

及び量反応関係の検討を行い、生殖影響のマーカーとなりうる血中、尿中の化学物質の濃度や、代謝物質濃度を測定すること、また生殖毒性の早期影響を評価するのに適切な予防医学的マーカーとしての有効性を評価する。内分泌攪乱作用による次世代影響を評価するのに適切なより感度の高い生後の発達時期にあわせた神経機能や学習行動を調べる鋭敏な方法を開発するなどの目的で、今回は実験動物を用いて開始した。

種々な産業労働現場で広範囲に使用され、また女性労働者の種々の産業現場への進出、増加に伴い、生殖毒性の有無が疑われ、最近では環境中での内分泌攪乱化学物質として次世代への影響の懸念もある有機溶剤スチレンモノマーを用いて、生殖、妊娠と胎児への影響、生後発達、行動奇形学的影響などの解析を行った。生後生理的発達に遅れなどが見られたことから、これに基づき神経化学的影響を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った。また、内分泌攪乱化学物質の生体内での代謝に関与している薬物代謝酵素チトクローム P450 についても未成熟ラットの酵素量、妊娠にともなう変化などについても検討を行いたいと考えている。

今後、本研究で得られた結果をふまえて、生殖毒性を未然に防ぐための予知マーカーを見つけ、次世代影響のマーカーとして有効かどうかを検討し、生殖障害の発現を未然に検知する新しい指標とする事ができるよう実験を行っていきたい。

B. 研究方法

1) 動物、溶剤曝露方法

動物は Wistar 系ラット（雄：5 週令、雌：6 週令）を用い、少なくとも 1 週以上の昼夜逆転リズムで慣化を行った。妊娠ラットはブラグ確認日を妊娠 0 日として、個別ケージにて飼育をおこなった。妊娠 6 日目から 20 日目までスチール製の噴霧式曝露チャンバー（70×70×120 cm）を用いて一日 6 時間の吸入曝露を 0ppm（空気）、スチレンモノマー

50ppm、300ppm で行った。対照群として通常の餌自由摂取群の他、栄養状態により生じるバイアスを避けるため 300ppm 群の摂取量と同量の餌を与えた pair feeding の対照群と 2 群を用いた。50ppm 群にも 300ppm と同量の餌を与えた。妊娠ラットは体重、餌摂取量、分娩後は新生仔死亡、仔の母当たり生存数、仔の体重、仔の総体重などを観察した。生後第一日目に新生仔ラットを母当たり 8 匹とし、以降 20 日目まで体重増加、生理的発達（耳介開示、開眼時期、上下歯芽萌出）、起きあがり反射、について観察を行った。

2) 脳内化学物質の分析

生後第一日目に新生仔ラットの全脳摘出（母当たり 2、3 匹）を行い、急速冷凍し、-80℃で保存した。残りの仔ラットはその後離乳期 21 日目に断頭を行い、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、小脳に 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 ケージの針でパンチアウトを行った）。その後、ホモジナイズ、遠心（15000g × 1min）を行い、上清を HPLC-ECD で脳内アミン及びその代謝物（セロトニン：5-HT、5-ヒドロキシインドール酸：5-HIAA、ドーパミン：DA、3,4 ジヒドロキシフェニール酸：DOPAC、ホモバニリン酸：HVA、ノルアドレナリン：NA）を定量した。タンパク質は Lowry et al の方法で測定を行った。

組織病理学的変化は出産後ラット、0 日、21 日令仔ラットの脳、肝臓、肺、腎臓、の各組織でホルマリン固定を行い、ヘマトキシリン-エオシン染色、ニッスル染色し検鏡した。

（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) スチレンモノマー曝露母ラットには明らかな有機溶剤曝露にともなう中毒症状は見られなかった。母ラットの妊娠中摂食量については、300ppm 曝露群で餌自由摂取対照群

