

重金属類の母胎への暴露調査及び細胞損傷影響

55 例の生体試料で重金属類 (Sn, Cd, Cu, Pb) を測定した：鉛の母体血中では平均値は 16.9 ppb (0.7 ppb~39.9 ppb) で、さい帯血では、平均値は 12.0 ppb (0.5 ppb~33.8 ppb) ppb であった。カドミウムでは、母体血で平均値は 1.63 ppb (0.45 ppb~4.70 ppb)、さい帯血で平均値は 0.79 ppb (0.31 ppb~1.82 ppb) であった。銅の母体血中の濃度は平均値 1212 ppb、さい帯血の平均値 506 ppb であった。スズの母体血中の平均濃度は 15.6 ppb、さい帯血の平均値は 14.5 ppb であった。いずれの重金属類の濃度平均値はこれまでの成人における測定値に比べ、同範囲内かあるいはそれよりも低い数値であった。母体血とさい帯血の比較では、いずれの重金属でもさい帯血の濃度は母体血に比べて同程度か低い傾向を示した。

活性酸素消去酵素のカタラーゼの測定値は、母体血の平均値が 356 U/mg (245~502) を示し、さい帯血での平均は 364 U/mg であった。また、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の活性を測定した結果、母体血では平均値が 1.43 U/mgHb (0.93~1.82) を示し、さい帯血での平均は 1.19 U/mg で、母体血の方が高い傾向を示した。各重金属濃度との相関は明瞭ではない。DNA 酸化の指標となる 8-oxodeoxy-guanosine の量をニューロケムにて測定したが、いずれも検出限界以下であった。

アジピン酸ジエチルヘキシルの生体影響について

T47D 細胞の E-SCREEN Assay により、DEHA は非常に弱いながらもエストロゲン様活性がみられた。この活性はエストロゲンレセプターアンタゴニストによって抑制されエストロジェ

ンレセプターを介した作用であることが明らかになった。

DEHA 投与したマウスから生まれた仔マウスの体重は出生後離乳まで投与群とコントロール群とに差はみられず、メスの子宮重量においても、変化はみられなかった。しかし、オスの精巣は投与群で有意に小さくなった。また、胸腺重量は投与群で変化はなかったものの、脾臓は投与群で大きくなる傾向がみられた。脾臓及び胸腺についてリンパ球サブセットの解析では特に変化はみられなかった。さらに DEHA の遅延型過敏症反応への影響では：DEHA 投与群は反応増強の傾向が明らかになった。胸腺重量、脾臓重量は、変化がみられなかったが、胸腺のリンパ球サブセットは、投与群で CD4⁺CD8⁺ダブルポジティブ細胞が増加し、CD4⁺CD8⁻ダブルネガティブ細胞が減少し、CD4⁺CD8⁺シングルポジティブ細胞が減少する傾向があった。また、脾臓においては、CD3⁺CD4⁺細胞が増加し、CD19⁺細胞が減少する傾向があった。以上、DEHA は、フタル酸エステル類同様に精巣毒性の可能性、さらに、免疫系に影響を及ぼす可能性もあると考えられる。したがって、DEHP の代替物質として DEHA を用いることには、さらに詳細な検討が必要と思われる。

DEHP の生殖系への影響

DEHP 最終投与日から 11 日目に、精巣重量及び SHC の減少が観察された。組織切片において、精細管内に(多核)巨細胞が観察され、精母細胞から減数分裂を経て、精子細胞へ分化する段階に、DEHP が影響を及ぼすことが推測された。さらに 56 日目の観察において、Middle-dose、High-dose 群で SHC が減少し、組織切片上に、精細管間隙の拡大が生じた。これらの結果から、DEHP は精巣の精母細胞に影響を及ぼすことより、精子形成を阻害すると推測される。又、この障害は Low-dose 群では一時的な影響であるが、

Middle-dose 及び High-dose 群では、精細管内の幹細胞にも影響し、精巣機能を障害することが推測された。

さらに、母動物(F0)に対する影響は観察されなかったが、出生仔(F1)の生後 4 日生存率が DEHP 投与により低下した。離乳にあたる生後 3 週目、雄出生仔(F1)の精巣重量において大きな影響は観察されなかったが、High-dose 群の精巣組織切片で、一部、精細管内に空胞化が観察された。又、性成熟に至る生後 9 週目の観察では、High-dose 投与群において、雄仔マウス精巣の SHC が有意に減少し、組織切片の観察により、一部、精細管内に空胞化が観察された。これらの結果より、DEHP が妊娠中の精巣器官形成期に暴露した場合、次世代の雄性生殖に影響を及ぼすことが判明した。又、この影響は性成熟する生後 9 週においても観察されたことより、生殖能に影響を与えることが推測される。

2001 年、FDA は、DEHP の安全性について設定した、Tolerable Intake(TI) value(患者がある一定期間に DEHP に暴露された時に副作用を生じないと推定される量)の基準となる動物試験は、いずれも FDA の報告から考慮した DEHP 摂取量の 1000 倍以上とはるかに高い値での影響であり、安全性評価に対する再検討が必要である。

有機スズ化合物のステロイドホルモン産生に及ぼすリスクについて

メチルスズである methyltin trichloride、dimethyltin dichloride 及び trimethyltin chloride の H295R 細胞コルチゾール産生に及ぼす影響は、Trimethyltin chloride 10 μM で有意なコルチゾール産生の低下が見られたが、LDH 活性測定より、細胞毒性によるものと考えられた。ブチルスズでは：DBT 1.0、10 μM でコルチゾール産生が有意に低下した。TBT 0.56、1.0 及び 10 μM において、更に TBT0 0.3、0.56、1.0

及び 10 μM の曝露においても同様であった。MBT 及び tetrabutyltin では有意な影響は認められなかった。その他、オクチルスズ (Diocetyl tin dichloride、trioctyltin chloride)、フェニルスズ (MPT、DPT、TPT、tetraphenyltin) を含めた 4 グループの有機スズのうち、H295R 細胞コルチゾール産生への阻害は、10 μM の曝露による影響は検体の細胞毒性のため正しく評価されていないと思われる 0.3 - 1.0 μM の曝露範囲で TBT0、TBT 及び DBT は H295R 細胞コルチゾール産生を阻害し、特に TBT0 はコルチゾール産生を最も強く阻害した。しかし、MBT 及び tetrabutyltin はコルチゾール産生に何ら影響を及ぼさなかった。

以上 H295R 細胞のコルチゾール産生を顕著に阻害したブチルスズ化合物、TBT0、DBT 及び TBT の P450scc、 3β -HSD II、P450c17、P450c21 及び P45011 β のステロイド合成に関与する酵素に対する阻害作用を検討した：TBT0、TBT 及び DBT の 1.0 μM 曝露により P450c21 が阻害された。尚、1.0 μM の曝露ではこれらの有機スズに毒性は認められない。TBT0 の 1.0 μM 曝露では P45011 β も阻害した。また、TBT0、TBT 及び DBT の 12.5 μM の曝露では P450c21 のみならず P450c17 や P45011 β も阻害された。一方、H295R 細胞のコルチゾール産生の阻害に影響を及ぼさなかった MBT や tetrabutyltin はいずれのステロイド合成酵素も阻害しなかった。

一方、ブタ精巣ライディッヒ細胞のテストステロン産生に及ぼす影響では：DBT では、hCG の刺激では 0.1 μM 以上の濃度で、cAMP の刺激では 0.03 μM 以上の濃度でテストステロン産生が有意に低下した。TBT では、0.03 μM 以上の濃度において、hCG あるいは cAMP で誘導したいずれのテストステロン産生も有意に低下させた。TBT も DBT と同様 0.3 μM 以上で細胞外に逸脱す

