

淀川流域におけるレチノイン酸受容体 アンタゴニスト汚染の実態解明

大阪大学大学院工学研究科
環境・エネルギー工学専攻
井上 大介、澤田 和子、池 道彦

1. はじめに

レチノイン酸受容体（RAR）は、脊椎動物が共通に保有する核内受容体の一つである。RAR は、ビタミン A の代謝物である *all-trans* レチノイン酸（atRA）の結合を介して、視覚や形態形成、発生、細胞分化、組織の恒常性など、多様な機能の制御を司っており、特に胚発生において重大な機能を果たしている。一方、RAR アンタゴニストによってその機能発現が抑制されると、様々な脊椎動物種に対して、眼や脳、心臓、体節、肢など多様な器官の発達に異常をもたらすことが知られており¹⁻³⁾、特に発生期の RAR アンタゴニストへの曝露は重篤かつ多様な生体影響を引き起こす。これらの生体影響の報告から、RAR アンタゴニストは幅広い生物種に深刻な生体異常を引き起こし得る潜在的なリスクファクターであると考えられる。

近年、米国環境保護庁の研究者らによる調査において、製紙工場廃水が流入する河川水中に RAR アンタゴニスト様作用を示す物質が存在することが初めて確認された⁴⁾。また、中国・北京市の下水処理場の流入水、処理水でも、RAR アンタゴニスト活性が検出された⁵⁾。そこで、淀川水系及び猪名川水系を対象に予備調査を実施したところ、淀川の中流域及び猪名川の下流域で顕著な RAR アンタゴニスト活性が検出され、RAR アンタゴニスト汚染が両河川でも存在することが見出された⁶⁾。上述した通り、RAR アンタゴニストによる RAR シグナル伝達系攪乱は多様な生物種に重篤な健康影響を及ぼし得ることから、これらの汚染の報告は将来の深刻な問題の発生を危惧させるものである。しかし、いずれの研究調査事例でも、汚染実態及び原因物質は明らかになっていないことから、RAR アンタゴニストによる未知のリスクを正しく評価し、その制御戦略を確立するための予見的研究が重要である。

そこで本研究では、淀川流域における RAR アンタゴニスト汚染に伴う生態リスク発現の可能性を明らかにするため、予備調査で汚染が確認された淀川中流域における汚染実態を明らかにすることを目的としている。

平成 22 年度に実施した活性ベースでの汚染実態把握から、RAR アンタゴニスト汚染は淀川中流域の特定の部分において時期によらず生じており、その一部は下水処理場に流入する下水に由来しているが、未特定の汚染源も存在することが明らかになった。また、下水中の原因物質の分取を試み、下水中には複数の RAR アンタゴニストが存在しているが、最も主要な物質は処理場によらず共通していることを明らかにした。これらの結果を受け、平成 23 年度は、汚染源が特定されなかった天野川における詳細な汚染実態調査を行うとともに、下水中の主要な RAR アゴニストの分離・精製・化学構造推定と汚染状況把握に取り組んだ。

2. 実験材料および方法

2.1 供試試料

平成 22 年度の調査において常にアンタゴニスト汚染が確認され、汚染源が不明であった天野川において、平成 23 年 4 月 27 日に詳細な汚染調査を実施した。平成 22 年度の調査地点である地点 9 の他、a1～a9 の合計 10 地点から河川水試料を採取した(図 1)。また、下水中に含まれる RAR アンタゴニストを特定するため、大阪府下の標準活性汚泥法を採用する C 下水処理場において、最初沈殿池越流水(流入水)と最終沈殿池越流水(処理水)の試料を採取した。

各試料の採取は褐色ガラス瓶または 10 L ポリタンク(予め超純水とメタノールで洗浄し、現場で共洗いして使用)を用いて行い、採取後の試料は、氷冷下に保存した状態で実験室まで運搬した。

