

数種の内分泌攪乱化学物質の マウス腹腔マクロファージ細胞機能に及ぼす影響

熊谷 健*, 白澤 衣理, 堤 啓, 蝦名 敬一, 横田 勝司

Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on Cellular Function in Mouse Peritoneal Macrophages

Takeshi KUMAGAI*, Eri SHIROSAWA, Hiromu TSUTSUMI, Keiichi EBINA, and Katsushi YOKOTA

(Received November 22, 2004)

We investigated the effects of nine possible endocrine disrupting chemicals (EDCs) on the nitric oxide (NO) production and growth of mouse peritoneal macrophages. Genistein and coumestrol inhibited lipopolysaccharide-induced NO production in macrophages, whereas other EDCs had no effect. In WST-8 assay, the growth of mouse macrophages was induced by 17 β -estradiol, bisphenol A, nonylphenol, diethyl phthalate, genistein and daidzein. In addition, the cell viability of daidzein-treated macrophages was 1.7-fold increased as compared with non-treated macrophages. These results suggest that EDCs affect cellular function in macrophages.

Key words — endocrine disrupting chemicals (EDCs) ; nitric oxide (NO) ;
macrophage growth

はじめに

内分泌攪乱化学物質 (Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs), いわゆる環境ホルモンとは, 動物の生体内に取り込まれた場合に本来その生体内で営まれている正常なホルモン作用に影響を与える外因性物質の総称であり, 生態系への影響が大きな社会問題として注目されている.^{1,2)} 一般にホルモンは, 動物の発生過程における組織の分化, 成長, 生殖機能の発達, 恒常性などを調節するうえで重要な役割を担っており, それぞれ特異的な受容体 (レセプター) を介して生理活性を発現する. EDCsはこのホルモンレセプターに結合することでホルモン類似作用を示すと考えられており, 多くのEDCsは, 女性ホルモンの一種であるエストロゲンのレセプターに結合することでエストロゲン類似作用を示すことが知られている.³⁾ このEDCsとしての作用が疑われている物質として dioxin 類や polychlorinated

biphenyl などの有機塩素化合物や bisphenol A や nonylphenol などの芳香族化合物などが知られている.⁴⁾ また, 植物由来のエストロゲン作用を有する物質 (phytoestrogen) として genistein, daidzein, coumestrol, resveratrol などが知られており健康食品やサプリメント錠剤として利用されているが, coumestrol の大量摂取によってヒッジに不妊が認められている⁵⁾ ことから phytoestrogen の摂取によるヒトの健康への影響も懸念されている. さらに 17 β -estradiol などの天然エストロゲンも実験レベルでエストロゲン作用を示す量が河川水中で検出され⁶⁾ 水生生物に対する作用も危惧されていることから, 天然物由来のエストロゲンが EDCs として作用する可能性も考えられている.

現在, EDCs の環境への影響については, 魚類の雌化, 鳥類での卵のふ化率の減少, 哺乳類における精子数の減少などの生殖機能に対する異変が報告されている^{4,7)} ことから, EDCs の生

殖機能に対するメカニズムについて研究が進められているが, 免疫応答など他の生理機能に対する影響については不明な点が多い.

そこで, 著者らはEDCsの免疫応答に及ぼす影響を解明する目的から, 内分泌攪乱作用を有していると考えられているEDCsとして化学物質と植物および天然エストロゲン9種 (nonylphenol, bisphenol A, diethyl phthalate, benzo[α]pyrene, genistein, coumestrol, resveratrol, daidzein, 17 β -estradiol) を用い, 免疫担当細胞の一つであるマクロファージ (M ϕ) の細胞機能としてのlipopolysaccharide (LPS) 誘導nitric oxide (NO) 産生並びにM ϕ に対する増殖誘導活性に与える影響について検討を行った.

実験材料と方法

1. 試薬

17 β -estradiol (Sigma社製), bisphenol A, nonylphenol, diethyl phthalate (和光純薬社製), benzo[α]pyrene (東京化成社製), genistein (LKT laboratories社製), coumestrol, resveratrol (Biomol社製), daidzein (Extrasynthese S.A.社製) を dimethyl sulfoxide で可溶化後, 終濃度が17 β -estradiolでは10 nM, bisphenol A, nonylphenol, diethyl phthalate, benzo[α]pyreneでは各10 μ M, genistein, coumestrol, resveratrol, daidzeinでは各1 μ Mで実験に供した.

