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

河野 真知 2019 年 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される。しかし、oxyPAHs の影響は哺乳類に対する知 見がほとんどであり、水生生物に対してはあまり分かっていない。

本研究では、化学物質に対して感受性が高い魚類胚に oxyPAHs を暴露し、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。

本研究では主に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を顕微鏡下で観察した。その結果、個々のoxyPAHs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。胚の卵黄の陥没、油球の黒化、発生の遅延及び停止などは特定の物質にのみ見られた影響であるが、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)はどのoxyPAHs 暴露でも共通して観察された。

胚への影響をさらに詳しく調べるために oxyPAHs 暴露した胚の生体内 代謝に対する影響をメタボロミクス解析により調べた。その結果、アスコルビン酸やヒドロキシプロリンの変動からコラーゲン形成に対する影響を始めとする様々な影響が生じていたのではないかと予測された。これらの影響が実際に 胚中あるいは孵化仔魚で起こっているか、検証を進めた。

コラーゲンは軟骨を形成する主成分であることから、oxyPAHs が軟骨形成に何らかの影響を与えているのではないかと予測して、oxyPAHs を暴露した胚から孵化した仔魚の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、胚中コラーゲン中のヒドロキシプロリンの減少も確認されたことから、oxyPAHs 暴露により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。その他にグルタミン酸やアスパラギン酸などの変動から過剰なアンモニア生成が予測され、oxyPAHs に暴露された胚中アンモニア量を実際に測定したところ有意な上昇を確認した。

本研究ではその他にも、oxyPAHs 暴露された胚中の過酸化脂質やカルボニル化タンパク質といった、酸化ストレスマーカーの有意な上昇を確認し、暴露によって脂質やタンパク質が酸化損傷(酸化ストレス)を受けていたことを見出した。また、oxyPAHs が暴露された胚中では、oxyPAHs が明らかに CYP1Aの代謝を受けていることを確認した。

ABSTRACT

Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (oxyPAHs) are directly discharged into the atmosphere with exhaust gas from the diesel engine automobiles and industries, and are also generated through photo-oxidation and/or microbial metabolism of parent polycyclic aromatic hydrocarbons. Because oxyPAHs have diversity of forming process, they distribute widely in environment and are not exception in aquatic environment. They are already known to cause the gene toxicities in fish embryos. However, the studies for their toxicities to aquatic organisms have been limited, although several effects of them to mammals were already well-known. Therefore, in the present study, we examined the effects to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos exposed to 4 individuals of oxyPAHs by the observations with microscope, metabolomics approach, and biochemical method. At last, the affected mechanisms in the embryos exposed to oxyPAHs and larvae were also explored.

The embryos exposed to individual oxyPAH showed the characteristic effects with each substance dependence; for example, caving in yolk sac, blackened oil droplet, and underdevelopment in medaka embryos. The exposures of any oxyPAHs also caused the poor development of cephalic part, unabsorbed and hypertrophied yolk-sac, tubular

heart as blue-sac syndrome and other symptoms. These effects for the hatching larvae were too serous to swim well.

Metabolomics approach with GC/MS predicted that ascorbic acid and hydroxyproline, which are absolutely essential components for the collagen synthesis, decreased in the embryos exposed to oxyPAHs. In fact, poor formations of the cartilage were confirmed especially in the cephalic and caudal part of hatching larvae. Hydroxyproline composed collagen also decreased, and could form the deficient collagen in the embryos. Metabolomics also suggested that the excess ammonia existed in embryos exposed to oxyPAHs. This phenomenon was also confirmed by the measurement of ammonia in the embryos. Excess ammonia can cause the serious toxicities in organisms. The embryos exposed to oxyPAHs could affect to the ammonia, and cause the severe effects including deformations in the hatching larvae.

The present study could show that the embryos exposed to oxyPAHs were induced the oxidative stress in lipid and protein. These oxidative stresses could also cause the serious effects in embryos exposed to oxyPAHs. In addition, we could confirm that oxyPAHs could be metabolized by CYP1A. Until now, although the possibilities of xenobiotics metabolism by embryos were not well-known, their oxidative metabolism possibly causes the gene toxicities even in fish embryos.

目次

目沙	۲.	•	• •	• •	• •	•	•	• •	•	•	•	•	•	• •	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	1
第 1	章	Î į	諸言																											
	1.	1	含酸	檢素多	環	芳香	族	炭	化	水素	長類	頁と	は	•	•	• •		•	•	•	•	•	•	•	•		•	, •	•	• 7
	1.	2	本研	肝究の)目(的•	•	•	•	•	• •		•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	10
第 2	2 章	בֿ إ	顕微	鏡下	で観	察	され	しる	O	xy]	PA]	Hs	<i>(</i>)	ヒノ	メゟ	ブナ	胚	に	対	す	る景	影	酄							
	2.	1	目的	j • •	•		•	•	•	•		•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 1	11
	2.	2	実騎	方法	<u>:</u> •		•	•	•	•		•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• :	12
		2. 2	2. 1	試薬	₹•		•	•	•	•		•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 1	12
		2. 7	2. 2	予備	討試	験・	•			•			•	•	•	•		•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	• 1	12
		2. 2	2. 3	影響	點點	験・	•			•			•	•	•	•		•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	• .	14
		2. 2	2. 4	oxyl	PAH	[s 0)暴	:露	開想	始其	朝と	:影	響	発	現	レィ	ベル	\ (T)	関	係	に	関	す	る	検	証	•	•	•	15
		2. 2	2. 5	水中	10	oxy	PA	Hs	濃	度	測定	定の	つた	め	の	前	処理	里と	:分	祈	· •	•	•	•	•		•	•	•	17
		2. 2	2. 6	統計	上解本	折・				•			•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• [18
	2.	3	結果	₹••	•					•			•	•	•	•		•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	• [18
		2. 3	3. 1	予備	試調	験の	結	果	•	•		•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	• [18
		2. 3	3. 2	試騎	水	中の) O	хуF	PΑΙ	Is :	濃月	变•	•	•	•	•	•			•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	19
		2. 3	3. 3	胚の)発	生中	ルこ	観	察	され	てた	5 02	xyF	PAI	Hs	の:	暴調	喜 景	彡響	۲. آ	•	•	•	•	•	•	•	•	• :	20
		2. 3	3. 4	oxyl	PAH	Is を	魚	.胚	に	暴調	露し	た	.後	ļ	孵化	'匕1	した	- 仔	·魚	に	現	れ	た	影	響	•	•	•	• ′	22

		2.	3. 5		oxy	PA.	Hs	0)	E	C1	0	لح	EC	C 5 () 0	つ彩	圣月	了多	乏什	匕•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 2	24
		2.	3. 6		暴詞	露開	射始	期	と	影	響	発	現	と	そ	の	進	行	に	関	す	る	検	証	•	•	•	•	•	•	•	•	• 2	24
	2.	4	考	察			•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		• 2	27
第 3	章	î	メタ	7	ドロ	3:	クフ	スル	<u>-</u> J	こる	51	乙学	全物	勿貨	景	ź雤	雪	平征	[j 0])楨	這角	Ė												
	3.	1	目	的	j •		•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•				•	•	•	•	•	•	•	•	• 3	80
	3.	2	実	験	方	去•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 3	31
		3.	2. 1		試	槧•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 3	31
		3.	2. 2		予(備記	除	·	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 3	31
		3.	2. 3		メ	タオ	ĭП	111	ク	ス	に	ょ	る	腎	影	響	評	価	の	た	め	の	暴	露	試	験	•	•	•	•	•	•	• 3	32
		3.	2. 4		採	录•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•		•	•	•	•			•	•	•	•	•	• 3	3
		3.	2. 5		代詞	射物	加測	定	(D)	た	め	の	前	処	理	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 3	34
		3.	2. 6		代詞	射物	加測	定	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 3	35
		3.	2. 7		デ	ータ	'処	理	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•			•	•	•	•			•	•	•	•	•	• 3	35
		3.	2. 8		統詞	計解	檌		•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 3	86
	3.	3	結	果	とき	考察	-	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 3	86
		3.	3. 1		予(備記	 、験	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 3	86
		3.	3. 2		ゲ、	ンタ	! ?	イ	シ	ン	暴	露	にに	ょ	る	腎	臓	組	織	損	傷	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 3	37
		3.	3. 3		血液	夜性	生状	•	•	•	•	•	•	•			•		•				•	•	•			•	•	•	•	•	• 4	10

3. 3	3. 4	メタ	ボロ	ミクン	スに、	よる	ゲン	タ	マノ	イシ	ン	の景	/響	評	価	•	•	•	•	•	•	•	• 41
3. 4	まと	:め・		• • •				•	•		•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 45
第4章 >	メタス	ボロミ	クス	によ	る o	xyPA	AHs	の l	ニメ	ダ	力月	丕中	~(の暑	影響	聖言	平信	Б					
4. 1	目的	J••		• •				•	•		•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 47
4. 2	実験	方法		• • •				•	•				•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 47
4. 2	2. 1	試薬		• • •				•	•		•		•	•	•	•	•	•	•	•	•		• 48
4. 2	2. 2	メタ	ボロ	ミクス	ス影	響評	価の	た	めの	り暴	露	試懸	争•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 48
4. 2	2. 3	水中	の oxy	/PAH	s濃	度測	定の	つた	め	の育		理。	と分	祈	•	•	•	•	•	•	•	•	• 50
4. 2	2. 4	代謝	物測定	它のか	こめ(の前	処理	と	分析	斤・	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 50
4. 2	2. 5	水中	濃度の	のデー	ータタ	処理		•	•		•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 51
4. 2	2. 6	代謝	物のう	デーク	夕処3	埋お	よひ	解	析		•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 51
4. 3	結果	およ	び考察	矣•				•	•		•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 52
4. 3	3. 1	試験	水中の	の濃度	主•			•	•		•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 52
4. 3	3. 2	主成	分分析	斤の角	军杆剂	結果		•	•		•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 53
4. 3	3. 3	ANQ	のメ	タボ	ロミ	クス	解析	斤に	によ	る景	影響	評化	置•		•	•	•	•	•	•	•	•	• 54
4. 3	3. 4	BAQ	のメ	タボ	ロミ	クス	解机	斤に	によ	る景	 ど 響	評化	画•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 58
4. 3	3. 5	PHQ	のメ	タボロ	コミ	クス	解材	介に	よる	る景	/響	評估		•	•	•	•	•	•	•	•		• 60
43	8 6	NAO	のメ	タボ	ロミ	クス	、解末	斤に	· 上	ろ星	 杉	ない イングラング アイス・アイス かいしょう かいしょう かいし	픎•			•	•	•			•	•	• 61

第 5 章	xyPAHs のヒメダカ孵化仔魚に対する奇形誘発メカニズムの検証(骨形成に
着目し、	骨形成異常の調査)
5. 1	目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・64
5. 2	実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・65
5.	2.1 試薬・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・65
5.	2.2 軟骨染色のための暴露試験・・・・・・・・・・・66
5.	2.3 軟骨染色・・・・・・・・・・・・・・・・・・・67
5.	2.4 ヒドロキシプロリン濃度測定のための暴露試験・・・・・・・68
5.	2.5 胚中のヒドロキシプロリン濃度測定・・・・・・・・・69
5.	2.6 胚中のタンパク質濃度測定・・・・・・・・・・・・71
5.	2.7 統計解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 71
5. 3	結果および考察・・・・・・・・・・・・・・・・72
5.	3.1 軟骨染色・・・・・・・・・・・・・・・・・・72
5.	3.2 ヒドロキシプロリン濃度・・・・・・・・・・・74
第6章	xyPAHs のヒメダカ胚に対するその他の影響の検証
6. 1	目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・75

4.4 まとめ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・62

5. 1	2	-	美 思	険フ	了法	- •	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	76
(6.	2.	1	部	大薬	इं •	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	76
(6.	2.	2	Е	RC	D	活'	性(の7	たし	め	か :	暴	露	試	験	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	77
(6.	2.	3	Е	RC	D	測;	定	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	78
(6.	2.	4	酉	夋化	゚゚゚゙゚゙゚゙゚゙゚゙゚゙゚゚゙゙゙゙゙゚゚゙゙ヹ゚゚゙゚	<u>۲</u>	レ	ス	則知	定	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	79
		6.	2.	4.	1	TE	BAI	RS	測	定	つ	た	X,) T,)泰	影露	結	詠	ì.	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	80
		6.	2.	4. 2	2	TE	BAI	RS	測	定	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	81
		6.	2.	4.	3	力	ル	ボ	二)	レイ	化	タ	ン	パ	ク	質	測	定	の	た	め	の :	暴	露	試	験	•	•	•	•	•	•	•	82
		6.	2.	4.	4	力	ル	ボ	二)	レイ	化	タ	ン	パ	ク	質	測;	定	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	82
(6.	2.	5	A	TP	測	定	の7	たと	め	の碁	录	露	試	験	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	84
(6.	2.	6	A	ТР	測	定	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	84
(6.	2.	7	フ	アン	⁄モ	二	ア	測定	定	カカ	F- (め	の	暴	露	試	験	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	85
(6.	2.	8	フ	アン	⁄モ	二	ア	農月	变剂	則定	定	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	85
(6.	2.	9	糸	包計	- 処	理	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	86
5.	3	洕	古具	果ま	3L	び	考	察	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	86
(6.	3.	1	E	RC	D	活'	性	とこ	L)	ネノ	レ	ギ	_	生	成	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	86
(6.	3.	2	酉	夋化	゚゚゚゙゚゙゚゙゚゙゚゙゚゙゚゚゙゙゙゙゙゚゚゙゚	<u>۲</u>	レ	ス	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	89
		6.	3.	2.	1	脂	質	のj	過酉	酸個	化	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	90
		6	3	2	2.	タ	ン.	ノペ	ク旨	質の	Dì	品	酸	化	•	•				•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•		91

		6. 3. 2	2. 3	oxyF	PAHs	暴露	によ	. り 訝	ら 得さ	られる	一酸化	<u> </u>	トレ	スに	.関う	よる:	考察	关•	• 93
	6.	3. 3	エネ	ベルギ	一生	.成•						•	• •		•	• •	•		• 94
	6.	3. 4	アン	/モニ	アの	過剰	生成	およ	こびそ	一の他	1の景	/響	• •		•		•		• 97
第7章	Î	総合	考察。	とまる	とめ・	• • •	•	• •	• •	• •				•	• •		•		101
図表・	•		• • •										•				•	•	102
謝辞																			

参考文献

第1章 諸言

1.1 含酸素多環芳香族炭化水素類とは

代表的な環境汚染物質である多環芳香族炭化水素類(PAHs)は、主たる石油 構成成分の1群であり、ベンゼン環を二つ以上有する物質群である。PAHs による環 境汚染には、石油流出事故による汚染が挙げられ、タンカーの座礁などによりタンカ 一の燃料油(重油)などが水域に流出した際には結果として油中に含まれる PAHs に よって、周辺海域のみならず、場合によっては広範囲の水域にさえも高濃度で拡散さ れることがある。また、PAHs は木材、ゴムやプラスチック等をはじめとする、あら ゆる有機物の不完全燃焼時にも、非意図的に生成する。この生成過程における PAHs の最たる発生源は自動車や工場の煙や排ガスであり、これらから排出された排気ガス 中には一定濃度の PAHs が含まれている。排気ガス由来の PAHs は主として大気汚染 源として注目されることが多い。しかし、燃焼に伴って放出された PAHs は、大気中 に排出・拡散された後、降雨や大気からの直接沈降など、様々な経路から水域に入る 可能性が考えられる。特に、都市部や大規模工業地域に接する沿岸域における PAHs 分布はこのような排気ガス由来の PAHs に大きく依存すると考えられる。 PAHs の多 くは疎水性が強く、一度水域に入ると、ゆっくりと水中を沈降して海底質にやがて到 達する。そのため、水中よりも海底質から高濃度で検出される傾向にある。

PAHs の生物に対する影響は多岐にわたる。特にベンゾ (a) ピレンのように

我々人間をはじめとして様々な生物に対して変異原・発がんを引き起こすものが数種知られており(Straif et al. 2005)、これらは魚類に対しても同様の影響を引き起こすことが既に多くの研究から明らかにされている(Cheikyula et al. 2008)。魚類に対してはその他にも、胚時期のPAHs 暴露により奇形を呈する仔魚の孵化や、脳の神経発達を妨げるなど、多岐にわたる影響が報告されている(Incardona et al. 2004; Barron et al. 2004; Caris et al. 2008)。

PAHs は、難分解性ゆえに、一度環境中に放出されると長期にわたり残留する傾向にある。環境中に放出された PAHs の一部は光や微生物等により酸化されるなどして、様々な PAHs 派生物となる。その派生物の 1 つが含酸素多環芳香族炭化水素類(oxyPAHs) である。oxyPAHs は、PAHs を形成するベンゼン環に酸素原子が二重結合で結合した形状を持ち、特に酸素原子を 2 つ有するものはキノンと称される。oxyPAHs は PAHs が酸化されて生成される他に、ディーゼルエンジンや工場などの煙中に混入して、直接大気中に排出される。また、不完全燃焼時にも PAHs と同時に生成されることも報告されている(Layshock et al. 2010)。oxyPAHs が環境汚染物質の 1 つとして注目され始めたのは、ごく最近であるが、これは人々の大気汚染への関心が高くなり、oxyPAHs が様々な毒性を有する PAHs の構造と共通点が多いことに起因すると考えられる(Oda et al. 2001; Delgad-Saborit et al. 2013; Alam et al. 2013)。

oxyPAHs はディーゼル排気ガス中の微粒子に含まれる物質の中でも特に毒性が強い物質群の1つかもしれない、と考えられている(角等、2007; Lundstedt et al. 2007;

Gurbani et al. 2013)。大気へ放出された後、燃焼由来の PAHs と同様に oxyPAHs も最終的に水系に到達することが推測されるが、oxyPAHs は PAHs よりも水溶性が高い傾向にあり、環境水中に到達後は拡散されやすいのではないかと考えられるが、その動態を詳細に調べた例はない。oxyPAHs の水系中の分布は、海水や河川水、底質などを対象としてモニタリング及び報告がなされている。さらには魚や貝類などの水生生物中の検出例も報告されており、これらの結果から考えても、広く水環境中に分布しているということが示唆される。(Machala et al. 2001; Itoh et al. 2005; Brorstrom et al. 2008; Layshock et al. 2010; Bandowe et al. 2014; Qiao et al. 2014)。

oxyPAHs はこれまで大気汚染物質として注目されることが多かったため、生物に対する影響研究は我々人間を想定した哺乳類を対象としたものが多い。哺乳類内に取り込まれた oxyPAHs は、薬物代謝を受ける過程や受けた後に遺伝子毒性を誘発して発癌を促す可能性があることや、酸化還元反応を受けて体内で活性酸素種を生成して DNA や脂質、タンパク質を酸化損傷することが報告されている(Durant et al. 1996; Misaki et al. 2007; Layshock et al. 2010; Santos et al. 2013; Katsnelson et al. 2014)。

一方、水生生物への影響はほぼ未知であったが、近年ゼブラフィッシュ胚や、ヒメダカ胚を用いた研究により魚類胚に対する oxyPAHs の影響例が報告された(Knecht et al. 2013; Dasgupts et al. 2014)。これらの研究によると、PAHs よりも低い濃度の暴露下で胚の死亡が確認された。また、死亡せずに孵化した場合でも、ヨークサックの肥大や管状心臓、頭蓋の委縮などの形態異常を呈する、ブルーサック症候群に類似した奇形

を有する仔魚が孵化することが確認された。上記の奇形仔魚は、PAHs を魚類胚に暴露したときに観察される影響と類似していることが指摘された。

このように魚類対する oxyPAHs の影響の報告例が散見され始めたが、その影響はいまだ未知な部分が多く、影響発現メカニズムに関しては全く知られていない。 oxyPAHs の発生経路と環境存在量などから考えると今後、さらに詳細に水生生物に対する影響を明らかにされるべきである。そして、その結果次第では、今後、oxyPAHs の環境中での残留、排出に関する行政的な規制の設定なども図る必要があるかもしれない。

1.2 本研究の目的

上述したとおり、oxyPAHs の特に水生生物に対する影響研究は、まだ始まったばかりであり、未知な部分が多い。しかし、水環境中への流入経路も種々様々あると考えられ、さらにその水環境中濃度分布もPAHsと同等であるとする調査例もある。よって、さらに oxyPAHs の水生生物に対する影響研究を進め、今後の水環境保全に貢献するデータを構築すべきだと考えた。そこで、本研究では魚類の中でも感受性が高く、oxyPAHs に対する影響の一部が既に報告されている胚に注目し、oxyPAHs が魚類胚へ与える影響を胚中の代謝物変動の異常からとらえると共に、その変動と奇形誘発との関連を調べた。さらにその代謝物変動から予測された影響が、実際に体内で起こっているか検証し、これら全てを通して oxyPAHs の魚類胚に対する影響メカニズ

ムの一端を解明することを目的とした。

第2章 顕微鏡下で観察される oxyPAHs のヒメダカ胚に対する影響

2.1 目的

これまで水生生物に対する PAHs の毒性について、多くの研究がなされてい る。例えばベンゾ (a) ピレンによるマミチョグの DNA 損傷 (Nacci et al. 2002)、ヒ メダカの免疫機能の抑制(Carlson et al. 2002)、ニジマスの臓器において細胞壊死や骨 の催奇形性 (Hose et al. 1984)、ジベンゾジオフェンやフェナントレンによるゼブラフ イシュ胚の心拍異常、及びピレンによる貧血や末梢血管の欠陥、神経細胞の壊死 (Incardona et al. 2004) などが挙げられるが、その他にも様々な影響が数多く報告さ れている。一方、oxyPAHs に対する魚類への影響例はあまり知られていない。第 1 章で既に述べたが、oxyPAHs を魚胚に暴露すると、PAHs 暴露時に類似した影響が観 察された報告例がある(Machala et al. 2001; Lundstedt et al. 2007; Dasgupta et al. 2014)。 これらの結果は、oxyPAHs も PAHs と似たような毒性を持つ可能性が示唆されるもの である。しかし、魚胚に対する oxyPAHs の影響でさえも、情報が限られているため、 PAHs との影響類似性なども証明できるまで至っておらず、さらに詳細な暴露影響を 明らかにする必要がある。そこで本章では、oxyPAHs の中から市販されていて入手可 能な5種類、アセナフテンキノン(ANQ)、7,12-ベンズアントラセンキノン(BAQ)、 1,4-ナフトキノン (NAQ)、9,10-フェナントレンキノン (PHQ)、1,4-クリセンキノン (CHO) をヒメダカ胚にそれぞれ水暴露したとき、どのような影響が顕微鏡下で確 認できるか調べることを目的とした。

2.2 実験方法

2.2.1 試薬

アセナフテンキノン(ANQ)は Sigma-Aldrich Japan、7,12-ベンズアントラセンキノン(BAQ)、1,4-ナフトキノン(NAQ)、9,10-フェナントレンキノン(PHQ)、1,4-クリセンキノン(CHQ)は東京化成工業株式会社製を用いた。試験水に各 oxyPAHsを添加するときには N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)(和光純薬工業株式会社)を助剤として使用した。水中濃度把握のための分析では、(N+1)0、本サン(残留農薬試験用)、ジクロロメタン(残留農薬試験用)、硫酸ナトリウム(無水)(試薬特級)を和光純薬製、内部標準物質のクリセン-(1)0 とアントラセン-(1)1 Cambridge Isotope Laboratoriesのものを使用した。

2.2.2 予備試験

oxyPAHs がヒメダカ胚に対して影響を及ぼす濃度を調べるために ANQ、BAQ、NAQ、PHQ、CHQ それぞれについて、以下の条件で予備試験を行った。

予備試験の暴露濃度はそれぞれの水溶解度(ANQ:90.14 mg/L、BAQ:0.2885 mg/L、307.95 mg/L、PHQ:7.5 mg/L、CHQ:0.6179 mg/L)を参考に以下のように設定した:

ANQ: 0.1, 1, 10, 100, 1000, 5000 μg/L

BAQ: 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50, $500 \mu g/L$

NAQ: 3, 9, 27, 80, 400, 1000, 2500 μ g/L

PHQ: 20, 50, 100, 200, 400, 80, 1000 μg/L

CHQ: 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50, $500 \mu g/L$).

飼育水には、エアレーションで1日曝気して脱塩素を行った水道水を高圧蒸気滅菌器 (HA-300MIV、HIRAYAMA) で加熱滅菌し、その後、十分量の酸素を添加したものを使用した。各 oxyPAHs を DMF に溶解して調製し(標準原液)、この標準原液を飼育水に各設定濃度になるように添加した。このとき、助剤の DMF の水中濃度は 100 μL/L となるようにした(飼育水 100 mL に対し、10 μL 添加)。ANQ は暴露区の設定濃度の一部が水溶解度を超えている可能性が考えられたため、1000 μg/L と 5000 μg/L の両暴露区には飼育水 100 mL に対し 50 μL の DMF を添加して暴露試験を行った。また飼育水に DMF のみ添加した助剤区と、oxyPAHs 及び DMF も添加しない飼育水のみの対照区もそれぞれ用意した。

ガラス容器に飼育水 100 mL を入れ、そこに受精直後の胚を 10 個ずつ収容したものを 3 つ用意した。ここに各 oxyPAHs が設定濃度になるように添加し、ヒメダカ胚が孵化するまで暴露を継続した。ガラス容器は 24℃ に設定したインキュベータ内に収容し、暴露開始から孵化後 3 日目までインキュベータ内で飼育した。光周期は

14 時間:10 時間(明:暗)に設定した。試験水は毎日全量換水し、換水前後に水温、pH、DOを測定した(水温:24.1±0.4°C、7.5±0.2、DO:5.5±1.7 mg/L)。換水後は三眼実体顕微鏡(STZ-171-TLED、島津理化)で胚、あるいは仔魚を観察し、その時死卵が確認されれば速やかに取り除いた。孵化仔魚は oxyPAHs と DMF を含まない飼育水に移し、孵化後3日目まで顕微鏡下で観察を行って、仔魚への影響も調べた。

2.2.3 影響試験

影響試験は、予備試験の結果を参考に暴露濃度を設定した。濃度は以下の通りである:

ANQ: 320, 800, 1000, 2000, 5000 μ g/L

BAQ: 5.12, 12.8, 32, 80, 200, $500 \mu g/L$

NAQ: 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 μg/L

PHQ: 50, 100, 200, 400, 800 μg/L

なお CHQ は、予備試験の結果全く影響が見られなかったので、対象物質としなかった。 試験水は、2.2.2 項と同様に DMF に溶解した 0.0 oxyPAHs を飼育水に添加し調製した。助剤の DMF の水中濃度も、予備試験と同様に 1.00 0.0

暴露区の設定濃度の一部が水溶解度を超えている可能性があり、特に 1000 、2000、5000 μg/L の量暴露区は飼育水 100 mL に対し 50 μL の DMF を添加して試験水を調製した。暴露区と同時に、飼育水に DMF のみ添加した助剤区と、何も添加しない飼育水のみの対照区もそれぞれ用意した。

暴露は基本的に 2. 2. 2 項に準じて行った。飼育水 100 mL に対し受精直後のヒメダカ胚を10個ずつ収容したものを5つ用意し、孵化まで各 oxyPAHsに暴露した。各容器は 24°C に設定したインキュベータ内に収容し、暴露開始から孵化後 3 日目までインキュベータ内で飼育した。光周期は、14 時間:10 時間(明:暗)に設定した。試験水は毎日全量換水し、換水前後に水温、pH、DO を測定した(水温:24.0±0.5°C、pH:7.4±0.1、DO:5.3±1.2 mg/L)。孵化仔魚は oxyPAHs と DMF を含まない飼育水に移し、孵化後 3 日目まで三眼実体顕微鏡下で観察を行い、その形態をそれぞれMoticam 2.0 で撮影し、その写真を用いて詳細に奇形などを観察した。影響試験における観察項目は、死亡数、孵化数、孵化日数と胚の発生過程で何らかの影響が観察された胚の数などを調べた。また、奇形を呈した孵化仔魚数も調べた。

2.2.4 oxyPAHs の暴露開始期と影響発現レベルの関係に関する検証

通常、化学物質の影響を調べるための魚類胚の暴露試験では、産卵された当日、あるいは翌日から胚に化学物質を暴露することが多い。そのため、暴露開始時期や暴露期間が異なった場合や、その暴露期間に応じた影響レベルの差異が生じるのか、

などの検証はこれまでほとんどなされていない。そこで本研究では、暴露開始期、及び暴露期間を通常の試験とは異なった形に設定して oxyPAHs を胚に暴露し、そのとき oxyPAHs が胚に与える影響が異なるのか、といった点を検証した。

2.2.3 項と同様に、ANQ、BAQ、NAQ、PHQ の 4 物質を対象に以下のように 暴露試験を行った。まず、2.2.3 項試験から得られた結果より、本試験の暴露濃度は 2.2.3 項の試験で、胚中に何らかの影響が確実に観察できた濃度に設定した。すなわ ち、ANQ: $5000\,\mu\text{g/L}$ 、BAQ: $500\,\mu\text{g/L}$ 、NAQ: $200\,\mu\text{g/L}$ 、PHQ: $400\,\mu\text{g/L}$ とした。

まず、2. 2. 3 項で行ったようにヒメダカ胚を受精後数時間放置し、発生が進むものを選択し、即日暴露を開始した。暴露期間に応じて暴露群を分け、それぞれ暴露期間が 24 時間(1 日間)に限る区を E-1、2 日間暴露した区を E-2、3 日間暴露した区を E-3 とした。E-1~E-3 はそれぞれ暴露後、oxyPAHs を含まない飼育水に移し、孵化まで飼育を続けた。また、一般的にヒメダカ胚中で臓器が形成されるのは受精後4日目程度までと考えられるが、本研究では受精後4日目までは oxyPAHs を含まない水中でヒメダカ胚を飼育し、受精後4日目から孵化まで暴露を行う暴露群も設けた(E-4)。これも孵化した仔魚は飼育水に移し、孵化後3日目に三眼実体顕微鏡下で観察を行ってその影響を調べた。

各暴露区ともに飼育水 100 mL に対し受精直後の胚を 10 個ずつ収容したものを 3 つ用意した。各容器は 24°C に設定したインキュベータ内に収容し、暴露開始から孵化後 3 日目までインキュベータ内で飼育した。光周期は、14 時間: 10 時間(明:

暗)に設定した。試験水は毎日全量換水し、換水前後に DO、pH、水温を測定した(水温:24.4±0.7°C、pH:7.4±0.1、DO:5.3±0.8 mg/L)。換水後は三眼実体顕微鏡 (STZ-171-TLED、島津理化)下で観察をし、死卵を取り除いた。孵化仔魚は孵化後3日目まで三眼実体顕微鏡下で観察を行い、影響を調べた。観察項目は2.2.3項と同様のものに設定した。

2.2.5 水中の oxyPAHs 濃度測定のための前処理と分析

試験対象とした oxyPAHs の水中濃度を測定するために、換水前と換水後にそれぞれ試験水を採水した。採水した試験水 30 mL にジクロロメタン 10 mL を加え、振とう機で 15 分間振とうした後、ジクロロメタン層(下層)だけを採取し、この有機層から無水硫酸ナトリムで脱水した。この操作をもう 1 度繰り返し、2 回目得られたジクロロメタン層を 1 回目の抽出液に併せた。この併せた抽出液を 40℃ で加温しながら、約 0.3 mL まで窒素ガスで濃縮した。濃縮後、ヘキサンを 3 mL 加え、また約 0.3 mL まで窒素ガスで濃縮する、という操作を 2 回繰り返し、溶媒をヘキサン置換した。置換後、各抽出液をそれぞれ 1 mL また 0.1 mL になるように窒素ガスでさらに濃縮した。その際に内部標準物質(アントラセン・d₁0 とクリセン・d₁2)の濃度が最終的に 100 μg/L となるように添加した(1 mL に対し 1000 μg/L を 100 μL、0.1 mL に対

に添加した。標準液と試験水から得られたサンプルは、GC/MS で測定した。GC/MS は Agilent Technologies 社製の 7890A のガスクロマトグラフに 5975C 質量分析装置を装着したものを用いた。カラムは DB-5MS(30 m×0.25 mm、膜厚 0.25 μ m、Agilent Technologies)を使用し、測定は SIM モードで行った。注入口温度と検出器温度はともに 270°C に設定した。カラム温度は 60°C で 1 分間保持し、その後 30°C/min で 60°C から 300°C まで昇温し、12 分間保持した。サンプルと標準液はオートサンプラ (7693Series)により 1 μ L をパルスドスプリットレスモードで注入した。

GC/MS から得られたクロマトグラムから ANQ、BAQ、NAQ、PHQ のピーク 面積値を算出した。ANQ、NAQ、PHQ は、アントラセン- \mathbf{d}_{10} のピーク面積値で補正 し、BAQ はクリセン- \mathbf{d}_{12} のピーク面積値で補正した。補正した標準液のピーク面積値 から検量線を作成し、各物質の試験水中の濃度を算出した。

2.2.6 統計解析

影響試験における観察項目の死亡数、孵化日数、胚の発生で影響が観察された胚の数、奇形仔魚数など、それぞれの観察項目に対して、対照区との有意差を調べるためにダネットの多重比較により検定した。ダネット検定は SPSS 14.0J(IBM 社)により、有意水準 5%で行った。また観察項目の死亡数や胚の発生で影響が観察された胚の数、奇形仔魚数全てを含めて「影響」と定義し、どれか 1 つでも観察されれば「影響」とした。定義した影響に対してダネット検定を行い、有意差が見られた一番

