

令和 6 年度 化学物質規制対策

「大学・公的研究機関と連携した化学物質管理高度化推進事業」

化学物質の魚類中体内動態と
代謝酵素分画による *in vitro* 分解との相関

調査報告書

令和 7 年 2 月
国立大学法人 鹿児島大学

目次

1. 概要と目的.....	1
1.1. 研究目的.....	1
1.2. 試験結果概要.....	2
1.2.1. 第一物質グループの魚体内動態.....	2
1.2.2. 第一物質グループの魚体内動態.....	2
1.2.3. 魚体内動態と S9 画分による <i>in vitro</i> 分解との相関性の検証.....	2
2. 方法.....	3
2.1. 対象物質.....	3
2.2. 試験魚.....	4
2.3. 流水式暴露水槽の設置.....	4
2.4. 蓄積性試験の水中濃度設定のための毒性試験.....	6
2.4.1. 第一物質グループ.....	6
2.4.2. 第二物質グループ.....	6
2.5. 生物蓄積性試験.....	6
2.6. 水中濃度分析.....	7
2.6.1. 第一物質グループ.....	7
2.6.2. 第二物質グループ.....	7
2.7. 魚体中濃度分析.....	8
2.7.1. 第一物質グループ.....	8
2.7.2. 第二物質グループ.....	9
2.8. 生物濃縮係数及び排泄速度の算出.....	10
2.9. S9 画分の調整.....	10
2.9.1. ニジマス肝臓由来 S9 画分の調整.....	10
2.9.2. コイ肝臓由来 S9 画分の調整.....	11

2.10. S9 画分の品質評価.....	11
2.10.1. タンパク質含量の測定.....	11
2.10.2. EROD 活性の測定.....	11
2.11. S9 画分による <i>in vitro</i> 分解試験.....	12
2.12. 代謝酵素関連遺伝子のリアルタイム PCR 系の確立.....	13
2.13. 生物蓄積試験における代謝酵素関連遺伝子発現解析.....	13
3. 結果と考察.....	14
3.1. ヒメダカに対する簡易毒性試験結果.....	14
3.1.1. 第一物質グループ.....	14
3.1.2. 第二物質グループ.....	14
3.2. 水中濃度の測定結果.....	15
3.2.1. 第一物質グループ.....	15
3.2.2. 第二物質グループ.....	16
3.3. 化学物質生物蓄積性試験結果.....	16
3.3.1. 第一物質グループ.....	16
3.3.2. 第二物質グループ.....	18
3.4. S9 画分の評価結果.....	20
3.5. S9 画分による <i>in vitro</i> 分解試験結果.....	20
3.6. S9 画分による分解速度と BCF _{ss} 及び排泄速度との相関性の検証結果.....	23
3.7. 代謝酵素関連遺伝子のリアルタイム PCR 系による発現解析結果.....	24
4. 今後の課題.....	25
5. 人材育成.....	27
6. 参考文献.....	28

1. 概要と目的

1.1. 研究目的

魚類類に対する化学物質濃縮試験は、多数の魚を必要とするが、近年、関心が高い動物愛護の観点から考えると、近い将来、実験魚を用いない試験法確立とそれによる評価が我が国でも求められると考えられる。そのため、将来を見据えたデータ構築と準備が必要である。コンパートメントモデルによる化学物質濃縮評価は、水中や餌中の化学物質の生物への取込と排泄の差に基づいて、蓄積の大小が決定するが本モデルにおいては、その蓄積性は生物の化学物質排出能力に依存する。よって、化学物質の蓄積性は生物からの排泄速度と、排泄に寄与する薬物代謝能を把握すれば、ある程度把握できる可能性が高い。実際、欧州では蓄積性を判断する上で、魚類肝臓やミクロソーム由来で薬物代謝酵素を多く含む S9 mix 分画により、化合物の *in vitro* 分解速度を予測モデルに組み込む方法が提案されている。一方で実際の魚体内の物質動態は複雑であり、単純に *in vitro* 化学物質分解のパターンと一致するかどうかは分からない。化学物質の生体内変化は物質依存的であるが、魚体中の化学物質の代謝、排泄に関するデータは限定的であり多くない。また S9 分画による *in vitro* での物質分解と、実際に化学物質暴露された魚体生体内での蓄積から排泄までの動態が、どの程度の相同・相違性を持つか、という知見も少ない。そのため、例えば化審法などの蓄積評価で直ちに *in vitro* 試験に移行したとしても、実生物体内の物質動態をどの程度外挿できるか、判断が難しいのが現状であろう。そのため将来を見据えて、現在、*in vitro* 法の精度や信頼性において未知な部分が多い、実生物の取込・排泄・蓄積との関係性や、経鰓・経口取込時の排泄と S9 分解能の関係、*in vitro* における複数魚種から得た S9 の化学物質分解能の種間差、などを検討すれば、将来求められる非生物試験による蓄積評価法を確立する上で有用なデータを得られると考えられる。

そこで本研究では将来の生物を用いない化学物質の蓄積評価試験の確立に寄与するデータを構築することを最終目標とした。令和 6 年度は、近年着目されている *in vitro* における魚肝臓 S9 分画による化学物質分解と、実際に化学物質を蓄積した魚体中からの化学物質の体内動態の相関性を明らかにすることを目的とした。

1.2. 試験結果概要

1.2.1. 第一物質グループの魚体内動態

第一物質グループとして、多環芳香族炭化水素類（PAH 類）のうち、多環芳香族炭化水素類（PAH 類）のうちフルオレン、フェナントレン、ピレン、1-メチルピレン、ベンゾ[a]アントラセンを選定し、コイに対して生物蓄積試験を行った。その結果、ベンゾ[a]アントラセン以外の4種類のPAH類の蓄積が確認され、定常状態におけるPAH類の生物濃縮係数(BCFss)、及び排泄速度 k_2 を算出した。BCFss と排泄速度 k_2 が算出された4種類のPAH類については、ニジマス肝臓由来 S9 画分による *in vitro* 分解との相関性を検証した。

1.2.2. 第二物質グループの魚体内動態

第二物質グループとして、農薬として使用されている殺虫剤及び除草剤等のうち、フェノブカルブ、フェニトロチオン、イソプロチオラン、ベンチオカーブ、シマジン、オキシジアゾンの6種類を選定し、コイに対して生物蓄積試験を行った。その結果、6種類すべての農薬類で蓄積が確認され、BCFss、及び排泄速度 k_2 を算出した。算出された6種類のうち、フェノブカルブ、フェニトロチオン、ベンチオカーブの3種類の農薬類については、ニジマス肝臓由来 S9 画分による *in vitro* 分解との相関性を検証した。

1.2.3. 化学物質の魚類中体内動態と代謝酵素分画による *in vitro* 分解との相関性の検証

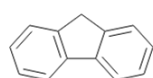
鹿児島県下の養鱒場で入手したニジマス肝臓より得られた S9 画分のタンパク質含量及び EROD 活性は、市販品のものと比較して、遜色ない品質であった。また、第一物質グループの4種類のコイに対する生物蓄積性試験の結果得られた BCFss 及び排泄速度 k_2 と高い相関が確認された。

2. 方法

2.1. 対象物質

本研究では、同時分析ができる 5～6 種類程度の化学物質グループを設定した。第一物質グループとして、多環芳香族炭化水素類（PAH 類）のうちフルオレン、フェナントレン、ピレン、1-メチルピレン、ベンゾ[a]アントラセン、ジベンゾチオフェンを選別した（図 1）。PAH 類は石油構成成分であり、燃焼を伴って排泄される。環境中でも検出されることがあり、実環境中の魚体に取り込みが確認されている物質群であることから、上記の 6 物質を試験物質とした。第二物質グループとして農薬類として、フェノブカルブ、シマジン、フェニトロチオン、ベンチオカーブ、イソプロチオラン、オキサジアゾン選定した（図 1）。これらは一般的な農薬として使用されており、散布時期には環境中より検出される。

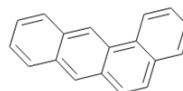
第一物質グループ



フルオレン
分子量：166.2



フェナントレン
分子量：178.2



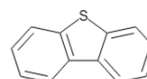
ベンゾ[a]アントラセン
分子量：228.3



ピレン
分子量：202.3

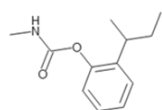


1-メチルピレン
分子量：216.3

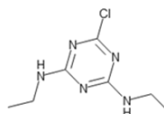


ジベンゾチオフェン
分子量：184.3

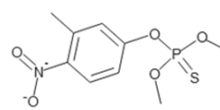
第二物質グループ



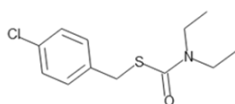
フェノブカルブ
分子量：207.3



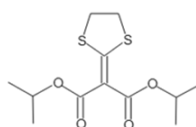
シマジン
分子量：201.7



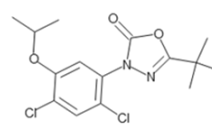
フェニトロチオン
分子量：277.2



ベンチオカーブ
分子量：257.8



イソプロチオラン
分子量：290.4



オキサジアゾン
分子量：345.2

図 1 本研究における対象物質

2.2. 試験魚

本研究で用いるコイ (*Cyprinus carpio*) は、山口県下関市にある国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産大学校から当歳魚を供与して頂いた。現在、馴致のため、コイを実験室内の 200 L ポリカーボネート製タンク内に 100 尾ずつ収容し、飼育した。