に比べて有意に少なかった。また妊娠中体重増加には差はなかった (table 1)。妊娠期間、新生仔ラット死亡数、死産はスチレンモノマー 300ppm 曝露群で pair feeding の対照群と有意差が見られ、スチレンモノマー曝露に関連した影響とみられた。各曝露群の新生仔の数、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みられなかった (table 2)。生後直後の大脳重量はスチレンモノマー 300ppm 群のみ餌自由摂取対照群に比べてやや減少傾向にあった (table 3)。

2) 仔の生理的発達では歯芽萌出時期 (上、下)、開眼口、起きあがり反射行動でスチレンモノマー 300ppm 曝露群で両対照群に比べて有意な遅れが見られた。50ppm 群では起きあがり反射行動で餌自由摂取群との間で有意な遅れが見られた (table 4)。

3) 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。ドーパミン系ではドーパミン代謝物の 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 (figure 1)。小脳では差は見られなかった。

神経化学的分析結果・生後 21 日令では前頭葉皮質でセロトニンは各群との間には差はみられてなかったが、線条体では 50ppm 曝露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有意に増加していた。ドーパミンの代謝物 HVA は高い傾向にはあったが有意差は見られなかった。代謝率を示す、5-HIAA/5-HT 比では 300ppm, 50ppm 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。

D. 考 察

妊娠中スチレンモノマー曝露を受けた母ラ

ットの妊娠への影響として、妊娠期間の延長、新生仔死亡の増加では、摂食量の減少による影響に加えてスチレンモノマー自体の影響が大きくみられた。また仔ラットの生理的発達でもスチレンモノマーの影響が歯芽萌出 (上下)、開眼時期の遅れ、起きあがり反射行動にみられた。このことから仔の脳内神経伝達化学物質を分析しところ、生後直後のラットの脳はまだ未分化であるために大脳、小脳全体の分析を行ったが、スチレンモノマー 300ppm 曝露群で大脳セロトニン量の低下が見られた。セロトニンは特に胎児期から新生仔にかけて濃度でも他の発達時期、成獣期に比べても高く、他の脳内アミン類の発達を含めて胎児期において成長因子の一つとしての役割が大きいと言われている、このことから生理的発達実験で見られた胎児、生後発達、反射の遅れにも関与していると思われる。

21 日目の離乳期ではセロトニンの代謝物である 5-HIAA が減少しており、セロトニンからの代謝速度の遅れも両対照群に対して顕著であった。これは栄養状態に関わらず、胎仔期において神経伝達物質に対してスチレンモノマーそのものが影響をあたえたためと考えられる。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' に関連しているとも思われる。

内分泌攪乱化学物質の代謝に関連のあると考えられている薬物代謝酵素チトクローム P450 量でも、特に妊娠中ではチトクローム P450 量、代謝酵素活性とも減少していることが考えられる。妊娠中での低下などは内分泌攪乱化学物質によって受ける生体側の影響を大きくする一つの要因となることが考えられ、今後この面からも検討を行う必要があると考えている。今回の研究の結果から内分泌の体内動態に関連のある神経伝達化学物質の変動がスチレンモノマー曝露によって起きる可能性があるということから、異常を通して、この作用機序的な面からの検討が必要であると思われる。生体内化学物質の変動から早期

に生殖影響のマーカーとなりうる血中、尿中の化学物質、代謝物質濃度を評価することも検討したい。

E. 結 論

- 1) 実験的に妊娠中有機溶剤スチレンモノマー曝露を行い高濃度曝露群では妊娠状態への影響が見られた。
- 2) 高濃度曝露群の仔ラットでは生理的発達指標に遅れが見られた。
- 3) 高濃度曝露群仔ラットの大脳内での神経伝達化学物質、セロトニンの含有量が減少していた。
- 4) 離乳期の仔ラット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曝露

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。これからの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考えられる。

F. 研究発表

論文発表

1. 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
2. Katakura Y. Kishi R. Ikeda T. Miyake H (in print) : Effects of prenatal styrene exposure on postnatal development and brain serotonin and catecholamine levels in rats. Environ.Res.83

Developmental effects and neuroendocrine regulation as early markers of reproductive toxicity.

