

海洋中に存在するポリスチレンの分解物(スチレントリマー)の骨代謝を含む 内分泌かく乱作用及び海洋細菌によるスチレントリマーの分解

鈴木 信雄¹, 田渕 圭章², 池内 俊貴³, 酒徳 昭宏⁴, 本田 匡人¹

¹ 金沢大学環日本海域環境研究センター, ² 富山大学研究推進機構研究推進総合支援センター,
³ 長浜バイオ大学フロンティアバイオサイエンス学科, ⁴ 富山大学学術研究部理化学系

概要

背景: マイクロプラスチックは難分解性であり, 低温の環境下である海洋では分解しないと信じられてきた。しかし, 実際に海洋中にはスチレンオリゴマー(スチレンモノマー, スチレンダイマー:2, 4-ジフェニル-1-ブテン, スチレントリマー:2, 4, 6-トリフェニル-1-ヘキセンの一定の組成比を持つ混合物)が存在し, 特に海洋中にはスチレントリマーが多いことが報告されている。したがって, マイクロプラスチックがスチレンオリゴマーにまで分解され, このスチレンオリゴマーが海洋生物に影響を与えている可能性が高い。さらにスチレンダイマー及びスチレントリマーの合成及び精製は難しい。そのため, スチレンオリゴマーの毒性影響を調べた研究は非常に少なく, 合成品の純度が低いため, 結果に一致を欠いているのが現状である。一方, 我々は, 魚類(主にキンギョ)のウロコを骨モデルとして用いて, ビスフェノール A やトリブチルスズなどの化学物質の骨代謝に対する作用を調べ, これらの化学物質には, 魚類の骨代謝に影響を与えることを報告している。そこで本研究では, キンギョのウロコを用いて, スチレンオリゴマーの骨代謝に対する作用を調べた。さらに本研究では, スチレンオリゴマーを分解可能な海洋細菌のスクリーニングについても実験を行った。

方法: 本研究では, まず, テイラピアのエストロゲン受容体との結合実験を行い, スチレンオリゴマーのエストロゲン様活性を調べた。次に, キンギョ(*Carassius auratus*)のウロコを材料として用いてスチレンオリゴマーの骨代謝に及ぼす影響を調べた。即ち, スチレンオリゴマー(10 µg/L, 100 µg/L, 1 mg/L)を培地に添加して, ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用をエストロゲンと比較した。さらにスチレンオリゴマーをキンギョに投与して血液中のカルシウム濃度に対する影響も評価した。一方, スチレンオリゴマーの海洋細菌による分解を調べるため, スチレンオリゴマーのみを含む 1/2 海水・寒天プレートで培養してスチレンオリゴマーを資化できる海洋細菌を調べた。

結果・考察: エストロゲン受容体との結合実験の結果, スチレントリマーのみに, エストロゲン受容体(ER α)との結合活性が認められた。そこで以下の実験では, スチレントリマーのみに注目して, 骨代謝に対する作用を調べた。ウロコを用いたアッセイの結果, スチレントリマーはエストロゲンと同様にして, 骨芽細胞及び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。また, スチレントリマーは骨芽細胞及び破骨細胞のマーカー遺伝子の発現も上昇させた。さらにスチレントリマーをキンギョに投与すると血液中のカルシウム濃度が上昇して, 骨吸収作用(破骨細胞の活性化作用)を確認できた。エストロゲンにおいても, 血液中のカルシウム濃度の上昇による骨吸収作用はよく知られているので, *in vitro* に加えて, *in vivo* においても, スチレントリマーには, エストロゲン様作用があることがわかった。次に, スチレンオリゴマー(10 mg/L)を含む 1/2 海水・寒天プレートを用いて, 海洋細菌のスクリーニングを行った。その結果, いくつかの海洋細菌は, スチレンオリゴマーを資化している可能性が示された。

1. 研究目的

1.1 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¹⁾。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²⁾。

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³⁾。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、実際には、精製ポリスチレンが30~150°Cで分解し、分解したポリスチレン中のスチレンモノマー (Fig. 1A) : スチレンジイマー (Fig. 1B) : スチレントリマー (Fig. 1C) の組成比が1:1:5であることが報告されている²⁾。さらにプラスチック由来のスチレンオリゴマーが実際に海洋環境中に存在していたことから、本研究ではポリスチレンに注目した⁴⁻⁶⁾。

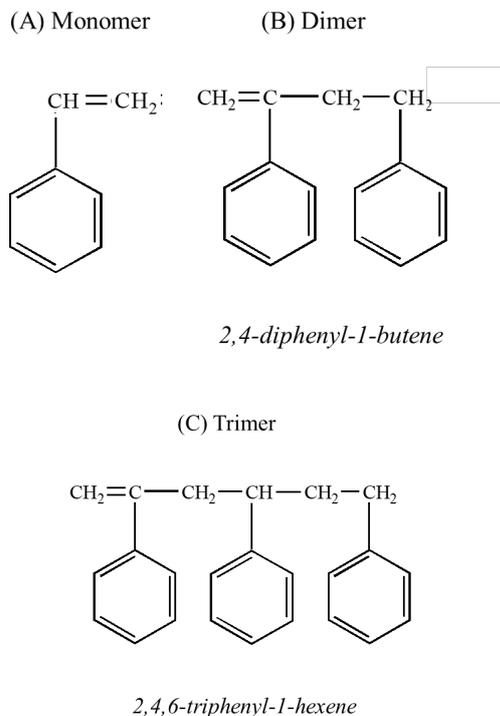


Fig. 1 Chemical structure of styrene oligomer

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⁶⁾。その中でも特に、スチレントリマー (2,4,6-トリフェニル-1-ヘキセン) が日本沿岸域の海水中に 0.35~6.97 µg/L (平均: 3.26 µg/L) で検出されている⁶⁾。

