

生物学的手法を用いた環境モニタリング手法についての研究 (VI) ー環境水バイオマーカー遺伝子を用いた環境評価法についてー

半野勝正 尾田正二* 三谷啓志* 吉澤 正

(*: 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻動物生殖システム分野)

1 はじめに

生体は常に外来性の各種化学物質等の異物に曝露されている。これら化学物質が標的とする因子は、化合物の立体構造や化学的性質によって様々であり、細胞を構成する機能因子や酵素の機能を阻害あるいは攪乱するものが多数知られている。しかしながら、生体は同時に様々なレベルでこれらを速やかに代謝し、排出する機構を作り出してきた。このような細胞内の各種応答の中で最も大きな影響を与える機構は、ゲノム情報の正確な伝達機構である。ゲノム情報を司る DNA 結合性転写制御因子の機能が、細胞の運命や個体の発達や生命現象に重大な影響を与えることが知られている。化学物質が直接的あるいは間接的に特異的に転写因子の機能を活性化もしくは不活性化することで、大きな細胞応答が得られることが知られている。最近の研究では、特定の転写制御因子が同定されなくても、下流の一群の遺伝子の発現変動から上流の転写制御因子を探る試みもなされている¹⁾。今回、化学物質(ダイオキシン類及び重金属類)に暴露したメダカ胚から抽出した全 RNA に対してメダカ cDNA マイクロアレイ試験を行い、各化学物質に対して特異的に発現誘導する 20 個の遺伝子を網羅的に抽出し、「環境水バイオマーカー遺伝子」と命名した²⁾。更に、複数の化学物質の混合液をメダカ胚に曝露することによる複合影響を「環境水バイオマーカー遺伝子」の発現誘導から生物学的考察を加えた。

2 試験方法

2・1 メダカ卵と各試験液への曝露方法

メダカの飼育と採卵、及び各試験液への曝露方法は、既報³⁾のとおりである。

2・2 全 RNA 抽出及び調整

全 RNA 抽出及び調整は、既報³⁾のとおりである。

2・3 1st strand cDNA の合成

1st strand cDNA 合成は、既報³⁾のとおりである。

2・4 定量的リアルタイム PCR

定量的リアルタイム PCR は、既報³⁾のとおりである。なお、用いたプライマー対は、Primer3 program (Rozen and Skaletsky,2000) により設計した。(表1)

2・5 メダカ cDNA マイクロアレイ

2・2 で抽出したメダカ胚由来の RNA 試料について、メダカ cDNA マイクロアレイによる環境モニタリングに適する遺伝子の網羅的探索を行った。使用したアレイは、Agilent 社製のメダカカスタムアレイである。

(使用機器及びキット)

1)メダカカスタムマイクロアレイ(44K×4 Pack, 36,398 スポット搭載, Agilent 社製)

2)RNA 濃度測定機器:Nanodrop ND-1000

3)ハイブリダイゼーションオープン:Agilent DNA Microarray Hybridization Oven

4)スキャニング:Agilent DNA Microarray Scanner

5)数値化ソフト:Feature Extraction (ver10.7)

6)使用したキット及び試薬類:

-Agilent One Color Spike Mix Kit

-Agilent Quick-Amp Labeling Kit (1color 用)

-QIAGEN RNeasy Mini kit-Agilent Gene Expression Hybridization kit

-Agilent Gene Expression Wash Buffer 1

-Agilent Gene Expression Wash Buffer 2

-Agilent 10% Triton X-102

(方法)

1)RNA の分解がないことを確認した後、DNA マイクロアレイ実験に必要な RNA 量 (500ng)に相当する試料液量を RNA サンプルから分取した。そして、一色法のプロトコール(ファイル名:One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Quick Amp Labeling), ver 5.7)の方法に準じて実施した。

まず、一色法に用いる内部スパイク One-Color Spike-Mix を所定の方法により調製した。次に、必要

量の One-Color Spike-Mix と 500ng の供試検体 RNA を鋳型として、MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) を用いた逆転写反応により T7 Promoter primer を付加させた cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として、T7 RNA polymerase による cRNA 合成反応 (40°C, 2 時間) を実施した。この反応において Cyanine 3 (Cy-3)-CTP を取り込ませることにより、Cy-3 ラベル化 cRNA を合成した。この Cy-3 ラベル化 cRNA を QIAGEN RNeasy Mini kit を用いて精製し、NanoDrop ND-1000 により cRNA 濃度を測定して、増幅効率や Cy-3 の取り込み効率を算出した。この際、精製した Cy-3 ラベル化 cRNA の増幅効率が 10 倍以上、かつ取り込み効率が 9pmol/μg 以上であることを確認して、次のステップに進んだ。1.65 μg 分の Cy-3 ラベル化 cRNA を断片化反応 (60°C, 30 分間) させた後、蛍光標識プローブとしてマイクロアレイとのハイブリダイゼーションに供した。

