

Investigation of early effect markers on reproduction and developmental toxicity in rats exposed to styrene.

Kishi R., Sata F., Katakura Y., Umemura T., Kurahashi N.

Department of public health Hokkaido university school of medicine

Key word: styrene, LL, PR, prenatal, sex difference, developmental effects, CYP P450IIC11/6, CYP P450IIE1

Abstract:

It is reported that styrene exposure increased the level of prolactin, while also reported that styrene exposure had no effects on the level of prolactin, the effects of styrene exposure to endocrine system is still obscure. Therefore, we investigated that how styrene exposure affect on various hormone (prolactin, leuteinizing hormone, growth hormone and thyroid stimulating hormone) levels of Wistar rats.

Sex, age and pregnancy induced changes in the metabolism of styrene in rat liver were investigated in relation to the regulation of cytochrome P450IIC11 and P450IIE1 content using monoclonal antibodies. Immature male rats had a higher level of microsomal protein than females, and this increased with development. No differences by sex was found at 18 weeks. No differences in cytochrome P450 content was seen between immature male and female rats. Pregnancy decreased the metabolism of styrene. Monoclonal antibody-directed analysis showed that the level of P450IIE1 decreased in late pregnant rat, than in no pregnant rat. P450IIC11/6 increased dramatically with development in male rats and only slightly in female rats, so that much higher levels were found in adult males than in adult females.

表1 スチレン曝露、皮下投与による内分泌ホルモン動態の結果要約

(n=8, 予備的データ)

	PRL	LH	GH	TSH
曝露群 (雌)	↑ (p < 0.05)	↑ (p < 0.05)	差なし	差なし
皮下投与群 (雌)	差なし	↑ ↑ (p < 0.01)	↑	差なし (p < 0.01)
皮下投与群 (雄)	差なし	↑ (p < 0.01)	差なし	↓ (p < 0.01)

↑ : コントロール群より有意に増加

↓ : コントロール群より有意に減少

表2 ミクロソーム蛋白量とチトクローム P450 量の性差

Age	Sex	Microsomal protein (mg/ g liver)	Cytochrom P450 (nmol/ mg protein)
21st day	Male	25.2 ± 3.0*	0.597 ± 0.022
	Female	18.4 ± 1.5	0.600 ± 0.023
Adult	Male	30.7 ± 1.8	0.739 ± 0.073**
[18w]	Femal	28.4 ± 3.4	0.584 ± 0.046

表3 ミクロソーム蛋白量とチトクローム P450 量の週令差

Age	Male		Female	
	Microsomal protein	cytochrom P450	Microsomal protein	cytochrom P450
	[mg/g liver]	[nmol/mg protein]	[mg/g liver]	[nmol/mg protein]
Newborn	ND	ND	17.96 ± 1.9	0.094 ± 0.01
21st day	25.2 ± 3.0	0.597 ± 0.022	18.4 ± 1.5	0.60 ± 0.023
Adult [18w]	30.7 ± 1.8*	0.739 ± 0.073*	28.4 ± 3.4**	0.584 ± 0.046**

ND: Not determined

*: p<0.05

* *: p<0.01

表4 ミクロソーム蛋白量とチトクローム P450 量の妊娠に伴う変化

gestation period	Microsomal protein (mg/ g liver)	Cytochrom P450 (nmol/ mg protein)
Non-pregnant	28.4 ± 3.4	0.584 ± 0.046
10th day	28.2 ± 1.9	0.592 ± 0.045
21st day	26.3 ± 1.8	0.489 ± 0.018**

** : $p < 0.01$

表5 スチレン酵素代謝活性の性差、週令差、妊娠による変化

	styrene glycol
Male, 3 w	50.7 ± 6.6
Male, 18w	92.5 ± 7.1 ^a
Female, 3 w	41.5 ± 3.4
Female, 18w	38.2 ± 3.8
Pregnant (10 d)	29.0 ± 8.2
Pregnant (21 d)	22.1 ± 4.9 ^b

