

課題名 RF-0909 実環境の複合汚染評価を目的としたトキシコゲノミクス解析法の開発と現場への適用に関する研究

課題代表者名 宇野 誠一（鹿児島大学水産学部海洋資源環境行く研究センター 准教授）

研究実施期間 平成21～23年度

累計予算額 9,900千円（うち23年度 3,250千円）
予算額は、間接経費を含む。

研究体制

- (1)メタボロミクスによる影響評価法の確立に関する研究（鹿児島大学）
- (2)トランスクリプトミクスによる影響評価法の確立に関する研究（愛媛大学）

研究概要

1. はじめに（研究背景等）

現在、世界では年間数千にも及ぶ化学物質が作られている。これまでの環境汚染研究ではある特定の物質について、その環境動態や生物影響を調べるという手法が取られてきた。しかし現在のように多種多様な化学物質が地球上に存在し、実環境に放出される危険性がある状況で、個々の化学物質の環境動態や生物影響を調べるには限界が来ている。近年、我が国では厳格な規制が功を奏して、主たる環境汚染物質の汚染レベルは非常に低い状況にある。反面、個々の化学物質は無影響濃度未満であっても、そのいくつか複合的に生物に作用して悪影響を及ぼす複合影響が懸念されるようになってきた。現在の化学物質の影響評価は主として生物の致死が指標として用いられているが、今の日本の環境中では化学物質が生物を死に至らせるような濃度で存在することは特殊な場合を除いて考えにくい。しかし、ごく微量で死に至らないまでも生物に何らかの影響を与えたり、複合的に化学物質が存在して初めて生物に影響を与える、などの事象は一般環境でも十分起こり得る。またその影響がこれまで未知の症状である可能性もある。このような状況に対応するためには従来の致死を指標とした影響評価法では不十分であり、今後は鋭敏に影響をとらえ、複合影響にも適用可能で、症状を網羅的に検出可能な新たな影響評価法の開発が急務である。

トキシコゲノミクスは遺伝子、タンパク質、代謝物などの変動を網羅的に検出して、生体機能の変化や特定の臓器や組織が受けた影響などを詳細に解析する手法である。中でもトランスクリプトミクスは遺伝子を対象とするが、近年の発展はめざましいものがある。数万種類の遺伝子の発現レベルを精度良く検出でき、魚類などにも適用され、毒性学や免疫学などに応用されている。メタボロミクスは代謝物を対象とするが、トキシコゲノミクスの中でも最も未発達な手法である。魚類の適用は少なく、さらに環境汚染物質影響評価法としての適用例はほとんどない。現在の技術では一般の研究施設で調べることができる代謝物はせいぜい数十程度で、得られる情報も少ない。しかしメタボロミクスは遺伝子情報を必要とせず、また、生物に現れる症状をもっとも良く表現できる手法として注目されている。メタボロミクス、トランスクリプトミクスとも従来の毒性影響評価法よりも何倍も感度良く生体内毒性影響が見出せ、複数の臓器に毒性影響が同時に起こった場合でも、それらの毒性影響を網羅的に見出せる可能性が高い。メタボロミクスとトランスクリプトミクスにはそれぞれ欠点もあるが、両者の手法を併せて毒性影響評価を行えばそれらの欠点の多くを互いにカバーでき、分子メカニズムを念頭に置いた網羅的かつ定量的な化学物質の複合影響評価を感度良く、しかも迅速に行える可能性を秘めており、また化学物質の複合影響評価などにも有効なツールとなり得ると期待されている。

2. 研究開発目的

本研究では実験魚として非常に扱いやすく、これまでの毒性影響評価法でも一般的に用いられているヒメダカを用いて、研究を進めていった。そして上記の状況を踏まえ、①メタボロミクスとトランスクリプトミクスを同時に行い、これらの手法を用いた複合影響評価の方法を確立すること、さらに、②実環境の環境診断を①で確立した評価法を用いて行うために礎となるデータの構築とシステムを作ることを目的とした。これまでのトキシコゲノミクスでは機能が未知な遺伝子発現や代謝物変動の情報は利用されないのが一般的であるが、我々の研究グループでは、機能に関する情報が得られていない遺伝子や代謝物であっても、それらの変動はそのときの生物が受けた外部刺激に対する応答反応であると考え、変動した全ての遺伝子および代謝物のデータから応答の大きさ（数値化）とその生物学的意義を推定する手法の構築を目指し、この手法を用いて化学物質の複合影響評価に適用することを試みた。

さらには①で確立した手法を用いて、実際の海底質が生物にどの程度の影響を与えるかという汚染影響評価を行い、その影響度を数値で表して影響度比較を行うことを達成目標とした。ここでは実際の現場で汚染評価を行うのではなく、発想を転換して、「現場を実験室に持ってくる」という考えをもとに、実際の海底から採取した底質を実験室に持ち込み、底質に含まれる化学物質を全抽出して暴露を行うという手法を試みた。これにより、天候などの自然に由来する各地の条件の違いを排除した同一条件下で影響評価を行うことができ、さらにコントロール（対象）区と暴露区の比較も容易に行うことが可能になる。

3. 研究開発の方法

（1）サブテーマ（1）と（2）の共通事項

本研究では、メタボロミクスおよびトランスクリプトミクスの両結果を照らし合わせながら評価法を確立していくという手順を取った。両試験の間の誤差をなるべくなくすため、本研究ではほとんどの試料をサブテーマ（1）と（2）でシェアして解析を行った。よって、以下に両サブテーマでの共通する部分の方法を記した。

1) 絶食および低温暴露試験(平成21年度)

平成21年度はヒメダカに与える影響が全く異なると考えられる、絶食および低温暴露という2つのストレスを単独あるいは複合的にヒメダカに与えて、それぞれの影響がメタボロミクスおよびトランスクリプトミクスによってどのように見出せるかを検証した。本試験ではサンプルを得るまでは同様の手法を取った。本試験では1週間餌を飽食に与えて25℃の水温で飼育するコントロール区、1週間水温は25℃に保つが餌を全く与えない絶食区、1週間飽食に餌を与えて25℃で飼育を行うがそれから付加的に1日だけ10℃の低温下におく低温区、1週間絶食区と同条件で飼育した後付加的に1日だけ10℃の低温下におく絶食・低温区をそれぞれ設け、ヒメダカを採取した。採取した個体から肝臓を摘出し、メタボロミクスおよびトランスクリプトミクス解析に供した。

本試験の主たる目的は、①本研究の暴露試験は絶食下で行うため、絶食自体の影響を把握すること、②全く異なったストレスに複合的に暴露されたときに、本研究で用いる解析法が影響をどのように表現できて、さらにどのように定量化できるかを検証すること、③②で得られた結果、およびさらに絶食および低温に対するヒメダカの影響をさらに詳細に解析した結果から具体的にヒメダカ体内の代謝にこれらのストレスがどのような影響を与えたかを検証する、等である。

2) フェナントレンおよびピレンの単独または複合暴露試験(平成22年度)

平成22年度は多環芳香族炭化水素類(PAHs)の一種のフェナントレンおよびピレンを対象物質とした。PAHsは複数個のベンゼン環から構成される物質の総称である。PAHsは物質間でベンゼン環の数と構造がわずかに異なるだけであり、それぞれのPAHsの生物影響はほぼ共通していると考えられているが、PAHsによる複合影響に関してはほとんど調べられていない。本研究では、PAHsの中でも水環境から比較的高濃度で検出されるフェナントレンおよびピレンを暴露物質として選択した。ヒメダカ稚魚に対して毒性試験を行い、両物質の暴露濃度を設定した後、メタボロミクスおよびトランスクリプトミクス解析のための暴露試験を行った。本試験では1回の暴露試験を行ってそこから採取したヒメダカ試料をテーマ(1)と(2)でシェアした。

フェナントレンの5(フェナントレン低濃度区)および50(フェナントレン高濃度区) $\mu\text{g/L}$ 、ピレンの3(ピレン低濃度区)および30(ピレン高濃度区) $\mu\text{g/L}$ 、フェナントレン5 $\mu\text{g/L}$ +ピレン3 $\mu\text{g/L}$ (複合低濃度区)およびフェナントレン50 $\mu\text{g/L}$ +ピレン30 $\mu\text{g/L}$ (複合高濃度区)のそれぞれの暴露水槽を用意し、そこに生後1ヶ月のヒメダカを投入して96時間暴露した。同時にコントロール区と溶媒のエタノールだけを添加した溶媒区も設けた。サンプリングは暴露直前、24、96時間に行い、メタボロミクスおよびトランスクリプトミクス解析に供した。

ここでの主たる目的は、①影響が類似しているストレスの複合影響を、本研究で確立する解析法でどのように表現でき、どのように定量化できるかを検証する、②類似した影響をヒメダカに与えると考えられるフェナントレンとピレンの複合暴露を行ったときに、単純に複合暴露の影響の度合いが大きくなるだけなのか、それとも全く異なった影響が見出せるか、などを中心に詳細に両者の代謝物暴露がヒメダカにどのような影響を与えるかを検証する、等である。

3) 実環境における生物影響評価～野外地底質抽出物の暴露試験(平成23年度)

平成23年度は、21年度から22年度に検討、確立してきたメタボロミクスによる解析方法を用いて、実際に環境から採取された海底質の影響評価を試みた。底質を採取した地点は人口密集域に近接していて、様々な化学物質が底質中に残留していると考えられる大阪湾とフィリピン スービック湾である。風乾した底質をアセトン/ヘキサン(1:1)およびトルエンにより抽出液を得た。この抽出液を合わせ、ロータリーエバポレータで乾固した後、残渣に1 mLのアセトンを加えて抽出液とした。本試験ではこの抽出液を底質からの全抽出物を含むものとして扱った。まず、メタボロミクス解析のための暴露試験(本試験)の暴露濃度を決定するために、数段階の濃度を用意して、ふ化後2.5週齢のメダカ稚魚を20個体ずつ入れ、72時間の毒性試験を行った。上記抽出液から、等倍、5倍希釈、25倍希釈、125倍希釈した溶液をそれぞれ用意した。1Lの試験水に抽出物濃度を1g 底質/L相当量になるように抽出液0.1 mLを添加したもの(等倍希釈)を初めとして、この濃度よりも5、25、125倍希釈した試験水をそれぞれ用意して毒性試験を行い、その結果から大阪湾、スービック湾ともに等倍希釈(1 g底質/L)およびその25倍希釈(0.04 g底質/L)の濃度でそれぞれ本試験を行った。暴露は24時間行った。また、コントロールと溶媒のアセトンのみを添加した溶媒区も設けた。本試験でも1回の暴露試験から得られた試料をテーマ(1)と(2)でシェアした。暴露試験終了後得られたサンプルはメタボロミクスおよびトランスクリプトミクス解析に供した。

本試験の主たる目的は、海底質の全抽出物をヒメダカに暴露して、①その影響の地域間差などが検出できるか、②実環境レベルの汚染評価に本研究で確立した方法は適用可能か、などを中心に検証した。

(2) メタボロミクスによる影響評価法の確立に関する研究の解析方法

各ヒメダカを個体ごとにマイクロチューブに収容し、そこにクロロホルム/メタノール/水混合溶液(1:2:0.8, v/v/v)を加えて、直径5 mmのジルコニアボールを入れ、高速振とう粉碎器により6分間振とうして代謝物を抽出した。その後、12000gで5分間遠心分離して、メタノール/水相を採取した。液体を乾固し、代謝物をメトキシム化、さらにトリメチルシリル化した。この誘導体化物をGC/MSに導入し、スキャンモードによりメダカ肝臓中の代謝物を測定した。得られたクロマトグラムからAMDIS(Ver. 2.69, NIST)によりピークの重なりなどを調べて、S/N比が15以上のピークを選別した。全ての定量可能ピークから定量に最適だと考えられるイオンを1つずつ選び、この面積値を求めた。この面積値を内部標準物質ピーク面積で普遍化した。得られたデータをまず個々のピークごとに一元配置分散分析(ANOVA)により処理して、各群間で有意差($p < 0.05$)があるものを選別した。さらに、選別された代謝物のデータを主成分分析(PCA)により処理した。

(3) トランスクリプトミクスによる影響評価法の確立に関する研究の解析方法

ヒメダカ試料をトリゾール試薬(インビトロジェン(株))に浸漬し、全RNAを抽出した。抽出したRNAはDNase処理を行った後にRNeasy Mini Kit(キアゲン)を用いて精製した。全RNAにOne Color Spike Mix(アジレントテクノロジー(株))を加えた後、Quick Amp Labeling Kit(アジレントテクノロジー(株))を用いて相補的RNA(cRNA)を合成・増幅し、cRNAをCy3で蛍光標識した。Cy3標識されたcRNAは精製した後に36,460プローブからなる 4×44 のマイクロアレイに 65°C で17時間ハイブリダイズさせた。その後、マイクロアレイを洗浄し、DNA Microarray Scanner(アジレントテクノロジー(株))によりスキャンした。画像データを基に各プローブの蛍光強度を数値化し、GeneSpring GX 7.3(アジレントテクノロジー(株))により正規化および対数変換した。全ての検体で共通して検出可能であったプローブのみを選択し、グループ間の遺伝子発現の変動を調べた。

本研究で用いたマイクロアレイに搭載されたプローブが検出する遺伝子に関する情報は、それぞれの塩基配列を基に実施した相同性検索(BlastX)より得た。また、それぞれの遺伝子に対してBlast2GOを用いて生物学的プロセスの遺伝子オントロジーのターム(GO term)を付加し、各遺伝子産物の機能情報を得た。定量可能であった遺伝子の全データを用いて、24時間および96時間暴露試料においてそれぞれ暴露群とコントロール群すべてを対象として、等分散を仮定しないANOVAを行った。処理区間で有意差($p < 0.05$)が検出されたプローブのみを選別し、これらのプローブから得られたデータのみを主成分分析(PCA)に投入した。主成分1(PC1)あるいはPC2依存的に発現が変動した遺伝子をスクリーニングした後、有意に影響を受けている生物学的プロセスの遺伝子オントロジーをフィッシャーの正確確率検定によって検出した。

4. 結果及び考察

本研究では概念自体がわかりにくいメタボロミクスおよびトランスクリプトミクスの2つのオミックスの手法から得られたデータを数値化するために、コントロール区とストレスを加えた区の間で代謝物量および遺伝子発現に差があったものをANOVAによって選別した。ここで各区間に差があったものだけを選別したのは、次に行うPCA処理を行う際に、各区の違いをよりデフォルメすることが主目的である。ANOVAで処理した後、PCA処理を行った。ここでPCAを行った際には、一般的には主成分1(PC1)が最も影響の特徴を表しており、次にその影響の特徴を示すものが主成分2(PC2)として表現される。このPC1とPC2の2つの数値を平面にプロットすると、影響の大きさの視覚的判別が容易になる。すなわち、平面上でストレス暴露区のプロットがコントロール区のプロットから大きく離れれば離れるほど、その影響は大きいことになり、コントロール区とあまり大差ない場所、あるいはごく近い場所にプロットされた場合はその影響がほとんど無い、あるいはごく小さいということを意味する。これらのコントロールからの距離はその影響の大きさを示している。このようにデータをPCAにより示し、さらにコントロールとの距離=影響の大きさという概念で本研究では影響の大きさを数値化した。

(1) メタボロミクスによる影響評価法の確立に関する研究
1) 絶食および低温暴露試験(平成21年度)

1) 絶食および低温暴露試験(平成21年度)

PCAで処理した結果から得られたPC1とPC2をプロットしたものを図1に示す。それぞれの同一区ではごく近い場所に群を形成し、さらに4つの群はそれぞれ明らかに異なった位置に分布した。すなわちコントロール区から見ると絶食区はPC1の正の方向に、低温区はPC2の負の方向に離れて分布した。また、絶食-低温区は絶食区および低

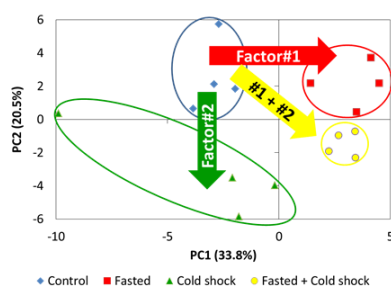


図1 メタボロミクス解析より得られたコントロール区、絶食区、低温区、および絶食-低温暴露のPCA解析結果

温区のベクトルの和にあたる位置の近辺に分布した。

2) フェナントレンおよびピレンの単独または複合暴露試験（平成22年度）

本研究では単独および複合暴露ともに低濃度と高濃度の間には10倍の暴露濃度差を設けたが、メタボロミクスにより影響解析を行ったところ、フェナントレンとピレンの単独および複合暴露ともに、濃度依存的な影響の差異は見られず、それはPCA解析の結果でも判別することができなかった（図2）。24時間の時点における代謝物データをPCAにより解析したところ、PCA解析によってフェナントレンとピレンの影響の差異もほとんど見られなかった。このことは両暴露の影響が非常類似していることが原因であると考えられたが、PC1方向に大きく広がるような分布を示した。このことからPC1が単独影響を示すものと考えられた。また、複合暴露は溶媒区および単独暴露区と比較するとはPC2の方向に離れて分布した。これは複合暴露区が単独暴露区とは多少異なった影響を受けていた可能性を示唆するものである。96時間の時点ではフェナントレンとピレン単独暴露区はPC2方向で分離をしており、フェナントレンの影響がピレン暴露区よりも多少強い可能性を示した。また、複合暴露群はPC1方向に離れて分布する傾向を示したが、24時間ほどクリアな分離を示すものではなく、絶食の影響が疑われた。

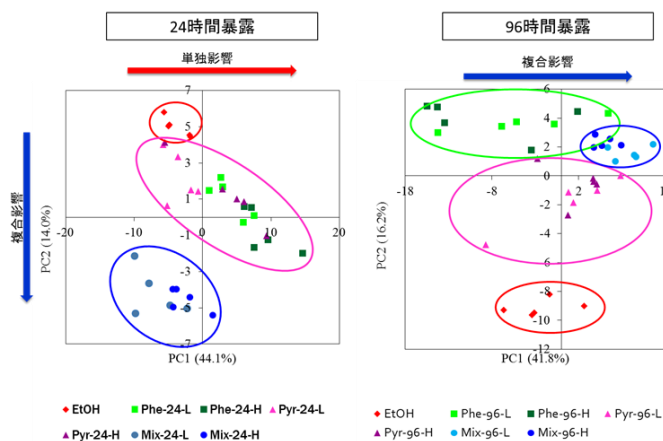


図2 フェナントレンとピレンの単独および複合暴露から得られた代謝物データのPCA解析結果

今回のフェナントレンとピレン、それぞれがヒメダカに与える影響は類似していると考えられるが、作用機序が似ている場合の複合影響を我々が行ったANOVA→PCA解析による影響評価では単独暴露は暴露物質が異なってもほぼ同じベクトル上に示されると考えられる。そして、これらが複合して暴露されたときには2つのパターンが考えられ、その1つは個々の単独暴露のベクトルと同じ方向に位置し、そのベクトルの大きさのみが変化するものであり、もう1つはベクトルの方向が単独暴露とは全く異なって向く場合である。前者は類似している暴露物質故に影響が単純に増強されるパターンであり、後者は両者の暴露物質の生物に与える影響が類似していても複合暴露により、単独暴露のときとは全く異なった影響を与えるパターンである。今回の24時間の時点でのフェナントレンとピレンの複合暴露群はPCA解析の結果、コントロール（溶媒区）と比較するとPC2の方向に位置し、単独暴露群はPC1方向に分離する傾向をみせたために、後者に当てはまるパターンであると言える。

3) 実環境における生物影響評価～野外海底底質抽出物の暴露試験（平成23年度）

暴露試験を行う前に、底質抽出液の72時間での急性毒性試験を実施したところ、スービック湾で採取した底質の抽出液を等倍で添加した区（1 g底質/L相当）で75%の致死率がみられた。また、大阪湾にて採取した底質の抽出液では致死影響は観察されず、大阪湾の底質に含まれる化学物質は致死影響をエンドポイントとした場合、ヒメダカに与える影響はスービック湾よりも相対的に低いことが明らかとなった。図3に底質抽出物に暴露後、代謝物データからPCA解析を行った結果を示した。その結果、コントロールに対してPC1方向に各群が離れていく傾向を示した。このことからPC1がヒメダカの受けた影響を示すと判断して、このPC1のみをピックアップして平均値を求め、グラフにしたものが図3右図に示したものである。その結果、PC1は大阪湾とスービック湾の底質抽出物ともに5倍希釈の方が25倍希釈の抽出液暴露区よりも大きく、濃度依存的に影響が現れていることを示していた。また、大阪湾とスービック湾を比較するとスービック湾の25倍希釈抽出液を暴露したものが、大阪湾の5倍希釈のものと同程度の影響を受けていたと考えられた。また24時間の時点では、大阪湾の25倍希釈液はほぼヒメダカの代謝には影響を与えていないと考えられた。これらの結果は上述のメタボロミクス解析のための暴露試験前に行った毒性試験の結果と一致していたが、メタボロミクスの感度は致死を指標とした毒性試験と比較すると25倍以上の感度があると考えられた。

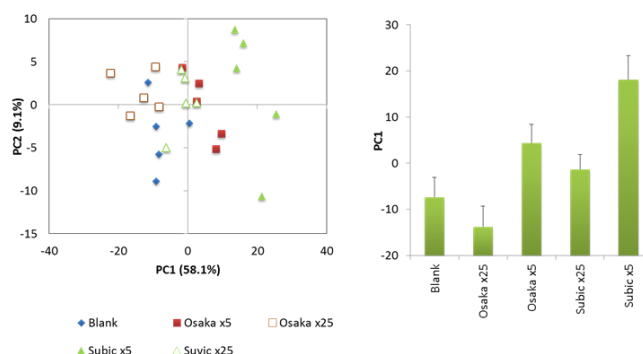


図3 大阪湾およびスービック湾底質抽出物に暴露したときに得られた代謝物データをPCA解析したもの（左図）と、PCAからPC1の値をピックアップして示した図（右図）

(2) トランスクリプトミクスによる影響評価法の確立に関する研究

1) 絶食および低温暴露試験(平成21年度)

マイクロアレイ実験より、絶食あるいは低温刺激によって発現量に変化した遺伝子群のデータをPCAに供し、各個体におけるPC1およびPC2スコアを得た(図4)。PCAの結果、対照区、低温刺激区、絶食区、絶食+低温刺激区の4群はそれぞれ個別のグループを形成し、PC1が低温刺激の影響を、PC2が絶食による影響を明確に反映した。低温および絶食の複合ストレスを与えた区は、PC1およびPC2の両方に得点を獲得、単独ストレスによる影響と分離された。以上のことから、絶食に対するメダカの生体応答は低温刺激に対するそれとは大きく異なっており、それぞれ独立していると考えられた。また、絶食と低温刺激の両方のストレスを受けた個体においては、それぞれのストレスに対する応答が同時に起こっていると推察された。

2) フェナントレンおよびピレンの単独または複合暴露試験(平成22年度)

フェナントレンおよびピレンを単独または複合で24時間または96時間暴露したメダカ稚魚における遺伝子発現プロファイルデータをもとに主成分分析を行った(図5)。24時間暴露の結果、フェナントレンまたはピレンの単独暴露を受けた個体は、PC2に沿って対照区の個体とは分離され、PC2のスコアは単独のPAHsによる影響を反映しているものと考えられた。フェナントレンに暴露された個体とピレンに暴露された個体が分離しなかったことから、両化合物による影響は類似していると推察された。また、両化合物ともに低濃度区と高濃度区が分離しておらず、濃度依存的な影響は相対的に弱いと考えられた。一方、フェナントレンとピレンの複合暴露を受けた個体はPC1に沿って他の処理区の個体とは分離され、PC1のスコアが複合影響を反映していることが明確に示された。複合暴露区においても低濃度区と高濃度区が分離しておらず、濃度の違いによる影響の差異は小さいと考えられた。96時間暴露試験では、24時間暴露試験ほど処理区間の隔離が明確ではなく、PC1がおそらくは複合影響を反映していると考えられたが、PC2が何を反映しているかを現時点では断定することはできなかった。

3) 実環境における生物影響評価～野外海底質抽出物の暴露試験(平成23年度)

暴露試験の結果、PC1(37.8%)に沿って各区の個体が分離されたため、各処理区のPC1スコアの平均値を求めた(図5)。その結果、PC1のスコアは対照区、25倍希釈区、5倍希釈区の順に濃度依存的な変化を示した。大阪湾とスービック湾を比較したところ、スービック湾の5倍希釈抽出液を暴露した個体のPC1スコアが対照区から最も離れており、スービック湾の25倍希釈区と大阪湾の5倍希釈区がほぼ同レベルであった。このことから、スービック湾の抽出液に対する生体応答の方が大阪湾の抽出液に対するそれよりも大きく、スービック湾の底質に含まれる化学物質の方が総量として生態影響ポテンシャルは高いことが推定された。この結果は、先に実施した急性毒性試験から得られた毒性ポテンシャルの評価結果と一致していた。したがって、本研究にて構築した複合毒性の評価手法は環境試料の生態影響評価にも適用可能であり、致死毒性のような急性毒性が発現するよりも25倍以上低濃度であっても、その毒性ポテンシャルを推定するのに有効であることが示された。

(3) サブテーマ1および2から得られた結果のまとめと複合影響の解釈

ここまで述べてきた通り、本研究にて我々が用いたPCAをベースとした代謝物および遺伝子の解析手法は、二種類の環境ストレスに対する応答をそれぞれ検出したにとどまらず、両方のストレスを受けた個体においてはそれぞれのストレスに対する応答が同時に起こっていることを明確に捉えることを可能とした。本実験で採用した絶食や低温刺激のように作用機序が大きく異なることが予

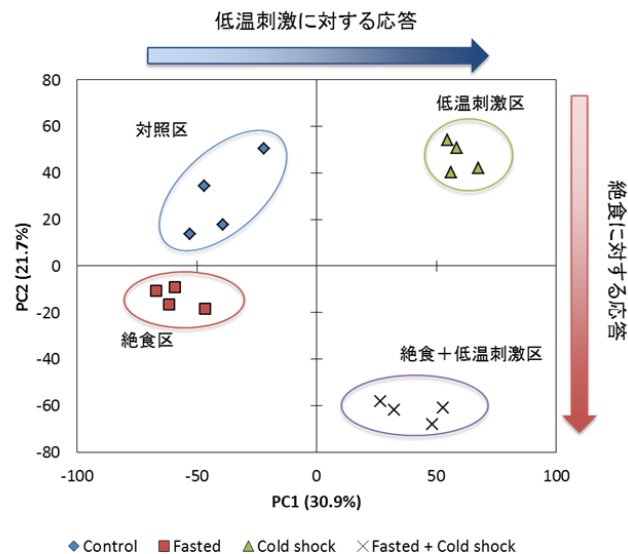


図4 絶食および低温刺激によって変動した遺伝子群の発現量データを用いた主成分分析の結果

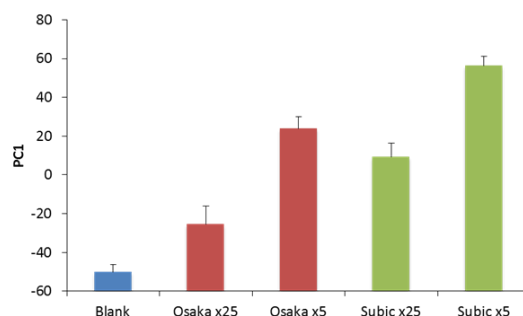


図5 各底質抽出液の暴露区における遺伝子発現プロファイルの変化から求めた第一主成分のスコア

想されるストレスの組み合わせの場合は、PCAにてそれぞれの影響が異なる次元に反映され、複合影響はその和として表すことが可能だろうと思われる（図6）。また、本実験で用いたフェナントレンとピレンは化学的特性が類似しているため、これらの生物への作用機序には共通点が多いと考えられる。実際に本研究のメタボロミクスおよびトランスクリプトミクスのPCAの結果でも、フェナントレン単独暴露区とピレン単独暴露区の個体は分離せず、同一のグループに属すると見なされた。このとき、単独暴露区は対照区に対してPC2方向に分離された一方で、複合暴露区はPC1方向に分離された。以上のことから、作用機序が類似している複数の環境ストレスを与えた場合、各成分の影響は類似しているため同一の次元で表現され、複合影響として特異的に検出される応答は単独影響とは異なる次元で表現されると仮説を立てた（図7）。

