

(資料 1 4) 平成 2 2 年度終了特別研究の実施状況及びその評価

1. 九州北部地域における光化学越境大気汚染の実態解明のための前駆体観測とモデル解析

課題代表者 横内 陽子 (化学環境研究領域)

1. 1 研究の概要

長崎県五島市福江島に大気観測施設を設置し、オゾン、非メタン炭化水素、窒素酸化物、一酸化炭素、微小粒子状物質を観測した。2009 年春に 100ppb を超えるオゾンと共に高濃度の粒子状硫酸塩や有機エアロゾルを観測した。モデル解析の結果、主に中国大陸からの越境輸送が高濃度の原因であるが、オゾンについては東アジア以外からの流入も多いこと、春季 3~6 月平均の中国寄与率は、オゾンが 26%、エチレンが 23%、粒子状硫酸塩が 83%、窒素化合物 NO_y が 62% と高いことなどが明らかとなった。中国における前駆物質排出インベントリの検証、大気汚染予報システムの検証なども進めた。

1. 2 研究期間

平成 2 0 ~ 2 2 年度 (3 年間)

1. 3 研究成果

(1) 研究目的

我が国では近年光化学オゾンが増加傾向にあり、九州北部地域では中国からの越境大気汚染が原因と考えられる高濃度オゾンが観測されている。この越境光化学オゾンのメカニズムの解明と今後の影響予測を的確に行うために、本研究では、光化学オゾン前駆物質である非メタン炭化水素 (NMHC)、窒素酸化物 (NO_x) および二次生成粒子の観測とモデルの連携によって、(1) 東アジアから九州北部への光化学オゾン前駆物質の輸送実態の解明、(2) 九州北部地域に発生した光化学大気汚染エピソードの実態の解明、(3) 大気汚染予報システムの検証と改良を目指した。

(2) 研究目的・目標の達成度

① 研究目的・目標の達成度

本研究の主要な目的である九州北部地域における春季の光化学越境大気汚染の解明について、中国の寄与が大きいことを観測およびモデル解析によって示した。また、同レベルの高濃度オゾンについて、輸送過程の異なるケースがあることが新たに分かった。また、中期計画に対する達成度についても、モデル解析による光化学越境大気汚染の実態解明、中国における前駆物質排出インベントリの検証、大気汚染予報システムの検証などが進み、当初目標を基本的に達成した。

② 貢献度

- ・ 福江観測データ等によって検証された大気汚染予報システムを使用して、東アジア地域の大气汚染濃度分布を予報し、その結果を研究所のホームページから発信した。
- ・ 環境省の越境汚染・酸性雨対策検討会、PM_{2.5} や VOC の関連委員会等において多数の研究成果が活用され、大気環境施策に貢献した。
- ・ IGBP/IGAC や Atmospheric Brown Clouds (ABC) 等におけるデータベース作成に貢献した。
- ・ 国際誌や学会における研究発表によって科学技術・学術に貢献した。

(3) 本研究で得られた成果

本研究では、光化学オゾン前駆物質の系統的な観測とモデルの連携によって、光化学オゾンエピソードの実態解明を進めるために、以下の3つのサブテーマ研究を実施した。

[サブテーマ1] 光化学オゾン前駆物質の高精度測定システムの構築

①C₂~C₁₀ 炭化水素測定システムの開発

カラムスイッチング機能を付加したGC-FIDと自動大気濃縮装置を組み合わせ、C₂~C₁₀炭化水素20成分を分離分析するNMHC自動連続測定システムを構築した。大気濃縮装置、ガスクロマトグラフ、水素ガス発生装置などの全ての動作を自動化すると共にリモート制御を可能にした。

②NO_y測定システムの作製

Thermo製の大气微量化学種測定用NO_x計のインレットにモリブデンコンバータを取り付け、吸引する窒素化合物を一酸化窒素に変換し、その濃度をNO_x計で測定して、総反応性窒素酸化物(NO_y)を測定できる装置を作製した。またインパクターを用いてガス状・粒子状別の観測を可能にした。

[サブテーマ2] 福江島における通年および春季集中観測

長崎県福江島大気観測施設(128.7E, 32.8N)に観測サイトを設置し、NMHC、オゾン、NO_x、一酸化炭素(CO)、NO_y、粒子状物質の観測を行った。福江島は九州北部西端に位置し大陸からの輸送を観測するのに適している。観測サイトの周囲は民家も少なく人為起源汚染の発生源は少ない。