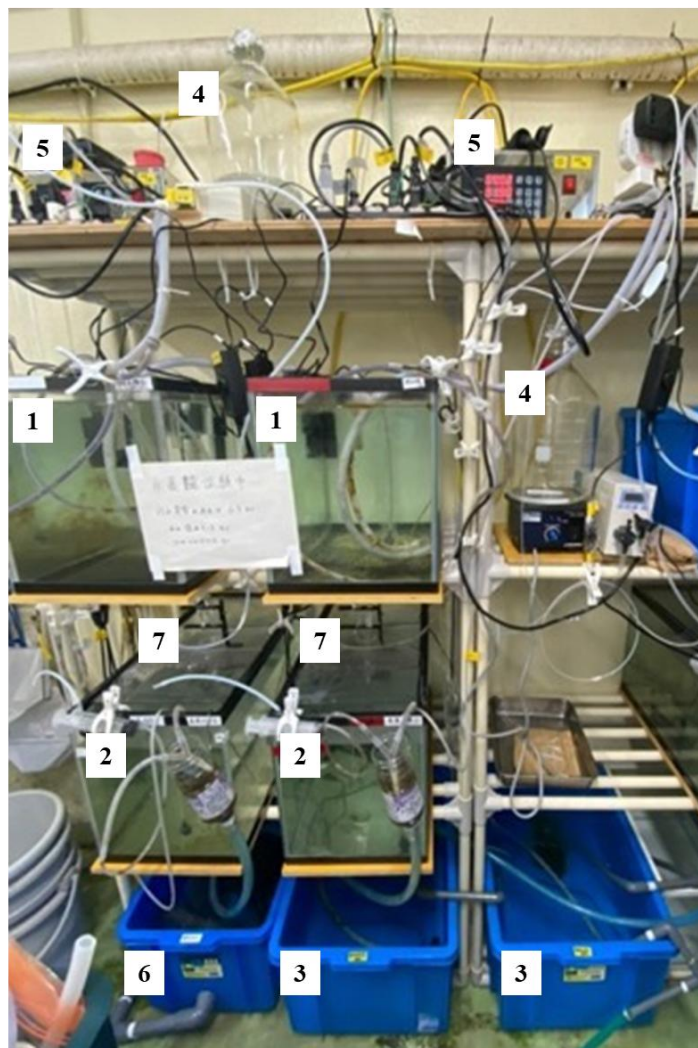
S9 画分を分画・調整用のニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) は、ベクトル株式会社から供与して頂いた。200L ポリカーボネート製タンク内に 50 尾程度を収容し、S9 画分の分画作業まで、17℃で 3 週間程度、馴致・飼育した。なお、馴致期間中は無給餌で飼育した。

2.3. 流水式暴露水槽の設置

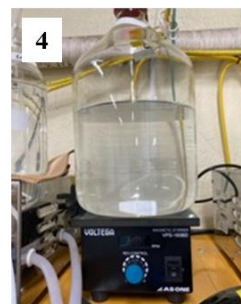
本研究では、安定した濃度での暴露を行うために、OECD TG305 および化審法を参考に連続式流水水槽を作成して試験を行った (図 2)。貯水水槽には水位検出器 (図 2-1) を取り付け、常に一定の水位になるようにした。貯水タンクより暴露水槽には 60cm 水槽、曝気水道水の注水には工業用液体充填機 (図 2-5)、試験物質の溶解した標準溶液の注水にはペリスタポンプ (STEPDOS, 図 2-4) を用いた。貯水水槽から暴露水槽への注水は工業用液体充填機に加えて補助的にサイフォンで水が流れるようにした。また、試験物質を含む微量ポンプに接続するチューブには PE チューブを用いて、チューブへの試験物質の付着を最小限にした。本研究では、化学物質を含む標準原液にはジメチルスルホオキシド (DMSO や HCO-40) を混合し、水溶解度の小さな物質も水に溶解しやすい状態にした上で、魚が収容されている水槽中の水交換率をできる限り減らした (図 2-4)。飼育水の排水は液面と排水の状態が分かるようにサイフォンを利用した排水装置 (図 2-5) を作成し、廃液タンク中には物理ろ過用の綿、活性炭を加え、排水処理を行った (図 2-6)。注水口は滴定速度を目視で確認でき、さらにトラブルの際は液量を測定できるように組付けが容易に行える注水口を作成した (図 2-7)。

本流水システムにおいて、溶存酸素濃度を一定レベルに保つために、エアレーションを貯水水槽に水を注ぐ貯水水槽、貯水槽、そして魚が入った水槽の全てにエアレーションを施した。また、試験期間を通してヒーターとサーモスタットを用いて、水温を約 25℃に維持するようにした。

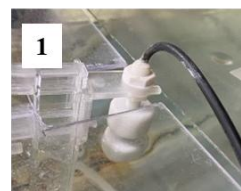
生物蓄積性試験を行うにあたり、水中の化学物質濃度が安定しているかを調べるため、水中濃度を数回測定した。水中濃度が安定したのを確認後、蓄積試験を開始した。



1. 貯水水槽、2. 暴露水槽、3. 貯水タンク、
4. 標準溶液と微量ポンプ、5. 注水装置、6. 廃液タンク、
7. 注水口



4. 標準溶液
スターラーで常時攪拌



1. 貯水水槽
水位検出装置を設置



2. 暴露水槽



7. 注水口

図 2. 本研究で用いた流水式水槽

2.4. 蓄積性試験の水中濃度設定のための毒性試験

2.4.1. 第一物質グループ

蓄積試験の水中濃度決定のために、ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対して半止水式の簡易毒性試験を行った。試験魚には約 12 ヶ月齢のものをを用い、雌雄の区別はしなかった。ガラス製の飼育水槽に 1 L の飼育水を注ぎ、試験魚を 7 尾収容した。各対象物質の濃度は、フェナントレンでは 14.8~1200 µg/L (5 試験区/公比: 3)、フルオレンでは 22.2~1800 µg/L (5 試験区/公比: 3)、ジベンゾチオフェンでは 18.5~1500 µg/L (5 試験区/公比: 3)、ベンゾ[a]アントラセンでは 0.15~12 µg/L (5 試験区/公比: 3)、ピレンでは 1.85~150 µg/L (5 試験区/公比: 3) に設定した。水温は 24°C になるように調温した。暴露期間は 96 時間とし、24 時間ごとに各暴露区のヒメダカの死亡数を確認した。

2.4.2. 第二物質グループ

第二物質グループとして、農薬として使用されている殺虫剤及び除草剤を選定した。選定した物質は、同時に測定可能なフェノブカルブ、フェニトロチオン、イソプロチオラン、ベンチオカーブ、シマジン、オキシジアゾンの 6 種類とした。

蓄積試験の水中濃度決定のために、ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対して半止水式の簡易毒性試験を行った。試験魚には約 12 ヶ月齢のものをを用い、雌雄の区別はしなかった。ガラス製の飼育水槽に 1 L の飼育水を注ぎ、試験魚を 7 尾収容した。各対象物質の濃度は、フェノブカルブでは 0.19~15 mg/L (5 試験区/公比: 3)、フェニトロチオンでは 0.19~15 mg/L (5 試験区/公比: 3)、イソプロチオランでは 0.12~10 mg/L (5 試験区/公比: 3)、ベンチオカーブでは 0.19~15 mg/L (5 試験区/公比: 3)、シマジンでは 0.06~5 mg/L (5 試験区/公比: 3)、オキシジアゾンでは 0.01~1 mg/L (5 試験区/公比: 3) に設定した。水温は 24°C になるように調温した。暴露期間は 96 時間とし、24 時間ごとに各暴露区のヒメダカの死亡数、及び痙攣や炎症など影響を確認した。

2.5. 蓄積性試験

蓄積試験は、薬液と飼育水を一定流速で注水する流水式暴露装置を設置した。暴露水槽は 60 cm ガラス水槽とし、そこに注水する飼育水と薬液の注水速度はそれぞれ 50 mL/min. 及び 1 mL/min. に設定した。

蓄積試験の試験魚としてコイ (*Cyprinus carpio*) を用いた。蓄積試験は各濃度区水槽あたり 50 尾を収容し実施した。蓄積試験開始後、第一物質グループでは、0, 1, 5, 7, 14, 21, 28 日目に 4 尾ずつサンプリングを行った。また、排泄試験として薬液注入を停止後、3, 5, 7, 10, 14, 28 日目に 4 尾ずつサンプリングを行った。第二物質グループでは、蓄積試験開始後、0, 1, 5, 7, 14, 17 日目に 4 尾ずつサンプリングを行った。また、排泄試験として薬液注入を停止後、3, 5, 7 日目に 4 尾ずつサンプリングを行った。サンプリングは、体長測定後、餌料由来の PAH 類の検出を避けるため腸管を抜き取り、その後魚体重を測定した。サンプリング後、

