

暴露作業で有意に高い結果であった。尿中代謝物と 8-OHdG レベルは正の相関性を示した。Q アレル数が減少するにつれて、白血球 8-OHdG 値は有意水準の境界で減少傾向を示した。殺虫剤暴露、PON1 多型、2 変数間の交互作用を独立変数として含む白血球 8-OHdG の一般線型モデルにおいて、3 変数すべては統計学的に有意であった。

これらの結果は有機リン殺虫剤がヒト血液・尿中の酸化ストレスを、特に代謝物と関連して誘発する可能性を示唆している。

A. 研究目的

有機リン系殺虫剤は殺虫剤や神経ガスとして幅広く使われている。シトクローム P450 依存性ミクロソームモノオキシゲナーゼによって *in vivo* で活性化され酸化脱硫による高毒性酸素(oxon)類似物質となる。この過程は肝臓で主に起こる。肝には、グルタチオン-S-トランスフェラーゼやモノオキシゲナーゼ、パラオキシナーゼのようなチオンやオキソンを解毒できる酵素がいくつか存在する。

殺虫剤は *in vitro* や *in vivo* で活性酸素種(ROS)の産生を誘発すると報告されてきた。過酸化水素(H₂O₂)、超酸化物(O₂⁻)、ヒドロキシルラジカル(HO)のような ROS は生体高分子と反応し、酵素の不活性化や脂質の過酸化、そして 8-OHdG のような DNA 傷害を起こす。

パラオキシナーゼは有機リン系神経作用剤や殺虫剤を加水分解するエステラーゼ蛋白である。ヒトのパラオキシナーゼ多重遺伝子集団は第 7

染色体の長腕の q21-q22 に位置し、お互いに隣接し、PON1、PON2、PON3 と名づけられた 3 つのメンバーを含む。PON1 は有機リン系殺虫剤のオキソン誘導体をジエチルリン酸に代謝する酵素である。チオノ型有機リン剤のオキソン誘導体は、肝臓や肺組織中の PON1 の存在パターンと類似しているシトクローム P450 3A 族による酸化的脱イオウ化により生成される。PON1 はマクロファージや血清中の酸化ストレスを直接減少させ、PON1 が欠落すると血清だけでなくマクロファージでも酸化ストレスが増加する結果となる。

PON1 活性の分子基盤は遺伝子の多型により決定される。すなわち position 192 でのアミノ酸 single glutamine (Q)→arginine(R)への置換である。パラオキシソンの加水分解において、PON1 の Q アレル(position 192 がグルタミン)は R アレル(position 192 がアルギニン)よりも効率が数分の一となりうる。

これらの事実は有機リン系殺虫剤がヒト体内の酸化ストレスレベルを上昇し、PON1 遺伝子型が Q/R や R/R よりも Q/Q であるヒトでより多くの ROS が産生されるという仮説を導いている。これらを検証するために、我々は、有機リン殺虫剤を使用する 18 人と使用しない 18 人の末梢血の白血球及び精子から抽出した DNA 中の 8-OHdG レベルを測定し、殺虫剤使用の状況と PON1 遺伝子型による比較を行った。

B. 研究方法

対象

主に有機リン系殺虫剤に暴露した男性 18 人、暴露していない男性 18 人をこの研究の対象者とし、末梢静脈血と精液を収集した。平均年齢と標準偏差はそれぞれ 33.2 ± 7.0 と 34.5 ± 7.5 である。個々の対象者よりインフォームドコンセントを取得したが、一般的な検査の結果を本人に返却した上で、資試料を連結不可能匿名化した。研究計画については、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得た。

DNA の抽出と多型解析

ゲノム DNA は K2 EDTA で抗凝固された末梢血と精子から DNA Extractor WB kit(Wako, Osaka, Japan)を使用し、そのキットのプロトコール

