

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09713

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュによる薬物の発生毒性評価 ～マウス・ラットとの比較～

研究課題名(英文)Assessment of toxicity for chemicals using zebrafish

研究代表者

坂田 ひろみ (SAKATA-HAGA, Hiromi)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50294666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：発生毒性の評価にゼブラフィッシュ(ZF)を用いる利点と問題点を明らかにし、薬物の発達毒性評価における適切なZFの利用法について考察することを、また、ZFの発生毒性評価への有用性を高めるため、新しい骨染色法の開発を目的に本研究を行った。ZF受精卵を2%EtOHに曝露すると死滅卵が多く、得られた稚魚に単眼等の外表奇形を認めしたが、1%EtOH群には目立った外表奇形がなく、アポトーシスや5HT関連遺伝子の発現と局在も対照群と同様であった。また、本研究で開発した透明化固定液を用いた骨染色法により、従来法より短時間でZFの骨染色を行うことが可能となり、発生毒性試験におけるZFの利便性が向上した。

研究成果の概要(英文)：To examine developmental toxicity of EtOH in zebrafish, fertilized eggs of zebrafish were exposed to 1, 2, or 3% (v/v) ethanol during 5-60 hours post fertilization. The medium contained 3% ethanol killed most of the eggs. Some larvae exposed to 2% ethanol showed cyclopia. There were no significant differences of expression of genes relating apoptosis and 5-HTergic system between the 1% ethanol-exposed larvae group and its control. We also examine a new protocol requiring no skinning and evisceration for whole-mount bone staining of zebrafish. The anesthetized zebrafish was immersed in a newly developed fixative containing formalin, Triton X-100, and KOH, then stained with a solution containing alizarin red S. Our new procedure for whole-mount bone staining could be a powerful tool for testing the developmental toxicity of chemicals and for screening for knockout or mutant animals.

研究分野：先天異常学

キーワード：ゼブラフィッシュ 発生毒性 エタノール 骨染色

## 1. 研究開始当初の背景

近年、飼育コストが安価で、ヒトとの相同性も比較的高く、発生過程が受精直後から観察可能なゼブラフィッシュが実験動物として注目されており、化学物質や薬物の発生毒性評価においても利用が進められている。しかし、発生毒性評価にゼブラフィッシュを用いることの利点は盛んに強調させている一方で、ゼブラフィッシュでは解析が困難である点についてはあまり触れられていない。そこで我々は、薬物の発達毒性評価におけるゼブラフィッシュの有用性と問題点を、従来から用いられてきたマウスやラットの知見と比較することで明らかにしたいと考え、本研究を計画した。また、実験動物を用いた変異体スクリーニング試験や毒性試験の際には骨染色標本の観察が行われるが、従来の骨染色法では組織の透明化に時間と手間がかかることや、皮膚、内臓等の除去作業によるアーティファクトが問題となる。ゼブラフィッシュ等の小型魚類のモデル動物としての利点は、短時間で簡便に多くの個体を観察できることであり、小型魚類において、骨格の原位置を保ちつつ、迅速に骨染色標本の作製ができる手法が考案されれば、ゼブラフィッシュの発生毒性評価モデルとしての有用性がさらに高まるものと推察される。従来の骨染色標本作製においては、まず標本を固定し、アリザリンレッドSを含む骨染色液に標本を浸漬する。その後、過剰に染色された部分から色素を除去する際に、KOH等で軟部組織の透明化を行っていた。この場合、反応時間を長くしたり、反応温度を上げたりすることでより透明な標本を得ることができるが、反応が進みすぎると軟部組織が溶解し、骨格がバラバラになってしまう。即ち、骨格の原位置を維持しつつ、より透明度の高い標本作製するには、透明化の温度と時間を調整しなければならない。今回我々は、骨格染色用の固定液にKOHを加えることで、標本の固定と透明化を同時に行う方法を考案した。さらに十分に透明化されたゼブラフィッシュ骨格標本を、蛍光ズーム顕微鏡で撮影し、本法で作製された骨格標本の有用性を検討した。

## 2. 研究の目的

本研究は、従来のげっ歯類を用いた発生毒性評価で得られた知見を、ゼブラフィッシュを用いて再評価することで、発生毒性の評価にゼブラフィッシュを用いることの利点と問題点を明らかにし、薬物の発達毒性評価における適切なゼブラフィッシュの利用法について考察することを目的とした。また、ゼブラフィッシュの発生毒性評価への有用性を高めるため、新しい骨染色法の開発に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュ成魚(名東水園)は $28 \pm 1$  に水温調節した飼育システム内で

