

研究課題

ゼブラフィッシュ胚を用いた化学物質の発達神経毒性評価法と高感度バイオマーカーの開発

研究代表者 CHEN Chaobao （帯広畜産大学大学院畜産学研究科博士課程
獣医学専攻 2 年）

共同研究者 久保田 彰 （帯広畜産大学グローバルイノベーション研究センター）

野見山 桂 （愛媛大学沿岸環境科学研究センター）

田上 瑠美 （愛媛大学沿岸環境科学研究センター）

研究背景と目的

中枢神経系に対する毒性は、致死を含む重大影響に直結しうる。とりわけ、化学物質に対する感受性の高い胚発生期における曝露は次世代（胚・胎児）の神経発生に影響を及ぼすことがあるため、発達神経毒性は化学物質安全性評価において重要視されている。また、最近では、増加する子どもの発達障害と化学物質曝露の関係性を示唆する疫学知見も増えてきている。

一方、動物を用いた毒性試験に関する世界的な 3R（代替・削減・改善）の潮流や試験実施にかかる経費および時間といった観点から、化学物質の有害性評価において動物実験代替法の利用を促進する活動が拡大している。こうした中で申請者は、動物福祉に配慮し多数の化学物質をハイスループットに評価できるゼブラフィッシュに注目した。ゼブラフィッシュは、ヒトとゲノム相同性が高いばかりでなく、脳や神経回路の保存性も高いことから神経生物学分野でも重用されている。さらに、曝露胚を用いた各種オミクス解析（トランスクリプトーム・メタボロームなど）により、化学物質の毒性発現機序の解析や高感度なバイオマーカーの開発を行うことも可能である。

本研究の目的は、動物福祉に配慮した新たな発達神経毒性の統合的評価手法をゼブラフィッシュ胚で開発するとともに、神経毒性物質の曝露に応答する高感度なバイオマーカーを開発することである。今年度は、新たに代表的な PFAS を対象として研究を実施した。

研究方法

今年度はまず、帯広畜産大学・久保田の研究室で、ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) およびペルフルオロヘキサンスルホン酸 (PFHxS) を対象に、ゼブラフィッシュ胚 (RIKEN WT 系統) を用いた曝露試験を実施し、行動解析に供試した。このため、発達期間を通した曝露に相当する受精後 4 時間からの継続曝露 (半止水式: 24 時間ごとに全量換水) を行い、受精後 5 日齢の胚仔魚を用いて行動解析を実施した。曝露濃度は、浮袋の膨張不全を誘発しない最高濃度を最大濃度として公比 10 で 3 段階 (PFHxS: 0.1、1、10 μ M、PFOS: 0.01、0.1、1 μ M) (各群 20 匹を 3 セット) とした。行動解析にはビデオトラッキングシステム (Zantiks MWP) を用い、48 ウェルプレートの各ウェルに胚仔魚を 1 匹ずつ投入し、連続明期での運動量 (10 分を 4 セット)、ならびに明暗切替時の明期または暗期での運動量 (10 分を各 3 セット) を測定した。さらに、同様の曝露試験を実施し回収した胚仔魚を用いて、神経関連遺伝子 (*mbp*、 *α 1-tubulin*、*shha*、*gap43*、*syn2a*、*esr2a*、*bdnf*) の発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。

次いで、帯広畜産大学・久保田の研究室で新たに調製した PFOS および PFHxS の各曝露胚の瞬間凍結試料を用いて、愛媛大学沿岸環境科学研究センター・野見山准教授および田上准教授の研究室で、神経伝達物質に及ぼす影響を評価した。このため、一級アミンに特異的に反応する誘導体化試薬「Py-Tag」を用いて、チロシン代謝系の 5 物質 (Dopamine、Norepinephrine、Tyramine、Octopamine、3-Methoxytyramine) およびトリプトファン代謝系の 3 物質 (Serotonin、Tryptamine、5-Methoxytryptamine) の計 8 種を対象とした分析を行った。

研究成果

PFOS および PFHxS 曝露胚を用いた行動解析の結果、いずれも高濃度群 (PFOS: 1 μ M、PFHxS: 10 μ M) で明暗切替時の暗期の行動量は有意に増加した (Fig. 1)。また、PFOS 1 μ M では明暗切替時の明期、ならびに連続明期における行動量の有意な増加が認められた。