2. 実験用動物

マウス (BALB/C系) 雄性 (4-5 weeks) は, 日本SLC (浜松) から購入し, 23 \pm 1 $^{\circ}$ C, 湿度55 \pm 5%で飼育したものを使用した.

3. マウス腹腔M ϕ の調製

マウス常在性腹腔M ϕ は, Cohnらの方法⁸⁾に準じた以下の方法で採取した. すなわち, マウスを断頭脱血後, 10 unit/ml heparin sodium salt (Nacalai tesque社製), 0.5% bovine serum albumin (Invitrogen社製) 含有 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS, Invitrogen社製) を腹腔内投与後, 開腹し, M ϕ を含むD-PBS

を適量回収した. 得られたM ϕ は4 $^{\circ}$ Cにて700 rpm, 5 min 遠心後, 上層を除去し, D-PBSを加え洗浄を行った. この操作を3回行い, 得られた細胞は, 10% fetal calf serum (Equitech-Bio社製), 100 unit/ml penicillinおよび0.1 mg/ml streptomycin (Invitrogen社製) 含有RPMI1640培地 (Invitrogen社製) に懸濁し, 血球計算盤で細胞数を算出後, 96 wellの tissue culture plate (Falcon社製) に5 \times 10⁵ cell/mlになるように播き, 5% CO₂下で37 $^{\circ}$ C, 2 h培養後培地で洗浄し, 実験に供した. またplateに付着した細胞はギムザ染色で97%以上がM ϕ であることを確認した.

4. Nitric oxide (NO) assay⁹⁾

各EDCs含有培地でM ϕ を24 h培養後, LPS (Sigma社製) を0.1 μ g/mlとなるように添加しさらに24 h培養を行い, その培養上清について Griess法を利用したNitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Cayman社製) を用い, 同社のプロトコールに従い試薬を添加した. すなわち, 培養上清100 μ lを新しいassay plateに移し, Griess Reagent R1と Griess Reagent R2をそれぞれ50 μ lずつ加え10 min放置後, 540 nmにおける吸光度を測定した. NO産生量は, EDCs非添加培地培養M ϕ における吸光度に対するEDCs含有培地培養M ϕ での吸光度の割合から評価した.

5. 生細胞数の測定

M ϕ 生細胞数の測定は, 各EDCs含有培地でM ϕ を48 h培養後, WST-8 assayを利用したCell Counting Kit-8 (同人化学社製) を用い同社のプロトコールに従って行った. すなわち各wellの培地を除去後, 培地とWST-8溶液 (5 mM WST-8, 0.2 mM 1-methoxy PMS, 150 mM NaCl) の混液 (10:1) を加え, さらに2 h培養後, 細胞内に取り込まれたWST-8が還元されることで形成したWST-8ホルマザンの450 nmにおける吸光度を測定した. M ϕ の生細胞数は, EDCs非添加培地培養M ϕ における吸光度を100%とした場合のEDCs添加培地培養M ϕ での吸光度の割合から cell viabilityを求めることで評価した. またEDCs含有培地で培養したM ϕ について光学顕微鏡下で

形態観察を行った。

6. 統計学的処理

有意差検定は、Student's *t*-testにより行った。

結果および考察

EDCsとしての作用が疑われている化学物質として bisphenol A, nonylphenol, diethyl phthalate, benzo[*a*]pyrene の4種を、植物由来のエストロゲン様作用を示すことが報告されている物質、いわゆる phytoestrogen として genistein, coumestrol, resveratrol, daidzein の4種を、また天然エストロゲンである 17β -estradiol を用い、これら EDCs の $M\phi$ に対する影響を検討した。 $M\phi$ は、LPS や各種サイトカイン、特に炎症性サイトカインである IL-1 や TNF- α などによって誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) が誘導されることによって、大量の NO を生成^{10,11)} することが知られていることから、あらかじめ、EDCs 含有培地で培

