

同一患者から採取した血液と腹水中の揮発性有機化合物濃度の関係について、検出頻度及びその測定濃度より統計解析が可能であったトルエン及び p-ジクロロベンゼン濃度について検討を加えた。その結果、p-ジクロロベンゼン濃度には有意な正の相関関係（順位相関係数=0.893、n=7、p=0.029）が認められたが（図 1）、トルエン濃度には有意な相関関係は認められなかった（順位相関係数=-0.270、n=12、p=0.370）。

### C.3. 採血方式及び場所の違いによる血中揮発性有機化合物濃度の差異

揮発性有機化合物は環境中に普遍的に存在していることから、試料の採取時及びその保存期間中に汚染を受ける可能性が高い。事実、周囲の環境等からの汚染を防止するために、血清保存用試験管内の空気を窒素で置換するなどの対策を講じる愛知衛研方式を用いて採取した平成 12 年度の検出率が、そうではない平成 11 年度の検出率よりも低い傾向を示していた。そこで、採血方式及び場所の違い（東海大方式 vs 愛知衛研方式）による血中揮発性有機化合物濃度の差異を調べるため、愛知衛研職員 4 名について、以下の異なる 3 方法にて採血及び血清分離を行なった。

①愛知衛研で愛知衛研方式

②東海大学病院で愛知衛研方式

③東海大学病院で東海大方式

採血は 2 日連続で行ない、1 日目は①で、2 日目は②及び③にて実施した。各方式で採血及び分離した血清中の揮発性有機化合物濃度を表 2 に示した。まず、東海大学病院において同じ日に愛知衛研と東海大の両方式で血液を採取し、同一被験者 4 名の血中揮発性有機化合物濃度を測定した。その結果、全検体から同程度の濃度が検出された p-ジクロロベンゼン及び全く検出されなかったナフタレンを除き、愛知衛研方式で採血した場合の検出率及び濃度が、東海大方式のそれらよりも低い傾向が認められた。この結果は、上述の不妊症患者における平成 11 年度と 12 年度の相違（11 年度は東海大方式、12 年度は愛知衛研方式による採血・血清分離）と同様の傾向を示すものであった。

また、東海大学病院での採血の前日に①（愛知衛研で愛知衛研方式）で採取した血中の揮発性有機化合物濃度は、東海大学病院にて両方式（②及び③）で採取した場合と比べて、検出率及び濃度が低い傾向を示していた。この結果については、採血日が異なること、愛知衛研から東海大学病院への移動によるトラベルブランクの影響が考えられること、それに検体数が非常に少ないこと等から、今回の結果のみから採血場所（東海大学病院）の汚染

を第一義的な原因と断定的に考えることはできない。

なお、環境汚染の状況を調べる目的で、東海大学病院で採血を実施した手術室、研究室等の空気中の揮発性有機化合物濃度を測定した。その結果、総揮発性有機化合物濃度として手術室が  $76 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (中央値、 $n=5$ )、研究室 1 が  $17 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (中央値、 $n=3$ )、研究室 2 が  $37 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (中央値、 $n=3$ ) であった。一方、愛知衛研の職員 4 名のうち、1 名の自宅の室内空気中揮発性有機化合物濃度は  $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$  であった。従って、東海大学病院内の空気中揮発性有機化合物濃度の方がかなり低い値であることが判明した。

以上のことから、その具体的汚染源、汚染様式は不明ではあるが、生体内の揮発性有機化合物濃度を測定する際には、採血方式及び場所によって汚染が発生する可能性が高いことが明らかとなった。今後、不妊症患者等の生体内における揮発性揮発性有機化合物のより詳細な存在実態を明らかにするためには、周囲の環境等からの汚染防止を万全にした状態での検体採取・保存及び測定が重要な課題であることが明らかとなった。

#### D. 結論

1. 今回測定を行なった不妊症患者 ( $n=18$ ) の血液及び腹水中には、トル

エン、*p*-ジクロロベンゼンなどの揮発性有機化合物が ppb からサブ ppb のオーダーで存在することが示唆された。

2. 同一患者から採取した血液と腹水中の *p*-ジクロロベンゼン濃度には、有意な正の相関関係 (順位相関係数  $=0.893$ ,  $n=7$ ,  $p=0.029$ ) が認められた。

3. 採血方式や場所によって汚染が発生する可能性が示唆された。今後、不妊症患者等の生体内における揮発性揮発性有機化合物のより詳細な存在実態を明らかにするためには、周囲の環境等からの汚染を防止した検体採取、保存及び測定が重要な課題であることが明らかとなった。

