

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18310044
 研究課題名（和文） 農薬分解産物ニトロフェノール類の生殖毒性および肺癌活性化に関する研究
 研究課題名（英文） Studies on toxic effects of nitrophenols contained in degradation products of insecticide in reproduction and promoting activity in lunge cancer
 研究代表者
 田谷 一善（TAYA KAZUYOSHI）
 東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授
 研究者番号：60092491

研究成果の概要：ディーゼル排気微粒子から分離し、農薬の分解産物中にも含まれるニトロフェノール類(NP)の生殖・副腎機能及び肺癌活性化への影響をラット、ウズラおよび培養細胞系を用いて検討した。その結果、NP は、エストロゲンやアンドロゲンリセプター(ER)と結合して、エストロゲン作用や抗アンドロゲン作用を示す内分泌攪乱化学物質である事実が判明した。また、肺癌を促進する可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2007年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：複合新領域

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：人体有害物質

1. 研究開始当初の背景

大気汚染は、人間を含めて地球に生存するすべての動植物にとって深刻な生命に係わる問題である。WHO の報告では、大気汚染による推定年間死亡者数は300万人にもものぼり、この数は交通事故死者の数をはるかに超えている。都市部においては、ディーゼル車から排出されるディーゼル排気微粒子（DEP）が、大気汚染の主たる原因になっている。その被害は人間の健康だけにとどまらず、野生動物を含めた地球上に生息するすべての動植物に広く及んでいる。これまで、DEP の影響については、呼吸器系や循環系などの健康影響が報告されてきたが、生態系への影響に

については看過されてきた。近年、共同研究者の鈴木らは、DEP 中に血圧下降作用などの循環系への作用に加えてエストロゲン作用と抗アンドロゲン作用を有する化学物質が含まれている事実を明らかにし、その有効成分として5種類のニトロフェノールを世界で初めて単離・構造決定に成功した。その後、これらのニトロフェノール類は、現在日本でも使用されている農薬（殺虫剤：フェニトロチオン）とパラチオン（日本は現在使用されていないが、世界中で、まだ広く使用されている）の分解産物であることが判明した。従ってニトロフェノール類は、DEP の排気ガスからだけではなく、農薬散布により環境中に

はすでになかなりの量が存在すると考えられる。実際、大気、雨水、土壌、海岸底質からその存在が確認されている。特に、農薬の分解産物の約 50%がニトロフェノール類に変化すること、並びにニトロフェノール類は空气中を飛散することから、ヒトを含めたあらゆる動物の呼吸器や皮膚から吸収される可能性がある。また、田んぼや野菜に撒かれたこの殺虫剤はニトロフェノールに分解された後食品として経口的に生体に吸収される可能性も考えられ、人の健康だけでなく食物連鎖を介して生態系への影響も危惧される。さらに、私共のこれまでの研究から生殖機能(卵巣や精巣機能)への影響が明らかになっており、次世代への影響も危惧されている。他方、近年厚生労働省研究班が我が国で行った大規模疫学研究で「女性ホルモンにさらされる期間が長い人ほど肺癌にかかりやすい」ことが判明した。これまでの研究から、ヒトを含めた動物の肺胞にエストロゲン・リセプター(ER)の存在が確認され、エストロゲンが肺癌の増殖に関係する可能性が指摘されている。事実、国内における DEP の肺癌への寄与率は、男性では 7.9%、女性では 21.4%と、女性が有意に高いことから、肺癌活性化に由来から関与が推測されている。これらの事実を踏まえて、私共は、「農薬や DEP 由来のニトロフェノール類が、近年の野生動物の生殖異変やヒトでの肺癌発生率の増加に関与するのではないか」との仮説を提唱している。

2. 研究の目的

本研究では、農薬の分解産物であり、DEP 中にも含まれるニトロフェノール類が動物生体系に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、生殖機能への影響及びヒトの肺癌や乳癌発生との関連性を検討した。

3. 研究の方法

本研究では、農薬の分解産物であり DEP からも検出される 3 種類のニトロフェノール類(3-メチル-4-ニトロフェノール(PNMC)、3-フェニル-4-ニトロフェノール(PNMPP)、パラニトロフェノール(PNP))について雌雄生殖機能と副腎機能への影響をラットとウズラを用いて明らかにした。また、肺癌活性化への影響をヒト肺癌細胞を用いて明らかにした。

