

## 凡 例

ABAC1	ATP-binding cassette, sub family A,member1
ACN	Acetonitrile
ACTH	Adrenocorticotrophic hormone
ADS	Androstenedione
ALD	Aldosterone
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ATP	Adenosine triphosphate
AW	Ammonia Water
CA	Citric acid
CCS	Corticosterone
CCS-d8	Corticosterone d8
CE	Collision Energy
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonium] -1-propanesulfonate
CID	Collision-Induced Dissociation
CRH	Corticotropin-releasing hormone
DCC	11-Doxycorticosterone
DDW	Distilled deionized water
DES	Diethylstilbestrol
DES-d8	Diethylstilbestrol d8
ECL	Electrochemical luminescence
EDC	Endocrine disrupting chemical
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

ENVI	ENVI-Carb 250 mg
ER	Estrogen Receptor
ESI	Electric Spray Ionization
FA	Formic Acid
FWHM	Full Width at Half Maximum
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
HCCS	18-Hydroxycorticosterone
Hex	n-Hexane
HDL	High density lipoprotein
HPA	Hypothalamic-pituitary-adrenal system
HPGT	17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase Conjugated Second Antibodies
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase
17 $\beta$ -HSD	17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase
LC	Liquid Chromatography
LDL	Low density lipoprotein
LDLR	Low density lipoprotein receptor
LH	Luteinizing hormone
MeOH	Methanol
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
P450scc	Cytochrome P450 side chain cleavage
PBR	Peripheral benzodiazepine receptor
PBS	Phosphate buffered saline

PGN	Pregnenolone
PGT	Progesterone
POMC	Pro-opiomelanocortin
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyaclylamidegel electrophoresis
S/N	Signal/Noise
SPE	Solid Phase Extraction
SR-B1	Scavenger receptor class B type 1
SRM	Selected Reaction Monitoring
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory protein
TCDD	Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TEA	Triethylamine
TOF	Time of flight
TS	Testosterone
TS-d3	Testosterone d3
TS-17G	TS-17( $\beta$ -D-glucuronide)
VLDL	Very low density lipoprotein
WAX	Weak anion exchange
WB	Western blotting

## 目 次

緒 言	1
-----	---

### 第 I 章 DES の体内分布と副腎の組織学的探索

1. 序 文	3
2. 材 料 と 方 法	4
1) 供 試 動 物 と 投 与 方 法	4
2) 臓 器 の 採 取	4
3) ステロイド及び DES の抽出方法	4
4) DES の測定方法	5
5) 副腎の乾燥重量の測定	7
6) 副腎組織のサンプル調製	7
7) タンパク質定量	8
8) 組織学的探索	8
9) 統計学的分析	8
3. 結 果	9
1) 投与 1 時間後の体内での DES 分布	9
2) 各臓器の重量及び副腎タンパク質量	9
3) 組織学的探索	9
4. 考 察	15
5. 小 括	17

### 第 II 章 DES の副腎ステロイド合成への影響

1. 序 文	18
--------	----

2. 材料と方法	20
1) 供試動物と DES の投与	20
2) 臓器の採取	20
3) 副腎及び血中ステロイドの定量	20
4) LC-MS/MS による血中 ACTH の定量	20
5) RT-PCR	20
6) 試験管内反応試験	21
7) ウェスタンブロッティング	22
8) オイルレッド染色	22
9) 電子顕微鏡学的探索	23
10) 副腎コレステロール測定	23
11) 統計学的分析	23
3. 結果	24
1) 血中コルチコステロンおよび ACTH 量と下垂体 POMC	24
2) 副腎ステロイドとその前駆物質	24
3) 副腎ステロイド合成の律速因子	24
4) 副腎内のコレステロール	25
4. 考察	34
5. 小括	37

### 第Ⅲ章 DES 投与雄ラットの血中コレステロールとアポリポ蛋白質

1. 序文	38
2. 材料と方法	39
1) 供試動物と投与方法	39
2) 血清の採取	39

3) HDL、LDL/VLDL コレステロール測定	39
4) 血清 ApoA1 及び ApoE の検出	39
5) 統計学的分析	39
3. 結果	40
1) HDL、LDL/VLDL コレステロールの変化	40
2) 血清 ApoE および ApoA1 の発現	40
4. 考察	43
5. 小括	46

#### 第IV章 DES 投与ラット肝における APOE 分泌抑制

1. 序文	47
2. 材料と方法	48
1) 供試動物と投与方法	48
2) 臓器の採取	48
3) 肝臓のサンプル調製	48
4) タンパク質定量	48
5) 肝臓灌流	48
6) ウェスタンブロッティング	49
7) 統計学的分析	49
3. 結果	51
1) 肝臓での ApoE の合成	51
2) 肝臓からの ApoE、ApoA1 分泌	51
4. 考察	55
5. 小括	57

総 括	58
謝 辞	61
引用 文 献	62

## 緒 言

ヒトや動物の健康被害の多くが食品や大気に含まれる化学物質暴露に起因していることが明らかとなってきた。中でも生体のホルモン恒常性を乱す内分泌かく乱物質はホルモン受容体を介して生殖毒性を引き起こすことが知られている[50]。内分泌かく乱物質のひとつである Diethylstilbestrol (DES) は、1940 年代から 1970 年代に、米国や欧州において習慣性流産や早産の防止薬として妊婦に処方された非ステロイド性の合成エストロゲンである。当時、DES は、家畜の肥育促進剤として飼料にも添加されていた。また、リン酸 DES は前立腺がんの治療薬として近年まで使用されていた。DES の暴露を受けた女性から生まれた女兒に思春期以降に通常稀な膣腺腫が多く発生することが明らかになり、1971 年にその使用が禁止された。その後、DES の胎児期の暴露によって不妊、子宮形成不全、精巣がん、尿道下裂、潜在精巣、精子数減少、精子受精能の減少などが報告されている[36,49,50,42,43,47]。DES はエストロゲン受容体(ER)に結合することが知られている[11,14,26]が、その詳細な毒性機序や体内動態は不明なままである。今日、DES は臨床現場で使用が禁止されているが、外因性エストロゲンの作用機序研究のモデル物質となっている[19]。DES の作用は複雑で、どのような機序で特異的な毒性を発揮するのかを突き止めるのは容易ではないが、その機序を解明し、その毒性の引き金を引くものを明らかにすることが重要である。

当研究室では、これまで DES 投与による成オスラットへの影響を探索してきた。これまでの研究から DES 投与によって精巣の小胞体における蛋白質のフォールディングを介添えする蛋白質 PDI (Protein disulfide isomerase) のダウンレギュレーション[57]や精巣 P450<sub>scc</sub> 酵素活性阻害[39]による精巣毒性を明らかにしてきた。



一方、内分泌かく乱物質は、副腎へも影響を与えるがその詳細な研究は少ない[8]。本研究では、DES による副腎への影響を見出し、その詳細を明らかにし、さらに、その機序について探索することを目的とした。

# I 章 DES の体内分布と副腎の組織学的探索

## 1. 序文

環境中に存在する化学物質によるヒトや動物への健康被害や潜在的な悪影響への関心が高まってきている。内分泌かく乱物質は繁殖や成長において重要なエストロゲンと類似した作用を持ち、エストロゲン受容体 (ER) を介して生殖毒性を引き起こすことが知られている[56]。しかし、それだけでは説明することができない様々な機序を介した生殖系への影響が証明されてきている[54]。DES は、1940 年代中盤から 1970 年代にかけて、米国や欧州において習慣性流産や早産の防止薬として妊婦に処方された非ステロイド性の合成エストロゲンである。DES の暴露を受けた女性から生まれた子どもたちに膣腺腫や不妊、子宮形成不全、精巣がん、尿道下裂、潜在精巣、精子数減少、精子受精能の減少などが報告されている[42,45,46,48,49,53]。DES は、その強い生殖毒性から内分泌かく乱物質の代表格とされている。大規模なコホート研究から、妊婦に投与された DES の用量は体重 1kg あたり約 23–150 mg との報告がある[13]。DES は ER に結合することが知られている[13,18,31]が、その詳細な毒性機序や体内動態は不明なままである。今日、DES は臨床現場での使用は禁止されているが、外因性エストロゲンの作用機序研究のモデル物質となっている[25]。DES の作用は複雑で、どのような機序で特異的な毒性を発揮するのかを突き止めるのは容易ではないが、その機序を解明し、その毒性の引き金を引くものを明らかにすることが、創薬や合成化学物質の使用に際しての重要な課題である。

本章では、DES が投与後、どのような体内分布をたどるのかを探索するとともに、その標的器官となる副腎における組織学的影響を探索することを目的とした。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 供試動物と投与方法

オスの Sprague-Daly (SD) ラット(体重  $280 \pm 20$  g、8 週齢)を用いた。ラットは、自由採食、自由飲水とし、実験開始前 1 週間馴化させた。DES をオリーブオイルに 0.1 mg/ml 濃度に溶解し、ゾンデを用いて 1 ml を胃内強制投与した。Control 群として、オリーブオイル 1 ml を同様に投与した。DES の体内分布を探索するため、投与開始から 1 時間後にサンプリングを行った。同様に DES 0.1 mg/ml を毎回 1 ml、隔日投与し、投与開始 1 週間(1w、総投与回数 4 回、)後および 2 週間(2w、総投与回数 8 回)後の翌日にサンプリングを行った。なお、ラットは、本学動物実験委員会の規定に基づき、飼養管理を行った。

### 2.2. 臓器の採取

ペントバルビタール麻酔下で、ラット腹壁を切開し、腹大動脈から採血すると同時に放血殺した。採取した血液および摘出した各臓器(大脳、小脳、海馬、下垂体、肝臓、腎臓、副腎、精巣)の重量を計量した後、速やかに液体窒素にて急速凍結し、使用時まで  $-25^{\circ}\text{C}$  で保存した。肝臓は 1.15 % KCL-10 mM EDTA で灌流し、臓器内血液を除去した。また採血した血液の一部は、氷上にて 30 分以上静置し、遠心分離(3000rpm、 $4^{\circ}\text{C}$ 、20 分間)後、得られた上清を血清とした。血清は、実験に供するまでに同様に凍結保存した。

### 2.3. ステロイド及び DES の抽出方法

各臓器(大脳、小脳、海馬、下垂体、肝臓、腎臓、副腎、精巣)を 50 ml 遠心管に採取して計量し、テストステロン、エストラジオール、コルチコステロン及び DES の内部標準物質を 5 ng/ml 添加した。ACN を加えてバイオミキサ

一 (BM-1、日本精機社製)で 1 分間細切した。細切した試料は高速冷却遠心分離機 (7780 II、クボタ社製)において 8,000 rpm ( $10,160 \times g$ )、10min で遠心分離した上清を No.41 フィルター (Whitman)でろ過して集められた。この操作を 2 回繰り返して集められた上清に ACN 飽和 Hex を加え、シェーカー (SR-2<sub>DW</sub>、TAITEC 社製)により激しく振とう混和した後、Hex 層と ACN 層が分離するまで静置し必要に応じて遠心分離した。分液ロートを用いて ACN 層を集め、0.3 ml の FA を添加した(終濃度 1%)。その溶液を予め MeOH、1 % FA で洗浄した精製固相カラム 1 (WAX)に負荷した。WAX を通液した溶液と WAX を 20 ml ME OH で洗浄した溶液を精製固相カラム 2 (HSP)に負荷して得られた溶液と、MeOH : 2 % CA (9:1、v/v)を 5 ml 通液して得られた溶液をエバポレーター (BUCHI、EYELA)で濃縮乾固して 1 ml の ACN:水 (4:6、v/v)に溶解し 2.0  $\mu$ m Ultra free-MC (Millipore)でタンパク質を除去したものを DES 及びステロイドホルモン試料とした。

## 2.4. DES の測定方法

### 2.4.1. 分析機器

測定に用いた LC および MS は、定性には飛行時間型質量分析計 (LC;Nexera、島津製作所、TOF MS ; MicroTOFQII、Bruker Daltonics)を使用した。得られたスペクトラムは Data analysis (version 4.0、Bruker Daltonics)を用いて解析した。検出された化合物はタンデム四重極型質量分析計 (LC; Ultimate 3000、MS/MS; TSQ Quantum Ultra、Thermo Fisher Scientific)を用いて測定し、定量解析ソフト LCQuan 2.6を用いて定量した。

### 2.4.2. 測定条件

分離カラムは L-column 2 ( $C_{18}$  3  $\mu$ m、 $2.1 \times 150$  mm、化学物質評価研

究機構)を使用した。カラム温度は 40 °C、注入量は 10 µl、移動相条件は LC-TOF MS で測定対象化合物がポジティブイオンでは、0.1 % FA (A)と 0.1 % FA 含有 ACN (B)、ネガティブイオンでは 0.03 % AW (A)と 0.03 % AW 含有 ACN (B)を用いて、流速 0.2 ml/min によるグラジエントで測定した。グラジエント条件は 95 % (A) : 5 % (B)から 3 分後に 60 % (A):40 % (B)、9 分後に 5 % (A):95 % (B)、2 分間保持した後、平衡化 4 分を行い総測定時間 15 分間で行った。MS の測定条件として TOF は、MS 測定範囲は 50 ~ 1,000  $m/z$ 、Capillary voltage は 4,500 V、Nebuliser gas は 1.6 bar、Dry gas は 8 L/min、Dry temperature は 180 °C に設定して測定した。10 mM ギ酸ナトリウム / 2-プロパノール (1:1、v/v)を測定して、Na (NaCOOH)<sub>1-14</sub> で得られたスペクトラム 90.9766 ~ 974.8132  $m/z$  を用いて質量補正して質量精度の誤差を 5 ppm 以下に設定した。LC-MS/MS は Q<sub>1</sub> による MS Scan によりプリカーサーイオンを決定後、Tube Lens の最適化を行い、次に Collision Energy (CE)を 10 から 80V まで測定してプロダクトイオンを生成し、最適なスペクトラムを選択して CE の最適化を行い、Selected Reaction Monitoring (SRM)を設定した(表 1-1)[34]。N<sub>2</sub> ガスは Sheath gas を 50 units、Ion Sweep Gas を 10 units に設定し、Collision Gas は Collision Cell Pressure を 1.5 m Torr に設定した。Ion Spray はポジティブモードで 3,000 V、ネガティブモードでは-2,500 V に設定し、ポジティブモードとネガティブモードを交互に測定 (切り替え時間は 50 m sec)した。ガス温度は Vaporizer Temp 350 °C、Capillary Temp は 270 °C に設定した。Q<sub>1</sub>、Q<sub>3</sub> の半値幅 (Full Width at Half Maximum、FWHM)は 0.7  $m/z$  に設定し、夾雑成分による影響が認められた場合、Q<sub>1</sub> の FWHM を 0.2  $m/z$  に変更して測定した。

#### 2.4.3. Data analysis による真度判定

LC-TOF MS による測定で得られた MS スペクトラムは内部標準物質 (ギ

酸ナトリウムまたは ESI-Low Concentration tuning mix、Agilent)を用いて質量補正した。DES 及びステロイドホルモンの質量を抽出して得られた質量は SigmaFit<sup>TM</sup> によって元素組成解析を行い、プリカーサーイオンの値とその化合物の組成式から計算して求められた理論値と比較することで DES 及びステロイドホルモンを同定した[40]。

#### 2.4.4. 検量線の作成

検量線は内部標準物質を一律 5 ng/ml、標準物質を 0.1、0.5、1.5、10、50、100 ng/ml とし、標準物質と内部標準物質とのピーク面積の比を求め縦軸に面積比、横軸に濃度を設定して作成した。