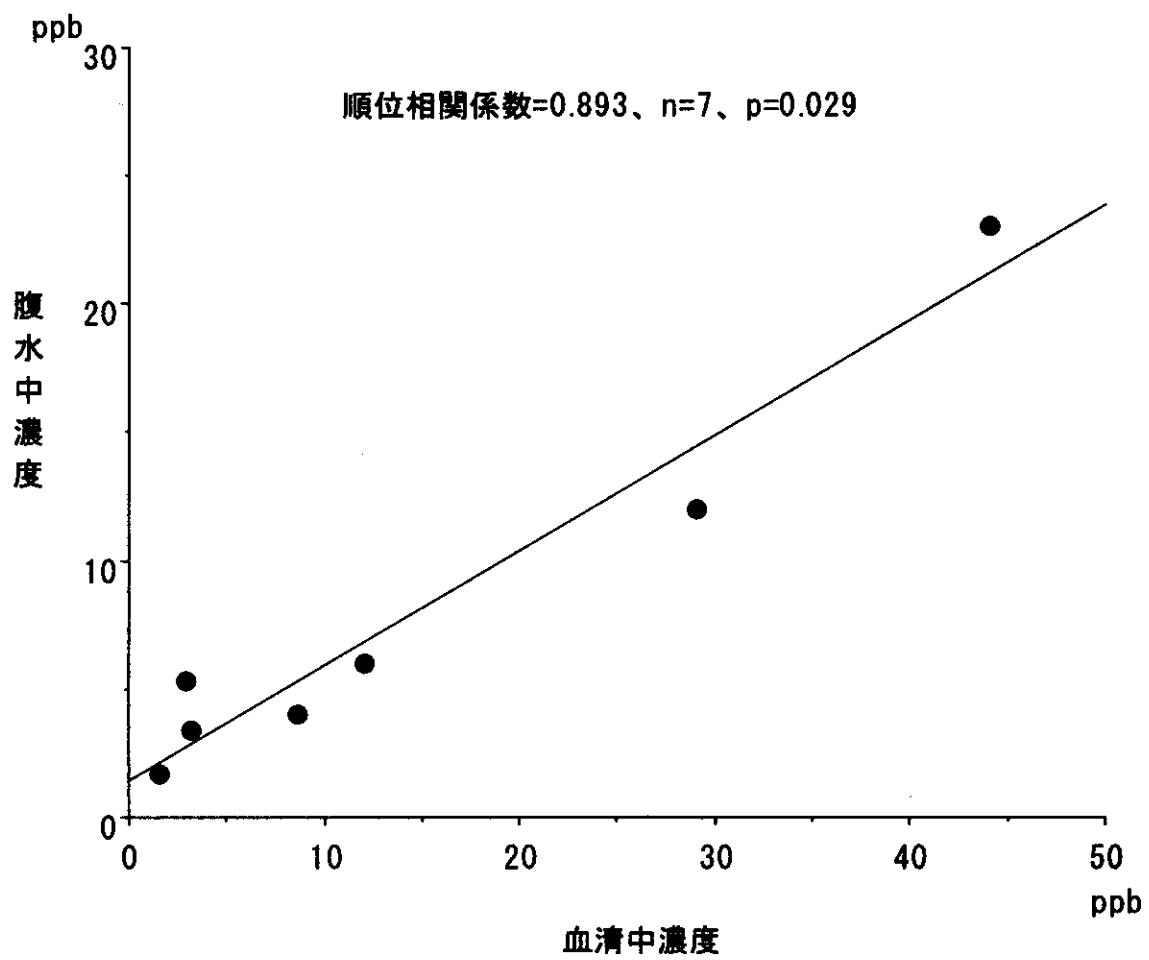


図1 血清及び腹水中のp-ジクロロベンゼン濃度の相関

表1 不妊症患者の血清及び腹水中の揮発性有機化合物濃度

採取年度	平成11年				平成12年				(単位; ppb) 計	
	血清 (n=5)	腹水 (n=5)	血清 (n=12)	腹水 (n=13)	血清 (n=12)	腹水 (n=13)	血清 (n=12)	腹水 (n=13)		
測定項目	検出率 %	中央値 (25-75%)	検出率 %	中央値 (25-75%)	検出率 %	中央値 (25-75%)	検出率 %	中央値 (25-75%)	検出率 %	中央値 (25-75%)
トルエン	100	1.4 (0.9-1.5)	100	1.5 (1.2-2.1)	67	0.7 (0.6-1.0)	77	1.3 (0.8-1.6)	80	1.2 (0.7-1.6)
p-ジクロロベンゼン	80	3.1 (2.2-24)	80	4.4 (2.6-14)	33	10 (5.0-21)	39	4.0 (3.2-7.5)	49	4.0 (2.7-12)
m,p-キシレン	100	1.4 (0.9-2.2)	100	2.1 (1.6-4.0)	8	4.5	31	1.1 (0.9-2.0)	43	1.8 (0.9-2.6)
エチルベンゼン	80	1.0 (0.7-1.5)	80	1.3 (1.3-3.9)	8	4.5	31	1.0 (0.7-1.7)	37	1.2 (0.8-2.0)
o-キシレン	80	0.6 (0.5-0.9)	80	0.7 (0.7-1.8)	8	1.5	8	0.8	29	0.7 (0.6-1.2)
スチレン	60	0.5 (0.5-0.8)	80	0.6 (0.6-1.9)	8	2.0	8	1.5	26	0.6 (0.5-1.6)
ベンゼン	40	0.7 (0.6-0.7)	40	0.5 (0.5-0.5)	0	-	0	-	11	0.6 (0.5-0.7)
ナフタレン	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-

中央値及び25-75%値は検出された検体についてのみの値

探血方式及び場所の違による血中揮発性有機化合物濃度の差異		愛知衛研		愛知衛研		東海大学	
探血方式	探血場所	愛知衛研 (n=4)		愛知衛研 (n=4)		東海大学 (n=3)	
測定項目		検出率 %	中央値 (25-75%)	検出率 %	中央値 (25-75%)	検出率 %	中央値 (25-75%)
p-ジクロロベンゼン		100	19 (13-38)	100	15 (12-32)	100	20 (12-66)
トルエン		75	0.8 (0.6-1.4)	100	2.3 (2.0-2.9)	100	6.0 (5.6-8.3)
m,p-キシレン		0	—	100	1.1 (1.0-1.3)	100	4.0 (3.6-6.3)
エチルベンゼン		0	—	50	0.6 (0.5-0.7)	100	4.6 (4.0-6.6)
o-キシレン		0	—	25	1.1	100	1.2 (0.4-2.0)
スチレン		0	—	0	—	100	8.3 (5.6-11)
ベンゼン		0	—	0	—	33	0.5
ナフタレン		0	—	0	—	0	—

中央値及び25-75%値は検出された検体についてのみの値

平成12年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書

内分泌かく乱物質に関する生体試料(さい帯血等)の分析法の開発と  
その実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

環境中のホルモン様物質の胎児・胎盤特異的遺伝子発現への影響

主任研究者 牧野恒久 東海大学  
分担研究者 塩田邦郎 東京大学  
研究協力者 横田博 酪農学園大学

研究要旨

内分泌かく乱物質は細胞分化及び生殖器管形成期すなわち胎児期に暴露されると、成長後およびその子孫への不可逆的影響が心配されている。すなわち、この時期のかく乱化学物質の作用を解析するためには、母体・胎盤・胎児における化学物質の代謝解毒反応を詳細に明らかにすることが求められている。そこで我々は、化学物質解毒酵素の妊娠期での機能を明らかにする事を目的として、臓器・細胞レベルおよび酵素レベルでの研究をおこなった。

A. 研究目的

薬物は体内に取り込まれた後、肝臓で様々な代謝を経て排泄される。内分泌かく乱物質の作用機序の解明や毒性を評価するために、母胎から胎盤を通して胎児に到達するまでの各臓器での代謝反応および内分泌かく乱物質による細胞分化への影響を明らかにしてゆくことを目的とする。特に、内分泌かく乱物質が吸収される消化管と排泄される腎、化学物質のバリアーである胎盤での代謝と動態について、肝臓の場合と比較して、その特徴を調べる。また、上記臓器で働いている酵素の機能

