

D. 考 察

従来、尿中 dialkyl phosphate の測定には一般に液体抽出法がよく用いられるが、操作が煩雑で GC/MS 分析においても多くの時間が必要となっている。そこで本研究では液体抽出法に固相抽出法を組み合わせた、ヒト尿中 dialkyl phosphate、DMP、DEP、DMTP および DETP の同時測定系を確立することを目的とし、種々の検討を行った。その結果、エバポレーション時における液性 (pH) 条件は DMP の回収に影響することが明らかとなり、さらに検討を加えた結果、エバポレーション時の液性を炭酸カリウムにて中性付近に設定することにより、DMP の回収率を向上させることができた。なお、エバポレーション時の液性は DEP、DMTP および DETP の回収に影響を与えなかった。したがって、我々が検討した尿中 dialkyl phosphate 測定系において、比較検討を行った 4 種の pH のうち、pH 8 が最適な液性であることが示唆された。エバポレーション時の液性を調整することにより DMP の回収率が向上した機序については明らかではない。しかし、酸性条件下では DMP がイオンの形で存在していることに依存している可能性が考えられる。次に最適抗酸化剤の選択とその添加濃度に

ついて検討を行った。その結果、SoD を 10 mg/ml (尿) の濃度で添加することにより、DMTP、DETP からの DMP、DEP の産生は 1 %以下まで抑制することができた。また、データに示していないが、抗酸化剤 SoD 10 mg/ml (尿) は DMP、DEP の測定に影響を与えることは確認できなかった。ゆえに我々は尿中 dialkyl phosphate 測定系における抗酸化剤 SoD 10 mg/ml (尿) を最適濃度とした。さらに我々はサンプル前処理過程において固相抽出操作を加えることにより GC/MS 分析に費やす時間は既報と比較し、飛躍的に短縮させることができた。また、サンプル中の不純物を高度に除去したことにより、分析機器の汚染も最小限に抑制することができた。今回検討した尿中 dialkyl phosphate 測定条件を用い、DMP、DEP、DMTP および DETP を測定した時の検出限界はそれぞれ 10、1、0.3、0.3 ppb 程度であった。これらの検出限界は既報に比べ、同等であるかまたは 1/3 程度であった。

E. 結 論

以上の結果より、我々が検討した dialkyl phosphate 測定法は迅速、簡便かつ高感度に尿中から DMP、DEP、DMTP および DETP 測定できる測定法であることが示唆された。

F. 今後の展望

我々は今回確立した dialkyl phosphate 測定法を用いて、ジクロロボス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンなどの有機リン系化合物を日常的に取り扱う作業者の曝露の実態と健康状態の関係を明

らかにすべく、それら曝露作業者の協力を得て尿中 dialkyl phosphate 測定を施す予定である。また、尿中 dialkyl phosphate の高感度測定が可能となったため、有機リン系化合物の低曝露作業者に対する研究も進める予定である。

4. 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

化学物質によるヒト生殖・次世代影響の解明と

内分泌かく乱作用検出のための

新たなバイオマーカーの開発

—殺虫剤曝露集団の生殖影響のリスク評価としての有機リン系殺虫剤ジクロロ
ボスの生殖毒性実験—

研究協力者

岡村 愛 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学

大谷 勝己 産業医学総合研究所

高木健次 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻

分担研究者

上島 通浩 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学

柴田 英治 愛知医科大学医学部衛生学講座

市原 学 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学

4. 厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

分担研究報告書

化学物質によるヒト生殖・次世代影響の解明と内分泌かく乱作用

検出のための新たなバイオマーカーの開発

— 殺虫剤曝露集団の生殖影響のリスク評価としての有機リン系殺虫剤ジクロロボスの生殖毒性実験 —

研究協力者

岡村 愛 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学

大谷 勝己 産業医学総合研究所

高木健次 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻

分担研究者

上島 通浩 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学

柴田 英治 愛知医科大学医学部衛生学講座

市原 学 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学

研究要旨

殺虫剤曝露集団でみられた精子運動性の低下、作業の閑散期における血中テストステロン値の上昇をふまえ、雄性ラットを用いた DDVP の 9 週間皮下投与実験を行った。精子数に有意な差は見られなかったが、精子運動性は 2 mg/kg 群で有意に低下した。精子運動解析装置を用いてヒトにおける WHO 基準に準じた運動性評価を行うと、高速直進運動精子率の低下傾向、不動精子の増加傾向が認められた。精子自動解析装置を用いた場合、詳細な運動性を評価することが可能になり、運動性変化をより鋭敏に検出できる可能性がある。血中テストステロン値に関してはコントロールと比較して有意差は見られなかったが、1 mg/kg 群で対照群に比べ増加傾向がみとめられ、臓器重量でテストステロン反応性臓器として知られる前立腺重量の増加傾向と一致した。精巣組織所見としては、ステージⅦにおいて、円形精子細胞／セルトリ細胞数の比に有意な変化