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⁵⁾。これらの報告から、プラスチック由来のスチレン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、スチレンジ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。

1.2 本研究の目的

骨代謝は、骨組織に存在する骨を作る細胞である骨芽細胞と、骨を壊す細胞である破骨細胞の働きにより調節されている。骨芽細胞は血中のカルシウムを利用して骨量を増やす一方で、破骨細胞は骨組織を溶かし、血中にカルシウムを供給する働きを持つ。

本研究では、魚類の骨代謝に及ぼすスチレンオリゴマーの影響を評価する方法として、魚類のウロコに着目した。硬骨魚類のウロコは、石灰化層と繊維層から成る骨基質の上に骨芽細胞と破骨細胞が共存していることから、骨のモデルとして使用できる⁷⁾ (Fig. 2)。さらに、魚類のウロコは再生する能力を持っており、この再生ウロコは通常のウロコよりも骨芽細胞と破骨細胞の活性が高いことが報告されている⁸⁾。

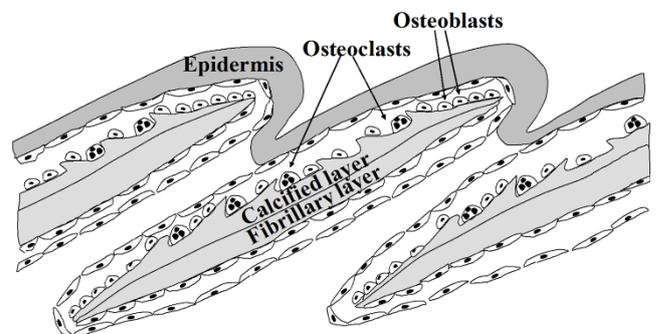


Fig. 2 Schematic diagram of fish scales

当研究室では、再生ウロコを用いた魚類の骨代謝に対する環境汚染物質の作用を解析するための *in vitro* のバイオアッセイ法を開発^{9,10)}しており、実際にその方法を用いて、ポリ塩化ビフェニル¹¹⁾やトリブチルスズ¹²⁾を正確に評価した実績がある。このウロコのバイオアッセイ法は、骨芽細胞と破骨細胞の共存する系で、骨芽細胞と破骨細胞の活性を、それぞれのマーカー酵素であるアリカリフォスファターゼ (Alkaline phosphatase: ALP) および酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (Tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) により、測定が可能である^{9,10)}。

一方、エストロゲンには、骨代謝を調節する作用があり、魚類においても骨代謝に関与していることが報告されている^{9,10,13)}。さらに環境汚染物質であるビスフェノール A には、内分泌かく乱作用があり、エストロゲン受容体と結合する活性を有する¹⁴⁾。そのビスフェノール A が骨代謝に影響を与えることも報告されている¹³⁾。

以上のような背景から、本研究では、スチレンオリゴマーの骨代謝に対する内分泌かく乱作用 (特にエストロゲンに対する作用) を評価した。

2. 研究方法

2.1 実験 1: 魚類のエストロゲン受容体のレポーター

アッセイ

ナイルティラピアのエストロゲン受容体 ER α , ER β 1 及び ER β 2 に対するスチレントリマーとの結合をルシフェラーゼ活性で測定する系を用いて調べた。長浜バイオ大学の池内がアッセイ系を既に構築作成済みであり、その系を用いて解析した。哺乳類のエストロゲン受容体には、スチレントリマーは結合しないという報告¹⁵⁾があり、これまでスチレントリマーにはエストロゲン様の内分泌かく乱作用はないと考えられてきた。しかしながら、魚類のエストロゲン受容体との応答性は調べられていない。そこで、本研究ではナイルティラピアのエストロゲン受容体 ER α , ER β 1 及び ER β 2 に対する作用を解析した。

ナイルティラピアのエストロゲン受容体 ER α (DDBJ/EMBL-Bank/GenBank accession number : NM_001279770.1; corresponding to amino acids 1-585), ER β 1 (DDBJ/EMBL-Bank/GenBank accession number : NM_001279774.1; corresponding to amino acids 1-557), ER β 2 (DDBJ/EMBL-Bank/GenBank accession number : NM_001279477.1; corresponding to amino acids 1-667) を

PCR で増幅し、pcDNA3.1(+)にクローニングした。3 つのエストロゲン応答性エレメントを含むティラピア・ビテロジェニンプロモーター領域の 1778 bp 断片を PCR で単離し、ルシフェラーゼレポーター pGL4.20 ベクターに挿入した。これらのプラスミドを、リポフェクタミンを用いて HEK293 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞は G418 でスクリーニングした。スクリーニング後、各コロニーを回収した。各クローンのエストロゲンに対する応答性は、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後、スチレンオリゴマー処理で試験した。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。

