

② Down-regulations of expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively

3. 総説

石塚真由美、藤田正一 「化学物質による野生生物及び生態系への影響とは」 化学物質と環境 2003 58:7-10

4. 著書

石塚真由美、岩田久人、藤田正一：トキシコロジー7 章 環境毒性（日本トキシコロジー学会）2002（290-303）

板倉隆夫、石塚真由美、藤田正一：シトクロム P450（講談社サイエンティフィック）印刷中

藤田正一「臨床薬物代謝化学」（廣川書店）印刷中

Ishizuka M, Yamamoto Y, Takada A, Kazusaka A, Fujita S. The loss of enzyme activities by a single amino acid substitution of a newly cloned rabbit CYP2D isozyme, CYP2D24. International Congress Series. 2002 1223:121-126

平成 15 年度

1. 論文発表

1) Zein Shaban, Samir El-Shazlyb, Mayumi Ishizuka, Kazuhiro Kimura, Akio Kazusaka, and Shoichi Fujita. PPAR · dependent Modulation of Hepatic CYP1A by Clofibrilic Acid in Rats (in press)

2) Konomu Saito, Hyung-Sub Kim, Noriaki Sakai, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Polymorphism in diazepam metabolism in Wistar rat (in press)

3) Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short period exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone metabolism in testis of prepubertal rats. Arch Toxicol. 2003 Aug;77(8):446-51.

4) Sakamoto KQ, Nakai K, Aoto T, Yokoyama A, Ushikoshi R, Hirose H, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Cytochrome p450 induction and gonadal status alteration in common carp (Cyprinus carpio) associated with the discharge of dioxin contaminated effluent to the Hikiji River, Kanagawa Prefecture, Japan. Chemosphere. 2003 May;51(6):491-500.

5) Ishizuka M, Yonemoto J, Zaha H, Tohyama C, Sone H. Perinatal exposure to low doses of 2, 3, 7, 8-

tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters sex-dependent expression of hepatic CYP2C11. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003;17(5):278-85.

6) Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita, Yoko Goto, Takeomi Isono, Ishinazaka Tsuyoshi, Sakurai Yasunori. Organochlorine compound accumulation in Steller sea lion *Eumetopias jubatus* migrating along the coast of Hokkaido in northern Japan. *Jpn J Toxicol.* 2003;6(1):1-10

2. 学会発表

1) 第135回日本獣医学会 (平成15年春)

① Nakano et al. マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構—鉄による効果—

② Ibrahim et al. Down-regulations of expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively

2) 第30回 日本トキシコロジー学会

① Nakano et al. マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構—鉄による効果—

② Sasaki et al. 抗菌剤フラゾリドンとその代謝物が肝薬物代謝酵素系に与える影響

3) 環境ホルモン学会 第6回研究発表会

① Joji Tsunada, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka and Shoichi Fujita. Transient neonatal exposure of brain to testosterone surge initiates amplification of testosterone production in astrocytes.

② Naosuke Saji, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Biomonitoring of the Harbor Seawater Environment in Hokkaido Coast with Induced Hepatic Cytochrome P450 of Minnow

4) Annual Meeting of Society of Environmental Toxicology and Chemistry in New Zealand

① Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita, Yoko Goto, Takeomi Isono, Tsuyoshi Ishinazaka, Vladimir N. Burkanov, Yasuhiro Sakurai. Organochlorine pollutions in Steller SeaLions *Eumetopias Jubatus* living in the far eastern waters

② Hyung-Sub Kim, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Short period exposure of di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone and arachidonic acid metabolisms in testis of prepubertal rats

5) バイオアッセイ研究会・環境毒性学会

②星野広志、藤田正一、後藤陽子、磯野岳臣、石名坂豪、Vladimir N. Burkanov, 桜井泰憲. Organochlorine pollutions in Steller SeaLions *Eumetopias Jubatus* living in the far eastern waters (極東海域に棲息するトドにおける有機塩素系化合物汚染)

③ Hyung-Sub Kim, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Short period exposure of di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone and arachidonic acid metabolisms in testis of prepubertal rats

Nikaidou, S., Ishizuka, M., Maeda, Y., Hara, T., Kazusaka, A., Fujita, S. Effect of components of green tea extracts, caffeine and catechins on hepatic drug metabolizing enzyme activities and mutagenic transformation of carcinogens. *J Vet Med Sci.* (In press)

Shaban, Z., El-Shazly, S., Abdelhady, S., Fattouh, I., Muzandu, K., Ishizuka, M., Kimura, K., Kazusaka, A., Fujita, S. Down regulation of hepatic PPAR α function by AhR ligand. *J Vet Med Sci.* 66(11):1377-86 (2004)

平成 16 年度

1. 論文発表

Muzandu, K., Shaban, Z., Ishizuka, M., Kazusaka, A., SHOICHI, Fujita, S. Possible involvement of peroxynitrite in estrogen-induced oxidative stress. *Free Radical Research.* (In press)

Shaban, Z., Soliman, M., El-shazly, S., El-bohi, K., Abdelazeez, A., Kehelo, K., Kim, H., Muzandu, K., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S. AhR and PPAR α Antagonistic effects on CYP2B and CYP3A and additive inhibitory effects on CYP2C11. *Xenobiotica.* (In press)

Sakamoto, K.Q., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S. Iodine intake as a possible cause of discontinuous decline in sperm counts: a re-evaluation of historical and geographic variation in semen quality. *Jpn J Vet Res.* 52(2):85-94. (2004).

Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Alterations of activities of cytosolic phospholipase A2 and arachidonic acid-metabolizing enzymes in di-(2-ethylhexyl)phthalate-induced testicular atrophy. *J Vet Med Sci.* 66(9):1119-24 (2004).

Saito K, Sakai N, Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Strain differences in diazepam metabolism at its three metabolic sites in sprague-dawley, brown norway, dark agouti, and wistar strain rats. *Drug Metab Dispos.* 32(9):959-65 (2004).

Shaban Z, El-Shazly S, Ishizuka M, Kimura K, Kazusaka A, Fujita S. Related PPARalpha-dependent modulation of hepatic CYP1A by clofibrilic acid in rats. *Arch Toxicol.* 78(9):496-507 (2004).

Saito K, Kim HS, Sakai N, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Polymorphism in diazepam metabolism in Wistar rats. *J Pharm Sci.* 93(5):1271-8 (2004)

2. 学会発表

Shaban, Z、El-Shazly, S、石塚真由美、数坂昭夫、藤田正一、NEGATIVE CROSS-TALK BETWEEN PPAR-ALPHA AND AHR、日本薬学会 (2005)

Zein Shaban, Samir El-Shazly, Mayumi Ishizuka, Kazuhiro Kimura, Akio Kazusaka, and Shoichi Fujita, PPAR • • dependent Modulation of Hepatic CYP1A by Clofibrilic Acid in Rats. *Microsomes and Drug Oxidations* (2004)

Shaban, Z、El-Shazly, S、石塚真由美、数坂昭夫、藤田正一、Ah 受容体リガンドによる PPAR α 機能の抑制、環境ホルモン学会 (2004)

石塚真由美、高菅卓三、谷川力、数坂昭夫、藤田正一、野生ドブネズミに蓄積する環境汚染物質と生体影響の genomics 解析、環境ホルモン学会 (2004)

藤田正一、石塚真由美、高菅卓三、谷川力、千葉一成、佐治尚介、坂本健太郎、数坂昭夫、日本の野生生物における内分泌攪乱と環境汚染、環境ホルモン学会 (2004)

K.M. Muzandu, M. Ishizuka, A. Kazusaka and S. Fujita. POSSIBLE INVOLVEMENT OF PEROXYNITRITE IN ESTROGEN-INDUCED OXIDATIVE STRESS AND PROTECTIVE ROLE OF CAROTENOIDS. 10th International Congress of Toxicology (2004, Finland)

H-S. Kim, M. Ishizuka, A. Kazusaka and S. Fujita. DI-(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE SUPPRESSES TAMOXIFEN-INDUCED APOPTOSIS IN PITUITARY GH3 CELLS. 10th International Congress of Toxicology (2004, Finland)

M. Ishizuka, T. Takasuga, T. Tanikwa, S. Fujita. SUPPRESSION OF TESTOSTERONE SYNTHESSES IN TESTES OF WILD NORWAY RATS IN JAPAN: ACCUMULATION OF PERSISTENT

ORGANOCHLORINE POLLUTANTS AND EFFECT. 10th International Congress of
POLYBROMINATED DIPHENYL ETHER AND THEIR Toxicology (2004, Finland)

視床下部および精巣のエストロゲン及びテストステロン

産生酵素の性差と環境化学物質の影響の検討

主任研究者 石塚真由美 北海道大学大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座 助手

分担研究者 藤田正一 北海道大学・大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座 教授

分担研究者 数坂昭夫 北海道大学・大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座 助教授

研究要旨

胎生仔期・新生仔期のラットあるいはマウスの視床下部では、ステロイドホルモンによるインプリンティングが起こり、性成熟後の性行動が調節されていることが分かっている。周生期には、オスの精巣からテストステロンが一時的に放出され、この雄性ステロイドホルモンが脳に到達することで、視床下部に発現する CYP19 (アロマターゼ) がテストステロンをエストロゲンに変換し、エストロゲン受容体などを介して脳のインプリンティングが行われている。この時期のアロマターゼ発現はオスで活性が高く、また、アロマターゼの発現がテストステロンを含むアンドロゲンによって誘導されるとの報告もある。テストステロンはステロイド 5 α 還元酵素によって、よりアンドロゲン活性の強いジヒドロテストステロンに変換される。しかし、RT-PCR を用いたプレ実験では、この時期の視床下部におけるアロマターゼ発現量に性差は認められなかった。そこで、組織的に性差が顕著である SDN-POA (sexually dimorphic nucleus of the preoptic area : 性的二型核) における、エストロゲン産生酵素アロマターゼ、及び、アンドロゲン産生酵素であるステロイド 5 α 還元酵素について、mRNA 発現レベルの定量を行った。

