

平成22年 6月11日現在

研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19681006
 研究課題名 (和文) 脳の発達・性分化に及ぼす揮発性有機化合物の影響と作用機序の解明
 研究課題名 (英文) Research for the effects of toluene exposure on the development and sexual differentiation of the brain
 研究代表者
 塚原 伸治 (TSUKAHARA SHINJI)
 埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授
 研究者番号：90318824

研究成果の概要 (和文)：近年、胎児や小児に対する環境リスクの増大が懸念され、環境化学物質の曝露による子供の健康影響について関心が払われている。本研究では、ラットを実験モデルとして用いて、室内空気汚染物質として知られるトルエンの発達期曝露による脳の性分化への影響を検討した。その結果、トルエンの発達期曝露によって雄胎仔の血中テストステロン濃度低下や成熟した雄ラットの性的二型核であるSDN-POAの縮小が引き起こされることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：We recently pay attention to the risk of the adverse effects of environmental chemical exposure on child health. This study was aimed to determine the effects of developmental exposure to toluene, a volatile organic compound widely used as an industrial solvent, on the sexual differentiation of the brain. As the results, it was found that exposure to toluene during developing period decreased blood testosterone levels of fetal male rats and the volume of the SDN-POA, a sexually dimorphic nucleus, of male rats in adulthood.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	16,500,000	4,950,000	21,450,000

研究分野：神経毒性学、神経内分泌学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：トルエン、脳の性分化、テストステロン、性的二型核、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景
 これまで化学物質の健康影響を評価す
- るには、一般的なヒトあるいは動物の集団を対象とし、毒性を評価する研究が主流であつ

た。しかし、化学物質過敏症、シックハウス症候群や内分泌かく乱物質、等の健康影響に関する研究や大気汚染に関する疫学研究からも窺えるように、ある種の環境汚染物質の影響を受けやすい集団（高感受性集団）が存在することが明らかになってきた。また、古典的な毒性だけでなく、比較的低濃度の曝露によって引き起こされる軽度ではあるが生活の質に対する影響、後発影響や次世代影響などの曝露期間を越えて長期間持続する影響を検証することが近年の健康影響研究に求められている。

性差がみられる成熟個体の脳機能は、器官形成がなされる発達期において脳が性的に分化することにより獲得される。脳の性分化とは、性的に未分化な脳が性特異的な構造を形成してゆく過程である。言い換えるならば、脳の発達過程が性的な可逆性から不可逆性へと移行することである。脳の性決定は遺伝子ではなく、発達期の性ステロイドホルモン環境によって左右される脆弱性があり、脳の性分化の臨界期に曝露された有害化学物質の影響は、たとえそれ以降の曝露を受けなかったとしても、一生残る可能性がある。また、幼弱個体の化学物質に対する感受性は成熟個体のものと違いがあるとされ、成熟個体と比べてその感受性は高いと考えられている。このことから、成熟個体では影響がみられない低濃度の化学物質曝露であっても、幼弱個体では影響が顕れるという懸念がある

脳の性分化とは男らしさ・女らしさを獲得してゆくプロセスであるとも捉えることができる。脳の性分化異常がジェンダーアイデンティティ、性的指向など性に関する脳機能障害の根本となっている。現在では、性同一性障害など重度障害が社会的に広く知られているが、一般的な男性・女性として日常生活を営む上で支障は無くとも軽度の障害を有した集団は大きいと考えられる。このような性に関する脳機能障害は生活の質に密接に関連した問題を引き起こし、発症の原因・機序が未解明である現状から、性の脳機能障害と化学物質汚染との因果関係や関連性を検討する視点に立った研究は意義深いと考える。

以上のことから、脳の性分化に及ぼす化学物質の影響評価は重要である。脳の性分化の本質的なプロセスは脳発達の一過程として、性特異的に進行する。脳の性分化の重要な要素であるライフサイクルの時間軸における発達期と性別は化学物質の曝露影響の程度を左右する感受性要因と成り得る。脳の性分化に対する化学物質の影響を検証することで、これら要因のリスクを明らかにすることができる。本研究では、これまでの研究知見を生かし、脳の性分化に及ぼす化学物質