①NMHCの毎時間観測を2008年11月に開始した。NMHC測定用の大気試料は地上約5mに設置したインレットからステンレス管を通して大量吸引し、一部を測定システムに導入した。2009年6月以前の観測では、芳香族とオレフィン類について配管あるいはバルブによるロスが疑われたため、解析対象から除いた。2009年7月以降現在(2011年2月4日)まで、オレフィン類、芳香族類を含む15成分の炭化水素について定量値を得た。汚染イベント時の非メタン炭化水素組成を基に、光化学反応履歴や排出量について解析した。

②オゾン、NO_x、COの観測は2008年11月から、NO_yは2009年3月から現在まで継続している。地上約3mのところろにインレットを設置し、テフロンチューブを用いて室内に引き込み、装置に大気を導入した。

③粒子状物質の化学組成はエアロダイン社製の四重極型エアロゾル質量分析計(Aerosol mass spectrometer: Q-AMS)を用いて測定した。Q-AMSはPM₁程度の粒子を測定しており、主に人為起源由来のサルフェート(SO₄)、ナイトレート(NO₃)、アンモニウム(NH₄)、クロライド(Cl₁)、有機物(Org)を測定できる。Q-AMSのインレットも③と同様地面から3mの位置にインレットを設置し、ステンレス製の配管入口にPM_{2.5}サイクロン(URG製)を設置して粗大粒子をカットした。Q-AMSの観測は2009年3-5月、2010年12月に行った。

④気象要素はVaisala WXT520を用いて測定した。測定項目は風向、風速、気温、相対湿度、気圧、降雨強度である。

[サブテーマ3] モデル解析等による実態解明と予報システムの検証・改良

福江観測期間を対象にして、東アジアスケールの化学輸送モデル(CTM)によるシミュレーション計算を実施し、福江の観測データを使用して検証するとともに、日本、中国、韓国の各地域からの大気汚染物質濃度の寄与率を評価した。CTMとして、地域気象モデルシステム(RAMS)と連携したCMAQ4.4を用いた。計算領域はインドシナ半島を含む東アジア地域であり、水平分解能80kmの78×68格子点で表現し、鉛直方向には上空23kmまでを19層に分割した。大気汚染物質の発生量にはアジア域排出インベントリREASの2005年推計結果ほかを利用した。シミュレーション期間は2009年1月1日から2010年8月15日までとし、ゼロエミッション法にて日本、中国、韓国の各地域を対象とした排出量感度実験を実施し、各地域からの大気汚染物質濃度の寄与率を評価した。

更に、NMVOC成分毎に観測濃度とモデル濃度を比較することにより、NMVOC排出インベントリの妥当性を評価した。

サブテーマ1で開発を進めた「C₂~C₁₀炭化水素測定システム」と「NO_y測定システム」は、2008年11

月に福江島の無人観測ステーションに設置され、当初の計画通り、2008年度中にサブテーマ2を立ち上げることができた。2009年度、2010年度は通年観測と集中観測によって、オゾン、NO_x、NMHC、粒子状物質に関するデータを蓄積し、2010年12月までのデータについて化学輸送モデルによるシミュレーションを終了した。

1. 2009年春の高濃度オゾン現象の解明

2009年春に、高濃度オゾンが観測された。2009年4月～5月中旬におけるオゾンの平均値は62ppbvであったが、4月7日から12日にかけては高濃度期が続き最高で99ppbvを記録した（エピソード1とする）。また、5月7日から5月9日にかけて最高で109ppbvとなる高濃度期が続いた（エピソード2とする）。日本の環境基準が60ppbvであることを考慮すると、長崎福江島では4月から5月の1カ月の間に、しばしば、環境基準を大きく上回る高濃度オゾンが観測されることが明らかとなった。高濃度オゾン時には粒子状物質も高濃度となり、4月8日の質量濃度の日平均値は約 $60 \cdot \text{gm}^{-3}$ に上った。これは日本のPM_{2.5}粒子状物質の環境基準（日平均値） $35 \cdot \text{gm}^{-3}$ の2倍近い値である。粒子状物質の組成については、主要成分がSO₄、Org、NH₄であることが分かった。なお、エピソード2の高濃度オゾン時の粒子状物質濃度はエピソード1の場合に比べて半分程度であった。また、CO濃度もエピソード1では700ppbvに近づいたが、エピソード2では300ppbv前後で推移した。NMHCもエピソード2でエピソード1の半分以下となり、エタン以外では特にその差が顕著であった（例えば、アセチレン：1.6ppb・0.24ppb、n-ブタン：0.18ppb・0.04ppb）。このように同程度の高濃度オゾンが観測されたエピソード1と2で、他の成分には大きな違いがあることが分かった。この違いが何に由来するのかをモデルを用いて検討した。

