

- 14th Beijing Conference and Exhibition on Instrumental Analysis (BCEIA2011), 2011. 10. 12-15, Beijing, China.
- 40) Chizhova, T. L., Nakase, H., Tischenko, P. Y., Hayakawa, K.: Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the North-western part of Japan Sea. PICES 2011 Annual Meeting, 2011. 10. 14-23, Khabarovsk, Russia.
- 41) 濱 寛貴, 唐 寧, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一: 多環芳香族炭化水素およびニトロ多環芳香族炭化水素からみた最近14年間の我が国の都市大気汚染の変化, フォーラム2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011. 10. 27-28, 石川.
- 42) 戸次加奈江, 鳥羽 陽, 滝上英孝, 鈴木 剛, 唐 寧, 亀田貴之, 早川和一: GC-MS/MSによる大気粉塵中水酸化多環芳香族炭化水素類の一斉分析, フォーラム2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011. 10. 27-28, 石川.
- 43) 岡山達哉, 鳥羽 陽, 早川和一, 亀田貴之: 試料前処理を簡略化できる大気粉じん中ニトロ多環芳香族炭化水素類の分析システムの開発, フォーラム2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011. 10. 27-28, 石川.
- 44) 末松千賀子, 唐 寧, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一: 多環芳香族炭化水素及びニトロ多環芳香族炭化水素から見た最近12年間の東アジア3ヵ国(中国, 韓国, ロシア)の都市の大気汚染の変化, フォーラム2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011. 10. 27-28, 石川.
- 45) 福島杏希, 亀田貴之, 安積愛理, 松木 篤, 唐 寧, 鳥羽 陽, 早川和一: 黄砂粒子表面におけるニトロ化多環芳香族炭化水素の二次生成と越境大気汚染, フォーラム2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011. 10. 27-28, 石川.
- 46) 細住智恵美, 鳥羽 陽, 田村憲治, 呉 慶, 薫 麗君, 張 雪梅, 唐 寧, 亀田貴之, 早川和一: 中国人小学生を対象とした尿中酸化ストレスマーカーの測定—大気汚染物質曝露による影響—, フォーラム2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011. 10. 27-28, 石川.
- 47) 川部季美, Nassar, H. F., 大嶋雄治, 鈴木信雄, 笹山雄一, 服部淳彦, 中野 淳, 鳥羽陽, 亀田貴之, 早川和一: 多環芳香族炭化水素類のメダカの胚発生に及ぼす影響, フォーラム2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011. 10. 27-28, 石川.
- 48) 杉本直樹: qNMRの食品・天然物分析への応用—波及効果と現状—. 第4回食品薬学シンポジウム講演, 2011. 10. 28-29, 東京.
- 49) Hayakawa, K., Toriba, A., Kameda, T., Tang, N.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in Japan sea. The 4th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition. The 4th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition, 2011. 11. 2-6, Tokyo, Japan.
- 50) 奈良雅之, 服部淳彦, 大西晃宏, 赤塚陽子, 鈴木信雄, 松田准一: 赤外・ラマン分光によるキンギョのウロコの状態分析. 医用分光学会, 2011. 11. 13, 島根.
- 51) 杉本直樹, 田原麻衣子, 久保田領志, 小林憲弘, 清水久美子, 合田幸広, 西村哲治: NMRによる汚染物質のモニタリング技術の検討. 第48回全国衛生化学技術協議会年会, 2011. 11. 15, 長野.
- 52) 川部季美, Mohamed Nassef, 大嶋雄治, 鈴木信雄, 笹山雄一, 服部淳彦, 中野 淳, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 早川和一: 水酸化多環芳香族炭化水素のメダカとウニの胚発生に及ぼす影響. 日本薬学会北陸支部第123回例会, 2011, 11. 27, 石川.