は見られなかった。殺虫剤散布作業など労働現場などでのリスク評価を行うためのデータのヒトへの外挿という視点からは、コリンエステラーゼ活性の阻害がより少ない 1 mg/kg 未満の低容量域において、影響の有無を確認することが今後必要と考えられる。先の疫学調査における作業員における精子運動性の低下は、温熱など撒布作業に関連した他の要因も原因となりうるが、結論は現段階では保留したい。

A. 研究目的

有機リン系殺虫剤は世界中の農薬売上高の 1/3 を占め、その生殖毒性の評価は重要な課題となっている。これまでに我々は殺虫剤散布作業員を対象に行った生殖機能調査において、作業員の精子運動性が非曝露群と比較して散布頻度の高い夏期に有意に低下していることを報告した。殺虫剤散布作業との関連を示唆する結果であり、作業に関連する有害要因としては温熱やライフスタイルの他の要因も考慮する必要があるが、殺虫剤に限定して考えた場合、調査集団が使用していた殺虫剤の中で使用頻度が高く、動物実験で精巣毒性の報告(Krause et al;1974 他)のある殺虫剤はジクロロボス(DDVP)であった。しかし、これらの報告は米国環境(EPA)等においてリスク評価の資料とはされてなく、ジクロロボスの男性生殖毒性の有無について明確な結論はでていない。これは、1970 年

代以前に発表された報告内容のいくつかは、現在から見ると固定、包埋方法、一群あたりの動物数、群の数などが不十分で、判断を十分に下せないことが一因であろう。

このため、平成 14 年度にはヒトでの調査を再び行う前の予備的検討として、ラットを用いた有機リン系殺虫剤ジクロロボスの 9 週間皮下投与実験を行った。その結果、特異的生殖毒性は認められなかったと結論し、報告書に記載した。しかし、その後、さらに詳細に結果を検討した結果、精巣病理標本上で一定の変化が投与群に生じている疑いが強くなった。また、男性作業員の生殖機能健康調査のデータをより詳細に再解析した結果、血中テストステロン濃度が非曝露対照群に比べ冬に有意に高値であることが新たに判明した。ヒト集団での精子運動性の低下は、WHO 基準に基づき運動性を 4 段階に区別して計測した場合にはじめて明らかに

なる内容であり、動物を用いた生殖毒性評価において強い精巣毒性物質でない場合は、従来の運動率算出法では運動性への軽微な影響を鋭敏に明らかにできない可能性が認識された。

このため、本年度は改めてラットを用いた9週間皮下投与実験を行い、曝露指標としてのアセチルコリンエステラーゼ、各種精子指標、精巣組織標本、血中テストステロン解析を行った。また、精子自動解析装置(CASA)を用いた精子運動性の各種パラメーターについても検討した。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

本実験は、名古屋大学医学部動物実験指針に準拠して行った。あらかじめ実験計画を動物実験施設に提出し審査を受けた上で、動物が受ける苦痛を最小限とするよう、飼育管理、取り扱い等に留意しつつ実施した。

材料

試薬

- ・ ネンブタール注射液 (大日本製薬)
- ・ 生理食塩水 (扶桑薬品株式会社)
- ・ ハンクス液 (イン

ビトロジェン株式会社)

- ・ 残留農薬試験用ジクロロボス標準品(関東化学株式会社)

病理組織固定液

- ・ ブアン液
- ・ ホルマリン液
- ・ 染色液

<PAS 染色>

- ・ 0.5 %過ヨウ素酸水
- ・ 亜硫酸水
- ・ Schiff 試薬

<その他必要な試薬>

- ・ エタノール
- ・ キシレン
- ・ 封入剤

ラット

Wistar 系 10 週齢雄ラット 34 匹

上記ラットをランダムに4群(n=8 or 9)に分け、生理食塩水に溶解したDDVP溶液(1, 2, 4 mg/kg)と生理食塩水のみ4種類の投与薬を頸背部に週6日、9週間皮下投与した。翌日にネンブタール麻酔下で腹部大動脈より採血を行った。次に輸精管、精巣上体尾部を摘出し、それぞれの精子運動率を精液自動解析装置(CASA)を用いて測定した。

また、精巣上体尾部に関しては光学顕微鏡下で精子数を測定した。同様に肝臓、腎臓、前立腺、精嚢腺、副腎を摘出し、重量を測定後 - 80°C に凍結保存した。精巣、精巣上体に関しては病理組織標本作製のため、ブアン固定液に浸した。

精子検査方法

a) 精子原液作製

予め 37°C に加温したハンクス液 2.5 ml をシャーレに入れ、左側精巣上体尾部を均一になるまで細切し、懸濁液とした。これをガーゼで濾過したものを精子原液とし、その後の検査までの間、インキュベータで 37°C に保った。

b) 精子運動能測定

精子原液を予め 37°C に加温したハンクス液で 20 倍に希釈した。軽く混ぜた後、血球計算盤内(改良 Neubauer 型)に少量の精子希釈液を入れ、精子自動解析装置および倍率 200 倍で光学顕微鏡にて観察した。手作業による観察では、精子は運動精子及び非運動精子に区別して、合計約 100 個の精子を計数した。頭部のみ、あるいは尾部のみの精子については計数の対象から外した。

c) 精子数測定(精巣上体尾部重量あたり)

