

平成29年度経済産業省委託

平成29年度化学物質安全対策

QSAR で推定される生体反応速度の AE 同族体間での比較と  
有害性評価への適用の試み

調査報告書

平成30年3月

愛媛大学 沿岸環境科学研究センター

調査課題名: QSAR で推定される生体反応速度の AE 同族体間での比較と有害性評価への適用の試み

研究代表者: 仲山 慶

職名: 講師

所属: 愛媛大学沿岸環境科学研究センター

所属機関住所: 〒790-8577 松山市文京町2-5

調査体制:

仲山 慶(研究代表者): アルコールエトキシレートの暴露試験および遺伝子発現解析

宇野誠一(研究分担者): アルコールエトキシレートの化学分析

加茂将史(研究協力者): 遺伝子発現データの統計解析

山根雅之(研究協力者): 試験設計提案, 被験物質の提供

富山大輔(研究協力者): 試験設計提案, 被験物質の提供

## 目次

1. 背景および目的
2. 材料および方法
  - 2.1 試験物質
  - 2.2 被験生物
  - 2.3 致死時間決定のための AE 暴露試験
  - 2.4 濃縮性評価のための AE 暴露試験
  - 2.5 化学分析
    - 2.5.1 水中の AE 濃度分析
    - 2.5.2 魚体中の AE 濃度分析
  - 2.6 遺伝子発現解析のための AE 暴露試験
  - 2.7 遺伝子発現解析
    - 2.7.1 シーケンスデータの取得
    - 2.7.2 遺伝子発現解析
      - 2.7.2.1 遺伝子発現量の定量
      - 2.7.2.2 重要遺伝子の特定
3. 結果および考察
  - 3.1 AE 暴露濃度と致死時間との関係
  - 3.2 AE の濃縮性試験
  - 3.3 AE 混合物の作用機序の解析
  - 3.4 EO3 および EO8 暴露による影響の解析
  - 3.5 有害性を規定する遺伝子の選抜と生存率の予測
  - 3.6 まとめ
4. 謝辞
5. 調査結果の公表
6. 参考文献

## 1. 背景および目的

アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS)やアルコールエトキシレート(AE)等のポリオキシアルキレン類は、その構造に依存して有害性が変化することが知られている。AE に関しては、アルキル基の炭素鎖長が長いほど、親水基であるエチレンオキシド(EO)の付加モル数が少ないほど、毒性が強いことが明らかとなっている。さらに、AE には炭素鎖長やEO 付加モル数が異なる多数の同族体が存在し、それらの混合物として使用されることが一般的である。したがって、AE の有害性を正確に評価するためには、各同族体を対象とした試験を実施しなければならないが、高いコストがかかるため現実的ではない。そこで、一部の同族体から得られた毒性データを用いて未評価の同族体の有害性を推定するために、構造活性相関モデル(QSAR)が用いられている。化審法の審査においても QSAR の適用が推進されているが、その活用法や適用範囲には議論の余地がある。

平成 28 年度の我々の研究において、AE のメダカに対する急性毒性(致死)を EO 付加モル数から予測する QSAR が構築された。また、AE を暴露したメダカの体内での遺伝子発現パターンの変化は EO 付加モル数が異なっても類似している、すなわち、毒性メカニズムはほぼ同じであろうと結論づけられた。したがって、我々が構築した QSAR は同一メカニズムの化合物群から得られたモデルであり、その予測精度が高いことを裏付けている。

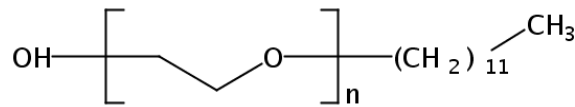
同研究では、上記のことに加え、AE 暴露による遺伝子発現変動は死亡率に依存したパターンを示すことが明らかにしている。このメダカが死に至るまでの時間は EO 付加モル数が減るに従って短縮されること、AE 暴露濃度-遺伝子発現量の回帰直線の傾きの絶対値と逆相関することが示唆された。これらのことから、AE 暴露によってメダカが死に至る際に生じる一連の生体反応は、EO 付加モル数に依存して反応速度が変化するという仮説が立てられた。本仮説を証明する手段として、EO 付加モル数の異なる AE の魚体内への取込速度を明らかにするとともに、時系列での遺伝子発現変動と比較する必要がある。以上の成果が得られれば、構造の異なる AE の有害性を反応速度論で時間から説明する、新たな評価軸が得られることが期待できる。

さらに、本研究によって AE の構造から魚体内濃度を予測するモデルが構築され、化学物質の審査における QSAR の適用範囲の検証にも寄与するデータが得られる。

## 2. 材料および方法

### 2.1 試験物質

試験に用いたトリエチレングリコールモノデシルエーテル(CAS 番号:3055-94-5)およびオクタエチレングリコールモノデシルエーテル(CAS 番号:3055-98-9)は、東京化成工業株式会社より購入した。対象とした化合物は炭素鎖長が 12 のものに限定し、酸化エチレン(EO)の平均付加モル数がそれぞれ 3 または 8 のものとした(図 1, 以下、EO3, EO8 と記す)。被験化合物は、暴露試験開始前に、それぞれ 1,000 mg/L となるよう調製し、遮光瓶にて暗所に保管した。



略称	名称	エチレンオキサイド 繰り返し数 (n)	CAS RN
EO3	トリエチレングリコール モノデシルエーテル	3	3055-94-5
EO8	オクタエチレングリコール モノデシルエーテル	8	3055-98-9

図1. 本研究で使用した2種のアルコールエトキシレートの名称および構造

## 2. 2 被験生物

試験には鹿児島大学から譲渡を受けたヒメダカ (*Oryzias latipes*) を愛媛大学にて継代飼育したものを用いた。水温 25~26°C で飼育し、餌料としてアルテミア幼生を毎日与えた。換水は毎日行い、飼育水には脱塩素水道水を用いた。照明時間は 15 時間とした。暴露試験にはふ化後 6 週齢の稚魚を用いた。

## 2. 3 致死時間決定のための AE 暴露試験

暴露試験には 1 L 容ガラス製円形容器を用いた。各容器に 1 L の試験水を入れた後に、ヒメダカを 10 個体ずつ移した。試験は 3 連で行った。各 AE 化合物の設定濃度は以下の通り。

EO3: 0.375, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0 mg/L

EO8: 0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25.0 mg/L

試験水の交換は毎日 1 回行い、容器中の 95% の試験水を交換した。水温は 24~25°C に維持し、照明時間は 15 時間とした。飼育水の pH は 7.4~7.6 であった。試験開始から 96 時間まで、へい死の有無を観察した。死亡した個体はその都度、試験容器から取り除いた。