ハイブリダイゼーションは以下の手順で実施した。

予めハイブリダイゼーションチャンバーベースにセットしたガスケットスライド上に蛍光標識プローブを均一に広がるように滴下した。この場合、各供試検体由来の蛍光標識プローブは 1 つのアレイ上で反応させた。滴下後、マイクロアレイをガスケットスライド上に載せ、ハイブリダイゼーションチャンバーを組み立てた。次いで、チャンバーをハイブリダイゼーションオープンにセットし、回転させながら (10rpm) , 65°C で 17 時間反応させた。ハイブリダイゼーション後のマイクロアレイは、10% Triton X-100 を終濃度 0.005% になるように添加した Wash Buffer 1 及び Wash Buffer 2 で洗浄した後、Agilent DNA Microarray Scanner でスキャニングを行った。得られた画像データを Feature Extraction ソフトウェアを用いて数値化した。また、同時に出力される品質管理レポート (QC report) のスパイクサンプルの傾きと相関係数から、マイクロアレイ実験の信頼性を確認した。

2) アレイ間ノーマライズ

(使用したソフトウェア)

GeneSpring GX 10.0 (Agilent 社製)

(方法)

4 検体のアレイデータについて、Gene Spring を用いてアレイ間ノーマライズを行った。アレイ間ノーマライズの方法としてグローバルノーマライゼーション法を選択し、Agilent 社奨励プロトコール(ファイル名; One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis, ver 5.7)に従い、以下の条件で実施した。

・Threshold raw signals to 1.0

しきい値以下のプローブを除外する。

・NormAlization Algorithm: Percentile Shift

・Shift to percentile: 75

アレイごとに測定値の 75 percentile の値で補正し、アレイ間のばらつきを抑えて、生物学的な変動のみを抽出する。上記のアレイ間ノーマライズと同時に、数値化データ(Raw data)に記載されたフラグ情報(5 項目)をもとに、データの信頼度の指標となる 3 種類の Gene Spring flag (“P (Present)”, “M (Marginal)”, “A (Absent)”)に変換した。これは、いずれか一つでも “Absent” と判定された場合は、“A” の Gene Spring flags が付き、“Absent” の判定はないがいずれかの項目で “Marginal” 判定があった場合は “M” が付く。“Absent” 及び “Marginal” の判定が全く付かなかった場合、“P”(最も信頼性の高い判定)となる。

2・6 統計処理

統計処理は、既報³⁾のとおりである。

3 結果及び考察

3・1 ダイオキシン類関連遺伝子・重金属関連遺伝子の発現誘導

ダイオキシン類、重金属類を試験液としてヒメダカ胚へ曝露し、24 時間、48 時間後のダイオキシン類及び重金属類関連遺伝子の発現誘導についてマイクロアレイ試験を行った。各試験液における解析有効遺伝子数と特異的に発現誘導(コントロール比 0.5 倍未満又は 2 倍を超える)した遺伝子数を表 2～表 3 に示す。メダカ胚に曝露 24 時間後の試験(ダイオキシン類 5 物質、重金属類 4 物質)では、7,712 の遺伝子が特異的に高く、6,317 の遺伝子が特異的に低く発現誘導された(表 2)。メダカ胚に曝露 48 時間後の試験(ダイオキシン類 5 物質、重金属類 2 物質)では、5,383 の遺伝子が特異的に高く、443 の遺伝子が特異

的に低く発現誘導された(表3)。

3・2 環境水バイオマーカー遺伝子の抽出

最初に、各マイクロアレイ試験において共通して解析有効な遺伝子の中から特異的発現誘導を示し、かつリアルタイム PCR により発現変動を確認した 20 遺伝子をバイオマーカー遺伝子と位置付け「環境水バイオマーカー遺伝子」として抽出した。また、これらの遺伝子の発現誘導量の相関を解析し、体内での働きの近い4つの遺伝子グループに分類した(表4)。

3.3 環境水バイオマーカー遺伝子を用いた生物影響評価

3・3・1 化学物質単独曝露による環境水バイオマーカー遺伝子の発現誘導

3・3・1・1 ダイオキシン類異性体(単独曝露)

