

201133012A

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

ステロイドホルモン受容体に作用する化学物質の  
構造活性相関に基づく毒性評価システムに関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者  
早川 和一  
(金沢大学)

平成24(2012)年 3月

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

ステロイドホルモン受容体に作用する化学物質の  
構造活性相関に基づく毒性評価システムに関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

金沢大学

早川 和一

研分担者

京都薬科大学

細井 信造

金沢大学

鈴木 信雄

国立医薬品食品衛生研究所

杉本 直樹

平成24（2012）年 3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- ステロイドホルモン受容体に作用する化学物質の構造活性相関に基づく毒性評価システムに関する研究…………… 1  
早川和一

## II. 分担研究報告

1. エストロゲン受容体への作用に関する研究…………… 21  
早川和一
2. 構造活性相関の解析に関する研究…………… 34  
細井信造
3. 生物材料を用いた試験に関する研究…………… 51  
鈴木信雄
4. 有機化合物の絶対純度の決定に関する研究…………… 87  
杉本直樹

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 101

## IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 105

# I . 総括研究報告

## 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

### 平成 23 年度総括研究報告書

#### ステロイドホルモン受容体に作用する化学物質の構造活性相関に基づく毒性評価システムに関する研究

研究代表者 早川 和一 金沢大学 医薬保健研究域薬学系 教授

研究分担者 細井 信造 京都薬科大学 薬学教育研究センター 准教授

研究分担者 鈴木 信雄 金沢大学 環日本海域環境研究センター 臨海実験施設 准教授

研究分担者 杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長

#### 研究要旨

本課題研究の主対象化合物である多環芳香族炭化水素（PAH）とニトロ多環芳香族炭化水素（NPAH）の健康リスクを考察するために、環日本海域の大気及び海水・河川水中のPAH、NPAH濃度の継続調査より次のことを明らかにした。大気中には多種類のPAH、NPAHが含まれており、特に中国で極めて高濃度であった。この主要原因とし、産業（工場）や家庭（住居）における多量の石炭消費と石炭燃焼設備の大気汚染対策の遅れ等の影響が考えられた。一方、日本海のPAH濃度は、他の海域と比較し比較的高いレベルにあった。次に、昨年度に引き続き、PAHの代謝物であるPAH誘導体が示す毒性作用について調べた結果、NPAHの強い変異原性に加えて、PAHキノン体（PAHQ）の活性酸素種産生作用、PAHQ及びPAH水酸化体（OHPAH）によるエストロゲン受容体の内分泌攪乱作用が明らかになった。これらOHPAH及びPAHQの内分泌攪乱作用について構造活性相関が示唆された。即ち、強い結合親和性を示したPAHQでは、O-H distance、第一イオン化エネルギー、双極子モーメント、log Pでそれぞれ 7.434~11.519 Å、8.526~9.766 eV、1.085~5.556 debye、1.457~3.782 の範囲に存在した。これらのパラメータの範囲が活性予測の指標となる可能性が示唆された。さらに、受容体結合試験法によって得られた結合親和性の相対結合活性値が0.4以上と限定すると、PAHQは4環性CQ骨格を共通構造とし、2つのケトン基を末端の環に持つという構造的特徴をもつことが分かった。また、これらNPAHやOHPAH、PAHQが環境や生体中に存在することが明らかにされている。以上より、PAHのみでなく環境中に存在するこれ等PAH誘導体も、ヒトや動物の健康影響を引き起こす要因となっている可能性が考えられた。次に、ステロイドホルモン受容体に作用する化学物質のバイオアッセイシステムとして、真骨魚類、例えばキンギョは、背骨ではなくウロコからカルシウムを出し入れしていることに注目して、ウロコの培養システムを開発した。またウロコは再生する特徴を持ち、通常のウロコと比較すると細胞活性が高いことから、昨年度は再生ウロコを用て、より高感度な評価システムを構築した。そこで本年度は、開発した評価システムを用いて、①2~6環の合計48種類のOHPAH類の骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を解析し、②OHPAH添加によるウロコの骨芽細胞及び破骨細胞のマーカー遺伝子が変化すること、さらに③PAH投与キンギョで、実際にPAHがOHPAHに代謝されていることを明らかにした。本法は酵母two-hybrid法より広範な機序に由来する毒性を検出できるシステムであると考えられる。最後に、PAHの信頼性の高い網羅的迅速定量分析法の開発のための基礎研究を行った。現状では、検量線の作成に多

大な時間と労力を要し、GC/MSの検出感度のばらつき（日差変動）が大きい。この問題を解決しなければ、精度の高い分析は困難である。このような背景から、GC/MSでのPAHsの定量値について新規算出方法を検証した。その結果、3つの内標準物質およびチューニングデータを用いた新規補正法Multi Internal standards Calibration Objective (MICO) は、精度が高く不確かさの小さい定量値を算出することができた。構築したMICO-MDPD-qGC/MS法により、PAH等の精確な自動定量分析が可能となると示唆された。

## A. 研究目的

多環芳香族炭化水素（PAH）類はヒトや野生生物への影響が懸念されると同時に、偏西風等によって長距離輸送されることから越境汚染を引き起こす可能性も危惧されている。PAHは燃焼中に空気や有機物中の窒素と反応してニトロ化体（NPAH）を生成するほか、大気輸送中の化学反応によって様々なPAH誘導体を生成する。これ等の中には、例えばNPAHが強い変異原性を示すように、多岐に渡る毒性が危惧される。そこで、まず、大気輸送及び生体内代謝により生成されるPAH誘導体を中心に、これらが示す毒性と生体影響との関わりについて、化学分析及び毒性解析の両側面から検討した。

次に、前年度の研究から、酵母 two-hybrid アッセイ法によって得られた多環芳香族炭化水素（PAH）の水酸化体（OHPAH）のエストロゲン様及び抗エストロゲン活性と構造的または物理化学的特徴との間に相関が見られることが分かっている。そこで、受容体結合試験法で結合親和性が見られたPAHのキノン体（PAHQ）についても同様に相関の有無を検討した。

一方、本研究では環境中での有機汚染物質の毒性化反応の中で、特に魚の骨代謝に焦点を絞り研究を行った。そこで魚の骨代謝の影響を評価する方法として、魚類のウロコに注目した。昨年度は、この再生ウロコを用いた評価システムを開発した。そこで本研究では、この評価システムを用いて、①2～6環の合計48種類の

OHPAH類の骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を解析、②OHPAH添加によるウロコの骨芽細胞及び破骨細胞のマーカー遺伝子の変化、さらに③キングョへのPAHの投与実験を行い、実際にPAHがOHPAHに代謝されるか否かについても解析した。

一方昨年度は、PAHsについてSIにトレーサブルな信頼性の高い分析法を構築するために、定量核磁気共鳴法（定量NMR: quantitative NMR (qNMR))を応用し、入手可能であった9種の水酸化PAH類(OHPAH)の市販試薬について計量学的に信頼性の高い純度値を求めた。その結果、市販試薬や市販標準品を定量用標準品として常法であるクロマトグラフ法により定量値を求めたとしても、現状では、少なからず誤差が常に生じ、SIへのトレーサビリティーの確保が不可能であることを明らかとした。この誤差を消去し、且つ、得られた値のSIへのトレーサビリティーを確保した定量分析法は、現状では存在しない。本年度は、上述の点に着目し、迅速、精確、網羅的な新規定量分析法として多次元データベースを用いた迅速定量分析法(Multi Dimensional Property Database - quantitative GC/MS (MDPD-qGC/MS))の開発のため、定量精度の向上に関する基礎研究に着手した。本法は従来のGC/MS定量分析法とは根本的に原理が異なり、測定対象化合物に関する多次元情報(SIにトレーサブルな絶対純度、MSスペクトル、保持時間(保持指標)、検量線情報等)をデ

