

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：27401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04356

研究課題名（和文）イオン性化学物質の生物濃縮特性の解明と予測手法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of bioconcentration characteristics of ionic organic organic chemicals and development of a prediction method

研究代表者

小林 淳（Kobayashi, Jun）

熊本県立大学・環境共生学部・教授

研究者番号：00414368

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 7,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では有機フッ素化合物（PFAS）、医薬品のようなイオン性有機化合物を対象として、魚類への生物濃縮特性の解明、生物濃縮係数（BCF）の予測手法の開発を目的とした。ニジマスを対象に医薬品の生物濃縮実験を行い、BCF、体内半減期、呼吸器官経由の取り込み効率等を明らかにした。また、対象物質のアルブミンとのタンパク結合実験により結合定数を求め、さらにシミュレーションにより結合自由エネルギー（ G ）を推定した。PFAS・医薬品の \log BCFを G のみで説明、予測することは出来なかったが、他の説明変数を加えて機械学習を適用することで、PFAS・医薬品の \log BCFを一体的に予測する手法を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリ塩化ビフェニルのような疎水性の有機化合物はオクタノール/水分配係数の対数値（ \log Kow）を用いて生物濃縮係数（BCF）を予測する手法が確立されているが、特に界面活性剤であるPFASは \log Kowを得ることが困難なため、適切な予測手法の確立が課題であった。本研究ではPFAS、医薬品を対象とし、アルブミン等のタンパクとの結合自由エネルギーに着目して各種実験やシミュレーション、機械学習を用い、生物濃縮係数の予測手法を構築した。本手法を用いることで4700種以上あるPFASや医薬品といったイオン性有機化合物のBCFの予測が可能となり、魚類に対するPFASの暴露評価やリスク評価に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to elucidate the bioconcentration characteristics of ionic organic compounds such as per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and pharmaceuticals in fish and to develop a method for predicting bioconcentration factors (BCF). Bioconcentration experiment of pharmaceuticals was conducted on rainbow trout to clarify BCF, half-life, and efficiency of uptake via the respiratory surface. The binding constants were determined by protein binding experiments with albumin of the target substance, and the binding free energy (G) was further estimated by simulation. The \log BCF of PFAS and pharmaceuticals could not be explained or predicted only by the G values. We applied machine learning using the G and other variables and developed the method to predict the \log BCF of PFAS and pharmaceuticals in an integrated manner.

研究分野：環境化学

キーワード：生物濃縮 PFAS 医薬品 結合自由エネルギー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで生物濃縮に関する研究はポリ塩化ビフェニル (PCB) のような疎水性の有機化合物を中心に行われてきたが、ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) のような親水性の有機化合物も高い生物濃縮性をもつことが明らかとなり、世界的に研究が進められている。PFOS を含む有機フッ素化合物 (PFAS) のような界面活性剤、医薬品などのイオン性有機化合物はこれまで生物濃縮性は低いと考えられていたため、生物濃縮メカニズムの理解や生物濃縮の予測手法の構築が遅れている。当研究室では PFAS の生物濃縮性の予測に、PFAS とアルブミン等とのタンパク結合定数が説明変数として有効である可能性を示した。しかし、タンパク結合定数を用いた生物濃縮性の予測手法が前駆体や分子構造、官能基の異なる PFAS (4700 種以上) や医薬品に対しても適用できるかは不明であり、課題として残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、PFAS や医薬品のようなイオン性有機化合物の魚類への生物濃縮特性を明らかにするとともに、イオン性有機化合物に適用可能な生物濃縮係数の予測手法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 生物濃縮実験

ニジマスを対象に医薬品 10 種 (カフェイン、カルバマゼピン、クロタミトン、デキサメタゾン、ジクロフェナク、ドネペジル、フルオキセチン、ハロペリドール、ロラタジン、セルトラリン) の生物濃縮実験を実施した。ニジマス幼魚を養殖業者より購入し、2 週間馴化後に実験を開始した。水温は 14°C とし、暴露期間は 13 日間 (暴露濃度 $1 \mu\text{g L}^{-1}$)、排泄期間は 7 日間として流水式で実験を行った。生物濃縮係数 (BCF)、取り込み速度定数 (k_u)、排泄速度定数 (k_d) を求めた。