を試験管レベルで測定し、どのような機能がどのような臓器でどのような時期にどの程度発現するのかを明らかにしてゆく。

B. 研究方法

B・1 昨年度からの継続研究により栄養膜幹細胞株 (TS 細胞) を用いることでレチノイン酸の胎盤栄養膜細胞の分化過程への影響を *in vitro* で再現出来ることを示している (投稿中論文)。そこで今年度はさらに胎盤細胞の分化に対するベンツピレンの作用を解析した。解析は、1 および 10  $\mu$ M ベン

ツピレン存在下で培養した TS 細胞から RNA を調整し、各種胎盤特異遺伝子プローブを用いたノーザンハイブリダイゼーションにより行った。

B・2 ラット消化管でのビスフェノール A の吸収を反転腸管を用いた実験で検討した。

B・3 ラット腎動脈にビスフェノール A を混入させた灌流液（アルブミンを含む）を注入し、腎静脈と尿中の代謝物を調べることで腎臓でのビスフェノール A の代謝・動態を解析した。

B・4 ラット胎盤ミクロソームを用い、グルクロン酸抱合（解毒）活性を測定した。

### C. 研究結果

C・1 10  $\mu$ M ベンツピレン存在下でも、TS 細胞の分化に大きな変化は見られなかった。

C・2 腸の管腔側に添加されたビスフェノール A (BPA) は粘膜上皮細胞に吸収され、そのほとんどがグルクロン酸抱合された。抱合体の一部は漿膜側に吸収されたが、多くが管腔側（粘膜側）に戻された。漿膜側へのグルクロン酸抱合の取込みは結腸で最も高かった。

C・3 腎動脈中に添加した BPA は、直ちに腎静脈中に検出され、尿中にはほとんど検出されなかった。

C・4 胎盤ミクロソームを用いた実

験では、一般的薬物のグルクロン酸抱合活性が母親側胎盤に存在したが、BPA のグルクロン酸抱合活性は検出されなかった。免疫組織染色により、UGT1A6 に相当する分子種が胎盤脱落膜層に発現していることが分かった。グルクロン酸抱合体を分解してもとの薬物に戻す酵素 ( $\beta$ -グルクロニダーゼ) の活性がラット胎盤母親側に存在していることを見出した。

### D. 考察

我々は、ベンツピレンの細胞内受容体と考えられている AhR が TS 細胞で発現していることをすでに確認している（昨年度報告）。この結果を踏まえた今年度の研究であったが、ベンツピレンによる栄養膜細胞分化への大きな影響がないことは、予想外の結果であった。今後さらに詳細な解析が必要であるが、胎盤形成の初期段階にはベンツピレンは無害であるのかもしれない。ラット臓器を用いた研究からは、まず、消化管に入った BPA はそのほとんどがグルクロン酸抱合されてから吸収されることがわかった。また、腎では他の薬物は様々な代謝を受けるが、BPA は濾過も代謝もされないと考えられる。今後グルクロン酸抱合体の尿中への移行についてさらに調べる。最近の報告にあったように、グルクロン酸抱合体を分解してもとの薬物に戻す酵素 ( $\beta$ -

グルクロニダーゼ)の活性がラット胎盤母親側にも存在していた。このことから血液中に存在するBPAのグルクロン酸抱合体が胎盤でもとのフリーの状態に戻され、胎児側に移行する可能性が示唆される。

#### E. 結論

BPAの体内動態を考察すると、消化管と肝臓で大部分がグルクロン酸抱合されることが判明した。その後、少なくとも腎では何ら代謝は進行せず、おそらく濾過され排泄されるのみと思われる。UGT1A6に相当する分子種が胎盤脱落膜層に存在し、薬物の水際での解毒に働いていると考察された。しかしBPA等のUGT活性は検出されず、かえってグルクロン酸抱合体を分解する酵素( $\beta$ -グルクロニダーゼ)の活性が高く、せっかく解毒した抱合体を元に戻してしまう可能性が考えられた。今後、ラット胎盤やTS細胞での、UGTや $\beta$ -グルクロニダーゼの機能を詳細に検討した後、来年以降、ヒトの試料について検討していく予定である。

#### F. 研究業績

##### ① 学会発表

第130回日本獣医学会学術集会(平成12年10月)

「栄養膜細胞の分化におよぼすレチノイン酸の影響の解析」

巖 軍麗・田中 智・大鐘 潤・塩田 邦郎

米国細胞生物学会(ASCB)第40回年会(平成12年12月)

「Retinoic acid promotes differentiation of trophoblast cells into giant cell」

巖 軍麗・田中 智・大鐘 潤・塩田 邦郎

第3回環境ホルモン学会

「内分泌かく乱化学物質のラット肝におけるグルクロン酸抱合」

横田 博、井上博紀、松本順也、柴田憲明、加藤清雄、湯浅 亮

第3回環境ホルモン学会

「ビスフェノールA投与ラット肝における性ホルモンのグルクロン酸抱合能低下とクミルフェノール及びタモキシフェン投与の影響」

柴田憲明、横田 博、松本順也、湯浅 亮

第3回環境ホルモン学会

「ラット肝灌流法によるノニルフェノール及びアルキルフェノールのグルクロン酸抱合体の胆汁排泄」

大道寺智、横田 博、井上博紀、加藤清雄、湯浅 亮

第3回環境ホルモン学会

「ラット脳灌流モデルを用いたビスフェノールAの脳組織への残留」

井上博紀、横田 博、秋山毅一郎、伊



藤隆志、翁長武紀、田村守、加藤清  
雄

② 論文発表

J. Yan, S. Tanaka,  
M. Oda, T. Makino, J. Ohgane and K.  
Shiota. “Retinoic  
acid promotes differentiation  
of trophoblast stem cells to a  
giant  
cell fate” *Developmental Biology*  
(投稿中)

平成 12 年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（さい帯血等）分析法の開発と  
その実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

経口免疫寛容へのジブチルスズの影響  
－ 抗原特異的な T 細胞応答への影響

主任研究者 牧野恒久 東海大学  
分担研究者 織田 肇 大阪府立公衆衛生研究所  
研究協力者 益川邦彦 神奈川県衛生研究所  
渡邊裕子 神奈川県衛生研究所  
藤巻照久 神奈川県衛生研究所

