

平成21年6月5日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18590131

研究課題名（和文） 多環芳香族炭化水素類塩素置換体の発生期に対する影響

研究課題名（英文） The effect for the prenatal stage by chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons

研究代表者

西村 哲治（NISHIMURA TETSUJI）

国立医薬品食品衛生研究所・環境衛生化学部・部長

研究者番号：20156110

研究成果の概要：

多環芳香族炭化水素塩素置換体が生成する条件を明らかにし、固相抽出ーガスクロマトグラフィー/質量分析法による分析条件を確立した。ベンゾ[a]ピレン（B[a]P）が最も反応性が高く、一および二塩素置換体の生成が塩素接触直後から認められた。

塩素置換体は、代謝活性化を必要とせず、原体の代謝活性化時に示した濃度よりも低濃度において変異原性を示した。細胞傷害無作用濃度は、原体の無作用濃度以下であった。心筋への発生・分化の過程で影響を及ぼしている可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	15,000,000	0	15,000,000
2007年度	10,000,000	0	10,000,000
2008年度	10,000,000	0	10,000,000
年度			
年度			
総計	35,000,000	0	35,000,000

研究分野：環境衛生

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：多環芳香族炭化水素類、塩素置換体、発生期、マウス幹細胞、分化マーカー、転写発現、変異原性、蛍光タンパク質

1. 研究開始当初の背景

現在の日本では、水道水に対して、水系感染症の発生や拡大が起らないように塩素が残留するように措置されている。これまでの歴史の中で、水系感染症による被害を考えると塩素消毒の必要性は高い。しかしながら、一方ではトリハロメタン類等、消毒副生成物と称される有害化学物質が、塩素を添加することにより非意図的に生成することもわかっ

てきた。浄水工程で、消毒副生成物の生成を低減するための処理が行われてはいるが、皆無にすることは現実的には困難な状況である。トリハロメタン類の生成、ハロ酢酸、臭素酸等、これまでの科学的な取り組みにおいて十分に情報が収集され、安全性に対する評価がなされたもので、水道水として適性に把握し、制御しなくてはならない項目については水道水質基準で基準値が設けられている。しかし、

塩素が存在する条件下では、あらゆる化学物質は、酸化作用や、塩素付加、塩素置換の反応を受けることが予想される。したがって、水道水のように浄水工程で塩素に接触する機会を持つ条件下では、これまで把握できていない反応生成物質も生じることが考えられる。

大気中に放出された多環芳香族炭化水素類は、自然落下や雨水とともに地表に落下する。その後、地中に浸透して地下水に達するか、様々な経路を経て河川・湖沼に流入すると考えられる。水系に流入した多環芳香族炭化水素類は、水生生物に摂取されて蓄積・代謝されるか、そのまま底質や飲料水の源となっている水中に存在していると考えられる。これまで行われた環境実態調査で、水中濃度は必ずしも高くはないが、全国的に多数の採水地点で検出されている。また、底質からも全国的に検出されている。したがって、底質成分等からくる濁質に付着して、または溶解した状態の多環芳香族炭化水素類を含んだ水が水道原水として取水されて、水道水の原材料となっていることが考えられる。申請者らが水道原水を測定した結果からも、低濃度ながら数種の多環芳香族炭化水素類が検出された（厚生労働科学研究費）。しかし、ほとんど大部分の浄水については、多環芳香族炭化水素類の検出例はない。これは、凝集沈殿などの過程で不溶解成分として除去されていることが考えられる。しかし、一方では溶解性多環芳香族炭化水素類については通常の凝集沈殿・急速ろ過による浄水処理では除去が困難であるとの結果を得ている。これらのことを考慮すると、浄水過程の物理的な除去によらず、多環芳香族炭化水素類の原体が消失していることが推測される。この現象は、多環芳香族炭化水素類が塩素やオゾンと反応することで異なった構造反応生成物になっている可能性を示唆している。

