

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04286

研究課題名(和文) 臭素化ダイオキシンを蓄積する海産無脊椎動物を対象とした毒性リスク評価

研究課題名(英文) Ecotoxicological assessment of a naturally occurring dioxin, 1,3,7-Tribromodibenzo-p-dioxin in marine invertebrates

研究代表者

平野 将司 (Hirano, Masashi)

東海大学・農学部・准教授

研究者番号：20554471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、海産生物から検出される低臭素化ダイオキシンの1,3,7-TriBDDに着目し、海産甲殻類アミ、イガイ類を対象として海産無脊椎動物に対する臭素化ダイオキシン類(PBDDs)の毒性リスクを評価した。生態毒性試験の結果から、本研究における最小作用濃度を見積もることができた。また、イガイ類を用いたトランスクリプトーム解析から、蓄積濃度の範囲において神経変性への作用を見出した。加えて、海産甲殻類アミの脱皮に関する分子基盤、DNA情報について整備を進めることができた。さらに、有明海において、二枚貝から3臭素化体のPBDDsが検出され、汚染実態に関する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、海産甲殻類や二枚貝に対する臭素化ダイオキシン類の潜在的毒性リスクを評価することができた。また、実験材料として情報基盤に乏しい海産無脊椎動物の分子基盤、ゲノム情報の整備に進展がみられたため新規性の高い知見が得られた。特に1,3,7-TriBDDの毒性影響濃度を特定できたことから、国際機関の環境政策への適用を目指し、沿岸環境における塩素系/臭素系ダイオキシンの包括的な毒性リスクの把握に貢献できる点で社会的意義は非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：Natural polybrominated dibenzo-p-dioxin (PBDD) congeners including di-/triBDDs are detected in marine invertebrates. To evaluate the ecotoxicological impact of triBDDs on marine invertebrates, we investigated the effect of 1,3,7-TriBDD on growth of mysids. Exposure to 20 µg/L 1,3,7-TriBDD resulted in a significant decrease in growth. Transcriptomic analysis of the digestive gland of mussels indicated that naturally occurring PBDDs may have a potential to elicit adverse effects on neurogeneration through a unique mechanism in the mussels. Moreover, we analyzed tri-/tetraBDDs in marine organisms including fishes, shrimps and bivalves collected from the Ariake Sea. The high level of triBDDs was found in oyster and mussel samples, and 1,3,7/1,3,8-TriBDDs were the predominant congeners. These results suggest the bioaccumulation of triBDD and their potential ecotoxicological effect.

研究分野：環境毒性学

キーワード：臭素化ダイオキシン 甲殻類 二枚貝 トランスクリプトーム 環境化学物質 生態毒性 化学分析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ダイオキシン類は環境残留性や生物蓄積性が高く、ヒトや野生生物に対する毒性影響が懸念されたことから、先進諸国を中心に多くの汚染実態調査やリスク評価が実施されてきた。一方、ダイオキシン類の塩素が臭素に置換した臭素化ダイオキシン類 (polybrominated dibenzo-*p*-dioxins/dibenzofurans, PBDD/Fs) が沿岸域において広域的に存在することが示唆されている。これまでに報告されている国内外の魚介類を用いた PBDDs モニタリング調査では、人為起源とは明らかに異なる高濃度の低臭素化ダイオキシンが検出されている^{1,2)}。また、こうした低臭素化ダイオキシン類は、海綿や紅藻、関連バクテリアによって有機ハロゲン化合物から生合成される経路が考えられており、天然起源の化合物とされている。これら低臭素化ダイオキシン類は、特に二枚貝や甲殻類において高濃度で検出されていることから、海産生物への影響について知見の集積が必要であるものの、毒性機序またリスク評価については不明である。

