

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25281032

研究課題名(和文) 人体・食品中に高頻度高濃度で検出される恒常性攪乱物質が有する経世代毒性影響の解明

研究課題名(英文) Elucidation of next-generation toxicity having highly detective and concentrated homeostatic disruptive chemicals in human and food

研究代表者

太田 壮一 (Ohta, Souichi)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：10213729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,200,000円

研究成果の概要(和文)：食品等から人体に微量に摂取された、環境汚染物質によるヒトの内分泌や免疫系等の高次機能への毒性影響に関して未だ不明な点が多い。本研究では、食事試料中の高濃度汚染物質及び高毒性物質としての、PFOS及びTCDDをマウスに投与した時の性ホルモン系への攪乱影響について評価を行った。その結果、PFOSやTCDDが有する性ホルモン攪乱作用は、CholesterolからProgesterinを経由するAndrogenやEstrogenへの生合成経路において、両化合物の阻害作用点は、その合成系の上流に位置するProgesterinよりも下流のAndrogen合成系側に存在する可能性が推察された。

研究成果の概要(英文)： There are yet many any questions about the toxicity influence on highly advanced functions such as sex hormone secretion or the immune system in human body by environmental pollutants intake with a very small amount from food. In this study, when we administrated PFOS or TCDD to mice each, it was analyze in sex hormone levels in the blood and evaluate their disruption effect As a result, if we assumed a biosynthesis pathway to Androgen and Estrogen which went by way of Progesterin from Cholesterol, it was estimated the sex hormone disruption effect having PFOS and TCDD exist the Androgen synthetic pathway side more downstream than Progesterin located upstream of the synthetic pathway.

研究分野：環境学

キーワード：内分泌攪乱 性ホルモン ダイオキシン PFOS 恒常性攪乱

1. 研究開始当初の背景

ダイオキシン類等に代表される環境汚染物質の急性かつ大量曝露による毒性影響については、過去から多くの研究者によって報告されている。事実、動物実験や過去の汚染事故の曝露による健康影響では、免疫、生殖、代謝、甲状腺及び中枢神経等の様々な生体への健康影響が報告されている。しかし、一般の生活環境中で食品等から人体に微量に摂取された、環境汚染物質によるヒトの内分泌や免疫系等の高次機能への毒性影響に関して未だ不明な点が多い。近年の興味深い知見としては、培養細胞にダイオキシン(TCDD)を添加すると、アリルヒト・ロカ・ホン受容体(AhR/AhR)に結合、活性化するものの、この複合体がさらにエストロゲン受容体(ER)に結合し、不活性化状態の ER を活性化すること、並びにダニアレリゲンの接種マウスに、7週間を新たに投与した時にアトピー性皮膚炎を増悪させることが報告されている。すなわち、これら報告は環境汚染物質によって、遺伝子変異あるいはエピジェネティック変異による感受性の変化が、生体内で起こり得ることを示唆している。そして代表者らは、上記の「攪乱」や「変異」が頻発する時期は生体防御機構が脆弱かつ分化が活発な胎児～乳児期であると考察した。事実、胎児は、PCBs やポリブフェニルエーテル(PBDEs; 難燃剤)等の 87 種の環境汚染物質の曝露を受けていること(Needham *et al.*, 2011)が報告されている。上記の背景より、我が国でも、2011 年より 10 万組(目標値)の親子を対象に有害化学物質と各種疾患等の関連性を調査するコホート研究(エコチル調査)が開始され、そのフォローアップとして出生子が 13 歳に達するまで継続的な調査が行われる予定となっている。しかしこの調査には、以下の 2 つの問題点があると代表者らは推察した。すなわち、13 歳までのフォローアップだけで、ヒトの生涯に亘る健康影響の評価が可能であるか、また、毎日、様々な生活環境で無数の化学物質を低濃度摂取するヒトの健康影響を、化学物質の「正」の毒性作用のみで関連づけることが可能であるか、ということである。従って、上記物質が示す生体恒常性の攪乱、すなわち、リアルタイムで変動する pg オーダーの性ホルモンや抗体価の変動に伴って生じる生体ネットワーク攪乱に関する理解は全く進んでいない。そこで代表者らは、まず我々が日常、食事から高頻度高濃度で摂取することにより、健康に悪影響を及ぼす可能性の高い汚染物質を選定し、18 種類の超微量の性ホルモンとその代謝物を内分泌系の攪乱指標とした、高精度高感度型分析法の構築を試み、その構築した分析法を駆使して、健康有害物質投与マウスの血中の性ホルモン変動をモニタリングすることにより、上記物質の内分泌毒性影響を解明することを当初の目的とした。