Kishi R, Honnma K, Sata F, Kobashi G, Katakura Y, Ikeda T, Miyake H

Key word : styrene, prenatal exposure, maternal toxicity, developmental effects, serotonin, dopamin

Abstract:

Maternal reproductive effects in Wistar rats exposed to 0, 50, 300ppm styrene for 6 h/day during gestational days 6 to 20 were evaluated. Their offspring were observed postnatally for neurochemical changes, growth, and physical landmarks of development. Mothers exposed to styrene were compared with pair-fed and ad-lib-fed controls in order to adjust nutrient conditions. Prolongation of the gestational period, food intake, and the number of neonatal deaths or stillbirths in 300ppm-exposed dams showed evidence of styrene-related effects. Other reproductive parameters, such as litter size, birth weight, and sex ratio, were found to exhibit no effects within the variation range studied. A neurochemical effect was observed in that the 5-HT and HVA concentrations in cerebrum were significantly decreased. Incisor eruption (mandible), eye opening, and the air-righting reflex were delayed in rat pups born to dams receiving 300ppm styrene exposure compared with the pair-fed and ad lib control groups. Pups born to dams delayed air-righting reflex compared with ad lib controls. These results suggest that the offspring developmental landmarks even when nutritional effects were controlled.

TABLE 1. Effects of prenatal styrene exposure on maternal food intake and body weight gain

Treatment	control groups		styrene exposure groups	
	control-1 (ad lib.)	control-2 (pair-fed)	50 ppm (pair-fed)	300 ppm (pair-fed)
Number of litters	(14)	(12)	(9)	(14)
Food intake (g/day)				
GD 6-13	18.0 ± 2.3	(pair-fed)	(pair-fed)	15.0 ± 2.4 **
GD 14-20	21.4 ± 4.5	(pair-fed)	(pair-fed)	18.9 ± 1.0 **
Total weight gain during exposure (g)	94.3 ± 15.7	89.3 ± 13.7	78.9 ± 24.3	86.3 ± 9.5

values are expressed as means(g) ± S.D. GD: Gestation day

Control-1: ad lib. control, Control-2 and 50 ppm group were given same quantity of food consumption with 300 ppm styrene exposure group (pair-fed)

** : Statistically significant in comparisons with ad lib. feeding controls (P<0.01)

TABLE 2. Results of reproductive toxicity of prenatal styrene exposure on gestation day 6 to 20 in female rats

Treatment	control groups		styrene exposure groups	
	control-1 (ad lib.)	control-2 (pair-fed)	50 ppm (pair-fed)	300 ppm (pair-fed)
Number of litters	(14)	(12)	(9)	(14)
Length of gestation (day)	21.6 ± 0.5	22.0 ± 0.7	22.0 ± 0.7	22.1 ± 0.6 *
% of Neonatal death (rate)	1.2 (2/173)	1.3 (2/152)	2.8 (3/107)	7.3 (12/164) **
No of live-born offspring (/litter)	12.4 ± 1.5	12.7 ± 1.8	11.9 ± 3.1	11.7 ± 2.2
% of male pups	49.2 ± 0.1	48.0 ± 0.1	45.4 ± 0.1	41.6 ± 0.1

Values are expressed as mean ± S.D. of litters

Number in parenthesis is total number of neonatal death among all litters of each group

Control-1: ad lib. control, Control-2 and 50 ppm group were given same quantity of food consumption with 300 ppm styrene exposure group (pair-fed)

: Statistically significant in comparisons with pair-feeding controls (p<0.05)
by cumulative chi-square method

* : Statistically significant in comparisons with ad lib. feeding controls (p<0.05)

TABLE 3. Effects of prenatal styrene exposure on postnatal body weight and brain weight in newborn offspring