また、精巣から放出されるテストステロンは、周生期脳インプリンティングに不可欠である。しかし、環境化学物質への曝露がテストステロン産生酵素の活性や発現量に影響を与える可能性は考えられる。そこで、内分泌攪乱化学物質の一つであるフタル酸エステルをラ

ットに投与し、精巣におけるステロイドホルモン代謝酵素への影響について調べた。フタル酸エステル曝露群では、血中テストステロン濃度が減少し、また、精巣に発現するテストステロン代謝酵素の発現及び活性を変動させることが明らかとなった。

A. 研究目的

胎生仔期・新生仔期のラットあるいはマウスの視床下部では、ステロイドホルモンによるインプリンティングが起り、性成熟後の性行動が調節されていることが分かっている。周生期には、オスの精巣からテストステロンが一時的に放出され、それが脳に到達することで、視床下部に発現する CYP19 (アロマターゼ) がテストステロンをエストロゲンに変換することで脳のインプリンティングが行われている。この時期のラット脳に BBB (blood-brain barrier) は形成されていない。しかし、血中に大量に発現する α -フェトプロテインによってエストロゲンがトラップされ、テストステロンのみが脳に到達すると考えられている。また、この時期のアロマターゼ発現はオスで活性が高く、さらに、アロマターゼがテストステロンを含むアンドロゲンによって誘導されるとの報告もある。テストステロンはステロイド 5 α 還元酵素によって、よりアンドロゲン活性の強いジヒドロテストステロンに変換される。しかし、これまでの研究では、視床下部セクションにおいて RT-PCR を用いこれらの性ホルモン産生酵素の発現量を半定量したところ、プレ実験では、この時期の視床下部に

おけるアロマターゼ発現量に性差は認められなかった。

視床下部において、SDN-POA (sexually dimorphic nucleus of the preoptic area) はメスよりもオスにおいて顕著に大きく、この部位の性差は神経細胞のアポトーシスがテストステロン-エストラジオールによって抑制されることが原因と考えられている。そこで、この SDN-POA において、エストロゲン産生酵素アロマターゼ、及び、アンドロゲン産生酵素であるステロイド 5 α 還元酵素について、mRNA 発現レベルの定量を行った。

一方で、周生期のステロイドホルモンによる脳インプリンティングは、精巣からのテストステロン放出が重要であることが分かっている。ダイオキシン類などの環境化学物質への曝露は、血中のホルモン濃度を変動させることが報告されている。また、ビスフェノール A やフタル酸エステルのような環境化学物質は、肝臓や子宮に発現するステロイド 5 α 還元酵素やアロマターゼの発現を変動させることが報告されている。そこで、テストステロンの生合成・分泌の主要臓器である精巣において、環境化学物質の一つフタル酸エステル曝露がステロイドホルモン代謝酵素群にどのような影響を与えるのかを調べた。

B. 研究方法

1. SDN-POA における性ホルモン産生酵素の発現量の性差

ラットのステロイド 5 α 還元酵素 type2 およびアロマターゼの塩基配列から特異的なプライマーを設計した。妊娠 20 日齢のラットのオス及びメスから RNA を抽出し、real-time PCR 7700 (ABI) を用いて各ステロイドホルモン産生酵素の mRNA 発現量を定量した。

2. 精巣におけるステロイドホルモン代謝酵素群への環境化学物質の影響

未成熟オスラットにフタル酸エステルであるジエチルヘキシルフタル酸を 0、100mg、1000mg/kg/day で 5 日間経口投与し、精巣におけるテストステロン代謝活性にどのような影響を及ぼすのかを調べた。テストステロン生合成に関与する 17 β HSD、活性型テストステロンジヒドロテストステロン生合成に関与するステロイド 5 α 還元酵素、また、テストステロンを水酸化し、テストステロンのクリアランスに関与する CYP3A 及び CYP2C11、テストステロンをエストロゲンに変換するアロマターゼ (アロマターゼ) などについて発現や代謝活性を HPLC-UV やウエスタンブロッティング法、RT-PCR 法を用いて測定した。血中テストステロン濃度は ELISA 法により解析した。

(倫理面への配慮)

ヒトの組織及び動物を用いた全ての実験は北海道大学および同大学大学院獣医学研究科の定める実験ガイドラインに従って研究を実施した。動物実験計画の立案は、動物の導入から、飼育、実験操作、終了後の処置までを、科学的にはもとより動物福祉の観点に立って十分な検討を行い、動物実験の範囲を研究目的に必要な最小範囲にとどめるため実験操作の十分な検討を行った。

