

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 1 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2011～2012
課題番号：	23790677
研究課題名（和文）	水生生物に対する化学物質のイオンチャネルに対する複合影響評価
研究課題名（英文）	Assessment of the combined effect of chemicals on the ion channels of freshwater fish.
研究代表者	
清水 宏泰	(Shimizu Hiroyasu)
	大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：	60340551

研究成果の概要（和文）：

メダカのエラ上皮細胞を用いて水生生物に対する化学物質の影響評価方法を確立しようとした。メダカのエラ細胞の分離、パッチクランプ法によりホールセルモードで電流を観察することは容易であったが、いったん化学物質を暴露するとシーリング率が落ち、画一的・再現性のある結果を得ることは難しかった。イオンチャネルを評価する場合、遺伝子破壊メダカ等によるバイオアッセイを組み合わせるのがよいと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this project was to assess the effect of chemicals on the ion channels of Medaka (*Oryzias latipes*) cells. Epithelial cells from the gill were obtained and the patch clamp method was used to observe whole cell current. Although this observation was not difficult, the condition of the cells deteriorated after exposure to the chemicals, which affected the reliability and reproducibility of the data. Electrophysiological methods appear to be unsuitable for assessing the effect of chemicals on ion channels. Therefore, other assessment methods, such as using gene knock out Medaka, might be explored as alternatives.

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	400,000	120,000	520,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：メダカ、水生生物、化学物質、パッチクランプ、毒性、バイオアッセイ

1. 研究開始当初の背景

産業現場では、膨大な数の化学物質が使用され、有害物質に関して化審法などの法規制がなされている。しかし、毎年 1,000 種類以上の化学物質が新規に登録され、それらの毒性の評価が明らかでないうちに使用されている。化学物質の人体への影響は長年のテーマであり、研究が数多くなされているが、石綿等、発がん性その他毒性の評価は困難であり、評価が不十分なまま化学物質が使用されることが問題となっている。

また、近年、国連 GHS 勧告（化学品の分類および表示に関する世界調和システム）の関連文書等で示された定義等がわが国において導入されているが、人体への影響だけでなく、水生毒性として水生生物、水生環境への有害性についても注意喚起されていることが特徴であり、水生環境への化学物質毒性評価は今後重要なテーマとなると考えられる。この研究の目的は水生生物（メダカ）への化学物質の影響を電気生理学的手法を用いて観察し、評価するものである。

2. 研究の目的

化学物質を使用する際には国連 GHS 勧告により化学物質の水生生物への影響を考慮しなければならないが、その評価を行っている研究はまだまだ少ない。この研究は水生環境への化学物質毒性評価として特に水生生物のイオンチャネルへの化学物質の影響を評価することに主眼をおいたものである。

水生生物はさまざまなものがあるが、魚類

が最も入手が簡単でコストも安く維持も簡単であることよりメダカを使用する。メダカは日本人にとって慣れ親しんだ生物であり、遺伝情報も Web 上で利用可能であることが非常に大きな利点である。さらに遺伝子破壊メダカの作成法も確立されており、遺伝子破壊メダカの作成を行っている研究施設もあることから、それらを組み合わせて日本発のバイオアッセイを確立することができるのではないかと考えた。メダカに対する毒性であれば、公衆衛生的に一般国民も理解しやすく、毒性に対して一定の教育効果も得られるのではないかと考えた。

メダカの臓器において直接、水に触れる部分はエラである。エラは魚類にとって重要な臓器であるが、有害物質の影響を直接的に受ける臓器といえる。また、有害物質のエラへの影響を観察することで有害物質が肝臓での代謝を受けず化学物質の影響を直接的に評価することも可能となる。

特に水溶性化学物質は影響を直接的にエラに影響を与えられ考えられるため、エラの細胞を用いて化学物質暴露によりエラのイオンチャネルに及ぼす影響、イオン輸送変化をパッチクランプ法を用いて電流を直接的に観察することにより評価しようとした。

