

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（臍帯血等）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

ヒト副腎由来の培養細胞を用いたステロイドホルモン産生に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響

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： 中陳 静男
星薬科大学助教授

研究要旨

環境由来の化学物質が内在性のステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) にどのような影響を及ぼすかを解明する目的で、H295R 細胞を用いてステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を評価するアッセイ法の基礎的検討を行い、方法を確率した。このアッセイ法を用い農薬 DDT とその代謝物、ジコホル、クロルデンおよびヘキサクロルベンゼンの影響、各種パラヒドロキシ安息香酸エステル類の影響、および植物エストロゲンであるダイゼイン、ゲニステインおよびそれらの配糖体であるダイジン、ゲニスチンの影響を検討し、コルチゾール産生を抑制するいくつかの化学物質を特定した。この H295R 細胞はヒト副腎皮質由来のステロイドホルモン産生細胞であり、環境由来の化学物質の及ぼす影響を検討することは、ヒトにおけるリスクを評価できるが可能性がある。

A. 研究目的

ステロイドホルモンは個体発生、細胞の増殖・分化、性の分化と行動、神経情報伝達の制御など重要な生理機能に関わっており、生体の恒常性を保つためには必須の作用分子である。近年になりステロイドホルモン生合成に関与する酵素群がクローニングされ、それらの転写調節をはじめとするステロイド合成機序の詳細、およびステロイドホルモンの核内受容体が明らかにされたことからその作用発現機構が分子レベルで明らかにされつつある。

本研究は、環境ホルモンといわれる環境由来の化学物質が生体のステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) にどのような影響を及ぼすかを解明する目的で、ヒト副腎皮質由来のステロイドホルモン産生細胞 (H295R 細胞) を用いて、*in vitro* でその直

接的な影響を検討するものである。この H295R 細胞はヒト由来であり、かつ広範囲にわたるステロイドホルモンの産生能力を保持している。この細胞を用いて直接環境由来の化学物質の及ぼす影響を検討することは、内在性のステロイドホルモン産生に影響を及ぼすと考えられる化学物質を特定することができ、信頼できる結果を迅速に得ることが可能である。さらに本研究を発展させることにより、ステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を細胞レベル、分子レベルで解明することが可能である。

そこで本研究では、はじめに環境由来の化学物質のステロイドホルモン産生に及ぼす影響を評価するアッセイ系の検討を行い、方法を確立した。次に確立したアッセイ系を利用して内分泌かく乱化学物質として知

られている農薬 DDT とその関連代謝物質、各種パラヒドロキシ安息香酸エステル類、植物エストロゲンおよび合成エストロゲン等の影響を検討した。

B. 研究方法

H295R 細胞は英国エジンバラ大学の J. I. Mason 教授から供与を受けた。細胞は ITS⁺ (1.0 %)、Ultrosor G (2.0 %) および抗生物質を含有する D-MEM-F12 メジウムを用い 5% CO₂-95% Air の気相中、37 °C の条件下で継代培養した。細胞を実験に使用に当たり細胞をトリプシンで処理後、24 well のプレートにサブカルチャーし、コンフルエント後、ITS⁺ (1.0 %)、牛血清アルブミン (0.01 %) および抗生物質含有の D-MEM-F12 メジウムに交換した。24 時間後さらにメジウムを交換し、種々の検体のエタノール溶液を添加し (エタノール濃度は 1% 以下)、同時にステロイド合成を誘導するため (Bu)₂cAMP を添加した。一定時間後にメジウム中に分泌されたステロイドをラジオイムノアッセイ (RIA) により測定した。サンプルの細胞毒性を考慮してメジウム中に放出される LDH を測定した。さらに well 中の細胞を洗浄後溶解し、全タンパク質量を測定して、細胞数の指標とした。なお、コルチゾールの測定にはコルチゾール測定 RIA キット (DPC 社製) を用いた。LDH の測定は細胞障害試験用の CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay (Promega 社製) を用いた。well 中の細胞は SDS (1 %) NaCl (150mM)、EGTA (5mM) MgCl₂ (0.5 mM)、MnCl₂ (0.5mM)、および PMSF (0.2mM) 含有の Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を用い溶解した後、BCA Protein assay reagent (Pierce 社製) を用いて測定した。

C. 研究結果

ステロイドホルモン産生に及ぼす影響を評価するアッセイ法の検討

H295R 細胞を使用してステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を評価するアッセイ法の基礎的検討を行い、“研究方法”に示した方法を確率した。H295R 細胞の産生するステロイドホルモンについては、産生量の多いコルチゾールを測定す

