

ゼブラフィッシュを用いた強制経口投与手法の開発

Improvement for an Oral Gavage Dosing Method in Zebrafish



藤原尚美*
Naomi Fujiwara



豊久志朗***
Shiro Toyohisa



井土俊輔**
Shunsuke Ido



古川 賢****
Satoshi Furukawa
博士 (獣医学)

医薬、農薬、食品分野においては、マウスやラットへの被験物質の経口投与が実用化されており、さらには、繁殖が容易かつ省スペースで大量に飼育できるゼブラフィッシュを用いた研究が進められている。ゼブラフィッシュにおける被験物質の投与は飼育水や餌へ混合する方法や、麻酔による強制経口投与が行われている。これらの方法では、魚体への正確な摂取量や麻酔の影響が課題であった。我々は、これらの課題を解決するため、ゼブラフィッシュへの新たな強制経口投与手法を開発し、無麻酔で正確な投与ができ、かつ、反復投与も可能であり、有効であることがわかった。

In the fields of pharmaceuticals, agrochemicals, and foods, oral administration of test substances to mice and rats has been put to practical use. In addition, research has been conducted using zebrafish, which are easy to breed and can be bred in large quantities in a small space. In zebrafish, the test substance is administered by mixing with rearing water or food, or by forced oral gavage dosing using anesthesia. In these methods, the exact amount of intake to the fish and the effect of anesthesia were issues. To address these limitations, we developed a new method of gavage for zebrafish, and found that it is effective for accurate gavage without anesthesia and repeated gavage is also possible.

Keywords:

ゼブラフィッシュ
強制経口投与
無麻酔

Zebrafish (*Danio rerio*)
Oral gavage
Unanesthetized

【セールスポイント】

- ・ゼブラフィッシュは低コストで、広い飼育スペースを必要としないため、複数の試験を実施することが可能であり、国内外で多く活用されている。
- ・開発した強制経口投与手法は、無麻酔で反復投与が可能である。

まえがき

当社では、工場、最終処分場を対象とし、ミジンコ、藻類および魚類を用いた毒性試験を行い、排水や浸出水などの環境影響評価を行っている¹⁾。我々は、魚類を用いた研究^{2) 3) 4)}を進める中で、医薬、農薬、食品分野におけるゼブラフィッシュによる毒

性 / 薬効評価方法の検討を開始した。これらの分野では、ラットやマウスなど（以降、げっ歯類を称す）の評価試験として直接、胃内に被験物質を投与する強制経口投与方法が多用されている。魚類における飼育水添加による曝露では、魚体の被験物質の摂取量が不明であり、げっ歯類と毒性 / 薬効を単純に比較

*技術開発センター 技術開発部 資源循環技術室 **技術開発センター 新技術インキュベーション部
*** (株)イー・アール・シー高城
****日産化学(株) 生物科学研究所 安全性研究部

することができない。魚類における強制経口投与は確立されているものの、既存の方法では麻酔の影響を受け、技術的難易度が高い。そこで、我々はこれらの課題を解決するために、ゼブラフィッシュへの無麻酔で反復投与可能な強制経口投与手法の開発を進めている。

1. 実験動物を用いた投与手法とゼブラフィッシュ

動物実験では一般的にげっ歯類が用いられるが、その飼育/管理には大掛かりな施設が必要であり、これに替わるもしくはこれと併用する実験動物として、魚類が注目されている。その中でもゼブラフィッシュは繁殖が容易で、脊椎動物として哺乳類やヒトとのゲノム相関性が高く有用なモデル生物である。

1.1 ゼブラフィッシュとは

ゼブラフィッシュは、硬骨魚類条鰭綱の真骨魚類(コイ目コイ科ダニオ属)に属し、インド、バングラデシュおよびネパールなどの南アジア諸国を流れる川が原産地である(図1)。体長は4~5cmの小型魚であり、大量飼育が可能である。

