

氏名	はら 原	その 園	あきら 景
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)		
学位記番号	論 薬 博 第 680 号		
学位授与の日付	平 成 14 年 11 月 25 日		
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当		
学位論文題目	ラット妊娠初期の生殖生理に及ぼす塩化トリブチルスズの影響に関する研究		
論文調査委員	(主 査) 教 授 市 川	厚	教 授 佐 藤 公 道 教 授 中 川 照 眞

### 論 文 内 容 の 要 旨

有機スズ化合物は工業や農業の分野で広く用いられている。トリブチルスズ化合物 (TBT) は広い範囲の殺生物作用を示すことから、木材等の保存剤、漁網や船底の防汚剤などに使われてきた。TBT は貝類に対して非常に低濃度で成長低下、奇形、生殖不能などの毒性を示し環境に大きな影響を与えたことから、1980年代後半より先進国での防汚剤としての使用は制限された。近年、環境中に放出された化学物質がホルモン様作用を示し生物の生殖に悪影響を与えている可能性が示唆され、環境ホルモン問題として大きな社会問題となっている。内分泌かく乱物質の疑いがある化合物の中で、TBT は実際に生態系に悪影響を与えている点で特に強い関心が持たれている。TBT は環境中に広く存在し生物濃縮を起こすことが示されており、人への影響が危惧されてきた。本研究は、哺乳類の生殖に及ぼす TBT の影響を明らかにするために、ラットを用いて妊娠初期に投与した塩化トリブチルスズ (TBTCI) による生殖生理への影響を解析した。

#### 第一章 ラット妊娠初期に投与した塩化トリブチルスズによる妊娠の成立・維持に対する影響

塩化トリブチルスズ (TBTCI) の妊娠に及ぼす影響を調べるため、ラットの妊娠 0-7 日に TBTCI を 8.1-16.3 mg/kg 経口投与した後、20日に妊娠所見を観察した。全ての投与量において、飼料摂取量および体重増加の減少が見られた。また、高用量群においては、下痢などの所見を認めた。妊娠率は TBTCI の 12.2 mg/kg 以上の投与で有意に低下した。妊娠率の低下は飼料摂取量および体重増加量の減少に起因していないことを飼料制限対照群を用い比較することにより確認した。これらの結果から、ラット妊娠初期に TBTCI を投与すると、妊娠が不成立となることがわかった。

次に、TBTCI を妊娠 0-3 日つまり着床前期間、妊娠 4-7 日つまり着床中から着床後期間に投与した後、妊娠所見を調べた。TBTCI は妊娠 0-3 日に投与したとき、16.3 mg/kg 以上の投与量で妊娠率の低下を引き起こすが、妊娠が成立した個体の胚・胎児の生存には影響しないことがわかった。妊娠 4-7 日に投与すると 16.3 mg/kg 以上の投与量で着床後の胚死亡数の上昇が起きたことから、TBTCI の毒性は着床後の胚の生存において強く現れることがわかった。

#### 第二章 ラット妊娠初期に投与した塩化トリブチルスズによる着床および黄体機能に対する影響

TBTCI の着床に対する影響について、偽妊娠ラットを用いて子宮の機械的刺激により脱落膜反応を誘導し、脱落膜腫の変化を指標に検討した。その結果、脱落膜刺激前および刺激後いずれの期間に投与しても脱落膜腫の形成を抑制することが分かった。そこで、脱落膜反応に影響する血中ステロイド濃度の変化を調べたところ、TBTCI は血中エストラジオール濃度には影響を与えないが、プロゲステロン濃度を顕著に減少させることが明らかになった。この結果から、プロゲステロンの減少を起こすことが妊娠の不成立に関わることが示唆された。

次に、妊娠 0-3 日に TBTCI を投与し、妊娠 5 日に着床の有無を子宮の着床部位における血管透過性の上昇を指標として観察した。着床が見られない個体数は用量依存的に上昇し、16.3 mg/kg 以上の投与量で有意に上昇した。妊娠 4 日において TBTCI 8.1 mg/kg 以上の用量で血中プロゲステロン濃度の低下が観察された。TBTCI を投与したラットに対し妊娠 0-4 日にプロゲステロン 2 mg および妊娠 4 日にエストラジオール 100 ng を皮下投与した結果、TBTCI による着床阻害を回復させることが出来た。以上より、TBTCI はプロゲステロンの低下を介して着床阻害を引き起こすことを確認した。