#### 2.5. 副腎の乾燥重量の測定

1 週間隔日(以下、1w)及び 2 週間隔日(以下、2w)投与ラット副腎を真空乾燥機を用いて、24 時間乾燥させたのち、各重量を測定した。

#### 2.6. 副腎組織のサンプル調製

片側副腎に 200 µl の 0.25 M スクロース溶液を加えホモジナイズ後、900 ×g、4 °C、10 分間遠心分離後の上清をサイトゾル画分とした。

#### 2.7. タンパク質定量

Lowry[37]の方法に基づいて行った。1 N NaOH で希釈したサンプル 100 µl に反応混液(2 % NaCO:2 % 酒石酸 Na:1 % CuSO:5HO=100:1:1)を 1 ml 加え、37 °C で 15 分間反応させた後、1 N フェノール試薬を 100 µl 加え、37 °C で 30 分間反応させた。吸光光度計を用い波長 650 nm から得られた吸光値を測定した。ウシ血清アルブミンを用いて作成した検量線からサンプル中のタンパク質濃度(mg/ml)を算出した。

## 2.8. 組織学的探索

ラットは、麻酔下で動脈からリンゲル液を灌流した後、4 %パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を 10 分間灌流固定した。その後、副腎組織ブロックをアルコール脱水、パラフィン包埋した。パラフィン包埋組織を 5  $\mu\text{m}$  に薄切し、常法に従い、ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色を施した。

## 2.9. 統計学的分析

データは Microsoft excel を用いて、F 検定を行い、Student t 検定 (片側) で分析した。データは平均値  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  S.E.) で示し、有意水準 ( $P < 0.05$ ) をもって統計学的に有意とした。

### 3. 結果

#### 3.1. 投与 1 時間後の体内での DES 分布

DES 単回投与 1 時間後、DES は、肝臓に最も多く分布し、次いで副腎、下垂体に多く分布していた(図 1-1)。

#### 3.2. 各臓器の重量及び副腎タンパク質量

2 w DES 投与後副腎では、Control に比較し、腫大した副腎が観察された(図 1-2A)。さらに、1 w 及び 2 w DES 投与後副腎の乾燥重量と副腎総蛋白量はともに、有意に増加していた(図 1-2B、1-2C)。1w 及び 2w 投与後、各臓器の重量を比較したところ、2 w DES 投与群では、体重と精巣重量が減少していた(図 1-3)。一方、副腎重量だけが 1w 及び 2w 後、DES 投与群で有意に増加し、1 w DES 投与群の副腎重量は、Control 群の約 1.3 倍増加していた。このことから、DES 投与によって副腎が腫大していることが明らかとなった。

#### 3.3. 組織学的探索

2 w 投与副腎の HE 染色の結果、図 1-4 で示すように、DES 投与後副腎では、副腎皮質の束状帯及び網状帯が肥大していた。また、図 1-4E 及び図 1-4F で示したように、副腎皮質束状帯の細胞内空胞の小型化が観察された。



表 1-1. ステロイドホルモンおよびその抱合体と内部標準物質の最適 SRM 設定

Analyte	Observed SRM $m/z$	Collision E	T Lens
Pregnenolone(PGN)	299.0>281.0	14	75
	299.0>97.1	5	75
Progesterone(PGT)	315.0>97.0	23	77
	315.0>109.0	27	77
17-Hydroxyprogesterone(HPGT)	331.0>97.0	28	85
	331.0>109.0	28	85
Androstenedione(ADS)	287.0>97.0	20	84
	287.0>109.0	23	84
Testosterone(TS)	289.0>97.0	26	91
	289.0>109.0	25	91
11-Deoxycorticosterone (DCC)	331.0 > 97.3	28	85
	331.0 > 109.2	28	85
Corticosterone (CCS)	347.0 > 105.2	42	82
	347.0 > 121.2	25	82
18-Hydroxycorticosterone(HCCS)	363.0>91.2	45	125
	363.0>269.2	15	125
Aldosterone(ALD)	361.0>109.0	32	100
	361.0>157.0	32	100
Diethylstilbestrol(DES)	267.0>237.0	-30	-70
	267.0>251.0	-26	-70
TS d3(TS-d3)	292.0>97.0	23	91
	292.0>109.0	25	91
17 $\beta$ E2 d2(E2-d2)	273.0>147.0	-40	-104
	273.0>185.0	-43	-104
Corticosterone d8 (CCS-d8)	355.0>100.4	33	126
	355.0>125.5	29	126
Diethylstilbestrol d8 (DES-d8)	275.0>244.0	-26	-65
	275.0>259.0	-27	-65

- 1) SRM (Selected Reaction Monitoring) 選択的反応モニタリング
- 2)  $m/z$  質量  $m$  と電荷  $z$  の比
- 3) Collision E (Collision Energy) 衝突誘起解離 (Collision-induced dissociation: CID) を行う時に衝突エネルギーを利用してイオンの解離を引き起こすためのエネルギー値
- 4) T Lens (Tube lens) ESI において生成したイオンを質量分析部に導入するための印加電圧値
- 5) d 体 内部標準物質として用いられるサロゲート物質

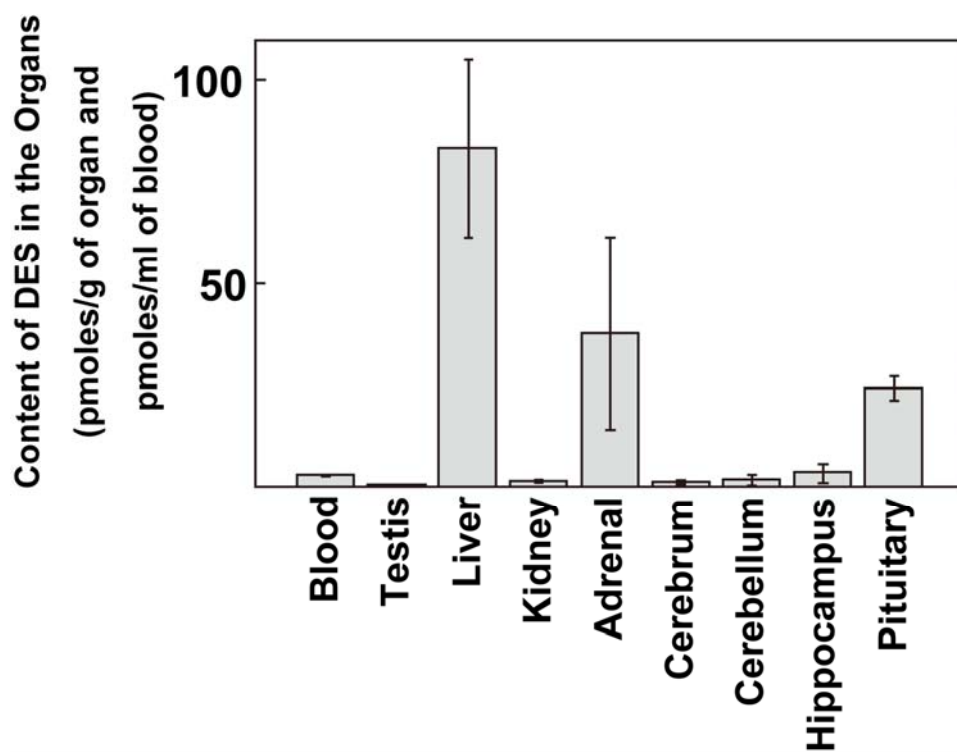


図 1-1. 投与 1 時間後における各臓器への DES の分布

DES(0.1mg)を投与 1 時間後の各臓器における DES の分布濃度を LC-MS 分析によって定量した。(n=5、ただし、対をなす臓器については片側のみを測定した。)

平均値±標準誤差で示している。

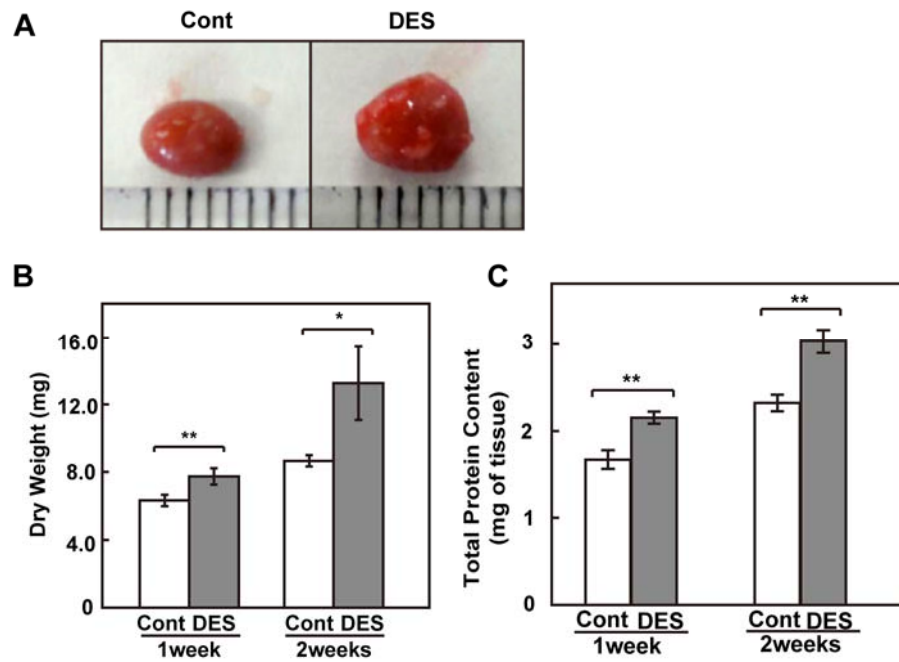


図 1-2. DES 投与副腎の外観、乾燥重量および総蛋白質量

A:2w 投与副腎の外観

B: 副腎の乾燥重量 (n=3)

C: 副腎総蛋白質量 (n=3)

\*は、有意水準 ( $P<0.05$ ) で有意差あることを示す。

\*\*は、有意水準 ( $P<0.01$ ) で有意差あることを示す。

平均値±標準誤差で示す。

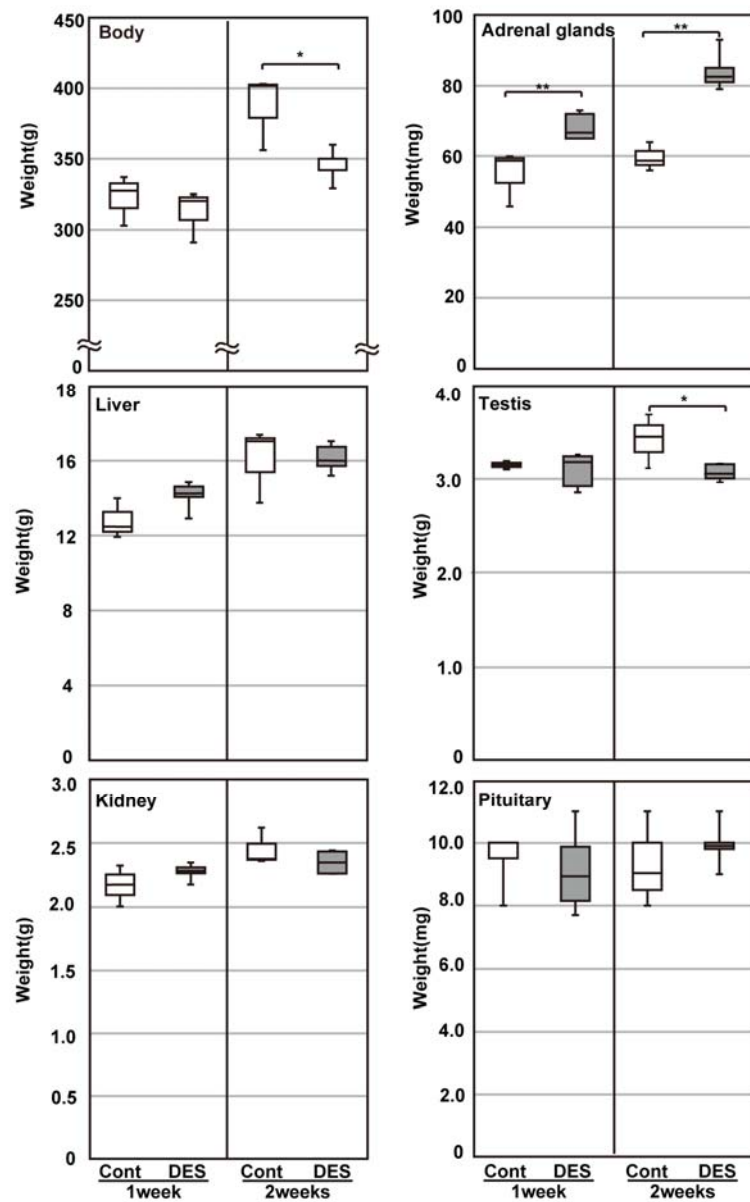


図 1.3. 体重と組織重量

D:1w 及び 2w 投与した Control 群と DES 投与群の体重及び臓器別重量を示す。

各データは、四分位で示している。最小値、第一四分位、中央値、第三四分位、最大値を示している。

\*は、有意水準 ( $P < 0.05$ ) で有意差あることを示す。

\*\*は、有意水準 ( $P < 0.01$ ) で有意差あることを示す。

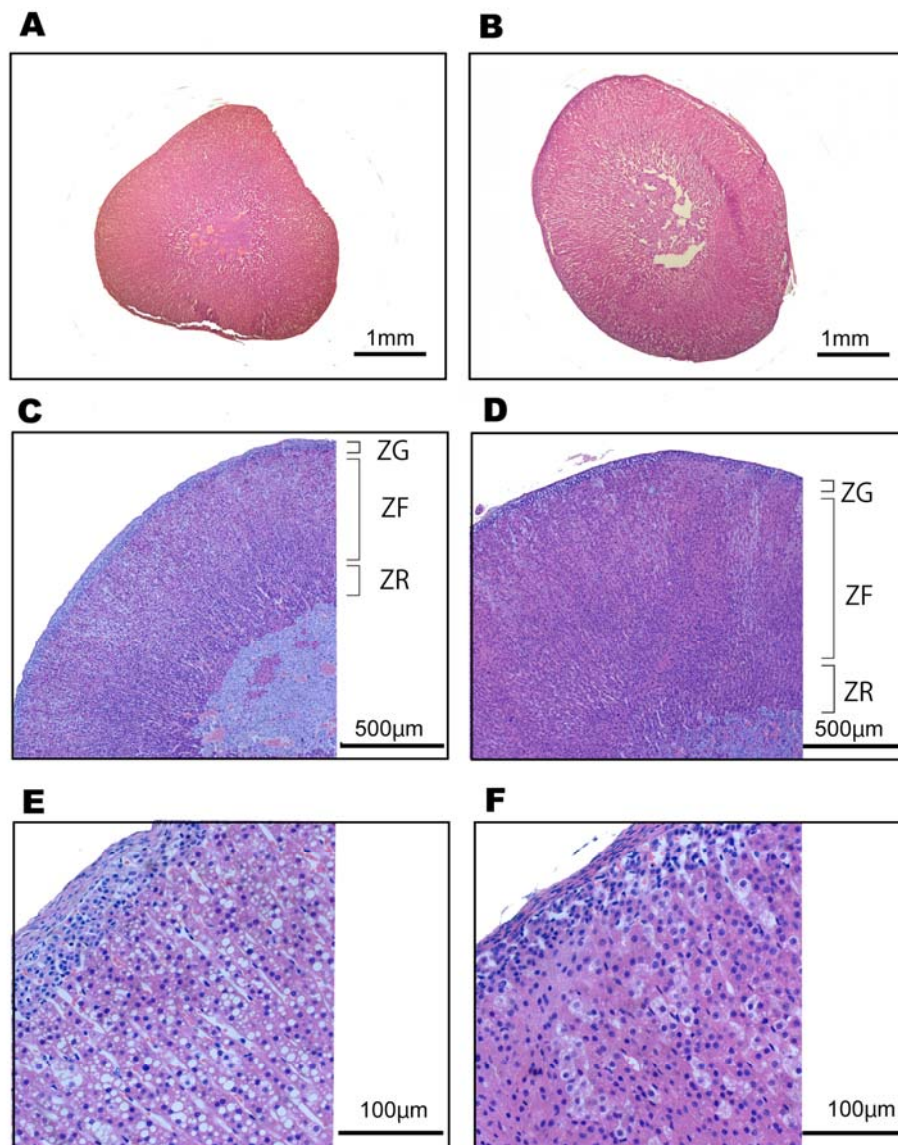


図 1-4. 2w 投与副腎の HE 染色

Control 副腎は A、C、E、DES 投与副腎 B、D、F。C-F は副腎皮質領域を示す。ZG:球状帯、ZF:束状帯、ZR:網状帯を示している。2w DES 投与副腎では、束状帯及び網状帯領域の肥厚が認められる(C、D)。また、DES 投与副腎では、束状帯領域の細胞内空胞の小型化が認められる(E、F)。