2. 研究の目的

上記背景のもと、本研究では、食事(生体)試料中の高濃度汚染物質及び高毒性物質としての、ペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)及びダイオキシン(TCDD)をモデル化合物として選択し、両物質をそれぞれマウスに投与した時の性ホルモン系への攪乱影響について評価を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 被検物質:

生体高蓄積性を有する撥水剤のペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)及びダイオキシン(TCDD)を用いた。

(2) 動物実験:

被検物質の連続曝露によるマウスの内分泌系(性ホルモンレベル)への影響評価;

C57BL/6マウス:7週齢を購入し、1週間の予備飼育後、実験に使用した。動物の飼育は、摂南大学薬学部動物飼育室のケミカルハザード室で行った。なお、餌は基礎飼料MF(オリエンタル酵母製)を、水は水道水を自由摂取させた。また、TCDD及びPFOSの投与試料はエタノール:Tween:生理食塩水(1:10:89)で溶解し、調製した。なお、動物実験に際しては、摂南大学動物実験委員会の承認を受け、動物実験における指針を遵守して行った。

血液の採取方法;

TCDD(1.5 µg/kg body weight)、PFOS(1.54 mg/kg body weight)を5匹/群のC57BL/6マウスに2日間隔で経口投与し、投与24時間後に尾から血液(100 µL)を採取した。又、4週間後には屠殺し、血液(心臓から)及び精巢をそれぞれ採取し、分析試料とした。

(3) 血中性ホルモン試料の前処理法:

サンプル100 µLが入ったマイクロチューブにd-E1~E3,P4およびT5(1 ppm)を25 µL、エタノール300 µLを添加し、遠心分離器で遠心(3000 rpm × 15 min)した後、上層を分取する。次に、超純水300 µL、酢酸エチル300 µLを添加し、よく混和後、遠心分離器で遠心(3000 rpm × 5 min)し、上層を分取した。その上層抽出液を乾固させた後、MSTFA 50 µLを加え、誘導体化を行った。最終濃縮液は、HRGC-MSを用いて性ホルモン及びその代謝物の同時一斉分析を行った。

(4) 高分解能GC/MSの運転条件:

分析機器:Hewlett・Packard 6890 ガスクロマトグラフ(GC)-JEOL JMS-700M 質量分析計(MS)

カラム及びカラム温度:

カラム;Agilent Technologies DB-5MS
(15 m×0.25 mm i.d.,0.10 µm)

カラム温度;90 °C(1.5 min) 220 °C
(15 °C/min) 310 °C(8 °C/min),4 min

(isothermal)

MSの条件:

キャリアガス：He、イオン化法：EI
注入口、インターフェース及びチャンパー温度：260、260及び260 °C
イオン化電圧：42 eV、イオン化電流：700 μA
イオンマルチ電圧：1.1 kV、分解能：9,000

4. 研究成果

まず、血液100 μL を用いて、その中に含まれる18種類の性ホルモンとその代謝物の検出下限について、本研究室現有の高分解能GC/MS (JEOL製 JMS800)を駆使して、タイムゲルピング法を導入した新たな選択イオンモニタリング法を採用しながら求めることを試みた。その結果、今回、採用した超微量分析法で十分に検出することが可能であることが明らかとなった。具体的には、7現行の性ホルモン1ピークに対するモニターチャンネルを2チャンネル方式から4チャンネル方式に変更するだけでも、2倍以上の感度向上が観察された。

次に、PFOS及びTCDDをそれぞれ隔日で経口投与した時によるマウスの血液及び精巣中のTestosterone濃度のモニタリングを行った。その結果、24日後では、PFOSの投与は対照群の約60%、一方、TCDDの投与はそれの約40%まで、血中のTestosterone濃度を減少させた。それに対して、精巣中では同様に、24日後にはPFOSは約15%、TCDDは約20% Testosterone濃度を減少させることが認められた。

さらに、上記化合物の投与によるマウス血中の性ホルモン・代謝物について、詳細に検討したところ、Progesteroneは、24日後ではPFOS及びTCDDともに約50%、またProgesteroneは約40%の減少が観察された。その他、Androstendione及びDihydrotestosteroneにおいては、投与1日後から減少し始め、24日後ではAndrostendione及びDihydrotestosteroneの濃度が、対照群の約60%まで減少させることが確認された。