CMAQを用いたオゾン濃度のシミュレーション結果は観測をよく再現した。特に4月8日や5月9日の高濃度時期について観測結果と一致した。CMAQ計算における発生源の寄与を推定するため、日本、中国、韓国の各領域の前駆物質の発生量をゼロとしてそれぞれの寄与を求めた（ゼロエミッション実験）。その結果、4月8日（エピソード1）と5月9日（エピソード2）は、いずれも中国の寄与が比較的大きいことが分かったが、エピソード1では全体の半分程度であり、エピソード2では全体の3分の1程度であった。一方でシミュレーションによって得られたオゾン濃度の半分以上の寄与を占めたのは、中国、韓国、日本以外の「Other」で、境界領域内の他の地域（東南アジア、自由対流圏など）や、境界領域外からの流入が示された。一方、同様のシミュレーションを行ったとき、二次粒子（SO₄）、CO、NMHCはほとんど中国起源であった。オゾンも、中国起源だけをみると、二次粒子、CO、NMHCと同様の濃度変化を示した。オゾンの場合、域外からの流入（日中韓以外）の寄与も大きく、5月9日は相対的に域外からの寄与が多いため、100ppbv程度の高濃度となり、粒子状物質やCOと異なる挙動を示したと考えられる。SO₄など粒子状物質は中国大陸からの越境汚染の寄与が大きい。オゾンについてはより広い範囲の影響を考慮する必要があることが示唆された。また、NMHCについて、エタン、プロパン、n-ブタンの3成分の相対比を使って両エピソード中の反応履歴について検討した結果、エピソード1では一定の排出比を持って排出されたNMHCが主に反応によって消失していること、エピソード2では大きな希釈効果を受けていることが示唆された。

さらに、この2つの高濃度オゾン時（エピソード1とエピソード2）のオゾンの空間分布をモデル計算した結果、エピソード1では、オゾンの高濃度気塊が中国沿岸域から短時間で到達しており、従って水平・鉛直スケールも小さいこと、エピソード2では、高濃度気塊が複雑な輸送の後に到達しており、水平・鉛直スケールも大きいことが分かった。対流圏上部の気塊が混入しているとすれば、エピソード1に比べて、粒子状物質などの濃度が低く、NMHCに大きな希釈効果が見られたことと整合する。

本研究の成果は、今後国内環境基準達成のためにどの程度越境汚染の影響を考慮する必要があるかを示唆しており、環境問題の解明解決に大きく役立つと考えられる。

2. 観測値とCMAQモデル計算結果の比較

高濃度オゾン時以外の期間についても2010年12月まで、オゾンとCO、NO_yと全硝酸、AMS、NMHCを対象に観測値とCMAQモデル計算結果を比較した。モデル計算結果では、オゾンはやや過大、COはやや過小になる傾

向はあるものの、それらの時間変動をほぼ再現された。NO_yはほぼ再現されたが、全硝酸は過大であった。一方、NO_xは過少であったので、全硝酸とNO_xが相殺した結果、NO_yは良く再現しているように見えると考えられる。AMS成分では、NH₄⁺とSO₄²⁻の時間変動はほぼ再現され、NO₃⁻は過大、OAは過少となった。NMHCについては、全体的に過少であり、中国のアルカン類排出量を過小評価している可能性が示唆された。

以上の結果から、モデルは越境大気汚染を概ね的確に捉えていると考えられることと、今後の検討課題（NMHC排出量見直し等）が明らかになった。

3. 中国起源 NMHC 排出量の推定

NMHCについては、従来のインベントリーでは中国からの排出量が過小評価されている可能性がある。そこで、中国のみの影響を受けた汚染イベントを捉えて、その気団中の各成分濃度の増分比を利用して中国からの排出量推定を試みた（トレーサー比法）。中国からの排出量について信頼できる推定値が得られている一酸化炭素（年間201Tg/y）を基に、2010年1月2日23時、2月18日7時、5月23日15時の汚染イベントを活用して、中国からの各NMHC排出量を推定した。その結果、たとえば、エタン、プロパン、アセチレン、ベンゼンについて、それぞれ中国からの排出量は970、790、880、1010Gg/yと推定された。なお、この手法による排出量の推定では、輸送中の反応によるロスがある成分については過小評価になるため、オレフィン類に応用することは難しい。

