

(資料 1 4 - 1) 平成 1 7 年度終了特別研究の実施状況及びその評価

1. 大陸規模広域大気汚染に関する国際共同研究
2. 湿地生態系の自然再生技術評価に関する研究
3. 有機フッ素化合物等 P O P S 様汚染物質の発生源評価・対策並びに汚染実態解明のための基盤技術開発に関する研究
4. 有害化学物質情報の生体内高次メモリー機能の解明とそれに基づくリスク評価手法の開発に関する研究

1. 大陸規模広域大気汚染に関する国際共同研究

課題代表者 畠山 史郎（大気圏環境研究領域）

1) 研究の概要

中国での航空機観測を4回行い、これと同期した地上観測を行った。これにより発生源地域の汚染物質の濃度分布を詳細に解析することができた。また、中国での飛行機観測に対応した数値シミュレーションを行い解析した。

アジア地域を対象としたSO₂排出強度マップを作成し、大気モデルへの入力を行った。また発生源の解析と発生量の将来予測を行い、中国ではエネルギー集約型産業の立地が促進すると予想された。

奥日光前白根山において、オゾン濃度を測定した結果、夏季には首都圏からの光化学オゾンが卓越するが、秋には自由対流圏中をアジア大陸から輸送されるオゾンが中心的になることが分かった。

2) 研究期間

平成13～17年度（5年間）

3) 研究成果

(1) 四川盆地－杭州湾地域間の大気汚染物質の輸送に関する野外観測

航空機観測は平成14年春（渤海湾周辺）、平成14年～15年冬（上海・杭州湾周辺東シナ海沿岸部）、平成15年夏および平成16年初夏（上海～武漢～重慶・成都の内陸大都市周辺）の4回行った。

これらの観測により以下の諸点が明らかになった。

- 1) 中国の沿岸域の大規模発生源近傍ではNO_xの発生量が多く、そのためNO_x中に含まれるNOによるオゾンの破壊が起こって、オゾンとNO_xの濃度の間には負の相関が見られ、NO_x濃度が高いとむしろオゾン濃度が低下する。
- 2) NO_xとSO₂の濃度間には高い正の相関が見られるので、1)の現象とも合わせ、航空機観測で測定されるNO_xとSO₂の比は発生源の比をよく反映しているものと考えられる。報告されている発生源インベントリーデータとの比較から、1995年～2000年の間にNO_x放出量の増加、SO₂放出量の減少、またはその両方が起こっていることがわかった。
- 3) 中国上空ではエアロゾル中の酸性成分はアンモニアなどによってよく中和されている。ただし、沿岸部ではほぼ1:1に中和されているのに対して内陸部ではやや酸性成分が過剰である。一方、四川盆地（峨眉山）、武漢（武当山）、杭州湾（舟山）の3地点においてオゾン、NO_x、SO₂およびエアロゾルの化学成分を測定した。期間は2002年6月、2003年8月から9月上旬、2004年5月中旬から6月中旬にかけての主に夏季である。
 - 1) ガス成分のオゾン、NO_x、SO₂の平均濃度を見るとオゾン濃度が高く、SO₂、NO_xは低かった。オゾンに関しては、2004年5月23日に武当山で98 ppbvを、舟山では2004年6月8日と2003年8月27日にそれぞれ92 ppbv、99 ppbvを観測した。明確な日変化を示していることから、光化学反応の影響を受けていることがわかった。NO_x、SO₂の最高値はそれぞれ29 ppbv（2003年8月6日）、21 ppbv（2003年8月21日）であり、いずれも舟山で観測された。
 - 2) エアロゾルの化学成分については、冬季の青島のデータと比較すると、いずれの場所でもN

O_3^- が相対的に低い。夏季は気温が高く NH_4NO_3 が気相に放出されるからだと考えられる。 ns s - SO_4^{2-} 、 NH_4^+ については、多少の変動が認められるが全般的には $100 \sim 200 \text{ neq m}^{-3}$ であり、 ns s - SO_4^{2-} と NH_4^+ の当量比はほぼ1対1となっていた。

さらに、ライダーによる連続観測から、安徽省合肥におけるエアロゾル分布の特徴を明らかにした。まず、エアロゾルは高度2 km以下の地上付近に集中しており、エアロゾル層内では夏に消散係数が大きく冬に小さいという年周変動が見られる。この変動は相対湿度とよく対応しており、吸湿性エアロゾル（硫酸塩等）が支配的な成分であることを示唆している。偏光解消度の観測からも北京に比べて春でも黄砂の影響が小さい（9月には無視できる）ことが示された。また、多湿となる夏場でも南風が強い時期には消散係数が小さく、大規模な風系の変動に伴い地域の気象環境特性が変動する様子が明らかにされた。

(2) 大陸規模のモデルによる広域大気汚染の解明

中国での飛行機観測に対応した数値シミュレーションを行った。シミュレーションは気象モデルRAMSと大気質モデルCMAQの両者を用いた。物質の発生量データには、Streetsらの成果を標準として用いたが、 SO_2 と NO_x に関しては本研究の成果である甲斐沼らの結果を併用して比較した。

四川盆地、北京、九州、台湾北部を含む東西約2900 km、南北約2000 kmの範囲を、水平間隔が東西・南北ともに30 kmの計算格子で覆い、気象と大気汚染の数値モデルにより、2004年5月19日から28日にかけて広域大気汚染の数値シミュレーションを行った。計算結果を課題1による航空機観測データ等と比較し検討を行なった。本課題では、計算結果に大きな影響を与える要因の中から、物質発生量の分布データと、計算に与える側面境界としての物質濃度の二つに注目して、感度解析を行なった。

全部で3ケースのシミュレーションを行なった。ラン1は、既存の物質発生量データを用い、側面境界濃度も標準的な値を与えたもの、ラン2は、物質発生量データとして課題3で得られた2000年推計値データを用いたもの、ラン3は、ラン2で西方の境界条件濃度を二酸化窒素、オゾン、二酸化硫黄の三者について標準よりもかなり高濃度にするにより、特に西からの長距離輸送の影響を調べるためのものである。

まず、ラン1とラン2を比較することにより、発生量データの違いによる影響を調べた。計算期間平均で見たオゾンの地上分布を比較すると、黄海上でピークを示す基本的水平分布は一致しているが、そのピーク値に違いがあり、ラン2では10 ppb程度を上限に低くなった。これは課題3で得られた発生量データの NO_x が既存のデータに比して少ないためと考えられた。

次にラン2とラン3を比較することにより、西方の境界条件の影響を調べたが、両者の差は地上付近では計算領域西方に限定的であり、黄海や揚子江下流域での両者の差はかなり小さかった。

課題1で得られた飛行機観測データと比較するために、飛行機の位置データから計算結果を内挿することにより、フライトパスに沿った濃度同士を比較した。全般的に、フライトパスに沿った細かな濃度変動の再現性は芳しくなかった。これは、数値モデルの精度、発生量データの誤差、計算の空間解像度不足等の結果と考えられた。5月27日の比較結果では西方境界条件濃度を上げるにより、飛行機観測データとの一致性が、多少ではあるが向上した。

(3) 社会経済モデルを基にした発生源インベントリーとその将来予測

東方ロシアを含むアジア地域を対象として、 SO_2 と NO_x の排出強度分布図を作成した。中国、インド、韓国については、比較的詳細な排出源データをもとに、その他の国については、国別 SO_2 、 NO_x 排出データをもとに、排出強度の算定を行った。行政区界については、いくつかの境界図を併用したために、若干ながら複数の排出強度推定値を持つグリッドが存在する。その場合には、韓国、インド、中国、アジア全域境界図の順に推計値を採用した。

将来の大気汚染物質の排出予測に関しては、中国を対象として、将来の社会・経済状況の推計値をもとに、エネルギー消費量を推計し、化石燃料の燃焼に伴う大気汚染物質の排出量を推計した。分析にあたっては、基準シナリオ、エネルギー高需要シナリオ、政策シナリオの3つのシナリオを想定し、大気汚染排出量への影響を推計した。

また、中国の将来シナリオに基づいて、SO₂、NO_x排出量を2030年まで予測した。SO₂排出量は石炭消費量の増加に伴って2010年ごろまで増加する。基準シナリオでは2010年の排出量は2000年に比べると9.45百万トン多い。2010年以降は脱硫装置などの導入によりSO₂排出量は減少する。これに対して、NO_x排出量に関しては、SO₂ほど有効な手段がないので、今後30年にわたって増加することが予測された。

(4) 高山域における自由対流圏オゾンの観測

中国におけるNO_xの放出による光化学オゾンの増加がどのような影響を及ぼしているかは興味ある問題である。本研究では自由対流圏を通して、日本上空に到達するアジアのバックグラウンドオゾン把握するため、高山域における自由対流圏オゾンの観測を行った。観測としては奥日光前白根山頂上直下の鞍部において、7～10月に、オゾン濃度の測定を行った。その結果、9月中旬頃までの夏季には東京周辺の首都圏から輸送されるローカルな光化学オゾンが卓越するが、10月になると、自由対流圏の中をアジア大陸から輸送されてくるオゾンが中心になることが分かった。このとき観測されるオゾンの濃度は隠岐島や八方尾根で秋季に観測されるオゾン濃度と非常に近く、この季節にアジア大陸から輸送されてくるアジアのバックグラウンドオゾン濃度を反映していることが示された。

観測は2002年7月21日～10月17日の88日間および2004年7月21日～10月10日の82日間、栃木県奥日光前白根山山頂付近の稜線上標高2320mで行われた。

2002年の観測期間の前半は、日最低値の平均は18.86ppbであり、これをバックグラウンドとすると、その値は低く日較差が大きい。さらに、時折60ppb程度の高濃度を観測した。後方流跡線解析を行うと、このような高濃度のオゾンは関東平野から輸送されてきていた。この期間のオゾン濃度の平均値は27.30ppbであった。日射量が強く、光化学反応が起こりやすい夏季にもかかわらず平均値が低いのは、日本が太平洋高気圧に覆われ、太平洋上の汚染の少ない空気がバックグラウンドとして輸送されてくるためと考えられる。

それに対して観測期間後半の秋季には、山頂付近ではオゾンの日内変動がほとんど見られず、小山市などの平野部とは大きく異なっている。この期間のオゾン濃度の平均は40.52ppbで、日射量が弱まっているにもかかわらず、オゾンの平均値は前半よりも大きかった。これは、季節の移り変わりに伴い、太平洋高気圧の影響が小さくなり、大陸からのバックグラウンドオゾン量が増加したからだと考えられた。オゾンの前駆体となるNO_xの大陸における発生量の増加と、それに伴う対流圏オゾンの変化を今後もモニタリングする必要がある。

