

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：27401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22310023

研究課題名（和文） アミにおける生殖・発生異常とその発生メカニズムを活用した環境水評価手法の開発

研究課題名（英文） Development of environmental water assessment methods using generation mechanism and reproductive and development in *Americamysis bahia*

研究代表者

古賀 実 (KOGA MINORU)

熊本県立大学・環境共生学部・教授

研究者番号：40131916

研究成果の概要（和文）：本研究では、NP 異性体混合物および NP 異性体 5 種のアミへの急性毒性と成長・成熟への検討を実施してきた。その結果、これらの化学物質はいずれもアミの成長・成熟への影響を及ぼすことを明らかにした。続いて、アミの生殖試験を実施し、NP がアミの生殖におよぼす影響について検討を行った。その結果、アミの生殖試験では、成長・成熟への影響に加え、総産仔数が有意に減少していることが確認され、NP はアミの生殖機能に影響を及ぼすことが示唆された。また本研究で作成した DNA マイクロアレイを用いて NP 異性体混合物を曝露したアミの遺伝子発現解析を実施した結果、1  $\mu\text{g/L}$  曝露で 32 遺伝子、3  $\mu\text{g/L}$  曝露で 27 遺伝子、10  $\mu\text{g/L}$  曝露で 43 遺伝子、30  $\mu\text{g/L}$  曝露で 72 遺伝子の発現変動遺伝子を検出することが出来た。これら遺伝子はアミの脱皮や生殖に関与する可能性が示唆された。

本研究で実施した、アミの成長・成熟および生殖を指標とした試験法は高感受性であり、海域における評価手法としては非常に有用であると考えられた。更にアミの DNA マイクロアレイを作製できたことで更に詳細な影響評価（産仔数に影響をおよぼす遺伝子群の把握など）にも応用可能であると考えられる。本研究において NP をモデル化学物質として実施したアミを用いた成長・成熟試験および生殖試験に遺伝子発現解析を加えた総合的な評価法は、海域での影響だけでなく、その原因も追究可能な方法であり、大変有用である可能性が示唆された。今後は実環境水を用いた評価を実施し応用し、更に有効な手法として活用できるように研究を進めていくことが必要である。また今回得られた結果や今後得られた結果は、精力的に公表し国内外に広めていきたい。

研究成果の概要（英文）：In this study, an acute and chronic toxicities of growth and mature of nonyl phenol and related compounds on *Americamysis bahia* have been investigated. As results, these compounds showed adverse effects of growth and reproductive functions on the experimental organism. And also, reproductive effects were observed in addition to the growth effects. Nonyl phenols positively indicated adverse effect on reproductive function. Using DNA micro array, gene expression profiling of after exposed to nonyl phenols mixture, 32 alternating genes expression exposed at 1 $\mu\text{g/L}$ , 27 genes at 3  $\mu\text{g/L}$ , 43 genes at 10  $\mu\text{g/L}$ , and 72 genes at 30  $\mu\text{g/L}$  were detected. The possible participation of these alternating genes expression related to molting and reproduction on *Americamysis bahia* are suggested.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：生態系影響評価、マイクロアレイ、有害化学物質、環境技術、生態学

