

図4 . Bisphenol A および estradiol の新生仔期投与により遅発性に精子細胞に引き起こされる形態学的異常の模式図。

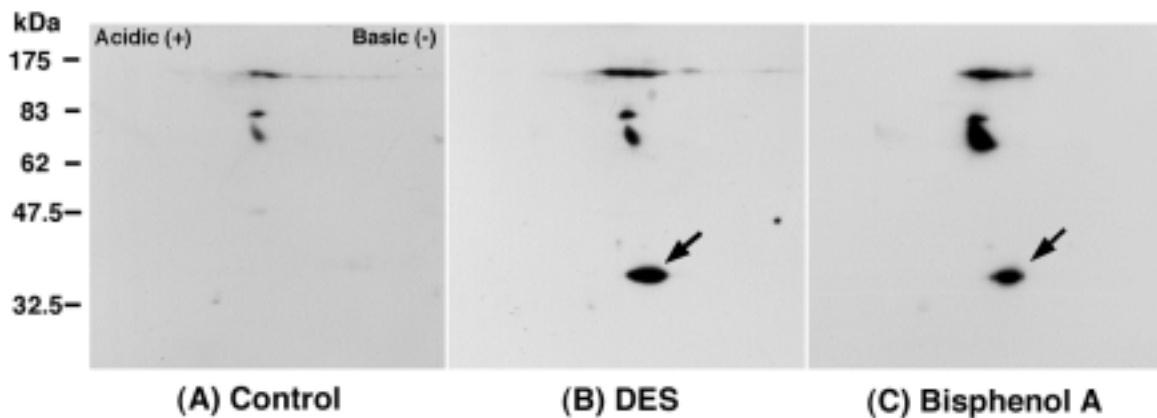


図5 . 培養セルトリ細胞株 TM4 に DES あるいは bisphenol A を添加することにより、二次元蛋白電気泳動像のチロシンリン酸化パターンに引き起こされる変化。矢印で示すように、DES あるいは bisphenol A により 38kD 蛋白のチロシンリン酸化が著明に亢進する。

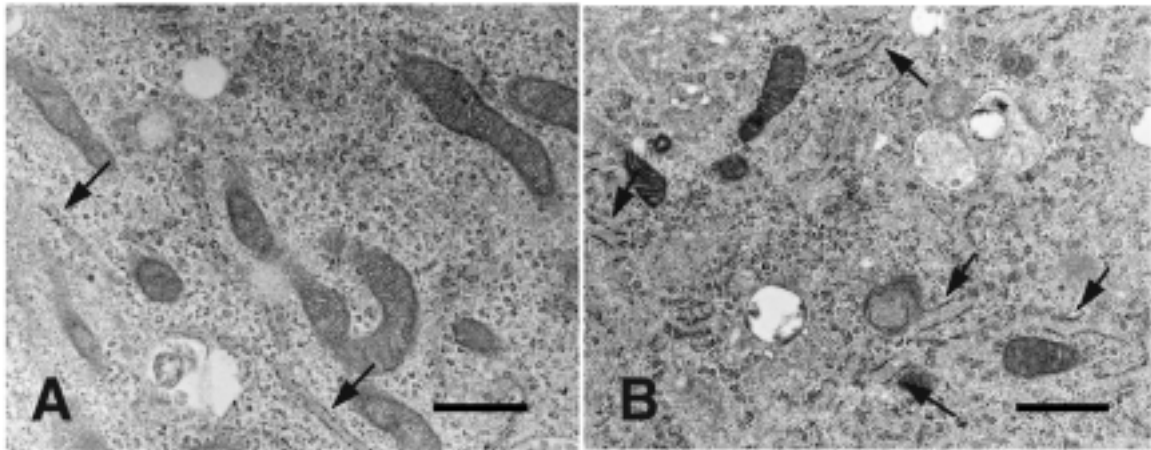


図6 . 培養セルトリ細胞株 TM4 に DES を 10 $\mu\text{g/L}$ 添加して 3 日間処理した場合の電子顕微鏡像。A. 対照、B. DES 添加。矢印で示すように、DES 添加により、粗面小胞体内腔の著明な拡大が引き起こされる。Scale bars, 1 μm .

D. 考察

1. 齧歯類新生仔期におけるエストラジオール、ビスフェノール A、アルキルフェノール、トリプルスズ曝露の精子形成に対する影響

1) DES および β -estradiol 3-benzoate による精子形成障害の比較

我々は前年度の研究で、ラット新生仔に DES を投与した場合の作用の解析について報告した (Toyama et al., J. Andrology, 22:413-423, 2001)。DES 投与では血液・精巣関門の形成が遅延したのに対し、今回の β -estradiol 3-benzoate の新生仔に対する投与実験では主に精子細胞の発達に影響を受けた。精細管によってはステップ 8 精子細胞が精上皮から集団ではがれていたこともあったが、この場合はセルトリ細胞—精子細胞間の特殊接合装置が欠失していたためにセルトリ細胞が精子細胞を保持出来なかったためであろう。この特殊接合装置の機能はまだ解明されていないが、この装置は分化中の造精細胞 (ステップ 8 以降の精子細胞) を精上皮内に保持するという仮説がある。今回の実験では、この仮説を支持するような結果を得られた。この特殊接合装置に構造がよく似ているセルトリ細胞間の特殊接合装置 (機能的には血液・精巣関門を形成する) には形態異常はあったものの成熟精子細胞まで分化が進行していたことは血液・精巣関門が機能的には異常がなかったことを示唆する。

DES は強いエストロゲン作用があると言われているが、ラットの精巣発達に対する作用に関する限り β -estradiol 3-benzoate (17 β -estradiol も同様) と DES ではその効果の現れ方が異なっており、DES の精子形成阻害作用にエストロゲン作用が関与するという考え方は更なる検討を要する。DES と estradiol, bisphenol A の作用様式の相違の分子レベルでの解明は今後の課題である。最近、DES は少なくともその作用の一部はエストロゲン受容体と類似した別のオーファン受容体 ERR β (estrogen-receptor-related receptor β) を介して発現することが報告されていることから (Tremblay et al., Genes and Development, 15:833-838, 2001)、このような新規受容体の精巣内発現様式の検討が DES と estradiol, bisphenol A の作用様式の差違の機構解明の手がかりになると考えられる。

2) β -estradiol 3-benzoate による精子形成障害における標的細胞

我々は既に β -estradiol 3-benzoate を成熟雄マウスに投与して (20 μ g/Kg)、同じく精子細胞での尖体の断裂、変形、核の変形、セルトリ細胞の特殊接合装置の部分的欠損を報告した (Toyama et al., Molecular and Cellular Endocrinology, 178:161-168, 2001)。新生仔と成体とでは単位体重あたりの投与量は違うものの (新生仔では成体の 1/10 量で作用が現れた)、基本的には同様の効果が認められ、estradiol が新生仔期にセルトリ細胞に及ぼした効果が、生殖細胞の分化に対する影響として遅発性に発現して精子細胞形成障害として表れたと考えられる。ただし、estradiol が新生仔期に精祖細胞 (spermatogonia) に及ぼした効果が遅発性に精子細胞形成障害として発現した可能性も否定できない。

β -estradiol 3-benzoate に関してはその作用はラットでもマウスでも同じように現れるので、種を越えて同じ作用のあることがわかった。我々は DES についてもその作用はラットとマウスで同じように現れることを既に発表した (第 4 回環境ホルモン学会、2001 年 12 月)。また、ラットに関しては 17 β -estradiol も β -estradiol 3-benzoate も同様の作用を示すことがわかった。

3) 精子形成障害における bisphenol A と β -estradiol 3-benzoate の作用機構の類似性

bisphenol A はグッピーでは精子産生能を減少させるという報告があるが (Haubruge et al., Proceedings of Royal Society of London B, 267:2333-2337, 2000)、哺乳類精巣に関しては、精子形成障害を引き起こすという報告 (vom Saal et al., Toxicol Ind Health, 14:239-260, 1998) と、顕著な影響はないとする報告 (Fisher et al., Environmental Health Perspectives, 107:397-405, 1999; Cagen et al., Regulatory Toxicology and Pharmacology, 30:130-139, 1999; Atanassova et al., Endocrinology, 141:3898-3907, 2000) が対立している (Nature, news 395: 828, 1998)。特に、上記の vom Saal らの報告では、胎生期に

