

学位論文題名

Xenobiotic metabolizing enzymes as biomarkers for levels of environmental pollution

（環境汚染レベルのバイオマーカーとしての異物代謝酵素）

学位論文内容の要旨

環境汚染物質の多くは異物代謝酵素活性に変動を与えることが知られている。そこで、逆にこれらの酵素活性の変動が環境汚染レベルのバイオマーカーになりうるのではないかと考え以下の実験を行った。

本研究の第一部では、異物代謝酵素活性の変動の特性を調べるため、環境汚染物質への暴露を含む種々のストレスによって異物代謝がどのような影響を受けるか、酵素量や活性の変動を各酵素の分子種レベルでラットを用いて調べた。まず、外来異物の侵入によるストレス以外の要因による異物代謝酵素の変動を調べる目的で、肝部分切除後起こる肝再生時のP450の変動を分子種別に調べた。ラット肝臓におけるシトクロムP450は、肝切除後の肝再生時に、各P450分子種ごとに特異的な挙動を示した。特に雄特異的なP450分子種は蛋白発現量が著しく減少し、その回復は他のP450分子種に比べて遅れることが分かった。次に、外来物質によるストレスとして農薬暴露を選び、P450ならびにグルタチオン抱合酵素（GST）、グルクロン酸抱合酵素、キノン還元酵素の代謝酵素の変動を調べた。イソプロチオランは抗菌剤として、ブタクロール、プレチラクロールは除草剤として、日本国内の水田などで大量に消費されている。いずれの農薬投与ラットの肝臓においても異物代謝酵素の誘導が起こり、その誘導の度合いは各酵素の分子種別に異なることが分かった。

以上から、各ストレスによる異物代謝酵素の変動の程度は与えられたストレスによって、また、代謝酵素の分子種によって異なること、従って異物代謝酵素を指標として環境汚染をモニタリングするためにはいくつかの分子種の変動を調べ、異物代謝全体の変動を把握することが必要であることが分かった。

第二部では実際に野生生物を用いて、異物代謝酵素をバイオマーカーとした環境汚染のモニタリングの可能性を模索した。多くの環境汚染物質は最終的に河川や海洋に集約される。そこで、全国河川に棲息し、食物連鎖では上位に立つモクズガニ（*Eriocheir japonicus*）を対象として実験を行った。

各河川（北海道：茨戸川・尻別川、茨城県：利根川）より採取したモクズガ

ニ肝臓中に蓄積する環境汚染物質のうち、ポリ塩化ダイオキシン(PCDDs)、ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDFs) およびコプラナーポリ塩化ビフェニル(PCBs)、DDTを含む有機塩素系殺虫剤など、有機塩素系化合物の濃度を測定した。PCDD及びPCDFの異性体組成比から、ダイオキシン類の主たる発生源が燃焼活動由来であること、また、茨戸川および尻別川におけるダイオキシン類の汚染がクロロニトロフェンなど農薬に由来するものが含まれている可能性も示唆された。2,3,7,8-PCDD類は利根川より採取したモクズガニの肝臓で最も蓄積していた。総PCBや、DDTなどの有機塩素系殺虫剤は、利根川由来のカニよりも尻別川由来の個体で高濃度を示した。有機塩素系化合物に関してはいずれの個体も検出可能な蓄積濃度を示したことから、疎水性の環境汚染物質を測定する場合、モクズガニの肝臓は測定対象として有効であることが明らかとなった。また、河川水中の多環芳香族類(PAHs)を測定したところ、利根川において最も高い濃度を示した。

モクズガニが実際に環境汚染物質に暴露されることによって異物代謝酵素が変動することを明らかにするため、まず、モクズガニにPAHsの一種である3メチルコラントレン(3MC)を投与し、酵素活性の変動を調べた。モクズガニのP450量及びその薬物代謝活性も3MC投与量に比例して増加した。また、棲息河川水中のPAHs濃度がもっとも高かった利根川から採取したモクズガニが、もっとも高いP450量及び酵素活性を有していたことが明らかとなった。PCDD、PCDF、コプラナーPCB濃度はダイオキシン類毒性等価ファクター(TEF)によって毒性等価値(TEQ)に換算することができる。TEFは、実験動物を用いた研究から、これら各ダイオキシン類の生体に対する毒性や、ダイオキシン類に対する生体応答(P450の誘導など)を考慮して、個々に算出されたものである。PCDD、PCDF、コプラナーPCBの化学分析結果よりTEQ値を計算したところ、TEQ値の高いモクズガニにおいて、肝臓のP450およびGSTは、高活性値を示した。従って、モクズガニの肝臓の異物代謝酵素の変動を指標に平面構造を持つPAH、PCDD、PCDF、コプラナーPCBなどのモニタリングが可能であることが明らかとなった。

