

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：57102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651057

研究課題名（和文）メダカ卵への新たな物質導入法による化学物質の発生影響評価法

研究課題名（英文）Chemical Developmental Toxicity Test Using A New Material Introducing Technique for Medaka Egg

研究代表者

富永 伸明 (TOMINAGA NOBUAKI)

有明工業高等専門学校・物質工学科・教授

研究者番号：30227631

研究成果の概要（和文）：高電界パルス印加により初期発生中のメダカ卵に物質を導入する方法を用い新規化学物質影響評価法の開発を試みた。メダカ卵の発生に遺伝子発現および形態観察レベルでほとんど影響を与えず、物質の取り込み量を有意に高める高電界パルス条件を見出した。実際にビスフェノールAを用いて定量を行ったところ、外液濃度以上の卵内への取り込みがGC-MSで定量できた。また、特異的な遺伝子発現の変動が起こっていることをDNAマイクロアレイで確認した。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel method of chemical developmental toxicity assay using pulsed power electroporation chemical transfer technique for fertilized medaka egg. We could find the best pulsed power treatment condition which introduced chemicals efficiently and did not affected embryogenesis and gene expression. Then we measured uptake of bisphenol A under this condition by GC-MS. Bisphenol A concentration in egg extract was higher than immersed solution. According to DNA microarray data, we found the specific gene expression profile by uptake of bisphenol A.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響評価

キーワード：発生影響評価法，パルスパワー，メダカ，DNA マイクロアレイ，タンパク合成阻害剤，トランスクリプトーム，フェノーム

1. 研究開始当初の背景

化学物質の生物影響は多岐にわたるが、特に発生初期は様々な器官形成が急速に進行する時期であり化学物質に対する感受性が非常に高い。このときに受けた影響が回復不可能となることや、成体となった後に影響が表面化してくる可能性があることから、近年胎児、小児に対するリスクおよび経世代影響評価の必要性が高まっている。しかし、ヒトを含む哺乳類は母体内で発育し発生段階の観察が困難なため、催奇形性試験や母体投与による影響評価のように手間がかかり、簡易な

発生影響評価手段はない。魚類は脊椎動物の基本的体制を備え、多産、卵殻や胚が透明で観察が容易、母体外での早い発生といった特徴があり、魚類受精卵を用いた評価系は哺乳類の代替として極めて有望であり、特に国外において発生影響評価に用いる報告がなされている。しかし、堅牢な殻を持っている魚類に化学物質を取り込ませることは難しく、マイクロインジェクションのような熟練手技が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、極短パルス高電界により硬い殻を持つメダカ卵への物質導入法によって化学物質の導入を試み、導入後のメダカ卵中での遺伝子発現の変化のDNAマイクロアレイによる解析およびメダカ卵の透明性を有効に利用した形態観察による新規な化学物質の発生影響評価法の開発研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 高電界パルス印加によるメダカ卵への化学物質の導入—ブルームライン高電界パルス発生装置を用い、電極間距離1mmの特性セルを製作して極短パルス高電界をメダカ卵に印加した。その際、外液100 μ lに種々濃度の化学物質を加えた。2時間浸漬した後、RO水で十分に洗浄し、96穴マイクロプレートにそれぞれの卵を個別に入れ、20度でインキュベートした。

(2) DNAマイクロアレイによる遺伝子発現変動解析—高電界パルス印加しないシャムオペレーションをコントロールにし、24時間後あるいは8日後に卵40個あるいは3個からRNAを抽出し、遺伝子発現状態をメダカ6000遺伝子搭載のDNAマイクロアレイで測定した。それぞれの実験は最低3回行い、測定データは統計的に処理し、有意なデータについて3倍あるいは1/3倍の発現量の変動が見られた遺伝子を上昇、下降と判断した。

(3) 導入量の定量—高電界パルス印加した後のメダカ卵を洗浄後、外側の水分をキムワイプで除去し、ホモジネートした。遠心分離後、得られた溶液を卵抽出液とし、GC-MMSで定量した。

