

論文内容の要旨

論文題目；

「メダカ由来環境水バイオマーカー遺伝子を用いたダイオキシン類及び重金属類の複合影響の評価」

(New method to evaluate environmental toxicities in environmental water using the 20 biomarkers for exposure to dioxin isomers and heavy metals in early developmental stage embryos of medaka (*Oryzias latipes*.)

氏名；半野 勝正

【序論】

現在、わが国で行われている環境中の有害化学物質のモニタリングは、化学分析可能な化学物質を対象として、主に機器分析により行われており、必ずしも実際の生態系を反映したモニタリングとはなっていない。メダカは、OECD/NEA, JISなどで指定された水圏環境の標準試験生物としての歴史があり、実際の環境評価に使われてきたが、現場で実際に利用されている内容は急性毒性（個体の死）、孵化率、奇形の発生などの生体観察のみを指標としたものが主流であった。現在の環境水の状況は、ダイオキシン類等の有機塩素化合物やPFOS (perfluorooctanesulfonate)等の有機フッ素化合物に代表される内分泌攪乱作用物質及びそれらの複合が汚染の主流になり、必ずしも肉眼観察による生物毒性影響の把握だけでは原因物質の解明に辿りつけない状況がある。

本研究の目的は、メダカ胚の生体内における環境水バイオマーカー遺伝子（環境水モニタリングに適した遺伝子）の発現変動を解明することにより、化学物質の複合汚染等に対する生物毒性影響を早期に予知し、その原因物質を推定する手法を開発することである。

第1章では、メダカ卵をダイオキシン類に曝露した場合のダイオキシン類のメダカ卵内への浸透量をGC/MSで測定するとともにメダカ胚の発生段階に現れる発生異常を実体顕微鏡により観察し、その関連性を検討した。第2章では、ダイオキシン類等の環境汚染物質に対しての異物代謝応答の働きで知られているCYP1A1遺伝子の発現誘導と特に哺乳類のダイオキシン類異性体に対する生物毒性の指標とされているTEF（毒性等価係数）との関連性を明らかにした。また、メダカには4種類のAhR (1b-1, 1b-2, 2a, 2b)と1種類のAhRRが存在していることを明らかにした。第3章では、化学物質（ダイオキシン類と重金属類）に24時間及び48時間曝露後のメダカ胚から全RNAを抽出し、メダカcDNAマイクロアレイにより遺伝子発現の誘導と抑制が顕著な「環境水バイオマーカー遺伝子」を網羅的に探索した。第4章では、環境水バイオマーカー遺伝子を用いて複数の化学物質の曝露による生物への複合効果を環境水バイオマーカー遺伝子の発現誘導により評価する手法について検討した。

【結果及び考察】

第1章 メダカ胚発生段階におけるダイオキシン類の生物影響

ダイオキシン類(2378TCDD, 10 μ g/L, 200 μ L)に曝露した場合のヒメダカ胚に蓄積する量をGCMS (ガスクロマトグラフ質量分析)・SIM (Selected Ion Monitoring) 法により定量した。