また、対象物質の肝臓における代謝速度を調べるため、OECD の試験ガイドライン Test No.319B (2018) に従い、ニジマスの肝 S9 を用いて肝代謝実験を行った。実験により得られた代謝速度 V_M をもとに肝 S9 における固有クリアランス $CL_{\text{INT, IN VITRO}}$ 、肝固有クリアランス $CL_{\text{INT, IN VIVO}}$ を求めた。また、肝クリアランス (C_{LH}) を well-stirred model に基づいて求め、 C_{LH} から魚体の代謝速度定数 (k_M) を求めた。

(2) 対象物質とタンパクとの結合親和性の評価

対象物質のアルブミンとの結合定数を求めるため、タンパク結合実験を限外ろ過法により行った。限外ろ過した対象物質の遊離態濃度を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計で測定し、タンパク結合定数 (K_A) を求めた。また、対象物質および多数の PFAS、医薬品とタンパクとの結合親和性を評価するために、ドッキングシミュレーションを Molecular Operating Environment (MOE、富士通九州システムズ) を用いて実施した。タンパク質構造データベース (PDB) よりヒト血清アルブミン (PDB ID 4E99)、ヒト肝臓型脂肪酸結合タンパク (PDB ID 3STM) を入手した。また、ニジマスのアルブミン、脂肪酸結合タンパクのアミノ酸配列を NCBI より入手し、PDB ID 4E99、3STM を鋳型としてホモロジーモデリングにより各タンパクの立体構造を構築した。ドッキングシミュレーションにより対象物質と各タンパクとの結合自由エネルギー (GBVI/WSA dG スコア) (kcal/mol) を推定した。

(3) 機械学習による生物濃縮係数の予測

機械学習を用いてイオン性有機化合物 (PFAS、医薬品) の BCF (whole body) の予測を行った。目的変数は \log BCF、説明変数は結合自由エネルギーの推定値等の 13 項目とした。なお、研究開始当初は代謝速度定数を説明変数に含める予定であったが、後述の通りほとんどの対象物質で肝臓での代謝が認められなかったため含めていない。本研究室の暴露実験で取得した BCF および既報の報告値 (Burkhard et al., 2021; Gómez-Regalado et al., 2023) を教師データ ($n = 63$)、検証データ ($n = 28$) に分割して重回帰分析、XGBoost、ランダムフォレストによる機械学習を行い、各手法の予測精度を評価した。さらに、米国環境保護庁 (US EPA) で毒性試験用に優先順位付けされた PFAS 75 種および複数の医薬品を対象に \log BCF を予測した。

4. 研究成果

(1) 医薬品の生物濃縮実験

各医薬品の BCF は 1.1 (クロタミトン) ~ 152 (ドネペジル) で物質により大きな幅があった。排泄速度定数 k_d は 0.24 (ドネペジル) ~ 1.8 day^{-1} (クロタミトン)、体内半減期は 0.38 ~ 2.9 日であった。取り込み速度定数 k_u は 1.2 (クロタミトン) ~ 72 (セルトラリン) $\text{L kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ であった。 k_u から呼吸器官経由の医薬品の取り込み効率を求めたところ 0.054 ~ 3.3% と推定され、ポリ塩化ビフェニルのような疎水性の中性有機化合物と比較して低い値を示した。また、これらの数値は既報 (Armitage et al., 2013) のイオン性有機化合物の取り込み効率の予測式で求めた値より

も低く、呼吸器経路のイオン性有機化合物の取込み効率に関して精度の高い予測式を構築する必要性が示された。本研究および文献値 (Chen et al., 2017) より得られた生物濃縮に関するパラメータと各対象物質の物性値の関係を主成分分析により解析した (図 1)。Log BCF、 $\log k_u$ は水中での対象物質の解離を考慮したオクタノール/水分配係数の対数值 ($\log D_{ow}$) と強い関連があることが示された。

PFAS・医薬品 12 物質を対象にニジマス肝 S9 を用いて代謝実験を行ったところ、ジクロフェナク、ロラタジンの 2 物質以外は統計的に有意な減少が確認されなかった。このことから、本研究で対象としている物質では肝代謝は大きく寄与しておらず、腎排出や呼吸器官など他の経路からの排出が考えられた。ヒトでは薬物代謝酵素 CYP2C9、3A4 が本研究での対象医薬品を代謝することが知られているが、ニジマスはこれらの薬物代謝酵素をもたないため、肝代謝が見られなかったと考えられる。