研究要旨

内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の生体機能へのリスク評価を行うことを目的として、食品抗原の経口感作によって誘導される免疫応答への影響を検討した。内分泌かく乱作用が疑われる物質のうち、胸腺萎縮などの免疫機能への影響がすでに知られている DBT (塩化ジブチルスズ) について、末梢リンパ節細胞の抗原特異的な応答への影響を検討した。

A. 研究目的

内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の生体への影響は、内分泌系だけでなく免疫系や神経系などの他の生体機能も含めた検討を行うことの必要性が認識されている。

一方、免疫担当細胞である T 細胞や B 細胞の応答は様々な細胞応答や物質により増強・阻害され修飾されることが知られている。このことから、内分泌かく乱作用が疑われる化学物質が免疫担当細胞の応答に影響を及ぼし、正常な応答を変化させることが考えられる。特に T 細胞は外来抗原の認

識に重要な役割を果たし、その分化過程で暴露される物質の影響は大きい。

船底塗料や食品の包装材等に幅広く用いられていたトリブチルスズ化合物 (TBT) は、水生生物への毒性が強く、メスの巻き貝の不妊化を引き起こすことが明らかとなっている<sup>1)</sup>。その代謝物のうちジブチルスズ (DBT) は、依然プラスチックの安定剤として用いられ、環境中の残留性も高い<sup>2)</sup>。また、ラットにおいて胸腺萎縮を引き起こすことが明らかとなっている。そこで、マウスを用いて、より実態に近い暴露モデルを想定し、ジブチ

ルスズの経口免疫寛容への影響を検討することを目的とし、経口感作抗原に対するT細胞応答についての影響を検討した。

## B. 研究方法

### B・1 実験動物

C3H/HeN メス4週令マウスは、日本クレアより購入した。

### B・2 化学物質

二塩化ジブチルスズ(DBT)は、アルドリッチ社製を用いた。

### B・3 抗原

ウシ $\alpha_{s1}$ -カゼインは、Zittle らの方法により生乳から抽出し、陰イオン交換カラム DEAE-Sephacel (Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) を用いて精製した。

### B・4 抗原特異的抗体価への影響

5~7匹のマウスに3日ないしは4日置きにジブチルスズをゾンデで経口投与し、20%カゼインを含んだ餌(船橋農場製)あるいはカゼインを含まない普通食(CE-2 日本クレア社製)を自由摂取させ、4週間飼育した。化学物質はエタノール(特級;和光純薬社製)に溶かし、生理食塩水100 $\mu$ l に対し0.1%添加し、調整した。投与量は1回あたり1.0 $\mu$ g, 10.0 $\mu$ gとした。これらの濃度はマーケットバスケット法により食品経由の有機スズ摂取量調査における2.29 $\mu$ g/人/日<sup>3)</sup>および魚介類汚染によるジブチルスズ一日摂取量の推定値0.45 $\mu$ g/人/日<sup>4)</sup>を参考とし設定した。なお、FAO およ

びWHOで設定されている許容一日摂取量(ADI)は塩化トリブチルスズで1.6 $\mu$ g/kg/日である。また、経口トレランス実験により、トレランスを破綻すると考えられるコレラトキシン<sup>5)</sup>(CT)10.0 $\mu$ g投与群を設け、その影響について比較した。

マウスは1週間ごとに採血を行い、血清をとりカゼイン特異的総抗体価およびIgGサブクラスをELISAにより測定した。抗体価はMann Whitney 検定により、有意差検定を行った。

### B・5 T細胞増殖応答への影響

B-4に従い、4週間飼育した後、マウス後肢および尾底部にカゼイン100 $\mu$ gを免疫し、10日後にリンパ節細胞を採取し、抗原特異的な増殖応答をH<sub>3</sub>の取り込みおよびMTSアッセイ(プロメガ社製)により測定した。増殖応答はt検定により、有意差検定を行った。

## C. 研究結果

### C・1 抗原特異的抗体価への影響

マウスにカゼイン食を与えた場合、血中カゼイン特異的総抗体価は普通食に比べ有意に増加し、投与開始2から3週間後に最高値となり、以後ほぼ横ばいとなった。

カゼイン食とともにDBTを28日間経口投与した後の抗原特異的総抗体価は有意に増強した(p<0.01)(図1)。また、この時のIgGサブクラス(IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>)をみると、IgG<sub>1</sub>が有意に増強した(p<0.01)(図2)。カゼイン経口投与による免疫応答は、IgG<sub>1</sub>およ

び IgG<sub>2a</sub> 産生を誘導するが、ジブチルスズはヘルパーT細胞における Th<sub>2</sub> 型が誘導する IgG<sub>1</sub> 産生を有意に増強した。

ゆえに、ジブチルスズは抗原とともに経口感作され、抗原特異的免疫応答を修飾することが明らかとなった。

#### C・2 T細胞増殖応答への影響

動物をアジュバントとともに抗原で免疫すると、抗原特異的なT細胞や抗体の応答を誘導できるが、動物にこの抗原をあらかじめ経口投与しておくとも免疫応答は低下し、実験的に経口トレランスを誘導することが出来る。この系を用いて、経口トレランスにおけるT細胞増殖応答へのDBTの影響を検討した。

カゼインを経口投与しないDBT単独での抗原に対するT細胞増殖応答への影響を図3に示した。DBTは、MTSアッセイが示すミトコンドリアにおける代謝活性を有意に増強した。

経口寛容におけるT細胞増殖応答へのDBTの影響を図4に示した。抗体産生を増強したDBTは、H<sub>3</sub>取り込みおよびMTSアッセイいずれにおいても増殖応答を有意に増強した。MTSアッセイにおいて、DBTはCTでは影響がみられなかったカゼイン低濃度刺激においても代謝活性を有意に増強した。

#### D. 考察

抗原とともに経口感作されたジブチルスズは、免疫応答を増強するアジュバント様の影響を示すことが明らか

かとなった。これまでの実態調査において、養殖ハマチでDBT 13.6ppm<sup>6)</sup>の濃度事例もみられ、本研究におけるDBT影響濃度は、閉鎖系水域での汚染レベルとして考えうると思われた。また、高濃度投与では、細胞応答を抑制する毒性発現の影響を示すことから、濃度により異なる影響を示すと考えられた。

