

## 大阪湾圏域の底質環境修復に向けた海産ミミズが有する 有害化学物質削減能力の解明（その2）

伊藤克敏<sup>1</sup>・羽野健志<sup>2</sup>・大久保信幸<sup>2</sup>・持田和彦<sup>3</sup>・隠塚俊満<sup>1</sup>  
水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所

・1: 研究員 2: 主任研究員 3: グループ長

### [研究目的]

大阪湾内港湾域の底質からは、現在でも高濃度の有害化学物質が検出されており、早急な底質環境修復技術の構築が求められている。これまでに我々は、汚染底質に高い耐性を持つ海産ミミズ (*Thalassodrilides* sp.) が、汚染が進行した底質中に含まれる複数の有害化学物質を削減する能力を持つことを見出した。本研究課題では、大阪湾圏域の底質環境修復に向け、海産ミミズが有する汚染底質浄化能力の解明に取り組む。昨年度の本課題の実施により、海産ミミズが汚染に適応する際、体内の代謝物を調節しながら順応していることを明らかにした。さらに、有害化学物質の分解には薬物代謝酵素系を活性化し、化学物質を体外に排出する過程においてを分解していることを示唆する結果を得た。本年度は、昨年度得られた次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析結果を精査し、有害化学物質分解に関与する因子が、温度などの物理的環境変化によりどの様な挙動を示すのかを検討した。さらに、大阪湾圏域での環境浄化実施に向け、室内実験において海産ミミズの底質浄化能力を検証すると共に、大阪湾に生息する海産ミミズの探索を行った。

### [研究方法]

#### 1. 大阪湾大正内港底質汚染実態調査

##### 1-1 試験底質

2012年9月に大阪湾内大正内港にてエグマンバージ採泥器を用いて採取した。底質試料は、1mmメッシュの篩で濾した後、試験に供するまで-20℃で保存した。

##### 1-2 多環芳香族炭化水素類 (PAHs) の測定

底質試料を QuEChERS (アジレント・テクノロジー株式会社) で前処理したのち、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) を用いて 16 種類の PAHs を既報に従い測定した。なお、選定した 16 種類の PAHs は、アメリカ合衆国環境保護庁 (U. S. EPA) が定める特定有害物質である。PAH の底質含有量は、国内基準が定められていないため、U. S. EPA が底質評価に用いる値と比較した。

#### 2. 海産ミミズの汚染底質浄化メカニズムの解明

##### 2-1 試験対象種

海産ミミズ (*Thalassodrilides* sp.): 小型の貧毛類で、長期飼育が可能な種であり、予備試験の結果から石油由来の汚染物質の一種である 1-ニトロナフタレン (PAHs の 1 種ナフタレンにニトロ基が結合した物質) について、非常に高い代謝能を有していることが明らかとなっている。実験には愛媛県南部海域の養殖場底泥より採取し、研究

所で継代飼育中の個体を用いた。

## 2-2 曝露試験

曝露試験には密閉式のガラス円柱容器(420ml)を用い、大阪湾大正内港より採取した汚染底質 70g (湿重量) に海産ミミズ 200 個体、及び底質湿重量当たり 4 倍量の海水を加え試験区とした。曝露期間中は無給餌とし、15℃、20℃、及び 25℃の暗条件下で 10 日間曝露試験を実施した。海産ミミズのサンプリングは、実験開始前、1 日目、3 日目、及び曝露試験終了後に実施した。各海産ミミズサンプルを底質より取り出し、ケイ砂を敷設した海水中で 5-10 分程度水浴した。その後、液体窒素で急速凍結し、前処理まで-80℃で保存した。

## 2-3 リアルタイム PCR 法を用いた海産ミミズの遺伝子発現量解析

昨年度実施した次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析の結果から、化学物質分解に関与が示唆される遺伝子を抽出した(表 1)。抽出した遺伝子は、3' RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法を用いて、mRNA の 3' 末端に poly-A tail を確認し、海産ミミズ由来の可能性が高い遺伝子を選択し、リアルタイム PCR 法を用いた遺伝子発現量の定量法を確立した。