4. 中国・韓国・日本の寄与率推計

CMAQモデル計算結果をもとに、再現性の良い大気汚染物質成分について、2009年春季（3～6月）の発生源地域別寄与率を評価した。オゾンの寄与率は、中国26%、韓国3%、日本4%であり、中国影響が1/4程度を占めることが分かった。NO_yについては、中国の影響がより大きく、春季平均で62%にも達し、韓国と日本の割合もそれぞれ11%、17%と高くなった。一方、PM_{2.5}成分のうち、NH₄⁺とSO₄²⁻の中国寄与率はそれぞれ86%と83%に達し、PM_{2.5}に対しても中国からの越境汚染影響が非常に大きいと考えられた。一方、エチレンの中国寄与率は23%であり、東アジア以外からの影響が大きいことが明らかとなった。

5. その他の解析

NMHCについては、濃度だけでなく、組成比も大きな変動を示すことが明らかになった。排出後短時間の（従って、反応が進んでいない）気塊では、反応性の高いエチルベンゼンやキシレンも検出されたが、輸送時間が長い気塊の場合にはほとんど検出されなかった。このような反応性による違いを知るために、各成分の観測濃度を排出地域の濃度（中国大都市の文献値）で割った値をそれぞれの成分の反応速度定数に対して半対数プロットしたところ、トルエンとプロピレンを除いてよい直線性が得られた。このことは、NMHC組成比が化学輸送モデルに組み込まれている反応スキームについてもよい検証手段となる可能性を示唆している。

2010年5月に数回行った福江島でのゾンデ観測によってオゾンと気象要素の鉛直分布を明らかにした。また、ライダー観測による人為起源粒子の鉛直分布データを解析することにより、海上混合層と大気汚染濃度の鉛直構造を把握した。更に、これらの鉛直観測データや福江島地上観測データ等によって大気汚染予報システムを検証した。

1. 4 外部研究評価結果

	5	4	3	2	1	合計
事後評価	3	5				
（平成23年3月）	38	62				100%

注) 上段：評価人数、下段：%

事後評価基準（5：たいへん優れている、4：優れている、3：普通、2：やや劣る、1：劣る）

外部研究評価委員会による事後評価の平均評点 4.4点

1. 5 評価結果の概要

[現状評価]

福江島における大気汚染物質の観測を継続し中国からの越境輸送の寄与を推定するためのモデルを整備することを目的として進められ、ほぼ期待通りの成果が得られた。

また、越境化学汚染のモニタリング基地ができ、そこでの観測データの採集方法が確立したことは評価される。

[今後への期待・要望]

今後、モニタリングの方法論の改良や長期の測定が期待される。こうした、基礎的な測定結果は、環境問題の現状を明らかにする上で不可欠であり、モデルの精度や信頼性を向上させるためにも重要であり、さらに観測データの強化を期待する。

この成果を今後どのように活かしていくのか最善の方策を決めていく必要がある。政策や外交への反映も含め、中国との共同研究をもっと積極的に進めるべきである。また、海外からの寄与推定は環境改善の政策や国際的な連携を強化する面からも重要と思われる。

1. 6 対処方針

福江島におけるオゾン、窒素酸化物、炭化水素およびエアロゾルの観測を継続し、モデル解析と合わせて、越境光化学オゾンに対する東アジアの影響を正しく評価すると共に、成果を環境改善や政策に活用する方策についても検討を進めていきたい。また、中国との共同研究については、清華大学との都市大気汚染研究、大気物理研究所とのモデル研究、北京師範大学との排出インベントリ研究などを推進するとともに、日中韓の研究者間でのモデル相互比較研究の準備を進めており、今後も連携を強化していく。

2. エピジェネティクス作用を包括したトキシコゲノミクスによる環境化学物質の影響評価法開発のための研究

課題代表者 野原 恵子（環境健康研究領域）

2. 1 研究の概要

環境化学物質の生体影響に関与する重要かつ未解明な機序であるエピジェネティクスについて、動物実験において無機ヒ素（以下ヒ素と記す）のエピジェネティック作用（DNAメチル化作用、ヒストン修飾作用）を中心に、作用の検索・機序・生体影響との関連を解明する研究を行った。メチル化DNA量の精密測定法を確立し、ヒ素長期投与によるグローバルなメチル化DNA量の変動や各種関連因子との関係を明らかにした。またヒ素の胎児期曝露や長期曝露について、発癌等生体影響、遺伝子発現変化、エピジェネティック変化を各種手法を用いて解析し、それらの因果関係や臓器特異性についての知見を得た。さらに、ヒ素によるエピジェネティック変化の機序として、DNA損傷との関連が示唆された。

