

高分子素材からなる生活関連製品由来の内分泌かく乱化学物質の分析及び動態解析

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： 中澤 裕之
星薬科大学

研究協力者： 中陳 静男
星薬科大学

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、方法を確立した。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。このアッセイ法を用いて、プラスチック可塑剤として用いられているフタル酸エステル類の影響、プラスチック関連物質としてビスフェノール A、4-ノニルフェノールおよび 4-*t*-オクチルフェノールの影響、および食品包装用ラップ類のジクロロメタン抽出物低分子画分・メタノール可溶部分の影響を検討し、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。

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、プラスチック可塑剤であるフタル酸エステル類の影響、プラスチック関連物質としてビスフェノール A、4-ノニルフェノールおよび 4-*t*-オクチルフェノールの影響、および食品包装用ラップ類のジクロロメタン抽出物低分子画分・メタノール可溶部分

の影響を検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養

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) を用い溶解させた後、BCA Protein assay reagent (Pierce 社製) を用いて測定した。

2) 材質試験用試料の調製

食品包装用ラップ 0.5 g をジクロロメタン 20mL に溶解させ室温で放置。その後、10mL のメタノールで高分子を沈殿させ遠心分離、上清のみを濃縮乾固させ、10mL のメタノールで溶解し、メンブランフィルターを通し試験試料とした。

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”に示した方法を確立した。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。

フタル酸エステル類の影響

検体として、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、アジピン酸ジエチルヘキシル、フタル酸ジエチルヘキシル、フタル酸ヘキシル、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジプロピル、およびフタル酸を用いた。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、フタル酸ジシクロヘキシルが 5 および 10 μg/mL の濃度において H295R 細胞のコルチゾールの産生を抑制することを明らかにした。その他のフタル酸エステル類およびフタル酸は何ら影響を及ぼさなかった。またこれらの濃度では細胞に対する毒性はほとんど認められなかった。

ビスフェノール A、4-ノニルフェノールおよび 4-*t*-オクチルフェノールの影響

プラスチック関連物質としてビスフェノール A、4-ノニルフェノールおよび 4-*t*-オクチルフェノール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、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、4-*t*-オクチルフェノールが 0.26 μg/mL の低濃度において、H295R 細胞のコルチゾールの産生を 84% に抑制することを明らかにした。10 μg/mL の高濃度ではコルチゾールの産生

ほとんど認められなかった (5%以下)。またこれらの濃度における細胞毒性は認められなかった。また、ビスフェノール A 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。

食品包装用ラップ類のジクロロメタン抽出低分子画分・メタノール可溶部分の影響

食品包装用ラップフィルムの材質から溶出される成分によりヒトが曝露される可能性を考慮して、業務用あるいは一般用食品包装用ラップフィルムのジクロロメタン抽出低分子画分・メタノール可溶部分についてその影響を検討することとした。試料は業務用、一般用食品包装用ラップフィルム 32 種から材質試験用試料の調製に従って調製したものをを用いた。試料の最終濃度は 5 $\mu\text{L}/\text{ml}$ として、影響を検討した。その結果、32 品目のうち 8 品目からの抽出物が H295R 細胞のコルチゾールの産生を有意に抑制した。この濃度では検体の細胞毒性は認められなかった。同時にこれらラップフィルムのジクロロメタン抽出低分子画分・メタノール可溶部分のノニルフェノールの含有量が測定されている (主任研究者、中澤 裕之) ことから、試料中のノニルフェノール含有量とコルチゾール産生の抑制との間の相関関係を調べたところ、相関関係は認められなかった ($r = -0.3069$)。

D. 考察

内分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、過去数十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。

結果は示していないが、今回確立したアッセイ系に農薬 DDT の主成分である p, p' -DDT およびその代謝物を適用した結果、コルチゾール産生を抑制することを明らかにしている。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 11β -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の開発の発端となった化合物である。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た化合物であり、本アッセイ系がステロイド産生に及ぼす影響を評価出来ることを示したものである。

フタル酸エステル、アジピン酸エステル類はプラスチックの可塑剤として用いられる。またこれらは内分泌かく乱化学物質としての疑いをもたれており、生活全般に塩化ビニル樹脂を中心としたプラスチック製品が利用されていることからヒトへの健康影響が懸念されている。そこで代表的な化合物 8 種の影響を検討し結果、フタル酸ジシクロヘキシルが高濃度において H295R 細胞のコルチゾールの産生を抑制したが、その他の化合物は何ら影響を及ぼさなかった。ビスフェノール A はエポキシ樹脂やポリカーボネートの原料として用いられており、ノニルフェノールやオクチルフェノールは工業用洗浄剤であるノニルフェノール・エトキシレートやオクチルフェノール・エト

キシレートの分解により生成され、それぞれ環境中で広範囲に汚染されていることが考えられている。これらの中で、4-*t*-オクチルフェノールが 0.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の比較的低濃度において、コルチゾールの産生を抑制することを明らかにした。

食品包装用ラップフィルムからノニルフェノール等の内分泌かく乱化学物が食品へ移行するおそれが懸念されている。そこで一般用・業務用食品包装用ラップフィルム 32 種から材質試験用試料の調製に従って調製した試料の影響を検討した結果、8 品目からの抽出物が H295R 細胞のコルチゾールの産生を有意に抑制することを明らかにした。この試料中のノニルフェノール含量とコルチゾールの産生の抑制との間には相関関係が認められないことから、ノニルフェノール以外の成分がコルチゾールの産生を抑制している可能性が考えられる。

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が分子レベルで明らかにされつつある。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になるとと思われる。

E. 結論

ステロイドホルモン産生 (steroidgenesis) 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て、プラスチック可塑剤として用いられているフタル酸エステル類の影響、プラスチック関連物質としてビスフェノール A、4-ノニルフェノールおよび 4-*t*-オクチルフェノールの影響、および食品包装用ラップ類のジクロロメタン抽出物低分子画分・メタノール可溶部分の影響を検討した結果、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。

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(星薬大・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