PBDDs の毒性評価については、塩素化ダイオキシン類と同等あるいは上回る毒性を示す結果が示されているが、評価された異性体はごく一部に限られている³⁾。先行研究において、瀬戸内海において特異的に高濃度で検出された 3 臭素化体の 1,3,7-tribromodibenzo-*p*-dioxin (1,3,7-TriBDD) を海産甲殻類のアミ類へ曝露し、次世代シーケンズ解析を用いた RNA-seq 解析から、1,3,7-TriBDD に応答する転写産物を包括的に調べた。その結果、臭素化ダイオキシンは有機塩素系化合物 (塩素系ダイオキシン・PCB) とは明らかに異なる遺伝子発現応答を示すことを明らかにしてきた。しかしながら、環境中での検出濃度、あるいは海産無脊椎動物における生物蓄積濃度での毒性影響などは未検討であり、海産生物における最小影響濃度など国際的な毒性評価は定まっていない。

2. 研究の目的

本研究では、PBDDs を蓄積する海産無脊椎動物 (二枚貝および甲殻類) に対する天然起源 PBDDs の汚染実態および毒性リスクの評価を目的とした。具体的には、海産生物で検出される 1,3,7-TriBDD を主な評価物質として設定し、二枚貝および甲殻類を対象に、①生態影響試験、②オミクス解析、③化学分析による汚染実態調査を行い、有害性評価を目指した。

3. 研究の方法

(1) 海産アミ類を用いた 1,3,7-TriBDD の生態影響評価

実験には海産甲殻類アミ *Americamysis bahia* を供した。急性毒性試験は OPPTS850.1035 に準拠し、ふ化 24 時間以内の幼生を用いて 96 時間の曝露を行った。24 時間毎に生死について判別した。成長成熟試験では、ふ化幼生を飼育温度 25±1 °C、明暗周期 16 h : 8 h の条件下で 7 日間飼育し、ふ化後 7 日齢を 0.2、2 および 20 µg/L の 1,3,7-TriBDD 試験液に 14 日間曝露した。曝露期間中は脱皮殻の観察を行い、曝露終了後、体長、頭胸甲長および湿重量を測定した。試験液の塩濃度は 25 ‰に設定し、人工海水のみの対照区及び 0.05 %ジメチルスルフォキシド含有の溶媒対照区を設けた。

(2) 海産アミ類のゲノム解析と 20-hydroxyecdysone 曝露によるトランスクリプトーム解析

アミ *A. bahia* の成体をプールし、ゲノム DNA を抽出した。得られた DNA を用いてライブラリー調製後、ハイブリッドアセンブルによるゲノムシーケンスを実施した。また、ふ化後 7 日齢の個体を用いて脱皮ホルモンである 20-hydroxyecdysone (20E) を 24 時間曝露した。曝露個体から total RNA を抽出し、ライブラリー調製後、Novaseq で塩基配列を決定した。得られた塩基配列をバイオインフォマティクス解析し、脱皮関連遺伝子群の発現変動を調べた。

(3) 1,3,7-TriBDD を曝露したイガイ中腸腺におけるトランスクリプトーム解析

実験にはムラサキイガイを供試した。徳島県の養殖場で天然採捕されたムラサキイガイを研究室にて馴化後、25 µg/L の 1,3,7-TriBDD 試験液に 48 時間および 7 日間曝露した。曝露終了後、ムラサキイガイから中腸腺を摘出し、RNA-seq 解析に供した。得られた塩基配列は、CLC Genomics Workbench を用いて *de novo* アセンブリを行い、contig 配列を作成した。発現変動がみられた遺伝子 (DEGs) について、バイオインフォマティクス解析を行った。パスウェイ解析、Gene Ontology 解析は DAVID、ネットワーク構築には ClueGO を用いた。

(4) 魚介類を対象とした PBDDs 分析による生物蓄積性評価

有明海をサンプリング地点に設定し、魚類 (ヒラメ、ハゼ)、二枚貝 (イガイ、カキ)、甲殻類 (アキアミ類)、フジツボやイボニシを採取した。魚類においては、筋肉および肝臓を摘出し、試料とした。これらを前処理によって濃縮した試料を GC-MS/MS 分析に供し、低臭素化ダイオキシン類 (1,3,7/1,3,8-TriBDD、2,3,7-TriBDD、1,2,3,7/1,2,3,8-TetraBDD) の各異性体濃度を定量し

