

平成15年度
内分泌攪乱化学物質等の作用
メカニズムの解明等基礎的研究
研究報告書

平成16年3月

財団法人日本公衆衛生協会

目 次

. 目的	1
. 内容	1
-1. 指定研究	1
-2. 業務担当者一覧	2
-3. 指定研究結果報告	5
1 . ラット生殖腺の器官培養系におけるトリブチルスズの影響の評価 日本獣医畜産大学獣医畜産学部獣医生理学 鈴木 勝士	7
2 . 内分泌攪乱化学物質による雄性生殖器への影響の分子細胞生物学的メカニズムの 解明 千葉大学大学院医学研究院環境生命医学 森 千里	2 1
3 . 内分泌かく乱化学物質の性腺ホルモン作用機構の解明に関する研究 名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学 那須 民江	5 3
4 . フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学 岸 玲子	6 9
5 . 核内受容体ファミリーを介する化学物質の生体影響に関する研究 大阪大学大学院薬学研究科生命情報環境科学 西川 淳一	8 3
6 . ビスフェノールA膜受容体の分子生物学的検討と作用機序の解明に関する研究 大阪市立大学大学院医学研究科生体機能解析学 船江 良彦	1 0 1
7 . 甲殻類（ミジンコ）におよぼす内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する研究 自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター 渡邊 肇	1 1 5

．目 的

人や野生動物の内分泌作用を攪乱し、生殖機能障害、先天奇形等を引き起こす可能性のある内分泌攪乱化学物質による環境汚染は、科学的には未解明な点が多く残されているものの、生物生存の基本的条件に関わる問題であり、世代を越えた深刻な影響をもたらすおそれがあることから環境保全上の重要課題である。

今後、内分泌攪乱化学物質のリスク評価を実施するために、内分泌攪乱化学物質が人や野生動物に影響を及ぼすメカニズムについての知見の蓄積を急ぐ必要があるが、そのための調査研究はこれまでほとんど実施されていない。

そこで、本調査研究では、内分泌攪乱化学物質等の作用メカニズム等に関する実態を解明することを目的とした。

．内 容

内分泌攪乱化学物質等の作用メカニズムに関する 分子生物学的機構の解明、バイオマーカーの開発・評価、胎児期の曝露による影響発現の解明等、各種調査研究及び評価解析について、別紙 1 の各研究班毎に、以下の指定研究を実施するとともに、昨年度実施した作用メカニズムに関する研究発表会を開催した。なお、研究発表会終了後、内分泌攪乱化学物質等研究推進専門委員会において、研究成果の評価を行い、今後必要と思われる研究については、環境省へ指定研究の推薦を行うこととした。

また、実施に当たっては、請負先が必要に応じて技術的指導・支援を行うものとした。

-1．指定研究

- (1) ラット生殖腺の器官培養系におけるトリブチルスズの影響の評価
- (2) 内分泌攪乱化学物質による雄性生殖器への影響の分子細胞生物学的メカニズムの解明
- (3) 内分泌かく乱化学物質の性腺ホルモン作用機構の解明に関する研究
- (4) フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価
- (5) 核内受容体ファミリーを介する化学物質の生体影響に関する研究
- (6) ビスフェノールA膜受容体の分子生物学的検討と作用機序の解明に関する研究
- (7) 甲殻類(ミジンコ)におよぼす内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する研究

-2. 業務担当者一覧

(1) ラット生殖腺の器官培養系におけるトリブチルスズの影響の評価

主任研究者

鈴木 勝士 (日本獣医畜産大学 教授)

研究協力者

鈴木 浩悦 (日本獣医畜産大学獣医学部 講師)

斉藤 賢一 (日本獣医畜産大学獣医学部 助教授)

竹中 基郎 (日本獣医畜産大学獣医学部 大学院生)

八木 美央 (日本獣医畜産大学獣医学部 大学院生)

千葉 純子 (日本獣医畜産大学獣医学部 大学院生)

小山絵里子 (日本獣医畜産大学獣医学部 学部学生)