4) 研究実施の背景

東アジア地域は大気環境の面で、今や世界で最も注目を浴びている地域である。NO_xやSO₂の放出量は、ヨーロッパや北米などの先進地域では20世紀後半以降横ばい又は減少傾向なのに対して、アジア地域では大幅な伸びを示している。中でも中国は巨大な人口を抱え、急速に工業化を進めているため、最も重要な大気汚染物質発生源として注目されてきた。

中国の中南部四川盆地から杭州湾にかけての領域は広大な平野とそこを流れる長江を有し、両端には成都、重慶と上海、杭州、中間にも武漢などの大都市を抱えて、人口も多く、排出された大気汚染物質のやりとりにより、自然環境や農作物、文化財・遺跡を含む建造物、さらには人間の健康に対して多大の影響が加えられているものと考えられる。成都・重慶と上海・杭州の間の

距離は1500 kmにおよび、そのスケールは大陸規模である。中国では現在もエネルギーの70%近くを石炭に頼っており、硫黄酸化物系の大気汚染が深刻であるが、経済発展とともに窒素酸化物を主因とする光化学大気汚染の深刻化も懸念されており、両者を含む大気汚染現象の解明とその将来予測に基づく大陸規模の広域大気汚染の管理・制御は緊急に着手すべき問題である。

本研究では、現在の中国で問題となっている硫黄酸化物系の大気汚染と、今後益々重要となってくるものと予想される窒素酸化物・光化学大気汚染系の大気汚染が混在する広域の大気汚染を観測、モデルの分野から研究し、中国をフィールドとした共同研究から、今後インドや東南アジアにおいても問題化すると予想される大陸規模の広域大気汚染の現象を解明し、その管理・制御に資することを目的とした。

5) 評価結果（総合評価）

	5	4	3	2	1	合計
事後評価	2	6				8
(19年4月)	(25)	(75)				(100)

注) 上段：評価人数、下段：%

事後評価基準（5：大変優れている、4：優れている、3：普通、2：やや劣る、1：劣る）

外部研究評価委員会による事後評価の平均評点 4.3点

6) 評価結果の概要

本研究では、はじめて中国との共同航空機観測を実施し、ガス成分・エアロゾルの化学組成を明らかにすることに成功している。この成果は、科学的な貢献度に加えて、今後の政策立案への高い貢献度があると評価できる。今後とも共同研究を継続し、観測データを蓄積して、将来の日本への影響予測についての定量的な評価の研究を継続してほしい。また、時期によって発生源・発生量の変動することを考慮した測定およびモデルを作成し、大気成分の拡散様式についての予測精度が高まることを期待する。さらに今後は、本研究で得られた貴重なデータを国際誌に発表するとともに、中国との結果／結論の共通認識が醸成できるような環境を生みだし、関係分野への影響を強めていく努力が払われることを望む。

7) 対処方針

本特研はアジア自然共生研究グループのプロジェクトに発展的に継承されており、中国における共同観測研究も継続されている。また、これらの観測データを活用し、発生量の時間変動を考慮したモデル開発にも取り組んでいる。これまでも国際学会誌に論文を発表してきているが、今後も継続して成果を国際的にアピールする。また、研究チームのメンバーはほぼ毎年中国の大気環境学会（中国環境保護総局の官僚も出席している）に招かれて講演をしており、研究成果は中国の公的な場で公開し、結果／結論が共有されつつあるが、今後もその更なる進展を図る。

2. 湿地生態系の自然再生技術評価に関する研究

課題代表者 野原 精一（生物圏環境研究領域）

1) 研究の概要

モデルサイトとして実際に自然再生事業が実施されている低湿地（霞ヶ浦湖岸）とその参照低湿地（涸沼湖岸、菅生沼、小櫃川河口湿地等）を選定し、景観管理の履歴に関連する社会・経済的統計資料、植生地理学的資料等の収集及びデータベース化を行うとともに、種及び生態系レベルでの多様性と水草帯の機能（水循環機能、生物生産機能、分解機能等物質循環機能、多様性保全機能、土壌保全機能等）について、重点的に調査・実験を行い、水草帯の生態系サービス機能から評価基準を算定するためのベースを作成する。サブテーマは以下の3つである。

- 1) 湿地生態系の機構把握に関する研究、湿地生態系モデル構築、観測、診断手法の開発
- 2) 自然再生技術に関する研究、播きだし法、植栽法、土木工法等の検討、バイオマニュピュレーション手法の応用
- 3) 自然再生のシナリオ・評価に関する研究、自然再生シナリオ構築、事業評価モデルの開発

2) 研究期間

平成15～17年度（3年間）

3) 研究成果

(1) 湿地生態系の機構把握に関する研究

湖沼沿岸域が生態系機能として有する脱窒機能に対し、水生植物群落が与える影響を定量的に評価することを目的として、野外における脱窒量を実測した。沿岸植生は脱窒菌の重要な炭素源として機能しており、無機物を材料とする人工構造物では代用し得ないこと、また、この傾向は易分解性有機物が増加する秋季から冬季にかけて顕著であることが示唆された。

塩湿地植物群落の成立要因の解明に取り組み、小櫃川河口塩湿地における優占種4種を中心とした生育状況とそれらの生育環境調査を行った。シオクグと混生する場合、遷移の進行により競争に負けた。常緑多年草のシオクグによる光資源の制限・土壌の安定化・湿潤化による。

(2) 自然再生技術に関する研究

これまで提案されてきた有機物速度測定法が湿地（冠水土壤）の有機物分解速度の評価に適用できるか明らかにするために、代表的な有機物分解測定方法をいくつか比較検討した。有機物の指標としてセルロースを用いた方法における速度は0.5～3.6 loss (%) day^{-1} 、プロテインを用いた場合は0.8～3.4 loss (%) day^{-1} であった。ここで示された広い速度範囲から、現場の有機物分解速度の評価には統一した手法の検討を必要とする事が分かった。

水位の変化が底泥機能へ及ぼす影響として、底泥中の細菌相の機能的多様性への影響に注目して実験を行った。細菌が利用できる炭素源のパターンから、底泥中の細菌群集の多様性と水位の関係を解析した。30種類の炭素源のいずれかを含む培地に底泥を添加して細菌の増殖を調べ、アミン、アミノ酸類、カルボン酸類の寄与率が高いことから、冠水条件下の底泥では、これらの基質を利用する細菌が優占してくることが推測された。

霞ヶ浦湖岸で確認されたマコモ、クサヨシ、カサスゲを試験対象種として、水位変化による生育状況の違いを調べ、現地において植物の成長期（4月～9月）に水位操作を行うと、長期間の水位上昇では、カサスゲ群落がミクリ群落、クサヨシ群落がヨシ群落に変遷する可能性が高くな

り、また、長期間の水位低下では、クサヨシ群落は縮小し、代わりに陸域の植生に変遷すると推察された。

霞ヶ浦植生帯復元地区の湖岸に隔離水界を設置し、外来魚の操作を行うことで移植あるいは操作した水生植物の成長に差がでるかどうかを調べた。さらに、投入した霞ヶ浦航路浚渫土起源の土壌シードバンクから沈水植物が成長するかどうかを調べた。ブルーギルの除去は沈水植物の成長を有意に促進した。また、土壌シードバンクからはコウガイモとオオトリゲモが出現した。

水位変化がカサスゲ、マコモ、クサヨシの生育に及ぼす影響実験から、現地において植物の成長期（4月～9月）に水位操作を行うと、長期間の水位上昇では、カサスゲ群落がミクリ群落、クサヨシ群落がヨシ群落に変遷する可能性が高くなり、また、長期間の水位低下では、クサヨシ群落は縮小し、代わりにシロバナサクラタデ、アメリカセンダングサ、さらにはセイタカアワダチソウが侵入することで、陸域の植生に変遷すると推察された。

塩湿地植生の復元の試みるシオクグの刈り取り実験では、一時的に回復傾向が見られたがすぐに消滅した。中洲の優占種であるアイアシ、ヨシ、シオクグの環境と比較して、ハマツナが優占する上洲の底質は含水率が低く、容積重の軽い砂質に純群落を形成した。ハマツナの生育適地は、塩湿地内で他種との競争関係が少ない、底質は不安定な砂質で有機物が蓄積しにくい場所、強い乾燥と冠水が交互に繰り返される場所である。上記からハマツナの再生適地は、攪乱強度の強い低地で砂が寄せているような場所（中洲の川沿いや川の瀬）であることが示唆された。

(3) 自然再生のシナリオ・評価に関する研究

粗朶消波堤は、消波効果あるが、2～3年で既に粗朶の消失（流出多く、維持管理必要）がおこり流れ出した粗朶の環境影響は検討する必要がある。植生に関して、ヨシなどの水草帯の回復なく、一方アサザの一部植栽は定着成功して（植栽法の有効性）いる。湿地生態系の物質循環から、底質の有機物の蓄積、分解活性上昇というデメリットや、湖水の硝酸、底質のアンモニアの濃度増加や、脱窒活性の増加する場合もあるという問題が指摘された。その他植生では、浮葉植物のヒシが増加しアサザ駆逐の可能性があり、目標とする植生再生につながらない場合が見られた。物理的には粗朶の消波堤3面囲いでは湖水水温の上昇が確認され湖水交換率低下が見られた。現地でのアサザの撒き出し法は他種の刈り取り作業が必要、アサザのセーフサイトは水位低下時の裸地と推定されている。

4) 研究実施の背景

「21世紀『環の国』づくり会議」で提唱され、「新・生物多様性国家戦略」に盛り込まれた自然再生事業では湿地の再生が重要な課題の一つとなっている。湿地は近年の工業化・農地化によって埋め立てられ、特に都市域では河川河口域にのみ僅かに残るようになっている。それらの湿地生態系の機能を再生させ、より良い環境を取り戻すには、人工湿地を含めた湿地の再生・創造が不可欠である。しかし、自然の節理を無視した再生・創造では持続可能な生態系を確保できない。そのため、より自然に近い湿地生態系の自然再生実験等によって自然の節理を学び、湿地生態系の再生及び管理・事業評価を実施する必要がある。

本研究は自然再生事業に先立つ理念・シナリオの形成を行い、野外調査及び再生実験等から基礎的知見を得て、持続可能な湿地生態系の再生技術の検討を行うと同時に、再生評価手法を開発することを目的とする。