飼育した。これらのゼブラフィッシュより受精卵を得て、種々の濃度のエタノールに曝露した後、孵化後の稚魚の外表形態の観察、ホールマウント免疫染色、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション、および定量的RT-PCRを行い、エタノールがゼブラフィッシュの発達に及ぼす影響について検証した。

(2) ICRマウス(日本SLC)の妊娠6、7、8、又は9日にバルプロ酸(VPA)400 mg/kgを皮下投与した。妊娠10日に母獣を深麻酔して胚を採取した。胚を4%PFAで浸漬固定した後、抗ニューロフィラメント抗体を用いたホールマウント免疫染色を行って脊髄神経の走行を観察した。次に、脊髄神経形成異常(SNDs)および神経管閉鎖不全(NTDs)の有病率と投与量の相関性を明らかにするため、妊娠8日に100、200、400、又は600 mg/kgのVPAを投与し、同様の観察を行った。さらにSNDsおよびNTDs発症に対する葉酸の効果を検討するため、妊娠6-10日に3 mg/kg/dayの葉酸投与を受けたマウスに対し、妊娠8日にVPA400 mg/kgを投与し、SNDsとNTDsの有病率を解析した。

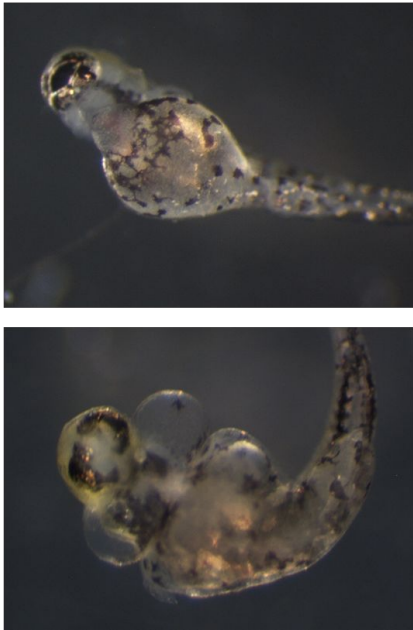
(3) ゼブラフィッシュ成魚を低温麻酔した後、界面活性剤とKOHを含む透明化固定液(Table 1)に約16~72時間浸漬した。次にAlizarin red Sを含む染色液に15-60分浸漬した後、界面活性剤を含む洗浄液で余剰な染色を除去した。骨染色標本はグリセロールに浸漬し、実体顕微鏡で観察・画像取得を行った。また、Alizarin red Sの蛍光を発する性質を利用して、蛍光ズーム顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡によるZ-stack撮像を行い、取得画像を統合し骨の三次元像描出を試みた。さらに骨染色標本でHoechstによる蛍光核染色を行い、Alizarin red Sの蛍光との多重観察を行った。

## 4. 研究成果

(1) 2%エタノール曝露群では、飼育過程で死滅する受精卵の割合が多く、わずかに得られた稚魚には単眼などの重篤な外表奇形を有する個体が含まれていた(Fig. 1)。一方、1%エタノール曝露群では、受精卵の多くが自力で孵化し、稚魚に目立った外表奇形は認められなかった。この外表奇形が認められない曝露量である1%エタノールに曝露した稚魚を用いた解析では、アポトーシス関連遺伝子である casp3とp53は対照群に比べて発現量が多い傾向にあったが、有意な差は見られなかった。セロトニン(5-HT)関連遺伝子であるFEVとTPHRの発現量については、対照群との間に大きな差は認められなかった。さらにホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法により5-HT合成酵素遺伝子(TPH; 5-HT細胞のマーカー)の局在、及び抗5-HT抗体を用いたホールマウント免疫染色により5-HT神経細胞の局在を観察したと

ころ、対照群、1%エタノール群ともに中脳縫線核でTPHの発現がおよび5-HT免疫陽性反応が認められたが、その局在や発現量については群間で大きな差がなかった。

Fig. 1. 2% EtOHに曝露したゼブラフィッシュ稚魚  
\*受精後約5時間から2%(v/v)EtOH中で飼育



(2) VPA曝露マウス胚では、主に胸神経と腰神経において神経束の欠損や隣接する神経束との吻合、および後根神経節の分節化の異常などのSNDsが認められた。SNDs有病率は、妊娠8日での投与のみで有意に増加したが(60.0%)、NTDsの有病率は妊娠7日(26.4%)または8日(27.7%)の投与で有意に増加した。また、VPA曝露胚におけるSNDsとNTDsの有病率には有意な用量相関性が認められた。さらに、葉酸投与はVPAにより誘発されるNTDsの発症を有意に抑制したが、SNDsに対しては効果を示さなかった。以上より、胎生期VPA曝露によるSNDsの感受期は妊娠8日であること、およびSNDsの発症頻度はVPA投与量と用量相関性があることが明らかになった(発表論文参照)。また、胎生期VPA曝露によるSNDsとNTDsは、臨界期は類似するものの、葉酸による抑制効果の違いから、異なるメカニズムにより誘発される可能性が示唆された。

