様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　６ 月 ２３ 日現在

機関番号：８２１０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2020
課題番号：１７Ｋ１８３４４

研究課題名（和文）ミジンコに対する化学物質の複合影響メカニズムの解明：遺伝子発現解析の活用

研究課題名（英文）Mechanism analysis of chemical mixture effects on the daphnids using gene expression analysis

研究代表者

渡部　春奈（WATANABE, Haruna）

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員

研究者番号：００６２０３９５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,500,000円

研究成果の概要（和文）：多種多様な化学物質によるミジンコへの複合影響メカニズムを解明するため、金属、医薬品、農薬等からニセネコゼミジンコ繁殖影響試験において相乗作用を示す化学物質の組み合わせを明らかにした。このうち、医薬品のデキサメタゾンとエリスロマイシン、農薬のシハロトリンとPBOの組み合わせについて次世代シーケンシングによる遺伝子発現解析を行い、前者の混合曝露時に抗酸化作用に関わる遺伝子の発現抑制などが生じていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ミジンコの慢性影響に対し相乗作用を示す曝露条件下で遺伝子発現解析を実施した例はほとんどなく、今後解析を進めることで相乗作用に特異的なシグナル伝達経路や、ミジンコに対する医薬品等の作用機序の解明につながる新たな知見が得られると考えられる。また、本研究で相乗作用を示した化学物質の組み合わせから、類似作用を持つ化学物質群の複合影響を優先的に評価するなど、化学物質評価・管理対策への貢献も期待される。

研究成果の概要（英文）：To understand mechanisms of mixture toxicity to daphnids by a wide variety of chemicals, we identified combinations of chemicals which induced synergistic effect in Ceriodaphnia dubia reproduction test from metals, pharmaceuticals, pesticides and so on. From the combinations, the daphnids exposed to pharmaceuticals, dexamethasone and erythromycin, and insecticides, cyhalothrin and PBO, were subjected to transcriptome analysis using next generation sequencing, and we found the specific gene expression in the mixture of dexamethasone and erythromycin, such as suppressed expression of genes related to antioxidant activity.

研究分野：生態毒性学

キーワード：ミジンコ　複合影響　相乗作用　遺伝子発現解析　医薬品　農薬

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　C－19、F－19－1、Z－19（共通）

１．研究開始当初の背景

(1) 水環境中の化学物質による水生生物への複合影響評価の必要性

水環境中の多種多様な化学物質は、個別には水生生物に対して影響を及ぼす濃度レベルになくても、複数同時に曝露されることで相乗的な複合影響を及ぼす可能性がある。個別物質から複合影響を予測するモデルとして、相加性に基づくモデル（濃度加算法、独立作用法）があり、この予測値より実際に混合曝露したときの実測値が上回ったとき、相乗作用が示唆されるが、多種多様な化学物質の組み合わせをすべて生態影響試験に供することはできない。

(2) ミジンコに対する化学物質の作用機序の解明

効率的な評価を行うためには、化学物質の作用機序に基づき、複合影響の作用メカニズムを理解した上で、優先評価すべき組み合わせを推定する必要がある。しかし生態影響評価に用いられている主要3生物（魚類、甲殻類、藻類）の1つであるミジンコに対し、急性影響試験において金属類などによる相乗作用が示された事例は多いが、慢性影響試験で相乗作用が示され、さらに作用機序が解明されている化学物質群はほとんどない。

２．研究の目的

そこで本研究では、ミジンコ繁殖試験において相乗作用を示す化学物質の組み合わせを探索し、曝露後のミジンコをRNA-Seq等に供し網羅的遺伝子発現解析を行う。そして各物質および相乗作用時に特異的に発現している遺伝子群やシグナル伝達経路を推定することで、相乗作用の作用メカニズムの解明を試みる。さらに、相乗作用時に特異的に発現していた遺伝子やその反応経路から、同様のメカニズムにより優先評価が必要な化学物質群を推定する。