低い濃度を最小影響濃度 (LOEC)、有意差が見られなかった一番高い濃度を無影響

濃度(NOEC)として求めた。さらに毎日観察された影響数を数え、10%影響濃度

(EC10) と半数影響濃度 (EC50) の経日変動を Ecotox ver2.6d を用いて求めた。EC10

と EC50 の経日変動の算出は、対照区で 90%以上の孵化が観察された孵化日までを対

象とした。

2.3 結果

2.3.1 予備試験の結果

予備試験では対照区と溶媒区ともに、試験に用いた全ての胚が孵化した。ま

た CHQ を暴露した胚には何も影響が見られなかった。この結果より、CHQ では以後

の影響試験を行わなかった。NAQでは $400 \mu g/L$ 以上の暴露濃度で全ての胚で死亡が

観察された。またPHQでは800 µg/L以上の濃度で全ての胚で死亡が観察された。ANQ

では 5000 µg/L の濃度で 95%の胚が死亡した。一方、BAQ では 500 µg/L の濃度で 50%

の胚から孵化したが、孵化仔魚は全て何らかの形態異常を呈していた。これらの結果

を参考に最高濃度をそれぞれ、

ANQ: $5000 \,\mu g/L$

 $BAQ:500 \mu g/L$

 $NAQ: 400 \mu g/L$

20

 $PHQ:800 \mu g/L$

に設定し、さらなる影響試験を行うことにした。それぞれの oxyPAHs について最高 濃度から影響が観察されなかった濃度まで公比を 2 または 2.5 倍に設定し、5 または 6 濃度暴露区を設定した。

2.3.2 試験水中の oxyPAHs 濃度

測定された試験水の各 oxyPAHs 水中濃度を Table. 1 に示した。BAQ、NAQ、PHQ の実測値は設定値と近かったが、ANQ での 1000 μg/L 以上の区では設定値の半分程度の実測濃度だった。これは、ANQ は他の物質に比べ設定濃度が高かったことと、特に高濃度区の試験水で水溶解度をはるかに超えたために全てが試験水に溶解していなかった可能性があったと考えられた。しかし、ANQ を初め、全ての oxyPAHsで暴露期間中に大きな水中濃度変化はなかったため、実測値を使用して、以降は解析を行った。

2.3.3 胚の発生中に観察された oxyPAHs の暴露影響

予備試験に引き続いて行った本試験では、対照区および溶媒区での暴露期間中の胚中、及び孵化後の仔魚には何も影響が確認できなかった。それに対し、暴露区では予備試験と同様の影響が観察された。このとき観察された影響の出現比率を

Table. 1 に示した。暴露によって観察された死亡数は、ANQ では 1113 μ g/L 以上の暴露区で有意差があった。また BAQ では 64.4 μ g/L、NAQ では 74.3 μ g/L、PHQ では 155 μ g/L 以上の暴露区で有意に増加していた。

各 oxvPAHs に観察された影響、異常の概略を以下に示す。ANO の暴露最高 濃度区、2720 μg/L 暴露区では暴露開始後 2 日目から 21 日目までの間、特定の成長段 階で死に至る、ということはなく、断続的に少数ずつの死亡が確認され、最終的に 93%の胚が死亡した。特にこの最高濃度暴露区では、対照区や溶媒区の孵化日よりも 2倍以上の期間、孵化することなく胚のままの状態で生存しているが、その後、多く が孵化できずにそのまま死亡した。また胚発達中に卵黄の部分が徐々に陥没していく 症状 (Fig. 1a-1) が ANQ 暴露群で特異的に観察された。 例えば、水中濃度が 2720 μg/L 暴露区において暴露後5日目から卵黄部分が陥没し始め、その陥没は徐々に大きくな った。その他の発生中の影響として、暴露後4日目に頭蓋の委縮やうっ血(Fig.1a-2)、 脊椎の湾曲、6日目から7日目には管状心臓や心浮腫が観察された。573 µg/Lと1113 μg/L 暴露区では、暴露後 4 日目に同じような頭蓋の委縮が観察され、暴露後 8 日目 にはうっ血や脊椎の湾曲が観察された。これらの症状は 2720 μg/L 暴露区では全ての 胚でこれらの症状が観察されたのに対し、573 μ g/L では 5%、1113 μ g/L では 20%の胚 のみで観察されたに過ぎなかった。これらのことから、ANQ 暴露による様々な影響 は暴露濃度依存的にその頻度と深刻度が上昇することが示唆された。

BAQ では 64.4 μg/L 暴露区で暴露開始後 10 日目から 14 日目の間に 35%、165

μg/L 暴露区では 5 日目から 10 日目の間に 48%、498 μg/L では 2 日目から 6 日目の間に全ての胚が死亡した。また暴露開始後 3 日目から油球が黒くなる症状が特異的に観察された (Fig. 1b-1)。この症状は BAQ を暴露した胚にのみ観察され、油球が黒くなった胚は翌日には全て死亡した。この症状は、22.4 μg/L と 64.4 μg/L 暴露区ではわずかに観察されたに過ぎなかったが、165 μg/L 暴露区では全体の 12.5%、468 μg/L 暴露区では 100%の胚で観察され、発症した全ての胚が死亡した。油球が黒くなる以外の症状については、暴露開始後 5 日目に頭蓋の委縮が観察され、暴露後 7 から 9 日目にかけてうっ血(Fig. 1b-2)や管状心臓、心浮腫といった症状が観察された。これらの症状は 12.8 μg/L 暴露区で 3%、22.4 μg/L 暴露区で 35%、64.4 μg/L 暴露区で 23%が観察され、全て 50%以下の発症率であったが、165 μg/L では 83%の頻度で観察された。

NAQ の 314 µg/L 暴露区では胚の初期状態から全く卵割が進まず、暴露後 2 目以内に全ての胚が死亡した(Fig. 1c)。予備試験時にも 400 µg/L 暴露区以上の暴露水中濃度において全ての胚で同様の症状が観察され、直後に死亡した。314 µg/L 暴露区より低い濃度ではこの症状は全く観察されなかった。しかし、74.3 µg/L 暴露区では暴露後 9 から 12 日目の間に 13%、145 µg/L 暴露区では 2 から 5 日目の間に 78%の胚の死亡が観察された。また 145 µg/L 暴露区では暴露開始 1 日目に頭蓋の委縮や左右で眼の大きさが異なるなどの異常が観察され、5 日目に脊椎の湾曲(Fig. 1d-1)、6 日目に管状心臓(Fig. 1d-2)、心浮腫(Fig. 1-3)、うっ血が 98%の胚で観察された。74.3 µg/L 暴露区でも同様の影響が 10%の胚で観察された。

PHQ 暴露では 734 µg/L 暴露区で卵割が全く進まない、といった NAQ と同様の症状が観察され、やはり観察された翌日に全ての胚が死亡した。734 µg/L 暴露区より低い暴露濃度区では暴露開始後から孵化日の間、断続的に胚が死亡し、特に孵化日付近の暴露後9日目から11日目の間に、孵化途中で死亡したように見てとれる胚が観察された。最終的に80.7 µg/L 暴露区では10%、155 µg/L 暴露区では25%、347 µg/L 暴露区では85%の胚が死亡した。この他の影響として80.7 µg/L、155 µg/L、347 µg/L 暴露区では暴露開始後3日目に頭蓋の委縮(Fig. 1e-1; Fig. 1f-1)が観察され、暴露後8日目には管状心臓や心浮腫(Fig. 1f-2)、うっ血が観察された。これらの症状は80.7 µg/L 暴露区で10%、155 µg/L 暴露区で23%、347 µg/L 暴露区で75%の胚でそれぞれ観察された。

2.3.4 oxyPAHs を魚胚に暴露した後、孵化した仔魚に現れた影響

対照区と溶媒区では受精後9日目から10日目に全ての胚で孵化し、孵化仔魚に特に異常が見出されることはなかった。これに対して、oxyPAHs 暴露された胚から孵化した仔魚には様々な影響が観察された。

ANQ では 573 μg/L以上の暴露区で孵化の遅延が観察され、518 μg/L以上の暴露区で頭蓋の委縮 (Fig. 2b-1) や心浮腫 (Fig. 2b-2)、管状心臓 (Fig. 2b-3)、脊椎の湾曲 (Fig. 2b-4)、尾部の不形成といった異常が観察された。特に心浮腫や管状心臓が生じた仔魚は、泳ぐことが出来ず、孵化後すぐに死亡する個体が多く見られた。

BAQ では 12.8、64.4、165 μg/L 暴露区で孵化の遅延が観察された。また、22.4 μg/L 暴露区で 47%、64.4 μg/L 暴露区で 66%、165 μg/L 暴露区で 69%に ANQ と同様な頭蓋の委縮 (Fig. 2c-1)、心浮腫 (Fig. 2c-2)、管状心臓 (Fig. 2c-3)、脊椎の湾曲 (Fig. 2c-4)、尾部の不形成といった影響が孵化仔魚に見られた。

NAQ では 36.5 μ g/L 暴露区以外の濃度で孵化の遅延が観察された。また孵化 仔魚への影響が観察されたのは、74.3 μ g/L と 145 μ g/L の 2 区のみであった。観察された影響は、脊椎の湾曲(Fig. 2d-1)、ヨークサックの未吸収(Fig. 2d-2)、尾部の不 形成などが挙げられる。特に脊椎の湾曲は、145 μ g/L 暴露区で孵化した全ての奇形仔 魚で確認され、このような個体は真っ直ぐに泳ぐことが出来なかった。

PHQでは347 μg/L 暴露区でのみ孵化の遅延が観察され、80.7 μg/L 暴露区で3%、155 μg/L 暴露区で47%、347 μg/L 暴露区で100%の孵化仔魚で頭蓋の委縮(Fig. 2e-1)、心浮腫(Fig. 2e-2)、管状心臓(Fig. 2e-3)、ヨークサックの未吸収、尾部の不形成などの影響が観察された。心浮腫および管状心臓が観察された仔魚も、孵化後、泳ぐことが出来なかった。また、上記の孵化仔魚で観察された影響は暴露濃度に依存して増え、さらに暴露濃度の上昇と共に重症化する傾向が見られた。

2.3.5 oxyPAHs の EC10 と EC50 の経日変化

各 oxyPAHs の暴露影響試験の結果から、胚への影響について NOEC、LOEC、EC10、EC50 をそれぞれ算出し Table. 2 に示した。EC10 および EC50 は、孵化するま

で各暴露日ごとに各値を算出し、その結果を経日変化として Fig. 3 に示した。

各 oxyPAHs の NOEC は、BAQ が最も低く 9.86 μg/L、次に NAQ、PHQ の順であり、最も高いのは ANQ で 573 μg/L であった。LOEC、EC10、EC50 も同じように BAQ が最も濃度が低く、ANQ の濃度が最も高かった。また ANQ、NAQ、PHQでは EC50が EC10の 2 倍程度だったのに対し、BAQ では 4 倍ほどの高い濃度を示した。

各 oxyPAHs の EC10 と EC50 の経日変化を算出したところ、EC10 では発生初期の受精直後から受精後 3 日目までの間に BAQ が 817 μg/L から 237 μg/L、PHQ が 423 μg/L から 144 μg/L までそれぞれ顕著に減少していた(Fig. 3a)。一方、BAQ の EC50 は、EC10 と同様に受精直後から受精後 3 日目までの間に顕著に減少していた。しかし、他の oxyPAHs では ANQ の EC50 は EC10 に比べると緩やかに減少しており、PHQ と NAQ に至ってはあまり減少していなかった(Fig. 3b)。

2.3.6 暴露開始期と影響発現とその進行に関する検証

影響試験と同じように観察された胚および仔魚への影響を Table. 3 にまとめた。本検証でも対照区と溶媒区は受精後9から10日目で全ての胚が正常に孵化した。 ANQ を発生初期に24時間暴露したE-1、2日間暴露したE-2、3日間暴露したE-3の胚は全てが約80%死亡したのに対し、受精後、4日目から孵化まで暴露したE-4の胚は約40%の死亡が確認されたのみであった。またE-1やE-2、E-4は尾ひれが卵膜の外に出た状態で死亡した胚が多く見られたのに対し、E-3ではそのような状況があま

り観察されず、ANQ を受精直後から孵化まで暴露したときと同様に、卵黄の陥没が徐々に大きくなりそのまま死亡した胚が観察された。その他の影響として E-1、E-2、E-3 において ANQ の特徴的な影響の卵黄の陥没 (Fig. 4a-1) のみならず、うっ血 (Fig. 4a-2) や管状心臓 (Fig. 4a-3) などが胚の発生過程で観察された (Fig. 4a)。しかし、E-4 では卵黄の陥没などの異常はほとんど観察されなかったが (Fig. 4b)、37%の胚で死亡が観察された。死亡した胚では、うっ血や管状心臓といった異常が観察された。E-1、E-2、E-3 の胚の孵化仔魚では頭蓋の委縮や管状心臓、心浮腫、脊椎の湾曲などブルーサック症候群に類似した形態異常が観察された。E-4 では孵化した仔魚の 40%が E-1~E-3 と同様の形態異常を有する仔魚だったが、残りの 60%は正常な仔魚だった。

BAQでは E-1、E-2、E-3の胚がそれぞれ 87%、97%、100%死亡し、暴露期間に応じて死亡率が上昇するのが確認されたのに対し、E-4ではほとんど死亡が観察されなかった。また、E-1、E-2、E-3においては受精直後から孵化まで暴露したときと同様に、油球が黒化する影響が見られた(Fig. 4c)。油球が黒化した胚は後日、100%死亡することが確認された。また油球の黒化以外にも、うっ血や管状心臓などの異常も観察された。一方、E-4では油球の黒化は全く観察されず、胚発生中は正常に発達した様子が観察された。孵化仔魚では E-1 で 4 尾、E-2 で 1 尾がそれぞれ孵化した。孵化した仔魚のうち E-1 と E-2 それぞれ 1 尾ずつ頭蓋の委縮(Fig. 4d-1)や管状心臓(Fig. 4d-2)、心浮腫(Fig. 4d-3)を呈する奇形仔魚だった(Fig. 4d)。E-4 で孵化した

仔魚は全て奇形を呈しない正常な仔魚だった。

NAQでは E-1 と E-3ではそれぞれ 40%、43%の胚で死亡したのに対し、E-2 と E-4では、ほとんどの胚で死亡は確認されなかった。E-1、E-3の胚においては頭蓋の委縮や発生の遅延が観察されたが、E-2、E-4の胚中の異常は観察されなかった。 胚への異常が観察された E-1、E-3では孵化した仔魚のうち E-1では 66%、E-3では90%が頭蓋の委縮や心浮腫、管状心臓、脊椎の湾曲などの形態異常を呈しており、特に脊椎の湾曲はほとんどの奇形仔魚で観察された(Fig. 4e)。一方、異常が観察されなかった E-3と E-4では孵化した仔魚は奇形を呈することなく正常であった。

PHQ では E-1、E-2、E-3 でそれぞれ 10%、40%、63%の胚が死亡した。発生後期に暴露した E-4 では 97%の胚が死亡し、死亡した胚では尾部が壊死したように黒くぼやけていく様子が観察された (Fig. 4f)。この症状は受精後 8 日目(暴露後 4 日目)あたりから徐々に尾部が黒くなっていき、その後 2、3 日後に胚全体が黒くなって、直後に死亡した。E-1 では異常はほとんど観察されなかったが、E-2、E-3 では発生の遅延や発育不良が観察された。PHQ に暴露された胚は E-1 で 90%、E-2 で 60%、E-3 で 37%が孵化した。孵化した仔魚のうちそれぞれ 22%、44%、90%が形態異常を呈し、観察された形態異常は、頭蓋の委縮や心浮腫、脊椎の湾曲であった (Fig. 4g)。E-4 は孵化した仔魚全て奇形仔魚であり、観察された形態異常は同じく頭蓋の委縮、心浮腫であった (Fig. 4h)。

2.4 考察

oxyPAHs のヒメダカ胚死亡に至る過程に着目すると、BAQ では 468 μg/L 暴 露区のとき暴露後6日目に全ての胚で死亡が観察された。NAQでは314 µg/L暴露区、 PHQ では 734 μg/L 暴露区でそれぞれ暴露後 2 日目、3 日目に 100%の死亡が観察され た。ANQでは一番高い暴露濃度の2720 μg/L 暴露区でも100%の死亡は観察されなか ったが 93%の胚が死亡し、孵化した 7%の仔魚にも発生過程で既に異常が観察され、 孵化した仔魚にも何らかの奇形を呈していた。また DMF を添加した溶媒区と比較す ると、ANQ では 1113 μg/L (6115 nM) 以上の濃度で有意な差が認められた。一方 BAQ では 64.4 µg/L (250 nM) 以上、NAQ では 74.3 µg/L (470 nM) 以上、PHQ では 155 µg./L (745 nM) 以上の濃度でそれぞれ対照区に対し有意な差があった。これら 4 物質の 胚への死亡影響を比較すると、BAQの影響が最も強く、ANQの影響が最も弱いこと が示唆された。Knecht et al. (2013) の報告によるとゼブラフィッシュ胚への死亡影響 は ANQ で 500 μM、BAQ と PHQ は 20 μM においてそれぞれ受精後 2 日目に 100%の 胚で死亡が観察された。また NAQ では 0.8 μM で受精後 24 時間後に全ての胚で死亡 が観察された。暴露期間が孵化までに時間が掛かるヒメダカ胚の方が長いために一概 にはいえないが、本研究の結果から考察すると、ヒメダカ胚の方がゼブラフィッシュ よりも oxyPAHs に対する感受性が高い可能性がある。

oxyPAHs 暴露影響の死亡前に観察される個々の物質に依存する特異的なパターンとして、ANQ では卵黄が徐々に陥没する症状、BAQ では油球が黒くなる症状、

NAQとPHQではともに卵割が起こらずに発生が止まる症状がそれぞれ物質固有に観察された。これまで化学物質の魚類胚への影響を調査した研究は数多く報告されているが、本研究で観察されたようなものと類似した胚発生期の影響発現に関する事例はほとんどないと思われる。そのため、oxyPAHs 暴露影響の死亡原因や各物質に見られた特徴的な異常との関係性はよく分からない。しかし、BAQの油球が黒くなる症状やNAQ、PHQの卵割が起こらない症状は、これらの症状が観察された直後に胚は死亡しているので、死亡と直積的に関係している可能性が高いと考えられた。

ANQ、BAQ、PHQを暴露した胚から孵化した奇形仔魚には共通した特徴があった、すなわち、頭蓋の委縮、口蓋形成が不完全、心臓浮腫、管状心臓、背骨または尾部の湾曲などである。これらの症状はダイオキシン類やPAHs 類を魚類胚に暴露した際に観察される形態異常の1つ、ブルーサック症候群と類似していた。oxyPAHsとPAHsの構造がベンゼン環骨格を基本としたものであり、これら2つの物質群の相違は酸素が孵化しているか否かの点でしかない。本研究でもブルーサック症候群に類似した奇形仔魚がANQ、BAQ、PHQを暴露した胚から観察された理由として、この影響はベンゼン環が複数連なる化学物質により誘発されることに起因するのかもしれない。

全ての物質において発生初期時に暴露を開始した場合には、最初に行った受精直後から孵化まで暴露した場合と同じ症状が見られた。しかし、観察された症状の深刻度は暴露期間の長さに依存しており、E-1より E-3 の方がより症状が重い傾向が

見られた。一方、発生中期から暴露を開始した場合では、発生初期に暴露を開始したときに観察された症状は一切見られなかった。特に BAQ と NAQ は発生中期から暴露開始をした場合、胚への影響は全く観察されず、正常な仔魚が孵化した。ANQ では発生初期に暴露したときに観察された卵黄の陥没は発生中期から暴露を開始したときには見られなかったが、その後得られた孵化仔魚は奇形を呈していた。そして、頭蓋の委縮や管状心臓、心臓浮腫に加え、背骨や尾部の骨曲りが、奇形仔魚全てに観察された。PHQ でも発生初期に暴露を開始した場合に観察された症状は、発生中期に暴露を開始したときには見らなかったが、発生初期に暴露した場合や受精直後から孵化まで暴露した場合では見られなかったような尾部が壊死する、という非常に特異的な影響が見られた。胚発生中の尾部の壊死の進行は PHQ でのみ観察され、本影響が観察された胚は数日後には死亡していたことから、死亡に何らかの関係があることが考えられた。

第3章 メタボロミクスによる化学物質影響評価の検証

3.1 目的

生物は恒常性を維持するため様々な代謝を行っており、タンパク質などが分 解されてアミノ酸や有機酸、糖類などの代謝物が生成される。また生成された代謝物 は、引き続きさらなる代謝を受ける。体内で疾病やストレスなど、何らかの異常が起 こった際には、健康時とは異なる代謝をしてその異常から脱し、かつ恒常性を維持し ようとして個々の代謝物生成量や投入量を変化させて対応する。メタボロミクスはこ のような代謝物変動(代謝物プロフィール)を網羅的に調べ、生物の健康状態を調べ る手法である。その網羅性から、個体に複数の影響が生じたときにこれらを同時に捉 えることができるだけでなく、特定の臓器や機能に対して何らかの異常が起こった際 の評価なども行うこともできる。メタボロミクスは哺乳類を対象とした医薬品分野で その研究が盛んに進められており、その一部の結果は病状判断や薬の開発に応用され ている。魚類に対する適用例も近年増加しており、様々な場面での使用の可能性が探 求されているが、先行する医薬分野に比べるとはるかに未熟で発展途上にあるといっ て良い。

本研究では魚類でも哺乳類と同様に特定の臓器や機能に対して評価を行うことができるのかどうか、魚に腎影響が生じた際の血液中の代謝物プロフィールを調べ、 魚に現れた影響と特徴的な代謝物変動の関連などを調べるために、高濃度で生物に暴 露すると深刻な腎影響を誘発することが知られているゲンタマイシンをコイ (Cyprinus carpio) 腹腔内に投与して腎障害及び損傷を誘発させた。そして、このと きの血漿中の代謝物プロフィールをメタボロミクスにより網羅的に捉えて、腎臓でど のような影響が引き起きているかを検証した。

3.2 実験方法

3.2.1 試薬

ゲンタマイシン硫酸塩、塩化ナトリウム、2-フェノキシエタノール、ヘモグロビンBーテストワコーは和光純薬工業株式会社のものを用いた。採血で使用したヘパリンナトリウムは三菱ウェルハーマ株式会社から購入した。代謝物を測定するための分析では、2-プロパノール(HPLC分析用)、アセトニトリル(HPLC分析用)、ヘキサン(残留農薬試験用)、の-メチルヒドロキシルアンモニウム=クロリド(和光一級)を和光純薬製、ピリジン(脱水)を関東化学株式会社製、MATFA+1%TMCSをサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製、内部標準物質の2,2-ジメチルコハク酸(和光一級)は和光純薬製、ミリスチン酸-d27はフナコシ株式会社のものを使用した。

3.2.2 予備試験

コイにどの程度ゲンタマイシンを腹腔内投与すれば腎障害を誘発するか、を

確認するため、Cianciolo et al. (2010) が行ったゼブラフィッシュ稚魚に対するゲンタマイシン腹腔内暴露試験を参考に予備試験を行った。予備試験では対照区、低濃度区、高濃度区の3つを設け、各区にそれぞれ2尾ずつコイを用いた。ゲンタマイシン硫酸塩を0.9%食塩水に溶解し、低濃度区では投与直後の体内濃度が0.5 mg/g(設定濃度)となるように50 mg/mLの試験液を、高濃度区ではやはり設定濃度として5 mg/gとなるよう500 mg/mLの試験液をそれぞれ調製した。そして、それぞれの試験液を各コイの体重100 gに対し1 mL 当量をツベルクリン用シリンジで腹腔内に投与した。また対照区の個体にはゲンタマイシンを含まない0.9%食塩水のみの試験液を1 mL腹腔内投与した。予備試験の影響観察項目は致死とし、試験開始前日から試験実施中は給餌しなかった。観察期間は腹腔内投与後3日間とし、その間コイは、馴致時と同じ水槽に収容した。試験期間中の水温は24±1.5°C、DOは5.6±0.5 mg/Lであった。

3.2.3 メタボロミクスによる腎影響評価のための暴露試験

3. 2. 1 項の予備試験の結果をもとに、試験の暴露濃度を決定した。暴露区は対照区、低濃度区、中濃度区、高濃度区の 4 つを設け、各区 5 尾ずつ用いた。試験液は予備試験と同様にゲンタマイシン硫酸塩を 0.9 %食塩水に溶解したものを用いた。低濃度区では投与直後の体内濃度が 0.02 mg/g となるように 4 mg/mL の試験液を、中濃度区では 0.063 mg/g となるように 12.6 mg/mL の試験液を、さらに高濃度区では 0.2 mg/g となるように 40 mg/mL の試験液をそれぞれ調製した (体内濃度はいずれも設定

値)。対照区には 0.9% 食塩水を試験液した。調製したそれぞれの試験液をコイの体重 100 g に対し 0.5 mL 当量腹腔内に投与した。対照区には 0.9% 食塩水を 0.5 mL 投与した。試験開始前日から試験実施中、給餌はしなかった。腹腔内投与後、それぞれのコイから 3 日間、3.2.4 項に示すように採尿した。試験期間中の水温は 24 ± 1.7 °C、DOは 5.7 ± 0.8 mg/L であった。

暴露開始後 3 日目に、暴露区および対照区のコイを 2-フェノキシエタノールで麻酔をし、ヘパリンナトリウム処理したシリンジでコイ尾柄部から 5 mL 採血した。ヘマトクリット値計測のために、ヘマトクリット毛細管に約 75 μ L の血液を入れて 10 分間遠心分離(370 g、4 °C)し、毛細管内の血液全量に対する赤血球の体積比からヘマトクリット値を見積もった。

また、血色素量を調べるために、5 mL のヘモグロビン B-テストワコーが入ったガラス試験管に血液を $20\,\mu$ L 加え、その後、分光光度計(UV-1600、島津製作所)により $540\,\mathrm{nm}$ の波長で血中ヘモグロビン濃度を測定した。

残った血液を $1.5 \, \text{mL}$ のポリプロピレン (PP) 製マイクロチューブに移し、 $10 \,$ 分間遠心分離($370 \, g$ 、 $4 \, ^{\circ}$ C)して血漿を得た。得られた血漿は、分析まで $-80 \, ^{\circ}$ Cで保存した。

3.2.4 採尿

本研究ではゲンタマイシンによる腎影響の状態などを調べるために、コイの

尿を採尿し種々の測定を行った。採尿は小山らの方法を参考に行った(小山ら,1979)。 ゲンタマイシン試験液を腹腔内投与した後、コイの泌尿生殖孔に採尿カニューラを装着した (Fig. 5)。 採尿カニューラは内径約1 mm のポリエチレンチューブを用いた。このチューブの両端に外径約1.3 mm のシリコンチューブの一端を斜めに切ったもの (STA) をはめた。また、外径約1.3 mm のシリコンチューブ (STB) をはめて、コイの泌尿生殖孔に挿入し、STB を臀鰭直前の体壁に接する位置で縫合糸により固定した。チューブを装着したコイを1個体ずつ、1.5 Lのペットボトルの底部を切り取ったケースに収容した。このケースを60 cm 水槽に6個入れた。固定した採尿カニューラの端を遠沈管 (PP 製) 内に導いて、サイフォンで尿が遠沈管に流入するようにセットした。

無類は採尿カニューラを挿入すると、それに対するストレスにより一時的に 尿量が増えることが知られている。これは実験室多尿症と呼ばれ、回復するまでに 24 時間程度を要する(小山, 1983)。そのため、本研究では採尿カニューラを挿入後 24 時間目以降の尿が平常時の尿であるとし、それ以降に採取されたものを後の評価 に用いた。尿量を 12 時間ごとに計測し、採尿のための遠沈管をその都度交換し測定 用の試料とした。

3.2.5 代謝物測定のための前処理

2 mLの PP 製マイクロチューブに血漿 100 uLを取り、2-プロパノール 375 uL、

アセトニトリル 375 μ L、超純水 250 μ L をそれぞれ加え、内部標準溶液として 200 μ g/mL の 2,2-ジメチルコハク酸を 100 μ L 加えた。この混合溶液を TissueLyser II (Qiagen ドイツ) で振とうし、10 分間遠心分離(10000 g、4 $^{\circ}$ C)を行った後、上清 500 μ L を別の 2 $^{\circ}$ mL のマイクロチューブへ移した。そこに 200 $^{\circ}$ μg/mL のミリスチン酸 $^{\circ}$ d₂₇ を 50 $^{\circ}$ μL 入れ、窒素ガスを吹き付け、完全に溶液を乾固させた。ミリスチン酸は GC/MS 測定時のタイムロック用に添加した。

試料を乾固後、残渣に o-メチルヒドロキシルアンモニウムクロリド 4 mg をピリジン1 mLに溶解したものを $10\,\mu$ L加え、ウォーターバスで $90\,$ 分間振とう $(30^{\circ}$ C、 $110\,$ rpm)してメトキシム化を行った。メトキシム化後、MATFA+1%TMCS を $90\,$ μ L 加え、ウォーターバス $30\,$ 分間振とう $(37^{\circ}$ C、 $110\,$ rpm)し、トリメチルシリル(TMS)化を行った。 TMS 化後、ヘキサンを $100\,$ μ L 加え、 $5\,$ 分間遠心分離($10000\,$ g、 $4\,$ $^{\circ}$ C)し、上清を以下の GC/MS 測定に用いた。

3.2.6 代謝物測定

血漿中代謝物測定には GC/MS(ガスクロマトグラフ:HP6890、質量分析装置:5973MSD、Agilent Technologies, Inc.)を用いた。カラムは DB-5MS (30 m×0.25 mm、膜厚 0.25 μ m、Agilent)を用いた。測定はスキャンモードで行った。注入口温度は 250°C、検出器温度は 290°C に設定した。カラム温度は 60°C で 1 分間保持し、その後 10°C /minで 60°C から 325°C まで昇温し、10 分間保持した。サンプルはオートサンプラ

(7683Series, Agilent) により、1 µLをスプリットレスモードで注入した。

3.2.7 データ処理

MSD ケミステーション (Agilent) を用いて、GC/MS クロマトグラム上で定性可能な代謝物ピーク (S/N 比>5) の面積値を算出した。イノシトールに関しては、コイ血漿中から検出されるもののほとんどがミオイノシトールだと思われたが、立体異性体が幾つか存在し、ミオイノシトール以外の異性体もいくつか GC/MS 上で検出されたため、本研究ではイノシトール類全てを総じて「イノシトール」と扱った。得られた各ピーク面積値は 2,2-ジメチルコハク酸のピーク面積値で標準化した。なお本研究では、個々の標準化した代謝物ピーク面積値=血漿中の代謝物濃度、として以下の解析を行った。

3.2.8 統計解析

ゲンタマイシン暴露時の血漿中代謝物変動の特徴をとらえるために 2.6 項で標準化したデータを用いて主成分分析 (PCA) を行った。PCA は R 言語 (http://www.r-project.org/) を用いて行った。また、各代謝物における暴露区とコントロール区間の比較は一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合は Tukey の多重比較により行った (p < 0.05、SPSS 14.0J、IBM 社)。

3.3 結果と考察

3.3.1 予備試験

予備試験を行ったところ、低濃度区(0.5 mg/g)と高濃度区(5 mg/g)のコイ はゲンタマイシンを投与してからしばらくの間遊泳していたが、その動きは対照区と 比較するとあまり活発ではなかった。その後、高濃度区では投与後1時間内に2尾共 死亡した。一方、低濃度区では投与60時間後に1尾、84時間後に残りの1尾が死亡 した。対照区では1尾も死ななかったため、両暴露区の死亡はゲンタマイシンの影響 によるものと考えられた。死亡個体をそれぞれ解剖したところ、全ての個体の腹腔内 の複数箇所から出血しているのが確認された。また低濃度区では鰓の退色、腎臓の肥 大および退色、腹水が溜まったことによる腹部膨満、眼球突出が観察された。一方、 高濃度区では腹腔内の出血以外に目立った異常は観察されなかったが、これは投与後、 コイが短時間で死亡したため、低濃度区で見られたような症状が出なかったと考えら れた。Hentschelet al. (2005) はゼブラフィッシュに 5 mg/mL のゲンタマイシンを腹 腔内投与したところ、腎臓に浮腫ができ、近位尿細管の細胞壊死や形態変化などが生 じることを観察している。また、Salice et al. (2001) らは金魚に 50 mg/kg のゲンタマ イシンを腹腔内投与し、糸球体に影響を与えることを見出している。ただし、これら の投与実験では本研究で見られた腹腔内の出血や、腹部膨満などの症状は観察されて おらず、コイはゼブラフィッシュや金魚と比べるとゲンタマイシンに対する感受性が 高いのではないかと考えられた。

予備影響試験の結果からゲンタマイシンの投与濃度は、低濃度区の設定体内 濃度の 0.5 mg/g でも高すぎると判断し、メタボロミクスのための暴露試験では投与直 後の体内濃度を予備試験の 0.5 mg/g よりもさらに 2.5 倍低い 0.2 mg/g を高濃度区、中 濃度区を 0.063 mg/g、低濃度区を 0.02 mg/g (全て設定値)と設定して、それに合わ せて試験液を調製し、それぞれ腹腔内投与することにした。

