

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：27101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510036

研究課題名(和文)内湾の底質汚染とイトゴカイによる汚染底質評価に関する研究

研究課題名(英文)Development of bioassay method of sediment using polychaete, Capitella telata

研究代表者

上田 直子(Ueda, Naoko)

北九州市立大学・国際環境工学部・教授

研究者番号：10433400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は堆積物食性多毛類のイトゴカイを試験生物とする底質のバイオアッセイ法の開発である。汚染物質を重金属類(Cd、ZnおよびCu)とし、コンパクトな曝露実験系を確立した。急性毒性試験では、イトゴカイ成体に対するCdのLC50は7.65mg/L、ZnのLC50は15.9mg/L、CuのLC50は2.62mg/Lとなり、文献値とほぼ同様の値が得られた。一方、慢性毒性試験では成体および幼生ともLC50では判定できなかった。そこで、生死以外の判定方法としてイトゴカイDNAマイクロアレイを作成し、遺伝子発現変動解析を試みた。その結果、CdおよびZnに共通して発現変動した遺伝子が7種確認された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried the development of toxicity tests of sediment for marine organisms, Polychaete, Capitella telata. The hazardous heavy metals (Cd, Zn and Cu) were selected as the toxic substances. First, we contrived the simple and convenient toxicity testing system.

In the acute toxicity tests for Capitella (Adult), we were able to obtain the concentrations of LC50 (96h) of Cd, Zn and Cu, respectively 7.65mg/l, 15.9mg/l and 2.62mg/l. These values were corresponded with literatures. However, in the chronic toxicity tests for Capitella (Adult and Larva), we could not identified the toxicities by the LC50 (28d) value. Then, we produced the Capitella DNA microarray in order to qualitatively assess the toxicities at the level of gene expression. As results, Cd and Zn, even the low concentrations, were found to cause strong alteration of 7 kinds Capitella gene expression.

研究分野：海洋生態学

キーワード：汚染底質 重金属 イトゴカイ バイオアッセイ DNAマイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、海域の汚染問題は水質から底質へと移りつつある。海域に放出された様々な汚染物質は最終的に海底に堆積・残留し、海洋生態系へ影響を及ぼす。従って、汚染底質の生物に対する毒性影響評価方法として、底質のバイオアッセイ法の確立は急務と考える。

(2) 現在、わが国には実用化レベルに達した海洋生物を用いた底質のバイオアッセイ法がほとんどない。本研究において試験生物に選定したイトゴカイは堆積物食性多毛類で、世界中の内湾に一般的に生息する種である。このため、開発したバイオアッセイ法は世界的に汎用できる方法となる。

(3) また、イトゴカイはその生理・生態が他の無脊椎動物に比べてかなり詳細にわかっていること、イトゴカイの室内飼育が比較的容易であること、イトゴカイの生活環が1ヶ月程度と短く慢性毒性試験が約1ヶ月で行えることなど、試験生物としての適性が非常に高いと考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、底質の影響を真に反映するバイオアッセイ法として、堆積物食性多毛類のイトゴカイを試験生物とし、重金属類のカドミウム(Cd)、亜鉛(Zn)および銅(Cu)の急性毒性および慢性毒性を判定する試験方法を開発することである。

(2) 最初に、人工海水を用いたコンパクトな止水式の曝露実験系の確立を目指し、効率的なバイオアッセイ法を考案する。

(3) 次に、重金属類の急性毒性値および慢性毒性値が半数致死濃度(LC50)で求められるかどうかを検討する。

(4) 慢性毒性については、イトゴカイ DNA マイクロアレイを開発し、重金属類による遺伝子発現変動を指標とした遺伝学的手法の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 止水式曝露実験系の確立

