

論文の内容の要旨

論文題目「海洋性発光バクテリア *Aliivibrio fischeri* の生物発光強度に及ぼす環境汚染物質の複合影響に関する研究」

学位申請者 関根 嗣晃

キーワード：複合影響, 海洋性発光バクテリア *Aliivibrio fischeri*, 生物発光強度, 金属錯体, 揮発性有機化合物

本文

大気汚染物質の例として、微小粒子状物 (Particulate Matter 2.5、以下 PM_{2.5}) は、粒子態であり様々な混合物である。揮発性有機化合物 (Volatile Organic Compounds) はガス態である。これらの大気汚染物質は視程障害や健康影響をもたらす。PM_{2.5}は呼吸に伴って吸入されると細気管支や肺胞に沈着し、さらにその一部の成分は血液に移行して循環し、全身または局所に酸化ストレスを与えると考えられている。大気汚染物質の長期曝露に起因する世界の早期死亡者数は年間 880 万人を超え、喫煙による影響よりも大きく、その主たる原因は PM_{2.5} であると報告されている。PM_{2.5} のモニタリング法として、重量測定法のような物理学的手法、化学成分分析が主に用いられている。PAH キノン類、Cu²⁺、Fe²⁺は酸化ストレスの原因物質であり、これを有害性の指標とする場合もある。しかし、PM_{2.5}は場所、時期により成分が異なることもあれば未知・未確認の成分が存在する場合もある。そこで、未知・未確認、複合影響を総合的に評価できるバイオアッセイ (生物検定法) が着目されている。本研究室では、海洋性発光バクテリア *Aliivibrio fischeri* (*A. fischeri*, 旧名: *Vibrio fischeri*) を生物材料とする発光細菌試験により PM_{2.5}抽出物の毒性評価を試みた。結果、PM_{2.5}抽出物は混合物であり、生物発光強度が低下する場合もあれば、増加する場合もみられた。具体的に、どの化学成分が影響を及ぼしているのか、複合影響については未解明である。そこで、本研究の目的は、*A. fischeri* の生物発光強度に及ぼす環境汚染物質の複合影響およびその要因についてモデル混合物を用いて明らかにすることである。モデル混合物には、2成分間に化学結合を含む場合として、金属イオン (Cu²⁺、Co²⁺、Zn²⁺) に2座配位子 (エチレンジアミン、グリシン) を反応させ配位構造を変化させた。2成分間に化学結合が見られない場合として、VOCsを選択した。環境試料中の重金属イオンは、ヒト・生態系に対して望ましくない影響を与えることがある。水環境中の重金属イオンは、多くの場合有機または無機化合物と配位結合した錯体として存在し、水生生物への毒性は一様でない。錯体の中で、中心金属イオンに対して非共有電子対をもつ分子やイオンなどの配位子が配位してできる錯体は Werner 型錯体と呼ばれ、配位数に応じて独特の立体構造を形成する。配位子が二座配位子のような場合、共存する量に応じて金属錯体の配

