

「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ことから、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曝露し、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。

以下、プロジェクト毎にその成果を示す。

- (1) ディーゼル排気微粒子 (DEP) には性ステロイドホルモンレセプターmRNA発現を抑制する活性や、抗アンドロゲン様作用を示す活性があることを明らかにしている。昨年度より、原因物質の検索に着手し、現在、DEP抽出物、分画物のうち中世分画に存在する活性物質の同定を行っている。
- (2) ディーゼル排ガス (DE) の胎仔期曝露により、雄性マウス胎仔性分化関連因子 (Ad4BP/SF-1、MIS) mRNAの発現が低下すること、さらに雌性マウス胎仔BMP-15 mRNAの発現が低下することが明らかになった。また、胎仔期曝露を行ったマウスでは、血中テストステロン値の変動、精巣組織像の変化および一日精子生産量の低下など悪影響が認められ、さらにその影響はDEをフィルターろ過したガス成分を曝露した場合でも残存していた。今年度は、胎仔期から成長期に至る連続曝露の影響を検討し、同様に雄性生殖系に影響を与えることが判明した。また、精巣特異的遺伝子を搭載したマイクロアレイを用いて、DE曝露の影響を検討し、いくつかの遺伝子発現が変動するという結果を得ており、現在、その変動と生殖機能との関連について検討中である。
- (3) DEのマウス胎仔期または新生仔期曝露により、成長後の学習記憶能力の低下が起こることが示唆されている。また、新生仔脳内遺伝子発現を検討した結果、両曝露ともCYP1A1mRNA発現量の上昇を引き起こし、DE中の成分が脳内へ移行している可能性が示唆された。さらに、電子顕微鏡を用いた検討でも、脳内組織にDEPと推定される粒子が認められている。本年度は、行動影響に関する検討を系統的に実施し、低濃度の曝露群で

自発運動量に変動が生じることを認め、さらにそれらのマウスの脳内モノアミン量（ドパミン、セロトニンなど）に変化が起きている結果を得た。

これらの成果を踏まえ、今後、原因物質の同定作業を進め、また、生体内でのDEPの取り込み、移行、蓄積機構の解明を進めたい。今年度は本研究の最終年にあたることから、今までに得られた成果をまとめて、論文発表や学会発表等を積極的に行い、安全で健康な生活環境を築くための科学的基礎資料を提供したいと考えている。

2. 研究実施内容

【目的】

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ことから、本研究では（１）ディーゼル排ガス(DE)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）DE曝露の雄性生殖機能への影響を解析する、（３）DE曝露の脳神経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目的とした。

【方法】

1. ディーゼル排気微粒子(DEP)に含まれる様々な内分泌かく乱物質の同定とその作用機序

1.1 エストロゲンレセプターmRNA(ERmRNA)発現低下に関与する物質の同定

精巣ライディッヒ細胞株TM3細胞にDEP分画試料を処理し、ERmRNA発現量を定量的に解析した。

1.2 抗アンドロゲン物質の同定

LC/MSによる原因物質同定を実施した。

2. DE曝露による雄性生殖系への影響

2.1 生殖機能に及ぼす影響

ICR系妊娠マウスに妊娠2日目から曝露を開始し、出産・授乳期、成長期も曝露を継続した（以下、連続曝露系）。曝露は、（１）高濃度曝露群：1日12時間、3.0 mg DEP/m³濃度、（２）低濃度曝露：1日8時間（平日のみ）、0.1 mg DEP/m³濃度、の二種類である。雄性出生仔を6、12齢で麻酔下に心採血し、生殖器を摘出して重量を測定した。片側の精巣上体は培養液にミンス後、位相差顕微鏡下に運動率、および形態の観察を行った。各臓器をHE染色し、光学顕微鏡下に組織学的検討を行なった。DSP（一日精子生産量）、血清中総テストステロン濃度(T)を測定した。さらに、精巣における性ステロイドホルモン合成関連因子の各mRNA発現量を測定した。また、精巣特異的遺伝子のマイクロアレイを用いた解析を行った。

2.2 電子顕微鏡観察

2.1で実施した低濃度曝露による動物の精巣組織を用いて、電子顕微鏡を用いた超微形態観察を行った。

3. 曝露による脳神経系の発達に対する影響

3.1 各種遺伝子発現に対する影響

ICR系マウスに妊娠2日から16日まで0.3〜3.0 mgDEP/m³の濃度で曝露した。大脳を生後2〜16日齢の時点で実験に供した。バイオマトリックス研究所製マイクロアレイを用いて解析を行い、さらに定量的PCR法でmRNAの変動を検討した