た。

4. 研究成果

(1) 1,3,7-TriBDD の生態影響評価

既報から、海産無脊椎生物における低臭素化ダイオキシン類の生物蓄積濃度は数十 ppb であったことから、最大濃度を 50 $\mu\text{g/L}$ に設定して海産甲殻類アミを用いた 1,3,7-TriBDD の急性毒性試験を実施した。毒性試験の結果、50 $\mu\text{g/L}$ において致死影響は認められなかった。このことから、実環境中における生物蓄積濃度では急性毒性影響は示さないものと考えられた。

次いで、アミ類を用いた 1,3,7-TriBDD の 14 日間における成長成熟試験を実施した。試験濃度区の設定は上述の生物蓄積濃度を参考に、最大 20 $\mu\text{g/L}$ を設定し、公比 10 で行った。14 日間毎日脱皮殻の観察を行い、脱皮数の変化を算出したものの、脱皮数への影響は認められなかった。しかしながら、20 $\mu\text{g/L}$ 曝露区において、対照区と比較して有意な体長および体重の低下が認められた (図 1A, B)。以上のことから、本研究における 1,3,7-TriBDD の最小作用濃度は 20 $\mu\text{g/L}$ と見積もられた。

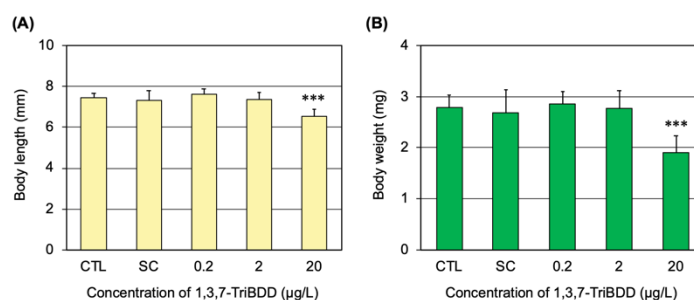


図 1 1,3,7-TriBDD を 14 日間曝露したアミ類の体長および体重への影響

(2) 海産アミ類のゲノム解析と 20E 曝露によるトランスクリプトーム解析

海産アミ類のトランスクリプトームを整備する目的として、ゲノム解析、加えて脱皮ホルモンによる RNA-seq 解析を行った。ハイブリッドアセンブルによるゲノム解析の結果、総塩基数 509.6 Mb を取得した。本研究によりレファレンス配列の整備を進めることができたため、今後マッピングに対応するゲノム DNA の配列情報をさらに取得する予定である。

1,3,7-TriBDD の成長成熟試験において、脱皮への影響は認められなかったものの、成長抑制がみられたため、この分子機序を明らかにすること、さらに脱皮を指標とした化学物質評価法を構築する目的として、脱皮関連遺伝子群の発現変化を精査した。陽性対照として 20E を曝露し、エクジステロイドに応答する遺伝子群の発現変動を調べた。実験には 7 日齢個体に 50, 100 および 200 $\mu\text{g/L}$ の 20E を 24 時間曝露し、RNA-seq 解析に供した。20E による発現変化を調べた結果、初期遺伝子と考えられる E75、また後期遺伝子と考えられる FTZ-F1 の発現誘導がみられた。その他、脱皮関連遺伝子群としてキチン合成酵素 Chs、キチンを分解する酵素キチナーゼ Cht7、さらに cuticle protein ファミリー遺伝子である CPR7 の顕著な発現誘導が認められた (図 2)。以上から、甲殻類においてエクジステロイドに応答する初期-後期遺伝子群など脱皮関連遺伝子の発現変化について知見を得た。

