

博士論文（要約）

ニホンドロソコエビのメタボローム解析による
曝露重金属判別手法の開発

柳原 未奈

生態系保全は、生態系そのものの保全という意味でも、あるいは人間が住む地球環境の保全という意味でも取り組まれるべき課題である。特に都市沿岸域の底質には都市域で発生した汚染物質が蓄積しやすく、底生生物保全のための対策が必要である。そのためには、底質中のどの物質が毒性を及ぼす主要因になっているか推定することが重要である。底生生物を対象とする底質に曝露し、致死率を評価することで底質毒性の評価が行われてきた。毒性要因推定が可能となるような新たな手法を開発することが求められる。

底質中に含まれる物質のうち、重金属は形態や bioavailability の評価が複雑で、化学分析を基にした毒性の評価を困難にしてきた。一方で、人間社会において広く使用され、ノンポイントの発生源が多く存在するという点で、底質中の重金属が曝露しているかどうかを判別することが重要である。

そこで本研究では、底生生物ニホンドロソコエビ *Grandidierella japonica* の代謝物応答に基づいて重金属曝露の有無を判別する手法を開発することを目的として掲げ、以下の流れで研究を行った。具体的には、①判別モデル構築に向けた代謝物応答データ取得の条件とデータ解析手法の検討、②重金属曝露時の *G. japonica* の代謝物応答に基づいた曝露判別モデルの構築、③判別モデルの適用：*G. japonica* に対する道路塵埃中重金属の曝露評価という内容から構成される。本研究では代謝物応答という体内応答に着目し、生体情報をもとにどの物質の曝露が主要因であったのか推定することを試みた。以下、各章における結論についてまとめる。

① 判別モデル構築に向けた代謝物応答データ取得の条件とデータ解析手法の検討（4 章）

代謝物応答は多変量であり、かつ様々な要因で変動することが知られている。本研究では重金属曝露という特定のストレスに対する応答に着目してモデル構築を行うため、曝露試験に用いる底質組成の影響を評価し、適した条件について検討を行った。また、高分解能質量分析計のノンターゲット分析で得た多変量のなかから、重金属曝露と関連の強い変量、すなわち代謝物に着目してデータ解析を行う手法について検討した。

まず、4 種類の組成の底質について、代謝物応答への影響を評価した。底質曝露試験においては参照底質の組成が重要な因子の一つであり、底質成分の摂食により体内応答に影響を及ぼすことが考えられたためである。その結果、参照底質の組成そのものが代謝物応答に影響を及ぼすことが示され、特に環境底質と人工底質を使用した際には代謝物応答の特徴が大きく異なることが示唆された。一方、同様の参照底質を用いて、Control 群と銅曝露群における代謝物応答を比較すると、1 種類の人工底質を除き銅曝露による応答変化を区別できることが明らかとなった。なお、検討から除外された底質条件下では、銅曝露濃度が十分ではなかったと考えられた。この結果から、銅曝露の影響に注目する際は 3 種とも参照底質としての使用に適するものと考えられた。

次に、バイオマーカー探索の手法の検討を目的とし、単変量解析（t 検定）と多変量解析（partial least squares-discriminant analysis; PLS-DA）を用いて解析を行った。Cu, Zn,

Cd, その混合物に曝露した際の *G. japonica* から検出された代謝物から、それぞれの重金属の曝露のバイオマーカーを探索したところ、t 検定では Zn 曝露時に有意に変化する代謝物がみられなかった。一方、PLS-DA モデル構築後、VIP 値によって Cu, Zn, Cd 曝露に関わる重要な代謝物応答を探索することが可能であり、その有効性が示された。

さらに、partial least squares-regression (PLS-R) モデルによって代謝物応答から個体レベルへの影響予測を行った。短期間の曝露後の代謝物応答値から、慢性曝露試験後の繁殖影響を予測する回帰モデルが構築され、さらに高い予測能力を示した。そのため、代謝物応答によって曝露影響を評価するだけでなく、慢性的な影響を予測するという手法の拡張が期待された。

② 重金属曝露時の *G. japonica* の代謝物応答に基づいた曝露判別モデルの構築 (5 章)

重金属 (Cr, Ni, Cu, Zn, Cd) 曝露時の *G. japonica* の代謝物応答を分析し、そのプロファイルをもとに曝露重金属を推定する PLS-DA モデルを構築した。また、重金属以外にフルオランテン、ニコチン、塩分濃度変化についても曝露時の代謝物応答を分析し、これらの曝露と重金属の曝露をモデルにより判別できるか検証した。

得られた代謝物応答のうち、高濃度で化学物質に曝露した群における応答値を用いて、PLS-DA により判別モデルを構築した。その結果、Cr, Ni, Cu, Zn, Cd の重金属のほか、フルオランテン、ニコチン、塩分濃度変化ストレスについて判別する 8 種類のモデルが得られた。VIP 値によって判別に寄与する代謝物を選択し、それらを変数としてモデルを再構築した結果、モデルの予測能力を示す指標値 Q^2 値に基づいて、モデルが十分な予測能力を示すことが確認された。また、test data set の入力によって検証した結果、Cu, Zn, Cd を混合した状態でも各モデルにおいて曝露群とみなされ、混合時でも各物質の曝露を検出できる可能性が示された。

判別に関与する代謝物質群を VIP 値によって整理したところ、曝露群における応答の仕方は様々であり、ある一部の変化の大きい物質ではなく、多様な物質が判別に関与していることが示唆された。また、一部の物質は既往研究における報告と一致したものの、特定の物質に反応するという物質は見られなかった。今後は、高分解能質量分析計によって検出されたピークから、物質を推定、同定していくプロセスを改善することで、その物質名の作用機序について情報を収集していくことが重要である。

③判別モデルの適用：*G. japonica* に対する道路塵埃中重金属の曝露評価 (6 章)

②において構築したモデルを用いて、道路塵埃曝露時の *G. japonica* における重金属曝露の有無を評価した。道路塵埃曝露時の代謝物応答値をモデルに入力し、その結果からどの重金属の曝露があったか評価した。

首都高速道路の清掃車によって 2 か所で採取された道路塵埃 (RD1, RD3) と、東京都内の河川にて採取された底泥 (ES1, ES2) を対象試料とし、それらに曝露した際の *G. japonica*

の代謝物応答を解析した。

道路塵埃、河川底泥曝露時の代謝物応答を 5 章で構築したモデルに入力したところ、対象物質の曝露があったと推測されるサンプルは見られなかった。モデル構築に用いたデータセットは LC50 の濃度での曝露時の応答値から構成されるため、今回評価した底質中の物質の曝露影響は、LC50 の濃度における曝露影響より小さいことが示唆された。実際には底質中から高濃度で各物質が検出されていることから、bioavailability が低い状態で存在していたことが推測された。

以上の①～③の結論を踏まえ、全体の結論について述べる。本研究では、ニホンドロソコエビ *G. japonica* の代謝物応答に基づいて重金属曝露の判別モデルを構築し、曝露重金属を判別する手法を開発した。ただし、適用範囲は、今回対象とした物質や、曝露経路、曝露濃度によって制限されると考えられた。本手法では生物応答に基づいて曝露物質の情報が得られるため、bioavailability を別途検討する必要がなく、曝露評価と毒性要因推定が同時に可能となる手法であると考えられた。今後、更なる手法の活用のため、手法の適用可能な範囲について検証を進める必要がある。