

「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が明らかになった。本年度、原因物質の探索に着手し、DEP抽出物、分画物を用いて検討したところ、中性画分に原因物質が含まれていることが判明した。
- (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。本年度、胎仔期にDEを曝露したマウスの出生後の雄性生殖系への影響を検討したところ、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。
- (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。本年度、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。

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るとともに、胎児期～成長期までの全域DE曝露を実施して、その雄性生殖系および脳神経系におよぼす影響を検討し、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

酵母ハイブリッド法を用いてDEP分画試料の抗アンドロゲン作用の評価を行なった。ソックスレー抽出法で得られたDEP抽出物を、水溶性強酸性、脂溶性強酸性、弱酸性、フェノール性、中性、塩基性の六画分に分画し検討した。

2. DE曝露による雄性生殖系への影響

ICR系妊娠マウスに妊娠2日目から16日目までの期間、1日12時間、1.0 mg DEP/m³の濃度でDEおよびfiltered-DE (0.30 μm以上の粒子状物質を99.97%除去するフィルターを使用) を曝露した。妊娠17日目以降は、清浄大気下で出産・飼育し、対照群は全期間清浄大気下で飼育した。雄性出生仔を8、16日齢および3、4、5、12週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。各臓器をホルマリンで固定後HE染色し、光学顕微鏡下に組織学的検討を行なった。DSPは、精巣をホモジナイズして精子濃度を求め、重量換算して算出した。また、ELISA法で血清中総テストステロン濃度を測定した。さらに、定量的PCR法で精巣におけるテストステロン分泌を調節するホルモンのレセプターおよびテストステロン産生に関与す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。

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DEを0.3、1.0、3.0 mgDEP/m³の濃度で曝露し、対照群は清浄大気下で飼育した。暴露時期は以下のように設定した。

①胎仔期DE曝露：妊娠2日目から妊娠16日目まで母体曝露。

②新生仔期DE曝露：出生日から16日目まで母仔共に曝露。

仔マウスを2、5、16日齢の時点で解剖し、脳および血液を採取した。前脳部

を材料とし、定量的PCR法を用いて、性ステロイドホルモン関連遺伝子群、甲状腺ホルモン関連遺伝子群、ストレス応答遺伝子群の発現量を測定した。

3.2 脳神経組織の病理学的解析

ICR系妊娠マウスに妊娠2日目から16日目まで胎仔期曝露を行い、その出生仔脳組織を8週および11週齢時に採取し、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いた組織学的検討を行なった。

【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

DPE抽出物、分画物を用いてERmRNA発現量への影響を検討した結果、中性物質画分(N)にERmRNA発現量を低下させる原因物質が含まれていることが推察された。N画分のカラムクロマト分画物には、複数の画分に低下活性が認められた。また、CYP1A1mRNA発現誘導が種々の画分で認められたことからAhレセプター刺激物質は多数存在することが示唆された。

1.2 抗アンドロゲン物質の同定

得られた六画分は、いずれの画分もアンドロゲン作用は示さなかったが、弱酸性、フェノール性、中性の各画分に抗アンドロゲン作用が認められた。これらの物質についてさらに分画し、最終的にLC/MSを行なったところ、分子量259及び212の物質が含まれることが明らかとなった。

2. DE曝露による雄性生殖系への影響

胎仔期DE曝露では、体重が8日齢および5週齢で有意に低下し、16日齢で低下傾向を示した。一方、体重換算した副生殖腺重量は、8および16日齢で有意に増加し、5週齢で低下傾向を示した。また、DSPが5および12週齢で有意に低下した。DSP低下の原因を検討する目的で、テストステロンおよび同合成関連因子の遺伝子レベルでの解析を行なった。その結果、血清中テストステロン濃度は、3週齢で有意に減少し、12週齢で有意に上昇した。また、テストステロン合成関連因子mRNA発現量では、5週齢でFSHRが有意な増加、ARが増加傾向を示し、12週齢でStARが有意に増加、ERおよび17β-HSDが減少傾向を示した。一方、胎仔期filtered-DE曝露では体重換算した精巣重量が16日齢で有意に低下し、8日齢で低下傾向を示した。また、DE曝露群と同様にDSPが12週齢で有意に低下した。さらに、血清中テストステロン濃度が5週齢で有意に上昇した。mRNA発現量では、5週齢でFSHRが有意に増加し、LHRが増加傾向を示し、12週齢でLHR、P450c17および17β-HSDが有意に増加し、StARが増加傾向を示した。さらに、精巣組織の観察の結果、両曝露とも減数分裂異常像である多核巨細胞が多く認められたほか、精細管内空胞化や分裂停止像の増加などの異常所見が認められた。

したがって、DEあるいはfiltered-DEの胎仔期曝露はともに血清中テストステロ

ン濃度の変動および精巣組織細胞の異常像を惹起しており、その結果、精子形成を抑制している可能性が示唆され、出生仔の精巣機能に有害な影響を与えることが示された。

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

①胎仔期DE曝露：DE曝露により2日齢におけるCYP 1A1 mRNA発現量が増加したが、その後の発現上昇は確認できなかった。また、2日齢雌および5日齢雄でER α horumRNA、ER β mRNA、Aromatase mRNA発現量が増加した。

②新生仔期DE曝露：DE曝露により5日齢におけるCYP 1A1 mRNA発現量が増加した。また、雄の新生仔におけるH0-1 mRNA発現量が増加したが、雌では確認できなかった。2日齢におけるER α mRNA発現量が雌雄ともに増加し、とくに雌では5および16日齢においても増加した。

以上、周産期のDE曝露は新生仔の脳の成熟や性分化に重要な遺伝子の発現に影響を与える可能性が示唆され、今後これらの変動により、血中ホルモン値や行動へ影響が与えられるのかどうかを検討する必要があると思われる。

3.2 脳神経組織の病理学的解析

曝露群において、大脳皮質、小脳、海馬にcaspase3陽性細胞が散在して認められた。電子顕微鏡的にもapoptosis小体形成過程の特徴的所見であるクロマチンの不均一な凝集やCrescent-Shaped Spacesを伴った核不整を呈する細胞が確認された。また、末梢微小血管周囲にある清掃細胞数が減少傾向にあり、その細胞質内顆粒に変性像やDE粒子と疑われる沈着物質が観察された。さらに、血管周囲にあるアストロサイトの膨潤化および微小血管狭窄が各部位に散在的に認められた。これらの結果より、母体のDE曝露がその出生仔の脳組織に対して病理学的影響を与えた可能性が高く、学習記憶および行動におよぼす影響が推定されることから、今後、それらに対する詳細な検討が必要であると考えられた。

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：
 - ・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 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曝露による雌性・雄性生殖系、内分泌系、免疫系への影響

In vivoグループ

① 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（論文発表および特許出願）

（１）論文（原著論文）発表

- Takeda, K., Tsukue, N., and Yoshida, S.: Endocrine-disrupting activity of chemicals in diesel exhaust and diesel exhaust particles. *Environmental Science*. 11, 1, 033-045, 2004
- Tsukue, N., Yoshida, S., Sugawara, I., and Takeda, K.: Effect of Diesel Exhaust on Development of Fetal Reproductive Function in ICR Female Mice. *Journal of Health Science*, 50 (2), 174-180, 2004

（２）特許出願

なし