コンパクトな曝露実験装置(図1)は、プラスチック製50ml遠沈管の底に清浄な底質



図1 イトゴカイの曝露実験装置

を厚さ1~2cm程度入れ、そこに濃度を調整した重金属類を含む人工海水(SEALIFE)を30ml入れた。各遠沈管には微弱なエアレーションを行った。

(2) 急性毒性試験

上記の曝露実験装置を用い、コントロールおよび海水で濃度を調整したCd、ZnおよびCuの溶液にイトゴカイの成体を10匹ずつ入れて96時間暗所で曝露させた後、生存個体数を計測した。急性毒性試験では、試験期間中に換水および給餌は行わなかった。

求められた死亡率よりロジスティック解析によりLC50を求めた。また、その結果を文献値と比較することで、本方法の急性毒性値の妥当性を検証した。

(3) 慢性毒性試験

急性毒性試験と同じ実験装置を用い、急性毒性試験で得られたLC50の1/100~1/10の濃度範囲に調整したCdおよびZnの溶液で試験を行った。

Cd溶液について、各濃度にイトゴカイの成体を10匹ずつ入れて28日間暗所で曝露させた後、生存個体数を計測した。慢性毒性試験では、試験期間中は3日に1回換水及び給餌を行った。

CdおよびZn溶液について、各濃度にイトゴカイ幼生20匹ずつ入れて28日間暗所で曝露させた後、生存個体数を計測した。幼生を用いた場合は、幼生が定着するまでの数日は人工海水のみで飼育し、その後実験を開始した。

(4) イトゴカイ DNA マイクロアレイによる遺伝学的手法の検討

イトゴカイ DNA マイクロアレイの作成および網羅的な遺伝子発現解析

天草(清浄)および洞海湾の泥(汚染底質)で飼育したイトゴカイの遺伝子配列を次世代シーケンサー(Ion Torrent PGM: サーマージャパン社)によって解析した。

次に、各イトゴカイ群において特異的に発現している遺伝子および両群で共通している遺伝子をプロファイルし、9,223遺伝子を搭載したイトゴカイ DNA マイクロアレイを作成した。

イトゴカイ DNA マイクロアレイを利用して、CdおよびZnに曝露したイトゴカイ試料について網羅的遺伝子発現解析を行い、発現変動遺伝子群のスクリーニングを行った。

4. 研究結果

(1) 急性毒性試験(高濃度短期間曝露試験)
イトゴカイ成体を用いた急性毒性試験の

結果を図2、図3および図4に示す。イトゴカイ成体に対する重金属類の急性毒性値は、CdのLC50が7.65mg/L、ZnのLC50が15.9mg/L、CuのLC50が2.62mg/Lの値が得られた。3種の重金属類の中ではCuがもっとも毒性が高く、Znがもっとも低い結果となった。

