

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20310017

研究課題名（和文）環境汚染化学物質の次世代影響評価法構築

研究課題名（英文）Construction of evaluation method of Environmental contaminants for future generation

研究代表者

蔵崎 正明（KURASAKI MASAOKI）

北海道大学・大学院地球環境科学研究院・助教

研究者番号：80161727

研究成果の概要（和文）：本研究は、内分泌攪乱化学物質の新規生体影響評価法開発に加え、人工胎盤様膜を構築する研究を融合させ、その胎盤様膜を透過した内分泌攪乱化学物質の濃度で次世代影響の評価を試みるものである。

新規評価法に関しては、培養細胞を用いて内分泌攪乱化学物質のアポトーシスへの影響評価系、および細胞の分化に及ぼす影響評価系、また、LTP に対する応答および神経スパインを用いた脳機能に対する影響評価系等を確立した。ヒト胎盤細胞を用いた疑似人工膜形成では胎盤の通過能と同様の性質を示すこと、および内分泌攪乱化学物質等が膜の細胞に蓄積し、かつ影響ある濃度が膜を通過することを示した。本結果から模擬人工膜と新影響評価系を組み合わせることで次世代影響評価を行なえることを示した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is combine of development of novel evaluated methods for endocrine disrupters using cultured cell system and construction of an artificial placenta-like membrane using human Bewo cells. To assess endocrine disrupters as stand points of future generation, effects of endocrine disrupter concentration passed through the membrane like as placenta are evaluated by the developed methods using the cultured cell system.

About the novel evaluating system, evaluation systems of endocrine disrupters using reaction of apoptosis and differentiation in the cells were confirmed. In addition, it was successful constructed the evaluation systems of the chemicals on brain function using a reply to LTP and extension of the nerve in brain sections. On the other hand, it was shown that same property concerning pass through ability for the endocrine disrupters was indicated in the constructed placenta-like membrane. And although major part of the chemicals was accumulated in the Bewo cells, effective concentration of them to organism was passed through the membrane. From the results, these combination mentioned above has been indicated as an effective method for evaluation of endocrine disrupters on future generation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：環境医学、環境修復学、環境適応科学

科研費の分科・細目：環境影響評価・環境政策

キーワード：胎盤細胞、次世代影響、アポトーシス、神経分化、PC12 細胞、Bewo 細胞、LTP、神経スパイン

1. 研究開始当初の背景

内分泌攪乱化学物質による環境汚染は、性ホルモン調節攪乱の原因と考えられており、さらに世代を超えた影響をもたらす恐れが考えられている。しかし、環境省の環境ホルモン戦略課題 SPEED98 の達成の結果、ノニルフェノール等数種の内分泌攪乱物質が生態系を乱す恐れがあるとされたもの、検討された 10 数種の内分泌攪乱物質ではヒトを含む哺乳動物には性ホルモン攪乱の可能性がほとんど認められなかった。このため現状においては、内分泌攪乱化学物質の一種であるダイオキシン類（ダイオキシン、ジベンゾフラン、コプラナーPCB）のみに多く着目され、その他の内分泌攪乱化学物質に関しては、大気、河川、海洋、土壌のみならず、そこに棲む動植物を通じて、食品中にまで広がっている可能性があるにも関わらず、大きな関心を集めることがなくなっている。しかし、Jacobson らの報告（New England J. Med. 335:783-789, 1996）により、微量のこれら内分泌攪乱化学物質が母乳を通じ新生児の脳神経系に影響を与える可能性が指摘されて以来、ビスフェノールなどによる多動性障害誘引の可能性、脳神経伝達系への影響など、性ホルモン攪乱作用以外の新しい攪乱作用を引き起こす可能性が示唆されて来ている。我々もこれまで培養細胞を用いた実験系を用い内分泌攪乱化学物質が性ホルモンのみの攪乱にとどまらず、ごく微量で発生や分化等にも影響を与える可能性を見出し報告してきている（Life Sci. 74, 2301-2312, 2004；Life Sci. 69, 403-408, 2001；Biomed. Res. 21, 353-359, 2000；Biochem. Biophys. Res. Commun. 272, 557-562, 2000）。これまでの我々の研究成果を踏まえて、さらに内分泌攪乱化学物質の多くが脂溶性化学物質であることを考慮して、胎盤あるいは母乳を通じて曝露される危険性のある胎児や乳幼児への安全性を確保する必要が急務であると思われる。また、今後一層内分泌攪乱化学物質による生体の様々な伝達系への影響を詳細に把握し、母体から胎児への影響すなわち次世代への影響を把握しその解決に当たることが最も重要な課題と考えている。