5) 評価結果（総合評価）

	5	4	3	2	1	合計
事後評価 (19年4月)		7 (88)	1 (12)			8 (100)

注) 上段：評価人数、下段：%

事後評価基準（5：大変優れている、4：優れている、3：普通、2：やや劣る、1：劣る）

外部研究評価委員会による事後評価の平均評点 3.9点

6) 評価結果の概要

本研究は、自然再生研究の困難さを勘案すれば、個別研究成果としては高く評価される。また、沿岸湿地帯の再生評価について、初期の目的は達成できた。本研究成果が単なる生態学的な研究報告に止まらず、行政や市民にむけたわかりやすい公表や解説の努力を行っていくとともに、研究成果を一般的なものとするために研究の更なる継続が不可欠であると考えられる。また、今後は、物理系・土木系の研究者を参加させることも念頭に置いて、波浪や流動、さらには基盤である土質とその変化等にも着目した検討体制を整備し、気象学的・水文学的パラメーター、地形変化を測定することも必要であると考えられる、との指摘もなされた。

7) 対処方針

本研究成果を生態学会等において学術的な研究発表を行い学術論文としてまとめると共に市民にむけて所外発表会や一般公開等において広報活動を行い行政向けの解説記事の執筆に努める。また、一般化するために自然再生研究を継続し体系化するように経常研究やプロジェクト研究を進め、物理系・土木系の研究者との共同研究体制を組織し、三次元流向流速計等により波浪や流速を把握し、底質とその変化等にも着目した研究を展開させてゆきたい。気象学的・水文学的パラメーター、地形変化を測定するように GPS 測量器等を整備し自然再生研究を発展させて行く所存である。

3. 有機フッ素化合物等 P O P_s 様汚染物質の発生源評価・対策並びに汚染実態解明のための基盤技術開発に関する研究

課題代表者 柴田 康行（化学環境研究領域）

1) 研究の概要

奥日光前白根山において、オゾン濃度を測定した結果、夏季には首都圏からの光化学オゾンが卓越するが、秋には自由対流圏中をアジア大陸から輸送されるオゾンが中心的になることが分かった。残留性有機汚染物質（P O P_s）として取り組み優先度の高いフッ素系界面活性剤（P F O S 類）並びに多環芳香族炭化水素（P A H s）を対象として研究を実施した。P F O S 類は用途並びに排出情報を整理し、主要排出経路である水系を中心に都内河川並びに全国沿岸域の環境汚染状況を解明し、下水処理過程で除去しきれないことを示した。また紫外線分解できることを示し分解経路の概要を明らかにするとともに、魚の曝露マーカー蛋白を同定した。一方、非意図的生成物質の P A H s は放射性炭素¹⁴Cを用いた発生源同定・分配法を確立し、東京周辺でのバイオマス起源の大気中燃焼生成物の割合を推定する事に成功した。

2) 研究期間

平成15～17年度（3年間）

3) 研究成果

(1) P F O S 並びに類縁有機フッ素系界面活性剤

- 1) 用途や排出経路に関する情報をまとめた結果、下水等からの水系排出が主要経路と考えられる結果となった。
- 2) 都内河川の調査から汚染実態を明らかにし、一般の下水処理では P F O S は除去しきれないことを示した。
- 3) 生物中の P F O S 類分析法について従来法の問題点を明らかにし、新たな手法を確立した。二枚貝をつかった全国沿岸調査の結果、P F O S 類の分布の概要といくつかのホットスポットの存在を明らかにした。
- 4) 魚類のフルオロカルボン酸曝露指標として nucleoside diphosphate kinase ないし近縁の蛋白を見いだした。
- 5) P F O S の紫外線分解実験を行い処理技術としてのポテンシャルを示すとともに、短鎖のフルオロカーボン類が気相中に出てゆき溶液中には C-S 結合が切れた様々な長さのフルオロカーボン、フルオロアルコール、フルオロカルボン酸が生じることを明らかにした。

(2) P A H s 並びに大気中燃焼起源炭素の放射性炭素¹⁴Cを指標とした発生源探索

- 1) 主に燃焼起源物質並びにガス状物質の凝結に由来する1ミクロン以下の微小大気粒子画分の¹⁴C測定から、バイオマス燃焼ないし生物起源の炭素の割合を明らかにした。
- 2) 燃焼起源と考えられる元素状炭素 E C 画分の¹⁴C測定からバイオマス燃焼起源の割合を調べ、1) と矛盾しないことを確かめた。
- 3) 大気粉じん中の P A H s を精製し¹⁴C測定を行って、東京郊外で1)、2)の結果とも矛盾しない3割程度の割合でバイオマス起源 P A H s が存在することを明らかにした。

4) 研究実施の背景

P O P_sはストックホルム条約で全球的な削減、廃絶への取り組みが行われているが、現在指

定された12物質の他にもPOPs様の性質を持ち汚染が懸念される物質は多い。ここでは意図的生成物質の中で情報が少なく取り組み優先度が高いと考えられたPFOS等の有機フッ素系界面活性剤（サブテーマ1）、並びに代表的な非意図的生成物質であるPAHs（サブテーマ2）を対象として、PFOS類は実態解明から曝露指標、分解法の開発まで、またPAHs類は発生源の評価手法の開発を中心に研究を行った。

5) 評価結果（総合評価）

	5	4	3	2	1	合計
事後評価	3	6				9
(19年4月)	(33)	(67)				(100)

注) 上段：評価人数、下段：%

事後評価基準（5：大変優れている、4：優れている、3：普通、2：やや劣る、1：劣る）

外部研究評価委員会による事後評価の平均評点 4.3点

6) 評価結果の概要

本研究では、有機フッ素化合物等POPs様汚染物質の発生源並びに汚染実態解明という緊急性の高い課題に積極的に取り組み、詳細な研究を世界に先駆けて実施しており、達成度は高く、社会・行政への貢献度も高い。しかし、POPsあるいはその類縁物質を健康リスクが懸念される化学物質として規制措置の対象とするにはデータ解釈を含む科学的な知見が不十分であり、今後戦略的な研究展開が求められる。一方、POPs等について排出源はほぼ特定できつつあるとのことであるが、今後対策や行政にどのように反映し、総合的に管理するか検討する必要がある。また、感度の高い分析法を用いた本研究の成果は、影響評価側のプログラムを立案する際に、国内外にかかわらず有効となるであろう。今後は、研究成果が最大限活用されるよう、社会への周知も含め、発信の仕方を工夫してほしい。

7) 対処方針

フッ素系界面活性剤の毒性は入り口のPRARと呼ばれる受容体との結合がその引き金を引いていると考えられているものの、研究はまだまだこれからの状態であり、現状では十分なリスク評価ができる段階ではないと考えられます。しかしながら、PFOSの場合、反復投与試験による齧歯類への影響のNOAELは、投与動物自体へもF2世代に対しても $1\text{ mg kg}^{-1}\text{ day}^{-1}$ を切ると報告されています。また、カルボン酸タイプのBCFは炭素が一つ増えると8倍増加することも報告されており、現在話題になっているPFOA以外のより鎖の長い化合物の濃度レベルやそのリスク評価が注目されます。今回の特別研究は、リスク研究を支える柱の一つとしての化学分析に絞って研究を推進しましたが、今後毒性研究グループとの研究交流を通じてよりの確なリスク評価に貢献できるよう、努力していきたいと考えています。

4. 有害化学物質情報の生体内高次メモリー機能の解明とそれに基づくリスク評価手法の開発に関する研究

課題代表者 藤巻 秀和（環境健康研究領域）

1) 研究の概要

低濃度長期のホルムアルデヒド曝露が海馬におけるシナプスの可塑性、記憶・学習機能などに重要な役割を果たしているNMDA受容体を介する記憶形成機構にかく乱を生じる結果を得た。低濃度長期のホルムアルデヒド、あるいはトルエンの曝露は、抗原刺激の付加による神経成長因子の産生を修飾し、神経-免疫ネットワークのかく乱作用を誘導していることを明らかにした。揮発性化学物質の体内動態に関して、SPMEを用いて脳内での揮発性物質を簡便に、短時間で検知する手法が開発できた。

2) 研究期間

平成15～17年度（3年間）

3) 研究成果

(1) 脳・神経系における化学物質の影響解析

海馬におけるシナプスの可塑性、神経細胞生存などに重要な役割を果たしているNMDA受容体サブユニット（NR2AとNR2B）の機能は動物の学習行動や記憶機能に密接に関連している。低濃度ホルムアルデヒド曝露をすると、海馬におけるNMDA受容体サブユニットの遺伝子発現が有意に増加することを明らかにした。さらに、アレルギーモデルマウスにホルムアルデヒド曝露を行った結果でも、NR2A mRNAの発現増強に働くことが明らかとなった。（図3）一方、NMDA受容体遺伝子の発現の制御にかかわるドーパミン受容体であるD1とD2遺伝子の発現は、曝露により有意に増加することを明らかにした。したがって、曝露により海馬におけるNR2A、D1とD2 mRNAの発現に変化がみられたことは、低濃度、長期のホルムアルデヒド曝露が海馬において記憶・学習機能に重要な役割を果たしているNMDA受容体を介する記憶形成機構に変調を生じたことを示唆する。

さらに、低濃度ホルムアルデヒド曝露による嗅細胞からの情報伝達系である嗅球、扁桃体でのGABAニューロンの活性化、ドーパミンニューロン系への作用を明らかにした。また、海馬からの情報交換の場でもありストレス応答領域である視床下部において、そのホルモン情報伝達にもかく乱が起こることを明らかにした。海馬から扁桃体、視床下部への情報伝達回路の動きを探るために、高周波で海馬破壊処理したマウスに曝露してその影響を解析したところ、扁桃体、視床下部での記憶関連遺伝子の更なる変動が認められた。

化学物質の特異性を調べるため行った低濃度のトルエンの長期曝露では、マウス海馬においてNMDA受容体サブユニットNR2Bの遺伝子発現増強を介して細胞内情報伝達網のアップレギュレーションを引き起こすことを明らかにした。

(2) 免疫系における化学物質の影響解析

低濃度ホルムアルデヒド曝露では、免疫記憶の情報伝達経路、少なくともリンパ球の増殖、分化、抗体産生の増強などを積極的に促進し、Th1/Th2バランスをかく乱する作用は認めなかった。ただし、肺胞洗浄液中のIL-1βの低下、血漿中のCCL2産生の低下、脾臓細胞からのCCL2産生の亢進などが曝露により認められた。低濃度トルエンの12週間曝露では、血漿中の総IgE抗体価の有意な上昇がみられ、肺胞洗浄液中のIFN-γ産生の抑制も認められた。