表 1 有害化学物質分解に関与が示唆される遺伝子名とその略語、及び機能

遺伝子名	略語	機能
Cytochrome P450 family 4 protein	CYP	薬物代謝酵素
Aromatic ring-cleaving dioxygenase	Dioxy. 1	芳香環開裂酵素
Dioxygenase	Dioxy. 2	二原子酸素添加酵素

## 3. 大阪湾底質浄化実証試験及び応用に向けた取り組み

### 3-1 海産ミミズを用いた底質浄化実証試験

曝露試験には密閉式のガラス円柱容器(420ml)を用い、上記対象底質 86g (乾燥重量) に海産ミミズ 200 個体、及び底質乾燥重量当たり 4 倍量の海水を加え試験区とした。各試験区ともに 3 試験区実施し、海産ミミズを加えない試験区を対照区とした。曝露期間中は無給餌とし、20℃、暗条件下で 10 日間曝露試験を実施した。試験終了後、底質を遠心分離(3,000rpm、20 分)して間隙水を採取し、等量のジクロロメタンを加え化学物質を抽出した。間隙水に含まれる化学物質の分析には、約 1,000 種類の化学物質の一斉分析が可能である GC-MS ソフトウェア (NAGINATA) を用いて網羅的に解析し、海産ミミズの存在下で減少する物質を特定した。

### 3-2 大阪湾における海産ミミズの探索

大阪内大正内港での海産ミミズを用いた底質浄化の実施に向け、2013 年 12 月及び 2014 年 2 月に大正内港にて汚染度合いの異なる 2 地点 (図 1) で海産ミミズの探索を行った。なお、1. における底質採取地点は地点 A である。底質の採集にはエグマンバージ採泥器を用い、現地にて酸化還元電位 (ORP) を測定した。底質は、速やかに研

究所に持ち帰り、海産ミミズを探索すると共に、含水率、強熱減量、及び酸揮発性硫化物量（AVS）を既報に従い測定した。

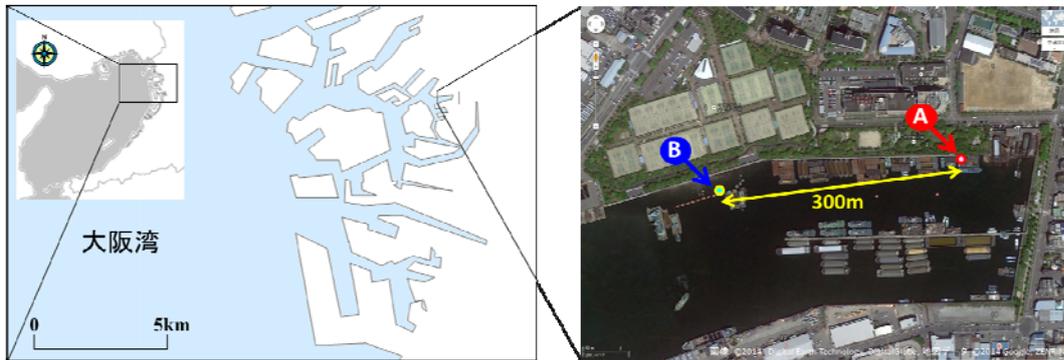


図1 海産ミミズ探索地点 A及びB

## [結果と考察]

### 1. 大阪湾大正内港底質汚染実態調査

U. S. EPA は、底質中の 13 種類の PAH に関して、底生生物に対して種々の悪影響を及ぼす濃度の Effects range low (ERL) 及び Effects range median (ERM) を基に、Good (REL 以下)、Intermediate (ERL～ERM) 及び Poor (ERM 以上) に分類して評価している。その 13 種類の PAHs の内、11 種類が今回分析した 16 種類に含まれている。分析の結果、アセナフテン、フェナントレン、アントラセン、フルオレン、ピレン、クリセン、ベンゾ[a]ピレン、及びジベンゾ[a, h]アントラセンの 8 種の濃度が Poor と判定された。残りの 3 物質ナフタレン、アセナフテン、及びフルオレンについても Intermediate と判定された。また、基準値が設けられていない物質についても高値を示した。ERM は、底生生物の 50% が何らかの悪影響を受ける濃度と定義されており、実際に大正内港採取地点 A においては、底生生物はほとんど観察されなかった。これらの結果から、早急に何らかの対策を施す必要性があると考えられる。