2.2 実験 2: スチレントリマーの肝臓での卵黄タンパク質の合成能の解析 (*in vivo*)

金沢大学の実験動物委員会の指針に基づき、メダカ (*Oryzias latipes*) を用いた *in vivo* の試験を行った。バットに水を入れて、ヒーターで加温して水温を 25°C に保った。プラスチックから溶出する分解産物のコンタミネーションを防ぐため、飼育容器には 5 L のガラス製梅酒瓶を用いて、エアレーションには加工したガラス製パスツールピペットを用いた。飼育水は 1 L とし、対照群にはスチレントリマーを溶解するときに用いた溶媒であるエタノールを終濃度 0.1% となるように飼育水に加え、実験群にはスチレントリマーを 10 μ g/L, 100 μ g/L となるように飼育水に加えた。また、陽性対照群には 100 ng/L, 1 μ g/L となるように E₂ (β -エストラジオール-水溶性, Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, United states) を飼育水に加えた。

ヒメダカを 0.03% m-アミノ安息香酸エチルメタンスルホネート水溶液 (Sigma-Aldrich Co. LLC) で麻酔後、顕微鏡と解剖キットを用いて肝臓のサンプリングを行った。採取した肝臓は NucleoSpin[®] RNA (タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本) の RA-1 (1% 2-メルカプトエタノール含有) を加えた溶解液を入れたスクリーキャップチューブにジルコニアビーズと共に入れた。ビーズクラッシャー (タイテック株式会社, 埼玉, 日本) にて肝臓を破碎後、-80°C で凍結保存した。

採取した肝臓から NucleoSpin[®] RNA (タカラバイオ株式会社) を用いて添付のプロトコルに従い、total RNA を抽出した。抽出後、Nano Drop (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, United states)で RNA 濃度を測定後、-80°Cで凍結保存した。

PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit(タカラバイオ株式会社)を用いて、添付のプロトコルに従い、cDNA を合成した。Nano Drop (Thermo Fisher Scientific)で測定した total RNA 量の結果から、total RNA 量が 1 µg になる様に RNA 原液を調整した。RNA 量が少ないサンプルに関しては、プロトコルの最大添加量の 5.75 µL を用いて cDNA 合成を行った。cDNA を用いて定量 PCR 法によりビテログレニンの発現を解析した¹⁶⁾。

2. 3 実験 3: ウロコを用いたスチレントリマーの破骨及び骨芽細胞に対する作用 (*in vitro*)

金沢大学の実験動物委員会の指針に基づき、キンギョ (*Carassius auratus*) を麻酔し、ウロコを採取した。キンギョを2週間飼育して、飼育後再度麻酔して再生ウロコを採取する。2週間という再生期間は、前報告⁸⁾で確認済である。スチレントリマーを培地に添加して、ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を解析した。

プレインキュベーション後、L-15 培地を抜き取り、スチレンオリゴマーを、10 µg/L, 100 µg/L, 1 mg/L の濃度になるように希釈した L-15 培地を 200 µL ずつ各ウエルに入れた。この時、Control 群には 99.5%エタノール(富士フィルム和光純薬株式会社)を 10 µg/L, 100 µg/L, 1 mg/L になるように希釈した L-15 培地を用いた。

15°Cで 6 時間インキュベートした後に、曝露液を抜き取り、各ウエルにリン酸緩衝液を 100 µL ずつ加えて再生ウロコを洗浄した。ウエル内のリン酸緩衝液を完全に抜き取り、骨芽細胞酵素活性測定用の再生ウロコには、アルカリ緩衝液 (1 mM MgCl₂ 含有 0.2 M Tris-HCl 緩衝液 pH 9.5) を、破骨細胞酵素活性測定用の再生ウロコには酒石酸緩衝液 (0.5 M 酒石酸ナトリウム含有酢酸緩衝液 pH 5.3) を各ウエルにそれぞれ 100 µL ずつ加え、-80°Cで凍結・保存した。

骨芽細胞及び破骨細胞のマーカー酵素 (ALP 及び TRAP)^{9, 10)}に加えて、これらのマーカー遺伝子の発現も解析した。なおマーカー遺伝子は、骨芽細胞は *alp* 及び *dkk1* を用い、破骨細胞の方は *nfatc1* と *cathepsin K* を使用した¹⁶⁾。

2. 4 実験 4: 海洋細菌によるスチレントリマーの分解

海洋細菌をスチレントリマーのみを含む培地で培養して、スチレントリマー分解菌をスクリーニングして、分解菌を単離

した(特願 2022-16907)。そこで本研究では、その菌が実際にスチレントリマーを分解しているのかを詳細に調べた。

グリセロールストックした細菌を液体培地(ペプトン 1%, 酵母エキス 0.5%を含む 1/2 ALLEN 海水培地)で培養し、遠心分離機にて集菌後、1/2 ALLEN 海水にて洗浄した。10 mg/L スチレントリマーを添加した 1/2 ALLEN 海水に細菌を懸濁し、15°Cで 24 時間振とう培養した。培養液を 200 µL ずつ測り取って 96 穴プレート(丸底)に移し、initial と 24 時間経過後の濁度を測定した。

