

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340037

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

研究課題名(英文) Study of the toxicity on the adrenal and reproductive functions, and the activation of breast cancer by nitrophenols derived from pesticides

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：PNP投与で雌ラットの膣開口が遅れる傾向が認められた。卵巢のステロイド合成酵素 mRNA 発現量が7日齢で減少していたが、14日齢では増加していた。PNP投与により初期に卵巢のエストロゲン生成が低下していると推察された。脳弓状核のkiss1が増加し、背内側核のGnIH発現が増加していた。卵巢には抑制的に作用し、性中枢には促進的に作用していることが示唆された。PNMPPは雄性ホルモン作用と抗雄性ホルモン作用の両方示すことが明らかとなった。ウシ卵細胞を用いてPNPの卵成熟に対する影響を解析した結果、PNPはCYP11A1、PTGS2の発現に影響し、卵丘細胞・卵複合体の膨潤を抑制したと推察された。

研究成果の概要(英文)：The neonatal exposure to PNP showed the toxic effects that are different from neonatal exposure to EE. The vaginal opening was delayed after neonatal PNP, however, the estrous cycles seem normal until PND90. Consistent with the steroidogenic genes expression, the concentration of estradiol-17b showed a similar pattern. Furthermore, PNP could suppress the expression of estrogen receptor b(ERb), but not estrogen receptor a (ERa) in PNP cultured ovaries or in ovaries of PNP treatment. These results suggested that PNP may directly affect the expression of ERb in developmental rat ovaries, thence, causing the disrupted steroidogenesis during ovarian development and the delayed puberty in adulthood. PNMPP showed both androgenic and anti-androgenic effects. An exposure to PNP altered the expansion-related gene expression in the bovine cumulus cell expansion, specifically PTGS2 (up-regulated with MD) and CYP11A1 (down-regulated with HD).

研究分野：比較生殖内分泌学

キーワード：ニトロフェノール ステロイド合成 卵巢 肝 小腸 卵 内分泌攪乱 AhR

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PM10に加えて、PM2.5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まれており、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、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。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。

内分泌かく乱物質は、内分泌系を妨害することができる人工または天然の物質である。内分泌かく乱物質は、様々な水、食料、空気を含む環境で発見される。特に胎子期や新生児期中の内分泌かく乱物質への曝露は、発育・分化過程、代謝機能、さらには内分泌器癌に影響を与えると考えられている。しかし、内分泌かく乱物質の新生子曝露後による生殖器系に対する毒性作用のメカニズムはまだ不明である。この毒性作用のメカニズムを解明するため、モデル物質として17エチルエストラジオール (EE) について解析し、リスク評価指標を検討した。

得られた評価指標について、ディーゼル排気中に含まれる4-ニトロフェノール (PNP) を用いて、内分泌かく乱物質による新生子曝露の影響を性成熟過程と性成熟後の雌ラットを用いて解析した。

3. 研究の方法

(1) 哺乳動物の生殖機能に対する影響

雌性生殖機能への遅発影響のメカニズムを明らかにするため、新生子期EE及びPNPへの曝露後に、性成熟前の雌ラットの卵巣重量、卵巣ステロイド、およびホルモンプロファイルに対する影響を解析した。

雌性生殖機能への遅発効果の初期変化を、EEの新生子期曝露1日齢の卵巣でマイクロアレイ解析により解析した。

(2) ウシ卵細胞の卵成熟に対するPNPの影響

ウシ卵細胞を用いてPNPの卵成熟に対する影響を解析した。EGFファミリーに属するアンフィレグリンを含む培地で22時間培養し卵丘細胞・卵複合体の膨潤、それに関連する遺伝子 HAS2, TNF1P6, StAR, CYP11A1,

PTGS2 の発現、プロジェステロン及び PGE2 分泌に対する PNP 添加の影響を解析した。

(3) 雄への影響

精巣を除去しテストステロンを投与した未成熟の雄ラットを用いて 4-nitro-3-phenylphenol (PNMPP) の雄性ホルモン作用および抗雄性ホルモン作用を解析した。