おける bisphenol A 曝露により出生後、精子形成能が対照にくらべて 20%低下することが報告されているが、精子形成過程のどの段階あるいはどの細胞群に障害があるのかという点については明確な知見が乏しかった。

本研究ではじめて、bisphenol A の新生仔期曝露で、ラットの成熟後の精子細胞に奇形が生じ、セルトリ細胞-精子細胞間の特殊接合装置に欠損が起こることが明らかになった。このような異常精子細胞は精子まで発達せず、死滅してしまうと思われる。実験期間をさらに延ばして、この精子細胞の運命を追うとともに、bisphenol A の作用を他の実験動物でも追試する必要がある。bisphenol A は人間が毎日摂取しているので、今回の実験のようにラットの精巣に少しでも悪影響が認められたからには、人類に対する影響を無視できない。

bisphenol A は基本的にエストラジオール投与と同様の精子細胞の形成障害を示し、エストロゲン受容体を介した効果であると考えられる。マウスでは 10ng 以上の β -estradiol 3-benzoate、ラットでは 10 μ g 以上の bisphenol A で上記の異常が出る。今までの我々の経験から、マウスの投与量はラットのその 1/10 とすると、in vivo では bisphenol A は β -estradiol 3-benzoate の 1/100 の強さと言える。bisphenol A のエストロゲン受容体への結合能は estradiol の 1,000 分の 1 から 10,000 分の 1 と言われているが、in vivo では予想されるよりはるかに強い障害作用を持っていた。

生後 5 日目から bisphenol A を投与し始めた実験の結果も他の群の結果と差が無かった。このことから、bisphenol A は生後 5 日以降から投与した時にその作用を現すのであろう。これらの実験結果を基礎データとして、これからは bisphenol A, β -estradiol 3-benzoate, 17 β -estradiol の投与期間を狭めていって、これらの薬剤が精子細胞に影響を及ぼす生後日齢を特定する必要がある。

4) 新生仔期にエストロゲン様作用物質を投与された齧歯類の成熟後の妊孕性

新生仔期に bisphenol A, β -estradiol 3-benzoate, 17 β -estradiol を投与したマウス、ラットにつき、成熟後の妊孕性につき検討した結果、いずれの場合も受精率は対照と有意な差が認められなかった。したがって、精子形成障害の程度は妊孕性自体に大きな異常を引き起こすには至らなかったと考えられる。精子数や精子運動性、次世代への影響については今後検討する予定であるが、上記化合物で特定の精子形成過程で形態異常が引き起こされる以上、実質的には安全であると判断するためには、より精細な生殖機能変化の検討が必要と考えられる。

また、上記エストロゲン様作用物質の投与時期は視床下部の性分化の時期に対応しており、今後、視床下部発達に対する機能形態学的影響、性行動の変化についても検討が必要である。

5) 精子形成障害物質の作用時期と複合作用

血液・精巣閉門形成後（生後 20 日）に tamoxifen または DES を投与しても、今回の実験系においては血液・精巣閉門には異常が見られなかった。tamoxifen または DES は血液・精巣閉門の形成に直接的または間接的に関与するが、一端形成された閉門を破壊する作用はないと考えられる。マウス、ラットいずれにおいても tamoxifen と DES の混合投与では Leydig cells の分化が著明に抑えられることは特異的な所見であり、今後更にメカニズムを追求する必要がある。

6) 精子形成障害物質による肥満細胞の遊走

肥満細胞の遊走は DES 投与と同様に 17 β -estradiol を投与したラットの精巣でも見られた。 β -estradiol 3-benzoate については生まれた日に 500 μ g を投与したラットで既に報告がある (Gaytan et al. J. Andrology, 10 :351-358. 1989)。肥満細胞が精子形成にどのような影響を及ぼしているかを今後明らかにしてゆく必要がある。

2. *in vitro* における作用解析

DES をマウス精巣セルトリ細胞株 TM4 およびマウス精巣ライディッヒ細胞株 TM3 に添加し、二次元 Western Blot 法で解析したところ、約 38kDa のタンパク質 (p38) のチロシンリン酸化が、対照群に較べ有意に増強していた。さらに、DES を添加した TM4 および TM3 細胞は、粗面小胞体の内腔が対照群に較べ拡大していた。これらの所見は、DES のセルトリ細胞ならびにライディッヒ細胞に対する特異的な障害作用のメカニズムとして、細胞内情報伝達のカスケードが関与し、その結果、細胞内の膜構造に変化が生じたと考えられる。特に、培養液から DES を除いても TM4 の p38 のチロシンリン酸化が持続することは、新生仔期における DES 曝露の影響が精巣成熟後も持続することと関連すると考えられる。

DES 以外の内分泌攪乱化学物質候補を TM4 に添加した場合も、p38 のチロシンリン酸化の亢進が検出された。*in vivo* における作用と TM4 細胞の p38 のチロシンリン酸化の亢進とは現時点では必ずしも対応していないので、今後、p38 のチロシンリン酸化に対する各物質の濃度依存性を検討する必要がある。p38 の同定に関しては、細胞内情報伝達のカスケードとの関連から p38 MAP kinase との関連性に重点をおいて検討する予定である。

E. 結論

平成 12 年度選定のリスク評価優先 12 物質中でアルキルフェノール、トリブチルスズについて、齧歯類新生仔期に曝露した場合の精子形成に対する影響を検討した結果、明確な障害作用は検出できなかった。これに対し、平成 13 年度に新たにリスク評価の対照となった物質のうちビスフェノール A について齧歯類新生仔期に曝露した場合の精子形成に対する影響を検討した結果、精巣成熟後に精子細胞の形成障害が高頻度に検出された。この精子細胞形成障害は新生仔期におけるエストラジオールに対する曝露により引き起こされたものと高い類似性を示し、エストロジェン受容体を介したセルトリ細胞に対する作用であることが推測される。ビスフェノール A の障害作用はエストロジェン受容体に対する結合能から推測されるよりはるかに高いものであった。

培養細胞を用いた内分泌攪乱化学物質候補の作用機構解析を行い、セルトリ細胞株 TM4 において 38kD の蛋白質のチロシンリン酸化が特異的に亢進することを明らかにし、今後、作用機構をもとにした内分泌攪乱化学物質の検出、分類の可能性が示された。

Study on the molecular and cell biological mechanisms of defective spermatogenesis caused by endocrine disruptors

Shigeki Yuasa

Professor, Chiba University, Graduate School of Medicine, Department of Anatomy and Developmental Biology

Key Words: endocrine disruptors, estradiol, bisphenol A, DES, spermatogenesis, Sertoli cells, tyrosine phosphorylation

Abstract:

It has been suggested that the exposure to estrogenic substances during the testicular development has been considered as one of the causes of the defective spermatogenesis related to endocrine disruptors. However, the effect of estrogens on the testicular development has little been elucidated. In the present study, we have made it clear that administration of β -estradiol 3-benzoate or 17β -estradiol at the neonatal stage of rodents frequently causes the specific morphological abnormalities of spermatids such as acrosomal deformity, nuclear deformity and the defects in the adhesive structures between spermatids and Sertoli cells later at the stage of spermatogenic cell maturation. Based on the mechanisms of spermatogenic defects by these model chemicals, alkylphenol (nonylphenol, 4-octylphenol) with high affinity for estrogen receptor, tributyltin with low affinity, and bisphenol A which shows high affinity but has little information about the effect on spermatogenesis, were extensively examined in regard to the effects on the testicular development following neonatal exposure. It became clear that neither alkylphenol nor tributyltin

showed clear effect on the testicular development. In contrast, bisphenol A caused clear defects such as morphological abnormalities in the spermatids and also in the adhesion structures between spermatids and Sertoli cells later at the stage of spermatogenic maturation, similarly as observed in the case of β -estradiol 3-benzoate or 17β -estradiol administration. The limited period of bisphenol A-administration between postnatal day 5 to 11 was critical to these defects.