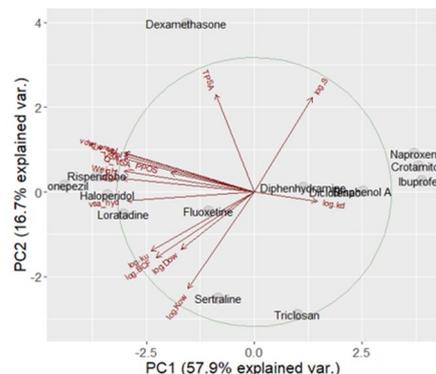


図 1 生物濃縮関連パラメータと物性値との関係

(2) PFAS・医薬品の結合自由エネルギーと log BCF の関係

PFAS および医薬品の各タンパク結合定数は 3.1×10^5 (PFHxS) から 3.1×10^6 (ドネペジル) であった。PFAS では炭素鎖の長いものほど結合定数が大きかった。つぎに、ドッキングシミュレーションで推定した結合自由エネルギーを説明変数として log BCF を推定できないか検討を行った。アルブミン (4E99 site I) に対する PFAS、医薬品の結合自由エネルギーと log BCF の関係を図 2 に示す。両物質群ともに結合自由エネルギーと log BCF との間に統計的に有意な相関 ($p < 0.05$) が認められた。しかし、同程度の結合自由エネルギーでも PFAS と医薬品では log BCF の数値に差がみられ、結合自由エネルギーのみではイオン性有機化合物全体の log BCF を精度高く推定することは出来ないことが示され、予測手法の改善が必要であることが分かった。アルブミン (4E99) site II、脂肪酸結合タンパク (3STM) においても同様の結果であった。

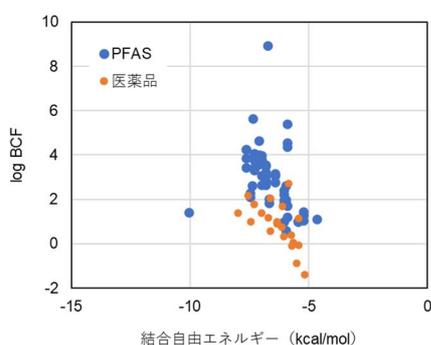


図 2 PFAS・医薬品のアルブミン (4E99 site I) との結合自由エネルギーと log BCF の関係

(3) 予測手法の構築

結合自由エネルギーなど 13 項目を説明変数として機械学習で予測した log BCF と検証データ ($n=28$) との関係を図 3 に示す。いずれの手法においてもリン酸を官能基として含む C8/C8 PFPiA が過小予測となり、検証データに対する誤差が大きくなった (標準誤差: 重回帰 1.79、XGBoost 1.57、ランダムフォレスト 1.40)。リン酸を官能基として含む物質の学習データが限られていることが主な原因と考えられ、精度向上のためにはリン酸が付加された有機フッ素化合物の実測 BCF を充実させる必要がある。重回帰分析ではカフェインが過小予測となり、医薬品類の予測精度には課題を残したが、XGBoost、ランダムフォレストを用いた場合には医薬品類にも対応出来ており、イオン性有機化合物の log BCF 予測に適した手法であると考えられた。

上記手法を用いて PFAS・医薬品 118 物質 (学習データ含む) の log BCF を予測した結果を図 4 に示す。評価対象とした物質の多くは log BCF 2 以下であると推定された。しかし、6:2 diPAP (図 4 の 92 番) 8:2 diPAP (図 4 の 93 番) のように官能基にリン酸をもつ物質は log BCF が高い可能性があることが示唆され、今後実験的に生物濃縮性を確認する必要があると考えられた。また、参考までに US EPA の CompTox に掲載されている log BCF の予測結果を図 4 に示すが、本研究の手法は CompTox と同等以上の精度で予測可能であった。

以上のように本研究ではイオン性有機化合物を対象に、タンパクとの結合自由エネルギー等を説明変数とした log BCF の予測手法を構築した。リン酸を官能基としてもつ有機フッ素化合物については今後実測データを増やし、精度向上を図る必要がある。