に従って分離した。

我々はアレル特異的蛍光 TaqMan プローブを使って PON1 遺伝子の遺伝子型分析を行った。オリゴヌクレオチドプライマー 5'-CTGAGCACTTTTATGGCACAAATGA-3' と 5'-ACCACGCTAAACCCAAATACATCTC-3' を PON1 遺伝子の 84 塩基対を増幅するために用いた。プローブ オリゴヌクレオチドのシーケンスは 5'VIC-CCTACTTACAATCCTG-3'(Q192 アレル特異的)と 5'FAM-CCCTACTTACGATCCTG-3'(R192 アレル特異的)を用いた。PCR 反応は、TaqMan2×Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems, Foster, USA) 12.5ul、VIC と FAM でラベルされたプローブ、センスまたはアンチセンスプライマー と 100 ng のゲノム DNA を含む 25ul の反応液中で行った。プローブとプライマーの最終濃度はそれぞれ、200 nM と 900 nM に設定した。PCR サイクル条件は 50°C で 2 分、次に 95 度で 10 分を 1 回、そして 95 度で 15 秒、60 度で 1 分を 40 サイクル行った。

8-OHdG の分析

それぞれ 10 μ g の DNA は 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.8) 100 μ l に浮遊させた。サンプルはヌクレアー

ゼ P1(Sigma, St Louis, MO)の 12 単位を 37°C、1 時間で、そして *Escherichia coli* アルカリフォスファターゼ (Sigma, St Louis, MO)の 1.3 単位を 1 M Tris-HCL 緩衝液(pH 7.5)に加えて 37 度で 1 時間インキュベートすることで、デオキシヌクレオチドに消化した。8-OHdG 測定に ELISA キット(8-OHdG Check, Japan Institute for Control of Aging, Fukuroi, Japan)を用いた。抗体を薄く張ったマイクロウェルプレートを用いて競合 ELISA を製品マニュアルに従って行った。8-OHdG 濃度は検量線によって算出した。

統計学的解析

有機リン系殺虫剤使用者とコントロール間の 8-OHdG 値の平均の比較に Wilcoxon 順位和検定を用いた。また 2 群間での PON1 遺伝子型の分布パターンを比較して傾向をつかむために χ^2 乗検定を用いた。殺虫剤使用者とコントロールの PON1 遺伝子型による 8-OHdG 増減の傾向の存在を検定するのに回帰分析を用いた。他の変数をコントロールした後、殺虫剤暴露、PON1 遺伝子型、相互作用の白血球や精子細胞中の 8-OHdG への影響を調べるために、一般線型モデルを用いた。

C. 研究結果

尿中の 8-OHdG は殺虫剤使用者の方がコントロールより有意に高かった。血液白血球中の 8-OHdG 平均値もコントロールに比べ殺虫剤使用者で有意に高かった。

PON1 Q/Q 遺伝子型の保有率は殺虫剤作業員で 21.4%、対照群で 16.7% であった。それらの間の比較では統計的に有意な差は見られなかった。白血球 8-OHdG 値は、Q アレル数が減少するにつれ、有意水準の境界で減少傾向を示した ($p=0.062$)。しかし、コントロールの白血球 8-OHdG では有意な傾向は見られなかった。精子の 8-OHdG では、どの群においても有意な増減傾向は見られなかった。

殺虫剤暴露(殺虫剤作業員=1、コントロール=2)、PON1 多型(Q/Q=1, Q/R=2, and R/R=3)、それらの間の相互作用の独立変数を含む白血球 8-OHdG の一般線型モデルにおいて、3つの変数全ては統計学的に有意であった。

D. 考察

白血球および尿中の 8-OHdG 値の平均はコントロールと比較して殺虫剤作業員で有意に高値を呈した。しかも有機リン剤の尿中代謝物と尿中 8-OHdG の間には正の相関関係が認められた。これは 8-OHdG 産生につながる ROS の酸化ストレスが有機リン

殺虫剤の代謝の過程で発生していることを示す。有機リン殺虫剤がヒト白血球の酸化ストレスを誘発することを示すこの結果は、過去の研究結果と一致している。Phosphamidon, trichlorfon, dichlorvos のような有機リン系殺虫剤は、SOD 活性阻害、マロンアルデヒド生成の増加、乳酸デヒドロゲナーゼの漏出、グルタチオンペルオキシゾーム活性の減少によって示されるように、酸化ストレスを誘発することが報告されてきた。しかし、殺虫剤作業者と対照者の精子の 8-OHdG 値は有意な違いが見られなかった。それは、少なくとも部分的には精子細胞のサンプルサイズが小さいことによるのであろう。

