

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390171

研究課題名(和文) 容器・包装品から溶出する化学物質の毒性メカニズムの解明と安全基準策定に関する研究

研究課題名(英文) Study on toxic mechanism of chemical substances eluted from containers and packages and risk assessment

研究代表者

那須 民江 (Tamie Nasu)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10020794

研究成果の概要(和文)：野生型および芳香族炭化水素受容体(AhR)-nullマウスに0, 32, 64 μ mol/kgのスチレントリマー、あるいは0, 32, 64 μ mol/kgのオクタクロロスチレンを4日間投与し、AhRを介した薬物代謝酵素の誘導と甲状腺ホルモンへの影響を検討した。スチレントリマーは予想に反して、AhRの転写活性化を抑制し、CYP1A1やUGTの遺伝子の発現を抑制したが、オクタクロロスチレンは逆にAhRを転写活性化しCYP1A1やUGT1A1遺伝子発現を誘導した。これらの結果として、スチレントリマーは血漿中T4レベルを上昇させたが、オクタクロロスチレンは影響を与えなかった。

研究成果の概要(英文)：Wild-type and aromatic hydrocarbon receptor (AhR)-null male mice were orally given 0, 32 and 64 μ mol/kg styrene trimer or octachlorostyrene for 4 days. Unexpectedly, styrene trimer down-regulated AhR mRNA expression, and accordingly down-regulated CYP1A1 and UGT1A1 and 1A6 mRNA expressions in the liver of wild-type mice. These findings were not observed in AhR-null mice. As a result, styrene trimer increased plasma total and free T4 levels in the wild-type mice. Octachlorostyrene treatment transactivated AhR and induced CYP1A1 and UGT1A1 in the wild-type mice. However, this chemical did not influence plasma T4 levels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：社会医学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：スチレントリマー、オクタクロロスチレン、アリールヒドロカーボン受容体、甲状腺ホルモン、グルクロン酸抱合酵素、CYP1A1、ダイオキシン、妊娠マウス、メカニズム

1. 研究開始当初の背景

PCB等の塩化多環芳香族炭化水素化合物の曝露により甲状腺疾患の発症頻度が上昇する(Langer et al., Eur J Endocrinol 1998;

Murai et al., Environ Res 1987)という疫学研究を受けて、類似した化学構造を有す化学物質、例えばダイオキシンや3-メチルコラントレン(3MC)等の甲状腺への影響

が実験動物を用いて検討されている。これらの化学物質の多くは AhR に結合し、標的遺伝子の UGT を誘導し、甲状腺ホルモン (T4) の排泄を促し、甲状腺過形成を誘発する (Nishimura et al., *Endocrinology* 2003)。

スチレントリマーは容器から溶出するスチレンオリゴマーの一つであり、我々の日常生活において曝露の可能性が高い化学物質である。その毒性に関する *in vivo* の研究は数少ない。最近になって、Ohyama らはスチレントリマーが次世代の仔のテストステロンの増加やセルトリ細胞数や黄体形成ホルモンの減少等の生殖毒性を示すことを報告している (*Exp Biol Med (Maywood)* 232:301-308, 2007)。この報告はスチレントリマーが生殖毒性を有することを示すが、しかしそのメカニズムはまだ検討されていない。

スチレントリマーの *in vitro* の研究はいくつか報告されている。これらの多くはエストロゲン受容体 (ER) への結合アッセイやヒト乳がん細胞 (MCF-7 cells) の増殖試験である。しかしこの結果の見解には一致がみられていない。Date et al (*Food Chem Toxicol*, 2000) と Ohno et al., (*Environ Health Perspect*, 2002) はスチレントリマーが ER、アンドロゲンレセプター (AR)、甲状腺ホルモン受容体に結合しないことを報告している。一方、Ohyama et al., (*Environ Health Perspect* 2001) はスチレントリマーにより MCF-7 細胞の増殖が上昇することを報告している。

外因性内分泌かく乱化学物質の問題が提起されてから、上記のような細胞レベルの研究に焦点が向けられてきたが、このようなデータから当該物質の健康リスク評価は困難であり、現在スチレントリマーを含むオリゴマーの安全基準は提言されていない。

このような学術的背景のもと、我々はスチレンオリゴマーの代表としてスチレントリマーの内分泌系への影響を分子レベルから個体レベルにおいて解析し、安全基準を策定する計画を立てた。

2. 研究の目的

野生型、AhR-null マウスを用いて、スチレントリマーが肝臓や甲状腺等の AhR に結合して転写を抑制する様式、この転写抑制が甲状腺ホルモンレベルに与える影響、これらに関わる甲状腺ホルモンの代謝 (UGT、脱ヨード酵素等) の遺伝子群を明らかにすることを目的とした。また、親世代の生殖器への影響とそのメカニズムを解明することを計画した。野生型、AhR-null マウスに、化学構造が類似しているオクタクロロスチレンを投与し、甲状腺への影響

