

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

生殖毒性の早期影響マーカーとしての神経内分泌動態と
次世代影響に関する研究

主任研究者 岸 玲子（北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野教授）

研究要旨

内分泌かく乱作用の疑いのある有機溶剤スチレンモノマーは産業的にも種々の用途に広範囲に使用され、日常生活でも食品トレー、ポリスチレン製食器など多量に使用されている。取り扱い作業者の数も多く、疫学調査では女性労働者で不妊、低体重児出産などの報告もある。このことから、スチレンの健康影響として内分泌機能への影響もあることが示唆される。スチレンモノマー曝露による血中プロラクチンレベルの増加に関する報告はいくつかあるが、何ら相関はないという報告もあり、一定の結果は得られていない。そこで我々は、二種類の方法でスチレンモノマーをラットへ曝露し、プロラクチンをはじめ各種ホルモンへの影響を検討した。また今まで毒性試験などでも扱われにくい、神経行動学的評価にもつながるような次世代影響を引き起こすメカニズムについても考慮し、基礎的なスチレン代謝酵素の妊娠による変化、雌雄による差、週齢差があるかを検証する実験も行った。スチレン曝露 *in vivo* 実験により、ラットのプロラクチンなどが変化し、内分泌かく乱作用のマーカーとして神経内分泌系の測定が有効であることが示唆された。また、スチレンモノマー代謝酵素活性は、成熟ラットでは雌雄による性差がみられ、CYP2C11/6 は成熟雄で活性が高かった。一方、妊娠中はスチレンモノマーの薬物動態が非妊娠時とは異なり、酵素活性が減少していた。

研究協力者

佐田 文宏（北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野講師）
片倉 洋子（北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野）
梅村 朋弘（北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野）
倉橋 典絵（北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野）
那須 民江（信州大学医学部公衆衛生学講座講師）

A 研究目的

近年、内分泌かく乱物質の健康影響が重要視されているため、内分泌かく乱物質を含めた環境化学物質曝露による神経内分泌物質の動態と、生殖毒性の発現を明らかにすることを目的とした。

スチレンモノマーの産業分野での用途の広さ、また日常的にも食品用容器としての使用量の多さにともない、スチレンの取り扱い作業者の数も多い。スチレンは変異原性や催奇形性の疑いもあり、ヒトの疫学でも月経障害などへの影響につ

いて検討されている。実験動物を用いて、内分泌かく乱作用を有しているかどうかを血清中のホルモンを測定し、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を検討する。今までの毒性試験などでは扱われにくい、神経行動学的評価にもつながるような次世代影響を引き起こすメカニズムについても考慮し、生殖毒性の有無をみる上でも必要と思われる雌雄による代謝の差、妊娠中の変化を知るために体内での代謝酵素に関しても検討を行う。スチレンなどの有機溶剤はおもに肝ミクロソーム分画に存在する薬物代謝酵素(チトクローム P450)によって代謝されるが、このチトクローム P450 には種々の isozyme が存在し、毒性発現にとって重要である。成熟ラットと同じよう活性が低週齢でも認められ性差がみられるのか、また、妊娠中におけるスチレンの代謝酵素活性が非妊娠時と異なっているかについて in vitro で検討を行う。

B 研究方法

対象動物:動物は Wistar 系雄性ラット、雌性ラット(日本クレア(株)・東京)を用いた。12 時間昼夜逆転サイクルで 1 週間以上飼育を行い、餌(MF:オリエンタル・イースト)と水は自由摂取とした。

1) 内分泌動態の変化

吸入曝露処置群に対しては、動物は 8 週齢の雌系ラットを各群 8 匹ずつ用いた。スチール製のチャンバーを用い、100ppm スチレンモノマーを 9:00~17:00 の 8 時間/日で 2 週間曝露した。餌は曝露中も自由摂取とした。2 週間の曝露後、直ちに採血し、血漿成分を分離して、血漿中の

プロラクチン(PRL)、黄体形成ホルモン(LH)、成長ホルモン(GH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)レベルを、酵素結合免疫測定法(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)で測定した。

皮下投与群は 8 週齢雌雄ラットを用い、2 週間の皮下連続投与(10g/kg)後、直ちに採血をし、吸入曝露群と同じように、PRL、LH、GH、TSH について ELISA で測定した。