The effect of β -estradiol 3-benzoate, 17β -estradiol and bisphenol A was detected on the testicular developmental stage of germ cell maturation, and was different from the effect of diethylstilbestrol (DES) which has also strong estrogenic activity and cause the delay of the progression of meiosis. Specialized junctional complex of Sertoli cells was defective in all the cases of the administration of these chemicals, and at least one of the common point of action is considered to be directed to Sertoli cells, which support the overall process of spermatogenic cell differentiation. Furthermore, tamoxifen has both antagonistic and weak agonistic activity to estrogen receptor, and exhibited weak DES-like activity on the testicular development. Remarkably, combined administration of DES and tamoxifen at the low dose which shows little effect individually exhibited enhanced DES-like action and remarkably inhibited the development of Leydig cells.

A Sertoli cell line, TM4 exhibits morphological change and enhanced tyrosine phosphorylation of a specific protein with the molecular weight 38kD (p38) following the exposure to DES. Morphological change was recovered after withdrawal of DES, but the tyrosine phosphorylation of p38 continued even in the absence of DES. Furthermore, all of bisphenol A, estradiols, alkylphenol and tributyltin also enhanced tyrosine phosphorylation of p38.

Above findings suggested that many of the candidates of endocrine disruptors exert the influences on the development of spermatogenic cells through the action on the Sertoli cells. Each of these chemicals is considered to have specific harmful actions on the spermatogenic cells of various developmental stages according to various parameters such as estrogen receptor binding or actions on the various intracellular signal transduction systems in the downstream of receptor binding. It should be especially noticed that the combination of low dose of individual chemical occasionally exhibit cumulative effect and the harmful action is enhanced.

(2) フタル酸ジ 2 - エチルヘキシルの代謝の種差に関する検討

研究者 那須民江 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学教授)

研究要旨

フタル酸ジ 2 - エチルヘキシル(DEHP)の代謝の種差を検討するために、ラット、マウス、マーモセットの肝、肺、腎、小腸、および精巣の代謝酵素の発現および DEHP 投与による誘導を検討した。

- 1) Lipase-mRNA はマーモセットの肝以外の臓器において検出された。即ち、Lipase-mRNA の量と DEHP による誘導に種差が認められた。マーモセットの肝の量は検出限界以下であり、DEHP による誘導が観察されたのはラット肝のみであった。
- 2) MEHP のグルクロン酸抱合活性は検討した動物種の臓器では検出できなかった。UDPglucuronyltransferase 1A, 2B ファミリーの代表としてそれぞれ 1 - ナフトールとビスフェノール A を基質として活性測定を行った。これらの活性、DEHP による誘導性にも種差がみられた。特にビスフェノール A の活性はマーモセットにおいて高いことが注目された。DEHP 投与によりラットとマウス肝およびマーモセット腎における 1 - ナフトールの抱合活性が誘導された。
- 3) アルコール脱水素酵素(ADH)とアルデヒド脱水素酵素(ALDH)活性にも種差が認められた。ADH の活性はマーモセット肝において最も高かったが、DEHP による誘導はラット肝においてのみ観察された。ALDH の活性は基質により異なり、ラットあるいはマーモセットにおいて高かった。DEHP の影響を受けるのは低分子量のアルデヒドで、ラットとマウスの肝において観察された。
- 4) PPARalpha-mRNA 量にも種差がみられ、マーモセットの検討したすべての臓器において低い値が得られた。ラットの腎と小腸では DEHP 投与により mRNA 量は明らかに減少していた。

研究協力者

青山 俊文(信州大学医学部教授)

横田 博(酪農学園大学獣医学部助教授)

王 瑞生(独立行政法人産業医学総合研究所主任研究員)

山ノ下 理(信州大学医学部研究生)

A. 研究目的

di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP、CAS-No. 117-81-7) は *o*-フタル酸のジエステル化合物(分子量=390.56)で、主にポリビニルクロライド(PVC)製品の可塑性や弾力性を増強するために 10~60% (w/w)程度使用されている。加工性、経済性から、全可塑剤生産の約 8 割を占めている。

DEHP は体内に吸収されると、まずリパーゼにより加水分解され、モノエステル体(mono(2-ethylhexyl)phthalate、MEHP)となる。MEHPの一部はグルクロン酸抱合され、排泄するが、残りの部分は あるいは -1 酸化され、ジカルボン酸となり、 -酸化系にはいっていく。一方、DEHP の加水分解により生成した 2エチルヘキシルアルコール(2-EH)はアルコール脱水素酵素およびアルデヒド脱水素酵素の作用によりカルボン酸(主として 2 - エチルヘキサン酸、2-EHA)となる。

これら代謝物のモノおよびジカルボン酸は peroxisome proliferators-activated receptor alpha (PPARalpha)に配位し、その標的遺伝子発現にさまざまな影響を及ぼすことが、想定される。

過去に行われた研究において、DEHPの代謝に種差が認められることが明らかとなっている。例えば、霊長類ではMEHPのグルクロン酸抱合体が主な代謝物であるが、ラットではこの代謝物の排泄はほとんど認められず、マウスは霊長類とラットの間隔的な代謝物の排泄パターンを示す。またDEHPの毒性発現にはPPARalphaの関与が大きい、この転写活性化にも大きな種差がみられる。本研究においては、毒性発現と関わりの深いPPARalphaの誘導が単に発現量の差に起因するのか、それとも代謝動態の種差が関与しているか明らかにするために行われた。

B. 研究方法

1) 実験動物

動物実験はすべて信州大学中央実験動物施設の動物実験に関するガイドラインに従って行った。マーモセットの臓器は三菱化学安全科学研究所の倉田氏より供与された。3ヶ月齢のマーモセットを未処理群(コントロール)とDEHP投与群(100、500、2500mg/kg、経口投与)に分け、18ヶ月齢において解剖した。肝、腎、肺、小腸、精巣を敵出し、一部はRNA抽出用としてRNAlaterに保存し、残りは酵素活性測定のため使用まで-85℃で保存した。

マーモセット以外の実験動物に関しては、CD-1マウス(8週齢の雄)とSDラット(8週齢の雄)を使用した。12匹のマウスと10匹のラットを2群に分け、コントロール(コーン油のみ投与)、DEHP(2.5mmol/kg)投与群とした。コーン油およびDEHPを毎日、14日間投与し、最終投与から16時間後に解剖して、測定臓器(肝、腎、肺、血清、精巣)を採取した。

2) RNAの単離、及びcDNAの合成

肝、腎、肺、小腸の一部はQIAGEN社製RNAlaterに浸し、単離するまで-20℃で保存した。RNAはQIAGEN社製Rneasy Mini KitにQIAGEN社製Rnase-Free Dnase setを付け加え、DNA freeのRNAを単離した。cDNAの合成はInvitrogen life technology社製SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kitを使い、Oligo(dT)₁₂₋₁₈プライマーで合成した。

3) Lipase 及び PPARalpha mRNA の定量

プライマー、プローブの作成は下記GIナンバーの塩基配列を参考に、またマーモセットに関してはマウスとヒトの共通な配列からmRNAの一部分の配列を読みとり、その配列を基にしてPE Biosystems社製Primer Express version 1.0で作成した。ラットとマウスのGAPDHはPE Biosystems社製を使用した。

LipaseはPE Biosystems社製SYBR green PCR Master Mixを使用し、SYBR Green Iの蛍光で測定した。PPAR-alphaとGAPDHはPE Biosystems社製TaqMan Universal PCR Master Mixを使用し、TaqMan probeで測定した。プライマー濃度は100nM、プローブ濃度は200nMでPCRを行った。

PPAR-alphaのTaqMan probeは全て蛍光物質としてFAM,消光剤としてTAMURAを付けた。GAPDHのTaqMan probeは全て蛍光物質としてVIC,消光剤としてTAMURAを付けた。