ダイオキシン類単独曝露(曝露時間 48 時間)の「環境水バイオマーカー遺伝子」の発現誘導量を可視的に把握するため、20 角レーダー図に示した。

メダカ胚を 2378T4CDD, 123478H6CDD, O8CDD(いずれも 1 μ g/L)に 48 時間曝露させた場合、CYP1A1 の相対発現誘導量は、各ダイオキシン類異性体に割り当てられている TEF 値に比例していた。また、2378T4CDD (TEF=1)に単独曝露した場合は、CYP1A1, UDPGT, AhR2a, AhRR (以上第 1 グループ)の発現が誘導された。TEF の比較的低い PCDDs 及び Co-PCB (123478H6CDD; TEF=0.1, O8CDD; TEF=0.0003)に単独曝露した場合は、CYP1A1 が TEF に比例した誘導を示した他、CACHD1, RAR- α , ER- α (以上第 2 グループ)の発現が誘導された(図1)。

3・3・1・2 重金属類(単独曝露)

Pb (1mg/L)に単独曝露した場合は、RAR- α , ER- α (第 2 グループ)と CDC37, HSP70, MT (Metallothionein) (第 4 グループ)の発現が誘導された。

Hg (0.5mg/L)に単独曝露した場合は、MTF1, Tropomyosin, HSP90a (第 3 グループ)と TBP, TNF-R, CDC37, HSP70, MT, ependymin1 (第 4 グループ)が誘導された。

Al (10mg/L)に単独曝露した場合は、UDPGT, ER- β (第 1 グループ)と CACHD1, RAR- α , ER- α

(第 2 グループ)の発現が誘導された(図2)。

3・3・2 化学物質複合曝露による環境水バイオマーカー遺伝子の発現誘導

3・3・2・1 ダイオキシン類と重金属類の複合曝露による遺伝子発現

3・3・2・1・1 2378T4CDD と Pb との複合曝露による遺伝子発現

2378T4CDD と Pb を混合した試験水(混合試験液; 2378T4CDD; 0.1 μ g/L, Pb; 1mg/L)にメダカ胚を曝露した場合、CYP1A1 と AhRR の 2 遺伝子(第 1 グループ)に相乗的な発現誘導が認められた。また、UDPGT と AhR2a では計算値とほぼ同じ発現量となり、発現誘導の加算性が示された。その他の環境水バイオマーカー遺伝子では、計算値からの発現減少率が大きかった。特に、RAR- α , ER- α の減少率が大きかった。2378T4CDD(0.1 μ g/L)の単独曝露の場合は血流障害が発生しないが、Pb(1mg/L)の単独曝露の場合は 3 日目あたりから血流が遅くなる。孵化する個体もあるが体躯が小さく生育不良であり、20%弱の死亡率であった。複合曝露によるメダカ胚への生物影響は、全ての試験胚において血流障害が発生した(図3, 発生率; 100%)。

3・3・2・1・2 2378T4CDD と Hg との複合曝露による遺伝子発現

2378T4CDD と Hg を混合した試験水(混合試験液; 2378T4CDD; 0.1 μ g/L, Hg; 0.5mg/L)にメダカ胚を曝露した場合、CYP1A1 と AhRR の 2 遺伝子(第 1 グループ)に相乗的な発現誘導が認められた。また、HSP70 (第 4 グループ)の発現が計算値より減少していた。他の遺伝子は、ほぼ計算値と同じ加算的な発現誘導が認められた。2378T4CDD(0.1 μ g/L)の単独曝露の場合は血流障害が発生しないが、Hg(0.5mg/L)の単独曝露の場合は 3 日目あたりから血流障害とともに死亡する胚も増加し、孵化したメダカは体の背骨の曲がったものが目立ち(骨奇形)、1 週間以内に全てが死亡した。複合曝露によるメダカ胚への生物影響は、全ての試験胚において血流障害が発生した(図4, 生存率; 100%)。

3・3・2・2・6 ダイオキシン類と重金属類の複合曝露と生物影響(血流障害)

血流障害が発生した複合曝露は、2種ダイオキシン類異性体混合; (2378 T4CDD+PCB126)とダイオキシン類と重金属類の混合; 2378T4CDD+Pb, 2378T4CDD+Hg, PCB126+Hg であった (発生率; 100%)。血流障害が発生しなかった複合曝露は PCB126+Pb と 2 種重金属類 (Pb+Hg) の場合であった (発生率; 0%)。複合曝露において RAR- α の発現が計算値からの減少 (抑制) 率が大きい組合せは血流障害が発生し、RAR- α の加算的発現誘導と相乗的発現誘導が見られた組合せは血流障害が発生しなかった (図5)。