2. 研究の目的

ジーゼル排ガスや燃焼排気などに含まれる多環芳香族炭化水素類の塩素暴露における反応生成物の一部は、多環の炭化水素塩素化合物の一種となると予想されることから、ダイオキシン様の生理作用を示すことが考えられ、その作用を明らかにすることはヒトおよび生態系に対する非意図的環境汚染化学物質の影響をさらに明確にでき、生態系に対する環境負荷の削減、ヒトの健康影響リスクの削減にとり重要な情報を提供できる。特に、対象とする多環芳香族炭化水素塩素置換体は、浄水工程、または排水処理の塩素暴露の工程で生成すると考えられることから、影響の及ぶ範囲は広く、検討する意義は高い。

本研究では、WHO 飲料水水質ガイドラインで、飲料水を介して経口摂取することに関してヒトへの健康影響を考慮しなければなら

ない化学物質として取りあげられている多環芳香族炭化水素類の中からフルオランテン (FL)、ベンゾ [b] フルオランテン (B [b] F)、ベンゾ [k] フルオランテン (B [k] F)、ベンゾ [a] ピレン(B [a] P)、ベンゾ [g,h,i] ペリレン(B [ghi] P)、インデノ [1,2,3-cd] ピレン (IP) の6物質を対象物質とし、浄水処理の塩素消毒過程で生成するおそれのある塩素置換体の水中における挙動を明確にする。マウス幹細胞を用いて、心筋、血球系、神経系等の細胞への分化誘導が開始して2～3日の間で分化の過程にしたがって特異的に転写発現する遺伝子と発現量が増減する遺伝子および Ah 受容体遺伝子を対象として、これらの多環芳香族炭化水素類塩素置換体が遺伝子の転写におよぼす影響を検討する。以上の検討により、多環芳香族炭化水素類塩素置換体の生体影響、特に発生期の胚・胎児の発生・成長に及ぼす影響を遺伝子の転写発現量の増減を指標として明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 塩素化反応条件と分析方法

精製水 1 L に対して 100mM のリン酸緩衝液 (pH7.0) を 1 mL 添加し、模擬水試料とした。次亜塩素酸ナトリウムを添加して遊離塩素イオン濃度を 1.0mg/L とし、多環芳香族炭化水素を最終濃度が 3.0 μ g/L となるように添加した。20 $^{\circ}$ C で攪拌しながら、0 時間、2 時間、4 時間、6 時間、16 時間および 24 時間、塩素イオンと反応させた。反応停止時に、塩素イオンは、アスコルビン酸ナトリウムを 1 L あたり 20mg 添加し消去した。硝酸(1:10)を用いて pH を 3.5 程度に調整した後、前洗浄した固相カートリッジ OasisHBL PLUS に流速 10ml/分 で通水した。固相カートリッジの乾燥後、固相カートリッジに捕捉された物質を 5mL のジクロロメタンにより溶出した。窒素ガス気流下で乾固直前まで濃縮し、ジメチルスルホキシドに溶解して試験に供した。多環芳香族炭化水素原体および塩素置換体の挙動については、ガスクロマトグラフー質量分析計で同定した。

(2) ガスクロマトグラフィー/質量分析法

ガスクロマトグラフ (GC) 装置 : HP6890 (Hewlett Packard, Wilmington, DE, USA)
注入方法 : パルススプリットレス
カラム : DB-5 フーズドシリカキャピラリーカラム (30 m \times 0.25 mm ID, 膜厚 0.25 mm (J&W Scientific, USA).
昇温条件 : 100 $^{\circ}$ C (1 分), 220 $^{\circ}$ C (10 $^{\circ}$ C/分), 280 $^{\circ}$ C (3 $^{\circ}$ C/分), 280 $^{\circ}$ C (5 分)
キャリアーガス : He ガス
流速 : 1.2 mL/分.
注入量 : 2 μ l
注入口温度 : 250 $^{\circ}$ C

質量分析計：5973 質量分析計(Hewlett Packard, USA)

イオン化モード：EI

イオン化電圧：70 V

イオン源温度：280°C

検出モード：選択イオンモード(SIM)