精子原液を 0.5 % 中性緩衝ホルマリン液にて 100 倍希釈した。血球計算盤内に少量の精子希釈液を入れ、倍率 200 倍で鏡検し、1×1 mm 区画中の精子数を計数した。区画を変え計 5 区画について計数し、平均値を求めた。左側精巣上体尾部の単位重量あたりの精子数を以下に従って算出した。

$$\text{精子数 [1/g]} = [\text{区画内精子数平均値} \times 10^4 \times 100(\text{希釈倍率}) \times 2.5(\text{原液作製時の液量})] / \text{精巣上体尾部重量 (g)}$$

組織検査法

GMA (2-ヒドロキシエチルメタクリレート) 樹脂を用いて包埋後、3 μm 切片の標本作製し、PAS 染色の後に鏡検した。各個体の精巣標本に関して、3 つの精細管断面(stage VII)を観察後、固体ごとに精細管あたりの精子細胞/セルトリ細胞数比を求めた。

血液生化学検査

採取した血液から赤血球コリンエステラーゼ活性値 (Voss and Sachsse

の変法利用)、および血中テストステロン濃度(RIA法)を測定した。

数の比に有意な変化は見られなかった(表3)。

C. 研究結果

今回の実験の投与量の範囲では、4 mg/kg 群でのみ解剖時の体重に对照群と比較し有意差が見られた。臓器重量は 4 mg/kg 群で副腎が増加、体重、肝臓が減少していた(表1)。

赤血球コリンエステラーゼ活性値は量依存的に減少し、1 mg/kg, 4 mg/kg でそれぞれ 44%および 55%阻害された(図1)。

精子数に有意な差は見られなかったが、精子運動性は 2 mg/kg 群で有意に低下した(図1、2)。精子運動解析装置を用いてヒトにおける WHO 基準に準じた運動性評価を行うと、高速直進運動精子率の低下傾向、不動精子の増加傾向が認められた(表2)。

血中テストステロン値に関してはコントロールと比較して有意差は見られなかった(図3)。ただし、有意ではなかったものの 1 mg/kg 群で对照群に比べ増加傾向がみとめられ、臓器重量でテストステロン反応性臓器として知られる前立腺重量の増加傾向(表1)と一致した。

病理組織検査ではステージⅦにおいて、円形精子細胞/セルトリ細胞

表1 各臓器の絶対重量(g)

	control群	1 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg
ラットの数	8	8	9	9
体重	426±24	423±14	413±29	370±30 *
左精巣上体	0.58±0.02	0.56±0.03	0.57±0.03	0.56±0.05
左精巣	1.62±0.06	1.63±0.11	1.64±0.14	1.64±0.17
前立腺	0.7±0.09	0.80±0.13	0.63±0.24	0.58±0.15
精嚢腺	1.96±0.19	2.17±0.21	2.19±0.31	1.88±0.16
左副腎	0.034±0.0034	0.036±0.0089	0.035±0.012	0.044±0.007*
肝臓	12.75±1.7	12.7±0.9	11.69±1.5	10.83±1.89*