## 1. 研究開始当初の背景

現在、内分泌攪乱作用が疑われている化学物質を対象として、甲殻類などの無脊椎動物に対する有害性評価法の開発が国際的に進められている。これら試験法は、自然界で観察された異常個体の発生原因及びメカニズム解明などに大きく寄与できると考えられる。内分泌攪乱物質の多くは、産業排水や生活排水にも多く含まれ、河川等を通じて海洋に広がり、水圏に棲息する野生生物に多大な影響を及ぼす可能性がある。しなしながら、内分泌化学物質問題に関する研究の多くは、水圏に棲息する脊椎動物におけるものがほとんどであり、多くの無脊椎動物において内分泌攪乱作用の主な標的である内分泌系は十分に明らかにされていないのが現状である。無脊椎動物の内分泌系は脊椎動物の内分泌系と大きく異なることから、脊椎動物を対象に行ったリスク評価研究で影響がないと言われた化学物質が無脊椎動物に影響を及ぼしている可能性は否めない。また、直接的に脊椎動物に影響がない場合でも、無脊椎動物に影響があり、それらを捕食した脊椎動物において間接的に影響が現れる可能性もある。そのため、生態系全体を考慮した脊椎動物に偏らない評価が必要であり、無脊椎動物（海産の無脊椎動物）を対象としたリスク評価手法の確立と発生したリスクのメカニズム解明は急務である。スコットランド沿岸に棲息するヨコアミや日本の仙台湾に棲息するミツクリハマアミでは、間性個体が見られ、仙台湾のその地点では、ビスフェノール A やノニルフェノール (NP) が検出されている。この間性個体では、雌雄の特徴を併せ持つ二次性徴の形成異常が認められているが、実験的検証はなされておらず、水質汚染と生殖異常との因果関係はいまだ不明である。この要因として、甲殻類の発生・脱皮・生殖に関する内分泌調整機構の知見が極めて乏しいことが挙げられ、甲殻類に対する内分泌かく乱物質の影響に関する知見の集積が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、甲殻類（アミ類）の発生・脱皮・生殖に関する内分泌調整機構に着目し、これらに対する影響を形態学的、生化学、分子生物学アプローチから多角的に評価し、これまで不明な点が多かった甲殻類の内分泌調整機構について基礎的知見を得、内分泌か

く乱作用の疑われる化学物質による影響評価を試み、環境水の評価法として確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

1) 内分泌かく乱作用が指摘されているノニルフェノール (NP) の各種異性体および市販の NP 異性体混合物を用いて、それら物質のアミへの急性毒性、成長・成熟および繁殖影響を調べた。各試験には、熊本県立大学環境共生学部にて5年以上継代飼育している USEPA 由来の海産甲殻類アミ *America mysis bahia* を用いた。

### 1-1) 急性毒性試験

試験物質には、4-(2-Methyloctan-2-yl)phenol (NP-0)、4-(3-Ethyl-2-methylhexan-2-yl)phenol (NP-I)、4-(2,6-Dimethylheptan-2-yl)phenol (NP-C')、4-(3-Methyloctan-3-yl)phenol (NP-N) および 4-(2,5,5-Trimethylhexan-2-yl)phenol (NP-Q) を用いた。アミを用いた急性毒性試験は孵化 24 時間以内の幼体を用いて、USEPA の試験法 (EPA/600/4-90/027F) に準拠して行った (USEPA, 1993)。試験方法は、300 ml 容のガラス製ビーカーに試験液 200 ml を入れて曝露を行った。試験液の塩濃度は 25‰ に設定し、0.1 % DMSO 含有の溶媒対照区を設けた。各濃度区それぞれ 10 個体を 2 群に分け 96 時間半止水式曝露を行った。試験液は 24 時間毎に交換し、餌はブラインシュリンプ孵化幼生をアミ 1 個体あたり約 100 個体程度の量を 1 日 2 回に分けて与えた。試験期間中、毎日観察を行い、曝露終了後における死亡率からプロビット解析により 48 時間及び 96 時間の LC50 値を算出した。

### 1-2) 成長・成熟試験

NP 異性体混合物、NP 異性体の NP-N および NP-Q を対象に、NP 異性体の成長・成熟試験を実施した。いずれの物質も曝露濃度を急性毒性値を基に NP 異性体混合物は、0.3, 1, 3, 10 及び 30  $\mu\text{g}/\text{l}$ 、NP-N および NP-Q は 0.5, 5.0 および 50  $\mu\text{g}/\text{l}$  に設定し、14 日間曝露した。成長・成熟試験には、孵化 24 時間以内の幼体を飼育温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明暗周期 16h:8h の条件下で 7 日間飼育し、孵化後 7 日齢を供試した。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 0.1% DMSO 含有の助剤対照区を設けた。各濃度区それぞれ 5 個体/250 ml 試験液とし半止水式曝露を行った (n=8)。試験液は 24 時間毎に交換し、餌