さらに、本実験系において、自己トレランスの実験系モデルである経口トレランスを破綻することが明らかとなっているコレラトキシンと同等あるいはそれ以上に経口抗原特異的な抗体産生およびT細胞応答に影響を及ぼすことが明らかとなった。これにより、ジブチルスズは過剰な免疫応答を引き起こし、経口トレランスの誘導を破綻することが考えられた。現代病といわれ患者数が増加している自己免疫疾患は自己トレランスの破綻により引き起こされると考えられている。このことから、ジブチルスズのように経口トレランスの誘導を破綻すると考えられる化学物質の存在は非常に興味深い。

ゆえにDBTのアジュバント様の影響および経口トレランスへの影響について、細胞応答および伝達、ターゲット細胞等の細胞レベルでの解析をすすめることが必要と考えられる。

#### E. 結論

食品抗原の経口感作における抗原特異的なT細胞応答に対するジブチ

ルスズの影響を検討した。ジブチルスズは、投与量により2通りの異なる影響を及ぼすことが明らかとなった。アジュバント様の影響では、過剰な免疫応答を引き起こし、経口トレランスの誘導を破綻することが考えられた。

#### F. 研究業績

##### 学会発表

渡邊裕子, 八村敏志, 藤巻照久, 中澤裕之, 上野川修一, 牧野恒久: 抗原特異的なT細胞応答に対するジブチルスズの影響, 日本農芸化学会 2001 年度大会 講演要旨集, 75, 262, 京都.

##### 参考文献

- 1) Horiguchi T., et al ; Appl. Oragnomet. Chem., 11, 451(1997).
- 2) 田尾博明ら ; 環境化学, 9(3), 661-671 (1999) .
- 3) 関沢純 ; 国立医薬品食品衛生研究所報告, 116, 126-131(1998) .
- 4) 山本勇夫;北海道医誌, 69(2), 273-281(1994).
- 5) Charles O. Elson et al ; J. Immunol. ,133(6), 2892-2897.
- 6) 大沢敬子ら ; 分析化学, 37, 471-475(1988).

