

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「内分泌かく乱物質」
研究課題「大気中に存在する新しいタイプの
内分泌攪乱物質」

研究終了報告書

研究期間 平成12年11月～平成17年10月

研究代表者: 武田健
(東京理科大学薬学部、教授)

1 研究実施の概要

自動車排ガスの健康影響に対する人々の関心は、自動車の普及とともに高くなり、1960年代にはすでに排ガス成分の主として呼吸器系疾患へ及ぼす影響が報告されている。一方、自動車排ガスには、ガス成分だけではなく、微粒子成分である浮遊粒子状物質 (SPM: suspended particulate matter) が含まれていることがわかってきた。ガソリン車は、ガス成分の規制も進み、さらに SPM もほとんど排出していない。自動車からの SPM 排出量を車種別に比較すると、ディーゼル車から排出されるディーゼル排ガス中粒子 (DEP: diesel exhaust particle) を 1 とした場合、ガソリン車はほぼ 0 に近いと報告されている。SPM は、自動車からの排出が約 80% を占め、次いで工場からの排出、民生、航空機、船舶の順となっている。さらに、わが国では、都内の貨物車に占めるディーゼル車の割合は 1975 年では 20% 以下であったのに対し、1990 年以降、約 60% にまで増加している。実際、SPM は、1970 年頃をピークに減少したが、1975 年頃からは改善されていない。したがって、大気中 SPM の増加の多くは、ディーゼル車の増加によるディーゼル排ガス (DE: diesel exhaust) 由来の DEP と考えられる。

現在までに世界各地で行われた疫学的研究の成果により、SPM の健康に及ぼす影響としては、呼吸器系、循環器系、免疫系に及ぼす影響が報告されている。一方、我々は、本 CREST 研究の先行研究によって、マウス成獣に DE を 6 カ月まで曝露することで、精子形成障害などの内分泌かく乱作用を示すことを報告している。また、脳神経系には様々なホルモン受容体が発現しており、脳の発達には各種ホルモン受容体の正常な働きが必要である。特にこれらの発現は発達中の脳に著しく、知能の発達や、脳の性分化、性行動の発達に関係している。さらに、これまでに、内分泌攪乱作用を示す化学物質の中に脳神経系へ影響する物質が報告されている。そこで、本研究で我々は、大気中に存在する内分泌かく乱物質として、とくに DE 中に含まれる様々な内分泌かく乱物質を同定し、その作用を分子レベルで解析すること、さらに、恒常性維持に最も重要な役割を果たす、生殖系と脳神経系に着目してそれらへの影響を、病理学的、細胞生物学的および分子生物学的手法を駆使して検討し、最終的には、影響を与える物質の同定を行い、その除去方法の確立を目指した。

1. DEP 中に含まれる内分泌かく乱物質の同定

1.1 抗男性ホルモン作用物質

実際の走行条件に類似した条件下で採取した DEP をベンゼン-エタノール抽出を行い、蒸留・乾固した残渣を抽出物として実験に用いた。ヒト前立腺癌由来で野生型のヒト男性ホルモン受容体 (AR) を発現する PC3/AR 細胞に、男性ホルモン受容体 (AR) の活性化に応答してルシフェラーゼを発現するプラスミド pGLP5Ap5.8 を導入し、DEP 抽出物で処理した細胞のルシフェラーゼ活性 (LUC-AR) を測定し、抗アンドロゲン作用を評価した。さらに、AR に直接作用する化合物を試験する方法である酵母 two-hybrid 法を用いて、抽出物の男性ホルモン様作用/抗男性ホルモン作用を評価した。その結果、DEP 中には抗男性ホルモン作用を有する化合物が含まれており、その一部は AhR アゴニストとして作用する PAH であり、また一部は AR アンタゴニストとして作用する化合物であることが明らかになった。さらに、DEP 中の AR アンタゴニスト成分の検索を行った。DEP 抽出物を各種クロマトグラフィーで分画し、酵母 two-hybrid 法により作用を評価した。その結果、新規な AR アンタゴニストとして 1-ニトロピレンが同定された。さらに 3-ニトロフルオランテンをはじめとする数多くのニトロ PAH に抗男性ホルモン作用が観察されるとともに、AR にも結合した。また、抗男性ホルモン化合物として水酸化フェナンスレン類が同定され、現在、詳細を検討している。以上の結果から、DEP 中の AR アンタゴニスト化合物として、1-ニトロピレンをはじめとするニトロ PAH や水酸化 PAH が重要であることが明らかになった。

1.2 エストロゲンレセプター α (ER α) mRNA 発現抑制作用

1.1 と同様の方法で作成した DEP 抽出物を、マウス精巣由来ライディッチ細胞株である TM3 細胞培養系に添加し、回収した細胞から、定法に従い、RNA 抽出、逆転写後、ER α mRNA の発現量を定量的 PCR 法で解析した。その結果、DEP 抽出物では、ER α mRNA 発現量が低下していた。さらに、DEP 抽出物を詳細に分画してその活性を追跡したところ、中性抽出画分に活性が存在しており、

その分画に含まれる物質として、モノヒドロキシフェナンスレンが推定された。

2. 雄性生殖系への影響

2.1 雄性生殖腺分化過程に及ぼす影響

妊娠マウスに DE を曝露し、胎齢 14 日の雄胎仔への影響を検討した結果、精巣のセルトリ細胞から分泌され雄性生殖系への分化を誘導するミュラー管抑制因子 (MIS: Müllerian inhibiting substance) および核内受容体型転写因子で性ホルモン産生を促進させる Ad4BP/SF-1 (adrenal 4-binding protein/steroidogenic factor 1) mRNA 発現量が有意に減少することが判明し、性腺原基から雄性生殖腺への分化抑制を引き起こす可能性が示唆される結果を得ている。なお、雌胎仔では、卵胞の発生に関与する Bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) の mRNA 発現が有意に減少していた。以上のことから、雌の生殖器発生にも悪影響を及ぼす可能性が示唆された。

2.2 精子形成に及ぼす影響

化学物質の影響は胎仔期曝露による影響が強く出ることがあることから、胎児期曝露の影響を検討している²¹⁾。ICR 系妊娠マウスに妊娠 2 日目から 16 日目までの期間、マウスの活動期である夜間に 1 日 12 時間 (22 時～翌朝 10 時)、1.0 mg DEP/m³ の濃度で曝露を行い、妊娠 17 日目以降は、清浄大気下で出産・飼育した。雄性出生仔を 8, 16 日齢および 3, 4, 5, 12 週齢で麻酔下に心採血し、その後、生殖器 (精巣, 精巣上部, 前立腺, 凝固腺, 精嚢) を摘出して、重量を測定した。また、各臓器をホルマリンで固定後 HE 染色し、光学顕微鏡下に組織学的検討を行なった。DSP は、重量で換算して算出した。また、ELISA 法を用いて血清中総テストステロン濃度を測定した。さらに、精巣におけるテストステロン分泌を調節するホルモンのレセプターおよび T 産生に関与する性ステロイドホルモン合成関連因子の各 mRNA 発現量を定量的 PCR 法で解析した。その結果、胎仔期 DE 曝露では体重が低下し、副生殖腺重量が増加した。また、DSP が低下し、テストステロン値が変動した。さらに、0.30 μm 以上の粒子状物質を 99.97%除去するフィルターを使用して、同様の胎仔期曝露を行った結果、精巣重量および DSP が低下し、テストステロン値が上昇する結果を得ている。また、両曝露とも精巣組織に、薬剤投与など外来異物を摂取したときに精巣に生じる所見で、減数分裂期における分裂異常によって生じるものと考えられている、多核巨細胞が認められた。また、一部でホルモン関連の mRNA 発現量の変動も認められている。これらの結果より、胎仔期 DE 曝露は血清中テストステロン濃度を増加させ、DSP の低下を招くことが示された。さらに、精巣組織異常像もこれを裏付ける結果である。また、テストステロン産生に関与する因子の mRNA 発現量に、一部変動が認められた。したがって、胎仔期 DE 曝露は、出生仔雄性生殖系に内分泌攪乱をもたらし、最終的には精子形成を抑制することが推察され、その影響は継世代的であることが示唆された。

以上の結果から、動物種や曝露濃度により影響は異なるものの、DE 曝露は雄性生殖系に有害な影響を及ぼすこと、また、その影響は次世代的であることが示されている。

3. 脳神経系に対する影響

3.1 脳内遺伝子

脳神経系の機能的な発達過程において化学物質や環境条件の影響を受けやすいのは胎仔期から成長期にかけてである。本研究で我々は、周産期 DE 曝露が脳神経系の発達過程に及ぼす影響を新生仔の脳内性ステロイドホルモン関連遺伝子 (アンドロゲン受容体、ER α 、 β 、アロマトラーゼ) および甲状腺ホルモン関連遺伝子 (甲状腺ホルモン受容体、BDNF (brain-derived neurotrophic factor)、ニューログラニン) の発現量を中心として検討し、さらに、ストレスタンパク関連遺伝子 (HO-1 (heme oxygenase 1)、メタロチオネイン) の脳内発現量を測定することで、DE 中の成分が脳に到達しているか否かの指標とすることを試みた。曝露は、生殖器系に及ぼす影響と同様の条件、濃度で実施した。その結果、周産期の DE 曝露は新生仔脳内 ER α 、 β の mRNA 発現量を最大 1.5 倍まで有意に上昇させていた。発現上昇パターンは曝露濃度、時期などによって異なっていた。この結果から、DE 曝露が脳内ステロイドホルモン系、特にエストロゲン系に影響を与えている可能性が推測された。一方、甲状腺ホルモン関連因子に関して、いくつかの因子について変動傾向は認められたものの有意な変動は観察されなかった。なお、甲状腺に関して、遺伝子レベルでの変動は認められなかったものの、電子顕微鏡観察では形態変化が認められる所見が得られており、現在、検討中である。また、DE の脳内移行に関する検討では、チトクローム P450 の一つであり、PAH により誘導されることが分かっており DEP 曝露のバイオマーカーの一つとして考えら

公開資料

れている CYP1A1 mRNA の発現上昇が、曝露群で確認された。さらに、H0-1 とメタロチオネインも一部では変動が認められた。以上の結果から、周産期の DE 曝露により DEP が新生仔脳内に移行している可能性が考えられた。

3.2 行動

ヒト曝露と類似した条件として胎仔期から成長期までの DE 曝露を実施した。ICR 系マウスに胎齢 2 日目から出生後 7 週齢まで DE 曝露(平日 AM 9:00~PM 5:00、0.1 mg DEP /m³)を行った。その後、8 週齢より対照群、曝露群共に 12 匹の雄性マウスを用いて以下の一連の行動評価試験を実施した。その結果、自発運動量において、24 時間の総運動量に差は認められなかったものの、曝露群で測定開始 11、12 時間後に有意な亢進が、17 時間後に有意な低下が認められた。自発運動は脳内モノアミン系がその調節に関与していることが知られており、これらの伝達物質が変動した可能性が考えられた。そこで、脳内モノアミン類およびその代謝物量について、行動試験を行ったマウスについて測定を行った結果、ドパミン(DA)系においてその代謝産物である HVA 量が有意に増加し、セロトニン(5-HT)系においては 5-HT 量およびその代謝産物である 5-HIAA 量が有意に増加し、代謝回転(5-HIAA /5-HT)も有意に亢進していた。以上の結果から、DE 曝露は DA 系および 5-HT 系の脳神経系機能や代謝系に何らかの影響を及ぼしており、それが自発運動の変動をもたらした可能性が示唆された。

3.3 脳組織

脳組織に対する影響について電子顕微鏡を用いた超微形態観察を含めて実施している。今までに、曝露群において、大脳皮質、小脳、海馬に caspase3 陽性細胞が散在して認められており、電子顕微鏡的にも apoptosis 小体形成過程の特徴的所見であるクロマチンの不均一な凝集や Crescent-Shaped Spaces を伴った核不整を呈する細胞が確認されている。また、清掃細胞数が減少傾向にあり、その細胞質内顆粒に変性像や DE 粒子と疑われる沈着物質が観察された。さらに、血管周囲浮腫および微小血管狭窄が各部位に散在的に認められた。これらの結果より、胎仔期や新生仔期の DE 曝露が仔マウス脳組織の発達過程において何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆されている。

本研究から、DEP 中の内分泌かく乱物質の一部が判明した。また、生殖系および脳神経系という生体維持における最も重要な高次機能に DE 曝露が影響を与えている可能性を示す結果を得た。ディーゼル車の規制は急速に進んでいるとはいえ、それは新車に限ったものであり、現行のディーゼル車は今後も 10 年程度は走り続ける可能性が高いことから、注意を要する。また、今回、DE の中でも DEP にその内分泌かく乱作用の本体がある可能性が示唆される結果を得た。ディーゼル排ガス中の微粒子成分を粒度分布(個数換算)で検討すると、その大部分はいわゆるナノ粒子にあたることから、ディーゼル車のみならず、今後、産業として重要となると考えられているナノテク産業から生じるナノ粒子による生体影響の可能性についても十分な検討が必要であると考えられる。

残念ながら、本研究では初期の目的の一つである、内分泌かく乱作用物質の除去法を確立するまでには至らなかったが、今後、本研究を発展させる中で、除去法の確立を目指したい。

(研究内容は多岐にわたり膨大なため、概要をまとめるに当たりすべての研究内容を網羅することをやめ、1の内分泌かく乱物質の同定に関しては早川グループ(1.1)と吉田グループ(1.2)の研究を記載し、2及び3の項目に関しては武田グループの研究を中心に記載した。なお、各グループの研究内容は「3研究実施内容及び成果」に記載してある)

公開資料

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本研究では、大気中に存在する内分泌かく乱物質に注目した。都市大気浮遊粒子状物質の約40%はディーゼル排気由来である。そこで本研究ではつぎの4点を達成目標として研究を開始した。(1)ディーゼル排ガスに含まれる様々な内分泌かく乱物質を同定し、その作用について分子レベルで解析する。(2)ディーゼル排ガスの生殖機能への影響を系統、種、曝露時期を変えて評価する。また、(3)ディーゼル排ガスを妊娠中に曝露し、胎仔の性分化、脳神経系及び生殖系の発達に対する影響を病理学的、分子生物学的及び行動薬理学的手法を駆使して検討することを計画した。(4)同定した内分泌かく乱原因化学物質の大気中濃度を測定して、ヒトへの影響を推定するとともに、その除去法の確立を目指す。

また、本研究グループは、当初6グループから出発し最終的には1グループが派生して7グループとなった。以下、グループごとの役割分担を記す。①東京理科大学:総括班、全ての実験への参加、②東京都立衛生研究所(現、東京都健康安全研究センター):種差の検討、③金沢大学:ディーゼル排ガス中に含まれる内分泌かく乱物質の分離・分析、④国立環境研究所:妊娠期動物に対するディーゼル排ガス曝露の影響、⑤(財)結核予防会結核研究所:妊娠期動物に対するディーゼル排ガス曝露の影響-仔の生殖発達に対する影響、⑥星薬科大学:妊娠期動物に対するディーゼル排ガス曝露の影響-仔の行動薬理学的研究、⑦大分県立看護科学大学(平成15年度より):ディーゼル排ガス中に含まれる内分泌かく乱物質の作用解析。

公開資料

(2) 実施体制

研究代表者
武田 健

In vitro 研究プロジェクト

研究実施項目

ディーゼル排気微粒子に含まれる化学物質の内分泌かく乱作用の解析

金沢大学大学院自然科学研究科 薬学部衛生化学研究室

大分県立看護科学大学 人間科学講座 生体反応学

結核研究所 分子病理学科

東京理科大学薬学部衛生化学研究室

In vivo 研究プロジェクト

研究実施項目

胎仔期ディーゼル排ガス暴露による雌性・雄性生殖系、内分泌系、免疫系への影響

東京理科大学薬学部衛生化学研究室

大分県立看護科学大学 人間科学講座 生体反応学

国立環境研究所 環境ホルモン・ダイオキシン研究プロジェクト

東京都健康安全研究センター 環境保健部環境衛生研究科

結核研究所 分子病理学科

行動研究プロジェクト

研究実施項目

ディーゼル排ガス胎仔期暴露の脳神経系におよぼす影響の解析

東京理科大学薬学部衛生化学研究室

星薬科大学薬品毒性学教室

大分県立看護科学大学 人間科学講座 生体反応学

国立環境研究所 環境ホルモン・ダイオキシン研究プロジェクト

結核研究所 分子病理学科

3 研究実施内容及び成果

3. 1 in vitro グループ

3. 1. 1 ディーゼル排ガス微粒子 (DEP) 含有成分の抗男性ホルモン作用 (金沢大学 早川グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

DEP の内分泌かく乱作用の本体を検索する目的で下記の実験を行なった。

【方法】

DEP の捕集-1 乗用車 (2500 cc、1996 年製)、バス (4160 cc、1990 年製)、トラック (7410 cc、1989 年製) の 3 台のディーゼル車を用い、アイドリング状態の DEP を捕集した。各ディーゼル車の排気マフラーの後方 50 cm にローボリュームエアサンプラー (柴田、L-30 型) を設置し、吸引流速 30 L/min でガラス繊維フィルター (Pallflex T60A20 フィルター、直径 55 mm) 上に DEP を捕集した。ガラス繊維ろ紙は 5 分毎に交換した。各ディーゼル車毎にフィルター 5 枚 (DEP 約 10 mg 含有) を抽出操作に供した。以下、乗用車、バス、トラックについて得られた抽出物をそれぞれ EC、EB、ET と記し、ブランクフィルター抽出物は EB と記す。

DEP の捕集-1 ディーゼルトラック (4610 cc、1999 年製) を用いた。エンジン負荷または走行速度を変えながらトラックをシャーシーダイナモ上で運転し、DEP を捕集した。エンジン負荷は、エンジンの回転数を 2400 rpm で一定とし、最大エンジン負荷 (6 kN) の 0% (0 kN)、50% (3 kN)、75% (4.5 kN) の 3 条件とした。走行速度は、20 km/h、50 km/h 及び 80 km/h の 3 条件とした。トラックの排気マフラーを希釈トンネルに直結し、トラック排気の全量を希釈トンネルに導入した。希釈トンネルの最後部から排気の一部を取り出し、テフロンコートガラス繊維フィルター (Pallflex Tx フィルター、45 cm x 60 cm) 上に DEP を 30 分間捕集した。フィルターの 100 cm² 部分 (DEP 約 10 mg 含有) を切り出し、抽出操作に供した。以下、エンジン負荷 0%、50%、75% で得られた抽出物はそれぞれ L0、L50、L75、走行速度 20 km/h、50 km/h、80 km/h で得られた抽出物はそれぞれ S20、S50、S80 と記す。

抽出操作 フィルターを 5 mm 角程度に細切した後、ベンゼン-エタノール (3 : 1) 160 mL を用いて超音波抽出した。抽出は 2 回行い、ベンゼン-エタノール溶液を合して室温-減圧下で溶媒を留去した。残渣をエタノールで溶解し、抽出物濃度を 10 mg/mL とした。

ヒト培養細胞を用いた抗男性ホルモン作用 [1] ヒト前立腺癌由来で野生型のヒト男性ホルモン受容体 (AR) を発現する PC3/AR 細胞に、男性ホルモン受容体 (AR) の活性化に応答してルシフェラーゼを発現するプラスミド pGLPSAp5.8 を導入した。DEP 抽出物で処理した細胞のルシフェラーゼ活性 (LUC-AR) を測定し、抗アンドロゲン作用を評価した。

酵母 two-hybrid 法による抗男性ホルモン作用 西原らの方法に従った。本法で測定される b-ガラクトシダーゼを bGal-AR と表記する。

アリル炭化水素受容体 (AhR) アゴニスト活性 PC3/AR 細胞に、AhR の活性化に応答してルシフェラーゼを発現するプラスミド pLUC1A1 を導入した。DEP 抽出物で処理した細胞のルシフェラーゼ活性 (LUC-AhR) を測定し、AhR アゴニスト活性を評価した。

【結果及び考察】

DEP 抽出物の抗男性ホルモン作用と PAH の寄与

男性ホルモン (ジヒドロテストステロン ; DHT) の非存在下または存在下で細胞を DEP 抽出物で処理し、DEP 抽出物の男性ホルモン様作用及び抗男性ホルモン作用を評価した。DHT 非存在下では、何れの抽出物の処理によっても LUC-AR の有意な上昇は見られず、男性ホルモン様作用は認められなかった (Fig.1-A)。一方、DHT 存在下では DHT で上昇した LUC-AR が抽出物の濃度依存的に低下した (Fig.1-B)。作用の強さは EC < EB < ET の順であった。このとき、何れの抽出物も認められるような細胞毒性を示さなかった (Fig.1-C) ことから、Fig.1-B に示した LUC-AR の低下は抽出物の抗男性ホルモン作用に基づくものであり、DEP には抗男性ホルモン物質が含まれていることが明らかになった。

我々すでに、AhR アゴニストとして作用する PAH が抗男性ホルモン作用を示すことを見いだしていたので、抽出物の AhR に対する作用を検討した。何れの抽出物も AhR を活性化

し、その作用の強さは EC < EB < ET で、抗男性ホルモン作用の強さと一致した。更に、抽出物の抗男性ホルモン作用は、AhR アンタゴニストである a-ナフトフラボンで減弱されること、代謝阻害剤 SKF-525A で増強されることから、DEP 抽出物中の AhR アゴニストの未代謝物が抗男性ホルモン作用の一部を担っていると考えられた。DEP 抽出物中の AhR アゴニスト物質の一つとして PAH を分析したところ、Table 1 に示した化合物が検出された。AhR アゴニストとして作用しない pyrene を除く 10 の PAH の濃度の合計は EC < EB < ET であり、抗男性ホルモン作用及び AhR 活性化作用の順と一致した。そこで、10 種 PAH の混合物について抗男性ホルモン作用と AhR 活性化作用を検討した結果、DEP 抽出物に含まれる濃度で有意な作用を示した。

酵母 two-hybrid 法は AR に直接作用する化合物を試験する方法であるので、酵母 two-hybrid 法でも抽出物の男性ホルモン様作用／抗男性ホルモン作用を評価した。何れの抽出物も男性ホルモン様作用は示さず、抗男性ホルモン作用を示したことから、抽出物中には AR アンタゴニストとして作用する化合物が含まれていることが明らかになった。

以上の結果より DEP 中には抗男性ホルモン作用を有する化合物が含まれており、その一部は AhR アゴニストとして作用する PAH であり、また一部は AR アンタゴニストとして作用する化合物であることが明らかになった。

DEP 抽出物の抗男性ホルモン作用とディーゼル車走行条件

停車、発進、加速、登坂時などのように、車の走行条件によって DEP 含有成分も変化することが考えられる。そこで、異なるエンジン負荷条件（加速・登坂時に対応）と異なる走行速度条件で DEP を捕集し、抽出物の男性ホルモン様作用／抗男性ホルモン作用を評価した。

ヒト細胞 PC3/AR で得られた結果を Fig.2 に、酵母 two-hybrid 法で得られた結果を Fig. 3 に示した。何れの抽出物も男性ホルモン様作用は示さず（Fig. 2-A、Fig. 3-A）、抗男性ホルモン作用を示した（Figs. 2-B,C、Figs. 3-B,C）。両方法において、エンジン負荷を変化させた場合の作用の強さは L0 < L50 < L75 の順で、エンジン負荷が強くなるほど、抗男性ホルモン作用が強くなることが明らかになった。一方、走行速度の違いによっては、抗男性ホルモン作用の強さに有意な差は見られなかった。

以上の結果より、抗男性ホルモン化合物の DEP 含有量は、走行速度によってはあまり影響を受けないが、エンジン負荷が高くなるほど多くなることが明らかになった。

DEP 中の AR アンタゴニストに関する研究

上記研究で、DEP 中の抗男性ホルモン作用を示す化合物が含まれ、その一部は AR アンタゴニストとして作用する化合物であることを見いだした。

そこで次に、DEP 中の AR アンタゴニスト成分の検索を行った。DEP 抽出物を各種クロマトグラフィーで分画し、酵母 two-hybrid 法により作用を評価した。その結果、新規な AR アンタゴニストとして 1-ニトロピレンが同定された。これまで、ニトロ基以外の官能基を持たない化合物が AR に結合するとの知見は得られていなかったため、1-ニトロピレン以外のニトロ PAH についても同様に抗男性ホルモン作用を試験した。その結果、3-ニトロフルオランテンをはじめとする数多くのニトロ PAH に抗男性ホルモン作用が観察されるとともに、AR にも結合した。

(2) 研究成果の今後期待される効果

DEP 中には抗男性ホルモン作用があることが判明し、その本体は AH アンタゴニスト／アゴニスト作用を示す化合物であり、その一部は PAH であることが示された。DEP 中の AR アンタゴニスト化合物として、1-ニトロピレンをはじめとするニトロ PAH や水酸化 PAH が重要であることが明らかになった。更に、抗男性ホルモン化合物として水酸化フェナンスレン類が同定され、現在、詳細を検討している。DEP における抗男性ホルモン作用物質の本体が明らかとなったことで、今後、これらの物質の発生を止めるあるいは特異的に除去する方法の開発に向けての重要な資料が提供できたものと考えられる。

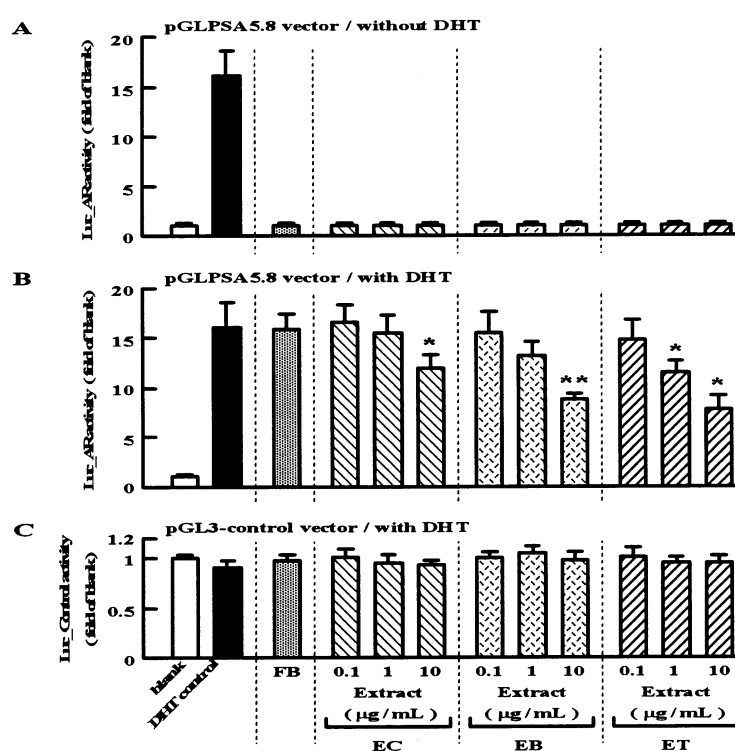


Fig.1 pGL3/AR luciferase assay for androgenic (A), antiandrogenic (B) and cytotoxic (C) effects of DEPE samples. The cells transiently transfected with pGLPSA5.8 or pGL3-control vector were treated with 0.2% ethanol (blank), 10 pM DHT (DHT control), FB or each DEPE sample alone or in combination with 10 pM DHT for 24 h and then processed for measurement of luciferase activity. Each column and vertical bar represent the mean and SD, respectively, from five separate cultures. * and **; Significantly different from DHT control ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively).

Table 1. Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons having four or more rings in the DEPE samples.

Compound	Concentration (μM)		
	EC	EB	ET
Pyrene	0.94	4.76	4.90
Benz[a]anthracene	0.35	0.72	0.67
Chrysene	1.02	0.95	1.10
Benzo[b]fluoranthene	0.16	0.68	0.79
Benzo[k]fluoranthene	0.02	0.11	0.20
Benzo[a]pyrene	0.10	0.61	0.79
Benzo[ghi]perylene	UDL	0.29	0.38
Benzo[b]chrysene	UDL	0.02	0.02
Coronene	0.14	0.47	0.34
Perylene	UDL	0.57	0.67
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	UDL	0.33	0.29
Sum (except pyrene)	1.79	4.75	5.26

UDL : under the determination limit. The determination limits are 0.07 μM for benzo[ghi]perylene, 0.01 μM for benzo[b]chrysene, 0.05 μM for perylene and 0.1 μM for indeno[1,2,3-cd]pyrene in the present study.

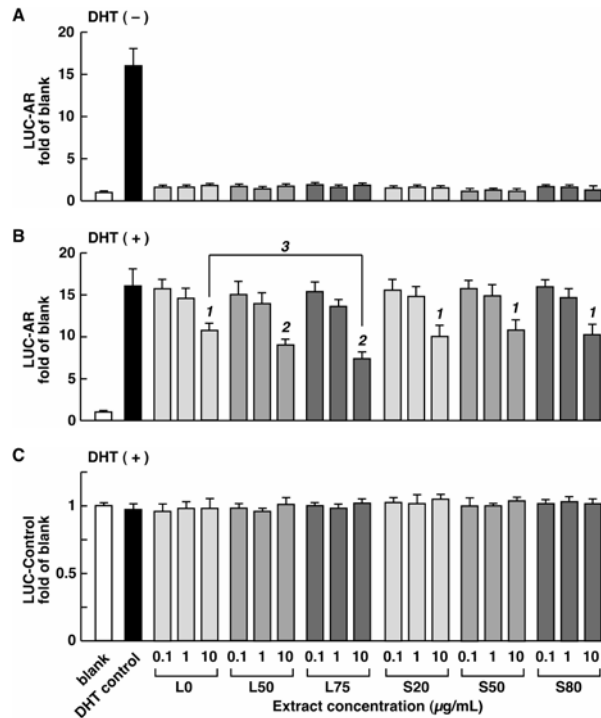


Fig. 2. DEPE have antiandrogenic activity. PC3/AR cells were transiently transfected with pGLPSAp5.8 (A and B) or pGL3-control vector (C). Cells were treated with 0.2% ethanol (blank), 10 pM DHT (DHT control) or DEPE samples at indicated concentration in the absence or presence of 10 pM DHT for 24 h and then luciferase activity was measured. The effect of DEPE as androgen agonists (A), androgen antagonists (B) and on pGL3-control luciferase as an index of cytotoxicity (C) is shown. Each column and vertical bar represent the mean and SD, respectively, of three separate extract samples. ¹ and ²Significantly different ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) from DHT control, respectively; ³Significantly different ($P < 0.05$) from L75 at 10 mg/mL.

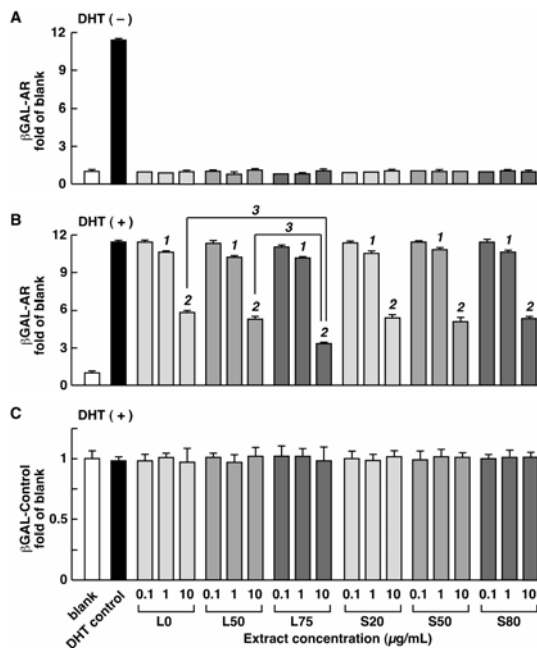


Fig. 3. DEPE samples exhibit androgen antagonistic activity in a yeast-based assay lacking AhR. Y190-hAR or Y190-control yeast were treated with 1.1% ethanol (blank), 0.5 nM DHT (DHT control) or DEPE samples at indicated concentration in the absence or presence of 0.5 nM DHT for 24 h and then processed for measurement of b-galactosidase activity. DEPE androgenic (A), antiandrogenic (B) and cytotoxic (C) effects are shown. Each column and vertical bar represent the mean and SD, respectively, of three separate extract samples. ¹ and ²Significantly different ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) from DHT control, respectively; ³Significantly different ($P < 0.05$) from L75 at 10 mg/mL.

