

令和元年6月20日現在

機関番号：57102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02990

研究課題名(和文) 新規高電界パルス物質導入法によるメダカ胚期生態毒性試験の高感度化

研究課題名(英文) Improvement of medaka embryo toxicity assay by a novel pulsed power electroporation system

研究代表者

富永 伸明 (TOMINAGA, Nobuaki)

有明工業高等専門学校・創造工学科・教授

研究者番号：30227631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、メダカ受精卵を用いた高感度な化学物質の生物影響評価法の開発を行った。高電界パルスを用いた化学物質導入法を用いることで、メダカ受精卵に高効率かつ安定的に取り込ませることができた。また、ネオニコチノイド系農薬をモデル化合物として評価したところ、急性毒性は低いものの発生異常が生じることが分かった。また、その影響は代謝物においても同様に引き起こされた。また、顕著な形態的な影響が現れていない時期においても遺伝子発現が変化していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の動物実験は、多くの制限があり、代替法の開発が期待されている。本研究の成果から、メダカ受精卵に効率よく化学物質を導入し、高感度に影響評価をできたことは、新たな動物代替法の可能性を示せた。代替動物実験で多くの化学物質の評価が行えるようになることは社会的意義がある。また、環境中に存在する化学物質にとどまらず、医薬品の開発等にも応用が期待される。メダカは脊椎動物であり、ヒトや他の生物との相同性も高いことから、作用機序のメカニズムが分子レベルで明らかにでき、学術的にも意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we improved the fish embryo toxicity assay using the nano-second pulsed electric field and medaka embryo. We achieved successfully efficient chemical incorporation to medaka egg by our original developed nano-second pulsed electroporation system without any adverse effects. Then we evaluated neonicotinoid chemicals and its metabolites. According to the results, neonicotinoids, were not only parent compounds but also metabolites, showed some developmental toxicity against medaka embryo. Moreover, various genes were affected gene expression even at lower concentration, which were not shown any phenotypic alteration.

研究分野：環境生物学

キーワード：胚毒性試験 メダカ 高電界ナノパルス ネオニコチノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2013年に魚類を用いた生態毒性試験として、魚類胚期急性毒性試験が OECD のテストガイドライン No.236(TG236)が採択された。Lammer らは、ゼブラフィッシュにおいて TG236 は TG203 と強い相関があること、また、Embry ら、Strahle らは、TG212 より長期試験においても代替可能と報告しており、ハイスループット化・動物愛護の観点から稚魚・未成魚を用いる急性毒性試験 (TG203) や胚・仔魚期短期毒性試験 (TG212) を TG236 に置き換える動きも出ている。一方、国立環境研究所のグループは、各試験法における感受性の違いに注目して比較を行い、(1) TG236 は TG212, 203 に比べ、感度が 10~20 倍劣っている、(2)TG236 はゼブラフィッシュのみが対象魚となっているが、生態系を考慮する場合はいくつかの魚種を使う必要がある、(3)他魚種を使用する場合は発達の速度の違い等を考慮した試験法に変更する必要があることを示唆した。

メダカは、日本固有の魚種であり、日本の生態毒性試験には欠かせず、対象魚種と加える必要性が最も高いと研究代表者は考える。今年、日本から提案したメダカ拡張 1 世代繁殖試験 (TG240) が OECD に採用されたように、メダカはゼブラフィッシュに比して発生が安定しており、飼育・取扱いが容易である。しかし、堅牢な卵殻および卵膜を持つため、化学物質を卵内に取り込ませることは難しい。TG236 で規定されたゼブラフィッシュ用のプロトコルをそのまま当てはめることはできないことから、メダカ卵に化学物質を効率よく取り込ませ、ゼブラフィッシュと同等以上の高感度な評価系の開発は望まれるところであった。

2. 研究の目的

本研究は、メダカ受精卵に安定的に多くの化学物質の導入が行える装置を用い、OECD テストガイドライン(TG) 236 の高感度化とハイスループット化の改良を行う。また、稚魚・未成魚試験等の従来の短期毒性試験法との整合性を検討し、代替の可能性を検討する。さらに、化学物質の毒性発現機構の分子生物学的な解明を行い、本導入法を魚類胚期急性毒性試験用に最適化することで操作が簡便かつ高感度な安定した試験系を確立することを目的とする。また、ネオニコチノイド系農薬および生物影響評価がなされていない代謝物について評価し、影響を比較検討した。