GC/MS による分析は以下のように実施した。前処理に用いるガラス器具を洗浄後、アセトンとヘキサンで有機溶媒洗浄した。共栓試験管(S-50:株式会社マルエム, 大阪, 日本)に 10 µg/L スチレン混合内標準を 100 µL 添加した。サンプル培養液を 5 mL 共栓試験管に移し、ジクロロメタンを 10 mL 測り取って加え、300 rpm, 20 分間振とうさせた。振とう後、1500 rpm, 5 分間、4°Cで遠心分離(Model 2410:久保田商事株式会社, 東京, 日本)した。

パスツールピペットを用いて沈殿層を別の共栓試験管に移し、再度ジクロロメタンを 10 mL 加え、再抽出した。抽出液に無水硫酸ナトリウムを 5 g 測り取って加え、300 rpm, 10 分間振とうさせ脱水を行った。抽出液を濾過後、窒素吹き付けによる濃縮を行い、GC/MS 分析用サンプルとした。その後、GC/MS (Agilent 6890:アジレント・テクノロジー, 東京, 日本)を用いて、単離した菌によるスチレントリマーの分解能を調べた。

2. 5 統計処理

本研究では、同一の個体において対照群と実験群のウロコを採取した実験については、Paired t-test で検定した。一方、実験群と対照群との比較は、student's t-test で行った。なお、P 値 5%未満を統計学的水準とした。なお、データは、平均値±標準誤差で表示した。

3. 研究結果

3. 1 実験 1: 魚類のエストロゲン受容体のレポーター

アッセイ (*in vitro*)

スチレンオリゴマー(スチレンモノマー, スチレンダイマー及びスチレントリマー)に対するエストロゲン受容体 α , $\beta 1$ 及び $\beta 2$ との結合実験を行った。その結果、ER α において、100 µg/L のスチレントリマーにのみ活性が見られた(Fig. 3)。しかしながら、スチレントリマーには、ER $\beta 1$ と $\beta 2$ に対しては、活性は見いだせなかった。

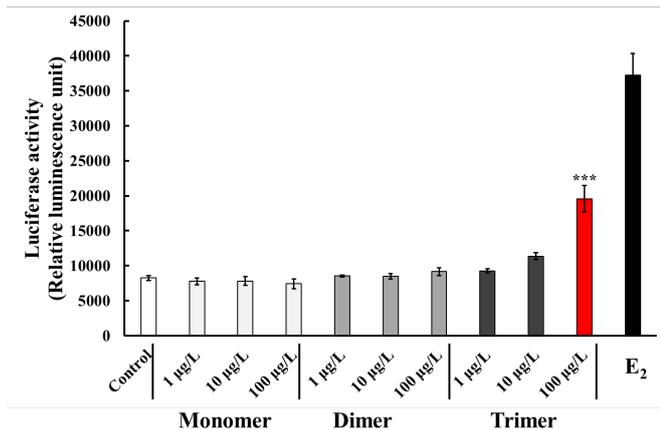


Fig. 3 Schematic diagram of fish scales

3. 2 実験2: スチレントリマーの肝臓での卵黄タンパク質の合成能の解析 (*in vivo*)

ヒメダカの肝臓におけるビテロゲニンの遺伝子発現解析の結果を (Fig. 4) に示す。対照群ではビテロゲニンの発現が検出できなかった。また実験群である 10 µg/L のスチレントリマーにおいてもビテロゲニンの発現が見られなかった。一方、曝露量が 10 倍量である 100 µg/L の濃度ではビテロゲニンの発現が誘導されていることがわかった。この誘導されたビテロゲニンの発現量は、陽性対照群である 100 ng/L の E₂ に曝露させたメダカのビテロゲニン発現量と同程度であった。また、陽性対照群において 10 倍量である 1 µg/L の E₂ では、さらにビテロゲニンの発現量が増加し、濃度依存的にビテロゲニンの誘導が確認された。

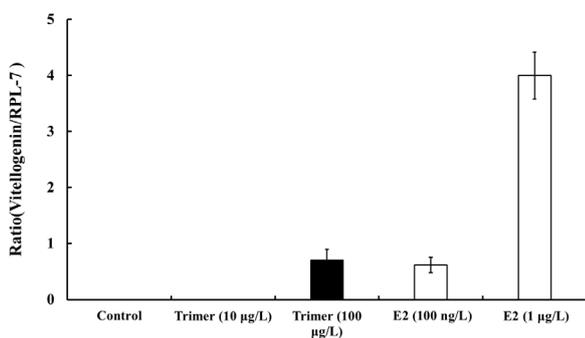


Fig. 4 Schematic diagram of fish scales

3. 3 実験3: ウロコを用いたスチレントリマーの破骨及び骨芽細胞に対する作用 (*in vitro*)

スチレントリマーに対する骨芽細胞の酵素活性は、対照群と比較して 10 µg/L の濃度のみで統計学的に有意に上昇 (Fig. 5) しており、破骨細胞の酵素活性は 10 µg/L と 100 µg/L の濃度で統計学的に有意な上昇が見られた (Fig. 6)。

