

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14781

研究課題名(和文) OxyPAHの胚暴露により減少するアスコルビン酸と孵化仔魚の奇形誘発に関する探求

研究課題名(英文) Examination for relationship between decreasing of ascorbic acid by exposure of OxyPAH and inducing of malformation on fish larvae

研究代表者

宇野 誠一 (UNO, Seiichi)

鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・准教授

研究者番号：50381140

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)：本研究では化学物質暴露に対する魚体中での生体内防御物質としてのアスコルビン酸(AsA)の役割を明らかにするために、AsAが不足した飼料を魚に与えて胚を得て、検証を行った。まず、AsAが不足した胚の奇形誘発率は上昇した。このことはAsAがコラーゲン生成に欠かせないことを示唆していた。更にAsAが胚中で少なくなると、低いOxyPAH暴露濃度でも、高率で胚に影響が現れることが分かった。これは、抗酸化物質として、またコラーゲン形成時に必須のAsAが胚中で足りず起きる現象であると示唆された。これらの結果から、AsAが化学物質暴露の制御物質として欠かせないものである、ということを実験的に明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined the role of ascorbic acid (AsA) as the defense-component in fish exposed to chemicals. Medaka fish were fed the artificial food with small amount of AsA or without AsA. The malformation rate in the hatching larvae from embryos spawned by those fish tended to increase with decreasing the contents of AsA in embryos. This result suggests that AsA is absolutely necessary for the formation of collagen. When AsA contents in embryos became low, several effects were caused in embryos even by lower concentration of Oxygenated PAH. Because AsA reacting as the antioxidant and catalyst at the formation of collagen were shortage in embryos, those effects were caused even in low exposure concentration of OxyPAH. As a result, we showed that AsA is absolutely necessary for the defense-component to the exposure of chemicals.

研究分野：環境毒性学、環境化学

キーワード：アスコルビン酸 酸化ストレス コラーゲン 抗酸化作用 奇形誘発 ヒメダカ OxyPAH

1. 研究開始当初の背景

キノン類等の酸素化多環芳香族炭化水素類 (OxyPAH) は大気汚染で問題視されているディーゼル廃棄微粒子 (DEP) に含まれる物質の中でも、毒性が強い物質群の1つであると考えられ、都市部近郊の海底質中からも検出されている。我々は予備試験として、数種の OxyPAH をヒメダカ胚に暴露したところ、孵化仔魚の脊椎骨湾曲、頭蓋骨の矮小化・球状化、口蓋骨の未発達、ヨークサックの膨張、管状心臓の形成、といった様々な影響が誘発されるのを見出した。その後、OxyPAH 暴露影響をさらに詳細に調べるために、暴露中にアミノ酸や糖類等の胚中代謝物の変動を網羅的に調べたところ (メタボロミクス)、孵化直前の胚中アスコルビン酸 (ビタミン C、以下 AsA) が、OxyPAH 未暴露の対照区よりも大きく減少していた。AsA は魚体内で十分量作ることができない必須ビタミンであり、骨や血管を構成するコラーゲン形成に欠かせない。また、化学物質の生物に対する影響の1つ、酸化ストレスに対して抗酸化物質としてもはたらく。これらの結果と背景をもとに、OxyPAH の胚暴露による仔魚の奇形発現等は、AsA の機能から考えると、AsA 減少が直接あるいは間接的に寄与しているのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では上記1項に述べた AsA に関する仮説を確認するために、
 1) 胚発生中の AsA の孵化仔魚の形態異常等の影響への関与を検証するため、AsA を極度に減らした餌料でヒメダカ親魚を飼育、産卵させ、その卵を孵化させて OxyPAH 暴露時の影響と完全あるいは一部類似した影響が孵化仔魚に現れるかを見極める。
 2) AsA の化学物質暴露に対する防御作用を検証するために、1)の卵を産卵後数時間目から OxyPAH に暴露し、OxyPAH 暴露時に特有の影響が、予備試験時より低い暴露濃度で見出せるかを調べる。
 という2点を検証することを目的とした。本研究の仮説が立証されれば OxyPAH の毒性発現メカニズムの一端を明らかにするだけでなく、化学物質暴露に対する生体内防御物質としての AsA の役割を明らかにできる。

