

Chemical より購入した。

放射能標識[4-¹⁴C]ステロイドである cholesterol (1887 MBq/mmol)、dehydroepiandrosterone (2.05 GBq/mmol)、progesterone (2.05 GBq/mmol) 及び deoxycorticosterone (2.22 GBq/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⁺、NADPH、glucose 6-phosphate 及び glucose 6-phosphate dehydrogenase はシグマアルドリッチジャパンから購入した。Adrenodoxin は Kimura ら¹⁵⁾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及び特級を用いた。

B-2. H295R 細胞の培養

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞の培養は、培地として insulin (6.25 µg/ml)、transferrin (6.25 µg/mL)、selenium (6.25 ng/mL) 及び linoleic acid (5.35 µg/mL) を含む D-MEM / F-12 培地 (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 % Ultrosor G (Sepracore, France) 及び抗生物質 (penicillin: 50 IU/ml, streptomycin: 50 µg/ml) を加えた培養液を使用した。細胞は 75 cm² flasks を使用し、5 % CO₂ - 95 % air の気相中 37 °C で培養を行い、継代した。必要に応じて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コルチゾールの分析

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で 1 % ITS Plus、0.01 % bovine serum albumin (bovuminar®: Intergen) 及び抗生物質を含む D-MEM / F-12 培地に交換し 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 cAMP (1 mM) 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。検体及び dibutyryl cAMP を添加した一定時間後に培養液中に分泌されたコルチゾールはラジオイムノアッセイ法による測定キットを用いその濃度を測定した。検体の細胞に対する毒性を評価するために、CytoTox96®non-radioactive cytotoxicity assay kit を用いて H295R 細胞から逸脱する LDH 活性を測定した。また、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 (PBS) で良く洗浄後、150 mM NaCl、1 % sodium dodecyl sulfate、5 mM EGTA、0.5mM MgCl₂、0.5 mM MnCl₂ 及び 0.2 mM phenylmethyl-sulfonylfluoride (PMSF) を含む 50 mM

Tris-HCl buffer (pH 7.4)を用いて溶解し、全蛋白質量を測定した。

B-4. ライディッヒ細胞の単離と細胞培養

生後2-3週齢の幼若ブタ去勢により得られる精巣を0.3% collagenase / dispase - 0.03% trypsin inhibitorを用いて34℃で処理し、ライディッヒ細胞を含有する上清を得た。この上清を5-70%のPercoll® gradientに積層し、2,500 g×20分間の遠心分離を行い、ライディッヒ細胞を単離した。培養液として0.1% fetal bovine serum、insulin (5 µg/mL)、transferrin (5 µg/mL)、vitamine E (10 µg/mL)及び抗生物質 (penicillin: 50 IU/ml、streptomycin: 50 µg/ml)を含むD-MEM / F-12 培地 (1:1 mixture of Dulbecco's Modified Eagle's and Ham's F-12)を使用した。細胞は5% CO₂ - 95% airの気相中37℃で、必要に応じてサブカルチャーして実験に使用した。

B-5. ライディッヒ細胞のステロイド産生の誘導とテストステロンの分析

96-well plateにライディッヒ細胞を24時間サブカルチャーした後、培養液を交換し、検体のステロイド産生に対する影響を検討するため、エタノールに溶解した検体を加えた。3時間培養後、細胞のステロイド産生を誘導する目的で8Br-cAMP (0.1 mM)またはhCG (10 IU/mL)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、培養

液中のエタノール濃度は最終濃度1.0% (v/v)を越えないこととした。この濃度では細胞のテストステロン産生には影響を及ぼさないことを確認した。検体及び8Br-cAMPまたはhCGを添加した一定時間後に培養液中に分泌されたテストステロン濃度をラジオイムノアッセイ法による測定キットを用いて測定した。検体の細胞に対する毒性を評価するために、CytoTox96®non-radioactive cytotoxicity assay kitを用いてライディッヒ細胞から逸脱するLDH活性を測定した。

B-6. H295R細胞からミトコンドリア及びミクロソームの調製

Dibutyl cAMP (1 mM)とEGF (10 ng/mL)で24時間処理したH295R細胞を冷却したPBSで良く洗浄後、0.25 M sucrose (5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)、0.5 mM EDTA、1 mM DTT 及び0.1 mM PMSFを含む；緩衝液A)中でDounce tissue grinder (Wheaton)を用いてホモゲナイズした。定法に従い9,000 g×20分間遠心分離してミトコンドリア画分を得た。ミトコンドリア画分は更に70 mM sucrose、5 mM MgCl₂、0.5 mM CaCl₂ 及び20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)を含む0.21 M mannitolで洗浄後、同様に遠心分離し、1 mM DTT、0.1 mM PMSF 及び20% glycerolを含む同緩衝液に懸濁した。上清には8 mM CaCl₂を加えて氷冷下1時間のインキュベーション後、10,000 g×10分間の遠心分離を行い、ミクロソーム画分を得た。洗浄後ミクロソーム画分は20% glycerolを

含む緩衝液 A に懸濁した。ミトコンドリア画分は更に酵素活性測定のために超音波処理を行った (10 cycles of 15 sec 50 W, Model VC50T, Sonic & Materials Inc.)。それぞれの画分は一定の蛋白質濃度に調整し、-70 °C で保存した。

B-7. 酵素活性の測定

P450scc (cholesterol 側鎖切断酵素) 活性及び P45011 β (11 β -hydroxylase) 活性は、各々 [4-¹⁴C] cholesterol (500 Bq/1 nmol/2 μ L ethanol) 及び [4-¹⁴C] deoxycorticosterone (500 Bq/1 nmol/2 μ L ethanol) を基質としてミトコンドリア、glucose-6-phosphate (25 mM)、glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.1 unit)、NADP⁺ (0.5 mM) 及び adrenodoxin (2 μ M) の存在下 37 °C、2 時間インキュベーションすることにより測定した。3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II (3 β -HSD II) 活性は [4-¹⁴C] dehydroepiandrosterone (500 Bq/1 nmol/2 μ L ethanol) を基質として、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中でミクロソーム、NAD⁺ (0.5 mM) の存在下 37 °C、1 時間インキュベーションすることにより測定した。P450c17 (17 α -hydroxylase/C_{17,20}-lyase) 及び P450c21 (21-hydroxylase) 活性は [4-¹⁴C] progesterone (500 Bq/1 nmol/2 μ L ethanol) を基質として、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中でミクロソーム、glucose-6-phosphate (25 mM)、glucose-6-phosphate dehydrogenase (0.1 unit)、NADP⁺ (0.5 mM) の存在下