PON1 多型の分布は人種間で大きく異なっている。PON1 Q192 アレルの遺伝子頻度は白人で 0.69、ヒスパニックで 0.59、日本人で 0.34、韓国人で 0.4 である。殺虫剤作業者と対照群の PON1 アレルの遺伝子頻度と、日本人の PON1 アレル頻度である 0.34 を比較したところ、統計学的に有意差は見られなかった(χ^2 乗値は殺虫剤作業者と対照群で 2.14、コントロールで 0.55 であった)。多型分布のパターンは 2 つの集団で有意な差は無かった。

PON1 遺伝子型に関連して、殺虫剤作業者と対照群の白血球と尿中の 8-OHdG 値を測定した。Q/Q タイプの

殺虫剤作業者の白血球 8-OHdG 値は同じタイプのコントロールの白血球と比較して 2 倍であったが、サンプルサイズが小さかったため統計学的有意差は得られなかった(殺虫剤作業者と対照者ともに 3 人)。Q アレル数が殺虫剤作業者と減少するにつれて、血液白血球中の 8-OHdG にも減少傾向がみられたが、対照群ではみられなかった。有機リン系殺虫剤がヒトの体、特に Q/Q タイプにおいて、酸化ストレスの多少と対応していた今回の結果は、血清パラオキシナーゼが哺乳類における数々の有機リン系殺虫剤の解毒に関して有意な役割を果たすという過去の報告を支持している。そして、PON1 はヒト体内で内因性のフリーラジカル除去システムの一つである。おそらく、特定の脂質過酸化物を加水分解することにより、ヒトの血清パラオキシナーゼはリポタンパクが酸化されるのを防ぐ。また、PON1 は血漿に銅イオンを暴露した場合にレシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)活性を保護するが、このように PON1 は酸化ストレスを減少させる。そしてまた、PON1 はリポキシゲナーゼ誘導性の HDL 脂質過酸化を減少させる。PON1 欠落マウスでは、血清酸化ストレスの増加が示され、それらの HDL はもはや酸化反応から

LDLを保護することができない。

肺組織では、PON1は主にクララ細胞、内皮細胞、肺胞上皮組織のタイプI細胞に存在する。肺胞の内面は有機リン化合物のような環境毒物への暴露を直接受ける。タイプI肺胞細胞中のPON1は吸入された有機リン系殺虫剤の毒性の保護に役割を果たしているかもしれない。

暴露状況、PON1遺伝子型、この2つの変数間の交互作用を独立変数として含む、白血球8-OHdG値に対する一般線型モデルにおいて、それらすべての変数は白血球8-OHdG値の有意な決定要素であった。白血球8-OHdG値はコントロールに比べ殺虫剤作業員で、他のPON1遺伝子型よりもPON1 Q/Q型で、そして特に他のPON1遺伝子型の殺虫剤作業員または対照群よりもPON1 Q/Q型の殺虫剤作業員で高くなっていた。それ故に、殺虫剤だけでなくPON1遺伝子多型も殺虫剤作業員において白血球8-OHdG値の高値に関与する可能性がある。

すなわち、今回の結果結果をまとめると、有機リン殺虫剤がヒト血液中の酸化ストレスを、特にPON1 Q/Qタイプの人で誘発する可能性を示唆している。ただし、解析したサンプル数が少なく、今回の研究では暴露群において暴露量の多少を考慮して

いないため、今後これらの点をふまえた研究が必要である。

II-3. 有機スズ化合物

王海蘭、上島通浩、那須民江、丁 訓誠、李 衛華、
宮田麻衣子、山ノ下理

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

— 有機スズ中毒元患者の健康状況調査 —

研究協力者

王 海蘭 日本学術振興会外国人特別研究員 (H16.4-8)
社団法人日本食品衛生協会リサーチ・レジデント (H16.9-H17.3)