(2) 内分泌攪乱化学物質による雄性生殖器への影響の分子細胞生物学的メカニズムの解明

主任研究者

森 千里 (千葉大学大学院医学研究院 環境生命医学 教授)

研究協力者

深田 秀樹 (千葉大学大学院医学研究院SRL 環境健康医学 助教授)

外山 芳郎 (千葉大学大学院医学研究院形態形成学 講師)

小宮山政敏 (千葉大学大学院医学研究院環境生命医学 講師)

前川眞見子 (千葉大学大学院医学研究院形態形成学 助手)

(3) 内分泌かく乱化学物質の性腺ホルモン作用機構の解明に関する研究

主任研究者

那須 民江 (名古屋大学大学院医学系研究科 教授)

研究協力者

市原 学 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)

上島 通浩 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)

山ノ下 理 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)

宮田麻衣子 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)

(4) フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価

主任研究者

岸 玲子 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 教授)

研究協力者

佐田 文宏 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 助教授)

西條 泰明 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 助手)

近藤 朋子 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 研究員)

梅村 朋宏 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 大学院生)

倉橋 典絵 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 大学院生)

馬 明月（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 大学院生）
大村 実（九州大学大学院医学研究院 衛生学教室 助手）

（５）核内受容体ファミリーを介する化学物質の生体影響に関する研究

主任研究者

西川 淳一（大阪大学大学院薬学研究科 助教授）

研究協力者

今川 正良（名古屋市立大学薬学部 教授）

（６）ビスフェノールA膜受容体の分子生物学的検討と作用機序の解明に関する研究

主任研究者

船江 良彦（大阪市立大学大学院医学研究科 教授）

研究協力者

今岡 進（関西学院大学理工学部 教授）

長田真優子（大阪市立大学大学院医学研究科 助手）

吉田 徳之（大阪市立大学大学院医学研究科 助手）

岡田 和嗣（大阪市立大学大学院医学研究科 大学院生）

（７）甲殻類（ミジンコ）におよぼす内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する研究

主任研究者

渡邊 肇（岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター 助教授）

研究協力者

鑪迫 典久（国立環境研究所 研究員）

勝 義直（岡崎国立共同研究機構 助手）

-3 . 指定研究結果報告

ラット生殖腺の器官培養系におけるトリブチルスズの影響の評価

研究者 鈴木 勝士 (日本獣医畜産大学 教授)

研究要旨

トリブチルスズ(TBT)は、船底塗料として世界的に用いられ、その曝露によってイボニシなどの貝類にインポセックスを引き起こし、雌の産卵能力を障害すると言われている。作用機序に関してはアロマトラーゼの阻害が示唆されているが、哺乳動物の生殖器官形成に対して、どのような影響があるかは明らかにされていない。そこで本実験は、ラットの生殖腺-中腎器官培養系を用いてTBTの直接的な影響を調査した。動物は、Wistar Imamichi ラット近交系を用い、交配翌日を胎齢0.5日として、胎齢15.5日で帝王切開し、胎仔を摘出した。摘出した胎仔を実体顕微鏡下で解剖し、中腎と生殖腺を摘出し、CMRL 培地のフィルター上のドロップの中で培養した。TBT (0.05、0.2、0.5、1、および2 μ M)、テストステロン (T; 2 μ M)、およびアロマトラーゼ阻害剤 (塩酸フアドロゾール、F; 0.1、1、および10 μ M) をそれぞれ培地に加え、4日間培養しその影響を調べた。培養後、生殖腺-中腎組織を Bouin 液で固定し組織学的検索を行った。TBT 曝露によって、雄の精巣発達に対しては明らかな影響は見られなかったが、用量依存性に中腎ウォルフ管の先端が著しく膨化した。雌ではウォルフ管が後期まで残存した。T、Fの曝露では、ウォルフ管の膨化は見られなかったが、雌ではTBTと同様に後期までウォルフ管が残存していた。組織学的検索においても、雄においてはウォルフ管の膨化が確認され、雌では薬物処置した方の中腎でより頭側までウォルフ管が残存していた。以上の結果から、ラットの生殖腺-中腎培養系において、TBTがアロマトラーゼ阻害作用を示す可能性が示された。また、雄で見られたウォルフ管の膨化は、TBTに特異的な機序によって生じている可能性がある。

