

様式3

愛媛大学沿岸環境科学研究センター
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」
共同研究報告書

平成 29 年 1 月 20 日

化学汚染・沿岸環境研究拠点 拠点長 殿

申請者（研究代表者）

所属機関 千葉大学予防医学センター

職 助教

氏名 江口 哲史

下記の共同研究について、別紙の通り報告します。

1 研究課題

尿メタボローム解析によるヒト化学物質曝露リスクの解明

2 研究組織

氏名	所属	職	分担研究課題
代表者 江口 哲史	千葉大学予防医学 センター	助教	メタボローム分析・データ解析
拠点対応教員 野見山 桂	愛媛大学沿岸環境 科学研究センター	准教授	試料提供・解析助言

3 研究内容 （別紙）

研究課題名: 尿メタボローム解析によるヒト化学物質曝露リスクの解明

千葉大学予防医学センター 江口 哲史

愛媛大学沿岸環境科学研究センター 野見山 桂

研究目的

本研究「尿メタボローム解析によるヒト化学物質曝露リスクの解明」の構想は、細胞内に数千種類存在する低分子代謝物（メタボローム）の解析を通して周辺環境の変化・化学物質の曝露を反映するバイオマーカーを特定し、環境疫学・環境毒理学の端緒開拓を目指すものである。具体的にはコホート調査により得られた尿中のメタボロームを測定し、環境要因・化学物質の曝露レベルとの関係を解析することで曝露を反映するバイオマーカーを特定する。さらに、バイオマーカーの機能を解析することで、化学物質曝露による毒性発現機序の解明を試みる。

本年度は特に鉛バッテリーリサイクルによる汚染が顕著なベトナム、Dong Mai 地域住民における鉛曝露の影響を、メタボローム解析を通じて解明することを目的とした。本調査地域は鉛バッテリーのリサイクルを 40 年以上継続しており、地域の表層土 (Fujimori et al. 2016) や地域住民血中 (median: 34 $\mu\text{g}/\text{dL}$, min-max: 14-122 $\mu\text{g}/\text{dL}$) (Noguchi et al. 2014) から極めて高濃度の鉛が検出されている。このような鉛曝露による健康被害に腎障害がある。腎臓は鉛をはじめとする重金属の標的組織の 1 つであり、尿細管に鉛が蓄積することで腎炎などを引き起こすことが知られている (Reyes et al. 2013)。このため、既報においても職業的曝露による鉛の腎毒性が報告されている (Clarkson and Kench 1956)。

このような背景から、鉛曝露による鉛バッテリーリサイクル地域住民の健康影響が懸念されるが、メタボローム解析により鉛の毒性影響を解析した研究は動物実験が中心であり、ヒトを対象とした疫学研究は限られている。このため、本研究では鉛バッテリーリサイクル地域住民および対照地域住民から得た尿中のメタボロームを分析し、そのプロファイルを比較することで、鉛曝露に関連するバイオマーカー候補物質を探索し、その機能を解析することで曝露により変動するパスウェイの解析を試みた。

研究内容

本研究は愛媛大学および千葉大学の倫理委員会より承認を受けた研究である。研究対象は成人のみとし、ベトナムの鉛バッテリーリサイクル地域住民 (n = 44)、 対照地域住民 (n = 51) より 2010-2011 年に採取した尿検体を測定に供した。

263 種の尿中メタボロームは既報に改良を加え (Eguchi et al. 2016; Soga et al. 2009; Yuan et al. 2012)、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (HPLC-MS/MS) で測定した。各地域住民の血中鉛濃度および尿中 δ -aminolevulinic acid 濃度は既報で報告されたデータを用いた (Noguchi et al. 2014)。

得られた尿中メタボロームデータは、データクリーニングおよび白色化の後、機械学習手法の1つである randomforest (Breiman 2001) により解析を試みた。解析は、鉛バッテリーリサイクル地域住民、対照地域住民 2 群の判別分析に加え、鉛濃度とメタボロームデータの回帰分析を行った。モデルの信頼性確認のため、判別分析および回帰分析に先立ち、対象検体をランダムにトレーニングセット: バリデーション用テストセットに 3:1 で分割した。モデル最適化の後、Janitza らの手法に基づきモデルの変数重要度を算出し (Janitza et al. 2016)、 $p < 0.05$ となったメタボロームをバイオマーカー候補とした。また、バイオマーカー候補となったメタボロームの Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) ID (Kanehisa et al. 2008) を用い、Reactome V58 (Fabregat et al. 2016) により enrichment analysis を行った。この結果、false discovery rate (FDR) < 0.05 のパスウェイを曝露により変動した生体内パスウェイとして解析を試みた。

本研究で対象とした成人鉛バッテリーリサイクル地域住民の血中鉛濃度 (mean: 48 $\mu\text{g/dL}$, min-max: 14-122 $\mu\text{g/dL}$) は対照地域住民 (mean: 3.9 $\mu\text{g/dL}$, min-max: 0.98 – 10.6 $\mu\text{g/dL}$) の約 10 倍の値を示した。この値はアメリカ合衆国保健福祉省が推奨する成人血中鉛濃度の推奨基準である 25 $\mu\text{g/dL}$ (Roscoe et al. 2002) を超過していた。また、鉛曝露による腎臓の機能不全が血中鉛濃度 10 $\mu\text{g/dL}$ 程度でも発生することが報告されており (Flora et al. 2012)、本研究における鉛バッテリーリサイクル地域住民血中鉛濃度は健康影響が懸念されるレベルだった。

これらの結果に基づき、鉛バッテリーリサイクル地域住民、対照地域住民 2 群の判別分析を試みた。判別分析の結果、2 群の判別能を表す area under the curve (AUC) はトレーニングセットで 0.915、 テストセットで 1.0 と高い値を示し、尿中メタボ

ロームの組成から2つのグループを明確に判別することができた。また、血中鉛濃度を目的変数として、メタボローム組成から回帰分析を試みたところ、 R^2 値はトレーニングセットで0.532、テストセットで0.448であり、良好な値が得られた。判別分析および回帰分析より得られたモデルの変数重要度を算出したところ、判別分析で31種、回帰分析で35種のメタボロームが $p < 0.05$ であり、うち先行研究で測定された δ -aminolevulinic acidを含む13種のメタボロームが判別分析、回帰分析で重複していた (Table 1)。本研究ではこれら13種のメタボロームを、鉛曝露レベルを反映するマーカー候補物質とした。

Table.1 Altered urinary metabolome in participants from lead-acid battery recycling site, Vietnam

	p-value	KEGG ID
2-Hydroxy-2-methylbutanedioic acid	< 0.01	C02612
Arginine	0.0259	C00062
Cystine	0.00862	C00491
δ -aminolevulinic acid	< 0.01	C00430
Ethanolamine	< 0.01	C00189
Glutamine	0.0259	C00064
Glycerophosphocholine	< 0.01	C00670
N-Acetylputrescine	< 0.01	C02714
Pyrophosphate	< 0.01	C00013
Pyruvate	< 0.01	C00022
S-adenosyl-L-homocysteine	< 0.01	C00021
Spermine	< 0.01	C00750
Urea	< 0.01	C00086

これらのメタボロームについて enrichment analysis によるパスウェイ解析を試みた。この結果、低分子化合物の輸送に関わるメタボロームの変動が明らかになった (FDR < 0.05) (transportations of small molecules [Arginine, Cystine, Glutamine, Pyrophosphate, Pyruvate, S-adenosyl-L-homocysteine, Spermine and Urea], Table 2)。

重金属曝露は腎臓において糖、アミノ酸、リン酸類など、低分子化合物の再吸収低下を引き起こすファンコーニ症候群の発症と関係することが知られている (Hammond 1977)。本研究においてもファンコーニ症候群と同様に、アミノ酸、タンパク質の尿中排泄量増加をともなう疾患であるシスチン尿症に関連するパスウェイ (Defective SLC3A1 and SLC7A9 causes cystinuria, Table2) の変動が確認されており (FDR < 0.05) (Table 2)、本研究で対象としたベトナム鉛バッテリーリサイクル地域住民が鉛曝露により、腎臓への悪影響を受けている可能性が示唆された。

Table 2. The result of enrichment analysis (p-value and False discovery rate (FDR) correction of p-value) of altered metabolic pathways identified as potential markers (Matching KEGG IDs) in urine

Pathway name	Entities pValue	Entities FDR	Submitted KEGG ID
Miscellaneous transport and binding events	3.54E-05	0.00654	C00013;C00062;C00491
Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides	4.44E-05	0.00654	C00022;C00021;C00064;C00062;C00491
Metabolism of polyamines	6.28E-05	0.00654	C00013;C00750;C00021;C00086;C00062
Transmembrane transport of small molecules	6.81E-05	0.00654	C00013;C00750;C00022;C00021;C00064;C00086;C00062;C00491
SLC-mediated transmembrane transport	1.58E-04	0.0122	C00750;C00022;C00021;C00064;C00086;C00062;C00491
Transport of glucose and other sugars, bile salts and organic acids, metal ions and amine compounds	4.08E-04	0.0233	C00750;C00022;C00064;C00086;C00062
Defective SLC3A1 causes cystinuria (CSNU)	4.85E-04	0.0233	C00062;C00491
Defective SLC7A9 causes cystinuria (CSNU)	4.85E-04	0.0233	C00062;C00491
Urea cycle	6.89E-04	0.0296	C00013;C00086;C00062
Antigen processing: Ubiquitination & Proteasome degradation	8.86E-04	0.0337	C00013;C00064;C00062
Agmatine biosynthesis	0.00108	0.0378	C00086;C00062
Transmission across Chemical Synapses	0.00143	0.0395	C00189;C00013;C00021;C00064
Neuronal System	0.00143	0.0395	C00189;C00013;C00021;C00064
Synthesis of diphthamide-EEF2	0.00146	0.0395	C00013;C00021
Conjugation of phenylacetate with glutamine	0.00190	0.0444	C00013;C00064
Amino acid transport across the plasma membrane	0.00202	0.0444	C00064;C00062;C00491
Metabolism of ingested SeMet, Sec, MeSec into H2Se	0.00202	0.0444	C00013;C00022;C00021