最後に、上記両化合物をそれぞれ2日毎に経口投与して、1ヵ月後までマウスの血中のAndrogen代謝物及びEstrogenの濃度をモニタリングした結果、興味深いことには、上記の性ホルモン物質濃度の減少傾向とは異なり、Androgen代謝物やEstrogen濃度の変動はほとんど観察されなかった。

以上の結果から、代表者らは、PFOSやTCDDが有する性ホルモン各欄作用は、CholesterolからProgesteroneを経由する、AndrogenやEstrogenへの生合成経路を想定した場合、両化合物の性ホルモン合成阻害の作用点は、その合成系の上流に位置するProgesteroneよりも下流のAndrogen合成系側に存在する可能性が推察された。

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5件)

Kakutani H., Aozasa O., Akiyama E., Nakao T., Ohta S.; Property of cytochrome P450 1A inducibility by polychlorinated/brominated biphenyls (Co-PXBs) detected in Japanese breast milk. *Toxicology Reports*, **2**, 685-91, 2015.

Akiyama E., Kakutani H., Nakao T., Motomura Y., Takano Y., Sorakubo R., Mizuno A., Aozasa O., Ohta S.; Facilitation of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by debrominated tetrabromobisphenol A compounds detected in Japanese breast milk. *Environmental Research*, **140**, 157-64, 2015.

Nakao T., Akiyama E., Kakutani H., Mizuno A., Aozasa O., Akai Y., Ohta S.; Detection of tribromobisphenol A as debrominated compounds of tetrabromobisphenol A in breast milk collected in Japan. *Journal of Environmental Chemistry*, **25**, 69-77, 2015.

Nakao T., Akiyama E., Kakutani H., Mizuno A., Aozasa O., Akai Y., Ohta S.; Levels of tetrabromobisphenol A, tribromobisphenol A, dibromobisphenol A, and bisphenol A in Japanese breast milk. *Chemical Research in Toxicology*, **28**, 722-8, 2015.

Kakutani H., Aozasa O., Mizuno A., Akiyama E., Nakao T., Ohta S.; *In vitro* and *in vivo* induction of cytochrome P450 by coplanar polychlorinated/brominated biphenyls (Co-PXBs) providing high TEQ in mother's milk in Japan. *Toxicology*, **324**, 68-75, 2014.

[学会発表](計25件)

角谷秀樹、中尾晃幸、太田壮一、他2名「健康有害物質による間葉系幹細胞の脂肪・骨芽細胞分化攪乱作用」、第65回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015年10月17日、大阪大谷大学(大阪・富田林)

角谷秀樹、中尾晃幸、太田壮一、他2名「TCDDの経口・経鼻曝露による抗原特異的な抗体産生変動」、第65回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015年10月17日、大阪大谷大学(大阪・富田林)

角谷秀樹、秋山恵麻、太田壮一「健康有害物質TCDDとTBBPAの曝露により観察される間葉系幹細胞分化攪乱影響」、第24回環境化学討論会、2015年6月24-26日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)

太田壮一、角谷秀樹、中尾晃幸、「マウス授乳期のダイオキシン曝露した新生仔の成獣期における抗体産生能への影響」、第24回環境化学討論会、2015年6月24-26日、札幌コンベンションセンター(北海道)