(1) 雌哺乳類の生殖機能への影響(雌ラットを用いる実験)

① 下垂体前葉細胞への直接作用

下垂体前葉細胞の単層培養系にニトロフェノール類を 24 時間作用させ、培養液中の黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)濃度を測定することにより、それぞれ

のホルモンの分泌に及ぼす影響を調べた。

② 副腎皮質への作用

ラット副腎皮質細胞の単層培養系に、ニトロフェノールを作用させ、培養液中のコルチコステロン量の測定およびステロイドホルモン合成酵素 mRNA の定量し、副腎のステロイドホルモン分泌能への直接作用を調べた。

(2) 雌の生殖機能への影響(雌ウズラを用いる実験)

① 産卵数及び孵化率への影響

成熟雌ウズラに 5 日間ニトロフェノールを筋肉内投与して、投与前、投与中及び投与後の産卵数を記録し、人工孵化器を用いて孵化率と卵殻の厚さを調べた。

② 幼雛ウズラの卵巣・卵管への影響

3 週齢雌ウズラにニトロフェノールを 5 日間筋肉内投与し、卵巣、卵管の重量と組織学的変化を調べた。

(3) 肺癌細胞増殖への影響

ニトロフェノールの生体に対する肺ガン活性化性能を詳しく検討した。

① *in vitro* 肺癌活性性能検出試験

実験には、エストロゲン受容体(ER)を発現しているヒト肺ガン細胞株、A549, H23, NCI-H838 を用い、ニトロフェノールを作用させることにより肺癌活性性能を解析した。陽性対照群としてエストラジオールを作用させ、投与群と比較した。暴露後の細胞を用いて詳細な分子生物学的解析(RT-PCR 法による原因遺伝子発現解析、ウエスタンブロット法によるたんぱく質発現解析)及び細胞学的解析(増殖アッセイ、アポトーシスアッセイ)を行った。

(4) 雄の生殖機能への影響(雄ラットを用いる実験)

① 精巣レベルの作用

ライディヒ細胞の単層培養系を用いて、ニトロフェノールを作用させ培養液中のテストステロンとインヒビンを測定した。

ニトロフェノールを 5 日間筋肉注射して、2 週間後に精巣と副生殖腺の重量と組織学的変化を調べ、血中 LH、FSH、テストステロン、インヒビン濃度を測定した。

(5) 雄の生殖機能への影響(雄ウズラを用いる実験)

① 視床下部・下垂体への作用

精巣摘出後 1 週間の雄ウズラにニトロフェノールを静脈注射して経時的に血中 LH 濃度を測定した。

② 精巣への作用

ニトロフェノール類を1回筋肉注射2週間後に精巣萎縮を起こしたウズラの精巣を病理組織学的に精査した。

4. 研究成果

(1) 成熟雄ウズラにおける PNMC の生殖機能への影響

本研究では、成熟雄ウズラに PNMC の3用量 (78mg, 103mg, 135mg/kg 体重) を一回筋肉内投与した結果、投与後約2週間から精巣萎縮が認められた。精巣が萎縮した個体では、精子形成は停止し、テストステロン分泌量も著しく低下した。クロアカ部面積と精巣重量に正の相関関係が認められた。また、成熟雄ウズラライディヒ細胞の単層培養に PNMC を添加した結果、培養液中のテストステロン分泌量が低下したことから、精巣ライディヒ細胞のテストステロンの合成を抑制することが判明した。以上の結果から PNMC はウズラ精巣機能抑制作用を有することを明らかにした。

(2) 成熟及び幼雛雌ウズラにおける PNMC の生殖機能への影響

本研究では、成熟雌ウズラに PNMC の3用量 (1mg, 10mg, 100mg/kg 体重) を1日1回5日間胸筋肉内に投与した。投与前、投与中、投与後の各5日間における産卵数、卵重量を測定し、採集した受精卵を、人工孵卵器にて孵化させ孵化率を調べた。また、最終投与5日後に剖検し、肝臓及び生殖器の重量を測定した。100mg/kg 投与群のウズラに産卵率の有意な低下が認められたが、産卵された卵の孵化率には影響は認められなかった。血中 LH とエストラジオール濃度の有意な低下が認められた。また、3週齢雌ウズラに PNMC の3用量 (0.1mg, 1mg, 10mg/kg 体重) を1日1回3日間筋肉内に投与し、最終投与24時間後に剖検した。PNMC 投与群では、卵管重量が有意に低下し、血中 LH とエストラジオール濃度の有意な低下が認められた。以上の結果から、PNMC は雌ウズラの視床下部・下垂体に作用し、LH 分泌を抑制することにより卵巣機能に影響を及ぼすものと推察された。