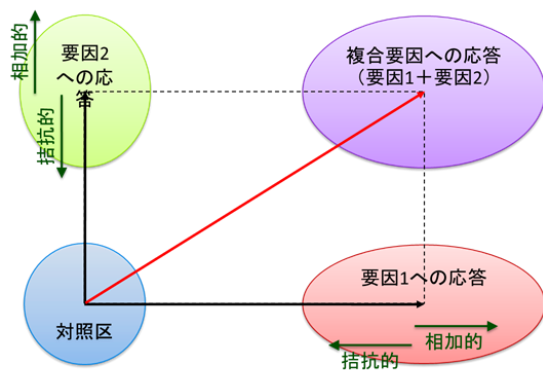


図6 主成分分析をベースとした解析法による作用機序が独立している場合の複合影響の表現

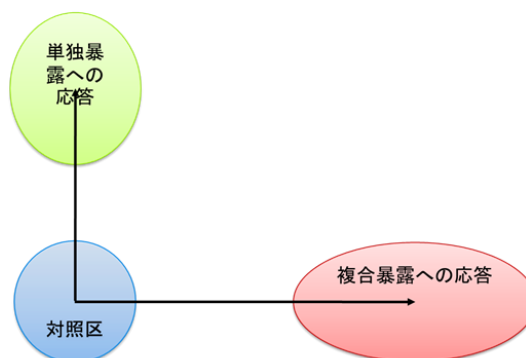


図7 主成分分析をベースとした解析法による作用機序が類似している場合の複合影響の表現

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

本研究により複合的なストレスを受けたメダカにおける生体影響を、PCAを基本としたオミックスデータの解析法によって、単独のストレスによる影響とは分離して評価することが可能となった。これまでに雌雄差を反映した遺伝子群の検出や、単独のストレスによって発現量が変化する遺伝子群の検出にPCAが用いられることはあったが、複合影響の検出に応用したのは本研究が初めてである。本試験で与えたような絶食と低温刺激のように作用機序も影響も異なることが予想されるストレスを組み合わせた場合、PC1とPC2がそれぞれ単独の影響を反映し、複合影響はPC1とPC2の両スコアの和として表現された。しかしながら、化学的性質が類似したフェナントレンとピレンを暴露した試験においては、それらの化合物の挙動や影響に共通性が多く見られることは容易に予想可能であり、実際に両化合物単独暴露による影響はPC2のみに反映されており、それぞれの化合物の影響は分離されなかった。一方で、複合暴露による影響はPC1に投射され、明らかに単独暴露による影響とは区別された。さらに、本手法を実環境中から採取した底質試料中に含まれる化学物質暴露に対する応答の検出に応用したところ、致死影響が現れるよりも遙かに低濃度であっても生体応答を検出でき、その応答の大きさは致死影響を指標とした時の毒性ポテンシャルと比例関係にあった。つまり、現状では致死影響あるいはそれに準ずるエンドポイントでしか複合毒性は評価されていないが、本手法を用いることで、より高感度で複合毒性を検出することが可能となったと言える。このように本手法は、我々が最終目標として掲げている実環境中に存在する汚染物質の複合影響評価および影響度の数値化のために大いに貢献すると確信している。

PAHsの単独暴露による影響に関する知見は比較的多く存在するが、複合影響に関する知見は乏しい。本試験では、単独暴露区ではまったく影響を受けていなかったアミノ酸代謝や解糖系、コラーゲン合成系が複合暴露区で顕著に抑制されていた。このことは、化学物質の複合作用によって、単独の化学物質を対象とした暴露試験からはまったく推定できない影響が引き起こされることを示しており、複合毒性の優れたモデルケースとなり得ると同時に複合影響評価の重要性を我々に再認識させた。

(2) 環境政策への貢献

化学物質の複合影響についてはその重要性は認識されているものの、作用機序の複雑さ故、研究が遅れているのが現状である。個々の化合物を対象とした化学物質のリスク評価は、毒性物質の初期スクリーニングには重要な役割を持つが、化学物質の環境影響を評価する際には、より複雑な要因を加

味する必要がある。本研究は、個々の化学物質は無作用濃度未満であっても、複合的に作用することで生物に対して悪影響を及ぼすことを示しており、このことは現行の化学物質の環境影響評価手法の有用性を根幹から揺るがすものである。現状では、複合影響の評価手法は確立されておらず、海外ではすでに実施されている工場等の全排水を対象とした生物試験（WET test）についても、我が国では未だ検討段階である。本研究より得られる成果は、化学物質の複合毒性を広く認識させることに貢献するのみならず、将来的に確立すべき複合毒性の影響評価手法の礎となるポテンシャルを有している。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) S. Uno, A. Shintoyo, E. Kokushi, M. Yamamoto, K. Nakayama, J. Koyama: Environmental Science and Pollution Research (2012)
“Gas chromatography-mass spectrometry for metabolite profiling of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) juveniles exposed to malathion.” (in press)

<査読付論文に準ずる成果発表>

「特に記載すべき事項はない」

(2) 主な口頭発表（学会等）

- 1) 國師恵美子、宇野誠一、小山次朗：第19回日本環境化学討論会（2010）
「メタボロミクスによるヒメダカに対する多勧芳香族炭化水素類の影響評価」
- 2) 宇野誠一、國師恵美子、山元優孝、新豊葵、小山次朗：第16回バイオアッセイ・日本環境毒性学会研究会合同研究発表会（2010）
「メダカ稚魚を用いたメタボロミクスによる化学物質影響評価の試み」
- 3) 山元優孝、宇野誠一、小山次朗：第16回バイオアッセイ・日本環境毒性学会研究会合同研究発表会（2010）
「メタボロミクスによる多環芳香族炭化水素のメダカ胚に対する影響評価」
- 4) E. Kokushi, S. Uno, J. Koyama: International symposium on the formation of research center on control against negative impacts to coastal fisheries resources in Southeast Asia, Kagoshima, Japan, 2010
“Assessment of effects of starvation on freshwater carp by ¹H-NMR metabolomics approach.”
- 5) M. Yamamoto, J. Koyama, S. Uno: International symposium on the formation of research center on control against negative impacts to coastal fisheries resources in Southeast Asia, Kagoshima, Japan, 2010
“Toxicity assessment of PAHs on medaka embryo by ¹H-NMR metabolomics approach.”
- 6) E. Kokushi, S. Uno, J. Koyama: The international conference on marine pollution and ecotoxicology, Hong Kong, China, 2010.
“Assessment of metabolite variations in starved freshwater carp by ¹H-NMR metabolomics approach.”
- 7) K. Nakayama, I.C. Handoh, J.Y. Song and S.I. Kitamura: 6th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology, Hong Kong, China, 2010.
“Analyzing the effects of multiple environmental stressors by microarray data.”
- 8) E. Kokushi, S. Uno, J. Koyama: The 39th scientific symposium of UJNR aquaculture panel meeting, Kagoshima, Japan, 2010
“Assessment of effects of starvation on freshwater carp by ¹H-NMR metabolomics approach.”
- 9) K. Nakayama, S. Uno, E. Kokushi, I.C. Handoh, S.I. Kitamura: SETAC North America 31st Annual Meeting, Portland, USA, 2010.
“Transcriptome and metabolome changes by multiple environmental stressors.”
- 10) K. Nakayama, I.C. Handoh, J.Y. Song, and S.I. Kitamura: SETAC North America 31st Annual Meeting, Portland, OR, USA, 2010.
“Evaluation of the binary effects of environmental stressors using transcriptomic data.”
- 11) S. Uno, E. Kokushi, M. Yamamoto, T. Niino, Y. Ohori, J. Koyama: SETAC North America 31st

- Annual Meeting, Portland, USA, 2010.
 “Toxicity assessment of dichlorophenols on medaka (*Oryzias latipes*) embryo by metabolomics approach.”
- 12) 仲山 慶、半藤逸樹、北村真一：平成22年度日本水産学会春季大会 水産環境保全委員会主催シンポジウム「水産環境における化学物質汚染の現状・評価・対策」（2010）
 「複合的環境ストレスに対する生体影響評価」
- 13) K. Nakayama, I.C. Handoh, J.Y. Song and S.I. Kitamura: The 8th International Symposium on Advanced Environmental Monitoring, Sapporo, Japan, 2010.
 “Evaluation of binary effects of environmental stressors using transcriptomic data.”
- 14) 仲山 慶：日本環境毒性学会特別セミナー「環境・健康分野へのOMICSの活用」（2010）
 「トランスクリプトームデータを用いた複合影響評価」
- 15) S. Uno, K. Nakayama, E. Kokushi, A. Shintoyo, M. Yamamoto, Y. Murakami, S-I. Kitamura, J. Koyama: 15th International Symposium on Toxicity Assessment (ISTA15), Hong Kong, China, 2011.
 “Toxicity assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) based on metabolome data.”
- 16) S. Uno, A. Shintoyo, E. Kokushi, M. Yamamoto, J. Koyama: 15th International Symposium on Toxicity Assessment (ISTA15), Hong Kong, China, 2011.
 “Metabolic profiling of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to organophosphorous pesticide using gas chromatography mass spectrometry.”
- 17) K. Nakayama, S. Uno, E. Kokushi, A. Shintoyo, M. Yamamoto, J. Koyama, Y. Murakami, S-I. Kitamura: 15th International Symposium on Toxicity Assessment (ISTA15), Hong Kong, China, 2011
 “Toxicity assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) based on transcriptomic data.”
- 18) 宇野誠一、新野竜大、大堀祐司、國師恵美子、小山次郎：第20回環境化学討論会（2011）
 「メタボロミクスを用いたメダカ (*Oryzias latipes*) の胚に対するクロロフェノール類の影響評価」
- 19) 國師 恵美子、宇野誠一、小山次郎：第20回環境化学討論会（2011）
 「コイ (*Cyprinus carpio*) の尿を用いたGC/MSメタボロミクスによるクロルピリホスの有害性評価」
- 20) S. Uno, K. Nakayama, T. Nino, E. Kokushi, J. Koyama: International Symposium on Advanced Studies by Young Scientists on Environmental Pollution and Ecotoxicology. Ehime, Japan, 2011.
 “Metabolomics approach to evaluate effects of environmental contaminants in fish.”
- 21) 宇野誠一、仲山慶、北村真一、國師恵美子、新豊葵、小山次郎：第17回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会（2011）
 「PAH類に暴露したヒメダカ稚魚のメタボロームとトランスクリプトームの変動の比較」
- 22) 仲山慶、宇野誠一、國師恵美子、新豊葵、小山次郎、村上安則、北村真一：第17回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会（2011）
 「多環芳香族炭化水素の単独・複合暴露に対する生体応答の解析」
- 23) 仲山慶、宇野誠一、半藤逸樹、北村真一：フォーラム2011：衛生薬学・環境トキシコロジー，フォーラムIII「フィールドをMolecular Toxicology手法で測る～環境汚染物質の生体・生態影響～」（2011）
 「複合的な環境要因に対する生体応答の検出と影響の評価」
- 24) S. Uno, K. Nakayama, S-I. Kitamura, Y. Murakami, E. Kokushi, A. Shintoyo, K. Ito, J. Koyama: 2011 International Conference on Environmental OMICS, Guangzhou, China. 2011.
 “Toxicity evaluations for individual and mixed exposures of phenanthrene and pyrene in medaka (*Oryzias latipes*) alevin with metabolomics and transcriptomics.”
- 25) K. Nakayama, S. Uno, E. Kokushi, J. Koyama, I.C. Handoh, S-I. Kitamura: 2011 International Conference on Environmental OMICS, Guangzhou, China, 2011.
 “Transcriptomic and metabolomic changes caused by the effects of single and combined environmental stressors.”
- 26) K. Nakayama, S. Uno, E. Kokushi, A. Shintoyo, Ito K, J. Koyama, I.C. Handoh and S.I. Kitamura: 6th SETAC World Congress/SETAC Europe 22nd Annual Meeting. Berlin, Germany, May 20-24, 2012.
 “Transcriptomic responses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to individuals or mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons: mixture toxicities or fasting effects?”（ア

ブストラクト提出済み)

7. 研究者略歴

課題代表者：宇野 誠一

1968年生まれ、東京水産大学大学院海洋生産学専攻博士後期課程修了、博士（水産学）、
現在、鹿児島大学 水産学部 准教授

研究参画者

(1)：宇野 誠一 (同上)

(2)：仲山 慶

1974年生まれ、九州大学大学院生物資源環境科学府博士後期課程修了、博士（農学）、現在、愛媛大学 沿岸環境科学研究センター 化学汚染・毒性解析部門 講師

RF-0909 実環境の複合汚染評価を目的としたトキシコゲノミクス解析法の開発と現場への適用に関する研究

(1) メタボロミクスによる影響評価法の確立に関する研究

鹿児島大学 宇野 誠一

平成21～23年度累計予算額：4、822千円

（うち、平成23年度予算額：1、595千円）

予算額は、間接経費を含む。

【要旨】 現在、世界では数多くの化学物質が作り出され、地球上の生物は多かれ少なかれこれらの化学物質に暴露されている。既に個々の毒性を調べるというのは困難であり、化学物質が複数存在したときの生物への影響評価法もほとんど確立されていない。また、現在の日本の環境中化学物質濃度はかなり低く、従来法では影響評価が難しい。よって今後どのように環境汚染影響評価を行うかは早急に検討されるべき課題である。メタボロミクスは生体内代謝物変動を網羅的にとらえ、生物の今の体調を知る方法である。本法は発展途上の方法であり、確固たる解析法も確立されてはいないが、遺伝子情報を必要としない、生物種を選ばない、体内の出来事を鋭敏に代謝物変動として示す、といった特徴を持ち、生物に対する実環境レベルでの化学物質影響評価の有効な手段となり得る。そこで本サブテーマは、ヒメダカを対象とし、①メタボロミクスの手法を確立するための基礎を築くこと、②複合ストレスに対する影響評価を行うこと、③①と②の過程を経て、実際の環境試料に対する定量的な影響評価を行うこと、を主たる目標として掲げた。これらを達成するためにメタボロミクスのデータを一元配置分散分析と主成分分析により処理して、平成21年度はヒメダカに与える影響が全く異なる複合ストレスとして絶食と低温、22年度は影響が類似するフェナントレンとピレンの各々の複合暴露がヒメダカに与える影響を明確に評価できるか検討した。その結果、確立した手順と評価法でヒメダカが受ける複合的な影響が評価できることが分かった。そこで23年度は海底質試料の全抽出物にヒメダカを暴露してその影響評価を行った結果、生死を基準とした評価法の25倍以上の感度で影響が検出可能であった。これらの結果より本研究で確立したメタボロミクスによる影響評価法は今後の環境影響評価に非常に有効な手段であることを示した。

【キーワード】 メタボロミクス、複合影響、ヒメダカ、海底質、主成分分析

1. はじめに

現在、世界では年間数千にも及ぶ化学物質が作り出されている。しかし、これらの物質の生物に対する影響評価は十分に行われているとは言えない。これまでの環境汚染研究はある特定の物質についてその環境動態や生物影響を調べるという手法が取られてきた。しかし現在のように多種多様な化学物質が地球上に存在し、かつ、実環境に放出される危険性も懸念される中、個々の化学物質の環境動態や生物影響を調べるには限界が来ていると言え、今後は視点を変えた環境汚染評価を行っていく必要があると言える。さらに、主たる環境汚染物質に対して厳格なる規制が行

われている現在、これまで目を向けられていなかったような濃度レベルでしか存在しない化学物質の環境汚染に目を向ける時代が間もなくやってくると考えられる。さらには複合的に化学物質に暴露された際の生物影響の評価も厳密に求められつつある。実際、現在、これら全てを網羅して評価できる影響評価法はない。従来、行われている生物の化学物質に対する影響評価は、その生物の生死や成長を基準とするものがほとんどである。しかしこの従来法では現在の環境基準以下の濃度で潜在する化学物質の生物に対する影響は見出すことが難しいこと、さらに複合的に化学物質が存在して生物がそれらに暴露されたときには個々の物質を対象とした影響試験では見出せなかった、物質が複合されることにより全く予想されなかった生物影響があったとしても見逃す可能性が高い。そこで感度が良く、精度の高い、さらには複合的な化学物質暴露の影響さえも的確に評価可能である、といった全てを網羅する新しい影響評価法の開発が急務となる。

トキシコゲノミクスは生体が持つ分子情報を、遺伝子、タンパク質、代謝物などの様々な動きや変動を階層ごとで網羅的にとらえて解析する手法である。これら網羅的に生物内の情報をとらえる手法を総称してオミックスと呼ぶ。メタボロミクスはオミックスの中でも代謝物を対象とするものであるが、遺伝子やタンパク質を扱う手法と比較すると遙かに未成熟な手法であり、確固たる方法が確立されているわけではない。しかし、遺伝子やタンパク質の誘導はそのときの生体内で行う命令形であり、実際に体内でどのような対応が行われたかは明らかにできないのに対して、代謝物はその命令が施された結果を示すため、生体内の対応やそのときの状態をオミックスの中でも最も良く反映すると言える¹⁾。メタボロミクスは医薬分野で盛んに研究が進められているが、魚類などを初めとする水生生物への適用はまだ少なく、さらに環境汚染物質影響評価法としての適用例はさらに少ない^{2,3)}。しかし、先行する医薬分野の哺乳類を対象とした研究から、メタボロミクスは従来の毒性影響評価法よりも何倍も感度良く生体内毒性影響が見出せることが知られている。しかも複数の臓器に毒性影響が同時に起こった場合でも、それらの毒性影響を網羅的に見出せる可能性が高い。

上記のようにメタボロミクスは様々な場面に適用可能であり、その応用範囲はきわめて広いと考えられているが、他のオミックス法と比較するとピックアップできる情報量が遙かに少なく、1つの代謝物が複数の役割を兼ねていることが多いため、その解析は難しい。メタボロミクス研究が開始された当初から、網羅的に代謝物をとらえる手法としてNMRを適用するものが最も多い。その理由として、NMRは簡単に代謝物情報が得ることができ、その数の多さから先行研究として参照しやすいことも挙げられよう。しかし反面、NMRは感度が低く、検出可能な代謝物種数が少ないという問題があり、十分な代謝物情報が得られない。そこで、近年ではキャピラリー電気泳動や液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーなどと質量分析装置を組み合わせた分析機器を用いてその分析情報をとらえる研究が行われるようになってきた。このような質量分析装置を用いた場合にはNMRとは比べものにならないくらい多くの情報が得られる反面、代謝物の定性が難しいため、代謝物情報のほとんどが未知代謝物で占められてしまう。そこで、多くの研究は定性可能な代謝物をとらえて、その情報のみから生体内情報を探るという手段をとることが一般的である。現在の質量分析装置を用いたメタボロミクス研究のあり方は個々の研究の考え方にもよるが、網羅的に代謝物変動をとらえる、というメタボロミクスの大きなメリットを捨てていると言っても過言ではないし、未知の重要な生体応答情報に対しては目を向けていない。

我々は本研究を行うに先立ってメタボロミクス研究を始めた当初はやはりNMRを用いて魚類の

化学物質やストレスに対する影響を調べてきた⁴⁻⁷⁾。しかし、やはりNMRでは代謝物の情報があまり多くなく、より詳細な情報を扱って影響評価を行うことは困難であった。そこで、GC/MSに注目した。GC/MSは現在では多くの研究機関が所有する分析機器の1つである。このGC/MSによるメタボロミクスを用いた環境汚染評価法が確立し、解析の手順と方法を示し、その有用性を示していけば、多くの研究機関でも導入しやすい可能性が高い。しかし、未知の代謝物も網羅するようなGC/MSを用いたメタボロミクスはほとんど研究例がなく、特に環境汚染物質の生体影響評価などを行う場合はどのような方法が最適でどのような流れで解析を進めるのが最も良いか、という段階から始めなければならないというのが現状であった。

2. 研究開発目的

上記のような現状や背景を踏まえ、本サブテーマでは、実験魚として非常に扱いやすくこれまでの毒性影響評価法でも対象生物として広く用いられているヒメダカを対象として、①GC/MSを用いたメタボロミクスを確立するためのデータの構築と手法を確立すること、②複合ストレスに対する影響評価を行うこと、③①と②の過程を経て、実際の環境試料に対する定量的な影響評価を行うこと、を主たる目標GC/MSを用いたメタボロミクスによる影響評価を進める上でどのような方法で、どのように解析を進めるべきかを確立することを目的とした。メタボロミクスを評価ツールとして、しかも定量的に影響評価を行うことに用いる研究例はこれまで皆無であると考えられる。本法を確固たるものとするために、同じ条件でストレス暴露したヒメダカを対象として、遺伝子を対象としたトキシコゲノミクスによる評価も同時に行って、メタボロミクスの結果と詳細に照らし合わせた。オミックスの中ではトキシコゲノミクスは最も発達した方法であり、メタボロミクスよりも完成度が高い。また、遺伝子発現と代謝物誘導は密接な関係を持つため、遺伝子の発現データを組み合わせることにより、これまで1つの代謝物が複数の機能を持つために解析が難しいというのが1つの難点であったメタボロミクスによる生体内評価が、従来よりも容易に解析できる多くの手掛かりを得ることができる可能性が高い。さらに考え方を進めて、両者の手法を併せて化学物質の影響評価を行えばそれらの欠点の多くを互いにカバーでき、分子メカニズムを念頭に置いた網羅的かつ定量的な化学物質の複合影響評価を感度良く、しかも迅速に行える可能性を秘めているため、本研究で得られる成果の意義は非常に大きいと考える。

3. 研究開発方法

(1) 試験開発の概要

本研究では主として2つのストレスが複合的に存在しているときと、単一で存在しているときとのヒメダカに対する影響を、明瞭に区別してメタボロミクスにより検出できるか、そのためにはどのような解析を行えば良いかを検討し、1つ1つデータを構築していった。

平成21年度はヒメダカに与える影響が全く異なると考えられる、絶食および低温暴露という2つのストレスを個々、あるいは複合的にヒメダカに与えて、それぞれの影響がメタボロミクスによってどのように見出せるかを検証した。ここでの主たる目的は、①本研究の暴露試験は絶食下で行うため、絶食自体の影響を把握すること、②全く異なったストレスに複合的に暴露されたときに、本研究で用いる解析法が影響をどのように表現できて、さらにどのように定量化できるかを検証すること、③②で得られた結果、およびさらに絶食および低温に対するヒメダカの影響をさ

らに詳細に解析した結果から具体的にヒメダカ体内の代謝にこれらのストレスがどのような影響を与えたかを検証する、等である。

平成22年度は多環芳香族炭化水素類（PAHs）の一種のフェナントレンおよびピレンを対象物質とした。PAHsは複数個のベンゼン環から構成される物質の総称である。燃焼により発生したり、石油中に含まれており、石油流出時に環境中に放出されることが知られ、陸水域問わずに広く存在する。またベンゾ(a)ピレンのように変異原性を有する物質がいくつか存在しているために、これまで水生生物に対して数多くの影響試験が行われてきた。しかし、変異原性に関しては多くを調べられているものの、それ以外の影響に関して実際はあまり知られていないのが現状である。PAHsは多種存在するが、その構造はベンゼン環の数と構造がわずかに異なるだけであり、それぞれのPAHsの生物影響はほぼ共通していると考えられているが、PAHsによる複合影響に関してはほとんど調べられていない。本研究では、PAHsの中でも水環境から比較的高濃度で検出されるフェナントレンおよびピレンを暴露物質として選択し、それぞれの単独暴露、あるいは複合暴露を行って、それぞれの暴露時の影響の相違がメタボロミクスで検出できるか検討を行った。ここでの主たる目的は、①影響が類似しているストレスの複合影響を、本研究で確立する解析法でどのように表現でき、どのように定量化できるかを検証する、②類似した影響をヒメダカに与えると考えられるフェナントレンとピレンの複合暴露を行ったときに、単純に複合暴露の影響の度合いが大きくなるだけなのか、それとも全く異なった影響が見出せるか、などを中心に詳細に両者の代謝物暴露がヒメダカにどのような影響を与えるかを検証する、等である。

さらに平成23年度は、21年度から22年度に検討、確立してきたメタボロミクスによる解析方法を用いて、実際に環境から採取された海底質の影響評価を試みた。海底質の全抽出物をヒメダカに暴露して、①その影響の地域間差などが検出できるか、②実環境レベルの汚染評価に本研究で確立した方法は適用可能か、などを中心に検証した。

（2）絶食および低温暴露試験（平成21年度）

2Lのガラス水槽を2つ用意し、これに生後8週間のヒメダカ4尾をそれぞれに収容した。用いたヒメダカは全て雄の個体を選別した。これらのヒメダカを1週間絶食状態（全く餌をやらない状態）においた（絶食区）。一方、コントロールとして、1週間、毎日餌（アルテミア）を飽食に与えた個体4尾を収容した水槽も2つ用意した（コントロール区）。各飼育水の水温は25℃に保ち、弱いエアレーションを施した。また、それぞれの飼育水槽の水は毎日全量を交換し、毎日タイマーにより14時間明状態、10時間暗状態を繰り返した。1週間後、絶食区およびコントロール群の水槽1つずつから、全ての個体をサンプリングし、直ちに肝臓を摘出して液体窒素により凍結した。さらに、残りの絶食区の水槽を10℃に設定したインキュベータに1日収容して飼育を継続した（絶食－低温区）。同様にコントロール区の水槽1つも同じインキュベータに1日収容した（低温区）。これらの水槽を24時間、インキュベータ内に放置した後、全ての個体をサンプリングして、直ちに肝臓を摘出し、液体窒素により凍結した。摘出した肝臓は分析まで-80℃で保管した。

（3）フェナントレンおよびピレンの単独または複合暴露試験（平成22年度）

1）暴露試験

メタボロミクス解析のための暴露試験（本試験）の暴露濃度を決定するために、数段階の濃度のフェナントレンあるいはピレンを飼育水に添加して、月齢1ヶ月のヒメダカ稚魚の96時間毒性試験を行った。この毒性試験の結果から、本試験ではフェナントレンの暴露濃度を5（フェナントレン低濃度区）および50（フェナントレン高濃度区） $\mu\text{g/L}$ 、ピレンの暴露濃度を3（ピレン低濃度区）および30（ピレン高濃度区） $\mu\text{g/L}$ のそれぞれ2濃度区を設置することにした。さらに複合暴露試験濃度はフェナントレン5 $\mu\text{g/L}$ + ピレン3 $\mu\text{g/L}$ （複合低濃度区）およびフェナントレン50 $\mu\text{g/L}$ + ピレン30 $\mu\text{g/L}$ （複合高濃度区）の組み合わせでそれぞれ添加したものの2濃度区とした。

本試験の暴露はガラス水槽を用い、2Lの飼育水で行った。水温は25℃に保ち、緩やかなエアレーションを施した。この飼育水に上記の設定濃度になるようにフェナントレン、ピレン、あるいは両物質を添加した。このとき、助剤としてエタノールを用いた。これらの飼育水槽に加えて、ピレンとフェナントレン、およびエタノールのいずれも添加しないコントロール区と、エタノールのみを添加した溶媒区も設けた。これら全ての水槽に25尾ずつの生後4週齢のヒメダカ稚魚を収容した。暴露は96時間行い、0（暴露試験直前）、24、96時間目にそれぞれの水槽から12尾ずつのヒメダカを採取した。暴露試験期間中、稚魚に餌を与えなかった。飼育水は毎日完全に交換する反止水式水槽で試験を行い、毎日タイマーにより14時間明状態、10時間暗状態を繰り返した。採取したヒメダカは直ちに液体窒素で凍結し、代謝物分析まで-80℃の冷凍庫で保存した。

2) ヒメダカ体内中フェナントレンおよびピレンの濃度測定

上記のフェナントレンとピレンの単独および複合暴露区からそれぞれ採取したヒメダカ稚魚を、1尾ずつ2 mLのポリプロピレン（PP）製マイクロチューブに収容し、そこにヘキサンを1 mLを加えて、高速振とう粉碎器（TissueLyser II, キアゲン）により6分間振とうした。振とう後、12,000 gで遠心分離し、ヘキサンを集めてクリーンアップを行った。クリーンアップには160℃で12時間加熱した後、3%の含水量になるように調製したシリカゲルを9インチのガラスパスツールピペットに詰めた簡易カラムを用いた。このカラムをヘキサン10 mLで洗浄した後、ヘキサン抽出液を負荷した。その後、ヘキサンと3%アセトン含有ヘキサンを10 mLずつ流してこれを合わせた。その後、内部標準物質として、100 ng/mLのフェナントレン- d_{10} およびピレン- d_{10} を100 μL ずつ添加し、100 μL まで窒素ガスを吹き付けて濃縮した。これをバイアル瓶に詰め、GC/MSにより分析した。