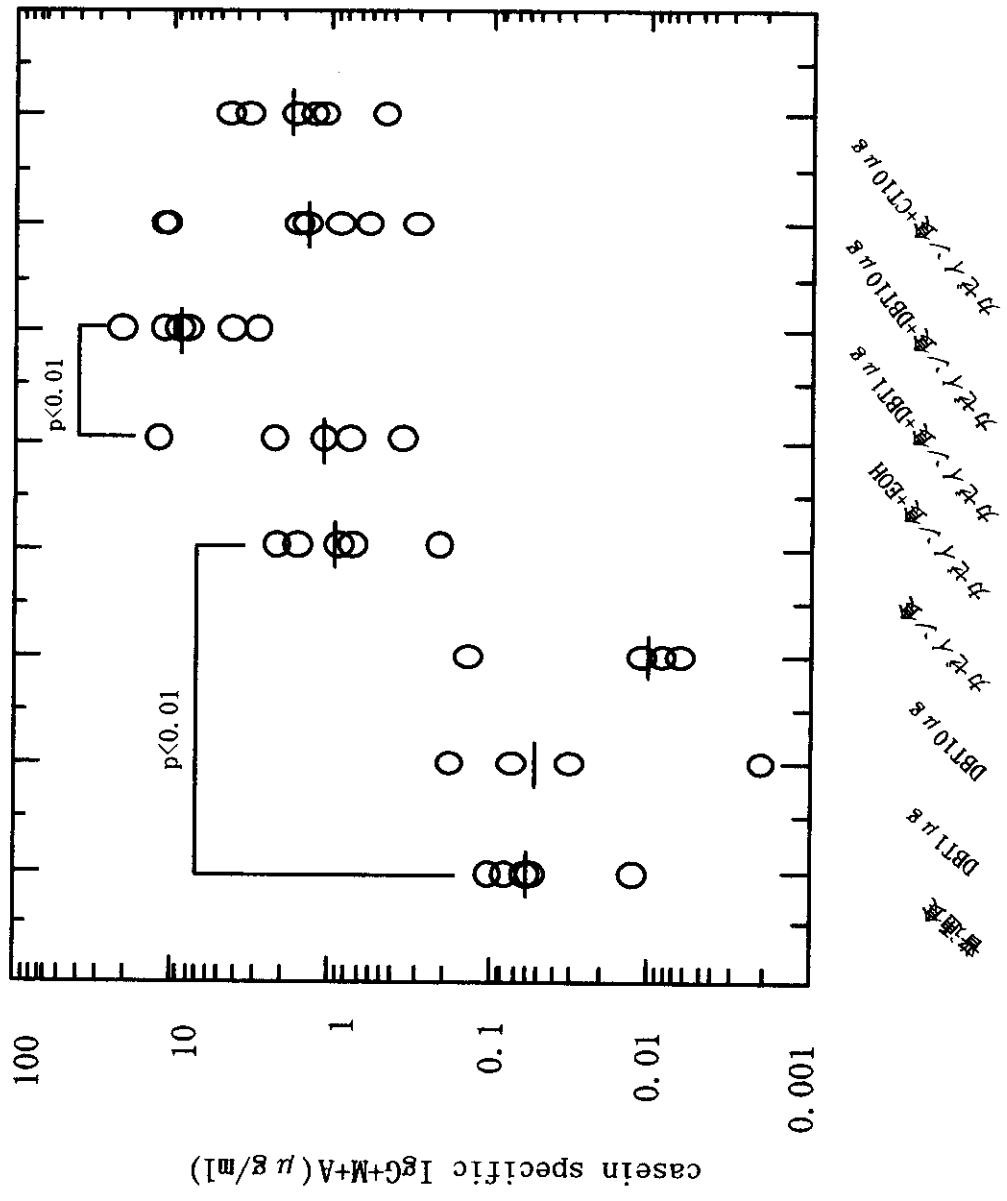


図.1 カゼイン経口投与による特異的総抗体価へのジブチルスズの影響

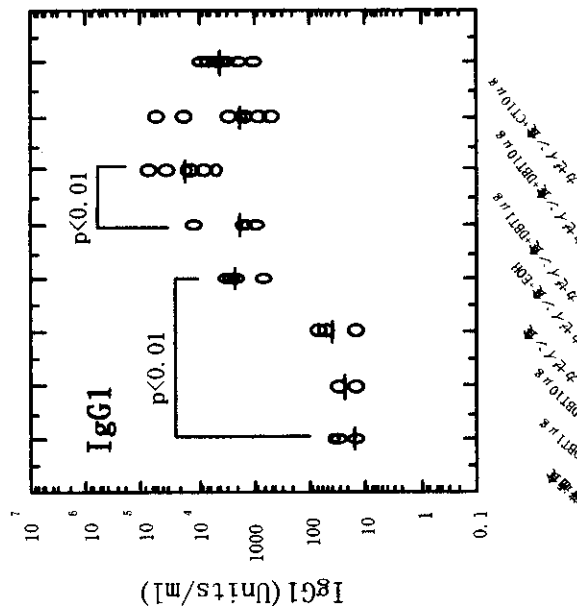
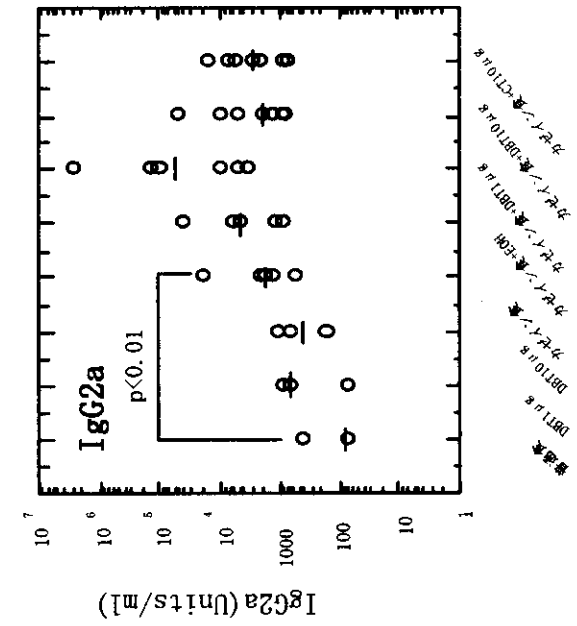
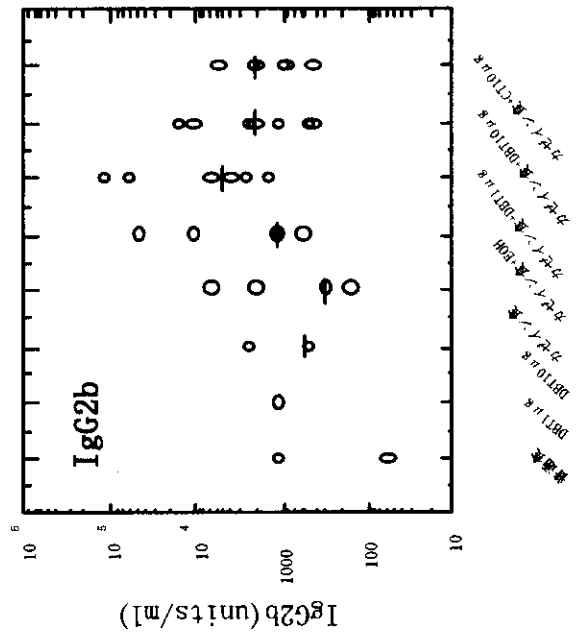