3. 研究の方法

メダカ受精卵をモデルとして使用した。メダカから受精後 5 時間以内の卵を採取し、個別に分離したのち、各種暴露溶液中でメダカ卵に高電界パルス印加し、各物質を卵内に導入した。影響評価化合物としてネオニコチノイド系農薬を選定し、その代謝物についても比較検討するため、独自に合成を行った。各化学物質は 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、2 時間浸漬後洗浄し、等張液中で受精後 6 日から孵化まで培養、観察を行った。10 mg/L(Low) 及び 100 mg/L(High) のアセタミプリド(Ace)、クロチアンジン(Clo) 及びイミダクロプリド(Imi) に暴露したメダカ卵について 2 日間培養した胚を用いて RNA-seq 解析を行い、得られた発現変動遺伝子についてクラスター解析、PCA 解析、パスウェイ解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 試験法の確立 OECD TG236 は、ゼブラフィッシュを対象生物としている。本研究では、メダカをモデル生物として使用し、高感度化を目指した。TG236 においてはゼブラフィッシュ胚への化学物質の取り込みの不安定性が問題になっているが、本研究では高電界パルス法を採用することにした。今回、ジノテフラン(DINO)のメダカ卵への導入量を定量的に測定したところ、卵抽出液の DINO 濃度は暴露液の約 20% であり、効率よく取り込ませることができていることが分かった。

(2) ネオニコチノイド系農薬の代謝物の合成 ネオニコチノイド系農薬代謝物である N-アセチルアセタミプリド(NAc-Ace)、N-アセチル-N-脱メチルアセタミプリド(NAc-NDMe-Ace)、脱メチルクロチアンジン(DMeClo)、ジノテフランウレア(UF)、脱メチルジノテフラン(FNG)、N-アミノジノテフラン塩酸塩(NAD) 等の純度の高い標品を合成することができた (Fig. 1)。

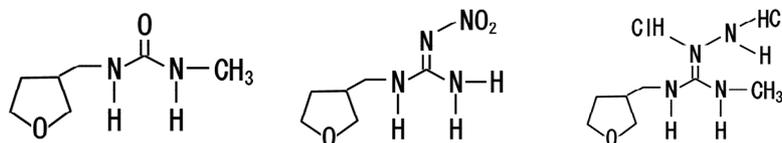


Fig. 1 本研究で合成した代表的なネオニコチノイド系農薬代謝物の構造式の例

(3) 急性毒性、発生毒性、催奇形性 Ace, Clo の急性毒性は低く、心臓肥大、血管形成遅延、血塊形成などの発生異常が暴露濃度依存的に増加し、心臓肥大は 0.45 mM Ace 導入群で 23%、0.4 mM Clo 導入群で 25%、血管形成遅延は Ace 導入群で 29%、Clo 導入群で 35% に上昇した。また、心臓が細く伸びた形状になる形態異常や、不整脈のように心臓の拍動が乱れるものが現われた。Ace の代謝物である NAc-Ace および NAc-NDMe-Ace 導入群も急性毒性は低く、心臓・血管

形成の異常，不整脈様の異常が現われ，原体と同じ発生影響を示す傾向が見られたが，発生異常率は原体の Ace より低かった．一方，DMeClo 導入群では，受精後 6 日目でも細胞塊の状態のものなど顕著な発生の遅れがみられ，DMeClo はメダカ胚に対し強い発生毒性を示した．また，DINO 導入群で発生異常が確認できたが，全て軽い症状の血栓であった．1, 2 mM DINO 導入群において，奇形個体も確認でき，尾が湾曲している個体や泳げず横たわっている個体が見られた (Fig. 2) ．一方，これより低い濃度で奇形個体はほとんど観察されなかった．UF, FNG, NAD 導入群においても発生異常は，全て軽い症状の血栓であった．1, 2 mM UF, FNG, NAD 導入群において，DINO 導入群と同程度に奇形個体が現れ，2 mM NAD 導入群では有意に奇形個体が増加した．UF, FNG, NAD 導入群で確認