研究協力者

鈴木 浩悦 (日本獣医畜産大学獣医学部 講師)
斉藤 賢一 (日本獣医畜産大学獣医学部 助教授)
竹中 基郎 (日本獣医畜産大学獣医学部 大学院生)
八木 美央 (日本獣医畜産大学獣医学部 大学院生)
千葉 純子 (日本獣医畜産大学獣医学部 大学院生)
小山絵里子 (日本獣医畜産大学獣医学部 学部学生)

A. 研究目的

13年および14年度と、TBTによる初期胚の着床不全のメカニズムと生存胚における生殖細胞系列の突然変異誘発の可能性を調査するために、妊娠初期のラットにTBTを経口投与し、得られた産仔の形態異常およびゲノムDNAにおけるマイクロサテライトの変異を検出することを試みた。しかし、使用した用量では、産仔が十分量の精巣DNAを得られる日齢まで生育する腹が少なかったこと、さらにマイクロサテライト増幅時のマイナーなバンドのパターンが、サンプリングおよび抽出過程の様々な要因によりより変動しやすいなどの理由から当初の目的に対して明確な回

答が得られなかった。

一方、昨年度の本研究会で TBT が RXR と特異的に結合し、アゴニスト活性を有する可能性が報告された。TBT の内分泌攪乱作用に関しては、イボニシでのインボセックスが、アロマターゼ活性阻害により誘発されている可能性が報告されており、さらに、哺乳動物のいくつかの細胞培養系において、TBT によりアロマターゼの活性阻害や mRNA 発現の変化が引き起こされることが報告されている。しかし、TBT と RXR の直接的な関連を示唆する成績は、昨年の本研究会での西川らの本報告以外に知られていない。しかし、アロマターゼの発現が RXR 当の核内レセプターや転写調節因子により制御されていると言う報告は多数見られる。従って、一つの仮説として、アロマターゼ阻害が TBT の RXR に対する作用により仲介されている可能性がある。

イボニシのインボセックスに対してはアロマターゼ阻害説が知られているが、イボニシではアロマターゼを含むステロイド代謝酵素の動態や RXR などの核内受容体ファミリーに関する知見はほとんどない。一方、哺乳動物では TBT の時期特異的な投与により生殖腺や外部生殖器に対して、イボニシで見られる様な内分泌攪乱作用が有るか否かに関しては詳細な研究はなされていないが、アロマターゼが生殖腺や脳の性分化において重要なキーファクターであることは明らかとなっており、ステロイド代謝系酵素の動態、RXR を含む核内受容体とそれによる遺伝子発現調節のメカニズムに関しては現在、盛んに研究が進められている。

上記の現状を踏まえると、一つの仮説として TBT によるアロマターゼの阻害作用が存在するならば、それは哺乳動物の生殖腺発生過程において何らかの影響を及ぼす可能性があり、それが RXR を介する系で説明される可能性がある。13 年度および 14 年度の問題点を克服するために、まず、*in vitro* の器官培養系で TBT による影響、特に毒性作用以下のホルモン作用としての影響の是非を確認し、その上で *vivo* の系を検討する方策をとることにした。本研究では TBT の作用アッセイおよびその解析モデル系として、ラット胎仔から摘出した生殖腺-中腎器官培養系の開発を行った。性決定後（胎齢 15.5）の生殖腺-中腎組織をラットから摘出し、フィルター上で培養し、培養液に、TBT、テストステロン、アロマターゼ阻害剤等を添加して、培養系で生殖腺と-中腎の発生過程に対する影響を調査する。同時に摘出した対側側の器官は対照として溶媒を添加し、発生が正常に試行することを確認し、TBT の様な内分泌攪乱物質のアッセイおよび作用解析のための培養系モデルの開発を行う。