Treatment	control groups		styrene exposure groups	
	control-1 (ad. lib.)	control-2 (pair-fed)	50 ppm (pair fed)	300 ppm (pair-fed)
Number of litters	(14)	(12)	(10)	(14)
No of live born offspring(/litter)	12.4 ± 1.5	12.7 ± 1.8	11.9 ± 3.1	11.7 ± 2.2
Body weight at birth (g)	5.2 ± 0.5	5.1 ± 0.5	5.2 ± 0.4	5.1 ± 0.5
Body weight at 21st (male, g)	39.6 ± 5.4	37.9 ± 3.8	35.1 ± 2.6	34.9 ± 3.4 ^{#*}
Cerebrum weight of brain (mg)	159.0 ± 11.8	144.3 ± 16.9	151.8 ± 14.8	138.1 ± 13.1 *
Cerebellum weight of brain (mg)	56.9 ± 6.6	64.5 ± 18.5	59.5 ± 10.2	59.6 ± 9.7

values are expressed as means ± S.D.

Control-1: ad.lib.control, Control-2 and 50 ppm group were given same quantity of food consupction with 300 ppm styrene-exposure group (pair-fed)

: Statistically significant in comparisons with pair feeding controls (p<0.05)

* : Statistically significant in comparisons with ad.lib feeding controls (p<0.05)

TABLE 4. Effects of prenatal styrene exposure on postnatal physiological development and reflexes in offspring.

Treatment	control groups		styrene exposure groups	
	control-1 (ad lib.)	control-2 (pair-fed)	50 ppm (pair-fed)	300 ppm (pair-fed)
Number of litters	14	12	9	14
Number of offspring	(112)	(96)	(72)	(112)
Body weight (21-day) (g)	38.8 ± 5.4	37.1 ± 3.8	34.7 ± 2.5	34.9 ± 3.4
Incisor Eruption				
Upper (day)	10.3 ± 1.5	11.7 ± 2.3	12.3 ± 2.0	12.7 ± 3.2 *
Lower (day)	9.0 ± 1.4	9.2 ± 1.8	10.2 ± 2.2	11.3 ± 2.4 ^{#*}
Eye opening (day)	14.7 ± 1.3	14.5 ± 1.4	14.6 ± 1.3	15.6 ± 1.5 [#]
Air righting reflex (day)	18.4 ± 0.7	18.7 ± 0.6	19.1 ± 0.2 *	19.4 ± 0.6 ^{**}

Values are expressed as mean ± SD of litters

: Statistically significant in comparisons with pair feeding controls (p<0.05)

* : Statistically significant in comparisons with ad lib. feeding controls (p<0.05)

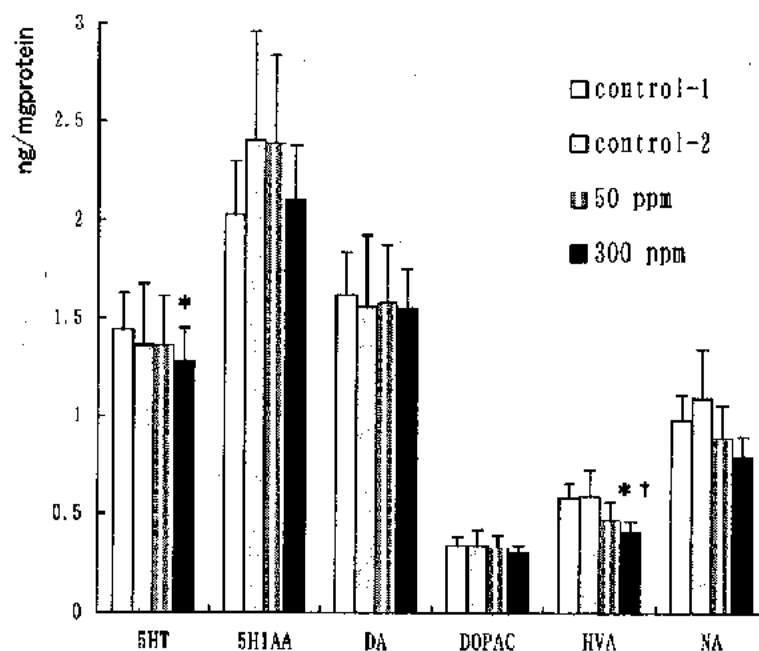


Fig.1 The neurochemical effects of prenatal styrene in newborn offspring cerebrum