- 53) 杉本直樹：核磁気共鳴(NMR)法を利用した定量技術と日本薬局方試薬への応用-NMRによる天然有機化合物の定量分析とその役割-. 第40回生薬分析シンポジウム特別講演, 2011. 12. 1, 大阪.
- 54) 佐藤雄亮, 根本 鉄, 鈴木信雄, 矢野幸子, 服部淳彦, 北村敬一郎：キンギョの再生ウロコの *in vivo* および *in vitro* 系による機械的刺激の骨代謝への影響. 平成 23 年度生体医工学会北陸支部大会, 2011. 12. 10, 石川.
- 55) 杉本直樹：定量 NMR の天然物分析への応用. 平成 23 年度試験検査センター技術研修会, 2011. 12. 15-16, 東京.
- 56) 鈴木信雄, 矢野幸子, 古澤之裕, 池亀美華, 田渕圭章, 北村敬一郎, 和田重人, 高崎一朗, 清水宣明, 近藤 隆, 服部淳彦：LIPUS の骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用：魚の培養ウロコを骨のモデルとした解析. 第 15 回超音波骨折治療研究会, 2012. 1. 21, 東京.
- 57) Inomata, Y., Kajino, M., Sato, K., Ohara, T., Kurokawa, J. I., Ueda, H., Tang, N., Hayakawa, K., Okuda, T., Ohizumi, T., Akimoto, H.: Newly developed emission inventory, REAS-POP: particulate PAHs in Northeast Asia. Third international workshop on emission Inventory in Asia, 2012. 2. 24-25, Yokohama, Japan.
- 58) Maruyama, Y., Suzuki, N., Hattori, A.: Activation of osteoclasts in female goldfish during the reproductive stage. 7th Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology. 3. 3-7. 2012, Penang, Malaysia.
- 59) 谷内口孝治, 松本典子, 鈴木信雄, 羽賀雄紀, 鈴木元治, 松村千里, 鶴川正寛, 中野 武, 川部季美, 鳥羽 陽, 早川和一, 服部淳彦：魚類の骨代謝に対するポリ塩化ビフェニルの作用. 第 45 回日本水環境学会, 2012. 3. 14-16, 東京.
- 60) 鈴木信雄, 松本典子, 川部季美, 中野 淳, 鳥羽 陽, 早川和一, 北村敬一郎, 田渕圭章, 高崎一朗, 古澤之裕, 近藤 隆, 服部淳彦：魚類の骨代謝に及ぼす多環芳香族炭化水素類の作用. 第45回日本水環境学会, 2012. 3. 14-16, 東京.
- 61) 北 将大, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 早川和一：GC-MS/MSによる大気粉じん中多環芳香族炭化水素キノン類の一斉分析法の開発, 日本薬学会第132年会, 2012. 3. 28-31, 北海道.
- 62) 吉田翔太, 中瀬久淑, 唐 寧, 洪 天祥, 立松路也, 川西琢也, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 早川和一：日本海における多環芳香族炭化水素の分布, 日本薬学会第132年会, 2012. 3. 28-31, 北海道.
- 63) 末松千賀子, 濱 寛貴, 唐 寧, 亀田貴之, 鳥羽 陽, 早川和一：東アジア4ヶ国(日本, 中国, 韓国, ロシア)における大気中多環芳香族炭化水素及びニトロ多環芳香族炭化水素の長期変動, 日本薬学会第132年会, 2012. 3. 28-31, 北海道.
- 64) 福島杏希, 亀田貴之, 安積愛里, 松木 篤, 唐 寧, 鳥羽 陽, 早川和一：黄砂発生時に中国北京で観測されたニトロピレンの大気内二次生成, 日本薬学会第132年会, 2012. 3. 28-31, 北海道.
- 65) 鳥羽 陽, 戸次加奈江, 唐 寧, 亀田貴之, 早川和一：GC-MS/MSによる大気粉じん中水酸化多環芳香族炭化水素類の測定, 日本薬学会第132年会, 2012. 3. 28-31, 北海道.
- 66) 旭 美樹, 細住智恵美, 鳥羽 陽, Chetiyankornkul, T., 唐 寧, 亀田 貴之, 早川和一：活性酸素種を生成する 9,10-phenanthrenequinone のヒト尿中代謝

物の測定, 日本薬学会第132年会, 2012. 3. 28-31, 北海道.

- 67) 笠原千栄子, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 鈴木信雄, 早川和一: 魚の胆汁及び尿中多環芳香族炭化水素代謝物の測定, 日本薬学会第132年会, 2012. 3. 28-31, 北海道.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 定量値の新規算出方法

	概要	検量線本数	計算式	得られる定量値
a	絶対検量線法	1	P	a
b	通常の内標準法 (IS一つでの比)	1	P/AI or P/BI or P/CI	b1, b2, b3
c	IS三種それぞれにより比を算出し、この3つの値を平均した後、検量線を作成	1	Ave (P/AI, P/BI, P/CI)	c
d	IS三種それぞれにより検量線を作成し、得られた3つの定量値を平均	3	Ave (b1, b2, b3)	d
e	cに対し、IS三種それぞれで算出されるPAHsおよびISそれぞれのm/zにおける強度比の平均で補正	1	$d \times \text{Ave}[(\text{PAHsTc}/\text{PAHsTs}_1)/(\text{ATc}/\text{ATs}_1), (\text{PTc}/\text{PTs}_1)/(\text{BTc}/\text{BTs}_1), (\text{PTc}/\text{PTs}_1)/(\text{CTc}/\text{CTs}_1)]$	e