B. 研究方法

1. 動物

動物繁殖研究所から導入した Wistar Imamichi ラット近交系を用いた。交配翌日、プラグあるいはスメア中に精子が確認されたものを胎齢 0.5 日とした。胎齢 15.5 日の早朝に帝王切開し、胎仔を摘出した。なお、飼育管理はコンベンショナルな環境で行い、ライトコントロールは 8 時から 22 時まで明、22 時から 8 時まで暗とした。温度は 23 ± 2 、湿度は $55 \pm 5\%$ に制御され、餌 (CR-LPF, オリエンタル酵母, 東京) および水は自由摂取とした。

2. 器官培養

実体顕微鏡下で胎児の胎仔の生殖腺を中腎とともに摘出し、片側を対照、片側を薬物処置とした。器官は、ペニシリン-ストレプトマイシン、インスリン (10 μ g/ml)、トランスフェリン (10

μg/ml) および L-グルタミン (200mM) を添加した 500μl の CMRL-1066 培地 (Gibco) に浮遊させた Millicell CM filter (Millipore) 上のドロップの中に置かれた。培養は、5%CO₂、飽和湿度、37 °C の条件で行った。1 対の生殖腺の片側をコントロール (溶媒添加) として、対側の培地に、TBT (50nM-2μM)、テストステロン (2μM)、アロマトラーゼ阻害剤 (塩酸ファドロゾール、100nM-10 μM) を加え、4 日間培養した。培地は 2 日毎に置換した。

3. 顕微鏡観察と組織観察

培養中の組織は連日、実体顕微鏡 (OLYMPUS SZX) で観察した。経時変化を CCD カメラ (Digital Camera System, Pixera, CA, USA) で撮影し、記録した。培養 4 日目に、光学顕微鏡 (OLYMPUS BX50) で観察および撮影後、Bouin 液 (Sigma diagnostics) で 2 時間固定し、70%アルコールにて 4 日に保存した。固定組織はアガロース中に包埋し、定法に従ってパラフィン包埋し、切片 (3μm) を作製した。ヘマトキシリン-エオジン染色後、光学顕微鏡を用いて切片の組織学的観察を行った。

4. アロマトラーゼとテストステロン受容体の発現部位の確認実験

胎齢 16.5 日齢の胎仔の中腎、精巣、腎臓、および副腎を摘出し、Trizol にて RNA を抽出した。RT-PCR high kit (東洋紡) にて、アロマトラーゼとテストステロン受容体の遺伝子断片を増幅した。使用したプライマーは、アンドロジェン受容体については上流配列が F-AAGACCTGCCTGATCTGTGGA、下流配列が R-GCTTTCATGCACAGGAATTCC であり、アロマトラーゼについては、上流配列が F-TTCCCATGGCAGATTCTTGTG、下流配列が R-TCCGATACTCTGCGATGAGA であった。

C. 研究結果

1. TBT 処置による影響率

0.05 ~ 2μM で生殖腺-中腎器官培養系を処置したところ、雄では 1 ~ 2μM の処置群すべてウォルフ管において先端が異常に拡張していた (表 1 および図 1)。0.2μM では、異常の程度がより軽度のものが見られた。一方、雌では、1 ~ 2μM でウォルフ管の残存を示したが、0.2μM で、その程度が軽度になり、0.05μM では見られなくなった (表 1 および図 2)。

2. テストステロン処置による影響率

2μM 濃度で、雄では 3 例、雌では 2 例を処置し、実体顕微鏡下で観察した。雄では TBT 処置の際に見られたようなウォルフ管の末端拡張という明らかな形態異常は特に認められなかった。雌では、TBT 処置と同様、ウォルフ管の残存が見られた (図 3)。

3. アロマトラーゼ阻害剤による影響率

塩酸ファドロゾールによる処置では、雄の TBT 処置の際に見られたものとは異なり、ウォルフ管の末端より中央における拡張を認めた (図 4 および表 2)。雌では、TBT 処置と同様、各用量でウォルフ管が後期まで残存していた (図 5 および表 2)。雌雄ともに、濃度を下げると、異常の程度が軽度になった (表 2)。