る LDH 活性で示した細胞毒性がわずかに認められた。TPT による曝露の場合も 0.03 μM 以上の濃度において、テストステロン産生が有意に低下した。TPT 曝露により細胞毒性も認められ、0.1 μM 以上の濃度で細胞外に逸脱する LDH 活性の上昇傾向が認められた。

習慣流産患者における内分泌かく乱物質

習慣流産患者および対照の背景と BPA、PCBs、HCB、DDE の測定値との関連を検討し、BPA は習慣流産で高い傾向にあった (NS) が、健常者の Mean+2SD (1.63 ng/ml) を cut off としたとき異常高値を示す症例は患者群で 9 人、コントロールで 0 人であった ($P=0.00032$)。患者群において BPA、PCB、HCB、DDE の測定値と NK 細胞活性、プロゲステロン値、プロラクチン値には相関は認められなかった。また、抗核抗体の有無、甲状腺機能低下の有無、 $P<10\text{ng/ml}$ 以下を黄体機能不全 (LPD) と定義した時の LPD 有無、高プロラクチン血症の有無との関係についても関係は認められなかった。一方、BPA 値との関連を検討したところ、BPA 異常値を持つ患者は LPD が有意に高頻度に認められた。

妊婦の母体血液 (平均分娩週数 37 週)、臍帯血、羊水における測定では、PCBs、DDE は妊娠末期において非妊時の濃度と有意差がなかったが、BPA、HCB は妊娠末期に高濃度であった。HCB については脂質あたりの濃度に換算すると非妊時との差は認めないため、血中の脂質量が妊娠中に増加したためと思われた。PCB、HCB、DDE、BPA ともに臍帯血、羊水では母体血よりも低濃度となっていることが確認された。

胎児・胎盤特異的遺伝子発現への内分泌かく乱化学物質影響

胎盤の灌流システム確立には困難を極め、精巣についても年度内でのシステムの確立には至らなかった。子宮については、灌流システムの

確立に成功した。マイクロゾームの活性解析の結果、母体側の子宮組織に UGT 活性が認められたが、胎児側胎盤ではほとんど検出されなかった。また、ウェスタンブロットティングにおいても UGT1A6 が子宮組織で検出された。UGT2B1 についても同様であった。グルクロン酸抱合体を分解してもとの薬物に戻す酵素である β -グルクロニダーゼもまた、母体側子宮組織で活性が認められ、それよりは弱い、胎児側胎盤でも活性が検出された。また、BaP の胎盤形成および胎児発生への影響は、BaP 投与群で用量依存的に新生児の発育に遅延がみられた。妊娠 8.5 日目に採取した子宮・胎盤組織を解析した結果、胎盤の海綿状栄養膜細胞と呼ばれる分化栄養膜細胞の数が、BaP 用量依存的に減少している像がみられた。また、BaP によって誘導されることが知られている CYP1a1 遺伝子の発現が、母体脱落膜組織、および、胎児において認められた。さらに、TS 細胞では、BaP の受容体である AhR が未分化・分化状態に関係なく発現しており、常に BaP に対する感受性はあると考えられた。しかし、BaP による CYP1a1 の発現誘導は、分化 TS 細胞のみで起こることが判明した。また、BaP 存在下においても、TS 細胞の増殖や分化に顕著な差はなく、特に、in vivo への投与実験で観察されたような海綿状栄養膜細胞の現象も起こらなかった。

正常子宮内膜間質細胞等を用いた内分泌かく乱化学物質の細胞特異的増殖促進効果

乳癌細胞由来 MCF-7 細胞では E2 の投与により 10^{-9} M をピークに細胞増殖促進作用が認められた。p-N、Genistein では 10^{-7} M、BBP、Dizein は、 10^{-6} M、DEHP、BPA では 10^{-5} M をピークに細胞増殖が亢進した。一方、子宮内膜由来 HHUA 細胞の場合、E2 の投与では、 10^{-9} M をピークに細胞増殖の促進が認められた。DEHP では 10^{-5} M、

p-N、BBP、Dizein、Genistein では 10^{-7} M をピークに増殖促進効果を認めた。さらに、ヒト正常子宮内膜由来間質細胞でも同様の検討を行った。その結果 E2 の投与により、 10^{-8} M をピークとする細胞増殖を認めた。しかしながら BSA、DEHP の投与では、MCF-7 や HHUA 細胞で認められたような有意な細胞増殖効果は認められなかった。

E. 結論

ディスポーザブル腹水採取器具の開発

DEHP のコンタミがなく、安全性と実使用に問題ない腹水採取器具の設定ができた。この結果、本研究班に必要な生体試料採取器具と保存容器の設定が終了した。

ノニルフェノール (NP) 及びオクチルフェノール (OP) の分析法開発と生体試料の測定

LC-MS を用いた OP、NP の選択的且つ高感度な分析法を構築した。本法の検出限界は血液試料中濃度として 4-NP は 1 ng/mL、4-*t*-OP、4-*n*-OP 及び 4-*n*-NP は 0.1 ng/mL、尿試料中にある場合は、4-NP は 0.1 ng/mL、4-*t*-OP、4-*n*-OP 及び 4-*n*-NP は 0.01 ng/mL であった。ボランティアによる経口投与の結果、OP、NP は速やかに尿中に排泄され、その殆どが抱合体であった。さい帯血、母体血、腹水、尿等計 35 検体を分析した結果、試料中の NP、OP 濃度は、いずれも検出限界以下であった。

多環芳香族炭化水素類 (PAHs) 及びその代謝物のヒト生体試料における分析

- ・ 2-OHF について、分析法の開発に成功した。この分析法をヒト尿試料に適用し、1-OHP も同時測定した。喫煙者の尿中 2-OHF 及び 1-OHP 濃度はより有意に高かった。PAHs の摂取により、生体内でエストロゲン活性

を有する代謝物が生成し、尿中に排泄されていることが明らかとなった。

- ・ ヒト毛髪中に PAHs が蓄積されることが明らかとなった。喫煙による PAHs 濃度への影響は観察されなかったが長期的な PAHs 曝露の指標になると考えられた。
- ・ ヒト母乳中の PAHs の前処理法を確立し、母乳中に PAHs が存在することが明らかとなった。乳幼児への影響は問題となることから、例数を増やして継続的にモニタリングを行う必要があると考えられた。

ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) のヒト生体試料分析

アイソトープ希釈法および GC/HRMS を用いるヒト生体試料中 PBDEs (3-7 臭素化体) の高精度分析法を開発し、我が国における母乳汚染の現状および大阪府における母乳汚染の経年変化を明らかにした。我が国における現在の平均的母乳中 PBDEs 濃度は脂肪あたり数 ppb であり、海外の報告値と同程度のレベルであった。また、蓄積性の高い低臭素化物が自主規制される前の期間 (1970 年代-80 年代後半) では PBDEs 濃度の経年的上昇が認められたが、以降は特に著しく上昇することなく 1-2 ppb 前後で推移していることから、我が国における母乳汚染は徐々に収束の方向に向かっていると期待される。

