

A. 研究目的

哺乳類周生期では、脳神経のエストロゲン・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。ビスフェノールAはエストロゲン受容体への結合性が極めて弱いとされてきた。しかし、化学物質への感受性の高い発達期の脳神経系に影響は不明である。そこで、ビスフェノールAの脳発達への影響についてその原因を明らかにする為に、ビスフェノールAを妊娠ラットに連続投与し、小脳重量やニューロフィラメントの発現量に差の見られた生後7日目において、新生仔の小脳を採取し、発現量が変動するmRNAをcDNAマイクロアレイによって解析した。

B. 研究方法

1. ビスフェノールAの曝露 in vivo

妊娠6日目からビスフェノールA (0.25mg/kg)あるいはコントロールとしてコーンオイルを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日目に新生仔から脳(視床下部及び小脳)を採取し、RNA抽出を行って、コントロール群とビスフェノールA曝露群の脳(各4匹分をpool)において発現量に差のあるmRNAを解析した。解析には、クロンテック RAT TOXICOLOGY Ver1.0

グラスアレイを用い、GSI Lumonics ScanArray 4000によってスキニングした。

2. 1. ビスフェノールAの曝露 in vitro

生後2日齢のラット新生仔から小脳細胞を採集し、DMEMによってポリリジンコートディッシュを用いて初代培養を行った。ビスフェノールAはプレ培養2日後に100nM、100uMの濃度で曝露し、細胞増殖率をWST-1法によって測定した。また、増殖したグリア細胞のマーカー蛋白GFAP (glial fibrillary acid protein)発現量を、GFAP抗体を用いてウェスタンブロット法により定量した。

(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. 脳セクション重量への影響

ビスフェノール A 曝露によって、生後 7 日齢のオスでは、有意に小脳の重量が減少した (Figure 1)。視床下部については、ビスフェノール A 曝露の影響をは見られなかった。また、メスでは、小脳、視床下部ともに、ビスフェノール A 曝露によって脳セクションの重量は変化しなかった。小脳重量は、2 ヶ月後にはコントロール群とビスフェノール A 曝露群とで差は消失していた。そこで、生後 7 日齢のオス小脳を用いて、ビスフェノール A 曝露によって発現変動する mRNA をスクリーニングした。

2. 新生仔期における小脳発現遺伝子のマイクロアレイ解析

ビスフェノール A を曝露した生後 7 日目の新生オスラットの小脳において、発現量が減少する遺伝子は、hormonal receptor、G proteins、tumor suppressors & oncogene、calcium binding protein など約 50 種、発現レベルが上昇する遺伝子は hormonal receptor、G proteins、tumor suppressors や oncogene、TGF beta、protease、neuronal transmitter receptor など約 120 種が同定された。その中で、2 回の実験によって再現性が認められた遺伝子を Table 1 に示す。今回の解析では、ビスフェノール A 曝露によって、小脳に発現する 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) 蛋白質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。カルモジュリン結合性の ras ファミリー・Kir (kinase-inducible ras-like) の発現量は変わらず、PKC (protein kinase C) や同じく ras ファミリーである Rin (ras-like protein in neurons) の発現量は増加していた。また、NMDA (N-methyl-D-aspartate receptor) 受容体 2A、2B、AMPA (3H-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxasole-4-propionate) 受容体、GluR2 (glutamate receptor 2) 発現量に変動は見られなかった。一方、ビスフェノール A の曝露によって、mGluR (metabotropic glutamate receptor) のうち、mGluR 2、mGluR 5、mGluR 6、mGluR 7 の発現量は増加していたが、小脳に分布の多い GluR1 の発現量に変化は見られなかった。

3. 初代培養細胞へのビスフェノール A 曝露の影響

生後 7 日目におけるオスの小脳重量は減少していたが、初代小脳培養細胞では、ビスフェノール A の曝露によって細胞増殖が抑制されることが示された (Figure 2)。アストロサイトの指標蛋白である GFAP 発

現量は、蛋白 mg あたりでは、ビスフェノール A 曝露による影響は認められなかった。

D. 考察

1. ビスフェノール A 曝露への脳セクション重量の影響

ビスフェノール A を曝露したオス新生ラットでは、小脳重量が減少していた。しかし、視床下部重量に変化は見られなかった。小脳細胞は、他のセクションとは異なり、生後数週間に細胞増殖・分化のピークを迎える。従って、生後 7 日齢で小脳重量にのみの増加が抑制されたのは、脳セクションにおける発育ステージの違いと考えられた。