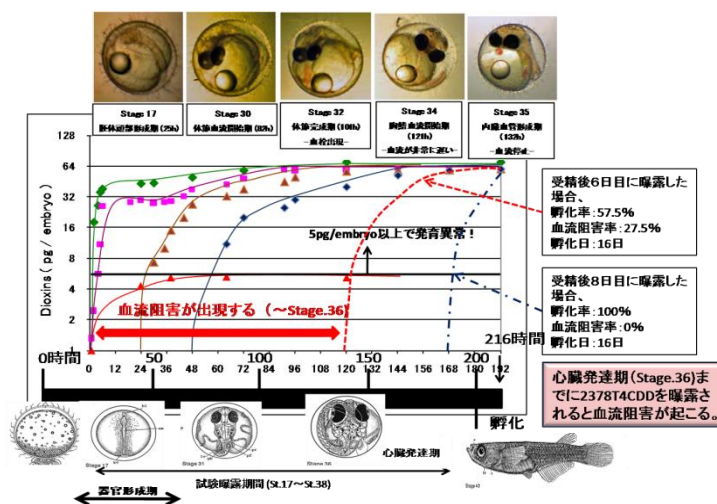


図1 2378TCDD曝露後のメダカ胚への蓄積量変化と生物影響

CYP1A1

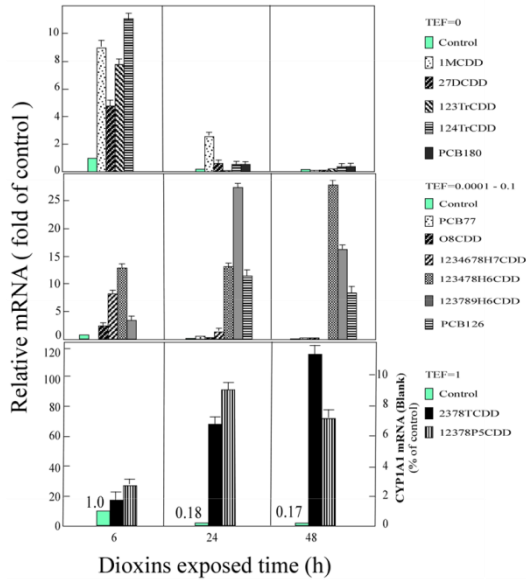


図2 ダイオキシン類異性体曝露によるCYP1A1の発現誘導量

表1 CYP1A1発現誘導量比から算出したダイオキシン類TEF値

Isomer	WHO(2005) ^a	(6hours) ^b	(24hours) ^b	(48hours) ^b
2378T4CDD	1	1	1	1
12378P5CDD	1	1.9	1.9	0.84
123478H6CDD	0.1	0.38	0.21	0.29
123789H6CDD	0.1	0.25	0.54	0.25
Co-PCB(#126)	0.1	-	0.23	0.10
1234678H7CDD	0.01	0.62	0.025	0.0009
Co-PCB(#77)	0.0001	-	0.0109	0.0022
08CDD	0.0003	0.18	0.0015	0.0019
1MCCDD	0	0.60	0.04	0.0005
27DCDD	0	0.30	0.010	0.0004
123TrCDD	0	0.44	0.0009	0.0010
124TrCDD	0	0.63	0.0088	0.0042
PCB(#180)	0	-	0.0078	0.0039

(注) 2378T4CDD曝露によるCYP1A1発現誘導量を1とした場合の各異性体曝露によるCYP1A1発現誘導量。
a: WHO2005TEF (2005年のWHOで制定されたTEF値)
b: 曝露後の時間: 6時間, 24時間, 48時間

2378T4CDDは曝露後6時間(脳・耳胞分化開始期: Stage 20)までに約32 pg程度まで急激に蓄積し、その後24時間後(血流開始期: Stage 25)

まではあまり増加しなくなった。曝露24時間後から再度ゆっくり増加し、最終的には64 pg/胚となった。生物影響として、Stage 32(体節完成期)に尾部に血栓が現れ、Stage 34(胸鰭血流開始期)から血流速度が非常に遅くなり、Stage 35(内臓血管形成期)に血流が停止する発生異常が誘発された(図1)。

第2章 ダイオキシン類異性体曝露によるメダカ胚内のCYP1A1の発現誘導量

13種類のダイオキシン類異性体にStage 17胚を曝露し、6時間、24時間及び48時間後にCYP1A1発現誘導量を調べた(図2; 縦軸は相対発現量を示す)。曝露後24時間及び48時間後のメダカ胚のCYP1A1の発現誘導量比は、哺乳類を対象として算出されたTEF値(ダイオキシン類毒性等価係数)と非常に高い相関性を示し、メダカ(メダカ胚)においても哺乳類と同等の生体異物代謝経路が存在していることが示唆された(表1)。また、この条件下で曝露濃度と発現量に直線関係があり、CYP1A1の発現量は多様なダイオキシン類の影響指標として有用であることが示された。一方、メダカには4つのAhR遺伝子(AhR1b-1, AhR1b-2, AhR2a, AhR2b)と1つのAhRRが存在し、AhR2aとAhRRが、ダイオキシン類曝露に対する発現量が大きいことからダイオキシン類の影響指標として有力なバイオマーカー遺伝子であることが示された。

