Ikenaka, Y., Ishizuka, M., Kubota, A. (2017): Evolution of avian UGT family genes in relation to feeding habit. 19<sup>th</sup> International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms, Matsuyama, Japan, July, p. 183.

### 【国内学会】

1. 久保田彰、若山 裕己、中村 倫子、川合 佑典、芳之内 結加、岩田 久人、平野 将司、中田 晴彦 (2017): ゼブラフィッシュをモデルとした *in silico* および *in vivo* 解析によるビスフェノール類のエストロゲン様作用の評価. 環境ホルモン学会第20回研究発表会, 神戸市, 12月, プログラム・要旨集, p. 65.
2. 森田友理、若山裕己、芳之内結加、岩田久人、川合佑典、久保田彰 (2017): 有機リン系難燃剤およびその代謝物による発達期ゼブラフィッシュに対する影響. 第44回日本毒性学会学術年会, 横浜市, 7月, プログラム・要旨集, S271.
3. 中村倫子、若山裕己、芳之内結加、森田友理、岩田久人、川合佑典、久保

田 彰 (2017): ゼブラフィッシュをモデルとした*in vivo*および*in silico*解析によるビスフェノール類のエストロゲン様作用の評価. 第44回日本毒性学会学術年会, 横浜市, 7月, プログラム・要旨集, S271.

### 今後の課題

本研究において、OPFRs および代謝物のエストロゲン様作用、心血管毒性、成長阻害といった多様な発生毒性が確認された。これまでの研究で明らかにされてきた毒性学的知見や、ハウスダスト等屋内環境における高濃度汚染、一部の OPFRs の環境残留性や生物濃縮特性を考慮すると、OPFRs は臭素系難燃剤の代替として必ずしも適しているわけではないと考えられた。代替に適している可能性がある物質としては、分子サイズが大きいため環境中での拡散性や生物に対する毒性が低いと期待される縮合型リン系難燃剤が挙げられる。今後はこうした代替物質の成分について有害性評価を実施する必要があると考えられた。