

戦略的国際共同研究プログラム(SICORP)

日本－中国共同研究

終了報告書 概要

1. 研究課題名：「上水の安全性を確保するためのハイスループット毒性評価システムの構築」
2. 研究期間：2016年8月～2019年3月
3. 主な参加研究者名：
日本側チーム

	氏名	役職	所属	研究分担
研究代表者	中西 剛	教授	岐阜薬科大学	研究全体の統括
主たる共同研究者	永瀬 久光	教授／ 名誉教授	岐阜医療科学大学／ 岐阜薬科大学	
主たる共同研究者	伊川 正人	教授	大阪大学	
研究参加者	井戸 章子	助教	岐阜薬科大学	
研究参加者	廣森 洋平	助手	鈴鹿医療科学大学	
研究参加者	木村 朋紀	准教授	摂南大学	
研究期間中の全参加研究者数			6名	

中国側チーム

	氏名	役職	所属	研究分担
研究代表者	Jiaying Hu	Professor	Peking University	研究全体の統括
主たる共同研究者	Yi Wan	Associate Professor	Peking University	分析全般
主たる共同研究者	Zhaobin Zhang	Associate Professor	Peking University	生物学的実験 全般
研究参加者				
研究参加者				
研究期間中の全参加研究者数			3名	

4. 国際共同研究の概要

大都市圏の水環境の汚染が、上水の品質に深刻な影響を与える可能性が懸念されている。これまでに我々は、水循環の乏しい大都市圏において、下水処理をしたにも関わらず、環境中に有害汚染物質が放出されてしまうことが実際に起こっていることを示してきた。また上水では慢性毒性を示すような消毒副生成物の存在が懸念されているが、未知汚染物質による原水の汚染は新たな有毒副生成物の発生を招く可能性も十分に考えられることから、このようリスクに対する水質管理対策が望まれる。本研究では、生殖毒性や催奇形性を示す未知有害物質の作用点として核内受容体に焦点を絞り、これらに作用することで毒性を示す汚染化学物質を高感度かつハイスループットに検出するためのシステム構築に資する基盤技術の開発を試みた。

5. 国際共同研究の成果

5-1 共同研究の学術成果

本研究では、以下の成果を得た。

- (1) 水検体から核内受容体に作用する未知汚染物質を効率よく精製するために受容体アプニニティー担体を用いた選別手法の開発を行った。
- (2) 水検体から核内受容体に作用する未知汚染物質を同定するための、超高速高分離液体クロマトグラフ/ハイブリッド四重極飛行時間型 質量分析システムを用いたメタボローム解析手法を確立した。
- (3) 未知汚染物質の生体影響を評価するための遺伝子改変動物の作製を行った。
- (4) 作製した遺伝子改変動物を用いて、迅速かつ効果的に未知汚染物質の生体影響を評価することができた。

5-2 国際連携による相乗効果

本研究は、日本のように水資源の豊富な国では行うことが難しい問題について、水循環の乏しい中国内陸部の大都市における水環境汚染問題を背景に行われたものである。また分子生物学的手法や遺伝子改変動物などの作製を得意とする日本側と、分析手法の開発に十分な経験と実績を有する中国側の技術を組み合わせることでのし得たものである。

また日中双方の研究チームは、共同研究を推進するためお互いを訪問するだけでなく、学生を対象としたセミナーを開催したり、会食をしたりして、人的交流や人材育成にも尽力した。

5-3 共同研究成果から期待される波及効果

これまでに行われてきた環境汚染物質に対するリスク評価は、専ら目的とする化学物質を分析し、その化学物質の影響をバッテリー試験として *in vitro* 試験を用いて評価するのみであった。この点において、我々が開発した手法は、毒性を示す可能性がある未知汚染物質を同定するのみならず、その毒性評価を動物個体で迅速かつ効果的に行うものであり、従来法よりも遙かに優位性がある。我々が開発した方法論は、水環境に留まらず、様々な環境におけるリスク評価への応用が期待される。