第3章 cDNA マイクロアレイによる環境水バイオマーカー遺伝子の網羅的探索

表2 バイオマーカー遺伝子間の発現変動量の相関係数R

	CYP1A1	UDPGT	ER-β	AhR1	CACHD1	RAR-α	ER-α	VEGF-R	AGXT	Tropomyosin	MTF1	HSP90	TNF	Ependymin1	CDC37	HSP70	MT
CYP1A1	1	0.8705	0.7968	0.6447	0.2490	0.2293	0.1533	0.2400	0.2990	0.2934	0.3148	0.3263	0.3222	0.2302	0.2573	0.2207	0.1559
UDPGT	0.8705	1	0.8743	0.5064	0.2265	0.4592	0.2720	0.0959	0.5151	0.6234	0.6595	0.4971	0.3630	0.1841	0.2689	0.2328	0.152
ER-β	0.7968	0.8743	1	0.6285	0.9960	0.4832	0.3871	0.2324	0.3208	0.2608	0.3187	0.3959	0.3874	0.3007	0.2404	0.3058	0.1077
AhR1	0.6447	0.5064	0.6285	1	0.5889	0.6675	0.5045	0.4238	0.2045	0.3286	0.4220	0.3545	0.5712	0.4392	0.3772	0.3971	0.2612
CACHD1	0.2490	0.2265	0.9960	0.5889	1	0.6564	0.5547	0.2449	0.1970	0.0927	0.0412	0.2315	0.4686	0.2687	0.1811	0.2768	0.4067
RAR-α	0.2293	0.4592	0.4832	0.6675	0.6564	1	0.8711	0.5578	0.2362	0.1929	0.3514	0.3223	0.7181	0.5174	0.3910	0.4261	0.2371
ER-α	0.1533	0.2720	0.2871	0.5045	0.5547	0.8711	1	0.4801	0.1975	0.1183	0.2298	0.3247	0.6212	0.4814	0.4265	0.3839	0.1718
VEGF-R	0.2400	0.0959	0.2324	0.4238	0.2449	0.5578	0.4801	1	0.5076	0.4687	0.2466	0.2371	0.6264	0.7379	0.6161	0.6251	0.5431
AGXT	0.2990	0.5151	0.3208	0.2045	0.1970	0.2362	0.1975	0.5076	1	0.6606	0.6345	0.5418	0.3617	0.2047	0.0592	0.1288	0.5189
Tropomyosin	0.2934	0.6234	0.2608	0.3286	0.0927	0.1929	0.1183	0.4687	0.6606	1	0.9711	0.6933	0.1860	0.2138	0.0592	0.1319	0.3647
MTF1	0.3148	0.6595	0.3187	0.4220	0.0412	0.3514	0.2298	0.2466	0.6345	0.9711	1	0.7343	0.3061	0.0922	0.0539	0.0707	0.3192
HSP90	0.3263	0.4971	0.3959	0.3545	0.2315	0.3223	0.3247	0.2371	0.5418	0.6933	0.7343	1	0.5882	0.4351	0.539	0.5673	0.2587
TNF	0.3222	0.3630	0.3874	0.4686	0.7181	0.6212	0.6264	0.3617	0.1860	0.3061	0.5882	0.4351	1	0.9133	0.9719	0.9681	0.6699
Ependymin1	0.2302	0.1841	0.3007	0.4392	0.2687	0.5174	0.4814	0.7379	0.2047	0.2138	0.0922	0.4351	0.9133	1	0.9237	0.9125	0.7055
CDC37	0.2573	0.2689	0.2404	0.3772	0.1811	0.3910	0.4265	0.6161	0.0592	0.0539	0.539	0.9719	0.9719	0.9237	1	0.9586	0.7009
HSP70	0.2207	0.2328	0.3058	0.3971	0.2768	0.4261	0.3839	0.6251	0.1288	0.1319	0.0707	0.5673	0.9681	0.9125	0.9586	1	0.7834
MT	0.1559	0.152	0.1077	0.2612	0.4067	0.2371	0.1718	0.5431	0.5189	0.3647	0.3192	0.2587	0.6699	0.7055	0.7009	0.7834	1

表3 バイオマーカー遺伝子4グループの内訳と予測される細胞応答

Group	バイオマーカー遺伝子名	予想される細胞応答
1	CYP1A1, UDPGT, ER-β, AhR1(AhR2a, AhRR), CACHD1	解毒・異物代謝
2	AhR1, CACHD1, RAR-α, ER-α, VEGF-R	性・ホルモン制御
3	VEGF-R, AGXT, MTF1, Tropomyosin, HSP90	細胞増殖制御
4	HSP90, TNF, Ependymin1, CDC37, HSP70, MT	免疫・神経系制御