3. 研究の方法

(1) 市販餌中 AsA の含有量測定

一般に市販されているメダカ用、あるいは淡水魚用の餌を10種類購入し、それぞれに含まれる AsA 量を調べた。魚類への AsA 吸収を考慮して、幾つかの AsA 存在形態がある、という研究分担者の横山による情報のもと、AsA とデヒドロアスコルビン酸 (DAsA)、AsA リン酸体 (PAsA) の3種類を測定対象とし、HPLC により測定した。

(2) AsA 含有量がヒメダカ産卵に及ぼす影響

AsA 含有量を 300、30、0 (含まず) になるように AsA を添加した人工飼料をそれぞれ調製した。

30センチ規格のガラス水槽に9Lの水を注ぎ、各餌を給餌するための水槽を3本ずつ用意した (n=3)。それぞれの水槽に6雄12雌の生後7~8ヶ月のヒメダカを投入した。水温は25℃に保ち、各水槽にスポンジフィルターとエアレーションを施した。試験開始前1週間はテトラミンを給餌して環境馴致し、その後、2ヶ月にわたり各水槽で産卵される受精卵の個数を数えた。

(3) AsA 不足胚への OxyPAH 暴露

AsA が不足した胚は、AsA を十分に含む胚と比較するとより低濃度の OxyPAH により影響発現するか、ということを検証するために以下の実験を行った。

AsA 含量が 300、30、0 mg/kg 含む人工餌を1ヶ月間与え続けたそれぞれのヒメダカ胚を用意した。ガラス容器に100 mLの飼育水を用意し、そこに oxyPAH の一種である 7,12-ベンゾ(a)アントラセンキノン (BaQ) を 20、100、500 ng/mL になるように添加した。助剤にはジメチルホルムアミドを用いた。また、BaQ を含まない対照区も設けた。この飼育水に AsA 0、30、300 mg/kg を与え続けた各親から得た胚を個別に、BaQ を含む各飼育水に10個ずつ投入した。これをそれぞれにつき6つずつ容器を用意し (繰り返し6、n=6、但しコントロールは n=4)、20日間暴露実験を行った。暴露試験の詳細はこの試験のための予備試験として行った、市販餌を親魚に与えて得た胚への暴露試験 (Kawano et al. 2017) と同様の操作で行った。また、暴露濃度もこの予備試験の結果をベースに決定した。

4. 研究成果

(1) 市販餌中 AsA 含有量

市販されていた10種類のメダカあるいは淡水魚用の AsA 含有量を調べたところ、以下のような結果であった (Table 1)。

Table 1 市販餌中 AsA 含有量

Food Name	Concentration of AsA (mg/kg)			Total AsA
	AsA	DAsA	PAsA	
A	94.6	14.9	216	326
B	39.7	9.38	371	421
C	23.0	2.58	18.2	43.8
D	103	16.9	93.3	213
E	126	14.2	58.5	199
F	25.3	7.25	82.6	115
G	55.4	16.6	216	288
H	34.4	4.05	147	185
I	10.1	2.39	52.4	65.0
J	10.3	3.50	42.0	55.8

3種類の AsA のうち、総体的に PAsA が最も多く含まれている餌が多く、次に AsA が多く含まれる傾向にあった。しかし、餌 C、D、E などは AsA が AsA リン酸体よりも多く含まれており、その目的に応じてメーカーが含有量を変えていると考えられた。また、DAsA

はどの餌もその含量が 10% 以下であり、意図的に混合させた、というよりは製造後、時間と共に AsA や PAsA が DAsA に変化したものを検出した可能性がある。AsA、DAsA、PAsA の含有量を合計した量 (Total AsA) は最も多いもので 421 mg/kg、もっとも少ないもので 43.8 mg/kg とほぼ 10 倍の開きがあった (平均 191 mg/kg)。この結果から AsA 量ははそれぞれの餌でかなり幅があることが分かった。今回は B の餌の Total AsA 量を参考に、今後人工飼料を作る際に、AsA を最も多く含む餌には 400 mg/kg の AsA 濃度になるように調製することにした。また各餌中で PAsA の含有量が多い傾向にあるために、本研究では添加する AsA はリン酸体を用いることにした。