(4) 鳥類におけるステロイド代謝系に対する影響

ウズラを用いて para-nitrophenol (PNP) を種々の量 75 日間経口投与した。肝の組織学変化、血中コルチコステロン濃度の変化を解析した。CYP450、CYP 1A4, 1A5, 1B1, heme oxygenase, aryl hydrocarbon receptor 1 の mRNA 発現量を PNP 投与後の肝および初代培養肝細胞で測定した。

4. 研究成果

(1) 哺乳動物の生殖機能に対する影響

ヒトでは胎児期に起こる中枢の性分化が、ラットでは出生前後に見られることを利用し、出生直後 24 時間以内の雌ラットに単回投与実験を行った。

新生子の EE への暴露は、126-145 日齢に、異常な発情周期を示した(遅発影響)。正常な発情周期を示す 90 日齢では、LH サージおよび卵巣ホルモンの減少が EE 投与群で認められた。遺伝子発現解析では、黄体形成ホルモン/絨毛性ゴナドトロピン受容体 (LHCGR) をコードする mRNA のレベルが EE 投与群の卵巣で上昇していた。これらの結果は、EE の新生子期暴露が性成熟後に卵巣機能不全を誘発したことを示唆した。

雌性生殖機能への遅発影響のメカニズムを明らかにするため、新生子期 EE への暴露後に、性成熟前の雌ラットの卵巣重量、卵巣ステロイド、およびホルモンプロファイルに対する影響を解析した。卵巣重量は、新生子期 EE 曝露後、生後 14 日と 21 日で有意に減少した。卵巣での P450arom の発現は 14 日齢で増加したが、インヒピン・アクチピン A と B の発現は 21 日齢に減少した。P450arom の発現増加に一致してエストラジオール 17

の末梢血液中濃度が EE 投与群で 14 日齢に増加した。また、新生子期 EE 曝露により 14 日齢で黄体形成ホルモン (LH) の末梢血中濃度は増加した。しかしながら、新生子期 EE 曝露したラットにおいて 14 日齢で、の視床下部弓状核 (ARC) のキスペプチン発現量は減少した。これら結果から、新生子期 EE 曝露が性成熟期における生殖ホルモンの分泌変化を誘起し、性成熟後に雌ラットの生殖機能の遅発変化を生じること示唆した。

マイクロアレイ解析により、アポトーシスの活性化因子の一つである *Harakiri* (Hrk) が減少していた。新生子期 EE 露出卵巣における遺伝子発現のリアルタイム PCR 分析の結果、*in vitro* で EE 曝露した卵巣における Hrk

mRNA が減少した。免疫組織化学染色により、Hrk タンパク質とカスパーゼ 3 が生後 1 日の卵巣卵母細胞に共局在することを明らかにした。卵巣におけるアポトーシス陽性染色を示す卵母細胞の数が、EE に曝露することにより生後 1 日の対照群の卵巣に比べて少ないことを TUNEL 染色により示した。新生子 EE 曝露した卵巣で 7 日齢と 21 日齢で卵胞形成の異常が認められた。Hrk 発現抑制の結果、TUNEL 染色陽性卵母細胞の数を減少させたと考えられた。また、Hrk mRNA 発現抑制が、他のエストロゲン様物質で処理された卵巣でも観察された。これらの結果を併せて考えると、EE は Hrk の発現抑制を介して、新生子卵巣における卵母細胞のアポトーシスを阻害することで卵胞形成を阻害し、その結果性成熟後に生殖機能に対する遅発影響を誘起したと推察された。

ディーゼル排気ガス中に存在し、エストロゲン作用を示すことが明らかになっているパラニトロフェノール (PNP) を 10 mg / kg 皮下投与し、その影響を生殖器および中枢において解析した。

