

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510073

研究課題名(和文) 農薬分解産物ニトロフェノールの副腎・生殖毒性機構と乳癌活性化リスクに関する研究

研究課題名(英文) Study on mechanisms of toxicity for nitro-phenols found in diesel exhaust on adrenal gland and reproductive organs, and risks for activating mammary carcinoma cells.

研究代表者

渡辺 元 (Watanabe, Gen)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90158626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：幼若雄ラットではPNMPP添加は、下垂体細胞からのFSHおよびLHの基礎分泌に対し無効であったが、GnRH刺激に対する反応が有意に低下した。精巢のライディッヒ細胞はPNMPP添加によりテストステロン分泌を有意に増加し、hCGの刺激に対しても増強が見られた。幼若雄ラットの実験ではPNMPPが抗雄性ホルモン作用を示した。

マウスの正常乳腺上皮細胞に対して、細胞増殖の促進が見られたが、乳がん由来細胞に対しては増殖作用を示さなかった。ヒトの乳がん由来細胞においてもPNMCとPNP共に細胞増殖の促進が認められず、in vivoでも脳の性分化に影響を与えないものと判断された。

研究成果の概要(英文)：Although PNMPP did not show effects on the basal secretion of FSH and LH from pituitary cells of immature male rats, secretion of both hormones stimulated by GnRH were decreased by adding PNMPP. PNMPP stimulated testosterone secretion from Leydig cells and enhanced the response to the hCG in vitro. PNMPP was proved to have anti-androgenic effects in vivo using castrated immature male rats supplemented with testosterone.

PNMC and PNP stimulated proliferation of normal mammary epithelial cells in mice, but did not for cells derived from mammary tumor of both mice and human. Nitrophenols failed to show effects on sexual differentiation of the brain in the rat.

研究分野：環境保全学

科研費の分科・細目：環境リスク制御・評価

キーワード：ニトロフェノール 環境 生殖毒性 ディーゼル排気ガス

1. 研究開始当初の背景

大気汚染、特に微小粒子状物質による大気環境は、先進国では改善の兆しが見えてきたが、開発途上国では深刻な大気環境汚染を引き起こし、ヒトへの健康影響と生態系破壊が懸念されている。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物に広く及んでいる。

そのため、環境省は 2009 年 9 月、浮遊粒子状物質の環境基準値に従来の PM 10 に加えて、PM 2.5 の環境基準値を制定した。この環境基準値には、欧米の研究に加えて、10 年以上にわたる国立環境研究所を中心にした多くの研究機関の DEP 健康影響研究が反映された。これで、粒子状物質の総量規制という点では、欧米並みの環境基準値となった。しかし、世界の研究の動向はさらに先に進み、従来の総重量規制から、ナノレベルの粒子の個数規制や、個別の有害化学物質の規制も考える方向に推移している (欧州毒性学会、ギリシャ、2008)。

DEP 中には、数千を超える化学物質が含有されており、当初どの化学物質が原因物質であるかについては不明であったため、毒性学的研究は困難と考えられてきたが、近年、国立環境研究所 (国環研) の鈴木らの研究グループが DEP 中から、血管弛緩作用を有する化学物質として 5 種類のニトロフェノール類の単離に成功し (Mori et al. Biol.Pharm.Bull.,2003)、毒性学的研究が可能となった (国際毒性学会、ICTX2004, タンペレ、フィンランド) ことにある。

これらの化学物質の供与を受けて、申請者らは世界に先駆けて、生物影響に関する国環研と共同研究に取り組み、ニトロフェノール類の副腎機能や生殖機能 (卵巣や精巣機能) への影響を明らかにしており (研究業績 1,2,4,5,8,14,19,20,21,30,31)、次世代への影響も強いことを国際学術誌を介して発信してきた。また、ニトロフェノール類の生殖毒性をラット (哺乳類) とウズラ (鳥類) で比較した結果、ラットでは影響の認められない量で、ウズラでは著しい精巣萎縮が起こるなど鳥類への精巣機能抑制作用が強い事が明らかとなった (研究業績 31)。さらに近年の研究で、ウズラの肝細胞では、毒物代謝系のグルクロン酸抱合活性がラットより約 3~4 倍低い事が報告されていることから、鳥類への影響は哺乳類より数倍強い事が示唆された (Lee et al. Env.Tox.Chen., 2007)。

その後、このニトロフェノール類は、農薬フェニトロチオン (日本で使用されている殺虫剤) やパラチオン (日本では禁止されているが世界中で未だ広く使用されている殺虫剤で、輸入野菜などに付着していることがあり国際的な問題となっている) の第一次分解産物であることが判明し、2008 年の欧州毒性学