2) スチレン代謝における性差、週齢差、妊娠による代謝酵素活性の変化

週齢差は新生仔として(0 日、誕生後 12 時間以内)、離乳直後(誕生後 21 日目)、成熟ラットは 18 週目を使用した。妊娠ラットは、プラグ確認日を妊娠 0 日とし、各妊娠時期として妊娠中期は妊娠 10 日目、妊娠後期は妊娠 21 日目とした。各週齢と各妊娠日にそれぞれ雌雄共にと殺を行い、肝と肺を切除し液体窒素中で凍結し、ミクロソームの調整に用いるまで -80 で保存、各群 5 匹、または 7 匹を試料とした。肝臓は新生仔ラット以外は 1 固体ごとに肝重量の 3 倍の 1.15%KCl 溶液中でホモジナイズし、10,000g × 10 分で冷却遠心を行い、沈査を 105,000g × 60 分で遠心した。調整したミクロソーム画分は -85 で酵素アッセイまで凍結保存した。ミクロソーム蛋白は Lowry et al. (1951)の方法で測定した。チトクローム P450 量の測定は Omura & Sato (1964)の方法で行った。

酵素活性アッセイ:肝のスチレン代謝酵素活性はミクロソーム画分にスチレンを加えて、代謝物スチレングリコールの生成量の測定を行った。スチレン基質は 0.085mM (low-Km 酵素用 P450IIE1)、

185mM (high-Km 酵素用 P450IIC11/6) 濃度を加えた。薬物代謝酵素活性の測定はバイアルー平衡法 (Sato & Nakajima, 1979) で行った。

モノクロナール抗体反応：性、年齢、妊娠期間によるスチレン代謝変化と薬物代謝酵素 P450 との関係はモノクロナール抗体を使用して行った。今回使用したは anti-CYP2C11/6 MAb(clone 1-68-11)、anti-CYP2E1 MAb (clone 1-91-3)である。

統計解析は ANOVA を行った。グループ間に有意差がみられたときは t-検定または paired T 検定も行った。

(札幌医大動物実験倫理委員会、北海道大学倫理委員会の指針に従って実験を行った)

C 研究結果

1) 内分泌動態の変化について

吸入曝露群では、スチレンモノマー曝露群では雌のみ PRL レベル、LH レベルともに増加を示したが、TSH、GH レベルでは差はみられなかった。

皮下投与群 (雄) では、スチレンモノマー曝露で LH レベルが増加し、TSH が減少した。一方、皮下投与群 (雌) では、LH レベルと GH レベルが増加した。雌雄ともに PRL での変化はみられなかった。

2) スチレン代謝における性差、週齢差、妊娠による代謝酵素活性の変化

ミクロソーム蛋白量と P450 量の性差、週齢差について表 1 に示した。3 週齢 (21 日目) ではミクロソーム蛋白量は雄で雌に比較して多かった。チトクローム P450 量に差はみられなかった。しかし成熟ラット (18 週齢) ではミクロソーム蛋白量に雌雄間で差がなく、チトクロ

ム P450 量が雄で多かった。18 週齢の成熟ラットでは明確にチトクローム P450 量に性差が現れていた。

週齢による差について、雄では 3 週齢 (21 日目) に比べ 18 週齢 (成熟ラット) でミクロソーム蛋白量、チトクローム P450 量が増加していた。新生仔では検出できなかった。雌ではミクロソーム蛋白量は成熟ラット (18 週齢) と若齢ラット (新生仔、3 週齢) の間に差があるが、チトクローム P450 量は 21 日目で成熟ラットと同じレベルであった。しかし、3 週齢のほうが新生仔ラットより多かった。

表 2 に妊娠に伴う変化を示した。ミクロソーム蛋白量については妊娠各期で大きな変化はみられなかったが、チトクローム P450 量は妊娠後期 (妊娠 21 日目) で妊娠前期、妊娠中期 (妊娠 10 日目) と比べ減少していた。

スチレンの P450 代謝酵素活性に関しては、スチレングリコール生成量の測定を行った。18 週齢の成熟ラットで性差がみられ、雄のほうが高い活性があり、成熟ラットでは 3 週齢ラットに比べ、倍近い活性がみられた。雌では週齢による差はみられなかった。妊娠後期になると非妊娠時より低い活性であった。妊娠時期による差は妊娠週齢に伴って漸減する傾向がみられた。

モノクロナール抗体によるスチレン代謝の抑制に関しては、モノクロナール抗体によるスチレングリコール生成抑制の割合を求めた。抗 CYP2C11/6 モノクロナール抗体で処理をした場合、CYP2C11/6 は、特に雄で強い影響を受け、成熟ラット (18 週齢) で未熟ラットに比べ、有意に高い活性を示した。また、雌では妊娠後期 (妊娠 21 日目) で有意に減少してい