4 結論

本研究では、メダカの胚において誘導される遺伝子発現の異常を検出し、外観上の異常がみられないような弱い環境毒性をも評価する手法を開発することを目指した。更に、本法では、検討する遺伝子の数を 20 まで増やすことによって、毒性物質に特異的に発現される遺伝子のパターンがあることを見出し、環境毒性の原因となる物質を特定することが可能であるか否かについて検討した。その結果、「環境水バイオマーカー遺伝子」の発現誘導のパターンから、ダイオキシン異性体の種類を推測することが可能であった。また、重金属についても特有の「環境水バイオマーカー遺伝子」の発現誘導のパターンがあることも明らかにした。以上の結果をもとに、ダイオキシン類異性体の複合暴露、およびダイオキシン類と重金属の複合暴露による「環境水バイオマーカー遺伝子」の発現誘導パターンを解明した。本法は、また、メダカ胚に外見的異常が見出されないような低濃度毒性の場合にも有効であり、さらにダイオキシン異性体、重金属の複合汚染の場合にも有効であると考えられ、従来法に比して画期的である。

5 参考文献

- 1) Zhang Z., Hu J. Development and Validation of Endogenous reference Genes for

Expression Profiling of Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to Endocrine Disrupting Chemicals by Quantative Real-Time PCR. *Toxicol. Sci.* 95(2). 356-368 (2007).

- 2) 半野勝正:メダカ由来環境水バイオマーカー遺伝子を用いたダイオキシン類及び重金属類の複合影響の評価,東京大学大学院新領域創成科学研究科 学位論文, (2010).
- 3) 半野勝正, 尾田正二, 三谷啓志, 杉山寛:生物学的手法を用いた環境モニタリング手法についての研究 (V) —メダカ胚発生段階におけるダイオキシン類の生物毒性影響について—, 千葉県環境研究センター年報, 第 9 号, 210-215 (2009)

6 用語の説明

本論文では、以下の略語を用いた。

AhR: aryl hydrocarbon receptor

AhRR: AhR repressor

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

Co-PCBs: Co-planar Polychlorinated biphenyls

CYP1A1: cytochrome P450 1A1

DMSO: dimethyl sulfoxide

DNA: deoxyribonucleic acid

GC-MS: Gas Chromatography Mass Spectrometer

mRNA: messenger RNA

PCDDs: Polychlorinated dibenzo-p-dioxins

PCDFs: Polychlorinated dibenzofurans

RNA: ribonucleic acid

RT-PCR: reverse transcription-PCR

RXR: retinoid X-receptor

TEF: Toxicity Equivalency Factor (毒性等価係数)

TEQ: Toxicity Equivalency Quantity (毒性等量)