養した $M\phi$ に LPS を添加し、培養上清中に放出された NO 量の測定を行った。その結果、Fig. 1 に示すように、培地のみで培養した control 群に比べて、 17β -estradiol 処理群においてわずかに NO 産生が減少する傾向を示し、他の化学物質4種についても、 17β -estradiol と同様に NO 産生が減少する傾向を示したが、大きな変化は認められなかった。また、Fig. 2 に示すように、resveratrol, daidzein は、NO 産生量に大きな変化は認められなかったが、genistein では NO 産生量の減少傾向を示し、coumestrol においては control 群の約 45% と有意な NO 産生量の減少が認められたことから、coumestrol は、 $M\phi$ の LPS に対する感受性を変化させ、iNOS の誘導を抑制することで NO 産生を低下させる可能性が考えられた。

また、内分泌攪乱作用を示すと考えられている物質の中には、ヒト乳癌細胞株である MCF-7 細胞に対する細胞増殖反応を示すことが報告¹²⁻¹⁴⁾ されていることから、EDCs が正常細胞に対しても同様に細胞増殖誘導活性を有するのか細胞

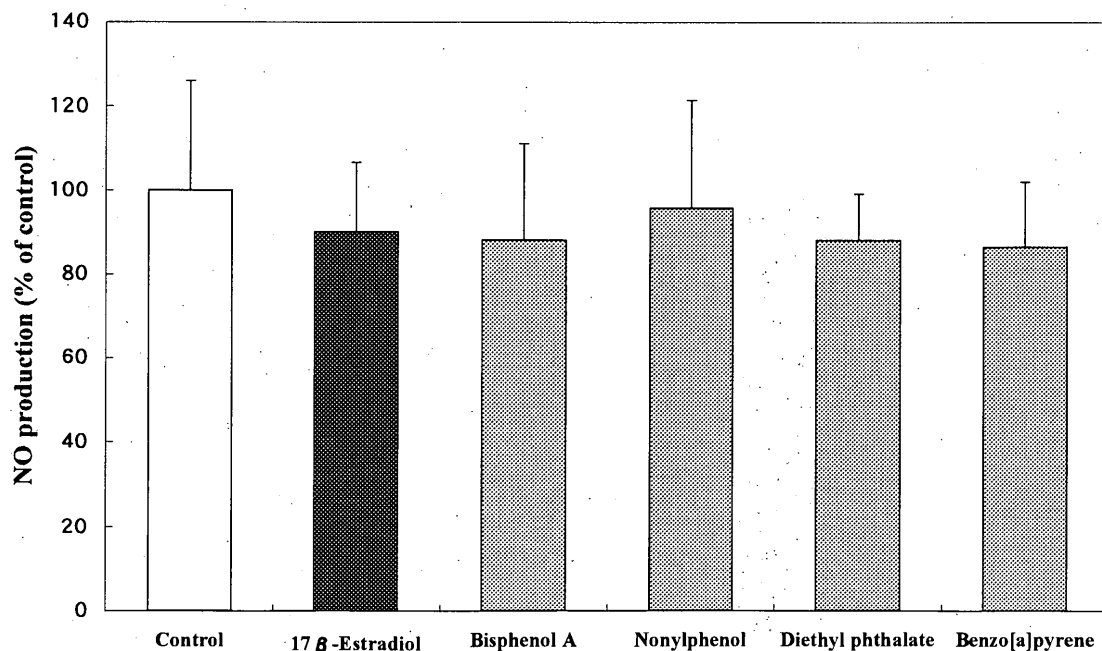


Fig. 1. Effects of EDCs on NO Production in Macrophages
Mouse peritoneal macrophages (5×10^5 cells/ml) were cultured for 48 h in the presence or absence of EDCs. During the last 24 h of incubation, cells in each well were chased with $0.1 \mu\text{g/ml}$ of LPS. The level of NO production was determined by measuring the accumulation of nitrite in the culture medium. Data are mean \pm S.D. from three separate experiments.