2. ビスフェノール A 曝露で変動する新生仔・小脳の遺伝子スクリーニング

ビスフェノール A の曝露によって、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。従って、ビスフェノール A 曝露によって、特にアセチルコリンやドパミンなどの神経伝達に影響がある可能性が考えられた。実際、*in vitro* 実験では、ビスフェノール A 曝露によって、アセチルコリンによるチャンネル活性化・細胞膜脱分極が阻害されることが報告されている。また、ドパミン受容体 D4 などはエストロゲン曝露で発現が増加することが報告されている。今回のビスフェノール A 曝露による

ドパミン D2、D4 受容体発現量の増加は、エストロゲン様作用によることが考えられた。

また、マイクロアレイの解析から、アポトーシス関連遺伝子では、*bcl-2*、*bax-alpha* (*bcl2-associated X protein membrane isoform alpha*)、*caspase3* のいずれの発現量も増加していた。ビスフェノール A は Ca^{2+} ATPase 機能を阻害し、アポトーシスを誘導することが、精巣由来細胞では報告されている。また、神経培養細胞において、 Ca^{2+} ATPase をブロックすると *bcl2* 発現量の増加が報告されている。ビスフェノール A はミトコンドリアにおいて ATP 代謝を阻害することも報告された。前述したように、ビスフェノール A 曝露によって、カルモジュリン発現量が減少することから、神経組織においても、同様にカルモジュリンを介する Ca^{2+} ATPase などの活性化が阻害され、アポトーシスを引き起こす可能性が考えられた。

3. 小脳初代培養へのビスフェノール A 曝露の影響

小脳初代培養では、ビスフェノール A 曝露によって、細胞増殖が抑制されていた。1 のマイクロアレイ解析の結果から、ビスフェノール A 曝露では、アポトーシスを誘発する *bax* の増加が認められた。また、カルモジュリン発現量が減少することから、ビスフェノール A 曝露が細胞増殖を抑制する可能性が考えられた。

E. 結論

ビスフェノールA低濃度でも、胎生仔期・新生仔期の曝露は、発達段階の脳神経に発現する遺伝子群の発現量を変動させることが明かとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ishizuka M, Kim Eun-Young, Iwata H, Tateishi Y, Shimamoto Y, Yoon Seok-Joo, Maruyama Y, Chiba I, Ibrahim SZ, Kazusaka A, Fujita S. The effect of bisphenol A on the cerebellum development in neonatal male rats following uterus and lactational exposure. (投稿中)

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. Arch Toxicol. (in press)

Sakamoto KQ, Kunisue T, Watanabe M, Masuda Y, Iwata H, Tanabe S, Akahori F, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Accumulation patterns of polychlorinated biphenyl congeners and organochlorine pesticides in Steller's sea eagles and white-tailed sea eagles,

threatened species, in Hokkaido, Japan. Environ Toxicol Chem. 2002 Apr;21(4):842-7.

Chiba I, Sakakibara A, Iwata TH, Ishizuka M, Tanabe S, Akahori F, Kazusaka A, Fujita S. Hepatic microsomal cytochrome p450s and chlorinated hydrocarbons in largha and ribbon seals from Hokkaido, Japan: differential response of seal species to Ah receptor agonist exposure. Environ Toxicol Chem. 2002 Apr;21(4):794-806.

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

5) 日本トキシコロジー学会

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—

Table 1 List of genes showing up- and down-regulation in cerebellum by BPA exposure

Induced genes

Accession number	Gene name	Expression	Gene function
Y00396	c-myc proto-oncogene	2.20	Basic Transcription Factors
U49729	bax-alpha	3.29	Bcl Family Proteins
AF019973	neuron-specific enolase	2.69	Energy Metabolism
AJ002745	chemokine receptor-like 1	2.72	G Protein-Coupled Receptors
AF001953	guanine nucleotide-binding protein beta subunit 5 (GNB5)	2.36	G Proteins
M17525	guanine nucleotide-binding protein alpha stimulating activity polypeptide	3.23	
M17526	guanine nucleotide-binding protein G(0) alpha subunit	7.48	
X05137	low-affinity nerve growth factor receptor (NGF receptor)	3.02	Growth Factor & Chemokine Receptors
U03491	transforming growth factor beta 3 (TGF-beta3)	2.96	Growth Factors, Cytokines & Chemokines
U92289	prostaglandin D2 receptor	4.09	Hormone