母乳中ビスフェノール A (BPA) の高感度 HPLC-蛍光定量法の開発

- ・ 市販乳製品中 BPA の定量: 前回確立した分析法を用いて、市販乳製品 7 検体中の BPA 濃度を測定したところ、その濃度範囲は 0.70 1.20 ppb であった。
- ・ 母乳中 BPA の定量: 前処理法として新たな液-液抽出法を検討し、0.5 5.0 ppb の範囲で良好な直線性を与える ($r=0.999$) 検量線を得た。この方法による BPA の検出下限 ($S/N=3$)

は 0.20 ppb であった。

- ・ 母乳試料 8 検体中の BPA 濃度は平均値±SD で 0.64±0.12 ppb であった。
- ・ 同一個人より得られた妊婦血清(母体血及びさい帯血)と母乳中 BPA 濃度 (n=6) との相関性を調べた結果、さい帯血-母乳間で比較的高い相関が観測された。

クロルデン関連物質及びヘキサクロロベンゼン(HCB)の人体暴露の分析

一般成人 189 人からの血清試料を分析したところ、93.7%の人から *trans*-ノナクロル (0.03 1.65 ppb) が、90.5%から HCB (0.02 2.20 ppb) が、また、43.4%の人からは *cis*-ノナクロル (0.03 0.44 ppb) が検出された。また、ごく少数からはオキシクロルデン (2 人、0.24、0.56 ppb) や *trans*-クロルデン (1 人、0.04 ppb) も検出された。検出された CLDs のうち、*trans*-ノナクロル濃度は、年齢をその中央値 (41 才) を用いて中央値未満と以上の二階層に分けて比較したところ、高年齢層の人の血中 *trans*-ノナクロル濃度は、低年齢層の人と比べ有意に高かった ($p=0.006$)。また、男性の方が女性よりも有意に高かった ($p=0.001$)。一方、年齢の低い階層において、魚介類の摂取日数が一週間に 5 日以上の方では、2 日以内及び 3 4 日の階層の人と比べ、有意に血中 *trans*-ノナクロル濃度が高かった ($p<0.05$)。検出された HCB について、CLDs と同様な解析を実施したところ、年齢の高い人のほうが血中 HCB 濃度が有意に高かった ($p=0.000$)。

パラベン類によるヒト暴露の研究

臍帯血からパラベン類が検出される原因調査のため、産院で使用する医療用品を中心にパラベン類の実態調査を行い、医療用品を用いたときの生体内の挙動について検討を行った。産院で使用する医療用品の中で浣腸液及び局部

麻酔剤にパラベン類が含まれており、1 回の使用あたり 4~20mg の摂取量と推定された。ラットを用いた局部麻酔剤の注入実験によりラット血中メチルパラベン半減期 8.5 分であった。また、ラットを用いたパラベン類 6 種を含む浣腸液の実験で、メチルパラベンが最も高濃度に検出されたが、分解の遅いパラベンほど高濃度に検出されたと考えられた。

ブチルスズ化合物の生体試料分析に関する研究

ブチルスズ化合物の人体暴露の調査を目的として、毛髪及び妊婦生体試料を対象とした。その結果、毛髪にブチルスズ化合物が認められた。妊婦生体試料の分析から母体側から胎盤を通過してブチルスズ化合物が胎児側に移行している可能性が示唆された。また、母乳から乳児への暴露の可能性が示唆された。

2. 生体への影響と作用機序

有機スズ化合物の経口免疫寛容への影響

実験的経口トレランスを誘導したマウスの抗原特異的免疫応答への DBTC および TBTC の影響を抗体産生能および脾臓細胞増殖について検討を行い、DBT および TBT が引き起こす過剰な免疫応答が経口トレランスを破綻することが示唆された。

重金属類の母胎への暴露調査及び細胞損傷影響

母体末梢血と胎児さい帯血における重金属濃度はいずれにおいても個体間でばらつきがあり、この差異が食生活や住環境を含むどのような要因によるかは今後の調査が必要である。母体と胎児の相関は見られたが、母体血に比べてさい帯血では低い傾向を示した。活性酸素消去酵素のカタラーゼ、SOD 活性は、個体差が認められ、SOD 活性は母体血の方が高い傾向を示した。特定の重金属の濃度との相関は認められ

なかった。活性酸素とタンパク質・脂質の酸化状態等を明らかにして、これらの作用機序や他の化学物質との相加相乗効果により DNA・遺伝子への障害が生殖腺の発生、分化等に影響を及ぼし内分泌かく乱作用を発現する可能性についてさらに検討していきたいと考える。

アジピン酸ジエチルヘキシルの生体影響について

DEHA は、*in vitro* の研究より、エストロゲン様作用が検出された。また、DEHA を投与したマウスから生まれた仔において、精巣重量の減少、脾臓重量の増加が見られた。さらに、DEHA を投与したマウスの胸腺及び脾臓の構成細胞の比率に変化を生じさせ、遅延型過敏症反応を強めた。

DEHP の生殖系への影響

本研究において、PVC 製医療用具から溶出する DEHP のヒト暴露量において雄性生殖へ影響を及ぼすことが危惧された。今後、PVC 製医療用具の使用にあたり、DEHP 代替物質の探索や可塑剤の溶出を抑制した新規医療用具の研究及び開発が必要である。

有機スズ化合物のステロイドホルモン産生に及ぼすリスクについて

内分泌かく乱化学物質のステロイドホルモン産生に及ぼす有機スズ化合物の影響を解明するため、副腎由来の H295R 細胞のコルチゾール産生及び精巣ライディッヒ細胞のテストステロン産生に及ぼすメチルスズ化合物、ブチルスズ化合物、オクチルスズ化合物及びフェニルスズ化合物、計 15 種の影響を検討した。その結果、TBT、TBT、DBT 及び TPT は 0.3 - 1.0 μM の曝露で H295R 細胞の産生するコルチゾール産生を抑制した。このコルチゾール産生の抑制は、ステロイド合成酵素である P450c21 や P45011 β の阻害が一因と考えられる。一方、精巣ライディッヒ細胞の

テストステロン産生も TBT、DBT 及び TPT の曝露により有意に抑制され、その濃度は更に低く 0.03 μM 程度であることを明らかにした。

習慣流産患者における内分泌かく乱物質

BPA 高値と習慣流産、また、BPA 高値と LPD の存在の関係が示された。今回測定に用いた ELISA 法による BPA 測定値は大豆類に含まれるイソフラボンと交差反応するなど BPA 類似物質を測定している可能性が指摘され、今後他の優れた測定方法によってこの結果を確認する必要がある。ただし BPA は代謝速度が PCB などと比較して早いと、反復する流産の原因であるかどうかは疑問である。また今回の検討では 1 回の採血であり、BPA が患者血中において絶えず高値をとっているか検討する必要がある。個々の症例での高値の原因は現在不明である。また、症例数も 25 例と少なく、習慣流産と内分泌かく乱物質についての報告はまだ少なく、今後の検討が必要と思われた。

胎児・胎盤特異的遺伝子発現への内分泌かく乱化学物質影響

BaP 投与実験では、胎児内でも CYP1a1 の発現誘導が認められ、BaP が直接胎児まで届いていることを、強く示唆した。子宮・胎盤での β -グルクロニダーゼ活性の存在をもあわせて考えると、胎盤は内分泌かく乱物質のバリアーとしては、さほど効率的には機能できないのかもしれない。

BaP の胎盤発生への影響解析では、*in vivo*、*in vitro* の両面から研究を行うことの意義が改めて確認できた。すなわち、TS 細胞への顕著な影響が見られなかったことから、BaP の胎盤形成への影響は、胎盤を構成する栄養膜細胞に対する直接的なものではなく、母体組織への影響を介した二次的なものであるということを示唆することができた点に意義がある。同様の研究を進めてゆくうえで、TS 細胞は有用なシステ

