

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510035

研究課題名(和文) 線虫を用いた含フッ素含有医薬品(フルオロキノロン)の生態影響評価

研究課題名(英文) Ecotoxicogenomic Studies on Fluoroquinolones Using Nematode *Caenorhabditis elegans*.

研究代表者

一川 暢宏 (Ichikawa, Nobuhiro)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：10380932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：有機フッ素化合物の環境影響調査の一環としてフッ素含有医薬品レボフロキサシン(LVFX)、トスフロキサシン(TFLX)の土壌自活線虫*C. Elegans*に対する影響を調査し、フッ素を含まない類薬であるナリジクス酸(NA)の効果と比較した。全ての薬剤が*C. elegans*の発生・成長段階に影響を与えていたが、LVFX、TFLXではNAよりも低濃度で影響が観察され、加えてNAにない生殖や成長に関する遺伝子の発現抑制が見られた。以上の結果は、既報の有機フッ素化合物摂取による出生児体重減少・精子奇形等の影響を支持するものであり、今回の影響に構造中のフッ素が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate environmental and biological effects of fluoroquinolones such as Levofloxacin (LVFX) and Tosufloxacin (TFLX) on the nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) as a model organism and compared it with one of the old quinolones, nalidixic acid (NA). Two fluoroquinolones affected the fecundity and reproduction of *C. elegans* with lower concentration than NA. In addition, as a result of *C. elegans* DNA microarray analysis, LVFX or TFLX exposure down-regulated 8 genes in *C. elegans* including *mlc-3*, *cmd-1*, *col-108* and *col-139*, significantly. The findings of the present study demonstrate that fluoroquinolones could cause multiple biological defects to *C. elegans* and these effects may be relevant to fluorine.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：フルオロキノロン系抗菌剤 レボフロキサシン トスフロキサシン 線虫 生態影響調査 トキシコジェノミクス DNAマイクロアレイ 有機フッ素化合物

1. 研究開始当初の背景

(1) Perfluoro Organic Compound (PFOC) 等に代表される有機フッ素化合物は、撥水性・撥油性・耐熱性・絶縁性・耐薬性・透明性・潤滑性などの多機能な特徴を有する化学物質であり、この特性を生かして食品包装紙などの撥水剤、化粧品・シャンプー等の界面活性剤、調理器具のコーティング剤など多様な生活用品に使用されている。中でも、フッ素テロマーアルコール (FTOH) は工業的に広く利用され、新たな環境汚染物質として注目されている。また、PFOCs は生体内においても難分解性や高い蓄積性を示すことが知られており、その毒性として内分泌かく乱作用、視床下部の副腎髄質ホルモンの増加などの神経内分泌系への影響、核内受容体 PPAR を転写活性化する脂質代謝系へ影響など、生体にさまざまな影響を及ぼすことが報告されている。研究分担者らは最近の研究で、8:2 FTOH は雄メダカ肝臓中で卵黄タンパク前駆物質ビテロゲニン (VTG) を誘導することを明らかにした。そのエストロゲン様活性はビスフェノール A (BPA) よりも強いことから、POPs に指定されている PFOS や PFOA などの有機フッ素化合物のみならず、その潜在的汚染源 FTOHs も含め、水生生物に対する影響評価を行ってきた。

(2) 一方、医薬品や石鹸などのボディケア用品は PPCPs (Pharmaceuticals and Personal Care Products) と総称され、これらの化学物質による生態系への影響が懸念されている。これらの物質は、製品の廃棄、摂取した生体から排泄などによって環境中に放出される。また、製品に添加されている濃度としては微量であっても、広範囲で使用されることや、影響が特異的かつ選択的であることから、低濃度であっても生物に対して影響を及ぼす可能性が考えられ、欧米を中心にわが国でも、河川水中の医薬品検出に関する報告例が相次いでいる。研究代表者らも韓