妊娠ラットにおいてプロゲステロンは黄体で合成される。妊娠 0-3 日に TBTCI を投与し妊娠 4 日にその影響を検討した。TBTCI 投与は、黄体中のプロゲステロンを不活性化する酵素  $20\alpha$ -Hydroxysteroid dehydrogenase ( $20\alpha$ -HSD) の活性とその mRNA の発現を対照群に比して増大した。その結果として、黄体におけるプロゲステロン産生の低下（代謝の亢進）が示された。卵巣の組織学的検査の結果、黄体に空胞変性が認められ黄体に悪影響を与えることが明らかになった。ラットにおいて黄体機能の維持に重要な役割をしているプロラクチンを測定したところ、プロゲステロン濃度の低下と対応してプロラクチン濃度の低下が見られた。TBTCI はプロラクチン低下により早期の黄体機能退行を引き起こすことが示唆された。

次に、ラット顆粒膜黄体細胞を用いて、TBTCI がプロゲステロン産生に対する影響を検討したところ、TBTCI は 300 nM で無刺激時および各種刺激を与えたときのプロゲステロン産生を抑制した。TBTCI は黄体細胞に直接悪影響を与えることを示した。

以上著者は、ラットにおいて TBTCI を着床前の期間に投与すると妊娠の成立を抑制することを見いだした。その原因は血中プロゲステロンの低下によって着床阻害が起きるためであることを明らかにした。このプロゲステロンの低下の原因として、1) 黄体において誘導された  $20\alpha$ -HSD によるプロゲステロンの代謝不活性化、2) 顆粒膜黄体細胞のプロゲステロン産生の直接抑制、を示した。これらの成果は、TBTCI のラット生殖能に対する悪影響を明らかにしたものであり、環境毒性学の基礎知見として貢献するものである。

### 論文審査の結果の要旨

トリブチルスズ化合物は木材等の保存剤、漁網や船底の防汚剤等に広く用いられてきたが、環境中に放出された高濃度のトリブチルスズ化合物により魚介類の成長や生殖に悪影響を及ぼすことがわかり、防汚剤としての使用が禁止された。しかし、環境中に残存するトリブチルスズ化合物が生物濃縮を介して生態系の攪乱やヒト等のほ乳類に影響を及ぼすことが懸念されている。そのため、ほ乳類における毒性薬理が早急に解明されることが必要である。本論文は、この観点から、ラットを用いて妊娠初期に投与した塩化トリブチルスズ (TBTCI) による生殖生理への影響を解析し、TBTCI の毒性発現機構を明らかにしたものである。

第一章では、著者は、高濃度 (12 mg/kg 以上) の TBTCI の経口投与により雌ラットでは体重の減少や下痢が起きるとともに、妊娠率の顕著な低下が見られることを明らかにした。次いで、妊娠率の低下は、TBTCI が卵の子宮着床後に作用して、生育途中の胚生存に致命的な作用を有したことによると結論した。

第二章では、著者は、TBTCI の着床胚に対する影響のメカニズムを、同物質の性ホルモンへの作用や組織像変化から解析した。まず、TBTCI は偽妊娠ラットの子宮に機械的な刺激を加えて形成する脱落膜腫反応を抑制することを見いだし、次いで、脱落膜腫の形成に関与するホルモンであるプロゲステロンの血中濃度の低下を見いだした。これらの結果から、着床阻害の原因はプロゲステロンの血中濃度の低下によると結論した。次いで、プロゲステロン低下が起きる機構を解析し、TBTCI がプロゲステロンを不活性化する酵素  $20\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase の活性とその mRNA 発現を促進することを発見した。また、黄体におけるプロゲステロンの産生低下を組織学的な検査により確認した。さらに、TBTCI は顆粒膜細胞に直接作用するのか、あるいは顆粒膜細胞を活性化するプロラクチンを阻害して間接に作用するのか、どちらでプロゲステロン生成を阻害するか検討した。その結果、TBTCI はどちらにも作用したため着床阻害を起こすことを明らかにした。

以上、著者は、ラットの妊娠期において、TBTCI による血中プロゲステロンの低下により着床阻害と胚生存に致命的な毒性が誘起されることを見いだした。そして、そのメカニズムとして二つの可能性、一つは黄体において  $20\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase の誘導によるプロゲステロンの代謝不活性化を起こすこと、もう一つは顆粒膜細胞でのプロゲステロン産生の直接抑制であることを示唆した。これらの成果は TBTCI のラット生殖生理での毒性発現を明らかにしたものであり、環境毒性学の基礎知見として貢献するものである。

よって、本論文は博士（薬学）の学位として価値あるものと認める。

さらに、平成14年 8 月30日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。