

氏 名	み さ き けん た ろ う 三 崎 健 太 郎
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2742 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	工 学 研 究 科 環 境 工 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	大気環境中の AhR 活性多環芳香族化合物類の探索およびその遺伝子発現と毒性作用に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 松 井 三 郎 教 授 森 澤 眞 輔 教 授 内 山 巖 雄

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、芳香族炭化水素レセプター (AhR) 活性を示す、大気環境中における未知の多環芳香族化合物類 (PACs) の探索と、いくつかの PACs による代謝酵素誘導、DNA 付加体形成を調べた成果をまとめたものであって、序論、本論 (5 章)、結論からなっている。

序論では、研究背景、研究目的、論文構成について述べている。

第 1 章では、11 種類の PAKs と 7 種類の PAQs などの oxy-PAHs, および 21 種類の PAHs による AhR を介したレポーター遺伝子発現誘導能を酵母とマウス肝臓ガン (H1L1) 細胞を用いた方法で調べた。それにより B[a]FO, B[b]FO, B[c]FO, NCQ, ChQ, BAQ などの oxy-PAHs が、H1L1 細胞の系で B[a]P に対して 0.025~0.37 倍の活性を示すことを新たに見出した。各方法において B[a]P 基準の誘導等価係数 (IEF) 値に変化を生じさせる多くの要因を、文献データとの比較により考察している。

第 2 章では、H1L1 細胞における IEF 値と既存研究の分析データから、B[a]FO や B[b]FO の AhR 活性がガソリン粉塵や大気浮遊粒子抽出物の総活性の 0.06%~1.3% に寄与することを見出している。さらに、道路粉塵とディーゼル粉塵の抽出物のいずれも、HPLC による分画は、PAHs の分画領域のほかに、より極性の高い oxy-PAHs の分画領域が活性に寄与していることを見出している。

第 3 章では、AhR 活性が高いことが認められた PAH (B[a]P, B[a]A, Chr, B[b]FA, B[k]FA, DB[a,h]A, N[a]P) をそれぞれ塩化メチレン溶媒中でオゾン酸化し、その酸化混合物の AhR 活性を H1L1 細胞を用いた試験によって測定し、ほとんどの混合物の活性がもとの活性より減少し、B[a]P の酸化混合物の活性は B[a]P の活性と同程度であることを確認した。そこで、B[a]P のオゾン酸化混合物を逆相分離し、AhR 活性の高い分画を分取精製して、High-MS が 286.063 を示して酸素が 3 個含まれていることを確認すると共に 2 次元 NMR 測定結果と合わせて、得られた物質が水酸化多環芳香族ラクトン構造を保持することを推定している。

第 4 章では、5 μ M の PACs に暴露された HepG2 における代謝酵素の mRNA の誘導を、リアルタイム RT-PCR を用いて測定した。CYPs mRNA は、B[k]FA, DB[a,h]A など特に強く誘導され、24 h 以後も誘導されたが、B[a]P の誘導はそれらよりやや少なかった。B[b]F, DB[a,c]A, N[a]P のような PAH, BAQ, NCQ, B[b]FO のような oxy-PAH の CYPs mRNA 誘導が確認されたが、ほとんどの PAH の AhR 活性は oxy-PAHs より高いことを明らかにしている。一方、AKR1C1 は NCQ, B[a]FO, B[b]FO などの oxy-PAH の他、B[a]P, B[k]FA, DB[a,h]A などの強 AhR 活性 PAH でも大いに誘導され、24 h 前後で誘導が下がる傾向と共に、PAH のほうが oxy-PAH より誘導に時間を要することを見出している。NQO1 mRNA は、BAQ, NCQ, B[a]FO, B[b]FO のような oxy-PAH により多くの PAH と同程度の誘導を示し、経時変化は、ほとんどの PAC に対して、6 h から 24 h までは急速に増大し、PAHs よりも oxy-PAHs で少し速く、AKR1C1, NQO1 mRNA いずれもが何らかの酸化物、あるいは ROS 由来の EpRE 活性を反映していることを示唆してい