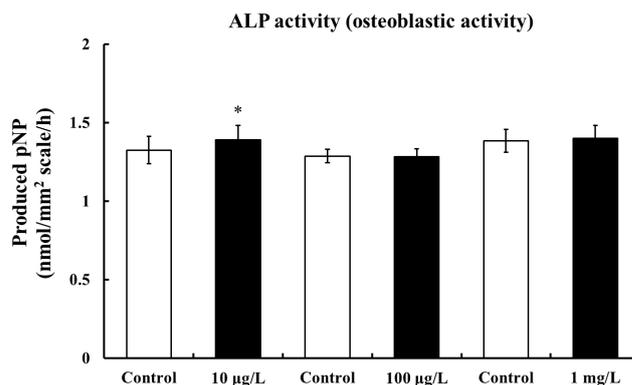


Fig. 5 Influence of styrene trimer on osteoblasts

*: P < 0.05

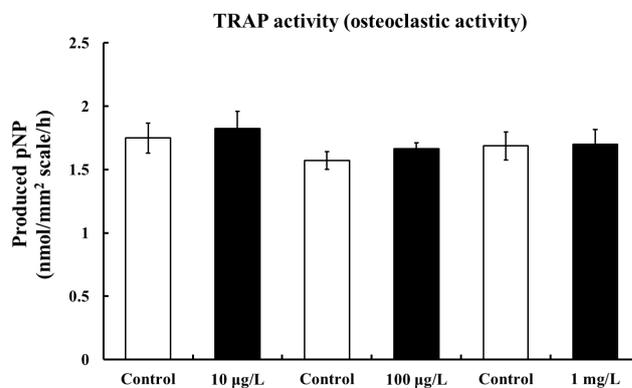


Fig. 6 Influence of styrene trimer on osteoclasts

*: P < 0.05; **: P < 0.01

3. 4 実験4: 海洋細菌によるスチレントリマーの分解

濁度測定を 3 回繰り返して行った結果を (Fig. 7) に示す。スチレントリマーを添加した培養液のみの濁度と比較し、アジの腸内細菌の懸濁液を添加したスチレントリマーを含む培養液において、菌の増殖を確認できた。また、菌の増殖は、3 回とも同様な結果が得られており、菌の増殖についての再現性を確認することができた。

濁度測定を行ったサンプルを GC/MS 分析した結果を (Fig. 8) に示す。スチレンダイマーの分子量である m/z 91 において、スチレントリマーを含む培養液のみのピーク面積が 2326 であるのに対し、アジの腸から単離した菌を入れて培養したスチレントリマーを含む培養液のピーク面積が 8872 であった。培養液中にスチレンダイマーが顕著に増加していた。これは、スチレントリマーが、アジの腸内細菌により分解され、スチレントリマーをスチレンダイマーに分解したことを示す。

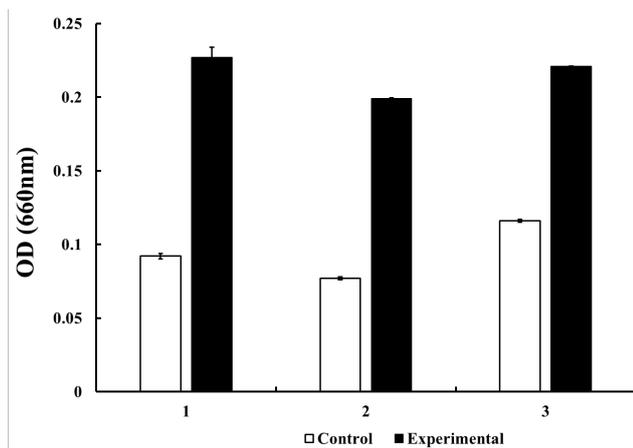


Fig. 7 Effect of the addition of styrene trimer on the growth of isolated marine bacteria

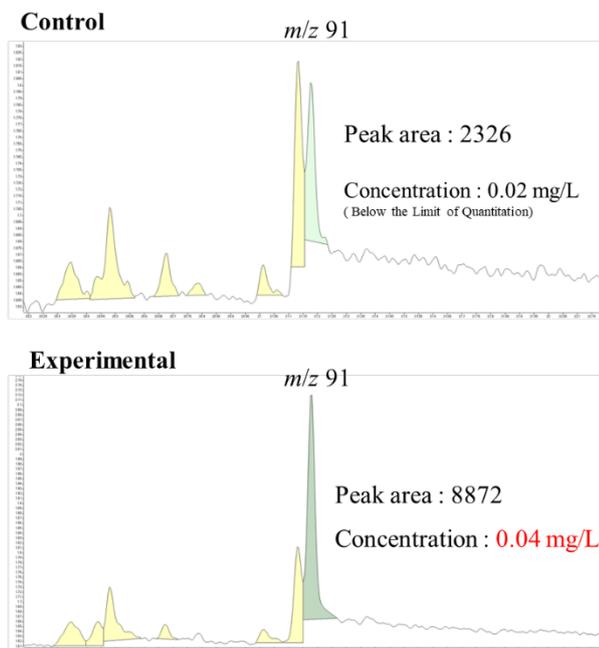


Fig. 8 Analysis of the resolution of styrene trimer in isolated marine bacteria

4. 考察

ER α に対する 100 $\mu\text{g/L}$ のスチレントリマーの比活性は $61.9\% \pm 4.9$ であり、E $_2$ の約 60% の比活性がある事が明らかとなった。これまで、スチレンオリゴマーは、哺乳類のエストロゲン受容体には結合しないと結論付けられている¹⁷⁾。スチレンオリゴマーがエストロゲン受容体と結合すると報告されたが¹⁸⁾、その後、その結果は否定され、高濃度でしか結合しない¹⁵⁾。