M84009	dopamine receptor D4	4.83	Receptors
L34542	Ctk; non-receptor protein tyrosine kinase	2.21	Intracellular Kinase Network Members
L01702	R-PTP-A; receptor protein-tyrosine phosphatase alpha	2.35	Intracellular Protein Phosphatases
L26525	epithelial discoidin domain receptor 1	2.44	Intracellular Transducers, Effectors & Modulators
L31619	neuronal acetylcholine receptor protein alpha 7 subunit (NACHRA7)	2.04	Ligand-Gated Ion Channels
X03362	erbB2 proto-oncogene	2.03	Oncogenes &
U10995	Ear-3; V-erbA related protein; COUP-TFI transcription factor	2.43	Tumor Suppressors
J05166	solute carrier family 4 member 2	2.73	Other Membrane Channels & Transporters
U87305	transmembrane receptor unc5 homolog 1	2.17	Other Receptors (by Ligands)
D28512	synaptotagmin III (SYT3)	5.04	Other Trafficking & Targeting Proteins
X63434	urokinase-type plasminogen activator	2.02	Serine Proteases

Reduced genes

Accession number	Gene name	Expression	Gene function
J04629	sodium/potassium-transporting ATPase beta 2 subunit	0.46	ATPase Transporters

X13817	calmodulin	0.32	Calcium-Binding Proteins
M75153	Rab-11A	0.36	G Proteins
J05189	neuromedin K receptor (NKR)	0.48	Hormone Receptors
U13396	Janus tyrosine-protein kinase 2	0.34	Intracellular Kinase Network Members
X13058	cellular tumor antigen p53 (TP53)	0.43	Oncogenes & Tumor Suppressors
D10754	proteasome delta subunit	0.42	Other Immune System Proteins
D83598	sulfonylurea receptor	0.48	Other Receptors

During the gestational and the lactational periods, dams were orally treated with BPA (5 mg/L) dissolved in distilled water. The expression levels of various genes were examined by cDNA microarray technique using male rat cerebellum mRNA at the postnatal day 7. The determinations were carried out twice and the expression values represent average from the two independent experiments.

Figure 1
 Effects of BPA on the weight of brain sections from pups at the postnatal day 7. During the gestation and the lactation periods, dams were orally treated with BPA dissolved in distilled water (5 mg/L). Mean values (\pm SD) indicate % of cerebellum or hypothalamus weight / body weight. Closed bar indicates the weight values from control pups and open bar shows BPA treated animals. N=12-16 in each group. * $p < 0.05$. A) cerebellum. B) hypothalamus.

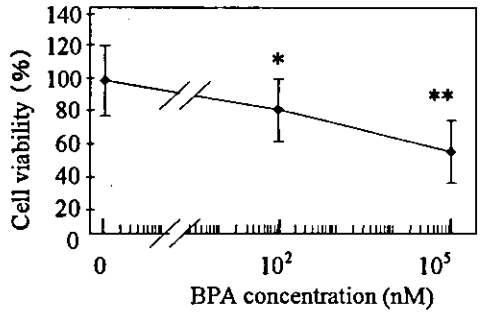
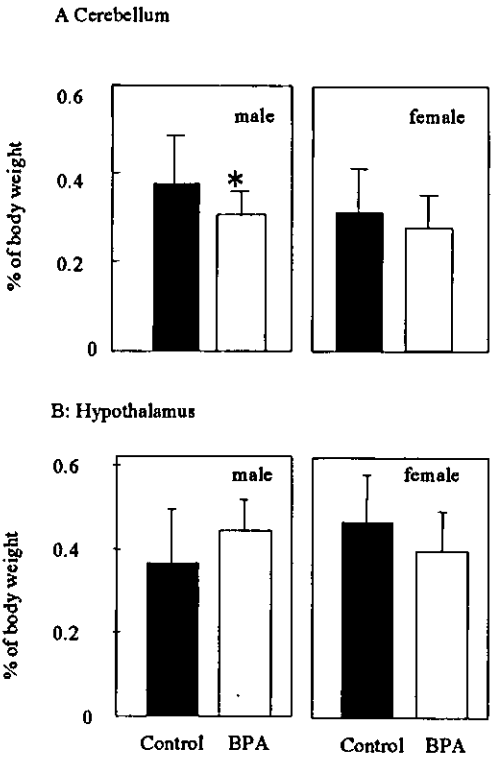