(2) AsA 含有量がヒメダカ産卵に及ぼす影響

2 ヶ月にわたり、AsA 量が 300、30、0 mg/kg 含む人工飼料でそれぞれ親魚を飼育し、得た卵数の変動を Fig. 1 に示す。

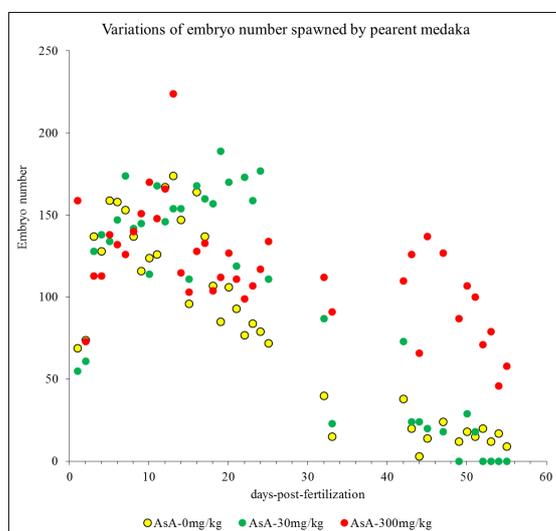


Fig. 1 産卵数の変動

本研究ではこの産卵数変動の検証を数回行ってその再現性を確認したが、毎回多少の違いはあるものの、試験開始 1 ヶ月目くらいから 30 及び 0 mg/kg の餌群の産卵数が徐々に下がる傾向を見せた。またこの 1 ヶ月目くらいから 30 及び 0 mg/kg の親魚に、体が白くなった後、数日で死ぬ個体が出始め 2 ヶ月目に至るまでかなりの数が死亡した。哺乳類では AsA 欠乏により壊血病になり、重症化した場合、死に至ることが知られている。魚の場合、壊血病に関する知見はほとんどないと思われる。しかし、本研究で見られた AsA が十分に与えられない群の死亡率が高くなる原因として、AsA が十分に吸収できないことにより壊血病に類する影響が誘発されたことが考えられた。しかし、このような親魚の AsA 欠乏あるいは不足による影響が見られたものの、Fig. 2 に示すように卵の受精率には大きな影響は見られなかった。Fig. 1 に示した結果から考えると、AsA の不足は精子へ

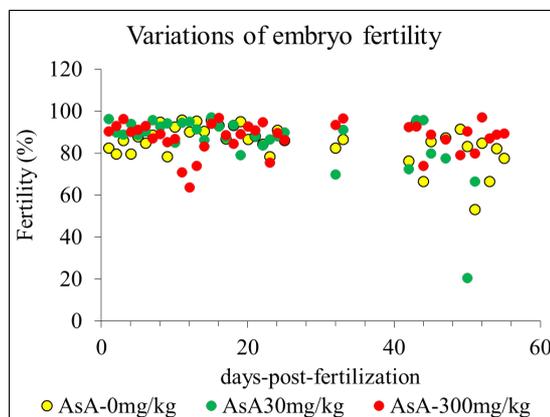


Fig. 2 受精率の変動

の影響はあまりないのかもしれない。また、得られた各群の卵を確保し、その後、孵化率、奇形率、発生途中の死亡率などを観察したが、採取された卵のロット間差が大きかったものの、0 mg/kg の餌群からは 1 ヶ月目くらい以降に得られた卵から 40~50% の孵化仔魚に何らかの奇形を有する 때가あった。また、30 mg/kg でも 25 日目に得られた卵で 50% を越える奇形率が観察されることがあった。AsA は皮膚、膜、軟骨を構成するコラーゲン形成に欠かすことができない。また AsA は少なくとも親魚にとっては必須ビタミンである。胚が発生する中で AsA が自己生産できるか否かは分からないが (我々の検証では AsA が胚発生中に突然増えることがあり、胚は親魚と違って AsA を体内で合成できる可能性がある) 十分に胚に AsA が与えられず、このことから正常なコラーゲンが形成されないことが、このような奇形誘発を招いた可能性が考えられた。しかし、この奇形誘発率は、試験間で変動が大きかったため、さらに詳細な検証が必要である。また、AsA を減らした餌を与えられた親群が産んだ卵は卵膜の形状異常が観察され、この卵膜形成異常は不完全なコラーゲン形成に由来するものと思われた。

(3) AsA 不足胚の OxyPAH 暴露影響

AsA 含量が 0、30、300 mg/kg の人工飼料を与え続けられた親から得た、それぞれの胚を OxyPAH の一種である BaQ に暴露した。その孵化率、死亡率、孵化日数、孵化稚魚の奇形誘発率をそれぞれ Fig. 3 から 6 に示した。

