

研究課題名

環境医薬品の生物影響解明に向けた分子的基盤の確立

研究組織

研究代表者 中村文音（東京理科大学先進工学部）
研究分担者 宮川信一（東京理科大学先進工学部）
研究分担者 西村優佳（東京理科大学先進工学部）
拠点構成員 野見山桂（愛媛大学沿岸環境科学研究センター）

研究目的

ヒトが服用した医薬品由来の化学物質が、使用後に下水道等を経て河川に流入していることが世界各地で明らかとなっている。これらの医薬品類が環境に放出されたのち、水生生物にどのように作用するか十分に研究されておらず、自然環境および生態系への負荷が懸念されている。そのため、魚類をはじめとする水生動物の医薬品に対する影響を、分子・細胞・個体レベルで明らかにする必要がある。そこで本研究では、抗うつ薬や抗精神薬等の医薬品曝露によるメダカ等魚類の行動異常を誘導する実験系において、脳内の神経伝達物質（モノアミン系物質）の変動を、高感度 LC-MS によるターゲット分析によって解析し、脳内代謝物の面から医薬品に対する分子応答メカニズムを明らかにすることを目的とした。

研究方法

メダカ (*Oryzias latipes*) の成魚に Mirtazapine 1mg/L、Amitriptyline 0.1mg/L、Chlorpromazine 0.1mg/L を 96 時間曝露した。溶媒として用いた DMSO の飼育水中の終濃度は 0.01% とし、コントロール群には DMSO を 0.01% になるよう飼育水に添加した。曝露期間中は無給餌とした。採取した全脳は 1 サンプルごとにチューブに移し、質量を測定後に液体窒素で直ちに凍結した。その後サンプルを、愛媛大学沿岸環境科学研究センターに送付し、質量分析法によって、メダカの脳内のモノアミン（ドーパミン、セロトニン、ノルエピネフリン、オクトパミン、チラミン、トリプタミン、3-メトキシ

チラミン (3-MT)、5-メトキシトリプタミン (5-MT)) の濃度を測定した。実験のストラテジーと使用した医薬品類の詳細は図 1 に示した。網羅的なメタボローム解析は、Human Metabolome Technologies 社 (山形県鶴岡市) の CE-TOF-MS, Basic scan で外注した。得られた代謝物のデータは、スパースモデリング部分的最小二乗判別分析 (Sparse partial least squares discriminant analysis ; sPLS-DA) によって解析した。

サンプル数	オス	メス	
DMSO	8	8	<ul style="list-style-type: none"> ・ 1つのチューブに1つの脳を入れる ・ 8種類のアミノ酸誘導体を測定 <p style="margin-left: 20px;">Tyramine, Dopamine, Octopamine, Norepinephrin, Tryptamine, 3-MT (3-Methoxytyramine), Serotonin, 5-MT (5-Methoxytryptamine)</p>
Mirtazapine	8	5	
Amitriptyline	8	9	
Chlorpromazine	9	8	

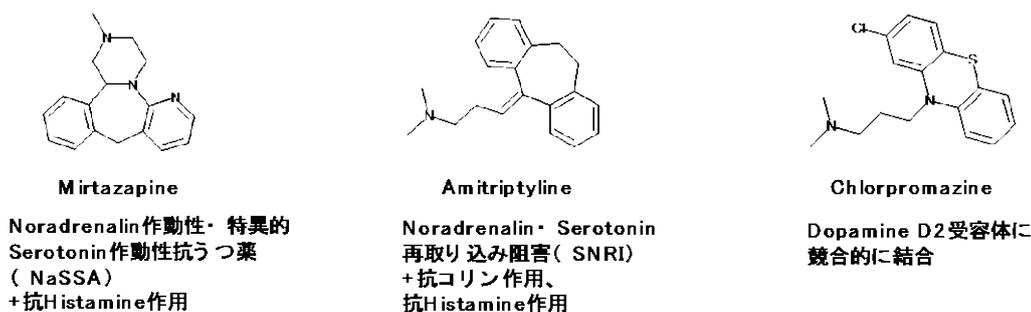


図1. 本実験のストラテジーと、使用した医薬品の説明

研究成果

Mirtazapine、Amitriptyline、Chlorpromazine およびコントロールである DMSO を 96 時間曝露したメダカの全脳におけるモノアミン類を LC-MS によって定量した。得られたデータは、昨年度のデータと合わせて解析し、図 2 (オス)、図 3 (メス) に示す結果を得た。各医薬品成分ごとに特徴は以下のとおりである。

- ・ Mirtazapine を曝露すると、オス、メスともに Dopamine と Serotonin レベルが有意に低下した。メスでは Serotonin 代謝物の 5-MT も低下した。
- ・ Amitriptyline を曝露すると、オスで Norepinephrine レベルが増加、メスで 3-MT レベルが低下した。
- ・ Chlorpromazine を曝露すると、メス Dopamine と Serotonin レベルが増加