一方、本研究において、魚類であるニルティラピアの細胞を用いて解析した結果、スチレンオリゴマーが魚類のエストロゲン受容体に結合する事を初めて明らかにすることができた。環境汚染物質は、哺乳類の細胞よりも魚類の細胞の方が低濃度で効果があることが報告されている¹²⁾。スチレントリマーは、海水中に多量に含まれている^{5, 6)}。本研究において、魚類のエストロゲン受容体とスチレントリマーが結合したことは、スチレントリマーが自然界においても魚類の内分泌をかく乱している可能性を示している。したがって、スチレントリマーの影響を詳細に解析する必要があると思われる。

ヒメダカのおスの肝臓を用いた遺伝子発現解析の結果、100 $\mu\text{g/L}$ のスチレントリマーにおいてエストロゲン様作用の誘導が引き起こされ、肝臓内でビテロゲニンが合成されていることが明らかとなった。日本沿岸海域におけるスチレントリマーの濃度は 0.35 ~ 6.97 $\mu\text{g/L}$ (平均: 3.26 $\mu\text{g/L}$)⁹⁾ なので、本章でビテロゲニンの誘導が確認された濃度は、自然環境下より高い濃度である。しかしながら、72 時間よりも長期間の曝露により、ヒメダカにおいても低濃度のスチレントリマーでもビテロゲニンが合成される可能性がある。

ヒメダカは淡水魚であることから、スチレントリマーは体表から取り込まれる。スチレントリマーは、疎水性が高い物質なので、体表からの取り込みが低い可能性がある。一方、海産魚は、体表からの脱水を防ぐために、海水を飲み、食道で NaCl を吸収して、腸で 1/3 海水にまで希釈して、腸から Na 及び Cl と共に水を吸収する¹⁹⁾。したがって、海産魚は、スチレントリマーを経口投与と同様な方法で取り込まれることになる。今後は、海産魚を用いて、スチレントリマーによる肝臓におけるビテロゲニンの誘導を引き起こす濃度を調べていく予定である。

スチレントリマーにおいて 10 µg/L と 100 µg/L の濃度で統計学的に有意に破骨細胞の酵素活性が上昇していることが明らかとなった。この 100 µg/L という濃度は、エストロゲン受容体と結合したスチレントリマーの濃度と一致する。この濃度がエストロゲン受容体との結合に最適な濃度かもしれない。

本研究において、スチレントリマーはエストロゲン受容体 α タイプとの結合を確認することができた。スチレントリマーは、他の受容体との結合活性を有している可能性がある。骨芽細胞と破骨細胞の活性を上昇させるステロイドホルモンとして、エストロゲンの他に活性型ビタミン D₃ があげられる(鈴木, 私信)。したがって、スチレントリマーは、ビタミン D₃ の受容体と結合している可能性が考えられ、今後調べていきたいと考えている。

本研究において、このアジの腸内細菌を用いて濁度を測定した。その結果、濁度測定を 3 回繰り返し行ったが、再現性が高く、スチレントリマー入りの培養液のみの濁度と比較して、アジの腸内細菌の懸濁液を添加したスチレントリマーを含む培養液において濁度の上昇が見られた。さらに GC/MS 分析により、実際にスチレントリマーからスチレンダイマーへ分解が引き起こされていることが明らかとなった。今後、スチレントリマーを分解する酵素を単離していき、バイオリクターを開発していきたい。

5. 今後の課題

本研究において、淡水魚のキンギョ及びメダカを用いてスチレントリマーの内分泌かく乱作用を証明することができた。しかしながら、スチレントリマーは海洋環境中に存在する汚染物質^{5, 6, 21)}なので、海産魚類を用いてスチレントリマーに対する作用を解析していく必要がある。なお、我々はメジナにスチレントリマーを経口投与すると、血液中のマグネシウム濃度、無機リン濃度が上昇するということを報告している²⁰⁾。マグネシウム及び無機リン濃度が上昇したことから、スチレントリマーは海産魚類の腎臓に作用している可能性も考えられる。また、マグネシウム及び無機リンは骨組織を構成するミネラルの 1 種であり、骨代謝にもスチレントリマーは影響を与えている可能性が高い。

以上のことから、海産魚類に対してもスチレントリマーは、塩代謝をかく乱していると考えられる。さ

らに、海産魚においても、スチレントリマーがエストロゲン受容体と結合しているのかについても調べていきたい。エストロゲンは、ウロコの破骨細胞を活性化して骨吸収を促進するホルモンである。淡水魚のキンギョと同様にして、エストロゲンは海産魚のメジナの破骨細胞を活性化することを報告している⁹⁾。スチレントリマーも海産魚の破骨細胞を活性化する可能性が高い。今後、解析していく予定である。またエストロゲン受容体にエストロゲンが結合した後に引き起こされるシグナルカスケードが実際に動いているのかを、RNAseq 解析により調べていきたい。既にデータがあるので、報告会までに解析を終えて、報告会で発表していく予定である。