の発達期曝露の影響についての検証を進め、その作用機序を明らかにしてゆく。

2. 研究の目的

発達期に性分化したほ乳類の脳内には、神経核の大きさやニューロン数などの性差がみられる領域が存在する。このような形態学的な性差が生じた領域は性的二型核と呼ばれ、これら領域の働きによって成熟個体の脳機能の性差や性特異性が出現する。発達期の脳内では、脳の形態形成に重要なプログラム細胞死（アポトーシス）が自然発生的に起こり、このアポトーシスによって脳形成に必要な神経細胞の選択がなされる。さらに、性的二型核として発達する領域では、アポトーシスを起こして死んでゆく細胞数に性差があり、これによって神経核の大きさとニューロン数の性差が生じる。アポトーシスを誘導して細胞に死の情報を伝達する物質、反対にアポトーシスを抑制して細胞の生存性を高める物質は多種多様であり、脳の性分化に重要な性ステロイドホルモンもアポトーシス調節因子である。これに加えて、様々な外来性の有害化学物質が死のシグナルとして細胞に作用し、アポトーシス細胞死を誘導することが知られている。

室内空気の汚染物質として検出される比較的低濃度のトルエンやホルムアルデヒドなどの揮発性有機化合物（volatile organic compound: VOC）は化学物質過敏症やシックハウス症候群の原因物質として問題視されている。低濃度 VOC が及ぼす成熟個体の脳への影響に関する検討は進められているものの、幼弱個体に関する解析はあまり進められておらず、脳発達や性分化への影響に関する研究報告は殆ど見受けられない。室内空気の VOC 濃度は新築住宅や増改築住宅において高く、新築時期や増改築時期は新生児の誕生時期と重なる傾向がある。このようなことから、VOC の健康影響の検討は成人だけではなく、小児や胎児についても進めてゆかねばならないと考える。

以上のことから、本研究では、VOC の一つであるトルエンの曝露による脳の性分化への影響を検討するため、ラットを用いて、脳の性分化の方向性の決定に重要な臨界期のテストステロン分泌、性的二型核やその形成に関与する発達期のアポトーシス細胞死に対するトルエン曝露の影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 胎仔ラットのテストステロン分泌に対する妊娠ラットのトルエン曝露の影響

妊娠 15 日目から 19 日目の 5 日間、トルエン (0.09、0.9、あるいは 9 ppm、90 分/

日)をラットに吸入曝露した。対照群には清浄空気を同一条件で曝露した。妊娠 19 日目の曝露直後、ネンプタールを腹腔内注射して深麻酔した動物を帝王切開して胎仔の血液および精巣を採取した。採取した血液より血漿を回収して、血漿中テストステロン濃度をエンザイムイムノアッセイ法により測定した。採取した精巣より抽出したトータル RNA を用いて、逆転写反応後、テストステロン合成に関与するステロイド産生酵素 (P450_{scc}、3β-HSD1、P450_{c17} および 17β-HSD3) と胎仔精巣のライディッヒ細胞の分化増殖マーカーである Ins13 の mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR 法により解析した。また、雄胎仔の精巣における 3β-HSD のタンパク質発現に対するトルエン曝露の影響を検討するため、抗 3β-HSD 抗体を用いた免疫組織化学的解析をおこなった。

(2) ラットの性的二型核に対するトルエンの周生期曝露の影響

胎生 17 日から出生 6 日にかけてトルエン (10 あるいは 50 ppm、8 時間/日) をラットに全身曝露した。対照群には清浄空気を同一条件で曝露した。出生 7 日齢および性成熟に達した 3-5 ヶ月齢の雌雄仔ラットより採取した脳組織を 10%ホルマリン-生理食塩水にて浸漬固定した。クリオスタットを使用して、固定脳組織の前額断連続凍結切片を作製した。その後、出生 7 日齢雌雄仔ラットの脳組織切片を用いて、アポトーシス細胞マーカーである single-stranded DNA (ssDNA) に対する抗体を用いた免疫組織化学染色をおこない、組織切片中のアポトーシス細胞を検出した。解析対象として性的二型核の一つである SDN-POA (sexually dimorphic nucleus of the preoptic area) を選定し、SDN-POA 内に観察された ssDNA 免疫陽性細胞数を光学顕微鏡下で計測した。

成熟雌雄仔ラットの脳組織切片を用いて、SDN-POA のマーカーであるカルビンディン D28K に対する抗体を用いた免疫組織化学染色をおこなった。光学顕微鏡を用いて、カルビンディン D28K の免疫陽性反応によって可視化された SDN-POA を観察し、デジタル画像を取得した。画像解析ソフトウェア (ImageJ 1.40g, NIH, USA) を使用した画像解析から、組織切片中のカルビンディン D28K 免疫陽性領域の面積を計測し、SDN-POA の体