#### 4. 考察

本研究から、質量分析によって初めて、臓器内での DES の分布を直接検出し、定量することに成功し、DES 投与後の体内分布を明らかにした。DES は投与後 1 時間で、全身に広く分布し、最も多くの DES が肝臓から検出された。次いで、下垂体、副腎から検出された。経口投与された DES が消化管から吸収され、門脈を介して肝臓に到達することから、早期に多量の DES が肝臓に分布することが予想される。一方で、DES はこれまで毒性報告の多い精巣よりも、副腎や下垂体に多量に分布していた。副腎や下垂体に DES が特異的に分布する理由は不明であるが、これら DES の親和性が高い臓器では、早期に直接的な障害が誘発されることが予測される。DES はエストロゲン受容体 (ER) に結合することが知られている。ER には、 $\alpha$  と  $\beta$  が知られており、副腎や下垂体では、エストロゲン受容体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) が多く発現している [31]。DES は、ER $\alpha$  及び  $\beta$  のどちらにも同程度の親和性を持つ [31] が、DES の生殖毒性は、ER $\alpha$  依存的に作用すると言われている [18]。このことから、DES は ER $\alpha$  を多く発現する副腎や下垂体に高親和性を示すことが示唆される。DES はこれまで生殖毒性が多く報告されてきたが、本研究から、DES は生殖器よりも副腎や下垂体に特異的に分布することを明らかにした。

DES の投与を受けたラット副腎の重量は増加していた。さらに副腎の総蛋白質量および乾燥重量が増加していたことから、DES 投与により、副腎組織が増加し、腫大していることが明らかとなった。また、2 w DES 投与副腎では、副腎皮質の束状帯及び網状帯が肥厚し、束状帯の細胞内空胞が DES 投与によって著しく小型化していた。また、示してはいないが、1wDES 投与副腎では、束状帯領域の細胞内空胞小型化は認められたが、束状帯領域の肥厚は認められなかった。ゆえに、DES による副腎組織変化は、腫大する前に細胞内の変化が生じていることが明らかである。

以上の結果から副腎は DES の主要な標的器官であることが示唆される。高濃度のエストラジオールやエチニルエストラジオール処置のオスラットでは、

副腎重量の増加や副腎皮質細胞の空胞の減少が認められている[1,5]。このことからエストロゲン活性のある化学物質やDESは、副腎の重量増加を誘発し、副腎機能に重要なステロイド代謝に影響を与えていることが示唆される。

## 5. 小括

Diethylstilbestrol(DES)は、非ステロイド性の合成エストロゲンで、1950-1970年代にかけて米国やヨーロッパで、流産防止薬として妊婦に投与された薬物である。胎児期にDESの暴露を受けて生まれた女兒の思春期以降に、通常稀な膣腺腫の発生報告が相次ぎ、その使用が禁止された。また、DESは家畜の肥育促進剤としても飼料に添加されていたこともある。DESの暴露を受けることによって、乳がん発生、胎児期の暴露によって膣腺腫や子宮形成不全、不妊、男性においては、性器形成不全、精子濃度低下のリスクが高まる報告がある。DESが生殖器系に影響を与えることは明らかであるが、その詳細な作用機序は未だ不明なままである。現在DESの臨床現場における利用はないが、その強力なエストロゲン活性から、内分泌かく乱物質のモデル物質として研究に用いられている。DESの作用機序を解明は、他の内分泌かく乱物質の作用機序解明にも橋渡しとなることが期待される。

本探索から、DESの毒性として多くの報告がある精巣よりも、下垂体や副腎にDESが高い親和性を持つことを明らかにした。これらの臓器への特異的な親和性は不明であるが、これらがDESによる直接的な標的器官となる可能性がある。DES投与により、副腎は束状帯領域内の空胞が小型化し、その後には腫大することが明らかとなった。他のエストロゲン活性のある物質であるエストラジオールやエチニルエストラジオール投与においても同様に副腎の腫大や空胞の減少が認められていることから、DESのエストロゲン活性がこれらに影響を与えることが示唆される。このことはDESが、副腎重量増加を誘発し、副腎機能へ影響を与えることが示唆された。



## 第Ⅱ章 DES による副腎ステロイド合成への影響

### 1. 序文

内分泌攪乱物質は、副腎のステロイド合成に影響を与えるが、その副腎への影響やステロイド合成についての研究は少ない[8]。さらに副腎のコルチコステロン合成に関与するチトクローム P450 酵素に関する報告は、これまでに見当たらない。Zimmerman らは DES 暴露における副腎の重量増加とステロイドホルモンレベルの減少を報告した唯一の研究グループである[59]。副腎は、体内に占める割合は小さいながら、その機能は多岐に渡る。とりわけ、副腎皮質から合成・分泌されるステロイドは、我々が生存していく上で必要不可欠なホルモンである。特に代表的な副腎皮質ホルモンであるコルチゾール、げっ歯類ではコルチコステロンは、我々が生きていく上で曝されるストレスに対して、抵抗性を付与するとともに、代謝や免疫機能の過剰な反応を抑制する重要な役割を担っている。また近年では、胎児の成長や出産時に重要なホルモンでもある[7,18]。胎児期に十分なコルチコイドの暴露を受けなければ、胎児の成長が阻害され、死産となる報告がある[12]。また、出産時には、母体のコルチゾール濃度の著しい上昇が分娩を誘起するとされている。また、副腎皮質から産生されるアルドステロンが近年精巣のステロイド合成に関与する報告がある。このように副腎皮質ホルモンは、生体にとって必要不可欠なホルモンである。コルチコステロンの合成は、細胞内のコレステロールがミトコンドリア内でプレグネノロンに変換され、小胞体でプロゲステロン、デオキシコルチコステロンを経て、最終的にコルチコステロンが合成される。第Ⅰ章では、DES はこれまで多くの毒性報告がある生殖器よりも副腎や下垂体に高濃度に分布していることが明らかとなった。さらに、DES 副腎は腫大し、その内部は皮質、特に束状帯領域の肥厚し、細胞内の空胞の小型化が明らかとなった。本章では、DES が副腎機能にどのような影響を与えているか副腎ステロイドや関連する生体内物質を測定することにより明らかにすることを

目的とした。

## 2. 材料および方法

### 2.1. 供試動物と投与方法

第 I 章に準ずる。

### 2.2. 臓器の採取

第 I 章に準ずる。

### 2.3. 副腎及び血中ステロイドの定量

第 I 章に準ずる。

### 2.4. LC-MS/MS による血中 ACTH の定量

標準試薬 ACTH をトリプシンでがん消化して nLC-qTOF で測定して得られたスペクトラムを、タンパク質データベースである Mascot で検索して ACTH を同定した。ACTH を消化して得られたペプチドを MS/MS 分析でアミノ酸配列を決定した。MS/MS で得られたフラグメント情報から四重極型 MS を設定した (Selected Reaction Monitoring: SRM 法)。血清に 50mM 重炭酸アンモニウム 100  $\mu$ l をいれてホモジナイズし、遠心後上清 40  $\mu$ l にトリプシン 10  $\mu$ l をいれて 5 時間反応させた (溶液内消化)。それぞれに 0.1 % ギ酸含有アセトニトリルを加え、試料とした。抽出した溶液に、同じ条件で消化して得られた標準溶液を添加することで得られた検量線から定量 (標準添加法) した。

### 2.5. RT-PCR

#### 2.5.1. mRNA の抽出

mRNA の抽出は MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit II (Tissue) を用いて行った。副腎と下垂体をそれぞれホモジネートチューブ (Lysing Matrix I) (MP-Biomedicals (Q-Biogene)) に入れ、Lysis Buffer を 300  $\mu$ l 加えた。MagNA Lyser Instrument (Roche Diagnostics) を用いて、6,000 rpm、50 秒間でホモジナイズし、室温で 30 分間静置した後、Capture Buffer を 600

μl 加え、17,000 ×g で 5 分間遠心分離し、その上清 880 μl を用い、MagNA Pure LC 350(Roche Diagnostics)を使用して mRNA の抽出を行った。

### 2.5.2. cDNA の合成

抽出した mRNA を Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche Diagnostics)のマニュアルに従い、Anchored-Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer を用いて逆転写し、cDNA を合成した。

### 2.5.3. Real-time PCR(RT-PCR)

LightCycler® 2.0(Roche Diagnostics)を使用し、TaqMan® Probe 法により定量的 PCR を行った。方法は LightCycler® TaqMan® Master(Roche Diagnostics)および Universal ProbeLibrary(UPL)(Roche Diagnostics)のマニュアルに従った。PCR は 95 °C、10 分間インキュベートした後、95 °C、10 秒間、55 °C、20 秒間、72 °C、2 秒間(検出)を 45 サイクル行った。解析には LightCycler Software Ver. 4.0(Roche Diagnostics)を用いた。標的遺伝子をラット StAR、PBR、P450scc、POMC、内部標準遺伝子をラット β-アクチンとした。当教室既存のラット β-アクチン cDNA plasmid を段階希釈して、それをスタンダードとして用いた。各サンプルの β-アクチンの発現量に対する標的遺伝子の発現量の割合で定量した。使用した UPL および primer の配列は表 2-1 のとおりである。

## 2.6.試験管内酵素反応試験

### 試験管内ステロイド合成酵素反応試験

2ml チューブに、0.5 M リン酸緩衝液 150 μl、0.1 M MgCl<sub>2</sub> 75μl、20 mM NADPH 60μl、20 mM NADH 60μl、DDW 915μl、30 mM 基質 30μl、副腎ミトコンドリア画分(終濃度 0.2%CHAPS で処理したもの)60μl を混合したものを反応液とした。20-ヒドロキシコレステロールを基質とし、反応液を 1 時間、

37 °Cでインキュベートした。反応開始を0分として10分毎に反応液を回収した後、100 °C、2分間煮沸させて酵素反応を停止させた。その後各時間の反応液中のプレグネノロン濃度をLC-MS/MS及びLC-TOFMSを用いて測定した。

### 2.7.1 ウェスタンブロッティング

副腎を0.25 M スクロース溶液でホモジナイズし、900 × g、10分間、4°Cで遠心分離した。得られた上清をさらに、5,000 × g、10分、4°Cで遠心分離し、得られた上清を可溶化画分、沈殿をミトコンドリア画分とした。第1章に準じて、蛋白質定量した両画分は、SDS アクリルアミドゲル電気泳動によって分子量ごとに分離した後、PVDF膜に転写した。可溶化画分は、LDL受容体およびHDL受容体(SR-B1)に対する特異抗体を用いて目的の蛋白質を検出した。ミトコンドリア画分は、P450<sub>scc</sub>に対する特異抗体を用いて目的の蛋白質を検出した。内部標準蛋白質としてβ-アクチンに対する特異抗体を用いた。

### 2.7.2 デンシトメーター解析

CS Analyzer ソフト(ATTO)を用い、WBから検出されたバンドをデンシトメーター解析から数値化し、定量した。各サンプルの内部標準蛋白質をβ-アクチンとして、その発現量に対する標的蛋白質の発現量の割合から定量を行った。

### 2.8. オイルレッド染色

凍結副腎をクリオスタッドミクロトーム(CR-502;大和光機工業)上で低温薄切(7μm)し、常法に従い、ヘマトキシリン染色及びオイルレッド染色を施した。

## 2.9. 電子顕微鏡学的探索

副腎組織を4%パラホルムアルデヒドで灌流し、1 mm キューブ状に整形したのち、4 %パラホルムアルデヒド、2.5 %グルタルアルデヒド 0.1 M リン酸バッファーに2 時間浸漬した。組織ブロックは0.1 M リン酸バッファーで洗浄後、1.0 %四酸化オスミウム 0.1 M リン酸バッファーで1 時間固定し、アルコール脱水を施した。サンプルは80-100 nm に薄切し、2 %酢酸ウラニルメタノールとクエン酸鉛で染色した後、電子顕微鏡下で鏡検した。

## 2.10. 副腎コレステロール測定

総コレステロール及び遊離コレステロールはそれぞれのコレステロール E キット(ワコー)を用いた。副腎組織を0.25 M スクロース溶液でホモジナイズ後、 $900 \times g$  で10 分間遠心分離し、得られた上清を用いて総コレステロールを測定した。さらに、上記上清に0.25 M スクロース溶液に終濃度0.1 % CHAPS 及び0.1 % SDS を添加し細胞膜を破壊したサンプルを用い、遊離コレステロールを測定した。各反応液と副腎上清サンプルを混和し、37 °C で10 分間インキュベートした後、600 nm の波長で吸光値を測定した。標準コレステロール溶液の吸光値から検量線を作成し、総コレステロール及び遊離コレステロール量を算出した。

## 2.11. 統計学的分析

第 I 章に準ずる。

### 3. 結果

#### 3.1. 血中コルチコステロンおよび ACTH 量と下垂体 POMC

血中のコルチコステロンは、DES 投与 1 週間及び 2 週間後、Control 群に比較し有意に減少していた(図 2-1A)。なお、質量分析によって定量されたコントロール群の平均コルチコステロン濃度(約 100ng/ml)は、過去に報告されたデータに一致していた[2,14]。一方、血清 ACTH は、DES 投与後、有意な変化は認められなかった(図 2-1B)。さらに下垂体の ACTH ペプチドをエンコードする POMC mRNA は、DES 投与後も誘導されていなかった。(図 2-1C)

#### 3.2. 副腎ステロイドとその前駆物質

副腎のコルチコステロン、アルドステロン、コルチコステロン前駆物質を定量した結果を図 2-2 に示した。デオキシコルチコステロンを除く全てのコルチコステロン前駆物質及びコルチコステロンが DES 投与 1 w 後には顕著に減少していた。また、アルドステロンおよび 18-ヒドロキシコルチコステロンも同様に DES 投与後 1 w で有意に減少していた。

#### 3.3. 副腎ステロイド合成の律速因子

ミトコンドリア内へのコレステロール輸送は、StAR や PBR といったステロイド合成律速因子が関与する[16,44]。ゆえに、これら蛋白質が DES によって障害を受けていないか確認するため、mRNA を RT-PCR にて探索した。その結果を図 2-3 に示す。1 週間 DES 投与群では、StAR、PBR の遺伝子は、いずれも増加傾向にあった(図 2-3A、B)。これまでの我々の研究から、DES を投与したラット精巣のステロイド合成阻害は P450scc 活性阻害に因ることを明らかにした[39]。一方、副腎の P450scc の mRNA は増加傾向であった(図 2-3C)。また、P450scc の蛋白質および活性も DES 投与によって、わずかに増加していた(図 2-4)。さらに、血中コレステロールの取り込みに関与する