得られた結果から、各化合物の暴露により 50% の個体が死亡する際の AE 暴露濃度と暴露時間の関係を求めた。

## 2. 4 濃縮性評価のための AE 暴露試験

暴露試験には 14 L 容ガラス製水槽を用い、4 L の試験水に対し、60 個体のヒメダカを入れた。試験は 1 連で行った。予備暴露試験の結果に基づいて、各 AE の暴露濃度はへい死が生じない 1.5 mg/L とした。暴露水の交換は、同濃度の AE 水溶液を毎分約 5.3 mL 滴下させる流水式で実施し、1 日あたり都合 2 回換水 (8 L) とした。水温は 24~25°C に維持し、照明時間は 15 時間とした。飼育水の pH は 7.3~7.7 であった。試験開始から 72 時間までを AE を暴露する取込期間とした。取込期間終了後、直ちにメダカを清水に移し、144 時間の排泄期間を設けた。1 日あたり魚体重の 2% のフリーズドライブラインシュリンプを毎日与えた。試験期間中に死亡した個体は無かった。

表 1 に示す時間に各水槽より暴露水試料およびメダカを 4 検体ずつサンプリングし、暴露水は褐色ガラス瓶に、全魚体は 1.5 mL チューブに入れ、AE の分析を行うまで-25°Cで保存した。

表 1. 濃縮性試験におけるサンプリング時間

経過時間 (h)	試験フェーズ	魚体採取	暴露水採取
1	取込 1 時間	○	○
3	取込 3 時間	○	
6	取込 6 時間	○	
24	取込 24 時間	○	○
72	取込 72 時間	○	○
73	排泄 1 時間	○	
75	排泄 3 時間	○	
78	排泄 6 時間	○	
96	排泄 24 時間	○	
120	排泄 48 時間	○	

## 2. 5 化学分析

### 2. 5. 1 水中の AE 濃度分析

水中の AE 分析は Dunphy ら(2001)の手法を一部改変して行った。分析法のフローは附図で示す。固相の C2(Bond Elut, 100 mg, Agilent), SCX polymer および SAX polymer (SampliQ, 30 mg, Agilent)を直列に繋ぎ、超純水 10 mL とアセトニトリル 10 mL でそれぞれ洗浄した。その後 C2 カラムのみに超純水 20 mL を流しコンディショニングした。EO3 および EO8 の 1.5 mg/L 群の試験水 5 mL, 3 mg/L 群の試験水 3 mL を採り、EO3 の暴露群試験水には炭素鎖長 13 の EO3(ファインサーフ TD-30, 青木油脂工業株式会社), EO8 の試験水には炭素鎖長 13 の EO8(TD-80)をそれぞれ外部標準物質として添加した。試験水を C2 カラムに負荷し、吸引マニホールド上で 30 分間空引きした後、遠心分離(3500 rpm, 15 分間, 4°Cを 2 回)してカラムから水分を除去した。C2 カラム下部に上記で洗浄した SCX, SAX 両カラムを接続し、アセトニトリル 5 mL を流してこれを集め(第 1 液), さらにメタノール/酢酸エチル/水混合液(40:10:1, v/v/v) 5 mL と酢酸エチル 10 mL を連続的に流したものを併せた(第 2 液)。第 2 液を窒素ガスにより溶媒を乾固した後(30°C), 残渣をアセトニトリル 1 mL で溶解して、これを第 1 液に併せた。この混合溶液に EO3 暴露群のものには TD-80 を, EO8 のものには TD-30 を内部標準物質として添加した。さらにトリエチルアミン 100  $\mu$ L と 200 mg の 2-フルオロ-1-メチルピリジニウム-*p*-トルエンスルホナートを加え、振とう器で 2 時間振とうして AE をメチルピリジニウム化誘導体化物に変化させた。誘導体化後、アセトニトリルを窒素ガスで除去し、残渣をアセトニトリルで 1 mL にメスアップした。さらに、PTFE フィルター(孔径 0.22  $\mu$ m(TORAST Disc SyringeFilter, 島津ジーエルシー)でアセトニトリル溶液を濾過して、LC/MS 分析用サンプルとした。AE 誘導体化物の測定はアジレントの HPLC 1200 シリーズと API-2000(アプライドバイオシステムズ)を組み合わせた LC/MS により行っ

た。移動相には A: アセトニトリル, B: 0.01%ギ酸溶液を用い, AE 誘導体化物を ODP-50 4D(4.6 mm id × 15 cm, Shodex)カラムを用いて, グラジエント法により分離した。移動相は, サンプル注入(5 μL)後, 5 分間 A: B = 50: 50(v/v)で保持し, その後, 13 分で A が 100%となるようにグラジエント法により A の比率を増加させ, 3 分間 A が 100%の状態を保持した。ここまで, 移動相の流量を 200 μL/min とした。その後, HPLC カラム洗浄のため, 流量を 1 mL/minとしてアセトニトリルを 5 分間流した後, 次のサンプル測定のために A:B=50:50 の移動相を 1 mL/min の流速で 4.5 分間流した。測定のための m/z 値は Dunphy ら(2001)に準じた。

## 2. 5. 2 魚体中の AE 濃度分析

全魚体をポリプロピレン製のマイクロチューブに入れ, アセトニトリルを 1 mL, 外部標準物質(EO3 が測定対象の場合は TD-30, EO8 の場合は TD-80), ジルコニアボールを入れて, 魚試料を粉砕し, AE 抽出を行った。その後, 10 分間遠心分離(16000 g, 4° C)を行い, 上層の溶液を採取した。残渣にアセトニトリル 1 mL を加えて, 再び振とう抽出, 遠心分離を行った。上層液を採取していた溶液に併せ, これに 2 mL 超純水を添加し, 上記水中 AE 分析と同様にコンディショニングした C2 カラムに負荷した。負荷後の操作は 2. 5. 1 に示す方法と同様に行った。

## 2. 6 遺伝子発現解析のための AE 暴露試験

暴露試験には 1 L 容ガラス製円形容器を用い, 1 L の試験水に対し, 10 個体のヒメダカを入れた。試験は 2 連または 3 連で行った。2. 3の結果に基づいて, へい死が観察された最小濃度(EO3: 3.0 mg/L, EO8: 3.13 mg/L)を暴露濃度とした。生存個体が 80, 60, 40%(EO8 には 90%も追加)となることが予想される暴露時間をそれぞれ算出し, 各時間でメダカをサンプリングした。AE を添加しない対照区も設けた。詳細は表 2 に示す。試験水の交換は毎日 1 回行い, 容器中の 95%の試験水を交換した。水温は 24~25°Cに維持し, 照明時間は 15 時間とした。飼育水の pH は 7.5~7.7 であった。試験は無給餌で行った。死亡した個体はその都度, 試験容器から取り除いた。

サンプリングした個体は, 全魚体を TRIzol 試薬(サーモフィッシャーサイエンティフィック)にて固定し, 遺伝子発現解析に用いるまで-80°Cで保存した。

## 2. 7 遺伝子発現解析

### 2. 7. 1 シーケンスデータの取得

TRIzol 試薬にて固定した試料を TissueLyser II(キアゲン)にてホモジナイズし, 全 RNA を抽出した。DNase 処理(RNase-Free DNase Set, キアゲン)を行った後に, RNeasy Mini Kit(キアゲン)で RNA を精製した。RNA 溶液の吸光度から RNA の濃度を算出した後に, Agilent RNA 6000 Nano Kit および 2100 Bioanalyzer(アジレント)を用いて, RNA の品質を確認した。相対的に品質の良い試料を各試験区から 4 検体ずつ選別し, TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit(イルミナ)で二本鎖 cDNA ライブラリを調製した。調製したライブラリの品質を Agilent DNA 1000 Kit および 2100 Bioanalyzer(アジレント)にて確認し, 各ライブラリの濃度は定量的 PCR 法にて測定した。1 回のシーケンス取得に対して異なるイン