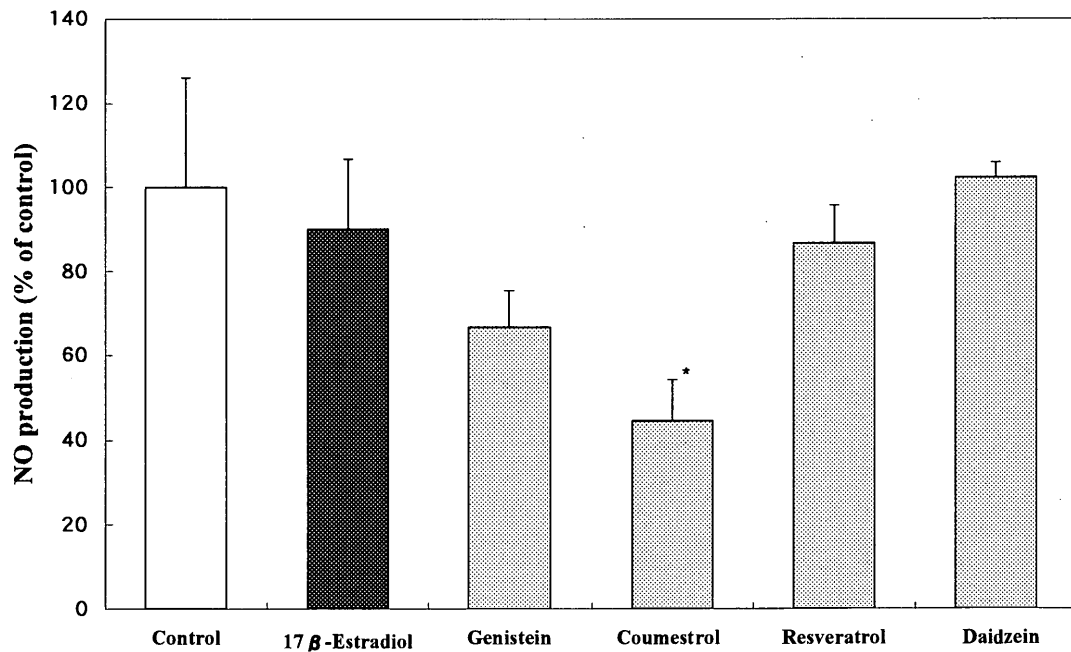


Fig. 2. Effects of Phytoestrogens on NO Production in Macrophages

Mouse peritoneal macrophages (5×10^5 cells/ml) were cultured for 48 h in the presence or absence of Phytoestrogens. During the last 24 h of incubation, cells in each well were chased with $0.1 \mu\text{g/ml}$ of LPS. The level of NO production was determined by measuring the accumulation of nitrite in the culture medium. Data are mean \pm S.D. from three separate experiments. Significantly different from control, * $p < 0.05$.