LDL 受容体および HDL 受容体 (SR-B1) に対する特異抗体を用いて、副腎組織をウエスタンブロットした結果、図 2-5 に示すように DES 投与によって LDLR は約 2 倍、SR-B1 は約 3-4 倍にそれぞれ増加していた。

### 3.4. 副腎内のコレステロール

図 2-6A に 2 週間処置副腎皮質のオイルレッド染色の結果を示した。副腎皮質内で赤く染まる脂質は、DES 投与によって明らかに減少していた。さらに、より詳細な構造を探索するために、電子顕微鏡下において探索したところ、副腎皮質細胞内の液滴が小型化していた(図 2-6B)。副腎内の総コレステロール及び遊離コレステロールは、いずれも DES 投与によって減少していた(図 2-7)。ゆえに、DES 投与によって副腎のコレステロールエステルも減少していることが明らかとなった。



表 2-1. 各プライマー配列

標的遺伝子	Accession No.	UPL (配列)		プライマー
StAR	NM_031558	#18(cagcagga)	F	ggaaggctggaagaaggaaa
			R	acacctggcaccaccttact
PBR	NM_012515	#130(ctggacac)	F	gaaaccctcctggcatcc
			R	tccagattatgtaggagccatacc
P450 <sub>scc</sub>	NM_017286	#9(catcacca)	F	acctattccgotttgcctt
			R	cacgatctcctccaacatcc
POMC	NM_139326	#62(acctgctg)	F	aggacctcaccacggaaag
			R	ccgagaggtcgagtctgc
$\beta$ アクチン	NM_031144	#115(gacccaga)	F	ctaaggccaaccgtgaaaag
			R	gcctggatggctacgtaca

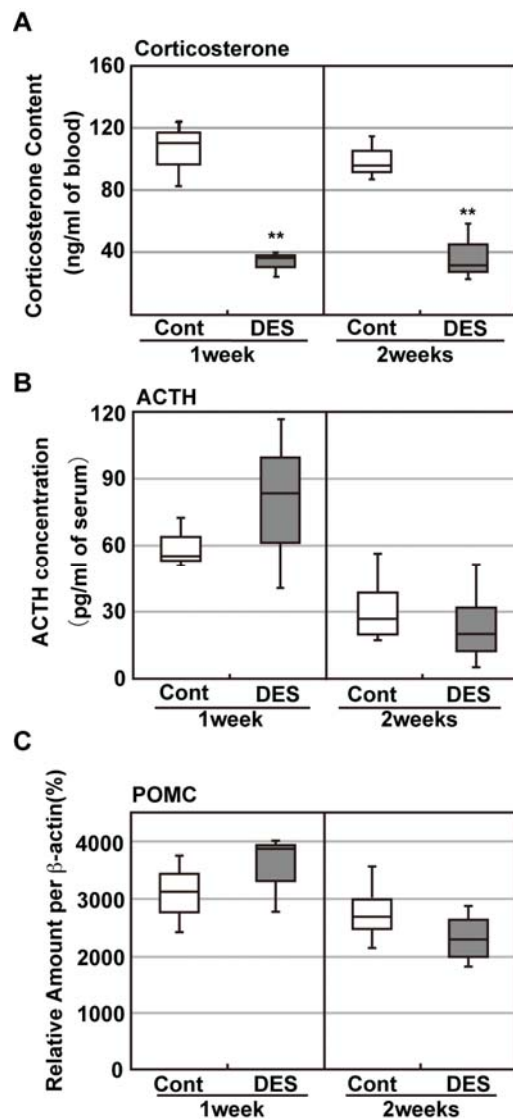


図 2-1. 血中コルチコステロン、血清 ACTH と下垂体 POMC mRNA

A. 1w および 2w 投与の血中コルチコステロン濃度、B.1w および 2w 血清 ACTH 濃度、C.1w および 2w 投与下垂体 POMC mRNA を示す。

各グラフは、四分位を用いて示している。長方形の中央のラインは中央値を示す。長方形の下側の辺は、第一四分位、上側の辺は第三四分位を示す。長方形から上に伸びる実線の先端は最大値、下側に伸びる実線の先端は最小値を示している。

\*\*は、DES 投与によって有意水準 ( $P < 0.01$ ) において有意に減少していることを示す。(n=3-4)

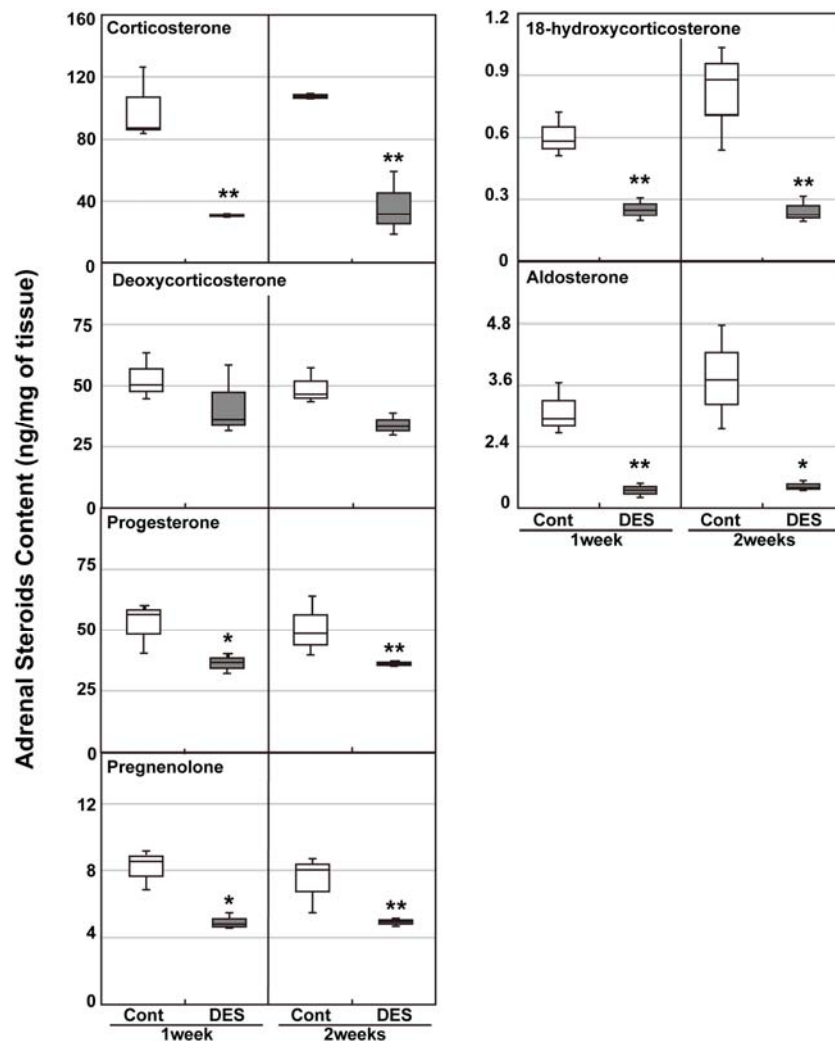


図 2-2. 副腎のステロイド合成

1w および 2w 投与副腎内のコルチコステロンおよびその前駆物質であるプレグネノロン、プロゲステロン濃度、アルドステロンとその前駆物質の 18-ヒドロキシアルドステロン濃度を示す(各群 n=3-4)。各グラフは、四分位を用いて示している。長方形の中央のラインは中央値を示す。長方形の下側の辺は、第一四分位、上側の辺は第三四分位を示す。長方形から上に伸びる実線の先端は最大値、下側に伸びる実線の先端は最小値を示している。

\*は DES 投与によって有意水準( $P < 0.05$ )において有意に減少していることを示す。\*\*は、DES 投与によって有意水準( $P < 0.01$ )において有意に減少していることを示す。(n=3-4)

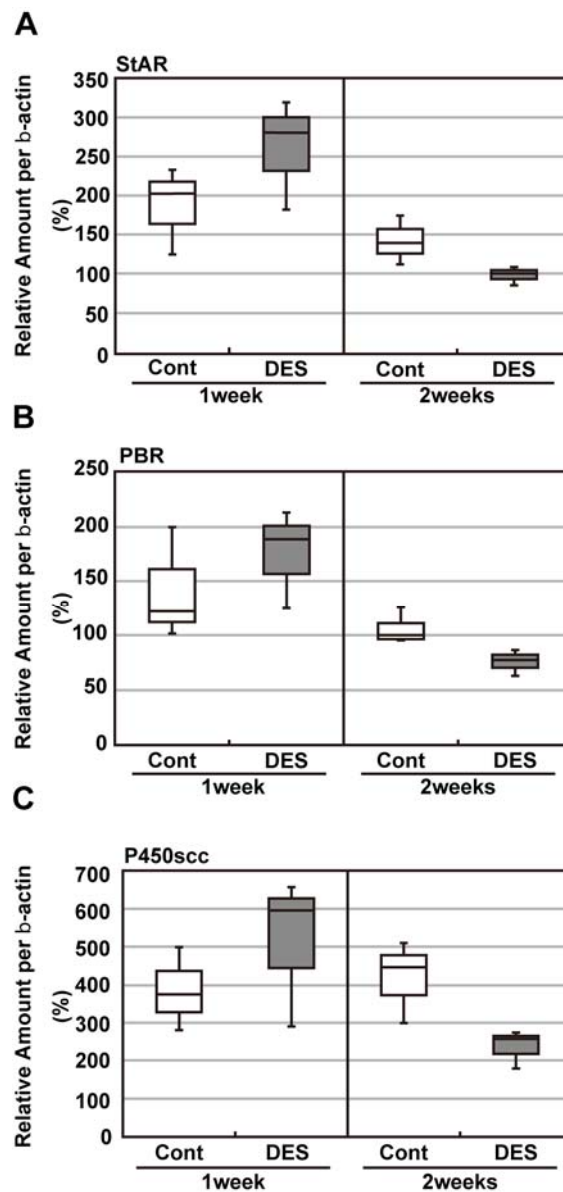


図 2-3. 副腎ステロイド合成関連因子 StAR,PBR,P450scc

1w および 2w 投与副腎の A.StAR mRNA、B.PBRmRNA、C.P450scc mRNA を示す。各データは四分位を用いて示している。長方形の中央のラインは中央値を示す。長方形の下側の辺は、第一四分位、上側の辺は第三四分位を示す。長方形から上に伸びる実線の先端は最大値、下側に伸びる実線の先端は最小値を示している。

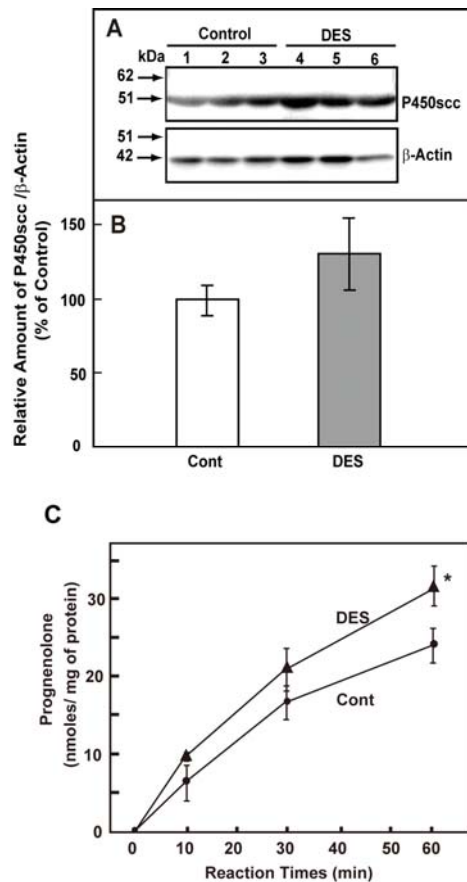


図 2-4. 1w投与副腎 P450scc のウェスタンブロットおよび酵素活性

- A. 1w投与後の副腎ミトコンドリア内における P450scc の WB を示す。プローブ抗体として、ウサギポリクローナル抗 Cytochrome P450scc 抗体 (Millipore)、ウサギポリクローナル抗  $\beta$ アクリン抗体 (Abcam) を用いた。
- B. WB から得られたバンドをデンストメトリー解析によって定量した。内部標準蛋白質の  $\beta$ アクリンに対する P450scc の発現量を示す。平均値  $\pm$  標準誤差で示す。
- C. P450scc の酵素活性の測定結果を示す。1w投与副腎を用いて、20-ヒドロキシコレステロールを基質として酵素反応後、経時的に合成された反応液中のプレグネノロン濃度を測定した。平均値  $\pm$  標準誤差で示している。\*は DES 投与によって有意水準 ( $P < 0.05$ ) において有意に減少していることを示す。

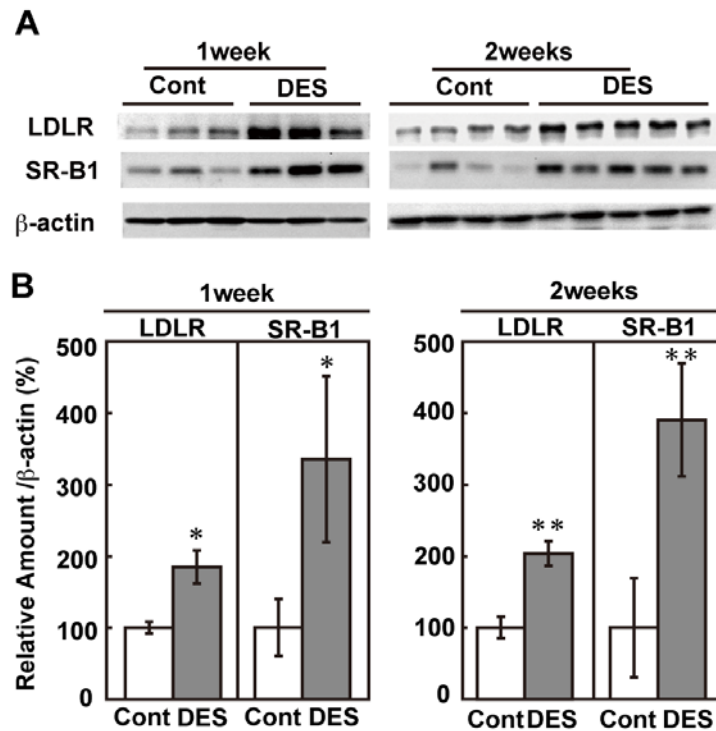


図 2-5. 副腎 LDL 受容体 (LDLR) と HDL 受容体 (SR-B1)

A. 1w および 2w 投与副腎における LDLR と SR-B1 の WB。プローブ抗体抗体は、ニワトリポリクローナル抗 LDLR 抗体 (Sigma-Aldrich)、ウサギポリクローナル抗 SR-B1 抗体 (Sigma-Aldrich)、ウサギポリクローナル抗 β ア ク チ ン 抗体 (Abcam) を用いた。(1w 投与 Control(n=3)、DES (n=3)、2w 投与 Control(n=4)、DES(n=5))