C. 結果

1. SDN-POA における性ホルモン産生酵素の発現量の性差

①アロマターゼ mRNA 発現量

図にアロマターゼの胎生 20 日齢のオス及びメスの mRNA 発現量を示した。この時期のアロマターゼ発現量はオスで高い傾向を示したが、顕著な性差は認められなかった (Figure 1)。

②ステロイド 5 α 還元酵素 mRNA 発現量

図にステロイド 5 α 還元酵素の胎生 20 日齢のオス及びメスの mRNA 発現量を示した。この時期のステロイド 5 α 還元酵素発現量はメスで高い傾向を示した。しかし、有意な性差は認められなかった (Figure 1)。

2. 精巣におけるステロイドホルモン代謝酵素群への環境化学物質の影響

ジエチルヘキシルフタル酸暴露によって血中テストステロン濃度は減少した

(Figure 3)。そこで、精巣においてテストステロン合成に関与する 17β HSD 活性を測定した。これまで 17β HSD 発現が減少するとの報告があったが、今回の結果では、 17β HSD 活性に大きな変化は認められなかった。テストステロンを水酸化する CYP3A、CYP2C11 の発現量及び活性はジエチルヘキシルフタル酸曝露で増加していた。

5α 還元酵素はテストステロンをよりアンドロゲン受容体への結合性が強いジヒドロテストステロンに変換する。ジヒドロテストステロン感受性は精巣よりも前立腺で顕著とされている。また、肝臓においても 5α 還元酵素が発現することが報告されている。今回の結果から、精巣における 5α 還元酵素活性は、ジエチルヘキシルフタル酸曝露によって上昇することが明らかとなった (Figure 4)。しかし、肝臓における 5α 還元酵素活性はジエチルヘキシルフタル酸によって変動を受けなかった。

アロマターゼは P450 分子種のひとつで、アンドロゲンをエストロゲンに変換する。アロマターゼノックアウトマウスは性行動に不可欠であり、また、精巣のエストロゲンは精子形成・維持に重要であることが最近の研究で報告されている。今回の結果では、ジエチルヘキシルフタル酸曝露は精巣のアロマターゼ mRNA 発現レベルを減少させることが明らかとなった (Figure 5)。

D. 考察

1. SDN-POA における性ホルモン産生酵素の発現量の性差

胎生 18-20 日齢の視床下部においてアロマターゼ発現はピークを迎えるが、その発現パターンは精巣からのテストステロン周生期放出 (テストステロンシャワー) とリンクしていると考えられている。発生初期の神経に分布するアロマターゼはアンドロゲン曝露で発現が誘導されるとの報告もあるが、アロマターゼ 5' 上流域にはアンドロゲン受容体結合サイトは見つかっておらず、アロマターゼの誘導機序については不明な点が多い。

今回の結果から、これまでの報告とは異なり、胎生期ラットの視床下部におけるアロマターゼやステロイド 5α 還元酵素の発現レベルには有意な性差は認められなかった。アロマターゼ/ステロイド 5α 還元酵素の mRNA 発現レベル比は、オスで高い傾向を示したが (Figure 2)、同様に有意な性差は認められなかった。従って、脳インプリンティングには、酵素群の発現レベルや活性ではなく、周生期のテストステロン量の性差が重要であると考えられた。

2. 精巣におけるステロイドホルモン代謝酵素群への環境化学物質の影響

ジエチルヘキシルフタル酸曝露結果によって、精巣でエストロゲン産生酵素であるアロマターゼ mRNA 発現レベルが減少することが分かった。フタル酸エステルは PPAR (peroxisome-proliferator activated receptors) の中でも、特に PPAR α に結合

し、CYP4A など、脂肪酸代謝酵素をはじめとするその標的遺伝子の転写を活性化する。一方、ゼブラフィッシュでは、アロマターゼの 5' 領域に PPAR α 結合サイトが存在し、実験動物に対する PPAR α リガンド WY-14643 の投与はアロマターゼ発現レベルを上昇させることが分かっている。ジエチルヘキシルフタル酸は PPAR α のリガンドであるが、その代謝物 MEHP (モノエチルヘキシルフタル酸) はアロマターゼ発現レベルを転写レベルで抑制することが報告された。また、PPAR γ リガンド thiazolidinediones の一種 troglitazone はエストロゲン産生酵素・アロマターゼのプロモーター領域において、PPAR γ を介して、アロマターゼの転写活性を阻害することが報告されている。従って、PPAR α リガンドが代謝を受け、代謝物が PPAR γ など他の PPAR isoform に結合し、その機能を活性化・あるいは阻害してステロイド生合成あるいはその代謝に影響を及ぼす可能性が考えられる。

また、これまでの報告と今回の報告を合わせ、精巣におけるテストステロン生合成・異化代謝酵素群は、フタル酸エステル (ジエチルヘキシルフタル酸: DEHP 及びジブチルフタル酸 DBP) によって図のような影響を受けることが考えられた (Figure 6)。