ムである。将来これらの結果をヒトへと外挿するために、ヒト UGT 分子種の単離・同定および基質特異性や発現解析が必要であり、それらが今後の課題である。

正常子宮内膜間質細胞等を用いた内分泌かく乱化学物質の細胞特異的増殖促進効果

MCF-7、HHUA 細胞における検討では、反応の程度において若干の相違を認めたものの、全ての被検物質で濃度依存性の細胞増殖促進効果を認めた。今回は子宮内膜間質細胞を用いた正常細胞での検討でも、濃度依存性に移る事を認めた。すなわち細胞の特性により感受性が異なり、そのことが物質の生体内での反応機序の多様性を示唆するものと考えた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Chetianukornkul, A. Toriba, R. Kizu, T. Makino, H. Nakazawa, K. Hayakawa, Determination of 1-Hydroxypyrene in Human Urine by HPLC with Fluorescence Detection Using a Deuterated Internal Standard. *J. Chromatogr. A*, in press.
2. A. Toriba, H. Nakamura, T. Chetianukornkul, R. Kizu, T. Makino, H. Nakazawa, T. Yokoi, K. Hayakawa, Determination method of monohydroxybenzo[a]pyrene isomers using column-switching HPLC. *Anal. Biochem.*, submitted.
3. A. Toriba, Y. Kuramae, T. Chetianukornkul, R. Kizu, T. Makino, H. Nakazawa and K. Hayakawa, Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human hair by HPLC with fluorescence detection: A biological monitoring method to evaluate the exposure to PAHs. *Atmos. Environ.*, submitted.
4. Determination of 4-nonylphenol and 4-octylphenol in human serum and urine by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, submitted.
5. Y. Sun, M. Wada, N. Kuroda, K. Hirayama, H. Nakazawa, K. Nakashima, Simultaneous determination of phenolic xenoestrogens by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Sci.*, 17, 697-702 (2001).
6. T. Watanabe, H. Yamamoto, K. Inoue, A. Yamaguchi, Y. Yoshimura, K. Kato, H. Nakazawa, N. Kuroda, K. Nakashima, Development of sensitive high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chloride as a labeling reagent for determination of bisphenol A in plasma sample, *J. Chromatogr. B*, 762, 1-7 (2001).
7. Nakajin, S., Shinoda, S., Ohno, S., Nakazawa, H. and Makino, T.: Effect of phthalate esters and alkylphenols on steroidogenesis in human adrenocortical H295R cells, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 10, 103-110 (2001).
8. Ohno, S., Shinoda, S., Toyoshima, S., Nakazawa, H., Makino, T. and Nakajin, S.: Effects of flavonoid phytochemicals on cortisol production and on activities of steroidogenic enzymes in human adrenocortical H295R cells,

- J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **80**, (2002) in press
9. 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* 235: 422-432, 2001.
 10. H. Inoue, H. Yokota, T. Makino, A. Yuasa and S. Kato. Bisphenol A Glucuronide, a Major Metabolite in Rat Bile after Liver Perfusion. *Drug Metab Dispos* 29: 1084-1087, 2001.
- Sugiura MO, et al. PCBs, DDE and hexachlorobenzen are not associated with recurrent miscarriage. (発表準備中)
- ## 2. 学会発表
1. 村野孝代、和泉俊一郎、鈴木隆弘、松林秀彦、新井正、Shanta F Haque、牧野恒久 (東海大学医学部)、内分泌かく乱物質の細胞増殖におけるエストロゲン受容体の関与についての検討：第 52 回日本産科婦人科学会、4、2000、徳島
 2. 村野孝代、和泉俊一郎、鈴木隆弘、奥脇伸二、内田能安、牧野恒久 (東海大学医学部)、内分泌かく乱物質の作用について、cell line システムと酵母系アッセイシステムでの比較検討：第 73 回日本内分泌学会、6、2000、京都
 3. T Murano, S Izumi, K Sakabe, S F Haque, T Suzuki, H Matsubayasi, S Okuwaki, T Makino, Environmental Endocrine Disruptors in an E-Screen Assay and a Yeast-Based Transcriptional Assay 11th International Congress of Endocrinology (Sydney, Australia. Oct 29- Nov 2, 2000)
 4. T. Murano, S-I. Izumi, H. k. Sakabe, S. F. Haque, M. Onoe, T. Makino. Effect of Environmental Endocrine Disruptors on Cell Proliferation and Estrogen Receptor-Mediated Transcription. 8th World Congress of Gynecological Endocrinology. (Florence, Italy. Dec 6-9, 2000)
 5. Chetianukornkul, A. Toriba, R. Kizu, T. Makino, H. Nakazawa, K. Hayakawa, Determination of 1-Hydroxypyrene in Human Urine by HPLC with Fluorescence Detection Using a Deuterated Internal Standard method. HPLC Kyoto, PW303, September, 2001, Kyoto.
 6. Toriba, T. Chetianukornkul, R. Kizu, H. Oka, T. Makino, H. Nakazawa, K. Hayakawa, Metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) as Biomarkers of Exposure to PAHs in Cigarette Smoke, SETAC/AP Symposium 2001, PB11, November, 2001, Kanazawa.
 7. 阿久津和彦、堀 伸二郎、臭素化ジフェニルエーテルの環境中挙動とその毒性、第4回日本水環境学会シンポジウム講演集, p147, 2001 年 9 月 10・11 日, 北九州.
 8. 阿久津和彦、堀 伸二郎、北川幹也、織田肇、中澤裕之、牧野恒久、母乳中の臭素系難燃剤ポリ臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) 濃度について、日本食品衛生学会第 82 回学術講演会講演要旨集, p39, 2001 年 10 月 25・26 日, 長崎.
 9. 和田光弘、木下由美、孫 艶、黒田直敬、牧

