

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

宇野誠一(鹿児島大)、仲山慶(愛媛大)

環境汚染物質の生物影響試験

現在、世界では年間に数千にも及ぶ化学物質が作り出され、
また既に多種多様な化学物質が地球上に存在している

従来:主として個々の物質を対象として生物影響評価試験を行ってきたが、

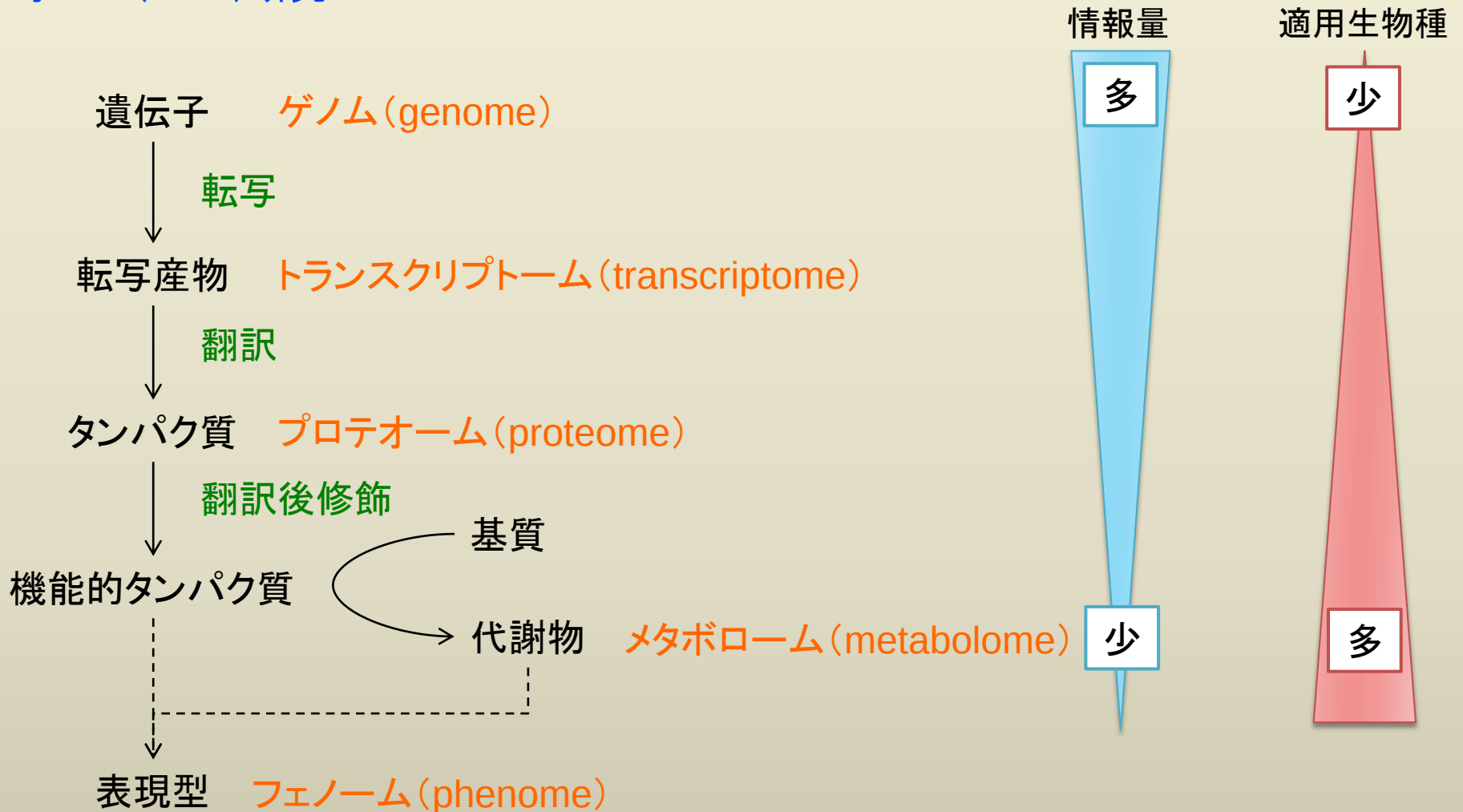
- 1) 個々の化学物質について生物影響を調べるには限界がある
- 2) 幾つかの物質が存在したときの複合影響評価が難しい
- 3) 非常に低濃度レベルでしか存在していない化学物質の生物影響評価を行う場合、従来法では感度が悪く、評価不可能な場合がある