表1 リアルタイム PCR に使用したプライマー対

No.	Gene (abbreviation)	Gene ID	Forward primer (5-3')	Reverse primer (5-3')
1	CYP1A1	CP1A1_ORYLA	TGGTTTTTGGTCTGGGAAAG	TGAATCATGATCGCCAAAAA
2	EF-1a	TC45642	GGAGGCCAGCGACAAGATGAGC	ACACGGCCGACAGGGACAGTTC
3	β -actin	TC55265	CACCTGTAGCGCCGTACACACAG	TGACACCCTGGTGCCTGGGGCGAC
4	AhR1b-1	Q90W03_ORYLA	ACATCCAGGGCAGACTCAAG	ATGTTCTTGGTGCCTGATTTC
5	AhR1b-2	ENSORL00000018199	TCCAGGGCAGACTCAAGTTC	GGTCTGATCTCCAGAATGG
6	AhR2a	ENSORL00000000135	GTCGCCTGAAGTTTCTCCAT	TCCAGCTTGTGTTTGGTCTG
7	AhR2b	ENSORL00000018196	TCAGGGACGGCTGAAGTATC	AGCATTTTGGCTCGGATCT
8	AhRR	PDCD6	GCTTTGCCTTGGTGGTGAG	GCGGTCTCTATGTGGATGT
9	ependymin1	EPDR1	GAGCATGGTGTATGTCCAGA	CTTCCTGTCCGACCACTCCT
10	ependymin2a	ENSORL00000011214	GAAGCTGACAGCCTATGCAA	CAGCAGAGCATCAAAGTGGA
11	ependymin2b	ENSORL00000012350	TGAGATCGATGATGCCAAAC	TCAGGCAACTTCCATACCA
12	HSP90a	HSP90AA1	CGCATGAAGGACAACCAGAA	GGCGTTCACAAAAGCAGAG
13	HSP90b	HSP90B1	TGGGACTGGGAACCTGATGAA	AGCCGTGAAGTGGATGTGAG
14	p23	PTGES3	GTCTTGGAGGAGCTGACAATGA	ATCTGTGCGTTTGTGTTTGA
15	CDC37-1	ENSORL00000005543	GAGGAGAATCAGGCCAACAC	AGTGTCTGCCACTTGGGTTT
16	CDC37-2	ENSORL00000009960	ATCCGGAGAATCAGGGAAAC	TCACAGCTCTGTCTGTCTG
17	TATA-box binding protein (TBP)	NP418451	GGAACGGGAGAAGCACAAA	TACGGCATCATGGGACTGAA
18	TBT-binding protein	TC59386	CTCTCTGTTGCTGGGATTTT	CACCTTCAGAGCGATGTTGG
19	TNF-R	AV668946	GCAACTCCCAACACTCATTCC	TTTTTGCCTTCTCGTCCAC
20	ER- α	ESR1	CCACCCAGCCACCACTATCT	AGCCCTCACAAGACCACACC
21	ER- β	Q8UW75_ORYLA	TACCAGCAAGGGTGTGAGGA	GGGCAGATGTAGTCGGTGTG
22	RAR- α	Q75SV5_ORYLA	GCATCATCAAGACGGTGGAG	GAGGAGTTGGTTGGCGAAAG
23	HSP70	HSP71_ORYLA	GATCACCATCACCAACGACA	CTTCTCCACCACCCTCTTCC
24	Metallothionein (MT)	MT_ORYLA	CTGCGACTGCTCCAAAACCTG	TGGCAGCTTAAATCCAAAGG
25	Metal regulatory transcription factor 1 (MTF1)	MTF1	TCTCTCCCTCCTCATCCAC	AACTCATCTGCCACCAGCAA
26	AGXT	AGXT (2 of 2)	CCGAAAAGGGGTTGGAAGAG	CAGCATCTCCCTCCAGTCGT
27	VWFA and cache domain-containing protein 1 Precursor	CACHD1	TTTACATCAACCTGCCCAACC	AGTTCACATCCACCCCAACC
28	UDPGT	ENSORL00000013131	CAGTGAAGCCGATGGACAAA	GGAGGTCAGAAACACGAGCA
29	Tropomyosin	TPM1 (alpha)	GCAGCAGAGGACAGAAGCAA	GATCCAACTCCTCTCAACCA
30	glutathione S-transferase alpha 5	GSTA5	CCTCTCTGGACCGTTACCT	CGGCTGTGGTTCCTCTTAC
31	VEGF-R	Q75WK4_ORYLA	AGGAAGGGACCAGGATGAGG	GGGCTGTGTTGATGGGTATG

表2 曝露 24 時間後のメダカ胚発生段階における
解析有効遺伝子数と特異的発現誘導遺伝子数

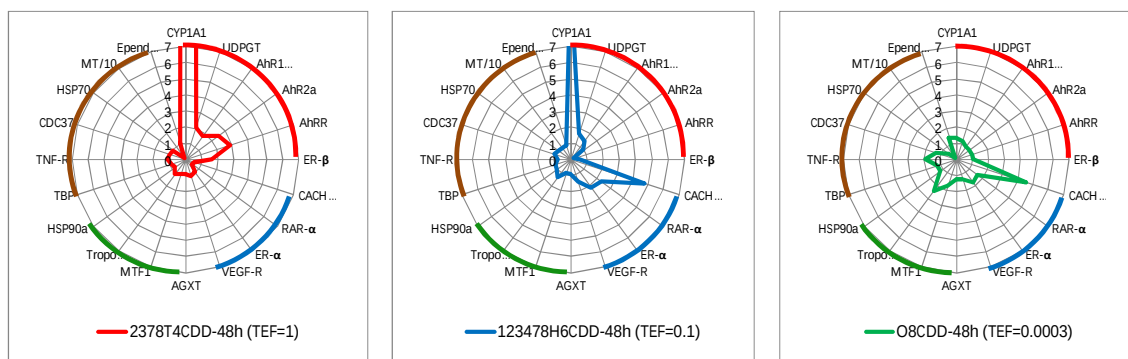
chemicals exposed for 24 hr	effective genes for analysis	Up-regulated genes (>2-fold)	Down-regulated genes (<0.5-fold)	The specific regulated genes
2378TCDD	27,880	1,411	113	1,524
123478HxCDD	27,601	585	362	947
PCB77	27,639	657	180	837
PCB126	27,322	200	384	584
PCB180	27,586	246	267	513
Pb	25,741	367	514	881
Cu	26,577	1,001	1,273	2,274
Hg	25,591	2,655	2,257	4,912
Cd	26,874	590	967	1,557
Total		7,712	6,317	14029