国の Mankyung River 流域の汚染実態 (季節変動)に加え、関連下水処理場及びその除去特性について、解熱消炎鎮痛剤 3 種、抗てんかん剤 1 種、抗不整脈用剤 3 種、脳循環代謝改善剤 1 種および抗菌剤として、抗真菌剤: Fluconazole, 抗生物質製剤: Erythromycin, Clarithromycin, 合成抗菌剤: Levofloxacin, 殺菌剤: Triclosan について調査したところ数 ppt ~ 数 ppb の濃度範囲で検出された。PPCPs による水環境の汚染は、ヒトへの暴露による健康影響や、薬剤耐性菌の発生などの問題を引き起こす可能性があることを示した。

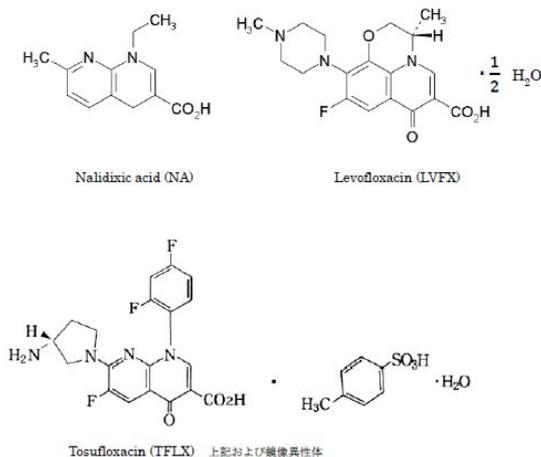
(3) この中で Levofloxacin (LVFX) は、基本構造上にフッ素を導入したフルオロキノロン系抗菌薬 (FQs) の 1 つで、国内外の臨床現場で頻用されている。フルオロキノロン誘導体は、それまでの抗菌剤に比べ、抗菌活性や抗菌スペクトラムが飛躍的に改良され、腸管からの吸収性も高められたために適応疾患が呼吸器感染症や耳鼻科、外科領域などへと大きく広がった。また、それまでの経口抗菌薬の主役であったセフェム系薬などのラクタム系薬に比し、高い病巣移行性を示すこともその優れた有用性の根拠となり、国内外で臨床使用可能な FQs は、約 20 種類にも達している。抗菌薬の開発が低調となっている近年、臨床での最重要課題は既存の抗菌薬に対する耐性菌の発生を最小に止め、抗菌剤の有効性持続を図ることである。臨床において、特に経口抗菌薬として最重要である FQs もその 1 つである。加えて FQs はフッ素含有医薬品であり、汚染による、河川における環境リスクを明らかにし、環境での耐性菌の発生を防止する観点からも、早急に環境リスク評価を行う緊喫の課題である。

2. 研究の目的

知見の少ない含フッ素医薬品の 1 つである FQs の生態影響評価を線虫 (*Caenorhabditis. Elegans*、以下 *C. elegans* と略す) を用いて

評価する。*C. elegans* は非寄生性の土壌自活線虫で受精卵から成熟個体になるまでが約 3 日間とライフサイクルが短く、致死や成長・成熟および繁殖を指標とした幅広い生態影響評価が可能である。体長約 1mm と小さいが、筋肉、消化管、神経系、上皮、生殖器などを備えた多細胞生物である。また、全ゲノム配列が解読されており、ゲノムワイドな構造機能解析がなされ、転写、発現様式、表現系解析およびタンパク質相互作用解析など、ポストゲノム研究が進んだ生物である。*C. elegans* のゲノムサイズは、ヒトの約 1/3(100Mbp)、遺伝子数は約半分(約 19,000 種)であるが、ヒトをはじめ、他の生物種との高い相同性を持っている。

本研究では、*C. elegans* を用いて、有機フッ素化合物として含フッ素医薬品である FQs の中からレボフロキサシン (Levofloxacin, LVFX) およびトスフロキサシン (Tosufloxacin, TFLX) をモデル化合物として調査し、フッ素を含有していないキノロン系抗菌薬であるナリジクス酸 (Nalidixic Acid, NA) と比較検討した。



