

課題名 5RFb-1203 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

課題代表者名 小林 淳（熊本県立大学環境共生学部環境資源学科環境分析化学研究室）

研究実施期間 平成24～26年度

累計予算額 25,135千円（うち26年度6,638千円）

予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 残留性有機汚染物質、生態リスク、食物網蓄積モデル、曝露評価、フラックス、遺伝子発現、毒性影響、DNAマイクロアレイ

研究体制

- (1) 残留性有機汚染物質の生物蓄積機構の解明と食物連鎖モデルの構築（熊本県立大学）
- (2) 沿岸海洋生物における残留性有機汚染物質の毒性影響の解明とリスク評価に関する研究（尚綱大学短期大学部）

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

現在世界の化学物質の登録数は9000万種（2015年4月現在）を超え、わが国では数万種が流通している。国際的に2020年までにすべての化学物質による人の健康や環境への影響を最小化することが合意された（SAICM）ことから、多種多様な化学物質のリスク管理がますます重要となってきた。ポリ塩素化ジフェニル（PCBs）などの残留性有機汚染物質（POPs）は、難分解性・高蓄積性を示すことから生態系への影響が危惧されている。近年ではポリ臭素化ジフェニルエーテル（PBDEs）などの臭素系難燃剤やペルフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）などの有機フッ素化合物がストックホルム条約により新規POPsとして指定され、高い学術的・社会的関心を集めている。しかしながら、これら新規POPsの汚染実態、毒性影響、生態リスクに関する知見は極めて乏しい。

河口域は生物多様性に富み、生物生産が豊かな領域であるが、河川を通して栄養塩とともにPOPsなどの化学物質も流入する。そのため、河口域に棲息する生物に対する化学物質の適切なリスク評価・管理は急務の課題となっている。特に水生生物は、河口域に流入した化学物質の影響を直接的に受けると考えられ、生物多様性の保全のためには化学物質の曝露評価、毒性影響評価およびその毒性発現機序に関する研究を推進し、生態リスク評価を行うことが極めて重要である。

水環境に排出された化学物質は、水・底質や餌生物を介した食物連鎖によって生物に取り込まれるため、これらの媒体を通じた曝露評価ならびにフラックスの定量化が環境リスクや物質循環を考えるうえで重要である。そのため、多くの化学物質ならびに多様な生物の濃度予測に対応可能な食物網蓄積モデルの構築、適用が不可欠である。また、現場生物を用いた生態リスク評価は有用と考えられるが、実際は現場生物の飼育・実験方法などの確立の困難さから、多くの研究ではモデル生物が使用されている。一般に化学物質の生態影響試験は、水系食物連鎖における生産者として単細胞緑藻類、一次消費者として甲殻類、高次消費者として魚類などが用いられている。これらの試験系では主に生長阻害や遊泳阻害、短期曝露による毒性影響などを評価しているが、これらエンドポイント以外の生物影響については評価が難しいと考えられる。一方、近年の遺伝子解析技術の進展により、DNAマイクロアレイや次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析が様々な生物に対して適用できるようになっており、新規バイオマーカー分子の探索やその機能解析などが進んでいる。しかしながら、新規POPsであるPBDEやPFOSを対象として、網羅的遺伝子発現解析を実施した研究はほとんどなく、新規POPsの毒性影響については不明な点が多い。

2. 研究開発目的

河口域における残留性有機汚染物質（POPs）の循環と生態リスクを明らかにすることを目的とし、サブテーマ（1）では現地調査によって水・底質・生物中のPOPs、栄養塩類濃度や生物群集組成の時空間的変動等を明らかにするとともに、食物網蓄積モデルを構築して現場生物のPOPsの曝露評価、生態リスク評価を行う。サブテーマ（2）では、POPsを曝露した魚類などのモデル生物を用いて、DNAマイクロアレイによる網羅的発現解析を行い、POPs応答遺伝子の探索や機能予測からPOPsの潜在的毒性影響を明らかにする。また、サブテーマ（1）で得られた現場生物の多毛類に着目し、POPsを曝露した多毛類を用いて、DNAマイクロアレイによる網羅的発現解析

を行い、POPs応答遺伝子の探索や機能予測、さらには定量的リアルタイムPCR法の確立・測定も試み、POPsの潜在的毒性影響を明らかにする。

本研究の概略を図1に示す。

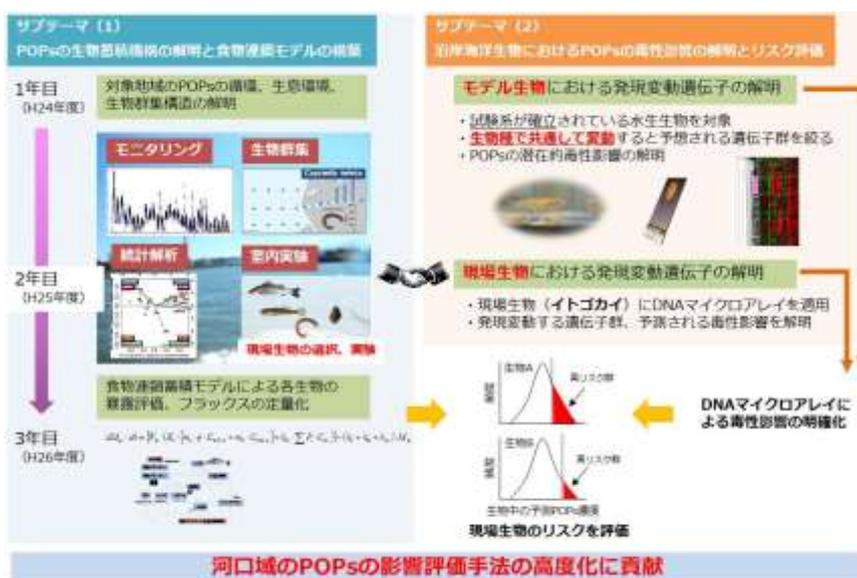


図1 本研究の概略

3. 研究開発の方法

(1) 残留性有機汚染物質の生物蓄積機構の解明と食物連鎖モデルの構築

1) 調査対象地域と対象物質

本研究では有明海に流入する大牟田川を対象とした。大牟田川の感潮域に全23点を設定し、海水の影響を受けない淡水域に3調査定点を設定した。潮汐の振幅の影響を強く受けることから、大牟田川では河口から約4 kmまで塩水遡上が確認されている。分析対象物質は、PCB、PBDE、PFOSとした。

2) 河口域における物質循環、生物群集に関する研究

2012年5月から2012年12月にかけての定期観測（1ヶ月から2ヶ月間隔）は上流部から沖合にかけて約6 kmのトランセクトラインを設定し、各調査地点において満潮時から下げ潮時に観測を実施した。水質の調査項目としては、水温、塩分、溶存酸素濃度(DO)、栄養塩類(NH₄-N、NO₃+NO₂-N、PO₄-P)およびChlorophyll a（以下Chl-a）とした。水温、塩分、DOおよびChl-aはCTD(YSI, model 6600)により測定した。海水試料については表層水をボトルで直接採取し、海底から上方約50 cm層の底層水は横型のバンドーン型採水器により採取した。堆積物の調査は、水質調査と同時にを行った。各調査地点において、エクマンバージ採泥器を用いて堆積物表層を乱さないように丁寧に採取し、円形コアサンプラー(直径2.9 cm)を用いてその堆積物表層(0-1 cm)を押し出して切り、ランダムに10回採取し、混ぜ合わせたものを1サンプルとし、堆積物表層の環境要因(粒度組成、全有機炭素含量(TOC)、全窒素含量(TN)、酸揮発性硫化物態硫黄(AVS-S)、有機態炭素の安定同位体比(d-¹³C)および窒素安定同位体比(d-¹⁵N)、Chl-a含量定量用のサンプルとした。さらに、予備調査により定めた代表点(Stn 2, 13, 18)においては、底生動物の定量用サンプルとして、エクマンバージ採泥器により採取した堆積物試料を目合い1 mmのふるいを用いてふるい、ビニール袋に入れて持ち帰った。

設置型の多項目水質計による連続観測は、大牟田川の河口から約2 km上流の調査地点において、2012年10月26日から10分間隔で行った。多項目水質計による観測は、水温、塩分、DO、Chl-aおよび水深について行った。データの回収および付着物の除去については、およそ2週間間隔で行い、必要に応じて各センサー値の補正をした。これらのデータおよびPOPs濃度の測定値を用いてフラックスを算出した。

3) POPsの食物連鎖蓄積モデルの構築と生態リスク評価に関する研究

a) 現場調査

2012年8月、12月に当該水域の5地点においてPCB・PBDE測定用の水試料(表層水・底層水)および底質試料を採取した。また、2012年10月、2013年8月にPFOS測定用の水試料(表層水・底層水)および底質試料を採取した。2012年10月に魚類調査を行い、対象地域の水生生物を採取した。

PCB・PBDE測定用の水試料は5Lを加圧ろ過によりガラス繊維ろ紙およびC18固相ディスクを通過させ、それぞれ懸濁態試料および溶存態試料とした。水・底質・生物いずれの試料も高速溶媒抽出によってPCB・PBDE・

PFOSの抽出を行った。PCB・PBDE測定用の抽出液は、多層シリカゲルカラムによりクリーンアップを行い、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計により定性・定量を行った。PFOS抽出液は固相カートリッジによりクリーンアップを行い、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計により定性・定量を行った。

b) 現場生物の栄養段階とPOPs濃度の関係

生物の窒素安定同位体比から各生物の栄養段階を推定した。その後、生物中のPCB・PBDE・PFOS濃度と栄養段階との関係から食物連鎖を通じた生物濃縮係数(TMF)を求めた。

c) 食物網蓄積モデルの構築とリスク評価

各種生物の体内濃度を予測するために食物網蓄積モデルを用いた。モデルの基本構造はArnot and Gobas (2004)を参考にし、水生生物中のPOPs濃度を推定した。モデルは水・底質中のPOPs濃度が変数となっており、現場の水・底質中のPOPs濃度の平均やばらつきを反映させた生物中の濃度の予測が可能となる。

本研究で得た当該地域の水溶形態・底質中のPCB・PBDE(#47)・PFOS濃度を入力値として用いた。サブテマ(2)の毒性実験における化学物質と一致させるために、PCBは全209異性体(個別の異性体を計算後、合計)、PBDEは#47(2,2',4,4'-tetrabrominated diphenyl ether)を対象として計算した。

対象生物は同地域に棲息するゴカイ(計算設定体重 0.5 g)、カニ(同 2 g)、マハゼ(同 20 g)、ハゼクチ(同 40 g)、ボラ(同 500 g)、スズキ(同 1 kg)とし、各生物中の予測濃度の検証にはこれらの生物中PCB濃度の実測値を用いた。

本研究では次の手順でリスク評価を行った。まず、水・底質濃度の実測データの分布に基づいて乱数(モンテカルロ法、1000回)を発生させ、現場水域でとりえる濃度を推定した。つぎに、推定した水・底質濃度を食物網蓄積モデルに代入し、各生物中の濃度を推定した。そして、文献調査から体内濃度ベースの毒性値を取得し、得られた各生物の濃度分布と無影響濃度(NOEC)を照らし合わせて、NOECを超過する個体の割合を推定した。このNOEC超過割合を生態リスクとして評価した。体内濃度でのNOECの報告値がない場合は、数理モデルによって曝露濃度(水)からの魚体中濃度の推定し、魚類の体内濃度ベースのNOECを推定した。

(2) 沿岸海洋生物における残留性有機汚染物質の毒性影響の解明とリスク評価に関する研究

1) メダカを用いたPOPs応答遺伝子の解析と潜在的毒性影響の評価

試験化学物質としてKC-500、BDE-47およびPFOSを用いた。曝露試験は、熊本県立大学で継代飼育している約3ヶ月齢の成魚の雄メダカ(*Oryzias latipes*)を用いた。これらを2 L容のガラス水槽に試験液を入れて曝露し、曝露濃度は0.1%ジメチルスルフォキシド含有の溶媒対照群と各化学物質の曝露群(1000 µg/l)を設定した。各曝露群について10個体を用い、96時間止水式曝露を行った。なお曝露試験中は無給餌とした。なお曝露試験中は、行動異常(急沈降の有無、旋回運動の有無、生死確認など)と形態異常(体表の状態、各ヒレの状態、解剖時所見など)の観察も行った。曝露終了後、既報に従い、肝臓からtotal RNAを抽出し、cRNAを合成、Cy5標識後、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った(Uchida et al., 2010)。有意($p < 0.05$)かつ発現比が2倍以上、1/2以下の遺伝子を発現変動遺伝子とした。

2) イトゴカイを用いたPOPs応答遺伝子の解析と潜在的毒性影響の評価

試験化学物質としてKC-400、BDE-47およびPFOSを用いた。曝露試験は、熊本県立大学で飼育しているイトゴカイを用いた。曝露濃度は0.1%ジメチルスルフォキシド含有の溶媒対照群と各化学物質の曝露群(1 µg/l~100 mg/l)を設定し、72時間曝露した。曝露終了後、既報に従い、total RNAを抽出し、cRNAを合成、Cy5標識後、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。有意($p < 0.05$)かつ発現比が2倍以上、1/2以下の遺伝子を発現変動遺伝子とした。リアルタイムPCRによる遺伝子発現量の測定は、抽出したtotal RNAを逆転写し、合成したcDNAを用いて $\Delta\Delta Ct$ 法を用いたリアルタイムPCR(ライフテクノロジーズ)を行った。なお内部標準遺伝子にはribosomal protein L7a-likeを使用した。

4. 結果および考察

(1) 残留性有機汚染物質の生物蓄積機構の解明と食物連鎖モデルの構築

1) 河口域における物質循環、生物群集に関する研究

当該水域において、底生動物の全採集個体数において端脚類(*Melitidae* sp.)、ホソイトゴカイ(*Mediomastus* sp.)、シズクガイ(*Theora fragilis*)およびイトゴカイ(*Capitella teleta*)が上位を占めた。

大牟田川河口域におけるPCBの循環について、移流と生物による取り込み量について試算した。系内におけるPCBのマスのバランスの特徴としては、溶存態および堆積物として蓄積されているPCBの絶対量が水中懸濁態を大きく上回る点である。イトゴカイの体内における蓄積量は、水中および堆積物中の1000分の1未満となり、生

物体としての蓄積量が小さいことが示された。水の収支をもとに試算した溶存態および粒状態PCBのフラックスについては、それぞれ存在量の約3分の1が系外から流入することが示された。今回の調査では、粒子の沈降フラックスについて定量していないため、水中-堆積物間におけるPCBの交換について、定量的な議論はできないが、本研究域が高濁度域であり、懸濁粒子濃度が高いことを踏まえると、PCBの沈降量も大きいことが可能性として考えられる。個体群動態モデルおよび現場における生息密度をもとに推定したイトゴカイによるPCB蓄積速度は 0.12 mg d^{-1} となり、1日でイトゴカイの体内における存在量の約4分の1に達する結果となった。このように現存量に対して高い取り込み速度を示した理由として、イトゴカイは日和見種であり、高い成長速度を示すことが重要であると考えられる。

2) POPsの食物連鎖を通じた生物蓄積と食物連鎖モデルの構築

採取生物の窒素・炭素安定同位体比をもとに各生物の栄養段階を推定し、PCB、PBDE、PFOS濃度との関係を調べた。各物質は生物の栄養段階が上昇するにつれて増加し、食物連鎖を通して濃縮されていることが明らかになった。食物連鎖を通じた濃縮係数(TMF)は、総PCBでは1.52、PCB異性体($n = 58$)は $0.9 \sim 3.28$ であった。総PBDEでは1.17、PBDE異性体($n = 7$)は $0.46 \sim 1.66$ であった。また、PFOSのTMFは8を示し、PCBやPBDEよりも高い値であった。また、PCB・PBDEの各異性体のTMFとオクタノール/水分配係数との関係を解析した結果、河口域における化学物質の食物連鎖を通じた濃縮傾向は他の水域の傾向と異なることが明らかになった。

胃内容物調査、文献調査をもとに現場の食物網を推定し、POPsの食物網蓄積モデルを構築した。その結果、PCB・PBDEは高い精度で生物中の濃度が予測可能であったが、PFOSは魚種によって推定精度にばらつきがみられた。

3) 生態リスク評価

食物網蓄積モデルによる曝露評価・リスク評価は、比較的高い精度で予測が可能であったPCB・BDE47を対象とした。PFOSについては食物網蓄積モデルの予測精度が低く、さらにハザード比による初期評価においてもリスクが低かったため、食物網蓄積モデルを用いたリスク評価は行っていない。当該水域において栄養段階が上位のスズキ、現場での優占種のイトゴカイを代表生物としてリスク評価を行った。

総PCBのNOECについては、文献調査結果をもとにファットヘッドミノーのNOEC $2.2 \text{ } \mu\text{g/l}$ を採用した。体内濃度への変換にあたっては、ファットヘッドミノーに対するAroclor1248の生物濃縮係数(60,000)を用いた。ファットヘッドミノーのNOEC $2.2 \text{ } \mu\text{g/l}$ に生物濃縮係数60000を乗じ、体内中PCB濃度 $132 \text{ } \mu\text{g/g-ww}$ を得た。この体内中PCB濃度($132 \text{ } \mu\text{g/g-ww}$)をNOECとして用いた。BDE47のNOECについては、文献調査結果をもとにファットヘッドミノーの血漿中のチロキシンの減少に対するNOEC $11 \text{ } \mu\text{g/g-ww}$ を用いた。

総PCBについては、曝露評価の結果、スズキの体内濃度(全身)は概ね $10^4 \sim 10^7 \text{ pg/g-wet}$ の範囲にあると推定され、NOEC($1.32 \times 10^8 \text{ pg/g-ww}$)を超過する割合は全体の0%と推定された。このことから対象水域における総PCBのスズキに対する生態リスクは低いと考えられる。なお、参考までにサブテマ(2)においてKC-500をメダカに曝露した試験において、体内中の総PCB濃度を推定したところおおよそ 10^9 pg/g-wet のオーダーとなり、スズキの曝露評価の最大濃度よりも2桁高い値であった。一方、イトゴカイについて曝露評価を行った結果、体内中の総PCB濃度は 10^3 pg/g-wet のオーダーであると推定された。サブテマ(2)のイトゴカイ曝露実験において遺伝子レベルで発現変動がみられた濃度は 1 mg/l であり、この際のイトゴカイの体内濃度は 10^9 pg/g-ww のオーダーと推定され、曝露評価の値と 10^6 程度差があることから総PCBのイトゴカイに対するリスクは低いと考えられた。BDE47については、曝露評価の結果、スズキの体内濃度は概ね $10 \sim 10^6 \text{ pg/g-wet}$ の範囲にあると推定され、NOEC($1.1 \times 10^7 \text{ pg/g-ww}$)を超過する割合は全体の0%であると推定された。このことからBDE47のスズキに対する生態リスクは低いと考えられた。なお、サブテマ(2)においてBDE47をメダカに曝露した試験において、メダカ中のPBDE濃度を推定したところおおよそ 10^9 pg/g-wet のオーダーとなり、スズキの曝露評価の最大濃度よりも3桁高い値であった。一方、イトゴカイについて曝露評価を行った結果、体内中のBDE47濃度は 10 pg/g-wet のオーダーであると推定された。サブテマ(2)のイトゴカイ曝露実験において遺伝子レベルで発現変動がみられた濃度は 0.45 mg/l であり、この際のイトゴカイの体内濃度は 10^9 pg/g-ww のオーダーと推定され、曝露評価の値と 10^8 程度差があることからBDE47のイトゴカイに対するリスクは低いと考えられた。

今後さらに精緻なリスク評価を行うためには、現場生物を用いた毒性試験法の整備、体内濃度ベースの毒性影響濃度の集積、毒性影響濃度の種間差の補正方法の確立などが求められる。

(2) 沿岸海洋生物における残留性有機汚染物質の毒性影響の解明とリスク評価に関する研究

河口域に棲息する水生生物に対するPOPsの毒性影響については不明な点が多く、それらを明らかにすることはPOPsの生態リスク評価の一助となる。本研究では、POPsを曝露した魚類や多毛類を用いて、DNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、POPsの潜在的毒性影響の予測を試みた。

1) メダカにおけるPOPsの潜在的毒性影響の解明とリスク評価

96時間の曝露期間を通じて、行動異常や外観的奇形を呈する個体はみられず、死亡個体も確認されなかった。このことから、今回設定したPOPsの曝露濃度は雄メダカ成魚に対し急性毒性影響を示さないことが示唆された。

そこで、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を試みたところ、KC-500曝露により44遺伝子、BDE-47曝露により35遺伝子、PFOS曝露により39遺伝子の発現が増加した。KC-500曝露では、ダイオキシン類曝露に対する有用なバイオマーカーとして知られるcytochrome P450 1A (CYP1A) 遺伝子の発現が10倍以上増加した。また、CYP1A遺伝子だけでなく、hsp遺伝子の発現も変化したことから、KC-500はダイオキシン類と類似の毒性影響を示すことが示唆された。さらに、choline kinase α 、DNA-damage-inducible transcript 4およびhaptoglobin遺伝子の発現に増加がみられた。これらのことから、KC-500は肝臓の炎症、さらにはアポトーシスやガン化に関与することが示唆された。

BDE-47はKC-500と同様に、ダイオキシン類曝露に対する有用なバイオマーカーとして知られるCYP1A遺伝子の発現を増加した。また、CYP26C1遺伝子の発現も増加しており、これはBDE-47曝露によって発現が増加した35遺伝子のなかで最も高い誘導倍率を示した。これまでのエピゲノム解析により、食道ガン患者におけるCYP26C1遺伝子のDNAメチル化異常が見出されている。しかしながら、魚類における役割・機能は不明である。これらのことから、BDE-47はダイオキシン類と類似の毒性影響を有することが示唆されたが、魚類におけるCYP26C1遺伝子のDNAメチル化異常と毒性影響の関与については今後明らかにする必要がある。さらに、choriogenin H、choriogenin H-minorおよびchoriogenin L遺伝子の発現に増加がみられた。Choriogeninは卵膜タンパク前駆体であり、vitellogeninと同様にエストロゲンによって肝臓で合成され、環境エストロゲンに対する有効なバイオマーカーとして知られている。ヒト培養細胞を用いた研究では、BDE-47はエストロゲン受容体 α および β に対してアゴニスト活性を示し、弱いエストロゲン様作用を有することが示唆されている (Kojima et al., 2009)。これまで魚類におけるBDE-47のエストロゲン様作用に関する報告はなく、本研究によって初めて雄メダカに対するBDE-47のエストロゲン様作用が明らかとなった。

PFOS曝露によりvitellogenin 3 precursor遺伝子の発現が増加した。Vitellogeninは魚類を含め鳥類や両生類などの卵性脊椎動物の繁殖に重要な役割を担っているリンタンパク質の前駆体である。しかし、雄魚や未成熟魚でもエストロゲン様作用をもつ化学物質に曝露された場合、vitellogeninが誘導されることが報告され、環境エストロゲンの有効なバイオマーカーとなりうる。最近の報告では、PFOSを曝露した初期生活段階の海産メダカにおいてvitellogenin遺伝子の発現誘導が明らかにされている (Fang et al., 2012)。これらのことから、雄メダカに対するPFOSのエストロゲン様作用が示唆された。さらに、KC-500曝露によって発現が増加したcholine kinase α 遺伝子やBDE-47曝露によって発現が増加したCYP26C1遺伝子の発現がPFOS曝露によっても同様に増加した。これらの遺伝子は前述の通り、ガンの増殖、発症および進行やDNAメチル化異常などに関与する可能性がある。ニジマスを用いた研究では、PFOAの発ガン促進作用が報告されていることから、雄メダカに対するPFOSの発ガン作用が示唆された。

