環境研究総合推進費　終了課題成果報告会
革新型研究開発領域課題（若手枠）（5RFb-1203）

平成27年3月6日（金）

# 河口域における残留性有機汚染物質の循環とそれが沿岸生態系に与える影響の定量的評価

研究代表者　小林　淳（熊本県立大学環境共生学部）
研究分担者　小森田智大（熊本県立大学環境共生学部）
石橋　弘志（尚絅大学短期大学部）

研究実施期間：　平成24年度～平成26年度
累積予算額：　25,135千円

# 本研究の背景と目的

河口域は生物多様性に富み、生物生産が豊富であるが、残留性有機汚染物質（POPs）など様々な物質が流入し、人間活動の影響を受けやすい

- 食物連鎖を通した蓄積性の評価は少なく、効率的な暴露評価手法が必要
- 公的な毒性試験ではモデル生物を用いるが、現場生物に対する毒性影響を明らかにすることで、より実態に近いリスクを評価できる。
- POPs暴露による生物の表現型への影響に加え、遺伝子レベルで毒性評価が必要

**本研究の目的**

**POPsが河口域における水生生物に与える影響を定量的に評価する**

**①暴露評価**
・食物網蓄積モデルを用いた底生生物を含む多様な生物に対する暴露評価方法の構築

**②有害性評価**
・DNAマイクロアレイによるPOPsの影響評価
・汚染された海域で優占する底生動物による暴露試験系の確立
→　遺伝子レベルでの有害性評価の実施、潜在的リスクの解明

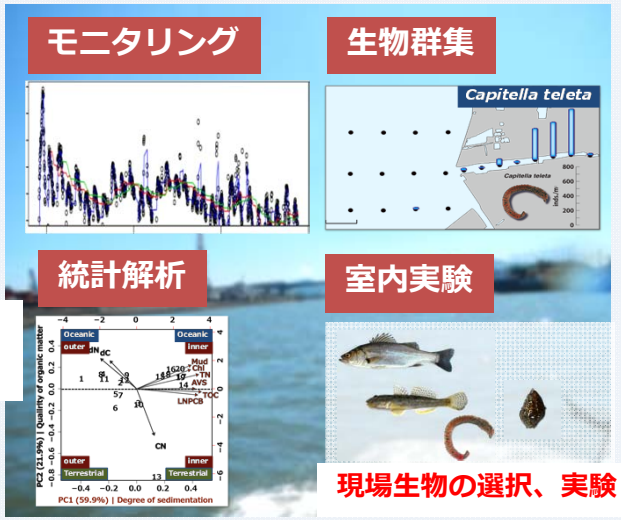
**③河口域のPOPsの影響評価手法の提案**

# 全体の研究計画

## サブテーマ（1）
## POPsの生物蓄積機構の解明と食物連鎖モデルの構築

1年目
（H24年度）

対象地域のPOPsの循環、生息環境、
生物群集構造の解明

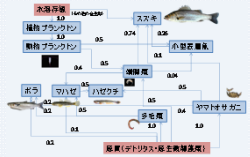



2年目
（H25年度）

食物連鎖蓄積モデルによる各生物の
暴露評価、フラックスの定量化

3年目
（今年度）

$$dM_B/dt = \{W_B \cdot (K_1 \cdot [m_o \cdot \phi \cdot C_{WT,O} + m_P \cdot C_{WD,S}] + k_D \cdot \sum P_i \cdot C_{Di})\} - (k_2 + k_E + k_M) \cdot M_B$$



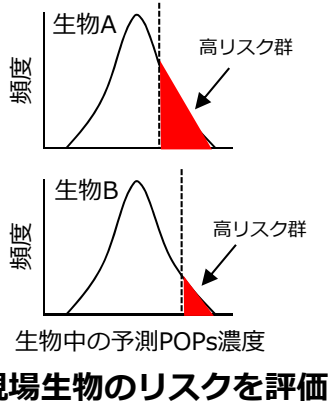
## サブテーマ（2）
## 沿岸海洋生物におけるPOPsの毒性影響の解明とリスク評価