孵化率については BaQ 未暴露 (Fig. 3 の control) の胚は AsA の過不足関係なくほぼ 100% に近い孵化率を得た。しかし、0 mg/kg 及び 30 mg/kg の群は 20 ng/mL で減少する傾向が見られ、500 ng/mL の BaQ 暴露では AsA 含量が減少するにつれて孵化率が低下する傾向が明瞭に見られた。また、死亡率 (Fig. 4) に関しては、やはり 20 ng/mL BaQ 暴露で AsA 含量の 0 と 30 mg/kg 群で上昇する傾向が見られ、500 ng/mL 暴露区では AsA 含量が少なくなるほど、AsA が有意に上昇する傾向が見られた。さらに奇形率に関しては、300 mg/kg の AsA 群では 20 mg/kg で 20% 程度しか出現

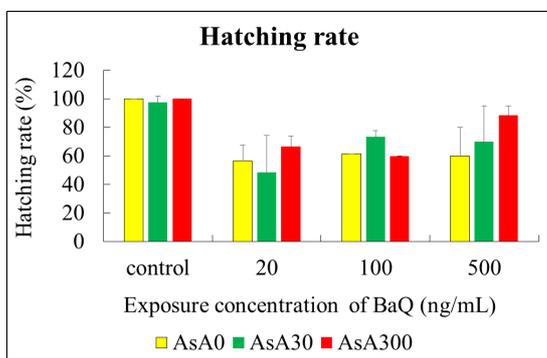


Fig. 3 孵化率の比較

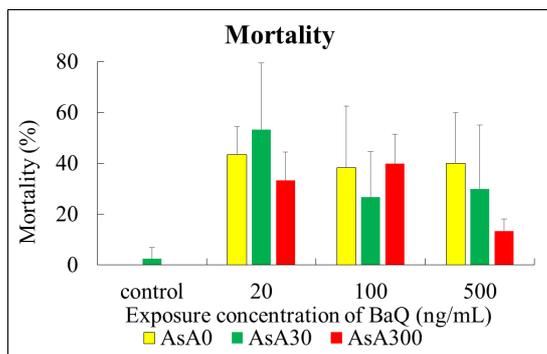


Fig. 4 死亡率の比較

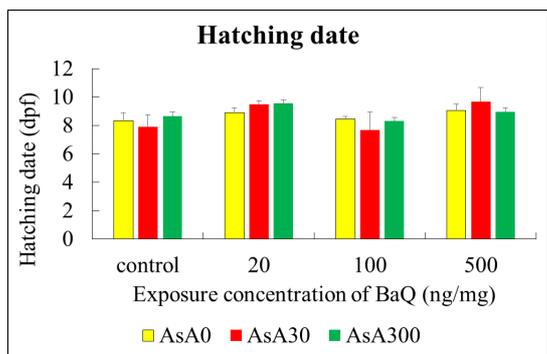


Fig. 5 孵化日数の比較

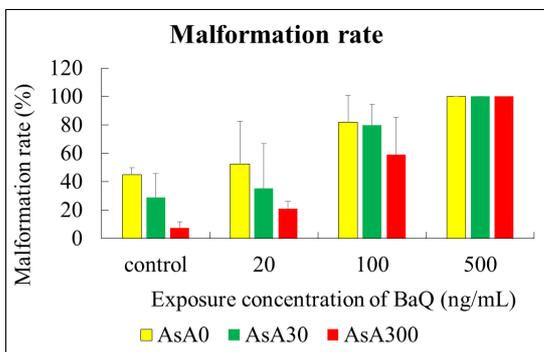


Fig. 6 奇形誘発率の比較

しなかったが、AsA 含量が少なくなると奇形率が上昇し、AsA 0 mg/kg では50%を越えた。100 ng/mL BaQ 暴露でも同様の傾向が見られた。500 ng/mL では通常餌を与えた親から得

た胚でもほぼ全ての個体が奇形を誘発するBaQ 暴露濃度であり、本研究でも、どのAsA 含有量でもほぼ全ての胚から奇形稚魚が生まれた。これらの影響に対して、孵化日数に関してはどの区もほとんど影響を受けず、ほとんど対照区と変わらなかった。