積を推定算出した。

4. 研究成果

(1) 胎仔ラットのテストステロン分泌に対する妊娠ラットのトルエン曝露の影響

実験では妊娠ラットを用いて、妊娠 15 日から 19 日の 5 日間にかけてトルエンを吸入曝露した。この曝露期間は、ラットの脳の性分化の臨界期に含まれ、精巣からのテストステロンの産生分泌が活発な時期である。妊娠 19 日目の曝露終了直後、妊娠ラットの子宮内胎仔を確認したところ、一腹の胎仔の総数、雌胎仔の数、および雄胎仔の数に対するトルエン曝露の影響は見られなかった。各胎仔から採取した血液から分離した血漿中のテストステロン濃度をエンザイムイムノアッセイ法により定量した結果、0.9 あるいは 9 ppm のトルエンを曝露した妊娠ラットの雄胎仔の血漿中テストステロン濃度は、同一条件で清浄空気を曝露した対照群の値よりも有意に低くなっていた (図 1)。0.09 ppm のトルエン曝露群の雄胎仔の血漿中トルエン濃度は対照群と比べて有意な違いはみられなかった。曝露量に関係なく、雌胎仔のテストステロン濃度はトルエンによって変化しなかった。また、雌胎仔のテストステロン濃度は、同一実験群の雄胎仔のテストステロン濃度に比べて有意に低かった。以上の結果から、妊娠後期における母ラットのトルエン吸入曝露は子宮内の雄胎仔ラットのテストステロンレベルを低下させることが明らかになった。

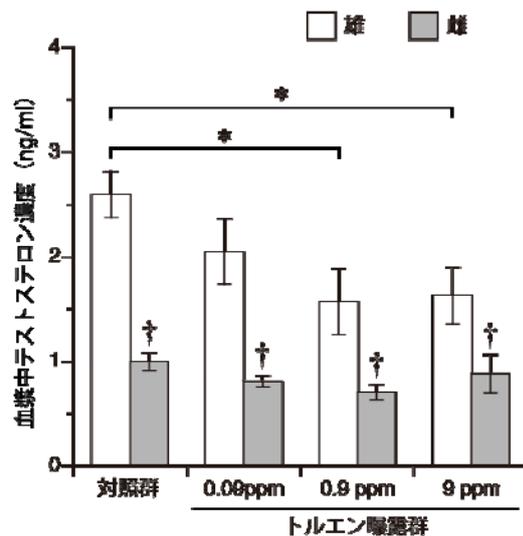


図 1. 胎仔ラットの血中テストステロン濃度に対するトルエン曝露の影響 (Toxicology Letters, 185, 79-84, 2009 の図を改変)

次に、トルエン曝露によって生じるテストステロン濃度低下の原因を探るため、採取

した雄胎仔の精巣におけるステロイド産生酵素の mRNA の発現レベルをリアルタイム PCR 法により解析した。精巣におけるテストステロンの産生はライディッヒ細胞によりなされており、この細胞はコレステロールからテストステロンを合成するために必要な酵素 (P450scc, 3β -HSD1, P450c17, 17β -HSD3) を発現している。清浄空気を曝露した対照群の雄胎仔と 0.9 ppm のトルエンを曝露した妊娠ラットの雄胎仔から採取した精巣の各種ステロイド産生酵素の mRNA レベルを測定した結果、トルエンを曝露した雄胎仔の精巣の 3β -HSD1 の mRNA の発現レベルは対象群よりも有意に低下していた。しかし、 3β -HSD1 以外のステロイド産生酵素の mRNA の発現はトルエン曝露によって影響を受けなかった。さらに、抗 3β -HSD 抗体を用いた免疫組織学的解析の結果、胎生 19 日目の雄胎仔ラットの精巣の間質領域において、 3β -HSD 免疫陽性反応を示すライディッヒ細胞が多数観察された (図 2)。間質領域の 3β -HSD 免疫陽性領域を計測したところ、0.9 あるいは 9 ppm のトルエンを吸入曝露した妊娠ラットの雄胎仔における値は対照群に比べて有意に少なくなっていた。コレステロールを基質としたテストステロン合成において、 3β -HSD はその中間代謝過程であるプレグネノロンからプロゲステロンへの反応を触媒する。従って、 3β -HSD のタンパク質発現量の減少は、精巣でのテストステロン産生能の低下を引き起こすと考えられる。胎仔精巣のライディッヒ細胞の分化増殖マーカーである Ins13 の mRNA の発現量はトルエン (0.9 ppm) によって変化しなかった。このことから、テストステロンを産生分泌するライディッヒ細胞の数自体はトルエン曝露によって変化していないと考えられる。以上のことから、胎生後期のトルエン曝露による雄胎仔の血中テストステロン濃度の低下は、精巣の 3β -HSD の発現量の減少が原因であることが示唆された。