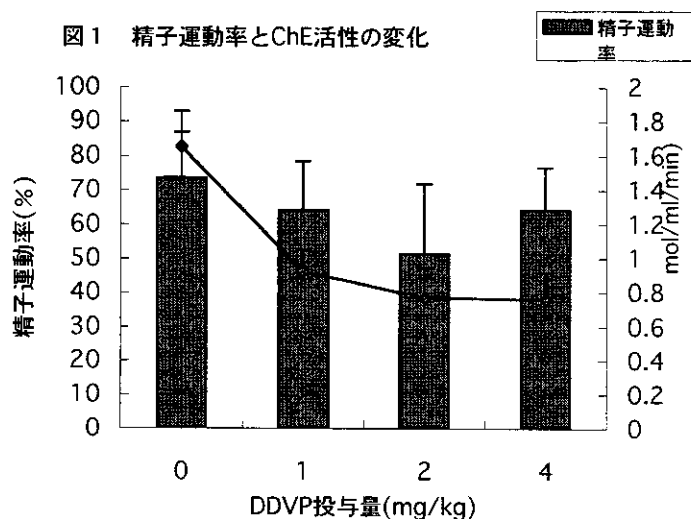


図2

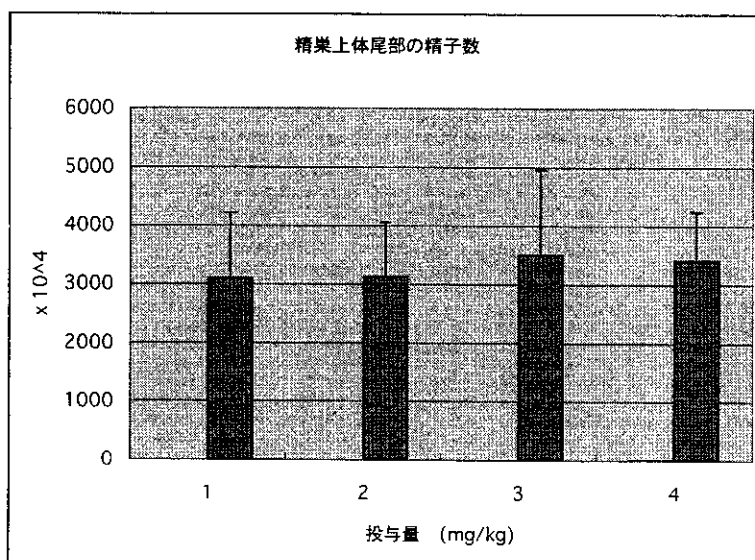


表 2-1 精子運動解析装置による輸精管精子の運動性評価

輸精管

mg/kg	rapid	medium	slow	static
0	55.4±15.3	5.9±5.3	5.0±2.4	33.9±11.3
1	56.4±11.0	3.4±2.1	4.4±3.2	36.4±11.5
2	47.4±20.0	2.9±1.9	7.0±6.0	42.9±20.5
4	46.90±19.1	2.1±1.6	5.6±5.2	45.3±20.0

表 2-2 精子運動解析装置による精巣上体尾部精子の運動性評価

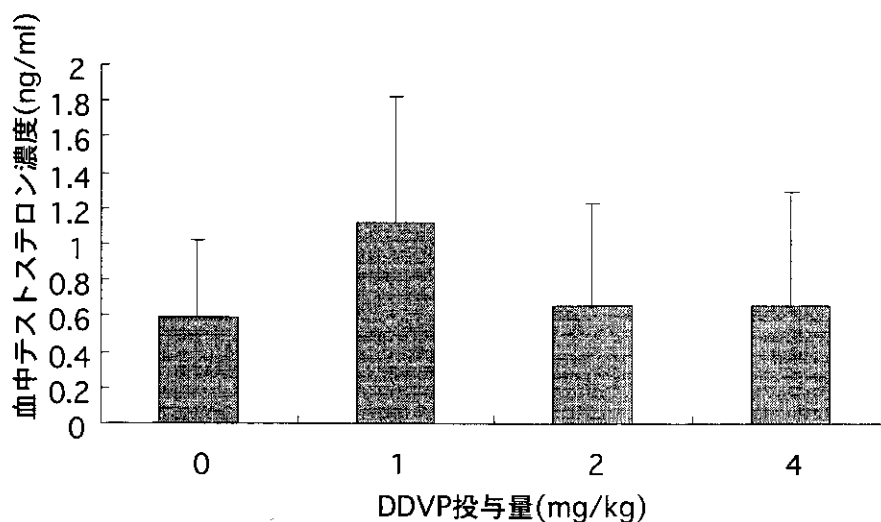
尾部

mg/kg	rapid	medium	slow	static
0	70.5±14.8	3.1±2.7	5.1±4.5	21.5±12.0
1	61.4±13.0	3.1±2.2	4.8±3.3	30.8±13.0
2	49.0±21.0	2.0±1.7	8.0±6.7	40.8±20.5
4	60.8±12.4	3.2±2.6	5.6±4.4	30.3±12.1

表 3 ステージVII精細管における円形精子細胞／セルトリ細胞数の比

投与量 (mg/kg)	円形精子細胞	セルトリ細胞	精子細胞／セルトリ細胞
0	145.1±26.6	11.0±3.3	14.2±3.1
1	141.4±24.6	10.1±4.0	15.9±4.7
2	132.1±19.3	10.3±2.9	13.4±1.6
4	147.5±19.1	11.8±3.7	13.5±2.1

図3 血漿中テストステロン濃度



D. 考察

今回の研究範囲では最大投与量でのコリンエステラーゼ活性が55%阻害されていたが、これはヒトでは急性中毒状態に相当する。生殖器系に関しては2 mg/kg投与群で有意な運動精子率の低下が見られ、精子運動性をより詳細に解析した場合、有意ではなかったが、全体として高速直進運動精子率の減少傾向、非運動精子率の上昇傾向が認められた。精子自動解析装置を用いた場合、詳細な運動性を評価することが可能になり、運動性変化をより鋭敏に検出できる可能性が示された。ヒトでの疫学調査では、WHO基準¹⁾にのっとり運動性を4段階に区分した場合に、緩徐な直進運動精子率および非前進運

動精子率の有意な変化をみとめている²⁾が、動物モデルにおいても同様のことはいえると思われる。これは今後の課題であろう。

その他の項目に関しては、全体として用量依存性の変化はみとめられなかった。したがって昨年の結果とあわせ、パイナップル畑などで1970年代に使われ強い生殖毒性の存在が明らかになった殺線虫剤1,2-ジブromo-3-クロロプロパン(DBCP)とは少なくとも異なり、精粗細胞の消失など明瞭な精細管変性を伴う強い生殖毒性はないと考えられる。しかし、有意な変化ではなかったが、血中テストステロン濃度と前立腺重量がともに1 mg/kg投与群で増加傾向にあったことから、この群では少なくとも