B. WB から検出されたバンドをデンシトメトリー解析によって定量した。グラフは、内部標準蛋白質として β ア ク チ ン を用い、その発現量に対する LDLR、SR-B1 の発現量の割合 (%) を示す。

\*は DES 投与によって有意水準 ( $P < 0.05$ ) をもって有意に増加していたことを示す。

\*\*は DES 投与によって有意水準 ( $P < 0.01$ ) をもって有意に増加していたことを示す。

平均値 ± 標準誤差で示している。

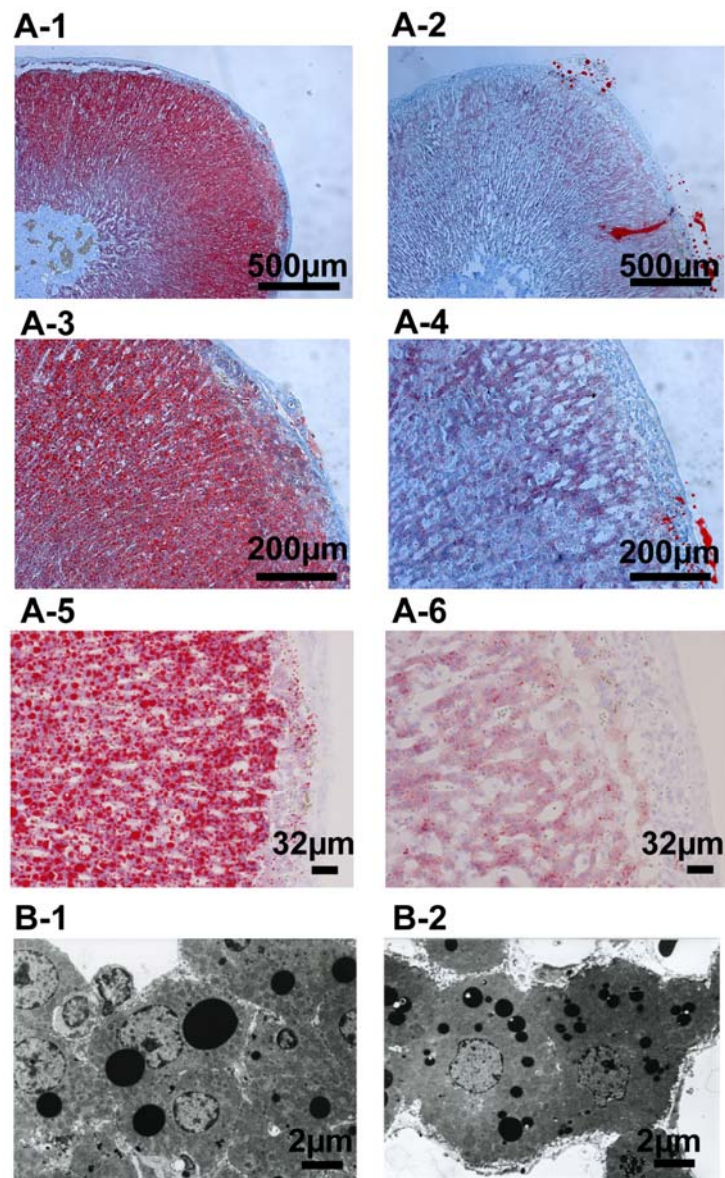


図 2-6. 副腎皮質のオイルレッド染色および束状帯領域細胞の電子顕微鏡像

- A. 2w Control 副腎 (1、3、5) および DES 投与副腎 (2、4、6) のオイルレッド染色像を示す。赤く染まる脂質は DES 投与によって減少していた。
- B. 2w 投与副腎束状帯領域細胞の電子顕微鏡像。Control (B-1)、DES (B-2)。DES 投与によって細胞内の脂肪滴が小型化していた。

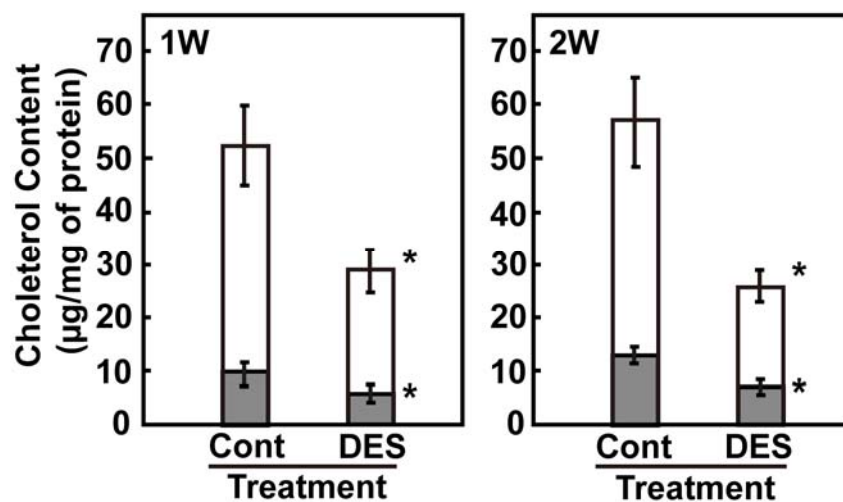


図 2-7. 1w 及び 2w 投与副腎の総コレステロールおよび遊離コレステロール濃度

1w および 2w 投与副腎コレステロール濃度を示す。白カラム+灰色カラムは総コレステロールを、灰色カラムは遊離コレステロール濃度それぞれ示す。  
\*は、有意水準 ( $P < 0.05$ ) をもって DES 投与によって有意に減少していることを示す。平均値 ± 標準誤差で示している。



## 4. 考察

本章から DES 投与によって副腎のステロイド合成が阻害されることが明らかとなった。副腎は、視床下部-下垂体-副腎の HPA 軸を構成し、副腎コルチコステロンの分泌は下垂体から分泌される ACTH によってコントロールされる。第 I 章の結果から副腎皮質束状帯領域の細胞内空胞の減少が生じ、肥大が生じていたのは、このコルチコステロン合成阻害による血中のコルチコステロン濃度の低下によって ACTH がフィードバック反応の結果であることが示唆された。しかし、DES 投与後も血清 ACTH や ACTH ペプチドを合成する下垂体 POMC mRNA は増加しておらず、血中のコルチコステロン低下によって ACTH によるフィードバック機構は誘導されていなかった。この理由は不明であるが、前立腺がん治療に DES-DP を用いた患者においても血中 ACTH や POMC が増加していなかったことが報告されている[25]。また DES は、FSH/LH 細胞の異分化を誘導し、プロラクチン産生細胞を増加させることが知られている[50]。そのため、DES は下垂体 ACTH 産生細胞にも障害を与えているかもしれない。また、副腎腫大をコントロールする他の因子として steroidogenesis factor-1(SF-1)が知られており[8,11]。DES はこれに影響を与えている可能性が考えられる。DES による副腎腫大の機序を解明するには、さらなる研究が要される。

副腎が腫大する疾病として先天性副腎過形成症が知られている。これは、StAR や P450scc の変異によって引き起こされることが知られ、深刻なステロイド合成障害を特徴とする[43]。コレステロールは 17 個の炭素ステロイド骨格を持ち、コルチコステロンなど、ステロイド合成の原料となる。副腎でのステロイド合成は、細胞質のコレステロールが StAR や PBR によってミトコンドリア内に運ばれると、そこでステロイド合成能を決定づける P450scc によってプレグネノロンに変換される。DES 投与によって腫大した副腎内では、これらの因子は阻害は受けず、増加傾向であった(図 2-3)。ゆえに、DES はコレステロールのミトコンドリア輸送やプレグネノロンへの変換に直接影響を与えていないことが

示唆されると同時に、ステロイド合成の初期段階には影響を与えないようである。副腎ステロイド合成の原料となるコレステロールの供給は、細胞内での合成と血中からの供給が知られており、後者に関連する因子として LDL 受容体 (LDLR) や HDL 受容体 (SR-B1) がある[21]。げっ歯類では、副腎ステロイド合成には HDL 受容体を介して得られる HDL 由来のコレステロールが積極的に利用される[21,30]。DES 投与によって、副腎のコレステロール取り込みに関与する HDL 受容体と LDL 受容体の発現が阻害されていないかウエスタンブロットを行った結果、両受容体は、予想に反し、DES 投与によって増加していた。これら受容体の発現は増加しているものの、DES 投与によって受容体の取込み機能に障害が生じている可能性は否定できない。そこで受容体発現誘導にも関わらず、副腎ステロイド合成が抑制されるかを探索した結果、副腎内のコレステロールが減少していたことを見出した。現段階において、なぜ副腎のコレステロールが減少するのかは不明であるが、本章の結果から DES 投与によって副腎ステロイド合成に必要なコレステロールの供給を阻害することを明らかにした。DES の副腎毒性は、これまで報告してきた P450scc 阻害による精巣ステロイド合成阻害[39]とは異なる機序で生じていた。この副腎コレステロール減少機序を解明するには、投与後より早期の段階による探索が求められる。

副腎で産生されるステロイドは、胎児や新生児の成長や発達だけでなく、陣痛や出産にも重要な役割を担う[7,25]。DES によって引き起こされる慢性的なコルチコステロンの低下は、内分泌恒常性を攪乱し、ストレス抵抗性を減弱化させる可能性がある。本章から明らかとなった DES 投与によるコルチコステロンの低下は今後、DES の膣腺腫や生殖器異形成などの生殖毒性を解明する上で、新たなステップになるであろう。我々は、胎児期から成熟するまでには長期間を有し、その間に重要なステージである胎児期の成長、出産、成長期には、様々なホルモンの影響を受ける。そのため、DES の毒性がどの段階で生じているのか、またそのメカニズムを探索することは容易ではな

い。成熟動物を用いた本章の研究では、DES による直接的な影響を明らかにすることに成功した。本章から明らかとなった副腎のステロイド合成抑制とコレステロール減少は今後、妊娠動物や胎児における DES 毒性のメカニズムを探る上で重要な証明となることが期待される。さらに DES は、生体内で厳密にコントロールされているコレステロールの恒常性を攪乱している可能性が示唆される。

## 5. 小活

内分泌かく乱物質は、副腎のステロイド合成に影響を与えるが、その副腎への影響やステロイド合成についての研究は少ない。副腎皮質から合成・分泌されるステロイドは、我々が生存していく上で必要不可欠なホルモンである。特に代表的な副腎皮質ホルモンであるコルチゾールは、我々が生きていく上で曝されるストレスに対して、抵抗性を付与するとともに、代謝や免疫機能の過剰な反応を抑制する重要な役割を担っている。また近年では、胎児の成長や出産時に重要なホルモンである報告がある。本章では、DES が副腎機能にどのような影響を与えているかを明らかにすることを目的とした。その結果、DES は、副腎のステロイド合成を阻害し、それは、副腎内のコレステロールの減少に起因することを見出した。本章から明らかとなった DES 投与によるコルチコステロンの低下は今後、DES の腫腺腫や生殖器異形成などの生殖毒性を解明する上で、新たなステップになるであろう。我々は、胎児期から成熟するまでには長期間を有し、その間に重要なステージである胎児期の成長、出産、成長期には、様々なホルモンの影響を受ける。そのため、DES の毒性がどの段階で生じているのか、またそのメカニズムを探索することは容易ではない。成熟動物を用いた本章の研究では、DES による直接的な影響を明らかにすることに成功した。本章から明らかとなった副腎のステロイド合成抑制とコレステロール減少は今後、妊娠動物や胎児における DES 毒性のメカニズムを探る上で重要な証明となると期待される。さらに DES は、生体内で厳密にコントロールされているコレステロールの恒常性を攪乱している可能性が示唆される。

### 第Ⅲ章 DES 投与ラットの血中コレステロールとアポリポ蛋白質

#### 1. 序文

第Ⅰ章では、DES 投与オスラットにおける DES の体内分布、副腎の組織学的な変化を明らかにした。さらに第Ⅱ章では、DES 投与副腎のステロイド合成阻害が、原料となる副腎内コレステロールの減少に因ることを見出した。本章では、さらにその機序を探索することを目的とした。副腎のようなステロイド合成器官におけるコレステロールの供給には、主に細胞内での新規合成と血中コレステロールからの取込みが知られている[21]。げっ歯類では、後者による供給が主経路として知られている[21,30]。薬物によって、血中のコレステロールが著しく減少した場合、副腎のコレステロールが減少し、ステロイド合成が抑制される報告がある[20]。副腎における血中コレステロールの取り込みには、LDL 受容体やHDL 受容体 (SR-B1) が関与する。LDL 受容体は、リポ蛋白質に存在するアポリポ蛋白質の ApoB100 や ApoE をリガンドとし、エンドサイトーシスによってリポ蛋白質を取込む。HDL 受容体では、HDL 構成アポリポ蛋白質、ApoA1 を認識し、HDL に存在するコレステロールエステルを取込む。第Ⅱ章では、DES 投与によってこれらの受容体発現が誘導されていることが明らかとなった。これまで、中長期投与における DES の影響を探索してきたが、DES のさらなる毒性メカニズムを明らかにするため、単回投与後の血中におけるコレステロール変化、そしてそれらの機序を明らかにすることを目的とした。

## 2. 材料および方法

### 2.1. 供試動物および投与方法

第 I 及び II 章同様に SD オスラットを用い、第 I 章に準じた飼育管理を行った。Control 群にはオリーブオイルのみを DES 投与群には、オリーブオイルに溶解した DES0.1 mg をゾンデを用いて胃内強制投与し、投与 6、12、24、48 時間後にサンプリングを実施した。

### 2.2. 血清の採取

第 I 章に準ずる。

### 2.3. HDL、LDL/VLDL コレステロール測定

HDL and LDL/VLDL Cholesterol Quantification Kit(Bio Vision) のプロトコールに準じて行った。血清サンプルと等量の Precipitation Buffer を混合し、室温にて 10 分以上反応させた後、 $2,000 \times g$ 、10 分間遠心分離した。得られた上清を HDL 画分、沈渣に PBS を加え溶解したものを LDL/VLDL 画分とした。各画分サンプルに反応液を加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 60 分間、遮光し反応させた。その後、波長 570 nm で吸光値を測定し、標準コレステロール液から得られた吸光値から検量線を引き、各画分のコレステロール濃度を算出した。

### 2.4. 血清 ApoA1 及び ApoE の検出

各血清サンプルを蒸留水で 30 倍に希釈し、第 II 章と同様に SDS-PAGE、ウエスタンブロットを行った。ヤギポリクローナル抗 ApoE 抗体 (Millipore)、ウサギポリクローナル抗 ApoA1 抗体 (Bio vision)を用いて目的とする蛋白質を探索した。

### 2.5. 統計学的分析

第 I 章に準ずる。

### 3. 結果

#### 3.1. HDL、LDL/VLDL コレステロールの変化

図 3-1 に DES 単回投与後の各画分のコレステロール濃度をグラフで示した。その結果、DES 投与後 12 時間以降に HDL 画分のコレステロールが著しく低下し、48 時間後も持続していた。また、LDL/VLDL 画分のコレステロールは投与 6 時間後でのみ有意に減少したが、その後は Control 群と同程度に推移していた。

#### 3.2. 血清 ApoE および ApoA1 の発現

血清 HDL コレステロールが著しく減少していたことから、HDL を構成する主要アポリポ蛋白質の ApoA1 及び HDL 粒子の成熟に関与するアポリポ蛋白質である ApoE をウェスタンブロッティングにて探索し、結果を図 3-2 に示した。その結果、HDL を構成する ApoA1 は DES 投与後も Control と変化は見られなかった。一方、ApoE は投与後 12 時間後から著しく減少し、投与 48 時間後も減少したままであった。さらに、ApoE の減少は、HDL コレステロールの減少に一致していた。