(3) PNMC の抗アンドロゲン作用及び幼若雄ラットにおける PNMC の精巣機能への影響

本研究では、*in vitro*でのヒトアンドロゲンレセプター組込酵母 (hAR-Yeast) を用いたレポーター発現実験及び *in vivo*で幼若雄ラットを用いた Hershberger 実験を用いて、PNMC の抗アンドロゲン作用を検討した。*in vitro* の hAR-Yeast を用いた実験では、使用した PNMC の全ての濃度 ($4.9 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-3} M$) で、抗アンドロゲン作用が認められた。*in vivo*での Hershberger 実験では、PNMC 投

与群で副生殖腺重量の低下及び血中 FSH と LH 濃度の上昇が認められた。以上の結果から、PNMC は、*in vivo*と *in vitro*の両方で、抗アンドロゲン作用を有することを明らかにした。幼若雄ラットに PNMC (1, 10, 100mg/kg) を連続5日間皮下投与した結果、PNMC 100mg/kg 投与群では、血中 FSH と LH 濃度の有意な上昇が認められ、血中テストステロンとインヒビン濃度及び精巣内のテストステロンとインヒビン含有量に有意な低下が認められた。PNMC の精巣テストステロン分泌への影響を明らかにするために、ライディヒ細胞単層培養系に PNMC を添加し、培養液中のテストステロン濃度を測定した結果、PNMC は、ライディヒ細胞のテストステロン分泌を抑制した。さらに、PNMC は、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) 刺激ライディヒ細胞のテストステロン分泌も抑制した。以上の結果から、PNMC は、精巣ライディヒ細胞に直接作用してテストステロンの分泌抑制作用を有することを明らかにした。

(4) 幼若雄ラットにおける PNMC の副腎機能への影響

本研究では、幼若雄ラットに PNMC を連続5日間皮下投与した結果、副腎重量の低下と血中プロゲステロン、コルチコステロン及び甲状腺ホルモン (FT4) 濃度の低下が認められたことから、PNMC は副腎皮質及び甲状腺機能への抑制作用があることが推測された。PNMC の副腎機能抑制作用を明らかにする目的で、ラット副腎細胞初代培養系を用いて、PNMC のプロゲステロンとコルチコステロン分泌に及ぼす作用を検討した結果、PNMC は ACTH による副腎細胞からのプロゲステロンとコルチコステロン分泌を抑制した。以上の結果から、PNMC は、副腎皮質細胞に直接作用してプロゲステロンとコルチコステロン分泌を抑制する作用を有することを明らかにした。

(5) PNP のエストロゲン様作用及び抗アンドロゲン作用

本研究では、*in vivo*で、幼若雌ラットを用いた子宮肥大反応実験及び幼若雄ラットを用いた Hershberger 実験を用いて、PNP のエストロゲン作用及び抗アンドロゲン作用を検討した。子宮肥大反応試験では、PNP 10mg/kg と 100mg/kg 投与群で子宮重量が有意に増加した。Hershberger 実験では、PNP 投与群で副生殖腺重量の有意な低下と血中 FSH と LH 濃度の上昇が認められた。以上の結果から、PNP は、*in vivo*において、エストロゲン様作用及び抗アンドロゲン作用を有することを明らかにした。

(6) PNMC および PNMP のエストロゲン様作用 DEP 中から分離した二種類のニトロフェノ

ール (PNMC および PNMP) について、そのエストロゲン様作用を調べる目的で、①酵母レポーター遺伝子発現実験、②ラット子宮肥大反応性実験、③オキシトシンに対する子宮収縮反応実験、および④子宮内膜上皮細胞の増殖活性検査 (Proliferating cell nuclear antigen assay, PCNA 法) を実施した。酵母受容体レポーター遺伝子発現実験では、PNMC および PNMP ともに エストロゲン受容体 α ($ER\alpha$) との有意な結合能が認められた。ラット子宮肥大反応性実験、子宮収縮反応試験、および子宮内膜上皮細胞の増殖活性検査においても、PNMC、PNMP がエストロゲン活性を有することが明らかとなった。以上の結果より、DEP から分離した二種類のニトロフェノールがエストロゲン様作用を有する事を初めて明らかにした。また、PNMP が PNMC に比べて強エストロゲン活性を有する事実が判明した。

