

2024 年 10 月 28 日

YYYY/MM/DD

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

To: President, Japan Society for the Promotion of Science

研究活動報告書

Research Report

1. 受入研究者/ Host researcher

受入研究機関・部局・職
Name of Host Institution, Department and Title 金沢大学・環日本海域環境研究センター・教授

受入研究者氏名
Host Researcher's Name 鈴木 信雄

2. 外国人招へい研究者/ Fellow

所属研究機関・部局・職
Name of Institution, Department and Title DDU Gorakhpur University, Department of Zoology,
Emeritus Professor (ex.)

外国人招へい研究者氏名
Fellow's Name Ajai K. Srivastav

3. 採用期間/ Fellowship Period

2024 年 6 月 6 日

～

2024 年 10 月 5 日

4. 研究課題/ Research Theme

Study on the endocrine disrupting effect of styrene trimer, one of pollutant derived from plastics

5. 研究活動報告/ Research Report

(1) 研究活動の概要・成果/ Summary of Research Results

日本における研究活動の概要（背景を含む）及び成果を以下に示す。

背景

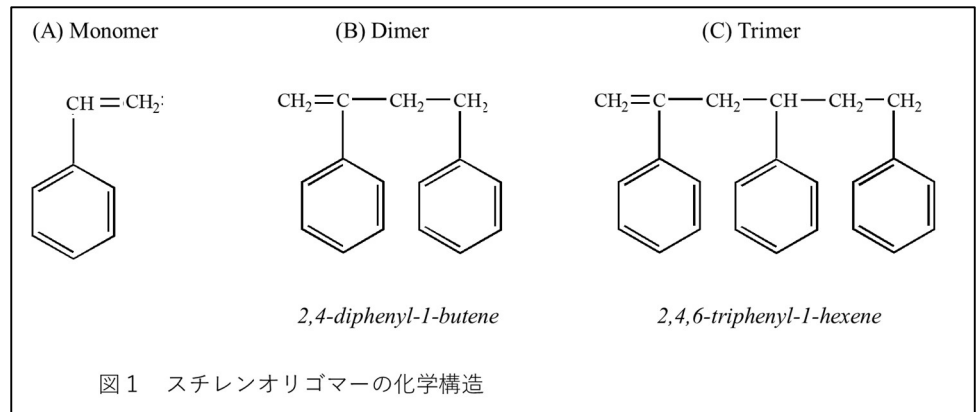
1950 年から 2015 年におけるプラスチック生産量は世界全体で約 83 億トンに上る。2015 年以降のプラスチック生産量は、毎年約 3 億トンずつ増加している。また、これらのプラスチックのうちリサイクルされているのは 9%のみであり、それ以外は地中に埋められるか、海に運ばれて海洋ゴミとなっている。これらのプラスチックが、海洋環境において紫外線による劣化や波などで機械的に細断化されることでマイクロプラスチックとなり、世界的な海洋汚染問題となっている。

海洋環境中に占めるポリマーの上位は、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレンの 3 種類であると報告されている (Hidalgo-Ruz et al., Environ. Sci. Technol., 2012)。従来の考え方では、プラスチックは難分解性であり、海洋という低温の環境下では分解しないと信じられてきた。しかしながら、実際には、精製ポリスチレンが 30～150℃で分解し、分解したポリスチレン中のスチレンモノマー：スチレンジマー：スチレントリマー（図 1）の組成比が 1:1:5 であることが報告されている (Kimukai et al., Appl. Sci., 2020)。さらに、日本沿岸や世界の海域でもスチレントリマーは約 1-10 µg/L 検出されており、日本沿岸域における海水中的スチレンオリゴマーの濃度は、0.65～8.65 µg/L（平均:4.03 µg/L）と報告されている (Amamiya et al., Mar. Pollut. Bull., 2020)。また、世界の他の海域でも同様にスチレントリマーが検出されている (Kwon et al., Environ. Pollut., 2018; Aoyama et al., Sci. Total Environ., 2019)。これらの報告から、プラスチック由来のスチレントリ