た。CYP2E1 は3週齢では雌雄とも同程度発現しており、雄3週齢で60%、雌3週齢で66%の抑制がみられた。その後雄では減少しているが雌では減少程度は小さく、妊娠後期で発現量は減少した。

D 考察

1) 内分泌動態の変化について

Bergamaschi (1996)らの疫学調査の報告によると、スチレンモノマーを曝露された作業員では、プロラクチンレベルが有意に増加していた。Mutti (1998)らも同様の報告をしている。我々の動物実験の結果では、予備的検討ではあるが、実際に100ppm 2週間曝露でプロラクチンレベルが増加し、過去の疫学的報告を裏付ける結果となった。また、全てのスチレン曝露群において、LHレベルが増加を示した。また、雌雄の差なく、スチレン曝露でLHを増加させるという結果であった。このことはスチレンに内分泌かく乱作用がある可能性を示唆している。つまり、スチレン自体にエストロゲン様作用があるわけではなく、エストロゲンを制御する働きのあるLHに作用することで内分泌作用に影響を及ぼす可能性も考えられる。

今後の課題として、実際の性ホルモンの動態を明確にすることがあげられる。さらに、プロラクチン抑制作用があるといわれるドーパミン、GABAといった神経伝達物質についても検討し、スチレンが線条体など脳内の組織学的にどのような変化をおよぼしているかを明らかにすることが必要と思われる。

また、今回、曝露濃度は一点(100ppm)のみの測定であったので、曝露濃度を変化させ、ホルモンの変動を測定し、ホル

モンへの影響を生じない閾値を推定することも可能と思われる。

2) スチレン代謝における性差、週齢差、妊娠による代謝酵素活性の変化

これまで行ってきたスチレンモノマーの妊娠中曝露による生殖、胎仔への影響の観察から、スチレンモノマー高濃度曝露によって発達毒性がみられていたが、このメカニズムを解明するために代謝酵素変化に対するスチレンモノマーの影響を検討した。大抵の動物では肝ミクロソーム酵素活性のレベルは発達段階によって異なり未成熟な時期では活性は低い、しかし生後急速に増加し、外来性化学物質に対する代謝も行われる。チトクロームP450はそのisozymeによっては性特異性をもち、発達に伴って調整されている。スチレンの場合も酵素活性は未成熟ラットで低く、思春期(青春期)以降に活性が高くなっていた。今回の実験からこれは雄特異的チトクロームCYP2C11/6の発現によるものとみられる。18週齢で未熟期の数10倍の誘導がみられ、雌では雄よりも18週齢では低い発現量であった。ラットではほかの種に比べて性差が強くあらわれ、芳香族炭化物、トルエンでみられたが、トリクロールエチレンではなかったとの報告(Nakajima 1992)があるが、今回、スチレンでは性差がみられた。この性差は雄特異的チトクロームCYP2C11/6の体内分布によると考えられ、この分子種に対する親和性の違いによるものと思われる。またこの分子種は性ホルモンの代謝に関連していることから、性ホルモン動態との関連も考慮に入れる必要があると考えられる。

代謝酵素誘導への妊娠にともなう影響

についてはチトクローム酵素経由の代謝に変化がみられるが、まだそのメカニズムについてはよく知られていない。また、CYP2E1 のほうは性差による影響はあまり受けなかった。しかし、妊娠後期では発現量が減少し、酵素活性が低下した。P450 isozymes 全体が妊娠にともなって減少するといわれているが、妊娠時のスチレンなどの炭化水素の代謝に及ぼす影響を調べるためには、胎仔への影響は、成熟動物とは異なることを考慮する必要があると思われる。

E 結論

1) スチレン曝露 *in vivo* 実験により、ラットのプロラクチンなどが変化し、内分泌かく乱作用のマーカールとして神経内分

泌系の測定が有効であることが示唆された。

2) スチレンモノマー代謝酵素活性は成熟ラットでは雌雄による性差がみられ、未成熟ラットではみられなかった。チトクローム CYP2C11/6 は成熟雄で活性が高かった。

3) 妊娠中はスチレンモノマーの薬物動態が非妊娠時とは異なり、酵素活性が低下していた。

F 研究発表

Katakura Y, Kishi R, Ikeda T, Miyake H. Effects of Prenatal Styrene Exposure on Postnatal Development and Brain Serotonin and Catecholamine Levels in Rats. *Environ Res* 85:41-47, 2000.