免疫系を抗原刺激により活性化した後での低濃度長期のホルムアルデヒド、あるいはトルエンの曝露は、抗原刺激の付加による神経成長因子の産生で組織特異的な影響を認め、神経—免疫ネットワークのかく乱作用を誘導していることが明らかとなった。さらに、新たな曝露系として低濃度のトルエン鼻部曝露を行い、免疫メモリーの産物であるT h 2タイプ優位の抗体産生を増強することを明らかにした。

(3) 体内動態の測定および曝露評価と評価手法の開発

揮発性化学物質の体内動態に関して、トルエンをマウスに鼻部曝露すると、曝露前後で有意な差が認められ、曝露濃度の増加に応じて海馬近傍からS P M Eに吸着されたトルエン量は増大していることが確認された。S P M Eを用いて脳内での揮発性物質を簡便に、短時間で検知する手法を開発できた。また、生存している個体の脳内でのグルタミン酸やG A B Aなどの神経伝達物質の変動の検知にも成功した。*in vivo* マイクロダイアリシス法は、先のS P M Eと組み合わせると生きたままリアルタイムの神経伝達物質の動きと化学物質の体内の濃度とを測定でき、化学物質の濃度と神経伝達の情報の動きとの関連を解析する上で新たな手法として展開できる。これらの結果は、嗅覚からの化学物質曝露による刺激情報が、神経伝達物質を介した情報伝達系を修飾して扁桃体、海馬、視床下部などの大脳辺縁系に影響を及ぼし、また、海馬からの視床下部への情報伝達が修飾され、記憶情報回路にかく乱作用を生じていることを示唆している。以上の成果から、低濃度におけるホルムアルデヒド、あるいはトルエン曝露は曝露期間の長期化により嗅覚からの情報伝達回路を介して海馬における記憶に関する機能分子の活性化を生じ、ストレス反応系としての視床下部、下垂体でのホルモン分泌系のかく乱を生じ、動物の学習・行動にもなんらかの変化をもたらされている可能性が考えられる。

本研究成果は、過去の一般毒性に比較して、低用量曝露により引き起こされる神経、免疫・アレルギーを中心とする高次機能への影響を評価し、高次機能に関わる化学物質リスク評価に寄与にする。また、環境化学物質が高次機能へ与える影響を適切に評価し、化学物質の健康に及ぼすリスクを低減する施策に貢献する科学的知見が提供できる。さらに、次世代、小児、高齢者、有病者、健康影響を受けやすい高感受性集団を対象とした今後の研究への糸口を提供できる。

4) 研究実施の背景

近年、居住環境が原因と考えられる「シックハウス症候群」や「多種化学物質過敏状態」（いわゆる化学物質過敏症）の増加が報告され、いずれも室内に存在している比較的低濃度の化学物質の影響が関与して健康を害していると考えられている。それらの症状の中で、アレルギー性疾患の症状も高いことが報告されている。われわれの環境中にはダニ、カビ、花粉などの生物因子、電磁波や紫外線などの物理因子も化学因子とともに存在しているため、その真の原因については不明な点が多く特定できていないが、化学因子のなかでは室内で濃度の高い揮発性有機化合物が何らかの関連をもっているといわれている。ところで、先進国の共通の悩みであるアレルギー疾患の増加と環境中の化学物質との因果関係を示唆する科学的知見も多く見られ、大気中のディーゼル排気粒子のような粒子状物質の中に増悪をうながす物質の存在することが明らかとなっている。しかしながら、化学物質を曝露されるすべての人々がアレルギー症状を示すわけではなく、アレルギー素因をもっている人か、あるいはすでになんらかの炎症の症状を示している一部の人々が影響を受けやすいことから、遺伝的因子と環境因子との相互の関連が症状悪化に重要と考えられている。

われわれの体には、外界からの刺激に対して常に体内の状態を健康な状態に保つために恒常性の維持機構が備わっており、神経—免疫—内分泌間の連携が重要な役割を担っている。中でも、記憶機能は、神経系と免疫系に備わっている生命維持に必須の機能であり、神経系における記憶

機能の中枢は脳皮質と海馬であり、5感からはいった情報の統合と蓄積に重要な役割を果たしている。一方、免疫系における記憶機能はリンパ球により維持されており、一度侵入した抗原情報が記憶され、2度目以降の侵入には迅速に、かつ大規模に反撃できる体制をととのえる働きをしている。神経系と免疫系は、記憶という機能以外にも、産生する情報伝達分子において共通の分子がそれぞれの機能を制御していることが、近年明らかとなっている。リンパ球が、神経成長因子の受容体を発現するとともに、神経成長因子を産生・分泌することが報告されている。逆に、脳内での神経細胞であるグリア細胞がリンパ球によって産生される免疫情報伝達物質として働くサイトカインを分泌して、脳内での炎症に関与していることも明らかとなっている。

したがって、化学物質による情報伝達因子産生や記憶機能のかく乱は、恒常性機構の維持にも大きく影響することが考えられる。しかしながら、これまでなされてきた神経—免疫—内分泌系への化学物質による曝露の影響評価では、環境中の濃度よりはるかに高い濃度域での毒性が研究されている。化学物質の曝露による体内への蓄積あるいは代謝産物が、化学物質の毒性の発現をどうして健康影響を誘導すると考えられてきた。だが、最近の居住環境による健康影響を評価するときに室内濃度レベルで報告されている揮発性の化学物質による健康不良の誘導は、これまで明らかになっている毒性発現の機構では説明できない反応がおきている可能性がある。低濃度域での揮発性化学物質の曝露による神経—免疫軸を中心とした機能への影響については、国際的にも報告が非常に少ない。そこで、われわれは、低濃度域における化学物質の影響は、におい情報、刺激情報として認識され、体内で情報として蓄積されていく過程、あるいはその情報の蓄積が神経系、免疫系で何らかの影響を誘導し、遺伝素因と関連して恒常性の維持機構の破綻、あるいはかく乱として現れることを仮定した。

記憶機能への影響についての研究は、神経、免疫に共通で生命維持機能としての役割の解明だけでなく、現実に問題となっている認知症や化学物質過敏症での集中力、記憶力の低下の解明に繋がる。また、アレルギー反応の増悪において重要な記憶産物であるIgE抗体の産生は抗体クラススイッチの機構のかく乱がかかわっている可能性があり、それら機構にかかわる情報伝達分子への影響解明は鋭敏な指標の探索になりえると考えられた。

本研究では、神経—免疫—内分泌系の機能のなかで情報の蓄積される記憶機構に焦点をあて、比較的低濃度の揮発性有機化合物に着目し、

- 1) 嗅覚系を介した脳・神経系における情報伝達の過程、および海馬を中心とした記憶にかかわる領域での解析、
- 2) 呼吸器系を介した免疫系リンパ性器官への情報伝達、最終的な記憶産物としての抗体産生までの情報伝達経路における解析、
- 3) 化学物質曝露後の脳内動態と環境中揮発性化学物質濃度の実態把握を加味して神経—免疫系における記憶機能のかく乱作用を考察し、その健康リスク評価に役立つ指標の探索、及び手法の開発を目的とした。

5) 評価結果 (総合評価)

	5	4	3	2	1	合計
事後評価	1	7	1			9
(19年4月)	(11)	(78)	(11)			(100)

注) 上段：評価人数、下段：%

事後評価基準 (5：大変優れている、4：優れている、3：普通、2：やや劣る、1：劣る)

6) 評価結果の概要

いわゆるシックハウス症候群やアレルギー疾患など低濃度の揮発性有機物質の生体影響を嗅覚系、呼吸器系、神経-免疫系の3系について解析し、サブテーマ間での連携性を維持しつつ総合的にリスク評価を実施しており、一定の成果を上げている。シックハウスのような複合的問題に還元的なエンドポイントを設け、ある程度、実証的な成果を挙げたことは高く評価できる。しかし、基礎研究としては優れた成果が出ているものの、低濃度暴露による過敏症が生起する機構を明らかにするまでには至っていない点、高次機能メモリーの関与の明確化やその実体解明など、今後の進展に期待される課題も残されている。今後は、得られた成果を対策（健康被害予測等）にどのように活用するかについても検討すべきであろう。

7) 対処方針

ヒトにおけるシックハウス症候群のような原因や病態が十分に解明されていない健康障害にかかわる低濃度化学物質の影響を、実験動物を用いて明らかにする事を目的に行われた研究であったが、外部研究評価委員会からのご指摘にみられるように、基礎研究としての低濃度揮発性有機物曝露の有害性の解明には貢献できていると考えている。しかしながら、その有害性の機構解明、特に高次機能メモリー機構関与の機構については課題が残されており、18年度開始の環境リスク研究プログラム中核研究プロジェクト「感受性要因に注目した化学物質の健康影響評価」の中でこれらの課題を進めている。今後は、さらに科学的知見を積み上げ得られた成果を化学物質によると考えられるヒトへの健康影響の解明や未然防止に役立てられるように、学会や国際誌をどうして発信し、ガイドラインや指針値にみられる化学物質に関する管理政策への寄与により社会へ還元できるように務めるつもりである。

(資料 1 4 - 2) 平成 1 8 年度終了特別研究の実施状況及びその評価

1. 有機物リンケージに基づいた湖沼環境の評価と改善シナリオ作成
2. トキシコゲノミクスを利用した環境汚染物質の健康・生物影響評価法の開発に関する研究

1. 有機物リンケージに基づいた湖沼環境の評価と改善シナリオ作成

課題代表者 今井 章雄（水圏環境研究領域）

1) 研究の概要

湖沼有機物の化学組成（糖類組成、分子サイズ等）情報から分解性や起源を評価する手法を開発・確立する。霞ヶ浦を対象として、湖水柱や底泥での溶存有機物（DOM）の生産や分解性、微生物群集との連動関係を重点的に評価する。さらに難分解性DOMの動態、湖水に蓄積するメカニズムや主要発生源を、フィールド調査とモデル解析を駆使して明らかにする。最終的に湖沼流域発生源対策等の効果を評価し、湖沼環境改善の具体的な方向性を提言する。

2) 研究期間

平成16～18年度（3年間）

3) 研究成果

(1) 有機物組成と分解性のリンケージ評価

1) 糖類組成分析

電気化学的検出HPLCによる糖類濃度および組成の高感度分析手法を開発・確立した。溶存酸素の妨害を除くためガス透過テロンチューブからなる減圧ディガッサーモジュールを自作しサンプルインジェクターと検出器の間に設置した。結果、当該手法の分析感度は従来法よりも約100倍向上した。サンプルの最適加水分解時間を実験的に求めた。

霞ヶ浦湖水と優占藍藻類培地中の糖類濃度・組成を分析した。霞ヶ浦湖水（2004年）における全溶存糖濃度は冬季（1月）で $1.8 \mu\text{M}$ 、夏季（7月）で $3.0 \mu\text{M}$ で、冬季に比べ夏季に高い存在量を示した。単糖組成は年間を通してほとんど変化しなかった。優占藍藻類3種の生分解前後の培地の糖類組成を分析した。藻類は定常期に多くの溶存糖を排出し、藻類種によって排出する溶存糖の量や質に顕著な違いがあった。藻類種によらず多く排出される糖は主にグルコースであった。藻類培地は生分解を受けると、グルコースが選択的に消費され、生分解後の糖類組成は湖水と同様にほぼ均一的なものとなった。すなわち、グルコース含量が多いほどDOMは分解性が高いと言える。湖水と生分解後の培地の糖類組成が類似していたのは、湖水が難分解性（分解率 $< 10\%$ ）であるためと推察される。

2) アミノ酸組成分析

湖水、河川水中DOMに含まれるアミノ酸組成を、光学異性体であるD型アミノ酸とL型アミノ酸別に、分離・定量できる手法を確立した。

3) 有機炭素（TOC）検出サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）分析

DOMの分子サイズをTOCを評価パラメータとして検出するHPLC-SECシステムを開発した。TOC検出器として島津製作所TOC計（TOC-500）の非分散型赤外線（NDIR）を取り出し改造した。無機炭酸除去ユニット、湿式反応ユニットおよび制御プログラムは自作した。

分析カラム、溶離液組成等の分析条件を幾度となく変えて、最終的に、DOMや難分解性DOMに対する最適な分子量スタンダードであるポリスチレンスルホン酸を分離できる条件を見出した。下水流入水と下水処理水の分子量分布を測定したところ、下水流出水には従来の紫外線吸収（UV）では検出できなかった高分子サイズDOM成分が存在していることがわかった。すなわち、高分子サイズDOMは分解性が高いと判断できる。

4) 放射性炭素同位体比によるDOMの同位体識別化

霞ヶ浦湖水および流入河川水のろ過サンプルを対象として、適切な前処理後に、安定炭素同位体比を元素分析-安定同位体比質量分析計 (EA-IRMS) で、放射性炭素同位体比を加速器質量分析計 (AMS) で測定した。

霞ヶ浦湖水および河川水サンプルの放射性炭素同位体比 ($\Delta^{14}\text{C}_{\text{DOC}}$) は、約-200‰を境に湖水と河川水では、明瞭な違いを示した (湖水: -212‰~-13‰、河川水: -475‰~-17‰)。これは、湖水や河川水のDOMが、重い (年代として若い) $\Delta^{14}\text{C}_{\text{DOC}}$ 値を持つ湖水DOMと、軽い (年代として古い) $\Delta^{14}\text{C}_{\text{DOC}}$ 値を持つ河川水DOMとに、それぞれ同位体的に識別可能であることを示している。放射性同位対比測定が、湖沼におけるDOMの起源推定を行ううえで、非常に有効な指標であると強く示唆される。

霞ヶ浦湖水および流入河川水DOMの放射性同位体年代測定 (^{14}C 年代値) は、非常に古い値 (湖水で最大約900年前以上前、河川水で約4500年以上前) を示した。しかし、湖内植物プランクトン由来DOMが1000年以上古い ^{14}C 年代値を持つとは考えにくいいため、湖内DOMの非常に古い ^{14}C 年代値は、古い ^{14}C 年代値を持つ河川水DOMの影響によると考えられる。

5) 3次元励起蛍光スペクトル法の確立

DOMの特性評価に良く適用される3次元励起蛍光スペクトル法により、湖水や流域水DOMの特性評価を行った。標準化したデータを用いて蛍光波長、励起波長、蛍光強度から成る3次元の等高線図 (EEM) を作成した。オートサンプラーによるサンプル吸引からデータ取り込みまでの制御、データの標準化は全て自作のプログラムで実施した。

湖や河川に流れ込む流域発生源水として下水処理水、し尿処理水、生活雑排水を対象にEEMを作成した。サンプルの種類 (起源) によって、EEMのピークプロファイルは顕著に異なっていた。また、湖水や河川水のEEMではフミン様物質に由来するPeak 3とPeak 4のみが検出された。特にPeak 4は全てのサンプルで検出された。Peak 4はフミン様物質由来とされているが、実際にフミン/非フミン分画を実施して同ピークがどちらの画分に由来するか確認した研究例はない。同ピークがフミン様物質を反映しているか否か、未だ不明である。そこで湖水・河川水サンプルをフミン/非フミン画分に分画し、各画分のEEMを作成した。結果、どちらの画分でもPeak 4が確認され、非フミン物質によるPeak 4への寄与は3~5割であった。従って、Peak 4をフミン様物質由来とするこれまでの説明は不適切であると結論された。すなわち、定説が覆った。

6) 雨水DOMの特性

霞ヶ浦臨湖実験施設屋上に自作雨水サンプラーを設置して雨水サンプルを採取し、そのDOMの分画分布 (フミン物質、疎水性中性物質、親水性酸、塩基物質、親水性中性物質に分画) 等の特性を調べた。雨水DOM分画分布はこれまで報告された例はない。

雨水DOM濃度は0.08~4.30 mg-C/Lの範囲で大きく変動した。湖水よりもDOM濃度が高いケースも多くあった。窒素やリンについても同様な傾向があった。雨水DOMの分画分布では、親水性酸が卓越しており (43%)、次いで親水性中性物質 (26%)、フミン物質は17%で湖水よりも顕著に低い値を示した。雨水DOMの分解性はとても高く、平均40%で、DOM濃度が高いほど分解率が大きい傾向が示された。

7) 降雨時河川水中DOMの特性

霞ヶ浦流入河川 (恋瀬川等) で降雨時調査を行い、降雨時における河川水DOMの特性等を検討・評価した。同時に、懸濁物質 (POM) を含むサンプルとろ過サンプルを長期間分解試験に供して、POMから難分解性DOMへの寄与があるか否かを検討した。降雨時河川水に対してこ

のような調査研究がなされたのは初めてである。

降雨時に河川水量の上昇とともに、POM濃度が急激に増大した（0.8→17.1 mg-C/L）。DOM濃度も上昇したが、著しいものではなく降雨前の約60%に留まった（2.4→3.9 mg-C/L）。DOM分画分布も流量上昇と伴って変化した。フミン物質の存在比が35%から45%に増大した。降雨イベントは、河川にフミン物質を供給することが明らかとなった。

降雨時に採水したサンプルとそのろ過サンプル中の難分解性DOMの濃度と分画分布には顕著な違いが見られなかった。従って、降雨時に河川から湖沼に供給されるPOMからの湖水難分解性DOMへの寄与は無視できることがわかった。以前、平水時の河川水に対して同様な実験を行い、同じ結果を得ている。従って、河川水POMからの湖水難分解性DOMへの寄与は無視できると結論される。湖沼の主要な有機物はDOMで、そのほとんどが難分解性であることを考慮すると、湖沼の有機物汚濁に係る流出水対策は抜本的に見直す必要があると言える。

(2) 湖水柱・底泥でのDOMと難分解性DOMの生産メカニズムの解明

1) 底泥微生物群集構造解析

湖内の物質循環に大きく関与している底泥に着目し、分子生物学的手法（制限酵素断片長多型[RFLP]解析）を用いて霞ヶ浦底泥に棲息する微生物群集構造の季節変動を調査し、底泥の微生物群集と底泥環境との相互関係について評価した。

RFLPによるPCR産物の切断パターンを月ごと、深さごとに比較した結果、それぞれ明確な違いがあることがわかった。霞ヶ浦底泥中では季節変化に伴い真正細菌群集構造が3次的に（深度的に）変動すること、0～15 cm間の底泥中に多様な種が広く存在すること、特に夏季に細菌群集の多様性が高いことが示唆された。月ごとに作成した系統樹から、底泥からは硫酸還元菌に近縁な塩基配列を持つクローンが全ての月のサンプルで多数確認された。その分布は0～1 cm層からはほとんど検出されず、1 cm以深で大部分が検出され、特に4～8 cmにその検出が集中していた。すなわち、底泥表層から8 cm程度の深さにかけて嫌気化が進行していると言える。これは好気メタン酸化を行うメタン酸化菌がやはり8 cm程度の深さまで分布していることから裏付けられる。また、他の海洋性細菌に近縁の塩基配列を持つクローンも確認されたことから、霞ヶ浦が汽水湖であったことを反映しているとともに、硫酸還元菌に近縁な塩基配列を持つクローンも多く確認されたことと合わせて、底泥中がまだ完全に淡水化していないことが強く示唆される。

2) 湖水柱の微生物群集構造解析

霞ヶ浦湖水、湖岸域、流入河川における微生物の群集構造をPCR-DGGE法によって検討した。結果、群集構造に季節的な違いが認められた。湖内と河川では微生物群集が夏季に大きく異なっていたが、湖内と湖岸域では違いが認められなかった。一方、秋季には湖内、湖岸域、河川で各々異なった微生物群集が存在していた。

3) 分子生物学手法による湖水細菌存在量の算定

細菌の計数は一般的に蛍光色素染色後に蛍光顕微鏡で直接検鏡するが、細菌細胞が小さい、あるいは懸濁物（特に粘土鉱物）が多い場合、その判別が困難である。本研究では、湖水の真正細菌に特異的なプライマーを用いた定量的PCR（RT-PCR）を実施し、湖水や河川水中の細菌存在量の定量を検討した。

湖水および河川水中のrDNA濃度を2年間に渡り測定した。季節変動が顕著であったが、地点間の差は小さかった。

4) 藍藻類増殖のモデル化

藻類の優占化に鉄が及ぼす影響について数理モデルによる解析を行った。霞ヶ浦で優占する藍藻

類 *Microcystis* (1987年以前優占) と *Planktothrix* (1987~2000年優占) の純粋培養系で鉄に対する詳細な増殖特性を把握し、そこから鉄制限時における増殖モデル (Monod と Droop 式使用) を作成した。