* P: PAHsのピーク面積値, A, B, C: IS三種, I: ISのピーク面積値

Tc: 検量線を作成した際のチューニング強度式から得られたPAHsおよびISのm/zにおける強度値の平均

Ts₁, Ts₂, Ts₃, Ts₄, Ts₅: 試料測定日のチューニング強度式から得られたPAHsおよびISのm/zにおける強度値

II. 分担研究報告

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 年度分担研究報告書

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

エストロゲン受容体への作用

—酵母 two-hybrid 法を用いた多環芳香族炭化水素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—

研究分担者 早川 和一 金沢大学 医薬保健研究域薬学系 教授

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）の環境動態と健康リスクの関係を考察した。これまでの環日本海域に位置する各都市の大気及び海水・河川水中の PAH、NPAH 濃度の継続調査より次のことが明らかになった。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、他の海域と比較しても比較的高濃度のレベルにあった。以上より、大気及び海域における PAH、NPAH の環境動態を明らかにすることができた。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。更に、これら内分泌攪乱作用と化合物の構造との間に相関性があることも明らかになった。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。

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。また、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

気輸送中に様々な化学反応によって NPAH を含む PAH 誘導体を生成する。これ等 PAH 誘導体の中には、例えば NPAH が強い変異原性を示すように、多岐に渡る毒性を発現する可能性が危惧される。そこで、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。

B. 研究方法

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域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を行った。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の評価、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に関する内分泌攪乱作用の評価、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。

C. D. 結果・考察

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。分析の対象としたのは、US Environmental Protection Agency (EPA) に環境汚染物質として測定すべき項目としてリストアップされた 16 種類の PAH のうち、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 の年平均濃度之和は、撫順 (1205 pmol m⁻³) > 瀋陽 (313 pmol

m⁻³) > 北京 (270 pmol m⁻³) > 鉄嶺 (258 pmol m⁻³) > ウラジオストク (34 pmol m⁻³) > 北九州 (12 pmol m⁻³) > 札幌 (11 pmol m⁻³) > 東京 (5.9 pmol m⁻³) > 釜山 (5.6 pmol m⁻³) > 金沢 (3.6 pmol m⁻³) の順となった。NPAH の濃度は PAH より低いが、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 (Fig. 1)。このように、中国の都市の PAH、NPAH の年平均濃度は他国の都市に比して非常に高い。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。

2. 日本海域及び関連河川における PAH 濃度

日本海域は、地震や火山活動の盛んな地帯であるとともに、タンカーやパイプライン等の事故の危険性も増している (Lorre *et al.*, 2006; Lipiatou *et al.*, 1997)。また日本海域は、中国等からの大気汚染や河川の水質汚濁の影響も受け易い上、両端が狭い海峡で閉鎖性が高く環境変化に敏感である。従って、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、大西洋より高かつ

た。

今後、更にデータを蓄積させることにより、汚染の現状はより明らかになって行くと考えられる。

3. PAH 誘導体の生成

2で述べたように、発生したPAH類は発生源周辺に留まるに限らず、様々な要因で長距離を輸送され、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) (Fig. 2)。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。また、大気粉塵からも同定できた。

4. PAH 誘導体による毒性影響

3で述べたように環境中に放出されたPAHはPAH誘導体となって存在しているため、PAH誘導体が生体に対してどのような作用を示すかが重要となってくる。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、それらは最終的にDNAへ損傷

を及ぼす付加体となることで、強い変異原性を示すことが知られている (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着目されている。酵母 two-hybrid assay を用いた PAH 代謝産物によるエストロゲン受容体への作用を調べた本実験結果から、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 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。

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、PAHの分子構造を考える上で2つの因子、即ち、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 との関係を図 3 に示した。図に示したように、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 10.8-11.7Å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 8.4-11.6Å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結果を図 4 に示した。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 8.2~11.5Å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 (E₂) 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。

以上の結果により、バイオアッセイにより示された OHPAH および PAHQ が有するエストロゲン/抗エストロゲン作用を *in silico* での構造活性相関により予測できたことは、環境中や生体内に無数に存在する PAH 誘導体のリスクを知る上での有効な手法となることが期待できる。