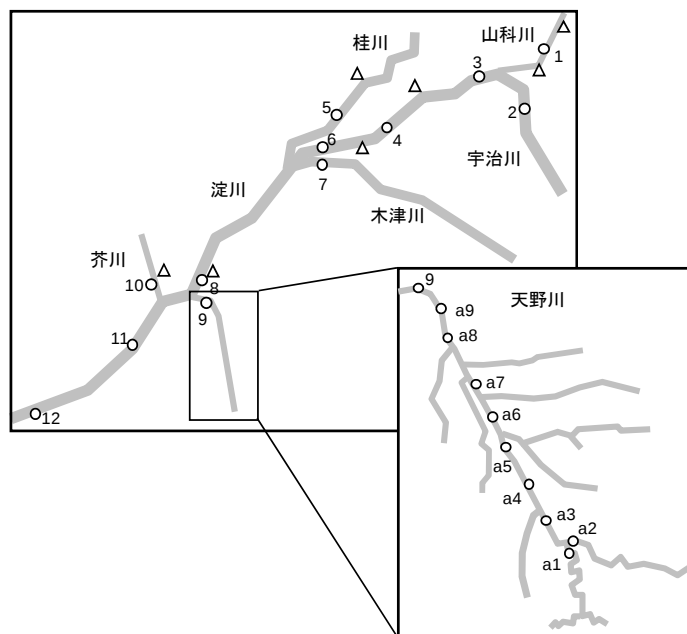


図 1 河川水試料の採水地点
○ 採水地点、△ 下水処理場

2.2 試料の前処理

既往研究において、環境中に存在する RAR アンタゴニストが極性物質である可能性が指摘されている⁴⁾。そこで、以下の固相抽出法により、飼料中の極性物質を濃縮した。まず、ガラス繊維濾紙 (GF/B; Whatman) を用いて浮遊粒子状物質を除去した試料を、メタノール (MeOH) 6 mL および超純水 6 mL でコンディショニングした Oasis HLB カートリッジ (6 cc/500 mg; Waters) に通水した。その後、カートリッジを十分に乾燥させ、MeOH 6mL でカートリッジに捕捉された化学物質を溶出した。溶出液は、窒素気流下で濃縮・乾固させ、元試料の 20,000 倍濃度になるようにジメチルスルホキシド (DMSO) (活性測定用) あるいは MeOH (HPLC 分画用) に転溶して、-20℃で保存し、使用前に同溶媒を用いて適宜希釈した。

2.3 RAR アンタゴニスト活性の評価

各試料の RAR アンタゴニスト活性の評価には、ヒト RAR α を導入した酵母 two-hybrid 法⁷⁾を用いた。各実験系には、RAR の内因性リガンドである atRA と試料を併せて 1%(v/v)になるように添加した。なお、実験系における atRA の終濃度は 100 nM とし、試料の終濃度は元試料に対して 1-100 倍になるように調整した。コントロール系では atRA と RAR の結合によって β -ガラクトシダーゼによる発色が抑制される。このため、コントロール系と試料添加系の発色を比較する(試料添加による発色抑制の程度を計測する)ことにより、RAR アンタゴニスト活性の強さを評価することができる。そこで、コントロール系の β -ガラクトシダーゼ(RAR 活性)を 100% とし、各試料の活性をコントロール系に対する相対値(%)として求めた。

2.4 HPLC 分画

試料中の RAR アンタゴニストを特定するために、HPLC を用いて試料中に含まれる化学物質を分画し、RAR アンタゴニスト活性を示す画分の特定を試みた。HPLC 分析は、LC-10Avp システム(Shimadzu)を用い、表 1 の分析条件により行い、分析中の 0-44 分に 2 分間隔で溶出液を分取した(合計 22 画分)。HPLC 分画で分取した各試料は、乾燥させた後、DMSO に転溶して、RAR アンタゴニスト活性を測定した。ここで顕著な活性が確認された画分を分取・乾燥させた後、MeOH に転溶した。

1 回目の HPLC 分画で分取した活性画分に含まれる各物質は、UFLC Prominence(Shimadzu)を用いた分画に供した。表 2 の条件で分析を行い、検出された各ピークを分取し、乾燥して DMSO に転溶して、RAR アンタゴニスト活性を測定した。ここで活性が確認されたピークは、分取・乾燥させた後、アセトニトリルに転溶して GC/MS 分析に供した。

2.5 LC/MS 分析

2.4 の UFLC Prominence を用いた活性画分の分析・活性ピークの特定期間には、スキャンモード(スキャン幅： m/z =100-800、イオンモード：ポジティブ・ネガティブ)での MS 分析も実施し、活性ピークの MS データを取得した。

