

た。

今回、測定対象としなかった無機スズ、モノオクチルスズ及びモノフェニルスズと思われるピークがクロマトグラム上、多くの試料から認められたため今後、これらの物質についても検討を進める必要があると考えられた。

E. 結論

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分析法の検討を行った。その結果、毛髪試料の分析結果からブチルスズ化合物による生体暴露が認められた。妊婦の生体試料の分析から母体側から胎児側に胎盤を通過してブチルスズ化合物が移行している可能性が示唆された。また、母乳中からブチルスズ化合物の検出が認められたことから母乳から乳児への暴露の可能性が示唆された。

F. 研究発表

なし

G. 知的的財産権の出願・登録状況

なし

H. 健康危険情報

なし

Table 1 毛髪試料中のブチルスズ化合物分析結果

(ug/g)							
No.	MBT	DBT	TBT	Total	Sex	Age	Address
1	0.971	0.41	nd	1.38	F	39	Kanagawa
2	0.110	0.01	nd	0.12	F	27	Kanagawa
3	0.349	0.03	0.074	0.45	F	32	Kanagawa
4	0.235	0.02	nd	0.26	F	32	Kanagawa
5	0.100	0.02	nd	0.12	F	21	Tokyo
6	nd	0.02	nd	0.02	F	60	Kanagawa
7	0.020	0.03	nd	0.05	F	21	Tiba
8	0.119	0.04	nd	0.16	F	21	Tokyo
9	0.385	0.22	nd	0.61	M	19	Tokyo
10	0.978	0.42	nd	1.40	F	41	Hokkaido
11	0.067	0.01	nd	0.08	F	21	Tokyo
12	nd	nd	nd	nd	F	22	Tokyo
13	0.025	nd	nd	0.03	F	48	Tochigi
14	0.013	0.01	nd	0.02	F	21	Tokyo
15	0.028	nd	nd	0.03	F	21	Tokyo
16	0.049	0.01	nd	0.06	F	21	Tokyo
17	0.151	0.01	nd	0.16	F	21	Tokyo
18	0.011	nd	nd	0.01	F	21	Tokyo
19	0.022	0.02	nd	0.04	F	21	Tokyo
20	0.106	0.17	3.332	3.61	M	41	Hokkaido
21	0.166	0.02	nd	0.19	F	18	Tochigi
22	0.341	0.03	0.016	0.39	M	53	Kanagawa
23	0.941	0.01	nd	0.95	F	23	Kanagawa
24	0.118	nd	nd	0.12	M	11	Kanagawa
25	0.314	nd	nd	0.31	F	46	Kanagawa
26	0.020	nd	nd	0.02	M	19	Kanagawa
27	0.069	nd	nd	0.07	F	49	Kanagawa
28	0.034	nd	nd	0.03	F	38	Kanagawa
29	0.277	0.01	nd	0.29	F	16	Niigata
30	0.369	0.05	nd	0.42	M	14	Kanagawa
31	0.165	0.04	nd	0.21	F	74	Saitama
32	0.226	0.03	nd	0.26	F	84	Niigata
33	0.121	0.05	nd	0.17	F	19	Kanagawa
34	0.063	0.02	0.005	0.09	F	48	Kanagawa
35	0.048	0.02	nd	0.07	F	52	Kanagawa
36	0.069	0.02	0.006	0.10	M	50	Kanagawa
37	0.162	0.07	nd	0.23	F	41	Kanagawa
38	0.110	nd	nd	0.11	F	30	Kanagawa
39	nd	0.01	0.005	0.02	M	53	Kanagawa
40	0.008	nd	nd	0.01	F	51	Kanagawa
41	nd	nd	nd	nd	M	2	Kanagawa
42	nd	nd	nd	nd	M	2	Kanagawa
43	0.148	0.03	0.006	0.18	F	30	Kanagawa
44	nd	nd	nd	nd	M	58	Kanagawa
45	0.036	0.02	nd	0.06	F	45	Kanagawa
46	0.066	0.07	nd	0.14	F	52	Kanagawa
47	nd	nd	nd	nd	F	47	Kanagawa
48	0.038	0.03	nd	0.07	F	39	Kanagawa
49	0.030	0.02	nd	0.02	F	10	Kanagawa
50	nd	0.02	nd	0.02	F	50	Kanagawa
51	0.116	0.01	nd	0.13	F	41	Kanagawa
52	0.015	0.03	nd	0.05	F	41	Kanagawa
53	0.138	0.04	0.008	0.19	F	26	Kanagawa
54	nd	nd	nd	nd	F	43	Kanagawa
55	nd	nd	nd	nd	F	63	Kanagawa
56	0.259	0.13	nd	0.39	M	10	Kanagawa
57	nd	nd	nd	nd	F	50	Kanagawa

Sample amount : 0.2g

M: male F: female

MBT: as butyltin trichloride

DBT: as dibutyltin dichloride

TBT: as tributyltin chloride

Method detection limits (3 σ of blank values) : MBT, TBT; 0.005ug/g, DBT; 0.01ug/g

Table 2 毛髪試料中のブチルスズ化合物分析概要

	(ug/g)		
	MBT	DBT	TBT Total
Whole (n=57)			
Average $\leq$	0.145	0.04	0.065 0.25
Max	0.978	0.42	3.332 3.61
Min	0.008	0.01	0.005 0.02
Rate of detection	46/57 (80.7%)	39/57 (68.4%)	8/57 (14.0%) 49/57 (86.0%)
Female (n=45)			
Average $\leq$	0.181	0.04	0.007 0.19
Max	0.978	0.42	0.074 1.40
Min	0.008	0.01	0.005 0.02
Rate of detection	38/45 (84.4%)	32/45 (71.1%)	4/45 (8.9%) 40/45 (88.9%)
Male (n=12)			
Average $\leq$	0.141	0.06	0.283 0.48
Max	0.385	0.22	3.332 3.61
Min	0.02	0.01	0.005 0.02
Rate of detection	8/12 (66.7%)	7/12 (58.3%)	4/12 (33.3%) 9/12 (75.0%)