以上の結果から、各POPsを曝露したメダカ肝臓中において発現が増加した遺伝子群のスクリーニングに成功し、各POPsの潜在的毒性影響が明らかになった。しかしながら、実環境中においてこれらPOPsは複合して存在しており、これらの水生生物に対する複合影響を評価することは極めて重要な課題である。そこで、各POPs曝露によって共通して発現増加した遺伝子群を抽出し、それらの複合汚染に対する新規バイオマーカー候補遺伝子としての可能性を考察した。本研究では、各POPs曝露により共通して4つの遺伝子 (choline kinase α 、thyrotropin releasing hormone receptor 2 (trhr2)、emx1 transcription factorおよびneurolysin (metallopeptidase M3 family)) の発現が増加した。これらのことから、これらの遺伝子はPOPsの複合曝露に対する新規バイオマーカー候補遺伝子であることが示唆された。これら4遺伝子のうち、choline kinase α 遺伝子の発現は、KC-500曝露により4.6倍、BDE-47曝露により2.7倍、PFOS曝露により3.3倍増加し、各POPs曝露によって高い誘導倍率を示した。Choline kinase α は α と β の2つのアイソザイムが存在する。細胞内に取り込まれたコリンはcholine kinaseによってリン酸化されホスホコリンとなり、細胞膜の構成要素ホルファチジルコリンの合成経路へと組み込まれる。これまでの研究によると、choline kinaseはガンの増殖、発症および進行に関与することが提案されている。例えば、乳ガン、肺ガン、大腸ガン、前立腺ガン、膀胱ガンなどのガンのなかにcholine kinase、特に α 型が過剰発現されるものがあることが知られている。本研究ではcholine kinase α 遺伝子以外に、各POPs曝露によってガン化に関与する遺伝子群の発現も増加しており、これらを総合して考えるとcholine kinase α は今回供試したPOPsの複合曝露に対する新規バイオマーカー候補として特に注目すべき遺伝子であることが示唆された。

2) イトゴカイにおけるPOPsの潜在的毒性影響の解明とリスク評価

1 mg/lのKC-400、0.45 mg/lのBDE-47および10 mg/lのPFOSを72時間曝露したイトゴカイでは明瞭な急性毒性影響は確認されなかった。そこで、これらの試験区のイトゴカイ試料について、DNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を試みた。今回用いたDNAマイクロアレイチップに搭載された9223遺伝子のうち、KC-400、BDE-47およびPFOS曝露によってそれぞれ210、313および31遺伝子の発現が変化し、これらPOPsによって発現変動する遺伝子群のスクリーニングに成功した。KC-400(210遺伝子/9223遺伝子=2.3%)あるいはBDE-47(3.4%)曝露によって変動した遺伝子の割合は、PFOS(0.34%)曝露と比較してそれぞれ6.8倍あるいは10倍高かった。今回用いたKC-400(1 mg/l)およびBDE-47(0.45 mg/l)の曝露濃度は、PFOS(10 mg/l)と比較して10倍程度低いにもかかわらず、KC-400およびBDE-47はPFOSと比較してより多数の遺伝子の発現に影響すると考えられた。これら発現変動した遺伝子のうち、発現が増加した遺伝子数は、KC-400で210、BDE-47で295、PFOSで26であった。一方、発現が抑制した遺伝子数は、KC-400で0、BDE-47で18、PFOSで5であり、発現増加した遺伝子数と比較すると極めて少なかった。これらのことから、以下特に発現増加した遺伝子群について考察することとした。

DNAマイクロアレイによって明らかになったKC-400応答遺伝子群について、特異的なプライマー対を設計し、PCR条件等を最適化することによって、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いたリアルタイムPCRによる遺伝子発現定量系を構築した。この定量系を用いて、KC-400を3日間曝露したイトゴカイについて各遺伝子発現量を測定した。Tensinは細胞質のリントタンパク質で、アクチンフィラメントに結合し、接着斑として機能する。1 mg/LのKC-400曝露群では有意に増加したことから、KC-400は細胞の構造形成に影響すると考えられた。DnaJはシャペロンタンパク質であり、熱ショックタンパク質(Hsp)と相互作用し、ガンに関与することが知られている。1 mg/LのKC-400曝露群では有意に増加した。また大腸ガンとの関連が指摘されているUBA domain-containing protein遺伝子の発現は1 mg/L以外のKC-400曝露群で有意に抑制された。これらのことから、KC-400の発ガンへの関与が示唆された。Insulin degrading enzymeはインスリン分解酵素である。これまで血糖値やアミロイド β 脳内蓄積によるアルツハイマー病との関連が報告されている。1 mg/LのKC-400曝露群では有意に増加した。全てのKC-400曝露群において、26S proteasome regulatory subunit rpn2遺伝子発現に影響はみられなかった。脂肪細胞の分化に関わるグリセロール-3-リン酸脱水素酵素(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)や脂肪酸合成酵素(fatty acid synthase)の遺伝子発現は、1 mg/LのKC-400曝露群で有意に増加した。また、脂質代謝関連遺伝子cytochrome P450(CYP) 4A11のホモログであるCYP XL-301-like遺伝子の発現は1 mg/LのKC-400曝露群で有意に増加した。これらのことから、KC-400は脂肪合成・脂質代謝系に影響すると考えられた。

DNAマイクロアレイによって明らかになったBDE-47応答遺伝子群について、特異的なプライマー対を設計し、PCR条件等を最適化することによって、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いたリアルタイムPCRによる遺伝子発現定量系を構築した。この定量系を用いて、BDE-47を3日間曝露したイトゴカイについて各遺伝子発現量を測定した。mRNAのプロセッシングに関与するheterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q、カルシウムセンサーとして知られるdouble C2-like domains、 β -like、筋繊維形成に関与するfibrillin 3-like遺伝子の発現は、0.45 mg/LのBDE-47曝露によって有意に増加した。また、アポトーシス誘導に関与するcaspase-8-like遺伝子の発現も0.45 mg/LのBDE-47曝露によって有意に増加した。今回、遺伝子発現量の定量は実施しなかったが、DNAマイクロアレイでは、ガン化に関与するras and EF-hand domain-containing protein homolog isoform 1やras-related protein Rab-11A-like遺伝子の発現も増加しており、別途実施した遺伝子オントロジー解析の結果と併せて考えると、BDE-47の潜在的毒性影響は極めて多岐に渡り、ガン化への関与も示唆された。

DNAマイクロアレイによって明らかになったPFOS応答遺伝子群について、特異的なプライマー対を設計し、PCR条件等を最適化することによって、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いたリアルタイムPCRによる遺伝子発現定量系を構築した。この定量系を用いて、PFOSを3日間曝露したイトゴカイについて各遺伝子発現量を測定した。10 mg/LのPFOS曝露によってアセトアルデヒド脱水素酵素の一種であるaldehyde dehydrogenase family 1 member L2遺伝子の発現が増加した。ユビキチン/プロテアソーム経路に関与するUBX domain-containing protein、アミノ酸トランスポーター関連excitatory amino acid transporter、アミノ酸の取り込みに関与するvitamin k-dependent γ -carboxylase、脂質代謝関連CYP XL-301-like、色素沈着関連garnet遺伝子の発現は、0.1、1、100 mg/LのPFOS曝露で抑制された。これら遺伝子群の関与したPFOSの潜在的毒性影響が示唆されたが、これら遺伝子群の発現抑制の生理学的意義等の解明は今後の検討課題であろう。

以上のことから、各POPsによって影響を受けた遺伝子群が明らかとなった。さらに本研究において発現増加した遺伝子のうち、KC-400とBDE-47曝露で共通して発現が増加したのは8遺伝子であった。言い換えると、8遺伝子以外の遺伝子の種類はKC-400とBDE-47でそれぞれ異なっていた。また、PFOS曝露で発現増加した26遺伝子のうち、BDE-47と共通して発現増加したのは25遺伝子であった。KC-400とPFOS曝露において共通して発現が増加した遺伝子は今回確認されなかった。これらのことから、PFOS曝露による潜在的毒性影響はBDE-47でも引き起こされる可能性があったが、一方でBDE-47あるいはKC-400特有の潜在的毒性影響も示唆され、本研究で用いたPOPsによる潜在的毒性影響は極めて多岐に渡ると考えられた。

実環境中においてPOPsは複合して存在するため、これらPOPsの水生生物に対する複合影響を評価することは極めて重要な課題である。そこで、各POPs曝露によって共通して発現増加した遺伝子群を抽出し、それらの複合汚染に対する新規バイオマーカー候補遺伝子としての可能性を考察した。各POPs曝露によって共通して2つの遺伝子(guanine-nucleotide-exchange-factorとpresenilin 1-1)の発現が増加した。このうち、guanine-nucleotide-exchange-factorはguanosine triphosphate (GTP)に結合するためにguanosine diphosphate (GDP)の放出を制御することによってGTPaseを活性化することが知られている。また、ガン化との関連も示唆されている。さらに、ヒトのアルツハイマー病の原因遺伝子として知られているpresenilin 1-1については、リアルタイムPCRによる測定法を確立し、遺伝子発現に及ぼす濃度依存的影響を調査した。Presenilin 1-1遺伝子の発現量は、1 mg/LのKC-400、0.45 mg/LのBDE-47曝露によって有意に増加し、0.1, 1, 100 mg/LのPFOS曝露によって有意に抑制された。PCBsはアルツハイマー病との関連も指摘されている。これらのことから、guanine-nucleotide-exchange-factor とpresenilin 1-1は今回実施した3種類のPOPs複合曝露に対する新規バイオマーカー候補として特に注目すべき遺伝子であることが示唆された。しかしながら、本研究で対象としたイトゴカイでは、これらの遺伝子配列は明らかになっているものの、実際の機能については解析がなされていない。今後、イトゴカイにおけるこれら遺伝子群の機能や毒性学的意義を明らかにするとともに、長期曝露試験などによって遺伝子発現の経時的変化を確認し、POPs複合汚染に対する新規バイオマーカー候補遺伝子としての可能性を精査する必要がある。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

野外調査結果に基づき現場におけるPCBのフラックスを明らかにした。生物を含めたフラックスに関する知見は限られており、POPsの環境動態および生物移行を理解するうえで貴重なデータとなる。また、食物連鎖を通じた化学物質の濃縮係数(TMF)は、一般に化学物質の疎水性が強い物質ほど値が大きくなると考えられていたが、対象河口域ではこの傾向とは逆の傾向を示すことを明らかにした。さらに、現場の水・底質のPCB・PBDE・PFOS濃度から食物網を通して各種生物中濃度の予測する食物網蓄積モデルを構築し、生物の体内濃度に基づいて生態リスク評価を行う手法を提案した。

ストックホルム条約に新たに登録されたポリ臭素化ジフェニルエーテル類や有機フッ素化合物を対象として、水生生物に対する毒性影響を遺伝子レベルで調査した研究は極めて少ない。本研究では、メダカおよびイトゴカイのDNAマイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を試み、遺伝子レベルからPOPsの潜在的毒性影響を明らかにした。特に、本研究によって初めてイトゴカイにおけるPOPs応答遺伝子が明らかとなった。また、POPsの複合曝露(毒性)に対する新規バイオマーカー候補遺伝子が両生物種において明らかになった。これら遺伝子の今後のさらなる機能解析によって、生態毒性試験の標準化・高度化に大きく寄与できるとともに、本研究成果は、POPsの生態リスク評価において極めて重要な情報を提示できる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

POPsによる底質汚染のモデルとして、現場生物イトゴカイを用いた評価系を構築した。これらは新たな生態影響評価試験の標準化・高度化に大きく寄与できる。また、DNAマイクロアレイ解析による遺伝子レベルでの毒性影響評価により、環境基準の設定や生態系保全および生物資源の利活用を促進する一助になりえる点からも環境政策に資する。さらに世界をリードする学術情報を発信するだけでなく、POPsに関するストックホルム条約などに関連した国際社会のニーズや生態系保全・生物多様性保全を考慮した化学物質の安全性評価・利用指針の構築に資することが期待され、今後の環境政策に大きく貢献できる。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) J. Kobayashi, Y. Imuta, T. Komorita, H. Ishibashi, K. Yamada, F. Ishihara, N. Nakashima, J. Sakai, K. Arizono, M. Koga: Chemosphere, 118, 201-206 (2015)
 “Trophic-magnification of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in an estuarine food web of the Ariake Sea, Japan”

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 小森田智大、小林淳、石橋弘志、中島尚哉、石原史隆、伊牟田優希、古賀実、堤裕昭: 2012年度日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会(2012)
「大牟田川河口域における水質・底質の環境要因の空間分布と底生動物群集の関係」
- 2) T. Komorita, J. Kobayashi, H. Ishibashi, N. Nakajima, H. Ishihara, Y. Imuta, A. Umehra, M. Koga, H. Tsutsumi: The First Asian Marine Biology Symposium, Phuket, Thailand, 2012
“Spatial distribution of macro zoobenthos community related to the environmental variables surround a mouth of a small river, southern Japan.”
- 3) 小林淳、小森田智大、中島尚哉、石原史隆、伊牟田優希、梅原亮、石橋弘志、有蘭幸司、古賀実: 第22回環境化学討論会(2013)
「有明海の河口域における残留性有機汚染物質の空間分布と分配」
- 4) 伊牟田優希、小林淳、小森田智大、中島尚哉、石原史隆、梅原亮、石橋弘志、有蘭幸司、古賀実: 第22回環境化学討論会(2013)
「有明海の河口域に棲息する水生生物への残留性有機汚染物質の蓄積解析」
- 5) 石原史隆、小林淳、小森田智大、中島尚哉、伊牟田優希、梅原亮、石橋弘志、有蘭幸司、古賀実: 第22回環境化学討論会(2013)
「海産魚類における残留性有機汚染物質の体内分布特性」
- 6) H. Ishibashi, M. Uchida, M. Hirano, J. Kobayashi, T. Komorita, H. Nakamura, Y. Kagami, T. Kusano, Y. Ishibashi, K. Arizono: 7th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology, Hong Kong, 2013
“Transcriptomic analysis of the liver of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to Kanechlor-500, BDE47 or PFOS.”
- 7) 小林淳、小森田智大、石橋弘志、有蘭幸司、古賀実: 第23回環境化学討論会(2014)
「有明海の河口域におけるポリ塩化ビフェニルの食物網蓄積モデルの構築と検証」
- 8) 川中理可、小林淳、石原史隆、櫻井健郎、小森田智大、石橋弘志、有蘭幸司、古賀実: 第23回環境化学討論会(2014)
「汽水域に棲息する多毛類のポリ塩化ビフェニルの取込み経路と体内動力学」
- 9) 石原史隆、小林淳、小森田智大、石橋弘志、有蘭幸司、古賀実: 第23回環境化学討論会(2014)
「魚類におけるポリ臭素化ジフェニルエーテルの体内分配に及ぼす代謝の影響」
- 10) 伊牟田優希、小林淳、小森田智大、山田勝雅、石橋弘志、有蘭幸司、古賀実: 第23回環境化学討論会(2014)
「大牟田川河口域における残留性有機汚染物質の食物連鎖蓄積について」
- 11) 前田佳貴、伊牟田優希、石原史隆、中島尚哉、小林淳、小森田智大、石橋弘志、有蘭幸司、古賀実: 第23回環境化学討論会(2014)
「有明海河口域における有機フッ素化合物の生物蓄積」
- 12) 小森田智大、小林淳、伊牟田優希、石原史隆、中島尚哉、石橋弘志、堤裕昭: 日本海洋学会秋季大会(2014)
「河口域におけるポリ塩化ビフェニル(PCBs)の動態」

7. 研究者略歴

課題代表者: 小林 淳

新潟大学大学院自然科学研究科博士後期課程修了、博士(工学)、現在、熊本県立大学環境共生学部助教

研究分担者

1) 小森田 智大

北海道大学大学院環境科学院博士後期課程修了、博士(環境科学)、現在、熊本県立大学環境共生学部助教

2) 石橋 弘志

長崎大学大学院生産科学研究科海洋資源学専攻博士後期課程修了、博士(学術)、現在、尚絅大学短期大学部准教授

5RFb-1203 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

(1) 残留性有機汚染物質の生物蓄積機構の解明と食物連鎖モデルの構築

熊本県立大学

環境共生学部環境資源学科

環境共生学部環境資源学科

小林 淳

小森田智大

平成24～26年度累計予算額：13,514千円

(うち、平成26年度予算額：2,629千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

ポリ塩化ビフェニル (PCBs)、ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs)、ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) などの残留性有機汚染物質 (POPs) は高い毒性、残留性、生物蓄積性を有することからヒト健康や生態系に対して適切なリスク管理が必要である。河口域は生物多様性に富み、生物生産が豊かな領域であるが、河川を通して栄養塩とともにPOPsなども流入するため、河川からの流入も含めた物質循環や多様な生物に対応可能な食物連鎖を通じたPOPsの曝露評価・リスク評価手法の構築が必要である。本研究では、対象水域 (福岡県大牟田川) における野外調査、モデルシミュレーションを通して対象水域に棲息する生物に対してPOPsの生態リスク評価を行った。野外調査では対象水域の栄養塩やPOPs濃度の三次元分布、生物個体群構造を明らかにした。さらに、係留センサーによる水質の常時観測結果から河川および現場の優占種であったイトゴカイへのPCBsのフラックスを推定した。また、採取生物の窒素・炭素安定同位体比をもとにPOPsの食物連鎖を通じた濃縮係数 (TMF) を求め、河口域における化学物質の食物連鎖を通じた濃縮傾向は他の水域の傾向と異なることを明らかにした。胃内容物調査、文献調査をもとに現場の食物網を推定し、POPsの食物網蓄積モデルを構築した結果、PCB・PBDEは高い精度で生物中の濃度が予測可能であったが、PFOSは魚種によって推定精度にばらつきがみられた。高い精度の得られたPCB・PBDEについて曝露評価を行い、既往の生態毒性値やサブテーマ (2) のDNAマイクロアレイで遺伝子発現変動がみられた濃度と照らし合わせてリスク評価を行ったところ、これらの物質による生態リスクは低いことが示唆された。本研究で提案した食物網蓄積モデルによる曝露評価手法ならびにリスク評価手法は他の海域にも適用でき、生態リスク評価の高度化に貢献できる。

[キーワード]

食物網蓄積モデル、生態リスク、物質循環、個体群動態、フラックス

1. はじめに

現在世界の化学物質の登録数は9000万種 (2015年4月現在) を超え、わが国では数万種が流通している。国際的に2020年までにすべての化学物質による人の健康や環境への影響を最小化するこ

とが合意された（SAICM）ことから、多種多様な化学物質のリスク管理がますます重要となってきた。多くの化学物質のなかでも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）、ペルフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）を代表とする残留性有機汚染物質（POPs）は高い毒性・残留性・生物濃縮性・長距離移動性を有するため、特にリスク管理が必要な物質群であるといえる。

河口域は生物多様性に富み、生物生産の豊かな領域であるが、河川を通して栄養塩とともに有害化学物質等も流入するため、河口域に棲息する多様な生物に対して適切なリスク管理が必要である。水環境に排出された化学物質は、水・底質・餌生物を経由して生物に取り込まれるため、これらの媒体を通じた曝露評価ならびにフラックスの定量化が生態リスクや物質循環を考えるうえで重要である。また、化学物質による毒性発現が生物の標的臓器中の負荷量（濃度）に依存することを考慮すると、曝露評価には一般的に用いられる水中濃度よりも食物連鎖を考慮した生物中濃度に基づいた評価がより望ましいと考えられる。そのため、多くの化学物質ならびに多様な生物の濃度予測に対応可能な食物網蓄積モデルの構築、適用が不可欠である。

水生生物に対する化学物質の有害性評価については、急性・慢性毒性試験による表現型に対する閾値の算出に加えて、DNAマイクロアレイやリアルタイムPCRを用いた遺伝子レベルでの毒性評価によってさらに鋭敏な閾値を得られる可能性がある。また、より実態に近い生態リスクを評価するためには、メダカなどのモデル生物に加えて現場生物を用いた研究が必要不可欠である。現場に棲息する生物を対象に毒性実験を行った研究例は限られており、重要な知見となり得る。

2. 研究開発目的

河口域におけるPOPsの循環と生態リスクを明らかにすることを目的とし、現地調査によって水・底質・生物中のPOPs、栄養塩類濃度や生物群集組成の時空間的変動などを明らかにするとともに、食物網蓄積モデルを構築して現場生物のPOPsの曝露評価、生態リスク評価を行う。また、サブテーマ（2）と連携して現場生物を用いたPOPsの毒性影響実験を行い、得られた毒性影響濃度の閾値と曝露評価結果とを照らして遺伝子レベルでの生態リスク評価を行う。

3. 研究開発方法

（1）調査対象地域および対象物質

1) 調査地域

本研究で調査対象とした大牟田川は有明海に流入する二級河川である（図(1)-1）。本研究では、感潮域に全23点を設定し、海水の影響を受けない淡水域に3調査定点を設定した。潮汐の振幅の影響を強く受けることから、大牟田川では河口から約4 kmまで塩水遡上が確認されている。

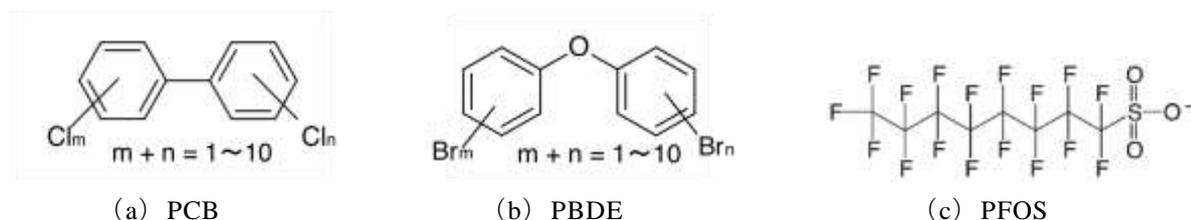


図(1)-1 調査地点図

図中の数字は調査定点名を示す。黒色の定点は底生動物の季節変動の調査定点を示す。

2) 分析対象物質

分析対象物質は、PCB、PBDE、PFOSとした（図(1)-2）。残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約において、PCBは2001年に指定されたが、臭素系難燃剤のPBDE（テトラブロモジフェニルエーテル、ペンタブロモジフェニルエーテル、ヘキサブロモジフェニルエーテル、ヘプタブロモジフェニルエーテル）およびフッ素系界面活性剤のPFOSは近年指定された新規のPOPsである。PCB、PBDEは209種類の異性体が存在し、いずれも疎水性が極めて高い。一方、PFOSは界面活性剤であるため、水にも油にも溶解する両親媒性である。このように各物質で物性が異なり、環境挙動や生物蓄積性が大きく異なることが予想される。



図(1)-2 対象物質

(2) 河口域における物質循環、生物群集に関する研究

1) 試料採取

2012年5月から2012年12月にかけての定期観測（1ヶ月から2ヶ月間隔）は上流部から沖合にかけて約6 kmのトランセクトラインを設定し（図(1)-1の調査定点参照）、各調査地点において満潮時から下げ潮時に観測を実施した。水質の調査項目としては、水温、塩分、溶存酸素濃度（DO）、栄養塩類（ $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{+NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ ）およびChlorophyll *a*（以下Chl-*a*）とした。水温、塩分、DOおよびChl-*a*はCTD（YSI、model 6600）により測定した。海水試料については表層水をボトルで直接採取し、海底から上方約50 cm層の底層水は横型のバンドーン型採水器により採取した。

堆積物の調査は、水質調査と同時に行った。各調査地点において、エクマンバージ採泥器を用い

て堆積物表層を乱さないように丁寧に採取し、円形コアサンプラー（直径2.9 cm）を用いてその堆積物表層（0-1 cm）を押し出して切り、ランダムに10回採取し、混ぜ合わせたものを1サンプルとし、堆積物表層の環境要因、粒度組成、全有機炭素含量（TOC）、全窒素含量（TN）、酸揮発性硫化物態硫黄（AVS-S）、有機態炭素の安定同位体比（ $\delta^{13}\text{C}$ ）および窒素安定同位体比（ $\delta^{15}\text{N}$ ）、Chl-*a*含量定量用のサンプルとした。さらに、予備調査により定めた代表点（Stn 2, 13, 18）においては、底生動物の定量用サンプルとして、エックマンバージ採泥器により採取した堆積物試料を目合い1 mmのふるいを用いてふるい、ビニール袋に入れて持ち帰った。