2.6 GC/MS 分析

GC/MS 分析は、Varian 450-GC および 220-MS(Varian)を用い、表 3 の条件により行った。

表 1 活性画分の分取のための HPLC 分析条件

溶離液	水／アセトニトリル
アセトニトリル濃度	0-3 分：20%、3-30 分：20-100%、30-40 分：100%、40-45 分：20%
流速	1.0 mL/分
分析カラム	Shim-pack VP-ODS (250 mm × 4.6 mm)
カラム温度	40℃
UV 検出波長	254 nm

表 2 活性ピーク特定のための HPLC 分析条件

溶離液	1%ギ酸／アセトニトリル
アセトニトリル濃度	0-5 分：70%、5-26 分：70-97%、26-28 分：97%、28-30 分：70%
流速	1.0 mL/分
分析カラム	Inertsil ODS-3 (150 mm × 4.6 mm)
カラム温度	40℃
UV 検出波長	254 nm

表 3 GC/MS 分析条件

キャリアガス	ヘリウム
オーブン温度	0-2 分：40℃、2-23 分：40-250℃ (10℃/分)、23-27 分：250℃
流速	1.0 mL/分
分離カラム	Factor Four Capillary Column VF-5ms (30 m × 0.25 mm, ID DF=0.25)
MS 検出	m/z=50-650
インジェクター温度	250℃
スプリット比	1:10

3. 実験結果および考察

3.1 天野川における RAR アンタゴニスト汚染

天野川における未特定の汚染源を調査するため、平成 22 年度の調査で常に顕著な活性が確認された地点 9 とその上流の 9 地点(a1～a9)において、平成 23 年 4 月に汚染実態調査を行った。各地点より採取した試料の 100 倍濃縮における RAR アンタゴニスト活性の測定結果を図 2 に示す。その結果、地点 a7 までは顕著な活性が確認されなかったが、地点 a8 から地点 9 にかけて RAR アンタゴニスト活性が高くなっていく傾向が観察され、特に地点 a9 ならびに地点 9 では他の地点よりも比較的高い RAR アンタゴニスト活性を示した。そこで、この地点 a9 および地点 9 について、RAR アンタゴニスト活性の用量反応性を調査した結果、地点 a9 においては 50 倍濃縮で 22.1%、100 倍濃縮で 30.6%、地点 9 においては 50 倍濃縮で 18.4%、100 倍濃縮で 29.7%の阻害が確認され、用量反応的に RAR アンタゴニスト活性が高くなることが確認された(図 3)。このことから、特に地点 a8 と地点 a9 の間に重要な汚染源が存在しているものと考えられた。

天野川地点 a8 は大阪府枚方市村野西町に位置し、地点 a9 は大阪府枚方市宮之阪に位置している。この間には工場などの排水路は確認できず、3 つの雨水用ポンプ場が位置しているが、採水日は晴天日であることから、この排水が影響しているとは考えにくい。これらのことから、天野川における汚染源は特定できなかったが、何らかの自然因子(例えば、藻類などによる合成)などの関与を含め、詳細を明らかにしていく必要があると考えられた。

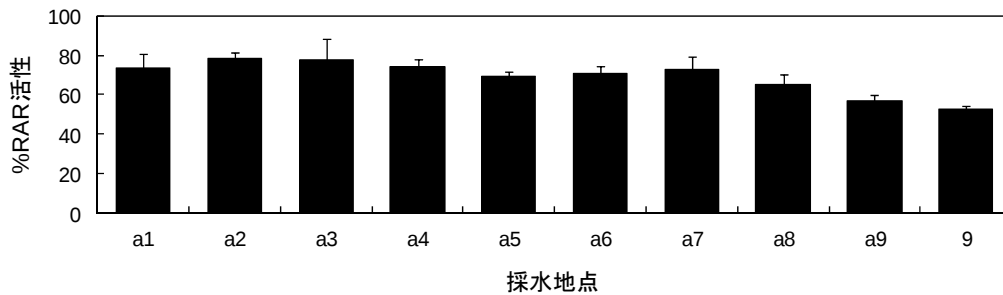


図 2 天野川 10 地点における RAR アンタゴニスト活性
濃縮倍率：100 倍、エラーバー：標準偏差 (n=3)