3. 1. 2. 多環芳香族炭化水素類の尿中代謝物測定による曝露評価(金沢大学 早川グループ)

今後、疫学調査などで、重要であるヒトにおける DE 曝露評価法の開発を目的として以下の実験を行なった。

【実験】

尿中 1-ヒドロキシピレン(1-OHP)の測定

尿試料(10 mL)に希塩酸を加えて pH 5.0 とした後、酢酸緩衝液(pH 5.0)で3倍に希釈し、37°C

でプレインキュベートした後、b-グルクロニダーゼ/アシルサルファターゼ溶液を適量加え、37°Cで2時間程度インキュベートした。また内標準物質として被検体の重水素化体を添加した。この酵素処理した試料をメタノールに続いて水を流して前処理した Sep-Pak C₁₈ カートリッジ(Waters)に導入した。その後水及び20%メタノール溶液で洗浄し、メタノールで目的物質を溶出した。溶出液を減圧乾固後メタノール(1 mL)に再溶解し、HPLC 検液とした。1-OHP 及び内部標準物質は、アルキルアミド型逆相カラム(Discovery RP-Amide C₁₆, 250×4.6 mm i.d., 5mm, SUPELCO)により分離し、蛍光検出器を用いて励起波長(240 nm)・蛍光波長(387 nm)において検出した。この際の移動相条件は、アセトニトリル/リン酸緩衝液(pH 7.0) (57/43, v/v)を用い、流速は1 mL/minとした。

尿中 2-ヒドロキシフルオレン(2-OHF)の測定

尿試料(10 mL)を用い、1-OHP の前処理と同様に処理した。内分標準物質として 2-OHF の重水素化体を添加した。分析に用いたカラムスイッチング HPLC システムの概略図を Fig. 4 に示す。まずクリーンアップを目的として C1 カラム(Cosmosil 5C₁₈-MS 250×4.6 mm i.d., 5mm, ナカライ)で粗分離した後、カラムスイッチングにより C3 カラム(Discovery RP-Amide C₁₆, 250×4.6 mm i.d., 5mm, SUPELCO)に導入して 2-OHF と内部標準物質とを分離した。検出は、励起波長(270 nm)・蛍光波長(327 nm)で行った。この際の移動相条件は、アセトニトリル/リン酸緩衝液(pH 7.0) (40/60, v/v)を用い、流速は1 mL/minとした。

尿試料の捕集

尿試料は、職業暴露のない金沢市在住の喫煙者 10 名 (10-50 本/日) 及び非喫煙者 7 名、さらにタイ・チェンマイ市在住喫煙者 7 名 (10-20 本/日) 及び非喫煙者 6 名から捕集した。起床後の初尿を捕集し、-20°Cで保存した。測定後、定量値としての尿中代謝物濃度は、尿中のクレアチニン単位量あたりの濃度として算出した。

【結果及び考察】

尿中 1-ヒドロキシピレン(1-OHP)の分析法開発

重水素化 1-ヒドロキシピレンを内部標準物質として使用し、フェノール性化合物を強く保持するアルキルアミド型逆相カラムにより 1-OHP とその重水素化体とが良好に分離($R_s=1.45$)された(Fig. 5)。また目的成分と尿試料に由来する夾雑ピークとが完全に分離し、検出限界は0.1 mg/Lであった。被検体とその重水素化体との分離が達成されたことにより、1-OHP-*d*₉ が優れた内部標準物質であることが明らかとなり、従来定量には標準添加法が一般に用いられていたが、内部標準法による定量がはじめて可能になった。

尿中 2-ヒドロキシフルオレン(2-OHF)の分析法開発

2-OHF と内部標準物質である重水素化 2-OHF (2-OHF-*d*₉)は、前処理カラム(C1)において尿試料に由来する夾雑ピークと粗分離され、カラムスイッチングを経てさらにアルキルアミド型逆相カラム(C3)により 2-OHF と 2-OHF-*d*₉ とが良好に分離($R_s=1.4$)した(Fig. 6)。2-OHF の検出限界は0.03 nmol/L (S/N=3)であり、従来の GC-MS 法と同等の感度であった。

日本人とタイ人における尿中 1-OHP と 2-OHF 濃度比較

日本とタイに居住する被験者(喫煙者及び非喫煙者)尿中の 1-OHP 及び 2-OHF を上述の2つの蛍光検出-HPLC システムを用いて測定した(Table 2)。日本人に関して、1-OHP よりも 2-OHF で喫煙者と非喫煙者間で有意差が大きかった。2-OHF は、タバコ煙に対する曝露により敏感に反応するバイオマーカーであることが明らかとなった。一方、タイ人に関しては喫煙による尿中 2-OHF の有意な上昇は認められなかった。これは、タイにおける自動車排ガスなどによる大気汚染レベルが日本より高く、PAH 曝露のバックグラウンドレベルが高いことに起因すると考えられた。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究の成果は、尿中物質から DEP 曝露状況の推定が可能であることを示すものである。今後、実施されることが望まれる大規模な疫学的調査にあたって、最も大切な点は、ヒトから非侵襲的な方法で曝露状況を検討可能な体液などを得ることである。その点、尿を用いる本法は採取時に医療関係者を必要とせず、ヒト曝露状況の非侵襲的な検査法として重要な役割を果たす可能性が考えられた。

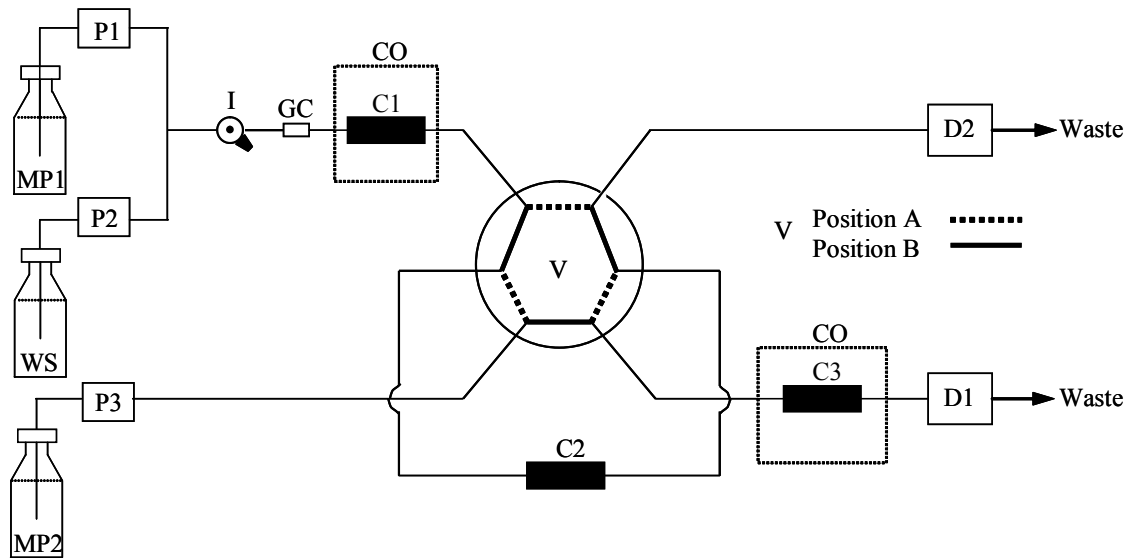


Fig. 4 Flow diagram of HPLC system using column-switching; I: injector, P1-3: Pumps, D1 and D2: fluorescence detectors, GC: guard column, C1: clean up column (ODS column), C2: trapping column (RP-Amide column), C3: separation column (RP-Amide column), MP1, MP2: mobile phases, WS: washing solvent, V: switching valve, CO: column oven.

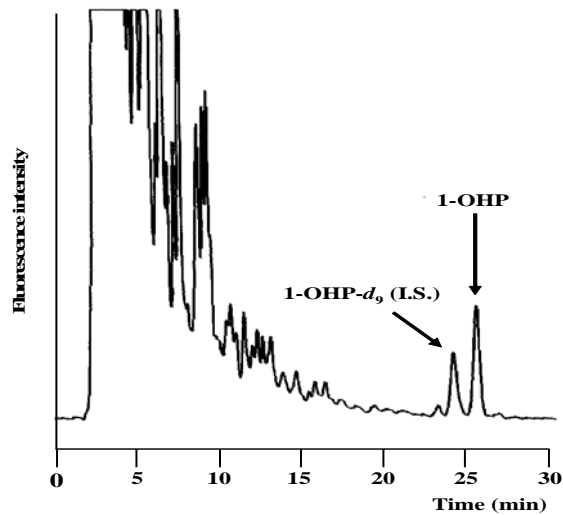


Fig. 5 HPLC chromatogram of a urine sample from a smoker

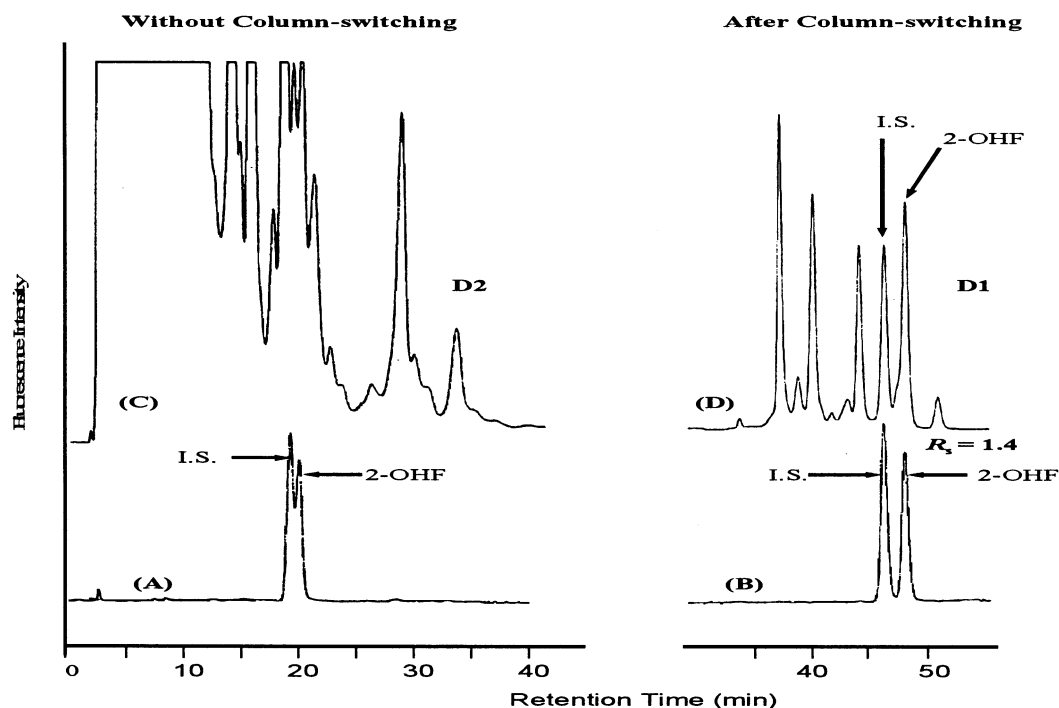


Fig. 6 Representative HPLC chromatograms of a standard solution (A and B) and human urine (C and D). Chromatograms A and C were obtained by detecting the eluate from the ODS column (C1) with the detector D2, and Chromatograms B and D were obtained by detecting with the detector D1 after the separation on the RP-Amide column (C3) via the trapping column (C2) by column-switching (Fig. 4).

Table 2 Urinary concentrations of 2-OHF and 1-OHP ($\mu\text{mol/mol}$ creatinine) in Japanese and Thai subjects

Characteristic	Smokers		Non-smokers		Ratio (Smoker/Non-smoker)	
	Japanese	Thai	Japanese	Thai	Japanese	Thai
Number (Male)	10 (10)	7 (5)	7 (4)	6 (3)		
Age, Mean (Range)	48 (23-69)	54 (32-76)	33 (22-51)	34 (26-47)		
2-OHF, Mean \pm S.D.	0.26 \pm 0.16**	0.75 \pm 0.15***	0.04 \pm 0.02	0.22 \pm 0.15	6.5	3.4
CV (%)	61.5	20	50	68		
Range	0.06 - 0.51	0.50 - 1.01	0.01 - 0.06	0.05 - 0.46		
1-OHP, Mean \pm S.D.	0.12 \pm 0.13	3.03 \pm 1.91*	0.06 \pm 0.08	0.91 \pm 0.59	2.0	3.3
CV (%)	108	63	133	65		
Range	0.02 - 0.45	1.00 - 5.76	0.01 - 0.22	0.20 - 1.72		
Ratio (2-OHF/1-OHP)	2.2	0.25	0.67	0.24		

* Significantly different from non-smoker ($P < 0.05$)

** Significantly different from non-smoker ($P < 0.01$)

*** Significantly different from non-smoker ($P < 0.001$)

3. 1. 3.ディーゼル排気微粒子によるエストロゲンレセプター α mRNA 発現抑制作用 (大分県立看護科学大学 吉田グループ、東京理科大学 武田グループ、金沢大学早川グループ)

【方法】

使用細胞 マウス精巣由来ライディツヒ細胞株 TM3 細胞を用いた。

DEP 国立環境研究所より供与された。

DEP 抽出法 ベンゼン-エタノール (1:3 v/v)溶液を用い、ソックスレー抽出法にて DEP 抽出物を得た。DEP 抽出物を 1) 中性物質画分、2) 塩基性物質画分、3) 水溶性強酸性物質画分、4) 脂溶性強酸性画分、5) カルボン酸性物質画分、6) フェノール制物質画分にそれぞれ分離し 6 個の試料を調整した。さらに、中性物質画分を、中圧カラムクロマトグラフィーを用い、100 画分に分画した。使用したカラムはシリカゲルカラムで移動相としてヘキサン、ヘキサン酢酸エチル混液、酢酸エチル、メタノールを用いた。カラムクロマトグラフィーで分画した分画物をさらに HPLC を用い細分画した。使用したカラムは逆相系カラムを用い、移動相はアセトニトリル-水系を用いた。

細胞曝露法 TM3 細胞を 1×10^5 cells/10ml/dish の濃度で 100mm dish に播種し 16 時間後に DEP、DEP 抽出物あるいは分画物を添加し、24 時間後に細胞を回収した。回収した細胞から、定法に従い、RNA 抽出、逆転写後、発現遺伝子を ABI PRISMTM 7700 Sequence Detection System あるいは PRISM7000 Sequence Detection System を用い、定量解析した。検討遺伝子として、ER α および CYP1A1 mRNA、またリファレンスとして GAPDH mRNA の発現量を解析した。

DEP フィルター処理 DEP を 1%DMSO 含有 PBS 溶液で 1, 3 mg/ml に調整し、30 分間超音波処理を行った。この DEP 懸濁液をメディウム中で 24 時間インキュベートし、0.2 mm メンブランフィルターで微粒子を除去し、TM3 細胞に 24 時間処理した。また、DEP を 1%DMSO 含有 PBS 溶液で 1, 3 mg/ml にし、30 分間超音波処理した。この DEP 懸濁液を 0.2 mm メンブランフィルターで微粒子を除去し、TM3 細胞に 24 時間処理した。

【結果】

DEP による ER α mRNA 発現抑制作用の原因物質探索

DEP 処理による ER α mRNA 発現抑制作用を示す物質が DEP の溶出成分か不溶性成分のどちらかに存在するか明らかにするため、DEP 溶液をフィルター処理し、その変化を解析した。

DEP 懸濁液を 30 分の超音波処理後に、24 時間メディウム中、37°C でインキュベート後、ポアサイズ 0.2 mm のフィルターで処理し DEP 不溶性成分を除去したものを TM3 細胞に処理した。フィルター処理と未処理のもので、どちらの ER α mRNA 発現量もコントロールに比べ、同程度に低下した。同様に CYP1A1 mRNA 発現量誘導も、フィルター処理の有無によって差は見られなかった (Fig. 1A)。このことから、DEP 処理による mRNA 発現量変動は、DEP から溶出した物質、あるいはフィルターを通過した 0.2 mm 以下の超微粒子によるものと考えられる。このことを確認するために、DEP を 30 分間超音波処理した後にフィルター処理し、DEP 不溶性成分を除去したものを TM3 細胞に処理したところ、フィルター処理していないものは ER α mRNA 発現量が低下した (Fig. 1C)。フィルター処理した DEP 溶液では、ER α mRNA 発現抑制作用が認められなかった CYP1A1 mRNA 発現量についても、フィルター処理していない DEP 溶液では CYP1A1 mRNA 発現量は誘導されたが、フィルター処理した DEP 溶液では、CYP1A1 mRNA 発現量誘導が見られなかった (Fig. 1B 1D)。これらのことから、mRNA 発現に影響を与えているのは DEP から溶出した物質によるものと考えられた。そこで、DEP に吸着している化学物質を抽出し、複数の分画法を組み合わせ、原因物質の探索を試みた。まず、DEP 抽出物 (DEPE) を液液分配法で分画し、DEP 分画物をそれぞれ TM3 細胞に処理した。中性物質画分 (N) に ER α mRNA 発現量を低下させる原因物質が含まれている可能性が示唆された (Table 1)。また、CYP1A1 mRNA 発現誘導が種々の

公開資料

画分で見られたことから Ah レセプター刺激物質は多数存在する事が示唆された。

次に N 画分をカラムクロマトグラフィーにより 100 画分に分離し (図 2)、分画物を同様に処理した。N40 画分および N55 画分分画物 (N 換算濃度 0.3 mg/ml) 処理により、ER α mRNA 発現量が対照群と比較して約 50%低下した (図 3)。N27 画分~37 画分分画物処理で、対照群と比べて 0.3~10%の ER α mRNA 発現量低下が認められた。また、0.3 mg/ml の N40~N58 画分分画物処理により、ER α mRNA 発現量は対照群と比較して約 15~50%低下した。

さらに、これら活性が認められた画分を HPLC 法により細分画した (図 4)。HPLC 分画物の NII-5 画分分画物及び NIV-1 画分分画物 (N 画分換算濃度 300 mg/ml) の処理により ER α mRNA 発現が有意に減少し、対照群と比較してそれぞれ約 40 %低下した (図 5 A,B)。それ以外の画分において ER α mRNA 発現に有意な変動は認められなかった。

発現低下が認められた分画に含まれる物質として、モノヒドロキシフェナンスレンが推定された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

DEP 中にエストロゲンレセプター α mRNA 発現抑制作用を示す物質が存在することを明らかにし、その物質の同定まであと一步のところまでたどりついている。先に明らかにした抗男性ホルモン活性物質とともに、DEP 中の内分泌かく乱作用物質の本体を明らかにし得たことは、今後の、予防法開発の展開において、重要であると考えられる。

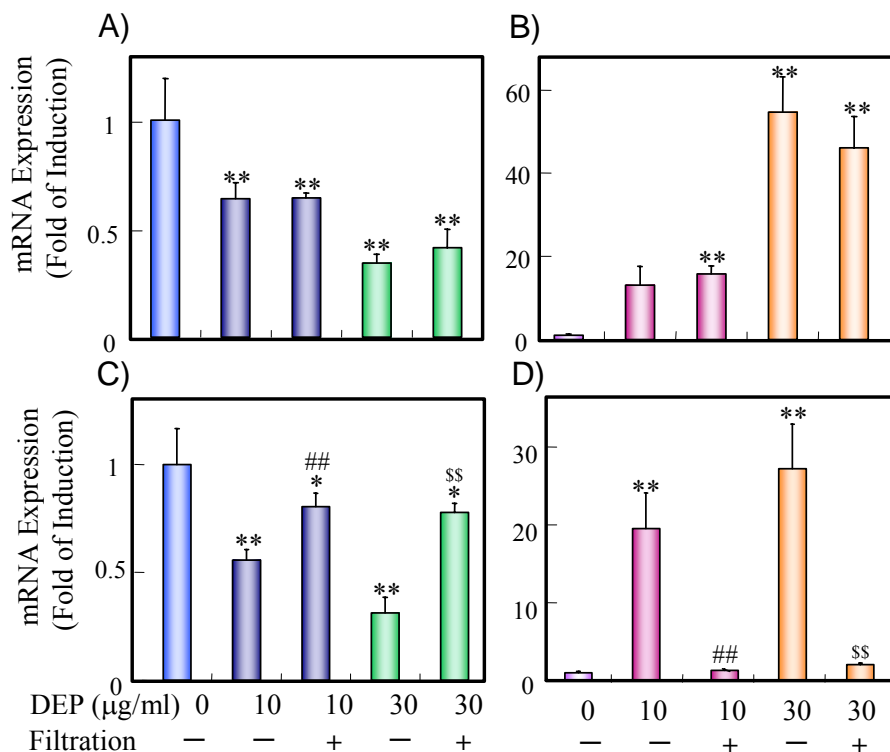


Fig. 1 DEPによるER mRNA発現量低下におけるDEPからの溶出成分の影響

A), B) DEP懸濁液24時間インキュベーション後フィルター処理

C), D) DEP懸濁液30分間インキュベーション後フィルター処理

A), C) ER α mRNA B), D) CYP1A1 mRNA

##(P<0.01) DEP10μg/ml filter +or-, \$\$ (P<0.01) DEP30μg/ml filter +or-

** (P<0.01)

Table. 1 DEP 30 µg/ml相当濃度時の推定mRNA発現量比

分画物	ER	CYP1A1
N & B	0.68	18.8
N	0.77	18.6
BE	1.0	4.5
BW	1.0	1.0
WAL	0.80	8.6
WAE	0.85	4.9
WAP	0.85	16.2
WAC	1.0	1.5
SAE	0.85	1.7
SAL	0.94	1.9
SAW	0.92	1.2

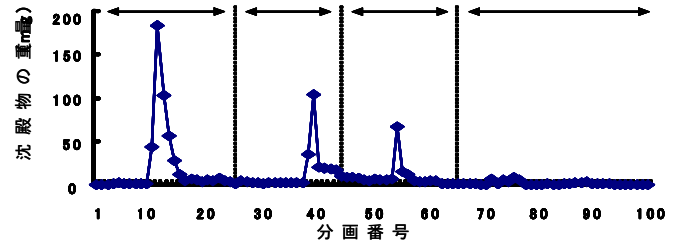


図2. DEPのN画分分画物のカラムクロマトグラム

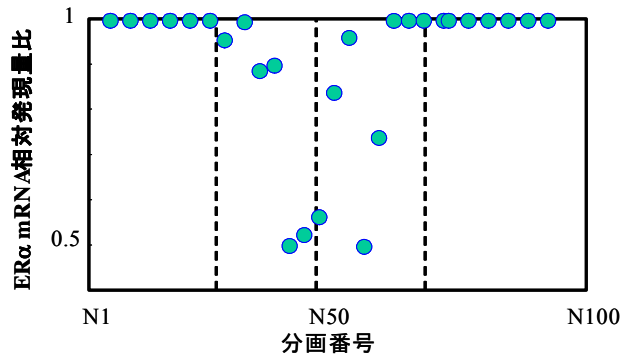


図3. N画分分画物処理によるERα mRNA推定発現量 (N画分換算濃度0.3mg/ml処理時、対照群の発現量を1とした)

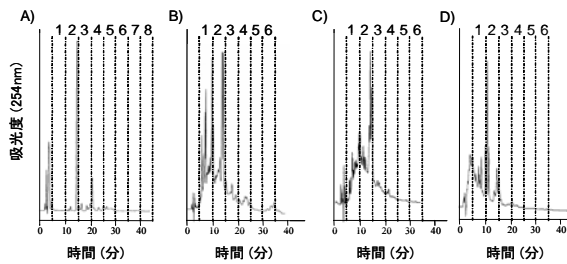


図4. N30~N58画分のHPLCクロマトグラム

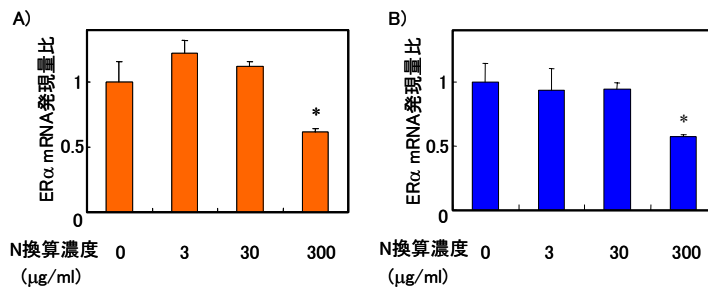


図5. HPLC画分分画物処理によるTM3細胞におけるERα mRNA発現変動
A)NII-5画分処理 B)NIV-1画分処理 平均±標準誤差 * $p < 0.05$

3. 1. 4. ディーゼル排気微粒子 (DEP) 曝露ヒト絨毛癌細胞株における DNA Microarray による遺伝子発現解析 (結核予防会結核研究所 菅原グループ、東京理科大学 武田グループ、金沢大学 早川グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

DEP の生殖器に及ぼす成分を検討する為、DEP 抽出物 (①Crude) を中性 (②N)、水溶性強酸性 (③SA_w)、脂溶性強酸性 (④SA_p)、カルボン酸性 (⑤WAc)、フェノール性 (⑥WAp) の各物質分画に分画し BeWo 由来ホルモン産生能に及ぼす影響を *in vitro* で検討した。更に、hCG 以外にも DEP により変動している遺伝子はないかという事を検討する為に、DNA Microarray を行う事で、DEP 分画の添加で発現が変動する多くの遺伝子の発現プロファイルを包括的に解析した。DNA chip は、近年解読された約 32,000 のヒト遺伝子のうち、約 16,600 の遺伝子を搭載した IntelliGene Human Expression CHIP を用いた。また、解析ソフトを用いて解析を行う事で、DEP 分画ごとの特徴及び変動する重要な遺伝子群の特定を試みた。

【方法】

細胞

過去の報告より、hCG は *in vitro* における DE 及び DEP の内分泌系への影響を評価する際に有用なマーカーである事が示唆された。その為、この hCG 産生細胞である絨毛癌細胞株 BeWo を本実験では使用した。

DEP 分画

結核研究所内のディーゼルエンジンの dilution tunnel 内に付着しているディーゼル排気粉塵を採取し、金沢大学薬学部衛生化学研究室における液-液抽出法により、5 画分に分画した。それらは、中性 (N)、水溶性強酸性 (SA_w)、脂溶性強酸性 (SA_p)、カルボン酸性 (WAc)、フェノール性 (WAp) 画分である。

DEP 添加及び RNA 抽出

BeWo を 24well のシャーレに 2×10^6 cell/ml medium の密度で播き、そこに生理食塩水またはエーテルを用いて 10mg/ml に調製した各 DEP 画分を $5 \mu\text{L}$ (= $50 \mu\text{g}$) 添加して、DEP 分画濃度を $50 \mu\text{g/ml}$ になるようにし、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ インキュベーター内で培養した。24 時間後に細胞を回収し、Total RNA を抽出した。

DNA Microarray

少量の RNA で高感度の発現解析が出来、蛍光標識効率が高い RNA Transcript SureLABEL™ Core Kit を用いて、DEP 添加及び、コントロールとして生理食塩水またはエーテル添加のサンプル由来 BeWo Total RNA を各約 $10 \mu\text{g}$ を鋳型として、それぞれ Cy3-UTP™、Cy5-UTP™ で標識した cDNA を調製した。この 2 つの標識 cDNA を混合してターゲット溶液を調製し、IntelliGene HS Human Expression CHIP のスポット領域に広げ、 70°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。翌日洗浄後、Affymetrix 428™ Array Scanner を用いて各蛍光シグナルをスキャニングし、解析ソフト ImaGene™ Ver. 5.6、GeneSight™ Ver. 4.1 を用いてデータ解析を行った。DNA チップ解析装置 Affymetrix 428™ Array を用いて、各スポットの蛍光シグナルを読み取った。洗浄・乾燥後のチップの製品ラベル側を手前、アレイ面を上にして、スキャナーのステージにセットした。付属の Affymetrix Jaguar Software Version 2.0 を用いて、読み取り範囲パラメーターを設定し、スキャニングを行った。スキャニングにより得られた画像データから、画像の補正に ImaGene Version 5.6、比較検討に GeneSight Version 4.1 を用いて、各スポットの蛍光シグナルを定量した。

GeneSpring によるクラスター解析

クラスター解析とは、その実験における遺伝子発現変化のしかたを元にグループ化する方法である。この解析法は、DNA Microarray により得られる膨大な量のデータを可視化出来る有用な方法である。今回、各遺伝子の発現プロファイル間のコサイン係数を元にした発現の類似性を尺度として、クラスタリングを行った。これを行う事により、6 つの DEP 分画の遺伝子発現変動における類似性やその特徴を探った。

【結果】

DNA Microarray

全 DEP 分画で有効シグナルのあった遺伝子数（発現のみられた遺伝子数）は、チップ上の 16645 個の遺伝子のうち 3548 個で、全体の 21.3%の遺伝子であった。

各 DEP 分画添加群とコントロール群のシグナル発現比（Cy3/Cy5 又は Cy5/Cy3）を縦軸、横軸に取って、スキャッチャープロットを描いた。変動幅が 1 及び -1 に収まる遺伝子が殆どだが、変動幅が 1 及び -1 以上の遺伝子も存在した。2 倍以上変動のあった遺伝子数は、①Crude で上昇が 240 個、減少が 290 個、②N で上昇が 149 個、減少が 175 個、③SAw で上昇が 358 個、減少が 229 個、④SA_E で上昇が 189 個、減少が 226 個、⑤WAc で上昇が 315 個、減少が 252 個、⑥WAp で上昇が 356 個、減少が 385 個という内訳となった。また、5 倍以上変動のあった遺伝子数は、①Crude で上昇が 0 個、減少が 5 個、②N で上昇が 2 個、減少が 1 個、③SAw で上昇が 2 個、減少が 35 個、④SA_E で上昇が 1 個、減少が 13 個、⑤WAc で上昇が 3 個、減少が 27 個、⑥WAp で上昇が 44 個、減少が 49 個という内訳となった。以上より、①Crude、②N、④SA_E、⑥WAp において有意に発現減少した遺伝子数の方が多く、③SAw、⑤WAc においては有意に発現増加した遺伝子数の方が多く結果が得られた。また、⑥WAp において、5 倍以上変動のあった遺伝子数が他の分画と比べて圧倒的に多い特徴を示し、多くの遺伝子発現を変化させる成分が含有されているのではないかという事が示唆された。そして、②N を除く分画で 5 倍以上発現減少した遺伝子数の方が多く、③SAw 及び⑤WAc は前述のように発現減少した遺伝子数の方が少ないものの、増加した遺伝子よりも大きく変動した遺伝子の数は多かった。この事より、各分画で有意な発現上昇及び減少した遺伝子数にばらつきはあるものの、すべての分画は遺伝子発現を減少させる傾向の方が強い事が示唆された。

機能ごとカテゴリー化した変動遺伝子の検討

スポットされている遺伝子の機能ごとに 12 のカテゴリーに分け、カテゴリーごとの変動の違いも検討した。①細胞骨格関連遺伝子群、②薬剤耐性や感染症関連など免疫系遺伝子群、③DNA 修復など核内での現象に関連した遺伝子群、④胚形成や形態形成に関わる遺伝子群、⑤学習や行動に関わる遺伝子群、⑥細胞間接着や細胞間伝達に関わる遺伝子群、⑦性分化など生殖に関わる遺伝子群、⑧代謝に関わる蛋白及び酵素、⑨ストレスなど外部刺激に反応する遺伝子群、⑩蛋白合成に関わる遺伝子群、⑪アポトーシスや成長など生理機能に関わる遺伝子群、⑫機能やその翻訳産物が特定されていない仮想遺伝子群や ESTs (Expressed sequence tag) の 12 のカテゴリーに遺伝子を分類した。2 倍以上の変動のあった遺伝子を、その機能で上記のカテゴリーに分類した。また、カテゴリーで分類した遺伝子数を、その DEP 分画添加群で発現変動のあった総遺伝子数で割って、DEP 分画ごとでどんな機能を持った遺伝子がよく動いているか、その割合を調べた。DEP は、⑥細胞間接着や細胞内伝達、⑧代謝に関わる蛋白や酵素に影響を与えていた。その割合として、分画 SA_E、WAp は⑥及び⑧に属する遺伝子の発現を多く上昇させ、分画 N に関してはその遺伝子発現の多くを減少させていた。他の分画は、発現上昇及び減少の割合はほぼ同じであった。また、この実験系では DEP はスポットされている⑦生殖に関わる遺伝子にはほとんど影響を与えていなかった。しかし、DEP により、⑨外部ストレスに対し反応を示す遺伝子群が 3 番目に多く有意な変動を示しており、DEP によるストレスで反応を示している事が確認された。