このモデルを使って、霞ヶ浦湖心の鉄濃度レベル (50 nM) での2種藻類の鉄の獲得競争シミュレーションを行い解析したところ、鉄不足状態では *Microcystis* は *Planktothrix* との競争に勝ち優占することが示唆された。すなわち、鉄は *Microcystis* の増殖制限要因の一つであるが、鉄のみでアオコが発生しない原因を説明できないと結論された。霞ヶ浦で *Planktothrix* が2000年以降増えなくなったのは鉄制限が原因であると説明できる。

5) 底泥からの溶出

湖水有機物の供給源として底泥から溶出されるDOMの寄与はとても重要である。しかし、DOMの底泥溶出を、長期に渡って実際に測定したとする報告は皆無に近い。そこで、本研究では、霞ヶ浦を対象として、底泥コアサンプルを採取して、間隙水DOMの鉛直濃度プロファイルおよびDOM溶出フラックスの経年変化や季節変化を検討した。

DOM底泥溶出フラックスは経年的・季節的に顕著に変動することが確認された。底泥溶出フラックスは1997年以降減少傾向にあり、季節的には、定説である夏季ではなく、春季(5~6月)に最大になった。春季には底泥底生動物(ユスリカと貧毛類)の密度が急激に増大することが認められたため、春季におけるDOMの大きな底泥溶出フラックスは生物攪乱(バイオターベーション)によると示唆された。底泥微生物群集構造解析では、硝化細菌である *Nitrospira* 属に近縁なクローンが6月に1~10 cmで最大数が観測されている。この結果は、6月に底泥深さ10 cm程まで酸素が供給されることを示し、生物攪乱によって底泥に“水みち”ができた事を意味する。すなわち、生物攪乱説と整合する。

DOMと同様に底泥間隙水中の窒素 ($\text{NH}_4\text{-N}$) とリン ($\text{PO}_4\text{-P}$) の鉛直プロファイルと溶出フラックスについても検討した。 $\text{NH}_4\text{-N}$ のピークはDOMと同様に概ね10 cm以深にあったが、 $\text{PO}_4\text{-P}$ のピークは深さ4~6 cmに存在していた。 $\text{NH}_4\text{-N}$ の溶出フラックスは経年的に減少傾向にあったが、 $\text{PO}_4\text{-P}$ のフラックスは漸増していた。季節的にはともに夏季に最大フラックスを示した。DOM、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、および $\text{PO}_4\text{-P}$ の溶出メカニズムは相当に異なったものであると言える。底泥群集構造解析により硫酸還元菌が4~8 cmに集中して存在していることが判明している。従って、硫酸還元菌と $\text{PO}_4\text{-P}$ 溶出のリンケージが示唆される。

6) 分解性、サイズ、UV吸収能の関係

湖水DOMの分解性、分子サイズ(UV260 nm検出)および紫外外部吸光度(UV) / 溶存有機炭素(DOC)比の長期的トレンド(1995~2004年)を検討・評価した。

霞ヶ浦湖水中のDOMは年々難分解性化しており(湖心で分解率25%→7%)、同時に低分子化(760→680 g/mol)、かつUV/DOC比は漸増している(15.7→24.7 abs/cm·L·g)ことが判明した(図11)。この結果は、霞ヶ浦では、低分子でUV吸収能の高いものが難分解性DOMとして残存・蓄積していることを示している。すなわち、生分解性と分子サイズとUV吸収能の密接なリンケージが明らかとなった。

(3) DOMの動態および発生源対策効果の評価

1) 流域モデル

リモートセンシングによる多時期衛星画像(Quick Bird)を用いてクラスター分析(ISO DATA法とその階層化)によって恋瀬川流域における詳細な土地被覆分類を得た。水域: 1.5%、水田: 15.1%、市街地: 9.1%、落葉樹: 13.2%、畑地: 18.4%、裸地: 13.7%、常緑樹: 29.1%。

2) 湖内モデルによる対策の評価

霞ヶ浦湖内3次元流動モデルを使って、下水処理場放流水の放流先を変更した場合に（現状＋9カ所）、環境基準点および上水取水口において、下水処理場由来の難分解性DOMの濃度がどのように変化するかをモデル計算によって評価した。

結果、湖水の流れは複雑に影響することが明らかとなった。土浦入りや湖盆地に放流した場合には湖心での濃度寄与は上昇し、一方、高浜入り左岸や湖尻に放流するとその寄与は低下した。ほとんどのケースで湖尻へ放流すると処理水の寄与は著しく減少した（湖心：－84%、上水取水口：－90%）。全DOMに対する低減効果を見積もると、平均で掛馬沖は28%、玉造沖は8%、湖心は11%、麻生沖はマイナス0.8%（増）、取水口は19%。

湖尻への放流先変更に伴う費用を年価として算定した（年価＝年当たりの建設費＋年当たりの維持管理費）。湖周（陸上）ルートと湖底ルートの二つのケースを想定した。湖周ルートでは446百万円／年、湖底ルートでは620百万円／年と算定され、湖周ルートのほうが安価であった。ただし、霞ヶ浦に隣接する下水処理場の計画処理量は25万m³／dであり、この流量で試算すると湖底ルートのほうが安価となった。

同様に、下水処理場に高度処理を導入した場合についてもモデル計算を実施してその効果を検討した：①砂ろ過、②砂ろ過＋オゾン、③砂ろ過＋活性炭、④砂ろ過＋オゾン＋活性炭、⑤凝集沈殿＋砂ろ過、⑥凝集沈殿＋砂ろ過＋オゾン、⑦凝集沈殿＋砂ろ過＋活性炭、⑧凝集沈殿＋砂ろ過＋オゾン＋活性炭、⑨凝集沈殿＋砂ろ過＋逆浸透膜。結果として、下水処理水の湖尻への放流先変更に対応する難分解性DOM濃度の低減効果を持つものは高度処理⑨だけであった。高度処理⑨導入に係る年価を試算すると1054百万円／年であった。放流先の湖尻へ変更のほうが高度処理の導入よりも費用対効果は高いと判断された。

上記の費用対効果算定は適切な科学的知見に基づいている。かつ評価ポイントは実際の環境基準点や上水取水口であるため、その効果算定は非常に具体的である。このような科学的適切さと定量的具体性も持った費用対効果算定は、環境行政・政策に大きなかつ実質的な貢献を果たすと期待される。

4) 研究実施の背景

1980年代中頃に琵琶湖北湖で注目された湖水中における溶存COD濃度の漸増現象は、その後、十和田湖、野尻湖、霞ヶ浦、さらに印旛沼と遍在的な広がりを見せている。難分解性で溶存態の有機物（DOM）が湖水中で漸増している。湖沼でのDOM濃度の上昇は、湖沼生態系（特に植物プランクトン－バクテリア微生物群集構造等）、水道水源としての湖水の健康リスク（トリハロメタン等の消毒副生成物）上昇および異臭味、有害化学物質の可動化等、湖沼環境に甚大な影響を及ぼすと考えられる。湖沼環境および水道水源保全上、緊急に、難分解性DOMが湖水中で蓄積・卓越するメカニズムを、特に内部由来の難分解性DOMの寄与を明らかにする必要がある。

本研究の目的は、湖水有機物（DOMや粒子状有機物（POM））等の化学的組成特性（DOM分画分布、分子量、糖類組成、アミノ酸組成、炭素安定・放射性同位体比等）から分解性や起源を評価する手法を開発・確立し、湖水柱や底泥中でのDOM特性と起源、生産と分解性、および微生物群集との連動関係（リンケージ）を評価することである。さらに湖沼での難分解性DOMの動態、湖水に蓄積するメカニズムおよび主要発生源を、フィールド調査とモデル解析によって明らかにする。最終的には発生源対策の費用対効果を算定して、発生源対策に係る具体的な提言を行う。

5) 評価結果（総合評価）

	5	4	3	2	1	合計
事後評価	2	6				8
(19年4月)	(25)	(75)				(100)

注) 上段：評価人数、下段：%

事後評価基準（5：大変優れている、4：優れている、3：普通、2：やや劣る、1：劣る）

外部研究評価委員会による事後評価の平均評点 4.3点

6) 評価結果の概要

湖沼や閉鎖性海域で現在最も問題になっている難分解性有機物に関して国際的にも貴重なデータを蓄積し、その動態や蓄積機構を解明したことは極めて高く評価される。また、発生源対策の費用対効果分析も試みており、処理水の放流方法や下水の処理方法などの効果を見積もった点で社会・行政にも貢献している。底泥からの湖水への回帰に対しては、流れや風波との関係を考慮して研究を継続し、さらなる現象解明とモデル解析を進めて欲しい。また、湖沼でも海洋での研究のようにDOMの光化学的分解の効果は出ているか、興味ある課題である。今後の水環境基準のあり方の検討や水質保全施策の検討、すなわち水環境保全施策の進展に直接寄与するように、環境省と密に連携した調査研究に発展させることを希望する。

7) 対処方針

外部研究評価委員会からの高い評価を糧に、（1）現象解明を目指す基礎研究、（2）着実・地道なモニタリング、（3）技術開発、（4）モデル解析、（5）費用対効果評価等を横断的に組み合わせたアプローチで研究を今後も進展させてゆきたい。

ご指摘頂いた底泥溶出現象における流れと風波との関係については、現在使用中のモデルの更なる一般化に伴い実測データに基づいて組み込んで行く方針である。また、DOMへの光化学的反応の影響は、ご指摘の通りに、DOMを易分解性にする、あるいは難分解性するという相反する説がある、とても興味深いテーマである。藻類由来DOM、海水、河川水、下水処理水等のDOMに対する光化学反応の影響については既に研究を行い論文として発表している。今後は、湖水DOMを対象として同様な研究を実施してゆきたい。

水環境保全施策の進展に直接的に寄与することは、我々が展望する研究目標の一つである。環境行政スキームにおいて学術的に漠然として不明瞭な部分を明確化するアプローチを取り、環境省と整合性高く連携して、研究を進展させてゆきたい。

2. トキシコゲノミクスを利用した環境汚染物質の健康・生物影響評価法の開発に関する研究

課題代表者 野原 恵子（環境健康研究領域）

1) 研究の概要

環境研の複数の領域の研究者が連携して、環境汚染物質の生体影響や生物への悪影響について、近年めざましく開発が進んだトキシコゲノミクス技術を活用した影響検出・予測法の開発や有効性の検証を行った。その結果、各種有害化学物質の実験動物や環境微生物に対する影響検出や影響経路の解明に、トキシコゲノミクスが極めて有効であることが明らかとなった。また、本研究の成果として得られたトキシコゲノミクスの環境研究への応用例やダイオキシン応答性遺伝子データベースを一般に公開するためのWebページを作成した。