以上の研究結果から、モクズガニは、環境中の平面構造を持つ有機塩素系化合物や多環芳香族類をモニターするのに、化学分析の対象として有効であること、哺乳類や魚類に関する研究を元に算出されているTEFは、モクズガニに関しても外挿可能であることが明らかとなった。そして異物代謝酵素の変動は環境汚染レベルのバイオマーカーとして有用であることが示唆された。今後、これまで行われてきた環境、あるいは野生生物中の化学物質の分析に加えて、生体反応を考慮した環境汚染のモニタリングやリスクアセスメントは、ますます重要となると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 田 正 一
副 査 教 授 高 島 郁 夫
副 査 教 授 前 出 吉 光
副 査 助 教 授 数 坂 昭 夫

学 位 論 文 題 名

Xenobiotic metabolizing enzymes as biomarkers for levels of environmental pollution

(環境汚染レベルのバイオマーカーとしての異物代謝酵素)

環境汚染物質の化学分析には膨大な時間、コスト、労力、そして特殊な技術を必要とし、さらに環境中に数多く存在する化学物質の複合汚染や未知の化学物質を考慮した環境リスクアセスメントは難しいことが指摘されてきた。そこで、バイオマーカー、即ち、生体反応の情報によって環境化学物質の暴露に対する影響を評価する研究が注目されている。環境汚染物質の多くは異物代謝酵素活性に変動を与えることが知られており、石塚君は、逆にこれらの酵素活性の変動が環境汚染レベルのバイオマーカーになりうるのではないかと考え、まず、ラットを用いて異物代謝酵素活性の変動の特性を調べ、種々のストレスによる異物代謝酵素の量や活性の変動の程度は与えられたストレスによって、また、代謝酵素の分子種によって異なることを明らかにした。従って異物代謝酵素を指標として環境汚染をモニタリングするためにはいくつかの分子種の変動を調べ、異物代謝全体の変動を把握することが必要であることが分かった。

次に、実際に全国河川に棲息し、河川中の食物連鎖では上位に立つモクズガニを用いて、異物代謝酵素をバイオマーカーとした環境汚染のモニタリングの可能性を模索した。モクズガニが実際に環境汚染物質に暴露されることによって異物代謝酵素が変動することを、汚染物質の投与実験により確認した。さらに、各河川より採取したモクズガニ肝臓中に蓄積する有機塩素系化合物の濃度を測定し、化合物の組成比からその発生源を推測し、モクズガニの肝臓は化学分析の測定対象として有効であることを明らかにした。また化学分析結果及び異物代謝酵素活性測定結果から、平面構造を持つ有機塩素系化合物の蓄積濃度の高いモクズガニにおいては、肝臓の異物代謝酵素が、高活性値を示すことを明らかにし、モクズガニの肝臓の異物代謝酵素の変動を指標に平面構造を持つ多環芳香族や有機塩素系化合物などによる汚染の評価が可能であることを示唆した。

以上の研究結果から、モクズガニは、環境中の平面構造を持つ有機塩素系化合物や多環芳香族類をモニターするのに、化学分析の対象として有効であること、そして異物代謝酵素の変動は環境汚染レベルのバイオマーカーとして有用であることが示唆された。今後、これまで行われてきた環境、あるいは野生生物中の化学物質の分析に加えて、生体反応を考慮した環境汚染のモニタリングやリスクアセスメントは、ますます重要となると考えられ、今回の知見は新しい環境評価システムを考える上で、きわめて示唆に富んだ知見といえる。よって審査員一同は石塚真由美君が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。