

平成14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15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 .....	1
-3 . 指定研究結果 .....	4
( 1 ) 甲殻類 ( ミジンコ ) に及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 .....	5
( 2 ) 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 .....	1 4
( 3 ) 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 .....	3 0
( 4 ) 内分泌攪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 5
( 5 ) 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 9
( 6 ) TBT によるラット妊娠初期胚の着床不全のメカニズムと生存胚における 生殖細胞での突然変異誘発の可能性に関する研究 .....	7 3
( 7 ) 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 .....	9 6
-4 . 平成 13 年度研究結果の評価 .....	1 2 2

## ・ 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、各研究班毎に、以下 -1.の指定研究を実施した。

### -1. 指定研究

- ( 1 ) 甲殻類 ( ミジンコ ) に及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 ) 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
- ( 3 ) 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
- ( 4 ) 内分泌攪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
- ( 5 ) 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
- ( 6 ) TBT によるラット妊娠初期杯の着床不全のメカニズムと生存杯における生殖細胞での突然変異誘発の可能性に関する研究
- ( 7 ) 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

### -2. 業務担当者一覧

- ( 1 ) 甲殻類 ( ミジンコ ) に及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  
鑑迫 典久 ( 独立行政法人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 )  
曾根 宏明 ( 岡崎国立共同研究機構非常勤研究員 )
- ( 2 ) 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生命情報環境科学専攻  
微生物動態学分野助教授 )
  - 研究協力者  
今川 正良 ( 名古屋市立大学薬学部教授 )

( 3 ) 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生体化学分野教授)

研究協力者

今岡 進 (関西学院大学理工学部教授)

廣井 豊子 (大阪市立大学大学院医学研究科講師)

( 4 ) 内分泌攪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研究科環境労働衛生学教授)

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助教授)

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講師)

山田 哲也 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)

系原誠一郎 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)

古橋 功一 (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 (信州大学医学部社会予防医学)

( 5 ) 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教授)

研究協力者

佐田 文宏 (北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野講師)

玉置 淳子 (北海道大学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助手)

( 6 ) TBT によるラット妊娠初期杯の着床不全のメカニズムと生存杯における生殖細胞での突然変異誘発の可能性に関する研究

主任研究者

鈴木 勝士 (日本獣医畜産大学獣医畜産学部教授)

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)

( 7 ) 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

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）

足立 哲也（千葉大学大学院医学研究院環境生命医学助手）

深田 秀樹（千葉大学大学院医学研究院環境生命医学助手）

### -3. 指定研究結果

## (1) 甲殻類(ミジンコ)に及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

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)

### 研究要旨

甲殻類は地球上の生物において大部分を占めているにもかかわらず、その知見は限られている。内分泌攪乱化学物質影響を生態系全体で捉えた場合、甲殻類への影響を考慮する必要があるが、甲殻類の内分泌系は脊椎動物とは大きく異なっており現在までの知見から類推することは困難である。本研究では、生態系においても重要な位置を占めているミジンコをモデルとしてその内分泌攪乱物質の評価と作用メカニズムを解明することを目的としている。この目的のために、ミジンコの化学物質に対する感受性を増殖試験を中心に解析すると同時に、ほとんど知見のなかったミジンコの遺伝子の解析を行った。さらに化学物質により発現が変動する遺伝子についての予備的な解析を行った。

### 研究者協力者

鑑迫 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)

曾根 宏明(岡崎国立共同研究機構非常勤研究員)

### A. 研究目的

地球上に生息する生物のうち95%が無脊椎動物と言われ、その中の大部分を甲殻類が占めていることから、甲殻類の研究とその保護は地球上の生命環境の維持と密接に結びついている。ところが、内分泌攪乱化学物質影響については、広範な生物種における影響が懸念されているにもかかわらず、甲殻類についてはほとんど研究がなされていないのが現状である。甲殻類の内分泌系は脊椎動物のそれと大きく異なることから、脊椎動物を対象としたリスク評価により影響が無いとされた化学物質が甲殻類において重篤な影響を及ぼし生態系を乱す可能性がある。従って、生態系全体を考慮した場合には脊椎動物に偏らない評価が必要であり、この点からも甲殻類を対象としたリスク評価系の確立とそのメカニズムの解明は急務である。特に水棲甲殻類の一つであるミジンコは食物連鎖の下位に位置することから、生態系全体を保護し環境を維持する観点から重要である。本研究では、ミジンコを用いた内分泌攪乱化学物質影響を評価する系を確立し、その作用メカニズムを遺伝子レベルから解明することを目的とする。

### B. 研究方法

環境省が選定した優先してリスク評価に取り組む化学物質の内分泌攪乱作用の作用メカニズムを解明するために、ミジンコをモデル動物とし主に影響評価と遺伝子解析の両面からの解析を行う。これにより、最終的に遺伝子レベルからの内分泌攪乱作用の作用メカニズムの解明を目指す。

#### 1. 化学物質からのアプローチ

ミジンコにおける化学物質の内分泌攪乱影響評価を繁殖阻害試験にもとづいて行った。研究材料

としては、比較的広く使用されているダフニアマグナ (*Daphnia magna*) を用いた。試験温度  $24 \pm 1$  または  $21 \pm 1$ 、 $1 \text{ pH}7 \pm 0.5$ 、半止水式、週 3 回換水の条件下で試験を行った。飼育水は活性炭でろ過したものを、100m l の容器に 80m l の水を用いて飼育した。水の硬度は 80mg/L、溶存酸素濃度は 80-90% であった。エサはクロレラを用い、一日当りおよそ  $2 \times 10^7$  のクロレラを与えた。ダフニアマグナの発生 24 時間後から内分泌攪乱を疑われる化学物質に曝露し、約 10 日後から産まれる仔虫の数をカウントした。給餌、換水、観察を続け、21 日後にそれまでの全産仔数、脱皮数を統計処理した。コントロールと有意差が生じた濃度を影響濃度 (LOEC) とする。これらの影響について脱皮ホルモンや幼若ホルモン影響と比較検討した。

暴露試験では、環境省のリスク評価に関する 20 物質の中から代表的な化学物質について繁殖阻害影響などについて評価した。試験法は OECD テストガイドラインの TG 211 に従って行った。一つの濃度あたり通常 10 回の反復実験を行い、6 濃度について実験を行った。環境省が指定した優先してリスク評価に取り組む物質の中から、ノニルフェノール、ビスフェノール A、トリブチルスズ、オクタクロロスチレンについて、ミジンコの繁殖阻害試験を行った。コントロールと有意差が生じた濃度を影響濃度とした。また甲殻類における主たるホルモンである脱皮ホルモンや幼若ホルモンが繁殖におよぼす影響を評価するために、環境省のリスク評価に関する 20 物質以外の化学物質としてダフニアマグナを脱皮ホルモンや幼若ホルモン (フェノキシカルブ、ピリプロキシフェン、エクダイソン) 添加した水環境中で生育させ、繁殖と用量の関係についても明らかにした。

## 2. 遺伝子からのアプローチ

GenBank に登録されている *Daphnia magna* の遺伝子のうち、タンパク質をコードしているものはわずかに 6 種類にすぎない。そこで、まずホルモンレセプターや代謝メカニズム解明のための基盤となる遺伝子情報の取得を行った。

具体的には、下記の手順でダフニアマグナで発現している遺伝子の EST 情報を取得した。ダフニアマグナから mRNA を調整し、cDNA ライブラリーを作製する。ライブラリー作製には、cDNA の方向をそろえるために、ファージ由来の ZAP II をベクターとして用いた。従来の遺伝子情報が極端に少ないことから、まずライブラリーから任意に選択したクローンの遺伝子配列を解析することにより、ダフニアマグナに関する遺伝子情報を取得した。この配列解析に関しては 3000 程の遺伝子に関して行った。