設置型の多項目水質計による連続観測は、大牟田川の河口から約2 km上流の調査地点において、2012年10月26日から10分間隔で行った。多項目水質計による観測は、水温、塩分、DO、Chl-*a*および水深について行った。データの回収および付着物の除去については、およそ2週間間隔で行い、必要に応じて各センサー値の補正をした。

2) 処理方法

研究室に持ち帰った海水試料について、栄養塩類定量用の海水試料は、懸濁物を除くためにディスマックフィルター（Whatman、GF/F）を通して、清浄なポリエチレン製の容器に採取し、 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。濾液に含まれる栄養塩類は自動栄養塩分析装置（Bran+Luebbe、AACSIII）を用いて測定した。Chl-*a*の測定については、海水試料0.4 Lをガラス繊維性濾紙（Whatman、GF/F）上に濾過捕集し、濾紙とともに濾過捕集物を90%アセトンに浸出させた。次に24時間冷暗所に保存し、超音波処理を施すことによって、光合成色素の溶媒（アセトン）への抽出を行った。抽出溶媒に含まれる光合成色素は、蛍光光度計（TURNER、10-AU-5）を用いて蛍光光度法¹⁾で測定した。

底質の粒度分析用サンプルは、ウェットシービング法により粒度組成を分析した。底質表層のTOCおよびTN分析用サンプルは、凍結乾燥後、乳鉢を用いて細かくすり潰し、無機炭酸塩を除去するため2N塩酸で処理した。さらに、このサンプルを真空乾燥した後、自動分析装置（FAISONS、NC2500）を用いて、TOCおよびTNの含有量を測定した。さらに、元素分析計に接続された質量分析計（DELTA plus）で、窒素と炭素の安定同位体比（ $\delta^{15}\text{N} \cdot \delta^{13}\text{C}$ ）を測定した。安定同位体比は以下の式1により定義した。

$$\delta^{15}\text{N}, \delta^{13}\text{C} = \left[\frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right] \times 1000 \text{ (‰)} \quad \text{式1}$$

$$R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}, {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$$

標準試料は、 $\delta^{13}\text{C}$ がPDB、 $\delta^{15}\text{N}$ が大気窒素である。

堆積物試料に、ガス発生管内で18N 硫酸を加え、発生したガスのガステック検知管（ヘデロテック-S 用）により得られた硫化物量から、酸揮発性硫化物（AVS-S）の濃度を求めた。底質表層のChlorophyll *a*分析用サンプルは、約0.5 gをネジ付き試験管に分取し、90 %アセトン10 mlを用いて12~24時間冷暗所で抽出した。その後、蛍光光度計（TURNER社 10-AU-005）を用いて蛍光値を測定し、サンプルの含水率と蛍光値からChlorophyll *a*現存量を求めた。堆積物表層のChl-*a*は、袋の中の試料を均等になるようにしっかり攪拌した後、湿泥を90%アセトン溶液中に浸出し、海水試料のChl-*a*と同じ手順により測定した。

3) データ解析

本研究では、堆積物の環境要因の傾向を把握するために、主成分分析による類型化を実施した。底生動物群集に対しては、Brey-Curtis類似度指数を算出し、非計量多次元尺度法 (NMDS) による類型化を行った。データ解析は、R 2.12.2のveganパッケージにより行い、NMDSと環境要因の関係はベクトルを用いて表現した。

設置式の多項目水質計については、データの回収後、塩分が3未満かつ水深が0.1 m未満の場合を干出時と見なし、データを除去した。その後、データの傾向を把握するために、1時間、13時間、25時間および2週間の移動平均を施した。

4) 河口域における溶存酸素濃度の連続観測による酸素フラックスの定量化

大牟田川の河口から約2 km上流側の干潟上 (堆積物表層から約10 cm上方) に、多項目水質計 (YSI6600) を設置し、10分間隔で水温、塩分、水深および溶存酸素濃度を測定した。機器のメンテナンスは2週間に1回行った。

5) POPsの循環過程の定量

本研究では、PCBの循環過程を定量化するために、まず水中の粒状と溶存PCB濃度として、2012年の夏季と冬季に得られた実測値の平均値を代表値とした。各態PCBの輸送量を算出するために、流速については、2012年から2013年にかけて多項目水質計を用いて実測した水の変化量を用いた。次に、潮汐流に伴う往復成分を除去するために、1潮汐分の水収支を積分することで、水の輸送フラックスとし、調査期間の平均値を代表値とした。

本研究域においては、底生動物の優占種の1種として、イトゴカイが出現した。イトゴカイの増殖速度については、以下に示すTsutsumi²⁾のロジスティック成長方程式 (式2) に基づくと仮定し、個体数を定義した。

$$N_t = 405 / (1 + e^{15.2 - 0.2 * t}) \quad \text{式2}$$

ここで、Nは密度 (個体数/0.01 m⁻²)、添え字のtは日数を示す。次に、式2を変形し、野外における増加速度を算出した (式3)。

$$dN/dt = -0.2 * N * ((405 - N) / 405) \quad \text{式3}$$

野外において得られたイトゴカイの生物量を密度で除すことで平均個体重を算出し、個体数の増加速度に乗じることで湿重量の増加速度を推定した。平成25年度までの実績をもとに、ゴカイ類への生物底質蓄積係数 (BSAF) をもとにイトゴカイのPCB体内濃度を推定した。

PCBの循環過程のために用いたパラメーターの概要を表(1)-1に示す。

表(1)- 1 PCB 循環過程の定量化に用いたパラメーター一覧

パラメーター	単位		備考
溶存態PCB濃度	ng L ⁻¹	7,728	本研究
懸濁態PCB濃度	ng L ⁻¹	920	本研究
流速	m ³ m ⁻² d ⁻¹	0.17	本研究
イトゴカイの増殖速度	inds m ⁻² d ⁻¹	42	Tsutsumi (1990)
イトゴカイの密度	inds m ⁻²	210	本研究
イトゴカイの個体重	mgWW inds ⁻¹	5.75	本研究
イトゴカイの生息域	m ²	236,00	
河口の断面積	m ²	596	
堆積物のPCB含量	ng g ⁻¹	64.8	本研究
BSAF		0.17	本研究

(3) POPsの測定方法

1) 試料採取と処理

2012年8月、12月に図(1)-1のStn 2、8、13、18、23において水、底質試料を採取した。水試料は、表層水についてはステンレス製バケツ、底層水については河床・海底から上方約50 cmの位置で横型のバンドーン型採水器を用いて6L採取した。採取した水試料は褐色ガロン瓶に氷冷保存し、大学に帰着後はろ過時まで4℃で保存した。PFOS分析用試料は2012年10月、2013年8月に採取した。

魚類調査は2012年10月にStn 17および上流の地点において実施し、投網によって魚類等を採取した。採取した生物は、分析用生物については氷冷して大学まで持ち帰った。大学帰着後は、分析用生物は解剖時まで冷凍保存した。魚類については耳石による年齢査定、胃内容物の調査を行った。

2) 分析方法

a) 試薬

PCB標準液 (BP-MXP、MBP-MXP、PCB-IS-A)、PBDE標準液 (BDE-MXE、MBDE-MXE)、PFOS標準液 (MPFOS) はWellington Laboratories社から購入した。アセトン、ジクロロメタン、トルエン、*n*-ヘキサン、無水硫酸ナトリウム (残留農薬分析用 (5000倍濃縮))、*n*-デカン (特級)、22%硫酸シリカゲル (ダイオキシン類分析用) は和光純薬株式会社から購入した。

b) PCB・PBDE分析における抽出および精製

i) 水試料

水試料5Lを加圧ろ過装置 (DF-40-ST、ADVANTEC社) に設置後、ガラス繊維ろ紙 (公称孔径0.5 μm (GC-50)、1 μm (GA-100)、ADVANTEC社) および固相ディスク (3M™ エムポア™ ディスク C18FF オクタデシル ファストフロー) を重ねたディスクホルダー (KS-90-UH、ADVANTEC社) に接続し、高純度窒素を用いて加圧ろ過を行い、懸濁態と溶存態に分けた (通水速度は約100 ml/分)。本研究では、ガラス繊維ろ紙上の残渣を懸濁態とし、ガラス繊維ろ紙を通過して固相ディスクで捕集された物質を溶存態とした。

ろ過後のガラス繊維ろ紙、固相ディスクはそれぞれハイδροマトリックス、ガラスビーズを封入した高速溶媒抽出用の高耐圧ステンレス製容器に移した。その後、¹³Cラベル化されたPCB (MBP-BPX) およびPBDE (MBDE-MXE) をそれぞれ50 µl (PCB各異性体1000 pg、PBDE各異性体1000~5000 pg) 添加し、抽出に供した。抽出は高速溶媒抽出 (ASE200、日本ダイオネクス社) を用いてアセトン、トルエンで各1回行い、各抽出液は200 ml ナスフラスコに入れ、半日程度放置して有機溶媒層と水層を分離させ、その後無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。有機溶媒層は別の200 ml ナスフラスコに移し、ロータリーエバポレーターで約1 mlまで濃縮した。この濃縮した抽出液を、22%硫酸シリカゲル6 g、無水硫酸ナトリウム2 gを充填したカラムクロマト管 (内径15 mm、長さ300 mm) に添加し、*n*-ヘキサン80 mlで溶出させた。この溶出液をロータリーエバポレーターを用いて約1 mlまで濃縮した後、10 ml ガラス遠沈管に移し、デカン50 µlを添加した後、窒素気流によって50 µlまで濃縮した。この濃縮液に¹³Cラベル化されたPCB (PCB-IS-A) を50 µl (1000 pg) 添加し、良く混合した後、ガラスバイアルに移し、機器測定に供した。

ii) 底質試料

湿重量約4 gを測りとり、ハイδροマトリックス (アジレント) で脱水後、ASE用の33 mlステンレスセルにガラスビーズとともに詰めた。その後、¹³Cラベル化したPCB (MBP-BPX) およびPBDE (MBDE-MXE) をそれぞれ50 µl (PCB各異性体1000 pg、PBDE各異性体1000~5000 pg) 添加し、抽出に供した。抽出、精製は水試料と同様の方法で行い、機器分析に供した。

iii) 生物試料

底生動物試料は、現場で採取した水をろ過した水中で一晩置くことにより、胃内容物を排出させた。魚類試料は、解剖して胃を摘出、切開した後、内容物を除去した。内容物を除去した胃は、生理食塩水で洗浄した後、他の部位に合わせた。各生物試料は底質等の体表付着物を注意深く除去した後、貝試料・甲殻類は軟体部、魚類は全身を分析対象とし、ホモジナイズに供した。ホモジナイズ後、湿重量約4 gを測りとり、ハイδροマトリックスで脱水後、ASE用の33 mlステンレスセルにガラスビーズとともに詰めた。その後、¹³Cで同位体ラベルされたPCB (MBP-BPX) およびPBDE (MBDE-MXE) をそれぞれ50 µl (PCB各異性体1000 pg、PBDE各異性体1000~5000 pg) 添加し、抽出に供した。抽出は、ジクロロメタン/ヘキサン (v:v = 1:1) 混合溶液を用いて高速溶媒抽出を行った。抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水後、水試料と同様の方法で精製を行い、機器分析に供した。

c) 機器分析

高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (Agilent 6890 (アジレント社) /MS700 (日本電子株式会社)) を用いてPCB、PBDEの定性・定量を行った。PCBは全209異性体、PBDEは27異性体を測定対象とした。

d) PFOS分析方法

水試料はガラス繊維ろ紙 (GC-50、公称孔径0.5 µm、ADVANTEC社製) を用いて減圧ろ過を行い、濾水を溶存態、ろ紙上残渣を懸濁態として分析に供した。溶存態試料 (500 ml) は、クリーン

アップスパイクとして¹³C-PFOS (MPFOS、Wellington Laboratories社製)を100 µl (10 ng) 添加し、固相抽出を行った。懸濁態試料および底質試料(約2 g)は、ビーカーに移した後、メタノール(HPLC用) 20 mlを加え、¹³C-PFOSを100µl (10 ng) 添加し、超音波抽出を20分間行った。抽出液をろ過し、ろ液を固相抽出に供した。生物試料(約2 g)はハイドロマトリックスで脱水後、ASE用の33 mlステンレスセルにガラスビーズとともに詰めた。その後、¹³C-PFOSを100 µl (10 ng) 添加し、抽出に供した。抽出は、水/メタノール混合溶液(v:v = 2:8)を用いてASE抽出を行った。抽出液は、メタノール濃度が10%以下となるように超純水で希釈(約200 ml)した後に固相抽出(Presep[®] PFC(和光純薬工業社製))を行った。メタノール、超純水でコンディショニング後、抽出液を固相カートリッジに負荷し、1秒1滴程度の速度で通水させた。通水後、超純水10 mlを通して超純水に溶解する成分を脱離させ、その後、2分間減圧乾燥させた。次いでメタノール2 mlでPFOSを溶出させ、10 mlポリプロピレン製の遠心沈殿管に受けた。メタノール溶出液は、窒素気流で1mlまで濃縮した後、ポリプロピレン製スナップバイアルに100 µl移し、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC/MS/MS)(Ultimate 3000/ TSQ Quantum Access MAX、Thermo Scientific社製)によりPFOSの定性・定量を行った。

(4) 食物連鎖を通じた生物濃縮の解析および食物網蓄積モデルの構築

1) 食物網の解析

食物網の解析は炭素・窒素安定同位体比、胃内容物の観察、文献調査により行った。安定同位体比の測定は、スズキ、ボラ、マハゼ、ハゼクチ等の魚類は体全体、貝類や甲殻類は軟体部を分析対象とし、脱脂処理を行った後、機器測定を行った。胃内容物は、現場で魚類(スズキ、ボラ)の消化管を摘出した後、10%中性ホルマリン溶液に浸漬したものを顕微鏡観察に供した。

2) 水生生物の栄養段階とPOPsの蓄積の関係

窒素安定同位体比から各生物の栄養段階を推定し、PCB・PBDE・PFOSの蓄積との関連について解析を行った。栄養段階の算出について、基礎生産者である植物プランクトンの $\delta^{15}\text{N}$ は変動が大きいため、変動の小さい巻貝や二枚貝などの一次消費者を基礎として栄養段階を決定する手法が提案されている³⁾。本研究では既報³⁾を参考に各生物の栄養段階(TL)を式4より算出した。

$$\text{TL}_{\text{consumer}} = \left[\left(\delta^{15}\text{N}_{\text{consumer}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{snail}} / 3.4 \right) \right] + 2 \quad \text{式4}$$

ここで、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{consumer}}$ は消費者の $\delta^{15}\text{N}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{snail}}$ は巻貝の $\delta^{15}\text{N}$ を示す。

食物連鎖を通じた濃縮係数(Trophic magnification factor: TMF)は、水生生物の栄養段階と対数変換したPOPs濃度の間の回帰直線の傾き(式5)を式6に代入して求められる⁴⁾。TMFが1以上であれば食物連鎖を通じた生物濃縮が起こっていることを示し、1よりも小さければ生物濃縮が起こっていないことを示す。

$$\ln \text{POPs} = a + (b \times \text{TL}) \quad \text{式5}$$

ここで、TLは栄養段階、 a は切片、 b は傾き(TMf)を示す。

$$TMF = \exp^p$$

式6

3) 食物連鎖モデルの構築

a) 食物連鎖モデルの基本式

各種生物の体内濃度を予測するために食物網蓄積モデルを用いた。モデルを用いることで現場の水・底質中のPOPs濃度のばらつきを反映させた曝露評価が可能となる。モデルの基本構造はArnot and Gobas⁵⁾を参考にし、式7より水生生物中の化学物質濃度を計算した。化学物質の取込みは、水（溶存態）中の化学物質の呼吸器官を経由した取込みと餌中の化学物質の腸管を経由した取込みの2つの経路がある。一方、体内からの消失は、呼吸器官、フン、肝臓代謝による排泄・代謝経路に加えて、正味の消失ではないが、成長（体重増加）による体内濃度の希釈も考慮される。

$$dM_B / dt = \left\{ W_B \cdot (k_1 \cdot C_{WD} + k_D \cdot \sum P_i \cdot C_{D_i}) \right\} - (k_2 + k_E + k_M) \cdot M_B \quad \text{式7}$$

ここで、

M_B	魚体内中の化学物質質量 (g)
W_B	時間 t における魚体重 (kg)
k_1	呼吸器官（鰓と皮膚）を通した化学物質の取り込み速度定数 (L / (kg · day))
C_{WD}	水相における溶存態の化学物質の濃度 (g/L)
k_D	摂餌を通した化学物質の取り込み速度定数 (kg-diet/(kg-organism · d))
P_i	餌生物 i 種類からなる食物の構成比
$C_{D,i}$	餌生物 i 中の化学物質濃度 (g/kg)
k_2	呼吸器官（鰓と皮膚）を通した化学物質の消失速度定数 (1/day)
k_E	フンによる排泄を通した消失速度定数 (1/day)
k_M	化学物質の代謝変換速度定数 (1/day)

式7において定常状態（左辺 $dM_B/dt=0$ ）を仮定した場合は、魚体中の化学物質濃度は式8で表される。

$$C_B = \left\{ k_1 \cdot C_{WD} + k_D \cdot \sum P_i \cdot C_{D_i} \right\} / (k_2 + k_E + k_G + k_M) \quad \text{式8}$$

ここで、 C_B は魚体中の化学物質濃度 (g/kg、すなわち M_B/W_B)、 W_B は体重 (kg)、 k_G は成長速度定数 (1/day) である。

肝臓における化学物質の代謝変換による消失は、代謝速度定数 k_M (1/day) で表される。代謝変換プロセスは化学物質や生物種に依存するが、既存の報告値が極めて限られている。Arnot and Gobas⁵⁾では、この値を0と仮定しており、本研究においても $k_M=0$ として計算した。

b) 食物網の推定

対象地域の食物網は、有明海における各生物の食性調査に関する既報⁶⁻⁹⁾および本研究での胃内容物調査結果等を参考に構築した。

c) モデル式への入力値

対象地域は福岡県の大牟田川河口とし、本研究で得た当該地域の水溶存態・底質中のPCB・PBDE (#47)・PFOS濃度の平均値を入力値 (C_{w-diss} 、 C_{sed}) として用いた。PCBは異性体別に濃度予測を行った。リスク評価の際はサブテーマ (2) の毒性実験における化学物質と一致させるために、PCBは全209異性体の合計、PBDEは#47 (2,2',4,4'-tetrabrominated diphenyl ether) を対象として計算した。

対象生物は同地域に棲息するゴカイ (計算設定体重 0.5 g)、カニ (同 2 g)、マハゼ (同 20 g)、ハゼクチ (同 40 g)、ボラ (同 500 g)、スズキ (同 1 kg) とし、各生物中の予測濃度の検証には本研究で得た実測値を用いた。なお、各生物の雌雄判別が困難であったため、モデル計算には雌雄による成長速度の違いや産卵による影響は含めていない。

(5) 現場生物を用いたPOPsの毒性評価実験

野外調査において優占して棲息していたイトゴカイ (図(1)-3) を対象にPOPsの曝露実験を行った (図(1)-4)。イトゴカイは、世界各地に普遍的に棲息するコスモポリタン種であるため、本研究で得られる毒性影響に関する知見は世界のPOPs汚染地域に適用できる。さらに、イトゴカイは、塩基配列が解読されている、DNAマイクロアレイ用のチップが製造されているなど、他の沿岸生物と比較して大きなアドバンテージを有する。

実験に用いたイトゴカイは、20°Cに設定したインキュベーター内で魚類養殖用のドライペレット (ソフトEP TVS-3、メルシャン株式会社) を餌として与えた株 (培養密度 約1万個体/m²) を用いた。給餌は0.5 gを3日に1回程度行った。曝露試験を始める前日に、形態的特徴にもとづき成熟した雄のみを選別した。実験には、清浄な50 ml遠沈管を用い、事前にガラスビーズを10 mlと塩分を30%に調整した人工海水を40 ml加えた。それぞれの実験容器に対して選別したイトゴカイを10個体を入れ、約24時間人工海水 (SEALIFE、株式会社日本海水) 中に馴致した後、曝露試験を開始した。

PCB (KC-400)、PBDE (BDE #47)、PFOSの曝露原液の調整にはジメチルスルホキシド (DMSO) を用い、DMSOの濃度が0.1%となるように人工海水に溶解させた。水溶解性の高いPFOSの曝露海水は1時間、難水溶性であるPCB・PBDEの曝露海水は24時間以上スターラーで攪拌した後、イトゴカイの曝露実験に供した。曝露濃度 (公称値) は、PFOSについては対照区、0.1、1、10、100 mg/l、PCBについては対照区、0.001、0.01、0.1、1.0 mg/l、PBDEについては対照区、0.001、0.01、0.1、0.45 mg/lとした。72時間の止水式で曝露を行った後、サブテーマ (2) のDNAマイクロアレイ解析に供した。



図(1)-3 イトゴカイ



図(1)-4 イトゴカイの POPs 曝露実験の様子

(6) 生態リスク評価

1) PCB、PBDE、PFOSに対する既存の有害性情報の取得

PCB、PBDE、PFOS に対する水生生物への毒性情報の収集には米国環境保護庁（USEPA）の生態毒性データベース（ECOTOX¹⁵⁾を利用し、PCB（Aroclor1248（KC-400相当））、PBDE（BDE47）、PFOSの急性毒性値（半数致死濃度（LC₅₀））、慢性毒性値（最低影響濃度（LOEC）、無影響濃度（NOEC））を取得した。一般に、生態毒性試験によって得られるLOEC、NOECは曝露した媒体中の化学物質濃度によって表されるため、毒性試験における生物中の化学物質濃度を報告した研究例は限られる。そのため、生物体内濃度をベースとしたNOECはほとんど報告されていない。体内濃度の報告値がない場合は、数理モデルによって曝露濃度（水）からの魚体中濃度の推定し、魚類の体内濃度ベースのNOECを推定した。

2) 食物網蓄積モデルを用いたリスク評価

本研究では次の手順でリスク評価を行った。まず、水・底質濃度の実測データの分布に基づいて乱数（モンテカルロ法、1000回）を発生させ、現場水域でとりえる濃度を推定した。つぎに、推定した水・底質濃度を食物網蓄積モデルに代入し、各生物中の濃度を推定した。そして、ECOTOXや文献調査から体内濃度ベースの毒性値を取得あるいは数理モデルより予測し、得られた各生物の濃度分布と無影響濃度（NOEC）を照らし合わせて、NOECを超過する個体の割合を推定した。このNOEC超過割合を生態リスクとして評価した。解析はRおよびExcel 2010（Microsoft, USA）を用いて行った。