最後に、スチレントリマーを分解できる可能性が高い海洋細菌を単離することができた。今後は、スチレントリマーを分解する酵素を単離して、バイオリクターの開発を行っていきたい。

6. 文献

1. Geyer, R., Jambeck, J.R. and Law, K.L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3, 25–29.
2. Kimukai, H., Kodera, Y., Koizumi, K., Okada, M., Yamada, K., Hiaki, T. and Saido, K. (2020). Low temperature decomposition of polystyrene. *Appl. Sci.*, 10, 5100.
3. Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C. and Thiel, M. (2012). Microplastics in the marine environment: A review of the methods used for identification and quantification. *Environ. Sci. Technol.*, 46, 3060–3075.
4. Saido, K., Koizumi, K., Sato, H., Ogawa, N., Kwon, B. G., Chung, S. Y., Kusui, T., Nishimura, M. and Kodera, Y. (2014). New analytical method for the determination of styrene oligomers formed from polystyrene decomposition and its application at the coastlines of the North-West Pacific Ocean. *Sci. Total Environ.*, 473–474, 490–495.
5. Kwon, B.G., Amamiya, K., Sato, H., Chung, S.Y., Kodera, Y., Kim, S.K., Lee, E.J. and Saido, K. (2017). Monitoring of styrene oligomers as

- indicators of polystyrene plastic pollution in the North-West Pacific Ocean. *Chemosphere*, 180, 500–505.
6. Amamiya, K., Koizumi, K., Yamada, K., Hiaki, T., Kasui, T. and Saido, K. (2020). Analysis of drifting polystyrene degradation surround Japan. *Austin J. Environ. Toxicol.*, 6, 1030.
 7. Suzuki, N., Somei, M., Seki, A., Reiter, R.J. and Hattori, A. (2008). Novel bromomelatonin derivatives as potentially effective drugs to treat bone diseases. *J. Pineal Res.*, 45, 229-234.
 8. Suzuki, N., Kitamura, K., Omori, K., Nemoto, T., Satoh, Y., Tabata, M.J., Ikegame, M., Yamamoto, T., Ijiri, K., Furusawa, Y., Kondo, T., Takasaki, I., Tabuchi, Y., Wada, S., Shimizu, N., Sasayama, Y., Endo, M., Takeuchi, T., Nara, M., Somei, M., Maruyama, Y., Hayakawa, K., Shimazu, T., Shigeto, Y., Yano, S. and Hattori, A. (2009). Response of osteoblasts and osteoclasts in regenerating scales to gravity loading. *Biol. Sci. Space*, 23, 211-217.
 9. Suzuki, N., Suzuki, T. and Kurokawa, T. (2000). Suppression of osteoclastic activities by calcitonin in the scales of goldfish (freshwater teleost) and nibbler (seawater teleost). *Peptides*, 21, 115-124.
 10. Suzuki, N. and Hattori, A. (2002). Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J. Pineal Res.*, 33, 253-258.
 11. Yachiguchi, K., Matsumoto, N., Haga, Y., Suzuki, M., Matsumura, C., Tsurukawa, M., Okuno, T., Nakano, T., Kawabe, K., Kitamura, K., Toriba, A., Hayakawa, K., Chowdhury, V.S., Endo, M., Chiba, A., Sekiguchi, T., Nakano, M., Tabuchi, Y., Kondo, T., Wada, S., Mishima, H., Hattori, A. and Suzuki, N. (2014). Polychlorinated biphenyl (118) activates osteoclasts and induces bone resorption in goldfish. *Env. Sci. Poll. Res.*, 21, 6365–6372.
 12. Suzuki, N., Tabata, M.J., Kambegawa, A., Srivastav, A.K., Shimada, A., Takeda, H., Kobayashi, M., Wada, S., Katsumata, T. and Hattori, A. (2006). Tributyltin inhibits osteoblastic activity and disrupts calcium metabolism through an increase in plasma calcium and calcitonin levels in teleosts. *Life Sci.*, 78, 2533-2541.
 13. Suzuki, N. and Hattori, A. (2003). Bisphenol A suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the cultured scales of goldfish. *Life Sci.*, 73, 2237-2247.
 14. Hiroi, H., Tsutsumi, O., Momoeda, M., Takai, Y., Osuga, Y. and Taketani, Y. (1999). Differential interactions of bisphenol A and 17beta-estradiol with estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta. *Endocr. J.* 46, 773-778.
 15. Ohno, K., Azuma, Y., Date, K., Nakano, S., Kobayashi, T., Nagao, Y. and Yamada, T. (2003). Evaluation of styrene oligomers eluted from polystyrene for estrogenicity in estrogen receptor binding assay, reporter gene assay, and uterotrophic assay. *Food Chem. Toxicol.*, 41, 131–141.
 16. Thamamongood, T.A., Furuya, R., Fukuba, S., Nakamura, M., Suzuki, N. and Hattori, A. (2012). Expression of osteoblastic and osteoclastic genes during spontaneous regeneration and autotransplantation of goldfish scale: A new tool to study intramembranous bone regeneration. *Bone*, 50, 1240-1249.
 17. Nobuhara, Y., Hirano, S., Azuma, Y., Date, K., Ohno, K., Tanaka, K., Matsushiro, S., Sakurai, T., Shiozawa, S., Chiba, M. and Yamada, T. (1999). Biological evaluation of styrene oligomers for endocrine-disrupting effects. *Food Hyg. Safe. Sci.*, 40, 36-45.
 18. Ohyama, K. I., Nagai, F. and Tsuchiya, Y. (2001). Certain styrene oligomers have proliferative activity on MCF-7 human breast tumor cells and binding affinity for human estrogen receptor α . *Environ. Health Perspect.*, 109, 699–703.
 19. Watanabe, S., Mekuchi, M., Ideuchi, H., Kim, Y.K. and Kaneko, T. (2011). Electroneutral cation-Cl-