はブラインシュリンプ孵化幼生をアミ 1 個体あたり約 150 個体程度の量を 1 日 2 回に分けて与えた。曝露期間中、生死の観察、脱皮を行った個体の抜け殻から脱皮数及び脱皮頻度の観察も毎日行い、曝露終了後、体長、体重および頭胸甲長を測定し、実体顕微鏡を用いて外観的二次性徴から雌雄の観察も行った。

#### 1-3) 繁殖影響試験

NP 異性体混合物の繁殖への影響を調べるために、EPA OPPTS 850.1350 Mysid Chronic Toxicity Test に準拠して繁殖試験を行った。試験は 2 L の試験水に孵化後 24 時間以内の幼生個体を 10 匹入れ、28 日間半止水式曝露を行った。試験期間中、雌雄判別を行い、雌雄各 5 匹に入れ替えを行った。測定項目は、生存率、総脱皮数、体長、湿重量、頭胸甲長、雌個体の育児嚢の大きさ、性比および曝露開始 21-28 日目の産仔数とした。

2) DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を実施し、生体内における影響の評価を行った。

#### 2-1) アミ DNA マイクロアレイの作製

性成熟しているアミの個体 5 匹(雌雄混合)から totalRNA を抽出した。抽出した totalRNA を、Genome Sequencer FLX System(ロシユ・ダイアグノスティクス社製)を利用した高速シーケンス解析を実施した。その解析結果をもとにアミ DNA マイクロアレイを株式会社エコジェノミクスにて DNA マイクロアレイの作製を行った。作製後、DNA マイクロアレイの評価の為に、脱皮ホルモン様物質：

20E(20-hydroxyecdysone)を 500  $\mu\text{g}/\text{l}$  の濃度で 8 時間および 24 時間曝露し、変動する遺伝子の確認を行った。ここで得られた結果を基に、実際の評価に使用するフォーカスタイプの DNA マイクロアレイに搭載する遺伝子を選別する。

#### 2-2) アミ DNA マイクロアレイを用いた NP を曝露したアミの遺伝子発現解析

孵化後 7 日齢のアミを NP 異性体混合物に 0(溶媒対照区)、1, 3, 10, 30  $\mu\text{g}/\text{L}$  の濃度で 14 日間曝露し、曝露終了後、各試験区 15 匹のアミ(3 匹 $\times$ n=3)から totalRNA を抽出した。total RNA の抽出は、RNeasy<sup>®</sup>Mini Kit(株式会社キアゲン)を、自動核酸抽出装置 QIAcube<sup>™</sup>(株式会社キアゲン)に適用して行った。抽出した total RNA は分光光度計を用いて OD260 及び 280 を測定し、純度及び濃度を確認した。抽出した total RNA は、cRNA 合成に用いるまで $-30^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

cRNA 合成は、含量 1  $\mu\text{g}$  の total RNA を、Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies, USA)を使って行った。cRNA 合成時に、蛍光色素 Cy5 (Agilent Technologies,

USA)での標識を行い、遺伝子発現解析に供するまで $-30^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

DNA マイクロアレイは 2, 240 種の遺伝子を搭載したフォーカスタイプのアミ DNA マイクロアレイを使用した。

DNA マイクロアレイとのハイブリダイゼーションは、2  $\mu\text{g}$  の Cy5 標識 cRNA をハイブリダイゼーション溶液と混合し、 $45^{\circ}\text{C}$  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、専用スキャナー(GenePix 4000B; Axon Instruments, USA)でスポット蛍光強度を読み取り、専用ソフト Microarray Imager (Combimatrix Corp., USA)を用いて数値化を行った。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、DNA マイクロアレイ全体のスポット強度の中央値を用いて正規化し、解析ソフト arraystat (Imaging Research Inc, USA)を使って有意( $p<0.05$ )に発現変動を示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。