高感度かつ高精度な新規影響評価法の開発が急務



生体応答を網羅的にとらえる

ーム(-ome)研究



本研究の目標

- ①生体が受けた影響の定量化
- ②トキシコゲノミクスを用いた複合影響評価手法の確立
- ③実環境における生物影響評価を行う



研究内容

1. 1W 絶食&低温暴露試験

2. PAH(フェナントレン&ピレン)複合暴露試験

3. 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の暴露試験



方法

- ▶ トランスクリプトミクスおよびメタボロミクスにより得られた結果に対して、一元配置分散分析を行った後、主成分分析を行って、ストレスに対する遺伝子および代謝物の影響の数値化を試みた



1. 絶食&低温暴露試験～主たる目的

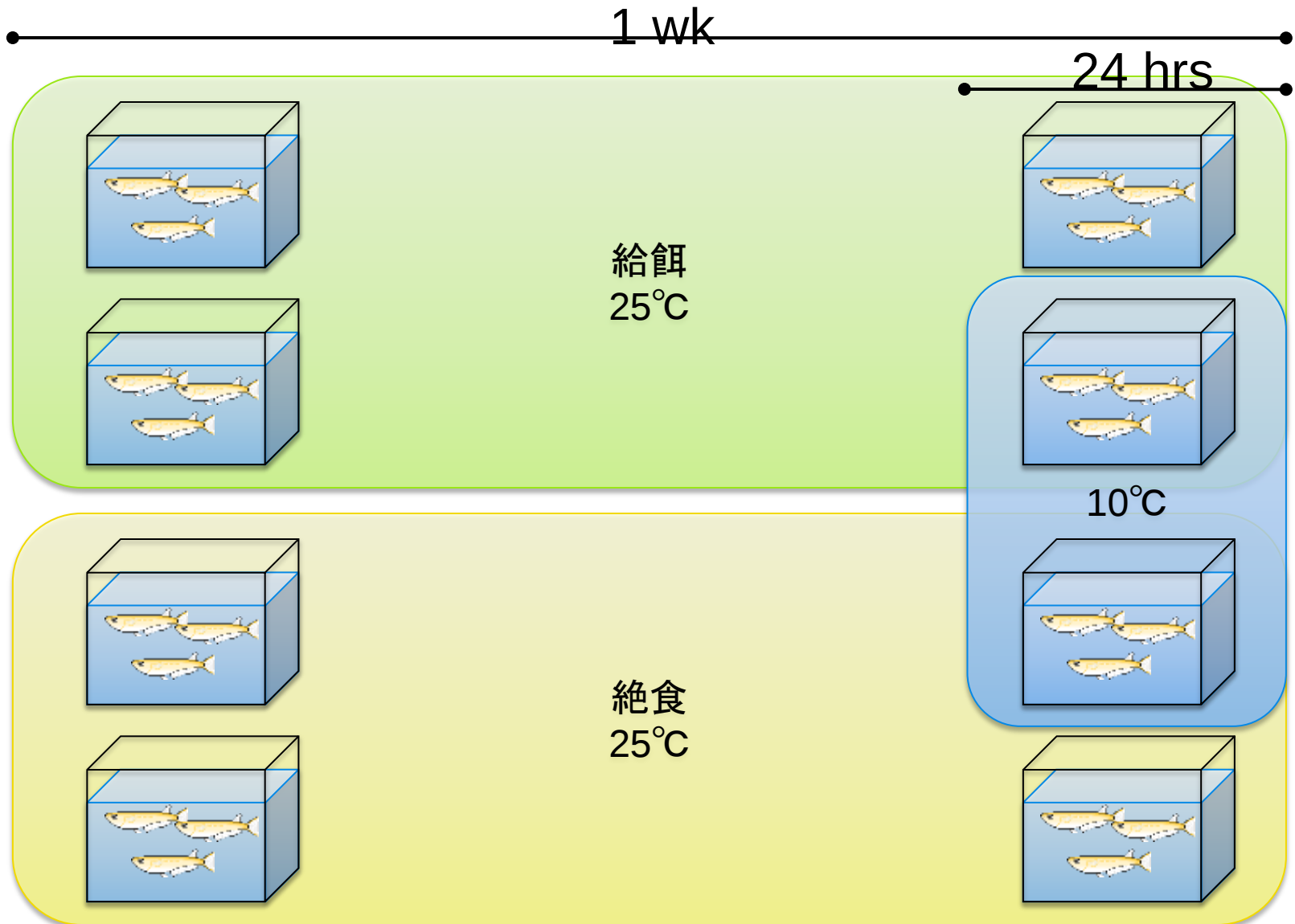
①絶食の影響を見極めること