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

食用油（ラード）に混入したトリメチルスズによる中毒を発症した中国の地域集団を対象に、生殖内分泌、甲状腺機能、神経系に関する横断研究による健康調査を行った。初年度は中毒事件発生地 of 病院に入院した 225 名（男性 117 人、女性 108 人、年齢 32.6 ± 14.9 歳（平均 \pm SD））の患者データベースを作成し、中毒当時の症状を解析した。ラードを食べ始めてから発症までの潜伏期と 1 日当たり摂取したラードの量の間には有意な負の相関が見られた。患者が摂取したラードの総量と倦怠感、行動異常、昏睡、痙攣、躁状態、幻覚、振戦、構音障害の間に有意な関連性がみられた。また、一日当たり摂取したラード量と記憶障害、躁状態、幻覚症状の間に有意な関連性が見られた。最終年度には、この解析結果および 2 年目に行った予備実験結果をもとに調査対象者、調査内容を決定し、現在の健康状態に関する調査を行った。生殖内分泌系および甲状腺機能に関しては元中毒患者群と対照群との間、あるいは重症者と軽症者の間に有意な差を認めなかったが、神経系の自覚症状や腱反射には差を認めた。すなわち、トリメチルスズの急性中毒からの快復後長期間経た後の生体影響としては、子供の発達影響への可能性は別として、生殖影響が仮に問題となるにしてもその程度は神経系に比べ十分小さいことが明らかとなった。

A. 研究目的

有機スズ化合物は、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。トリブチルスズやトリフェニルスズはイボニシのインポセックスの原因とされる。これらの有機スズ化合物は現在船底塗料としては用いられていないが、別の種類のスズ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。

トリメチルスズ($(\text{CH}_3)_3\text{Sn}$)は無色の液体で、融点 23°C 、沸点 182°C 、水に不溶である。トリメチルスズはスズ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、近年、生産販売量は制限されているが、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。Guardら³及びHallasら⁴の研究によると、無機スズ及び有機スズは河口生態系で生物や非生物ルートでメチル化され、トリメチルスズになる。生体影響に関する報告は、動物実験研究や、事故による少人数の中毒例がほとんどである。特に生殖・次世代影響についてはラットでの研究があるが^{5,6}、疫学研究報告は皆無である。このため、本研究では1998年に中国で発生したトリメチルスズ中毒事件の元患者の中毒当時の症状を解析し、現在の生

殖内分泌系、甲状腺機能を含めた健康状態について29人及び対照者26人の症例対照研究を行った。詳細については、各年度の分担研究報告書を参照されたい。

B. 研究方法

本研究の実施にあたっては、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得た。

B-1) 予備調査

初年度に、事件当時ある病院に入院した225名の患者の資料をもとにデータベースを作成し、患者が摂取したラードの量と症状との関係を解析した。解析結果および2年目に行った予備実験結果をもとに調査対象者、調査内容を決定し、最終年度に現在の健康状態に関する調査を行った。

最終年度に行った本調査の2週間前には予備調査を行って、地元の衛生管理局から患者の名簿を入手し、村の臨床医の協力を得て元患者と連絡を取り、対照者にも調査への協力の意思を確認した。

B-2) 本調査

調査期間：2005年1月13-14日

調査対象：事件当時中毒患者の多発した一つの村を今回の調査対象として選んだ。当時この村では重症患者11人、軽症患者34人が発生した。今までに元患者のうち一人が死亡し、

転居した元患者と出稼ぎ中の元患者を除いた 29 人全員が今回の調査に参加した。29 人のうち、中毒発症当時の重症者は 9 人、軽症者は 20 人、性別は男性 12 人（重症 5 人、軽症 7 人）、女性 17 人（重症 4 人、軽症 13 人）であった。

対照者は性を調整した同じ村に住む、年齢の近い、26 人の村民とした。大人の女性患者 14 人に対して対照者 16 人、大人男性患者 10 人に対して対照者 10 人とした。患者と対照者の年齢は Table 1 で示した。女性においては年齢を±2 歳で調整したが、労働可能年齢の男性に関しては仕事の都合で対照者の年齢の調整はできなかった。なお本調査は、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て実施した。現在の年齢が 15 歳以下の元患者 5 人（男性 2 人—14,15 歳、女性 3 人—7, 10, 13 歳）には採血を避ける倫理的配慮により対照者を設定しなかった。