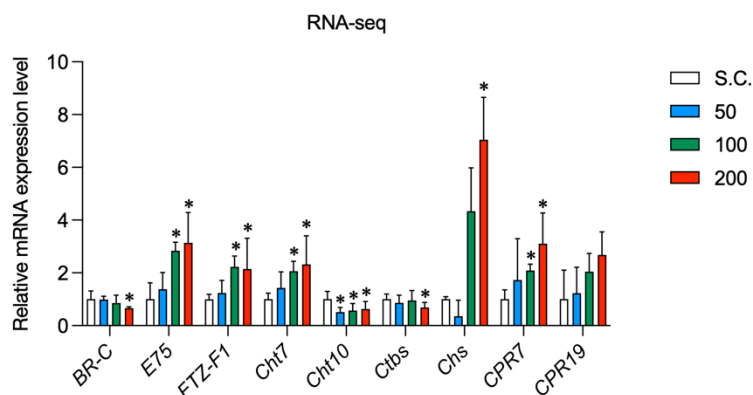


図 2 20E を 24 時間曝露した 7 日齢アミの遺伝子発現解析

(3) 1,3,7-TriBDD を曝露したイガイ中腸腺におけるトランスクリプトーム解析

これまでの国内外の知見から、低臭素化ダイオキシン類はイガイ類に蓄積がみられていることから、ムラサキイガイを用いて影響評価を行った。25 $\mu\text{g/L}$ の 1,3,7-TriBDD に 48 時間および 7 日間曝露し、中腸腺におけるトランスクリプトーム解析を行った。各曝露区あたり 3 個体を供試し、対照区と比較して有意な DEGs を抽出した。その結果、48 時間後では 65 遺伝子、7 日後では 113 遺伝子が有意な変動が認められた。このうち、18 遺伝子が共通した変動遺伝子として同定された。

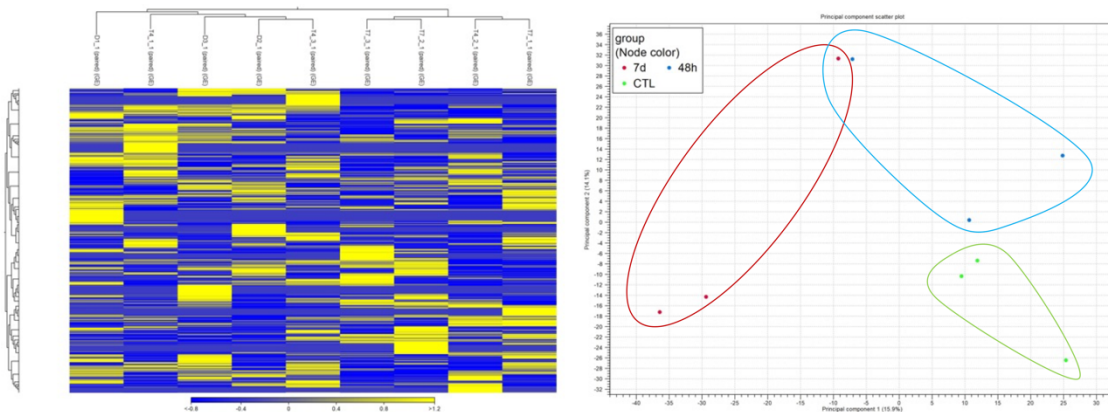


図3 1,3,7-TriBDDを暴露したムラサキガイ中腸腺における遺伝子発現プロファイル

発現変動遺伝子群について、クラスター解析、また主成分分析したところ、48時間曝露区、7日間曝露区それぞれ対照区とは異なる発現プロファイルを示した(図3)。さらに、パスウェイ解析の結果、48時間曝露では、*amyotrophic lateral sclerosis*、*oxytocin signaling pathway*や*ribosome*への影響がみられ、7日後では*ribosome*、*neurogeneration*や*GABAergic synapse*に関連する遺伝子群の変動が示された。以上から、イガイ類では本研究で試験した濃度の1,3,7-TriBDDによって、より曝露期間が長くなるに従い神経変性への影響が起こる可能性が考えられた。

(4) 魚介類を対象としたPBDDs分析による生物蓄積性評価

有明海をサンプリング地点として、魚類(ヒラメ、ハゼ)、二枚貝(イガイ、カキ)、甲殻類(アキアミ類)、イボニシやフジツボを採取した。魚類は筋肉、肝臓を分析対象とした。甲殻類は個体全体を試料とし、その他の試料は殻を取り除き、軟体部を用いた。臭素化ダイオキシン類を抽出し、GC-MS/MS分析に供した。

