

京都大学	博士（工学）	氏名	Riping Huang
論文題目	Risk Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals by Integrating Adverse Outcome Pathway, Machine Learning and Zebrafish Embryo Model: A Case Example of Bisphenol A (有害事象パスウェイ、機械学習、ゼブラフィッシュ胚モデルの統合による内分泌かく乱化学物質のリスク評価：ビスフェノール A を例として)		
(論文内容の要旨)			
<p>各国の政府機関は内分泌攪乱化学物質(EDC)の健康リスクを懸念し、EDCを規制する政策を導入している。しかし、EDCの毒性メカニズムの複雑さ、特に、重要な曝露経路、低用量効果、非単調な用量反応などのいくつかの特性は、従来のリスク評価手法に課題を投げかけている。さらに、毎年、世界各地で新規化学物質が上市されており、リスク評価のための関連データの入手が急務となっている。そこで本研究では、EDCの規制を支援するために、EDCの統合的なリスクを効率的かつ系統的に評価する手法を開発することを研究目的としている。</p> <p>第1章では、EDCの潜在的なリスク、EDCが従来のリスク評価手法に与える課題を提示し、本研究の意義や目的、構成などについて述べている。</p> <p>第2章では、EDCのリスク評価手法開発の文献調査を行っている。EDCのリスク評価に関する研究の現状について、各国の政府機関の動向や、評価手法および評価ツールの開発状況を紹介した。また、従来の技術や研究内容に比較しての、本研究の新規性についても述べている。</p> <p>第3章では、ビスフェノール A (BPA) 曝露によるリスク評価に、従来の評価手法を用いた結果を示している。文献から収集した BPA の尿中濃度データと、簡易的な代謝モデルに基づいて、中国人の BPA 曝露量を算出した。また、参照用量 (RfD) (50 mg/kg bw/day) および暫定耐容一日摂取量 (t-TDI) (4 mg/kg bw/day) に基づき、ハザード指数 (HQ) による BPA 曝露のリスク評価を行った。その結果、中国人は広く BPA に曝露されているが、リスクは高くないことがわかった。また、妊婦や小児は成人と比較して曝露リスクが高く、個人差もあることから、影響を受けやすい集団に対する曝露には、より注意が必要であることが示唆された。従来のリスク評価手法で用いられている RfD や TDI 値は、化学物質の有害事象を包括的に把握するには限界があり、リスク評価結果には不確実性が伴うことにも示されている。</p> <p>第4章では、ToxCast データベース、有害性発現経路 (AOP)、機械学習を組み合わせたインシリコ (<i>in silico</i>) モデルを開発し、EDCの毒性メカニズムの解明に加え、EDCによる様々な有害性に対するリスク評価を行った。物質の物理化学的性質や用途を考慮して、40種類のEDCを研究対象として選定した。ToxCast データベースと ToxPi ツールにより、40種類のEDCが引き起こす分子開始イベント (MIE) を収集し、優先順位付けを行った。EDC関連の AOP ネットワークを構築するために、MIEに関連する AOP 情報を、AOP-Wiki データベースから収集した。有害性発現 (AO) の毒性は、AOP ネットワークと機械学習により評価した。予測結果は、ToxRefDB から収集した動物実験データにより検証した。40種類のEDCの作用機序をプロファイリングするために、44種類のAOP、22種類のMIE、40種類のAO、</p>			