会 EUROTOX2008 (ロードス、ギリシャ) で初めて農薬の分解化学物質の毒性について強く注目された。特に、これらの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気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があり、「食の安全」の面からも対策が急がれる問題である。現行法では、農薬類の二次分解産物は農薬検査の対象に無いため、その実態も把握されていないので、早急な対応が必要である

2. 研究の目的

本研究では、大気汚染の主要な原因物質として知られているディーゼル排気微粒子 (DEP) 中から単離し、後に農薬の分解産物でもあることが明らかとなり、健康影響と生態系への影響が危惧されている未規制化学物質 (ニトロフェノール類) の副腎・生殖毒性発生メカニズムを解明すると共に、そのリスク評価に有用な指標について明らかにする。さらに、これらのニトロフェノール類はエストロゲン様作用を持つことが判明したので、乳癌細胞に対する活性化作用について明らかにし、環境保全および人の健康に有用な資料を提供することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 各種生理的状態下のラットにおけるニトロフェノールの副腎系・生殖系への影響

- ・日齢の異なる雌雄ラットにおける投与実験

- ・妊娠期および泌乳期における投与実験
- ・次世代への影響
- ・乳子期における投与実験

(2) 初代細胞培養系を用いるニトロフェノール類の作用メカニズムの解明

- ・下垂体前葉細胞系
- ・卵巣細胞系
- ・精巣細胞系
- ・副腎皮質細胞系

(3) 株化癌細胞系を用いるニトロフェノール類の影響評価

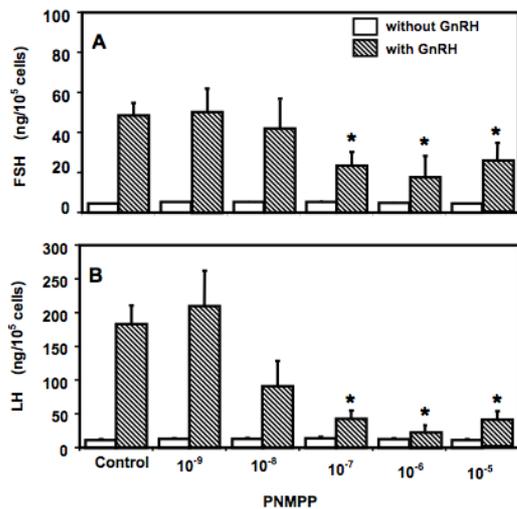
・ヒト副腎皮質癌細胞株 (H295R) を用いたステロイドホルモン合成経路への作用点解明

・エストロゲン反応性ヒト乳癌細胞株 (MCF-7) によるニトロフェノール類の影響評価法の開発

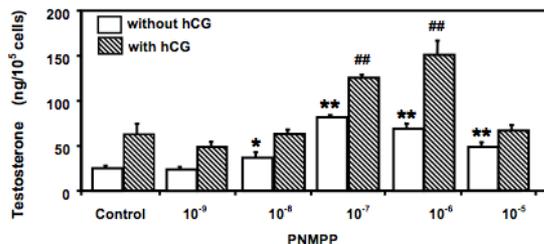
4. 研究成果

ディーゼル排気ガス微粒子 (DEP) から単離されたニトロフェノール類の中で、エストロゲン活性が *in vitro* 及び *in vivo* で 明ら

かにされている 4-nitro-3-phenylphenol (PNMPP) について、春機発動前の幼若雄ラットを用いて下垂体細胞および性腺細胞に対する直接作用と *in vivo* における抗雄性ホルモン作用について解析した。春機発動前の幼若雄ラットの下垂体性腺刺激ホルモン分泌細胞及び精巣ライディッヒ細胞に対する PNMPP の直接作用を調べるために、28 日齢の雄ラットから下垂体および精巣を摘出し培養した。その結果、培地への PNMPP 添加は下垂体細胞からの FSH および LH の基礎分泌に対し無効であったが、GnRH による分泌刺激に対する反応は、PNMPP 添加によって有意に低下した。