3. 研究の方法

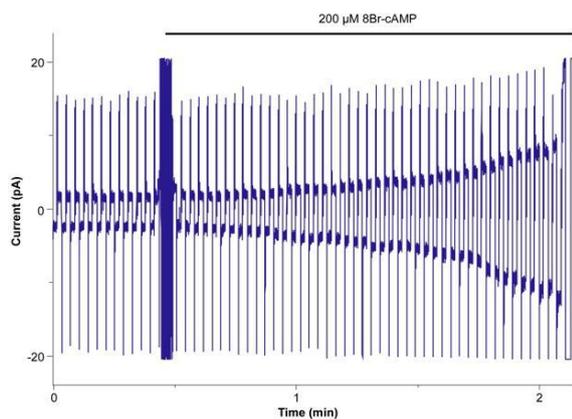
メダカは京都大学から入手し、循環水槽で飼育・繁殖している。メダカを顕微鏡下で解剖し、エラを取り出す。エラの組織塊をコラゲナーゼ、DNase を用いてエラの細胞を分離

する。

分離した細胞には間質系細胞も含まれているため、分離が必要であるが、文献よりエラ上皮の最も外側に存在する Filament epithel を 5HT-4 の存在と、その大きさを評価することが可能であるとされている (Michael GJ et al., 2004)。本研究のオリジナルな部分であるが、自動細胞解析分取装置 (BD FACSaria) を使用して 5HT-4 抗体と TITC でエラ組織よりの細胞を標識し、Filament epithel cell を分取した。採取した細胞をパッチクランプ法で Whole cell 電流を得て化学物質を暴露させることにより毒性評価に使用した。採取した細胞のシーリング率は悪くなかった。下にメダカの Cl

実際に Whole cell mode で Cl⁻電流を観察したデーターを示す(図 1)。

図1. メダカのエラ上皮細胞にcAMPを投与し得られた Whole cell modeにおけるCl⁻イオン電流



4. 研究成果

カドミウム、フッ素を用いてホールセルにて採取した細胞のパッチクランプを行った。カドミウムはCl⁻チャンネルをオープンロッ

クすることを明らかにしたが、その機序は不明である。この原因を解明するためには、カドミウムは蛋白中のシステインの SH 基に結合し生理学的作用をきたすことが示唆された。この実験系ではまずカドミウムにより Cl⁻電流が増加することを示すことができた。この機序を証明するためにはメダカの標的イオンチャンネルの cDNA をプラスミドに組み込み、システインを変異させた cDNA を用いて強制発現系でパッチクランプすること、あるいは遺伝子破壊メダカが必要であると考えられた。結論として電流の変化のみで化学物質の毒性を評価することは困難であった。

フッ素はパッチの取得を困難にさせ、シーリング率を低下させる。フッ素はCl⁻チャンネルにより輸送されることが推定されたため、CFTR 遺伝子の遺伝子破壊メダカを作成しようとした。京都大学より提供を受けた変異を組み込んだメダカの体細胞のゲノムを HRM (熱解離曲線) を用いてスクリーニングを行おうとしたが、メダカは SNP が多く、変異をスクリーニングできる範囲が限られているため最終的に遺伝子破壊メダカの作成を断念した。オープンロックするのみだけでは論文としての報告は難しく、メダカを使用する場合、今回は断念したが遺伝子破壊メダカあるいはゼブラフィッシュを用いて、さらに生化学的な手技を組み合わせることが必須であると考えられた。

パッチクランプ法はハイスループットなバイオアッセイとして用いることは難しいことが予想されたが、やはり難しかった。今後、継続する場合には、メダカの細胞を取得

したのち、それらをいったん培養し、安定した、大量の細胞を用いてパッチクランプ法にて評価すべきであると考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 宏泰 (Shimizu Hiroyasu)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60340551