(7) PNMC および PNMP のホルモン依存性癌細胞への腫瘍プロモーション作用

PNMC および PNMP がホルモン依存性乳癌および肺癌細胞増殖に及ぼす影響について検証した。初めに、PNMC および PNMP の遺伝子障害性を検討する目的で、CHO 細胞を用いたコメットアッセイを実施したところ、PNMC および PNMP のいずれも遺伝子障害性は認められず、PNMC および PNMP の発癌に対するイニシエーター作用は否定された。次に、エストロゲン反応性乳癌細胞株 MCF-7 と肺癌細胞株 A549 および H1395 を用いて、細胞増殖試験を実施した。その結果、MCF-7 ではエストロゲン- 17β 、PNMC、PNMP で増殖活性が認められたが、A549 および H1395 ではエストロゲン- 17β 、PNMC、PNMP を添加しても有意な細胞増殖効果は認められなかった。さらに、ER を介する転写活性の有無を確認するために、エストロゲン応答配列レポーターアッセイを MCF-7 乳癌細胞株、および ER β が発現している H1395 肺癌細胞株を用いて行った。その結果、MCF-7 ではエストロゲン- 17β 、PNMC、PNMP 添加で有意な転写活性を示し、H1395 では、PNMC のみが有意な転写活性を示した。以上の結果から、PNMC および PNMP は、乳癌細胞に対しては腫瘍プロモーション作用を示したが、肺癌細胞への腫瘍プロモーション作用は示さなかった。また、本研究において PNMC は、ER β に結合して転写活性を示す事実を明らかにした。

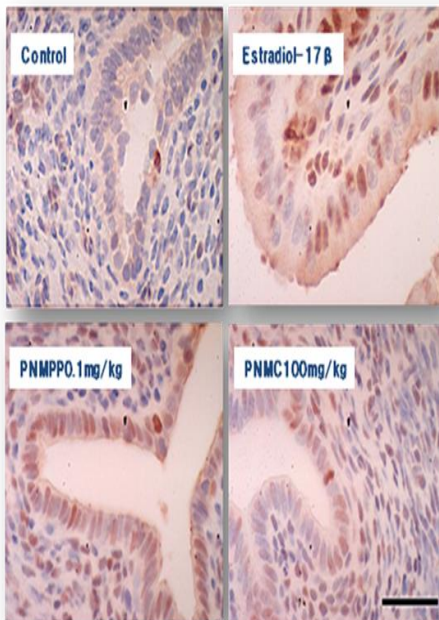
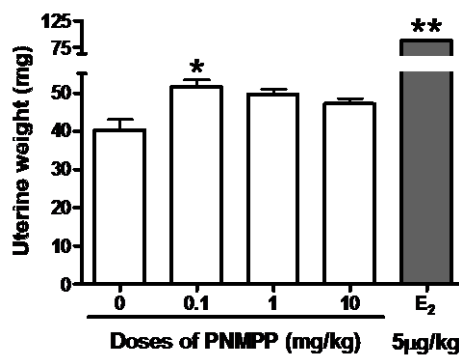
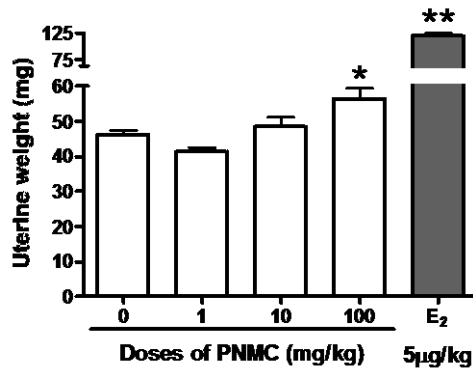
(8) PNMC および PNMP のステロイド合成経路への作用

PNMC および PNMP の内分泌攪乱作用機序を解明する目的で、エストロゲン活性以外のステロイドホルモン合成経路への影響の有無について検討した。実験には、ヒト副腎皮質

