

魚類の胚・仔魚期における短期毒性試験のオプションとしての EROD 活性測定手法の検討

Examination of a Simple Measuring Method of EROD Activity, as Option for Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages

川原 志郎

Shiro KAWAHARA

小林 弘明

Hiroaki KOBAYASHI

関根 俊郎

Toshiro SEKINE

原 美由紀

Miyuki HARA

要旨

本研究では Noury らの手法を参考に、ゼブラフィッシュの仔魚を用いた *in vivo* の EROD 活性の測定方法を検証し、最適化するとともに、WET 手法や「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」など胚・仔魚期短期毒性試験との連結について、その可能性と注意点について検討した。その結果、受精後 9 日目の仔魚を用いて定量的に EROD 活性を測定できることが明らかとなり、同じロットの受精卵を用いることに留意すれば、胚・仔魚期短期毒性試験と連結できる可能性が示された。事業所排水や環境水を対象とした試験後に、その水に含まれる化学物質に関する情報を得るために一つのオプションとして本手法が利用できる可能性が示唆された。

キーワード: EROD、ゼブラフィッシュ、Whole Effluent Toxicity（全排水毒性、WET）、生物応答を用いた排水試験法（検討案）、胚・仔魚期短期毒性試験のオプション

Key Words: EROD, zebrafish, Whole Effluent Toxicity, draft protocols of effluent testing using bioassays, option for Short-term Toxicity Test on Fish Embryo and Sac-Fry Stages

1 はじめに

現在、米国化学会の Chemical Abstracts Service (CAS) の登録化学物質数は年々増加しており 2014 年 7 月現在で 8900 万種を上回っている。また、実際に世の中に流通している化学物質の数も数万種あると言われている。このため、ヒトや野生生物は常に複数の化学物質に曝露されている。これは野生生物体内から複数種の外因性化学物質が検出されていることからも明らかである¹⁾。

一方で、我が国における環境中の化学物質は、現在のところ基本的には対象とする単一の化学物質を機器分析により測定し、その結果をそれぞれの化学物質に定められた基準値などと比較することによって評価・管理されており、またその対象とする化学物質についても流通している化学物質の数のうちの極一部にとどまっている²⁾。今後、さらに安全で安心な環境を確保していくためには、環境中の化学物質のヒトや野生生物への曝露実態、つまり化学物質の複合影響や新規あるいは未規制の化学物質の影響も考慮できる評価体制を構築していくことが望ましい。

この問題を解決するために有効と考えられる手法の一つにバイオアッセイがある。バイオアッセイとは、生き物が化学物質の曝露などその生物が棲む環境に変化が起きた際に表する遺伝子レベルから生死を含めた様々な生体反応を検知し、評価に用いることであり、この際に実際に測定し指標とする項目をバイオマーカーという。バイオアッセイの特徴として、その生物が棲む環境が生物に及ぼす影響を総合的に評価する事が可能であり、また評価に用いるバイオマーカーによってはその影響を及ぼ

している原因を推定するための情報を得ることが可能であることがあげられる。このためバイオアッセイは環境中における化学物質の曝露実態を考慮した評価・管理に有効な手法といえる。

バイオアッセイを用いた水質の評価・管理手法のひとつに米国の Whole Effluent Toxicity（全排水毒性、以下、WET）があり、同様の方法が欧米諸国や韓国などでは制度化されている。日本においても既存の規制を補完する新たな水質の評価・管理手法として、魚類、甲殻類、藻類の 3 種の生物を用いたバイオアッセイにより、事業所などからの排水や環境水が生物に及ぼす影響を評価する手法が検討されており³⁾、平成 26 年には排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会において「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」⁴⁾がまとめられた。

この検討案や WET 手法の中では、魚類については、推奨種のひとつとしてゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)があげられており、OECD TG No. 212などを参考に、卵の受精後、4 時間以内の胚期から、対照区の半数が孵化してから 5 日目までの約 9 日間の胚から仔魚期における短期毒性試験が提案されている。エンドポイントとしては孵化率や孵化後生存率、生存率、生存指標、あるいは行動異常や形態異常などとされている。

WET 手法や「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」などでは何らかの影響が確認された場合には、毒性削減評価 (TRE) や毒性同定評価 (TIE) を行い、影響を低減させるための策を講じていくことになっている。これらの作業にあたり順番や取り組み方などは状況に応じて様々なものになることが予想されるが、試料中に含