ることとし、生合成を誘導する cAMP の処理時間と濃度について検討を加えた。その結果、処理時間に依存して 60 時間まで、培地中のコルチゾール産生がほぼ直線的に増加すること、また cAMP 濃度に依存してコルチゾール産生がほぼ直線的に増加することを明らかにした。cAMP の濃度は 1mM を越える濃度になるとコルチゾール産生はほぼ飽和した。以後の実験には、コルチゾール生合成の誘導を行うための cAMP 濃度は 1mM とし、処理時間は 48 時間に設定した。

農薬 DDT とその代謝物等による影響

検体として、*p,p'*-DDT、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDE、*o,p'*-DDT、その代謝物である *o,p'*-DDD、ジコホール、トランス・クロルデン、シス・クロルデン、およびヘキサクロルベンゼンを用いた。検体の濃度は 10 μg/mL (10ppm) を最大濃度として、以下影響の認められない濃度まで各種濃度を設定し、影響を検討した。その結果、*p,p'*-DDT、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDE、*o,p'*-DDT、*o,p'*-DDD、およびジコホールが 1 μg/mL を越え、高濃度になると (Bu)₂cAMP で誘導した H295R 細胞のコルチゾールの産生を抑制することが判明した。10 μg/mL の濃度ではコルチゾール産生が強く抑制され *p,p'*-DDD、*p,p'*-DDE、ではコントロールの 10% 以下であった。これらの検体の細胞に与える傷害の指標として測定した培養上清中の LDH 活性はいずれの濃度においても影響が認められなかったが、ジコホールは細胞に対する毒性が高く、10 μg/mL の濃度において培養上清中の LDH 活性が増加傾向した。トランス・クロルデン、シス・クロルデン及びヘキサクロルベンゼンのコルチゾール産生に及ぼす影響は軽微かあるいはほとんど認められない程度であった。

各種パラヒドロキシ安息香酸エステル類の影響

パラオキシ安息香酸、そのメチルエステル、エチルエステル、プロピルエステル、ブチルエステル、イソプロピルエステル、イソブチルエステル、およびパラジクロルベンゼンを検体として用いた。検体の濃度は 10 μg/mL を最大濃度としてその影響を検討した。その結果、パラオキシ安息香酸

では全く影響が認められないが、そのエステル部分が長くなるにつれて、(Bu)₂cAMPで誘導した H295R 細胞のコルチゾールの産生は抑制され、パラオキシ安息香酸ブチルおよびパラオキシ安息香酸イソブチルはコントロールと比較してコルチゾールの産生が40%に抑制された。しかしこれらの検体は細胞に障害を与え、培養上清中の LDH 活性が増加傾向にあった。その LDH 活性は細胞の総 LDH 活性の 10%であった。またジクロロベンゼンはコルチゾール産生に対して全く影響を及ぼさなかった。

植物エストロゲンおよびジエチルスチルベ ストロール (DES) 等の影響

植物エストロゲンの検体としてダイゼインとゲニステインおよびそれらの7-グリコシドである配糖体、ダイジンとゲニスチンを用いた。また合成エストロゲンとして DES および天然のエストロゲンとしてエストラジオール-17 β を検体として用いた。その結果アグリコンに相当するダイゼインとゲニステインは 2.6 μ g/mL を越え高濃度になると H295R 細胞のコルチゾールの産生を抑制することが判明した。10 μ g/mL の濃度ではコルチゾール産生が強く抑制された。また、いずれの濃度においても培養上清中の LDH 活性を指標とした細胞障害、および細胞数に影響は認められなかった。それに対して、配糖体であるダイジンとゲニスチンでは全く影響が認められなかった。DES においてもコルチゾール産生に及ぼす影響が高濃度 (10 μ g/mL) において認められるが、ダイゼインやゲニステインと比較して軽微であった。それに対してエストラジオール-17 β は 1 μ g/mL 前後の低濃度においてコルチゾール産生を抑制し、濃度が上昇するにつれ抑制効果は増加するが、高濃度の 10 μ g/mL の濃度においても 35%に抑制される程度でその用量反応曲線は緩やかであった。

D. 考察

内分泌かく乱化学物質の野生動物並びにヒトに対する影響について関心が高まっている中、過去十数年にわたって同定されてきた内分泌かく乱化学物質は環境エストロゲンといわれる物質で、エストロゲン受容