2. 研究の目的

本研究において、これまで行なってきた培養細胞を用いた内分泌攪乱化学物質の生体影響評価法開発の研究に加え、人工胎盤様膜を構築する研究を融合させさらに発展させる。つまり、人工胎盤様膜を改良し、その膜

を用いて内分泌攪乱化学物質の胎盤膜透過性を調べ、その胎盤様膜を透過した内分泌攪乱化学物質の濃度が生体にどのような影響を及ぼすかということを手で確立した培養細胞系のシステムを用いて評価することで、内分泌攪乱化学物質の母体から胎児への影響の評価を可能にしたいと考えている。この系が有効に動けば内分泌攪乱化学物質を含む環境汚染化学物質の次世代影響評価法として用いることが可能となる。

そのため、第 1 段階として、ヒト胎盤細胞を人工膜に培養し胎盤様の膜を構築する。膜の形状、素材、細胞の培養条件などの検討を行い現実の胎盤透過性に近いものの再現を目指す。胎盤透過性の評価はすでに定まっている既知の薬剤あるいはデキストランを用いて行う。また同時に、内分泌攪乱化学物質の新しい評価法に開発を進める。PC12 細胞を用いた神経分化評価、同細胞を用いたアポトーシスを指標とした評価などを確立し、さらに脳機能に対する評価方法の構築を試みる予定である。研究分担者の細川はラット脳の実馬を分離培養し、電気シグナル応答を測定する方法を確立している。これを化学物質影響評価に用いることが可能かどうかの検討を進める。これらを総合して内分泌攪乱化学物質に対する有効な次世代影響評価法を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) アポトーシス因子を用いた内分泌攪乱化学物質影響評価法の開発

アポトーシスは遺伝子の上で定められた細胞死として認識されているが、正常な発育と器官形成が行われるためには必要不可欠な過程である。PC12 細胞はラット副腎髄質腫細胞であり、この細胞を培養中に、栄養因子である牛胎児血清を抜くと簡単にアポトーシスを誘導することができる。この細胞にアポトーシスを起こす条件化で化学物質を曝露する系を評価系として用いる。今回アポトーシスシグナルの伝達系の因子、酵素などの動態を調べて、さらに精密でかつ新しい影響評価系の構築が可能か否かの検討を進める。

(2) 内分泌攪乱化学物質による細胞分化影響評価法の構築

我々が用いる PC12 細胞は培養中に神経成長因子を添加すると神経様細胞に分化することがよく知られている。この系が分化に対する影響評価系として用いることが可能かどうかの検討を内分泌攪乱化学物質を細胞に低濃度曝露させることにより行なう。

さらに攪乱物質がこの分化過程のどこに影響しているのかを、神経成長因子を始まりとするシグナル伝達系のリン酸化過程をウェスタンブロット法で検証し、因子の特定を行う。

(3) 内分泌攪乱化学物質による神経障害影響評価法の構築

ラット脳より生きた状態で海馬を分離培養し記憶に関係あるといわれている long term potentiation (LTP) を測定する技法をすでに確立している。この系に内分泌攪乱化学物質等の環境汚染化学物質を低濃度添加しLTPの変化が起こるか否かを検討することによって、記憶に対する影響評価系の構築を試みる。また、同時に神経スパインを用いた系も同様の評価が可能か否かを確かめる。

(4) ヒト胎盤細胞を用いた胎盤様膜の構築

胎盤モデル膜構築のためにヒト BeWo 細胞を用いる。この細胞を基底膜上に培養し、その生育を膜の抵抗値で評価する。基底膜には平面膜、三次元膜の二種類を用いて行うが膜の安定性および吸収効率・検出感度の増大のためには三次元膜が有効であると考えられる。膜素材は数種の人工膜を以前の研究の際に用い今回は成績の良好だった2種を用いる予定である。膜透過性は既に確立しているデキストランを用いて胎盤透過性を評価し、動物実験において得られている実際の胎盤膜透過性に近い値を得るように、細胞培養の条件検討、膜素材の検討等を行う。