**モデル生物**における発現変動遺伝子の解明

- 試験系が確立されている水生生物を対象
- **生物種で共通して変動**すると予想される遺伝子群を絞る
- POPsの潜在的毒性影響の解明

**現場生物**における発現変動遺伝子の解明

- 現場生物（**イトゴカイ**）にDNAマイクロアレイを適用
- 発現変動する遺伝子群、予測される毒性影響を解明




**現場生物のリスクを評価**

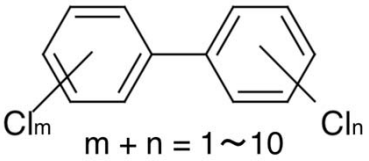
**DNAマイクロアレイによる毒性影響の明確化**

**河口域のPOPsの影響評価手法の高度化に貢献**

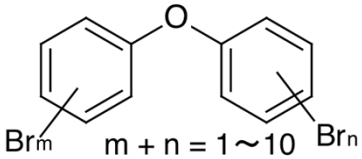
# 研究体制

| サブテーマ名 | 氏名<br>（主な専門分野） | 担当 |
|---|---|---|
| ＜サブテーマ1＞<br><br>POPsの生物蓄積機構の解明と食物連鎖モデルの構築 | 小林　淳<br>熊本県立大<br>(環境化学) | ・野外調査および試料中のPOPs測定<br>・食物連鎖蓄積モデルの構築、リスク評価 |
| | 小森田　智大<br>熊本県立大<br>(海洋生態学) | ・野外調査および栄養塩動態の解析<br>・生物個体群の動態解析<br>・室内暴露実験の実施 |
| ＜サブテーマ2＞<br>沿岸海洋生物におけるPOPsの毒性影響の解明とリスク評価 | 石橋　弘志<br>尚絅大学短期大学部<br>(環境毒性学) | ・室内暴露実験の実施<br>・DNAマイクロアレイ解析による毒性影響評価 |

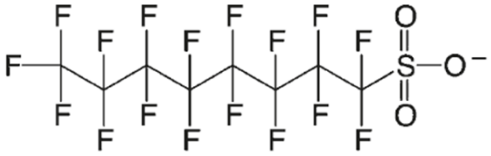
# 対象物質




ポリ塩化ビフェニル
（PCB）




ポリ臭素化ジフェニルエーテル
（PBDE）




パーフルオロオクタンスルホン酸
（PFOS）

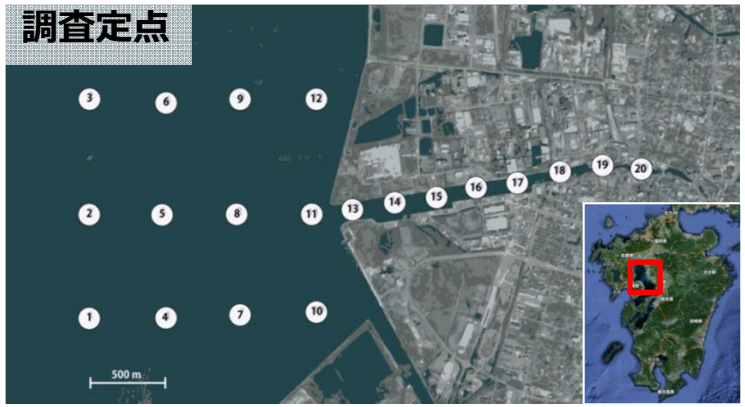
- PCB、PBDEは疎水性物質であり、脂質に蓄積しやすい。209種の異性体が存在する
- PFOSは界面活性剤であり、水にも油にも溶解するため挙動の予測が難しい
- DNAマイクロアレイを用いた遺伝子レベルの毒性データがほとんどない

# 野外調査の概要

【調査地域】大牟田川（福岡県）

【調査】
2012年5月～2013年3月　栄養塩調査（5～20地点）
2012年8月、12月　POPs調査（5地点）

【POPs分析】
・PCB、PBDE　高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計
・PFOS　液体クロマトグラフタンデム型質量分析計



# ■ POPs暴露実験の概要

## メダカ

- 標準的なモデル生物
- 化審法、OECD等で毒性試験方法が確立
- 毒性学的知見が多く集積されている
- 遺伝子情報が解読されている

## イトゴカイ

（現場で優占的に棲息）

- 世界各地の有機汚染の進行した沿岸域に棲息する
- 毒性試験方法が確立しておらず、毒性学的知見が乏しい
- 遺伝子情報が解読されている

### 清浄なガラスビーズを基質としたイトゴカイ暴露試験方法の確立

（北九州市立大学 上田教授と共同開発）

**【実験条件】**

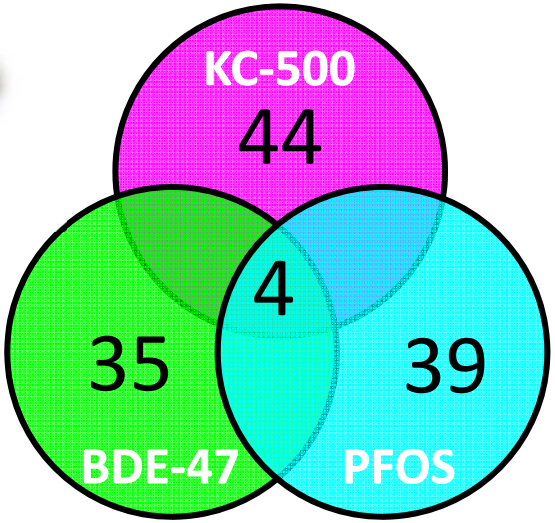
水温：20℃（インキュベーター内）
飼育密度：10個体/容器（*n*=3）
暴露時間：72時間（3日間）
暴露濃度：下表
給餌：なし
雌雄：オス
基質：ガラスビーズ

