

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26881003

研究課題名(和文)メタボローム解析による環境汚染物質のヒト健康リスク評価法確立

研究課題名(英文)Development of method for human risk assesment of environmental chemicals using metabolomics

研究代表者

江口 哲史(Eguchi, Akifumi)

千葉大学・予防医学センター・特任助教

研究者番号：70595826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用いたハイスループットかつ定量性に優れた血清・尿中メタボローム分析法を検討し、コホート調査など、大規模調査に適用可能な分析手法を確立した。手法確立後、コホート試料測定と並行し、臭素系難燃剤を投与したマウスの血清中メタボロームについて解析を行った。これらの結果、化学物質の曝露を反映するマーカー候補物質を複数見出した。これらはいずれもエネルギー代謝に関連するマーカーであり、難燃剤の曝露がエネルギー代謝系のかく乱に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we determine the high-throughput analytical method of ionic metabolome in serum and urine, using LC-MS/MS. The experimental values for almost target metabolome agreed well with the threshold values (coefficient of variation < 30%), indicating that the developed method might be suitable for rapid screening analysis. After the method development, we determined the metabolome analysis in serum from mice exposed to brominated flame retardant (BFRs) to identify toxicological biomarkers that characterized the exposure effects. The exposed mice showed lower levels of long-chain acylcarnitines and citrate cycle-related metabolites, and higher levels of some amino acids, long-chain phospholipids, and short-chain acylcarnitines. The change of serum metabolome profiles might be related to energy metabolism in exposed mice.

研究分野：環境分析化学

キーワード：メタボロミクス 残留性有機汚染物質 環境化学 分析化学

### 1. 研究開始当初の背景

ポリ塩化ビフェニル (PCBs), ポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDEs) に代表される残留性有機汚染物質 (POPs) は多様な生物から検出され、今なお汚染が顕在化している。これら化学物質の毒性影響として、甲状腺ホルモンをはじめとするホルモン恒常性のかく乱にくわえ、幼児期における脳神経系発達の阻害や、癌の発生率増加などが報告されている。しかしながら、これまでのヒトを対象とした研究の多くは汚染物質と甲状腺ホルモンなどの特定のバイオマーカーとの相互関係を解析した例がほとんどであり、毒性発現機序を包括的に解析した報告は限られている。

近年、細胞内に数千種類存在する低分子代謝物 (メタボローム) の解析が化学物質のリスクを包括的に解析する手法として注目されている。メタボローム解析は体液、生体組織中のアミノ酸、アミン、核酸、糖類、脂質、ホルモン類などを包括的に測定することで、主に医学・薬学の分野で疾病マーカーの探索や薬効のメカニズム解明、副作用の検索などに適用されている研究手法である。本手法は特定のバイオマーカーのみを対象とした解析とは異なり、生体内における代謝経路の変動を捉えることが可能である。

メタボローム解析をコホート調査などの疫学的手法と組み合わせ、汚染物質の曝露に起因するバイオマーカーや生体内パスウェイを特定することは化学物質曝露による未知のリスクや毒性機序を明らかにする上で有用な手法であるが、環境化学物質の曝露とメタボローム解析を組み合わせた研究は限られている。

また、疫学調査のような大規模調査においては、既存研究に比べハイスループットかつ定量性の高いメタボローム測定手法を確立する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究「メタボローム解析による環境汚染物質のヒト健康リスク評価法確立」の構想は、細胞内に数千種類存在する低分子代謝物 (メタボローム) の解析を通して有機ハロゲン化合物の曝露を反映するバイオマーカーを特定し、環境疫学・環境毒性学の端緒開拓を目指すものである。

具体的にはコホート調査により得られたヒト血清・尿中のメタボローム測定法を確立し、有機ハロゲン化合物との関係を解析することでバイオマーカーの特定を進める。さらに、バイオマーカーの機能をデータベースおよびパスウェイ解析をもちいて解析することで、有機ハロゲン化合物の毒性発現機序を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を使用した、尿・血液中

メタボロームのハイスループットな一斉分析法を検討し、コホート調査など、大規模調査に適用可能な分析手法を確立することが本研究の目的である。手法確立後、本手法を *in vivo* 試験試料やコホート試料などに適用し、有機ハロゲン化合物の曝露応答マーカーを多変量解析、機械学習により特定する。