線虫致死影響試験、成長・成熟・繁殖影響試験による生態影響評価を行い、さらにマイクロアレイおよび定量的リアルタイム PCR を用いた遺伝子発現解析を行った。線虫 *C. elegans* を用いて環境中への影響を評価する

ことは、その環境中で生息する生態系全体の評価につながるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 野生型線虫 (Bristol 株 N2) の L1 幼虫を使用し、生餌として大腸菌 (*Escherichia coli* DH5 FT) を用いた。各薬剤等は市販特級試薬を用いた。通常の臨床用量を使用した際のヒトにおける血中濃度を参考に暴露溶液の濃度を決定した。LVFX は、4.0-4000 μM 、TFLX は 0.977-500 μM 、NA は 7.81-500 μM の濃度範囲で各々 1% DMSO 溶液に溶解し試験液とした。対照群は 1% DMSO 溶液を暴露した。

(2) 各薬剤の *C. elegans* に対する暴露影響を成果において述べるバイオアッセイにより評価した (図 1、図 2)。

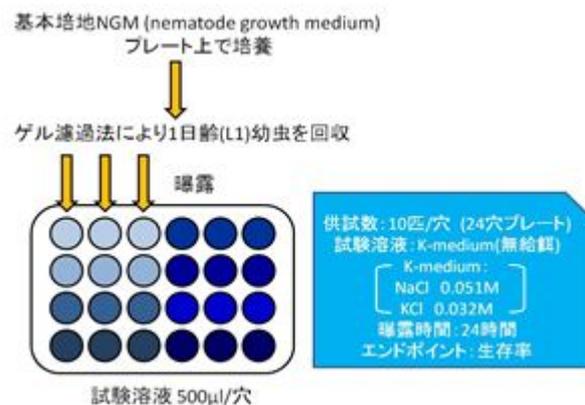


図 1 : 致死毒性試験

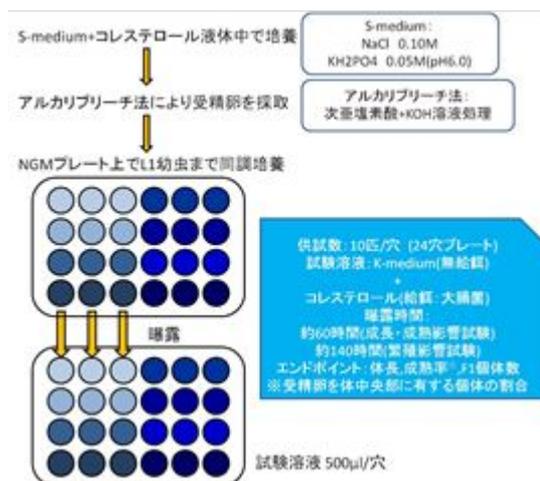


図 2 : 成長・成熟・繁殖影響試験

供試数：10 匹/（致死・成長・成熟試験）

1 匹/穴（繁殖試験）

曝露濃度：

62.5 - 4.0 × 10³ μM（LVFX の致死毒性試験）

7.81-5.0 × 10² μM（TFLX, NA 致死毒性試験、
LVFX, NA 成長・成熟・繁殖試験）

0.977-62.5 μM（TFLX 成長・成熟・繁殖試験）

曝露時間：約 24 時間（致死影響試験）

約 55 時間（成長・成熟影響試験）

産卵終了まで（繁殖影響試験）

（3）各薬剤の *C.elegans* に対する曝露影響濃度の中から下図に示した濃度について DNA マイクロアレイ解析を行った。

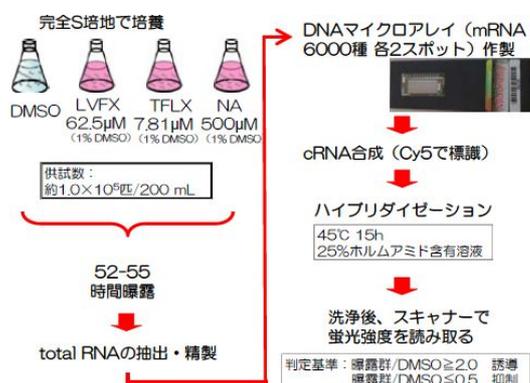


図3：DNA マイクロアレイ解析の概要

4. 研究成果

