

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	宮田 知代子
論文題目	化学物質の分子サイズや代謝分解性に着目した生物濃縮性評価手法に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>生物濃縮性をもつ化学物質は、環境中の生物に悪影響を及ぼす懸念があるため様々な規制を受け、新規な合成化学品の製造・販売にあたってはその生物濃縮性の評価が求められる。生物濃縮性の試験には魚が用いられ、化合物を水に溶解させる水曝露法、あるいは餌に混ぜて与える餌曝露法により魚体に取り込ませた後、体中の化合物濃度の水中あるいは餌中濃度に対する比を濃縮倍率として算出し、その値を評価する。しかしこの試験は、時間を要する上、多数の実験動物(魚)を必要とするため、開発コストの削減のみならず動物愛護の観点からも改良が求められている。本論文は動物実験を行うことなく化合物の生物濃縮性を正確に予測・評価するための手法開発を検討したもので、内容は以下のとおりである。</p> <p>第1章序論に続く第2章では、化合物が鰓経路で取り込まれる際の濃縮性と分子サイズの関係が調べられている。従来から、立体的にかさ高い分子は生体膜を透過しにくいと考えられており、欧州では真空中の分子を内包する球の直径$D_{\max \text{ aver}}$を評価指標として、その値が17.4 Å以上であれば、生物濃縮の可能性は低い(濃縮倍率<5000)とみなしてよいことになっている。$D_{\max \text{ aver}}$は、分子が取り得るすべての安定コンフォメーションのそれぞれについてつくられる内包球の直径(D_{\max})の平均値であるが、その算出には特定のソフトウェアが必要で、かつ使用には量子化学等の専門知識が求められるため汎用性に問題がある。そこで一般に利用されている分子モデリング・計算化学ソフトと自作のプログラムを組み合わせ、より簡便に$D_{\max \text{ aver}}$を算出する方法を考案した。さらに水棲生物における濃縮性を評価するには水中でのD_{\max}を指標とする方が適切と考え、濃縮倍率が既知の1665化合物について分子動力学シミュレーションを実施し、水中で取り得る安定コンフォメーションから求められるD_{\max}と濃縮倍率の関係を解析した。その結果、分子の水中D_{\max}の平均値($D_{\max \text{ aver}}$)が17.1 Åあるいは最小値($D_{\max \text{ min}}$)が15.6 Åを上回る化合物であれば、鰓から取り込まれにくく低濃縮性と判断できることを明らかにし、膜透過性への寄与が大きいと考えられるコンパクトなコンフォメーションの分子構造を反映する後者の方が、より安全に配慮した評価基準であるとした。</p> <p>第3章では魚の腸管膜経路の濃縮性と化合物の分子サイズの関係を検討している。水中の化合物は鰓経路のみでなく口からも魚に取り込まれることが考えられる。経口摂取による濃縮ポテンシャルを評価する試験法では、化合物を餌に混ぜて与えることがガイドラインにより定められているが、魚が取り込む餌の量にばらつきが大きく暴露量の制御が困難であることが問題となっている。そこで、魚の腸管を用いた<i>in vitro</i> 反転腸管法によって分子量や分子サイズの異なる公知の9化合物の膜透過性を評価した。コイから採取した腸管を表裏反転させ、内部を緩衝液で満たした状態で、被験化合物の溶液に浸し、一定時間経過後に内部に移行した化合物の濃度を測定した。その結果、分子量345以下かつ$D_{\max \text{ min}}$ 13.9 Å以下の4化合物は腸管内への透過が認められたのに対し、分子量が548以上かつ$D_{\max \text{ min}}$ 15.8 Å以上の5化合物は腸管膜をほとんど透過しなかった。これにより、腸管膜経路の濃縮性も鰓経路と同様に分子サイズで判定できる可能性が示された。</p> <p>第4章では魚による化合物の代謝速度と濃縮性の関係が調べられている。化学物質の濃縮性には物理化学的性質に加え、生物体内での代謝分解性も大きく影響する。魚による代謝については、現在、分子構造から代謝速度を予測する定量的構造活性相関</p>			