# DNAマイクロアレイによるPOPs応答遺伝子の解析

- これまでPOPsの毒性影響に関して、遺伝子レベルで評価した例はほとんどない。そこで、POPsの潜在的毒性影響を遺伝子レベルで明らかにするため、DNAマイクロアレイにより遺伝子発現解析を試みた。
- 本研究では、モデル生物あるいは現場生物として、魚類（メダカ）と多毛類（イトゴカイ）を供試した。

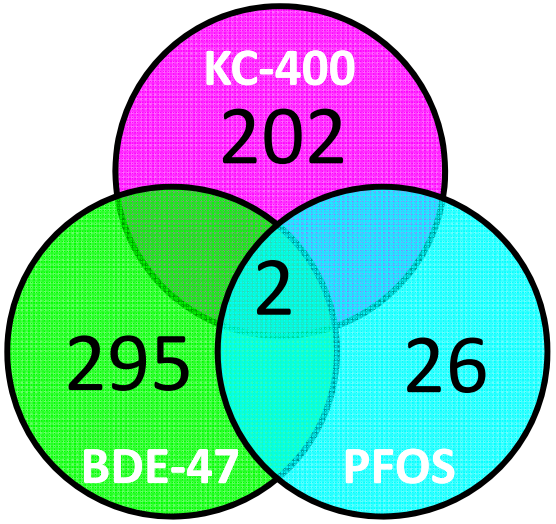
メダカ

**暴露濃度**:
KC-400: 1 mg/L
BDE-47: 1 mg/L
PFOS: 1 mg/L
**暴露時間**:96時間



イトゴカイ

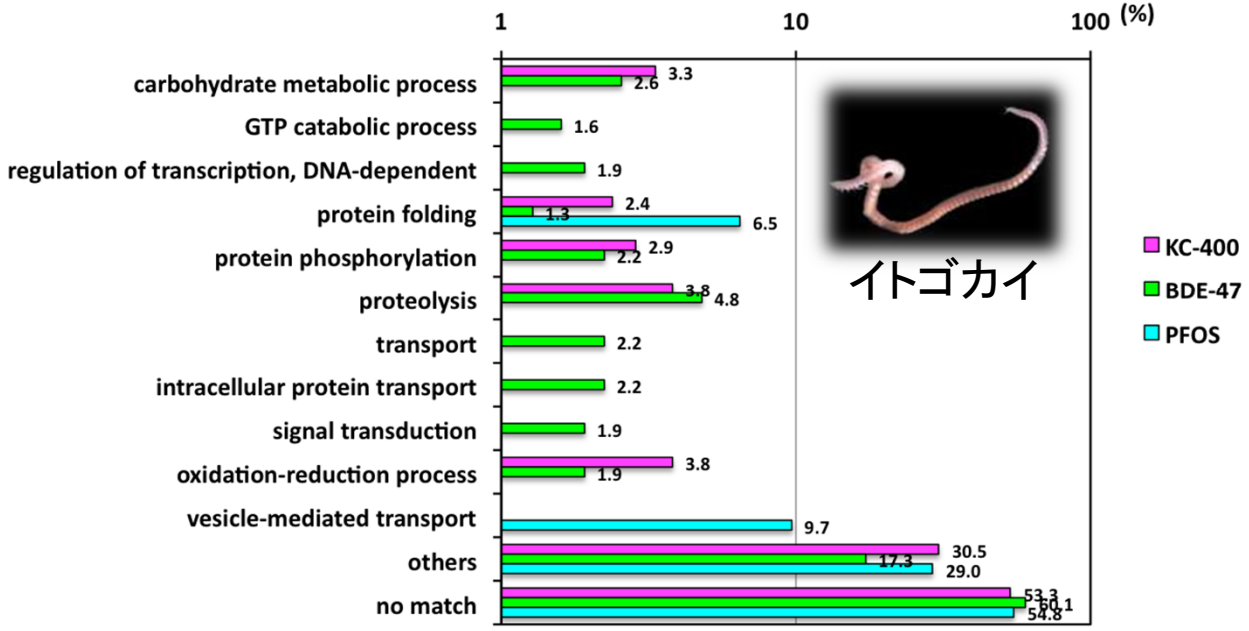
**暴露濃度**:
KC-400: 1 mg/L
BDE-47: 0.45 mg/L
PFOS: 10 mg/L
**暴露時間**:72時間