4. 研究成果

(1) 高電界パルス印加によるメダカ卵への影響とタンパク合成阻害剤の取り込みによる遺伝子発現変化—タンパク合成阻害剤をモデル化合物として、形態観察で発生途上での異常、死亡を指標に取り込み効率を評価し、導入効率が现阶段で最も良いと考えられる高電界パルス印加条件を決定した(特許出願中)。この高電界パルス印加による受精卵への影響について形態観察およびDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現変動解析で観測した。形態観察においてコントロールとの違いは何ら見られず、ほぼ100%の割合で孵化し、正常に成長した。また、24時間後および6日後の卵における遺伝子発現状況もコントロールと比較して、有意に発現変動している遺伝子はほとんど確認されず、コントロールと相違はないことが分かった(図1A, B)。このことから、高電界パルス印加によるメダカ卵へのダメージはほとんど無いか、24時間後までにほぼ回復すると考えら

れた。一方、シクロヘキシミドあるいはアクチノマイシンD導入群では、発生が遅れる個体および孵化する前に死亡する個体が多く

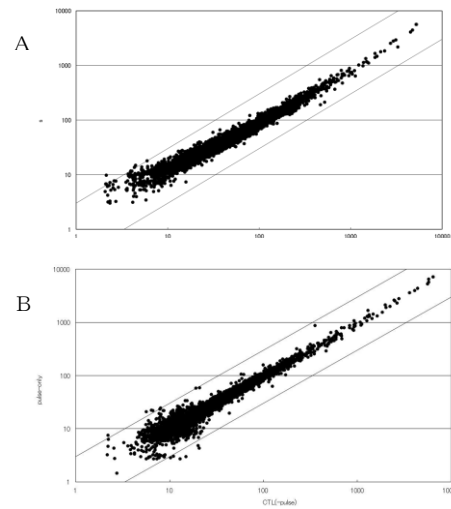


図1. 高電界暴露後の遺伝子発現状況の比較 (A)24時間後, (B)6日後

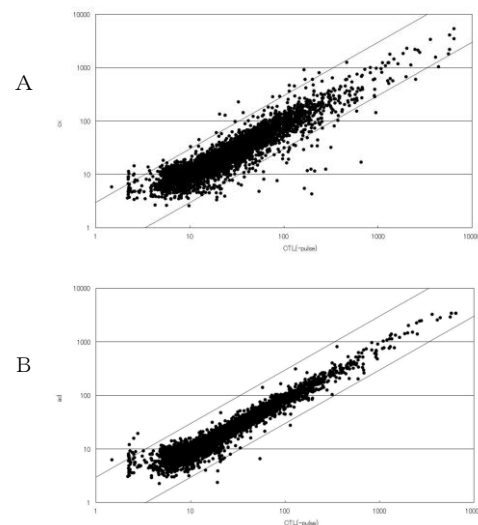


図2. タンパク合成阻害剤導入後の遺伝子発現状況 (A)シクロヘキシミド/コントロール, (B)アクチノマイシンD/コントロール

現われた。特にシクロヘキシミドでは、ほぼ100%の割合で異常個体が現われ、化合物の分子量の違いから、シクロヘキシミド程度の低分子は本高電界パルス条件での導入効率が非常に高いことが示唆された。また、物質それぞれに特有の形態異常が観察され、両物質のタンパク合成阻害機構は異なることが、発生過程に表現型として現れたと考えられた。7日後まで発生している受精卵についてDNAマイクロアレイ解析を行ったところ、有意に発現量に変動した遺伝子が確認でき、その遺伝子数はシクロヘキシミドの方がア

クチノマイシンDより多かった(図2A, B). このことは取り込み量が多いシクロヘキシミドの方が発生毒性を強く示しており, 形態観察でも異常個体が多いことと一致すると考えられる.