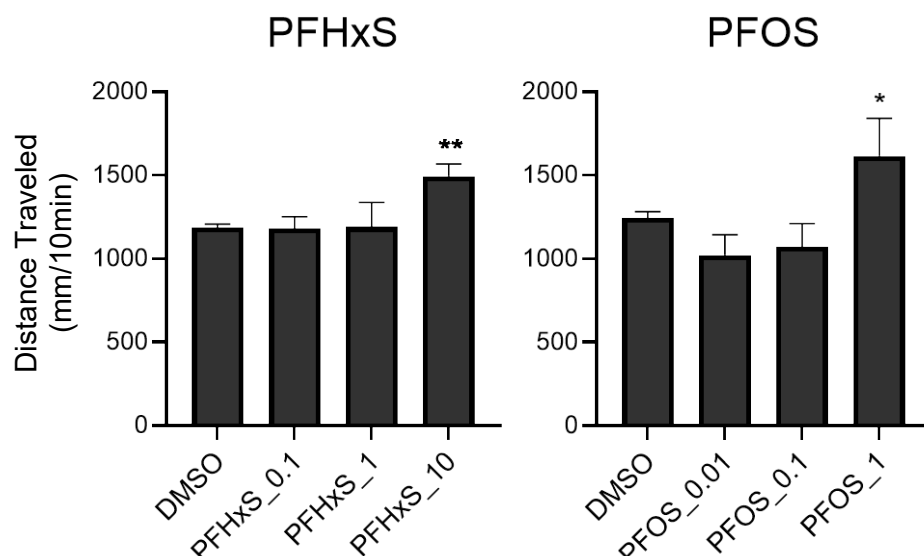


Fig. 1. PFHxS および PFOS 曝露胚仔魚における明暗切替時の暗期の行動量（横軸の PFAS 濃度の単位は μM ）

各曝露群につき、正常な浮袋の膨張が確認できた受精後 5 日齢の稚魚 12 匹を 48 穴プレートの各ウェルに 1 匹ずつ投入し、行動解析装置 Zantiks-MWP を用いてデータを取得した。これを 3 プレート用意してデータを取得し、平均 $\pm$ 標準偏差（ $n=3$ ）で図示した。

神経関連遺伝子の発現変動に関する結果を Table 1 にまとめた。PFOS および PFHxS の曝露胚では、脳内の神経細胞保護、神経細胞の成長と分化、シナプス可塑性に関与する神経栄養因子をコードする *bdnf*、神経新生の制御に関わるエストロゲン受容体 *esr2a*、神経伝導や神経細胞保護に関連する遺伝子である *mbp* の発現量が、いずれも有意に増加した。一方、発達中の軸索および樹状突起における微小管細胞骨格の重要な構成要素となる *α 1-tublin* の発現量は、いずれも有意に低下した。また、神経発生に不可欠であり軸索再生のマーカーでもある *gap43* の発現量は PFOS で増加し、神経伝達に関連する遺伝子である *syn2a* の発現量は PFHxS で増加した。以上より、PFOS および PFHxS 曝露胚で誘発された発達神経毒性は、神経細胞構造の形成、分化および再生の阻害、次いで起きる神経伝達の障害が寄与している可能性が示された。

Table 1 受精後 96 時間の PFOS および PFHxS 曝露胚仔魚における神経関連遺伝子の mRNA 発現量

Chemical	Concentration (μM)	Genes						
		<i>bdnf</i>	<i>esr2a</i>	<i>shha</i>	<i>α1-tublin</i>	<i>mbp</i>	<i>gap43</i>	<i>syn2a</i>
DMSO	0	1.0 ± 0.12	1.0 ± 0.076	1.0 ± 0.10	1.0 ± 0.10	1.0 ± 0.16	1.0 ± 0.11	1.0 ± 0.092
PFHxS	1	1.1 ± 0.12	1.2 ± 0.028	1.0 ± 0.083	0.84 ± 0.044	1.2 ± 0.088	1.1 ± 0.11	1.2 ± 0.34
	10	1.1 ± 0.078	1.1 ± 0.052	1.1 ± 0.059	0.85 ± 0.10	1.3 ± 0.037	1.1 ± 0.047	1.5 ± 0.13**
	100	1.9 ± 0.12***	1.3 ± 0.11*	1.1 ± 0.012	0.77 ± 0.043**	1.4 ± 0.071*	1.1 ± 0.048	1.5 ± 0.19**
PFOS	1	1.2 ± 0.17	1.1 ± 0.20	0.96 ± 0.088	0.91 ± 0.12	1.1 ± 0.21	0.96 ± 0.11	0.98 ± 0.12
	10	2.5 ± 0.46***	1.3 ± 0.20**	1.1 ± 0.090	0.91 ± 0.078	1.4 ± 0.29*	1.2 ± 0.041*	1.2 ± 0.080
	100	5.0 ± 0.35***	1.4 ± 0.087***	1.0 ± 0.060	0.47 ± 0.060***	0.76 ± 0.11	1.5 ± 0.083***	1.3 ± 0.15