解析した遺伝子情報から、発現している遺伝子の概要を把握するとともに、近縁種との遺伝子配列の比較を行うことにより、遺伝子レベルでの解明の基盤を構築する。これらの情報は、ダフニアマグナのホルモンレセプターの解析や内分泌攪乱化学物質による遺伝子発現変化の解析のための基礎的な情報として利用する。

(倫理面への配慮) 研究に用いる動物の種類上、倫理面に問題は生じない。

## C. 研究結果

### 1. 化学物質からのアプローチ

幼若ホルモンのアナログであるフェノキシカルブやエクダイソンを飼育水中に添加し、増殖試験を行った。その結果、フェノキシカルブ、ピリプロキシフェン、エクダイソンは、ppt のオーダー

ーで増殖に影響を及ぼすことが明らかになった(図1)。

一方、ノニルフェノールは300 ppbまでの濃度範囲ではほとんど増殖に影響はなく、ビスフェノールAは10 ppmの高濃度において増殖阻害がおきることが明らかになった。この阻害濃度は、幼若ホルモンやそのアナログが影響を及ぼす濃度とは非常に離れていた(図1)。脊椎動物に対してエストロゲン作用を有すると考えられているこれらの化学物質の影響は数百 ppb から ppmの濃度で見られるが、この作用機構については不明であり、今後解析を行う必要がある。またさらに優先してリスク評価に取り組む化学物質の影響を明らかにしていく必要がある。

## 2. ミジンコの遺伝子情報の解明

ダフニアマグナから全 RNA を調整し、オリゴdTセルロースにより mRNA を精製した。この mRNA をもとにオリゴdTをプライマーとした cDNA を合成した後に、ZAP II をベクターとしてライブラリーを構築した。

従来の遺伝子情報が極端に少ないことから、まずライブラリーから任意に選択したクローンの遺伝子配列を解析することにより、ダフニアマグナに関する遺伝子情報を取得した。この配列解析をランダムに抽出した5212 遺伝子に関して行い、正確に読めた3755 遺伝子についてさらに配列が重複している遺伝子などをクラスタリングにより整理し、独立な1639 遺伝子を同定した(図2)。これらはデータベースと比較することにより、相同性のある遺伝子を検索した。これらのデータは、GeneBank に登録予定である(表1)。

また現在、ディファレンシャルディスプレイ法の原理に基づいた遺伝子発現変化の解析を進めており、フェノキシカルブ処理により多数の遺伝子の発現が変動していることを見出している(図3)。この方法は、通常のディファレンシャルディスプレイ法とことなり電気泳動をキャピラリーで行うことにより、そのピークの面積比から相対的な遺伝子の発現量の比に関して解析が可能となる。ミジンコの遺伝子に関するデータベースが未整備なために、どのような遺伝子の発現が変化しているのか網羅的に解析するのは現在のところ困難であるが、上記のデータベース構築と並行して解析を進めることにより、今後種々の化学物質影響を示すマーカー遺伝子の探索が可能になると思われる。

## D. 考察

増殖試験の結果から、フェノキシカルブなどの幼若ホルモンのアナログに対して非常に感受性が高いことが示された。これは、幼若ホルモンのアナログとしてある面予測される結果ではあるが、それぞれの化学物質についての反応性は異なっていた。またミジンコにおける真の幼若ホルモンの構造も知られていないことから、予想外の化学物質に対して高い感受性を示す可能性も考えられる。

こうした問題を明らかにするには、ホルモン受容体を用いたレポーターアッセイ系などを用いた系の確立が必要である。この系の確立によって、化学物質が特定の受容体に結合し影響を及ぼす可能性があるのかについて、評価することが可能となる。しかし、こうしたレポーターアッセイ系は、すでに脱皮ホルモン受容体など仮想的な標的分子を設定していることになる。

全く未知、あるいは無関係と思われる生体分子がこうした化学物質によって影響を受けている可能性を考慮した場合には、必ずしもレポーターアッセイ系が有用な手段とはなりえない。実際に幼若ホルモンの受容体については、ショウジョウバエなど比較的研究の進んでいる昆虫などを含めて必ずしも明確なコンセンサスが得られていないのが現実である。

こうした問題点を解決するには、遺伝子発現変化を解析することにより、その変化がホルモン様

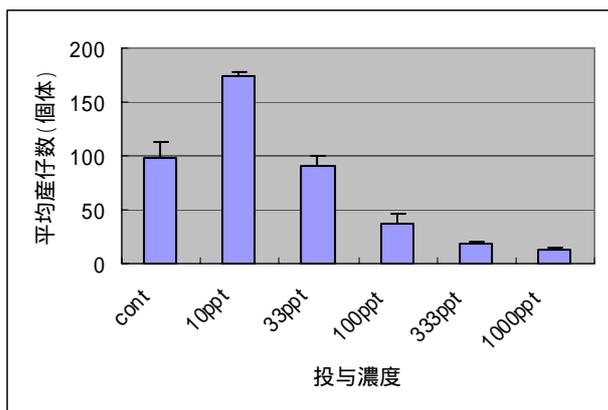
の遺伝子発現の変化が、別の反応による変化によるものかを見極める必要があるであろう。実際に遺伝子発現に着目した場合には、実際の生殖影響が見られる濃度よりも低濃度で、大きな遺伝子変動が確認された。従って今後、どのような種類の遺伝子がどのようなホルモンや化学物質で発現が変化するのかについて明らかにしていく事により、的確なリスク評価が可能になっていくと思われる。

## E . 結論

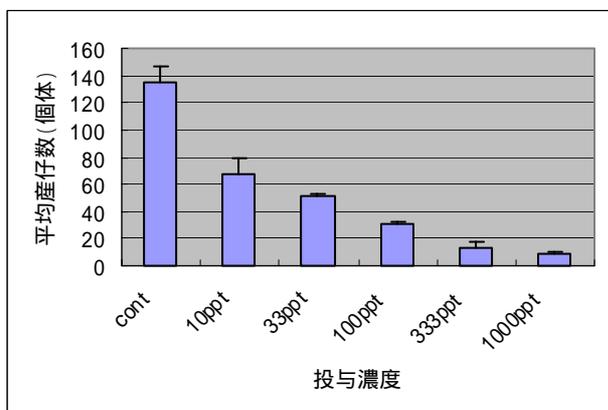
ミジンコへの影響を解析する手法として古くから増殖試験が行われてきたが、遺伝子レベルで発現を解析することにより、鋭敏にその影響を評価できる糸口がつかめた。

今後、遺伝子情報をさらに充実させるのと同時に、遺伝子レベルでの評価系を構築することにより、既知のレセプターに依存しない統括的な影響評価と機構解明のシステムの構築が可能になると思われる。