調査内容： 調査は二日間かけて行った。村近くの病院の協力で、元患者と対照者に病院に来てもらって検査内容について説明し、“説明・同意書”（インフォームドコンセントの書式）にサインを得た後に検診を行った。

各対象者に問診、体重・血圧・脈拍測定、神経内科的診察、採血、採尿、毛髪採取を行った。問診では年齢、性別など属性と中毒当時の症状及び現在残る自覚症状、中毒後に妊

娠・出産した子供の状況を調査した。神経内科的診察では専門医による温痛覚、触覚、筋張力(muscular tone)、筋力、指鼻試験、対指試験、腹壁反射、膝腱反射、アキレス腱反射、バビンスキー現象、oppenheim 反射、Hoffmann 反射の検査を行った。

血液サンプルについて、貧血検査—Hb, RBC, WBC, 肝機能検査—総ビリルビン、直接ビリルビン, AST, ALT, 甲状腺機能—TSH, Free T4, 性ホルモン— LH, FSH, テストステロン或は E2, HBsAg の測定を行った。

尿サンプルについて、ウロペーパー II を使って、ウロビリノーゲン、潜血、ケトン体、ブドウ糖、蛋白質、pH を測定した。

毛髪サンプルについて、有害ミネラル—Be, Al, Ni, As, Cd, Sn, Hg, Pb, 必須ミネラル—Mg, P, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Mo, Se, I, 参考測定ミネラル—Li, V, Co, Ge, Na, K の量を ICP-MS により測定した (SRL)。

C. 調査結果

データベースを作成した 225 名の患者は男性 117 名、女性 108 名で、平均年齢 32.6 ± 14.9 歳(3—76 歳)であった。

重度中毒患者が摂取したラード総量は軽度中毒患者と比較して、有意に多かった。ラードを食べ始めてから、発症までの潜伏期は最短 1 日、最長 28 日、平均 5.9 ± 4.3 日であった。

潜伏期(y)と1日当たり摂取したラードの量(x)の間に有意な負の相関が見られた。 $y = -20.539 + 8.329x$ $R^2 = 0.15458$ $p < 0.001$

患者の主な臨床症状は頭痛、眩暈、耳鳴、聴力減退、記憶力減退、幻聴、幻視及び抑うつ状態、躁状態などの神経系症状、及び消化器系症状としては吐き気、嘔吐、腹痛等が見られた。重症の患者に振戦や意識障害も見られた。ロジスティック回帰分析によると、患者が摂取したラードの総量と倦怠感、行動異常、昏睡、痙攣、躁状態、幻覚、振戦、構音障害の間に有意な関連性がみられた。一日当たり摂取したラード量と記憶障害、躁状態、幻覚症状の間に有意な関連性が見られた。

1) 神経内科検査では、元患者27人と対照者25人(一人脳梗塞既往歴を持たため除いた)とも温痛覚、触覚、筋張力、筋力、指鼻試験、対指試験、腹壁反射、バビンスキー現象、Oppenheim反射、Hoffmann反射は全員正常であった。膝腱反射については27人中10人、対照者25人中1人が減弱し。アキレス腱反射については27人中9人、対照者25人中1人で減弱していた。両反射とも有意な差を示した(Table 2)。

2) 貧血、肝機能、甲状腺機能検査結果は、男女別で、患者と対照者の間で有意な差は見られなかった(Table 3-1)。重症患者、軽症患者と対照者の間にも有意な差は見られなかった(Table 3-2)。HBsAg陽性者は、患者