速やかに液体窒素で凍結後、48 時間以上凍結乾燥処理した。凍結乾燥処理後、2 個体をプールし、解剖バサミと乳鉢を用いて細かく粉碎し、使用するまで-20℃で保存した。

2.6. 水中濃度分析

2.6.1. 第一物質グループ

各暴露水槽から水をそれぞれ 20 mL ずつ採取した。これにヘキサン 10mL を添加し、15 分間振とう器により振とうし、遠心分離 (2000 rpm, 15 min., 4℃)を行った。上層のヘキサン相を採取し、水層には新たにヘキサン 10 mL を採取し、振とう機で 15 分間振とうした。上記と同条件で遠心分離を行った後、ヘキサン相を採取し、先のヘキサン相と合わせた。このヘキサン溶液をガラス漏斗に詰めた無水硫酸ナトリウムに通して脱水した。その後、内部標準物質 (アントラセン-d10, ピレン-d12) を最終濃度 100 ppb になるように加えて、水中設定濃度と GC/MS の感度に応じて濃縮した。GC/MS による分析は株式会社島津製作所製の GCMS-QP2020-NX により行い、分析時の GC/MS の条件は、以下の通りとした。

注入口温度：280℃

イオン限温度：230℃

注入量：1 µL

カラム：Agilent J&W GC カラム DB-5MS(長さ 30m、内径 0.25mm、膜厚 0.25µm)

昇温条件：80℃ (1 分間保持) →20℃/min で昇温→300℃ (3 分間保持)

分析時間：15 分間

分析モード：SIM モード

2.6.2. 第二物質グループ

水中濃度の測定は、令和 5 年度化学物質規制対策「大学・公的機関と連携した化学物質管理高度化推進事業 (経口暴露による化学物質蓄積性の生物種間差に関するデータ構築)」の農薬測定法を一部改変して行った。各暴露水槽から水をそれぞれ 10 mL ずつ採取した。これをあらかじめアセトニトリル 10 ml で馴染ませた DisQuE 抽出用チューブに入れ、プラスチックトレイを Milli-Q を 5 ml で洗い流し、同様に抽出チューブに入れた。手で軽く振とうしたのち、1 分間振とう、遠心分離 (3000 rpm, 5 min., 4℃) を行なった。遠心分離後の上清 1 mL をマイクロピペットで分取し、DisQuE 精製用 2 mL チューブ (硫酸マグネシウム 150 mg、PSA 25 mg、C18 25 mg を含む) に添加、30 秒間ボルテックスで攪拌、遠心分離 (3000 rpm, 5min., 4℃) を行なった。その後上清 500 µL をマイクロピペットで遠沈管に分取し、その遠沈管に milli-Q 水 3 mL とヘキサン 2 mL を入れて手で 1 分間振とう、遠心分離 (2000 rpm, 5 min., 4℃) を行った。パスツールピペットにガラスウールを詰めて、その上に無水硫酸ナトリウムを乗せた脱水カラムを 10 mL 濃縮管に挿して、遠心分離後の上層を脱水カラムに通して脱水した。その後遠沈管にもう一度ヘキサン 2 mL を入れて、同じ工程を行なっ

た。2 回目の上層を脱水カラムに通した後、流せるだけのヘキサンをカラムに通して抽出を行なった。その後、内部標準物質（ナフタレン-d、アントラセン-d）を最終濃度 100 ppb になるように加えて、水中設定濃度と GC/MS の感度に応じて濃縮した。GC/MS による分析は株式会社島津製作所製の GCMS-QP2020-NX により行い、分析時の GC/MS の条件は、以下の通りとした。

注入口温度：280℃

イオン限温度：230℃

注入量：1 μL

カラム：Agilent J&W GC カラム DB-5MS(長さ 30m、内径 0.25mm、膜厚 0.25 μm)

昇温条件：50℃（1 分間保持）→20℃/min で昇温→300℃（3 分間保持）

分析時間：18.5 分間

分析モード：SIM モード

2.7. 魚体中濃度分析

2.7.1. 第一物質グループ

魚体中の試験物質の分析は、令和 5 年度化学物質規制対策「大学・公的機関と連携した化学物質管理高度化推進事業（経口暴露による化学物質蓄積性の生物種間差に関するデータ構築）」の PAH 類の測定法を一部改変して行った。プラスチックトレイ上に乾燥ホモジネートした試料 0.3g 秤量し、Milli-Q を 5 ml で浸潤した。これをあらかじめ 10 mL のシクロロヘキサン:ヘキサン(1:1)で馴染ませた DisQuE 抽出用チューブに入れ、プラスチックトレイを Milli-Q を 5 ml で洗い流し、同様に抽出チューブに入れた。手で軽く振とうしたのち、超音波抽出(15 min.)、遠心分離(3000 rpm, 5 min., 4℃)を行い、上層 5 ml を共栓試験管に分取した。これを 0.5 ml まで濃縮しヘキサンを 1 ml 足し再度 0.5 ml まで濃縮した。濃縮した溶液を 2 ml までヘキサンでメスアップし、全量を z-sep+クリーンアップ用チューブに入れ、1 分間ボルテックスしたのち遠心分離（3000 rpm, 5 min., 4℃）した。濃縮管にパストゥールピペットで作成した無水硫酸カラムを挿し、そこにクリーンアップした溶液 1 ml を分取し、流せるだけのヘキサンを流した。その後、内部標準物質（アントラセン-d10、ピレン-d12）を最終濃度 100 ppb になるように加えて、魚体中濃度と GC/MS の感度に応じて濃縮した。GC/MS による分析は株式会社島津製作所製の GCMS-QP2020-NX により行い、分析時の GC/MS の条件は、以下の通りとした。

注入口温度：280℃

イオン限温度：230℃

注入量：1μL

カラム：Agilent J&W GC カラム DB-5MS(長さ 30m、内径 0.25mm、膜厚 0.25μm)

昇温条件：80℃（1 分間保持）→20℃/min で昇温→300℃（3 分間保持）

分析時間：15 分間

分析モード：SIM モード

2.7.2. 第二物質グループ

魚体中の試験物質の分析は、令和 5 年度化学物質規制対策「大学・公的機関と連携した化学物質管理高度化推進事業（経口暴露による化学物質蓄積性の生物種間差に関するデータ構築）」の農薬測定法を一部改変して行った。プラスチックトレイ上に乾燥ホモジネートした試料 0.4g 秤量し、Milli-Q を 5ml で浸潤した。これをあらかじめアセトニトリル 10ml で馴染ませた DisQuE 抽出用チューブに入れ、プラスチックトレイを Milli-Q を 5ml で洗い流し、同様に抽出チューブに入れた。手で軽く振とうしたのち、1 分間振とう、遠心分離（4℃、3000rpm、5min、decel3）を行なった。遠心分離後の上清 1 mL をマイクロピペットで分取し、DisQuE 精製用 2 mL チューブに添加、30 秒間ボルテックスで攪拌、遠心分離（3000 rpm, 5 min., 4℃）を行なった。その後上清 500 μ L をマイクロピペットで遠沈管に分取し、その遠沈管に milli-Q 水 3 mL とヘキサン 2 mL を入れて手で 1 分間振とう、遠心分離（2000 rpm, 5 min., decel3, 4℃）を行った。パスツールピペットにガラスウールを詰めて、その上に無水硫酸ナトリウムを乗せた脱水カラムを 10 mL 濃縮管に挿して、遠心分離後の上層を脱水カラムに通して脱水した。その後遠沈管にもう一度ヘキサン 2 mL を入れて、同じ工程を行なった。2 回目の上層を脱水カラムに通した後、流せるだけのヘキサンをカラムに通して抽出を行なった。脱水カラムを通した後のその後、内部標準物質（ナフタレン-d、アントラセン-d）を最終濃度 100 ppb になるように加えた。0.1 mL まで濃縮し、バイアル瓶に詰めた。GC/MS による分析は株式会社島津製作所製の GCMS-QP2020-NX により行い、分析時の GC/MS の条件は、以下の通りとした。

注入口温度：280℃

イオン限温度：230℃

注入量：1 μ L

カラム：Agilent J&W GC カラム DB-5MS(長さ 30m、内径 0.25mm、膜厚 0.25 μ m)

昇温条件：50℃（1 分間保持）→20℃/min で昇温→300℃（3 分間保持）

分析時間：18.5 分間

分析モード：SIM モード

2.8. 生物濃縮係数及び排泄速度の算出

本研究において、生物濃縮係数（BCF）は暴露期間中の魚体中の濃度が定常状態となった3点の平均値をとり、その魚体中濃度（C_f）と水中濃度（C_w）の比によって定常状態におけるBCF値（BCF_{ss}）（L/kg）として算出した。

$$BCF_{ss} = C_f / C_w$$

また、排泄速度定数（k₂）は、逐次プロット法により算出した。縦軸にln（濃度）、横軸に時間を取り、直線回帰を実施し、得られた回帰直線の傾きを排泄速度定数 k₂（day⁻¹）とした。

2.9. S9 画分の調整

2.9.1. ニジマス肝臓由来 S9 画分の調整

本研究では、品質が保証されたS9の購入ができなかったため、鹿児島県内のニジマス養殖場から入手したニジマスから肝臓由来S9画分の調製を行った。ニジマス肝臓由来S9画分の調製は、OECD TG319B、及び平成27年度化学物質安全対策「肝S9を用いた*in vitro*による生物蓄積性評価法に関する調査」を参考した。