2) 研究期間

平成 16～18 年度（3 年間）

3) 研究成果

(1) トキシコゲノミクスを利用した環境汚染物質の健康影響の実験的予測法

1) 環境汚染物質の免疫系への悪影響の遺伝子発現変化からの検出・予測に関する研究

胸腺は、重要な免疫細胞であるTリンパ球（T細胞）の分化・成熟の場となる免疫臓器である。また胸腺は環境からの影響を受けやすく、多くの環境化学物質が胸腺萎縮作用をもつことが知られている。胸腺萎縮作用をもつ化学物質の多くは免疫機能抑制作用を示すことが報告されている。そこで、各種環境化学物質による免疫系への悪影響を、トキシコゲノミクスを利用した胸腺の遺伝子発現の網羅的解析から予測する方法の有効性について検討した。

マウスに胸腺萎縮作用を持つことが知られているダイオキシン、無機ヒ素（ NaAsO_2 ）、PFOS、有機スズなどの環境汚染物質や、エストロゲン（ E_2 ）、合成グルココルチコイド（GC）ホルモンであるDEXを投与し、胸腺の遺伝子発現変化の網羅的解析を行った。その結果、各汚染物質やホルモンがそれぞれ異なる経路で胸腺萎縮をおこすことが示唆された。特に無機ヒ素については、リンパ球細胞株での検討を含めて、無機ヒ素が転写因子 E_2F_1 の機能を抑制し胸腺T細胞の細胞周期を抑制することによって胸腺萎縮を誘導するという分子経路をあらたに明らかにした。無機ヒ素はGCの分泌を介して胸腺萎縮をおこすことが報告されていたが、本研究の結果では無機ヒ素とGCはそれぞれ異なる経路で胸腺萎縮をおこすことが示唆された。また無機ヒ素は胸腺細胞の主要な細胞群であるDP細胞に影響を及ぼすことが考えられたが、ダイオキシンは胸腺の中でごく少数の細胞群であるDN細胞に影響を及ぼして胸腺萎縮を誘導することが遺伝子発現解析から示唆された。

これらの結果から、胸腺での遺伝子発現変化の網羅的解析が、環境汚染物質の胸腺および免疫系への悪影響の検出や、影響の分子経路や標的となる細胞群の同定に有効であることが示された。また免疫系への影響が未知の環境汚染物質の影響予測にも有効であることが示唆された。

その他、各種免疫細胞においてダイオキシン曝露によって発現変動する遺伝子を明らかにし、ダイオキシンの影響検出指標となる遺伝子候補を明らかにした。

2) ダイオキシンによる細胞増殖抑制の原因遺伝子の探索

T細胞はダイオキシンによる免疫毒性の主要な標的細胞のひとつである。ダイオキシンによる転写因子AhRの活性化によって遺伝子発現が変化しT細胞の増殖抑制がおこることが免疫毒

性につながると考えられている。この免疫毒性経路に密接に関与する遺伝子の同定にT細胞株の利用が有効と考えられるが、生体内のT細胞は正常のAhRを発現しているのに対して、これまで調べられたT細胞株はすべてAhRの機能が欠損していた。そこで恒常的活性化型AhRを発現させたT細胞株を作成し、AhRの活性化によって発現が変化する遺伝子の検索を行った。T細胞株に活性化型AhRを発現させることによってアポトーシスや細胞周期抑制に関係する遺伝子の発現変化が検出された。これらの遺伝子をT細胞株に強制発現させることによって細胞増殖抑制との関係を調べた結果、増殖抑制の原因であることが示唆される遺伝子を明らかにした。

3) ヒト、マウス、ラットリンパ球における遺伝子発現を指標としたダイオキシン感受性の比較

ダイオキシンに対する動物種差は、主に各動物種のAhRとダイオキシンとの親和性によって決まり、ヒトは比較的感受性が低いと考えられている。ヒトと実験動物のダイオキシン感受性を直接比較するために、活性化AhRによって誘導される代表的な遺伝子である*CYP1A1*について、ヒト、マウス、ラットでそのmRNAを同一の効率で増幅できるPCRプライマーを設計し、また各動物の血液リンパ球でダイオキシンによる*CYP1A1*発現量を測定するための至適条件を明らかにした。この実験系を用いて*CYP1A1*発現量を比較した結果、ヒトのリンパ球では、ダイオキシンに対する感受性が高いと考えられているC57BL/6マウスやSDラットよりも発現量が高いことが明らかとなった。すなわち、ヒトのリンパ球はダイオキシンに対する感受性が高いことが示唆された。また、リンパ球にはAhRの親和性以外にダイオキシン反応性を決定する因子があり、影響の種差を考える上で考慮すべきであることが示唆された。

4) ヒトとマウスにおけるダイオキシン感受性の種差決定因子に関する研究

実験動物のデータをヒトへ外挿するための基礎資料とするため、ダイオキシンに対するヒトと実験動物の感受性に影響を与える因子として、AhR-ダイオキシン親和性以外の因子を明らかにすることを目的として研究を行った。ダイオキシン親和性のAhRを発現するC57BL/6マウス由来の肝臓ガン細胞Hepa1c1c7と、ダイオキシンと低親和性のAhRを発現するヒト由来の肝臓ガン細胞HepG2でのダイオキシンによる*CYP1A1* mRNA誘導量は、ダイオキシン曝露4時間以降ではHepa1c1c7とHepG2とでほぼ等しくなり、ダイオキシンとAhRの親和性に対応しなかった。この原因として、核内に移行したAhRの分解速度がHepG2よりHepa1c1c7で速く、Hepa1c1c7での*CYP1A1* mRNA誘導の抑制に関与していることが示唆された。また、ヒストン脱アセチル化酵素の一種であるHDAC1の*CYP1A1*プロモーター領域への結合タイムコースが異なることも*CYP1A1* mRNA誘導を調節している要因の1つであることが示唆され、これらがヒトとマウスのダイオキシン感受性の決定に重要な因子であると考えられた。

(2) トキシコゲノミクスによる生物影響の検出に基づく環境影響評価法

1) DNAアレイを用いた植物への環境ストレス影響評価手法の開発

4種類の環境ストレスに特異的に応答する遺伝子を単離し、特異性の高い植物の環境診断用のDNAアレイの作製を試みた。シロイヌナズナにおいてオゾン(0.2ppm)、紫外線(290~315nm)、酸性雨(人工酸性雨、pH5)、SO₂(1ppm)の各ストレスに対して特異的に発現する遺伝子を単離する目的でこれらのストレスを1時間及び6時間与えた植物からtotalRNAを単離し、Affimetrix社のGene Chip Arabidopsis ATH1 Genome Arrayを用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、各ストレスで対象区に比べ発現量が1時間で3倍以上増加し、且つその増加が6時間目まで続いた遺伝子を多数単離することが出来た。そのうち、それぞれのストレス特異的に発現上昇する遺伝子がオゾン、紫外線、酸性雨、SO₂暴露により15個、76個、9個、31個あることが明らかになった。

次にこれらの遺伝子が本当に各ストレス特異的に発現応答するのかについての検証を行った。

シロイヌナズナからcDNAを単離し、93種類の遺伝子を得ることができた。これらを用いてサブセットcDNAマイクロアレイの作製を行った。その結果、オゾン、酸性雨、SO₂、紫外線に対し、それぞれ10個、7個、19個、25個の遺伝子の発現が特異的に起こっていることが確認できた。

次にこれらの遺伝子を用いて植物へのストレス診断ができるかどうかの検証を行った。各ストレスで特異的に発現増加すると考えられる遺伝子のうち、ストレス処理していない植物（コントロール）に対して発現上昇の割合が高い上位4種類（紫外線は3種類）の遺伝子をピックアップしてミニマイクロアレイを作製した。その結果、オゾンで1種類、SO₂で2種類、紫外線で2種類の遺伝子が明らかに特異的に応答する遺伝子があることが判った。違うロットのサンプルでもほぼ全て問題なく使用できることから今回作製したミニマイクロアレイは少なくともオゾン、SO₂、紫外線ストレスを区別できる事が判った。

2) 環境微生物DNAマイクロアレイの開発とDNAマイクロアレイを用いた有害化学物質の影響評価

(ア) 微生物群集構造解析用DNAマイクロアレイの作成

今回作製した微生物群集構造解析用DNAマイクロアレイを用いることで、PCRによる遺伝子増幅なしで、直接抽出した細菌由来のrRNAを検出することができた。DNAマイクロアレイの最適操作条件を検討し、この条件で、16種類の純菌から抽出したrRNAを用いた解析を行った。その結果から、作成したDNAマイクロアレイ上のプローブのハイブリダイゼーション特性が明らかになり、得られたシグナルを正確に評価するための知見を得ることができた。続いて細菌群集構造が16SrRNAクローンライブラリー解析によって決定されている貴金属回収工場排水由来の活性汚泥試料を用いて、DNAマイクロアレイの微生物群集構造解析への適用を試みた。その結果、クローンライブラリー解析から存在が確認されている微生物グループをDNAマイクロアレイで検出することが可能であった。以上の検討の結果、今回作成したアレイの有用性を確認できた。

(イ) DNAマイクロアレイを用いたアンモニア酸化細菌への直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩(LAS)の影響評価

アンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas europaea* の全ゲノム配列が解読され、網羅的な遺伝子発現解析をDNAマイクロアレイで行うことが可能となった。そこで、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩(LAS)に対する *N. europaea* の挙動をmRNAレベルで解明することを目的として研究を行った。DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析により、LAS添加後、約30種類の遺伝子が発現強度を増大させた。その中で特にアンモニア酸化、細胞膜形成、ストレス応答に関係のある遺伝子が強く発現した。さらにリアルタイムPCRにより、DNAマイクロアレイで発現が確認された遺伝子の発現量を定量し、LAS添加による発現量の増大を確認した。これらのことから、*N. europaea* は10mg/LのLASを添加すると、細胞膜が破壊され、増殖および亜硝酸の生成が停滞し、2日後にはアンモニア酸化、細胞膜形成に関する遺伝子が発現し、代謝エネルギーの獲得および細胞膜の形成が行われ、LASによるダメージの回復を凶ると考えられた。