中3人、対照者中6人で、有意な差がなかった。

3) 尿検査の結果は、患者と対照者とも異常者を見られなかった。

4) 毛髪中ミネラル検査では、スズの量は元患者の中に一人高値者(2064.09 ppb)がみられたが、患者と対照者との間に有意な差はなかった。男性患者の毛髪ではP, Cu, Geの量は対照者より有意に高かった。女性患者の毛髪ではCa, Kの量は対照者より有意に低かった、Li, Vの量は、対照者より有意に高かった。男女を合計した重症患者、軽症患者と対照者の測定結果はTable 4に示した。軽症患者ではBe, As, Cd, Fe, Li, Coの量は対照者より有意に高かったが、重症患者では有意な差がなかった。

5) 性ホルモン関係の検査については、大人女性患者の中閉経者7人、月経期1人、妊娠中1人であった。卵胞期や、排卵期、或は黄体期の5人はいずれもLH, FSH, E2のレベルは正常範囲だった(Table 5)。閉経者のLH, FSH, E2レベルは対照者と比べ、有意な差が見られなかった(Table 6)。大人男性患者のLH, FSHのレベルは対照者より有意な差が見られなかったが、Testosteroneのレベルは対照より有意に高かった(Table 7)。

6) 元患者達に現在残る自覚症状はTable 8で示した。記憶力減退、反応が遅い、頭痛、眩暈、力が乏しいという訴えが目立った。

7) 15歳以下の5人について、中

毒当時重症だった 7 歳の女児の毛髪中スズの量は 434.04 ppb と測定され、他の 4 人より高かった。又、母親はこの子が風邪を引きやすい、学習能力が低下していると述べた。

D. 考察

今回の調査結果では、毛髪中のスズの量は元患者 29 人中 28 人の平均値には対照者と差が無く、6 年前の中毒当時摂取したスズ量と現在の毛髪中のスズ量との関連は見られなかった。高値者(2064.09 ppb)のスズ量は平均値より約 20 倍高く、別の原因で毛髪に入ったことが考えられた。また、貧血、肝機能、甲状腺機能及び尿の検査結果では当時スズ中毒との関連は見られなかった。元患者には膝腱反射とアキレス腱反射の減弱者が多く、現在でも神経系への影響が残存していると考えた。男性患者のテストステロンレベルは対照者より高かったが、対照者より約 10 歳若いことが原因と考えられる。

今回の調査では元患者と対照者ともほぼ全員毛髪中有害ミネラル Be, Al, Ni, As, Cd, Pb の量は日本人の基準値より高く、生活環境中での暴露量が高いと思われた。調査対象の自覚症状中四肢の痺れ、倦怠感は As の高値との関連があると考えた。

生殖・次世代影響および甲状腺機能に関しては、有機スズ化合物中、トリブチルスズやトリフェニルスズの内分泌かく乱作用が明らかになっ

ている。トリメチルスズについては、Puale ら(1986)の研究⁵により、妊娠ラットにトリメチルスズを投与した後、妊娠期の母獣の体重減少が見られ、新生仔の生存率低下、仔ラット成年後の体重減少、および生後 1 日目の仔ラットの脳に病理的な変化がみとめられている。妊娠中トリメチルスズ暴露による次世代ラットの学習能力への影響も報告されている⁶。今回の調査範囲では元中毒患者群と対照群との間、あるいは重症者と軽症者の間に集団として有意な差は認められなかったが、中毒時 2 歳だった女児の免疫能や学習能力が低下している可能性があり、また、中毒者が事件後意識して妊娠しないようにしていることが明らかになった。

E. 結論

塩化トリメチルスズの中毒患者においては、生殖、次世代影響の存在を完全には否定できないものの少なくとも成人の生殖内分泌および甲状腺機能においては明確な影響はみられず、むしろ神経系の残存影響が問題になると考えられた。

文献：

1. Annau Z. 1988. Organometals and brain development. *Progr. Brain Res.* 73:

295-303.