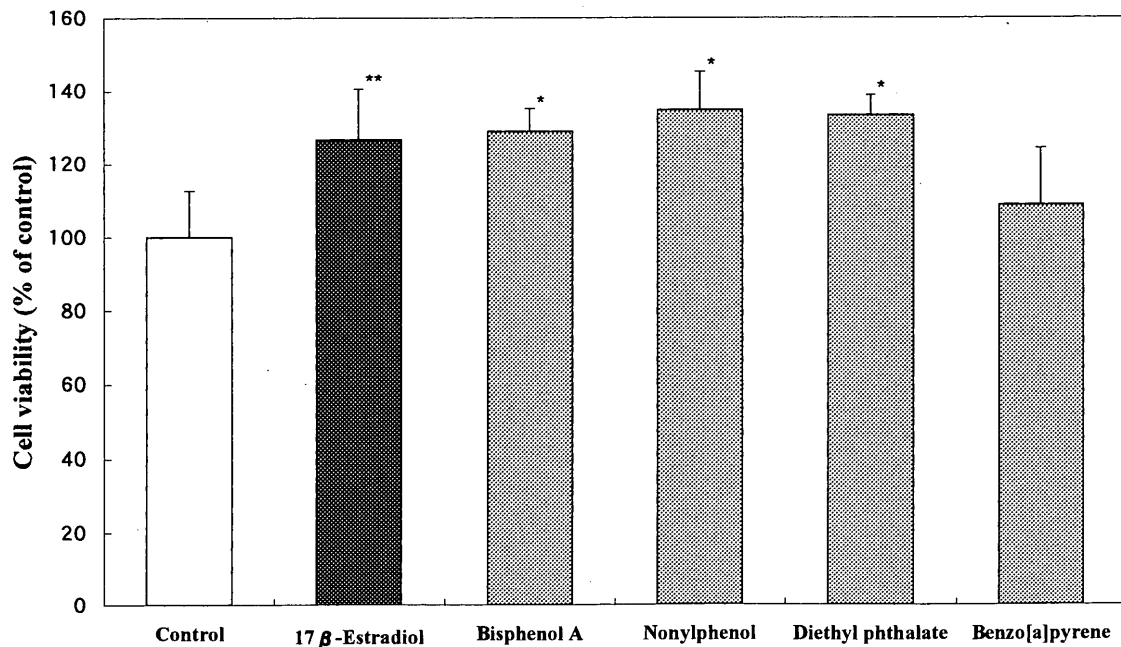


Fig. 3. Effects of EDCs on Macrophage Proliferation

Mouse peritoneal macrophages (5×10^5 cells/ml) were cultured for 48 h in the presence or absence of EDCs. Cell viability was assessed by WST-8 assay. Data are mean \pm S.D. from three separate experiments. Significantly different from control, * $p < 0.005$, ** $p < 0.01$.

増殖測定として細胞内ミトコンドリア内脱水素酵素活性を測定し、この酵素活性と生細胞数が比例することを利用してWST-8 assayを用い検討を行った。その結果Fig. 3に示すように、bisphenol A, nonylphenol, diethyl phthalate処理M ϕ においてcontrol群より有意に高い17 β -estradiolと同程度のcell viabilityが認められた。同様にphytoestrogenを用い検討した結果、isoflavone類のgenistein, daidzein処理M ϕ においてcontrol群より有意に高いcell viabilityを示したことから(Fig. 4), isoflavone類がM ϕ を活性化し細胞増殖を誘導した可能性が考えられた。また、本実験において認められた測定結果が実際に生細胞数を反映しているかどうか直接確認するため光学顕微鏡下で形態観察を行った結果、control群より高い吸光度を示したEDCs処理M ϕ において生細胞数の増加が観察され、本測定結果が細胞数に依存していることを確認した。さらにM ϕ に対する細胞増殖活性を示したEDCsの中でdaidzein処理M ϕ においては、control群に比し約1.7倍と明らかなcell viabilityの増加が

認められた。すでにヒト体内に取り込まれたdaidzeinは腸内細菌によって修飾され、よりエストロゲン作用の強いequolとなることが報告されている¹⁵⁾ことから、M ϕ においても同様に細胞内に取り込まれたdaidzeinがequolに代謝されたことによって顕著な細胞増殖活性を示したものと考えられた。またMCF-7細胞などのヒト乳癌細胞株に対するEDCsの細胞増殖作用には、細胞内のエストロゲンレセプターが関与することが報告されている¹²⁻¹⁴⁾ことから、今回示したM ϕ に対するEDCsの細胞増殖反応についても、M ϕ 内のエストロゲンレセプターを介して作用が発現している可能性が考えられた。

以上の結果から、EDCsの中には免疫担当細胞であるM ϕ に対してLPS誘導NO産生やM ϕ に対する細胞増殖誘導活性などM ϕ の細胞機能に影響を及ぼすものがあることが示唆されたが、今回、検討したすべてのEDCsはいずれも単一濃度での作用を検討していることから、今後は、M ϕ に対するこれらEDCsの作用における用量依存性などについてさらに詳細に検討していく予定である。