Figure 2
 Comparison of cell viability (%) in harvested cerebellums treated with DMSO or BPA. Cerebellums of male rat pups at postnatal day 2 were collected and harvested. The cells were maintained under the conditions of 37 C, 5 % CO₂. After the 2 days of pre-culture, the cells were treated with DMSO or BPA at the dose of 100 nM or 100 uM for 7 days. The cell proliferation rate was determined using WST-1. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

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

テストステロンによる neonatal インプリンティング時のステロイド代謝酵素の変動
—in vivo におけるステロイド代謝経路の変動—

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

研究協力者 網田丈二 北海道大学・大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座

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。

前年度は周生期脳において、アロマターゼやステロイド 5 α 還元酵素がどのような変動を示すのかを明らかにした。本年度は、平成 14 年度に引き続き、CYP19 (アロマターゼ) やステロイド 5 α 還元酵素以外にも、3 β HSD、17 β HSD などテストステロン代謝に関わる酵素群がどのような影響を受けるのかを、real-time RT-PCR によって、mRNA レベルで明らかにした。

In vivo 実験において、メスへの周生期のテストステロン投与によって、72 時間後の新生仔ラットの視床下部では、17 β HSD、アロマターゼ mRNA には変動が見られなかったが、ス

テロイド 5 α 還元酵素の発現は、コントロール群に比べて有意に減少した。また、3 β HSD の mRNA 発現レベルは、テストステロン曝露によって上昇す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 \rightarrow エストラジオールの変換が不可欠である。また、テストステロンの生合成には 3 β HSD、17 β HSD、CYP17 などさまざまな酵素群が関わっている (図 1)。最近では、ステロイド合成酵素は生殖器や副腎以外に、脳にも高頻度で発現し、ニューロステロイドの生合成に寄与していることが報告されている。しかし、周生期におけるニューロステロイドの生合成系が Adult とどのように違うのかについては、明らかにされていない。そこで、本研究では、周生期における精巣からのテストステロン分泌が脳のニューロステロイド産生にどのような影響を与えるのかについて明らかにする為、以下の実験を行った。

B. 研究方法

in vivo におけるテストステロン曝露の影響

生後 4 時間以内のラットにテストステロンを皮下投与し、72 時間後に視床下部を採取した。ステロイドホルモン生合成酵素 (3 β HSD、17 β HSD、CYP17、CYP19、ステロイド 5 α 還元酵素など) について mRNA 発現レベルを real time RT-PCR で測定した。

(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

in vivo におけるテストステロン曝露の影響

テストステロン曝露によって、3 β HSDの mRNA 量は増加した。一方で、テストステロンを活性型デヒドロテストステロンに変換する 5 α 還元酵素 (type2) の発現レベルはテストステロン曝露で顕著に減少することが明らかとなった(図2)。

D. 考察

周生期の *in vivo* の視床下部ではテストステロン曝露によって 5 α 還元酵素の発現が抑制された。従って、*in vivo* ではテストステロンの濃度上昇に伴ってアンドロゲン産生の負の方向に制御が移行する可能性が考えられた。

E. 結論

周生期のテストステロン曝露によって脳視床下部におけるニューロステロイド合成系に関与する酵素の発現はテストステロン産生について正の方向に制御されていることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2) 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.

3) 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.

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

① 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.