4. TBT 処置した中腎-生殖腺の組織学的検索

TBT 処置した雄の中腎-生殖腺では、組織学的検索においてもウォルフ管末端の異常な拡張が確認された。また、調査したすべてにおいて、中腎近傍の精索部分に広範囲なアポトーシスが見られたが、対照側でも 1 例において、同様の部位に極狭い範囲のアポトーシスが見られた (図 6)。雌においては、対照側で頭側のウォルフ管は退行しており、残存は確認できなかったが、1、0.5、

0.2 μ M の TBT 曝露で、頭端近くまでウォルフ管の残存が見られた。雌では雄と同様な異常なアポトーシス像は見られなかった (図 7)。

5. テストステロン処置した中腎-生殖腺の組織学的検索

テストステロン処置では、雄では TBT に見られたウォルフ管末端の拡張像は検出されなかったが、中腎近傍の精索部分に狭い範囲ではあるがアポトーシスが見られた。雌では、TBT 処置と同様にテストステロン処置側のウォルフ管が、より頭側にまで残存しているように見えた (データは示さず)。

6. アロマターゼ阻害剤処置した中腎-生殖腺の組織学的検索

塩酸フアドロゾールによる雌の 10 μ M、1 μ M、0.1 μ M 曝露では、ウォルフ管は対照側のものと比較して、頭側にまで長く残存しているのが確認できた。(図 7)。雄では、10 μ M 曝露の 1 例では TBT 処置と同様のウォルフ管末端の膨化は見られなかったが、ウォルフ管の途中が一部拡張しているのが認められた。(図 8)。

7. アロマターゼとアンドロジェン受容体の発現部位

RT-PCR 法により、アロマターゼが胎齢 16.5 日齢の精巣、副腎、および卵巣に存在し、その存在量は特に卵巣で多いことが確認された。一方アンドロジェン受容体は、精巣、卵巣、雌雄の中腎および副腎で発現していることが確認された。

D. 考察

イボニシにおけるインボセックスの発生機序として、TBT によるアロマターゼの阻害作用が示唆されているが、哺乳動物の生殖腺の発生過程に対して、TBT がどのような作用を有するかは検討されていなかった。本実験は、TBT がラットの中腎-生殖器官培養系において発生攪乱作用を有する可能性を示唆している。未分化生殖腺は、中腎の近傍に形成され、正常では Sry が発現すれば精巣に分化するが、その発現がなければ卵巣へと分化する。Sry の発現により生殖細胞を支持するセルトリ細胞が分化し、ミュラー管抑制ホルモン (MIH) を分泌することで、ミュラー管は退行する。この時、中腎に由来する体細胞からは胎児型ライディッヒ細胞が分化し、テストステロンを分泌する。テストステロンに反応してウォルフ管が発達し、雄の生殖道および副生殖腺が形成される。雌では、セルトリ細胞の分化は誘導されず、MIH が分泌されないためミュラー管は退行せず、テストステロンはアロマターゼにより代謝され、エストロジェンが産生されるため、ウォルフ管は退行し、ミュラー管が発達して雌性生殖道が形成される。これらの生殖腺の分化過程は、器官培養系を用いた *in vitro* の系でも再現することが、多数の研究者によって確認されている。未分化生殖腺からの精巣の分化は、マウスでは血清を含む培地を用いて、フィルター上に置かれたドロップ内で生殖腺を培養することで実施されており、この実験系は主に性索形成の分子機構を明らかにするために、中和抗体やアンチセンス oligo による機能分子の抑制実験において使用されているが、毒性実験の使用例はそれほど多くない。また、ラットの生殖腺を用いた生殖腺の器官培養系もいくつかの研究者から報告されている。ラットでは、マウスと異なり血清を含む場合に、性索形成が抑制されることが知られており、このために無血清培地が考案され使用されている。我々は、予備実験として、ラットの無血清培地を用いて、13.5 日齢の未分化生殖腺を摘出し、同様なフィルター培養により、TBT の性索形成に対する影響を評価した。しかし、2.5 μ M の