3) 有意な発現変動遺伝子の抽出

今回の実験では、DEP のような外部ストレスに対し反応を示す遺伝子群のひとつである、酸化還元酵素や抗酸化系酵素、それらに関連した蛋白に着目した。スポットされているこれらの遺伝子の各 DEP 分画で 2 倍以上の有意な変動のみられた酸化還元酵素や抗酸化系酵素、そしてその関連蛋白のみを調べた。多数の酸化還元酵素や抗酸化系酵素が有意な変動を示していた。例を挙げると、グルタチオンペルオキシダーゼ-4 が分画 N を除くすべての分画で有意な発現上昇を示しており、グルタレドキシニン-1 がすべての分画で有意な発現減少を示した。その他の抗酸化系酵素についてみると、カタラーゼの発現はみられず、スーパーオキシドジスムターゼ-1 はほとんど発現に差はみられなかったものの、すべての

DEP 分画で発現がみられた。近年注目されているレドックス制御機構を構成しているグルタチオン系及びチオレドキシニン系に属する酵素をみると、グルタチオン系に属する酵素で、還元型グルタチオン (GSH) の生合成に関わるグルタチオンシンターゼはすべてで発現しており、GSH を酸化型グルタチオン (GSSG) に酸化し、また H_2O_2 や過酸化脂質の除去に関わる酵素の GPX は GPX1~3 に発現はみられず、GPX4 のみ発現していた。GPX4 は、すべての DEP 分画で有意な発現誘導がみられ、特に分画 WAp において、その変動の割合が大きかった。GSSG を還元して GSH に戻す酵素であるグルタチオンレダクターゼに発現はみられなかった。チオレドキシニン系をみると、基質タンパク質のジスルフィド結合を還元するなどのほたらきをもつチオレドキシニンは、4 つあるアイソフォーム (TRX-1、2、3、4) の TRX-1、2 に発現がみられ、分画 WAc 及び WAp において TRX-1 の発現誘導がみられた。基質タンパク質を還元する際に酸化型になった TRX を還元型に戻すチオレドキシニンレダクターゼは、ほぼ全ての DEP 分画で発現がみられた。カタラーゼや GPX など共に H_2O_2 除去機構として近年同定された、チオレドキシニン依存性ペルオキシダーゼは、5 つあるアイソフォーム (PRX-1、2、3、4、5) すべてに発現がみられた。中でも、分画 SAw では PRX1 の発現誘導及び PRX4 の発現抑制がみられ、分画 WAc では PRX3 の強い発現抑制がみられた。また、外来異物代謝系の抱合反応に関わる第 2 相酵素群のひとつであるグルタチオン-S-トランスフェラーゼの 4 つのアイソフォーム (α 、 β 、 π 、 θ) に多数発現がみられ、有意な変動もみられた。活性酸素産生により酸化ストレス応答で誘導される熱ショックタンパクも多数発現しており、有意な変動もみられた。そして、DEP のマーカーとして知られるヘムオキシゲナーゼ-1 は、Crude でその発現上昇はみられたものの、他の分画では有意な変動はほとんどみられず、この実験系では鋭敏な反応は示さなかった。

GeneSpring によるクラスター解析

フィルタリングの条件は、16,645 個の遺伝子のうち、6 つの DEP 分画すべてで発現のあった遺伝子のみを設定した。フィルタリングの結果、2 枚あるチップ A 及び B において 6 つの DEP 分画すべてで発現のみられた遺伝子数は、チップ A で 80 個、チップ B で 183 個に絞られた。また、各遺伝子間のコサイン係数を求め、その値の近い遺伝子同士を発現パターンが類似しているとし、類似している遺伝子同士順に近くに配置し、クラスターとしてまとめていくと (階層的クラスタリング) 系統樹を描く事が出来た。左の系統樹を Gene Tree と呼び、各遺伝子の類似性を表す。近くに配置されているものほどその変動のパターンに類似性が高く、また系統樹の短いものほどコサイン係数が小さく、変動の類似性も高い。そして、上の系統樹を Conditioned Tree と呼び、DEP 分画ごとの類似性を表す。同様に、近くに配置されているものほどその変動のパターンに類似性が高く、また系統樹の短いものほどコサイン係数が小さく、変動の類似性も高い。

分画 SAw 及び WAp において遺伝子の大きく変動している数が多く、それに次いで分画 WAc も多かった。その変動の度合いとしては、SAw>WAp>WAc の順であった。それに対して、分画 SAw 及び WAp においては遺伝子の変動遺伝子の数は少ない傾向がみられた。

チップ A 及び B で異なるクラスタリング結果となったが、DEP の元である Crude と分画 N 及び分画 WAc は、チップ A 及び B 共にそのクラスターが離れた位置にあり、まったく異なる挙動を示していた。

(2) 研究成果の今後期待される効果

Glutathione peroxidase 4 (GPX4) がほぼすべての分画で有意な発現上昇を示しており、Glutaredoxin-1 (GLRX1) がすべての分画で有意な発現減少を示していた。GPX は、活性酸素除去機構でカタラーゼと相補的にはたらき、活性酸素 H_2O_2 を消去している。 H_2O_2 だけでなく、後の過程で生成するヒドロキシラジカルにより産生し、生体に有害な作用を示す過酸化脂質の除去にも関与している。また、GPX は少なくとも 4 つのアイソフォームを持っており、中でも今回の実験ですべての分画において有意な変動を示した GPX4 は、唯一の単量体で、ほとんどの組織で発現している膜結合型の脂質ペルオキシド型酵素であり、過酸化脂質の除去に関わっている。その為、今回の実験の結果は、DEP という外部ストレスにより活性酸素が生成して酸化的ストレスが生じ、それに伴って活性酸素の除去機構が惹起され、その

公開資料

メカニズムを構成する酵素のひとつである GPX が誘導されたという事が示唆された。なお、今回の実験でこの GPX と同様のはたらきを示すカタラーゼは、どの DEP 分画でも誘導されていなかった。過去の報告より、このカタラーゼはペルオキシソームに存在し、基質である H_2O_2 に対するミカエリス定数が非常に高い為に親和性が弱く、実際に生体内での H_2O_2 除去にはあまり主要な役割は果たしていないと考えられており、その為 GPX のはたらきは生体内で大変重要になっている。このように、GPX のはたらきはカタラーゼよりも大きい事から、この実験系では GPX がカタラーゼより優位に作用しており、活性酸素除去機構を担っている酵素のひとつである事が示唆された。

生体は DEP などによる酸化ストレスなど多彩なストレスに対し、酸化還元状態を制御する事によって適応し、ホメオスタシスを維持してきている。近年、この制御機構は「レドックス制御機構」と呼ばれている。この機構は、生体のタンパク質システイン残基上のチオール (SH) 基の酸化還元状態 (ジチオール \leftrightarrow ジスルフィド) に伴う、タンパク質の立体構造変化を利用した活性調節機構である。この機構の主役とされているのが、前述した GPX の関与するグルタチオン系と、もうひとつがチオレドキシニン系である。TRX は、成人 T 細胞白血病の研究過程でインターロイキン 2 レセプター (IL-2R) / α 鎖誘導因子として発見された ATL 由来因子であると近年同定された遺伝子である。TRX は酸化ストレスのような種々のストレスで誘導され、GSH と同様に H_2O_2 の除去する抗酸化物質としてのはたらきも持つ。他にも、H⁺ 供与体としてリボヌクレアーゼによる DNA 生合成や、メチオニンスルホキシドレダクターゼ、3' -ホスホアデニルスルフェイトレダクターゼなどの酵素に関与し、転写因子 nuclear factor- κ B や redox factor-1 を介した AP-1 を活性化するなど、生物内で様々なはたらきを持っている。また、近年では、TRX 依存性で、カタラーゼや GPX に並ぶ H_2O_2 除去作用をもっているとされているチオレドキシニンペルオキシダーゼや、TRX と活性部位を共有するチオレドキシニンスーパーファミリーも同定され、これらによるレドックス制御機構の解明が進んでいる。そして、このチオレドキシニンスーパーファミリーに属するのが、今回の実験ですべての DEP 分画で発現が減少したグルタレドキシニンである。GLRX は、-Cys-Pro-Gly-Cys- というジチオールを持った活性部位を有し、TRX と同様に基質タンパク質のジスルフィド結合を還元する。しかし、TRX と異なり、GSH のついたタンパク質から GSH を切り離すグルタチオン-ジスルフィドレダクターゼとしてもはたらいており、グルタチオンに依存してレドックス制御に関わっている。TRX と GLRX のメカニズムに関しては Fig を参照。今回、グルタレドキシニンの発現が減少したという事でチオレドキシニン系の方が優位にはたらいている事が考えられる。このように、DEP 分画添加によりレドックス制御に関わる酵素やストレスなど外来異物に対する解毒化の作用をもつ酵素やタンパクが多数変動しており、中でも GPX 及び GLRX は DEP に対し鋭敏な作用を示しており、DEP のマーカーとして知られる抗酸化系酵素 HO-1、この実験系では hCG に並ぶ、DEP の影響を解析する上での鋭敏な生体曝露指標になるのではないかと示唆された。

分画 SAw、WAc、WAp で多くの遺伝子が発現変動し、Crude と分画 N、SAE では遺伝子の変動に動きはみられていない傾向がみられた。この事より、Crude から 5 つに分画される事により、DEP 中の成分も分散され、各 DEP 分画中の成分の濃度も Crude より高くなった為、DEP 分画の作用も大きくなっている事や Crude とは異なった作用を示している事などが考えられる。また、Crude を分画した事によりその活性本体が分画 SAw、WAc、WAp に多く移行しており、その刺激性は SAw>WAp>WAc の順に大きい事、分画 N、SAE には活性本体が少ない事が示唆された。そして、クラスタリング解析の結果は、チップ A 及び B でほぼ異なった結果となったが、チップ A 及び B で Crude と分画 N、WAc はクラスターが離れた位置に属している為、Crude と分画 N 間、Crude と分画 WAc 間には遺伝子の発現パターンに類似性がみられないという傾向があった。その為、分画 N、WAc には活性本体が少ない、という事が示唆できる。hCG やアンドロゲンなど性ホルモンに作用を及ぼす内分泌攪乱作用を示す分画は分画 N で、遺伝子全体的な視野でその遺伝子発現変動に影響を及ぼしている分画は分画 SAw 及び分画 WAp であるという事が結論として導かれた。

公開資料

3. 2 in vivo グループ

3. 2. 1 種差の検討 (東京都健康科学センター 渡辺グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

【実験方法】 曝露実験は、ディーゼルエンジン (排気量 309cc、回転数 2,600 rpm で運転) の排出ガスを清浄空気で希釈し写真 1 に示した曝露チャンバー内に導入して行った。胎仔期・哺乳期・離乳後のラットを全排出ガス群 (希釈した排出ガスを曝露)・除塵排出ガス群 (ヘパフィルターで 0.05 μ m 以上の粒子状成分を除去した排出ガスを曝露)・対照群 (活性炭層とヘパフィルターを通した清浄空気を曝露) に分け 1 日 6 時間 12 日間曝露し、アレルギー反応・骨格形成・生殖器及び肺の形態と機能について検討した。表 1 に各チャンバー内の粒子状物質並びに二酸化窒素濃度を示した。アレルギー反応の検討のうちスギ花粉に対する IgE 抗体産生に関する実験は、図 1 に示したスケジュールで行い、曝露濃度段階を設定し閾値の検討を行った。

表 1 ディーゼル排出ガスの曝露条件

	粒子状物質 二酸化窒素	
	(mg/m ³)	(ppm)
対照群	<0.01	0.02
全排出ガス群	高濃度	1.71
	低濃度	0.17
除塵排出ガス群	高濃度	<0.01
	低濃度	<0.01



写真 1 動物曝露チャンバー

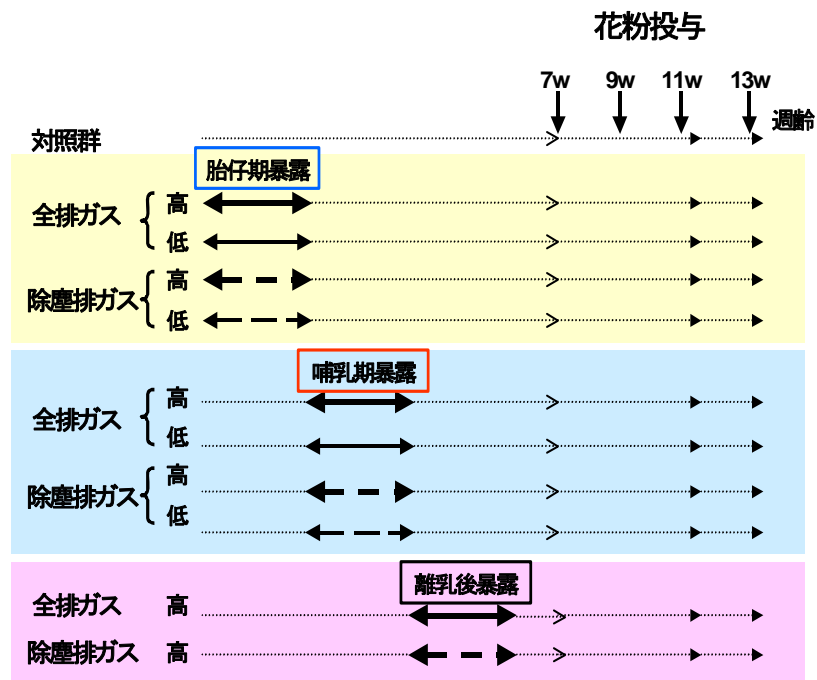


図1 各実験群の略称と実験スケジュール

公開資料

【結果】

アレルギー反応

①胎仔期に曝露（全排出ガス・除塵排出ガス）された場合、哺乳期、離乳後曝露に比べスギ花粉に対する反応が強く、花粉三回感作でIgE抗体が有意に上昇した（図2）。IgE抗体産生を指標として算出した排出ガス濃度の閾値は生活環境の約10倍であった。②気管支上皮に肥満細胞が著しく増加しており花粉症症状の発現を助長することが示された。③抗原としてスカシガイのヘモシアニン（KLH）を用いて同様の実験を行った結果KLHに対するIgE抗体が有意に上昇し、スギ花粉以外の抗原に対しても強いアレルギー反応を起こすことが明らかになった。④胸腺リンパ球はCD4優位でアレルギーを起こしやすい状態になっていた（表2）。⑤生後に親仔を入れ替える実験を行った結果、母親から次世代への免疫機能に対する影響は母胎内で起こることが明らかになった（図3）。

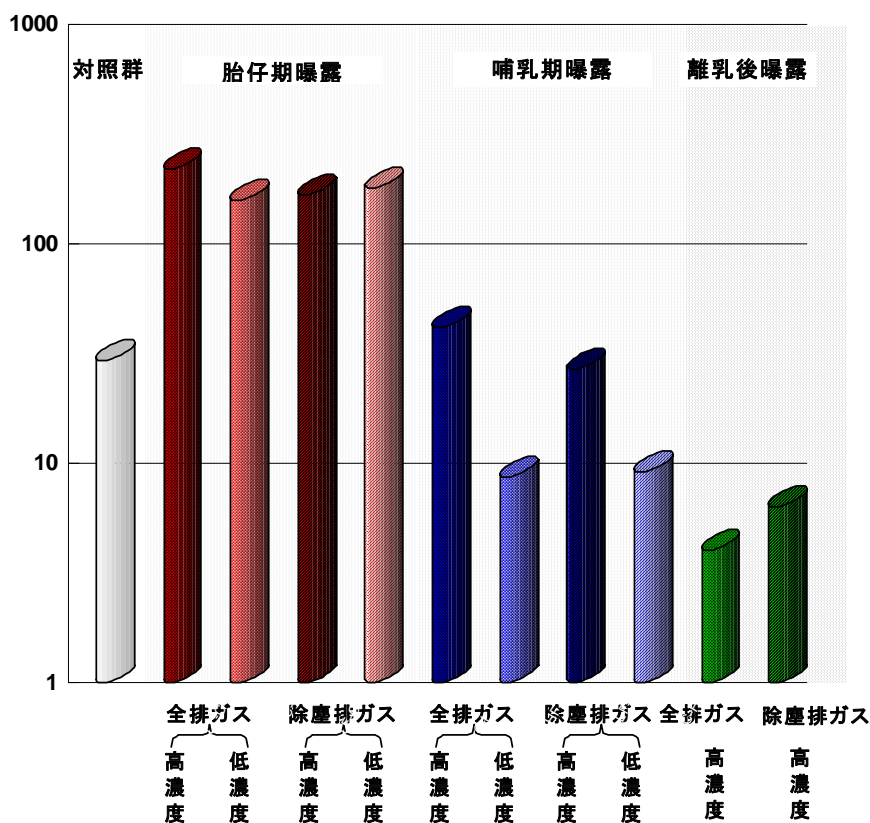
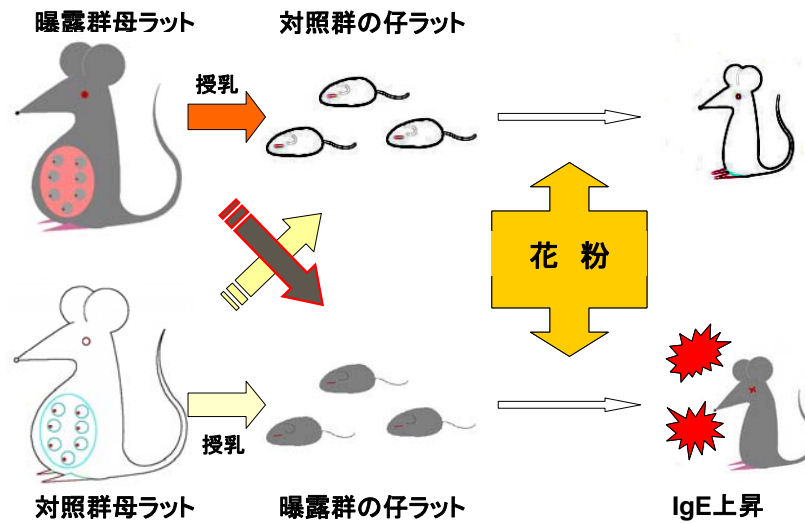


図2 スギ花粉に対する特異的IgE抗体価(3回投与)

表2 胸腺リンパ球の構成比率

	リンパ50000個中			
	CD4	CD8	CD4/CD8	
対照群	4551	2380	1.91	
胎仔期	全排出ガス群	4223	1674	2.52
	除塵排出ガス群	4398	1573	2.80
哺乳期	全排出ガス群	3606	2043	1.77
	除塵排出ガス群	3419	1966	1.74



骨格形成への影響

胎仔期に全排出ガスあるいは除塵排出ガスに曝露されたラットでは、胎仔期における頭頂骨の形成と石灰化は対照群より早期に認められたが、生後では頭蓋骨縫合部の癒合過程が遅延していた。対照群では、石灰化した骨に挟まれた間質組織に存在する基質はエオジンに強く染まりこの部分への骨化が進むと考えられた。曝露群では基質のエオジン染色性が弱く骨化の動きが遅延していた石灰化骨に骨芽細胞は認められたが、破骨細胞はきわめて少なく骨代謝障害の生じていることが示唆された。

免疫機能と骨組織とは身体における機能がかなり異なる。しかし、免疫反応の主体となるリンパ球、骨形成に関わる骨芽細胞並びに破骨細胞はともに骨髄由来である。排出ガスの胎児期における曝露によってアレルギー反応と骨形成の両方に変化がみられたことから、曝露の影響は胎児の未分化な組織の及ぶと考えられた。初期における頭蓋骨形成の違いが成長に伴ってどのような生理機能に関わってくるかの検討は今後の課題である。

生殖機能への影響

雄性生殖器官：排出ガスの胎仔期曝露群（全排出ガス・除塵排出ガス）では、胎仔精巣でセルトリ細胞形成抑制、性成熟後にセルトリ細胞と精子数の減少がみられた。セルトリ細胞は、胎生後期から生後数日の限られた時期に形成されること、精子の成熟過程に係ること、一つのセルトリ細胞が養育できる精子の数には上限があることが知られている。以上のことから排出ガスの胎仔期曝露は精巣形成時に不可逆的変化を起こし生殖機能の低下を起こすことが考えられた。

雌性生殖器官：胎仔卵巣では原始卵胞数の減少がみられた。一生涯に発育し排卵される卵胞の数は胎仔期に定まることが知られており、胎仔期曝露の影響と性成熟後の卵巣機能低下との関連が考えられた。

肺の生化学的・形態学的・呼吸機能の変化

全排出ガスあるいは除塵排出ガスに曝露された胎仔では、気管支分岐、芽状突起の形成、肺胞上皮細胞の増殖等、肺胞形成の初期段階には影響がみられないが、それに次ぐ肺胞上皮細胞への分化の段階で影響を受け、肺表面活性物質の欠乏を起こすことが明らかになっ

公開資料

た。自発性呼吸後の肺の組織学的所見では、肺胞の虚脱と気道の過拡張が顕著に認められた。

また、生後 12 ヶ月目の呼吸の仕方について検討した結果、胎仔期に曝露されたラットでは、呼吸時の体の動きが大きい（努力して呼吸する）こと、時間当たりの呼吸数が多い（一呼吸にかかる時間が短い）ことがわかった。胎仔期後半の肺表面活性物質の欠乏は、出生時における呼吸困難のみならず生後の肺の発育を阻害し呼吸機能の低下を起こすことが示唆された。

【結 論】

- ① ディーゼル排出ガスの曝露は、次世代の健康に影響を及ぼし生活の質(クオリティ・オブ・ライフ)を低下させる一要因となることが示唆された。
- ② 次世代に影響を及ぼす機序として、曝露された妊娠ラットの内分泌環境の変化が胎仔の未分化な間葉組織に作用し細胞間相互作用を阻害することによると考えられた。
- ③ 除塵曝露の場合でも全排出ガス曝露と同様の影響がみられ、排出ガス中のガス状成分あるいは除塵後も残存しているナノ粒子の関与が考えられた。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究の結果は、汚染物質の世代を超えた影響について明らかにしたものである。次世代の健康を守るために環境化学物質の基準値づくりを進める一助となる。

また、本研究の中には、加齢性変化が加速して現れたと考えられる形態や機能の変化があった。すなわち、排出ガスの曝露は加齢性変化を加速する可能性が考えられる。健康寿命をできるだけ長くする社会の仕組みづくりには、環境化学物質の問題にも注意を向ける必要があるという科学的根拠となる。

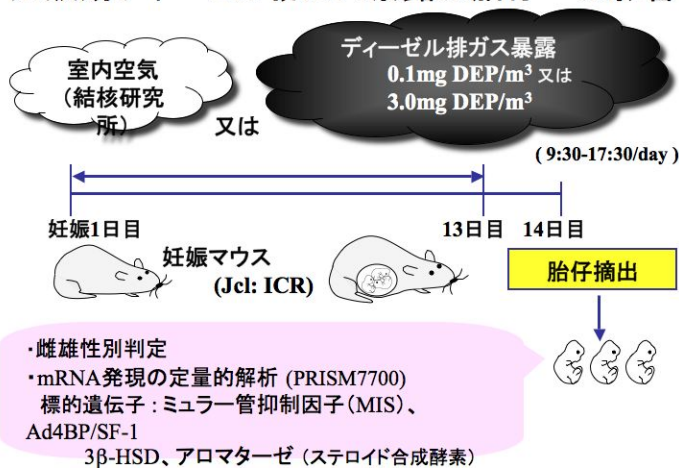
3. 2. 2 雄性生殖腺分化過程に及ぼす影響（東京理科大学 武田グループ、結核予防会結核研究所 菅原グループ）

(1)研究実施内容及び成果

DE 中には多くの化学成分が含まれており、それらの中にはエストロゲン作用、抗エストロゲン作用、抗アンドロゲン作用を示す物質が含まれていることが判明している。また、化学物質の生体影響は最も敏感な時期である胎仔期に注目すべきであることから、我々は胎仔期 DE 曝露によるマウス胎仔雄性生殖腺分化過程に及ぼす影響を検討した（右図）。

妊娠マウスに DE を曝露し、胎齢 14 日の雄胎仔への影響を検討した結果、精巢のセルトリ細胞から分泌され雄性生殖器への分化を誘導するミュラー管抑制因子(MIS: Müllerian inhibiting substance) および核内受容体型転写因子で性ホルモン産生を促進させる Ad4BP/SF-1 (adrenal 4- binding protein/steroidogenic factor 1)mRNA 発現量が有意に減少することが判明し、性腺原基から雄性生殖腺への分化抑制を引き起こす可能性が示唆される結果を得た（図1）。なお、雌胎子では、卵胞の発生に関与する Bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) の mRNA 発現が有意に減少していた。以上のことから、胎子期の DE 曝露による胎齢 14 日目の生殖腺分化への影響は、雄胎子のほうが雌胎子よりも感受性が高い可能性が考えられ、雌の生殖器発生にも悪影響を及ぼす可能性が示唆された。

妊娠期ディーゼル排ガス曝露の胎仔への影響



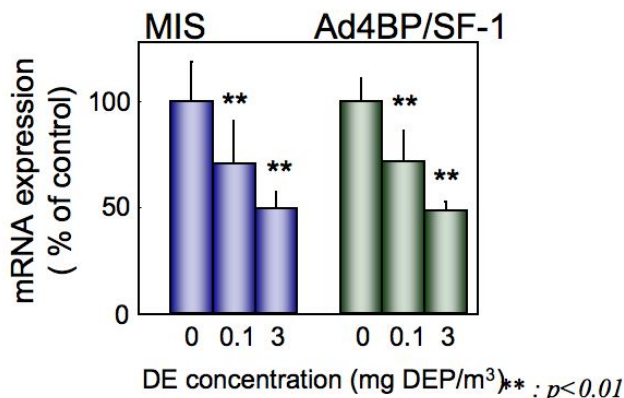


図1 胎仔期 DE 曝露による雄胎仔の性分化関連 mRNA 発現への影響

3. 2. 3 雄性生殖系に及ぼす影響 (東京理科大学 武田グループ、国立環境研究所 高野グループ、結核予防会結核研究所 菅原グループ)

本研究では、DE 曝露の雄性生殖系に及ぼす影響が継代的であるかをより詳細に検討する目的で、妊娠期間中に DE 曝露を行い、雄性産仔生殖系への影響を生殖器重量、DSP、血清中総テストステロン値およびホルモン合成関連諸因子 mRNA 発現変動を指標として検討した。また、DE はガス成分と微粒子成分であるディーゼル排気微粒子 (DEP: diesel exhaust particles) から構成されている。現在、DE に対する規制強化策として DEP 除去が進められているが、それによる生体影響の変化は未だ不明である。そこで、DE をフィルターに通したガス成分 (filtered-DE) 曝露を同様に行い、その影響を検討した。

【実験】

国立環境研究所の DE 曝露チャンバーを用いて、ICR 系妊娠マウスに妊娠 2 日目から 16 日目までの期間、マウスの活動期である夜間に 1 日 12 時間 (10 p.m.-10 a.m.)、1.0 mg DEP/m³ の濃度で DE および filtered-DE (0.30 μm 以上の粒子状物質を 99.97% 除去するフィルターを使用) を曝露した。妊娠 17 日目以降は、清浄大気下で出産・飼育し、対照群は全期間清浄大気下で飼育した。雄性出生仔を 8、16 日齢および 3、4、5、12 週齢で麻酔下に心採血し、生殖器 (精巣、精巣上体、前立腺、凝固腺、精嚢) を摘出して重量を測定した。各臓器をホルマリンで固定後 HE 染色し、光学顕微鏡下に組織学的検討を行なった。DSP は、精巣をホモジナイズして精子濃度を求め、重量換算して算出した。また、ELISA 法で血清中総テストステロン濃度を測定した。さらに、定量的 PCR 法で精巣におけるテストステロン分泌を調節するホルモンのレセプターおよびテストステロン産生に関与する性ステロイドホルモン合成関連因子の各 mRNA 発現量を測定した。解析した因子を以下に示す。ホルモンレセプター; (1) AR: androgen receptor、(2) ER: estrogen receptor、(3) LHR: luteinizing hormone receptor、(4) FSHR: follicle stimulating hormone receptor、性ステロイドホルモン合成関連因子; (1) StAR: steroidogenic acute regulatory protein、(2) P450_{sc}: cytochrome P450 side-chain cleavage、(3) 3β-HSD: 3β-hydroxysteroid dehydrogenase、(4) P450_{c17}: 17α-hydroxylase/C17-20-lyase、(5) 17β-HSD: 17β-hydroxysteroid dehydrogenase、(6) P450_{arom}: cytochrome P450 aromatase。

【結果】

胎仔期 DE 曝露では、体重が 8 日齢および 5 週齢で有意に低下し、16 日齢で低下傾向を示した。一方、体重換算した副生殖腺重量は、8 および 16 日齢で有意に増加し、5 週齢で

公開資料

低下傾向を示した。また、DSP が 5 および 12 週齢で有意に低下した (図 1)。DSP 低下の原因を検討する目的で、テストステロンおよび同合成関連因子の遺伝子レベルでの解析を行なった。その結果、血清中テストステロン濃度は、3 週齢で有意に減少し、12 週齢で有意に上昇した。また、テストステロン合成関連因子 mRNA 発現量では、5 週齢で FSHR が有意な増加、AR が増加傾向を示し、12 週齢で StAR が有意に増加、ER および 17 β -HSD が減少傾向を示した。

一方、胎仔期 filtered-DE 曝露では体重換算した精巣重量が 16 日齢で有意に低下し、8 日齢で低下傾向を示した。また、DE 曝露群と同様に DSP が 12 週齢で有意に低下した (図 2)。さらに、血清中テストステロン濃度が 5 週齢で有意に上昇した。mRNA 発現量では、5 週齢で FSHR が有意に増加し、LHR が増加傾向を示し、12 週齢で LHR、P450c17 および 17 β -HSD が有意に増加し、StAR が増加傾向を示した。

さらに、精巣組織の観察の結果、両曝露とも減数分裂異常像である多核巨細胞が多く認められたほか、精細管内空胞化や分裂停止像の増加などの異常所見が認められた。

【まとめ】

本研究はいまだ明らかでない、DE あるいは filtered-DE の胎仔期曝露が出生仔の精巣機能に及ぼす影響を検討したものである。精巣機能の二つの大きな指標であるテストステロン産生と精子産生 (DSP) の結果では、青年期以降にテストステロン上昇が認められ、さらに DSP は精子形成の始まる青年期以降に低下するという点で両曝露系ともに共通した結果を示した。

本研究で認められた高テストステロン値は、視床下部からの性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH: gonadotropin releasing hormone) 分泌に対するネガティブ・フィードバック作用により、精子形成過程に共に重要な卵胞刺激ホルモン (FSH: follicle stimulating hormone)、黄体形成ホルモン (LH: luteinizing hormone) 分泌が抑制されることで精子産生を低下させた可能性が考えられた。なお、DE 曝露では幼若期にテストステロン低下が認められたが、この時期のテストステロンはセルトリ細胞維持にも重要な役割を果たしていることから、低テストステロン値がセルトリ細胞数減少を招き、その結果、DSP が低下した可能性が考えられた。さらに、精巣組織で観察された精母細胞分裂異常像である多核巨細胞や各種異常所見の増加も、これらの結果を支持すると考えられる。なお、検討した精巣内各種因子の mRNA 発現量に変動が認められているが、それらの変動と精巣の生理機能との関連については今後の検討課題である。