37°C、1 時間インキュベーションすることにより測定した。インキュベーション終了後ステロイドを ethyl acetate / 2,2,4-trimethylpentane (1/1, v/v) で抽出して乾固し、TLC (Kieselgel 60F254, Merck) により基質と反応生成物を分離した。展開溶媒は benzene/acetone (8/1, v/v)、benzene/ethyl acetate (2/1, v/v)、benzene/acetone (7/3, v/v) を使用した。ラジオオートグラフィーで放射能標識ステロイドを検出した後、それぞれのスポットの放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定した。P450scc、P45011 β 及び 3 β -HSD II 活性は pregnenolone、corticosterone 及び androstenedione の生成量として、P450c17 活性は 17 α -hydroxy progesterone と 11-deoxycortisol 生成量の総和として、P450c21 活性は 11-deoxycortisol と 11-deoxycorticosterone 生成量の総和としてそれぞれ表した。

B-8. 有意差の検定

有意差の検定は Student' s の *t*-test を用いた。

C 研究結果

C-1. H295R 細胞のコルチゾール産生に及ぼす有機スズ曝露の影響

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を Fig. 1 に示した。Trimethyltin chloride 10 μ M で有意なコルチゾール

産生の低下が見られた。しかしこの時の培養上清に逸脱したLDH活性は総LDH活性の48.9%であり、コルチゾールの低下は細胞毒性によるものと考えられた。その他の濃度において何ら影響は認められなかった。

ブチルスズであるDBT、TBT、TBT0のH295R細胞コルチゾール産生に及ぼす影響をFig. 2に示した。DBT 1.0及び10 μM の曝露において、それぞれコルチゾール産生が有意に低下した。同様に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、それぞれ有意な低下が認められた。しかし、Figには示していないが、DBT、TBT及びTBT0各々10 μM の曝露で、培養上清に逸脱したLDH活性は総LDH活性のそれぞれ19.9、49.7及び45.8%であった。いずれの場合も培養上清中のLDH活性が有意に上昇して細胞毒性が認められた。また、TBT0 1.0 μM の曝露においてもLDHの有意な活性上昇（総LDH活性の17.7%）が認められた。しかしその他の濃度では、いずれの検体においても有意なLDHの逸脱は認められなかった。同様にFigには示していないが、MBT及びtetrabutyltin各々0.1、1.0及び10 μM の曝露において、コルチゾール産生に及ぼす有意な影響は認められなかった。

オクチルスズであるdioctyltin dichloride、trioctyltin chloride及びmonoctyltin oxideのH295R細胞コルチゾール産生に及ぼす影響をFig. 3に示した。Dioctyltin dichloride 10 μM 、trioctyltin chloride 0.56及び10 μM

の曝露においてそれぞれコルチゾール産生が有意に低下した。しかし、10 μM の曝露で培養上清に逸脱したLDH活性は総LDH活性の各々48.9及び52.7%と有意に増加し、細胞毒性が認められた。その他の濃度ではLDHの逸脱に影響は認められなかった。

フェニルスズであるMPT、DPT、TPT及びtetraphenyltinのH295R細胞コルチゾール産生に及ぼす影響をFig. 4に示した。MPT 10 μM 、TPT 1.0及び10 μM 及びDPT 10 μM の曝露において、それぞれコルチゾール産生が有意に低下した。しかし、各フェニルスズ10 μM の曝露で培養上清に逸脱したLDH活性は各々総LDH活性の9.8、16.2及び28.0%と有意に増加し、細胞毒性が認められた。

4グループの有機スズのうち、H295R細胞コルチゾール産生を阻害したブチルスズの影響をまとめてFig. 5に示した。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、削除した。Figが示すように、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。

C-2. コルチゾール生合成に関与する酵素に及ぼすブチルスズの影響

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の作用機序を明らかにする

ため P450_{scc}、3 β -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 (Table I)。酵素活性の表示はコントロール値を 100 としたときの相対値で表した。その結果、TBT0、TBT 及び DBT の 1.0 μ M 曝露により P450c21 が阻害された。尚、1.0 μ M 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 μ M 曝露では P45011 β も阻害した。また、TBT0、TBT 及び DBT の 12.5 μ M 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。

C-3. ライディッヒ細胞のテストステロン産生に及ぼす有機スズ曝露の影響

H295R 細胞のコルチゾール産生を低下させた DBT、TBT 及び TPT を取り上げ、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を検討した。

DBT の影響を Fig. 6 に示す。ライディッヒ細胞のステロイド産生を誘導する為にそれぞれ hCG と cAMP を用いているが、hCG の刺激では 0.1 μ M 以上の濃度で、cAMP の刺激では 0.03 μ M 以上の濃度でテストステロン産生が有意に低下した。しかし、0.3 μ M 以上の濃度では LDH 活性を指標とした若干の細胞毒性が認められた。ライディッヒ細胞のテストステロン産生に及ぼす TBT の影響を Fig. 7 に示した。0.03 μ M 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 μ M 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。

ライディッヒ細胞のテストステロン産生に及ぼす TPT の影響を Fig. 8 に示した。TPT による曝露の場合も 0.03 μ M 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 μ M 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。

D. 考察

本論文では、ステロイドホルモン産生に及ぼす有機スズの影響を検討する目的で、有機スズ化合物であるメチルスズ、ブチルスズ、オクチルスズ及びフェニルスズ化合物の中から 15 種を取り上げ、ステロイドホルモン産生にどのような影響を及ぼすかを、まず最初にヒト副腎 H295R 細胞を *in vitro* モデルとして使用してそのコルチゾール産生に及ぼす影響を検討し、次にブタ精巣ライディッヒ細胞の初代培養系を利用したテストステロン産生に及ぼす影響を検討した。

有機スズ化合物、特にオクチルスズ化合物は PVC の形成時の熱分解安定化剤や製品の紫外線耐久性を高めるための安定化剤として用いられている。またブチルスズ化合物のうち TBT 及び TPT は船底塗料や漁網防汚剤として使用されてきた。また、DBT はプラスチック安定化剤として使用される一方、TBT の分