2. 2 研究期間

平成19～22年度（4年間）

2. 3 研究成果

（1）研究目的

近年、各種の化学物質が遺伝子発現を変化させることにより生体に悪影響を及ぼすことが明らかにされ、遺伝子発現の網羅的解析法であるトキシコゲノミクスが悪影響の検出に有効であることが示されてきた。従来これらの研究は、遺伝子の機能はDNAの塩基配列に基づいて決定されるというジェネティクスの考え方を基盤として進められてきた。しかし最近、塩基配列の変化によらず、DNAメチル化やヒストン修飾などの、いわゆるエピジェネティックな修飾による遺伝子発現の調節機構であるエピジェネティクスの重要性が目ざされている。エピジェネティックな修飾は環境の影響を受けて変動しやすく、後発的な影響や経世代影響と密接に関係することが報告され、環境化学物質の生体影響を考える上で極めて重要と考えられる。

本研究では、現在世界各国で発癌などの健康被害をもたらしているヒ素を中心に、実験動物において高感受性期や標的遺伝子、後発・経世代影響等に注目してそのエピジェネティック作用を検索し、生体影響との関連や機序を明らかにすることを目的とする。また環境研で研究成果を蓄積してきたダイオキシンについてもエピジェネティック作用に関して検討を加える。

（2）研究目的・目標の達成度

本研究では、化学物質に対する感受性が高い胎児期における曝露や、また長期曝露の実験系において、性差・臓器特異性や後発・経世代影響に注目してエピジェネティクス変化を明らかにし、生体影響との関連についての考察を行った。その結果、従来の仮説と異なる結論に至るデータを含め、ヒ素のエピジェネティック作用の性質に関して当初の予想を上回る多くの知見を得ることができた。本研究で得られた成果は、化学物質の生体影響評価に今後エピジェネティクスからの視点を加える上で重要な科学的知見を提供するものと考えられる。5メチルシトシンの精密分析法を確立し、エピジェネティクス研究に技術的にも貢献した。その他、化学物質のエピジェネティクスに関して、招待講演5件を含むシンポジウム講演や、世界最大の毒性学会である米国毒性学会大会、および環境エピゲノミクス研究会定例会でシンポジウムセッションを企画・進行し、新たな研究分野の重要性の普及に貢献した。

(3) 本研究で得られた成果

サブテーマ 1. 環境化学物質のエピジェネティック作用における高感受性期、臓器特異性および後発・経世代影響

サブ 1-1. 無機ヒ素のエピジェネティクス

代表的なエピジェネティック作用の機序は、DNA メチル化修飾（5 メチルシトシン修飾）およびヒストンのメチル化/アセチル化修飾変化による遺伝子発現調節である。複数のグループの先行研究で、マウスへのヒ素の長期曝露または胎児期曝露による発癌増加と DNA メチル化変化の関連が報告されている。本研究ではこれらの実験系において、詳細なエピジェネティック作用の解析と生体影響との関連について検討した。

1-1-1. ヒ素の胎児期曝露

胎児期は一般的に化学物質に感受性が高い時期である。妊娠中にヒ素曝露を受けた C3H マウスの仔(雄)が 74 週（1 年 5 カ月）令に達した時に肝癌を高率に発症することが Waalkes ら（2004）によって報告され、エストロゲン受容体 α ($ER\alpha$) プロモーター領域の DNA メチル化低下を介した $ER\alpha$ の発現上昇が原因であることが示唆されている。この実験系において、ヒ素の発癌への影響および各種後発影響とエピジェネティック作用の関連を検討する研究を行った。

Waalkes らの実験にならって、妊娠した C3H マウスに妊娠 8 日から 18 日の間のみ 85 ppm 亜ヒ酸を含む水を投与し、生まれた仔について約 74 週令まで経時的に検討を行った。