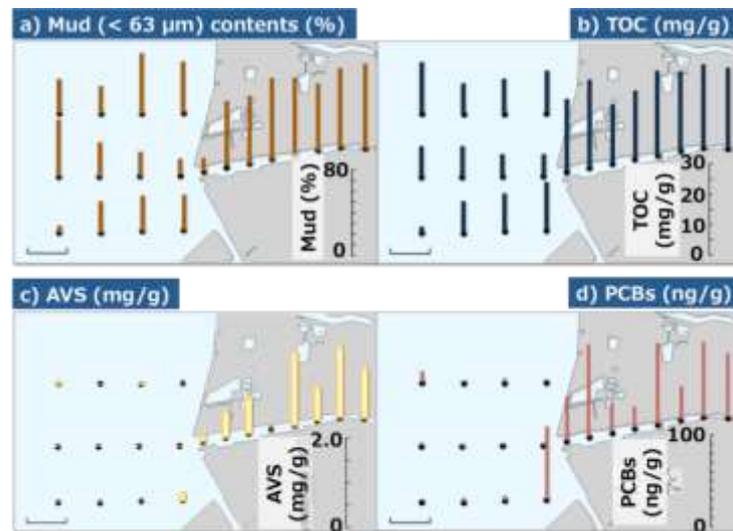
4. 結果および考察

(1) 河口域における物質循環、生物群集に関する研究

1) 底生動物群集の構造と底質中POP_s含有量の空間的特徴

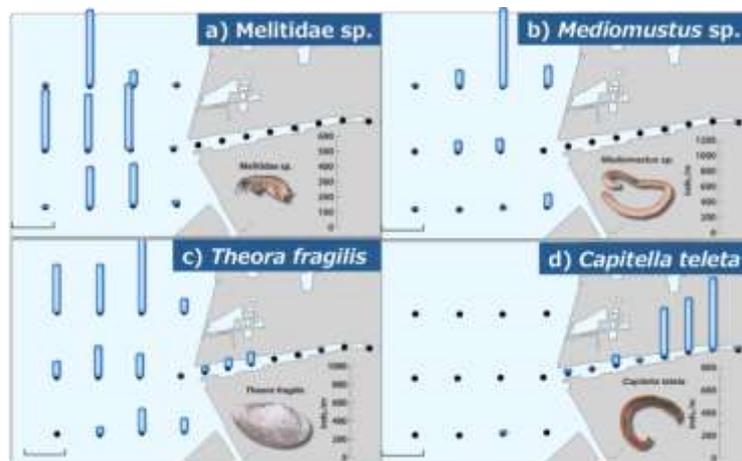
分布調査時において得られた堆積物の環境要因について、泥分（粒径63 μm未満）、全有機炭素含量(TOC)、酸揮発性硫化物態硫黄（AVS-S）および総PCB含量を代表例として図(1)-5a~dに示す。底質の特徴として、有明海側から大牟田川にかけて泥分およびTOCではそれぞれ33.5 ± 13.9 % (±S.D.)ならびに106 ± 4.0 mg/g (±S.D.) から緩やかに上昇し、河口から上流にかけて63.7 ± 18.9 % (±S.D.)ならびに25.2 ± 3.1 mg/g (±S.D.)に達した（図(1)-5a, b）。これに対して、AVSおよびPCBについては、有明海側ではそれぞれ0.04 ± 0.05 mg/g (±S.D.)ならびに10.3 ± 21.9 ng/g (±S.D.)とほ

とんど検出されなかったのに対して、河口よりも上流側においては 0.85 ± 0.60 mg/g (\pm S.D)ならびに 60.3 ± 29.3 ng/g (\pm S.D)へと急上昇した。



図(1)- 5 各調査定点における堆積物の(a) 泥分、(b) TOC、(c) AVS、(d) PCBs の分布

底生動物の特徴として、種数については有明海側から上流側に向けて種数が 19.3 ± 2.7 (\pm S.D.)から 11.8 ± 4.3 (\pm S.D.)へと減少した。底生動物の全採集個体数の中から選別された上位4種として、端脚類 (*Melitidae sp.*)、ホソイトゴカイ (*Mediomustus sp.*)、シズクガイ (*Theora fragilis*) およびイトゴカイ (*Capitella teleta*) の分布を図(1)-6に示す。*Melitidae sp.*および*Mediomustus sp.*は河口よりも有明海側の定点 (Stn 1~12) に生息しており、最大でそれぞれ992 inds./m²ならびに501 inds./m²達した。シズクガイの分布域は河口から上流側の調査定点 (Stn 2~15) と、幅広い範囲で生息が確認された。これに対して、イトゴカイの分布域はほとんどが上流側の調査定点 (Stn 13~20) に限定されていた。



図(1)- 6 底生動物の優占種(a) *Melitidae sp.*、(b) *Mediomustus sp.*、(c) *Theora fragilis*、(d) *Capitella teleta* の分布

底生動物群集の定量調査の結果をもとに、多次元尺度法による類型化を行った。底生動物群集は、地理的区分に応じて大きく3つのグループ（外側、中間、上流側）に分けられた。環境要因との対応関係を示したところ、底生動物群集は環境傾度（第一主成分と対応）によく対応することが示された。

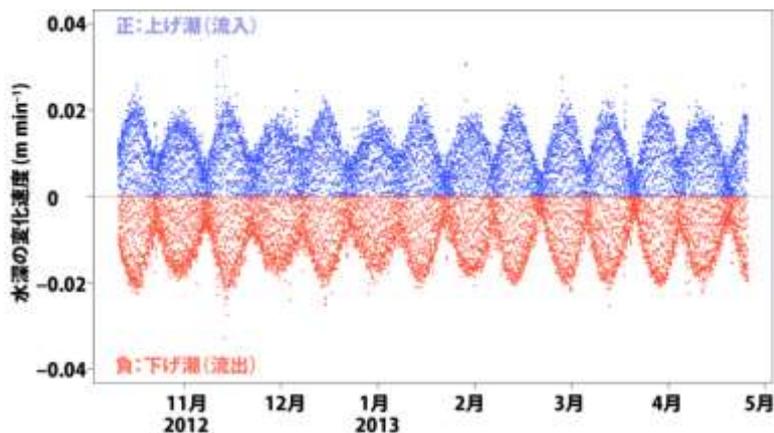
本研究域において、上流側における優占種は堆積物食者のイトゴカイであった。堆積物表層に含まれるPCB含量は他の海域と比べても大きな違いは無いが、本研究域では重要な環境要因の1つとしてPCBが選択された。このことから、堆積物食者にとっては、摂餌を通して低濃度のPCBに曝露されている可能性が示された。

2) 河口域における流量測定

期間中に得られた水深の時間変化より、観測場所において大潮時には1潮汐で最大3 mに達する潮位差があり、小潮時であっても約1 m程度の潮位差が確認された。干満差が大きいことから、塩分も潮汐周期に応じて5から33の範囲を変動した。さらに、大潮時には比較的高塩分であり、小潮時には低塩分化する傾向が示された。DOについても、潮汐周期に応じて変動すると共に、冬季から春季にかけて上昇する明瞭な季節変動パターンを示した。

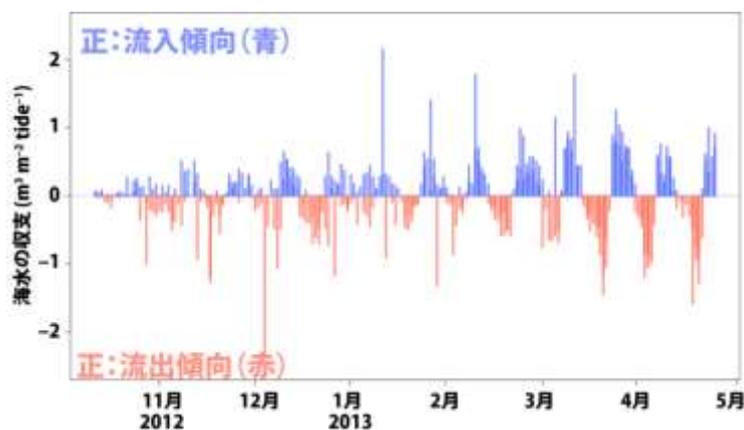
得られた水深データを時間で微分することで算出した水深の変化速度を図(1)-7に示す。変化速度は大潮時に高く、小潮時に低く、上げ潮時と下げ潮時にはそれぞれ正ならびに負の値を示した。塩分をもとに、観測した水に含まれる海水の割合を算出し、水深の変化速度を乗じて求めた一潮汐間における海水の収支を図(1)-8に示す。海水の収支について正と負の値を示す時期は連続し、およそ1週間程度で入れ替わる周期性を示した。

DOの収支については、10月から1月にかけては概ね負の値を示し、内部で酸素消費過程が卓越することが示された。青で示された海水の流入時期において、物理的には海水の流入量が増えることからDOの供給量も増加するはずではあるが、収支を計算すると、海水の供給パターンとは変動が一致しないことが見て取れる。このことは、大牟田川河口域において、物理的なプロセスに伴う酸素の輸送に比べて、河口よりも上流側において生物・化学的な過程による酸素消費の卓越が示唆された。さらに、DOの顕著な上昇が確認された2月から3月にかけては、DOの消費および生産について明瞭な傾向がなく、日変動も大きくなることが示された。このことは、春期にかけて生物過程が活性化し、基礎生産による酸素の供給と有機物の好氣的な分解による酸素の消費の日変動が大きくなったためであると考えられる。



図(1)-7 水深の変化速度の時間変化

青色と赤色のプロットはそれぞれ上げ潮と下げ潮を示す。



図(1)-8 海水の収支の日変化

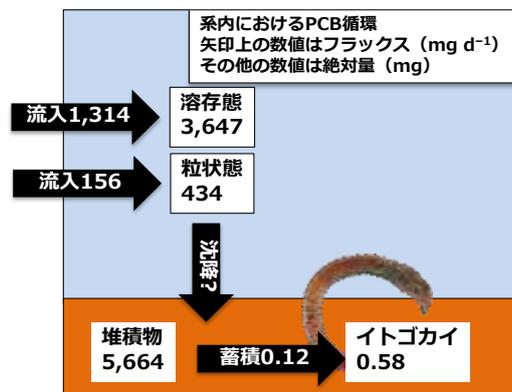
青色と赤色のプロットはそれぞれ海からの流入量が正の場合と負の場合を示す。

3) POPsのフラックスの定量

大牟田川河口域におけるPCBの循環について、移流と生物による取り込み量についての試算結果を図(1)-9に示す。系内におけるPCBのマスバランスの特徴としては、溶存態および堆積物として蓄積されているPCBの絶対量が水中懸濁態を大きく上回る点である。イトゴカイの体内における蓄積量は、水中および堆積物中の1000分の1未満となり、生物体としての蓄積量が小さいことが示された。水の収支をもとに試算した溶存態および粒状態PCBのフラックスについては、それぞれ存在量の約3分の1が系外から流入することが示された。今回の調査では、粒子の沈降フラックスについて定量していないため、水中—堆積物間におけるPCBの交換について、定量的な議論はできないが、本研究域が高濁度域であり、懸濁粒子濃度が高いことを踏まえると、PCBの沈降量も大きいことが可能性として考えられる。

個体群動態モデルおよび現場における生息密度をもとに推定したイトゴカイによるPCB蓄積速度は 0.12 mg d^{-1} となり、1日でイトゴカイの体内における存在量の約4分の1に達する結果となった。このように現存量に対して高い取り込み速度を示した理由として、イトゴカイは日和見種であり、

高い成長速度を示すことが重要であると考えられる。



図(1)-9 大牟田川河口域における PCB のマスバランスの概要

(2) 対象地域における POPs 濃度

1) 水試料

総PCB濃度（懸濁態と溶存態の合計値）の平均値は6,800 pg/L ($n = 19$) であり（表(1)-2）、日本全国の沿岸域の濃度¹⁰⁾の平均値と比較して約16倍高かった。懸濁態PCB濃度は 850 ± 820 pg/L、溶存態PCB濃度は $5,900 \pm 13,000$ pg/Lであり、溶存態PCB濃度の方が懸濁態よりも高い値を示した。PCB濃度の水平分布は、河川中流のStn 23から海域のStn 2に向かって懸濁態の表層・底層ならびに溶存態の表層については漸減する傾向にあった。一方、溶存態の表層のPCB濃度については、河口付近のStn 8、Stn 13で顕著に高い濃度を示した。

総PBDE濃度（懸濁態と溶存態の合計値）は800 pg/L ($n = 10$) であり、日本全国の沿岸域の濃度¹⁰⁾の平均値と比較してほぼ同等であった。懸濁態PBDE濃度は 340 ± 710 pg/L、溶存態PBDE濃度は 420 ± 690 pg/Lであり、懸濁態と溶存態でPBDE濃度はほぼ同等であった。PBDE濃度の水平分布は、河口のStn 13から海域のStn 2に向かって漸増する傾向にあった。PBDEの分布は、PCBの分布と大きく異なった。対象地域におけるPCB・PBDEの排出源や懸濁態と溶存態の分配挙動も含めた輸送過程などの違いによって水平分布に差が表れたものと考えられる。

PFOS濃度（溶存態）は 2600 ± 1500 pg/L ($n = 19$) であり、日本全国の沿岸域の幾何平均値（490 pg/L、 $n = 64$ ）¹¹⁾よりも高い値を示した。

2) 底質試料

PCB濃度は 40 ± 33 ng/g-dw ($n = 4$) であり、日本全国の沿岸域の濃度¹⁰⁾の平均値と比較してほぼ同等であった（表(1)-2）。PCB濃度の水平分布は、河川中流のStn 18から海域のStn 2に向かって減少する傾向にあり、水試料の傾向（溶存態表層試料を除く）と一致した。PBDEs濃度は 2.8 ± 2.4 ng/g-dw ($n = 4$) であり、日本全国の沿岸域の濃度¹⁰⁾の平均値と比較して低い値であった。PBDE濃度の水平分布は、河口のStn 13から海域のStn 2に向かって漸増する傾向にあった。PBDEの分布は河川のStn 18よりも海域のStn 2で高い傾向にあり、水試料の傾向と一致した。PFOS濃度は 48 ± 39 pg/g-dw ($n = 3$) であり、日本全国の沿岸域の濃度¹¹⁾における平均値よりも低い値であった。

3) 生物試料

総PCB濃度についての各生物の平均値は1500 (ハゼクチ) ~5400 (スズキ) ng/g-lipidであった (表(1)-3)。総PCB濃度はボラ、スズキといった大型の生物で高い値を示した。スズキの筋肉 ($n=3$) は、全国値¹⁰⁾と比較して平均値では低いものの中央値では約2倍高い値を示した。総PBDE濃度は89 (ヒイラギ) ~140 (ハゼクチ、スズキ) ng/g-lipidであった (表(1)-3)。総PCB濃度ではカニ、ヒイラギ、ハゼグチとその他の魚類で濃度差が見られたが、総PBDE濃度では魚種間で大きな差は見られなかった。PFOS濃度についての各生物の平均値は16 (フトヘナタリ) ~2700 (ボラ) ng/g-wetであった (表(1)-3)。環境省の調査¹¹⁾における魚類中PFOSの幾何平均値 ($n=64$) は0.39 ng/g-wetであり、本研究と同等の値であった。

表(1)-2 水・底質中の PCB・PBDE・PFOS 濃度

	水 ^a (溶存態+懸濁態)	水 ^b 溶存態	水 ^b 懸濁態	底質 ^b
SS (mg/L)	—	—	157 ± 23	
PCB (pg/L)				
#3	60	33 ± 60	27 ± 44	1300 ± 1300
#8/#5	340	250 ± 470	91 ± 240	2500 ± 2100
#28	210	180 ± 500	27 ± 16	1200 ± 760
#52/#69	210	180 ± 420	31 ± 24	2100 ± 1800
#70	250	210 ± 520	42 ± 37	490 ± 490
#98/#95	110	100 ± 240	10 ± 6.3	190 ± 190
#118	88	70 ± 180	18 ± 14	1100 ± 950
#153	220	210 ± 530	13 ± 8.6	470 ± 370
#138	150	140 ± 370	10 ± 6.6	410 ± 360
#180	200	190 ± 490	10 ± 8.4	220 ± 140
#194	26	23 ± 57	3.2 ± 6.0	42 ± 18
#209	3.3	0.7 ± 1.8	2.6 ± 3.8	190 ± 190
ΣPCB	6800	5900 ± 13000	850 ± 820	40000 ± 33000
PBDE (pg/L)				
#28/#33	19	14 ± 13	5.2 ± 8.4	96 ± 42
#49	4.8	ND	4.8 ± 11	38 ± 30
#47	41	30 ± 37	11 ± 11	74 ± 31
#100	4.2	ND	4.2 ± 11	16 ± 20
#99	0.5	0.5 ± 1.2	9.6 ± 17	91 ± 24
#154	32	27 ± 50	4.9 ± 14	100 ± 120
#153	57	48 ± 81	9.4 ± 22	220 ± 120
#183	75	62 ± 83	13 ± 28	60 ± 120
#209	127	75 ± 200	52 ± 170	130 ± 260
ΣPBDE	800	470 ± 650	330 ± 710	2800 ± 2400
PFOS (pg/L)	—	2600 ± 1500	—	48 ± 39

^a平均値、^b平均値±標準偏差

表(1)-3 生物中の PCB・PBDE・PFOS 濃度

	フトヘ ナタリ ^a	ヒイラギ ^a	ハゼクチ	マハゼ	スズキ	ボラ
<i>n</i>	10	5	3	4	7	3
標準体長 (mm) ^b	—	47 ± 6	157 ± 23	115 ± 7.1	310 ± 209	174 ± 4.9
湿重量 (g-wet) ^b	—	2.7 ± 0.9	46 ± 16	20 ± 4	1110 ± 1730	90 ± 3.9
年齢 (year) ^b	—	—	1.3 ± 0.5	0	1.6 ± 1.5	0.7 ± 0.6
脂質含量 (% wet weight) ^b	0.58	2.4	0.83 ± 0.34	1.17 ± 0.57	4.95 ± 3.37	1.21 ± 0.79
δ ¹⁵ N ^b	8.7	11 ± 0.91	11 ± 2.1	10 ± 1.7	13 ± 1.8	7.2 ± 2.3
栄養段階 ^{1b}	2.0	3.0 ± 0.27	2.8 ± 0.62	2.6 ± 0.51	3.5 ± 0.52	1.8 ± 0.68
PCB (ng/g-lipid) ^b						
#3	2.8	4.8 ± 3.0	0.63 ± 0.58	3.1 ± 1.0	12 ± 1.3	5.6 ± 2.6
#8/#5	14.6	71 ± 58	12 ± 3.7	26 ± 13	140 ± 100	96 ± 66
#28	ND ^c	53 ± 12	24 ± 8.4	80 ± 18	110 ± 97	81 ± 54
#52/#69	130	190 ± 42	96 ± 30	330 ± 53	350 ± 130	370 ± 300
#70	170	120 ± 29	45 ± 14	190 ± 67	200 ± 120	350 ± 280
#98/#95	42	19 ± 2.5	25 ± 4.9	85 ± 20	68 ± 24	66 ± 45
#118	150	170 ± 46	82 ± 19	150 ± 40	200 ± 110	160 ± 150
#153	140	190 ± 52	90 ± 33	120 ± 70	180 ± 120	130 ± 100
#138	120	130 ± 49	65 ± 24	75 ± 9.9	120 ± 68	100 ± 94
#180	35	40 ± 15	23 ± 17	9.5 ± 11	45 ± 28	39 ± 34
#194	4.1	4.8 ± 1.9	2.7 ± 1.7	3.7 ± 1.9	7.3 ± 6.2	6.8 ± 6.1
#209	8.4	4.4 ± 0.5	2.8 ± 1.4	8.0 ± 4.3	22 ± 19	18 ± 20
ΣPCB	2300	3100 ± 840	1500 ± 490	3800 ± 2000	5400 ± 2300	5000 ± 3900
PBDE (ng/g-lipid) ^b						
#28/#33	11	26 ± 15	21 ± 13	16 ± 28	27 ± 20	26 ± 14
#49	2.4	1.0 ± 1.1	ND ^c	6.4 ± 5.7	2.4 ± 4.2	1.5 ± 2.6
#47	6.8	29 ± 33	48 ± 30	55 ± 24	57 ± 39	56 ± 36
#100	1.0	2.8 ± 3.5	4.0 ± 3.0	6.5 ± 1.8	7.3 ± 6.0	4.2 ± 1.8
#99	2.2	4.6 ± 4.5	11 ± 6.5	23 ± 14	4.9 ± 2.9	3.6 ± 2.3
#154	ND ^c	3.6 ± 1.5	5.0 ± 3.0	6.0 ± 4.9	6.0 ± 4.1	3.0 ± 2.6
#153	6.8	1.0 ± 1.5	2.2 ± 1.9	ND ^c	4.0 ± 2.0	2.0 ± 2.1
#183	3.3	0.88 ± 0.028	4.4 ± 4.5	0.84 ± 0.7	2.8 ± 4.7	0.57 ± 0.39
#209	74	4.8 ± 6.8	4.2 ± 7.2	ND ^c	11 ± 13	3.0 ± 3.5
ΣPBDE	128	89 ± 80	140 ± 74	132 ± 71	140 ± 80	120 ± 68
PFOS (ng/g-lipid) ^b	16 ± 12	—	2600 ± 2100	1500	970 ± 590	2700 ± 2200

^a 混合試料^b 平均 ± 標準偏差^c 不検出

(3) 食物連鎖を通じた生物濃縮の解析および食物網蓄積モデルの構築

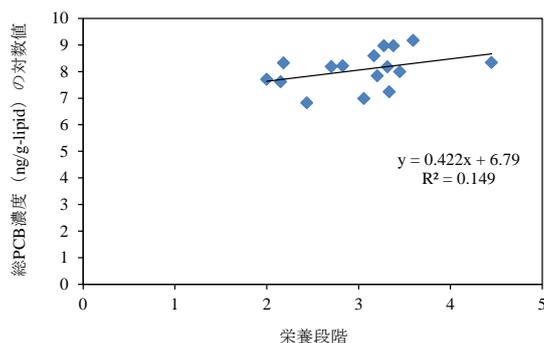
1) 食物網解析

対象地域において採取した生物の $\delta^{13}\text{C}$ は -22.0 (ホソイトゴカイ) $\sim -11.5\text{‰}$ (クモヒトデ) の範囲であった。底質は -22.9‰ であり、オキシジミやホソイトゴカイに近い値を示した。 $\delta^{15}\text{N}$ は 7.2 (オキシジミ、ボラ) $\sim 12.8\text{‰}$ (スズキ) の範囲であり、スズキが最も高い値を示した。 $\delta^{15}\text{N}$ は概して 3.4‰ 上昇するごとに栄養段階が1上昇すると言われているが、対象地域ではオキシジミやボラが下位の消費者であると考えられた。これらの1つ上の栄養段階はマハゼやハゼクチ、最上位はスズキであると考えられた。

胃内容物は、スズキについてはエビ類、カニ類などの甲殻類のほか、ハゼ科などの硬骨魚類が観察された。これらの生物はスズキの下位に位置しており、炭素・窒素安定同位体比の結果を反映していた。また、本調査の結果は、有明海で採捕したスズキの胃内容物を調査結果⁶⁾と同様の傾向(アミ類55%、エビ類8%、シャコ類9%、その他甲殻類2%、魚類26%(著者による図からの読み取り値))であった。ボラについては、消化管内に底質が含まれていたが、顕微鏡観察にて珪藻を含むデトリタスが胃内容物として確認された。胃内容物調査に供した個体以外のボラにおいても消化管内には底質が詰まっており、当該調査域においてボラは底質上に存在する珪藻を含むデトリタスを主に食しているものと考えられた。

2) 各生物の栄養段階とPOPsの蓄積の関係

窒素安定同位体比の測定結果に基づき、各生物の栄養段階を推定した。本研究では底生藻食者の巻貝であるフトヘナタリを一次消費者と設定し、他の生物の栄養段階を推定した。各生物の栄養段階と総PCB濃度の関係を図(1)-10に示す。生物中のPCB濃度は栄養段階が上昇するにつれて緩やかに増加し、調査対象地域において総PCBが食物連鎖を通して濃縮されていることが明らかになった。PBDE、PFOSについても同様の傾向が認められた。

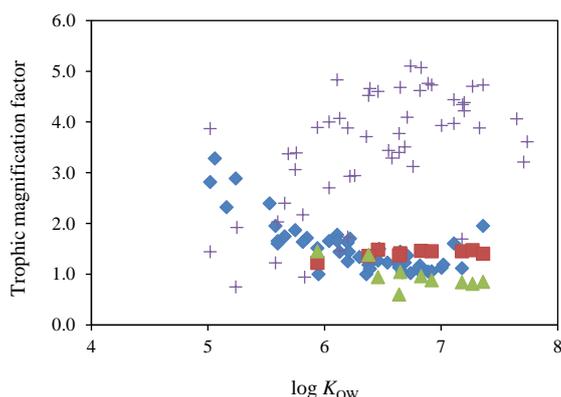


図(1)-10 生物の栄養段階と PCB 濃度の関係

TMFは、総PCBは1.52、PCB異性体 ($n = 58$) は 0.9 (#177) ~ 3.28 (#9) であった。総PCBのTMFはTwelvemile Creekにおける河川生態系で観察されたTMF¹²⁾と同等であった。PCB異性体のTMFはNorthwater polynya⁴⁾、ハドソン湾¹³⁾で観察された値よりも低い値であった。TMFは食物網の構造や食物連鎖長によって変化することが報告されている。Northwater polynya⁴⁾、ハドソン湾¹³⁾で観察されたTMFは、海鳥や海洋ほ乳類などの高次消費者を含むため食物連鎖長が長いのに対して、