- 野恒久, 中澤裕之, 中島憲一郎, 生体試料中ビスフェノールAの高感度 HPLC 蛍光定量: 第14回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 松島, p143-144 (2001)
10. 黒田直敬, 入江美樹, 和田光弘, 大庭義史, 牧野恒久, 中澤裕之, 中島憲一郎, カラムスイッチング HPLC-蛍光検出による生体試料中ビスフェノール A の定量: 日本分析化学会第50年会, 熊本, p353, 1 (2001)
 11. 寺澤, 月岡, 佐藤, 畑山, 中澤, 牧野: 「パラベン類の血中濃度と皮膚吸収」, 日本環境化学会 10 回環境化学討論会, 56-57 (2001). (2001 年 5 月松山市)
 12. 寺澤, 月岡, 佐藤, 畑山, 中澤, 牧野: 「ヒト血清及び尿中のパラベン類の挙動」, 環境ホルモ学会第4回研究発表会, 391 (2001). (2001 年 12 月つくば市)
 13. 寺澤, 月岡, 佐藤, 畑山, 中澤, 牧野: 「ヒト血清及び尿中の内分泌かく乱化学物質の挙動」, 第17回全国環境研究所交流シンポジウム, 15-1 (2002). (2002 年 2 月つくば市)
 14. 孫田信一, 中川千玲, 武藤宣博, 小野教夫, 杉浦真弓, 鈴森 薫: 重金属類のヒト胎児及び母体における蓄積に関する検討. 日本先天異常学会, 2001.7.4 (横浜)
 15. 加藤未歩, 山崎聖美, マクロファージ系培養細胞における内分泌攪乱化学物質の影響: 第4回日本内分泌攪乱化学物質学会、つくば, 2001. 12. 14-15、研究発表会要旨集, 326, 2001.
 16. 川口研, 山崎聖美, 中澤裕之, アジピン酸ジエチルヘキシル (DEHA) の生体影響: 第4回日本内分泌攪乱化学物質学会、つくば, 2001. 12. 14-15、研究発表会要旨集, 355, 2001.
 17. 小林 直, 佐藤麻紀, 井之上浩一, 吉村吉博, 中澤裕之 (星葉大) 熊坂謙一 (神奈川県衛生研究所) 牧野恒久 (東海大), 「ポリ塩化ビニル製医療用具の安全性評価 (第5報) マウスに対する Di (2-ethylhexyl) phthalate の妊娠期及び性成熟期投与による影響」; 第122 年会日本薬学会 (2002)
 18. 篠田 聡, 大野修司, 豊島 聡, 中澤裕之, 牧野恒久, 中陳静男, ヒト副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール分泌に及ぼす各種フラボノイドの阻害効果: 第74 回日本生化学大会, 2001 年 10 月, 京都
 19. 篠田 聡, 大野修司, 藤巻照久, 中澤裕之, 牧野恒久, 中陳静男, ヒト副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼす各種有機スズ化合物の阻害効果: 第4回環境ホルモ学会研究発表会, 2001 年 12 月, つくば
 20. 中島羊奈子, 佐藤 剛, 大野修司, 中澤裕之, 牧野恒久, 中陳静男, ブタ精巣ライディッヒ細胞初代培養系構築とテストステロン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質のリスク評価への応用: 第4回環境ホルモ学会研究発表会, 2001 年 12 月, つくば
 21. 佐藤 剛, 中島羊奈子, 大野修司, 中澤裕之, 牧野恒久, 中陳静男, ブタ精巣ライディッヒ細胞初代培養系構築とテストステロン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響: 日本薬学会第122 年会, 2002 年 3 月, 千葉
 22. J. Yan, S. Tanaka, M. Oda, J. Ohgane and K. Shiota. Retinoic acid promotes differentiation of trophoblast stem cells to a giant cell fate. 14th International Congress of Developmental Biology (平成13年7月)
 23. 阪本浩和, 横田博, 佐山義克, 湯浅亮 「ラット消化管内における Bisphenol A のグルクロン酸抱合と脱抱合」 第4回日本内分泌

- 攪乱化学物質学会（平成 13 年 12 月）
24. 大道寺智、横田博、井上博紀、加藤清雄、湯浅亮「ノニルフェノール肝蓄積によるエストラジオールの代謝・排泄の攪乱」第 4 回日本内分泌攪乱化学物質学会（平成 13 年 12 月）
 25. H. Inoue, G. Yuuki, H. Yokota, T. Onaga and S. Kato. Bisphenol A Glucuronidation and Absorption in Rat Intestine. 第 4 回日本内分泌攪乱化学物質学会（平成 13 年 12 月）
 26. 牛頭圭介、横田博、斉藤昌之、湯浅亮「PCB 水酸化体のラット肝ミクロゾーム及びUDP-グルクロン酸転移酵素（UGT）分子種によるグルクロン酸抱合」第 4 回日本内分泌攪乱化学物質学会（平成 13 年 12 月）
 27. 村野孝代、和泉俊一郎、鈴木隆弘、松林秀彦、新井正、Shanta F Haque、牧野恒久（東海大学医学部）、内分泌かく乱物質の細胞増殖におけるエストロゲン受容体の関与についての検討：第 52 回日本産科婦人科学会、4、2000、徳島
 28. 村野孝代、和泉俊一郎、鈴木隆弘、奥脇伸二、内田能安、牧野恒久（東海大学医学部）、内分泌かく乱物質の作用について、cell line システムと酵母系アッセイシステムでの比較検討：第 73 回日本内分泌学会、6、2000、京都
 29. T Murano, S Izumi, K Sakabe, S F Haque, T Suzuki, H Matsubayasi, S Okuwaki, T Makino. Environmental Endocrine Disruptors in an E-Screen Assay and a Yeast-Based Transcriptional Assay. 11th International Congress of Endocrinology (Sydney, Australia. Oct 29- Nov 2, 2000)
 30. . T. Murano, S-I. Izumi, H. k. Sakabe, S. F. Haque, M. Onoe, T. Makino. Effect of Environmental Endocrine Disruptors on Cell Proliferation and Estrogen Receptor-Mediated Transcription 8th World Congress of Gynecological Endocrinology. (Florence, Italy. Dec 6-9, 2000)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

平成 13 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

内分泌かく乱物質の作用様式の多様性について

主任研究者 牧野恒久 東海大学
研究協力者 和泉俊一郎 東海大学
岩崎克彦 東海大学
村野孝代 東海大学

研究要旨

内分泌かく乱物質はエストロゲンレセプターを介し、エストロゲン様細胞増殖作用を持つが、それぞれの物質とエストロゲンレセプターとの親和性は一様ではなく、また一部ではレセプターとの直接的な作用が認められない物質も存在するなど、作用機序には多様性が見られる。エストロゲンレセプターのサブタイプ α 、 β の発現割合は臓器により異なるため、臓器により、これら物質の感受性が異なる可能性も示唆される。そこで今回は、異なる臓器由来のエストロゲンレセプター 発現細胞を用い、E-screen assay（エストロゲン依存性細胞増殖効果の評価）を行い、その効果について比較検討した。その結果、同じエストロゲン発現細胞であっても、物質に対する反応は異なる結果を示し、これら化学物質の生体内での反応の多様性が示唆された。

A. 研究目的

近年、内分泌攪乱作用を持つ化学物質が多数報告されているが、それら内分泌攪乱物質の作用機序についてはまだ十分な解明がなされていない。代表的な内分泌攪乱作用のスクリーニングの一つにエストロゲンレセプター発現細胞を用いた E-screen assay があるが、これまでのヒト乳腺細胞由来の MCF-7 に加え、今回は、子宮内膜由来細胞である、HHUA、および、正常子宮内膜間質細胞に対しても、同様

の手法を用い、それぞれの物質投与時の細胞増殖促進効果について比較検討した。

今回実験に用いたヒト正常子宮内膜細胞は、あらかじめ同意の得られた症例の手術標本から入手した。

B. 研究方法

B.1 被検物質

Diethyl- hexil phthalate
Butyl- benzil phthalate
Bisphenol-A
p-Nonylphenol

Dizein

Genistein

B. 2.1 E-screen / WST-1 assay assay

96 穴プレートに細胞 (MCF-7、子宮内
膜間質細胞) 懸濁液を 5000cells/50 μ
l/well ずつ播種し、37°C、5%CO₂ で、24
時間培養する。前培養後、フェノール
レッドフリー、10%Charcoal-dextran
処理 FCS 含有 Medium に交換し、濃度調
整した被検物質を加えさらに 5 日間同
条件で、培養する。培養後 WST-1 assay
(Cell Counting Kit:和光純薬) にて
細胞増殖を評価 (生細胞中で活性をも
つミトコンドリア脱水素酵素の基質で
ある WST-1 を各 Well に 10 μ l ずつ加え
3 時間 37°C にて incubation 後 OD_{450nm} を
測定) する。