解生成物でもある。これらの有機スズによる海洋汚染は ppb オーダーと極めて低濃度にも関わらず、生物濃縮等により今なお ppm オーダーの高濃度で有機スズ化合物が海洋生物に蓄積していることが報告されている。例えば、Ebdon ら³⁾は英国におけるカキの TBT、DBT 及び MBT の濃度を測定し、それぞれ平均 3.1、16.1 及び 16.7 $\mu\text{g/g}$ であり、その生物濃縮係数は 1000 程度であることを報告している。Tsunoda⁴⁾は新潟のマーケットから購入した魚介の DBT、TBT 及び TPT 濃度を測定し、高い濃度としてそれぞれ 0.674、0.669 及び 0.186 $\mu\text{g/g}$ であることを報告している。Kannan ら⁵⁻⁷⁾は各種ブチルスズを測定し、地中海で 1992 - 1993 年に漁獲したイルカに 1.2 - 2.2 $\mu\text{g/g}$ 含まれること、カナダ西海岸の seaduck に最高 1.1 $\mu\text{g/g}$ であること、更にワシントンやオレゴンのカワウソに最高 2.6 $\mu\text{g/g}$ であること等を報告している。Shim ら⁸⁾は韓国のカキ中の TBT 及び TPT の濃度を測定しており、それぞれ 0.095 - 0.885 及び 0.155 - 0.678 $\mu\text{g Sn/g}$ であることを報告している。更に TBT はカキにおいて 25,000 倍に生物濃縮されることも報告している。Harino ら⁹⁾は日本の大阪湾と淀川の 11 種類の魚の TBT 及び TPT の濃度を測定しており、それぞれ 0.011 - 0.082 及び 0.01 - 0.030 $\mu\text{g/g}$ の範囲であることを報告している。Guruge ら¹⁰⁾はスリランカの西海岸から採取した rabbit fish に総ブチルスズとして 11 - 38 $\mu\text{g/g}$ であることを報告している。一方、ヒトにおける有機ス

ズの蓄積量の詳細は明らかではないが、日本における研究¹⁶⁻¹⁸⁾は食品からの TBT 及び TPT の一日あたりの摂取量はそれぞれ 2.2 - 6.9 及び 0.7 - 5.4 μg であることを報告している。

検体として実験に使用した多くの有機スズは 10 μM の曝露により毒性が認められ、コルチゾール産生が阻害された。しかし、毒性の認められない、あるいは低いと思われる濃度 (1.0 μM) 以下の曝露において、TBT0、TBT、DBT 及び TPT は H295R 細胞の産生するコルチゾール産生を有意に阻害した。これらの 1.0 μM の有機スズは各々 0.60、0.34、0.30 及び 0.30 $\mu\text{g/ml}$ に相当し、生物濃縮により海洋生物が蓄積している有機スズの濃度範囲に相当することになる。次のステップとしてコルチゾール産生に関連しその合成経路を触媒する 5 種類の酵素に対するブチルスズ化合物の影響を *in vitro* において検討した。その結果、TBT0、TBT 及び DBT は 1.0 及び 3.1 μM の濃度で P450c21 (21-hydroxylase) 及び P45011 β (11 β -hydroxylase) 活性を有意に阻害することを明らかにした。しかし、H295R 細胞のコルチゾール産生を抑制しなかった MBT 及び tetrabutyltin は 12.5 μM の高濃度において、いずれの酵素活性も阻害することはなかった。

一方、テストステロンは主に精巢のライディッヒ細胞で産生され、高等動物の発生初期において性分化と密接に関連しており、この産生が何らかの理由で阻害された場合、発生や性分化、及び生殖の初期の段階において深刻な

影響が現れることが懸念される。そこで、テストステロンを産生するライディッヒ細胞の初代培養系を構築して、そのテストステロン産生に及ぼす数種のブチルスズの影響を検討した。テストステロンの合成経路には Δ^4 経路と Δ^5 経路が存在し、動物種により大きく異なる。ブタ精巣におけるテストステロン合成経路はヒトと場合と良く類似していることから、ブタ精巣からライディッヒ細胞の初代培養系を構築し、テストステロン産生に及ぼす影響を検討した。検体として、H295R細胞のコルチゾール産生を阻害したTPT、TBT及びDBTを用いた。その結果、0.03 μM という非常に低濃度（約10 ppb）でテストステロン産生を阻害することを明らかにした。以上の実験成績から、TBT0、TBT及びDBTは、生物濃縮により海洋生物が蓄積している濃度範囲の曝露において、H295R細胞のコルチゾール産生及びライディッヒ細胞のテストステロン産生を有意に抑制することを明らかにした。コルチゾール産生の抑制に関しては、その作用機序の一つとして、P450c21及びP45011 β を阻害することが明らかとなった。

最近 imposex は、androgen から estrogen の生合成を触媒する P450 aromatase が organotin compounds により阻害され、相対的な androgen レベルが上昇することが原因ではないかと考えられており、それを証明するようにヒトのステロイドホルモン合成、特にエストロゲン生合成に関与する CYP19 を阻害することが相次いで報告されて

いる^{19,20)}。特に Heidrich ら¹⁹⁾は、ヒト胎盤 aromatase 活性が TBT ($\text{IC}_{50} = 6.2 \mu\text{M}$) 及び DBT により直接阻害されるが、MBT 及び tetrabutyltin によって阻害されないことを報告している。

E. 結論

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、TBT0、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。

F. 参考文献

- 1) Nakajin, S. *et al.*, *Environ. Toxicol and Pharmacol.*, **10**: 103-110 (2001).
- 2) Ohno, S. *et al.*, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **80**: in press (2002).
- 3) Ebdon, L. *et al.*, *Sci. Total Environ.*, **83**: 63-84 (1989).
- 4) Tsunoda, M., *Tohoku J. Exp. Med.* **169**: 167-178 (1993).

- 5) Kannan, K. *et al.*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **31**: 19-23 (1996).
- 6) Kannan, K. *et al.*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **35**: 64-69 (1998).
- 7) Kannan, K. *et al.*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **36**: 462-468 (1999).
- 8) Shim, W. J. *et al.*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **35**: 41-47 (1998).
- 9) Harino, H. *et al.*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **39**: 13-19 (2000).
- 10) Guruge, K.S. *et al.*, *Mar. Pollut. Bull.* **42**: 179-186. (2001):
- 11) Smith, B.S. *J. Appl. Toxicol.* **1**: 22-25 (1981).
- 12) Horiguchi, T. *et al.*, *Sci Total. Environ.* **214**: 65-70 (1998).
- 13) Morcillo, Y. *et al.*, *Environ. Res.* **81**: 349-54 (1999).
- 14) Horiguchi, T. *et al.*, *Mar. Pollut. Bull.* **31**: 402-405 (1995).
- 15) Kimura, T. *et al.*, *Methods in Enzymology Vol. LII*. Academic Press, New York, p.132-136 (1978)
- 16) Tsuda, T. *et al.*, *J. AOAC Int.* **78**: 941-943 (1995).
- 17) Yamamoto, I. *et al.*, *Hokkaido Igaku Zasshi.* **69**: 273-281 (1994).
- 18) Sekizawa, J. *et al.*, *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku.* **116**: 126-131 (1998).
- 19) Heidrich, D. D. *et al.*, *Steroids* **66**: 763-9 (2001).
- 20) Saitoh, M. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**: 198-204 (2001).