- 1) ニジマスを氷冷麻酔したのち、体重、体長を計測した。
- 2) 氷冷した解剖台の上におき、排泄腔から鰓膜の付近までハサミで縦切開を行い、内臓を露出させるために胸鰭の後ろまで横方向に切開を行った。
- 3) 生殖腺の外部形態で雌雄判別を行い、記録した。本研究では、雄と判断されたもののみを用いた。消化系を摘出し、ハンクス氏液（0.35 mg/mL NaHCO₃, 2.3 mM EDTA, 10 mM HEPES含有）で肝門脈に25G或いは23Gの注射針を装着したシリンジを用いて肝臓を灌流した。
- 4) 脱血した肝臓を消化系より摘出し、シャーレ内に満たした上述のハンクス氏液で洗浄したのち、細胞破碎液（50 mM Tris-Cl, 150 mM KCl₂, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.25 M スクロース含有）を満たしたシャーレにストックした。なお、全ての作業は氷上で行った。
- 5) 肝臓重量を計測した後、ハサミで細断し、金網で濾したのち、ガラス製ホモジナイザーに移し、適量の細胞破碎液を加えてホモジナイズした。
- 6) 得られた肝臓ホモジネートをマイクロチューブに2 mlずつ分注し、遠心分離(13,000 ×g, 20 min., 4°C)した。
- 7) 表層の脂肪の層を除去した後、上清（S9）を50 mlチューブにプールし、混合した。混合したS9を1.8 ml凍結保存用チューブに0.5 mlずつ分注し、すぐに液体窒素で凍結した。凍結後、-80°C冷凍庫で保存した。

2.9.2. コイ肝臓由来 S9 画分の調整

コイ肝臓由来 S9 画分の調整は、ニジマス同様に OECD TG319B、及び平成 27 年度化学物質安全対策「肝 S9 を用いた *in vitro* による生物蓄積性評価法に関する調査」を参考した。

- 1) コイを氷冷麻酔したのち、体重、体長を計測した。
- 2) 25G 或いは 23G の注射針を付けた注射筒に上述のハンクス氏液を入れ、背大動脈より全身脱血を行った。その際、鰓弓或いは心臓の一部を切除し、血液が流れるようにした。
- 3) 氷冷した解剖台の上におき、排泄腔から鰓膜の付近までハサミで縦切開を行い、内臓を露出させるために胸鰭の後ろまで横方向に切開を行った。
- 4) 消化系とともに肝臓を摘出し、肝臓のみをトリミングした。
- 5) 肝臓重量を計測した後、ハサミで細断し、金網で濾したのち、ガラス製ホモジナイザーに移し、適量の上述の細胞破碎液を加えてホモジナイズした。
- 6) 得られた肝臓ホモジネートをマイクロチューブに 2 ml ずつ分注し、遠心分離 ($13,000 \times g$, 20 min., 4°C) した。
- 7) 表層の脂肪の層を除去した後、上清 (S9) を 50 ml チューブにプールし、混合した。混合した S9 を 1.8 ml 凍結保存用チューブに 0.5 ml ずつ分注し、すぐに液体窒素で凍結した。凍結後、 -80°C 冷凍庫で保存した。

2.10. S9 画分の品質評価

2.10.1. タンパク質含量の測定

前節で得られた RT-S9 について、品質の評価をするため、タンパク質含量を測定した。測定は BIORAD 社のブラッドフォードプロテインアッセイを用いて、プロトコルに従い測定した。

2.10.2. EROD 活性の測定

前節で得られた RT-S9 について水酸化酵素 (EROD) 活性を測定した。7-Ethoxyresorufin O-Deethylase (EROD) 活性は Vehniäinen ら (2012) の方法に従い、以下の手順で測定した。

- 1) 96 蛍光測定プレートに S9 (10 倍希釈、100 倍希釈、測定用とブランクを 3 ウェルずつ) を 20 μL ずつ加えた。
- 2) 2.5 μM 7-Ethoxyresorufin を 20 μL 加えた。
- 3) 100 mM HEPES (pH 7.8) を 140 μL 加えた。
- 4) 5 mM NADPH in 100 mM HEPES を 20 μL を加え、コロナ電気株式会社製グレーティングマイクロプレートリーダー SH-9500 を用いて Resorufin 蛍光強度 (Ex. 540 nm/De. 584 nm; every 60s for 5 min.) を測定した。

2.11. S9画分による *in vitro* 分解試験

各魚種から得られた S9 画分による *in vitro* 分解試験は OECD TG319B、及び平成 27 年度化学物質安全対策「肝 S9 を用いた *in vitro* による生物蓄積性評価法に関する調査」に準じて以下の通り実施した。

- 1) 100 mM リン酸カリウム二塩基緩衝液と100 mM リン酸カリウム一塩基緩衝液を88 : 12 (v/v) を混合し、リン酸緩衝液を調製した。
- 2) S9画分をタンパク質含量が2 mg/mlになるようにリン酸緩衝液で希釈した。5 mlのS9希釈液にリン酸緩衝液で250 mg/mLに調整したアラメチシン溶液を500 μ L 加え、氷上で15分間プレインキューベートした。なお、コイ肝臓由来S9画分には終濃度100 μ g/mLとなるように大豆由来のトリプシンインヒビターを添加した。
- 3) それぞれリン酸緩衝液で調整した20 mM NADPH 溶液、5 mM UDPGA 溶液、5 mM L-グルタチオン還元型溶液、1 mM PAPS 溶液を各500 μ Lずつ加えてS9反応溶液を作成した。
- 4) 静かにボルテックスした後、380 μ LずつGCバイアル瓶に分注した。
- 5) 第一物質グループの被試験物質ミックス（フルオレン、フェナントレン、ピレン、1-メチルピレンの4試験物質がそれぞれ最終濃度0.25 μ Mになるように調整したもの）を20 μ L添加し、一定時間反応（12 $^{\circ}$ C）させた。また、第二物質グループの被試験物質ミックス（フェノブカルブ、フェニトロチオン、ベンチオカーブの3試験物質がそれぞれ最終濃度0.33 μ Mになるように調整したもの）を20 μ L添加し、一定時間反応（12 $^{\circ}$ C）させた。
- 6) メタノール 1.6 mLを添加して反応を停止させた。
- 7) QuEChERS法で前処理したのち、GC/MSを用いて定量した。
- 8) 縦軸に対数変換した被試験物質濃度、横軸に時間（分）を取り、直線回帰を行い、その傾きを分解速度定数（ min^{-1} ）として算出した、

2.12. 代謝酵素関連遺伝子のリアルタイム PCR 系の確立

PAH 類の代謝に係る代謝酵素遺伝子の発現解析を行うため、チトクローム P450 1A (Cyp1A)、及び PAH 類を認識する核内レセプター (AhR) とその下流遺伝子 (Arnt, AhRR) の情報を Ensembl や NCBI GenBank などのデータベースより収集し、プライマーの設計と定量リアルタイム PCR 系を確立した。プライマー情報と PCR 産物サイズを表 1 に示した。なお、解離曲線解析を行い、プライマーダイマーや非特異的な副産物等の有無を調べ、反応特異性を確認した。

表 1 代謝酵素関連遺伝子発現解析用プライマー

論文投稿データにつき掲載不可

2.13. 生物蓄積試験における代謝酵素関連遺伝子の発現解析 (第一物質グループ)

PAH 類の代謝に係る代謝酵素遺伝子の発現解析を行うため、蓄積試験開始後、0, 1, 3, 7, 14 日目にサンプリングを行った。サンプリングは、鰓弓の一部を裁断後、ハンクス氏液を用いて背大動脈より灌流し、脱血した。肝臓を採取後、ISOGEN (ニッポンジーン社) 中でホモジナイズを行い、使用まで -80°C で保存した。

Total RNA の抽出とゲノム DNA の除去は、ISOGEN 及び DNase1 (ニッポンジーン社) の取扱説明書に従い行った。逆転写反応は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて、その取扱説明書に従って逆転写を行い、cDNA を合成した。本年度は、対象臓器を肝臓、対象遺伝子を Cyp1A として、発現解析を行った。リアルタイム PCR は、LightCycler®96 システム (ロシュ社) で使用した。リアルタイム PCR の反応は、10 倍希釈した cDNA を 5 µL、SYBR Green リアルタイム PCR マスターミックス (Thermo Fisher Scientific 社) を 10 µL、そして各々の対象遺伝子について 200 nM のプライマーセットを含む 20 µL の混合物中で行った。リアルタイム PCR は初期段階 95°C で 3 分間、次いで 95°C で 10 秒間、60°C で 10 秒間を 50 サイクルで増幅した。発現レベルは比較 CT 法で算出した。

