

201236002B

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22～24年度 総合研究報告書

研究代表者  
早川 和一  
(金沢大学)

平成25(2013)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22～24年度 総合研究報告書

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25(2013)年 3月

# 目 次

## I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 37

III. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 45

# I . 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
（総合）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

研究要旨

多環芳香族炭化水素（Polycyclic aromatic hydrocarbon: PAH）類は代表的な環境汚染物質であり、発がん性を有するものが多く、最近、内分泌かく乱作用、活性酸素種（ROS）過剰産生作用などの毒性を示すものがあることも明らかになった。そこで、本研究は、PAH 類のようにステロイド系ホルモン受容体に結合してかく乱作用を発現する医薬品や化学物質に焦点を合わせ、その毒性発現の有無を予測可能とする簡便な方法として、酵母 two-hybrid 法によるエストロゲン様/抗エストロゲン作用試験構造に基づく予測法と、魚のウロコや受精卵等を用いるバイオアッセイ法を組み合わせることの可能性を追求した。まず、ステロイド系ホルモン受容体の一つとして、エストロゲン受容体に結合してかく乱作用を発現する可能性がある PAH 及びその水酸化体（OHPAH）65 種、キノン体（PAHQ）20 種、ケトン体（PAHK）9 種を対象として、毒性指標として酵母 two-hybrid 法を用いたエストロゲン様/抗エストロゲン作用の強さを求め、毒性を発現する構造要件を明らかにすることを目的とした。その結果、PAH 及び PAHK はいずれの活性も示さなかったが、OHPAH と PAHQ のいくつかはエストロゲン様活性または抗エストロゲン活性を示した。キノン類のように水酸基以外の官能基に酸素を持つことででもエストロゲン受容体（ER）を介するエストロゲン様活性や抗エストロゲン活性を発現することが初めて示された。さらに、強い活性を示す OHPAH と PAHQ は、環数、L/B 比及び O-H distance の 3 つの構造パラメータが 17-β エストラジオール（E2）の値と近い狭い範囲にあることから、明確な構造活性相関のあることが明らかになった。さらに、ER に対する結合は、末端にキノン構造を持つものがより強いことが分かった。これら以外の物理学的パラメータについては、ROS 過剰産生等も含めて相関は見出せなかった。以上のことは、ER に結合して活性を示すか否かの毒性情報がない化学物質のかく乱作用について、これら構造パラメータの値から予測可能なことを示唆している。一方、魚のウロコは、カルシウムの出し入れをし、ヒトの骨と同様に骨を作る細胞（骨芽細胞）と骨を壊す細胞（破骨細胞）が石灰化した骨基質の上に共存しており、シンプルな骨のモデルである。さらに、ウロコは再生するという性質をもち、その再生ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性が非常に高いことが判明した。そこで本研究では、上述の構造パラメータを用いる推定法に組み合わせるバイオアッセイ法として、まず、魚のウロコ

を用いる化学物質の毒性評価系を、骨芽細胞及び破骨細胞の活性が高い再生ウロコを用いて開発したところ、骨芽細胞及び破骨細胞に対する PAH 類の毒性の本体は OHPAH である可能性が示された。そこで、PAH をキンギョに腹腔内投与して、ウロコ再生（骨形成）に及ぼす影響を見るとともに、メダカの胚にも PAH 及び OHPAH を投与して毒性作用を比較した。その結果、毒性は PAH 及び OHPAH のいずれでも現れたが、その強さから OHPAH が毒性の本体である可能性が高いことが判明した。この結果は、酵母 two-hybrid 法で OHPAH が強い抗エストロゲン活性を示した結果と矛盾しない。以上の結果は、酵母 two-hybrid 法による活性に基づく構造パラメータを用いた第一次スクリーニングと魚のウロコや受精卵を用いる第二次スクリーニングの組み合わせの有効性を示しているが、魚のウロコや受精卵では化学物質の代謝活性化が起こり、ER 結合以外のプロセスによる毒性も現れることを考慮する必要がある。さらに、PAH 類の環境動態の概要を把握するために、東アジアの都市大気中 PAH とニトロ多環芳香族炭化水素（NPAH）を測定したところ、特に中国で高濃度であった。そこで、能登半島で大気試料を連続捕集すると、中国の冬季暖房期のみ大気中 PAH と NPAH の濃度が上昇し、組成と後方流跡線の解析からも、これらが日本まで長距離輸送されていることが明らかになり、この間の日本海への PAH、NPAH 負荷の可能性も示唆された。最後に PAH 類を対象に、定量核磁気共鳴法（定量 NMR: quantitative NMR (qNMR))および定量値の新規補正法 Multi Internal standards Calibration Objective (MICO)により、化学物質の迅速、精確な定量分析法 (MDPD-MICO-qGC/MS)を開発できた。得られたスペクトルや検量線等、化合物のデータを元に MDPD を構築し、これを参照することによって科学のおよび計量学的に信頼性の高い定量値を算出することができる。本法により、環境中の PAH 等の精確な自動定量分析が可能となると考えられた。

鈴木 信雄 金沢大学 准教授  
細井 信造 京都薬科大学 准教授  
杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所  
室長

## A. 研究目的

多環芳香族炭化水素（Polycyclic aromatic hydrocarbon : PAH）類は石油や石炭など化石燃料の燃焼に伴って生成して大気中に放出される非意図的生成化学物質の一つであり、難分解性の有機化合物として環境中に広く存在している。PAH 類は有機物質の不完全燃焼によっ

て生成し、ガソリン車、ディーゼル車などの自動車排ガスや工場からの排気、ゴミの焼却、タバコ煙などの人為的発生源の他、森林火災や火山の噴火などの自然現象に起因するものもある。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、多様な毒性を発現する可能性がある。PAH や NPAH は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 は原油にも含まれており、1997 年 1 月に日本海で発生したロシア船籍タンカーナホトカ号の重油流出事故では、流出した大量の重油による海洋生態系への影響が危惧されている。また 2010 年 4 月に起きたメキシコ湾の石油掘削基地の爆発により原油が流出した。これは 1989 年に 4 万キロリットルが流出したアラスカ州のタンカー事故（エクソンバルディーズ号原油流出事故）を超え、過去最悪の環境汚染を引き起こす恐れがある。オイルタンカー等の事故は直接、海洋の PAH 汚染を引き起こし、長期間その海域の生物に影響を与える恐れがある。