B. 2.2 E-screen / Idu assay

細胞増殖効果を Thymidine analogue であ
る Idu (5-Iodo-2-deoxyuridine) の取り
込み (DNA・Idu Labeling and Detection
Kit: TAKARA) により、各 well の細胞増
殖効果について評価した。96 穴プレート
に細胞 (HHUA) 懸濁液を 5000cells/50 μ
l/well ずつ播種し、37°C、5%CO₂ で、24
時間培養する。前培養後、フェノールレ
ッドフリー、10%Charcoal-dextran 処理
FCS 含有 Medium に交換し、濃度調整した
被検物質を加えさらに 24 時間
incubation する。各 well の medium 中に
Idu を加え (終濃度 10 μ M)、24 時間
incubation し、細胞中の DNA に Idu を取
り込ませる。PBS 洗浄、blocking (細胞
の固定と DNA の一本鎖化) 後、抗 Idu 抗
体 (5 μ g/ml、37°C、30min)、ウサギ抗マ
ウス IgG・POD 標識抗体 (37°C、30min)

を反応させる。発色試薬 (TMBZ) を加え、
呈色反応後 OD_{450nm} を測定する。

C. 研究結果

MCF-7 (図 1)

乳癌細胞由来 MCF-7 細胞では E2 の投与
により 10⁻⁹ M をピークに細胞増殖促進作
用が認められた。p-N、Genistein では 10⁻⁷
M、BBP、Dizein は、10⁻⁶ M、DEHP、BPA
では 10⁻⁵ M をピークに細胞増殖が亢進し
た。

HHUA (図 2)

一方、子宮内膜由来 HHUA 細胞の場合、E2
の投与では、10⁻⁹ M をピークに細胞増殖
の促進が認められた。DEHP では 10⁻⁵ M、
p-N、BBP、Dizein、Genistein では 10⁻⁷ M
をピークに増殖促進効果を認めた。

子宮内膜間質細胞 (図 3)

ヒト正常子宮内膜由来間質細胞でも同様
の検討を行った。その結果 E2 の投与によ
り、10⁻⁸ M をピークとする細胞増殖を認
めた。しかしながら BSA、DEHP の投与で
は、MCF-7 や HHUA 細胞で認められたよう
な有意な細胞増殖効果は認められなかつ
た。

D. 考察

MCF-7、HHUA 細胞における検討では、
物質により、反応の程度や濃度において
若干の相違を認めたものの、全ての被検
物質で、濃度依存性の細胞増殖促進効果
を認めた。また今回は子宮内膜組織から
得られた間質細胞を用い、正常細胞での
検討も行ったが、この場合、E2 の添加に
より、HHUA や MCF-7 よりも高濃度である
10⁻⁸ M をピークに濃度依存性の細胞増殖

効果を認めた。一方、BSA や DEHP の添加では、MCF-7 や HHUA 細胞に見られたような有意な細胞増殖の亢進は認められなかった。これらの結果より、異なる組織間もしくは、悪性細胞か正常細胞かの違いにより、細胞の物質に対する感受性が異なり、それぞれ物質の生体内での反応の多様性が示唆された。今回、正常細胞では、間質系細胞の評価のみとなってしまうが、実際のところ悪性、正常細胞の比較のためには、子宮内膜癌細胞に相当する上皮系細胞の評価が必要となる。今回子宮内膜組織から間質細胞と上皮細胞を分離し培養を試みたが、間質細胞に比し増殖能の低い上皮系細胞が必要量採取できなかった事情があり、やむを得ず間質細胞のみの評価となった。今後は培養条件等の再検討を行い、上皮系細胞の評価もぜひ行っていきたい。

F. 研究業績

学会発表

1. 内分泌かく乱物質の細胞増殖におけるエストロゲン受容体の関与についての検討: 村野孝代、和泉俊一郎、鈴木隆弘、松林秀彦、新井正、Shanta F Haque、牧野恒久 (東海大学医学部)、第 52 回日本産科婦人科学会、4、2000、徳島
2. 内分泌かく乱物質の作用について、cell line システムと酵母系アッセイシステムでの比較検討: 村野孝代、和泉俊一郎、鈴木隆弘、奥脇伸二、内田能安、牧野恒久 (東海大学医学部)、第 73 回日本内分泌学会、6、2000、京都
3. Environmental Endocrine Disruptors in an E-Screen Assay and a

Yeast-Based Transcriptional Assay

T Murano, S Izumi, K Sakabe, S F Haque, T Suzuki, H Matsubayasi, S Okuwaki, T Makino

11th International Congress of Endocrinology (Sydney, Australia. Oct 29- Nov 2, 2000)

4. Effect of Environmental Endocrine Disruptors on Cell Proliferation and Estrogen Receptor-Mediated Transcription.

T. Murano, S-I. Izumi, H. k. Sakabe, S. F. Haque, M. Onoe, T. Makino.

8th World Congress of Gynecological Endocrinology.

(Florence, Italy. Dec 6-9, 2000)