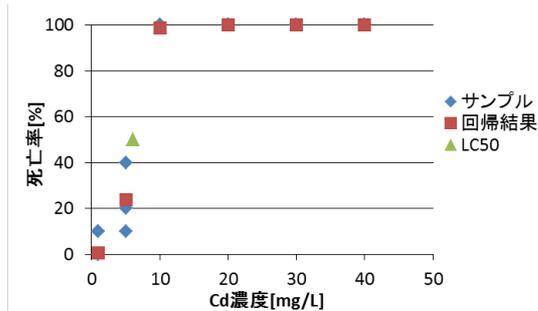


図2 イトゴカイに対するCdの急性毒性

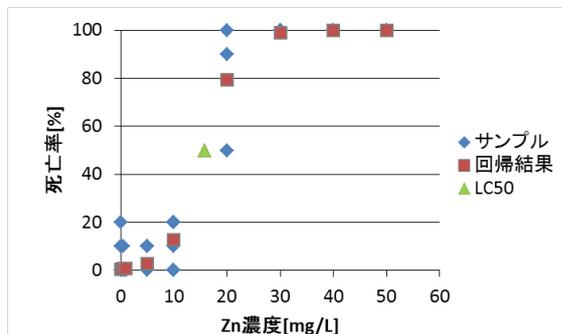


図3 イトゴカイに対するZnの急性毒性

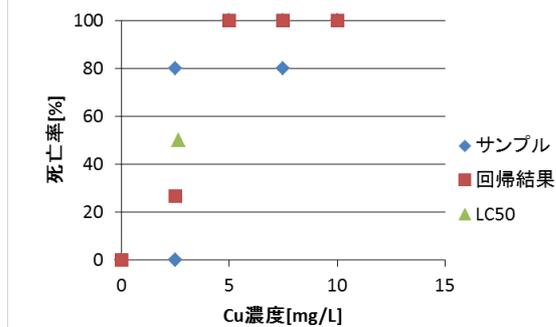


図4 イトゴカイに対するCuの急性毒性

また、これらの結果を文献値と比較すると、Cuを除いてほぼ文献値の範囲内であったため、今回開発した急性毒性の試験方法は妥当と考え、急性毒性のエンドポイントはLC50で求められると判断した。なお、CuのLC50が文献値より低いことについては、今後検討の必要がある。

(2)慢性毒性試験（低濃度長期間曝露試験）

最初、Cdによる慢性毒性試験をイトゴカイの成体を用いて行った。試験ではいずれの濃度でもイトゴカイの生存率が100%を大きく上回り、この曝露条件でCdの毒性影響はみられなかった。なお、生存率が100%を大

幅に超えた理由として、試験前にイトゴカイ成体の雌雄を確認しなかったため、28日間の曝露期間中に遠沈管内で繁殖があったためと考えられる。イトゴカイ成体を試験生物とする場合、バイオアッセイには雌雄の別や成熟度を考慮する必要があることがわかり、成体を慢性毒性試験に用いると試験方法が煩雑になることが判明した。

次にイトゴカイの成熟期間が約一ヶ月であることから、試験生物としてイトゴカイ幼生を用い、CdおよびZnで28日間の慢性毒性試験を行った。その結果、Cdではすべての濃度でほぼ100%近い生存率が得られ、この曝露条件では幼生にもCdの毒性影響はみられなかった（図5）。一方、亜鉛ではLC50が0.15mg/l付近となり、急性毒性値の1/100の濃度でイトゴカイ幼生に毒性影響がみられることがわかった（図6）。この結果は急性毒性試験の結果と異なり、慢性毒性試験ではCdよりZnの方がイトゴカイ幼生に対して毒性が高いことを示した。