測定上のばらつきとは異なる原因でテストステロンが高い傾向にあった。殺虫剤散布作業など労働現場などでのリスク評価を行うためのデータのヒトへの外挿という視点からは、コリンエステラーゼ活性の阻害がより少ない 1 mg/kg 未満の低容量域において、影響の有無を確認することが今後必要と考えられる。

DDVP の精子運動性への影響の有無については、グレーゾーンの残る結果となった。個体間の測定結果の変動が大きく生じうる影響の大きさが小さい場合、検出力をあらかじめ見積もって 1 群あたりの匹数を設定する必要がある。先の疫学調査における作業における精子運動性の低下は、温熱など撒布作業に関連した他の要因も原因となりうるが、今回の研究結果で観察された量反応関係を伴わない 2 mg/kg での運動性の低下が真の現象である可能性が残る以上、ヒトでの運動性低下の原因に関する結論は現段階では保留したい。

このような精子運動性の低下があった場合、妊娠に対する具体的なリスクになりうるかはまた別の問題であり、将来の検討課題であることを最後に指摘しておく。

E. 結論

雄性ラットに対する DDVP の 9 週間皮下投与実験を行った。男性生殖器関連の変化としては、高速直進運動精子率の低下傾向、不動精子の増加傾向が認められ、運動精子率の低下としては 2 mg/kg 群において有意であった。先の疫学調査における作業における精子運動性の低下は、温熱など撒布作業に関連した他の要因も原因となりうるが、結論は現段階では保留したい。

F. 文献

- 1) WHO, WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
- 2) Kamijima M, Hibi H, Gotoh M, Taki K, Saito I, Wang H, Itohara S, Yamada T, Ichihara G, Shibata E, Nakajima T, Takeuchi Y. A Survey of Semen Indices in Insecticide Sprayers. J Occup Health 46, 109-118, 2004

5. 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

化学物質によるヒト生殖・次世代影響の解明と内分泌

かく乱作用検出のための新たなバイオマーカーの開発

— 有機錫化合物中毒患者調査のための予備実験 —

研究協力者

宮田麻衣子 研究支援者（名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学）

山ノ下 理 受託研究員（名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学）

分担研究者

上島 通浩 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学

主任研究者

那須 民江 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学

5. 厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

化学物質によるヒト生殖・次世代影響の解明と内分泌かく乱作用
検出のための新たなバイオマーカーの開発
— 有機錫化合物中毒患者調査のための予備実験 —

研究協力者

宮田麻衣子 研究支援者（名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学）

山ノ下 理 受託研究員（名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学）

分担研究者

上島 通浩 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学

主任研究者

那須 民江 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学

研究要旨

塩化トリメチルスズのニューロステロイド合成への影響を知る目的で、マウスライディツヒ腫瘍細胞を用いて実験を行った。塩化トリメチルスズは比較的細胞毒性の強い化学物質であった。テストステロンの絶対濃度には影響を与えないが、プロゲステロンに対する濃度は、量依存的に低下させた。これは塩化トリメチルスズによる CYP17 の遺伝子発現の抑制が起因すると解された。このように、塩化トリメチルスズは生殖腺ステロイド合成を抑制することが明らかとなった。これは、塩化トリメチルスズがニューロステロイド合成にも影響を与える可能性を示唆するものであり、これらの結果を踏まえて、次年度の疫学調査を行うことが望まれる。

A. 研究目的

有機錫化合物(organotin compound)は、炭素とスズの直接結合をもつ化合物の総称で、プラスチックの安定剤や、殺菌剤、防腐材及び海洋防付着ペンキなどに幅広く使われている。

トリブチル錫やトリフェニル錫はイボニシのインボセックスの原因とされる。これらの有機錫化合物は現在船底塗料としては用いられていないが、別の種類の錫化合物は食品包装にも用いられる塩化ビニル等の安定剤として用いられているため、類縁化合物のヒトでのデータは重要である。

トリメチル錫($(\text{CH}_3)_3\text{Sn}$)は無色の液体で、融点 23°C 、沸点 182°C 、水に不溶である。トリメチル錫は錫化合物の中で最も強い神経毒性を持つ化学物質と報告され¹、プラスチックの安定剤や、虫、ねずみの化学不妊剤、及び殺菌、殺虫剤として使われている²。近年、トリメチル錫の生産販売量は制限されている。Guardら³及びHallasら⁴の研究によると、無機錫及び有機錫は河口生態系で生物や非生物ルートでメチル化され、トリメチル錫になる。今までのトリメチル錫に関する報告は、ほとんど動物実験

研究や、事故による少人数の中毒例である。特に次世代への影響については、ラットでの研究により報告されているが^{5,6}、疫学研究報告は皆無である。今回、私達は1998年中国で発生したトリメチル錫中毒事件について調査を計画した。