3.3.2 ゲンタマイシン暴露による腎臓組織損傷

本試験では高濃度区の投与直後の体内濃度を 0.2 mg/g と設定したが、予備試験で全個体が死亡した設定体内濃度 0.5 mg/g よりも 2.5 倍低い濃度であった。しかし、1 尾は投与後 48 時間で腹を上にし、60 時間で死亡した。その他もう 1 尾が 60 時間で腹を上にして試験終了時の 72 時間に死亡、さらに他の 1 尾が試験終了時に腹を上に向けた状態になり、結果として高濃度区の 5 尾中 3 尾のコイが死亡、あるいは死に近い状態になった。このことから、設定体内濃度 0.2 mg/g でもコイに与えるダメージはまだ大きかったと考えられた。これよりも低い 0.063 mg/g の中濃度区では死亡個体は観察されなかったことから、上記の結果と合わせて考えると 0.5 mg/g という濃度は半数致死濃度に近い濃度であった可能性があり、高濃度区としてはもっと設定濃度を下げる必要があったと言える。また、以下に示す結果も合わせて考えると、この高濃度区で見られた死亡あるいは致死に近い状態になったのは、ゲンタマイシン暴露のみによる影響だと考えられ、他の要因も重なったために引き起こされた影響とは考えにく

い。

高濃度区の生存した残り 2 尾のみのデータを用いて以後のメタボロミクス影響評価を行うのは難しいことから、本研究では高濃度区以外の中濃度区と低濃度区のみで以下の影響評価を行うことにした。

暴露区の低 (0.02 mg/g)、中 (0.063 mg/g) 濃度区共に鰓の退色や眼球突出など、予備試験と同じ症状が観察された。また、試験開始直前から終了までにコイの体重は対照区では全個体で平均約4%減少したのに対し、暴露区では低濃度区で3尾、中濃度区で4尾の体重が約25%増加し、その他の個体の体重が対照区と同様に減少していた。暴露区の体重が増加した個体に共通した特徴として、腹部が膨張しており、さらに症状が進んだ個体では、鱗が逆立つ様子が観察された。これらの腹部が膨張した個体を解剖したところ、大量の腹水と血塊が腹部に溜まっており、暴露区個体の体重増加はこの腹水に起因したと考えられた。淡水魚体内は体液の浸透圧が周囲の水より高いため、鰓などから水が体内に侵入しやすい。そこで体内の水の量を調節するために薄い尿を多量に排泄して浸透圧を調節している。この尿排泄は主として腎臓により行われているが、腎臓の尿の生成や排泄機構がゲンタマイシン暴露によって正常に働かなくなり、結果として腹水が溜まったと思われる。

採尿カニューラを装着後、24 時間は暴露区、対照区ともに多量の尿の排泄が 確認され、実験室多尿症が起こっていたことが示唆された。多尿症期間中、暴露区で 尿量は暴露濃度依存的に減少する傾向が見られた。採尿カニューラを装着してから 24 時間後には暴露区、対照区ともに多尿症が改善され、かつ尿排泄量も安定した。 多尿症改善後、対照区の尿排泄量は 12 時間で約 10 mL で、試験期間終了までほぼ同 量の尿を排泄し続けた。これに対して暴露区の尿排泄量は、多尿症改善直後は低濃度 区で約5 mL/12 hr、中濃度区で約2 mL/12 hr と対照区と比べるとかなり少ない傾向に あった。さらに時間経過と共に尿排泄量は少なくなり、中濃度区では採尿カニューラ 装着36時間後に、低濃度区では48時間後に尿が排泄できない個体が出始め、最終的 に中濃度区で4尾、低濃度区で2尾が全く尿を排泄できない状態になった。また中濃 度区では採尿カニューラを装着後36時間後と48時間後に血尿が観察された。原尿は 魚の体内を循環した血液が糸球体によってろ過されて生成される。さらに生成された 原尿は尿細管で再吸収および分泌されて、最終的に尿として排泄される(Picone et al. 2011)。ゲンタマイシン暴露により観察された血尿は、暴露により腎臓が損傷を受け、 その結果出血したものの一部が尿細管から排出され、血尿となったと考えられた。ま た、尿排泄量の減少あるいは尿が全く排泄出来なくなったのは糸球体が影響を受けて そのろ過機能が働かなくなり、原尿生成量が減少した結果起こったことが示唆された。 Mingeot-Leclercq と Tulkens (1999) によるとゲンタマイシンなどのアミノグリコシド 系の物質は糸球体でろ過された後、近位尿細管上皮細胞により細胞内に取り込まれる。 細胞内ではリソソームに取り込まれその数を増加させ、ホスホリパーゼを阻害し、さ らにミトコンドリアやミクロソームにも障害を与えてしまう。これらの影響が腎臓内 の細胞死を引き起こし、結果として腎障害が起きる。今回のコイの暴露でも同様の、

あるいはさらに深刻な症状が引き起こされた可能性が高い。

3.3.3 血液性状

低、中濃度区のコイ血液中のヘマトクリット値は対照区と比較すると有意に低下していた (p<0.05、Fig. 6-a)。また、ヘモグロビン濃度は濃度依存的に減少する傾向が見られたが、有意差があったのは高濃度区のみであった (Fig. 6-b)。一般的に魚類では出血による血液量の減少や、特定部位における血液の貯留、造血器官である腎臓での血球の新生阻害などが原因で貧血が起こる。上記のように、本研究ではゲンタマイシン腹腔内投与後、鰓の退色が観察されたが、上記の血液性状の結果と合わせて考えると、ゲンタマイシンに暴露されたコイは貧血状態にあったことが示唆された。

3.3.4 メタボロミクスによるゲンタマイシンの影響評価

代謝物を GC/MS の測定により検出された血漿中代謝物のうちは 49 物質が定性された。定性された各代謝物の面積値を用いて主成分分析を行った結果を PCA スコアプロット上に示した (Fig. 7)。PCA スコアプロットでは、PC1 方向の負側に対照区、正の方向に中濃度区、2 つの区に挟まれて低濃度区がそれぞれクラスターを形成した。Fig. 7 より PC1 方向に暴露濃度依存的に対照区から離れる傾向があったため、PC1 はコイが受けた暴露影響の強さを示していると判断した。また、PC2 方向への各グループ間の明瞭な分離は見られなかったために、その意味付けは難しいと判断した。

PCA から得られたローディングプロットを Fig. 8 に示したが、特に実線で囲った代謝 物群が PC1 方向の分離に正の相関で、破線で囲ったものが負の相関で有意に寄与していた。

魚類の腎臓の主な機能である浸透圧調節にはタウリンやイノシトール類などが欠かせない(Fiess et al. 2007)。これらの浸透圧調節物質によって、魚類は急激な環境変化にも対応している。Fig. 8 に示したローディングプロットから、PC1 の分離に有意に寄与していた代謝物のうち、タウリン、イノシトールは暴露濃度依存的に増加する傾向が見られ、特にイノシトールは両暴露区ともに有意に増加していた(Fig. 9)。これらの代謝物の増加は腎機能の損傷により浸透圧調節が正常に働かなくなったことと密接に関係していると考えられた。3.3.2 項でも述べたように、ゲンタマイシンに暴露されたコイは腹水などが溜まる個体が多く見られ、その浸透圧調節機能が正常に働いていない状態にあったが、浸透圧調節に関わる各代謝物変動からも、コイの腎臓の浸透圧調節が正常に行えていなかったことが示唆された。

また、PC1 の分離に有意に寄与していたオルニチン、クレアチニン、尿素などは、特に中濃度区で増加する傾向が見られた(Fig. 10)。コイには完全な尿素回路はないと考えられる(Felskie et al. 1998)が、オルニチンは恐らく尿素を作るための中間代謝物であり、血漿中のオルニチンと尿素の増加は腎臓の損傷からこれらを上手く排泄できず、暴露濃度依存的に腎損傷が激しくなるに伴って、血中濃度が暴露濃度に応じて増加したと思われた。またクレアチニンは筋肉運動のエネルギー源となるク

レアチンが代謝されたときに生成する老廃物の1つであるが、通常糸球体でろ過され、 尿と共に体外へ排泄される。しかし、ゲンタマイシン暴露により糸球体が損傷し、特 に中濃度区での糸球体損傷が進んで、そのろ過機能が正常に働かなくなったことによ り、クレアチニンも排泄されずに体内に蓄積し、その血中濃度が増加した可能性が高 い。保科はウナギの鰭赤病の進行による腎臓の機能低下により血中クレアチニン濃度 の増加を観察しており、血中のクレアチニン量の変動が腎臓障害の指標として有効で あると報告している(保科,1962)。またゲンタマイシンと同様に腎障害を起こす薬剤 であるシスプラチンをゼブラフィッシュに暴露して腎障害を誘発させると、血中のク レアチニン濃度が増加したという報告もあり(Hentschelet al. 2005)、これらの過去の 結果と本研究の結果は良く一致していた。

ローディングプロットで PC1 の分離に対して負の相関があった代謝物のうち、グリセロール、オレイン酸、パルミチン酸、ミスチリン酸、グリセロールー3ーリン酸 (Fig. 8 の G3P)、コレステロール、乳酸、グルコースなど、そのほとんどが脂質や脂肪酸、糖類といったエネルギー生成に関連するものであった。またトリプトファン (Fig. 11-a) も TCA 回路内のアセチル CoA の生成に深く関わっているため、エネルギー生成には欠かせない代謝物である。これらの代謝物は多くで有意ではなかったものの、暴露濃度依存的に減少する傾向が見られ、特に中濃度区のコイではエネルギー生成量自体が低下しているのではないかと予想された。また、3-ヒドロキシ酪酸 (Fig. 8 の 3-HB) は PC1 に対して正の相関を持っていたが、この代謝物は解糖系か

ら端を発するエネルギー生成量不足時に、β酸化と呼ばれる脂肪酸代謝が起こってエ ネルギー生成が行われるが、その際に生成されるものである(Kokushi et al. 2010)。 本研究では暴露濃度が高くなるにつれて、3-ヒドロキシ酪酸の増加が見られ、特に中 濃度区はコントロール区に対して有意な増加をしていた(Fig. 11-b)ことから、グル コース生成量の低下などから解糖系に由来するエネルギーが低下し、コイ体内で β 酸化が起こっていたことが示唆された。β酸化は一般的に絶食状態が長く続くと見ら れる現象である (Drew et al. 2008; Salem et al. 2007)。本研究の暴露試験も絶食状態で 行っているが、その期間は3日間と短く、この間の絶食でβ酸化が起こったとは考え にくい。既に我々はコイの絶食状態における代謝物の経時変動を報告しており(國師 ら, 2011)、この結果を合わせて考えても今回のβ酸化はゲンタマイシン暴露により引 き起こされた影響だと考えられた。化学物質暴露によるβ酸化の誘発はこれまで幾つ か見出されている。Fig. 12 に示したクエン酸の濃度依存的な濃度低下は解糖系の各代 謝物の生成量が低下したことに起因していると思われた。また、コハク酸は TCA 回 路内でスクニシル CoA が代謝されて生成されるが、スクニシル CoA とその代謝上流 のα-ケトグルタル酸は、エネルギー不足時に TCA 回路内クエン酸からの代謝だけで なく、様々なアミノ酸が投入され生成される(Kokushi et al. 2015)。特に TCA 回路内 では ATP などのエネルギー生成が 2-オキソグルタル酸以降の代謝で起こるため、解 糖系からの代謝物投入量が低下したときにこのアミノ酸の利用はエネルギー生成の ために非常に重要なものとなる(Kokushi et al. 2015)。今回、コハク酸が PC1 方向の

分離に正の相関があったが、暴露濃度依存的にエネルギー生成量が落ちた結果、体内 のアミノ酸が積極的に TCA 回路に投入され、その結果、コハク酸が特に中濃度区で 増加したと考えられた(Fig. 12)。また、フマル酸の変動はPC1の分離に対して有意 ではなかったが (p > 0.51 で有意だったが、フマル酸は p=0.45)、特に中濃度区では 対照区に対して有意に増加しており、これはコハク酸の生成量が濃度依存的に上昇し たことを受けた結果と思われる。ヒスチジン、リジンも特に中濃度区で有意に増加し ていた (Fig. 11-c、Fig. 11-d) が、これらは TCA 回路に投入するためのアミノ酸生成 などに用いられるために、筋肉中などのタンパク質を分解して積極的に体内で生成さ れ、結果として血漿中濃度が増加した可能性がある。このように暴露区で通常よりも 盛んに代謝を行って積極的にエネルギー生成を行っていたのは、ゲンタマイシン暴露 により腎臓だけでなく体の各部に異常を来しており、コイ体内で恒常性が大きく攪乱 されていたことに起因すると考えられた。特に中濃度区の個体の腹腔内で複数ヶ所か らの出血が観察されており、これらの傷を治すために大量のエネルギーが投入された 可能性もある。

Fig. 8 において楕円で囲まれた部分以外のラベルを付した代謝物は、PC2 方向の分離に有意に寄与した代謝物である。これらの代謝物は特に筋肉中に多く存在し、ピルビン酸に端を発して生成されるものが数種見られたが、PCA では PC2 方向では特徴的な分離が見られなかったため、ゲンタマイシン暴露との関連は薄いのかも知れない。これまで多くの日用品由来医薬品などの Pharmaceuticals and Personal Care Products

(PPCPs)のモニタリングが行われてきたが、高濃度で検出された例はあまり多くない。さらにゲンタマイシンのモニタリング例は少なく、他の PPCPs よりも遙かに高い濃度で環境水中に分布しているとは考えにくい。その水溶解度(50 mg/mL)の高さなども合わせて考えると、今回の影響試験で見られたような急性毒性症状の全てが実環境で生じる可能性は非常に低いだろう。今回の暴露試験では、ゲンタマイシンが少なくともコイ腎機能の多くに影響を与えることが分かったため、今後、化学物質暴露による魚類の腎機能影響を調べる上でのモデル物質として適していると考えられた。

3.4 まとめ

これまで、魚類を用いた環境中の化学物質暴露により誘発される腎臓の影響に関する研究は多くなされている(Reimschuessel et al. 1990; Bacchetta et al. 2014; Ribas et al. 2014; Salice et al. 2001; Hentschel et al. 2005; Cianciolo et al. 2010)。しかし、これらの多くは腎臓組織の観察や血液性状などを調べたものがほとんどであり、魚類の腎臓機能低下、あるいは腎臓組織の損傷に伴って起こる代謝物変動を調べた例はほとんどない。

本研究では、ゲンタマイシンをコイに腹腔内投与して腎臓の機能低下や損傷を誘発させ、そのときの血漿中の代謝物プロフィールを調べると共に、コイに現れる影響との関連などを調べた。ゲンタマイシン暴露の結果、尿量の減少や血尿、貧血、

腹部膨満などが観察され、これらの症状から明らかにコイの腎臓が影響を受けていることを示唆していた。また、血漿中代謝物の変動から、腎臓の主な機能である浸透圧調整に関与するタウリンやイノシトールなどが、ゲンタマイシン暴露濃度依存的に増加する傾向が見られた。これらの代謝物変動は腎臓の浸透圧調整の機能低下から腹水が溜まっていたことに関連していると考えられた。さらにオルニチンやクレアチニン、尿素の暴露区での増加は、腎臓内の糸球体損傷によりろ過機能が低下し、これら代謝物が体外へ排泄されず血中濃度が上昇したことを示唆していた。

エネルギー生成に関与する代謝物の多くはゲンタマイシン暴露濃度依存的に減少する傾向が見られ、これらは暴露によるコイが通常よりもより多くのエネルギー量を必要であったことを示していたと考えられた。

第4章 メタボロミクスによる oxyPAHs のヒメダカ胚中への影響評価

4.1 目的

第3章で、メタボロミクス解析の有用性の検証と魚類に対する化学物質影響 の可能性を追求した。前章でも述べたように、メタボロミクス解析はオミクス技術の 1 つで医薬品の安全評価や病理診断、毒性評価など医薬分野で広く研究されている評 価法であり、生体内の代謝物の変動情報を網羅的に収集し、生体内の異変を推測する 手法である。網羅的に生体内の代謝物を調べるため、体の各部位から生理・病理機構 の発見ができると考えられている(Salek et al. 2007; Mellert et al. 2011)。よって、もし 生物体内の複数ヶ所で異常を来たした場合、従来であればこの異常を調べるためには 個々の異常に対して1つ1つ試験を行う必要があったが、メタボロミクス解析は一度 試験を行えばこれらの影響を全て捉えることが出来る可能性を持つ (Kokushi et al. 2010; Uno et al. 2012)。代謝物情報は遺伝子情報などと比べるとはるかに情報が少な いが、一方でゲノム情報を必要とせず、代謝物質や代謝経路の多くが生物種を通して 共通しているため、多くの生物に対してその情報を共有できるという利点を持つ。近 年では魚類への化学物質影響への適用例だけでなく、水環境中における汚染物質と水 生生物との相互作用や水生生物の臓器に対する機能や健康における環境リスクの影 響評価法としての使用例も増えており、様々な知見が得られている(Samuelsson et al. 2006; Picone et al. 2011; Olivelra et al. 2013; Liu et al. 2015)

第2章の結果から、oxyPAHs がヒメダカ胚の発生中に様々な影響を与えることは分かったが、その要因まで明らかにできなかった。そこで本章では、胚の発生に与える影響をより詳細に調べるために、ヒメダカ胚に各 oxyPAHs をそれぞれ水暴露し、oxyPAHs による胚発生中の生体内代謝に対する影響や、暴露により誘発される稚魚の奇形の要因と代謝物変動との関連性、さらには各 oxyPAHs のヒメダカ胚に対する影響の相同・相違性を、メタボロミクス解析を用いて明らかにすることを目的とした。

4.2 実験方法

4.2.1 試薬

暴露溶液および試験水の分析には第2章2.2.1項と同じものを使用した。胚から代謝物を抽出する際に使用した有機溶媒のメタノール(和光純薬株式会社)はHPLC 分析用を使用し、クロロホルム(関東化学株式会社)は残留農薬 PCB 分析用300 倍濃縮を用いた。誘導体化剤には o-メチルヒドロキシルアンモニウム=クロリド(和光純薬工場株式会社、和光一級)、ピリジン(脱水)(関東化学株式会社)を用いて、メトキシム化剤には MATFA+1%TMCS(サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)を用いた。内部標準物質は2,2-ジメチルコハク酸(和光純薬工場株式会社、会社、和光一級)とミリスチン酸-d₂₇(フナコシ株式会社)を使用した。

4.2.2 メタボロミクス影響評価のための暴露試験

本試験では oxyPAHs の詳細な影響を調べるため、影響試験の結果を参考に、 メタボロミクス解析のための暴露試験を以下の条件で行った。試験対象としたのは ANQ、BAQ、NAQ、PHQ の 4 物質とした。各物質の暴露濃度は、

 $ANQ:5000\,\mu\text{g/L}$

 $BAQ:500 \mu g/L$

 $NAQ:200 \mu g/L$

 $PHQ:400 \mu g/L$

とした。これの暴露濃度は第2章で形態異常が全ての胚に見出された濃度から決定した。また暴露区以外に oxyPAHs と DMF を添加していない飼育水のみの対照区と、飼育水に DMF のみを添加した溶媒区の2つをそれぞれ用意した。

oxyPAHs は第 2 章と同様の方法で DMF に溶解させて、飼育水に添加した。 ガラス容器に飼育水 100 mL を加え、受精直後のヒメダカ胚を 25 個ずつ収容したも のを 6 つ用意した。各 oxyPAHs を含む DMF 溶液の添加量は水中濃度が 100 μL/L に なるようにした(飼育水 100 mL に対し、10 μL 添加)。これらを温度が 24°C、光周 期は 14 時間:10 時間(明:暗)に設定したインキュベータ内で飼育した。試験水は毎 日全量換水し、換水前後に DO、pH、水温(水温: 24.7±0.4°C、pH: 7.7±0.1、DO: 7.3±0.8 mg/L)を測定した。換水後、毎日顕微鏡下で観察を行い、死卵を取り除いた。サンプリングは暴露開始後、6日目まで毎日行った。サンプリング時には胚を 25個ずつ採取し、あらかじめ秤量した 2 mL のポリプロピレン製マイクロチューブに入れて、胚の総重量を測定した後、液体窒素で直ちに凍結し、分析まで-80°Cで保存した。試験水中の oxyPAHs 濃度を測定するために試験水の調整直後と1日経過後の換水前の試験水を2日おきに oxyPAHs 暴露区では5 mL ずつ、対照区と溶媒区は30 mL ずつ採取した。

4.2.3 水中の oxyPAHs 濃度測定のための前処理と分析

oxyPAHs 濃度測定のための前処理と分析については、2.2.3 項と同じ手法で 分析を行った。

4.2.4 代謝物測定のための前処理と分析

採取したヒメダカ胚が入ったマイクロチューブに、クロロホルム 260 μ L、メタノール 530 μ L、超純水(Milli-Q)210 μ L をそれぞれ加え、内部標準物質として 2,2-ジメチルコハク酸(200 μ g/mL)を 100 μ L 加えた。それに直径 0.5 mm のジルコニア製ビーズを 1 つ入れ、細胞破砕機により粉砕した。粉砕後、クロロホルム 260 μ L、Milli-Q210 μ L を加えた後、さらにクロロホルム 500 μ L 加えた。この混合溶液を 10分間遠心分離(12000 g、4°C)して、上層の水/メタノール相を採取し、新たな 2 mL

のマイクロチューブへ移した。そこに 200 μ g/mL のミリスチン酸- d_{27} 水溶液を 50 μ L 入れ、窒素ガスを吹き付け、完全に溶液を乾固させた。ミリスチン酸は GC/MS 測定 時のタイムロックのための指標物質として添加した。

乾固後、残渣に o-メチルヒドロキシルアンモニウム=クロリド 4 mg をピリジン (脱水) 1 mL に溶解したものを 10 μ L 加え、ウォーターバスで 90 分間振とう (30°C、110 rpm) してメトキシム化を行った。 メトキシム化後、MATFA+1%TMCS を 90 μ L 加え、ウォーターバスで 30 分間振とう (37°C、110 rpm) し、トリメチルシリル (TMS) 化を行った。 TMS 化後、ヘキサンを 100 μ L 加え、5 分間遠心分離(10000 g、4°C)した後、上清をそれぞれ 10 倍希釈し、GC/MS 測定に供した。

胚中の代謝物を測定するために Agilent Technologies 社製の HP6890 のガスクロマトグラフに 5973MSD 質量分析装置を装着した GC/MS を用いた。カラムはDB-5MS(30 m×0.25 mm、膜厚 0.25 μ m、Agilent Technologies)を用いた。測定は SCANモードで行った。注入口温度は 250°C、検出器温度は 290°C に設定した。カラム温度は 60°C で 1 分間保持し、その後 10°C/min で 60°C から 325°C まで昇温後、10 分間保持した。サンプルはオートサンプラ(7683Series)により 1 μ Lをスプリットレスモードで注入した。

4.2.5 水中濃度のデータ処理

水中濃度のデータ処理については2.2.4項と同様の手法で行った。

4.2.6 代謝物のデータ処理および解析

GC/MS より得られた MS データは、MetAlignTM (ver. 080311, Wageningen University) を用いてピーク検出を行った。

MetAlign™により得られた代謝物の各ピーク面積を、それぞれ 2,2-ジメチルコハク酸のピーク面積と胚の重さで標準化し、全てに 10⁴ した値を以下の統計解析に用いた。なお本研究では、個々の標準化した代謝物ピーク面積=胚中の代謝物濃度としてそれぞれの評価などを行った。

補正して得られた代謝物情報全てを対象に、主成分分析(PCA)と一元配置分散分析(ANOVA)をR言語(http://www.r-project.org/)を用いて行った。得られたPCA スコアプロットの結果を出発点として、oxyPAHs 暴露の生体内代謝に対する影響の有無を調べた。さらに定性できた48物質の各代謝物の面積を対照区と暴露区で比較し、暴露されたことによる各代謝物の変動、すなわち各代謝物の増減と個々の代謝物の代謝経路上の関連から、ヒメダカ胚の代謝経路への影響を推測した。また溶媒区と暴露区間の違いを、ダネットの多重比較により検定した。ダネット検定はSPSS14.0J(IBM社)を用いて有意水準5%で行った。

4.3 結果および考察

4.3.1 試験水中の濃度

各 oxyPAHs の水中濃度の実測値はそれぞれ、ANQ は 2806±35.9 µg/L、BAQ

は $467\pm13.8~\mu g/L$ 、NAQ は $167\pm45.8~\mu g/L$ 、PHQ は $323\pm53.1~\mu g/L$ であった。全ての 暴露区において設定濃度より実測値は低かったが、暴露期間中、大きな水中濃度変動 が見られなかったため、全ての oxyPAHs について一定の水中濃度を維持できていた と判断した。また対照区および溶媒区からはいずれの oxyPAHs も検出されなかった。

4.3.2 主成分分析の解析結果

GC/MS の測定により検出された代謝物のうち 48 物質が定性された。定性された各代謝物面積値を用いて主成分分析を行い、まずは対象区と溶媒区で試験期間中に代謝物変動の差異がなかったかを調べた。その結果、対照区と溶媒区でいくつかの代謝物変動は見られたものの大きく変動している代謝物はなく、またプロット間における統計的な有意差は認められなかった。このことから、試験期間中、対照区と溶媒区では代謝物変動の大きな差異はなかったと判断し、以下の結果では溶媒区の結果を用いてデータ処理を行った。

溶媒区と各暴露区の0日目から6日目の代謝物を対象にして主成分分析を行った結果をPCAスコアプロット上に示し、各日ごとにプロットを平均してその平均値を0日目から6日目にかけて線で繋ぎ、発生の軌跡を描いた。ANQ暴露群ではPC1方向に溶媒区と大きく離れて軌跡を描いた(Fig. 13)。このことからANQ暴露においてPC1方向はANQの影響を示し、PC2は発生に伴って変動した代謝物を示していたことが示唆された。BAO暴露群とPHO暴露群はPC2方向に溶媒区と大きく離れて軌

跡を描いた。また PC1 方向の負側から正側にかけて発生に伴い軌跡が動いたことから PC1 は発生に伴って変動した代謝物を示し、PC2 は BAQ と PHQ のそれぞれの影響を示していたことが考えられた(Fig. 14; Fig. 15)。NAQ 暴露群では他の oxyPAHs 暴露群と比較すると溶媒区と大きく離れてはいないが、PC2 方向に離れて軌跡を描き、PC1 方向には発生に伴い PC1 方向の負側から正側へ軌跡が動いたことから PC1 は発生に伴い変動した代謝物、PC2 はNAQの影響を示していたことが考えられた(Fig. 16)。これらの PCA の結果から各 oxyPAHs 暴露群で暴露影響を表している PC1 または PC2 方向の分離に寄与する代謝物を選別し、oxyPAHs 暴露により胚が受けた影響を詳細に検証した。

4.3.3 ANO のメタボロミクス解析による影響評価

ANQ 暴露によって変動した代謝物や代謝経路への影響をより詳細に調べるために、PCAから得られたローディング、および ANOVA の結果から溶媒群と ANQ 暴露群で有意な差が見られた代謝物の変動を調べた。その結果、変動していた代謝物は主として、1)エネルギー生成、2)尿素回路、3)神経伝達物質、4)コラーゲン代謝に関わる代謝経路のものとが考えられた。

エネルギーの 1 つである ATP は TCA 回路でその大半が生成されるが、ローディングから、TCA 回路におけるコハク酸 (p=0.90)、クエン酸 (p=0.52)、フマル酸 (p=0.63) に PC1 方向の分離に強い相関があり、TCA 回路内で ATP 生成に何らか

の影響があったと推測された。またロイシン (p=0.43) やバリン (p=0.35) といっ た分岐アミノ酸やチロシン (p = 0.88) やフェニルアラニン (p = 0.59) のような芳香 族アミノ酸も PC1 方向の分離に強い相関を示しており、特に発生初期において溶媒 群より有意に低い値を示していた(Fig. 17)。芳香族アミノ酸や分岐アミノ酸は、タ ンパクの再合成やエネルギー生成に必須な前駆体であることが知られている。また、 パントテン酸からアセチル CoA が生成され、このアセチル CoA が TCA 回路に投入 される経路もエネルギー生成に間接的に関与する。さらにグルタミン酸などはその炭 素骨格が α-ケトグルタル酸生成に用いられ、結果としてその後の TCA 回路内のエネ ルギー生成に大きく寄与する。そのグルタミン酸を生成するために分岐アミノ酸の投 入、代謝が行われる(Li et al. 2014)。上記のエネルギー生成に関与するアミノ酸類は 溶媒群より有意に低い値を示していた。また1日目から6日目までパントテン酸 (p=-0.68) は有意に高い値を示した(Fig. 18)。これら全ての変動から、ANQ 暴露によっ て魚胚が通常よりも多くのエネルギーが必要としていた、と考えられた。さらに、ロ ーディグの結果よりグルコース (p=0.79)、グルコース-1-リン酸 (G1P) (p=0.62)、 グルコース-6-リン酸(G6P)(p=0.60)といった糖類にも PC1 方向の分離に強い 相関があり、これらの変動は暴露1日目から6日目まで有意に低かった(Fig. 18)。 グルコースの暴露区の胚中の変動では初日に減少が見られ、その後増加傾向を示した。 G1P や G6P は、暴露初期に減少傾向が見られ、暴露後期には増加傾向が見られた。 魚類胚では、発生初期において TCA 回路によるエネルギー生成よりも、糖類が関与

した代謝経路内のエネルギー生成の方が優先的に行われることが報告されている (Boulekbache. 1981)。このことから ANQ 暴露時に観察された、発生初期における糖類の減少はエネルギー不足を補うためのものであり、胚中では ANQ 排出やその影響に対応するために過剰なエネルギーが必要な状態であったことが考えられた。 ANQ の影響の特徴として、エネルギーの源となる卵黄の陥没が挙げられるが、 ANQ 暴露により過剰なエネルギー生成したことと何らかの関連があるのではないかと考えられた。

また神経伝達物質として働くグルタミン酸(p=0.85)や芳香族アミノ酸類、 γ -アミノ酪酸(GABA)(p=0.86)、グリシン(p=0.51)は PC1 方向の分離に強い相関があり、溶媒区より 1 日目から 6 日目まで有意に低い値を示し、各日間の変動も溶媒区と比べると非常に小さいものであった。上記の神経伝達物質として働く各代謝物は、脳の神経細胞と神経細胞の情報伝達を担う物質を生成する(Jiang et al. 2015)。これらの代謝物が溶媒区よりも ANQ 暴露区で常に有意に低くなっていたが、これは、本来であれば神経伝達物質として用いられるはずがエネルギー不足のためにエネルギー生成を優先的にするために使われ結果として慢性的に神経伝達物質生成が十分になされていなかった、あるいは何らかの形で胚発生中に神経伝達を阻害するような影響を受けていたことが可能性として考えられた。神経冠細胞は神経胚期において重要な働きを持ち、神経冠細胞が正常に分化することで骨や血管、心臓などの臓器が形成される。この神経冠細胞が変異を起こすと、骨形成の異常や管状心臓、心浮腫など

の影響を引き起こすことが知られている(Wang et al. 2006; Dong et al. 2012)。ANQ を 暴露した胚から脊椎の湾曲や管状心臓を呈した仔魚が孵化したことから、神経冠細胞 に変異が起こった可能性は十分に考えられる。また ANQ 暴露における特徴的な代謝 物の変動としてアミノ酸類の減少が挙げられる。アミノ酸類の減少は、TCA 回路へ と投入するだけでなく、暴露によって大きく影響を受けた臓器・器官・組織・機能を 修復するためのタンパク質合成に支障を来した可能性が高い。

魚類ではアンモニアを直接排泄する他、尿素回路を通して尿素へと代謝して 排泄することも知られている(Fujisawa et al. 2016)。特に成魚になると尿素回路に関 与する酵素発現が抑制される魚種が多いが、そのほとんどが胚において高く発現する。 この発現は尿素回路を通してアンモニアを解毒するためであると報告されている (Korte et al. 1997; Caidovic et al. 2014)。 実際に ANO に暴露された胚中において尿素 回路に関与する尿素 (p = -0.68) やクレアチニン (p = -0.44)、アルギニン (p = 0.48)、 オルニチン (p = 0.80)、グルタミン酸 (p = 0.85) などが PC1 方向への分離に強い相 関があった。尿素やクレアチニンは発生に伴い有意に増加しており、アルギニンやオ ルニチン、グルタミン酸などは常に溶媒群より有意に低い値を示していた(Fig. 19)。 アルギニンから尿素とオルニチンが生成されるが、尿素が急激に増加していたことに 対し、オルニチンは発生に伴う大きな変動がなかったことからアルギニンから尿素へ の生成が優先されたことが考えられた。このことから ANQ 暴露による組織の損傷な どが起因して、過剰にアンモニアが生成され、それを尿素回路で尿素へと代謝してい

たことが考えられる。

この他に PC1 への強い相関があった代謝物にアスコルビン酸とヒドロキシプロリンが挙げられた。これらはコラーゲン合成に関与しており、プロリンをヒドロキシプロリンへ水酸化する際にアスコルビン酸が触媒酵素として必要とされる。コラーゲンは骨や血管の主成分として重要な役割を持つため、正常にコラーゲンが合成されなかった場合、骨や血管の形成に影響を及ぼし、催奇形性の原因となる。ANQ 暴露された胚中のアスコルビン酸(p=0.41)とヒドロキシプロリン(p=0.65)、プロリン(p=0.70)には強い相関があり、これらは発生に伴い有意に減少していた (Fig. 20)。このことからコラーゲン合成が攪乱され、正常なコラーゲンが生成されていないことが考えられた。その結果、骨形成や血管の形成が阻害され、頭蓋の委縮や口蓋形成不全、脊椎の湾曲、管状心臓などの症状が孵化仔魚に現れたのではないかと考えられた。

4.3.4 BAQ のメタボロミクス解析による影響評価

BAQ 暴露によって、尿素をはじめとする尿素回路に関与する代謝物が大きく変動していた。ローディングの結果から、尿素(p=-0.96)、アルギニン(p=0.29)、クレアチニン(p=0.73)、オルニチン(p=0.63)、グルタミン酸(p=0.81)で PC2 方向の分離と強い相関があった。尿素、アルギニン、クレアチニンは発生に伴い増加傾向を、オルニチンとグルタミン酸は減少傾向をそれぞれ示した(Fig. 21)。このことから BAO 暴露の影響によって胚内で炎症や代謝による過剰な呼吸に伴って過剰な