### A . Pyriproxyfen



### B . Fenoxycarb



### C . BisphenolA

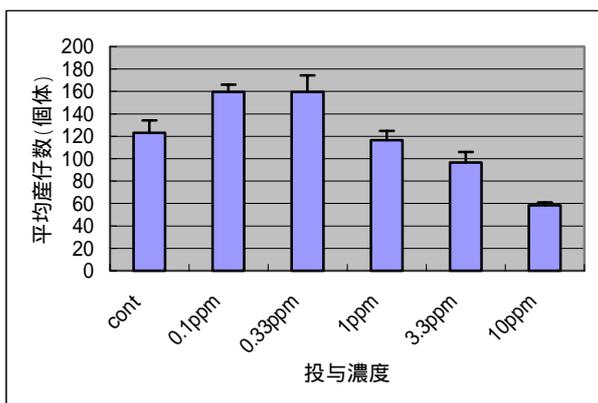
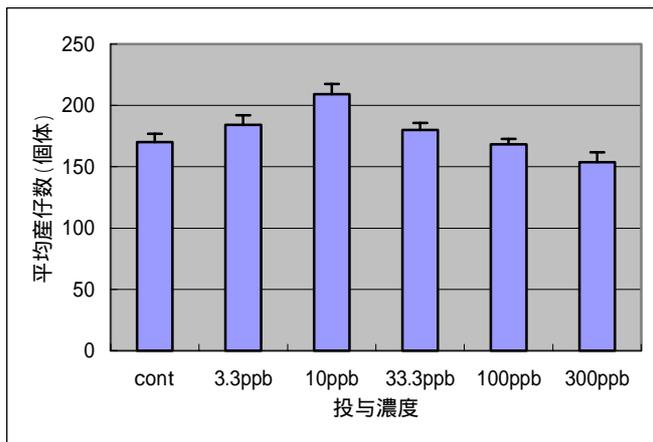


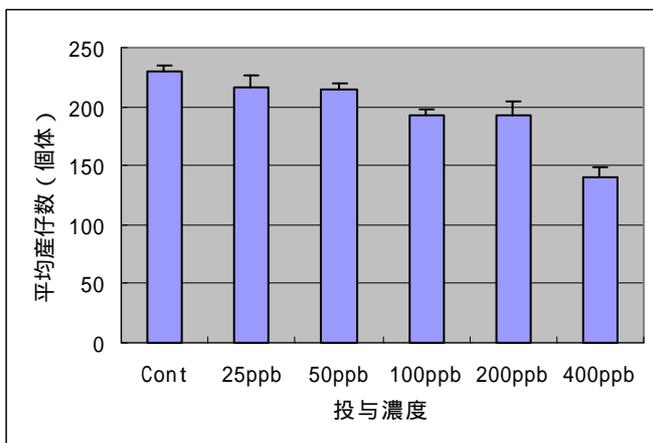
図1 脱皮ホルモンおよび幼弱ホルモンアナログによる増殖阻害試験

研究方法に記載した曝露条件で、それぞれの化学物質を曝露し、産仔数を計算した。

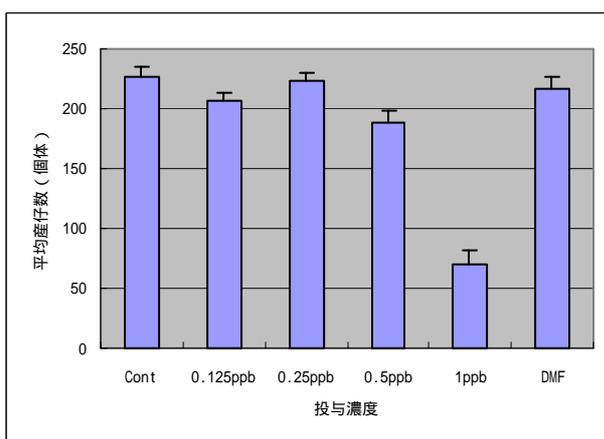
### D . Noprylphenol



### E . Octachlorostyrene



### F . Tributyltin



2ppb で親がすべて死亡

図1 脱皮ホルモンおよび幼弱ホルモンアナログによる増殖阻害試験 (続)

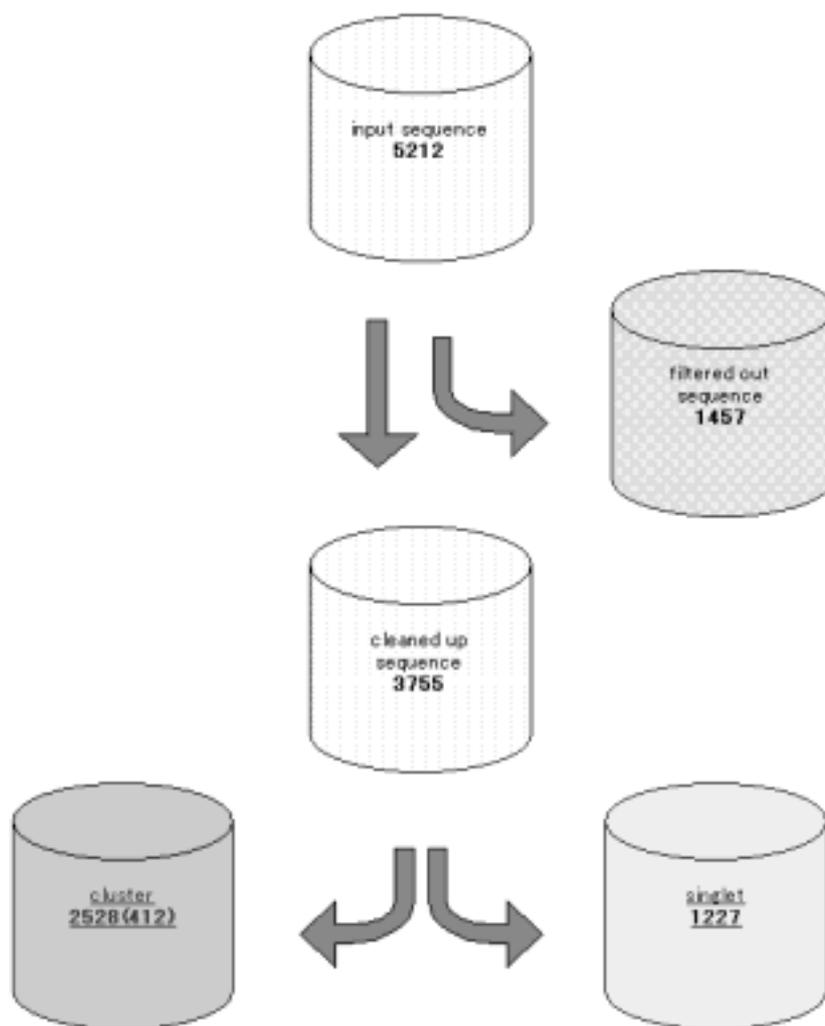


図2 EST 解析の概略

5 2 1 2 遺伝子をピックアップし塩基配列を解析。一定のクオリティを満たした遺伝子が 3 7 5 5 遺伝子。重複があった遺伝子は 2 5 2 8 遺伝子あり、これらは 4 1 2 遺伝子のグループに分類された。一方重複のなかった遺伝子は 1 2 2 7 遺伝子存在した。