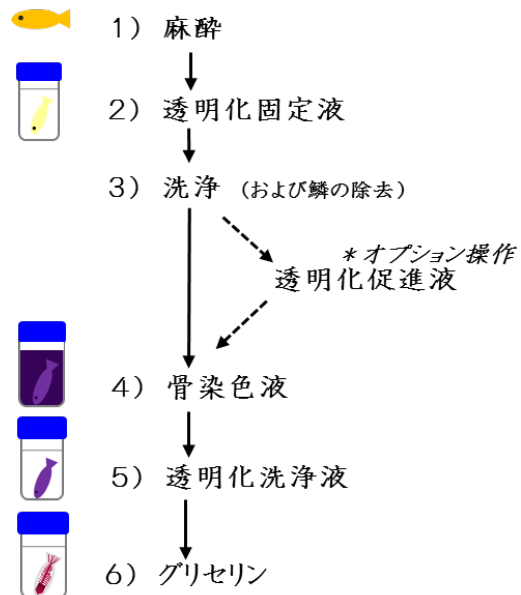
(3) 我々が開発した、中性ホルマリン、界面活性剤、およびKOHを含む透明化固定液を用いることにより、これまでよりも短時間で、透明度が高く、損傷がほとんどないゼブラフィッシュの全身骨格標本を作成することができた(Fig.2、および発表論文参照)。また、エチレングリコール、界面活性剤、およびKOHを含む透明化促進液の使用により、透明化の迅速性が高まった。

本法で作製した標本は軟部組織がほぼ完全に透明化していることから、厚い軟部組織に覆われた骨(椎骨など)であっても高倍像を明瞭に描出することが可能であった。また、

共焦点レーザー顕微鏡での観察も可能であり、Z-stack撮影した画像を最大値投影(MIP)処理して立体的な画像を取得することも可能であった。さらに本骨染色法では、透明化処理後も組織構築は保たれており、核との二重染色や組織学的解析への利用も可能であった。

本法は、鱗の除去以外は溶液の交換と温度管理のみの作業で行うことができるため、従来法より短時間でゼブラフィッシュ成魚の全身骨格標本を作製することが可能になり、化学物質の発生毒性試験におけるゼブラフィッシュの利便性を向上されることに貢献した。また、本法は毒性試験等でスクリーニングとして多個体を解析する際に有用な骨染色の自動化の開発につながることを期待される。ゼブラフィッシュ骨染色の自動化が実現すればさらに化学物質の発生毒性試験におけるゼブラフィッシュの有用性はさらに高まると推察される。

Fig. 2. 骨染色の手順



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Bold J, Sakata-Haga H, Fukui Y. Spinal nerve defects in mouse embryos prenatally exposed to valproic acid. *Anat Sci Int*, 93; 35-41 (2018)  
DOI: 10.1007/s12565-016-0363-9, 査読有

Sakata-Haga H, Uchishiba M, Shimada H, Tsukada T, Mitani M, Arikawa T, Shoji H, Hatta T. A rapid and nondestructive protocol for whole-mount bone staining of small fish and *Xenopus*. *Sci Rep*, 8: 7453 (2018)  
DOI: 10.1038/s41598-018-25836-4, 査読有

〔学会発表〕(計3件)

坂田ひろみ、島田ひろき、塚田剛史、狩山信生、有川智博、東海林博樹、八田稔久。小型実験動物のための迅速骨染色法の開発。第57回日本先天異常学会学術集会 (2017)

坂田ひろみ、Bold Jurant、福井義浩、島田ひろき、八田稔久。バルプロ酸が脊髄神経の形成に及ぼす影響。第76回日本解剖学会中部支部学術集会 (2016)

坂田ひろみ、島田ひろき、狩山信生、有川智博、東海林博樹、八田稔久ゼブラフィッシュ骨格観察のための簡易透明化法の開発と解析法の検討第122回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2016)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

坂田 ひろみ (SAKATA-HAGA, Hiromi)  
金沢医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：50294666

### (2)研究分担者

福井 義浩 (FUKUI, Yoshihiro)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号：50144168

澤田 和彦 (SAWADA, Kazuhiko)  
つくば国際大学・医療保健学部・教授  
研究者番号：10284324