昨年度の調査において、中国における塩化トリメチルスズ中毒者の症状は主に頭痛、ふらふらする、眩暈、記憶力減退及び精神異常であった。これらの症状から判断すると、塩化トリメチルスズは脳、神経系に影響を与えることが予想される。

最近、脳でもステロイドホルモンが合成されることが明らかにされ、ニューロステロイドと呼ばれ、記憶や学習などで重要な役割を果たしている。ニューロステロイドは生殖腺のステロイド合成と同様な酵素によって行われ、コレステロールから合成される。

最近、私達の教室では、マウスライディッヒ腫瘍細胞におけるテストステロン合成系に関わる遺伝子発現系の解析方法を開発した。この解析方法を利用して、塩化トリメチルスズの生殖腺ステロイド合成に与える影響を検討し、ニューロステロイド合成への影響を考察した。

B.研究方法

1) 細胞の培養と回収

1)-1 細胞の培養

細胞は MLTC-1 マウスライディッチ腫瘍細胞 (ATCC:CRL-2065)を用いた。75cm² 培養フラスコで細胞を培養し、コンフルエントを 5ml の PBS(phosphate buffered saline pH7.4)で洗い、2×トリプシン 10 μ l を加えて 37°C 10 分インキュベートした。その後、20%FBS、50 μ g/ml アンピシリンを含んだ RPMI1640 培養液を 5ml の加え、50ml 遠心チューブに移し、1000g で 5 分間 (22°C) 遠心した。上清を捨て、フェノールレッド抜ききの 0.45%グルコース、10mM HEPES、10%FBS を含んだ RPMI1640 培養液を加えた後、25cm² フラスコに 2ml ずつ分注した。各フラスコに 3ml の 0.45%グルコース、10mM HEPES、10%FBS を含んだ RPMI1640 培地をそれぞれ加えて 37°C で 24 時間インキュベートした。

1)-2 化学物質処理

塩化トリメチルスズの最終濃度が 0M、10⁻⁶M、10⁻⁵M、3.3 \times 10⁻⁵M、10⁻⁴M、3.3 \times 10⁻⁴M、10⁻³M となるようにフラスコに添加した。塩化トリメチルスズは 0.5%エタノールに溶解させたものを使用した。これらの化学物質添加後、細胞を 37°C で 2 日間インキュベートした。

1)-3 細胞および細胞外液の回収

LDH を測定するために 2ml の培養液を 2ml チューブに入れて回収し、-80°C に保存した。残りの細胞および培地に 120 μ l のトリパンブルー溶液を加え、方眼マイクロメーター (1.25cm \times 1.25cm) 格子を備えた顕微鏡において細胞数を数えた。その後培地を廃棄し、フェノールレッドと血清抜ききの 2ml の 0.45%グルコース、10mM HEPES を含んだ RPMI1640 培地で 2 回洗浄し、同じ組成の培地を 5ml 加えた。50 μ l、100nM の hCG を加え、37°C で 2 時間インキュベートした。インキュベーション終了後培地を各 2ml ずつ 2 本回収し、テストステロンとプロゲステロン測定のため、-80°C で保存した。残りの培地を捨てて、2ml の 2×トリプシンを加え、37°C 10 分インキュベートした。これを 2ml チューブに移し、1500g で 5 分間 (22°C) 遠心した。上清を捨てて、-80°C で保存した。

2) テストステロン・プロゲステロンの測定

培養液中に放出されたテストステロンとプロゲステロンは EIA Kit (Cayman 社、USA) を用いて測定した。

3) RNA 抽出・cDNA 合成

回収した細胞に 70%エタノールを 400 μ l 入れてよく攪拌した。2ml collection tube に乗せた RNeasy mini spin column に混合液を注ぎ、12000rpm で 15 秒間 遠心した。廃液を捨て、collection tube を元に戻し、Buffer RW1(Wash buffer) 350 μ l を column に注ぎ、12000rpm で 15 分間 遠心した。Collection tube を新しいものと交換し、DnaseI 溶液と Buffer RDD を 1:7 の割合で混ぜた溶液 80 μ l を column のメンブランに注ぎ、20~25°C で 15 分間放置した。Buffer RW1 350 μ l を column に注いだ後、12000rpm で 15 分間 遠心した。Collection tube を新しいものに交換し、Buffer RPE(Wash buffer) 500 μ l を column に注いだ。12000rpm で 15 分間 遠心し、廃液を捨て、collection tube を元に戻して、Buffer RPE 500 μ l を column に注いだ。その後 15000rpm で 2 分間遠心した。Collection tube を新しいものと交換し、再び 15000rpm で 1 分間遠心した。1.5ml collection tube に交換し、RNase-free water 50 μ l を column のメンブランに注ぎ、30 秒間放置した。15000rpm で 1 分間 遠心し、RNA 抽出液を得た。

