

博士論文

紫外線照射による界面活性剤の分解とその遺伝毒性に関する研究

Study on the degradation of surfactants by ultraviolet irradiation
and change of the genotoxicity

2017年2月

静岡県立大学大学院
薬食生命科学総合学府
環境科学専攻
光環境生命科学研究室

久保田 徹

目次

緒論	・・・	1
第一章 非イオン系界面活性剤 ノニルフェノールポリエトキシレート(NPEO) とその紫外線分解物の細胞毒性		
第一節 序論	・・・	5
第二節 NPEO の培養細胞への影響	・・・	6
2-1 実験材料および実験方法	・・・	6
2-1-1 実験材料	・・・	6
2-1-2 細胞の培養	・・・	7
2-1-3 alamarBlue assay による細胞増殖率の測定	・・・	7
2-1-4 共焦点レーザー顕微鏡による細胞膜の変化観察	・・・	8
2-2 実験結果	・・・	8
2-2-1 NPEO 作用後の各培養細胞の増殖率	・・・	8
2-2-2 NPEO による ASF4-1 細胞の形態変化	・・・	8
第三節 NPEO の紫外線照射による分解	・・・	11
3-1 実験材料および実験方法	・・・	11
3-1-1 実験材料	・・・	11
3-1-2 NPEO への紫外線照射	・・・	12
3-1-3 UV 照射 NPEO の調製	・・・	12
3-1-4 HPLC 用移動相溶液の調製	・・・	12
3-1-5 HPLC 測定	・・・	12
3-2 実験結果	・・・	12
3-2-1 NPEO の HPLC パターン	・・・	12
3-2-2 紫外線照射後の NPEO パターン	・・・	13
3-2-3 紫外線照射後の NPEO の UV 吸収スペクトル	・・・	16
第四節 NPEO 分解物の培養細胞への影響	・・・	18
4-1 実験材料および実験方法	・・・	18
4-1-1 実験材料	・・・	18
4-1-2 実験方法	・・・	18
4-2 実験結果	・・・	18
第五節 考察	・・・	20
第二章 NPEO およびその紫外線分解物によるヒストン H2AX のリン酸化		
第一節 序論	・・・	22

第二節 NPEO による γ -H2AX の誘導	...	23
2-1 実験材料および実験方法	...	23
2-1-1 実験材料	...	23
2-1-2 細胞の培養	...	23
2-1-3 Trypan blue 染色による細胞生存率の測定	...	23
2-1-4 γ -H2AX の測定	...	23
2-1-4-1 免疫蛍光染色法による γ -H2AX の検出	...	23
2-1-4-2 ウェスタンブロッティングによる γ -H2AX の解析	...	24
2-1-5 DNA 二本鎖切断(DSBs)の測定	...	24
2-2 実験結果	...	24
2-2-1 NPEO 作用後の MCF-7 細胞生存率	...	24
2-2-2 NPEO 作用後の γ -H2AX の生成	...	25
2-2-3 NPEO 作用後の DNA 二本鎖切断(DSBs)の生成	...	31
第三節 NPEO による γ -H2AX 誘導メカニズム	...	32
3-1 実験材料および実験方法	...	32
3-1-1 実験材料	...	32
3-1-2 細胞周期依存的 γ -H2AX の測定	...	32
3-1-3 FCM による ROS の測定	...	32
3-1-4 蛍光基質の分解による caspase 活性の測定	...	32
3-1-5 Plasmid relaxation assay による DNA 損傷の測定	...	33
3-2 実験結果	...	33
3-2-1 γ -H2AX 誘導と細胞周期との関連性	...	33
3-2-2 γ -H2AX 誘導における ROS の関与	...	36
3-2-3 NPEO(15)によるプラスミド DNA の損傷	...	36
第四節 紫外線照射 NPEO による γ -H2AX の誘導	...	40
4-1 実験材料および実験方法	...	40
4-1-1 実験材料	...	40
4-1-2 紫外線照射試料の調製	...	40
4-1-3 実験方法	...	40
4-2 実験結果	...	40
4-2-1 紫外線照射後の NPEO 分解物による MCF-7 細胞の生存率への影響	...	40
4-2-2 紫外線照射後の NPEO 分解物による γ -H2AX の誘導(免疫染色法)	...	42
4-2-3 紫外線照射後の NPEO 分解物による γ -H2AX の誘導(ウェスタンブロッティング法)	...	45

4-2-4	紫外線照射後の NPEO 分解物による DNA 二本鎖切断	… 46
第五節	紫外線照射 NPEO による γ -H2AX 誘導メカニズム	… 47
5-1	実験材料および実験方法	… 47
5-1-1	実験材料	… 47
5-1-2	試料の調製	… 47
5-1-3	実験方法	… 47
5-2	実験結果	… 48
5-2-1	紫外線照射 NPEO による γ -H2AX 誘導と 細胞周期との関係	… 48
5-2-2	紫外線照射 NPEO による γ -H2AX 誘導と ROS の関与	… 48
第六節	考察	… 52

第三章 陰イオン系界面活性剤 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)の細胞毒性およびヒストン H2AX のリン酸化

第一節	序論	… 54
第二節	LAS の培養細胞への影響	… 55
2-1	実験材料および実験方法	… 55
2-1-1	実験材料	… 55
2-1-2	細胞の培養	… 55
2-1-3	alamarBlue assay による細胞増殖率の測定	… 55
2-2	実験結果	… 55
第三節	LAS による γ -H2AX の誘導	… 56
3-1	実験材料および実験方法	… 56
3-1-1	実験材料	… 56
3-1-2	細胞の培養	… 56
3-1-3	実験方法	… 57
3-2	実験結果	… 57
3-2-1	LAS 作用後の γ -H2AX の生成	… 57
3-2-2	LAS 作用後の DNA 二本鎖切断(DSBs)の生成	… 57
第四節	LAS による γ -H2AX 誘導メカニズム	… 60
4-1	実験材料および実験方法	… 60
4-1-1	実験材料	… 60
4-1-2	細胞周期依存的 γ -H2AX の測定	… 60
4-1-3	FCM による細胞内活性酸素種(ROS)の測定	… 60
4-2	実験結果	… 60

4-2-1	LAS 作用後の γ -H2AX 誘導と細胞周期との関連性	...	60
4-2-2	LAS 作用後の γ -H2AX 誘導と ROS の関与	...	62
第五節	LAS の紫外線照射による分解	...	63
5-1	実験材料および実験方法	...	63
5-1-1	実験材料	...	63
5-1-2	LAS への紫外線照射	...	63
5-1-3	試料の調製	...	63
5-1-4	HPLC 用移動相溶液の調製	...	63
5-1-5	HPLC 測定条件	...	63
5-2	実験結果	...	63
第六節	紫外線照射 LAS の培養細胞への影響	...	65
6-1	実験材料および実験方法	...	65
6-1-1	実験材料	...	65
6-1-2	実験方法	...	65
6-2	実験結果	...	65
第七節	紫外線照射 LAS による γ -H2AX の誘導 およびそのメカニズム	...	66
7-1	実験材料および実験方法	...	66
7-1-1	実験材料	...	66
7-1-2	紫外線照射試料の調製	...	66
7-1-3	実験方法	...	66
7-2	実験結果	...	66
7-2-1	紫外線照射 LAS 作用後の γ -H2AX の誘導	...	66
7-2-2	紫外線照射 LAS 作用後の DSBs の生成	...	68
7-2-3	紫外線照射 LAS による γ -H2AX 誘導と 細胞周期との関連性	...	69
第八節	考察	...	70
総括		...	72
謝辞		...	75
参考文献		...	76

略語一覽

ABS	: Alkylbenzene sulfonic acid
ATM	: Ataxia telangiectasia mutated
BSFGE	: Biased sinusoidal field gel electrophoresis
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
DCFH-DA	: 6- carboxy -2,7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
DNA	: Deoxyribonucleic acid
DNA-PK	: DNA-dependent protein kinase
DSBs	: Double strand breaks
EDTA	: Ethylene diamine tetraacetic acid
FBS	: Fetal bovine serum
FCM	: Flow cytometer
FITC	: Fluorescein
HPLC	: High performance liquid chromatography
IC ₅₀	: Inhibitory concentration 50%
LAS	: Linear alkylbenzene sulfonic acid
LC ₅₀	: Lethal concentration 50%
NAC	: N-acetylcysteine
NBD-PC	: NBD-phosphatidylcholine: 1-acyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3- benzoxadiazol 4-yl) amino] caproyl] -sn-glycero-3-phosphocoline
NPEO	: Nonylphenol polyethoxylate
oc-DNA	: Open circular DNA
PBS(-)	: Phosphate-buffered saline (-)
PC	: Phosphatidylcholine
PDL	: Population doubling level
PI	: Propidium iodide
PMSF	: Phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	: Polyvinylidene fluoride
ROS	: Reactive oxygen species
sc-DNA	: DNA supercoil
SDS-PAGE	: Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
Tris-HCl	: Tris (hydroxymethyl) aminomethane
UV	: Ultraviolet
γ -H2AX	: Phosphorylation of histone H2AX

緒論

我々の日常生活を支えている多くの人工化学物質、中でも最も多く利用されている界面活性剤は、1分子中に油になじみやすい部位(親油基)と、水になじみやすい部位(親水基)とを有する化合物で、洗浄目的の石鹸に始まり、食品や化粧品などの乳化剤や保湿剤、プラスチックや金属製品の表面処理剤など幅広い業態、製品で汎用されている。特に1960年頃の洗濯機の普及とともに家庭用洗浄剤の利用が増加し、界面活性剤の生産が増え、2015年には年間1,108,054トンの生産量にまで拡大している[1]。

界面活性剤は、親水基が水中でマイナスに解離する陰イオン(アニオン)界面活性剤、プラスに解離する陽イオン(カチオン)界面活性剤、pHによってどちらにも解離する両性界面活性剤、イオンに解離しない非イオン(ノニオン)界面活性剤に分類される(Fig. 1)。

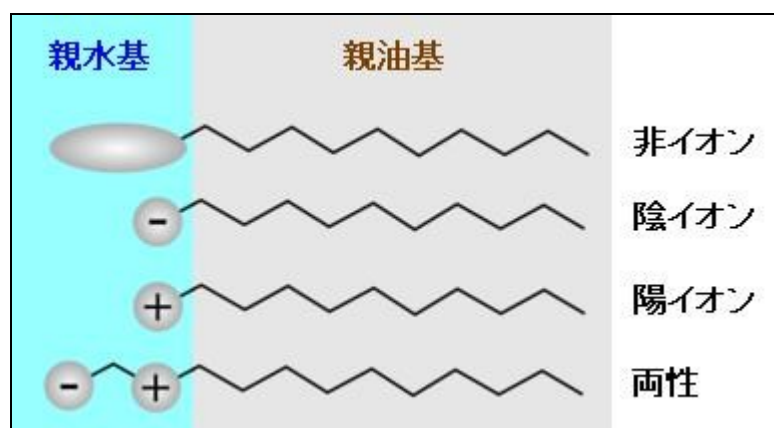


Fig. 1 Kinds of surfactants

1960年頃の家庭用洗浄剤普及の際に合成洗剤の主成分であった陰イオン界面活性剤である分岐型アルキルベンゼンスルホン酸塩(Alkylbenzene sulfonic acid:ABS)は、下水処理場、河川、湖などの環境汚染をきっかけに使用が規制されたが、その後同じ陰イオン界面活性剤である直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸塩(Linear alkylbenzene sulfonic acid:LAS)が使用されるようになった。また1980年頃には、様々な用途に利用でき、比較的生態への影響が低く、安価に生産が可能なポリオキシエチレンアルキルエーテルなどの非イオン界面活性剤が使われるようになった。2015年には、陰イオン界面活性剤は429,069トン/年、非イオン界面活性剤は588,955トン/年が生産されており、中でも陰イオン界面活性剤のアルキル(アシル)スルホネート群が95,001トン、非イオン界面活性剤のポリオキシエチレンアルキルエーテル群が248,579トンと多くの割合を占めている[1]。

界面活性剤の人体や動植物など生態系に及ぼす影響については、国際的に環境問題としてその重要性が増大し、数多くの研究からデータベース化されている。具体的には、毒性の強さを見極めるために、急性毒性、慢性毒性、遺伝毒性、生殖毒性などの指標が示されている。これら界面活性剤の多くは家庭からの排水も含め、下水処理場を経由して河川や湖などの水系環境に流入しているため、その環境での自然浄化(微生物分解など)の程度や水生生物への影響、環境中および生体内での蓄積性、毒性など正しく把握することが重要である。

ノニルフェノールポリエトキシレート(Nonylphenol polyethoxylate:NPEO) (Fig. 2)は 1980年頃から使われ始めた代表的な非イオン界面活性剤の一つで、エチレンオキシド鎖(側鎖)の数を調整して親水性や疎水性を変化させることのできる物質である(側鎖 n の数値が低いと疎水性で、数値が高いと親水性:n = 0–70)。

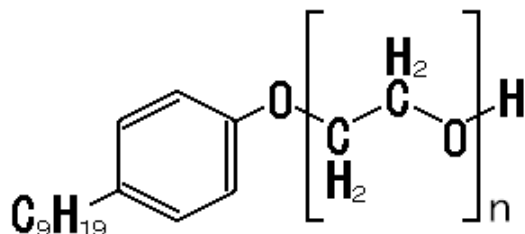


Fig. 2 Structure of nonylphenol polyethoxylate(NPEO)

そのため、幅広い業態、製品で使用され、その結果、大量の NPEO が環境中に流出していることが報告されている。環境中に流出した NPEO は通常微生物によって分解される[2-4]。その分解過程は複雑で、初めは好気性の微生物分解によって側鎖の分解が次第に進み、末端の側鎖が酸化されてカルボン酸となったノニルフェノキシカルボン酸などになり、最終的に嫌気性の微生物分解によってノニルフェノールに分解される(Fig. 3)[5]。

一般的に NPEO の微生物分解は 20 日以上で 50%、30 日でも 50%のまま停止するとされ、難分解性である[2、6]。その結果、長期にわたって生態系へ影響を及ぼすと考えられる。さらに NPEO の親油基のアルキルフェノールは分解されずに残存している[7]ことから考えると、ノニルフェノールのベンゼン環の崩壊やアルキル鎖の短縮などの分解はさらに難分解性であると予想される。実際に、アメリカの The Grand Calumet River では、最大 0.64 $\mu\text{g/L}$ 、平均 2 ppm の検出が見られ、New York's Mohawk River では最大 1.7 ppm の検出が見られている。国内においても、名古屋市内の下水処理場放流水から NPEO 分解物である NPEO(1)～NPEO(4)が 0.6 ～ 89 $\mu\text{g/L}$ 、ノニルフェノールが 1 ～ 7.7 $\mu\text{g/L}$ 検出されている[8、9]。

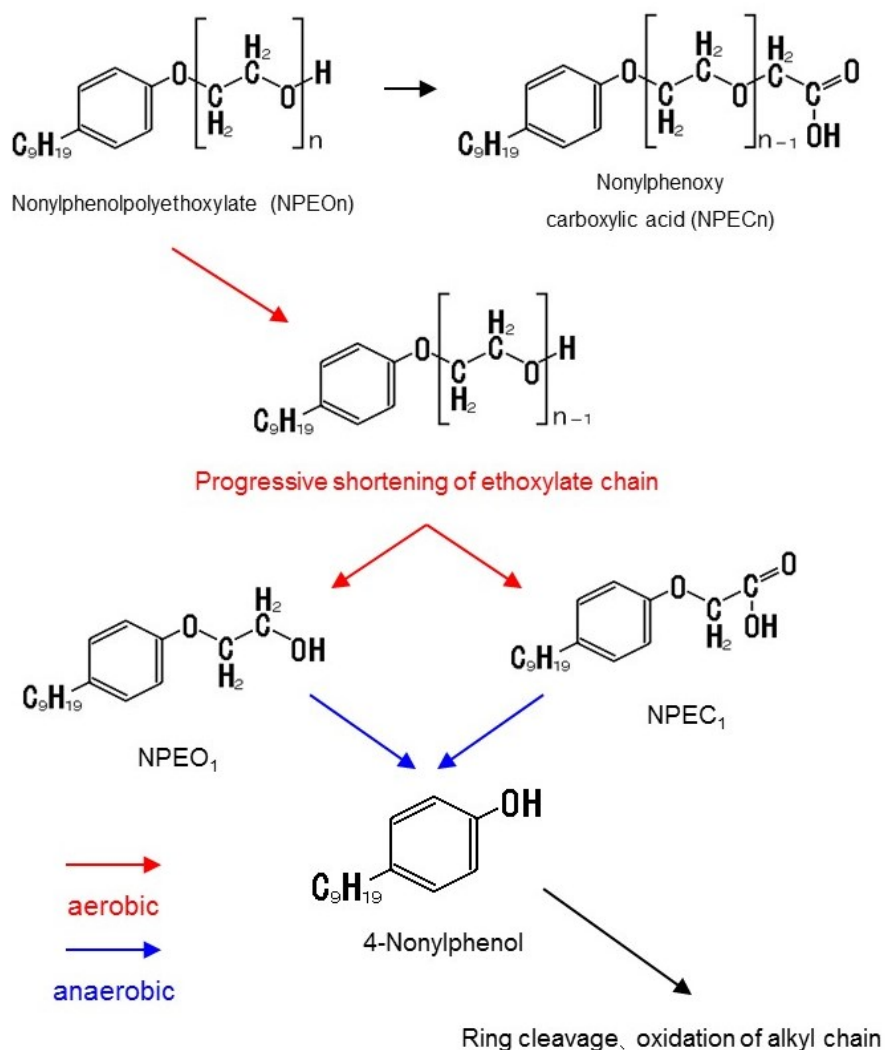


Fig. 3 The mechanism of NPEO degradation by bacteria ([3] European bans on surfactant trigger transatlantic debate., *Environ.Sci.Technol*, **31**(7), 316A-320A, 1997)

地球上に降り注ぐ太陽光に含まれる紫外線は、波長によって UVA(400～320nm)、UVB(320～290nm)、UVC(290～100nm)の3種類に分類される。UVBの一部とUVCはオゾン層に吸収され地表には届かないが、長波長UVBとUVAは吸収されず地表に到達している。界面活性剤を含む多くの環境中に存在する化学物質やヒトを含む生物の細胞に至るまで、この紫外線に日常的に曝露されている。

紫外線照射による人体への影響の主要因は、DNA 損傷の生成である[10-18]。DNA が短波長の紫外線を吸収すると DNA 中のチミンとシトシンのピリミジン塩基が隣り合った箇所 (dipyrimidine 部位) で、シクロブタン型ピリミジンダイマー (cyclobutane pyrimidine dimer、CPD) や6-4 光産物 (6-4 pyrimidine-pyrimidone photo product、6-4PP) などの塩基損傷産物が生成される。このような紫外線による化学構造の変化は、DNA にとどまらず広く化学物質においても起こる。

水環境中の界面活性剤も紫外線による分解変性をうけている。紫外線照射後に生成する

ヒドロキシラジカルなどの活性酸素種によって n-Dodecyl benzene surfonate が二酸化炭素、水、亜硫酸水素ナトリウムに分解される[19]。NPEOも同様に、環境中において紫外線による変性を受けている。紫外線照射によりエチレンオキシド基の短縮のほか、エチレンオキシド基のカルボキシル化やアルキル基の酸化、およびその中間体が生成され[20]、側鎖 9 の NPEO の紫外線分解中間体として側鎖 2 の NPEO およびそのエトキシ酢酸化合物の検出、ポリエチレングリコールが生成することが報告されている[21]。微生物による分解では側鎖などを段階的に分解し、分解が途中で停止する場合も多いが、紫外線による物理的な分解ではCO₂など比較的分子量の低い物質にまで分解される[19]。また微生物分解の過程で生成される中間物質については、段階的に側鎖が短くなることで水系生物への毒性が増加している可能性が示唆される[22]。しかしながら、紫外線による化学物質の分解物とヒトへの毒性を直接的に結ぶ報告は少なく、その中間生成物の毒性変化にまで着目した報告は少ない。

そこで本研究では、第一章では生産量の多くを占める非イオン系界面活性剤、中でも NPEO に着目し、その培養細胞への影響を検討するとともに、環境中に流出した際に受ける紫外線(UV)照射による NPEO の分解、反応中間体の毒性について解析した。第二章では、NPEO およびその UV 分解物の遺伝的影響を、ヒストン H2AX のリン酸化 (Phosphorylation of histone H2AX: γ -H2AX) に着目して検討した。第三章では、非イオン系界面活性剤に次いで生産量が多い陰イオン系界面活性剤である直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (Linear alkylbenzene sulfonate :LAS) に着目して検討を行った。

第一章 非イオン系界面活性剤 ノニルフェノールポリエトキシレイト NPEO とその紫外線分解物の細胞毒性

第一節 序論

非イオン系界面活性剤の生態系に及ぼす影響については、主に水系生物への影響についての報告[23-28]が多く、シュリンプやメダカ、ブルーギルに対するLC₅₀の検討[22、29、30]や数種のおたまジャクシに対する運動抑制効果の出現[31]などが挙げられる。代表的な非イオン系界面活性剤であるNPEOは、2015年に製造された非イオン系界面活性剤全体の42%を占めている[1]。NPEOの水系生物への影響は、側鎖長の違いによる影響変化についても報告されており、側鎖が短くなるほど低濃度でLC₅₀に到達している[22、29、30]。最も側鎖の短いノニルフェノールは、その分子構造が17β-estradiolに類似していることから、エストロゲン受容体に結合し、エストロゲン様作用を引き起こすとされている[32-34]。しかしながら、哺乳類などの恒温動物へのNPEOの影響を示した事例は少なく、さらにヒトへの生体内影響を示した例はみられない。

NPEOは通常環境中において微生物によって分解される[2-4]が、その分解性は50%程度で難分解性である[2、6]。一方、環境中のNPEOは紫外線による分解変性を受けており、紫外線照射によりエチレンオキシド基の短縮の他、エチレンオキシド基のカルボキシル化やアルキル基の酸化、およびその中間体の生成が報告されている[20、21]。分解物の1つであるノニルフェノールの一般毒性については、ラットの経口投与でLD₅₀が1,300-2,462 mg/kgと急性毒性が認められている[35、36]が、その他中間分解物についての生態影響の知見は見られない。また紫外線によるNPEOの分解とヒトへの毒性を直接的に結ぶ報告は少なく、その中間生成物の毒性変化にまで着目した例は少ない。

そこで本章では、正常ヒト皮膚由来繊維芽細胞 ASF4-1 細胞、広く実験に用いられているマウス胎児由来繊維芽細胞 NIH-3T3 細胞、浮遊系のヒト由来白血病細胞 Jurkat 細胞を使用し、NPEOの培養細胞への毒性について検証を行った。NPEOはエチレンオキシド鎖(側鎖)が0~70のものを用い、各培養細胞への毒性評価として細胞増殖率の変化について検討を行った。また、NPEOの側鎖に応じた細胞の形状変化を共焦点顕微鏡により観察した。さらに、UV照射後のNPEOの分解とその毒性変化について検討を行った。側鎖10と70のNPEOを使用し、UVA、UVB、UVC各波長の紫外線をそれぞれ照射し、その分解物を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて分析した。また、それら紫外線照射によって変性を受けたNPEOの培養細胞への毒性について検討した。

第二節 NPEO の培養細胞への影響

2-1 実験材料および実験方法

2-1-1 実験材料

【試薬】

•4-ノニルフェノール(4-Nonylphenol) (東京化成工業(株))

•ノニルフェノールポリエトキシレイト(NPEO)

NPEO(2)※ 商標名 ノニオン NS-202

NPEO(4.5) 商標名 ノニオン NS-204.5

NPEO(10) 商標名 ノニオン NS-210

NPEO(15) 商標名 ノニオン NS-215

NPEO(20) 商標名 ノニオン NS-220

NPEO(30) 商標名 ノニオン NS-230

NPEO(40) 商標名 ノニオン NS-240

NPEO(70) 商標名 ノニオン NS-270

※NPEO のカッコ内の数字はエチレンオキシド(側鎖)の個数を示す。各々の純度は90%以上。

以上、日本油脂(株)より譲渡して頂いた。

•NBD-PC (NBD-phosphatidylcholine: 1-acyl-2-[6-[(7-nitro- 2-1,3- benzoxadiazol 4-yl) amino] caproyl] -sn-glycero-3-phosphocoline) (Avanti Polar Lipids, Inc.)

•alamarBlue (Bio-Rad Co.,Ltd.)

その他の試薬は市販の特級品を使用した。

【細胞】

•ASF4-1 細胞 (加治和彦 前静岡県立大学教授より分与して頂いた。)

•NIH-3T3 細胞 (大日本製薬より購入した。)

•Jurkat 細胞 (RIKEN cell bank より購入した。)

【培養用培地】

•ASF4-1 細胞用 MEM

9.4 g/L Eagle's MEM② (MEM) (Nissui Pharmaceutical Co.,Ltd.)および 235 μl/L phenol red solution, 0.5 % membrane filtered (Gibco Laboratories Co.,Ltd.)を超純水 1 L に溶解し、121 °C で 20 分高圧蒸気滅菌したものに、培地に対し 10 %となるよう fetal bovine serum (FBS) (JRH Biosciences Co.,Ltd.)を加え使用した。

•NIH-3T3 細胞用 DMEM

9.5 g/L Dulbecco's modified eagle medium② (DMEM) (Nissui Pharmaceutical Co.,Ltd.)を超純水 1 L に溶解し、121 °C で 20 分高圧蒸気滅菌したものに、培地に対し 10 %となるよう calf serum (CS) (Bio Whittaker Co.,Ltd.)を加え使用した。

•Jurkat 細胞用 RPMI

10.2 g/L RPMI 1640 medium^② (RPMI) (Nissui Pharmaceutical Co.,Ltd.)を超純水 1 L に溶解し、121 °Cで 20 分高圧蒸気滅菌したものに、培地に対し 1 %となるよう penicillin-streptomycin (Gibco Laboratories Co.,Ltd.)を加え、さらに 10 %となるよう fetal bovine serum (FBS) (JRH Biosciences Co.,Ltd.)を加え使用した。

2-1-2 細胞の培養

2-1-1の通り調製した培地を用い、37 °C、5 %CO₂ インキュベーター内で継代培養した。細胞継代は対数増殖期後期の細胞を用い、3 日毎に行った。倍加時間は NIH-3T3 細胞は約 20 時間、Jurkat 細胞は約 15 時間であった。実験に用いた各細胞は、対数増殖期後期であるコンフルエント前の状態のものを使用した。

ASF4-1 細胞については、細胞集団倍加数(population doubling level;PDL)が累積 45 回(45PDL)において倍加能力が低下し始め、64.1 PDL で細胞寿命に達する細胞であるため、PDL は $\Delta PDL = (\log(\text{回収した細胞数}/\text{播種した細胞数}))/\log 2$ にて計算し、継代は、凍結保存用(31.2 PDL; 5.0×10^5 cells)を溶解し、培養した。倍加時間が約 84 時間で、実験に用いた細胞は、33.5 PDL のものを使用した。

2-1-3 alamarBlue assay による細胞増殖率の測定

alamarBlue assay は、生細胞内ミトコンドリアの活性脱水素酵素を利用して alamarBlue 色素を酸化還元反応によって酸化型(青色)から還元型(赤色)に変化させることで細胞増殖の測定を行う方法である。死細胞内ミトコンドリアでは活性が見られないため、細胞死を高感度に測定できる。

ASF4-1 細胞、NIH-3T3 細胞の付着細胞系では、96 穴プレートに 2.0×10^4 cells/mL の細胞懸濁液を 50 μ L ずつ蒔き、24 時間培養した。Jurkat 細胞(浮遊系細胞)では、96 穴プレートに 2.0×10^5 cells/mL の細胞懸濁液を 50 μ L ずつ蒔き、24 時間培養した。

培養後、PBS(-)で 10 mM に調製したノニルフェノールおよび NPEO を各培養培地で最終濃度 $\times 2$ に調製し、これを 50 μ L 加え(最終細胞数、ASF4-1 細胞および NIH-3T3 細胞 = 1.0×10^3 cells/100 μ L/well、 Jurkat 細胞 = 1.0×10^4 cells/100 μ L/well)、さらに alamarBlue 試薬を全量の 10 %量(10 μ L)加えた。

CO₂ インキュベーター内で 4 時間インキュベートした後に、蛍光マイクロプレートリーダー (BIO-TEK^R Instruments, INC.)を用いて、励起波長 560 nm、検出波長 590 nm にて測定を行った。その後、24 時間ごとに変化を測定した。

これら実験で得られた数値は、3 回から 5 回繰り返し行ったプレート穴ごとの平均値および標準偏差を算出して求めた。

2-1-4 共焦点レーザー顕微鏡による細胞膜の変化観察

NBD-PC 溶液は、最終濃度 0.01 mg/mL に調整し染色溶液とした。ASF4-1 細胞(2.0×10^5 cells/mL) 1 mL を 35mm dish に蒔き、CO₂ インキュベーター内にて 24 時間培養し、細胞を付着させた。実験直前に上清培地を取り除き、PBS(+)で洗浄後、調製した染色液 1 mL を加え、室温にて 2 分間反応させ細胞膜を蛍光染色した。染色液除去後、PBS(+)で洗浄し、PBS(+) 1 mL を加え、共焦点顕微鏡に設置し、画像取り込み直前に最終濃度 500 μ M となるように PBS(+)で調製した NPEO 1 mL を加え、経時的に画像を撮影した。共焦点レーザー顕微鏡は LSM510 Ver.2.3 (Carl Zeiss Co.,Ltd.)を用いた。

2-2 実験結果

2-2-1 NPEO 作用後の各培養細胞の増殖率

Fig. 4 に側鎖長の異なった NPEO 作用後の各培養細胞における細胞増殖変化を示した。各々の結果は、NPEO 濃度が ASF4-1 細胞において 200 μ M、Jurkat 細胞において 100 μ M、NIH-3T3 細胞において 300 μ M の場合を示している。すべての細胞において、側鎖が短くなるにつれ、側鎖依存的に細胞増殖の減少が観察された。Fig. 5 に NPEO 側鎖 10、20、70 それぞれの濃度依存的な細胞増殖変化を示した。いずれの細胞も側鎖の短い NPEO ほど細胞増殖を減少させたが、NPEO(20) 100 μ M では NIH-3T3 細胞でほとんど増殖率に変化がなかったのに対し、Jurkat 細胞では 20 %まで大幅に減少した。ASF4-1 細胞では 40 %程度の減少であった。この結果から NPEO 感受性は Jurkat 細胞 > ASF4-1 細胞 > NIH-3T3 細胞の順で高いことが確認された。

2-2-2 NPEO による ASF4-1 細胞の形態変化

NBD-PC は脂溶性の phosphatidylcholine (PC)に蛍光基が付加した分子で、細胞膜に存在する PC と NBD-PC が交換することによって細胞膜に取り込まれる。これにより蛍光顕微鏡で細胞膜の変化を観察することが可能となる。Fig. 6 に untreated および NPEO(10)と NPEO(70)をそれぞれ加えたときの、時間経過による細胞の変化を示した。untreated が変化していないのに対し、NPEO(10)では 5 分後あたりから細胞膜が崩壊し、10 分後には付着していた細胞が浮遊し始め、30 分後には完全に浮き上がった状態になったのが確認された。NPEO(10)の 30 分後の蛍光画像は浮遊してしまったため焦点がずれ、蛍光が観察できなかった。NPEO(70)では細胞はシャーレ上に付着していたが、時間とともに細胞膜の蛍光値が徐々に減少するのが確認された。これは、膜に取り込まれた NPEO(70)によって膜上の蛍光物質が薄まったためと考えられる。

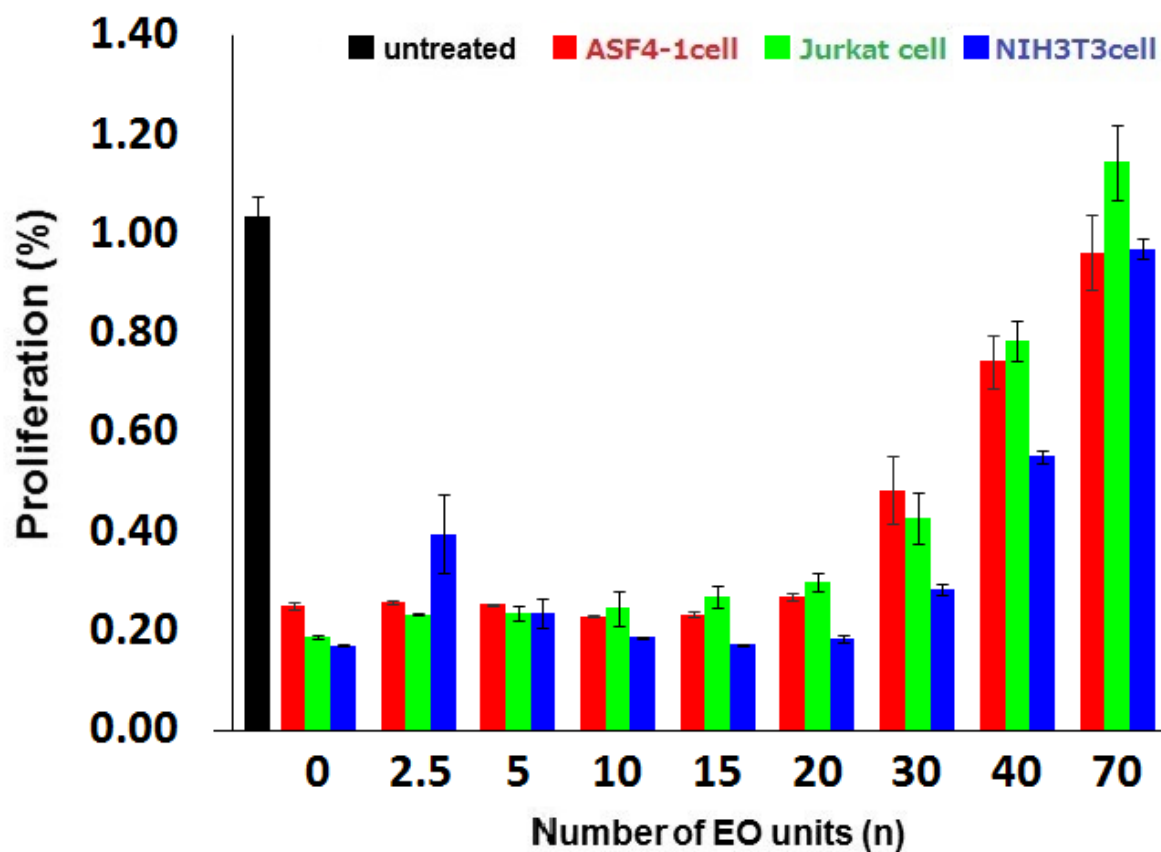


Fig. 4 Ethoxylate chain-dependent cytotoxicity of NPEOs.