(3) umu 試験

ウムラック（日本抗体研究所，群馬）を使用し、添付のマニュアルに従い操作を行った。

代謝活性化は、定法に従いフェノバルビタールおよびメチルコランズレンにより酵素誘導をかけたラット肝から調製したミクロソーム画分を添加し、変異原性の検出と同時に対象物質を代謝させながら作用を評価した。

(4) ES細胞分化評価系の構築

細胞分化への移行が判定できる、分化過程で特異的に発現する遺伝子の転写制御領域を細胞DNAから分離し、ルシフェラーゼ遺伝子の5'末端側に導入したプラスミドを新たに構築した。さらに、緑色（pZsGreen1-1, Clontech社）または赤色（pDsRed-Express-1, Clontech社）の蛍光タンパク質を発現できるベクターの蛍光タンパク質の転写開始点の5'末端側に上記の分化特異的発現遺伝子の制御領域を同様に挿入したプラスミドを作製した。ES細胞にこれらの構築したプラスミドを形質導入し、形質転換細胞を作製した。分化移行にしたがい発現誘導されるルシフェラーゼもしくは緑色または赤色の蛍光タンパク質の転写量の有無により形質転換細胞の分化過程が正常であるかどうかを判定できる試験系を構築し、本研究に使用した。

指標遺伝子の制御領域は、マウスES細胞の細胞DNAを鋳型とし、DNAデータベースから全塩基配列の情報を得て、転写開始点から上流約2000塩基の所までをPCRにより増幅・分離した。

構築したプラスミドの遺伝子導入は、TransFast™トランスフェクション試薬（Promega, Co., WI, USA；トランスフェクション試薬と省略）を用いて、製品附属のマニュアルに従い行なった。

分化特異的遺伝子として、心筋系の原始細胞の指標遺伝子にはGATA-4遺伝子、中胚葉の指標遺伝子にはHepatic Nuclear Factor-4遺伝子、その他Ah受容体遺伝子などを用いた。

(5) 細胞毒性評価

未分化のES細胞に対して、DMSOに溶解した多環芳香族炭化水素6物質またはその塩素化体抽出試料を曝露し、細胞を溶解した細胞溶解液中のATP量をルシフェラーゼの発光強度を指標として、24時間後の細胞傷害性を評価した。市販のCell-Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assayキット（Promega）を使用し、製品マニュアルに従って操作した。DMSOの最終濃度は0.1%になるよ

うに添加した。

(6) ES細胞の維持

マウスES細胞の継代用培地（以下、ES細胞維持培地と省略）は、高グルコース含有Dulbecco's Modified Eagle's Medium（Sigma-Ardorich, Com., ST, USA, 以下D-MEMと省略）に、55°C、30分間加熱保温して非動化したウシ胎児血清を20% (v/v) 添加し、100倍濃度の非必須アミノ酸溶液（Invitrogen, Gibco, 東京）を1/100容、1mMピルビン酸ナトリウム（Invitrogen, Gibco, 東京）、 10^3 units/mL血病細胞増殖阻止因子（leukemia inhibitory factor; LIF, ESGRO, Chemicon, CA, USA）、0.1mMメルカプトエタノール（Invitrogen, Gibco, 東京）となるように、それぞれ添加して使用した。

マウスES細胞は、ゲラチンを被覆した細胞培養用プラスチックシャーレに栄養細胞を $4\sim 8 \times 10^4$ 細胞/cm²となるように播き、栄養細胞の上で増殖できる状態にして培養した。継代培養は、0.25%トリプシン-1mM EDTA溶液（Invitrogen, Gibco, 東京）処理により単細胞とし、直径90mmシャーレ当たり 1.0×10^6 細胞を、栄養細胞でおおったシャーレ上にまいた。24時間ごとに新しい培地に交換して細胞を維持した。この条件下で、細胞は3日間ではほぼ2倍に増加した。細胞の維持は、上記の操作を3~4日ごとに繰返した。