RNA の検定を電気泳動により行った。10 \times FA gel buffer(MOPS が 200mM、sodium acetate が 50mM、EDTA が 10mM

となり、pH が 7.0 となるように 10N の NaOH で調整)を作った。その後 1.2% FA gel(0.24g アガロース、2ml 10 \times FA gel buffer、18ml RNase-free water)を 100ml 三角フラスコに入れ、電子レンジで溶解し、37% formaldehyde を 0.36ml 加え、エチジウムブロマイドを 0.2 μ l 加えた。ゆっくり混ぜてプレートに流した後、4°C に 30 分ほど放置してゲルを固めた。5 \times RNA loading buffer(80 μ l saturated bromophenol blue solution、0.8 μ l 0.5M EDTA pH8.0、7.2 μ l 37% formaldehyde、100% glycerol、30.84 μ l formamide、40 μ l 10 \times FA gel buffer)を作り、RNA 抽出液 1 に対し、5 \times RNA loading buffer が 4 になるように加えて、RNA サンプルを調整した。その後 65°C 5 分間放置し、氷冷水につけた。次にマーカー(5 \times RNA loading buffer と saturated bromophenol blue solution の割合が 1:4 になるようにする)を作成した。さらに 1 \times FA gel running buffer(40ml 10 \times FA gel buffer、8ml 37% formaldehyde、352ml RNase free water)を作り、Mupid(ミニゲル泳動槽)に流し、固めておいた 1.2% FA gel を入れ、分子マーカーを端に 3.25 μ l 乗せ、RNA サンプルを乗せて 50V、1 時間泳動した。

cDNA の合成は Super Script

First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit を使い、Oligo(dT)₁₂₋₁₈ プライマーで合成した。

4) 定量リアルタイム PCR

プライマー、プローブの作成は下記 GI ナンバーの塩基配列を参考に、その配列を基にして PE Biosystems 社製 Primer Express version 1.0 で作成した。マウスの GAPDH は PE Biosystems 社製を使用した。PPAR-alpha と GAPDH は PE Biosystems 社製 TaqMan Universal PCR Master Mix を使用し、TaqMan probe で測定した。プライマー濃度は 100nM、プローブ濃度は 200nM で PCR を行った。その他の mRNA は SYBR Green 法で測定した。

PPAR-alpha の TaqMan probe は全て蛍光物質として FAM, 消光剤として TAMURA を付けた。GAPDH の TaqMan probe は全て蛍光物質として VIC, 消光剤として TAMURA を付けた。

Quantitative real time-PCR は PE Biosystems 社製 ABI PRISM 7000 Sequence Detection System で行った。各測定物質はそれぞれのアンプリコンを Rromega 社製 pGEM-T Easy vector 又は Invitrogen life technology 社製 pCR2.1 vector に組み込み、解析した数値は GAPDH に対する比として表した。

使用したプライマーあるいはプローブは以下の通りである。

- HMG-CoA synthase (HS): forward primer: 5'-TGTGGCACCCGATGTCTTT-3', reverse primer: 5'-GACCAGATACCA CGTTCCTTCAA-3';
- HMG-CoA reductase (HR): forward primer: 5'-TGTGGTTTGTGAAGCCGTCAT-3', reverse primer: 5'-CGTCAACCATAGCTTCCGTAGTT-3';
- steroidogenic acute regulatory protein (StAR): forward primer: 5'-AAGGAAAGCCAGCAGGAGAAC-3', reverse primer: 5'-TCCATGCGGTCCACAAGTT-3';
- peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR): forward primer: 5'-AGTTCGTGGCAC TGCATAAGC-3', reverse primer: 5'-GCTGCCCATCTCTCCTCCTA-3';
- cytochrome P450scc (CYP11A): forward primer: 5'-CCATCAGATGCAGAGTTTCAA-3', reverse primer: 5'-TGAGAAGAGTATCGACGCATCCT-3';
- 3-hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4-isomerase (3 β -HSD): forward primer: 5'-GGAGGCCTGTG

TTCAAGCAA-3',
reverse primer: 5'-GGCCCTGCAACA
TCAACTG-3';

• cytochrome P450_{17 α} (C₁₇₋₂₀ lyase CYP17) :
forward primer: 5'-
CCATCCCGAAGGACACACAT-3',

reverse primer: 5'-
CTGGCTGGTCCCATTTCATTT-3';

• 17 β -HSD: forward primer: 5'-CA
ACGATTCCTCCTGACACGAT-3',
reverse primer: 5'-GCTGATGTTGC
GTTTGAGGTAA-3';

• PPAR α : GI 7106384, forward pri
mer: 5'-TTTCCCTGTTTGTGGCTGCTA-3',
reverse primer: 5'-CCCTCCTGCAACT
CTCAATG-3'

Taq Man probe, 5'-
AATTTGCTGTGGAGATCGGCCTGG-3'

• GAPDH: PE Biosystems 社製 TaqMan
Rodent GAPDH Control Reagents を使用
Taq Man probe, 5'-
CCCGTTCTCAGCCTTGACAGTGCC-3'