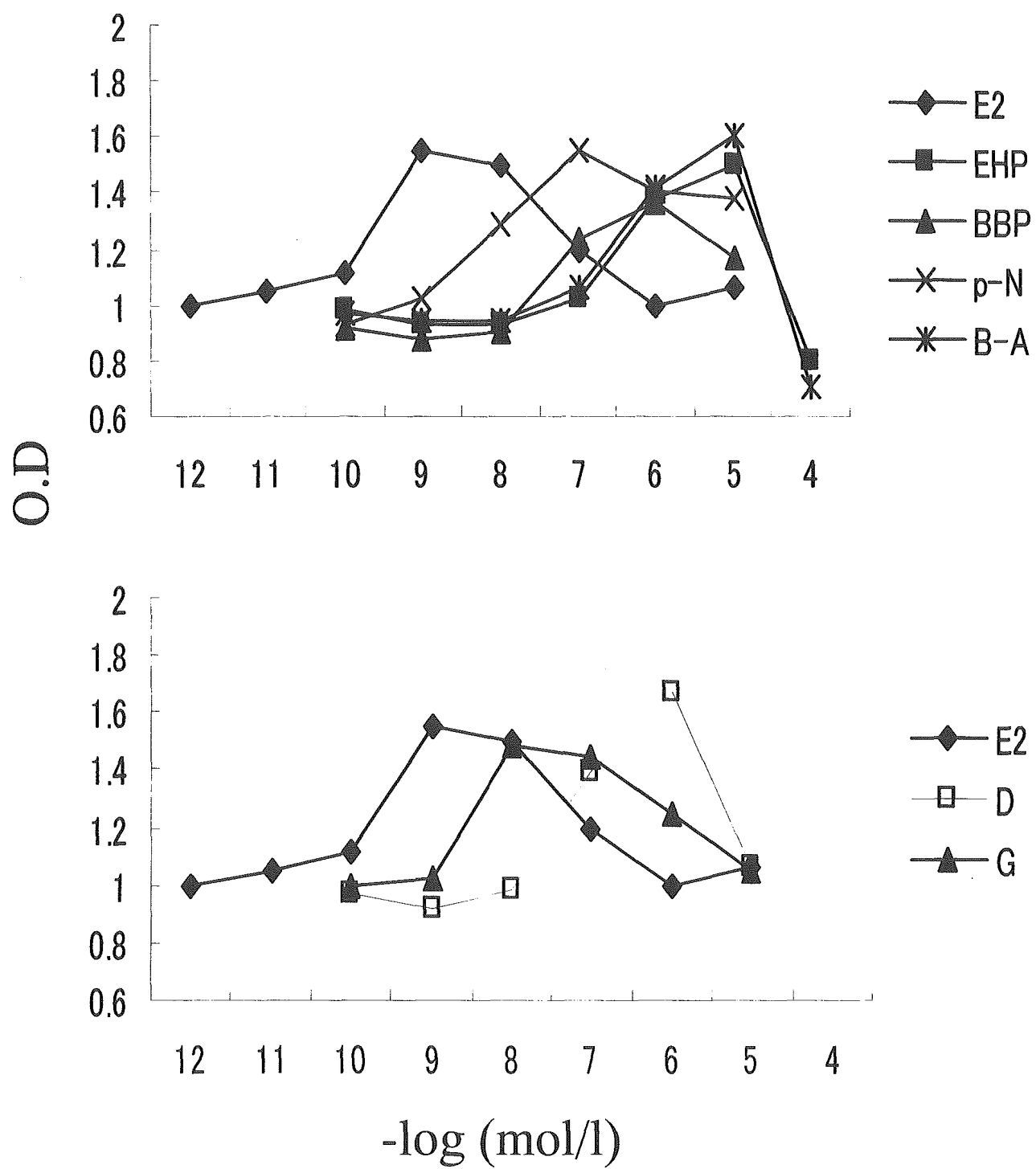


図1. E-screen assay MCF-7細胞

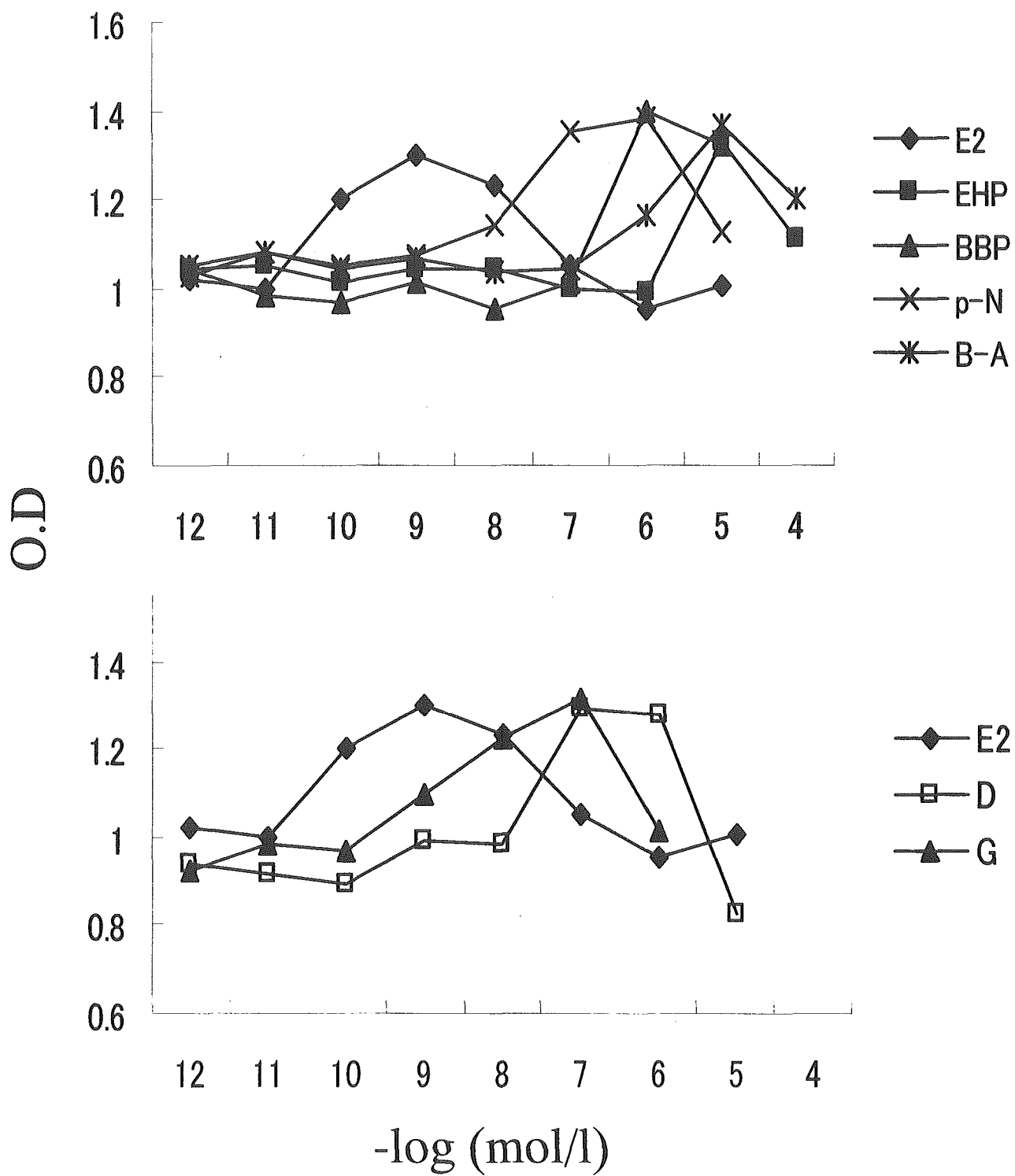


図2.E-screen assay HHUA細胞

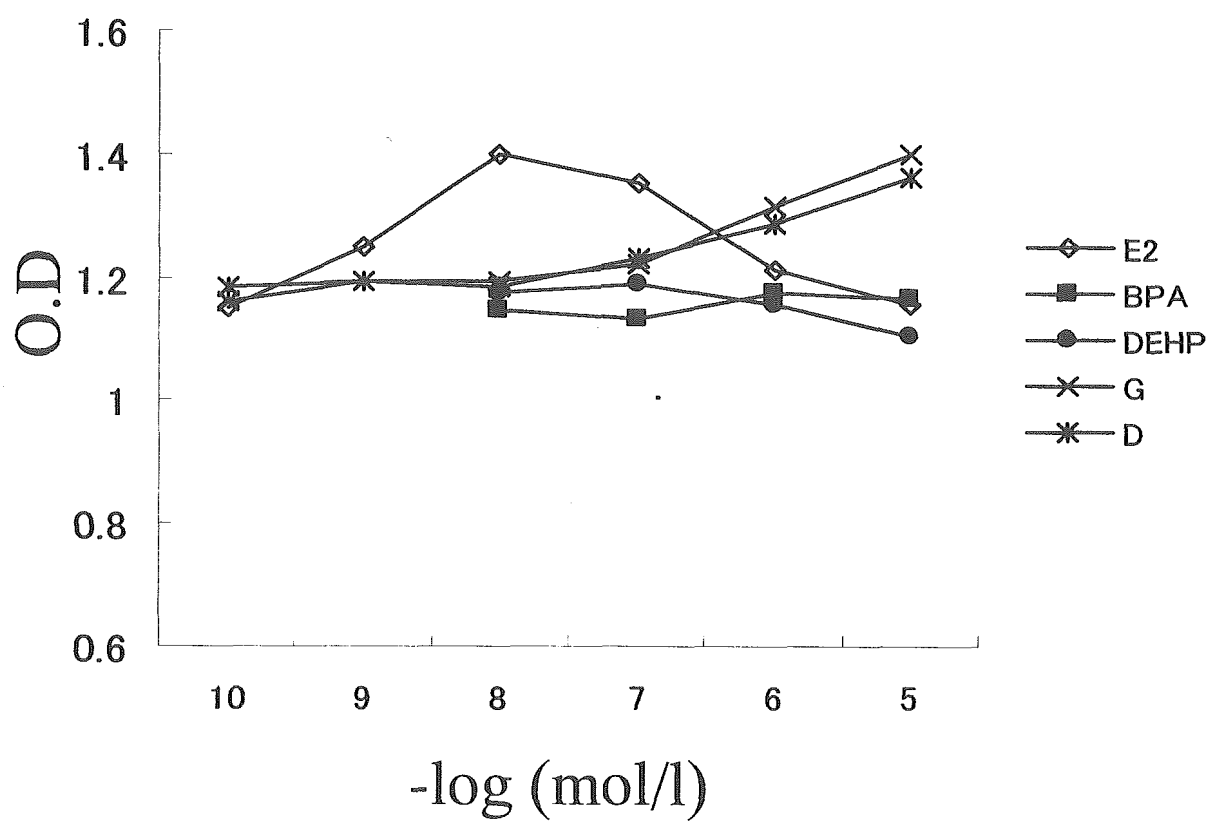


図3. E-screen assay 子宮内膜間質細胞

平成13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

内分泌かく乱化学物質測定用ディスプレイザブル器具の開発に関する研究

主任研究者	牧野恒久	東海大学教授
研究協力者	岩崎克彦	東海大学助教授
	和泉俊一郎	東海大学講師
	益川邦彦	神奈川県衛生研究所所長
	平山クニ	神奈川県衛生研究所
	藤巻照久	神奈川県衛生研究所
	石川健次	テルモ（株）
	中橋敬輔	テルモ（株）

研究要旨

さい帯や腹水などの生体試料中の内分泌かく乱化学物質の暴露量測定を行う当班の研究内容に鑑みて、それらの生体試料を採取、保存する際には測定物質等のコンタミを極力低減させる必要がある。これまでのガラス製に代わり、煩わしい準備の必要もなく、破損やコンタミの心配ないプラスチック製ディスプレイザブル腹水採取器具の開発を行い、Di-2-ethylhexyl phthalate(DEHP)のコンタミの心配がなく、安全性に問題ないことを確認した。

A. 研究目的

本研究班はさい帯や腹水などの生体試料中の内分泌かく乱作用の疑いがある物質の暴露量測定を行うことを目的の一つとしている。その研究内容に鑑みて、それらの生体試料を採取する際には測定物質等のコンタミを極力低減させなければ、高感度分析の意味がなくなってしまう。これまではガラス製の採取器具や保存容器は、洗剤洗浄、アセトン洗浄、200℃加熱、清浄域で徐冷等、非常に複雑な作業でコンタミを低減させて研究に供していた。さらに

各共同研究先に貴重な生体試料を送付する際に、保存容器の破損事故もあり、当研究班の研究に支障が出ることも心配されていた。そこで、それらのガラス製の生体試料採取器具や保存容器に代わり、煩わしい準備の必要もなく、破損やコンタミの心配ないプラスチック製ディスプレイザブル生体試料採取器具および保存容器を開発することが本研究の目的である。

本年度は、昨年度までに設定できなかった腹水採取器具について開発し、Di-2-ethylhexyl phthalate(DEHP)のコ

ンタミレベルの確認と安全性確認を行う。

B. 研究方法

B・1 腹水採取器具の選定

腹水採取器具は、母親の腹部に設けられた検査用の孔に硬質のパイプを挿入し、それと柔軟チューブで接続したシリンジで吸引して腹水を採取する形態を考えた。それらの要求事項を表1にまとめた。また、この器具は体内に一部挿入するので、その部分は医療用具と同等の安全性が必要と考えた。安全性試験はガイドライン試験¹⁾を参考にし、表2に示す試験を行った。

B・2 DEHP 汚染度測定

実際の腹水採取方法を考慮した方法で測定試料調製をした。パイプおよびチューブを通してヘキサンをシリンジに規定量吸引し1分間静置させ、その後静かにチューブ、パイプ越しに排出して測定試料とした。なお、抽出用のヘキサンは関東化学社製フタル酸エステル試験用(18041-79)を用いた。

DEHP 測定は、GC/MS(SIM: Selected Ion Monitoring)により行い、測定装置、測定条件等を表3に示した。

