

審査の結果の要旨

氏名 日置恭史郎

水環境における有害物質による汚染は水のみならず底質にも広がっている。その化学分析的評価はすでに環境行政に取り入れられ、様々な物質が定期的にモニタリングされている。一方、その水生生物への影響という観点では不明な点が多く残されている。最も大きな評価上の障壁は、底質中有害物質の生物への移行、摂取の評価である。環境中の汚染底質や汚染微粒子等の化学分析や毒性評価事例は数多くあるが、その毒性の原因が解明された例は稀である。化学物質動態の理論的解明は不均質な環境試料においては極めて困難であり、むしろ生物側の体内での応答から推測することが現実的な方法である。

そのような化学物質の生物への曝露に関するバイオマーカーとして、個々の物質および物質群の解毒に関与するタンパク質等が野生生物等を対象に広く用いられてきたが、底質毒性試験に用いられる微小な水生無脊椎動物においてこれらを検出することは、必要試料量や作業の手間から大きな困難が伴う。一方、生物応答の上流に位置する遺伝子発現は、比較的少ない試料量で網羅的に化学物質曝露に対する応答を示すものとして有効な手法と考えられている。

本論文は「汽水産端脚類を用いた底質毒性評価への cDNA-AFLP による遺伝子発現プロファイリングの適用」と題し、底質毒性評価における遺伝子発現解析手法として、生態毒性評価研究に従来用いられてきていない cDNA-amplified fragment length polymorphism (AFLP) 手法を適用するための検討を行ったものである。cDNA-AFLP は制限酵素による切断と PCR による増幅を基礎とした手法であり、比較的安価に遺伝子発現パターンを得ることができ、新規のバイオマーカー遺伝子を発見するツールとして活用できるのではないかという着想のもと、基礎的検討から、環境試料に対する適用まで実施している。対象生物として、汽水産端脚類ニホンドロソコエビ (*Grandidierella japonica*) を用いている。

論文は7つの章で構成され、結果に関する章は4~6章である。第1章では、論文の背景および研究目的、論文の構成を述べている。第2章では、関連する事項として、底質汚染、底質毒性要因推定手法、バイオマーカー、トランスク

リプトーム解析、試験生物種について既往の知見が整理されている。第 3 章では、本論文における実験手法とデータ解析手法がまとめられている。

第 4 章は、cDNA-AFLP によるニホンドロソコエビの遺伝子発現解析の基礎的検討を行っている。具体的には、鋳型 DNA の検出範囲、発現プロファイルの再現性、化学物質ごとの特異性について、検討がなされている。検出範囲や再現性といった基礎的な情報を得るとともに、銅・亜鉛・ニコチンを対象として発現変動のデータを取得し、変動した座位が個々の物質に特異的であることを確認している。この結果は手法の有用性を示しており、特に第 6 章での環境試料での評価に直接的につながる成果である。

第 5 章では、環境底質に適用することを想定して、対象とする有害物質以外の要因による偽陽性がないかを確認している。粒子径分布や有機物含量などが異なりかつ急性致死毒性を示さない 6 種類の底質を東京湾周辺で採取して用い、第 4 章で得られた 3 つの物質に特異的な座位が変動しないことを確認し、本手法の環境試料への適用可能性を示している。

第 6 章では、急性毒性を示す環境試料に本手法を適用している。重金属やニコチンを含み、毒性を示すことを確認した高速道路塵埃に試験生物を曝露し、その遺伝子発現を明らかにしている。さらに Sediment TIE 手法による毒性要因推定も並行して実施し、遺伝子発現応答との関連性を検討している。道路塵埃に曝露した系と、Sediment TIE 手法において毒性が低減できた系とでは、cDNA-AFLP を用いた遺伝子発現解析で共通の座位はなく、毒性低減と遺伝子発現変化との対応が認められた。また、ニコチン曝露に対して特異的な 8 つ座位のうち 7 座位が道路塵埃曝露系と有意差がなく、バイオマーカーとしての有用性が示唆されている。

第 7 章は総括および課題、今後の展望が述べられている。

以上のように、本論文は、汽水産端脚類を用いて cDNA-AFLP により底質汚染物質の曝露のバイオマーカーを探索し、環境試料への適用性を示している。今後本手法の適用事例が蓄積されることで水環境管理および水域生態系保全に資する有用なツールとなることが期待される。また、道路塵埃の有害性を底生生物の遺伝子発現により解析した事例は過去になく本論文の新規性が認められる。本論文の成果は、今後の都市環境工学の学術の進展に大きく寄与することが期待される。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。