Cells (ASF4-1cells, NIH-3T3cells = 1.0×10^3 cells/100 μ L/well, Jurkat cells = 1.0×10^4 cells/100 μ L/well) were incubated in medium containing NPEO(0-70) (ASF4-1cells = 200 μ M, NIH-3T3cells = 300 μ M, Jurkat cells = 100 μ M) and Alamarblue (10 μ L/well) at 37°C for 24 h in CO₂ incubator. Fluorescence was measured by Microplate Reader. Values are means \pm S.D. (n = 5).

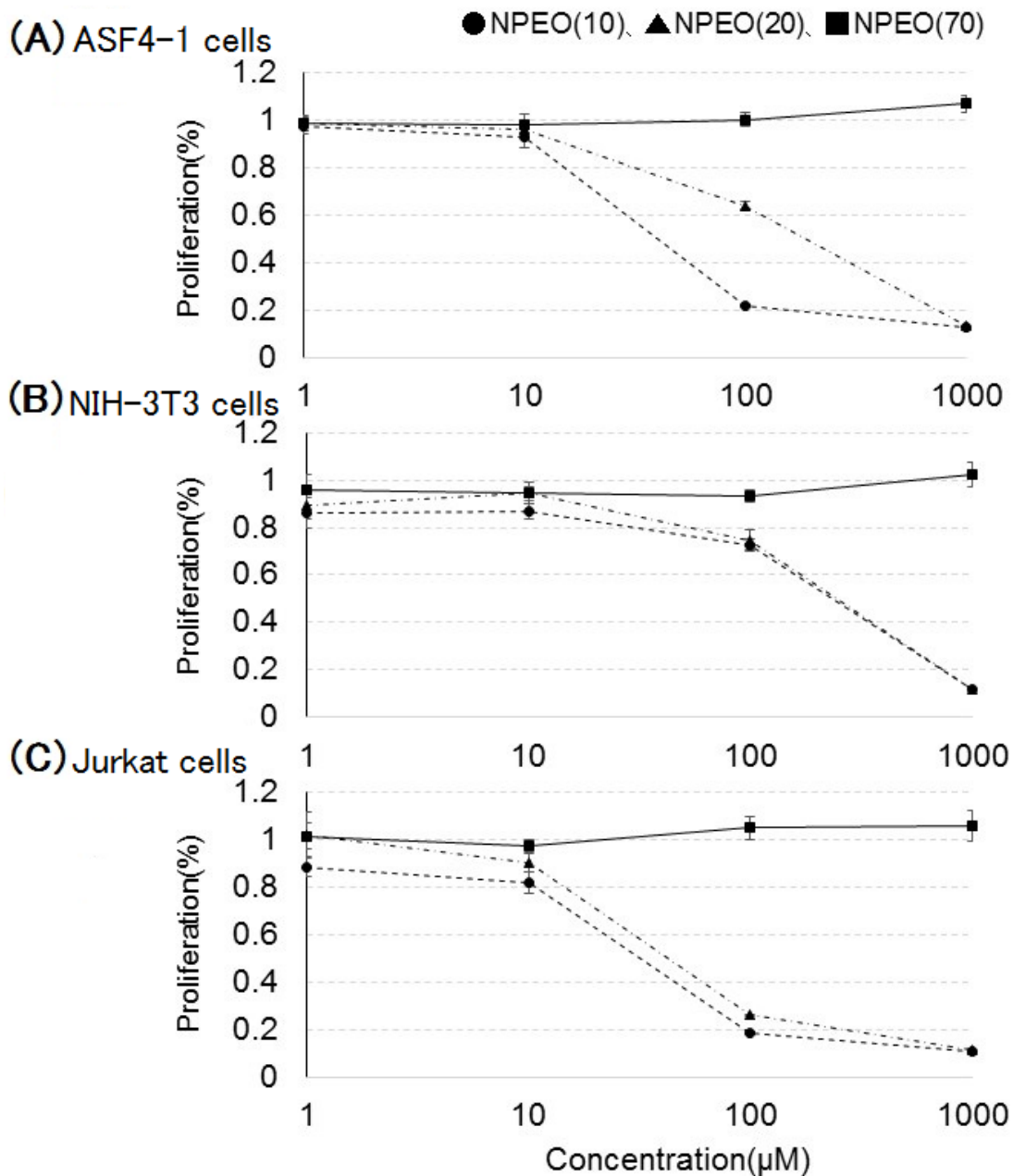


Fig. 5 Concentration-dependent cytotoxicity of NPEOs.

Cells (A) ASF4-1 cells, (B) NIH-3T3 cells = 1.0×10^3 cells/100μL/well, (C) Jurkat cells = 1.0×10^4 cells/100μL/well) were incubated in medium containing NPEO(10,20,70) and alamarBlue (10 μL/well) at 37°C for 24 h in CO₂ incubator. Fluorescence was measured by Microplate Reader. Values are means ± S.D. (n = 5).

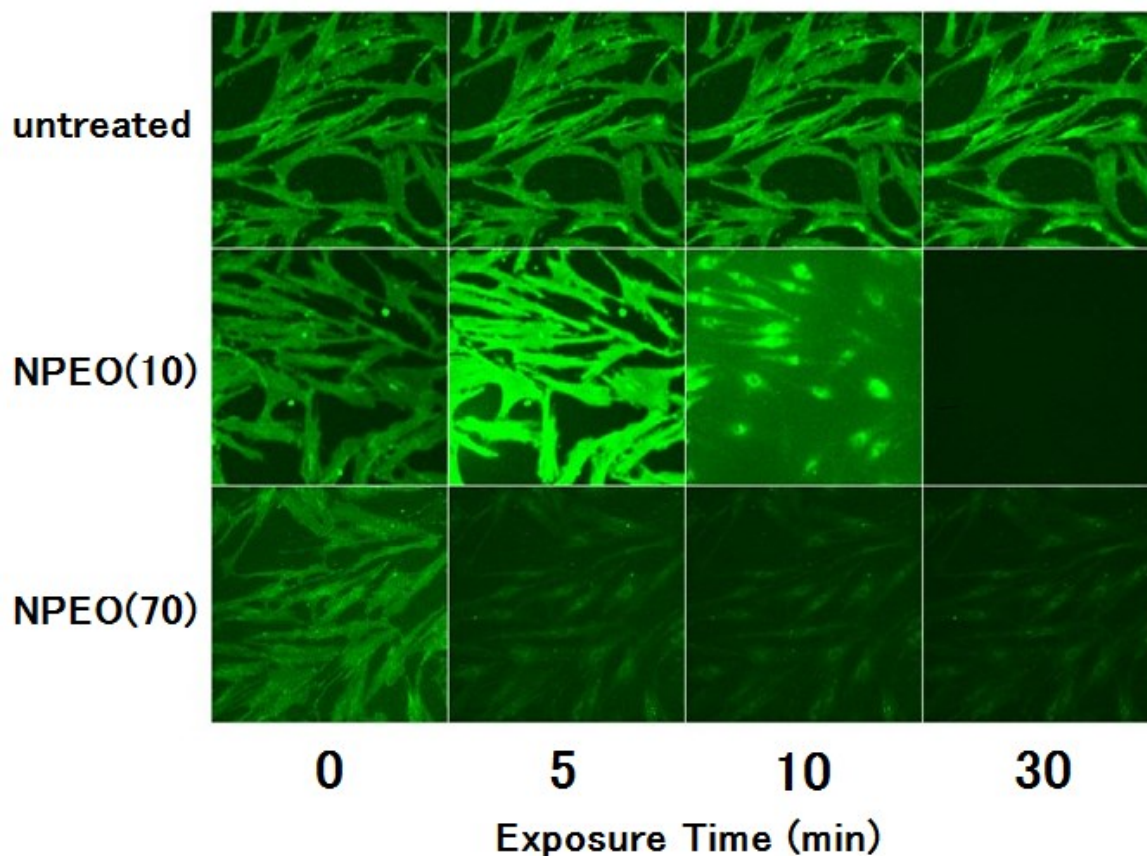


Fig. 6 Fluorescence images of ASF4-1 cells treated with NPEOs.

ASF4-1 cells labeled with NBD-PC were observed in the presence of NPEO(10,70) using a confocal microscopy as a function of time after addition of NBD-PC.

第三節 NPEO の紫外線照射による分解

3-1 実験材料および実験方法

3-1-1 実験材料

【試薬】

- アセトニトリル (HPLC グレード)
- n-ヘキサン (HPLC グレード)
- 2-プロパノール (HPLC グレード) 以上、関東化学(株)より購入した。
- 4-n-ノニルフェノール (Dr.Ehrenstoefer GmbH.Co.,Ltd)
- ノニルフェノールヘキサエトキシレート(NPEO(6))(林純薬工業(株))

その他は第二節と同様の試薬を使用した。

3-1-2 NPEO への紫外線照射

UVA および UVB 照射は紫外線照射装置 HP-30LM (ATTO 社製) を、UVC の照射には紫外線照射装置 HP-50C (ATTO 社製) を使用した。各紫外線照射装置の波長スペクトルを Fig. 7 に示す。UVA 照射(波長領域 320~380 nm, 最大強度波長 365 nm)、UVB 照射(波長領域 280~320 nm, 最大強度波長 312 nm)、UVC 照射(波長領域 180~280 nm, 最大強度波長 254 nm) の各線量率は UVA で 6.0~9.0 J/cm²/h、UVB で 5.0~8.0 J/cm²/h、UVC で 3.0~5.0 J/cm²/h である。照射は室温にてドラフト内で行い、コントロールはドラフト内にアルミホイルで遮蔽し放置することにより照射試料と同条件とした。すべての試料は、19mmφ ガラスシャーレに液量 1.0 ml を加え、Dura Seal(Laboratory Stretch Film) (Diversified BioTec.Co.,Ltd) で密閉し使用した。

3-1-3 UV 照射 NPEO の調製

NPEO(10) と NPEO(70) について、10 mM 濃度の水溶液を調製後、3-1-2 の条件で各波長の紫外線を各線量 (250-1000 J/cm²) 照射した。各試料は 1 mM の濃度でアセトニトリルに溶解し、HPLC 用試料とした。

3-1-4 HPLC 用移動相溶液の調製

移動相はアセトニトリル:H₂O 系の 30% アセトニトリル溶液(A 液)、80% アセトニトリル溶液(B 液) の移動相溶液を用いて測定を行った。H₂O はすべて超純水を使用し、溶液はソニケーター(SHARP UT-205)にて 30 分超音波処理し脱気したものを使用した。

3-1-5 HPLC 測定

HPLC の測定は、LC-10A series (島津製作所) を用いた。カラムはシリカカラム TSKgel Silica-150 (4.6 mmID×25 cm) (東ソー(株)より購入) を用い、カラム温度 25.0°C、流量 1.0 ml/min で行い、検出は UV 吸収 275 nm で行った。インジェクションはマニュアルインジェクターで行い、サンプルレーンは 5 μl を使用した。移動相溶液は、A 液 100% でスタートし、30 分間で B 液 100% へ直線グラジエントをかけ、合計 30 分間の測定を行った。UV 吸収スペクトルの測定は、スペクトルフォトメーター (U-3300、HITACHI) にて 200-400 nm 範囲で測定した。

3-2 実験結果

3-2-1 NPEO の HPLC パターン

Fig. 8 に各側鎖 (n=0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 70) の NPEO の HPLC パターンを示す。側鎖 10 から側鎖が長くなるほど徐々にピーク幅が広がり始めるとともに、ピーク頂点のリテンションタイムが遅くなっていくことが確認された。

3-2-2 紫外線照射後の NPEO の HPLC パターン

Fig. 9 に NPEO(10)および NPEO(70)の UVA、UVB、UVC 照射後の分解物の HPLC パターンを示した。NPEO(10)の UVA 照射では、いずれの線量においても未照射のものと HPLC パターンに違いが見られなかったのに対し、UVB 照射および UVC 照射では線量依存的にピークが減少していることが観察された。また、UVC 照射では UVB 照射と比較し、その減少が顕著であった。この結果から、UVB、UVC 照射では NPEO(10)の分解が進行しているものと推察された。NPEO(70)における UVA 照射では 500 J/cm² 線量から線量依存的に、検出時間 5 分あたりの NPEO(10)以下のピークが出現した。UVB 照射では UVA 照射と同様、250 J/cm² 線量から線量依存的に NPEO(10) 以下のピークが顕著に出現し、さらに、1000 J/cm² 線量では NPEO(10) 以下のピークが減少していることが確認できた。またさらに 750 J/cm² 線量からは NPEO(70)のピークが減少した。UVC 照射では UVB 照射で確認された現象が、さらに顕著に現れ、1000 J/cm² 線量では検出ピークがほぼ完全に消失した。この結果から、いずれの波長においても NPEO(70)の分解が進行し、UVA < UVB < UVC の順で波長依存的に側鎖の短い NPEO が短時間で生成しているものと推察された。

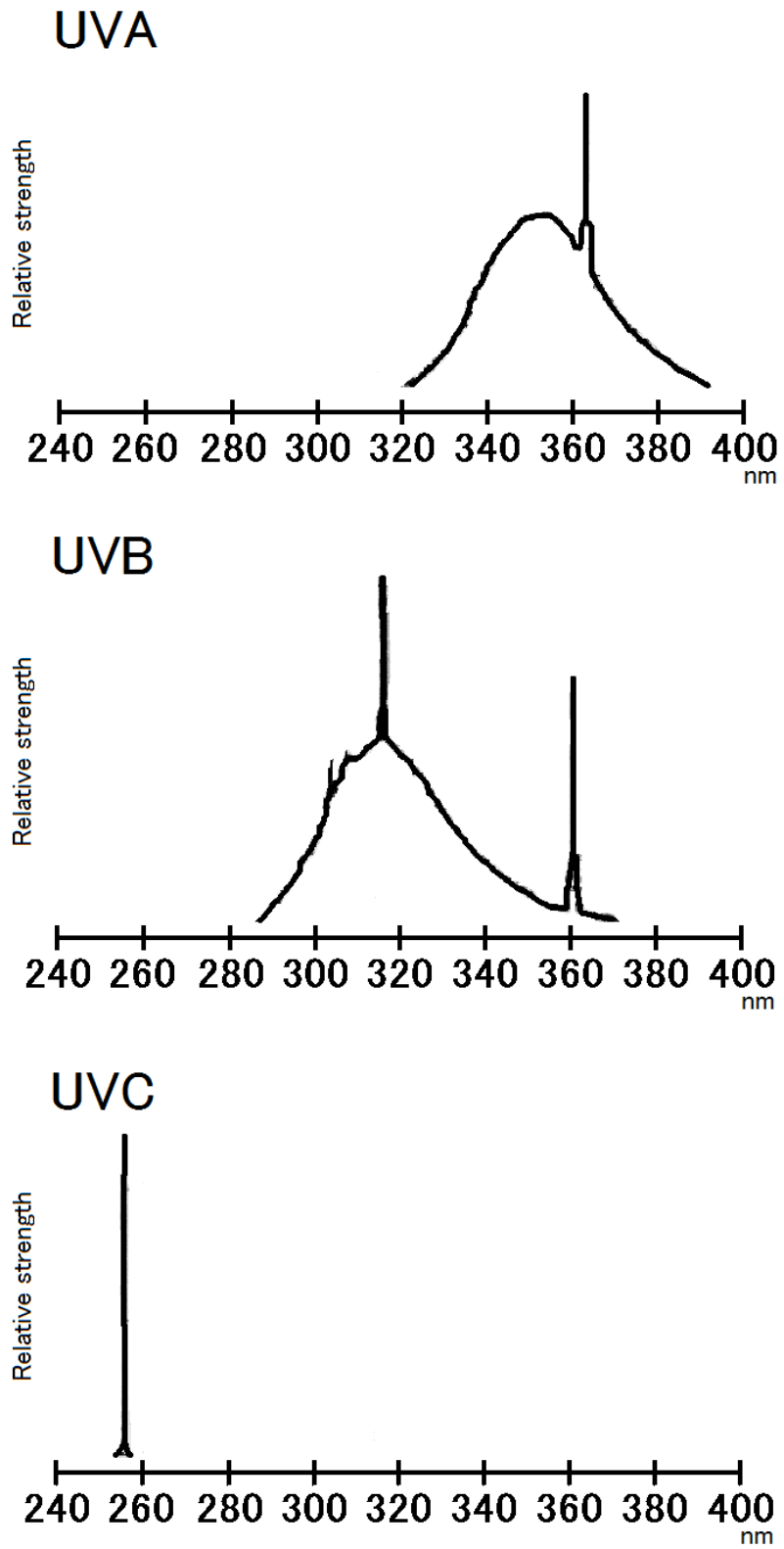


Fig. 7 UV spectra patterns of HP-30LM and HP-50C.

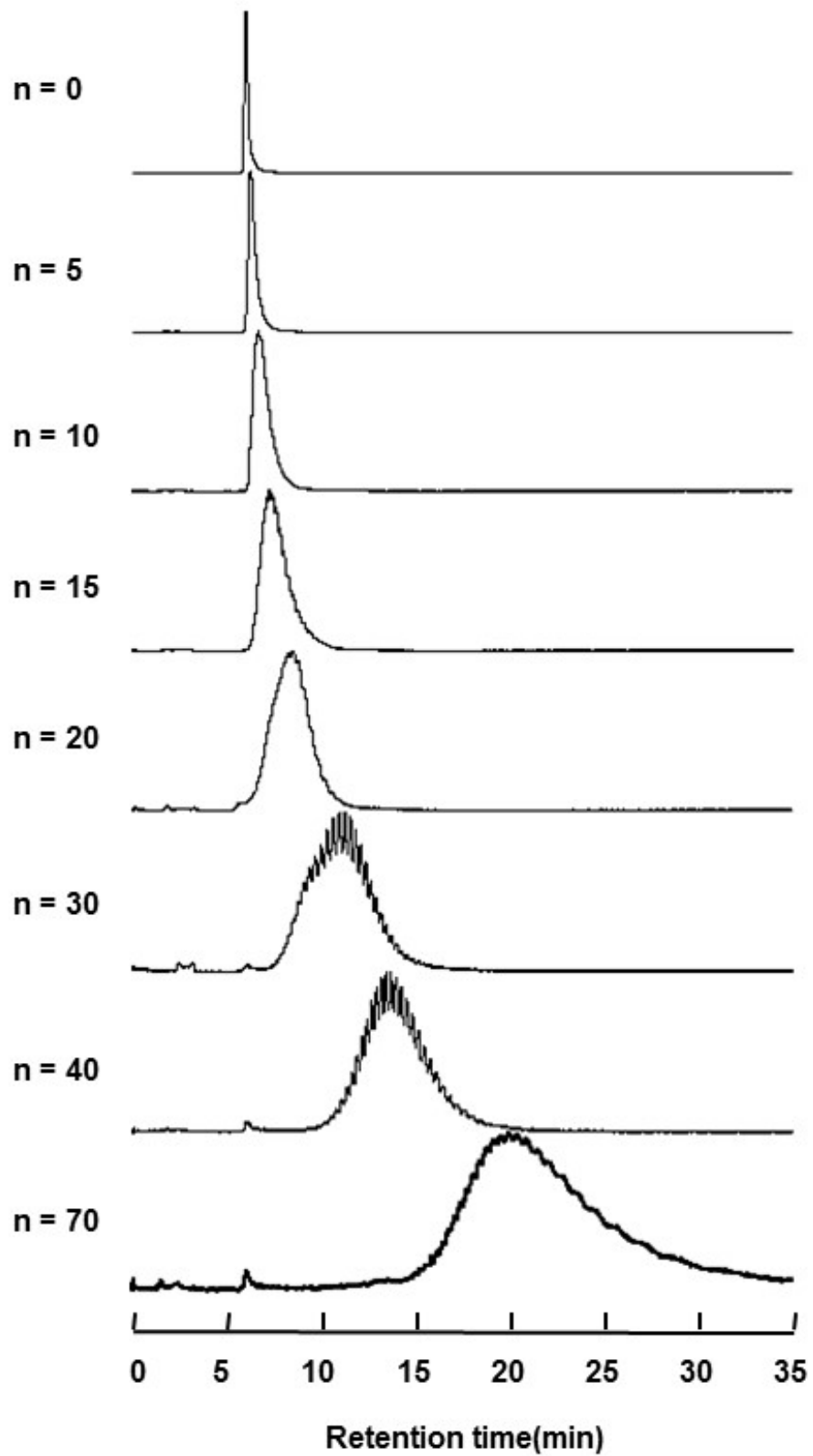


Fig. 8 HPLC patterns of NEPOs.

NPEO(0,5,10,15,20,30,40 and 70) were analyzed using HPLC.

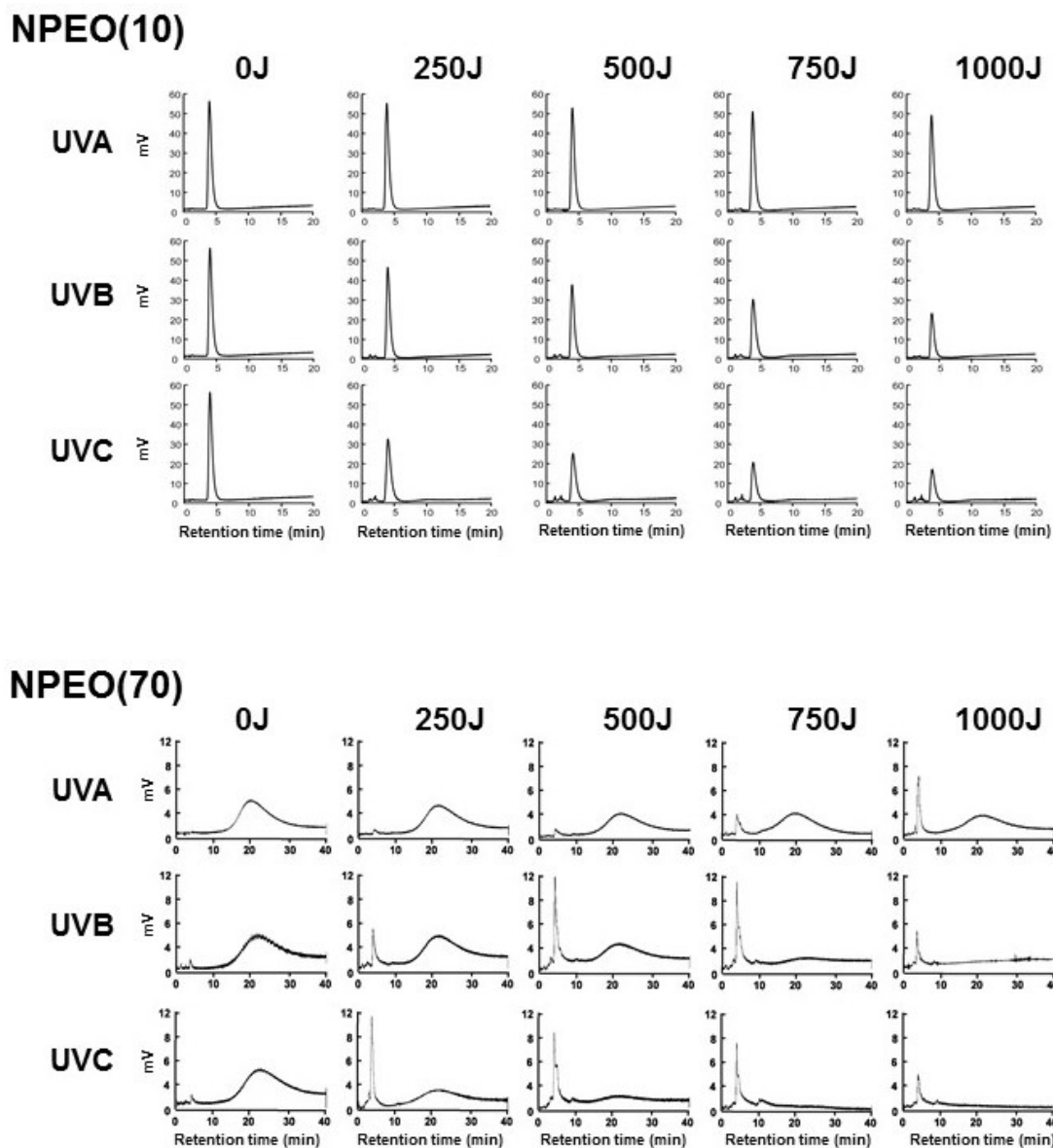


Fig. 9 HPLC patterns of UV-irradiated NPEOs.

UV ($0-1000 \text{ J cm}^{-2}$)-irradiated NPEO(10) and NPEO(70) were analyzed using HPLC.

3-2-3 紫外線照射後の NPEO の UV 吸収スペクトル

Fig. 10 に各紫外線 500 J/cm^2 と 1000 J/cm^2 照射後の NPEO(10)分解物と NPEO(70)分解物の UV 吸収スペクトルを示す。275 nm 付近の UV 吸収スペクトルはベンゼン環に由来しているため、このピークの減少はベンゼン環の分解を示している。UVA においては、NPEO(10)分解物、NPEO(70)分解物ともにスペクトルに変化は見られなかった。UVB においては、NPEO(10)、NPEO(70)ともにその分解が進行し、スペクトルの強度が線量依存的に減少していることが確認された。この減少は、NPEO(70)が NPEO(10)よりも顕著に表れた。UVC に関しても、各 NPEO の分解がさらに進行し、スペクトル強度が UVB 照射

時よりも顕著に減少した。側鎖 10 と側鎖 70 の差もより顕著に表れ、NPEO(70)の 1000 J/cm² 照射ではスペクトルのピークがほとんど消失した。この結果から、UVA 照射の分解ではベンゼン環の崩壊は起こらないが、UVB、UVC 照射の分解ではベンゼン環の崩壊まで進行しており、波長が短いほど進行が進んでいるものと推察された。

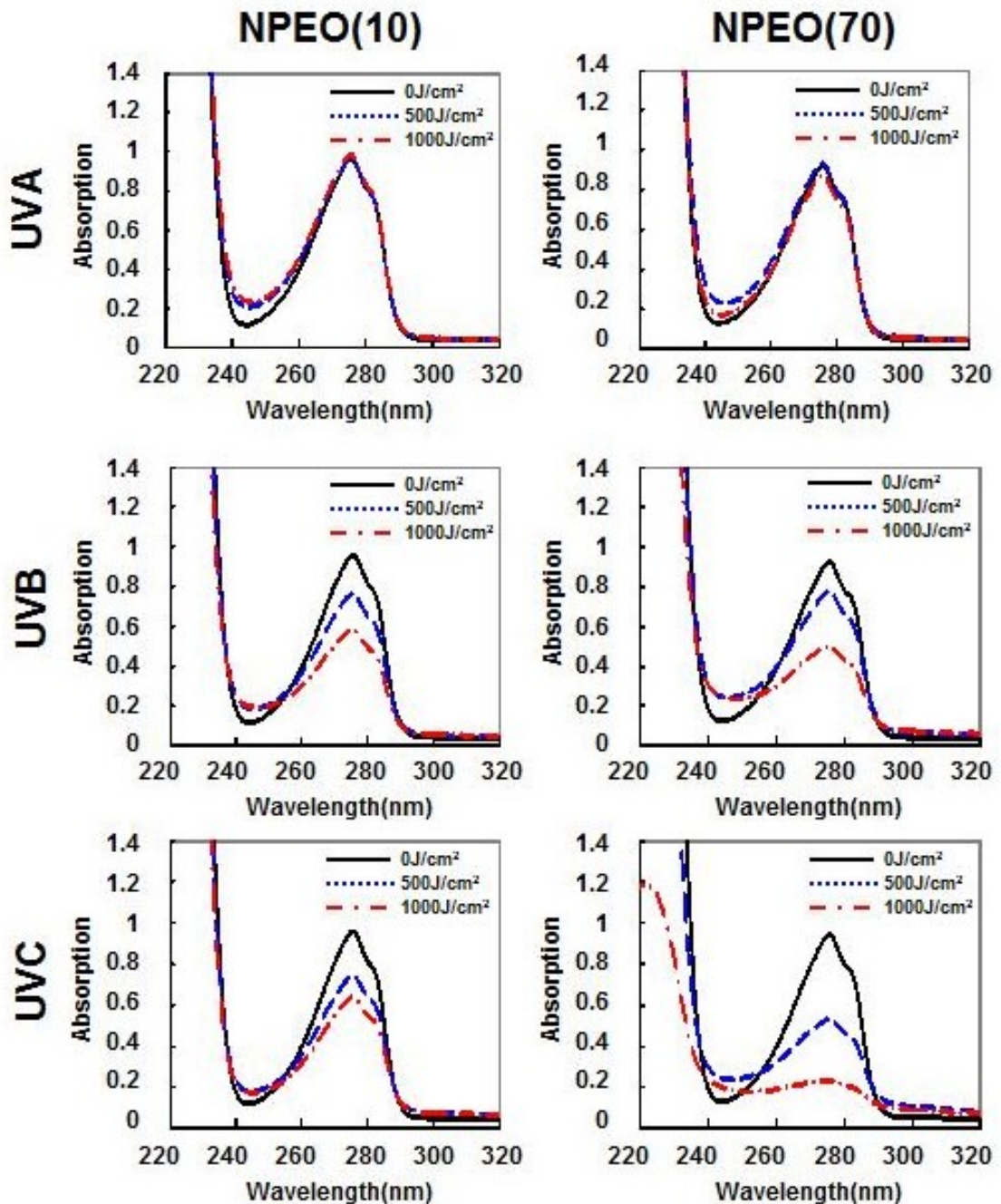


Fig. 10 UV spectra of NPEOs irradiated with UV irradiation.

