OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Juvenile hormone analog, fenoxycarb induced apoptotic effects in the developing ovary of Daphnia magna
Author(s)	Hsieh, Li-Chi
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/107017
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（HSIEH LI-CHI）	
論文題名	Juvenile hormone analog, fenoxycarb induced apoptotic effects in the developing ovary of *Daphnia magna* (幼若ホルモン類似体フェノキシカルブによるオオミジンコ卵巣発生過程におけるアポトーシス誘導)

論文内容の要旨

Chapter 1: General introduction

Juvenile hormone analogs (JHAs) are widely used insect growth regulators that disrupt endocrine signaling pathways essential for arthropod development and reproduction. Although their adverse effects on non-target crustaceans such as *Daphnia magna* have been well documented, the cellular mechanisms and temporal specificity underlying JHA-induced reproductive toxicity remain poorly understood. This dissertation investigates the reproductive effects of the JHA fenoxycarb in the freshwater cladoceran *Daphnia magna*, with a particular focus on identifying sensitive exposure windows and elucidating ovarian cellular responses.

Chapter 2: Cellular and temporal observation of fenoxycarb-induced reproductive toxicity in *Daphnia magna*

Time-course exposure experiments revealed that reproductive output was most strongly reduced when fenoxycarb exposure occurred between 16 and 32 h after oviposition. To investigate ovarian changes associated with this sensitive period, a CRISPR/Cas9-mediated knock-in line expressing H2B–GFP under the control of the germline-specific *vasa* promoter was established. This reporter system, combined with multiphoton microscopy, enabled high-resolution, three-dimensional imaging of ovarian nuclei in vivo.

Imaging analyses revealed that fenoxycarb exposure during this period weakened ovarian GFP signals and disrupted germline cell morphology, particularly in developing oocytes. Multiphoton imaging further demonstrated apoptosis-like nuclear abnormalities in oocytes, including nuclear collapse and irregular nucleolar structures, accompanied by a reduction in oocyte number relative to nurse cells. In addition, comparison of reproductive and sex-determination windows showed that these juvenile hormone–dependent processes are temporally distinct, with sex determination occurring at a later developmental stage.

Chapter 3: General discussion and conclusion

Collectively, these findings demonstrate that fenoxycarb impairs reproduction in *Daphnia magna* through temporally restricted disruption of oocyte development rather than generalized toxicity. This study provides mechanistic insight into endocrine disruption at the cellular level and establishes an advanced, non-invasive framework for investigating reproductive toxicity in aquatic invertebrates.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　HSIEH LI-CHI　）	
論文審査担当者	（職）　氏　名 主 査　教授　渡邉　肇 副 査　教授　關　光 副 査　教授　本田　孝祐

論文審査の結果の要旨

第１章 緒論では、幼若ホルモンの生物学的な重要性と環境におよぼす問題を包括的に述べている。

幼若ホルモン類似体（Juvenile hormone analogs: JHAs）は、節足動物の発生や生殖に重要な内分泌シグナルを攪乱する昆虫成長制御剤として広く利用されている。一方で、ミジンコ類などの非標的甲殻類に対する生殖毒性も報告されているが、その細胞レベルでの作用機構や感受性時期については十分に解明されていない。本研究では、淡水性枝角類 Daphnia magna をモデル生物として、JHA の一種であるフェノキシカルブが生殖に及ぼす影響を解析した。特に、曝露感受性時期の同定と、卵巣における細胞学的変化の解明を目的とした。

第２章では、フェノキシカルブによる生殖毒性の時系列・細胞学的解析ついて述べている。

時系列曝露実験を行った結果、産卵後 16～32 時間にフェノキシカルブへ曝露した場合に、最も強い繁殖低下が生じることを明らかにした。この感受性時期における卵巣変化を解析するため、CRISPR/Cas9 により生殖系列特異的 vasa プロモーター制御下で H2B-GFP を発現するノックイン系統を作製した。

さらに、多光子顕微鏡を用いた in vivo 三次元イメージング系を構築し、卵巣細胞核の高解像度観察を可能とした。その結果、フェノキシカルブ曝露によって卵巣における GFP シグナルが減弱し、特に発達中の卵母細胞において細胞形態異常が認められた。

また、多光子イメージング解析により、卵母細胞における核崩壊や不規則な核小体形成など、アポトーシス様の核異常が観察された。加えて、ナース細胞に対する卵母細胞数の減少も確認された。

さらに、生殖感受性時期と性決定感受性時期を比較した結果、幼若ホルモン依存的なこれら二つの過程は異なる発生時期に制御されており、性決定はより後期に生じることを示した。

第３章では、総括と今後の展望を述べている。

本研究により、フェノキシカルブは一般的な毒性によってではなく、時間的に限定された卵母細胞発生過程を阻害することで Daphnia magna の繁殖を低下させることを明らかにした。

また、CRISPR/Cas9 ノックイン技術と多光子顕微鏡観察を組み合わせた非侵襲的解析系を確立し、水生無脊椎動物における生殖毒性を細胞レベルで評価する新たな研究基盤を構築した。

本研究成果は、幼若ホルモン型内分泌かく乱物質の作用機構理解に重要な知見を与えるとともに、水生生物に対する化学物質リスク評価への応用が期待される。

以上のように、乳児用ミルク開発に向けて母乳成分の定量法の確立が必要であるが、本研究では質量分析を用いた定量法の開発に成功していることを示している。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。