

「内分泌かく乱物質」

平成 12 年度採択研究代表者

武田 健

(東京理科大学薬学部 教授)

## 「大気中に存在する新しいタイプの内分泌攪乱物質」

### 1. 研究実施の概要

都市大気浮遊粒子状物質の約 40%はディーゼル排気微粒子由来である。本研究ではディーゼル排ガスに含まれる様々な内分泌かく乱物質を同定し、その作用について分子レベルで解析する。各種成分の生殖機能への影響を系統、種、暴露時期を変えて評価する。また、各成分の妊娠期暴露の影響を検討するため、胎仔の性分化、脳神経系及び生殖系の発達に対する影響を病理学的、分子生物学的及び行動薬理学的手法を駆使して検討する。

平成 12 年度に ICR 系マウスにおいて胎仔期ディーゼル排ガス暴露により雄性胎仔の性分化関連因子 mRNA 発現が低下することを明らかにした。

平成 13 年度は、胎仔期ディーゼル排ガス暴露による影響の系統差を検討した。ICR 系マウスの他に、C57BL/6J 系、ddY 系の 3 系統を用いた結果、ICR 系では Ad4BP/SF-1 及び MIS が、C57BL/6J 系では MIS のみの発現が低下したが、ddY 系はいずれの変化も認められなかった。雄性胎仔ディーゼル排ガス暴露による性分化関連因子 mRNA 発現への影響の程度はマウスの系統により大きく異なることが明らかになった。

胎仔期ディーゼル排ガス暴露による脳神経系への影響を検討した。出生仔の行動解析から、ディーゼル排ガス暴露は学習記憶系に影響を及ぼすことを示唆する結果が得られた。

一方、ディーゼル排ガス中に含まれている微粒子 (DEP)の性ステロイドホルモンレセプター mRNA 発現への影響を *in vitro* 培養系で解析した結果、DEP 処理により精巣ライディッヒ細胞及びヒト乳がん細胞のエストロゲンレセプター mRNA の発現が有意に低下することが明らかになった。

ディーゼル排ガス暴露のマウス個体に及ぼす影響、また *in vitro* 系において DEP の各種組織由来の細胞に及ぼす影響を DNA チップを用いて mRNA 発現レベルで検討した。組織毎に特徴的な遺伝子が多数変動することが明らかになった。

平成 14 年度以降は、雄性胎仔生殖腺分化関連因子の発現の低下が、その後の雄性生殖腺の発達にどのような影響を及ぼすかを検討するとともに、雌性胎仔への影響も検討する。また、学習記憶系への影響を示唆する結果を得たことから、脳神経系への影響をより詳細に解析する。また、DEP による性ステロイドホルモンレセプター mRNA の発現低下に関しては原因物質を特定するとともに作用機序を明らかにする。DNA チップ解析において発現変動した遺伝子の生体内での役割

を調べ、変動による生体への影響を明らかにする。

## 2. 研究実施内容

### 【目的】

生体に取り込まれた環境中の様々な化学物質が内分泌系に影響を与え、生殖系や脳神経系などに影響を及ぼすことが危惧されている。我々は、実際の環境中濃度に匹敵するディーゼル排ガス (DE)を妊娠マウスに吸入暴露し、胎仔への影響を性分化関連因子 mRNA 発現量を指標に検討した。その結果、雄性生殖腺分化に関与する MIS 及び Ad4BP/SF-1 mRNA 発現量が低下することを見いだした。本年度は、実験動物数を増加して再度上記事実を確かめると同時に、DE による両遺伝子の発現低下の濃度依存性及びマウス系統間での感受性の違いを検討した。また、胎仔期 DE 暴露が脳神経系へ与える影響を調べるために、行動薬理学的手法を用いて検討した。さらに、in vitro 培養系でDE中に含まれるディーゼル排気微粒子 (DEP)の性ステロイドホルモンレセプターmRNA 発現に及ぼす影響を検討した。

### 【方法】

#### 1. DE 暴露による性分化関連因子への影響

##### 1.1 濃度依存性の検討

ICR 系妊娠マウスを DE 暴露群 (DEP:0.1 mg/m<sup>3</sup>, 3.0 mg/m<sup>3</sup>)及び対照群に分け、妊娠 2 日目から 13 日目まで DE を暴露した。妊娠 14 日目に胎仔を摘出した。雄性胎仔における MIS、Ad4BP/SF-1 mRNA の発現を Real-Time Quantitative PCR 方を用いて定量的に測定した。

##### 1.2 系統差の検討

妊娠マウス (ICR 系、C57BL/6J 系、ddY 系)を DE 暴露群 (DEP:0.1 mg/m<sup>3</sup>)及び対照群に分け、妊娠 2 日目から 13 日目まで DE を暴露した。妊娠 14 日目に胎仔を摘出し、MIS 及び Ad4BP/SF-1 mRNA 発現を測定した。