## 4. 研究成果

### 1-1) 急性毒性試験

アミに対する NP-0、NP-I、NP-C'、NP-N および NP-Q の急性毒性試験を実施した。その結果、アミに対する 48h-LC50 値は、NP-0 が 144  $\mu\text{g}/\text{l}$ 、NP-I が 91  $\mu\text{g}/\text{l}$ 、NP-C' が 131  $\mu\text{g}/\text{l}$ 、NP-N が 72  $\mu\text{g}/\text{l}$ 、NP-Q が 89  $\mu\text{g}/\text{l}$  と算出された。NP-I、NP-Q、NP-N、NP 混合物は、50  $\mu\text{g}/\text{l}$  以上で生存率の減少が顕著にみられたが、NP-0、NP-C' は、100  $\mu\text{g}/\text{l}$  以上で顕著な生存率の減少がみられた。アミにおける急性毒性値は、強い方から NP-N、NP 混合物、NP-Q、NP-I、NP-C'、NP-0 となった。一方で、ヒメダカにおける急性毒性値は、強い方から NP-0、NP-N、NP 混合物、NP-Q、NP-I、NP-C' と報告されている(孫ら、2009)。NP-0 は、アミにおいては最も毒性が低いものの、ヒメダカにおいては最も毒性が強いことが明らかになった。また、ヒメダカと比較すると、毒性学的感受性はアミの方が約 2 ~ 4 倍高いことが判明した。これらのことから、種差における各物質の影響に違いが認められ、アミは NP 異性体に対して強い感受性をもつことが明らかになった。

### 1-2) 成長・成熟試験

14 日間の NP 曝露による死亡率は、0.3, 1, 3, 10 および 30  $\mu\text{g}/\text{l}$  の各濃度区それぞれ平均 12.5, 22.5, 15, 22.5 および 10 %であった。また、対照区および助剤対照区の死亡率は、それぞれ平均 2.5 および 10 %であった(生存率は対照区および助剤対照区でそれぞれ平均 97.5 および 90 %を維持した)。USEPA では正確な試験が行われているか判断するた

め、対照区の生存率が80%以上であることを判断基準として定めており (USEPA, 1994)、本実験はこの基準を十分満たす結果が得られた。NP曝露終了後におけるアミの体長は、NP-1  $\mu\text{g}/\text{l}$  以上の曝露区において、対照区と比較して有意な体長低下が認められ、また、頭胸甲長においても NP-10 及び 30  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露区において、対照区と比較して有意な低下が確認された。曝露終了後における体重においても、NP-30  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露区において、対照区と比較して有意な低下が認められた。曝露終了後、その外観的二次性徴から判別した雌雄比において、統計学的有意差は認められなかったものの、未成熟な生殖腺を呈する個体が濃度依存的に増加傾向を示し、NP-30  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露区では、対照区と比較して未成熟個体数の有意な増加が認められた (12.5%)。曝露期間中における脱皮の観察において、NP-30  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露区では、曝露開始約10日から脱皮抑制がみられ、曝露期間中における脱皮数から算出した曝露終了後の総脱皮数は、NP-10 及び 30  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露区において、対照区と比較し有意な低下が認められた。近年、西欧の汽水域における NP の検出濃度範囲は <0.2-12  $\mu\text{g}/\text{l}$  であることが報告されており、環境水中の存在濃度に近い濃度の NP はアミの成長阻害を引き起こすことが明らかとなった。また曝露期間中、毎日脱皮殻を観察し、脱皮数から累積した総脱皮数についても対照区と比較し有意な低下が認められたことから、NP曝露によりアミの脱皮が顕著に抑制され、それに伴い環境中存在濃度に近い濃度において成長及び成熟の遅延が誘起されることが示唆された。