高濃度においても、胎齡 13.5 日性索形成等の性分化に対する TBT の明瞭な影響は観察されなかった（データは示さず）。

TBT にアロマターゼ阻害などのステロイド合成に対する影響が存在する可能性が指摘されており、その場合、影響が見られるのは、生殖腺の分化が開始し、雌雄に特異的なステロイド合成が行われる時期であると予想される。正常では、生殖腺の分化後に、精巣あるいは卵巣から分泌されるステロイドホルモンの影響により、副生殖器の分化が雄あるいは雌の方向に制御されている。そこで、我々は上述の培養系を用いて、生殖腺分化後（15.6-16.5 日）の中腎-生殖腺を摘出および培養し、それに対する TBT の影響を評価した。この培養系では対象側の生殖腺-中腎では、生殖腺の分化に応じて、雄ではウォルフ管の発達とミュラー管の退行が、雌ではウォルフ管の退行とミュラー管の発達が観察された。従って、我々は短期間ではあるが、ステロイドにセンシティブである副生殖器の分化過程を再現し、薬物の影響を評価できる培養系を開発したと言える。さらに、RT-PCR 法により、16.5 日の中腎において、テストステロン受容体の高い発現レベルを確認した。しかし、この培養系では 5 日間の培養期間を過ぎると、雌雄いずれの副生殖器も退行を開始するため、より長期間の培養系のためには、血清の添加等の方法の改善が必要であると考えられる。

我々の開発した、生殖腺分化後の副生殖器の分化過程を観察しえる培養系を用いて、我々は、雌の生殖腺-中腎培養系に対する TBT の曝露が、テストステロンおよびアロマターゼ阻害剤と同様な作用として、正常では退行すべきウォルフ管の胎生後期までの残存を生じることを観察した。組織学的検索では、対照培養系においてウォルフ管は頭部から徐々に消失する傾向があり、それは *in vivo* で報告されている状況と同じである。TBT 処置でも、ウォルフ管は、退行を始めていたが、頭部が長く残存していた。少なくとも現在のところ、ウォルフ管退行因子は同定されておらず、テストステロンの積極的な作用が存在しなければ、ウォルフ管は退行すると言われている。我々の用いた培養系においても、雄ではウォルフ管が維持されるが、雌では培養開始後に急速に退行することが観察された。また、RT-PCR 法では、この時期の卵巣で高い、アロマターゼの発現が確認され、同時に中腎において高いアンドロジェン受容体の発現が確認された。今回はアンドロジェン受容体作用の阻害や、直接的に培養液中のテストステロン濃度の測定を行っていないが、状況証拠は、仮説としての TBT によるアロマターゼ阻害の可能性を支持している用に見える。しかし、TBT が直接アンドロジェン受容体に作用した可能性や、アンドロジェン受容体以降の細胞内カスケードに影響している可能性も除外できない。

一方、雄では、ウォルフ管は退行せず（発達し）、ミュラー管が MIH により退行するが、その過程は我々の器官培養系においても、対照側で再現されていた。また、TBT 曝露によってミュラー管の退行が遅延するという減少は見られなかったことから、TBT はセルトリ細胞の MIH 合成に対しては直接明らかな影響を有さないと考えられる。しかし、精巣ではアロマターゼ活性はセルトリ細胞で認められており、TBT がセルトリ細胞のステロイド合成酵素に影響している可能性がある。TBT 曝露で観察された、ウォルフ管（頭端）の異常な拡張所見は、テストステロンおよびアンドロジェン阻害薬では認められなかった。従って、この影響は TBT に特異的な作用であると考えられる。RT-PCR 法によりこの時期の精巣においてアロマターゼが存在することが確認されたが、その発現量は卵巣に比較するとわずかであり、これが直接、器官培養系で見られた雄のウォルフ

管の異常を説明するとは考えづらい。しかし、ノックアウトマウスで示されている様に、雄におけるエストロジェンの作用は雄の造精および生殖器分化に対して重要であり、アロマターゼの抑制によるエストロジェン作用の低下が雄に与える影響も考えられる。組織学的検索では、中腎に近い部分の性索の一部で過剰なアポトーシスが TBT 曝露により認められたが、程度は少ないものの同様な異常が、対照側でも観察された。従って、これが真に TBT による影響か否かを判断するためには、さらなる実験が必要である。一般に器官培養系では、器官が大きくなるにつれて、その中心部では、酸素や栄養が枯渇する傾向がある。今回我々が用いた培養組織は、培養液の表面に浮遊させたフィルター上のドロップの中に置かれた。栄養は下部の培養液からフィルターの穴を通じて供給され、酸素はドロップの液層にたいして供給されと考えられる。しかし、それでも組織の成長に伴い、その中央部分は栄養および酸素の欠乏傾向にあるはずであり、この状況は周囲組織より薬物に対してセンシティブ（死にやすい）状況を生み出している可能性がある。