表3 曝露 48 時間後のメダカ胚発生段階における
解析有効遺伝子数と特異的発現誘導遺伝子数

chemicals exposed for 48 hr	effective genes for analysis	Up-regulated genes (>2-fold)	Down-regulated genes (<0.5-fold)	The specific regulated genes
2378T4CDD	28,864	74	50	124
123478H6CDD	28,668	348	97	445
O8CDD	29,161	814	51	865
PCB77	29,076	1,009	81	1,090
PCB126	29,190	368	42	410
Pb	28,312	2,463	67	2,530
Al	29,123	307	55	362
Total		5,383	443	5,826

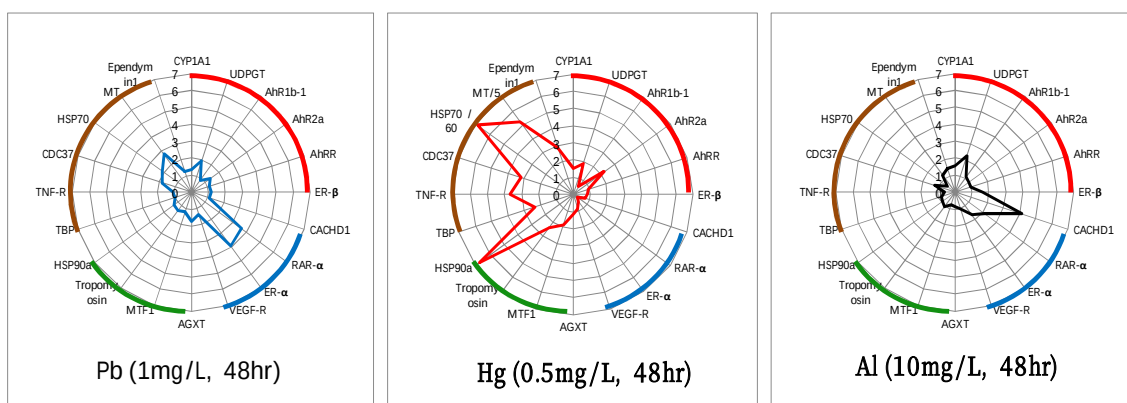
表4 環境水バイオマーカー遺伝子の概要

Group	No.	Biomaker symbol	Gene or Ensemble Gene ID	Gene title	予想される細胞応答
1	1	CYP1A1	CP1A1_ORYLA	Cytochrome P450 1A	解毒・異物代謝
	2	UDPGT	ENSORLGG00000013131	UDP glucuronosyltransferase	異物代謝（糖転移酵素）
	3	AhR1b-1	Q90W03_ORYLA	Aryl Hydrocarbon Receptor 1	芳香族炭化水素受容体
	4	AhR2a	ENSORLGG00000000135	Aryl Hydrocarbon Receptor 2	芳香族炭化水素受容体
	5	AhRR	ENSORLGG00000005309	AhR Repressor	芳香族炭化水素受容体制御
	6	ER-β	Q8UW75_ORYLA	Estrogen receptor beta	細胞増殖，その他（皮膚構成）
2	7	CACHD1	CACHD1	VWFA and cache domain-containing protein 1 Precursor (Cache domain-containing protein 1)	Caイオンの運搬
	8	RAR-α	Q75SV5_ORYLA	Retinoic acid receptor alpha	血管形成・骨分化，形成
	9	ER-α	ESR1	Estrogen receptor	生殖機能の形成，細胞増殖
	10	VEGF-R	Q75WK4_ORYLA	VEGFR	血管内皮細胞増殖制御
3	11	AGXT	AGXT(2 of 2)	Alanin-glyoxylate aminotransferase	肝細胞増殖制御・解毒
	12	MTF1	MTF1	Metal-response transcription factor1	重金属恒常性制御
	13	Tropomyosin	ENSORLT00000009777	Tropomyosin	筋肉収縮制御
	14	HSP90	ENSORLGG00000017525	Heat shock protein hsp90	転写因子機能維持
4	15	TBP	Q8UWB4_ORYLA	TATA-box binding protein	転写制御（基本転写因子）
	16	TNF-R	ENSORLT00000020294	TNF receptor	炎症防御・免疫制御
	17	CDC37	CDC37(1 of 2)	Hsp90 co-chaperone Cdc37	たんぱく質安定化、フォールディング
	18	HSP70	HSP71_ORYLA	Heat shock 70 kDa protein 1 (HSP70-1)	抗細胞死・抗炎症
	19	MT	MT_ORYLA	metallothionein	重金属恒常性制御、神経発育抑制
	20	Ependymin1	EPDR1	Ependymin related protein 1	血管形成・神経可塑性維持