ゼブラフィッシュは小型淡水魚のメダカ(*Oryzias latipes*)と同様に、OECD(Organisation for Economic Co-operation and Development: 経済協力開発機構)テストガイドラインや化審法(化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律)の生態毒性試験において従来から用いられていた。ゼブラフィッシュの動物実験としての歴史は、1980年代に分子生物学者ジョージ・ストライジンガー(オレゴン大学)が、実験動物として取り扱うようになったことが始まりと言われている⁵⁾。ゼブラフィッシュを実験動物として用いるメリット^{5) 6)}は、以下のとおりである。

- ①実験室で飼育・産卵が容易で1回に100~300個もの卵を得られるため、多数の条件での試験が可能
- ②飼育に広い空間や大掛かりな施設を必要としないため、げっ歯類と比較して低コスト



図1 ゼブラフィッシュ
当社隅晃彦氏による撮影

- ③体外受精であることから受精卵の回収が可能
 - ④胚が透明なので発達過程を観察でき、研究対象となる特定の発達ステージを選抜することが可能
- ゼブラフィッシュを用いた研究論文が増加しており(図2)、2018年には3000報を大きく超え、10年前の約3倍となっている。また、ゼブラフィッシュの毒性に関する論文についても同様の傾向が見られ、最新の年報では10年前の4倍に増加しており、ゼブラフィッシュを用いた研究が盛んに行われていることがわかる⁷⁾。

1.2 りげっ歯類およびゼブラフィッシュにおける被験物質の投与手法

げっ歯類においては、様々な被験物質の投与手法が実施されており、強制経口投与、腹腔内投与および静脈内投与は、被験物質の投与量をもとに体重当たりの正確な曝露量を把握することができる。ゼブラフィッシュにおいても、げっ歯類と同様に強制経口投与^{8) 9)}、腹腔内投与および静脈内投与が実施されているものの、いずれも麻酔下での投与であり、その影響が危惧される。さらに、腹腔内投与および静脈内投与は、技術的に難易度が高く、反復投与が難しいとされている。一方、簡易な投与手法としては、飼育水に添加する方法(飼育水添加)や餌に混合する方法(混餌投与)が用いられている²⁾(図3)。しかし、Rafaelらの研究では、げっ歯類の強制経口投与による半数致死量(LD₅₀)とゼブラフィッシュの飼育水添加による半数致死濃度(LC₅₀)について比較したところ¹⁰⁾、両者の間には相関がみられなかった(表1)。飼育水添加および混餌投与ではゼブラフィッシュが被験物質をどれだけ取り込んだのが不明であり、曝露量ベースでのゼブラフィッシュとげっ歯類の比較が困難である。よって、ゼブラフィッシュをげっ歯類に代わる実験動物として用いるためには、両者間で相関性が高く、曝露量ベースでの比較が可能な投与手法の開発が望まれる。