4. 研究成果

(1) アポトーシス因子を用いた内分泌攪乱化学物質影響評価法の開発

内分泌攪乱化学物質によるアポトーシスに対する影響を、アポトーシスを血清因子除去により誘導した系で評価すると、トリブチルスズ、2,4,5-T はアポトーシス誘導を阻害、ノニルフェノール、フタル酸ジエチルは増強、ビスフェノール等は無変化であった (図 1)。

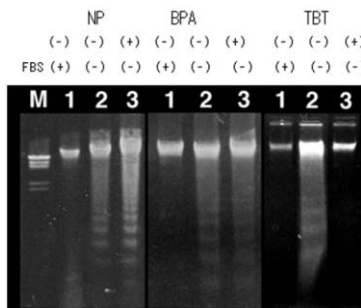


図 1 内分泌攪乱化学物質のアポトーシスに及ぼす影響。NP: ノニルフェノール、BPA: ビスフェノール、TBT: トリブチルスズ

また、アポトーシスを阻害または増強した系で、アポトーシス増強因子である Bax およ

びミトコンドリアからのシトクロムCの放出量をウェスタンブロット法により測定すると、ノニルフェノール、フタル酸ジエチル曝露によりこれらの量が増加し、アポトーシスを増強している機構が推定できた。このことから、アポトーシスを評価指標にした系およびアポトーシス因子の系を影響評価系に用いることが可能であることが示された。

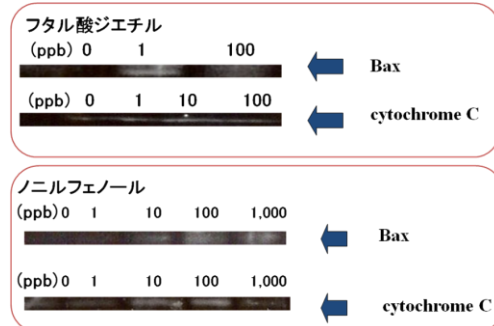


図 2 フタル酸ジエチルあるいはノニルフェノール曝露による Bax 量およびシトクロムC放出量の変化

(2) 内分泌攪乱化学物質による細胞分化影響評価法の構築

PC12 細胞に神経成長因子を投与するとあたかもニューロン様の分化を引き起こす。その系にビスフェノールAを添加するとその分化を完全に抑制する (図 3)。

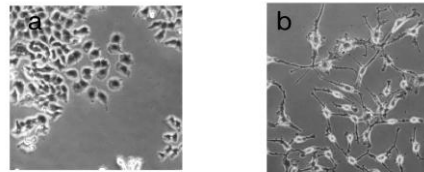


図 3 神経成長因子添加による神経細胞への分化. ビスフェノールA添加 (a) および添加前 (b)

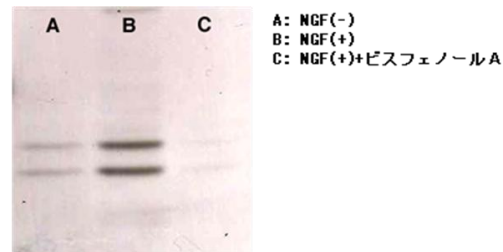


図 4 ビスフェノールAによる Erk リン酸化の阻害

その抑制メカニズムを MAP Kinase を中心とするシグナル伝達系で調べてみると、ビスフェノールA添加で、神経成長因子による Erk1,2 および Creb のリン酸化を完全に阻害することで、軸索の伸展を抑制していることが明らかになった (図 4)。これらの反応を