(QSAR) 式が考案されているが、その予測力は不十分で、代謝されやすく濃縮性は低いと予測した化合物が実際には高い濃縮性を示す例が認められている。そこで現行法の予測力の低さを改善すべくOECD が 2018 年にガイドラインとして示した、魚の肝 S9 分画を用いる *in vitro* 試験の有用性を検討した。生物試験でみられた代謝速度と QSAR による予測値に乖離が認められる一連のアルキルフェノール類を被験化合物として選定し、ニジマスの肝S9に補酵素を加え一定時間インキュベートしたところ、立体的にかさ高い置換基をもつ化合物の分解が他に比べ遅かった。この分解速度の違いは、化合物が代謝を受ける部位付近の立体的な環境の違いによると考えられ、現行 QSAR 予測式はかさ高い置換基による立体的な反応阻害効果をうまく考慮できていないことが示された。さらにこの *in vitro* 系での代謝分解が遅い化合物は、生物試験で求められた濃縮倍率も大きく、この試験を取り入れることで従来の予測が改善されると結論している。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

さまざまな機能をもった多数の合成化学品が多方面で利用されている今日、化合物の毒性を多角的に評価し、影響を最小限にする管理・規制が欠かせない。特に環境中に放出された化合物は多様な経路を通じて生物の体内に取り込まれ得る。取り込まれた化合物の中には長期にわたって生体内にとどまる生物濃縮性をもつものがあり、そのような化合物は食物連鎖を通じて捕食生物に蓄積し、最終的にはヒトに深刻な健康影響を引き起こす可能性がある。従って、新規な化合物の製造・販売にあたっては、影響を受ける生物に対する毒性試験に加えてその生物濃縮性を評価しておくことが法律で求められている。生物濃縮性は魚を用いて調べられるが、現行のプロトコルでは試験に時間を要し、また多くの実験動物を必要とする。本論文は、化合物の生物濃縮性評価の高能率化をめざし、使用する実験動物の数をできるだけ減らしながらも正確な評価を可能にする手法の開発を目指したものである。評価できる点は以下の3つにまとめられる。

- 1) 水中の分子を内包する球を仮定し、その直径を分子のかさ高さを示す指標として計算する科学的に妥当かつ汎用性に優れた方法を開発し、鰓経由の取り込みに由来する濃縮倍率が既知の1665化合物について、算出された直径と濃縮倍率との関係を解析した。その結果、一定の値より大きな直径をもつ化合物は低濃縮性であることが示され、その値を新規化合物の環境毒性評価において動物実験を省略できる新しい基準値として提案した。
- 2) 魚の腸管の化合物透過性を測定する *in vitro* 反転腸管法を確立し、分子量や分子サイズの異なる一連の化合物を評価した。その結果、経口摂取による濃縮性の有無も鰓経由の取り込みの場合と同様に化合物の分子サイズで判定できる可能性を示した。
- 3) 濃縮性に影響を与える化合物の魚体内での代謝分解性について、魚の肝S9画分を用いる *in vitro* 代謝試験が、現在用いられるQSAR予測法を補完する上で有用であり、両者を組み合わせることでより精緻な濃縮性予測が可能になることを示した。

以上のように本論文は、化合物の生物濃縮性予測における新しい基準および指標を提案しており、これらが今後規制に取り入れられることで新規物質のより効率的かつ正確な毒性評価とそれに要する動物実験の削減につながることを期待できる。この成果は生物有機化学、環境毒性学およびレギュラトリーサイエンスの発展に寄与するところが大きい。

よって本論文は博士（農学）の学位論文として価値があるものと認める。

なお、令和4年2月15日、論文並びにそれに関連した分野にわたり諮問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。