その結果、①ヒ素曝露したマウスより生まれた仔(ヒ素曝露群、F1)の雄でのみ肝臓で腫瘍の増加を確認し、先行研究と同一の結果を得た。しかし、対照群(ヒ素非曝露群)とヒ素曝露群マウスのそれぞれ正常肝、腫瘍肝正常部分および腫瘍部分の検討を行った結果、先行研究で報告されたヒ素曝露による $ER\alpha$ プロモーター領域の DNA メチル化低下も $ER\alpha$ の発現上昇も認められなかった。すなわち、ヒ素による腫瘍の増加には $ER\alpha$ の DNA メチル化変化と発現変化は必須でないことが示された。

さらに本研究では新たな結果として、②胎児期のみのヒ素曝露によって、雄の仔の肝臓で 6 週令までは変化がないが、49 週令以降または 74 週令で後発的に発現変化する遺伝子の存在をみいだした。これらの遺伝子の中にはプロモーター領域のヒストン修飾が変化しているものが含まれ、ヒストン修飾が遺伝子発現変化に関与することが示唆された。一方 DNA メチル化変化は検出されず、DNA メチル化の関与はないと考えられた。また F1 雌雄の仔(F2)の肝臓では同様な遺伝子発現変化は観察されず、F2 への経世代影響は見られなかった。

さらに後発影響として、③60 週令の雌雄の仔の脳の内側視索前野でそれぞれアンドロゲン受容体 ($AR\alpha$) と $ER\alpha$ のタンパク量が増加すること、これらの増加はリガンド非依存的であることが明らかとなった。

④代謝機能への後発影響の総合的解析を行い、胎児期ヒ素曝露が 60 週令雄マウスにおいて、体重増加や血糖値の上昇をはじめとする前糖尿病段階を導く可能性を明らかにした。これらの後発影響に対するエピジェネティック作用の関与に関して今後検討が必要である。

また、⑤集団型全自動行動学習装置 IntelliCage を用いて、空間学習や高次認知機能を測定する簡便かつ再現性の極めて高い試験法を確立し、ヒ素曝露による影響の検出を開始した。

⑥ヒ素による肝癌に特有な DNA メチル化変化を検索するために、74 週令雄の対照群の正常肝臓とヒ素曝露群の肝癌組織について、最新の手法の一つである MeDIP-アレイ法を用いてゲノムワイドな領域特異的 DNA メチル化状態の測定を行い、現在データ解析を行っている。今後ヒ素特有の肝癌増加に関するエピジェネティックマーカー開発の可能性を検討する計画である。

1-1-2. 飲水中ヒ素の長期曝露

Cui ら（2006）の先行研究で、A/J マウスにヒ素を長期投与すると肺癌が増加すること、その癌組織では癌抑制遺伝子の DNA メチル化増加と発現抑制が起こることが報告され、DNA メチル化変化の発癌への寄与が示唆されている。しかしこの報告では、癌抑制遺伝子の発現低下が癌の原因か結果かは不明である。そこで

癌を発症しにくい C57BL/6 マウスにおいて、ヒ素曝露による癌抑制遺伝子の発現変化や DNA メチル化、ヒストン修飾変化を検索し、因果関係の検討を試みた。

雌雄 C57BL/6 マウスに 50 ppm 亜ヒ酸を 6 カ月飲水投与し、肝臓および肺における 癌関連遺伝子 (p16INK4a, Rassf1a, ER α , Cyclin D1) の発現や、プロモーター領域の DNA メチル化、ヒストン修飾を調べた。

曝露後、対照群・ヒ素曝露群雌雄において肝臓と肺に腫瘍がないことを確認した。これらのマウスの肝臓と肺について検討した結果、ヒ素曝露群の雄の肝臓でのみ、癌抑制遺伝子 p16INK4a の発現が低下していることが明らかとなった。p16INK4a プロモーター領域において DNA メチル化変化は検出されなかったが、抑制型ヒストンメチル化 (H3K9me2) および H3K9 メチル化酵素 G9a の増加が検出された。以上より、ヒ素による p16INK4a 癌抑制遺伝子の発現低下に G9a のリクルートを介した抑制型ヒストン修飾の誘導が関与することが示唆された。同時にヒ素の作用に性差と臓器特異性があることが示された。

1-1-3. 低メチル食および飲水中ヒ素の長期曝露

Okoji ら (2002) の先行研究で、C57BL/6 マウス (雄) を低メチル食、または低メチル食+亜ヒ酸飲水投与で飼育することによって、肝臓の 5 メチルシトシン量がそれぞれ約 25%、または 60-90%と大幅に低下することが報告されている。本研究では 5 メチルシトシン量の精密分析法を確立し、Okoji らと同一の実験系において 5 メチルシトシン量を測定し、ヒ素によるグローバル DNA メチル化変化量を明らかにした。