Table 3 毛髪試料中のブチルスズ化合物分析結果の家族性

Group No.	Sample No.	MBT	DBT	TBT	Tota	Sex	Age	Adre	(ug/g)
1	20	0.106	0.17	3.332	3.61	M	41	Hokkaido	
	10	0.978	0.42	nd	1.40	F	41	Hokkaido	
	9	0.385	0.22	nd	0.61	M	19	Tokyo	
2	22	0.341	0.03	0.016	0.39	M	53	Kanag	
	23	0.941	0.01	nd	0.95	F	23	Kanag	
3	24	0.118	nd	nd	0.12	M	11	Kanag	
	25	0.314	nd	nd	0.31	F	46	Kanag	
4	26	0.020	nd	nd	0.02	M	19	Kanag	
	27	0.069	nd	nd	0.07	F	49	Kanag	
5	29	0.277	0.01	nd	0.29	F	16	Niigata	
	32	0.226	0.03	nd	0.26	F	84	Niigata	
6	30	0.369	0.05	nd	0.42	M	14	Kanag	
	36	0.069	0.02	0.006	0.10	M	50	Kanag	
	34	0.063	0.02	0.005	0.09	F	48	Kanag	
7	21	0.166	0.02	nd	0.19	F	18	Tochigi	
	13	0.025	nd	nd	0.03	F	48	Tochigi	
	14	0.013	0.01	nd	0.02	F	21	Tokyo	
M: male		F: female							

Table 4 妊婦生体試料中のブチルスズ化合物分析結果

Table 4 妊婦生体試料中のブチルスズ化合物分析結果

No.	Sample	MBT	DBT	TBT	(ug/g) total
1	Hair	0.971	0.41	nd	1.38
	Umbilical cord	—	—	—	—
	Maternal blood (serum)	nd	nd	nd	nd
	Umbilical cord blood (serum)	nd	nd	nd	nd
	Breast milk	0.074	0.06	nd	0.13
2	Hair	0.110	0.01	nd	0.01
	Umbilical cord	nd	nd	nd	nd
	Maternal blood (whole blood)	0.031	nd	nd	0.03
	Umbilical cord blood (whole blood)	0.050	nd	nd	0.05
	Breast milk	nd	nd	nd	nd
3	Hair	0.349	0.03	0.084	0.46
	Umbilical cord	0.023	nd	nd	0.02
	Maternal blood (whole blood)	0.066	nd	nd	0.07
	Umbilical cord blood (whole blood)	0.067	0.02	nd	0.09
	Breast milk	0.073	nd	nd	0.07
4	Hair	0.235	0.02	nd	0.26
	Umbilical cord	0.008	nd	nd	0.01
	Maternal blood (whole blood)	0.022	0.01	nd	0.03
	Umbilical cord blood (whole blood)	0.012	nd	nd	0.01
	Breast milk	—	—	—	—
Sample amount : 0.2g					