E. 結論

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。

F. 参考文献

- Atkinson R., Arey J., *Environmental Health Perspective*, **102**, 117-126 (1994)
- Biswas S., Seema A., Rahman I., *Biochem. Pharmacol.*, **71**, 551-564 (2006)
- BP report (2004)
- Collantes E. R., Tong W., Welsh W. J., *Anal. Chem.*, **68**, 2038-2043 (1996)
- Hayakawa K., Onoda Y., Tachikawa C., Hosoi S., Yoshita M., Chung S. W., Kizu R., Toriba A., Kameda T., Tang N., *J. Health Sci.*, **53**, 562-570 (2007)
- Hayakawa K., Bekki K., Yoshita M., Tachikawa C., Kameda T., Tang N., Toriba A., Hosoi S., *J. Health Sci.*, **57**, 274-280 (2011)
- Kameda T., Akiyama A., Toriba A., Tang N., Hayakawa K., *Sci. Technol.*, **45**, 3325-3332 (2011)
- Kihara H., Utida N., Ikuta S., *Kodansha Scientific* (1994)
- Lipiatou E., Tolosa I., Simó R., Bouloubassi I., Dachs J., Marti S., Sicre M. A., Bayona J. M., Saliot A., Albagés J., *Deepsea Res. II*, **44** (3-4), 881-905 (1997)
- Lorre A., Point V., *Mar. Pollut. Bull.*, **52**, 560-571 (2006)
- Motoyama Y., Bekki K., Chung S. W., Tang N., Kameda T., Toriba A., Taguchi K., Hayakawa K., *Journal of Health Science*, **55**, 845-850 (2009)
- Nagy E., Zeisig M., Kawamura K., Hisamatsu Y., Sugeta A., Adachi S., Moller L., *Carcinogenesis*,

26, 1821-1828 (2005)

Sander L. C., Wise S. A., *NIST Special Publication*, **922** (1997)

Shimada T., *Drug Metab. Pharmacokinet*, **21**, 257-276 (2006)

Stadtman ER., Berlett BS., *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 485-494 (1997)

Stadtman ER., Levine RL., *Amino Acids.*, **25**, 207-218 (2003)

Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenaki M., Scoullou M., *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **64**, 178-189 (2006)

Vione D., Barra S., Gennaro G.DE., Rienzo M.DE., Gilardoni S., Perrone M. G., Pozzoli L., *Ann. Chim.*, **94**, 17-32 (2004)

Xia T., Kovochich M., Nel A., *Clin. Occup. Environ. Med.*, **5**, 817-836 (2006)

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) 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).

5) 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).

6) 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).

7) 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. *Anal. Chem.*, **84** (7), 3215-3221 (2012).

8) 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. Chromatogr. B*, **893-894**, 173-176 (2012).

9) 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).

2. 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 52nd Meeting of Korean Society for Atmospheric Environment (2011), 2011. 5. 12-14, Incheon, Korea.
- 2) 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
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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。
 - 12) 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。
 - 13) 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。
 - 14) 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。
 - 15) 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。
 - 16) 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。
 - 17) 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。
 - 18) 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。
 - 19) 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。
 - 20) 李 瑞波，亀田貴之，鳥羽 陽，李 英，早川和一，林 金明：H₂O₂-NaHSO₃ 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。
 - 21) 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.
 - 22) Hayakawa, K.: Change of air pollution in Japan during last 14 years from view point of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. The 14th Beijing Conference and Exhibition on Instrumental Analysis (BCEIA2011), 2011. 10. 12-15, Beijing, China.
 - 23) Chizhova, T. L., Nakase, H., Tischenko, P. Y., Hayakawa, K.: Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the North-western part of Japan Sea. PICES 2011 Annual Meeting, 2011. 10. 14-23, Khabarovsk, Russia.
 - 24) 濱 寛貴，唐 寧，亀田貴之，鳥羽 陽，