Control-1: ad lib.control, Control-2 and 50 ppm group were given same quantity of food consumption with 300 ppm styrene-exposure group (pair-fed). † : Statistically significant in comparisons with pair feeding controls ($p < 0.05$). * : Statistically significant in comparisons with ad lib.feeding controls($p < 0.05$)

Abbreviations: 5-HT(5-hydroxytryptamine), 5-HIAA(5-hydroxyindoleacetic acid), DA(Dopamine), DOPAC(3,4-dihydroxyphenylacetic acid), HVA(Homovanillic acid), NA(Norepinephrine)

5. 生殖発達毒性に関する研究

研究者 鈴木 勝士（日本獣医畜産大学獣医畜産学部獣医生理学教授）

研究要旨

内分泌攪乱化学物質等の悪影響として懸念されるいくつかの生物作用すなわち、発生過程そのものの遺伝子による制御と環境による修飾というテーマ（生殖過程での本来のプログラムが不可逆的に破壊される現象の解明、生後の免疫系の発達、脳神経系の発達などにかかわる現象の解明）のうち、今年は、特に生殖過程における異常に注目し、遺伝子突然変異に起因する生殖器異常（hgn/hgn ラット）と in utero TCDD 暴露により誘発される生殖器系の異常について、検討した。

hgn/hgn 系統ではその原因遺伝子が BN 系との戻し交配とマイクロサテライトリンケージにより、第 10 染色体にマップされ、完全連鎖する複数のマイクロサテライトマーカーが RH パネルにより比較的狭い範囲で配列決定された。マウスの相同な染色体の情報に基づき精巣で発現している遺伝子について調査する必要性が生じた。既知の精巣発生に重要な役割を果たしていると考えられる遺伝子発現が確認され、hgn の正常対立遺伝子が、セルトリ細胞の増殖や機能維持に重要な役割を果たしている可能性が高くなった。精巣発生に関わる遺伝子で環境により影響される遺伝子の探索がよりいっそう重要になると考えられる結果が得られた。

TCDD の発生影響については、予備実験ながら、精巣上体の部分欠損、精子数と運動のうには異常なしとの既報の成績は再現されるとともに、交尾行動は過剰なのに射精障害があり、精子に授精能がないという新知見が得られた。精巣上体など副生殖器に関する機能異常を解明する必要と、組織特異的な転写調節にかかわる環境影響という新たなテーマが生じた。

研究者協力者

鈴木 浩悦（日本獣医畜産大学 助手）
斎藤 賢一（日本医科大学医療技術専門学校 助教授）
尼崎 肇（日本獣医畜産大学 助教授）
川西 廣明（（財）動物繁殖研究所 研究員）

A. 研究目的

生殖機構の発達と生殖細胞の分化には遺伝と環境が関わっている。発生中あるいは生後初期にこれらの遺伝的に制御された分化過程が環境により影響されると、本来のプログラムが変更され、形態的にも機能的にも不可逆的な異常が生じる可能性がある。内分泌攪乱化学物質についてはこのような有害影響が懸念されている。近年、ノックアウト動物など新規の分子的手法等の開発に伴い、分子発生学の長足な進歩があり、一方で内分泌攪乱化

合物の野生動物とヒトの健康影響に関する研究が進展するとともに、エストロゲン受容体を介する反応に代表されるようにいくつかの作用機序が判明しつつあるとともに、さらに謎が謎を生む状況が生じている。既知の機序だけではこれらの全体像は説明できない。これらの化学物質が極めて多様多様で未知の生物作用が含まれていると想定されることと、発生過程を制御している遺伝子の種類とその発現カスケードがまだ解明されておらず、いずれの過程が環境により影響を受けやすいかなどについてもまだ分かっていないことが多いからである。