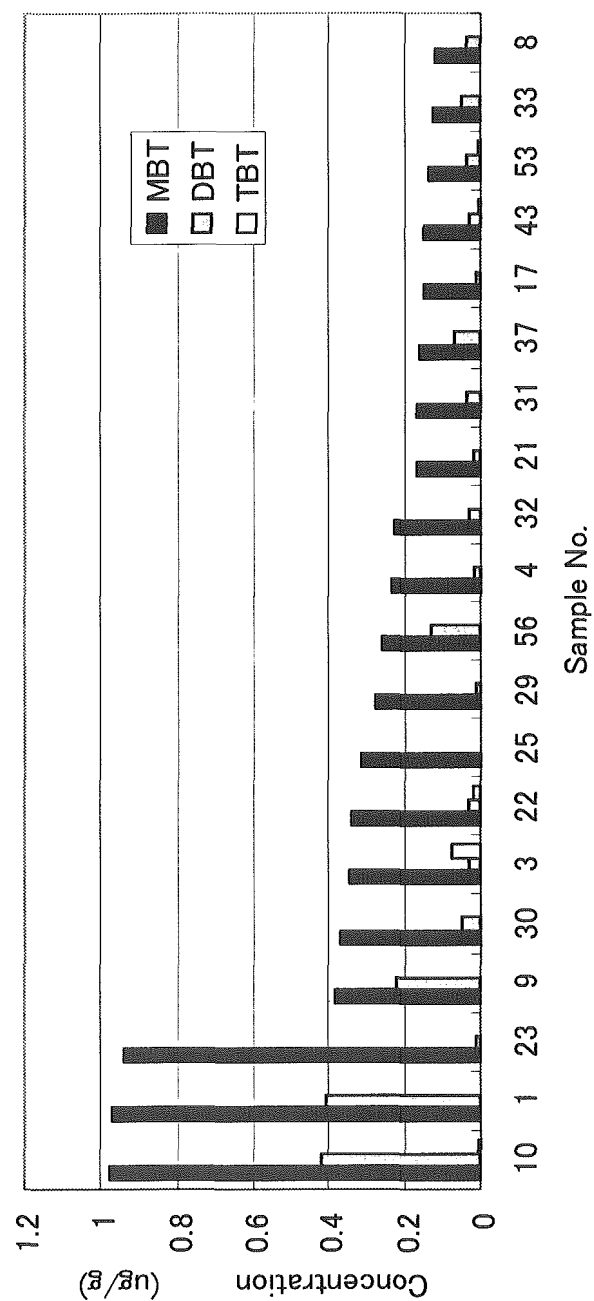


Fig. 1 毛髪試料中におけるブチルスズ化合物の存在比

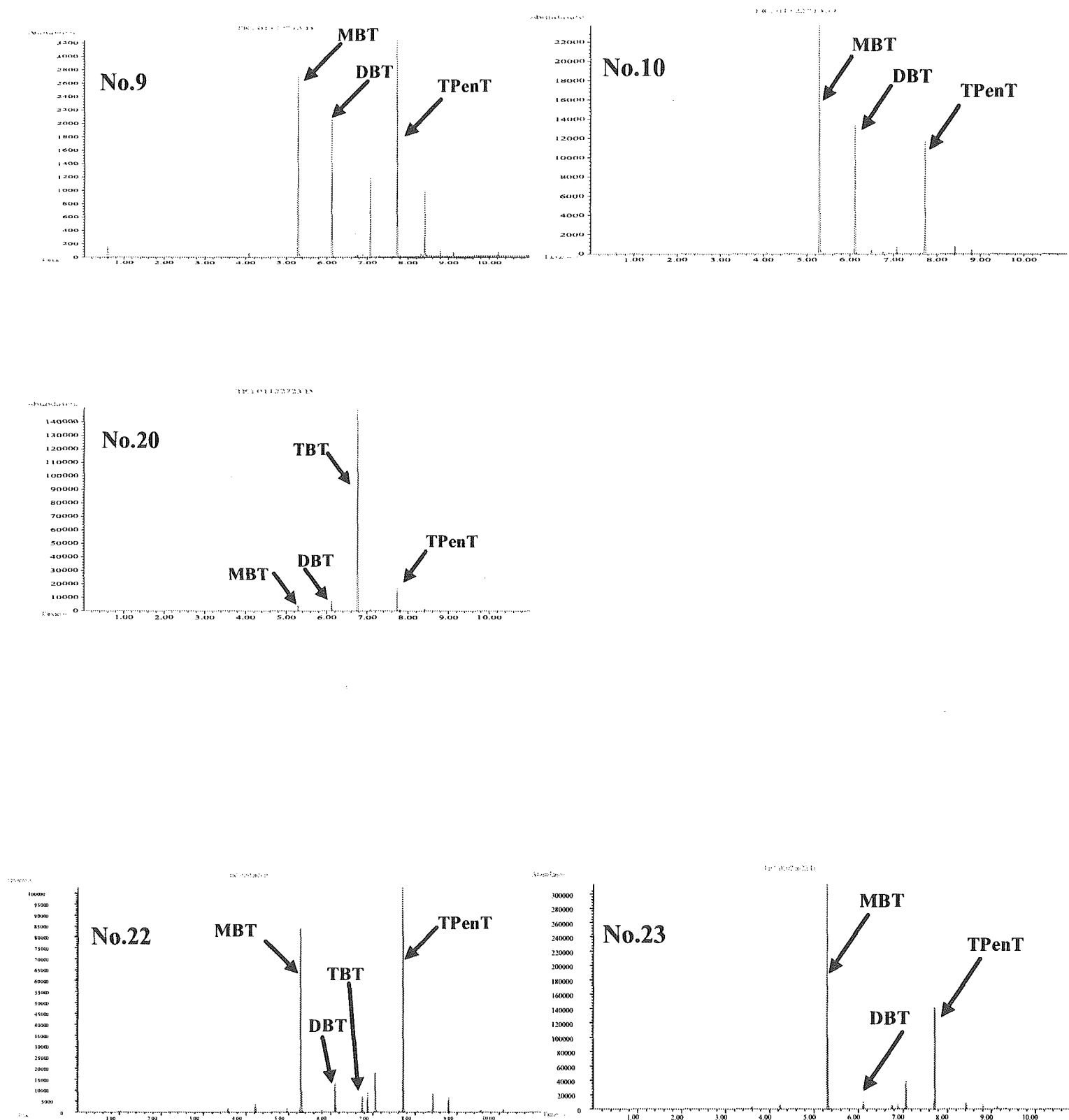


Fig. 2 毛髪試料におけるブチルスズ化合物のクロマトグラム

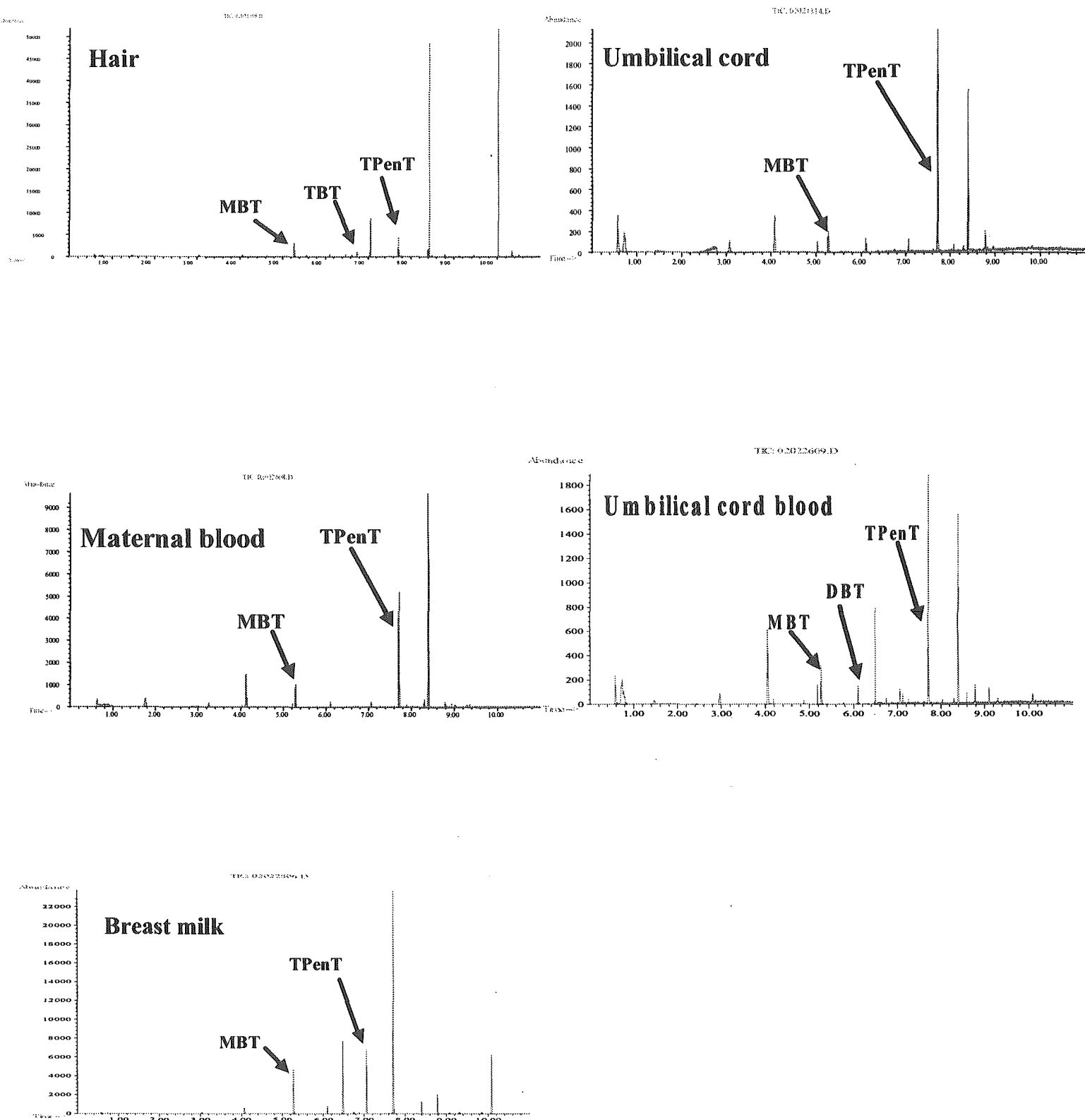


Fig. 3 妊婦生体試料(No.3)におけるブチルスズ化合物のクロマトグラム

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

経口免疫寛容への有機スズ化合物の影響

-抗体産生能への影響

主任研究者 牧野恒久

東海大学

研究分担者 織田 肇

大阪府立公衆衛生研究所

研究協力者 益川邦彦，渡邊裕子，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環境汚染レベルにおける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経口免疫寛容における抗体産生能への影響を検討した。有機スズ化合物のうち、TBTC（塩化トリブチルスズ）および DBTC（二塩化ジブチルスズ）について検討を行った。

A.研究目的

我々はこれまでマウスを用い、ジブチルスズが抗原の経口感作による抗体産生を増強すること、また経口免疫寛容（経口トレランス）を誘導した末梢リンパ節細胞の増殖応答を増強することを明らかとした。そこで、本研究では経口免疫寛容を誘導したマウス抗体産生能および脾臓細胞の応答へのジブチルスズおよびトリブチルスズの経口免疫寛容に対する影響を明らかとすることを目的とした。

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(DBTC)および

塩化トリブチルスズ(TBTC)は、アルドリッチ社製を用いた。

B・3 抗原

ウシ α_{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 経口免疫寛容を誘導したマウス抗体産生能への影響

5～7 匹のマウスに 3 日ないしは 4 日置きに DBTC および TBTC をゾンデで経口投与し（10 回投与）、20%カゼインを含んだ餌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 μ l に対し 0.1%添加し、調整した。投

与量は 1 回あたり DBTC では $0.1\mu\text{g}$, $1.0\mu\text{g}$, $10.0\mu\text{g}$ とし、TBTC は $0.2\mu\text{g}$, $20\mu\text{g}$ とした。また、実験的経口トレランスを破綻すると考えられるコレラトキシン (CT) $10.0\mu\text{g}$ 投与群を設け、その影響について比較した。