Strategic International Collaborative Research Program (SICORP)
Japan—China Joint Research Program
Executive Summary of Final Report

1. Project title : 「High throughput identification technologies of toxic chemicals for protecting the safety of drinking water」
2. Research period : Aug. 2016 ~ Mar. 2019
3. Main participants :
Japan-side

	Name	Title	Affiliation	Role in the research project
PI	Tsuyoshi Nakanishi	Professor	Gifu Pharmaceutical University	Overseeing the entire research
Co-PI	Hisamitsu Nagase	Professor	Gifu University of Medical Science/ Gifu Pharmaceutical University	Biological experiments
Co-PI	Masahito Ikawa	Professor	Osaka University	Establishment of animal experimental models
Collaborator	Akiko Ido	Assistant Professor	Gifu Pharmaceutical University	Biological experiments
Collaborator	Youhei Hiromori	Assistant Professor	Suzuka University of Medical Science	Molecular biological experiments
Collaborator	Tomoki Kimura	Associate Professor	Setsunan University	Molecular biological experiments
Total number of participants throughout the research period: 6				

China-side

	Name	Title	Affiliation	Role in the research project
PI	Jiaying Hu	Professor	Peking University	Overseeing the entire research
Co-PI	Yi Wan	Associate Professor	Peking University	Analysis of chemical substances
Co-PI	Zhaobin Zhang	Associate Professor	Peking University	Biological experiments
Total number of participants throughout the research period: 3				

4. Summary of the international joint research

It is feared that the pollution of the water environment in the metropolitan area could have a serious effect on the quality of the waterworks. We previously reported that sewage treatment water in a metropolitan area where water circulation is scarce potentially included hazardous pollutants. It is suggesting that hazardous pollutant is emitted in the water environment of such a metropolitan area. In addition, in tap water, the presence of chlorine by-products, such as showing chronic toxicity is concerned. The inclusion of unknown

contaminants in the water environment of a metropolitan area may lead to the occurrence of new toxic byproducts. Therefore, it is necessary to develop the water quality management method for such a risk.

In the current study, we focused on nuclear receptors as a point of action of unknown hazardous substances exhibiting reproductive toxicity and teratogenic properties, and tried to develop fundamental technologies that contribute to the construction of a high-sensitivity and highly-throughput systems to detect contaminants that exhibit toxicity by acting on them.

5. Outcomes of the international joint research

5-1 Scientific outputs and implemented activities of the joint research

Our research team got the following results.

- (1) We developed a sorting method using receptor affinity carriers to efficiently purify the unknown contaminants acting on a nuclear receptor from the water specimen.
- (2) To identify unknown contaminants acting on a nuclear receptor from a water specimen, we established a Metabolome analysis method using Ultra Performance liquid chromatography/Q-Tof-mass spectrometry system.
- (3) The generation of transgenic animals for evaluating the biological effects of unknown contaminants was carried out.
- (4) We have established a method that can evaluate the biological effects induced by unknown contaminants quickly and effectively using the transgenic animals.

5-2 Synergistic effects of the joint research

Our research project was conducted on the background of water pollution problems in large cities in the inland part of China, where water circulation is scarce. In a country rich in water resources like Japan, it is difficult to tackle such a problem. The project was also achieved by combining the Japan side which specializes in the molecular biological techniques and production of transgenic animals, and the Chinese technology with sufficient experience and track record in the development of analytical methods.

In addition to visiting each other in order to promote collaborative research, both Japanese and Chinese researchers also held seminars and dined for students, and worked hard to develop human exchanges and human resources.

5-3 Scientific, industrial or societal impacts/effects of the outputs

The risk assessment for environmental pollutants, which has been carried out so far, was solely to analyze the chemical substances of interest and to evaluate the toxicity of the chemical substances using in vitro tests. In this regard, our method is not only to identify the unknown contaminants that may exhibit toxicity, it is intended to perform the toxicity evaluation quickly and effectively in experimental animals, there is much superiority than conventional methods. The methodology we developed is not confined to the water environment, but is expected to be applied to risk assessment in various environments.