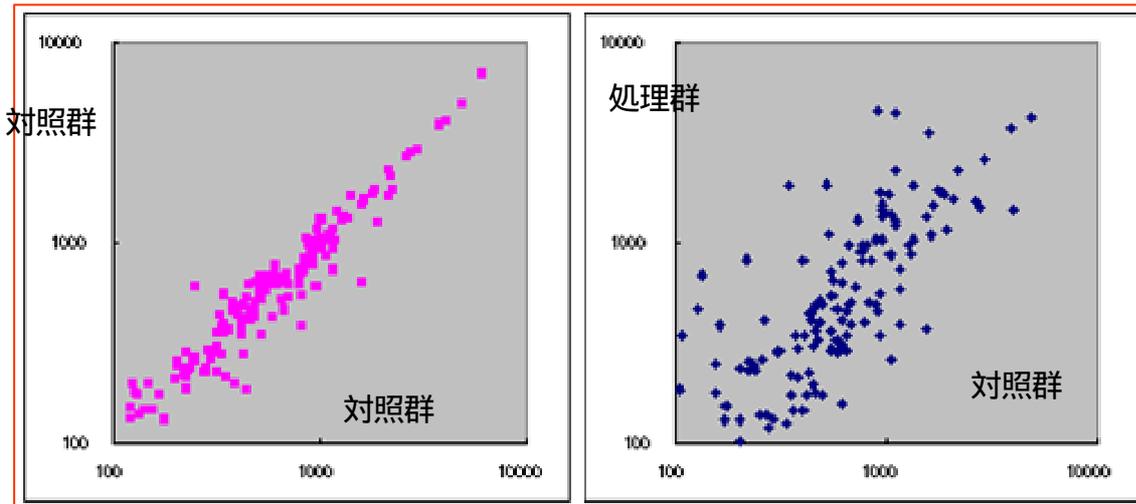


図3 遺伝子発現パターンの変化

ミジンコを2 ppbのフェノキシカルブ処理した後にRNAを抽出、精製し発現量について対照群と比較した。左のパネルは同一実験の比較で再現性の確認をしている。1つの点はそれぞれ遺伝子をあらわし、それぞれの軸の値がその遺伝子の発現レベルを示す。右のパネルは、処理群(Y軸)と対照群(X軸)との比較で、フェノキシカルブ処理により大きく遺伝子の発現が変動していることがわかる。

clusterID	contigID	fragments	homology search result	score	E-value	consensus length
0	contig1	12	embLA_058875.1 PF0206875 Bana acidothermus mRNA for acidic ribosomal protein 1 (psr1 gene)	71.9	1e-09	920
0	IGU001_S_C_000013_E12r	1	ref NC_000900.1  <i>Methanococcus jannaschii</i> complete genome	42.1	0.42	487
1	contig1	2	ref NC_003074.1  <i>Arabidopsis thaliana</i> chromosome 3, complete sequence	43.1	2.2	584
2	contig1	43	ct AF083984 AF083984 <i>Drosophila melanogaster</i> cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	127	1e-24	972
2	contig2	2	ct AF083984 AF083984 <i>Simulium aureum</i> NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	3e-17	468
2	IGU001_S_C_000001_A12r	1	ct AF083984 AF083984 <i>Simulium aureum</i> NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	4e-17	518
2	IGU001_S_C_000001_C08r	1	ct AF083984 AF083984 <i>Simulium aureum</i> NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	4e-17	526
2	IGU001_S_C_000002_B01r	1	ct AF083984 AF083984 <i>Simulium aureum</i> NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	4e-17	475
2	IGU001_S_C_000002_B09r	1	ct AF083984 AF083984 <i>Simulium aureum</i> NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	4e-17	545
2	IGU001_S_C_000002_E11r	1	ct AF083984 AF083984 <i>Simulium aureum</i> NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	3e-17	462
2	IGU001_S_C_000004_A01r	1	ct AF208954.1  <i>Drosophila simulans</i> isolate MDW86 mitochondrion, complete genome	81.8	4e-13	385
2	IGU001_S_C_000004_A11r	1	ct AF208954.1  <i>Drosophila simulans</i> isolate MDW86 mitochondrion, complete genome	81.8	6e-13	518
2	IGU001_S_C_000004_B11r	1	ct AF083984 AF083984 <i>Simulium aureum</i> NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	4e-17	501
2	IGU001_S_C_000004_C01r	1	ct AF083984 AF083984 <i>Simulium aureum</i> NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	4e-17	506
2	IGU001_S_C_000004_G05r	1	ct AF147119 AF147119 <i>Drosophila guttifera</i> strain 1908-1971.1 cytochrome oxidase II (COII) gene, partial cds, mitochondrial gene for mitochondrial product	85.7	2e-14	228
2	IGU001_S_C_000004_H05r	1	ct AF083984 AF083984 <i>Simulium aureum</i> NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	4e-17	496
2	IGU001_S_C_000005_E07r	1	ct AF147119 AF147119 <i>Drosophila guttifera</i> strain 1908-1971.1 cytochrome oxidase II (COII) gene, partial cds, mitochondrial gene for mitochondrial product	85.7	3e-14	453
2	IGU001_S_C_000005_F03r	1	ct AF083984 AF083984 <i>Simulium aureum</i> NY isolate 02 cytochrome oxidase II (COII) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, complete cds	95.6	4e-17	528

表1 EST配列のBlast検索結果(一部)

得られた配列情報をもとに、Blast検索を行い、類似した塩基配列がデータベース上に登録されているか確認した。

# Evaluation of chemicals as endocrine disruptors on crustacean

Hajime Watanabe, Ph.D.

Center for Integrate Bioscience, Okazaki National Research Instituts

Hajime Watanabe, Yosihnao Katsu, Hiroaki Sone and Norihisa Tatarazako

## **Abstract :**

The water fleas, *Daphnia magna*, reproduce by cyclic parthenogenesis as a predominant strategy and environmental stimuli such as light cycle, population, induce organisms to switch from parthenogenesis to gamogenetic reproduction. During the gamogenetic period, they produce male daphnia and dormant resting eggs, which can survive prolonged periods of environmental adversity. However, little is known about the mechanism(s) associated with the switch from parthenogenesis to gamogenetic reproduction. In addition to the life-cycle switching, molecular structures and functions of well known hormones such as ecdysone and juvenile hormone are not well known.

In the present study, we investigated the effect of chemicals on reproduction and compared with the effect of juvenile hormone agonists such as pyriproxyfen and fenoxycarb, on neonatal development in *Daphnia*. We found that juvenile hormone agonists affect on reproduction at ppt level whereas bisphenol A affects at ppm level. We also analyzed expression sequence tags from wild type daphnid and difference of gene expression pattern between fenoxycarb treated and control daphnid were examined by differential display. Combination of gene expression analysis and traditional reproduction assay will be helpful for evaluation of chemicals on reproduction of invertebrates.

## (2) 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

研究者 西川淳一 (大阪大学大学院薬学研究科助教授)

### 研究要旨

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。内分泌攪乱物質は、この核内受容体を介して体内システムを攪乱し、生物の発生や分化、恒常性の維持に深刻な影響を及ぼすと考えられている。これら内分泌攪乱物質の潜在的なターゲットと考えられる核内受容体ファミリーはリガンド作動性の転写調節因子であり、N端側にZnフィンガーを含むDNA結合領域、C端側に転写活性化領域とリガンド結合領域を有するという一次構造上の特徴がある。近年のゲノムプロジェクトの進展によりヒトゲノムのほとんどの塩基配列が決定されたが、このような特徴を持つ核内受容体ファミリーの遺伝子はヒトゲノム上には48種類存在した。48種類の内訳は、リガンド既知の受容体が23種類、リガンド未知のオーファン受容体が25種類であった。本研究では、すべてのヒト核内受容体について網羅的に内分泌攪乱化学物質との結合性を調べ、疫学調査や動物実験で得られたデータと比較・検討することにより、新たな内分泌攪乱物質の作用点を明らかにすることを目的とするが、本年度はまずアッセイ系の検証が可能なりガンド既知の23種類の受容体について検討した。