３．研究の方法

(1) 試験物質

ミジンコ繁殖試験において相乗作用を示す化学物質の組み合わせを探索するため、相乗作用が既知または作用機序から相乗作用が懸念される2種の化学物質の組み合わせを文献調査などにより抽出した（表1）。金属類と多環芳香族炭化水素 (PAHs) の組み合わせはミジンコやヨコエビの急性毒性試験による既存研究（Mayer et al., 2015; Gauthirer et al., 2014）より選定した。PAHsとPBOまたはα-Naphtoflavone (ANF) の組み合わせは薬物代謝酵素CYPに対する作用機序から、同様に医薬品類のSulfamethoxazole (SMZ) やIbuprofen (IBP)、Ketoconazole (KTZ)、Dexamethasone (DEX)、Erythromycin (ERM) はCYP基質（CYPにより代謝）とそのCYP阻害剤の組み合わせになるよう選定した。ピレスロイド系殺虫剤のCyhalothrin (CHT) は、ピレスロイド系殺虫剤の共力剤として利用されているPBOと混合曝露した。有機溶媒を用いてストック溶液を調製する際はN,N-ジメチルホルムアミド（DMF）を用い、試験溶液への添加量は0.01% (v/v) になるように濃度設定した。

表１　試験物質の組み合わせと作用機序

試験物質 [分類用途]		**作用機序**	
物質A	**物質B**	**物質A**	**物質B**
Cu [金属]	**Cd** [金属]	酸化ストレス、メタロチオネイン誘導	
Zn [金属]	**Cd** [金属]	酸化ストレス、メタロチオネイン誘導	
Pyrene [PAHs]	**Cu** [金属]	AhRアゴニスト, CYP1A1基質	酸化ストレス、メタロチオネイン誘導
Phenanthrene (PHE)[PAHs]	**Cu** [金属]	AhRアゴニスト, CYP1A1基質	酸化ストレス、メタロチオネイン誘導
Pyrene [PAHs]	**PBO** [殺虫共力剤]	AhRアゴニスト, CYP1A1基質	CYP阻害
Pyrene [PAHs]	**α-Naphthoflavone (ANF)** [CYP阻害剤]	AhRアゴニスト, CYP1A1基質	CYP1A1阻害
Fluoranthene (FLU) [PAHs]	**ANF** [CYP阻害剤]	AhRアゴニスト, CYP1A1基質	CYP1A1阻害
β-Naphthoflavone (BNF)	**ANF** [CYP阻害剤]	AhRアゴニスト, CYP1A1基質	CYP1A1阻害
Sulfamethoxazole (SMZ)[抗菌剤]	**Ibuprofen (IBP)** [NSAIDs抗炎症薬]	ﾃﾄﾗﾋﾄﾞﾛ葉酸合成阻害, CYP2C9阻害	COX阻害, CYP2C9基質
Ketoconazole (KTZ)[抗真菌剤]	**Dexamethasone (DEX)**[副腎皮質ホルモン製剤]	エルゴステロール合成阻害, CYP2C19, CYP3A阻害	抗炎症作用, 免疫抑制作用等, CYP3A4基質
Erythromycin (ERM)[抗生物質]	**DEX** [副腎皮質ホルモン製剤]	タンパク質合成阻害, CHY3A4基質・阻害	同上
PBO [殺虫共力剤]	**Cyhalothrin (CHT)** [ﾋﾟﾚｽﾛｲﾄﾞ系殺虫剤]	CYP阻害	Naチャネルモジュレーター

(2) ニセネコゼミジンコ繁殖試験

ニセネコゼミジンコ（*Ceriodaphnia dubia*）を用いた繁殖試験は、生物応答を用いた排水試験法（検討案）（排水 (環境水) 管理のバイオアッセイ技術検討分科会, 2014）に準拠し、約6日間の産仔数から最大無影響濃度（NOEC）とX%阻害濃度（ICx）を対数ロジスティック法により求めた。複数の曝露条件を同時に試験するため、連数を10から適宜5～8に減らして実施した。

(3) 等効果線図法と濃度固定法

各物質の単体試験結果に基づいて物質Aと物質Bの濃度比を5通り程度設定し（例えばA: B = 1:0, 0.75:0.25, 0.5:0.5, 0.25: 0.75, 0:1）、各混合濃度比のICx（IC25またはIC50）を算出して

等効果線図（図 1）を作成した。物質 A と B が類似作用であり、濃度加算性が成り立つ相加作用を示す場合、等効果線は傾き-1 の直線（相加直線、y=1-x）に、これより左下側に等効果線がプロットされる場合は相乗作用、右上側に等効果線がプロットされる場合は相殺作用であることを示す。等効果線図を作成するには各濃度比（5 程度)×3～4 濃度区＋対照区の 16～21 試験区を同時に試験する必要があるため、予備試験として、相加直線上の濃度区の組み合わせ、すなわち 2 物質の TU=各濃度/IC50 の和が 1 になるように、TU 換算で、3/4:1/4、1/2:1/2、1/4:3/4 と異なる濃度比で 2 物質を混合して曝露する試験も行った。