- メダカおよびイトゴカイにおける**POPs応答遺伝子群のスクリーニングに成功**した。
- 両生物種で遺伝子発現の増加した遺伝子数について比較したところ、KC-400およびBDE-47暴露したイトゴカイではメダカに比べ、より多数の遺伝子の発現に影響することが示唆された。
- また、メダカでは4遺伝子、イトゴカイでは2遺伝子がPOPs暴露によって共通して発現増加しており、これらは**POPs複合汚染のバイオマーカー候補遺伝子であることが示唆**された。
- 今後これらの知見はPOPsのリスク評価に極めて重要な情報を提供するだろう。

# 遺伝子オントロジー解析によるPOPsの毒性影響の予測

- そこで公共データベースを用いて、今回発現増加した遺伝子群のgene ontology (GO) アノテーション情報を作成し、**GOを用いて遺伝子群の機能予測**を試みた。なお、GO Termは大きく3つのサブカテゴリ (Biological Process, Cellular Component, Molecular Function) で表現される。
- 以下、代表例として、イトゴカイにおける**Biological Process（生物学的プロセス）**に関与するGO解析の結果を示した。



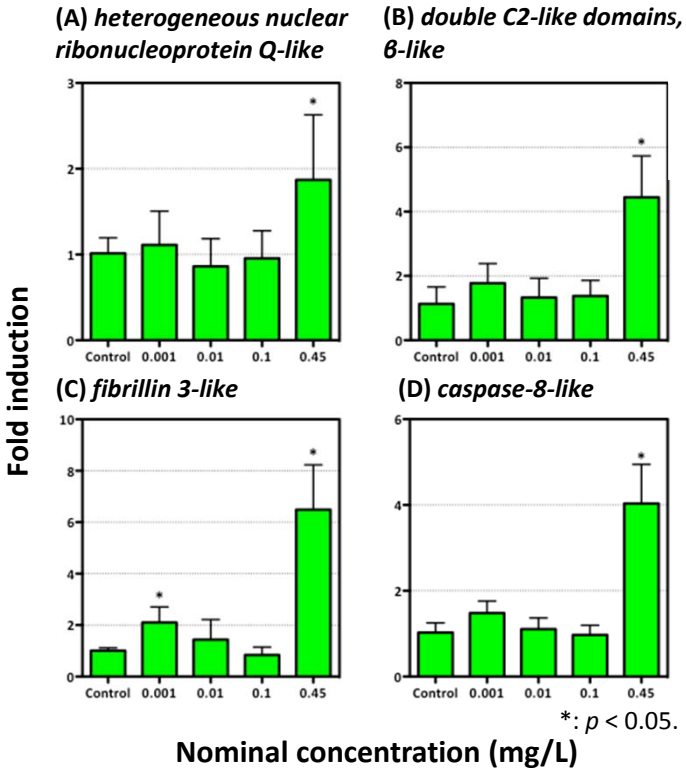

- 3物質ともに、タンパク質フォールディング（protein folding）に影響した。また、KC-400とBDE-47は、タンパク質のリン酸化（protein phosphorylation）や分解（proteolysis）などの遺伝子機能にも影響した。
- さらに、KC-400とBDE-47は、タンパク質機能以外の遺伝子機能にも影響し、**KC-400とBDE-47による潜在的毒性影響は多岐に渡る**と考えられた。

- 一方、メダカでは、KC-500・BDE-47はtransport, signal transductionおよびcell development/differentiationに特に影響し(PFOSの影響小)、KC-500はproteolysis、BDE-47はendocrine/reproduction、PFOSはmetabolic processに影響大

**POPsの毒性は共通する影響に加え、特異的な影響もある**

# 遺伝子解析によるPOPsの毒性影響の予測

- そこでPOPs特異的な毒性影響の一端を明らかにするため、遺伝子の発現増加が顕著だった遺伝子群の機能から毒性影響の予測を試みた。
- 以下、代表例として、イトゴカイにおけるリアルタイムPCRの測定結果を示した。



