

内分泌攪乱化学物質（有機溶剤・スチレン）の次世代影響に関する研究  
－スチレンへの妊娠中曝露のラット脳内神経化学物質への影響－

主任研究者 岸 玲子 北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野教授

研究協力者 片倉 洋子、池田 聡子、三宅 浩次

研究要旨

内分泌攪乱物質の一種とされている有機溶剤スチレンは産業的にも大型機器など種々の用途に広範囲に使用され、日常生活的にも食品トレイ、ポリスチレン性食器など多量に使用されている。職業上でスチレンを取り扱い作業を行う者の数も多く、最近では女性労働者の多職場への進出により、妊娠中も職場で働く女性も増加する傾向にある。スチレンは変異原性や催奇形性についての疑いがあり、ひとの疫学でも女性労働者の月経障害や低体重児出産などの影響について検討されている。実験的に発生の初期から、成長後までそれぞれの時期に対応した鋭敏な次世代影響の検出方法の開発、生殖毒性の検討、次世代の神経発達、行動傷害の多様性の検討、次世代影響を引き起こすメカニズムを検討する目的で、今回妊娠中スチレン曝露による生殖と胎仔への影響を曝露中の摂食条件を考慮してラットを用いて実験、検討を行った。特に脳内神経化学物質の濃度に影響が出ているかどうかは、生後発達にも関与すると思われるセロトニン系で生後直後にセロトニンの減少が見られた。また生後離乳期の21日目ではセロトニンの代謝物5-HIAAの減少が有意であった。5-HIAA/5-HT比も有意に低くなっていた。妊娠中の胎仔脳の発達にとって鋭敏な時期における神経障害作用のある化学物質の暴露は仔の生後発達に影響を与える可能性があると思われる。今回の実験で使用された濃度50ppmは日本でのスチレン許容濃度でもあり、産業現場で使用される化学物質の許容濃度等の検討には生殖毒性、発達毒性も考慮した討論が必要と思われる。

これからは母ラットのエストロゲン、黄体ホルモン等の測定などを見ることでより早期での内分泌攪乱物質の生殖内分泌系への影響を検出していく方法等も実験的な仔ラットへの影響などとあわせて検討していきたいと考えている。

## 研究目的

本研究は、産業労働現場で広く使用され、また最近の女性労働者の増加に伴い、変異原性や催奇形性が疑われ、疫学的にも女性労働者の月経障害や低体重児出産などの影響も懸念されている有機溶剤スチレンについて、これまで生殖と胎児への影響、生後発達、行動奇形学的影響などの解析を行ってきたが、これに基づきスチレン暴露による神経化学的影響を暴露中の摂食条件を考慮してラットを用いて実験を行い次世代影響の検討を行うことを目的とした。

## 研究の方法

### 1、動物、溶剤暴露方法

動物はWistar系ラットを用い、妊娠ラットはプラグ確認日を妊娠0日とし、個別ケージにて飼育を行った。妊娠6日目～20日目までスチール製の噴霧式暴露チャンバーを用いてO<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>濃度をチェックしながら、一日6時間の吸入暴露を0ppm（空気）、スチレン50ppm、300ppmで行った。対照群は通常の餌自由摂取群の他、栄養状態により生ずるバイアスを避けるため300ppm群の摂食量と同量を与えたpair feedingの対照群と2群を用いた。50ppm群にも300ppm群と同量の餌を与えた。生後第一日目に新生仔ラットを母あたり8匹とし、以降20日目まで体重増加、生理的発達、反射について観察を行った。

### 2、脳内神経化学物質の分析

生後第1日目に新生仔ラットの全脳摘出（母当たり2～3匹）をおこない、液化フレオン中で急速冷凍し-80℃で保存をした。残りの仔ラットはその後離乳期21日目に断頭を行い、全脳摘出をし、新生仔ラットと同様に保存した。各脳部位（生後直後は大脳、小脳の2分割、生後21日目は前頭葉皮質、線条体、海馬、視床下部、中脳をHeffner et al.の方法により、15ケージの針でpunch outを行った）。その後、ホモジナイズ、遠心を行い、上清をHPLC-ECDで脳内アミン及びその代謝物（serotonin, 5-HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA）を定量した。蛋白量はLowry et al.の方法で測定を行った。