メダカ胚において多種多様の環境水に特異的に発現誘導する環境水バイオマーカー遺伝子を探索するため、メダカ cDNA マイクロアレイを利用した網羅的探索を行った。ダイオキシン類標準 10 試料、重金属類標準 6 試料と実試料（処分場周辺水）2 試料の計 18 試料から全 RNA を抽出し、36,398 種類のメダカ関連遺伝子及び転写産物を搭載したメダカカスタムアレイ（Agilent 社製）を用いて、曝露後 24 時間及び 48 時間においてコントロール胚との発現比が 2 倍以上、若しくは 0.5 倍以下の特異的発現を示した遺伝子を抽出した。その中からリアルタイム PCR にて特異的発現誘導を確認することができた 18 遺伝子と上記アレイに搭載されておらず既に特異的誘導を確認している 2 遺伝子（*AhR2a*, *AhRR*）の計 20 遺伝子を環境水バイオマーカーとして選定した。アレイから探索された 18 遺伝子間の発現誘導量の相関を調べたところ正の高い相関 ($R>0.5$) を持つ 4 つの遺伝子グループが分類された（表 2），各グループは、表 3 に示すように遺伝子の細胞応答機能に共通性が見られた。

第 4 章 環境水バイオマーカー遺伝子を用いた複合化学物質の生物影響評価

複数化学物質の混合曝露による環境水バイオマーカー遺伝子の発現誘導を確認するため、ダイオキシン類（2378T4CDD, PCB126, 各 0.1 μ g-TEQ/L）と重金属類（Pb : 1mg/L, Hg : 0.5mg/L）の等量混合において曝露時間 48 時間後の「環境水バイオマーカー遺伝子」の発現誘導量をレーダー図に示して検討した。なお、各図の縦軸は、コントロール（DMSO 0.1%）を 1 とした場合の各試験液曝露による遺伝子の相対発現量を示す。最終濃度（2378T4CDD ; 0.1 μ g-TEQ/L + Pb ; 1mg/L）の混合試験液に曝露した場合の複合効果を図 3 に示す。曝露 48 時間後において、第 1 グループの *CYP1A1* と *AhRR* が著しく相乗的に発現が誘導された。

一方、第 2 グループの *ER- α* と *RAR- α* に計算値と比較して明瞭な発現抑制が見られた。これに対して、最終濃度（PCB126 ; 0.1 μ g-TEQ/L + Pb ; 1mg/L）の混合試験液に曝露した場合（図 4）は、*RAR- α* （第 2 グループ）に相乗的な発現誘導が、*ER- α* に計算値と比較して明瞭な発現抑制が認められた。*RAR- α* は胚形成時における血管や骨の形成に大きく関与する遺伝子であることが報告されており（Hayashida et al., 2004），今回の PCB126 + Pb のように *RAR- α* の発現抑制が見られない試料に曝露した胚では、血流阻害はほとんど起こらなかったが、*RAR- α* の発現抑制が見られた試料（例えば 2378T4CDD + Pb）では、血流阻害が発生する胚の割合が非常に高く、生物毒性影響（血流阻害）の発生と高い関連性を示唆していた。

一方、県内の最終処分場浸出水（処分場 B2 水）に曝露した場合の「環境水バイオマーカー遺伝子」の発現誘導パターンとその形状から混入成分と推定された水銀（Hg）とアルミニウム（Al）の発現誘導パターン図を図 5 に示す。処分場 B2 水の化学分析結果は、Al が 3.0mg/L, Hg が 0.01mg/L（排水基準値 ; 0.005mg/L）であった。実際、アルミニウム（Al, 3.0mg/L）と水銀（Hg, 0.01mg/L）

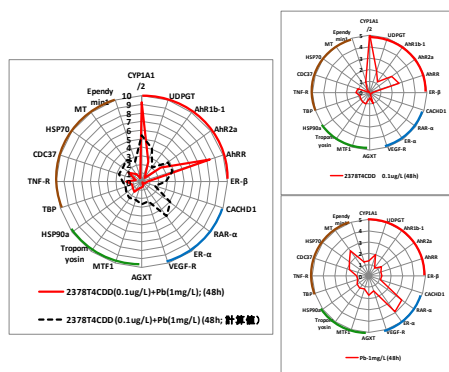


図3 2378T4CDDとPbの複合効果(曝露48時間後)