GCの注入口温度は280℃、検出器温度は270℃に設定した。また高温槽温度は60℃で1分間保持した後、30℃/minで200℃まで昇温して1分間保持した。さらに3℃/minで225℃まで昇温し1分間保持し、30℃/minで300℃まで昇温して15分間保持した。カラムはDB-5ms（内径0.25 mm × 長さ30 m、膜厚 0.25 μm ; J&W Scientific）を使用した。注入量は1 μL とした。

分析は各区3サンプルずつ行い、それぞれの濃度は平均した（n=3）。

（4）実環境における生物影響評価～野外海底質抽出物の暴露試験（平成23年度）

平成21～22年度に確立したメタボロミクスによる影響評価法により、平成23年度は実環境から採取した海底質抽出物の影響評価を行った。底質を採取した地点は人口密集域に近接していて、様々な化学物質が底質中に残留していると考えられる大阪湾とフィリピン スービック湾で（図

図(1)-1 底質採取地点⁸⁾



(1)-1)、大阪湾で2004年、スービック湾で2005年に採取した。

風乾した底質をアセトン/ヘキサン（1:1）およびトルエンにより抽出液を得た。この抽出液を合わせ、ロータリーエバポレーターで乾固した後、残渣に1 mLのアセトンを加えて抽出液とした。本試験ではこの抽出液を底質からの全抽出物を含むものとして扱った。

まず、メタボロミクス解析のための暴露試験（本試験）の暴露濃度を決定するために、数段階の濃度を用意して、ふ化後2.5週齢のメダカ稚魚を20個体ずつ入れ、72時間の毒性試験を行った。上記抽出液から、等倍、5倍希釈、25倍希釈、125倍希釈した溶液をそれぞれ用意した。1Lの試験水に抽出物濃度を1g 底質/L相当量になるように抽出液0.1 mLを添加したもの（等倍希釈）を初めとして、この濃度よりも5, 25, 125倍希釈した試験水をそれぞれ用意して毒性試験を行い、その結果から大阪湾、スービック湾ともに等倍希釈（1 g底質/L）およびその25倍希釈（0.04 g底質/L）の濃度でそれぞれ本試験を行うことにした。ふ化後3.5週齢のメダカ稚魚に対して、アセトンの終濃度が0.01%となるように上記の希釈率に水中濃度になるように調製した抽出液を添加した。

本試験は1.7Lのガラス水槽を用い、1Lの飼育水を用いて行った。水温は25℃に保ち、緩やかなエアレーションを施した。この飼育水に上記の設定濃度になるように大阪湾およびスービック湾底質の抽出物をそれぞれ添加した。このとき、助剤としてアセトンを用いた。これらの飼育水槽に加えて、底質抽出物とアセトンのいずれも添加しないコントロール区と、アセトンのみを添加した溶媒区も設けた。これら全ての水槽に20尾ずつの生後3.5週齢のヒメダカ稚魚を収容した。暴露は24時間行い、暴露後直ちに水槽からヒメダカを採取した。暴露試験期間中、稚魚に餌を与えなかった。飼育水は毎日完全に交換する反止水式水槽で試験を行った。採取したヒメダカは直ちに液体窒素で凍結し、代謝物分析まで-80℃の冷凍庫で保存した。

(5) 代謝物の抽出および測定

全ての暴露試験で採取した肝臓あるいはヒメダカ稚魚を個体ごとに2 mLのPP製マイクロチューブに収容し、そこに内部標準物質として2,2-ジメチルコハク酸を添加し、クロホルム/メタノール/水混合溶液(1:2:0.8, v/v/v)を加えた。

平成21年度はこのマイクロチューブを氷を敷き詰めた水中に入れ、15分間超音波照射して代謝物を抽出した。抽出後、12000gで5分間遠心分離し、メタノール/水相を集めた。

平成22と23年度には上記マイクロチューブに直径5 mmのジルコニアボールを入れ、高速振とう粉砕器により6分間振とうして代謝物を抽出した。その後、12000gで5分間遠心分離して、メタノール/水相を採取した。

上記メタノール/水相を採取後、窒素ガスを吹き付けて完全に乾固した。この溶液に塩酸メトキシアミン-無水ピリジン溶液を添加して、30℃で90分間ゆるやかに振とうして代謝物をメトキシム化した。メトキシム化後、全てのマイクロチューブに1%TMCA-MSTFA溶液を添加し、38℃で45分間ゆるやかに振とうして代謝物をさらにトリメチルシリル(TMS)化した。TMS化後、ヘキサンを添加し、これをGC/MSにより測定した。

GC/MS測定にはカラムにDB-5ms(内径0.25 mm × 長さ30 m、膜厚 0.25 μm; J&W Scientific)を用いた。注入口温度は250℃、検出器の温度は290℃に設定した。恒温層の温度は以下のように昇温条件は、60℃で1分間保持した後、325℃まで10℃/minで昇温し、325℃で12分間保持した。サンプル注入はスプリットレスモードで行い、注入量は1 μLとした。

(6) データ処理

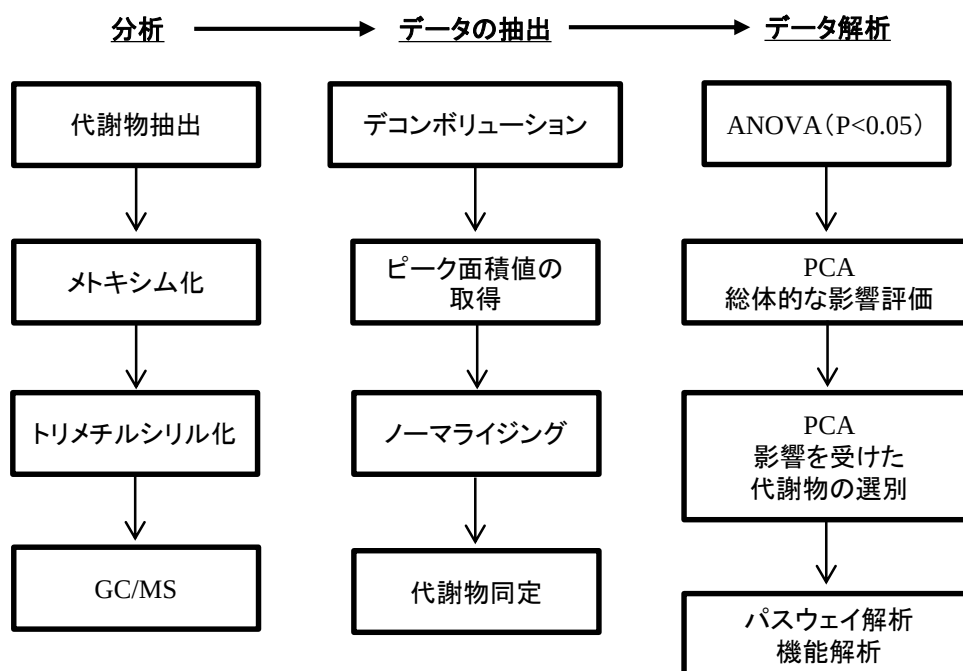
GC/MSクロマトグラム上の個々の代謝物データはAutomated Mass Spectral Deconvolution & Identification System (AMDIS ver. 2.1、NIST)を用いてピークの選別と認識(デコンボリューション)を行った。デコンボリューション後、S/N比が15以上のものをピークと見なし、全てのピーク面積を求めた。検出されたピークは内部標準物質の面積値との比率(ノーマライジング)を求め、それに 10^6 を掛けたものを定量値とした。これらの定量値を用いて次の(6)に示す統計処理を行った。

また検出された代謝物ピークの全てをNIST05ライブラリーから、あるいは実際に市販されている代謝物標準品を誘導体化後GC/MSに注入し、マスパターンを得ることにより、できる限りピークの定性を行った。

(7) 統計処理

(6) で得られたデータをまず個々のピークごとに一元配置分散分析(ANOVA)により処理して($p < 0.05$)、各群間で有意差があるものを選別した。さらに、選別された代謝物のデータを主成分分析(PCA)により処理した。これらの統計処理は統計ソフトR(<http://www.r-project.org/>)により行った。

上記(4)～(6)項の処理の流れを図(1)-2に示す。



図(1)-2 代謝物抽出から解析までの流れ

4. 結果及び考察

(1) 数値化に関する手順と考察

本研究ではその概念自体がわかりにくいメタボロミクスおよびトランスクリプトミクスの2つのオミックスの手法から得られたデータを数値化する方法を開発することを1つの目的とした。メタボロミクスでは代謝物の変動を網羅的にとらえ、非常に多くのデータを得ることができる。そのデータの多さゆえにこれまで行われてきたメタボロミクス研究では統計処理を行うことが多い。しかし、確固たる方法は確立されておらず、また、その統計的意味が曖昧なものも多いのが現状である。そこで我々は従来行われている統計処理をさらに発展させて、その手法を確固たるものにし、この統計処理によって得られたデータをもとに数値化、そしてヒメダカに対するストレス影響（化学物質暴露なども含む）を視覚化する手法の検討を行った。

メタボロミクスの代謝物データはGC/MSを用いた場合、クロマトグラム上で1つ1つの代謝物がピークとして検出される。そのため、個々のピーク面積が容易に得ることができる。すなわち面積値が大きいときにはその代謝物がヒメダカ体中に多く存在し、その値が小さいときには体中にあまり存在していないことを意味する。本研究はこの面積値＝代謝物濃度と見なしてこれを個々の代謝物データとした。

この代謝物データを用いて、コントロール区とストレスを加えた区の間で代謝物量に差があったものをANOVAによって選別した。ここで各区間に差があったものだけを選別したのは、次に行うPCA処理を行う際に、各区の違いをよりデフォルメすることが主目的である。さらに、各区間で影響があったものだけをふるいにかけることにより、影響を定量化した後に行うパスウェイなどを用いた詳細な影響評価を行う際に、どの部分の代謝経路に影響が現れるかが明瞭になるため、影

響の特徴をとらえるのが容易になる。ANOVAで処理した後、PCA処理を行った。ここでPCAを行った際には、一般的には主成分1（PC1）が最も影響の特徴を表しており、次にその影響の特徴を示すものが主成分2（PC2）として表現される。このPC1とPC2の2つの数値を平面にプロットすると、影響の大きさの視覚的判別が容易になる。すなわち、平面上でストレス暴露区のプロットがコントロール区のプロットから大きく離れれば離れるほど、その影響は大きいことになり、コントロール区とあまり大差ない場所、あるいはごく近い場所にプロットされた場合はその影響がほとんど無い、あるいはごく小さいということを意味する。これらのコントロールからの距離はその影響の大きさを示している。また、平面上にプロットされる上で、個々の代謝物データがPC1方向およびPC2の方向にそれぞれ位置させるために、どの程度の寄与があったかを示すものとして負荷量というデータがPCAで処理する際には算出できる。この負荷量により、ANOVAで選別した代謝物から、さらにヒメダカ体内のどの代謝物が主として影響を受けたがピックアップできることになり、PCA後のさらに詳細な解析なデータ処理を行う上で重要な情報となる。このようにデータをPCAにより示し、さらにコントロールとの距離=影響の大きさという概念で本研究では影響の大きさを数値化した。

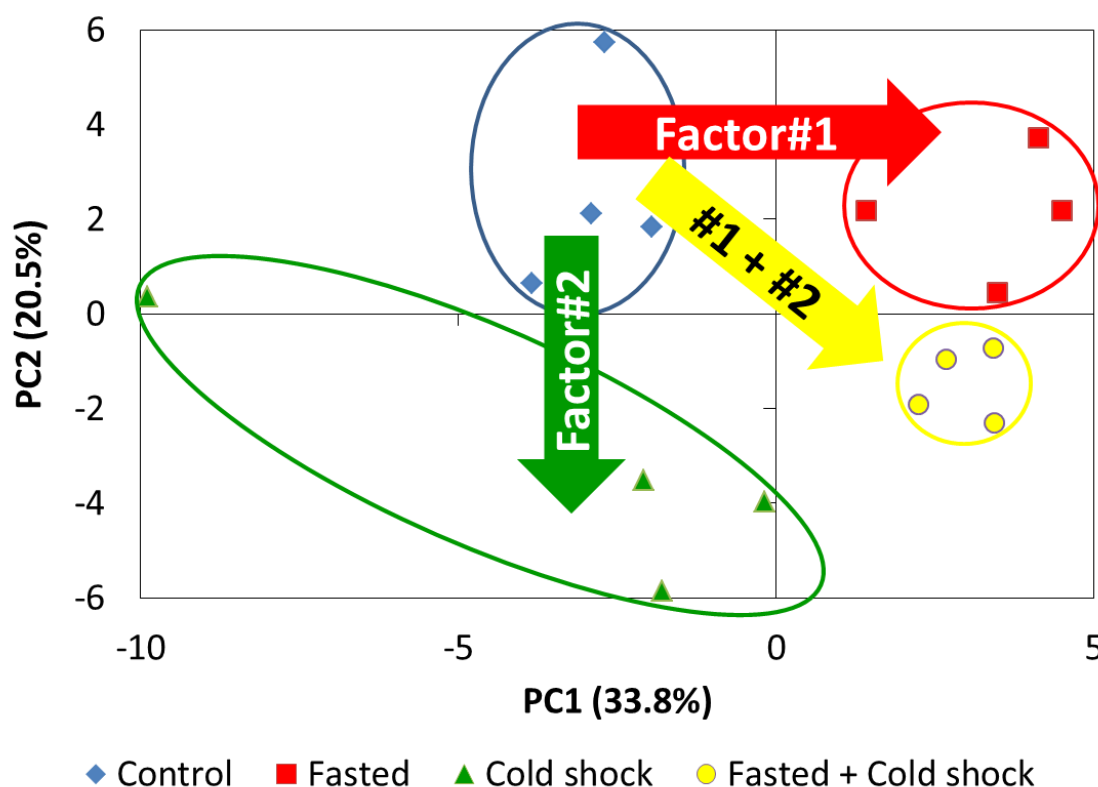
本研究ではこのPCAを用いて、2つの複合ストレスがあった場合、そのストレスが全く異なった性質を持つ場合（平成21年度行った絶食と低温暴露試験）と、類似した性質を持つ場合（平成22年度行ったフェナントレンとピレンの暴露試験）の2つの複合暴露のパターンを以下（2）および（3）に示すように表現することができた。また、距離=影響という影響の定量法を用いて、平成23年度には実際の野外底質試料から得た抽出物をヒメダカに暴露し、2つの場所の影響の地域間差が見出せるかなどを検証した。

（2）メダカの絶食および低温暴露試験（平成21年度）

1）PCAによる定量、視覚化

メタボロミクス解析によって得られたデータを用いて、ANOVAによりコントロール区、絶食区、低温区、絶食－低温区のそれぞれの群間で有意差があった代謝物を選別した。さらにその選別された代謝物をPCAによって処理した。PCAで処理した結果から得られたPC1とPC2をプロットしたものを図(1)-3に示す。図(1)-3に示すように、それぞれの同一区ではごく近い場所に群を形成し、さらに4つの群はそれぞれ明らかに異なった位置に分布した。すなわちコントロール区から見ると絶食区はPC1の正の方向に、低温区はPC2の負の方向に離れて分布した。また、絶食－低温区は絶食区および低温区のベクトルの和にあたる位置の近辺に分布した。詳細はサブテーマ2の報告書に譲るが、同様の試料をトランスクリプトミクスにより解析したところ、PC1とPC2の軸が逆になったものの、両者の平面上における分布パターンは一致しており、さらに絶食－低温区は絶食区および低温区のベクトルの和にあたる部分に位置するなど一致していた。

平成21年度にストレスとして選択した絶食と低温は全く性質を異としたものであり、それぞれヒメダカに与える影響はかなり異なることが考えられた。このようにそのストレス因子の作用機序が独立している場合、本研究で行ったようなANOVAでデータ処理し、さらにPCA処理する方法を行うことにより、以下のような表現ができると考えられた。すなわち、各成分（各ストレスによる影響、ここでは絶食と低温から受けた影響）が図(1)-3のFactor#1および#2のように異なった次元のベクトルにより表現される。そしてこのベクトルの大きさが影響の強さとして示される。ま



図(1)-3 コントロール区、絶食区、低温区、および絶食－低温暴露をPCA処理し、PC1とPC2をプロットしたもの。水色の菱形はコントロール区、赤い四角は絶食区、緑の三角は低温区、黄色い丸は絶食－低温区を示す。

た、2つの成分の複合影響（ここでは絶食と低温の複合影響）はFactor#1と#2のベクトルの和として表すことができる。2つのストレス因子の作用機序が独立している場合の複合影響は、そのストレス因子がどのようなものであっても本研究で行ったデータの処理を行えば同じように表現できると考えられた。

2) 個々の代謝物に対する影響

個々の区における特徴を詳細にとらえるために、定性可能であった代謝物を対象としてさらにその変動などを調べた。その中から生物が生きる上で欠かせないエネルギー生成の場であるTCA回路に関わる代謝物とその大まかな代謝経路を示したものを図(1)-4に示した。

絶食区ではその量を減らすものと、7日間の絶食であまりその量に変動しないものの2つに大別された。特に、ロイシン、イソロイシン、バリン、トリプトファン、フェニルアラニン、リジンなどは必須アミノ酸であり、その摂取の大半は餌からの直接取り込みに依存しているものである。しかし、これらは絶食区では7日間の絶食があつたにも関わらず、その量はコントロールとあまり変わらないものであつた。これら必須アミノ酸の外部からの取り込みの経路は他にはないことから、これはおそらく筋肉中などに保持されているタンパク質を分解して必須アミノ酸を作り出していると考えられた。また、必須アミノ酸と同様に、餌からの取り込みにその量が大きく依存し

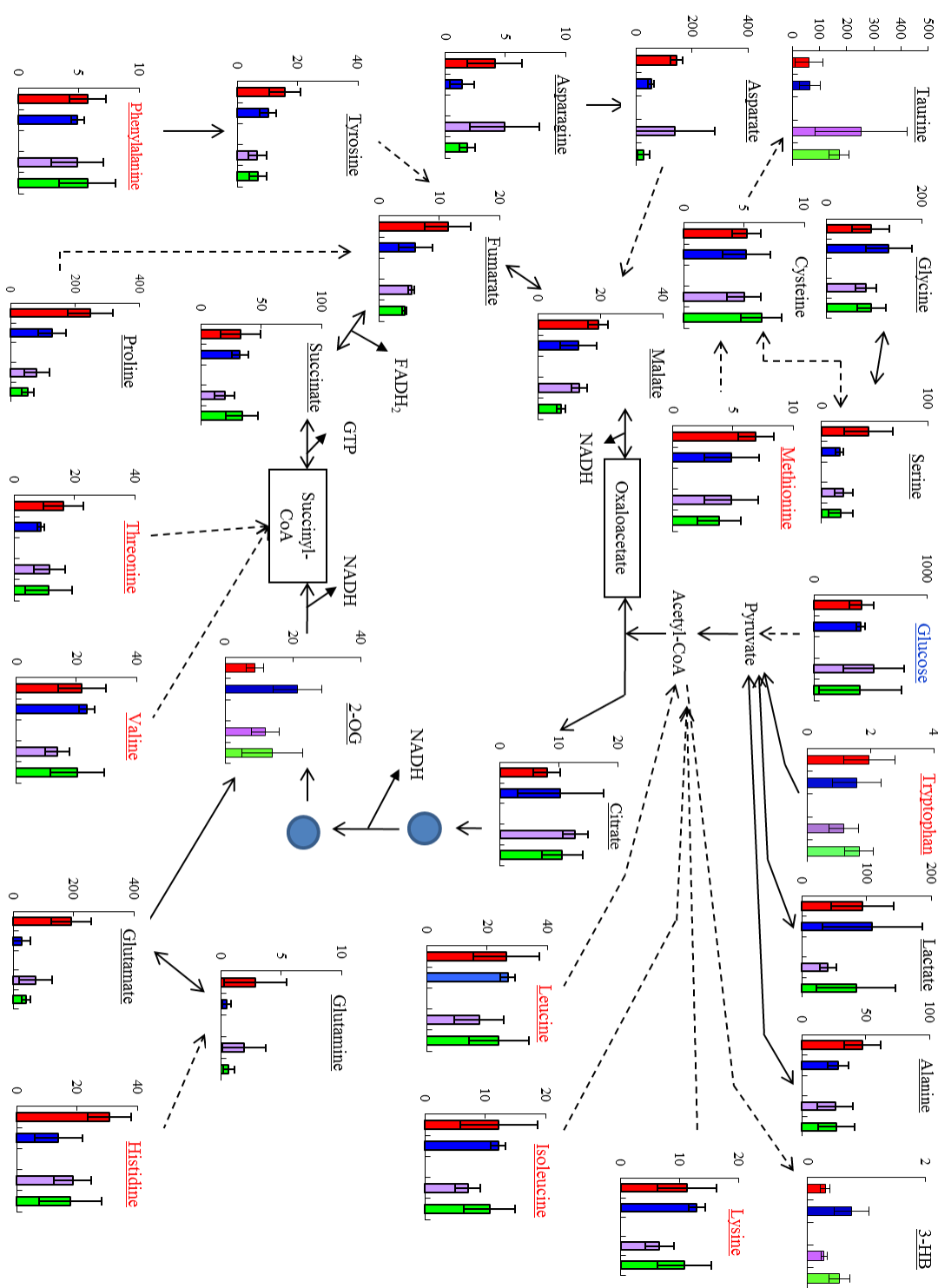


図 (1)-4 TCA に関連する代謝物とその代謝経路の概略図
赤字の代謝物は必須アミノ酸、青地の代謝物はグルコースを示す。グラフは左の赤いものが
コレストロール区、2 番目の青いものが絶食区、3 番目の紫のものが低温区、4 番目の緑のものが
絶食-低温区を示す。縦軸は GC/MS のデータをノーライズングしたもので単位はない。

ているグルコースもコントロールとほとんど量が変わりなかった。別に行った試験により、この週齢のヒメダカを絶食させたときに10～12日目にほとんど死に至ることを確認している。必須アミノ酸とグルコースが絶食区でコントロール区とほとんど変わらぬ量であったのは、ヒメダカ体内で糖新生が起こっていた可能性が高いと考えられた。糖新生が起こった場合、グルタミン酸などのアミノ酸の炭素骨格を用いてグルコースを生成しようという代謝が発生するが、本研究ではグルタミンやグルタミン酸、2-オキサロ酢酸（2-OG）の変動から考えても、糖新生が起こっていた可能性が高いことが示唆される結果であった⁶⁾。糖新生は本来、体内のエネルギー生成を維持するために起こる現象であるが、絶食区のTCA回路内のクエン酸やコハク酸などの量がコントロールとさほど変わらない量となっているのは、糖新生が起こっている結果によりこのような状態になっていると考えられた。糖新生は結果的に身体に保持されていたタンパク質を放出して、分解してしまうので、生物にとっては消耗が激しく長い期間、この糖新生の状態を維持することは難しい。上述したように、絶食を続けると10日目あたりから死に至るのはこの消耗がきっかけになっていることは間違いない。本研究で見られたような絶食区の代謝物変動はこの消耗する過程を良く反映している結果だと言える。

絶食区では3-ヒドロキシ酪酸（3-HB）がコントロールと比べると大きく増加していた。これは、やはり絶食時にエネルギー生成のために起こる脂肪酸の β 酸化のときに生成される代謝物であり⁶⁾、この量の増加はヒメダカ体内でのエネルギー生成量が、通常のTCA回路の働きだけでは足りなくなり、体内に蓄積している脂質を分解して脂肪酸を得て、それを利用してエネルギーを得ていることを示唆するものである。

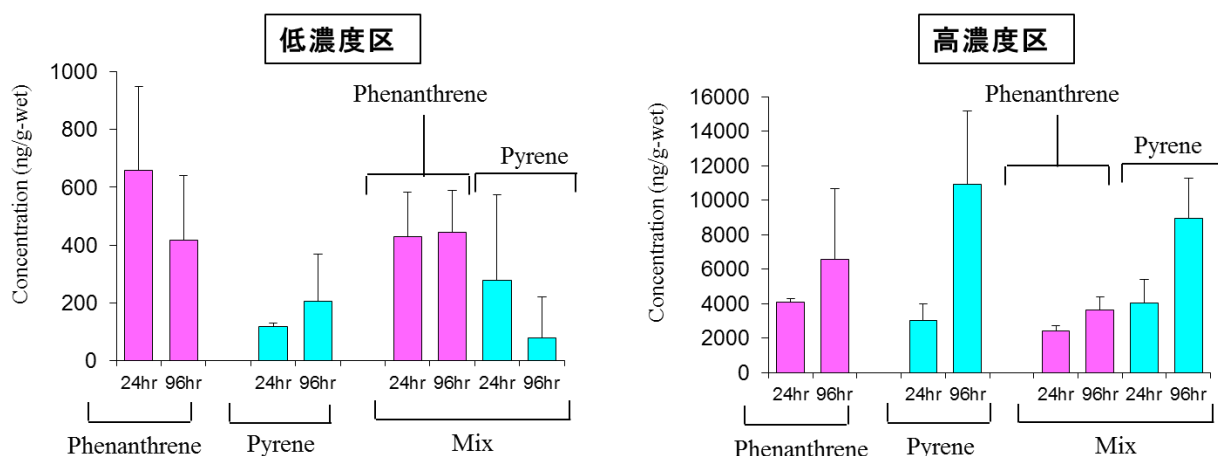
増加している代謝物に対して、減少している代謝物はおそらく絶食による消耗によるものと考えられた。このように絶食という緊急事態にヒメダカ体内では必要なものを積極的に作り出してそれを供給しており、その利用に緊急性の小さいものはあまり積極的に作り出すことはない、と予想される結果となった。

低温区は絶食区と同程度か、あるいは絶食区よりも量を少なくする代謝物がほとんどであった。これは低温状況下でヒメダカ体内の代謝速度を低下させてエネルギー消費を抑えた結果か、ヒメダカが変温動物であり低温のために代謝の速度が遅くなった可能性が考えられる。この区では低温暴露直前まで餌を飽食に与えられており、この後、もし低温暴露を続けたとしても急速に代謝物量が減るとは考えにくい。

低温区と絶食-低温区は、ほぼ絶食区および低温区で見られた代謝物変動が同時に連動して起こっていると考えられる結果となった。これは上記1)のPCAの結果を良く反映しており、絶食区-低温区は絶食区と低温区の代謝物に対する影響が併せて起こっているということの証明でもある。また、絶食は上記1)のPCAでもコントロール区に対してPC1方向に離れて位置していた。このPCAの結果はコントロール区-絶食区間の代謝物変動がコントロール区-低温区よりもかなり大きいことを示している。このことは、今まで述べたように定性可能であった代謝物をピックアップして詳細に変動を調べても、その影響は一目瞭然であり、ヒメダカの代謝が絶食の影響を低温暴露よりも大きく受けていたということを意味するものであった。