共同研究における主要な研究成果リスト

1. 論文発表等

*原著論文（相手側研究チームとの共著論文）

・査読有り：発表件数：計 6 件

1. Zhaobin Zhang, Ying Hu, Jilong Guo, Tong Yu, Libei Sun, Xuan Xiao, Desheng Zhu, Tsuyoshi Nakanishi, Youhei Hiromori, Junyu Li, Xiaolin Fan, Yi Wan, Siyu Cheng, Jun Li, Xuan Guo and Jianying Hu. Fluorene-9-bisphenol is anti-oestrogenic and may cause adverse pregnancy outcomes in mice., *Nat. Commun.*, **2017**, 8, 14585. doi:10.1038/ncomms14585
2. Akiko Ido, Yohei Hiromori, Liping Meng, Haruki Usuda, Hisamitsu Nagase, Min Yang, Jianying Hu and Tsuyoshi Nakanishi. Occurrence of fibrates and their metabolites in source and drinking water in Shanghai and Zhejiang, China., *Sci. Rep.*, **2017**, 7, 45931. doi:10.1038/srep45931
3. Wenxin Hu, Fumei Gao, Hong Zhang, Youhei Hiromori, Shuhei Arakawa, Hisamitsu Nagase, Tsuyoshi Nakanishi and Jianying Hu. Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma and Disruption of Progesterone Synthesis of 2-Ethylhexyl Diphenyl Phosphate in Human Placental Choriocarcinoma Cells: Comparison with Triphenyl Phosphate., *Environ. Sci. Technol.*, **2017**, 51(7), 4061–4068. doi:10.1021/acs.est.7b00872
4. Yasushi Nishioka, Kazuki Tamai, Masanari Onda, Youhei Hiromori, Tomoki Kimura, Jianying Hu, Hisamitsu Nagase and Tsuyoshi Nakanishi. Potential Interference of Oil Vehicles on Genital Tubercle Development during the Fetal Period in ICR Mice., *Biol. Pharm. Bull.*, **2018**, 41(2), 266–271. doi:10.1248/bpb.b17-00830
5. Ichiro Yoshida, Keishi Ishida, Hiroshi Yoshikawa, Sho Kitamura, Youhei Hiromori, Yasushi Nishioka, Akiko Ido, Tomoki Kimura, Jun-ichi Nishikawa, Jianying Hu, Hisamitsu Nagase and Tsuyoshi Nakanishi, In vivo profiling of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced estrogenic/anti-estrogenic effects in female estrogen-responsive reporter transgenic mice. *J Hazard Mater.* in press doi:10.1016/j.jhazmat.2019.121526
6. Wenxin Hu, Yingting Jia, Qiyue Kang, Hui Peng, Haojia Ma, Shiyi Zhang, Youhei Hiromori, Tomoki Kimura, Tsuyoshi Nakanishi, Leming Zheng, Yifu Qiu, Zhaobin Zhang, Yi Wan and Jianying Hu, Screening of house dust from chinese homes for chemicals with liver X receptors binding activities and characterization of atherosclerotic activity using an in vitro macrophage cell line and ApoE^{-/-} mice. *Environ Health Perspect.* in press. doi:10.1289/EHP5039

・査読無し：発表件数：計 0 件

該当なし

*原著論文（相手側研究チームを含まない日本側研究チームの論文）：発表件数：計 3 件

・査読有り：発表件数：計 3 件

1. Erina Shiraishi, Akiko Ido, Youhei Hiromori, Kento Tanaka, Tomoki Kimura, Hisamitsu Nagase and Tsuyoshi Nakanishi. Utility of murine dendritic cell line DC2.4 for in vitro assay of skin-sensitization potential., *Fund. Toxicol. Sci.*, **2017**, 4(3), 121-126. doi: 10.2131/fts.4.121
2. Kerstin Törner, Tsuyoshi Nakanishi, Tomoaki Matsuura, Yasuhiko Kato and Hajime Watanabe. Genomic integration and ligand-dependent activation of the human estrogen

receptor α in the crustacean *Daphnia magna*., *PLOS One*, **2018**, 13(6), e0198023.
doi: 10.1371/journal.pone.0198023