G. 研究業績

研究論文

- 1) 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).
- 2) 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

学会発表

- 1) 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：篠田 聡，大野修司，豊島 聡，中澤裕之，牧野恒久，中陳静男，第 74 回日本生化学大会，2001 年 10 月，京都
- 3) 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：篠田 聡，大野修司，藤巻照久，中澤裕之，牧野恒久，中陳静男，第 4 回環境ホルモン学会研究発表会，2001 年 12 月，つくば
- 4) ブタ精巣ライディッシュ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：中島羊奈子，佐藤 剛，大野修司，中澤裕之，牧野恒久，中陳静男，第4回環境ホルモ

ン学会研究発表会, 2001年12月, つくば

- 5) 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: 佐藤 剛, 中島羊奈子, 大野修司, 中澤裕之, 牧野恒久, 中陳静男、日本薬学会第122年会, 2002年3月, 千葉

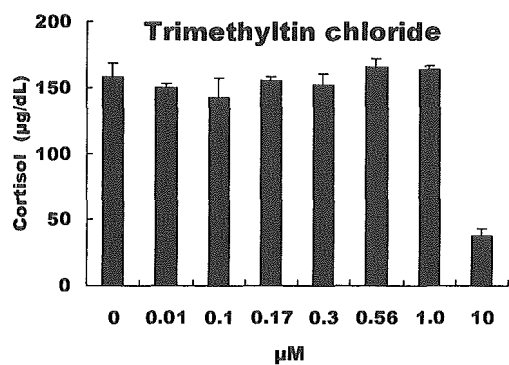
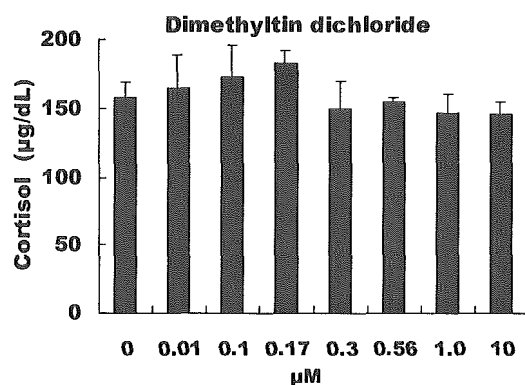
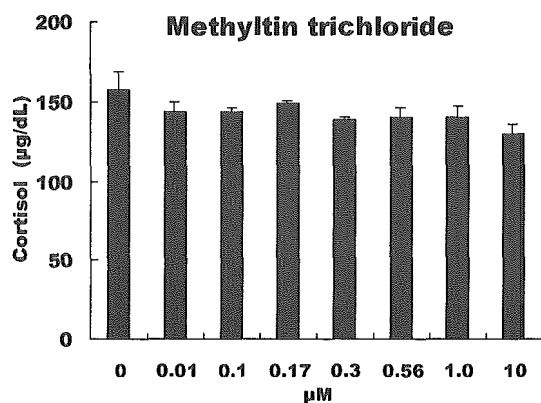


Fig. 1 メチルスズ化合物の影響

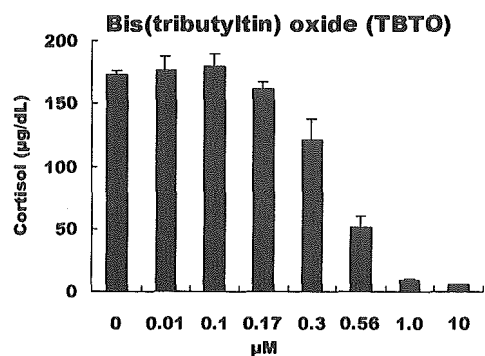
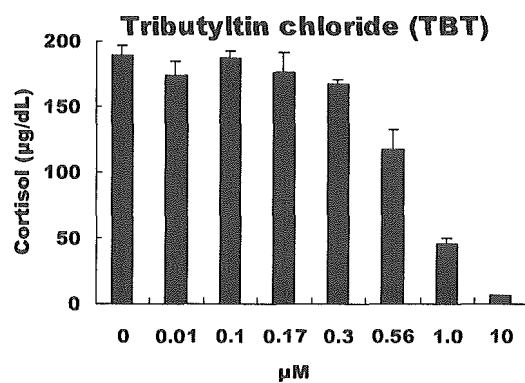
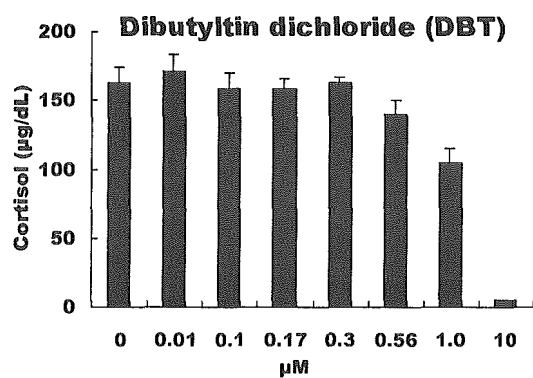