Quantitative real time-PCRはPE Biosystems社製 ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systemで行った。各測定物質はそれぞれのアンプリコンを Romega社製 pGEM -T Easy vector 又は Invitrogen life technology社製 pCR2.1 vector に組み込み、標準品とした。使用したRNA量は、動物種を問わず、肝 2.6ng、小腸 8.6ng、腎臓 7.6ng、肺 3.0ng、精巣 2.0ngであった。解析した数値は GAPDH に対する比として表した。DEHP 投与の影響は、コントロール群の lipase または PPARalpha/GAPDH を 100 として、その比率で表した。

Lipase

ラット GI 6981167

CTGAAAGTGAGAACATTCCCTTCA
CCGTGTAAATCAAGAAGGAGTAGGTT

マウス GI 6678709

TGGATGAGCGACTCCTACTTCA
CGGATCCTCTCGATGACGAA

マーモセット

CCATGGCTGGACGGTAACA
AGCCAGTCCACCACGATGA

PPARalpha

ラット GI 6981381

ATGGAGTCCACGCATGTGAAG
ACGCCAGCTTTAGCCGAAT

Taq Man probe

CTGCAAGGGCTTCTTTCGGCGAAC

マウス GI 7106384

TTTCCCTGTTTGTGGCTGCTA
CCCTCCTGCAACTTCTCAATG

Taq Man probe

AATTTGCTGTGGAGATCGGCCTGG

マーモセット

CCTGAAAAGCCTGAGGAAACC
TGAACTTCATGGCAAAAAGCAA

Taq Man probe

TTCTGCGACATCATGGAGCCCAAG

GAPDH

ラット、マウス

PE Biosystems 社製 TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents を使用

マーモセット

TGGTGATGGGATTTCCATTGA
ATGATTCCACCCATGGCAAA

Taq Man probe

CCCGTTCTCAGCCTTGACAGTGCC

4) ライディッヒ細胞の分離と精製

マウスとラットから精巢を摘出し、EBSS (Earle's Balanced Salt Solution, Sigma)にて洗浄後、被膜を除去した。その後、collagenase (Wako, 1mg/ml), hyaluronidase (Sigma, 1mg/ml), BSA (Sigma, 1mg/ml)を含む 25mM HEPES buffer (Naquarai.; 20ml)にて震盪 (20min; 80cycle/min; 34°C)し、細胞を分散させた。この細胞分散液を 0.07%BSA を含んだ EBSS で 40ml に希釈し、5分間静置し、その上清を遠心 (250 × g; 5min)して沈澱を得た。これを 0.07%BSA を含んだ EBSS 3ml で希釈し、Percoll を用いた密度勾配遠心分離 (800 × g; 20min)を行った。2匹あるいは3匹のマウスから摘出された精巢を EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) 5-50%の濃度付近 (density 1.050-1.070g/ml) に層状に分離された細胞を採取し、3- β -hydroxysteroid dehydrogenase による組織染 (Steinberger; 1966)を行ったところ、およそ 80% が 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase 陽性であり、これらがライディッヒ細胞であることを確認した。その後、RNA later 液で分析時まで保存した。

5) グルクロン酸抱合活性の測定

所定の方法でマイクロソーム分画を調製し、酵素源として使用した。MEHP のグルクロン酸抱合活性は Sjöberg らの方法 (Biochem Pharmacol 1991, 41, 1493-1496) に基づき HPLC を用いて行った。UDPglucuronyltransferase 1A の基質として 1-ナフトール (1NA) を、UDPglucuronyltransferase 2B の基質としてビスフェノール A (BPA) を用い、グルクロン酸抱合活性は、標準グルクロナイドを用いて HPLC で測定した (Biochem. Journal 1999, 340, 405-409)。

6) ADH と ALDH の測定

ミトコンドリアとポストミトコンドリアの分画：肝臓組織に 4 倍容量の緩衝液 (0.25 M sucrose-50 mM Tris, pH 7.40, 0.1 mM DTT) を加えてホモジネイトした。800g × 15 分間遠心して、核やデブリを取り除いた後、さらに 12,000g × 15 分間遠心し、ミトコンドリア分画を沈殿させた。上清を再度遠心し、残存のミトコンドリアを回収した。ミトコンドリア分画を緩衝液に再浮遊させ、遠心して再沈殿させた後、組織重量の 1 容量の緩衝液に浮遊させ、0 において 10 秒間、3 回超音波粉碎した。サンプルのタンパク質定量は Bradford 法を用いて行った。ミトコンドリアとポストミトコンドリア分画は使用するまで -80 °C で保存した。

ADH 活性測定：1ml の反応液に 180 mM グリシン-60 mM ピロリン酸緩衝液 (pH9.0), 1 mM semicarbazide, 1 mM GSH, 1 mM NAD⁺, および酵素源であるポストミトコンドリア分画 (約 100 mg のタンパク質) を入れて、37 °C、3 分間プレインキュベーションした。基質 (10mM 2-ethylhexanol (2-EH)、または 2-phenoxyethanol (2-POET)) を添加することによって反応を開始させた。340 nm における吸光度増加を 90 秒間記録し、 $\epsilon=6220\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて NADH の単位時間当たりの生成量を算出した。

ALDH 活性測定：1ml の反応液に 70 mM ピロリン酸緩衝液 (pH8.5), 1 mM pyrazole, 1 mM NAD⁺, および酵素源であるミトコンドリア、またはポストミトコンドリア分画 (約 100 mg のタンパク質) を入れ、3 分間プレインキュベーションした後、基質 (10 mM 2-ethylhexanal、または 3-phenylpropionaldehyde) を添加することによって反応を開始させた。340 nm における吸光度増加

を 120 秒間記録し、 $e=6220\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ を用いて NADH の単位時間当たりの生成量を算出した。反応温度はミトコンドリア分画の場合 37、ポストミトコンドリア分画の場合 25 を用いた。

C. 結果

1) ラット、マウスの体重・臓器重量

表 1 にラット、マウスおよびマーモセットの体重および臓器重量を示す。用いた実験動物において、DEHP 投与による体重の増加への影響は認められなかった。マーモセットにおいては、DEHP 投与による臓器重量の変化も認められなかった。ラットおよびマウスにおいて、DEHP 投与は腎臓および精巣重量への影響を与えなかったが、肝重量および肝/体重比を増加させた。DEHP による肝重量の増加は、マウスの場合 1.30 倍、ラットの場合 1.53 倍で、マウスよりラットへの影響が強かった。

2) リパーゼ

コントロール群の各臓器における lipase mRNA 量を 100% として DEHP 群の lipase-mRNA 量を算出した(図 1)。マウスの場合、肝において lipase-mRNA 量が増加する傾向を示したが、有意差は認められなかった。しかし DEHP 処理によりマウスの肝臓重量が著しく増加しているため、肝臓当たりでは増加していることが推測される。

ラットにおいては DEHP 投与により肝臓の lipase-mRNA 量は明らかに増加していた。ラットの肝臓重量もマウスと同様 DEHP 投与により増加したため、肝臓当たりの lipase-mRNA 量はさらなる増加していることが推測される。一方、腎臓における lipase-mRNA 量は DEHP 処理により減少した。肺、小腸の lipase-mRNA 量は DEHP 処理による影響は受けなかった。

マーモセットの場合、肝における lipase-mRNA 量はほとんど検出されず、DEHP 投与の影響も受けなかった。腎臓、肺、小腸では lipase-mRNA 量は検出された。DEHP 処理により 100mg/kg 投与群の肺のリパーゼ mRNA 量は増加したが、量-反応関係は認められなかった。腎および小腸の lipase-mRNA 量は DEHP 処理の影響を受けなかった。

3) MEHP のグルクロン酸抱合

すべての動物(ラット・マウス・マーモセット)臓器マイクロゾームにおいて、MEHP のグルクロン酸抱合活性は検出されなかった。

1NA を基質として用いた場合:

コントロールの動物におけるグルクロン酸抱合活性は、ラット>マーモセット=マウスであった(図 2、 $p < 0.05$)。マウスにおいては 1NA のグルクロン酸抱合活性は肝=肺>腎=小腸であった。ラットでは腎=肝>肺=小腸で、肺と腎における 1NA のグルクロン酸抱合酵素活性におおきな種差が存在することが推測された。マーモセットにおいては 1NA のグルクロン酸抱合活性は、肝>腎>小腸であり、ラットと類似していた。