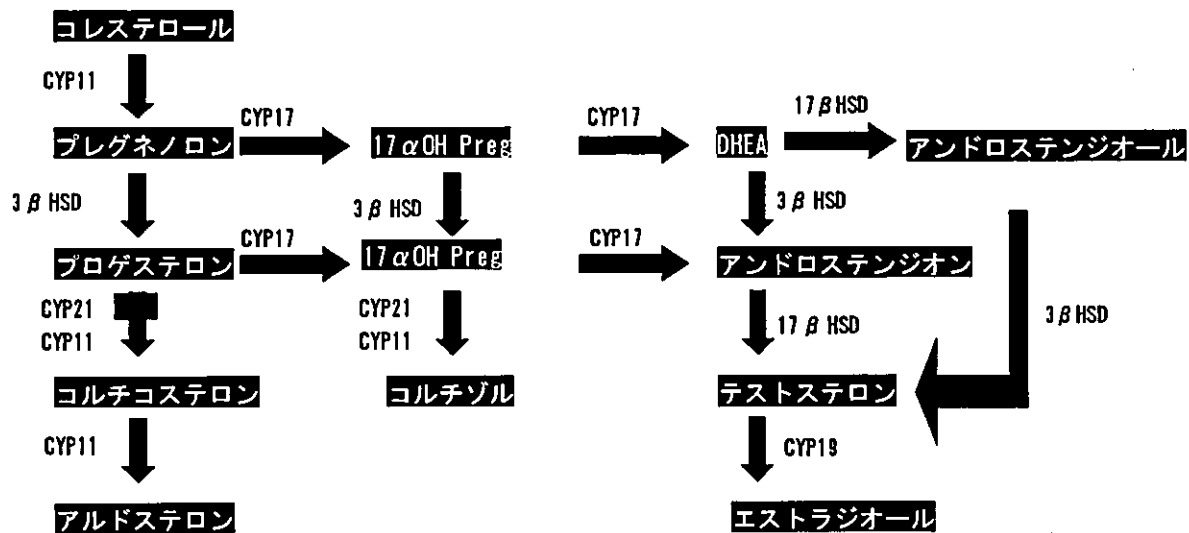


図1. ステロイドホルモン合成経路。Preg. : プログネノロン。
DHEA : デヒドロエピアンドロステロン

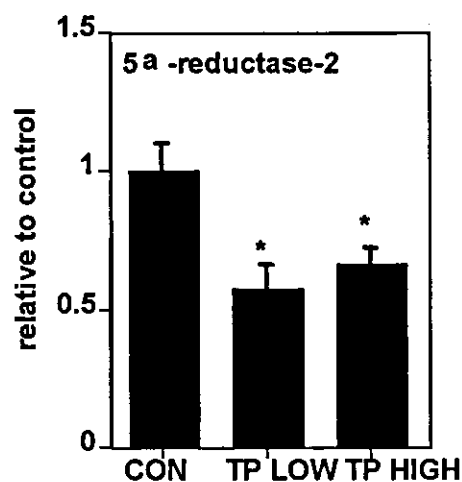


図2. 視床下部における5 α 還元酵素のmRNA発現レベルの変動。生後4時間後のメスラットにテストステロンを皮下投与し視床下部における5 α 還元酵素の発現変動をreal-time RT-PCR法を用いて測定した。TP LOW: テストステロン100 μ g/匹、TP HIGH: テストステロン1mg/匹皮下投与。CON: 対照群としてコーンオイルを投与した

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

テストステロンによる neonatal インプリントイング時のステロイド代謝変動
—グリア細胞におけるステロイド代謝経路の変動—

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
研究協力者	網田丈二	北海道大学・大学院獣医学研究科 環境獣医科学講座

研究要旨

グリア細胞はニューロンに比べてステロイド代謝活性が顕著に高いことが報告されている。そこで、グリア細胞のニューロステロイド産生経路が、周生期のステロイドホルモンインプリントイングによってどのように変化するのかについて調べた。グリア細胞由来 C6 細胞や、新生仔期の視床下部の初代培養細胞では、テストステロンの曝露によって、アロマトラーゼ、ステロイド5 α 還元酵素 mRNA はともに発現レベルが上昇した。

テストステロンの前駆体であり、胎児期や新生時期に産生能が上昇し、血中濃度が高くなるデヒドロエピアンドロステロンを基質としたところ、C6 細胞や視床下部由来の初代培養細胞では、17 β HSD によって生合成されるアンドロステンジオールが主要な代謝物として検出された。その生成速度は曝露 36 時間後まで時間依存的であった。