14日間の NP-N 曝露における生存率は、0.5, 5 および 50  $\mu\text{g}/\text{l}$  の各濃度区それぞれ平均で 75, 82.5 および 92.5% であった。14日間毎日脱皮殻の観察を行い、算出した脱皮数の経時変化と曝露最終日における累積総脱皮数では、0.5  $\mu\text{g}/\text{l}$  では曝露7日目から、5, および 50  $\mu\text{g}/\text{l}$  では曝露6日目から有意な脱皮数の減少が認められた。曝露終了後の総脱皮数では、濃度依存的に減少し、助剤対照区と比較して、0.5  $\mu\text{g}/\text{l}$  では約 21% ( $p < 0.05$ )、5  $\mu\text{g}/\text{l}$  では約 37% ( $p < 0.01$ )、50  $\mu\text{g}/\text{l}$  では約 49% ( $p < 0.01$ ) と有意な減少がみられた。体長では、助剤対照区と比較して、50  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露区において、約 6.5% 減少し有意な低下が確認された ( $p < 0.01$ )。これらの結果から NP-N は、脱皮数の減少が成長の遅延を引き起こすことが示唆された。脱皮は成長や繁殖に不可欠であり、アミ類のライフサイクルにおいて重要な生理現象である。そのため脱皮数の減少は、個体群の維持に重要な影響を及ぼすものと考えられ、NP-N による個体群への影響が懸念された。頭胸甲長では、助剤対照区と比較して、50  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝

露区において、約 9.4% 有意に減少していた ( $p < 0.01$ )。また、体長と頭胸甲長間で正の相関性がみられたため、体型バランスへの影響はないことが示唆された。湿重量では、助剤対照区と比較して、50  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露区において、約 20% 有意に減少していた ( $p < 0.01$ )。曝露終了後、その外観的二次性徴から判別した雌雄比において、NP-N では、濃度依存的に未成熟割合の増加が確認された。以上のことから、NP 異性体は、性成熟の遅延を引き起こすことが示唆された。

14日間の NP-Q 曝露における生存率は、0.5, 5 および 50  $\mu\text{g}/\text{l}$  の各濃度区それぞれ平均で 60, 77.5 および 70% であった。14日間毎日脱皮殻の観察を行い、算出した脱皮数の経時変化と曝露最終日における累積総脱皮数では、5  $\mu\text{g}/\text{l}$  では曝露5日目から、50  $\mu\text{g}/\text{l}$  では曝露7日目から助剤対照区と比較して有意な減少が認められた。また、曝露8日目以降の 50  $\mu\text{g}/\text{l}$  では、脱皮抑制が顕著にみられた。曝露終了後の累積総脱皮数総では、助剤対照区と比較して、5  $\mu\text{g}/\text{l}$  では約 42% ( $p < 0.05$ )、50  $\mu\text{g}/\text{l}$  では約 58% ( $p < 0.05$ ) 減少し、有意な減少がみられた。これらの結果から、NP-Q は、低濃度でも脱皮に影響を及ぼすことが明らかになった。脱皮数の減少は、個体群の維持に重要な影響を及ぼすものと考えられ、NP-Q による個体群への影響が懸念された。体長では助剤対照区と比較して、5  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露区において約 3.4% ( $p < 0.05$ ) 減少、50  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露区においては約 43% ( $p < 0.01$ ) 減少し、有意な低下が認められた。頭胸甲長では濃度依存的に減少し、助剤対照区と比較して、0.5  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露区において約 8.3% ( $p < 0.05$ )、5  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露区において約 12.3% ( $p < 0.01$ )、50  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露区においては約 33.9% ( $p < 0.01$ ) 減少し、有意な低下が認められた。また、0.5  $\mu\text{g}/\text{l}$  では、体長と頭胸甲長間の相関係数が 0.05 となり、相関関係は認められなかった。この結果から、体長と頭胸甲長間の相関は、奇形などの指標となるため (Okumura, 2003)、体型の相対成長比に影響を与えた可能性が考えられ、成長に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、5  $\mu\text{g}/\text{l}$  以上の濃度区では、このような影響は観察されていないが、高濃度区では奇形個体は死亡した可能性が考えられた。湿重量では、50  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露区において、助剤対照区と比較して約 43% の有意な低下が確認された ( $p < 0.01$ )。また、高濃度区ではアルテミアの残渣が多く観察され、摂食不足による成長の阻害も考えられる。曝露終了後、その外観的二次性徴から雌雄比を算出した。濃度依存的な影響はみられなかった。