ラットとマウスの肝臓においては DEHP 投与によりグルクロン酸抱合酵素の誘導が確認された(それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$)。しかしその他のラットおよびマウスの臓器(腎・肺・小腸)では、活性は検出されたが、活性変動は認められなかった。マーモセットの肝における 1NA のグルクロン酸抱合活性は、DEHP の投与の増加に従い低下する傾向が、腎においては上昇する傾向が認められた。一方、小腸における活性は DEHP 投与の影響を受けなかった。

BPA を基質として用いた場合：

ラットとマウスの肺、マーモセットの腎と肺では BPA のグルクロン酸抱合活性は検出されなかった。BPA のグルクロン酸抱合活性はマーモセットの肝が最も高く、次いでマウス、ラットの順であった。臓器別でみると、すべての動物種において肝臓における活性が高く、他の臓器での活性は低かった。1NA と異なり、BPA のグルクロン酸縫合活性は DEHP 処理の影響を受けなかった。

4) ADH の活性

DEHP の中間代謝物である 2-EH を基質とする ADH 活性は 3 種類の動物種の肝のミトコンドリアにおいて検出されたが、ラットにおいてのみ、DEHP 投与によって、有意に亢進した (Table 2)。動物間で比較すると、その活性はマーモセット > マウス > ラットであった。2-POET を基質とした場合、マウスとラットでは、活性がほとんど検出されなかった。一方、マーモセットでは明らかに検出されたが、いずれの DEHP 投与量群においても有意な変動がなかった。

5) ALDH の活性

Table 3 はミトコンドリアにおける ALDH の活性を示す。2-ethylhexanal を基質とした場合、活性はラット > マーモセット > マウスの順であった。DEHP 処理の影響を受けたのはマウスのみであった。3-phenylpropionaldehyde を基質とした場合、活性はマーモセット > ラット > マウスの順であった。この気質の場合、どの動物種においても DEHP 処理の影響を受けなかった。

ポストミトコンドリアにおいては、2-ethylhexanal の ALDH 活性はマーモセット = ラット > マウスで、3-phenylpropionaldehyde の ALDH 活性はマーモセット > ラット > マウスであった。どちらの基質も用いた場合においても、DEHP の処理により活性の上昇がみられたのはマウスのみであった。

6) PPARalpha-mRNA

図 3 はラット、マウス、マーモセットの肝、腎、肺、小腸の PPARalpha-mRNA を示す。数値はコントロール群の各臓器を 100% として示した。マウスとラット肝において、DEHP 投与により PPARalpha-mRNA が増加傾向を示した。マウスとラットの肝重量が増加 (ラットで 1.53 倍、マウスで 1.30 倍) しているので、肝当たりの PPARalpha-mRNA はかなり増加しているかもしれない。ラットの腎と小腸においては、DEHP 処理により PPARalpha-mRNA は減少していた。マーモセットにおいては、肝と腎の PPARalpha-mRNA は DEHP 投与により増加する傾向がみられたのみであった。

7) 精巣ライディッヒ細胞の PPARalpha-mRNA

検討した 3 種の動物の精巣における PPARalpha-mRNA は DEHP 投与の影響は認められなかった。

D. 考察

1)リパーゼ

これまでの研究によると、小腸における lipase 活性はマウス>ラット>>>マーモセットと報告されている。図 1 ではントロール群のリパーゼ mRNA を 100%として、DEHP 群の値を算出した。今、測定された lipase-mRNA/GAPDH 値が真の臓器における数値を反映すると仮定すると、マウス(0.2140)、ラット(0.1188)、マーモセット(0.0020)で、既報の結果と一致する。測定された lipase-mRNA 量は lipase の活性を反映するかもしれない。また同様の方法で臓器間の lipase-mRNA 量を比較すると、マウスの場合、肺(8.2108)、腎(7.4351)、肝(1.4752)、小腸(0.2140)、ラットの場合、肺(4.9841)、腎(0.2517)、肝(0.2407)、小腸(0.1188)、マーモセットの場合、肺(0.0033)、腎(0.0049)、肝(ほとんど検出されず)、小腸(0.0020)であり、肺と腎における lipase-mRNA 量が多いのが注目される。従って、検討したどの動物種においても吸収経路により加水分解される割合がかなり異なってくることが予想される。ラットやマウスの場合、経気道曝露の方が経口摂取された場合よりも加水分解されやすいかもしれない。しかしマーモセットの場合は両曝露経路の間に加水分解され易さの差は認められないかもしれない。DEHP 投与により、ラット肝の lipase-mRNA が約3倍に誘導されていたので、DEHP 投与ラットでは肝の lipase 活性も誘導されているかもしれない。これらの考察は、測定された lipase-mRNA 量が DEHP から MEHP への加水分解速度を反映する場合にのみ妥当となる。従って、今後 DEHP を基質として、in vitro で lipase 活性を測定することによって、加水分解の種差を論じる必要がある。これに関しては、現在進行中である。

2)MEHP のグルクロン酸抱合

MEHP のグルクロン酸抱合活性はいずれの動物種においても検出できなかった。これまでの経験から、測定条件等に問題はないと思われるので、検出感度以下の活性しかないと思われるが、in vitro の条件を無視できる肝灌流法(Drug Metb. Disp. 2001,29, 1084-1087)での臓器レベルでの抱合活性の測定を検討する必要がある。DBP のモノエステル体である MBP では活性がみられることが報告されているので、このような MEHP 以外のフタル酸モノエステルの活性測定で検討する必要もある。

一方、1NA や BPA を基質とした場合、多くの臓器で活性が認められた。1NA と BPA の抱合活性はそれぞれ UDPglucuronyltransferase 1A と 2B ファミリーのアイソザイムの発現量を反映する。マウスの肺を除けば、肺と小腸における UDPglucuronyltransferase 1A と 2Bf の発現は低いことが予想される。このことは経口的あるいは経気道的に吸収された DEHP がマウスの肺を除いたこれらの部位で lipase により加水分解されても、同じ部位でグルクロン酸抱合される割合は低いことを意味する。興味深いのは、マーモセット肝における UDPglucuronyltransferase 2B ファミリーの発現量がラットやマウスよりはるかに多いことが予想される点である。今回は確認することができなかったが、もし DEHP のグルクロン酸抱合がこの 2B ファミリーによる場合は、グルクロン酸抱合活性に大きな種差が認められることになる。

DEHP 投与でネズミ(ラット・マウス)では肝の UDPglucuronyltransferase 活性の誘導が観察されたが、マーモセットではその逆に抑制傾向が観察された。これは、種による影響の違いを示しており、特に抑制傾向は本当にあるのか再度検討する必要がある。なぜなら、UGT 全般の機能(両基質の活性は全体を代表している)の抑制は薬物の解毒機能の低下を意味しているからである。しかし、大量投与ではじめて顕著な差が出るので、少量投与の場合は問題ないと思われる。

3) ADH, ALDH

DEHP の代謝において、ADH と ALDH は加水分解により生成した MEHP と 2 - EH の両代謝経路の反応に関わっている。MEHP の中間代謝物のアルコール標準品がなかったため、2 - POEH で代表させた。ADH の活性は脂肪族のアルコール(2 - EH)が基質の場合も、芳香族アルコール(2 - POEH)が基質の場合もマーモセットにおいて最も高かった。特に、後者の場合、ラットやマウスでは活性は検出されなかった。従って、生成したアルコール中間代謝物の代謝活性はネズミの様な小動物よりも霊長類の方が高いと思われる。

多くの ALDH 酵素分子種はミトコンドリアや細胞質などに存在して、それぞれ異なるアルデヒドに対して、親和性を持っている。ミトコンドリアでは、DEHP の中間代謝物である 2-ethylhexanal に対して、いずれの動物種も活性を示したが、ラットにおいて、最も高く、マウスにおいては最も低く、マーモセットは中間であった。ADH の場合と同様に、MEHP からのアルデヒド中間代謝物の標準品がないため、2-phenoxyethanal で代表させた。この場合も 2-ethylhexanal に対する ALDH 活性と類似した傾向が見られた。以上をまとめると、DEHP 代謝経路における ADH,ALDH の活性はマウスにおいてはラットやマーモセットより低いといえよう。