アンモニア生成が起こっていた可能性が考えられた。さらに、PC1 方向の分離にのみ強い相関があったバリン (p=-0.90) やロイシン (p=-0.87)、イソロイシン (p=-0.90) といった分岐アミノ酸類が溶媒区よりも有意に低く、特に発生後期に急速に減少していたことから筋肉組織、あるいはそれに類した組織の分解によるエネルギーの生成やタンパク質合成が起こっていた可能性がある。これらの代謝によってさらにアンモニアは過剰に生成されていた可能性がある。

またアスパラギン酸(p=0.68)、GABA(p=0.80)が発生後期に有意な減少傾向を示した。ニジマスにおいてアンモニアを暴露したときこれらの代謝物がアミノ基転換反応を通してグルタミン酸へ供給されることが知られている(Sanderson et al. 2010)。これは暴露により α -ケトグルタル酸が枯渇したときにグルタミン酸を通してエネルギーを供給するために起こる反応である。これらのことから暴露によって大量に生成されたアンモニアの処理、またはエネルギー生成に用いるためのグルタミン酸を供給するために、アラニン、アスパラギン酸、GABAが急速に減少したことが考えられた。

この他に ANQ 暴露群と共通した動きとして見られたのが神経伝達物質とコラーゲン 代謝である。先行研究においてゼブラフィッシュに BAQ を暴露した際に同様に神経 伝達物質が大きく変動していたことが報告されている (Elie et al. 2015)。チロシンや フェニルアラニンなど芳香族アミノ酸類はドーパミンなどを生成するときの前駆体 として知られているが、ゼブラフィッシュに暴露した際に、ドーパミンやセロトニン の増加が見られた。Gesto et al. (2006, 2008) はニジマスに数種の PAHs を暴露したとき、ニジマスの脳においてドーパミンやセロトニンが攪乱されたことを明らかにした。ゼブラフィッシュは PAHs に暴露されると神経冠細胞に影響を受ける、という報告もある (Vignet et al. 2014a; 2014b)。これらのことから PAHs には神経毒性があると考えられており、PAHs と構造が類似している oxyPAHs にも似た影響があるのではないかと報告されている (Elie et al. 2015)。神経伝達物質ではグルタミン酸や GABA、チロシンが有意に低く、グルタミンやフェニルアラニン、トリプトファンは発生に伴い増加していた (Fig. 22)。これらのことから、本研究でも BAQ が胚中で何らかの神経影響を引き起こしていたのかもしれない。

もう 1 つ、ANQ と共通する代謝異常として、BAQ 暴露群でもコラーゲン代謝に関わっているアスコルビン酸(p=-0.65)とヒドロキシプロリン(p=-0.34)、プロリン(p=-0.71)が PC1 方向の分離に強い相関が見られ、これらの代謝物は全て発生後期で急速に減少していた(Fig. 23)。この変動から、ANQ 暴露群と同じく、コラーゲン合成が阻害されていのではないかと予想された。

4.3.5 PHQ のメタボロミクス解析による影響評価

PHQ 暴露群の PCA データは PCA スコアプロット上で BAQ と似たような軌跡を描いており、変動した代謝物も類似していた。PHQ 暴露によって変動した特徴的な代謝物として尿素回路に関与する代謝物が挙げられた。ローディングの結果より、

オルニチン (p=-0.86) やクレアチニン (p=0.78)、グルタミン酸 (p=-0.38)、尿素 (p=0.31)、アルギニン (p=0.59) は PC2 方向の分離に強い相関を示した。グルタミン酸、オルニチンは発生に伴う変動はあまり見られなかったが、溶媒区より常に有意に低く、尿素はやアルギニン、クレアチニンは発生に伴い有意的な増加傾向を示した (Fig. 24)。またロイシン (p=-0.82) やバリン (p=-0.88) のような分岐アミノ酸やチロシン (p=-0.48) などに強い相関があり、有意に低い値を示していた。これらの変動は BAQ 暴露時と類似していたことから、筋肉中のタンパク質の分解や合成などの異化作用による修復が行われていたことが考えられ、結果その過程で大量にアンモニアが生成された可能性が考えられた。

TCA 回路ではクエン酸以外は大きな変動が見られなかった一方で、乳酸 (p=0.52) に PC2 方向の分離に相関があり、発生に伴い増加していた (Fig. 25)。この乳酸の増加は嫌気的解糖系によるものであることが考えられる。つまり、PHQ 暴露によって何らかの原因で胚中が貧酸素状態に陥っていたことが推測された。嫌気的条件下になると嫌気的解糖系によるグルコースからのエネルギー生成が起こる。ローディングよりグルコース (p=-0.74) も PC2 方向の分離に強い相関があり、グルコースが低い値を示したのはエネルギー生成のためにその量が減少した可能性が考えられた。また TCA 回路におけるクエン酸以外の有機酸類に大きな変動が見られなかったのは、嫌気的条件下による TCA 回路の抑制が起こっていたことが考えられた。

この他に特徴的な代謝物変動として、アスコルビン酸 (p = -0.66) とヒドロ

キシプロリン (p=-0.40)、プロリン (p=-0.57) が PC2 方向の分離に強い相関があった。これらは発生に伴い有意に減少しており、特に発生後期に大きく変動していた (Fig. 26)。これは ANQ と BAQ 同様、コラーゲン合成が阻害されている可能性が考えられた。

4.3.6 NAQ のメタボロミクス解析による影響評価

NAQ 暴露によって変動した特徴的な代謝物は、発生初期における乳酸とアラ ニンの急激な増加である。ローディングにおいて乳酸 (p = -0.67) とアラニン (p =-0.67) には PC1 方向の分離に強い相関があった。魚類は貧酸素状態になると嫌気的 解糖系によって乳酸が増加する。またこのときコリ回路によってグルコースから乳酸 が作られたりするため、より乳酸が増加する。生成された乳酸はピルビン酸へと転換 され、糖新生によってグルコースの生成を促進させる(Landon et al. 2013)。NAO に 暴露された胚中の代謝物を見てみると乳酸が発生初期に顕著に増加していた。またグ ルコースを見てみると常に低い値を示していたことから解糖系によるエネルギー生 成が行われていたことが考えられた (Fig. 27)。嫌気的条件下になると TCA 回路は抑 制され、エネルギー生成が阻害される。それを補うために嫌気的解糖系によってエネ ルギーが生成される。発生初期の乳酸の急激な増加は、嫌気的解糖系によるものであ ると考えられた。実際に TCA 回路におけるクエン酸などの有機酸類は溶媒区と比べ ると大きく変動していなかったことから、TCA 回路における ATP 量は変化がなかっ

たと考えられた。

また他のoxyPAHsで見られたような分岐アミノ酸などのアミノ酸類の減少は見られなかった。しかし、尿素回路に関与する代謝物で類似した変動が見られた。アスパラギン酸やグルタミン酸、アルギニン。尿素などが発生に伴い、有意な変動をしていた(Fig. 28)。このことから NAQ 暴露によってもアンモニアが大量に生成されていた可能性が考えられた。

一方でコラーゲン合成に関与するアスコルビン酸とヒドロキシプロリンにおいてはアスコルビン酸では減少が見られなかったが、ヒドロキシプロリンにおいて発生後期に急速な減少を示した。NAQをヒメダカ胚に暴露したとき、必ず背骨や尾部における骨の湾曲が見られたので、骨形成が阻害されていることが推測されたが、ヒドロキシプロリンのみ減少しか確認できず、骨形成への影響までは断言できない。

4.4 まとめ

ヒメダカ胚に各 oxyPAHs をそれぞれ水暴露し、oxyPAHs による胚発生中の生体内代謝に対する影響についてメタボロミクス解析を用いて調べたところ、oxyPAHs 暴露により 3 つの共通した代謝物の変動が見られた。1 つ目は、コラーゲン代謝に関与するアスコルビン酸やヒドロキシプロリンなどが顕著に減少していたこと、2 つ目にアンモニア生成に関与するグルタミン酸やアスパラギン酸などが顕著に増加していたこと、3 つ目にエネルギー生成に関与するグルコースなどの糖類や TCA 回路に

関わるコハク酸などの有機酸類の顕著な増減が共通していた。これらの結果から、共通した影響としてコラーゲン代謝への影響、アンモニアの過剰な生成、さらにエネルギー生成の促進または抑制が起こり得る可能性が考えられた。

第5章 oxyPAHsのヒメダカ孵化仔魚に対する奇形誘発メカニズムの検証(骨形成に着目し、骨形成異常の調査)

5.1 目的

第2章の結果では、oxyPAHsのヒメダカ胚に対する影響として頭蓋の委縮や 脊椎の湾曲が観察されたことを述べた。このことから、胚が oxyPAHs 暴露により骨 形成に何らかの影響を受けた、と考えられた。また第4章の結果の1つとして、コラ 一ゲン代謝が阻害されている可能性が挙げられた。コラーゲン代謝はプロリンやリジ ンがアスコルビン酸によってヒドロキシプロリンやヒドロキシリジンに水酸化され ることで生成され (Fig. 20; Fig. 23; Fig. 26)、生成されたヒドロキシプロリンなどによ ってコラーゲンは構成される (Siddigi and Alhomida. 2006)。コラーゲンは臓器などの 形態維持や骨や血管などの形成に関与する。またコラーゲンは特異なタンパク質であ り、特にヒドロキシプロリンはコラーゲン中からしか検出されないことからコラーゲ ンのバイオマーカーとしても使用される (Watts NB. 1999)。第3章の結果では、コラ ーゲンを構成するプロリンやヒドロキシプロリン、また水酸化するために必須である アスコルビン酸が oxyPAHs 暴露区全てで胚発生中に顕著に減少していた。

これらの第2章および第4章の結果から、本項ではoxyPAHsのヒメダカ胚に対する暴露により、胚発生中の骨形成阻害が起こるのではないか、と仮説を立てた。そこでまず、骨を直接観察するために軟骨・硬骨二重染色を行った。軟骨・硬骨二重

染色法は、筋肉などの骨以外の組織を透明化させ、硬骨と軟骨をそれぞれ赤と青に染 め分ける方法である (Potthoff et al. 1984; Langille and Hall. 1987)。小型の脊椎動物を 対象に行われており、この方法により外部から骨格系を直接観察することができる。 実際にヒメダカ胚では受精後 5 日目から徐々に硬骨化が始まることがすでに分かっ ている(武田ら、2002)。本章では、軟骨から硬骨が形成されることから、まず軟骨が 形成されているかどうか調べるために二重染色のうち軟骨だけを青く染色し、その形 態を調べた。次にコラーゲン量の定量するためのマーカーとして用いられるヒドロキ シプロリンを測定した。先ほど述べたようにヒドロキシプロリンはコラーゲン以外か らはほとんど検出されないためコラーゲン量を定量するための最適なマーカーであ る。ヒドロキシプロリンの測定には比色法を用いる。タンパク質中のヒドロキシプロ リンを酸加水分解した後、クロラミン T によりヒドロキシプロリンをピロールに変 換させ、そこに p-ジメチルアミノベンズアルデヒドを添加させることでピロールと反 応し、比色生成物が生じるので、これを測定してヒドロキシプロリンを定量する。定 量結果より、タンパク質中のヒドロキシプロリンが減少していたかどうか検証した。

5.2 実験方法

5.2.1 試薬

暴露溶液は 2. 2. 1 項と同じものを使用した。バッファーは、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム・12 水和物(試薬特級・和光純薬工業株式会社

製)から作成したリン酸緩衝液(PBS)を用いた。孵化仔魚の固定にはホルムアルデヒド(和光一級・和光純薬工業株式会社)、軟骨染色のアルシアンブルーはSigma-Aldrich Japan のもの、硬骨染色にはアリザリンレッド(試薬特級・和光純薬工業株式会社)を用いた。その他にグリセリン(試薬特級)、無水エタノール(日本薬局方)、水酸化カリウム(和光特級)、四ホウ酸ナトリウムは和光純薬工業株式会社製、氷酢酸はAlfa Aesar 社、トリプシンはBecton, Dickinson and Company のものを用いた。

コラーゲンを構成するヒドロキシプロリン測定に使用した、クロラミンT(試薬特級)、p-ジメチルアミノベンズアルデヒド(DMAB)(試薬特級)、L-ヒドロキシプロリン(試薬特級)はナカライテクス株式会社のものを使用した。また塩酸(試薬特級)と2-プロパノール(分子生物学用)は和光純薬工業株式会社製を用いた。ヒドロキシプロリンの測定値を補正するためにタンパク濃度を測定した。測定には、バイオ・ラッドプロテインアッセイ濃縮色素試薬(Bio-Rad Laboratories)を使用した。標準液は、アルブミンーウシ血清由来ーフラクションV-pH7.0(BSA)(生化学用)の和光純薬工業株式会社製を使用した。

5.2.2 軟骨染色のための暴露試験

軟骨染色を行うために ANQ、BAQ、NAQ、PHQ の 4 物質を対象に以下の条件で暴露試験を行った。暴露濃度は、第 2 章の結果より暴露された全ての胚中で何らかの影響が確認された濃度に設定した。設定した濃度は以下の通り:

 $ANQ\,:\,5000\,\mu\text{g/L}$

 $BAQ:500\,\mu g/L$

 $NAQ:200\,\mu g/L$

 $PHQ:400 \mu g/L$

ただし、この暴露濃度下では ANQ では孵化せずにそのまま死亡するため、対照区の孵化日(受精後9日目)からさらに9日後の暴露 18日目までに孵化しなかった胚は、胚の状態でホルマリン固定した。暴露溶液は、2. 2. 2 項と同じように、DMF に溶解させて、飼育水に添加した。助剤である DMF の濃度が 100 μL/L となるようにそれぞれ飼育水に添加した(飼育水 100 mL に対し、10 μL 添加)。また飼育水に DMF のみ添加した溶媒区と、何も添加しない飼育水のみの対照区もそれぞれ用意した。

飼育水 100 mL に受精直後の胚 100 個を収容し、孵化まで暴露した。各容器は24℃に温度設定したインキュベータ内に収容し、暴露開始から孵化後3日目まで、インキュベータ内で飼育した。光周期は、14 時間:10 時間(明:暗)に設定した。試験水は毎日全量換水し、換水前後に DO、pH、水温を測定した(水温:24.0±0.5℃、pH:7.4±0.1、DO:7.4±1.2 mg/L)。換水後は顕微鏡下で観察をし、死卵を取り除いた。孵化した仔魚は、何も添加していない飼育水に移し、孵化後3日目に10%に希釈したホルムアルデヒドで1週間固定した。ただし、孵化後3日目まで生存しないと判断した仔魚は直ちに10%に希釈したホルムアルデヒドで1週間固定した。

5.2.3 軟骨染色

軟骨染色に用いるアルシアンブルー溶液は、無水エタノール 35 mL と氷酢酸 15 mL を混合させた溶液にアルシアンブルーを 10 mg 溶解させて作成した。また中性 化に必要な飽和ホウ酸ナトリウム溶液は、四ホウ酸ナトリウムを milli-Q 水に飽和状態で溶解して調製した。筋肉分解するためのトリプシン溶液は、飽和ホウ酸ナトリウム溶液 15 mL と milli-Q 水 35 mL を混合させた溶液にトリプリンを 500 mg 溶解して 調製した。

固定した仔魚は、50%エタノール、無水エタノールにそれぞれ 1 日ずつ浸透させて脱水を行った。脱水後、アルシアンブルー溶液に浸透させて軟骨を染色した。アルシアンブルー溶液は強酸であるため、浸透させすぎると軟骨部分まで溶解してしまうため、染色時間は 24 時間以内にとどめた。アルシアンブルー溶液で染色した後、飽和ホウ酸ナトリウム溶液に 1 日静置し、中性化を行った。次に筋肉分解を行うために、トリプシン溶液に数時間室温で浸透させた。筋肉分解後、1%水酸化カリウムとグリセリンの比率が 3:1、1:1、1:3 の順に 1 日ずつそれぞれに浸透させて、最後に 100% グリセリンに浸透させて保存した。100% グリセリンに保存できた標本は、顕微鏡下で頭蓋骨部分と尾骨部分をそれぞれ写真に撮り、撮った写真は Image J を用いて、頭蓋骨の長さを測定したり、基鰓骨や尾骨の数などを数えて、軟骨形成の状況を調べた。

5.2.4 ヒドロキシプロリン濃度測定のための暴露試験

ヒドロキシプロリンの変動を第4章の結果と比較するために、第4章と同じ

条件下で oxyPAHs 暴露試験をヒメダカ胚を用いて行った。暴露物質は、ANQ、BAQ、

NAO、PHO の 4 物質を対象にした。暴露濃度は

ANQ: $5000 \,\mu g/L$

 $BAQ: 500 \mu g/L$

 $NAQ : 200 \mu g/L$

PHQ: $400 \mu g/L$

にそれぞれ設定した。oxyPAHs は、2.2.2 項と同様に DMF に溶解させて飼育水に添

加した。助剤である DMF の飼育水中濃度が 100 μL/L となるようにそれぞれ暴露溶液

は飼育水に添加した (飼育水 100 mL に対し、10 μL 添加)。また飼育水に DMF のみ

添加した溶媒区と、何も添加しない飼育水のみの対照区もそれぞれ用意した。飼育水

100 mLに受精直後のヒメダカ胚を30個ずつ収容したものを各暴露区3つずつ用意し

た。各容器は24℃に温度設定したインキュベータ内で飼育した。光周期は、14時間:

10 時間 (明:暗) に設定した。試験水は毎日全量換水し、換水前後に DO、pH、水

温を測定(水温: 24.0 ± 0.6 °C、pH: 7.7 ± 0.1 、DO: 6.6 ± 1.4 mg/L) した。換水後は

顕微鏡下で観察をし、死卵を取り除いた。暴露開始後5日目と6日目にそれぞれ胚を

73

採取し、採取した胚はあらかじめ秤量した 2 mL のポリプロピレン製マイクロチューブに入れて、胚の総重量を測定した後、分析まで-80°C で保存した。

5.2.5 胚中のヒドロキシプロリン濃度測定

PBS はリン酸二水素ナトリウムとリン酸水素二ナトリウム・12 水和物がそれぞれ1 M となるように milli-Q 水に溶解させ、pH6.0 に調整したものを作成した。測定に用いるクロラミン T 液は1gのクロラミン T を milli-Q 水 10 mL に溶解し、分析まで冷蔵保存した。使用直前にクロラミン T 液: PBS=1:4 の割合で混合させたものを用いた。DMAB 溶液は、2gの DMAB と濃塩酸 2.2 mL を混合し、沸騰水中で加熱溶解させた。室温下に放置して放冷した後、2-プロパノールを12.2 mL 添加して撹拌させて作成した。また検量線作成用のヒドロキシプロリン標準液は、L-ヒドロキシプロリンを milli-Q 水で溶解させ、各濃度(1.25、2.5、5、10 mg/mL)に調整した。

胚が入ったマイクロチューブに PBS(pH6.0)を 0.6 mL 添加し、直径 5 mm のジルコニア製ビーズを 1 つ入れ、細胞粉砕機(TissueLyser II; Qiagen、ドイツ)により粉砕した。粉砕後、10 分間遠心分離(16,000 g、 4° C)を行い、上清から 10 μ L をタンパク質の濃度測定用に取り分け、残りのホモジネイトしたサンプルでヒドロキシプロリンを測定した。マイクロチューブの中身を全てガラス試験管に移し、12M 塩酸 1 mL を加え、沸騰水中で 30 分間加熱した。放冷後、そこに 2-プロパノールを 1 mL 加えて混合した。このときヒドロキシプロリン標準液にも 1 mL に対して 2-プロパノ

ール 1 mL を加え、混合した。それぞれ混合した後、クロラミン T 液を 0.5 mL 加え、4 分間室温で静置した。静置した後、DMAB 液を 2.5 mL 加え、沸騰水中で 2 分間加熱し、その後 1 時間室温で静置してサンプルと DMAB を反応させた。静置後、紫外可視分光光度計 UV-1600(島津製作所)の 575 nm の波長で測定した。標準液の結果から検量線を作成し、各サンプルのヒドロキシプロリンの濃度を算出した。各サンプルから算出したヒドロキシプロリン濃度を同じサンプルのタンパク質濃度で除して、タンパク質濃度あたりのヒドロキシプロリン量を求めた。

5.2.6 胚中のタンパク質濃度測定

タンパク質濃度測定用に取り分けたサンプル (10 μL) を用いてタンパク質濃度を測定した。タンパク質濃度測定は Bio-Rad Laboratories 社製の Bio-Rad Protein Assay に従って行った。タンパク質の標準液は BSA が 1 mg/mL となるように milli-Q 水で作成した。調製後、0.5、0.1、0.2、0.5 mg/L となるように milli-Q 水で希釈して標準液を調製した。発色試薬は、Dye Reagent Concentrate を milli-Q 水で 5 倍希釈したものを用いた。

ホモジネイトしたサンプルは、PBS で 10 倍希釈して測定した。96 穴プレートにタンパク標準液および 10 倍希釈したサンプルを各ウェルに 10 μ L ずつ 3 穴それぞれに入れ分析回数は 3 回とした。そこに希釈した Dye Reagent Concentrate を 200 μ L ずつ添加した。添加後、マイクロプレートリーダー (MICROPLATE READER SH-9000,

CORONA ELECTRIC)に入れ、インキュベータ(25°C)内で 5 分間撹拌させ、595 nm の波長で測定した。測定した標準液から検量線を作成し、各サンプルのタンパク質濃度を算出した。

5.2.7 統計処理

測定した結果は全て溶媒区と暴露区間との違いを、ダネットの多重比較を用いて検定した。ダネット検定は SPSS14.0J (IBM 社) を用いて有意水準 5%のもとで行った。

5.3 結果および考察

5.3.1 軟骨染色

第2章の結果より oxyPAHs を暴露した胚から孵化した仔魚の頭蓋の発達不全 や尾骨形成不全、口蓋形成不全などは軟骨形成不全が大いに関係していることが疑わ れた。これまで魚類胚を用いたダイオキシン類による軟骨の形成不全に関する研究が 多くなされており、その多くが軟骨染色によって検証がなされていた(Teraoka et al. 2002; Wang et al. 2006)。また魚種によっては頭部における軟骨形成に関与する遺伝子 が分かっており、その遺伝子を標的に研究してこの現象のメカニズムが少しずつ解明 されつつある(Dong et al. 2012; Burns et al. 2015)。そこで本研究では、軟骨染色によ って軟骨が正常に形成されているか調べた。

ヒドロキシプロリンの結果と比較するため暴露濃度は5.2.7と同じ濃度で孵 化まで暴露を行った。孵化後3日目の仔魚を10%ホルマリンで固定して軟骨染色を行 った。頭部の軟骨はそれぞれ上からメッケル軟骨 (Fig. 29a-1)、基舌骨 (Fig. 29a-2)、 角舌骨 (Fig. 29a-3)、口蓋方形軟骨 (Fig. 29a-4)、角鰓骨 (Fig. 29a-5) と呼ばれる。 共通して見られた影響としてメッケル軟骨の形成が出来ていない仔魚が多く見られ た。メッケル軟骨は、下顎の部分にあたり、この骨が形成されていない仔魚は頭蓋が 未発達なうえに口蓋形成不全も見られた。このことからメッケル軟骨が出来ていない ことにより口蓋形成が出来ていないことが示唆された。また他に共通して見られた影 響として尾骨の軟骨形成がほぼ出来ていないことが観察された (Fig. 30)。正常に形 成されていれば4ヶ所軟骨部位が染色されるはずが、ほぼ染色されず染色されても一 部のみの尾部が多く見られた。また尾骨が形成されていない仔魚でも泳いでいる仔魚 も見られたため、見た目には何も異常が見られなかった仔魚も染色をすることで異常 を見出すことが出来た。

染色した頭蓋骨のそれぞれの部位を1点と数え、全て染色されたときを5点としたときの結果を以下に示した (Fig. 31-a)。ANQ、BAQ、NAQでは有意に低い値が示され、PHQでは有意差はなかったが溶媒区より低い値だった。実際に頭蓋骨を観察すると、メッケル軟骨以外にも形成出来ていない軟骨が多く見られたことから暴露によって頭部の軟骨形成が出来ていないことが示唆された。また基舌骨の長さをそ

れぞれ測定したところ ANQ、BAQ、NAQ、PHQ 全てにおいて有意に短くなっていることが示唆された(Fig. 31-b)。このことから頭部が溶媒区より短いあるいは小さくなっていることが明らかになった。また短くなっていることによって角鰓骨の数が少なくなっていた仔魚や、基舌骨まで形成されていない仔魚が見られた。これらのことから、軟骨形成不全により頭部の形成が出来ていないことが明らかになった。

軟骨の形成不全には様々な研究がなされており、少しずつ解明されつつある。 軟骨や骨の形成は神経冠細胞の分化に依存しており、発生の過程において神経冠細胞 が変異を起こすと骨の形成に影響を及ぼすことがラットや鳥類で報告されている (Chen et al. 2000; Debelak and Smith 2000)。魚類胚において神経胚時の神経冠細胞の 変異が軟骨や骨の形成に影響を与えると言われており、発生初期に強く影響を受ける 神経冠細胞が変異を起こし、軟骨や骨細胞の機能に影響を与え、軟骨の形成不全が引 き起こされる(Langille and Hall 1988)。本項の結果である頭部や尾部の軟骨形成不全 は、同じように暴露によって神経冠細胞が変異を起こしたものであると考えられた。

5.3.2 ヒドロキシプロリン濃度

5日目と6日目の胚中のヒドロキシプロリン濃度を測定した結果、対照区と溶媒区で大きな差が見られなかったので、溶媒区と暴露区で比較をしたグラフを以下に示した(Fig. 32)。溶媒区と比較すると全ての暴露区でヒドロキシプロリン量が有意に低い値を示していた。特にBAQが5日目と6日目で最も減少していたのに対し、

ANQでは5日目から6日目にかけて大きな減少は見られなかった。

これらの結果からコラーゲンを構成するアミノ酸が不足していたことが示唆された。コラーゲン中のヒドロキシプロリンが不足するとコラーゲンは不完全なコラーゲンとなり、軟骨や血管の形成に悪影響を及ぼす。第2章の影響試験で見られた頭蓋の発達不全や血栓、管状心臓に何らかの関連がある可能性が示され、正常なコラーゲンではなかったために正常に軟骨等が形成されなかったのではないかと考えられた。

第6章 oxyPAHs のヒメダカ胚に対するその他の影響の検証(EROD やアンモニア、酸化ストレスの検証)

6.1 目的

第2章の結果から oxyPAHs によって誘発された奇形仔魚はブルーサック症候 群(BSD)に類似した特徴を呈していた。BSD はダイオキシンや PAHs などを魚類胚 に暴露した際に観察される特徴的な形態異常である (King-Heiden et al. 2012)。BSD の原因として薬物代謝酵素の酸化酵素 P450の1つ、CYP1A が挙げられている。CYP1A は、異物応答反応として生体外異物を酸化させる働きを持つと共に、反応中に活性酸 素も生成する。特に芳香族炭化水素受容体(AhR)がダイオキシン類などと結合して 活性化すると、CYP1A の発現を促進する。その結果、活性酸素の生成も促進される (Madison et al. 2015)。活性酸素は通常の状態であっても少なからず生成され、生成 された活性酸素は抗酸化作用によって打ち消されることで生体内のバランスが維持 されている。しかし、活性酸素が過剰に生成されると抗酸化作用とのバランスが崩れ、 活性酸素によってタンパク質や脂質、DNA などが酸化損傷される酸化ストレスが引 き起こされる。例えば過酸化脂質は、血管の内皮膜などを傷つけ、浮腫やうっ血の原 因になることや、過酸化脂質のマロンジアルデヒド(MDA)などのアルデヒドによ るタンパク質の酸化損傷が引き起こされるなどの報告がなされている (Bauder et al. 2005)

また、第4章のメタボロミクス解析の結果から、oxyPAHs 暴露によってヒメダカ胚中のエネルギー代謝やアンモニア排泄に関わる代謝に影響を与えていたことが見出された。oxyPAHs は構造上、CYP1Aを介した薬物代謝が行われている可能性が高いが、あまりよく知られていない。もし、胚がoxyPAHsを体内に取り込んだ後、成魚同様に薬物代謝を行っていたならば、胚が酸化ストレスによる何らかのダメージを受けている可能性があるのではないかと考えた。そこで本研究では、まず、ヒメダカ胚がoxyPAHsを体内に取り込んだ際にCYP1Aを誘導するかを検証し、さらに胚の暴露時の酸化ストレスレベルと、酸化ストレスを引き起こす因子を探求することを目的とした。

6.2 実験方法

6.2.1 試薬

暴露溶液は2.2.1項と同じものを使用した。ホモジネイト用のバッファーとして、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム・12水和物(試薬特級・和光純薬工業株式会社)から作成したリン酸緩衝液(PBS)を用いた。ATP 測定用のバッファーは、HEPES(分子生物学用・同仁北化学研究所)とスクロース(試薬特級・和光純薬工業株式会社)から作成した HEPES バッファーを使用した。ATP 測定には和光純薬工業株式会社の「組織の」ATP 測定キットを用いた。タンパク質濃度測定には5.2.1項と同じものを使用した。

薬物代謝酵素活性(ethoxyresorufin-O-demethylase: EROD)測定に用いたエトキシレゾルフィンとレゾルフィンは Sigma-Aldrich Japan、ニコチンアミドアデニンヌクレオチドリン酸(NADPH)(還元型)はオリエンタル酵母工業株式会社製のものをそれぞれ使用した。酸化ストレス測定に用いたトリクロロ酢酸(TCA)(生化学用)とグアニジン塩酸塩(特級)、リン酸三カリウム(一級)は和光純薬工業株式会社、2-チオバルビツール酸(TBA)、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)(試薬特級)は Sigma-Aldrich Japan を使用した。アンモニア測定に用いたフェノール、ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム、クエン酸三ナトリウム(特級)、ニトロプルシッドナトリウム(特級)、塩化アンモニウム(特級)は和光純薬工業株式会社、を使用した。その他、水酸化ナトリウム(特級)、リン酸三カリウム(一級)、エタノール(HPLC分析用)、塩酸(特級)は和光純薬工業株式会社のものを用いた。

6.2.2 EROD 活性のための暴露試験

EROD 測定は、ANQ、BAQ、NAQ、PHQの4物質ともに、第2章で示した影響濃度曲線の結果(Fig. 3)から暴露3日目以降、影響濃度曲線が安定していることが判明していたため、本研究ではこの結果を参考に暴露後3日目の10%影響濃度を高濃度に設定し、その1/10を中濃度、高濃度の1/100を低濃度とし3つの暴露濃度区を設けた。暴露濃度は、

ANQ: 15, 150, 1500 μg/L

BAQ:2 , 20 , $200\,\mu g/L$

NAQ: 1, 10, $100 \,\mu g/L$

PHQ: 1.5, 15, $150 \mu g/L$

にそれぞれ設定した。oxyPAHs は 2.2.2 項と同様に DMF に溶解し、飼育水に添加した (DMFの飼育水中濃度が $100\,\mu\text{L/L}$ となるように添加: 飼育水 $100\,\text{mL}$ に対し、 $10\,\mu\text{L/L}$ 添加)。また、飼育水に DMF のみ添加した溶媒区と、何も添加していない飼育水のみの対照区もそれぞれ用意した。飼育水 $100\,\text{mL}$ に受精直後のヒメダカ胚を $30\,\text{MJ}$ 何で収容したものを各濃度区 $3\,\text{O}$ ずつ用意した。各容器は 24°C に温度設定してあるインキュベータ内で飼育し、光周期は $14\,\text{時間}:10\,\text{時間}$ (明:暗)に設定した。試験水は毎日全量換水し、換水前後に DO、pH、水温を測定した(水温: $24.0\pm0.5^\circ\text{C}$ 、 $pH:7.4\pm0.1$ 、 $pO:7.3\pm1.1\,\text{mg/L}$)。換水後は顕微鏡下で観察をし、死卵を取り除いた。暴露開始後 $6\,\text{H}$ 目まで毎日胚を採取し、採取した胚はあらかじめ秤量した $2\,\text{mL}$ のポリプロピレン製マイクロチューブに入れて、胚の総重量を測定した後、分析まで- 80°C で保存した。

6.2.3 EROD 測定

CYP1A の活性を調べるために、CYP1A の基質となるエトキシレゾルフィン

の脱エチル化反応(エトキシレゾルフィン O-脱メチル化活性、

ethoxyresorufin-O-deethylase:EROD)から得られるレゾルフィンの測定を行った。

リン酸二水素ナトリウムとリン酸水素二ナトリウム・12 水和物がそれぞれ1 M となるように milli-Q 水に溶解し、pH7.4 に調整したものを PBS とした。エトキシレゾルフィンを PBS に溶解させ、1 mM エトキシレゾルフィン溶液を作成し、分析まで-20°C で冷凍保存した。使用直前に PBS で 500 倍希釈し、2 nmoL/mL のエトキシレゾルフィン溶液に調整して使用した。同様にレゾルフィンも PBS に溶解し、1 mM レゾルフィン溶液を作成し、分析まで-20°C で冷凍保存した。使用直前に PBS で 500 倍希釈し、2 nmoL/mL のレゾルフィン標準液に調整した。検量線を作成するためにレゾルフィン標準液を 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 nmoL/mL にそれぞれ調製した。また酵素の NADPH を PBS に溶解し、2 mM の NADPH 溶液を作成し、分析まで-20°C で冷凍保存した。

