

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K14522

研究課題名（和文）化学物質暴露時の魚胚内酸化ストレス強度と影響発現に関わるアスコルビン酸の重要性

研究課題名（英文）Assessing the Impact of Ascorbic Acid on Oxidative Stress in Fish Embryos Exposed to Chemicals

研究代表者

國師 恵美子（KOKUSHI, EMIKO）

鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・助教

研究者番号：90714866

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：アスコルビン酸（AsA）は抗酸化物質でもあり軟骨形成にも関与している。先行研究ではヒメダカ胚に酸素化多環芳香族炭化水素類（OxyPAHs）を暴露すると、孵化仔魚の奇形が確認され、OxyPAHsの暴露による酸化ストレスとAsA不足による軟骨形成への影響が起きている可能性が示唆された。そこで本研究課題では、AsAを欠乏胚を作成してoxyPAHsを曝露し、化学物質曝露時に生じる酸化ストレスが胚に現れる影響にどのように関わっているかを検証した。その結果、胚中AsA濃度の減少に伴う感受性の増大が観察された。また、骨形成や血管・心臓に関する奇形誘発率が経時的に上昇しており、酸化ストレスの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで化学物質暴露による形態異常や発生毒性は観察されていたが、それらの酸化ストレスとAsAの胚中濃度を明らかにする研究は行われていなかった。我々は親魚にAsAを欠乏させた餌を作成し、AsA欠乏胚を作成することで、胚中AsAの変動を明らかにするとともに、化学物質への感受性が増大することを明らかにした。本研究結果は、親魚の栄養摂取が化学物質暴露などのストレスへの耐性を高める可能性を示唆しており、養殖魚への餌の工夫やストレス耐性の高い次世代を育成するうえでの技術への知見として貢献できたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Ascorbic acid (AsA) functions as an antioxidant and is also involved in cartilage formation. Previous research showed that exposing medaka embryos to oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (OxyPAHs) resulted in morphological abnormalities in hatched fry, suggesting the potential impact of OxyPAHs-induced oxidative stress and AsA deficiency on cartilage formation. Therefore, this study aimed to create AsA-deficient embryos and expose them to OxyPAHs to investigate how oxidative stress occurring during chemical exposure affects the embryos. As a result, increased susceptibility associated with decreased AsA concentration in embryos was observed. Moreover, there was a temporal increase in the incidence of abnormalities related to bone formation, blood vessels, and the heart, suggesting the involvement of oxidative stress.

研究分野：環境保全学

キーワード：アスコルビン酸 メダカ 魚胚 含酸素多環芳香族 催奇形性

1. 研究開始当初の背景

アスコルビン酸(ビタミンC、以下AsA)は、魚体内での合成が限られており、栄養摂取や外部からの補給が必須な栄養素である。特に、皮膚や軟骨の形成においては不可欠な役割を果たし、コラーゲンの合成に直接関与している。さらに、AsAは強力な抗酸化作用を有し、体内で発生する過剰な活性酸素種(ROS)の産生を抑制し、酸化ストレスから身体を守る機能を担っている。ROSは、化学物質へのばく露や外部ストレスなどの影響により、生体内で大量に生成され、細胞内の酸化ストレスを増大させ、細胞構造や機能に損傷を与える可能性がある。この酸化ストレスは、生体内の脂質、タンパク質、遺伝子などの損傷を引き起こし、さまざまな生物学的影響をもたらすことが知られている。そのため、AsAは生体内での酸化ストレスの緩和に重要な役割を果たし、生体の防御機構において不可欠な栄養素であると考えられている。これまで、申請者の研究者のグループは、ヒメダカの卵に酸素化多環芳香族炭化水素類(OxyPAHs)を連続的にばく露し、その影響を調査した。その結果、OxyPAHsのばく露により、ヒメダカの胚において脊椎骨の湾曲、頭蓋骨の縮小、未発達のおしぼり、管状の心臓など、形態に異常が見られた。これらの形態異常は、酸化ストレスが胚の発生や発育に与える影響を示唆するものであり、特にAsAの重要性を示唆する結果であった。

これまで、魚類とAsAの関連性としては、養殖業などの餌の添加剤として注目されている。しかし、化学物質ばく露時の防御物質としての働きの詳細や、化学物質ばく露によりAsAが過剰消費されたときのコラーゲン形成などに対する影響などについて、断片的に調べられた例がわずかにあるのみである。これまで多くの化学物質の魚類胚ばく露による孵化仔魚の奇形発現報告例はあるが、そのメカニズムのほとんどは明らかにされていない。AsAは生物にとって必須ビタミンであり、生体内での機能を考えると化学物質影響発現を左右する物質であることは間違いない。本研究では、胚中のAsAと化学物質ばく露時により生じる酸化ストレス影響がどのように関わっているかを検証することで魚胚への化学物質ばく露時の孵化魚の奇形発現メカニズム解明のための重要なデータを構築できることが期待できると考えられたのが研究開始当初の背景である。

2. 研究の目的

本研究ではAsAを欠乏させたヒメダカ胚に、oxyPAHsを曝露し、胚中のAsAと化学物質曝露時により生じる酸化ストレス影響がどのように関わっているか明らかにすることを目的とした。特に、化学物質ばく露による胚発生中の生死、孵化日数、孵化仔魚の形態異常と胚中のAsAとの評価を重点的に行った。

3. 研究の方法

AsA無添加の人工飼料を投与したヒメダカ親魚からAsA欠乏胚を採取した。ばく露物質は、先行研究で酸化ストレスを引き起こすことが確認されたoxyPAHsの一種である1,2-ベンズアントラキノン(BAQ)を選定した。また、酸化ストレスのバイオマーカーであるチオバルビツール酸反応物(TBARs)アッセイによってAsA欠乏胚中の脂質の過酸化度を測定した。

ばく露試験は100mLビーカーに卵を10個収容し、毎日換水を行う半止水式で実施し、ばく露濃度は低濃度区は12.8、高濃度区は200µg/Lとし、助剤区も設けた。試験期間は胚中AsA濃度の減少が定常状態に達するAsA不足餌の給餌後4週目までとした。得られた欠乏胚を用いてBAQばく露を行い、ばく露後3,6日目の胚中のTBARsを測定した。ばく露胚中AsA濃度HPLCで各週測定した。

4. 研究成果

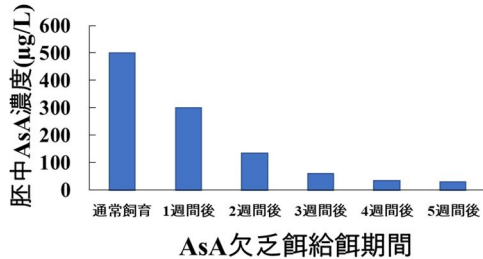
1) AsA含有量の違いによるヒメダカ胚への影響

予備試験では親魚の餌中AsA濃度の違いが受精率や産卵数、卵の発生にどのような影響があるのかを確認した。そのため、AsA含有量がそれぞれ300、30、0mg/kgの人工餌を作成し、AsA含有量以外はすべて同様の条件とした。この餌を親魚に投与して、投与開始後2か月間の産卵数や受精率などを観察する試験を3回行った。その結果、試験開始1か月後からAsA含有量30及び0mg/kg与えた親魚は体色の白色化や突然死が増加する傾向が観察された。特にメス個体は早朝に斃死を確認することが多く、斃死後の個体を解剖すると腹部に卵が詰まった状態のままであり、産卵が困難になることと関係していることが示唆された。哺乳類では、AsAが不足することにより、壊血病といった症状が観察されることが知られているが、魚では壊血病などの明確な知見は得られていない。しかし、本研究で確認されたAsA不足餌を与えた親魚の高い死亡率は、おそらくAsAが十分に吸収できないことにより壊血病と類似した影響が誘発されたことが考えられた。さらにその影響はオスよりもメスでの影響が強く出ている傾向にあった。

また、卵の受精率に関しては、試験期間2か月を通して300、30、0mg/kgの人工餌投与群で

は有意な差は確認できなかった。AsA の存在の有無は卵の受精率には影響しないと考えられる。しかしながら、受精した卵の発生を確認したところ、個体差が大きく有意な差は確認できなかったが、AsA0mg/kg の餌を 1 か月与えられた親魚から得られた受精卵は 40-50% 程度の形態異常が確認された。AsA はコラーゲン形成に欠かすことができない物質であり、AsA 皮膚や膜、軟骨形成は深く関連している。AsA 含有量が 0mg/kg 投与群の親魚から得られた卵は親由来の AsA が不足していると考えられ、胚発生中に体を形成する上での AsA 不足が招いた形態異常なのではないかと考えられる。

そこで、実際 AsA0 mg/kg の餌を与えられた親魚から得られた胚中の AsA 濃度がどの程度なのか、HPLC にて確認を行った結果が以下の通りである (Fig. 1)。



試験開始 0 日目の通常餌で飼育している親魚から得られた胚中 AsA 濃度は約 500 µg/kg であったが、AsA 0 mg/kg の餌に切替えて 1 週間後には 300 µg/kg と急激に減り、2 週間後には 130 µg/kg、3 週間後には 60 µg/kg、4 週間後には 35 µg/kg、5 週間後には 30 µg/kg と検出限界に近い値であった。試験開始から試験終了の 5 週間後まで胚中 AsA 濃度は経時的に減少することが確認できた。

Fig.1 AsA 欠乏餌給餌による胚中 AsA 濃度の変化

2) AsA 不足胚を用いた BAQ ばく露影響

AsA 含有量が 0 mg/kg の人工飼料をそれぞれ 1 週間から 5 週間与えられた親魚から得られた OxyPAHs の 1 種である BAQ にばく露した。ばく露期間は約 20 日程度であり、孵化するまでばく露し、孵化後 3 日目には麻酔をかけて顕微鏡にて形態観察を行った。その死亡率を Fig. 2 に示した。

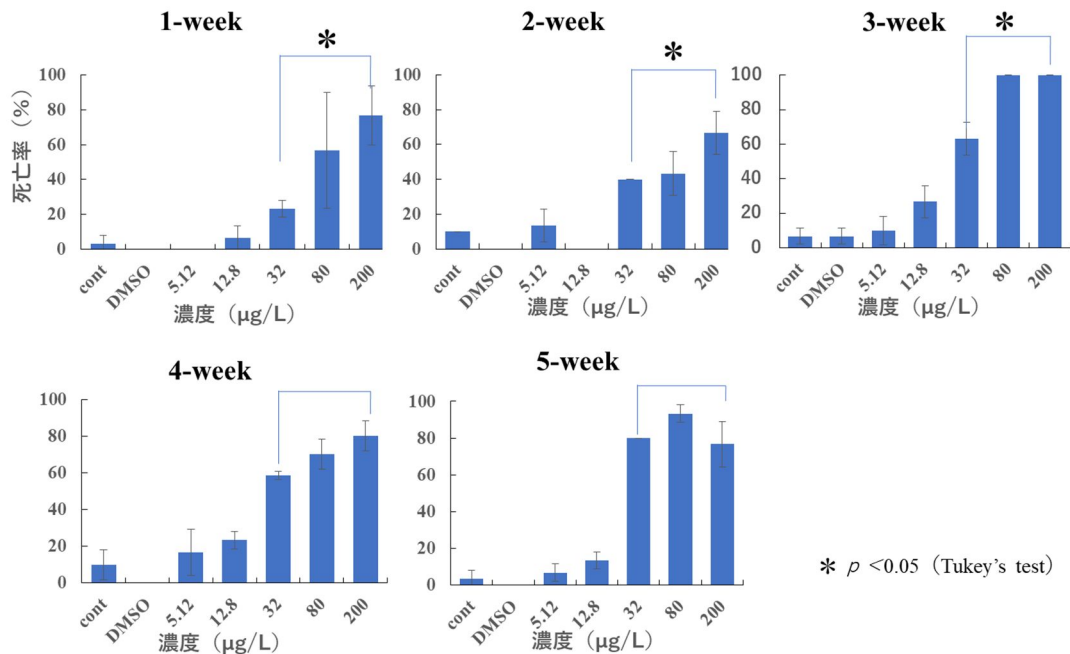


Fig. 2 AsA 欠乏胚への BAQ ばく露による死亡率

AsA 欠乏餌を投与して 1 週間後の受精卵 32 µg/kg 以上のばく露区で対照区と比較して高い死亡率が確認でき、濃度依存的に高くなる傾向であった。これはばく露影響による違いであると考えられた。AsA 欠乏餌投与後 2 週間から 5 週間の死亡率変化をみると 200 µg/kg では 1 週目からあまり死亡率が変化しなかったものの、32 µg/kg 及び 80 µg/kg では AsA 欠乏餌投与期間が長くなるにつれて死亡率が高くなる傾向が観察された。

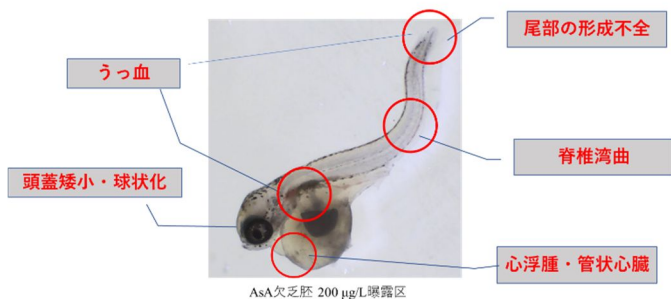


Fig. 3 ばく露により観察された奇形症状

これは、ばく露による影響に加えて胚中の AsA 濃度が低下したことにより死亡率が高まった

ことが考えられた。

同様に、胚の奇形率も顕微鏡にて観察を行った。胚の奇形は孵化後3日目に麻酔をかけて実態顕微鏡で孵化仔魚を撮影して行い、主に頭部、心臓、脊椎、尾部などの形態異常や鬱血などの点において観察を行い、発生頻度を確認した(fig. 3)。その結果を Fig. 4 に示す。

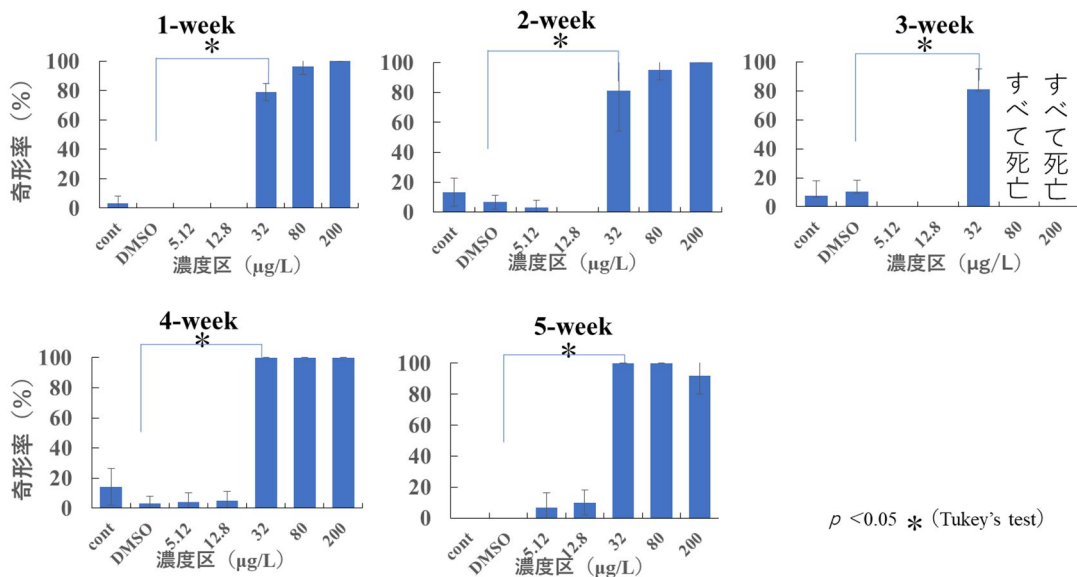


Fig. 4 AsA 欠乏胚への BAQ ばく露による奇形率

AsA 不足胚への BAQ ばく露では、AsA 欠乏餌を投与してから 1 週間後に得られた受精卵を用いて BAQ ばく露を行ったところ、12.8 µg/kg までは奇形が観察されなかったものの、32 µg/kg 以上のばく露区では 80%以上の奇形が観察された。以降、2 週間目から 5 週間目までいずれの週も奇形率においては AsA 欠乏餌の投与期間に応じた変化は、32 µg/kg の暴露区が AsA 欠乏餌の投与期間に応じて奇形率が増加していたことであった。そこで、先行研究において AsA 通常餌により飼育した親魚より得られた胚に BAQ をばく露した際の死亡率と奇形率と今回のそれぞれの結果を比較した図を示した (Fig. 5)

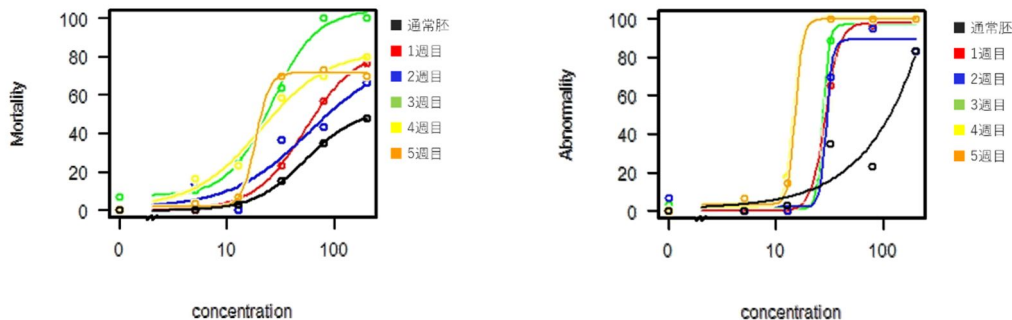


Fig.5 通常胚と AsA 不足胚に対する BAQ ばく露影響比較

この比較した図からは、死亡率は AsA 投与通常胚に比較して AsA 欠乏胚は BAQ ばく露をすると、AsA 欠乏の期間に応じて経時的に感受性が增大している傾向が観察された。一方、奇形率に関しては AsA 不足 1 週目から奇形率の増加が確認され、特に AsA 不足餌投与の 4 週目以降に影響が出ていることが確認できた。さらに、今回 BAQ のばく露をした際に 12.8 µg/kg と 32 µg/kg のばく露区では奇形率に大きな差が観察され、両濃度区の間には奇形症状を呈する閾値がある可能性が示唆された。

本研究では、80 µg/kg と 200 µg/kg では死亡率が高く、観察できた孵化仔魚が少なかったため、32 µg/kg 区での奇形個体について頭部、脊椎、尾部、管状心臓、心浮腫及び鬱血について確認したところ、分散があるもののいずれの形態異常も AsA 欠乏餌の投与期間が長くなればなるほど奇形率が上がる傾向を示した。特に頭部異常は高い発生頻度が確認された。この原因として、胚中 AsA 濃度の減少に伴い、経時的に BAQ ばく露に対する感受性が增大していることが考えられ、その理由として AsAno 抗酸化作用が低下したことによる酸化ストレスによる影響が増加した可能性が考えられた。

3) AsA 欠乏胚を用いた BAQ ばく露による酸化ストレス影響

2)までの結果により、AsA 欠乏胚に BAQ をばく露すると酸化ストレスが原因と考える形態異常が確認されたことから、胚中の AsA と化学物質曝露時により生じる酸化ストレス影響がどのように関わっているかを検証した。酸化ストレスを調べる項目として、膜の過酸化状態を示し、酸化ストレスのバイオマーカーであるチオバルビツール酸反応物 (TBARs) アッセイによって AsA 欠乏胚中の脂質の過酸化度を測定した。その結果、胚中 AsA 濃度の減少に伴う感受性の増大が観察された。また、骨形成や血管・心臓に関する奇形誘発率が経時的に上昇しており、酸化ストレスによる発生毒性への関与が示唆されたものの、TBARs はすべての週で助剤区と有意な差は見られなかった。このことから BAQ 曝露によって生じる酸化ストレスは脂質以外の部分で生じている可能性が考えられた。

本研究により、AsA 欠乏餌を投与した親魚では投与後 1 か月程では親魚自体にも生死にかかわる影響が出ること、また産卵した卵の受精率には影響がないものの、受精した胚の発生過程で死亡率や奇形率があがることが確認できた。これは、発生にともなう生体内での様々な酸化ストレス反応に対応できなくなることが原因と考えられた。さらに、AsA 欠乏胚に化学物質ばく露を行うと胚の死亡率や奇形率はさらに増加することが確認できた。特に、本研究で使用した OxyPAHs などは胚の発生に影響を与えることが知られている化学物質であるが、このような化学物質に AsA が欠乏した胚が暴露されると感受性が増大することが確認できた。この結果は、養殖場など様々なストレスにさらされる魚の試料に AsA の重要性を示す結果であり、今後さらに研究をすすめていく必要性を感じる結果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Emiko Kokushi, Machi Kawano, Tamaki Seki, Chouji Kawai, Miyuki Naruse, Aya Maehara, Jyunta Furukawa, Seiichi Uno
2. 発表標題 Monitoring of parent and alkylated PAHs in sediments of Tokyo Bay, Japan
3. 学会等名 9th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Emiko Kokushi, Miki Yamashita, Machi Kawano, Miyuki Naruse, Tamaki Seki, Chouji Kawai and Seiichi Uno
2. 発表標題 Toxicity evaluations of sediments collected in Ariake sea using embryos of Java medaka (<i>Oryzias javanicus</i>)
3. 学会等名 9th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Machi Kawano, Seiichi Uno, Emiko Kokushi, Jiro Koyama
2. 発表標題 Endogenous effects in embryos of Japanese medaka exposed to oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons
3. 学会等名 SETAC North America 39th Annual Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北條裕也、國師恵美子、内村未来、宇野誠一
2. 発表標題 アスコルビン酸の抗酸化作用を低下させたヒメダカ胚で誘発される酸化ストレス由来の影響に関する研究
3. 学会等名 第2回環境化学物質3学会合同大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鹿児島大学水産学部附属海洋資源環境教育研究センター 環境保全学研究室
<http://aquatox-kagoshima.com/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------