Fig. 2 ブチルスズ化合物の影響

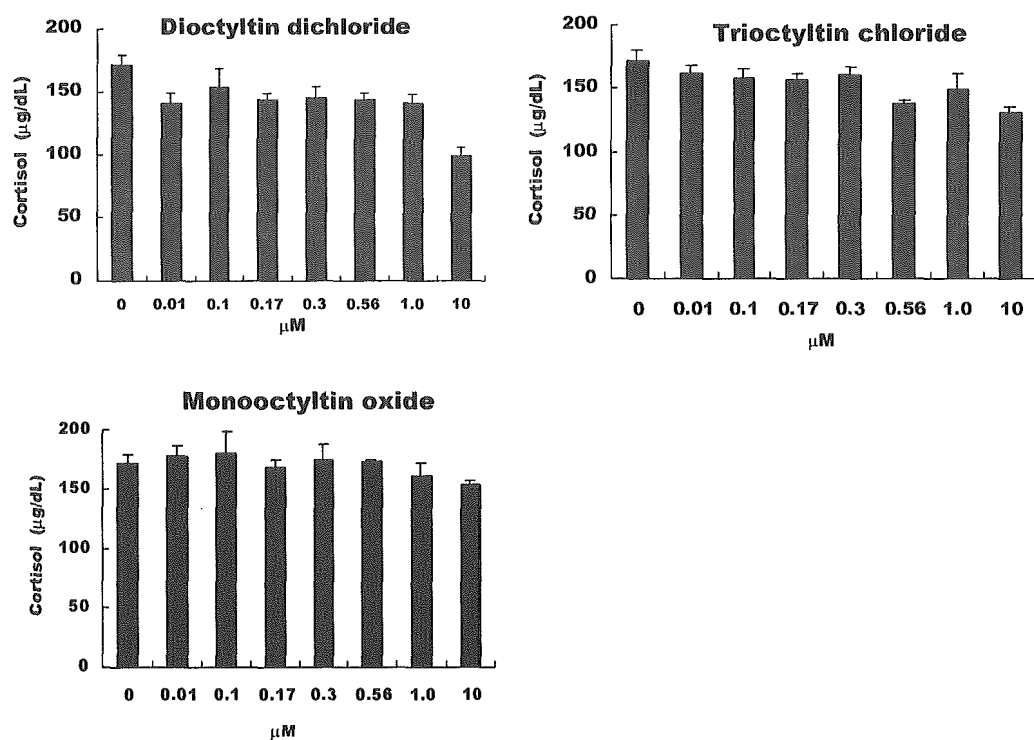


Fig. 3 オクチルスズ化合物の影響

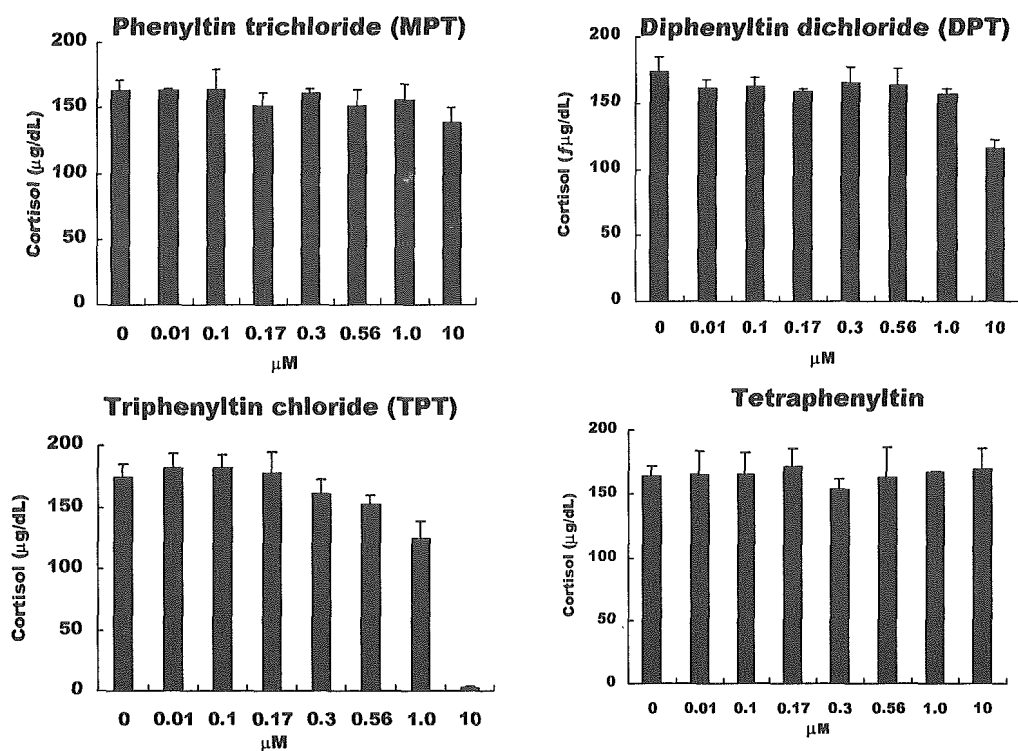


Fig. 4 フェニルスズ化合物の影響

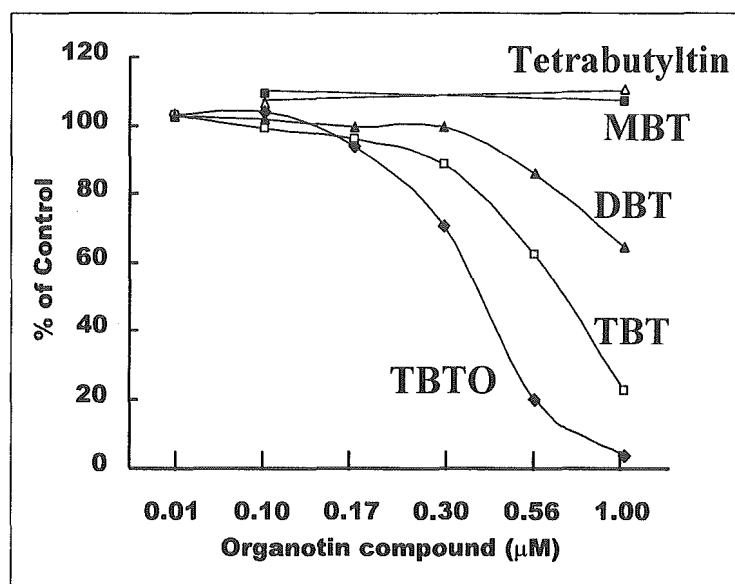


Fig. 5 ブチルスズ化合物の比較

Table I コルチゾール産生に關与する酵素の活性阻害

Addition μ M		Enzyme activity (% of control)				
		P450 _{scc}	3 β HSD II	P450 _{c17}	P450 _{c21}	P450 _{11β}
None		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
TBTO	1.0	82.2 $\pm$ 7.4	----	123.9 $\pm$ 1.6	96.0 $\pm$ 0.9*	77.5 $\pm$ 7.0*
	3.1	77.3 $\pm$ 11.7	----	100.0 $\pm$ 4.1	81.8 $\pm$ 4.5*	51.2 $\pm$ 1.9**
	12.5	59.2 $\pm$ 2.9**	91.3 $\pm$ 0.8	63.9 $\pm$ 2.6*	22.2 $\pm$ 3.1*	29.7 $\pm$ 8.8**
TBT	1.0	----	----	108.6 $\pm$ 3.8	88.9 $\pm$ 3.1*	97.6 $\pm$ 7.0
	3.1	----	----	109.3 $\pm$ 6.5	82.3 $\pm$ 2.1*	88.1 $\pm$ 4.6
	12.5	114.4 $\pm$ 20.0	93.3 $\pm$ 3.5	73.8 $\pm$ 5.5	38.8 $\pm$ 4.6*	33.3 $\pm$ 7.0**
DBT	1.0	----	----	95.3 $\pm$ 8.4	88.3 $\pm$ 4.3*	106.7 $\pm$ 6.3
	3.1	----	----	107.5 $\pm$ 2.7	88.6 $\pm$ 6.7*	76.9 $\pm$ 7.4*
	12.5	121.1 $\pm$ 3.3	98.0 $\pm$ 1.9	73.3 $\pm$ 2.5*	58.3 $\pm$ 2.6**	68.5 $\pm$ 2.9**
MBT	12.5	129.5 $\pm$ 9.3	100.8 $\pm$ 1.5	73.7 $\pm$ 7.6	82.3 $\pm$ 8.0	106.4 $\pm$ 14.5
Tetrabutyltin	12.5	107.5 $\pm$ 14.9	104.1 $\pm$ 4.6	81.6 $\pm$ 4.4	88.0 $\pm$ 4.2	101.5 $\pm$ 6.7

MBT: butyltin trichloride, DBT: dibutyltin dichloride, TBT: tributyltin chloride, TBTO: bis(tributyltin) oxide, * p < 0.05, ** p < 0.01