本研究では食物連鎖長が2（巻貝）～3.6（スズキ）と短いこともTMFの算出に影響していると考えられる。PBDEの全異性体の合計値は1.17、値の得られた各異性体（ $n=7$ ）は0.46（#183）～1.66（#100、#154）であった。また、PFOSのTMFは8を示し、PCBやPBDEよりも高い値であった。この原因の1つとして、PFOSはPCBやPBDEと比較して体内濃度が平衡に達する時間が短いことが考えられる。

PCB異性体のTMFと $\log K_{ow}$ の関係を図(1)-11に示す。多くの異性体でTMFは1を上回り、食物連鎖を通して生物濃縮されていることが示された。PCB異性体のTMFは $\log K_{ow}$ が増加するにしたがって減少する傾向がみられた。この結果は、脂溶性の高いPCB異性体ほど食物連鎖を通して濃縮しにくいことを示している。これまでの既報^{14, 15)}の多くでは脂溶性の高い化学物質のほど食物連鎖を通して濃縮する傾向がみられておるが、本研究の結果は既報の結果と一致しなかった。しかし、バルト海の表層食物連鎖では $\log K_{ow}$ とTMFは正の相関を示したのに対し、底層食物連鎖では負の相関を示し¹⁵⁾ており、TMFは対象とする食物連鎖によって大きく変化するものと考えられた。本研究で対象としている河口域は複数の食物連鎖が混合しており、また移動性の大きい生物も存在する。そのため、特に $\log K_{ow}$ の大きいPCB異性体については、上位捕食者中のPCB濃度が定常状態に達していない可能性も考えられる。



図(1)- 11 PCB 異性体に対する TMF と $\log K_{ow}$ の関係

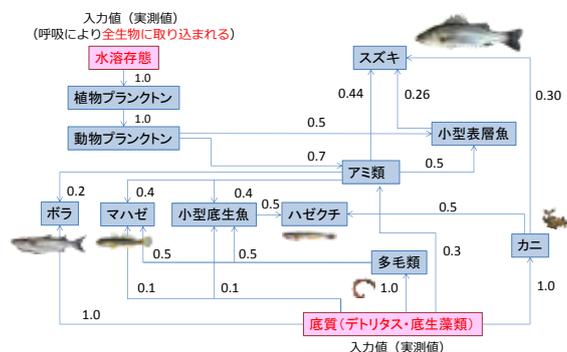
◆本研究、■バルト海 表層食物連鎖¹⁵⁾、▲バルト海 底層食物連鎖¹⁵⁾、+ 中国の淡水¹⁴⁾

3) 食物網蓄積モデルを用いた水生生物中のPOPs濃度の予測

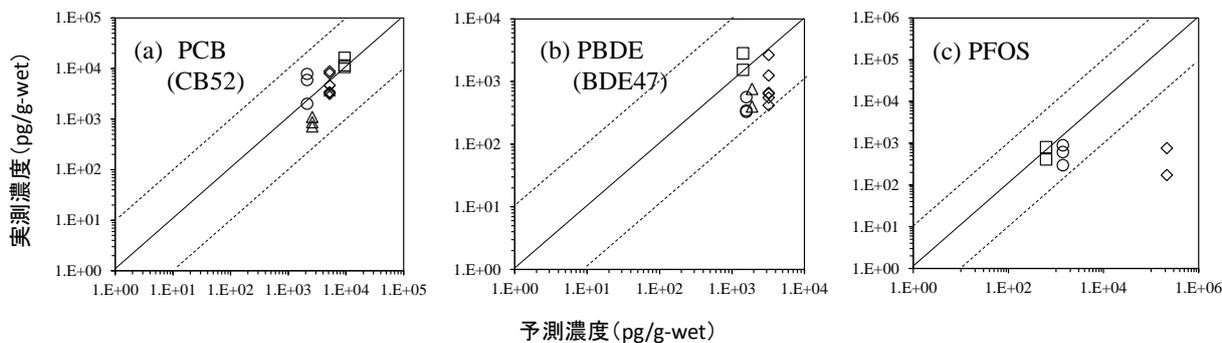
食物網解析や文献調査にもとづいて現場の食物網を構築し（図(1)-12）、食物網蓄積モデルにより各生物の体内中POPs濃度を予測した。PCB（#52）、PBDE（#47）の各生物に対するモデル予測値と実測値の比較を図(1)-13(a)、(b)に示す。いずれの生物においても予測値は実測値の1/10～10倍の範囲に収まり、本研究の食物網蓄積モデルの予測精度は比較的高いことが示された。しかし、本研究のモデルは定常状態を仮定しているため、対象水域で定常状態に達していないと考えられる高塩素のPCB異性体については予測値が実測値を上回る傾向にあった。

PFOSの各生物に対するモデル予測値と実測値の比較を図(1)-13(c)に示す。ボラ、マハゼにおいて、予測値は実測値の1/10～10倍の範囲に収まったが、スズキは過大推定（100倍程度）となり、魚種によって予測精度が異なった。この原因の一つとして、モデルの本質的なパラメーターである呼吸器官経由および腸管経由のPFOSの取り込み速度定数の報告値が限られている¹⁶⁾ことが挙げ

られる。水生生物に対するPFOSの室内曝露実験によって、より精度の高い取り込み速度定数を取ることがモデル予測精度の向上に貢献すると考えられる。



図(1)-12 食物網蓄積モデルにおいて適用した対象水域の食物網
図中の数値は餌の構成比を示す。



図(1)-13 PCB (#52) の各生物に対するモデル予測値と実測値の比較
□ボラ、◇スズキ、△ハゼクチ、○マハゼ

(4) 対象水域における生態リスク評価

食物網蓄積モデルによる曝露評価・リスク評価は、比較的高い精度で予測が可能であったPCB・BDE47を対象とした。PFOSについては食物網蓄積モデルの予測精度が低く、さらにハザード比による初期評価においてもリスクが低いと判断されたため、食物網蓄積モデルを用いたリスク評価は行わなかった。生態リスクは、食物網蓄積モデルを用いて各生物の曝露評価を行った後、NOECの値と照らし合わせ、その超過確率として表した。当該水域において栄養段階が上位のスズキ、現場での優占種のイトゴカイを代表生物としてリスク評価を行った。

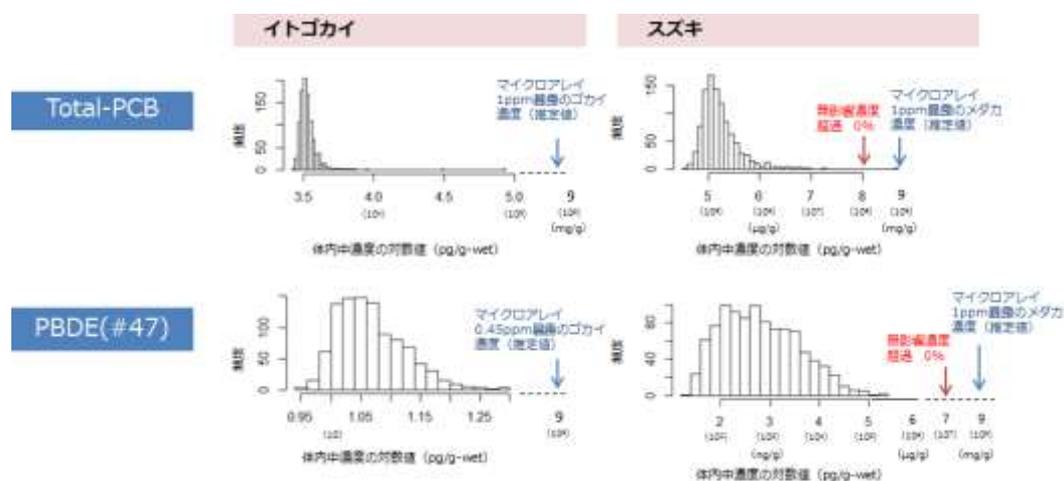
総PCBのNOECについては、文献調査結果をもとにファットヘッドミノーのNOEC 2.2 $\mu\text{g/l}$ ¹⁷⁾を採用した。体内濃度への変換にあたっては、ファットヘッドミノーに対するAroclor1248の生物濃縮係数(60,000)¹⁸⁾を用いた。ファットヘッドミノーのNOEC 2.2 $\mu\text{g/l}$ に生物濃縮係数60000を乗じ、体内中PCB濃度132 $\mu\text{g/g-ww}$ を得た。この体内中PCB濃度(132 $\mu\text{g/g-ww}$)をNOECとして用いた。BDE47のNOECについては、文献調査結果をもとにファットヘッドミノーの血漿中のチロキシンの減少に対するNOEC 11 $\mu\text{g/g-ww}$ ¹⁹⁾を用いた。

生態リスク評価の結果を図(1)-14に示す。総PCBについては、曝露評価の結果、スズキの体内濃

度（全身）は概ね $10^4 \sim 10^7$ pg/g-wetの範囲にあると推定され、NOEC (1.32×10^8 pg/g-ww) を超過する割合は全体の0%と推定された。このことから対象水域における総PCBのスズキに対する生態リスクは低いと考えられる。なお、参考までにサブテーマ（2）においてKC-500をメダカに曝露した試験において、体内中の総PCB濃度を推定したところおよそ 10^9 pg/g-wetのオーダーとなり、スズキの曝露評価の最大濃度よりも2桁高い値であった。一方、イトゴカイについて曝露評価を行った結果、体内中の総PCB濃度は 10^3 pg/g-wetのオーダーであると推定された。サブテーマ（2）のイトゴカイ曝露実験において遺伝子レベルで発現変動がみられた濃度は1 mg/lであり、この際のイトゴカイの体内濃度は 10^9 pg/g-wwのオーダーと推定され、曝露評価の値と 10^6 程度差があることから総PCBのイトゴカイに対するリスクは低いと考えられた。

BDE47については、曝露評価の結果、スズキの体内濃度は概ね $10 \sim 10^6$ pg/g-wetの範囲にあると推定され、NOEC (1.1×10^7 pg/g-ww) を超過する割合は全体の0%であると推定された。このことからBDE47のスズキに対する生態リスクは低いと考えられた。なお、サブテーマ（2）においてBDE47をメダカに曝露した試験において、メダカ中のPBDE濃度を推定したところおよそ 10^9 pg/g-wetのオーダーとなり、スズキの曝露評価の最大濃度よりも3桁高い値であった。一方、イトゴカイについて曝露評価を行った結果、体内中のBDE47濃度は10 pg/g-wetのオーダーであると推定された。サブテーマ（2）のイトゴカイ曝露実験において遺伝子レベルで発現変動がみられた濃度は0.45 mg/lであり、この際のイトゴカイの体内濃度は 10^9 pg/g-wwのオーダーと推定され、曝露評価の値と 10^8 程度差があることからBDE47のイトゴカイに対するリスクは低いと考えられた。

今後さらに精緻なリスク評価を行うためには、現場生物を用いた毒性試験法の整備、体内濃度ベースの毒性影響濃度の集積、毒性影響濃度の種間差の補正方法の確立などが求められる。



図(1)- 14 PCB、BDE47 のスズキとイトゴカイに対する生態リスク評価の結果

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

野外調査結果に基づき現場におけるPCBのフラックスを明らかにした。生物を含めたフラックスに関する知見は限られており、POPsの環境動態および生物移行を理解するうえで貴重なデータとなる。また、食物連鎖を通じた化学物質の濃縮係数（TMF）は、一般に化学物質の疎水性が強い

物質ほど値が大きくなると考えられていたが、河口域ではこの傾向とは逆の傾向を示すことを明らかにした。さらに、現場の水・底質のPCB・PBDE・PFOS濃度から食物網を通して各種生物中濃度の予測する食物網蓄積モデルを構築し、生物の体内濃度に基づいて生態リスク評価を行う手法を提案した。また、公的な毒性影響試験法の少ない海洋生物について、現場生物のイトゴカイを用いた試験方法を構築した。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

多様な生物に対する化学物質のリスク管理は、化学物質による人の健康や環境への影響の最小化に資する。本研究で用いた食物網蓄積モデルは多様な生物に対する様々な化学物質の曝露評価を可能とし、生物中の体内濃度に基づいた生態リスクを評価することができ、本手法は生態リスク評価の高度化に寄与できる。また、毒性影響試験に関する報告が少なく、知見の集積が求められている海洋生物を対象に、イトゴカイを用いた生態影響試験方法を構築したことにより、幅広い生物種に対する生態影響試験が可能となった。今後の試験方法の標準化・高度化に大きく寄与できる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) J. Kobayashi, Y. Imuta, T. Komorita, H. Ishibashi, K. Yamada, F. Ishihara, N. Nakashima, J. Sakai, K. Arizono, M. Koga: *Chemosphere*, 118, 201-206 (2015)

“Trophic-magnification of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in an estuarine food web of the Ariake Sea, Japan”

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 小森田智大、小林淳、石橋弘志、中島尚哉、石原史隆、伊牟田優希、古賀実、堤裕昭：2012年度日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会（2012）
「大牟田川河口域における水質・底質の環境要因の空間分布と底生動物群集の関係」
- 2) T. Komorita, J. Kobayashi, H. Ishibashi, N. Nakajima, H. Ishihara, Y. Imuta, A. Umehra, M. Koga, H.

Tsutsumi: The First Asian Marine Biology Symposium, Phuket, Thailand, 2012

“Spatial distribution of macro zoobenthos community related to the environmental variables surround a mouth of a small river, southern Japan.”

- 3) 小林淳、小森田智大、中島尚哉、石原史隆、伊牟田優希、梅原亮、石橋弘志、有菌幸司、古賀実：第22回環境化学討論会（2013）
「有明海の河口域における残留性有機汚染物質の空間分布と分配」
- 4) 伊牟田優希、小林淳、小森田智大、中島尚哉、石原史隆、梅原亮、石橋弘志、有菌幸司、古賀実：第22回環境化学討論会（2013）
「有明海の河口域に棲息する水生生物への残留性有機汚染物質の蓄積解析」
- 5) 石原史隆、小林淳、小森田智大、中島尚哉、伊牟田優希、梅原亮、石橋弘志、有菌幸司、古賀実：第22回環境化学討論会（2013）
「海産魚類における残留性有機汚染物質の体内分布特性」
- 6) 小林淳、小森田智大、石橋弘志、有菌幸司、古賀実：第23回環境化学討論会（2014）
「有明海の河口域におけるポリ塩化ビフェニルの食物網蓄積モデルの構築と検証」
- 7) 川中理可、小林淳、石原史隆、櫻井健郎、小森田智大、石橋弘志、有菌幸司、古賀実：第23回環境化学討論会（2014）
「汽水域に棲息する多毛類のポリ塩化ビフェニルの取込み経路と体内動力学」
- 8) 石原史隆、小林淳、小森田智大、石橋弘志、有菌幸司、古賀実：第23回環境化学討論会（2014）
「魚類におけるポリ臭素化ジフェニルエーテルの体内分配に及ぼす代謝の影響」
- 9) 伊牟田優希、小林淳、小森田智大、山田勝雅、石橋弘志、有菌幸司、古賀実：第23回環境化学討論会（2014）
「大牟田川河口域における残留性有機汚染物質の食物連鎖蓄積について」
- 10) 前田佳貴、伊牟田優希、石原史隆、中島尚哉、小林淳、小森田智大、石橋弘志、有菌幸司、古賀実：第23回環境化学討論会（2014）
「有明海河口域における有機フッ素化合物の生物蓄積」
- 11) 小森田智大、小林淳、伊牟田優希、石原史隆、中島尚哉、石橋弘志、堤裕昭：日本海洋学会秋季大会（2014）
「河口域におけるポリ塩化ビフェニル(PCBs)の動態」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Yentsch, C.S. and Menzel, D.W.: Deep-Sea Research 10, 221–231 (1963)
“A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence”
- 2) Tsutsumi, H., Fukunaga, S., Fujita, N., Sumida, M.: Marine Ecology Progress Series 63, 157–162 (1990)
”Relationship between growth of *Capitella* sp. and organic enrichment of the sediment”
- 3) Post, D.M.: Ecology 83, 703–718 (2002)
“Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions”
- 4) Fisk, A.T., Hobson, K.A., Norstrom, R.J.: Environ. Sci. Technol. 35, 732–738 (2001)
“Influence of chemicals and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the Northwater Polynya marine food web”
- 5) Arnot, J.A. and Gobas, F.A.P.C.: Environ Toxicol Chem 23, 2343–2355 (2004)
“A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystem”
- 6) 環境省：有明海・八代海等総合調査評価委員会海域再生対策検討作業小委員会（第2回）
配付資料（2012）
- 7) 日本魚類学会自然保護委員会編：干潟の海に生きる魚たち 有明海の豊かさと危機、東海大学出版（2009）
- 8) 大谷壮介、上月康則、仲井薫史、石山哲、村上仁士：海岸工学論文集 53、1056–1060（2006）
「干潟の底生微細藻類量の季節変動に及ぼすヤマトオサガニの摂餌圧の影響に関する考察」
- 9) 高橋一生：日本プランクトン学会報 51、46–72（2004）
「淡水・沿岸域におけるアミ類の摂餌生態（総説）」
- 10) 環境省：平成21年度版 化学物質と環境（2010）
- 11) 環境省：平成22年度版 化学物質と環境（2011）
- 12) Walters, D.M., Fritz, K.M., Johnson, B.R., Lazorchak, J.M.: Environ. Sci. Technol. 42, 2316–2322 (2008)
“Influence of trophic position and spatial location on polychlorinated biphenyl (PCB) bioaccumulation in a stream food web”
- 13) Kelly, B.C., Ikonomou, M.G., Blair, J.D., Gobas, F.A.P.C.: Sci. Total Environ. 401, 60–72 (2008)
“Bioaccumulation behavior of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in a Canadian Arctic marine food web”
- 14) Wu, J.P., Luo, X.J., Zhang, Y., Yu, M., Chen, S.J., Mai, B.X., Yang, Z.Y.: Environ. Pollut. 157, 904–909 (2009)
“Biomagnification of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls in a highly contaminated freshwater food web from South China”

- 15) Nfon, E., Cousins, I.T., Broman, D.: *Sci. Total Environ.* 397, 190–204 (2008)
“Biomagnification of organic pollutants in benthic and pelagic marine food chains from the Baltic Sea”
- 16) Sakurai, T., Kobayashi, J., Kinoshita, K., Ito, N., Serizawa, S., Shiraishi, H., Lee, J.H., Horiguchi, T., Maki, H., Mizukawa, K., Imaizumi, Y., Kawai, K., Suzuki, N.: *Environmental Toxicology and Chemistry* 32, 2009–2017 (2013)
“Transfer kinetics of perfluorooctane sulfonate (PFOS) from water and sediment to a marine benthic fish, marbled sole (*Pseudopleuronectes yokohamae*)”
- 17) DeFoe, D.L., Veith, G.D., Carlson, R.W.: *J. Fish Res. Board Can.*, 35, 997–1002 (1978)
“Effects of Aroclor[®] 1248 and 1260 on the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*)”
- 18) 環境省：第2回 POPs 対策検討会資料、平成14年3月
- 19) Lema S., C., Dickey, J.T., Schultz, I.R., Swanson, P.: *Environmental health perspective* 116, 1694–1699 (2008)
“Dietary exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) alters thyroid status and thyroid hormone-regulated gene transcription in the pituitary and brain”

(2) 沿岸海洋生物における残留性有機汚染物質の毒性影響の解明とリスク評価に関する研究

尚綱大学短期大学部食物栄養学科

石橋 弘志

平成24～26年度累計予算額：11,621千円

(うち、平成26年度予算額：4,009千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

残留性有機汚染物質 (POPs) であるポリ塩素化ビフェニル (PCBs)、ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) などの臭素系難燃剤、ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) などの有機フッ素化合物は、難分解性・高蓄積性を示すことから生態系への影響が危惧されている。河口域は生物多様性に富み、生物生産が盛んであるが、河川を通して栄養塩とともにPOPsなども流入する。しかしながら、河口域に棲息する水生生物に対するPOPsの毒性影響については不明な点が多く、それらを明らかにすることはPOPsの生態リスク評価の一助となる。本研究では、POPsを曝露した魚類や多毛類を用いて、DNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、POPsの潜在的毒性影響の予測を試みた。魚類に対しては、KC-500は肝臓炎症、アポトーシス、ガン化に関与し、BDE-47はエストロゲン様作用、PFOSはエストロゲン様作用、発ガン作用などに関与することが示唆された。多毛類に対しては、KC-400はガン化や脂肪合成・脂質代謝系に影響し、BDE-48は発ガン作用、PFOSはアミノ酸取込みや脂質代謝系などに影響することが示唆された。また、両生物種において、POPsの複合曝露 (毒性) に対する新規バイオマーカー候補遺伝子の存在が明らかになった。本研究によって魚類や多毛類に対するPOPsの潜在的毒性影響を初めて明らかにした。これらの成果は、今後POPsの生態リスク評価において極めて重要な情報を提示できるだけでなく、生態毒性試験の標準化・高度化にも貢献できるであろう。

[キーワード]

遺伝子発現、毒性影響、生態リスク、メダカ、イトゴカイ

1. はじめに

ポリ塩素化ビフェニル (PCBs) などの残留性有機汚染物質 (POPs) は、難分解性・高蓄積性を示すことから生態系への影響が危惧されている。また、これらPOPsを対象として、これまで化学分析による濃度分布や環境動態、生物蓄積、毒性影響などに関する研究が精力的に行われてきた。一方、ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) などの臭素系難燃剤やペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) などの有機フッ素化合物は、ストックホルム条約により新規POPsとして指定され、高い学術的・社会的関心を集めている。しかしながら、これら新規POPsの汚染実態や毒性影響に関する知見は極めて乏しいのが現状である。

河口域は生物多様性に富み、生物生産が盛んであるが、河川を通して栄養塩とともにPOPsなどの化学物質も流入する。そのため、河口域に棲息する生物に対する化学物質の適切なリスク評価・管理は急務の課題となっている。特に水生生物は、河口域に流入した化学物質の影響を直接的に

受けると考えられ、生物多様性の保全のためには、化学物質の毒性影響評価やその毒性発現機序に関する研究を推進し、生態リスク評価を行うことが極めて重要である。また、現場生物を用いた生態リスク評価は有用と考えられるが、実際は現場生物の飼育・実験方法などの確立の困難さから、多くの研究ではモデル生物が使用されている。

一般に化学物質の生態影響試験は、水系食物連鎖における生産者として単細胞緑藻類、一次消費者として甲殻類、高次消費者として魚類などが用いられている。これらの試験系では主に生長阻害や遊泳阻害、短期曝露による毒性影響などを評価しているが、これらエンドポイント以外の生物影響については評価が難しいと考えられる。一方、近年の遺伝子解析技術の進展により、DNAマイクロアレイや次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析が様々な生物に対して適用できるようになっており、新規バイオマーカー分子の探索やその機能解析などが進んでいる。しかしながら、新規POPsであるPBDEやPFOSを対象として、網羅的遺伝子発現解析を実施した研究はほとんどなく、新規POPsの毒性影響については不明な点が多い。

2. 研究開発目的

サブテーマ（2）では、POPsを曝露した魚類などのモデル生物を用いて、DNAマイクロアレイによる網羅的発現解析を行い、POPs応答遺伝子の探索や機能予測からPOPsの潜在的毒性影響を明らかにする。一方、サブテーマ（1）で得られた現場生物として多毛類に着目し、POPsを曝露した多毛類を用いて、DNAマイクロアレイによる網羅的発現解析を行い、POPs応答遺伝子の探索や機能予測、さらには定量的リアルタイムPCR法の確立・測定も試み、POPsの潜在的毒性影響を明らかにする。

3. 研究開発方法

（1）メダカを用いたPOPs応答遺伝子の解析と潜在的毒性影響の評価

1) 試験化学物質

試験化学物質としてポリ塩化ビフェニル（Kanechlor-500: KC-500）、テトラブロモジフェニルエーテル類（BDE-47）およびペルフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）を用いた。KC-500とBDE-47はAccuStandardから、PFOSは和光純薬工業株式会社からそれぞれ購入した。その他の試薬はすべて特級を用いた。