デックスを付した 5 検体のライブラリをプールし、計 8 回のシーケンスを行い 40 検体分のデータを取得した。プールしたライブラリは変性後に 150-cycle MiSeq Reagent Kit v3 に注入し、MiSeq(イルミナ)を用いて 75 bp × 2 のペアエンドリードを得た。

表 2. 遺伝子発現解析のための暴露試験における、各実験区のサンプリング時間と生存個体数の予測値および実測値

時間(h)	生存個体数(10 検体中)					
	対照区		EO3		EO8	
	予測値	実測値	予測値	実測値	予測値	実測値
0	10	10				
1.2			8	10		
2.7			6	8.5		
4.9			4	1.3		
5.9					9	10
12.7					8	7.7
29.0	10	10			6	7.7
52.0	10	10			4	7.3

## 2. 7. 2 遺伝子発現解析

### 2. 7. 2. 1 遺伝子発現量の定量

発現量の定量は、清水と坊農 (2015) (清水厚志, 坊農秀雅 (2015) 次世代シーケンサー DRY 解析教本 株式会社学研メディカル秀潤社)を参考に、次の手順で行った。メダカの参照配列は、ensembl (<http://asia.ensembl.org/info/data/ftp/index.html>) が提供しているものを利用した。全ての作業は、Ubuntu 16.04 上で行った。

次のソフトを入手した。

[1] FastQC: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

[2] Bowtie2: <http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml> (Langmead & Saizberg, 2012)

[3] Tophat: <https://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml> (Trapnell et al., 2012)

[4] Cufflinks: <http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/> (Trapnell et al., 2012)

まず、[1]を用いて得られたシーケンスデータの品質確認を行った。全てのデータに対して低品質と判断されたシーケンスは 0%であったため、データの加工修正は行わなかった。次に、[2]及び[3]を用いて得られた配列データを参照配列にマッピングした。最後に[4]を用いて、発現量を定量した。全個体で共通して定量できた遺伝子数は 20,459 であった。

### 2. 7. 2. 2 重要遺伝子の特定

全ての処理区のデータを対象に、一元配置分散分析を行い、発現量に変化した遺伝子を抽出した ( $p = 0.01$ )。抽出された 2,499 遺伝子を対象に、DAVID を用いて遺伝子の機能的



分類を行った。

DAVID: <https://david.ncifcrf.gov/> (Huang et al., 2009a, 2009b)

また、一元配置分散分析で抽出された全遺伝子の発現量データを用いて、個体間での相関分析を行い、発現量のパターンの類似度について調べた。

次に、これら発現量の中から、AE の暴露により発現した(または発現が抑制された)遺伝子の抽出を試みた。本課題では、死亡率が同じであれば遺伝子の発現量も同じ、という仮定を置いている。そこで、死亡率が同じ群では発現量の相関が高くなり、死亡率が異なる群では無相関に近づく遺伝子セットの抽出を行った。

一元配置分散分析で抽出された遺伝子は 2,499 であるため、遺伝子の選び方の総数は非常に多く、全ての可能な組み合わせで相関を取ることは非常に困難である。そこで、近似的に最適解が抽出できると考えられている遺伝的アルゴリズムを援用した。

遺伝的アルゴリズムの流れは以下である。

- ① まず、遺伝子に 1 または 0 のラベルをでたらめに貼る。
- ② 1 のラベルが貼られている遺伝子を選び出して、個体間の遺伝子発現量の相関を調べる。この相関係数を  $\rho$  とする
- ③ 相関を取った二つの個体の死亡率がほぼ同じであれば、この二つの個体間で遺伝子発現が似ていなければならないので、 $+\rho$  の得点を与える。もし、死亡率が異なる群から選ばれた個体であれば、これらの二つの個体の遺伝子発現パターンは異なっていなければならない(無相関でなければならない)ので、 $-|\rho|$  (絶対値を取って引き算する) の得点を与える
- ④ 上の①ででたらめに決めた 1 または 0 の配列とは少しだけ 1,0 のパターンが異なる配列を用意し、②, ③と同じ作業を行い、その配列に対して得点を与える
- ⑤ 得点が高い配列を残し、また新たに 1,0 のパターンが少しだけ異なる配列を用意する以上を繰り返すことで、死亡率が同じ個体間では遺伝子発現のパターンが似ている、異なっている個体間ではパターンが異なる、遺伝子のセットが選び出されると期待される。

このように選び出した、遺伝子群の発現量を説明変数とした回帰モデルを構築し、生存率を推定した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 AE 暴露濃度と致死時間との関係

EO3 および EO8 を暴露した際の暴露時間と生存率との関係を図 2 に示す。EO3 では暴露濃度 3 mg/L 以上の処理区で全個体が 24 時間以内に死亡したが、1.5 mg/L 以下では全ての個体が 96 時間まで生存した。EO8 では 6.25 mg/L 以上の区では全個体が 12 時間以内に死亡し、1.56 mg/L 以下では全個体が 96 時間まで生存した。3.13 mg/L 区では 96 時間まで徐々に生存率が低下する結果となった。いずれの化合物を用いたケースでも、死亡が観察された濃度区では加速度モデル(AFT)で暴露時間と生存率との関係が説明可能であった。しかし、死亡が観察されない濃度区(図 2 で灰色で表示)では、死亡率を高めにより予測する傾向にあり、予測精度は低くなった。これは AFT によるフィッティングが「死亡が観察された処理区」に対する適合性を優先するためだと考えられた。

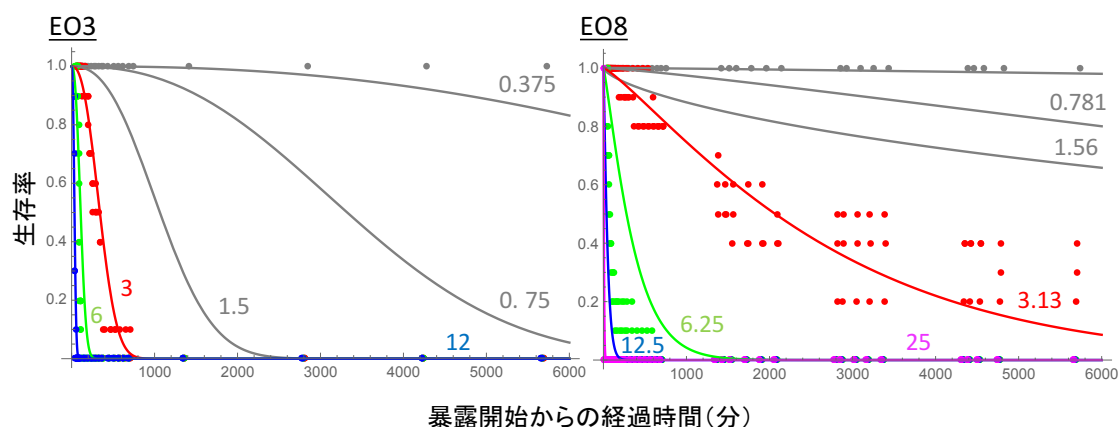


図2. 各AE暴露時の暴露時間経過に伴う生存率の変化。図中の数字は各AEの暴露濃度(mg/L)を示す。グレーで示した濃度区は死亡が確認されていないため、不正確なフィッティングとなっている。

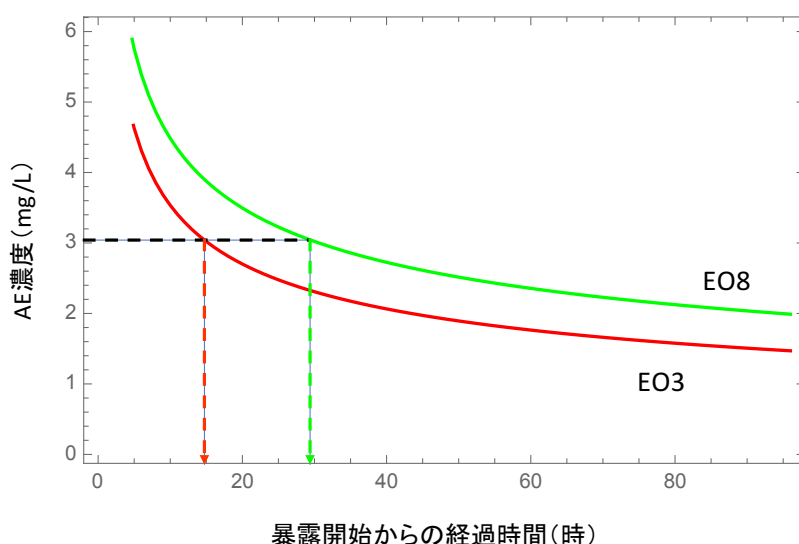


図3. 各AE暴露時に50%の個体が死亡する暴露時間と暴露濃度との関係。赤線がEO3, 緑線がEO8を示す。本試験で死亡個体が観察された3 mg/Lと比較すると、EO3の方が早く50%の個体がへい死することがわかる。

これらのデータに基づき、50%の個体が死亡する際の暴露時間と暴露濃度との関係を求めた結果を図3に示す。重量ベースで算出した濃度での比較ではあるが、EO3とEO8をそれぞれ同濃度で暴露した場合、LT<sub>50</sub>はそれぞれ15時間、30時間程度となり、EO3の方が致死時間が短いことが示された。

### 3.2 AEの濃縮性試験

各サンプリング時間のメダカ全魚体中の各AE濃度を図4に示す。いずれの化合物についても、取込期間中の魚体中濃度が時間経過とともに2倍～7倍程度低下していた。このことは暴露水中のAE濃度が徐々に低下していたことに起因しており、暴露開始から72時間の時点でEO3が0.17 mg/L、EO8が0.20 mg/Lと、設定濃度の約10分の1まで低下していた。この原因は現在調査中であるが、少なくとも本試験の結果からは取込速度を算出することが出来なかった。濃縮性試験については、再試験を予定している。

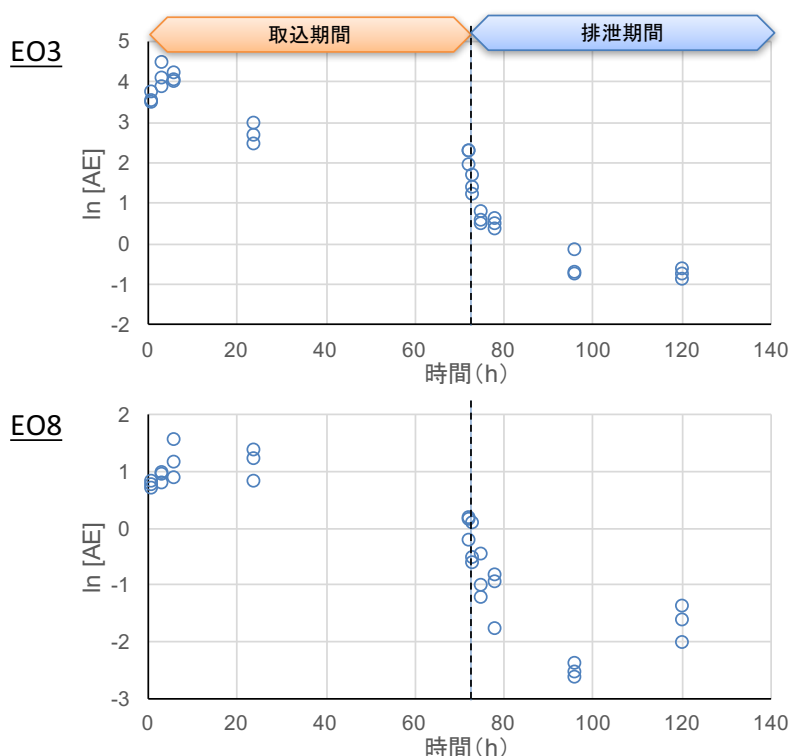


図4. 濃縮性試験の結果。各サンプリング時間での全魚体中AE濃度(mg/L)を対数で示す。

排泄期間については、いずれの化合物においても明瞭な $\alpha$ 相と $\beta$ 相が観察され(図5)、 $\alpha$ 相の濃度データから排泄速度定数および体内濃度半減期を算出した。その結果、体外への排泄に関しては化合物間で大きな差が無いことが明らかとなった。一方で、コイを対象に炭素鎖長12のAEの濃縮性を評価した試験では、EO付加モル数が少ないほど生物濃縮性が高いことが明らかとなっていることから(Wakabayashi et al., 1987)、取込速度はEO付加モル数が少ないほど早いと推察される。このことは、3.1にてEO3の方がEO8よりも致死時間が短いことと矛盾しない結果であった。

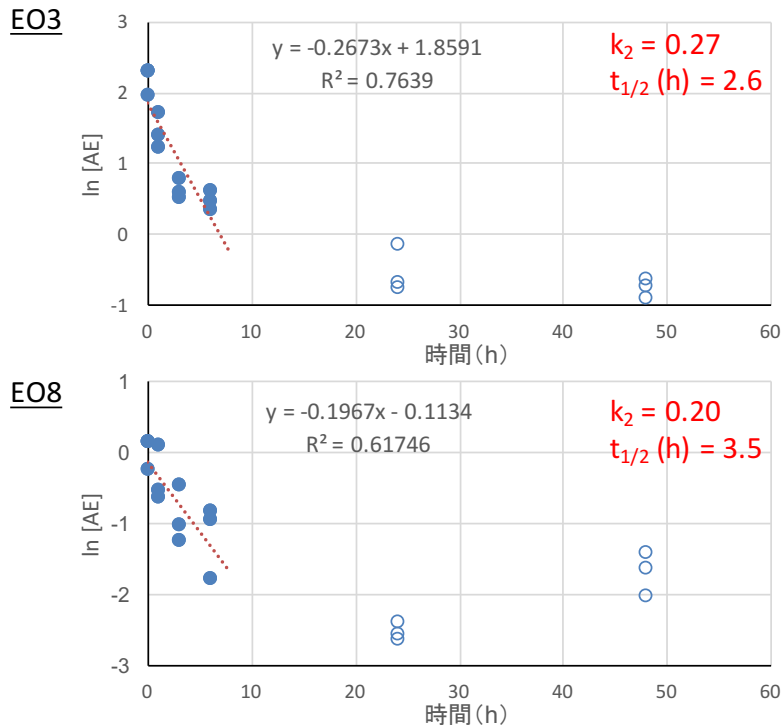


図5. 濃縮性試験の排泄期間の結果のみを示す。α相の濃度データから排泄速度定数( $k_2$ )および体内濃度半減期( $t_{1/2}$ )を算出した。

### 3.3 AE 混合物の作用機序の解析

平成 28 年度に実施した AE 混合物を暴露した試験より得られた、メダカの遺伝子発現プロファイルデータの再解析を行った。検出されたすべての遺伝子を対象に一元配置分散分析を行い、群間で発現量が有意に異なる ( $p = 0.01$ ) 遺伝子を抽出したところ、3,318 の遺伝子が有意な変動を示すことが明らかとなった。これらの遺伝子の遺伝子オントロジー (GO) に基づいて、エンリッチメント解析により抽出された機能的クラスターの一部を表 3 に示す。この結果から、細胞膜に存在するイオンチャンネルが影響を受けており、とくにシナプス前後膜に存在する受容体やトランスポーターの発現変動が観察された。これらの分子の変動が、AE 暴露時に生じる麻酔作用と関連している可能性が示唆された。

また、ヘモグロビン合成や赤血球の分化に関連する遺伝子も変動しており、赤血球が AE のターゲットとなっていると推察された。このことは、LAS がメダカの赤血球を標的にしたため体内で貧酸素状態が生じ、その状態から回復するために赤血球の産生を促進していたという、我々の先行研究の結果と類似している (Tasaki et al., 2017)。これは、AE も LAS と同様に赤血球をターゲットとすることを示唆している。

この他にも、脂肪酸の  $\beta$  酸化や TCA 回路など、エネルギー産生に関わる生体内機能が AE の暴露によって影響を受けていたことが明らかとなった。

表 3. AE 混合物の暴露によって変動したメダカの遺伝子を機能で分類した結果  
(平成 28 年度に取得したデータを再解析, 259 クラスターの一部を抜粋)

GO ID	GO category	GO term
<b>Cluster 1 (Enrichment score: 10.35)</b>		
GO:0006810	BP	Transport
GO:0006811	BP	Ion transport
GO:0005216	MF	Ion channel activity
<b>Cluster 5 (Enrichment score: 6.03)</b>		
GO:0055114	BP	Oxidation-reduction process
GO:0016491	MF	Oxidoreductase activity
<b>Cluster 6 (Enrichment score: 5.76)</b>		
GO:0016020	CC	Membrane
GO:0016021	CC	Integral component of membrane
<b>Cluster 9 (Enrichment score: 3.68)</b>		
GO:0045202	CC	Synapse
GO:0030054	CC	Cell junction
GO:0004872	MF	Receptor activity
<b>Cluster 18 (Enrichment score: 2.32)</b>		
GO:0086010	BP	Membrane depolarization during action potential
GO:0005244	MF	Voltage-gated ion channel activity
GO:0034765	BP	Regulation of ion transmembrane transport
<b>Cluster 62 (Enrichment score: 1.08)</b>		
GO:0042541	BP	Hemoglobin biosynthetic process
GO:0006783	BP	Heme biosynthetic process
GO:0030218	BP	Erythrocyte differentiation
<b>Cluster 113 (Enrichment score: 0.62)</b>		
GO:0055088	BP	Lipid homeostasis
GO:0033539	BP	Fatty acid beta-oxidation using acyl-CoA dehydrogenase
<b>Cluster 159 (Enrichment score: 0.35)</b>		
GO:0006099	BP	Tricarboxylic acid cycle

表 4. AE (EO3 または EO8) の暴露によって変動したメダカの遺伝子を機能で分類した結果 (平成 29 年度に取得したデータを解析, 183 クラスターの一部を抜粋)

GO ID	GO category	GO term
<b>Cluster 1 (Enrichment score: 13.01)</b>		
GO:0016491	MF	Oxidoreductase activity
GO:0055114	BP	Oxidation-reduction process
<b>Cluster 3 (Enrichment score: 5.14)</b>		
GO:0005201	MF	Extracellular matrix structural constituent
GO:0005581	CC	Collagen trimer
<b>Cluster 6 (Enrichment score: 2.92)</b>		
GO:0055088	BP	Lipid homeostasis
GO:0033539	BP	Fatty acid beta-oxidation using acyl-CoA dehydrogenase
<b>Cluster 15 (Enrichment score: 2.04)</b>		
GO:0007229	BP	Integrin-mediated signaling pathway
GO:0008305	CC	Integrin complex
<b>Cluster 50 (Enrichment score: 1.21)</b>		
GO:0006783	BP	Heme biosynthetic process
<b>Cluster 63 (Enrichment score: 0.90)</b>		
GO:0042541	BP	Hemoglobin biosynthetic process
GO:0030218	BP	Erythrocyte differentiation
<b>Cluster 67 (Enrichment score: 0.82)</b>		
GO:0006096	BP	Glycolytic process
GO:0006094	BP	Gluconeogenesis
<b>Cluster 96 (Enrichment score: 0.55)</b>		
GO:0007154	BP	Cell communication
GO:0005921	CC	Gap junction
<b>Cluster 122 (Enrichment score: 0.30)</b>		
GO:0016020	CC	Membrane
GO:0016021	CC	Integral component of membrane
<b>Cluster 148 (Enrichment score: 0.15)</b>		
GO:0005230	MF	Extracellular ligand-gated ion channel activity

### 3. 4 EO3 および EO8 暴露による影響の解析

平成 29 年度に実施した AE の単一化合物を暴露した試験より得られた, メダカの遺伝子発現プロファイルデータの解析を行った。検出されたすべての遺伝子を対象に一元配置分散分析を行い, 群間で発現量が有意に異なる ( $p = 0.01$ ) 遺伝子を抽出したところ, 2,499 の遺伝子が有意な変動を示すことが明らかとなった。これらの遺伝子の機能的分類を 3. 3 と同様に行った結果を表 4 に示す。酸化還元酵素, 細胞接着や細胞外マトリックス, ヘムおよびヘモグロビン合成等が影響を受けていることが示され, 3. 3 の結果と多くの部分が一致した

ことから、AE 暴露による影響の再現性が確認された。とくに、エンリッチメントスコアは大幅に低下しているものの、細胞間コミュニケーション・イオンチャンネルに関わる遺伝子の変動が検出されており、これらは AE 暴露に特徴的な影響であると予想された。

また、脂質のホメオスタシス、脂肪酸の  $\beta$  酸化、糖新生等に関連する遺伝子群が比較的上位のクラスターを形成していた。この一因として、絶食による影響が挙げられる。群間で有意な発現変動を示した 2,499 遺伝子を用いた相関分析の結果を図 6 に示す。この図から、AE 暴露の有無にかかわらず、暴露時間が近い個体間で相関係数が高いことがわかる。これらの結果から、有意な変動を示した遺伝子群の多くは暴露開始からの経過時間、すなわち絶食による影響で変動したと考えられた。このことは、エンリッチメント解析によって、エネルギー産生に関わる遺伝子群が比較的上位のクラスターを形成していたことと矛盾しない。一方で、昨年度実施した AE 混合物暴露試験においても、暴露開始から 48 時間での群間の比較で、表 3 に示す通り、エネルギー産生に関連する遺伝子群の発現変動が検出されていたことから、AE の暴露はメダカのエネルギー産生にも影響を及ぼすが、同じ代謝経路が絶食によっても影響を受けるため、今年度の試験結果では AE による影響が絶食に対する応答でマスクされていたと考えられた。

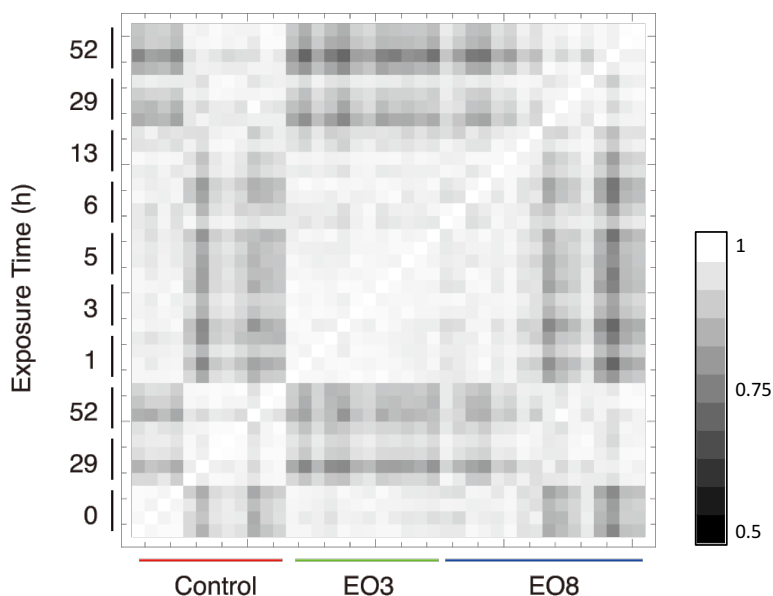


図6. 一元配置分散分析で抽出された遺伝子の発現量から求めた相関行列。横軸に暴露区、縦軸に暴露時間を示す。相関係数が1に近づくほど淡色で表す。対角線を境にして相関行列が対称になっており、対角線上では同サンプル間の相関を表しているため、相関が1になっている。

### 3. 5 有害性を規定する遺伝子の選抜と生存率の予測

まず、一元配置分散分析で抽出された 2,499 遺伝子の発現量で相関を調べた、相関行列を図 6 に示す。原点から右に、最初の 4 個体間で高い相関を示すなど、同じ処理区の個体間では相関係数が高くなった。対照区 0 時間の 4 個体と対照区の 29 時間および 52 時間の個体(右隣の 8 個体)は比較的相関が低かった。これらは全て対照区の個体であるため、AE 暴露による影響は受けていない。一方、EO3 を暴露した個体と対照区 0 時間の個体で

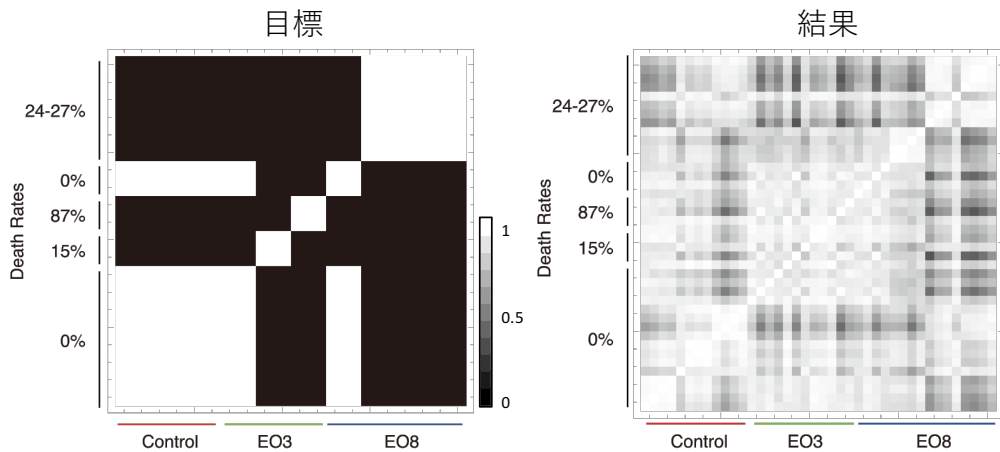


図7. 死亡率が同程度であれば遺伝子発現パターンは類似するとの仮説に基づいた、相関行列の目標値(左)と、遺伝的アルゴリズムにより仮説に近づくよう抽出された20遺伝子から求めた相関行列(右)。

の遺伝子発現も相関が高くなっていった。このことは EO3 では暴露時間が短く、時間の変化に伴う影響が小さいためと考えられた。同様の結果が EO8 の 6 時間, 13 時間暴露群との相関からも窺える。また, 対照区 29 時間, 52 時間の個体と EO8 の 29 時間, 52 時間暴露の個体間でも遺伝子発現量の相関が高い。以上の結果は, 遺伝子発現の変化量は, 暴露により誘導(または阻害)された遺伝子よりも, 時間が経つことで変化する遺伝子, すなわち絶食の影響により変化が生じた遺伝子がより支配的であることを示している。

次に、「2. 7. 2. 2 重要遺伝子の特定」で記した, 遺伝的アルゴリズムで選び出した遺伝子の発現量で調べた相関行列を図 7 に示す。図 7 の左図が, 目標とする遺伝子発現パターンである(死亡率が異なる個体間の遺伝子発現量は無相関, 同じであれば相関は 1)。遺伝的アルゴリズムで, この目標に可能な限り近くなる遺伝子のセットを選び出し相関を調べたのが図 7 右図である。図 7 右図は図 6 の結果とほぼ同じように見えるが, 例えば, 対照区の 0 時間個体と 29 時間個体との間で遺伝子発現の相関が高くなっている等, 時間経過に

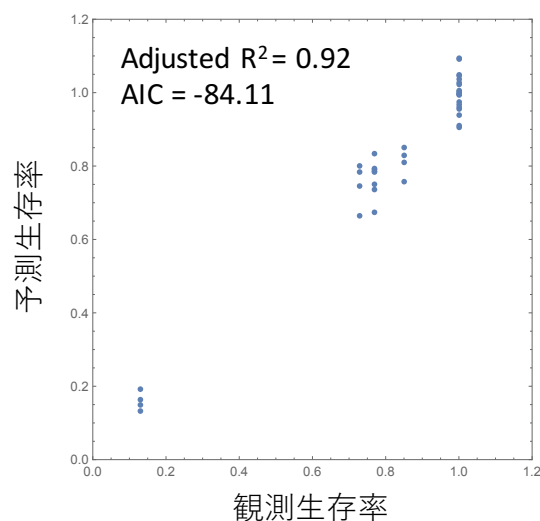


図8. 選ばれた20遺伝子の発現量データを説明変数として算出した予測生存率と実際に観測した生存率との比較



より発現量が変化した遺伝子が除去されていることが見て取れる。

遺伝的アルゴリズムにおいて選り出された遺伝子は、2,499 個中 20 個であった。ここで選り出された 20 遺伝子の発現量を説明変数、生存率を従属変数として線形回帰を行い、観測生存率と予測生存率を比較した結果を図 8 に示す。これらは、「生存率を高く推定する」という観点から選ばれた遺伝子ではないにもかかわらず、高い精度で生存率が予測することが可能であった。これらは AE の有害性に関与した遺伝子である可能性が高いことが示唆されるが、実際に AE の影響のみに関与した遺伝子であるかどうかは慎重な検討が必要である。

### 3.6 まとめ

本研究によって、EO3 および EO8 の暴露によって 50%のメダカ個体が死亡する際の暴露濃度と暴露時間との関係が明らかとなり、EO 付加モル数の少ない方が致死時間は短いことが示された。改良した AE の分析法を用いて各同族体の濃縮性を評価したところ、排泄速度は EO3 と EO8 でほぼ同等であったことから、BCF の違いを考慮すると、EO3 の方が取込速度は早いと推察され、致死時間が短いことと矛盾しなかった。遺伝子発現解析から AE の作用機序を解析したところ、膜構造や膜貫通ユニットの遺伝子発現変動が顕著であり、細胞管シグナル伝達が阻害されていることが示唆された。また、LAS と同様に AE も赤血球をターゲットにしている可能性が示された。さらに、絶食によって変動するエネルギー代謝に関わる遺伝子群も AE 暴露による影響を受けており、時系列で解析すると、AE の影響を絶食による影響がマスクしていることが考えられた。加えて、絶食の影響を取り除くと、20 遺伝子が選り抜きされ、これらの遺伝子の発現量からメダカの生存率を予測すると、高い精度で生存率が予測できることが判明した。ただし、この生存率予測が普遍的であるかについては、さらなる検討が必要である。

昨年度の研究成果と併せて考えると、AE の有害性評価にあたり EO 付加モル数の違いは致死濃度や致死時間には大きく影響するものの、作用機序については大きな違いを生じさせないものと考えられた。したがって、比較的高精度で有害性の予測が可能であるため、同一の評価単位に取りまとめでも差し支えないのではないかと考える。ただし、炭素鎖長の違いについては本研究課題では評価していないため、これらについては別途検討が必要であると考えている。

## 4. 謝辞

本研究は、平成 29 年度の経済産業省「化学物質管理に関する科学的知見の充実に向けた調査研究」の助成により実施した。

## 5. 調査結果の公表

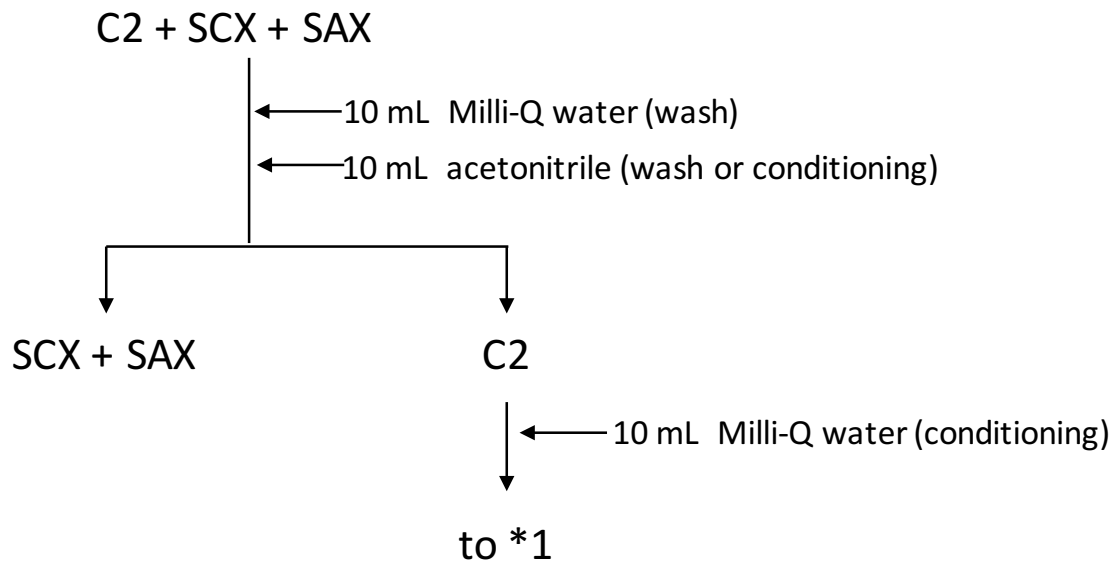
一部のデータは平成 29 年度日本環境毒性学会研究発表会にて発表した。また、今年度の研究成果は平成 30 年度日本環境毒性学会研究発表会にて発表を予定している。

なお、本研究で得られた成果は学術誌での公表を予定しているため、着目した個々の遺伝子名については、本報告書中には記載しなかった。

## 6. 参考文献

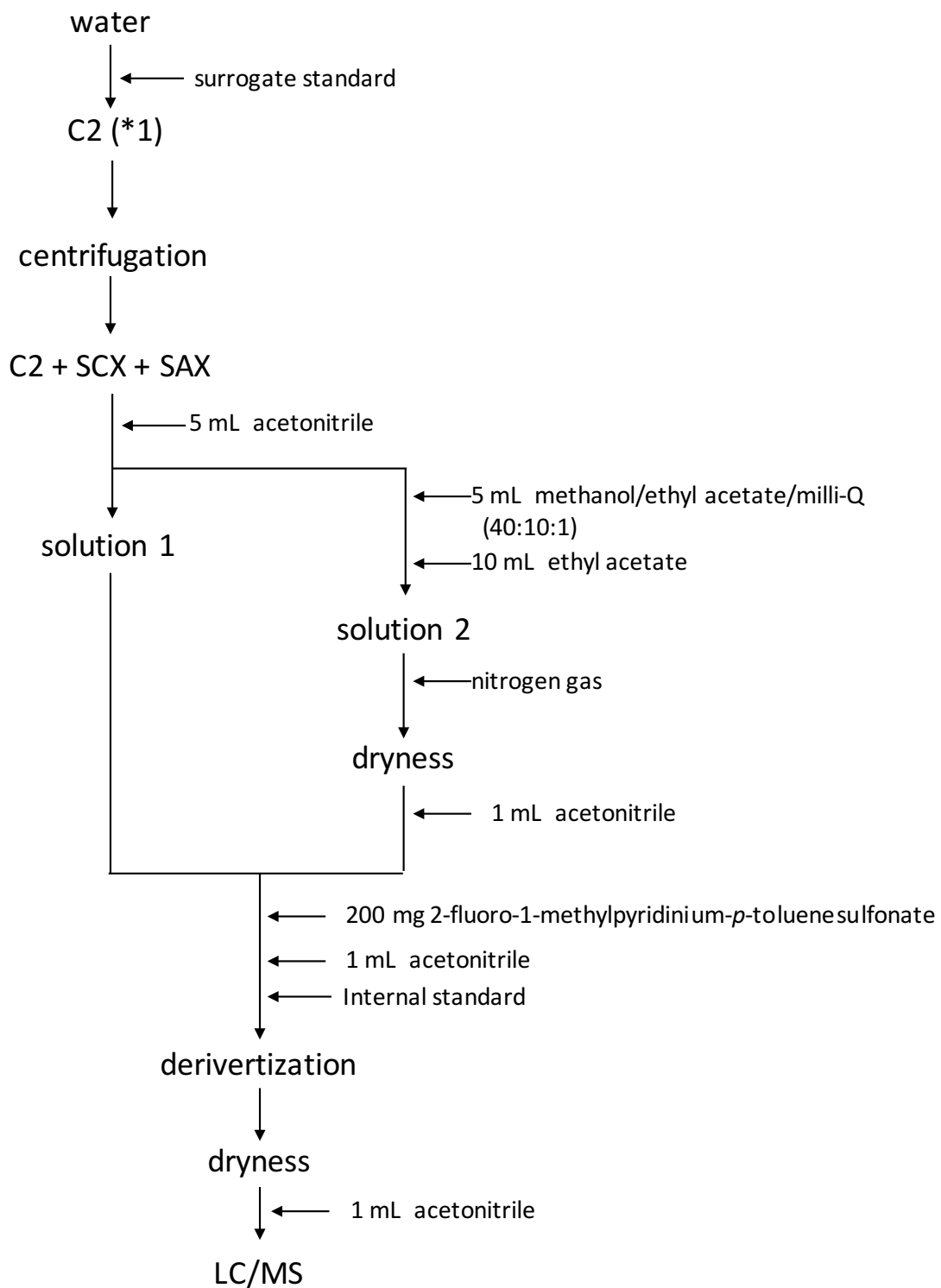
- Dunphy JC, Pessler DG, Morrall SW. 2001. Derivatization LC/MS for the simultaneous determination of fatty alcohol and alcohol ethoxylate surfactants in water and wastewater samples. *Environmental Science and Technology* 35, 1223–1230.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. 2009a. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protocols* 4, 44–57.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. 2009b. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research* 37, 1–13.
- Langmead B & Saizberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9, 357–359.
- Tasaki J, Nakayama K, Shimizu I, Yamada H, Suzuki T, Nishiyama N, Yamane M. 2017. Cellular and molecular hypoxic response in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to linear alkylbenzene sulfonate at sublethal concentrations. *Environmental Toxicology* 32, 122–130.
- Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Saizberg SL, Rinn JL, Pachter L. 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols* 7, 562–578.
- Wakabayashi M, Kikuchi M, Sato A, Yoshida T. 1987. Bioconcentration of alcohol ethoxylates in carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 13, 148–163.
- 清水厚志, 坊農秀雅. 2015. 次世代シーケンサー DRY 解析教本. 株式会社学研メディカル秀潤社.

## SPE column washing



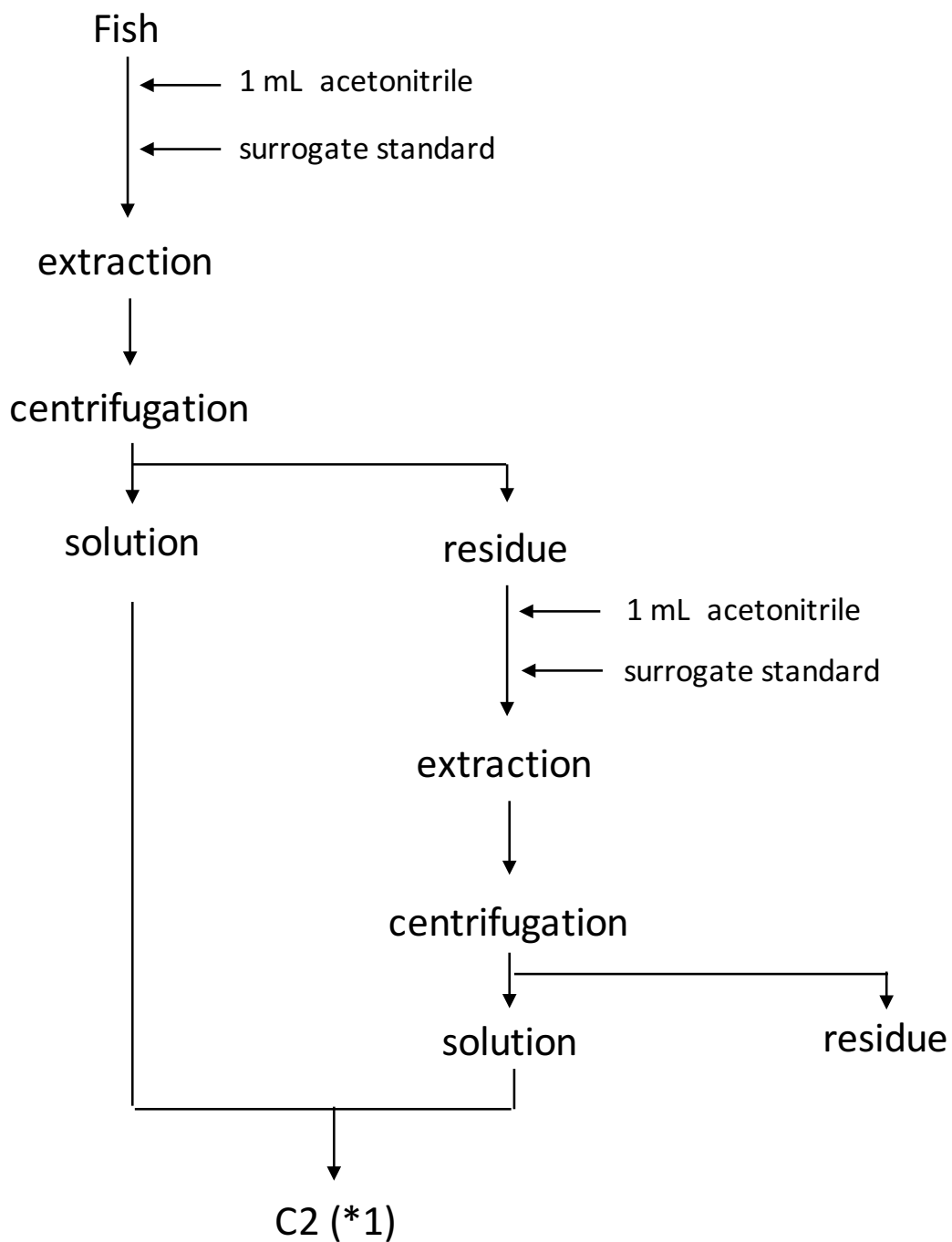
附図1. 固相抽出カラムのコンディショニング

### Analytical procedure of AEs in water



附図 2. 水中 AE の分析法

# Analytical procedure of AEs in fish



附図 3. 魚体中 AE の分析法