受容体をコードする遺伝子をRT-PCRにより増幅後、塩基配列を決定したところ、23種類の受容体はすべてGenBankに登録されている配列と同じであった。これらの遺伝子を用いて酵母two-hybrid法によるアッセイ系を構築し、それぞれのリガンドに対する応答性を検証した。その結果、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、AR、PR、GR、MR、RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 、RAR $\gamma$ 、TR $\alpha$ 、TR $\beta$ 、VDR、RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、RXR $\gamma$ 、FXR、CARの17種類については良好なりガンド応答性が認められたが、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ 、LXR $\alpha$ 、LXR $\beta$ 、SXRの6種類の受容体については、リガンドを加えない状態でも高い活性を示し、信頼性のあるアッセイ系とはいえなかった。次に、構築したアッセイ系を用い、環境省が優先的にリスク評価に取り組む20物質について結合性を調べたところ、多くの化学物質が複数の受容体に作用することがわかった。

以上の結果から、内分泌攪乱作用が疑われる候補物質の多くはエストロゲン受容体との結合だけでなく、複数の核内受容体に影響を及ぼし、これらの複合した作用が内分泌攪乱物質としての毒性につながるものと考えられた。

### 研究協力者

今川正良 (名古屋市立大学薬学部・教授)

### A. 研究目的

内分泌攪乱作用は、急性毒性や慢性毒性、発癌性や催奇形成といったこれまでの毒性学とは違う新しい概念の毒性であり、ホルモンの受容体を介して生物の発生や分化に深刻な影響を及ぼすと考えられている。従来、ホルモンの受容体はそれぞれのリガンドに対し特異性が高く、人間が非意図的に作り出した化学物質がホルモン受容体に結合して毒性を発揮するとは一般には考えられてこなかった。ところが、大量に環境中に放出される化学物質(例えば農薬や洗剤、プラスチックの原料など)の中にも、ホルモン受容体と結合して、天然のホルモン作用を模倣して働く物質が数多く

存在することが分かってきた。本来、ホルモンとは極微量でその作用を発揮するため、必要な時に必要な量だけ合成され、必要なくなれば代謝され効果を持たなくされる。しかし、人工的に作り出された化学物質が体内に取り込まれれば、生体のホルモン制御系を無視して働き、人の健康や生態系に悪影響を与える可能性がある。

ホルモン受容体の中でも核内受容体は脂溶性低分子生理活性物質の受容体であることから、環境中に放出された低分子化学物質のターゲットとして最も重要である。最近のゲノムプロジェクトの進展により、これら核内受容体ファミリーの遺伝子数はヒトゲノム中に48種類存在することが確定された<sup>1)</sup>。48種類の受容体は、そのほとんどが生物の発生・分化や恒常性の維持に重要な役割を果たしていると推定されており、これらの受容体のいずれに対して化学物質が干渉しても、生物の健康は害される可能性がある。これまで、内分泌攪乱化学物質のターゲットとしてはエストロゲン受容体やアンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体を中心に研究・調査が進められてきたが、化学物質による内分泌系攪乱作用という観点からは十分とは言えない。また、現在、内分泌攪乱化学物質の作用点がエストロゲン受容体以外にある可能性がさかんに議論されるようになり、そのような観点からも多くの受容体について結合性を調べておく必要がある。そこで本研究では、ヒトの核内受容体すべてについて網羅的に内分泌攪乱化学物質との結合性を調べ、疫学調査や動物実験で得られたデータと比較・検討することにより、新たな内分泌攪乱物質の作用点を明らかにすることを目的とする。

## B．研究方法

### 1．核内受容体 cDNA の単離

#### (1) プライマーの設計

ヒト核内受容体のリガンド結合ドメイン (LBD) を RT-PCR で増幅するため、GenBank に登録されている配列を基にプライマーを設計した。

#### (2) RT-PCR

Clontech よりヒト臓器由来 mRNA を購入し、これを鋳型として逆転写酵素 (Revert ra Ace、東洋紡) を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型とし、耐熱性 DNA ポリメラーゼ (Ampli Taq Gold、Applied Biosystems 社) を用いて PCR を行い、LBD をコードする DNA を増幅した。

#### (3) 塩基配列の決定

PCR により増幅した DNA 断片を pBluescript (Staratagene 社) にサブクローニングし、自動蛍光式 DNA シーケンサー DSQ1000 (島津製作所) にて塩基配列を決定した。

### 2．酵母 two-hybrid 系の構築

1.(1) で単離したそれぞれのヒト由来核内受容体 LBD を酵母 two-hybrid 用ベクター pGBT9 (Clontech 社) に挿入し、得られた発現ベクターを pGAD424-TIF2 とともに酵母 Y190 に組み込んだ<sup>2)</sup>。

### 3．試薬

各種核内受容体に対する標準リガンドとしては以下の物質を用いた。

17 $\beta$ -Estradiol---ER $\alpha$ ,  $\beta$  5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone---AR Progesterone---PR

Corticosterone---GR Aldosterone---MR *all-trans*-Retinoic acid---RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$

3,3',5-Triiodo-L-thyronine---TR $\alpha$ ,  $\beta$  1,25(OH)<sub>2</sub>VitaminD<sub>3</sub>---VDR

9-*cis*-Retinoic acid---RXR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  Linoleic acid---PPAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$

22(R)-Hydroxycholesterol---LXR $\alpha$ ,  $\beta$  Chenodeoxycholic acid---FXR

5- $\beta$ -Pregnane-3,20-dione---CAR Rifampicin---SXR

環境省が優先的にリスク評価に取り組む20物質は、日本エヌ・ユー・エス株式会社より供与して頂いた。

#### 4．被検試薬の調整

標準リガンドを含め全ての試薬はDMSOに溶解後-20℃で保存し、使用前にDMSOで段階希釈して用いた。

#### 5．酵母 two-hybrid 法によるリガンドアッセイ

各種受容体 LBD とコアクチベーター (TIF2) を組み込んだレポーター遺伝子発現酵母の懸濁液に被検物質 ( $10^{-8} \sim 10^{-4}M$ ) を加え、30℃で4時間反応させた。その後、酵母を遠心分離により集め、Zymolyase で酵母細胞壁を溶解後、被検試薬で誘導された $\beta$ -galactosidase 活性を比色法にて定量した<sup>2)</sup>。試験はすべて n=3 で行った。

(倫理面での配慮)

アッセイ系に用いた遺伝子は、個人を特定できないように市販の mRNA を購入し、それを鋳型として RT-PCR により取得した。

### C．研究結果

#### 1．ヒト核内受容体遺伝子の単離

ヒト核内受容体ファミリーのうちリガンド既知の23種類の受容体 (ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, PR, GR, MR, RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , TR $\alpha$ , TR $\beta$ , VDR, RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$ , PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ , FXR, CAR, SXR) について、LBD 部分をコードする DNA を PCR により得ることに成功した。得られた DNA 断片の塩基配列を解析し、すべての受容体 LBD について既報の塩基配列と一致していることを確認した。

\* 略号

ER (エストロゲン受容体) AR (アンドロゲン受容体) PR (プロゲステロン受容体) GR (グルココルチコイド受容体) MR (ミネラルコルチコイド受容体) RAR (ビタミン A 受容体) TR (甲状腺ホルモン受容体) VDR (ビタミン D 受容体) RXR (レチノイド X 受容体) PPAR (ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体) LXR (肝臓 X 受容体) FXR (ファーネソイド X 受容体) CAR (構成的アンドロスタン受容体) SXR (外来異物応答性受容体)

#### 2．酵母 two-hybrid 法によるリガンドアッセイ系の確立

核内受容体 LBD は、リガンド依存的にコアクチベーターと相互作用することが知られている。そこで、1.で得た受容体 LBD とコアクチベーター-TIF2 を酵母に導入し、two-hybrid 法により両タンパク質のリガンド依存的な相互作用を調べた (図1~23)。