→化学物質暴露試験を絶食下で行うため。

②作用機序の異なる2種類ストレスの単独および複合影響をそれぞれ検出

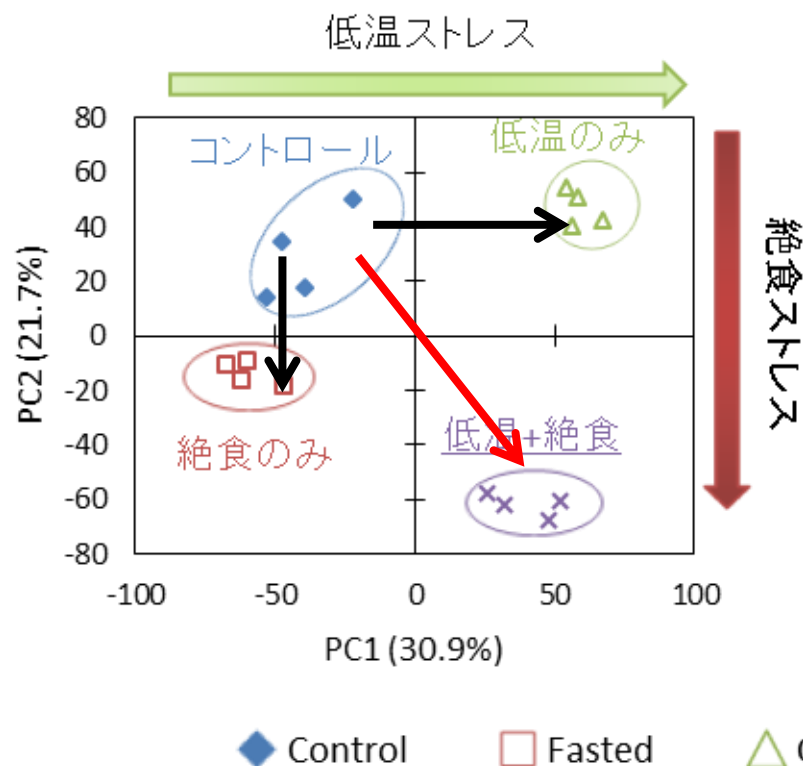


実験方法

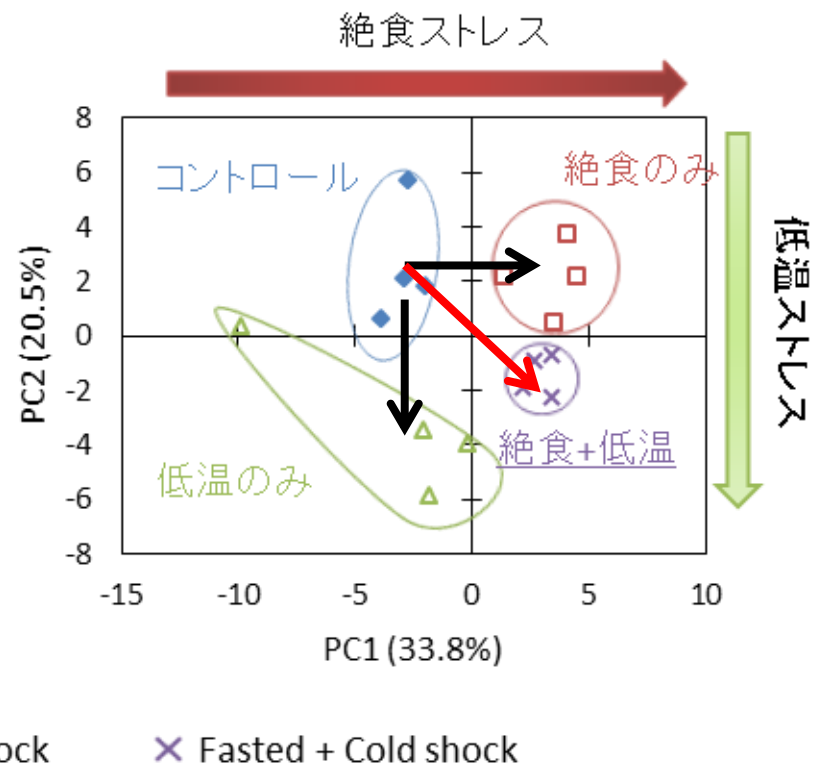


絶食&低温暴露試験の結果～主成分分析

A. トランスクリプトミクス

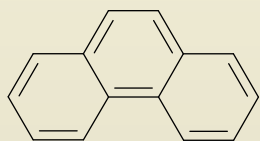


B. メタボロミクス

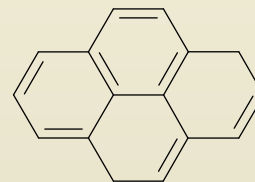


絶食あるいは低温の単独影響は一次元目と二次元目にそれぞれプロットされ、絶食+低温の複合影響は単独影響のベクトルの和にあたる部分にプロットされた

PAH暴露試験～フェナントレンとピレン



フェナントレン



ピレン

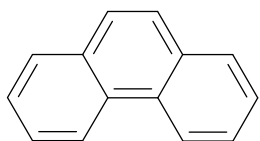
燃焼時に発生、あるいは石油中に含まれる多環芳香族炭化水素。
構造の類似性から生物に与える影響も類似する。

フェナントレンおよびピレンを複合暴露したときの影響は？

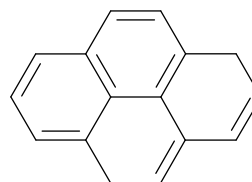


実験方法

0 hour	24 hour	96 hour
Control	Control	Control
	Sol. Cont.	Sol. Cont.
	Phenanthrene 5 ppb	Phenanthrene 5 ppb
	Phenanthrene 50 ppb	Phenanthrene 50 ppb
	Pyrene 3 ppb	Pyrene 3 ppb
	Pyrene 30 ppb	Pyrene 30 ppb
	Binary 5 + 3 ppb	Binary 5 + 3 ppb
	Binary 50 + 30 ppb	Binary 50 + 30 ppb