（3）フェナントレンおよびピレンの単独または複合暴露試験（平成22年度）

1) フェナントレンおよびピレンのヒメダカ体内中濃度変動



図(1)-5 ヒメダカ体内中フェナントレンおよびピレン濃度

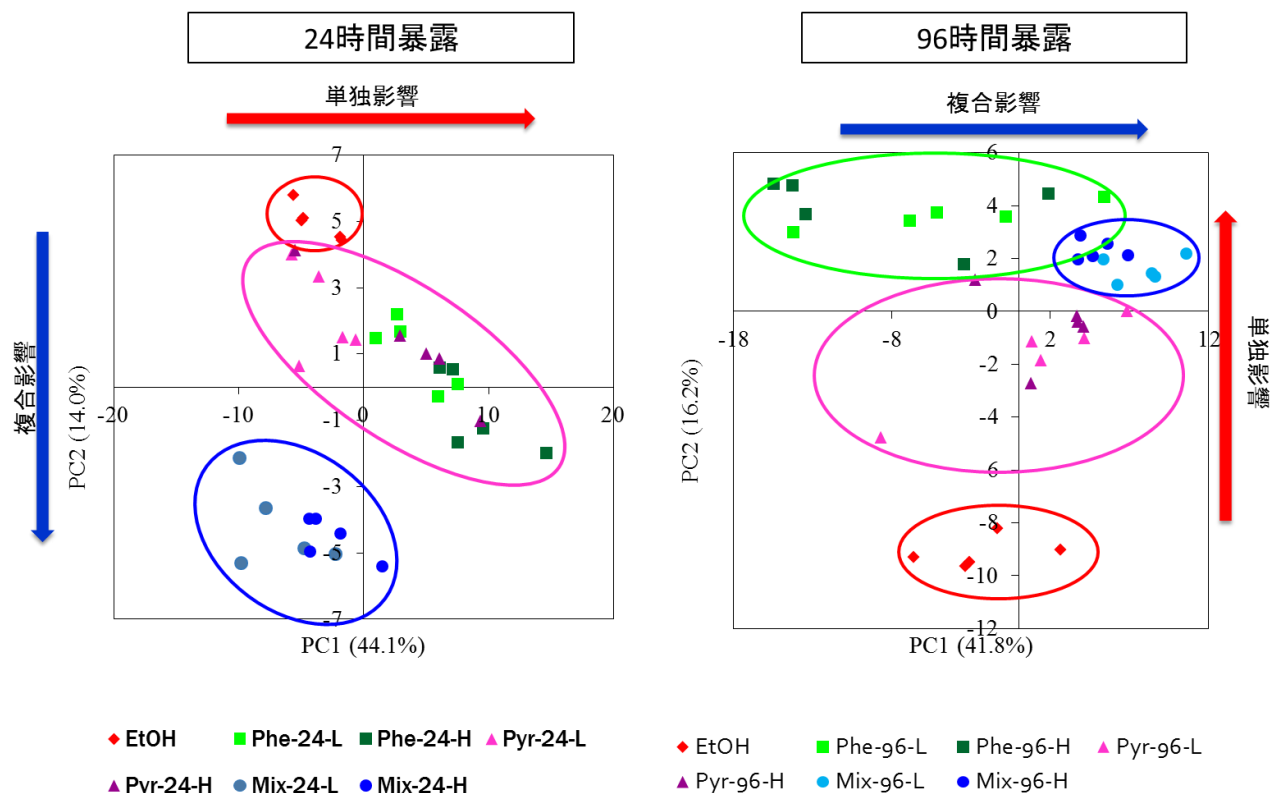
左のPhenanthreneはフェナントレン単独暴露区、真ん中のPyreneはピレン単独暴露区、右のMixはフェナントレン-ピレン混合暴露区を示す。

図(1)-5に24および96時間におけるフェナントレン、ピレン各単独および複合暴露区のヒメダカ中の両PAH濃度を示した。各高濃度区のヒメダカ中PAH濃度は低濃度区の10倍程度の濃度となっており、暴露濃度依存的に体内中に各PAHが取り込まれたと考えられた。特に高濃度区はフェナントレン、ピレン共にppmのレベルでヒメダカに蓄積されていた。

ピレンに関しては低濃度区では24および96時間の体内濃度がフェナントレン単独暴露区よりも低かったが、高濃度区ではフェナントレン暴露区よりも同等か若干濃度が高くなる傾向が見られた。本研究では取り込みや蓄積に関しては詳細に検証するものではないので、これ以上確認しておらず、本研究で見られた蓄積の傾向に関する理由は良く分からない。また、混合暴露区でもピレンは同様の傾向を示し、低濃度区ではフェナントレン濃度の方が高かったものの、高濃度区ではピレン濃度の方が同等、あるいは若干高い傾向にあった。混合暴露と単独暴露のヒメダカ中濃度を比較すると、フェナントレン、ピレンともそれほど大きく値が変わるものではなかった。

2) PCAによるフェナントレン、ピレンの単独および複合暴露時の影響評価

本研究では単独および複合暴露ともに低濃度と高濃度の間には10倍の暴露濃度差を設けた。その結果上記1)で示したように、体内濃度も濃度依存的に増加しているのが観察された。しかし、メタボロミクスにより影響解析を行ったところ、フェナントレンとピレンの単独および複合暴露ともに、濃度依存的な影響の差異は見られず、それはPCA解析の結果でも判別することができなかった(図(1)-6)。本研究で設定した暴露濃度は、暴露試験前に行った毒性試験をもとに設定しており、高濃度区は半数致死濃度の約3~5倍低い濃度に設定した。よって、低濃度区は半数致死濃度の30~50倍低い濃度に設定されている。この低濃度区と高濃度区がどの暴露でも影響差異が見られなかったということは死に至るよりもかなり低い濃度で、実際にはヒメダカが代謝物質の変動に影響を受けていたことを示唆しており、ヒメダカは本研究で対象として暴露したPAHsにはか

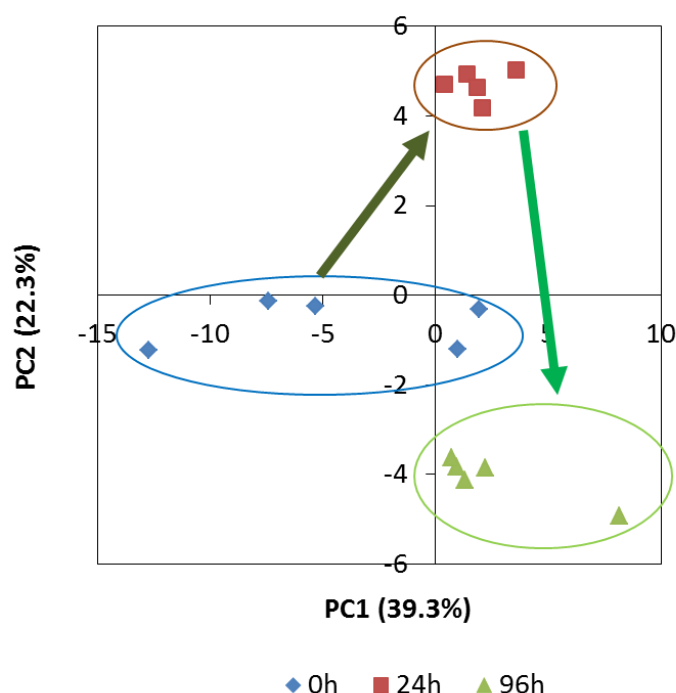


図(1)-6 フェナントレンとピレンの単独および複合暴露から得られた代謝物データのPCA解析結果

なり低い濃度で影響を受ける可能性が高いと考えられた。これらの事実はメタボロミックスの影響検出感度の良さを示すものである。

24時間の時点における代謝物データをPCAにより解析した。その結果、PCA解析によってフェナントレンとピレンの影響の差異もほとんど見られなかった。このことは両暴露の影響が非常類似していることが原因であると考えられたが、PC1方向に大きく広がるような分布を示した。このことからPC1が単独影響を示すものと考えられた。また、複合暴露は溶媒区および単独暴露区と比較するとはPC2の方向に離れて分布した。これは複合暴露区が単独暴露区とは多少異なった影響を受けていた可能性を示唆するものである。このようにフェナントレンとピレンの各単独暴露群があまり明瞭な分離を示さなかったこと、さらには暴露濃度による影響の違いがあまり見られなかったのはトランスクリプトミックスの結果と良く一致した。

96時間の時点ではフェナントレンとピレン単独暴露区はPC2方向で分離をしており、フェナントレンの影響がピレン暴露区よりも多少強い可能性を示した。また、複合暴露群はPC1方向に離れて分布する傾向を示したが、24時間ほどクリアな分離を示すものではない。これは絶食の影響が大きいと考えられる。稚魚のレベルで96時間の絶食というのはかなり限界に近い期間であり、我々が行った別の試験ではこの後数時間絶食を続けると稚魚が死に始めることを観察している。絶食というファクターは平成21年度の試験でも述べたようにヒメダカの代謝にとっては特に大きな影響を示すものである。96時間の時点では絶食の影響が大きくて、各暴露の影響の特徴をばかして



図(1)-7 コントロールの代謝物データによるPCA解析結果

しまった可能性が高い。このことは我々が本研究のメタボロミクスを確立させるために独自に行った、様々な暴露物質を対象として行った試験でも同様のことを観察している。実際、コントロール区の0、24および96時間の代謝物データをANOVA→PCA解析を行うと図(1)-7のような結果が得られ、96時間の間の絶食により、かなり大きく代謝物変動が起こっていることが示された。特に、この図のPCAの結果から考えると96時間目では無視できないくらい絶食の影響は大きいと考えられる。よって96時間のPCAのみによる影響評価は的確であるとは言えず、絶食下で暴露試験を行う場合、本研究で扱うANOVA→PCA解析による影響評価は24時間の結果を対象として行う方が精度が高いと言える。詳細はテーマ2の報告書に譲るが、このような絶食の影響はトランスクリプトミクスの方が顕著であり、96時間のデータではメタボロミクスよりもさらにPAHs暴露の影響を不明瞭にしていた。メタボロミクスは96時間の時点ではある程度、各暴露区の影響がPCA解析の結果から判断できることから、代謝物に対する影響は遺伝子に対する影響よりも遅れて現れると考えられた。これはPAHsがヒメダカ体内に取り込まれ、それが異物として認識されて遺伝子が発現するのと比較すると、遺伝子からタンパク質誘導、そして異物混入のストレスの対応があって代謝物が生成されるという順序を体内では大まかに経ていると考えられるが、遺伝子誘導から代謝物生成までのステップに至るまでにはある程度時間差があるために起こるのではないかと考えられた。

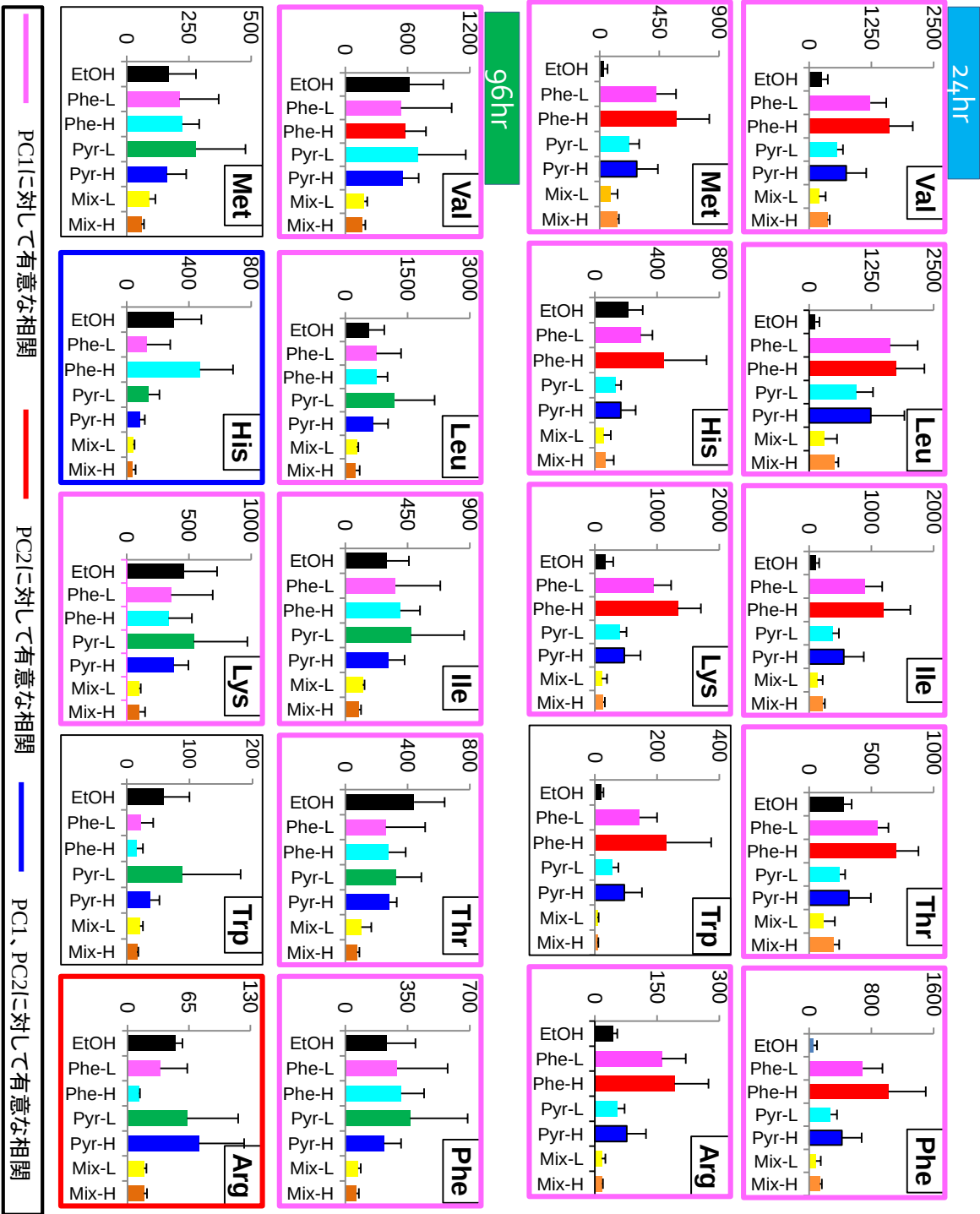
今回のフェナントレンとピレン、それぞれがヒメダカに与える影響は前述したように非常に類似していると考えられる。このように作用機序が似ている場合の複合影響を我々が行ったANOVA→PCA解析による影響評価では単独暴露は暴露物質が異なってもほぼ同じベクトル上に示されると考えられる。このベクトルの大きさがその影響の強さを示すが、その方向はほぼ同じだと考えられる。そして、これらが複合して暴露されたときには2つのパターンが考えられる。その1つは、

個々の単独暴露のベクトルと同じ方向に位置し、そのベクトルの大きさのみが変化するものであり、もう1つはベクトルの方向が単独暴露とは全く異なって向く場合である。前者は類似している暴露物質故に影響が単純に増強されるパターンであり、後者は両者の暴露物質の生物に与える影響が類似していても複合暴露により、単独暴露のときとは全く異なった影響を与えるパターンである。今回の24時間の時点でのフェナントレンとピレンの複合暴露群はPCA解析の結果、コントロール（溶媒区）と比較するとPC2の方向に位置し、単独暴露群はPC1方向に分離する傾向をみせたために、後者に当てはまるパターンであると言える。

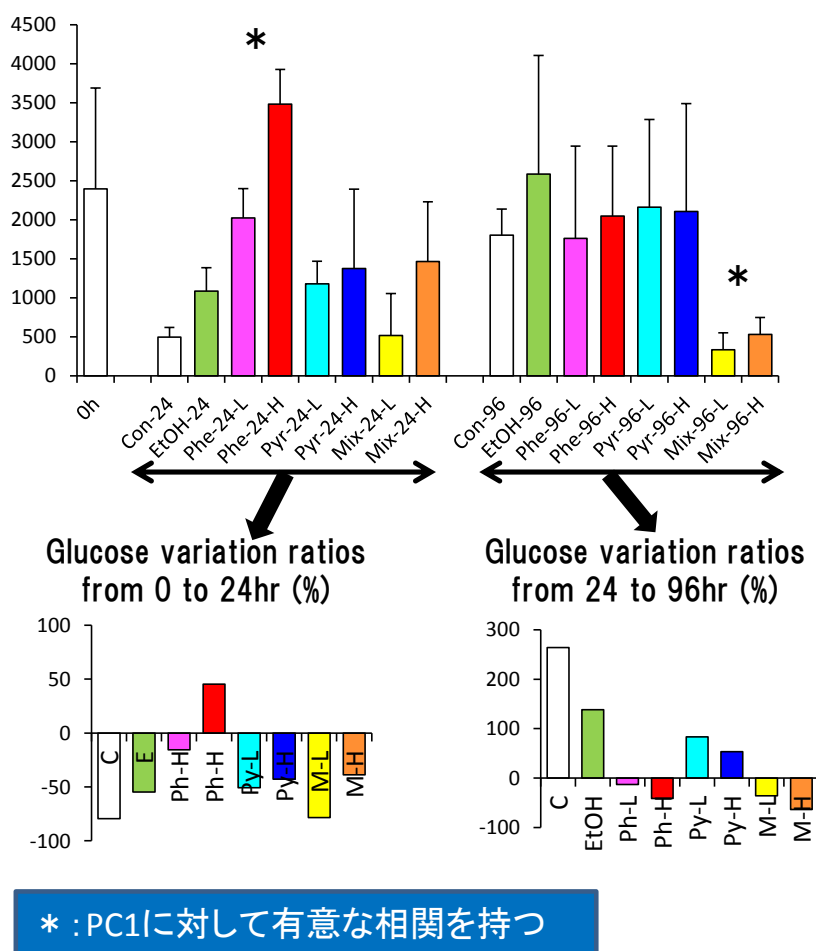
平成21、22年度で示したように本研究で行った、メタボロミクスのデータをANOVA→PCAで処理する解析は、全く性質が異なった、あるいは性質が類似した複合影響のどちらも説明可能であった。このような解析を行うためにはできる限り、得られたGC/MSのクロマトグラム上から代謝物情報を拾い上げることが重要となってくる。そのためのポイントとしてはAMDISによるデコンボリューションとデコンボリューション後に精度良くピーク面積を個々のピークについて取っていくこと、そして、精度の良い内部標準物質の選定が必要となってくる。メタボロミクスのGC/MS上で検出されるピーク数は、その都度サンプルによって異なり、ヒメダカ稚魚だと300～600本程度であり、ヒメダカ胚を用いた場合は発生日数によって異なるが、多い時には800を超える。これらのピーク1つ1つのピーク面積値を個々のサンプルについて求めるのは非常に時間がかかり大きな労力を必要とする。今後、このような作業の自動化などを行うためのソフト開発なども視野に行い、GC/MSのメタボロミクスを完成させていくことが、本解析法を広めていくための1つの条件となってくると考えている。

3) 個々の代謝物に対する影響

個々の代謝物でまず注目されるのは必須アミノ酸の変動である。魚類の必須アミノ酸は一般的に図(1)-8に示すバリン (Val)、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、トレオニン (Thr)、フェニルアラニン (Phe)、メチオニン (Met)、ヒスチジン (His)、リジン (Lys)、トリプトファン (Trp) およびアルギニン (Arg) の10種類とされているが、PCAの負荷量を解析したところ、24時間ではトリプトファンを除き他の9種類の必須アミノ酸がPC1の分離に大きく関与していた。これはフェナントレン単独暴露区で必須アミノ酸が上昇していたが、溶媒区と複合暴露区では単独暴露と比較するとかなり低い結果となった。24時間の時点ではフェナントレンの単独暴露区ではグルコースの上昇が観察された（図(1)-9）。このように必須アミノ酸の上昇とグルコースの上昇という連動した動きは前述したように絶食時に観察される変動の特徴であるが、単独暴露区では24時間の時点で類似した変動が観察された。24時間という短時間の絶食が原因となり、糖新生が起こっているとは考えにくく、これの上昇は生体外異物をヒメダカが取り込んだことにより、この異物を体外に排出するためにかなりのエネルギーが必要となったか、あるいは既に暴露により何らかの影響を体内で受け、それを治癒させるためにエネルギーやアミノ酸類が必要になり、過剰に投入する必要があるのではないかと考えられた。このように、化学物質暴露により、糖新生に類似した代謝物変動が起こることは、いくつかの研究で知られており、この必須アミノ酸産生の源は筋肉中のタンパク質だと考えられている。この点も絶食のときの状況と良く似ている。ピレンに関しては24時間の時点ではフェナントレンの動きに類似していたが、溶媒区との差はフェナントレンよりも小さく、また96時間の時点では溶媒区の変動と比較的一致していた。このこ



図(1)-8 各暴露群における必須アミノ酸量の比較(上が24時間、下が96時間)



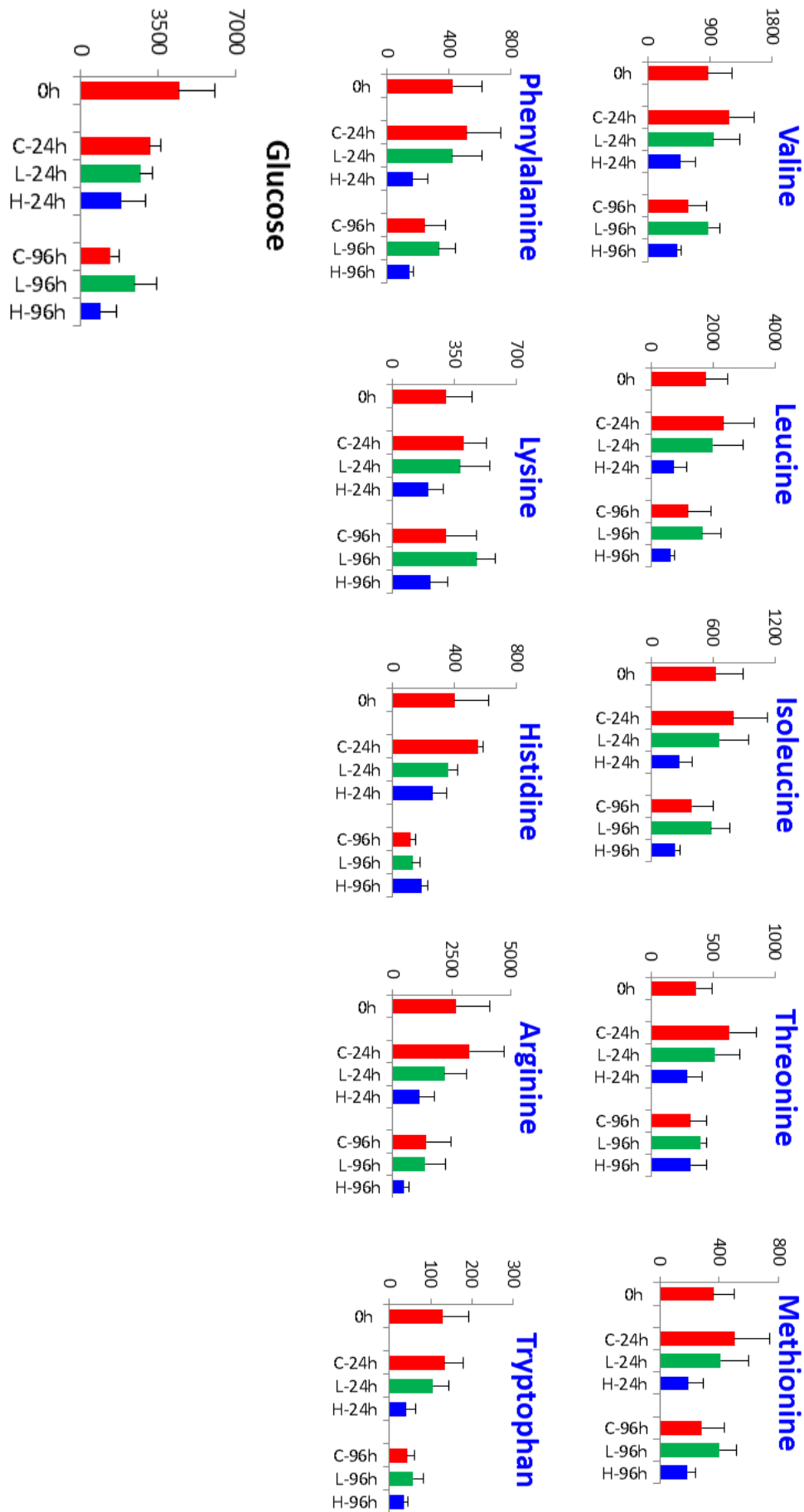
図(1)-9 グルコースの量の比較とその時間経過に伴う変動

とから、96時間の時点では絶食の影響がピレン暴露の影響よりも大きく出ていたと考えられた。

24時間の時点では溶媒区と複合暴露区ではほとんど差が見られず、一見したところ複合暴露の影響はほとんどないのではないかとと思われる結果となった。この件については後で詳細に考察する。

96時間では溶媒区の必須アミノ酸は上昇していた。これに伴いグルコースの上昇が観察されたことから、絶食によりエネルギー生成量が足りなくなり、糖新生が起こったためにアミノ酸量を増やす必要があったと考えられた。これは平成21年度に行った絶食試験と同様の現象であると考えられ、その由来はタンパク質であると考えられた。

96時間の時点ではフェナントレンとピレンの暴露群の必須アミノ酸は24時間よりも大きく量を減らすものが多かった。本来、絶食の影響が出てきてもおかしくないこの時間で溶媒区と同様に必須アミノ酸の量を増やせない理由として、溶媒区よりも早い時期に筋肉中タンパク質を分解して必須アミノ酸を投入したために、さらなる分解すべきタンパク質が不足してさらなる必須アミノ酸の投入が難しくなりつつあるのではないかと予想された。このことは、フェナントレンの単



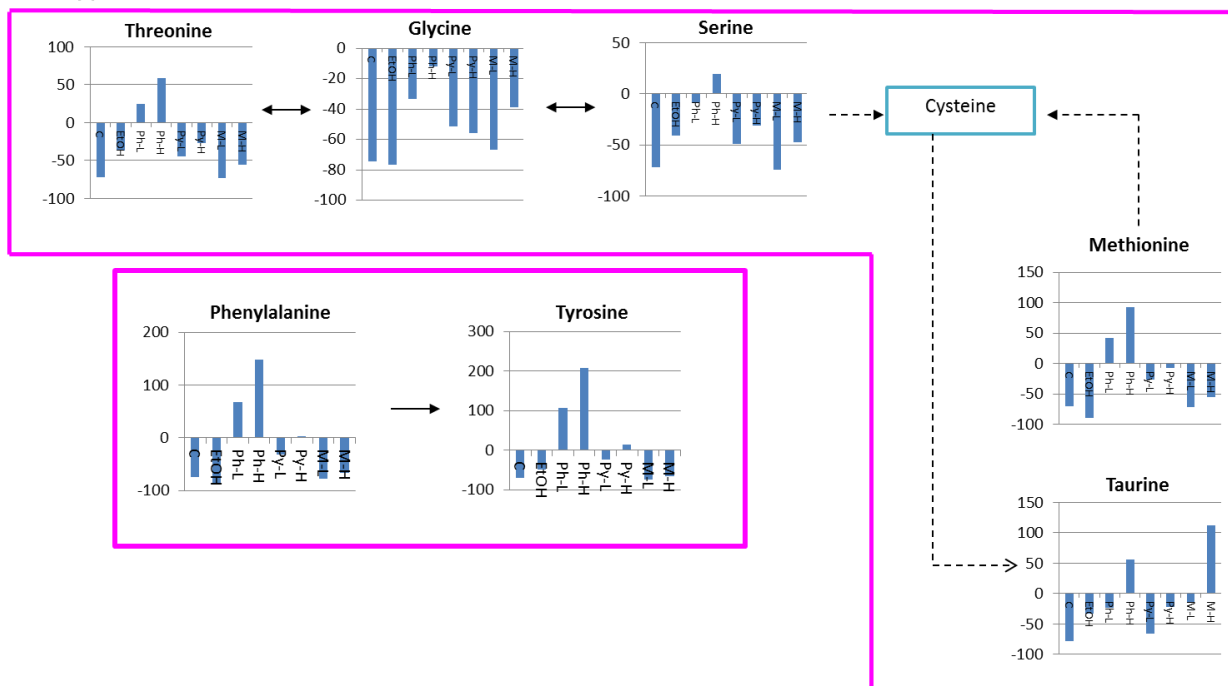
図(1)-10 ヒメダカ稚魚にパラチオンを暴露したときの必須アミノ酸量の比較
赤いものがコントロール、緑のものが20 μ g/L、青が2000 μ g/Lに暴露したもの。0hは暴露直前、24hは暴露後24時間目、96hは暴露後96時間のデータを示す。

独暴露によりヒメダカが早く「消耗」してしまったとも考えることができる。また、96時間の時点におけるグルコースをみるとピレン暴露区は24時間から若干の上昇が観察されたことから、糖新生が起こったと考えられた。これらの結果から、暴露濃度は若干異なるものの、フェナントレン暴露の方がピレン暴露よりもヒメダカに短時間で強い影響を与えていたと考えられた。