- 発現パターンの特徴**
- 1) CYP1A1の発現誘導量はTEFに比例する。
 - 2) TEFの低い異性体は第2群を誘導する。
(CACHD1, RAR- α , ER- α 等)

図1 ダイオキシン類 (PCDDs; 1 μ g/L) 単独曝露による発現変動
(注: 各図の縦軸は, コントロール液 (DMSO 0.1%水溶液) の発現量を1とした場合の
相対発現量比の平均を示す。n=3)



- 重金属類 (Pb, Hg, Al)**
単独曝露により発現誘導する遺伝子
- 1) Pb (1mg/L) : 第2グループ, 第4グループ
 - 2) Hg (0.5mg/L) : 第3グループ, 第4グループ
 - 3) AL (10mg/L) : 第1グループ, 第2グループ

図2 重金属類単独曝露による発現誘導
(注: 各図の縦軸は, コントロール液 (DMSO 0.1%水溶液) の発現量を1とした場合の
相対発現量比の平均を示す。n=3)

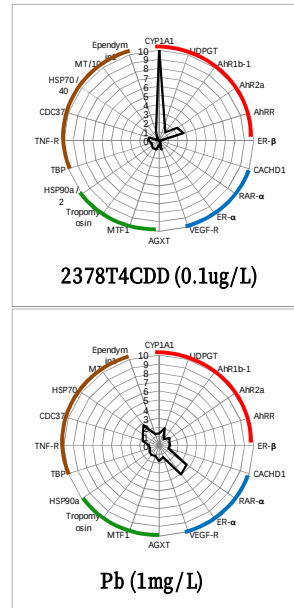
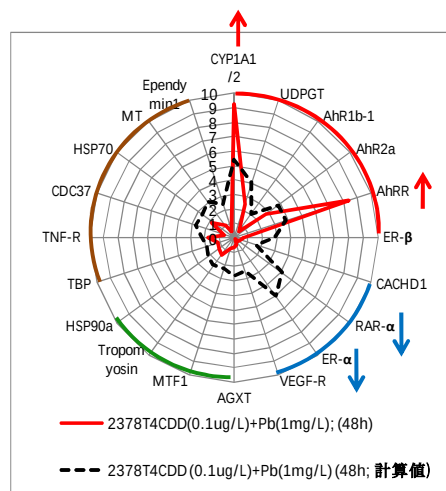


図3 複合曝露による発現誘導-2

(2378T4CDD;0.1 μ g/L(0.1 μ g-TEQ/L)+Pb;1mg/L)

(注:各図の縦軸は, コントロール液 (DMSO 0.1%水溶液) の発現量を1とした場合の
 相対発現量比の平均を示す。n=3)