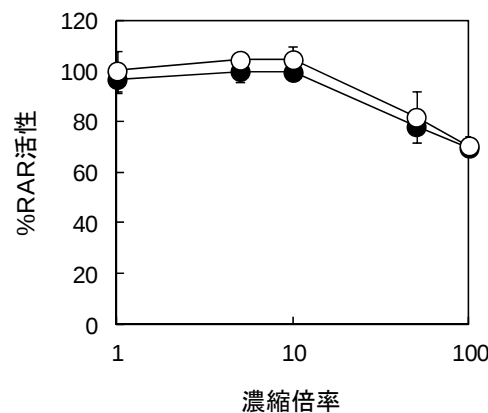


図 3 地点 a9(●)および地点 9 における RAR アンタゴニスト活性の容量反応性
(エラーバー：標準偏差 (n=3))

3.2 下水中の RAR アンタゴニストの特定に関する試み

昨年度の検討において、複数の下水処理場で顕著な RAR アンタゴニスト活性が検出された。そこで、新たに C 下水処理場の試料を用いて、下水中の主要な RAR アンタゴニストの特定を試みた。まず、C 下水処理場より採取した流入水および処理水試料の RAR アンタゴニスト活性を測定した。その結果、流入水においては、RAR 活性が 10 倍濃縮で 48.4%、50 倍濃縮で 73.0%、100 倍濃縮で 88.7%阻害され、明確な用量反応性を示した(図 4)。また、処理水においても、10 倍濃縮で 14.6%、50 倍濃縮で 28.0%、100 倍濃縮で 37.1%の阻害が確認され、用量反応的な RAR アンタゴニスト活性が確認された(図 4)。RAR アンタゴニストはごく微量で含まれていると想定され、また分取・精製の段階で一部をロスする可能性もあるため、なるべく活性の高い試料から分取・精製することが望ましい。このため、特に顕著な活性が認められた流入水試料を原因物質特定に用いることとした。

そこで、原因物質の分取・精製の第一段階として、流入水試料を HPLC に供して 2 分間隔で溶出液を分取し、各分面試料の RAR アンタゴニスト活性を測定した。結果を図 5 に示す。昨年度に行った別の下水処理場における結果と同様に、保持時間 20-22 分および 22-24 分の連続する 2 つの画分において、最も高い活性が検出され

た。このため、20-24 分の画分に最も高活性あるいは最も高濃度の汚染原因物質が含まれていることが示唆された。また、この 2 画分以外にも、32-34 分など、幾つかの画分において顕著な RAR アンタゴニスト活性が検出されたことから、下水中には複数の RAR アンタゴニストが存在していることが改めて明らかになった。

次に、1 回目の HPLC 分画で最も顕著な活性が検出された 20-24 分の画分に含まれる RAR アンタゴニストを分離するため、それらの画分を別条件の HPLC 分画に供した。その結果、LC クロマトグラム上で 21 個のピークが検出された(図 6 上)。そこで、これらのピークを個別に分取し、RAR アンタゴニスト活性を測定したところ、ピーク 7、10、18 が活性を示すことが確認された(図 6 下)。そのため、これら 3 つのピークを対象に詳細な活性測定を行った結果、ピーク 10 と 18 では用量反応的に RAR アンタゴニスト活性が上昇することが確認された(図 7)。LC/MS を用いて、ピーク 10 の MS を確認したところ、 $m/z=204$ 、 245 、 357 (ポジティブモード)のフラグメントイオンが検出された。

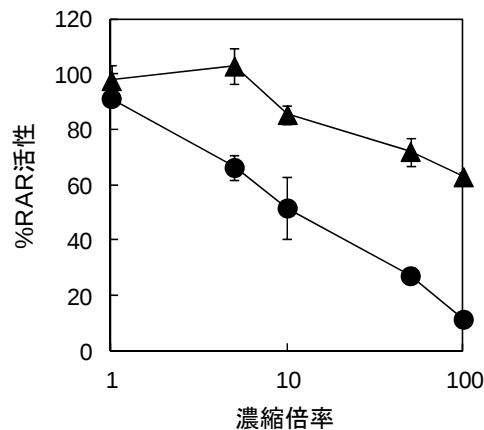


図 4 C 下水処理場の流入水試料(●)および処理水試料(○)における RAR アンタゴニスト活性(エラーバー：標準偏差 (n=3))