その後、2 M の NADPH を全てのウェルに 10 μL ずつ添加し、マイクロプレートリーダー (MICROPLATE READER SH-9000, CORONA ELECTRIC) のインキュベータ (25°C) で 5 分間撹拌した。撹拌後、マイクロプレートリーダーの 530/585 (励起光/蛍光) nm の波長で直ちに EROD の測定を開始した。最初の測定を 0 分とし、測定開始から 20 分経過までは 5 分毎に測定し、20 分経過から 60 分経過までは 10 分毎に 60 分まで測定した。測定ごとに、レゾルフィン標準液から検量線を作成し、各サンプルの蛍光強度からレゾルフィン濃度を算出した。時間に対する各サンプルのレゾルフィン濃度の増加量との関係から EROD 活性速度を算出した。 算出した EROD 活性速度をタンパク質濃度で除して、タンパク質濃度あたりの EROD 活性速度を求めた。タンパク質濃度は 5. 2.6 項と同様の方法で測定した。

6.2.4 酸化ストレス測定

過酸化脂質は、脂質が酸化されて生成されるマロンジアルデヒド(MDA)などのアルデヒドとチオバルビツール酸(TBA)酸性条件で反応させて、生成したチオバルビツール酸反応物(TBARS)を測定した。TBARS は過酸化脂質生成の指標として広く使用され、酸化ストレスのバイオマーカーの1つでもある。タンパク質の酸化はカルボニル化タンパク質により評価した。カルボニル化タンパク質は酸化されたことによって生じたカルボニル基に 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを反応させ発色させて測定した。

6.2.4.1 TBARS 測定のための暴露試験

暴露は ANQ、BAQ、NAQ、PHQ の 4 物質を対象とし、暴露濃度は 6.2.2 項と同様にした。飼育水 100 mL に受精直後のヒメダカ胚を 50 個ずつ収容したものを各濃度区 3 つずつ用意した。各容器は 24℃ に温度設定してあるインキュベータ内で飼育した。光周期は、14 時間:10 時間(明:暗)に設定した。試験水は毎日全量換水し、換水前後に DO、pH、水温を測定した(水温:24.0±0.5℃、pH:7.4±0.1、DO:7.3±1.1 mg/L)。換水後は顕微鏡下で観察をし、死卵を取り除いた。暴露開始後 6 日目まで毎日胚を採取し、採取した胚はあらかじめ秤量した 2 mL のポリプロピレン製マイクロチューブに入れて、胚の総重量を測定した後、分析まで-80℃で保存した。

6. 2. 4. 2 TBARS 測定

PBS はリン酸二水素ナトリウムとリン酸水素二ナトリウム・12 水和物がそれぞれ 1 M となるように milli-Q 水に溶解し、pH7.4 に調整したものを用いた。
0.37%TBA-15%TCA 溶液は 0.25 M 塩酸にそれぞれ 0.37%TBA と 15%TCA を溶解して調製した。

胚を入れたマイクロチューブに TBS(pH7.4)を $0.6\,\text{ mL}$ 添加し、直径 $5\,\text{ mm}$ のジルコニア製ビーズを $1\,\text{つ入れ}$ 、細胞粉砕機(TissueLyser II; Qiagen,ドイツ)により粉砕した。粉砕後、 $10\,\text{分間遠心分離}$ ($16,000\,g$ 、 4°C)を行い、上清から $10\,\mu\text{L}$ をタンパク質濃度測定用に取り分け、残りの上清で TBARS を測定した。上清から $0.4\,\text{mL}$

をガラス試験管に移し、0.37% TBA-15% TCA 溶液を $0.8\,$ mL 添加した。これを沸騰水中で $15\,$ 分間加熱した後、室温で放冷した。放冷後、 $10\,$ 分間遠心分離($16,000\,$ g、4%)し、上清をセルに移した後、分光光度計(UV-1600、島津製作所)により $532\,$ nm の波長で TBARS を測定した。測定して得られた吸光度 (ABS) を以下の式にあてはめ、TBARS を算出した。

TBARS (mmol) = ABS
$$\times$$
 2000 / (2.56 \times 10⁵)

さらに算出した TBARS の値をタンパク質濃度で除して、タンパク質濃度あたりの TBARS を求めた。タンパク質濃度は 5.2.6 項と同様の方法で測定した。

6.2.4.3 カルボニル化タンパク質測定のための暴露試験

カルボニル化タンパク質測定は ANQ、BAQ、NAQ、PHQ の 4 物質を対象に行った。暴露は 6.2.2 項と同じ条件下で行った。飼育水 $100\,\mathrm{mL}$ に受精直後のヒメダカ胚を $50\,\mathrm{m}$ 値ずつ収容したものを各濃度区 $3\,\mathrm{m}$ つずつ用意した。各容器は $24^\circ\mathrm{C}$ に温度設定してあるインキュベータ内で飼育し、光周期は、 $14\,\mathrm{e}$ 時間: $10\,\mathrm{e}$ 時間(明:暗)に設定した。試験水は毎日全量換水し、換水前後に DO 、 pH 、水温を測定した(水温: $24.0\,\mathrm{m}$ も $0.5^\circ\mathrm{C}$ 、 pH : 7.4 ± 0.1 、 DO : $7.3\pm1.1\,\mathrm{mg/L}$)。換水後は顕微鏡下で観察をし、死卵を取り除いた。暴露開始後 2、4、6、 $8\,\mathrm{He}$ 目にそれぞれ胚を採取し、採取した胚はあら

かじめ秤量した 2 mL のポリプロピレン製マイクロチューブに入れて、胚の総重量を 測定した後、分析まで-80°C で保存した。

6.2.4.4 カルボニル化タンパク質測定

PBS はリン酸二水素ナトリウムとリン酸水素二ナトリウム・12 水和物がそれぞれ1 M となるように milli-Q 水に溶解し、pH7.4 に調整したものを用いた。10 mM DNPH 溶液は、2 M の塩酸に DNPH を溶解して作成した。また 6 M グアニジン塩酸溶液は milli-Q 水で 20 mM リン酸カリウム溶液を作成し、それにグアニジン塩酸塩を溶解させ 6 M グアニジン塩酸溶液を作成した。20% TCA 溶液は milli-Q 水に TCA を溶解して作成した。

胚を入れたマイクロチューブに TBS(pH7.4)を 0.6 mL 添加し、直径 5 mm のジルコニア製ビーズを 1 つ入れ、細胞粉砕機(TissueLyser II; Qiagen,ドイツ)により粉砕した。粉砕後、10 分間遠心分離(16,000 g、4°C)を行い、上清から 10 μ Lをタンパク質の濃度測定用に取り分け、残りの上清でカルボニル化タンパク質を測定した。上清から 0.5 mL をガラス試験管に移し、そこに 10 mM DNPH 溶液を 4 mL 加え、1 分間ボルテックスミキサーを 15 分毎に 4 回行った。その後、20% TCA 溶液を 5 mL 加え、5 分間遠心分離(1000 g、20°C)を行い、上清を廃棄した。残った沈殿物にエタノール:酢酸エチル=1:1 を 4 mL 加え、5 分間遠心分離(1000 g、20°C)を行い、上清を廃棄した。最後に残った沈殿物に 6 M グアニジン塩酸溶液を 2 mL 加え、3 分

間遠心分離(1000 g、20 °C)を行い、上清をセルに移した後、分光光度計(UV-1600、 島津製作所)により 370 nm の波長で測定した。測定して得られた吸光度(ABS)を 以下の式に用いて、カルボニル化タンパク質を算出した。

カルボニル化タンパク質 $(mM/g) = ABS \times 胚重量 \times 0.22$

さらに得られたカルボニル化タンパク質の値を、タンパク質濃度で除してタンパク質 濃度あたりのカルボニル化タンパク質濃度を求めた。

6.2.5 ATP 測定のための暴露試験

oxyPAHs 暴露時には胚中でのエネルギー消費が促進されると予測されたため、本研究では、ATP の測定を試みた。ATP 測定は ANQ、BAQ、NAQ、PHQ の 4 物質を対象に行った。暴露は 6.2.2 項と同じ条件下で行った。サンプリングは、暴露開始後、4、6、8 日目にそれぞれ行い、採取した胚はあらかじめ秤量した 2 mL のポリプロピレン製マイクロチューブに入れて、胚の総重量を測定した後、分析まで-80°C で保存した。

6.2.6 ATP 測定

HEPES バッファーは milli-Q 水で 0.25 M スクロース溶液を作成し、そこに HEPES を

溶解させ、10 mMHEPES 溶液を作成した。そこに水酸化ナトリウム溶液を滴下して、pH7.4 になるように調製した。

胚が入ったマイクロチューブに $10 \, \text{mM}$ の HEPES バッファー(pH7.4)を胚重量 $10 \, \text{mg}$ に対して $100 \, \mu \text{L}$ ずつ添加し、直径 $5 \, \text{mm}$ のジルコニア製ビーズを $1 \, \text{つ入}$ れ、細胞粉砕機(TissueLyser II; Qiagen、ドイツ)により粉砕した。粉砕後、 $10 \, \text{分間遠心}$ 分離 $(16,000 \, g, 4^{\circ}\text{C})$ を行い、上清から $10 \, \mu \text{L}$ をタンパク質の濃度測定用に取り分け、残りの上清で ATP を測定した。ATP の測定は和光純薬の「組織の」ATP 測定キットを用いて測定した。新しいマイクロチューブに上清 $100 \, \mu \text{L}$ を移し、そこに ATP 抽出試薬を $100 \, \mu \text{L}$ 添加した。そのマイクロチューブを転倒撹拌し、 $30 \, \text{分間室温で静置した。静置後、蛍光用 } 96 \, 穴プレートに <math>100 \, \mu \text{L}$ ずつ分注し、そこに発色試薬の L/L 試薬を $100 \, \mu \text{L}$ 添加して生物・化学発光測定装置(アトー株式会社)で測定した。

6.2.7 アンモニア測定のための暴露試験

生体内で薬物代謝が過剰に行われた際には過剰のアンモニアが生成されると考えられる。そこで、oxyPAHs に暴露された胚中のアンモニア濃度の測定を試みた。アンモニア測定は ANQ、BAQ、NAQ、PHQ の 4 物質を対象に行った。暴露は 6.2.6 項と同じ条件下で行った。暴露開始後 2、4、6、8 日目にそれぞれ胚を採取し、採取した胚はあらかじめ秤量した 2 mL のポリプロピレン製マイクロチューブに入れて、胚の総重量を測定した後、分析まで-80°C で保存した。

6.2.8 アンモニア濃度測定

PBS はリン酸二水素ナトリウムとリン酸水素二ナトリウム・12 水和物がそれぞれ1 M となるように milli-Q 水に溶解し、pH7.4 に調整したものを用いた。フェノール・アルコール溶液は 95%エタノールにフェノールを 10 g 溶解し、調整した。酸化試薬は milli-Q 水 100 mL に水酸化ナトリウムを 5 g 加え、さらにジクロロイソシアヌル酸 0.5 g を溶解して、これに milli-Q 水 100 mL にクエン酸三ナトリウムを 50 g 溶かしたものを加え、最後に milli-Q 水 50 mL を加えて作成した。ニトロプルシッド溶液は milli-Q 水 100 mL にニトロプルシッドドカリウムを 0.5 g 溶解して作成した。また検量線作成用のアンモニア標準液は、塩化アンモニウムを 105°C で 2 時間乾燥させた後、milli-Q 水 100 mL に 0.382 g 溶解してアンモニア体窒素標準液 1000 mg/L 作成した。作成した標準液を milli-Q 水で希釈して、0.05、0.1、0.2、1.0 mg/L の溶液を調整した。

胚を入れたマイクロチューブに PBS(pH7.4)を 0.6 mL 添加し、直径 5 mm のジルコニア製ビーズを 1 つ入れ、細胞粉砕機(TissueLyser II; Qiagen,ドイツ)により粉砕した。粉砕後、10 分間遠心分離(16,000 g、4°C)を行った。標準液とサンプルの上清それぞれから 0.5 mL をガラス試験管に移し、フェノール・アルコール溶液 20 μ L を加え、混合した。そこに酸化試薬を 50 μ L 加えてさらに混合した後、ニトロプルシッド溶液を 20 μ L 添加して混合させた。混合させた後、40°C の湯浴で 30 分間加熱し、室温で放冷する。放冷後、分光光度計(UV-1600、島津製作所)により 640 nm

の波長で測定した。標準液の結果から検量線を作成し、各サンプルのアンモニア濃度 を算出した。

6.2.9 統計処理

測定した結果は全て溶媒区と暴露区間との違いを、ダネットの多重比較により検定した。ダネット検定は SPSS14.0J (IBM 社) を用いて有意水準 5%のもとで有意差の有無を調べた。

6.3 結果および考察

6.3.1 EROD 活性とエネルギー生成

薬物代謝酵素群のうちシトクロム P450 は、正常な生命活動を維持するために生体内のホルモンバランスなどを調節する役割がある一方で、化学物質が体内に吸収された際に誘導され、その化学物質が体外へ排出されやすい構造に変化させる役割を持つ。特にシトクロム P450A(CYP1A)は、芳香族炭化水素や有機ハロゲン系化合物の暴露により、顕著に誘導されることが知られている。このため CYP1A の mRNAや酵素タンパク質、酵素活性は芳香族炭化水素や有機ハロゲン系化合物の有効なバイオマーカーとなっている(Carlson and Zelikoff. 2004; Uno et al. 2012; Kim et al. 2013)。薬物代謝酵素 CYP1A の活性は EROD 活性として測定され、魚類においても様々な種で EROD 活性の測定が行われている(Li et al. 2011; Mu et al. 2012)。

ANQ、BAQ、NAQ、PHQを対照区、溶媒区を含めた5濃度に分け、暴露開始から6日目まで毎日胚を採取してEROD測定を行った。その結果対照区と溶媒区で差が見られなかったので、以下暴露区と溶媒区とを比較した結果を示した(Fig. 33)。

ANQ 暴露区では $1500 \, \mu g/L$ でのみ 3 日以降から溶媒区より有意に高い EROD 活性を示した。この濃度区では 3 日目以降から顕著に EROD 活性が上昇し、4 日目にピークとなった。一方、15、 $150 \, n g/mL$ は EROD 活性量にあまり変化が見られず、溶媒区とほぼ同じで推移した(Fig. 33-a)。このことから ANQ にヒメダカ胚が暴露される際には、高濃度で暴露されない限り、CYP1A による薬物代謝があまり行われないと考えられた。

BAQ 暴露区では $20 \,\mu$ g/L と $200 \,\mu$ g/L の暴露区で $2 \,$ 日目以降から溶媒区より有意に高い EROD 活性を示した。これらの濃度区では $5 \,$ 日目まで顕著に活性が増加した。また $2 \,\mu$ g/L では $3 \,$ 日目と $6 \,$ 日目に有意差が見られたが、その日以外では有意差は見られなかった(Fig. 33-b)。この結果、BAQ の CYP1A は数 $10 \,\mu$ g/L レベルの暴露で、ヒメダカ胚中で顕著に CYP1A が誘導されると考えられた。

NAQ 暴露区では、 $10 \,\mu$ g/L と $100 \,\mu$ g/L の暴露区では $2 \,\theta$ 目から増加傾向を示し、 $4 \,\theta$ 目以降から $8 \,\theta$ 目まで溶媒区より有意に高い EROD 活性を示した (Fig. 33-c)。この結果から、NAQ も数 $10 \,\mu$ g/L レベルの暴露で、ヒメダカ胚中で顕著に CYP1A が誘導されると考えられた。

PHQ 暴露区では 15 μg/L と 150 μg/L の暴露区で 2 日目以降から溶媒区より有

意に高い EROD 活性を示しこれが 6 日目まで続いた。 $1.5\,\mu g/L$ でも 3 日目以降から溶媒区より有意に高い EROD 活性を示した(Fig. 33-d)。この結果から、PHQ は他の oxyPAHs と異なり、数 $\mu g/L$ の暴露で鋭敏にヒメダカ胚が反応し、CYP1A が誘導されることが分かった。

上記の結果から ANQ、BAQ、NAQ、PHQ の各 oxyPAHs の暴露により、EROD 活性の増加が認められたことから、各 oxyPAHs 間で誘導濃度に違いはあるものの、ヒメダカ胚中で CYP1A が誘導されることが示唆された。中でも PHQ が最も高い EROD 活性を示し、BAQ と NAQ がほぼ同じ濃度で CYP1A が誘導されていた。ANQ は最も低い EROD 活性を示していたことから他の物質に比べ CYP1A による代謝活性 は高くないのかもしれない。また 4 物質において共通して見られた特徴として 2 日目 以降から EROD 活性は増加傾向を示し、4 日目または 5 日目にピークを示すものが多かった。その後も減少傾向は見せるが、溶媒区よりも常に高い値を示していた。

通常ヒメダカ胚は受精後約3日目から4日目に臓器が形成されはじめる (Iwamatsu 1998)。つまり本研究で観察されたようなヒメダカ胚中でのEROD活性が最も高かった時期は、肝臓などの臓器が作られた時期にあたる。肝臓は主たる薬物代謝の場であり、肝臓の形成と発達伴い、胚中に吸収された oxyPAHs の代謝が促進されたと考えられた。

6.3.2 酸化ストレス

6.3.1 項に示したように、oxyPAHs 暴露によって CYPIA が誘導されることが 示唆されたことから、この薬物代謝に伴って胚中で活性酸素が生成されたことが考えられた。 CYP は酸素添加酵素として知られ、生成時に活性酸素を発生させる。 特に CYPIA は活性酸素を効率的に誘導することが知られている。 活性酸素種による酸化 ストレスとは、脂質やタンパク質、DNA などを活性酸素によって酸化損傷させるような症状を指し、酸化ストレスが深刻化すると発癌の原因などにもなると考えられて いる。 生体内では活性酸素種を打ち消す抗酸化作用や抗酸化作用物質により、活性酸素を体内から除去することで生体の恒常性を維持している。しかし、活性酸素と抗酸 化作用のバランスが崩れると酸化ストレスに伴う様々な症状が引き起こされるようになる。 そこで本項では oxyPAHs 暴露によって活性酸素による酸化ストレスがどの 程度誘発されていたのか、酸化ストレスの有効なバイオマーカーである TBARS とカルボニル化タンパク質により検証した。

6.3.2.1 脂質の過酸化

ANQ、BAQ、NAQ、PHQを対照区、溶媒区を含めた5濃度に分け、暴露開始から6日目まで毎日胚を採取してTBARSの測定を行った。その結果、対照区と溶媒区で大きな差が見られなかったので、以下暴露区と溶媒区との比較した結果を示した(Fig. 34)。

ANQ 暴露区では 1500 μg/L でのみ 2 日目以降に明瞭な TBARS の増加傾向が

見られ、2 日目から 6 日目まで常に溶媒区より有意に高い値を示した。 $15\,\mu g/L$ 、 $150\,\mu g/L$ では散発的に有意に高い値が見られたが、 $1500\,\mu g/L$ ほどは顕著な上昇が観察されなかった(Fig. 34-a)。

BAQ 暴露区では $20 \,\mu$ g/L と $200 \,\mu$ g/L の暴露区で $1 \, \mathrm{Fl}$ 目から $6 \, \mathrm{Fl}$ 目まで常に有意に高い値を示した。 $2 \,\mu$ g/L 暴露区では $6 \, \mathrm{Fl}$ 目のみ有意な上昇が見られた (Fig. 34-b)。 NAQ 暴露区では $1 \, \mathrm{Fl}$ 目と $4 \, \mathrm{Fl}$ 目から $6 \, \mathrm{Fl}$ 目まで $10 \,\mu$ g/L と $100 \,\mu$ g/L で溶媒区より有意に高い値を示した。 $2 \, \mathrm{Fl}$ 日と $3 \, \mathrm{Fl}$ 日は溶媒区と暴露区間での差は小さくなる傾向を示したが、これは他の $\mathrm{oxyPAHs}$ では見られない現象であった。 $1 \,\mu$ g/L は $5 \, \mathrm{Fl}$ 目に有意な上昇を示したが、それ以外は溶媒区とほぼ同じ変動を示し、その差は小さかった (Fig. 34-c)。

PHQ 暴露区では 1 日目から 6 日目まで $15 \,\mu g/L$ と $150 \,\mu g/L$ の暴露区で溶媒区 より有意な高い値を示した。また $15 \,\mu g/L$ と $150 \,\mu g/L$ の間に明瞭な濃度依存的な差異 は見られなかった。 $1.5 \,\mu g/L$ はむしろ溶媒区よりも低い値を示すこともあったが、これはほぼ過酸化脂質の影響が見られなかったとみるべきであろう(Fig. 34-d)。

上記の結果から ANQ、BAQ、NAQ、PHQ全てで、一定の暴露濃度以上でTBARS が有意に高くなることが認められたことから、脂質が酸化損傷を受けていた可能性が 示唆された。PHQ は高い EROD 活性を示していたが、脂質の過酸化はそれほど大きくないのかもしれない。PHQ については EROD 活性と脂質の過酸化レベルの関連が それほど強くなく、少なくとも PHQ の脂質の過酸化は CYP1A 誘導以外の要因によ

るものだった可能性もある。

6.3.2.2 タンパク質の過酸化

カルボニル化タンパク質は ANQ、BAQ、NAQ、PHQ を対照区、溶媒区を含めた 5 濃度に分け、暴露開始から 8 日目まで 2 日おきに胚を採取して測定を行った。 その結果、対照区と溶媒区で大きな差が見られなかったので、以下暴露区と溶媒区との比較した結果を示した(Fig. 35)。

ANQ 暴露区では 150 μg/L で 4、6 日目に、1500 μg/L においては 4、6、8 日目に溶媒区より有意に高い値を示し、4 日目から 8 日目にかけてカルボニル化タンパク質が蓄積されていく傾向を示した。15 μg/L は溶媒区とほぼ同じ変動を示し、差は見られなかった (Fig. 35-a)。ANQ は 1500 μg/L 区のみに脂質の過酸化が認められたが、タンパク質はそれよりも 1/10 濃度が低い 150 μg/L から酸化損傷が認められた。
BAQ 暴露区では 2 日目および 8 日目にのみそれぞれの暴露区(2 μg/L 区では 2 日目のみ)で溶媒区より有意に高い値を示した。4、6 日目には全ての暴露区において溶媒区と有意な差は見られなかった(Fig. 35-b)。これらの結果から BAQ 暴露ではタンパク質に対する酸化損傷をヒメダカ胚はそれほど受けてなかった可能性が考えられた。

NAQ 暴露区では 2、4、8 日目に 10 ng/mL と 100 ng/mL で溶媒区より有意に高い値が見られた。また 10 \mug/L のみ 6 日にも有意な上昇が見られた . TBARS のと

きと同様、 $10 \,\mu$ g/L と $100 \,\mu$ g/L の間に濃度依存的な差は見られなかった。また $1 \,\mu$ g/L では $4 \,$ 日目のみ溶媒区と有意な差が見られた(Fig. 35-c)。これらの結果から NAQ 暴露区では $2 \,$ 日目から活性酸素による酸化損傷が引き起こされていたことが考えられた。

PHQ 暴露区では 4、6、8 日目に全ての濃度区において溶媒区より高い値が見られた。 よって PHQ 暴露区では 1.5 μg/L といった低濃度の暴露でも明らかな酸化ストレスが 誘発していることが示唆された。また 8 日目にはカルボニル化タンパク質量に濃度依存的な差が見られた (Fig. 35-d)。このことから暴露濃度の上昇につれて活性酸素の 蓄積量が増したのではないかと考えられた。

上記の結果から ANQ、BAQ、NAQ、PHQ 全ての暴露物質においてカルボニル化タンパク質が有意に高い値を示したことからタンパク質が活性酸素によって酸化損傷を受けていたことが示唆された。しかし、BAQのみ、その損傷量はそれほど大きく無かったのかもしれない。PHQでは脂質の過酸化と同様、タンパク質の過酸化についても CYP1A の誘導との相関が見られなかった。脂質、タンパク質の酸化ストレスの結果から考えると、少なくともこれらの酸化ストレスは薬物代謝に依存して誘導されたものではない可能性がある。

6.3.2.3 oxyPAHs 暴露により誘導される酸化ストレスに関する考察

TBARS とカルボニル化タンパク質の測定結果から、CYP1A による薬物代謝

と脂質及びタンパク質の過酸化との明瞭な相関は見出すことができず、PHQの酸化ストレスなどから考えると、その関係性は薄い可能性すらあると考えられた。また、BAQなどのように明瞭な脂質の過酸化は確認できたものの、タンパク質の過酸化などはそれほど大きな影響と言えなかった。このことから、oxyPAHsごとに酸化損傷を受ける部位は異なる可能性がある。

活性酸素種の標的となる主な脂質は細胞膜内の脂質、及び細胞内膜を構成するリン脂質などが挙げられる。脂質の過酸化に伴い細胞膜やリン脂質が酸化損傷を受けると、ミトコンドリアが影響を受け、続いてさらなる活性酸素種の生成を誘発して、最終的に細胞機能障害や細胞壊死を引き起こす。つまり酸化を受けた細胞は、別の細胞の酸化損傷を促すことになる(Green and Reed. 1998)。タンパク質の酸化はアミノ酸配列の切断や側鎖の修飾などを引き起こし、とりわけメチオニン、ヒスチジン、システイン、チロシン、トリプトファン残基は比較的酸化損傷を受けやすいと言われている(Eaton et al. 2002; Sell et al. 2007; Moskovitz and Oien 2010)。

TBARS測定において、特に高い濃度の暴露区で常に有意な差が見られたBAQとPHQ、ANQでは第2章の影響試験でいずれも胚内の血液凝集や管状心臓誘発などの影響が観察された。細胞膜やリン脂質が酸化損傷を受けると、血管の上皮膜などに細胞壊死などが起こり、その結果、血液の凝集や血管の形成異常が誘発される可能性がある。また、第2章で示したようにANQ暴露時には卵黄の陥没が起こり、第4章のメタボロミクス解析の結果で見られたような多くのアミノ酸類の減少はタンパク

質の過酸化と関連があるのかもしれない。今後、酸化ストレスと生体内に現れる暴露 影響やそれに伴って現れる症状についてはさらなる検証が必要である。

6.3.3 エネルギー生成

生物は恒常性を維持するために常に代謝を行っている。その主たる目的はエネルギー生死絵であり、生命維持のために生成したエネルギーを様々な器官に投入している。生体内の主たるエネルギー源である ATP は、解糖系と電子伝達系で僅かに、そして TCA 回路で最も多く生成される。生物が化学物質に連続的に暴露されると薬物代謝が活性化されるのみならず、その影響によって損傷を受ける場合があり、影響を受けた部分はいち早く回復させようとする。これらには通常よりも大量のエネルギーが必要となる。第4章のメタボロミクスの結果より、幾つかの oxyPAHs で TCA 回路における有機酸類の変動、その他、ATP 生成に関わる代謝経路での代謝物変動が確認されたが、本章では実際に oxyPAHs 暴露が胚中の ATP 生成量に直接どのような影響を与えているのか調べた。

ANQ、BAQ、NAQ、PHQをそれぞれ対照区、溶媒区を含めた5濃度に分け、 暴露開始から4日目、6日目、8日目に胚を採取して胚中のATPを測定した。ATPは 対照区と溶媒区で大きな差が見られた。これはDMFが生体外異物であり、それを体 外に排出しようとしてATPが投入された可能性がある。対照区のATPは胚発生期間 を通して大きな変動は見られなかった。以下暴露区と溶媒区とを比較して結果を示し た (Fig. 36)。

ANO 暴露区では4日目から濃度依存的な減少が見られ、15 μg/L では4日目 と8日目に、150 μg/L と 1500 μg/L では4日目と6日目、8日目に溶媒区と有意な差 が見られた(Fig. 36-a)。4日目から濃度依存的に急激に減少したATPは、濃度依存 的に ANO の暴露影響が大きくなり、その結果 ATP の投入量が異なったことによるこ とを示すと考えられた。また、ATP の生成量は低濃度暴露区の方が大きく、濃度が高 くなるにつれて DMF 区と変わらない傾向を示した。これは高濃度区の影響が小さか ったわけではなく、ANQ の高濃度暴露の影響により、ATP の生成が抑制されたので はないかと考えられた。第4章のメタボロミクスの結果から ANQ 暴露時の TCA 回 路に関わる有機酸の変動は、暴露後半でその代謝の間に多くの ATP が生成されるク エン酸、フマル酸、リンゴ酸の生成量に若干の有意差が見られたものの、DMF 区と はそれ程大きな差が見られなかった。これに対して、グルコース、G1P、G6Pといっ た糖代謝に関わる代謝物は試験期間を通じて抑制されていた。これらの結果から考え ると ANQ 暴露による濃度依存的な、かつ、経時的な生成抑制は解糖系で生成される ATP量が減少したことに関係しているのかもしれない。

BAQ 暴露区では $2 \mu g/L$ で 6 日目に溶媒区より有意に高い値を示した。また、 $20 \mu g/L$ は 4 日目に有意に高く、 $200 \mu g/L$ は 8 日目に有意に減少する傾向が見られた (Fig. 36-b) 結果として BAQ は濃度依存的、あるいは経時的かつ明瞭な変動が見られなかった。第 4 章のメタボロミクスの結果では TCA 回路内での有機酸の変動はコ

ハク酸、フマル酸で DMF 区よりも減少する傾向が見られた。また、グルコース、GIP、G6P は、連続的に BAQ 暴露されたとき、暴露後半にこれらの代謝物の生成が促進されていた。このことから、BAQ 暴露中期にはその影響から TCA 回路の働きが抑制され、それを受けて解糖系の代謝が暴露後半から補うように促進され、ATP 供給を維持しようとした可能性が考えられた。 200 μg/L 暴露区では 4 日目に ATP の生成が促進される傾向を示しており、また、6 日目及び 8 日目に 200 μg/L で ATP の生成が抑制される傾向が僅かながら見られたことから、BAQ の高濃度暴露の影響により、解糖系の ATP の生成が促進されても十分ではなく、結果として ATP 量の減少が起こったのかもしれない。これらを総合すると BAQ は明瞭な ATP の変動傾向が見られなかったものの、詳細に検証すると連続暴露により、暴露濃度が高くなるにつれて経時的にATP の生成が抑制される傾向にあったと考えらえた。

NAQ 暴露区では全ての暴露区において4日目から8日目にかけて減少傾向がみられ、1 μ g/L では4日目と8日目に、 $10\,\mu$ g/L では4日目と8日目に、 $10\,\mu$ g/L では4日目と8日目に流媒区と有意な差が見られた(Fig. 36-c)第4章のメタボロミクスの結果から考えると TCA 回路のコハク酸、フマル酸、リンゴ酸が DMF 区よりも多少抑制される傾向にあり、また、グルコース、G1P、G6P といった糖代謝に関わる代謝物も明らかに抑制されていた。このことから、NAQ も暴露4日目から6日目の間に ATP 生成を抑制するような影響が生じ、その抑制は濃度依存的に強くなったのではないかと考えられた。

PHQ 暴露区では特に 150 μg/L では 4 日目、6 日目、8 日目に著しい上昇が見られた。また、6 日目及び 8 日目には 15 μg/L も著しい上昇が見られた。さらに 1.5 μg/L では 6 日目に溶媒区と有意な差が見られた (Fig. 36-d)。 PHQ 暴露区は他の oxyPAHs とは異なり、明らかに濃度依存的な ATP 生成量の促進が暴露期間を通して観察された。第 4 章のメタボロミクスの結果では、TCA 回路の主たる ATP 生成に関わっているコハク酸、フマル酸、リンゴ酸の変動は DMF 区とほぼ変わっていなかった。また、グルコース、G1P、G6P といった解糖系の代謝物もグルコースが僅かに減少するものの、暴露期間に応じて DMF 区と同様に個々の代謝物量の増加が認められ、特に 6 日目の G1P と G6P は DMF 区よりもかなり高い傾向を示した。このことから、PHQ は ATP の生成が他の oxyPAHs のように抑制されることなく、胚内から PHQ を分解、排泄するため、あるいはその暴露影響から回復するために ATP の投入を積極的に行っていたのではないかと考えられた。

6.3.4 アンモニアの過剰生成およびその他の影響

タンパク質の同化・異化や、その他様々な生物の活動によって生じるアンモニアは非常に毒性が高いため、哺乳類では尿素に、鳥類では尿酸にそれぞれ老廃物として代謝して体外へ排泄する。これに対し、魚類は直接アンモニアを体外から排泄するアンモニア排出性である、と一般的にいわれている。肝臓におけるタンパク質異化の過程や、運動時に筋肉で生成されるアンモニアは直接、血液を介して鰓へと運ばれ、

体外へ排泄される。しかし、近年の研究によりいつかの硬骨魚類において尿素回路を持つ魚種があったり、胚の発生時にのみ尿素回路酵素や、尿素の生成過程で生じるカルバミルリン酸合成酵素の発現が確認されており、それらに関しては尿素回路あるいはそれに類似した代謝経路によってアンモニアを尿素へと代謝していると報告されている(Ip and Chew. 2010; LeMoine and Walsh. 2013; Fujisawa et al. 2016)。

第4章のメタボロミクスの結果より、各oxyPAHsに暴露された胚中の尿素回路に関わる代謝物が発生に伴い大きく変動していたことから、胚内で暴露により過剰に生成されたアンモニアの代謝、分解が盛んに行われていたことが推測された。また6.3.1項の結果より、oxyPAHs暴露により、胚内でCYP1Aが誘導されていたことからCYP合成のためのタンパク質異化、及びCYP1Aによる薬物代謝によって通常よりもエネルギーを多く必要とするためのタンパク質の異化作用も活発になる可能性が考えられ、その結果、その過程で生成されるアンモニアの量も多くなるのではないかと予想された。そこで本研究では、oxyPAHs暴露時の胚中アンモニアの測定を行い、その経時的な変動を調べた。