図.2 カゼイン経口投与によるIgG サブクラス産生への  
ジブチルスズの影響

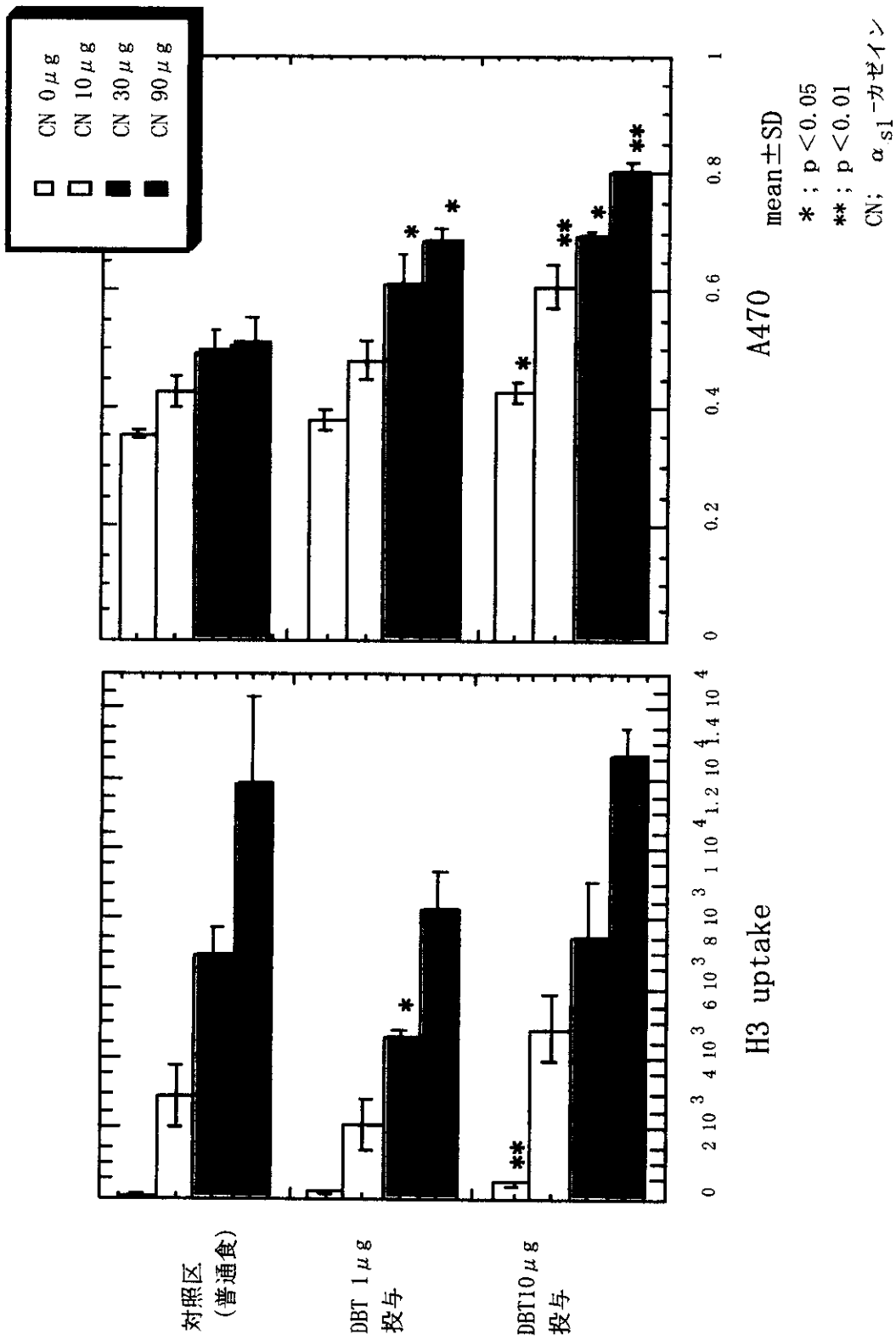


図.3 ジブチルスズ経口投与によるマウスT細胞増殖応答への影響



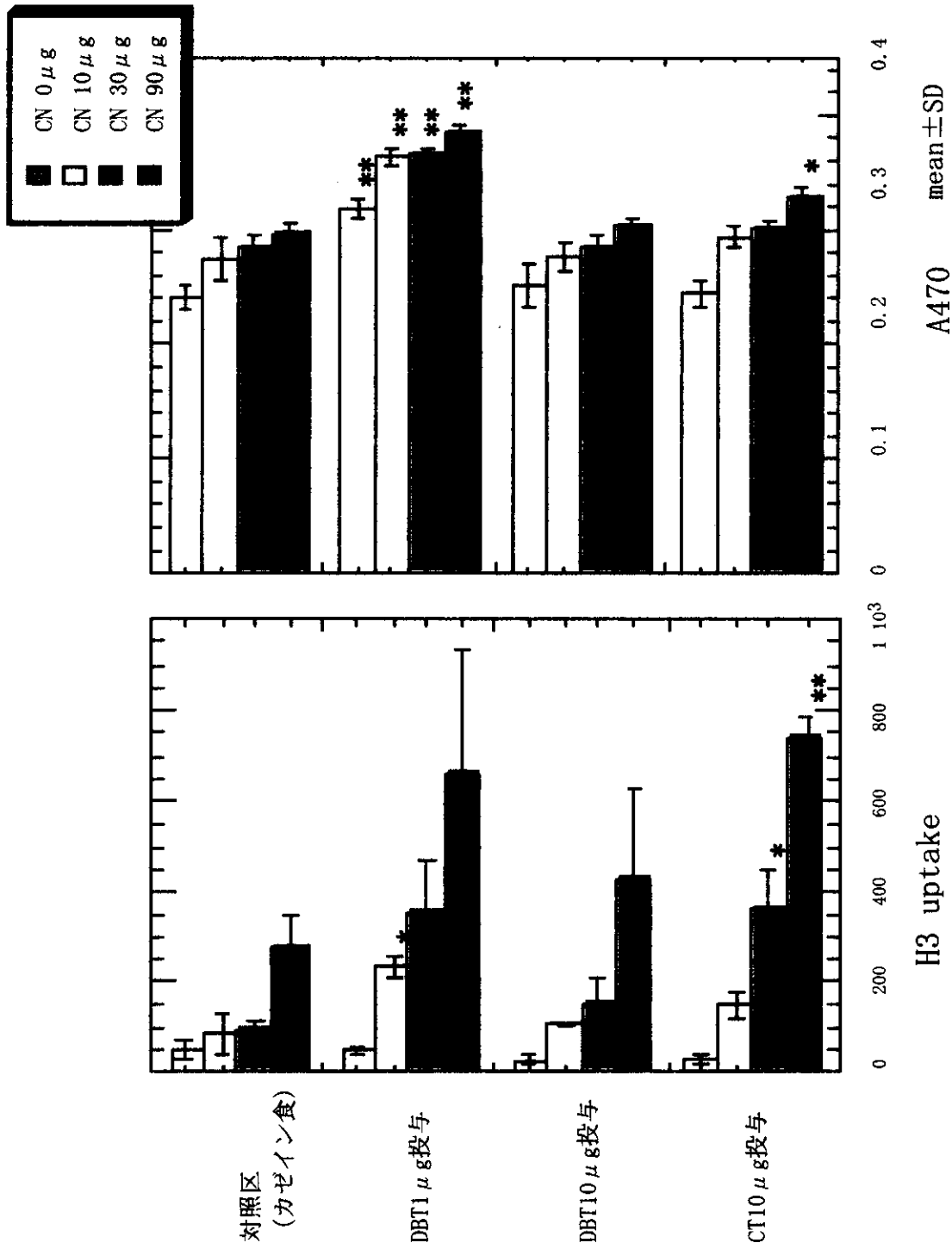


図.4 経口免疫寛容におけるマウスT細胞増殖応答への  
 ジブチルスズの影響

平成 12 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（さい帯血等）分析法の開発と  
その実試料の分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼす  
植物エストロゲンの阻害効果

主任研究者 牧野恒久 東海大学  
分担研究者 中澤裕之 星薬科大学  
研究協力者 中陳静男 星薬科大学

研究要旨

環境由来の化学物質の内在性ステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) に及ぼす影響を解明する目的で、ヒト副腎由来の H295R 細胞を用いてコルチゾール産生に及ぼす環境化学物質の影響を評価するアッセイ法を確立した。このアッセイ系を用いて食餌として多量に摂取する可能性がある植物エストロゲンであるフラボン及びイソフラボンの影響を検討した結果 6-hydroxyflavone, 4'-hydroxyflavone, apigenin, daidzein, genistein, biochanin A 及び formononetin が H295R 細胞の産生するコルチゾール産生を阻害した。さらに産生阻害の作用機序を検討した結果、これら植物エストロゲンのコルチゾール産生阻害作用はエストロゲンレセプターを介する作用ではなく、コルチゾール合成を触媒する酵素のうち、特にヒドロキシステロイド脱水素である  $3\beta$ -HSD タイプ II 及びモノオキシゲナーゼである P450c21 の阻害であることが明らかになった。特に植物エストロゲンは  $3\beta$ -HSD タイプ II を強力に阻害することが明らかとなった。

A. 研究目的

ステロイドホルモンは個体発生、細胞の増殖・分化、性の分化と行動、神経情報伝達の制御など重要な生理機能に関わっており、生体の恒常性を保つためには必須の作用分子である。近年になりステロイドホルモン生合成に関与する酵素群がクローニングされ、それらの転写調節をはじめとするステロイド合成機序の詳細、およびステロイ