## イトゴカイ

- mRNAのプロセッシング(A)、カルシウムセンサー(B)、筋繊維形成に関与する遺伝子(C)の発現は、0.45 mg/LのBDE-47暴露によって有意に増加
- またアポトーシス誘導に関与する遺伝子の発現も有意に増加(D)
- DNAマイクロアレイでは、ガン化に関与する遺伝子群の発現も増加しており、GO解析の結果と併せて考えると、BDE-47の発ガン作用が考えられた。

## メダカ

- 一方、メダカでは、KC-500、BDE-47およびPFOSの肝臓における発ガン作用や、BDE-47およびPFOSの肝臓における弱いエストロゲン様作用が示唆された。

以上成果はPOPs条約等に関連した国際社会のニーズや生態系保全を考慮したPOPsの安全性評価・利用指針の構築、生態影響試験の標準化・高度化に寄与

# 採取された生物と栄養段階を経たPOPsの蓄積特性

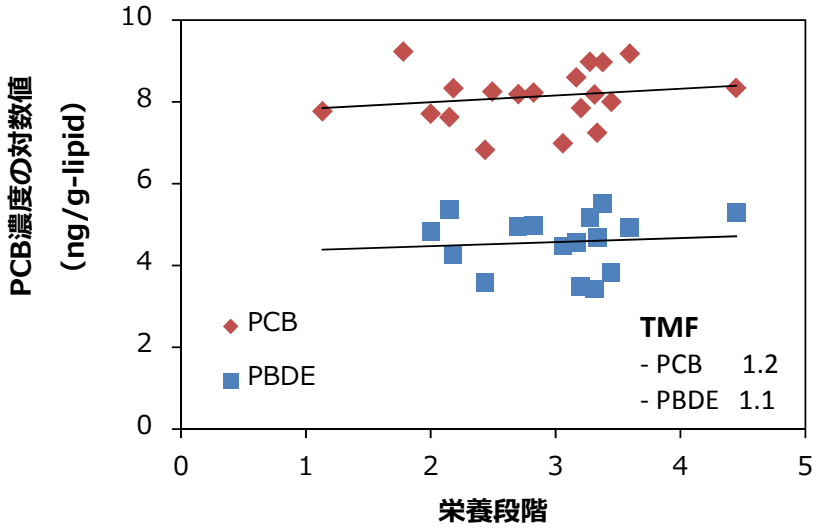
サブテーマ1

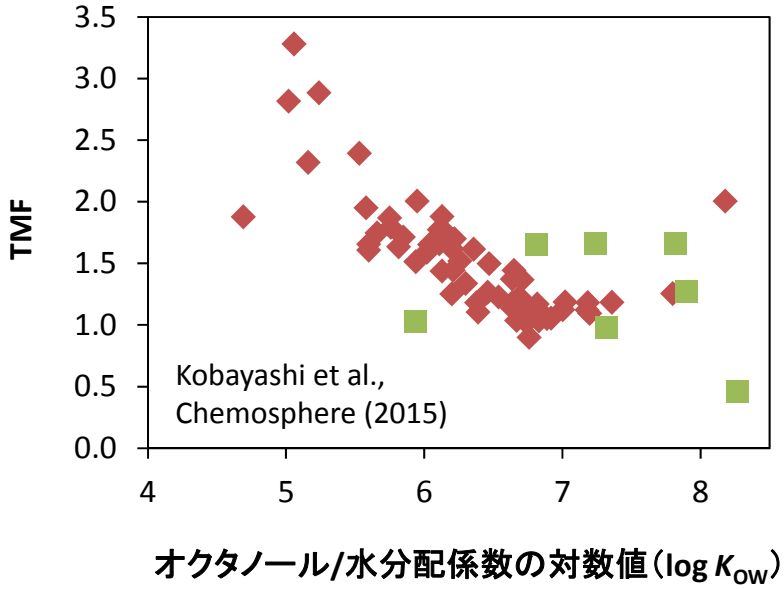
底生動物の優占種の密度（inds./m$^2$）

| 種名 | 分類群 | 合計 | 累積 |
|---|---|---|---|
| *Nippopisera nagati* | 端脚類 | 2864 | 0.27 |
| *Theora lubrica* | 二枚貝類 | 1771 | 0.43 |
| *Notomustus* sp. | 多毛類 | 1285 | 0.55 |
| *Capitella telteta* | 多毛類 | 1045 | 0.65 |
| *Heteromustus* sp. | 多毛類 | 944 | 0.74 |
| *Venemolpha micra* | 二枚貝類 | 491 | 0.79 |
| Others | | 2288 | |

魚類調査における採取個体数

| | 個体数 |
|---|---|
| ハゼクチ | 3 |
| ウロハゼ | 2 |
| マハゼ | 13 |
| ヒイラギ | 5 |
| スズキ | 9 |
| ボラ | 6 |