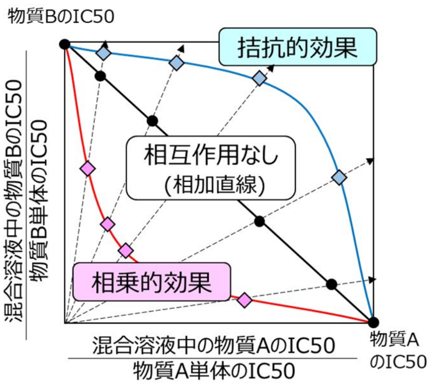

図 1　等効果線図

さらに 2 物質のうち物質 A を無影響濃度レベルに固定して、物質 B の濃度を変化させて混合曝露する濃度固定法で、①A：抗生物質の Erythromycin (ERM) と B：抗炎症薬の Dexamethasone (DEX)、②A：殺虫剤用共力剤の PBO と B：ピレスロイド系農薬の Cyhalothrin (CHT) の組み合わせについて混合曝露試験を行った。

(3) RNA-Seq による遺伝子発現解析

(2)において相乗作用を示した曝露条件とその濃度で各物質単体に曝露したミジンコから Total RNA を抽出しマクロジェンジャパンに委託して RNA-Seq（Illumina 社製, NovaSeq6000, ペアエンド, リード長 101 bp）を実施した。TruSeq stranded mRNA Library（Illumina 社製）を用いたライブラリー調整には各サンプル 1 μg 以上の Total RNA が必要であるが、ニセネコゼミジンコ成体から得られる Total RNA は 1 個体あたり 0.2～0.5 μg 程度と少なく、通常の試験（1 試験区 10 個体）の供試数では十分量が得られない恐れがあったため、相乗作用が示された条件で大容量ばく露試験（1 ビーカーあたり 150 mL に対し 10 匹曝露、1 試験区 n=4）を実施し、各試験区（対照区、各単独ばく露区、混合ばく露区）当たり 30 匹程度をプールして RNA 抽出を行った。これを 3 試験行い、繰り返し 3 として次世代シーケンシングに供した。得られたデータは国立遺伝学研究所データ解析拠点 Cell Innovation の Maser 等を用いて解析を行った。ニセネコゼミジンコは参照ゲノム情報が登録されていないため、Trinity により de novo アセンブリ後、Bowtie によりマッピングし、eXpress により発現量を算出した。また Uniprot に対する blastx を行い、各コンティグのアノテーションを付与し、edgeR 等を用いて発現比較解析を行った。

４．研究成果

(1) 金属類の複合影響

金属類同士の組み合わせについて、Cd に対し Cu と Zn をそれぞれ混合してニセネコゼミジンコ繁殖試験を実施し、等効果線図を作成したところ、Cd と Zn は相殺作用を示したが、カドミウムと銅は相乗作用を示した。これらの傾向は急性毒性試験による既存研究（Mayer et al., 2015）に一致しており、生物リガンド等との競合による生物利用性に関わるメカニズムで説明できる可能性がある。すなわち、Zn は Cd より生物リガンド（ミジンコ）への結合性が強いため、生物への取込が Cd から相対的に毒性の弱い Zn に置き換わることで毒性が弱くなったと推定される。一方、Cu は Cd より有機物リガンド（図 2 の DOC）との結合性が強く、Cu が有機リガンドを優先することによって、相対的に毒性の強い Cd のフリー態の割合が上がり、生物リガンドへの結合量（生物取込量）が増えたことで毒性が強くなったと考えられる。