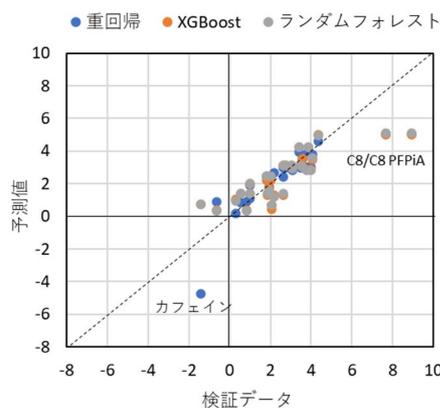


図 3 log BCF の検証用データと予測値の比較

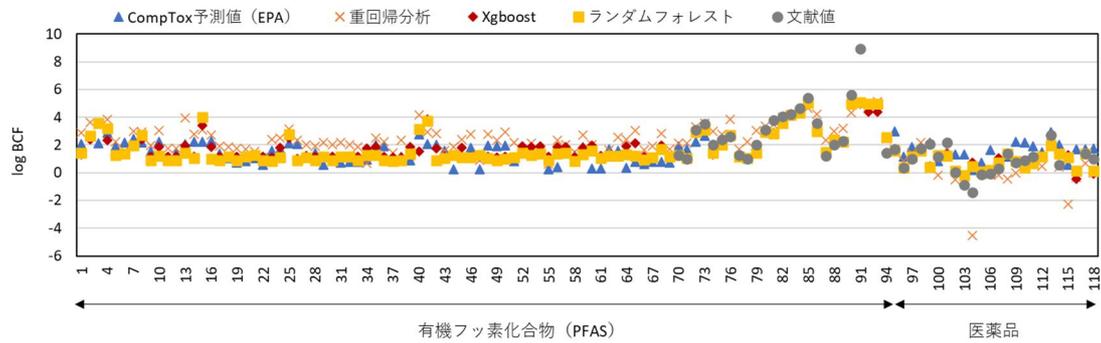


図4 機械学習の各手法により予測した log BCF の比較

< 引用文献 >

Armitage, J.M., Arnot, J.A., Wania, F. and Mackay, D. (2013), Development and evaluation of a mechanistic bioconcentration model for ionogenic organic chemicals in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32, 115–128.

Burkhard, L.P. (2021), Evaluation of Published Bioconcentration Factor (BCF) and Bioaccumulation Factor (BAF) Data for Per- and Polyfluoroalkyl Substances Across Aquatic Species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40, 1530–1543.

Chen, F., Gong, Z., Kelly, B.C. (2017), Bioaccumulation Behavior of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Adult Zebrafish (*Danio rerio*): Influence of Physical-Chemical Properties and Biotransformation. *Environmental Science & Technology*, 51, 11085–11095.

Gómez-Regalado, M.D.C., Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., Zafra-Gómez, A. (2023), Bioaccumulation/bioconcentration of pharmaceutical active compounds in aquatic organisms: Assessment and factors database, *Science of The Total Environment*, 861: 160638.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牧 隆成、上村 幸、櫻井 健郎、小林 淳
2. 発表標題 ニジマスにおける医薬品の移行動力学
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 櫻井健郎、遠藤智司、水川薫子、小林淳
2. 発表標題 パーフルオロアルキル酸化合物の海水から海産ゴカイへの移行動力学
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅田和貴、今泉圭隆、黒田啓介、三小田憲史、櫻井健郎、小林淳
2. 発表標題 G-CIEMSを用いた河川水中医薬品濃度の予測精度向上のための検討
3. 学会等名 第30回環境化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 磯本怜佳、櫻井健郎、小林淳
2. 発表標題 イオン性化学物質の生物濃縮係数とタンパク結合定数との関係について
3. 学会等名 第30回環境化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 櫻井健郎、小林淳、鈴木規之
2. 発表標題 パーフルオロアルキル酸の水圏食物網における生物蓄積挙動のモデル化
3. 学会等名 第30回環境化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林淳、磯崎涼介、櫻井健郎、水川薫子
2. 発表標題 ヒラメにおけるパーフルオロアルキル酸化合物の腸管経由の取り込み動態について
3. 学会等名 第30回環境化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 櫻井健郎、遠藤智司、小林淳、鈴木規之
2. 発表標題 パーフルオロアルキル酸代替化合物の魚における生物蓄積モデル動力学パラメーター推定の検討
3. 学会等名 第31回環境化学討論会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	櫻井 健郎 (Sakurai Takeo) (90311323)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康領域・室長 (82101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------