フェナントレン



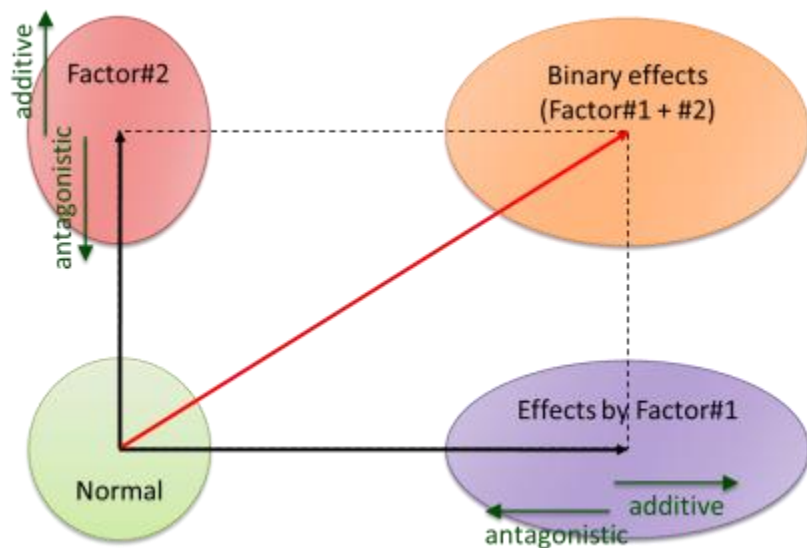
ピレン

http://www.***.net



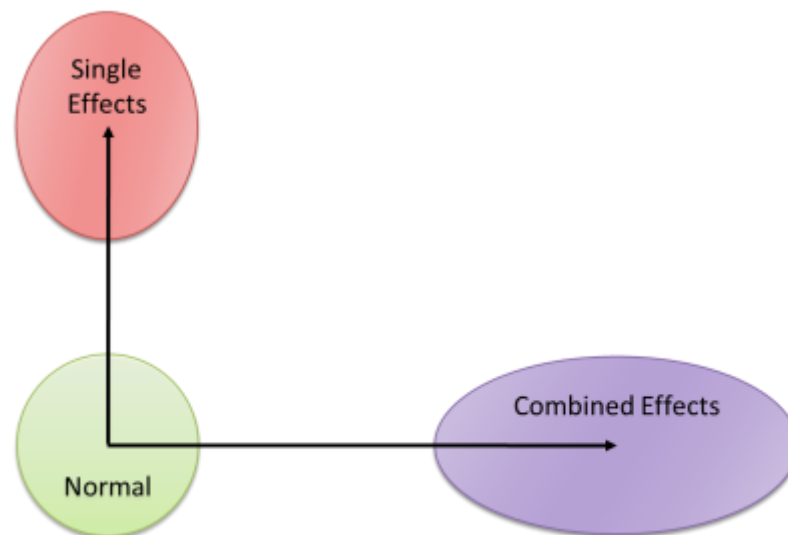
新たな影響評価～主成分分析による二次元指標

1) 仮説: 作用機序が独立している場合の複合影響



各成分の影響が異なる次元で表現される
複合影響は各成分のベクトルの和となる

2) 仮説: 作用機序が独立している場合の複合影響



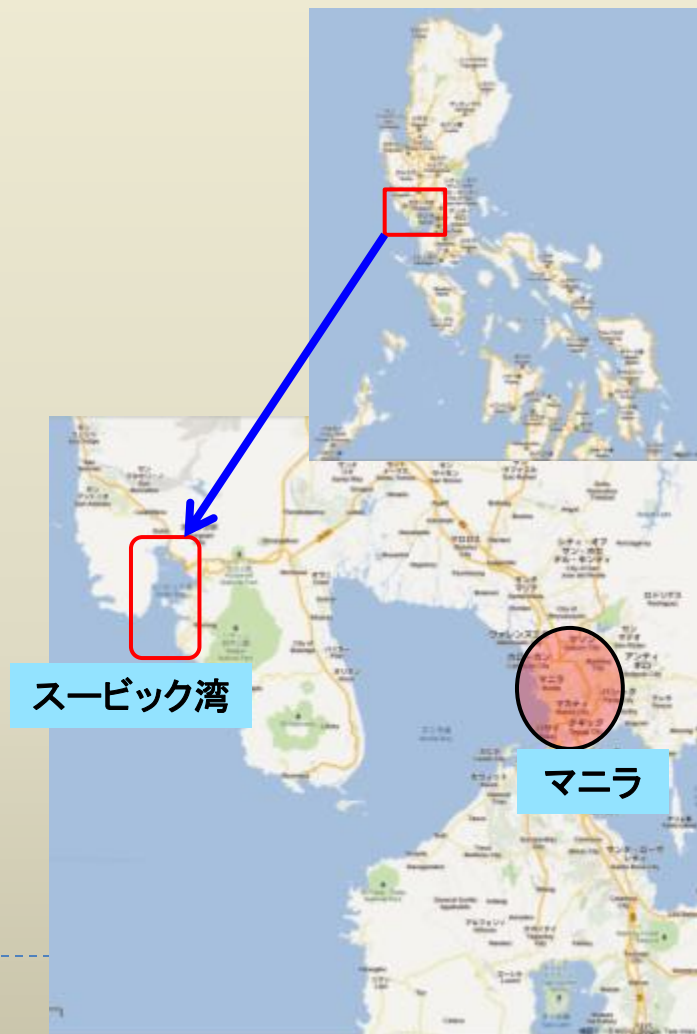
各成分の影響が同一の次元で表現される
複合影響は単独影響と異なる次元で表現される