E. 結論

胎生仔期でアロマターゼ発現レベルが高い胎生 20 日齢のラットでは、アロマタ

ーゼおよびステロイド 5 α 還元酵素の mRNA 発現レベルに性差は見られなかった。

一方、環境化学物質への曝露が、周生期脳インプリンティングに重要な精巣のテストステロンの生合成・代謝酵素の発現に影響を与えることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short Period Exposure of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Regulates Testosterone Metabolism in Testis of Prepubertal Rats. Archives of Toxicology (in press)

2. 学会発表

1) 第 133 回日本獣医学会 (平成 14 年春)

① 妊馬ホルモン・Equilenin による異物代謝酵素の誘導

② マウス海馬におけるビスフェノール A 投与の影響

2) 北海道薬物作用談話会

雌性ホルモンが Ah レセプター介在性・非介在性 CYP1A サブファミリー発現機構に及ぼす影響

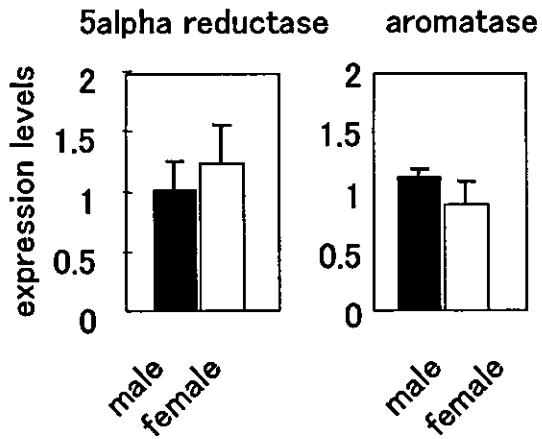
3) 環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会

Short Period Exposure of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Regulates Testosterone Metabolism in Testis of Prepubertal Rats

4) 14th International symposium on microsomes and drug oxidations

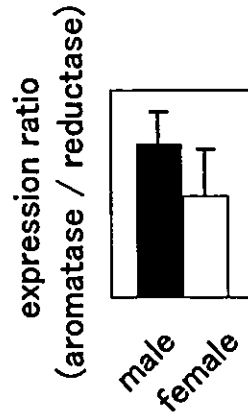
Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) Regulates levels of P450 and their metabolic activities in rat testis microsomes

Figure 1



The mRNA expression levels of Testosterone 5alpha reductatase and aromatase in rat SDN-POA at gestation day 20. The expression levels were shown as the ratio to GAPDH mRNA.

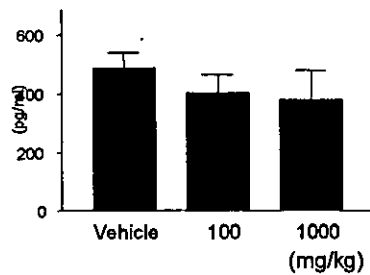
Figure 2



The mRNA expression ratio of Testosterone 5alpha reductatase and aromatase in rat SDN-POA at gestation day 20.

Figure 3

Serum testosterone level in rat treated with DEHP



Serum testosterone levels were measured using Testosterone EIA Kit. The standard curves ranged from 7.8 to 500 pg/ml.

Figure 4

Activities of testosterone 5 alpha reductase

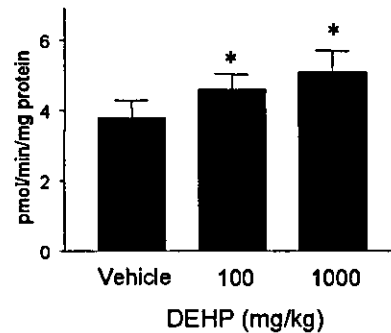
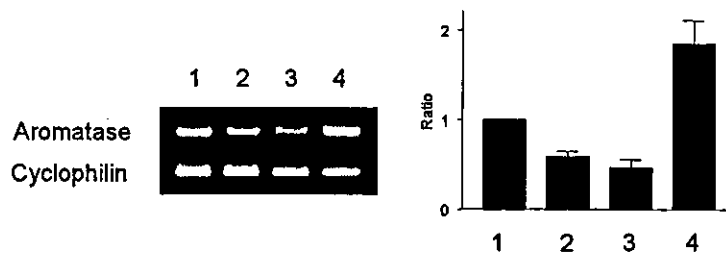


Figure 5

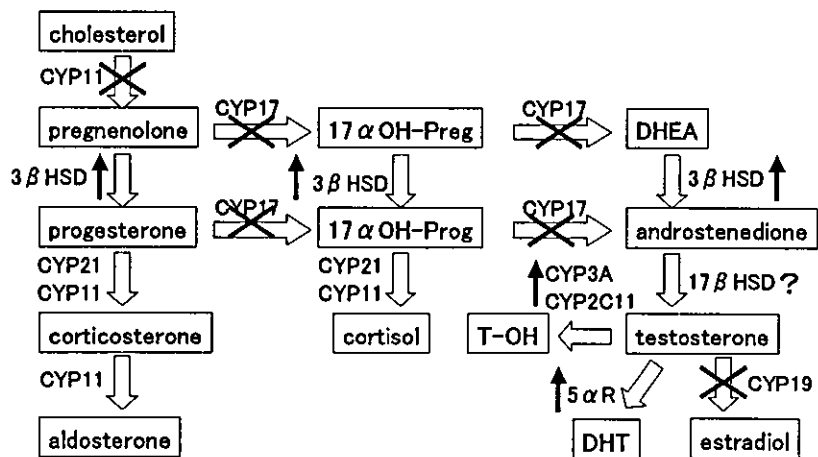
RT-PCR analysis of Aromatase (CYP19) mRNA expression in rat testis treated with DEHP