引用文献

- Breiman, L. Random forests. *Mach Learn* 2001;45:5-32
- Clarkson, T.W.; Kench, J.E. Urinary excretion of amino acids by men absorbing heavy metals. *Biochem J* 1956;62:361-372
- Eguchi, A.; Miyaso, H.; Mori, C. The effects of early postnatal exposure to a low dose of decabromodiphenyl ether (BDE-209) on serum metabolites in male mice. *J Toxicol Sci* 2016;41:667-675
- Fabregat, A.; Sidiropoulos, K.; Garapati, P.; Gillespie, M.; Hausmann, K.; Haw, R.; Jassal, B.; Jupe, S.; Korninger, F.; McKay, S.; Matthews, L.; May, B.; Milacic, M.; Rothfels, K.; Shamovsky, V.; Webber, M.; Weiser, J.; Williams, M.; Wu, G.; Stein, L.; Hermjakob, H.; D'Eustachio, P. The Reactome pathway Knowledgebase. *Nucleic acids research* 2016;44:D481-487
- Flora, G.; Gupta, D.; Tiwari, A. Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdiscip Toxicol* 2012;5:47-58
- Fujimori, T.; Eguchi, A.; Agusa, T.; Tue, N.M.; Suzuki, G.; Takahashi, S.; Viet, P.H.; Tanabe, S.; Takigami, H. Lead contamination in surface soil on roads from used lead-acid battery recycling in Dong Mai, Northern Vietnam. *J Mater Cycles Waste* 2016;18:599-607
- Hammond, P.B. Exposure of humans to lead. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1977;17:197-214
- Janitza, S.; Celik, E.; Boulesteix, A.-L. A computationally fast variable importance test for random forests for high-dimensional data. *Advances in Data Analysis and Classification* 2016:1-31
- Kanehisa, M.; Araki, M.; Goto, S.; Hattori, M.; Hirakawa, M.; Itoh, M.; Katayama, T.; Kawashima, S.; Okuda, S.; Tokimatsu, T.; Yamanishi, Y. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic acids research* 2008;36:D480-D484
- Noguchi, T.; Itai, T.; Tue, N.M.; Agusa, T.; Ha, N.N.; Horai, S.; Trang, P.T.K.; Viet, P.H.; Takahashi, S.; Tanabe, S. Exposure assessment of lead to workers and children in the battery recycling craft village, Dong Mai, Vietnam. *J Mater Cycles Waste* 2014;16:46-51
- Reyes, J.L.; Molina-Jijon, E.; Rodriguez-Munoz, R.; Bautista-Garcia, P.; Debray-Garcia, Y.; Namorado Mdel, C. Tight junction proteins and oxidative stress in heavy metals-induced nephrotoxicity. *Biomed Res Int* 2013;2013:730789
- Roscoe, R.J.; Ball, W.; Curran, J.J.; DeLaurier, C.; Falken, M.C.; Fitchett, R.; Fleissner, M.L.; Fletcher, A.E.; Garman, S.J.; Gergely, R.M.; Gerwel, B.T.; Gostin, J.E.; Keyvan-Larijani, E.; Leiker, R.D.; Lofgren, J.P.; Nelson, D.R.; Payne, S.F.; Rabin, R.A.;

Salzman, D.L.; Schaller, K.E.; Sims, A.S.; Smith, J.D.; Socie, E.M.; Stoeckel, M.; Stone, R.R.; Whittaker, S.G. Adult blood lead epidemiology and surveillance--United States, 1998-2001. *MMWR Surveill Summ* 2002;51:1-10

Soga, T.; Igarashi, K.; Ito, C.; Mizobuchi, K.; Zimmermann, H.P.; Tomita, M. Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal Chem* 2009;81:6165-6174

Yuan, M.; Breitkopf, S.B.; Yang, X.; Asara, J.M. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nat Protoc* 2012;7:872-881

成果発表

なし

今後の問題点

今後の問題点として参加者個人の食生活などの影響について、解析を深める必要があると考える。この点についてはアンケート調査の結果を含め、参加者の背景情報についても解析に加えることで解決したいと考える。今年度については本研究テーマについての成果発表はないが、検体の測定およびスクリーニングのデータ解析は終了しているため、来年度の学会参加や、国際誌への投稿準備を進めることで成果を出す予定である。