

令和 2 年 6 月 27 日現在

機関番号：57102  
研究種目：挑戦的研究（萌芽）  
研究期間：2018～2019  
課題番号：18K19884  
研究課題名（和文）AOPによる環境毒性学発展のための基盤形成研究

研究課題名（英文）Study on AOP analysis for ecotoxicology

研究代表者

富永 伸明（TOMINAGA, NOBUAKI）

有明工業高等専門学校・創造工学科・教授

研究者番号：30227631

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：AOPを環境毒性学の取り入れるための基盤となる試行的な研究をメダカおよび有機フッ素化合物をモデルとして行った。化学物質暴露のメダカの発生に対する影響をin silico,in vitro,in vivo系で評価した結果、有機フッ素化合物は親和性を持つ特異的なレセプターに作用する可能性があり、細胞に対する急性毒性は低い、細胞内の多くの遺伝子の発現に影響し、発生に悪影響を及ぼし、奇形を引き起こすことが明らかになり、そのメカニズムを基にしたAOPの構築が環境化学物質の生体影響評価および管理に有用であることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代社会生活に化学物質は切り離せない。実際に使用され、環境中に放出される化学物質は増大する一方であるが、ほとんど生物影響評価がされていない。毒性影響に関連した毒性発現メカニズムから評価し、数百のパスウェイに分類・評価・管理する方向に向かっている。本研究で得られた成果は、環境化学物質の発生影響が分子、遺伝子発現、形態レベルで評価可能であることを示すものであり、環境毒性学においてもAOPによる評価・管理が有効であることを示すものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated the effects of perfluoro organic chemicals (PFCs) on medaka embryogenesis. As results of in silico and in vitro analyses, some PFCs may bind and act the specific receptors. By in vivo analyses, they did not have acute toxicity to cells, but affected gene expression. Then malformation was occurred through embryogenesis disruption. These results indicated that the construction of AOP based on that mechanisms is useful for the evaluation of biological effects and management of environmental chemicals.

研究分野：環境影響評価管理学

キーワード：AOP 有機フッ素化合物 メダカ胚 高電界パルス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現代社会生活に化学物質は切り離せない。実際に使用され、環境中に放出される化学物質は増大する一方であるが、ほとんど生物影響評価がされていない。その理由として、従来から生体および生態系を考慮した化学物質の評価には動物実験が必要であり、費用がかかるだけでなく、動物愛護の観点からも毒性試験は減らすことが望まれていることがある。そこで、毒性影響に関連した生物学的応答や活性変化に基づいたエンドポイントを用いた複数の *in vitro* 試験系を組み合わせ、毒性発現メカニズムから評価し、さらに、数千種の化学物質を毒性発現のメカニズムに基づいた数百のパスウェイに分類・評価・管理する方向に欧米、OECD は向かっている。

しかし、実際には薬理活性が期待された化合物等を除くと作用機序が明確にされていないことが多い。特に環境毒性学で問題とされる環境化学物質において有害影響と初期応答のキーイベントの関係が明確になっている経路は極めて少なく、ホルモン活性等のレセプターが介在した経路などわずかししか使用可能な AOPs はない。環境中に存在する化学物質は極めて多いことから、環境毒性学の観点からも、AOP を取り入れた化学物質の評価は有用であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、モデル生物(メダカ胚)を用い有害影響の起点となる化学物質暴露による初期の遺伝子発現変動と発生段階おける異常および催奇形性を有害影響として、関連性を明確にする方法を確立し、環境毒性分野への AOP 解析を導入するための基盤形成を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、化学物質として有機フッ素化合物 (PFCs) を評価対象とした。

- (1) *In silico* 解析は、ヒト PPAR $\alpha$  の結晶構造を基にメダカ PPAR $\alpha_1$ , 2 および PPAR $\gamma$  の立体構造を予測し、PPAR $\alpha$  作動性とされる PFCs 17 種について 3 種のドッキングシミュレーションを実施し、相互作用および親和性について検討した。
- (2) *In vitro* 解析は、メダカ PPAR $\gamma$  の LBD を用いた two-hybrid assay を行った。また、メダカ肝細胞由来の培養細胞 DIT129 を用いた細胞毒性試験を行った。
- (3) *In vivo* 解析は、メダカ胚に浸漬法および高電界パルス法で PFOA, PFOS を導入し、致死毒性、発生毒性、催奇形性を評価した。また、暴露後のメダカ胚における遺伝子発現の変化を RNA シークエンスによるトランスクリプトーム解析で調査した。