4) PPARalpha

DEHP 自身は PPARalpha のリガンドとはならない。代謝物の MEHP やその代謝物のジカルボン酸、あるいは加水分解産物の 2EH の代謝物のカルボン酸(2EHA) がリガンドとなるため、PPARalpha の誘導はその発現量のみならず DEHP の代謝が深く関与していると思われる。Lipase の場合と同様に PPARalpha/GAPDH の比が真の mRNA の値を反映すると仮定すると、ラットとマウスは肝において最も多く、ついで腎であった。しかしマーモセットにおける PPARalpha-mRNA はラットやマウスよりはるかに低く、また、肝と腎における RNA 量は同程度であった。これは既報の研究結果と一致する。PPARalpha の誘導の傾向がマウスとラット肝においてのみ観察された。PPARalpha の標的遺伝子の一つである CYP4A はラットとマウス肝において誘導されており、DEHP 投与による PPARalpha の転写活性化が生じていることは確かであろう。

E. 結論

DEHP の代謝には種差がみられる。DEHP の様々な毒性は核内受容体の PPARalpha に依存している場合が多く、この誘導性が問題視されている。マーモセットの PPARalpha の発現はラットやマウスよりも遥かに少ないことが mRNA の解析から予想される。標的遺伝子の CYP4A からみると、誘導性はマウスとラットの肝において明らかに観察された。PPARalpha の誘導は DEHP ではなく、MEHP 等の代謝物による。従って、PPARalpha の誘導には、この発現量の差のみならず、lipase をはじめとする DEHP の代謝酵素の種差も関連しているかもしれない。ヒトの DEHP の代謝がマーモセットに類似している場合、ラットやマウスのデータからのリスク評価に注意が必要である。現在、DEHP の最初の代謝である lipase による加水分解速度の種差を検討しているので、最終的にこのデータも含めて、DEHP 代謝の種差を論じたい。

F. 研究発表

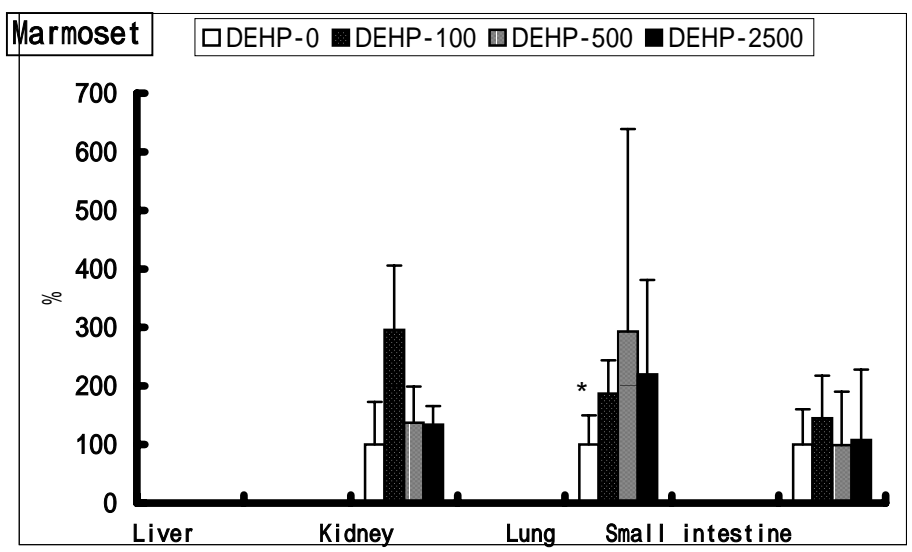
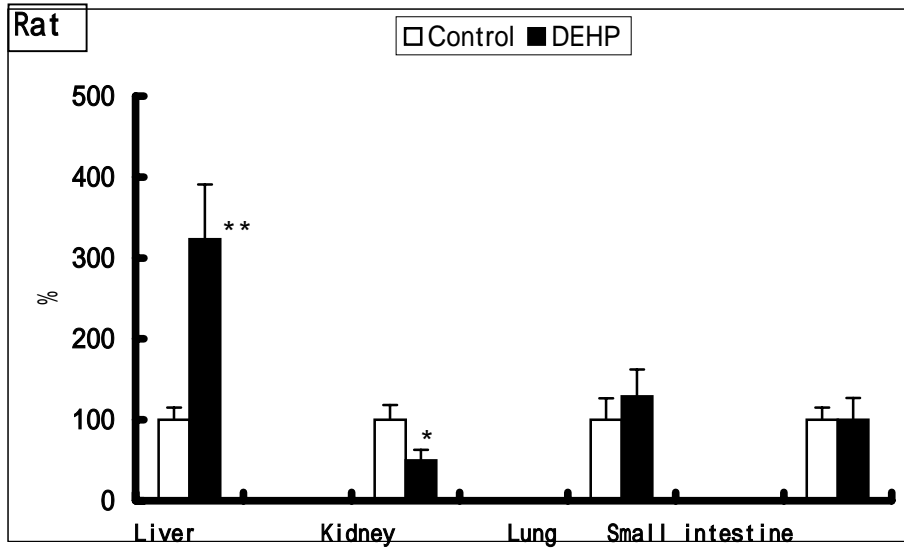
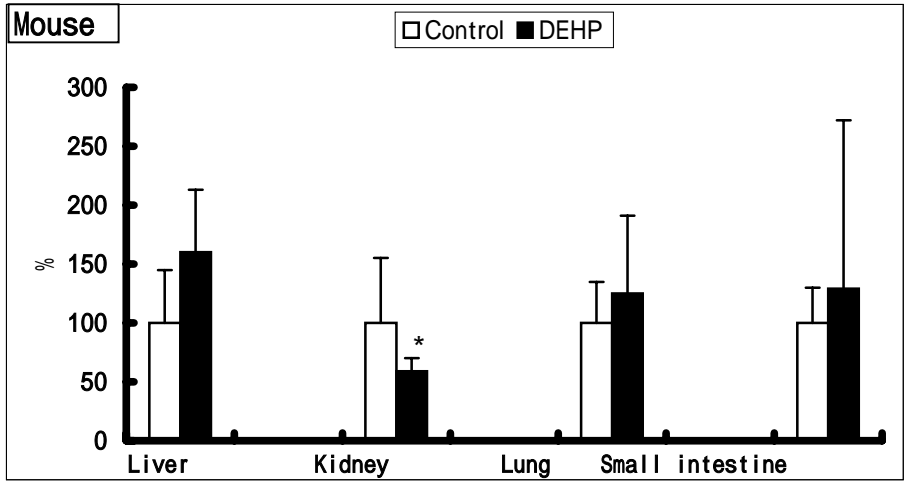
1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