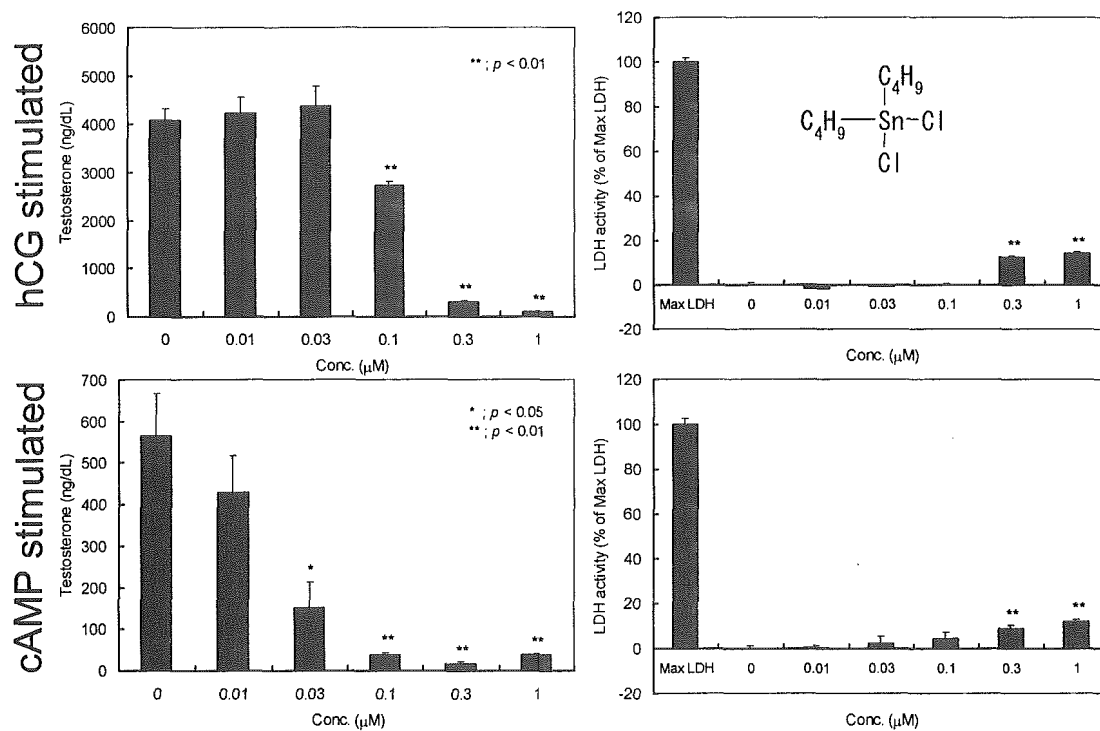


Fig. 6 Dibutyltin dichloride (DBT)の影響

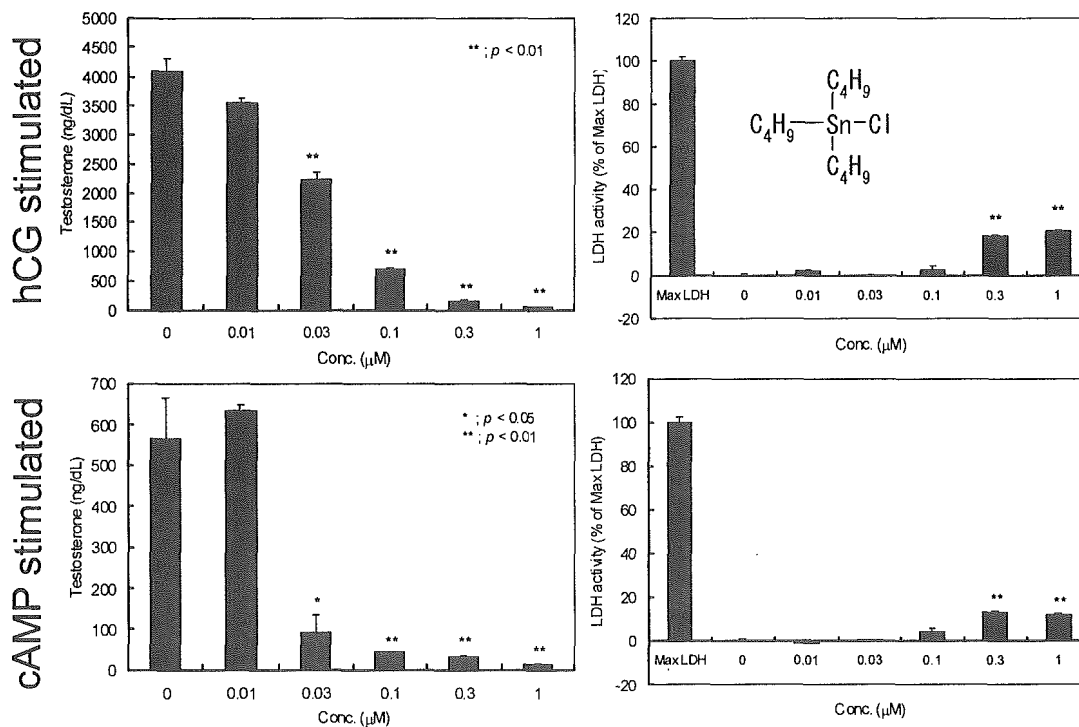


Fig. 7 Tributyltin chloride (TBT)の影響

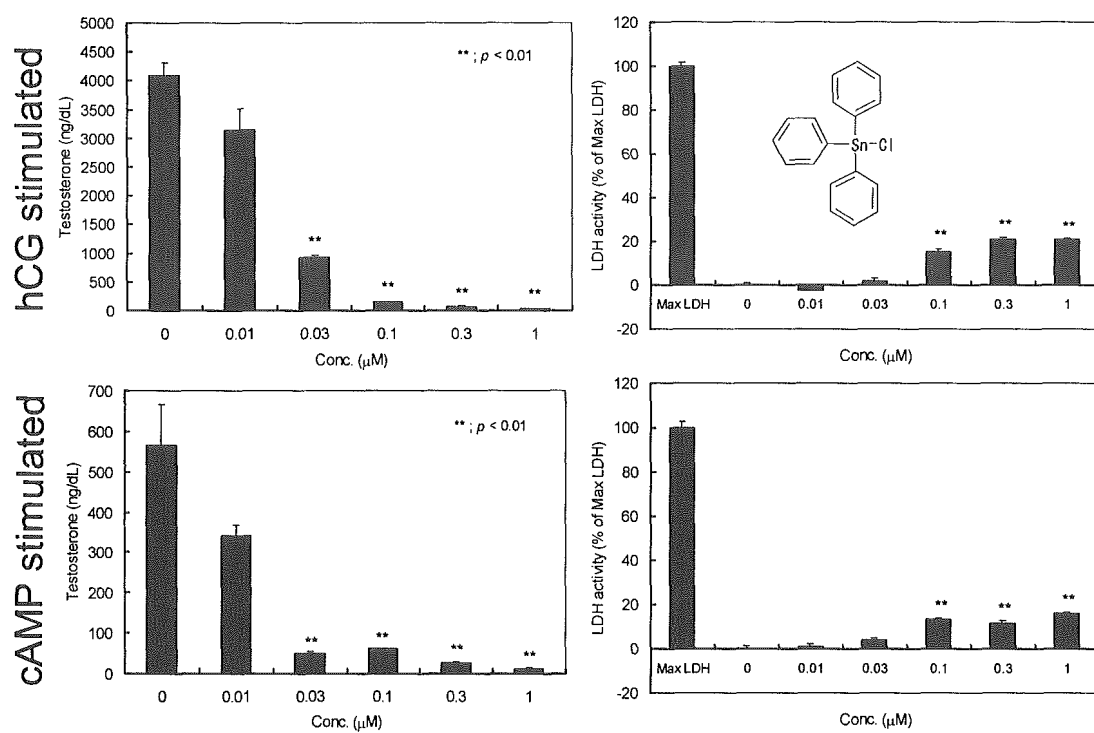


Fig. 8 Triphenyltin chloride (TPT)の影響

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の胎児及び母体における汚染状況の分析とその細胞障害
の解析に基づくヒト健康影響に関する検討

習慣流産患者における内分泌かく乱物質

主任研究者 牧野恒久 東海大学

分担研究者 鈴森 薫 名古屋市立大学

研究協力者 杉浦真弓 名古屋市立大学

孫田信一 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所

研究要旨

内分泌かく乱物質が生殖機能に与える影響のうち流産について調査した。ポリ塩化ビフェニール(PCB)、DDT は流産、早産をひき起こす危険性が懸念されている。これらの代謝速度は極めて長く、もし流産と関係するならば流産は反復する可能性がある。そこで 3-13 回くり返す、習慣流産患者の血中濃度を測定し、これらの化学物質が流産の原因となるかを検討した。患者血中の PCB、ヘキサクロロベンゼン(HCB)、DDT の代謝産物 DDE の濃度は対照と比較して高濃度ではなかった。これらの化学物質が同世代において流産をひき起こす危険性は低いと考えられた。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質は生物の生殖機能に障害を与えており、そのメカニズムについても解明が進められている。しかし、ヒトの疾患における実態調査は不十分である。ポリ塩化ビフェニール(PCB)は過去にヒトの散発性流産との関係が報告されている。また、ヘキサクロロベンゼン(HCB)、DDT の代謝産物である DDE についても 1980 年代に流産に関する報告がなされた。しかしこれらの化学物質が流産と関係するかどうかは結論が得られていない。ビスフェノール A(BPA)については最近、本邦でもその内分泌かく乱作用に

