

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22912

研究課題名(和文)殻なし孵化装置を用いた経時的連続観察による新規鳥類胚発生毒性評価法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method for evaluating avian embryonic toxicity by continuous observation using a shell-less incubation system

研究代表者

岩田 久人 (Iwata, Hisato)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授

研究者番号：10271652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリは、鳥類のなかでも入手が容易でゲノムが解読されているため、鳥類の毒性試験のモデル生物となっている。しかしながら、ニワトリ胚は不透明な卵殻内で発生するため、胚への化学物質曝露試験では同一個体の経時的発生毒性を観察することができない。したがって鳥類では、魚類モデル生物であるゼブラフィッシュのように、受精卵への曝露試験によって「いつ、どこに、どのような毒性が生じるのか？」といった詳細な情報を得ることが難しい。本研究では、卵殻がない状態で胚を発生させる装置を毒性学研究に応用し、ニワトリ胚の発生毒性を経時的に観察することに成功した。この装置を使い、ニワトリ胚の発生毒性発現過程を可視化できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学物質の安全性審査には、試験方法等の国際的調和を目指した取組が進められており、OECDにより試験方法の標準化のための「OECDテストガイドライン」(TG)が定められている。日本でも、TGに則った生態影響試験が実施されてきた。しかしながら鳥類に関するTGは、摂餌毒性試験や繁殖試験などいずれも成鳥を対象にした試験で、胚の表現型影響を詳細に調べる試験は含まれていない。本研究が示したように、新たな鳥類試験法によって発生毒性が評価できた学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The chicken has become a model organism for avian toxicity tests, because it is one of the most readily available birds and its genome has been decoded. However, since the chick embryos develop in non-transparent eggshells, it has not been possible to observe the developmental toxicity of the same individual over time in chemical exposure tests. Thus, as in a fish model organism, the zebrafish, it is difficult to obtain detailed information on "where, when, and how toxicity occurs in avian embryos" by exposure tests. In this study, we applied a device that develops embryos with no eggshells to toxicology research and succeeded in observing the developmental toxicity of chick embryos over time. Using this device, we were able to visualize the process of developmental toxicity in chick embryos.

研究分野：環境毒性学

キーワード：ニワトリ 発生毒性 殻なし孵化装置 有機リン酸エステル系難燃剤 鳥類

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ニワトリは、鳥類のなかでも入手が容易でゲノムが解読されているため、鳥類の毒性試験のモデル生物となっている。しかしながら、ニワトリ胚は不透明な卵殻内で発生するため、胚への曝露試験では同一個体の経時的発生毒性を観察することができない。したがって魚類モデル生物であるゼブラフィッシュやメダカのように、受精卵への曝露試験によって「いつ、どこに、どのような毒性が生じるのか?」といった詳細な情報を得ることが鳥類では難しい。近年、卵殻がない状態で鳥類胚を孵化させることが可能な孵化装置が開発された。この装置は大半がホームセンターで購入できる材料で安価に作製できる。申請者は、本装置を毒性学研究に応用すれば、鳥類の発生毒性を経時的に観察できることに気づいた。申請者らのグループは毒性学研究用に改良を重ね、独自に殻なしニワトリ胚の孵化に成功した。この装置を使えば、ニワトリ胚の発生過程を完全に可視化できる。

有機リン酸エステル系難燃剤 (PFRs) は、ヒトや野生生物の健康へ悪影響の可能性のあるために生産・使用禁止が決められた有機臭素系難燃剤 (BFRs) の代替物質として生産・使用されている。塩素含有 PFRs は国内外に生息する野鳥の組織や卵からも検出される。一方、これら塩素含有 PFRs の毒性に関する報告は非常に少ない。

2. 研究の目的

リン酸トリス (2-クロロエチル) (TCEP) は、PFRs の一種であり、難燃剤として繊維製品・工業材料・家具等に使用されている。近年、主要な BFRs の段階的廃止・規制により PFRs の生産・使用が増加している [1]。TCEP は製品に化学的結合していないので環境中に容易に放出され、鳥の組織および卵から検出される [2, 3, 4]。発生中の胚は、細胞増殖が活発で代謝能が低いいため、環境化学物質に対して非常に感受性が高いことが知られている。しかしながら、鳥類胚に対する TCEP の影響に関する研究はほとんどない。鳥類胚は不透明な卵殻内で発生するため、*in ovo* 曝露試験で経時的な胚観察は困難であった。近年、ニワトリ胚の発生を孵化するまで視覚化できる新たな殻なし孵化システムの論文が発表された [5]。本研究では、殻なし孵化システムでのニワトリ胚に対する TCEP 曝露の影響を評価した。さらに、心臓のトランスクリプトーム解析によって心毒性の作用機序の解明を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、ニワトリ有精卵を対照群、TCEP-低濃度 (L) 曝露群 (50 nmol/g 卵)、TCEP-中濃度 (M) 曝露群 (250 nmol/g 卵)、TCEP-高濃度 (H) 曝露群 (500 nmol/g 卵) に分け、孵卵開始時に卵殻に穴を開けて被験物質を投与した。孵卵 56 時間後に卵の内容物を殻なし孵化装置に移した。