- 早川和一：多環芳香族炭化水素およびニトロ多環芳香族炭化水素からみた最近14年間の我が国の都市大気汚染の変化，フォーラム2011：衛生薬学・環境トキシコロジー，2011. 10. 27-28，石川.
- 25) 戸次加奈江，鳥羽 陽，滝上英孝，鈴木 剛，唐 寧，亀田貴之，早川和一：GC-MS/MSによる大気粉塵中水酸化多環芳香族炭化水素類の一斉分析，フォーラム2011：衛生薬学・環境トキシコロジー，2011. 10. 27-28，石川.
- 26) 岡山達哉，鳥羽 陽，早川和一，亀田貴之：試料前処理を簡略化できる大気粉じん中ニトロ多環芳香族炭化水素類の分析システムの開発，フォーラム2011：衛生薬学・環境トキシコロジー，2011. 10. 27-28，石川.
- 27) 末松千賀子，唐 寧，亀田貴之，鳥羽 陽，早川和一：多環芳香族炭化水素及びニトロ多環芳香族炭化水素から見た最近12年間の東アジア3カ国（中国，韓国，ロシア）の都市の大気汚染の変化，フォーラム2011：衛生薬学・環境トキシコロジー，2011. 10. 27-28，石川.
- 28) 福島杏希，亀田貴之，安積愛理，松木 篤，唐 寧，鳥羽 陽，早川和一：黄砂粒子表面におけるニトロ化多環芳香族炭化水素の二次生成と越境大気汚染，フォーラム2011：衛生薬学・環境トキシコロジー，2011. 10. 27-28，石川.
- 29) 細住智恵美，鳥羽 陽，田村憲治，呉 慶，薫 麗君，張 雪梅，唐 寧，亀田貴之，早川和一：中国人小学生を対象とした尿中酸化ストレスマーカーの測定－大気汚染物質曝露による影響－，フォーラム2011：衛生薬学・環境トキシコロジー，2011. 10. 27-28，石川.
- 30) Hayakawa, K., Toriba, A., Kameda, T., Tang, N.: Polycyclic aromatic hydrocarbons in Japan sea. The 4th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition. The 4th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition, 2011. 11. 2-6, Tokyo, Japan.
- 31) Inomata, Y., Kajino, M., Sato, K., Ohara, T., Kurokawa, J. I., Ueda, H., Tang, N., Hayakawa, K., Okuda, T., Ohizumi, T., Akimoto, H.: Newly developed emission inventory, REAS-POP: particulate PAHs in Northeast Asia. Third international workshop on emission Inventory in Asia, 2012. 2. 24-25, Yokohama, Japan.
- 32) 北 将大，鳥羽 陽，亀田貴之，早川和一：GC-MS/MSによる大気粉じん中多環芳香族炭化水素キノン類の一斉分析法の開発，日本薬学会第132年会，2012. 3. 28-31，北海道.
- 33) 吉田翔太，中瀬久淑，唐 寧，洪 天祥，立松路也，川西琢也，鳥羽 陽，亀田貴之，早川和一：日本海における多環芳香族炭化水素の分布，日本薬学会第132年会，2012. 3. 28-31，北海道.
- 34) 末松千賀子，濱 寛貴，唐 寧，亀田貴之，鳥羽 陽，早川和一：東アジア4ヶ国（日本，中国，韓国，ロシア）における大気中多環芳香族炭化水素及びニトロ多環芳香族炭化水素の長期変動，日本薬学会第132年会，2012. 3. 28-31，北海道.
- 35) 福島杏希，亀田貴之，安積愛里，松木 篤，唐 寧，鳥羽 陽，早川和一：黄砂発生時に中国北京で観測されたニトロピレンの大気内二次生成，日本薬学会第132年会，2012. 3. 28-31，北海道.
- 36) 鳥羽 陽，戸次加奈江，唐 寧，亀田貴之，早川和一：GC-MS/MSによる大気粉じん中水酸化多環芳香族炭化水素類の測定，日本薬学会第132年会，2012. 3. 28-31，北海道.
- 37) 旭 美樹，細住智恵美，鳥羽 陽，Thaneeya

CHETIYANUKORNKUL, 唐 寧, 亀田 貴之, 早川和一 : 活性酸素種を生成する 9,10-phenanthrenequinone のヒト尿中代謝物の測定, 日本薬学会第132年会, 2012. 3. 28-31, 北海道.

- 38) 笠原千栄子, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 鈴木信雄, 早川和一 : 魚の胆汁及び尿中多環芳香族炭化水素代謝物の測定, 日本薬学会第132年会, 2012. 3. 28-31, 北海道.