### 4. 研究成果

(1) ヒト PPAR の結晶構造をモデルに得られたメダカ PPAR 結晶モデルは RMSD 値が 0.78 Å と算出され、良好なモデルが構築できたと考えられた。そのモデルを用いて 3 種のドッキングシミュレーションを行った結果、Induced fit 法の結果が、炭素数との相関性が良いことが分かった (Fig. 1)。メダカ PPAR $\alpha_1$  が  $\alpha_2$  よりエネルギー値が極小化していることから、親和性が高いと考えられる。また、PFOS の結合安定性が最も高いことが分かった。一方、PPAR $\gamma$  は、PPAR $\alpha$  に比べ全体にエネルギーが高いことから親和性は低いことが予想された。また、Induced fit 法では、炭素鎖数に依存した安定化傾向がみられるが、他の方法では逆の傾向が見られる結果であったことから、Induced fit 法による解析が有効であると考えられる。

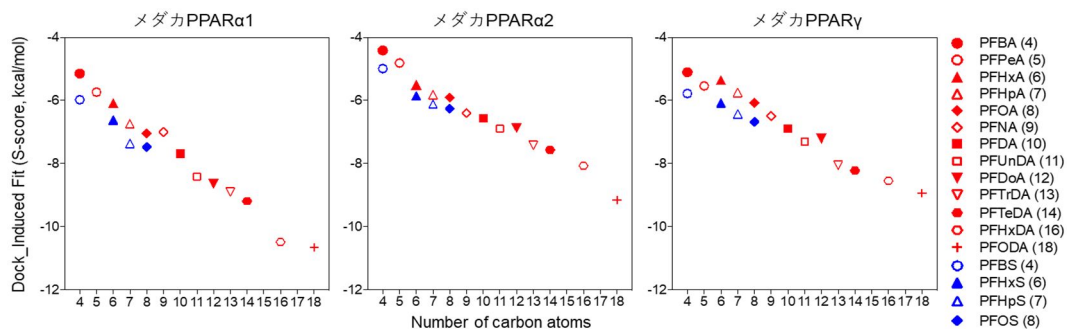


Fig. 1 PFCs と PPARs のドッキングシミュレーション

(2) PPAR $\gamma$  の two hybrid assay は、CV-1 細胞にプラスミド (pBIND-olPPAR $\gamma$  LBD(GAL4 融合)) をトランスフェクションして行った。非チアゾリジン系ヒト PPAR $\gamma$  パーシャルアゴニストである nTZDpa は、100 $\mu$ M で有意な転写活性化が認められた (Fig. 2)。PFOA 処理は、メダカ PPAR $\gamma$  を介した転写活性化は見られなかったが、PFOS 処理により有意差は認められなかったが、100 $\mu$ M で転写活性の促進が認められた (Fig. 3)。このことは、*in silico* での結果を支持するもので、PFCs は PPAR $\gamma$  に対する作動性は弱いと考えられる。現在、PPAR $\alpha$  のアッセイ系はプラスミドを構築した段階であるが、比較検討を行う予定である。また、メダカ肝細胞 DIT219 に対す

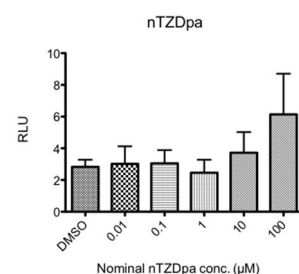


Fig. 2 nTZDpa の転写活性化

る細胞毒性試験では Cell counting kit による比色法で測定したが、PFOA、PFOS とともに 100 $\mu$ M まで急性の細胞毒性を示さなかった (Fig. 4)。