まれている化学物質に関する情報を得ておくことにより、後の作業の効率化や、さらに環境負荷を低減させるための策を講じることが可能になると期待される。一方で、上述した試験のエンドポイントとされている項目のみでは、その試料が生物に及ぼす影響の度合いは分かるが、影響の原因物質や水中に含まれている化学物質に関する情報を得ることは難しい。

先に述べたように、水生生物のうち特に魚類を用いたバイオアッセイでは、数あるバイオマーカーのひとつとして薬物代謝酵素の mRNA、タンパクの誘導および酵素活性が用いられることがある。この薬物代謝酵素は分子種により基質特異性有しているため、ある種の薬物代謝酵素の誘導が確認された場合は、その酵素に対応した化学物質の曝露を窺わせる指標となるため、環境中である種の化学物質の曝露を示すバイオマーカーとしての有効性が検討されてきた。

このため、OECD TG No. 212 を基礎とした WET 手法や「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」などの手法（以下、胚・仔魚期短期毒性試験）で、事業所の排水や環境水などの魚類への影響調査を行った後にこのようなバイオマーカーの測定が可能となれば、その評価対象とした水に含まれている化学物質に関する情報を得ることに一定の役割を果たすものと考えられる。

魚類を用いたバイオアッセイにおいては特に薬物代謝酵素シトクロム P450 1A（以下、CYP1A）が芳香族炭化水素や有機ハロゲン系化合物の曝露により、顕著に誘導されることが知られている⁵⁰⁾。薬物代謝酵素 CYP1A の活性は ethoxyresorufin-*O*-deethylase (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⁷⁹⁾。

魚類を用いた標準的な EROD の測定方法としては、成魚の場合は摘出した肝臓を、仔魚の場合は全魚をホモジナイズし、遠心分離機などを用いて S9 区画やミクロソーム区画を精製した後に *in vitro* の測定系で行うことが多く、胚や仔魚を用いる場合は 1 サンプルあたり数十尾用いる必要がある¹⁰⁾。

ゼブラフィッシュの受精卵を使用した胚・仔魚期短期毒性試験では試験終了時は仔魚の状態であり、対照区や影響の少なかった濃度区では各容器に 10 尾程度残っていることが一般的である。このため上述した EROD 活性の測定方法では試験後に連数を減らす必要が生じるため、このままの手法で上述してきたような試験と連結するには困難が生じる。また、試験終了後に連結することを考慮すると、極力簡易な測定手法であることが望ましい。

Noury ら¹¹⁾は胚から仔魚期まで曝露を行ったゼブラフィッシュ 10 尾を用いた、*in vivo* の EROD 活性測定方法を報告しており、上述してきたような短期毒性試験などの連結の可能性が考えられるものの、こういった観点か

らの検討はなされていない。

ここで本研究では Noury ら¹¹⁾の方法を参考に、簡易性と汎用性を考慮した EROD 活性測定方法とゼブラフィッシュを用いた胚・仔魚期短期毒性試験との連結の可能性およびその際の注意点について検討することを目的とした。

2 実験材料と方法

2.1 試験生物の飼育条件

実験には（独）国立環境研究所より購入したゼブラフィッシュを継代飼育した親魚から生まれた受精卵を用いた。

ゼブラフィッシュの飼育には脱塩素水道水を用い、明暗周期 16:8、水温 26±1 °C とし、朝夕に一日 2 度、テトラミンおよび孵化後 24 時間以内のアルテミア (*Artemia spp. Nauplii*) を適量与えた。産卵期の親魚は雌雄別々の水槽で飼育し、採卵する場合のみ前日の夕方から混泳させた。

2.2 試薬

本研究に用いた β -nephthoflavone (以下、 β NF)、resorufin sodium salt (Fluorescence Reference Standard (以下、resorufin))、7-ethoxy-resorufin (以下、7-ER)、dimethyl sulfoxide (以下、DMSO) は全て和光純薬工業より購入した。