### （倫理面への配慮）

実験動物の扱いに関しては、北海道大学の指針に従い、動物愛護上の十分な配慮のうえ行う。

## 研究成績

1、スチレン暴露母ラットには明かな中毒症状は見られなかった。母ラットの体重増加、摂食量については、300ppm暴露群で餌自由摂取対照群に比べて有意に少なかった。各暴露群の新生仔の数、母当たりの仔の総体重、仔の生下時体重、離乳期21日目までの仔の体重増加などでは各群間に差は見られなかったが、大脳重量はスチレン300ppm群のみ餌自由摂

取対照群に比べて有意に減少していた。

2、神経化学的分析結果では、生下時仔ラット大脳ではセロトニンが300ppm群で餌自由摂取のコントロール群に比べて有意に低かった。

ドーパミン系では代謝物のHVAが300ppm群で餌自由摂取対照群とpair feedingの対照群に比べて有意に低い濃度であった。小脳には差は見られなかった。これに対して、離乳期21日目の仔ラットでは前頭葉皮質でセロトニンは各群との間に差はみられなかったが、線状体では50ppm群で両対照群に比べて増加していた。セロトニンの代謝物である5-HIAAでは前頭葉皮質と海馬で300ppm群が低い濃度であった。

ドーパミン系では線条体でドーパミンが300ppm群で有意に増加していた。HVAは高い傾向にはあったが有意差は見られなかった。しかしカテコールアミン系では全体的にばらつきが大きく出ていた。代謝率を示す、5-HIAA/5-HT比では300,50 ppm群ともに海馬で両対照群に比べて代謝速度に遅れが見られた。

## 考察

生後直後のラットの脳はまだ未分化のために大脳全体の分析になるが、神経化学的解析では300ppm暴露群で5-HT量の低下が見られた。5-HTは特に胎児期から新生仔にかけて濃度も他の発達時期、成獣期に比べて高く、他の脳内アミン類の発達を含

めて胎仔期において成長に関与する因子としての役割が大きいといわれている、このために以前行った実験で見られた胎仔、生後発達、反射の遅れにも関与していると思われる。21日目の離乳期では5-HTの低下は見られなかったが、その代謝物質5-HIAAが減少しており、5-HTからの代謝速度の遅れも、両対照群にたいして顕著であった。これは栄養摂取状態にかかわらず、胎仔期においてneurotransmitter に対しスチレンそのものが影響を与えたためと考えられる。しかし、カテコールアミン系では生下時のHVAの減少が21日目では線条体で増加していた。これは前に行った行動奇形の解析で見られた‘catch up’とも思われるが、ドーパミン系は標準偏差が非常に大きく個体数を増加し解析を行うことが必要とおもわれる。又コントロール二群間にも差がみられたことからスチレン暴露による摂食量の変化や栄養状態の影響を考慮することが重要とおもわれる。

## 結語

有機溶剤スチレンの妊娠中暴露によって仔の脳内神経化学物質の濃度に影響が出ているかどうかを実験によって検討を行った。セロトニン系では生後直後にセロトニンの減少が見られた。また生後離乳期の21日目ではセロトニンの代謝物5-HIAAの減少が有意であった。5-HIAA/5-HT比も有意に低くなっていた。妊娠

中の胎仔脳の発達にとって鋭敏な時期における神経障害作用のある化学物質の暴露は仔の生後発達に影響を与える可能性があると思われる。今回の実験で使用された濃度50ppmは日本でのスチレン許容濃度でもあり、これからの産業現場で使用する化学物質の許容濃度等の検討には生殖毒性、発達毒性も考慮した討論が必要と思われる。

#### 研究発表

#### 論文発表

Katakura Y, Kishi R, Ikeda T, Miyake H. (1999): Effects of prenatal exposure to styrene on neurochemical levels in rat brain. Toxicology Letters 105, 239-249