### 4. 研究成果

分析法検討の結果、既存分析法と比較し、よりハイスループットかつ定量性に優れた分析手法を確立した。本研究では既存研究 “Yuan et al. 2012. Nature protocols 7 (5), 872” を改良し、親水性相互作用法 (HILIC) LC-MS/MS を使用した分析法確立を試みた (Fig. 1)。

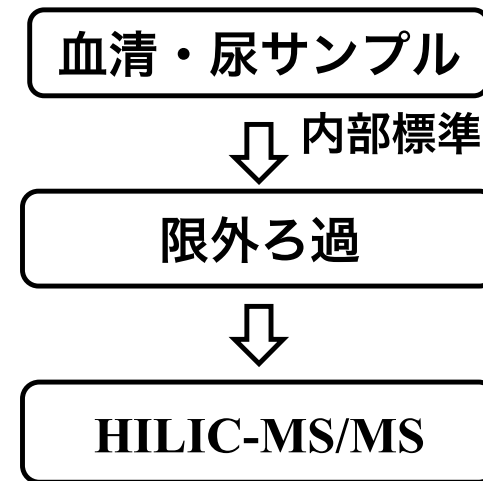


Fig. 1 測定フロー

分析法検討の結果、既存分析法と比較し、よりハイスループットかつ定量性に優れた分析手法を確立した。検討の結果、タンパク沈降等に要する時間が必要だった既存手法では、一日あたりの測定前処理検体数は 50 程度であったが、試料量の削減、サンプル希釈率の検討および前処理工程に限外ろ過フィルタによる処理を組み込むことで、一日あたりの測定前処理検体数を 100 検体程度まで増やし、スループットを高めることができた。また、検体の希釈により検出される代謝物の数が低可することが懸念されたが、本実験系においては検出される代謝物数の明確な低減は認められなかった。

また、プール尿試料を用い、繰り返し測定の再現性を  $n = 5$  で確認したところ、既存手法では目的物質 200 種のうち、約 130 種において測定値の変動係数が 30% を超過していたが、適切な内部標準物質を設定すること、前処理工程を改善することで変動係数が 30% を超過する物質を 60 種にまで抑えることに成功した。また、トリプル四重極質量分析計は一般的にメタボロミクス研究において多用される飛行時間型質量分析計に比べ、定量性に優れていることが知られている。

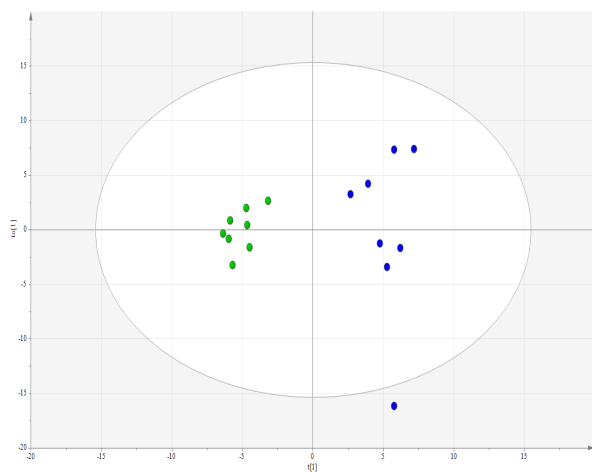
*In vitro*, *in vivo* 研究に比べ、コホート研究

や野生動物を対象とした研究においては主効果以外のさまざまな個体差要因がノイズになることが予想されるが、定量性・再現性・スループットに優れた本手法はそれら実データの解析に有用と考える。

続いて、本分析手法を疫学研究に適用する前段階として、まず臭素系難燃剤であるPBDEsを投与した仔マウス血清中におけるメタボロームの変動を解析した。PBDEsは臭素系難燃剤の中でも使用量が多く、化学構造がPCBsと類似しているため環境中に長期残留し、生態系への悪影響が懸念されている化学物質である。

PBDEsの投与は経口で行い、仔マウスより血清試料を採取した。血清試料は50 $\mu$ l使用し、Fig.1に示した測定手法で血清中メタボロームを測定した。

HILIC-MS/MSにより血清中メタボロームを測定した後、得られたデータを直交部分最小二乗法判別分析(OPLS-DA)を用いて解析した。判別モデルを作成した結果、曝露群、コントロール群の血清中メタボロームの組成から、2群を完全に判別することができた。この結果から、PBDEsの曝露により、代謝のかく乱が起きることが示唆された(Fig.2)。