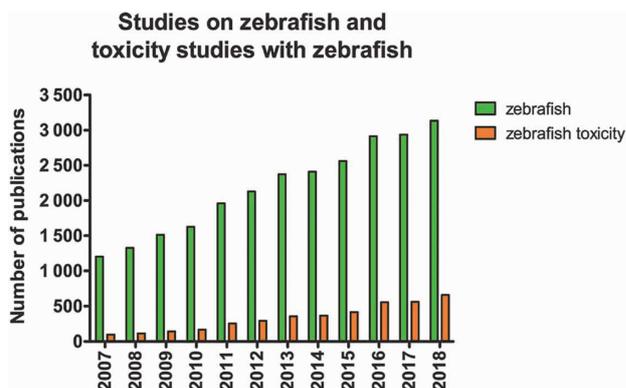


図2 ゼブラフィッシュを用いた研究論文数⁷⁾

飼育水に被験物質を添加する方法 餌に被験物質を混合する方法 麻酔下で強制的に経口投与する方法

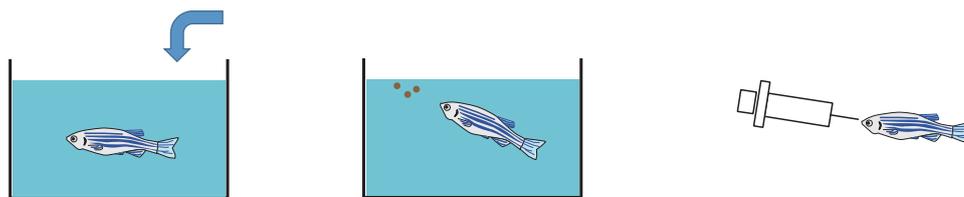


図3 ゼブラフィッシュへの経口投与手法

表1 げっ歯類とゼブラフィッシュの各投与手法による相関¹⁰⁾

げっ歯類/投与手法	ゼブラフィッシュ/飼育水添加	被験物質数
経口投与	0.28*	54
マウス 腹腔内投与	0.442*	47
静脈内投与	0.678*	46
経口投与	0.086*	47
ラット 腹腔内投与	0.582*	30
静脈内投与	0.667*	41

*げっ歯類の各投与手法によるLD₅₀とゼブラフィッシュの飼育水添加によるLC₅₀の相関係数を示す

2. ゼブラフィッシュを用いた強制経口投与手法の改良

従来、ゼブラフィッシュへの強制経口投与では、麻酔下で用事にて魚体の保定を行い、細い中空の管（以降、ゾンデと称す）を用いて被験物質を投与していた（以降、従来法と称す）。しかし、従来法では魚体の姿勢を直線的に保定することが難しいため、投与時にゾンデによって消化管を損傷したり、ゾンデが腸管内にまで到達しないことで口腔や食道に被験物質が滞留し、吐き戻す場合がある。さらに、被験物質の影響に加えて麻酔の影響も考慮する必要がある。そこで、我々は無麻酔下で魚体を直線的に保定するための保定装置を作製し、無麻酔下でゾンデにて投与する方法を考案した（以降、改良法と称す）。

2.1 投与後の魚体内での被験物質吸収状況

改良法による、ゼブラフィッシュにおける被験物質の吸収状況を確認するため、トリパンプルを投与し、1時間、3時間、8時間および24時間経過ごとに、サンプリングした。魚は安楽死させた後、ブアン液にて固定し、肉眼的および組織学的に観察した。トリパンプルは投与1時間後には上部腸管内に認められ、その後、下部腸管へと移動し、24時間後には体外に排泄されることを確認した（図4）。