2.3 EROD 活性の測定方法

曝露終了後、仔魚をそれぞれの試験区ごとに、脱塩素水道水で洗浄したのち、10 尾を褐色瓶に移し全体の水量を 2 mL とした。ここに蛍光基質である 7-ER 濃度を 2 mM に調製した DMSO 溶液を適量添加し（以下、反応溶液）、添加直後と一時間ごとに各反応溶液中の resorufin 濃度を分光蛍光光度計（日本分光株式会社：FP-8200）を用いて測定した。測定には蛍光用マイクロセルを用い、励起波長 (Ex) と蛍光波長 (Em) はそれぞれ 571 nm および 582 nm とした。試料量は 500 μL とし、測定終了後 500 μL の試料全て反応用の褐色瓶に戻した。酵素の働きにより生成した蛍光物質 (resorufin) の生成量は検量線の傾きより算出した。resorufin の検量線のレンジは 0 nM から 50 nM とした。酵素活性は、resorufin の量 (fmol) / 時間 (h) / 尾数 (larva) で表した。

2.4 反応溶液中の蛍光基質(7-ER)濃度の検討

実験には受精後 4 時間以内の受精卵を用いた。試験区は、対照区、溶媒対照区、および β NF 濃度を 10 μg/L とし、受精卵の数はそれぞれ、60 個、60 個、120 個とした。曝露は 300 mL ビーカーを用いて行い、曝露水量はそれぞれ 200 mL とし、96 時間曝露を行った。試験水は 2 日に一度換水した。EROD 活性を測定するにあたり、反応溶液中の 7-ER 濃度を 1 μM および 2 μM とし、2.3 に記した測定条件で 1 時間おきに 5 回（計 6 回）反応溶液中の resorufin 量を測定した。

2.5 9日間曝露時のEROD活性の挙動の検討

胚・仔魚期短期毒性試験では仔魚の卵黄吸収が完了する直前まで(孵化後5日間)観察を行うこととされており、孵化遅延などが起きなければ一般的には曝露期間は9日程度となることが多い。このため、本実験での曝露期間は9日間とした。試験区は、対照区、溶媒対照区、および β NF濃度を1.1、3.3、10および30 μ g/Lとし、EROD活性の挙動を明らかにした。実験にはスナップカップを用い、曝露水量は40mLとし、それぞれ15個の受精後4時間以内の受精卵を曝露した。換水は2日に一度行った。再現性および使用する受精卵のロット間の差を確認するために同様の試験を3度行った。EROD活性測定時の反応溶液中の7-ER濃度は2 μ Mとした。

2.6 統計処理

全ての統計処理はSPSS(Ver. 22, IBM社)を用いて行った。EROD活性はLeveneの検定により等分散性の検定を行い、等分散性が認められた場合には一元配置分散分析(one way ANOVA)を行った。一元配置分散分析において、有意差が認められた場合には多重検定(Tukey HSD検定)により有意差を検定した。等分散性が認められない場合はKruskal-Wallisの順位和検定を行い、有意差が認められた場合にはBonferroni adjustmentをもってMann WhitneyのU検定を行った。

3 結果

3.1 反応溶液中の蛍光基質(7-ER)濃度の検討

ゼブラフィッシュの仔魚を用いたEROD活性の測定にあたり、反応溶液中の蛍光基質(7-ER)濃度について検討を行った。反応溶液中の7-ER濃度を1 μ Mと2 μ Mとしたものを比較した場合、2 μ Mが最も感度が良かった(Fig. 1)。またその際、対照区を含めて全てのサンプルでresorufinの生成量は時間とともに増加し、直線性は良好であることを確認した。このため、以降の測定では反応溶液中の7-ER濃度は2 μ Mとすることとした。

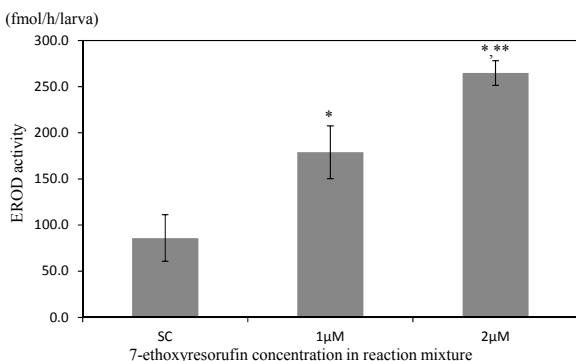


Fig. 1. Relation between 7-ER concentrations in reaction mixture and EROD activities.

Values represent means and standard deviations (n=4). SC indicates solvent control (measured in 2 μ M 7-ER). *indicates significant differences VS control ($P<0.05$). **indicates significant differences VS 1 μ M ($P<0.05$).