ゲラチンを被覆した培養用プラスチックシャーレは、0.1%ゲラチン溶液を細胞培養用プラスチックシャーレに加え、37°C、CO₂インキュベータ中で少なくとも2時間保温し、PBSで1回シャーレ表面を洗った後、使用した。

栄養細胞の作製は、以下の操作に従って行った。マウス14日~15日胚から初代培養した繊維芽細胞をアンプル当たり約 1×10^6 細胞分注し、液体窒素中で保存した凍結細胞を、オリエンタル酵母工業（株）から入手した。初代繊維芽細胞用培地には、D-MEMに、55°C、30分間加熱保温して非動化したウシ胎児血清を10% (v/v) 添加し、100倍濃度の非必須アミノ酸溶液を1/100容、1mMピルビン酸ナトリウム、0.1mMメルカプトエタノールとなるように、それぞれ添加して使用した。遠心で集めた細胞は、初代繊維芽細胞用培地に懸濁し、直径90mmのゲラチン処理を行った細胞培養用プラスチックシャーレに 2×10^5 細胞ずつ播き、CO₂インキュベータ中で5日間培養した。培養後、1μg/mLになるようにマイトマイシンC（和光純薬工業(株)、大阪）を添加し、CO₂インキュベータ中で2時間保温した。0.25%トリプシン-1mM EDTA溶液処理を行い、単細胞とした。直径90mmのゲラチン処理を行った細胞培養用プラスチックシャーレ当たり 2.5×10^6 細胞をまき、CO₂インキュベータ中で保温した。24時間ごとに培地を交換した。マ

イトマイシン処理細胞（支持細胞）は、処理後5日以内に使用した。

（7）ES細胞の分化移行

ES細胞を0.25%-トリプシン処理を行い、単細胞の浮遊液を調製した。ES細胞維持培地を用いて、 3.75×10^4 細胞/mLの細胞密度まで希釈し、バクテリア培養用プラスチックシャーレのふたに20 μ Lずつのせ、上下をさかさまにして37°C、CO₂インキュベータ中で、3日間培養を継続した。3日後、細胞塊（以下Embryonic Body：EBと省略）を含むスポットの溶液全量を、ES細胞維持培地からLIFを除き、仔ウシ血清を10%に低減した培養液150 μ Lをいれたバクテリア培養用の丸底の96穴マイクロプレートに移した。

心筋原始細胞への分化誘導は、バクテリア培養用の丸底の96穴マイクロプレートに移してから2日後に、細胞培養用シャーレにES細胞維持培地からLIFと仔ウシ血清を含まない培養液を用いて培養を継続した。心筋原始細胞の移行に関しては、拍動する細胞群の発生を別の指標とした。条件にもよるが、拍動する細胞群の発生は、90%以上のEBにおいて観察された。

4. 研究成果

（1）多環芳香族炭化水素塩素置換体の生成

定量・定性質量数(m/z)は、それぞれFL;202、FL一塩素置換体;236、FL二塩素置換体;270、B[b]F;252、B[b]F一塩素置換体;286、B[b]F二塩素置換体;320、B[k]F;252、B[k]F一塩素置換体;286、B[k]F二塩素置換体;320、B[a]P;252、B[a]P一塩素置換体;286、B[a]P二塩素置換体;320、B[ghi]P;276、B[ghi]P一塩素置換体;310、B[ghi]P二塩素置換体;344、B[ghi]P;276、IP;276、IP一塩素置換体;310、IP二塩素置換体;344であることを確認した。これらの質量数を用いて、多環芳香族炭化水素類の原体および塩素置換体を同定した。

多環芳香族炭化水素類を塩素に接触させた結果、原体は6時間以内に20%程度まで減少した。FLおよびIPは24時間まで時間に依存して原体は経時的に減少し、原体の減少と並行して一塩素置換体が生成した。B[b]F、B[k]F、B[a]PおよびB[ghi]Pは、4から6時間目に一塩素置換体の生成量が最大となり、その後減少傾向が見られた。また、B[k]FとB[a]Pの2物質は二塩素置換体の生成も認められた。塩素置換体の生成物が最大になる塩素曝露時間は、FLが24時間、B[b]Fが4時間、B[k]Fが6時間、B[a]Pが1時間、B[ghi]Pが6時間およびIPが6時間であった。