ANQ、BAQ、NAQ、PHQを対照区、溶媒区を含めた5濃度に分け、暴露開始から8日目まで2日おきに胚を採取して測定を行った。その結果、対照区と溶媒区で大きな差が見られなかったので、以下暴露区と溶媒区とを比較した結果を示した(Fig. 37)。

ANQ 暴露区では 1500 μg/L 暴露区で 4 日目から明らかな増加傾向が見られ、4 日目、

6日目、8日目は溶媒区より有意に高い値を示した。 $15 \mu g/L$ と $150 \mu g/L$ においても 6日目に有意な増加が認められた(Fig. 37-a)。ANQ 暴露時には溶媒区が 8日目に増加していたが、アンモニアは浸透圧調整物質としても利用されるため、この増加はそのために用いられた可能性が考えられた。

BAQ 暴露区では $20 \,\mu$ g/L と $200 \,\mu$ g/L において 4 日目から増加傾向が見られ、 $20 \,n$ g/mL は 4、6、8 日目に溶媒区より有意に高く、 $200 \,\mu$ g/L は 4 日目と 8 日目に溶媒区より有意に高い値を示した。 $2 \,\mu$ g/L は溶媒区とほぼ同じ変動をしており大きな差は見られなかった(Fig. 37-b)。

NAQ 暴露区では全ての暴露濃度において4日目から濃度依存的な増加傾向が見られ、 $1 \mu g/L$ では6日目に、 $10 \mu g/L$ では6日目と8日目に、 $100 \mu g/L$ では4日目と6日目と8日目に溶媒区より有意に高い値を示した(Fig. 37-c)。

PHQ 暴露区では全ての暴露濃度において濃度依存的な増加傾向が見られた。1.5 ng/mL では有意な差は見られなかったが、 $15\,\mu$ g/L では $6\,$ 日目に、 $150\,\mu$ g/L では常に溶媒区より有意に高い値を示していた(Fig. 37-d)。

いずれのoxyPAHs もヒメダカ胚中でほぼ濃度依存的にアンモニア濃度を上昇させることが確認され、暴露によりアンモニアが過剰に生成されていたことが示唆された。濃度依存的なアンモニア濃度の上昇は、薬物代謝のため、あるいはその影響から回復を図るために新たなタンパク質合成(異化)を盛んに行い、それが暴露濃度の上昇と共に著しくなることに依存するのであろう。

冒頭に述べたようにアンモニアは生物に対し非常に強い毒性を持っているため、体内に過剰に蓄積すれば生物に対して影響を及ぼし、死亡することもある。ニジマスでは胚にアンモニアを暴露するとブルーサック症候群様の影響を呈した仔魚が孵化することが報告されている(Dalton and Calvin. 1977)。どの暴露区でも4日目以降からの明瞭に増加傾向が見られ、臓器形成に伴った薬物代謝の活性化の影響も考えられた。また第2章の結果よりBAQ、NAQ、PHQでは早期に死亡する胚が観察されており、これはアンモニアの蓄積と何らかの関連がある可能性があるのかもしれない。

第7章 総合考察とまとめ

本研究では oxyPAHs が魚類胚へ与える影響を顕微鏡観察、胚中の代謝物変動などから捉えると共に、oxyPAHs 暴露による影響、特に奇形誘発とのメカニズムの一部を解明することを目的とした。

初めに oxyPAHs が魚類胚に対してどのような影響を与えるのか調べるために 影響試験を行った。本研究ではoxyPAHsの中から4種類、アセナフテンキノン(ANQ)、 7,12-ベンズアントラセンキノン (BAQ)、1,4-ナフトキノン (NAQ)、9,10-フェナント レンキノン (PHQ) を対象物質とした。ヒメダカ胚に oxyPAHs を暴露することによ り、各物質暴露でそれぞれ特徴的な影響が観察された。ANQ では卵黄の陥没、BAQ は油球の黒化、NAQ は発生が全く進まない、あるいは脊椎が湾曲する、PHQ では発 生の遅延や未発達な個体の孵化、などが特徴として挙げられた。その他、うっ血や管 状心臓、心浮腫などの症状が、全ての oxyPAHs 暴露下で確認された。加えて、ANQ、 BAQ、PHQ においてダイオキシン類などを魚類胚に暴露したときによく見られるブ ルーサック症候群様の症状を呈した仔魚が孵化した。これらの個体は口蓋形成不全、 頭蓋の委縮、管状心臓、心浮腫を呈していた。一方、NAO では孵化仔魚の背骨や尾 骨の湾曲、ヨークサックの未吸収が数多く観察された。oxyPAHs は PAHs と構造が類 似しているため、PAHs と同じような影響が発現することを予測していたが、PAHs で見られるようなブルーサック症候群様の症状が観察される一方で、PAHs 暴露では 見られないような、oxyPAHs 独特の影響も見られた。特に ANQ の卵黄の陥没や BAQ の油球の黒化といった影響は、他の化学物質でもあまり知られていない影響だと考えられる。このことから、ベンゼン環に酸素が結合する形態を持つ oxyPAHs と PAHs の間にはある程度影響発現メカニズムに相違があると考えられた。また、魚類に対する個々の PAHs の影響はそれが持つベンゼン環の数が異なってもかなり共通していることが知られているが、oxyPAHs は物質固有でその他には見られない特徴的な影響が観察されたことも大きな特徴の1つとして上げられる。なぜ、ベンゼン環の数が異なっただけで全く異なった影響が魚胚に現れたかは分からないが、酸素が付加する位置と関連性も含め、今後、さらに影響発現メカニズムを探求していく必要がある。

第3章では、oxyPAHsのヒメダカ胚中での影響発現メカニズムを明らかにするためにメタボロミクス解析を利用しようとしたが、これまで、研究を開始した当初は GC/MS による魚類のメタボロミクス解析の例があまり無かったために、その有用性を検証する必要があり、ハンドリングしやすいコイを対象として、その腎影響がメタボロミクスで判別できるかどうかを検証した。対象物質として既に多くの生物で腎影響を与えることが知られるゲンタマイシンを対象物質とし、コイに腹腔内注射を施して、血漿中の代謝物変動から腎臓の影響を調べた。その結果、浸透圧制御に対する影響やろ過機能の損失、エネルギー生成への影響など、幾つかの腎影響に繋がる代謝物変動が見出されたことにより、GC/MS メタボロミクスの有用性が確認された。魚の腎影響をメタボロミクスで評価した例は国内外でほとんどなく、これも本研究の重

要な成果であるため、ここに掲げた。

GC/MS メタボロミクスの有用性が確認できたため、oxyPAHs 暴露された胚中の代謝物変動を調べた。その結果、oxyPAHs 暴露により3つの共通した、影響が起こり得ることが予想された。すなわち、

- 1) 胚発生中の遊離アスコルビン酸とコラーゲンを構成するアミノ酸の減少から、軟骨を初めとする骨形成に対する影響が生じた
- 2) グルタミン酸やアスパラギン酸などの代謝物変動から、胚中で生成されたアンモニアから影響を受けた
- 3) 解糖系及び TCA 回路中の代謝物変動から、エネルギー生成に対する影響が生じた

などが挙げられた

1)で減少が見られたアスコルビン酸は、軟骨の主成分であるコラーゲン合成に欠かせない栄養素だが、ANQ、BAQ、PHQで大きく減少していた。さらにコラーゲンを構成するアミノ酸のヒドロキシプロリンも有意に減少していた。この結果からoxyPAHs 暴露によりコラーゲンが正常に生成されず、軟骨形成が阻害され、その結果、口蓋形成不全、頭蓋の委縮、脊椎の湾曲が生じるのではないかと考えられた。そこで第5章で軟骨・硬骨二重染色により、軟骨と硬骨を染め分け、特に軟骨形成に着目してoxyPAHs の骨形成に関わる影響を検証した。その結果、どのoxyPAHs 暴露におい

ても、メッケル軟骨と呼ばれる下顎を形成する軟骨が形成されていない仔魚が数多く 孵化した。また、尾骨部分の軟骨形成がほぼなされていないものも多かった。メッケ ル軟骨が欠けている個体のほとんどは頭蓋、口蓋量部分の形成が未熟であるものが多 く、観察を進めていくと上記の軟骨以外にも様々な部分の軟骨が欠落する個体が数多 く観察された。また、特に頭部分の軟骨のみならず硬骨形成にも oxyPAHs 暴露は大 きく影響を与えることが示唆された。加えて基舌骨の長さをそれぞれ比較したところ 全ての oxyPAHs において有意に短くなっていることが示唆された。これらの軟骨形 成の不全は様々な研究がなされており、その共通性から魚胚期の神経胚時の神経冠細 胞の変異が oxyPAHs 暴露により引き起こされた結果ではないかと考えられた (Langille and Hall 1988)。また、これらの骨染色による顕微鏡観察に加えて、軟骨を 形成するコラーゲン中のヒドロキシプロリン量を測定した。その結果、特に暴露 5 日目で全ての oxyPAHs 暴露区で胚中のヒドロキシプロリン量が減少していることが 確認され。特に oxyPAHs の中でも深刻な奇形を引き起こした BAQ のヒドロキシプロ リン含量が小さい、という結果が得られた。コラーゲン中のヒドロキシプロリンが不 足するとコラーゲンは不完全なコラーゲンとなり、軟骨や血管の形成に悪影響を及ぼ す。この結果は oxyPAHs 暴露により正常なコラーゲンが形成されず、正常な軟骨が 胚期に形成されなかったのみならず、第2章の影響試験で見られた頭蓋の委縮やうっ 血、管状心臓に何らかの関連がある可能性が考えられた。また、これらの検証により、 メタボロミクスの結果から予想された1)の仮説はほぼ実証された。

- 2) で掲げたグルタミン酸やアスパラギン酸などの代謝物変動から、胚中で過 剰なアンモニアが生じ、これが胚発生時の影響及び奇形誘発に深く関わったと予想し た。特に構造上 oxyPAHs は CYP1A による薬物代謝をヒメダカ胚中で受けると考えら れたため、CYP1A 誘導のバイオマーカーである EROD の誘導量を調べて、全ての oxyPAHs がその強弱はあるものの、胚内での薬物代謝に CYP1A が関わっていたこと を確認し、アンモニア発生量とその変動を各 oxvPAHs にヒメダカ胚に暴露して調べ た。その毛化、第6章で示したように全てのoxyPAHsに暴露されたヒメダカ胚内で 明らかに過剰なアンモニアが生成していることを見出した。アンモニアは生物にとっ てかなり強い毒である。oxyPAHs 暴露によるこの過剰なアンモニアの生成はヒメダカ 胚発生中及び孵化仔魚の奇形誘発に大きく関わったか可能性が高いと考えられた。事 実、過去にはニジマス胚にアンモニアを暴露するとブルーサック症候群様を呈した仔 魚が孵化することが報告されている (Dalton and Calvin. 1977)。この結果から oxyPAHs 暴露により過剰に発生したアンモニアがヒメダカ胚に影響を与え、奇形誘発に関与し たことが強く疑われた。また、メタボロミクスから導いた2)の予想もほぼ実証され たと考えている。
- 3)のエネルギー生成は関与している代謝物の数が多く判断が実際には難しかった。ATP 生成の主たる場は TCA 回路であることはいうまでもなく、TCA 回路を構成する有機酸の中でも特に、コハク酸からフマル酸、リンゴ酸、アセチル CoA に至るまでの間に TCA 回路で生成される全ての ATP が生成されている。しかし、例えば、

ANO、BAO、PHO などは明らかにクエン酸の有意な減少が確認できた。クエン酸か らコハク酸に至るまでの代謝経路では実は ATP は生成されない。そのため、クエン 酸の減少がどのように ATP 生成の増減に関わっているのか判断が難しく、今後の検 証課題の1つであると考えている。一般的にはコハク酸の前駆物質であるクエン酸の 減少が起こると、クエン酸からコハク酸に至る代謝経路において中間代謝物となる 2-オキソグルタル酸をグルタミン酸などの炭素骨格を用いて生成増加し、十分にコハ ク酸を生成する形態を作った後、ATP の安定的生成と提供を図る。しかし、上記にも 示したとおり、グルタミン酸はその他の代謝や機能にも数多く関わっている多機能ア ミノ酸であり、グルタミン酸の動きだけでは ATP 生成との関与、コハク酸が減少し たときの2-オキソグルタル酸とグルタミンさの関わりなどを予想することが難しい。 これらの代謝物変動と ATP 生成の問題は今後の課題としたい。本研究ではエネルギ 一代謝に関わる ATP 生成量と oxyPAHs 暴露の家計を少しでも明らかにすべく、 oxyPAHs に暴露された胚中の ATP 生成量とその経時的な変動を調べた。その結果、 ANQ、BAQ、NAQ といった oxyPAHs は暴露濃度が高くなるにつれて ATP の生成を 抑制するような働きをすることが示唆された。反対に PHQ 暴露時のみ、ATP の生成 が促進されることを見出した。生体外異物である、oxyPAHs 暴露、そして胚中への吸 収により、ヒメダカ胚は生体外異物である oxyPAHs を薬物代謝を初め、あらゆる手 段を用いて体外へと oxyPAHs を排出することを試みると考えられる。そのために本 来であれば大量の ATP が必要となるはずであり、ここで ATP の生成が抑制されるこ

とは胚にとっても致命的になりかねない。実際に、第6章で示したように、ANOを 除く BAO、NAO、PHO では比較的低濃度で脂質の過酸化が確認され、また、ANO、 NAQ、PHQ である程度明瞭なタンパク質の過酸化も確認された。これらの酸化スト レスは胚発生中の多くの期間で続くことが確認されたため、ヒメダカ胚にとっては無 視できない程、大きな影響を引き起こしていた可能性がある。そこで、ATP が抑制さ れるということはその個々の胚に対する影響の増大を意味し、実際に個体に現れる影 響も強くなると考えられる。oxyPAHs 暴露により ANQ 以外の BAQ では比較的低い 濃度暴露で奇形を呈した仔魚の孵化が観察され、NAQ では発生が全く進まず、発生 が進んだとしても奇形仔魚が数多く孵化した。これらの影響は ATP の生成と抑制、 薬物代謝、酸化ストレス等が密接に関わって起こる可能性が考えられた。一方で ATP の生成がむしろ促進されていた PHO 暴露群で解糖系に関する代謝経路にある代謝物 が経時的に有意に増加しており、TCA 回路を形成するコハク酸、フマル酸、リンゴ 酸といった代謝物生成もそれほど抑制されていないことが分かった。また BAQ など でも解糖系に関する代謝物生成が促進されていることが確認でき、ATP生成の抑制が ANQ や NAQ ほど深刻ではなかった。このことから、薬物暴露時の胚中 ATP の生成 量は TCA 回路による生成はもちろん無視できないが、グルコースに端を発する糖代 謝に大きく依存されるのはないかと考えられた。3) で示したエネルギー生成に対す る影響は、胚中 ATP を個別に測定し、その変動を調べ、さらに EROD や酸化ストレ スなどの変動を総合的に照らし合わせることで、ある程度説明が出来たのではないか と考える。また、比較的判断が難しいメタボロミクスによるエネルギー生成の説明も、 上記の個々の試験を照らし合わせることでかなり説明可能であった。

本研究ではANQ、BAQ、NAQ、PHQといったoxyPAHsを主として対象とし、 これらのヒメダカ胚の発生や影響、そして孵化仔魚の奇形誘発への関連を総合的に調 べた。その結果、oxyPAHs はこれまで知られていないような様々な影響をヒメダカ胚 に与えるだけでなく、孵化仔魚の骨形成不全やブルーサック症候群様の影響を与える ことが分かった。これらの影響メカニズムを明らかにするべく、様々な手法で探求を 進め、コラーゲン形成不全による骨形成の抑制、過剰なアンモニア発生による毒性発 現、そして、エネルギー生成抑制による影響の増大などを明らかにすることができた。 酸素化 PAHs はここに対象とした 4 種類以外にも様々な形態のものが実際は存在する。 今回対象とした4種類だけでも、個々に固有な影響を見出すことが出来たが、実環境 に残留する個々の oxyPAHs が全て個々に特徴的な影響を魚胚を初め、様々な生物に 与えることも否定できない。oxyPAHs の環境中の存在量は PAHs とそれほど変わらな い、という研究例もある(Layshock et al. 2010)。PAHs の水生生物に対する影響研 究は比較的進んでいるが、oxyPAHs に対する研究例はわずかしかない。今後、早急に その影響研究を進めるだけでなく、それと同時に環境中における oxyPAHs の発生、 残留量の減少を図ることが課題となることは間違いない。

Table 1 Effects of exposure to oxyPAHs in embryos and hatched larvae

Chemical	Nominal concentration (µg/L)	Measured concentration (μg/L)	Mortality (%)	Time to hatch (day)	Frequency of abnormalities in embryos (%)	Frequency of morphological abnormalities in larvae (%)
N'N-dimethylformamide	-	-	-	9.1 (±0.5)	0	-
Acenaphthenequinone	320	169 (±72.3) a	0	9.4 (±0.4)	0	-
	800	518 (±160.9)	$3(\pm 4.3)$	$9.4 (\pm 0.8)$	3 (±4.3)	5 (±5.3)
	1000	573 (±215.2)	$3(\pm 4.3)$	9.9 (±0.6) *	$5(\pm 5.0)$	$10 (\pm 0.5)$
	2000	1113 (±346.0)	15 (±5.0) *	10.7 (±1.3) *	20 (±10.0) *	33 (±12.7) *
	5000	2720 (±1489)	93 (±8.3) *	11.3 (±0.5) *	100 (±0.0) *	100 (±50.0) *
7,12- Benz(a)anthracenequinone	5.12	4.47 (±0.4)	0	9.2 (±0.4)	0	0
	12.8	9.86 (±2.1)	$3(\pm 4.3)$	9.9 (±0.7) *	$3(\pm 4.3)$	0
	32	$22.4 (\pm 1.4)$	$15 (\pm 15.0)$	$9.4 (\pm 0.8)$	35 (±5.0) *	47 (±17.9) *
	80	64.4 (±5.8)	35 (±5.0) *	10.7 (±1.0) *	23 (±22.8) *	66 (±12.9) *
	200	165 (±15.6)	48 (±32.7)*	10.7 (±0.9) *	83 (±13.0) *	69 (±40.0) *
	500	468 (±36.3)	100 (±0.0)*	0 p	100 (±0.0) *	0
1,4-Naphthoquinone	12.5	7.89 (±1.1)	0	9.8 (±0.7) *	0	0
	25	16.6 (±1.7)	0	9.6 (±0.8) *	0	0
	50	36.5 (±3.7)	5 (±5.0)	$9.4 (\pm 0.7)$	5 (±3.3)	0
	100	74.3 (± 11.8)	13 (±8.3) *	9.9 (±0.7) *	10 (±10.0) *	66 (±18.6) *
	200	145 (±17.4)	78 (±14.8) *	10.8 (±0.9) *	98 (±4.3) *	75 (±43.3) *
	400	314 (±36.3)	100 (±0.0) *	0 p	100 (±0.0) *	0
9,10- Phenanethrenequinone	50	46.5 (±4.4)	0	9.1 (±0.5)	0	0
	100	$80.7 (\pm 10.8)$	$10 (\pm 12.2)$	$9.3 (\pm 0.6)$	$10 \ (\pm 10.0)$	3 (±5.4)
	200	155 (±17.3)	25 (±11.2)*	$9.3 (\pm 0.8)$	23 (±4.3) *	47 (±22.6) *
	400	347 (±32.0)	85 (±5.0) *	10.9 (±2.7) *	75 (±15.0) *	100 (±0.0) *
	800	734 (± 101.0)	100 (±0.0)*	0 p	100 (±0.0) *	0

^{*}Significant difference from the solvent control group (p < 0.05)

a Numbers in parentheses represent the standard derivation

b All individuals were killed during embryonic development

Table 2 Concentration of NOEC, LOEC, EC10, and EC50

Chemical	NOEC (µg/L)	LOEC (µg/L)	EC10 (μg/L)	EC50 (μg/L)
Acenaphthenequinone	573	1113	656	1222
7,12-Benz(a)anthracenequinone	9.86	22.4	8.02	35.6
1,4-Naphthoquinone	36.5	74.3	35.6	66.2
9,10-Phenanthrenequinone	80.7	155	55.6	118

Table 3 Effects of exposure to oxyPAHs in embryos and hatched larvae

Chemical (Nominal concentration) (µg/L)	Group name	Mortality (%)	Time to hatch (day)	Frequency of abnormalities in embryos (%)	Frequency of morphological abnormalities in larvae (%)
Control	-	0	9.4 (±0.1)	0	0
	E-1	0	9.2 (± 0.1)	0	0
	E-2	0	9 (±0)	0	0
N'N-dimethylformamide (100)	E-3	0	$9.5 (\pm 0.1)$	0	0
(100)	E-4	0	$9.5 (\pm 0.3)$	0	0
	All	0	$9.3(\pm 0.2)$	0	0
	E-1	87 (± 4.7)	11.3 (± 1.3)	100 (± 0.0)	100 (± 0.0)
Acenaphthenequinone (5000)	E-2	83 (± 17)	$7.4 (\pm 5.3)$	83 (± 12.5)	63 (± 37.5)
	E-3	8 (± 8.2)	$11.4(\pm 1.0)$	$100(\pm 0.0)$	26 (± 13.0)
	E-4	$37 (\pm 20.1)$	$10.6 (\pm 0.3)$	20 (± 8.2	40 (± 26.5)
	All	$100(\pm 0.0)$	-	$100(\pm 0.0)$	0
	E-1	87 (± 4.7)	10.5 (± 0.7)	87 (± 4.7)	4 (± 5.9)
7.12-	E-2	97 (± 4.7)	11 (-)	$100(\pm 0.0)$	$100~(\pm~0.0)$
Benz(a)anthracenequinone	E-3	$100(\pm 0.0)$	0	$100(\pm 0.0)$	0
(500)	E-4	3 (± 4.7)	$9.7 (\pm 0.1)$	3 (± 4.7)	3 (± 4.7)
	All	$100(\pm 0.0)$	0	$100(\pm 0.0)$	0
	E-1	40 (± 29.4)	10.8 (± 0.6)	53 (± 20.5)	66 (± 24.5)
	E-2	7 (± 4.7)	$10.0 (\pm 0.4)$	0	11 (\pm 0.5)
1,4-Naphthoquinone (200)	E-3	43 (\pm 12.5)	$11.7 (\pm 0.4)$	60 (± 8.2)	90 (± 7.4)
	E-4	7 (± 4.7)	$10.8 (\pm 0.6)$	3 (± 4.7)	0
	All	$78 (\pm 14.8)$	$10.8 (\pm 0.6)$	$100(\pm 0.0)$	$100~(\pm~0.0)$
	E-1	10 (± 0.0)	11.2 (± 0.3)	0	22 (± 9.1)
9,10-Phenanethrenequinone (400)	E-2	40 (± 8.2)	$10.7 (\pm 0.6)$	67 (± 4.7)	44 (± 4.2)
	E-3	63 (± 18.9)	$12.3~(\pm 1.2)$	77 (\pm 17.0)	64 (± 38.1)
(400)	E-4	97 (± 4.7)	15 (-)	$100(\pm 0.0)$	$100~(\pm~0.0)$
	All	85 (± 5.0)	10.9 (± 2.6)	$100(\pm 0.0)$	$100~(\pm~0.0)$

E-1: exposure from post-fertilization to 1 day post-fertilization (dpf); E-2: exposure from post-fertilization to 2 dpf; E-3: exposure from post-fertilization to 3 dpf; E-4: exposure from 4 dpf to hatching; All: exposure form post-fertilization to hatching

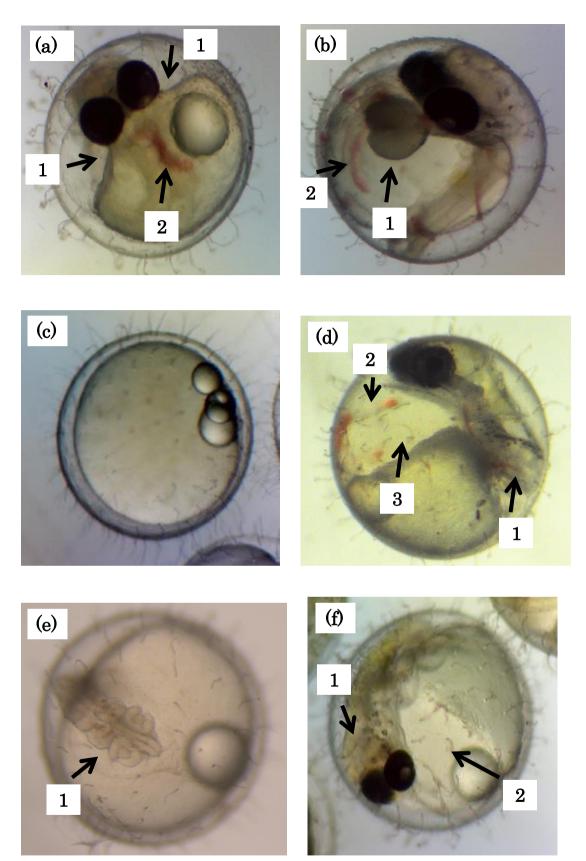


Fig. 1 Effects of individual oxyPAHs on medaka embryo development. (a) 5 (day post fertilization (dpf) embryo after exposure to 2720 μ g/L ANQ. (b) 4 dpf embryo after exposure to 468 μ g/L BAQ. (c), (d) 2 dpf and 8 dpf embryos after exposure to 314 and 145 μ g/L NAQ, respectively. (e), (f) 3 dpf and 8 dpf embryos after exposure to 734 and 347 μ g/L PHQ, respectively.



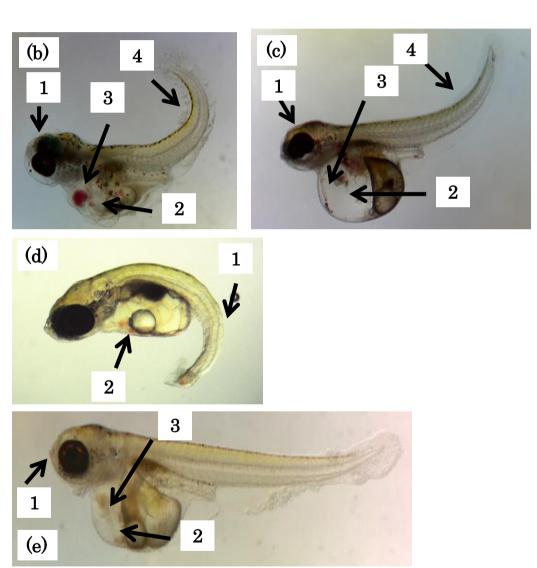


Fig. 2 Effects of individual oxyPAHs on larvae. 3 day-post-hatch (dph) larvae after exposure to (a) 10 $\mu g/L$ DMF, (b) 2720 $\mu g/L$ ANQ, (c) 165 $\mu g/L$ BAQ, (d) 145 $\mu g/L$ NAQ or (e) 347 $\mu g/L$ PHQ.

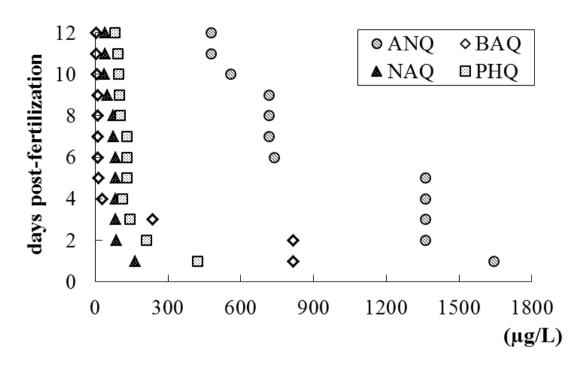


Fig. 3a

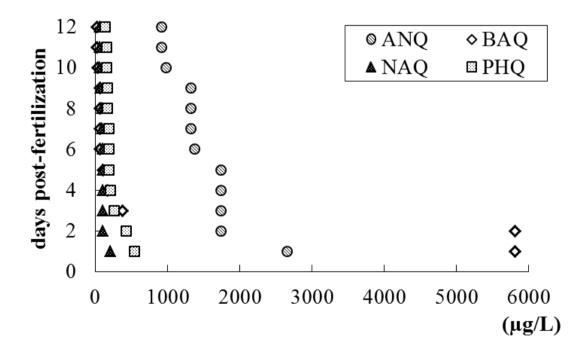


Fig. 3b

Fig. 3
Concentration-response relationship based on EC10 (Fig. 3a) and EC50 (Fig. 3b) values derived from medaka embryos.

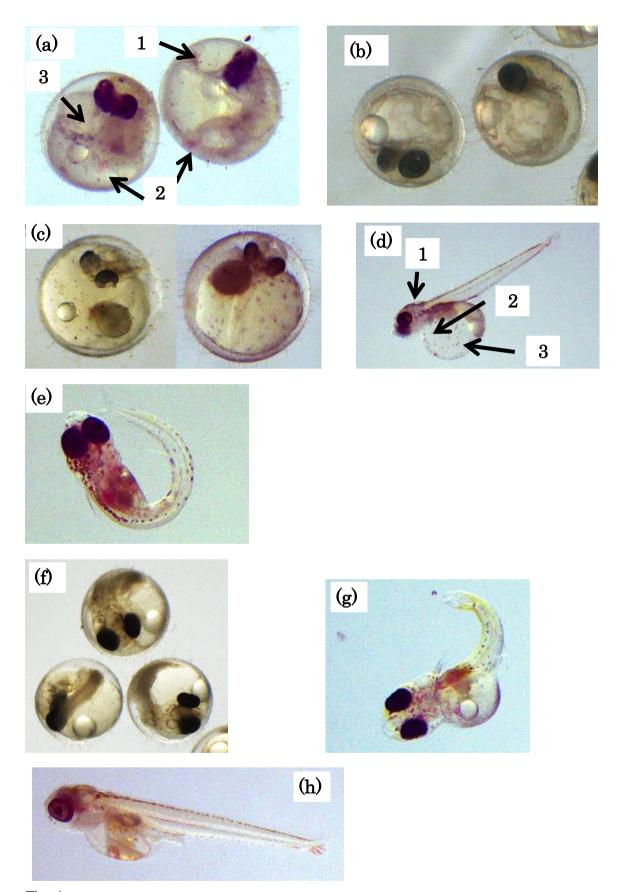


Fig. 4 Effects of individual oxyPAHs on larvae. 3 day-post-hatch (dph) larvae after exposure to (a) 10 $\mu g/L$ DMF, (b) 5000 $\mu g/L$ ANQ, (c) 500 $\mu g/L$ BAQ, (d) 200 $\mu g/L$ NAQ or (e) 400 $\mu g/L$ PHQ.

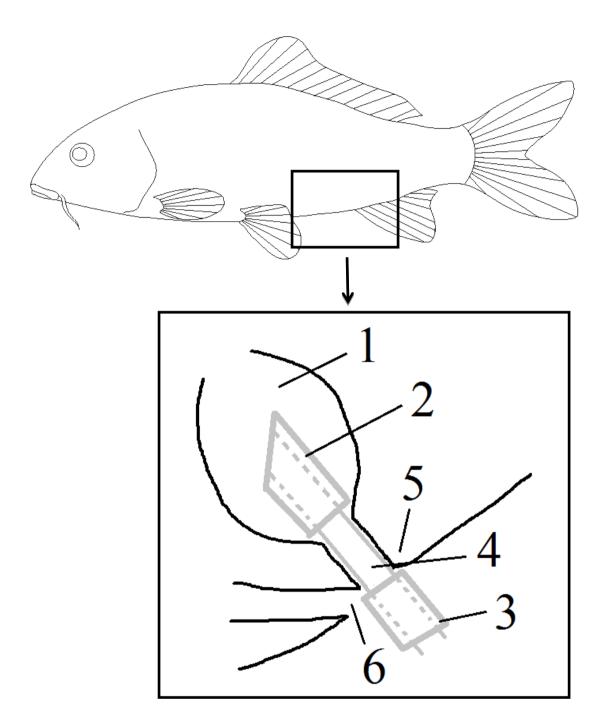


Fig. 5
Cannula inserted into urinary bladder of carp.

1: urinary bladder, 2: silicone tubing A (STA), 3: silicone tubing B (STB), 4: polyethylene tubing, 5: urogenital aperture, 6: anus.

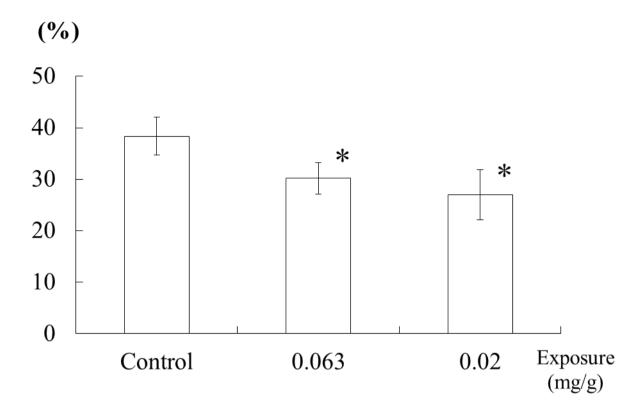


Fig. 6-a

Fig. 6-b

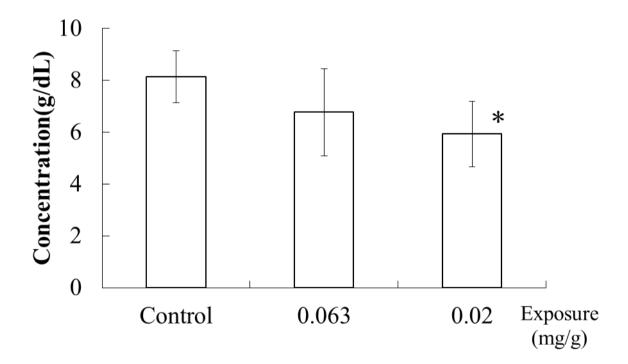


Fig. 6 Comparisons of (a) hematocrit value and (b) hemoglobin concentration in carp blood. Asterisks show significant difference to control group (p < 0.05). Error bars show the standard deviations (n=5). Hemoglobin concentration between control and exposures were not significant difference.