その結果、PNP 投与群で腔開口が遅れる傾向が認められた。また、性成熟前の 30 日齢で子宮重量が対照群より少ない傾向が見られたが、性成熟後は差が見られなかった。卵巣におけるステロイド合成酵素の mRNA 発現量が 7 日齢で減少していたが、14 日齢ではむしろ増加していた。PNP 投与により初期には卵巣のエストロゲン生成が低下していると推察された。脳の弓状核における *kiss1* は増加し、背内側核における *GnIH* の遺伝子発現は増加していた。

ディーゼル排気ガスに含まれるニトロフェノールの一つである PNP は、卵巣に対しては抑制的に作用し、性中枢に対しては促進的に作用していることが示唆された。

PNP の新生子暴露は、EE の新生子暴露とは異なる影響を示した。腔口開口が PNP の新生子曝露により遅れたが、発情周期は 90 日齢まで正常であった。PNP の新生子暴露群の卵巣で、21 日齢において原始卵胞及び一次卵胞の割合が増加し、胞状卵胞の比率が減少した。また、PNP 新生子暴露群では 14 日齢に StAR、P450scc、P450c17、P450arom などのステロイド合成酵素の発現が、対照ラットと比較して増加した。ステロイド合成酵素の遺伝子発現に対する影響と一致して、血中エストラジオール-17 の濃度も増加した。さらに、培養下で PNP 曝露された卵巣、及び PNP 新生子暴露群の卵巣において、エストロゲン受容体 α ($ER\alpha$) の遺伝子発現には影響しなかったが、エストロゲン受容体 β ($ER\beta$) の遺伝子発現を抑制した。これらの結果は、PNP が直接発育卵巣に作用して $ER\beta$ の遺伝子発現を抑制し、発育過程における卵巣ステロイド生成を傷害することで春機発動を遅延させたことを示唆した。

結論として、EE と PNP の新生子期曝露は、

それぞれ異なる作用点で生後早期に卵胞発育とホルモン分泌に作用し、性成熟後の生殖機能に対する遅発影響を発揮すると考えられた。

(2) ウシ卵細胞の卵成熟に対する PNP の影響
ウシ卵細胞を用いて PNP の卵成熟に対する影響を解析した結果、PNP は CYP11A1, PTGS2 の発現に影響して、卵丘細胞・卵複合体の膨潤を抑制したと推察された。

(3) 雄への影響

精巣を除去しテストステロンを投与した未成熟の雄ラットを用いて 4-nitro-3-phenylphenol (PNMPP) の雄性ホルモン作用および抗雄性ホルモン作用を解析するため 7 日間皮下投与し、血液中ホルモン濃度を測定したところ、10mg/kg 投与した群では卵胞刺激ホルモン(FSH) と黄体形成ホルモン(LH) 濃度が有意に減少した。テストステロンとプロラクチン(PRL) は有意に増加した。一方 0.001 および 0.01mg/kg 投与した群では FSH と PRL が増加した。PNMPP は雄性ホルモン採用と抗雄性ホルモン作用を両方示すことが明らかとなった。

(4) 鳥類におけるステロイド代謝系に対する影響

ウズラを用いて para-nitrophenol (PNP) を 75 日間経口投与したところ、肝にはリンパ球の集合や肝細胞の障害が認められた。血中コルチコステロン濃度が有意に上昇した。60 日投与後には肝における CYP450, CYP 1A4, 1A5, 1B1, heme oxygenase, aryl hydrocarbon receptor 1 の発現が顕著に増加した。さらに投与を継続したところ、75 日目ではそれら全ての遺伝子発現は減少した。肝細胞の 24 時間の初代培養においては、CYP 1A4, 1B1, heme oxygenase, は増加したが CYP1A5 は減少した。

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 7 件)

Haolin Zhanga, Kazuyoshi Taya, Kentaro Nagaokab, Midori Yoshidad, Gen Watanabe 4-Nitrophenol (PNP) inhibits the expression of estrogen receptor and disrupts steroidogenesis during the ovarian development in female rats. *Environmental Pollution* (2017) in printing (査読有)