(nmol/ g liver/ min)

a: $p < 0.01$, significantly different from 18Weeks of female group
and 3weeks of male group

b: $p < 0.05$, significantly different from non-pregnant group

表6 2種のモノクローナル抗体によるスチレングリコール生成の抑制

	Hy-Hel	Anti-P450IIE1	Anti-P450IIC11/6
Male, 3 w	1.70(100)	0.45(40)	1.53(91)
Male, 18w	5.53(100)	1.89(87)	1.35(25)
Female, 3 w	1.58(100)	0.34(34)	1.38(88)
Female, 18w	1.44(100)	0.28(44)	0.88(56)
Pregnant (day 10)	1.36(100)	0.36(71)	1.01(74)
Pregnant (day 21)	1.05(100)	0.26(90)	0.81(77)

(nmol/mg protein/ min)

() : mean of percentage of remaining activity expressed as activity
MAbs/activity with Hy-Hel $\times$ 100

9. 内分泌攪乱化学物質を始めとする環境汚染物質の野生生物に対する影響と環境評価

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

DDT や PCB などの有機塩素系化合物は、環境中において安定で脂溶性に富むため、食物連鎖の上位に立つ生物に高濃度の濃縮されることが知られている。以前、我々は、アザラシやイルカ等の海棲哺乳類に、生物濃縮によって高濃度のこれら有機塩素系化合物が蓄積されていること、平面構造を持つコプラナーPCB 類と、肝臓におけるシトクロム P450 依存の酵素活性や蛋白発現量との間に相関が見られたことを報告した。今回、我々は、高濃度に PCB 類などの有機塩素系化合物を蓄積しているアザラシの甲状腺ホルモンへの影響について検討した。PCB170 や PCB180 と血中の甲状腺ホルモンレベルは負の相関を示し、PCB による野生生物の汚染が内分泌系を攪乱している可能性が考えられた。

一方で、同じく食物連鎖の頂点に立ち、高濃度の環境汚染物質の曝露されていることを指摘してきたオジロワシ、オオワシについて、その成長過程と生体に蓄積する環境汚染物質の残量パターンを解析し、興味深い結果が得られたので報告する。PCB 類、DDT 類は、胸筋において他の有機塩素系化合物に比べて 10 倍から 100 倍高い蓄積濃度を示した。また、幼鳥においてももっとも高いレベルで蓄積していた PCB 異性体は 5 塩素化 PCB であった。亜成鳥や成鳥においてももっとも高い蓄積割合を示したのは 6 塩素化 PCB であった。さらに、TEQ 値に占める non-ortho PCB が関与する割合と、総 TEQ 値との間には負の相関が見られた。従って、コプラナー PCB によって P450、特に Ah 受容体を介して発現誘導を受ける CYP1 ファミリーが誘導され、生体に残存する環境汚染物質の排泄に関与している可能性が示唆された。

さらに、今回、ダイオキシン類による汚染が問題となった藤沢市の引地川水域に棲息するコイを採集した。肝臓における異物代謝能や生殖腺への影響の有無を汚染水域の上流に棲息するコイとの比較から検討した。引地川の藤沢工場下流域より採集した雌のコイでは、上流域棲息群に比べて、P450 量、CYP1A 発現量、CYP1A 依存の代謝活性が増加していた。また、雌個体においては、生殖腺重量や血中エストロゲン量について、下流域のコイでは減少が見られた。

また、当研究室では 1996 年度より野生げっ歯類のエゾヤチネズミを捕獲し、肝臓における P450 依存の異物代謝活性の変動を調べてきた。個体数変動周期より、棲息数がほぼ同じと思われる 1996 年及び 2000 年度に採集したエゾヤチネズミについて、棲息域の変化と異物代謝能の変動について考察を行ったので、報告する。

研究協力者

数坂昭夫（北海道大学・大学院獣医学研究科・助教授）、石塚真由美（北海道大学・大学院獣医学研究科・助手）、岩田久人（愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・助教授）