3.2 行動に対する影響

ICR系マウスにDE低濃度連続曝露を7週齢まで実施し、8週齢より雄性マウスを用いて6種類の行動評価試験を行った。行動試験終了直後の11週齢で脳を摘出、電気化学検出器付きHPLCで試料中モノアミン類およびその代謝物を一斉定量分析した。

3.3 脳神経組織の病理学的解析

高濃度または低濃度連続曝露群について、脳神経組織および甲状腺を中心として電子顕微鏡を用いた超微形態観察を実施した。

【結果・考察】

1. ディーゼル排気微粒子 (DEP) に含まれる様々な内分泌かく乱物質の同定とその作用機序

1.1 ERmRNA発現低下に関与する物質の同定

中性画分中の成分の同定を急いでいる。

1.2 抗アンドロゲン物質の同定

抗アンドロゲン作用物質についてそのプロフィールおよび含量推定を実施中である。

2. DE曝露による雄性生殖系への影響

2.1 生殖機能

高濃度曝露群において、体重および体重換算生殖器重量には変化は確認されなかった。曝露群6週齢のDSPは有意に低下し、Tは12週齢で有意に低下した。また、性ホルモン関連mRNA発現量が変動した。また、マイクロアレイ分析では、有意に変動した遺伝子数は、6週齢時15遺伝子、12週齢時3遺伝子であった。低濃度曝露においても、影響が認められた。一方、精液性状では、運動率と正常形態精子率が低下した。

2.2 電子顕微鏡観察

セルトリ細胞ミトコンドリアクリステ像の崩壊が認められた。間質細胞脂肪滴の形態異常が認められた。また、精細管内で、先体形成異常核形態異常など顕著な奇形精子が多く観察された。

以上の結果より、DE連続曝露は、内分泌攪乱作用を示し、精子形成過程に影響を与えており、次世代的に精液性状を悪化させる因子の一つである可能性が示唆された。

3. 曝露による脳神経系の発達に対する影響

3.1 各種遺伝子発現に対する影響

マイクロアレイで変動の認められた遺伝子のうち、機能の明らかなXist遺伝子に着目し、検討した結果、雌雄ともに濃度依存的有意な上昇が認められた。

3.2 行動

自発運動量において曝露群で測定開始11、12時間後に有意な亢進、17時間後に有意な低下が認められた。脳内モノアミンに関して、ドパミン（DA）系では代謝回転（HVA/DA）が有意に亢進した。一方、セロトニン（5-HT）系においては5-HT量、およびその代謝産物である5-HIAA量が有意に増加し、代謝回転（5-HIAA/5-HT）も有意に亢進した。以上、DE曝露はDA系および5-HT系を亢進させる可能性が示唆され、行動への影響が推定された。

3.3 脳神経組織の病理学的解析

脳組織については、昨年度までと同様の所見が得られ、DE曝露により病理学的変化が起こること確認された。甲状腺組織においては、光学顕微鏡による観察では、曝露群で特に毛細血管壁に変性や血管内皮細胞の脱落が認められ、電子顕微鏡による観察からは曝露群でリソソームの大きさや数の増加が認められた。現在、詳細を観察中である。

3. 研究実施体制

In vitroグループ

- ① 研究分担グループ長：武田 健（東京理科大学薬学部、教授）
- ② 研究項目：ディーゼル排気微粒子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 研究分担グループ長：武田 健（東京理科大学薬学部、教授）
- ② 研究項目：胎仔期ディーゼル排ガス暴露による雌性・雄性生殖系、内分泌系、免疫系への影響

行動グループ

- ① 研究分担グループ長：武田 健（東京理科大学薬学部、教授）
- ② 研究項目：ディーゼル排ガス胎仔期暴露の脳神経系におよぼす影響の解析

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文発表

- Yanagisawa R, Takano H, Inoue K, Ichinose T, Sadakane K, Yoshida S, Takeda K, Yoshino S, Yamaki K, Kumagai Y, Yoshikawa T: Complementary DNA

microarrayanalysis in acute lung injury induced by lipopolysaccharide and
dieselexhaust particles. *Exp Biol Med* 2004 Nov;229(10):1081-7