### 2. 海産ミミズの汚染底質浄化メカニズムの解明

確立したリアルタイム PCR 法を用いて、曝露温度の違いによる遺伝子発現量の変化を定量した。その結果、薬物代謝に重要な役割を担う第一相薬物代謝酵素であるチトクロム P450 (CYP) 及び二原子酸素添加酵素である Dioxygenase (Dioxy. 2) は、曝露温度が高いほど、コントロール区に比べ試験区で発現量が上昇する傾向が認められた。この結果から、温度が高いほど有害化学物質の分解が促進されることが示唆された。一方、芳香環開裂酵素である Aromatic ring-cleaving dioxygenase (Dioxy. 1) の発現量は、曝露温度による明確な違いは観察されなかったが、曝露期間が長くなることで、コントロール区よりも発現量が下がる傾向が認められた。このことから、芳香環の開裂に関しては、微生物等の関与も考慮に入れ今後検討する必要がある。

### 3. 大阪湾底質浄化試験

### 3-1 海産ミミズを用いた底質浄化実証試験

曝露試験 10 日後の間隙水に含まれる化学物質濃度を測定した結果、海産ミミズの存在により、ピレン、フルオレン、フルオランテン、及びアセナフテンなどの PAH の濃度が半分以下に減衰した。さらに、環境ホルモン様物質として知られているビスフェノール A の減衰も観察された。この結果から、海産ミミズは、大阪湾汚染底質に生息可能であり、底生生物に影響が大きいとされる間隙水中の PAHs 等の化学物質を分解する能力があることが実証された。

### 3-2 大阪湾における海産ミミズの探索

#### 3-2-1 海産ミミズ探索地点の底質分析結果

海産ミミズ調査地点 A 及び B の底質を観察した結果、地点 B は、茶褐色であり、海底表面に二枚貝が観察される等、生物の痕跡が確認できた。一方、地点 A は、炭の様な黒さを呈し、生物の痕跡はほとんど確認されなかった。地点 A 及び B の ORP、含水率、強熱減量、及び AVS の測定の結果、すべての項目において、地点 A よりも地点 B の汚染度合いの指標が低い値を示した。特に AVS に関しては、地点 A では水産用水基準値 0.2mg/g を遙かに超える値であったが、地点 B の 2014 年 2 月 13 日のサンプルは 0.19mg/g と基準値を下回っていた。

#### 3-2-2 海産ミミズ探索結果

本課題では、2013 年 12 月及び 2014 年 2 月に、2 地点において海産ミミズの探索を行ったが、海産ミミズの生息を確認することはできなかった。同じ瀬戸内海である愛媛県内において、海産ミミズの生息を確認していることから、引き続き大阪湾における海産ミミズの探索を実施する予定である。一方、地点 B には、ヨコエビやゴカイなど数多くの底生生物の生息を確認した。地点 B は、大正内港の重汚濁地点（地点 A）から、僅か 300m しか離れていない地点である。今後は、海産ミミズのみならず、汚染域に隣接した地点に生息する底生生物の底質浄化能力についても、本研究課題で明らかになりつつある海産ミミズの有害化学物質分解機構を元に検討する予定である。

### [結論]

本研究課題の実施により、大阪湾内大正内港の底質が PAHs により高濃度で汚染されている実態が明らかとなり、早急に何らかの対策を施す必要性があると考えられた。海産ミミズの有害化学物質分解能を検証した結果、大阪湾大正内港で問題となりうる PAHs を分解する能力が高いことが明らかとなった。また、その分解に関与が示唆される薬物代謝系の遺伝子は、温度が高いほど発現量が高いことが明らかとなった。この結果は、海産ミミズを用いた底質浄化を行う際には、冬期の水温が低い時期より夏季の海水温が高い時期に実施することで、効率よく底質浄化が進むことを示唆している。しかしながら、本研究課題で実施した海産ミミズの探索においては、海産ミミズの存在は確認できなかった。故に、大阪湾大正内港において、現時点で底質浄化を実施するには、生物の攪乱を抑えるために閉鎖的環境で実施する必要がある。今後、実環境に応用するため、海産ミミズの探索を進めるとともに、大阪湾に生息している生物種の浄化能を検討し、実験室レベルから規模を拡大して実施する予定である。