3. 結果と考察

3.1. ヒメダカに対する簡易毒性試験結果

3.1.1. 第一物質グループ

毒性試験の結果と予測された LC50 を表 2 に示した。フェナントレン、フルオレン、ベンゾ[a]アントラセン、ピレン、1-メチルピレン暴露区については、目立った死亡や症状などは見られず、予測された LC50 は設定した最高濃度よりも高かった。算出された LC50、及び水溶解度を基に、これら 5 種類の化学物質のコイに対する生物蓄積試験の設定濃度を表 2 の通り設定した。一方、ジベンゾチオフェン暴露区では、最高濃度区の死亡率は 71.4%であるとともに、異常遊泳が観察された。このことから、長期間において経時的に試験魚をサンプリングする蓄積試験には不向きであると考えられた。以上の毒性試験より、ジベンゾチオフェンはコイの蓄積試験の暴露化学物質グループから除外した。

表 2 第一物質グループのヒメダカに対する簡易毒性試験結果

化学物質	死亡率 (死亡数/供試数)	LC50	蓄積試験設定濃度
フルオレン	死亡なし	>1800 µg/L	高濃度区: 170 µg/L 低濃度区: 17 µg/L
フェナントレン	1200 µg/L: 14.3% (1/7)	>1200 µg/L	高濃度区: 110 µg/L 低濃度区: 11 µg/L
ベンゾ[a]アントラセン	12 µg/L: 14.3% (1/7)	>12 µg/L	高濃度区: 7.5 µg/L 低濃度区: 0.75 µg/L
ジベンゾチオフェン	1500 µg/L: 71.4% (5/7)	≒1374 µg/L	除外
ピレン	死亡なし	>150 µg/L	高濃度区: 13 µg/L 低濃度区: 1.3 µg/L
1-メチルピレン	死亡なし	>120 µg/L	高濃度区: 12 µg/L 低濃度区: 1.2 µg/L

3.1.2. 第二物質グループ

第二物質グループの毒性試験の結果、オキサジアゾン以外の化学物質で死亡が見られた。死亡が見られなかった濃度区においても多くの区で、痙攣や異常遊泳、体表や頭部の炎症など影響が見られた。コイの生物蓄積性試験では長期間にわたり暴露を行う事を考慮し、安全策をとる意味で、50%影響濃度 (EC50) を指標とすることとした。毒性試験の結果と予測された EC50 を表 3 に示した。第二物質グループについても、高濃度区を EC50 の 10 分の 1、低濃度区を EC50 の 100 分の 1 に設定した (表 3)。

表3 第二物質グループのヒメダカに対する簡易毒性試験結果

化学物質	影響出現率 (影響出現数/供試数)	EC50	蓄積試験設定濃度
フェノブカルブ	15 mg/L: 100% (7/7) 5 mg/L: 100% (7/7) 1.67 mg/L: 100% (7/7)	943 µg/L	高濃度区: 94 µg/L 低濃度区: 9.4 µg/L
シマジン	15 mg/L: 100% (7/7) 5 mg/L: 100% (7/7)	3,976 µg/L	高濃度区: 398 µg/L 低濃度区: 39.8 µg/L
フェニトロチオン	15 mg/L: 100% (7/7) 5 mg/L: 100% (7/7)	2,897 µg/L	高濃度区: 290 µg/L 低濃度区: 29.0 µg/L
ベンチオカーブ	15 mg/L: 100% (7/7) 5 mg/L: 85.7% (6/7)	1,300 µg/L	高濃度区: 130 µg/L 低濃度区: 13.0 µg/L
イソプロチオラン	10 mg/L: 100% (7/7)	7,946 µg/L	高濃度区: 795 µg/L 低濃度区: 79.5 µg/L
オキサジアゾン	影響無し	>1 mg/L	高濃度区: 100 µg/L 低濃度区: 10 µg/L

3.2. 水中濃度の測定結果

3.2.1. 第一物質グループ

第一物質グループでの暴露期間中、数日に一度、暴露試験水中の化学物質の濃度を測定した。測定結果を表4に示した。すべての化学物質はおおむね OECD TG305 の定めるところの変動幅 20%程度という条件を満たしていたため、生物蓄積性試験には大きな影響を与えないとし、試験を継続した。

表4 第一物質グループの取込期間中の水中濃度

論文投稿データにつき掲載不可

3.2.2. 第二物質グループ

第二物質グループでの暴露期間中、数日に一度、特に定常状態となることが予測された期間は毎日採水し、暴露試験水中の化学物質の濃度を測定した。その結果を表 5 に示した。すべての化学物質の変動幅は 20%以内という条件を満たしていたため、生物蓄積試験はこのまま継続した。

表 5 第二物質グループの取込期間中の水中濃度

論文投稿データにつき掲載不可

3.3. 化学物質生物蓄積性試験結果

3.3.1. 第一物質グループ

第一物質グループでは、ベンゾ[a]アントラセンを除く 4 物質で魚体への取込が確認された。それぞれ暴露期間中の体内濃度の変動を図 3 に示した。暴露期間の 7 日目から 28 日目において定常状態であると判断し、平均を定常状態の平均魚体中被試験物質濃度として算出した。

BCFss (L/kg) は、7 日から 28 日の合計 3 点のサンプリングポイントの平均を平均魚体内試験物質濃度として、検出された平均水中濃度との比率から算出した。今回の蓄積が確認された 4 物質の BCF は低濃度区と高濃度区で大きな差は見られなかった。

本研究で経鰓暴露を行った 5 物質の分子量はそれぞれフルオレン 166.21、フェナントレン 178.23、ピレン 202.25、1-メチルピレン 216.28、ベンゾ[a]アントラセン 228.29 であり、分子量が大きい物質ほど BCF の値の値が小さくなる傾向が見られた。分子量 228.29 のベンゾ[a]アントラセンが検出限界値以下であり取り込みが確認されなかったことから、PAH 類においては鰓からの取り込みでは、分子量が 210-220 を超える物質は鰓の鰓孔を通り抜けることが難しくなり取り込みが物理的に困難であると考えられた。

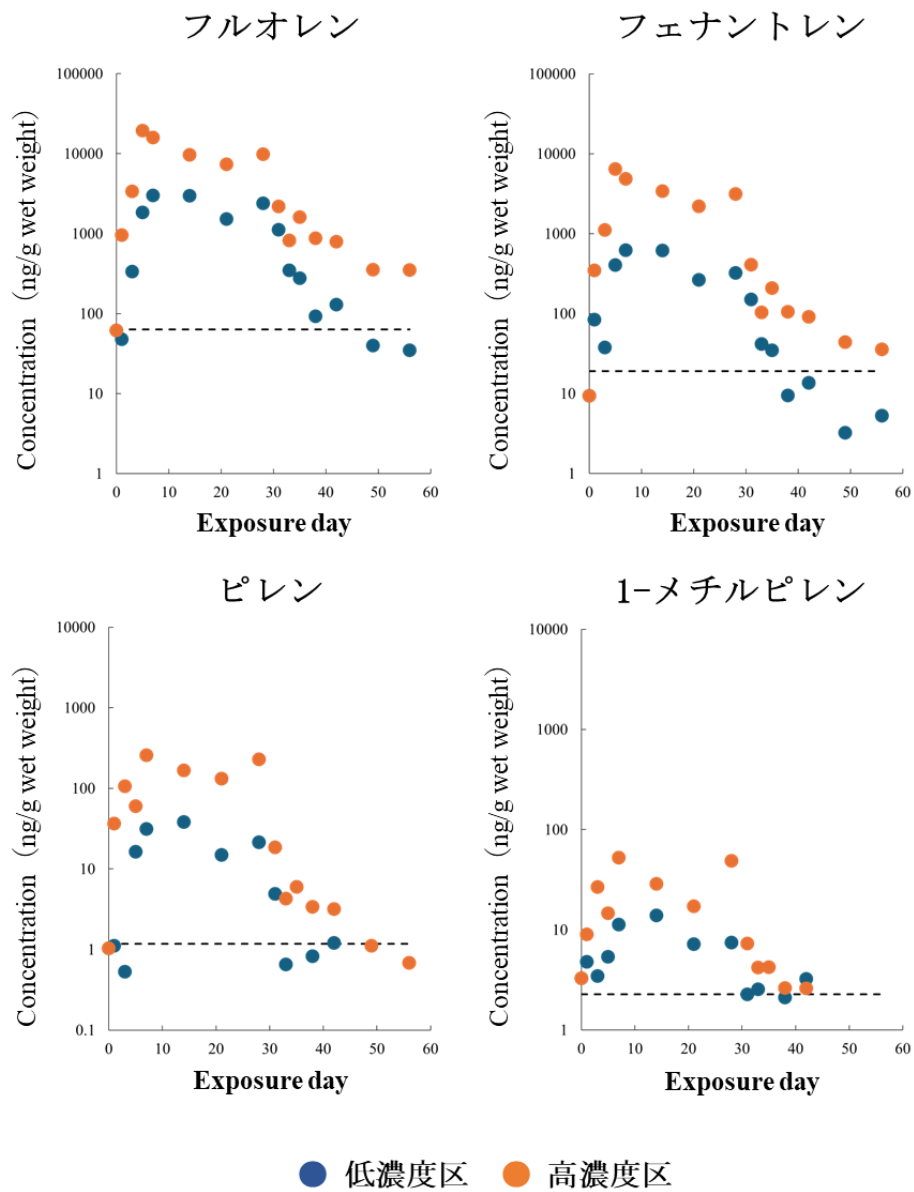


図 3. 第一物質グループ) 試験物質の魚体内濃度の変動

3.3.2. 第二物質グループ

第二物質グループでは、全ての化学物質で取込が確認された。それぞれ暴露期間中の体内濃度の変動を図 4 に示した。暴露期間の 10 日目から 17 日目において定常状態であると判断し、平均を定常状態の平均魚体中被試験物質濃度として算出した。