デジタルデータとして GC/MS 制御 PC に登録し、これを参照することによって、SI にトレーサブルで、且つ、精度が高く不確かさの小さい定量分析値を算出可能とする方法である。

## B. 研究方法

### 1. 酵母 two-hybrid 法を用いた PAH 及びその酸化的代謝物のエストロゲン様／抗エストロゲン活性

環日本海域に位置する日本及び中国、韓国、ロシアの各都市において大気粉塵の採取及び日本海と関連河川において水試料を採取し、これら試料中の PAH 及び NPAH を著者等が開発した HPLC 分析法を用いて定量分析した。また、PAH 誘導体が示す毒性については、Ames 試験による変異原性作用、酵母 two-hybrid アッセイ法を用いたエストロゲン様及び抗エストロゲン活性作用の評価、そして、FOX アッセイ及び DDT アッセイによる活性酸素種 (ROS) 産生作用の評価を実施した。さらに、内分泌攪乱作用については、各種化合物の構造的及び物理化学的特徴との相関性についても検討した。

### 2. PAHQ の分子構造と活性との関係

分子モデリングソフト CAChe を用いたコンピュータシミュレーション解析により、PAHQ の構造最適化及び物理化学的特性 (部分電荷、第 1 イオン化エネルギー、双極子モーメント、log P) の計算を行い、得られた結果と結合親和性との関係を検討した。

### 3. 魚類のウロコを用いた新規かつ高感度バイオアッセイ系の開発と応用

2~6 環の合計 48 物質の OHPAH 類を用いて、ウロコの骨芽細胞と破骨細胞の活性に対する

影響を評価した。その他の実験方法は昨年度に同じ。

麻酔したキンギョ (メス) のウロコを取り、2 週間後に再生ウロコを採取して培養した。試験物質としては、酵母 two-hybrid 法で最もエストロゲン活性が強く、昨年度も調べた 4-hydroxybenz[a]anthracene (4-OHBaA) を用いて、 $10^{-6}$  M で実験した。再生ウロコを培養後、キアゲンのキットを用いて RNA を調整して、タカラバイオのキットを用いて cDNA 合成をおこなった。

骨芽細胞のマーカーとして ALP、I 型コラーゲン、オステオカルシン、破骨細胞のマーカーとして TRAP、カテプシン K、nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 (NFATC1) を用いた。

結果はすべて、対照群のウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性に対する実験群のウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性の割合 (%) ± SEM の形で表した。遺伝子発現の変化は、一対の標本による平均の検定 (paired t-test) で行った。

benz[a]anthracene (BaA をエタノールに溶かしてキンギョの腹腔内に、 $5 \mu\text{g}/\text{g}$  BW 投与して、水温  $25^{\circ}\text{C}$  で飼育した後、解剖して胆汁を採取した。飼育時間は 12, 24, 48 及び 72 時間で、タイムコースごとに 5 匹のキンギョを用いた。対照群のキンギョは BaA 無添加のエタノールを投与したキンギョを同条件で飼育した後、解剖してそれぞれ胆汁を採取した。

採取した胆汁中の PAH 類は、グルクロン酸抱合体あるいは硫酸抱合体として存在している (Jongeneelen, et al, 1984, 1987)。そこで 1-hydroxypyrene (1-OH Pyr) グルクロニドを  $\beta$ -グルクロニダーゼ・アリルスルファターゼを用いて分解して、その回収率を求めた。

#### 4. 多次元データベースMDPDによるPAHsの絶対定量分析法の開発

PAHsは、18種混合標準液 (AccuStandard, Cat. No. M-610-QC-FL) を用いた。GC/MSの内部標準物質 (internal standard: IS) は認証標準物質 (Traceable Reference Material: TRM) である 1,4-bis(trimethylsilyl)benzene-*d*<sub>4</sub> (BTMSB, 和光純薬工業株式会社製)、CRM である diethyl phthalate (DEP, NMJ CRM 4022-b, 純度 99.98 ± 0.09 w/w%, 独立行政法人 産業技術総合研究所製) および bisphenol-A (NMJ CRM 4030-a, 純度 99.92 ± 0.06 w/w%, 独立行政法人 産業技術総合研究所製) の 3 種を選定した。acetone は和光純薬工業株式会社製高速液体クロマトグラフ用を、精製水はミリ-Q (超純水) を用いた。

定量分析には Shimadzu GCMS-QP2010 Plus (島津製作所株式会社) を用いた。なお、標準液および試料溶液の調製には、ウルトラマイクロ天秤 XP2U (メトラ社製) および化学用体積計 (5-20 mL メスフラスコ、10-500 μL マイクロシリンジ) を用いた。

IS 標準原液として acetone で BTMSB、DEP および bisphenol-A の 1000 mg/L を作製し、次に、IS 混合標準液を acetone で作製した。

#### C. D. 研究結果・考察

##### 1. 酵母 two-hybrid 法を用いた PAH 及びその酸化代謝物のエストロゲン様/抗エストロゲン活性

##### 1-1. 環日本海域の主要都市における PAH、NPAH 濃度の実態

環日本海域に位置する各都市の汚染状況を把握すべく、日本 (東京、北九州)、韓国 (釜山)、中国 (瀋陽、撫順、鉄嶺、北京)、ロシア (ウラジオストク) における、大気粉塵中

の PAH と NPAH の濃度測定を実施した。毒性の観点からヒトの健康に影響を及ぼしやすいとされる 4 環以上の 6 種 PAH を選択した。また、NPAH については、特に変異原性が強いことが示されている 11 種を分析対象とした。その結果、大気中 6 種 PAH の年平均濃度 (和) は、撫順 (1205 pmol m<sup>-3</sup>) > 瀋陽 (313 pmol m<sup>-3</sup>) > 北京 (270 pmol m<sup>-3</sup>) > 鉄嶺 (258 pmol m<sup>-3</sup>) > ウラジオストク (34 pmol m<sup>-3</sup>) > 北九州 (12 pmol m<sup>-3</sup>) > 札幌 (11 pmol m<sup>-3</sup>) > 東京 (5.9 pmol m<sup>-3</sup>) > 釜山 (5.6 pmol m<sup>-3</sup>) > 金沢 (3.6 pmol m<sup>-3</sup>) の順となった。NPAH の濃度は PAH より低い、都市毎の濃度は PAH の場合と同様に、中国の都市で高く日本、韓国の都市で低い結果となった。近年、中国では発展する産業や冬季の暖房に多量の石炭を使用しているが (BP report, 2004)、排煙脱粒子装置の普及は進んでいない。このため、PAH や NPAH が吸着した粒子状物質が多く排出されていると考えられた。

##### 1-2. 日本海域及び関連河川における PAH 濃度

日本海の汚染調査は国際的にも要望されているものの、これまでその実態に関する報告は殆どなかった。そこで著者らは、日本海域における PAH 汚染の実態を把握すべく、海水中の PAH 濃度測定を実施することとした。測定の対象は、人起源汚染物質である 3 環から 6 環の合計 13 種の PAH とした。

その結果、総 PAH 濃度は、日本列島側、大陸 (ロシア) 側外洋域でそれぞれ、9.63 ng/L (3.44-24.0 ng/L)、7.67 ng/L (4.10-30.6 ng/L) であり、大陸側がやや低かった。更に、瀬戸内海や東北沿太平洋域の総 PAH 濃度と比較すると、日本海は瀬戸内海より低く、東北沿岸太平洋側外と同じレベルであったが、大西洋より高かった。