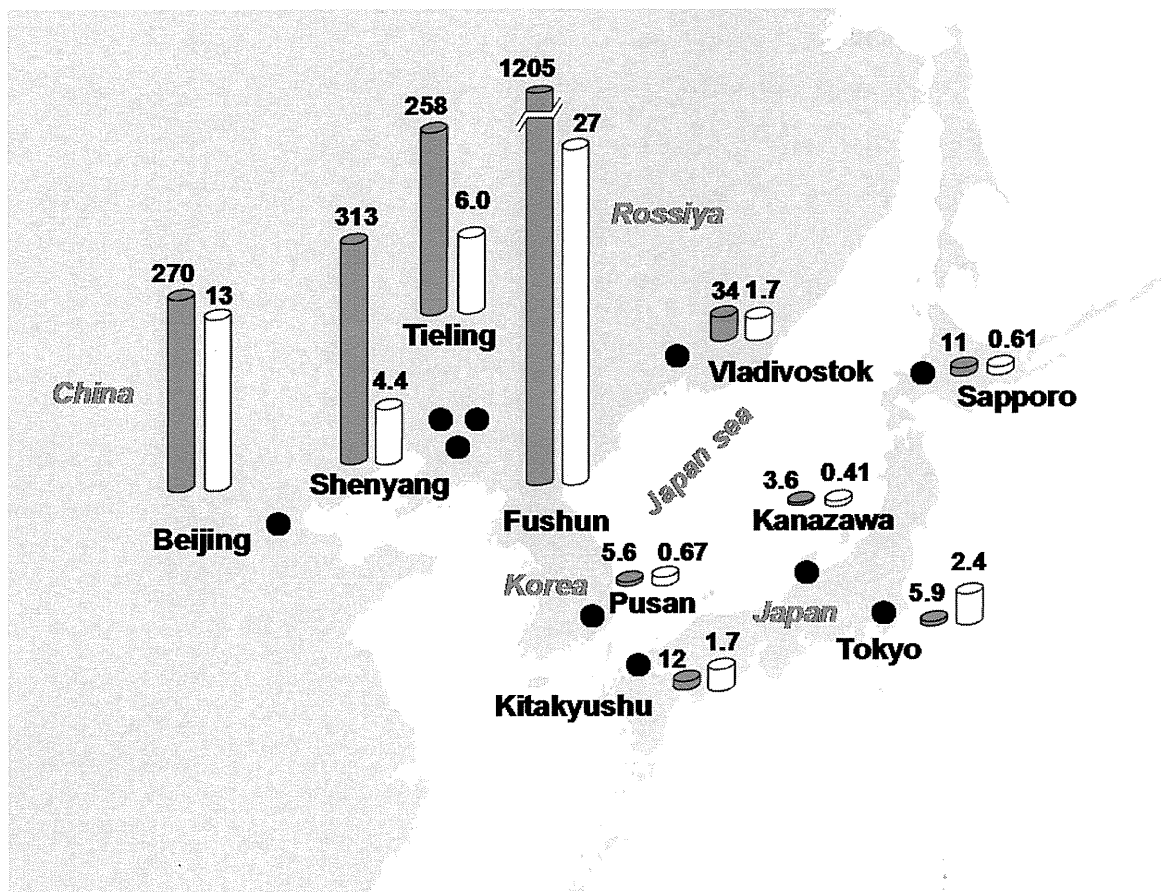
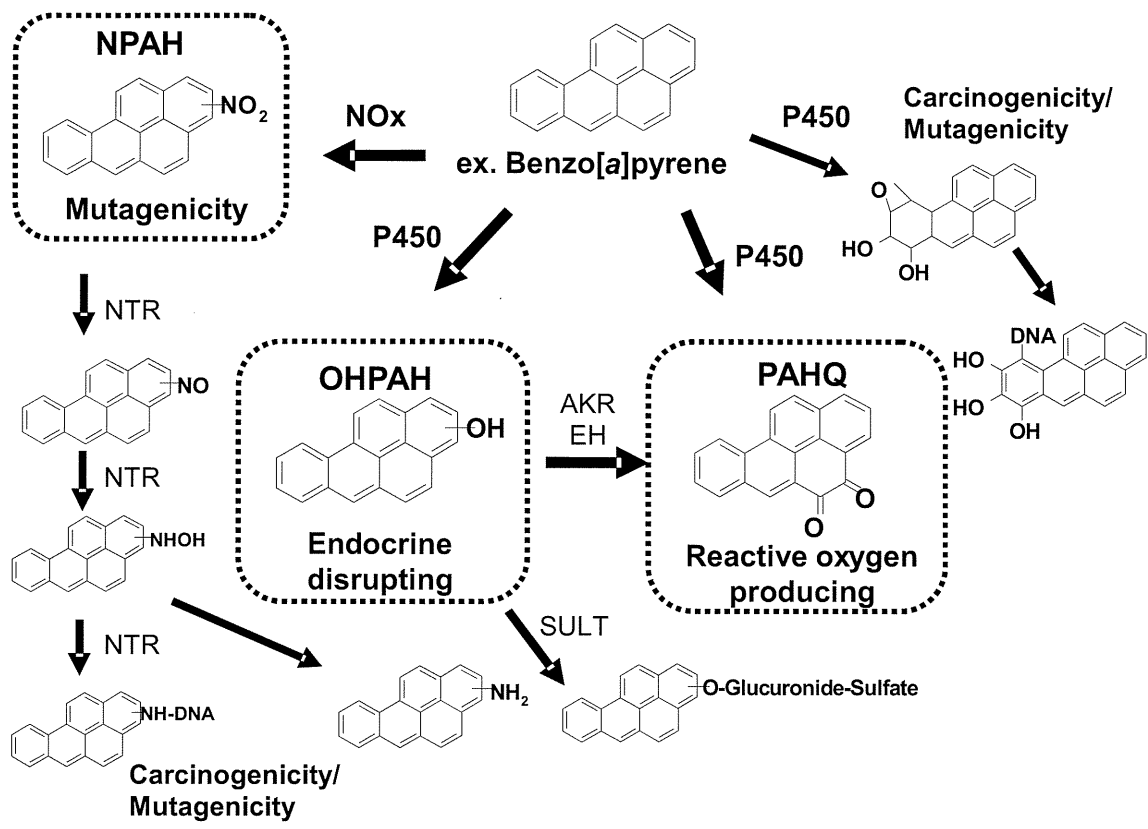