NPEOs irradiated with UV (500,1000J/cm²) were measured by UV spectrophotometer. NPEOs concentration was 1.0 mM in acetonitrile.

第四節 NPEO 分解物の培養細胞への影響

4-1 実験材料および実験方法

4-1-1 実験材料

第二節 2-1-1 と同様のものを使用し、細胞は ASF4-1 を用いた。

4-1-2 実験方法

PBS(-)で 10 mM 濃度に調製した NPEO(10)および NPEO(70)溶液を、第三節 3-1-2 の条件で線量 100-1000 J/cm² の範囲で紫外線照射した。照射した各 NPEO 溶液を、最終濃度が指定の濃度となるように培養培地で希釈し、第二節 2-1-3 と同様に ASF4-1 細胞に作用させ、増殖率の測定を行った。

4-2 実験結果

Fig. 11A に UVA、UVB、UVC 照射後の NPEO(10)分解生成物の ASF4-1 細胞増殖率への影響を示す。未照射サンプルで細胞増殖率が大幅に抑制されていたが、UVB、UVC 照射サンプルではその抑制が減少した。UVB 照射において、それは線量依存的であった。UVA 照射サンプルでは、いずれの線量でも細胞増殖率の変化は見られなかった。このことから UVA < UVB < UVC の順に波長依存的に NPEO(10)が分解され、その割合により NPEO(10)の毒性が減少すると考えられた。

Fig. 11B に UVA、UVB、UVC 照射後の NPEO(70)分解生成物の ASF4-1 細胞増殖率への影響を示す。UVA 照射 500 J/cm² でわずかな減少、1000 J/cm² で顕著な増殖率の減少が確認された。UVB 照射では 500 J/cm² で顕著な約 60 %の減少が確認されたが、1000 J/cm² では約 20 %の増殖率減少にとどまった。UVC 照射ではわずかな増殖率の減少は見られたものの、線量による差異は確認されなかった。

これらの結果から、UVA 照射では NPEO(10)の分解が起こらないため毒性変化が見られないが、NPEO(70)は側鎖が短くなり毒性が増加したと推察された。UVB、UVC 照射では、NPEO(70)の UVA 照射と同様に側鎖が短くなって毒性が増加するが、さらにベンゼン環の分解も起こるためその毒性が減少し、毒性を示さなくなったと推察された。この現象が UVB よりも UVC で顕著に確認されていることから、UV 波長のエネルギーに依存した影響であると考えられる。

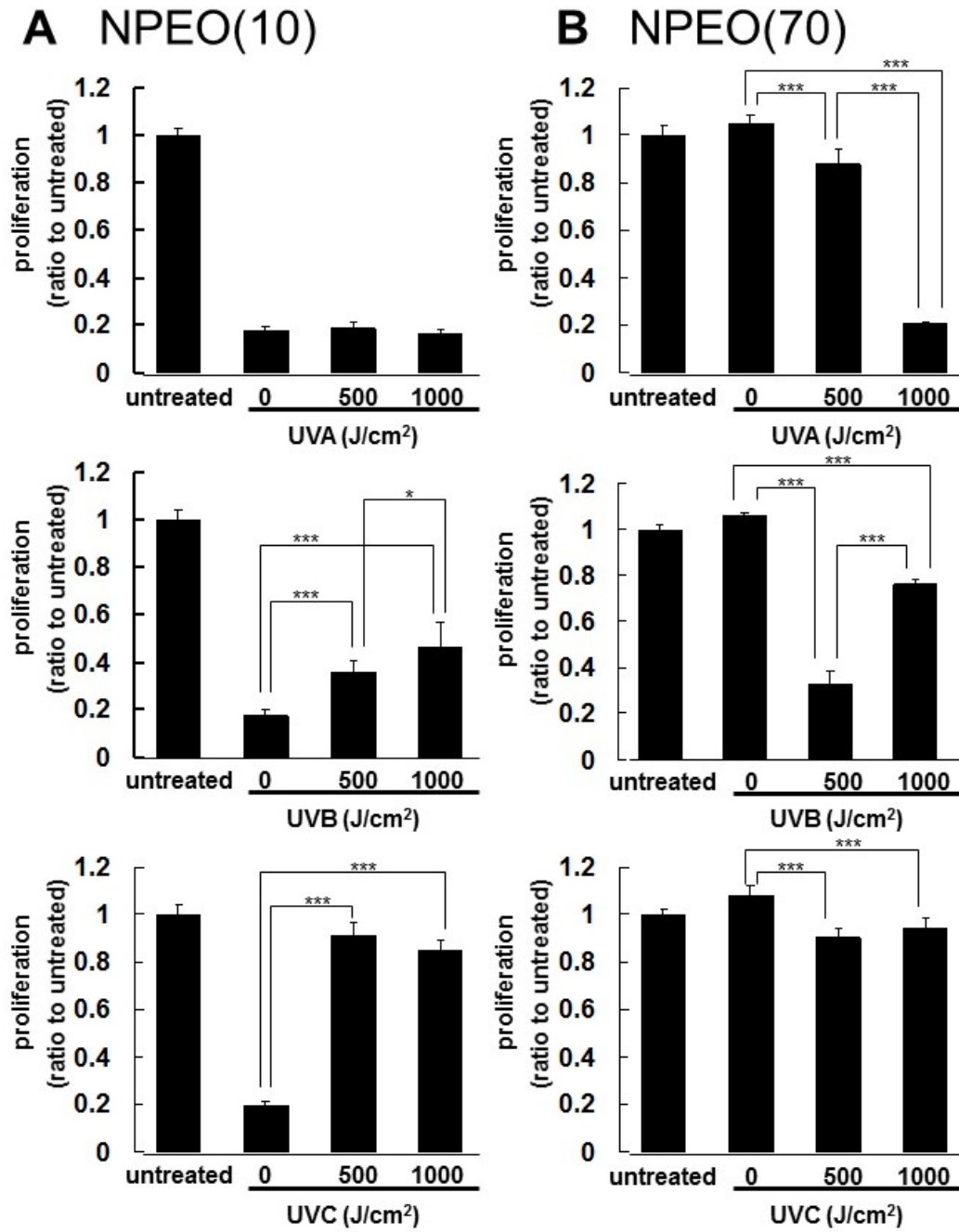


Fig. 11 Effect of NPEOs degraded by UV irradiation on cell proliferation.

ASF4-1 cells were incubated with NPEO(10) and (70) (conc.100 μ M) irradiated with UV (500 and 1000 J/cm²). The fluorescence intensity of alamarBlue was measured as in A: NPEO(10); B: NPEO(70). Values are means \pm S.D. ($n = 5$). Significant differences from untreated cells are represented by * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

第五節 考察

本章において培養細胞の増殖率に対する NPEO の影響を検討した。ASF4-1 細胞、NIH-3T3 細胞、Jurkat 細胞いずれも、側鎖 0 から側鎖 15 までの NPEO の添加で細胞増殖率が著しく低下し、その後側鎖 15 から側鎖 70 へ側鎖が長くなるにつれ、細胞増殖率が増加した (Fig. 4)。これは、NPEO の側鎖が短くなるにつれ細胞毒性が強くなり、特に側鎖 15 で強い毒性であることを示している。この結果は NPEO を *Mysidopsis bahia* (アミ科の甲殻類) へ作用させた際に、側鎖の違いにより影響が異なったという結果 [22] とほぼ同じ傾向を示した。また、NPEO 感受性が Jurkat 細胞 > ASF-4-1 細胞 > NIH-3T3 細胞の順で高くなった結果 (Fig. 5) は、感受性が細胞ごとに違うことを示していた。

ASF4-1 細胞を用いた共焦点顕微鏡の画像 (Fig. 6) では、NPEO(10、70)において経時的に蛍光が減衰した。また、NPEO(10)においては細胞膜の崩壊も観察された。この結果から、NPEO の培養細胞への影響は、NPEO の細胞膜への関与が示唆された。細胞膜表面が脂溶性であり、NPEO は側鎖の長さで親水性と親油性が変化する性質のため、親油基の極性が強くなる側鎖の短いものほど、細胞への影響を強く示すことが考えられた。

NPEO の経皮吸収を検討した報告では、0.1 % NPEO(9)で約 0.1 %の経皮への吸収が認められ、およそ 15 分間で急激に吸収されている [37]。この結果を考慮すると、NPEO を含む家庭用洗剤を扱う際、十数分の段階で皮膚に吸収され、細胞への直接的な影響を及ぼす可能性が考えられた。また、側鎖の違いによる細胞内への NPEO 吸収について、NPEO 側鎖依存性の結果と共焦点顕微鏡による画像から、側鎖の短い親油性の高い NPEO の方がより細胞内に吸収されると考えられた。

本章では、紫外線照射による NPEO の分解およびそれら分解物の培養細胞への影響についても検討した。NPEO(10)について UVA 照射ではいずれの線量においても変化が見られなかったが、UVB、UVC 照射では線量依存的に NPEO の分解が確認できた (Fig. 9)。吸光度計による測定では、275 nm ベンゼン環による UV 吸収強度が減少していた (Fig. 10) ことから、ベンゼン環の分解が起こっているものと推察された。

NPEO(70)においては、UVA 照射で線量依存的に側鎖 70 のピークが減少し、側鎖の短い NPEO のピークが出現した。UVB、UVC 照射ではこの現象がより顕著に出現し、さらに照射線量を増やした際には、出現した短い側鎖の NPEO のピークが減少した。これは NPEO(70)が紫外線照射により側鎖の短い(側鎖 10 以下)NPEO に分解され、UVB、UVC 照射ではさらにベンゼン環まで分解されたと推察された。また、UVA 照射によっておこる分解は、NPEO の側鎖の切断であり、ベンゼン環の分解までは起こらないと推察された。また、NPEO(70)の HPLC パターンから、側鎖 70 から側鎖 10 までの間の側鎖を持つ NPEO が検出されなかったことから、側鎖の切断はベンゼン環の近い位置で行われている可能性が示唆された。これら結果は、酸化チタン触媒を用い、フィルムで密閉した系で NPEO に紫外線を照射した結果と一致する [38、39]。しかしながら、この報告の中では最終的に二酸化炭素と水に分解している可能性が高いとしているが、本実験において最終分解物の同定までは確認できなかった。

NPEO の紫外線による分解については、NPEO(10)への UV 照射で、側鎖の切断やベンゼン環崩壊が起こることが判明した。中間生成物としては、側鎖のカルボキシル化とベンゼン環のヒドロキシル化が起こっているとされ[20]、NPEO(9)への UV 照射により、phenol ethoxycarboxylate や methylphenol ethoxycarboxylate、ethoxyphenyl heptanoic acid の中間生成物が発生するという報告もある[21]。alcohol ethoxylate や octylphenol ethoxylate のような芳香環のポリエチレン鎖を用いた実験では、ヒドロキシラジカルが分解に関与していることが報告されている[40、41]。本研究では、抗酸化剤 *N*-acetylcysteine (NAC)を添加して NPEO に UVB を照射すると NPEO の分解が抑制されたことから(データ示さず)、UVB 照射により発生した活性酸素種(ROS)により NPEO の側鎖やベンゼン環が破壊されていると推察された。NPEO およびノニルフェノールの自然太陽光による分解は、低反応性で一重項酸素によらない直接的な分解のため、その進行には時間がかかるとされている[42]が、Fig. 9、Fig. 10 の結果は、照射線量率が自然界の値(自然界での平均 UVA 照射線量率 6.0 J/cm²/h、平均 UVB 照射線量率 2.0 J/cm²/h)と比較し、UVA ではほぼ同線量率、UVB においても約 1/4 とほとんど大差はないため、環境中において日常的に起こりうる現象であると考えられる。

紫外線照射 NPEO は、培養細胞の増殖率、生存率に対して、紫外線の種類に応じた影響を示した。Fig. 11 より、NPEO(70)において UVA、UVB 照射分解物の作用で増殖率の減少が見られ、UVB 照射ではさらなる線量の増加で増殖率の回復が確認された。NPEO(10)において UVB、UVC 照射後分解物の作用で増殖率の増加が確認された。この結果は、前記 Fig. 4 の NPEO 側鎖依存による増殖率の変化と Fig. 9 の HPLC による NPEO の紫外線影響の結果から、UVA 照射で NPEO(70)の側鎖の切断が起こり、それに伴い増加した側鎖の短い NPEO によって細胞への毒性が増加したものと推察された。この減少は線量依存的に起こっているため、500 J/cm² では短い側鎖の NPEO が生成されているが十分な影響を与える濃度にまでいたらず、1000 J/cm² まで線量が増えることで影響を与える濃度に達し、毒性が増加したものと考えられた。NPEO(10)への UVA 照射で細胞増殖率の変化が見られない結果については、照射による NPEO(10)の分解がほとんど起こらなかった結果と一致する。UVC 照射においては、Fig. 9 の HPLC の結果および Fig. 10 の吸光度計の結果と併せて考察すると、ベンゼン環の分解が早い段階から進行し、生成した分解物が細胞へ影響を及ぼす濃度以下になっていたと考えられた。

以上、NPEO は紫外線によりその側鎖が切断され細胞毒性が徐々に上がり、その後ベンゼン環が分解することによって毒性の低い別の物質になっていくことが明らかとなった。環境中においては、地表に届く紫外線の約 92 %を占める UVA 照射によって側鎖の長い NPEO で側差の切断が起こり、短い側鎖の NPEO が生成されることで細胞への毒性が増加している可能性が考えられた。一方、UVB 照射について数%ではあるが地表に届いており、さらにベンゼン環の分解が進むことが予想される。また、高エネルギーの紫外線(UVB、UVC)照射による NPEO を含む廃水の無毒化などの環境浄化システムの有用性が示唆された。

第二章 NPEO およびその紫外線分解物によるヒストン H2AX のリン酸化

第一節 序論

化学物質の影響評価において、遺伝毒性試験は第一検討項目であり、特に重要視されている。日本においては、医薬品(薬事法)、食品添加物(食品衛生法)、農薬(農薬取締法)、新規化学物質(化学物質の審査および製造等の規制に関する法律)および労働環境検査(労働安全衛生法)と、多岐にわたって厳しく法規制されている。

遺伝毒性を予測する短期試験法としては、遺伝子の突然変異誘発性の指標であるAmes試験、DNA損傷の指標である小核試験、染色体異常試験などが利用されている。Ames試験は、バクテリアを用いた試験法であり、擬陽性が見られるなどの問題がある。そこで一般的には他の試験法(小核試験など)を併用している。小核試験は実験手法が煩雑で、顕微鏡下での判定を行うためばらつきも大きい。さらに、これら遺伝毒性試験で陰性の化学物質が発がん性を有する、逆に陽性の化学物質が発がん性を示さない場合も見受けられ、問題視されている。

ヒストンH2AXのリン酸化(Phosphorylation of histone H2AX: γ -H2AX)は、電離放射線による直接的なDNA二重鎖切断(Double strand breaks: DSBs)に反応して、早い段階に引き起こされる現象である[43]。損傷箇所周辺のヒストンバリエーションH2AXの139番目のセリン残基が迅速にリン酸化の化学修飾を受け、その後DSBs修復関連蛋白質群を切断部位に集積させ、複合体を形成して切断を修復する。また近年では、活性酸素種(Reactive oxygen species: ROS)の生成によるDNA損傷や、DNAのアルキル化、DNA一本鎖切断が生じた際に、それらの修復や、複製フォークの衝突などによりDSBsが生成し、 γ -H2AX が誘導されることが報告されている[44、45]。 γ -H2AX を免疫組織化学により可視化した場合、細胞核内で点状構造物(フォーカス)として観察することができる。このフォーカス数とDNA損傷量が比例関係にあるため、 γ -H2AX による遺伝毒性の評価は、環境汚染物質の細胞毒性の可能性を検証する効果的な方法と期待されている。また、 γ -H2AX による評価法は、低濃度で高感度の検出が可能であるという利点がある[46、47]。

前章では、NPEO による細胞毒性が、紫外線照射により変化することを示した。ノニルフェノールおよびNPEOの遺伝的毒性についての報告は、水系生物へのLC₅₀などの影響報告に比べ極めて少ないが、ヒトのリンパ球でのDNA損傷[48]、*Chironomus tentans*のDNA鎖切断[49]などが報告されている。また、ノニルフェノールはヒトの*c-Ha-ras*型癌遺伝子を導入したメスマウスの悪性腫瘍および乳房腫瘍の増加や、多様器官発ガンモデルマウスの肺癌増加を引き起こすという報告もある[50、51]。しかしながら、ネズミチフス菌および大腸菌を用いた復帰突然変異試験ならびにチャイニーズハムスター肺繊維芽細胞(CHL)を用いた染色体異常試験で代謝活性化の有無に関わらず陰性であるため[52]、遺伝子傷害性の発がん性物質ではないとされ[53]、また NPEO についても同様に遺伝毒性を有する可能性は低いとされている[54]。これら試験での使用濃度はノニルフェノールで0.78-200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、NPEOで40-10000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ である。実際に名古屋市内の水環境中で検出されたNPEOの平均濃度は2.38 $\mu\text{g}/\text{L}$ であった[55]。しかし、前章で示したように、NPEOによる細胞毒性が、紫外線

照射により変化することから、NPEO およびその紫外線分解物の遺伝的毒性を調査することは重要であると考え。そこで本章では NPEO およびその紫外線照射分解物について、 γ -H2AX を指標に遺伝毒性に関する検討を行った。

第二節 NPEO による γ -H2AX の誘導

2-1 実験材料および実験方法

2-1-1 実験材料

【試薬】

第一章第二節と同様の試薬を使用した。

その他の試薬は市販の特級品を使用した。

【細胞】

MCF-7 細胞 (JCRB 細胞バンクより購入した。)

【培養用培地】

MCF-7 細胞用 DMEM

9.5 g/L Dulbecco's modified eagle medium^②(DMEM) (Nissui Pharmaceutical Co.,Ltd.)を超純水 1 L に溶解し、121°C で 20 分高圧蒸気滅菌したものに、培地に対し 10 %となるよう fetal bovine serum(FBS) (JRH Biosciences Co.,Ltd.)を加え使用した。

2-1-2 細胞の培養

2-1-1 の通り調製した培地を用い、37°C、5 %CO₂ インキュベーター内で継代培養した。継代は対数増殖期後期の細胞を用い、3 日毎に行った。倍加時間は約 20 時間であった。実験に用いた細胞は、対数増殖期後期であるコンフルエント前の状態のものを使用した。

2-1-3 Trypan blue 染色による細胞生存率の測定

35 mm ディッシュに 2.0×10^5 cells/mL の細胞懸濁液を 1 mL ずつ蒔き、PBS で最終濃度 $\times 2$ に調製したノニルフェノールならびに NPEO を 1 mL 各培養培地に加え、24 時間培養した。培養後、培養用培地で個々の細胞を分離し遠心チューブに採取、細胞懸濁液と 0.3 %の Trypan blue 溶液を、400 個程度の細胞数が確認できる濃度で血球計算板に滴下し、顕微鏡下にて細胞を観察した。死滅細胞は特徴的な青色で観察されるため、死滅細胞および生存細胞をカウントし、細胞生存率を算出した。これら実験で得られた数値は、3 回から 5 回繰り返し行った計数領域ごとの平均値および標準偏差を算出して求めた。

2-1-4 γ -H2AX の測定

2-1-4-1 免疫蛍光染色法による γ -H2AX の検出

4.5 mL の 8well チャンバー フラスコに 2.0×10^5 cells/mL の細胞懸濁液を 1 mL 蒔き、PBS で最終濃度 $\times 2$ に調製したノニルフェノールならびに NPEO 1 mL をそれぞれ加え、1 時間インキュ

ベーター内で作用させた。作用後、PBSで洗浄し、速やかに2 %パラホルムアルデヒドを加え、室温で30分間固定した。その後、PBSで洗浄し、100 %メタノールを加え、-20℃の冷凍室で20分間固定した。固定された細胞は、100 mM Tris-HCl、50 mM EDTAを含むバッファーに、0.5 % Triton X-100を加え、室温で20分間浸潤させた。浸潤後、1 % ウシ血清アルブミンを加え、37℃で30分間放置した後、抗体反応させた。反応はphospho-H2AXに対する一次抗体 (mouse monoclonal) (Millipore Bedford, MA, 1:200)を2時間作用させ、その後fluorescein isothiocyanate (FITC)を結合させた二次抗体 (Jackson Immuno Research Laboratories, PA) を作用させた。細胞核を識別するため、細胞核をpropidium iodide (PI) (20 µg/mL)により染色した。染色した細胞は、蛍光顕微鏡(BX51, Olympus Co. Japan)にて観察した。

2-1-4-2 ウェスタンブロッティングによる γ -H2AX の解析

35 mmディッシュに 2.0×10^5 cells/mLの細胞懸濁液を1 mL蒔き、PBSで最終濃度 $\times 2$ に調製したノニルフェノールならびにNPEO 1 mLを加え、24時間培養した。培養後、細胞を溶解バッファー (50 mM Tris (pH 8.0)、5 mM EDTA、150 mM NaCl、0.5 % Nonidet P-40、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF))にて溶解させ、12.5 % SDS-PAGEにて分画させ、polyvinylidene fluoride (PVDF)膜上に染み込ませた。その後1 % スキムミルクで固定化し、膜にphospho-H2AX (rabbit polyclonal)に対する一次抗体(1:1000)またはactin (Santa Cruz Biotechnol. Inc., CA, 1:1000) を加え、4℃で一夜作用させた。作用後、HRPを結合させた二次抗体FITC (Jackson Immuno Research Laboratories, PA)を1時間作用させ、解析した。 γ -H2AX のバンドは、化学発光検出キット(GE Healthcare Ltd., UK)を用い観察した。

2-1-5 DNA 二本鎖切断 (DSBs) の測定

35 mmディッシュに 2.0×10^5 cells/mLの細胞懸濁液を1 mL蒔き、PBSで最終濃度 $\times 2$ に調製したノニルフェノールならびにNPEO 1 mLを加え、24時間培養した。細胞をトリプシン処理して回収し、1 %低融点アガロース (InCert Agrose: Biowhittaker Molecular Applications Ltd., USA)にて凝固させた。調整したアガローススタックに、0.5 mg/mLのプロテインキナーゼKと1 mg/mLのRNA分解酵素を作用させ、0.8 %アガロースゲルにてバイアス正弦曲線フィールドゲル電気泳動 (Biased sinusoidal field gel electrophoresis: BSFGE) (ATTO, Japan)した。得られたゲルは、エチジウムブロマイドにより可視化させた。

2-2 実験結果

2-2-1 NPEO 作用後の MCF-7 細胞生存率

Fig. 12にNPEO作用24時間後のMCF-7細胞生存率変化を示す。いずれの濃度においても側鎖0から側鎖15を下限に側鎖依存的に生存率が低下し、側鎖15から側鎖70を上限に側鎖依存的に生存率が回復した。また、各側鎖のNPEOについて濃度依存的に細胞生存率が低下した。この結果は、前章の alamarBlue assay による各細胞の細胞増殖率の結果と一致した。

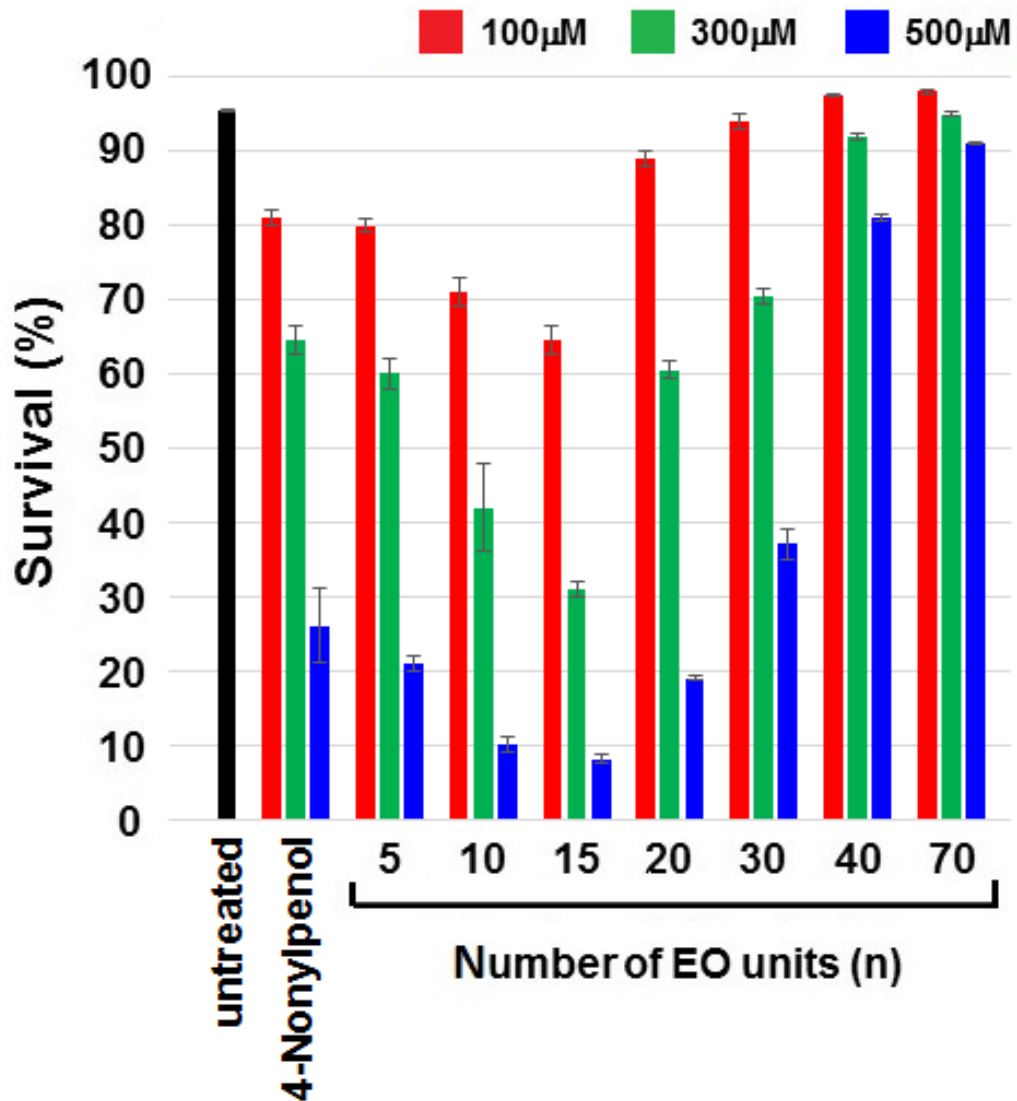


Fig. 12 Cytotoxicity of NPEOs.

MCF-7 cells survival after treatment with 4-Nonylphenol or NPEO(5–70) at concentrations ranging from 100 to 500 μM for 24 h. Cell survival was determined by Trypan blue exclusion assay. Values are means \pm S.D. ($n = 5$).

2-2-2 NPEO 作用後の $\gamma\text{-H2AX}$ の生成

Fig. 13に、NPEO(15)を100 μM 作用、1時間後の $\gamma\text{-H2AX}$ 免疫蛍光染色画像を示す。NPEO(15)で処理された細胞は、核内に $\gamma\text{-H2AX}$ のドット上の蛍光が鮮明に観察された。各NEPO(0,15,40,70)を処理し、 $\gamma\text{-H2AX}$ の蛍光ドットが10個以上観察された細胞をポジティブとしてカウントした結果をFig. 14に示す。NPEO(0)およびNPEO(15)処理の細胞で、高い $\gamma\text{-H2AX}$ の形成が見られた。一方、側鎖が長いNPEO(40,70)においては側鎖依存的に $\gamma\text{-H2AX}$ が減少し、特にNPEO(70)処理の細胞では検出されなかった。

NPEOによる $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導をウエスタンブロッティング法で検出した結果をFig. 15に示す。NPEO処理により側鎖15まで依存的に $\gamma\text{-H2AX}$ が増加し、その後側鎖依存的に $\gamma\text{-H2AX}$ が

減少した。この結果は、免疫蛍光染色による γ -H2AX の検出結果と一致する。また、100 μ MのNPEO(30)およびNPEO(40)において γ -H2AX が誘導されているにもかかわらず、Fig. 12において細胞生存率は低下していなかった。

最も細胞毒性が強く、 γ -H2AX の誘導が顕著に検出されたNPEO(15)について、詳細な実験を行った。Fig. 16に、100 μ MのNPEO(15)の処理時間依存的な γ -H2AX の誘導を免疫蛍光染色画像およびウエスタンブロッディング法で検討した。その結果、処理後15分の短い時間で γ -H2AX が見られた。またNPEO(15)の濃度依存性を検討した結果では、生存率変化の見られない10 μ Mから濃度依存的に γ -H2AX が増加した (Fig. 17)。

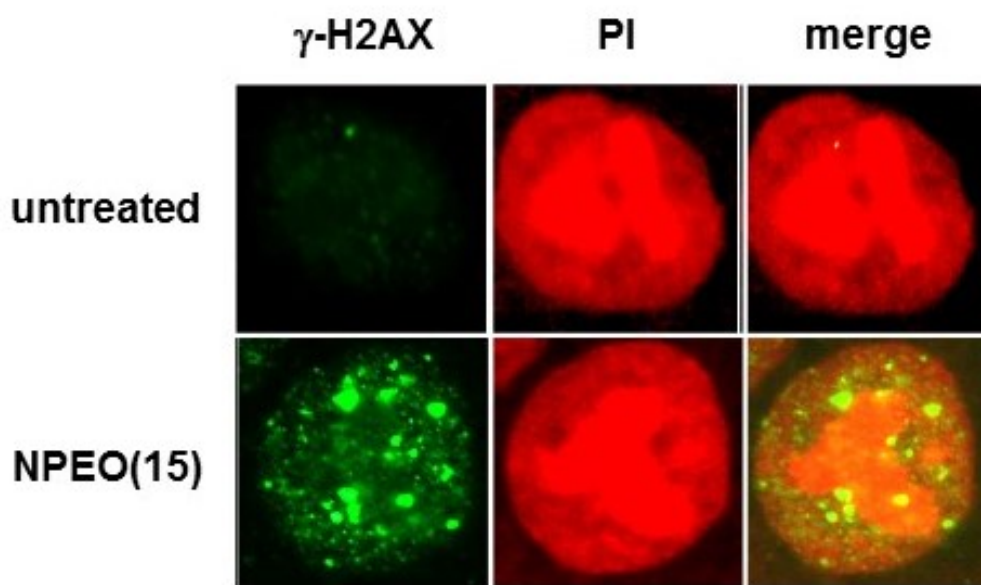


Fig. 13 Generation of γ -H2AX after treatment with NPEO(15).

Images of γ -H2AX foci 1 h after treatment with NPEO(15) (100 μ M) (MCF-7 cells). Nuclei were stained with PI.