癌細胞 (H295R) を用い、主要なステロイドホルモン合成経路に対する作用を調べた。評価法としては、1mM 8-Br-cAMP および PNMC あるいは PNMP を 48 時間作用させた H295R 細胞について、培養液中の各種ホルモン濃度を測定し、それらのホルモン合成に関する酵素遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。その結果、PNMC 添加で 10^{-7} から 10^{-4} M の濃度で培養液中のコルチゾール、テストステロン、エストロゲン- 17β 濃度は、PNMC の濃度依存的に低下し、プロジェステロン濃度は、PNMC 10^{-5} M の濃度で分泌増加のピークを示した。各種酵素の遺伝子発現解析では、PNMC 10^{-5} M の濃度においてエストロゲン- 17β 合成に関連する *3 β HSD2* 発現量の有意な低下と *17 β HSD4* 発現量の有意な増加が認められた。また、 10^{-7} から 10^{-4} M の PNMP 添加でコルチゾールとテストステロン濃度は変化せず、結果としてエストロゲン- 17β 濃度は PNMP の濃度依存的に低下し、プロジェステロン濃度は、 2×10^{-5} M の濃度で分泌増加のピークを示した。各種酵素の遺伝子発現解析では、PNMP 10^{-5} M の濃度で、プロジェステロン合成に関わる *CYP17* 発現量の有意な低下と *CYP19* の発現量低下が認められたことから、結果としてエストロゲン- 17β の濃度依存的低下とプロジェステロンの濃度依存的増加が引き起こされたものと推察された。以上の結果から、PNMC および PNMP は、ER と結合する作用とは異なる作用機序によりステロイド合成酵素に作用し、ステロイドホルモンの分泌を抑制する作用を有している事実が明らかとなった。

以上の結果から、DEP から分離された PNMC と PNP は、生殖及び副腎内分泌系に内分泌攪乱作用を示し、精巣、卵巣及び副腎機能を抑制作用を有することを明らかにした。PNMC と PNMP は ER α および ER β を介してエストロゲン様作用を示すと同時に、ステロイド合成経路の特定の酵素に作用してステロイド合成を阻害あるいは促進することにより生体内の内分泌攪乱作用を示す事実が明らかとなった。さらに、PNMC と PNP は殺虫剤フェニトロチオンとパラチオンの第 1 次分解産物であることが判明したことから、地球は、すでに大量のニトロフェノール類により汚染されていると推察された。ニトロフェノール類は、水のみでなく空気中を風によって移動することから、汚染は広範囲に及びかつ地球上の全ての動物に影響を及ぼす内分泌攪乱化学物質であることから、生態系への環境負荷が大きい事が推測された。

子宮肥大性試験ならびに
子宮内膜上皮細胞免疫組織学的検索

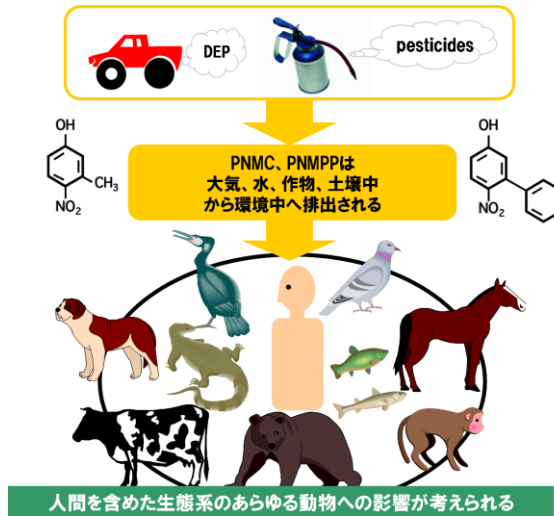


本研究の社会的的重要性

- ・ディーゼル排気より空気中に浮遊⇒広範囲に移動し肺、皮膚から吸収される
- ・農薬の分解産物⇒食物、水を介して経口か

ら吸収される

- ・ディーゼル排気規制以外にも農薬の中間産物による農薬の規制の必要性



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 16 件)

