

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：57102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00589

研究課題名(和文) 魚類胚による発生影響評価エンドポイントの精査

研究課題名(英文) Scrutiny of developmental impact assessment endpoints with fish embryos

研究代表者

山口 明美 (yamaguchi, akemi)

有明工業高等専門学校・技術部・技術専門職員

研究者番号：90399262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：発生や成長途中の生物は成体よりも化学物質暴露の影響を受けやすいが、理由は明らかではない。ナノ秒という極短時間に数キロボルトの電圧を魚類受精卵にかけることで、胚に影響を与えることなく膜の透過性を高め外部から物質を容易に取り込ませることができる。この方法でビスフェノールA、ベンゾピレンまたはワファリンをメダカ受精卵に導入し調査した結果、それぞれの物質で発生異常の顕在化に関連するパスウェイがあることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学物質暴露による発生への影響が懸念されているが、調査するための簡易な方法がない。メダカは飼育や観察しやすい透明な受精卵が容易に採取できる。導入した物質により、心臓の形態異常や血管形成不十分になるなど、異なる影響がみられた。また、メダカ卵の発生影響が現われる際に発現変動する遺伝子のグループがあることが分かった。本研究で用いた独自の方法は化学物質の発生への影響を調査するために有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Developing and growing organisms are more susceptible to chemical exposure than adults, but the reason is unclear. By applying a voltage of several kilovolts to a fertilized fish egg in an extremely short time of nanosecond, the permeability of the membrane can be enhanced and substances can be easily taken up from the outside without affecting the embryo. As a result of introducing bisphenol A, benzopyrene, or warfarin into fertilized medaka eggs by this method, it was found that each substance has a pathway related to the manifestation of abnormal development.

研究分野：環境科学

キーワード：発生影響評価 パスウェイ解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学物質の急性・慢性毒性評価の多くは、成長し外部からの刺激に耐性を持つ成体が用いられるが、防御機構が未発達な発生初期や幼生などの幼若生物は外部からの影響に非常に弱く、発生時期の化学物質暴露の影響が成長後に顕在化することがあり、より慎重なリスク管理を行う必要がある。脊椎動物である小型魚類の受精卵は摂餌行動をせず動物とみなされないため、動物愛護上の問題もなく、維持管理が容易であり哺乳類を用いた発生影響評価試験の代替法として医薬品やパーソナルケア製品のスクリーニングにも不可欠であり、今後ますます重要性が増すと考えられる。我々は高電界パルスを用いたメダカ受精卵に印加することで物質を通しにくい卵膜の透過性を一時的に変化させ、外部から物質を容易に取り込ませることができる独自の技術を開発した。この技術を用いてビスフェノール A(BPA)、ビスフェノール S(BPS) をメダカ卵に導入し観察を行ったところ、BPA は BPS より低濃度暴露で血管形成が遅延するなど循環器系に異常を起し、急性毒性は低いが催奇形性が高いこと、BPS は胚毒性による致死が多いことを報告し、物質特異的な作用の違いを確認できた。

2. 研究の目的

OECD は増加し続ける化学物質に対して、化学物質の暴露をインプットとし、受容体結合等の分子レベルの反応から、細胞レベルの遺伝子発現変動、タンパク質発現の増加・減少、生体組織、個体、個体群の各レベルにおいて、段階的、継時的、連続的に各レベルのイベントがおきることでアウトプットの個体群の減少が起きるとする AOP(Adverse outcome pathway) という考えで、Adverse outcome を引き起こす pathway の key event で整理し分類していく評価方法を推進しようとしている。しかし、pathway の key event の詳細が明らかになった物質はほとんどなく、モデルとなる AOP 経路の提示が早急の課題となっている。我々がメダカ胚発生期から得ている知見は、AOP における明確な化学物質の入力に対する Adverse outcome を捉えた格好のモデル系になる可能性があると考えた。循環器系への影響は多くの化学物質暴露において共通性が高い Adverse outcome であり、骨形成異常は選択性があるものと考えられ、そこに至る pathway の key event の共通性、特異性を明らかにすることは、AOP のモデルとして非常に興味あるものとなると考えられる。