A. 研究目的

哺乳類では周生期脳のスレロイドホル

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イングを阻害し、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イングには、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。また、テストステロンの生合成には 3β HSD、 17β HSD、CYP17 などさまざまな酵素群が関わっている。最近では、ステロイド合成酵素は生殖器や副腎以外に、脳にも高頻度で発現し、ニューロステロイドの生合成に寄与していることが報告されている。

神経系におけるステロイドホルモンの産生は特にグリア細胞で活発であることが報告されている。そこで、本研究では、視床下部由来の初代培養細胞やグリア細胞の株化細胞である C6 細胞を用いて、グリア細胞におけるステロイドホルモンの産生系と、それらにテストステロンの周生期曝露がどのような影響を与えるのかを明らかにする為に、以下の実験を行った。

B. 研究方法

1. 初代培養細胞におけるテストステロン曝露のステロイド生合成系への影響

新生仔ラット視床下部を採取し、初代培養を行った。培養細胞にテストステロンを曝露し、ステロイドホルモン代謝経路が

どのように変動するのかについて、real time RT-PCR 法で発現する代謝酵素 mRNA を測定すると共に、代謝物の測定を行った。

2. グリア細胞 (C6) におけるテストステロン曝露のステロイド生合成系への影響

最近の報告でステロイドホルモンの代謝活性はニューロンではなく、グリア細胞で高いことが分かっている。そこで、ラットグリア細胞 cell line である C6 細胞を用いて、テストステロンの曝露によって、ステロイドホルモン代謝経路がどのように変動するのかについて、real time RT-PCR 法で発現する代謝酵素 mRNA を測定すると共に、代謝物の測定を HPLC を用いて行った。

(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

1. 初代培養細胞におけるテストステロン曝露のステロイド生合成系への影響

視床下部由来の初代培養細胞では、テストステロン曝露によって、高濃度 (100 μ

M)では 3β HSD や CYP19mRNA の増加が認められた。

一方、テストステロン前駆体であり、胎児期・新生時期に生合成能が高くなり、血中濃度が上昇するデヒドロエピアンドロステロンを視床下部由来の初代培養細胞に曝露し、その代謝物濃度を測定したところ、曝露 12 時間後では、アンドロステンジオールの濃度はアンドロステンジオン濃度に比べて顕著に高い値を示した(図 1)。

2. グリア細胞 (C6) におけるテストステロン曝露のステロイド生合成系への影響

C6 細胞では、ステロイド代謝酵素である CYP19、 3β HSD、 17β HSD、 5α 還元酵素に関して mRNA レベルで検出することができた。C6 細胞をテストステロンに曝露したところ、高濃度($100\mu\text{M}$)では 3β HSD や CYP19、 5α 還元酵素 mRNA の発現が増加した。特に 5α 還元酵素はテストステロンの濃度依存的に発現が増加した。

テストステロン前駆体のデヒドロエピアンドロステロンを C6 細胞に曝露し、経時的に代謝物の濃度変化を調測定したところ、アンドロステンジオン、アンドロステンジオール、テストステロンに関して 36 時間まで、時間依存的にその濃度が増加することが分かった。特にアンドロステンジオールの産生は著しく(図 2)、グリア細胞である C6 細胞では、デヒドロエピアンドロステロンは、よりアンドロステンジオールに代謝されやすいことが明らかとなった。一方、テストステロンや、テストステロンの

活性型であるジヒドロテストステロンの前処置によって、C6 細胞ではアンドロステンジオールの生合成に変化は見られなかったが、アンドロステンジオンの生成は増加することが明らかとなった。

D. 考察

周生期の *in vivo* の視床下部ではテストステロン曝露によって 5α 還元酵素の発現が抑制されたが、*in vitro* ではその mRNA 発現量に変化は認められなかった。また、C6 細胞ではテストステロン曝露によって 5α 還元酵素の発現は増加し、*in vitro* や、モデル細胞において、*in vivo* の再現性が認められないことがわかった。 3β HSD については、テストステロン曝露によって *in vivo*、*in vitro* のいずれの実験系でも mRNA レベルの増加が認められ、プレグネノロンや胎児期に大量に生合成され放出されるデヒドロエピアンドロステロンからアンドロゲン合成する 3β HSD がテストステロンによる発現制御を受けている可能性が考えられた。