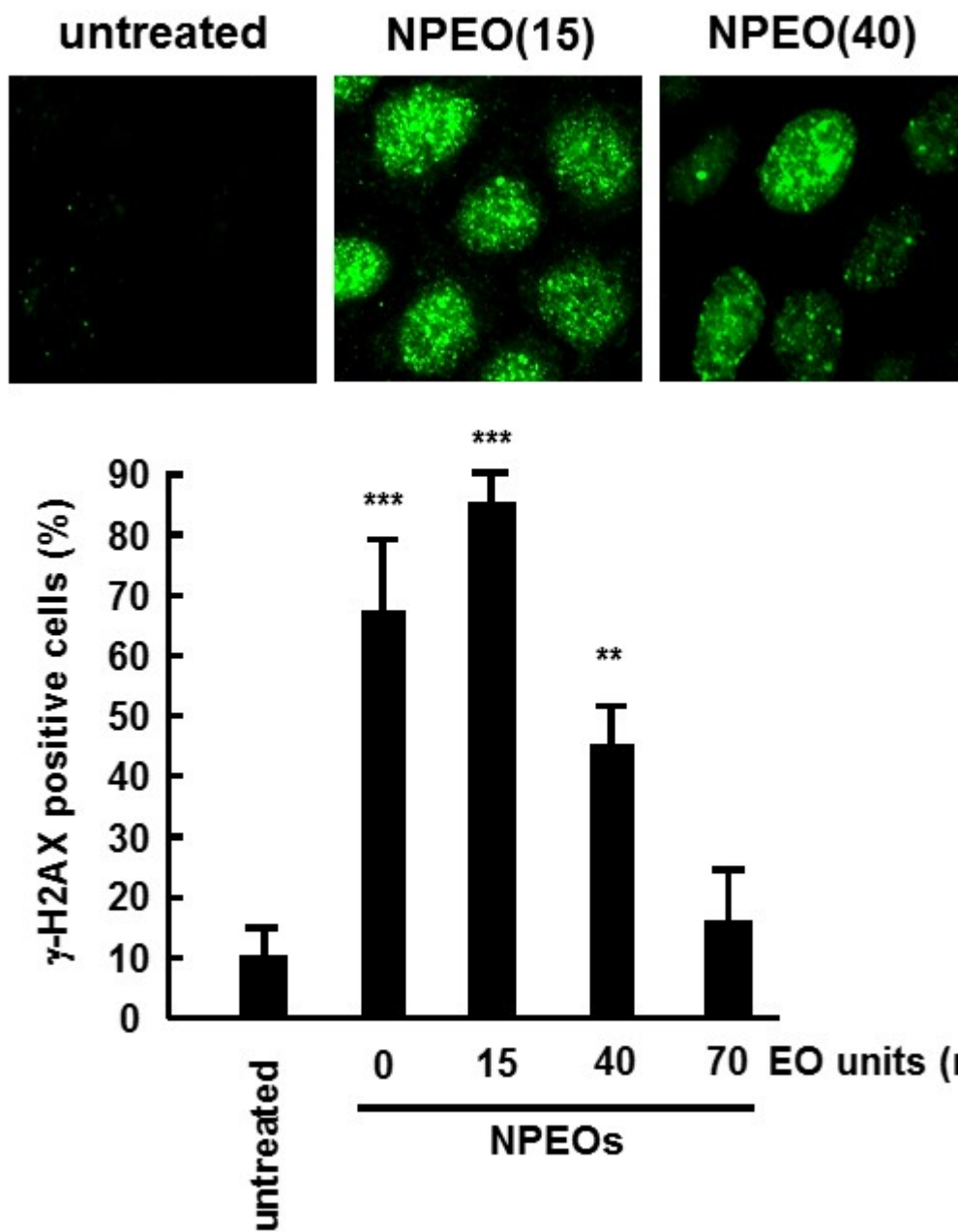


Fig. 14 Generation of γ -H2AX after treatment with NPEO(0,15,40,70) (100 μ M) (MCF-7 cells).

Values are the mean \pm S.D. (n = 5). Significant differences from untreated cells are represented by **p < 0.01 and ***p < 0.001.

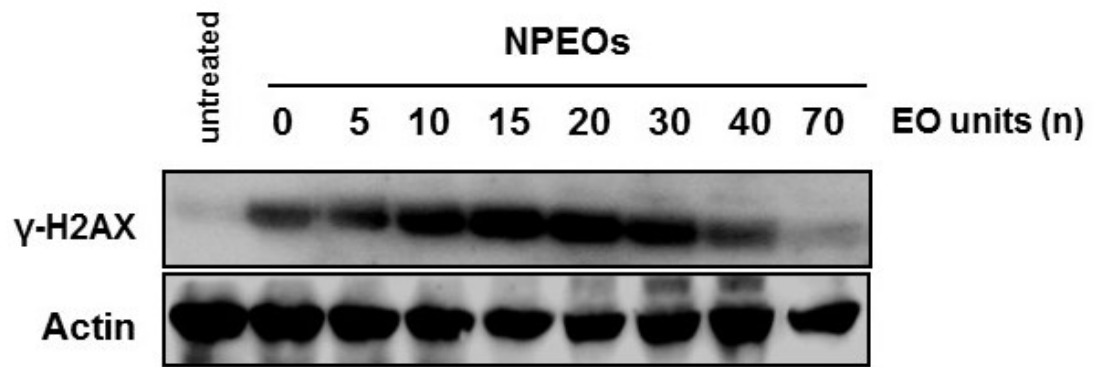


Fig. 15 Western blotting for detection of γ -H2AX after treatment with NPEO(0–70) (100 μ M) (MCF-7 cells). Actin was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE.

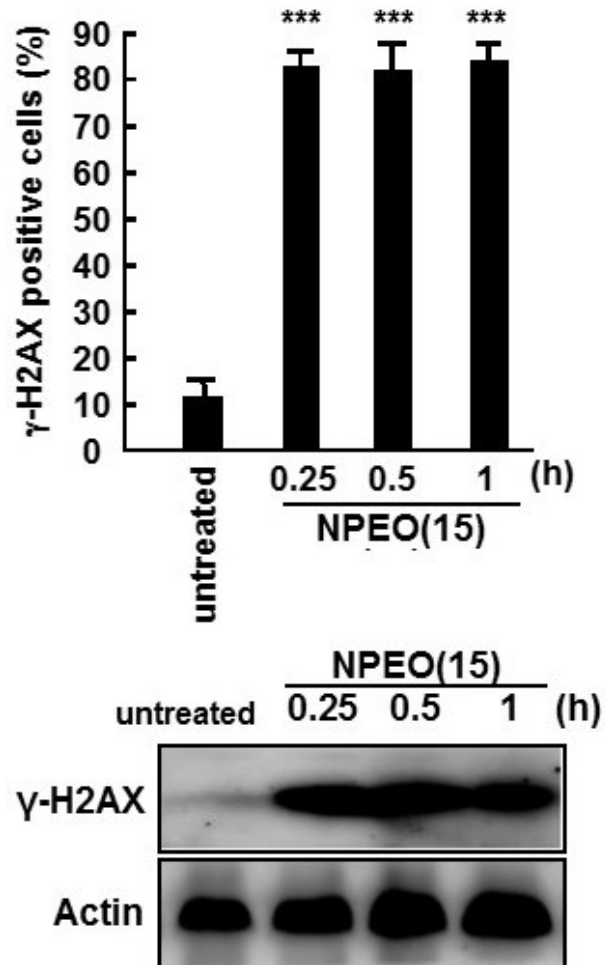
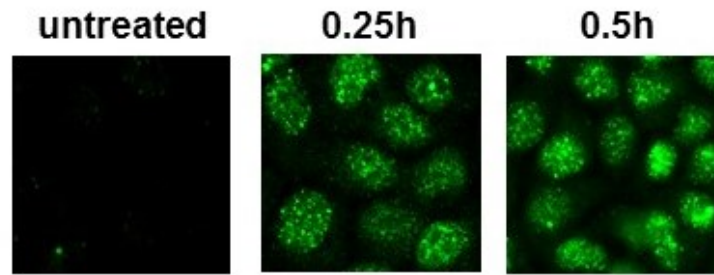


Fig. 16 Time-dependent generation of γ -H2AX after treatment with NPEO(15) (100 μ M) (MCF-7 cells).

Upper images and graph: Counts for γ -H2AX-positive cells determined by immunofluorescence staining, lower image: Western blot for detection of γ -H2AX. Actin was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE. Values are means \pm S.D. ($n = 5$). Significant differences from untreated cells are represented by *** $p < 0.001$.

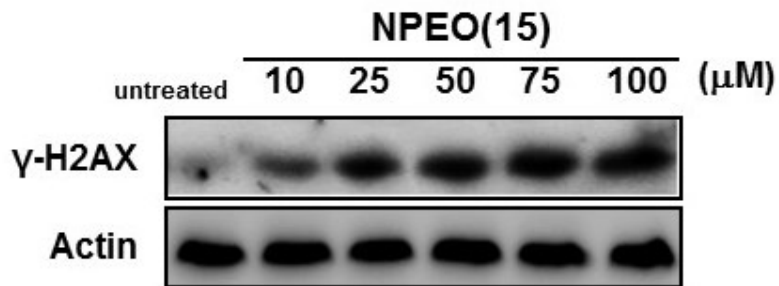
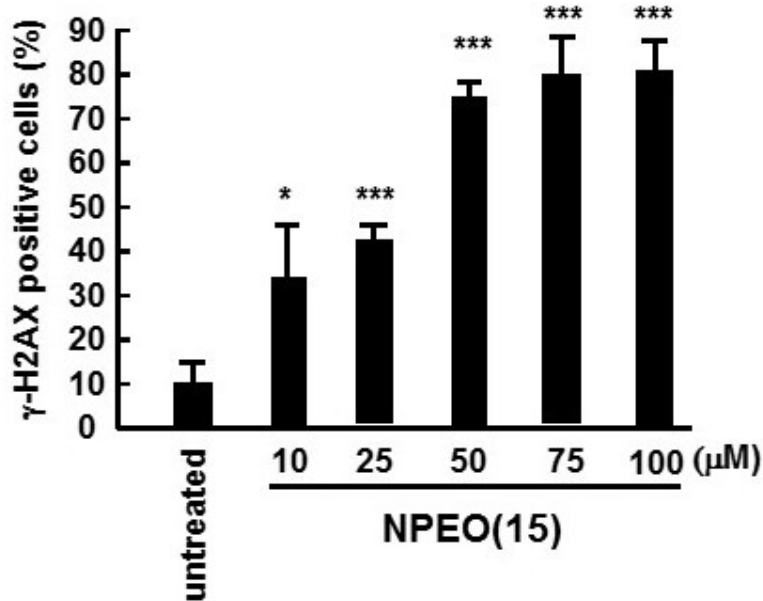
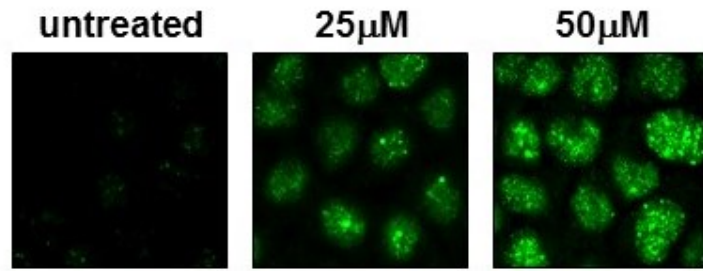


Fig. 17 Dose-dependent generation of γ -H2AX after treatment with NPEO(15) for 1 h (MCF-7 cells).

Upper images and graph: Counts for γ -H2AX-positive cells determined by immunofluorescence staining, lower image: Western blot for detection of γ -H2AX. Actin was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE. Values are means \pm S.D. ($n = 5$). Significant differences from untreated cells are represented by * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

2-2-3 NPEO 作用後の DNA 二本鎖切断の生成

γ -H2AXは、DSBsの生成が起因となって引き起こされる[56、57]。500 μ Mの各NPEO(0-70)を1時間作用させ、DSBsが引き起こされるかどうかをBSFGEにて確認した(Fig. 18A)。各NPEOにおいて、側鎖0から15に側鎖が増加するほど徐々にDSBsの生成が増加していき、その後側鎖40に向かい徐々にDSBsの生成が減少し、側鎖70では検出されなかった。また、NPEO(15)作用による濃度依存性の検討(Fig. 18B)では、25 μ Mから濃度依存的にDSBsの生成が増加した。この結果は、 γ -H2AXの誘導の結果とほぼ一致し、NPEOにより誘導された γ -H2AXがDSBs誘導に起因することを示した。

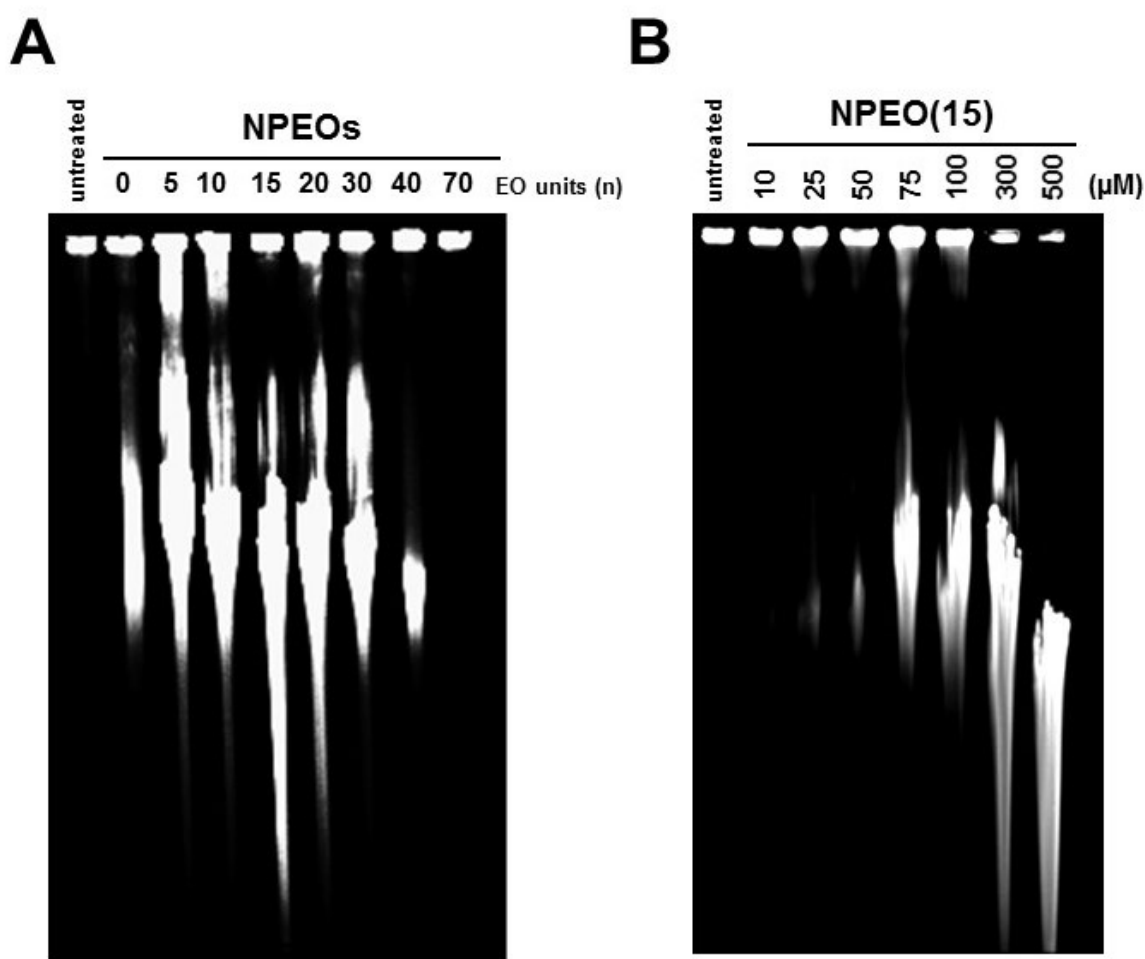


Fig. 18 Generation of DSBs after treatment with NPEOs (MCF-7 cells).

- (A) Detection of DSBs 1h after treatment with NPEO(0–70) (500 μ M) by BSFGE.
(B) Detection of DSBs 1h after treatment with NPEO(15) (10–500 μ M) by BSFGE.
All experiments were repeated two or three times with similar results.

第三節 NPEO による γ -H2AX 誘導メカニズム

3-1 実験材料および実験方法

3-1-1 実験材料

第二節 2-1-1 と同様のものを使用した。

3-1-2 細胞周期依存的 γ -H2AX の測定

35 mmディッシュに 2.0×10^5 cells/mLの細胞懸濁液を1 mL蒔き、PBSで最終濃度 $\times 2$ に調製したノニルフェノールならびにNPEO 1 mLを加え、24時間培養した。培養後、上清培地を除去し、PBSで洗浄し、トリプシン溶液500 μ lを加えた。37°C、5 %CO₂インキュベーター内で3分間放置した後、ピペッティングして十分に剥がした細胞へ、冷やした70 %エタノール溶液を加え、-20°Cで2時間以上固定した。固定後、2,000 rpmで5分間遠心分離し、PBSで2回洗浄した。その後、0.2 % TritonX-100、1 %ウシ血清アルブミンを含んだPBS (BSA-T-PBS)にて、室温で15分静置した。BSA-T-PBS中の細胞にphospho-H2AXに対する一次抗体(mouse monoclonal) (1:200)を1時間作用させ、その後二次抗体FITC (1:200) (Jackson Immuno Research Laboratories, PA)を1時間作用させた。抗体反応後、細胞を1 μ g/mL RNA分解酵素を含むBSA-T-PBSで処理した。細胞識別のため、細胞核をPI (10 μ g/ml)により染色した。FITCとPIの蛍光染色は、フローサイトメーター (FCM) (FACS CANTTM II; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)にて測定した。測定は、サンプル1つにつき10,000個以上の細胞を計測し、解析した。

3-1-3 FCM による ROS の測定

NPEO および H₂O₂ 処理による細胞内の ROS の生成は、6-carboxy-2,7-diclorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Molecular Probes, Eugene, OR)を使って確認した。培養シャーレに10 μ MのDCFH-DAを加え、NPEO および H₂O₂を処理し、1時間インキュベートした。その後、FCMを使い、細胞内のDCFH-DAの蛍光強度を測定した。

3-1-4 蛍光基質の分解によるcaspase活性の測定

35 mmディッシュに 2.0×10^5 cells/mLの細胞懸濁液を1 mL蒔き、PBSで最終濃度 $\times 2$ に調製したNPEO(15) 1 mLを加え、24時間培養した。培養後、上清培地を除去し、PBSで洗浄し、トリプシン溶液500 μ lを加え、細胞を回収した。ポジティブコントロールは、第一章第三節 3-1-2の条件でUVCを照射した細胞を用いた。回収した細胞を100 μ lのcell lysate buffer (10 mM Tris-HCl(pH 7.5)、130 mM NaCl、1 % Triton X-100、10 mM Na₄P₂O₇、10 mM Na₂HPO₄)に懸濁し、氷上に約15分間静止し細胞を完全に溶解した後、Bio-rad protein assay kit (Bio-rad)を用いてタンパク定量を行った。タンパク質量10 μ gと250 μ Mの蛍光基質 (Ac-DEVD-MCA; caspase-3/7)をreaction buffer (20 mM Hepes、10 % glycerol、2 mM dithiothreitol (pH 7.5))と混合し全液量を100 μ lに調製し、37°Cで1時間反応させた。反応後、蛍光分光光度計 (FL4500; Hitachi)で蛍光強度を測定 (EX.380 nm、EM.460 nm)した。

7-amino-4-methylcoumarin (AMC)を標準物質として検量線を引き、caspase活性を算出した。

3-1-5 Plasmid relaxation assayによるDNA損傷の測定

10 μ gのDNAプラスミド(pSPT18 vector: 3104 bp)を100 μ Lの純水で溶解し、96穴プレートにNPEOを加え、1時間インキュベートした。その後、1 %アガロースゲルにロードし、電気泳動を行った。ゲルはエチジウムブロマイドで染色し、トランスイルミネーターでDNAの損傷状況を確認した。

3-2 実験結果

3-2-1 γ -H2AX 誘導と細胞周期との関連性

Fig. 19に、100 μ MのNPEO(15)を30分間作用した後の γ -H2AXの誘導と細胞周期 (PI染色)の関係について、FCMのヒストグラムならびにドットプロット図を示す。NPEO(15)の30分間の作用において、細胞周期への影響は認められなかった。しかし、 γ -H2AXの蛍光強度は、未処理の細胞に比べNPEO(15)処理された細胞で増加した。特に、全細胞の約40 %で、ほぼ100倍の高い蛍光強度を示した。この γ -H2AXの蛍光強度の増加は、すべての細胞周期で確認され、周期依存性は認められなかった。

細胞周期における γ -H2AX誘導のポイントは2つあり、1つ目は細胞周期に影響を及ぼさない、各分裂フェーズに一樣に観察される独立した γ -H2AXの誘導で、電離放射線でのDNA損傷により引き起こされるような直接的なDSBsに基づく[58]。2つ目は核酸合成期(S期)に特徴的な増加を見せる γ -H2AX誘導で、紫外線照射や化学物質によるDNAの一本鎖切断や付加体形成などから始まる細胞の複製過程で起こるDSBsに基づく[59]。Fig. 19の結果から、NPEO(15)処理による γ -H2AXの誘導は細胞のすべての周期で観察されているため、DSBsを直接的に引き起こしている電離放射線でのDNA損傷と同様であることが示唆された。

ヒストンH2AXは、ATMやDNA-PKを介したDSBsの応答分子の基質である[44、60]ため、それらの阻害剤(wortmannin(Wort)とcaffeine(CF))をNPEO(15)の処理中作用させた。Fig. 20より、各阻害剤により γ -H2AXの誘導が濃度依存的に顕著に減少した。これらの結果から、NPEO(15)処理による γ -H2AX誘導は、直接的なDSBsが引き起こされた後、ATMまたはDNA-PKを介した伝達経路によって誘導されていることが示唆された。

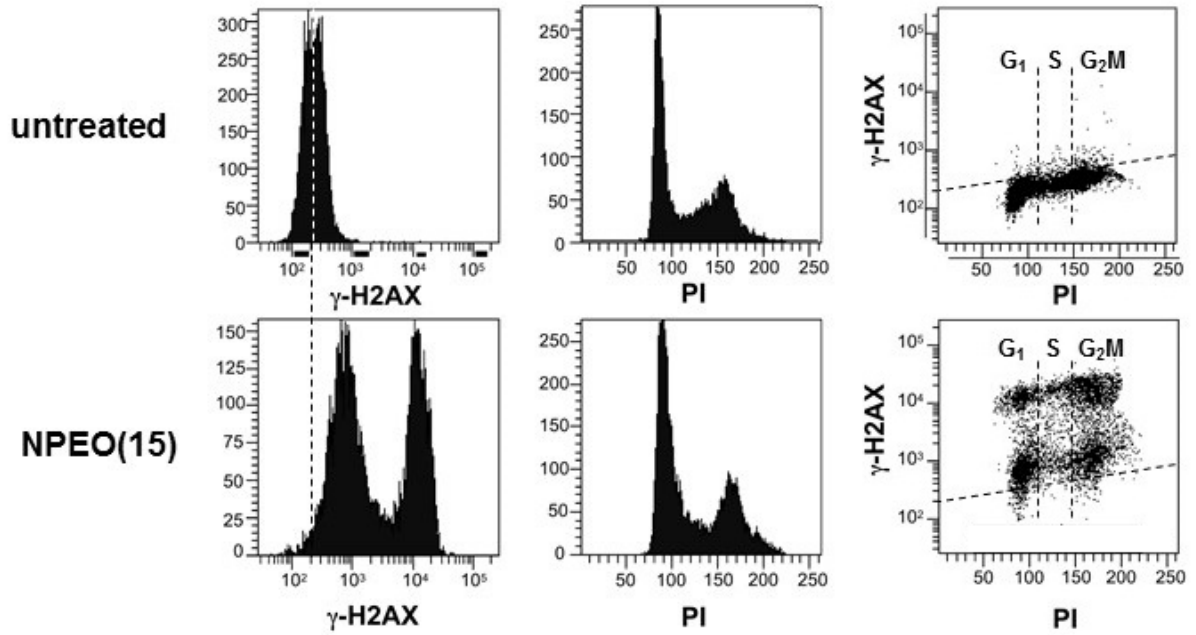


Fig. 19 Generation of γ -H2AX and dependency on cell cycle (MCF-7 cells).

Relationship between generation of γ -H2AX and cell cycle phases analyzed using flow cytometry. Cells treated with NPEO(15) (100 μ M) for 1 h were fixed and stained with antibody for γ -H2AX and PI. Left panels: γ -H2AX detected by immunofluorescence staining. Center panels: cell cycle phases analyzed by PI staining. Right panels: relationships between generation of γ -H2AX and cell cycle phases (PI).

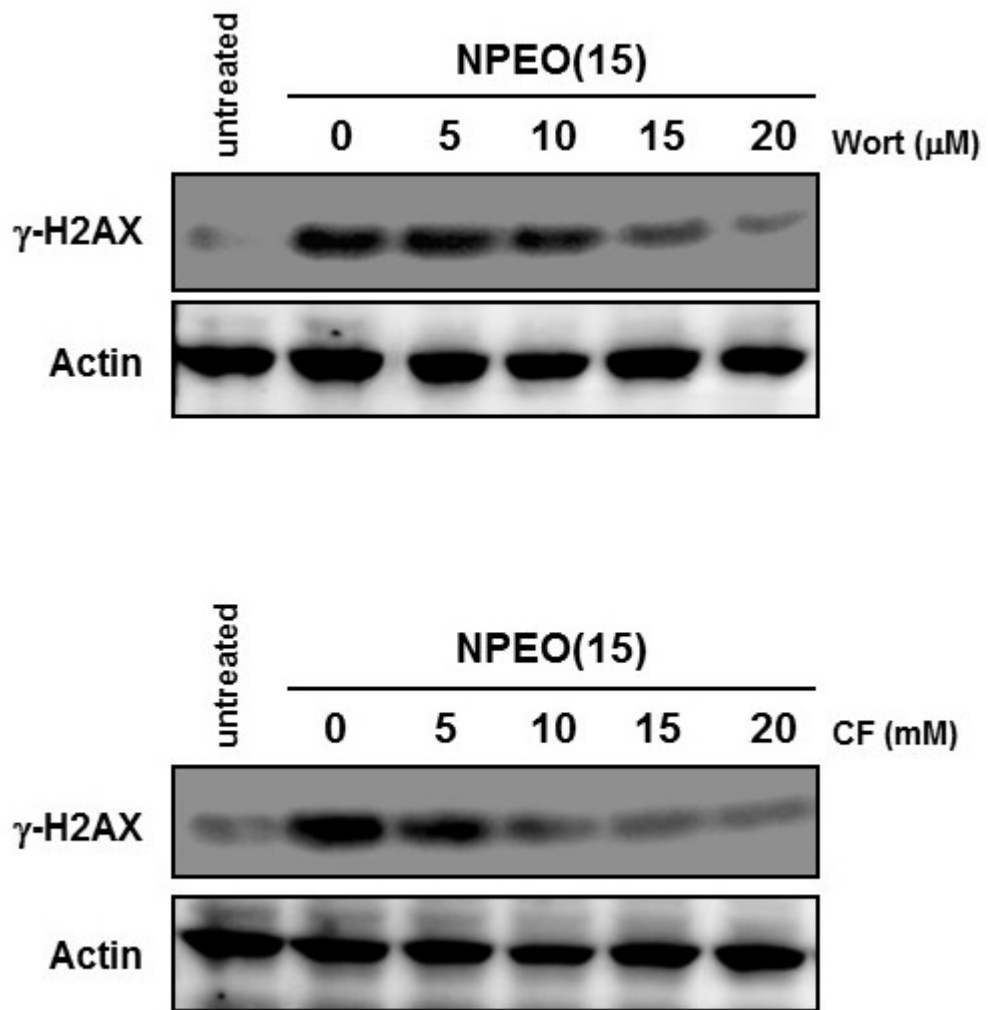


Fig. 20 Generation of γ -H2AX after treatment with NPEO(15) in the presence of ATM inhibitors (MCF-7 cells).

Cells were pretreated with inhibitors (Wort and CF) for 0.5 h, then treated with NPEO(15) (100 μ M) for 1 h.

3-2-2 γ -H2AX 誘導における ROS の関与

γ -H2AXには、DNAに直接的な損傷があたえられた際に引き起こされる場合と、細胞内に生成されたROSなどによるDNA損傷から、修復、複製などを介して誘導される間接的な場合があることは前述した。そこでまずROSの関与を検討した。

100 μ MのNPEO(15)および5 mMの H_2O_2 を1時間作用させた後、細胞内ROSをDCFH-DA (ROS蛍光試薬)を用いて検出した。Fig. 21Aより、 H_2O_2 を作用させた細胞では、高いROSの検出が確認されたが、NPEO(15)を作用させた細胞では検出されなかった。酸化防止剤 *N*-acetylcystein (NAC)を加え、100 μ MのNPEO(15)および5 mMの H_2O_2 を1時間作用させた後の γ -H2AX誘導を確認した (Fig. 21B)。NACを添加することで、 H_2O_2 作用による γ -H2AXの増加は抑制されたが、NPEO(15)作用による γ -H2AXの増加は抑制されなかった。またBSFGEによるDSBsの検出においても同様な結果であり、NPEO(15)によるDSBsの生成はNACで抑制されないが、 H_2O_2 による生成はNAC 25 mMで完全に消失した (Fig. 22)。これらの結果から、NPEO(15)による γ -H2AXの誘導増加は、ROSに関与していないことが示された。

さらに、 γ -H2AXはアポトーシスの際のDNA断片化においても検出される[61]ため、100 μ MのNPEO(15)作用後のcaspase-3の活性を測定した (Fig. 23A)。UVC照射は、caspase-3活性のポジティブコントロールとした。NPEO(15)作用後、 γ -H2AX は短時間で検出されたが、caspase-3の活性化は4時間まで確認されなかった。汎カスパーゼ阻害剤(Z-Asp-CH2-DCB)を作用させた場合、NPEO(15)作用による γ -H2AXの誘導を抑制しなかった (Fig. 23B)。これらの結果から、NPEO(15)による γ -H2AXの誘導増加は、アポトーシスの際のDNA断片化とは関係ないことが示された。

3-2-3 NPEO(15)によるプラスミドDNAの損傷

NPEO作用そのものによりDNA損傷が引き起こされるのか否か、plasmid relaxation assayによって検討した (Fig. 24)。スーパーコイルDNA (sc-DNA)に切断がはいると、開環状DNA (oc-DNA)に転換する。そのため、NPEOがDNAに直接損傷をもたらす場合、DNAプラスミドへの作用が起こりsc-DNAはoc-DNAに転換されると考えられる。しかし、非常に高濃度のNPEO(15) (100 μ M-10,000 μ M)の添加においても、sc-DNAはoc-DNAへ転換されなかった。この結果は、DSBsや付随する γ -H2AXの誘導が、直接DNAへNPEOが作用し γ -H2AXを誘導したのではなく、何らかの細胞内イベントにより引き起こされたことを示唆していた。

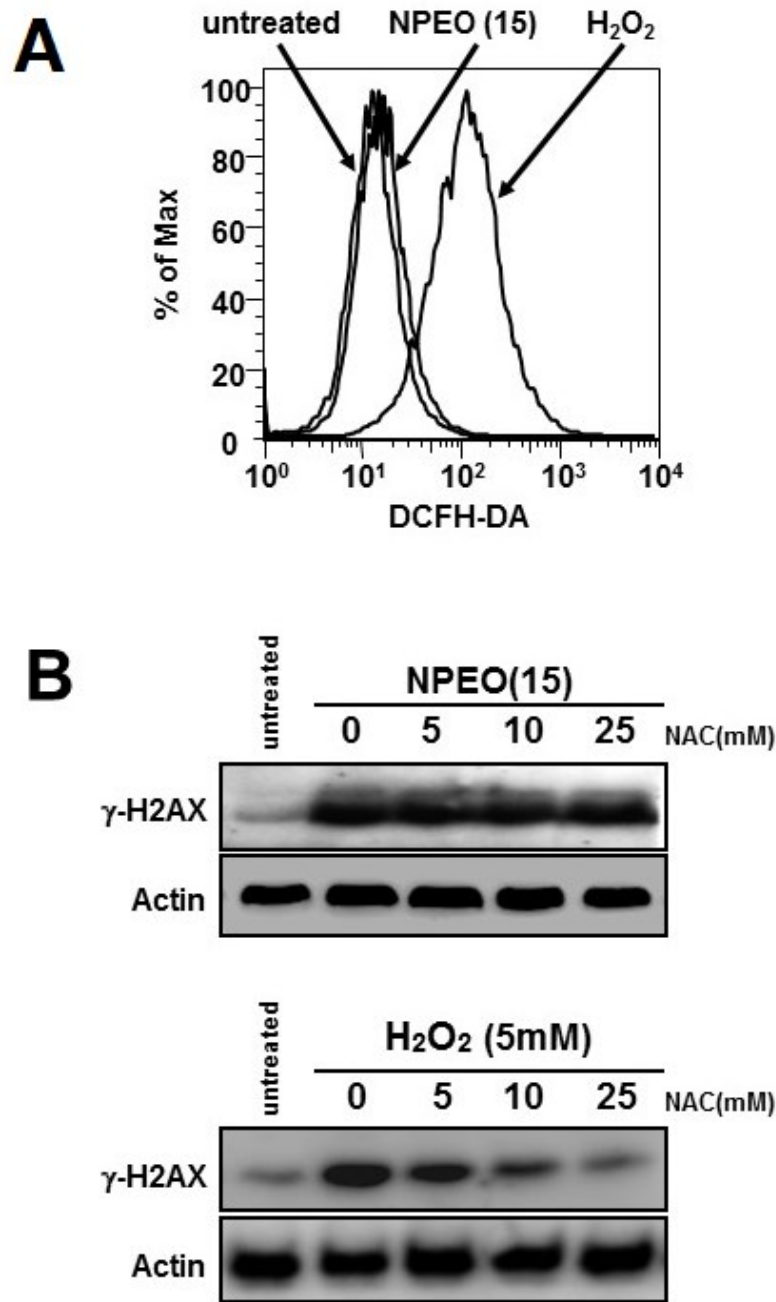


Fig. 21 Involvement of ROS in generation of γ -H2AX by NPEO(15) (MCF-7 cells).