BCF_{ss} (L/kg) は、10 日目から 17 日目の合計 3 点のサンプリングポイントの平均を平均魚体内試験物質濃度として、検出された平均水中濃度との比率から算出した。今回の蓄積が確認された 6 物質の BCF は低濃度区と高濃度区で大きな差は見られなかった。

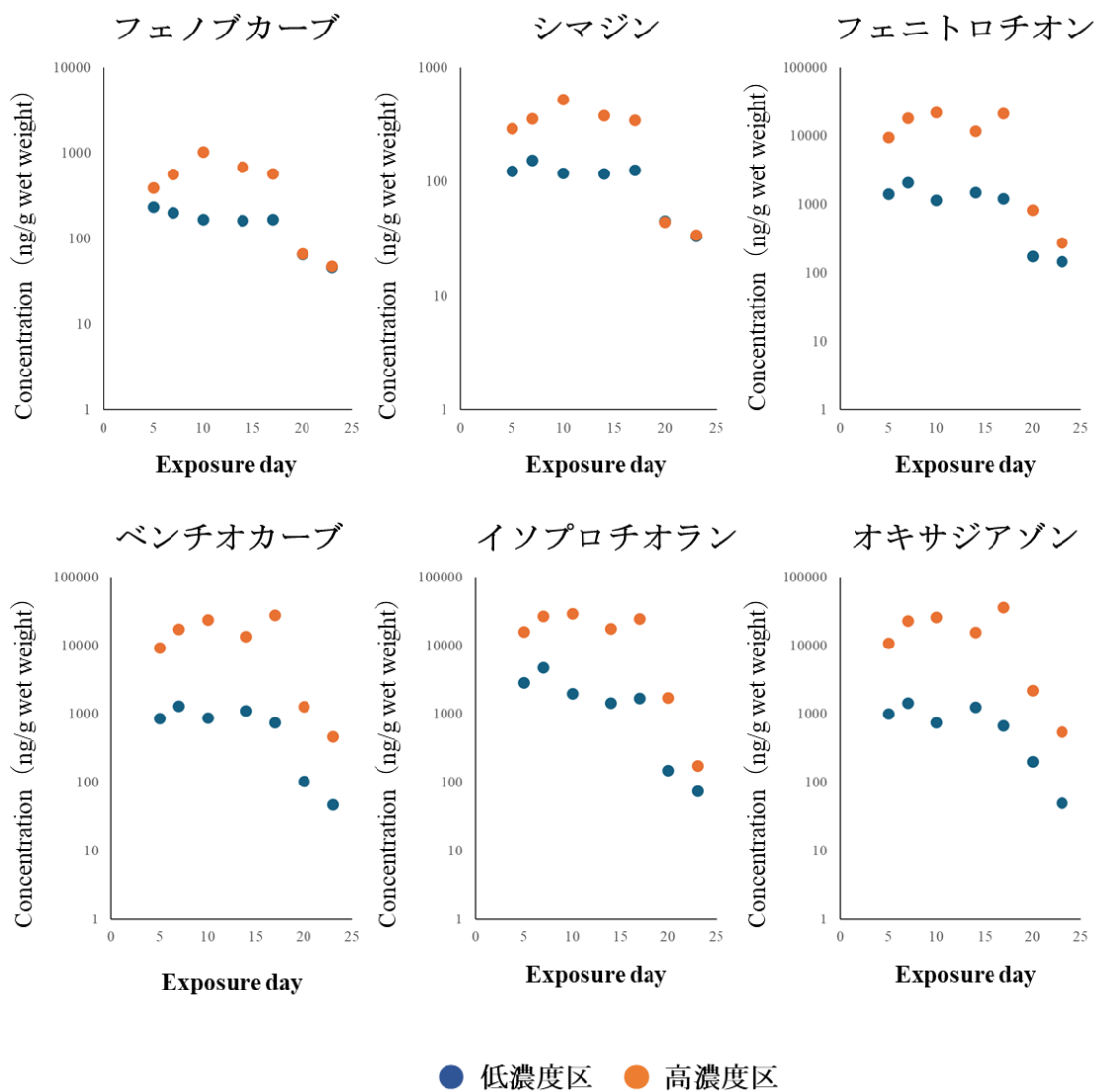


図 4. 第二物質グループ) 試験物質の魚体内濃度の変動

3.4. S9 画分の評価結果

タンパク質含量は、ニジマス肝臓由来 S9 画分で 290.4 mg/mL、コイ肝臓由来 S9 画分で 172.1~441.6 mg/mL であった。海外で販売されている KJ SCIENTIFIC 社製の RT-S9 市販品の製品提供時のタンパク質含量は 18~30 mg/mL であることから、使用時に十分な希釈が可能であり、*in vitro* 分解試験に使用するにあたり十分なタンパク質含量であると考えられた。

EROD 活性を調べた結果、ニジマス肝臓由来 S9 画分で 4.09 pmol/min./mg protein、コイ肝臓由来 S9 画分で 2.23~4.09 pmol/min./mg protein であった。KJ SCIENTIFIC 社製 RT-S9 の EROD 活性は、1.12~6.31 pmol/min./mg protein、Nicols らの報告では 5.43 ± 1.20 pmol/min./mg protein、平成 27 年度化学物質安全対策「肝 S9 を用いた *in vitro* による生物蓄積性評価法に関する調査」で報告されている活性は、0.5~2.6 pmol/min./mg protein であり、概ね同等の活性を示し、*in vitro* 分解試験に使用するにあたり十分な EROD 活性を有していると考えられた。以上の結果から、今回調整したニジマス肝臓由来 S9 画分及びコイ肝臓由来 S9 画分は、*in vitro* 分解試験において十分な代謝能力を有していると考えられた。

3.5. S9 画分による *in vitro* 分解試験結果

ニジマス肝臓由来 S9 画分、及びコイ肝臓由来 S9 画分による第一物質グループに対する *in vitro* 分解試験の結果を図 5 に示した。ニジマス肝臓由来 S9 画分による各物質の消失速度定数を算出した。第二物質グループでは、フェノブカルブ、フェニトロチオン、ベンチオカーブを選定し、初期濃度を各 0.33 μ M (91.4-113.9 ppb) に設定して *in vitro* 分解試験を実施したが、QuEChERS 法での抽出・精製では、S9 由来の脂肪酸等の夾雑物が多く、対象物質のマスマスペクトルと重なってしまい、信頼できるデータを得られなかった。また、農薬類の GC/MS での測定は、検出感度を 100 ppb 程度まで高めるとともに、分解試験における初期濃度 0.33 μ M のまま反応容量を 4 倍まで増やして実施を試みたが、夾雑物との見分けが難しく、信頼に足るデータを得られなかった。農薬類の S9 画分による分解速度に関する試験としては、今後、抽出・精製法の検討が必要であると考えられた。

コイ肝臓由来 S9 画分による各物質の消失速度定数はそれぞれ、フルオレンで 0.00004 min^{-1} 、フェナントレン 0.00409 min^{-1} 、ピレンで 0.00141 min^{-1} 、1-メチルピレンで 0.00443 min^{-1} であった。ニジマス肝臓由来 S9 画分で得られた各物質の消失速度定数と比較すると、フルオレンで約 1/100 倍、その他の物質においても、約 1/10 倍程度低い傾向を示した。この原因として、代謝能力の魚種間差や、肝臓と肝臓の組織の違い、さらに、肝臓中のトリプシノーゲンがトリプシンとなることによる代謝酵素活性への影響なども推察されたが、詳細は不明である。これらの不確定要素があったため、S9 画分による *in vitro* 分解試験と BCFss 及排泄速度 k_2 の相関性については、ニジマス由来の S9 画分による *in vitro* 分解試験のみの結果を用いて検証した。