についての研究がさかんに行われているが、ヒトでの流産との関係は報告されていない。PCB、HCB、DDE は代謝されにくいため、もしこれらの物質が流産と関係するならば反復する可能性がある。そこで習慣流産患者におけるこれらの物質の濃度を測定して、流産の原因であり得るかを検討した。また、これらの物質は甲状腺機能低下、プロラクチン分泌促進、免疫機能異常との関係を指摘されているため、各物質のこれらの影響についても解析した。

また、同一検体の母体、臍帯、羊水について PCB、HCB、DDE、BPA を測定し、妊娠中の動態についても検討

した。

B. 研究方法

B-1 生体試料の系統的収集

子宮形態異常、夫婦の染色体異常のない3回以上の原発性習慣流産患者25例（過去の流産回数 4.2 ± 2.2 、3から13回）を対象とし、出産、流産の既往がなく不妊症ではない女性30人をコントロールとした。平均年齢はそれぞれ 31.8 ± 4.1 、 32.0 ± 4.8 才、BMI は 21.7 ± 3.0 、 20.8 ± 2.3 であり、年齢、BMI のに有意差を認めなかった。習慣流産患者については内分泌かく乱物質測定と同時に抗リン脂質抗体、抗核抗体、Natural killer 細胞活性、TSH、freeT4、プロゲステロン、プロラクチンの測定も行った。

妊娠中の動態については15例（9人の初産婦、6人の経産婦、平均年齢33.9才）について調べた。分娩時に母体血、臍帯血、羊水を採取した。

B-2 PCB 異性体の分析方法

血液及び羊水約20gを秤量し、内標準物質として¹³C 標識の PCB6 種を各5ng 加え、さらに PCB 分析用エタノール12ml 及び PCB 分析用 n-ヘキサン20ml を加えて超音波及びボルテックスでよくかき混ぜた。分離したヘキサン層を取り出し、水・アルコール溶液は n-ヘキサン20ml で再抽出した。ふたつのヘキサン抽出液をあわせてヘキサンで洗浄した水2ml で洗った後、450℃で24時間加熱した無水硫酸ナトリウ