用することで細胞分化影響評価法の構築が可能となることが示唆された。

(3) 内分泌攪乱化学物質による神経障害影響評価法の構築

ラット海馬切片を活かしたまま LTP 反応を記録する方法は研究分担者の細川によって確立されている。本研究において、その系に内分泌攪乱化学物質であるトリブチルスズを添加したところ、コントロールに比べ有意に LTP が低下することがわかった。この結果により、トリブチルスズが記憶に影響を及ぼしている可能性、およびこの方法を用いれば記憶を指標にした影響評価系の構築が可能になることが併せて示唆された (図 5)。

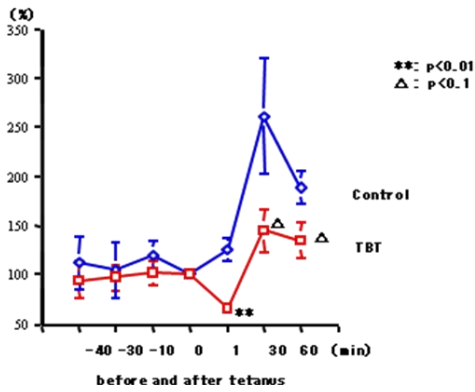


図 5 トリブチルスズの海馬長期増強 (LTP) への影響

また、LTP が増強され記憶が亢進されると神経軸策にトゲ状のスパインが増加することが確かめられている (図 6)。そのスパインを内分泌攪乱化学物質による脳機能に及ぼす影響評価としての指標に用いることが可能であることが確かめられた。

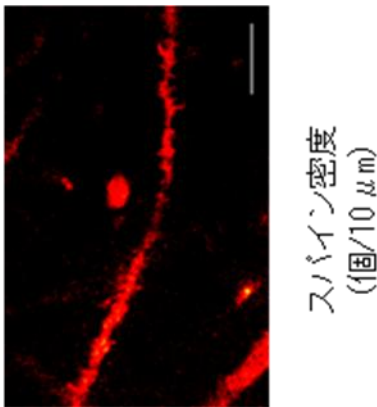


図 6 形態学的変化を指標とした脳機能評価法の開発

(4) ヒト胎盤細胞を用いた胎盤様膜の構築

まず最初に BeWo 細胞と影響評価系に用いた PC12 細胞と各内分泌攪乱化学物質に対する毒性を比較した。その結果、BeWo 細胞は

PC12 細胞よりも耐毒性が強く、DNA 損傷割合も PC12 細胞よりやや少ない値を示した。

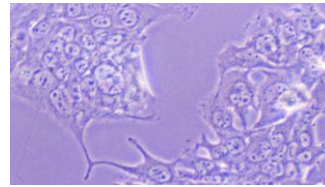


図 7 BeWo 細胞

この BeWo を用いて 2 種類の基底膜の上で培養を行ないタイトジャンクションの形成を電気抵抗を指標に確認したところ膜 Xの方が良好な成績を修めた (図 8)。

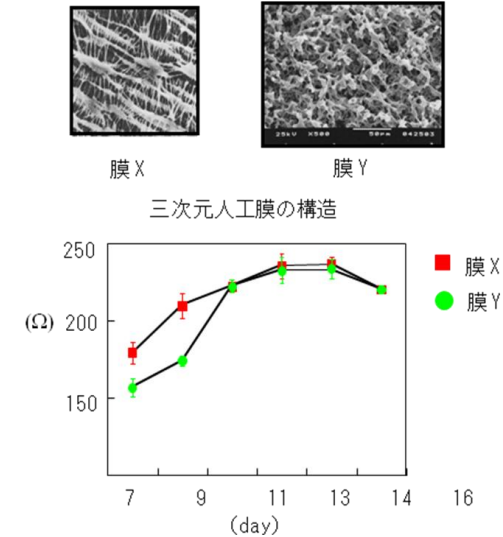


図 8 細胞のタイトジャンクション形成

膜 X を用いて細胞を培養し、タイトジャンクションが形成されるとデキストランが膜を透過しない性質を利用して内分泌攪乱化学物質添加のタイミングを計測した (図 9)。