論文投稿データにつき掲載不可

図 5. ニジマス肝臓由来 S9 画分による *in vitro* 分解試験における分解速度

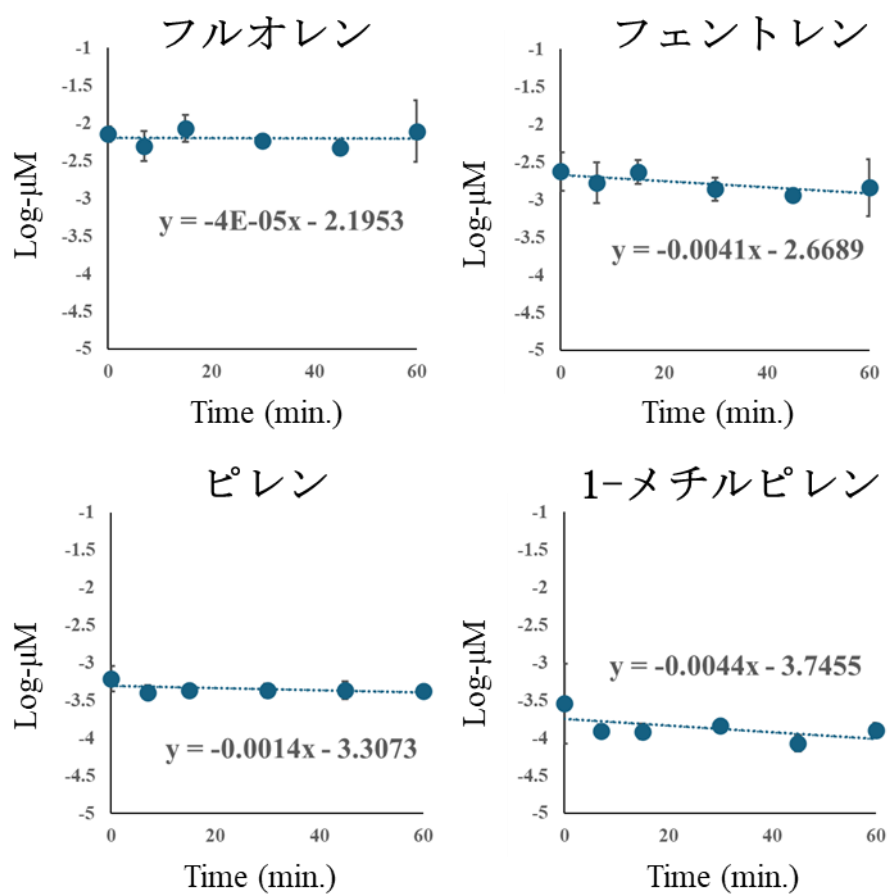


図 6. コイ肝臓由来 S9 画分による *in vitro* 分解試験における分解速度

3.6. *in vitro* 分解速度と BCF_{ss} 及び排泄速度との相関性の検証

3.3.で得られた BCF_{ss} および排泄速度 k_2 と 3.5.で得られたニジマス肝臓由来 S9 画分による分解速度について、それぞれ相関関係図を図 7 に示した。その結果、S9 画分による分解速度が遅い化学物質は、BCF_{ss} が高い、すなわち蓄積性の高く、S9 画分による分解速度が早い化学物質は蓄積性が低いという負の相関関係 ($r = 0.891$) が見出せた。対照的に S9 による分解速度が速い化学物質は排泄速度も速く、分解速度が遅いものは排泄速度も遅いという正の相関関係が見出せた ($r = 0.993$)。これは魚体内で代謝酵素により分解しづらい化学物質は蓄積性が高く、排泄速度も遅いという事を示している。以上の結果より、S9 画分による *in vitro* 分解試験は、実際の生体内における化学物質の蓄積性や排泄性を再現できることが示唆された。

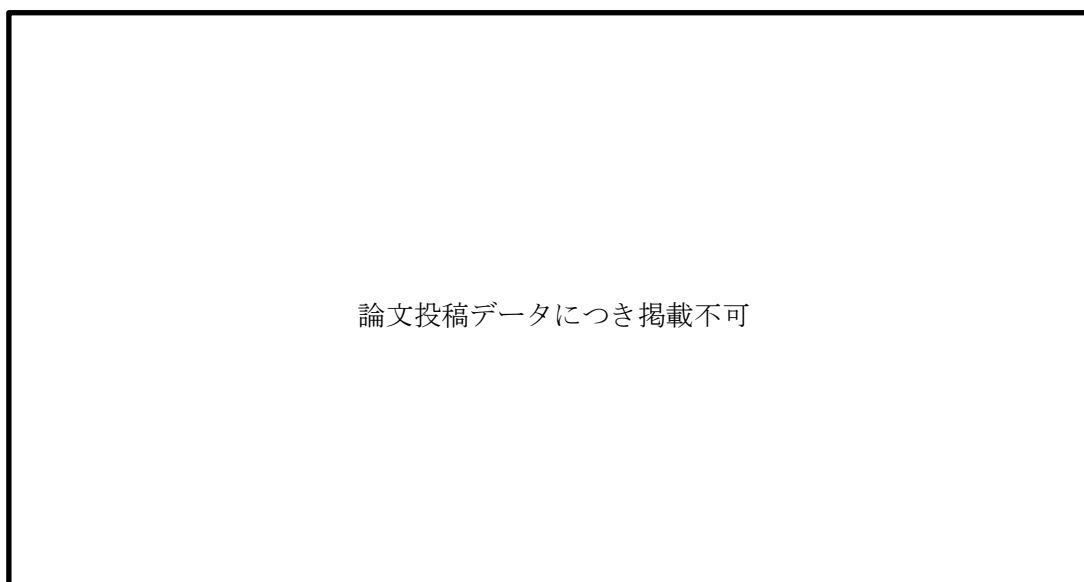


図 7. S9 画分による分解速度と BCF_{ss} 及び排泄速度 k_2 との相関関係

3.7. 代謝酵素関連遺伝子のリアルタイム PCR 系による発現解析結果

PAH 類の代謝に係る代謝酵素遺伝子の発現解析を行うため、Cyp1A、及び PAH 類を認識する核内レセプターである AhR とその下流遺伝子である AhR 核内輸送体の Arnt と AhR リプレッサーの AhRR に対するプライマーを設計した。これらのプライマーセット及びリアルタイム PCR 系はプライマーダイマーや非特異的反応、ゲノム DNA の増幅などは見られなかった。

設計したプライマーセットのうち、本年度は Cyp1A について、第一物質グループの生物蓄積試験における肝臓の発現解析を行った。フルオレンの魚体内動態と Cyp1A 発現の経時的变化の結果を図 8 に示した。低濃度区では最大発現は暴露開始後 5 日目であったのに対して、高濃度区では 7 日目であった。また、その発現量は低濃度区の最大発現が暴露前と比較し 16 倍程度であったのに対して、高濃度区は 100 倍程度と大きく異なっていた。一方、最大まで発現した時期は、蓄積量が定常状態になる前と共通しており、代謝酵素の誘導と蓄積量、及び定常状態になるタイミングは関連していることが分かった。今後、様々な代謝酵素の発現をモニタリングすることによって、生物蓄積性と S9 分解速度の関連性の補佐的情報を得られることが期待されると考えられた。

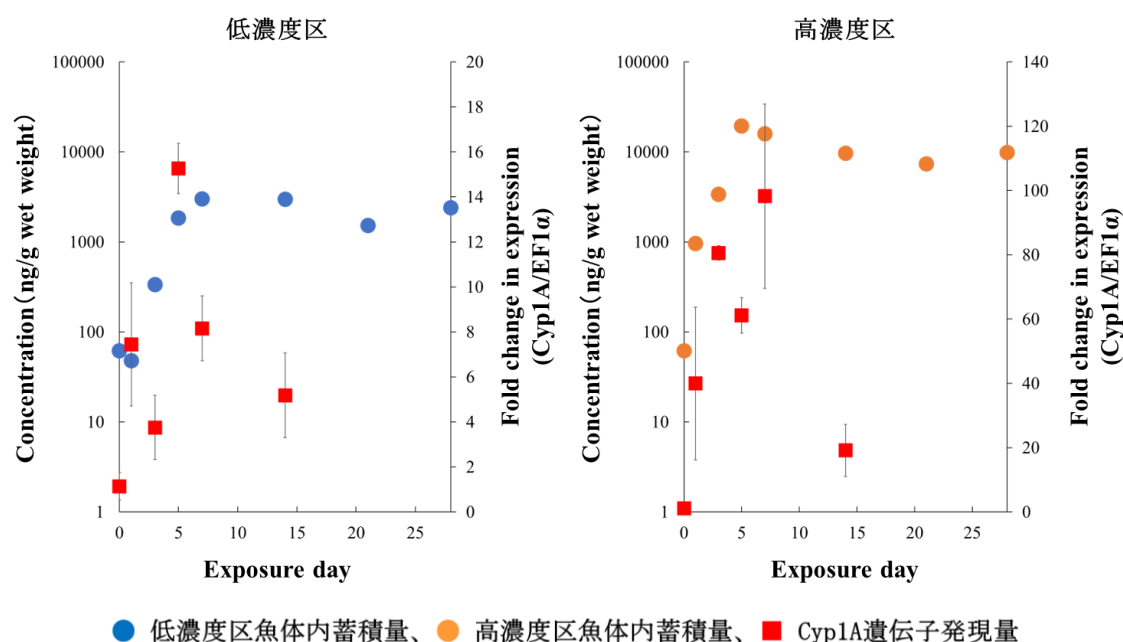


図 8. フルオレン魚体内蓄積量と Cyp1A 遺伝子発現の経時的变化

4. 今後の課題

本研究では将来の生物を用いない化学物質の蓄積評価試験の確立に寄与するデータを構築することを目的とし、近年着目されている *in vitro* における魚肝臓 S9 画分による化学物質分解と、実際に化学物質を蓄積した魚体中からの化学物質の体内動態の相関性を明らかにすることを目的とした。今回、蓄積が確認された PAH 類については、S9 画分による分解速度と BCF_{ss} は逆相関関係となり、対照的に排泄速度とは正の相関関係であり、これは代謝酵素により分解を受けやすい化学物質は蓄積しにくく排泄も早いという関連性を明らかにするという一定の成果を上げることができた。一方で、実際に試験を進めていく上で多くの課題が浮き彫りとなった。ここでは今後解決すべき点を 3 課題上げ、現在進めている研究と合わせて、課題解決策について述べる。

第一にニジマスの肝臓由来 S9 画分の製品が国内では入手ができなくなっている点である。以前、日本チャールス・リバー株式会社から販売されていたニジマス S9 画分であるが、入手できなくなっていた。また、その他海外メーカーからの取り寄せも当大学では不可能であった。これは大きな問題であり、我が国で本格的に非生物蓄積評価として S9 画分による *in vitro* 分解試験を取り入れる際には、品質の安定した S9 画分入手する必要がある、国内企業或いは公的機関による提供が出てくると考えられる。幸い、当研究室では養鱒場からニジマスを手入れし、S9 画分を分離し、試験を行うことができ、さらに本年度にニジマス試験魚の入手や当研究室内でのニジマス卵からの試験魚サイズまでの育成の目途が立ち、さらに S9 画分の調整法の確立をすることができたため、来年度以降も S9 画分を用いた試験を実行可能である。一方で、本年度、第二物質グループの農薬類では、4 倍量まで S9 画分の量を増やす必要があり、大量の S9 画分が必要となる化学物質も存在し、その場合は当研究室規模のみでは賄えない状態になる可能性も露見した。そのためにも我が国における欧州の化審法に準拠した S9 画分を提供できる研究施設などが望まれる。

第二に S9 画分による *in vitro* 分解試験に関する手法についてである。本年度は、OECD TG319B に従い試験を行った。一方、この試験法では、推奨される初期物質濃度は $\leq 1 \mu\text{M}$ とされているが、魚類の S9 画分の分解試験では、基質量を $0.05 \mu\text{M}$ まで少なることでより良好な結果が得られたと報告がある（宮田ら, 2022）。これは、TG319B が哺乳類の代謝試験をベースに設定されていると考えられるが、魚類の代謝活性は、哺乳類のそれと比較し非常に低いという報告があり、高濃度の基質量では S9 の代謝能では飽和していると考えられる（Weeks *et al.*, 2020、Black *et al.*, 2021）。そのため、魚類の代謝能に最適化した初期濃度を設定していく必要があると考えられる。一方、本研究でも直面した問題であるが、初期物質濃度を低濃度にすると検出限界以下となってしまうことがあった。今後、分子量が極端に多きものや検出が難しい物質を用いる予定もしているため、この点については S9 画分の反応容量や、さらに検出のための化学物質の抽出・精製法なども十分に検討していく必要があると考えられる。また、分子量や特性の異なり、初期濃度も変えていく必要があるが、その際に化学物質の分解速度を評価していく上では、基準となる物質に対する相対速度を算出する

必要もあると考えられる。当研究室では、今回も用いたピレンや Cyp1A により必ず代謝を受ける β -ナフトフラボンなども同条件で設定して、その相対比率で代謝能を算出する手法を検討中である。以上のように、今後、S9 画分による *in vitro* 分解試験を非生物蓄積評価の代替法として用いる上で、魚類の代謝能に最適化された基質量や S9 の反応容量など、基本的な方法論の確立が必要であると考えられる。

第三に他魚種の S9 画分の調整法の最適化についてである。本年度は、ニジマスに加えてコイを供試し、S9 画分の調整を行った。一方、分解速度が算出できたニジマスとは異なり、コイでは信頼に足るデータが得られなかった。得られなかった理由として、まずコイの肝臓は肝臓と膵臓の機能を持ち合わせた構造となっており、膵臓に含まれるトリプシン前駆体であるトリプシノーゲンが存在していると予測され、これが代謝酵素を分解しているのではないかという懸念である。トリプシノーゲンからトリプシンになるためには、エンテロペプチダーゼによる切断が必要であり、肝膵臓中ではトリプシノーゲンの状態で維持されていると考えられるが、その証明は本試験ではできなかった。また、分解試験中のタンパク質含量にも変化は見られなかったことから、この可能性は非常に低いと考えられる。もう一つが、本試験ではタンパク質含量に合わせて S9 画分の反応液容量を定めている点である。前述した通り、コイの肝膵臓には様々な分解酵素が含まれており、これらも全てがタンパク質である。これらのタンパク質を同時に測定していることから、S9 画分に含まれている化学物質代謝酵素の割合が少なくなり、ニジマス肝臓由来 S9 画分よりも早くに物質代謝能が飽和したのでわないと考えられる。これを解決するには、代謝能に合わせた S9 画分の反応容量を魚種ごとに検討し、SDS-PAGE やウエスタンブロッティングなどの分子生物学的な手法を用いて、S9 画分に含まれている各代謝酵素類の組成についても明らかにしていく必要があると考えられる。いずれにせよ種の多様性を考慮すると、S9 画分の分解能の魚種間差については明らかにする必要があると考えられる。

5. 人材育成

本研究課題を通して、生物蓄積性評価試験をはじめ化学物質評価や環境研究を担う人材育成も行ったので、実施内容と成果、問題点を列挙し説明していく。

1.) 卒論テーマとして生物蓄積評価試験の実施

本年度、卒論テーマとして本研究課題を提供した。近年、環境分野に興味関心を示す学生が減少する中、幸いにも1名の学部4年生が本研究課題に取り組んでもらい、試験を実施することができた。その際、当該学生も生物を用いた蓄積評価と *in vitro* における代謝の関連性について大変興味を抱いき、第一物質グループの試験の際には大変積極的に取り組み、新たな人材の発見と育成に一定の成果を上げることができたと考えられる。

2.) 学生実験における生物蓄積評価に関わる題材の提供

本年度、生物を用いた経口蓄積性試験を題材に学部3年生向けの学生実験を行った。その際、採血や解剖、さらに化学物質の蓄積に伴い現れる生物影響（今年度は血糖制御に関わる生物影響を調査）などを調べてもらい、学生の興味関心と高評価を得ることができた。この成果より、来年度以降もさらに学生達に蓄積評価への興味関心を持ってもらうため、この学生実験は引き続き続けていく予定である。

3.) 若手研究者育成について

本事業は若手研究者育成という事で、経験の浅い研究代表者の研究課題を採択していただいた。研究代表者の専門は、感染免疫を主体とした生体防御学であったが、本研究課題を申請するにあたり、生物蓄積試験や化学物質の代謝を勉強していく過程でこれらの研究内容に大変興味を抱いた。さらに、本研究を実施していく中で、*in vivo* における蓄積試験とリアルタイムに反応する代謝酵素、そして *in vitro* の分解速度がそれらと非常に相関性があり、ここから新たに多くの着想を得た。また、生物蓄積評価試験は実際にやってみないとわからないことが多くあり、本研究課題を通して経験を積ませていただいたことが、経験の浅い研究代表者のような若手研究者の育成という点で大きな成果であったといえる。他分野出身だとしても、若手研究者に対して課題採択を進めることは他分野からの本分野への引き抜き、及び人材育成として、十分な成果を上げることができると考えられる。

6. 参考文献

平成 27 年度化学物質安全対策「肝 S9 を用いた *in vitro* による生物蓄積性評価法に関する調査」

宮田知代子, 的場好英, 椋本麻記子, 中川好秋, 宮川 恒. 魚肝臓 S9 代謝反応における速度定数と遊離基質補正值を用いたアルキルフェノール類の生物濃縮倍率の予測精度向上. 日本農薬学会誌. 2022, 47, 31-39.

Black, J.S.R., Nichols, J.W., Fay, K.A., Matten, S.R., Lynn, S.G. Evaluation and comparison of *in vitro* intrinsic clearance rates measured using cryopreserved hepatocytes from humans, rats, and rainbow trout. *Toxicology*. 2021, 457, 152819-152836.

Connors, K.A., Du, B., Fitzsimmons, P.N. Comparative pharmaceutical metabolism by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver S9 fractions. *Environmental Toxicol.* 2013, Chem, 32, 1810-1818.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure. 2 October 2012.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. Test No. 319B: Determination of *in vitro* intrinsic clearance using rainbow trout liver S9 sub-cellular fraction (RT-S9). 27 June 2018

Uno, S., Koyama, J., Kokushi, E., Monteclaro, H., Santander, S., Cheikyula, J. O., Miki, S., Añasco, N., Pahila, I. G., Taberna Jr., H. S., Matsuoka, T. Monitoring of PAHs and alkylated PAHs in aquatic organisms after one month from Solar I oil spill off the coast of Guimaras Island, Philippines. *Environ. Monit. Assess.* 2010. 165. 501-515.

Nichols, J., Fay, K., Bernhard, M.J., Bischof, I., Davis, J., Halder M., Hu, J., Johanning, K., Laue, H., Nabb, D., Schlechtriem, C., Segner, H., Swintek, J., Weeks J., Embry M. Reliability of *In Vitro* Methods Used to Measure Intrinsic Clearance of Hydrophobic Organic Chemicals by Rainbow Trout: Results of an International Ring Trial. *Toxicol Sci.* 2018, 164, 563–575.