(A) Intracellular ROS formation after treatment with NPEO(15). Cells incubated in the presence of 10 μ M of DCFH-DA for 0.5 h were treated with NPEO(15) (100 μ M) or H₂O₂ (5 mM) for 1 h. The fluorescence intensity of DCFH-DA was analyzed by FCM. (B) Western blot analysis for γ -H2AX. Cells incubated with NAC (5–25 mM) for 30 min were treated with NPEO(15) (100 μ M) or H₂O₂ (5 mM) for 1 h. Actin is a standard for the equal loading.



Fig. 22 Involvement of ROS in generation of DSBs by NPEO(15) (MCF-7 cells).

Cells incubated with NAC (5-25 mM) for 30 min were treated with NPEO(15) (100 uM) or H₂O₂ (5 mM) for 1 h. BSFGE was performed for detection of DSBs.

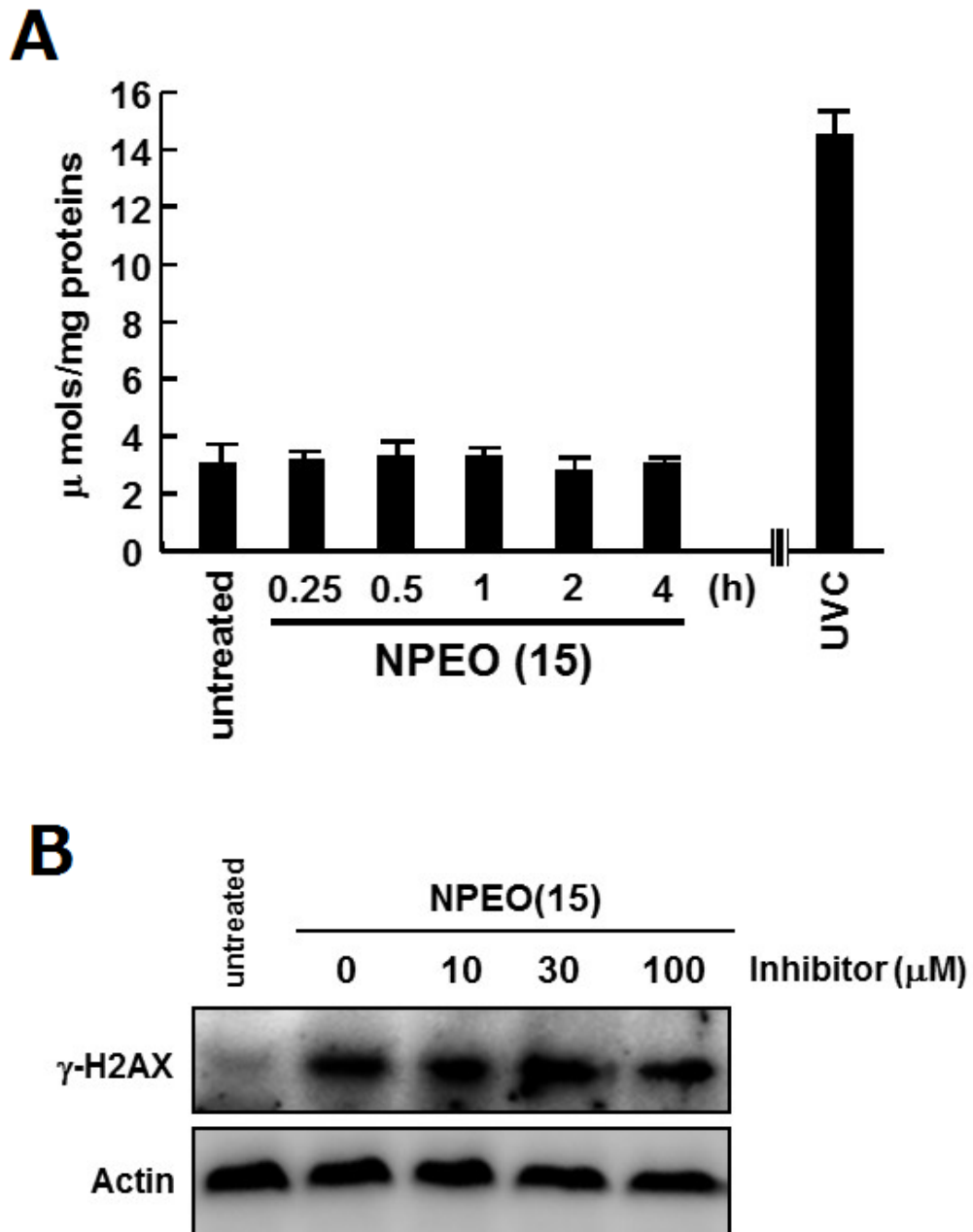


Fig. 23 Involvement of apoptosis in generation of γ -H2AX by NPEO(15) (MCF-7 cells).

(A) Caspase-3 activity after treatment with NPEO(15). Cells were treated with NPEO(15) (100 μ M) for each indicated period (0.25–4 h). Caspase-3 activity was measured using a fluorescence substrate. Values are means \pm S.D. ($n = 5$). (B) Generation of γ -H2AX in the presence of a caspase inhibitor. Cells pretreated with a pan-caspase inhibitor (Z-Asp-CH2-DCB) for 0.5 h were treated with NPEO(15) (100 μ M) for 1 h.

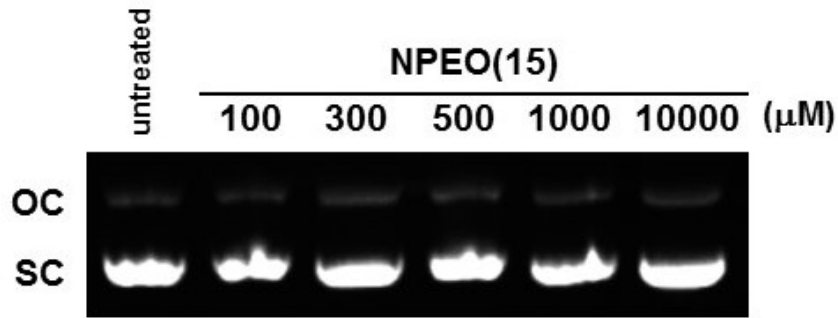


Fig. 24 Plasmid relaxation assay.

Plasmid DNA was treated with NPEO(15) (100–10,000 μM) for 1 h. Conformational change of plasmid DNA was analyzed by agarose gel electrophoresis. Super coiled and open circular DNA are represented as “sc” and “oc”, respectively.

第四節 紫外線照射 NPEO による $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導

4-1 実験材料および実験方法

4-1-1 実験材料

第二節 2-1-1 と同様のものを使用した。

4-1-2 紫外線照射試料の調製

PBS(-)で 10 mM 濃度に調整した各 NPEO 溶液を、第一章第三節 3-1-2 の条件で線量 100-1000 J/cm^2 の範囲で紫外線照射した。照射した各 NPEO 溶液を、最終濃度が指定の濃度となるように培養培地で希釈し、実験に使用した。

4-1-3 実験方法

生存率の測定は、第二節 2-1-3 と同様に行った。

$\gamma\text{-H2AX}$ の測定は、第二節 2-1-4 と同様に行った。

DSBs の測定は、第二節 2-1-5 と同様に行った。

4-2 実験結果

4-2-1 紫外線照射後の NPEO 分解物による MCF-7 細胞の生存率への影響

Fig. 25 に UVB 照射 (100-1000 J/cm^2) した NPEO(15) 作用後の MCF-7 細胞の生存率を示す。NPEO(15) 濃度依存的に生存率は低下した。NPEO(15) に UVB を照射すると、線量依存的に生存率が回復した。次に、Fig. 26 に UVB 照射 (100-1000 J/cm^2) した NPEO(70) の分解物作用後の MCF-7 細胞の生存率を示す。UVB 照射 500 J/cm^2 を下限に、線量上昇にともない一旦生存率が減少し、その後増加した。この変化は濃度が異なっても同様であった。

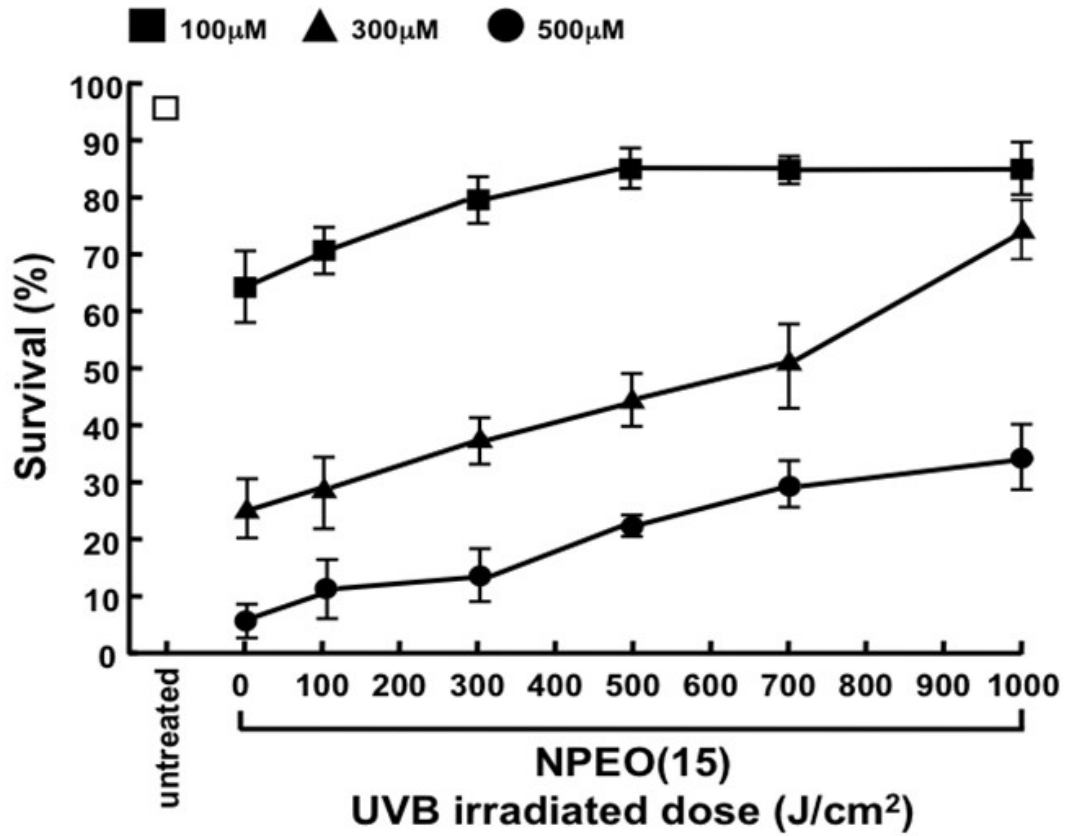


Fig. 25 Cytotoxicity of NPEOs irradiated with UVB.

NPEO(15) were irradiated with UVB (100–1000 J/cm²). Cells survival after treatment with UVB-irradiated NPEO(15) at concentrations ranging from 100 to 500 μM for 24 h was determined by Trypan blue exclusion assay (MCF-7 cells). Values are the mean ± SD (*n* = 5).

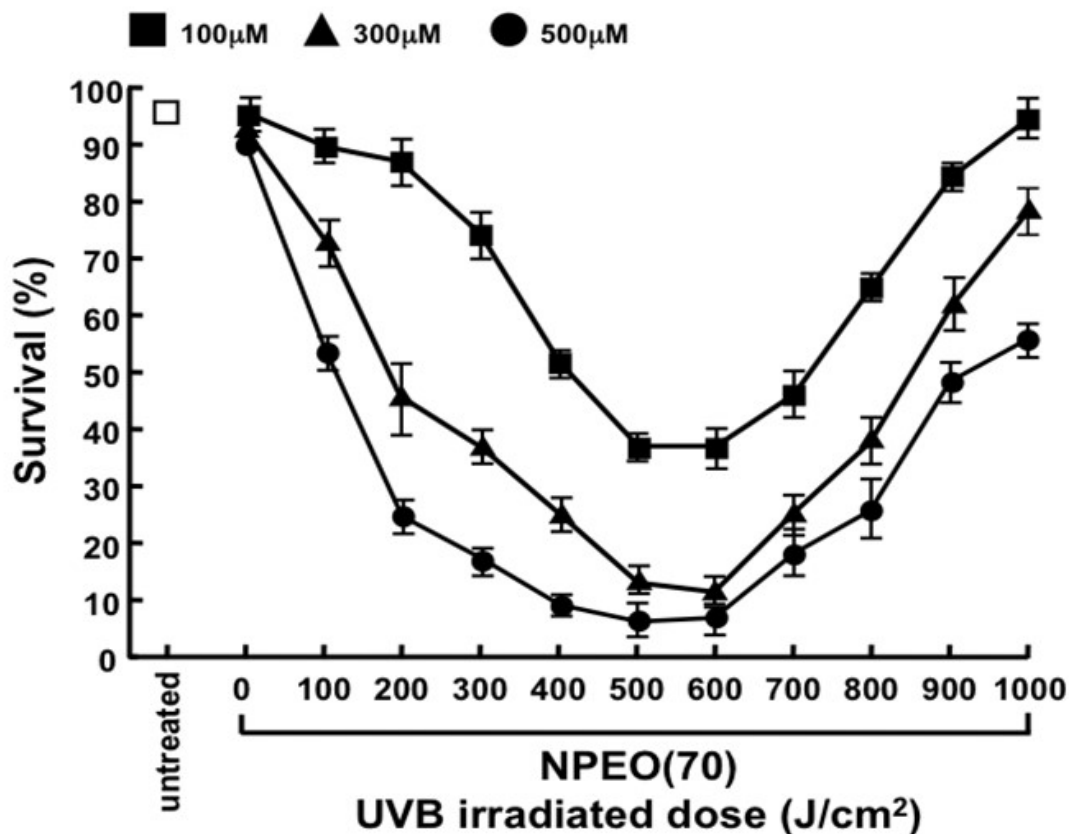


Fig. 26 Cytotoxicity of NPEOs irradiated with UVB.

NPEO(70) were irradiated with UVB (100–1000 J/cm²). Cells survival after treatment with UVB-irradiated NPEO(70) at concentrations ranging from 100 to 500 μM for 24 h was determined by Trypan blue exclusion assay (MCF-7 cells). Values are the mean ± SD (*n* = 5).

4-2-2 紫外線照射後の NPEO 分解物による γ -H2AX の誘導 (免疫染色法)

Fig. 27 に、各波長の紫外線を照射した NPEO による細胞内の γ -H2AX の誘導の蛍光染色イメージを示す。未照射の NPEO(10)では γ -H2AX の誘導が確認されたが、UVA 照射 1000 J/cm² および UVB 照射 500 J/cm² で若干減少し、UVB 照射 1000 J/cm² および UVC 照射でその誘導が顕著に減少した。逆に、未照射の NPEO(70)では γ -H2AX の誘導が見られなかったが、UVA 照射 1000 J/cm² および UVB 照射 500 J/cm² で誘導が顕著に増加し、UVA 照射 500 J/cm²、UVB 照射 1000 J/cm²、UVC 照射 500 J/cm² で若干の増加傾向を示した。次に、Fig. 28 に線量(100–1000 J/cm²)をかえて UVB 照射した NPEO(70)による γ -H2AX の誘導を示す。照射線量を上昇させると γ -H2AX の誘導量が増加し、500 J/cm² をピークに今度は減少した。

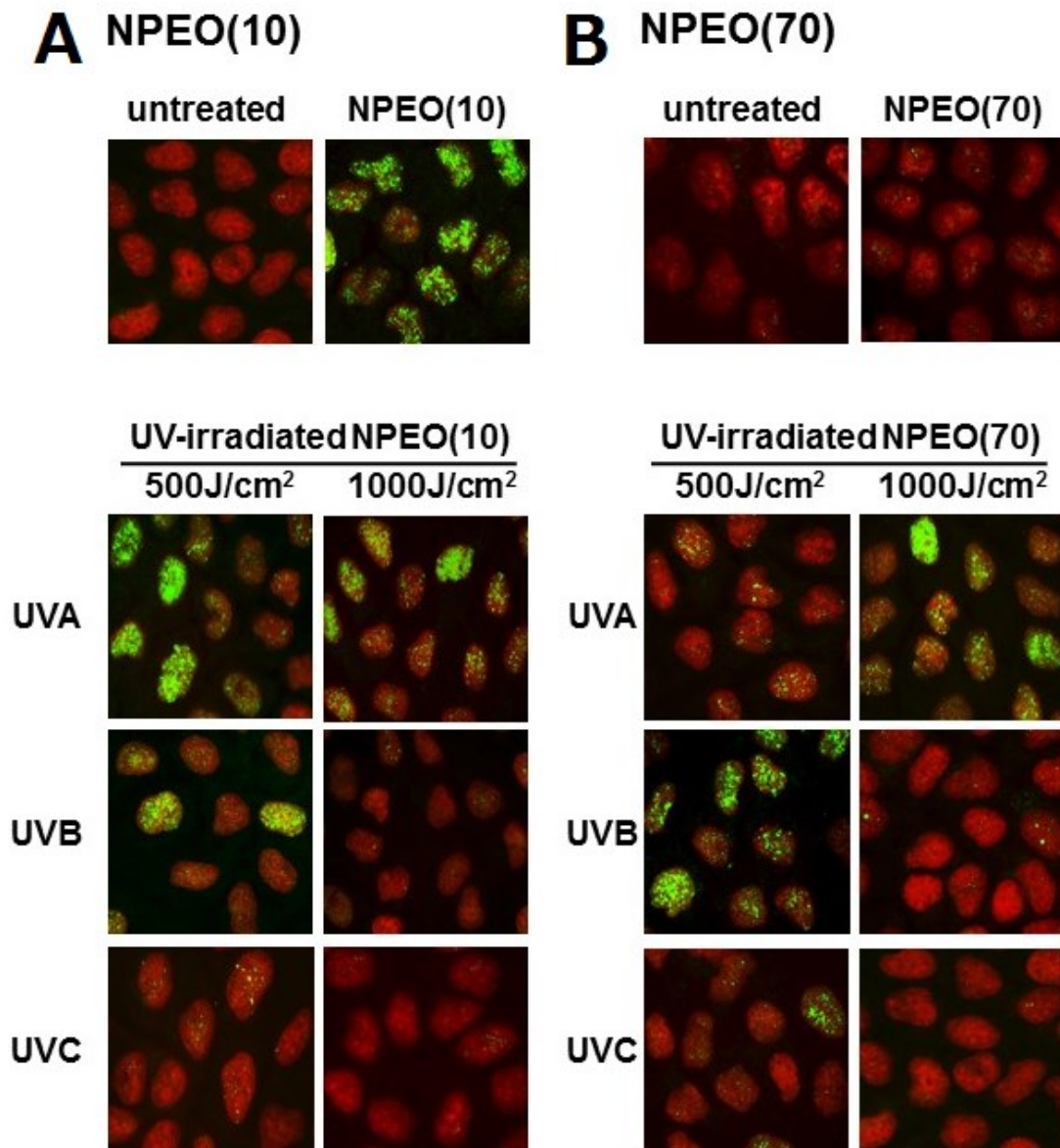


Fig. 27 Images of γ -H2AX foci after treatment with UV-irradiated NPEOs (MCF-7 cells).

γ -H2AX foci produced by treatment with UV-irradiated NPEOs (300 μ M) for 4 h were determined. Nuclei were stained with PI.

(A) γ -H2AX produced by NPEO(10) exposed to UVA, B and C (500 and 1000 J/cm²).

(B) γ -H2AX produced by NPEO(70) exposed to UVA, B and C (500 and 1000 J/cm²).

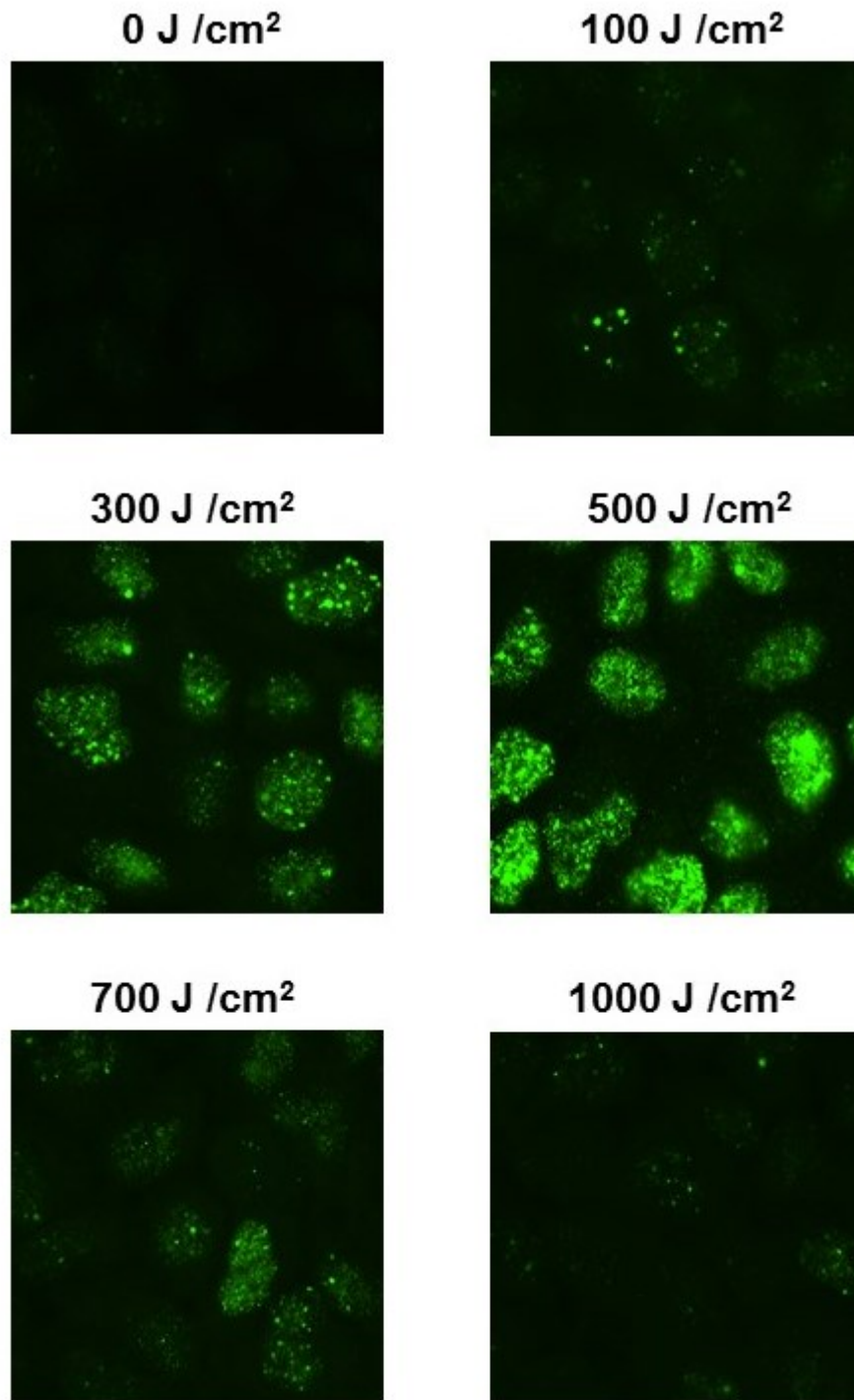


Fig. 28 Images of γ -H2AX foci after treatment with UVB-irradiated NPEO(70) (MCF-7 cells).

γ -H2AX foci produced by treatment with UVB-irradiated NPEO(70) (300 μ M) for 4 h were determined. NPEO(70) was exposed to several doses of UV (100, 300, 500, 700 and 1000 J/cm²).

4-2-3 紫外線照射後の NPEO 分解物による γ -H2AX の誘導 (ウエスタンブロッティング法)
 Fig. 29 に、各波長の紫外線を照射した NPEO による γ -H2AX 誘導のウエスタンブロッティングイメージを示す。NPEO(10)において、UVA 照射でわずかに γ -H2AX が減少し、UVB、UVC 照射で線量依存的に顕著に減少した。逆に、NPEO(70)において、UVA 照射で線量依存的に誘導量が増加したが、UVB 照射では 500 J/cm² をピークに、UVC 照射では 250 J/cm² をピークに一旦誘導量が増加した後、減少する傾向を示した。この結果は、4-2-2 に示した免疫蛍光染色法での結果と一致した。

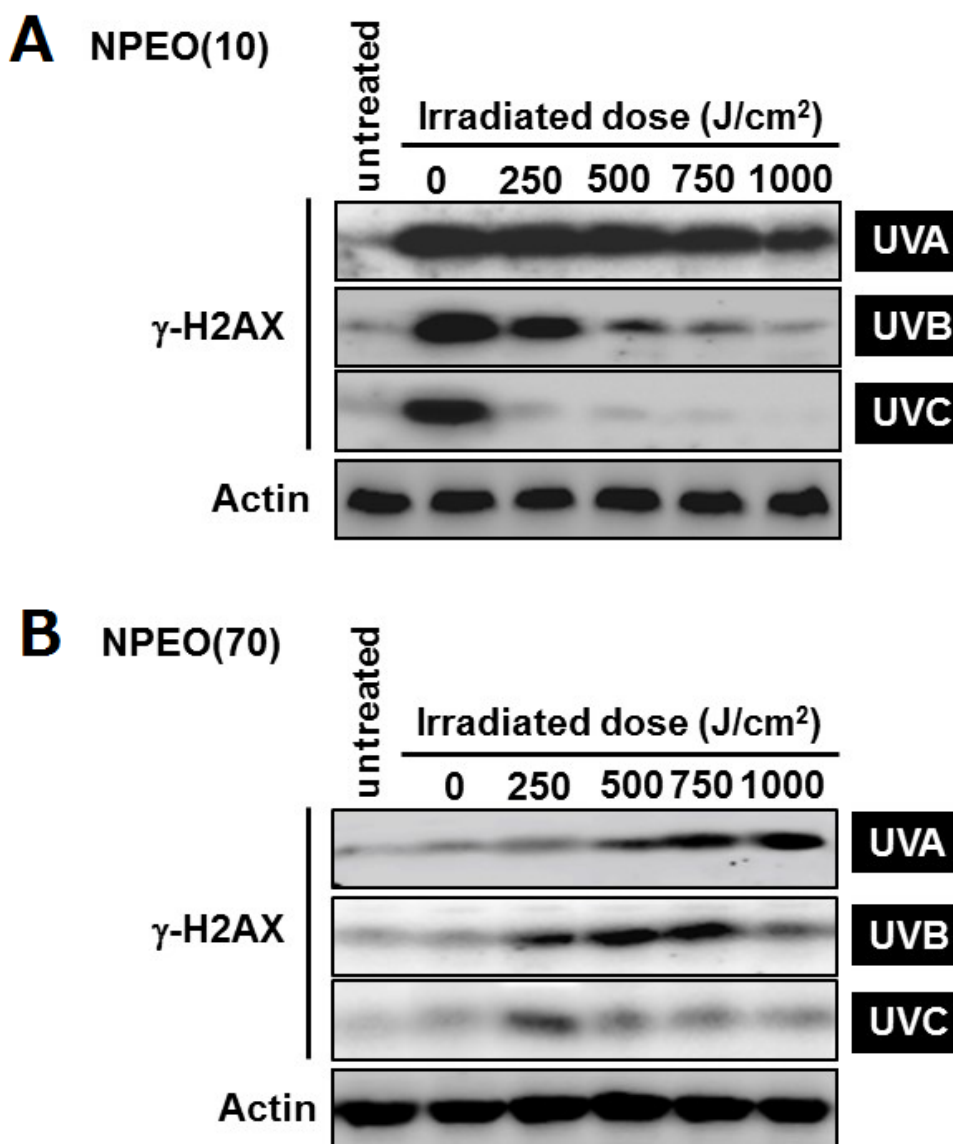


Fig. 29 Generation of γ -H2AX after treatment with UV-irradiated NPEOs (MCF-7 cells).

γ -H2AX after treatment with UV-irradiated NPEO(10) (A) and NPEO(70) (B) (100 μ M) for 4 h was detected using Western blotting. Actin was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE.

4-2-4 紫外線照射後の NPEO 分解物による DNA 二本鎖切断

各波長のUVを照射したNPEO作用後のDSBsの生成をBSFGEにて解析した。UVA照射したNPEO(10)ではすべての線量においてDSBsの生成が確認できたが、UVB照射ではその生成が線量依存的に減少し、UVC照射ではその生成が確認されなかった(Fig. 30)。NPEO(70)においては、UVA照射の1000 J/cm²およびUVB照射500 J/cm²で顕著なDSBsが検出できたが、その他線量およびUVC照射ではほとんど検出ができなかった(Fig. 31)。この結果は、先のウエスタンブロットティングの結果や細胞生存率の結果と一致した。

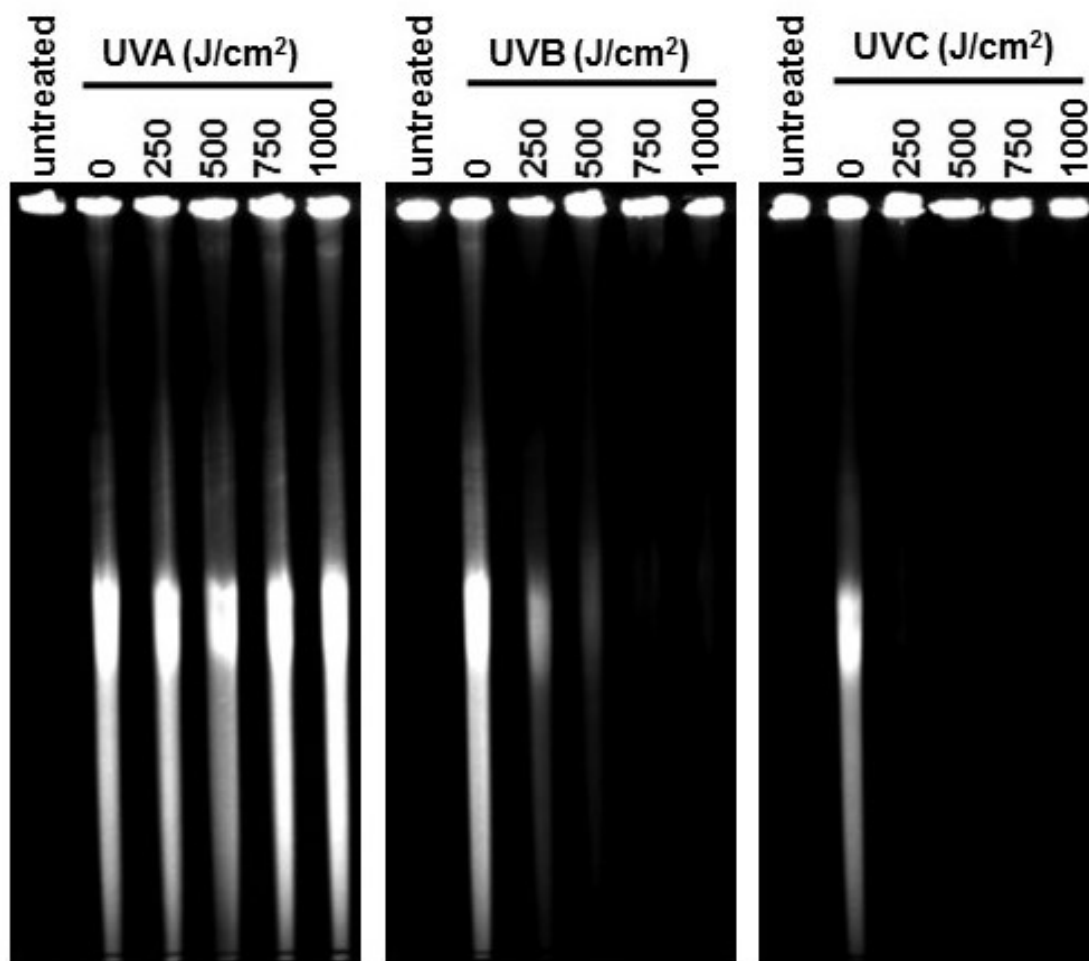


Fig. 30 Formation of DSBs after treatment with UV-irradiated NPEO(10) (MCF-7 cells).