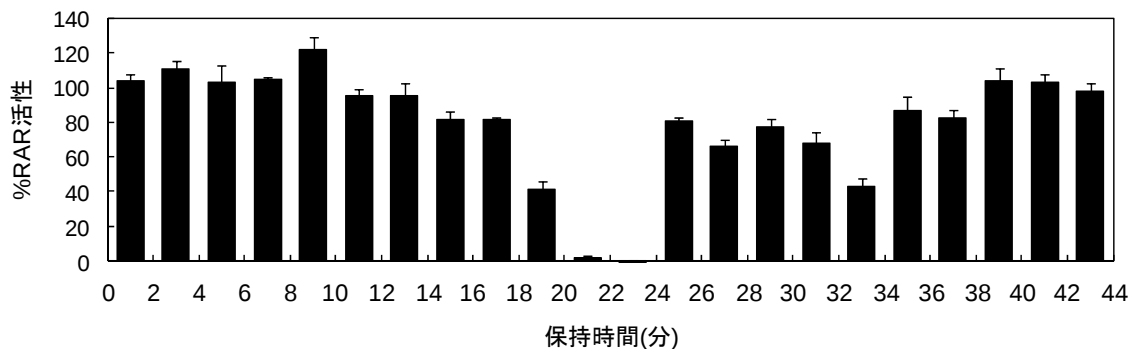


図 5 HPLC 分画による C 下水処理場流入水試料中の RAR アンタゴニスト活性画分の特定(濃縮倍率：100 倍、エラーバー：標準偏差 (n=3))

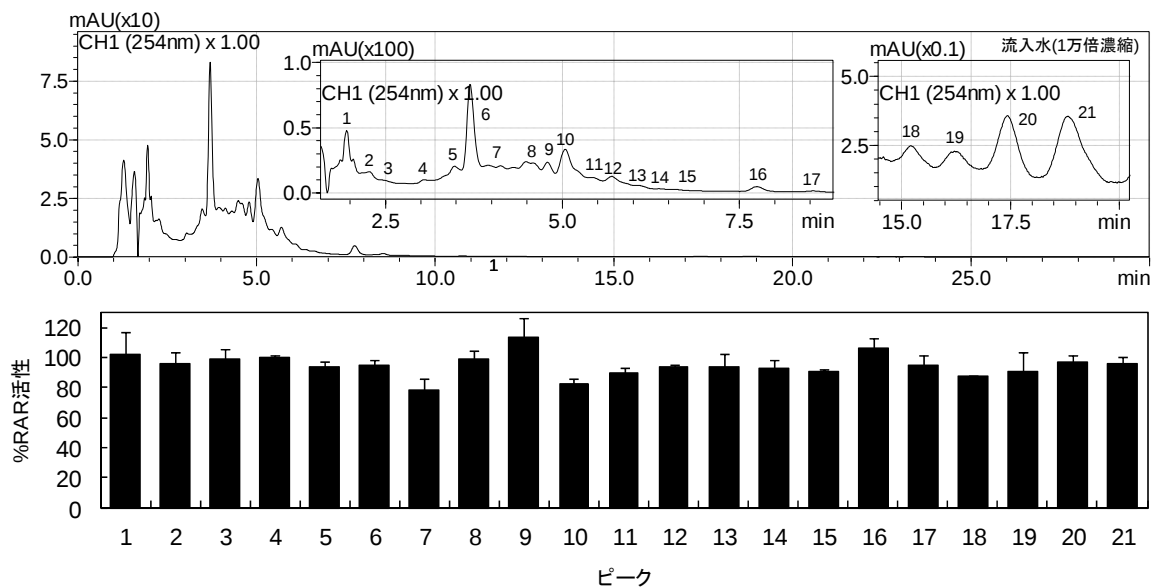


図 6 2 回目の HPLC 分画による活性画分 (図 5 の 20-24 分) からの活性ピークの特定
 上 : LC クロマトグラフ
 下 : 検出ピークの RAR アンタゴニスト活性 (濃縮倍率 : 100 倍、エラーバー : 標準偏差 (n=3))

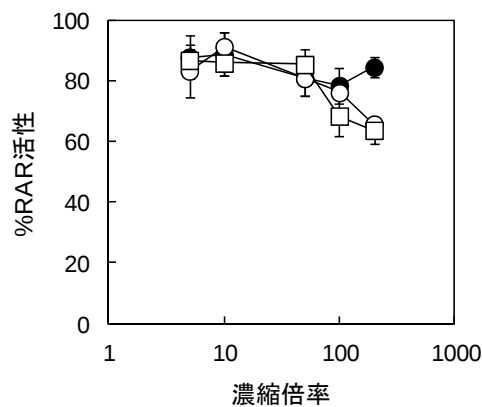


図 7 ピーク 7(●)、10(○)、18(□)の RAR アンタゴニスト活性の用量反応性
 エラーバーは標準偏差 (n=3)