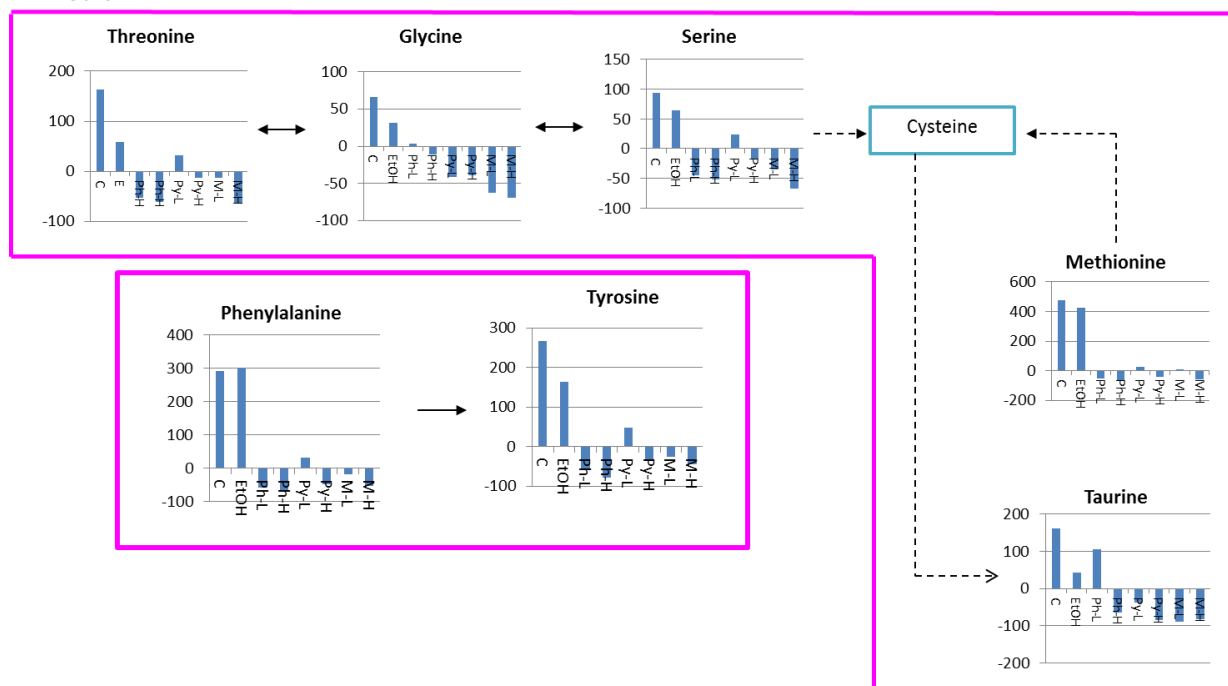
複合暴露区は96時間の時点でも必須アミノ酸量が増えることはなかった。また、負荷量による解析からこれら必須アミノ酸10種類中7種類の必須アミノ酸がPC1の分離に寄与していた。これは複合暴露区の分離に寄与していたことを意味する。溶媒区が24時間から96時間で必須アミノ酸量を増やし、フェナントレンなどは24時間の時点で大きく量を増やしていたのに対して、複合暴露区は全くと言って良いほど必須アミノ酸量に変動していなかった。この経時変化の比較から、複合暴露区では必須アミノ酸量を増やす必要がなかったのではなく、フェナントレンとピレンの複合暴露を受けて、単独暴露のときとは異なった新たな影響を受けて、増やせなかったのではないかと考察している。必須アミノ酸の化学物質に対する変動については、本研究の解析を確立するために自主的に行った暴露試験でも類似した傾向が観察されている。それをここに挙げると、殺虫剤のマラチオンを暴露して（暴露濃度20 µg/Lと2000 µg/L、2000 µg/Lはほぼ半数影響濃度）、0、24、96時間の必須アミノ酸量を比較したところ、24および96時間にかけて20 µg/L暴露区の必須アミノ酸は上昇し、グルコースの量も増加させる傾向を見せたが、2000 µg/L暴露区の方はほとんどそれらの量に変動はなかった（図(1)-10）。マラチオンの2000 µg/Lという暴露濃度はアセチルコリンエステラーゼ阻害をほとんどの個体が受ける程度の濃度であり、ヒメダカ体内での影響が大きすぎて筋肉中のタンパク質分解が妨げられたか、あるいはタンパク質を分解してもアミノ酸の消費が早くて見かけ上、増えない結果であるかのどちらかであると考えられた。この結果は今回行ったフェナントレンとピレンの暴露試験の結果と類似すると考えている。すなわち、複合暴露はヒメダカが決定的な何らかの打撃を体内で受け、その結果、筋肉中のタンパク質分解とアミノ酸生成の動きを妨げたか、アミノ酸消費が早くて見かけ上増加していないかのどちらかと考えられた。必須アミノ酸を上昇させることができるか否かは、もしかしたらその生体が回復できる程度の軽度のダメージを受けているか、それとも回復不能なほどのダメージを受けているかの指標となる可能性があり、今後さらに研究を進める必要がある。

上記の複合暴露によって必須アミノ酸が増加しない状況は、必須アミノ酸に由来する非必須アミノ酸への代謝変動にも影響を与えており、複合暴露区の非必須アミノ酸のほとんどが24～96時間の間にその量が増えることは無く、これは必須アミノ酸の影響と連動していると考えられた。図(1)-11にその例として、メチオニンおよびトレオニン、あるいはフェニルアラニンといった必須アミノ酸が代謝されて生成される主な非必須アミノ酸の0から24時間の変動率と24から96時間の変動率を示した。これによると変動を示した。これによると一部の例外はあるものの、コントロール区と溶媒区のそれぞれの代謝物が0から24時間にかけてその量を大きく減らしているのに対して、フェナントレン暴露された区のほとんどの代謝物が低、高濃度区ともに軒並み上昇しているのが分かる。このとき、ピレン暴露区では若干の上昇傾向が見られ、複合暴露区ではコントロール区や溶媒区とほとんど変わらない量を示した。これらに対して96時間にはコントロール区、溶媒区ともに24時間と比較すると大きくその量を上昇させているのが分かる。また、フェナントレン区は24時間から96時間にかけて非必須アミノ酸の量を大きく減らし、これは必須アミノ酸の量の減少がそのまま反映していると考えられた。ピレン暴露区に関しては非必須アミノ酸に若干

24時間



96時間



図(1)-11 トレオニン、メチオニンおよびフェニルアラニンに関連した非必須アミノ酸の量の変化
 24時間と記した上図が0から24時間の変動率(%)、96時間と記した下図が24から96時間
 の変動率(縦軸: %)を示す。また、棒グラフの左からC:コントロール区、EtOH:溶媒区、
 Ph-L、Ph-H: フェナントレン暴露区、Py-L、Py-H: ピレン暴露区、M-L、M-H: 複合暴露
 区

の上昇が認められ、これは絶食に対する糖新生などもある程度関係しているのではないかと予想された。これらに対して、複合暴露区に関しては24から96時間の間もその量を減らしているのが観察された。これは非必須アミノ酸の動きと連動しているために起こる可能性が高い。これらの結果から考えると、PAHs暴露によりまず影響を受けるのは必須アミノ酸である可能性が高い。フェナントレン暴露区のように大量に必須アミノ酸が投入された場合は非必須アミノ酸も一時的に体内中の濃度が上昇する可能性が高い。また、複合暴露区のように必須アミノ酸が上昇することなく減少する場合は非必須アミノ酸も代謝によって生成される量は非常に少ない。このように、ヒメダカ体内ではPAHsの暴露によって、必須アミノ酸および非必須アミノ酸の両者が結果として攪乱される影響が見られた。フェナントレン暴露区は前述したようにこれらの上昇については説明可能である。しかし、複合暴露区のように単独暴露区でのアミノ酸が上昇しているのにも関わらず、同じアミノ酸類が減少し続けるという現象はこれまで知られていなかった影響だと思われる。このような相違がどのような影響メカニズムで起こるかはこれからさらに検証する必要がある。特にタンパク質分解と必須アミノ酸の関係、必須アミノ酸と非必須アミノ酸の関係などを調べたり、場合によっては代謝経路途中の代謝酵素に対する影響なども調べる必要があるかもしれない。

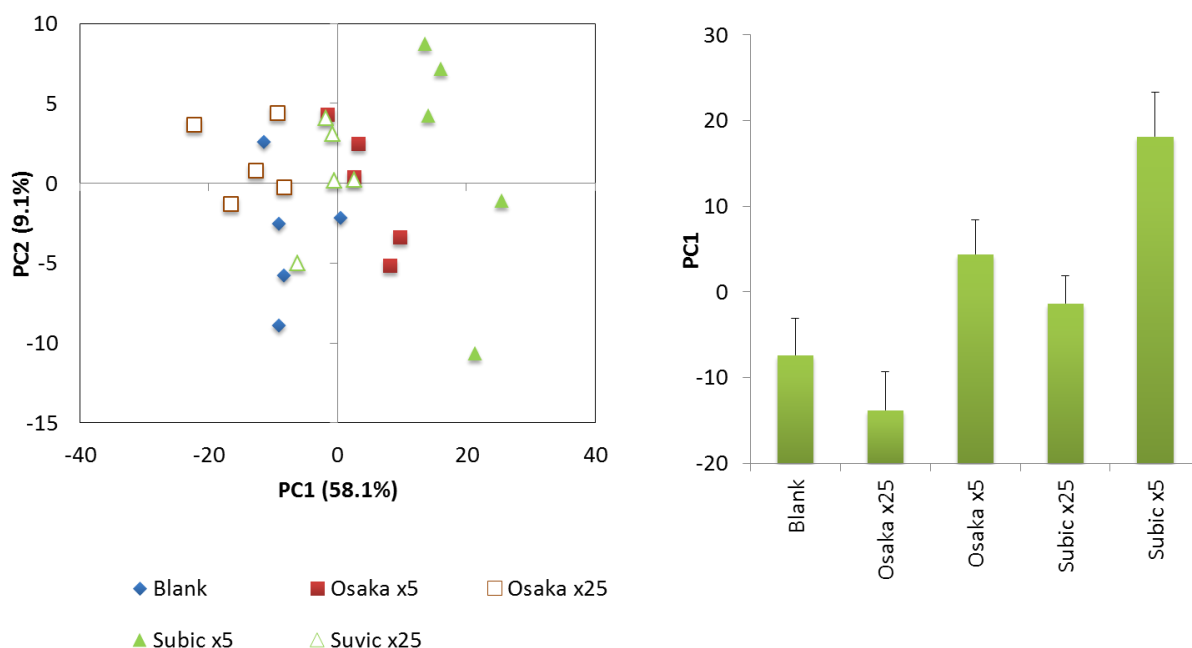
本研究における複合暴露区のように24時間の時点だけ見ていては影響が判断できない（見かけ上影響がないように見える）代謝物変動も多々確認された。これらの代謝物影響は0、24、96時間とデータを並べて初めて判別できる影響であることが多い。このことはメタボロミクスによる影響評価はPCAでは96時間の時点で絶食の影響が見られ影響はぼやけてしまうが、個々の代謝物に対する詳細な影響の評価のために、経時的なサンプルを少なくとも2点以上確保する必要があり、詳細にデータの検証を行う際は96時間のサンプルでも十分に対応が可能であることが分かった。

（４）実環境における生物影響評価～野外海底質抽出物の暴露試験（平成23年度）

平成22年度と23年度の研究から、ANOVAを行った後、有意差を示す代謝物をピックアップしてPCAにより解析を行う方法は網羅的に大量に得られるデータの2つの次元に集約し、かつ、影響の大きさ（定量化）とその特徴をとらえるのに非常に有効な手段であることが分かった。平成23年度は本解析法を用いて、実環境の底質の抽出物がどの程度ヒメダカに影響を与えるか、また、地域間差などが定量的に示せるかという点を中心に検証した。

メタボロミクス解析のための暴露試験を行う前に、底質抽出液の72時間での急性毒性試験を実施したところ、スービック湾で採取した底質の抽出液を等倍で添加した区（1g底質/L相当）で75%の致死率がみられた。また、大阪湾にて採取した底質の抽出液では致死影響は観察されず、大阪湾の底質に含まれる化学物質は致死影響をエンドポイントとした場合、ヒメダカに与える影響はスービック湾よりも相対的に低いことが明らかとなった。本試験の結果を受け、メタボロミクス解析は5倍および25倍希釈した抽出液を暴露したメダカにおいて実施することとした。

図(1)-12に底質抽出物に暴露後、代謝物データからPCA解析を行った結果を示した。その結果、コントロールに対してPC1方向に各群が離れていく傾向を示した。このことからPC1がヒメダカの影響を受けた影響を示すと判断して、このPC1のみをピックアップして平均値を求め、グラフにしたものが図(1)-12右図に示したものである。その結果、PC1は大阪湾とスービック湾の底質抽出物ともに5倍希釈の方が25倍希釈の抽出液暴露区よりも大きく、濃度依存的に影響が現れていることを示し



図(1)-12 大阪湾およびスービック湾底質抽出物に暴露したときに得られた代謝物データをPCA解析したもの（左図）と、PCAからPC1の値をピックアップして示した図（右図）

ていた。また、大阪湾とスービック湾を比較するとスービック湾の25倍希釈抽出液を暴露したものが、大阪湾の5倍希釈のものとはほぼ同程度の影響を受けていたと考えられた。また24時間の時では、大阪湾の25倍希釈液はほぼヒメダカの代謝には影響を与えていないと考えられた。これらの結果は上述のメタボロミクス解析のための暴露試験前に行った毒性試験の結果と一致していたが、メタボロミクスの感度は致死を指標とした毒性試験と比較すると25倍以上の感度があると考えられた。

このメタボロミクスの環境試料に対する影響評価結果は、本研究で構築した複合毒性の評価手法が一般環境試料に対する影響評価にも適用可能であり、その感度は25倍以上の低濃度暴露でも検出可能であることを示すことができた。また、スービック湾と大阪湾の毒性影響の違いも定量的に示すことに成功した。しかし、本研究では大阪湾とスービック湾間ではPC2に沿った分布の違いは見られず、地域間の影響の特徴がPCAからは見出すのは難しい。これは様々な理由が考えられるが、2つ以上のストレスファクター（2種類以上の化学物質暴露）があったときに、複合暴露はどのように説明できるのかといった点や、その影響に拮抗作用や相乗作用が起こったときにどのような表現になるのかといった点など、さらに本研究で確立した方法を用いて一般環境試料の評価や化学物質暴露の結果のデータを積み重ね、検証を行っていく必要がある。

（6）その他の適用例

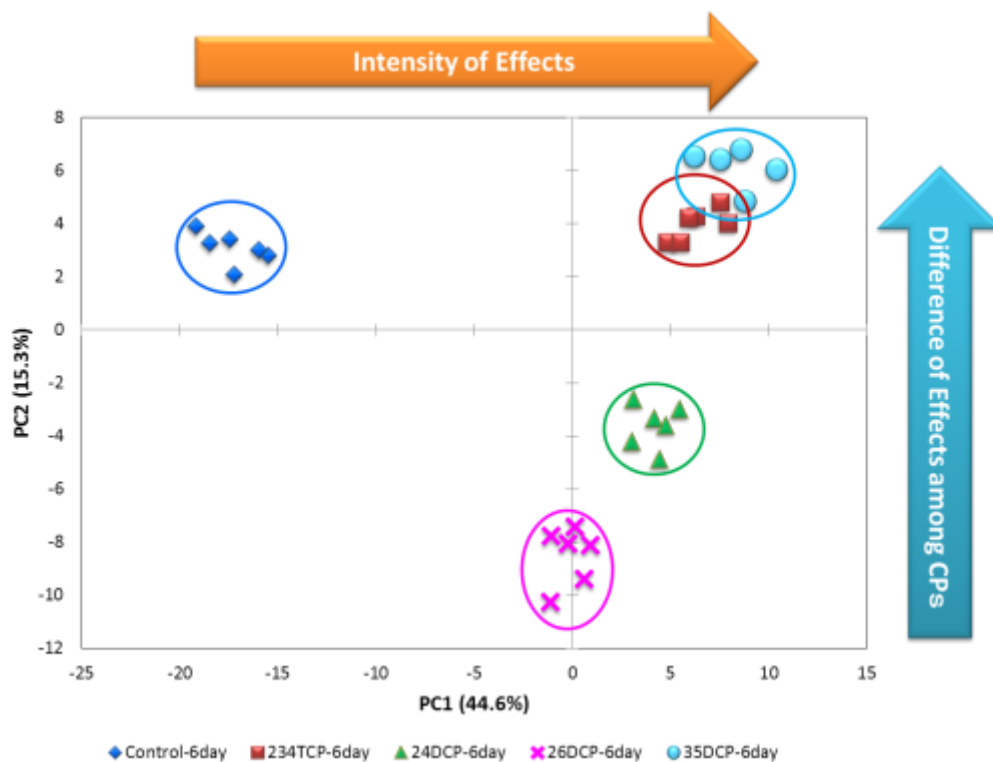
本研究を開始した当初、メタボロミクスは今よりも遙かに認知されていない方法であった。また、メタボロミクスは今現在もトランスクリプトミクスやプロテオミクスと比較すると成熟度の

低さが顕著であり、今後実用までにはさらなる発展が必要である。本研究の1つの使命として、メタボロミクスをまずは使えるものにすることが1つの課題であった。しかし、メタボロミクスのデータを担保するために遺伝子のデータを取ろうとしてトランスクリプトミクスを行うとしても、そのキット等々でかなり費用がかかり、予算の範囲ではできる試験に限界があった。そこでメタボロミクス単独でいくつか暴露物質を選定して、独自にメタボロミクスのための暴露試験を行い、できる範囲で本研究で行う解析法の確立のサブデータとして用いてきた。ここではヒメダカ稚魚だけでなく、胚（卵）や成魚も対象とし、さらには暴露物質もPAHs数種、農薬、クロロフェノール類といくつかの物質の暴露試験を行った。上に示したマラチオンの暴露試験の結果もその1つである。ここでは、このサブデータの1つを例としてヒメダカ胚にクロロフェノール類を暴露して、メタボロミクス解析を行った例を掲げておく。

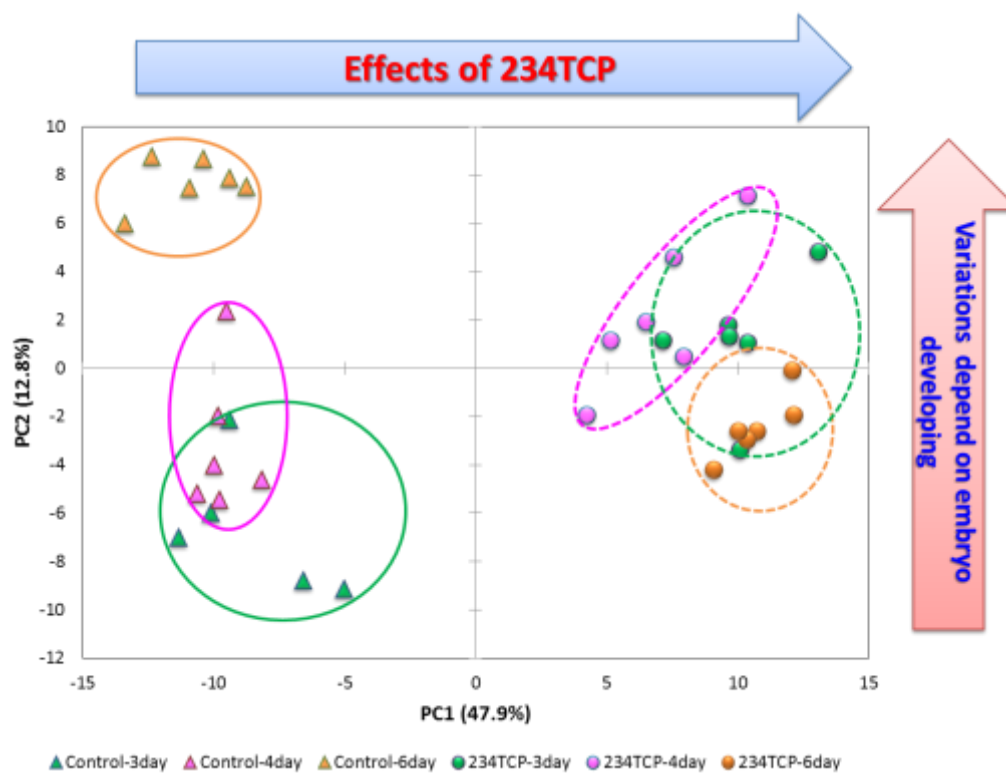
クロロフェノール類はある種の除草剤を製造する際に副生成物として形成されると言われ、その除草剤散布と同時に環境中に放出されるのが主たる環境汚染ルートである。その他にもトイレの芳香剤などにも使われているようである。クロロフェノール類は比較的古くから毒性影響試験研究で対象とされており、魚類に対する影響試験のデータも散見される。しかし、魚類胚に暴露して影響を調べた例はほとんどない。そこで本研究ではクロロフェノール類数種をヒメダカ卵に暴露し、代謝物を抽出して本研究で開発した方法を用いてメタボロミクス解析を行った。対象としたクロロフェノール類は2,4-ジクロロフェノール（24DCP）、2,6-ジクロロフェノール（26DCP）、3,5-ジクロロフェノール（35DCP）、2,3,4-トリクロロフェノール（234TCP）の4種類である。暴露濃度はメタボロミクスのための暴露試験を行う前に毒性試験を行い、卵の発生などを観察して影響濃度を調べた。その結果、メタボロミクスのための暴露濃度を24DCPと26DCPが6.25 µg/L、35DCPが2 µg/L、234TCPが160 ng/Lと設定した。これらの各濃度では各区ともほとんどの個体に奇形や孵化が早くなる現象が半分以上の個体に現れる濃度であり、このメタボロミクスの結果から将来の化学物質の催奇形性発現メカニズム解明の基礎とすることも狙いの1つであった。

上記の各クロロフェノール濃度にそれぞれ設定した飼育水にヒメダカ卵を暴露し、6日間飼育した。そしてそれぞれの胚サンプルの代謝物データを解析し、PCAに投じた結果を図(1)-13に示す。ここに示すように、塩素の付加する位置によって、各クロロフェノール暴露区は明らかに異なる群を形成した。このときPC1はクロロフェノール類の共通した毒性影響を表しており、PC2は個々のクロロフェノール類が持つ特徴的な影響を示していると考えられた。コントロール区から離れている距離と暴露濃度から考えると最もヒメダカ胚に与える影響が大きいのは234DCPだと考えられ、以下、35DCP、24DCP、26DCPの順に弱くなると考えられた。これらは今後詳細な解析を行ってさらなるクロロフェノール類のヒメダカ胚に与える影響や塩素付加位置による影響の違いなどを明らかにしていく予定である。

本研究では、いずれのクロロフェノールに暴露されていてもヒメダカの発生はかく乱されると考えられるデータを得ることができた。例えば234TCPを例に取り、暴露後3、4、6日目の代謝物データとコントロール区の代謝物データをPCAに投じた結果を図(1)-14に示す。これによると3から6日目にかけてコントロールはPC2の正の方向に移動していくのに対して、暴露区はコントロールとはPC2方向に全く異なった変動をすることが観察された。このPCAに関してもPC1は234TCPのヒメダカ胚に与える影響をしめしていると考えられる。このように本研究で確立した方法は、塩素基の付加位置の違いによる、ヒメダカ胚に与える影響を明確に区別して表すことができ、さらにはクロ



図(1)-13 暴露6日目のコントロール群、234TCP、24DCP、26DCP、35DCPのPCAスコアプロット



図(1)-14 コントロール群と234TCP暴露群のPCAスコアプロット

ロフェノール類がヒメダカ発生中に大きく代謝をかく乱することが示唆される結果を得ることができた。

(7) メタボロミクスの今後の課題

本研究で行ったGC/MSを用いたメタボロミクス解析は未同定物質が今後、いくつか追加されることはあると思われるが、その大部分は完成したと考えている。しかし、GC/MSで検出している代謝物は主として、トリメチルシリル化して検出できる物質に限られる。現在のところ、これはエネルギー生成に関する有機酸類、糖類、アミノ酸類などに限られ、その数は100種類程度でしかない。ヒメダカ体内に存在する代謝物全体からみるとこの数は数%程度の網羅性しかないと考えられる。今後はさらに定性可能な代謝物を増やし、情報量を増やして、「今、魚の中で何が起きているか」を詳細に明らかにできるような、詳細解析の部分を発展させる必要がある。そのためにはLC-TOF-MSやGC-TOF-MSなどの導入も検討し、今まで見えてなかった代謝物をピックアップする手法の確立が急がれる。それが確立されたときに、メタボロミクスはヒメダカ1個体が今受けている影響のレベルを総体的に定量し、かつその具体的な影響の種類と部位が網羅的に明らかにできるマルチ影響評価法として完成される。従来行われてきた影響試験法はほとんどが1つの目的しか果たすことができず、見出せる影響もせいぜい数個に過ぎない。メタボロミクスはその網羅性から多くの影響を同時に見出すことができ、かつ、本研究で示したような影響の度合いを数値として表すことができる、非常に多岐な情報を与える影響評価法となり得る。今後、さらに研究を続けて確固たる手法にすれば、万人に受け入れやすい方法になるだろう。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究では、これから広く使用されることがされていながらまだまだ未発達で、確固たる解析法などが確立されていないメタボロミクスにより、化学物質暴露を含めた、生物が受けるストレスをGC/MSを用いたメタボロミクスを確立することを目的としたが、本研究でこれまで述べてきたように、ANOVAにより影響を受けた代謝物質をピックアップし、PCAにより大量に得られたデータを2次元にまでデータを集約して、その影響の定量化までも実現した。メタボロミクスは機器分析により代謝物のデータを取得するが、そこで得られる情報量は非常に多い。また、例えば分析器としてGC/MSを用いた場合、多くの定性不能な代謝物が検出され、これらの未知ピークはこれまでのメタボロミクス研究では対象とされずに、定性可能な代謝物のみを扱うことがほとんどであった。しかし、多くのデータを無視することにより、網羅性というメタボロミクスのメリットは失われ、非常にマクロな評価になりかねない。本研究で確立した解析法は検出できる代謝物は定性の可否に関わらず、できる限りピックアップしてこれをデータ解析に用い、できる限りヒメダカ体内の情報を全て網羅することを目指した。未知の代謝物の変動も恐らく体内では何らかの意味があった可能性が高い。これらの情報全てを集約して最終的にPCAに投影し、そしてPCAに投影した形から、影響の大きさを定量化できることを示した本研究の科学的意義は大きい。本法は複合ストレスも明確に表現でき、そして、化学物質の単独暴露と複合暴露でそれぞれ引き起こされる生物への影響の共通・相違点を、PCAとそこから導かれる負荷量のデータから見出すことができる。

これは従来、検討されてきた様々な複合影響評価法にはない特徴の1つであり今後、化学物質の複合影響研究において重要な情報をもたらすことができる方法である。また、本研究では実環境での適用の可能性も示すことができ、その大阪湾とスービック湾の底質抽出物のヒメダカに与える影響差を定量化して示した。この影響の大きさは、致死を指標とした毒性試験と同様の傾向を見せ、かつ、その毒性試験よりも少なくとも25倍以上感度があることが分かった。今回の結果は、将来、本法を1つの環境診断法として適用するための礎となる。また、化学物質評価、しかも単独と複合の暴露影響のどちらでも同じ手法で評価でき、かつ、環境影響評価も可能にする本研究で示した解析法は、これまでの課題の多くの部分を解決する手法として注目される。

また、詳細に代謝物変動を解析した際には必須アミノ酸類とグルコースを指標として、フェナントレンとピレンの複合暴露によりヒメダカが受けた可能性を示した。また、非必須アミノ酸も必須アミノ酸が影響を受けたのに連動して、その代謝が大きく攪乱されているのが観察された。このようなアミノ酸代謝やアミノ酸量が化学物質暴露で影響を受けることはこれまでも研究例があったが、本研究のように必須アミノ酸全てが連動して影響を受けること、ほとんどの非必須アミノ酸が必須アミノ酸と連動しているということを観察している例はほとんどないと考えられる。同様の必須アミノ酸の変動に与える影響は他の物質でも既に我々は確認しており、これは今後、バイオマーカーとして利用できる可能性がある。またPAHsの複合影響の知見はほとんどないことから、本研究の結果は今後、様々な影響研究に発展していくと考えられる。特に、タンカー沈没などの海洋への石油流出事故は後を絶たず、そのもっとも生物に影響を与えるのはPAHs類であると言われる。しかし、その個々のPAHsは構造が類似しているために、毒性も類似していると考えられ、これが複数種集まってもその影響の種類はそれほど大きく変わらないと考えられてきたために、これまで複合影響を詳細に調べた例はほとんどない。しかし、一度石油が環境中に放出されたときには、ただ1種類のPAHが放出されるということではなく、必ず複数種のPAHsがまとまった量で一度に放出されるのが一般的である。本研究の結果から考えるとこれは水生生物などには非常に驚異であることに間違いはなく、今後様々なPAHsの複合影響が検証される必要がある。