3.2 9日間曝露時のEROD活性の挙動の検討

試験区を対照区、溶媒対照区、 β NF濃度を1.1、3.3、10および30 μ g/Lとし、9日間の曝露を行った後、EROD活性の測定を行った。再現性および使用する受精卵のロット間の差を確認するため、別日、別ロットの受精卵を用いて同様の実験を3度行った。

この3度の実験では各実験および各試験区間で、孵化率や孵化後生存率、生存率、生存指標に差は無かった。

試験終了後に行った全てのEROD活性の測定において、測定時間中、反応溶液中のresorufinは直線的に増加した($R^2=0.956-0.999$) (Fig. 2、例として一度目の実験、溶媒対照区、 β NF 3.3 μ g/Lおよび30 μ g/L曝露区の結果のみ掲載)。

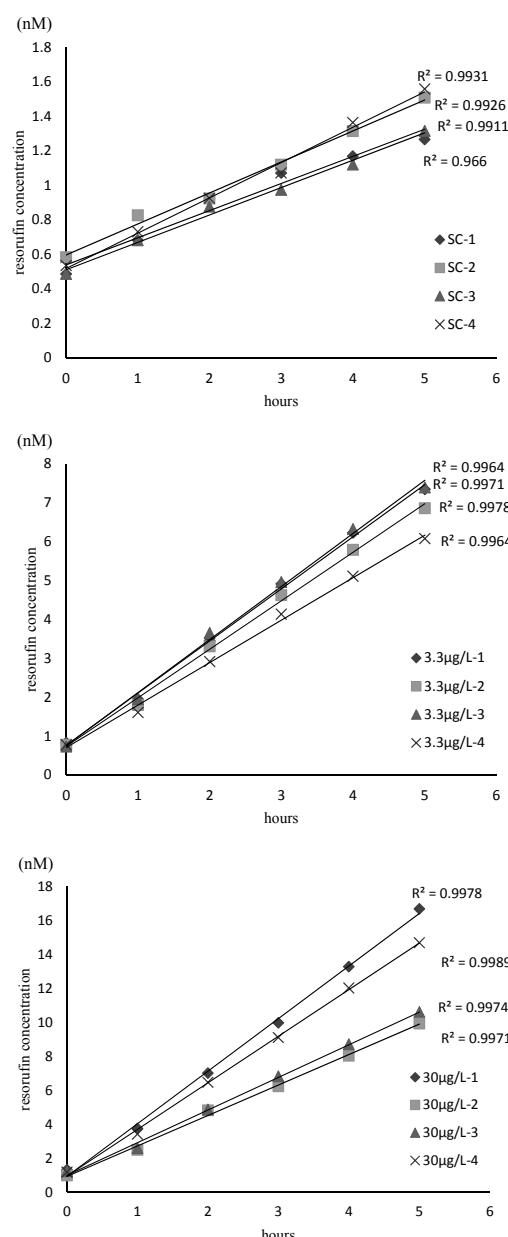


Fig. 2 Kinetics of resorufin production in reaction mixture in solvent control group (SC), β NF 3.3 and 30 μ g/L exposed groups of the first experiment.

また、測定終了後、測定に供した仔魚は全て生きていることを確認した。

いずれの試験においても濃度依存的な EROD 活性の上昇が確認され、溶媒対照区と比較して $10\mu\text{g}/\text{L}$ (2 回目および 3 回目) と $30\mu\text{g}/\text{L}$ で、さらに全ての測定で $1.1\mu\text{g}/\text{L}$ と $30\mu\text{g}/\text{L}$ を比較した結果、有意な差が検出された (Fig. 3)。

また、別日、別ロットの受精卵を試験に供した際には活性値に差が見受けられた。

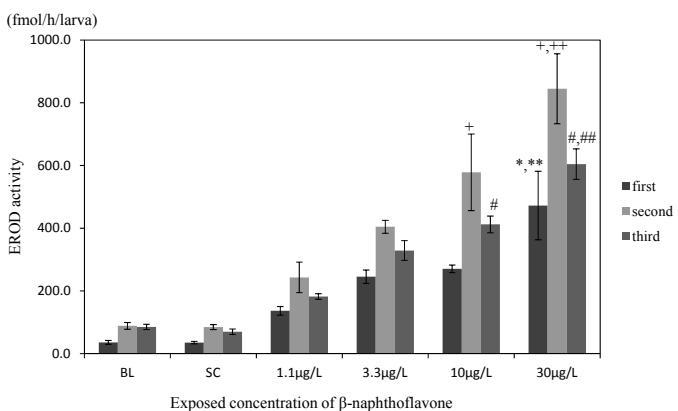


Fig. 3 Dose-response of β -NF on EROD activity of 9 dpf zebrafish larva.