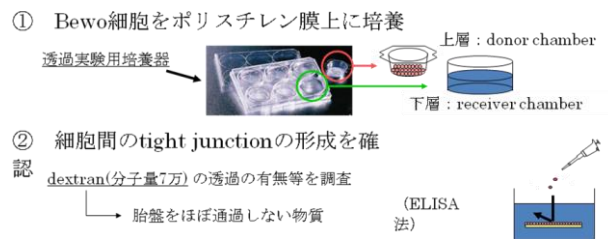


図 9 胎盤膜への内分泌攪乱物質添加

その結果、デキストランの透過係数がほとんど観察されない条件下で、ノニルフェノールの透過係数はデキストランの約 16 倍を示した。

表 1 NP とデキストランの透過係数 (NP 添加 1 時間後)

添加物質	透過係数 (cm/h)
デキストラン (分子量 70,000)	0.016
NP (1ppm)	0.268 ± 0.168 ^a

^a Mean ± SE (n=3)

その結果を胎盤膜が通常通過することが知られているスクロースと比較すると図 10 のような結果を得た。

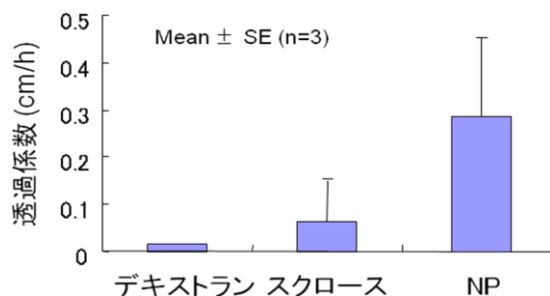


図 10 スクロース (糖) (添加量 3 ppm) との透過係数の比較

この図から考えるとノニルフェノールはスクロースの約 4 倍以上の透過能を持ち、影響評価系における結果から考えると誘導したアポトーシスを増強しうる濃度の透過が見込まれ、胎児への影響が十分に考えられる結果となっている。また、これらの知見を総合することで十分に次世代影響の評価が行なえることが期待される。

以上の結果を総合すると、本研究により、アポトーシスおよび分化に及ぼす影響評価系の構築が確立され、併せて脳の記憶のメカニズムと密接な関係のある LTP を指標にした内分泌攪乱化学物質の影響評価系を構築することに成功した。また、ヒト胎盤絨毛細胞を用いた胎盤様膜構築実験において、細胞のタイトジャンクションが形成され、デキストリン透過能が胎盤に近い膜を構成することが出来た。その膜を用いた内分泌かく乱化学物質の一つである、ノニルフェノールの透過実験を行なったところ、スクロースの 4 倍強の透過能を示し、十分に生体に影響のある量の透過が考えられた。以上の結果を総合すると十分に実用範囲にある次世代影響評価系の構築が為されたものと考えられる。

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 8 件)

- ① Dai Y, Mihara Y, Tanaka S, Watanabe K, Terui N. Nitrobenzene-adsorption capacity of carbon materials released during the combustion of woody biomass, *J. Hazardous Materials*, 174, 776-781, 2010. (査読有)
- ② He J, Fugetsu B, Tanaka S, Electrochemical Detection of Ethidium Bromide by using Pure Single-Walled Carbon Nanotube Sheet as the Electrode,

J. Electroanal. Chem., 638, 46-50, 2010. (査読有)

- ③ Sone H, Fugetsu B, Tanaka S. Selective elimination of lead(II) ions by polyurethane-alginate composite foams, *J. Hazardous Materials*, 162, 423-429, 2009. (査読有)
- ④ Kido M, Yustiawati, Syawal MS, Sulastri, Hosokawa T, Tanaka S, Saito T, Iwakuma T, Kurasaki M. Comparison of general water quality of rivers in Indonesia and Japan. *Environ. Monit. Asses.*, 156, 317-329, 2009. (査読有)
- ⑤ Aoki K, Egawa M, Saito T, Hosokawa T, Kurasaki M. Effects of gamma-hexachlorocyclohexane on apoptosis induced by serum deprivation in PC12 cells. *J. Environ. Sci. Health B*, 43, 471-475, 2008. (査読有)
- ⑥ 三浦真理, 蔵崎正明, 八若保孝, 斎藤健. ラットにおける亜鉛過剰摂取による銅吸収阻害機構. *北海道歯学雑誌* 29, 87-98, 2008. (査読有)
- ⑦ Kawakami M, Inagawa R, Hosokawa T, Saito T, Kurasaki M. Mechanism of apoptosis induced by copper in PC12 cells. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 2157-2164, 2008. (査読有)
- ⑧ Sato S, Mukai Y, Yamate J, Kato J, Kurasaki M, Hatai A, Sagai M. Effect of polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract on blood pressure elevation and macrophage infiltration in the heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 35, 43-49, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Kihara Y, Komori M, Sun Y, Sikder MT, Hosokawa T, Saito T, Kurasaki M. Mechanism of toxicity on human vascular endothelial cells by humic acid obtained from tropical peatland. 3rd International Symposium on Trace Elements & Health. May 26, 2011 (Murcia, Spain)
- ② Nishimura R, Sato Y, Tanaka M, Miyajima M, Hosokawa T, Kurasaki M, Saito T. Curcumin and copper binding curcumin induced apoptosis in PC12 cells via mitochondrial pathways. 3rd International Symposium on Trace Elements & Health. May 26, 2011 (Murcia, Spain)
- ③ Miyajima M, Minoshima M, Tanaka M, Nishimura R, Hosokawa T, Kurasaki M,