さらに, シクロヘキシミドとアクチノマイシンD導入群で比較するとそれぞれの化合物で特異的に発現量に変動している遺伝子が存在することが明らかにでき, 作用機構の違いが発生過程の胚に対して物質特異的な影響を及ぼしており, その影響は遺伝子発現変動レベルで起こり, 発生異常が原因の形態異常が生じていることが明らかになった(図3).

以上の結果は, フェノームおよびトランスクリプトーム解析を合わせて行うことで化学物質の発生影響を詳細かつ明確に調査することができる非常に有用な発生影響評価法となりうることを示唆するものである.

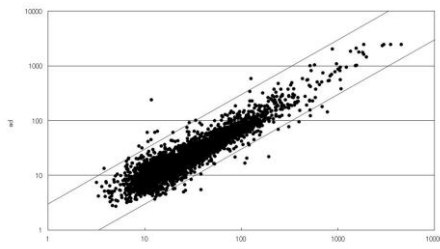


図3. タンパク合成阻害剤の遺伝子発現影響
シクロヘキシミド/アクチノマイシンD

(2)ビスフェノールAの取り込み量の定量および影響評価—実際に化学物質の発生影響評価の可能性を探るため, ビスフェノールA(BPA)を用いて取り込み量の定量およびDNAマイクロアレイによる遺伝子発現変動の解析を行った. 取り込み量については, 外液に50 μ M BPA溶液を用い, 卵抽出液中のBPA濃度をGC-MSで分析した. BPA溶液に浸漬しただけのコントロールでは卵抽出液のBPA濃度は約2 μ Mであったが, パルスを行った卵の抽出液のBPA濃度は約90 μ Mであり, メカニズムは不明であるが, 外液より高い濃度で取り込まれていることが分かり, 高電界パルス印加による物質の取り込み効率が高いことが確認された(表1).

表1 50 μ M BPAのメダカ卵中への取り込み量

	-Pulse, +BPA	+Pulse, +BPA
卵液濃度[ppb]	422.5	20377
卵液濃度[μ M]	1.85	89.3

また, DNAマイクロアレイの結果から, BPA溶液に浸漬しただけで有意な発現変動を示す遺伝子が数個存在したが, パルス印加後の方が多くの遺伝子の発現が変動してお

り, BPAの発生途中の卵への導入量が増加したことで影響が増したことが考えられた. 外液5 μ MでBPAを取り込ませたとき, 図4Aに示すように非常に多くの遺伝子の発現が増減しており, その変動幅も大きかった. 一方, 50 μ Mの外液でBPAを取り込ませた場合も特異的に発現が変動した遺伝子数は見られたが, その数は減少した(図4B). 形態観察で50 μ Mの場合, BPA導入直後から死亡する受精卵が多く, 6日後まで生存しているものが少なかった. 今回のDNAマイクロアレイの実験は6日目まで生存している受精卵のみを選抜して行っている. 生存してい