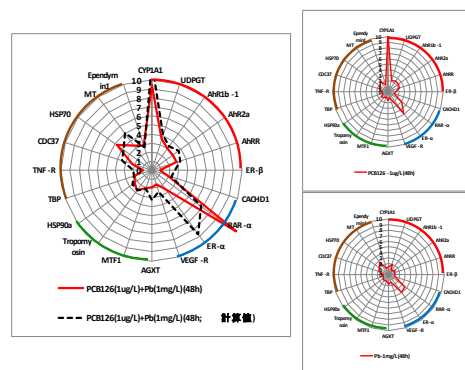


図4 PCB126とPbの複合効果(曝露48時間後)

の各相当量を単独曝露した場合の環境水バイオマーカー遺伝子の発現誘導量から計算した発現パターンと処分場 B2 の環境水バイオマーカー遺伝子の発現パターンを比較したところ、ほぼ同じパターンとなった。また、この結果から Hg と Al の複合曝露によるバイオマーカー遺伝子の発現誘導への影響はないことが推定された（加算性が成立する）。

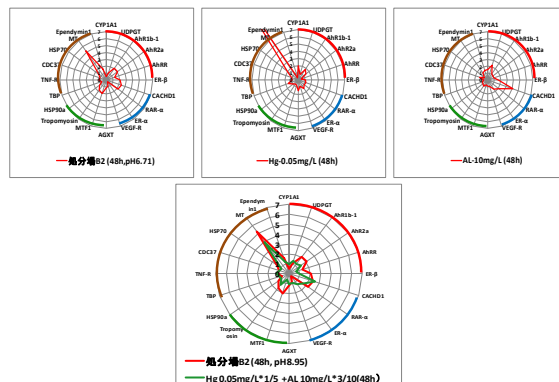


図5 処分場B2水とHgとAlの複合効果(曝露48時間後)

【結論】

本研究の結果、以下のことを新たに明らかにした。

- 1) ダイオキシン類 (2378TCDD) のメダカ卵への浸入パターンは、曝露開始後 6 時間 (脳・耳分化開始期: 20 期) の間に急激に浸透し、その後 24 時間後 (血流開始期: 25 期) から 48 時間後 (体節血流開始期—鰓血管完成期: 30—31 期) までに再度卵内濃度がゆっくり浸透し、最終的には 64pg/egg となり、その後は定常状態となるパターンである。生物影響として、Stage 32 (体節完成期) に尾部に血栓が現れ、Stage 34 (胸鰭血流開始期) から血流速度が非常に遅くなり、Stage 35 (内臓血管形成期) に血流が停止する発生異常が誘発された
- 2) 曝露濃度一定 (1μg/L) 下における *CYP1A1* の相対発現誘導比 (2378T4CDD の発現誘導量を 1 とした場合の他異性体の発現誘導量) は、哺乳類を対象とした算出された TEF 値 (ダイオキシン類毒性等価係数) と非常に高い相関性があり、ダイオキシン類異性体に対する応答性は哺乳類と同等であることを確認した。*CYP1A1* はメダカでも有力な環境水バイオマーカー遺伝子であることが明らかになった。また、メダカには 4 種類の *AhR* (1b-1, 1b-2, 2a, 2b) と 1 種類の *AhRR* が存在している。4 種の *AhR* の中でマイクロアレイに搭載していなかった *AhR2a* と *AhRR* もダイオキシン類 (2378T4CDD) に高い誘導性が認められ、環境水バイオマーカー遺伝子として有用であることが示された。
- 3) メダカ cDNA マイクロアレイを利用して、化学物質標準液及び環境水に一定時間曝露後に特異的に発現変動をする遺伝子の網羅的抽出を行い、合計 20 種類の環境水バイオマーカー遺伝子を選定した。
- 4) 今回選定した環境水バイオマーカー遺伝子の発現誘導を指標とすることにより、化学物質 (ダイオキシン類と重金属類) の混合曝露によるメダカ胚への複合影響の確認と評価及び環境水に混合している化学物質の種類と生物毒性 (血流障害) の推定 (予測) が可能であることが示唆された。

【原著論文】

- 1) Hanno K., Oda S., Mitani H. (2010) Effects of dioxin isomers on induction of *AhRs* and *CYP1A1* in early developmental stage embryos of medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere, 78, pp. 830-839.
- 2) Hanno K., Oda S., Mitani H. Screening of biomarkers for exposure to dioxins and heavy metals : Gene expression analysis in early developmental stage embryos of medaka (*Oryzias Latipes*) using cDNA microarray. (投稿準備中)