スズ投与終了後およびその 2 週間後にカゼイン $100\mu\text{g}$ /匹を腹腔内に免疫した。7 日後に採血を行い、ELISA 法により抗体価を測定し、経口トレランスを誘導した抗原特異的抗体産生への影響を検討した。

抗体価は Mann Whiteny 検定により、有意差検定を行った。

B・5 脾臓細胞増殖応答への影響

B-4 に従い、カゼインを免疫し、10 日後に脾臓細胞を採取し、抗原特異的な増殖応答を H_3 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。

B-6 ジブチルスズ経口投与による血中および脾臓濃度の分析

B-4 に従い、DBTC を $10.0\mu\text{g}$ 投与し、30 日後のマウス血液および脾臓を採取し、TBT, DBT および MBT (モノブチルスズ) の分析を行った。

また、DBTC $1.0\mu\text{g}$, $10.0\mu\text{g}$ をマウスに単回投与し、21 時間後に血液を採取し、有機スズ化合物の分析を行った。

有機スズ化合物は、以下の操作を行い分析した。試料 $0.2\sim 0.5\text{g}$ を 25% アンモニアヒドロキシドで加水分解後、ケイソウ土固相カラムに負荷し、20ppm メロポロン-ベンゼンで溶出した。溶出液を濃縮し、酢酸緩衝液

(pH5.46)および 5%テトラエチルホウ酸ナトリウムを入れ、エチル化した。これをフロリジルカラムで精製後、遠心濃縮し、ヘキサンで 0.2ml の試験溶液とした。試験溶液を GC-ICP-MS を用いて測定した。

C. 研究結果

C・1 経口免疫寛容を誘導したマウス抗体産生への影響

実験的経口トレランスを誘導したマウスの抗原特異的な抗体産生への TBTC および DBTC の影響を検討した。

図 1 にカゼイン特異的抗体産生の結果を示した。マウスにカゼインを免疫すると有意にカゼインに対する抗体が上昇する。この時、DBTC 投与群では $1.0\mu\text{g}$, $10.0\mu\text{g}$ 投与で抗体産生増強の傾向がみられ、TBTC では、抑制の傾向がみられた。次にカゼイン食をあらかじめ投与した場合、カゼインに対する抗体産生は、有意に減少し、経口トレランスが誘導された ($p<0.01$)。この時、DBTC 投与群ではいずれにおいても、マウス抗体産生を有意に増強した。また、TBTC 投与群では $20\mu\text{g}$ 投与において有意に増強した。コレラトキシン投与群においても抗体産生増強の傾向がみられたが有意差は認められなかった。

C・2 脾臓細胞増殖応答への影響

脾臓細胞増殖応答の結果を図 2 および図 3 に示した。カゼインに対する免疫応答を誘導した脾臓細胞の増殖応答では、MTS アッセイが示すミトコンド

リアにおける酵素活性への影響はみられなかったが、H₃ 取り込みによる増殖応答に対し、DBTC および TBTC 投与群では応答を有意に阻害した。

一方、経口トレランスを誘導したマウス脾臓細胞の増殖応答では、DBTC 0.1 μ g, 1.0 μ g 投与および TBTC 投与群において有意に応答を増強した。CT 投与群では影響はみられなかった。