C. 研究結果

C・1 腹水採取器具の設定

表1の要求に従って検討した結果、パイプ部材は医療用具として使用実績のあるポリプロピレンを外径約2.5mm、長さ約30cmの中空材に成形する。チューブ部材は医療用具の同等の安全性のある柔軟ポリエチレンを約30cmに成

形する。シリンジはテルモ社の50mLカテーテルチップタイプとした。それらをはめ込むことで組立て、包装をして定法によるエチレンオキサイドガス(EOG)滅菌をした。

C・2 DEHP 汚染度測定結果

先に述べた方法で測定した結果、いずれも定量下限値の10ppb以下であった。

なお、定量下限は試薬ブランクを5回繰り返して測定し、平均値及び標準偏差を求め、標準偏差 σ の10倍を定量下限とした²⁾。測定値の10 σ が9.7ppbであったので本研究の定量下限を10ppbとした。

D. 考察

設定した腹水採取器具は要求事項に合致し、実際の使用に耐えることを確認した。また、安全性試験も表2に示すように全て適合または陰性であり、安全性に問題はないと考える。

実使用のヘキサン抽出条件でDEHP溶出量が定量下限の10ppbであったため、DEHPのコンタミ影響はないと考える。

E. 結論

DEHPのコンタミがなく、安全性と実使用に問題ない腹水採取器具の設定ができた。この結果、本研究班に必要な生体試料採取器具と保存容器の設定が終了した。

F. 文献

1) 薬機第99号(平成7年6月27日

付)「医療用具の製造(輸入)承認申請に必要な生物学的試験のガイドラインについて」

- 2) 日本工業標準調査会：排ガス中のダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定法、JIS K0311、p. 39 (1999)

G. 知的財産の出願・登録状況

なし

H. 健康危険情報

各施設内規定に基づき適性運用。

表1 腹水採取器具の要求事項

部材名	要求事項
パイプ部材	外径約 2.5mm、長さ約 30cm、硬質な中空状
チューブ部材	長さ約 30cm、柔軟な中空状
シリンジ	容量 50mL、接続できること

表2 腹水採取器具の安全性試験結果

試験項目	試験基準	試験試料	試験結果
細胞毒性試験	ガイドライン試験	パイプ原料	適合
皮膚感作性試験	ガイドライン試験	パイプ原料	陰性
皮内反応試験	ASTM F749-87	パイプ原料	陰性
溶血毒性試験	ガイドライン試験	パイプ原料	陰性
発熱性試験	ガイドライン試験	パイプ原料	陰性
溶出物試験	滅菌済み輸液セット基準	パイプ原料	適合
溶出物試験	滅菌済み輸液セット基準	チューブ部材	適合
無菌試験	13 改日本薬局方	無菌試験	陰性

試験: テルモ(株)生物評価センターおよび物理化学評価センター

表3 GC/MS(SIM)法によるDEHP測定条件

項 目	測 定 条 件
測定装置 MS	日本電子製 Automass20
検出方法	選択イオン検出法(SIM)
イオン源及びインターフェイス温度	200°C、250°C
イオン化及びイオン化電圧	EI、70eV
モニターイオン	149
測定装置 GC	HP 製 HP5890 SERIES II
カラム	J&W 製 DB-5MS(0.25mm×30m,df0.25um)
カラム温度	50°C(1min)-20°C/min-280°C(10min)
注入口温度	220°C
注入法	スプリットレス
注入量	2 µL
キャリアガス	ヘリウム 1.2mL/min