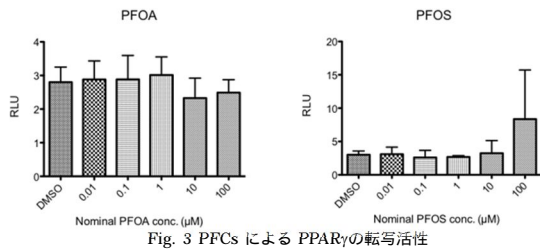


Fig. 3 PFCs による PPAR $\gamma$  の転写活性

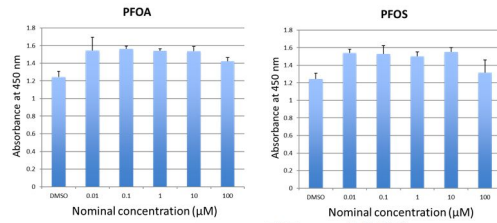


Fig. 4 メダカ肝細胞 DIT129 の急性毒性

(3) *In vivo* 暴露は、浸漬および高電界パルス法による導入の 2 つの方法で行った。両方の暴露方法において PFOA、PFOS とともに 200 $\mu$ M まで急性の致死毒性は認められず、*in vitro* の細胞系で行った急性毒性試験と同様の結果が得られた。

浸漬暴露群において PFOA、PFOS は 200 $\mu$ M で孵化率の有意な減少が観察され、発生異常を起こした個体の急激な増加が認められた (Fig. 5, 6)。発生異常が起こった個体には Fig. 7 に示すように頭部や尾部が壊死したような状態になった。このことは、PFOA、PFOS とともに界面活性作用があるが、暴露初期はほとんど浸透しないことから、個体の形成はある程度進んだものの、長時間の浸透暴露を行っている間に高濃度群では胚内部に浸透した物質により組織の壊死が引き起こされてしまったと考えられる。これらの個体は孵化することはできなかった。

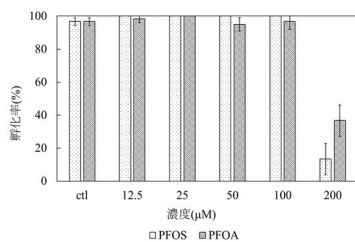


Fig. 5 PFCs 暴露の孵化率に対する影響

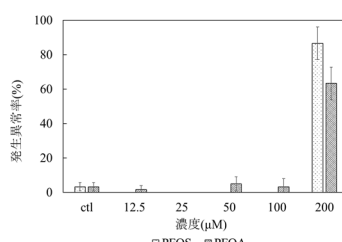


Fig. 6 PFCs 暴露による発生異常率

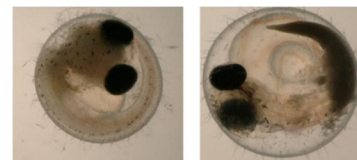


Fig. 7 PFCs 浸透暴露による発生異常個体

一方、高電界パルス法暴露群は、初日に 1 度導入するだけであるが、200 $\mu$ M PFOA 死亡率 3.3%、孵化率 90%、奇形率 23.3%であった。孵化率は高かったが、奇形の発生率も高かった。発生の途中で致死および孵化できない個体は Fig. 8 に示すように目や体の形成に異常をきたした個体が存在した。このことは、浸漬暴露時発生異常は発生が進行した後に体の一部あるいは広い範囲で細胞死が起こったが、高電界パルス導入は発生初期に PFCs に暴露されることにより、細胞の分化誘導に異常が起こり、奇形が発生していると考えられる。このことは、高電界パルス法による物質導入は、化学物質の発生影響を評価するために有効な物質導入法であることを示すものである。

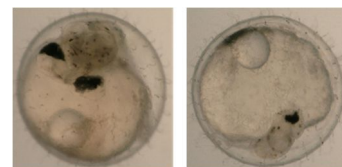


Fig. 8 PFCs 高電界パルス暴露による発生異常個体

種々条件下で PFOS および PFOA 暴露した 3 日齢、6 日齢胚、仔魚のトランスクリプトーム解析を行った。暴露により、多くの遺伝子の発現変動が確認された。PFOS、PFOA を高電界パルスで取り込ませた 6 日齢胚における RNASeq データのパスウェイ解析結果を Table 1 に示す。黄色で示す 4 つのパスウェイは両物質で共通に変動しているが、他にも特異的に変動しているパスウェイが認められることから、PFCs に共通したシグナルだけでなく、物質特異的なシグナルがあることが示唆された。また、PFOA に高電界パルス法と浸漬法で暴露した仔魚において共通して認められた発現変動上位の遺伝子について変化率を比較すると、高電界パルス法の方が浸漬法よりほとんどの遺伝子の発現変動が大きいことが分かった (Table 2)。