C-3 ジブチルスズ経口投与による血中および脾臓濃度の分析

表 1 に有機スズ化合物のマウス体内濃度分析結果を示した。本実験系での DBTC 投与後 1 ヶ月後のマウス脾臓および血液において MBT が検出され、血中濃度より脾臓の濃度が高いことが示された。DBT および TBT はいずれも検出限界以下であった。DBTC 単回投与では、1.0 μ g 投与の血液で MBT のみが検出され、10.0 μ g 投与では、MBT, DBT が検出された。DBT は、マウス生体内で比較的速やかに MBT に代謝されるが、投与後 1 ヶ月後においても数十 ng のオーダーで生体内濃度を維持していることが明らかとなった。

D. 考察

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、これらの応答を有意に増強することを明らかとした。このことから、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。さらに、抗原特異的な免疫応答を誘導した場合（図 2）にその応答を抑制することから、DBT および TBT が抗原提示能に影響を及ぼすことが考えられた。また、自己免疫疾患やアレルギーの発症は、過剰な免疫応答および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とから、これらの疾患の発症に DBT および TBT が関与する可能性が考えられ、アレルギー等の発症メカニズムに対する DBT および TBT の影響をさらに検討することが必要であると考えられた。

DBT 投与による有機スズ化合物の体内濃度分析では、DBT は MBT に比較的速やかに代謝されるが、その後 MBT が低濃度で体内に維持されることから、MBT の生体への影響についても検討を行う必要があると考えられた。