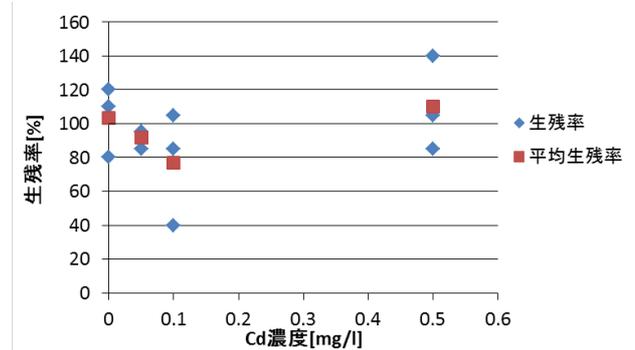


図5 イトゴカイに対するCdの慢性毒性

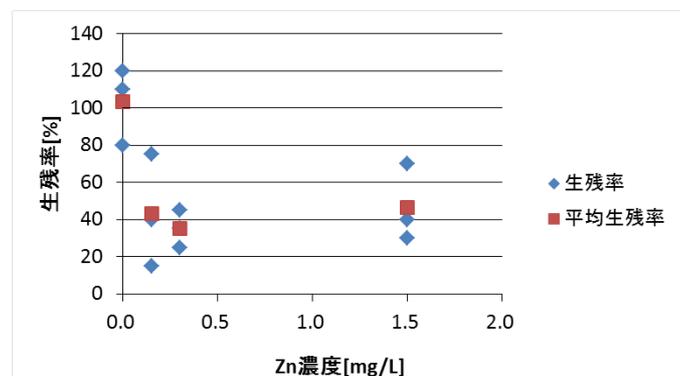


図6 イトゴカイに対するZnの慢性毒性

本実験から、慢性毒性実験の方法としては、イトゴカイ幼生を用いた28日間曝露が簡便で標準化しやすい方法であると考えた。

(3)イトゴカイDNAマイクロアレイによる遺伝学的評価手法の検討

急性毒性値の1/100~1/10の低濃度曝露で行った慢性毒性試験の結果から、生死の判別のための毒性評価は不十分であると考えた。そこで、低濃度曝露におけるエンドポイントを

検討するために、イトゴカイ DNA マイクロアレイによる遺伝学的評価手法の検討を行った。

最初に天草（清浄）および洞海湾の泥（汚染底質）でイトゴカイを飼育し、それぞれのイトゴカイ群 10 匹の個体（全身）から total RNA を抽出・精製した後、次世代シーケンサーによって遺伝子配列の解析を行った。イトゴカイのゲノム配列に関する情報は他の実験生物に比べて質・量とも極端に乏しいため、本研究では無脊椎動物種のレファレンスタンプク質データベースを利用して、DNA マイクロアレイ作成に必要な遺伝子配列情報（34,918 個×約 200 塩基長）を獲得した。さらに、そこから 9,223 種類の DNA マイクロアレイ用オリゴ DNA プロンプ（35～40 塩基長）を設計した。

次に、作成したイトゴカイ DNA マイクロアレイを利用して、Cd および Zn 曝露によるイトゴカイの発現変動遺伝子群の網羅的探索を行った。曝露実験はイトゴカイ成体を用い、Cd および Zn の濃度を急性毒性試験で得られた LC50 の 1/10 に設定し、48 時間飼育で生残した個体について行った（生残率はいずれも 100%）。その結果、DNA マイクロアレイに搭載された遺伝子のうち、Cd 曝露によって発現が 2 倍以上に増加した遺伝子は 13 種類、1/2 以下に抑制した遺伝子は 10 種類であった。また、Zn 曝露によって発現が 2 倍以上に増加した遺伝子は 41 種類、1/2 以下に抑制した遺伝子は 14 種類であった。慢性毒性試験の結果と同様に、Zn の方が Cd に比べてより多数の遺伝子発現に影響を及ぼすことがわかった。

これらの発現変動した遺伝子のうち、Cd および Zn に共通して発現変動した遺伝子およびその遺伝子の毒性学的知見を表 1 に示す。これらの遺伝子の変動は低濃度の Cd および Zn の潜在的毒性影響を示唆している。

	遺伝子名	機能
発現量増加	ATP-binding cassette, sub-family F, member 2	ATPに結合して様々な分子を細胞膜内外へ輸送
	ATP-dependent transporter	ATPに結合して様々な分子を細胞膜内外へ輸送
	DnaJ (Hsp40) homolog	タンパク質を正常に折りたたむ（フォールディング）
	neuronal calcium sensor	カルシウム依存的にon/offとなる神経系のセンサータンパク質
	neurocalcin homolog	カルシウム依存的にon/offとなる神経系のセンサータンパク質
発現量抑制	dedicator of cytokinesis	細胞内シグナル伝達に関与
	carboxypeptidase B-like	ペプチド中のアルギニン、リジンを攻撃するペプチド分解酵素

表 1 Cd および Zn 曝露に発現変動した遺伝子

今後は、今回の研究でスクリーニングされたこれらの遺伝子の新規バイオマーカーとしての有用性を確認し、より簡便な方法でバイオアッセイに使えるようリアルタイム PCR による測定法を確立していく予定である。また、短期曝露と長期曝露では遺伝子の応答が異なる可能性も考えられ、遺伝子発現の経時的変化等も確認する予定である。