Fig. 1 Annual average atmospheric concentrations of PAHs and NPAHs

Unit: pmol/m³ [PAHs] = [Pyr] + [BaA] + [Chr] + [BbF] + [BkF] + [BaP], [NPAHs] = [1,3-Dnp] + [1,6-Dnp] + [1,8-Dnp] + [9-NA] + [1-NP] + [2-NFR1+2-NP] + [6-Nc] + [7-NBaA] + [6-NBaP] + [3-Nper]

Year: 2001~2002 (Shenyang), 2002~2003 (Fushun), 2003~2004 (Tieling), 2004~2005 (Beijing, Fushun, Vladivostok, Kanazawa, Sapporo, Tokyo, Kitakyushu)



NTR: Nitroreductase, AKR: Aldo-keto reductase, EH: Epoxide hydrase, SULT: Sulfotransferase

Fig. 2 Metabolic activation of PAH/NPAH

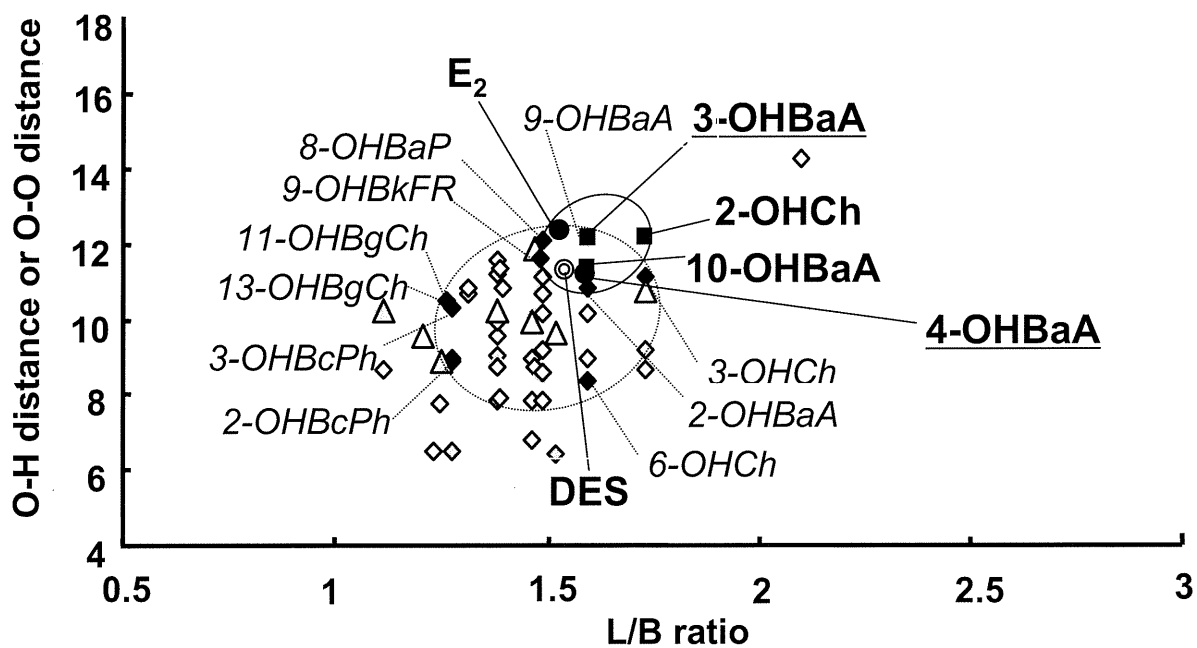


Fig. 3 Relationship between L/B ratios and O-H distances of strongly estrogenic and antiestrogenic OHPAHs