ム2gで乾燥させ、ビーカーに移した。ビーカーを50℃のメタルブロック上で20時間程度弱く過熱してヘキサンを蒸発させた。残留した脂質を秤量して脂質含有量を求めた。脂質に1N 水酸化カリウム／エタノール溶液3mlを加え、60℃に3時間加温した後、室温で一夜放置した。このアルカリ溶液に n-ヘキサン5ml 及び洗浄した水3mlを加えて攪拌した。分離したヘキサン層を取り出し、アルカリ溶液は n-ヘキサン5ml で再抽出した。2つのヘキサン抽出液を合わせて洗浄した水2mlで洗った後、無水硫酸ナトリウム（450℃で24時間加熱）1gのカラムクロマトにかけ、n-ヘキサン30mlで溶出させた。この n-ヘキサン溶液スナイダーカラムをつけて5ml程度に濃縮した。ヘキサン溶液をスピッツ試験管に移し、さらに0.1ml以下まで濃縮し、回収率測定のための

¹³C PCB(#169)5ngを加えて、ガスクロマトグラフ質量分析で測定した。

ガスクロマトグラフ質量分析の条件

キャピラリーカラム(60m DB5MS)を装着したガスクロマトグラフ／四重極質量分析計（島津、AOC-17、GC-17A、QP-5000）を使用した。キャリアーガスは高純度ヘリウム(99.999%)を用い、流速は1.5ml/minであった。カラム温度は最初100℃で2分間保持し、20℃/minで220℃まで昇温して5分間保持した。ついで2℃/minで280℃まで昇温して5分間保持した。選択イオン検出(SIM)には四塩化、五塩化、六塩化、七塩化、八塩化、九塩化、十塩化 PCB

及び HCB、DDE の $(M)^+$, $[M+2]^+$, $[M+4]^+$ の内の 2 つのイオンを用いて測定した。PCB 異性体 88 種、HCB 及び DDE の標準品の各イオンのピーク面積に対する 6 種類の ^{13}C PCB の $[M+2]^+$ ピーク面積と比較する内標準法により 18 種類の PCB 異性体、HCB 及び DDE の濃度を求めた。

B-3 ELISA 法による BPA の測定

血清検体各 1ml を HLB カラムに添加し、精製水と 10%メタノール各 1ml で洗浄後、1ml の 100%メタノールで溶出させた。溶出液は遠心エバポレーターで乾燥固定、それをアッセイ緩衝液 1ml に溶解させ、測定に用いた。

ELISA による測定は競合法により行った。ウサギ抗 BPA ポリクロナル抗体を固相化した 96 穴マイクロタイタープレートに検体 50 μ l を加えて、同時に HRP 標識 BPA 溶液 50 μ l を加えて 2 時間室温でインキュベートした。洗浄後、発色基質オルトフェニジンアミンを加え、15 分後に 2N 硫酸にて反応を停止し、各吸光度を 492nm にて測定した。同時に測定した BPA の標準曲線から検体中の BPA 濃度を求めた。

B-4 倫理面への配慮

患者及び妊婦に対しては研究内容、目的を事前に説明し自由意志に基づく文書によるインフォームドコンセント

を受けて試料の提供を受けた。

C. 研究結果と考察

C-1 習慣流産患者における検討

表 1 に患者および対照の背景、BPA、PCBs、HCB、DDE の測定値を示した。Whole body の総 PCBs、HCB、DDE について、習慣流産患者のほうが高値を示す傾向を認めなかった。Lipid basis においても測定を施行し、同様の結果であった。BPA はそれぞれ 2.97 ± 5.85 、 0.80 ± 0.38 ng/ml であり習慣流産患者は対照と比較して高い傾向にあった(NS)。また、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。

BPA、PCB、HCB、DDE の測定値について抗核抗体の有無、甲状腺機能低下の有無、 $P < 10$ 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調べるため Mann-WhitneyU 検定を施行した。BPA、PCBs、HCB、DDE 測定値と各種異常との関係は認められなかった。

BPA 異常高値と正常群について抗核抗体の有無、甲状腺機能低下の有無、 $P < 10$ 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を調べたところ、BPA 異常値を持つ患者は LPD が有意

に高頻度に認められた。

PCB は散発性流産との関係を示す報告が散見されたが習慣流産患者が高値を示すことはなく、流産の原因としては考えられないと思われた。HCB, DDE についても同様の結論だった。

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た。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ため、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、習慣流産と内分泌攪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。

C-2 正常妊婦における検討

表 2 に妊婦の母体血液（平均分娩週数 37 週）、臍帯血、羊水における BPA、PCBs、HCB、DDE の測定値を示した。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。

D. 研究業績

Sugiura MO, et al. PCBs, DDE and hexachlorobenzen are not associated with recurrent miscarriage. (発表準備中)

表1 習慣流産患者の背景と内分泌かく乱物質測定値

	Patients (n=25)	Controls (n=30)	p-value
Age	31.8±4.1	32.0±4.8	NS
Previous number of miscarriage	4.2±2.2		
BMI	21.7±2.97	20.81±2.25	NS
BPA (ng/ml)	2.97±5.85	0.80±0.38	P=0.09
Whole basis			
PCBs (ppb)	0.39±0.19	0.57±0.26	P=0.02
Hexachlorobenzen(ppb)	0.023±0.019	0.032±0.018	NS
DDE (ppb)	0.50±0.34	0.90±0.59	P=0.02
Lipid basis			
PCBs	314.4±153.1	415.4±195.9	NS
Hexchlorobenzene	15.6±12.5	21.5±10.9	NS
DDE	389.8±204.2	650.9±383.7	P=0.02

表2 妊婦の背景と内分泌かく乱物質測定値

	母体血 (n=15)	臍帯血	羊水
Age	33.9±5.9		
BMI	23.9±3.7		
分娩週数	37±2.1		
BPA (ng/ml)	2.84±2.2	1.35±0.6	0.98±1.11
Whole basis			
PCBs (ppb)	0.76±0.43	0.25±0.11	0.09±0.07
Hexachlorobenzene(ppb)	0.050±0.027	0.017±0.008	0.0046±0.0067
DDE (ppb)	1.30±0.99	0.35±0.22	0.109±0.12
Lipid basis			
PCBs	396.9±174.5	232.7±79.1	551.8±419.2
Hexchlorobenzene	24.6±10.2	16.2±5.0	17.2±9.5
DDE	730.0±569.6	368.1±286.9	370.6±213.4