また、成長成熟試験により、NP-Q、NP-N、NP 混合物は、アミの成長・成熟 (脱皮、体長、頭胸甲長、湿重量、性成熟) の遅延を引き起

こすことが明らかになった。さらに、NP-Q 0.5  $\mu\text{g}/\text{l}$  においては、アミの体型バランスへ影響を及ぼした可能性が示唆された。また、急性毒性では、NP-Nの毒性が最も強かったものの、成長成熟では各エンドポイントで作用する濃度も、各物質での作用点も異なることが確認された。本研究の成長成熟試験の最小作用濃度の結果は、環境中で検出される濃度と同程度もしくはそれ以下であったことから、アミの生態系へ影響を及ぼす可能性が十分にあることが示唆された。

### 1-3) 繁殖影響試験

曝露期間終了後の生存率は、S.C. で 72%、6.25  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露群で 84%、12.5  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露群で 84%、25  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露群で 72%と生存率に差は見られなかった。

曝露期間中の脱皮数の経時変化脱皮数については、12.5  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露群において曝露 4 日目から、25  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露群において曝露 6 日目から脱皮数の有意な減少が確認された。また累積総脱皮数においても 12.5 および 25  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露群において有意な減少が確認された。これらの事より NP はアミの脱皮阻害を引き起こすことが確認された。体長では 25  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露群において、頭胸甲長では、12.5  $\mu\text{g}/\text{l}$  以上の曝露群において、湿重量では全ての曝露群において有意に減少していることが確認された。また、性比や育児嚢の大きさに関しては、いずれの曝露濃度においても差は確認されなかった。F0 世代試験期間中における 21-28 日目の産仔数を表 3 に示す。今回の曝露試験期間中(21-28 日目)では、6.25 および 25  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露群において有意に総産仔数が減少していることが確認された。また対照群と比べて曝露群の方が早い時期に産仔を開始したにも関わらず総産仔数が少ないことは、NP がアミの生殖に影響を及ぼすことが示唆された。しかし今回の試験では限られたペアしか作ることが出来なかったため産仔数の変化がペアに依存する可能性も否定できなかった。今後は、ペアの数を増やすなどの対応も検討する必要がある。

### 2-1) アミ DNA マイクロアレイの作製

高速シーケンスの結果、解析総対象リード数は 275,323 リードであった。それらの内、104 リードが無効配列のフィルタリングにより除去され、275,219 リードに対し、アセンブルを実施した。その結果、アセンブルによって無効と判断されたリード数は 58,280 であり、シングレット(1本のリード配列で構成されているもの)数は 7,104、コンティグ(2本以上のリードを入れるから構成されているもの)数は 17,452 であった。これらの合計 24,556 リードを DNA マイクロアレイに搭載する遺伝子とした。

DNA マイクロアレイには 24,556 遺伝子を 3 スポットずつ搭載し、20E 曝露を行ったアミの遺伝子発現解析を行った。その結果、8 時間曝露で 1,036 個の遺伝子、24 時間曝露で 956 個の遺伝子の発現変動を捉える事が出来た。それら遺伝子のうち 629 個の遺伝子が共通であった。これら発現変動遺伝子を中心に、NP がアミの内分泌調節機構へどのような影響をおよぼすか調査するため(3-2 で使用)のフォーカスタイプの DNA マイクロアレイを作製した。