Values represent means and standard deviations ($n=4$). BL indicates blank control. SC indicates solvent control. *, +, # indicates significant differences VS SC ($P<0.05$). **, ++, ## indicates significant differences VS $1.1\mu\text{g}/\text{L}$ ($P<0.05$).

4 考察

本研究ではまず EROD 活性測定のための蛍光基質である 7-ER の反応溶液中の濃度について検討した。7-ER の DMSO への溶解度を確認した結果 $>2\text{mM}$ であった。溶媒に用いた DMSO は一定濃度以上となると胚や仔魚に影響を及ぼすことが報告されており、EROD 活性の測定中に仔魚の健康状態に影響を及ぼす場合、EROD 活性値にも影響を及ぼす可能性が考えられる¹²⁾。Hallare らは¹³⁾ゼブラファイッシュの胚への溶媒の影響について検討しており、その中で DMSO は 2% (v/v) まで生存率に影響を及ぼさず、0.1% (v/v) においても心拍数の低下や浮腫などの形態異常は起きないことを報告している。このため、本研究では反応溶液中の DMSO 濃度を 0.1% (v/v) を上限と設定した。その結果、反応溶液中の DMSO 濃度 0.1% (v/v) 以下の条件のもとでは、7-ER の最高濃度である $2\mu\text{M}$ で最も高い感度が得られることを確認した。

本研究において反応溶液中の 7-ER 濃度を $2\mu\text{M}$ とした測定では、いずれの測定においても測定終了後反応溶液中の全ての仔魚の生存と、反応溶液中の resorufin の生成量が直線的に増加していることが確認出来たことから、本測定条件で定量的な EROD 活性の測定が可能であることが示された。

CYP1A 誘導のモデル物質である β -NF の濃度を $1.1\mu\text{g}/\text{L}$ から $30\mu\text{g}/\text{L}$ まで公比 3 で設定し、胚・仔魚期短期毒性試験の試験期間を考慮し 9 日間の曝露を行った結果、濃度依存的な EROD 活性の上昇が確認できた。Fig. 3においては多濃度区間の多重比較を行ったが、対照区と $1.1\mu\text{g}/\text{L}$ 曝露区のみの比較を行った際にはいずれの実験結果でも有意な差が検出できた。実験条件が異なるため単純な比較は出来ないが、魚類の EROD 活性測定の標準的な手法である、成魚の肝臓から精製したミクロソーム区画を用いた *in vitro* の測定系においても同等の β -NF の曝露濃度から EROD 活性の誘導が確認できることが報告されており、本手法は標準的な手法と同等程度の感度を有すると考えられる¹⁴⁾。

また、別ロットの受精卵を用いた場合には β -NF の曝露濃度と EROD 活性の傾向は変わらないものの、活性値には差があることが示された。これには、仔魚や卵の状態、さらに親魚の栄養状態や産卵時の体調なども関係しているものと考えられた。したがって、本手法で EROD 活性を比較する際には同じロットの受精卵から生まれた仔魚であることを確認すること、また、別日、別試験での測定結果を活性値で比較する際には十分な注意が必要であるといえる。

本研究では胚・仔魚期短期毒性試験の後に、さらに試料水中に含まれる化学物質についての情報を得るためにひとつつのオプションとして、芳香族炭化水素や有機ハロゲン系化合物と関連の深いバイオマーカーである EROD 活性の測定の連結についての可能性とその際の注意点について検討した。

その結果、同じロットの受精卵を試験に用いれば、胚・仔魚期短期毒性試験の後に本手法を連結することが可能であることが示された。

EROD 活性自体は、胚・仔魚期短期毒性試験のエンドポイントとされている孵化率や孵化後生存率と直接的に関連するものではないが、試験後に本手法を用いることにより、特に燃焼系廃棄物や難燃剤、重油などを多く扱う施設やその処理施設からの排水や周辺の環境水の調査を行う際に、貴重な情報がもたらされることが期待される。

本手法は *in vivo* の EROD 活性測定のための、生体として正味の活性が測定でき、前処理の際の薬物代謝酵素活性の失活の懼れもない。また、一度の試験からより多くの情報を得るという観点からも実験動物の使用数の削減につながり、測定終了後に仔魚が生きた状態で残るため、さらに有用な情報を獲得することも可能である。測定準備も非常に簡易なうえ、試薬などの使用も少なくてすむためコスト面からも取り組み易い手法といえる。

5 まとめ

本研究では Noury ら¹¹⁾の手法を参考に、ゼブラフィッシュの仔魚を用いた *in vivo* の EROD 活性の測定方法を検証し、最適化するとともに、胚・仔魚期短期毒性試験との連結について、その可能性と注意点について検討した。その結果、同じロットの受精卵を用いることに留意すれば、胚・仔魚期短期毒性試験との連結が可能であることが示された。

このため、事業所排水や環境水を対象とした試験後に、その水に含まれる化学物質に関する情報を得るために一つのオプションとして本手法が利用できる可能性が示唆された。

今後、さらに胚・仔魚期短期毒性試験と連結する際に留意すべき点などを詳細に検討し、より実用的な手法としたい。さらに 7-ER 以外の薬物代謝酵素の分子種と対応が報告されている蛍光基質についても検討し、芳香族炭化水素や有機ハロゲン系化合物以外の化学物質群の存在の検知についても検討していきたい。

本研究では、胚・仔魚期短期毒性試験との連結を考慮した検討を行ったが、本手法を例えれば多環芳香族などが多く含まれる重油などの公共水域への流入による影響を確認するための手法としての活用についても検討したい。

また、本手法においては高い定量性が確認できたため、今後省スペースかつ *in vivo* での化学物質の代謝活性化や代謝阻害による生体影響の変化や、メタボロミクスなどの研究につなげていけることが期待できる。このため、環境分野だけでなく、ライフサイエンス分野の研究推進への寄与も期待したい。

文献

- 1) Isobe, T., Ochi, Y., Ramu, K., Yamamoto, T., Tajima, Y., Yamada, T. K., Amano, M., Miyazaki, N., Takahashi, S., Tanabe, S. :Organohalogen contaminants in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Japan: Present contamination status, body distribution and temporal trends (1978- 2003). *Marine Pollution Bulletin*, 58, 396-401 (2009)
- 2) 渡部春奈、鑑迫典久：事業場における生物応答を用いた排水評価・管理手法の検討、用水と廃水、Vol. 55 No. 1 75-83 (2013)
- 3) 鑑迫典久：環境水のバイオアッセイ—Whole Effluent Toxicity の考え方、水環境学会誌、29、8、426-432 (2006)
- 4) 排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会（2014）生物応答を用いた排水試験法（検討案）
- 5) Bucheli, T. D. and Fent, K. :Induction of cytochrome P-450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystem. *Crit. Rev. Environ. Sci. Tech-* nol., 25, 201- 268(1995)
- 6) Goksøy, A. and Förlin, L. :The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.*, 22, 287- 312(1992)
- 7) Floranne Le Bihanic, Catherine M. Couillard, Cyril Rigaud, Benoît Légaré :A simple and reliable *in vivo* EROD activity measurement in single *Fundulus heteroclitus* embryo and larva. *Mar. Environ. Res.*, 84, 17-23(2013)
- 8) Koponen K, kukkonen JVK, Lindstrom-Seppa P. :Chemical accumulation and biotransformation enzyme activities of rainbow trout embryos in water-borne exposure to PCB-77. *Mar. Environ. Res.* 46, 475-478(1998)
- 9) Tatarazako, N., et al. :New measurement method of P450s activities in the liver microsome with individual Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Sciences*, 9 (6) ,451-462(2002)
- 10) Jens C. Otte, Annette D. Schmidt, Henner Hollert, Thomas Braunbeck. :Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.*, 100, 38-50(2010)
- 11) Noury, P., Geffard, O., Tutundjian, R., Garric, J. :Non destructive *in vivo* measurement of ethoxresorufin biotransformation by zebrafish prolarvae: development and application. *Environmental Toxicology* 21, 324-331(2006)
- 12) 柏田 祥策、「生態毒性」評価のためのバイオアッセイ、ぶんせき、No. 10、598-603(2004)
- 13) Arnold Hallare, Kerstin Nagel, Heinz-R. Köhler, Rita Triebskorn :Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 63, 378-388(2006)
- 14) Shiro KAWAHARA, Narisato HIRAI, Mitsuru ARAI, Norihisa TATARAZAKO :Effects of *in vivo* Combined Exposure of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) to a Proestrogen, trans-Stilbene, and a CYP1 Inducer, β -nephthoflavone. *Journal of Environmental Chemistry*, Vol. 19 , No. 3 371-380(2009).