以上をまとめると、今回の研究でイトゴカイ成体を用いた急性毒性試験法はほぼ確立できたと考ええる。考案したコンパクトな曝露実験系によって、少量のサンプルで効率的なバイオアッセイが可能になった。一方、慢性毒性試験法は、コンパクトな曝露実験装置によるイトゴカイの長期飼育は可能になったが、イトゴカイ成体を用いた試験では適正な判定をすることができなかった。試験生物としてはイトゴカイ幼生を用いる方法が実用的であると考えられる。

また、生死による毒性影響以外に遺伝子による判定を試み、開発したイトゴカイ DNA マイクロアレイによって数種のバイオマーカー候補遺伝子の選出に成功した。現実の汚染底質による海洋生態系への影響は低濃度長期曝露の可能性が高いことから、実用的な慢性毒性試験方法の確立が急務と考えている。今後は、リアルタイム PCR による測定法で潜在的毒性影響をより簡便に判定する方法を構築し、イトゴカイのバイオアッセイ法を最終的に確立する予定である。

<引用文献>

中村由行、底質汚染評価のためのバイオアッセイ、水環境学会誌、29、2006、14-16
 日本環境毒性学会編、生体影響試験ハンドブック、朝倉書店、2004、349pp
 眞道幸司、海産生物を用いた毒性試験法および化学物質の有害性評価手法に関する近年の動向、海生研研報、15、2012、41-62
 眞道幸司、水域における化学物質の生態影響リスク推定の現状と水産環境保全に向けた課題、海生研研報、16、2013、29-50
 D.J.Reish, F.Piltz and J.M.Martin, Induction of Abnormal Polychaete Larvae by Heavy Metals, Marine Pollution Bulletin, 5, 1974, 125-126
 D.J.Reish, Effects of Chromium on Life History of Capitella capitata (Annelida:Polychaeta), Physiological responses of Marine Biota to Pollutants, 1977, 199-207
 D.J.Reish, Effects of Aluminum and Nickel on Survival and Reproduction in Polychaetous Annelids, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 23, 1979, 698-702
 D.J.Reish, Marine Ecotoxicological Tests with Polychaetous Annelids, Ecotoxicological Testing for the Marine

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)

Kiwao Kadokami, Xuehua Li, Shuangye Pan, Naoko Ueda, Kenichiro Hamada, Daisuke Jinya, Tomomi Iwamura, Screening analysis of hundreds of sediment pollutants and evaluation of their effects on benthic organisms in Dokai Bay, Japan, Chemosphere, 査読有, 721-728, 2013.

〔学会発表〕(計 3 件)

矢鍋毅幸、上田直子、イトゴカイを用いた底質のバイオアッセイ法の開発、2014年度日本水環境学会年会、平成 27 年 3 月 16 日～17 日、金沢大学、金沢市

矢鍋毅幸、上田直子、イトゴカイを用いた底質のバイオアッセイ法の開発、2014年日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会、平成 26 年 9 月 5 日～6 日、広島大学、広島市

矢鍋毅幸、上田直子、イトゴカイを用いた底質のバイオアッセイ法の開発、平成 25 年度日本水環境学会九州支部研究発表会、平成 26 年 3 月 1 日、鹿児島工業高等専門学校、霧島市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 直子 (UEDA, Naoko)
北九州市立大学・国際環境工学部・教授
研究者番号：10433400

(2) 研究分担者

山田 真知子 (YAMADA, Machiko)
福岡女子大学・国際文理学部・教授
研究者番号：30438303

(3) 研究分担者

門上 希和夫 (KADOKAMI, Kiwao)
北九州市立大学・国際環境工学部・教授
研究者番号：60433398

(4) 連携研究者

鏡 良弘 (KAGAMI, Yoshihiro)
瑞輝科学生物株式会社・主席研究員
研究者番号：70321742

(5) 研究協力者

矢鍋 毅幸 (YANABE, Takeyuki)