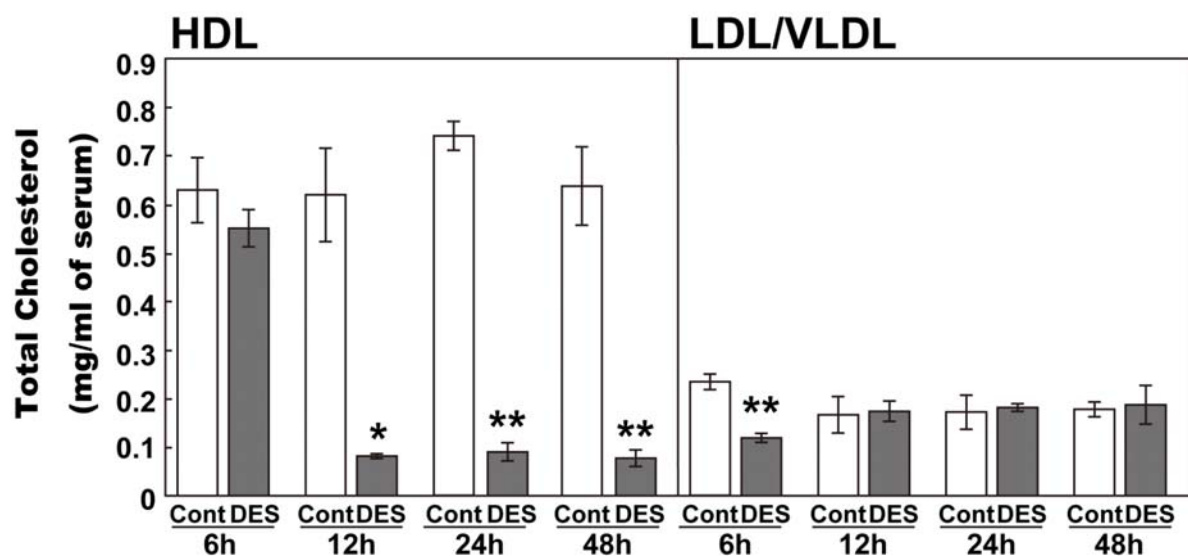


図 3-1. 血清 HDL および LDL/VLDL コレステロール濃度

6h、12h、24h、48h は投与後における血清中の HDL コレステロールおよび LDL/VLDL コレステロール濃度を示す。

白カラムはコントロール群 (n=3)、灰色カラムは DES 投与群 (n=3)を示す。

\*はコントロール群に比較し有意水準 ( $P<0.05$ ), \*\*は、コントロール群に比べて有意水準 ( $P<0.01$ )を持ってそれぞれ DES 投与群で有意に減少することを示す。

平均値±標準誤差で示している。



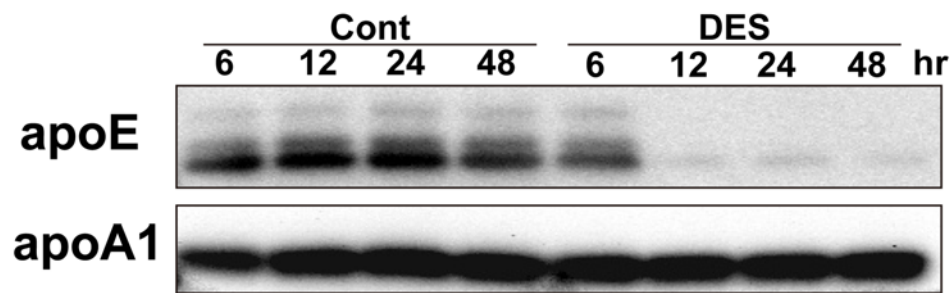


図 3-2.血清アポリポ蛋白質、ApoE および ApoA1 のウエスタンブロッティング

血清中のアポリポ蛋白質 ApoE と ApoA1 の特異抗体を用いて検出した。

Cont:コントロール個体(各時 n=3)、DES:DES0.1 mg/ml 投与個体(各時 n=3)。6、12、24、48hr は投与後の時間を示している。

プローブ抗体

ApoE: ヤギポリクローナル抗 ApoE 抗体 (Millipore)

ApoA1: ウサギポリクローナル抗 ApoA1 抗体 (Bio vision)

## 4. 考察

本章から DES 投与ラット血清において、投与 12 時間後から HDL コレステロールが著しく減少していることが明らかとなった。マウスでは、コレステロール降下薬のプロブコールによって血中のコレステロールが著しく減少し、副腎におけるコレステロール合成が低下し、その結果、コルチコステロン合成が阻害されることが報告されている[20]。また、げっ歯類の血中リポ蛋白質は、HDL が主要構成リポ蛋白質であり、HDL コレステロールはステロイド合成組織への重要なコレステロール供給源となる。副腎へのコレステロール供給を担う LDL 受容体および HDL 受容体の SR-B1 はいずれも DES によって発現が誘導されていた(第 II 章)ことから、副腎内コレステロール不足に因る代償性の発現誘導であると考えられる。このことから、本章で明らかとなった DES 投与による血中 HDL コレステロールの低下は、副腎へのコレステロール供給を阻害し、その結果、副腎内コレステロールが減少し、ステロイド合成抑制が引き起こされたことを見出した。

血中のリポ蛋白質は、それぞれ特異的な構造や機能を持つ。リポ蛋白質は、その比重によって、カイロミクロン、VLDL、LDL、HDL に分類され、血中における脂質の輸送に関与する。リポ蛋白質の比重はこの順に重くなり、粒子の大きさはこの順に小さくなる。リポ蛋白質は疎水性のトリグリセリド(中性脂肪)とコレステロールエステルを核に持ち、親水性のリン脂質、遊離コレステロール、アポリポ蛋白質と呼ばれる蛋白質によってこれらの表層が覆われている。HDL は、主に肝臓や小腸で合成、分泌されるアポリポ蛋白質 ApoA1 にコレステロールが付加され、未熟な HDL が形成される[36]。HDL は末梢組織を循環しながら、組織における余剰コレステロールを引き抜き、やがて成熟した HDL となり、肝臓に運搬され代謝を受ける(コレステロール逆輸送)。あるいはステロイド合成組織に運ばれ、供給されたコレステロールはステロイド合成の原料となる[9]。LDL は、ApoB100 を構成リポ蛋白質に持ち、コレステロールを多量に含み、組織にコレステロールを分配する役割を担う。LDL 受容

体を発現する臓器、主に肝臓に取り込まれ代謝される。過剰な LDL が血管壁に蓄積すると、コレステロールが沈着し、アテローム硬化症を引き起こすことが知られている[4]。これら過剰な LDL コレステロールは HDL や血中マクロファージによって除去されることが知られている[9]。DES 投与による HDL コレステロールの低下は、このような HDL の抗アテローム作用を減弱化させ、アテローム硬化を促進させるかもしれない。他の合成エストロゲンであるエチニルエストラジオールは、血中のコレステロールを低下させることが知られている[34]。DES と同様に副腎ステロイド阻害をもたらす可能性が示唆される。

さらに DES 投与によって HDL 特異的なアポリポ蛋白質の ApoA1 ではなく、ApoE が特異的に減少していることを見出した。ApoE は、肝臓、脳、副腎、精巣、卵巣、マクロファージなど様々な臓器で合成されるアポリポ蛋白質である[35]。その機能として、近年、抗アテローム作用が知られている[14,26,33]。ApoE 欠損動物はアテローム硬化症のモデル動物として様々な研究に用いられている[6,22,28]。ApoE は血中では、カイロミクロン、VLDL、HDL 上に存在し、取り込んだコレステロールのエステル化の促進を担っているとされている[41]。また、HDL 粒子が未熟な円盤状から球状に成熟する際にも必要とされる[33,38]。さらに LDL 受容体に対して非常に高い親和性を持ち、肝臓での HDL 取り込みにも関与する[35]。本章から、DES 投与によって HDL コレステロールの減少と血清 ApoE の減少が直接リンクするかは不明であるが、HDL を構成する ApoA1 発現は変化せず、ApoE が特異的に減少するのは興味深い。このことは、DES 投与によって ApoE が持つ機能を消失させ、HDL の成熟を妨げて、HDL コレステロール濃度を減少させていることは十分に考えられる。さらに、このことは、アテローム硬化作用を促進させるかもしれない。

DES 投与による HDL コレステロールと ApoE、両者の減少は、副腎ステロイド合成の阻害だけでなく、抗アテローム作用を減弱させ、アテローム症を促進させる可能性が示唆される。本章から DES 投与による影響は、内分泌か

く乱だけではなく、コレステロール代謝においても阻害作用を持つことを見出した。この事実は最近問題になっている薬物暴露により誘導されるアテローム硬化について、その機序を考える上で重要な示唆を与えるものである。

## 5. 小活

中長期的な DES 投与によって、副腎ステロイド合成が抑制されるのは、副腎内でのコレステロールの減少に起因することを前章で明らかにし、さらにその機序を明らかにするために、単回投与を実施し、血中のコレステロール濃度、アポリポ蛋白質の変化を探索した。その結果、DES 投与 12 時間後から血中の HDL コレステロールが著しく減少していることが明らかとなり、さらに投与 48 時間後においても HDL コレステロールは減少したままであった。HDL 構成アポリポ蛋白質の ApoA1 の血中量は DES 投与によって変化が生じていなかったが、血清 ApoE は、HDL コレステロールと同様に DES 投与 12 時間後から劇的に減少し、48 時間後も減少は持続していた。副腎のコレステロール供給には、細胞内での合成と血中からの供給の2つが知られており、げっ歯類では後者からの取り込みを積極的に行っている。血中からのコレステロール取り込みには、LDL 受容体や HDL 受容体(SR-B1)が知られている。これらは前章で DES 投与によって発現が誘導していたことから、血中コレステロールの減少によって代償的に発現が誘導したことが示唆される。すなわち、副腎内のコレステロールの減少は血中 HDL コレステロールの減少に起因することが示唆された。さらに、抗アテローム効果をもつ HDL コレステロール、ApoE の減少は、アテローム硬化を促進する可能性も示唆される。DES 投与によって、副腎ステロイド合成だけでなく、さらにその引き金としてコレステロール代謝への悪影響が明らかとなった。

## 第Ⅳ章 DES 投与ラット肝における APOE 分泌抑制

### 1. 序文

これまで DES による副腎ステロイド合成抑制を明らかにし、そのメカニズムを探ってきた。第Ⅱ章では、副腎ステロイド合成抑制は、副腎内コレステロールの減少に因ることを見出した。内分泌かく乱物質による影響は、これまでその多くが、臓器特異的な影響、例えば、生殖毒性や神経毒性として報告されてきた。しかし、第Ⅲ章から血中のコレステロールや ApoE といったコレステロール代謝にも影響を与えることが示されてきた。

肝臓は、体内におけるコレステロールのホメオスタシス調節で中心的な役割を担っている。肝臓では、自身の利用するコレステロールよりもはるかに多いコレステロールを合成、分泌し、末梢組織に供給している。そして、組織で余剰となったコレステロールを代謝し、排泄する機能も併せ持つ。このように、生体内でのコレステロールホメオスタシスは、合成、運搬、代謝が複雑に絡み合いながらそのバランスを厳密に保っている。

また、肝臓はアポリポ蛋白質代謝においても中心的な役割を担う臓器である。種々のアポリポ蛋白質が肝臓で合成、分泌されている。DES 投与によって血中から減少した ApoE は、他のアポリポ蛋白質と異なり、さまざまな臓器で合成されているが、血中に存在する多くは肝臓に由来する[14,34]。第Ⅰ章から DES は肝臓に最も多く分布していた。本章では、DES 投与による肝臓への影響を ApoE の合成能および分泌能に焦点を当て探索することを目的とした。

## 2. 材料および方法

### 2.1. 供試動物

第 I 章に準ずる。

### 2.2. 臓器の採取

第 I 章に準ずる。

### 2.3. 肝臓のサンプル調製

肝臓サンプルを 1.0 g 計量し、それぞれの重量の 4 倍量の 0.25 M スクロース溶液を加えてホモジナイズした。ホモジナイズ液は 900 ×g、10 分、4 °C で遠心分離した後、上清を 5,000 g、10 分、4 °C で遠心分離し、沈殿をミトコンドリア画分、上清を細胞質可溶化画分とした。

### 2.4. タンパク質定量

第 II 章に準ずる。

### 2.5. 肝臓灌流

第 I 章に準じて馴化させたオスラットを用い、実験開始 12 時間前にオリーブオイルに溶解した DES(0.1 mg/rat)を胃内強制投与した。コントロールとして、オリーブオイルのみ 1ml、胃内強制投与した。ラットをペントバルビタール麻酔下で開腹し、胆管にポリエチレンチューブをカニューレーションし、胆汁を回収した。門脈に速やかにカニューレーション後、後大静脈を開放し、前灌流を流速 30 ml/min で 10 分間行った。肝臓を単離し、図 4-1 のように循環灌流した。灌流液は Krebs-Henseleit Buffer(114mM NaCl、5 mM KCl、24 mM NaHCO<sub>3</sub>、1 mM MgCl<sub>2</sub>、2.2 mM CaCl<sub>2</sub>、10 mM HEPES、10 mM Glucose)に、牛胎児血清を終濃度 5 %になるように混合し、95 % O<sub>2</sub> + 55 % CO<sub>2</sub> ガスをエアレーションした。灌流液はインキュベーター内で 37 °C に

保持した。循環灌流開始を0分とし、灌流開始後から60分目までは10分毎に、以降は、90分後にそれぞれ灌流液を1 ml ずつ回収した。

## **2.6. ウェスタンブロッティング**

肝臓の可溶化画分、肝臓灌流液を用いて、それぞれウェスタンブロットを行った。プロトコールは第Ⅲ章に準ずる。

## **2.7. 統計学的分析**

第Ⅰ章に準ずる。



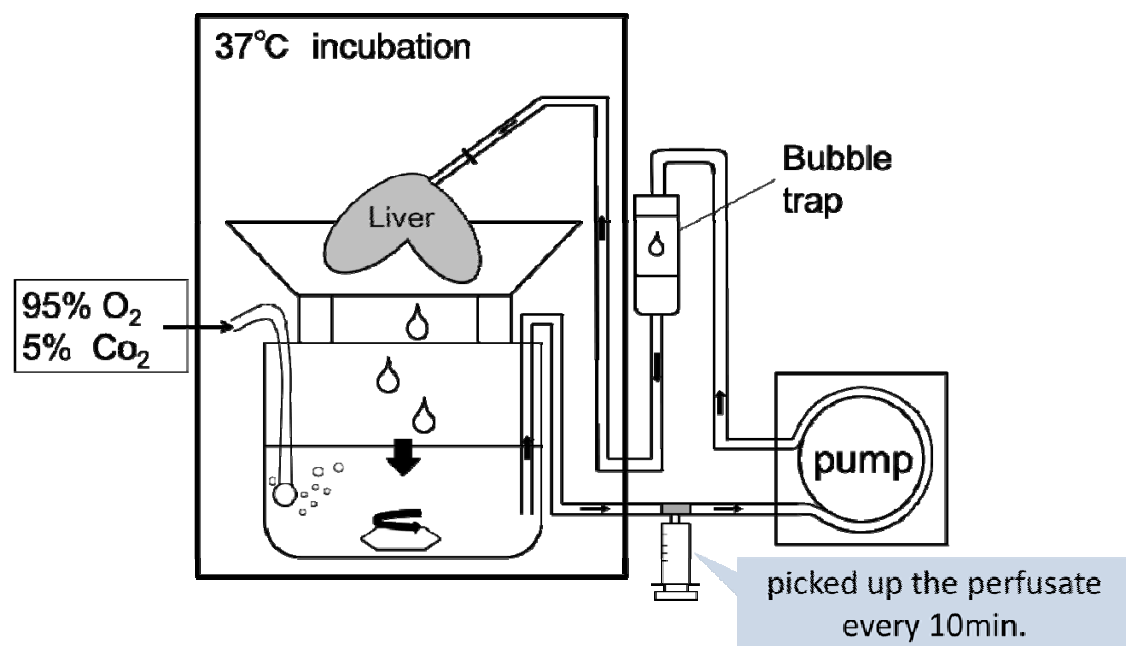


図 4-1. 肝臓単離灌流の概要

### 3. 結果

#### 3.1. 肝臓での ApoE の合成

単回投与 6、12、24、48 時間後におけるオスラット肝臓の ApoE のウエスタンブロットの結果を図 4-2 に示した。DES 投与後も肝臓では ApoE は十分に存在し、投与後 6 時間から 48 時間で変化することはなかった。