3. 研究の方法

高電界パルスを用いた暴露試験で特異的な影響が見られたワーファリン (WF)、BPA とベンゾピレン(BaP) をモデル物質とした。WF、BPA または BaP を DMSO に溶解してメダカ卵等張液で希釈し、暴露溶液を調製した。受精後 5 時間のメダカ卵を採取し、各種暴露溶液中でメダカ卵に高電界パルスを印加し、各物質を卵内に導入した。2 時間浸漬後洗浄し、等張液中で受精後 6 日目まで培養、観察を行った。また、試験物質導入後 2 日目および 6 日目のメダカ卵を採取し、遺伝子発現状況を次世代シーケンサーで網羅的に解析し、得られたデータについてネットワーク解析を行った。また、リアルタイム PCR で各種遺伝子発現の濃度依存性と経時変化を調査することで、再現性を確認した。同時に、CYP や HSP など外部刺激により変動する遺伝子についても調査した。WF 独自の Adverse outcome (骨形成異常) とともに、2 つのモデル物質 BPA、BaP と共通な Adverse outcome (循環器系異常) について、AOP pathway の key event の調節状況を調査することで注目すべき pathway を調査した。

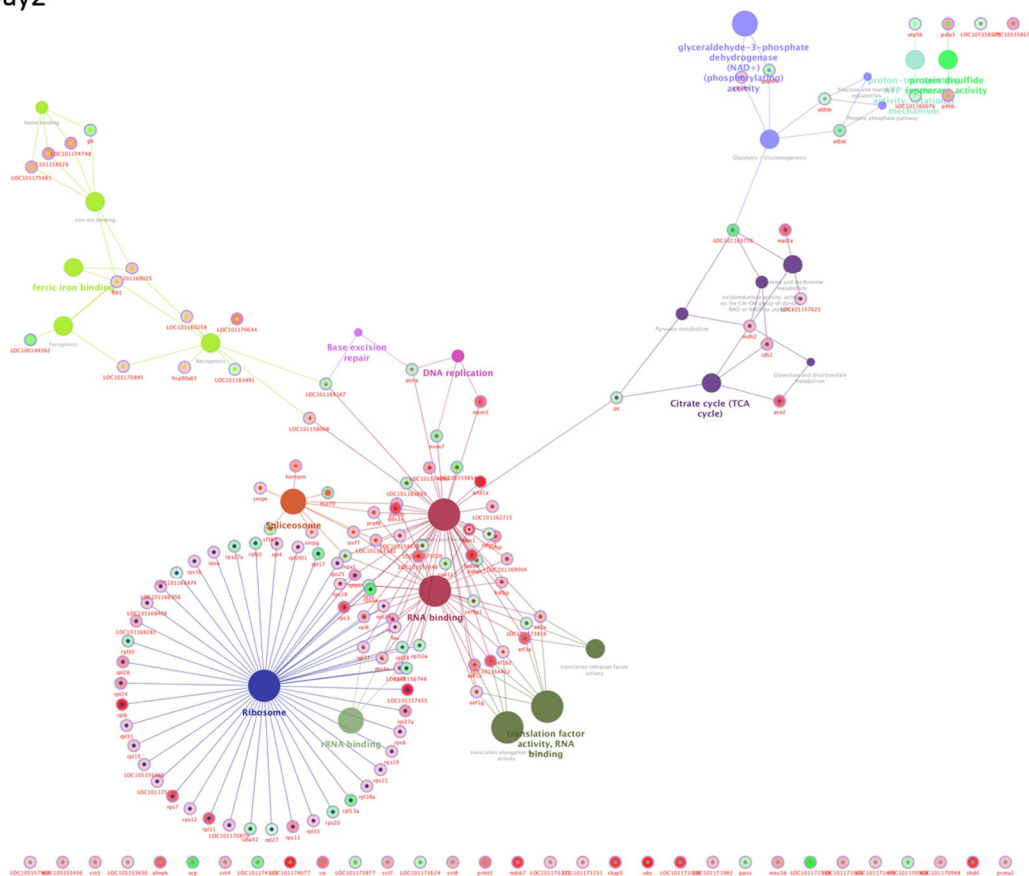
4. 研究成果

これまでは受精後 4 時間前後のメダカ卵でしか物質導入を行うことができなかったが、パルス印加条件を検討した結果、より発生が進み、心臓や血管などの各器官形成が行われる受精後 1 日、2 日目のメダカ卵にも物質導入を行うことができる条件を確立することができた。