

論文審査の結果の要旨

氏名 半野 勝正

本論文は4章からなり、第1章はダイオキシン類異性体のメダカ胚への生物毒性と浸透状況についての解析、第2章はダイオキシン類異性体を曝露した場合のメダカ胚における *CYP1A1* 等生物毒性関連遺伝子の発現誘導の解析、第3章は環境水バイオマーカー遺伝子（環境モニタリングに適した遺伝子）の網羅的探索、第4章は環境水バイオマーカー遺伝子を用いた化学物質の複合影響と実環境水を用いた生物毒性評価について述べられている。

現在の環境水の状況は、低濃度で多数の内分泌攪乱物質及びそれらの複合汚染が主流になり、個々の化学物質を個別に化学分析する今までの方法では原因物質の解明に辿りつけない状況がある。申請者はメダカ胚の生体内における環境水バイオマーカー遺伝子の発現変動を解析することにより、化学物質の複合汚染等に対する生物毒性影響を早期に予知し、その原因物質を推定する手法の開発を目指した。

第1章では、ダイオキシン類異性体を曝露した場合のメダカ胚への生物毒性が哺乳類において確立しているダイオキシン類毒性等価係数（TEF）にほぼ比例することを明らかにした。また、メダカ胚内へのダイオキシン類の浸透状況についてGC/MSにより定量分析を行った。その結果、ダイオキシン類は曝露後6時間の間に急激にメダカ胚に浸入しその後ゆっくりと上昇し定常状態になる浸透パターンを示すことを明らかにした。

第2章では、ダイオキシン類等が異物として生体内に浸入する場合に異物代謝応答の働きで知られている *CYP1A1* とその核内誘導を担う *AhR* 関連遺伝子の発現誘導について解析した。その結果、*CYP1A1* の発現誘導量は、TEF と非常に高い相関性があり、ダイオキシン類異性体に対するメダカの応答性は哺乳類と同様であることを確認した。*CYP1A1* はメダカでも有力な環境水バイオマーカー遺伝子であることが明らかとなった。また、メダカには、合計4種類の *AhR* (*AhR1b-1*、*AhR1b-2*、*AhR2a*、*AhR2b*) と1種類の *AhRR* が存在することを明らかとし、ダイオキシン類異性体曝露による各 *AhR* の発現誘導の結果から、4つの *AhR* の中で *AhR2a* の発現誘導性が最も高く、環境水バイオマーカー遺伝子として用いることが可能であることを明らかとした。また、ダイ

オキシシン類の生物毒性発現の抑制的制御機構を司るとされる *AhRR* も *CYP1A1* と同様にダイオキシシン類の毒性と相関性の高い発現誘導性を示し、環境水バイオマーカー遺伝子として有効であることを明らかにした。

第3章では、マイクロアレイ法により環境水バイオマーカー遺伝子の網羅的探索を行った。メダカ胚試料としてダイオキシシン類 10 試料、重金属類 6 試料と実試料 2 試料及びメダカ培養細胞 3 試料の計 21 試料から全 RNA を抽出し、メダカ関連遺伝子及び転写産物の 36,398 種を搭載したメダカカスタム cDNA マイクロアレイを用いて、曝露後 24 時間及び 48 時間においてコントロール胚との発現比が 2 倍以上、若しくは 0.5 倍以下の特異的発現を示した遺伝子を抽出した。その中からリアルタイム PCR 法にて特異的発現誘導が確認できた 18 遺伝子とアレイに搭載されておらず第2章で特異的誘導を確認した 2 遺伝子 (*AhR2a*, *AhRR*) の計 20 遺伝子を環境水バイオマーカー遺伝子として選定した。

第4章では、環境水バイオマーカー遺伝子の発現誘導のパターンからダイオキシシン異性体及び重金属類について、固有の発現誘導パターンがあることを解明した (単独曝露)。

また、ダイオキシシン類異性体の複合曝露及びダイオキシシン類と重金属類の混合曝露による環境水バイオマーカー遺伝子の発現誘導パターンを解析し、各組合せに対して特有の発現誘導パターンがあることを解明した (複合影響)。更に、実際の環境水 (廃棄物最終処分場浸出水) を用いて、環境水バイオマーカー遺伝子の発現誘導パターンを解析し、その特徴を上記の知見と照合することにより、本手法は、環境水の生物毒性を評価し、生物毒性の原因となる化学物質を特定することが可能であることを明らかにした (実環境水への適用)。

複数の化学物質による複合汚染の可能性を持つ環境水の生物毒性影響について複数の環境水バイオマーカー遺伝子の発現誘導パターンの解析から評価する本手法は、将来起こるであろう生物毒性を外見的異常が見出されない 48 時間以内の曝露試験で予見でき、化学物質の複合汚染による生物毒性の発生メカニズムの解明も可能とする点で画期的な手法である。

なお、本論文第2章は、Oda S., Mitani H.との共同研究で *Chemosphere* 誌に公表済みであり、論文提出者が筆頭著者として主体となって解析、および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。