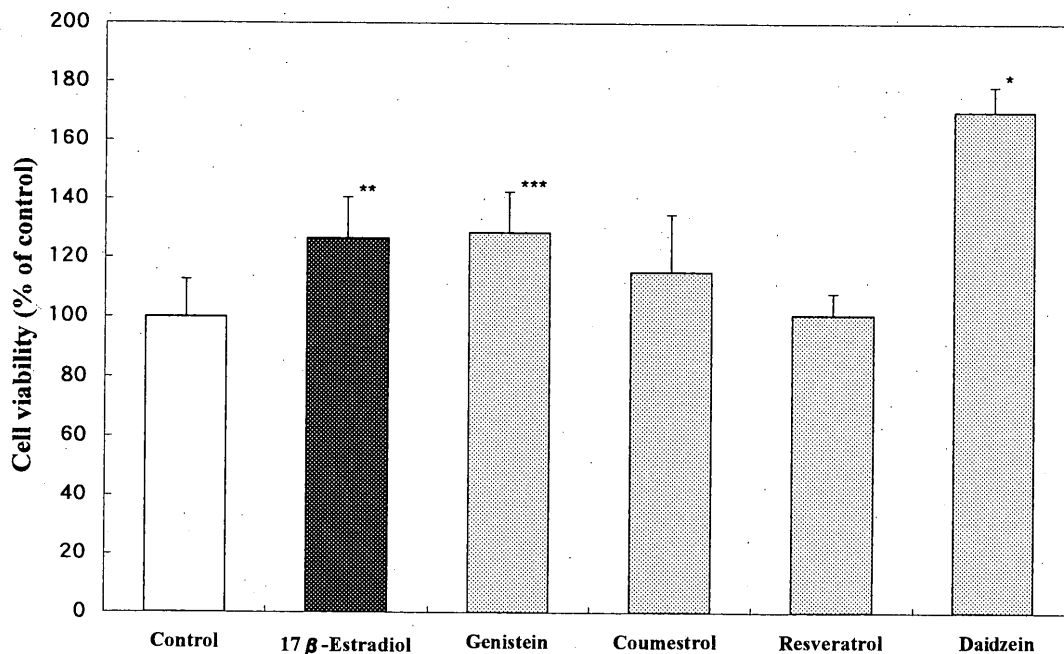


Fig. 4. Effects of Phytoestrogens on Macrophage Proliferation

Mouse peritoneal macrophages (5×10^5 cells/ml) were cultured for 48 h in the presence or absence of Phytoestrogens. Cell viability was assessed by WST-8 assay. Data are mean \pm S.D. from three separate experiments. Significantly different from control, * $p < 0.005$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.05$

REFERENCES

- 1) Bradlow H. L., Davis D. L., Lin G., Sepkovic D., Tiwari R., *Environ. Health Perspect.*, **103**, 147-150 (1995).
- 2) Colborn T., *Environ. Health Perspect.*, **103**, 135-136 (1995).
- 3) Kuiper G. G. J. M., Lemmen J. G., Carlsson B., Corton J. C., Safe S. H., van der Saag P. T., van der Burg B., Gustafsson J-A., *Endocrinology*, **139**, 4252-4263 (1998).
- 4) Morita M., *Gendaikagaku*, **393**, 40-44 (2003).
- 5) Kayama F., *Gendaikagaku*, **395**, 36-40 (2004).
- 6) Nojiri K., Motegi M., Hosono S., Kawamura K., Abstracts of papers, The 6th Annual Meeting of Japan Society of Endocrine Disrupters Research, Sendai, December 2003, p. 160.
- 7) Iguchi T., *Gendaikagaku*, **397**, 34-39 (2004).
- 8) Cohn Z. A., Benson B., *J. Exp. Med.*, **121**, 153-170 (1965).
- 9) Green L. C., Wagner D. A., Glogowski J., Skipper P. L., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R., *Anal. Biochem.* **126**, 131-138 (1982).
- 10) Moncada S., *Acta Physiol. Scand.*, **145**, 201-227 (1992).
- 11) Nathan C., *FASEB Journal*, **6**, 3051-3064 (1992).
- 12) Soto A. M., Sonnenschein C., Chung K. L., Fernandez M. F., Olea N., Serrano F. O., *Environ. Health Perspect.*, **103**, 113-122 (1995).
- 13) Korach K. S., Metzler M., McLachlan J. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 468-471 (1978).
- 14) Krishnan A. V., Stathis P., Permuth S. F., Tokes L., Feldman D., *Endocrinology*, **132**, 2279-2286 (1993).
- 15) Morimoto K., Hirose T., Kinjo J., Hirakawa T., Okawa M., Nohara T., Ogawa S., Inoue S., Muramatsu M., Masamune Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 351-356 (2001).