Lipase-mRNA



☒ 1 lipase-mRN

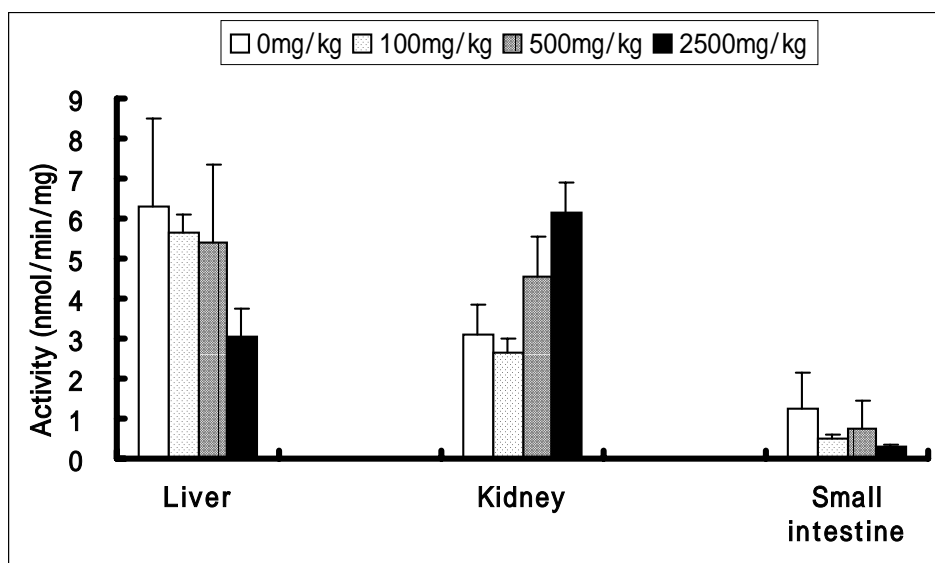
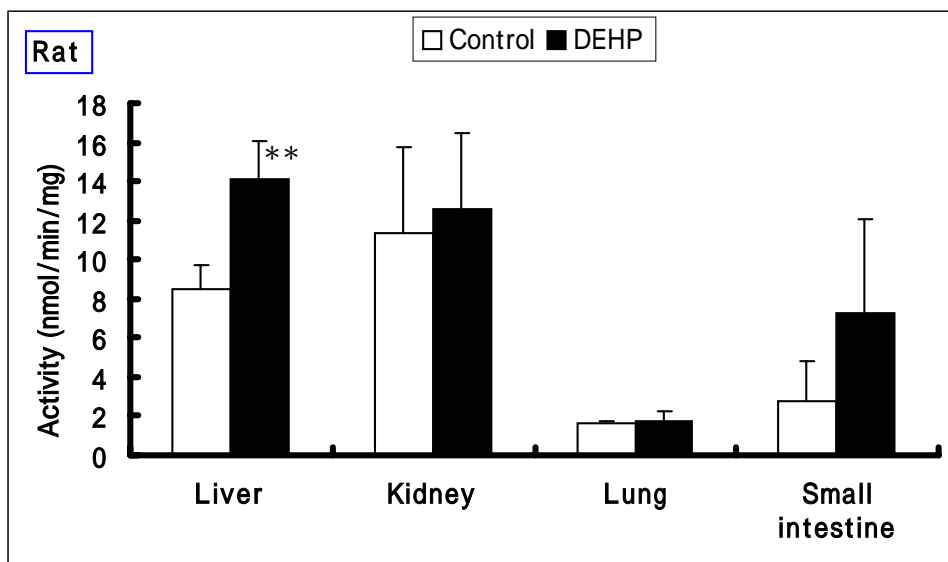
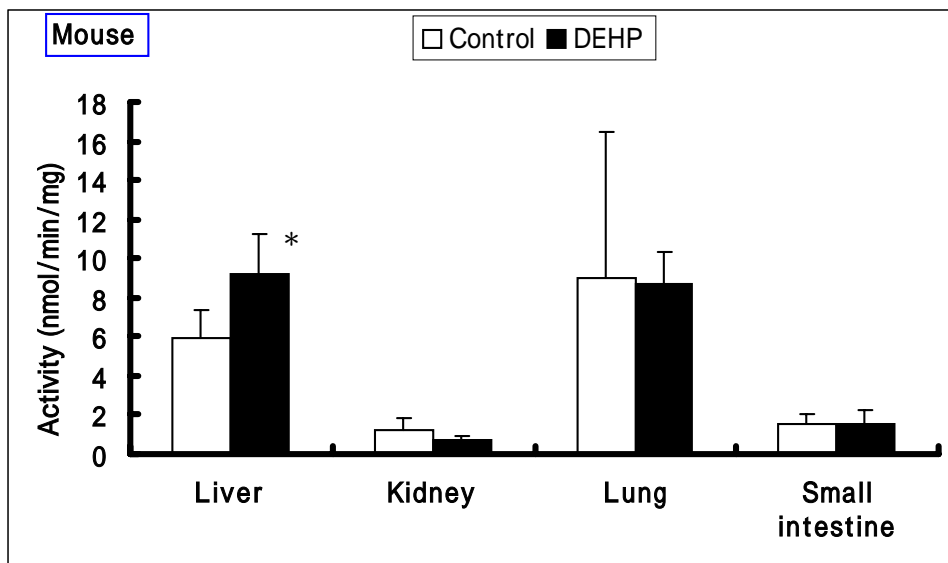