2) 試験生物

試験生物は、熊本県立大学で継代飼育しているメダカ（*Oryzias latipes*）を用いた。これらは、水温 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、光周期16時間：8時間（明期：暗期）の飼育条件で、1日2回ブラインシュリンプ孵化幼生（孵化後24時間以内）を飽食量与え、飼育を行った。飼育水には、水道水をフィルター濾過、脱塩素処理を行い、 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ に調温したものを用いた。各水槽の飼育水には、エアレーションを設置して十分に酸素を供給した。

3) 曝露試験

約3ヶ月齢の成魚の雄メダカを用いた。2L容のガラス水槽に試験液を入れて曝露し、曝露濃度は0.1%ジメチルスルフォキシド含有の溶媒対照群と各化学物質の曝露群（1000 $\mu\text{g/l}$ ）を設定した。

これら曝露濃度は、過去の論文等を参考に設定した¹⁻⁴⁾。各曝露群について10個体を用い、96時間止水式曝露を行った。なお曝露試験中は無給餌とした。曝露試験終了後、肝臓を摘出し、3個体分の肝臓を1サンプル (n=3) としてRNAlater®に保存した。これらはtotal RNAの抽出・精製まで-80°Cで保存した。

なお曝露試験中は、行動異常（急沈降の有無、旋回運動の有無、生死確認など）と形態異常（体表の状態、各ヒレの状態、解剖時所見など）の観察も行った。

4) Total RNAの抽出およびcRNAの合成・蛍光標識

Total RNAはRNeasy®Mini Kit (株式会社キアゲン) を用いて抽出した。抽出したtotal RNAは微量紫外可視分光光度計Q5000 (株式会社トミー精工) を用いてOD 260および280を測定し、純度と濃度を確認した。また、バイオアナライザー (アジレント社) を用いてRNAの分解を測定した。その後、total RNAはcRNA合成に用いるまで-30°Cで保存した。

cRNAは、1 µgのtotal RNAから、Quick Amp Labeling Kit (アジレント社) を使って合成した。cRNA合成時に、それぞれのサンプルを蛍光色素Cy5 (GE Healthcare社) によって標識し (Cy5-cRNAサンプル)、DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析に供するまで-30°Cで保存した。

5) DNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

メダカDNAマイクロアレイEG6000 (株式会社エコジェノミクス) を用いた。本アレイは、基礎生物学研究所バイオリソース (<http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/>) に掲載されている情報の中で完全長cDNAが取得できる6000種のメダカ遺伝子 (卵巣、肝臓、脳あるいは胚において発現している遺伝子群; 各遺伝子2スポット、合計12000スポット) の配列からオリゴプローブ (35~40 mer) をデザインして搭載したDNAマイクロアレイである。

ハイブリダイゼーションは、2 µgのCy5標識cRNAをハイブリダイゼーション溶液 (6x SSPE, 0.05% Tween-20, 20 mM EDTA, 25% formamide, 100 ng/µl salmon sperm DNA, 0.04% SDS) と混合し、45°Cで16時間、5 rpm/minで回転させながら行った。ハイブリダイゼーション終了後、洗浄溶液で洗浄後 (45°C; 6x SSPE+0.05% Tween-20、室温; 3x SSPE+0.05% Tween-20、室温; 0.5x SSPE+0.05% Tween-20、室温; 2x PBS+0.1% Tween-20、室温; 2x PBS)、専用のレーザースキャナー (GenePix 4000B; Axon Instruments, USA) でスポットの蛍光強度を読み取り、専用ソフトMicroarray Imager (Combimatrix Corp., USA) を用いて数値化した。なお、遺伝子のスポット蛍光強度は2スポットの平均値を使用した。

6) 統計解析

数値化されたスポット蛍光強度からバックグラウンドを補正後、内部標準遺伝子ribosomal protein L7 (Zhaobin and Jianying, 2007) を用いて正規化し、解析ソフトarraystat (Imaging Research Inc, USA) で有意 ($p < 0.05$) に発現変動を示した遺伝子を検出した。さらに発現比が2倍以上、1/2以下の遺伝子について発現変動遺伝子とした。

(2) イトゴカイを用いたPOPs応答遺伝子の解析と潜在的毒性影響の評価

1) Total RNAの抽出およびcRNAの合成・蛍光標識

イトゴカイへのPOPs曝露試験終了後、水分を除き、10個体ずつを1つのサンプル ($n=3$) としてRNAlater[®]に保存した。これらはtotal RNA抽出まで -30°C にて保存した。

Total RNAはRNeasy[®]Mini Kit (株式会社キアゲン) を用いて抽出した。抽出したtotal RNAは微量紫外可視分光光度計Q5000 (株式会社トミー精工) を用いてOD 260および280を測定し、純度と濃度を確認した。また、2100バイオアナライザー (アジレント社) を用いてRNAの分解および品質を測定した。抽出したtotal RNA は、cRNA合成に用いるまで -30°C で保存した。

cRNAは、1 μg のtotal RNAから、Quick Amp Labeling Kit (アジレント社) を使って合成した。cRNA合成時に、蛍光色素Cy5 (アジレント社) によって標識し (Cy5-cRNAサンプル)、DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析に供するまで -30°C で保存した。

2) DNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

イトゴカイDNAマイクロアレイ (株式会社エコジェノミクス) を用いて行った。本アレイは、9,223種の遺伝子のオリゴDNAプローブ (35~40 mer) をデザインし、それらをチップに搭載したDNAマイクロアレイである。また、DNAプローブは全てイトゴカイの遺伝子由来であるが、公共のデータベース (NCBI) による相同性検索の結果、イトゴカイにおける遺伝子の機能は未知であるが、DNA配列またはアミノ酸配列が他の生物種で知られている場合、その生物種および遺伝子名を採用している。

ハイブリダイゼーションは、2 μg のCy5標識cRNAをハイブリダイゼーション溶液 (6x SSPE, 0.05% Tween-20, 20 mM EDTA, 25% formamide, 100 ng/ μl salmon sperm DNA, 0.04% SDS) と混合し、 45°C で16時間、5 rpm/minで回転させながら行った。ハイブリダイゼーション終了後、洗浄溶液 (45°C ; 6x SSPE+0.05% Tween-20、室温; 3x SSPE+0.05% Tween-20、室温; 0.5x SSPE+0.05% Tween-20、室温; 2x PBS+0.1% Tween-20、室温; 2x PBS) で洗浄し、専用のレーザースキャナー (GenePix 4000B; Axon Instruments, USA) でスポットの蛍光強度を読み取り、専用ソフトMicroarray Imager (Combimatrix Corp., USA) を用いて数値化した。

3) リアルタイムPCRによる遺伝子発現量の測定

1) と同様に抽出したtotal RNA を逆転写し、合成したcDNAを用いて $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法を用いたリアルタイムPCR (ライフテクノロジーズ) を行った。なお内部標準遺伝子にはribosomal protein L7a-likeを使用した。

4) 統計解析

DNAマイクロアレイでは、数値化された各スポット蛍光強度からバックグラウンドの数値を補正後、内部標準遺伝子ribosomal protein L7a-likeを用いて正規化し、解析ソフトarraystat (Imaging Research Inc, USA) で有意 ($p < 0.05$) に発現変動した遺伝子を抽出した。さらに発現比が2倍以上、1/2以下の遺伝子について発現変動遺伝子とした。

各曝露群の比較では、GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) を用いて統計処理を行い、 $p < 0.05$ を有意差とみなした。遺伝子発現量は等分散性の検定を行い、等分散性が認められた場合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 (Dunnett's post-hoc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。

4. 結果および考察

(1) メダカにおけるPOPsの潜在的毒性影響の解明とリスク評価

1) KC-500により発現変動した遺伝子群の網羅的探索と潜在的毒性影響の解明

96時間の曝露期間を通じて、行動異常や外観的奇形を呈する個体はみられず、死亡個体も確認されなかった。このことから、今回設定したKC-500の曝露濃度は雄メダカ成魚に対し急性毒性影響を示さないことが示唆された。

そこで、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を試みたところ、KC-500曝露によって発現が増加した44遺伝子のスクリーニングに成功した。機能が既知の遺伝子群に着目しKC-500の潜在的毒性影響について考察した。

本研究では、ダイオキシン類曝露に対する有用なバイオマーカーとして知られるcytochrome P450 1A (CYP1A) 遺伝子の発現が10倍以上増加した。ダイオキシン類の毒性影響は主にAHR (aryl hydrocarbon receptor) シグナル経路を介して引き起こすことが知られている⁵⁾。AHRはダイオキシン応答受容体とも呼ばれ、ダイオキシン類など環境汚染物質の毒性影響を引き起こすリガンド活性化型転写因子である。AHRは通常、細胞内シャペロンタンパク質であるhsp90 (heat shock protein 90) や芳香族炭化水素化合物相互作用タンパク質と結合し不活性化した状態で細胞質内に存在しているが、体内にダイオキシン類のようなリガンドが取り込まれるとこれらのリガンドと結合し、核内へ移行、ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) とヘテロ二量体を形成する。AHR/ARNTヘテロダイマーはCYP1AやCYP1Bなどさまざまな標的遺伝子のプロモーター領域にあるダイオキシン応答配列 (DRE) に結合し、下流にある遺伝子の転写活性化を行う。これらシグナル経路が関与することにより、致死率の上昇、卵嚢浮腫、心嚢浮腫、頭部低形成、頭蓋顔面奇形、出血、体軸の催奇形性、成長の遅延などが起こることが報告されている⁶⁻⁸⁾。また本研究では、CYP1A遺伝子だけでなく、hsp遺伝子の発現も変化したことから、KC-500はAHRシグナル経路を介してダイオキシン類と類似の毒性影響を示すことが示唆された。

さらに本研究では、choline kinase α 、DNA-damage-inducible transcript 4およびhaptoglobin遺伝子の発現に増加がみられた。リン脂質の生合成に重要な酵素であるcholine kinaseは α と β の2つのアイソザイムが存在する。特にcholine kinase α はガンの増殖、発症および進行に関与することが明らかとなっている。また、DNA-damage-inducible transcript 4はアポトーシスを誘導する遺伝子であることが知られている⁹⁾。さらにヘモグロビンと特異的に結合する糖タンパク質であるhaptoglobinは炎症性疾患に関与する。これらのことから、KC-500は肝臓の炎症、さらにはアポトーシスやガン化に関与することが示唆された。

2) BDE-47により発現変動した遺伝子群の網羅的探索と潜在的毒性影響の解明

96時間の曝露期間を通じて、行動異常や外観的奇形を呈する個体はみられず、死亡個体も確認されなかった。このことから、今回設定したBDE-47の曝露濃度は雄メダカ成魚に対し急性毒性影響を示さないことが示唆された。

そこで、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を試みたところ、BDE-47曝露によって発

現が増加した35遺伝子のスクリーニングに成功した。機能が既知の遺伝子群に着目し、BDE-47の潜在的毒性影響について考察した。

BDE-47はKC-500と同様に、ダイオキシン類曝露に対する有用なバイオマーカーとして知られるCYP1A遺伝子の発現を増加した。また、CYP26C1遺伝子の発現も増加しており、これはBDE-47曝露によって発現が増加した35遺伝子のなかで最も高い誘導倍率を示した。これまでのエピゲノム解析により、食道ガン患者におけるCYP26C1遺伝子のDNAメチル化異常が見出されている。しかしながら、魚類における役割・機能は不明である。これらのことから、BDE-47はAHRシグナル経路を介してダイオキシン類と類似の毒性影響を有することが示唆されたが、魚類におけるCYP26C1遺伝子のDNAメチル化異常と毒性影響の関与については今後明らかにする必要がある。

さらに本研究では、choriogenin H、choriogenin H-minorおよびchoriogenin L遺伝子の発現に増加がみられた。Choriogeninは卵膜タンパク前駆体であり、vitellogeninと同様にエストロゲンによって肝臓で合成され、環境エストロゲンに対する有効なバイオマーカーとして知られている^{10,11}。ヒト培養細胞を用いた研究では、BDE-47はエストロゲン受容体 α および β に対してアゴニスト活性を示し、弱いエストロゲン様作用を有することが示唆されている¹²。これまで魚類におけるBDE-47のエストロゲン様作用に関する報告はなく、本研究によって初めて雄メダカに対するBDE-47のエストロゲン様作用が明らかとなった。

3) PFOSにより発現変動した遺伝子群の網羅的探索と潜在的毒性影響の解明

96時間の曝露期間を通じて、行動異常や外観的奇形を呈する個体はみられず、死亡個体も確認されなかった。このことから、今回設定したPFOSの曝露濃度は雄メダカ成魚に対し急性毒性影響を示さないことが示唆された。

そこで、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を試みたところ、PFOS曝露によって発現が増加した39遺伝子のスクリーニングに成功した。機能が既知の遺伝子群に着目し、PFOSの潜在的毒性影響について考察した。

Vitellogeninは魚類を含め鳥類や両生類などの卵性脊椎動物の繁殖に重要な役割を担っているリントタンパク質の前駆体である。脳下垂体から分泌された生殖腺刺激ホルモンはエストロゲンを合成し、血中のステロイド結合タンパクによって肝臓へ運ばれ、受容体を介して肝臓中でvitellogeninを生合成することが知られている¹³。合成されたvitellogeninは血中に分泌され卵内へ取り込まれ、リポビテリンおよびフォスビチンと呼ばれる卵黄タンパク質になると考えられている。血中vitellogeninは一般に雌魚の成熟時にmg/mlレベルまで達することが知られているが、雄魚や未成熟魚ではほとんど検出されない。そのため魚類の生殖生理機構を解明することを目的に、vitellogenin遺伝子の発現機構、vitellogeninの卵黄タンパク質への特異的分解過程、卵成長および生殖周期に伴うvitellogeninの変化などに関する研究が行われ、実用面でも雌に特異的に出現する性質を利用して早期雌雄判別法の指標タンパク、卵黄形成のモニタリングなどの分野で利用されていた。しかし近年、雄魚や未成熟魚でもエストロゲン様作用をもつ化学物質に曝露された場合、vitellogeninが誘導されることが報告され、環境エストロゲンの有効なバイオマーカーとなりうることが示唆されている¹³。本研究では、PFOS曝露によりvitellogenin 3 precursor遺伝子の発現が増加した。また最近の報告では、PFOSを曝露した初期生活段階の海産メダカにおいてvitellogenin遺伝子の発現誘導が明らかにされている⁴。これらのことから、雄メダカに対するPFOSのエストロゲン様作用が示唆

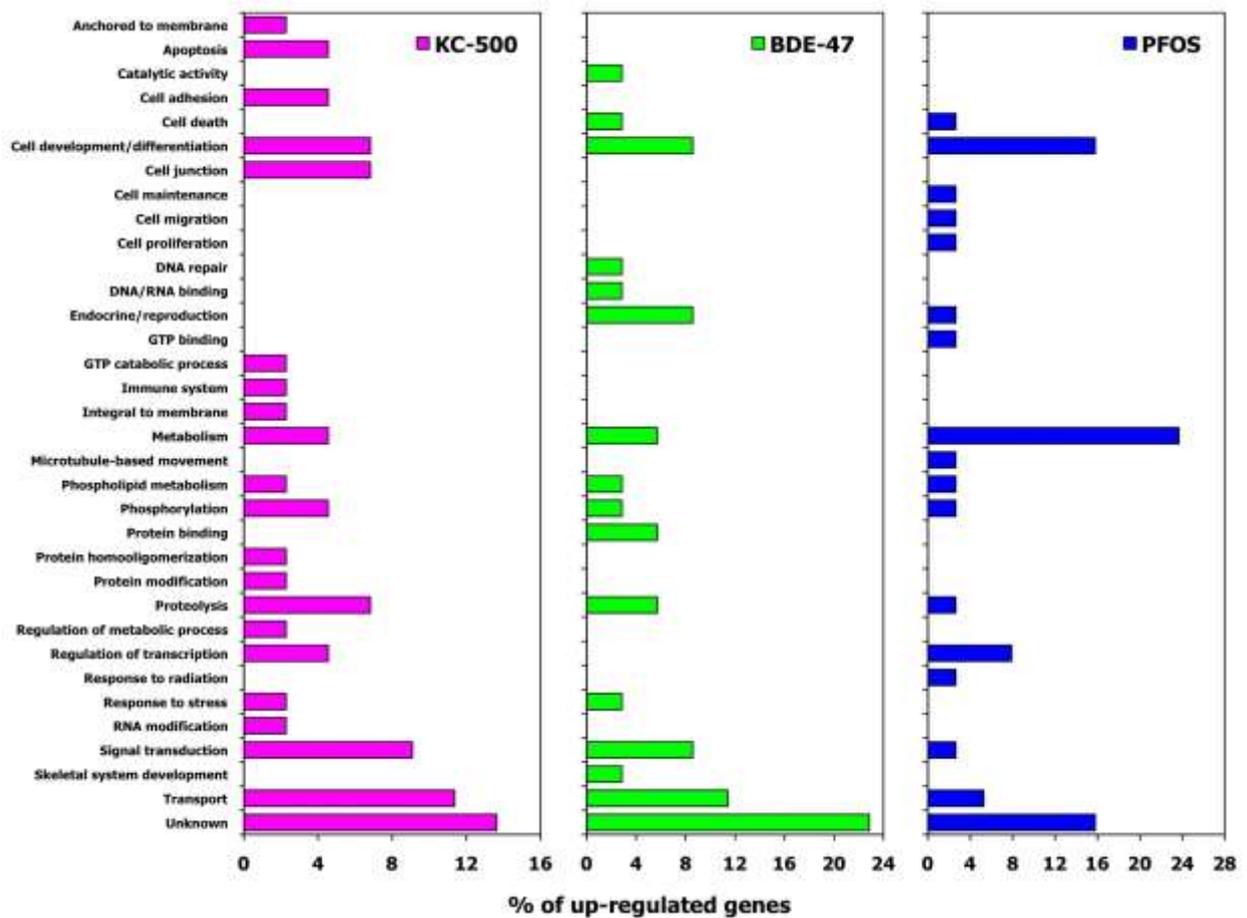
された。

さらに本研究では、KC-500曝露によって発現が増加したcholine kinase α 遺伝子やBDE-47曝露によって発現が増加したCYP26C1遺伝子の発現がPFOS曝露によっても同様に増加した。これらの遺伝子は前述の通り、ガンの増殖、発症および進行やDNAメチル化異常などに関与する可能性がある。ニジマスを用いた研究では、PFOAの発ガン促進作用が報告されていることから¹⁴、雄メダカに対するPFOSの発ガン作用が示唆された。

4) POPs曝露により発現が増加した遺伝子群のオントロジー解析

遺伝子オントロジー (gene ontology: GO) で定義された用語はGOタームと呼ばれ、すべての用語が3つの概念のカテゴリーに分類されている。すなわち、生物学的プロセス (biological process)、細胞の構成要素 (cellular component) および分子機能 (molecular function) である。そこで本研究では、生物学的プロセスについてGO解析を試み、各POPsがどのような遺伝子機能に影響するか解析した。

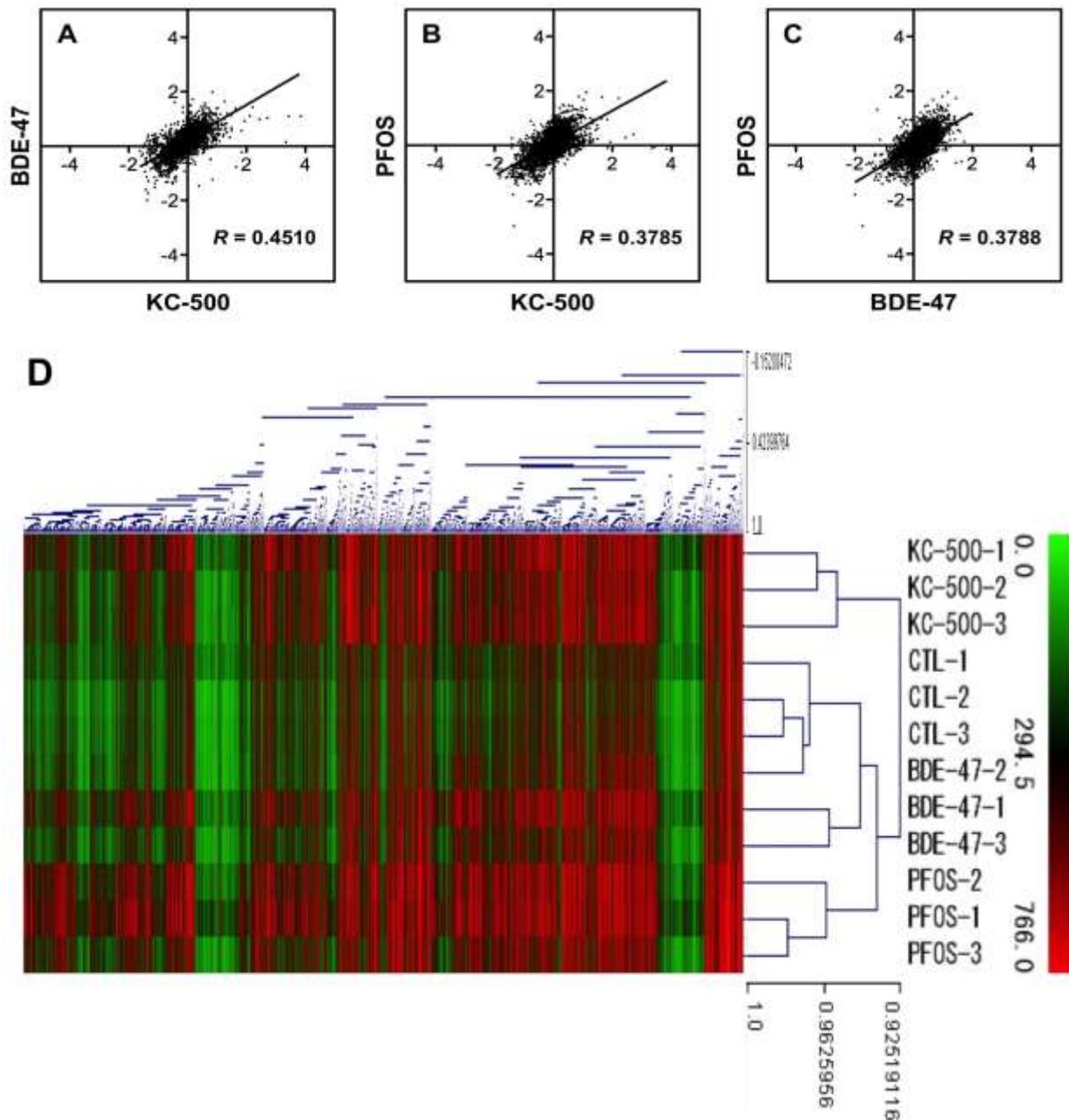
KC-500曝露では、transport, signal transduction, cell development/differentiation, cell junction, proteolysisの順に発現増加した遺伝子数が多く (図(2)-1)、KC-500はこれらの遺伝子機能に影響することが示唆された。またBDE-47曝露では、transport, cell development/differentiation, endocrine/reproduction, signal transductionの順に発現増加した遺伝子数が多く (図(2)-1)、BDE-47はこれらの遺伝子機能に影響することが示唆された。さらにPFOS曝露では、metabolism, cell development/differentiation, regulation of transcriptionの順に発現増加した遺伝子数が多く (図(2)-1)、PFOSはこれらの遺伝子機能に影響することが示唆された。これらのことから、各POPsによって影響を受ける遺伝子の機能は多岐に渡ること、またPOPsの種類によって特異的に遺伝子機能に影響することが明らかとなった。今後これらの遺伝子群についてパスウェイ解析などを試み、毒性発現機序のネットワークなどを明らかにする必要がある。



図(2)-1 POPs曝露により発現が増加した遺伝子群のオントロジー解析

5) POPs曝露により発現変動した遺伝子群の比較

各POPs曝露によって発現変動した遺伝子群について、ピアソンの相関係数を用いて物質間で比較したところ、KC-500とBDE-47 ($R = 0.4510$, 図(2)-2-A)、KC-500とPFOS ($R = 0.3785$, 図(2)-2-B)、BDE-47とPFOS ($R = 0.3788$, 図(2)-2-C) の間で統計学的に有意な正の相関関係が認められた ($p < 0.0001$) が認められた。また、階層的クラスター解析により比較を試みたところ、BDE-47とPFOS は同じクラスターに分類された (図(2)-2-D)。これらのことから、BDE-47とPFOSによる潜在的毒性影響は一部と類似すると考えられた。しかしながら、今回発現変動した遺伝子群についてパスウェイ解析などを試み、毒性発現機序のネットワークなどを明らかにする必要がある。



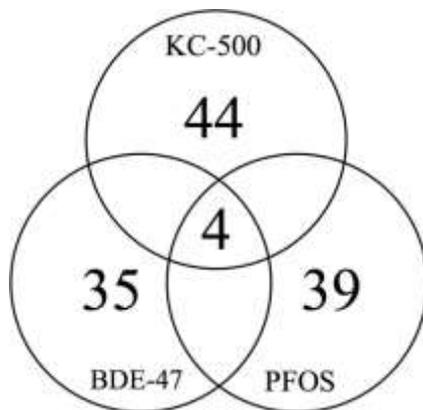
図(2)-2 POPs曝露による遺伝子発現解析

(A-C) ピアソンの相関係数. 各遺伝子の \log_2 変換した発現変動倍率を用いてPOPs間で比較した. (D) 階層的クラスター解析. 統計学的に有意な発現変動を示した遺伝子を用いてPOPs間で比較した. 赤色は発現誘導、緑色は発現抑制、黒色は変動なし.