### 2-2) アミ DNA マイクロアレイを用いた NP を曝露したアミの遺伝子発現解析

DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果、1  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露で 32 遺伝子、3  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露で 27 遺伝子、10  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露で 43 遺伝子、30  $\mu\text{g}/\text{l}$  曝露で 72 遺伝子の発現変動遺伝子を検出することが出来た。これら発現変動遺伝子の中で、5 遺伝子は全ての曝露群において共通して発現変動していた。それら 5 遺伝子の中でも、表皮を作る組織で見られ、クチクラ層の形成に関与し、昆虫等の発生や脱皮に重要であると言われている cuticular protein analogous to peritrophins 1-H は濃度依存的に発現変動が減少していた。今回の遺伝子発現解析で実施した曝露濃度は、実際に成長・成熟試験でも脱皮の減少が見られていたことから、cuticular protein analogous to peritrophins 1-H はアミの脱皮に関わるバイオマーカー候補として考えられた。今後は定量的リアルタイム PCR などの方法でより詳細な検討を進めることでバイオマーカーとしての有用性を明確化していく必要があると考えられた。

### 3) まとめ

本研究では、NP をモデル化学物質としてアミにおける生殖・発生異常とその発生メカニズムを活用した環境水評価手法の開発を進めてきた。本研究の結果より、アミの急性毒性試験、成長・成熟試験、繁殖試験および DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析は、アミの表現型への影響と生体内での影響を同時に調べる事が可能であり、海域での影響だけでなく、その原因も追究可能な方法である可能性が示唆された。今後は実環境水を用いた評価を実施し応用し、更に有効な手法として活用できるように研究を進めていくことが必要である。またそれら研究成果は、順次公表し、海域環境の生態影響に関する知見を集積することに貢献していく予定である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

① Arizono, K., Uchida, M., Hirano, M., Miura, S., Yoshidu, R., Nakamura, H., Kagami, Y., Kusano, T., Tatarazako, N., Kobayashi, J., Ishibashi, Y., Koga, M., Toxicity of Triclosan and Triclocarban in Mysid Crustacea (*Americamysis bahia*), Organohalogen Compounds, 査読有, Vol. 74, 2012, 976-979

〔学会発表〕 (計 5 件)

① 古閑亜理沙、米村香純、内田雅也、小林淳、有菌幸司、古賀実、海産甲殻類アミを用いた 4-ノニルフェノール異性体の生態毒性影響評価、第 21 回環境化学討論会講演要旨集、2012、855-856

② Arizono, K., Uchida, M., Hirano, M., Miura, S., Yoshidu, R., Nakamura, H., Kagami, Y., Kusano, T., Tatarazako, N., Kobayashi, J., Ishibashi, Y., Koga, M., Toxicity of Triclosan and Triclocarban in Mysid Crustacea (*Americamysis bahia*), 32nd International symposium on halogenated persistent organic pollutants, 2012

③ 米村香純、古閑亜理沙、小林淳、内田雅也、有菌幸司、古賀実 (2013) アミ (*Americamysis bahia*) を用いた環境汚染化学物質の生態毒性評価、第 47 回日本水環境学会年会講演要旨集、2013、646

④ 内田雅也、中村浩、鏡良弘、草野輝彦、古賀実、有菌幸司 (2012) アミ DNA マイクロアレイを用いた DDT の生態影響評価、平成 23 年度日本水環境学会九州支部研究発表会

⑤ 内田雅也、平野将司、中村浩、鏡良弘、草野輝彦、山内良子、三浦苑子、吉津伶美、古賀実、有菌幸司 (2011) 海産甲殻類・アミを用いた抗菌剤類の生態影響評価、第 17 回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pu-kumamoto.ac.jp/~kklab/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古賀 実 (KOGA MINORU)

熊本県立大学・環境共生学部・教授

研究者番号：40131916

### (2) 研究分担者

有菌 幸司 (ARIZONO KOJI)

熊本県立大学・環境共生学部・教授

研究者番号：70128148

### (3) 連携研究者

平野 将司 (MASASHI HIRANO)

愛媛大学沿岸環境科学研究センター

化学汚染・毒性解析部門

グローバル COE 研究員

研究者番号：20554471

### (4) 連携研究者

内田 雅也 (MASAYA UCHIDA)

熊本県立大学大学院環境共生学研究科博士後期課程 (申請時所属)

株式会社エコジェノミクス 主事研究員

(現所属：2012 年度以降)

研究者番号：80575267