A. 研究目的

シトクロム P450 (P450) による酸化反応は、地球上に棲息する殆ど全ての生物種において、環境汚染物質などの外来異物に対して働く主要な防御機構の一つであり、同時に、ステロイドホルモン、甲状腺ホルモ

ン、ビタミン類、エイコサノイドなど、生体内の様々な生理活性物質の重要な合成経路でもある。我々は、これまで、実験動物をはじめ、モクズガニやエゾヤチネズミを用いた研究から、環境汚染物質への曝露が P450 分子種の発現量を変動させること、また、環境汚染のインパクトを評価する方法として P450 の発現量及び活性の測定が有効なツールであることを明らかにしてきた。一方で、これまでの研究から、P450 の発現量が増加すると、汚染物質の種類によってはその代謝排泄が促進され、生体における汚染物質の残存量が減少することが示唆された。従って、生体に蓄積する汚染物質濃度の測定だけでは、環境汚染レベルのモニタリングを行うことは難しい可能性、および、環境汚染に耐性のある生物種は P450 をはじめとする異物の代謝・排泄機構が発達している可能性が考えられ、生体に残存する環境汚染物質と異物代謝能との関係について、より詳細な検討が必要であることがわかった。そこで、本研究では、陸圏及び水圏に棲息するさまざまな野生生物を採集し、野生生物における肝異物代謝能の解析や、蓄積する環境汚染物質を分析する。

前回の報告では、魚食性でかつ食物連鎖の頂点に立つ哺乳類のアザラシに関して、有機塩素系化合物の濃度分析を行い、同時に、肝臓におけるシトクロム P450 依存の異物代謝活性や蛋白発現量について分析を行った。そして、シトクロム P450 分子種のひとつ、CYP1A サブファミリー依存の代謝活性や発現量と、生体に蓄積するコプラナーPCB との間に相関が見られることを見出した。従って、肝臓の酵素 P450 は汚染の指標として、有効なバイオマーカーである可能性を示すことができた。しかし、一方で、これら環境汚染物質の蓄積が、野生動物の生体にどのような毒性影響をもたらしているのかは、明らかにされていない。今回、我々は、甲状腺ホルモンなどの内分泌系を攪乱することが指摘されている PCB

類の詳細な異性体ごとの蓄積を分析するとともに、甲状腺ホルモン機能への影響について調べたので報告する。

また、我々は、上記の海棲哺乳類と同じく魚食性で、食物連鎖の頂点に立ち、高濃度の環境汚染物質の生体蓄積が予想される鳥類のオオワシやオジロワシに関して、生体に蓄積する有機塩素系化合物について解析を行ってきた。これらの猛禽類は、絶滅危惧種や絶滅危急種に指定されており、日本に飛来する過程で、内分泌攪乱作用を持つ有機塩素系化合物に高濃度のレベルで曝露されていることがこれまでの研究から分かってきた。今回、これら猛禽類において、難分解性で脂溶性の高い有機塩素系化合物の蓄積パターンに関して、興味深い知見が得られたので報告したい。

さらに、環境汚染が進んでいる棲息域として、ダイオキシンの汚染水域より魚類であるコイを収集し、その肝臓における P450 依存の代謝活性を測定し、生体への影響を調べた。1992 年から 2000 年にかけて、(株)荏原製作所藤沢工場より引地川水系に排出されたダイオキシン類は、トータルで TEQ 値に換算すると、3.0g にも上ると推定される。これまでに発表されているデータはダイオキシン類の濃度の測定値が主であり、実際に周辺の棲息生物に対してどのような影響が出ているのかは明らかにされていない。我々は、汚染水域の上流・下流におけるコイの異物代謝能の変動や生殖腺への影響など、棲息生物にどのような生体影響が見られるのかを検討したので報告したい。