（1）まず研究代表者らは PPCPs に繁用されている合成香料である多環ムスク化合物や環境中に多く放出される有機リン系農薬等を用い線虫 *C. elegans* の致死、成長・成熟、繁殖、老化及び多世代影響を指標とした生態影響評価試験法を確立した（雑誌論文および Y. Hidaka, 他 3 名, N. Ichikawa, H. Ishibashi, N. Tominaga, K. Arizono: Effects of organophosphorus pesticides on reproduction of nematode *C. elegans*. ; 投稿中）。さらに、研究代表者らは、それを現在臨床における適正使用が課題となっている医薬品である炭酸リチウムに応用し、本バイオアッセイが医薬品の生体影響調査へも応用可能であることを示した（学会発表）。

また、研究分担者らはリチウム化合物に関する検討の中で、NCBI に公表されている線虫 mRNA 配列(32,872 種類)のうち、機能が既知としてアノテーションが存在するもののみ 6000 種を選択し、それぞれから 1 種類の 35-40 塩基長オリゴ DNA プローブ配列を設計し、CombiMatrix 社製 B3-マイクロアレイ作製機によって 12KCustomArray 社製オリゴ DNA マイクロアレイ基板上でプローブ合成した線虫 DNA カスタムチップを作製した（A. Inokuchi, 他 6 名, K. Arizono: Effects of lithium on growth, maturation, reproduction, and the gene expression of a nematode *C. elegans*. ; 投稿中）。

（2）バイオアッセイによるフルオロキノロン の *C.elegans* に対する影響評価

致死影響試験では 3 薬剤とも設定した曝露濃度範囲では影響は観察されなかった。成長試験では 3 薬剤とも設定したすべての濃度で濃度依存的な成長抑制が観察された。

成熟試験では、LVFX, TFLX 7.81 μM 以上および NA 15.6 μM 以上の濃度でコントロールと比較して抱卵が抑制された。

繁殖試験では、LVFX 250 μM, 500 μM では産卵が見られなかった（図 4）。

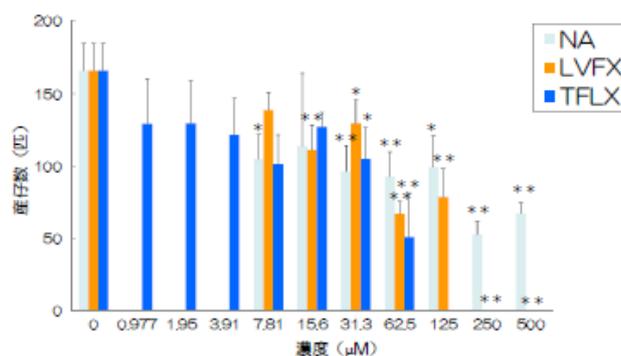


図4：繁殖試験 (*p<0.05, **p<0.01vs. control)