Li R, Song M, Li Z, Li Y, Watanabe G, Nagaoka K, Taya K, Li C. 4-Nitrophenol exposure alters the AhR signaling pathway and related gene expression in the rat liver. 2017 年 2 月 *J Appl Toxicol.*

37(2): 150-158 doi: 10.1002/jat.3332 (査読有)

Omnia A.H.A. El-Gendy, Gen Watanabe, Gamal A. Sosa, Abd El-Salam I. El-Azab, Mahmoud E.A. Abou-Elrous, Mohamed M.M. Kandiel Impairment of Epidermal Growth Factor-Stimulated Cumulus Cell Expansion by 4-Nitrophenol in Bovines: Morphological, Genetic and Hormonal Assessment *Global Veterinaria* 17 (5): 460-467, 2016 OI: 10.5829/idosi.gv.2016.460.467 (査読有)

Tang J, Song M, Watanabe G, Nagaoka K, Rui X, Li C. Effects of 4-nitrophenol on expression of the ER- and AhR signaling pathway-associated genes in the small intestine of rats. 2016 年 9 月 *Environ Pollut.* 216:27-37 doi: 10.1016/j.envpol.2016.05.040 (査読有)

Ahmed, Eman, Nagaoka, Kentaro; Fayez, Mostafa; Samir, Haney; Watanabe, Gen. Long-term p-nitrophenol exposure can disturb liver metabolic cytochrome P450 genes together with aryl hydrocarbon receptor in Japanese quail. *JJVR* .2015-08; 63(3):115-127 (査読有)

Ahmed, Eman, Nagaoka, Kentaro; Fayez, Mostafa, Samir, Haney; Mohamed M, Abdel-Daim, Samir, Haney, Watanabe, Gen Suppressive effects of long-term exposure to P-nitrophenol on gonadal development, hormonal profile with disruption of tissue integrity, and activation of caspase-3 in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Environ Sci Pollut Res* .2015;22:10930-10942. (査読有)

Trisomboon J1, Li C, Suzuki A, Watanabe G, Taya K. 4-Nitro-3-phenylphenol has both androgenic and anti-androgenic-like effects in rats. *J Reprod Dev.* 2015;61(2):134-7. (査読有)

[学会発表](計 4 件)

Haolin Zhang, Kentaro Nagaoka, Kento Usuda, Kaori Nozawa, Kazuyoshi Taya, Midori Yoshida and Gen Watanabe.

Estrogenic compounds impair primordial follicle formation by inhibiting the expression of proapoptotic Hrk in neonatal rat ovary. Cell biology 2016 annual meeting. アメリカ合衆国(サンフランシスコ) 2016年12月3日～ 2016年12月7日 .

Eman Ahmed, Mostafa Fayed, Haney Samir, Kentaro Nagaoka, Gen Watanabe. p-nitrophenol Can Disturb the Metabolic Processes of the Liver Through Interfering with the Aryl hydrocarbon receptor and Cytochrome P450 Enzyme System. 環境ホルモン学会 第17回研究発表会、2014年12月9～10日、東京 .

Eman Abdelnaby, Kentaro Nagaoka, Mostafa Fayed, Kazuyoshi Taya, Eman Abdelnaby, Haney Samir Kentaro Nagaoka, Mostafa Fayed Gen Watanabe. P-nitrophenol in diesel exhausts particles disrupt the regulation of reproductive function in male Japanese Quail (Coturnix japonica) . 第39回日本比較内分泌学会大会.2014年11月7日～9日、岡崎

Eman Abdelnaby, Kentaro Nagaoka, Mostafa Fayed, Kazuyoshi Taya, Gen Watanabe. . Long-term low dose p-Nitrophenol exposure can disrupt the hypothalamic-pituitary axis in the Japanese quail (Coturnix japonica) 第29回日本下垂体研究会 学術集会、2014年8月8～10日、東京 .

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