以上、本研究の結果、DE あるいは filtered-DE の胎仔期曝露はともに血清中テストステロン濃度の変動および精巣組織細胞の異常像を惹起しており、その結果、精子形成を抑制している可能性が示唆され、出生仔の精巣機能に有害な影響を与えることが示された。この結果は、DE の影響が DEP の中でも超微粒子成分による可能性を示唆するものである。

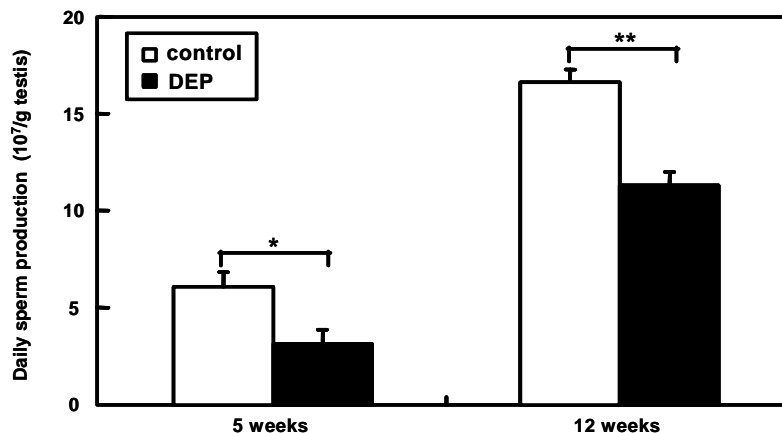


図 1 胎仔期 DE 曝露が一日精子生産量(DSP)に与える影響
思春期発来時(5 週齢)、成獣時 (12 週齢) ともに精子濃度が減少している

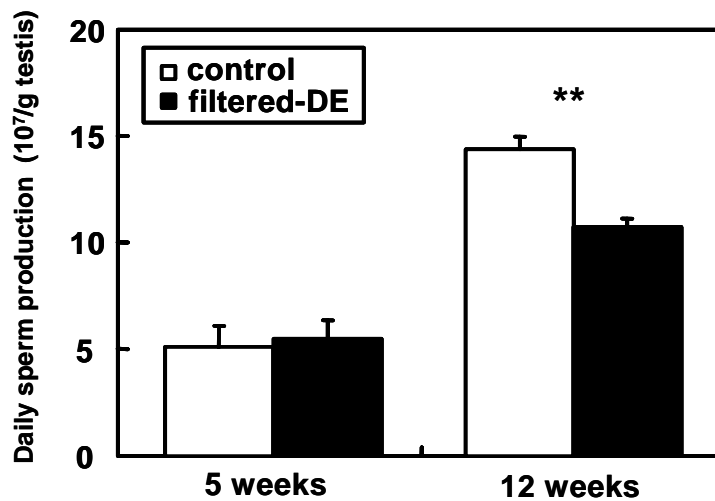
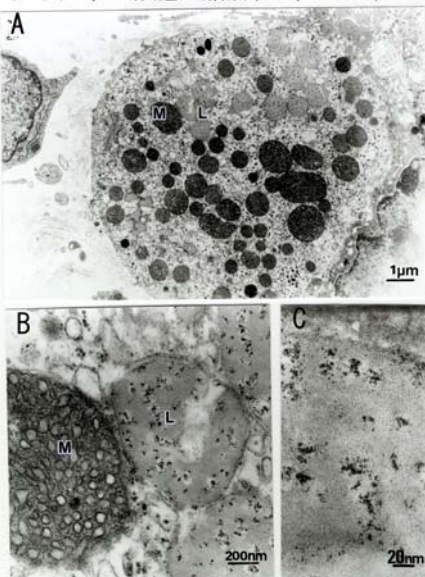


図2 フィルター除塵 DE 胎仔期曝露が一日精子生産量に与える影響
除塵後も 12 週齢時には精子数減少が認められる

ライディヒ細胞の脂肪粒 (T4D)



M:ミトコンドリア L:脂肪滴
A, B, Cの順に拡大。L内に粒子状物質が認められる。

さらに、最近、我々は、現在の環境基準値程度の低濃度で胎仔期および出生後の連続曝露を実施すると、雄性産仔においてテストステロン値の変動、雄性産仔の精子形成能の低下（一日精子生産量の低下および精巣組織像の悪化）および精子性状の悪化（運動率低下、奇形率上昇）が生じることを見だし、DE 曝露は、精液性状を悪化させる因子のひとつである可能性が推定される結果を得ている。さらに、電子顕微鏡を用いた検討で、同じく胎仔期曝露を行なった雄性産仔の精巣に存在し精子形成に重要な役割を果たすセルトリ細胞では活性酸素種によって生じるのと同様のミトコンドリアクリステの崩壊像が認められるとともに、精巣間質細胞（ライディヒ細胞）においては細胞内の脂肪滴にディーゼル排ガス由来と推定される無数の数 nm サイズの超微粒子が存在することを認めている（左図）。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究の結果、DE 胎仔期曝露は内分泌かく乱作用を示して、産仔の精子形成能に重大な影響を与えていることが示された。今後、これらの障害の防御法に関する検討を加えるとともに、ヒトにも起こりうるのかという、最も重要な課題についても、疫学的手法の応用も含めてさらに詳細な検討を加えたい。

3. 2. 3 ディーゼル排気微粒子(DEP)構成成分による感染性肺傷害の増悪と包括的遺伝子発現解析 (国立環境研究所 高野グループ)

(1) 研究実施内容および成果

自動車排気由来する大気汚染物質は、粒子状物質、二酸化窒素等の窒素酸化物、二酸

化硫黄等の硫化化合物、揮発性有機化学物質、金属、不完全燃焼後の燃料やオイル等、様々な物質を含有する。最近の疫学的報告によれば、これらの大気汚染物質の中でも、大気中の浮遊粒子状物質濃度の上昇が呼吸器疾患や循環器疾患の有症率、有病率、死亡率と、短い潜時で高い相関を示すことが明らかになっている。特に、大都市における浮遊粒子状物質の多くの部分を占めるディーゼル排気微粒子(DEP)は、その特性から健康影響が危惧されている。DEPは、炭素成分をcore(核)とし、その内部や周囲に、鉄や銅などの金属成分、硝酸や硫酸等のイオン成分、そして芳香族炭化水素等の化学物質といった非常に多くの物質から構成される。化学物質としては、ベンツピレンやニトロアレンなどの変異原性の強い多環芳香族炭化水素や種々のキノン系物質、そして環境ホルモンとしての作用が懸念されるダイオキシンが含まれることも明らかになっている。また、DEPに含まれる化学物質や金属成分は、持続的にスーパーオキシドとヒドロキシルラジカルといった反応性の高いフリーラジカル(活性酸素)を生成する可能性も指摘されている。一方、DEPは平均直径が0.2ミクロン未満と微小なため、容易に空中を浮遊し、吸気により気道に進入すると、肺胞領域にまで到達する。そのため、DEPの呼吸器系への傷害性がまず問題となる。また、近接する循環器系への影響も危惧されている。

事実、浮遊粒子状物質の健康影響は、呼吸器系・循環器系の有病者をはじめ、特定の高感受性群に特に出現しやすいことが近年の疫学的報告で明らかにされている。これらの浮遊粒子状物質に対する高感受性群は、気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患、慢性気管支炎、肺炎、循環器疾患、糖尿病、免疫不全状態、等の患者、入院患者あるいは老人施設入所者、高齢者、等より構成されている。これらの諸病態を有する個人あるいは患者は、感染症、特にグラム陰性菌の感染を被りやすく、感染を契機とする急性増悪により重症化をきたすことがしばしば経験される。しかし、浮遊粒子状物質がこれらの高感受性群に急性かつ重篤な健康影響をきたしうるメカニズムを証明し、疫学的報告に確固たる拠り所を与える実験的研究は、これまで皆無であった。

そこで我々は、DEPがグラム陰性菌に由来する感染性肺傷害を増悪することを、細菌毒素 lipopolysaccharide (LPS)を用いた実験的研究により証明した¹⁾。しかしながら、この検討では、限られた分子の変動解析にとどまり、また、病態増悪に主として寄与するDEPの主構成成分の特定には至っていない。そこで、本研究では、より幅広い遺伝子発現への影響を検討することを目的として、cDNA マイクロアレイ解析を用いた肺組織における遺伝子発現解析を行うとともに、DEPをジクロロメタンで有機化学成分と残渣粒子成分に分画し、感染性肺傷害に対するDEPの構成成分による影響の相違を検討した。

1) DEPがLPS誘発急性肺傷害に及ぼす影響に関するcDNAマイクロアレイ解析

【方法】ICR系雄性マウス(6週齢)に以下の実験群を設定し、ハロセン麻酔下に気管内投与を施行した。1) vehicle群 [PBS (pH7.4)-0.025% Tween 80-0.025% DMSO, 0.1ml/body]、2) DEP(250 μ g/body)群、3) LPS群(100 μ g/body, *E. coli* B55: 05, Difco Lab)、4) DEP+LPS群(2と3の併用)。投与4時間後に屠殺し、肺組織を摘出した。肺組織から抽出されたmRNAの5'末端をCy3あるいはCy5でラベルし、ハイブリダイゼーション、スキャンを行った。マイクロアレイはLifeArray (Incyte Pharmaceuticals)、蛍光検出はAxon GenePix scanners、データ解析にはIncyte GEMtoolsTM software (Incyte Pharmaceuticals)を使用した。検出されたシグナル値がvehicle群に比較して2倍以上、あるいは6倍以上増加した遺伝子数を算定した。加えて、シグナル値が20倍以上を示した遺伝子に関して、さらにリアルタイムPCR法を用いてその遺伝子発現を定量的に解析した。

【結果】vehicle群に対して、2倍以上発現が増加していた遺伝子数は、DEP群で38遺伝子、LPS群で1073遺伝子、DEP+LPS群で204遺伝子であった。また、6倍以上発現が増加した遺伝子数は、DEP群、LPS群、DEP+LPS群でそれぞれ3、18、26遺伝子であった。特に、DEP+LPS群において、metallothionein-1 and -2, S100 calcium-binding protein A9, lipocalin 2, and small inducible cytokine B family member 10の5遺伝子がシグナル値にして20倍以上を示した。さらに、この5遺伝子についてリアルタイムPCRを行ったところ、マイクロアレイのデータと概ね一致する結果が得られた(図1)。

公開資料

【考察】LPS による遺伝子発現の増加が、広範囲の遺伝子に比較的軽度の影響を及ぼしていたのに対し、DEP と LPS の併用により、限られた数の遺伝子の発現が顕著に増強されることが明らかとなった。この比較的少数の分子の発現増強が、DEP による LPS 誘発急性肺傷害の相乗的増悪に寄与している可能性が示唆された。

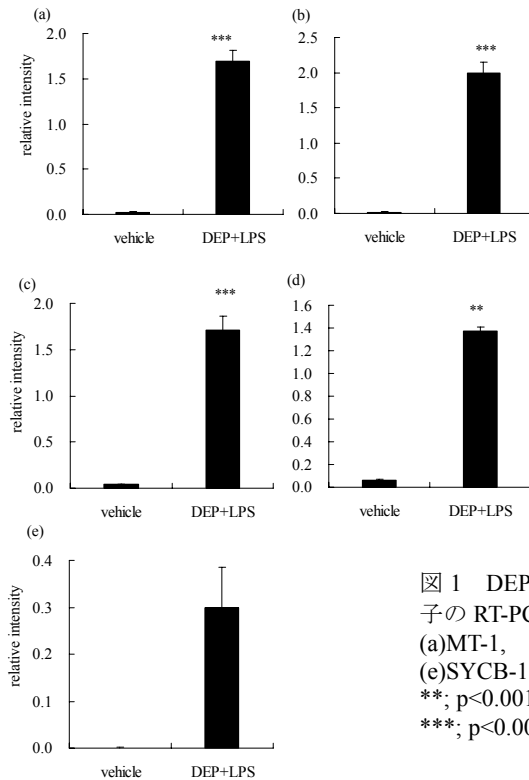


図1 DEP と LPS の併用投与で高発現を示した遺伝子の RT-PCR

(a)MT-1, (b)MT-2, (c)S100A9, (d)Lopocalin2, (e)SYCB-10

**、p<0.001 vs. vehicle group

***、p<0.0001 vs. vehicle group.

2) DEP 構成成分による急性肺傷害の増悪効果

【方法】ICR 系雄性マウス(6 週齢)に以下の実験群を設定し、ハロセン麻酔下に気管内投与を施行した。1) vehicle 群 [PBS (pH7.4)-0.025% Tween 80-0.25% DMSO, 0.1ml/body] 2)有機化学成分群(DEP-OC:125µg/body), 3) 残渣粒子群(washed DEP: 125µg/body), 4)LPS 群(75µg/body), 5)DEP-OC + LPS 群 (2 と 4 の併用), 6)washed DEP + LPS 群 (3 と 4 の併用)。投与 24 時間後にエーテル麻酔下で屠殺後、気管支肺胞洗浄液(BALF)の細胞所見、肺水腫の重症度、病理組織学的所見、肺組織における

炎症性タンパクの発現(IL-1β; interleukin-1β, MIP-1α; macrophage inflammatory protein-1α, MCP-1; macrophage chemoattractant protein-1, KC; keratinocyte chemoattractant)を検討した。また、これらタンパク、Toll-like receptor (TLR) 2 および 4 の遺伝子発現を、投与 4 時間後に評価した。DEP の抽出は、DEP1g に対して、10ml のジクロロメタンによる超音波抽出を 4 回繰り返すことにより、可能な限り有機化学成分を回収し、その残渣を粒子成分として用いることとした。

【結果】DEP-OC、washed DEP の単独投与では、炎症細胞浸潤(図 2)、肺水腫(図 3)、病理学的所見(データ未表示)に、vehicle 投与と明らかな相違はなかった。LPS 群では、vehicle 群と比較し、BALF 中の好中球数および肺水分量が有意な増加を示し、肺胞隔壁の炎症細胞浸潤も認められた。DEP-OC+LPS 群では LPS 群と比較して有意な BALF 中の好中球の増加を認めたが、肺水分量および病理組織学的所見において有意な差は見られなかった(図 2,3)。一方、washed DEP+LPS 群では LPS 群と比較して有意な好中球数、肺水分量の増加と、炎症細胞浸潤の増悪、肺胞出血が観察された。肺における IL-1β, MIP-1α, MCP-1, および KC のタンパク発現は、DEP-OC、washed DEP の単独投与では vehicle 投与と変化はなく、LPS 群で

公開資料

vehicle 群に比較して有意な増強が見られた(表 1,2)。さらに、washed DEP+LPS 群においては、LPS 単独群に比較し著明かつ有意な発現量の増加が認められた。一方、DEP-OC+LPS 群では、これらのタンパク発現は LPS 群に比較し抑制あるいは抑制傾向を示した。IL-1 β および MIP-1 α の肺組織における遺伝子発現も、タンパク発現とほぼ同様の傾向を示した(データ未表示)。

LPS の重要な receptor である TLRs の遺伝子発現に関し、TLR2 は LPS 群で有意な上昇が認められた(図 4.A)。加えて、LPS と DEP-OC あるいは washed DEP との併用投与により、さらなる発現量の増加が認められ、washed DEP+LPS 群でより顕著であった。TLR4 の発現は、DEP-OC 群、washed DEP 群、LPS 群、DEP-OC+LPS 群において若干の増加を示し、washed DEP と LPS の併用で LPS 単独群に比較し有意な増強が認められた(図 4.B)。

【考察】DEP による LPS 関連急性肺傷害の増悪は、DEP に含まれる多様な有機化学物質よりむしろ残渣である粒子成分によってもたらされることが示唆された。この増悪には、炎症性サイトカイン、ケモカイン、および TLRs の発現増強が関与している可能性も示された。一方、炭素粒子である Activated charcoal の併用では有意な肺水腫の増悪は認められなかったことから(データ未表示)、DEP に含有される難抽出性の脂溶性化学物質、遷移金属、水溶性成分の役割について更なる検討を加える必要があるものと考えられた。また、DEP に含有される有機化学物質に関しても、炎症性タンパクの発現を介さない炎症性肺傷害増悪経路の存在が示唆された。

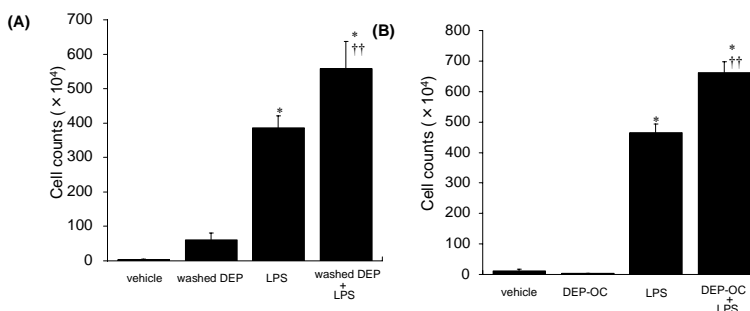


図 2 気管支肺胞洗浄液中の好中球数の変化
*: p<0.01 vs. vehicle, ††: p<0.01 vs. LPS.

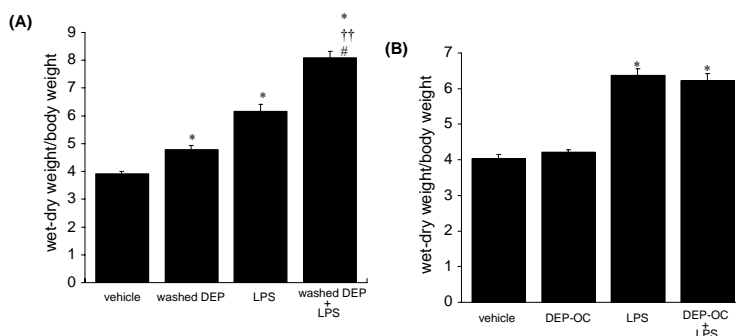


図 3 肺水分量の変化
*: p<0.01 vs. vehicle, ††: p<0.01 vs. LPS, ‡: p<0.01 vs. washed DEP

/total lung supernatants					
Group	n	IL-1 β (ng)	MIP-1 α (pg)	MCP-1(pg)	KC(pg)
vehicle	5	0.47±0.28	0	0	0
washed DEP	5	0	0	0	0
LPS	5	28.56±6.67*	2269.7±586.6*	4033.2±656.4*	3205.2±497.2*
washed DEP+LPS	5	47.82±7.88*†	4201.8±493.5*†	7477.4±811.4*††	4146.0±641.9*†

表1 LPSとDEP残渣粒子成分の併用による肺組織中の炎症性タンパク発現変化

/total lung supernatants					
Group	n	IL-1 β (ng)	MIP-1 α (pg)	MCP-1(pg)	KC(pg)
vehicle	6	0.14±0.09	0	0	0
DEP-OC	6	0.07±0.07	0	0	0
LPS	6	44.67±6.48*	2989.3±432.9*	5286.1±992.8*	3903.6±597.3*
DEP-OC+LPS	6	37.18±7.43*	1932.1±440.9*†	3712.6±602.4*	2417.1±535.6*††

表2 LPSとDEP有機化学成分の併用による肺組織中の炎症性タンパク発現変化

*: p<0.01 vs. vehicle, †: p<0.05 vs. LPS, ††: p<0.01 vs. LPS

(2)研究成果の今後期待される効果

我々の研究成果は、大気中の浮遊粒子状物質の増加が細菌感染に関連する炎症性肺傷害を増悪する可能性があることを示した。これは、粒子状物質による大気汚染に対する高感受性群の存在に言及したこれまでの疫学的知見に、少なくとも部分的に実験的論拠を与えうるものと考えられる。また、マイクロアレイ解析を用いた検討が、DEP に関連する病態の増悪メカニズムを解明する手段として有用であることも示唆された。マイクロアレイ解析は、本病態に限らず、メカニズムの解明や早期バイオマーカーの検索ツールとしても有効である可能性があり、今後ますます研究を進展する必要がある。また、DEP の構成成分により病態への増悪影響がかなり異なることから、今後、さらに成分を細かく分画し、主要な増悪因子を特定していくことが望まれる。

3. 3 脳神経系への影響（東京理科大学 武田グループ、星薬科大学 鈴木グループ）

1. 脳内遺伝子発現に及ぼす影響（東京理科大学 武田グループ）

(1) 研究実施内容及び成果

我々は、周産期 DE 曝露が脳神経系の発達過程に及ぼす影響を新生仔の脳内性ステロイドホルモン関連遺伝子（アンドロゲン受容体、 $ER\alpha$ 、 β 、アロマターゼ）および甲状腺ホルモン関連遺伝子（甲状腺ホルモン受容体、BDNF(brain-derived neurotrophic factor)、ニューログラーニン）の発現量を中心として検討し、さらに、ストロスタンパク関連遺伝子（HO-1(heme oxygenase 1)、メタロチオネイン）の脳内発現量を測定することで、DE 中の成分が脳に到達しているか否かの指標とすることを試みた²³⁾。曝露は、生殖器系に及ぼす影響と同様の条件、濃度で実施した。その結果、周産期の DE 曝露は新生仔脳内 $ER\alpha$ 、 β の mRNA 発現量を最大 1.5 倍まで有意に上昇させていた。発現上昇パターンは曝露濃度、時期などによって異なっていた。この結果から、DE 曝露が脳内ステロイドホルモン系、特にエストロゲン系に影響を与えている可能性が推測された。一方、甲状腺ホルモン関連因子に関して、いくつかの因子について変動傾向は認められたものの有意な変動は観察されなかった。なお、甲状腺に関して、遺伝子レベルでの変動は認められなかったものの、電子顕微鏡観察では形態変化が認められる所見が得られており、現在、検討中である。また、DE の脳内移行に関する検討では、チトクローム P450 の一つであり、

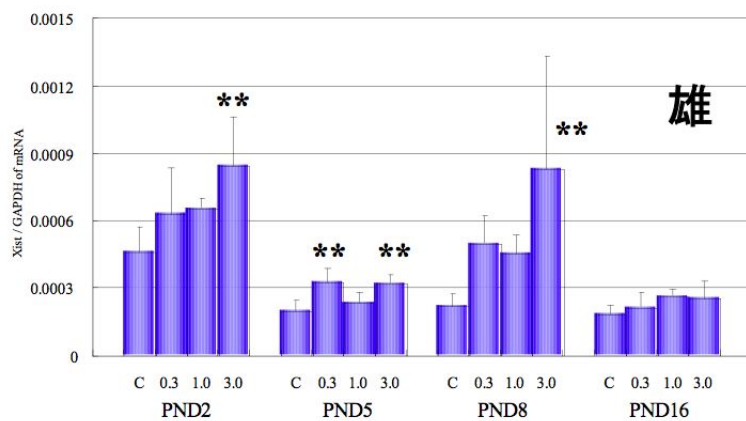


図1 DEの胎仔期曝露による新生仔(雄マウス)の脳内における Xist mRNA発現量
n=5 **<0.01 vs. control by Dunnet test.

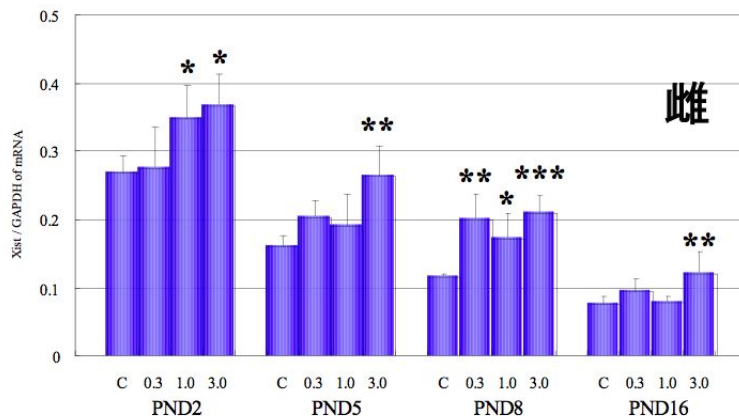


図2 DEの胎仔期曝露による新生仔(雌マウス)の脳内における Xist mRNA発現量
n=5 *<0.05, **<0.01, ***<0.001 vs. control by Dunnet test.

PAHにより誘導されることが分かっており DEP 曝露のバイオマーカーの一つとして考えられている CYP1A1 mRNA の発現上昇が、曝露群で確認された。さらに、HO-1 とメタロチオネインも一部では変動が認められた。

さらに、最近、ICR 系マウスに妊娠 2 日から 16 日まで 0.3、1.0、あるいは 3.0 mgDEP/m³ の濃度で曝露し、仔マウス大脳部を摘出して遺伝子発現検索をバイオマトリックス研究所製 cDNA マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、1.5 倍以上の発現変動がみられた遺伝子は 3 つあり、その中でも機能の明らかな Xist 遺伝子に着目して、成長に伴う変動を検討した。その結果、3.0 mgDEP/m³ では雌全群、雄 2、5、8 日齢（雌 1.4~1.8 倍、雄 1.6~3.8 倍）、1.0 mgDEP/m³ では雌 2、8 日齢（1.3~1.5 倍）、0.3 mgDEP/m³ では雌 8 日齢、雄 5 日齢（雌 1.7 倍、雄 1.6 倍）でそれぞれ有意な上昇が認められた。結果は、DE の胎仔期曝露は濃度依存的に次世代における Xist 遺伝子の発現量を上昇させていることが示唆されている。本結果は今のところ、XistmRNA の発現上昇を示すのみであるが、これらが、実際の X 染色体不活性化に役割を果たすのかどうかは不明であり、現在、検討中である。

(2) 研究成果の今後期待される効果

周産期の DE 曝露により DEP が新生仔脳内に移行していること、さらに、DE 曝露が発生過程においてその性分化に何らかの影響を与える可能性を示唆するものである。3. 2. 1 で述べた胎仔で明らかにされた性分化関連因子の変動とともに、DE 曝露は性分化に影響を与える可能性があり、今後の検討が重要である。

3. 3. 2 DE 曝露マウスにおける行動評価（星薬科大学 鈴木グループ、東京理科大学 武田グループ）

(1) 研究実施内容及び成果

DEP の成体期慢性曝露マウスにおける行動評価

DEP の曝露は国立環境研究所曝露チャンバーを使用し、3 mg/m³、12 hr/day の条件で、1、3 および 6 ヶ月間慢性曝露することにより曝露マウスを作成した。まず、通常の飼育ケージにおける運動量を赤外線カウンター法に従って検討した。その結果、雄性曝露マウスの暗期における運動量の減少が認められた。さらに、事務所衛生規則値 (0.15 mg/m³) 以下である 0.1 mg/m³、12 hr/day の曝露においても、曝露期間が長くなるに従って、暗期における運動量の減少傾向が認められた。これらの結果は、サーカディアンリズムの変化や情動性の変化に起因する可能性が考えられるが、その作用点としては脳内 serotonin (5-HT) 神経系や dopamine 神経系の関与が示唆される。これらの神経系は学習・記憶にも重要な役割を担っていることが知られているため、次に、記憶の保持に対する DEP 慢性曝露の影響について step through 法に従い検討を行った。この方法では、ライトで明るく照明された A 区画と、暗く電気刺激を与える B 区画の 2-compartment box を用いた。マウスは明るい場所を嫌う性質があるため、A 区画に入れられたマウスは、box 間のしきりをとることにより速やかに B 区画へ移動する。この時の B 区画へ移動するまでの時間をプレ値とした。条件づけ日では、マウスが A 区画から B 区画に移動した際に電気刺激を与え、翌日からは電気刺激を与えず、A 区画から B 区画へ移動するまでの時間を測定した。マウスは、B 区画へ移動すると電気刺激を与えられることを学習するため、条件づけの翌日からは B 区画への移動時間が延長するが、日を重ねるに従い電気刺激を与えられた記憶が保持できなくなり、移動時間がプレ値にまで回復していく。DEP を慢性曝露されたマウスにおいて、記憶保持能力の低下が認められた。さらに、我々は情動変化に着目し、特に不安感受性の変化について明暗試験法に従って検討した。この方法では、明るく広い白区画と暗く狭い黒区画からなり、両区画間を自由に行き来できる 2-compartment box を用いた。マウスは、明るく広い場所を嫌い、狭く暗い場所を好む性質を有している。マウスはこの box に入れられると、新奇環境であるため探索行動を示す。しかしながら明るく広い白区画に不安を感じ、探索行動をしたい欲求と白区画の不安感との葛藤が起こる。元来、本法は抗不安薬のスクリーニング法として開発された手法ではあるが、不安感受性の亢進したマウ

スでは白区画への滞在時間が減少する。DEP を慢性曝露されたマウスにおいて、不安感受性の亢進が認められた。以上の結果から、DEP の慢性曝露が情動行動に影響を及ぼす可能性が示唆された。そこで我々は、情動行動を担う主要な神経系である dopamine 神経系および 5-HT 神経系における受容体の機能変化について [³⁵S]GTPγS binding assay に従い検討した。この方法は、マウスの脳から細胞膜標本を取り出し、*in vitro* において作動薬を処置した際の受容体の機能を直接的に測定する方法である。DEP 慢性曝露により、全脳における dopamine 受容体の機能変化は認められなかったものの、全脳における 5-HT 受容体の有意な機能亢進が認められた。

以上のことから、DEP の慢性曝露により 5-HT 神経系の機能変化に起因した記憶保持能力および情動行動の変化が引き起こされる可能性が示唆された。しかしながら、これらの変化は全ての曝露マウスで認められるものではなく、それぞれの行動変化が一部の曝露スケジュール・曝露濃度で曝露されたマウスのみで認められたにすぎなかった。したがって、DEP の成体期慢性曝露は情動行動、記憶の保持に変化を及ぼす可能性は否定できないものの、中枢神経系に対してそれほど重篤な障害は与えないものと考えられる。

DEP の胎仔期および成長期慢性曝露マウスにおける行動評価

脳の機能的な発達過程において、最も外界から影響を受けやすいのは胎仔期から成長期の期間である。成体の脳は血液-脳関門が発達しており、血液から薬物などの脳への侵入を防いでいる。この血液-脳関門は、成長期以降に発達することが報告されているため、胎仔期から成長期にかけては血液-脳関門がほとんど形成されておらず、未発達であると考えられる。したがって、このような時期に DEP の曝露を受けると、成体と比較して容易に DEP が脳内へ移行することが推察される。さらに、脳の発達において神経細胞の増殖は胎仔期、特に器官形成期に最も盛んに行われることが明らかにされている。そのため、生後の脳重量は胎仔期ほど変化しない。一方、脳の機能的な発達を示すシナプスの形成およびシナプス密度の増加に伴う神経ネットワークの構築は、出生後の成長期において最も盛んに行われていることが報告されている。すなわち、胎仔期および成長期が、中枢神経系において DEP などの環境化学物質に対する感受性の最も高い時期であると考えられる。そこで我々は、胎仔期および成長期に 0.3、1 および 3 mg/m³ を 12 hr/day の条件で DEP を曝露された次世代モデルを作成し、行動薬理的に検討を行った。次世代モデルは、胎児期においては胎盤を通じて、成長期においては母乳および直接吸引することにより DEP に曝露されることとなる。通常の飼育ケージにおける運動量を赤外線カウンター法に従って検討した結果、DEP の胎児期および成長期慢性曝露により、運動量の有意な増加が認められた (図 1)。特に、新奇環境への馴化の過程である測定開始直後の運動量の増加が認められた。新奇環境への適応能力の低下には 5-HT 神経系の機能変化に起因する不安感受性亢進の関与が考えられる。そこで、次に、DEP の胎児期および成長期慢性曝露による不安感受性の変化を明暗試験法に従って検討した。その結果、対照群と比較して白区画への滞在時間変化、すなわち不安感受性の変化は認められなかった (図 2)。さらにはストレスを負荷した際の不安感受性の変化について検討を行った。一般に、ストレスを負荷された直後は不安感受性が増大し、明暗試験における白区画への滞在時間の減少が認められる。本実験では、その減少率を検討することで、ストレスに対する感受性の変化について検討した。ストレスサーとしてコミュニケーションボックス装置を用いた。装置は床に刺激電流が流れるステンレス製のグリッドが敷いてあり、透明のしきり板によって 9 区画に分割されている。それぞれの区画は直接電気刺激を受ける A 区画と、プラスチック製のショック回避プレートを敷くことにより電気刺激を受けない B 区画から構成されている。B 区画のマウスは直接電気刺激を受けないが、隣接する電気刺激を受けるマウスの飛び跳ね、もがき、悲鳴、排尿、排便などの情動反応にさらされることにより、不安や恐れなどの心理的ストレスを受けることになる。そこで、DEP の胎児期および成長期慢性曝露マウスを B 区画に、同系統の非曝露マウスを A 区画に入れ、DEP の胎児期および成長期慢性曝露マウスに心理的ストレスを負荷した。心理的ストレスを負荷した直後に明暗試験を行ったところ、DEP の胎児期および成長期慢性曝露マウスにおいて対照群と比較し、白区画滞在時間の減少率に増大

公開資料

傾向が認められた (図 2)。

以上のことから、DEP の胎児期および成長期慢性曝露により、ストレスに対する脆弱性が引き起こされる可能性が示唆された。

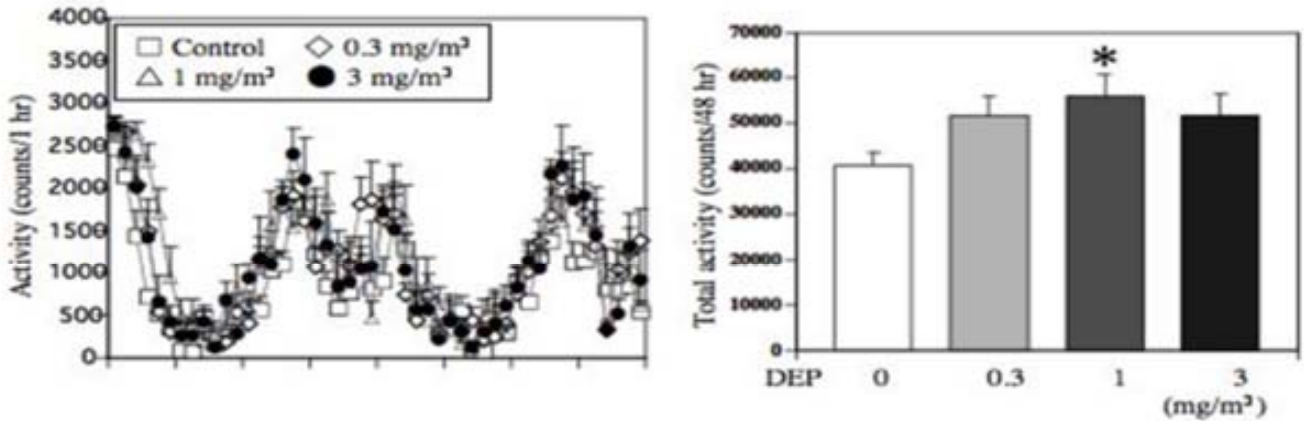


図 1 DEP の胎児期および成長期曝露が自発運動量に及ぼす影響
DEP の胎児期および成長期曝露により、自発運動量の亢進が認められた。* $p < 0.05$ vs. control group.