- Log $K_{OW}$の低い化合物でTMFが高く、既存の報告とは逆の傾向を示した。
- 河口域は動的→定常に至るのに長時間を要するlog $K_{OW}$の高い物質で蓄積度が低下

# 食物網蓄積モデルの構築と検証

サブテーマ1

モデルの基本式はArnot and Gobas（2004）を参考

$$dC_B / dt = \left(k_1 \cdot C_{W-diss} + k_D \cdot \sum P_i \cdot C_{Di}\right) - \left(k_2 + k_E + k_M + k_G\right) \cdot C_B$$

・**水、底質濃度の実測値**を代入し、**生物中濃度を予測**（定常状態を仮定）

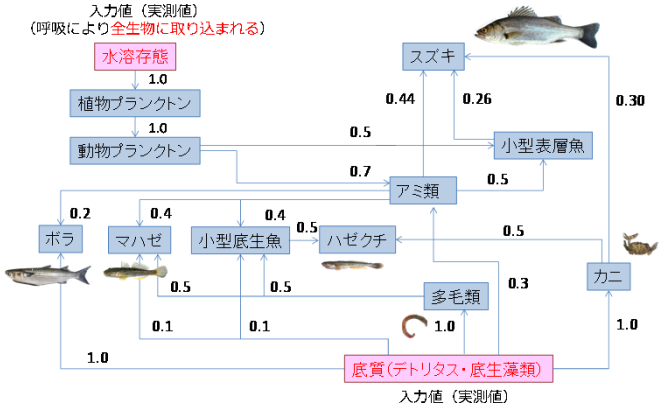
・**取込み・排泄速度定数**

PCB・PBDE：　オクタノール/水分配係数（$K_{OW}$）のQSAR式

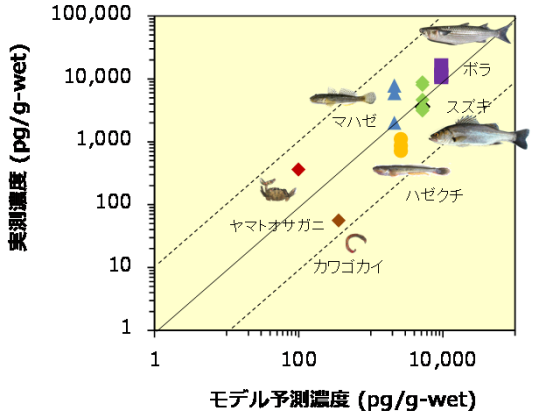
（Arnot and Gobas (2004), Kobayashi et al (2013)を参考）

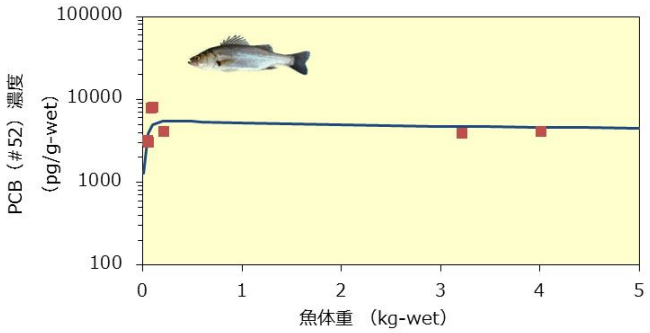
PFOS：　海産魚の実測値（Sakurai, Kobayashi et al (2013)を参考）