E. 結論

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。

F. 研究業績

該当なし

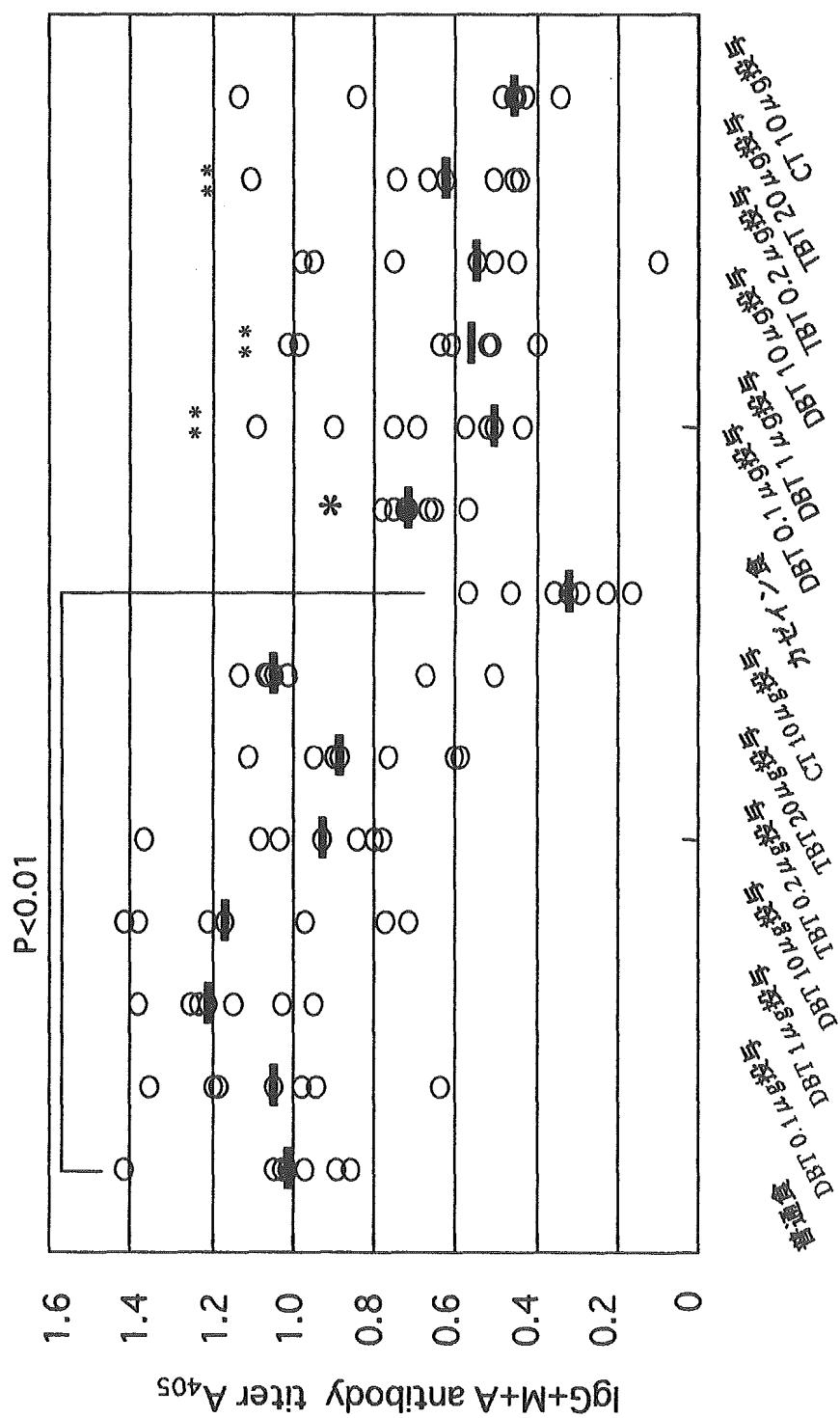


図1. 経口免疫寛容を誘導したマウス抗体産生への有機スズ化合物の影響

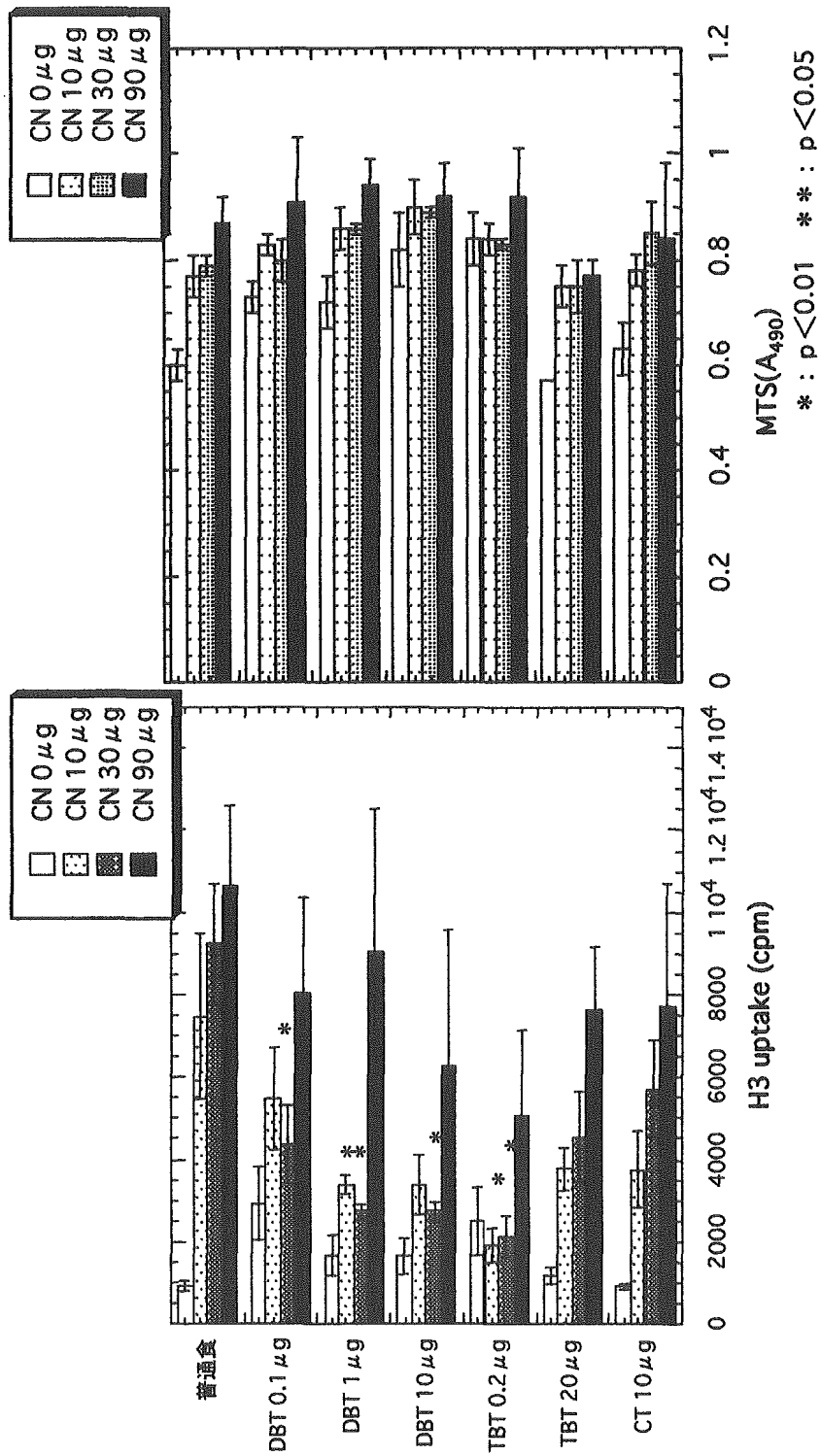


図2. 免疫応答を誘導したマウス脾臓細胞の増殖応答への有機スズ化合物の影響

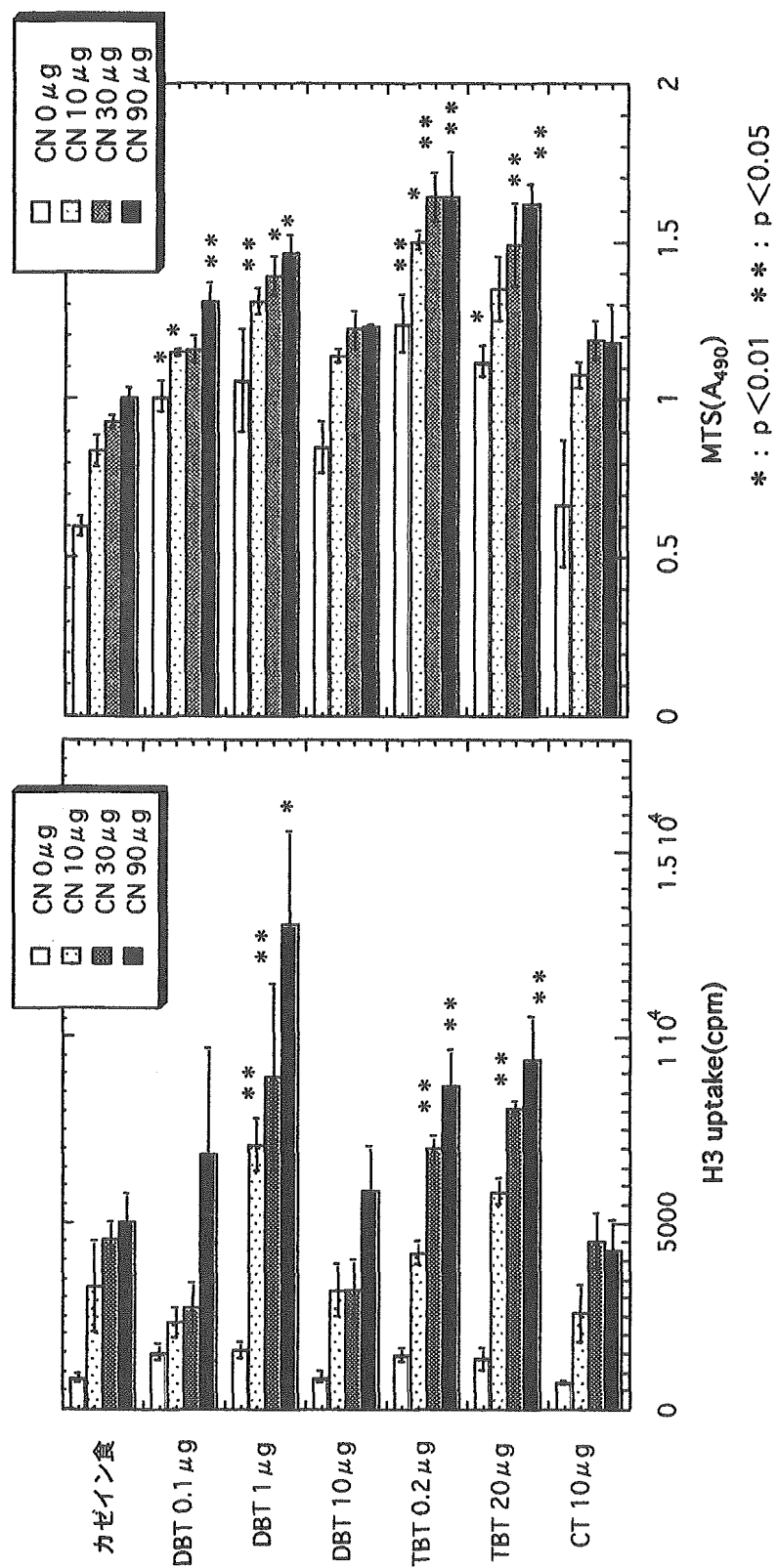


図3. 経口免疫寛容を誘導したマウス脾臓細胞の増殖応答への有機スズ化合物の影響

表1. ジブチルスズ経口投与によるマウス体内濃度

DBT投与後30日		DBT単回投与後21時間後		
		脾臓(n=2)	血液(n=3)	血液(n=3)
($\mu\text{g/g}$)		DBT 10 μg 投与	DBT 10 μg 投与	DBT 1 μg 投与 DBT 10 μg 投与
MBT		0.030 $\pm$ 0.006	0.010 $\pm$ 0.006	0.020 $\pm$ 0.002 0.065 $\pm$ 0.054
DBT		N.D.	N.D.	N.D. 0.033 $\pm$ 0.021
TBT		N.D.	N.D.	N.D. N.D.

検出限界($\mu\text{g/g}$) 血液 MBT: 0.002 脾臓 MBT: 0.005
 DBT: 0.004 DBT: 0.01
 TBT: 0.002 TBT: 0.005

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

生体試料（さい帯血等）における内分泌かく乱化学物質、内分泌かく乱作用を
含む重金属類の暴露状況の調査及びヒト健康影響に関する研究

主任研究者 牧野恒久 東海大学医学部産婦人科教授
分担研究者 鈴森 薫 名古屋市立大学医学部産婦人科教授
研究協力者 孫田信一 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所
遺伝学部室長

研究要旨

内分泌かく乱化学物質の母体を介した胎児等への影響を明らかにするために、絨毛、羊水、さい帯血等の試料収集を行い、内分泌かく乱化学物質として疑われている重金属類の母体及び胎児への蓄積状況と重金属等に対する in vivo 細胞反応を調査し、内分泌かく乱化学物質がヒト健康に及ぼす影響の作用機序の一つと考えられる遺伝子（DNA）への障害として、8-ヒドロオキシ-デオキシグアノシンの検出法を検討した。また、母体末梢血と胎児さい帯血における重金属類の暴露状況と、生体内高分子物質（DNA、タンパク質）損傷や活性酸素の影響の指標となる各種マーカー（SOD 活性、カタラーゼ活性、8-oxo-deoxyguanosine 量等）について測定を行い、それらの相関を明らかにするために解析を進めた。

A. 研究目的

環境中に存在する化学物質の多くがヒト健康に重大な影響を及ぼす可能性があるが、その中で内分泌かく乱化学物質として知られているものでもその生体内における汚染濃度や実際のヒト健康への影響についての調査研究はまだ限られている。