### 1-3. PAH 誘導体の生成

大気輸送中に PAH は紫外線やニトロラジカル ( $\cdot\text{NO}^3$ )、ヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) などと化学反応すると、PAH ニトロ体 (NPAH) や PAH 水酸化体 (OHPAH)、PAH キノン体 (PAHQ) 等の誘導体となる (Vione *et al.*, 2004; Kameda *et al.*, 2011; Atkinson *et al.*, 1994)。一方、これ等 PAH 誘導体は、生体内に取り込まれた後、代謝によっても生成する。例えば、PAH 類は、主に肝臓において、アリール炭化水素受容体 (AhR) を活性化することにより薬物代謝酵素、CYP1A1 等のシトクロム P450 酵素などを誘導し、次いで P450 の存在下で PAH 類は OHPAH や PAHQ といった PAH 誘導体へと代謝される (Shimada *et al.*, 2006)。これら代謝物のいくつかは、健常ヒト尿や正常魚 (ヒラメ) 胆汁中から同定できた。

### 1-4. PAH 誘導体による毒性影響

PAH 誘導体の毒性としては、NPAH による変異原性が古くから良く知られている。NPAH は、PAH がニトロ還元酵素 (Nitroreductase: NTR) により代謝を受けることにより生成し、最終的に DNA 損傷を及ぼす付加体となることで、強い変異原性を示す (Nagy *et al.*, 2005)。また、PAHQ についても活性酸素種 (ROS) 産生能を有することから (Motoyama *et al.*, 2009)、ラジカルの生成を経て物理的に DNA を損傷させ、細胞機能障害や細胞死を引き起こすことも知られている (Biswas *et al.*, 2006; Stadtman *et al.*, 1997; Valavanidis *et al.*, 2006; Stadtman *et al.*, 2003)。このような酸化ストレスは、多くの経路で、癌を始めとし、循環器系疾患、感染症、老化など様々な疾患に関与するとされる (Xia *et al.*, 2006)。

一方、近年、PAH 誘導体による内分泌攪乱作用が注目されている。酵母 two-hybrid assay を用

いた本実験結果から、PAH 代謝産物である OHPAH 及び PAHQ の中にエストロゲン様/抗エストロゲン様作用を示すものがあり、この間に構造活性相関があることが明らかとなった (Hayakawa *et al.*, 2007; Hayakawa *et al.*, 2011)。

このように、大気中での様々な化学反応によって PAH 誘導体が生成するのと同時に、体内に取り込まれた PAH は、生体内の様々な代謝を介して活性な PAH 誘導体を生成することから、ヒトは日常的に様々な生理活性作用を示す PAH 誘導体に高濃度曝露されている可能性が高い。

### 1-5. PAH 誘導体を示す構造活性相関

PAH 等の環境化学物質が示すエストロゲン受容体 (ER) を中心としたホルモン受容体への結合及び活性化といった作用は、その立体構造によって、作用の有無や強弱が異なるものと推測される。そこで、PAHOH 及び PAHQ が示すエストロゲン/抗エストロゲン様作用について、分子構造または物理化学的特性パラメータによる予測が可能かどうか考察を行った。著者等は、母核構造と水酸基の位置が活性に関与していることを予測し、母核構造の違いを表すパラメータである Length-to-breadth ratio (L/B 比) (Sander *et al.*, 1997; Collantes *et al.*, 1996) 及び水酸基の位置を表すパラメータとして O-H distance (Kihara *et al.*, 1994) を使用した構造活性相関を調べた。

まず、OHPAH における活性と L/B 比及び O-H-distance との関係を解析した。ER のアゴニスト活性を示した化合物は、L/B 比が 1.5-1.7、O-H distance が 10.8-11.7 Å の範囲に、また抗エストロゲン活性を持つ PAHOH は L/B 比が 1.2-1.7、O-H distance が 8.4-11.6 Å の範囲に集中することが明らかになった。また、PAHQ についても同様に解析した。エストロゲン様活性を示した PAHQ は、L/B 比が 1.2~1.4 及び 1.7~1.8、

O-H distance が 8.2~11.5 Å の狭い範囲に集中して存在していた。これらは、ER の既知アゴニスト化合物である 17β-Estradiol (E<sub>2</sub>) 及び diethylstilbestrol (DES) と類似しており、これらパラメータ値の類似が活性を強く示す要因の一つであると考えられた。

## 2. PAHQ の他分子構造と活性との関係

### 2-1. 酸素原子の部分電荷と結合親和性の関係

体内ホルモンである E<sub>2</sub> は ER の LBD の binding pocket 内でいくつかのアミノ酸残基と水素結合する。E<sub>2</sub> の 3 位のフェノール性水酸基は Glu 353、Arg 394、水と水素結合を形成する。また 17 位のアルコール性水酸基は His 524 と水素結合を形成する (Tanenbaum *et al.*, 1998 ; Fang *et al.*, 2001)。

また、E<sub>2</sub> の分子内では電子密度の偏りが生じている。特に水酸基の酸素原子は電気陰性度が大きいこと、その部分電荷が大きくなり、それらは水素結合の donor として働くことが考えられる。この時、Glu 353 との水素結合距離が 2.37 Å と他のアミノ酸と比べて最も小さく、水素結合が最も強いことが分かる。この E<sub>2</sub> の 3 位の水酸基は水素結合の donor として働くため、ER との結合には酸素原子の電子状態が大きく関与していることが考えられる。結合親和性を示す PAHQ の部分電荷は -0.320 ~ -0.256 の範囲に存在した。この範囲は PAHQ 全体の部分電荷の範囲とほとんど変わらず、活性発現の要因は得られなかった。

### 2-2. 第 1 イオン化エネルギーと結合親和性との関係

上述のように、E<sub>2</sub> の 3 位のフェノール性水酸基は Glu 353 に対して水素結合の donor として働くため、ER との結合にはフェノール性水酸基

の電子供与性の違いが大きく関与していることが考えられる。従って、試験物質の第 1 イオン化エネルギーとの関係性を評価したところ、エストロゲン様活性または抗エストロゲン活性を示す PAHQ の第 1 イオン化エネルギーはそれぞれ 8.526 ~ 9.029、8.526 ~ 9.201 eV の比較的狭い範囲に存在し、E<sub>2</sub> の値 (8.876 eV) もこの範囲内であった。このことから PAHQ では第 1 イオン化エネルギーが各活性の強さに影響を及ぼす可能性が示唆されたが、結合親和性を示す PAHQ の第 1 イオン化エネルギーは 8.526 ~ 9.766 eV の広い範囲に存在したため、これらの範囲は PAHQ 全体の部分電荷の範囲とほとんど変わらなかった。

### 2-3. 双極子モーメントと結合親和性との関係

ER のリガンドである E<sub>2</sub> の分子内には水酸基の寄与による電子密度の偏りが存在する。フェノール性水酸基の酸素原子は電気陰性度が大きく、そのため酸素原子に負の電荷が偏ることが予想される。従って、分子内の電子密度の偏りが活性及び結合親和性に及ぼす影響を検討する一つの指標として、双極子モーメントとの関係性を評価したところ、結合親和性を示した PAHQ では、1.085 ~ 5.556 debye の広い範囲に存在し、活性発現の要因は得られなかった。

### 2-4. 分子の疎水性 (log P) と結合親和性との関係

hERα に対する結合親和性とフェノール類の疎水性 (log P 値; 水/オクタノール分配係数) との間に比例関係の成立が報告されている (Fang *et al.*, 2001)。従って、PAHQ も同様の傾向を示す可能性が考えられたため、各化合物の log P 値と活性の強さとの関係性を評価したところ、結合親和性を示した PAHQ の log P 値は 1.457 ~ 3.782 の広い範囲に存在しており、明確な活性

発現要因は得られなかった。

## 2-5. ER に対する PAHQ の結合活性の酵母 two-hybrid アッセイ法と受容体結合試験法の比較

抗エストロゲン活性を評価できなかった 9,10-PQ、BcP-1,4-Q、1,4-AQ の 3 種を除いた 17 種の PAHQ のうち、酵母 two-hybrid アッセイ法と受容体結合試験法のいずれかで活性または結合親和性を有し、さらに、受容体結合試験法によって得られた結合親和性の RBA 値が 0.4 以上と限定すると、共通する PAHQ は 1,2-CQ、1,4-CQ、BaP-7,8-Q、BaP-7、10-Q の 4 種であった。この 4 種の PAHQ は四環性の chrysenequinone (CQ) 骨格を共通構造として持ち、さらに 2 つのケトン基が末端の環に存在するという構造的特徴を持つ。つまり、CQ であれば 1, 2, 3, 4 位、BaP であれば 7, 8, 9, 10 位のいずれか 2 つにケトン基が存在している。一方、ER のリガンドである E<sub>2</sub> の構造は四環性構造を持ち、官能基は両末端の A 環および D 環に存在する。このことから、1) CQ 型四環性構造を共通構造とする、2) 官能基を持つ環は末端に存在する、という 2 つの構造的特徴があることがわかった。

また、chrysene (Chr) 骨格を持つ 3 種の PAHQ と BaP 骨格を持つ 6 種の PAHQ を同じ母核構造の PAHQ 同士で比較したところ、酵母 two-hybrid アッセイ法においても受容体結合試験法においてもそれぞれ *o*-PAHQ である 1,2-CQ、BaP-7,8-Q が最も強い活性を示した。理由として、2 つのケトン基がオルト位に存在することで Arg 394 と水分子の水素原子に対して 1 つのケトン基が作用するよりも 2 倍の相互作用で水素結合を作ることができるため、同じ母核構造を持つほかの PAHQ よりも活性及び結合親和性が強くなることが推定される。

## 3. 魚類のウロコを用いた新規かつ高感度バイオアッセイ系の開発と応用

### 3-1. 魚類のウロコの骨芽細胞及び破骨細胞に対する OHPAH 類の影響

4 環の 1-OHBaA、2-OHBaA、4-OHBaA、5-OHBaA、9-OHBaA、1-OHBcP、2-OHBcP、及び 3-OHBcP と、5 環の 2-OHBbFR、3-OHBbFR、9-OHBbFR、10-OHBbFR、12-OHBbFR、4-OHBcP、9-OHBcP 及び 10-OHBcP の計 16 物質はエストロゲン様作用を示す傾向が認められた。また、今回の試験では 2 環、3 環及び 6 環ではエストロゲン様作用を示す物質はみられなかった。

一方抗エストロゲン作用を示す傾向がみられた物質は、2 環の 2-OHNp、3 環の 2-OHF1、4 環の 3-OHBaA、10-OHBaA、4-OHBcP、2-OHCh、3-OHCh 及び 4-OHCh、5 環の 6-OHBbFR、7-OHBbFR、8-OHBbFR、11-OHBbFR、3-OHBkFR、8-OHBaP、11-OHBgCh、6 環の 6-OHIDP 及び 8-OHIDP の計 17 物質であった。

この中で、酵母 two-hybrid 法と相関する傾向がみられた物質は、エストロゲン様作用では 12-OHBbFR、4-OHBcP があり、抗エストロゲン作用を示した物質としては 4-OHBcP、3-OHCh、6-OHBbFR、8-OHBaP、11-OHBgCh であった。また、今回試験した中では、5 環の OHPAH 類に骨芽細胞及び破骨細胞活性に有意に作用するものが多いようにみられた。ウロコ培養アッセイ法を用いた解析において、一部の OHPAH 類ではエストロゲン様作用あるいは抗エストロゲン作用を示すことが判明した。しかしながら、ほとんどの OHPAH 類は、酵母 two-hybrid 法とは相関がみられなかった。

本研究の結果から、OHPAH 類の大部分が骨芽細胞及び破骨細胞活性を上昇もしくは低下させる等の影響を与えることがわかった。酵母 two-hybrid 法でエストロゲン様作用を示した

4-OHBaA は、昨年度の実験においてもエストロゲン様作用を示し、今回の解析でも、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞の活性に上昇がみられ、同様の作用を示す結果が得られた。しかしながら、その他のほとんどの OHPAH 類は、酵母 two-hybrid 法とは相関がみられなかった。

キンギョのウロコを  $E_2$  で処理した際には、6 時間培養で骨芽細胞及び破骨細胞の両活性ともに上昇する（昨年度、研究報告参照）。したがって、今回調査した 48 物質の OHPAH 類の中で  $E_2$  と同じ挙動、即ちエストロゲン様作用を示す傾向にあったものは 4-OHBaA に加えて、4 環では、 $10^{-8}$  M で破骨細胞活性が上昇傾向を示した 1-OHBaA、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が上昇傾向を示した 2-OHBaA、 $10^{-10}$  M 及び  $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が上昇傾向を示した 5-OHBaA、 $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が上昇傾向を示した 9-OHBaA、 $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が上昇傾向、及び  $10^{-10}$  M で破骨細胞活性が有意に上昇した 1-OHBcP、 $10^{-8}$  M で破骨細胞活性が上昇傾向を示した 2-OHBcP、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が上昇傾向を示した 3-OHBcP があった。

また、5 環では、 $10^{-10}$  M で破骨細胞活性が有意に上昇した 2-OHBbFR、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が上昇傾向を示した 3-OHBbFR、 $10^{-10}$  M で骨芽細胞活性が有意に上昇、及び  $10^{-6}$  M で上昇傾向を示した 9-OHBbFR、 $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性及び破骨細胞活性が上昇傾向を示した 10-OHBbFR、 $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が上昇傾向を示した 12-OHBbFR、 $10^{-6}$  M で破骨細胞活性が上昇傾向を示した 4-OHBcP、 $10^{-10}$  M で骨芽細胞活性が上昇傾向、 $10^{-8}$  M で破骨細胞活性が上昇傾向を示した 9-OHBcP、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が上昇傾向、及び  $10^{-10}$  M で破骨細胞活性が上昇傾向を示した 10-OHBcP があった。

$E_2$  とは逆の挙動、即ち抗エストロゲン作用を示す傾向であった物質は、2 環では、 $10^{-8}$  M で

骨芽細胞活性が有意に減少、及び  $10^{-10}$  M で破骨細胞活性が減少傾向を示した 2-OHNp があった。3 環では、 $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示した 2-OHF1 があった。4 環では、 $10^{-10}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示した 3-OHBaA、 $10^{-10}$  M で破骨細胞活性が有意に減少した 10-OHBaA、全濃度で破骨細胞活性が減少傾向を示した 4-OHBcP、 $10^{-10}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向、及び  $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が有意に減少した 2-OHCh、全濃度で骨芽細胞活性が減少傾向を示した 3-OHCh、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示し、 $10^{-8}$  M で破骨細胞活性が有意に減少した 4-OHCh があった。5 環では、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向、及び  $10^{-10}$  M で破骨細胞活性が有意に減少した 6-OHBbFR、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示した 8-OHBbFR、 $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示した 11-OHBbFR、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示した 3-OHBkFR、 $10^{-10}$  M で破骨細胞活性が減少傾向を示した 8-OHBaP、 $10^{-10}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示し、 $10^{-8}$  M 及び  $10^{-6}$  M で破骨細胞活性が減少傾向を示した 11-OHBgCh があった。6 環では、 $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示した 6-OHIDP、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示し、破骨細胞活性が  $10^{-10}$  M で減少傾向、及び  $10^{-6}$  M で有意に減少した 8-OHIDP があった。

骨芽細胞及び破骨細胞において、作用が一致しない、また濃度の違いによっても作用に違いが認められた物質は、3 環では、破骨細胞活性が  $10^{-10}$  M で有意に低下し、 $10^{-6}$  M で上昇傾向を示した 2-OHPH があった。4 環では、破骨細胞活性が  $10^{-10}$  M で低下傾向を示し、 $10^{-8}$  M 及び  $10^{-6}$  M で上昇傾向を示した 3-OHFR、骨芽細胞活性が  $10^{-10}$  M で低下傾向を示し、 $10^{-6}$  M で上昇傾向を示した 1-OHPy、 $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が上昇傾向を示し、破骨細胞活性が  $10^{-6}$  M で低下傾

向を示した 11-OHBaA、 $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示し、破骨細胞活性が  $10^{-10}$  M で上昇傾向を示した 5-OHBcP、 $10^{-10}$  M 及び  $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が減少傾向を示し、 $10^{-6}$  M で破骨細胞活性が有意に上昇した 6-OHCh があつた。5 環では、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が有意に減少したが、破骨細胞活性が  $10^{-10}$  M 及び  $10^{-8}$  M で有意に上昇した 1-OHBbFR、 $10^{-6}$  M で骨芽細胞活性が有意に減少したが、破骨細胞活性が  $10^{-8}$  M で上昇傾向を示した 8-OHBkFR、 $10^{-8}$  M で骨芽細胞活性が有意に上昇したが、破骨細胞活性が  $10^{-10}$  M で有意に減少、 $10^{-8}$  M で減少傾向を示した 9-OHBkFR、 $10^{-10}$  M で骨芽細胞活性が低下傾向を示し、破骨細胞活性が  $10^{-10}$  M で上昇傾向、 $10^{-6}$  M で減少傾向を示した 6-OHBaP、 $10^{-10}$  M で骨芽細胞活性が有意に減少傾向を示したが、 $10^{-10}$  M で破骨細胞活性が上昇傾向を示した 13-OHBgCh があつた。

キンギョの ER は  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 種類が存在し、 $\gamma$  は  $\beta$  のサブタイプであり、キンギョの場合は、 $\beta 2$  が  $\beta$ 、 $\beta 1$  は  $\gamma$  のことを示している (Yoshikubo et al., 2005)。キンギョの普通ウロコにおける ER は  $\beta$  タイプが最も多く発現しており、 $\alpha$  タイプの発現量は少ないことが報告されている。また再生 14 日目の再生ウロコでも  $\beta$  タイプが最も多く発現している (未発表データ)。一方、 $\alpha$  タイプの発現は非常に低く、 $\alpha$  タイプがメインで発現しているヒトとは異なっていることが判明した (Yoshikubo et al., 2005)。酵母 two-hybrid 法で使用しているものは hER であるが、 $\alpha$  タイプのみでなく、 $\beta$  タイプも発現させている。したがって、酵母 two-hybrid 法との相関がほとんどみられなかったのは、ウロコでは  $\alpha$  タイプの発現量が少なく、 $\beta$  タイプが主に発現していることが原因かもしれない。

また、OHPAH 類の曝露する濃度が低濃度及

び高濃度で骨芽細胞と破骨細胞の活性に違いが認められた。上記で述べたように、魚類のウロコには 3 種類の ER があり、これはそれぞれに対する結合性の相違である可能性がある (Yoshikubo et al., 2005)。例えば、低濃度では、ER  $\alpha$  が応答し、高濃度では、ER  $\beta$  が応答することが考えられる。一例として、ビスフェノール A の場合は、ER  $\alpha$  と ER  $\beta$  に対する応答性が異なることが報告されている (Matsushima et al., 2010)。また、ビスフェノール A はエストロゲン関連受容体 (Estrogen related receptor : ERR) とも結合する (Liu et al., 2010)。魚類にも ERR が存在している可能性があり、この受容体とも結合して影響を与えたとも考えられる。

また、酵母 two-hybrid 法は ER 単独の系であるのに対し、ウロコ培養アッセイ系は骨組織の器官培養系である為、酵母 two-hybrid 法に比べて、より脊椎動物の骨代謝に近いモデルである。したがって、OHPAH 類が ER を介しての作用に加えて、その他の受容体もしくは受容体を介さず働いた可能性も考えられる。

### 3-2. OHPAH 添加によるウロコの骨芽細胞及び破骨細胞のマーカー遺伝子の変化

4-OHBaA の作用をリアルタイム PCR により詳細に解析した結果、骨芽細胞のマーカーでは I 型コラーゲン、破骨細胞のマーカーでは酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ mRNA の発現が有意に上昇し、細胞活性の結果とも一致した。さらに、骨芽細胞のマーカーであるオステオカルシンと破骨細胞のマーカーであるカテプシン K は上昇傾向にあつた。これらの結果は、骨芽細胞及び破骨細胞の活性が上昇するというエストロゲンの作用と一致していた。

昨年度の結果では、6 時間の培養で、骨芽細胞及び破骨細胞の活性が有意に上昇したのに対し、今回の結果では両活性ともに上昇する傾

向を示したのみであった。しかしながら、リアルタイム PCR を用いて骨芽細胞と破骨細胞のマーカーを解析した結果、骨芽細胞のマーカーではタイプ I コラーゲン、破骨細胞のマーカーでは TRAP mRNA の発現が有意に上昇し、細胞活性の結果とも一致していた。したがって、4-OHBaA はエストロゲン様作用を示すことがわかった。

### 3-3. キンギョへの PAH の投与実験

胆汁中の 4-OHBaA 濃度は、腹腔内投与から 12 時間 (9.78 M)、24 時間 (15.88 M)、48 時間 (16.96 M) と経つにつれて上昇し、72 時間 (12.99 M) では少し低下し始めた。一方コントロールの胆汁からは 4-OHBaA のピークが確認されなかった。

## 4. 多次元データベース MDPD による PAHs の絶対定量分析法の開発

### 4-1. 定量値の新規算出方法の検討

まず、従来の方法である絶対検量線法 (a) および内標準法 (b) の検量線を作成した。すなわち、PAHs について段階的な 6 濃度を各濃度 5 試料調製し、これを異なる 5 日で 5 セット行ったすべての平均による検量線を作成した。また、定量値を算出する試料、想定濃度 0.2 および 1.0% の 2 濃度 (各  $n=5/\text{日} \times$  異なる 5 日で 5 セット) を測定し、検量線より濃度を算出した。

次に、GC/MS 多次元データベース構築のための新規算出方法を検討した。試料の注入量の変動や感度変動に伴う不確かさは、内標準法、すなわち、IS と測定対象成分が常に同じ変動を示すことを前提として、測定対象成分/IS の面積比と濃度の関係式を求めることにより、機器の感度変動等が相殺され無視できるとされている。しかし、実際には、モニターイオンが異なれば、

GC/MS の検出感度のばらつき (日内および日差変動) も異なるため、それを補正できる IS を対象化合物ごとに個別に設定する必要が生じる。よって、従来の内標準法で検出器の応答能の変動を完全に補正し、高精度の分析値を得ることはできない。そのため、従来の IS 一つで補正する内標準法を見直し、保持時間の異なる 3 つの IS を用いて機器のドリフトなどの感度変化をキャンセルアウトする定量値の新規補正方法 (Multi Internal standards Calibration Objective; MICO, 特許出願予定) を考案した (c, d)。さらに、装置間変動を補正するため、チューニング結果を用いた補正方法を追加した (e)。検討した定量値の算出方法を Table 1 に示す。

### 4-2. 定量値の精度の評価

高い分析精度および再現性を確保することを目指し、a-e の 5 法について、想定濃度 0.2 および 1.0% の定量値を算出した。

PAHs 18 種すべての結果より、以下の傾向が得られた。a は他の方法と比べて日差変動が大きかった。b は選択した IS に依存するため、IS 三種すべてを平均して算出した c および d がより精密な定量値を算出できた。MICO により算出した c-e については、日差変動が小さくなった。また、本実験は 1 台の装置で検証を行ったため、d および e は同等となったが、機器間の検証では e の補正が有用であると予想される。

次に、想定濃度 1.0% で得られた PAHs 18 種  $\times$  5 セット 計 90 個の定量値について、ばらつきを基に分類した。絶対検量線 a での定量値および RSD が 20% 以上だった PAHs は 28.9% であり、約 3 割が想定した定量値から大きく外れた。一方、定量値もしくは RSD が 20% 以内となった PAHs は、内標準法 b1: 93.3%, b2: 91.1%, b3: 73.3%、新規 MICO c: 85.6%, d: 93.3%, e: 93.3% であった。以上のことより、c および d の算出

で確度があがり (RSD10%前後)、e で真度があがるため、e の算出方法が最も効果的なのではないかと考えられた。

MICO は、装置内変動および装置間変動を補正し、さらに不確かさの小さい定量値を算出できることから、GC/MS データベース構築に応用可能と考えられた。実際、検査機関等は、高い定量精度を保ちつつ、迅速な一斉分析法の開発を待ち望んでいる。我々の提案する MICO を用いた MDPD-qGC/MS による PAHs の一斉分析は精度の問題点を解決する可能性が高い。

## E. 結論

1. PAH 誘導体を中心に我々東アジアを取り巻く環境において、主要な大気汚染物質の一つである PAH 類は、PAH 誘導体へと姿を変えて我々人類の健康を脅かしている危険性があり、今後も PAH 誘導体の毒性や環境中濃度等、動態を突き止めていかななくてはならない大きな環境問題であると思われる。

2. PAHQ の酸素原子の部分電荷及び第 1 イオン化エネルギー、双極子モーメント、log P を、CAChe を用いたコンピューターシミュレーション解析によって算出した。受容体結合試験法で、多環芳香族炭化水素の水酸化体 (OHPAH) 以外の酸化体で結合親和性が見られたキノン体 (PAHQ) についても同様に構造活性相関の有無を検討したところ、一定の構造パラメータ範囲内に活性が存在することが示唆された。即ち、強い結合親和性を示した PAHQ では、O-H distance、第一イオン化エネルギー、双極子モーメント、log P でそれぞれ 7.434~ 11.519 Å、8.526 ~ 9.766 eV、1.085 ~ 5.556 debye、1.457 ~ 3.782 の幾分広い範囲に存在した。さらに、受

容体結合試験法によって得られた結合親和性の RBA 値が 0.4 以上と限定すると、PAHQ は 4 環性 CQ 骨格を共通構造とし、2つのケトン基を末端の環に持つという構造的特徴をもつことが分かった。また、その構造は E<sub>2</sub> の構造と類似することがわかり、PAHQ にも OHPAH 同様に構造活性相関があるのではないかと考えられた。

3. 2~6 環の合計 48 種類の OHPAH 類について、ウロコの骨芽細胞と破骨細胞の活性に及ぼす影響を評価した結果、エストロゲン様作用あるいは抗エストロゲン作用を示すものがあることが判明した。その中でも 4-OHBaA はこれまでの研究結果と同様に、エストロゲン様作用を示した。4-OHBaA の作用を詳細に解析した結果、骨芽細胞のマーカーでは I 型コラーゲン、破骨細胞のマーカーでは酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ mRNA の発現が有意に上昇し、細胞活性の結果とも一致した。したがって、4-OHBaA はエストロゲン様作用を示すことがわかった。PAH をキンギョに投与後、胆汁中の水酸化 PAH を分析した結果、実際に水酸化 PAH が生じることを証明した。

4. 標準物質の定量値の信頼性を飛躍的に向上させるため、GC/MS に対し、MICO を適用することにより精度が高く不確かさの小さい定量値の算出が可能であることを示した。qNMR および qGC/MS の情報を組み合わせて総合的なデジタルデータベースを構築することで、SI トレーサビリティが確保された測定対象の標準物質を全く必要としない迅速定量分析法の確立を可能とすると考えられる。すなわち、これまでに我々が開発した技術を応用することによ

って、環境中の化学物質の自動モニタリング結果を、科学的な根拠に基づいた、且つ、計量学的に定量値の信頼性を確保した定量分析値として採用することが可能であると考えられる。来年度は、MDPD-qNMR-MICO-qGC/MS のシステム整備を行い、次いで本システムの実用化のため、PAHs の定量分析について実証試験を行う予定である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kameda, T., Akiyama, A., Yoshita, M., Tachikawa, C., Toriba, A., Tang, N., Hayakawa, K.: Mutagenicities and endocrine-disrupting activities of 1-hydroxy-2-nitropyrene and 1-hydroxy-5-nitropyrene. *J. Health Sci.*, **57** (4), 372-377 (2011).
- 2) Li, R., Kameda, T., Li, Y., Toriba, A., Tang, N., Hayakawa, K., Lin, J.-M.: Hydrogen peroxide-sodium hydrosulfite chemiluminescence system combined with high-performance liquid chromatography for determination of 1-hydroxypyrene in airborne particulates. *Talanta*, **85** (5), 2711-2714 (2011).
- 3) Tang, N., Tokuda, T., Izzaki, A., Tamura, K., Ji, R., Zhang, X., Dong, L., Kameda, T., Toriba, A., Hayakawa, K.: Recent change in atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons (NPAHs) in Shenyang, China. *Environ. Forensics*, **12**, 342-348 (2011).
- 4) Kobayashi, Y., Chiba, H., Mizusawa, K., Suzuki, N., Cerdá-Reverter, J.M. and Takahashi, A.: Pigment-dispersing activities and cortisol-releasing activities of melanocortins and their receptors in xanthophores and head kidneys of the goldfish *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **173**, 438-446 (2011).
- 5) 鈴木信雄, 関 あずさ, 染井正徳, 中村正久, 矢野幸子, 大森克徳, 池亀美華, 三島弘幸, 早川和一, 服部淳彦: メラトニンの新規作用: 骨に対する作用とその誘導体を用いた骨疾患治療薬の開発. *比較内分泌学*, **37**, 194-203 (2011).
- 6) 杉本直樹: 分析対象の有機化合物の純度は大丈夫ですか? 定量 NMR による絶対純度測定法の開発. *日薬雑誌 (Folia Pharmacol. jpn.)*, **137**, 232-236 (2011).
- 7) 濱 寛貴, 徳田貴裕, 伊崎陽彦, 大野友子, 渡辺有梨, 神田哲雄, 唐 寧, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一: 金沢市内における大気粉塵中多環芳香族炭化水素類およびニトロ多環芳香族炭化水素類の最近 12 年間の変遷. *大気環境学会誌*, **47** (1), 1-8 (2012).
- 8) Li, Y., Yoshida, S., Chondo, Y., Nassar H., Tang, N., Araki, Y., Toriba, A., Kameda, T., Hayakawa, K.: On-line concentration and fluorescence determination HPLC for polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater samples and its application to Japan sea. *Chem. Pharm. Bull.*, **60** (4), 531-535 (2012).
- 9) 戸次加奈江, 鳥羽 陽, 唐 寧, 亀田貴之, 滝上英孝, 鈴木 剛, 早川和一: 多環芳香族炭化水素類の生体影響に対し輸送及び生体内代謝がどのように関与しているのか. *薬学雑誌*, **132** (3), 325-329 (2012).