化学分析の結果を図4に示した。魚類では、筋肉および肝臓いずれも3臭素化体および4臭素化体の蓄積は認められなかった。一方、海産無脊椎動物では、カキおよびイガイで3臭素化体の高い蓄積が明らかとなった。特に、カキでは1,3,7/1,3,8-TriBDDに加え2,3,7-TriBDDの蓄積もみられ、脂質重量当たりでは既報の蓄積濃度よりも高値であった。また、甲殻類においても低値であるものの1,3,7/1,3,8-TriBDDが検出された。本研究で供した全ての試料において、4臭素化体は検出されなかった。

以上のことから、これまで報告されている臭素化ダイオキシン類の蓄積特性と同様に有明海に生息する生物においても海産の無脊椎動物に高い蓄積がみられることが示唆された。

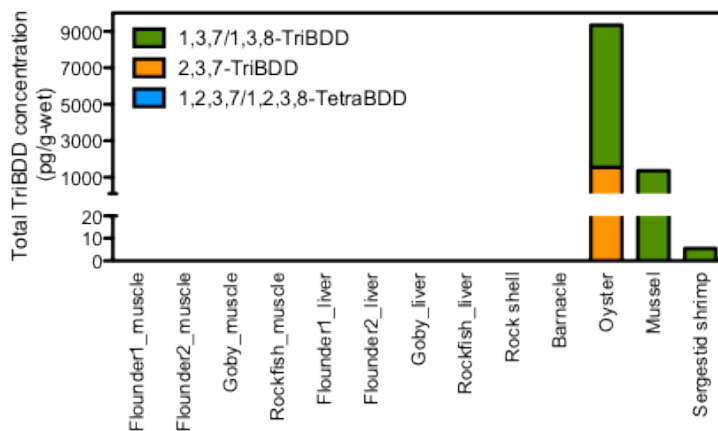


図4 有明海で採取した魚介類における低臭素化ダイオキシン類の蓄積濃度

<引用文献>

- 1) Haglund *et al.* (2007). *Environ. Sci. Technol.*, 41(9), 3069-3074.
- 2) Goto *et al.* (2017). *Environ. Sci. Technol.*, 51, 11771-11779.
- 3) Van den Berg, M. *et al.* (2013). *Toxicol. Sci.*, 133(2), 197-208.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishibashi Hiroshi, Uchida Masaya, Temma Yuki, Hirano Masashi, Tominaga Nobuaki, Arizono Koji	4. 巻 193
2. 論文標題 Choriogenin transcription in medaka embryos and larvae as an alternative model for screening estrogenic endocrine-disrupting chemicals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ecotoxicology and Environmental Safety	6. 最初と最後の頁 110324 ~ 110324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ecoenv.2020.110324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi Akemi, Uchida Masaya, Ishibashi Hiroshi, Hirano Masashi, Ichikawa Nobuhiro, Arizono Koji, Koyama Jiro, Tominaga Nobuaki	4. 巻 242
2. 論文標題 Potential mechanisms underlying embryonic developmental toxicity caused by benzo[a]pyrene in Japanese medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 125243 ~ 125243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemosphere.2019.125243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishibashi Hiroshi, Uchida Masaya, Hirano Masashi, Hayashi Taka, Yamamoto Ryoko, Kubota Akira, Ichikawa Nobuhiro, Ishibashi Yasuhiro, Tominaga Nobuaki, Arizono Koji	4. 巻 767
2. 論文標題 In vivo and in silico analyses of estrogenic potential of equine estrogens in medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science of The Total Environment	6. 最初と最後の頁 144379 ~ 144379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scitotenv.2020.144379	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirano Masashi, Toyota Kenji, Ishibashi Hiroshi, Tominaga Nobuaki, Sato Tomomi, Tatarazako Norihisa, Iguchi Taisen	4. 巻 33
2. 論文標題 Molecular Insights into Structural and Ligand Binding Features of Methoprene-Tolerant in <i>Daphnids</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 2785 ~ 2792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.0c00179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ochiai Mari, Kurihara Nozomi, Hirano Masashi, Nakata Akifumi, Iwata Hisato	4. 巻 54
2. 論文標題 <i>In Vitro</i> Cytotoxicity and Risk Assessments of Environmental Pollutants Using Fibroblasts of a Stranded Finless Porpoise (<i>Neophocaena asiaeorientalis</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology	6. 最初と最後の頁 6832 ~ 6841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.9b07471	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishibashi Hiroshi, Uchida Masaya, Hirano Masashi, Hayashi Taka, Yamamoto Ryoko, Kubota Akira, Ichikawa Nobuhiro, Ishibashi Yasuhiro, Tominaga Nobuaki, Arizono Koji	4. 巻 767