このうち有機スズやカドミウムなどの重金属類のいくつかは内分泌かく乱化学物質、または内分泌かく乱

様作用をする物質とされているが、その実際の影響と作用機序はまだ十分に解明されていない。これまでの重金属類のヒトへの暴露状態に関する調査では、個々の重金属類の濃度や重金属類全体の濃度が個体によってかなりの差が認められている。一方、重金属類は活性酸素の発生やその作用機序と深く関わることも知られている。今回、母体末梢血と胎児さい帯血における重金属類の濃度に

ついて調査するとともに、生体内高分子物質（DNA、タンパク質）の損傷や活性酸素の影響の指標となる各種マーカーについて測定を行い、これらと重金属類の暴露状況の相関を明らかにする目的で解析を実施した。

B. 研究方法

1) 重金属類の母体血及び胎児さい帯血における濃度の測定

母体末梢血及び胎児さい帯血（抗凝固剤処理後、凍結保存）を、0.1N 硝酸で5～50 倍に希釈後、ゼーマン原子吸光法で測定した。

2) 血液中のスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）活性値の測定

活性染色法（ポリアクリルアミド・ゲル- NTB 法）にて SOD 活性を検出後、コントロールの SOD を基準にして、NIHImage 1.6I を用いて分析を行った。

3) カタラーゼ活性値の調査

一定量の試料を 50mM 過酸化水素水に加え、240nm の吸光度の減少量から活性値を求めた。過酸化水素を1分間に 1 μ mole 消費する量を 1U とした。

4) DNA 中の 8-ヒドロキシ-デオキシグアノシン（8-OH-dG）量の分析

内分泌かく乱化学物質の細胞内の影響の一機序として遺伝子構造（DNA）に直接障害を及ぼす可能性を予測し、この影響を検出する指標として、DNA 中の 8-OH-dG 分析法を実施した。各検体 2～4 ml の血液から調整した 30 μ g の DNA を、

DNAase 処理後ニューロケムにて分析した。

5) タンパク質の酸化の検出

生体試料をポリアクリルアミド・ゲルにて電気泳動後、DNP 法にて分析した。

（倫理面への配慮）

① 試料等の提供者及びその家族に対しては、研究内容と目的等を事前に十分に説明し自由意思に基づく文書によるインフォームドコンセントを受けて、試料等の提供を受ける。

② 生体試料の収集とその解析研究等に関しては、厚生省等から出されている遺伝子解析研究に関する倫理指針等に沿い、個人識別情報の符号化等を徹底して個人情報を保護し、試料等の提供者及びその家族の人権及び利益を保護する。

C. 研究結果

1) 内分泌かく乱様作用が疑われる重金属類の母体末梢血と胎児さい帯血における濃度を原子吸光法により測定した。これまで 55 例の生体試料に関して 5～50 倍希釈試料を用いて測定した。いずれの重金属類（Sn、Cd、Cu、Pb）においても個体間にかんりのばらつきが認められた。鉛の母体血中の濃度は 0.7 ppb から 39.9 ppb、平均値は 16.9 ppb であった。これに対して、さい帯血では、0.5 ppb から 33.8 ppb、平均値は 12.0 ppb であった。カドミウムの母体血中の濃度は 0.45 ppb から 4.70 ppb、平均値は 1.63 ppb であった。