・食物網は文献（環境省，2010など）、胃内容物調査を参考に構築

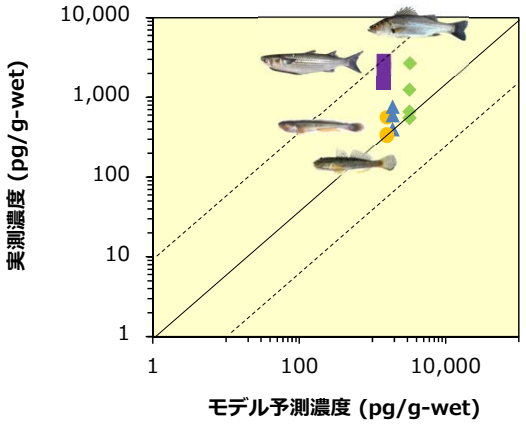



(a) PCB（#52）

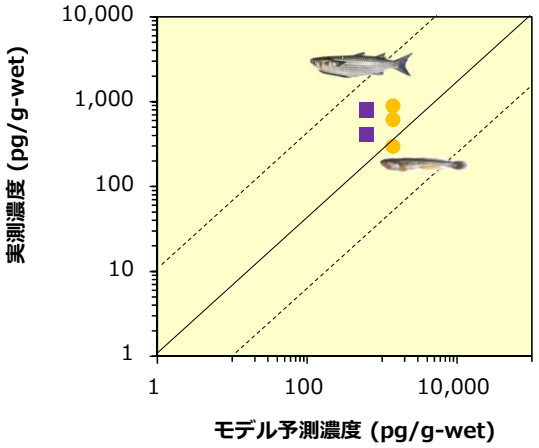



- **種々の生物の濃度を高い精度で予測することが可能**
- **成長に応じた濃度変化にも対応**




(b)PBDE（#47）




(c) PFOS

スズキは100倍以上の過大推定

→ 速度定数の取得および算出式の誘導が必要

- **PBDEについても予測可能**
  **（ボラ、スズキで過小推定 → 代謝（脱臭素化）の影響？）**
- **両親媒性物質のPFOSについてはさらなる検討が必要**

**水・底質中の化学物質濃度が把握できれば、**

**疎水性の化学物質の食物連鎖を通した暴露評価・リスク評価に適用できる可能性**

**今後の課題**

・代謝速度定数の取得

・PFOSを含む有機フッ素化合物の速度定数の取得、予測式の定式化

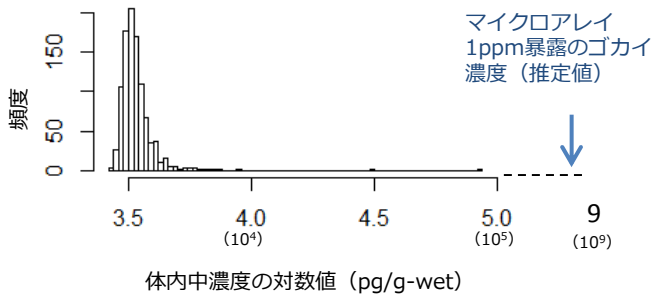
# 各生物の暴露分布とリスク評価

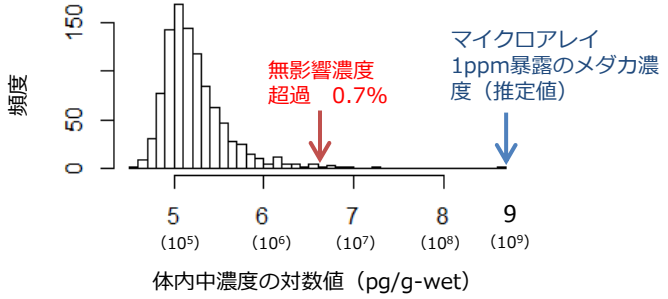
サブテーマ1

- 水・底質濃度についてモンテカルロシミュレーション（1000回）を行い、食物網蓄積モデルに代入して各生物の濃度を推定
- 既存の毒性値（NOEC）を米国環境保護局のECOTOXより取得し、リスクを評価

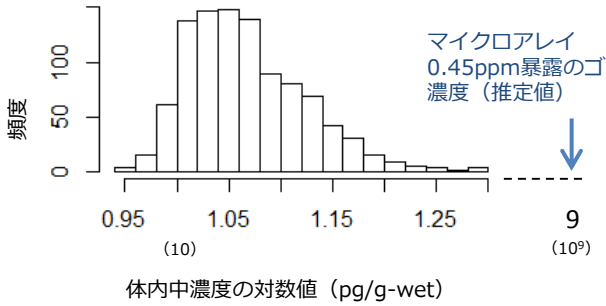
**イトゴカイ**　　**スズキ**

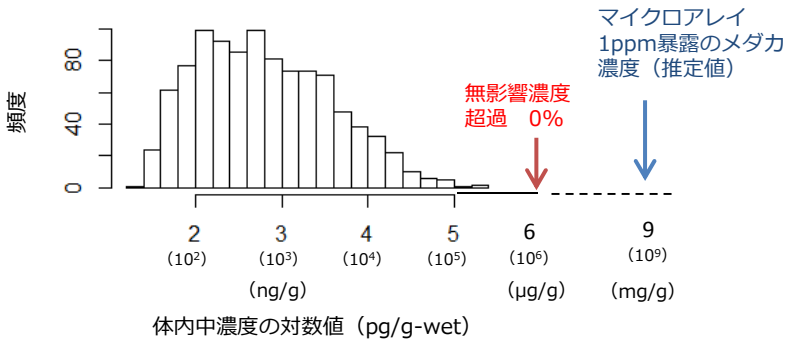
Total-PCB




PBDE(#47)