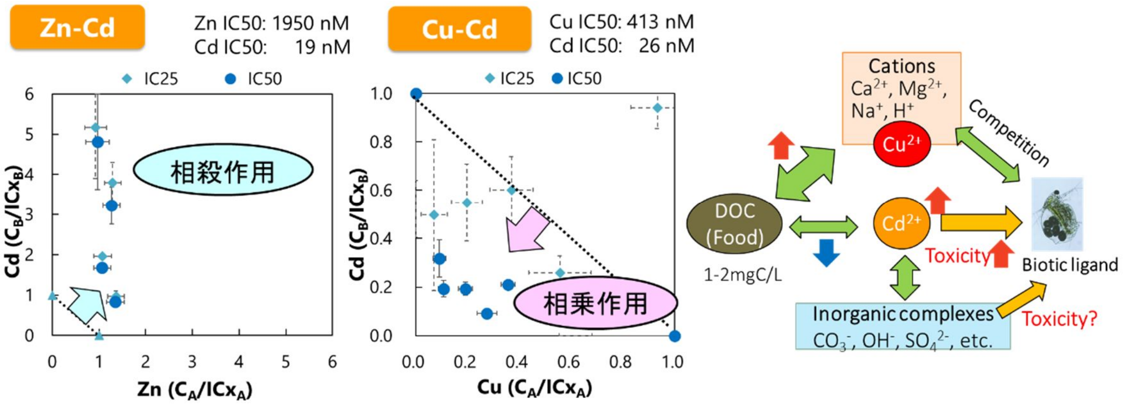

図 2　金属類の等効果線図と生物利用性のメカニズム仮説

(2) 多環芳香族炭化水素類の複合影響

多環芳香族炭化水素（PAHs）の Phenanthrene (PHE) と、金属類（Cu, Cd, Ni）の組み合わせによるヨコエビへの相乗作用について既報（Gauthirer et al., 2014）があることから、同じ PAHs の Pyrene と Cu の組み合わせによるミジンコ繁殖試験を実施した。等効果線図を作成するための予備試験として、2 物質の TU = 各濃度/IC50 の和が 1 になるように、TU 換算で、3/4:1/4、1/2:1/2、1/4:3/4 と異なる濃度比で 2 物質を混合し、各単独物質と同時に試験した。2 物質が相乗作用を示す場合は阻害率 50%以上を示すことが期待されたが、阻害率は 50%よりやや小さく、相加性かやや相殺よりの傾向を示すことが分かった。PHE と Cu の組み合わせも同様に相加性を示した。

次の候補として PAHs の代謝に CYP 酵素が関与していることから、Pyrene と CYP 阻害剤の Piperonyl butoxide (PBO) を組み合わせて同様に予備試験を行ったが、明確な相乗作用は示されなかった。PAHs は魚類等においては AhR 受容体経由で毒性が発現し、CYP1A1 によって代謝されるため、CYP1A1 の阻害剤である α-Naphthoflavone (ANF) との組み合わせで相乗作用が生じると推定されている（Billiard et al., 2006; Hodson et al., 2007）。そこで Pyrene および FLU に対し、ANF を組み合わせて等効果線図を作成したところ、相加または相殺傾向が示された（図 3）。また、ゼブラフィッシュの胚仔魚期短期毒性試験において相乗作用を示した β-Naphthoflavone（BNF、CYP1A1 誘導）と ANF の組み合わせについても相加作用に基づく予測値とほぼ一致し、相乗作用は示されなかった（図 3）。

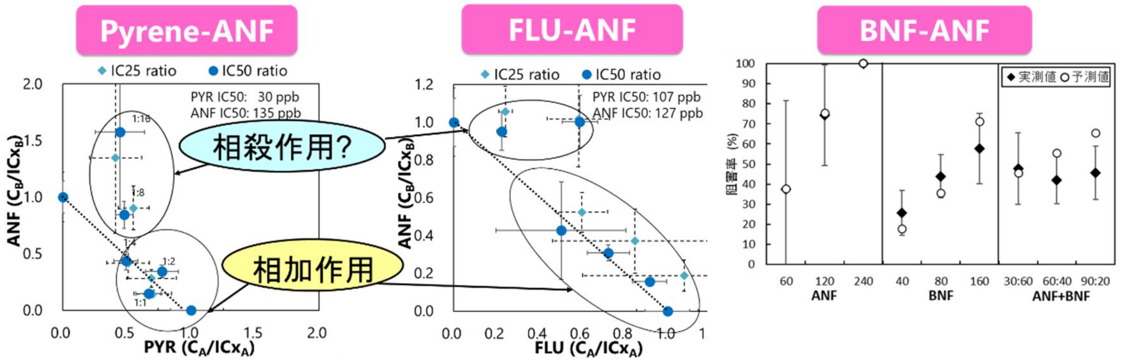

図 3　PAHs との混合曝露試験結果

(3) 医薬品類の複合影響

医薬品について、CYP による代謝とその阻害の組み合わせから、NSAIDs 抗炎症薬の Ibuprofen（CYP2C9 で代謝）と抗菌剤の Sulfamethoxazole（CYP2C9 を阻害）を混合ばく露し、等効果線図を作成したところ相乗作用は示されなかった（相殺傾向）。同様に副腎皮質ホルモン製剤の Dexamethasone（DEX, CYP3A4 で代謝）と抗真菌剤の Ketoconazole（KTZ, CYP3A を阻害）の組み合わせで相乗作用を期待したが、TU による予備検討では相加傾向を示した。ミジンコが持つ CYP の種類は脊椎動物等とは異なり、その機能の類似性は完全に解明されていないことから、期待される効果が得られなかったと考えられる。