Saito T. Elucidation of the role of zinc, zinc-enzyme and tetrahydrobiopterin in the alteration of catecholamine metabolism in the cerebral cortex with aging in senescence-accelerated mouse. 3rd International Symposium on Trace Elements & Health. May 26, 2011 (Murcia, Spain)

- ④ 孫永琨、高橋久美子、齋藤健、細川敏幸、蔵崎正明。PC12 細胞を用いたジエチルフタル酸の生体に及ぼす影響解析及びその新規影響評価法。第 81 回日本衛生学会 2011 年 3 月 28 日 (東京)
- ⑤ 西村 亮、佐藤睦将、田中将登、蔵崎正明、細川敏幸、宮島美貴、齋藤 健。PC12 細胞におけるクルクミンの細胞死誘導に対する道の制御機構。第 81 回日本衛生学会 2011 年 3 月 26 日 (東京)
- ⑥ 北村昌彦、齋藤健、細川敏幸、蔵崎正明。豊平川河川水中のホウ素濃度および細胞培養系を用いたホウ素の生体影響評価。第 21 回微量元素学会 2010 年 7 月 4 日 (京都)
- ⑦ 堀尾由香莉、細川敏幸、齋藤健、蔵崎正明。PC12 細胞を用いたアスバルテムのリスク評価。第 80 回日本衛生学会 2010 年 5 月 10 日 (仙台)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蔵崎 正明 (KURASAKI MASAOKI)
北海道大学・大学院地球環境科学研究所
助教
研究者番号：80161727

(2) 研究分担者

齋藤 健 (SAITO TAKESHI)
北海道大学・大学院保健科学研究所・教授
研究者番号：40153811
細川 敏幸 (HOSOKAWA TOSHIYUKI)
北海道大学・北海道大学高等教育推進機構
・教授
研究者番号：00157025

田中 俊逸 (TANAKA SHUNITZ)
北海道大学・大学院地球環境科学研究所
教授
研究者番号：30142194

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

小森 幹育子 (KOMORI MIYAKO)

北海道大学・地球環境科学研究所・技術補助員

孫 永琨 (SUN YONGKUN)
北海道大学・大学院環境科学院・博士課程
Md. Tajuddin Sikder (MD. TAJUDDIN SIKDER)

北海道大学・大学院環境科学院・博士課程
木原 佑介 (KIHARA YUSUKE)

北海道大学・大学院環境科学院・修士課程
堀尾 由香莉 (HORIO YUKARI)

北海道大学・大学院環境科学院・修士課程
北村 昌彦 (KITAMURA MASAHIKO)

北海道大学・大学院環境科学院・修士課程
高橋 久美子 (TAKAHASHI KUMIKO)

北海道大学・大学院環境科学院・修士課程
宮島 美貴 (MIYAJIMA MIKI)

北海道大学・大学院保健科学院・博士課程
西村 亮 (NISHIMURA RHO)

北海道大学・大学院保健科学院・修士課程
田中 将登 (TANAKA MASATO)

北海道大学・大学院保健科学院・修士課程