マーが海洋環境中の生物に影響を与えている可能性が高いと考えられる。しかしながら、スチレングダイマーやスチレントリマーの精製は困難であり、これらの標準品も非常に高価であることから、スチレンオリゴマーに対する影響を評価した研究は少ないのが現状である。

以上のことから、スチレントリマーの内分泌かく乱作用を調べる

ために、以下の実験を行った。実験 1：女性ホルモン（エストロゲン）受容体との結合性の解析、実験 2：*in vitro* の骨モデル（ウロコ）を用いた骨代謝へのかく乱作用の解析、実験 3：*in vivo* におけるカルシウム代謝への影響解析を実施した。



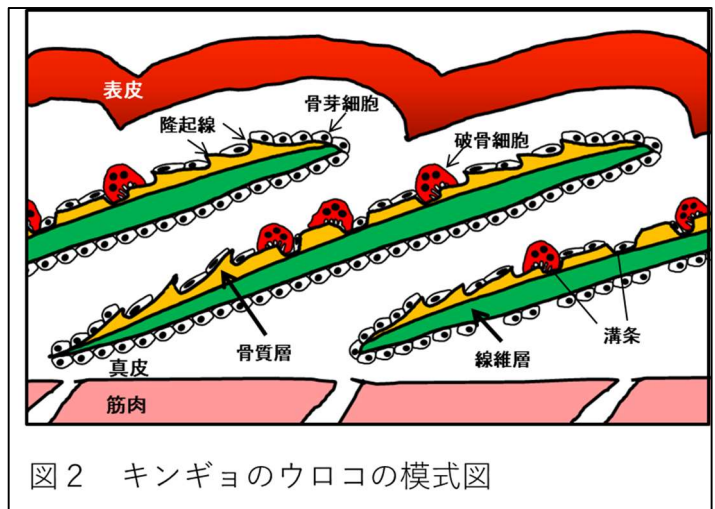
研究成果

実験 1：女性ホルモン（エストロゲン）受容体との結合性の解析

ナイルティラピアのエストロゲン受容体 $\text{ER}\alpha$ を HEK 293 細胞にトランスフェクションし、スチレンオリゴマーとの結合性を調べた。まず、フェノールレッドを含まないダルベッコ改変イーグル培地（5%デキストランチャコール処理ウシ胎児血清添加）を 96 ウェルプレートに播種した。その後、スチレンオリゴマーを処理することにより、エストロゲン受容体に対する応答性を調べた。24 時間後に細胞を回収し、Steady-Glo Assay System Kit を用いたルミネセンスアッセイにより、細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、100 $\mu\text{g/L}$ のスチレントリマーにのみ結合活性が見られた。 $\text{ER}\alpha$ に対する 100 $\mu\text{g/L}$ のスチレントリマーの比活性は、 E_2 の約 60% の比活性がある事が明らかとなった。

実験 2：*in vitro* の骨モデル（ウロコ）を用いた骨代謝へのかく乱作用の解析

キンギョのウロコ（図 2）を用いたバイオアッセイ系（Suzuki et al., Peptides, 2000）を用いて、スチレントリマーの骨芽細胞及び破骨細胞に対する影響を調べた。 E_2 は破骨細胞を活性化させ（Suzuki et al., Peptides, 2000）、骨芽細胞の活性も上昇させる（Yoshikubo et al., Life Sciences, 2005）。そこで、スチレントリマーに対する破骨細胞及び骨芽細胞の作用を調べた。その結果、スチレントリマー（10 $\mu\text{g/L}$ ）はエストロゲンと同様にして、骨芽細胞と破骨細胞のマーカー酵素活性を上昇させる作用が認められた。



実験 3：*in vivo* におけるカルシウム代謝への影響解析

スチレントリマー（100 $\mu\text{g/L}$ ）を淡水魚であるキンギョに経口投与した。その結果、経口投与後 12 時間後、24 時間後、それぞれの血漿中のカルシウム濃度が、対照群と比較し、統計学的に有意に上昇していることがわかった。

以上の研究成果は、第二回環日本海生命科学研究会で発表した。現在、国際誌に研究成果を公表するために、論文を準備中である。

(2) 主な研究発表（雑誌論文、学会、集会、知的財産権等）/ Main Research Publications

論文

Rao, A., Upadhyay, R. K., Srivastav, S. K., Suzuki, N. and Srivastav, A. K.: Protective effects of amla (*Emblca officinalis*) fruit pulp extract and selenium against dimethoate induced nephrotoxicity in Wistar rats. Int. J. Zool. Invest., 10: 1104-1113 (2024)

Yadav, R.P., Srivastav, S.K., Suzuki, N. and Srivastav, A.K.: Jamun (*Syzygium cumini*) seed and orange (*Citrus sinensis*) peel extracts ameliorate the toxic effects of lead on kidney biomarkers in rats. Acta Sci, Anim. Sci., in press

学会及び研究会

端野開都, 河合 海, 本田匡人, 松原 創, 池内俊貴, 道祖土勝彦, 楠井隆史, 古澤之裕, 田渕圭章, 遠藤雅人, 高橋ゆかり, Ajai K. Srivastav, 鈴木信雄: プラスチック由来の有害化学物質の魚類の骨代謝に対する影響評価. 第二回環日本海生命科学研究会, 国立立山青少年自然の家, 富山, 2024 年 9 月 26 日-27 日.

黒田康平, 水澤寛太, 高橋明義, 池亀美華, 丸山雄介, 松原 創, 本田匡人, 田渕圭章, 平山 順, Ajai K. Srivastav, 服部淳彦, 鈴木信雄: 魚類の骨芽細胞及び破骨細胞に対するホルモン(メラニン凝集ホルモン及びカルシトニン)の作用: キンギョのウロコを用いた解析. 令和 6 年度日本動物学会中部支部大会, 福井大学, 福井, 2024 年 12 月 7 日-8 日.
(予定)

(3) その他/Remarks

2024 年 6 月に, 金沢大学理工学域生命理工学類の授業科目(生物学臨海実習 2, 学部 3 年生対象)において, Srivastav 教授は講義を行った. 講義時に, 学生からの英語で質問もあり, 学部学生の教育にも貢献した(図 3).

2024 年 7 月に, 受け入れ教員のラボで実験を行い, 博士前期課程の学生の実験の指導も行った(図 4). なお, 2024 年 7 月に Srivastav 教授から指導を受けた学生は, 前回の Srivastav 教授の来日(2023 年 3 月)時にも指導を受けて, 以下の論文を国際誌に発表している. 若手研究者の育成にも貢献している.

Kuroda, K., Hatano, K., Kawamura, R., Fukushima, A., Sasayama, Y., Tabuchi, Y., Furusawa, Y., Ikegame, M., Hattori, A., Hirayama, J., Fukuda, T., Uekura, S., Matsubara, H., Kawago, U., Sekiguchi, T., Srivastav, A.K. and Suzuki, N.: Possible involvement of Calcitonin I and II in calcium metabolism of the female reproductive physiology of goldfish (*Carassius auratus*). Int. Aquat. Res., 15: 15-26 (2023)

Kuroda, K., Srivastav, A.K., Suzuki, A., Rafiuddin, M.A., Toyota, K., Endo, M., Honda, M., Watanabe, K., Maruyama, Y., Tabuchi, Y., Hattori, A., Urata, M., Matsubara, H. and Suzuki, N.: Stanniocalcin in the corpuscles of Stannius inhibits the osteoclastic activation by regulating the Rankl/Opg expression. J. Biol. Regul. Homeost. Agents., 37: 5141-5149 (2023)



図 3 Srivastav教授の講義の様子



図 4 Srivastav教授の実験の様子

2024年7月に、富山大学の若手研究者とのデスカッションを行い(図5)、研究交流を実施した。デスカッションした時の結果を基にして、本研究の研究成果を国際誌に発表予定である。



図5 Srivastav教授と富山大学の若手教員との交流