これにより、受精直後から受精後 2 日目までの発生初期の任意のごく狭い範囲で確実にメダカ胚に物質導入し、クリティカルウインドウ曝露を行うことができるようになり、化学物質影響を精査するための実験条件が整った。受精後 1 または 2 日目のメダカ受精卵に WF または BPA を導入し観察したところ、受精後 5 時間のメダカ胚にこれらの物質を導入した場合と比較して、より低濃度で血管形成異常が観察された。農薬のネオニコチノイドでも同様の暴露試験を行ったところ、BPA や WF と同様に受精後 1 から 2 日目の胚は受精直後より低濃度で形態異常の発生率が上昇した。また、心臓の形態異常発生率が上昇するなど、より重篤な影響が現われる傾向がみられた。このことから、器官形成が行われる受精後 1 から 2 日目の胚は受精直後の胚よりも外部からの物質暴露の影響を受けやすいと考えられる。化学物質暴露による形態異常発生の臨界期についてさらに詳細に調査する必要があると考えられる。

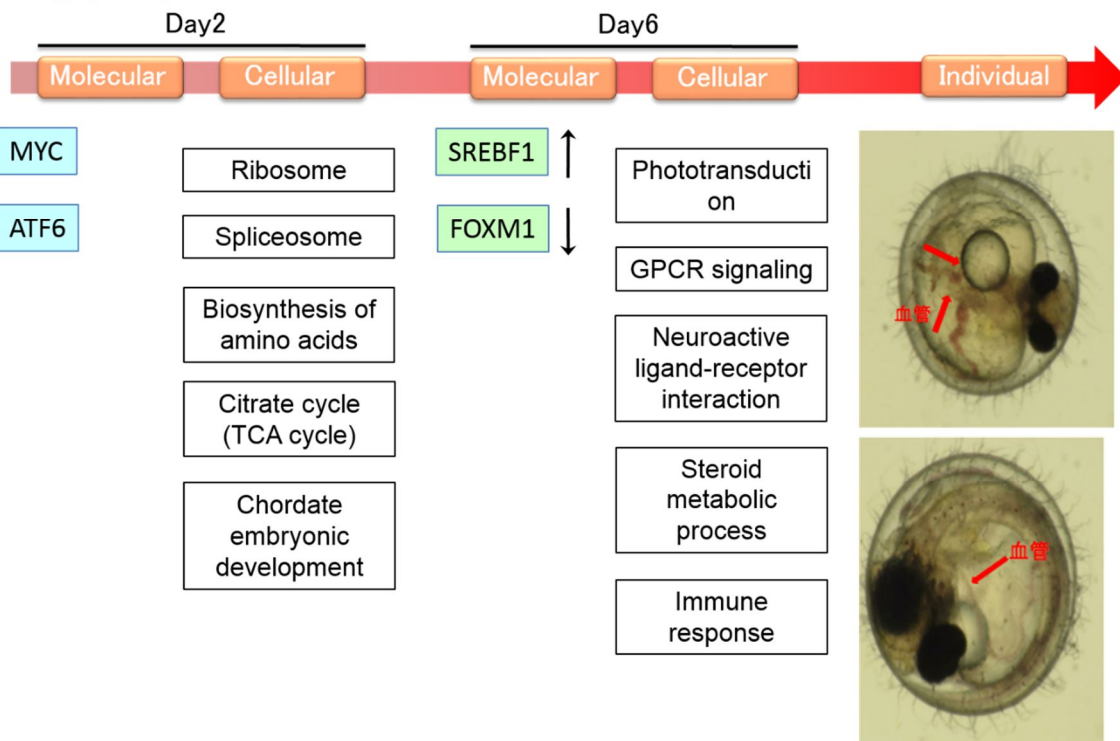
モデル物質として選定した WF、BPA および BaP について、従来よりも暴露濃度を幅広く設定して暴露することで、無影響濃度およびほぼすべての個体に異常が見られる濃度を特定し、確実に影響の見られる暴露濃度を設定した。未処理コントロール、パルス印加のみの群と、WF、BPA および BaP について、受精後 4 時間のメダカ受精卵に導入して発生状況を観察し、受精後 2 日目または 6 日目の時点でサンプリングした。これらのメダカ卵をサンプルとして次世代シーケンズ解析を行い、発現変動している遺伝子群のデータを得た。これらのデータを用いてネットワーク解析を行い、モデル物質それぞれに特異的な発生異常の顕在化に関連するパスウェイの検索を行った。