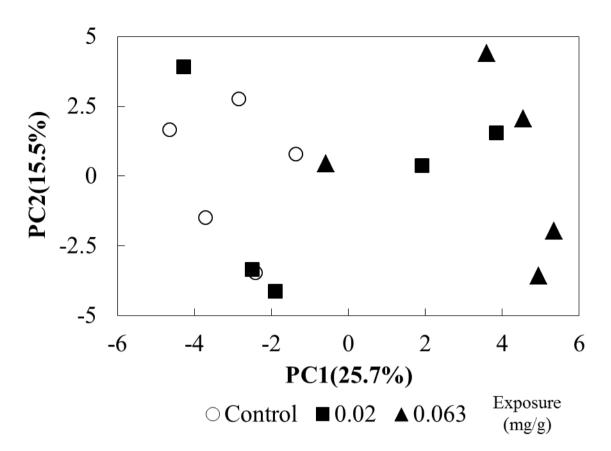


Fig. 7
PCA score plots of PC1 vs. PC2 from GC/MS metabolites profiles in carp plasma. Circles show control; squares, low exposure group; and triangles, high exposure group. The figures in parenthesis show contribution rate to PC1 and PC2.

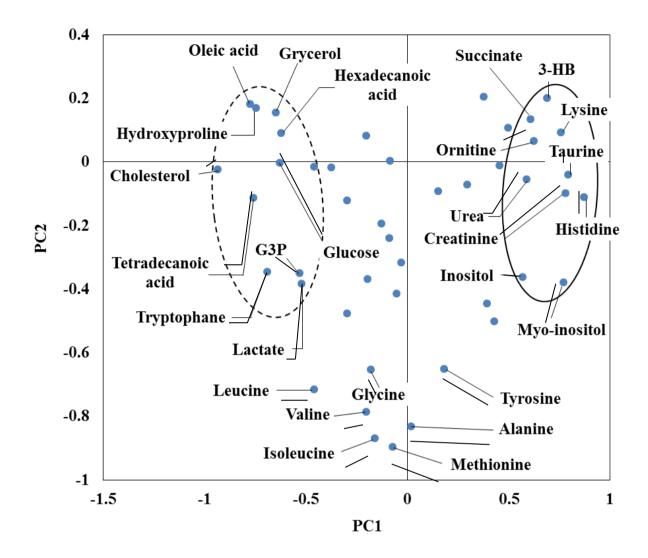


Fig. 8
PC1 and PC2 loading plots obtained from PCA showed in Fig. 3. Metabolites enclosed solid and broken lines have significantly positive and negative correlations to separation on PC1 resulted from PCA, respectively.

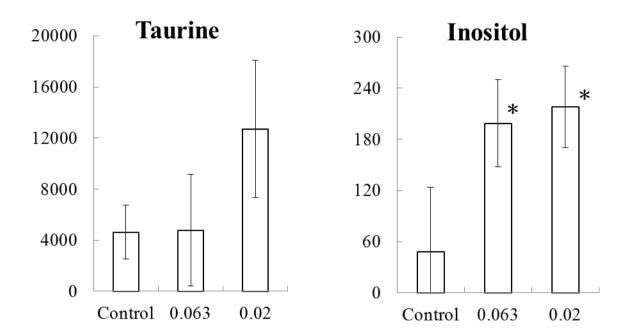
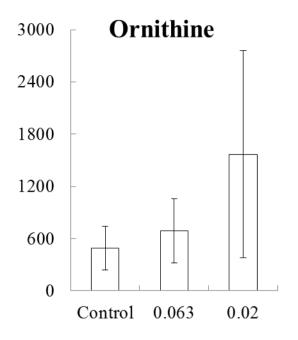
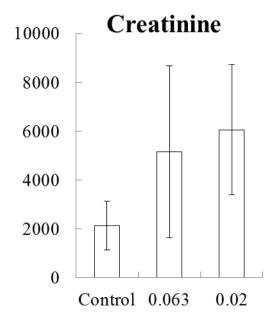


Fig. 9 Comparisons of metabolites related the regulation of osmotic pressure in plasma of carp among control and exposure group. Asterisks show significant difference to the control group (p < 0.05). Vertical axis shows the corrected value derived from the peak area on the GC chromatogram.





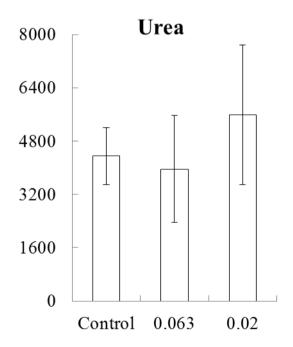


Fig. 10

Comparison of creatinine, urea and ornithine in plasma of Carp among control and exposure groups.

Error bars show the standard deviations (n=5). Vertical axis shows the corrected value derived from the peak area on the GC chromatogram.

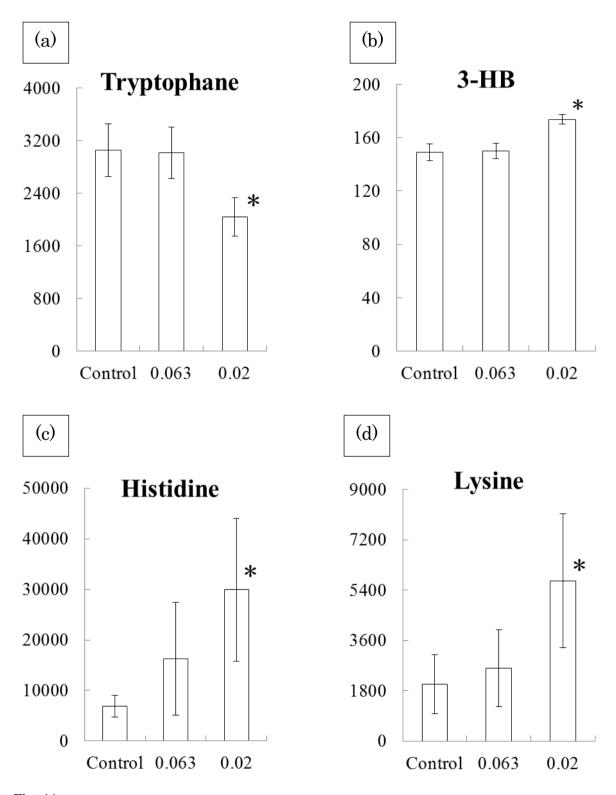


Fig. 11 Comparisons of metabolites related energy synthesis in plasma of carp among control and exposure group. Asterisks show significant difference to the control group (p < 0.05). Vertical axis shows the corrected value derived from the peak area on the GC chromatogram.

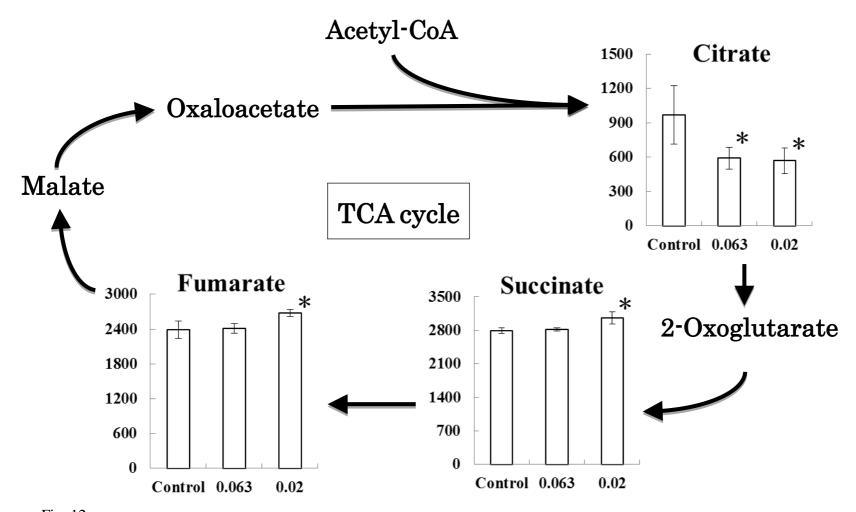


Fig. 12 Comparisons of metabolites related TCA cycle in plasma of carp among control and exposure group. Asterisk stand for significant difference to the control group (p < 0.05). Vertical axis show the corrected value derived from the peak area on the GC chromatogram.

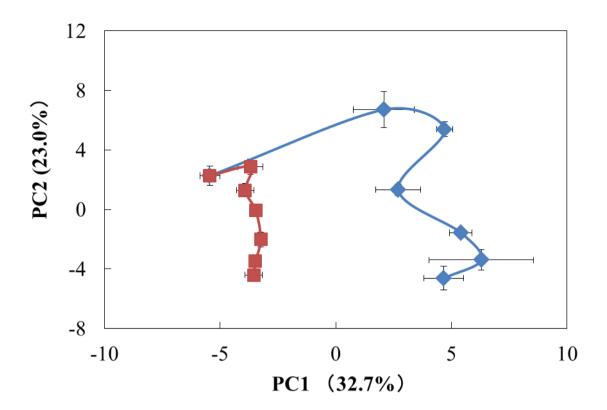


Fig. 13

The time-dependent responses of the fish to ANQ were examined by the trajectories derived from PCA analysis. The trajectory for metabolites in the each group curved left to right from 0 to 6 dpf. Blue show control; red, ANQ exposure group.

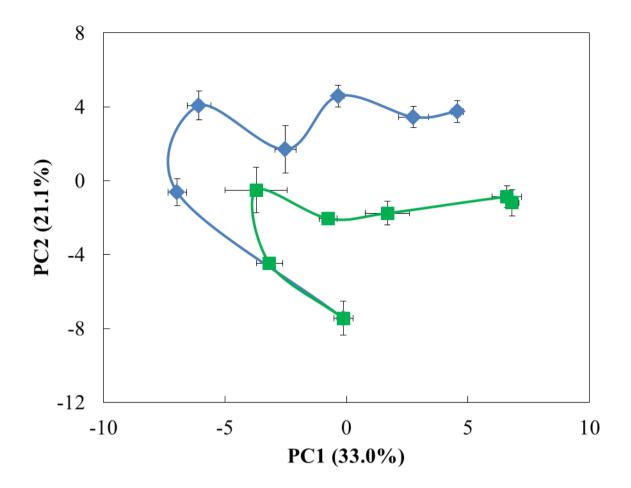


Fig. 14

The time-dependent responses of the fish to BAQ were examined by the trajectories derived from PCA analysis. The trajectory for metabolites in the each group curved left to right from 0 to 6 dpf. Blue show control; green, BAQ exposure group.

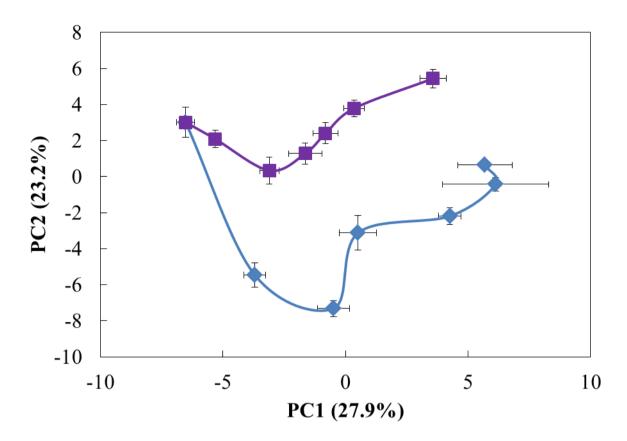


Fig. 15

The time-dependent responses of the fish to BAQ were examined by the trajectories derived from PCA analysis. The trajectory for metabolites in the each group curved left to right from 0 to 6 dpf. Blue show control; purple, PHQ exposure group.

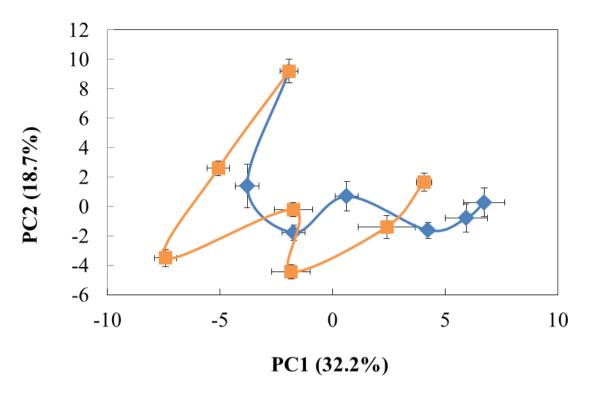


Fig. 16

The time-dependent responses of the fish to BAQ were examined by the trajectories derived from PCA analysis. The trajectory for metabolites in the each group curved left to right from 0 to 6 dpf. Blue show control; orange, NAQ exposure group.

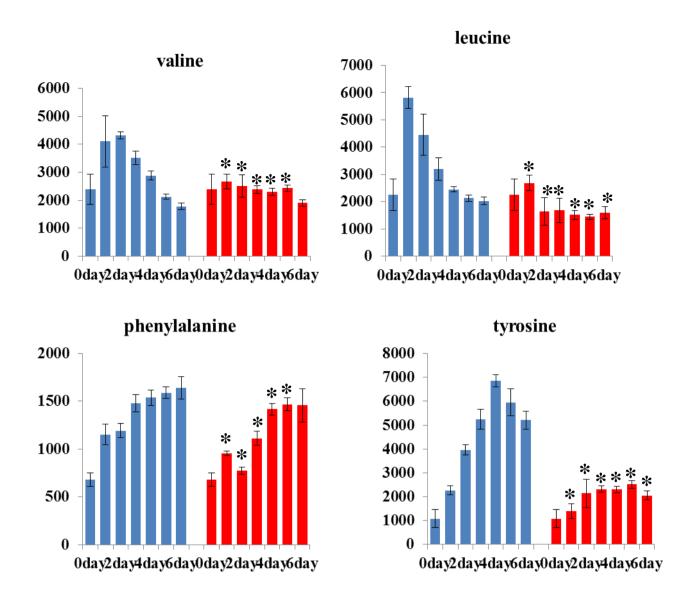


Fig. 17 Comparison of metabolites related energy synthesis in medaka embryos between solvent control and ANQ exposure. Vertical axis shows the corrected value derived from the peak area on the GC chromatogram. Error bars show the standard deviations (n=6). Asterisks show significant difference to the solvent control group (p < 0.05).

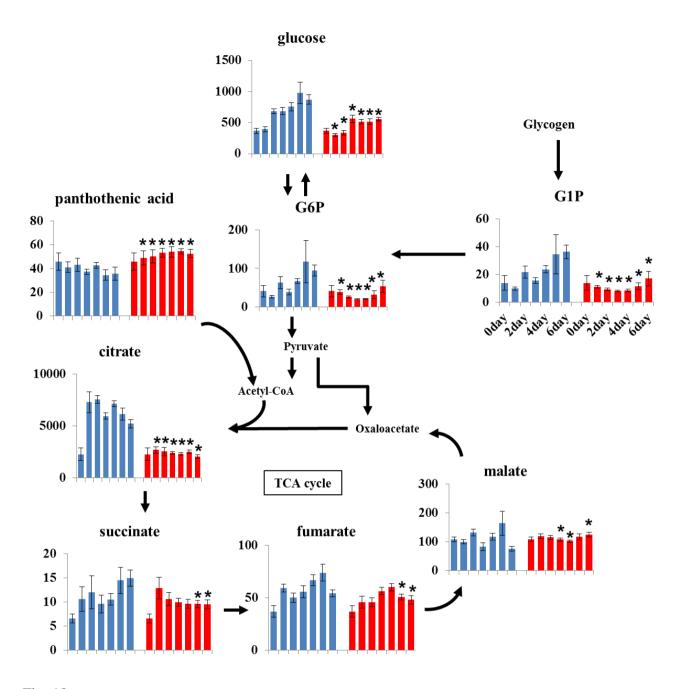


Fig. 18 Comparisons of metabolites related TCA cycle in medaka embryos between solvent control and ANQ exposure. Vertical axis show the corrected value derived from the peak area on the GC chromatogram. Error bars show the standard deviations (n=6). Asterisks show significant difference to the solvent control group (p < 0.05).

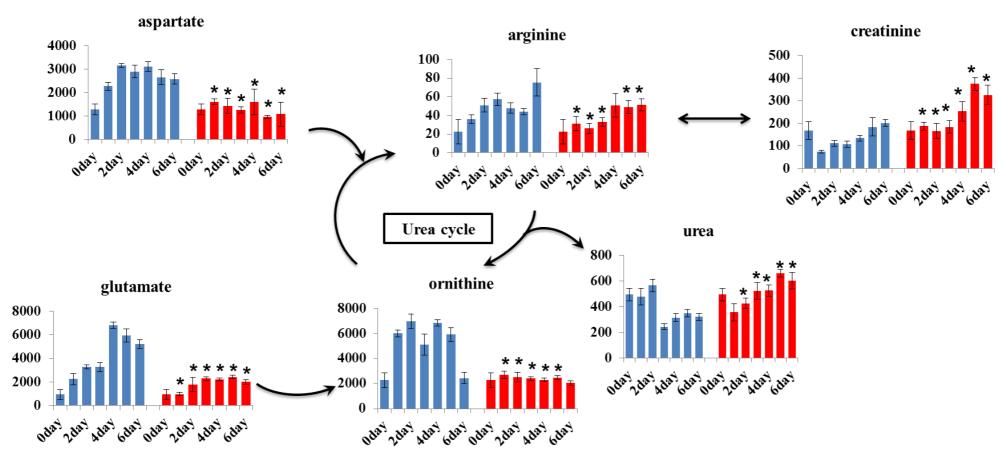


Fig. 19
Comparisons of metabolites related urea cycle in medaka embryos between solvent control and ANQ exposure. Vertical axis show the corrected value derived from the peak area on the GC chromatogram. Error bars show the standard deviations (n=6). Asterisks show significant difference to the solvent control group (p < 0.05).

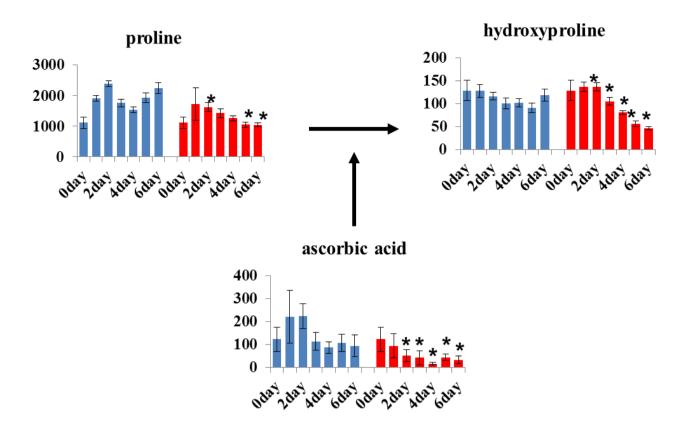


Fig. 20 Comparisons of metabolites related collagen synthesis in medaka embryos between solvent control and ANQ exposure. Vertical axis show the corrected value derived from the peak area on the GC chromatogram. Error bars show the standard deviations (n=6). Asterisks show significant difference to the solvent control group (p < 0.05).

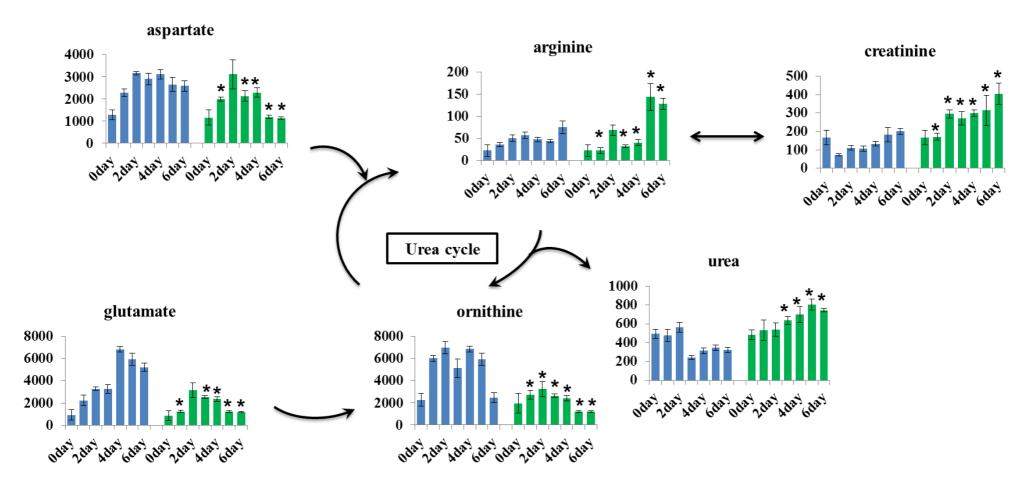


Fig. 21 Comparisons of metabolites related urea cycle in medaka embryos between solvent control and BAQ exposure. Vertical axis show the corrected value derived from the peak area on the GC chromatogram. Error bars show the standard deviations (n=6). Asterisks show significant difference to the solvent control group (p < 0.05).

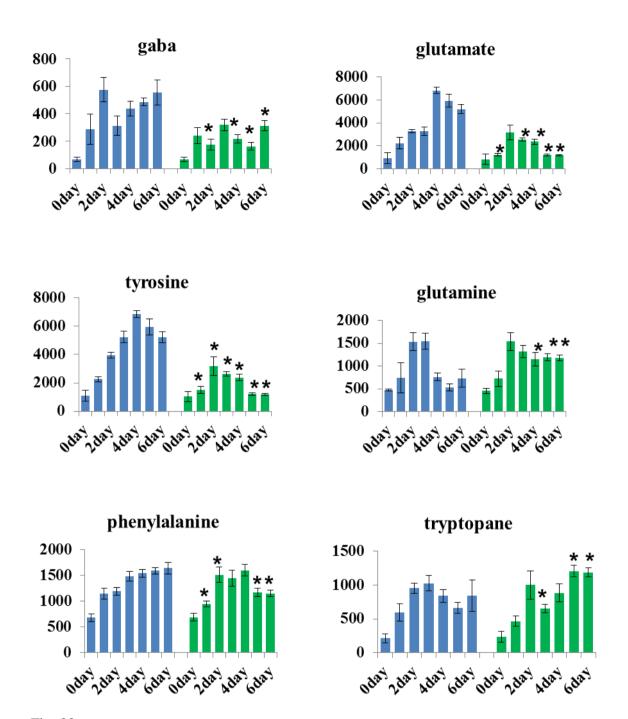


Fig. 22 Comparisons of metabolites related neurotransmitters in medaka embryos between solvent control and BAQ exposure. Vertical axis show the corrected value derived from the peak area on the GC chromatogram. Error bars show the standard deviations (n=6). Asterisks show significant difference to the solvent control group (p < 0.05).

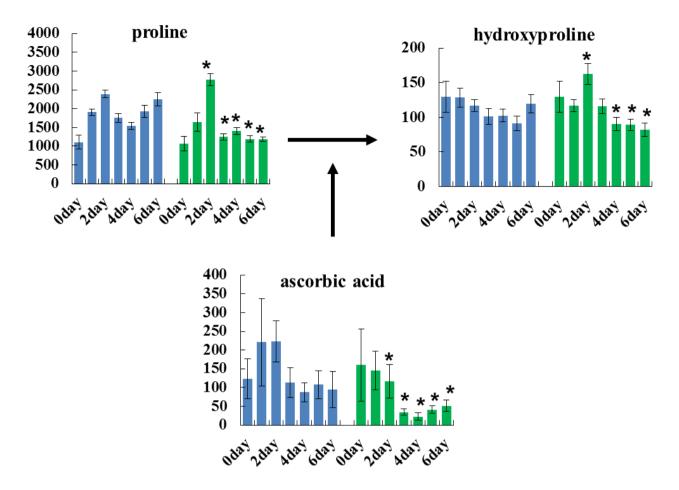


Fig. 23 Comparisons of metabolites related collagen synthesis in medaka embryos between solvent control and BAQ exposure. Vertical axis show the corrected value derived from the peak area on the GC chromatogram. Error bars show the standard deviations (n=6). Asterisks show significant difference to the solvent control group (p < 0.05).

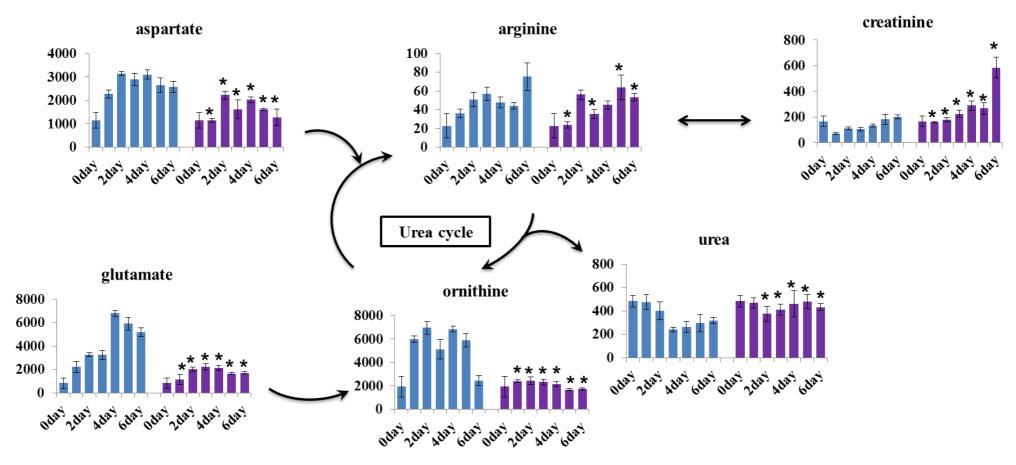


Fig. 24 Comparisons of metabolites related urea cycle in medaka embryos between solvent control and PHQ exposure. Vertical axis show the corrected value derived from the peak area on the GC chromatogram. Error bars show the standard deviations (n=6). Asterisks show significant difference to the solvent control group (p < 0.05).

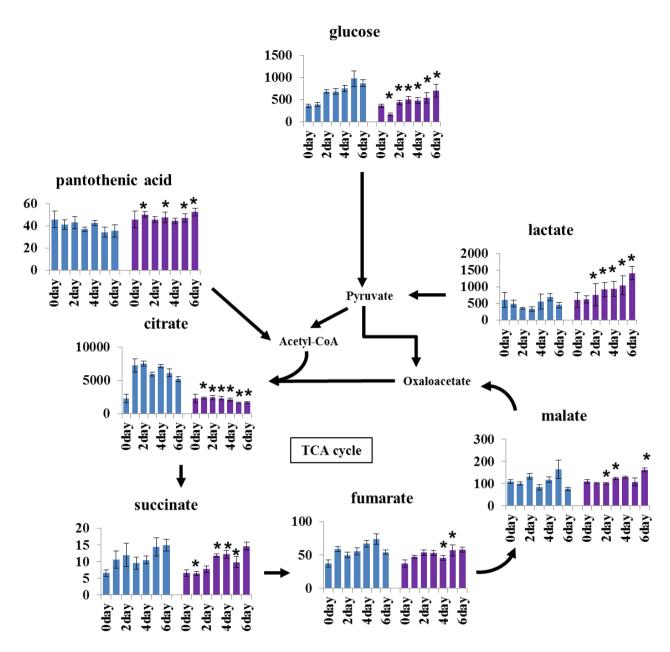


Fig. 25 Comparisons of metabolites related TCA cycle in medaka embryos between solvent control and PHQ exposure. Vertical axis show the corrected value derived from the peak area on the GC chromatogram. Error bars show the standard deviations (n=6). Asterisks show significant difference to the solvent control group (p < 0.05).

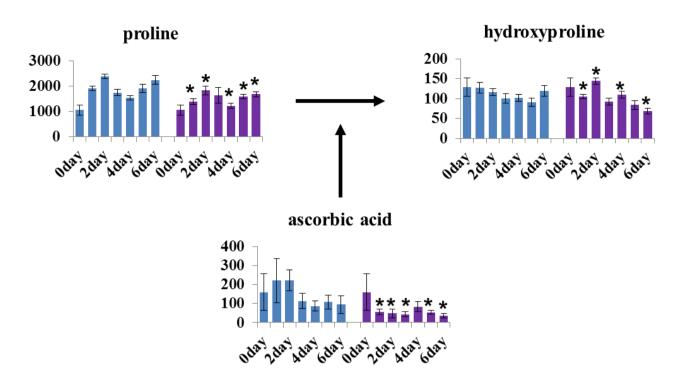


Fig. 26 Comparisons of metabolites related collagen synthesis in medaka embryos between solvent control and PHQ exposure. Vertical axis show the corrected value derived from the peak area on the GC chromatogram. Error bars show the standard deviations (n=6). Asterisks show significant difference to the solvent control group (p < 0.05).

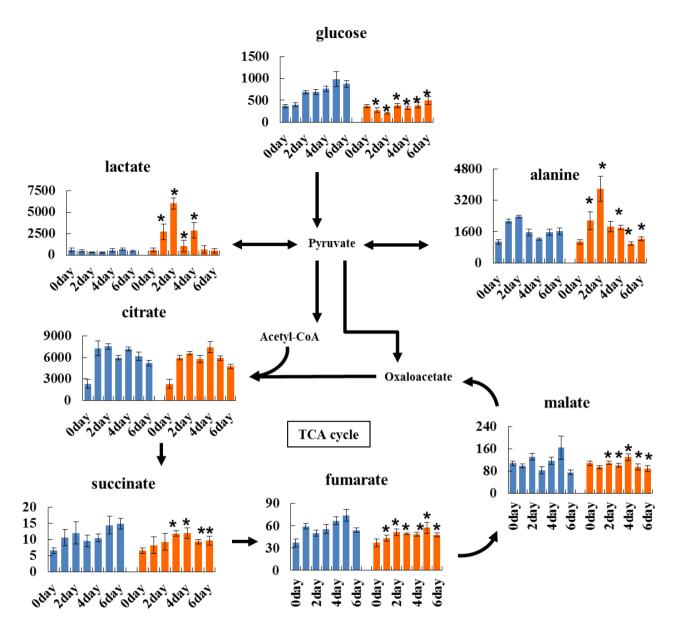


Fig. 27 Comparisons of metabolites related TCA cycle in medaka embryos between solvent control and NAQ exposure. Vertical axis show the corrected value derived from the peak area on the GC chromatogram. Error bars show the standard deviations (n=6). Asterisks show significant difference to the solvent control group (p < 0.05).

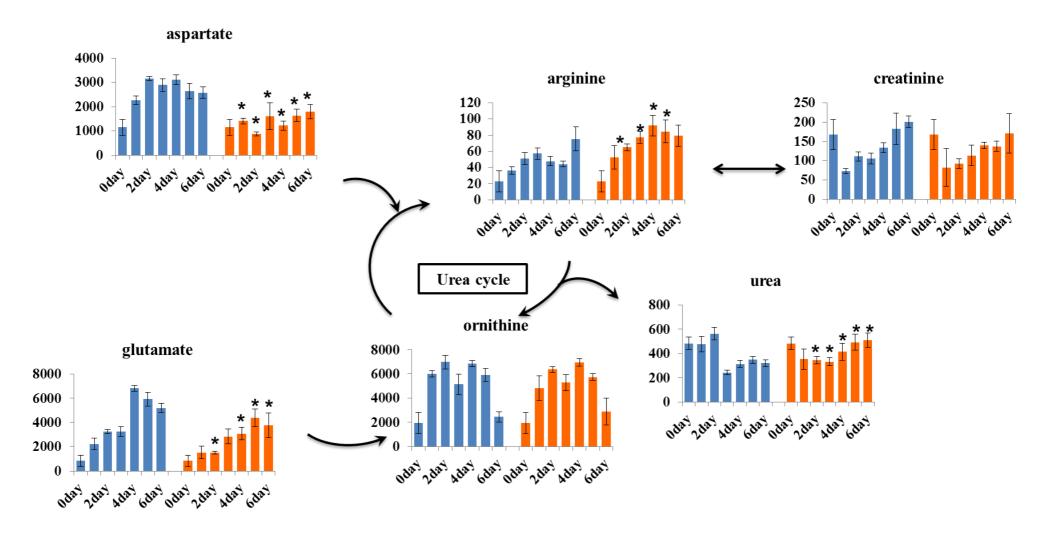


Fig. 28 Comparisons of metabolites related urea cycle in medaka embryos between solvent control and NAQ exposure. Vertical axis show the corrected value derived from the peak area on the GC chromatogram. Error bars show the standard deviations (n=6). Asterisks show significant difference to the solvent control group (p < 0.05).