6) POPs曝露に対する新たなバイオマーカー候補遺伝子の探索

以上の結果から、各POPsを曝露したメダカ肝臓中において発現が増加した遺伝子群のスクリーニングに成功した。また、これら変動遺伝子群とこれまでに報告されている毒性学的知見の関連を精査し、各POPsの潜在的毒性影響を示唆した。しかしながら、実環境中においてこれらPOPsは複合して存在しており、これらの水生生物に対する複合影響を評価することは極めて重要な課題

である。そこで、各POPs曝露によって共通して発現増加した遺伝子群を抽出し、それらの複合汚染に対する新規バイオマーカー候補遺伝子としての可能性を考察した。



図(2)-3 POPs曝露により共通して発現が増加した遺伝子群

本研究では、各POPs曝露により共通して4つの遺伝子（choline kinase α 、thyrotropin releasing hormone receptor 2 (trhr2)、emx1 transcription factorおよびneurolysin (metallopeptidase M3 family)）の発現が増加した（なおPFOS曝露によって発現増加したthyrotropin releasing hormone receptor 2 (trhr2) およびemx1 transcription factor遺伝子については統計学的な有意差は認められなかったが、それぞれ1.9倍以上増加していたため発現増加遺伝子とみなした）（図(2)-3）。これらのことから、これらの遺伝子はPOPsの複合曝露に対する新規バイオマーカー候補遺伝子であることが示唆された。また、これら4遺伝子のうち、本研究ではcholine kinase α に着目した。本遺伝子の発現は、KC-500曝露により4.6倍、BDE-47曝露により2.7倍、PFOS曝露により3.3倍増加し、各POPs曝露によって高い誘導倍率を示した。Choline kinase α は α と β の2つのアイソザイムが存在する。細胞内に取り込まれたコリンはcholine kinaseによってリン酸化されホスホコリンとなり、細胞膜の構成要素ホルファチジルコリンの合成経路へと組み込まれる。これまでの研究によると、choline kinaseはガンの増殖、発症および進行に関与することが提案されている。例えば、乳ガン、肺ガン、大腸ガン、前立腺ガン、膀胱ガンなどのガンのなかにcholine kinase、特に α 型が過剰発現されるものがあることが知られている。本研究ではcholine kinase α 遺伝子以外に、各POPs曝露によってガン化に関与する遺伝子群の発現も増加しており、これらを総合して考えるとcholine kinase α は今回供試したPOPsの複合曝露に対する新規バイオマーカー候補として特に注目すべき遺伝子であることが示唆された。

（2）イトゴカイにおけるPOPsの潜在的毒性影響の解明とリスク評価

1) POPsの急性毒性影響

これまでイトゴカイではKC-400、BDE-47あるいはPFOSの急性毒性影響は明らかにされていない。そこで、イトゴカイに対する各POPsの急性毒性影響を明らかにするため、72時間の止水式曝露による急性毒性試験を実施した。

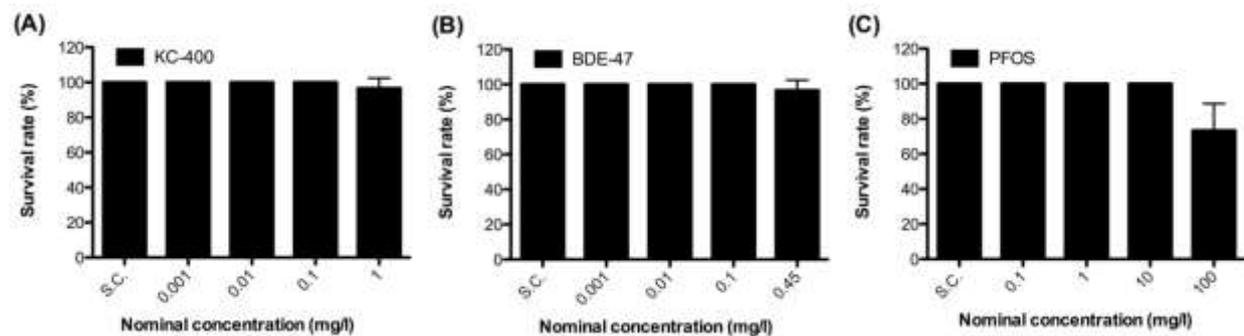
KC-400曝露は、0.001、0.01および0.1 mg/lの試験区において急性毒性は示さず、これらの試験区の生存率は100%であった（図(2)-3-A）。また、1 mg/lの試験区では1個体のみ死亡が確認され、生

生存率は96.7%であった（図(2)-3-A）。今回、溶媒対照区（S.C.）と全ての曝露区間に統計学的な有意差は認められなかった。

BDE-47曝露は、0.001、0.01および0.1 mg/lの試験区において急性毒性は示さず、これらの試験区の生存率は100%であった（図(2)-4-B）。また、0.45 mg/lの試験区では1個体のみ死亡が確認され、生存率は96.7%であった（図(2)-4-B）。しかし、0.1および0.45 mg/lの試験区では、軽度の遊泳障害を呈する個体が確認された。今回、溶媒対照区（S.C.）と全ての曝露区間に統計学的な有意差は認められなかった。

PFOS曝露は、0.1、1および10 mg/lの試験区において急性毒性は示さず、これらの試験区の生存率は100%であった（図(2)-4-C）。また、100 mg/lの試験区では8個体の死亡が確認され、生存率は73.3%であった（図(2)-4-C）。今回、溶媒対照区（S.C.）と全ての曝露区間に統計学的な有意差は認められなかった。

以上のことから、100 mg/lのPFOSを曝露した試験区を除き、KC-400、BDE-47あるいはPFOSは今回の曝露条件で明瞭な急性毒性を示さないことが示唆された。



図(2)-4 イトゴカイに対するPOPsの急性毒性影響

各濃度に調整したKC-400 (A)、BDE-47 (B) あるいはPFOS (C) を72時間止水式曝露し、曝露終了後の生存率(%)を算出した。急性毒性試験は各試験区10個体x3連(合計30個体)で実施し、生存率は平均値±標準偏差で示した。S.C.は溶媒対照区(DMSO)。

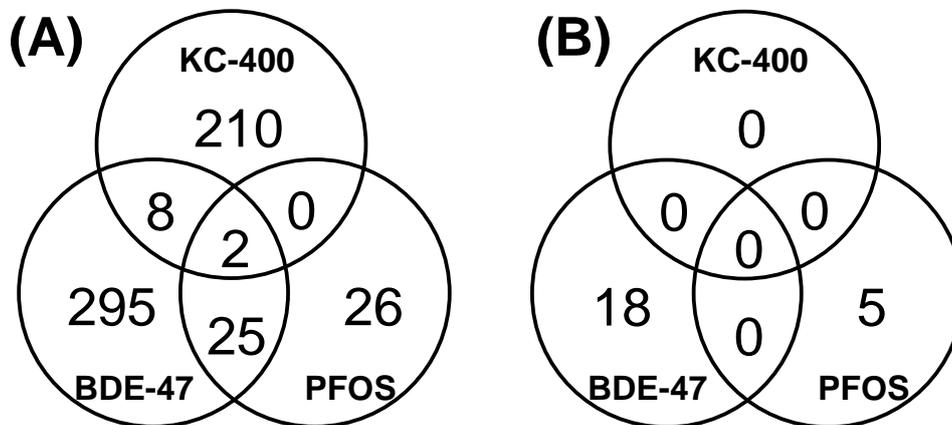
2) POPs曝露により発現変動した遺伝子群の網羅的探索

1 mg/lのKC-400、0.45 mg/lのBDE-47および10 mg/lのPFOSを72時間曝露したイトゴカイでは明瞭な急性毒性影響は確認されなかった。そこで、これらの試験区のイトゴカイ試料について、DNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を試みた。

今回用いたDNAマイクロアレイチップに搭載された9223遺伝子のうち、KC-400、BDE-47およびPFOS曝露によってそれぞれ210、313および31遺伝子の発現が変化し、これらPOPsによって発現変動する遺伝子群のスクリーニングに成功した。KC-400 (210遺伝子/9223遺伝子=2.3%) あるいはBDE-47 (3.4%) 曝露によって変動した遺伝子の割合は、PFOS (0.34%) 曝露と比較してそれぞれ6.8倍あるいは10倍高かった。今回用いたKC-400 (1 mg/l) およびBDE-47 (0.45 mg/l) の曝露濃度は、PFOS (10 mg/l) と比較して10倍程度低いにもかかわらず、KC-400およびBDE-47はPFOSと比較してより多数の遺伝子の発現に影響すると考えられた。

これら発現変動した遺伝子のうち、発現が増加した遺伝子数は、KC-400で210、BDE-47で295、

PFOSで26であった（図(2)-5-A）。一方、発現が抑制した遺伝子数は、KC-400で0、BDE-47で18、PFOSで5であり（図(2)-5-B）、発現増加した遺伝子数と比較すると極めて少なかった。これらのことから、本研究では、特に発現増加した遺伝子群について考察することとした。



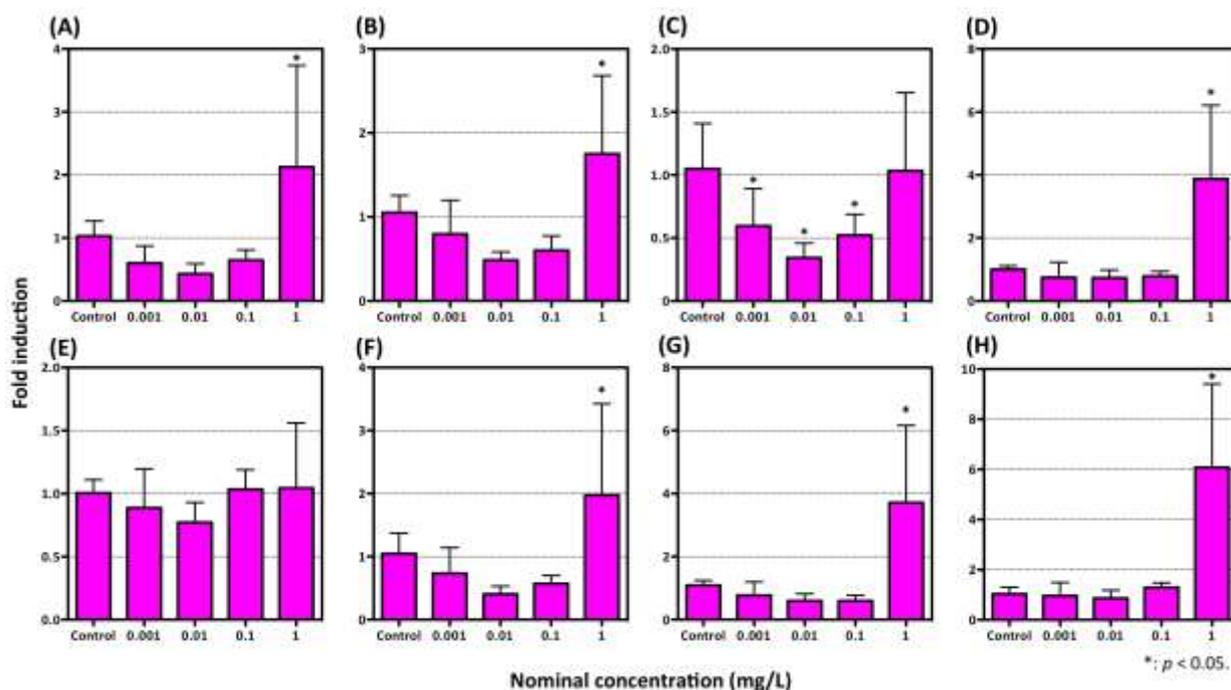
図(2)-5 POPs曝露により発現増加 (A) あるいは抑制した (B) 遺伝子数とそれらで共通して発現変動した遺伝子数

3) KC-400により発現変動した遺伝子群の網羅的探索と潜在的毒性影響の解明

DNAマイクロアレイの結果、KC-400応答遺伝子群の探索に成功した。そこで本研究では、イトゴカイの各遺伝子に特異的なプライマー対を設計し、PCR条件等を最適化することによって、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いたリアルタイムPCRによる遺伝子発現定量系を構築した。この定量系を用いて、KC-400を3日間曝露したイトゴカイについて各遺伝子発現量を測定した。

Tensinは細胞質のリントタンパク質で、アクチンフィラメントに結合し、接着斑として機能する¹⁵⁾。1 mg/LのKC-400曝露群では有意に増加したことから（図(2)-6-A）、KC-400は細胞の構造形成に影響すると考えられた。DnaJはシャペロンタンパク質であり、熱ショックタンパク質（Hsp）と相互作用し、ガンに関与することが知られている¹⁶⁾。1 mg/LのKC-400曝露群では有意に増加した（図(2)-6-B）。また大腸ガンとの関連が指摘されているUBA domain-containing protein遺伝子の発現は1 mg/L以外のKC-400曝露群で有意に抑制された（図(2)-6-C）。これらのことから、KC-400の発ガンへの関与が示唆された。

Insulin degrading enzymeはインスリン分解酵素である。これまで血糖値やアミロイド β 脳内蓄積によるアルツハイマー病との関連が報告されている。1 mg/LのKC-400曝露群では有意に増加した（図(2)-6-D）。全てのKC-400曝露群において、26S proteasome regulatory subunit rpn2遺伝子発現に影響はみられなかった（図(2)-6-E）。脂肪細胞の分化に関わるグリセロール-3-リン酸脱水素酵素（glycerol-3-phosphate dehydrogenase）や脂肪酸合成酵素（fatty acid synthase）の遺伝子発現は、1 mg/LのKC-400曝露群で有意に増加した（図(2)-6-F, G）。また、脂質代謝関連遺伝子cytochrome P450（CYP）4A11のホモログであるCYP XL-301-like遺伝子の発現は1 mg/LのKC-400曝露群で有意に増加した（図(2)-6-H）。これらのことから、KC-400は脂肪合成・脂質代謝系に影響すると考えられた。

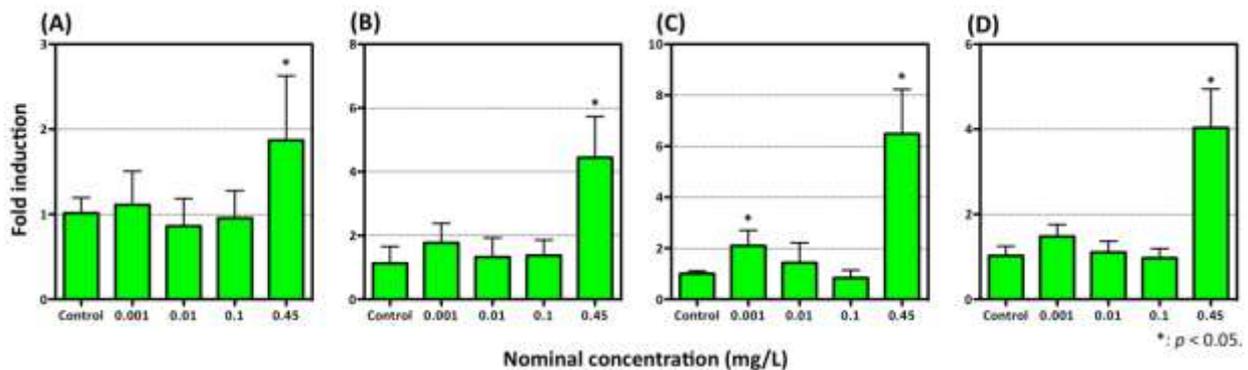


図(2)-6 リアルタイムPCRによるKC-400応答遺伝子群の発現解析

4) BDE-47により発現変動した遺伝子群の網羅的探索と潜在的毒性影響の解明

DNAマイクロアレイの結果、BDE-47応答遺伝子群の探索に成功した。そこで本研究では、イトゴカイの各遺伝子に特異的なプライマー対を設計し、PCR条件等を最適化することによって、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いたリアルタイムPCRによる遺伝子発現定量系を構築した。この定量系を用いて、BDE-47を3日間曝露したイトゴカイについて各遺伝子発現量を測定した。

mRNAのプロセッシングに関与するheterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q (図(2)-7-A)、カルシウムセンサーとして知られるdouble C2-like domains, β -like (図(2)-7-B)、筋繊維形成に関与するfibrillin 3-like遺伝子 (図(2)-7-C) の発現は、0.45 mg/LのBDE-47曝露によって有意に増加した。また、アポトーシス誘導に関与するcaspase-8-like遺伝子の発現も0.45 mg/LのBDE-47曝露によって有意に増加した (図(2)-7-D)。今回、遺伝子発現量の定量は実施しなかったが、DNAマイクロアレイでは、ガン化に関与するras and EF-hand domain-containing protein homolog isoform 1やras-related protein Rab-11A-like遺伝子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の潜在的毒性影響は極めて多岐に渡り、ガン化への関与も示唆された。なお本研究では、aldehyde dehydrogenase family 1 member L2, mitochondrial-likeやCYP XL-301-like遺伝子のリアルタイムPCR系を構築・測定したが、全てのBDE-47曝露群において、これら遺伝子群の発現に影響はみられなかった(data not shown)。

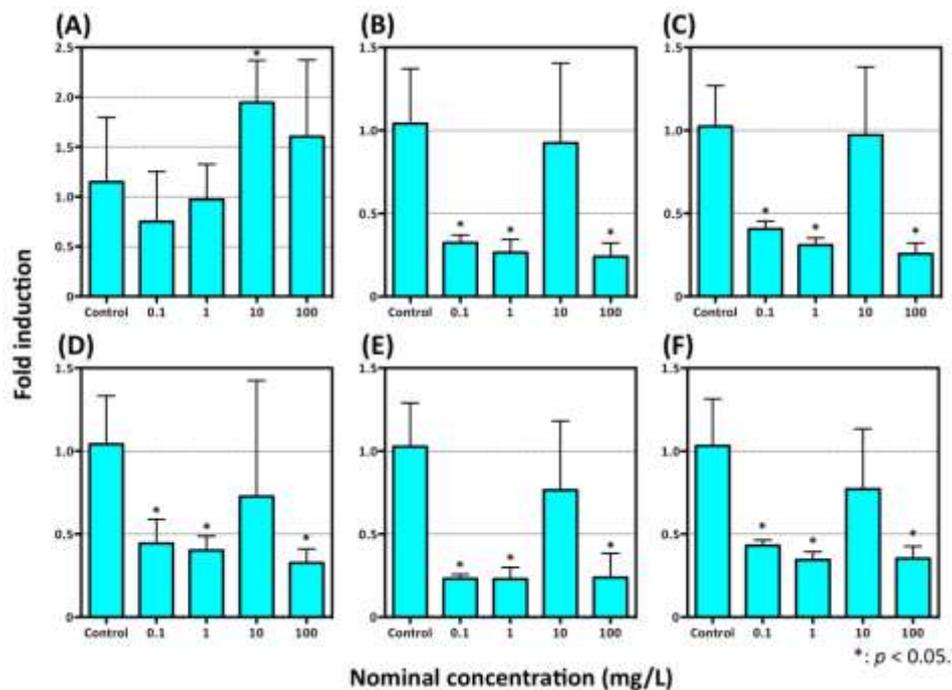


図(2)-7 リアルタイムPCRによるBDE-47応答遺伝子群の発現解析

5) PFOSにより発現変動した遺伝子群の網羅的探索と潜在的毒性影響の解明

DNAマイクロアレイの結果、PFOS応答遺伝子群の探索に成功した。そこで本研究では、イトゴカイの各遺伝子に特異的なプライマー対を設計し、PCR条件等を最適化することによって、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いたリアルタイムPCRによる遺伝子発現定量系を構築した。この定量系を用いて、PFOSを3日間曝露したイトゴカイについて各遺伝子発現量を測定した。

10 mg/LのPFOS曝露によってアセトアルデヒド脱水素酵素の一種である aldehyde dehydrogenase family 1 member L2 遺伝子の発現が増加した (図(2)-8-A)。ユビキチン/プロテアソーム経路に参与する UBX domain-containing protein (図(2)-8-B)、アミノ酸トランスポーター関連 excitatory amino acid transporter (図(2)-8-C)、アミノ酸の取り込みに関与する vitamin k-dependent γ -carboxylase (図(2)-8-D)、脂質代謝関連 CYP XL-301-like (図(2)-8-E)、色素沈着関連 garnet 遺伝子 (図(2)-8-F) の発現は、0.1, 1, 100 mg/LのPFOS曝露で抑制された。これら遺伝子群の関与したPFOSの潜在的毒性影響が示唆されたが、これら遺伝子群の発現抑制の生理学的意義等の解明は今後の検討課題であろう。



図(2)-8 リアルタイムPCRによるPFOS応答遺伝子群の発現解析

以上のことから、各POPsによって影響を受けた遺伝子群が明らかとなった。さらに本研究において発現増加した遺伝子のうち、KC-400とBDE-47曝露で共通して発現が増加したのは8遺伝子であった（図(2)-5-A）。言い換えると、8遺伝子以外の遺伝子の種類はKC-400とBDE-47でそれぞれ異なっていた。また、PFOS曝露で発現増加した26遺伝子のうち、BDE-47と共通して発現増加したのは25遺伝子であった（図(2)-5-A）。KC-400とPFOS曝露において共通して発現が増加した遺伝子は今回確認されなかった（図(2)-5-A）。これらのことから、PFOS曝露による潜在的毒性影響はBDE-47でも引き起こされる可能性があったが、一方でBDE-47あるいはKC-400特有の潜在的毒性影響も示唆され、本研究で用いたPOPsによる潜在的毒性影響は極めて多岐に渡ると考えられた。