殻なし孵化装置は、ポリスチレンプラスチックカップを使用して作製した。ポリメチルペンテンフィルムを凹形状になるように伸長し、カップ上部に設置した。カップ上部からの空気の入りがないようにポリメチルペンテンフィルムを被せて固定した。

ニワトリ胚の各毒性エンドポイントを孵卵 3 日目から 9 日目まで観察した。生存率および各個体の心拍数を調べるとともに、体長・頭+嘴長・眼直径、さらに胚体外血管の長さと同分枝数、赤血球数の指標である胚体外動脈の明度を画像解析ソフト ImageJ で測定した。孵卵 9 日目に胚を解剖し、体重・心臓重量を測定した。

次いで、心臓試料を用いて次世代シーケンス (NGS) 解析・バイオインフォマティクス解析をおこなった。TCEP 処理により影響を受けた生物学的プロセスを予測するために、遺伝子オントロジー (GO) 解析・転写因子エンリッチメント解析・ネットワーク解析・KEGG パスウェイ解析を実施した。さらにターゲットとなる遺伝子を精選し、より正確な発現レベルをリアルタイム PCR で定量化した。

4. 研究成果

(1) 生存率は、TCEP-M と TCEP-H 群では 9 日目にそれぞれ 19.2% と 18.9% で、対照群の 71.1% と比較して有意に減少した ($p < 0.001$)。体重および体長・頭+嘴長・眼直径は、TCEP 曝露群で 3-9 日目に有意な減少が確認されたことから、50 nmol/g 以上の TCEP 曝露は、発生初期から発生遅延の影響があることがわかった (図 1)。

(2) 心拍数は、TCEP-M・TCEP-H 群では 4 日目以降から対照群に比べ低下する傾向が認められた。また、体重に対する心臓重量比は TCEP-H で有意に増加していた。胚体外血管の長さと同分枝数は、TCEP-L では 3 日目、TCEP-M および TCEP-H では 3・4 日目に有意に減少した (図 2)。胚体外動脈の明度に関しては、TCEP-L 群・TCEP-M 群・TCEP-H 群で、それぞれ 3 日目・3~5 日目・4~7 日目に対照群に比べて有意に低い明度を示した。これらの結果は、TCEP に胚を曝露することで赤血球の数が減少することを示唆している。これらの結果より、TCEP 曝露は心血管系に影響を及ぼすことが明らかとなった。

(3) 心臓トランスクリプトームでは、GO 解析により心筋収縮、心室心筋組織の形態形成、および筋芽細胞分化への影響を予測した。転写因子エンリッチメント解析では、TCEP 曝露による NGKB1・SP1・SP3・SMAD4・GLI1・CTNNB1 の活性化が重要な分子開始イベントであると推定した。またネットワーク解析および KEGG パスウェイ解析により、Ca²⁺シグナル伝達および筋原線維スライドに関連する遺伝子の調節不全が示唆された。リアルタイム PCR の結果、RYR2 および MYL3 の遺伝子発現レベルが有意に低下する傾向が認められた。これらの遺伝子の発現変動がニワトリ胚で観察された心血管系毒性の原因である可能性がある。