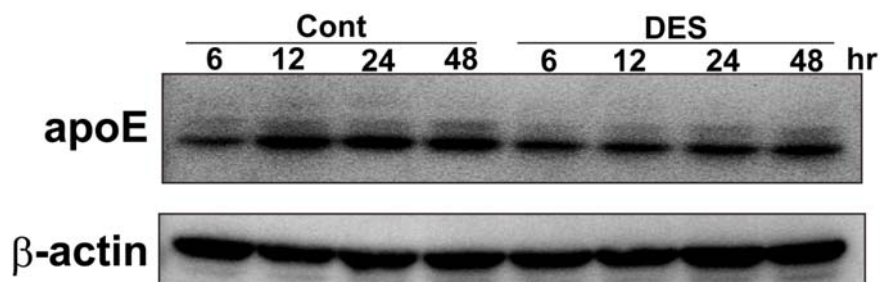
#### 3.2. 肝臓の LDL 受容体

投与 12 時間後の肝臓の可溶化画分を用いて、WB を行った結果、DES 投与によって肝臓の LDLR は有意に増加していた。(図 4-3)

#### 3.3. 肝臓からの ApoE、ApoA1 分泌

投与 12 時間後の肝臓を用いて灌流した後、灌流液中の ApoE 及び ApoA1 をウエスタンブロットにて検出し、その結果を図 4-4 に示した。図 4-4 に示すように灌流液中の ApoA1 は DES 投与後も経時的に増加していたのに対し、ApoE は灌流開始から終了までほとんど検出されなかった。ゆえに DES 投与によって肝臓からの ApoE 分泌が特異的に抑制されていることが明らかになった。

**A**



**B**

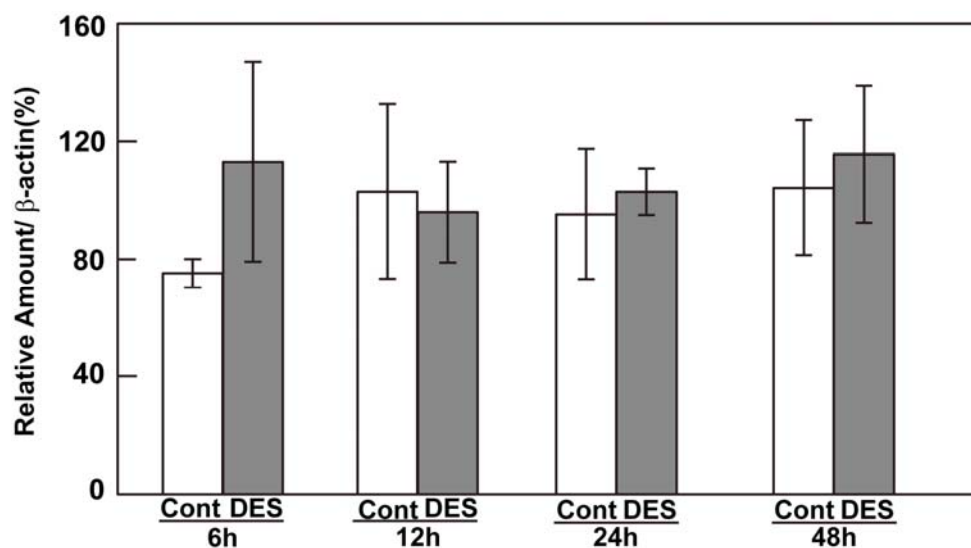


図 4-2. 単回投与オスラット肝臓での ApoE の発現

A. 肝臓での ApoE および内部標準蛋白質β-アクチンの WB 数字は投与後の経過時間を示す。上段は肝臓での apoE、下段は肝臓での内部標準物質としてβ-アクチンを各特異抗体にて検出した。

Cont:コントロール(各時、n=3)

DES:DES 投与個体(各時、n=3)

B. A で検出されたバンドをデンシトメトリー解析によって定量した。グラフは、内部標準蛋白質としてβアクチンを用い、その発現量に対する ApoE の発現量の割合 (%) を示す。

平均値±標準誤差で示している。

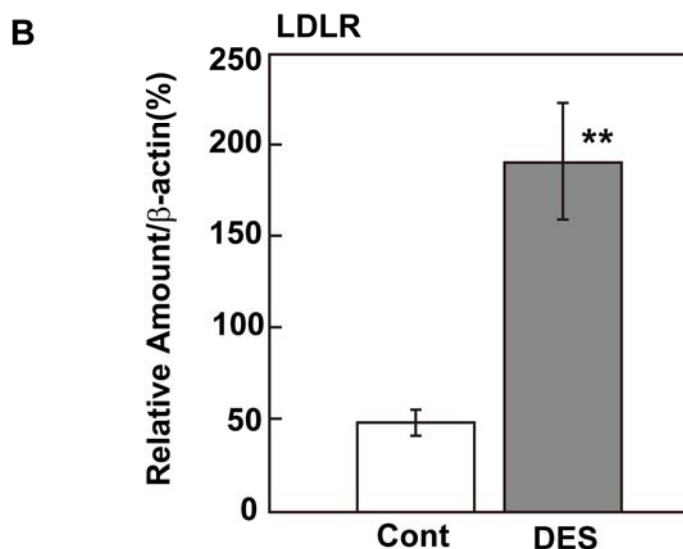
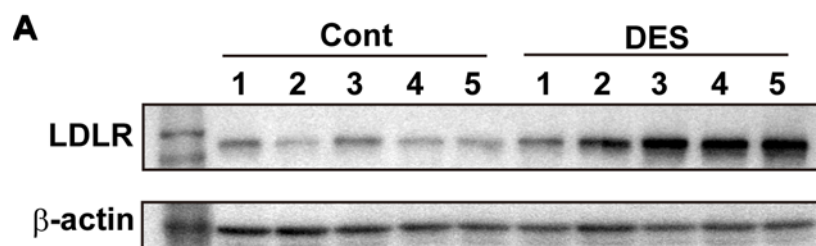


図 4-3. 投与12時間後における肝臓の LDLR

A. 単回投与12時間後における肝臓の WB。

上段は肝臓の LDLR、下段は肝臓での内部標準物質としてβ-アクチンを各特異抗体にて検出した。Cont:コントロール(各時、n=5)、DES:DES 投与個体(各時、n=5)。DES 投与12時間後に肝臓の LDLR は増加していた。プローブ抗体は、ニワトリポリクローナル抗 LDLR 抗体 (Sigma-Aldrich)、ウサギポリクローナル抗βアクチン抗体 (Abcam)を用いた。

B. A で検出されたバンドをデンストメトリー解析によって定量した。グラフは、内部標準蛋白質としてβアクチンを用い、その発現量に対する LDLR の発現量の割合 (%) を示す。

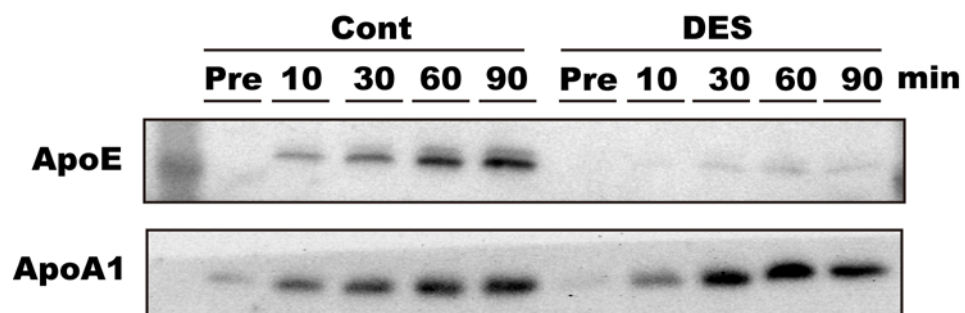


図 4-4. 肝臓灌流液中の ApoE と ApoA1

単回投与12時間後の肝臓を用い灌流した灌流液中の ApoE と ApoA1 を示す。Pre は未灌流の灌流液、数字は灌流開始からの経過時間を示す。

Cont:コントロール(n=3)、DES:DES 投与(n=5)

プローブ抗体:ヤギポリクローナル抗 ApoE 抗体 (Millipore)

ウサギポリクローナル抗 ApoA1 抗体 (Bio vision)

## 4. 考察

本章から DES 投与によって肝臓からの ApoE 分泌が抑制されることが明らかとなった。これまで合成エストロゲンによるコレステロールの低下は、肝臓における LDL 受容体の発現が増加することでリガンドの ApoE が存在するリポ蛋白質の取り込みが促進される結果と考えられてきた[9,41,49]。本章から DES 投与によって同様に肝臓の LDL 受容体の増加が認められたが、肝臓灌流の結果から、肝臓からの ApoE 自身の分泌が低下していたのは新たな発見である。細胞内で新規合成された ApoE は、古典的な分泌蛋白質合成経路を辿り、分泌される。小胞体を経てゴルジ装置で糖鎖の修飾を受けた(グリコシル化及びシアル化)後、細胞外に分泌される[35,58]。血中に存在する大部分の ApoE はグリコシル化されているが、このグリコシル化は、分泌に必須ではない。新たに分泌された ApoE は、すぐに血中に放出されず、細胞表面に存在するプロテオグリカンに強固に結合し、細胞外液に放出されるのを待つか、あるいは細胞内に再び取り込まれて分解を受けることとなる[26,52]。また、ApoE の分泌を調節する因子は様々ある。核内受容体の一つで脂質代謝に関与するリガンド依存性転写因子である Liver X receptor (LXR) のアゴニストが ApoE の分泌を増加させる報告がある[32]。また、ゴルジ装置へのコレステロールの蓄積は ApoE の分泌を阻害する[27]。ApoE 含有 HDL 粒子の形成には、細胞表面に存在し、組織から HDL にコレステロールを受け渡す ATP-binding cassette transporter A1(ABCA1)が関与する報告がある[32]。DES 投与によって、ApoE の合成は阻害されておらず、分泌機構のどこかを阻害していることが示唆される。今後、DES がどのように ApoE の分泌を阻害しているのかその詳細を明らかにすることが期待される。本研究から DES の毒性は、副腎に特異的に生じているのではなく、そのメカニズムとして肝臓にその引き金があることが示唆される。

内分泌かく乱物質の多くがエストロゲン作用を持つことから、これまで内分泌器官や標的臓器の生殖器への影響が多く研究されてきた。しかし、本章

からこれら内分泌かく乱物質が脂質代謝へ影響を与えることが明らかとなってきた。脂質代謝に関連し、近年、肥満と内分泌かく乱物質の関連が注目されつつある[15,17]。このように内分泌かく乱物質は、未だ新たな問題を提起し続けている。

また経口避妊薬の成分でもあるエチニルエストラジオールは血中コレステロールの低下や ApoE の低下、そして肝臓での LDL 受容体の発現増加などを引き起こすことが知られている[2,10,47]。本研究から明らかとなった DES の作用と類似した作用を持つようである。DES とは異なる合成エストロゲン剤は、今日でも経口避妊薬や閉経後やアルツハイマー病などのエストロゲン補充療法に用いられている。最近、国内では、経口避妊薬を使用している女性において、血栓症による死亡割合が多いことが明らかとなり、行政機関においても実態調査が始まっている。

DES は、現在、膣腺腫などの生殖毒性が明らかになり、すでに臨床現場での使用は禁止されている。しかし、その毒性メカニズムは未だ詳細には解明されていない。本章から明らかとなった DES の HDL コレステロール抑制や、肝臓からの ApoE 分泌阻害は、今後、他の内分泌かく乱物質の毒性メカニズムの解明の一助となるだけでなく、内分泌かく乱物質による脂質代謝異常への関与や合成エストロゲン剤による血栓症発生机序やアテローム硬化症の解明にも貢献することが期待される。

## 5. 小活

肝臓は、コレステロール代謝やリポ蛋白質代謝の中心的役割を担う。第Ⅲ章では、DES投与によって、血中のHDLコレステロールの減少に一致して、血清ApoEが減少することを見出した。HDL、ApoEのどちらも肝臓で主に合成、分泌され、脂質輸送や組織へのコレステロールの取り込みに関与する。血中に存在するApoEの多くが肝臓に由来することから、肝臓におけるApoEの合成能および分泌能を探索することを目的とした。肝臓でのApoE合成能と肝臓からの分泌能を探索した。その結果、DES投与後も肝臓内にApoEは、正常に存在していた。しかし、肝臓灌流実験では、DESを投与するとApoE分泌が特異的に阻害されていることが明らかとなった。血中に存在するApoEの多くが肝臓に由来する。これまで、合成エストロゲンによるコレステロール低下は、肝臓におけるLDL受容体発現増加によるリポ蛋白質の取り込みが促進することによると考えられてきた。肝臓からのApoEの分泌障害によって血中ApoEが著しく減少していたことが新たに発見である。今後はこの分泌抑制機序の更なる研究が望まれるとともに、本章から、内分泌かく乱物質が内分泌かく乱作用だけでなく、コレステロール代謝、脂質代謝へも影響を与えることが明らかとなった。最近、肥満と内分泌かく乱物質の関連や経口避妊薬における血栓症の発症が注目されてきており、本研究は、今後他の内分泌かく乱物質の毒性機序解明の一助となるだけでなく、合成エストロゲン剤の副作用の機序解明にも貢献することが期待される。



## 総括

内分泌かく乱物質のモデル物質である合成エストロゲン Diethylstilbestrol(DES)の毒性作用機序について、Estrogen 受容体を介することは明らかであるが、その詳細なメカニズムは不明な点が多い。これまで、DES による副腎に関する詳細な報告書はほとんどなく、本研究では DES の副腎への影響を新たに見出し、その作用機序を明らかにすることを目的とした。

第 I 章では、SpragueDawley の雄ラットを用い、対照群にはオリーブオイルのみを、DES 投与群には、オリーブオイルに溶解した DES (0.1mg/ml) を 1ml 胃内強制投与し、2w 投与、1w 投与、単回投与群とした。投与 1 時間後、DES は、肝臓に次いで副腎、下垂体に多く分布していた。1w および 2wDES 投与群では、副腎重量、副腎乾燥重量、総蛋白質量が増加し、副腎組織の腫大を見出した。さらに 2wDES 投与副腎組織中の束状帯および網状帯領域の肥大が観察され、束状帯領域の細胞内空胞の小型化が観察された。このことから、副腎は DES の主要な標的臓器となり、組織学的な変化から副腎機能への影響が初めて示唆された。

第 II 章では、DES 投与によって副腎のステロイド合成阻害を見出した。1w 投与群では、血中及び副腎内コルチコステロン濃度が減少し、コルチコステロン合成中間生成物量も減少していた。血中のコルチコステロンの低下によって血中 ACTH 濃度の上昇が予測されたが、DES 投与によって血中 ACTH や下垂体 ACTH 合成因子の POMC mRNA は誘導されていなかった。副腎が腫大する疾病として先天性副腎過形成症が知られている。これは、StAR や P450scc の変異によって引き起こされることが知られ、深刻なステロイド合成障害を特徴とする。そのため、次に副腎コルチコステロン合成調節に関連するタンパク質 (StAR、PBR) の発現を探索したが、DES 投与によっていずれも発現抑制は受けていなかった。また、コレステロールからステロイド合成の前駆物質であるプレグネノロンへ変換を媒介する酵素 P450scc が知られ、

