

学 位 論 文 要 旨

氏 名	河野真知
題 目	含酸素多環芳香族炭化水素類のヒメダカ胚中代謝攪乱と奇形誘発に関する研究 (Disturbance to metabolic profiles and malformation in Japanese medaka embryos exposed to oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons.)

含酸素多環芳香族炭化水素類 (oxyPAHs) は、酸素原子がベンゼン環と二重結合により結合した構造を持つ。oxyPAHs は自動車などの排気ガスから直接大気に排出される他、多環芳香族炭化水素類が光や微生物等によって酸化されて生成する。そのため大気中のみならず、河川水や底質の水環境や貝類などの水生生物中からも検出例があり、場所によっては高濃度で検出され、水生生物への影響が懸念されている。しかし、これまで行われた oxyPAHs の影響研究は哺乳類に対するものがほとんどであり、水生生物に対する影響はあまり分かっていない。そこで本研究では、化学物質に対して感受性が高い魚類胚に数種の oxyPAH を個々に暴露し、胚または孵化後の仔魚が受ける影響を顕微鏡観察などによって詳細に調べると共に、暴露された胚の発生段階における代謝物変動およびその攪乱をとらえて、観察された個々の影響と代謝物変動の関連性から、奇形仔魚誘発など、oxyPAHs によって引き起こされる魚胚への影響メカニズムの解明を目的とした。

最初に、4 種類の oxyPAHs を対象とし、まずヒメダカ胚に水暴露したときの影響の有無とその形態を顕微鏡下で観察した。その結果、ヒメダカ胚には様々な影響が現れたが、その影響は個々の oxyPAH に依存した特異的な影響と、全 oxyPAHs に共通した影響に大別された。例えば、胚の卵黄の陥没、油球の黒化、発生の遅延及び停止などは個々の oxyPAH 特有の影響であり、孵化仔魚のブルーサック症候群 (管状心臓や水浮腫、頭蓋の委縮等) 特有の奇形仔魚の出現はどの oxyPAH 暴露でも共通して観察された影響であった。

oxyPAHs はヒメダカ胚に様々な影響を与えることが明らかになったため、アミノ酸や糖類などの生体内代謝物の変動を捉えるメタボロミクス手法により、oxyPAHs 暴露されたヒメダカ胚中の特異的な代謝物変動を調べて、その影響発現機序を予測した。その結果、暴露された胚中ではアスコルビン酸の過剰消費やコラーゲン生成のプロリン-ヒドロキシプロリンに関連した代謝攪乱、エネルギー代謝攪乱、アンモニア代謝の遅延などが起きており、これらの代謝攪乱が上記で確認された oxyPAHs 暴露の胚への影響に大いに関連していると予測された。

メタボロミクスの結果を受けて、その解析結果から予測された影響発現機序が実際に oxyPAHs 暴露胚中で起こっているのかを確認するために以下の試験を行った。まず、コラーゲンは軟骨を形成する主成分であり、その形成にアスコルビン酸は欠かせない。よって oxyPAHs に暴露された胚中アスコルビン酸やプロリン-ヒドロキシプロリンの代謝攪乱は、胚発生期や孵化仔魚期の軟骨形成や奇形誘発に関連している、と予測した。oxyPAHs を暴露した胚から孵化した仔魚の軟骨を染色し軟骨形成不全を調べたところ、頭部や尾部の軟骨欠損が認められた。また、胚発生中のヒドロキシプロリンを測定したところ、有意な減少も確認された。この結果から、暴露胚中ではコラーゲン生成が正常に行えず、軟骨形成不全が起こっていることが示唆された。アスコルビン酸は強い抗酸化作用を持つことも知られており、その過剰消費は oxyPAHs 暴露された胚中で深刻な酸化ストレスが起こっていると予測された。そこで、脂質とタンパク質に対する酸化ストレスを調べたところ、oxyPAHs 暴露時に脂質、タンパク質が有意な酸化損傷を受けていることが明らかになった。これらの酸化損傷は暴露開始から直ちに認められたため、胚の発生を妨げるだけでなく、特に胚発生中の臓器や器官、その他の形成に重篤な影響を及ぼしていると考えられた。その他、oxyPAH に暴露された胚中の ATP 生成量変動を調べたところ、胚発生後期に急激な ATP 減少が認められ、この減少が胚の発生や孵化への遅延に繋がったと考えられた。さらに暴露期間中、胚中のアンモニア量を測定したところ、暴露初期から有意なアンモニア濃度上昇が確認された。アンモニアの毒性は強いいため、過剰なアンモニアの生成は胚への影響を増大させたと考えられた。