3. Ana M.F. Capitaio, Ana M.F. Capitaio, Mónica S. Lopes-Marques, Yoichiro Ishii, Raquel Ruivo, Elza S.S. Fonseca, Elza S.S. Fonseca, Inês Páscoa, Rodolfo P. Jorge, Mélanie A.G. Barbosa, Mélanie A.G. Barbosa, Youhei Hiromori, Youhei Hiromori, Takayuki Miyagi, Tsuyoshi Nakanishi, Miguel M. Santos, Miguel M. Santos, and L. Filipe C. Castro. Evolutionary Exploitation of Vertebrate Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ by Organotins., *Environ. Sci. Technol.*, **2018**, 52(23), 13951–13959.
doi: 10.1021/acs.est.8b04399

・査読無し：発表件数：計 0 件
該当なし

*その他の著作物（相手側研究チームとの共著総説、書籍など）：発表件数：計 0 件
該当なし

*その他の著作物（相手側研究チームを含まない日本側研究チームの総説、書籍など）：発表件数：計 0 件
該当なし

2. 学会発表

*口頭発表（相手側研究チームとの連名発表）

発表件数：計 1 件（うち招待講演：0 件）

*口頭発表（相手側研究チームを含まない日本側研究チームの発表）

発表件数：計 30 件（うち招待講演：10 件）

*ポスター発表（相手側研究チームとの連名発表）

発表件数：計 2 件

*ポスター発表（相手側研究チームを含まない日本側研究チームの発表）

発表件数：計 7 件

3. 主催したワークショップ・セミナー・シンポジウム等の開催

1. MOST-JST China-Japanese Research Cooperative Program, Hu / Nakanishi Team's Workshop、主催者：Jianying Hu（北京大学・教授）、北京大学、北京、中国、2017年5月13日、参加人数 22名
2. JST 戦略的国際共同研究プログラム：日本－中国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分野 中西・胡班 成果報告会、主催者：中西剛（岐阜薬科大学・教授）、十八楼、岐阜、日本、2017年8月7日、参加人数 53名
3. JST 戦略的国際共同研究プログラム：日本－中国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分野 中西・胡班 成果報告会、主催者：中西剛（岐阜薬科大学・教授）、岐阜都ホテル、岐阜、日本、2018年4月28日、参加人数 105

名

4. 研究交流の実績

【合同ミーティング】

- ・2016年10月18～21日：共同研究打ち合わせ、北京大学、北京、中国
- ・2017年5月12～14日：成果報告会・研究打ち合わせ、北京大学、北京、中国
- ・2018年12月19～22日：成果報告会・研究打ち合わせ、岐阜薬科大学、岐阜、日本
- ・2019年3月19～21日：成果報告会・研究打ち合わせ、北京大学、北京、中国

5. 特許出願

研究期間累積出願件数：0 件

6. 受賞・新聞報道等

【受賞】

1. 平成30年度 日本薬学会学術振興賞、受賞者：中西 剛、2018年3月25日
2. 2018年 日本毒性学会 日化協 LRI 賞、受賞者：中西 剛、2018年7月19日
3. 第8回日本毒性学会 ファイザー賞、受賞者：木村朋紀、小野寺章、岡山文香、中西 剛、2018年7月19日

【報道】

1. New Scientist 誌 「BPA-free water bottles may contain another harmful chemical」（イギリス）／Nat Commun. 2017 Mar 1 ;8:14585、2017年2月28日掲載
(<https://www.newscientist.com/article/2123098-bpa-free-water-bottles-may-contain-another-harmful-chemical/>)
2. Nature Highlight Toxicology 「Assessing the health impacts of 'BPA-free' plastics」／Nat Commun. 2017 Mar 1 ;8:14585、2017年3月1日掲載
(<http://www.natureasia.com/ja-jp/research/highlight/11678>)

7. その他

該当なし

以上