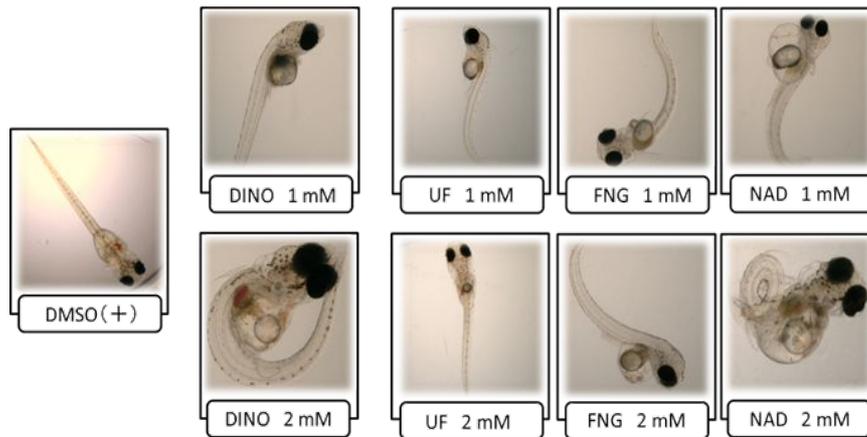


Fig. 2 DINO およびその代謝物暴露で現れた奇形個体

できた奇形は，DINO 導入群と同様であり，化合物特有な奇形は確認できなかった (Fig. 2) ．

(4) 遺伝子発現解析 Ace-Low/High, Clo-Low/High, lmi-Low/High 曝露群で発現変動した遺伝子数は，それぞれ 3,202/766, 897/927, 3,220/2,956 遺伝子であった．各曝露群の遺伝子発現プロファイルを用いてクラスター及び PCA 解析を行った結果，Ace-Low 曝露群は他の曝露群と異なるプロファイルを示した．また，High 曝露群に着目したところ，Ace-High 及び Clo-High 曝露群は類似した発現パターンを示したが，lmi-High 曝露群は異なるクラスターに属した (Fig. 3) ．次いで，パスウェイ解析を実施した結果，Ace-High, Clo-High 及び lmi-High 曝露群において，レチノール代謝，GnRH シグナル，ErbB シグナル，MAPK シグナル，スフィンゴ糖脂質合成シグナルが共通パスウェイとして抽出された．また，Ace-High 及び Clo-High 曝露群では，心筋細胞におけるアドレナリンシグナル伝達やステロイド生成に関わるパスウェイが影響を受けており，lmi-High 曝露群では DNA 修復に関わる fanconi anemia パスウェイやアラキドン酸代謝など，血流や発達障害を引き起こす遺伝子群への影響が認められた (Table 1) ．

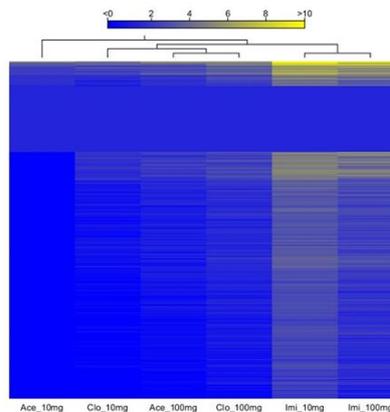


Fig. 3 遺伝子発現のクラスター解析

Table 1 アセタミプリド暴露のパスウェイ解析

Low				Acetaminiprid				High			
pathway	Count	%	PValue	pathway	Count	%	PValue	pathway	Count	%	PValue
ola04144:Endocytosis	211	1.92	0.00	ola00140:Steroid hormone biosynthesis	25	0.32	0.00	ola00140:Steroid hormone biosynthesis	25	0.32	0.00
ola04120:Ubiquitin mediated proteolysis	93	0.85	0.00	ola04261:Adrenergic signaling in cardiomyocytes	95	1.22	0.00	ola04261:Adrenergic signaling in cardiomyocytes	95	1.22	0.00
ola04141:Protein processing in endoplasmic reticulum	115	1.05	0.00	ola00604:Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series	13	0.17	0.01	ola00604:Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series	13	0.17	0.01
ola04012:ErbB signaling pathway	71	0.65	0.02	ola00982:Drug metabolism - cytochrome P450	22	0.28	0.01	ola00982:Drug metabolism - cytochrome P450	22	0.28	0.01
ola00860:Porphyrin and chlorophyll metabolism	24	0.22	0.02	ola04912:GnRH signaling pathway	52	0.67	0.01	ola04912:GnRH signaling pathway	52	0.67	0.01
ola04912:GnRH signaling pathway	71	0.65	0.04	ola00532:Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate / dermatan sulfate	18	0.23	0.01	ola00532:Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate / dermatan sulfate	18	0.23	0.01
ola00510:N-Glycan biosynthesis	36	0.33	0.05	ola04620:Toll-like receptor signaling pathway	44	0.56	0.02	ola04620:Toll-like receptor signaling pathway	44	0.56	0.02
ola00970:Aminoacyl-tRNA biosynthesis	28	0.26	0.06	ola04010:MAPK signaling pathway	128	1.64	0.02	ola04010:MAPK signaling pathway	128	1.64	0.02
ola04520:Adherens junction	75	0.68	0.07	ola00230:Purine metabolism	84	1.08	0.02	ola00230:Purine metabolism	84	1.08	0.02
				ola04012:ErbB signaling pathway	49	0.63	0.03	ola04012:ErbB signaling pathway	49	0.63	0.03
				ola00830:Retinol metabolism	23	0.30	0.03	ola00830:Retinol metabolism	23	0.30	0.03
				ola00983:Drug metabolism - other enzymes	18	0.23	0.04	ola00983:Drug metabolism - other enzymes	18	0.23	0.04
				ola04916:Melanogenesis	58	0.74	0.04	ola04916:Melanogenesis	58	0.74	0.04
				ola04370:VEGF signaling pathway	36	0.46	0.04	ola04370:VEGF signaling pathway	36	0.46	0.04
				ola04080:Neuroactive ligand-receptor interaction	155	1.99	0.05	ola04080:Neuroactive ligand-receptor interaction	155	1.99	0.05
				ola04622:RIG-I-like receptor signaling pathway	28	0.36	0.05	ola04622:RIG-I-like receptor signaling pathway	28	0.36	0.05
				ola00601:Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	18	0.23	0.07	ola00601:Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	18	0.23	0.07
				ola04514:Cell adhesion molecules (CAMs)	83	1.07	0.08	ola04514:Cell adhesion molecules (CAMs)	83	1.07	0.08
				ola00051:Fructose and mannose metabolism	20	0.26	0.08	ola00051:Fructose and mannose metabolism	20	0.26	0.08
				ola04270:Vascular smooth muscle contraction	58	0.74	0.10	ola04270:Vascular smooth muscle contraction	58	0.74	0.10