- ① Li CM, Taneda S, Taya K, Watanabe G, Fujitani Y, Nakajima T & Suzuki AK. Effects of in utero exposure to nanoparticle diesel exhaust on testicular function in immature male rats. *Toxicology Letters* 185, 1-8, 2009. 査読有
- ② Furuta C, Noda S, Li CM, Suzuki AK, Taneda S, Watanabe G & Taya K. Nitrophenols isolated from diesel exhaust particles regulate steroidogenic gene expression and steroid synthesis in the human H295R adrenocortical cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology* 229, 109-120, 2008. 査読有
- ③ Furuta C, Suzuki AK, Watanabe G, Li CM, Taneda S & Taya K. Nitrophenols isolated from diesel exhaust particles promote the growth of MCF-7 breast adenocarcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 230, 320-326, 2008. 査読有
- ④ Li CM, Suzuki AK, Takahashi S, Taneda S, Watanabe G & Taya K. Effects of 3-methyl-4-nitrophenol on the reproductive toxicity in female Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31(11), 2158-2161, 2008. 査読有

- ⑤ Li CM, Taneda S, Suzuki AK, Furuta C, Watanabe G & Taya K. Effects of 3-methyl-4-nitrophenol in diesel exhaust particles on the regulation of testicular function in immature male rats. *Journal of Andrology* 28, 252-258, 2007. 査読有
- ⑥ Li C, Taneda S, Suzuki AK, Furuta C, Watanabe G & Taya K. Effects of 3-methyl-4-nitrophenol on the suppression of adrenocortical function in immature male rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30(12), 2376-2380, 2007. 査読有
- ⑦ Li CM, Takahashi S, Taneda S, Furuta C, Watanabe G, Suzuki AK & Taya K. Impairment of testicular function in adult male Japanese quail (*Coturnix japonica*) after a single administration of 3-methyl-4-nitrophenol in diesel exhaust particles. *Journal of Endocrinology* 189, 555-564, 2006. 査読有
- ⑧ Li CM, Taneda S, Suzuki AK, Furuta C, Watanabe G & Taya K. Estrogenic and anti-androgenic activities of 4-nitrophenol in diesel exhaust particles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 217, 1-6, 2006. 査読有
- [学会発表] (計 15 件)
- ① Li CM, Taneda S, Watanabe G, Ito Y, Nakajima T, Taya K, Suzuki AK. Effects of nanoparticle enriched diesel exhaust on pregnancy in F344 rats. 41st Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, Kailua-Kona, Hawaii, May 2008.
- ② Li CM, Taneda S, Taya K, Watanabe G, Nakajima T, Suzuki AK. In utero exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust suppressed testicular function in immature male rats. 45th Congress of the European Societies of Toxicology, Rhodes, Greece, October 2008.
- ③ Taneda S, Li CM, Suzuki AK, Furuta C, Watanabe G, Taya K. 4-nitrophenol in diesel exhaust particles acts estrogen agonist and androgen antagonist. International Congress of Toxicology, Montreal, Canada, July 2007.
- ④ Li C, Taneda S, Suzuki AK, Furuta C, Watanabe G, Taya K. 3-methyl-4-nitrophenol in diesel exhaust particles suppresses adrenocortical function in immature male rats. International Congress of Toxicology, Montreal,

Canada, July 2007.

- ⑤ Li CM, Furuta C, Takahashi S, Taneda S, Watanabe G, Suzuki AK, Taya K. Impairment of testicular function in adult male Japanese quail (*Coturnix japonica*) after a single administration of 3-methyl-4-nitrophenol in diesel exhaust particles. 39th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, Omaha, NB, USA, August 2006.
- ⑥ Li CM, Taneda S, Suzuki AK, Furuta C, Watanabe G, Taya K. 3-methyl-4-nitrophenol in diesel exhaust particles effects on testicular function of immature male rats. The Second Asia-Pacific Forum on Andrology, Shanghai, China, October 2006.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田谷 一善 (TAYA KAZUYOSHI)
東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授
研究者番号：60092491

(2) 研究分担者

渡辺 元 (WATANABE GEN)
東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授
研究者番号：90158626
鈴木 明 (SUZUKI AKIRA)
独立行政法人国立環境研究所・PM2.5・DEP
研究プロジェクト・主任研究員
研究者番号：20124349
種田 晋二 (TANEDA SHINJI)
独立行政法人国立環境研究所・PM2.5・DEP
研究プロジェクト・NIES ポストドクフェロー
研究者番号：90391127

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

李 春梅 (LI CHUNMEI)
独立行政法人国立環境研究所・日本学術振興会外国人特別研究員
古田 千恵 (FURUTA CHIE)
岐阜大学・大学院連合獣医学研究科博士課程学生
野田 志穂 (NODA SHIHO)
東京農工大学・農学部獣医学科学生