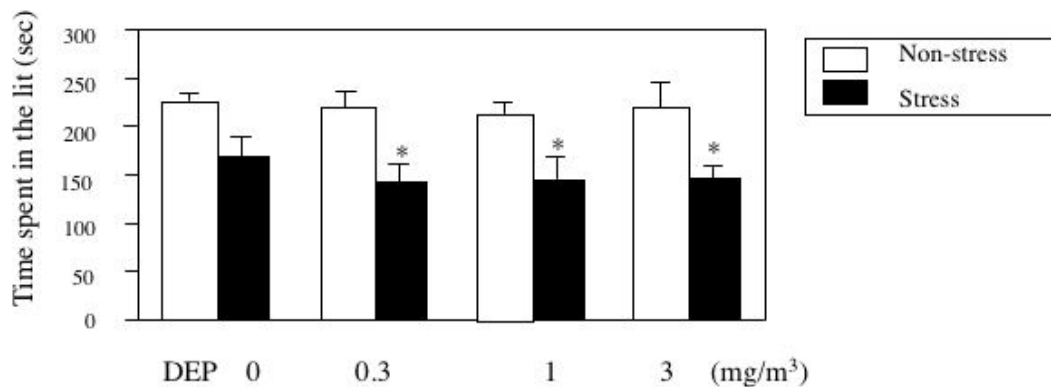


図 2 DEP の胎児期および成長期曝露がストレス感受性に及ぼす影響
DEP の胎児期および成長期曝露により、心理的ストレス非負荷時には不安感受性の変化は認められないが、心理的ストレスを負荷することによる不安感受性の亢進の割合が増加する。
* $p < 0.05$ vs. non-stress group.

公開資料

生体には外部ストレス因子に対応して様々な機能変化を起こす防御機構が備わっている。その一つに 5-HT 神経、特に 5-HT_{1A} 受容体の機能変化がストレス適応機構に重要な役割を担うことが知られている。5-HT 神経の起始核は縫線核に存在し、不安の形成に重要な役割を果たす大脳辺縁系を中心に分布しており、5-HT 神経系抗不安薬が副作用の少ない抗不安薬として期待されている。近年、5-HT_{1A} 受容体に親和性を有するタンドスピロン（セディール®）が 5-HT 系抗不安薬として使用されている。5-HT_{1A} 受容体は 5-HT 神経系の起始核が存在する背側縫線核のみならず、前頭前野、扁桃体、視床下部といったその投射先においても 5-HT 神経系を抑制的に調節している。そこで、DEP の胎児期および成長期慢性曝露による 5-HT_{1A} 受容体の機能変化を、背側縫線核、前頭前野、扁桃体および視床下部において [³⁵S]GTPγS binding assay に従い検討した。その結果、前頭前野のみではあるが、対照群と比較して有意な 5-HT_{1A} 受容体の機能低下が認められた（図 3）。前頭前野、特に帯状回領域は、情動、感覚の処理ならびに本能行動の抑制に深く関与していることが報告されている。また、この 5-HT_{1A} 受容体の機能低下が受容体数の低下によるものか否かを免疫染色法に従い検討したところ、帯状回領域において、5-HT_{1A} 受容体の免疫活性、髄鞘のマーカーである myelin associated glycoprotein や oligodendrocyte のマーカーである O4 免疫活性に変化は認められなかった（図 4）。

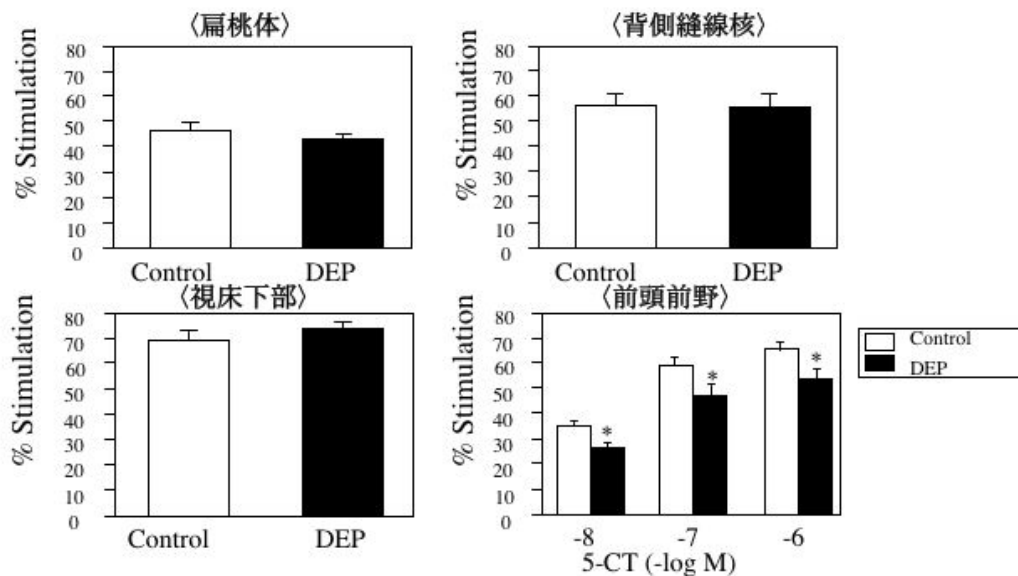


図 3 DEP の胎児期および成長期曝露が 5-CT 誘発 G-タンパク質活性化作用に及ぼす影響
DEP の胎児期および成長期曝露により、扁桃体、視床下部および背側縫線核において 5-CT 誘発 G-タンパク質活性化作用に変化は認められなかった。一方、前頭前野においては 5-CT 誘発 G-タンパク質活性化作用の有意な減弱が認められた。* $p < 0.05$ vs. control group.

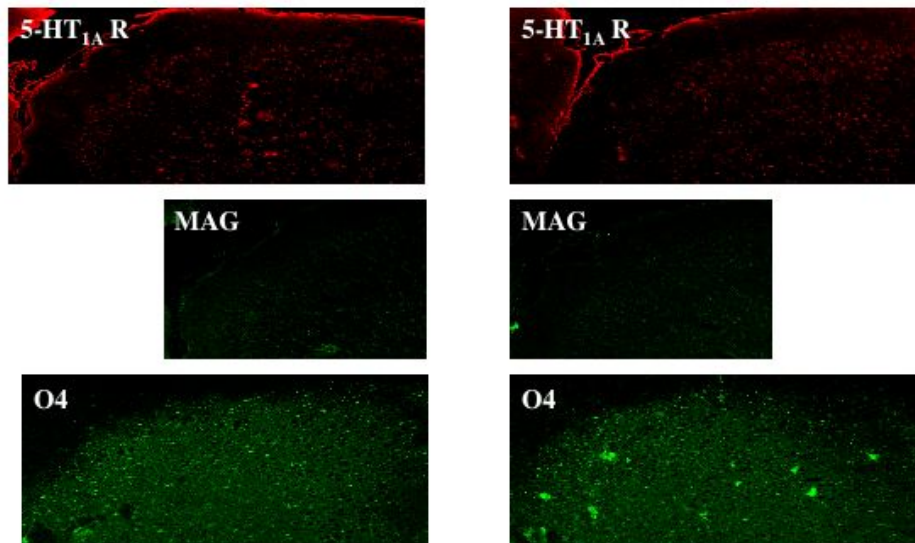


図 4 DEP の胎児期および成長期曝露が帯状回における 5-HT_{1A} 受容体、myelin associated glycoprotein (MAG) および O4 免疫活性に及ぼす影響
DEPの胎児期および成長期曝露により、帯状回における5-HT_{1A}受容体、myelin associated glycoprotein および O4 免疫活性に変化は認められなかった。

以上のことから、DEP の胎児期および成長期慢性曝露により、帯状回領域において脱髄の様な重篤な障害は惹起されないものの、5-HT_{1A} 受容体の機能低下が引き起こされる可能性が示唆された。

一方、飼育ケージ内におけるマウスの行動観察を行ったところ、DEP の胎児期および成長期慢性曝露マウスにおいて、fighting 行動を高頻度を示すことを確認している。この攻撃性の増加には、これまで検討してきた 5-HT 神経系の関与もさることながら、dopamine 神経系の関与も考えられる。そこで次に、DEP の胎児期および成長期慢性曝露マウスにおいて、dopamine 神経系の機能変化が引き起こされているか否かについて検討を行う目的で、依存性薬物に対する感受性の変化を評価した。まず、条件づけ場所嗜好性試験法 (conditioned place preference 法: CPP 法) に従い、morphine 誘発報酬効果 (精神依存) について検討を行った。この方法では、白と黒の 2-compartment box である CPP box を使用した。先にも示したようにマウスは暗い場所を好む性質があり、さらには滑らかな床面を嫌う性質を持っている。黒側区画は滑らかな床面で構成され、白側区画は凹凸のある床面で構成されているため、マウスは視覚的には黒側区画を好むが、触覚的には凹凸のある白側区画を好む。よって、嗜好性としては均衡のとれた box となっている。まず、前試験として中央のしきりを上げ、両区画を自由に行き来させ、それぞれの滞在時間から嗜好側を決定した。例えば、そのマウスの嗜好側が黒側区画であったならば、翌日、依存性薬物である morphine を投与し、白側区画へ 1 時間閉じ込めた。さらに翌日、生理食塩液を投与し、黒側区画へ 1 時間閉じ込める。この操作を 1 セッションとし、3 セッション、計 6 日間の条件づけを行う。条件づけの翌日、再び中央のしきりを上げ、両区画を自由に行き来させ、morphine を投与した白側区画の滞在時間を測定した。この値から、前試験で得られた白側区画への滞在時間の値を引いた値を CPP スコアとする。この CPP スコアが大きければより強い報酬効果が得られたことになる。DEP の胎児期および成長期慢性曝露により、morphine 誘発報酬効果の増強が認められた (図 5)。さらに、マウスに morphine

公開資料

などの依存性薬物を投与した際に自発運動量が増加することを利用し、morphine 誘発自発運動促進作用に対する影響について赤外線カウンター法に従い検討を行った。その結果、morphine 誘発自発運動促進作用の増強が認められた (図 6)。Morphine は、腹側被蓋野の dopamine 神経に投射している γ -aminobutyric acid (GABA) 神経上に分布している μ -opioid 受容体に作用することで、dopamine 神経の投射先である側坐核における dopamine の遊離を促進することが知られている。そこで、次に、DEP の胎児期および成長期慢性曝露により、側坐核を含む前脳辺縁部領域における dopamine 受容体の機能変化について $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding assay に従い検討したところ、dopamine 誘発 G-protein 活性化作用の有意な増強、つまり、dopamine 受容体の機能亢進が認められた (図 7)。

以上のことから DEP の胎児期および成長期慢性曝露により、dopamine 神経系の機能変化に起因する依存性薬物に対する感受性の亢進が引き起こされる可能性が示唆された。

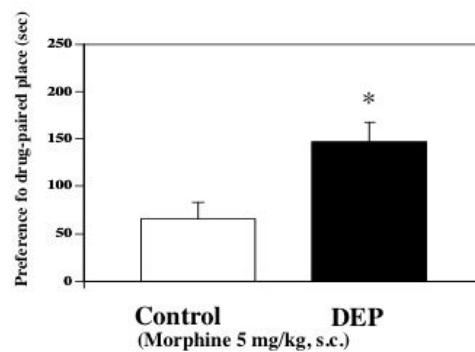


図 5 DEP の胎児期および成長期曝露が morphine 誘発報酬効果に及ぼす影響
DEP の胎児期および成長期曝露により、morphine (5 mg/kg s.c.) 誘発報酬効果の有意な増強が認められた。* $p < 0.05$ vs. control group.

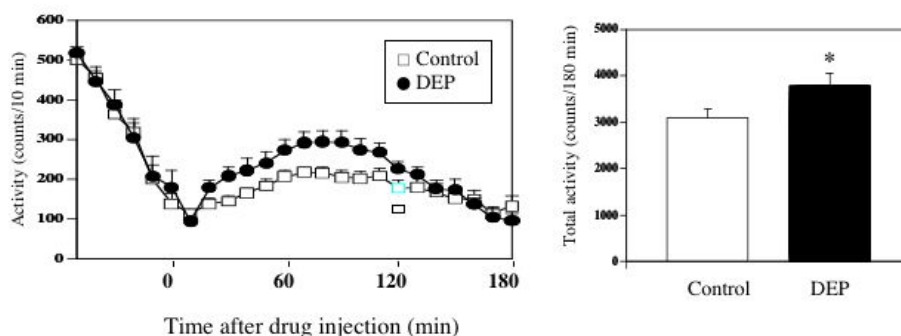


図 6 DEP の胎児期および成長期曝露が morphine 誘発自発運動促進作用に及ぼす影響
DEP の胎児期および成長期曝露により、morphine (10 mg/kg s.c.) 誘発自発運動促進作用の有意な増強が認められた。* $p < 0.05$ vs. control group.

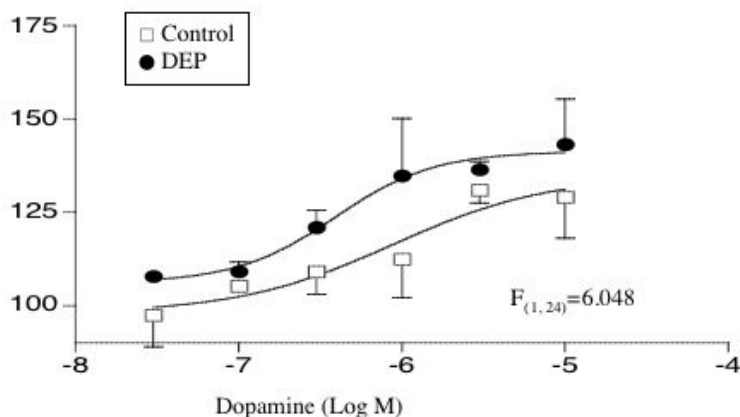


図 7 DEP の胎児期および成長期曝露が dopamine 誘発 G-タンパク質活性化作用に及ぼす影響
 DEP の胎児期および成長期曝露により、側坐核において dopamine 誘発 G-タンパク質活性化作用の有意な減弱が認められた。F_(1,24)=6.048, p<0.05 vs. control group.

DEP の作用機序

研究者らのこれまでの検討で、DEP の慢性曝露が、5-HT 神経系および dopamine 神経系の機能変化を引き起こすことが明らかとなった。DEP が生殖器系に影響を及ぼすことは明らかであり、内分泌かく乱作用が疑われている。これまで、5-HT 神経上に estrogen 受容体が存在することや、estrogen 処置により 5-HT_{1A} 受容体 mRNA の減少が認められることが報告されている。さらには、dopamine D₁ 受容体の遺伝子上に estrogen responsive element (ERE) が存在することが明らかとなり、estrogen 処置により dopamine D₁ 受容体 mRNA の up-regulation が認められることが報告されている。これらのことから、DEP が有する内分泌かく乱作用が 5-HT 神経系および dopamine 神経系に影響を及ぼす可能性が考えられる。また、研究者らは内分泌かく乱化学物質であり、estrogen 様作用を有する bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露によっても 5-HT_{1A} 受容体の機能低下や dopamine D₃ 受容体の機能低下を伴う dopamine D₁ 受容体の機能亢進を引き起こされることを明らかにしている。一方、内因性の estrogen である 17β-estradiol の胎児期および授乳期慢性曝露では依存性薬物の感受性亢進を引き起こされないことも明らかにしている。以上のことから、環境化学物質が引き起こす神経系への影響は estrogen 作用による可能性は否定できないが、その他にもターゲット分子があり、神経系の発達をかく乱している可能性が考えられる。近年、Block らは、microglia が DEP を取り込むことで酸化ストレスが生じ、dopamine 神経系を障害することを報告している。このことから DEP は、神経細胞に対して積極的な機能制御を行っているグリア細胞にも影響を及ぼす可能性が示唆される。生体には何万種ものタンパク質が存在しており、estrogen 受容体のような核内受容体だけでも数十種確認されている。そのため、一つの環境化学物質のターゲット分子が一つに限られないことは容易に予想できる。さらに現代人は環境中に何万種もの化学物質を放出しており、それらの複合曝露も考慮しなくてはならない (図 8)。

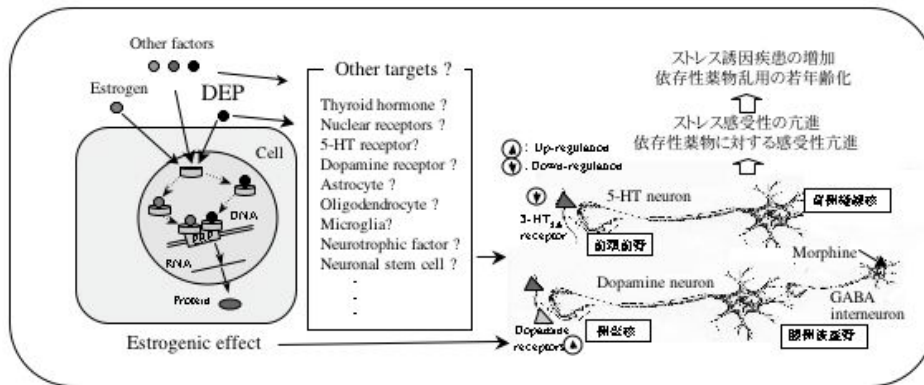


図 8 DEP の胎児期および成長期曝露が dopamine 神経系および 5-HT 神経系に及ぼす影響
 DEP は estrogenic effect を介して dopamine および 5-HT 神経系の発達をかく乱する可能性が考えられるが、そのターゲット分子が estrogen 受容体に限られるとは断定できない。DEP の胎児期および成長期曝露が dopamine や 5-HT 受容体、グリア細胞、さらには神経幹細胞に直接作用することで、神経発達をかく乱している可能性も十分考えられる。また、環境化学物質は無数に存在し、神経系の発達に影響を及ぼす化学物質がいくつも確認されてきている。これらの複合曝露も考慮しなくてはならない。

(2) 研究成果の今後期待される効果

現在、我が国では第 3 次覚せい剤乱用期に突入し、覚せい剤乱用が若年層にまで浸透していることや、脱法ドラッグの蔓延が深刻な社会問題となっている。現在までに著者らが明らかにしている結果は、高度成長期に DEP を大気中から摂取した母親から生まれた現代人が、依存性薬物の精神依存に対する脆弱性が引き起こされている可能性を提示するものであり、第 3 次覚せい剤乱用期や脱法ドラッグの蔓延は、環境因子も加わって誘導されているという大胆な仮説を提示することになるかもしれない。また、現在、我が国はストレス社会といわれ、現代人は多くのストレス刺激にさらされている。このような社会背景により不安神経症や引きこもり等のストレス誘因疾患の患者数は、近年急激な増加を示している。本研究で認められた胎児期および成長期における DEP 慢性曝露による情動行動の変化は近年認められるストレス誘因疾患患者の増加に一部関与している可能性が考えられる。本研究が環境化学物質問題への警鐘となり得ることを期待する。

3. 3. 4 DE 曝露マウスにおける行動評価 (東京理科大学 武田グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

DE 曝露による中枢神経系への影響を包括的に検討する目的で、ヒトの曝露と類似した条件として胎仔期から成長期までの DE 曝露を実施し、そのマウス行動に及ぼす影響を小倉博雄博士らによって構築された行動評価システムの Basic Menu²⁴⁾に基づき解析した。さらに、行動実験終了後、神経伝達物質である脳内モノアミンおよびその代謝物量について高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)を用いて測定し、その影響を神経化学的に解析した²⁵⁾。今回は、ヒト曝露と類似した条件として胎仔期から成長期までの DE 曝露を実施した。ICR 系マウスに胎齢 2 日目から出生後 7 週齢まで DE 曝

公開資料

露（平日 AM 9:00～PM 5:00、0.1 mg DEP/m³）を行った。この曝露濃度は、現行の環境基準値である。その後、8 週齢より対照群、曝露群共に 12 匹の雄性マウスを用いて以下の一連の行動評価試験を実施した。1) 自発運動測定による運動基本量の評価、2) Elevated plus maze test による不安情動性評価、3) Rotating rod test による運動協調性評価、4) Water maze test による学習記憶能力評価、5) Forced swimming test によるモチベーション評価を行った。脳内モノアミン類およびその代謝物は、電気化学検出器付き HPLC を用いて一斉定量分析した。また、代謝物量をその前駆物質の量で除することで代謝回転を算出した。測定したモノアミン類は Dopamine (DA)、Noradrenaline (NA)、Adrenaline (Ad)、5-Hydroxytryptamine (5-HT) の 4 種である。代謝物については、DA の代謝物である 3-Methoxytyramine hydrochloride、3,4-Dihydroxyphenylacetic acid、Homovanillic acid (HVA)、NA および AD の代謝物である 3-methoxy-4-Hydroxyphenylglycol hemipiperazinium、Normetanephrine hydrochloride、5-HT の代謝物である 5-Hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) の 6 種類について測定した。その結果、行動試験期間中の体重は、対照群と比較して曝露群で有意に減少していた。行動に関して今回検討した項目の中では、不安情動性、運動協調性、学習記憶能力、モチベーションには対照群と曝露群との間に有意差は認められなかった。自発運動量では、24 時間の総運動量に差は認められなかったものの、曝露群で測定開始 11、12 時間後に有意な亢進が認められた（図 1）。自発運動は脳内モノアミン系がその調節に関与していることが知られており、これらの伝達物質が変動した可能性が考えられた。そこで、脳内モノアミン類およびその代謝物量について、行動試験を行ったマウスについて測定を行った結果、DA 系において HVA 量が有意に増加し、5-HT 系においては 5-HT 量および 5-HIAA 量が有意に増加し、代謝回転（5-HIAA/5-HT）も有意に亢進していた。これらの結果から、HVA や 5-HIAA へと代謝を行う MAO や COMT などの代謝酵素が亢進した可能性が考えられる。また、5-HT 量の増加は、その前駆物質からの合成亢進、セロトニンニューロンの増加、シナプス間隙に放出された 5-HT の再取り込みの亢進、あるいはシナプス前ニューロンにおいて 5-HT を貯蔵顆粒に濃縮する小胞性モノアミントランスポーターの亢進など様々な可能性が考えられるが詳細は不明である。

本研究の結果から、DE 曝露は DA 系および 5-HT 系の脳神経系機能や代謝系に何らかの影響を及ぼしており、それが自発運動の変動をもたらした可能性が示唆された。

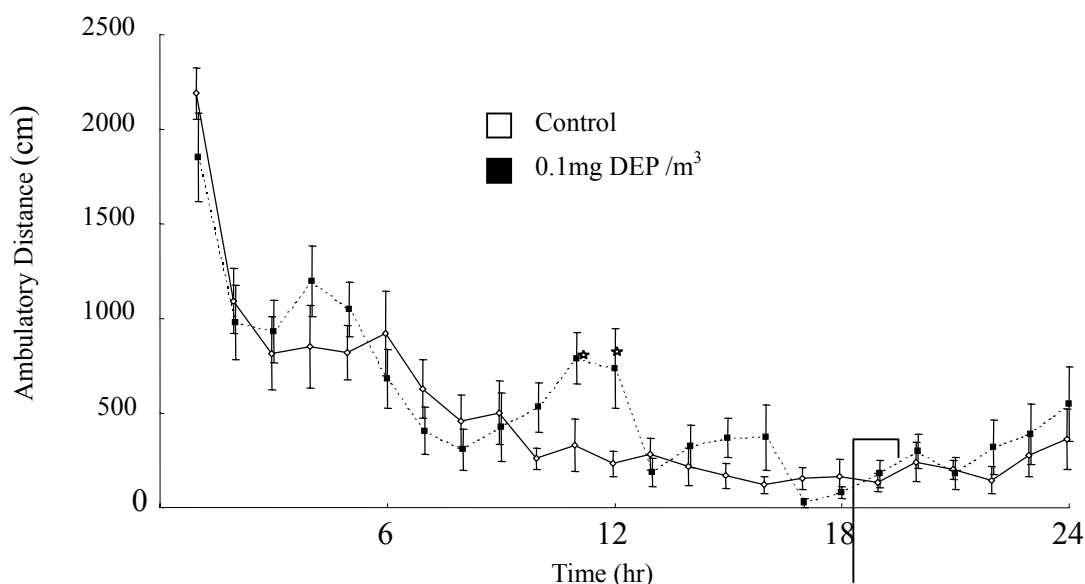


図 1 1 時間あたりの自発運動量の評価
Control : n=12, Diesel (0.1 mg DEP/m³) : n=12
(平均値±標準誤差)、 **p* < 0.05

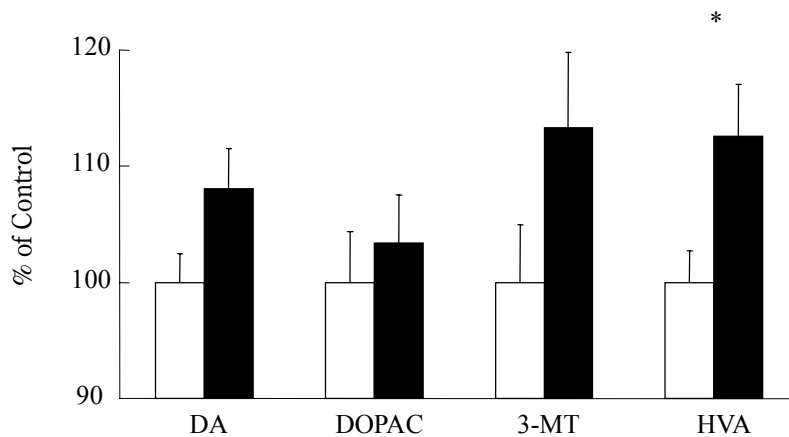


図2 DA系脳内モノアミン量とその代謝物量
Control : n=10, 0.1 mg DEP /m³ : n=10 (平均値±標準誤差)
対照群の値を100%とする相対値表記。**p* < 0.05

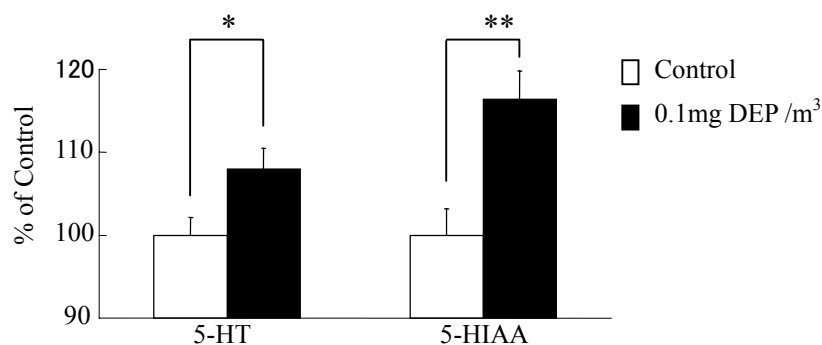


図3 脳内5-HT量とその代謝物量
Control : n=10, 0.1 mg DEP /m³ : n=10 (平均値±標準誤差)
対照群の値を100%とする相対値表記。**p* < 0.05、***p* < 0.01

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究で認められた自発運動量の変動は、DE曝露が5-HT系あるいはDA系の脳神経系機能や代謝系に何らかの影響を及ぼしたことによる可能性が示唆された。さらに、本研究で用いた曝露濃度は0.1 mg DEP /m³であり、これは現行のSPMの環境基準値であること、また、曝露時間が1日8時間と短く土曜日と日曜日は曝露していないことを考慮すると、幹線道路沿いなどにおける実際の環境曝露量よりも低値である可能性が高く、その濃度で行動および脳内モノアミン系に影響が認められたことは注意を要すると考えられた。

公開資料

3. 脳組織に及ぼす影響（東京理科大学 武田グループ）

(1) 研究実施内容及び成果

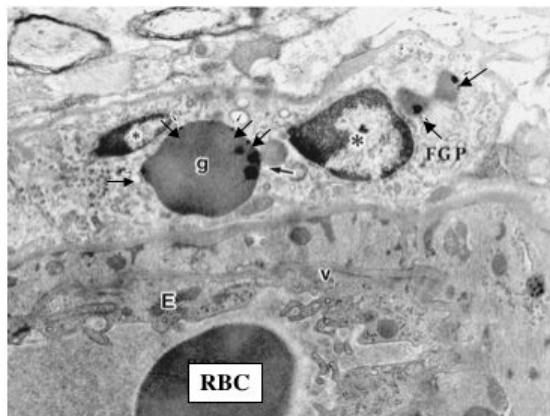
ICR系妊娠マウスに妊娠2日目から16日目まで胎仔期曝露を行い、その出生仔脳組織を8週および11週齢時に採取し、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いた組織学的検討を行った。曝露群において、大脳皮質、小脳、海馬にcaspase3陽性細胞が散在して認められた。電子顕微鏡的にもapoptosis小体形成過程の特徴的所見であるクロマチンの不均一な凝集やCrescent-Shaped Spacesを伴った核不整を呈する細胞が確認された。また、清掃細胞数が減少傾向にあり、その細胞質内顆粒に変性像やDE粒子と疑われる沈着物質が観察された。さらに、血管周囲浮腫および微小血管狭窄が各部位に散在的に認められた。これらの結果は、胎仔期を含む曝露条件で検討を行うと再現性良く観察することが出来ることを確認している。（上記の研究成果は栃木臨床病理研究所菅又昌雄所長、井原智美部長との共同研究であり、両博士の発見でもある）