Cells treated with NPEO(10) for 4 h were solidified in 1 % low-melting agarose and treated as described in Materials and Methods. The gel stacks containing the cells were loaded onto a 0.8 % agarose gel, and BSFGE was carried out.

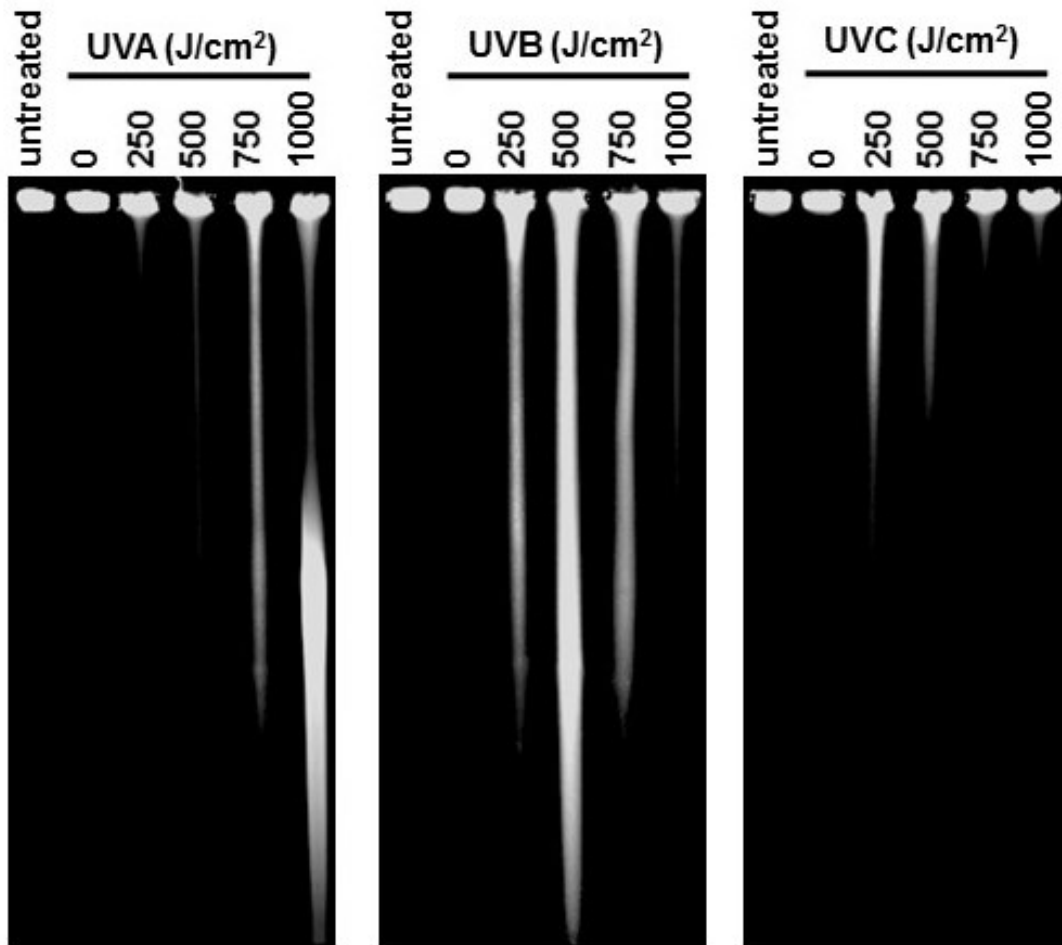


Fig. 31 Formation of DSBs after treatment with UV-irradiated NPEO(70) (MCF-7 cells).

Cells treated with NPEO(70) for 4 h were solidified in 1 % low-melting agarose and treated as described in Materials and Methods. The gel stacks containing the cells were loaded onto a 0.8 % agarose gel, and BSFGE was carried out.

第五節 紫外線照射 NPEO による γ -H2AX 誘導メカニズム

5-1 実験材料および実験方法

5-1-1 実験材料

第二節 2-1-1 と同様のものを使用した。

5-1-2 試料の調製

第四節 4-1-2 と同様な方法で調整した。

5-1-3 実験方法

第三節 3-1 と同様に行った。

5-2 実験結果

5-2-1 紫外線照射 NPEO による γ -H2AX 誘導と細胞周期との関係

各波長の UV 照射 NPEO(10, 70)における、 γ -H2AX の誘導と細胞周期との関係をフローサイトメーター (FCM) にて確認した (Fig. 32)。UVA 照射した NPEO(10)では、いずれの線量においても S 期、G₁ 期、G₂M 期のすべての分裂フェーズで γ -H2AX の増加が見られた。UVB 照射した NPEO(10)では、500 J/cm² の線量においてすべての分裂フェーズで γ -H2AX の増加が見られたが、1000 J/cm² の線量では増加は確認されなかった。UVC 照射ではいずれの線量においても γ -H2AX の誘導は検出されなかった。

UVA 照射した NPEO(70)では、500 J/cm² の線量においてすべての分裂フェーズで若干の γ -H2AX の増加が確認され、1000 J/cm² の線量でさらに増加した。UVB、UVC 照射した NPEO(70)では、500 J/cm² の線量において γ -H2AX の増加が確認され、その後 1000 J/cm² の線量では確認されなくなった。これらの結果は、ウェスタンブロッティング法による γ -H2AX 誘導の検出結果と一致する。また、すべての γ -H2AX の増加において、分裂フェーズ特異的な検出が確認されなかったことから、細胞周期との関連性はないと考えられた。

500 J/cm² の線量の UVB 照射した NPEO(70)について、wortmannin または caffeine を添加し、 γ -H2AX の誘導を測定した (Fig. 33)。その結果、各阻害剤の添加でそれぞれ濃度依存的に γ -H2AX の誘導が抑制された。これは、UVB 照射された NPEO(70)による γ -H2AX の誘導が、DSBs を原因として ATM または DNA-PK の活性により引き起こされていることを示唆し、未照射の側鎖の短い NPEO による γ -H2AX の誘導と同様な経路で引き起こされていると推察された。

5-2-2 紫外線照射 NPEO による γ -H2AX 誘導と ROS の関与

NPEO 分解物による γ -H2AX 誘導における細胞内の ROS 生成の関与について H₂O₂ と比較検証した (Fig. 34)。H₂O₂ による ROS 生成よりかなり劣るが、UVB 照射した NPEO(70)において若干の ROS 生成が確認された (Fig. 34A)。しかし、酸化防止剤 NAC を添加した検証結果 (Fig. 34B、34C) では、H₂O₂ による γ -H2AX の誘導が抑制されたのに対し、UVB 照射された NPEO(70)において γ -H2AX の誘導では若干の抑制が確認されたが有意な変化は見られなかった。同様に DSBs の生成においても、H₂O₂ 作用では抑制されたが、UVB 照射 NPEO(70)作用では NAC による抑制が見られなかった。これらの結果から UVB 照射された NPEO(70)による γ -H2AX は、若干の ROS の関与はあるものの、主な経路は未照射の側鎖の短い NPEO による γ -H2AX 誘導の経路と同様に、ROS に関与しない経路である事が示唆された。

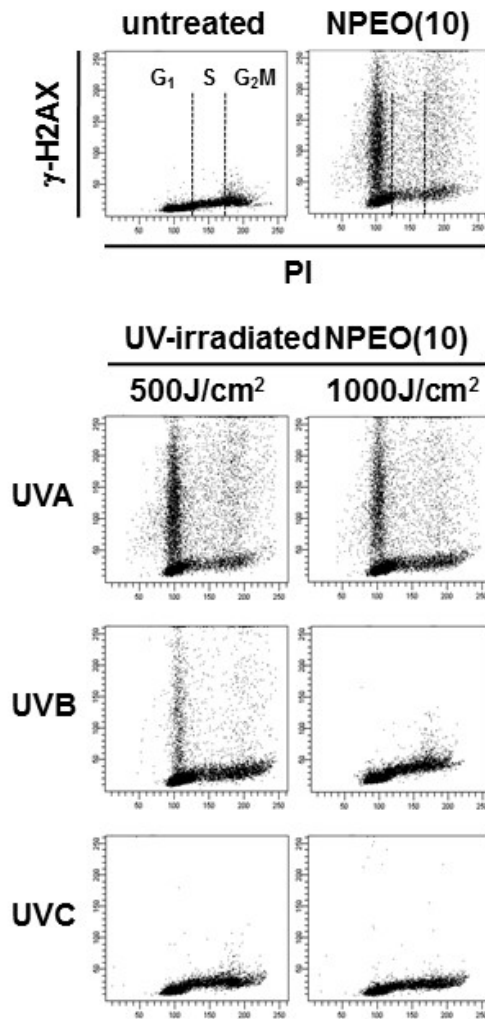
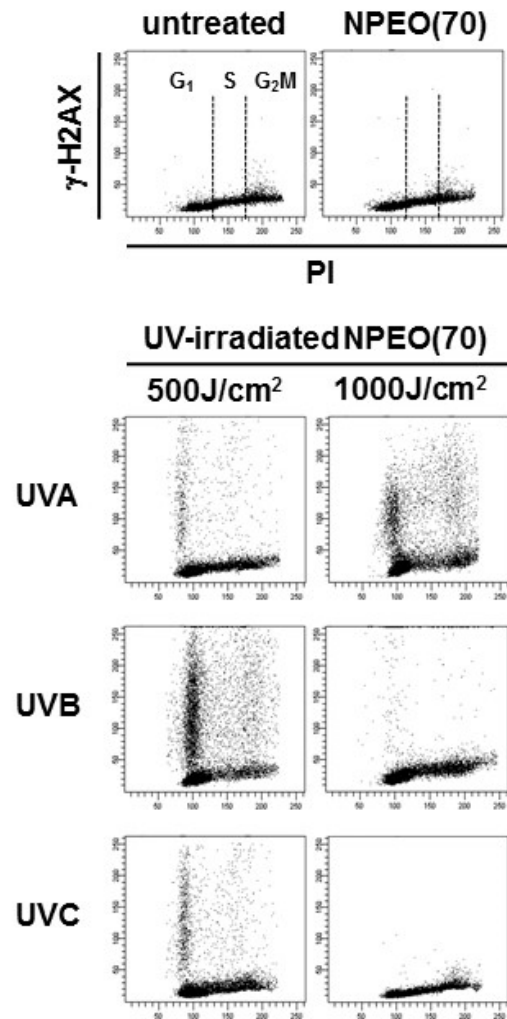
A NPEO(10)**B NPEO(70)**

Fig. 32 Flow cytometric analysis of γ -H2AX and cell cycle phases after treatment with UV-irradiated NPEOs (MCF-7 cells).

Cells treated with NPEOs for 4 h were fixed and immune-stained with γ -H2AX antibody and PI as described in Materials and Methods. The cells were analyzed using FCM and cell cycle dependent formation of γ -H2AX was revealed as dotted blots. (A): NPEO(10), (B): NPEO(70).

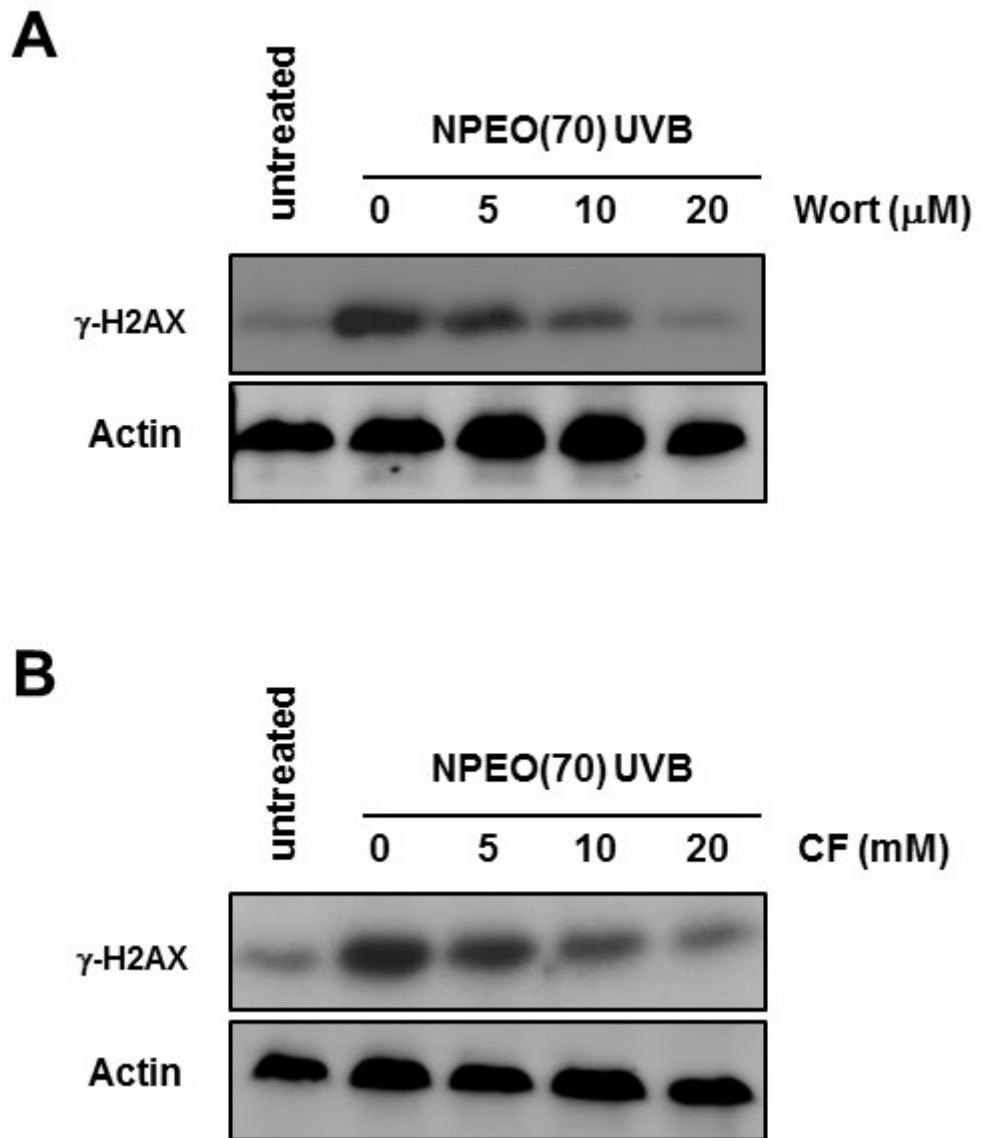


Fig. 33 Generation of γ -H2AX after treatment with UVB-irradiated NPEO(70) (MCF-7 cells).

Cells were pretreated with inhibitors (wortmannin(Wort) and caffeine(CF)) for 0.5 h, then treated with UVB (500 J/cm^2) -irradiated NPEO(70) ($300 \mu\text{M}$) for 4 h. (A): wortmannin, (B): caffeine

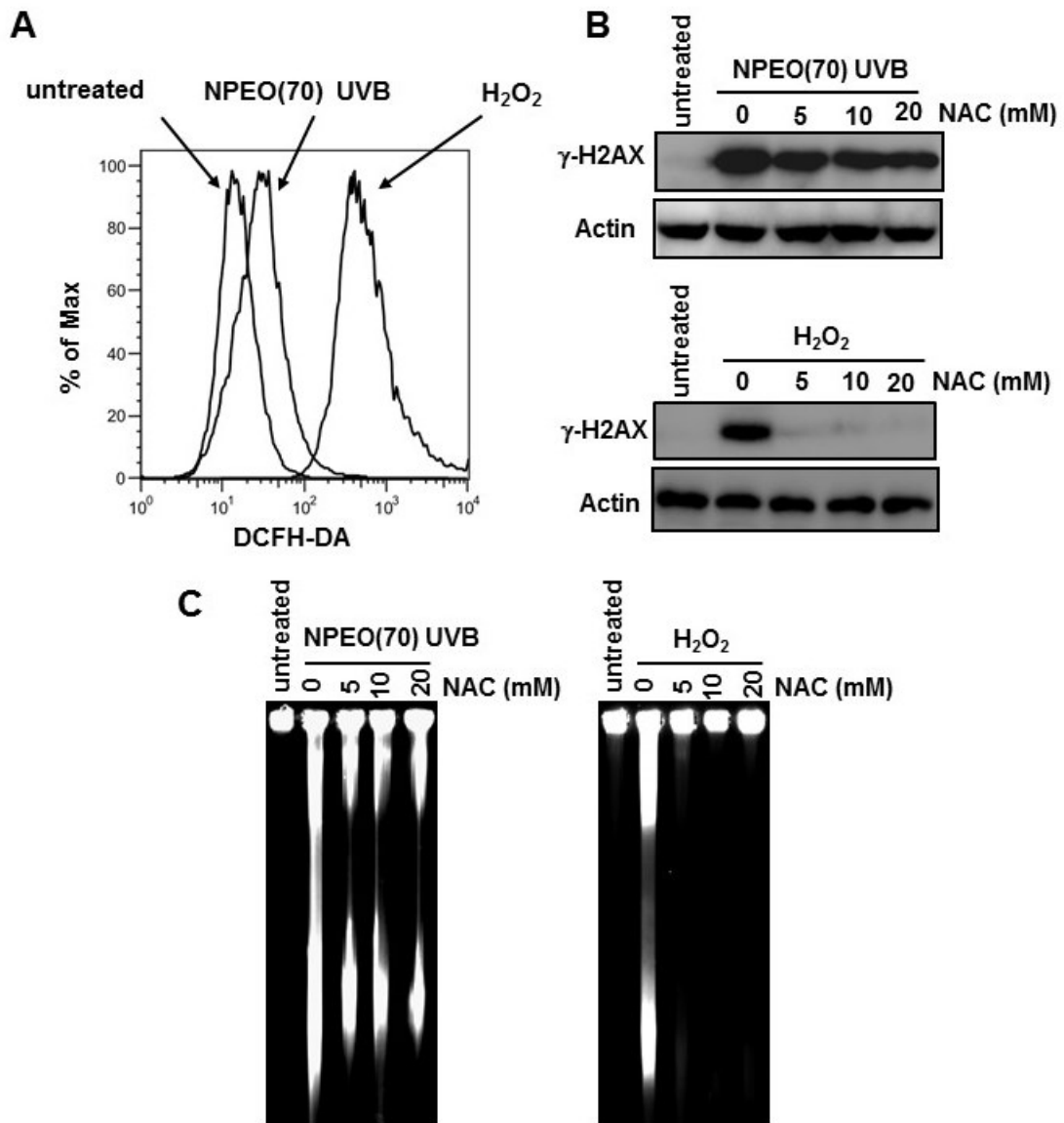


Fig. 34 Involvement of ROS in the generation of γ -H2AX by UVB-irradiated NPEO(70).

(A) Cells incubated in the presence of 10 μ M of DCFH-DA for 0.5 h were treated with UVB (500 J/cm²)-irradiated NPEO(70) (300 μ M) or H₂O₂ (3 mM) for 4 h (MCF-7 cells). The fluorescence intensity of DCFH-DA was analysed by FCM.

(B) Cells incubated with NAC (5–20 mM) for 30 min were treated with UVB-irradiated (500 J/cm²) NPEO(70) (300 μ M) or H₂O₂ (3 mM) for 4 h (MCF-7 cells). Actin is a standard for equal loading.

(C) Cells were treated as same as (B), and BSFGE was carried out.

第六節 考察

細胞の遺伝毒性を評価する指標として γ -H2AX の検出が注目されている[62, 63]。 γ -H2AX は、免疫組織化学による可視化によって、簡便な操作で核内での点状構造物(フォーカス)として観察できるため、多くの研究者に利用され始めている。本章では MCF-7 細胞を用いて NPEO 作用による γ -H2AX の誘導について検討した。前章において、NPEO の生存率への影響は細胞種により違いが見られたため、まず始めに MCF-7 細胞における生存率を検討した。MCF-7 細胞の生存率は、前章の各細胞の増殖率への影響と同様に、NPEO の側鎖によって変化し、側鎖 15 で最も高い細胞死を示した。そのため、以降の実験は NPEO(15) を使用し、また比較対象として影響がほとんど現れなかった NPEO(70)を用いた。UVB 照射後の NPEO(15)分解物および NPEO(70)分解物も、MCF-7 細胞以外を使用した前章の結果と同様な生存率の変化を示した。

γ -H2AX の誘導や DSBs の生成は、NPEO の側鎖の長さに依存して側鎖が短いほど顕著に見られ、この影響は濃度依存的に増加した。この結果は生存率の変化と一致することから、NPEO 作用によって DSBs が誘導され、細胞の生存率に影響を及ぼしたと考えられた。

また注目すべき点は、100 μ M 以下の低濃度の NPEO 作用、すなわち、細胞生存率にあまり影響が出ない濃度において、 γ -H2AX の誘導が観察できた点である。BSFGE による DSBs の検出で 75 μ M から強く DSBs が検出されたのに対し、 γ -H2AX の誘導が 25 μ M から有意に観察されたことから、 γ -H2AX を利用した DNA 損傷の検出は高感度であることを示している。この結果は、 γ -H2AX がパルスフィールドゲル電気泳動や comet assays など他の方法よりも DNA 損傷を鋭敏に検出できるというこれまでの報告と[60]一致する。また、NPEO による γ -H2AX の誘導は、アポトーシスによるものではないことを示しており、その点については後述する。

さらに紫外線照射による NPEO 分解物についても γ -H2AX の誘導を検討した。前章で紫外線照射による NPEO の分解状態に応じた細胞増殖率の変化を明らかにしたが、 γ -H2AX 誘導および DSBs 生成は、前章の増殖率の結果(Fig. 11)と同様な傾向を示した。そのため紫外線照射によって生成した NPEO 分解物の細胞毒性も紫外線未照射の NPEO の影響と同様に、DSBs 生成が寄与していると考えられる。

γ -H2AX の誘導は、DNA の直接的な DSBs に起因によるもの[43, 58]と、さまざまな DNA 損傷が生成した場合に DNA 複製や修復の過程で生じる間接的な DSBs に起因する[44, 45, 59]ものがある。そこで NPEO 作用による γ -H2AX と細胞周期の関連性を確認した(Fig. 19)が、細胞周期依存性は見られず、NPEO 作用における γ -H2AX 誘導は、直接的な DSBs により起こることが示唆された。しかしながら、plasmid relaxation assay により、高濃度の NPEO においても sc-DNA が oc-DNA に転換されなかったことから、NPEO が直接 DNA を切断しているのではなく、チャネルタンパク質のような膜輸送システムなどにより細胞内に NPEO が取り込まれたのち、DSBs を引き起こす機構を誘導すると考えられた。

電離放射線による γ -H2AX の誘導には、ATM や DNA-PK の伝達経路が介在していることが報告されている[44, 60]。そこで ATM を阻害する caffeine、DNA-PK 阻害剤の wortmannin を用いて検証を行った結果(Fig. 12A)、どちらも γ -H2AX の誘導を抑制したこと

から、ATM および DNA-PK いずれの経路も経由した γ -H2AX であることが示された。また、紫外線照射された NPEO による γ -H2AX の誘導においても未照射 NPEO による γ -H2AX の誘導経路と同様な過程によることが示された。

ノニルフェノールは生体内で ROS を発生させることが報告されている[64-66]。ROS は、酸化の起因となり DNA の一本鎖切断を生成することが知られているため、ROS を生成させる H_2O_2 をポジティブコントロールとして作用させ、また ROS を抑制する酸化防止剤 NAC を添加して、NPEO 作用による γ -H2AX の誘導が ROS による影響であるのか検討を行った (Fig. 12B-12D)。NPEO(15)では ROS の生成や、NAC による抑制が見られず、また細胞周期特異的な検出も見られなかった (Fig. 20) ため、NPEO による γ -H2AX の誘導は ROS などの酸化ストレスが関与していない系による経路で引き起こされていると推察された。しかし、前章で考察した通り NPEO(70)の UVB 照射においては NAC による抑制が確認されたことから、紫外線照射による NPEO の分解には ROS の関与が見られるものの、 γ -H2AX の誘導には ROS が影響を与えていないと考えられた。

γ -H2AX はアポトーシスの DNA フラグメンテーションによっても生成される[61]。そこで、アポトーシスの伝達経路の一部であるカスパーゼを阻害することで、NPEO による γ -H2AX の誘導が影響を受けるのかを確認した。NPEO(15)による γ -H2AX の誘導において汎カスパーゼ阻害剤による γ -H2AX 誘導の抑制は確認されず、caspase-3 の活性上昇も認められなかったため、NPEO による γ -H2AX の誘導は、アポトーシスの DNA フラグメンテーションとは異なった系であると推察された。

以上、NPEO による γ -H2AX の誘導は、ROS が関与せず、DNA 修復過程を介さない直接的な DSBs により引き起こされており、また、アポトーシスとは無関係な系であると推測されたが、詳細な誘導経路については導き出せなかった。

本章では、これまで遺伝毒性が低いとされていた NPEO に、 γ -H2AX 誘導を伴う DNA の損傷 (DSBs) が引き起こされることを初めて明らかにした。また、側鎖の短い NPEO ほど DSBs の誘導が強く引き起こされ、さらに遺伝毒性の無かった (低い) 側鎖の長い NPEO から、紫外線照射により側鎖の短い NPEO が生成し、遺伝毒性が出現することが示された。NPEO 以外のいくつかの環境化学物質についても、紫外線などによる光分解によってその遺伝的毒性が増加する報告[67-69]も見られるため、環境中のさまざまな化学物質について、太陽光による光分解の影響とその遺伝毒性について調査することが重要であると考えられた。

第三章 陰イオン系界面活性剤 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)の細胞毒性およびヒストン H2AX のリン酸化

第一節 序論

前章では国内生産量が多い非イオン系界面活性剤について検討したが、1980年頃まで主流であった陰イオン系界面活性剤についても依然として高い生産量を推移している。中でもアルキルスルホネート系界面活性剤は、陰イオン系界面活性剤全体の生産量のうち22 %を占めている、生産量の多い界面活性剤である[1]。そこで、アルキルスルホネート系界面活性剤である直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(Linear alkylbenzene sulfonate :LAS)に着目し、その影響についてNPEOと同様に検討した。

LASの構造はベンゼン環にアルキル基とスルホン酸塩が直鎖状に繋がった構造で(Fig. 35)、アルキル基鎖長を変換することで親水性を変化させることができる界面活性剤である。環境中に流出したLASについては、河川水で 50 $\mu\text{g/L}$ 以下、沈殿物からの検出も2 mg/kg程度とされ[70]、またその残存性も数時間から数日程度であると報告されている[71、72]。水系生物への影響についてもいくつか見られ、LASの50 %阻害濃度(IC₅₀)が 0.5 mg/L – 2.0 mg/Lの範囲であると報告されている[73–76]。環境中に存在するLAS濃度は、水系生物に影響を与える濃度よりも低いことから、そのリスクは低いと考えられる。しかし人への影響については、日常的に素手で洗剤液を取り扱うなどで皮膚への暴露が考えられ、人によっては手荒れなどの健康影響が生じてしまう。そのため、いまだ使用量の多いLASのリスクアセスメントは重要であり、人々の関心も高い。LASの遺伝的な影響については、枯草菌、ネズミチフス菌、大腸菌で感受性試験、突然変異試験においていずれも陰性の結果が得られ[77]、マウスを使った染色体異常においても陰性であった[78]。そのため、LASは遺伝毒性を示さないという見解となっている。また、環境中において微生物分解されたLASが水系生物の半数致死量LC₅₀に影響を及ぼす報告[79]は見られるが、遺伝毒性にまで言及した報告はない。

そこで本章では、LASによる培養細胞への影響について検討するとともに、 γ -H2AXを指標に遺伝毒性に関する検討を行った。また、紫外線照射後のそれらの変化について検討した。

第二節 LAS の培養細胞への影響

2-1 実験材料および実験方法

2-1-1 実験材料

【試薬】

・直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS)

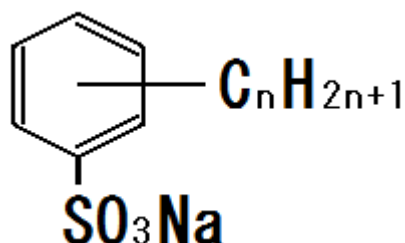


Fig.35 Structure of linear alkylbenzene sulfonate (LAS)

アルキル鎖アベレージ 12 (LAS) 商標名 ネオペレックス GS (花王株より譲渡して頂いた。)

アルキル鎖 10 (C₁₀LAS) (和光純薬工業より購入した。)

アルキル鎖 13 (C₁₃LAS) (和光純薬工業より購入した。)

その他の試薬は第一章第二節と同様の試薬または市販の特級品を使用した。

【細胞】

第一章第二節と同様の NIH-3T3 細胞を使用した。

【培養用培地】

第一章第二節と同様の NIH-3T3 細胞用培地を使用した。

2-1-2 細胞の培養

第一章第二節 2-1-2 と同様の方法で行った。

2-1-3 alamarBlue assay による細胞増殖率の測定

第一章第二節 2-1-3 と同様の方法で行った。

2-2 実験結果

Fig. 36 に LAS および NPEO 作用 48 時間後の NIH-3T3 細胞における細胞増殖率変化を示す。LAS および NPEO いずれの界面活性剤においても有意に細胞増殖の減少が観察された。この結果から、LAS も NPEO と同様に細胞への影響を示すことが確認された。

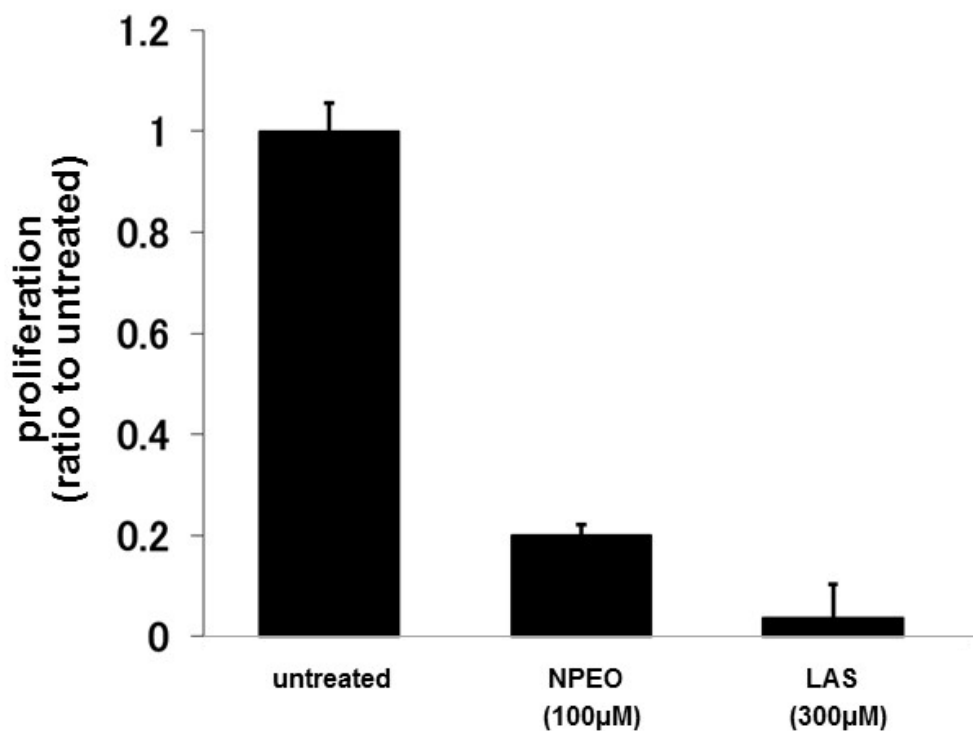


Fig. 36 Effect of NPEO and LAS on cell proliferation.