PAH や NPAH が含まれるディーゼル排ガス粉塵 (Diesel exhaust particulate: DEP) については、これまで主に肺がんや慢性的な呼吸器疾患のリスクに注目が置かれていたが、近年では DE を吸入した雄マウス及びラット、成長期のラットで精子産生の抑制が報告され、内分泌かく乱作用の点からも注目を集めるようになった。著者らは、DEP 抽出物 (DEPE) の抗アンドロゲン作用について、アンドロゲンレセプター (AR) を安定導入したヒト前立腺がん PC3/AR 細胞を用いたルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイによる検討を行い、DEPE が抗アンドロゲン作用を持ち、その中には PAH のようにダイオキシンレセプターと言われるアリル炭化水素受容体 (AhR) のアゴニストとして作用するものや、AhR アンタゴニストとして作用するものが存在することを明らかにした。これまで、DEPE 中の抗アンドロゲン物質の一つとして OHPhe (Hydroxyphenanthrene) が同定され、個々の物質の評価により水酸化 PAH (Hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbon: OHPAH) のいくつか特に強い抗アンドロゲン活性が見られた。さらに研究代表の早川らは、PAH はヒトエストロゲン受容体 (Human estrogen receptor :

hER) に対して結合しないが、OHPAH は結合を示し、酵母 two-hybrid 法を用いてエストロゲン様活性または抗エストロゲン活性を示すことを明らかにした。PAH 類のいくつかは AhR に結合し、Cytochrome P450 (CYP) を誘導する。PAH は誘導された CYP のうち、特に CYP1A1 によって代謝され OHPAH になることが知られている。したがって、体内で CYP1A1 により代謝された PAH 類が内分泌かく乱化学物質の本体である可能性が高い。しかも、OHPAH に加えて PAH キノン体 (PAHQ) も同様に抗エストロゲン活性を示すことを見出し、これら OHPAH と PAHQ の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た。従って、構造活性相関を解析すれば、その構造パラメータから内分泌かく乱活性の有無を推定でき、一次スクリーニング法を確立できるのではないかと考えた。

エクソンバルディーズ号の事故では、原油汚染海水で孵化した稚魚に脊柱彎曲が観察され、日本海ロシアタンカー事故でも、重油汚染海水で孵化した稚魚に脊柱彎曲が観察されている。そこで本研究では、特に魚の骨代謝に焦点を絞り、魚の骨と構造や代謝が共通する魚類のウロコに注目した。ウロコは破骨細胞と骨芽細胞が共存し、ヒトと同様の細胞構造と活性を持つ。さらに再生ウロコは骨芽細胞と破骨細胞のいずれの活性も高い。そこで、再生ウロコを用いた化学物質の高感度な毒性評価システムを構築し、OHPAH 類が毒性の本体である可能性が高いことを見出した。さらに、魚の受精卵についても、OHPAH 類が強い毒性を示し、酵母 two-hybrid 法の評価結果と相関することがわかった。そこで、二次スクリーニングとして、魚ウロコや受精卵を用いれば、より動物に近い系で化学物質の毒性評価が可能になると考えた。

さらに本研究では、開発する毒性評価システ

ムの対象となる PAH 類の環境汚染に関する基礎データとして、東アジアにおける大気中 PAH 類の輸送に関する把握を行った。

一方、PAH 類は誘導体なども含めると、非常に多種存在し、それらの多くが発癌性や変異原性等の有害性を有する。そのため、曝露量や健康リスクを評価するためには、水、大気などの環境中の微量の PAH 類を網羅的に且つ精確に定量する高度な測定技術力が要求されている。ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) 等を用いる PAH 類測定の一連の分析操作過程には、試料採取、試料調製、標準物質の入手、検量線作成、定量分析があり、これらのすべての過程が精確に行われなければ、得られた定量分析値の信頼性は確保できない。標準物質に関しては、純度や含量が精確に値付けられた標準品の入手が可能、あるいは、入手した標準品の純度の確証が重要である。しかし実際は、計量学的に純度が証明された標準物質はほとんど流通していない。本研究では、これまでに開発した定量核磁気共鳴法 (定量 NMR: quantitative NMR (qNMR)) を応用し、水酸化 PAH 市販試薬製品の純度値を測定し、純度のズレが少なからず定量値の誤差となっていることを明らかにした。そこで、精確な PAH 類の定量分析が可能な普遍的な検量線を作成し、迅速且つ網羅的な定量的スクリーニングが可能で、国際単位系 (SI) へのトレーサビリティを確保し、分析の一連の不確かさを明示することが可能な自動定量分析法の方法論の開発を試みた。すなわち、PAH の市販試薬製品について、qNMR を用いた計量学的に信頼性の高い純度値を求めた。また、昨年度構築した複数の内標準物質 (Internal Standard: IS) 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) が GC/MS データベース構築に応用可能と考えられたため、定量分析値の信

頼性の更なる向上を目指し、測定誤差を消去し、且つ、迅速、精確、網羅的な多次元データベースを用いた定量分析法 (Multi Dimensional Property Database - MICO - quantitative GC/MS (MDPD-MICO-qGC/MS)) を開発した。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

主な被検化合物は、2~6 環の USEPA 指定 16 PAH のうち蛍光特性を有する 15 化合物、その水酸化体 (OHPAH) 合計 65 化合物、PAH のキノン体 (PAHQ) 20 化合物、PAH のケトン体 (PAHK) 9 化合物とした。さらに、ビスフェノール A (BPA) 及びノニルフェノール (NP) も被検化合物とした。化合物の名称と略称、構造を Fig. 1, 2 に示した。

### 2. 酵母two-hybrid法を用いたエストロゲン様及び抗エストロゲン活性の測定

エストロゲン様及び抗エストロゲン活性の評価は ER リガンド結合ドメイン GAL4 の DNA 結合領域 (GAL4-DBD) と hER $\alpha$  の融合蛋白を産生するプラスミドと、GAL4 の転写活性化領域 (GAL4-AD) と ER のコアクチベーターである TIF2 の融合蛋白を産生するプラスミドを導入した *Saccharomyces cerevisia* Y190 株 (Y190ER) を用いた。細胞毒性の評価はコントロールベクター (pGBKT7-53 及び pGADT7-T) を導入した *Saccharomyces cerevisia* Y190 株 (以下 Y190p53-SV40LT) を用いた。エストロゲン様活性の評価では試料溶液による単独処理時の吸光度を、陽性対照である 100 nM E<sub>2</sub> 処理時の吸光度と比較した。抗エストロゲン活性及び細胞毒性の評価では試料溶液と共に 1 nM E<sub>2</sub> を添加し、同様の操作を行った。陽性対象としてエ