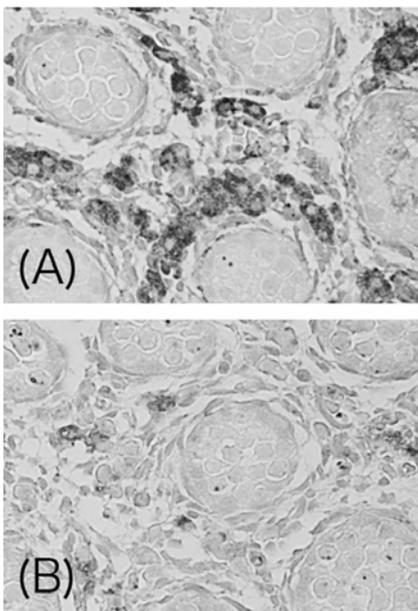


図 2. 雄胎仔ラットの精巣における 3β -HSD の免疫染色組織像。(A) 対照群の精巣、(B) 0.9 ppm トルエン曝露群の精巣 (Toxicology Letters, 185, 79-84, 2009 の図を改変)

(2) ラットの性的二型核に対するトルエンの周生期曝露の影響

解析対象とした SDN-POA は、体積やニューロンの数が雌よりも雄に優位な性的二型核である。ラットの SDN-POA はカルビンディン D28K というタンパク質を発現するニューロンが集まっており、カルビンディン D28K の免疫陽性反応により SDN-POA を光学顕微鏡下で確認することができた (図 3)。カルビンディン D28K の定量免疫組織学的解析により SDN-POA の体積を推定算出した結果、周生期に清浄空気を曝露した対照群とトルエン曝露群のどちらにおいても、雄ラットの SDN-POA のカルビンディン D28K 免疫陽性領域の体積は雌ラットよりも大きく、明瞭な性差がみられた (図 3)。しかし、SDN-POA の体積を実験群間で比較すると、50 ppm のトルエンを曝露した雄ラットの SDN-POA の体積は対照群の雄ラットの SDN-POA よりも有意に小さかった。10 ppm のトルエン曝露群の雄ラットの SDN-POA の体積は対照群雄の値と同程度であった。雌ラットの SDN-POA の体積は 10 ppm あるいは 50 ppm のトルエン曝露により変化しなかった。このことから、周生期に曝露したトルエンは雄ラットの脳の性分化のプロセスに影響を及ぼし、その影響が成熟期に至るまで持続するのだと考えられた。

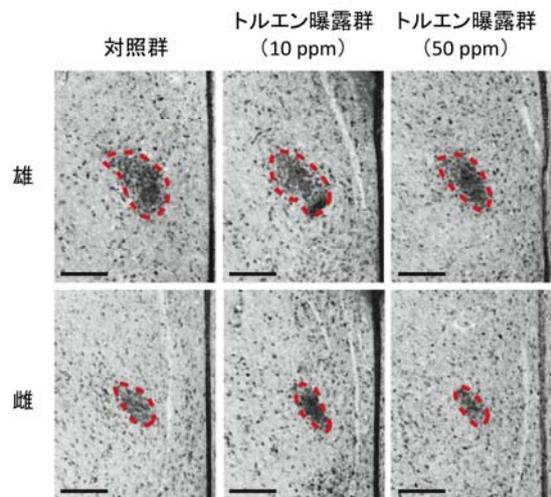


図 3. 成熟したラットの SDN-POA (破線の内側)。

出生 7 日齢の雌雄仔ラットの SDN-POA におけるアポトーシス細胞数を計測した結果、50 ppm のトルエンを周生期に曝露した雌雄仔

ラットのSDN-POAのアポトーシス細胞数は対照群に比べて有意に増加した。対照群と同様、トルエン曝露群のSDN-POAにおけるアポトーシスの性差は依然としてみられたが、50 ppmのトルエンを曝露した雄仔ラットのアポトーシス細胞数は対照群雌と同程度になるまで増加した。

周生期にトルエンを曝露した成熟雄ラットのSDN-POAの体積は対照群に比べて縮小した。このことは、トルエンが脳の雄性化に影響を及ぼし、その影響が成熟期に至るまで持続することを示唆している。ラットにおいて、周生期は脳の性分化の臨界期であり、テストステロンが未分化な脳に作用することで、脳の雄性化のプロセスが進行する。成熟期のSDN-POAの体積や発達期のSDN-POAにおけるアポトーシスは周生期のテストステロンの影響によって変化する。従って、トルエンの曝露によって生じたテストステロンレベルの低下が、アポトーシス促進ひいてはSDN-POAの体積縮小の一要因になると推測された。しかしながら、トルエンが脳に直接作用してアポトーシスが誘導されることも考えられる。アポトーシスに対するトルエンの影響メカニズムについては今後詳細に検討しなければならない。