NIH-3T3 cells were incubated with NPEO(10) (conc.100 µM) and LAS (conc.300 µM). The fluorescence intensity of alamarBlue was measured as in NPEO(10) and LAS. Values are means ± S.D. ($n = 5$).

第三節 LAS による γ -H2AX の誘導

3-1 実験材料および実験方法

3-1-1 実験材料

【試薬】

第二節 2-1-1 と同様のものを使用した。

【細胞】

第二章第二節と同様の MCF-7 細胞を使用した。

【培養用培地】

第二章第二節と同様の MCF-7 細胞用培地を使用した。

3-1-2 細胞の培養

第二章第二節 2-1-2 と同様の方法で行った。

3-1-3 実験方法

γ -H2AX の測定は、第二章第二節 2-1-4 と同様の方法で行った。DSBs の測定は、第二章第二節 2-1-5 と同様に行った。

3-2 実験結果

3-2-1 LAS 作用後の γ -H2AX の生成

Fig. 37A に、MCF-7 細胞に LAS を 100 μ M 作用させた、2 時間後の γ -H2AX 免疫蛍光染色像を示す。LAS で処理された細胞は、NPEO の時と同様に核内に γ -H2AX のドット状の蛍光が鮮明に観察された。また、それは LAS の濃度依存的に増加した (Fig. 37B)。

ウエスタンブロッティング法においても、 γ -H2AX を検討した。LAS 処理により 50 μ M の低濃度作用から γ -H2AX が検出され、濃度依存的に増加した (Fig. 38)。また、300 μ M 作用においては、作用時間依存的に γ -H2AX が増加した。この結果から、NPEO 作用と同様に LAS 作用でも γ -H2AX の生成が引き起こされることが示された。

3-2-2 LAS 作用後の DNA 二本鎖切断 (DSBs) の生成

各濃度 (50-500 μ M) の LAS を MCF-7 細胞に 2 時間作用させた後、DSBs の誘導を BSFGE にて確認した (Fig. 39)。その結果、DSBs が濃度依存的に引き起こされた。これは、 γ -H2AX の生成の結果とほぼ一致し、NPEO 作用と同様に γ -H2AX の生成が DSBs 誘導に起因することを示した。

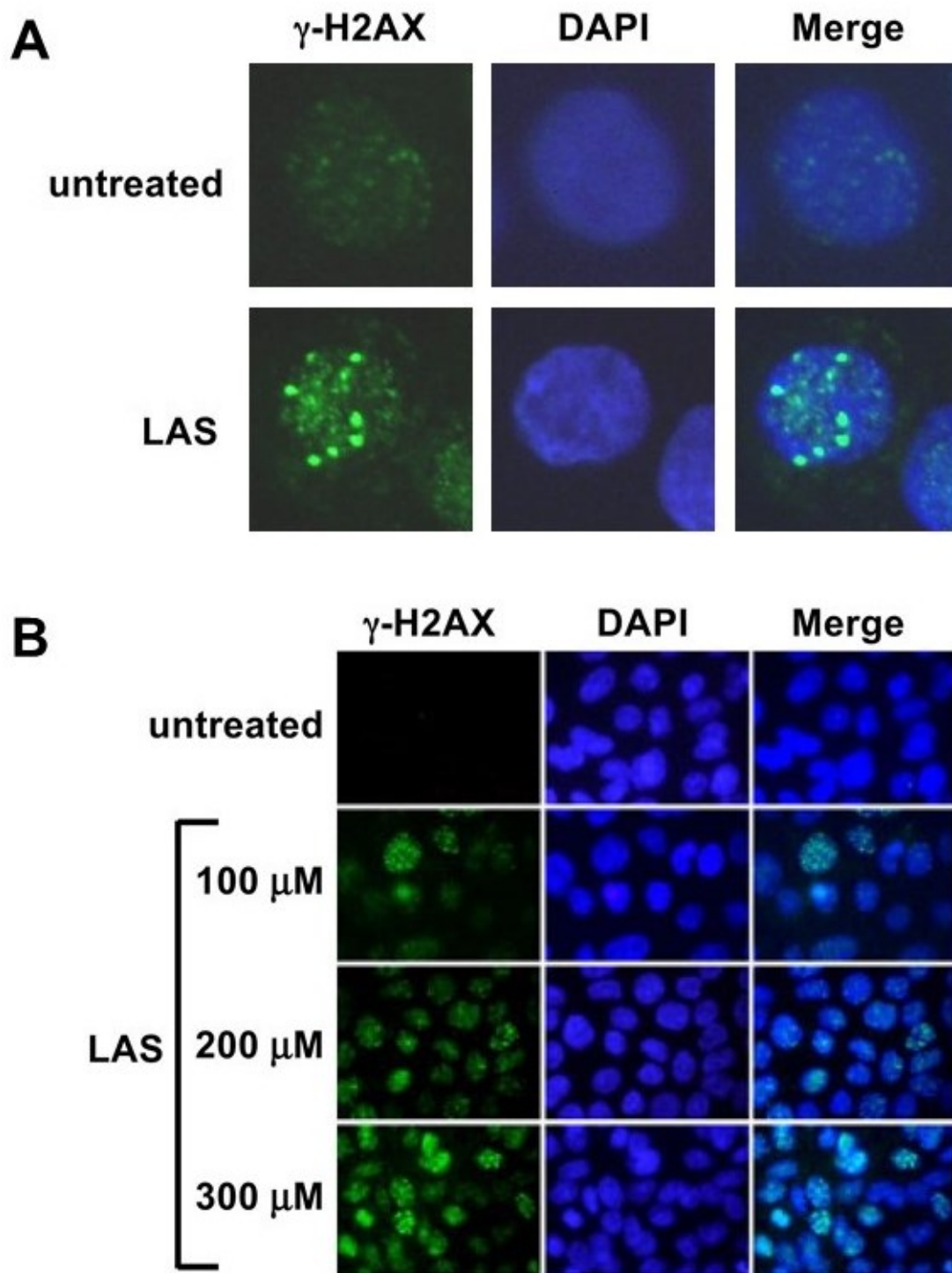


Fig. 37 Generation of γ -H2AX after treatment with LAS (MCF-7 cells).

(A) Images of γ -H2AX foci produced by treatment with LAS (100 μ M).

(B) Images of γ -H2AX foci 2 h after cells were treated LAS (100 – 300 μ M).

Nuclei were stained with DAPI and merged with the images for the generation of γ -H2AX.

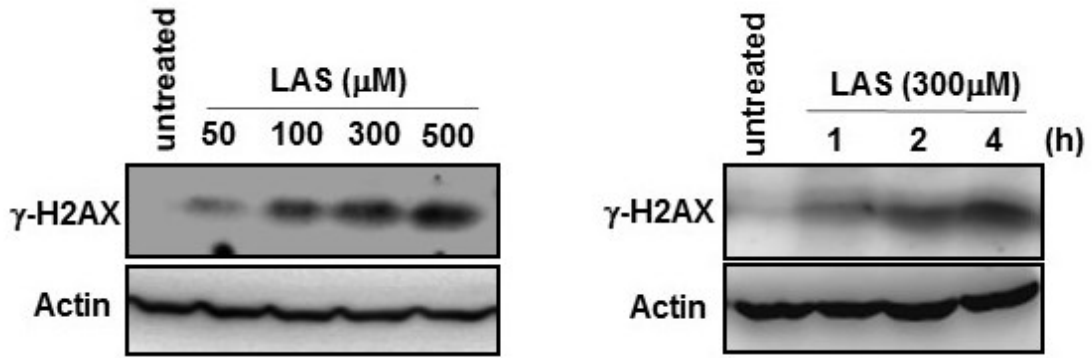


Fig. 38 Generation of γ -H2AX after treatment with LAS (MCF-7 cells).

Western blotting was performed for detection of γ -H2AX after treatment with LAS (50-500 μ M) or with LAS (300 μ M) for predetermined time (1, 2 and 4 h). Actin was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE.



Fig. 39 Generation of DSBs after treatment with LAS (MCF-7 cells).

DSBs were detected 2 h after treatment with LAS (50-500 μ M) by BSFGE. All experiments were repeated two or three times with similar results.

第四節 LAS による γ -H2AX 誘導メカニズム

4-1 実験材料および実験方法

4-1-1 実験材料

第三節 3-1-1 と同様のものを使用した。

4-1-2 細胞周期依存的 γ -H2AX の測定

第二章第三節 3-1-2 と同様の方法で行った。

4-1-3 FCM による細胞内活性酸素種 (ROS) の測定

第二章第三節 3-1-3 と同様の方法で行った。

4-2 実験結果

4-2-1 LAS 作用後の γ -H2AX 誘導と細胞周期との関連性

300 μ M の LAS を MCF-7 細胞に 30 分間作用させた後の γ -H2AX の誘導と細胞周期の関係について、FCM のドットプロット図を示した (Fig. 40)。細胞周期のドットカウント図 (図内左上) では、LAS 作用後においてもドット分布の変化が見られなかったことから、LAS 作用では細胞周期は変化しないことが示された。しかし、 γ -H2AX の蛍光強度はすべての細胞周期において LAS 処理された細胞で増加した。この結果から LAS 処理による γ -H2AX の誘導に細胞周期依存性は見られず、LAS が DSBs を直接的に引き起こしていることが示唆された。LAS により誘導された γ -H2AX は、ATM 阻害剤 (KU55933) を作用させると濃度依存的に減少した (Fig. 41)。この結果から、LAS 処理による γ -H2AX の誘導は ATM を介した伝達経路によって誘導されたことが示された。

これらの結果は、NPEO 作用の γ -H2AX の誘導メカニズムと同様な結果であった。

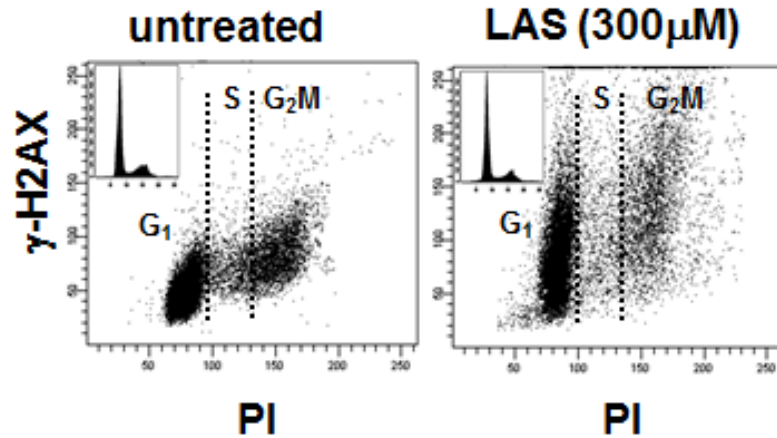


Fig. 40 Cell cycle and the generation of γ -H2AX after treatment with LAS (MCF-7 cells).

Cells treated with LAS (300 μ M) for 2 h were fixed and stained with the antibody for γ -H2AX and PI. Cell cycle phases and the correspondent generation of γ -H2AX were analyzed using FCM. Histograms show the cell cycle distribution; horizontal axis: DNA contents (PI), vertical axis: cell number.

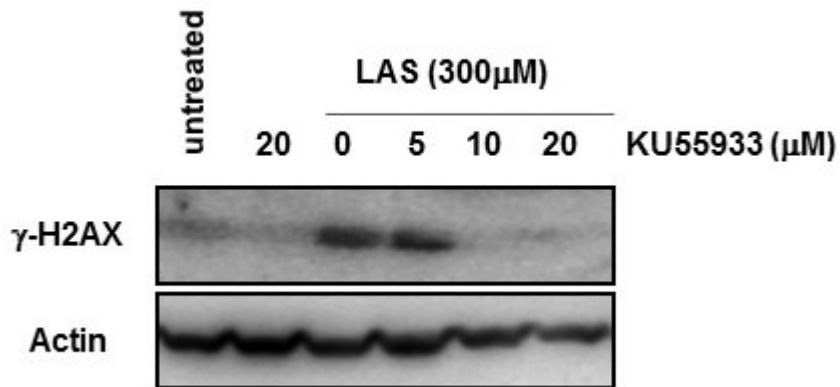


Fig. 41 Effect of the ATM inhibitor on the generation of γ -H2AX.

Cells were treated with the ATM inhibitor, KU55933, 30 min before being treated with LAS (MCF-7 cells).

4-2-2 LAS 作用後の γ -H2AX 誘導と ROS の関与

300 μ M の LAS を MCF-7 細胞に 2 時間、または 5 mM の H_2O_2 を 1 時間作用させた後、細胞内 ROS を DCFH-DA を用いて検出した (Fig. 42)。 H_2O_2 を作用させた細胞では高い ROS の検出が確認されたが、LAS を作用させた細胞ではわずかな検出にとどまった。酸化防止剤 (NAC) を 20 mM 加え、LAS (300 μ M) または H_2O_2 (5 mM) を作用させた結果では (Fig. 43)、NAC を添加することで H_2O_2 を作用させた細胞では γ -H2AX の誘導が抑制されたが、LAS を作用させた細胞では抑制されなかった。これらの結果から、LAS による γ -H2AX の誘導には、NPEO による作用と同様に、ROS が関与していないことが示された。

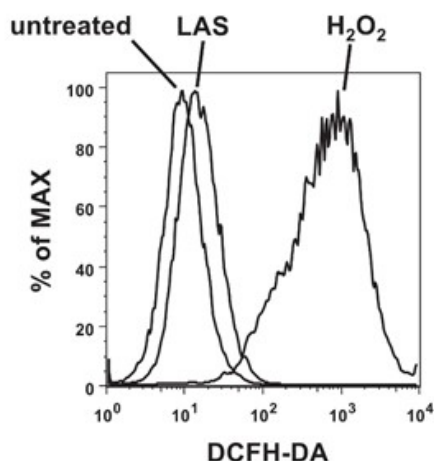


Fig. 42 Intracellular ROS formation after treatment with LAS.

Cells incubated in the presence of 10 μ M of DCFH-DA for 0.5 h were treated with LAS (300 μ M) or H_2O_2 (5 mM) for 1 h (MCF-7 cells). The fluorescence intensity of DCFH-DA was analyzed by FCM.

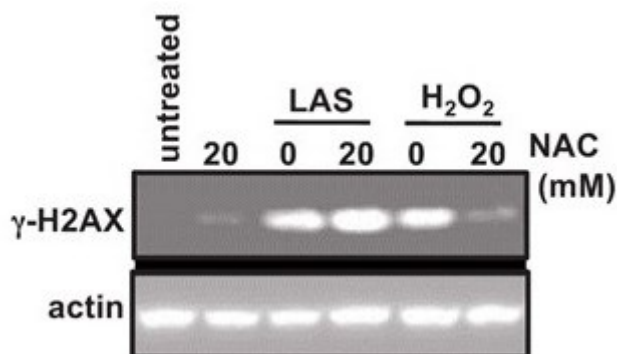


Fig. 43 Involvement of ROS in generation of γ -H2AX by LAS.

Cells incubated with NAC (0,20 mM) for 30 min were treated with LAS (300 μ M) or H_2O_2 (5 mM) for 1 h (MCF-7 cells). Actin is a standard for the equal loading.

第五節 LAS の紫外線照射による分解

5-1 実験材料および実験方法

5-1-1 実験材料

第一章第三節 3-1-1 および第二節 2-1-1 と同様のものを使用した。

(LAS、C₁₀LAS、C₁₃LAS)

5-1-2 LAS への紫外線照射

第一章第三節 3-1-2 と同様の方法で行った。

5-1-3 試料の調製

本実験に使用した側鎖平均 C₁₂ の LAS (以下、LAS) およびスタンダード LAS (C₁₀LAS、C₁₃LAS) を、10 mM 濃度の水溶液に調整後、実験用 LAS には 5-1-2 の条件で UVB を各線量 (100-1000 J/cm²) 照射し、1 mM の濃度でアセトニトリルに溶解し、HPLC 用試料とした。

5-1-4 HPLC 用移動相溶液の調製

移動相は 45 %アセトニトリル溶液に、1 mM の過塩素酸ナトリウム (NaClO₄) を添加し、ソニケーターで 30 分超音波処理し脱気したものを使用した。

5-1-5 HPLC 測定条件

測定は、LC-10A series (島津製作所) を用い、カラムはシリカカラム TSKgel Silica-150 (4.6mmID×25cm) (東ソー) を用い、カラム温度 25.0°C、流量 1.0 mL/min で行い、検出は UV 吸収 220 nm で行った。インジェクションはマニュアルインジェクターで行い、サンプルレーンは 5 μl を使用した。

5-2 実験結果

Fig. 44 に、スタンダード LAS (C₁₀LAS、C₁₃LAS) および LAS の UVB 照射後の分解物の HPLC パターンを示した。HPLC パターンでは、アルキル基鎖長が短いほど、検出速度が速くなっている。UVB 照射により照射線量依存的にピークが減少していることが確認された。スタンダード LAS のピークパターンから、鎖長が短くなるような分解の場合、検出時間の早い位置にピークが移動することが予測されるが、ピークの移動は見られずピークの減少のみが観察されていることから、NPEO と同様なベンゼン環の崩壊による分解が引き起こされている可能性が考えられた。

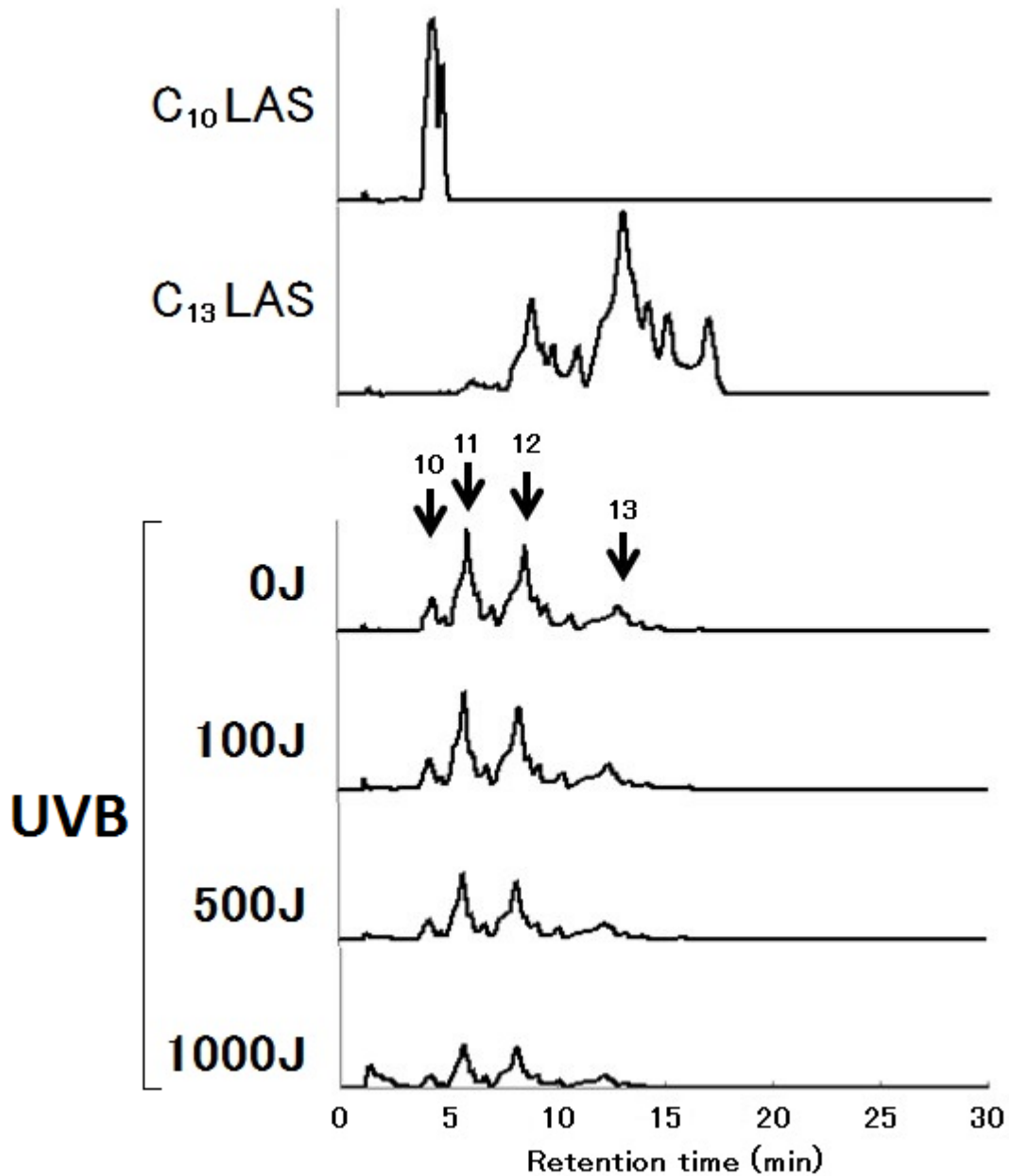


Fig. 44 Structures of LAS and HPLC patterns after exposure to UVB.

Standard LAS (C₁₀LAS and C₁₃LAS) and UVB (0-1000 J/cm²)-irradiated LAS were analyzed using HPLC. The arrows indicated LAS with each alkyl radical.

第六節 紫外線照射 LAS の培養細胞への影響

6-1 実験材料および実験方法

6-1-1 実験材料

第二節 2-1-1 と同様のものを使用した。

6-1-2 実験方法

PBS(-)で 10 mM 濃度に調整した LAS 溶液を、第二章第三節 3-1-2 の条件で線量 500 J/cm² で UVB 照射した。照射した LAS 溶液を、最終濃度が 300 μM となるように培養培地で希釈し、実験に使用した。細胞の増殖率の測定は、第一章第二節 2-1-3 と同様の方法で行った。

6-2 実験結果

Fig. 45 に LAS 作用 48 時間後の NIH-3T3 細胞における細胞増殖率変化を示す。LAS 作用により有意に細胞増殖は減少した。500 J/cm² の UVB 照射された LAS ではその減少が有意に抑制された。この結果から、LAS も NPEO と同様に紫外線照射によって LAS が分解し、その毒性が減少することが確認された。

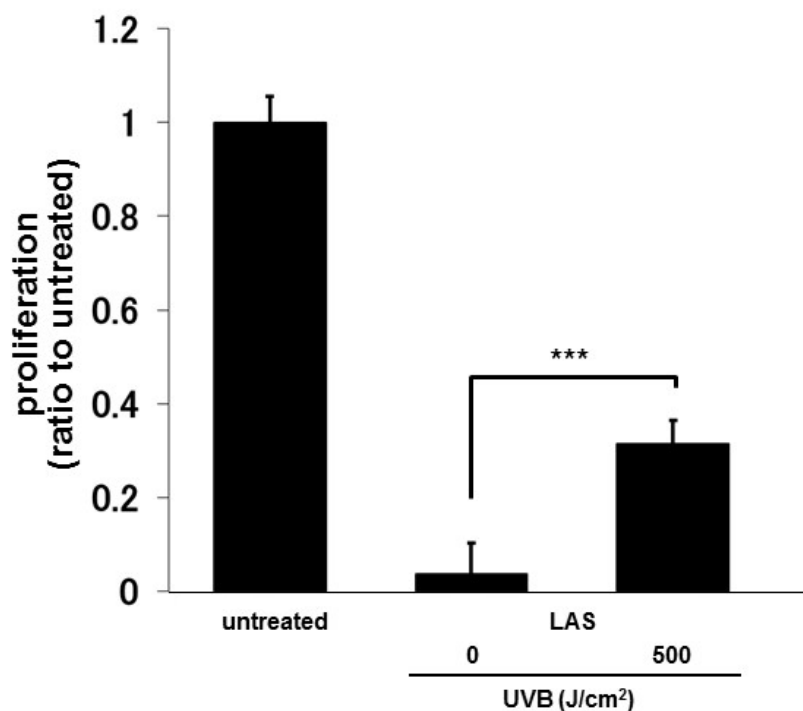


Fig. 45 Effect of LAS degraded by UVB irradiation on cell proliferation.

NIH-3T3 cells were incubated with LAS (conc.300 μM) irradiated with UVB (500 J/cm²). The fluorescence intensity of alamarBlue was measured as in LAS. Values are means ± S.D. (n = 5). Significant differences from untreated cells are represented by ***p < 0.001.

第七節 紫外線照射 LAS による γ -H2AX の誘導およびそのメカニズム

7-1 実験材料および実験方法

7-1-1 実験材料

第三節 3-1-1 と同様のものを使用した。

7-1-2 紫外線照射試料の調製

第六節 6-1-2 と同様のものを使用した。

7-1-3 実験方法

γ -H2AX の測定は、第二章第二節 2-1-4 と同様の方法で行った。

DSBs の測定は、第二章第二節 2-1-5 と同様に行った。

細胞周期依存的 γ -H2AX の測定は、第二章第三節 3-1-2 と同様の方法で行った。

7-2 実験結果

7-2-1 紫外線照射 LAS 作用後の γ -H2AX の誘導

Fig. 46 に、UVB 照射 (1000 J/cm^2) 後の LAS を MCF-7 細胞に $300 \mu\text{M}$ 作用させ、2 時間後の γ -H2AX 免疫蛍光染色像を示す。LAS で処理された細胞は核内に γ -H2AX のドット状の蛍光が鮮明に観察されたのに対し、UVB 照射後の LAS で処理された細胞では、ドット状の蛍光が少なくなっていた。

ウエスタンブロッティング法の結果においても、LAS への UVB 照射により線量依存的に γ -H2AX が減少することが確認された (Fig. 47)。この結果から、UVB 照射により、LAS が分解し、DNA 損傷性が抑制されていることが示された。

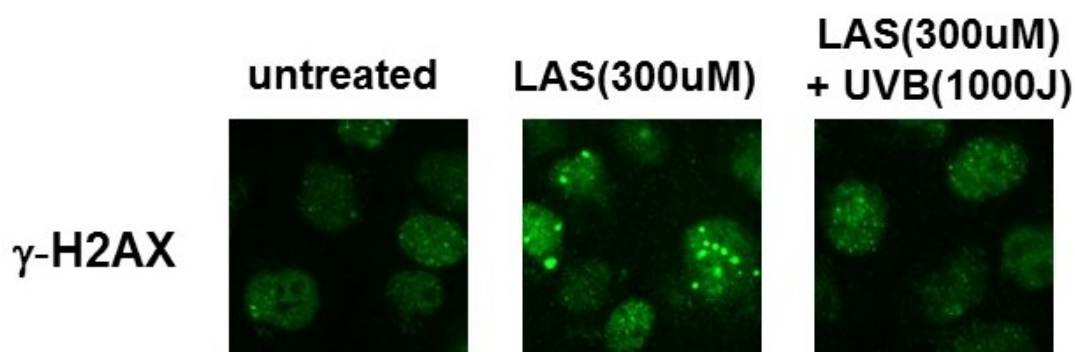


Fig. 46 Images of γ -H2AX foci after treatment with UV-irradiated LAS (MCF-7 cells).

γ -H2AX foci produced by treatment with UVB-irradiated (1000 J/cm^2) LAS ($300 \mu\text{M}$) for 2 h were determined.

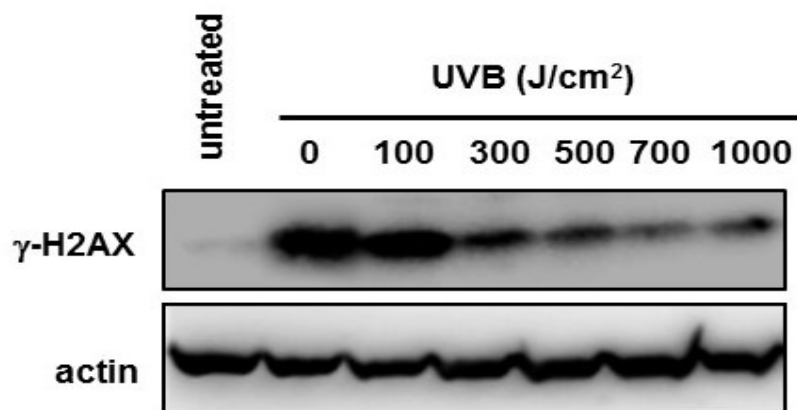


Fig. 47 The generation of γ -H2AX after treatment with LAS exposed to UVB (MCF-7 cells).

Western blotting was performed for detection of γ -H2AX after treatment with UVB-irradiated (100-1000 J/cm²) LAS (300 μ M) for 2 h. Actin was used as a standard for the equal loading of proteins for SDS-PAGE.

7-2-2 紫外線照射 LAS 作用後の DSBs の生成

UVB を各線量(100-1000 J/cm²)照射した LAS を MCF-7 細胞に 2 時間作用させ、DSBs の誘導を BSFGE にて確認した (Fig. 48)。その結果、各線量で DSBs の検出が線量依存的に減少した。これは、 γ -H2AX の生成の結果とほぼ一致した。また NPEO および紫外線照射 NPEO 分解物の作用による DSBs 誘導と同様の結果であった。



Fig. 48 Generation of DSBs after treatment with LAS exposed to UVB (MCF-7 cells).

Detection of DSBs 2 h after treatment with UVB (100-1000 J/cm²)-irradiated LAS (300 μ M) was performed by BSFGE.

7-2-3 紫外線照射 LAS による γ -H2AX 誘導と細胞周期との関連性

Fig. 49 に UVB 照射 (500、1000 J/cm²) した 300 μ M の LAS を MCF-7 細胞に 30 分間作用後の γ -H2AX の誘導と細胞周期の関係について、FCM のドットプロット図を示した。細胞周期のドットカウント図 (data not shown) では、UVB 照射 LAS 分解物作用後においてドット分布に変化が見られず細胞周期は変化しなかったが、LAS 分解物で処理された細胞において、すべての周期に γ -H2AX の誘導が観察され、また LAS への UVB 照射線量が増加するに従い γ -H2AX の誘導が減少した。

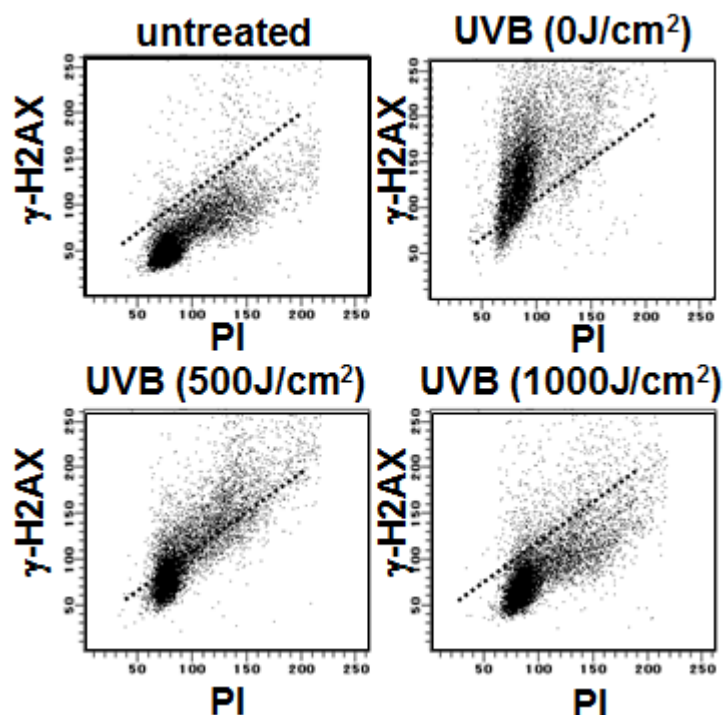


Fig. 49 Cell cycle and the generation of γ -H2AX after treatment with LAS exposed to UVB.

Cells treated with UVB-irradiated (500,1000 J/cm²) LAS (300 μ M) for 2 h were fixed and stained with the antibody for γ -H2AX and PI (MCF-7 cells). Cell cycle phases and the correspondent generation of γ -H2AX were analyzed using FCM. γ -H2AX-positive cells were gated (upper dotted positive slope).