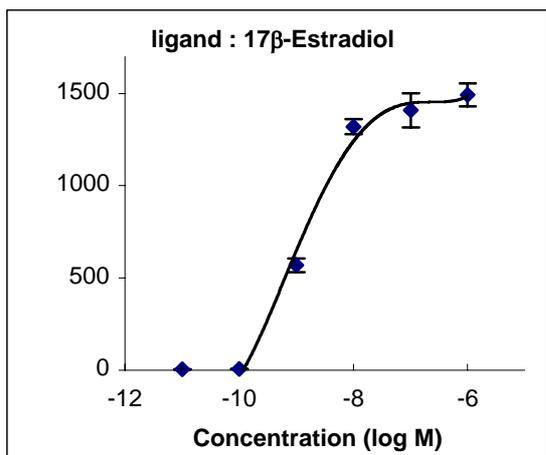


図 1 ER $\alpha$ の標準曲線

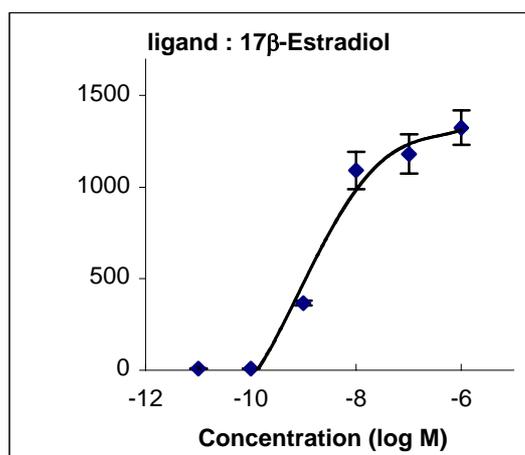


図 2 ER $\beta$ の標準曲線

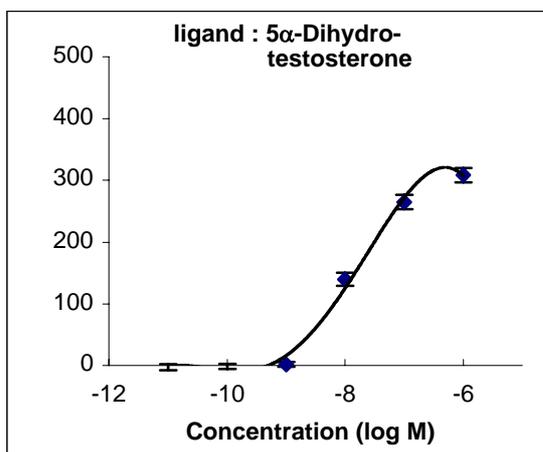


図 3 ARの標準曲線

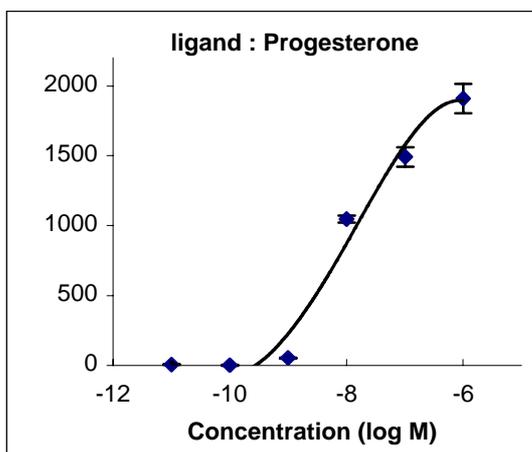


図 4 PRの標準曲線

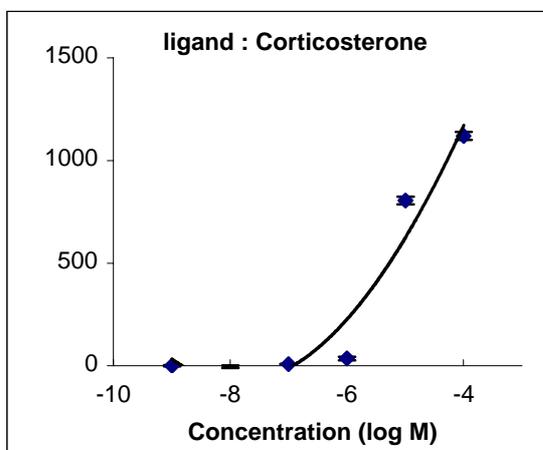


図 5 GRの標準曲線

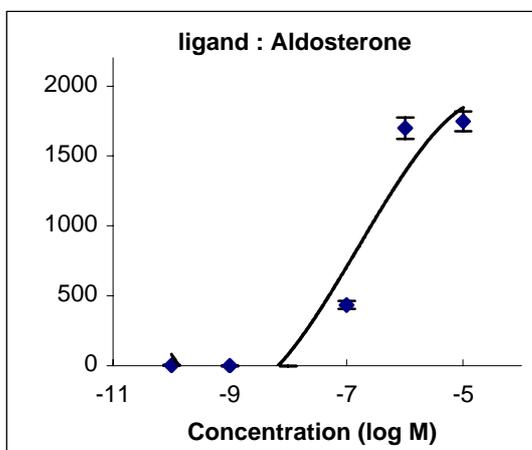


図 6 MRの標準曲線

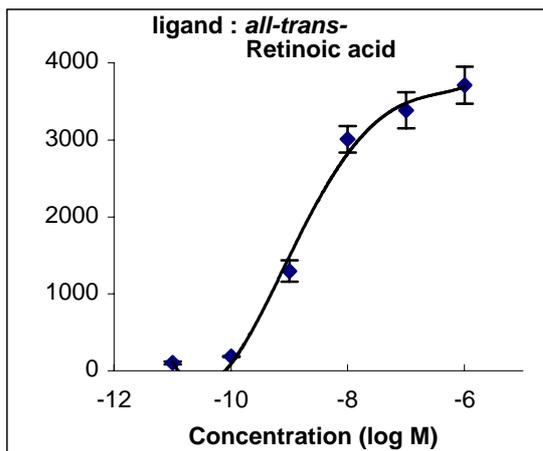


図 7 RAR $\alpha$ の標準曲線

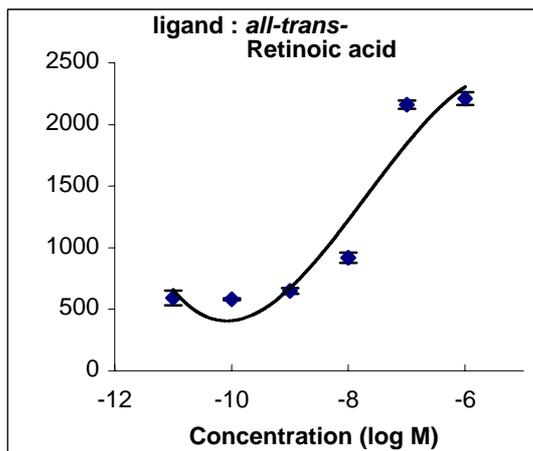


図 8 RAR $\beta$ の標準曲線

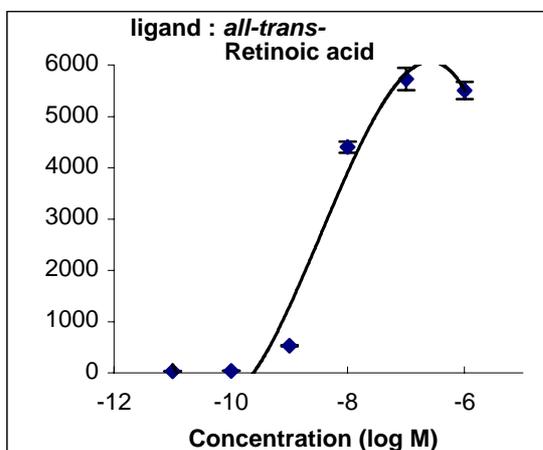


図 9 RAR $\gamma$ の標準曲線

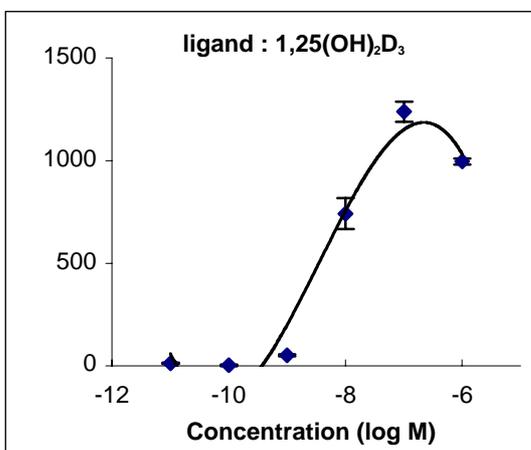


図 10 VDRの標準曲線

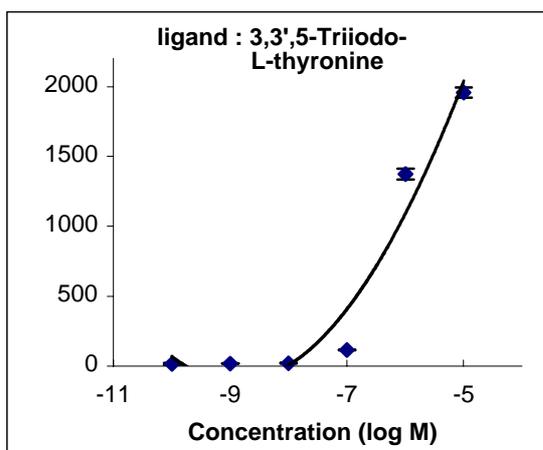


図 11 TR $\alpha$ の標準曲線

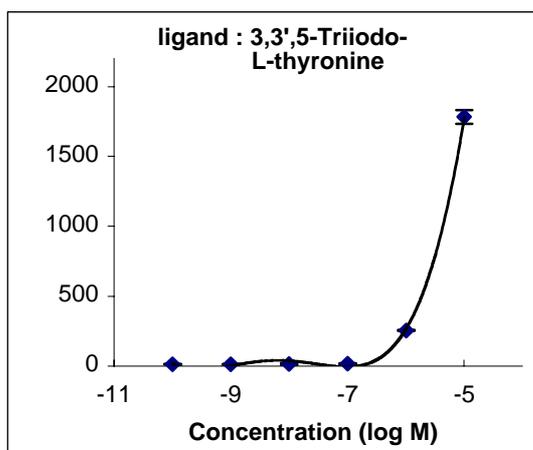


図 12 TR $\beta$ の標準曲線

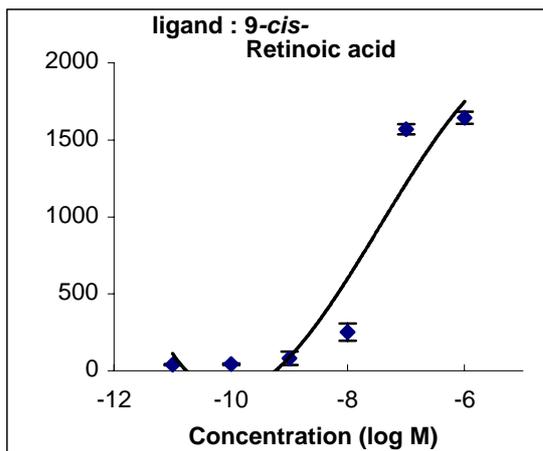


図 1 3 RXR $\alpha$ の標準曲線

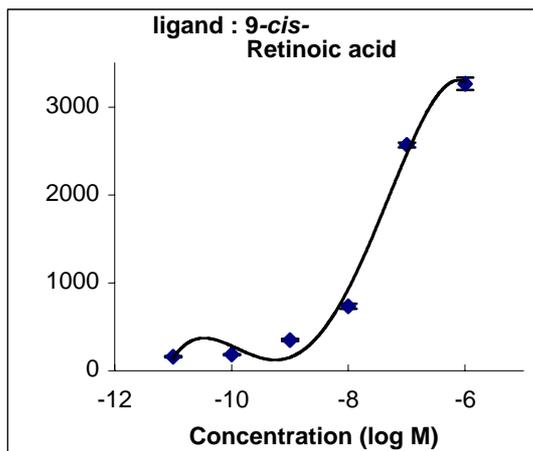


図 1 4 RXR $\beta$ の標準曲線

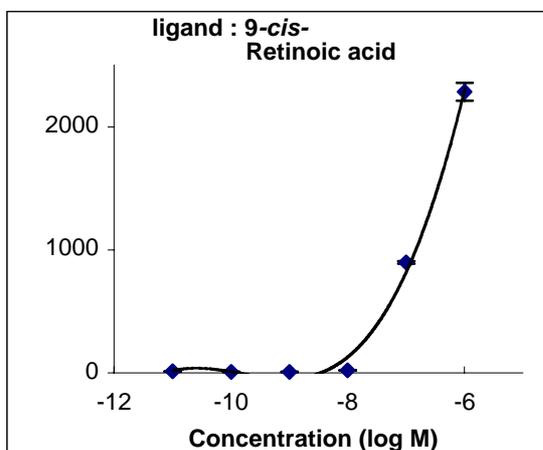