グリア細胞である C6 細胞では、ステロイド代謝酵素である 3β HSD、 17β HSD のいずれの酵素も発現していたが、デヒドロエピアンドロステロンを基質とした場合、代謝物としてアンドロステンジオールが多く検出されたことから、 3β HSD よりも 17β HSD 依存の活性がより高いことが示唆された。視床下部由来の初代培養細胞でも、同様に、胎児期・新生時期に血中濃度が高く

なるデヒドロエピアンドロステロンはアンドロステンジオールに変化しやすいことが明らかとなった。また、テストステロンの曝露によってアンドロステンジオン濃度が増加することから、周生期のテストステロン濃度上昇が、ステロイドホルモンの生合成経路を変化させることが考えられた。

E. 結論

周生期のテストステロン曝露によって脳視床下部におけるニューロステロイド生合成系に関与する酵素の発現はテストステロン産生について正の方向に制御されていることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2) 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.

3) 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.

4) 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.

5) 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 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

2) 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

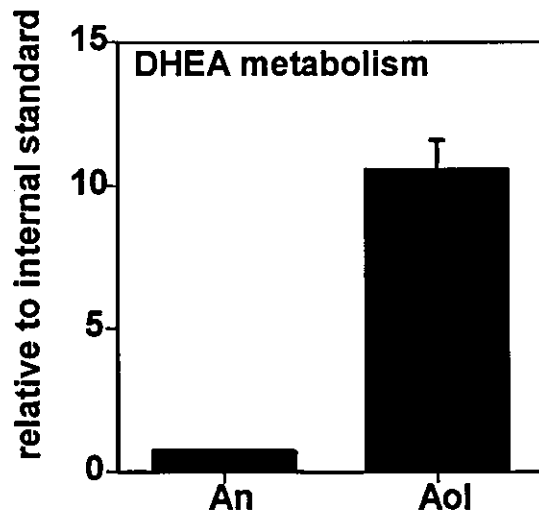


図1. 視床下部由来初代培養細胞におけるデヒドロエピアンドロステロンの代謝。視床下部由来培養細胞にデヒドロエピアンドロステロンを曝露し、12時間後の代謝物の濃度をHPLCで測定した。An:アンドロステンジオン、Aol:アンドロステンジオール。

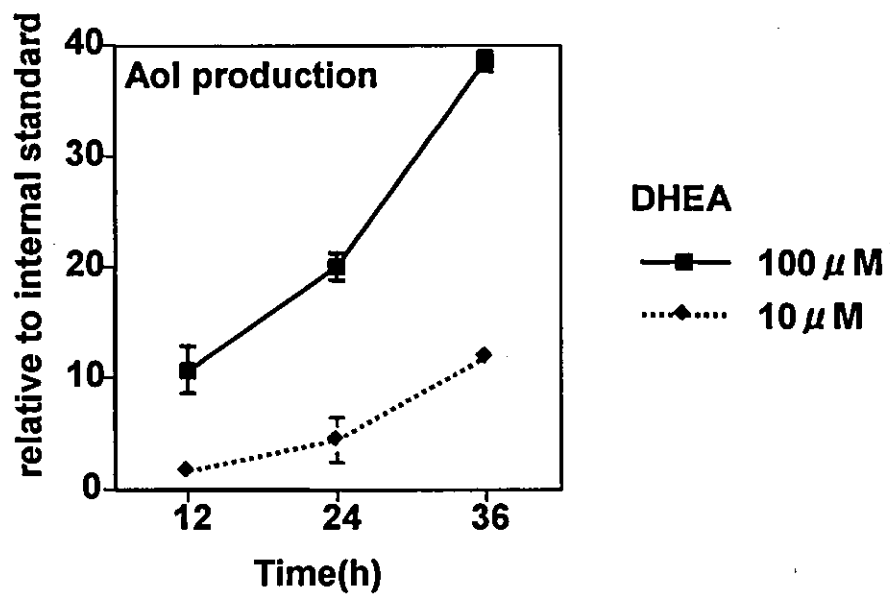


図2. C6細胞にデヒドロエピアンドロステロンを曝露した時のアンドロステンジオールの産生。C6細胞にデヒドロエピアンドロステロンを曝露し、12時間、24時間、36時間後の代謝物の濃度をHPLCで測定した。DHEA: デヒドロエピアンドロステロン。Aol: ア