Lane 1, vehicle control; Lane 2, DEHP-treated (100 mg/kg); Lane 3, DEHP-treated (1000 mg/kg); Lane 4, positive control (ovary).

Figure 6

DEHP & DBP effects on Steroid Biosyntheses



厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

周生期の脳神経細胞における環境化学物質の影響
ービスフェノール A 周生期曝露による行動への影響ー

主任研究者 石塚真由美 北海道大学大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座 助手

分担研究者 藤田正一 北海道大学・大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座 教授

研究要旨

胎生子期や新生期仔は、神経細胞が分化し、神経ネットワークを形成する重要な時期である。特に、哺乳類では周生期脳のステロイドホルモンへの曝露が性成熟後の性行動を決定していることが明らかとなっている。従って、この時期の内分泌攪乱化学物質への曝露は、ステロイドホルモンによる脳インプリンティングを阻害し、正常な性分化や性成熟後の性行動を攪乱することが懸念される。そこで、本研究では、胎生子期・新生仔期のラットに低濃度の内分泌攪乱化学物質ビスフェノール A に曝露し、脳の発達や行動に対する影響を調べた。

妊娠 1 日目から離乳期まで、母ラットに、連続でビスフェノール A を飲水投与(約 1.5mg/kg/day)し、得られたオス及びメスの仔ラットについて、生後 13 日齢から、自発運動量測定器 SCANET を用いて定期的に自発運動量および探索行動レベルなどを測定した。

ビスフェノール A 曝露によって、仔ラットのオス、メスともに eyelid-opening の早期化が観察された。また、胎仔期・新生仔期のビスフェノール A 低濃度曝露によって、新生仔期のオスラットでは自発運動量が増加することが分かった。しかし、メスでは自発運動量に変化がなかったため、ビスフェノール A 曝露によって、この時期の運動量の性差が消失することが明らかとなった。性成熟後はオス及びメスでは自発運動量に変化が現れることが分かっている。今回の解析から、ビスフェノール A を曝露した性成熟期の生後 49 日齢のオスラットでは、自発運動量及び探索行動量が一時的に抑制されることが明らかとなった。

A. 研究目的

哺乳類では周生期脳のステロイドホルモンへの曝露が性成熟後の性行動を決定していることが明らかとなっている。従って、この時期の内分泌攪乱化学物質への曝露は、ステロイドホルモンによる脳インプリンティングを阻害し、正常な性分化や性成熟後の性行動を攪乱することが懸念される。

周生期における脳インプリンティングには、アロマターゼ (CYP19) によるテストステロン→エストラジオールの変換が不可欠である。環境汚染物質の中には、アロマターゼ発現及び活性を阻害するものや、エストロゲン受容体への結合および転写活性化能を有する化合物が報告されている。ビスフェノール A はエストロゲン受容体に結合し、その標的遺伝子の転写を活性化する内分泌攪乱化学物質の一つである。ビスフェノール A は、主にプラスチック樹脂の材料として使用され、国内では年間 350000t が合成されている。近年、ビスフェノール A の食物への移行が問題となり、実際、ヒト臍帯血からはビスフェノール A が検出されることが報告された。これまで、ビスフェノール A はエストロゲン受容体への結合活性がエストロゲンに比べて顕著に弱いため、その毒性は低いと認識されており、ビスフェノール A の最大無作用量 (Non Adverse Effect Observed Adverse Effect ; NOAEL) は、マウス・ラットにおける試験結果から、50mg/ kg/ day とされ

ている。しかし、近年の報告では、①in vivo では薬物代謝酵素群によってビスフェノール A の代謝的活性化が起こる可能性、②胎児期や新生児期などの周生期では、化学物質に対する感受性が高くなる可能性、が報告されている。胎生仔期や新生仔期は、神経細胞が分化し、神経ネットワークを形成する重要な時期であるため、NOAEL 以下の低濃度の曝露でも、この時期には不可逆的な影響を受ける可能性が考えられる。また、近年、ビスフェノール A による酸化障害や DNA adduct の生成など、エストロゲン様作用以外の毒性も報告されている。そこで、本研究では、ラットを胎生仔期・新生仔期に低濃度のビスフェノール A に曝露し、脳の発達や行動に対する影響を調べた。