2) 培養可能な微生物遺伝子の網羅的解析による土壌生態系への影響評価法の開発

有害化学物質の土壌環境への影響を評価するうえで、微生物生態系の解析は非常に重要であるが、多くの有害化学物質が土壌中の微生物群集に及ぼす影響の知見は未だに少ない。そこで、重金属類の塩化第二水銀および揮発性有機塩素化合物のトリクロロエチレン(TCE)で汚染した土壌マイクロコズムを用いて両汚染物質が土壌微生物群集に及ぼす影響を明らかにするとともに、培養可能な微生物に注目した汚染土壌の影響評価法の開発を試みた。

まず、塩化第二水銀およびTCEで汚染した土壌中に存在する微生物の数を測定した。その結

果、両者の微生物数はそれぞれの汚染濃度の違いによる影響もなく経時的に一定だった。次に、汚染土壌に存在する全微生物群集(土壌サンプル)とその培養可能な微生物群集(Plate Wash サンプル) への影響を明らかにするため、PCR-DGGE解析を行った。さらに、多次元尺度法を用いた統計処理により微生物群集の変動を解析した。その結果、塩化第二水銀およびTCE汚染の影響による、土壌サンプルの微生物群集の変動は経時的に小さかったが、Plate Wash サンプルでは約0-50日目の期間に微生物群集は大きく変動していることが認められた。土壌サンプルでは確認しにくかった両汚染物質の影響が、Plate Wash サンプルを用いることで初めて明確になり、本解析法の有効性が示唆された。

次いで、DGGEゲルからバンドを切り出して特徴的な微生物群集の系統解析および同定を行った。塩化第二水銀汚染により、微生物群集の系統は4門に分類され(*Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*)、塩化第二水銀の及ぼす影響は微生物系統(門)で異なることが示唆された。汚染土壌に存在する特徴的な微生物として *Duganella violaceinigra*, *Lysobacter koreensis*, *Bacillus panaciterrae* が同定された。一方TCE汚染では、微生物群集の系統は3門に分類されたが(*Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*)、TCEの及ぼす影響と微生物系統との間に相関関係は認められなかった。汚染土壌に存在する特徴的な微生物として *Paenibacillus kobensis*, *Paenibacillus curdlanolyticus*, *Paenibacillus wynnii*, *Sphingomonas herbicidovorans* が同定された。これら特徴的な微生物群集は各汚染物質の分解代謝に関与していると考えられた。

3) PPAR結合性化学物質の魚類への影響の遺伝子発現解析からの探索

PFOR(パーフルオロオクタン酸)などの高フッ素化脂肪酸は生分解性が低いため、その生態影響が懸念されている。PFORはげっ歯類でパーオキシゾーム増殖因子受容体(PPAR)に結合し、パーオキシゾーム増殖因子(PP)活性を示すが、魚類に対しての作用の検討は充分に行われていない。PFORとその同族体が魚類においてどのような遺伝子を発現するかを明らかにすることによって、PFORの生態毒性のメカニズムを解明するために必要な知見が得られ、また、環境からの曝露のバイオマーカーが見出せることが期待される。

本研究では、PFORとその同族体パーフルオロヘキササン酸(PFHA)、および陽性対照として3,4,5,3',4'-ペンタクロロビフェニル(Pe nCB)を曝露したメダカに発現される遺伝子を、DNAアレイを用いて同定した。メダカを採用した理由は、1)化審法の生態毒性試験の試験動物であること、2)わが国固有の生態系を代表する魚類であること、3)既に実験動物として馴化されておりゲノムプロジェクトも進んでいること、である。

1群5匹のオスのメダカをPFOR、PFHAあるいはPe nCBを含む人工海水中で飼育した。曝露終了後、氷冷下で解剖し臍肝臓とエラを摘出し5匹の臍肝臓をまとめて総RNAを抽出し、遺伝子発現パターンをNimbleGen systemのメダカアレイ(NANDEMO ARRAY)を用いて解析した。対照群に比べて、1.5倍以上の遺伝子発現が認められた場合を陽性反応とした。

解析の結果、PFOR曝露では、PFHA やPe nCB では発現しない特徴的な遺伝子発現が認められ、PFOR曝露の特異的バイオマーカー候補となる遺伝子が明らかとなった。またメダカへのPFOR曝露では、PPの作用によりゲッ歯類で発現する脂質代謝酵素の発現は認められず、PFORのメダカへの作用様式がげっ歯類とは異なることが示唆された。

(3) 環境研トキシコゲノミクスデータベースの作成

ダイオキシン応答性遺伝子データベースは、ダイオキシン類曝露による遺伝子発現変動解析を集積し、外部閲覧者が容易に実験データを検索できるシステムを公開データベースとして構築することを目的とした。開発のコンセプトとして、単に2つのマイクロアレイ比較結果ファイルを

格納するだけでなく、以下のような多岐にわたる体系的データマイニング機能を搭載したソフトウェア化を目指した。1) 格納された解析結果がどのような目的の実験のなかで実施されたのか詳細を容易に検索できる。2) 今後データが大幅に拡大した場合、使用した化合物の種類や用量、実験動物あるいは細胞株によって実験系の検索が行える。3) 興味のある遺伝子の変動した実験系について、遺伝子の一般的名称や複数の公共データベースIDによって検索できる。4) 異なる実験系で実施された比較解析結果間をマルチプルに比較検討できる。5) 用量反応関係を検討できる実験系を抽出し、遺伝子ごとの用量反応関係を瞬時にグラフ化できる。6) 各遺伝子のゲノム情報のマスターデータベースを準備し、シスエレメントのゲノム内位置情報を提示できる。7) 存在する特異エレメントのゲノム内位置情報を多数の遺伝子間で比較したデータを提示できる。8) 登録された各遺伝子に関して、データベース内に集積してくる対象臓器や細胞株間の発現レベルを比較したグラフを提示できる。これらの機能を実現するため、6種のモジュール（EXPERIMENT、GENE、CURVE、COMPARISON、ELEMENT、DISTRIBUTION）を設け、ユーザフレンドリな環境を構築した。本データベースプロトタイプは、平成17年12月に国立環境研究所ホームページより公開した。

またこのダイオキシン応答性遺伝子データベースや、本研究で行ったトキシコゲノミクスの環境研究への応用例を広く公開するためのWebページ「NIESトキシコゲノミクスサイト」を作成した。

4) 研究実施の背景

近年のアレルギー増加の例にみられるように、ヒトの健康は明らかに環境の影響を受けて変化している。その主たる原因は明らかにされていないが、環境中の有害化学物質や大気汚染物質の関与が強く示唆されている。そこで環境汚染物質からヒトの健康を守るために、汚染物質の毒性評価を早急に行い、対策を立てることが必要である。しかし、多種類の環境汚染物質の生体影響を個々に評価するためには莫大な労力が必要であり、実際には影響評価が行われていない多くの化学物質や環境汚染物質が存在する。近年開発され、めざましく進歩しているゲノミクス技術の利用は、従来不可能であった多種類の汚染物質の生体影響評価を可能とすることが期待される。同じく多種類の汚染物質は大気や水、土壌を汚染し、生態系にも深刻な影響を及ぼすことが考えられる。トキシコゲノミクスの活用は、これらの悪影響の検出を大きく効率化し体系化することを可能にするばかりでなく、悪影響が顕在化する以前に影響を検出し予測することをも可能にすると期待される。

本研究では、遺伝子発現変化の解析によってどこまで生体の反応や生物影響を検出できるか等のトキシコゲノミクスの有効性の検証を行い、多種多様な環境汚染物質のヒトや生物への影響の新たな総合的・体系的な評価法確立に寄与することによって、ヒトの健康保持や環境保全への貢献をめざしている。

5) 評価結果（総合評価）

	5	4	3	2	1	合計
事後評価	4	5				9
(19年4月)	(44)	(56)				(100)

注) 上段：評価人数、下段：%

事後評価基準（5：大変優れている、4：優れている、3：普通、2：やや劣る、1：劣る）

6) 評価結果の概要

本研究はシャープなアプローチにより、有害化学物質の健康影響に関与する遺伝子を捕まえ、その役割を明らかにした優れた研究である。ゲノミクス手法を利用し、環境汚染物質の健康影響評価の有効性を世界に先駆けて実証した点は高く評価できるが、その一方で、全身的な健康影響の指標とするにはDose-Response解析も含め発展途上である。また、シロイヌナズナを用いて4種類の環境ストレスに特異的に発現上昇する遺伝子を単離したことは、もう一つの大きな成果であるが、定量的な実験がなされていない点は残念である。定量的な議論がなければリスク管理はできないので、本手法をリスク管理に如何に適用していくかの道筋を明らかにしていくためにも、複合効果の検討も含め、今後の研究の継続・発展に期待したい。今後は、作ったデータベースを誰が、どのように使っていくのか、一般に公開するのか等をもっと明確にしつつ、行政への活用も考慮すべきであろう。

7) 対処方針

ゲノミクス手法を用いた有害化学物質の免疫系への悪影響の検出については、ご指摘をいただいたように、用量依存性や時間的変化についてさらに解析をし、行政に活用される形とすることも視野に置いて、影響検出手法として確立をしていくことが今後の課題と考える。現在、今回の研究で影響検出指標として選択された遺伝子を搭載した安価な簡易型DNAアレイを作成する研究を進行中であり、これを用いて今後用量および時間依存性の検討を進めたいと考えている。さらに免疫毒性が指摘された有害化学物質については、今後もその影響検出に有効な遺伝子のデータを集積し、これらのデータをもとに影響未知の有害化学物質の免疫系への影響予測を可能とするシステムとしたい。

また、ご指摘のようにシロイヌナズナへの4種類の環境ストレスに対して特異的に応答する遺伝子については、異なるストレス強度（時間・濃度）に対する応答性についての解析がなされていない。今後はこれらの遺伝子がストレス強度を変えた時に発現応答するのか（定性性）、またはその発現量がストレス強度に比例するのか（定量性）、について検討していきたいと考えている。それらの結果を踏まえて、複合効果の影響も今後検討をしたい。また、将来的な発展事項としては、この手法をモデル植物のシロイヌナズナだけではなく他の植物に応用していく事も視野に入れている。現在、日本全国で普遍的に栽培されているアサガオを用いてこの手法が応用できるかどうかについて研究を開始している。また、海外との共同研究でシロイヌナズナのマクロアレイを用いて、オゾン及び酸性雨のマツへの影響評価が可能かどうかについての検証を行う予定である。

Webページ「NIESトキシコゲノミクスサイト」については、今後も新たな研究結果やデータベースへのデータ収集を加えて更新を続け、研究者や一般に対して有用な環境汚染物質の生体・生物影響研究の情報提供サイトとして公開を続けたい。