DEX に対し、同じく CYP3A 阻害剤の Erythromycin (ERM, CYP3A) と混合曝露し等効果線図を作成したところ、一部の濃度比でのみ相乗傾向を示した（図 4 左）。相殺傾向を示した濃度比では、ERM 自体の毒性が高くなってしまうため、CYP による代謝阻害の影響が見えにくくなっていると考えられた。そこで ERM 濃度を単独では影響のない 25 mg/L で固定して、DEX と共曝露したところ、DEX 単独曝露区と比べて毒性が増加した（図 4 右）。この結果は独立作用を仮定した複合影響モデルによる予測値より大きく、相乗傾向が示されたと言える。

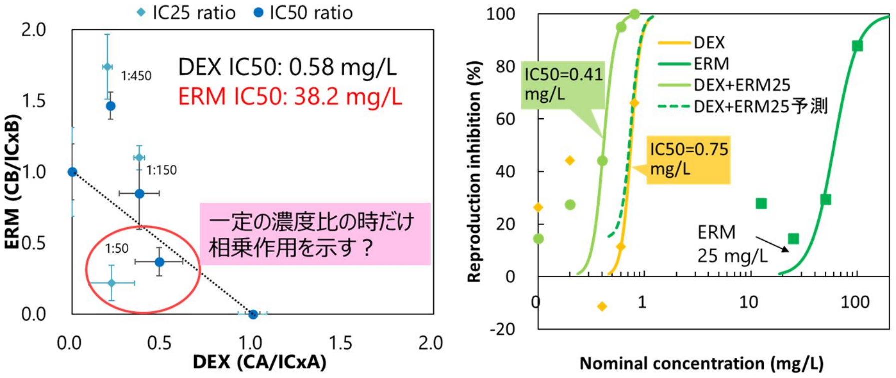

図 4　Dexamethasone (DEX) と Erythromycin (ERM) の等効果線図（左）および濃度固定法による混合曝露結果（右）（DEX＋ERM25 試験区の横軸は DEX 濃度、点線は独立作用を仮定した予測による影響曲線）

ERM と同じマクロライド系抗生物質のクラリスロマイシンやレキシスロマイシンなども、DEX と同様にして共曝露すると相乗作用を示す可能性があり、今後の検証が必要である。

(4) 農薬類の複合影響

ピレスロイド系農薬のシハロトリン(CHT)と殺虫剤用共力剤のピペニルブトキシド（PBO）の組み合わせは、CYP によるピレスロイドの解毒を PBO が阻害することでミジンコに対し相乗作用を示すことが知られている（Wheelock et al., 2009)。CHT は低濃度でミジンコに致死影響があり（単体 LC50 = 0.5～1.0 µg/L)、加えて有機溶媒中の安定性が低いことから濃度区の設定が難しく、等効果線図法では明確な相乗傾向はみられなかった。しかし、(3)の DEX＋ERM と同様に、PBO を無影響レベルの 50 µg/L に固定して共曝露したところ相乗作用が示された（図 5)。

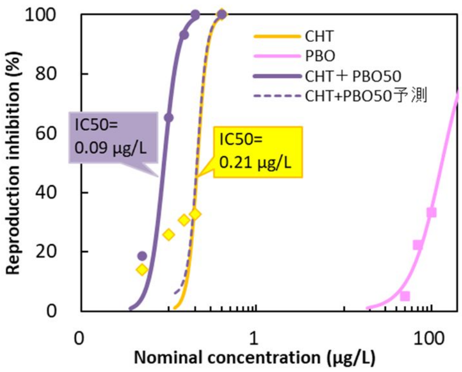

図 5　CHT＋PBO 固定混合曝露試験結果

(5) RNA-Seq による遺伝子発現解析

(3)(4)より濃度固定法で相乗作用を示した①DEX＋ERM、②CHT＋PBO について、RNA-Seq 用の Total RNA を抽出するため、大容量試験を実施した。①は対照区 (Control)、ERM (25 mg/L)、DEX (0.4 mg/L)、MIX (ERM 25 mg/L + DEX 0.4 mg/L)、②は助剤対照区 (DMF)、PBO (50 µg/L)、CHT (0.05 µg/L)、MIX (PBO 50 µg/L + CHT 0.05 µg/L) の試験区について RNA-Seq に供した。各サンプル 4.0～5.5 Gb の十分な量のデータが得られ、Q30 は約 95%でありクオリティも十分であった。Trinity による De novo アセンブリの結果、①の N50 は 4109 bp、マップ率は 75～84%程度であった。