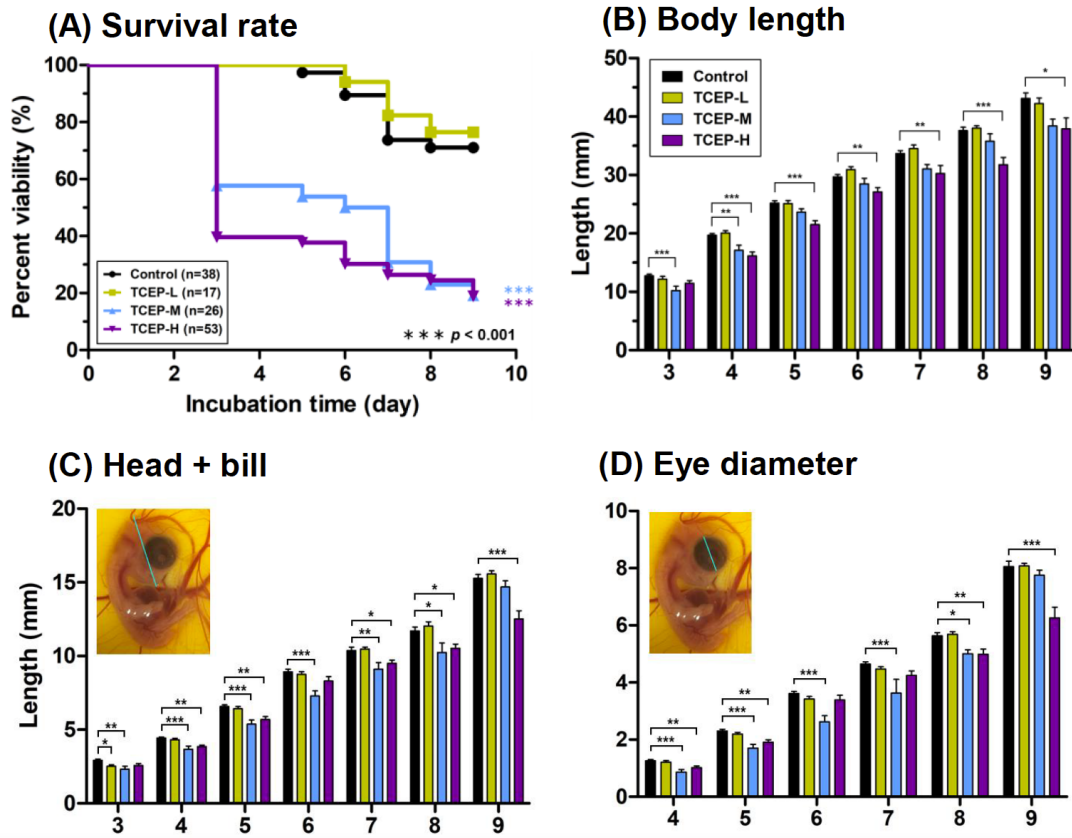


図1 ニワトリ胚の生存率 (A)、体長 (B)、頭部+嘴長 (C)、眼直径 (D) に対する TCEP 曝露の影響。データは平均値±標準誤差で示した。*は有意差を示す (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

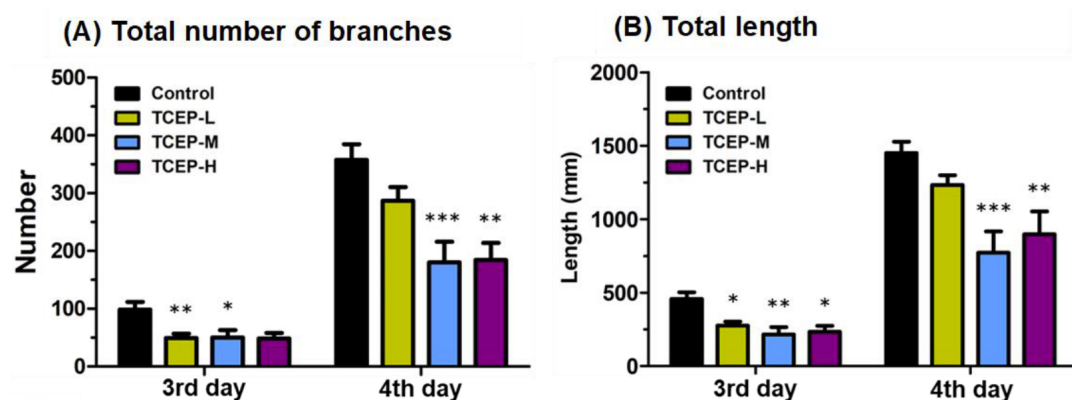


図2 胚体外血管の総分枝数 (A) および全長 (B) に対する TCEP 曝露の影響。データは平均値±標準誤差で示した。*は有意差を示す (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

<引用文献>

- (1) van der Veen *et al.*, *Chemosphere*, 88, 1119–1153, 2012. (2) Greaves *et al.*, *Environ. Sci. Technol.*, 48, 7942–7950, 2014. (3) Guo *et al.*, *Environ. Pollut.*, 237, 499–507, 2018. (4) Verreault *et al.*, *Sci. Total Environ.*, 639, 977–987, 2018. (5) Tahara *et al.*, *Japan Poult. Sci. Assoc.*, 51, 307–312, 2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanda Kazuki、Ito Shohei、Koh Dong-Hee、Kim Eun-Young、Iwata Hisato	4. 巻 207
2. 論文標題 Effects of tris(2-chloroethyl) phosphate exposure on chicken embryos in a shell-less incubation system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ecotoxicology and Environmental Safety	6. 最初と最後の頁 111263 ~ 111263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ecoenv.2020.111263	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Kazuki Kanda, Shohei Ito, Dong-Hee Koh, Eun-Young Kim, Hisato Iwata
2. 発表標題 Cardiotoxicity assessment of tris (2-chloroethyl) phosphate (TCEP) in ex-ovo chicken embryos by in situ observation and transcriptome analysis
3. 学会等名 39th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (DIOXIN2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuki Kanda, Shohei Ito, Dong-Hee Koh, Eun-Young Kim, Hisato Iwata
2. 発表標題 Ex-ovoニワトリ胚におけるリン酸トリス(2-クロロエチル)(TCEP)の発生毒性評価
3. 学会等名 3rd International Chemical Hazard Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuki Kanda, Shohei Ito, Dong-Hee Koh, Eun-Young Kim, Hisato Iwata
2. 発表標題 Developmental effects of exposure to tris (2-chloroethyl) phosphate (TCEP) on chicken embryos by in situ observation and transcriptome analysis
3. 学会等名 Japan-Korea Joint Symposium on Adverse Outcome Pathways: From Exposome to Phenotypic Effects (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mayumi Sakata, Yuka Yoshinouchi, Haruhiko Nakata, Eun-Young Kim, Hisato Iwata
2. 発表標題 In vitro assessment of chicken estrogen receptor transactivation by bisphenol analogs
3. 学会等名 Japan-Korea Joint Symposium on Adverse Outcome Pathways: From Exposome to Phenotypic Effects (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mayumi Sakata, Yuka Yoshinouchi, Haruhiko Nakata, Eun-Young Kim, Hisato Iwata
2. 発表標題 Assessment of in vitro transactivation potencies of chicken estrogen receptor by bisphenol analogs
3. 学会等名 第22回環境ホルモン学会研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuki Kanda, Shohei Ito, Dong-Hee Koh, Eun-Young Kim, Hisato Iwata
2. 発表標題 Cardiovascular toxicity assessment of tris(2-chloroethyl)phosphate(TCEP) in ex-ovo chicken embryos
3. 学会等名 第22回環境ホルモン学会研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takara Fukunaga, Kazuki Kanda, Hisato Iwata
2. 発表標題 Assessment of developmental toxicity of imidacloprid using chicken embryos in shell-less culture system
3. 学会等名 Japan-Korea Joint Symposium on Adverse Outcome Pathways: From Exposome to Phenotypic Effects (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神田宗欣, 伊藤匠平, Koh Dong-Hee, Kim Eun-Young, 岩田久人
2. 発表標題 ex-ovo ニワトリ胚におけるリン酸トリス(2-クロロエチル)(TCEP)の心血管毒性作用機序の解明
3. 学会等名 第44回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mayumi Sakata, Yuka Yoshinouchi, Haruhiko Nakata, Eun-Young Kim, Hisato Iwata
2. 発表標題 In vitro and in silico assessment of the activation of chicken estrogen receptor by bisphenol analogs
3. 学会等名 Society of Toxicology (SOT) 60th Annual Meeting and ToxExpo (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuki Kanda, Shohei Ito, Dong-Hee Koh, Eun-Young Kim, Hisato Iwata
2. 発表標題 Effects on the cardiovascular system of ex ovo chicken embryos exposed to tris (2-chloroethyl) phosphate (TCEP)
3. 学会等名 Society of Toxicology (SOT) 60th Annual Meeting and ToxExpo (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究室ウェブサイト日本語版 http://ecotoxiwata.jp 研究室ウェブサイト英語版 http://ecotoxiwata.jp/en/ 研究室Facebook http://fb.com/101980470429606 岩田久人ORCID record https://orcid.org/0000-0002-6867-0532</p>

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1件

国際研究集会 Japan-Korea Joint Symposium on Adverse Outcome Pathways: From Exposome to Phenotypic Effects	開催年 2019年～2019年
--	--------------------

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		
韓国	Kyung Hee University		