DES の投与を受けた精巣ではこの酵素の活性や発現が阻害されることを報告してきたが、副腎では DES 投与後も P450<sub>scc</sub> の酵素活性は阻害を受けていなかった。一方、血中からのコレステロール取込みに関与する LDL 受容体や HDL 受容体は、DES 投与によって発現が誘導されていたにも関わらず、副腎皮質の脂質やコレステロールが減少していることが明らかとなった。ゆえに副腎ステロイド合成の抑制は、原料となるコレステロールの減少に起因することが判明した。

第Ⅲ章では、副腎におけるステロイド合成のためのコレステロール供給は、血中からの取込みによるものが多い。そのため、血中のコレステロールを測定した。DES 単回投与群では、DES 投与 12 時間後から血中 HDL コレステロールが減少し、さらに、血清中の ApoE が減少していたことが分かった。一方、HDL 構成アポリポ蛋白質の ApoA1 は DES 投与後血中で変化しておらず、ApoE 特異的な DES の影響が示唆された。これらの結果から、副腎内コレステロールの減少は HDL コレステロールが減少し、血中からの供給不足が原因であることが分かった。

第Ⅳ章では、血中に存在する ApoE の大部分は肝臓からの分泌由来することから DES 投与後の肝臓への影響を調べた。その結果、肝臓内での ApoE の減少は認められなかった。しかし、肝灌流実験から DES ラット投与肝では ApoE の分泌が抑制されていることを見出した。

以上の結果、本研究から DES 投与により

- 1) 副腎でのステロイド合成が抑制されることを見出し、それは血中 HDL コレステロールの低下に因ることを見出した。
- 2) このコレステロールの低下の原因は、血中の ApoE が減少すること、さらに、それは肝臓からの分泌抑制で因ることを見出した。

副腎で産生されるステロイドは、胎児や新生児の成長や発達だけでなく、陣痛や出産にも重要な役割を担う[6,19]ことから、DES によって引き起こされる慢性的なコルチコステロンの低下は、内分泌恒常性を攪乱し、ストレス

抵抗性を減弱化させる可能性がある。成熟動物を用いた本研究では、DES による直接的な影響を明らかにすることに成功した。明らかとなった副腎のステロイド合成抑制とコレステロール減少は今後、妊娠動物や胎児における DES 毒性のメカニズムを探る上で重要な証明となることが期待される。

また、DES 投与によって血中で減少していた HDL コレステロールや ApoE は、どちらも抗アテローム作用をもつ因子と知られている。DES 投与によってこの抗アテローム作用が減弱される可能性が示唆される。さらに、肝臓から ApoE 分泌阻害は、DES がコレステロール代謝の根幹を担う肝臓へ影響を及ぼしている証拠である。このように、DES が本研究から副腎毒性だけでなく、その原因となる脂質代謝異常を引き起こすことが示された。近年、内分泌かく乱物質を原因とする健康被害は生殖毒性以外に肥満との関連が指摘されてきている。また、最近、合成エストロゲン剤による血栓症リスクが懸念されている。本研究で明らかとなった DES によるコレステロール代謝攪乱は上記健康被害いずれとも関連の深いものであり、今後さらなるメカニズムの解明が期待される。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる御指導ご鞭撻賜りました横田 博教授に心より深謝申し上げます。また、副査として論文をご精読頂きました田村 豊教授、片桐成二教授に心より深謝申し上げます。また、質量分析において多大なるご協力をいただきました食肉科学技術研究所の前田尚之氏に心より深謝申し上げます。本研究を遂行するあたり、ご協力いただきました獣医看護学類動物栄養学教室の宮庄拓講師、研究生の佐藤倫子氏、獣医学類獣医解剖学教室の植田弘美准教授、獣医生化学教室の岩野英知准教授、日本動物特殊診断株式会社の井上博紀氏、当時獣医病理学教室大学院生の坂口佳菜子氏、そして、獣医生化学教室各員に篤く感謝申し上げます。

最後に、社会人大学院における進学、研究にご理解をいただき、ご支援くださいました旭川市保健所衛生検査課の皆様と旭川市食肉衛生検査所の皆様に深く感謝申し上げます。

## 引用文献

1. Andrews P., Freyberger A., Hartmann E., Eiben R., Loof I., Schmidt U., Temerowski M., Folkerts A., Stahl B., Kayser M., 2002. Sensitive detection of the endocrine effects of the oestrogen analogue ethinylestradiol using a modified enhanced subacute rat study protocol (OECD Test Guideline no. 407). *Arch Toxicol.* **76**:194-202.
2. Bertolotti M., Spady D.K.1996. Effect of hypocholesterolemic doses of 17 alpha-ethinyl estradiol on cholesterol balance in liver and extrahepatic tissues. *J Lipid Res.***37**:1812-1822.
3. Besedovsky H.O., del Rey A., Sorkin E.1981. Lymphokine-containing supernatants from con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. *J immunol.* **126**: 385–387.
4. Besler C., Lüscher T.F., Landmesser U. 2012.Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol Med.* 4:251–268.
5. Biegel L.B., Flaws J.A., Hirshfield A.N., O'Connor J.C., Elliot G.S., Ladics G.S., Silbergeld E.K., Van Pelt C.S., Hurtt M.E., Cook J.C., Frame S.R. 1998. 90-Day feeding and one-generation reproduction study in Crl:CD BR rats with 17 $\beta$ -estradiol. *Toxicol Sci.* **44**: 116–142.
6. Bond A.R., Jackson C.L.2011.The fat-fed apolipoprotein E knockout mouse brachiocephalic artery in the study of atherosclerotic plaque rupture. *J Biomed Biotechnol.* 2011:379069.
7. Chida D., Miyoshi K., Sato T., Yoda T., Kikusui T., Iwakura Y. 2011. The role of glucocorticoids in pregnancy, parturition, lactation, and nurturing in melanocortin receptor 2-deficient mice. *Endocrinology.* **152**: 1652–1660.

8. Dallman M.F., 1984-1985. Control of adrenocortical growth in vivo. *Endocr Res.* **10**: 213–242.
9. Eren E., Yilmaz N., Aydin O.2012.High Density Lipoprotein and it's Dysfunction.Open *Biochem J.* **6**:78–93.
10. Erickson S.K., Jaeckle S., Lear S.R., Brady S.M., Havel R.J. 1989. Regulation of hepatic cholesterol and lipoprotein metabolism in ethinyl estradiol-treated rats. *J Lipid Res.* **30**:1763–1771.
11. Gardiner J.R., Shima Y., Morohashi K., Swain A. 2012. SF-1 expression during adrenal development and tumourigenesis. *Mol Cell Endocrinol.***351**:12-18.
12. Ge R.S., Dong Q., Sottas C.M., Latif S.A., Morris D.J., Hardy M.P. 2005. Stimulation of testosterone production in rat Leydig cells by aldosterone is mineralocorticoid receptor mediated. *Mol Cell Endocrinol.* **243**:35-42.
- 13.Giusti R.M., Iwamoto K., Hatch E.E. 1995. Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Ann Intern Med.* **122**: 778–788.
- 14.Greenow K., Pearce N.J., Ramji D.P. 2005. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl).* **83**:329-342.
- 15.Hatch E.E., Nelson J.W., Stahlhut R.W., Webster T.F. 2010. Association of endocrine disruptors and obesity: perspectives from epidemiological studies. *Int J Androl.* **33**:324-332.
- 16.Hauet T., Liu J., Li H., Gazouli M., Culty M., Papadopoulos V. 2002. PBR, StAR, and PKA: partners in cholesterol transport in steroidogenic cells. *Endocr Res.* **28**: 395–401.
- 17.Heindel J.J., vom Saal F.S. 2009. Role of nutrition and environmental endocrine disrupting chemicals during the perinatal

- period on the aetiology of obesity. *Mol Cell Endocrinol.* **304**:90-96.
18. Henley D.V. and Korach K.S. 2006. Endocrine-disrupting chemicals use distinct mechanisms of action to modulate endocrine system function. *Endocrinology.* **147**: S25–32.
  19. Henning S.J. 1978. Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am J Physiol.* **235**: E451–456.
  20. Hoekstra M., Korporeal S.J., Li Z., Zhao Y., Van Eck M., Van Berkel T.J. 2010. Plasma lipoproteins are required for both basal and stress-induced adrenal glucocorticoid synthesis and protection against endotoxemia in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **299**:E1038–43.
  21. Hu J., Zhang Z., Shen W.J., Azhar S. 2010. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab (Lond).* **7**:47.
  22. Ivanovski O., Nikolov I.G., Druke B.T., Massy A.Z. 2007. Atherosclerosis and vascular calcification in uraemia - a new experimental model. *Prilozi.* **28**:11–24.
  23. Karoutsou E. and Polymeris A. 2012. Environmental endocrine disruptors and obesity. *Endocr Regul.* **46**:37-46.
  24. Kaludjerovic J. and Ward W.E. 2012. The Interplay between Estrogen and Fetal Adrenal Cortex. *J Nutr Metab.* 2012:837901.
  25. Kitahara S., Umeda H., Yano M., Koga F., Sumi S., Moriguchi H., Hosoya Y., Honda M., Yoshida K. 1999. Effects of intravenous administration of high dose-diethylstilbestrol diphosphate on serum hormonal levels in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Endocr J.* **46**: 659–664.

26. Kockx M., Jessup W., Kritharides L. 2008. Regulation of endogenous apolipoprotein E secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **28**:1060–1067.
27. Kockx M., Dinnes D.L., Huang K.Y., Sharpe L.J., Jessup W., Brown A.J., Kritharides L. 2012. Cholesterol accumulation inhibits ER to Golgi transport and protein secretion: studies of apolipoprotein E and VSVGt. *Biochem J.* **447**:51-60.
28. Kolovou G., Anagnostopoulou K., Mikhailidis D.P., Cokkinos D.V. 2008. Apolipoprotein E knockout models. *Cur Pharm Des.* **14**:338–351.
29. Korach K.S., McLachlan J.A. 1985. The role of the estrogen receptor in diethylstilbestrol toxicity. *Arch Toxicol Suppl.* **8**: 33–42.
30. Kraemer F.B. 2007. Adrenal cholesterol utilization. *Mol Cell Endocrinol.* **265-266**: 42–45.
31. Kuiper G.G., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Häggblad J., Nilsson S., Gustafsson J.A. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* **138**: 863–870.
32. Kurano M., Iso-O N., Hara M., Ishizaka N., Moriya K., Koike K., Tsukamoto K.. 2011. LXR agonist increases apoE secretion from HepG2 spheroid, together with an increased production of VLDL and apoE-rich large HDL. *Lipids Health Dis.* **5**:134.
33. Kypreos K.E. and Zannis V.I. 2007. Pathway of biogenesis of apolipoprotein E-containing HDL in vivo with the participation of ABCA1 and LCAT. *Biochem J.* **403**:359–367.
34. Landschulz K.T, Pathak R.K, Rigotti A., Krieger M., Hobbs H.H. 1996. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high



- density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest.* **98**:984–995.
35. Larkin L., Khachigian L.M., Jessup W. 2000. Regulation of apolipoprotein E production in macrophages (review). *Int J Mol Med.* **6**:253–258.
  36. Lee J., Park Y., Koo S.I. 2012. ATP-binding cassette transporter A1 and HDL metabolism: effects of fatty acids. *J Nutr Biochem.* **23**:1–7.
  37. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**: 265–275.
  38. Lund-Katz S., Phillips M.C. 2010. High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport. *Subcell Biochem.* **51**:183–227.
  39. Maeda N., Okumura K., Tanaka E., Suzuki T., Miyasho T., Haeno S., Ueda H., Hoshi N., Yokota H. 2013b. Down Regulation of Cytochrome P450scc as an an Initial Adverse Effect of Adult Exposure to Diethylstilbestrol on Testicular Steroidogenesis. *Environ Toxicol. in print.*
  40. Maeda N., Tanaka E., Suzuki T., Okumura K., Nomura S., Miyasho T., Haeno S., Yokota H. 2013a. Accurate determination of tissue steroid hormones, precursors and conjugates in adult male rat. *J Biochem.* **153**:63–71.
  41. Mahley R.W., Innerarity T.L., Rall S.C. Jr, Weisgraber K.H. 1984 .Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.* **25**(12):1277-1294.
  42. Martin O.V., Shialis T., Lester J.N., Scrimshaw M.D., Boobis A.R., Voulvoulis N. 2008. Testicular dysgenesis syndrome and the

- estrogen hypothesis: a quantitative meta-analysis. *Environ Health Perspect.* **116**: 149–157.
43. Miller W.L. and Bose H.S. 2011. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J Lipid Res.* **52**:2111–2135.
  44. Miller W.L. 2013. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol.* **379**: 62–73.
  45. Newbold R.R, Padilla-Banks E., Jefferson W.N. 2006. Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology.* **147** : S11–17.
  46. Palmer J.R., Herbst A.L., Noller K.L., Boggs D.A., Troisi R., Titus-Ernstoff L., Hatch E.E., Wise L.A., Strohshitter W.C., Hoover R.N. 2009. Urogenital abnormalities in men exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Environ Health.* **8**: 37.
  47. Parini P., Angelin B., Rudling M. 1997. Importance of estrogen receptors in hepatic LDL receptor regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **17**:1800–1805.
  48. Schrager S. and Potter B.E. 2004. Diethylstilbestrol exposure. *Am Fam Physician.* **69**: 2395–2400.
  49. Shin J.H., Kim T.S., Kang I.H., Kang T.S., Moon H.J., Han S.Y. 2009. Effects of postnatal administration of diethylstilbestrol on puberty and thyroid function in male rats. *J.Reprod Dev.* **55**: 461–466.
  50. Shukuwa K., Izumi S., Hishikawa Y., Ejima K., Inoue S., Muramatsu M., Ouchi Y., Kitaoka T., Koji T. 2006. Diethylstilbestrol increases the density of prolactin cells in male mouse pituitary by inducing proliferation of prolactin cells and transdifferentiation of gonadotropic cells. *Histochem. Cell Biol.* **126**: 111–123.
  51. Stuber M. and Reemtsma T. 2004. Evaluation of three calibration

- methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Anal Bioanal Chem.* **378**: 910–916.
52. Sundaram M. and Yao Z. 2012. Intrahepatic role of exchangeable apolipoproteins in lipoprotein assembly and secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **32**:1073–1078.
  53. Unüvar T. and Büyükgebiz A. 2012. Fetal and neonatal endocrine disruptors. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* **4**: 51–60.
  54. Watson C.S., Jeng Y.J., Guptarak J. 2011. Endocrine disruption via estrogen receptors that participate in nongenomic signaling pathways. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **127**: 44–50.
  55. Windler E.E, Kovanen P.T, Chao Y.S., Brown M.S., Havel R.J., Goldstein J.L.1980. The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver. A binding site that membrane mediates the uptake of rat lipoproteins containing apoproteins B and E. *J Biol Chem.***255**:10464–10471.
  56. Wong E.W. and Cheng C.Y. 2011. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends Pharmacol Sci.* **32**: 290–299.
  57. Li Y., Okumura K., Nomura S., Maeda N., Miyasho T., Yokota H. 2011. Oxidatively damaged proteins in the early stage of testicular toxicities in male rats by orally administered with a synthetic oestrogen, diethylstilbestrol. *Reprod Toxicol.* **31**:26-34.
  58. Zannis V.I., McPherson J., Goldberger G., Karathanasis S.K., Breslow J.L. Synthesis, intracellular processing, and signal peptide of human apolipoprotein E. 1984. *J Biol Chem.* **259**:5495-5459.
  59. Zimmerman S.A., Clevenger W.R., Brimhall B.B., Bradshaw W.S. 1991. Diethylstilbestrol-induced perinatal lethality in the rat. II.

Perturbation of parturition. *Biol Reprod.* **44**: 583–589.