(5) 総括 本研究において，高電界パルス法を利用することで水溶性の高いネオニコチノイド系農薬においても高い効率で受精卵に取り込ませることが確認できた．また，成魚では毒性を示さない濃度でもメダカ受精卵に直接導入することで発生異常等を引き起こすことが確認でき，高感度化が達成できたと考える．さらに本研究で注目したネオニコチノイド系農

薬はメダカに発生異常を引き起こすが、その代謝物には特に発生毒性が高いものが存在することが分かった。環境中に存在するネオニコチノイド系農薬は原体だけでなく、代謝物となっても残留性が高く散布後長期間存在することが知られていることから、代謝物を含めた生物影響の慎重な調査が必要であると考えられる。さらに、遺伝子発現解析を行うことで形質として異常が観察されない濃度においてもネオニコチノイド系農薬及びその代謝物によって早期に遺伝子発現の変化が引き起こされており、化学物質の影響評価の指標にできる可能性があることが明らかにできた。また、パスウェイ解析等を活用することでネオニコチノイド系農薬はメダカ初期胚の様々な発達に影響することが予想されたことから、従来の神経系への影響だけでなく幅広い影響が懸念されることが分かった。

本研究で開発した評価系は、TG236 と比べ高感度であり、仔魚・成魚を用いた試験法と異なり、動物代替法となることから環境化学物質の生物影響評価にとどまらず、広い分野での利用が期待される手法となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Effects of lithium on developmental toxicity, teratogenicity and transcriptome in medaka embryos

Nobuaki Tominaga, Seiya Shino, Masaya Uchida, Hiroshi Ishibashi, Midori Iida, Tadashi Okobira, Kayla Arizono, Noriaki Yoshida, Koji Arizono

Fundamental Toxicological Sciences 6(2) 31-36 2019年2月 DOI:10.2131/fts.6.31 [査読有り]

Nanosecond pulsed electric field incorporation technique to predict molecular mechanisms of teratogenicity and developmental toxicity of estradiol-17 β on medaka embryos.

Yamaguchi A, Ishibashi H, Kono S, Iida M, Uchida M, Arizono K, Tominaga N

Journal of applied toxicology : JAT 38(5) 714-723 2017年12月 DOI: 10.1002/jat.3579 [査読有り]

〔学会発表〕(計4件)

ネオニコチノイド系農薬代謝物の合成

高橋圭介, 鶴見竜也, 稲見萌, 李醉, 日下部太一, 吉川晶子, 東屋功, 富永伸明, 池中良徳, 加藤恵介

日本薬学会第139年会 2019年3月

ネオニコチノイド系農薬のメダカの初期発生に対する影響の評価

井上傑士, 坂口ももか, 山口明美, 内田雅也, 高橋圭介, 加藤恵介, 有蘭幸司, 富永伸明

第24回日本環境毒性学会研究発表会 2018年9月

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

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

日本内分泌かく乱化学物質学会研究発表会要旨集 20th 64 2017年12月

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

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

日本内分泌かく乱化学物質学会研究発表会要旨集 20th 63 2017年12月

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：有蘭 幸司

ローマ字氏名：(ARIZONO, koji)

所属研究機関名：熊本県立大学

部局名：環境共生学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：70128148

研究分担者氏名：大河平 紀司

ローマ字氏名：(OKOBIRA, tadashi)

所属研究機関名：有明工業高等専門学校
部局名：創造工学科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：60629210

研究分担者氏名：石橋 弘志
ローマ字氏名：(ISHIBASHI, hiroshi)
所属研究機関名：愛媛大学
部局名：農学研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：90403857

研究分担者氏名：高橋 圭介
ローマ字氏名：(TAKAHASHI, keisuke)
所属研究機関名：東邦大学
部局名：薬学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：60380854

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。