DEX＋ERM の Control、DEX、MIX について edgeR を用いて発現変動解析を行った結果、試験区間で発現に差のある遺伝子（FDR-adjusted p value < 0.1 かつ Fold change >2 の基準を満たす遺伝子）は見つからなかった。これは図 6 の発現プロファイルに示すように、試験区間より Replicate 間の差が大きかったことが原因であると考えられる。本 RNA-Seq における Replicate は独立した試験から得ており、すなわち試験間の差が大きいことを意味する（特にクラスター解析によると試験 3 の傾向が異なっていた)。同一試験内で比較すると、試験 1 では Control に対し DEX で発現が増加または低減した遺伝子（FDR-adjusted p value < 0.001 かつ Fold change >2）のうちアノテーション情報が得られたものは 540 遺伝子、Control と MIX では 734 遺伝子、DEX と MIX では 777 遺伝子見つかった。DEX と MIX で発現が異なる 777 遺伝子のうち、試験 2 と 3 でも同様な発現変動があった遺伝子に絞り込むと 37 遺伝子となり、酸化ストレスを引き起こす活性酸素種 ROS を分解する Superoxide Dismutase（SOD）や Peroxidase の遺伝子発現が MIX で低減していたことが分かった。他にも MIX では脂質輸送に関わる遺伝子の発現抑制や外骨格クチクラに関わる遺伝子の発現増加がみられた。DEX は糖質コルチコイドであり、ヒトにおいては抗炎症作用や免疫抑制作用、代謝の調節（血糖上昇、タンパク質分解促進、脂肪分解促進、血圧上昇）など全身に影響を及ぼすが、ミジンコにおいてどのような作用をもたらすか現時点では分かっていない。今後は DEX および ERM それぞれの関連遺伝子について精査するとともに、MIX で特異的に発現または抑制されていた遺伝子に関わるシグナル伝達経路との関係、さらに遺伝子発現から繁殖影響へ至るパスウェイについて解明していきたい。

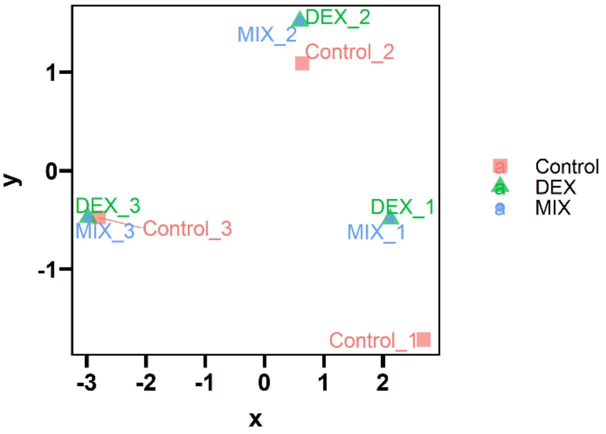

図 6　DEX＋ERM 試験の発現プロファイルの NMDS プロット

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　2件）

１．発表者名 Watanabe H., Abe R., Hiki K., Yamamoto H.
２．発表標題 Can we predict synergic effect of chemicals to daphnids based on current knowledge of chemical mechanism of action?
３．学会等名 SETAC North America 40th Annual Meeting（国際学会）
４．発表年 2019年

１．発表者名 Haruna Watanabe, Mana Noguchi, Hiroshi Yamamoto, Norihisa Tatarazako
２．発表標題 Chronic toxicity of binary mixture of cadmium, copper, and zinc to the daphnids (Ceriodaphnia dubia)
３．学会等名 PRIMO 19（国際学会）
４．発表年 2017年

１．発表者名 渡部春奈、野口愛、山本裕史、鑪迫　典久
２．発表標題 ニセネコゼミジンコ繁殖試験における金属類（Cd-Cu、Cd-Zn）の相乗または相殺影響
３．学会等名 第23回日本環境毒性学会研究発表会
４．発表年 2017年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立環境研究所ニュース39巻、化学物質の複合影響をどう評価するか、http://www.nies.go.jp/kanko/news/39/39-6/39-6-05.html

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
研究協力者	日置　恭史郎 (HIKI Kyoshiro)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・研究員 (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