これまでの研究では、グローバル DNA メチル化変化すなわち 5 メチルシトシン量は、ラジオアイソトープラベルしたメチル基を酵素存在下 DNA にとりこませる等の方法で行われていた。本研究では、5-methyldeoxycytidine (5medC) のイオン化効率補正用安定同位体標識化合物を合成し、5 メチルシトシン量を 5medC として LC/ESI-MS 法で精密測定する方法を確立した。雌雄 C57BL/6 マウスを Okoji らの実験にならって普通食 (MSD)、低メチル食 (MDD) または低メチル食+飲水中 50 ppm 亜ヒ酸投与 (MDD+As) で 5 ヶ月間飼育し、肝臓の 5 メチルシトシンを定量した。

その結果、全シトシン中の 5 メチルシトシン量の割合は、雌雄あわせて 4.8%-5.3%の間で変動するのみで、従来報告されているような大きな変動はないことが明らかとなった。さらに雄では 5 メチルシトシン量は普通食 (MSD) >低メチル食 (MDD) >低メチル食+ヒ素飲水投与 (MDD+As) の順に低下傾向を示し、雌では反対に MSD<MDD<MDD+As の順に増加することが明らかとなり、ヒ素による DNA メチル化変化に性差があることがわかった。この性差がヒ素に対する感受性の性差に関与することが示唆された。

サブ 1-2. ダイオキシンのエピジェネティクス

ダイオキシンは転写因子 AhR と結合し、AhR を活性化して遺伝子発現を誘導することによって毒性を発揮する。ダイオキシンに対する感受性には臓器特異性があり、その感受性は活性化した AhR によって誘導される CYP1A1 などの遺伝子の発現の強さと相関すると考えられている。マウスの肝臓はダイオキシンによって CYP1A1 発現が強く誘導され、脾臓では弱い。このようなダイオキシン感受性の差にエピジェネティック作用が関与するかどうかを検討した。

C57BL/6 マウス雌にダイオキシンを投与し、肝臓と脾臓の CYP1A1 の発現、および各種ヒストン修飾は ChIP 法で調べた。

ダイオキシンによって誘導される CYP1A1 遺伝子のエンハンサー領域のヒストン修飾を肝臓と脾臓で比較した結果、肝臓に比べて脾臓では、もともとの抑制型ヒストン修飾 (H3K27me3) レベルが高く、活性化型ヒストン修飾である H3Ac、H4Ac レベルが低いことが明らかとなった。また、ダイオキシン曝露によって肝臓では H3Ac、H4Ac レベルが大きく減少し、脾臓では H3K27me3 レベルの増加傾向とヘテロクロマチンプロテイン 1 の有意な結合増加が明らかになり、エピジェネティック修飾がその後のダイオキシン反応性に関与することが示唆された

サブテーマ2. 環境化学物質のエピジェネティック作用のメカニズム

2-1. ヒ素による DNA メチル化変化と S-adenosylmethionine (SAM)、DNA メチル基転移酵素 (DNMT) の関連の検討

DNA は SAM よりメチル基を供与され、DNMT の作用によってメチル化される。ヒ素も体内では SAM からメチル基を供与されてメチル化されることから、ヒ素による SAM の消費を原因とする DNMT の発現抑制がグローバル DNA 低メチル化を誘導することが示唆されている。ヒ素によるグローバル DNA メチル化変化の機序を探るため、上記の 1-3. 低メチル食および飲水中ヒ素の長期曝露の実験系において、SAM や DNMT 発現量の関係を検討した。

上記 1-1-3. で DNA メチル化を測定した実験系で、肝臓の SAM 量および DNMT 発現量を測定した。雄の SAM の量は普通食 (MSD)、低メチル食 (MDD)、低メチル食+ヒ素飲水投与 (MDD+As) 群で差がなかったが、雌では MDD 群、MDD+As 群で SAM 量が有意に低下した。1-1-3. の結果と考え合わせると、ヒ素が SAM を低下させてグローバルな DNA 低メチル化を誘導するという仮説が成り立たないことが示され、グローバル DNA メチル化変化を誘導する他の因子があることが示唆された。また DNMT1 の発現量は雄では MSD 群に比較して MDD 群、MDD+As 群で有意に低下し、低メチル食やヒ素が雄では DNMT1 の発現を抑制し、DNA メチル化を抑制した可能性が示唆された。