#### 2. DE 暴露による脳神経系への影響

ICR 系妊娠マウスを DE 暴露群 (DEP: 3.0 mg/m<sup>3</sup>)及び対照群に分け、妊娠 2 日目から 17 日目まで DE を暴露した。出生後、7 及び 10 週齢時に Step-down 型受動的回避行動試験、14 週齢時に自発運動量、痛覚感受性試験を行った。

#### 3. DEP に含まれる化学物質の内分泌かく乱作用の解析

3.1 精巣ライディヒ細胞株 TM3 細胞、ヒト乳癌細胞株 MCF-7 細胞に DEP を処理し、エストロゲンレセプターmRNA 発現量を定量的に解析した。

3.2 DE を吸入暴露したマウスの各種組織あるいは、DEP を処理した培養細胞における遺伝子発現変動を DNA チップを用いて検討した。

### 【結果・考察】

1. 妊娠期 DE 暴露の雄性胎仔への影響を検討した結果、Ad4BP/SF-1 mRNA の発現が、0.1 mg/m<sup>3</sup> 暴露群で約 20%、3.0 mg/m<sup>3</sup> 暴露群で約 50%低下した。MIS mRNA 発現量も同様に、それぞれ約 15%、約 50%低下した。このとき Ad4BP/SF-1 転写遺伝子の下流にあたるステロイド

ホルモン合成酵素のうち  $3\beta$ -HSD 及び Aromatase 遺伝子の発現が特に低下していた。なお、エストロゲン及びアンドロゲンレセプターの発現には変化が認められなかった。

2. 胎仔期ディーゼル排ガス暴露による Ad4BP/SF-1 及び MIS の発現変動の系統差を検討した結果、ICR 系では Ad4BP/SF-1 及び MIS が、C57BL/6J 系では MIS のみの発現が低下したが、ddY 系はいずれの変化も認められなかった。従って、DE 暴露による両遺伝子発現への影響には系統差が存在することが示唆された。胎仔における両遺伝子の発現の低下が、出生後どのような影響を引き起こすか検討する必要がある。
3. 胎仔期に DE 暴露を受けたマウスの脳神経系への影響を検討した結果、10 週齢における Step-down 型受動的回避行動試験において、DE 暴露を受けたマウスは有意に低値を示した。自発運動量及び痛覚感受性は影響が認められなかったことから、学習記憶系への影響が考えられる。今後、情動面などへの影響も検討していく予定である。
4. DEP に含まれる化学物質の内分泌かく乱作用を検討するためにマウス精巣ライディッヒ細胞 TM3、ヒト乳癌細胞 MCF-7 に DEP を処理し、エストロゲンレセプター mRNA 発現量を定量的に解析した。その結果、DEP により濃度依存的にエストロゲンレセプター mRNA の発現量が低下することが明らかになった。新しいタイプの内分泌かく乱作用と考えられ、原因となる物質の特定、作用機序を検討する予定である。
5. 胎仔期 DE 暴露の影響及び DEP の培養細胞に対する影響を DNA チップを用いて遺伝子発現レベルで網羅的に解析した。その結果、多数の遺伝子の発現が変動すること、細胞種により変動パターンが異なることが明らかになった。今後、発現が変動した遺伝子の機能を調べ、生体への影響を検討していく予定である。

### 3. 研究実施体制

#### In vitro グループ

- ① 武田 健(東京理科大学、教授)
- ② 研究項目
  - ・ DEP に含まれる化学物質の内分泌かく乱作用の解析

#### In vivo グループ

- ① 武田 健(東京理科大学、教授)
- ② 研究項目
  - ・ DE 暴露による性分化関連因子への影響
    1. 濃度依存性の検討
    2. 系統差の検討

#### 行動グループ

- ① 武田 健(東京理科大学、教授)
- ② 研究項目
  - ・ DE 暴露による脳神経系への影響

#### 4. 研究成果の発表

##### (1) 論文発表

- Hirohisa Takano, Rie Yanagisawa, Takamichi Ichinose, Kaori Sadakane, Ken-ichiro Inoue, Sei-ichi Yoshida, Ken Takeda, Shin Yoshino, Toshikazu Yoshikawa, Masatoshi Morita, Lung expression of cytochrome P450 1A1 as a possible biomarker of exposure to diesel exhaust particles., Arch Toxicol (2002) 76: 146-151
- 吉田 成一, 武田 健 「環境汚染物質による生体恒常性の攪乱「生殖系に影響を及ぼす化学物質」, 水環境学会誌 Vol.257 No.2 p68-72、2002
- 吉田 成一, 武田 健 「環境と未病—大気汚染が健康に与える影響」別冊・医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社, p30-34, 2001
- 吉田成一、武田 健 「ディーゼル排ガスが生体に及ぼす影響」「環境安全」No.91 p9-10 東京大学環境安全センター 2002

##### (2) 特許出願

なし