図2 1 - ナフトールの抱合活性

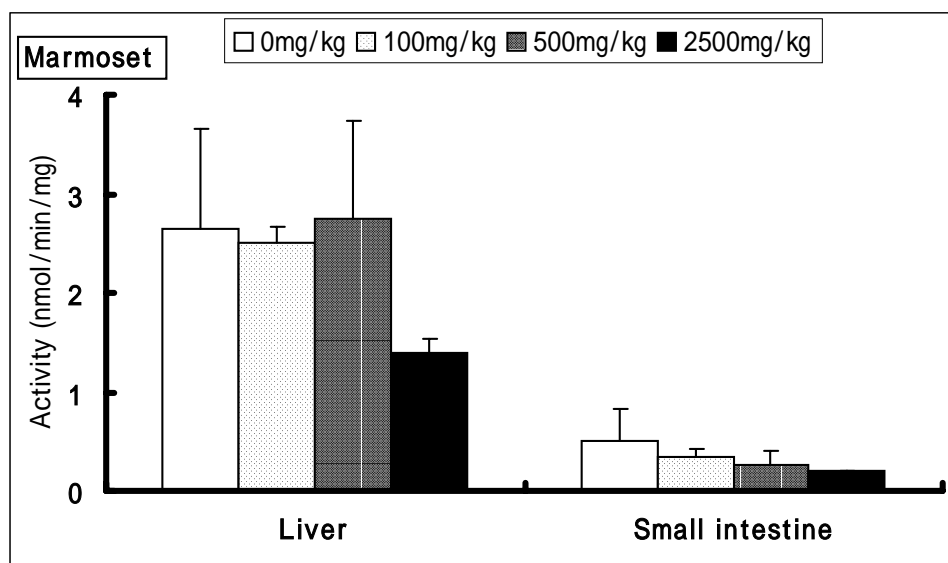
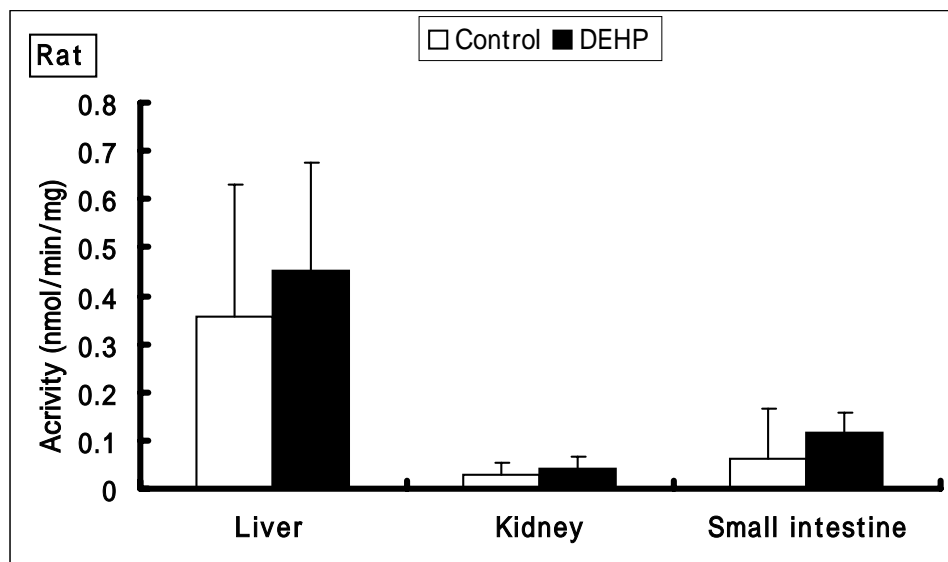
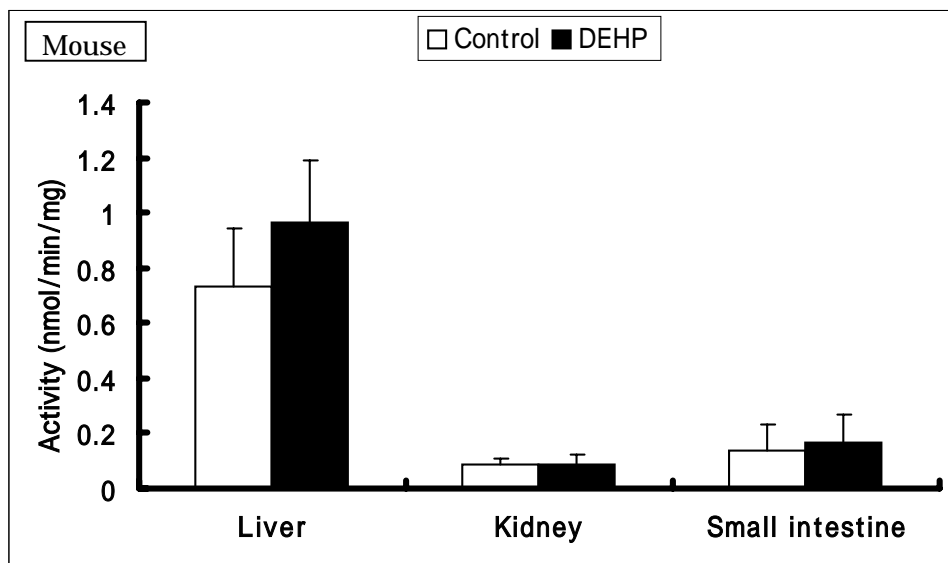
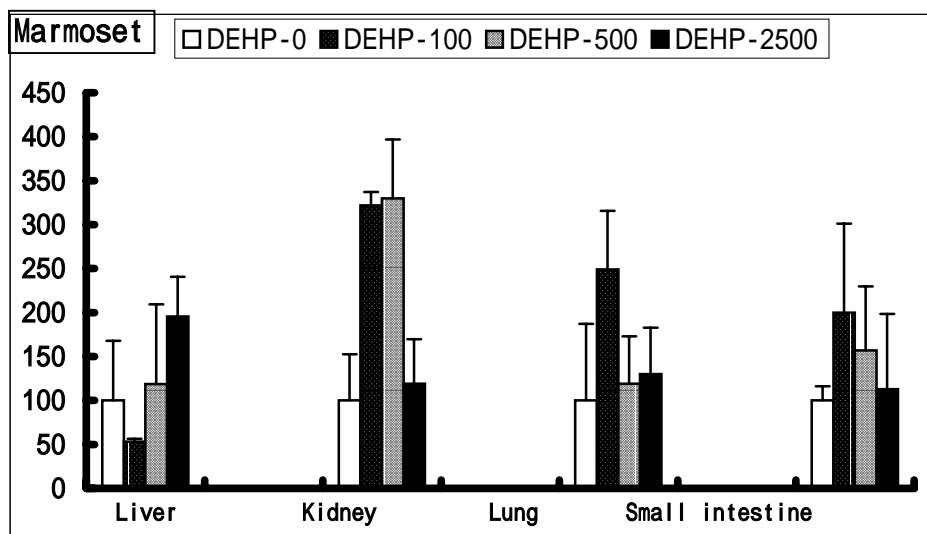
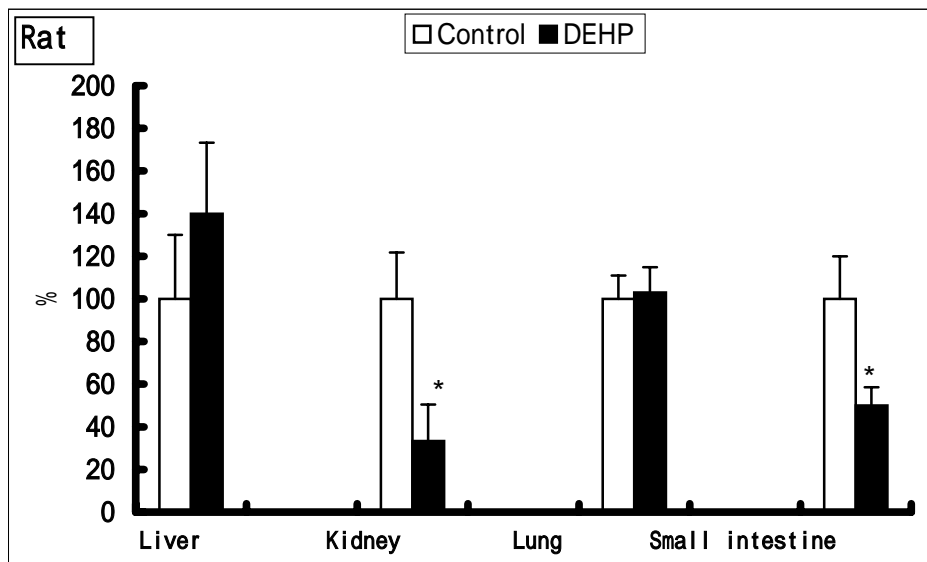
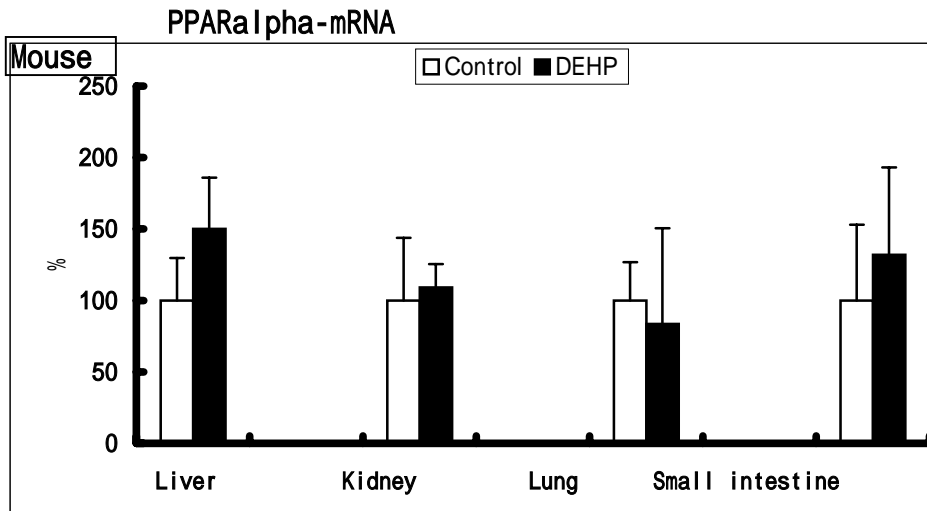


図3 ビスフェノールAの抱合活性



☒ 4 PPARalpha-mRNA

Differences among mouse, rat and marmoset in the metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate in several organs

Tamie Nasu-Nakajima, Nagoya University Graduate School of Medicine, Professor

Key words: di(2-ethylhexyl)phthalate, mouse, rat, marmoset, lipase, UDP-glucuronyltransferase, alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, PPARalpha

Abstract:

Differences among mouse, rat and marmoset in the metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate in liver, kidney, lung, small intestine or testis were investigated.

- 1) Lipase-mRNA was detected in all organs except in liver from marmoset: clear differences were seen in the content and induction by DEHP among species; the content in liver from marmoset was under detection limit; the induction by DEHP was seen only in the liver from rat.
- 2) The activity of UDP-glucuronyltransferases (UGT) were detected several organs when used 1-naphthol, model substrate of UGT 1A family, and bisphenol A, model substrate of UGT 2B family, but not mono(2-ethylhexyl)phthalate. Species differences were also seen in the activity and induction of UGT by DEHP. The activity of bisphenol A was highest in liver from marmoset. DEHP induced UGT activity for 1-naphthol only in liver from mouse and rat.
- 3) Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activities were also different among species. ADH activity was highest in liver from marmoset; the induction by DEHP was only seen in the liver from rat. Substrate-dependent species differences were seen in the activity of ALDH: ALDH activity was higher in liver from rat or marmoset than that from mouse; the induction by DEHP was seen in liver from rat and mouse when used low molecular aldehyde as a substrate.
- 4) Peroxisome proliferators-activated receptor alpha (PPARalpha) level was different among species: the content was lowest in all organs from marmoset. The induction by DEHP treatment was seen only in the liver from mice and rats.