京都大学	博士（工学）	氏名	Riping Huang
<p>167 種類の主要イベント（KE）をカバーする 6 種類の AOP ネットワークを構築した。その結果、40 種類の EDC が作用する MIE には、ER、AR、PPARA、THRB、TPO、AHR、NR1I2 などが含まれることが明らかになった。40 種類の EDC が引き起こす AO は、肝臓病変、生殖系障害、免疫系障害、がん、肥満、発達障害、神経変性などであった。ランダムウォーク解析の結果、肝臓と生殖器系に障害が発生しやすいことが示された。化合物を毒性または無毒性に分類するモデルの尤度を表す、受信者動作特性曲線（ROC）から得られた曲線下面積（AUC）は、0.71（生殖毒性）および 0.86（肝毒性）であり、本研究の手法が EDC の毒性予測に妥当であることを示した。</p> <p>第 5 章では、AOP に関連したインシリコリスク評価法の有効性を検討するため、本研究の手法を用いて EDC のバイオマーカーを予測し、実際にゼブラフィッシュ胚モデルを用いることで、その予測値の妥当性を検証した。BPA を研究対象として、BPA による MIE を ToxCast データベースから、また、関連する AOP 情報を AOP-Wiki データベースから収集し、BPA 関連 AOP ネットワークを構築した。そして BPA の MIE を定量化することで、ToxPi スコアを用いてランク付けを行った。AOP ネットワークにおける重要な KE は、再起動を伴うランダムウォーク法を用いて同定した。最後に MIE と KE の遺伝子バイオマーカーをゼブラフィッシュ胚モデルでテストした。その結果、BPA によって引き起こされる MIE は、TPO、PPARA、NR1I2、NR1I3、ER、AR、THRB などであり、TPO 拮抗作用は ToxPi スコアがより高いことを示した。BPA による有害性発現（AO）は、免疫系障害、生殖系がん、その他のがん、生殖系障害、成長発育障害、乳がん、肝臓病変、神経発育障害、人口動態の変化などであった。再起動を伴うランダムウォーク法の結果、重要な KE は、ビテロジェニン濃度、チロキシン濃度、血中 E2 濃度、海馬の遺伝子発現、肝臓の脂肪酸、卵巣のテストステロンなどであることがわかった。ゼブラフィッシュ胚を用いた急性毒性試験の結果においては、BPA の 96 時間 50 %致死濃度（LC50）値および孵化率、奇形率、心拍数の 96 時間有効濃度（EC50）値は、それぞれ 9.4、5.9、5.1 および 8.5 mg/L であった。加えて BPA は、ゼブラフィッシュ胚に背骨の曲がり、心膜浮腫、卵黄嚢浮腫を引き起こす可能性があることも認めた。さらに、ゼブラフィッシュ胚の遺伝毒性試験の結果からは、ESR1、ESR2B、THRB、VTG1 が MIE および KE のバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。</p> <p>第 6 章では、本研究の主な結論と展望をまとめた。</p>			

氏名	Riping Huang
----	--------------

(論文審査の結果の要旨)

本論文は有害性発現経路 (AOP) などの手法を用いて、内分泌攪乱化学物質 (EDC) の統合的なリスクを、効率的かつ系統的に評価する手法を用いることで、ビスフェノール A (BPA) を例として開発したものである。得られた主な成果は以下のとおりである。

1) 31,811 人の中国人の尿サンプルから得られた結果から、BPA に広く曝露されているものの、そのリスクは高くないことを示した。乳児、妊婦、子供、成人の BPA の平均曝露量は、それぞれ 30.92 ± 22.70 , 24.85 ± 9.40 , 34.13 ± 20.65 , 22.48 ± 16.21 ng/kg_bw/day であった。

2) 40 種類の EDC の作用機序をプロファイリングするために、44 種類の AOP、22 種類の分子開始イベント (MIE)、40 種類の有害性発現 (AO)、167 種類の主要イベント (KE) を含む 6 種類の AOP ネットワークを構築した。EDC の毒性は、EDC-MIE 行列と MIE-AO 確率ベクトルを統合したランダムウォーク法によって予測した。AOP ベースのランダムウォークモデルは、これら EDC の肝毒性および生殖毒性を効率的かつ正確に予測することが可能であることを認めた。

3) BPA の作用機序をプロファイリングするために、43 の AOP、13 の MIE、28 の AO、147 の KE を含む AOP ネットワークを構築した。BPA の毒性に重要な KE は、再起動を伴うランダムウォーク法によって予測した。ゼブラフィッシュ胚を用いた遺伝毒性試験の結果からは、VTG1 が KE の遺伝子バイオマーカーとして、ESR1、ESR2B、THRB が MIE の遺伝子バイオマーカーとして適用可能であることを示した。ゼブラフィッシュ胚の急性毒性試験の結果からは、96 時間 50%致死濃度 (LC50) 値は 9.4 mg/L であり、孵化率、奇形率、心拍数の 96 時間有効濃度 (EC50) 値は、それぞれ 5.9、5.1、8.5 mg/L であった。また、BPA はゼブラフィッシュ胚に背骨の曲がり、心膜浮腫、卵黄嚢浮腫を引き起こす可能性があることも示した。

以上の結果は、BPA のような環境中に存在する EDC のリスクを、安価かつ迅速に推測する手法を提案するものであり、今後の環境リスク管理手法の発展に大きく貢献するものであって、学術上および實際上、寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 4 年 8 月 5 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。