2.2 投与後の被験物質の吐き戻し確認

投与後、ゼブラフィッシュが被験物質を水槽内にて吐き戻した場合、正しく毒性/薬効を評価するこ

トリパンプル吸収状況

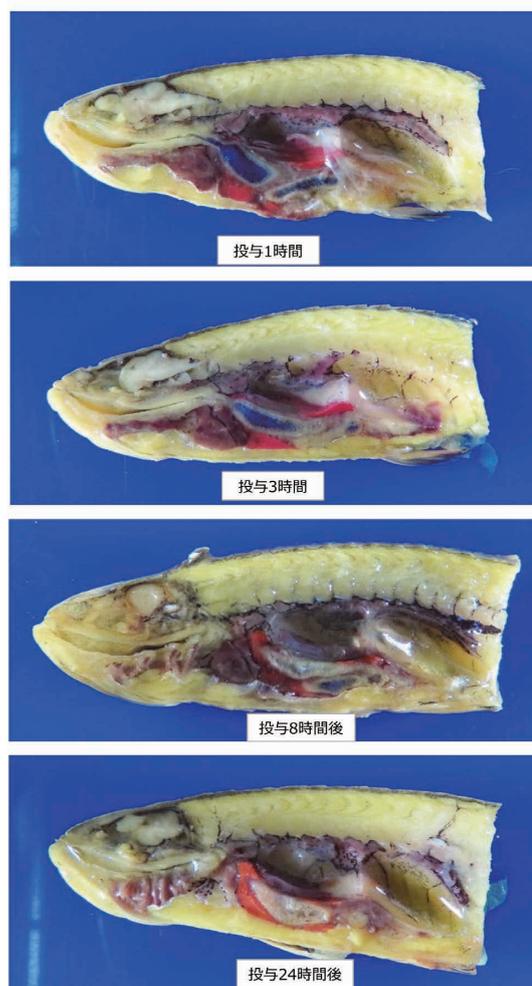


図4 時間経過による被験物質吸収状況の見える化
日産化学(株) 古川賢様による解剖と撮影



図5 メチレンブルーを用いた従来法と改良法の比較

とができない。このため、改良法による被験物質の吐き戻しの有無を確認するため、従来法と改良法についてゼブラフィッシュにメチレンブルーを単回投与し、目視観察を実施した。その結果、従来法では吐き戻しが認められたのに対し、改良法では認められなかった（図5）。これにより改良法では無麻酔下であっても、保定装置により魚体を適切な姿勢に保定することで、被験物質を確実に腸管内に投与できる有用な方法であることが確認された。また、改良法ではゼブラフィッシュを手にて装置に保定したが、そのストレスを無くすため、ゼブラフィッシュに全く触れることなく保定する方法を検討している。この方法ではゼブラフィッシュを水槽から掬い取り、水流を利用し、保定するものであり、これにより一層、ストレスを軽減した強制経口投与を行うことが期待できる。

2.3 改良法による反復投与の実施

反復投与を実施する際、従来法では、繰り返し麻酔を実施しなければならず、供試魚への麻酔の影響が危惧される。もし、改良法で反復投与ができるならば、麻酔の影響を受けることなく、投与を行うことが可能となる。そこで、我々は改良法で反復投与が可能か否かについて検討を行った。ゼブラフィッシュのオス5匹、メス5匹を用いて、改良法にて飼育水を週3回と週5回の頻度で4週間反復投与を行った。その結果、週3回および5回ともに、体重減少や死亡は認められず、改良法による反復投与が可能であることを確認した。

3. 今後の課題

改良法で得られた成果として、肉眼的に被験物質の吐き戻しがないことを確認した。しかし、極微量の吐き戻しについては、肉眼的には確認することができない。そこで、投与後のゼブラフィッシュを戻

した飼育水について被験物質を分析し、詳細に吐き戻しの有無を検討する予定である。さらに、麻酔の影響について、反復投与により従来法と改良法について魚体への影響を比較することで、反復投与における麻酔の影響について検討する予定である。病理学的な経験が豊富な日産化学（株）の協力を得ながら、改良法による摂取量の精度向上、活用方法についての研究を行う。

むすび

我々が考案したゼブラフィッシュの強制経口投与手法は、無麻酔かつ正確な曝露量を把握でき、さらに反復投与が可能であるという優れた特長を有し、適用拡大が期待される。今後は、この手法がげっ歯類の毒性/薬効評価前のスクリーニングの投与方法として活用されることを目指し、基礎データを収集してゆく。

[参考文献]

- 1) 藤原尚美ら：金属製品製造工場のWETを用いた排水中毒性要因の推定とその改善例，環境化学，25，p35-42. (2015)
- 2) Zang L. et al.: A Novel Protocol for the Oral Administration of Test Chemicals to Adult Zebrafish. *Zebrafish.*, 8, p203-210. (2011)
- 3) Yumiko H. et al.: sequential histological changes in the liver of medaka exposed to methylazoxymethanol acetate. *JSTP.*, 33, p219-226. (2020)
- 4) Meguro S. et al.: Body Fat Accumulation in Zebrafish Is Induced by a Diet Rich in Fat and Reduced by Supplementation with Green Tea Extract. *PLOS ONE* 10. 0120142. (2015)
- 5) 弥益恭：ゼブラフィッシュの発生遺伝学，裳華房，p1-7. (2015)
- 6) 蔭池勇太ら：ゼブラフィッシュモデルの環境毒性学研究における有用性，日衛誌，71，p227-235. (2016)
- 7) Steven C. et al.: Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.*, 33, p95-118. (2020)

- 8) Collymore C. et al.: Gavaging adult zebrafish . J. Vis. Exp., 78, 50691. (2013)
- 9) Dang M. et al.: Long-term drug administration in the adult zebrafish using oral gavage for cancer preclinical studies. Dis. Model. Mech., 9, p811-820. (2016)
- 10) Rafael M. et al. : comparison of zebrafish and rodent toxicity data., Society of Toxicology, March 10-14, Baltimore. (2019)