2-2. メチル欠乏食およびヒ素による酸化的 DNA 損傷と DNA メチル化変化の関連

ヒ素による DNA メチル化変化の機序を探ることを目的として、ヒ素の酸化ストレスによる DNA 損傷に着目して DNA メチル化変化との関連を解析した。具体的には、DNA のメチル化に関与するメチオニン、コリンを除去した methionine choline deficient diet (MCD 食) 及び DNA の低メチル化を引き起こすことが報告されているヒ素を投与することにより、酸化ストレスと DNA メチル化変化との関連について性差を含め検討を行った。

雌雄 C57BL/6 マウスを普通食、MCD 食、普通食+ヒ素 (50 ppm 亜ヒ酸) 飲水投与、MCD 食+ヒ素飲水投与で 1 または 3 週間飼育し、肝臓について検討を行った。

メチオニン・コリン欠乏食 (MCD 食) 投与群では 1 週間後、雄で各種酸化ストレス関連遺伝子の発現が有意に増加し、3 週間で雄雌共に酸化的 DNA 損傷の一種である 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) が有意に増加した。また 3 週間で 5 メチルシトシンが有意に減少しており、8-OHdG と 5 メチルシトシンが負の相関を示すことが明らかになった。更に、1 及び 3 週間で DNA メチル基転移酵素 (DNMT) 遺伝子の中に発現が有意に増加するものがみつかった。以上の結果から、MCD 食投与により生じた酸化ストレスが酸化的 DNA 損傷の誘発を介して、DNA の低メチル化及びそれに伴う DNMT 遺伝子の発現誘導を引き起こしていることが示唆された。一方、1~3 週間の 50 ppm ヒ素投与では、雄で 5 メチルシトシンの有意な減少が観察されたがその程度は MCD 食による減少より少なく、酸化ストレス関連遺伝子の発現や 8-OHdG 生成、DNMT 発現には顕著な影響は確認されず、50 ppm 亜ヒ酸短期曝露の影響はメチル欠乏食の影響より弱いことが示された。

2. 4 外部研究評価結果

	5	4	3	2	1	合計
事後評価	1	7				
(平成 23 年 3 月)	12	88				100%

注) 上段：評価人数、下段：%

事後評価基準 (5：たいへん優れている、4：優れている、3：普通、2：やや劣る、1：劣る)

外部研究評価委員会による事後評価の平均評点 4. 1 点

2. 5 評価結果の概要

[現状評価]

ヒ素による発がんメカニズムをエピジェネティクスの視点から手法を開発しながら詳細な実験を展開されたことは評価したい。ただし、結果的にエピジェネティクスから期待する成果が得られなかったことは残念である。

[今後への期待・要望]

エピジェネティクスの研究をリスク評価に結び付ける戦略、例えば、どのような場合にエピジェネティクス作用を調べる必要があるか等、成果をリスク評価との関連で考察することが望まれる。遺伝子変化の晩発性、性差の結果はヒ素のリスク評価上重要であり、更なる解明を望む。

2. 6 対処方針

本研究では各種条件下でのヒ素曝露の影響として、エピジェネティック作用のうち「遺伝子特異的 DNA メチル化変化」については、ほとんど検出されなかった。一方、DNA 反復配列に由来すると考えられる「グローバル DNA メチル化量変化」と「遺伝子特異的ヒストン修飾変化」が検出された。現在多くの化学物質が遺伝子特異的 DNA メチル化変化を誘導することが続々と報告されているが、手法的に不十分と思われる結果が見られたり、再現性が見られないという報告もあり、本研究の結果と考え合わせて、化学物質の「遺伝子特異的 DNA メチル化変化」誘導能の有無に関してはさらに検討が必要と考えられた。一方、本研究の結果から、「グローバル DNA メチル化量変化」と「遺伝子特異的ヒストン修飾変化」は化学物質曝露によって比較的変動しやすく、生体影響の原因につながる可能性が示唆された。次期の研究においては、特に「グローバル DNA メチル化量変化」と「遺伝子特異的ヒストン修飾変化」に着目し、その作用機序や特徴、生体影響との因果関係を明らかにすることを通して、リスク評価の指標として重要なエピジェネティック作用を明らかにしたい。化学物質曝露による遺伝子発現変化の晩発性、性差に関してはさらに解明を進めたい。