(2) 研究成果の今後期待される効果

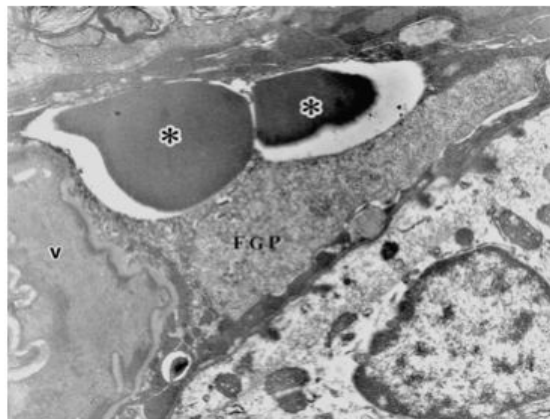
本研究の結果は、DEPが妊娠期に胎盤から胎仔に移行し、胎仔の脳血管関門や精巣血管関門を通過すること、その粒子は出生後も仔の特定の細胞に蓄積された状態で残り、周辺の細胞に影響を及ぼす可能性を示唆するものである。

これらの結果より、母体のDE曝露がその出生仔の脳組織に対して病理学的影響を与えた可能性が高く、学習記憶および行動におよぼす影響が推定されることから、今後、それらに対する詳細な検討が必要であると考えられた。

DE曝露群海馬



清掃細胞のapoptosis小体(*)およびDE粒子(arrow)を取り込んだ顆粒(g) (v:血管、E:内皮細胞、RBC:赤血球、FGP:清掃細胞)



清掃細胞(FGP)のapoptosis小体(*) (v:血管)

公開資料

4 研究参加者

① In vitro 研究プロジェクト

研究実施項目：ディーゼル排気微粒子に含まれる化学物質の内分泌かく乱作用の解析

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
武田 健	東京理科大学薬学部	教授	統括	H12, 12～
吉田 成一	東京理科大学薬学部	研究員	レセプター発現解析	H12, 12～H14, 10
	大分県立看護科学大学	講師	レセプター発現解析	H14, 11～
平田 悟史	東京理科大学薬学部	学生	データ整理	H13, 6～H14, 3
岩崎 亮平	東京理科大学薬学部	学生	データ整理	H13, 6～H15, 3
押尾 茂	東京理科大学薬学部	研究員	DEP 取込解析	H16, 4～H17, 3
	奥羽大学薬学部	教授	DEP 取込解析	H17, 4～
阿部 学	東京理科大学薬学部	CREST 技術員	DEP 取込解析	H16, 4～
入江 美代子	東京理科大学薬学部	CREST 研究補助員	電子顕微鏡解析	H16, 4～
早川 和一	金沢大学大学院自然科学研究科	教授	DEP 分離分析	H12, 12～ H13, 4～
木津 良一	金沢大学大学院自然科学研究科	教授	レセプター結合解析	H13, 4～H17, 3
	同志社女子大学薬学部	教授		H17, 4～
鳥羽 陽	金沢大学大学院自然科学研究科	助手	レセプター結合解析	H13, 4～
菅原 勇	結核研究所	センター長	遺伝子発現解析	H12, 12～

公開資料

② In vivo 研究プロジェクト

研究実施項目：胎仔期ディーゼル排ガス暴露による雌性・雄性生殖系、内分泌系、免疫系への影響

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
武田 健	東京理科大学薬学部	教授	統括	H12, 12～
吉田 成一	東京理科大学薬学部	研究員	胎仔への影響解析	H12, 12～H14, 10
	大分県立看護科学大学	講師	胎仔への影響解析	H14, 11～
机 直美	東京理科大学薬学部	CREST 研究員	精子形成影響解析	H14, 4～H16, 3
野口 浩平	東京理科大学薬学部	学生	データ整理	H13, 6～H14, 3
吉田 美紀	東京理科大学薬学部	学生	データ整理	H13, 6～H14, 3
藤元 彩葉	東京理科大学薬学部	学生	データ整理	H13, 6～H15, 3
小野 なお香	東京理科大学薬学部	学生	データ整理	H14, 6～H16, 3
押尾 茂	東京理科大学薬学部	研究員	精子形成影響解析	H15, 9～H17, 3
	奥羽大学薬学部	教授	精子形成影響解析	H17, 4～
入江 美代子	東京理科大学薬学部	CREST 研究補助員	電子顕微鏡解析	H16, 4～
大木 宏亮	東京理科大学薬学部	学生	データ整理	H16, 6～H17, 3
庭田 祐一郎	東京理科大学薬学部	学生	データ整理	H16, 6～
渡辺 伸枝	東京都安全研究センター	主任研究員	種差：ラット	H12, 12～
菅原 勇	結核研究所	センター長	種差：マウス	H12, 12～
高野 裕久	国立環境研究所	統合研究官	種差：マウス	H12, 12～
柳澤 利枝	国立環境研究所	契約研究員	種差：マウス	H13, 4～
市瀬 孝道	大分県立看護科学大学	教授	免疫系への影響解析	H15, 4～
定金 香里	大分県立看護科学大学	助手	免疫系への影響解析	H15, 4～

③ 行動研究プロジェクト

研究実施項目：ディーゼル排ガス胎仔期暴露の脳神経系におよぼす影響の解析

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
武田 健	東京理科大学薬学部	教授	統括	H12, 12～
吉田 成一	東京理科大学薬学部	研究員	生化学指標解析	H12, 12～H14, 10
	大分県立看護科学大学	講師	生化学指標解析	H14, 11～
机 直美	東京理科大学薬学部	CREST 研究員	ホルモン解析	H14, 4～H16, 3
阿部 学	東京理科大学薬学部	CREST 技術員	行動解析	H14, 4～
西口 主真	東京理科大学薬学部	学生	データ解析	H13, 6～H15, 3
渡辺 学	東京理科大学薬学部	学生	データ解析	H14, 6～H16, 3
小田桐 隆	東京理科大学薬学部	学生	データ解析	H15, 6～
押尾 茂	東京理科大学薬学部	研究員	行動解析	H15, 9～H17, 3
	奥羽大学薬学部	教授	行動解析	H17, 4～

公開資料

入江 美代子	東京理科大学薬学部	CREST 研究補助員	電子顕微鏡解析	H16, 4～
熊本 隆之	東京理科大学薬学部	学生	データ整理	H16, 6～
鈴木 智晴	東京理科大学薬学部	学生	データ整理	H16, 6～
高野 裕久	国立環境研究所	統合研究官	DE 暴露	H12, 12～
菅原 勇	結核研究所	センター長	DE 暴露	H12, 12～
鈴木 勉	星薬科大学	教授	行動解析	H12, 12～
成田 年	星薬科大学	助教授	行動解析	H13, 4～
矢島 義織	星薬科大学	助手	行動解析	H13, 4～

5. 成果発表等

(1)論文発表 (国内 0 件、海外 27 件)

1. Watanabe, N., and Kurita, M.: The masculinization of the fetus during pregnancy due to inhalation of diesel exhaust. *Environmental Health Perspectives*. 109: 111-119, 2001.
2. Iwai, K., Udagawa, T., Mizuno, S., Kawabata, Y., Sugawara, I., Goto, S., Seto, H., and Adachi, S.: Mutagenicity and tumorigenicity of diesel exhausts of high- and low-sulfur fuels: Inhalation and particle instillation studies in rats. *Journal of Japan Society for Atmospheric Environment*. 37:216-229, 2001.
3. Uchida, T., Ohashi, Y., Morikawa, E., Tsugita, A., and Takeda, K.: Proteome Analysis of the Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on murine testicular Leydig and Sertoli Cells. *Journal of Health Science*. 47, 136-144, 2001
4. Uchida, T., Yoshida, S., Inui, Y., and Takeda, K.: Effect of 2,3,7,8- tetraclorodibenzo -p-dioxin on testosterone production in isolated murine testicular cells. *Journal of Health Science*. 48, 292-295, 2002
5. Yoshida, M., Yoshida, S., Sugawara, I., and Takeda, K.: Maternal exposure to diesel exhaust decreases expression of steroidogenic factor 1(Ad4BP/SF-1) and Mullerian inhibiting substance (MIS) in the murine fetus. *Journal of Health Science* . 48, 317-324, 2002
6. Watanabe, N., and Ohasawa, M. : Elevated serum immunoglobulin E to *Cryptomeria japonica* pollen in rats exposed to diesel exhaust during fetal and neonatal periods. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2: 1-9,2002.
7. Takano, H., Yanagisawa, R., Ichinose, T., Sadakane, K., Yoshida, S., Yoshikawa, T., and Morita, M.: Diesel exhaust particles enhance lung injury related to bacterial endotoxin through expression of proinflammatory cytokines, chemokines, and ICAM-1. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 165: 1329-1335, 2002.
8. Takano, H., Yanagisawa, R., Ichinose, T., Sadakane, K., Inoue, K., Yoshida, S., Takeda, K., Yoshino, S., Yoshikawa, T., and Morita, M.: Lung expression of cytochrome P450 1A1 as a possible biomarker of exposure to diesel exhaust particles. *Archives of Toxicology*. 76: 146-151, 2002.
9. Saito, Y., Azuma, A., Kudo, S., Takizawa, H., and Sugawara, I.: Effects of diesel exhaust on murine alveolar macrophages and a macrophage cell line. *Experimental Lung Research*. 28:161-177, 2002.

10. Saito, Y., Azuma, A., Kudo, S., Takizawa, H., and Sugawara, I.: Long-term inhalation of diesel exhaust affects cytokine expression in murine lung tissues: comparison between low- and high-dose diesel exhaust exposure. *Experimental Lung Research*. 28:493-506, 2002.
11. Kizu, R., Okamura, K., Toriba, A., Mizokami, A., K.L. Burnstein, C.M. Klinge and Hayakawa, K.: Antiandrogenic activities of diesel exhaust particle extracts in PC3/AR human prostate carcinoma cells. *Toxicological Sciences*. 76, 299-309 (2003).
12. Kizu, R., Okamura, K., Toriba, A., Kakishima, H., Mizokami, A., K.L. Burnstein and Hayakawa, K.: A role of aryl hydrocarbon receptor in the antiandrogenic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in LNCaP human prostate carcinoma cells. *Archives of Toxicology*. 77, 335-343 (2003).
13. Yanagisawa, R., Takano, H., Inoue, K., Ichinose, T., Sadakane, K., Yoshino, S., Yamaki, Kumagai, Y., Uchiyama, K., Yoshikawa, T., and Morita, M.: Enhancement of acute lung injury related to bacterial endotoxin by components of diesel exhaust particles. *Thorax(An International Journal of Respiratory Medicine)*. 58: 605-612, 2003.
14. Takizawa, H., Abe, S., Okazaki, H., Kohyama, T., Sugawara, I., Saito, Y., Ohtoshi, T., Kawasaki, S., Desaki, M., Nakahara, K., Yamamoto, K., Matsushima, K., Tanaka, M., Sagai, S., and Kudoh, S.: Diesel exhaust particles upregulate eotaxin gene expression in human bronchial epithelial cells via nuclear factor-kappa B-dependent pathway. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 284: 1055-1062, 2003.
15. Hiramatsu, K., Takizawa, H., Azuma, A., Kudoh, S., and Sugawara, I.: Inhalation of diesel exhaust for three months affects major cytokine expression and induces bronchus-associated lymphoid tissue formation in murine lungs. *Experimental Lung Research*. 29: 607-622, 2003.
16. Takeda, K., Tsukue, N., and Yoshida, S.: Endocrine-disrupting activity of chemicals in diesel exhaust and diesel exhaust particles. *Environmental Science*. 11: 033-045, 2004
17. Yoshida S., and Takeda K.: The effects of diesel exhaust on murine male reproductive function. *Journal of Health Science*. 50(3); 1-5, 2004
18. Tsukue, N., Yoshida, S., Sugawara, I., and Takeda, K.: Effect of diesel exhaust on development of fetal reproductive function in ICR female mice. *Journal of Health Science*. 50: 174-180, 2004
19. Oshio, S., Ashizawa, Y., Yotsukura, M., Tohyama, Y., Iwabuchi, M., Adachi, Y., Matsuda, H., Tomomasa, H., Yoshida, S., Takeda, K., and Ueda, T.: Individual variation in semen parameters of healthy young volunteers. *Archives of Andrology*. 50: 417-425, 2004
20. Yanagisawa, R., Takano, H., Inoue, K., Ichinose, T., Yoshida, S., Sadakane, K., Takeda, K., Yoshino, S., Yamaki, K., Kumagai, Y., and Yoshikawa, T.: Complementary DNA microarray analysis in acute lung injury induced by lipopolysaccharide and diesel exhaust particles. *Experimental Biology and Medicine*. 229: 1081-1087, 2004
21. Kizu, R., Otsuki, N., Kishida, Y., Toriba, A., Mizokami, A., K.L. Burnstein, C.M. Klinge and Hayakawa, K.: A new luciferase reporter gene assay for the detection of androgenic and antiandrogenic effects based on a human prostate specific antigen promoter and PC3/AR human prostate cancer cells. *Analytical Sciences*. 20: 55-59 (2004).
22. Okamura, K., Kizu, R., Toriba, A., Murahashi, T., Mizokami, A., K.L. Burnstein, C.M. Klinge and Hayakawa, K.: Antiandrogenic activity of extracts of diesel exhaust particles emitted from

- diesel-engine truck under different engine loads and speeds. *Toxicology*. 195: 243-254 (2004).
23. Tozuka, Y., Watanabe, N., Osawa, M., Toriba, A., Kizu, R., and Hayakawa, K.: Transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons to fetuses and breast milk of rats exposed to diesel exhaust. *Journal of Health Science*. 50: 497-502, 2004.
 24. Fujimoto, A., Tsukue, N., Watanabe, M., Sugawara, I., Yanagisawa, R., Takano, H., Yoshida, S., and Takeda, K.: Diesel exhaust affects immunological action in the placenta of mice. *Environmental Toxicology*. 20: 431-440, 2005
 25. Watanabe, N.: Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses. *Toxicology Letters*. 155: 51-58, 2005.
 26. Hiramatsu, K., Azuma, A., Takizawa, H., Kudoh, S., and Sugawara, I.: The effects of inhalation of diesel exhausts on murine mycobacterial infection. *Experimental Lung Research*. 31: 405-416, 2005.
 27. Yoshida, S., Yoshida, M., Sugawara, I., and Takeda, K.: Mice strain differences in effects of fetal exposure to diesel exhaust gas on male Gonadal Differentiation. *Environmental Science*. in press.

(2)口頭発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

招待、口頭講演 (国内 117 件、海外 16 件)

ポスター発表 (国内 116 件、海外 17 件)

(東京理科大学 武田グループ)

招待講演

1. 吉田 成一：ディーゼル排ガスの生体影響～胎児期曝露の影響およびホルモンレセプターmRNA 発現への影響. 「空中浮遊微粒子 (PM2.5) の健康影響に関するワークショップ」、つくば市 (2月) 2001年
2. Yoshida, S.: Effect of diesel exhaust on reproduction. “U.S-Japan International Workshop for Endocrine Disrupting Chemicals” Tsukuba, Feb,2001
3. 武田 健：化学物質の環境モタリングのための微量分析ーバイオアッセイの活用. 「21世紀の化学の潮流を探る」日本化学会総会、東京 (3月) 2001年
4. 武田 健：トキシコロジー関連 DNA チップの開発と内分泌かく乱化学物質への応用. 122年会 日本薬学会、幕張 (3月) 2001年
5. 武田 健：子孫を残す細胞を守れ！. 薬学会「健康とくすり」市民講演会講演、東京 (11月) 2001年
6. 武田 健：環境化学物質の生体影響評価におけるゲノム情報の活用. 平成 13 年度日本薬剤師会試験検査センター技術講習会、東京 (11月) 2001年
7. 武田 健：ディーゼル排ガスの生体への影響. 「環境汚染と生態系ー新たなリスクと対策ー」第 11 回東京大学環境安全センターシンポジウム、東京 (12月) 2001年
8. 武田 健：化学物質による子宮内曝露マウス胎児の脳における遺伝子の変動ーDNAchipを用いた解析ー. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第 4 回研究発表会、つくば市 (12月) 2001年
9. 武田 健：ディーゼル排ガスの生殖系に及ぼす作用の分子基盤. 日本分子生物学会 シンポジウム「環境化学物質に対する生物応答の分子基盤」、横浜 (12月) 2002年

公開資料

10. 武田 健：ディーゼル排ガス胎仔期暴露が生殖系及び脳神経系に及ぼす影響. 科学技術事業団創造科学推進事業—文部科学省科学研究合同シンポジウム「経気道暴露有害物質の作用と浄化」、金沢（1月）2003年
11. 渡辺 肇：内分泌攪乱物質に係わる遺伝子技術を用いた試験法開発. 内分泌攪乱物質等の作用メカニズムの解明等基礎的研究 研究発表会、東京（6月）2003年
12. 吉田 成一：ディーゼル排ガスの生殖系及び脳神経系への影響. 第1回環境・衛生部会賞受賞者講演 フォーラム2003：衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台（10月）2003年
13. 机 直美：ディーゼル排ガスの生殖器系及び脳神経系に及ぼす影響について. 日本獣医畜産大学 獣医学研究科 講演、東京（10月）2003年
14. 武田 健：ディーゼル排ガスの生殖系及び脳神経系への影響. 東京理科大学総合研究所 環境・エネルギー研究部門 第2回シンポジウム、新宿区（11月）2003年
15. 武田 健：ディーゼル排ガスの健康影響. 日本人間関係学会 公開講座「環境科学の視点から」、野田市（11月）2003年
16. 武田 健：ディーゼル排ガス胎仔期曝露が生殖系及び脳神経系に及ぼす影響. —PM 2.5/DEPの健康影響に関するワークショップ—、つくば市（3月）2004年
17. 武田 健：ディーゼル排ガスの健康影響. 2004年環境展、東京（5月）2004年
18. 武田 健：薬学から応用へ—薬学から社会に発信するもの—. 21世紀の薬学を考える—日本学術会議薬学系三研連合同シンポジウム、東京（6月）2004年
19. 武田 健：Toxicogenomics—環境化学物質の生体影響評価におけるゲノム情報の活用. 第88次日本法医学会総会 シンポジウム(2)「毒性学における Toxicogenomics の展開」、旭川（6月）2004年
20. 武田 健：ディーゼル排ガス妊娠期曝露の出生仔への影響. 社団法人 自動車技術会・第3回PM測定・評価部門委員会、東京（9月）2004年
21. 武田 健：ディーゼル排ガス胎仔期曝露が生殖系及び脳神経系に及ぼす影響. 第45回大気環境学会年会 特別集会4「大気環境中ナノ粒子の挙動、性状、影響研究の課題」、秋田市（10月）2004年
22. 武田 健：ナノ粒子の健康科学. ゲノム新領域健康科学プロジェクト発表会 東葛テクノ会主催、柏市（10月）2004年
23. 武田 健：ディーゼル排ガスの生殖系及び脳神経系への影響. 東京理科大学 総合研究所 環境・エネルギー研究部門 第3回シンポジウム、野田市（11月）2004年
24. 武田 健：ディーゼル排ガス胎仔期曝露の生殖系及び脳神経系への影響. 東京大学大学院農学生命科学研究科 講演、東京（1月）2005年
25. 武田 健：大気中に浮遊する微粒子の健康科学—ディーゼル排ガスの健康影響の研究からナノ粒子の毒性学を展望する. 京都府立医大大学院医学研究科 講演、京都（2月）2005年
26. 武田 健：大気中微粒子の健康科学—ディーゼル排ガスの健康影響に関する研究からナノ粒子の毒性学を展望する. 日本薬学会第125年会 特別講演、東京都（3月）2005年
27. 武田 健：疾病を未然に防ぐ“予防薬学”を目指して—ディーゼル排ガスの健康影響の研究を例に—. フォーラム2005：衛生薬学・環境トキシコロジー、徳島（10月）2005年

学会発表（国内）

1. 武田 健：ディーゼル排気的环境ホルモン様作用に関する研究紹介. 第一回環境ホルモン研究会（EDC研究会）、東京（6月）2001年

公開資料

2. 吉田 成一、古賀 資和、長谷川 茜、田畑 真佐子、近藤 昭宏、武田 健：DNAチップを用いた精巣構成細胞への内分泌かく乱化学物質の影響解析. 第6回精子形成・精巣毒性研究会、西宮（10月）2001年
3. 吉田 成一、田畑 真佐子、近藤 昭宏、武田 健：内分泌かく乱化学物質の精巣構成細胞への影響～DNAチップを用いた解析. 日本アンドロロジー学会第21回学術大会 高槻市（7月）2002年
4. 吉田 成一、小野 なお香、机 直美、押尾 茂、梅田 隆、菅原 勇、高野 裕久、武田 健：胎仔期ディーゼル排ガス暴露による雄性マウスへの影響. フォーラム2002：衛生薬学・環境トキシコロジー、広島（10月）2002年
5. 平野 佐世子、吉田 成一、武田 健：ディーゼル排気微粒子及び構成成分のエストロゲンレセプターmRNA発現に及ぼす影響. フォーラム2002：衛生薬学・環境トキシコロジー、広島（10月）2002年
6. 小野 なお香、吉田 成一、机 直美、押尾 茂、菅原 勇、高野 裕久、武田 健：胎仔期ディーゼル排ガス暴露が雄性マウスのテストステロン産生に及ぼす影響. 第8回Testis Workshop 精子形成・精巣毒性研究会、千葉（9月）2003年
7. 机 直美、吉田 美紀、吉田 成一、菅原 勇、武田 健：ディーゼル排ガスのマウス胎仔期生殖腺分化過程への影響について. 第136回日本獣医学会学術集会、青森（10月）2003年
8. 机 直美：ディーゼル排ガスの健康影響～特に生殖器系および脳神経系に及ぼす影響について～. '03野生動物保護セミナー、江東区（11月）2003年
9. 机 直美、局 博一、渡辺 元、田谷 一善、林 英幸、森 洋樹、武田 健、鈴木 明：ディーゼル排気暴露の雌性生殖器に及ぼす影響. 「ディーゼル排気微粒子の化学分析と生体影響」に関するシンポジウム、札幌（2月）2004年
10. 押尾 茂、小野 なお香、庭田 祐一郎、吉田 成一、机 直美、菅原 勇、高野 裕久、武田 健：マウス精子形成に及ぼすディーゼル排ガス胎仔期曝露の影響. 日本アンドロロジー学会第23回学術大会、甲府（7月）2004年
11. 押尾 茂、小野 なお香、吉田 成一、武田 健：ディーゼル排ガス妊娠期曝露の出生仔への影響. 日本不妊学会学術講演会、旭川（9月）2004年
12. 庭田 祐一郎、小野 なお香、阿部 学、机 直美、吉田 成一、押尾 茂、菅原 勇、高野 裕久、武田 健：マウス精子形成に及ぼす除塵ディーゼル排ガス胎仔期曝露の影響. フォーラム2004：衛生薬学・環境トキシコロジー、千葉（10月）2004年
13. 庭田 祐一郎、小野 なお香、阿部 学、机 直美、吉田 成一、押尾 茂、菅原 勇、高野 裕久、武田 健：除塵ディーゼル排ガス胎仔期曝露がマウス精子形成に及ぼす影響. 第9回精子形成・精巣毒性研究会、大阪（10月）2004年
14. 小田桐 隆志、鈴木 智晴、神田 理恵子、押尾 茂、宇田川 忠、菅原 勇、小倉 博雄、武田 健：ディーゼル排ガス胎仔期～成長期曝露がマウスの行動に及ぼす影響. 日本薬学会第125年会、東京都（3月）2005年
15. 鈴木 智晴、佐分利 尚代、小田桐 隆志、押尾 茂、宇田川 忠、菅原 勇、小倉 博雄、武田 健：ディーゼル排ガス胎仔期～成長期曝露がマウス脳内モノアミン類およびその代謝物量に及ぼす影響. 日本薬学会第125年会、東京都（3月）2005年
16. 押尾 茂、庭田 祐一郎、小野 なお香、阿部 学、菅原 勇、高野 裕久、西宗 義武、武田 健：ディーゼル排ガス曝露により変動する精巣特異的遺伝子の検討. 日本アンドロロジー学会第24回学術大会、横浜（7月）2005年
17. 庭田 祐一郎、石原 亜季、入江 美代子、阿部 学、小野 なお香、押尾 茂、菅原 勇、高野 裕久、武田 健：ディーゼル排ガス胎仔期～成長期曝露のマウス精子性状に及ぼす影響. 日本アンドロロジー学会第24回学術大会、横浜（7月）2005年
18. 熊本 隆之、渡邊 学、机 直美、阿部 学、高野 裕久、押尾 茂、武田 健：ディーゼル排ガス胎仔期曝露のマウス X 染色体不活性化因子に対する影響解析. フォーラム2005：衛生薬学・環境トキシコロジー、徳島（10月）2005年

ポスター発表 (海外)

1. Sugamata, M., Ihara, T., Sugamata, M., and Takeda, K.: Fetal exhaust affects the nervous system of natal mice. Experimental Biology 2004 (ASIP) (Washington DC, USA) 17-21/APR/2004
2. Oshio, S., Niwata, Y., Ono, N., Tsukue, N., Yoshida, S., Sugawara, I., Takano, H., Nishimune, Y., and Takeda, K.: Analysis of the effects of diesel exhaust exposure in utero on mouse spermatogenesis using testis specific cDNA microarray. Copenhagen Workshop on Environment, Reproductive Health and Fertility Rigshospitalet, Copenhagen/Jan/2005
3. Niwata, Y., Ono, N., Yoshida, Y., Tsukue, N., Takano, H., Sugawara, I., Oshio, S., and Takeda, K.: Effect of diesel exhaust exposure in utero on mouse spermatogenesis. Copenhagen Workshop on Environment, Reproductive Health and Fertility Rigshospitalet, Copenhagen/Jan/2005
4. Sugamata, M., Ihara, T., Uchida, I., Takeda, K., Tabata, M., Sakata, C., Oshio, S., Watanabe, N., and Sugamata, M.: Diesel Exhaust Exposure Accelerates the Development of Endometriosis. IX World Congress on Endometriosis (Maastricht, The Netherlands) 14-17/Sep/2005

ポスター発表 (国内)

1. 吉田 成一、小泉 信滋、川尻 要、武田 健：ディーゼル排気微粒子及びダイオキシンによるストレスタンパク質 H0-1 の誘導. 日本薬学会第 121 年会、札幌 (3 月) 2001 年
2. 吉田 美紀、吉田 成一、菅原 勇、武田 健：胎仔生殖腺分化過程に及ぼすディーゼル排ガスの影響. 日本薬学会第 121 年会、札幌 (3 月) 2001 年
3. 吉田 成一、古賀 資和、長谷川 茜、田畑 真佐子、近藤 昭宏、武田 健：DNA チップを用いた内分泌かく乱化学物質の精巣構成細胞への影響解析. 第 122 年会 日本薬学会、幕張 (3 月) 2001 年
4. 吉田 成一、野口 浩平、小野 なお香、柳澤 利枝、高野 裕久、武田 健：ディーゼル排気微粒子気管内投与によるストレスタンパク質 mRNA 発現の影響. フォーラム 2001 衛生薬学・環境トキシコロジー、金沢 (10 月) 2001 年
5. 吉田 成一、野口 浩平、小野 なお香、柳澤 利枝、高野 裕久、武田 健：ディーゼル排気微粒子のストレスタンパク質 mRNA 発現への影響. 第 4 2 回大気環境学会年会、北九州 (10 月) 2001 年
6. 藤元 彩葉、吉田 成一、武田 健：ディーゼル排気微粒子のマウス胎盤 mRNA 発現への影響. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第 4 回研究発表会、つくば市 (12 月) 2001 年
7. 吉田 美紀、竹田 晴香、吉田 成一、菅原 勇、武田 健：ディーゼル排ガス曝露のマウス胎仔期雄性生殖腺分化過程に及ぼす影響. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第 4 回研究発表会、つくば市 (12 月) 2001 年
8. 平田 悟史、伊東 英恵、吉田 成一、武田 健：ディーゼル排気微粒子による性ステロイドホルモン受容体への影響. 第 122 年会 日本薬学会、幕張 (3 月) 2002 年
9. 吉田 美紀、竹田 晴香、吉田 成一、菅原 勇、武田 健：ディーゼル排ガス曝露のマウス胎仔期雄性生殖腺分化誘導過程に及ぼす影響—ディーゼル排ガス曝露濃度及びマウス系統差の検討—. 122 年会 日本薬学会、幕張 (3 月) 2002 年
10. 野口 浩平、小野 なお香、吉田 成一、武田 健：ディーゼル排気微粒子のマウス雄性生殖系に及ぼす影響の解析. 第 122 年会 日本薬学会、幕張 (3 月) 2002 年
11. 西口 主真、坂田 守、水尾 圭祐、成田 年、吉田 成一、松岡 隆、高野 裕久、鈴木 勉、武田 健：ディーゼル排ガスの脳神経系への影響. 122 年会 日本薬学会、幕張 (3 月) 2002 年