道・札幌)
中尾晃幸、角谷秀樹、太田壮一他 2 名「臭素系難燃剤テトラブロモビスフェノール A による間葉系幹細胞分化攪乱作用」、第 17 回環境ホルモン学会、2014 年 12 月 9-10 日、東京大学(東京・文京区)
中尾晃幸、角谷秀樹、太田壮一、他 2 名「TCDD による間葉系幹細胞の脂肪・骨芽細胞分化攪乱作用に関する検討」、第 17 回環境ホルモン学会、2014 年 12 月 9-10 日、東京大学(東京・文京区)
秋山恵麻、角谷秀樹、太田壮一、他 2 名「TeBBPA による脂肪細胞分化とエピジェネティック変化」、第 17 回環境ホルモン学会、2014 年 12 月 9-10 日、東京大学(東京・文京区)
角谷秀樹、中尾晃幸、太田壮一、他 2 名「ダイオキシン類が有する腸管バリア破綻に伴った免疫毒性影響」、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2014 年 10 月 11 日、京都薬科大学(京都・京都)
角谷秀樹、川口彩、太田壮一、他 2 名「健康有害物質が Caco-2 細胞のバリア機能に及ぼす影響評価」、第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2014 年 10 月 11 日、京都薬科大学(京都・京都)
角谷秀樹、古山英孝、太田壮一、他 2 名「ダイオキシンは腸管バリア機能を破綻することにより免疫毒性を示す」、第 23 回環境化学討論会、2014 年 5 月 14-16 日、京都大学(京都・京都)
角谷秀樹、古山英孝、太田壮一、他 2 名「マウス授乳期の TCDD 曝露の有無による免疫機能に対する毒性評価」、第 22 回環境化学討論会、2013 年 7 月 31 日-8 月 2 日、東京農工大学(東京・府中)
角谷秀樹、中尾晃幸、太田壮一、他 2 名「ビスフェノール系化合物が有する脂肪細胞分化能の検討」、第 22 回環境化学討論会、2013 年 7 月 31 日-8 月 2 日、東京農工大学(東京・府中)
中尾晃幸、角谷秀樹、太田壮一、他 3 名「乳幼児食品中のビスフェノール系化合物による汚染実態の解明と健康影響評価(第 3 報): 母乳および離乳食の汚染実態」、第 22 回環境化学討論会、2013 年 7 月 31 日-8 月 2 日、東京農工大学(東京・府中)
角谷秀樹、中尾晃幸、太田壮一、他 2 名「腸管ループ法を用いた環境・食品汚染物質による生体バリア破綻能の比較」、第 22 回環境化学討論会、2013 年 7 月 31 日-8 月 2 日、東京農工大学(東京・府中)
太田壮一、角谷秀樹、中尾晃幸、他 2 名「間葉系幹細胞から脂肪・骨細胞分化に及ぼす環境汚染物質の影響」、第 22 回環境化学討論会、2013 年 7 月 31 日-8 月 2 日、東京農工大学(東京・府中)
秋山恵麻、角谷秀樹、太田壮一、他 2 名「糖・脂質代謝関連受容体活性を指標と

した環境・食品中の健康有害物質の探索」、第 22 回環境化学討論会、2013 年 7 月 31 日-8 月 2 日、東京農工大学(東京・府中)
中尾晃幸、角谷秀樹、太田壮一、他 2 名「トランス脂肪酸の高精度分析法の開発: AOAC 改良法によるシス及びトランス脂肪酸の組成分析」、第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2013 年 10 月 12 日、同志社女子大学(京都・京都)
角谷秀樹、中尾晃幸、太田壮一、他 2 名「コプラナー型塩素・臭素化ビスフェニルが有する肝薬物代謝酵素誘導能の特性」、第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2013 年 10 月 12 日、同志社女子大学(京都・京都)
中尾晃幸、角谷秀樹、太田壮一、他 2 名「難燃剤テトラビスフェノール A とその代謝物による脂肪細胞分化作用」、第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2013 年 10 月 12 日、同志社女子大学(京都・京都)
中尾晃幸、角谷秀樹、太田壮一、他 2 名「テトラビスフェノール A (TeBBPA) の脱臭素化反応とその脱臭素化体の健康影響評価」、第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2013 年 10 月 12 日、同志社女子大学(京都・京都)
⑳ 角谷秀樹、太田壮一「ダイオキシン経口投与による OVA 特異的 IgG の産生」、第 42 回日本免疫学会総会・学術集会、2013 年 12 月 11-13 日、幕張メッセ(千葉・千葉)
㉑ Kakutani H., Akiyama E., Nakao T., Ohta S.; Observation of antigen-specific immunoglobulin production in 70-days long-term TCDD-exposed mice sensitized without adjuvants, 33th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants: 25-30 Aug, 2013, Seoul (South Korea)
㉒ Ohta S., Akiyama E., Kakutani H., Nakao T.; Dioxins and their related compounds weaken tight junction as epithelial barrier with decrease of claudin in Caco-2 cells, 33th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants: 25-30 Aug, 2013, Seoul (South Korea)
㉓ Akiyama E., Kakutani H., Nakao T., Ohta S.; Tetrabromobisphenol A and its debrominated compounds regulate adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes, 33th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants: 25-30 Aug, 2013, Seoul (South Korea)
㉔ Nakao T., Akiyama E., Kakutani H., Ohta S.; Levels of tetrabromobisphenol A and its related compounds in infant foods of Japan, 33th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants: 25-30 Aug, 2013, Seoul (South Korea)

〔図書〕(計0件)

該当無し

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

該当無し

取得状況(計0件)

該当無し

〔その他〕

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 壮一 (SOUICHI OHTA)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：10213729

(2) 研究分担者

角谷 秀樹 (HIDEKI KAKUTANI)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：00581414

秋山 恵麻 (EMA AKIYAMA)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：50581401

(但し、研究期間；平成 25-26 年度)

(3) 連携研究者

該当無し