各遺伝子の発現量は DMSO 群の値を 1 とする相対値で示した (平均 ± 標準偏差、n=4)。スタリスクは Dunnett 多重比較検定で DMSO 群と比べて有意差が認められたことを示す (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$)。

神経伝達物質への影響の評価では、PFOS および PFHxS 曝露胚の高濃度群において、Tyramine、Octopamine、3-MT、Serotonin、Tryptamine の濃度が有意に増加した (Fig. 2 に示す)。

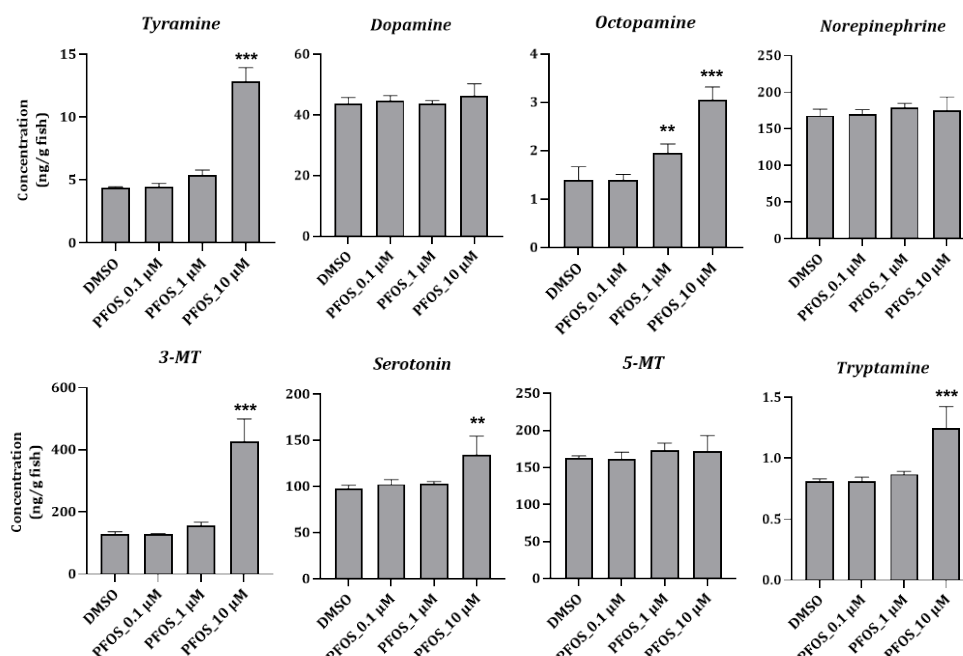


Fig. 2. PFOS 曝露胚仔魚における神経伝達物質およびその前駆体、代謝物の濃度 (平均 ± 標準偏差、n=4)。

ゼブラフィッシュの稚魚において、明期から暗期への急激な移行は活動の増加を引き起こし、稚魚が環境に慣れるにつれて活動量はその光下でのベースラインのレベルまで低下する (Burton et al., 2017,)。ゼブラフィッシュ胚仔魚へのエタノール曝露によって暗期の多動性がみられた研究では、コントロール群では暗期の行動量が徐々に低下した一方で、曝露仔魚の暗期の行動量低下は僅かであり、著者らは馴化に問題が生じた可能性を挙げた (MacPhail et al., 2009,)。したがって、本研究で認められた行動量の増加は、曝露した PFAS が胚仔魚に対し環境馴化の遅延を引き起こしたことに起因すると推察された。Dopamine は、行動の順応に必要なプロセスに寄与する線条体皮質回路機能の主要な調節因子として作用する。ゼブラフィッシュ胚仔魚への PFOS と D1 アゴニストの共処置により、PFOS 曝露でみられた多動性が修正された (Spulber et al., 2014,)。また、多動性を引き起こす主な変化は、行動抑制の欠如であることが示唆されており、Serotonin および Dopamine がこの制御に関連する。本研究でみられた PFOS 1 μ M および PFHxS 10 μ M における行動量増加は、抑制の欠如によるものとも考えられる。神経伝達物質とその前駆体や代謝物の濃度の増加と多動の関連性についてはさらなる検証が必要である。

今後の課題

スルホン酸系 PFAS である PFOS および PFHxS は、ともにゼブラフィッシュ胚で多動を誘発し、類似の神経関連遺伝子の発現変動プロファイルおよび神経伝達物質等の変動プロファイルを示した。こうした結果を踏まえ、今後は構造の異なる多様な PFAS (例：カルボン酸系、ヘキサフルオロプロピレンオキシドダイマー酸等) を対象に、曝露胚仔魚を用いて行動－遺伝子発現－神経伝達物質濃度を解析することで、発達神経毒性の構造的特徴と毒性発現機序の異同を考察する。得られた成果は学会等で発表するとともに、国際学術誌に英文として投稿する予定である。