6物質の中でB[a]Pが最も反応性が高く、一および二塩素置換体の生成が塩素接触直後から認められた。原体濃度が50%となる時間はB[a]P > B[b]F > B[k]F = IP > B[ghi]P > FLの順

に短かった。以上の結果から、6種の多環芳香族炭化水素ごとに、目的とする塩素置換体が効率的に生成する至適時間を設定することができた。

以下の検討には、B[a]Pは1時間もしくは6時間、B[b]Fは4時間、B[b]F、IPおよびB[ghi]Pは6時間、FLは24時間、それぞれ塩素との反応後に固相抽出した試料を供した。また、B[a]Pの二塩素置換体の比率を高めるためには6時間の曝露が最適であることから、6時間の反応後固相抽出を行った。

（2）変異原性

ウム試験により変異原性を評価した。原体の6物質全て、代謝活性化を行わない場合は1mg/L以下の濃度では変異原性を示さず、ラットマイクロソーム画分による代謝活性化により変異原性を示した。

塩素置換体は、代謝活性化を必要とせず、原体の代謝活性化を行って変異原性を示した濃度よりも低濃度においても変異原性を示す傾向を示した。

ベンゾ[a]ピレンでは、二塩素置換体の比率の高い混合抽出物が一塩素置換体の比率の高い混合抽出物に比べ、強い変異原性を示す傾向が見られたが、抽出試料中の塩素数が異なる置換体および二塩素置換体の混合物における精製度が低いため、厳密な評価はできなかった。

また、粗抽出標品を用いて暫定的な評価をした結果、ベンゾ[a]ピレン二塩素置換体は、ウム試験の代謝活性化無しの条件下で、最少量として0.01mg/L相当の抽出量において変異原性を示した。一方、ベンゾ[a]ピレンは、最少量として0.04mg/Lで代謝活性化を必要とする条件下で変異原性を示した。これらの結果から、ベンゾ[a]ピレン塩素置換体は、ベンゾ[a]ピレンに比べて細胞に対する毒性が強くなることが示唆された。

（3）細胞毒性評価

死細胞はATPが消費されるため、生細胞数に依存したATP量が検出される原理を応用した方法を用いた。DMSOに溶解した被験物質をDMSOの最終濃度が0.1%になるように添加した。24時間曝露した後、生細胞の指標となるATPの量を、細胞を溶解した細胞溶解液中のATP量をルシフェラーゼの発光強度で測定することにより、細胞に対する致死作用を評価した。

細胞傷害性無作用濃度は、FLが2mg/L、B[b]Fが2mg/L、B[k]Fが1mg/L、B[a]Pが10mg/L、B[ghi]Pが10mg/L、IPが5mg/Lであった。塩素置換体抽出試料では、FLが0.2mg/L相当量、B[b]Fが0.2mg/L相当量、B[k]Fが0.1mg/L相当量、B[a]Pが0.2mg/L相当量、B[ghi]Pが0.2mg/L相当量、IPが2mg/L相当量であった。塩素置換体抽出物は未精製のため相当量として濃度を算出した。塩素置換体の細胞傷害性無作用量は、

B[a]PとB[ghi]Pが最も低く、また原体の濃度に比べ1/50程度になっていた。その他の4物質は1/2.5から1/10程度であった。塩素との反応性細胞毒性評価の結果から、6物質の中ではB[a]Pが最も挙動に注意を払わなくてはならない物質であると考えられた。