今回、行った解析法によるPCAの利用、影響の定量化、さらには代謝経路を踏まえた影響の検証はある程度実用できるレベルまで到達した。しかし、今後、メタボロミクスによる詳細な影響の検証は、まだ多くの課題が残っており、さらなる発展が必要となる。この部分は本研究でも行ってきたようにトランスクリプトミクスとデータを照らし合わせながら、今後さらに研究を深めていき、PCAを用いた影響の視覚化、定量化とともに詳細な生体内の今起こっている悪影響の症状の診断までできるようなシステム作りを将来の目標としている。

(2) 環境政策への貢献

現在のところ、本研究では解析法の基礎を築いた段階であり、これからさらに研究を進めて数年後に実際の環境評価や環境政策に貢献できるレベルまで完成度を上げていく必要がある。本解析法は化学物質やストレスの複合暴露影響の評価が明確にでき、さらにその影響の大きさを数値で表すことができる。また、数値で影響の大きさを示すだけでなく、詳細に生体内で起こった影響も検証することができる方法であると言える。GC/MSは今では多くの研究施設が有している機器の1つである。今後ソフト開発などを行い、今は非常に煩雑で時間がかかる定量作業の時短化などを測れば、その感度の良さと情報量の多さ、応用範囲の広さから、かなり広く影響評価に用い

られる可能性があると考えている。

本法の応用範囲は広い。また、トランスクリプトミクスとの組み合わせ、あるいはメタボロミクス単独での使用で用途が変わってくることもある。まずは1つ1つの完成度を上げて、それを完成した段階で順次、学会や論文等で発表していく。今後、再び研究費獲得を目指し、そこで本法の完成を目指し、次の研究機関ではシンポジウムなどの開催をして、その周知に努めることを考えている。また、完成した部分から環境分析会社などに協力を依頼し、実際の影響評価に今回開発した方法の売り込みと周知を図っていき、本法の認知度を上げることも画策している。

また、本研究の最終的な目標は環境診断を我々が形成したトキシコゲノミクスを用いて行うことである。そしてこのような環境診断は直接新たな環境基準作りの基礎データを築くために使用可能なレベルまで、次のステップでは研究を進める予定である。この研究を進める上で、複数の環境基準作りに携わっている先生方のご意見などを伺い、さらには現在の環境行政や政策を常に睨みながら、社会のニーズにあった手法、そしてデータの構築を進めていくことも考えている。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) S. Uno, A. Shintoyo, E. Kokushi, M. Yamamoto, K. Nakayama, J. Koyama: Environmental Science and Pollution Research (2012)
 “Gas chromatography-mass spectrometry for metabolite profiling of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) juveniles exposed to malathion.” (in press)

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 國師恵美子、宇野誠一、小山次朗：第19回日本環境化学討論会（2010）
 「メタボロミクスによるヒメダカに対する多勸芳香族炭化水素類の影響評価」
- 2) 宇野誠一、國師恵美子、山元優孝、新豊葵、小山次朗：第16回バイオアッセイ・日本環境毒性学会研究会合同研究発表会（2010）
 「メダカ稚魚を用いたメタボロミクスによる化学物質影響評価の試み」
- 3) 山元優孝、宇野誠一、小山次朗：第16回バイオアッセイ・日本環境毒性学会研究会合同研究発表会（2010）
 「メタボロミクスによる多環芳香族炭化水素のメダカ胚に対する影響評価」

- 4) E. Kokushi, S. Uno, J. Koyama: International symposium on the formation of research center on control against negative impacts to coastal fisheries resources in Southeast Asia, Kagoshima, Japan, 2010
 “Assessment of effects of starvation on freshwater carp by ¹H-NMR metabolomics approach.”
- 5) M. Yamamoto, J. Koyama, S. Uno: International symposium on the formation of research center on control against negative impacts to coastal fisheries resources in Southeast Asia, Kagoshima, Japan, 2010
 “Toxicity assessment of PAHs on medaka embryo by ¹H-NMR metabolomics approach.”
- 6) E. Kokushi, S. Uno, J. Koyama: The international conference on marine pollution and ecotoxicology, Hong Kong, China, 2010.
 “Assessment of metabolite variations in starved freshwater carp by ¹H-NMR metabolomics approach.”
- 7) E. Kokushi, S. Uno, J. Koyama: The 39th scientific symposium of UJNR aquaculture panel meeting, Kagoshima, Japan, 2010
 “Assessment of effects of starvation on freshwater carp by ¹H-NMR metabolomics approach.”
- 8) K. Nakayama, S. Uno, E. Kokushi, I.C. Handoh, S.I. Kitamura: SETAC North America 31st Annual Meeting, Portland, USA, 2010.
 “Transcriptome and metabolome changes by multiple environmental stressors.”
- 9) S. Uno, E. Kokushi, M. Yamamoto, T. Niino, Y. Ohori, J. Koyama: SETAC North America 31st Annual Meeting, Portland, USA, 2010.
 “Toxicity assessment of dichlorophenols on medaka (*Oryzias latipes*) embryo by metabolomics approach.”
- 10) S. Uno, K. Nakayama, E. Kokushi, A. Shintoyo, M. Yamamoto, Y. Murakami, S-I, Kitamura, J. Koyama: 15th International Symposium on Toxicity Assessment (ISTA15), Hong Kong, China, 2011.
 “Toxicity assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) based on metabolome data.”
- 11) S. Uno, A. Shintoyo, E. Kokushi, M. Yamamoto, J. Koyama: 15th International Symposium on Toxicity Assessment (ISTA15), Hong Kong, China, 2011.
 “Metabolic profiling of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to organophosphorous pesticide using gas chromatography mass spectrometry.”
- 12) K. Nakayama, S. Uno, E. Kokushi, A. Shintoyo, M. Yamamoto, J. Koyama, Y. Murakami, S-I. Kitamura: 15th International Symposium on Toxicity Assessment (ISTA15), Hong Kong, China, 2011
 “Toxicity assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) based on transcriptomic data.”
- 13) 宇野誠一、新野竜大、大堀祐司、國師恵美子、小山次朗：第20回環境化学討論会（2011）

「メタボロミクスを用いたメダカ (*Oryzias latipes*) の胚に対するクロロフェノール類の影響評価」

- 14) 國師 恵美子、宇野誠一、小山次朗：第20回環境化学討論会（2011）

「コイ (*Cyprinus carpio*) の尿を用いたGC/MSメタボロミクスによるクロルピリホスの有害性評価」

- 15) S. Uno, K. Nakayama, T. Nino, E. Kokushi, J. Koyama: International Symposium on Advanced Studies by Young Scientists on Environmental Pollution and Ecotoxicology. Ehime, Japan, 2011.

“Metabolomics approach to evaluate effects of environmental contaminants in fish.”

- 16) 宇野誠一、仲山慶、北村真一、國師恵美子、新豊葵、小山次朗：第17回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会（2011）

「PAH類に暴露したヒメダカ稚魚のメタボロームとトランスクリプトームの変動の比較」

- 17) 仲山慶、宇野誠一、國師恵美子、新豊葵、小山次朗、村上安則、北村真一：第17回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会（2011）

「多環芳香族炭化水素の単独・複合暴露に対する生体応答の解析」

- 18) 仲山慶、宇野誠一、半藤逸樹、北村真一：フォーラム2011：衛生薬学・環境トキシコロジー、フォーラムIII「フィールドをMolecular Toxicology手法で測る～環境汚染物質の生体・生態影響～」（2011）

「複合的な環境要因に対する生体応答の検出と影響の評価」

- 19) S. Uno, K. Nakayama, S-I. Kitamura, Y. Murakami, E. Kokushi, A. Shintoyo, K. Ito, J. Koyama: 2011 International Conference on Environmental OMICS, Guangzhou. China. 2011.

“Toxicity evaluations for individual and mixed exposures of phenanthrene and pyrene in medaka (*Oryzias latipes*) alevin with metabolomics and transcriptomics.”

- 20) K. Nakayama, S. Uno, E. Kokushi, J. Koyama, I.C. Handoh, S-I. Kitamura: 2011 International Conference on Environmental OMICS, Guangzhou, China, 2011.

“Transcriptomic and metabolomic changes caused by the effects of single and combined environmental stressors.”

- 21) K. Nakayama, S. Uno, E. Kokushi, A. Shintoyo, Ito K, J. Koyama, I.C. Handoh and S.I. Kitamura: 6th SETAC World Congress/SETAC Europe 22nd Annual Meeting. Berlin, Germany, May 20-24, 2012.

“Transcriptomic responses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to individuals or mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons: mixture toxicities or fasting effects?”（アブストラクト提出済み）

（３）出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) 渡邊肇：薬学雑誌. 127. 1967-1974 (2007)
「トキシコゲノミクスー転写プロファイルから化学物質影響解析ー」
- 2) C.Y. Lin, B.S. Anderson, B.M. Phillips, A.C. Peng, S. Clark, J. Voorhees, H. Wu, M.J. Martin, J. McCall, C.R. Todd, F. Hsieh, D. Crane, M.R. Viant, M.L. Sowby, R.S. Tjeerdema: Aquatic Toxicology. 95. 230-238(2009)
“Characterization of the metabolic actions of crude versus dispersed oil in salmon smolts via NMR-based metabolomics.”
- 3) J.G. Bundy, M.P. Davey, M.R. Viant: Metabolomics. 5. 3-21 (2009)
“Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives.”
- 4) 宇野誠一、國師恵美子、小山次郎：環境毒性学会誌. 11. 63-67 (2008)
「魚類血漿を用いた有害化学物質の¹H-NMRメタボロミクス影響評価」
- 5) S. Uno, E. Kokushi, J. Koyama: Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry—Biological Responses to Chemical Pollutants, Eds., Y. Murakami, K. Nakayama, S.-I. Kitamura, H. Iwata and S. Tanabe by TERRAPUB, pp.281-289 (2008).
“Toxicological effects of heavy oil on carp by NMR-based metabolic profiling of plasma.”
- 6) 國師恵美子、宇野誠一、小山次郎：日本水産学会誌. 77. 75-83. (2011)
「¹H-NMRメタボローム解析を用いた絶食下コイ *Cyprinus carpio* L. の血漿中代謝物変動評価」
- 7) E. Kokushi, S. Uno, T. Harada, J. Koyama: Environmental Toxicology. (2012)
“¹H-NMR based metabolomics approach to assess toxicity of bunker A heavy oil to freshwater carp.”(in press)
- 8) htTCP://maps.google.co.jp/maps

(2) トランスクリプトミクスによる影響評価法の確立に関する研究

愛媛大学 仲山 慶

平成21～23年度累計予算額：5、078千円

(うち、平成23年度予算額：1、655千円)

予算額は、間接経費を含む。

【要旨】環境中には様々な化学物質が存在しており、生物はそれらに複合的に暴露されている。複数の化学物質による複合毒性はその重要性は認識されているものの、評価手法の確立には至っていない。本サブテーマでは2種の異なるストレスによる複合的な影響を遺伝子発現プロファイルの変化に基づいて、それぞれ単独による影響とは分離して評価する手法を構築することを初期目標とし、メダカを対象に①絶食・低温刺激試験と②PAHsの単独および複合暴露試験を実施した。さらに、①と②で構築した手法を用いて、実際に環境中に存在する化学物質の複合影響を、港湾域にて採取した底質からの抽出液を暴露することによって評価した。①の結果、作用機序も影響も異なることが予想されるストレスを組み合わせた場合、PC1とPC2がそれぞれ単独の影響を反映し、複合影響はPC1とPC2の両スコアの和として表現された。また、化学的性質が類似したフェナントレンとピレンを暴露した②の試験においては、両物質の化学的性質における類似性から予想された生体への作用機序の共通性を反映して、各化合物単独暴露による影響はPC2に反映され、それぞれの影響は分離されなかった。一方で、複合暴露による影響はPC1に投射され、明らかに単独暴露による影響とは区別された。このように、複合的なストレスを受けたメダカにおける生体影響を、PCAを基本とした解析法によって、単独のストレスによる影響とは分離して評価することが可能となった。また、実際に環境中に存在する化学物質の複合影響を、港湾域にて採取した底質からの抽出液を暴露することによって評価した結果、致死毒性が生じるよりも25倍以上低濃度の抽出液への暴露に対しても明確な生体応答が検出され、その応答の大きさは致死影響を指標とした時の毒性ポテンシャルと比例関係にあった。本研究で構築したトランスクリプトーム解析手法は、実環境中に存在する化学物質の複合影響の検出および評価に有効な手段になると思われる。

【キーワード】トランスクリプトミクス、複合毒性、メダカ、多環芳香族炭化水素、主成分分析

1. はじめに

環境中には様々な化学物質が存在しており、生物はそれらに複合的に暴露されている。複数の化学物質による影響、いわゆる複合影響はその重要性は認識されているものの、作用機序の複雑さ故、研究が遅れているのが現状である。個々の化合物を対象とした化学物質のリスク評価は、毒性物質の初期スクリーニングには重要な役割を持つが、化学物質の環境影響を評価する際には、より複雑な要因を加味する必要がある。我々は化学物質の複合影響に関する研究を継続して行っており、個々の化学物質は無作用濃度未満であっても、複合的に作用することで生物に対して悪影響を及ぼす事例を示してきた¹⁾。このような事例の積み重ねにより、複合影響の評価法を確立す

る必要性が高まっている。実際、我が国においても総排水毒性（WET）試験を導入するべく、試験法の検討が進められている。このように、排水中に含まれる化学物質による複合影響の評価手法は確立されつつあるが、環境中に存在する化学物質の複合影響を評価する手法は存在しないのが現状である。

複合影響評価手法の確立にあたり、化学物質の特性が多様でありその影響も多岐に渡ることから、影響の有無を判別する際の観測項目（エンドポイント）の選定が困難であるという問題点が挙げられる。現状では共通の尺度として致死影響あるいはそれに準ずるものが用いられている。しかしながら、近年の様々な化学物質の排出に関する法規制が奏功し、現在の環境中の濃度レベルで化学物質のみが原因で生物を死に至らしめることは、極端なケースを除いて考えにくい。したがって、環境中に存在するレベルでの化学物質の複合影響を評価する場合には致死影響をエンドポイントとして採用することができず、致死以前に起こる事象を観察する必要がある。

生体内で起こった変化を網羅的に検出する手法としてオーム解析手法が確立され、近年では環境毒性学の分野においても一般的に使われるようになった。具体的には遺伝子（トランスクリプトーム）やタンパク質（プロテオーム）、代謝物（メタボローム）の変動をそれぞれ網羅的に検出し、生体機能の変化や、特定の臓器や組織が受けた影響などを詳細に解析することができる手法である。中でもマイクロアレイ技術を用いたトランスクリプトーム解析、すなわちトランスクリプトミクスは、近年めざましい発展を遂げ、数万種類の遺伝子の発現レベルを精度良く検出することを可能としている。我々の研究グループでもメダカ²⁾やヒラメ³⁾などの魚類を対象にプラットフォームを開発し、毒性学や免疫学、発生学研究に応用している。このようにマイクロアレイ技術の発展に伴い、トランスクリプトミクス解析はきわめて汎用性の高い実験技術となり、分子メカニズムを念頭に置いた網羅的かつ定量的な化学物質暴露に対する生体応答の検出を可能としている。本技術が化学物質の複合影響の評価においても有効なツールとなると期待される。

2. 研究開発目的

前章で述べた通り、マイクロアレイ技術は広く利用されるようになったものの、同技術を用いた研究の多くは発現量が変化した遺伝子を羅列するにとどまり、そのデータ解析法は十分に成熟しているとは言えない。また、生体応答の理解には機能が既知な遺伝子の定量値のみが解析に使用され、機能が未知な遺伝子の発現量データは利用されないのが一般的である。我々の研究グループでは機能に関する情報が得られていない遺伝子であっても、それらの発現変動はその時生物が受けた外的刺激に対する応答反応であると考え、変動した全ての遺伝子の発現量データから応答の大きさとその生物学的意義を推定する手法を構築した。同手法を用いて、PCBsを暴露したメダカのオスにおける遺伝子発現プロファイルがメスのそれと類似していたこと、すなわちオスの脱雄性化が起こっていることを示した⁴⁾。そこで我々は、同データ解析手法が化学物質の複合影響評価にも応用可能ではないかと考えた。以上のことから、本研究では実験魚として一般的なメダカを対象として、トランスクリプトミクスによる複合影響評価をする方法を確立することを初期目標とした。さらに同手法を用いて実環境中に存在する化学物質の混合物の生態影響を評価することを最終目標とし、本研究ではそのための礎となるデータ解析手法の確立とシステムの構築を目的とした。

平成21年度は、本研究の主要な目的である複合毒性の評価を行うためのトランスクリプトーム

データ解析手法の構築および最適化を実施した。2種のまったく異なるストレスラーに対するメダカの生体応答を、遺伝子発現量の変化として捉え、各ストレスラー単独による影響と両者による複合的な影響をそれぞれ検出することを試みた。本試験では2種のストレスラーとして絶食および低温刺激を選択した。一般的に、生物が化学物質の毒性影響を受けた場合、生体内で様々な機能低下が引き起こされることが知られており、これは代謝の低下に他ならない。絶食による飢餓状態に陥った生物は代謝を低下させ、生命活動の維持に必要な最低限のエネルギーを産生・消費すると考えられている。また、低温条件下における生体内代謝経路に関わる酵素群の触媒効率が著しく低下することは容易に推察できる。このように代謝低下を引き起こす2種のストレスラーをモデルケースとして選択し、本研究で提案するデータの解析手法の妥当性評価を行った。

平成22年度は、上述のデータ解析手法によって化学物質の複合的な影響の検出が可能かを検証するとともに、影響の大きさの数値化を試みた。本試験では多環芳香族炭化水素（Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: PAHs）を対象物質とした。PAHsは主に化石燃料あるいはバイオマスの燃焼由来で発生するため、現在では環境中に遍在している。また、近年頻発している海難事故による重油あるいは原油の流出もPAHsによる環境汚染の一因である。環境中には多様な形態のPAHsが同時に存在していることがよく知られているにもかかわらず、PAHsによる複合毒性に関する情報は乏しいのが現状である。したがって、本試験ではPAHsの中でも比較的環境中の濃度が高く、魚類の体内に取り込まれやすいピレンおよびフェナントレンを暴露化合物として選択した。

平成23年度は、前年度までに構築した評価手法が、実際の環境中に存在する化学物質の複合暴露による生態影響の評価に適用可能かを検証した。港湾の底質には陸上および沿岸域にて使用された化学物質が蓄積・残留しているため、本研究では港湾より採取した底質に含まれる化学物質の複合影響を評価することとした。これまでの研究で、人間活動由来の化学物質による汚染が比較的進行していることが報告されている大阪湾およびスービック湾（フィリピン）を対象地域とした。それぞれの港湾域にて採取した底質に含まれる化学物質をメダカに暴露し、応答の大きさや応答した生体機能を検出し、各地点における化学物質の混合物が有する生態影響ポテンシャルを推定し、地点間の比較を行うことを目的とした。

3. 研究開発方法

（1）絶食・低温刺激試験（平成21年度）

ガラス水槽にメダカ4匹を収容した。これらを1週間絶食状態においた（絶食区）。一方、対照区として、1週間、毎日餌（アルテミア）を飽食まで与えた個体4匹を収容した水槽も用意した（対照区）。1週間後、絶食区および対照区の水槽1つずつから、すべての個体をサンプリングした。さらに、残りの絶食区の水槽を10℃に設定したインキュベータに1日収容して飼育を継続した（絶食-低温区）。同様に対照区の水槽1つも同じインキュベータに1日収容した（対照-低温区）。24時間後、インキュベータ内に放置した後、すべての個体をサンプリングして、直ちに肝臓を摘出した。肝臓は液体窒素にて凍結し、使用するまで-80℃で保存した。

（2）フェナントレンとピレンの単独または複合暴露試験（平成22年度）

オミックス解析のための暴露試験濃度を決定するために、数段階の濃度のフェナントレン ($C_{14}H_{10}$, MW: 178, CAS: 85-01-8) あるいはピレン ($C_{16}H_{10}$, MW: 202, CAS: 129-00-0) を飼育水に溶存させ、そこで月齢1ヶ月のヒメダカ稚魚の96時間毒性試験を行った。この毒性試験の結果からフェナントレンの暴露濃度を5および50 $\mu\text{g/L}$ 、ピレンの暴露濃度を3および50 $\mu\text{g/L}$ と決定した。さらに複合暴露試験濃度はフェナントレン5 $\mu\text{g/L}$ +ピレン3 $\mu\text{g/L}$ およびフェナントレン50 $\mu\text{g/L}$ +ピレン30 $\mu\text{g/L}$ とした。

ガラス水槽に2 Lの飼育水を用意した。水温は25℃に保ち、酸欠を防ぐために緩やかなエアレーションを施した。この飼育水に上記の濃度になるようにフェナントレン、ピレン、あるいは両物質を添加した。これらの飼育水槽に加えて、すべてのPAHsを含まないコントロール区も設けた。これらすべての水槽に25匹ずつのヒメダカ稚魚を収容した。暴露は96時間行い、0 (暴露試験直前)、24、96時間目にそれぞれの水槽から12匹ずつのヒメダカを採取した。暴露試験期間中、稚魚に餌を与えなかった。飼育水は毎日完全に交換する反止水式水槽で試験を行った。採取したヒメダカは直ちに液体窒素で凍結し、代謝物分析まで-80℃の冷凍庫で保存した。

(3) 底質抽出物暴露試験 (平成23年度)

底質試料は2004年に大阪湾より、2005年にフィリピンのスービック湾よりそれぞれ採取した。10 gの底質試料に含まれる化学物質をアセトン／ヘキサン (1:1) およびトルエンを用いて抽出した。有機溶媒をロータリーエバポレーターで蒸発させた後に、1 mLのアセトンに転溶したものを抽出液とした。

抽出液の急性毒性を調べるために、抽出液をアセトンで等倍、5倍、25倍、125倍希釈したものを準備した。試験水はアセトンの終濃度が0.01%となるように段階希釈した抽出液を添加して調製した。等倍の抽出液を添加した試験水において、1 Lあたりに1 gの底質から抽出された化学物質が含まれていることになる。1.7 L容ガラス製水槽に1 Lの試験水を入れ、各水槽にふ化後2.5週齢のメダカ稚魚を20個体ずつ入れた。暴露期間は72時間とし、試験水は毎日交換した。暴露終了まで死亡個体数を計数した。

抽出液の暴露に対するメダカの生体応答を検出するために、上記と同じ条件で暴露試験を実施した。ふ化後3.5週齢のメダカ稚魚に対して、アセトンの終濃度が0.01%となるように5倍および25倍希釈した抽出液を添加した試験水を24時間暴露した。暴露終了後、メダカ全魚体をトリゾール試薬 (インビトロジェン (株)) に浸漬し、使用するまで-80℃で保存した。

なお、すべての暴露試験は照明時間14時間、飼育水温25℃で行った。

(4) マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析 (トランスクリプトーム)

トリゾール試薬を使用し、試料より全RNAを抽出した。抽出したRNAはDNase処理を行った後にRNeasy Mini Kit (キアゲン) を用いて精製した。全RNAにOne Color Spike Mix (アジレントテクノロジー (株)) を加えた後、Quick Amp Labeling Kit (アジレントテクノロジー (株)) を用いて相補的RNA (cRNA) を合成・増幅し、cRNAをCy3で蛍光標識した。Cy3標識されたcRNAは精製した後に36,460プローブからなる4×44のマイクロアレイに65℃で17時間ハイブリダイズさせた。その後、マイクロアレイを洗浄し、DNA Microarray Scanner (アジレントテクノロジー (株)) によりスキャンした。画像データを基に各プローブの蛍光強度を数値化し、GeneSpring GX 7.3 (アジレ

ントテクノロジー(株))により正規化および対数変換した。すべての検体で共通して検出可能であったプローブのみを選択し、グループ間の遺伝子発現の変動を調べた。

本研究で用いたマイクロアレイに搭載されたプローブが検出する遺伝子に関する情報は、それぞれの塩基配列を基に実施した相同性検索 (BlastX) より得た。また、それぞれの遺伝子に対してBlast2GO⁵⁾を用いて生物学的プロセスの遺伝子オントロジーのターム (GO term) を付加し、各遺伝子産物の機能情報を得た。

定量可能であった遺伝子の全データを用いて、24時間および96時間暴露試料においてそれぞれ暴露群とコントロール群すべてを対象として、等分散を仮定しない一元配置分散分析 (ANOVA) を行った。処理区間で有意差 ($p < 0.05$) が検出されたプローブのみを選別し、これらのプローブから得られたデータのみを主成分分析 (PCA) に投入した。主成分1 (PC1) あるいはPC2依存的に発現が変動した遺伝子をスクリーニングした後、有意に影響を受けている生物学的プロセスの遺伝子オントロジーをフィッシャーの正確確率検定によって検出した。すべての統計解析はR (Ver. 2.12.2) により行った。

4. 結果及び考察

(1) 絶食・低温刺激試験 (平成21年度)

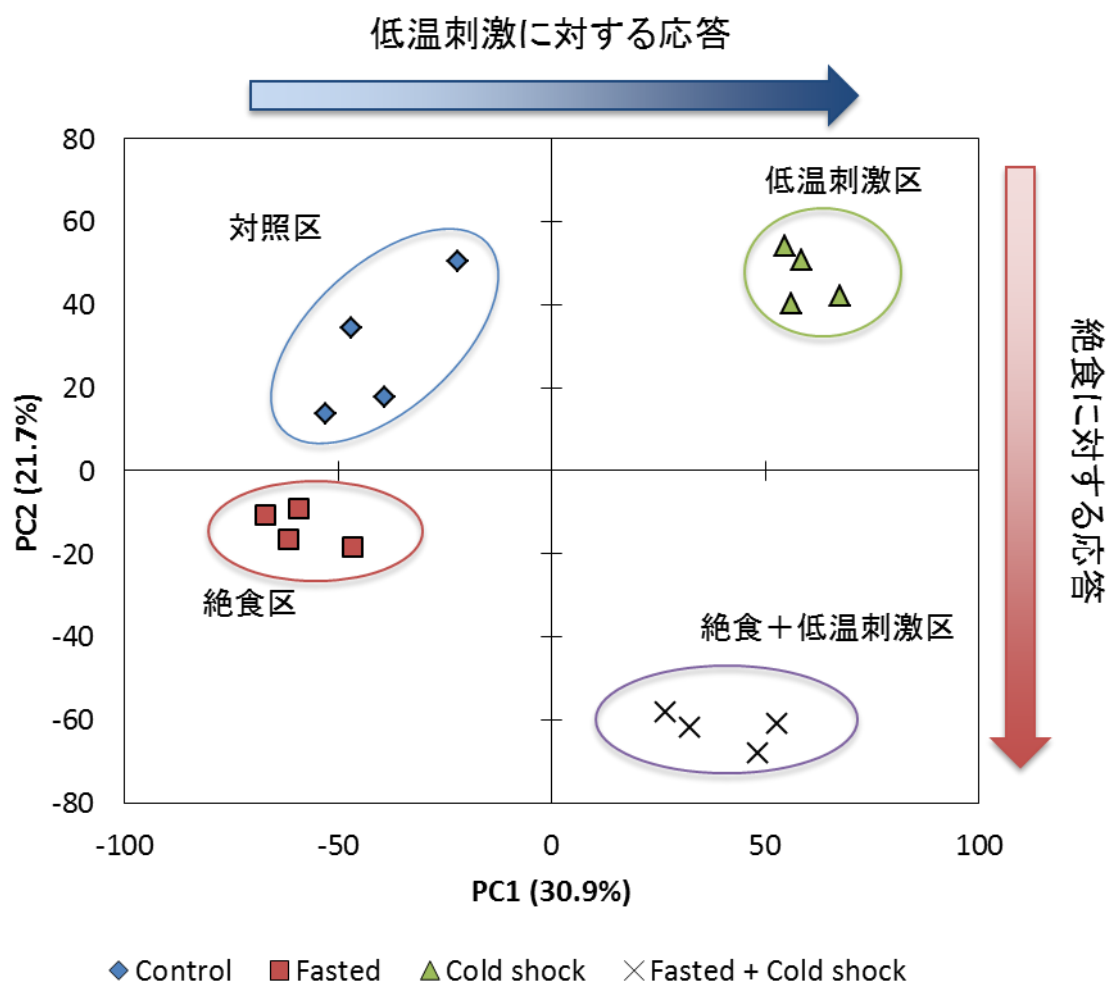
1) 主成分分析による絶食および低温刺激の単独または複合影響の抽出

マイクロアレイ実験より、すべての試料で共通して定量可能であった19,920プローブのデータを抽出した。これらのデータに対して一元配置分散分析を行い、群間で有意に異なる発現量を示した11,161プローブの発現量データを得た。これらの絶食あるいは低温刺激によって発現量が変化した遺伝子群のデータをPCAに供し、各個体におけるPC1およびPC2スコアを得た (図(2)-1)。PCAの結果、対照区、低温刺激区、絶食区、絶食+低温刺激区の4群はそれぞれ個別のグループを形成し、PC1 (30.9%) が低温刺激の影響を、PC2 (21.7%) が絶食による影響を明確に反映した。低温および絶食の複合ストレスを与えた区は、PC1およびPC2の両方に得点を得て、単独ストレスによる影響と分離された。以上のことから、絶食に対するメダカの生体応答は低温刺激に対するそれとは大きく異なっており、それぞれ独立していると考えられた。また、絶食と低温刺激の両方のストレスを受けた個体においては、それぞれのストレスに対する応答が同時に起こっていると推察された。