**Fig.2 血清中メタボローム組成に基づくPBDEs曝露マウス(青)、コントロール群(緑)の分類**

続けて、変動したマーカー群が生体内機構のどの部分に参与しているか、パスウェイ解析を用いて検討した。解析の結果、クエン酸回路、アミノ酸代謝、脂質代謝に関わるマーカーの変動が認められ、PBDEsがエネルギー代謝系のかく乱に参与している可能性が示唆された。

PBDEs曝露の影響が懸念されている甲状腺ホルモン甲状腺ホルモン類は体内でのエネルギー代謝および脂質代謝と関連することが知られており、本実験系においてもPBDEsが甲状腺ホルモンかく乱を通じて、エネルギー代謝をかく乱した可能性が示唆された。

これまでの結果を踏まえ、現在コホート試料についてもメタボロームの測定を開始し、現在測定値と化学物質曝露の量の関係について解析を進めている。コホート研究の実験計画についてはprotocol paperとして国際誌に投稿、受理された(Sakurai et al., 2016)。コホート研究におけるメタボローム解析の結果は今後詳細な解析を進め、国際誌に投稿予定である。

また、メタボローム解析に先立って行った母子血清中の有機ハロゲン化合物母子間移行率の予測に関する研究(Eguchi et al., 2015)および、電子電気機器廃棄物処理地域住民における、有機ハロゲン化合物および代謝物と甲状腺ホルモン濃度についても国際誌へ投稿、受理された(Eguchi et al., 2015)。今後はこれらの測定において検出された化学物質濃度とメタボロームとの関係を解析し、コホート調査における母子の化学物質曝露リスクについて、詳細な解析を進める予定である。

さらに、本分析手法を有機ハロゲン化合物の毒性解明を目的とした共同研究結果も得られ始めており(学会発表参照)、今後の研究成果拡大が期待できる結果となった。

## 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 3 件)

Sakurai, K., Miyaso, H., Eguchi, A., Matsuno, Y., Yamamoto, M., Todaka, E., Fukuoaka, H., Hata, A., Chisato, M., and On behalf of the Chiba study of Mother and Children's Health group (2016). Chiba study of Mother and Children's Health (C-MACH): cohort study with omics analyses. *BMJ open*, 6(1), e010531. 査読あり

Eguchi, A., Hanazato, M., Suzuki, N., Matsuno, Y., Todaka, E., & Mori, C. (2015). Maternal-fetal transfer rates of PCBs, OCPs, PBDEs, and dioxin-like compounds predicted through quantitative structure-activity relationship modeling. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-11. 査読あり

Eguchi, A., Nomiyama, K., Tue, N. M., Trang, P. T. K., Viet, P. H., Takahashi, S., & Tanabe, S. (2015). Residue profiles of organohalogen compounds in human serum from e-waste recycling sites in North Vietnam: Association with thyroid hormone levels. *Environmental research*, 137, 440-449. 査読あり

[学会発表](計 3 件)

Hiroyuki Nishikawa, Kei Nomiyama, Akifumi Eguchi, Hazuki Mizukawa, Mayumi

Ishizuka, Yoshinori Ikenaka, Shouta M. M.  
Nakayama, Shinsuke Tanabe  
TOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF PCBS  
AND OH-PCBS IN CAT USING  
METABOLOMICS APPROACH  
International Symposium on Environmental  
Chemistry and Toxicology 2016/0319 Ehime  
University, Matsuyama, Japan

江口 哲史、宮宗 秀伸、森 千里  
Effects of Decabromodiphenyl Ether (BDE-209)  
on Serum Metabolites in Early Postnatal Mice  
環境ホルモン学会第18回研究発表会 2015年  
12月10-11日、自治医科大学、栃木県下野市

野見山 桂、江口 哲史、水川 葉月、Yoo  
Jean、高口 倅暉、山本 泰央、国末 達也、  
岩田 久人、田辺 信介  
イヌ脳中 PCBs, OH-PCBs の毒性影響評価：  
メタボロミクスアプローチ  
環境ホルモン学会第18回研究発表会 2015年  
12月10-11日、自治医科大学、栃木県下野市

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

江口 哲史 (EGUCHI, Akifumi)  
千葉大学・予防医学センター・特任助教  
研究者番号：70595826