- 10) Li, R., Kameda, T., Toriba, A., Hayakawa, K., Lin, J.-M.: Determination of benzo[a]pyrene-7,10-quinone in airborne particulates by using a chemiluminescence reaction of hydrogen peroxide and hydrosulfite. *Analytical Chemistry*, **84** (7), 3215-3221 (2012).
- 11) Hosozumi, C., Toriba, A., Chuesaard, T., Kameda, T., Tang, N., Hayakawa, K.: Analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatography B*, **893-894**, 173-176 (2012).
- 12) Inomata, Y., Kajino, M., Sato, K., Ohara, T., Kurokawa, J., Ueda, H., Tang, N., Hayakawa, K., Ohizumi, T., Akimoto, H.: Emission and transport of particulate PAHs in Northeast Asia. *Environ. Sci. Technol*, **46**, 4941-4949 (2012).
- 13) Suzuki, N., Sekiguchi, T., Satake, H., Katoc, K., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Danks, J.A., Martin, T.J., Hattori, A., Nakano, M., Kakikawa, M., Yamada, S., Ogoshi, M., Hyodo, S., Yamaguchi, Y., Chowdhury, V.S., Hayakawa, K., Funahashi, H., Sakamoto, T. and Sasayama, Y.: Cloning of two members of the calcitonin receptor family from stingray, *Dasyatis akajei*: Possible physiological roles of the calcitonin family in osmoregulation. *Gene*, **499**, 326-331 (2012).
- 14) Thamamongood, T.A., Furuya, R., Fukuba, S., Nakamura, M., Suzuki, N., Hattori, A.: Expression of osteoblast-specific genes during spontaneous goldfish scale regeneration and role of cell-to-cell contact in controlling the onset of resorption/regeneration process found in intra-scale pocket autotransplantation of modified scales. *Bone*, **50**, 1240-1249 (2012).
- 15) 田原麻衣子, 杉本直樹, 大槻 崇, 多田敦子, 穉山 浩, 合田幸広, 西村哲治: 定量分析値の信頼性確保のための qNMR を用いた市販試薬の純度決定. *環境化学*, **22** (1), 33-41 (2012).
- 16) Omori, K., Wada, S., Maruyama, Y., Hattori, A., Kitamura, K., Sato, Y., Nara, M., Funahashi, H., Yachiguchi, K., Hayakawa, K., Endo, M., Kusakari, R., Yano, S., Srivastav, A.K., Kusui, T., Ejiri, S., Chen, W., Tabuchi, Y., Furusawa, Y., Kondo, T., Sasayama, Y., Nishiuchi, T., Nakano, M., Sakamoto, T., Suzuki, N.: Prostaglandin E2 increases both osteoblastic and osteoclastic activities in the scales of goldfish and participates in the calcium metabolism in goldfish. *Zool. Sci.*, in press.
- 17) 鈴木信雄, 舟橋久幸, 耿 啓達, 柿川真紀子, 山田外史, 廣田憲之, 北村敬一郎, 清水宣明, 早川和一, 三島弘幸, 岩坂正和, 上野照剛, 大森克徳, 矢野幸子, 池亀美華, 田渕圭章, 和田重人, 近藤 隆, 服部淳彦: 魚類のウロコを用いた評価系の開発と骨代謝研究への応用. まぐね, 印刷中

## 2. 著書

- 1) Suzuki, N. and Sakamoto, T., Comparative and general aspects of calcium homeostasis and its hormonal regulations. In “Evolution of calcium homeostasis and its hormonal regulation in vertebrates”. Suzuki, N. and Sakamoto, T., eds. Virtual special issues in Zoological Science, in press

## 3. 学会発表

- 1) Bekki, K., Takigami, H., Suzuki, G., Tang, N., Kameda, T., Toriba, A., Hayakawa, K.: DNA microarray analysis of gene expressions induced by polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives in rat liver cancer cells. The 52<sup>nd</sup> Meeting of Korean Society for Atmospheric Environment (2011), 2011. 5. 12-14, Incheon, Korea.
- 2) Kawabe, K., Suzuki, N., Hayakawa, K.: *in vivo* study of the effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on the regenerating scales in goldfish. The 52<sup>nd</sup> Meeting of Korean Society for Atmospheric Environment (2011), 2011. 5. 12-14, Incheon, Korea.
- 3) Hayakawa, K., Bekki, K., Kameda, T., Tang, N., Toriba, A.: Endocrine disruption and active oxygen species overproduction by oxidative metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons. The 52<sup>nd</sup> Meeting of Korean Society for Atmospheric Environment (2011), 2011. 5. 12-14, Incheon, Korea.
- 4) 池亀美華, 服部淳彦, 矢野幸子, 山本敏男, 鈴木信雄: 微小重力に対する破骨細胞の応答: 魚のウロコを用いた形態学的解析. 第31回日本骨形態計測学会, 2011. 5. 21-22, 岐阜.
- 5) 関あずさ, 鈴木信雄, 池亀美華, 染井正徳, 服部淳彦: 新規プロモメラトニン誘導体の骨折治癒モデルラットの骨代謝に及ぼす影響. 第31回日本骨形態計測学会, 2011. 5. 21-22, 岐阜.
- 6) Hayakawa, K.: Determination of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons/Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons in East Asia and Its Long-Range Transport to Japan. IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (ICAS 2011), 2011. 5. 22-26, Kyoto, Japan
- 7) Hayakawa, K., Tang, N., Kameda, T., Toriba, A.: Determination of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons long-range transported from China to Japan. IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (ICAS 2011), 2011. 5. 22-26, Kyoto, Japan.
- 8) 旭 美樹, 鳥羽 陽, 外山喬士, 熊谷嘉人, 唐 寧, 亀田貴之, 早川和一: 活性酸素種を生成する多環芳香族炭化水素キノン誘導体のヒト尿中代謝物の同定と定量, 第20回環境化学討論会, 2011. 7. 16-18, 熊本.
- 9) 亀田貴之, 安積愛理, 唐 寧, 松木 篤, 福島杏希, 鳥羽 陽, 早川和一: 黄砂粒子表面における多環芳香族炭化水素のニトロ化と越境輸送, 第20回環境化学討論会, 2011. 7. 16-18, 熊本.
- 10) Hayakawa, K., Hama, H., Tang, N., Kameda, T., Toriba, A.: Change of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in last 12 years of Kanazawa. International Network of Environmental Forensics (INEF) Conference, 2011. 7. 24-27, Cambridge, United Kingdom.
- 11) Nassar, H. F., Tang, N., Kameda, T., Toriba, A., Hayakawa, K.: Investigation of polycyclic aromatic hydrocarbons and selected nitrated derivatives concentrations in greater Cairo, Egypt. International Network of Environmental Forensics (INEF) Conference, 2011. 7. 24-27, Cambridge, United Kingdom.
- 12) 関あずさ, 鈴木信雄, 染井正徳, 矢野幸子, 服部淳彦: 新規プロモメラトニン誘導体の骨折治癒モデルラットの骨代謝に及ぼす影響. 第29回日本骨代謝学会, 2011. 7. 28-30, 大阪.