公開資料

12. 藤元 彩葉、吉田 成一、武田 健：ディーゼル排気微粒子のマウス胎盤 mRNA 発現の影響。122 年会 日本薬学会、幕張（3 月）2002 年
13. 藤元 彩葉、渡辺 学、机 直美、吉田 成一、武田 健：妊娠期ディーゼル排ガス暴露によるマウス胎盤への影響。フォーラム 2002：衛生薬学・環境トキシコロジー、広島（10 月）2002 年
14. 小野 なお香、吉田 成一、机 直美、押尾 茂、梅田 隆、菅原 勇、高野 裕久、武田 健：胎仔期ディーゼル排ガス暴露のマウス雄性生殖器系に及ぼす影響。日本内分泌攪乱化学物質学会 第 5 回研究発表会、広島（11 月）2002 年
15. 吉田 成一、平野 佐世子、高野 裕久、早川 和一、木津 良一、武田 健：ディーゼル排気微粒子及び構成成分によるエストロゲンレセプター mRNA 発現の抑制。日本内分泌攪乱化学物質学会 第 5 回研究発表会、広島（11 月）2002 年
16. 机 直美、吉田 成一、菅原 勇、武田 健：ディーゼル排ガスの胎仔期曝露による雌性生殖腺分化に関する発現遺伝子の解析。日本内分泌攪乱化学物質学会 第 5 回研究発表会、広島（11 月）2002 年
17. 机 直美、吉田 成一、菅原 勇、武田 健：ディーゼル排ガスにより雌性生殖腺分化時期に与える発現遺伝子への影響。第 123 年会 日本薬学会、長崎（3 月）2003 年
18. 西口 主真、阿部 学、松岡 隆、吉田 成一、高野 裕久、成田 年、鈴木 勉、武田 健：胎仔期ディーゼル排ガス暴露による受動的回避行動学習への影響。第 123 年会 日本薬学会、長崎（3 月）2003 年
19. 小野 なお香、吉田 成一、机 直美、押尾 茂、梅田 隆、菅原 勇、高野 裕久、武田 健：胎仔期ディーゼル排ガス暴露による雄性マウス出生仔性ステロイドホルモン産生への影響の解析。第 123 年会 日本薬学会、長崎（3 月）2003 年
20. 藤元 彩葉、渡辺 学、机 直美、吉田 成一、武田 健：妊娠期ディーゼル排ガス暴露のマウス胎盤への影響。第 123 年会 日本薬学会、長崎（3 月）2003 年
21. 渡邊 学、机 直美、吉田 成一、高野 裕久、武田 健：ディーゼル排ガスの胎仔期曝露によるマウス脳神経系への影響解析。第 123 年会 日本薬学会、長崎（3 月）2003 年
22. 机 直美、渡邊 学、高野裕久、武田 健：ディーゼル排ガス胎仔期曝露によるマウス新生仔の脳神経系への影響解析～Thyroid Hormone 関連遺伝子の解析～。内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム、湘南（6 月）2003 年
23. 渡邊 学、机 直美、高野 裕久、武田 健：ディーゼル排ガス胎仔期曝露によるマウス新生仔の脳神経系への影響解析～Steroid Hormone 関連遺伝子の解析～。内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム、湘南（6 月）2003 年
24. 小田桐 隆志、西口 主真、阿部 学、机 直美、吉田 成一、松岡 隆、高野 裕久、成田 年、鈴木 勉、武田 健：ディーゼル排ガス胎仔期曝露によるマウスの行動への影響。内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム、湘南（6 月）2003 年
25. 小野 なお香、吉田 成一、机 直美、押尾 茂、梅田 隆、菅原 勇、高野 裕久、武田 健：胎仔期にディーゼル排ガス暴露を受けた雄性マウスのテストステロン産生に及ぼす影響の解析。内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム、湘南（6 月）2003 年
26. 机 直美、藤元 彩葉、吉田 成一、柳澤 利枝、菅原 勇、高野 裕久、武田 健：ディーゼル排ガスの妊娠期曝露による胎子および胎盤への影響。フォーラム 2003：衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台（10 月）2003 年
27. 小野 なお香、吉田 成一、机 直美、押尾 茂、菅原 勇、高野 裕久、武田 健：胎仔期ディーゼル排ガス暴露による雄性マウス出生仔の生殖器系に及ぼす影響の解析。フォーラム 2003：衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台（10 月）2003 年
28. 小田桐 隆志、西口 主真、阿部 学、机 直美、吉田 成一、松岡 隆、高野 裕久、成田 年、鈴木 勉、武田 健：胎仔期ディーゼル排ガス暴露によるマウスの行動への影響。フォーラム 2003：衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台（10 月）2003 年

公開資料

29. 渡邊 学、机 直美、高野 裕久、武田 健：ディーゼル排ガスの周産期暴露によるマウス脳神経系への影響解析. フォーラム 2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台 (10月) 2003年
30. 机 直美、藤元 彩葉、渡邊 学、吉田 成一、柳澤 利枝、菅原 勇、高野 裕久、武田 健：胎仔期ディーゼル排ガス曝露による胎子および胎盤への影響について. 東京理科大学総合研究所 環境・エネルギー研究部門 第2回シンポジウム、新宿区 (11月) 2003年
31. 小野 なお香、吉田 成一、机 直美、押尾 茂、菅原 勇、高野 裕久、武田 健：ディーゼル排ガス胎仔期暴露による雄性マウスの生殖器系に対する影響. 東京理科大学総合研究所 環境・エネルギー研究部門 第2回シンポジウム、新宿区 (11月) 2003年
32. 小田桐 隆志、西口 主真、阿部 学、机 直美、吉田 成一、松岡 隆、高野 裕久、成田 年、鈴木 勉、武田 健：胎仔期ディーゼル排ガス曝露によるマウスの学習行動への影響. 東京理科大学総合研究所 環境・エネルギー研究部門 第2回シンポジウム、新宿区 (11月) 2003年
33. 渡邊 学、机 直美、高野 裕久、武田 健：周産期ディーゼル排ガス曝露によるマウス脳神経系への影響解析. 東京理科大学総合研究所 環境・エネルギー研究部門 第2回シンポジウム、新宿区 (11月) 2003年
34. 菅又 昌雄、井原 智美、西口 主真、小田桐 隆志、阿部 学、机 直美、吉田 成一、高野 裕久、武田 健：胎仔期ディーゼル排ガス曝露の脳への影響—光学および電子顕微鏡による病理学的解析. 東京理科大学総合研究所 環境・エネルギー研究部門 第2回シンポジウム、新宿区 (11月) 2003年
35. 渡邊 学、机 直美、高野 裕久、武田 健：ディーゼル排ガスの周産期暴露によるマウス脳の性分化関連因子への影響解析. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第6回研究発表会、仙台 (12月) 2003年
36. 小野 なお香、机 直美、押尾 茂、吉田 成一、菅原 勇、高野 裕久、武田 健：マウス雄性生殖系の発達に及ぼす胎仔期ディーゼル排ガス曝露の影響. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第6回研究発表会、仙台 (12月) 2003年
37. 机 直美、藤元 彩葉、吉田 成一、菅原 勇、柳澤 利枝、高野 裕久、武田 健：妊娠期ディーゼル排ガス曝露による胎子および胎盤への影響について. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第6回研究発表会、仙台 (12月) 2003年
38. 菅又 昌雄、井原 智美、菅又 美穂、西口 主真、阿部 学、小田桐 隆志、机 直美、吉田 成一、高野 裕久、武田 健：胎児期ディーゼル排ガス曝露の脳への影響—光学および電子顕微鏡による病理学的解析. 日本薬学会第124年会、大阪 (3月) 2004年
39. 机 直美、藤元 彩葉、渡邊 学、吉田 成一、菅原 勇、柳澤 利枝、高野 裕久、武田 健：ディーゼル排ガスの胎仔期曝露による胎子および胎盤への影響解析. 日本薬学会第124年会、大阪 (3月) 2004年
40. 渡邊 学、机 直美、高野 裕久、武田 健：ディーゼル排ガスの周産期曝露がマウス脳の性分化に及ぼす影響. 日本薬学会第124年会、大阪 (3月) 2004年
41. 小野 なお香、吉田 成一、机 直美、押尾 茂、菅原 勇、高野 裕久、武田 健：マウス胎仔期ディーゼル排ガス曝露が出生仔精子産生に及ぼす影響. 日本薬学会第124年会、大阪 (3月) 2004年
42. 小田桐 隆志、西口 主真、阿部 学、机 直美、吉田 成一、松岡 隆、高野 裕久、成田 年、鈴木 勉、武田 健：ディーゼル排ガスの学習記憶への影響. 日本薬学会第124年会、大阪 (3月) 2004年
43. 押尾 茂、机 直美、吉田 成一、阿部 学、武田 健：ディーゼル排ガスの健康影響. 2004 NEW 環境展、東京 (5月) 2004年
44. 押尾 茂、小野 なお香、庭田 祐一郎、阿部 学、机 直美、吉田 成一、高野 裕

- 久、武田 健：精巣特異的 cDNA マイクロアレイを用いたディーゼル排ガス胎仔期曝露マウスの精子形成に及ぼす影響の解析. フォーラム 2004：衛生薬学・環境トキシコロジー、千葉（10月）2004年
45. 庭田 祐一郎、小野 なお香、吉田 成一、机 直美、高野 裕久、菅原 勇、押尾 茂、武田 健：ディーゼル排ガス胎仔期曝露のマウス精子形成能に及ぼす影響. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第7回研究発表会、名古屋（12月）2004年
 46. 入江 美代子、石原 亜希、庭田 祐一郎、阿部 学、小野 なお香、菅原 勇、押尾 茂、武田 健：電子顕微鏡を用いたディーゼル排ガス胎仔期～成長期曝露がマウス精巣に及ぼす影響の検討. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第7回研究発表会、名古屋（12月）2004年
 47. 押尾 茂、庭田 祐一郎、小野 なお香、机 直美、吉田 成一、菅原 勇、高野 裕久、西宗 義武、武田 健：精巣特異的マイクロアレイを用いたディーゼル排ガス胎仔期曝露マウスの検討. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第7回研究発表会、名古屋（12月）2004年
 48. 押尾 茂、庭田 祐一郎、小野 なお香、菅原 勇、高野 裕久、武田 健：ディーゼル排ガス曝露がマウス精液性状に及ぼす影響. 日本薬学会第125年会、東京都（3月）2005年
 49. 庭田 祐一郎、小野 なお香、阿部 学、押尾 茂、高野 裕久、西宗 義武、武田 健：ディーゼル排ガス胎仔期～成長期曝露がマウス雄性生殖機能に及ぼす影響. 日本薬学会第125年会、東京都（3月）2005年
 50. 阿部 学、小野 なお香、庭田 祐一郎、机 直美、押尾 茂、高野 裕久、菅原 勇、西宗 義武、武田 健：ディーゼル排ガス曝露により変動する精巣特異的遺伝子の解析. 日本薬学会第125年会、東京都（3月）2005年
 51. 入江 美代子、石原 亜希、庭田 祐一郎、阿部 学、小野 なお香、菅原 勇、押尾 茂、武田 健：ディーゼル排ガス低濃度曝露がマウス精巣組織に及ぼす影響—電子顕微鏡による. 日本薬学会第125年会、東京都（3月）2005年
 52. 熊本 隆之、渡邊 学、机 直美、阿部 学、高野 裕久、押尾 茂、武田 健：ディーゼル排ガス胎仔期曝露によるマウス X 染色体不活性化因子(Xist)の変動. 日本薬学会第125年会、東京都（3月）2005年
 53. 庭田 祐一郎、阿部 学、小野 なお香、高野 裕久、菅原 勇、押尾 茂、武田 健：ディーゼル排ガス曝露の内分泌かく乱作用：雄性生殖系に及ぼす次世代影響. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第8回研究発表会、東京（9月）2005年
 54. 入江 美代子、庭田 祐一郎、石原 亜希、高野 裕久、栗原 孝行、押尾 茂、武田 健：電子顕微鏡によるディーゼル排ガス連続曝露マウスの精巣ライディヒ細胞解析. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第8回研究発表会、東京（9月）2005年
 55. 押尾 茂、庭田 祐一郎、小野 なお香、阿部 学、菅原 勇、高野 裕久、西宗 義武、武田 健：ディーゼル排ガス曝露により変動する精巣特異的遺伝子群. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第8回研究発表会、東京（9月）2005年
 56. 鈴木 智晴、岩田 麻理、小田桐 隆志、押尾 茂、宇田川 忠、菅原 勇、武田 健：ディーゼル排ガス曝露の雄性マウス自発運動活性と脳内モノアミン類に及ぼす影響. フォーラム 2005：衛生薬学・環境トキシコロジー、徳島（10月）2005年
 57. 庭田 祐一郎、石原 亜希、入江 美代子、阿部 学、小野 なお香、菅原 勇、高野 裕久、押尾 茂、武田 健：ディーゼル排ガス曝露の精子性状へ及ぼす影響. フォーラム 2005：衛生薬学・環境トキシコロジー、徳島（10月）2005年
 58. 石原 亜希、庭田 祐一郎、入江 美代子、阿部 学、菅原 勇、高野 裕久、押尾 茂、武田 健：ディーゼル排ガス曝露のマウス雄性生殖細胞に及ぼす影響—電子顕微鏡による超微形態観察—. フォーラム 2005：衛生薬学・環境トキシコロジー、徳島（10月）2005年
 59. 田中 静代、入江 美代子、熊本 隆之、張ウェイ、黄聖民、森本 健太、入江 克、

公開資料

高野 裕久、押尾 茂、武田 健：ディーゼル排ガス胎仔期～成長期曝露がマウス甲状腺に及ぼす影響。フォーラム 2005：衛生薬学・環境トキシコロジー、徳島（10月）2005年

（金沢大学 早川グループ）

学会発表（国内）

1. 唐 寧、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：自動ニトロアレーン分析計の改良と対象化合物種の拡大。第 63 回分析化学討論会、姫路（5月）2002年
2. 小野田 優、広瀬 敏治、神谷 真紀子、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：多環芳香族炭化水素類 (PAHs) 及びそのモノヒドロキシ体のエストロゲン様/抗エストロゲン作用。日本薬学会北陸支部第 106 回例会、石川（6月）2002年
3. 神谷 真紀子、岡 裕美、小野田 優、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：たばこ煙に含まれるエストロゲン様/抗エストロゲン作用物質の追跡。第 11 回環境化学討論会、箱根（6月）2002年
4. 木津 良一、白倉 義明、鳥羽 陽、早川 和一：Benzo[a]pyrene による DNA 損傷作用と細胞周期停止に関する研究。第 11 回環境化学討論会、箱根（6月）2002年
5. 佐々木 秀輝、米久保 淳、金井 みち子、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：LC/MS による水酸化 Benzo[a]pyrene の一斉分析。第 11 回環境化学討論会、箱根（6月）2002年
6. Chetiyankornkul, T., Toriba, A., Kizu, R., Hayakawa, K.: Urinary 2-Hydroxyfluorene and 1-Hydroxypyrene as Biomarkers of Exposure to Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. 第 15 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、金沢（8月）2002年
7. 鳥羽 陽、Chetiyankornkul, T., 戸塚 佳子、木津 良一、早川 和一：多環芳香族炭化水素類の曝露評価法の開発。日本分析化学会第 51 年会、札幌（9月）2002年
8. 唐 寧、早川 和一、田村 憲治：中国都市大気汚染による健康影響研究（2）PM の粒径別評価と個人曝露に関する研究概要。第 43 回大気環境学会年会、東京（9月）2002年
9. 柿本 均、横江 斉、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：環境大気試料とその周辺で採取された土壌試料中のダイオキシン類組成の比較。第 43 回大気環境学会年会、東京（9月）2002年
10. 唐 寧、柿本 均、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：環日本海域都市の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組成比較。第 43 回大気環境学会年会、東京（9月）2002年
11. 白倉 義明、木津 良一、鳥羽 陽、早川 和一：ベンゾ [a] ピレンによる DNA 損傷と細胞周期停止に関する研究。フォーラム 2002、衛生薬学・環境トキシコロジー、広島（10月）2002年
12. 神谷 真紀子、小野田 優、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：たばこ煙に含まれるエストロゲン様物質の追跡。大気環境学会中部支部学術講演会、石川（11月）2002年
13. 筒井 眞理、木津 良一、鳥羽 陽、早川 和一：ディーゼル排気粉じん抽出物の液性に基づく分画とそのアンドロゲン様/抗アンドロゲン作用。大気環境学会中部支部学術講演会、石川（11月）2002年
14. 戸塚 佳子、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：多環芳香族炭化水素類曝露評価法の開発－ディーゼル排ガス曝露動物への適用－。日本薬学会北陸支部第 107 回例会、福井（11月）2002年
15. 筒井 眞理、木津 良一、鳥羽 陽、早川 和一：ディーゼル排気粉じん抽出物の液

公開資料

- 性に基づく分画とそのアンドロゲン様作用／抗アンドロゲン作用．日本薬学会北陸支部第 107 回例会、福井（11 月）2002 年
16. 神谷 真紀子、小野田 優、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：たばこ煙に含まれるエストロゲン様物質の追跡．日本薬学会北陸支部第 107 回例会、福井（11 月）2002 年
 17. 地中 啓、飯尾 麗子、高山 成明、早川 和一：キャピラリー電気泳動法による尿中覚せい剤及びその代謝物の光学異性体スクリーニング試験法の開発．日本鑑識科学技術学会第 8 回学術集会、東京（11 月）2002 年
 18. 神谷 真紀子、小野田 優、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：たばこ煙に含まれるエストロゲン様作用物質の追跡．日本薬学会第 123 年会、長崎（3 月）2003 年
 19. 田村 憲治、新垣 たずさ、櫻井 四郎、島 正之、中井 里史、早川 和一、唐 寧、孫 貴範：中国における都市大気汚染の健康影響－瀋陽市における大気汚染調査の概要－．第 73 回日本衛生学会総会、大分（3 月）2003 年
 20. 竹島 和良、早川 和一、宮谷 大作、丁子 哲治、田畑 勝弘：環境材料によるニトロアレーン除去（1）－673 K における酸化鉄を用いる反応－．日本化学会第 83 春季年会、東京（3 月）2003 年
 21. 田畑 勝弘、竹島 和良、早川 和一、宮谷 大作、丁子 哲治：環境材料を用いるニトロアレーン除去（2）－酸化鉄による除去反応の流通気体依存性－．日本化学会第 83 春季年会、東京（3 月）2003 年
 22. 甲谷 繁、山本 典敬、工藤 昭彦、徳村 邦弘、早川 和一、中垣 良一：金属または金属酸化物担持型 BiVO₄ 光触媒による内分泌攪乱物質の可視光分解．第 12 回環境化学討論会、新潟（6 月）2003 年
 23. 野口 恵子、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：ディーゼル排出粉じん中のエストロゲン様／抗エストロゲン作用物質の追跡．日本薬学会北陸支部第 108 回例会、金沢（7 月）2003 年
 24. 鈴木 祥子、大野 賢一、三田 智文、小野田 優、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一、今井 一洋：蛍光偏光度測定法を用いた多環芳香族炭化水素モノヒドロキシ体とエストロゲンレセプター（ER α ）との相互作用解析，第 16 回バイオメディカル分析科学シンポジウム．富士吉田（8 月）2003 年
 25. 木津 良一、河野 公俊、山下 克美：ベンゾ[a]ピレンによる DNA 損傷と G2 チェックポイントの攪乱．第 62 回日本癌学会総会、名古屋（9 月）2003 年
 26. 神谷 真紀子、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：たばこ煙粒子状物質に含まれるエストロゲン様物質の追跡．第 44 回大気環境学会年会、京都（9 月）2003 年
 27. 唐 寧、田村 憲治、服部 哲幸、多賀 里奈、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：中国瀋陽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由来について．第 44 回大気環境学会年会、京都（9 月）2003 年
 28. 朴木 英治、早川 和一：北陸地域における冬季降水中的アジア大陸起源の硫酸イオンと硝酸イオンの濃度及び海塩成分の比．第 44 回大気環境学会年会、京都（9 月）2003 年
 29. 木津 良一：化学物質の経気道暴露と健康影響を考える．フォーラム 2003、衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台（10 月）2003 年
 30. 越湖 允也、木津 良一、鳥羽 陽、早川 和一：アリル炭化水素受容体(AhR)のリガンド測定法．日本薬学会北陸支部第 109 回例会、富山（11 月）2003 年
 31. 高田 雄介、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：大気中に存在する水酸化多環芳香族炭化水素類の同定と定量．日本薬学会北陸支部第 109 回例会、富山（11 月）2003 年
 32. 角田 誠、内野 絵里香、早川 和一、船津 高志：HPLC-化学発光検出法を用いたニトロカテコールアミン分析法の開発．第 12 回クロマトグラフィーシンポジウム、福岡（5 月）2005 年

公開資料

33. 早川 和一、呂 超、水上 聡子、鳥羽 陽、化学発光検出 HPLC による 1-ニトロピレノール類の検出. 第 12 回クロマトグラフィーシンポジウム、福岡 (5 月) 2005 年
34. 吉田 智裕、唐 寧、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：ディーゼル排出粉じん中の抗アンドロゲン作用物質の追跡. 第 12 回クロマトグラフィーシンポジウム、福岡 (5 月) 2005 年
35. 水上 聡子、呂 超、鳥羽 陽、早川 和一：ニトロ多環芳香族炭化水素類 (NPAH) の人体への曝露評価を目的とした、尿中代謝物分析法の開発. 第 66 回分析化学討論会、北海道 (5 月) 2005 年
36. 服部 哲幸、唐 寧、田村 憲治、鳥羽 陽、早川 和一：中国 3 都市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比較. 第 14 回環境化学討論会、大阪 (6 月) 2005 年
37. 岡 秀雄、柿本 均、木津 良一、早川 和一：石川県内湖沼 (河北潟) におけるダイオキシン類の分布について. 14 回環境化学討論会、大阪 (6 月) 2005 年
38. 佐々木 秀輝、米久保 淳、早川 和一：オンライン-バックフラッシュ前処理/アットカラム希釈を用いた LC/TOF-MS による水中農薬の一斉分析. 14 回環境化学討論会、大阪 (6 月) 2005 年
39. 早川 和一、唐 寧、服部 哲幸、楊 小陽、鳥羽 陽：化学発光検出/HPLC による環境試料中ニトロ多環芳香族炭化水素の分析. Separation Science 2005、東京 (7 月) 2005 年
40. 岡田 裕弥、楊 小陽、唐 寧、鳥羽 陽、早川 和一：多環芳香族炭化水素類の組成から輪島で捕集した大気浮遊粉じんがアジア大陸由来か否かを明らかにできるか?. 日本薬学会北陸支部第 112 回例会、富山 (7 月) 2005 年
41. 五十嵐 一彦、服部 哲幸、多賀 里奈、唐 寧、鳥羽 陽、早川 和一：多環芳香族炭化水素/ニトロ多環芳香族炭化水素の組成からみた石炭燃焼粉じんおよびディーゼルエンジン排出粉じんの変異原性の比較. 日本薬学会北陸支部第 112 回例会、富山 (7 月) 2005 年
42. 水上 聡子、鳥羽 陽、唐 寧、早川 和一：ニトロ多環芳香族炭化水素類 (NPAH) の人体への曝露評価を目的とした、尿中代謝物分析法の開発. 第 18 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2005)、静岡 (8 月) 2005 年
43. 水上 聡子、鳥羽 陽、唐 寧、早川 和一：ニトロ多環芳香族炭化水素類 (NPAHs) の人体への曝露評価を目的とした尿中代謝物分析法の開発. 日本分析化学会第 54 回年会、名古屋 (9 月) 2005 年
44. 唐 寧、田村 賢治、服部 哲幸、楊 小陽、鳥羽 陽、早川 和一：東アジアの都市における大気粉じん中多環芳香族化合物の分布と主要発生源. 第 46 回大気環境学会年会、名古屋 (9 月) 2005 年
45. 鳥羽 陽、唐 寧、早川 和一：ディーゼル排ガス曝露指標、ヒト尿中 1-ニトロピレン代謝物の測定. 第 46 回大気環境学会年会、名古屋 (9 月) 2005 年
46. 佐藤 努、玉村 修司、唐 寧、早川 和一：環日本海における多環芳香族炭化水素と黄砂構成物質の相互作用およびそれらの長距離輸送. 第 46 回大気環境学会年会、名古屋 (9 月) 2005 年
47. 早川 和一：金沢大学 COE プログラム「環日本海域の環境計測と長期・短期変動予測」. 第 46 回大気環境学会年会、名古屋 (9 月) 2005 年

ポスター発表 (国内)

1. 山田 健司、木津 良一、鳥羽 陽、松本 寛、酒井 茂克、早川 和一：大気粉じん抽出物の内分泌攪乱作用. 第 43 回大気環境学会年会、東京 (9 月) 2002 年
2. 小野田 優、神谷 真紀子、広瀬 敏治、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：水酸

公開資料

- 化多環芳香族炭化水素類の構造とエストロゲン様／抗エストロゲン作用の関係. フォーラム 2002、衛生薬学・環境トキシコロジー、広島（10月）2002年
- 小林 淳、木津 良一、杉山 英男、河原 栄：ヒト由来の培養細胞を用いた生体組織への金属の影響. フォーラム 2002、衛生薬学・環境トキシコロジー、広島（10月）2002年
 - 早川 和一、小野田 優、神谷 真紀子、広瀬 敏治、鳥羽 陽、木津 良一：水酸化多環芳香族炭化水素類の構造とエストロゲン様／抗エストロゲン作用についての考察. 第5回日本内分泌攪乱化学物質学会、広島（11月）2002年
 - 木津 良一、岡村 和政、鳥羽 陽、早川 和一：ディーゼル車排気粉じんの抗アンドロゲン作用—多環芳香族炭化水素の寄与とその作用機構—. 第5回日本内分泌攪乱化学物質学会、広島（11月）2002年
 - 戸塚 佳子、渡辺 伸枝、大澤 誠喜、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：ディーゼル排ガス粉塵曝露ラット母及び胎仔の組織中多環芳香族炭化水素濃度. 第5回日本内分泌攪乱化学物質学会、広島（11月）2002年
 - 岡村 和政、木津 良一、鳥羽 陽、早川 和一：多環芳香族炭化水素の抗アンドロゲン作用の分子機構に関する研究—AP-1を介した作用発現機構—. 日本薬学会第123年会、長崎（3月）2003年
 - 唐 寧、野口 恵子、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：化学発光検出HPLCによる大気中強変異原性物質3-ニトロベンズアントロンの検出. 日本薬学会第123回年会、長崎（3月）2003年
 - Chetiyankornkul, T.、Toriba, A.、Kizu, R.、Hayakawa, K.：Urinary 1-Hydroxypyrene and 2-Hydroxyfluorene as Biomarkers of the Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and the Contribution of Cigarette Smoking. 日本薬学会第123年会、長崎（3月）2003年
 - 山田 健司、木津 良一、鳥羽 陽、松本 寛、酒井 茂克、早川 和一：大気粉じん抽出物の内分泌攪乱作用. 日本薬学会第123年会、長崎（3月）2003年
 - 白倉 義明、木津 良一、鳥羽 陽、早川 和一：ベンゾ[a]ピレンによるDNA損傷と細胞周期停止に関する研究. 日本薬学会第123年会、長崎（3月）2003年
 - 戸塚 佳子、渡辺 伸枝、大澤 誠喜、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：ディーゼル排ガス粉塵曝露によるラット母・胎仔組織および母乳中の多環芳香族炭化水素蓄積傾向. 日本薬学会第123年会、長崎（3月）2003年
 - 筒井 眞理、木津 良一、鳥羽 陽、早川 和一：ディーゼル排気粉じん抽出物の断面とそのアンドロゲン様／抗アンドロゲン作用. 日本薬学会第123年会、長崎（3月）2003年
 - 岸田 佳子、大槻 直生、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：環境汚染物質のアンドロゲン様作用／抗アンドロゲン作用の新規ルシフェラーゼレポータージーンアッセイ法. フォーラム 2003、衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台（10月）2003年
 - 神谷 真紀子、岡 裕美、鳥羽 陽、木津良一、早川和一：たばこ煙のエストロゲン様／抗エストロゲン作用とそのエストロゲン様作用物質本体の追跡. フォーラム 2003、衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台（10月）2003年
 - 野口 恵子、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：ディーゼル粉じんのエストロゲン様／抗エストロゲン作用と抗エストロゲン作用物質本体の追跡. フォーラム 2003、衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台（10月）2003年
 - 戸塚 佳子、渡辺 伸枝、大澤 誠喜、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：ディーゼル排ガスを妊娠期・授乳期に曝露したラットの胎仔および母乳中多環芳香族炭化水素. フォーラム 2003、衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台（10月）2003年
 - 鳥羽 陽、T. Chetiyankornkul、木津 良一、早川 和一：多環芳香族炭化水素類の曝露評価のための尿中代謝物測定法の開発. フォーラム 2003、衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台（10月）2003年

公開資料

19. Chetiyankornkul, T.、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：Simultaneous Determination of Monohydroxy Metabolites of Naphthalenes, Fluorene, Phenanthrenes, Fluoranthene and Pyrene in Urine as Multi-biomarker of Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. 日本薬学会第 124 年会、大阪（3 月）2004 年
20. 筒井 眞理、木津 良一、鳥羽 陽、早川 和一：ディーゼル排気粉じん抽出物の抗アンドロゲン物質. 日本薬学会第 124 年会、大阪（3 月）2004 年
21. 多賀 里奈、唐 寧、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：石炭燃焼粉じん中ニトロ多環芳香族炭化水素の変異原性への寄与. 日本薬学会第 124 年会、大阪（3 月）2004 年
22. 唐 寧、田村 憲治、多賀 里奈、服部 哲幸、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：東アジアの都市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特徴. 日本薬学会第 124 年会、大阪（3 月）2004 年
23. 木津 良一、鳥羽 陽、山下 克美、早川 和一：ベンゾ[a]ピレンによる DNA 損傷と細胞周期チェックポイントに関する研究. 日本薬学会第 124 年会、大阪（3 月）2004 年
24. 岡村 和政、木津 良一、鳥羽 陽、早川 和一：前立腺特異抗原プロモーターにおける多環芳香族炭化水素の抗アンドロゲン作用の分子機構. 日本薬学会第 124 年会、大阪（3 月）2004 年
25. 大槻 直生、木津 良一、唐 寧、鳥羽 陽、早川 和一：ニトロ多環芳香族炭化水素のアンドロゲン様作用/抗アンドロゲン作用. 日本薬学会第 125 年会、東京都（3 月）2005 年
26. 吉田 智裕、唐 寧、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：ディーゼル排出粉塵中の抗アンドロゲン物質の探索. 日本薬学会第 125 年会、東京都（3 月）2005 年
27. 岡本 葉、木津 良一、唐 寧、鳥羽 陽、早川 和一：アリル炭化水素受容体-アンドロゲン受容体シグナル伝達経路間のクロストークに関する研究. 日本薬学会第 125 年会、東京都（3 月）2005 年
28. 木津 良一、岸田 佳子、唐 寧、鳥羽 陽、早川 和一：多環芳香族炭化水素類のアンドロゲン様作用. 日本薬学会第 125 年会、東京都（3 月）2005 年
29. 鄭 相運、木津 良一、早川 和一：BAE 細胞系における ROS 生成と NF- κ B の核転移を介した PAHs とその誘導体によるレドックスインバランスの誘導. 日本薬学会第 125 年会、東京都（3 月）2005 年
30. 服部 哲幸、唐 寧、鉾田、朱里、田村 憲治、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一：中国 3 都市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比較. 日本薬学会第 125 年会、東京都（3 月）2005 年
31. 柿本 健作、木津 良一、唐 寧、鳥羽 陽、早川 和一：多環芳香族炭化水素曝露評価法の開発. 日本薬学会第 125 年会、東京都（3 月）2005 年
32. 水上 聡子、鳥羽 陽、呂 超、唐 寧、木津 良一、早川 和一：尿中ニトロ多環芳香族炭化水素類 (NPAHs) 代謝物分析法の開発. 日本薬学会第 125 年会、東京都（3 月）2005 年
33. 大槻 直生、木津 良一、唐 寧、鳥羽 陽、早川 和一：ニトロ多環芳香族炭化水素及びその還元代謝物の抗アンドロゲン作用. フォーラム 2005：衛生薬学・環境トキシコロジー、徳島県（10 月）2005 年
34. 岡村 和政、岸田 佳子、眞田 法子、早川 和一、木津 良一：多環芳香族炭化水素類のアンドロゲン様作用. フォーラム 2005：衛生薬学・環境トキシコロジー、徳島県（10 月）2005 年
35. 楊 小陽、岡田 裕弥、唐 寧、鳥羽 陽、早川 和一：中国から日本への燃焼粉塵の長距離輸送に関する研究. フォーラム 2005：衛生薬学・環境トキシコロジー、徳島県（10 月）2005 年
36. 北岡 瞳、水上 聡子、鳥羽 陽、唐 寧、早川 和一：LC-MS/MS を用いたヒト尿中

公開資料

- ニトロ多環芳香族炭化水素代謝物分析法の開発. フォーラム 2005 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、徳島県 (10月)2005年
37. 柿本 健作、鳥羽 陽、早川 和一 : LC-MS/MS を用いたヒト尿中ピレングルクロン酸抱合体分析法の開発. フォーラム 2005 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、徳島県 (10月)2005年
 38. Sang Woon Chung, Toriba, A., Hayakawa, K.: Differential effects of PAHs and PAH-Quinones on ROS production and NF- κ B activation in A549 (Lung Carcinoma) cells. フォーラム 2005 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、徳島県 (10月)2005年
 39. 水上 聡子、北岡 瞳、鳥羽 陽、唐 寧、早川 和一 : 化学発光検出 HPLC を用いた、ヒト尿中ニトロ多環芳香族炭化水素類の代謝物分析法の開発. フォーラム 2005 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、徳島県 (10月)2005年
 40. 五十嵐 一彦、服部 哲幸、唐 寧、鳥羽 陽、早川 和一 : ディーゼルエンジン排出粉じん、石炭燃焼粉じん中の多環芳香族炭化水素及びニトロ多環芳香族炭化水素の濃度、変異原性の比較. フォーラム 2005 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、徳島県 (10月)2005年
 41. 吉田 智裕、唐 寧、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一 : ディーゼル排出粉じん中の抗アンドロゲン作用物質の追跡. フォーラム 2005 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、徳島県 (10月)2005年
 42. 岡田 裕弥、楊 小陽、唐 寧、鳥羽 陽、早川 和一 : 多環芳香族炭化水素類の組成に基づく中国で発生した燃焼粉じんの日本への長距離輸送の証明. フォーラム 2005 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、徳島県 (10月)2005年