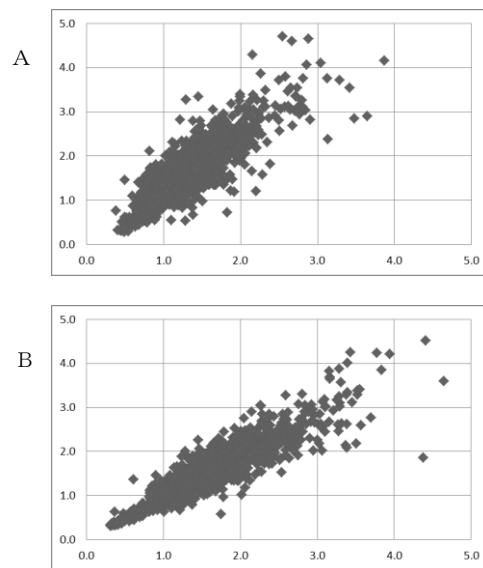


図4 BPA導入後の遺伝子発現状況
(A)5 μ M BPA/コントロール
(B)50 μ M BPA/コントロール

る卵の胚体には異常個体が当然ながら少ない. このことは, 生存している卵は導入量が何らかの原因で少ないことも考えられ, それが発動遺伝子数の減少に繋がっているかもしれない. 外液濃度5 μ MのBPAでも高電界パルスを印加すると死亡する卵が増加していたが, 受精卵の胚発生の状況はコントロールとほとんど相違が見られなかった. しかし, 遺伝子の発現は大きく変動していることから, BPAは個体の形成の制御系でなく, 他の制御系に強い影響を及ぼすのではないかと考えられる. さらに, メダカ卵への取り込み量を考慮すると卵液中のBPA濃度は従来の培養細胞で報告されている細胞毒性を示す濃度より低いと考えられる. これらのことは, BPAは発生途中の細胞に対しての毒性の方が強いのではないかと考えられ, 今後詳細な検討が必要である.

以上の結果から, まだ高電界印加による取り込みのメカニズム, 取り込み効率等の検討が必要ではあるが, 本研究で試みた高電界パルスによる物質導入法はメダカ卵への化学

物質の導入法として従来のマイクロインジェクション等と比較して非常に簡便な方法であることを示せただけでなく、効率の良い物質導入法であることも明らかにできた。また、DNAマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現測定により物質特異的な遺伝子発現の変動が見られることも分かった。また、形態観察により発生異常、致死の個体に対する影響も評価できたことから、本試験系は発生影響評価手法として有効であると考えられる。今後、より効率の良い物質導入条件の確立と遺伝子発現変動のトランスクリプトーム解析と形態観察のフェノーム解析を有効に結び付ける手法を見出していきたいと考えている。

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)

Susumu Kono, Akemi Yamaguchi, Takashi Tanabe, Nobuaki Tominaga, Hidenori Akiyama A Study of Material Incorporation for Medaka (*Oryzias latipes*) Eggs by Various Voltage Pulses Proc. of the 18th IEEE Int. Pulsed Power Conf.

Kubo T, Yamaguchi A, Tominaga N, Kono S Development of pulsed power supply for materials incorporation into medaka eggs. International Symposium on Technology for Sustainability (ISTS2012) 297-300

[学会発表] (計 5 件)

Kono S, Yamaguchi A, Kubo T, Imamura Y, Tominaga N Improvement of pulsed power system for incorporating materials into medaka eggs, 9th International Bioelectronics Symposium

岩屋 健人, 河野 晋, 山口 明美, 富永 伸明, 小田 達也 水中放電による衝撃波が生体に及ぼす影響に関する基礎研究 電気学会九州支部平成 24 年度 (第 3 回) 高専卒業研究発表会

山口明美, 今村泰隆, 河野晋, 富永伸明 高電界パルスによるメダカ卵への物質導入; 分子量と導入効率についての検討 第 64 回 電気関係学会九州支部連合大会

今村泰隆, 山口明美, 河野晋, 富永伸明 極性の異なる 2 連続パルスによるメダカ卵への影響 第 64 回 電気関係学会九州支部連合大会

富永伸明 化学物質暴露メダカにおけるエストロゲン応答遺伝子の発現変動 リスクサイエンス研究フォーラム 2012

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 物質導入方法およびその装置

発明者: 河野晋, 富永伸明, 山口明美

権利者: 独立行政法人国立高等専門学校機構

種類: 特許

番号: 特願 2013-120148

出願年月日: 2013 年 6 月 6 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富永 伸明 (TOMINAGA NOBAUKI)

有明工業高等専門学校・物質工学科・教授

研究者番号: 3 0 2 2 7 6 3 1

(2) 研究分担者

河野 晋 (KONO SUSUMU)

有明工業高等専門学校・電気工学科・准教授

授

研究者番号: 3 0 2 7 0 3 7 5

有蘭 幸司 (ARIZONO KOJI)

熊本県立大学・環境共生学部・教授

研究者番号: 7 0 1 2 8 1 4 8

(3) 連携研究者

山口 明美 (YAMAGUCHI AKEMI)

有明工業高等専門学校・技術支援センタ

ー・専門職員

研究者番号: 9 0 3 9 9 2 6 2