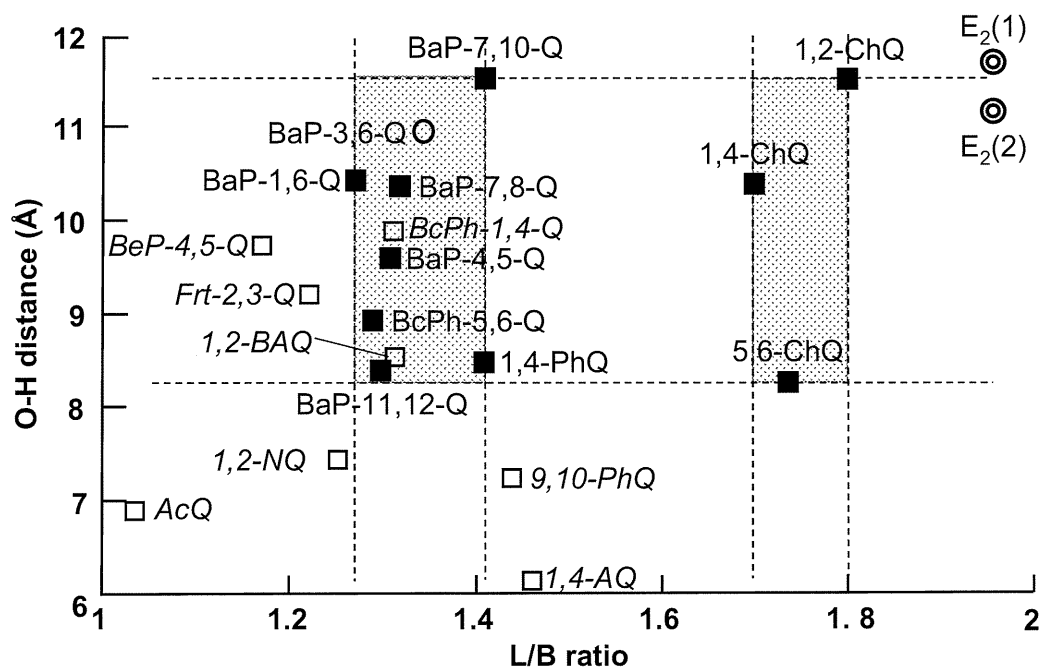


Fig. 4 Relationship between L/B ratios and O-H distances of strongly estrogenic and antiestrogenic PAHQs

Estrogenic activity of each test compound was assayed in the concentration range from 1×10^{-6} M to 1×10^{-9} M. Reactive effective potency of estrogenic activity (REP_E) was calculated from the value of E_2 as a positive control. Antiestrogenic activity of each test compound was assayed in the concentration range from 1×10^{-6} M to 1×10^{-9} M. Reactive effective potency of antiestrogenic activity (REP_{AE}) was calculated from the value of 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) as a positive control. Symbols: ○; Estrogenic activity ($REP_E = 2.3$), ■; Antiestrogenic activity ($REP_{AE} > 0.42$), □; inactive, ⊙; E_2 ¹⁶⁾

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 年度分担研究報告書

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

構造活性相関の解析

—多環芳香族炭化水素のキノン体の分子構造と活性との関係—

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

研究要旨

早川和一分担研究において実施した受容体結合試験法で、多環芳香族炭化水素（PAH）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ー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。これらのパラメーター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。

A. 研究目的

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について、いくつかの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。

B. 研究方法

分子モデリングソフト CAChe を用いたコンピューター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（Table 2）。

C. D. 結果・考察

1. 分子構造と活性との関係

酵母 two-hybrid アッセイ法及び受容体結合試験法によって得られた測定結果から、活性発現にはフェノール性水酸基が必須ではなく、キノン体構造でも十分であることが明らかとなった。これまでにエストロゲン様活性や ER に対する結合親和性を有する多くの化合物に共通

する構造的特徴に関する報告がなされている (Fang *et al.*, 2001)。西原らはフェノール環のパラ位に疎水性部を持つとエストロゲン様活性を示し、オルト位が嵩高いとその活性が減弱することを報告している。(Nishihara *et al.*, 2000)。しかし、OHPAH ではオルト位の炭素が縮環にあずかる OHPAH の中でも強い活性を示すものがあることから、この条件でも活性の有無の説明としては不十分であった。OHPAH では母核構造と水酸基の位置とが活性の発現に関与していると考え、2つのパラメーターを用いた。まず、母核構造の違いを表すパラメーターとして Length-to-breadth ratio (L/B 比) (Collantes *et al.*, 1996; Sander *et al.*, 1997) を用いた。L/B 比とは、分子のファンデルワールス表面を囲むように置いた四角形の長軸を L 軸、短軸を B 軸とし、この L 軸と B 軸の比の最大値を示したものである (Fig. 1)。一方、水酸基の位置の違いを表すパラメーターとして O-H distance を使用した。O-H distance は水酸基の酸素原子から最も離れた位置に存在する水素原子との距離を示したものである (Fig. 2)。そこで、E₂ 及び PAHQ の L/B 比と O-H distance を Table 1 に示し、OHPAH 同様に PAHQ でもこれらのパラメーターについて考察した。PAHQ では、2つあるケトン基のうち、酸素原子と水素原子の距離が最も離れた O-H distance を用いた。

L/B 比及び O-H distance と結合親和性の強さとの関係を Fig. 3 に示した。結合親和性を示した 12 種の PAHQ は L/B 比が 1.25 ~ 1.80、O-H distance が 7.434 ~ 11.519 Å の広い範囲に存在した。

2. 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 E₂ 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。E₂ 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) (Fig. 4)。

また、Fig. 4 に示すように E₂ 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いため、その部分電荷は大きくなり、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 E₂ 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。従って、PAHQ の酸素原子の部分電荷との関係を評価し、その結果を Fig. 5 に示した。結合親和性の指標として、Induction 値及び Inhibition 値、高濃度曝露での阻害割合 (Binding affinity) を用いた (Table 3)。

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。

3. 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、E₂ 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を評価し、その結果を Fig. 6 に示した。

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、E₂ 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 ~