

「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

我々は本プロジェクトにおいて、大気中に存在する内分泌攪乱物質に注目した。都市大気浮遊粒子状物質の約40%はディーゼル排気由来である。そこで本研究では(1)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。(2)ディーゼル排ガス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、(3)ディーゼル排ガスを妊娠期に暴露し、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ことを計画した。

平成12年度は、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ICR系マウスの他に、C57BL/6J系、ddY系の3系統のマウスを用いて検討した。ICR系では性ステロイドホルモン合成転写因子Ad4BP/SF-1及びミューラー管形成抑制因子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予試験的に検討した。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培養系において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年度は、胎仔期ディーゼル排ガス暴露による出生仔の生殖機能及び脳神経系への影響をICR系マウスで検討した。雄性出生仔 (4週齢) の副生殖腺重量が有意に増加し、副生殖腺の発育に関与するテストステロンの血中濃度が有意に増加することが明らかにな

った。また、雌性胎仔への影響を検討したところ、卵胞の発生に関与するBMP-15 (Bone morphogenetic protein -15)のmRNA発現量が有意に減少した。一方、脳神経系への影響では、胎仔期ディーゼル排ガス暴露により10週齢のマウスにおいて学習記憶能力が有意に低下した。4週齢では学習記憶能力に影響は認められなかった。このことから、胎仔期DE暴露により、出生後、発育段階のある時期に、学習記憶能力に影響を与える可能性が示唆された。

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。DEPを分離し、ER mRNA発現低下に関与する原因物質の探索を行った。その結果、活性の強い分画が得られた。

平成15年度以降は、学習記憶能力の低下に関連して脳組織、神経組織の組織化学的变化を検討するとともに、感受性の高い時期を特定する。さらに脳内の記憶学習系に関わる諸因子の発現変動を解析することにより脳神経系への影響について検討する。また、性ステロイドホルモンレセプターmRNAの発現低下に関わる物質の同定を引き続き行う。原因物質の判明後、それぞれの内分泌かく乱作用機序を解析する。その他、胎仔期DE暴露雄性マウスにおいて、副腎のAd4BP/SF-1 mRNAの発現変動を解析する。また、胎仔期暴露後出生した仔の生殖系組織重量増加及び血中テストステロン濃度の上昇の機構を解明する。さらに、原因物質同定の一環として、DEのガス成分、微粒子成分 (DEP)のどちらが活性を有するか検討する。

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近い

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。そこで、(1)胎仔期にディーゼル排ガスを暴露した雄性マウスの出生後の生殖系の変化を検討すること、(2)胎仔期ディーゼル排ガス暴露雌性マウスの生殖腺分化関連因子への影響を明らかにすることを試みた。

胎仔期DE暴露が、出生後の発達の段階で脳神経系へ何らかの影響を与えることを見いだしたが、その詳細についてはわかっていない。そこで、今年度は、脳神経系への影響を詳細に解析するために、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)による性ステロイドホルモンレセプターmRNA発現量減少の作用機構及び原因物質の探索を試みた。

【方法】

1. DE暴露による性分化関連因子への影響

1.1 出生仔への影響

ICR系妊娠マウスをDE暴露群 (DEP : 0.3、1.0、3.0 mg/m³)及び対照群に分け、妊娠2

日目から16日目までDEを暴露した。雄性出生仔が4、8、10週齢に成長した時点で解剖し、各種組織重量を測定した。4週齢雄性マウスに関しては血中テストステロンの濃度を測定し、テストステロン合成酵素mRNA発現量を定量的に解析した。

1.2 雌性胎仔マウスへの影響

ICR系妊娠マウスをDE暴露群 (DEP : 0.1 mg/m³) 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、生殖腺分化関連因子mRNA発現量を定量的に解析した。

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 : 0.3、1.0、3.0 mg/m³) 及び対照群に分け、妊娠2日目から16日目までDEを暴露した。出生後、4及び10週齢時にStep-down型受動的回避行動試験を行った。

3. DEPに含まれる化学物質の内分泌かく乱作用の解析

精巣ライディッヒ細胞株TM3細胞にDEP分画物を処理し、エストロゲンレセプターmRNA発現量を定量的に解析した。タンパク合成阻害剤及び、微粒子除去を行いER mRNA発現量低下作用のメカニズムを解析した。

【結果・考察】

1. 妊娠期DE暴露の雄性出生仔への影響を検討した結果、4週齢時における副生殖腺（前立腺、凝固腺、精嚢）重量及び精巣、精巣上体重量が対照群に比べ有意に増加した。血中テストステロン及び黄体形成ホルモンレベルを測定したところ、血中テストステロン値がDE暴露により有意に増加した。しかし、精巣一日精子産生能及び精巣上体尾部中精子濃度に有意な変化は認められなかった。これらのことから、DE胎仔期暴露により、血中テストステロン濃度が上昇し、その結果、副生殖腺重量が増加することが示唆された。また、精巣内ステロイドホルモン合成関連酵素mRNA発現を解析した結果、増加傾向が認められた。
2. 胎仔期DE暴露による雌性胎仔生殖腺分化に関する遺伝子発現を検討した結果、雌性胎仔で発現変動が認められたAd4BP/SF-1、MISの両mRNA発現量に変動は認められなかったが、卵胞発生に関与するBone morphogenetic protein-15 (BMP-15) mRNA発現量が有意に低下した。これらのことから、胎仔期DE暴露による雌性胎仔への影響は雄性胎仔と比べ小さいことが示唆されたが、卵胞の発生に何らかの影響を与える可能性が示唆された。
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、4週齢では対照群と比較して各濃度群において変化が見られなかったが、10週齢では、一部の濃度群で学習記憶能力が有意に低下した。胎仔期暴露により、出生後、発育段階のある時期、学習記憶能力に影響を与える可能性が示唆された。今後、脳の光学顕微鏡、電子顕微鏡による組織学的な観察を行い、胎仔期DE暴露による学習記憶能力への影響の原因を検討する。
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

ツヒ細胞TM3細胞にDEP、DEP構成成分（12種類）、DEP抽出物分画物（DEPE Fr）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。DEPによるエストロゲンレセプター mRNA発現抑制はシクロヘキシミドにより阻害されたことから、DEPによるER mRNA発現抑制作用は何らかの新規合成タンパク合成阻害が関与していることが示唆された。構成成分による原因物質探索ではDEPによるER mRNA発現抑制活性と比較すると各化合物の活性は小さかった。DEPE Frを用いた活性測定ではER mRNA発現抑制活性を有する画分を得ることが出来た。今後、活性画分をさらに再分画し原因物質の同定を試みる。

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. 出生仔への影響
 2. 雌性胎仔マウスへの影響

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. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

- (1) 論文（原著論文）発表
なし
- (2) 特許出願
なし