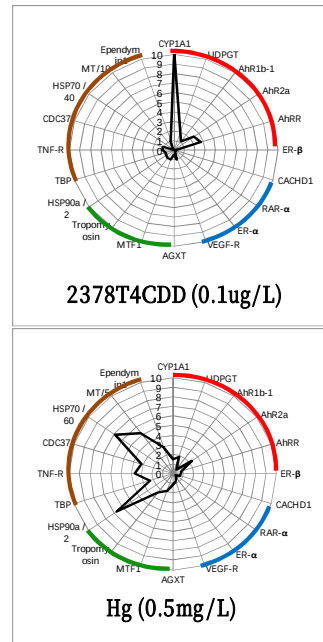
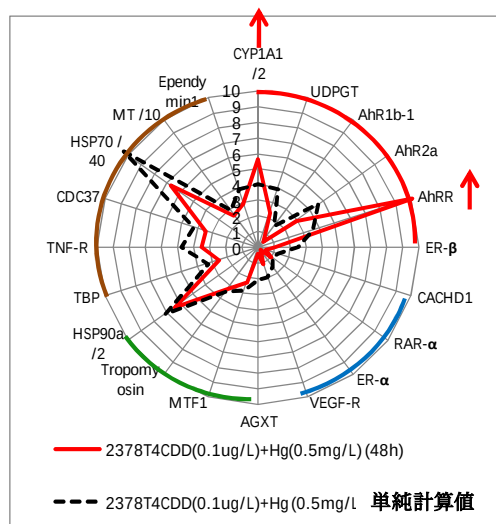
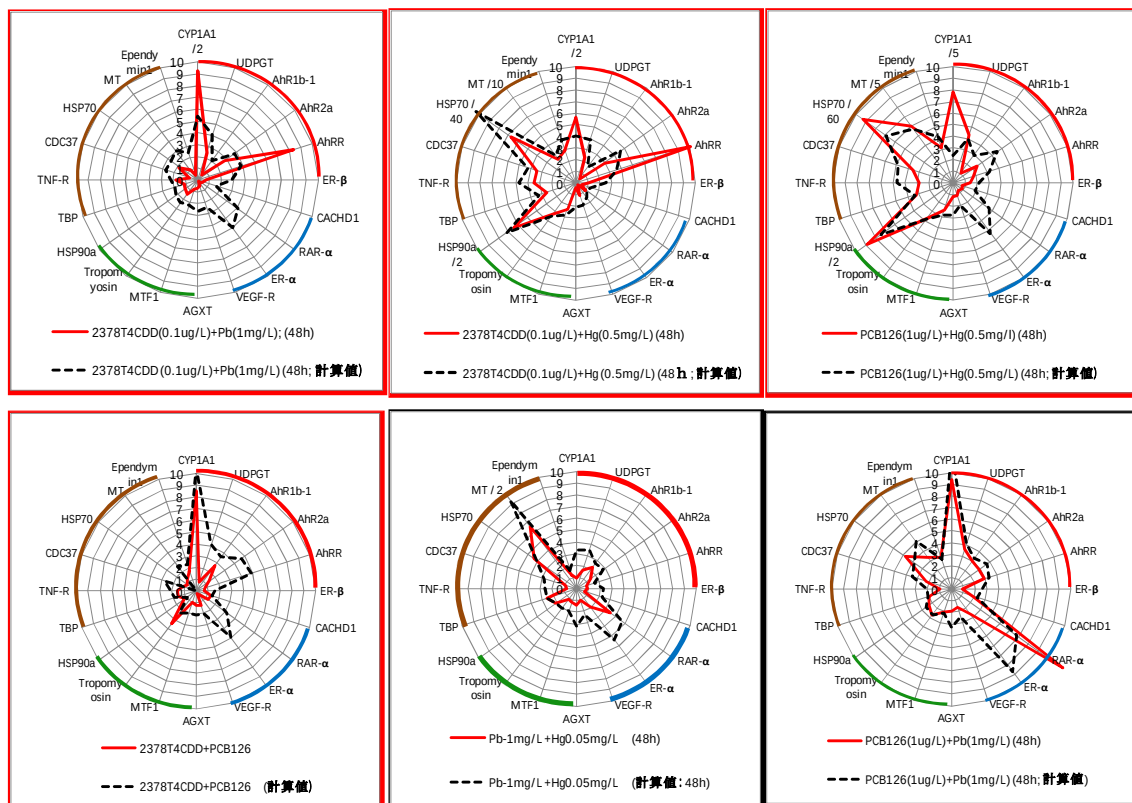


図4 複合曝露による発現誘導-3

(2378T4CDD;0.1 μ g/L(0.1 μ g-TEQ/L)+Hg;0.5mg/L)

(注:各図の縦軸は, コントロール液 (DMSO 0.1%水溶液) の発現量を1とした場合の
 相対発現量比の平均を示す。n=3)



血流障害が起きる

血流障害が起こらない

図5 複合曝露による発現誘導と生物影響（血流障害）

(注:各図の縦軸は, コントロール液 (DMSO 0.1%水溶液) の発現量を1とした場合の
相対発現量比の平均を示す。n=3)

A study of Environmental Toxic Evaluation Method (VI)
using biomarker-gene expressions for exposure to dioxins and heavy metals
in early developmental stage embryos of Medaka (*Oryzias latipes*)
Katsumasa HANNO, Shoji ODA, Hiroshi MITANI, Tadashi YOSHIZAWA

Abstract

Early life stages are generally most sensitive to toxic effects. Our knowledge on the action of manmade chemicals on the developing vertebrate embryo is, however, rather limited. We addressed the ecotoxicogenomic response of genes in the medaka(*Oryzias latipes*) embryos in a systematic manner by asking whether distinct chemicals would induce specific transcriptional profiles. We exposed Medaka embryos in the early developmental stage to Dioxins Isomers for 48 hours, respectively and after exposure, the biomarker-gene expression profiles were analyzed using Quantative real-time PCR .

Keywords:メダカ medaka (*Oryzias latipes*), 胚 embryo, ダイオキシン類 dioxin ,
バイオマーカー-biomarkers