BPA を導入した受精後 2 日目のサンプルでは代謝関連のパスウェイへの影響がみられ、受精後 6 日目のサンプルでは、神経（発現増加）、光シグナル（発現抑制）、免疫系のパスウェイに対する影響の移行が考えられた。

BPA_Day2

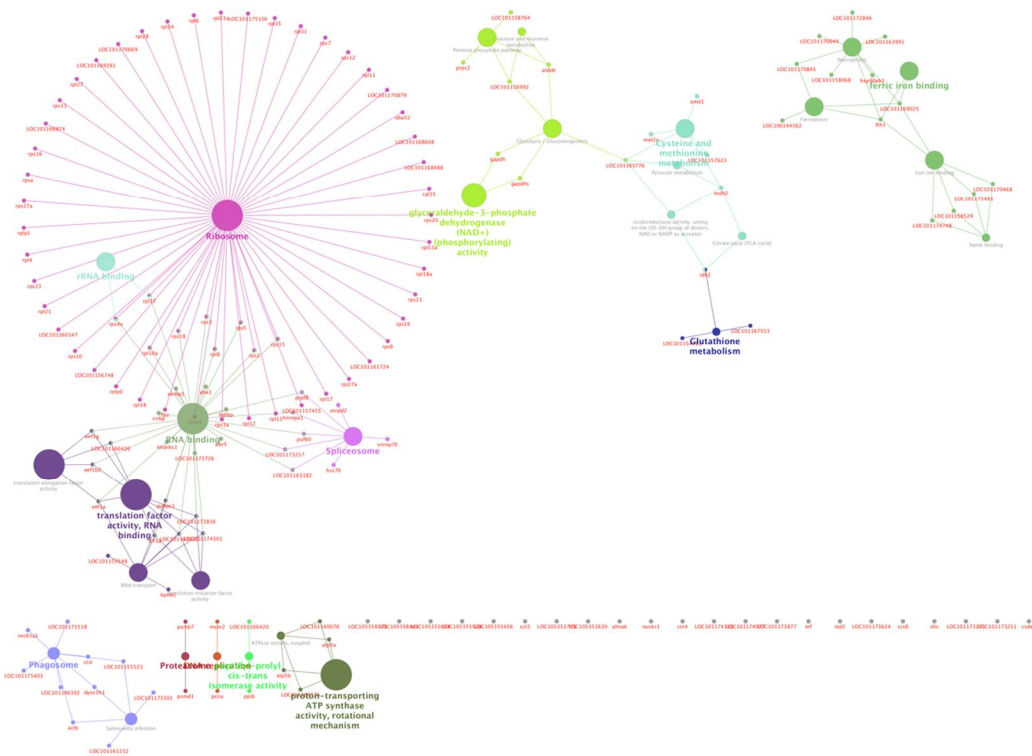


BPA_signaling

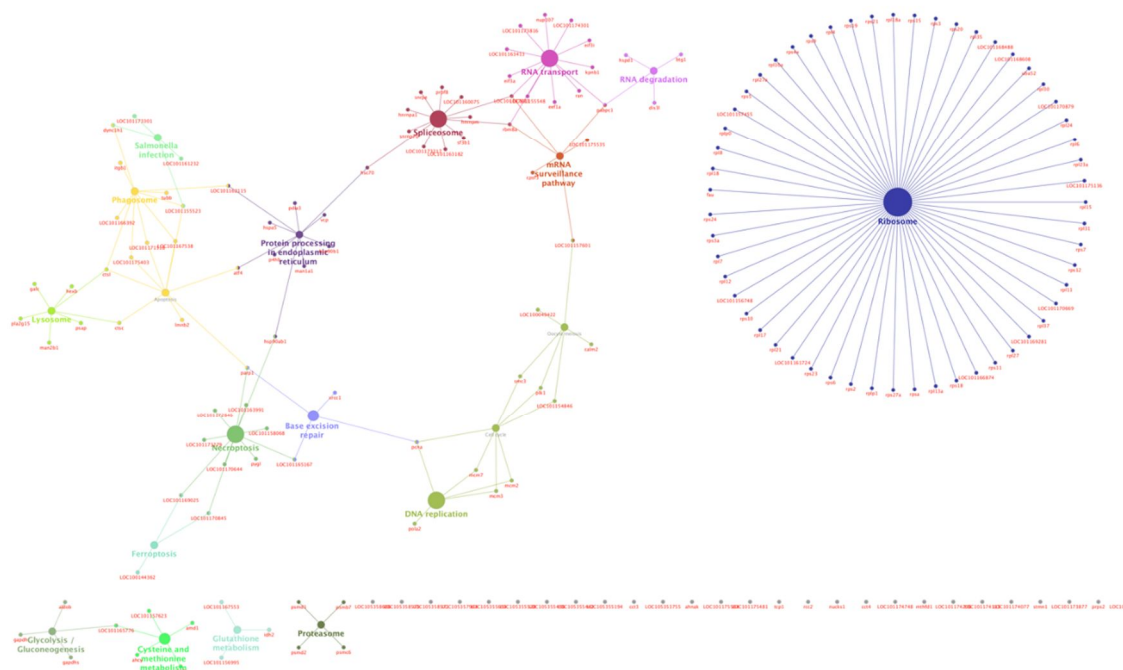


WF を導入したメダカ卵では、代謝系から高次機能への影響が経時的に現われることが観察された。

WF_Day2



BaP_Day2



いずれの化合物処理においても RNA 関連の遺伝子 (ribosomal protein, RNA-binding など) が多く、KEGG_pathway においても Ribosome, Spliceosome などが共通しており、化合物特徴的なものが少なく、BaP で誘導される CYP 関連も検出されなかった。代謝系の影響がどのように高次機能に繋がっていく経路は明らかではないが、発生初期に影響する代謝系の違いによって、発生後期の高次機能への影響が物質依存的に変わってくる可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaguchi A, Ishibashi H, Kono S, Iida M, Uchida M, Arizono K, Tominaga N	4. 巻 38(5)
2. 論文標題 Nanosecond pulsed electric field incorporation technique to predict molecular mechanisms of teratogenicity and developmental toxicity of estradiol 17 on medaka embryos	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Appl Toxicol.	6. 最初と最後の頁 714-723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jat.3579	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akemi Yamaguchi, Masaya Uchida, Hiroshi Ishibashi, Masashi Hirano, Nobuhiro Ichikawa, Koji Arizono, Jiro Koyama, Nobuaki Tominaga	4. 巻 242