図 1 5 RXR $\gamma$ の標準曲線

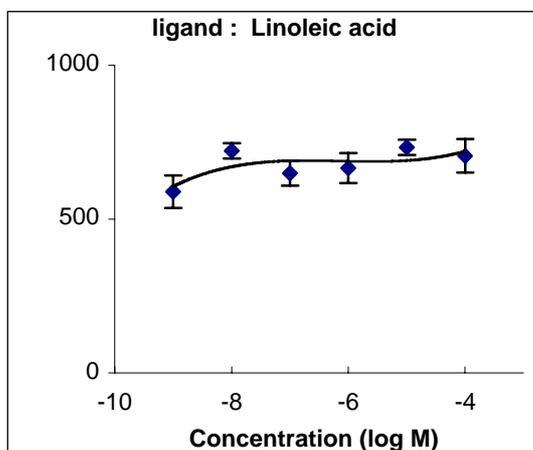


図 1 6 PPAR $\alpha$ の標準曲線

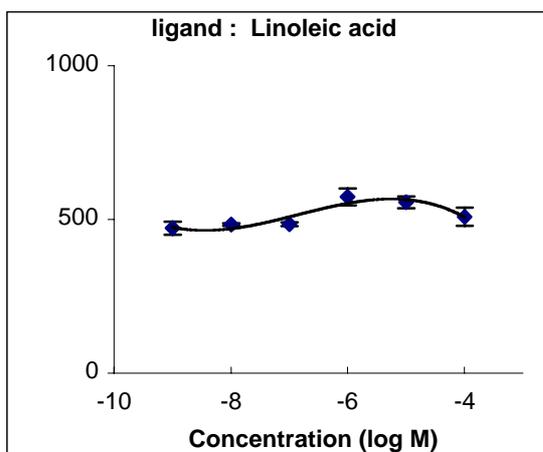


図 1 7 PPAR $\gamma$ の標準曲線

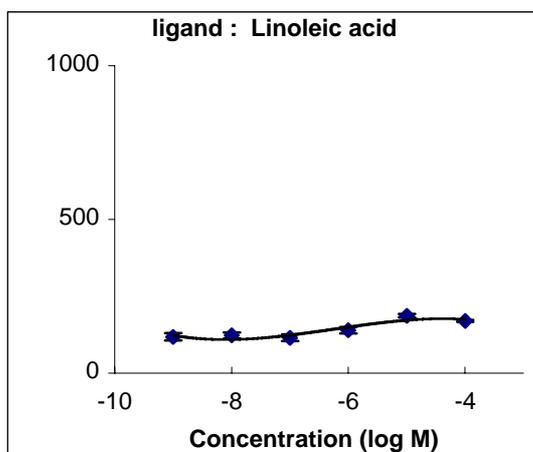


図 1 8 PPAR $\delta$ の標準曲線

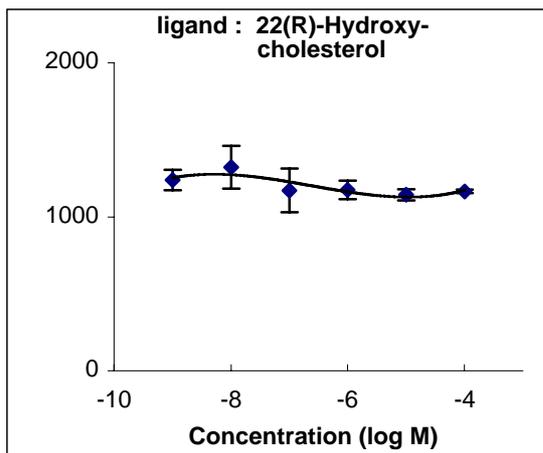


図 19 LXR $\alpha$ の標準曲線

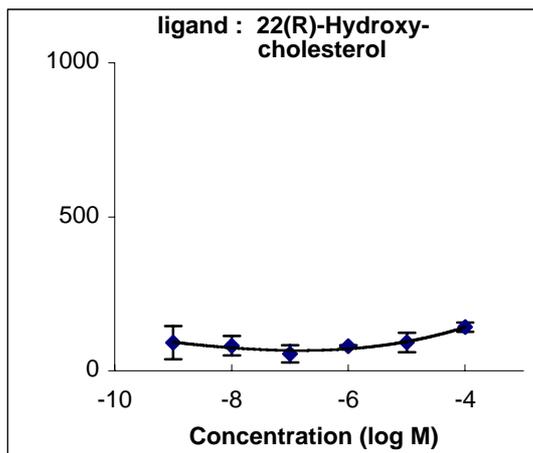


図 20 LXR $\beta$ の標準曲線

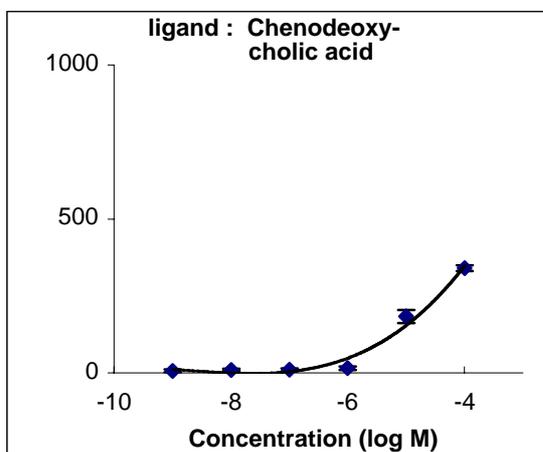


図 21 FXR の標準曲線

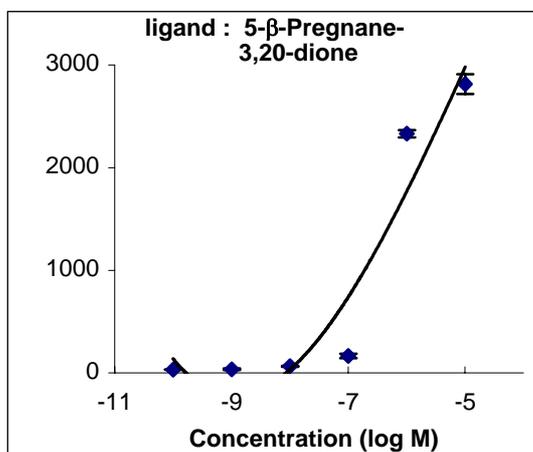


図 22 CAR の標準曲線

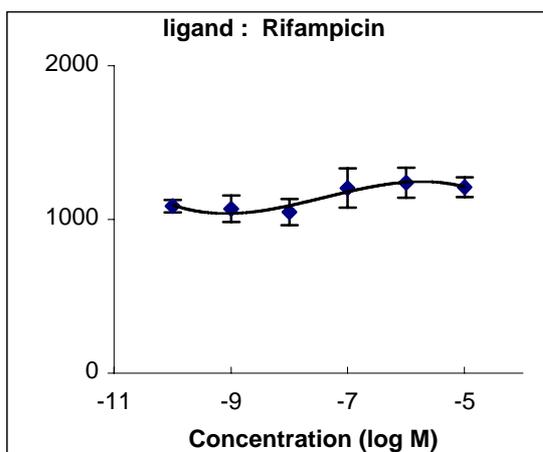


図 23 SXR の標準曲線

その結果、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、AR、PR、GR、MR、RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 、RAR $\gamma$ 、TR $\alpha$ 、TR $\beta$ 、VDR、RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、RXR $\gamma$ 、FXR、CAR については文献等に記載のあるリガンドに対し良好な応答性が認められたが、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ 、LXR $\alpha$ 、LXR $\beta$ 、SXR についてはリガンドを加えない状態でも高い活性を示すものが多く、信頼性のあるアッセイ系とはいえなかった。また、LXR のリガンドについては、24(S),25-Epoxycholesterol が最も高い結合性を示すとの報告があるが、入手不能であったため、代わりに 22(R)-Hydroxycholesterol を用いた。