エゾヤチネズミは北海道を始めとして中国北部、朝鮮、サハリンからフィンランドまで広範囲に棲息するタイリクヤチネズミの一種である。これまでの研究で我々は、エゾヤチネズミに、内分泌攪乱物質であり、P450 分子種の一つ CYP1A を誘導する多環芳香族類(PAH)や、CYP2B 誘導剤のフェノバルビタール(PB)を投与し、肝臓の P450

の発現量や代謝活性がどのように変動するかを分析した。そして、エゾヤチネズミでも、ラットなど実験動物と同様の異物代謝酵素誘導能を有していることを見出した。北海道北東部ではエゾヤチネズミは3-4年の周期をもって個体数が変動し、南西部では比較的不規則にかつ緩やかに個体数が変動していることが、森林総合研究所・斎藤ら(1998)によって報告されている。そこで、我々は今回の研究において、1996年および2000年に、北海道の森林・都市・都市近郊・農村地帯など、棲息環境の異なる地点からそれぞれエゾヤチネズミを捕獲し、肝臓の異物代謝活性について測定し、棲息環境の違いや変化と異物代謝能との関わりについて調べた。

B. 研究方法

(a) アザラシにおける PCB を始めとする有機塩素系化合物と甲状腺機能の攪乱

1997年冬に北海道沿岸で害獣駆除のために捕獲されたゴマフアザラシ、クラカケアザラシの成獣を資料として用い、血液、脂肪組織、犬歯を採集した。脂肪組織については GC/ECD によって有機塩素系化合物である PCB 類、ヘキサクロロベンゼン、ヘキサクロロシクロヘキサン類、クロルダン類、DDT 類の蓄積量について解析した。血液は、ラジオイムノアッセイ法によって、総サイロキシン (total T4)、フリーサイロキシン (free T4)、総トリヨードサイロニン (total T3)、フリートリヨードサイロニン (free T3) について分析を行った。また、アザラシの犬歯を用いて各個体の年齢鑑定を行った。

(b) 猛禽類における環境汚染物質の異性体蓄積パターンの解析

オジロワシ、およびオオワシは1998年から1999年にかけて回収した死体を保存し、胸筋について化学分析の資料とした。GC/ECDを用いて、ヘキサクロロベンゼン、

ヘキサクロロシクロヘキサン類、クロルダン類、DDT 類、PCB 類の蓄積量を、GC/MS(SIM)を用いてコプラナ PCB 類の濃度について分析を行った。

(c) ダイオキシン汚染水域に棲息するコイの肝臓の P450 依存代謝活性の測定と生殖腺への影響

2000年にダイオキシン類を含む排水のあった(株)荏原製作所藤沢工場の上流域、下流域、リファレンスとして境川よりそれぞれコイの採集を行った。常法によって肝臓からミクロソームを精製し、P450含有量や、依存の代謝活性について測定した。また、HE染色によって生殖腺への影響を調べ、ELISA法によって、血液中のエストロゲン(17βエストラジオール、エストリオール、エストロン)濃度を測定した。

(d) エゾヤチネズミの棲息環境による P450 依存の活性の変動

1996年及び2000年のサンプル収集は表に示す地点より行った(Table 1, Figure 1)。

捕獲したエゾヤチネズミは麻酔下において肝臓を採取し、常法にしたがってミクロソーム画分を調製し、P450含有量、アミノピリン N 脱メチル化、イミプラミン 2 位水酸化、エトキシレゾルフィン O 脱エチル化 (EROD) 活性、そして、テストステロンを基質とした P450 依存の代謝活性を測定した。

C. 研究結果

(a) アザラシ

各アザラシに蓄積している有機塩素系化合物の濃度について表に示す (Table 2)。PCB は今回分析した脂肪組織に蓄積する有機塩素系化合物の中では最高値を示した。以下、DDT、クロルダン類、ヘキサクロロシクロヘキサン、ヘキサクロロベンゼンの順で、高濃度の蓄積を示した。PCB 類の中では、平面構造をもち、ortho 位に塩素が一