2. 論文標題 In vivo and in silico analyses of estrogenic potential of equine estrogens in medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science of The Total Environment	6. 最初と最後の頁 144379 ~ 144379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scitotenv.2020.144379	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ochiai Mari, Nguyen Hoa Thanh, Kurihara Nozomi, Hirano Masashi, Tajima Yuko, Yamada Tadasu K., Iwata Hisato	4. 巻 55
2. 論文標題 Directly Reprogrammed Neurons as a Tool to Assess Neurotoxicity of the Contaminant 4-Hydroxy-2,3,5,5-tetrachlorobiphenyl (4-OH-CB72) in Melon-Headed Whales	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology	6. 最初と最後の頁 8159 ~ 8168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.1c01074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dau Pham Thi, Ishibashi Hiroshi, Tuyen Le Huu, Sakai Hiroki, Hirano Masashi, Kim Eun-Young, Iwata Hisato	4. 巻 806
2. 論文標題 Assessment of binding potencies of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers with Baikal seal and mouse constitutive androstane receptors: Comparisons across species and congeners	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science of The Total Environment	6. 最初と最後の頁 150631 ~ 150631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scitotenv.2021.150631	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内田雅也、石橋弘志、富永伸明、平野将司、草野輝彦、有蘭幸司
2. 発表標題 バイオアッセイの未来ー水生生物を対象としたトランスクリプトーム解析の観点から
3. 学会等名 第23回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平川周作、宮脇崇、堀就英、香月進、平野将司、岩田久人、辻学
2. 発表標題 油症患者におけるPCB異性体の特徴的蓄積パターンに影響を与える要因の解析
3. 学会等名 第29回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田雅也、石橋弘志、平野将司、水川葉月、成松哲也、富永伸明、有蘭幸司
2. 発表標題 海産甲殻類アミ(Americamysis bahia)を用いたフィプロニルとその分解物の生体影響評価
3. 学会等名 第23回環境ホルモン学会研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林太嘉、平野将司、石橋弘志
2. 発表標題 次世代型有機フッ素化合物のペルオキシソーム増殖剤応答性受容体結合予測
3. 学会等名 第23回環境ホルモン学会研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋弘志、水川葉月、内田雅也、成松哲也、富永伸明、伊藤一樹、平野将司、有菌幸司
2. 発表標題 汽水産アミを用いたバイオアッセイと分子レベルでの解析
3. 学会等名 第24回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田雅也、石橋弘志、平野将司、水川葉月、富永伸明、有菌幸司
2. 発表標題 海産甲殻類アミ(Americamysis bahia)を用いたフィプロニルおよび分解物の環境リスク評価
3. 学会等名 5th International Chemical Hazard Symposium
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野将司、内田雅也、小林淳、石橋弘志
2. 発表標題 天然起源1,3,7-TriBDDを曝露したイガイの中腸腺におけるRNA-seq解析
3. 学会等名 環境化学物質 3 学会合同大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野将司、内田雅也、富永伸明、有菌幸司、石橋弘志
2. 発表標題 汽水産アミAmericamysis bahiaにおけるエクジステロイドシグナル経路のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 環境化学物質 3 学会合同大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	石橋 弘志 (Ishibashi Hiroshi) (90403857)	愛媛大学・農学研究科・准教授 (16301)	
研究 分担者	内田 雅也 (Uchida Masaya) (80575267)	有明工業高等専門学校・創造工学科・准教授 (57102)	
研究 分担者	小林 淳 (Kobayashi Jun) (00414368)	熊本県立大学・環境共生学部・准教授 (27401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------