2. Smith P and Smith L. 1975. Organitin

- compounds and applications. *Chem. Br.* **11**: 208-226.
3. Guard HE., Cobet AB., Coleman WM. 1981. Methylation of trimethyltin compounds by estuarine sediments. *Science* **213**: 770-771
 4. Hallas LE., Means JC., Coney JJ. 1982. Methylation of tin estuarine microorganisms. *Science* **215**: 1505-1507.
 5. Paule MG., Reuhl K., Chen JJ., Ali SF., Slikker W JR. 1986. Developmental toxicology of trimethyltin in the rat. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **84**: 412-417
 6. Miyake K., Misawa T., Aikawa H., Joshida T., Shigita S. 1989. The effects of prenatal trimethyltin exposure on development and learning in the rat. *Jpn J. Industr. Health* **31**: 363-371
 7. Kreyberg S., Torvik A., Bjorneboe A., Wiik-Larsen W., Jacobsen D. 1992. Trimethyltin poisoning: report of a case with postmortem examination. *Clinical Neuropathology.* **11(5)**: 256-259
 8. Besser R., Kramer G., Thumler R., Bohl J., Gutmann L., Hopf HC. 1987. Acute trimethyltin limbic-cerebellar syndrome. *Neurology.* **37**: 945-950.
 9. Robert G. Feldman., Robera F White., Ikechukwu I Eriator. 1993. Trimethyltin encephalopathy. *Arch. Neurol.* **50**: 1320-1324.

Table 1 Age of patient group and control group

	patient	control
Female	44.79 ± 3.43 (n=14)	44.19 ± 3.21 (n=16)
Male	44.80 ± 11.76 (n=10)	54.9 ± 10.6 (n=10)
Total	44.79 ± 12.88 (n=24)	47.65 ± 12.33 (n=26)

Values are the means±standard deviations for each group.

Table 2 reflexes of patients and control

	patient		control		x ²	P
	normal	decreased	normal	decreased		
Patellar reflex	17	10	24	1	8.49	0.0036
Achilles reflex	18	9	24	1	7.19	0.0073

Values are the means±standard deviations for each group.

Table 3-1 甲状腺機能 (患者と対照者の男女別比較)

	Male		Female	
	Patient	control	patient	control
	n=10	n=10	n=14	n=16
TSH (uIU/ml)	1.26±0.68	1.80±0.83	2.44±1.58	2.46±1.92
Free T4 (ng/dl)	1.26±0.17	1.30±0.15	1.22±0.20	1.21±0.16

Values are the means±standard deviations for each group. There was no significant difference from the control (t-test).

Table 3-2 甲状腺機能 (患者と対照者の重症度別の比較)

	serious patient	mild patient	control
	n=8	n=16	n=26
TSH (uIU/ml)	1.76±1.46	2.02±1.38	2.21±1.60
Free T4 (ng/dl)	1.27±0.16	1.22±0.20	1.25±0.16

Table 4 Mineral content in the hair of patients and controls

	serious patient n=8	mild patient n=16	control n=26	test
Be (ppb)	3.71 ± 4.21	10.51 ± 12.392*	3.32 ± 2.86	a
Al (ppm)	14.11 ± 6.62	18.12 ± 9.29	13.77 ± 9.07	b
Ni (ppb)	368.71 ± 366.48	579.42 ± 748.37	266.87 ± 380.77	a
As (ppb)	379.41 ± 248.85	558.94 ± 326.86*	344.62 ± 242.76	b
Cd (ppb)	76.58 ± 30.56	100.69 ± 83.25*	52.47 ± 39.56	b
Sn (ppb)	83.16 ± 50.02	246.74 ± 494.23	116.44 ± 171.83	a
Hg (ppm)	1.27 ± 0.41	1.58 ± 0.63	1.65 ± 0.94	b
Pb (ppm)	1.37 ± 0.39	2.15 ± 1.39	1.31 ± 1.16	b
Mg (ppm)	24.91 ± 21.43	10.55 ± 8.97	16.71 ± 14.09	a
P (ppm)	213.74 ± 29.08	198.19 ± 33.51	201.36 ± 34.80	a
Ca (ppm)	102.01 ± 77.27	63.19 ± 62.42	92.74 ± 63.39	b
Cr (ppb)	57.45 ± 45.55	80.78 ± 59.45	63.53 ± 56.02	b
Mn (ppm)	3.37 ± 4.3	2.35 ± 1.8	1.54 ± 1.87	a
Fe (ppm)	13.36 ± 4.26	18.58 ± 6.61*	13.74 ± 6.19	b
Cu (ppm)	8.62 ± 4.01	8.91 ± 1.89	8.31 ± 2.06	b
Zn (ppm)	152.47 ± 23.12	123.53 ± 44.12	134.95 ± 26.15	b
Mo (ppb)	71.3 ± 38.02	76.99 ± 19.58	68.79 ± 33.94	b
Se (ppb)	562.13 ± 120.81	612.75 ± 220.7	522.61 ± 110.51	b
I (ppb)	305.08 ± 243.94	625.38 ± 625.52	854.34 ± 1349.3	a
Li (ppb)	14.64 ± 14.5	14.95 ± 9.57*	7.67 ± 4.29	b
V (ppb)	29.13 ± 19.12	32.16 ± 11.68	22.19 ± 13.03	b
Co (ppb)	10.28 ± 4.78	24.53 ± 25.83*	11.54 ± 6.16	a
Ge (ppb)	57.72 ± 3.92	58.89 ± 8.26	54.86 ± 8.99	b
Na (ppm)	88.12 ± 139.77	62.14 ± 64.02	94.43 ± 207.73	a
K (ppm)	35.79 ± 20.86	39.38 ± 18.46	33.47 ± 28.12	b