PCAは、数万遺伝子の発現量を表す数値として得られるきわめて高次元なマイクロアレイデータの次元を減少させ、遺伝子発現量における分散の特徴を抽出するのに有効な手法である。我々が行った別の研究でも、マイクロアレイデータをPCAにて解析することにより、メダカにおけるPCBs暴露に対する応答の特徴を抽出することに成功している⁴⁾。本手法は単に環境ストレスに対して応答する遺伝子群のスクリーニングだけでなく、数千~数万種類の遺伝子の発現データをもとに、生物が受けている影響のレベルを数値化し、少なくとも二種類のストレスによる複合的な影響を二次元の指標として導き出すことを可能とした。

2) 絶食による影響

GO termを用いたデータ解析の結果、絶食によって脂質代謝が劇的に影響を受けていることが明



図(2)-1 絶食および低温刺激によって変動した遺伝子群の発現量データを用いた主成分分析の結果

らかとなった。脂肪酸の合成 (fatty acid biosynthetic process [G0:0006633]) とコレステロールの合成 (cholesterol biosynthetic process [G0:0006695]) は抑制されたが、脂肪酸の β 酸化 (fatty acid beta-oxidation [G0:0006635]) は亢進された (表(2)-1、図(2)-2)。これは絶食に対する典型的な応答であり、脂質の生合成や輸送を抑制させることでエネルギー消費を減少させる一方で、 β 酸化によって体内に蓄積していた脂肪酸からアセチルCoAを合成させてエネルギー産生を促す。このとき、解糖系 (glycolysis [G0:0006096]) の抑制も引き起こされていたことから、絶食条件下のメダカにおいてはアセチルCoAの合成経路が解糖系から β 酸化へとシフトすることが示された。

本試験と並行して実施したメタボローム解析によって、TCA回路における代謝物のひとつである2-オキソグルタル酸の誘導が検出された。2-オキソグルタル酸はTCA回路内で合成および代謝されることに加え、グルタミン酸の異化によっても合成されることが知られている。トランスクリプトーム解析においても、グルタミン酸を2-オキソグルタル酸へと代謝するグルタミン酸脱水素酵

表(2)-1 絶食に対して応答した生物学的プロセスのGO term

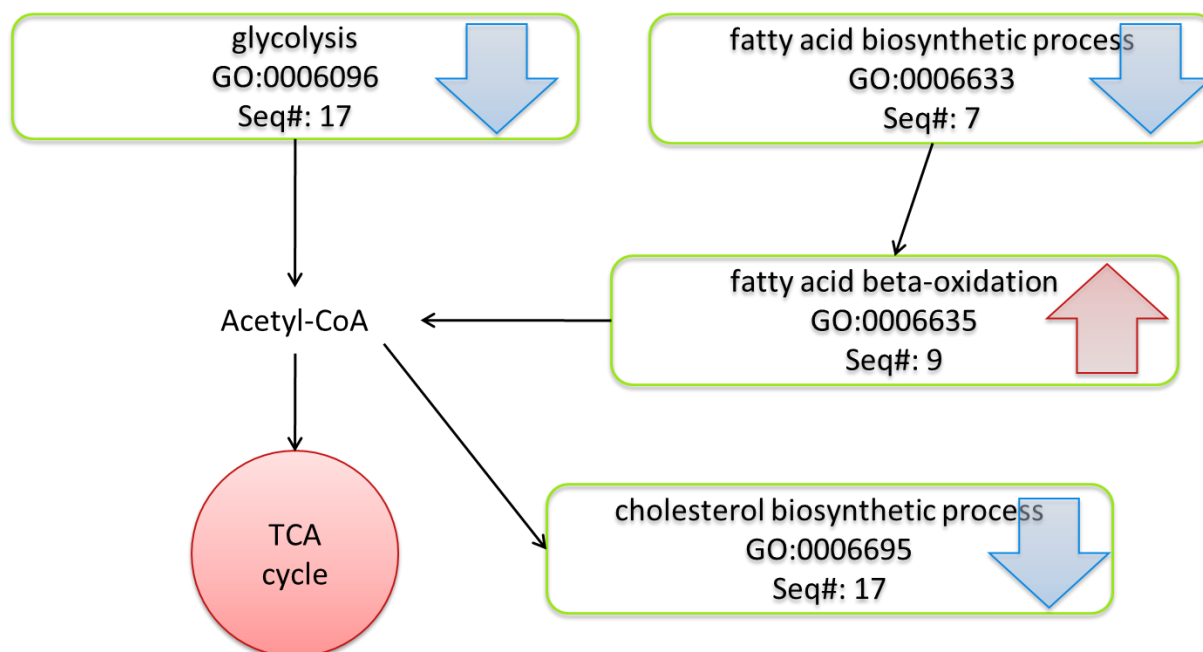
GO ID	GO term	Sequence number		p-value
		altered	(total)	
Down-regulated				
iron homeostasis				
G0:0006826	iron ion transport	18	(101)	0.001
G0:0006879	cellular iron ion homeostasis	17	(106)	0.005
lipid metabolism				
G0:0006629	lipid metabolic process	11	(48)	0.002
G0:0006631	fatty acid metabolic process	11	(36)	<0.001
G0:0006633	fatty acid biosynthetic process	8	(20)	<0.001
G0:0006695	cholesterol biosynthetic process	17	(27)	<0.001
G0:0008299	isoprenoid biosynthetic process	6	(14)	0.002
glycolysis				
G0:0006096	glycolysis	16	(61)	<0.001
G0:0006012	galactose metabolic process	6	(8)	<0.001
G0:0006006	glucose metabolic process	5	(24)	0.041
G0:0006086	acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate	3	(9)	0.041
immune system				
G0:0042110	T cell activation	3	(5)	0.013
G0:0050900	leukocyte migration	2	(3)	0.039
G0:0006935	chemotaxis	4	(16)	0.040
G0:0006954	inflammatory response	7	(43)	0.047
G0:0006956	complement activation	4	(17)	0.047
Up-regulated				
energy production				
G0:0006635	fatty acid beta-oxidation	8	(25)	0.003
G0:0006533	aspartate catabolic process	3	(4)	0.013
G0:0046327	glycerol biosynthetic process from pyruvate	2	(2)	0.032
immune system				
G0:0019221	cytokine-mediated signaling pathway	5	(20)	0.039
cell proliferation				
G0:0008156	negative regulation of DNA replication	4	(7)	0.008
G0:0051329	interphase of mitotic cell cycle	3	(3)	0.008

Statistical significance was analyzed by Fisher's exact test: $p < 0.05$.

素 (EC:1.4.1.3) の発現量が、絶食によって約2.5倍増加したことが明らかとなった。これらのことから、絶食によってグルタミン酸の異化を介したTCA回路へのエネルギー源の供給が亢進したと考えられた。

3) 低温刺激による影響

トランスクリプトーム解析の結果、24時間の低温刺激はタンパク質の安定性 (protein stabilization [G0:0050821]) や膜の流動性 (regulation of mitochondrial membrane permeability



図(2)-2 絶食によって変動した遺伝子群の生物学的遺伝子オントロジー

[GO:0046902])、シャペロン活性 (protein polymerization [GO:0051258]; protein folding [GO:0006457]) に関連する遺伝子を変動させ、代謝プロセスを抑制した絶食の影響とは異なった。低温刺激はタンパク質の安定性や膜の流動性を低下させることが報告されており⁶⁾、本研究の結果はそれと矛盾しなかった。これらの影響が結果としてシャペロン活性を上昇させたと考えられ、この応答はおそらく低温刺激に対する防御反応であると推察された。

低温刺激によって最も大きく変動した遺伝子のひとつとして、ステアリン酸CoA脱飽和酵素が挙げられる。同遺伝子は絶食によって約2倍抑制されたが、低温刺激によって17倍に増加した。ステアリン酸CoA脱飽和酵素は細胞膜を構成する脂質の不飽和度を上げることで膜の流動性を上昇させることが知られている。先に述べた通り、低温刺激は膜の流動性を低下させるため、これに対してステアリン酸CoA脱飽和酵素を誘導することで膜の流動性を上昇させる応答が生じたと考えられ、この反応は低温環境への適応の重要なプロセスであることが予想された。

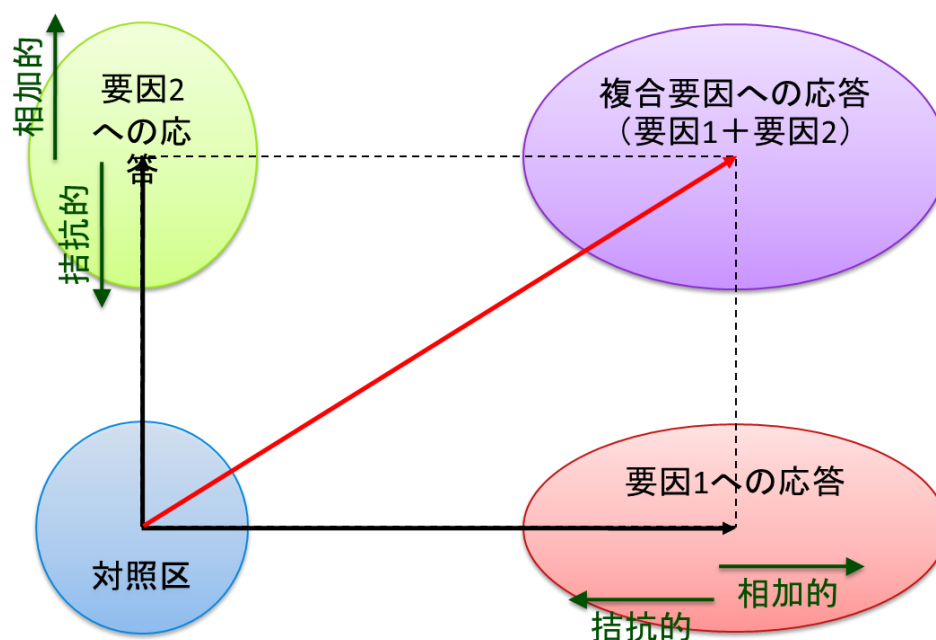
4) 絶食・低温刺激試験のまとめ

ここまで述べてきた通り、本研究にて我々が用いたPCAをベースとしたマイクロアレイデータの解析手法は、二種類の環境ストレスに対する応答をそれぞれ検出したにとどまらず、両方のストレスを受けた個体においてはそれぞれのストレスに対する応答が同時に起こっていることを明確に捉えることを可能とした。本実験で採用した絶食や低温刺激のように作用機序が大きく異なることが予想されるストレスの組み合わせの場合は、PCAにてそれぞれの影響が異なる次元に反映され、複合影響はその和として表すことが可能だろうと思われる (図(2)-3)。類似の作用機序を有するストレスの組み合わせの場合、あるいは化学物質暴露に対する応答を検出する場合

表(2)-2 低温刺激に対して応答した生物学的プロセスのGO term

GO ID	GO term	Sequence number		p-value
		altered	(total)	
Down-regulated				
protein stability				
GO:0050821	protein stabilization	7	(18)	0.039
GO:0022417	protein maturation by protein folding	3	(3)	0.034
membrane fluidity				
GO:0046902	regulation of mitochondrial membrane permeability	3	(3)	0.034
GO:0006656	phosphatidylcholine biosynthetic process	4	(7)	0.047
Up-regulated				
chaperone activity				
GO:0051258	protein polymerization	14	(26)	<0.001
GO:0006457	protein folding	22	(140)	<0.001
GO:0006986	response to unfolded protein	6	(22)	0.007
cell redox				
GO:0045454	cell redox homeostasis	7	(32)	0.010
cholesterol biosynthesis				
GO:0008299	isoprenoid biosynthetic process	4	(14)	0.023

Statistical significance was analyzed by Fisher's exact test: $p < 0.05$.



図(2)-3 主成分分析をベースとした解析法による作用機序が独立している場合の複合影響の表現

にも本手法が適用可能なのか次の実験で検証した。

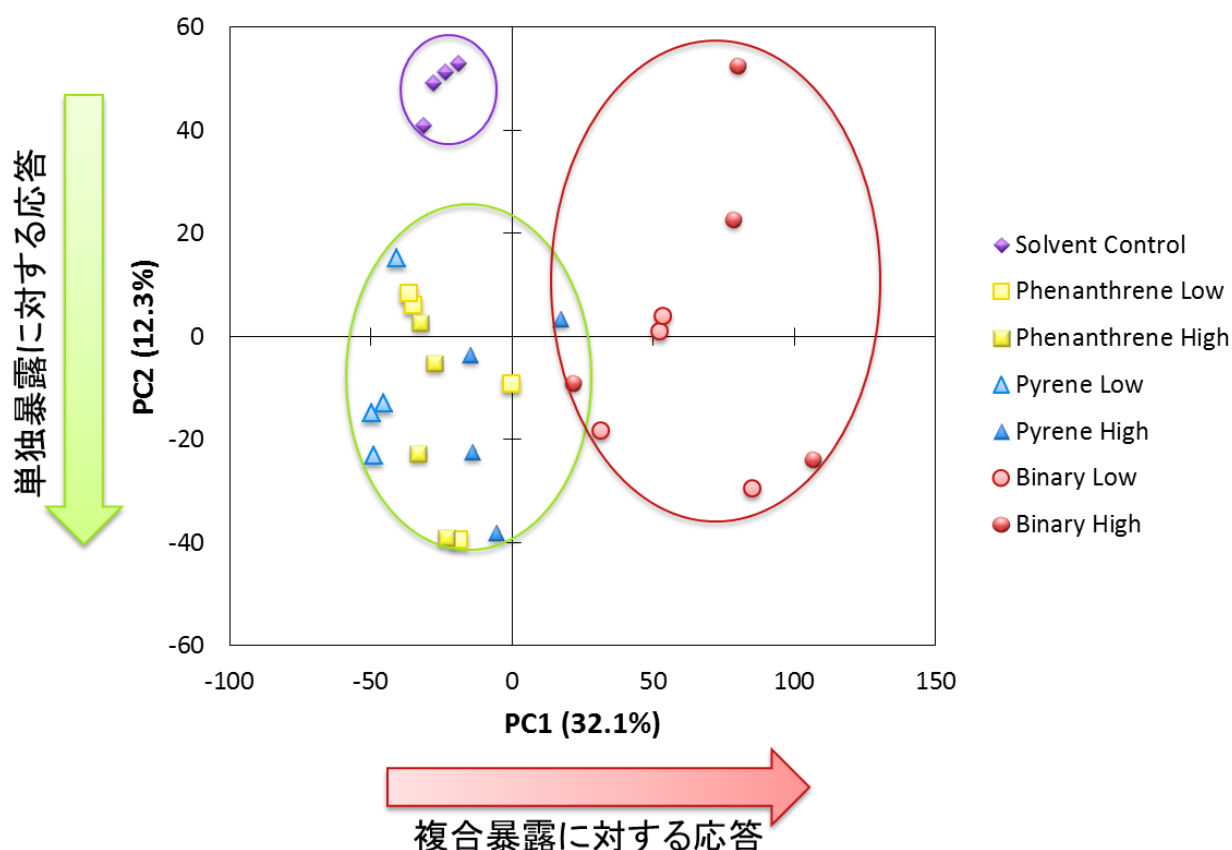
（２）フェナントレンとピレンの単独または複合暴露試験（平成22年度）

１）主成分分析によるフェナントレンおよびピレンの単独または複合影響の解析

フェナントレンおよびピレンを単独または複合で24時間または96時間暴露したメダカ稚魚における遺伝子発現プロファイルデータをもとに主成分分析を行った（図（2）-4）。24時間暴露の結果、フェナントレンまたはピレンの単独暴露を受けた個体は、PC2に沿って対照区の個体とは分離され、PC2のスコアは単独のPAHsによる影響を反映しているものと考えられた。フェナントレンに暴露された個体とピレンに暴露された個体が分離しなかったことから、両化合物による影響は類似していると推察された。また、両化合物ともに低濃度区と高濃度区が分離しておらず、濃度依存的な影響は相対的に弱いと考えられた。一方、フェナントレンとピレンの複合暴露を受けた個体はPC1に沿って他の処理区の個体とは分離され、PC1のスコアが複合影響を反映していることが明確に示された。複合暴露区においても低濃度区と高濃度区が分離しておらず、濃度の違いによる影響の差異は小さいと考えられた。96時間暴露試験では、24時間暴露試験ほど処理区間の隔離が明確ではなく、PC1がおそらくは複合影響を反映していると考えられたが、PC2が何を反映しているかを現時点では断定することはできなかった。以上のPCAの結果から、化学物質特異的な影響を検出することを意図する場合には、後述するような絶食などの要因がノイズとなり得るため、24時間以内の比較的短期暴露試験を実施すべきであると考えられた。

２）フェナントレンおよびピレンによる影響の詳細解析

PC1またはPC2に対して有意な相関関係を示したプローブを抽出した後、フェナントレンおよびピレンの単独または複合暴露によって誘導あるいは抑制された遺伝子群を検出した。それらのGOピレンの単独または複合暴露によって誘導あるいは抑制された遺伝子群を検出した。それらのGO termを用いた解析を行ったところ、誘導を受けた遺伝子群は単独暴露と複合暴露で重複していることが明らかとなった。誘導された遺伝子群は免疫応答（immune response [GO:0006955]）やアポトーシス誘導（induction of apoptosis [GO:0006917]）、脂質代謝（lipid metabolic process [GO:0006629]）、酸化ストレス（response to oxidative stress [GO:0006979]）に対する応答などに関連するものであった。それらの遺伝子群の変動パターンから影響を推察したところ、単独暴露と複合暴露でほぼ同等であるか、複合暴露が単独暴露の和すなわち相加影響として現れていた。一方で、抑制された遺伝子群のほとんどは複合暴露群で特異的であり、単独暴露では影響を受けていなかった。これらの抑制された遺伝子群はリン酸輸送（phosphate transport [GO:0006817]）、コラーゲン異化（collagen catabolic process [GO:0030574]）、酸素輸送（oxygen transport [GO:0015671]）、ヘム合成（heme biosynthetic process [GO:0006783]）、解糖系（glycolysis [GO:0006096]）などに関与するものであった。解糖系に関連する遺伝子のいくつかは複合暴露区で2倍程度抑制されていたにもかかわらず、単独暴露区ではまったく変化していなかった。また、24時間の暴露ではコラーゲン合成および異化に関連する遺伝子群は複合暴露区で2倍から10倍以上抑制されていたが、単独暴露区ではほとんど変化しておらず、コラーゲン合成に対するPAHsの複合影響が劇的であることを示唆していた（図（2）-5）。このように、誘導された遺伝子群から推定されるPAHsの複合影響は相加的あるいはそれ以下であったのに対し、抑制された遺



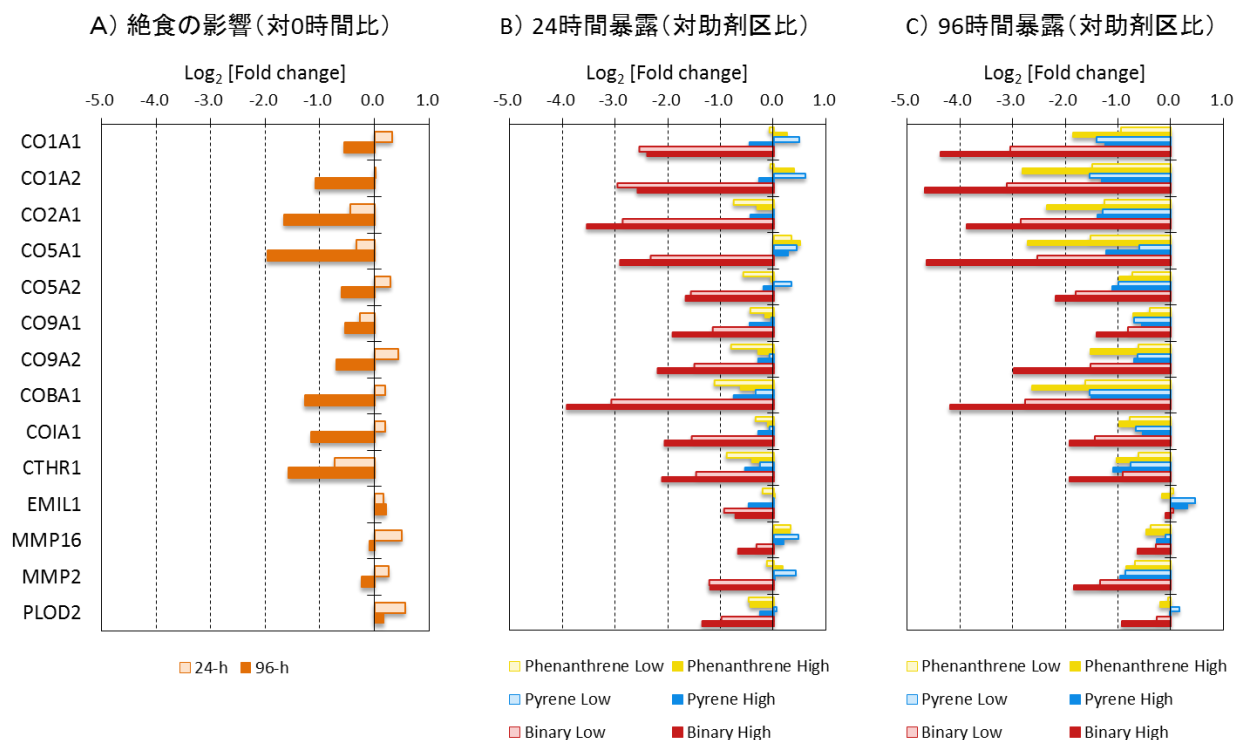
図(2)-4 フェナントレンとピレンの単独および複合暴露によって変動した遺伝子群の発現量データを用いた主成分分析の結果

伝子群から推定される複合影響は単独暴露による影響から予想できるものではなく、無作用レベルの化合物が混合することではじめて引き起こされるものであった。

3) 絶食による影響

暴露開始時(0時間)と暴露24時間および96時間における対照区の個体の遺伝子発現プロファイル PCAに供した結果を図(2)-6に示す。その結果、3群の個体はそれぞれ3つのグループに完全に分離し、PC1 (50.4%) は絶食による24時間と96時間での共通の影響を、PC2 (19.9%) は絶食に対する初期応答と後期応答の違いを反映していると推察された。共通の応答としては、DNA複製 (DNA replication [G0:0006260]) や細胞分裂 (cell division [G0:0051301])、ヘム合成 (heme biosynthetic process [G0:0006783])、脂肪酸β酸化 (fatty acid beta-oxidation [G0:0006635]) が抑制されていた一方で、グリコーゲンの代謝 (glycogen metabolic process [G0:0005977]) が促進されていた。これらに関連する遺伝子群の変化量は24時間と96時間でほぼ同等であった。また、初期応答としてはTCA回路 (tricarboxylic acid cycle [G0:0006099]) の亢進が、後期応答としてはグルコースの恒常性維持に関する機能 (glucose homeostasis [G0:0042593]) の誘導やコラーゲン異化の抑制 (collagen catabolic process [G0:0030574]) が引き起こされていた。

コラーゲン異化の阻害に着目すると、96時間の絶食によって最大で4倍程度の発現抑制が起こっ

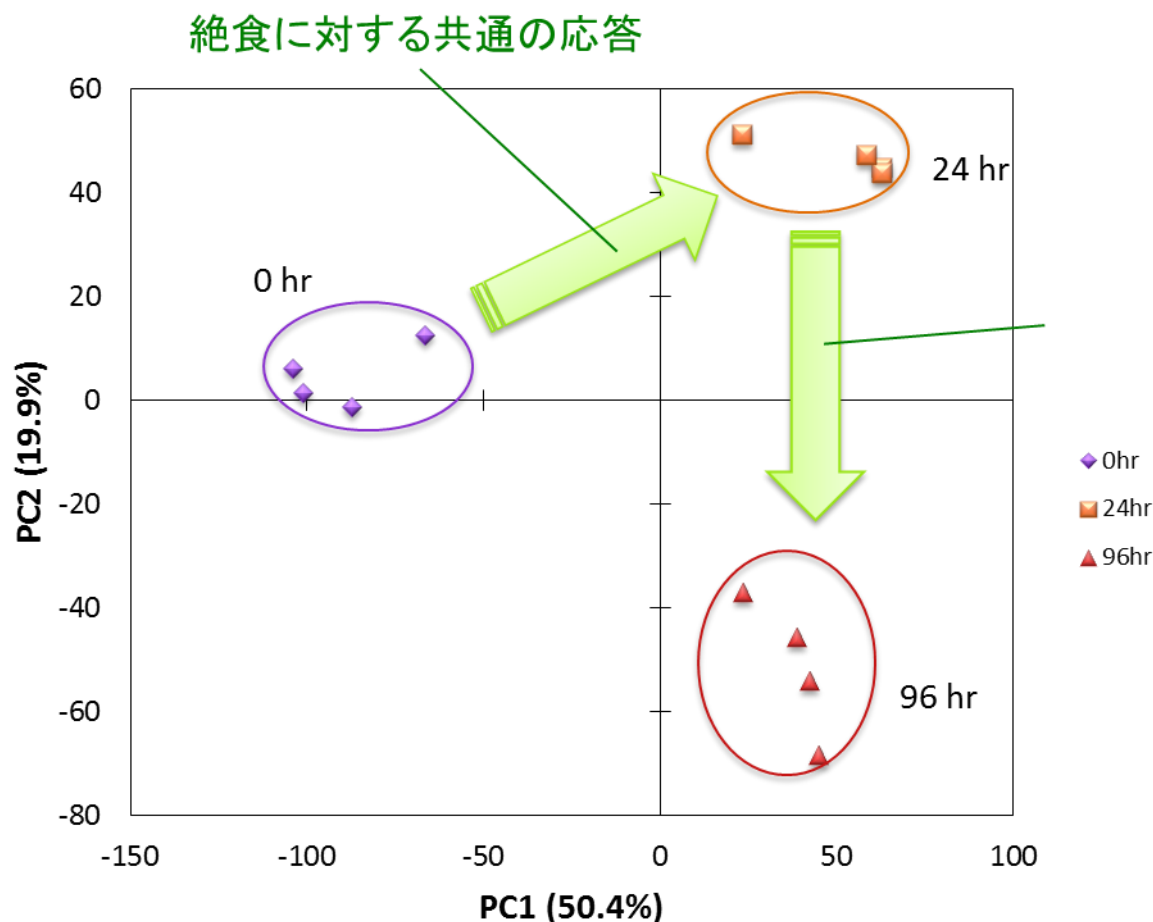


図(2)-5絶食あるいはフェナントレンとピレンの単独および複合暴露によるコラーゲンの合成・異化に関連する遺伝子群の発現量変化

ていた(図(2)-5)。先に述べた通り、24時間のPAHs複合暴露によってもコラーゲンの発現は阻害されていた。本試験では同一暴露時間の個体同士の発現量比較を行っていたことに加え、PAHsによる影響が絶食による影響よりも遙かに強かったためそれほど大きな問題とはならないが、これは化学物質による影響にも匹敵するものであり、稚魚にとって96時間の絶食状態は代謝物や遺伝子発現プロファイルに与える影響が非常に大きいことが示された。このことが原因で96時間暴露のメダカから明確な化学物質の影響が見出せなかったと考えられ、稚魚を対象とした化学物質の影響試験は24時間程度の暴露試験から評価するべきであると結論づけられた。