AsA は強力な抗酸化作用物質として、生物体内で起こる酸化ストレスに対して働くことが知られている。本研究を始めた当初、恐らく、AsA が不足した胚ではこの酸化ストレスによる影響が大きくなるだろうと予想された。孵化率と死亡率に関して、AsA 含有量が少ない胚ほど、その影響が大きいことが観察された。孵化率の低下は胚内において、BaQ 暴露の影響を受けて大きな酸化ストレスが生じ、これに対応するAsA が不足しているために、より深刻な影響を受け、また、死亡率も同様の理由でAsA 不足群で大きくなったことが本研究の結果から示唆された。また、孵化稚魚の奇形率に関しては、胚中でその形成にAsA が必須であるコラーゲンの形成がうまくいかず、AsA が少ない群ではBaQ 低濃度暴露でさえ、多くの奇形稚魚を産する結果となったと考えられた。その奇形のパターンはFig. 7に示すようなものであり、この形態は予備試験(Kawano et al. 2017)で得られたものとはほぼ一致していた。

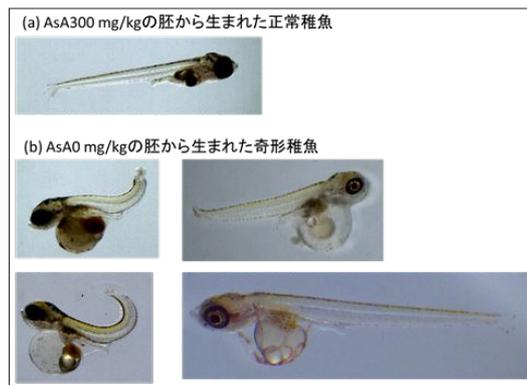


Fig. 7 AsA 0 mg/kg の胚を BaQ に暴露したときに孵化した奇形稚魚

本研究では化学物質暴露に対する魚体中における生体内防御物質としてのAsA の役割を明らかにするために、AsA が不足、あるいは全く含まない人工飼料を調製してこれを親魚に与えて胚を得て、幾つかの検証を行った。まず、AsA が不足、あるいは含まない餌を食べた親魚から生まれた胚への奇形誘発率は上昇する傾向が観察された。このことはAsA がコラーゲン生成に欠かせないことと、少なからず関係していると考えられた。また、AsA が不足する状況が1ヶ月強続くと、親魚自身が哺乳類の壊血病と同様の現象で死に至ることが明らかとなった。さらにAsA が胚中で少なくなると、通常では影響発現しないような低いOxyPAH 暴露濃度でも、高率

で胚に影響が現れることが分かった。これは、抗酸化物質として、またコラーゲン形成時に必須である AsA が胚中で足りずに起こってしまう現象であると示唆された。これらの結果から、AsA が化学物質暴露の制御物質として欠かせないものである、ということの一端を実験的に明らかにできた。

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 1 件)

1. M. Kawano, S. Uno, J. Koyama, E. Kokushi, A. McElroy: Effects of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons on the early life stages of Japanese medaka. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017. 24. 27670-27677. 査読有

[学会発表](計 6 件)

1. Seichi Uno, Saichiro Yokoyama, Machi Kwano, Emiko Kokushi, Jiro Koyama . Importance and efficiency of ascorbic acid in fish embryo as defensive substance to chemical exposure . SETAC North America 38th Annual Meeting (国際学会). 2017年 .
2. 河野真知、宇野誠一、國師恵美子、小山次朗 . 7,12-ベンズアントラセンキノンのヒメダカ胚に対する影響メカニズムの解明 . 第23回日本環境毒性学会研究発表会 .2017年 .
3. Seichi Uno, Saichiro Yokoyama, Machi Kwano, Emiko Kokushi, Jiro Koyama . Effects of chemical exposures in medaka embryos with deficient condition of ascorbic acid.19th International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (国際学会). 2017年 .
4. Machi Kawano, Seichi Uno, Emiko Kokushi, Jiro Koyama . Toxicity evaluations in Japanese medaka embryos exposed to 1,2-naphthoquinone with metabolomics. 7th SETAC World Congress/ SETAC North America 37th Annual Meeting (国際学会). 2016年 .
5. 河野真知、宇野誠一、國師恵美子、小山次朗 . フトキノンのヒメダカ胚発生と代謝物変動に与える影響 . 第21回日本環境毒性学会研究発表会 . 2015年 .
6. Machi Kawano, Seichi Uno, Jiro Koyama, Emiko Kokushi, Anne McElroy. Effects of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons to the early life stages of Japanese medaka.17th International Symposium on Toxicity Assessment (国際学会). 2015年 .

[その他]

ホームページ: aquatox-kagoshima.com

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇野 誠一 (UNO Seichi)

鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・准教授

研究者番号: 50381140

(2)研究分担者

横山 佐一郎 (YOKOYAMA Saichiro)

鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・助教

研究者番号: 60437952