学会発表 (海外)

1. Kizu, R., Toriba, A., and Hayakawa, K.: Study of environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons using Novel Biomarkers, 2002 CETRA Symposium on Toxicogenomics and proteomics in Risk Assessment, 2002. 5. Seoul, Korea.
2. Chetiyankornkul, T., Toriba, A., Kizu, R., and Hayakawa, K.: Analysis of Urinary 2-Hydroxyfluorene as a New Biological Marker of the Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, X International Symposium on Luminescence Spectrometry Detection Techniques in Flowing Streams Quality Assurance and Applied Analysis, 2002. 6. Granada, Spain. P70.
3. Kizu, R., Okamura, K., Toriba, A., Klinge, C.M., Burnstein, K.L., and Hayakawa, K.: Antiandrogenic Activity of Extracts of Diesel Exhaust Particulates. Society of Environmental Toxicology and Chemistry 23rd Annual Meeting. 2002. 11. Salt Lake City, Utah, USA.
4. Kohtani, S., Yamamoto, N., Kudo, A., Tokumura, K., Hayakawa, K., and Nakagaki, R.: Photocatalytic Degradation of Endocrine Disrupting Chemicals using Ag- or CuO-Loaded BiVO₄ under Visible Light, XXIst International Conference on Photochemistry (ICP21), 2003. 7. Nara, Japan
5. Chetiyankornkul, T., Toriba, A., Kizu, R., and Hayakawa, K.: Comparison of Urinary 1-Hydroxypyrene and 2-Hydroxyfluorene as Biomarkers of Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Cigarette Smoking, The 39th IUPAC Congress and the 86th Conference of The Canadian Society for Chemistry, 2003. 8. Ottawa, Canada.
6. Okamura, K., Kizu, R., Toriba, A., and Hayakawa, K.: Contribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Antiandrogenic Activity of Diesel Exhaust Particulates, 19th International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds, 2003. 9. Amsterdam, Netherlands.
7. Toriba, A., Chetiyankornkul, T., Kaji, E., Kizu, R., and Hayakawa, K.: Determination of urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as biological marker to evaluate the exposure to PAHs, 19th International Symposium on Polycyclic Aromatic

- Compounds, 2003. 9. Amsterdam, Netherlands
8. 木津 良一、越湖 允也、鳥羽 陽、早川 和一: アリル炭化水素受容体(AhR)のリガンド測定法. 10th Asian International Symposium on Ecotechnology (ASET10), 2003. 11. Toyama, Japan.
 9. Kizu, R., Okamura, K., Toriba, A., Burnstein, K.L., Kakishima, H., and Hakayawa, K.: Molecular mechanism for aryl hydrocarbon receptor-mediated antiandrogenic activity, SETAC 24th Annual Meeting in North America, 2003. 11. Austin, USA.
 10. Kanaoka, C., Hayakawa, K., Komura, S., Kimura, T., Ibusuki, R., Kizu, R., Sato, T., and Furuuchi, M.: Atmospheric Environment, Radioactivity and Organic Pollutants in Pan-Japan Sea Area, The 2nd International Workshop on Sandstorms and Associated Dustfall, 2003. 11. Nagoya, Japan.
 11. Furuuchi, M., Kato, S., Kanaoka, C., Komura, S., Hayakawa, K., Kizu, R., Tang, N., Limpaseni, W., Sun, X., Jang, C., Amorunkibamrung, M., and Minoura, N.: Comparison of Components of PM Samples Collected in Japan and Other East Asian Countries, The 2nd International Workshop on Sandstorms and Associated Dustfall, 2003. 11. Nagoya, Japan.
 12. Tabata, M., Chohji, T., Hayakawa, K., and Iwai, W.: Analysis of Iron Compounds in Atmospheric Aerosols collected at Toyama and Shengyang, The 2nd International Workshop on Sandstorms and Associated Dustfall, 2003. 11. Nagoya, Japan.
 13. Furuuchi, M., Kanaoka, C., Komura, S., Hayakawa, K., Kizu, R., Tang, N., and Minoura, N.: Components of TSP Samples during Asian Dust Storms, The 2nd International Workshop on Sandstorms and Associated Dustfall, 2003. 11. Nagoya, Japan.
 14. Hayakawa, K., Tang, N., Hattori, T., Igarashi, K., Yang, X., and Toriba A.: Are [NPAH/PAH] ratios indicates for contributors of airborne particulates?, International Symposium of Polyaromatic Compounds (ISPAC 20), 2005. 8. Tronto, Canada.

ポスター発表(海外)

1. Toriba, A., Kaji, E., Chetianukornkul, T., Kizu, R., and Hayakawa, K.: Determination of Benzo[a]pyrene Metabolites by Human Cytochrome p450 Using Column-switching HPLC with Fluorescence Detection, X International Symposium on Luminescence Spectrometry Detection Techniques in Flowing Streams Quality Assurance and Applied Analysis, 2002. 6. Granada, Spain.
2. Onoda, Y., Hirose, T., Kamiya, M., Toriba, A., Kizu, R., and Hayakawa, K.: Estrogenic / Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and their Monohydroxy Derivatives, SCOPE/IUPAC SCOPE/IUPAC International Symposium on Endocrine Active Substances, 2002. 11. Yokohama, Japan.
3. Okamura, K., Kizu, R., Toriba, A., and Hayakawa, K.: Antiandrogenic Activity of Diesel Exhaust Particulates Emitted from a Commercial Diesel-Engine Truck, SCOPE/IUPAC International Symposium on Endocrine Active Substances, 2002. 11. Yokohama, Japan.
4. Tang, N., Toriba, A., Kizu, R. and Hyakawa, K.: Comparison of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons in Cities of East Asia, 9th Asian Symposium on Ecotechnology -Toyama (ASET9), 2002. 12. Toyama, Japan.
5. 山田 健司、木津 良一、鳥羽 陽、松本 寛、酒井 茂克、早川 和一: 大気粉じん抽出物の内分泌攪乱作用. 9th Asian Symposium on Ecotechnology -Toyama (ASET9), 2002. 12. Toyama, Japan.
6. Honoki, H., Yasuda, H., Kawakami, T., and Hayakawa, K.: A ratio of non sea-salt sulfate ion from domestic origin in wet deposition to sulfur dioxide emitted from Toyama Prefecture in winter, 9th Asian Symposium on Ecotechnology -Toyama (ASET9), 2002. 12. Toyama, Japan.
7. 田端 勝弘、竹島 和良、丁子 哲治、早川 和一、岩井 正雄: 673Kにおける、 α -酸化鉄(III)を用いるピレンおよびベンゾ[a]ピレンの除去. 10th Asian International Symposium on Ecotechnology (ASET10), 2003. 11. Toyama, Japan.
8. 唐 寧、田村 憲治、多賀 里奈、服部 哲幸、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一: 中国瀋陽の大気中における多環芳香族炭化水素及びニトロ多環芳香族炭化水素の発

公開資料

- 生源について. 10th Asian International Symposium on Ecotechnology (ASET10), 2003. 11. Toyama, Japan.
9. 多賀 里奈、唐 寧、鳥羽 陽、木津 良一、早川 和一: 石炭燃焼粉じん中ニトロ多環芳香族炭化水素の変異原性への寄与. 10th Asian International Symposium on Ecotechnology (ASET10), 2003. 11. Toyama, Japan.
 10. 田端 勝弘、斉藤 大輔、竹島 和良、丁子 哲治、早川 和一、岩井 正雄: 673Kにおける、環境材料を用いる 1-ニトロピレンの除去反応. 10th Asian International Symposium on Ecotechnology (ASET10), 2003. 11. Toyama, Japan.
 11. Tamamura, S., Wang, X., Ota, Y., Sato, T., Tang, N., and Hayakawa, K.: Adsorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons onto the Components of Kosa aerosols and their stabilities, The 2nd International Workshop on Sandstorms and Associated Dustfall, 2003. 11. Nagoya, Japan.
 12. Tang, N., Tamamura, S., Hattori, T., Taga, R., Sun, G.F., Mishukov, V. F., Sergineko, V., Toriba, A., K., Kizu, and Hayakawa, K.: Characteristics of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons in Shenyang, Vladivostok and Kanazawa, The 2nd International Workshop on Sandstorms and Associated Dustfall, 2003. 11. Nagoya, Japan.
 13. Honoki, H., Watanabe, K., Iida, H., Kawada, K., and Hayakawa, K.: Behaviors of the Asian Continent and domestic origin acid rain constituents along the northwest winter monsoon in Hokuriku districts. Japan. Acid Rain 2005, 2005. 6. Praha, Czech Republic.

(東京都健康安全研究センター 渡辺グループ)

学会発表(国内)

1. 千倉 知子、池野谷 美奈、佐藤 かなこ、長井 二三子、武田 健、渡辺 伸枝: ディーゼル排ガス暴露が妊娠ラットの卵巣アロマターゼ活性に及ぼす影響. フォーラム 2001: 衛生薬学・環境トキシコロジー、金沢 (10月) 2001年
2. 池野谷 美奈、藤村 ちはる、山田 智三、武田 健、大澤 誠喜、渡辺 伸枝: ディーゼル排ガス暴露がラット胎子の肺表面活性物質に及ぼす影響. フォーラム 2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台 (10月) 2003年
3. 渡辺 伸枝: ディーゼル排ガスとスギ花粉症 胎児期曝露の影響. 第46回大気環境学会年会、名古屋 (9月) 2005年

ポスター発表(国内)

1. 池野谷 美奈、千倉 知子、武田 健、渡辺 伸枝: 胎仔期からのディーゼル排ガス曝露がラット免疫機能に及ぼす影響. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第4回研究発表会、つくば市 (12月) 2001年
2. 渡辺 伸枝、福森 信隆、大澤 誠喜、小縣 昭夫、瀬戸 博、上村 尚: ディーゼル排出ガスの胎仔期曝露が肺の機能に及ぼす影響. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第7回研究発表会、名古屋 (12月) 2004年

(国立環境研究所 高野グループ)

学会発表 (国内)

1. 高野 裕久、柳澤 利枝、市瀬 孝道、定金 香里、吉川 敏一: ディーゼル排気微粒子(DEP)によるエンドトキシン(LPS)惹起性急性肺傷害の増悪. 第16回日本 Shock 学

公開資料

- 会総会、広島（5月）2001年
2. 柳澤 利枝、高野 裕久、定金 香里、市瀬 孝道、井上健一郎、吉川敏一：PM2.5 気管内投与が細菌毒素に関連する肺傷害に及ぼす影響。第42回大気環境学会年会、北九州（10月）2001年
 3. 井上 健一郎、高野 裕久、柳澤 利枝、市瀬 孝道、定金 香里、吉川 敏一：エンドトキシン（LPS）による肺内サイトカイン、ケモカイン産生に及ぼすディーゼル排気微粒子（DEP）の影響。第14回日本アレルギー学会春期臨床大会、幕張（3月）2002年
 4. 柳澤 利枝、高野 裕久、井上 健一郎、市瀬 孝道、定金 香里、吉川 敏一：エンドトキシン（LPS）による肺内サイトカイン、ケモカイン産生にディーゼル排気微粒子（DEP）の構成成分が及ぼす影響。第14回日本アレルギー学会春期臨床大会、幕張（3月）2002年
 5. 柳澤 利枝、高野 裕久、定金 香里、市瀬 孝道、井上 健一郎、小林 隆弘：PM2.5、DEPの構成成分による傷害性の相違について。第43回大気環境学会年会、府中（9月）2002年
 6. 日吉 孝子、高野 裕久、柳澤 利枝、市瀬 孝道、下條 信弘、熊谷 嘉人：大気中微小粒子成分 9, 10-フェナントラキノンの経気道暴露による催炎症作用。大分（3月）2003年
 7. 日吉 孝子、高野 裕久、柳澤 利枝、市瀬 孝道、熊谷 嘉人：OVA感作アレルギーに対する大気中微小粒子成分 9, 10-フェナントラキノンの修飾効果。フォーラム2003：衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台（10月）2003年
 8. 井上 健一郎、高野 裕久、柳澤 利枝、桜井 美穂、日吉 孝子、市瀬 孝道、定金 香里、吉川 敏一：エンドトキシン（LPS）による肺傷害にディーゼル排気微粒子（DEP）の構成成分が及ぼす影響—第2報。第53回日本アレルギー学会総会、岐阜（10月）2003年
 9. 日吉 孝子、熊谷 嘉人、戸村 成男、市瀬 孝道、柳澤 利枝、高野 裕久：卵白アルブミンによる喘息モデルに大気中微小粒子成分 9, 10 フェナントラキノンが及ぼす影響について。第53回日本アレルギー学会総会、岐阜（10月）2003年
 10. 日吉 孝子、熊谷 嘉人、戸村 成男、市瀬 孝道、柳澤 利枝、井上 健一郎、高野 裕久：大気中微小粒子に含まれる 1, 2-ナフトキノンが卵白アルブミン誘発マウス喘息モデルに及ぼす影響。第74回日本衛生学会総会、東京（3月）2004年
 11. 日吉 孝子、熊谷 嘉人、戸村 成男、市瀬 孝道、柳澤 利枝、井上 健一郎、高野 裕久：大気中微小粒子に含まれる 9, 10-フェナントラキノンが卵白アルブミン誘発マウス喘息モデルに及ぼす影響。第74回日本衛生学会総会、東京（3月）2004年
 12. 井上 健一郎、高野 裕久、柳澤 利枝、桜井 美穂、市瀬 孝道、定金 香里、吉川 敏一：ディーゼル排気微粒子（DEP）は細菌毒素による急性肺傷害を増悪する。第44回日本呼吸器学会、東京（3月）2004年
 13. 井上 健一郎、高野 裕久、柳澤 利枝、桜井 美穂、市瀬 孝道、定金 香里、吉川 敏一：細菌毒素（LPS）による肺内サイトカイン・ケモカイン産生にディーゼル排気微粒子（DEP）の構成成分が及ぼす影響。第44回日本呼吸器学会、東京（3月）2004年
 14. 柳澤 利枝、高野 裕久、桜井 美穂、井上 健一郎、日吉 孝子、市瀬 孝道、定金 香里、早川 和一：マウス喘息モデルに対するディーゼル排気微粒子（DEP）構成成分の影響。第16回日本アレルギー学会春期臨床大会、前橋（5月）2004年
 15. 日吉 孝子、熊谷 嘉人、戸村 成男、市瀬 孝道、柳澤 利枝、井上 健一郎、高野 裕久：卵白アルブミンによる喘息モデルマウスに大気中微小粒子成分 1, 2-ナフトキノンが及ぼす影響について。第16回日本アレルギー学会春期臨床大会、前橋（5月）2004年
 16. 日吉 孝子、熊谷 嘉人、戸村 成男、市瀬 孝道、定金 香里、柳澤 利枝、井上 健一郎、高野 裕久：OVA感作アレルギーに対する大気中微小粒子成分 1, 2-ナフトキ

公開資料

- ノンの修飾効果. 第 45 回日本大気環境学会年会、秋田（10 月）2004 年
17. 柳澤 利枝、高野 裕久、井上 健一郎、吉田 成一、武田 健、吉川 敏一：ディーゼル排気微粒子がエンドトキシン誘発性急性肺傷害に及ぼす影響に関する cDNA マイクロアレイ解析. 第 45 回日本大気環境学会年会、秋田（10 月）2004 年
 18. 桜井 美穂、高野 裕久、柳澤 利枝、井上 健一郎、日吉 孝子、市瀬 孝道、定金 香里、吉川 敏一：P-46 アレルギー性気管支喘息モデルにディーゼル排気微粒子 (DEP) 構成成分が及ぼす影響. 第 45 回大気環境学会年会、秋田（10 月）2004 年
 19. 日吉 孝子、熊谷 嘉人、戸村 成男、市瀬 孝道、柳澤 利枝、井上 健一郎、高野 裕久：卵白アルブミンによる喘息モデルに大気中微小粒子成分 1, 2-ナフトキノンが及ぼす影響について. 第 54 回日本アレルギー学会総会、横浜（11 月）2004 年
 20. 柳澤 利枝、高野 裕久、桜井 美穂、井上 健一郎、日吉 孝子、定金 香里、市瀬 孝道、唐 寧、早川 和一：マウス喘息モデルに対するディーゼル排気微粒子 (DEP) 構成成分の影響 2. 第 54 回日本アレルギー学会総会、横浜（11 月）2004 年

国際会議

1. Yanagisawa, R., Takano, H., Inoue, K., Uchiyama, K., Yoshikawa, T.: Components of diesel exhaust particles diversely enhance acute lung injury related to lipopolysaccharide. The 8th Biennial Conference of the International Endotoxin Society, 2004. 11. Kyoto
2. Sakurai, M., Takano, H., Yanagisawa, R., Inoue, K., Oda, Y., Tamura, H., Ichinose, T., Yoshikawa, T.: Effects of components of diesel exhaust particles on systemic inflammatory response related to acute lung injury in mice. The 8th Biennial Conference of the International Endotoxin Society, 2004. 11. Kyoto

(結核研究所 菅原グループ)

学会発表 (国内)

1. 大木 宏亮、宇田川 忠、武田 健、木津 良一、菅原 勇：ディーゼル排気微粒子曝露ヒト絨毛癌細胞株における Microarray による解析. 第 45 回大気環境学会年会、秋田（10 月）2004 年

ポスター発表 (国内)

1. 大木 宏亮、平松 久弥子、宇田川 忠、武田 健、木津 良一、菅原 勇：ディーゼル排気微粒子分画によるマウスマクロファージ細胞株サイトカイン産生態の検討. 第 44 回大気環境学会年会、京都（9 月）2003 年
2. 大木 宏亮、平松 久弥子、宇田川 忠、木津 良一、武田 健、菅原 勇：ディーゼル排気微粒子分画によるマウスマクロファージ細胞株由来サイトカイン産生能及び絨毛癌細胞株ホルモン産生能の検討. 日本薬学会第 124 回年会、大阪（3 月）2004 年
3. 大木 宏亮、宇田川 忠、武田 健、木津 良一、菅原 勇：ヒト絨毛癌細胞株に及ぼすディーゼル排気微粒子曝露の影響—Microarray による解析. 日本薬学会第 125 回年会、東京（3 月）2005 年

公開資料

(星薬科大学 鈴木グループ)

学会発表 (国内)

1. 宮川 和也、成田 年、押尾 茂、富田 真理子、宮竹 真由美、水尾 圭祐、武田 健、鈴木 勉：学会周産期における環境化学物質の曝露による dopamine 神経障害. 第 35 回日本神経精神薬理学会、大阪 (7 月) 2005 年

(大分県立看護科学大学 吉田グループ)

ポスター発表 (国内)

1. 吉田 成一、平野 佐世子、高野 裕久、木津 良一、早川 和一、武田 健：ディーゼル排気微粒子のエストロゲンレセプター mRNA 発現抑制作用の解析. 第 123 年会日本薬学会、長崎 (3 月) 2003 年
2. 吉田 成一、六田 沙織、平野 佐世子、野口 恵子、早川 和一、高野 裕久、武田 健、市瀬 孝道：ディーゼル排気微粒子中に含まれるエストロゲンレセプター mRNA 発現低下に関与する物質の探索. フォーラム 2003: 衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台 (10 月) 2003 年
3. 六田 沙織、吉田 成一、野口 恵子、早川 和一、高野 裕久、武田 健、市瀬 孝道：ディーゼル排気微粒子中に含まれるエストロゲンレセプター mRNA 発現低下に寄与する物質の解析. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第 6 回研究発表会、仙台 (12 月) 2003 年
4. 吉田 成一、六田 沙織、定金 香里、西川 雅高、武田 健、市瀬 孝道：黄砂の内分泌かく乱作用に関する研究～ライディッヒ細胞における遺伝子発現解析. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第 6 回研究発表会、仙台 (12 月) 2003 年
5. 吉田 成一、六田 沙織、野口 恵子、早川 和一、高野 裕久、武田 健、市瀬 孝道：ディーゼル排気微粒子中のエストロゲンレセプター α mRNA 発現低下に関与する物質の探索. 日本薬学会第 124 年会、大阪 (3 月) 2004 年
6. 吉田 成一、平春 亜季子、野口 恵子、早川 和一、高野 裕久、武田 健、市瀬 孝道：ディーゼル排気微粒子中に含まれる Estrogen Receptor α mRNA 発現低下作用を有する物質の探索. フォーラム 2004: 衛生薬学・環境トキシコロジー、千葉 (10 月) 2004 年
7. 吉田 成一、長山 小夜子、森 育子、西川 雅高、市瀬 孝道. 黄砂の内分泌かく乱作用に関する研究～雄性生殖機能への影響. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第 7 回研究発表会、名古屋 (12 月) 2004 年
8. 吉田 成一、高野 裕久、市瀬 孝道：In vitro 細胞培養系を用いた微小粒子状物質によるケモカイン産生誘導. 日本薬学会第 125 年会、東京都 (3 月) 2005 年
9. 吉田 成一、高橋 久美子、日吉 孝子、高野 裕久、市瀬 孝道：粒子状物質の内分泌かく乱作用に関する研究～雄性生殖機能への影響. 日本内分泌攪乱化学物質学会 第 8 回研究発表会、東京 (9 月) 2005 年
10. 吉田 成一、益本 しほり、吉田 智裕、早川 和一、高野 裕久、武田 健、市瀬 孝道：ディーゼル排気微粒子中に存在する Estrogen Receptor α mRNA 発現低下作用を有する物質の同定. フォーラム 2005: 衛生薬学・環境トキシコロジー、徳島県 (10 月) 2005 年

公開資料

(3)特許出願

① 国内出願

なし

② 海外出願

なし

(4)受賞等

① 受賞

○平成 15 年度(第 1 回)日本薬学会 環境・衛生部会賞 受賞

受賞者:大分県立看護科学大学 講師 吉田成一

受賞内容:ディーゼル排ガスの生殖系及び脳神経系への影響

○平成 17 年度(第 1 回)精子形成・精巣毒性研究会 奨励賞 受賞

受賞者:東京理科大学薬学部薬学研究科 修士課程 2 年 庭田祐一郎

受賞内容:「ディーゼル排ガス胎仔期ー成長期曝露のマウス精子性状に及ぼす影響」

② 新聞報道

日本経済新聞 2002 年 4 月 22 日

「ディーゼル排気から環境ホルモン作用？」

東京理科大チーム確認

日刊工業新聞 2003 年 3 月 7 日

「ディーゼル排ガス暴露マウスの子 雄の男性ホルモン増加」

東京理科大など

産経新聞 2003 年 5 月 20 日

「ディーゼル車“母子関係”にも悪影響 妊娠中に排ガス 子供花

粉症」都がラット実験初めて立証「低年齢化の根拠に」

読売新聞 2004 年 8 月 30 日

「ディーゼル排ガス 胎児にも影響？」成長した雄マウス 精子生産能力低下

日本経済新聞 2005 年 9 月 22 日

「ディーゼル排ガスを吸ったマウス胎児にナノ粒子沈着ー東京理科大などの研究」

読売新聞 2005 年 9 月 22 日

「母がディーゼル排ガス吸引ー胎児の脳に粒子蓄積ー行動やホルモン異常」

公開資料

毎日新聞 2005年9月26日

「妊娠中に排ガス吸入のマウス 胎児の脳にナノ粒子」

2003年5月24日

1) 4月15日(土) NHK ニュース 午後7:00台

2) 4月15日(土) NHK ニュース 午後9:00台

4月15日(土) NHK ラジオニュース 午後6:00台

「ディーゼル排ガス胎仔期曝露の出生仔の雄性生殖系への影響」

③ その他

吉田 成一、武田 健

環境と未病—大気汚染が健康に与える影響

別冊・医学のあゆみ

医歯薬出版株式会社、p30-34, 2001

吉田 成一、武田 健

ディーゼル排ガスが生体に及ぼす影響

「環境安全」No. 91 p9-10

東京大学環境安全センター 2002

吉田 成一、武田 健

環境汚染物質による生体恒常性の攪乱

「生殖系に影響を及ぼす化学物質」

水環境学会誌 Vol. 257 No. 2 2002. 2

吉田 成一、武田 健

「環境汚染物質による生体恒常性の攪乱「生殖系に影響を及ぼす化学物質」

水環境学会誌 Vol. 257 No. 2 p 68-72、2002

机 直美、吉田 成一、武田 健

ディーゼル排ガスは生殖器系に影響を及ぼす?!

「科学と教育」日本化学会 51巻11号 p666-667 2003

吉田 成一、机 直美、武田 健

自動車排ガスの毒性

「科学」岩波書店 vol. 74 NO. 1 p72-73 2003

小野 なお香、吉田 成一、武田 健

妊娠中にディーゼル排ガスを吸うと雄マウスの生殖系に影響がでる?

日本薬学会第123年会講演ハイライト p29 2003. 3

渡邊 学、机 直美、高野 裕久、武田 健

ディーゼル排ガスは出生前後のマウスの能の発達に悪影響?

日本薬学会第124年会講演ハイライト p29 2004. 3

公開資料

押尾 茂、小野 なお香、小田桐 隆志、武田 健
 ディーゼル排ガスの生殖系および脳神経系への影響
 株式会社エヌ・ティー・エス 自動車排出ナノ粒子および DEP の測定と生体影響
 評価 p165-175 2005

(5)その他特記事項

6 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H13. 1. 15	武田チーム班会議	東京都新宿区（理窓会館）	7名	研究チーム顔合わせ
H14. 1. 10	武田チーム班会議	東京都新宿区（理窓会館）	15名	研究成果報告
H15. 1. 10	武田チーム班会議	石川県金沢市（石川厚生年金会館）	15名	平成14年度研究成果報告 平成15年度研究計画打ち合わせ
H15. 1. 10	科学技術事業団創造科学推進事業—文部科学省科学研究合同シンポジウム	石川県金沢市（石川厚生年金会館）	100名	経気道暴露有害物質の作用と浄化
H16. 1. 19	武田チーム班会議	東京都新宿区（理窓会館）	17名	平成15年度研究成果報告 平成16年度研究計画打ち合わせ
H17. 1. 28	武田チーム班会議	東京都新宿区（理窓会館）	19名	平成16年度研究成果報告 平成17年度研究計画打ち合わせ
H17. 11. 26	科学技術振興機構戦略的創造科学推進事業（CREST, JST）平成12年度採択課題最終報告会（予定）	千葉県野田市（東京理科大学薬学部講堂）	250名（予定）	「大気中に存在する新しいタイプの内分泌かく乱物質—大気中微粒子の健康影響の解明を目指して—」

(2)招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間

7 結び

先に述べたように、本研究では当初、(1)ディーゼル排ガスに含まれる様々な内分泌かく乱物質を同定し、その作用について分子レベルで解析する、(2)ディーゼル排ガスの生殖機能への影響を系統、種、曝露時期を変えて評価する、(3)ディーゼル排ガスを妊娠期に曝露し、胎仔の性分化、脳神経系及び生殖系の発達に対する影響を病理学的、分子生物学的及び行動薬理学的的手法を駆使して検討する、(4)同定した内分泌かく乱原因化学物質の大気中濃度を測定して、ヒトへの影響を推定するとともにその除去法の確立を目指す、という4つの達成目標を立てて、研究に取り組んだ。これらの中で、(1)～(3)については、初期の目標を達成しつつあると考える。残念ながら、(4)については、現在、構想中であり、今後の進展に期待している段階である。

今後は、本研究の成果である、「ディーゼル排ガスの影響の主役は排ガス中の微粒子にある」との仮説を発展させて、「ナノ粒子の健康科学」という研究分野を確立して、国民の健康発展のため、また、21世紀の基盤産業となると期待されるナノテクノロジーの健全な発展のために寄与したいと考えている。本研究チームは、当初6グループ、最終的には7グループで構成されたが、お互いの連絡や共同研究も地理的な制約を超えて比較的順調に遂行できたものと思われる。また、本課題に分配された研究費は、CRESTとしては比較的低額であったので、各グループへの配分額も低額とならざるを得なかったことは残念であり、総括チーム以外の構成員にはご迷惑をかけたかもしれない。なお、研究費の使用に関しては比較的自由度が高く、機動的に研究費を使用できたことは、研究遂行上、大変有意義であった。さらに、本課題で雇用した研究員は三名であったが、研究期間中に、二名は大学教員（講師、教授）に、一名は財団法人の運営する研究所研究員としてそれぞれ移動することとなった。移動後も、大学教員となった二名は、本研究グループの重要な構成員として残り、研究遂行にあたって重要な役割を果たしていただいた。CREST研究により、研究員だけでなく、技術員、研究補助員、チーム事務員を雇用できたことは、本研究を遂行する上でとても重要な用件であり、このような人的裏付けを伴うCREST研究費をいただけたことに対して、改めて謝意を表します。

最後に本研究の実施にあたり、終始、適切なお助言を賜りました鈴木継美研究総括をはじめとする研究アドバイザーの諸先生に厚く御礼申し上げます。また、お世話になりました科学技術振興機構の皆様方に厚く御礼申し上げます。さらにCREST「武田チーム」に所属し、研究を遂行して戴いた多くの共同研究者の方々に感謝申し上げます。

公開資料



▲ 東京理科大学 武田 健 先生



▲ 金沢大学 早川 和一 先生



▲ 星薬科大学 鈴木 勉 先生



▲ 国立環境研究所
高野 裕久 先生



▲ 東京都安全研究センター
渡辺 伸枝 先生



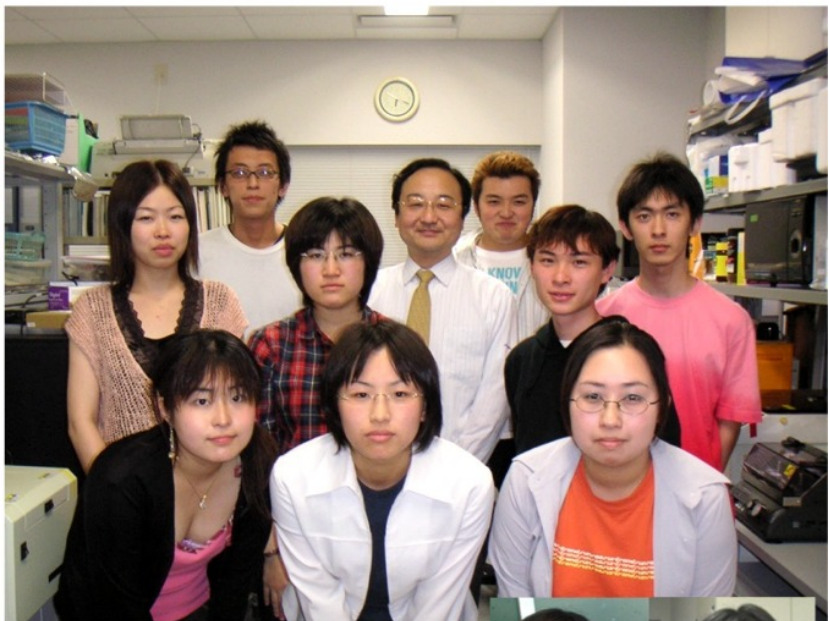
▲ 結核研究所 菅原 勇 先生



▲ 大分県立看護科学大学
吉田 成一 先生



▲ 東京理科大学 机 直美 先生
(現 日本自動車研究所 研究員)



▲ 奥羽大学 押尾 茂 先生と
東京理科大学武田チヨム