cotransporters NKCC2 β and NCC β expressed in the intestinal tract of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 159, 427-435.

20. Kawago, U., Hatano, K., Ikeuchi, T., Honda, M., Watabe, Y., Ogiso, S., Nagami, A., Matsubara, H., Urata, M., Matsumoto, K., Srivastav, A.K., Saido, K. and Suzuki, N. (2021). Effects of a styrene trimer (2,4,6-triphenyl-1-hexene) on plasma mineral concentrations of nibbler fish, *Girella punctata*. *Int. J. Zool. Inv.*, 7, 785-791.
21. Kwon, B. G., Chung, S. Y., Park, S. S., and Saido, K. (2018). Qualitative assessment to determine internal and external factors influencing the origin of styrene oligomers pollution by polystyrene plastic in coastal marine environments. *Environmental Pollution*, 234, 167–173

Endocrine Disrupting Effects of Degraded Polystyrene (Styrene Trimer) in the Ocean Including Bone Metabolism and Degradation of Styrene Trimer by Marine Bacteria

Nobuo Suzuki¹, Yoshiaki Tabuchi², Toshitaka Ikeuchi³, Akihiro Sakatoku⁴, Masato Honda¹

¹Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University, ²Life Science Research Center, University of Toyama, ³Graduate School of Biosciences, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, ⁴School of Science, Academic Assembly, University of Toyama

Summary

Background: It has been believed that microplastics are persistent and do not degrade in the ocean, which is a low-temperature environment. However, it has been reported that styrene oligomers (styrene monomer, styrene dimer: 2,4-diphenyl-1-butene, and styrene trimers: 2,4,6-triphenyl-1-hexene) are actually present in the ocean, especially styrene trimer in high concentrations. Therefore, it is highly likely that microplastics are degraded to styrene oligomers and that these styrene oligomers seem to be affecting marine organisms. Furthermore, high purity styrene oligomers are expensive and commercially difficult to obtain. Therefore, very few studies have investigated the toxic effects of styrene oligomers, and the results have been inconsistent due to the low purity of the synthesized products. On the other hand, we have investigated the effects of chemicals such as bisphenol-A and tributyltin on bone metabolism using fish scales as a bone model and reported that these chemicals have effects on bone metabolism in fish. In the present study, we investigated the effects of styrene oligomers on bone metabolism using goldfish scales. Furthermore, in this study, we conducted experiments to screen for marine bacteria capable of degrading styrene oligomers.

Methods: In the present study, we first examined the estrogen-like activity of styrene oligomers by reporter assay with estrogen receptors in tilapia. Next, the effects of styrene oligomers on bone metabolism were examined, using the scales of goldfish (*Carassius auratus*) as a material. That is, styrene oligomers (10 mg/L, 100 mg/L, 1mg/L) were added to the culture medium, and their effects on osteoblasts and osteoclasts in the scales were compared with those of estrogen. In addition, styrene oligomers were administered to goldfish, and their effects on blood calcium levels were also evaluated. On the other hand, to investigate the degradation of styrene oligomers by marine bacteria, we examined marine bacteria that can utilize styrene oligomers by culturing them on 1/2 seawater/agar plates containing only styrene oligomers.

Results and Discussion: As a result of reporter assay with estrogen receptor (ER α), only styrene trimer showed activity. Therefore, in the following experiments, we focused only on the styrene trimer to examine its effects on bone metabolism. The results of the assay using scales showed that styrene trimer increased osteoblast and osteoclast marker enzyme activities in the same manner as estrogen. Styrene trimer also increased the expression of osteoblast and osteoclast marker genes. In addition, the administration of styrene trimer to goldfish increased

the calcium concentration in the blood, confirming its bone resorption effect (activation of osteoclasts). Since it is well known that estrogen also has a bone resorption effect by increasing the calcium concentration in the blood, it was found that styrene trimers have estrogen-like effects *in vivo* as well as *in vitro*. Next, we screened marine bacteria, using 1/2 seawater-agar plates containing styrene oligomers (10 mg/L). The results indicated that some marine bacteria may capitalize on styrene oligomers