4) PCAによるPAHsの複合暴露の影響評価

本実験で用いたフェナントレンとピレンは化学的特性が類似しているため、これらの生物への作用機序には共通点が多いと考えられる。実際に本研究のPCAの結果でも、フェナントレン単独暴露区とピレン単独暴露区の個体は分離せず、同一のグループに属すると見なされた(図(2)-4)。このとき、単独暴露区は対照区に対してPC2方向に分離された一方で、複合暴露区はPC1方向に分離された。以上のことから、作用機序が類似している複数の環境ストレスを与えた場合、各成分の影響は類似しているため同一の次元で表現され、複合影響として特異的に検出される応答は単独影響とは異なる次元で表現されると仮説を立てた(図(2)-7)。今後、他の化学物質セットを用



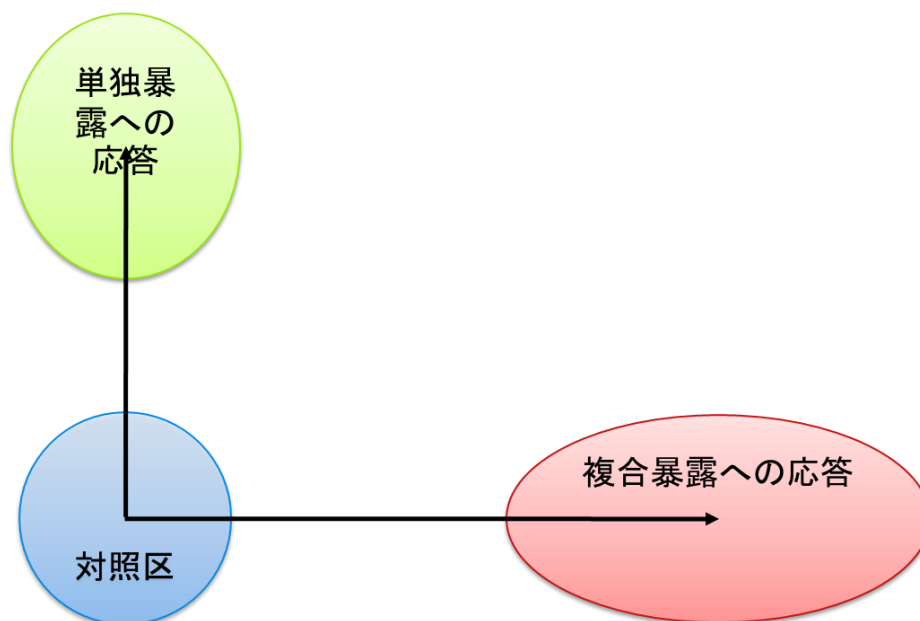
図(2)-6 暴露開始時（0時間）と暴露24時間および96時間において発現量が変動した遺伝子群の発現量データを用いた主成分分析の結果

いて本仮説を検証する。

（３）底質抽出物暴露試験

１）急性毒性試験

底質抽出液の72時間での急性毒性試験を実施したところ、スービック湾にて採取した底質の抽出液を等倍で添加した区（1 g底質/L相当）において75%の致死率がみられた。過去の研究でスービック湾ではPAHsの汚染が進行していることが報告されており、本試験で観察された急性毒性はPAHsによる寄与が大きいと予想された。しかし、底質中に含まれる化学物質の種類や濃度は明らかでないため、今後、化学分析によって原因である化学物質を同定および測定する必要がある。また、大阪湾にて採取した底質の抽出液では致死影響は観察されず、大阪湾の底質に含まれる化学物質は致死影響をエンドポイントとした場合、総量としての毒性ポテンシャルは相対的に低いことが明らかとなった。



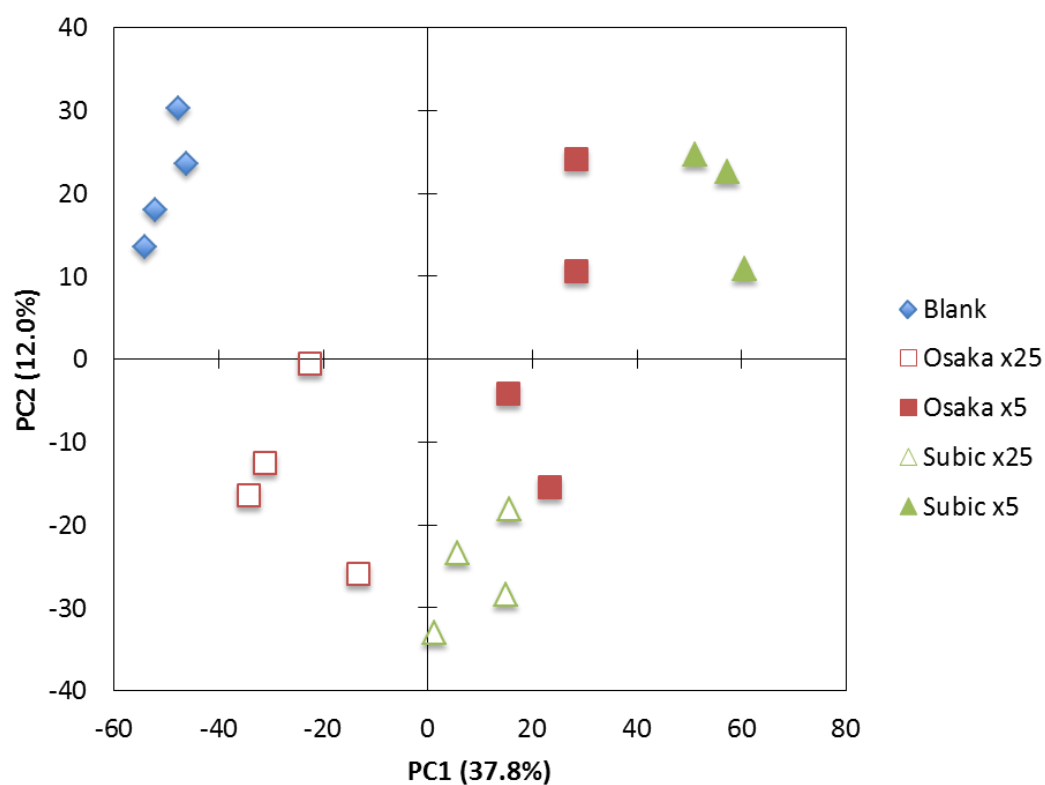
図(2)-7 主成分分析をベースとした解析法による作用機序が類似している場合の複合影響の表現

本試験の結果を受け、トランスクリプトーム解析は5倍および25倍希釈した抽出液を暴露したメダカにおいて実施することとした。

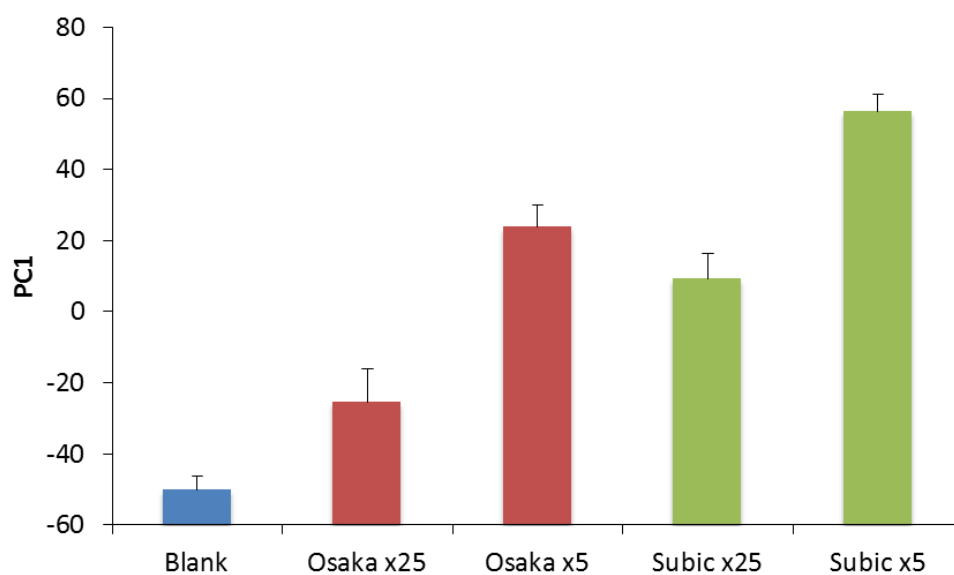
2) トランスクリプトーム解析による抽出液暴露に対する生体応答の検出

先述の(1)および(2)の試験結果を受け、本実験では底質抽出液を24時間暴露した後の遺伝子発現プロファイルの変化をPCAによって検出することを試みた。処理区間で有意な発現量変化が検出された3,523プローブのデータをPCAに供した結果を図(2)-8に示す。PC1(37.8%)に沿って各区の個体が分離されたため、各処理区のPC1スコアの平均値を求めた(図(2)-9)。その結果、PC1のスコアは対照区、25倍希釈区、5倍希釈区の順に濃度依存的な変化を示した。大阪湾とスービック湾を比較したところ、スービック湾の5倍希釈抽出液を暴露した個体のPC1スコアが対照区から最も離れており、スービック湾の25倍希釈区と大阪湾の5倍希釈区がほぼ同レベルであった。このことから、スービック湾の抽出液に対する生体応答の方が大阪湾の抽出液に対するそれよりも大きく、スービック湾の底質に含まれる化学物質の方が総量として生態影響ポテンシャルは高いことが推定された。この結果は、先に実施した急性毒性試験から得られた毒性ポテンシャルの評価結果と一致していた。したがって、本研究にて構築した複合毒性の評価手法は環境試料の生態影響評価にも適用可能であり、致死毒性のような急性毒性が発現するよりも25倍以上低濃度であっても、その毒性ポテンシャルを推定するのに有効であることが示された。

現状としては、底質抽出液暴露に対する応答から大阪湾とスービック湾の違いを検出するには至らなかった。ここまでの解析で地点間の差異が検出されなかった理由として2つの可能性が考えられる。第一に、大阪湾とスービック湾の底質に含まれていた化学物質の複合影響が実際に類似していたことが考えられる。第二に、両地点の底質抽出液暴露による影響には違いが存在するも



図(2)-8 大阪湾またはスービック湾で採取した底質からの抽出液の暴露によって変動した遺伝子群の発現量データを用いた主成分分析の結果



図(2)-9 各底質抽出液の暴露区における遺伝子発現プロファイルの変化から求めた第一主成分のスコア

の、一部の限られた遺伝子の発現のみにしか生じなかった可能性が挙げられる。今後は、底質中に含まれている化学物質を同定および測定するとともに、上記の可能性について検証する予定である。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究により複合的なストレスを受けたメダカにおける生体影響を、PCAを基本としたオミックスデータの解析法によって、単独のストレスによる影響とは分離して評価することが可能となった。これまでに雌雄差を反映した遺伝子群の検出や、単独のストレスによって発現量に変化する遺伝子群の検出にPCAが用いられることはあったが⁴⁾、複合影響の検出に応用したのは本研究が初めてである。本試験で与えたような絶食と低温刺激のように作用機序も影響も異なることが予想されるストレスを組み合わせた場合、PC1とPC2がそれぞれ単独の影響を反映し、複合影響はPC1とPC2の両スコアの和として表現された。しかしながら、化学的性質が類似したフェナントレンとピレンを暴露した試験においては、それらの化合物の挙動や影響に共通性が多く見られることは容易に予想可能であり、実際に両化合物単独暴露による影響はPC2のみに反映されており、それぞれの化合物の影響は分離されなかった。一方で、複合暴露による影響はPC1に投射され、明らかに単独暴露による影響とは区別された。さらに、本手法を実環境中から採取した底質試料中に含まれる化学物質暴露に対する応答の検出に応用したところ、致死影響が現れるよりも遙かに低濃度であっても生体応答を検出でき、その応答の大きさは致死影響を指標とした時の毒性ポテンシャルと比例関係にあった。つまり、現状では致死影響あるいはそれに準ずるエンドポイントでしか複合毒性は評価されていないが、本手法を用いることで、より高感度で複合毒性を検出することが可能となったと言える。このように本手法は、我々が最終目標として掲げている実環境中に存在する汚染物質の複合影響評価および影響度の数値化のために大いに貢献すると確信している。

PAHsの単独暴露による影響に関する知見は比較的多く存在するが、複合影響に関する知見は乏しい。本試験では、単独暴露区ではまったく影響を受けていなかった解糖系やコラーゲン合成系が複合暴露区で顕著に抑制されていた。このことは、化学物質の複合作用によって、単独の化学物質を対象とした暴露試験からはまったく推定できない影響が引き起こされることを示しており、複合毒性の優れたモデルケースとなり得ると同時に複合影響評価の重要性を我々に再認識させた。

(2) 環境政策への貢献

化学物質の複合影響についてはその重要性は認識されているものの、作用機序の複雑さ故、研究が遅れているのが現状である。個々の化合物を対象とした化学物質のリスク評価は、毒性物質の初期スクリーニングには重要な役割を持つが、化学物質の環境影響を評価する際には、より複雑な要因を加味する必要がある。本研究は、個々の化学物質は無作用濃度未満であっても、複合的に作用することで生物に対して悪影響を及ぼすことを示しており、このことは現行の化学物質の環境影響評価手法の有用性を根幹から揺るがすものである。現状では、複合影響の評価手法は確立されておらず、海外ではすでに実施されている工場等の全排水を対象とした生物試験（WET

test) についても、我が国では未だ検討段階である。本研究より得られる成果は、化学物質の複合毒性を広く認識させることに貢献するのみならず、将来的に確立すべき複合毒性の影響評価手法の礎となるポテンシャルを有している。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況 ※【別添】H23研究等報告書作成要領 参照

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) S. Uno, A. Shintoyo, E. Kokushi, M. Yamamoto, K. Nakayama and J. Koyama: Environmental Science and Pollution Research (2012)
 “Gas chromatography-mass spectrometry for metabolite profiling of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) juveniles exposed to malathion” (in press)

<査読付論文に準ずる成果発表> (「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可。)
 該当せず。

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 仲山 慶、半藤逸樹、北村真一：平成22年度日本水産学会春季大会 水産環境保全委員会主催シンポジウム「水産環境における化学物質汚染の現状・評価・対策」(2010)
 「複合的環境ストレスに対する生体影響評価」
- 2) K. Nakayama, I.C. Handoh, J.Y. Song and S.I. Kitamura: 6th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology, Hong Kong SAR, China, 2010.
 “Analyzing the effects of multiple environmental stressors by microarray data.”
- 3) K. Nakayama, I.C. Handoh, J.Y. Song and S.I. Kitamura: The 8th International Symposium on Advanced Environmental Monitoring, Sapporo, Japan, 2010.
 “Evaluation of binary effects of environmental stressors using transcriptomic data.”
- 4) 仲山 慶：日本環境毒性学会特別セミナー「環境・健康分野へのOMICSの活用」(2010)
 「トランスクリプトームデータを用いた複合影響評価」
- 5) K. Nakayama, I.C. Handoh, J.Y. Song, and S.I. Kitamura: SETAC North America 31st Annual Meeting, Portland, OR, USA, 2010.
 “Evaluation of the binary effects of environmental stressors using transcriptomic data.”
- 6) K. Nakayama, S. Uno, Y. Murakami and S.I. Kitamura: 15th International Symposium on

Toxicity Assessment, Hong Kong SAR, China, 2011.

“Toxicity assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) based on transcriptome data.”

- 7) S. Uno, K. Nakayama, E. Kokushi, A. Shintoyo, M. Yamamoto, Y. Murakami, S.I. Kitamura and J. Koyama: 15th International Symposium on Toxicity Assessment, Hong Kong SAR, China, 2011.

“Toxicity assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) based on metabolomic analyses.”

- 8) S. Uno, K. Nakayama, T. Nino, E. Kokushi and J. Koyama: International Symposium on Advanced Studies by Young Scientists on Environmental Pollution and Ecotoxicology, Matsuyama, Japan, 2011.

“Metabolomics approach to evaluate effects of environmental contaminants in fish.”

- 9) 仲山 慶、宇野誠一、國師恵美子、新豊 葵、小山次朗、村上安則、北村真一：第17回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会（2011）

「多環芳香族炭化水素の単独・複合暴露に対する生体応答の解析」

- 10) 宇野誠一、仲山 慶、北村真一、國師恵美子、新豊 葵、小山次朗：第17回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会（2011）

「PAH類に暴露したヒメダカ稚魚のメタボロームとトランスクリプトームの変動の比較」

- 11) 仲山 慶、宇野誠一、半藤逸樹、北村真一：フォーラム2011：衛生薬学・環境トキシコロジー、フォーラムIII「フィールドをMolecular Toxicology手法で測る～環境汚染物質の生体・生態影響～」（2011）

「複合的な環境要因に対する生体応答の検出と影響の評価」

- 12) K. Nakayama, S. Uno, E. Kokushi, J. Koyama, I.C. Handoh and S.I. Kitamura: 2011 International Conference on Environmental OMICS, Guangzhou, China, 2011.

“Transcriptomic and metabolomic changes caused by the effects of single and combined environmental stressors.”

- 13) S. Uno, K. Nakayama, S.I. Kitamura, Y. Murakami, E. Kokushi, A. Shintoyo, K. Ito and J. Koyama: 2011 International Conference on Environmental OMICS, Guangzhou, China, 2011.

“Toxicity evaluations for individual and mixed exposures of phenanthrene and pyrene in medaka (*Oryzias latipes*) alevin with metabolomics and transcriptomics.”

- 14) K. Nakayama, S. Uno, E. Kokushi, A. Shintoyo, Ito K, J. Koyama, I.C. Handoh and S.I. Kitamura: 6th SETAC World Congress/SETAC Europe 22nd Annual Meeting, Berlin, Germany, 2012.

“Transcriptomic responses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to individuals or mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons: mixture toxicities or fasting effects?”（アブストラクト提出済み）

（3）出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

- 1) 日本環境毒性学会特別セミナー「環境・健康分野へのOMICSの活用」（2010年7月2日、北海道大学農学部、観客20名）

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) K. Nakayama, Y. Oshima, K. Nagafuchi, T. Hano, Y. Shimasaki and T. Honjo: Environmental Toxicology & Chemistry, 24, 591-596 (2005)
“Early-life-stage toxicity in offspring from exposed parent medaka, *Oryzias latipes*, to mixtures of tributyltin and polychlorinated biphenyls”
- 2) K. Nakayama, N. Sei, Y. Oshima, K. Tashiro, Y. Shimasaki and T. Honjo: Marine Pollution Bulletin, 57, 460-466 (2008)
“Alteration of gene expression profiles in the brain of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to KC-400 or PCB126”
- 3) K. Nakayama, S.I. Kitamura, Y. Murakami, J.Y. Song, S.J. Jung, M.J. Oh, H. Iwata and S. Tanabe: Marine Pollution Bulletin, 57, 445-452 (2008)
“Toxicogenomic analysis of immune system-related genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)”
- 4) K. Nakayama, N. Sei, I.C. Handoh, Y. Shimasaki, T. Honjo and Y. Oshima: Marine Pollution Bulletin, 63, 366-369 (2011)
“Effects of polychlorinated biphenyls on liver function and sexual characteristics in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)”
- 5) A. Conesa, S. Götz, J.M. García-Gómez, J. Terol, M. Talón and M. Robles: Bioinformatics, 21, 3674-3676 (2005)
“Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research”
- 6) H.A. Thieringer, P.G. Jones and M. Inouye: BioEssays, 20, 49-57 (1998)
“Cold shock and adaptation”

Development and Application of Toxicogenomics for Toxicity Evaluations to Complex Pollutions in the Field

Principal Investigator: Seiichi UNO

Education and Research Center for Marine Resources and
Environment, Faculty of Fisheries, Kagoshima University
50-20 Shimoarata 4-Chome, Kagoshima 890-0056, Japan
Tel: +81-99-286-4262/ Fax: +81-99-286-4296
E-mail: uno@fish.kagoshima-u.ac.jp

Cooperated by: Ehime University

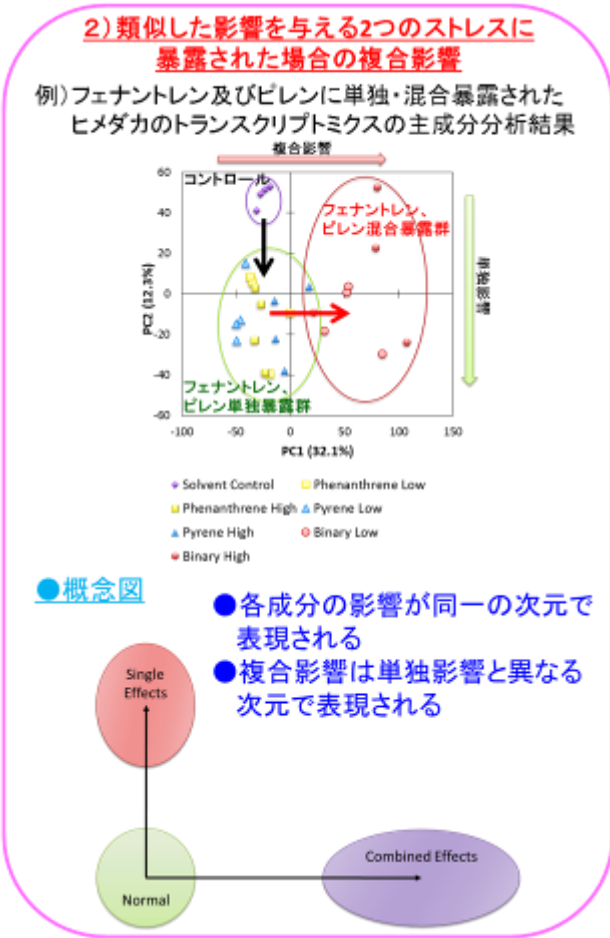
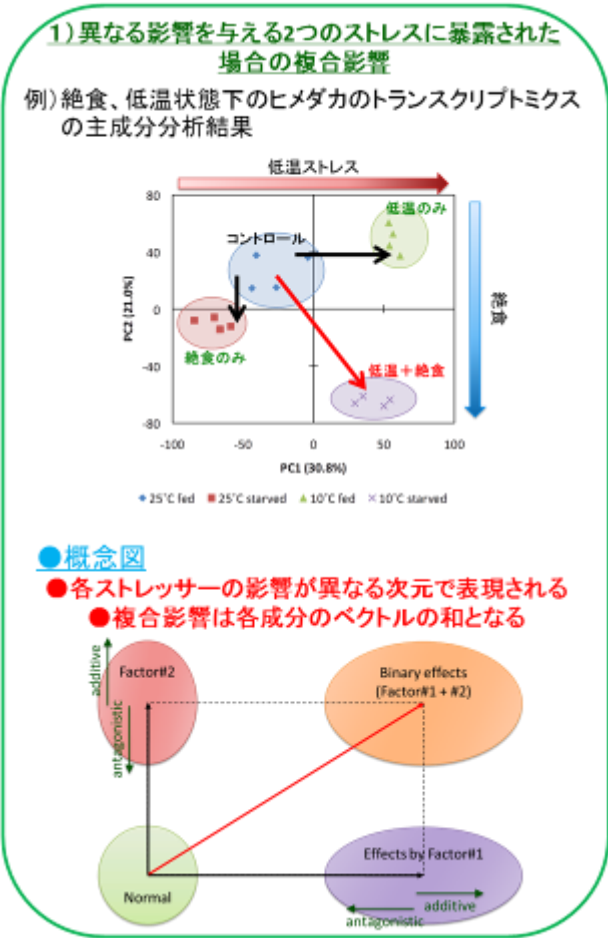
[Abstract]

Key Words: Metabolomics, Transcriptomics, Principal Component Analysis, Japanese Medaka, Combined Effect

The goal of this study was to develop an optimized method using metabolomics and/or transcriptomics to evaluate the effect of combined stressors to fish. The risks associated with exposure to contaminated marine sediments were also investigated using the optimized method. The present method of both omics was applied the handling of One-way analysis of variance (ANOVA) and principal component analysis (PCA) were used evaluate characteristic responses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) left under the starvation and cold shock. In PCA analysis, the group left only in starvation plotted in one dimension, and the group only subjected to cooling plotted in another dimension on the PCA score plot. Medaka exposed to the combination of starvation and cooling plotted as the sum of vectors from the individual effects of starvation and cooling. These results suggest that the group left in the combined stress simultaneously exhibited the symptoms induced with starvation and cooling. Similar effects were observed with metabolomics and transcriptomics. Additional experiments using both omics methods were used to evaluate the combined effects of two polycyclic aromatic hydrocarbons, phenanthrene and pyrene, in medaka. In this case, the data from combined exposures with phenanthrene and pyrene were not clearly clustered on the PCA score plot between both groups, suggesting that both compounds caused similar effects. The combined exposure group were clustered in the entirely other dimension from single exposure groups. This result suggests that the combined exposure of phenanthrene and pyrene produced different and unexpected effects in fish. Finally, the risks to fish from exposure to contaminated marine sediments from Osaka, Japan and Subic Bays, Philippines were evaluated with the optimized evaluation method. Both omics methods indicated that the extract from Subic Bay seriously affected medaka compared with Osaka Bay. The present method with

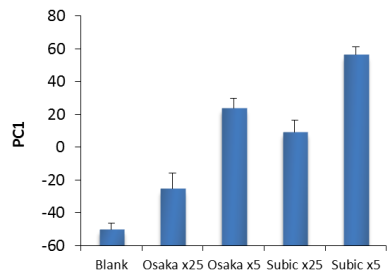
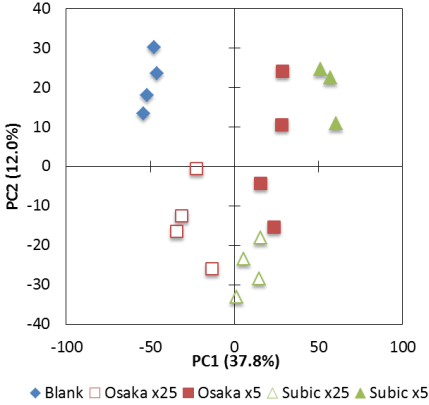
metabolomics or transcriptomics appears to be about 25 times more sensitive in detecting differences between groups as assessment based on mortality, indicating the enhanced usefulness of this approach.

1) 異なる影響を与える、あるいは類似した影響を与える2つのストレスを与えたときの、本研究で開発した定量化法による解析結果とその概念図

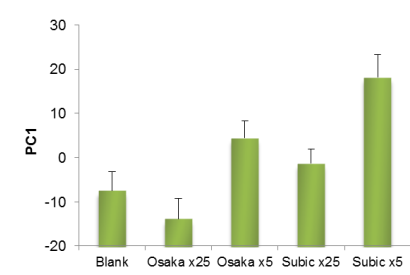
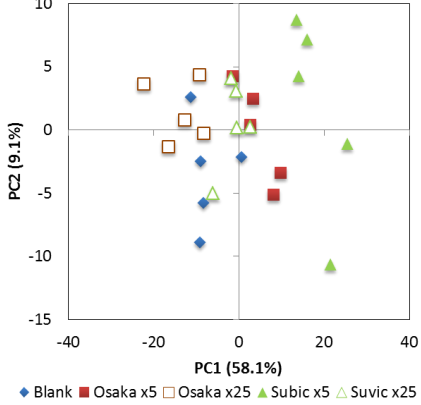


2) 大阪湾およびフィリピン・スービック湾で採取された底質抽出物にヒメダカを 24 時間暴露したときのトランスクリプトミクスとメタボロミクスの主成分分析結果と、定量化した影響の比較

A) トランスクリプトミクス



B) メタボロミクス



- 急性毒性試験ではスービック湾のみ影響あり。
- 急性毒性試験で影響があった濃度の 1/5 と 1/25 の濃度にヒメダカを暴露。大阪湾もスービック湾と同様の濃度で暴露。
- トランスクリプトミクス・メタボロミクスとも急性毒性試験の結果と一致。
- 急性毒性試験よりも 25 倍以上の高感度で影響を検出