個配位する mono-ortho PCB 類が、non-ortho 体に比べ、さらに高濃度に蓄積していることがわかった。

次に、血中における甲状腺ホルモン濃度と、蓄積する有機塩素系化合物との相関について表に示す。ほとんどの有機塩素系化合物と T3 の血中濃度の関しては、負の相関を示す傾向が得られた (Table 3)。特に、PCB170、PCB180 と、total T3 濃度との間には、有意な負の相関が見られた (Figure 2)。

(b)ワシ

オオワシ、オジロワシにおける有機塩素系化合物の胸筋における蓄積濃度を表に示す (Table 4、Table 5)。PCB 類は 0.12-38 mg / g wet wt.、DDT 類は 0.068-15mg / g wet wt.と、他の有機塩素系化合物に比べて 10 倍から 100 倍高い蓄積濃度を示した。PCB 類の中では PCB153 がもっとも高濃度でこれら猛禽類の胸筋に蓄積していることが明らかとなった。また、今回の分析結果では、日本にて採集されたオオワシ、オジロワシの PCB、DDT 類の汚染度はアメリカのスベリオル湖域に棲息するハクトウワシから検討されたもの (1991 年) と同程度であることが分かった。non-ortho 体や mono-ortho 体の PCB 類の蓄積による毒性影響度を TEQ 値に換算したところ、9.2-740 pg / g wet wt.であり、non-ortho PCB 類の比率は 70%以上を占めた。

また、成鳥だけではなく、各年齢ステージにおける PCB 異性体の蓄積パターンについても分析した (Figure 3)。幼鳥においてもっとも高いレベルで蓄積していたのは 5 塩素化 PCB であった。亜成鳥や成鳥においてもっとも高い蓄積割合を示したのは 6 塩素化 PCB であった。また、それぞれのステージにおいて 4 塩素化 PCB の総 PCB 量に対する割合は、幼鳥 10.3%、成鳥 1.6-2.4%であった。また、6 塩素化 PCB の総 PCB 量に対する比率は幼鳥で 36.5%であったのに対し、成鳥では 52.8-55.2%と、高い値を示した。

(c)コイ

引地川の藤沢工場上流域より採集した雌のコイでは、下流域棲息群に比べて、P450 量が増加していた (Figure 4)。また、肝臓におけるエトキシレゾルフィン O 脱エチル化は、同様に、工場より下流域に棲息する群において高活性を示した。また、抗ラット CYP1A 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、工場下流域のコイの肝臓では、CYP1A 抗体に反応する蛋白発現が増加していることが明らかとなった (Figure 5)。雌個体においては、生殖腺重量や血中エストロゲン量について、下流域のコイでは減少が見られた (Figure 6)。また、卵巣中の一次卵母細胞と二次卵母細胞の比率を調べたところ、汚染されていると考えられている群の個体では、二次卵母細胞の割合が少なかった。

(d)エゾヤチネズミ

1) 1996 年度のエゾヤチネズミにおける棲息域と肝異物代謝能との関係

エトキシレゾルフィン代謝は、ラットの肝臓では CYP1A サブファミリーが担っている。CYP1A サブファミリーはダイオキシン類、多環芳香族類など、平面構造を有する環境汚染物質に曝露されることによって、発現が誘導されることが知られている。EROD 活性は、1996 年捕獲の個体では、石狩由来群で最も高い値を示し、以下、札幌、中川と続いた (Figure 7)。また、中川由来のエゾヤチネズミは、1996 年度では、エリスロマイシン、イミプラミン、アミノピリン、アニリン代謝など、測定した全ての基質の代謝活性において、札幌・石狩由来の個体に比べて顕著に低い値を示した (Figure 7)。

2) 2000 年度のエゾヤチネズミにおける棲息域と肝異物代謝能との関係

(1) EROD

2000 年に捕獲したエゾヤチネズミでは、EROD 活性は、蘭越 (R)、石狩 (I) 由来群で最も高い値を示し、以下、札幌 (S)、