る。24 h でどの PAC も顕著な GSTM1 mRNA の誘導を示さず、B[a]P, B[k]FA, DB[a,h]A, DB[a,c]A の GSTM1 mRNA は control レベルより低く、またいくつかの PAC に対して GSTM1 mRNA 誘導が高濃度暴露領域で減少すること、いずれの PAC に対しても12 h までの期間で減少傾向を示すことを確認している。

AP-1を介する AKR mRNA の誘導量を調べたが、高い AhR 活性を示す PAH で高い誘導傾向にあり、これらの抗アンドロゲン活性（内分泌攪乱性）を有する可能性を示唆している。

第5章では、5 μ M の PACs に24 h 暴露された HepG2 細胞における、安定型 bulky DNA 付加体の生成を、³²P-ポストラベル法を用いて測定したが、その生成は B[a]P で顕著であるのに対し、他の PAH の放射活性強度はいずれも B[a]P の20%以下であった。また、oxy-PAH の中で CPPO が DNA 付加体を形成することを初めて確認している。5 μ M の B[a]P 暴露による付加体生成は、6 h から増大し24 h でピークとなり、その後減少した。また、代表的な PAH 暴露細胞における、酸化的 DNA 付加体を LC-MS/MS 法を用いて検出定量した。24 h 後における8-oxo-dG の生成は非暴露の control と変わらなかったが、これは培養細胞でのグリコシラーゼによる8-oxo-dG の急速な DNA 塩基除去修復に由来することを示唆している。一方、B[a]P, B[b]FA, B[k]FA の暴露により生成される付加体 ϵ -dA は3日後に顕著に増加することを確認している。

結論では、本論文で得られた成果について要約し、今後の研究課題について述べている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、大気環境において AhR 活性への寄与が高い未知の多環芳香族化合物類の探索と、多環芳香族化合物類に暴露した細胞における、AhR 活性などを介した代謝酵素誘導と DNA 付加体の形成を調べたものをまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 酵母とマウス肝臓ガン（H1L1）細胞を用いたレポーター遺伝子試験を用いて、20種類の oxy-PAHs と21種類の PAHs の AhR 活性を調べ、B[a]FO, B[b]FO, B[c]FO, NCQ, ChQ, BAQ などの oxy-PAHs が、H1L1 細胞の系で B[a]P に対して0.025～0.37倍の活性を示すことを新たに見出している。
2. H1L1 細胞を用いた AhR 活性試験にける誘導等価係数（IEF）値から、ガソリン粉塵や大気浮遊粒子抽出物に含まれる主な AhR 活性物質の中で、B[a]FO や B[b]FO の寄与が0.06%～1.3%を占めることを確認している。また道路粉塵とディーゼル粉塵の抽出物のいずれも、HPLC による分画において、PAHs の分画領域のほかに、より極性の高い oxy-PAHs の分画領域が AhR 活性に寄与することを見出している。
3. B[a]P のオゾン酸化物の中から、AhR 活性の高い物質を単離し、スペクトルメトリーから水酸化多環芳香族ラクトン構造であることを推定している。
4. PAHs や oxy-PAHs に暴露されたヒト肝臓ガン（HepG2）細胞による、6つの代謝酵素（3つの CYPs, 1つのアルド-ケト還元酵素, NQO1, GSTM1）の化合物、時間、濃度依存的な mRNA 発現を詳細に調べ、その誘導パターンを見出している。
5. 5 μ M の B[a]P に24 h 暴露された HepG2 細胞において、安定型 bulky DNA 付加体生成が顕著であった。oxy-PAH による DNA 付加体生成はほとんど報告されてこなかったが、本研究で CPPO によるその生成が初めて確認された。代表的な PAH に暴露された HepG2 細胞における酸化的 DNA 付加体生成を検出定量したが、どの PAH においても8-oxo-dG の生成量は非暴露の control と変わらず、B[a]P, B[b]FA, B[k]FA 暴露細胞による ϵ -dA は3日後に顕著な増加が見られた。

本論文は、大気環境中に存在する oxy-PAHs の AhR 活性を新たに見出し、その寄与を把握・提示している。また、oxy-PAHs による AhR 活性や代謝酵素誘導、DNA 付加体形成を PAHs のそれらの生体作用と比較した点に大きな特色があり、学術上、実際に寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値のあるものと認める。また、平成18年12月26日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。