(4) 分化過程における影響評価

B[a]PおよびB[a]P塩素置換体抽出試料の心筋への分化、中胚葉への誘導、Ah受容体転写発現に対する影響を検討した。分化誘導時から、細胞傷害性無作用量として求められたB[a]Pの10mg/L、B[a]P二塩素置換体抽出試料の0.2μg/ml相当を中心として0.5μg/ml相当を最高濃度として曝露し、分化移行後5～12日後まで観察した結果、心筋原始細胞分化の系において、緑色または赤色蛍光タンパク質の誘導活性が観察された。高濃度曝露群において蛍光タンパク質誘導の若干の促進傾向は見られたことは、正常分化の過程で指標遺伝子であるGATA-4の遺伝子発現誘導が促進されたことを示している。この結果が分化に及ぼす直接的な証拠は得られなかったが、本研究で検討していない現象に影響を及ぼしている可能性があると考えられる。緑色または赤色蛍光タンパク質の誘導活性に関して、濃度に依存する誘導は認められたが、発現時期に関する相違は認められなかった。

(5) 標準品に関する検討

多環芳香族炭化水素類塩素置換体の標準物質を市販製品として入手することができない。また、本件研究で実施した水溶液中の反応生成物を固相により抽出・濃縮する手法を適用し、精製標品を入す方法では粗抽出標品を作製することができたが、得られる量に限界があり、純度決定にはいたらなかった。そのため、現時点では同定および暫定的な定量は可能であったが、厳密な定量を行うことができなかった。このため、生成量、実態調査や生物に対する影響評価を実施することができなかった。そこで、DewhurstとKichen (F. Dewhurst and D. A. Kichen: Synthesis and properties of 6-substituted benzo[a]pyrene derivatives, J. Chem. Soc., Perkin Trans, 1 710-712(1972)) が報告している合成法にしたがって、多環芳香族炭化水素類一塩素置換体および二塩素置換体に焦点をあてて合成する準備を行った。多環芳香族炭化水素類を塩素で置換後、再結晶を繰り返し、濃縮粗合成物を分取用液体クロマトグラフにより塩素置換体の単一標品の濃縮・精製を行なう操作方法を設定した。B[a]Pの一塩素置換体と二塩素置換体を合成した。核磁気共鳴装置により純度決定と構造確認を進めた。今後、置換体の合成・精製を経た後、純度決定および構造確認した標準品を整え、

多環芳香族炭化水素類一塩素置換体の環境実態調査、生物に対する影響評価を厳密に行う。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Shibutani, M., Lee, K.-Y., Igarashi, K., Woo, G.-H., Inoue, K., Nishimura, T., Hirose, A.: Hypothalamus region-specific global gene expression profiling in early stages of central endocrine disruption in rat neonates injected with estradiol benzoate or flutamide. *Developmental Neurobiology*, 3(3), 253-269 (2007), 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① Nishimura, T., Tahara, M., Kubota, R., Shimizu, K., Ema, M., Tokunaga, H.: Toxicity of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons., 45th of the Society of Toxicology Annual Meeting (2007.3)
- ② 西村哲治, 清水久美子, 久保田領志, 田原麻衣子, 徳永裕司: 多環芳香族炭化水素類塩素置換体のマウス幹細胞分化過程に及ぼす影響評価. 第44回全国衛生化学技術協議会年会 p187-188 (2007.11)
- ③ 西村哲治, 清水久美子, 田原麻衣子, 久保田領志, 徳永祐司: ベンゾ[a]ピレンの塩素処理による塩素置換体の生成とその反応生成物の生体影響. 日本薬学会第128年会 (2008.3)
- ④ Nishimura, T., Shimizu, K., Tahara, M., Kubota, R.: Biological effects of six chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Dioxin 2008* (2008.8)

[図書] (計1件)

- ① 水環境ハンドブック (一部分担執筆); (社) 日本水環境学会編, p527-528 (2006)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 哲治 (NISHIMURA TETSUJI)
国立医薬品食品衛生研究所・
環境衛生化学部・部長
研究者番号: 20156110

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

清水 久美子 (SHIMIZU KUMIKO)
国立医薬品食品衛生研究所・
環境衛生化学部・非常勤職員