これに対して、さい帯血では、0.31 ppb から 1.82 ppb、平均値は 0.79 ppb であった。同様に、銅の母体血中の濃度の平均値は 1212 ppb、さい帯血の平均値は 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のそれに比べて同程度か低い傾向を示した。また、調査した重金属に関して個体間で差が認められ、母体血とさい帯血との濃度に相関が見られた。現在、さらに鉄、ニッケル等について解析を進めている。

2) 活性酸素消去酵素のカタラーゼの測定値では、個体間で差が認められた。母体血における活性値は 245 U/mg から 502 U/mg を示し、平均値が 356 U/mg であった。これに対して、胎児さい帯血における活性値の平均は 364 U/mg で、母体血のそれと大きな差はなかった。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、母体血の活性値は 0.93 U/mgHb から 1.82 U/mgHb を示し、平均値が 1.43 U/mgHb であった。これに対して、胎児さい帯血における活性値の平均は 1.19 U/mg で、SOD 活性は一般にさい帯血に比べ母体血の方が高い傾向を示した。これらの母体と胎児

における SOD の活性値には個体間に差が認められた。環境刺激にตอบสนองしてこれらの酵素活性が高くなっている可能性が考えられるので、各重金属濃度との相関を解析した。カタラーゼと SOD の活性と各重金属濃度との相関は (一部傾向があるが) 全体としては今のところあまり明瞭ではない。生体内の活性酸素の活性を反映した測定値がこれらの中に得ることができれば、ヒト健康影響に対する評価という点で重要な要素になると考えられる。

3) 各検体血液から調整した 30 μ g の DNA について 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結果、いずれも検出限界以下であった。これらの試料解析に適した高感度検出方法の開発を愛知医科大学生化学講座の協力の下に図ったが、いずれの方法でも検出限界以下であった。

4) タンパク質と脂質の酸化状況をポリアクリルアミド・ゲル、DNP 法にて測定し、現在その個体間、重金属類濃度等との相関を解析中である。

D. 考察

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った。その濃度の高低は、重金属の種類ごとに異なり、重金属間の相関は認められない。これらの重金属類の濃度の個体間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が、極めて興味ある点である。母体と胎児の関係を見てみると、高い数値を示した症例では、その胎児さい帯血でも同様に高い数値を示すことが明瞭である。調査した重金属類の濃度は、母体血に比べてさい帯血では低い数値を示すものが多かった。このことは重金属類の蓄積や胎盤等を経由した伝達の特性等によるものと考えられる。すなわち、重金属類の濃度が影響を及ぼす濃度を越えた場合には胎児の方により強い影響を及ぼす可能性が予想される。

活性酸素消去酵素のカタラーゼ、スーパーオキシドディスムターゼの活性を測定した結果、かなり個体差が認められることが判明した。また、SOD 活性は一般にさい帯血に比べ母体血の方が高い傾向を示した。種々の環境刺激に応答してこれらの酵素活性が高くなり、それに伴って活性酸素消去酵素のカタラーゼやスーパーオキシドディスムターゼの活性も高くなっている可能性があるが、これまで測定した特定の重金属の濃度との相関は今のところあまり明瞭にはなっていない。鉄などの他の重金属についてもさらに継続して分析を進めているが、今後活性酸素の発生・消去に関連する重金属類の蓄積濃度との関連を明らかにすることは、ヒト健康影響に及ぼすメカニズムに関連して重要な点ではないかと思われる。また、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。

(謝辞)

本研究に多大な御援助をいただいた愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所遺伝学部、中川千玲研究助手、同遺伝学部、武藤宣博主任研究員、愛知医科大学生化学講座、吉野昌孝教授に深謝申し上げる。

E. 健康危険情報

該当事項なし

F. 研究業績

1. 論文発表

発表準備中

2. 学会発表

孫田信一，中川千玲，武藤宣博，小野教夫，杉浦真弓，鈴木 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）

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし

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

アジピン酸ジエチルヘキシルの生体影響について

主任研究者 牧野恒久 東海大学医学部教授
分担研究者 中澤裕之 星薬科大学教授
研究協力者 山崎聖美 国立公衆衛生院

研究要旨

塩化ビニル製プラスチック製品の可塑剤として用いられてきたフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)が一部規制され、その代替化学物質が色々と使用されるようになった。そこで、DEHPの代替化学物質として食品用塩ビ製手袋や塩ビ製おもちゃなどに多く用いられるようになったアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHA)の内分泌かく乱作用など生体影響について調べた。その結果、DEHA には、*in vitro* の研究より、エストロゲン様作用が検出された。さらに、DEHA は、フタル酸エステル類と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た。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。

A. 研究目的

塩化ビニル製プラスチック製品の可塑剤として用いられてきたフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)が一部規制され、その代替化学物質が色々と使用されるようになった。そこで、DEHP の代替化学物質として食品用塩ビ製手袋や塩ビ製おもちゃなどに多く用いられるようになったアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHA)の内分泌かく乱作用など生体影響について調べた。

B. 研究方法

B-1. E-SCREEN Assay

ヒト乳癌細胞株である T47D を用いて E-SCREEN Assay を行った。細胞数 3750 cells/well となるようにプレートに播き、一晚インキュベートした。フェノールレッドにはエストロゲン様作用があるため、培養液をフェノールレッドフリーDMEM に

交換し、各ウェルに被験物質を添加した。被験物質添加後 4 日間インキュベートし、WST-1 を用いたアッセイにより細胞数をカウントした。

B-2. 胎児期及び授乳期 DEHA 暴露仔マウスへの影響

ddY マウスを交配させ、妊娠 3.5 日目から Low Dose 投与群は 5mg/kg/day、High Dose 群は 50mg/kg/day になるように DEHA をコーンオイルに混ぜたものを経口投与し、出産後も離乳にあたる 21 日目まで投与を続けた。コントロール群は、コーンオイルのみを経口投与した。投与終了の翌日、仔マウスの体重、生殖器、脾臓、胸腺重量を測定した。また、脾臓と胸腺については、FACS にてリンパ球サブセットの構成について解析を行った。