位構造が変化するが、配位構造と有害性の関係について調べた研究は少ない。*A. fischeri* は重金属イオン等の毒性物質と接触することにより、細胞増殖抑制あるいは酵素活性阻害により発光強度が減少する。この性質に基づき、*A. fischeri* は環境試料の有害性評価に広く利用されている。重金属イオンに両座配位子が結合した Werner 型錯体の配位構造が *A. fischeri* の発光強度に及ぼす影響を詳細に調べた例はなく、重金属イオンの毒性に及ぼす錯体形成効果については未だ不明な点がある。そこで本研究では、Werner 型錯体の *A. fischeri* に対する毒性影響を知るための基礎的知見を得ることを目的とし、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} および Cu^{2+} を対象に両座配位子として各金属イオンと典型的に Werner 型錯体を形成することが知られているエチレンジアミンおよびグリシンを反応させ、錯体の配位構造が *A. fischeri* の発光強度に及ぼす影響を検討した。合わせて、*A. fischeri* の生物発光強度に影響を与える物理化学的要因として、紫外線、酸化還元電位および浸透圧が知られている。錯形成においては ORP が変化することが知られており、で酸化還元電位 (ORP) に着目し、各錯イオン溶液の ORP と発光阻害の関係について検討した。また、エチレンジアミン錯体は配位数が変化してもイオン価は常に +2 であるが、グリシン錯体は配位数によって見かけのイオン価は 0 から +2 まで変化する。イオン価は *A. fischeri* による生物利用性に関係すると考えられ、各錯体溶液のイオン価と発光阻害の関係を検討した結果、錯体形成により金属イオンの生物発光阻害が低減することが示された。この要因として、エチレンジアミン錯体の場合は金属錯体溶液の酸化還元電位が、グリシン錯体の場合は見かけのイオン価が生物発光阻害に影響していた。実際に、 $\text{PM}_{2.5}$ で有害性モニタリングに用いられているアスコルビン酸 (AA) アッセイを用いて、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} の $\text{PM}_{2.5}$ 中の酸化ストレスの指標である活性酸素産生能 (ROS 産生能) に錯形成が及ぼす影響を検討した。配位子にはエチレンアミン類 (エチレンジアミン、ジエチレントリアミン、トリエチレンテトラミン) を用いた。 Cu^{2+} および Fe^{2+} の ROS 産生能は、錯体の形成によって抑制されることが示された。このことは、配位子の配位数および安定度定数、および錯体形成により溶液の ORP が低下し、より還元的な環境が形成されることで、AA の空気酸化が抑制されることが考えられる。さらに、配位構造の変化によって ORP が変化し、それに伴い ROS 産生能の変化が見られた。一方、揮発性有機化合物 (VOCs) は混合毒性が物理化学的パラメーターと関連付けられれば、さまざまな VOCs 混合物の毒性を事前に予測できる可能性がある。本研究では、VOCs の 2 成分の等量の混合が単独成分の毒性に及ぼす影響を評価し、特に低用量刺激 (ホルミス、生体の低用量における活動が陰性対照より増大すること) に着目するとともに、VOCs 混合試料の物理化学的パラメーターを分析し、それらの変化を推定することを目的とした。試験対象とした VOCs は、ホルムアルデヒド (FA)、アセトアルデヒド (AA)、トルエン (TL)、エチルベンゼン (EB) を用いた。物理化学的パラメーターとして、VOCs 混合物の揮発性の指標である揮発性指標 (Volatility index, *VI*)、および VOCs 間の自発的混合安定性を示す混合ギブズ自由エネルギー変化 (ΔG_{mix}) および溶解度パラメーターに着目した。その結果、VOCs の疎水性が増加するにつれて単成分の毒性が減少し、水溶性化合物 (FA

および AA) においては二相性の用量応答関係が見られた。さらに、FA および AA と疎水性化合物 (EB、TL) および TL と EB の組み合わせにおいてホルミシスが見られた。疎水性化合物は高い毒性を示したが、TL と EB の組み合わせでは、複合影響の 2 成分間の混合作用を示す Mixture toxicity index (*MTI*) に基づく作用形式は両成分の混合による拮抗的作用が見られ、ホルミシスが見られた。*MTI* は、溶媒中での 2 成分混合の *VI* により変化した。また、複合影響 (混合毒性) は、片方の成分が疎水性である場合に ΔG_{mix} との間に有意な相関関係を示した。これは、混合 VOCs の物理化学的パラメーターがさまざまな VOCs の組み合わせの混合毒性を推定するのに役立つ可能性がある。また、VOCs の発光阻害の要因として VOCs が細胞膜を一部溶解・構造を変化させたことによる呼吸鎖阻害とクオラムセンシング機構のオートインデューサーの生物学的利用能の低下が複合的に関係したことが挙げられる。本研究により、混合物の化学性状を知ることによって複合影響 (混合影響) を推定する可能性が見いだされた。