体に低濃度で結合して天然のエストロゲンと同様な作用を示す物質である。したがって、さまざまな環境化学物質と野生動物並びにヒトに及ぼす影響との関連を明らかにするため、それらの化学物質のエストロゲン受容体との結合性あるいはエストロゲン活性を調べることに主眼が置かれてきた。ステロイドホルモンは”key of the life”と称されるように個体発生、細胞の増殖・分化、性の分化と行動、および神経情報伝達の制御など重要な生理機能に関わっている。従って環境由来の化学物質が生体における内在性のステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) に影響を与えることにより野生生物やヒトに重要な生体影響を与えることが懸念される。そこで本研究では環境由来の化学物質が内在性のステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) にどのような影響を及ぼすかを解明する目的で、H295R 細胞を用いてステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を評価するアッセイ法の基礎的検討を行い、その方法を確率した。この H295R 細胞はヒト副腎皮質由来のステロイドホルモン産生細胞であり、この細胞を用いて直接環境由来の化学物質の及ぼす影響を検討することは、ステロイドホルモン産生異常などステロイドホルモン産生に影響を及ぼす化学物質を特定することができ、ヒトにおけるリスク評価が可能となる。

検体としてまず農薬である DDT を用いた。DDT は主成分が *p,p'*-DDT であり、その副産物として *o,p'*-DDT が含まれていた。現在は使用禁止となっているにも関わらずそれらの安定な代謝物である *p,p'*-DDD、*p,p'*-DDE および *o,p'*-DDD 等が野生生物に広く蓄積されているといわれている。さらに殺ダニ剤として現在も使用が許可されているジコホール、工業用クロルデンの主成分であるトランス・クロルデンおよびシス・クロルデン、ヘキサクロルベンゼンを検体として用いたが、ほとんど影響は認められなかった。農薬である *p,p'*-DDT およびその関連化合物は副腎皮質においてステロイド合成に関与する 11 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の阻害剤として臨床に供されているメチラポン開発の発端となった化合物であり、本アッセイ系においても

コルチゾール産生を抑制することが考えられる化合物である。各種パラヒドロキシ安息香酸エステルは防腐剤として食品や化粧品中に含まれており、ヒトが暴露される可能性が十分にある化合物である。これらの化合物は $10 \mu\text{g/mL}$ の高濃度ではあるが本アッセイ系においてコルチゾール産生を抑制することを認め、エステル部分が長くなるにつれてその傾向は大きかった。植物エストロゲンと呼ばれるダイゼインやゲニステインまたはそれらの配糖体であるダイジンやゲニスチンは大豆製品に多量に含まれることから、これらもヒトにおける暴露が十分考えられる化合物である。本アッセイ系においてダイゼインやゲニステインがコルチゾール産生を抑制することを認めた。しかし、それらの配糖体であるダイジンやゲニスチンは何ら作用を及ぼさなかった。また天然のエストロゲンであるエストラジオール 17β が比較的高濃度で H295R 細胞のコルチゾール産生を抑制することおよびその作用機序として受容体を介した作用では無いことが報告されている。本実験で得られたダイゼインやゲニステインが H295R 細胞のコルチゾール産生を抑制することに関する作用機序は現在不明である。近年になりステロイドホルモン合成に関与する酵素群がクローニングされそれらの転写調節をはじめとするステロイド合成機序の詳細が分子レベルで明らかにされつつある。本研究を進展させることにより、ステロイドホルモン産生に及ぼす環境化学物質の影響を細胞レベル、分子レベルで解明することが可能となる。

E. 結論

ステロイドホルモン産生 (steroidogenesis) に及ぼす環境由来の化学物質の影響を解明する目的で、ヒト副腎皮質由来の H295R 細胞を用いて、アッセイ法の基礎的検討を行い、方法を確率した。このアッセイ法を用い農薬 DDT とその代謝物、ジコホル、クロルデンおよびヘキサクロルベンゼンの影響、各種パラヒドロキシ安息香酸エステル類の影響、および植物エストロゲンであるダイゼイン、ゲニステインおよびそれらの配糖体であるダイジン、ゲニスチンの影響を検討し、高濃度ではあ

るがコルチゾール産生を抑制するいくつかの化学物質を特定することができた。

F. 研究業績

学会発表

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞のコルチゾール分泌に及ぼす DDT とその代謝物の影響：中陳静男、篠田 聡、豊島 聡、中澤裕之 (星葉大・薬)、牧野恒久 (東海大・医)、日本内分泌攪乱化学物質学会第 2 回研究発表会、12、1999、神戸