さらに、分取したピーク 7、10、18 を GC/MS 分析に供した結果、ピーク 10 においては保持時間 13.6、17.0 および 18.4 分に特異的なピークが検出されたため、それぞれのピークの MS スペクトルから物質検索を行った。保持時間 13.6 分の物質は 2,3,5,6-テトラメチルフェノールまたはチモール、保持時間 17.0 分の物質はクロタミトン、保持時間 18.4 分の物質はパラベン類の 4-ヒドロキシ安息香酸ブチル、

4-ヒドロキシ安息香酸アミル、4-ヒドロキシ安息香酸、4-ヒドロキシ安息香酸イソブチルまたはプロピルパラベンである可能性が高いことが明らかになった。これらの物質のうち、4-ヒドロキシ安息香酸ブチル、4-ヒドロキシ安息香酸アミル、4-ヒドロキシ安息香酸イソブチルは、Kamata ら⁸⁾の研究において、atRA に対してそれぞれ 0.046%、0.153%、0.072%の RAR γ に対するアゴニスト活性を有することが確認されている。以上のことから、今後はこれら候補物質がアンタゴニスト活性を示すかを確認する必要がある。

また、淀川の採水地点の中で常に顕著な RAR アンタゴニスト活性が検出された淀川の地点 9(天野川)について GC/MS 分析を行い、ピーク 10 の分析結果と比較したところ、両者に共通する MS スペクトルは検出されなかった。このため、やはり地点 9 における RAR アンタゴニスト汚染は下水に由来しているものではない可能性が高いものと示唆された。

4. まとめ

天野川における詳細な汚染調査の結果、淀川本流との合流直前のみで高い RAR アンタゴニスト汚染が確認されたが、明確な人為汚染源が確認されなかった。このため、例えば藻類による合成など、自然発生的な要因が関与している可能性が考えられ、今後はそれらを含めた調査が必要である。

また、下水中の主要な RAR アンタゴニストの特定を試みた結果、現在のところ物質特定には至っていないものの、幾つかの候補物質を明らかにすることができた。今後は、これらの候補物質の RAR アンタゴニスト活性の評価によって、原因物質を推定し、汚染実態を明らかにすることによって、生態影響発現の可能性を明らかにしていきたい。

5. 参考文献

- 1) Zile, M.H. 2001. Function of vitamin A in vertebrate embryonic development. *The Journal of Nutrition* 131, 705-708.
- 2) Claggett-Dame, M., DeLuca, H.F. 2002. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annual Review of Nutrition* 22, 347-381.
- 3) Zhou, J., Kochhar, D.M. 2003. Regulation of AP-2 and apoptosis in developing eye in a vitamin A-deficiency model. *Birth Defects Research Part A* 67, 41-53.
- 4) Schoff, P.K., Ankley, G.T. 2002. Inhibition of retinoid activity by components of a paper mill effluent. *Environmental Pollution* 119, 1-4.
- 5) Zhen, H., Wu, X., Hu, J., Xiao, Y., Yang, M., Hirotsuji, J., Nishikawa, J., Nakanishi, T., Ike, M. 2009. Identification of retinoic acid receptor agonists in sewage treatment plants. *Environmental Science and Technology* 43, 6611-6616.
- 6) 井上大介, 崔英民, 澤田和子, 清和成, 池道彦. 2009. 酵母 two-hybrid 法を用いたレチノイン酸受容体アンタゴニストによる水環境汚染の実態調査. *日本水処理生物学会誌 別巻* 29, 34.
- 7) Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, F., Matsuo, M., Nishihara,

- T. 1999. New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicology and Applied Pharmacology* 154, 76-83.
- 8) Kamata, R., Shiraishi, F., Nishikawa, J., Yonemoto, J., Shiraishi, H. 2008. Screening and detection of *in vitro* agonistic activity of xenobiotics on the retinoic acid receptor. *Toxicology in Vitro* 22, 1050-1061.