6) POPs曝露により発現が増加した遺伝子群のオントロジー解析

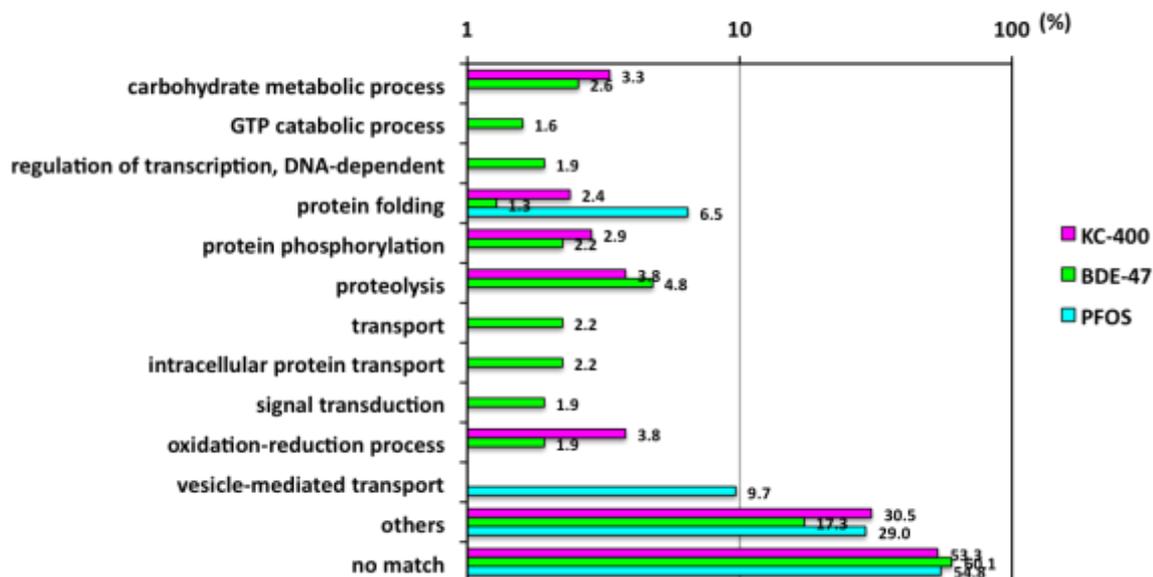
本研究では、公共データベースを用いて、今回発現増加した遺伝子群のGOアノテーション情報を作成し、GOを用いて遺伝子群の機能予測を試みた。

Biological Process（生物学的プロセス）に関与するGO解析を試みたところ（図(2)-9）、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。

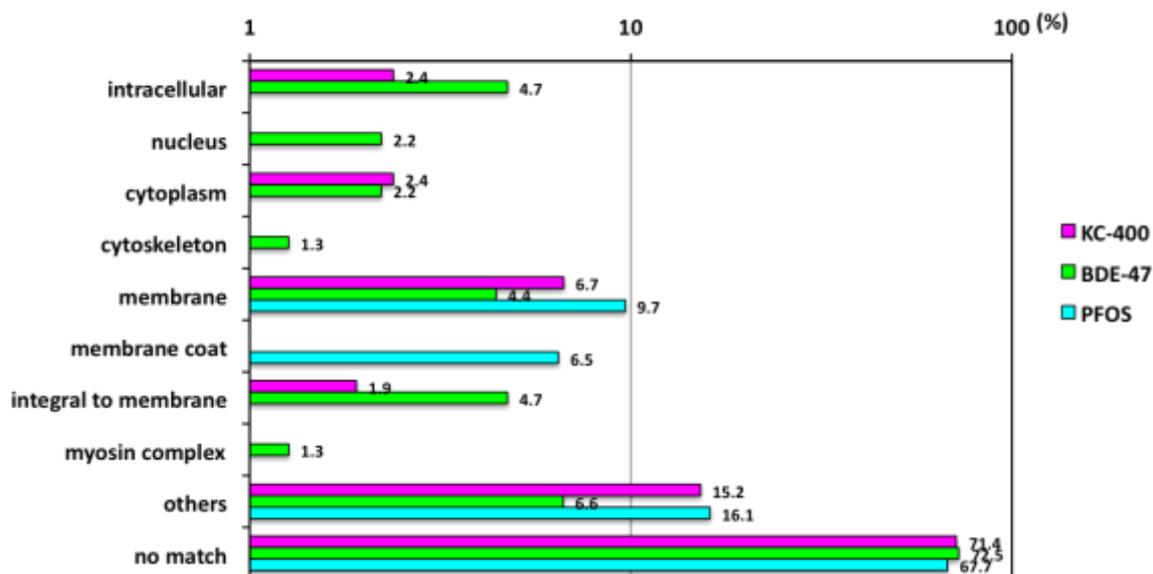
Cellular Component（細胞の構成要素）に関与するGO解析を試みたところ（図(2)-10）、3物質ともに、細胞膜（membrane）に影響し、KC-400とBDE-47は、細胞質（cytoplasm）などの遺伝子機能にも影響した。さらに、BDE-47は上述以外の遺伝子機能（核nucleus, 細胞骨格cytoskeleton, ミオシン複合体myosin complexなど）にも影響し、BDE-47による潜在的毒性影響は多岐に渡ると考え

られた。

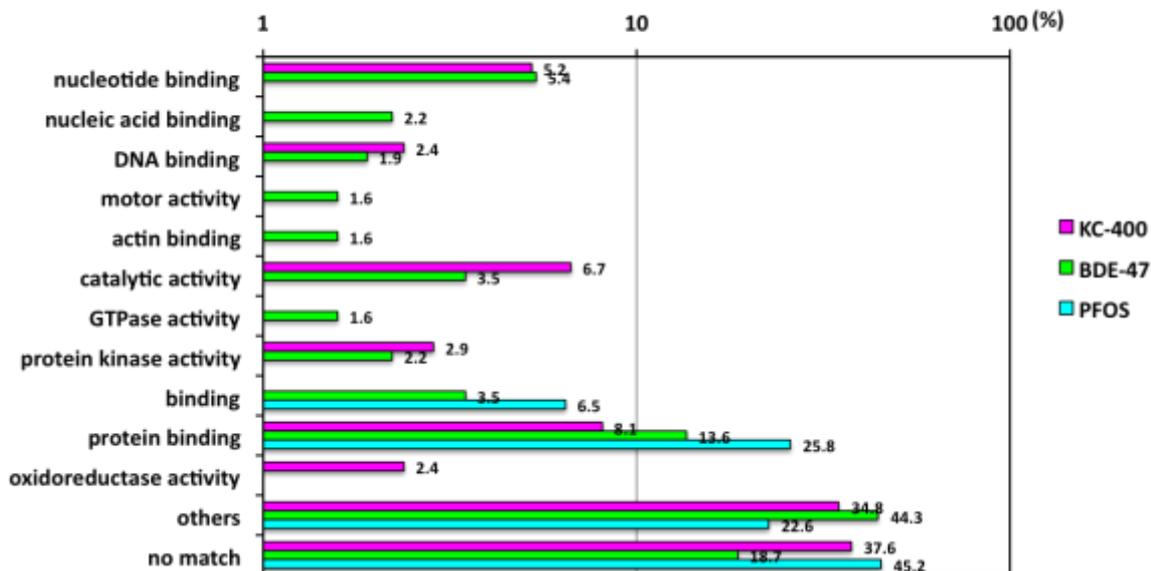
Molecular Function (分子機能) に関するGO解析を試みたところ (図(2)-11)、3物質ともに、タンパク質結合 (protein binding) に影響し、KC-400とBDE-47は、ヌクレオチド (nucleotide binding) やDNA結合 (DNA binding)、触媒 (catalytic activity) やタンパク質キナーゼ活性 (protein kinase activity) などの遺伝子機能にも影響した。さらに、BDE-47は上述以外の遺伝子機能 (核酸結合 nucleic acid activity, GTPase activityなど) にも影響し、BDE-47による潜在的毒性影響は多岐に渡ると考えられた。



図(2)-9 POPs曝露により発現が増加した遺伝子群のオントロジー解析：Biological Process



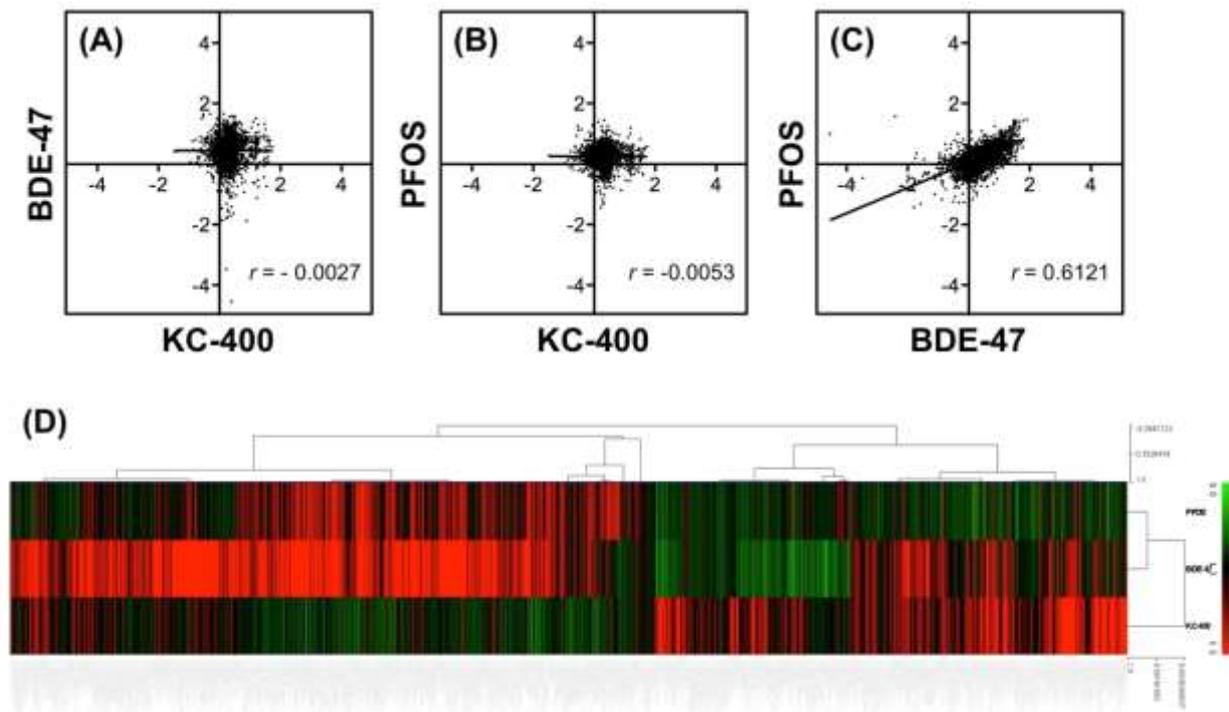
図(2)-10 POPs曝露により発現が増加した遺伝子群のオントロジー解析：Cellular Component



図(2)-11 POPs曝露により発現が増加した遺伝子群のオントロジー解析：Molecular Function

7) POPs曝露により発現変動した遺伝子群の比較

各POPs曝露によって発現変動した遺伝子群について、ピアソンの相関係数を用いて物質間で比較したところ、KC-400とBDE-47 ($r = -0.0027$)、KC-400とPFOS ($r = -0.0053$)で明瞭な関係は認められなかった(図(2)-12-AおよびB)。しかしながら、BDE-47とPFOSの比較では、統計学的に有意な正の相関関係 ($r = 0.6121$ 、 $p < 0.0001$)が認められた(図(2)-12-C)。また、階層的クラスター解析により比較を試みたところ、BDE-47とPFOSは同じクラスターに分類された(図(2)-12-D)。図(2)-5で示したように、PFOS曝露で発現増加した遺伝子の多くはBDE-47と共通したこと、また今回のピアソンの相関係数および階層的クラスター解析の結果を伏せて考えると、PFOSによる潜在的毒性影響は、BDE-47による影響の一部と類似すると考えられた。しかしながら、今回発現変動した遺伝子群についてパスウェイ解析などを試み、毒性発現機序のネットワークなどを明らかにする必要がある。



図(2)-12 POPs曝露による遺伝子発現解析

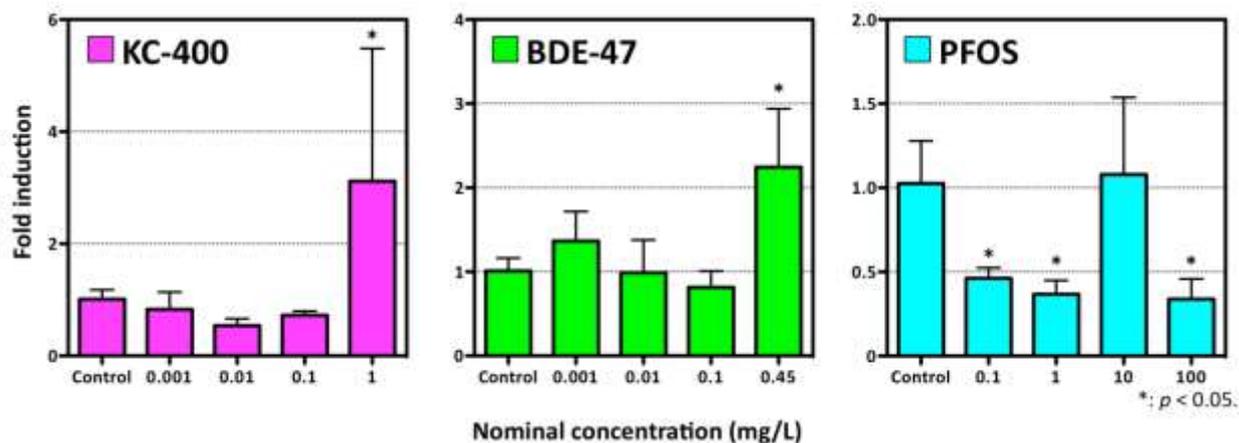
(A-C) ピアソンの相関係数. 各遺伝子の \log_2 変換した発現変動倍率を用いてPOPs間で比較した. (D) 階層的クラスター解析. 統計学的に有意な発現変動を示した遺伝子を用いて POPs間で比較した. 赤色は発現誘導、緑色は発現抑制、黒色は変動なし.

8) POPs曝露に対する新たなバイオマーカー候補遺伝子の探索

以上の結果から、各POPsを曝露したイトゴカイにおいて発現変動を示した遺伝子群のスクリーニングに成功した。また、これら変動遺伝子群とこれまでに報告されている毒性学的知見の関連を精査し、各POPsの潜在的毒性影響を示唆した。しかしながら、実環境中においてこれらPOPsは複合して存在するため、これらPOPsの水生生物に対する複合影響を評価することは極めて重要な課題である。そこで、各POPs曝露によって共通して発現増加した遺伝子群を抽出し、それらの複合汚染に対する新規バイオマーカー候補遺伝子としての可能性を考察した。

本研究では、各POPs曝露によって共通して2つの遺伝子（guanine-nucleotide-exchange-factorとpresenilin 1-1）の発現が増加した（図(2)-5-A）。このうち、guanine-nucleotide-exchange-factorはguanosine triphosphate（GTP）に結合するためにguanosine dephosphate（GDP）の放出を制御することによってGTPaseを活性化することが知られている¹⁷⁾。また、ガン化との関連も示唆されている。さらに、ヒトのアルツハイマー病の原因遺伝子として知られているpresenilin 1-1¹⁸⁾については、リアルタイムPCRによる測定法を確立し、遺伝子発現に及ぼす濃度依存的影響を調査した（図(2)-13）。Presenilin 1-1遺伝子の発現量は、1 mg/LのKC-400、0.45 mg/LのBDE-47曝露によって有意に増加し、0.1, 1, 100 mg/LのPFOS曝露によって有意に抑制された。PCBsはアルツハイマー病との関連も指摘されている。これらのことから、guanine-nucleotide-exchange-factor とpresenilin 1-1は今回実施した3種類のPOPs複合曝露に対する新規バイオマーカー候補として特に注目すべき遺伝子であること

が示唆された。しかしながら、本研究で対象としたイトゴカイでは、これらの遺伝子配列は明らかになっているものの、実際の機能については解析がなされていない。今後、イトゴカイにおけるこれら遺伝子群の機能や毒性学的意義を明らかにするとともに、長期曝露試験などによって遺伝子発現の経時的変化を確認し、POPs複合汚染に対する新規バイオマーカー候補遺伝子としての可能性を精査する必要がある。



図(2)-13 リアルタイムPCRによるPOPs応答遺伝子presenilin 1-1の発現解析

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

ストックホルム条約に新たに登録されたポリ臭素化ジフェニルエーテル類や有機フッ素化合物を対象として、水生生物に対する毒性影響を遺伝子レベルで調査した研究は極めて少ない。本研究では、メダカおよびイトゴカイのDNAマイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を試み、遺伝子レベルからPOPsの潜在的毒性影響を明らかにした。特に、本研究によって初めてイトゴカイにおけるPOPs応答遺伝子が明らかとなった。また、POPsの複合曝露（毒性）に対する新規バイオマーカー候補遺伝子が両生物種において明らかになった。これら遺伝子の今後のさらなる機能解析によって、生態毒性試験の標準化・高度化に大きく寄与できるとともに、本研究成果は、POPsの生態リスク評価において極めて重要な情報を提示できる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

POPsによる底質汚染のモデルとして、現場生物イトゴカイを用いた評価系を構築した。これらは新たな生態影響評価試験の標準化・高度化に大きく寄与できる。また、DNAマイクロアレイ解析による遺伝子レベルでの毒性影響評価により、環境基準の設定や生態系保全および生物資源の利活用を促進する一助になりえる点からも環境政策に資する。さらに世界をリードする学術情報

を発信するだけでなく、POPsに関するストックホルム条約などに関連した国際社会のニーズや生態系保全・生物多様性保全を考慮した化学物質の安全性評価・利用指針の構築に資することが期待され、今後の環境政策に大きく貢献できる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

H. Ishibashi, M. Uchida, M. Hirano, J. Kobayashi, T. Komorita, H. Nakamura, Y. Kagami, T. Kusano, Y. Ishibashi, K. Arizono: 7th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology, Hong Kong, 2013
“Transcriptomic analysis of the liver of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to Kanechlor-500, BDE47 or PFOS.”

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Yum, S., Woo, S., Kagami, Y., Park, H.S., Ryu, J.C.: Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 151(1), 51–56 (2010)

- “Changes in gene expression profile of medaka with acute toxicity of Arochlor 1260, a polychlorinated biphenyl mixture”
- 2) González-Doncel, M., Torija, C.F., Beltrán, E.M., García-Mauriño, J.E., Sastre, S., Carbonell, G.: *Aquat. Toxicol.* 148, 184–194 (2014)
 “Limitations of waterborne exposure of fish early life stages to BDE-47”
 - 3) Usenko, C.Y., Hopkins, D.C., Trumble, S.J., Bruce, E.D.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 262(1), 43–51 (2012)
 “Hydroxylated PBDEs induce developmental arrest in zebrafish”
 - 4) Fang, C., Wu, X., Huang, Q., Liao, Y., Liu, L., Qiu, L., Shen, H., Dong, S.: *Aquat. Toxicol.* 106–107, 9–19 (2012)
 “PFOS elicits transcriptional responses of the ER, AHR and PPAR pathways in *Oryzias melastigma* in a stage-specific manner”
 - 5) Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1619(3), 263–268 (2003)
 “Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD”
 - 6) Guiney, P.D., Walker, M.K., Spitsbergen, J.M., Peterson, R.E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168(1), 1–14 (2000)
 “Hemodynamic dysfunction and cytochrome P4501A mRNA expression induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during embryonic stages of lake trout development”
 - 7) Henry, T.R., Spitsbergen, J.M., Hornung, M.W., Abnet, C.C., Peterson, R.E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142, 56–68 (1997)
 “Early life stage toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in zebrafish (*Danio rerio*)”
 - 8) Antkiewicz, D.S., Burns, C.G., Carney, S.A., Peterson, R.E., Hideman, W.: *Toxicol. Sci.* 84, 368–377 (2005)
 “Heart malformation is an early response to TCDD in embryonic zebrafish”
 - 9) Knowles, L.M., Yang, C., Osterman, A., Smith, J.W.: *J. Biol. Chem.* 283(46), 31378–31384 (2008)
 “Inhibition of fatty-acid synthase induces caspase-8-mediated tumor cell apoptosis by up-regulating DDIT4”
 - 10) Chen, X., Li, V.W., Yu, R.M., Cheng, S.H.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 200–208 (2008)
 “Choriogenin mRNA as a sensitive molecular biomarker for estrogenic chemicals in developing brackish medaka (*Oryzias melastigma*)”
 - 11) Yu, R.M., Wong, M.M., Kong, R.Y., Wu, R.S., Cheng, S.H.: *Aquat. Toxicol.* 77, 348–358 (2006)
 “Induction of hepatic choriogenin mRNA expression in male marine medaka: a highly sensitive biomarker for environmental estrogens”
 - 12) Kojima, H., Takeuchi, S., Uramaru, N., Sugihara, K., Yoshida, T., Kitamura, S.: *Environ. Health Perspect.* 117(8), 1210–1218 (2009)
 “Nuclear hormone receptor activity of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated metabolites in transactivation assays using Chinese hamster ovary cells”
 - 13) Sumpter, J.P., Jobling, S.: *Environ. Health Perspect.* 103, 173–178 (1995)

- “Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment”
- 14) Tilton, S.C., Orner, G.A., Benninghoff, A.D., Carpenter, H.M., Hendricks, J.D., Pereira, C.B., Williams, D.E.: *Environ. Health Perspect.* 116(8), 1047–1055 (2008)
“Genomic profiling reveals an alternate mechanism for hepatic tumor promotion by perfluorooctanoic acid in rainbow trout”
- 15) Lo, S.H.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36(1), 31–34 (2004)
“Tensin”
- 16) Ohtsuka, K., Hata, M.: *Cell Stress Chaperones* 5(2), 98–112 (2000)
“Mammalian HSP40/DNAJ homologs: cloning of novel cDNAs and a proposal for their classification and nomenclature”
- 17) Cherfils, J., Zeghouf, M.: *Physiol. Rev.* 93(1), 269–309 (2013)
“Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs”
- 18) Russo, C., Schettini, G., Saido, T.C., Hulette, C., Lippa, C., Lannfelt, L., Ghetti, B., Gambetti, P., Tabaton, M., Teller, J.K.: *Nature* 405(6786), 531–532 (2000)
“Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease”

Quantitative Evaluation of the Impact of Persistent Organic Pollutants on an Estuarine Ecosystem

Principal Investigator: Jun KOBAYASHI

Institution: Prefectural University of Kumamoto
3-1-100 Tsukide, Kumamoto City, Kumamoto 862-8502,
JAPAN
Tel: +81-96-321-6710/ Fax: +81-96-321-6710
E-mail: jkobayashi@pu-kumamoto.ac.jp

Cooperated by: Shokei University Junior College

[Abstract]

Key Words: Persistent organic pollutants, Ecological risk, Food web bioaccumulation model, Exposure assessment, Flux, Gene expression, Toxicity effect, DNA microarray

Persistent organic pollutants (POPs) such as polychlorinated biphenyls (PCBs) are highly persistent and have strong bioaccumulation potentials and may adversely affect the ecosystem. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) have, in recent years, been classified as POPs by the Stockholm Convention on POPs, and they have therefore attracted a great deal of attention from researchers and social concerns. However, little information is available on the concentrations of these new POPs in environmental media and the toxic effects they may cause and ecological risks they pose.

Estuaries contain abundant nutrients, and a range of organisms live in them. However, harmful chemicals such as POPs flow into estuaries along with nutrients. Therefore, it is necessary to appropriately assess the risks posed by POPs to organisms living in estuaries. In subtheme (1), the risks posed by POPs to organisms living in an estuary on the Ariake Sea were assessed using field survey data and a model simulation. The PCB flux from the river water to *Capitella* sp. was estimated from field survey data. Trophic magnification factors (TMFs) for PCBs, PBDEs, and PFOS were determined using stable nitrogen isotope data obtained for living aquatic organisms. We developed a food web bioaccumulation model to assess the exposure of organisms to POPs. An ecological risk assessment was performed using information on the toxic effects of POPs, including the results of the DNA microarray studies performed under subtheme (2). The results suggested that only low levels of ecological risk are posed by total-PCBs and BDE47.

In subtheme (2), tests were performed to determine the toxicities of PCBs, PBDEs, and PFOS to fish and polychaeta. Comprehensive gene expression analysis using a DNA

microarray was then performed for the organisms, and an attempt was made to predict the potential toxic effects of the POPs. The toxicity test results for the fish suggested that KC-500 causes liver inflammation, apoptosis, and cancer, BDE-47 causes estrogenic effects, and PFOS is carcinogenic and has estrogenic effects. The toxicity test results for the polychaeta suggested that KC-400 affects carcinogenic processes, lipid synthesis, and lipid metabolism, BDE-47 affects carcinogenic processes, and PFOS affects amino acid uptake and lipid metabolism. A new biomarker candidate gene for the exposure of fish and polychaeta to mixtures of these three POPs was found. The results will be extremely important for use in ecological risk assessments and will contribute to the standardization and advancement of ecological toxicity tests.