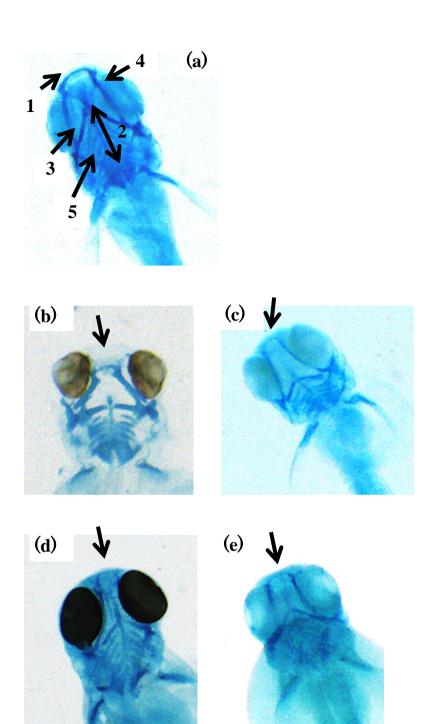


Fig. 29 Transparent specimen of larvae exposed to individual oxyPAHs. 3 dph larvae after exposure to a 10 μ g/L DMF, b 5000 μ g/L ANQ, c 500 μ g/L BAQ, d 200 μ g/L NAQ, or e 400 μ g/L PHQ 1: meckel's, 2: basihyal, 3: ceratohyal, 4: palatoquadrate, 5: ceratobrachials.

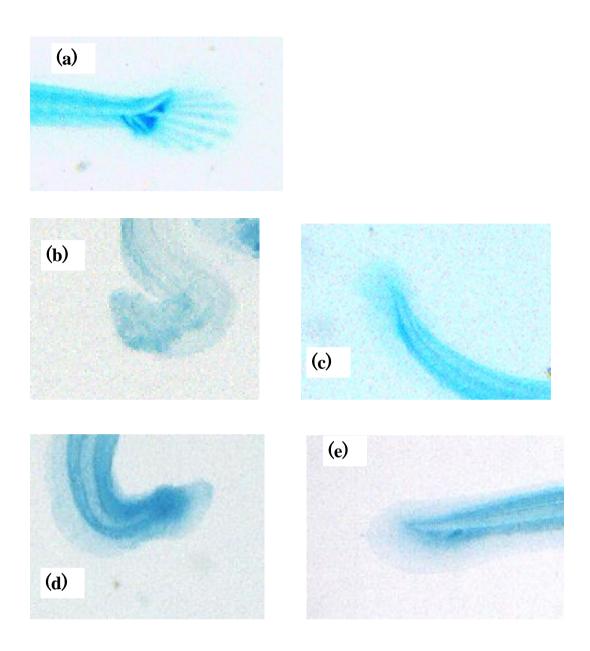


Fig. 30 Transparent specimen of larvae exposed to individual oxyPAHs. 3 dph larvae after exposure to a 10 $\mu g/L$ DMF, b 5000 $\mu g/L$ ANQ, c 500 $\mu g/L$ BAQ, d 200 $\mu g/L$ NAQ, or e 400 $\mu g/L$ PHQ

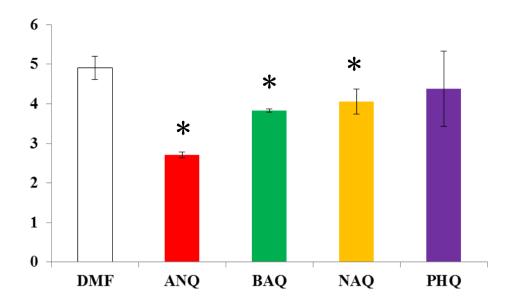


Fig. 31-a

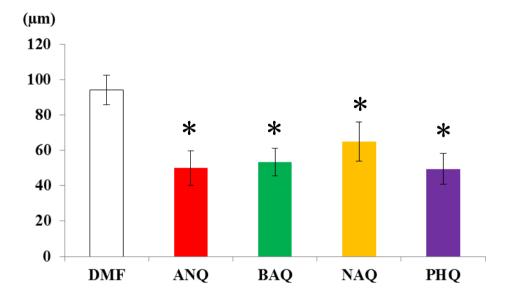


Fig. 31-b

Fig. 31 Comparisons of (a) bone number of ceratobrachials and (b) length of basihyal bone in 3 dph larvae after exposure to a 10 μ g/L DMF, 5000 μ g/L ANQ, 500 μ g/L BAQ, 200 μ g/L NAQ, or 400 μ g/L PHQ. Asterisks show significant difference to control group (p < 0.05). Error bars show the standard deviations (n=3).

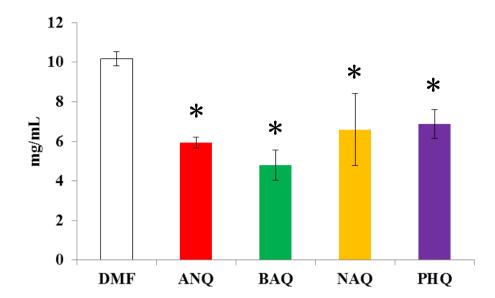


Fig. 32-a

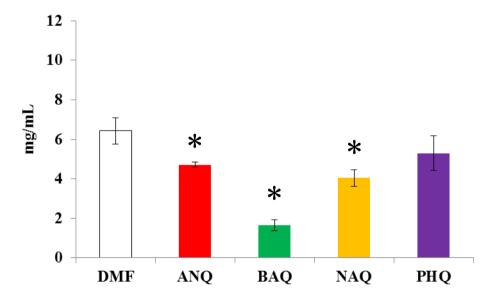
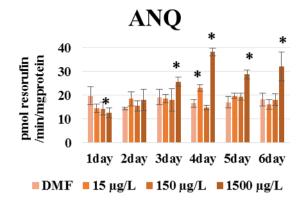


Fig. 32-b

Fig. 32 Comparisons of hydroxyproline concentration in medaka mebyos (a: 5 dpf; b: 6dpf). Asterisks show significant difference to control group (p < 0.05). Error bars show the standard deviations (n=3).



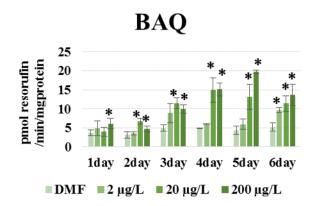
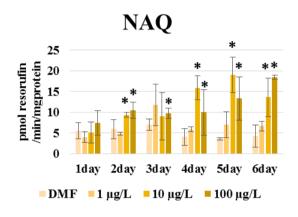


Fig. 33-a

Fig. 33-b



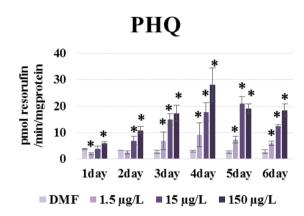
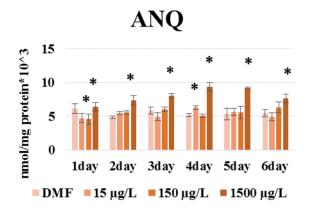


Fig. 33-c Fig. 33-d

Fig. 33 Comparisons of EROD activity in medaka embryos exposure to ANQ, BAQ, NAQ and PHQ. Asterisks show significant difference to control group (p < 0.05). Error bars show the standard deviations (n=3).



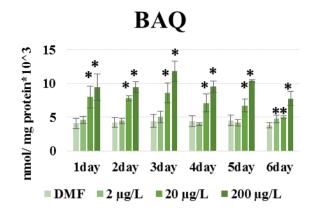
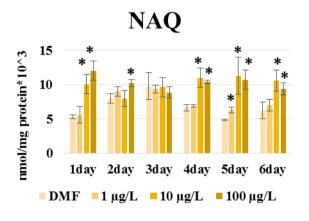


Fig. 34-a





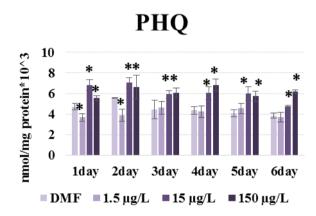
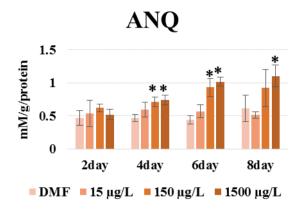


Fig. 34-d

Fig. 34 Comparisons of TBARS in medaka embryos exposure to ANQ, BAQ, NAQ and PHQ. Asterisks show significant difference to control group (p < 0.05). Error bars show the standard deviations (n=3).



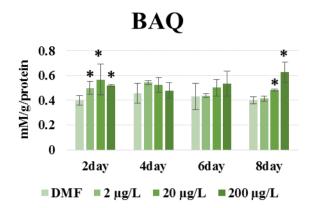
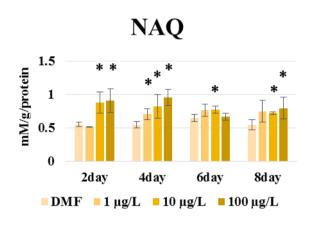


Fig. 35-a Fig. 35-b



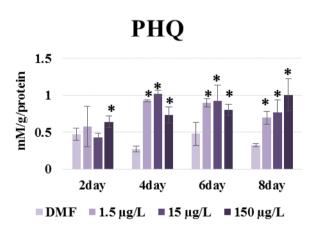
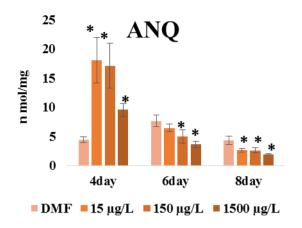


Fig. 35-c Fig. 35-d

Fig. 35 Comparisons of carbonyl protein concentration in medaka embryos exposure to ANQ, BAQ, NAQ and PHQ. Asterisks show significant difference to control group (p < 0.05). Error bars show the standard deviations (n=3).



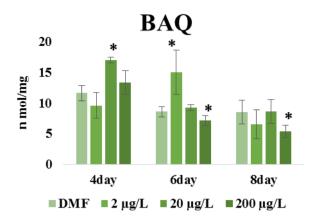
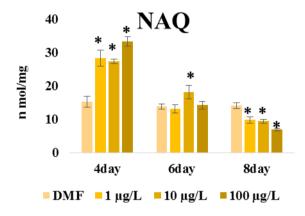


Fig. 36-a





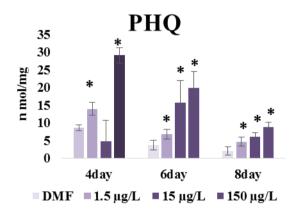
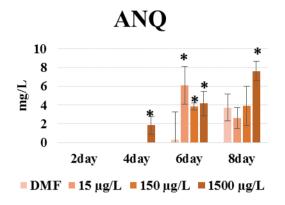


Fig. 36-c

Fig. 36-d

Fig. 36 Comparisons of ATP in medaka embryos exposure to ANQ, BAQ, NAQ and PHQ. Asterisks show significant difference to control group (p < 0.05). Error bars show the standard deviations (n=3).



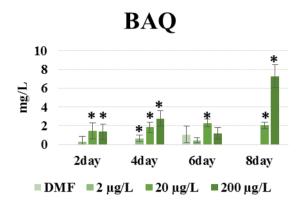
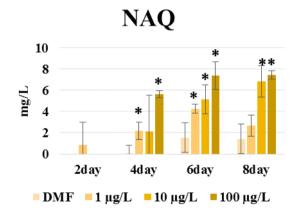


Fig. 37-a





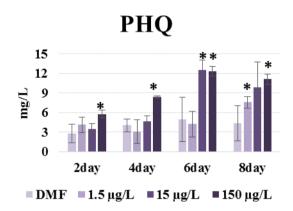


Fig. 37-c

Fig. 37-d

Fig. 37 Comparisons of ammonium ion in medaka embryos exposure to ANQ, BAQ, NAQ and PHQ. Asterisks show significant difference to control group (p < 0.05). Error bars show the standard deviations (n=3).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導頂きました鹿児島大学水産学部付属海洋資源環境教育研究センター宇野誠一教授に謹んで御礼申し上げます。また、研究を進めていく上で随時適切なご指導をして頂いた鹿児島大学小山次朗名誉教授、同センターの國師恵美子助教授にも深く感謝いたします。

博士課程の指導教員として多くのご助言を頂いた同センターの吉川毅准教授、鹿児島大学水産学部水産資源化学分野の小谷知也教授にも深く感謝いたします。

また研究を進めていく間、数々のご協力や激励をいただきました鹿児島大学水産学部海 洋資源環境教育研究センターの皆様に心より感謝致します。最後に、これまで私を経済的、精神 的に支えてくれた家族に深く感謝いたします。

参考文献

- Alam MS, Delgado-Saborit JM, Stark C, Harrison RM. (2013) Using atmospheric measurements of PAH and quinone compounds at roadside and urban background sites to assess sources and reactivity.

 Atmos. Environ. 77: 24-35.
- Arab N, Islami HR (2015) Effects of dietary ascorbic acid on growth performance, body composition, and some immunological parameters of caspian brown trout, *salmo trutta caspius*. J World. Aquac. Soc. 46(5): 505-518.
- Bacchetta C, Rossi A, Ale A, Campana M, Parma MJ, Cazenave J. (2014) Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach. Ecol Indic. 36, 532-538.
- Bandowe BA, Lueso MG, Wilcke W (2014) Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons and azaarenes in urban soils: a comparison of a tropical city (Bangkok) with two temperate cites (Bratislava and Gothenburg). Chemosphere. 107: 407-414.
- Barron MG, Caris MG, Heintz R, Rice SD. (2004) Evaluation of fish early life-stage toxicity models of chronic embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. Toxicol. Sci. 78 (1): 60-67.
- Bauder MB, Palace VP, Hodson PV. (2005) Is oxidative stress the mechanism of blue sac disease in retene-exposed trout larvae? Environ. Toxicol. Chem. 24(3): 694-702.
- Boulekbache H (1981) Energy metabolism in fish development. Amer. Zool. 21: 377-389.
- Brorstrom-Lunden E, Remberger M, Kaj L, Hansson K, Palm-Cousins A, Andresson H, Haglund P,

- Ghebremeskel M, Schlabach M (2010) Results from the Swedish National Screening Program 2008: screening of unintentionally produced organic contaminants. Swedish Environmental Research Institute (IVL) report B1944, Goteborg, Sweden.
- Buccafusco RJ, Ells SJ, LeBianc GA (1981) Acute toxicology of priority pollutants to bluegill (*Lepomis macrochirus*). Bull Environ Contam Toxicol 26: 446-452.
- Burns FR, Peterson RE, Heideman W (2015) Dioxin disrupts cranial cartilage and dermal bone development in zebrafish larvae. Auat. Toxicol. 164: 52-60.
- Caidovic L, Haskins N, Mumo A, Maiumdar H, Pinter M, Tuchmam M, Krufka A (2014) Expression pattern and biochemical properties of zebrafish N-acetylglutamate synthase. Plos. One. 9(1): e85597.
- Carins MA, Nebeker AV (1982) Toxicity of acenaphthene and isophorone to early life stages of fathead minnows. Arch Environ Contam Toxicol 11: 703-707.
- Caris MG, Holland L, Larsen M, Collier TK, Scholz NL, Incardona JP. (2008) Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles. Aquat. Toxicol. 88 (2): 121-127.
- Carlson EA, Li Y, Zelikoff JT (2002) Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo(a)pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. Aquat Toxicol 56: 289-301.
- Cheikyula JO, Koyama J, Uno S. (2008) Comparative study of bioconcentration and EROD activity induction in the Japanese flounder, red sea bream, and Java medaka exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ. Toxicol. 23(3):354-362.

- Chen SY, Periasamy A, Yang B, Jacobson K, Sulik KK (2000) Differential sensitivity of mouse neural crest cells to ethanol-induced toxicity. Alcohol. 20(1): 75-81.
- Cianciolo CC. Roman BL, Drummond IA, Hukriede NA. (2010) Intravenous microinjections of zebrafish larvae to study acute kidney injury. J Vis Exp. 4 (42).
- Dalton EB, Calvin MK (1977) Effects of prolonged exposure to ammonia on fertilized eggs and sac fry of rainbow trout (*salmo gairdneri*). Trans. Am. Fish. Soc. 106(5): 470-475.
- Dasgupta S, Cao A, Mauer B, Uno S, McElroy A. (2014) Genotoxicity of oxy-PAHs to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos assessed using the comet assay. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 21 (24): 13867-13876.
- Debelak KA, Smith SM (2000) Avian genetic background modulates the neural crest apoptosis induced by ethanol exposure. Alcohol. Clin. Exp.Res. 24(3): 307-314.
- Delgado-Saborit JM, Alam MS, Pollitt KJG, Stark C, Harrison RM. (2013) Analysis of atmospheric concentrations of quinones and polycyclic aromatic hydrocarbons in vapour and particulate phases. Atmos. Environ. 77: 974-982.
- Dong W, Hinton DE, Kullman SW (2012) TCDD disrupts hypural skeletogenesis during medaka embryonic development. Toxicol. Sci. 125(1): 91-104.
- Drew RE, Rodnick KJ, Settles M, Wacyk J, Churchill E, Powell MS, Hardy RW, Murdoch GK, Hill RA, Robison BD. (2008) Effect of starvation on transcriptomes of brain and liver in adult female zebrafish (*Danio rerio*). Physiol. Genomics. 35 (3), 283-295.
- Durant JL, Busby WF Jr, Lafleur AL, Penman BW, Crespi CL. (1996) Human cell mutagenicity of

- oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. Mutat. Res. 371 (3-4): 123-157
- Eaton P, Byers HL, Leeds N, Ward MA, Shattock MJ (2002) Detection, quantitation, purification, and identification of cardiac proteins S-thiolated during ischemia and reperfusion. J Biol. Chem. 277(12): 9806-9811.
- Elie MR, Cho I J, Nkrumah-Elie YM, Gonnerman GD, Stevens JF, Tanguay RL (2015) Metabolomic analysis to define and compare the effects of PAHs and oxygenated PAHs in developing zebrafish. Environ. Res. 140: 502-510.
- Felskie AK, Anderson PM, Wright PA. (1998) Expression and activity of carbamoyl phosphate synthetase

 III and ornithine urea cycle enzymes in various tissues of four fish species. Comp. Biochem.

 Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 119 (2), 355-364.
- Fiess JC, Kunkel-Patterson A, Mathias L, Riley LG, Yancey PH, Hirano T, Grau EG (2007) Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 146 (2), 252-264.
- Fujisawa K, Takami T, Kimoto Y, Matsumoto T, Yamamoto N, Terai S, Sakaida I (2016) Circadian variations in the liver metabolites of medaka (*Oryzias latipes*). Sci. Rep. 6: 20916.
- Gesto M, Soengas JL, Miguez JM (2008) Acute and prolonged stress responses of brain monoaminergic activity and plasma cortisol levels in rainbow trout are modified by PAHs (naphthalene, beta-naphthoflavone and benzo(a)pyrene) treatment. Aquat. Toxicol. 86(3): 341-351.

- Gesto M, Tintos A, Soengas JL, Miguez JM (2006) Effects of acute and prolonged naphthalene exposure on brain monoaminergic neurotransmitters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp. Biochem. Physiol C Toxicol. Pharmacol. 144(2): 173-183.
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. Science. 281(5381):1309-1312.
- Gundel U, Kalkhof S, Zitzkat D, von Bergen M, Altenburger R, Kuster E (2012) Concentration-response concept in ecotoxicoproteomics: effects of different phenanthrene concentrations to the zebrafish (*Danio rerio*) embryo proteome. Ecotoxicol Environ Saf 76: 11-22.
- Gurbani D, Bharti SK, Kumar A, Pandey AK, Ana GR, Verma A, Patel DK, Mudiam MK, Jain SK, Roy R, Dhawan A. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their quinones modulate the metabolic profile and induce DNA damage in human alveolar and bronchiolar cells. Int. J. Hyg. Environ. Health. 216 (5): 553-565.
- Hentschel DM, Park KM, Cilenti L, Zervos AS, Drummond I, Bonventre JV. (2005) Acute renal failure in zebrafish: a novel system to study a complex disease. Am J Physiol Renal Physiol. 288 (5), 923-929.
- Hose JE, Hannah JB, Puffer HW, Landolt ML (1984) Histologic and skeletal abnormalities in benzo(a)pyrene-treated rainbow trout alevins. Arch Environ Contam Toxicol 13: 675-684.
- Imanpoor M, Imanpoor MR, Roohi Z (2017) Effects of dietary vitamin C on skeleton abnormalities, blood biochemical factors, haematocrit, growth, survival and stress response of *Cyprinus carpio* fry. Aquacult. Int. 25: 793-803.
- Incardona JP, Collier TK, Scholz NL (2004) Defects in cardiac function precede morphological

- abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. Toxicol Appl Pharmacol 196: 191-205.
- Ip YK, Chew SF (2010) Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review. Front. Physiol. 1: 134.
- Itoh N, Tao H, Ibusuki T (2005) Optimization of aqueous acetylation for determination of hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in water by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. Anal Chim Acta 535: 243-250.
- Jiang J, Shi D, Zhou XQ, Yin L, Feng L, Liu Y, Jiang WD, Zhao Y (2015) Effects of glutamate on growth, antioxidant capacity, and antioxidant-related signaling molecule expression in primary cultures of fish enterocytes. Fish. Physiol Biochem. 41(5): 1143-1153.
- Kim RO, Kim BM, Hwang DS, Au DW, Jung JH, Shim WJ, Leung KM, Wu RS, Rhee JS, Lee JS (2013) Evaluation of biomarker potential of cytochrome P450 1A (CYP1A) gene in the marine medaka, *Oryzias melastigma* exposed to water-accommodated fractions (WAFs) of Iranian crude oil. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 157: 172-182.
- King-Heiden TC, Mehta V, Xiong KM, Lanham KA, Antkiewicz DS, Ganser A, Heideman W, Peterson RE (2012) Reproductive and developmental toxicity of dioxin in fish. Mol Cell Endocrinol. 351(1-2): 121-138.
- Knecht AL, Goodale BC, Troung L, Simonich MT, Swanson AJ, Anderson KA, Waters KM, Tanguay RL (2013) Comparative developmental toxicity of environmentally relevant oxygenated PAHs.

 Toxicol Appl Pharmacol 271: 266-275.

- Kokushi E, Uno S, Harada T, Koyama J (2012) 1H NMR-based metabolomics approach to assess toxicity of bunker a heavy oil to freshwater carp, *cyprinus carpio*. Environ. Toxicol. 27(7): 404-414.
- Kokushi E, Uno S, Harada T, Koyama J. (2010) 1H NMR-based metabolomics approach to assess toxicity of bunker a heavy oil to freshwater carp, *Cyprinus carpio*. Environ Toxicol. 27 (7), 404-414.
- Kokushi E, Uno S, Pal S, Koyama J. (2015) Effects of chlorpyrifos on the metabolome of the freshwater carp, *Cyprinus carpio*. Environ. Toxicol. 30 (3), 253-260.
- Korte JJ, Salo WL, Cabrera VM, Wright PA, Feiskle AK, Anderson PM (1997) Expression of carbamoyl-phosphate synthetase III mRNA during the early stages of development and in muscle of adult rainbow trout (*Oncorthnchus mykiss*). J Biol. Chem. 272(10): 6270-6277.
- Landon I, Eyckmans M, Vu TN, Laukens K, Boeck GD, Dommisse R (2013) H-NMR study of the metabolome of a moderately hypoxia-tolerant fish, the common carp (*Cyprinus carpio*).

 Metabolomics. 9:1216-1227.
- Langille RM, Hall BK (1987) Development of the head skeleton of the Japanese medaka, *Oryzias latipes* (teleostei). J Morphol. 193(2): 135-158.
- Langille RM, Hall BK (1988) Role of the neural crest in development of the cartilaginous cranial and visceral skeleton of the medaka, *Oryzias latipes* (Teleostei). Anat. Embryol. (Berl). 177(4): 297-305.
- Layshock JA, Wilson G, Anderson KA. (2010) Ketone and quinone-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in mussel tissue, sediment, urban dust, and diesel particulate matrices. Environ.

- Toxicol. Chem. 29 (11): 2450-2460.
- LeMoine CM, Walsh PJ (2013) Ontogeny of ornithine-urea cycle gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). Am. J Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 304(11): 991-1000.
- Li M, Wang J, Lu Z, Wei D, Yang M, Kong L (2014) NMR-based metabolomics approach to study the toxicity of lambda-cyhalothrin to goldfish (*Carassius auratus*). Aquat. Toxicol. 146: 83-92.
- Li ZH, Zlabek V, Velisek J, Grabic R, Machova J, Kolarova J, Li P, Randak T (2011) Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74(3): 319-327.
- Liu Y, Chen T, Li MH, Xu HD, Jia AQ, Zhang JF, Wang JS (2015) H NMR based metabolomics approach to study the toxic effects of dichlorvos on goldfish (*Carassius auratus*). Chemosphere. 138: 537-545.
- Lundstedt S, White PA, Lemieux CL, Lynes KD, Lambert IB, Oberg L, Haglund P, Tyskind M (2007)

 Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH-contaminated sites. Ambio 36: 475-485.
- Machala M, Ciganek M, Blaha L, Minksova K, Vondrack J (2001) Aryl hydrocarbon receptor-mediated and estrogenic activities of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons and azaarenes originally identified in extracts of river sediments. Environ Toxicol Chem 20: 2736-2743.
- Madison BN, Hodson PV, Langlois VS (2015) Diluted bitumen causes deformities and molecular responses indicative of oxidative stress in Japanese medaka embryos. Aquat. Toxicol. 165:

- Mellert W, Kapp M, Strauss V, Wiemer J, Kamp H, Walk T, Looser R, Prokoudine A, Krennrich G, Herold M, van Ravenzwaay B. (2011) Nutritional impact on the plasma metabolome of rats. Toxicol Lett. 207 (2): 173-181.
- Mhadhbi L, Boumaiza M, Beiras R. (2010) A standard ecotoxicological bioassay using early life stages of the marine fish *Psetta mxiama*. Aquat Living Resour 23: 209-216.
- Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. (1999) Aminoglycosides: nephrotoxicity. Antimicrob Agents Chemother. 43 (5), 1003-1012.
- Misaki K, Kawami H, Tanaka T, Handa H, Nakamura M, Matsui S, Matsuda T. (2007) Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of polycyclic aromatic ketones and polycyclic aromatic quinones. Environ. Toxicol. Chem. 26 (7): 1370-1379.
- Moskovitz J, Oien DB (2010) Protein carbonyl and the methionine sulfoxide reductase system. Antioxid. Redox. Signal. 12(3): 405-415.
- Mu J, Wang J, Jin F, Wang X, Hong H (2014) Comparative embryotoxicity of phenanthrene and alkyl-phenanthrene to marine medaka (*Oryzias melastigma*). Mar Pollut Bull 85: 505-515.
- Mu JL, Wang XH, Jin F, Wang JY, Hong HS (2012) The role of cytochrome P4501A activity inhibition in three- to five- ringed polycyclic aromatic hydrocarbons embryotoxicity of marine medaka (*Oryzias melastigma*). Mar. Pollut. Bull. 64(7): 1445-1451.
- Nacci DE, Kohan M, Pelletier M, George E (2002) Effects of benzo(a)pyrene exposure on a fish population resistant to the toxic effects of dioxin-like compounds. Aquat Toxicol 57: 203-215.

- Oda J, Nomura S, Yasuhara A, Shibamoto T. (2001) Mobile sources of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in a roadway tunnel. Atmos. Environ. 35 (28): 4819-4827.
- Oliveira HH, Babin M, Garcia JR, Filipak Neto F, Randi MA, Oliveira Ribeiro CA, Pelletier E (2013)

 Complex metabolic interacitons between benzo(a)pyrene and tributyltin in presence of dichlorodiphenyltrichloroethane in South American catfish *Rhamdia quelen*. Ecotoxicol. Envrion. Saf. 96: 67-74.
- Picone G, Engelsen SB, Savorani F, Testi S, Badiani A, Capozzi F. (2011) Metabolomics as a powerful tool for molecular quality assessment of the fish Sparus aurate. Nutrients. 3 (2), 212-227.
- Picone G, Mezzetti B, Banbini E, Capoxasa F, Placucci G, Capossi F (2011) Unsupervised principal component analysis of NMR metabolic profiles for the assessment of substantial equivalence of transgenic grapes (*Vitis vinifera*). J Apric. Food. Chem. 59(17): 9271-9279.
- Potthoff T, Kelley S, Moe M, Young F (1984) Description of porkfish larvae (*Anisotremus virginicus*, Haemulidae) and their osteological development. Bull. Mar. Sci. 34(1): 21-59.
- Qiao M, Qi W, Liu H, Qu J. (2014) Oxygenated, nitrated, methyl and parent polycyclic aromatic hydrocarbons in rivers of Haihe River System, China: occurrence, possible formation, and source and fate in a water-shortage area. Sci. Total. Environ. 481: 178-185.
- Reimschuessel R, Bennett RO, May EB, Lipsky MM. (1990) Development of newly formed nephrons in the goldfish kidney following hexachlorobutadiene-induced nephrotoxicity. Toxicol Pathol. 18 (1 Pt1), 32-38.
- Rhodes S, Farwell A, Hewitt LM, Mackinnon M, Dixon DG (2005) The effects of dimethylated and

- alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of the Japanese medaka. Ecotoxicol Environ Saf 60: 247-258.
- Ribas JL, da Silva CA, de Andrade L, Galvan GL, Cestari ES, Zampronio AR, de Assis HC. (2014)

 Effects of anti-inflammatory drugs in primary kidney cell culture of a freshwater fish. Fish

 Shellfish Immunol. 40 (1), 296-303.
- Salek RM, Maguire ML, Bentley E, Rubtsov DV, Hough T, Cheeseman M, Nunez D, Sweatman BC, Haselden JN, Cox RD, Connor SC, Griffin JL. (2007) A metabolomic comparison of urinary changes in type2 diabetes in mouse, rat, and human. Physiol Genomics. 29 (2): 99-108.
- Salem M, Silverstein J, Rexroad CE 3rd, Yao J. (2007) Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). BMC. Genomics. 8, 328.
- Salice CJ, Rokous JS, Kane AS, Reimschuessel R. (2001) New nephron development in goldfish (*Carassius auratus*) kidneys following repeated gentamicin-induced nephrotoxicosis. Comp Med. 51 (1), 56-59.
- Samuelsson LM, Forlin L, Karlsson G, Adolfsson-Erici M, Larsson DG (2006) Using NMR metabolomics to identify responses of an environmental estrogen in blood plasma of fish.

 Aquat Toxicol. 78 (4): 341-349.
- Sanderson LA, Wright PA, Robinson JW, Ballantyne JS, Bernier NJ (2010) Inhibition of glutamine synthetase during ammonia exposure in rainbow trout indicates a high reserbe capacity to prevent brain ammonia toxicity. J Exp. Biol. 213(Pt 13): 2343-2353.
- Sarmento NLAF, Martins EFF, Costa DC, Mattioli CC, Julio GS da Costa, Figueiredo LG, Luz MR, Luz

- RK (2018) Reproductive efficiency and egg and larvae quality of Nile tilapia fed different levels of vitamin C. Aquac. 482(1): 96-102.
- Sell DR, Strauch CM, Shen W, Monnier VM (2007) 2-aminoadipic acid is a marker of protein carbonyl oxidation in the aging human skin: effects of diabetes, renal failure and sepsis. Biochem. J. 404(2): 269-277.
- Siddigi NJ, Alhomida AS. (2006) Effect of mercuric chloride on urinary excretion of free hydroxyproline.

 Med. Sci. Monit. 12(3): BR95-101.
- Straif K, Baan R, Grosse Y, Secretan B, Ghissassi FE, Cogliano V. (2005) Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. Lancet Oncol. 6 (12): 931-932.
- Teraoka H, Dong W, Ogawa S, Tsukiyama S, Okuhara Y, Niiyama M, Ueno N, Peterson RE, Hiraga T (2002) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenso-p-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: altered regional blood flow and impaired lower jaw development. Toxicol. Sci. 65(2): 192-199.
- Uno S, Shintoyo A, Kokushi E, Yamamoto M, Nakayama K, Koyama J. (2012) Gas chromatography-mass spectrometry for metabolite profiling of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) juveniles exposed to malathion. Environ Sci Pollut Res Int. 19 (7): 2595-2605.
- Uno T, Ishizuka M, Itakura T (2012) Cytochrome P450 (CYP) in fish. Environ. Toxicol. Phamacol. 34: 1-13.
- Vignet C, Devier MH, Le Menach K, Lyphout L, Potier J, Cachot J, Budzinski H, Begout ML, Cousin X (2014b) Long-term disruption of growth, reproduction, and behavior after embryonic exposure of zebrafish to PAH-spiked sediment. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 21(24): 13877-13887.

- Vignet C, Le Menach K, Lyphout L, Guionnet T, Fere L, Lequay D, Budzinski H, Cousin X, BegoutML (2014a) Chronic dietary exposure to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs causes physiological disruption in zebrafish--part II: behavior. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 21(24): 13818-13832.
- Wang X, Willams E, Haasch ML, Dasmahapatra AK (2006) Japanese medaka (*Oryzias latipes*): developmental model for the study of alcohol teratology. Birth. Defects. Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 77(1): 29-39.
- Watts NB (1999) Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. Clin. Chem. 45(8): 1359-1368.
- 角 大悟, 熊谷 嘉人. (2007) シグナル伝達経路に影響を及ぼす新奇大気汚染物質 1,2-ナフトキノンのケミカルバイオロジー. 薬物雑誌 12:1949-1956
- 小山次朗 (1983) コイの実験室多尿症について、日本水産学会誌, 49 (6), 883-887.
- 小山次朗, 板沢靖男 (1979) カドミウム経口投与の魚に対する影響-Vコイにおける尿の分析所見, 日本水産学会誌, 45 巻 (6), 691-694.
- 武田洋幸、岡本仁、成瀬清、堀寛. "パターン形成と器官形成". 小型魚類研究の新展開:脊椎動物の発生・遺伝・進化の理解をめざして. 共立出版株式会社, 2002, p. 24-99.
- 保科利一 (1962) ウナギの鰭赤病に関する研究, 東水大特別研報, 6(1), 1-105.
- 國師恵美子, 宇野誠一, 小山次朗 (2011) 1H-NMR メタボローム解析を用いた絶食下コイ *Cyprinus carpio L.*の血漿中代謝物変動評価, 日本水産学会誌, 77 (1), 75-83.