（3）DNA マイクロアレイ解析（表 1）

LVFX 曝露により、49 の遺伝子が有意に発現抑制され、2 の遺伝子が有意に発現誘導

された。

TFLX 暴露により、21 の遺伝子が有意に発現抑制され、14 の遺伝子が有意に発現誘導された。

LVFX, TFLX 暴露により、共通した 8 の遺伝子が有意に発現抑制された。

Gene ID	NA	LVFX	TFLX	機能・特性等 * $p < 0.05$ vs. control (青: 抑制, 赤: 誘導)
	Ratio	Ratio	Ratio	
cmd-1	0.45	0.47*	0.41*	カルシウム結合タンパク質であるカルジュモリンをコード。成長率、受精率に影響する
mlc-3	0.40	0.35*	0.49*	胚の発達や産卵に必要なとされる
lhp-5	0.35*	0.36*	0.69*	脂質やステロイドホルモンの輸送に関与
mup-2	0.34	0.00	0.45*	胚の体壁筋細胞の収縮、筋組織、細胞ポジショニングに影響。適切な成長や生殖能力に必要
col-108	0.64	0.13*	0.48*	クチクラコラーゲン
col-139	0.65	0.06*	0.33*	クチクラコラーゲン
pri-2	1.22	0.40*	0.84	初期細胞分裂、生殖細胞系の有糸分裂に必要
hsp-12.3	1.79	1.15	4.53*	ヒートショックプロテイン。耐性幼虫において寿命の延長に貢献
hsp-70	1.40	0.00	2.68*	ヒートショックプロテイン
evl-14	1.44	0.00	5.17*	体細胞分裂期と減数分裂期両方で機能し、外陰部形成、減数分裂生殖細胞の発達、胚や幼虫の生存率、受精率に影響

表 1: 各薬剤暴露による主な遺伝子の発現パターン

本研究の結果より、3 種の薬剤とも *C. elegans* の発生段階に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。LVFX および TFLX では、より低濃度から成長抑制や抱卵抑制が認められ、LVFX は高濃度暴露で完全に産卵を抑制した。これらフッ素分子を含有する 2 薬剤では NA と比較して、低濃度で成長・成熟や細胞構成およびエネルギー代謝等に多く影響を与えていると考えられた。以上の結果は、すでに報告されている PFCs 摂取による出生児体重減少・精子奇形等の影響を支持するものであるため、LVFX および TFLX 曝露による影響に構造中のフッ素分子が関与している可能性があることが推察された。

さらに、約 6000 個の遺伝子が検出可能である線虫 DNA マイクロアレイによる解析を行った結果、フッ素を含む 2 薬剤で多くの遺伝子が発現抑制された。その中には成長や発達に関する遺伝子が多数含まれていた。さらに構造上に複数のフッ素を有する TFLX ではヒートショックプロテインに関する遺伝子の特異的な誘導が観察された。現在リアルタイム PCR 等を用いて、変動が認められた個々の遺伝子に対する精査を行っている。

線虫を用いたバイオアッセイ、DNA マイクロアレイは環境汚染物質のみならず、医薬品を含む PPCPs の生態影響を調査する有用なツールとなり得ることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

著者名: Y. Hidaka, T. Mori, H. Ji, S. Kawakami, N. Ichikawa, K. Arizono、論文タイトル: The removing and discharge of

the synthetic polycyclic musk compounds in sewage treatment plant., 雑誌名: *Journal of Environment and Safety*, 査読: 有、巻: 5、発行年: 2014、頁: 27-34

[学会発表](計 3 件)

発表者名: 山本 皓介, 佐々木 優, 高瀬 友佳子, 有蘭 幸司, 一川 暢宏、発表演題: 線虫トキシコジェノミクスによる医薬品の生体影響評価 - フルオロキノロン系抗菌剤について -, 学会名等: 日本薬学会第 134 年会、発表年月日 2014 年 3 月 30 日、発表場所: 水前寺総合体育館 (熊本県)

発表者名: 高瀬 友佳子, 佐々木 優, 山本 皓介, 有蘭 幸司, 一川 暢宏、発表演題: 線虫トキシコジェノミクスによる医薬品の生体影響評価 - フッ素含有抗菌剤について -, 学会名等: 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・学術大会、発表年月日 2013 年 10 月 12 日、発表場所: 同志社女子大学 (京都府)

発表者名: 佐々木 優, 高瀬 友佳子, 井口 綾子, 有蘭 幸司, 一川 暢宏、発表演題: 線虫トキシコジェノミクスによる医薬品の生体影響評価 - リチウムの生体影響について -, 学会名等: 第 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、発表年月日 2012 年 11 月 11 日、発表場所: 島根県民会館 (島根県)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一川 暢宏 (ICHIKAWA NOBUHIRO)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号: 10380932

(2) 研究分担者

有蘭 幸司 (ARIZONO KOJI)

熊本県立大学・環境共生学部 教授

研究者番号: 70128148