第八節 考察

本章において培養細胞の増殖率に対するLASの影響を検討した。LAS 300 μM の濃度で細胞増殖率が95%以上減少した (Fig. 36)。この濃度は、水系生物における IC_{50} 0.5 mg/Lよりも低い数値である。皮膚に接触したLASは、皮膚内への吸収は低いが、皮膚表面上に長時間留まるため[80]、その影響は無視できない。次にLASの細胞への遺伝毒性について $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導を指標として検討した。LASによる $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導は、NPEO作用と同様に細胞内にドット状の蛍光が鮮明に確認され (Fig. 37A)、それは濃度依存的に増加し (Fig. 37B、38)、また作用時間依存的であった (Fig. 38)。この結果は、LASの突然変異試験での結果[77]や染色体異常の確認では陰性という結果[78]と反し、遺伝毒性が確認されたことを示している。また、NPEOと同様に50 μM の低濃度から $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導が確認されているため、アポトーシスを反映した $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導ではないと推察される。この濃度での影響は、オオミジンコの LC_{50} の濃度 (1.2 – 53.1 mg/L)よりもはるかに低い濃度である。

LASは、DSBsの生成もNPEO作用と同様に引き起こし、また、細胞周期との関連性 (Fig. 40)やATM阻害剤を併用した際の結果 (Fig. 41)も、NPEO作用と同じ結果となった。そのため、LASおよびNPEOを作用させた際の $\gamma\text{-H2AX}$ を引き起こした一連の経路は同じであり、起因させる要因はNPEOとLASともに同じである可能性が示唆された。また、LASが好氣的条件化で分解される際、アルキル基末端のメチル基が酸化されてカルボキシル基を生じ、さらに酸化が進むことでアルキル基の酸化短縮が起こることによる抗酸化作用などが報告されている[81、82]が、ROS生成や酸化防止剤NAC添加への影響は見られなかった (Fig. 42、43)。したがって、NPEOと同様にROSなどの酸化ストレスが関与していない系による $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導であると推察された。NPEOおよびLASによるDSBsの誘導以外に界面活性剤 (Triton-X)によるDSBsの誘導も、ゲノム外損傷によって引き起こされていること[83]から、さまざまな界面活性剤において同様経路をたどり、DSBs生成からの $\gamma\text{-H2AX}$ 誘導によるリスクがある可能性が示唆された。

本章では、紫外線照射によるLASの分解およびその分解物の培養細胞への影響についても検討した。LASのUVB分解では、その分解物作用後の細胞増殖率は未照射と比べ有意に増加していた。またこれらの結果は、オオミジンコの LC_{50} において C_{11}LAS が15.8 mg/Lに対しその微生物分解中間体であるスルホフェニルアルキルカルボン酸塩 (C_{11}SPC)では355 mg/Lであった結果[79]と一致する。紫外線照射されたLAS分解物によるDSBs生成および $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導についても、紫外線照射によりその生成や誘導が線量依存的に減少しているため (Fig. 47、48)、その遺伝毒性が減少していると考えられた。今回、紫外線照射によるLAS分解のメカニズムとその分解物の特定はできなかったが、紫外線照射がその毒性を減少させるのに有用であることが確認された。環境中のLASは、有酸素条件下でスルホフェニルアルキルカルボン酸 (SPC)などの中間生成物をとめないながら微生物分解されている[81–83]。中間生成物であるSPCの分解は、脱スルホン化やベンゼン環の開環によって引き起こされるが、その進行は緩やかである[84、85]。UVB照射したLASにおいては、検出ピークの早い時間への移動は確認されず、検出ピークの減少のみが引き起こされた (Fig. 44)ことから、アルキル基鎖長の短縮は発生せずにベンゼン環の崩壊が進行してい

ると推察された。また、UVB 照射 1000 J/cm^2 では検出ピークがほとんど検出されていないことから、LAS のベンゼン環崩壊がかなり進行していると考えられた。この結果は、UVB を 1000 J/cm^2 照射する時間がほぼ 1 週間程度であったことから、約 1 週間の紫外線照射により LAS を完全分解させた後に環境へ放出させることで、環境への負荷を低減させることが可能性であると考えられた。

これらの結果から、LAS や NPEO を含む界面活性剤は、DSBs 生成および $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導に関連した遺伝毒性のリスクを有しているが、これら界面活性剤に紫外線を過剰量照射することでそのリスクを軽減させることが可能であると考えられた。また、 $\gamma\text{-H2AX}$ が界面活性剤の種類に依存せず検出されたことから、NPEO、LAS 以外の界面活性剤についてもその遺伝毒性のリスクが懸念され、さらにこれらの影響は特定のレセプターに働きかける内分泌攪乱物質のエストロゲン様活性などと異なり、すべての細胞に遺伝的な影響を及ぼすと考えられるため、その重要性は高いと思われ、今後さらなる検討が必要である。

総括

化学物質、なかでも界面活性剤は現在様々な分野と製品で利用されている物質である。界面活性剤の歴史は古く、紀元前から最初の界面活性剤「石鹼」が作られ、人々に利用されてきた。その後 18 世紀半ば頃から起こった産業革命によって工業用の化学物質も発展を続け、日本国内においても明治初期から界面活性剤の繊維工業での利用で技術革新が進んでいった。この間大量に生産された界面活性剤は、その後消費され、そのほとんどが環境中へ流出された。そのため、人を含めた多くの生態系に影響を及ぼしていると考えられるが、環境中での界面活性剤の分解物とヒトへの毒性を直接的に結ぶ報告は少なく、その中間生成物の毒性変化にまで着目した報告は少ない。

第一章では、現在生産量の多くを占める非イオン系界面活性剤、中でもノニルフェノールポリエトキシレイト(NPEO)に着目し、その培養細胞への影響を検討した。各種ヒト培養細胞に異なる側鎖 2~70 の NPEO を作用させると濃度依存的に細胞増殖率が減少した。また NPEO の側鎖が短くなるにつれその減少は顕著であり、特に側鎖 10、15、20 の NPEO で高い細胞毒性を示した。これは NPEO(1.5、9、15、40)を作用させた水系生物の LC₅₀ への影響を調査した結果と同様に、側鎖の短い NPEO ほど毒性が高いことを示している。ヒトにおいては、NPEO が短時間で経皮吸収されることから、人体への影響が懸念される。

次に、環境中に流出した際に受けている紫外線照射による NPEO の分解、反応中間体の毒性について解析した。NPEO の紫外線照射による分解では、NPEO(70)において 750 J/cm² 線量以上の UVA 照射で側鎖 15 以下の NPEO が生成した。UVB 照射では、まず NPEO の側鎖 15 近傍で切断が起こり、その後ベンゼン環の崩壊まで分解が進行した。UVC 照射ではその影響がより顕著に起こり、短時間で NPEO がベンゼン環まで崩壊した。本実験で使用した UVA、UVB 波長の紫外線は、通常地表に届く線量とあまり大差がないことから、これら紫外線照射による NPEO の分解は、嫌気性の微生物によって分解される工程よりも効率的な分解を引き起こしていることが示唆された。紫外線照射された NPEO(70)の分解生成物による培養細胞への毒性は、側鎖の切断と相関しており、毒性の現れなかった NPEO(70)が側鎖 15 以下への切断に伴って毒性が増加した。その後、UVB や UVC 照射においては、照射によるベンゼン環の崩壊に伴って毒性が低下した。また、高い毒性を示した NPEO(10)の紫外線照射分解生成物については、UVA 照射では構造変化が認められず高い細胞毒性を維持していたが、UVB や UVC 照射ではベンゼン環の崩壊が起こり、それに伴って細胞毒性が低下した。これらの結果から、毒性の現れなかった側鎖の長い NPEO は、地表に到達している UVA の暴露によって、側鎖の短い NPEO に変化することで細胞毒性が増加する一方、毒性の高い側鎖の短い NPEO は環境中の UVA 照射では高い毒性を維持し続けるため、生態系へのリスクを高めていると考えられた。しかし、UVB や UVC など高エネルギーの紫外線照射においては、NPEO のベンゼン環崩壊を引き起こし、それに伴って細胞毒性を低下させたことから、環境中での毒性低下に貢献していることが考えられた。

第二章では、NPEO の遺伝的影響をヒストン H2AX のリン酸化(γ -H2AX)に着目して検討した。側鎖 10 から 20 の NPEO を作用させたヒト乳癌由来細胞 MCF-7 細胞において、 γ -H2AX の誘導および DSBs の誘導が濃度依存的、作用時間依存的に増加した。これは

NPEO が遺伝的毒性を有する可能性は低いとされていたこれまでの報告と異なり、遺伝的毒性がある可能性を示していた。この誘導は、25 μM の低濃度の NPEO 作用から有意に観察されたことから、NPEO の遺伝的影響へのリスクの高さを示すとともに、 $\gamma\text{-H2AX}$ を用いた遺伝毒性の評価方法の感度の高さを示している。一方、側鎖 70 の NPEO では、 $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導および DSBs の誘導は認められず、側鎖の短い NPEO から側鎖 15 に向かって誘導が増加し、側鎖 15 から側鎖 70 に向かって誘導が減少することが確認された。 $\gamma\text{-H2AX}$ 誘導のメカニズムにおいては、NPEO 作用後の $\gamma\text{-H2AX}$ 誘導に細胞周期依存性は認められず、DNA の複製過程から起こる間接的な DSBs ではなく直接的な DSBs であることが示された。ATM 阻害剤や DNA-PK 阻害剤の添加、 H_2O_2 および NAC などを用いた検討で、ROS などの酸化ストレスが関与しない DNA に直接的な作用を及ぼす何らかの経路によることが示され、また、ATM や DNA-PK を介した応答により $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導が引き起こされることが示された。しかし、DNA プラスミドを用いた *in vitro* 系で検証した結果では、sc-DNA が oc-DNA に転換されなかったため、何らかの細胞内イベントによって DSBs が引き起こされていると考えられた。

紫外線照射による NPEO の遺伝毒性の変化については、側鎖 70 の NPEO に紫外線を照射すると、側鎖 15 以下の NPEO の生成に伴って、 $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導が増加し、その後 UVB や UVC 照射では NPEO のベンゼン環崩壊の進行に伴って $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導が減少した。紫外線照射した側鎖 10 の NPEO においては、エネルギーの低い UVA 照射では $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導がほとんど変化しなかったが、エネルギーの高い UVB や UVC 照射では $\gamma\text{-H2AX}$ 誘導が低下した。これらの結果から、側鎖の長い遺伝毒性の低い NPEO は、側鎖の短い NPEO に変化し、遺伝毒性が増加することが示された。しかし、高エネルギーの UVB や UVC の長時間照射は、側鎖の短い NPEO をさらに分解しその毒性を低減させることが示された。第一、二章で得られた結果は、環境中に流出した NPEO の分解生成物のリスク評価の必要性を示唆するとともに、高エネルギー紫外線照射の環境浄化システムへの応用の可能性を期待させた。

第三章では、非イオン系界面活性剤に次いで生産量の多い陰イオン系界面活性剤である直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS) に着目して検討を行った。LAS 作用によって細胞増殖率が有意に減少したが、これは水系生物の IC_{50} へ及ぼした影響の際の濃度よりも低い数値で現れた。また、 $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導を指標にした遺伝的影響においても、濃度依存的、作用時間依存的に増加した。 $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導の経路については NPEO と同様な経路によって引き起こされていることが確認されたため、化学構造に特異的な発現要因ではなく、界面活性剤全般にこれらの発現リスクが存在する可能性が示唆された。紫外線照射による影響については、NPEO と同様に LAS への紫外線照射によって LAS の分解が進み、その遺伝毒性も含めた細胞毒性が減少した。しかしその分解過程は異なり、NPEO は側鎖 (エチレンオキシド基) が分解された後、ベンゼン環が分解されているのに対し、LAS は側鎖 (アルキル基) の分解は起こらずにベンゼン環の分解が起こっていた。UVB 照射による LAS の分解は、照射時間がおおよそ 7 日程度であり、環境中の微生物による分解時間 (約 28 日) よりも進行が早いと、環境中へ流出する際のリスク低減が期待された。

本研究では、NPEO、LAS それぞれの界面活性剤の細胞毒性および遺伝毒性、また、紫外線照射による分解と分解物の毒性変化について検討した。NPEO と LAS は、 γ -H2AX を誘導することから遺伝毒性を有していることが明らかとなった。また、 γ -H2AX が界面活性剤の種類に依存せず検出されたことから、NPEO、LAS 以外の界面活性剤についてもその遺伝毒性のリスクが懸念され、さらにすべての細胞に遺伝毒性を示す可能性が示唆されたため、その重要度は高いと考えられる。しかし、界面活性剤自身に直接 DNA 損傷を誘導する能力がないことが明らかとなり、 γ -H2AX 誘導メカニズムについては今後の検討が必要である。UVB や UVC などの高エネルギー紫外線の長時間照射は、これら界面活性剤を効果的に分解し、遺伝毒性を低下させたことから、浄化システムへの応用が期待される。一方、界面活性剤によっては、紫外線照射により毒性の高い反応中間体に変化することが明らかとなり、それらのリスク評価の必要性が望まれる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻をいただきました静岡県立大学 大学院薬食生命科学総合学府 食品栄養環境科学研究所 光環境生命科学研究室 伊吹裕子教授ならびに、豊岡達士元助教、また、静岡県立大学 大学院生活健康科学研究科 五島廉輔元教授、五島綾子元教授、加治和彦元教授に心より御礼申し上げます。また、本研究における界面活性剤のサンプルをご提供いただいた、日本油脂株式会社様、花王株式会社様に深く御礼申し上げます。さらに、ご多忙の中、査読していただきました静岡県立大学 大学院薬食生命科学総合学府 食品栄養環境科学研究所 下位香代子教授、牧野正和准教授、増田修一准教授に感謝いたします。最後になりますが、長年にわたり私の研究活動を多方面から支えてくださいました皆様に、この場を借りて御礼申し上げます。本当にありがとうございました。

参考文献

- [1] 平成 27 年 経済産業省 生産動態統計年報 化学工業統計編(経済産業省大臣官房調査統計グループ)
- [2] 洗剤・環境科学研究会 編“洗剤の安全性と環境影響に関する文献・資料総覧”、合同出版、p19 (1997)
- [3] Renner, R. :European bans on surfactant trigger transatlantic debate., *Environ. Sci. Technol.*, **31**(7), 316A-320A (1997)
- [4] Ball, H. A. Reinhard, M and McCarty, P. L. :Biotransformation of halogenated and nonhalogenated octylphenol polyethoxylate residues under aerobic and anaerobic conditions., *Environ. Sci. Technol.*, **23**(8), 951-961 (1989)
- [5] European Commision :International Uniform Chemical Information Database IUCLID Data Set (CAS.84852-15-3) (2000)
- [6] 牧 秀明 著 “非イオン界面活性剤アルキルフェノールエトキシレイト(APE)の生分解性と水環境中挙動に関する研究”、大阪大学 工学部 環境工学科 1995 年度 博士論文
- [7] Rudling, L. :Swedish Water and Air Pollution Laboratory Report B134., *Swedish Water and Air Pollution Laboratory Stockholm* (1972)
- [8] 小島節子 渡辺正敏、水環境学会誌 21、“名古屋市内の水環境中のアルキルフェノールポリエトキシレイト(APE)および分解生成物の分布”、水環境学会 編、p302-309 (1998)
- [9] Ahel, M. Giger, W. and Schaffner, C. :Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment- II Occurrence and transformation in river., *Water Res.*, **28**, 1143-1152 (1994)
- [10] Hasan, T. and Khan, A. U. :Phototoxicity of the tetracyclines: photosensitized emission of singlet delta dioxygen., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**, 4604-4606 (1986)
- [11] Horio, T. and Okamoto, H. :Oxygen intermediates are involved in ultraviolet radiation-induced damage of langerhans cells., *J. Invest. Dermatol.*, **88**, 699-702 (1987)

- [12] Masaki, H. Atsumi, T. and Sakurai, H. :Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **206**(2), 474-479 (1995)
- [13] Cadet, J. Odin, F. Mouret, J. F. Polverelli, M. Audic, A. Giacomoni, P. Favier, A. and Richard, MJ. :Chemical and biochemical postlabeling methods for singling out specific oxidative DNA lesions., *Mutat. Res.*, **275**, 343-354 (1992)
- [14] Tyrrell, R. M. :Induction of pyrimidine dimmers in bacterial DNA by 365nm radiation., *Photochem. Photobiol.*, **17**, 69-73 (1973)
- [15] Peak, M. J. and Peak, J. G. :Single-strand breaks induced in *bacillus subtilis* DNA by ultraviolet light: action spectrum and properties., *Photochem. Photobiol.*, **35**, 675-680 (1982)
- [16] Han, A. Peak, M. J. and Peak, J. G. :Induction of DNA-protein cross-linking in Chinese hamster dells by monochromatic 365 and 405nm ultraviolet light., *Photochem. Photobiol.*, **39**, 343-348 (1984)
- [17] Nakajima, T. and Yukawa, O. :Radiation-induced translocation of protein kinase C through membrane lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes., *Int. J. Radiat. Biol.*, **70**(4), 473-480 (1996)
- [18] Pourzand, C. and Tyrrell, R. M. :Apoptosis, the role of oxidative stress and example of solar UV radiation., *Photochem. Photobiol.*, **70**(4), 380-390 (1999)
- [19] Hidaka, H. Kubota, H. Gratzel, M. Serpone, N. and Pelizzetti, E. :Photodegradation of surfactants; degradation of sodium dodecylbenzene sulfonate in aqueous semiconductor dispersions., *Nouv. J. de Chim.*, **9**(2), 67-69 (1985)
- [20] Chen, L. Zhou, H. Y. and Deng, Q. Y. :Photolysis of nonylphenol ethoxylates: the determination of the degradation kinetics and the intermediate products., *Chemosphere*, **68**, 354-359 (2007)
- [21] Castillo, M. Penuela, G. and Barcelo, D. :Identification of photocatalytic degradation products of non-ionic polyethoxylated surfactants in wastewaters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometric detection., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **369**, 620-628 (2001)

- [22] Hall, W. S. Patoczka, J. B. Mirenda, R. J. Porter, B. A. and Miller, E. : Acute toxicity of industrial surfactants to *Mysidopsis bahia*., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **18**, 765-772 (1989)
- [23] 木山秀樹、池田勉 : 解散植物プランクトンの成長に及ぼす界面活性剤の似るフェノール枝ときしレートとその分解産物ノニルフェノールの急性毒性に関する予備的研究、北海道大学水産科学研究彙報、53(2), p63-67 (2002)
- [24] Harris, R. M. Waring, R. H. Kirk, C. J. and Hughes, P. J. : Sulfation of “Estrogenic” alkylphenols and 17 β -Estradiol by human platelet phenol sulfotransferases., *J. Biol. Chem.*, **275**(1), 159-166 (2000)
- [25] Suiko, M. Sakakibara, Y. and Liu, MC. : Sulfation of environmental estrogen-like chemicals by human cytosolic sulfotransferases., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **267**, 80-84 (2000)
- [26] Hood, T. E. Calabrese, E. J. and Zuckerman, B. M. : Detection of an estrogen receptor in two nematode species and inhibition of binding and development by environmental chemicals., *Ecotoxi. Environ. safe.*, **47**, 74-81 (2000)
- [27] Nimrod, A. C. and Benson, W. H. : Xenobiotic interaction with and alteration of channel catfish estrogen receptor., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **147**, 381-390 (1997)
- [28] 西川淳一、今川正良、西原力、“内分泌攪乱物質の核内ホルモン受容体に対する影響”、実験医学4月号(羊土社)、18(6)、p731-736 (2000)
- [29] Yoshimura, K. : Biodegradation and fish toxicity of nonionic surfactants., *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **63** (12), 1590-1596 (1986)
- [30] Macek, K. J. and Krzeminski, S. F. : Susceptibility of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) to nonionic surfactants., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **13**(3), 377-384 (1975)
- [31] Ying, G. G. : Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment., *Environ. Int.*, **32**, 417-431 (2006)

- [32] Soares, A. Guieysse, B. Jefferson, B. Cartmell, E. Lester, J. N. :Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters., *Environ. Int.* **34**, 1033-1049 (2008)
- [33] Lee, P. C. Lee, W. :In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats, *Environ. Contam. Toxicol.* **57**, 341-348 (1996)
- [34] Pedersen, S. N. Christiansen, L. B. Pedersen, K. L. Korsgaard, B. Bjerregaard, P. :In vivo estrogenic activity of branched and linear alkylphenols in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss), *Sci. Total Environ.*, **233**, 89-96 (1999)
- [35] Berol Kemi A. B. :Nonylphenol acute oral toxicity in rats., *Inveresk Research International project no. 230086*, report no.2379 NTIS OTS 0558750. (1982)
- [36] De Jager, C. Bornman, M. S. Wandrag, S. and Sharp, V. W. :Lethal dose and reproductive parameters of p-nonylphenol in rats., *Archives of Andrology*, **46**, 183-187 (2001)
- [37] Monteiro-Riviere, N. A. van Miller, J. P. Simon, G. Joiner, R. L. Brooks, J. D. and Riviere, J. E. :Comparative in vitro percutaneous absorption of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates (NPE-4 and NPE-9) through human, porcine and rat skin., *Toxicol. Indust. Health.*, **16**, 49-57 (2000)
- [38] Pelizzetti, E. Minero, C. Maurino, V. Sclafani, A. Hidaka, H. and Serpone, N. : Photocatalytic degradation of nonylphenol ethoxylated surfactants., *Environ. Sci. Technol.*, **23**, 1380-1385 (1989)
- [39] 堀越智、渡辺奈津子、日高久夫、“内分泌攪乱物質ノニルフェノールおよびノニルフェノールポリエトキシレート界面活性剤の二酸化チタン光触媒による分解処理”、日本油化学会誌 第49巻6号(日本油化学会)、p61-69 (2000)
- [40] Brand, N. Mailhot, G. and Bolte, M. :The interaction “light, Fe(III)” as a tool for pollutant removal in aqueous solution: Degradation of alcohol ethoxylates., *Chemosphere*, **40**, 395-401 (2000)
- [41] Liu, G. Zheng, S. Xing, X. Li, Y. Yin, D. Ding, Y. and Pang, W. :Fe(III)-oxalate complexes mediated photolysis of aqueous alkylphenol ethoxylates under simulated sunlight conditions., *Chemosphere*, **78**, 402-408 (2010)

- [42] Ahel, M. Scully, F. E. Hoigne, J. and Giger, W. :Photochemical degradation of nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates in natural waters., *Chemosphere*, **28**, 1361-1368 (1994)
- [43] Rogakou, E. P. Pilch, D. R. Orr, A. H. Ivanova, V. S. and Bonner, W. M. :DNA doublestranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139., *J. Biol. Chem.* **273**, 5858-5868 (1998)
- [44] Bonner, W. M. Redon, C. E. Dickey, J. S. Nakamura, A. J. Sedelnikova, O. A. Solier, S. and Pommier, Y. :GammaH2AX and cancer., *Nat. Rev. Cancer*, **12**, 957-967 (2008)
- [45] Mah, L. J. El-Osta, A. and Karagiannis, T. C. :Gammah2ax: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair., *Leukemi*, **24**, 679-686 (2010)
- [46] Rogakou, E. P. Pilch, D. R. Orr, A. H. Ivanova, V. S. and Bonner, W. M. :DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139., *J. Biol. Chem.* **273(10)**, 5858-5868 (1998)
- [47] Marková, E. Torudd, J. and Belyaev, I. :Long time persistence of residual 53BP1/ γ -H2AX foci in human lymphocytes in relationship to apoptosis, chromatin condensation and biological dosimetry., *Int. J. Radiat. Biol.*, **87(7)**, 736-745 (2011)
- [48] Harreus, U. A. Wallner, B. C. Kastenbauer, E. R. and Kleinsasser, N. H. :Genotoxicity and cytotoxicity of 4-nonylphenol ethoxylate on lymphocytes as assessed by the Comet assay., *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **82**, 395-401 (2002)
- [49] Park, S. Y. and Choi, J. :Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure., *Environ. Int.*, **33**, 817-822 (2007)
- [50] Seike, N. Wanibuchi, H. Morimura, K. Wei, M. Nishikawa, T. Hirata, K. Yoshikawa, J. and Fukushima, S. :Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344 rat multiorgan carcinogenesis model., *Cancer Lett.*, **192**, 25-36 (2003)
- [51] Fukamachi, K. Han, B. S. Kim, C. K. Takasuka, N. Matsuoka, Y. Matsuda, E. Yamasaki, T. and Tsuda, H. :Possible enhancing effects of atrazine and nonylphenol on 7,12-dimethylbenz[a] anthracene-induced mammary tumor development in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats., *Cancer Sci.*, **95**, 404-410 (2004)

- [52] 厚生省 生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修、化学物質点検推進連絡協議会編、化学物質毒性試験報告 4, 749-772 (1996)
- [53] (財)化学物質評価研究機構、CERI 有害性評価書 ノニルフェノール(CAS 登録番号:25154-52-3)
- [54] (財)化学物質評価研究機構、CERI 有害性評価書 ポリ(オキシエチレン)ノニルフェニルエーテル(CAS 登録番号:9016-45-9)
- [55] 名古屋市内水域における非イオン界面活性剤ノニルフェノールエトキシレートの経年変化, 名古屋市、所報第 39 号、(2009)
- [56] Sedelnikova, O. A. Pilch, D. R. Redon, C. and Bonner, W. M. :Histone H2AX in DNA damage and Repair., *Cancer Biology & Therapy*, **2(3)**, 233-235 (2003)
- [57] Sandeep, B. Benjamin, P. C. Murphy, M. and Kurimasa, A. :ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks., *J. Biol. Chem.* **276(45)**, 42462-42467 (2001)
- [58] Kataoka, Y. Bindokas, V. P. Duggan, R. C. Murley, J. S. and Grdina, D. J. :Flow cytometric analysis of phosphorylated histone H2AX following exposure to ionizing radiation in human microvascular endothelial cells., *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, **47**, 245-257 (2006)
- [59] Tanaka, T. Huang, X. Halicka, H. D. Zhao, H. Traganos, F. Albino, A. P. Dai, W. and Darzynkiewicz, Z. :Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents., *Cytometry*, **A71**, 648-661 (2007)
- [60] Burma, S. Chen, B. P. Murphy, M. Kurimasa, A. and Chen, D. J. : ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks., *J. Biol. Chem.*, **276**, 42462-42467 (2001)
- [61] Rogakou, E. P. Nieves-Neira, W. Boon, C. Pommier, Y. and Bonner, W. M. :Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139., *J. Biol. Chem.*, **275**, 9390-9395 (2000)
- [62] Kuo, L. J. and Yang, L. X. :Gamma-H2AX – a novel biomarker for DNA double-strand breaks., *In Vivo*, **22**, 305-309 (2008)

- [63] Dickey, J. S. Redon, C. E. Nakamura, A. J. Baird, B. J. Sedelnikova, O. A. and Bonner, W. M. :H2AX: functional roles and potential applications., *Chromosoma*, **118**, 683-692 (2009)
- [64] Jubendradass, R, D'Cruz, S. C. and Mathur, P. P. :Short-term exposure to nonylphenol induces pancreatic oxidative stress and alters liver glucose metabolism in adult female rats., *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **25**, 77-83 (2011)
- [65] Mao, Z. Zheng, Y. L. and Zhang, Y. Q. :Behavioral impairment and oxidative damage induced by chronic application of nonylphenol., *Int. J. Mol. Sci.*, **12**, 114-127 (2010)
- [66] Riva, C. Porte, C. Binelli, A. and Provini, A. :Evaluation of 4-nonylphenol in vivo exposure in Dreissenapolymorpha: bioaccumulation, steroid levels and oxidative stress., *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, **152**, 175-181 (2010)
- [67] Ohnuki, G. Toyooka, T. and Ibuki, Y. :UVB in solar-simulated light causes formation of BaP-photoproducts capable of generating phosphorylated histone H2AX., *Mutat. Res.*, **702**, 70-77 (2010)
- [68] Ibuki, Y. Tani, Y. and Toyooka, T. :UVB-exposed chlorinated bisphenol A generates phosphorylated histone H2AX in human skin cells., *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 1770-1776 (2008)
- [69] Toyooka, T. Ohnuki, G. and Ibuki, Y. :Solar-simulated light-exposed benzo[*a*]pyrene induces phosphorylation of histone H2AX., *Mutat. Res.*, **650**, 132-139 (2008)
- [70] OECD SIDS Initial Assessment Report Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS), (2005)
- [71] Larson, R. J. Rothgeb, T. M. Shimp, R. J. Ward, T. E. and Ventullo, R. M. :Kinetics and practical significance of biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate in the environment., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 645-657 (1993)
- [72] Takada, H. Mutoh, K. Tomita, N. Miyazu, T. and Ogura, N. :Rapid removal of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) by attached biofilm in an urban shallow stream., *Water Res.*, **28**, 1953-1960 (1994)

- [73] Rosen, M. J. Li, F. Morrall, S. W. and Versteeg, D. J. :The relationship between the interfacial properties of surfactants and their toxicity to aquatic organisms., *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 954-959 (2001)
- [74] Debelius, B. Forja, J. M. Del Valls, A. and Lubian, L. M. :Effect of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and atrazine on marine microalgae., *Mar. Pollut. Bull.*, **57**, 559-568 (2008)
- [75] Renaud, F. Oberhansli, F. Teyssie, J. L. Miramand, P. Temara, A. and Warnau, M. : Sorption-desorption kinetics and toxic cell concentration in marine phytoplankton microalgae exposed to linear alkylbenzene sulfonate., *Mar. Pollut. Bull.*, **62**, 942-947 (2011)
- [76] Coelho, K. da S. and Rocha, O. :Assessment of the potential toxicity of a linear alkylbenzene sulfonate (LAS) to freshwater animal life by means of cladoceran bioassays., *Ecotoxicology*, **19**, 812-818 (2010)
- [77] 井上邦夫、砂川隆 :界面活性剤の突然変異性試験の結果について、フレグランスジャーナル、**38**、p67-74 (1979)
- [78] 井上清、柴田忠良、浜野米一、小田美光、桑野綾子、山本博之、光田文吉、国田信治 :合成洗剤のマウスにおける in vivo 染色体試験、大阪府立公衆衛生研究所年報、**8**、p17-24 (1977)
- [79] Kimerle, R. A. and Swisher, R. D. :Reduction of aquatic toxicity of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) by biodegradation., *Water Res.*, **11**, 31-37 (1977)
- [80] Howes, D. :The percutaneous absorption of some anionic surfactants., *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **26**, 47-63 (1975)
- [81] Alvarez-Munoz, D. Gomez-Parra, A. Blasco, J. Sarasquete, C. and Gonzalez-Mazo, E. : Oxidative stress and histopathology damage related to the metabolism of dodecylbenzene sulfonate in Senegalese sole., *Chemosphere*, **74**, 1216-1223 (2009)
- [82] Wu, Z. Yu, D. Li, J. Wu, G. and Niu, X. :Growth and antioxidant response in *Hydrocharis dubis* (Bl.) Backer exposed to linear alkylbenzene sulfonate., *Ecotoxicology*, **19**, 761-769 (2010)

- [83] Vock, E. H. Lutz, W. K. Hormes, P. Hoffmann, H. D. and Vamvakas, S. : Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity in the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with etoposide, melphalan, cisplatin, potassium cyanide, TritonX-100, and gamma-irradiation., *Mutat. Res.*, **413**, 83-94 (1998)
- [84] Zhang, C. K. Valsaraj, T. Constanta W. D. and Roy, D. : Aerobic biodegradation kinetics of four anionic and nonionic surfactants at sub- and supra-critical micelle concentrations (CMCs)., *Water Res.*, **33**, 115-124 (1999)
- [85] Yadav, J. S. Lawrence, D. L. Nuck, B. A. Federle, T. W. and Reddy, C. A. : Biotransformation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) by *Phanerochaete chrysosporium*: oxidation of alkyl sidechain., *Biodegradation*, **12**, 443-453 (2001)