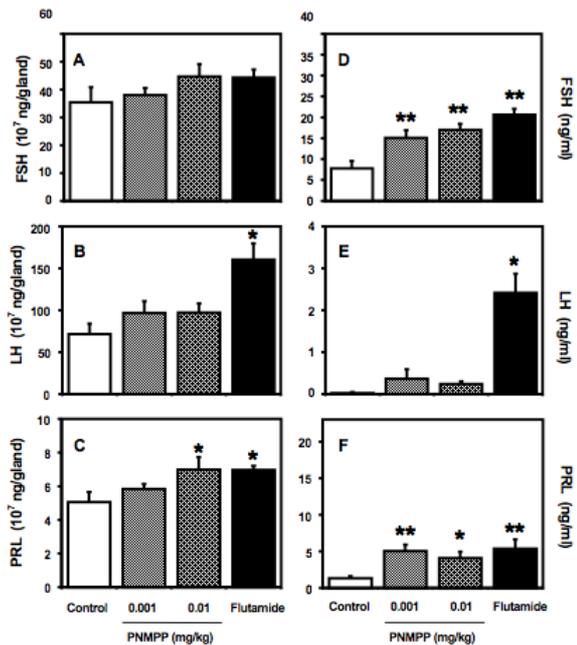


一方、精巣のライディッヒ細胞は PNMPP 添加によりテストステロン分泌が有意に増加し、hCG の刺激に対しても増強作用が見られた。



次に精巣を摘出した春機発動前の 28 日齢の幼若雄ラットにテストステロンを含んだシリコンチューブを移植し、常に一定レベルのテストステロンが維持されるようにした。このように処置した動物を 4 群に分け、PNMPP (0.001 あるいは 0.01 mg/kg) 投与群、あるいはアンドロジェンレセプター拮抗薬であるフルタマイド (4 mg/kg) 投与群、溶媒であるゴマ油を投与した対照群を設けて、それぞれ 7 日間皮下投与した。その結果、PNMPP 0.001mg/kg 投与群で腎、前立腺、亀頭の重量が対照群に比べて有意に減少していた。PNMPP 0.001 および 0.01mg/kg 投与群で血液中 FSH および PRL 濃度が有意に上昇した。こ

れらの効果はアンドロジェンレセプター拮抗薬であるフルタマイドの結果と同様であり、PNMPP が抗雄性ホルモン作用を示すことが明らかとなった。



マウスの正常乳腺上皮細胞 (Eph4) に対して、PNMC と PNP 共に 10⁻⁸~10⁻⁴M において細胞増殖の促進が見られたが、乳がん由来細胞 (NMuMG、4T1) に対しては増殖作用を示さなかった。

ヒトの乳がん由来細胞 (MCF7) においても PNMC と PNP 共に細胞増殖の促進作用が認められなかった。興味深い事に、PNMC の 10⁻⁴M において細胞増殖の抑制が認められたが、PNP においては同じ濃度でも変化が見られなかった。PNMC と PNP の違いや細胞の状態によって、感受性が異なる可能性が示唆された。

脳の性分化に対するニトロフェノールの影響を解析するために、出生直後 2 4 時間以内の雌ラットに 4-nitrophenol (PNP) の種々の量を皮下投与した。その結果、高濃度 (100mg/kg BW) では急性毒性によりラットが死亡したが、急性毒性が見られない中濃度 (10mg/kg BW) 及び低濃度 (1mg/kg BW) では、対照群と同様に春機発動を迎え、性成熟後も発情周期を回帰した。PNP は脳の性分化には顕著な影響を与えないものと判断された。

また、肝臓における ER、AhR、GST、CYP1A1 の mRNA の発現に対する PNP 投与の影響を 21 日齢の雄ラットを用いて検討した。その結果、200mg/kg BW の 3 回胃内投与によって ER、AhR、GST の mRNA が有意に上昇したが、CYP1A1 の mRNA の発現には影響が見られなかった。

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4件)

Li C, Li X, Suzuki AK, Zhang Y, Fujitani Y, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K. Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on pregnancy in rats. J Reprod Dev. 2013;59(2):145-50. 査読有
DOI:10.1262/jrd.2012-145

Li C, Li X, Jigami J, Hasegawa C, Suzuki AK, Zhang Y, Fujitani Y, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K. Effect of nanoparticle-rich diesel exhaust on testosterone biosynthesis in adult male mice. Inhal Toxicol. 2012;24(9):599-608. 査読有
DOI:10.3109/08958378.2012.7021400

Yamagishi N, Ito Y, Ramdhan DH, Yanagiba Y, Hayashi Y, Wang D, Li CM, Taneda, S, Suzuki AK, Taya K, Watanabe G, Kamijima M, Nakajima T. Effect of nanoparticle-rich diesel exhaust on testicular and hippocampus steroidogenesis in male rats. Inhal Toxicol. 2012 ;24(8):459-67. 査読有
DOI:10.3109/08958378.2012.688225

Li C, Li X, Suzuki AK, Fujitani Y, Jigami J, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K. Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on adrenocortical function in adult male mice. Toxicol Lett. 2012, 25;209(3):277-81. 査読有
DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.01.004

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~nvvetphys/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 元 (WATANABE Gen)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：90158626

(2)研究分担者

田谷 一善 (TAYA Kazuoshi)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：60092491

永岡 謙太郎 (NAGAOAKA Kentaro)

東京農工大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号：60376564

(3)連携研究者