し、3-MT レベルが低下した。

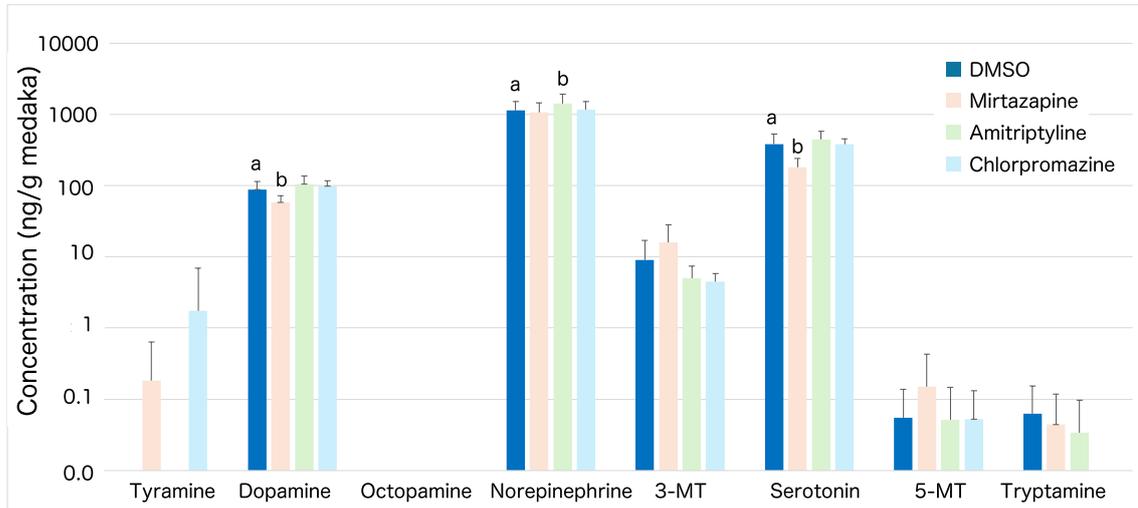


図2. メダカ全脳におけるモノアミン濃度 (オス)

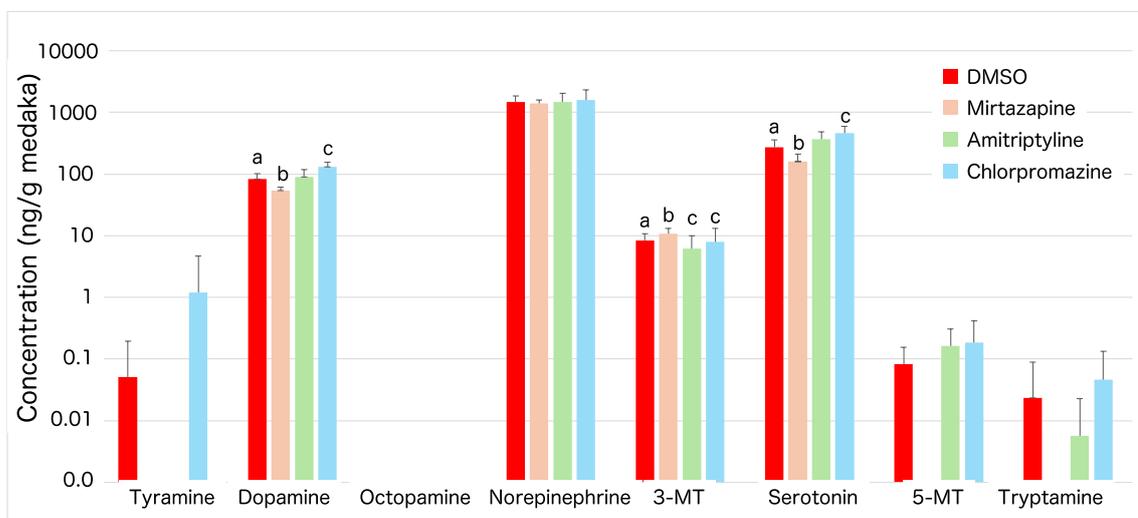


図3. メダカ全脳におけるモノアミン濃度 (メス)

今後の課題

本年度は一つの実験群で N=8 以上 (Mirtazapine メスを除く) として解析した。医薬品によってはオスまたはメスのみ有意差がついた代謝物があったが、どちらかに性で誤差が大きい群もあったことから、サンプル数に

については十分か検討する余地がある。あた、モノアミン類だけでなく、他の代謝物やホルモンの変動も考慮する必要あることから、甲状腺ホルモン等の測定を目指したい。

我々は RNA-seq 解析や網羅的メタボローム解析を既に行っており、データを取得している。今回調べたモノアミン類を合成あるいは分解する酵素や、代謝物の蓄積によって誘導される表現型が、遺伝子発現の面から説明できるかを検討し、医薬品の生物影響の作用メカニズムを明らかにしていく予定である。