



|                     |                                                                                                                                                           |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | A study of biological significance and toxicity of short-chain nonylphenol ethoxylates [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s)           | 劉, 闖                                                                                                                                                      |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                                     |
| Degree Name         | 博士(環境科学)                                                                                                                                                  |
| Dissertation Number | 甲第11985号                                                                                                                                                  |
| Issue Date          | 2015-09-25                                                                                                                                                |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/60081">https://hdl.handle.net/2115/60081</a>                                                                         |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a>                                 |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                           |
| File Information    | Liu_chuang_review.pdf, 審査の要旨                                                                                                                              |



# 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士 (環境科学)

氏 名 劉 闢

|      |    |     |         |              |
|------|----|-----|---------|--------------|
| 審査委員 | 主査 | 教 授 | 田 中 俊 逸 |              |
|      | 副査 | 教 授 | 露 崎 史 朗 |              |
|      | 副査 | 准教授 | 沖 野 龍 文 |              |
|      | 副査 | 助 教 | 蔵 崎 正 明 |              |
|      | 副査 | 教 授 | 齋 藤 健   | (大学院保健科学研究院) |

## 学 位 論 文 題 名

### A study of biological significance and toxicity of short-chain nonylphenol ethoxylates

(短鎖ノニルフェノールエトキシレートの生物学的意義および毒性に関する研究)

ノニルフェノール誘導体であるノニルフェノールエトキシレートは乳化剤、塗料、除草剤および化粧品の材料として用いられており、近年の研究により、石鹼等の原材料であるノニルフェノールと共に内分泌攪乱化学物質としての作用があることが報告されている。陸水環境中に投棄されたノニルフェノールエトキシレートは、河川微生物あるいは下水処理施設等において短鎖ノニルフェノールエトキシレートに分解されるが、魚類等を用いた毒性研究によれば、エトキシ鎖長が短くなればなるほどLD<sub>50</sub>の値が小さくなる、つまり生物毒性が強まることが報告されている。しかし、短鎖ノニルフェノールエトキシレートの詳細な分解機構および毒性の機構についてはその詳細は未だ不明である。本研究では、短鎖ノニルフェノールエトキシレートの次世代影響を明らかにすることを目的に分化発生期に重要なステップとなるプログラムされた細胞死：アポトーシスに及ぼす影響及びその機構を明らかにした。

まず、短鎖ノニルフェノールエトキシレートが確かに活性汚泥等で分解され難いことを、活性汚泥のリアクターおよび活性汚泥を不活化したリアクターを用いて明らかにした。これまでの知見と併せて考えると、長鎖ノニルフェノールエトキシレートは活性汚泥により短鎖ノニルフェノールエトキシレートに分解されるが、ノニルフェノールまで分解されないことが明らかになった。

次に本研究の目的である短鎖ノニルフェノールエトキシレートがアポトーシスに及ぼす影響をラット副腎髄質腫由来のPC12細胞を用いて調べた。PC12細胞は栄養因子である血清を培地中から除去することでアポトーシスを誘導することが良く知られている。短鎖ノニルフェノールエトキシレートの代表としてノニルフェノールジエトキシレート (NP<sub>2</sub>EO) を本実験では用いた。その結果、NP<sub>2</sub>EO自体はアポトーシスを誘導することは無かったが、無血清培地でPC12細胞に誘導したアポトーシスを0.1 ppmの濃度から抑制する効果があることが明らかになった。また、その機構を調べるとアポトーシス促進因子であるBaxの発現量を抑制することでミトコンドリアから細胞質へのシトクロムC放出量を抑えてアポトーシスを

抑制していることが分かった。PC12細胞の無血清培地により誘導されたアポトーシスはこれまでの研究により生体内酸化状態を亢進させることによるものと分かっている。このNP<sub>2</sub>EOのアポトーシス抑制効果の有無をさらに確かめるために、同じPC12細胞を用いて、無血清と同じく細胞内過酸化を起こす銅投与によるアポトーシスに対するNP<sub>2</sub>EOの影響を調べた。その結果、無血清と同じように0.1 ppmのNP<sub>2</sub>EO曝露により銅誘導アポトーシスが抑制され、その抑制機構は無血清の場合と同じくアポトーシス促進因子であるBaxの発現量を抑制することでミトコンドリアから細胞質へのシトクロムC放出量を抑えるものと判明し、生体内の酸化状態を改善していることが推測された。面白いことに、本研究室の過去の研究でノニルフェノール (NP<sub>0</sub>EO) は生体内過酸化状態を促進することでアポトーシスを増強しており、NP<sub>2</sub>EOは細胞のアポトーシス反応においてノニルフェノールと全く逆の反応を示すことが明らかになった。

この違いをさらに検証するためにノニルフェノールモノエトキシレート (NP<sub>1</sub>EO) およびNP<sub>2</sub>EOに比べやや長鎖ノニルフェノールエトキシレートであるNP<sub>5</sub>EOおよびNP<sub>10</sub>EOのアポトーシスに及ぼす影響を調べた。興味深いことに、NP<sub>5</sub>EOおよびNP<sub>10</sub>EOは誘導したアポトーシスに対して無反応であったが、NP<sub>1</sub>EO はNP<sub>2</sub>EO 同様にアポトーシスを抑制する効果があることが確かめられた。以上の結果からノニルフェノール自体はアポトーシスを促進するが短鎖ノニルフェノールエトキシレートはアポトーシスを抑制し、鎖長が延びるとその抑制効果が消失することが初めて示された。また、この抑制及び促進効果には生体内酸化状態が大きく関わっていることが示唆された。

以上、本論文により、下水処理等により生成される短鎖ノニルフェノールエトキシレートは、誘導したアポトーシスをアポトーシス促進因子を抑えることで抑制していることが証明された。このことは、水圏中に放出された短鎖ノニルフェノールが水棲動物に影響を与えるのみならず、それを摂取した際のヒトにも分化・発生等に影響を及ぼす可能性が示唆された。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。