- 13) 池亀美華, 服部淳彦, 北村敬一郎, 田畑 純, 矢野幸子, 山本敏男, 鈴木信雄: キンギョのウロコに存在する破骨細胞は微小重力下で活性化する. 第 29 回日本骨代謝学会, 2011. 7. 28-30, 大阪.
- 14) 中野 淳, 川部季美, 鈴木信雄, 北村敬一郎, 笹山雄一, 服部淳彦, 鳥羽 陽, 早川和一: 多環芳香族炭化水素類の内分泌かく乱作用: 魚類のウロコを用いたバイオアッセイによる解析. 平成 23 年度日本動物学会中部支部例会, 2011. 7. 30-31, 福井.
- 15) 鈴木信雄, 池亀美華, 田畑 純, 北村敬一郎, 矢野幸子, 山本敏男, 服部淳彦: 宇宙におけるウロコの破骨細胞の形態及び細胞活性の変化. 平成 23 年度日本動物学会中部支部例会, 2011. 7. 30-31, 福井.
- 16) 福島綾香, 古澤之裕, 田渕圭章, 高崎一朗, 近藤 隆, 和田重人, 服部淳彦, 早川和一, 北村敬一郎, 笹山雄一, 鈴木信雄: キンギョの鰓後腺におけるカルシトニン I 及び II mRNA の検出. 平成 23 年度日本動物学会中部支部例会, 2011. 7. 30-31, 福井.
- 17) 谷内口孝治, 鈴木信雄, 服部淳彦, 早川和一: キンギョのウロコにおける無機水銀の作用: *in vitro* のアッセイによる解析. 平成 23 年度日本動物学会中部支部例会, 2011. 7. 30-31, 福井.
- 18) 松本典子, 川部季美, 中野 淳, 早川和一, 鳥羽 陽, 北村敬一郎, 服部淳彦, 笹山雄一, 鈴木信雄: エストロゲン及び多環芳香族炭化水素類のキンギョの骨代謝に及ぼす影響評価. 平成 23 年度日本動物学会中部支部例会, 2011. 7. 30-31, 福井.
- 19) 川部季美, Mohamed Nassef, 大嶋雄治, 鈴木信雄, 笹山雄一, 服部淳彦, 鳥羽 陽, 早川和一: メダカの胚発生における多環芳香族炭化水素の影響: ナノインジェクション法による解析. 平成 23 年度日本動物学会中部支部例会, 2011. 7. 30-31, 福井.
- 20) 服部淳彦, 池亀美華, 矢野幸子, 鈴木信雄: 骨とメラトニン. 第 3 回抗加齢内分泌研究会学術集会, 2011. 9. 4, 神奈川.
- 21) Kameda, T., Akiyama, A., Toriba, A., Tang, N., Hayakawa, K.: Atmospheric formation of hydroxynitrofluoranthene from a photochemical reaction of particle-associated 2-nitrofluoranthene. 23rd International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds (ISPAC 23), 2011. 9. 4-8, Munster, Germany.
- 22) Bekki, K., Toriba, A., Takigami, H., Suzuki, G., Ning, T., Kameda, T., Hayakawa, K.: Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Hydroxides in the Airborne Particles using Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. 23rd International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds (ISPAC 23), 2011. 9. 4-8, Munster, Germany.
- 23) Bekki, K., Takigami, H., Suzuki, G., Hayakawa, K.: Effects of PAH Derivatives on Drug-Metabolizing Enzymes. 23rd International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds (ISPAC 23), 2011. 9. 4-8, Munster, Germany.
- 24) 田原麻衣子, 小林憲弘, 久保田領志, 清水久美子, 杉本直樹, 合田幸広, 西村哲治: NMRによる環境汚染物質市販標準品の純度評価. 環境科学会2011年会, 2011. 9. 8-9, 兵庫.
- 25) 早川和一: 多環芳香族炭化水素類の挙動と毒性に関する研究—東アジアを中心に—, 第52回大気環境学会年会, 2011. 9. 14-16, 長崎.

- 26) 亀田貴之, 安積愛理, 松木 篤, 唐 寧, 福島杏希, 鳥羽 陽, 早川和一: 越境輸送中の黄砂粒子表面におけるニトロ多環芳香族炭化水素の二次生成, 第52回大気環境学会年会, 2011.9.14-16, 長崎.
- 27) 片山裕規, 亀田貴之, 後藤知子, 松木 篤, 唐 寧, 鳥羽 陽, 早川和一: 黄砂粒子表面における多環芳香族炭化水素キノンの二次生成と越境輸送, 第52回大気環境学会年会, 2011.9.14-16, 長崎.
- 28) Boongla, Y., 鳥羽 陽, 亀田貴之, 早川和一: Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives from a car diesel engine fueled with biodiesel, 第52回大気環境学会年会, 2011.9.14-16, 長崎.
- 29) 立松路也, 唐 寧, 朴木英治, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 早川和一: 北陸地方の雪及び大気中の多環芳香族炭化水素, 第52回大気環境学会年会, 2011.9.14-16, 長崎.
- 30) 唐 寧, 伊崎陽彦, 立松路也, 濱 寛貴, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 島 正之, 早川和一: 中国3都市の大気中多環芳香族炭化水素類の比較, 第52回大気環境学会年会, 2011.9.14-16, 長崎.
- 31) 濱 寛貴, 唐 寧, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一: 金沢市内における大気粉塵中多環芳香族炭化水素類およびニトロ多環芳香族炭化水素類の最近11年間の変遷, 第52回大気環境学会年会, 2011.9.14-16, 長崎.
- 32) 猪股弥生, 佐藤啓市, 黒川純一, 大泉 毅, 秋元 肇, 梶野瑞王, 唐 寧, 早川和一, 植田洋匡: RAQM-POPモデルによる北東アジアにおける多環芳香族炭化水素の濃度及び沈着量の変動解析, 第52回大気環境学会年会, 2011.9.14-16, 長崎.
- 33) 北 将大, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 早川和一: GC-MS/MSによる多環芳香族炭化水素キノ
- ン類の一斉分析法の開発と大気粉塵試料への適用, 日本分析化学会第60年会, 2011.9.14-16, 名古屋.
- 34) 李 瑞波, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 李 英, 早川和一, 林 金明:  $H_2O_2$ - $NaHSO_3$  chemiluminescence system combined with HPLC for determination of oxygenated PAHsin airborne particulates. 日本分析化学会第60年会, 2011.9.14-16, 愛知.
- 35) 矢野幸子, 大森克徳, 佐藤雄亮, 北村敬一郎, 丸山雄介, 中野真樹, 服部淳彦, 池亀美華, 鈴木信雄: 物理的刺激に対するメダカのウロコの骨芽及び破骨細胞の応答. 第25回日本宇宙生物科学会, 2011.9.30-10.1, 神奈川.
- 36) 佐藤雄亮, 根本 鉄, 鈴木信雄, 矢野幸子, 服部淳彦, 北村敬一郎: 魚類の再生ウロコの骨代謝に及ぼす機械的刺激の影響: *in vivo* および *in vitro* のアッセイによる解析. 第25回日本宇宙生物科学会, 2011.9.30-10.1, 神奈川.
- 37) 鈴木信雄: 魚類のウロコにおけるホルモン及び物理的刺激(磁場刺激)の応答. 日本歯科基礎医学会, 2011.9.30-10.2, 岐阜.
- 38) Li, R., Kameda, T., Li, Y., Toriba, A., Tang, N., Hayakawa, K., Lin, J-M.: Hydrogen peroxide-sodium hydrosulfite chemiluminescence system combined with high-performance liquid chromatography to detect benzo[*a*]pyrene-7, 10-quinone in urban aerosols. The 14th Beijing Conference and Exhibition on Instrumental Analysis (BCEIA2011), 2011.10.12-15, Beijing, China.
- 39) Hayakawa, K.: Change of air pollution in Japan during last 14 years from view point of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. The