ストロゲン様活性評価には  $E_2$  100 nM を、抗エストロゲン活性評価には  $E_2$  1 nM を用いた。尚、酵母 two-hybrid アッセイ法を用いてエストロゲン様及び抗エストロゲン活性を測定する場合、化学物質の毒性がその評価の妨げとなる。抗エストロゲン活性の測定においては、 $E_2$  による  $\beta$ -galactosidase 誘導の活性の低下が試験物質のアンタゴニスト活性によるものか、酵母への毒性によるものかは区別することができない。そこで恒常的に  $\beta$ -galactosidase を発現する酵母を用いて、 $\beta$ -galactosidase 活性の低下が 10%以内となるときの影響が無いと判断した。

### 3. 構造－活性相関解析

最初に、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、半経験的分子軌道法である PM3 法を用いて、被検化合物の構造最適化及び物理化学的特性（環数、長軸長/短軸長比、水酸基等の官能基と最遠水素との間の距離、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、得られた結果と活性との関係を考察した。さらに計算化学統合プラットフォーム SCIGRESS を用いて分子力場計算 (MM3) を行い、次いで半経験的分子軌道計算 (PM3) により構造最適化後 14 種のパラメータ（双極子モーメント、電子親和性、生成熱、イオン化ポテンシャル、log P、polarizability、部分電荷、L/B 値など）の計算を行い、相対エストロゲン様活性 ( $REP_E$ )、相対抗エストロゲン活性 ( $REP_{AE}$ )、相対結合活性 (RBA)、活性酸素種 (ROS) 産生作用、consumption of SH group との相関を検討した。更に分子構造や物理化学的特性、活性値などのデータを可視化・解析するソフトウェア CIMPL を用いてフラグメント QSAR 解析 (QFAR) と SAL 解析を行い、活性発現におい

て重要な役割を果たしているフラグメント構造の抽出を行った。

### 4. キンギョを用いた実験 (in vivo)

一度ウロコを抜いたキンギョから麻酔下で再生ウロコを採取した。破骨細胞活性マーカーとして酒石酸耐性酸ホフターゼ (TRAP) の活性を、p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを基質として、pH 5.3 の酸性酒石酸緩衝液中で生成する p-ニトロフェノールを 405 nm で吸光度を測定することによって求めた。骨芽細胞活性マーカーとしてアルカリホフターゼ (ALP) の活性を、p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを基質として、pH 9.5 の 100 mM トリス・塩酸緩衝液) を酸性酒石酸緩衝液中で生成する p-ニトロフェノールを同様に測定することによって求めた。ウロコの面積は、メチレンブルー染色を施してイメージスキャナーにより自動測定した。細胞毒性は、テトラゾリウム塩を発色基質とする細胞内脱水素酵素の活性を生成するホルマザンの 450 nm の吸光度から測定する生細胞数測定から計算した。また、再生ウロコからキアゲンのキットにより mRNA を抽出し、cDNA を合成した。

一方、ウロコを抜いたキンギョの腹腔内に BaA 及び BcP をそれぞれ 0.1 ng/g、3 日おきに投与し、25°C でキンギョを飼育して 12 日目と 18 日目に再生ウロコを採取した。対照群としてエタノールを投与した。18 日目に再生ウロコを採取した後、胆汁も採取した。キンギョ 2 匹分の胆のうをすりつぶし、それを acetate buffer (0.5 M, pH5) で懸濁し、 $\beta$ -グルクロニダーゼ/サルファターゼ処理した。内部標準物質 (6-Hydroxychrysene- $^{13}C_6$  : 6-OHCh- $^{13}C_6$ ) を添加し、N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) + 1% Trimethylchlorosilane (TMCS)

で誘導体化し、GC-MS/MS (Thermo Fisher Scientific) で測定した。

## 5. メダカの実験

メダカの卵はメスの腹部から取り外し、受精後 8 時間の正常な受精卵だけを用いた。一方、アルミノシリケートキャピラリーカラム (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) をシリコン処理し、先端に 30° の斜角をつけた。このキャピラリーカラムにマイクロローディングフェムトチップ (Eppendorf, Madison, WI, USA) で PAH 類をキャピラリーカラムに付加した。マイクロマニピュレーター (MN-151; Narishige, Tokyo, Japan) を用いて、 $10^{-10}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-8}$  M の Benz[a]anthracene (BaA)、4-Hydroxybenz[a]anthracene (4-OHBaA) および Benzo[c]phenanthrene (BcP)、3-Hydroxybenzo[c]phenanthrene (3-OHBcP) を各々 0.5 nL ずつ受精卵に投与した。対照群には、PAH 無添加のトリオレイン (vehicle control) を投与した。投与後の卵は ERM (人工培地) に入れ、27°C で培養し、定期的に実体顕微鏡で卵を観察した。

## 6. 純度測定

NMR は JNM-ECA (600 MHz, 日本電子株式会社(現: 株式会社 JEOL RESONANCE))、qNMR および qNMR 多変量解析のケミカルシフト値は、BTMSB を基準シグナル (0 ppm) とし、 $\delta$  値を ppm 単位で表した。GC/MS は Shimadzu GCMS-QP2010 Plus (島津製作所株式会社) を用いた。測定試薬の秤量はウルトラマイクロ天秤 XP2U (メトラートレド株式会社) を用い、最小目盛 0.0001 mg まで読み取った。qNMR による純度測定には市販標準品または試薬 9 製品を、MDPD には PAH 18 種混合標準液 (AccuStandard,

Cat. No. M-610-QC-FL) を用いた。qNMR の基準物質には、高純度ヘキサメチルジシラン (hexamethyldisilane: HMD) (和光純薬工業(株)特注品) または認証標準物質である 1,4-Bis(trimethylsilyl)benzene- $d_4$  (1,4-BTMSB- $d_4$ , 和光純薬工業株式会社) を、HMD または 1,4-BTMSB- $d_4$  の校正には 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) を使用した。重アセトン (acetone- $d_6$ ) は、Isotec 製 (99.9 atom %D) を用いた。qNMR 標準液の調製および標準液中の HMD または 1,4-BTMSB- $d_4$  の濃度校正は既報に準じた。PAH の純度決定は PAH 標準品を精密に量り取り、qNMR 標準液に溶解し、NMR 試験管に封入し、qNMR 測定条件に最適化した NMR 装置に付し、HMD または 1,4-BTMSB- $d_4$  のシグナル強度面積、PAH に由来するそれぞれの特定シグナルの相対面積、分子量、濃度等を式(1) に代入し、PAH の純度を算出した。この一連の操作を 3 試行し、各シグナルより算出された純度値の平均を最終的に PAH の純度値として表した。なお、qNMR データ解析は、得られた Free Induction Decay (FID) 信号データを定量解析ソフトに導入して自動処理した。

$$P_{PAH} = \frac{I_{PAH} / H_{PAH}}{I_{STD} / H_{STD}} \times \frac{M_{PAH} / W_{PAH}}{M_{STD} / W_{STD}} \times 100 \quad \text{--- (1)}$$
$$P_{PAH} = \frac{I_{PAH} / H_{PAH}}{I_{BTMSB} / H_{BTMSB}} \times \frac{M_{PAH} / W_{PAH}}{M_{BTMSB} / W_{BTMSB}} \times 100$$

ただし、 $W_{STD}$ ,  $W_{PAH}$  = HMD または 1,4-BTMSB- $d_4$ 、PAH の濃度 (mg/mL)、 $M_{STD}$ ,  $M_{PAH}$  = HMD または 1,4-BTMSB- $d_4$ 、PAH の分子量、 $I_{STD}$ ,  $I_{PAH}$  = HMD または 1,4-BTMSB- $d_4$ 、PAH の特定基のシグナル強度面積、 $H_{STD}$ ,  $H_{PAH}$  = HMD または 1,4-BTMSB- $d_4$ 、PAH の特定基のプロトン数、 $P_{PAH}$  = PAH の純度 (%)。

また、GC/MS は Shimadzu GCMS-QP2010 Plus (島津製作所株式会社) を用いた。GC/MS の IS は 1,4-BTMSB-*d*<sub>4</sub>、DEP 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) の 3 種を選定した。GC/MS の測定条件は以下に記述する。GC/MS 条件: カラム、SGE forte GC Capillary Column BPX-5 (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm); 注入方法、スプリットレス; 注入量、1 μL; インサート、片側テーパーウールあり; キャリヤガス、He; カラム温度、45°C-30°C/min-190°C-2°C/min-200°C-15°C/min-260°C-5°C/min-315°C (10min); イオン化法、EI; イオン化電圧、70 eV; インターフェイス温度、280°C; イオン源温度、300°C; 測定モード、スキャンモード; スキャン範囲 (*m/z*)、50-550。測定前に EPA625 の DFTPP チューニングを行った (1 回/日)。その後、検量線を作成し、検量線を作成した日とは別の日に測定試料の測定を繰り返し、日差変動等を評価した。

## 7. 大気粉じんの捕集と PAH、NPAH 分析

中国東北地方からの冬季季節風の風下に位置する能登大気観測ステーション (石川県能登半島先端) において、大気浮遊粉塵をハイボリュームエアースンプラーで連続捕集した。フィルターは 1 週間毎に交換した。

フィルターを秤量後、PAH、NPAH を有機溶媒で抽出し、さらに精製した。試料中の PAH、NPAH をそれぞれ HPLC 蛍光検出法、HPLC 化学発光検出法を用いて測定し、PAH、NPAH の大気中濃度の季節変動を明らかにした。さらに、中国東北地方の都市 (瀋陽市) 及び金沢市の大気試料塵の PAH、NPAH 測定結果と季節変動パターン及び濃度、組成を比較し、さらに能登大気観測ステーションで捕集された空気塊の後

方流跡線を解析することによって、PAH、NPAH の長距離輸送の実態を明らかにした。

## C. D. 結果・考察

### 1. 酵母 two-hybrid 法を用いた PAH と OHPAH、PAHQ、PAHK のエストロゲン様及び抗エストロゲン活性

PAH と OHPAH の hER $\alpha$  におけるエストロゲン様及び抗エストロゲン活性を測定した結果、PAH はエストロゲン様及び抗エストロゲン活性を示さないが、OHPAH のいくつかは活性を示した。さらに、活性の強さは OHPAH を構成するベンゼン環の数によって異なる傾向が見られた。4 環構造を持つ OHPAH については、多くの化合物がエストロゲン様活性/抗エストロゲン活性を示し、その強さは 2、3 環構造の化合物よりも強かった。その中でも BaA 及び Chr のモノヒドロキシ体 (4-OHBaA、10-OH BaA、1-OHCh、2-OH Ch、3-OHCh) は強いエストロゲン様活性を、BaA 及び Chr、BcPh のモノヒドロキシ体 (2-OHBaA、9-OHBaA、2-OHCh、6-OHCh、2-OHBcPh、3-OHBcPh、4-OHBcPh) は強い抗エストロゲン活性を示した。特に 3-OHBcP は ER へのアンタゴニストと知られている 4-OHT よりも強い抗エストロゲン活性を示した。5 環構造を持つ OHPAH については、OHBbFR のうち 10-OHBbFR のみ抗エストロゲン活性を示した。11-OHBgCh と 13-OHBgCh は強い抗エストロゲン活性を示し、特に 11-OHBgCh は 5 環構造 OHPAH の中では最も強い活性を示した。一方、6 環構造を持つ OHIDP はいずれの活性もほとんど示さなかった。5、6 環構造の活性の強さは、全体的に 4 環構造の OHPAH よりも弱かった。

20 種の PAHQ のうち、11 種 (1,4-PQ、1,2-CQ、1,4-CQ、5,6-CQ、BcP-5,6-Q、BeP-5,6-Q、BaP-1,6-Q、BaP-4,5-Q、BaP-7,8-Q、BaP7,10-Q、BaP-11,12-Q)

が活性を示した。特に 1,2-CQ、1,4-CQ、5,6-CQ、BaP-7,8-Q は強い抗エストロゲン活性を示し、5 環構造を有する PAHQ にも強い抗エストロゲン活性があることがわかった。PAHQ と PAHK のエストロゲン様活性の測定した結果、20 種の PAHQ のうち 3 種(1,2-CQ、BaP-3,6-Q、BaP-7,8-Q) が活性を示したが、これらの活性は弱かった。

酵母 two-hybrid 法によって得られた PAH 及び OHPAH、PAHQ の活性測定の結果から、母核構造の PAH は全て活性を示さず、OHPAH と PAHQ の中に活性を示すものがあったことから、活性が認められた被検化合物について分子構造との関係を考察した。まず、PAH と OHPAH を比較すると、第一にフェノール性水酸基の存在は活性発現に必須である。次に、2~6 環構造を有する OHPAH のうち、3~5 環構造の化合物にエストロゲン様または抗エストロゲン活性が認められ、特に 4 環構造の化合物の活性は強かった。しかし、同じ環数を有しても活性の種類やその強さは全く異なり、環数のみで活性の有無を説明することはできない。また、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、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、オルト位がかさ高いとその活性が減弱することが報告されている。しかしながら、酵母 two-hybrid 法によって得られた OHPAH の測定結果より、オルト位の炭素が縮合にあずかる OHPAH の中でも 0.5 以上の相対活性値を示す化合物があることから、この条件でも活性の有無の説明には不十分である。この原因として、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とが活性の発現に関与していることが考えられた。

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。また、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、オルト位がかさ高いとその活性が減弱すると報告されている。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 つのパラメータを用いた。まず、母核構造の違いを表すパラメータとして Length-to-breadth ratio (L/B 比)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書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。一方、水酸基の位置の違いを表すパラメータとして 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。

強いエストロゲン様または抗エストロゲン活性を示す OHPAH モノヒドロキシ体の O-H distance は 8 ~ 12 Å であった。この範囲は 17β-エストラジオール (E2) 及びジエチルスチルベストロール (DES) の O-O distance (10.965 Å 及び 12.034 Å) と類似しており、これが活性を強く発現する原因の一つであることが考えられた。一方、いくつかの PAHQ にも比較的強い抗エストロゲン活性が認められたことは、その活性発現にはフェノール性水酸基は必須ではないことを示唆している。そこで、PAHQ についても L/B 比と O-H distance を求めて考察した。尚、PAHQ の 2 つあるカルボニル基のうち、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。エストロゲン様活性を示した 3 種の PAHQ は L/B 比が 1.32 ~ 1.80、O-H distance が 10.290 ~ 11.519 Å の狭い範囲に存在

した。この O-H distance の範囲は E<sub>2</sub> の値 (11.185 / 11.695 Å) に近似しており、これが活性を発現する要因の一つであることが考えられた。

以上の結果を総合すると、強いエストロゲン様/抗エストロゲン活性を示す OHPAH は、E<sub>2</sub> との構造類似が示されたことより、E<sub>2</sub> とエストロゲン受容体の結合の様に、OHPAH の水酸基がエストロゲン受容体の Glu353 残基及び Arg394 残基と水素結合を形成するとともに、OHPAH の芳香環と Phe404 の芳香環の間に van der Waals 力が働くことが推定された (Fig. 3)。一方、比較的強い抗エストロゲン活性を有する PAHQ については、やはりエストロゲン受容体の Glu353 残基及び Arg394 残基と水素結合を形成すると考えられる。さらに、PAHQ の芳香環と Phe404 の芳香環の間に van der Waals 力が働く。これらの相互作用によって、PAHQ が E<sub>2</sub> と類似の結合を生成する考えられた。

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。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。

分子内の電子密度の偏りが活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。エストロゲン様活性を示した PAHQ の双極子モーメントは 4.909 ~ 5.556 debye の狭い範囲であったが、E<sub>2</sub> の値 (1.44 debye) は範囲外であり、活性発現の要因は得られなかった。これまでに、hER $\alpha$  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) との間にある一定範囲内において比例関係の成立が報告されている。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。エストロゲン様活性を示した PAHQ の log P 値は 3.462 ~ 3.782 の狭い範囲に存在し、抗エストロゲン活性を示した PAHQ の log P 値は 2.459 ~ 3.782 の比較的狭い範囲に存在した。E<sub>2</sub> の値 (4.008) に近づくほど活性が強くなり、活性を示す割合が多くなることが示唆された。

以上のことから、エストロゲン受容体に作用する化学物質の物理化学的特性に基づく一次スクリーニングの要件として、①PAH の官能基 (OHPAH 若しくは PAHQ)、②環数、③L/B 比、④O-H distance を選択することができると考えられた。ヒトのエストロゲン受容体 (hER)  $\alpha$ 、 $\beta$  タイプに対して、二次スクリーニングに適用を検討しているキンギョの再生ウロコ系では  $\beta$  タイプが多く発現していることから、受容体の結合・作用部位のアミノ酸配列が異なることが推定される。従って、作用の発現様式 (アゴニストまたはアンタゴニスト) などに違いが生じる可能性を考慮する必要がある。

## 2. キンギョウロコの再生に及ぼす OHPAH 類の影響 (*in vivo*)

BaA 及び BcP を投与後 12 日目の再生ウロコを再生前のウロコと比較すると、両投与群ともウロコの再生が抑制され、特に BcP の作用が強かった。さらに、12 日目の再生ウロコの骨芽細胞活性は両投与群供に変化がみられなかったが、破骨細胞活性は両投与群ともに有意に上昇した (Fig. 4)。一方、BaA 投与キンギョの胆汁中から 4-OHBaA を同定した。また BcP 投与キンギョの胆汁中からも、3-OHBcP、

4-Hydroxybenzo[*c*]phenanthrene (4-OHBcP)、5-Hydroxybenzo[*c*]phenanthrene (5-OHBcP) を検出し、それぞれの濃度は  $7.4 \times 10^{-10}$  M、 $5.8 \times 10^{-10}$  M、 $8.9 \times 10^{-10}$  M と計算された。

以上の結果は、PAH 類若しくはその代謝物が破骨細胞を活性化して、ウロコの再生をかく乱する可能性を示唆する。*in vitro* 評価系において、骨芽細胞で発現して、破骨細胞を活性化する遺伝子が、4-OHBaA により活性化することが、昨年度分かった。したがって、OHPAH が毒物の本体であり、骨の細胞に作用して魚の骨代謝を攪乱している可能性が高い。また BaA を投与したキングヨの胆汁中から 4-OHBaA、さらに、BcP を投与したキングヨの胆汁中から 3-OHBcP、4-OHBcP、5-OHBcP が検出されたた事は、体内で PAH から CYP によって代謝生成した OHPAH がウロコの再生 (骨形成) をかく乱する可能性を示す。

### 3. メダカ受精卵に及ぼす PAH 類の影響

卵の致死率は、PAH 及び OHPAH の両投与群共に対照群より高く、特に 4-OHBaA は  $10^{-10}$  M という低濃度でも影響を及ぼした (Fig. 5)。卵の孵化率は、両投与群共に対照群より悪く、その傾向は OHPAH 群の方が PAH 投与群より強かった。さらに、両投与群とも孵化を遅延し、眼の発達異常や、卵黄の委縮などの発達障害を引き起こしていた。メダカの胚には代謝酵素である CYP とエストロゲン受容体が存在している事実に基づくと、メダカ体内で PAH から生じた OHPAH がエストロゲン受容体を通して、胚発生を攪乱させた可能性がある。

### 4. PAH 類の毒性作用と構造活性相関

PAH 誘導体 (水酸化体 (OHPAH) 64 種、ケ

トン体 (PAHK) 及びキノン体 (PAHQ) 27 種) のエストロゲン様/抗エストロゲン作用について調べた結果、OHPAH の中に特に強いエストロゲン様/抗エストロゲン作用を示す化合物が存在し、これらは 4 環構造から成る化合物であり、さらに、受容体との結合親和性とも相関した結果を示した。また、これら活性作用を示す化合物について、分子上の構造特異性を示す L/B 比 (長軸 L と短軸 B の比; 母核構造の違いを表す) 及び O-H distance (水酸基及びケトン基の位置の違いを表す) の 2 つのパラメータを測定した結果、各パラメータの値は一定の範囲に存在することが分かった。そして、これら強い活性作用を示す OHPAH が ER アゴニスト化合物として知られる E2 と類似した構造であることより、エストロゲン様活性物質の受容体との結合作用機序について検討した結果、これらは ER の binding pocket 内で水素結合やファンデルワールス力などによりアミノ酸と共有結合を形成する作用機序が推定された。一方、抗エストロゲン作用を示した PAHQ に関しては、受容体との高い親和性を有しており、エストロゲンと競合してアンタゴニスト作用を示すものと考えられた。さらに、この様な構造活性相関が示されたことで、今後、毒性作用が明らかでない未知化合物についての活性化作用の予測も可能となることが推察された。次に、PAHQ に特有な ROS 産生作用について、各種 PAHQ が示す活性作用について検討した。本研究では、2~4 環のベンゼン環で構成される PAHQ を対象とし、レドックスサイクルにおけるいくつかのエンドポイントについて評価を行った。その結果、特に 1,2-NQ、9,10-PQ、5,6-CQ、B[*c*]P-5,6-Q 等のオルト (*o*-) PAHQ が強い ROS 産生作用を示すことが明らかとなった。これらは、実際、環境及び生体中からも検出される化合物であることや、大気粉塵試料が ROS 産生作用を示す

こと等を考慮すると、これら *o*-PAHQ は、ROS 産生作用を通じて生体に悪影響を及ぼす可能性を秘めた重要な物質であることが示唆された。

上述した構造パラメータを含めて 14 種のパラメータについて活性との相関を見たところ、4 つのパラメータ（生成熱、イオン化ポテンシャル、log P、分極率）に明確な相関が認められた。生成熱では 40~60 kcal/mol に、イオン化ポテンシャルでは -8.5~-9.0 eV に、log P では 3.5~4.0 に、分極率では 25~35 Å に強い活性が認められた。分子構造の類似度に基づいてクラスタリングを行うと 3 つのグループ（第一クラスター~第三クラスター）に分かれた。第一クラスターに活性を持つものが集まる傾向が認められた。これらのうち、活性値が示されているものについてフラグメント QSAR（QFAR）を実行した。実測値 (actual) と予測値 (calculated) の相関 ( $R^2 = 0.990$ ) は極めて良かった。さらに第一クラスターに属する分子のうち、活性値を持つもの 37 種について SAL 解析を行ったところ、RBA 活性においては、末端が *p*-キノン構造となっているものに高い活性が認められた、REP<sub>AE</sub> では真ん中よりの環に *o*-キノン構造を持つものにも活性が認められた。

## 5. qNMR による PAH の純度決定

qNMR を用いて、PAH の市販試薬製品の純度値を測定した。qNMR スペクトル上に観察された基準物質 BTMSB および PAH に由来する各シグナル面積、水素数、濃度等を関係式(2) に代入し、それぞれの純度値を算出した。定量に用いた各シグナルおよびそれぞれのシグナルより算出された純度値の平均 (シグナル間 Ave.) を PAH の純度値として表した (Table 1)。その結果、Anthracene 98.3% (シグナル間 RSD 0.2%)、

Fluoranthene 99.1% (0.4%)、Benz[*a*]anthracene 95.2% (0.6%)、Benzo[*b*]fluoranthene 99.1% (0.6%)、Benzo[*k*]fluoranthene 98.3% (0.5%)、Benzo[*a*]pyrene 90.2% (0.9%)、Indeno[1,2,3-*cd*]pyrene 90.1% (1.0%)、Dibenz[*a,h*]anthracene 95.7% (0.2%)、Benzo[*g,h,i*]perylene 81.0% (0.2%) の純度値を与えた。製品によりその純度値は大きく異なり、 $81.0 \pm 0.2 \sim 99.1 \pm 0.6$  % (Ave.  $\pm$  RSD) の幅があることがわかった。また、試薬製品に記載されていたクロマトグラフィーを用いた面積百分率による純度値と比較した (Table 2)。qNMR により得られた純度値 (n = 3 Ave.) が 95.3% の Benz[*a*]anthracene、76.1% の Benzo[*g,h,i*]perylene については、製品に純度値の記載がなかったが、仮にこれらの純度を 100% として定量用標準品の代用とし、検量線を作成し定量分析を行ったとすると、得られる定量値は 4.7 および 23.9% の誤差を生じることになることが示唆された。

クロマトグラフィーは、相対ピーク面積比から定量する相対分析法であることから、分析値の信頼性確保や精度管理には、分析対象の標準物質の純度が精確に値付けられていることが不可欠である。そのため、濃度が値付けされた標準物質の使用が必須となりつつあるが、すべての化合物に対して、値付けされた標準物質を供給・入手することは現状では困難である。標準物質として代用に用いられる市販試薬や市販標準品を定量用標準品は、科学的な根拠に基づく純度の証明がほとんどの場合なされていないという問題がある。そのため、これらを用いて定量値を求めたとしても、現状では、SI へのトレーサビリティの確保は不可能である。

我々はこれまでに、定量値の信頼性を飛躍的に向上させるため、標準物質に対しては、NMR を用いた SI にトレーサブルな定量分析法 qNMR を開発した。この qNMR および qGC/MS

の情報を組み合わせ、測定対象化合物に関する多次元情報 (純度、NMR スペクトル、保持時間、検量線情報、MS スペクトル等) による総合的なデジタルデータベース MDPD を構築することで、これを参照することによって、上述の問題を解消し、測定対象の SI トレーサビリティが確保された精度の高い迅速定量分析法の確立が可能と考えた。そこで、本測定で得られた PAH の純度および NMR スペクトル等の化合物情報についても、MDPD に追加し、データの拡充を進めた。

結果として、複数の IS やチューニング結果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 MICO を考案し、PAH 18 種について、多次元データベースに MICO を適用した定量分析法 MDPD-MICO-qGC/MS を構築した。具体的には、検量線を作成するための標準試料は、PAH を 18 種混合した標準液と内標準物質を 3 種混合した標準液を作製し、それぞれマイクロシリンジで精密にはかり、アセトンで定容した。PAH の検量線は、各内標準物質との相対比により作成した。すなわち、1 被検物質あたり、3 本の検量線を作成してデータベースに登録した。これを用いて定量値を算出したところ、想定濃度と定量値 (日の異なる 5 回の試行の平均) がよく一致した。また、日の異なる 5 回の試行の相対標準偏差 (RSD) も小さく、定量値が想定濃度の 20% 以内と精確に定量できた測定は 18 種を 5 回試行した計 90 測定のうち 93.3% であった。この結果は、一度標準物質を用いて検量線を作成し、これをデジタルデータ化することにより、MDPD-MICO-qGC/MS が高い分析精度を実現できることを示している。化合物の多次元情報をデジタル登録する際には時間がかかるものの、一旦登録した測定対象化合物については、再度検量線作成を必要とせず、すなわち、測定対象

と同一の標準物質を用いることなく、迅速且つ網羅的な定量分析を可能とする方法とした。

#### 6. 能登半島先端で連続捕集した大気試料を用いた PAH、NPAH 長距離輸送の解析

PAH については 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。能登大気観測ステーションの大気中 PAH の濃度は、いずれも 10 月中旬から上昇し翌年の 4 月中旬まで高濃度を維持し、その後低下した。その濃度レベルの差は 10 倍以上であった。この季節変動は毎年繰り返した。10 月中旬から 4 月中旬は、中国国内で石炭を暖房施設で使用する期間に一致する。PAH 組成の比較を行うと、冬季 (10 月中旬～4 月中旬) で PAH 濃度が高かった時の能登大気観測ステーションの大気組成は同季節の瀋陽市の大気組成と近似したが、金沢市の大気組成とは異なっていた。また、能登大気観測ステーションで捕集したこの時期の大気塊の後方流跡線は 2、3 日前に中国東北地方を通過していたが、それ以外の季節の大気塊は日本国内か日本海周辺を通過し、中国東北地方は通過しなかった。さらに、冬季の能登大気観測ステーションの大気中 PAH 濃度は、同時期の瀋陽市の濃度の 1/100～1/300、金沢市の 1/10 以下であった。

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。しかし、能登大気観測ステーションで大気粉塵を 1 週間捕集したフィルターの 1/4 を用いても、従来の HPLC 化学発光検出法では感度が不十分で、夏季の試料について 1-Nitropyrene だけでなく 2-Nitrofluoranthene や 2-Nitropyrene なども定量



することは困難であった。そこで、フィルターの使用面積を 1/2 に増やし、さらに前処理方法を改良して定量下限の改善を図り、これを可能とした。本法を用いて、能登大気観測ステーションで連続捕集した大気試料の NPAH を定量した結果、いずれの NPAH も PAH と同様に 10 月中旬から上昇し翌年の 4 月中旬まで高濃度を維持し、その後低下する季節変動を繰り返していることが初めて明らかになった。また、NPAH の組成分析の結果も、PAH と同様に瀋陽市の大気組成に近似し、金沢市の大気組成とは異なっていた。以上より、冬季に中国東北地方で大量に生成した PAH、NPAH の一部は、日本まで長距離輸送されていることが明らかになった。またこの間に日本海に負荷する可能性も考えられた。

## E. 結論

酵母 two-hybrid アッセイ法により PAH15 種、OHPAH 65 種、PAHQ 20 種、PAHK 9 種のエストロゲン様及び抗エストロゲン活性を測定した結果、PAH と PAHK はいずれの活性も示さなかったが、PAHQ のいくつかはエストロゲン様及び抗エストロゲン活性を示した。強い活性を示す OHPAH と PAHQ は、環数、L/B 比及び O-H distance の構造パラメータが E2 の値と近い狭い範囲にあり、構造活性相関のあることが明らかになった。即ち、エストロゲン受容体に作用する化学物質の物理化学的特性に基づく一次スクリーニングとして、①PAH の官能基 (OHPAH 若しくは PAHQ)、②環数、③L/B 比、④O-H distance を選択できると考えられた。酵母 two-hybrid 法でエストロゲン様活性を示した 4-OHBaA は、魚の再生ウロコを用いた系で骨芽細胞及び破骨細胞の活性を上昇させた。

魚のウロコではエストロゲン受容体  $\beta$  タイプが多く発現しており、ヒトとの違いがあるが、PAH がキンギョのウロコ再生を抑制したこと、キンギョの体内で OHPAH に代謝されたこと、及びメダカの胚で OHPAH に毒性がみられた事実は、OHPAH が毒物の本体である可能性が高いことを示している。

活性 (ROS, consumption of SH group、 $REP_E$ 、 $REP_{AE}$ 、RBA) と構造パラメータとの相関について調べた結果、 $REP_E$ 、 $REP_{AE}$ 、RBA については 1 次スクリーニングのために利用可能な 4 つのパラメータ (生成熱、イオン化ポテンシャル、log P、分極率) を抽出できた。

PAH の分析法については、純度、NMR スペクトル、保持時間、検量線情報、MS スペクトル等一連の分析操作で重要な多次元情報を得て、デジタルデータベース化することにより、標準物質を用いることなく、より精確な定量分析が可能な新規分析法を構築することができた。

PAH や NPAH は東アジアにおける主要な大気汚染物質であり、今年度は、中国で冬季に大量に生成したこれらの一部が長距離輸送されて、我が国に到達していることが明らかになった。しかも PAH は NPAH だけでなく、内分泌かく乱作用や活性酸素種の過剰産生作用を有する OHPAH や PAHQ などの PAH 誘導体へと姿を変えて人類の健康を脅かす危険性がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Miller-Schlze, J. P., Toriba, A., Tang, N., Hayakawa, K., Tamura, K., Dong, L., Simpson, C. D.: Exposures to particulate air pollution and nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons amongst taxi drivers in Shenyang, China.

- Environ Sci. Technol.*, 44 (1), 216-221 (2010).
- 2) Yang, X.-Y., Igarashi, K., Tang, N., Lin, J.-M., Wang, W., Kameda, T., Toriba, A., Hayakawa, K.: Indirect- and direct-acting mutagenicity of diesel, coal and wood burning-derived particulates and contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Res.*, 695, 29-34 (2010).
  - 3) Kishida, M., Imamura, K., Kameda, T., Hayakawa, K., Bandow, H.: Determination of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere using gas chromatograph-mass spectrometer. *J. Environ. Chem.*, 20 (2), 173-181 (2010).
  - 4) Chujo, S., Okamoto, S., Sunahara, R., Hayashi, H., Takii, T., Hayakawa, K., Onozaki, K.: Cigarette smoke condensate extracts augment collagen-induced arthritis in mice" has been accepted for publication. *Int. Immunopharmacol.*, 10, 1194-1199 (2010).
  - 5) Kameda, T., Akiyama, A., Toriba, A., Tang, N., Hayakawa, K.: Determination of particle-associated hydroxynitropyrenes with correction for chemical degradation on a quartz fibre filter during high volume air sampling. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 90 (13), 976-987 (2010).
  - 6) Hayakawa, K., Suzuki, N., Kitamura, K., Bekki, K., Nakano, J., Yoshita, M., Toriba, A., Kameda, T., Tang, N.: Toxic effect of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites on fish bone metabolism. *Proceedings of Water Pollution X ;WIT Press-abstract*, 231-241 (2010).
  - 7) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀: 定量 NMR を用いた有機化合物の絶対定量法の開発と食品分析の信頼性の確保. *FFI ジャーナル*, 215 (2), 129-136 (2010).
  - 8) 早川和一, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 鈴木信雄: 総説: 多環芳香族炭化水素から見た海洋油汚染, *安全工学*, 50 (2), 85-92 (2011).
  - 9) 戸次加奈江, 滝上英孝, 鈴木 剛, 唐 寧, 鳥羽 陽, 亀田貴之, 早川和一: 中国・北京及び日本・金沢の大気が見せる AhR 活性化作用への PAH 類及びダイオキシン類の寄与. *環境化学*, 21 (1), 27-33 (2011).
  - 10) 片山裕規, 後藤知子, 亀田貴之, 唐 寧, 松木 篤, 鳥羽 陽, 早川和一: 日本および中国における大気粒子中多環芳香族炭化水素キノンの観測—濃度レベルの把握と発生要因の検討—. *大気環境学会誌*, 46, 20-29 (2011).
  - 11) Okamoto, S., Adachi, M., Chujo, S., Yamada, K., Akita, K., Itoh, S., Takii, T., Hayakawa, K., Onozaki, K.: Etiological role of cigarette smoking in rheumatoid arthritis: Nasal exposure to cigarette smoke condensate extracts augments the development of collagen-induced arthritis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 404, 1088-1092 (2011).
  - 12) 北村敬一郎, 中野 淳, 川部季美, 早川和一, 根本 鉄, 大嶋雄治, 島崎洋平, 服部淳彦, 鈴木信雄: 自動面積測定法によるキンギョのウロコを骨のモデルとしたアッセイ法の改良. *日本海域研究*, 42, 27-34 (2011).
  - 13) Suzuki, N., Yachiguchi, K., Hayakawa, K., Omori, K., Takada, K., Tabata, J.M., Kitamura, K., Endo, M., Wada, S., Srivastav, A.K., Chowdhury, V.S., Oshima, Y., Hattori, A.: Effects of inorganic mercury on osteoclasts and osteoblasts of the goldfish scales in vitro. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 56, 47-51 (2011).

- 14) Suzuki, N., Danks, J.A., Maruyama, Y., Sasayama, Y., Hattori, A., Ikegame, M., Nakamura, M., Tabata, M.J., Yamamoto, T., Furuya, R., Saijoh, K., Mishima, H., Srivastav, A.K., Furusawa, Y., Kondo, T., Tabuchi, Y., Takasaki, I., Chowdhury, V.S., Hayakawa, K. Martin T.J.: Parathyroid hormone 1 (1-34) acts on the scales and involves calcium metabolism in goldfish. *Bone*, **48**, 1186-1193 (2011).
- 15) Satone, H., Lee, J.M., Oba, Y., Kusakabe, T., Akahoshi, E., Miki, S., Suzuki, N., Sasayama, Y., Nassef, M., Shimasaki, Y., Kawabata, S., Honjo, T., Oshima, Y., Tributyltin-binding protein type 1, a lipocalin, prevents inhibition of osteoblastic activity by tributyltin in fish scales. *Aquatic Toxicol.*, **103**, 79-84 (2011).
- 16) 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).
- 17) 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).
- 18) 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).
- 19) 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).
- 20) 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).
- 21) 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).
- 22) Kameda, T., Akiyama, A., Toriba, A., Tang, N., Hayakawa, K.: Atmospheric formation of hydroxynitropyrenes from a photochemical reaction of particle-associated 1-nitropyrene. *Environ. Sci. Technol.*, **45** (8), 3325-3332 (2011).
- 23) Hayakawa, K., Bekki, K., Yoshita, M., Tachikawa, C., Kameda, T., Tang, N., Toriba, A., Hosoi, S.: Estrogenic/antiestrogenic activities of quinoid polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Health Sci.*, **57** (3), 274-280 (2011).
- 24) Hayakawa, K., Tang, N., Sato, K., Izaki, A., Tatematsu, M., Hama, H., Li, Y., Kameda, T., Toriba, A.: Development of HPLC determination method for trace levels of 1-, 2-nitropyrenes and 2-nitrofluoranthene in airborne particulates and its application to

- samples collected at Noto Peninsula. *Asian J. Atmos. Environ.*, **5** (3), 146-151 (2011).
- 25) 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).
- 26) 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).
- 27) 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).
- 28) 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).
- 29) 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).
- 30) 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).
- 31) 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).
- 32) 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).
- 33) 田原麻衣子, 杉本直樹, 大槻 崇, 多田敦子, 穂山 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).
- 34) Tang, N., Yoda, Y., Otani, N., Kameda, T., Toriba, A., Hayakawa, K., Shima, M.: Personal and atmospheric concentrations of ozone in southeastern Hyogo prefecture, Japan. *Chem. Pharm. Bull.*, **60** (8), 962-966 (2012).
- 35) Bekki, K., Takigami, H., Suzuki, G., Toriba, A., Tang, N., Kameda, T., Hayakawa, K.: Gene expression changes of phase I and II metabolizing enzymes induced by PAH derivatives. *Polycycl. Aromat. Comp.*, **32**(2), 141-153 (2012).
- 36) Kameda, T., Akiyama, A., Toriba, A., Tang, N.,