を調べ、スチレントリマーと比較した。

野生型の妊娠マウスにスチレントリマーを曝露し、胎仔への影響を検討した。

培養細胞にスチレントリマーを曝露し、AhR の転写抑制様式とそれに関わる遺伝子群を明らかにした。

3. 研究の方法

まず、野生型および芳香族炭化水素受容体 (AhR) -null マウスに 0, 32, 64 μ mol/kg のスチレントリマー、あるいは 0, 32, 64 μ mol/kg のオクタクロロスチレンを 4 日間投与し、血中の甲状腺ホルモンおよびそれに関わる受容体や酵素遺伝子の発現を解析し、影響の分子メカニズムを解析した。

妊娠マウスに妊娠 1 日目からスチレントリマーを投与し、母マウスと胎児への影響を検討した。

マウス肝臓がん由来の細胞株である Hepa-1c1c7 にスチレントリマーを曝露し、AhR の転写抑制様式とそれに関わる遺伝子群 (CYP1A1) を明らかにした。AhR 転写活性化の陽性物質として 3MC を用いた。

4. 研究成果

4-1 スチレントリマーの甲状腺ホルモンへの影響とその分子メカニズム

野生型マウスでは TotalT4 の血中濃度が増加した。FreeT4 も増加しており、TotalT4 の増加は殆ど FreeT4 の増加に依存することが明らかであった。しかしノックアウトマウスにおいては T4 レベルの上昇は見られなかった。この原因を明らかにするために、まず肝臓の T4 の抱合に関わる酵素発現を解析した。その結果、スチレントリマーは野生型マウス肝の

AhR, CYP1A1, CYP1A2 の発現を抑制し、これらは CYP1A の薬物代謝活性 (エトキシレゾルフィン O-脱エチル化の代謝活性) の低下を招いた。しかし、ノックアウトマウス肝においてはこれらに関しては何ら変化が見られなかった。さらにスチレントリマーは、野生型マウス肝の UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT) の発現を抑制したが、ノックアウトマウス肝にはこのような変化が見られなかった。興味ある知見は、スチレントリマーは AhR-mRNA の発現を低下させるが、核内の AhR の発現は上昇していたことであった。この原因を解明するためにゲルシフトアッセイを行った。スチレントリマーは AhR の XRE への結合を阻害していたので、AhR の核外移行を阻害していることが推察された。

以上の結果を総合すると、スチレントリマ

一による血漿中 T4 の上昇は肝における AhR の発現抑制およびそれに伴う T4 の抱合酵素である UGT の活性低下が一因であることが判明した。

4-2. オクタクロロスチレンの甲状腺ホルモンへの影響

スチレントリマーとは逆に、オクタクロロスチレンは野生型マウスの AhR-mRNA, CYP1A1/2 の mRNA の発現を誘導し、CYP1A の薬物代謝活性 (エトキシレゾルフィン O-脱エチル化の代謝活性) を増大させた。これらの影響は AhR-null マウスでは観察されなかった。

一方、オクタクロロスチレンは野生型マウスにおいて、UGT1A1 を若干誘導したが、1A6 には影響を与えなかった。AhR-null マウスにおいては両方の遺伝子発現を誘導し、これは UGT 活性 (1-ナフトール) からも明らかであった。両遺伝子型マウスにおいて、オクタクロロスチレンの T4 への影響は観察されなかった。このように、オクタクロロスチレンはスチレントリマーと異なった AhR 作用様式を示し、これらは、ダイオキシンや 3MC とも全く異なる AhR を介した甲状腺ホルモン系への作用を示し、毒性影響も異なることが示唆された。

4-3. 妊娠期スチレントリマー曝露の母マウスと胎仔への影響

AhR ノックアウトマウスにはスチレントリマーの薬物代謝酵素活性や甲状腺ホルモンの影響は観察されなかったため、野生型マウスのみを使用して実験を行った。

妊娠マウス (C57BL/6N) にスチレントリマーを 1 日目から 17 日目まで経口投与した。投与最終日の翌日に解剖して、種々の検討を行った。スチレントリマー投与による雌マウスの体重及び臓器相対重量には変化が見られなかった。雌マウス (妊娠していたマウス) の肝臓での AhR-mRNA 発現量はスチレントリマー低濃度群で減少していたが、AhR の標的遺伝子

(CYP1A1-mRNA) には変化がなかった。肝臓の ER α 発現量にも AhR と同様の変動が観察された。肝臓での T4 の排出に関わり、AhR を介して誘導される UGT1A1-, UGT1A6-mRNA の発現量にも変化がなかった。妊娠していなかった雌マウスでは AhR-, CYP1A1-, UGT1A1-, UGT1A6-mRNA の発現に変化がなかった。性ホルモンへの影響を調べるために、卵巣でのステロイド合成に関わる steroidogenic acute regulatory protein (StAR) と cytochrome P450 side-chain cleavage

enzyme (P450scc) の mRNA を測定した。しかし、妊娠していたマウスの卵巣での P450scc-, StAR-mRNA には変化がなかった。

スチレントリマーの胎仔への影響も検討した。胎仔の死亡率、胎仔数等や、体重、臓器相対重量、生殖器間距離、脳重量に変化がなかった。性別にも変化を与えなかった。スチレントリマーは妊娠マウスの甲状腺ホルモン脱ヨード酵素 (D3) には影響を与えないが、非妊娠マウスの D3-mRNA 量を減少させた。