Values are the means ± standard deviations for each group. Asterisk indicate that the value was significantly different from the control (*P < 0.05). Analysis method: a, square root transformation and Dunnett's multiple comparison; b, Dunnett's multiple comparison.

Table 5 Hormone status of females

	patient N=14				control N=15							
	normal	high	low	menopause	Menstrual phase	pregnant	normal	high	low	menopause	Menstrual phase	pregnant
LH	5	7	7	1	1	1	6	6	1	6	2	2
FSH	5	7	7	1	1	1	6	1	6	6	2	2
E2	5	7	7	1	1	1	7	7	6	6	2	2

Table 6 LH, FSH and E2 level after menopause of females

	patient n=7		control n=6	
LH (mIU/ml)	41.54±	15.42	26.01±	19.3
FSH (mIU/ml)	80.24±	18.46	46.24±	36.77
Estradiol (E2) (pg/ml)	11.81±	1.65	42.4±	43.47
Age	56.29±	7.18	54.67±	6.89
BMI	20.69±	1.99	22.23±	2.56

Values are the mean±standard deviations for each group. Asterisk indicate that the value was significantly different from the control (*p < 0.05, T-test)

Table 7 Hormone level of males

	patient n=10	control n=10
LH (mIU/ml)	6.43 ± 2.81	7.85 ± 2.85
FSH (mIU/ml)	6.32 ± 1.93	8.53 ± 3.48
Testosterone (ng/ml)	6.59 ± 1.3*	5.25 ± 1.27
Age	44.80 ± 11.76	54.9 ± 10.6
BMI	20.71 ± 2.21	20.97 ± 1.99

Values are the mean±standard deviations for each group. Asterisk indicate that the value was significantly different from the control (*P <0.05, T-test)

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

— 有機スズ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、平成 15 年度にマウスライディッチ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、progesterone 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。これらの結果を踏まえて、最終年度の疫学調査が実施された。

A. 研究目的

有機スズ化合物は、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。トリブチルスズやトリフェニルスズはイボニシのインポセックスの原因とされる。これらの有機スズ化合物は現在船底塗料としては用いられていないが、別の種類のスズ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。

トリメチルスズ($(\text{CH}_3)_3\text{Sn}$)は無色の液体で、融点 23°C 、沸点 182°C 、水に不溶である。トリメチルスズはスズ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、トリメチルスズ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、無機スズ及び有機スズは河口生態系で生物や非生物ルートでメチル化され、トリメチルスズになる。今までのトリメチルスズに関する報告は、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、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

チルスズ中毒事件について調査を計画した。

初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 マウスライディッヒ腫瘍細胞(ATCC:CRL-2065)を用いた。 75cm^2 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、 $2\times$ トリプシン $10\mu\text{l}$

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、2ml の 2 \times 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、-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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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