SYBR Green 反応は、25 μ l 中に最
終濃度 1 μ M SYBR Green PCR Master Mix
(Applied Biosystems), 400 nM プラ
イマー, および 1 ng cDNA をテンプレ
ートとして加え、95 $^{\circ}$ C で 10 分
間インキュベーションをして
Amplitaq Gold polymerase の活性化

を行った。引き続き 95 $^{\circ}$ C で 15 sec、
40 cycles denaturation を、60 $^{\circ}$ C で
1 分間 annealing と extension を行
った。

5) 統計学的検定

実験結果の有意差の検定には分散
分析後 Dunnett の多重比較を使用し
た。

C. 研究結果

塩化トリメチルスズを添加した場合、細
胞数は 0.033mM から減少し、細胞毒性
が強い物質であった (Fig.1) .例えば
0.1mM ではビスフェノールAを添加した
場合細胞数は 60%残っていたのに対し、
塩化トリメチルスズの場合は 20%残っ
ていたのみであった。

プロゲステロン濃度は 0.033mM から
上昇したが、テストステロン濃度に変化
はみられなかった (Fig.1) .しかし、プロ
ゲステロンに対するテストステロンの生
成割合をみると (Fig. 1)、0.01M から著
しく減少した。減少のパターンは過去に
検討したフタル酸モノエチルヘキシルや
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸添加後に類
似していたが、これらの化学物質より低
濃度から減少した。

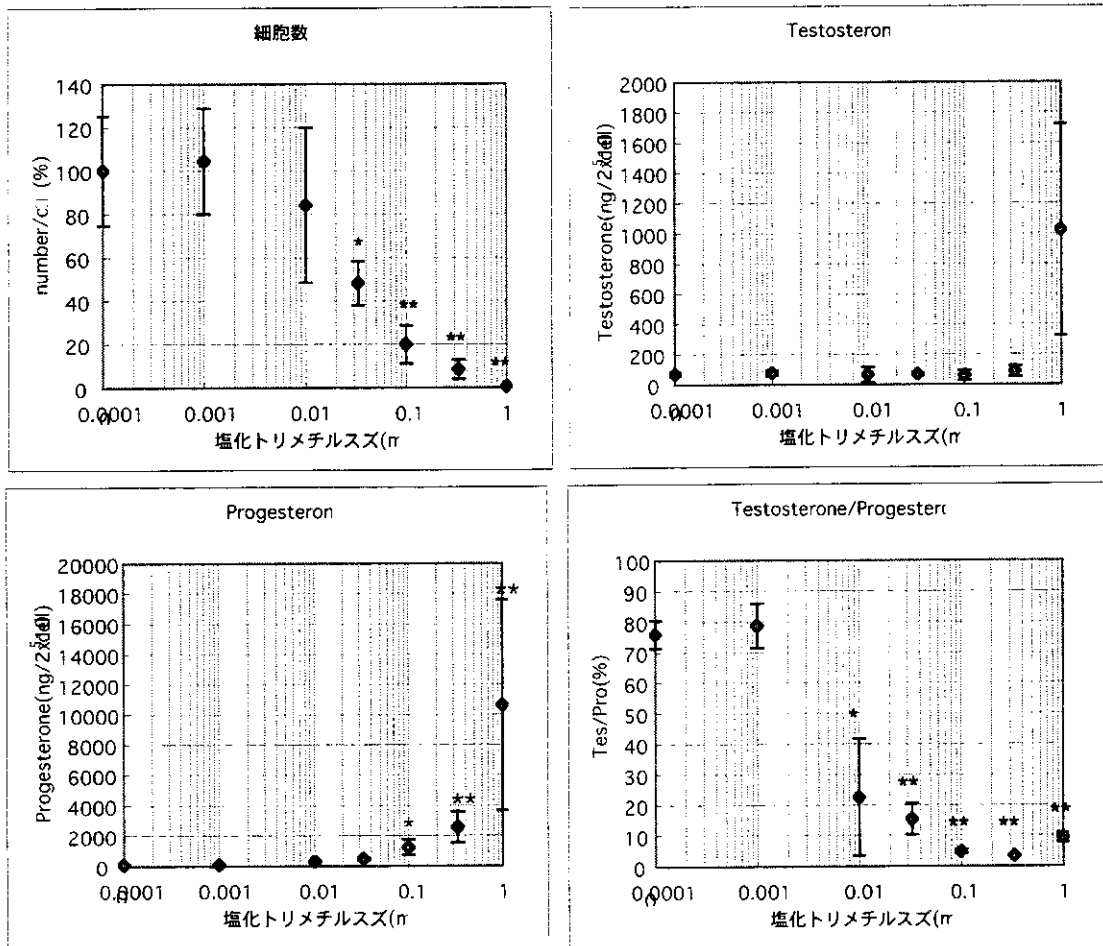


Fig.1 塩化トリメチルスズ添加後の細胞数、テストステロン、プロゲステロン濃度の変化