本研究課題において PFCs の *in silico*, *in vitro*, *in vivo* のメダカを用いた評価を行ったが、*in silico*, *in vitro* に相関性が認められ、今後、*in vivo* のフェノーム、トランスクリプトームとの関連性を明確にすることで環境毒性学 AOP が構築できると考えられた。

Table 1 PFCs 暴露による発現変動遺伝子のパスウェイ解析 (6 日胚)

100mM PFOS	200mM PFOA
ola04130:SNARE interactions in vesicular transport	ola00240:Pyrimidine metabolism
ola01100:Metabolic pathways	ola04130:SNARE interactions in vesicular transport
ola04150:mTOR signaling pathway	ola00052:Galactose metabolism
ola04068:FoxO signaling pathway	ola01100:Metabolic pathways
ola02010:ABC transporters	ola04150:mTOR signaling pathway
ola00750:Vitamin B6 metabolism	ola04910:Insulin signaling pathway
ola00030:Ribose phosphate pathway	ola03022:Basal transcription factors
ola00280:Valine, leucine and isoleucine degradation	ola04068:FoxO signaling pathway
ola00562:Inositol phosphate metabolism	ola03060:Protein export
	ola00561:Glycerolipid metabolism

Table 2 暴露方法による遺伝子発現変動影響の相違 (仔魚)

Gene name	fold change		Gene name	fold change	
	Pulse+	Pulse-		Pulse+	Pulse-
kfh-b	14.37	6.19	psttip1b	-8.77	-7.27
rasip1	9.24	6.19	utp3	-8.77	-3.63
skap2	9.24	6.19	dnph1	-9.74	-8.07
KDM4C	8.21	8.67	kctd1	-9.74	-4.04
COQ8A	7.19	9.91	slc7a9	-9.74	-4.04
rbms2a	7.19	4.95	TOM1L2 (1)	-10.72	-4.44
cabp2a	6.16	4.95	hcrtr2	-11.69	-3.88
chpfa	6.16	4.95	nr4a3	-12.66	-3.5
pdia5	6.16	4.95	slc6a17	-12.66	-5.25
sppl3	6.16	4.95	gstk1	-13.64	-11.3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaguchi A, Uchida M, Ishibashi H, Hirano M, Ichikawa N, Arizono K, Koyama J, Tominaga N	4. 巻 242
2. 論文標題 Potential mechanisms underlying embryonic developmental toxicity caused by benzo[a]pyrene in Japanese medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 12543-12550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125243">https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125243</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内田雅也, 富永伸明, 石橋弘志, 平野将司, 小山次郎, 有園幸司
2. 発表標題 環境化学物質の生物影響評価におけるAOP解析の必要性
3. 学会等名 第25回日本環境毒性学会研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋弘志, 内田雅也, 平野将司, 有園幸司, 富永伸明
2. 発表標題 ヒメダカ胚・仔魚におけるマイクロRNAの発現解析
3. 学会等名 第25回日本環境毒性学会研究
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋弘志, 平野将司, 内田雅也, 久保田彰, 石橋康弘, 富永伸明, 有園幸司
2. 発表標題 ヒメダカ胚に対するエクインエストロゲン類のin silico及びin vivoエストロゲン様作用
3. 学会等名 第22回日本環境ホルモン学会研究発表会
4. 発表年 2019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	平野 将司  (HIRANO Masashi)  (20554471)	熊本高等専門学校・拠点化プロジェクト系先端研究コアグループ・准教授   (57403)	
研究 分担者	石橋 弘志  (ISHIBASHI Hirosho)  (90403857)	愛媛大学・農学研究科・准教授   (16301)	