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14件)

1. 塚原伸治, 中島大介, 藤巻秀和: 脳の性分化におよぼす発達期トルエン曝露の影響と作用機序. 室内環境, 13, 1-8, 2010. (総説、査読有り)
2. Tsukahara S, Nakajima D, Kuroda Y, Hojo R, Kageyama S, & Fujimaki H: Effects of maternal toluene exposure on testosterone levels in fetal rats. Toxicology Letters, 185, 79-84, 2009. (原著論文、査読有り)
3. Tsukahara S: Sex differences and roles of sex steroids in apoptosis of sexually dimorphic nuclei of preoptic area in postnatal rats. Journal of Neuroendocrinology, 21, 370-376, 2009. (総説、査読有り)
4. Nakajima D, Tsukahara S, Hojo R, Kageyama S, Goto S, Shiraishi H, Shiraishi F, & Fujimaki H: Measurement of toluene concentrations in the blood of fetuses of pregnant rats exposed to low concentration toluene using headspace solid phase micro extraction-gas chromatograph-mass spectrometry. Journal of Health Science, 55, 50-55, 2009. (原著論文、査読有り)
5. Tsukahara S, Hojo R, Kuroda Y, & Fujimaki H: Estrogen modulates Bcl-2 family protein expression in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of postnatal rats. Neuroscience Letters, 432, 58-63, 2008. (原著論文、査読有り)
6. 塚原伸治, 石堂正美, 黒田佳香, 藤巻秀和: 揮発性有機化合物および農薬の発達期曝露による中枢神経系への影響についての調査研究. 大気環境学会誌, 43, 180-190, 2008. (技術調査報告、査読有り)
7. 中島大介, 塚原伸治, 影山志保, 白石不二雄, 藤巻秀和: 胎児・小児への影響を考慮したVOC研究の現状と展開. 室内環境, 11, 103-109, 2008. (解説、査読有り)

[学会発表] (計18件)

1. 塚原伸治, 黒田淑子, 中島大介, 影山志保, 藤巻秀和: 発達期のトルエン曝露によるテストステロン分泌および脳内のアポトーシス細胞死への影響. 平成20年度室内環境学会総会、東京、2008年12月1-2日.
2. Tsukahara S: Effects of developmental exposure to toluene on the sexual differentiation of the brain. Japan/China Symposium 2008 (KIZUNA2008): Strategies to Reduce Risks on the Brain Development Contingent to Urbanization, Tsukuba, Japan, October 23-25, 2008.
3. Tsukahara S, Nakajima D, Kuroda Y, Kageyama S, Hojo R, & Fujimaki H: Effects of exposure to toluene on steroidogenesis in testes and aromatization of testosterone in brain of male rats during fetal life. 45th Congress of the European Societies of Toxicology, Rhodes, Greece, October 5-8, 2008.
4. 塚原伸治, 中島大介, 黒田淑子, 影山志保, 藤巻秀和: 脳の性分化に関与する発達期の性ステロイドホルモン分泌および性的二型核のアポトーシスに及ぼすトルエン曝露の影響. 第49回大気環境学会年会、金沢、2008年9月17-19日.
5. 塚原伸治: 発達期の性的二型核におけるアポトーシスに関する研究. 第35回日本神経内分泌学会・第23回日本下垂体研究会合同学術集会、東京、2008年8月28-30日.
6. 塚原伸治, 中島大介, 黒田淑子, 影山志保, 藤巻秀和: 周産期トルエン曝露による胎仔ラットの脳内エストラジオール含量およ

- び出生仔ラットの SDN-POA のアポトーシスへの影響. 第 31 回日本神経科学大会、東京、2008 年 7 月 9-11 日.
7. 塚原伸治: 発達期の脳の性分化機構におよぼす化学物質の影響. 第 128 回日本薬学会年会、横浜、2008 年 3 月 26-28 日
8. 塚原伸治: VOC の脳神経系におよぼす影響. 第 48 回大気環境学会年会、岡山、2007 年 9 月 5-7 日.

[その他]

ホームページ等

http://www.nies.go.jp/risk/mei/mei002_5.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚原 伸治 (TSUKAHARA SHINJI)

埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号: 90318824

(2) 研究分担者

研究者番号:

(3) 連携研究者

研究者番号: