

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：57102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710072

研究課題名(和文) 内分泌攪乱物質のクリティカルウインドウ曝露による発生影響の精査

研究課題名(英文) Investigation of endocrine-disrupting chemical effect for developmental process of organism using novel critical-window exposure method.

研究代表者

山口 明美 (yamaguchi, akemi)

有明工業高等専門学校・その他部局等・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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究者らは、ナノ秒、数キロボルトの高電界パルスをもダカ卵に印加することでメダカ卵膜の物質透過性を一時的に高め、容易に物質を導入する新技術を開発した。女性ホルモンであるエストロゲン(E2)、E2様作用が疑われるビスフェノールA(BPA)およびビスフェノールS(BPS)等を導入し発生を観察したところ、濃度依存的に胚体、心臓、血球や血管の形成異常、孵化後の遊泳異常や骨格の奇形が見られた。また、DNAマイクロアレイにより各物質を導入したメダカ卵の遺伝子発現解析を行ったところ、各物質特異的に発現変動しており、特異的な形態異常や発生毒性に関連していると考えられる遺伝子群が検出できた。

研究成果の概要(英文)：We developed novel material incorporation technic into medaka fertilized eggs using high voltage pulse systems. We assessed the effects of estradiol-17 (E2), bisphenol A (BPA) or BPA relative compounds such as bisphenol S (BPS) for medaka eggs by the incorporation technic and observed by microscope. It was observed that embryonic malformation and abnormal formation of bone, hart, blood vessel and hemocyte chemicals dose-dependently. In addition, we carried out DNA microarray analysis of medaka eggs treated with E2, BPA, BPA relative compounds, and detected variation of each chemicals specific genes expressions. It is suggested that these genes relation to morphological abnormality induced by each chemicals treatment.

研究分野：環境科学

キーワード：生物・生体工学 電力工学 発生・分化 マイクロアレイ

### 1. 研究開始当初の背景

生物の初期発生期は免疫や代謝など外部刺激に対する防御機構が未発達であることから、成体よりも化学物質の暴露などの影響を受けやすい。さらに様々な器官が短時間のうちに形成される最も大きな変化をする時期であることから、この時期に発生のバランスが変化することで器官の形成異常などの不可逆的な影響や、成長後に異常が顕在化するなど、成体とは異なる影響を受けることが懸念される。これらのことから、化学物質の生体影響を調査するためには成体を用いた試験法のほかに幼若生物を用いて成体とは違う指標で詳細な調査を行う必要がある。生体影響評価のモデルとしては哺乳類のマウス等が用いられているが、高コストであることや、動物愛護の観点から多数の動物を用いて実験を行うことが難しいという問題がある。そのため、できるだけ簡易な調査法が必要であり、脊椎動物である魚類を用いることが提案されている。魚類のなかでもメダカは飼育が容易で哺乳類のマウス等と比較してライフサイクルが短く、全ゲノム解読済みで、様々な化学物質の生体評価を行うためのモデル生物として非常に有望である。さらに、メダカは卵性生物であり、卵膜が透明であることから母体外で発生進行が詳細に観察でき、母体経由暴露の場合のような試験物質の代謝という問題もない。卵内への評価対象物質の導入にはマイクロインジェクション法が多く用いられる。しかし、メダカ受精卵の卵膜は構造が堅牢で、マイクロインジェクション法により外部からの物質導入を行うには高い技術が必要である。研究者はナノ秒というごく短時間に数千ボルトという高電圧をメダカ受精卵に印加することでメダカ卵膜の物質透過性を一時的に変化させることで外部から容易に物質をメダカ受精卵に導入することができる技術を開発した。本技術は操作が簡便でメダカ卵 1 個を 10 秒程度で処理することが可能で、簡易な操作で初期発生期の化学物質の生物影響を詳細に調査することができると考えられた。

### 2. 研究の目的

研究者は、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析によって、新手法によるメダカ卵へのパルス印加はメダカの発生に対して何ら悪影響を及ぼさない一方、作用点の異なるタンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドとアクチノマイシン D を導入したメダカ卵でそれぞれ特徴的な形態異常が起こること、各タンパク合成阻害剤に特異的な遺伝子発現パターンが得られることを確認し、新手法の有効性を確認している。また、研究者は遺伝子発現変動を指標とした化学物質のホルモン様作用について研究を行うなかで、エストラジオール  $17\beta$  (E2) や E2 様作用を示すとされるビスフェノール A (BPA) のような様々なエストロゲン様作用物

質に暴露された成体のメダカのエストロゲン応答遺伝子の発現変動に物質特異性があることを明らかにしてきた。そこで、新規物質導入法により E2, BPA, BPA の類縁化合物ビスフェノール S (BPS)、近年水環境汚染で問題となっているベンゾピレン (BaP) をメダカ受精卵に導入し、形態観察および遺伝子発現変動を調査することで、初期発生期の生物に対する影響を詳細に調査することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ジメチルスルホキシドに溶解した E2, BPA, BPS または BaP ストック溶液を、メダカ卵と等張の塩類溶液を用いて希釈し種々濃度の溶液を調製する。メダカ卵はメスマダカの腹部から産卵、受精したものを採取して用いる。メダカ卵等張液を入れた 96 穴プレートにメダカ卵 1 個ずつ移す。パルス印加用セルにメダカ卵と種々濃度の試験物質溶液を入れ、パルス印加により各物質を卵内に導入する。パルス印加後、試験物質溶液を入れた 96 穴プレート上へ移し、2 時間静置後メダカ卵等張液で洗浄する。試験物質を導入したメダカ卵は、孵化するまで顕微鏡観察を行い、初期発生期への影響を調査する。また、異常の見られなかったものについては、孵化後も一定期間飼育し、孵化後に行動異常や形態異常が現れるかを観察する。これらの形態異常などを指標とする試験と合わせて、各種物質を導入したメダカ卵の遺伝子発現解析を行う。受精後 6 日間以上培養したメダカ卵は、6 個というわずかな数で DNA マイクロアレイ解析を行うことができる。そこで、パルス印加により各種物質を導入したメダカ卵の DNA マイクロアレイ解析を行い、各種遺伝子発現変動を調査することで、初期発生期の生物に及ぼす影響をフェノームからトランスクリプトームレベルで評価する。

### 4. 研究成果

#### E2 暴露

E2 に浸漬しただけのメダカ卵、パルス印加しただけの群は、すべて生存していた。一方、種々濃度 (0.01, 0.1, 1, 10  $\mu\text{M}$ ) の E2 溶液を用いてパルス印加により E2 を卵内に導入した群のパルス印加後 1 日目の死亡率は E2 濃度依存的にわずかに上昇する傾向が見られた (図 1)。E2 導入したメダカ受精卵の顕微鏡観察を行ったところ、心臓が肥大したものの、血管の形成が不十分なものが現われた。また、体が正常に形成されず、顕著な発生異常が見られるものも見られた (図 2)。このような形態異常の個体はパルス印加群にも現われたが、E2 の暴露濃度に依存して上昇する傾向が見られ、異常が発生した個体は 10  $\mu\text{M}$  E2 暴露群で生存個体の 24% に達した (図 1)。また、DNA マイクロアレイ解析の結果、E2 により発現量が変動することが知られている指標遺伝子の発現が変動していたほか、免疫、代謝、

シグナル伝達系に関わる遺伝子の発現が変動しており、これらの遺伝子が形態観察で見られた心臓や血管の形成異常や発生異常と関連していると考えられることから、今後E2暴露メダカ卵でのこれらの遺伝子発現について詳細に調査する予定である。

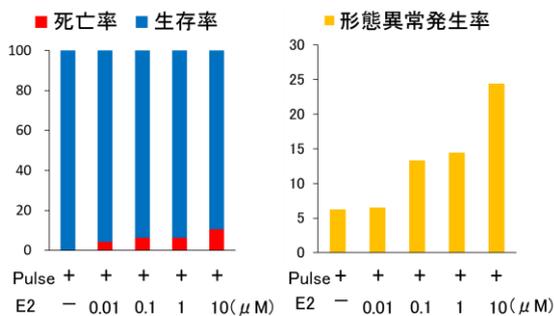


図1 パルス印加およびE2導入群の死亡率・生存率と形態異常発生率

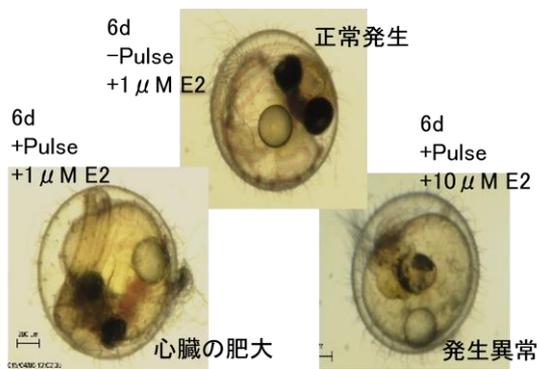


図2 E2浸漬またはE2導入したメダカ卵の生育状況

#### BPA, BPS 暴露

BPA または BPS に浸漬しただけの群は未処理コントロール群と同様に成長し、BPA または BPS につけただけではメダカ卵の成長に影響を与えなかった。50 μM BPA 溶液中でパルス印加し、メダカ卵内に導入された BPA 濃度を GC-MS により測定したところ、2 回の測定結果は 87.7, 90.8 μM であり、パルス印加することで非常に効率的にメダカ卵内に BPA が取り込まれたと考えられる。パルス印加により BPA (5, 50 nM), BPS (50, 500 μM) を導入した群は、心臓はできて、血球と血管がほとんどできないものが現われた(図 3, 4)。BPA 暴露群の生存率はそれぞれ 91.7, 90%であったが、21.8, 31.5%にこのような形態異常がみられ、暴露濃度依存的に形態異常発生率が上昇する傾向が見られた(図 5)。BPA はメダカ初期胚に毒性をほとんど示さない濃度で形態異常を発生させたことから、BPA の初期発生期の生物に対する影響を詳細に調査する必要があることが示唆された。BPS 暴露群は低濃度側では影響が見られなかったため、

BPA より高い濃度で暴露を行った。BPS 暴露群の生存率は 84.4, 80.2%で、形態異常発生率は 13.6, 16.9%であった(図 5)。BPS はメダカ初期胚に形態異常を引き起こすが、細胞毒性をより強く示し、BPA と BPS のメダカ初期胚に対する毒性の表れ方の傾向が異なることを観察できた。BPA または BPS を導入したメダカ卵の DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、それぞれ E2 と共通して発現変動している遺伝子群が検出でき、これらは BPA と BPS の E2 様作用に関連していると考えられる。