B. 研究方法

1. ビスフェノール A の曝露

妊娠 6 日目からビスフェノール A (5mg/L) 濃度で飲料水に混ぜ、ラットに毎日経口投与(コントロール群 4 匹、ビスフェノール A 群 4 匹)した。生後 1 日目でラット新生仔の匹数を調整し、1 腹メス 4 匹、オス 4 匹に調整し、生後 7 日目から、自発運動量および探索行動量の測定を SCANET を用いて定期的に行った。

(倫理面への配慮)

ヒトの組織及び動物を用いた全ての実験は北海道大学および同大学大学院獣医学研究科の定める実験ガイドラインに従って研究を実施した。動物実験計画の立案は、動物の導入から、飼育、実験操作、終了後の処置までを、科学的にはもとより動物福祉の観点に立って十分な検討を行い、動物実験の範囲を研究目的に必要な最小範囲にとどめるため実験操作の十分な検討を行った。

C. 結果

飲水投与ビスフェノール A 曝露によって、仔ラットのオス、メスともに体重や産仔数に変化は見られなかった。しかし、ビスフェノール A 曝露群では、オス・メスともに eyelid-opening の早期化が観察された (Figure 1)。また、メスではオスに比べて eyelid-opening が早期であった。

SCANET を用いた運動量の測定から、胎仔期・新生仔期のビスフェノール A 低濃度曝露によって、新生仔期のオスラットでは有意に自発運動量が増加することが分かった (Figure 2)。しかし、メスでは自発運動量に変化がなかったため、ビスフェノール A 曝露によって、この時期の運動量の性差が消失することが明らかとなった。また、性成熟期の 49 日齢では、オスラットの自発運動量及び探索行動が減少することが明らかとなった (Figure 3、4)。この減少は、その後、aging にもともなって消失することも明らかとなった。メスでは、ビス

フェノール A による探索行動の変化は観察されなかった。

D. 考察

エストロゲン曝露によって、eyelid-opening の早期化が報告されている。また、eyelid-opening には明らかに性差が存在し、メスはオスよりも早期である。したがって、今回ビスフェノール A 曝露で同様の結果が得られたのは、エストロゲン作用によるものと考えられた。

生後 13 日齢のオスでは、ビスフェノール A 投与群はコントロール群に比べて、有意な自発運動量の増加が見られた。また、オスでは、精製熟時の 49 日齢において、ビスフェノール A 投与群はコントロール群に比べて、有意に自発運動量および探索行動量が増加した。オスで観察された変化は、メスでは顕著ではなかった。従って、胎生仔期・新生仔期のビスフェノール A への曝露が、特に雄において、新生仔期のホルモンによる脳インプリンティングを変化させる可能性が考えられた。

E. 結論

ビスフェノール A の胎仔期及び新生仔期曝露は、新生仔期及び性成熟期のラットの自発運動量及び探索行動に影響を与えることが分かった。これらの行動の変化には明かな性差が見られることから、周生期のホルモンによる脳インプリンティング機構に、ビスフェノール A が影響を及ぼしている可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. The effect of bisphenol A on the behavior following uterus and lactational exposure. (投稿準備中)

2. 学会発表

1) 第 133 回日本獣医学会 (平成 14 年春)

① 妊馬ホルモン・Equilenin による異物代謝酵素の誘導

② マウス海馬におけるビスフェノール A 投与の影響

2) 北海道薬物作用談話会

雌性ホルモンが Ah レセプター介在性・非介在性 CYP1A サブファミリー発現機構に及ぼす影響

3) 環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会
Short Period Exposure of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Regulates Testosterone Metabolism in Testis of Prepubertal Rats

4) 14th International symposium on microsomes and drug oxidations

Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) Regulates levels of P450 and their metabolic activities in rat testis microsomes

5) 第 135 回日本獣医学会

① マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構—鉄による効果—

② Down-regulations of expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively

3. 総説

石塚真由美、藤田正一 「化学物質による野生生物及び生態系への影響とは」化学物質と環境 2003 58:7-10

4. 著書

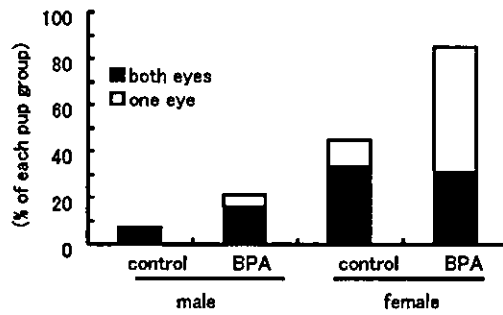
石塚真由美、岩田久人、藤田正一：トキシコロジー7 章 環境毒性 (日本トキシコロジー学会) 2002 (290-303)

板倉隆夫、石塚真由美、藤田正一：シトクロム P450 (講談社サイエンティフィック) 印刷中

藤田正一「臨床薬物代謝化学」(廣川書店) 印刷中

Figure 1

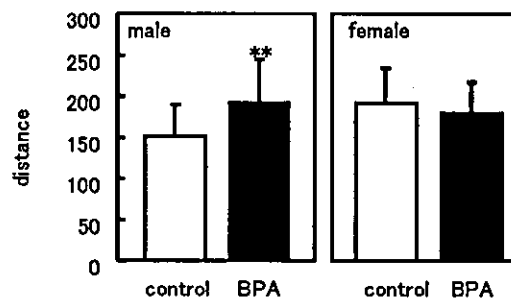
The effects of BPA on the eyelid opening at the postnatal day 17



The eyelid opened pups were examined at the postnatal day 17. During the gestation and lactation periods, dams had been exposed to BPA orally. The number of pups was as follows; control male (n=14), BPA male (n=19), control female (n=18), BPA female (n=13).

