

日本—中国 国際共同研究「都市における環境問題または都市におけるエネルギー問題に関する研究」 平成 28 年度 年次報告書	
研究課題名（和文）	上水の安全性を確保するためのハイスループット性毒性評価システムの構築
研究課題名（英文）	High throughput identification technologies of toxic chemicals for protecting the safety of drinking water
日本側研究代表者氏名	中 西 剛
所属・役職	岐阜薬科大学 薬学部 准教授
研究期間	平成 2 8 年 8 月 1 日～平成 3 1 年 3 月 3 1 日

## 1. 日本側の研究実施体制

氏名	所属機関・部局・役職	役割
中西 剛	岐阜薬科大学・薬学部・准教授	研究全般、統括
伊川正人	大阪大学・微生物病研究所・教授	毒性試験用遺伝子改変マウスの作製
永瀬久光	岐阜薬科大学・薬学部・教授	有害汚染物質の分離手法の確立、遺伝子改変マウスの性状解析

## 2. 日本側研究チームの研究目標及び計画概要

水検体中に存在する有害汚染物質を同定するために、各種核内受容体アフィニティーカラムの作製を行う。カラム作製に必要な核内受容体タンパク質を得るための遺伝子コンストラクトの作製とタンパク質作製のための条件検討を行う。また活性画分の評価を行うための *in vitro* レポーターアッセイも作製するとともに、分画された画分のリガンド活性を評価する。さらに *in vitro* 試験で認められた活性を実験動物でも検出するために、ホタルルシフェラーゼを用いた発光イメージングによりリガンド活性を検出することが可能なレポーターマウスの作製を行い、エストロゲンやアンドロゲンに対する応答性などの性状解析を行う。

### 3. 日本側研究チームの実施概要

WP1 では、水検体中に存在する有害汚染物質を同定するための、各核内受容体アフィニティーカラムの作製等の作製を行った。特に当該年度は、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  をモデル受容体としてアフィニティーカラム作製の最適な条件の検討を行った。アフィニティーカラムの作製には受容体タンパク質に可溶化タグタンパク質を付加することが必要不可欠であるが、このタグタンパク質に標的化学物質が非特異的に結合する可能性がある。そこで3種類のタグタンパク質を用意し、これらについてさまざまな化学物質の非特異的結合性に関する検討を行った。その結果、Trigger Factor タグが最適であることが確認された。一方で、化学物質の非特異的な結合は、タグタンパク質のみならずカラム担体に対しても起こることが予測される。そこでカラム担体に対する非特異的結合性についても検討を行った。その結果、検討したいずれの担体にも非特異的な結合が観察されてしまったが、ゲル濾過カラムを用いることで解決できる可能性が示された。

WP2 では、WP1 で得られた検体についての分析手法の開発と、生物活性を同定するために、各種核内受容体のレポーターアッセイの作製を行った。その結果、各種核内受容体のレポーターアッセイの構築を行うことができた。また既報をもとに固相抽出法と LC-MS/MS の条件を改良して、試験的に水道水中のフィブラート系化合物の同定を試みた。その結果、中国都市部の浄水場の原水および水道水中にはフィブラート系が検出されたものの、その濃度および生物活性は、欧米で報告されているものよりも低い値であった。しかしながら、一般的な浄水法である凝集沈殿—急速濾過法では、フィブラート系化合物はほとんど除去されない問題点も明らかとなった。また現在、一般的に用いられている Bisphenol A フリーのペットボトル中の飲料水についても検討を行った。その結果、この飲料水中から Fluorene-9-bisphenol (BHPF) が検出された。また BHPF は、乳ガン治療薬であるタモキシフェンの 1/10 程度の強い抗エストロゲン作用を示し、ヒトの血中からも検出された。またマウスを用いた *in vivo* 試験においても抗エストロゲン作用が確認され、BHPF がペットボトル中の飲料水の新たなリスクになり得る可能性が示された。

WP3 では、WP1 および WP2 で同定された化学物質の *in vivo* 試験の構築を行うために、エストロゲンおよびアンドロゲン応答性レポーターマウスの作製を行った。その結果、エストロゲン応答性レポーターマウスについては、子宮肥大試験法よりも高感度にエストロゲン作用を検出できるマウスラインを得ることができた。またこのマウスでは、子宮以外にも乳腺等を含む様々なエストロゲン標的臓器でエストロゲン活性を検出することが可能であった。さらに *in vivo* イメージングを用いることにより、経時的かつ非侵襲的に定量評価できることが確認され、既存の子宮肥大試験法と比較して、感度面のみならず試験の煩雑性の面においても優れた評価法になり得る可能性が示唆された。アンドロゲン応答性レポーターマウスについてもマウスラインを得ることができており、現在、その応答性について検討中である。