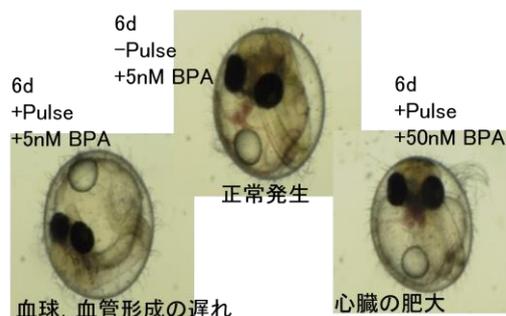


図3 BPA浸漬またはBPA導入したメダカ卵の生育状況

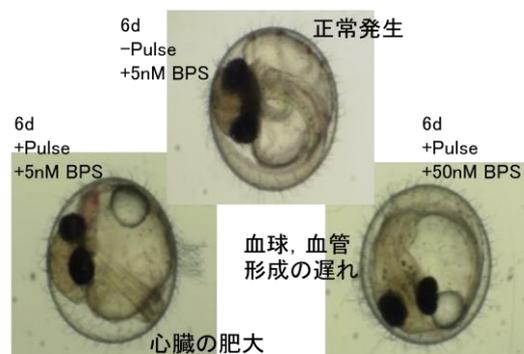


図4 BPS浸漬またはBPS導入したメダカ卵の生育状況

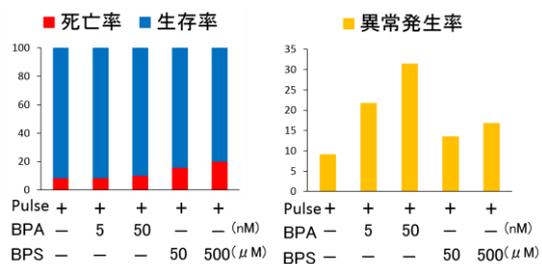


図5 パルス印加, BPAまたはBPS導入群の生存率・死亡率と形態異常発生率

一方 BPA, BPS 特異的に発現変動しているものも検出できた。これらは BPA, BPS のメダカ初期胚に対する形態異常の誘導や細胞毒性等の作用と関連する可能性が考えられる。

#### BaP 暴露

4, 40 nM BaP を導入したメダカ卵中の BaP 濃度を GC-MS により測定したところ、それぞれ平均値は 3.6 nM, 44.5 nM であり、暴露した外液の濃度とほぼ等しく、パルス印加により効率よくメダカ卵内に BaP が導入された。パルス印加群の死亡率は 6.3 %, パルス印加により 0.04, 0.4, 4 nM BaP を導入した群の死亡率は 6.3 から 7.3 % であり、この濃度の BaP はメダカ胚に致死的な影響を与えなかった。40 nM BaP 導入群の死亡率は約 19 % で、高濃度の BaP はメダカ初期胚に対して細胞毒性を示した (図 6)。パルス印加から 6 日目まで顕微鏡観察を行った結果、BaP 導入群は血管形成の遅れ、心臓肥大、卵黄表面での血球の凝集などの形態異常が見られた。さらに、目、骨格や心臓などの器官が正常に形成されず、胚胎としての形を成さない発生異常個体もあらわれた (図 7)。また、孵化した仔魚に背骨が大きく湾曲または波型に変形しているものや、体長が短くなり、腹部が正常に形成されていないなどの形態異常個体が現われた (図 8)。心臓肥大等の形態異常は BaP 濃度依存的に発生率が上昇する傾向が見られたが、最も高濃度の 40 nM BaP 導入群では形態異常発生率は減少した。一方で、40 nM BaP 導入群では形態異常の個体も現われたが、正常な胚胎が形成されない発生異常個体が生存個体中の 22 % に見られた (図 6)。このことから、BaP はメダカ卵内への導入量が比較的少ない場合には血管形成の遅れなど特定の形態異常を誘導するが、導入量が多くなると細胞毒性とともに発生毒性を示すことが分かった。

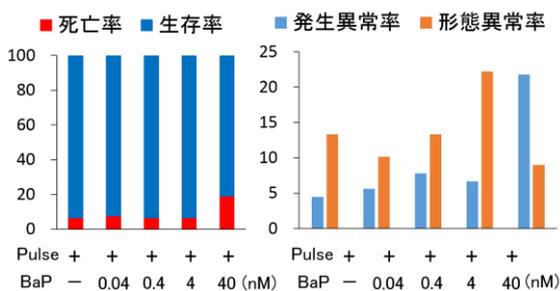


図6. BaP浸漬およびBaP導入群の死亡・生存率と発生・形態異常発生率

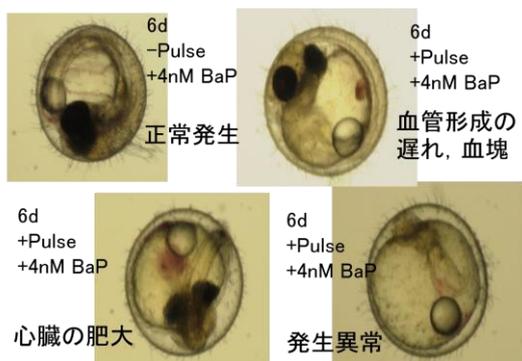


図7 BaPに浸漬またはBaP導入したメダカ卵の生育状況



図8 BaP導入したメダカ卵の生育状況と孵化後の形態異常

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Akemi Yamaguchi, Keisuke Kato, koji Arizono, Nobuaki Tominaga