Figure 2

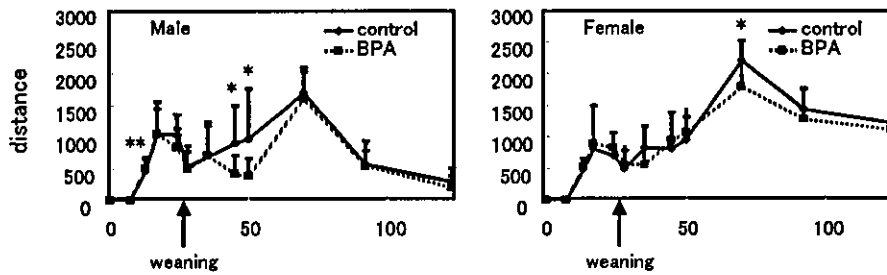
Motor activities of pups at the postnatal day 13



The effect of BPA on motor activities of pups at the postnatal day 13 were determined. Observations were carried for 1min using SCANET MV-10. n=13-19, ** p<0.01 (from control)

Figure 3

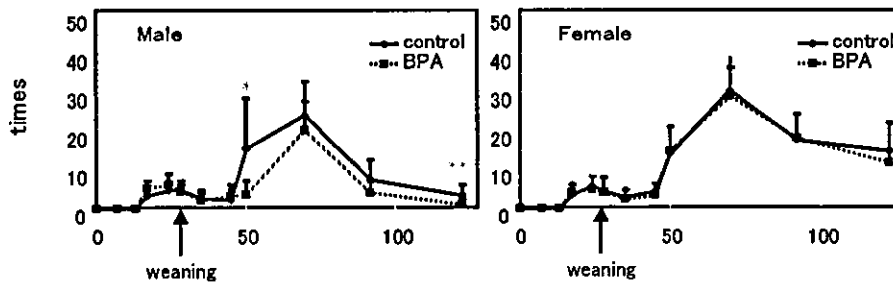
Alterations in motor activities of pups during developing and aging periods



The effect of BPA on motor activities of pups during developing and aging. Observations were carried for 1min using SCANET MV-10 for 1 min. n=12-19 in each group. * p<0.05 (from control).

Figure 4

Effects of BPA on rearing during the developing and aging periods



The effect of BPA on rearing times of pups during developing and aging. Observations were carried for 1min using SCANET MV-10 for 1 min. n=12-19 in each group. * p<0.05 (from control).

分担研究報告書

周生期の脳神経細胞における環境化学物質の影響

ービスフェノール A 曝露後の小脳のマイクロアレイ解析ー

主任研究者 石塚真由美 北海道大学大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座 助手

分担研究者 数坂昭夫 北海道大学・大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座 助教授

研究要旨

哺乳類では周生期のエストロゲン・アンドロゲン曝露が神経細胞アポトーシスの調節を行っていることが報告されている。従って、この時期の内分泌攪乱化学物質への曝露は、ステロイドホルモンによる神経細胞の正常な分化・増殖を攪乱することが懸念される。また、ビスフェノール A の胎仔期・新生仔期曝露によって、生後 7 日齢のラットでは、視床下部重量には変化が無かったが、小脳重量が有意に減少することが明らかとなった。そこで、本研究では、新生仔期のラット脳において、ビスフェノール A などエストロゲン作用を持つ環境汚染物質への低濃度曝露によって発現が変動する遺伝子群を、cDNA マイクロアレイ法を用いて解析した。

ビスフェノール A 曝露によって、G 蛋白質 α 及び β サブユニットの発現量が増加していた。 α は G_i (inhibiting) に比べ、 G_s (stimulating) 蛋白の発現量が顕著に増加していた。また、神経伝達物質受容体の中で、ドパミン D2、D4 受容体、ニコチン性やムスカリン性アセチルコリン受容体の発現量も増加することが示された。ビスフェノール A 曝露のオスラット小脳では、ホスホリパーゼ C の発現量は変わっていなかったが、カルモジュリン発現量は顕著に減少していた。bax-alpha (bcl2-associated X protein membrane isoform alpha) や caspase3 などアポトーシスを引き起こす因子については、発現量の増加が認められた。

また、小脳の初代培養細胞を用いた実験から、ビスフェノール A 曝露は細胞増殖を抑制することが明らかとなった。