本実験では、同様な時期の *In vivo* の投与実験を行っていない。このため、*in vivo* で曝露したときに、同様な影響が生じるのか否かについては、我々は直接的な情報を持ち合わせていない。いくつかのグループは、齧歯類においてトリアルキルスズ化合物の *in vivo* での生殖毒性を報告している。しかし、トリアルキルスズ化合物の催奇形性は、それらが胎児に直接作用を及ぼすのか、あるいは胚毒性は母体への毒性に起因するののかという点に関しては、評価するのが困難なため、不明確なままである。今回の実験は *in vitro* ではあるが、培養液に投与した TBT が、摘出した中腎-生殖腺に直接影響を与える可能性を示唆している。今回の培養実験において、雌雄両方で影響の見られた TBT の $1\mu\text{M}$ は、それが約 333g のラット母子体内に均一に分布している状態を仮定すると、0.1mg の TBT が体内に一様に分布した状態ということになる。実際の投与では、生体への吸収率、生体内での代謝、解毒作用、胎仔への移行率などを考慮する必要があり、仮に 100 倍の濃度を投与する必要があると考え、ラット 1 匹あたり 10mg の TBT を投与することとなる。Harazono らの報告によると、妊娠 0-3 日目のラットへの TBTC 投与では、妊娠率の低下は 16.5mg/kg 群から観察され、4-7 日目投与群の生存胎仔数の減少は 32.5mg/kg 投与群から観察されている。今回器官培養系で行った TBT 濃度は、*in vivo* の投与でも再現できる可能性があり、今後の検討が必要であろう。

ステロイドや甲状腺ホルモンなどの脂溶性低分子ホルモンの受容体である核内受容体群は、多細胞生物の内分泌調節系の主要な部分を担っている。最近、内分泌攪乱物質は、この核内受容体を介して生体内システムを攪乱し、生物の発生や分化、恒常性の維持に影響を及ぼすことが指摘されている。内分泌攪乱物質作用が疑われる化学物質のヒトの各種核内受容体に対する影響を調べた報告によると、TBT はレチノイン酸 X レセプター (RXR) に対して、標準リガンドである 9-シスレチノイン酸とほぼ同等の活性を示した。一方、Yanase らの報告によると、RAR:RXR ヘテロダイマーによって構成される核内受容体は、アロマターゼ活性の調節に関与する。従って、今回の実験においても、アロマターゼ活性に対して RXR が関与している可能性がある。従って、今回の培養系において、RXR アゴニストにより、TBT と同様な影響が現れるのか、あるいは RXR アンタゴニストを用いて、TBT で見られた作用が阻害されるのかを調査することは意義があると考えられる。

Table.1 The influence of TBT on embryonic gonad and mesonephro culture

Conc. of TBT-C (μ M)	Expansion of Wolffian duct	male		Remnant of Wolffian duct	female	
		Control	TBT		Control	TBT
1-2 μ M	+	0/8(0)	8/8(100)	+	0/5(0)	5/5(100)
	\pm	1/8(0)	0/8(0)	\pm	1/5(20)	0/5(0)
	-	7/8(88)	0/8(0)	-	4/5(80)	0/5(0)
0.2 μ M	+	0/4(0)	1/4(25)	+	0/3(0)	0/3(0)
	\pm	1/4(25)	2/4(50)	\pm	0/3(0)	3/3(100)
	-	3/4(75)	1/4(25)	-	3/3(100)	0/3(0)
0.05 μ M				+	0/2(0)	0/2(0)
				\pm	0/2(0)	0/2(0)
				-	2/2(100)	2/2(100)

abnormal/total (%)