ドホルモンの核内受容体が明らかにされたことからステロイドホルモンの作用発現機構が分子レベルで明らかにされつつある。

内分泌かく乱化学物質は「生体の恒常性、生殖、発生、あるいは行動に関与する種々の生体内ホルモンの合成、分泌、体内輸送、結合、ホルモン作用、およびそのクリアランスなどの諸過程を阻害する性質を持つ外来性の物質」

(ホワイトハウスワークショップ, 1997年1月)と定義されており,もしこれら環境由来の内分泌かく乱化学物質の曝露により内在性ホルモンの合成や分泌が阻害された場合,正常な内分泌系がかく乱される可能性が考えられる.特にこれらの化学物質が胎生期から新生仔期の限られた時期に曝露されることで,ステロイドホルモン合成が阻害された場合,生物における発生や生殖において深刻な影響が表れることが懸念される.内分泌攪乱化学物質のうち植物由来のエストロゲン活性物質は植物エストロゲンとも呼ばれており,特に大豆や大豆関連製品には植物エストロゲンの一種,フラボンやイソフラボンが多く含まれている.従来植物エストロゲンはヒトの健康に良い影響を与えると考えられており,特に疫学調査等により,大豆製品を多く摂取する日本やアジアでホルモン依存性の癌である乳癌や前立腺癌発生率が低いと言われている.しかし,これら植物エストロゲンのステロイドホルモン産生に及ぼす阻害効果については検討されていない.

我々は昨年度,内分泌かく乱化学物質の生体内ステロイドホルモン合成に及ぼす影響を解明することに視点をおき,ヒト副腎由来の H295R 細胞を用いて *in vitro* で,ステロイドホルモン合成阻害を指標にした評価系を確立した.本研究ではステロイドホルモン合成阻害を指標にした評価系を用いて,代表的な植物エストロゲンとして知られるフラボン及びイソフラボンのステロイ

ドホルモン産生に及ぼす阻害効果を検討することとした.

## B. 研究方法

### B-1. 実験材料及び試薬

dibutyryl cAMP およびフラボノイドである 5-hydroxyflavone, 6-hydroxyflavone, 7-Hydroxyflavone, 6-methoxyflavone, 4',5,7-trihydroxyflavone (apigenin), 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone (quercetin), 4'-hydroxyflavone, 7-hydroxy-4'-methoxy-isoflavone (formonnetin) はフナコシ, 4',7-dihydroxyisoflavone-7-glucoside (daidzin), 4',5,7-trihydroxyisoflavone (genistein), 4',7-dihydroxyisoflavone (daidzein), 4',5,7-trihydroxyisoflavone-7-glucoside (genistin), および 5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone (biochanin A) は和光純薬工業より購入した. 上皮増殖因子 (EGF, human recombinant) はフナコシより購入した. 放射能標識 [4-<sup>14</sup>C]ステロイドである cholesterol (1887MBq/mmol), dehydro-epiandrosterone (2.05GBq/mmol), progesterone (2.05GBq/mmol) および deoxycorticosterone (2.22GBq/mmol) はいずれも New England Nuclear 社製であり,日本ラジオアイソトープ協会から購入した. 各種標準ステロイド, NAD<sup>+</sup>, NADPH, glucose 6-phosphate および glucose 6-phosphate dehydrogenase は Sigma-Aldrich Japan から購入した. アドレノドキシンは Kimura

*et al.*<sup>1)</sup>の報告に従いウシ副腎より精製した。

その他の試薬は市販の分析用標準品および特級を用いた。

## B-2. 細胞培養

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞は J. Ian Mason 博士 (University of Edinburgh, Royal Infirmary of Edinburgh, Edinburgh, Scotland) より供与された。培地として insulin (6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), transferrin (6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), selenium (6.25  $\text{ng}/\text{mL}$ ), および linoleic acid (5.35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を含む D-MEM/F-12 medium (1:1 mixture of Dulbecco's Modified Eagle's and Ham's F-12 Medium) に、更に 1% ITS Plus (Collaborative Research, Bedford, MA), 2% Ultrose G (Sepracore, France) および抗生物質 (penicillin: 50 IU/ml と streptomycin: 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加えた培養液を使用した。細胞は 75  $\text{cm}^2$  flasks を使用し、5%  $\text{CO}_2$  - 95% air の気相中 37  $^\circ\text{C}$  で培養を行い、継代した。必要に応じて 24-well plate にサブカルチャーして実験に使用した。

## B-3. H295R 細胞のステロイド産生の誘導と cortisol の分析

24-well plate にサブカルチャーした H295R 細胞は、80% コンフルエントの状態に 1% ITS Plus, 0.01% bovine serum albumin (bovuminar®: Intergen) および抗生物質を含む D-MEM/F-12 培養液に交換し 24 時間培養後、同様の組成からなる新しいメジウム (0.5 mL) と置き換えた。次に、検体のステロイド産生に対する影響を検

討するため、エタノールあるいはメタノールに溶解した検体を加えた。それと同時に細胞のステロイド産生を誘導する目的で dibutyryl cyclic AMP (1mM) を加え更に一定時間 (24 時間あるいは 48 時間) 培養した。なお、メジウム中のエタノールあるいはメタノール等の溶媒は最終濃度 1.0% (v/v) を越えないこととした。この濃度では細胞のコルチゾール産生には影響を及ぼさないことを確認した。検体および dibutyryl cyclic AMP を添加した一定時間後に培養液中に分泌された cortisol はラジオイムノアッセイ法による測定キット (DPC cortisol kit, Diagnostic Product Corporation) を用いその濃度を測定した。食品や食品容器包装等に関連する化学物質の細胞に対する毒性を評価するために検体処理後に CytoTox96 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega Corp.) を用いて H295R 細胞から逸脱する LDH 活性を測定すると共に、well 中の細胞数を測定した。また、ウェルに付着している細胞数を測定する簡便な方法として、well 中の付着細胞を phosphate buffered saline で良く洗浄後、NaCl (150mM), sodium dodecyl sulfate (SDS, 1%), EGTA (5 mM),  $\text{MgCl}_2$  (0.5mM),  $\text{MnCl}_2$  (0.5mM) および phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 0.2mM) を含む Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4) を用いて溶解して全蛋白質量を測定した。蛋白質量の測定は BCA assay キット (Pierce Chemical Co.) を用いて測定した。