スズキ　total-PCBではNOECを超える個体が全体の0.7%程度
PBDEではNOECを超える個体は存在しないと推定

米国環境保護庁の生態毒性データベースECOTOXより無影響濃度（NOEC）を取得
PCB（Aroclor 1248）：5 mg/kg (μg/g) bw (whole body, Brown bullhead)
BDE47：1 mg/kg (μg/g) bw (liver, Rainbow trout)

# 本研究により得られた主な成果（科学的意義・環境政策への貢献）

◆ **汚染海域の代表生物であるイトゴカイの暴露実験系を確立**

沿岸底質汚染の毒性試験法としての国際標準化などが期待される。

◆ **新規POPs（PBDE、PFOS）について魚類（メダカ）、イトゴカイのDNAマイクロアレイを適用し、特異的に発現変動する遺伝子を解明**

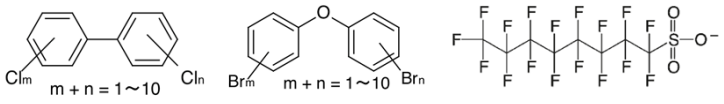
◆ **食物網蓄積モデルによるPOPsの暴露評価手法を構築**

多様な化学物質について食物連鎖を通した暴露やリスクを評価できる。

水・底質濃度のデータベースを活用して各水域での暴露評価、生態リスク評価などにも応用できる。

# 研究成果のまとめ

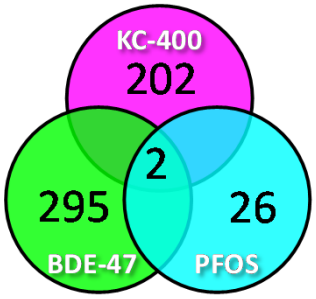
**対象物質**

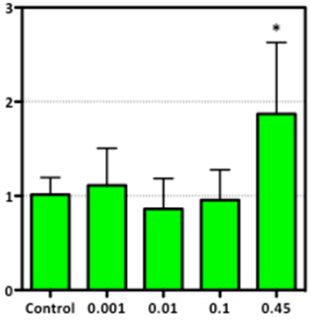



PCB　PBDE　PFOS

メダカ

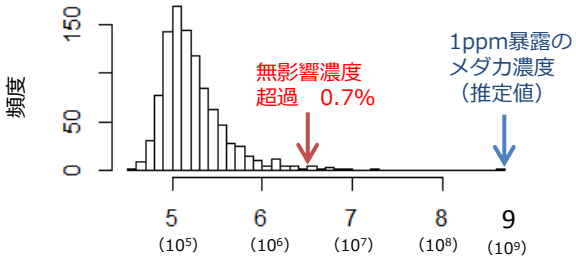
イトゴカイ



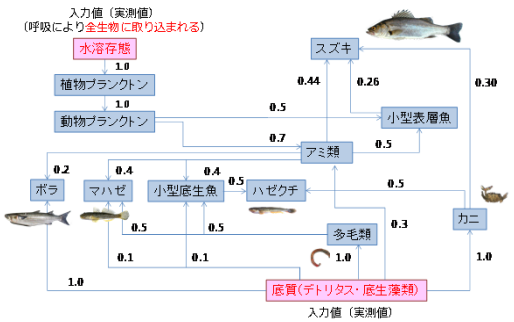



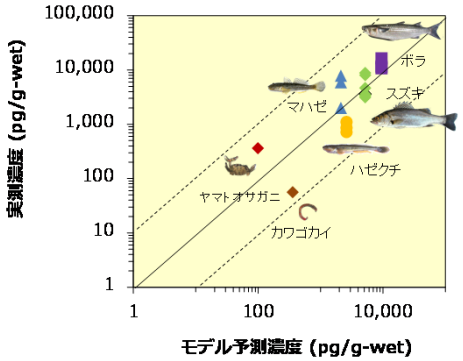

**モデル生物、現場生物を用いてPOPsの毒性を遺伝子レベルで評価**（サブテーマ2）

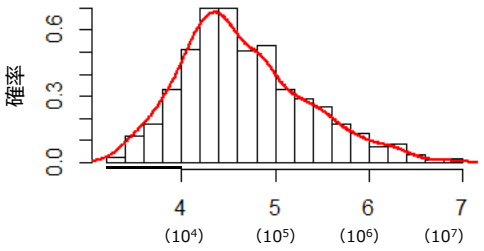
**スズキ**




**生態リスク評価手法の高度化に寄与**




**食物連鎖を通したPOPsの暴露評価手法の構築**（サブテーマ1）