実環境底質抽出物の暴露試験～採泥地点

1) 大阪湾



2) スービック湾 (フィリピン)



現場を実験室に持ってくる。
コントロールの設置ができ、的確な影響評価が可能となる。

底質抽出物の暴露試験

10 g 底質

↓
大阪湾(日本)

スービック湾(フィリピン)

↓
1 mL 抽出溶液(アセトンベース)

連続希釈: $\times 1$, $\times 5$, $\times 25$, $\times 125$

↓
1 L 暴露水(アセトン終濃度: 0.01%; $\times 1$ 区において1 g 底質/L 相当)

↓
20個体のメダカ稚魚

2.5週齢: 急性毒性試験

3.5週齢: 遺伝子発現・代謝物解析

↓
致死率の算出

マイクロアレイ実験・メタボローム解析

スービック $\times 1$ 区で暴露開始から72時間後に75%の致死率
大阪湾の抽出物では致死影響は観察されず

トランスクリプトミクスとメタボロミクスを併用することによって得られたアドバンテージ

●トランスクリプトミクス

遺伝子は外部刺激に対して鋭敏に反応
代謝物量はそれ程大きく変動しないことが多い

併用

遺伝子サイドの過大評価を避けることが可能
評価の精度向上

●メタボロミクス

検出可能な代謝物が限定されており、網羅性が小さい

方法自体が未発達

併用

網羅できない部分をカバーできる
メタボロミクスを発展させていく上で欠かせない

生体内に存在する代謝物数自体が少ない

個々の代謝物の機能は多岐にわたる

代謝物変動のみの情報では評価が難しいことがある

併用

遺伝子種数は非常に多いため、影響を受けた部分が判断しやすい
的確な影響評価が可能となる。

メタボロミクスにとってはトランスクリプトミクスを併用することによるアドバンテージはその他数多くある。

初期目標に対する達成度

①生体が受けた影響の定量化

変化した遺伝子群および代謝物群から応答の数値化に成功

②トキシコゲノミクスを用いた複合影響評価手法の確立

主成分分析に基づく二次元の指標を構築

③実環境における生物影響評価を行う

大阪湾とスービック湾をモデルとして実施

本研究で構築した指標は急性毒性試験の結果と一致したうえ、急性毒性試験よりも25倍以上高感度



将来構想、混合毒性 (Mixture Toxicity) 評価への応用

- ▶ 本研究ではオミックスによる影響評価の有効性を示すことができた。今後、さらにこれを拡張・発展していくために、継続的な研究を行っていく。
- ▶ 未発達であるメタボロミクスをさらに発展させる
→ LC-TOF-MSなどを併用し、検出可能な代謝物を増加、網羅する範囲の拡張
- ▶ 様々な地点から採取した底質試料などに本法を応用する。これにより地点間の生物に与える影響の差異を明らかにしていく(環境診断ツールとしての適用)。
- ▶ 本研究で構築した指標を成熟させて、新たな環境指標として提案し、社会にアピールしていく。