本研究の最終的な目的は、環境と遺伝子の応答あるいは応答する機能の中で有害作用との関連で重要な分子について、特殊な事例と普遍的な事例の両面から情報を得ることであ

る。遺伝的な因子に関しては、当教室の環境において突然変異が発生したと考えられ、既に近交化されている雄の生殖腺の低形成と不妊を主徴とし、それらの異常が常染色体性単純劣性で遺伝するラットの系統 (hgn 系) を用いて、その病理発生の解明と原因遺伝子の同定を行う。環境因子としては、他の研究費により TCDD の in utero 単回投与により誘発された生殖器系に形態レベルと機能レベルで異常をもつラットあるいは、初期発生に関する有害影響に関する研究が進行しており、将来的に本研究とドッキングすることになる。当面は、病理発生の解明を主体とする。これらの、遺伝的異常と環境誘発性の異常において、正常動物と異常動物との間で既知および未知の遺伝子の発現レベルを質的および量的に比較評価し、毒性マーカーとして有用な分子を検索する。

B. 研究方法

1) 突然変異ラットの遺伝解析：

精巣形成不全症ラット (hgn/hgn) は常染色体性単純劣性で発症し、雄にのみ不妊症を引き起こす。これまでの病態解析から、原因遺伝子は生殖腺の発達および生殖細胞の分化にとって重要な因子であると考えられる。このため、本年度は、原因遺伝子の同定を目指して、hgn 遺伝子の染色体への当てはめと、hgn 遺伝子座周辺の詳細なリンケージマップの作成を行った。精巣の異常と併発する腎臓の低形成症を確認することにより、雌の hgn/hgn を同定し、これに Brown Norway (BN) 系統の雄を交配し、得られた F1 の雄をさらに雌の hgn/hgn に戻し交配することで、総数 1000 匹以上の戻し交配世代の動物を作成した。連鎖解析には、この内、精巣で異常を判定できる雄 500 匹を用いた。解析に用いたマイクロサテライトのプライマーは、Research Genetics 社から購入した。PCR および電気泳動によるタイピングは常法に従った。500 匹以上の戻し交配動物でもなお hgn と完全連鎖するマイクロサテライトマーカーに関しては Rat/Hamster Radiation Hybrid panel (RH パネル) により配列した。hgn 遺伝子のマウスゲノム上

での位置を推定するために、ラットとマウスで共用できるマイクロサテライトを検索し、(ALS×JF1) F1×ALS のマウスバッククロスを用いて、タイピングを行った。hgn 遺伝子座存在領域と相同なマウス第 11 染色体の領域にマップされているいくつかの候補遺伝子について、正常および発症の精巣と腎臓でその発現を調査した。

2) 突然変異ラットの生後初期精巣における病態解析：

本症ラットにおける生後初期の精巣に関して、抗-PCNA 抗体によりセルトリ細胞と始原生殖細胞の増殖活性を評価するとともに、TUNEL 法 (in situ apoptosis detection kit ; TaKaRa) によりアポトーシスを呈する細胞を検出した。さらに、生殖腺分化に重要な転写調節因子である WT-1、AdBP/SF1、Sox9、および DAX-1 の発現を出生仔の正常および発症ラットの精巣で調査した。

3) TCDD の生殖発達毒性に関する予備実験：

Wistar Imamichi rat の近交系を用いて、1 群 3 匹の妊娠 15 日ラットに TCDD (1、2、または 4 μ /g) を 1 回投与し、雄性生殖器の発達過程に対する毒性を調査した。

(倫理面への配慮)

TCDD の取り扱いに関し、環境汚染を防止するためにヘパフィルター付きの陰圧チェンバー内で実験し、動物を含む TCDD 汚染物については安全な焼却法が開発されるまで、凍結保存する。

C. 研究結果

1) 突然変異ラットの遺伝解析：

現在までに精巣形成不全症ラットの病因遺伝子 hgn をラット第 10 染色体上の D10Rat159 から D10Rat68 の 1.4cM の範囲に絞り込み、連鎖するマイクロサテライトを RH パネルを用いて配列できたため、YAC ないし BAC によるコンテイング作成のための準備が整った。また、hgn が存在する染色体領域と相同なマウス第 11 染