2. 論文標題 Potential mechanisms underlying embryonic developmental toxicity caused by benzo[a]pyrene in Japanese medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 125243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永井匠, 池松裕人, 山口明美, 富永伸明, 河野晋
2. 発表標題 メダカ受精卵に対する組み合わせ矩形波電気パルスを用いた物質導入
3. 学会等名 平成31年電気学会全国大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池松裕人, 永井匠, 富永伸明, 山口明美, 河野晋
2. 発表標題 単発矩形波電気パルスを用いたメダカ受精卵に対する物質導入
3. 学会等名 平成30年度(第9回)電気学会九州支部高専研究講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田 雅也、山口 明美、平野 将司、河野 晋、石橋 弘志、有蘭 幸司、富永 伸明
2. 発表標題 ネオニコチノイド系農薬によるメダカ胚トランスクリプトームへの影響
3. 学会等名 環境ホルモン学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山口明美, 平野将司, 河野晋, 石橋弘志, 高橋圭介, 加藤恵介, 内田雅也, 有蘭幸司, 富永伸明
2. 発表標題 メダカ初期胚を用いたネオニコチノイドと代謝物の発生影響評価
3. 学会等名 環境ホルモン学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	平野 将司 (hirano masashi) (20554471)	熊本高等専門学校・拠点化プロジェクト系先端研究コアグループ・准教授 (57403)	