4-4. 培養細胞を用いた AhR 作用分子メカニズム解析

AhR は Dioxin Receptor と呼ばれ、3-methylcholanthrene (3MC) のような polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) や TCDD などのダイオキシン類などのリガンドにより活性化し、CYP1A を始めとする cytochrome P450 や UGT 等の誘導を惹起する。これまでの研究において、スチレントリマーが AhR の転写活性化を抑制することが判明した。そこで、マウス肝臓がん由来の細胞株である Hepa-1c1c7 を用いてスチレントリマーを 2 時間刺激し、AhR 誘導実験を行った。スチレントリマーには 4, 8 時間後弱い CYP1A1 の誘導活性、AhR の結合配列である DRE 依存的な luciferase 活性が確認されたが、その後減弱し、12 時間後にはコントロールレベルに戻っていた。またヒトの肝芽腫由来である HepG2、ヒトの乳がん由来である MCF-7 においても同様にスチレントリマーによる CYP1A1 の誘導が確認された。一方 ST-1 の単量体である Styrene による刺激では CYP1A1 の誘導は見られなかった。また、2 時間スチレントリマーにて前処置後刺激した後に 3MC で処置した場合、微弱ではあるが AhR の CYP1A1 の誘導能を亢進することがわかった。この経路が AhR 依存的なものであるかを評価するために Stealth RNAi を用いて knockdown を行ったところ、AhR 依存的に CYP1A1 の誘導が減弱することが確認された。このことから、スチレントリマーには AhR を介して CYP1A1 を誘導することが示唆された。しかし一方で長時間予めスチレントリマーで処置した後に 3-MC にて刺激した場合、CYP1A1 の発現量がコントロールに比べて減少した。また、スチレントリマーにて長時間刺激後に AhR のタンパク量を評価したところ、コントロールに比べて減少することが確認された。以上のことから一つの可能性として、スチレントリマーは AhR を一過性には活性化するが、その後 AhR のタンパク量を減少させることで結果的に AhR の全体としての活性を低下させると考えられる。そのため

スチレントリマー投与群マウスにおいて AhR による転写産物である UGT の発現量を減少させ、血清 Free の T₄ レベルが上昇したと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Nakajima T, Hopf NB, Schulte PA. Di(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP). pp183-195. In Identification of research needs to resolve the carcinogenicity of high-priority IARC carcinogens. View full report. IARC Technical publication No. 42,2010(査読あり)
2. Nakamura D, Yanagiba Y, Duan Z, Ito Y, Okamura A, Asaeda N, Tagawa Y, Li C, Taya K, Zhang SY, Naito H, Ramdhan DH, Kamijima M, Nakajima T. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. Toxicol Lett. 194: 16-25 ,2010(査読あり)
3. Ward EM, Schulte PA, Straif K, Hopf NB, Caldwell JC, Carreón T, Demarini DM, Fowler BA, Goldstein BD, Hemminki K, Husgafvel Pursiainen K, Kuempel E, Lewtas J, Lunn RM, Lyng E, McElvenny DM, Muhle H, Nakajima T, Robertson LW; IARC Working Group. Research Recommendations for Selected IARC-Classified Agents. Environ Health Perspect. 118 (10): 1355-1362, 2010(査読あり)
4. Yanagiba Y, Ito Y, Kamijima M, Gonzalez FJ, Nakajima T. Octachlorostyrene Induces Cytochrome P450, UDP-glucuronosyltransferase and Sulfotransferase via the Aryl Hydrocarbon Receptor and Constitutive Androstane Receptor. Toxicol Sci 111:19-26,2009(査読あり)
5. Yanagiba Y, Ito Y, Yamanoshita O, Zhang S-Y, Watanabe G, Taya K, Li C, Inotsume Y, Kamijima M, Gonzalez, FJ, Nakajima T. Styrene trimer may increase thyroid

hormone levels via down-regulation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) target gene UDP-glucuronosyltransferase. Environ Health Perspect. Jun;116(6):740-745,2008(査読あり)

6. Ito Y, Nakajima T. PPARalpha- and DEHP-Induced Cancers. PPAR Res. Article ID 759716,2008(査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

Yukie Yanagiba, Yuki Ito, Michihiro Kamijima, Frank J. Gonzalez, Tamie Nakajima (2010) Octachlorostyrene induces cytochrome P450, UDP-glucuronosyltransferase, and sulfotransferase via the aryl hydrocarbon receptor and constitutive androstane receptor. XII International Congress of Toxicology, XII International Congress of Toxicology2010. 7. 19-23 Barcelona-Spain Palau de Congressos de Barcelona

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那須民江 (中島) (Tamie Nasu)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10020794

(2) 研究分担者

村上正巳 (Masami murakami)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30241871

(3) 連携研究者

なし