Induction of the estrogen responsive genes encoding choriogenin H and L in the liver of male medaka (*Oryzias latipes*) upon exposure to estrogen receptor subtype selective ligands.

Journal of Applied Toxicology, 査読有, in press.

Akemi Yamaguchi, Koji Arizono, Nobuaki Tominaga

In vivo and in silico analyses of estrogenic potential of bisphenol analogs in medaka (*Oryzias latipes*) and common carp (*Cyprinus carpio*)

Ecotoxicology and Environmental Safety, 査読有, 120(2015) 198-205.

[学会発表] (計 7 件)

Yoshitake Fukuhara, Munetsugu Yoneda, Akemi Yamaguchi, Nobuaki Tominaga, Susumu Kono

Effects of pulsed power parameters on arterial incorporation technique into medaka (*Oryzias latipes*) eggs

5<sup>th</sup> Euro-Asian Pulsed Power Conference, EAPPC-2014

Sep 8-12, 2014

Kumamoto, Japan

石橋拓也, 福原義剛, 山口明美, 河野晋, 富永伸明

初期発生メダカ卵への電気パルス印加による物質導入及びその発生影響

第 51 回化学関連支部合同研究会

2014 年 6 月 28 日

北九州国際会議場 (福岡県北九州市)

山口明美, 福原義剛, 河野晋, 渡辺咲子, 中田晴彦, 有菌幸司, 富永伸明

新規物質導入法を用いたビスフェノール類

の発生影響評価  
環境ホルモン学会第 16 回研究発表会  
2013 年 12 月 12 日～12 月 13 日  
東京大学山上会館（東京都文京区本郷）

山口明美, 福原義剛, 河野晋, 渡辺咲子, 中田晴彦, 有菌幸司, 富永伸明  
ビスフェノール A の新規物質導入法による発生影響評価  
フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー  
2013 年 9 月 13 日～9 月 14 日  
九州大学医学部百年講堂（福岡県福岡市）

山口明美, 福原義剛, 河野晋, 富永伸明  
高電界パルスによるメダカ (*Oryzias latipes*) 卵への物質導入-物質導入量の増加を目的とした電圧パルスの連続印加および分子量と導入効率についての検討-  
第 19 回日本環境毒性学会研究発表会  
2013 年 9 月 7 日～9 月 8 日  
東洋大学（東京都文京区白山）

Susumu Kono, Akemi Yamaguchi, Takahiro Kubo, Yasutaka Imamura, Nobuaki Tominaga  
Improvement of Pulsed Power System for Incorporating Materials into Medaka (*Oryzias latipes*) Eggs  
9th International Bioelectrics Symposium (BIOELECTRICS2012)  
Sep 5, 2012  
Kumamoto, Japan

Takahiro Kubo, Akemi Yamaguchi, Nobuaki Tominaga, Susumu Kono  
Development of Pulsed Power Supply for Material Incorporation into Medaka (*Oryzias latipes*) Eggs  
2012 International Symposium on Technology for Sustainability (ISTS2012)  
Jul 31, 2012  
Bangkok, Thailand

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）  
名称：物質導入法及びその装置  
発明者：河野晋, 山口明美, 富永伸明  
権利者：独立行政法人高等専門学校機構  
種類：特願  
番号：2013-120148  
出願年月日：2014 年 8 月 29 日  
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 明美 (Yamauchi Akemi)  
有明工業高等専門学校教育研究技術支援センター・技術専門職員  
研究者番号：90399262