### 3 . 内分泌攪乱作用が疑われる化学物質の各種核内受容体に対する影響

2. で作成した酵母 Two-hybrid 系を用い、環境省が優先的にリスク評価に取り組む 20 物質について、各種核内受容体に対するアゴニスト作用を検討し、その結果を表 1-1 及び表 1-2 に纏めた。

その結果、アジピン酸ジ-2-ジエチルヘキシル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジシクロヘキシル、ペンタクロロフェノール、アミトロールはいずれの受容体に対しても不活性であったが、残りの 15 化合物はいずれかの受容体に対し活性が認められた。その中でも、アルキルフェノール類は既報の通り ER に対して活性を示したが、それ以外にも RAR に対し強い活性を示した(図 2-4-27)。試験したノニルフェノールとオクチルフェノールは、RAR に対し  $10^{-6}$  M から影響を示し、ER への最少影響濃度とほぼ同じであった。

また、図 2-8 に示したように RXR には様々な化合物がアゴニスト活性を示したが、その中でも有機スズ化合物は内因性のリガンドである 9-シスレチノイン酸とほぼ同等の活性であった。ノニルフェノールとオクチルフェノールも、有機スズ化合物と比較するとかなり弱い活性であるが、有意な影響である。また、ベンゾフェノンや 4-ニトロトルエンも  $10^{-4}$  M では有意な活性を持つ。

ER、RAR、RXR 以外に、多くの化学物質が陽性反応を示したのは CAR である。CAR には、試験した 20 化合物のうち半数以上の 12 の化合物がアゴニスト活性を示し、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジ-n-ブチル、ノニルフェノール、オクチルフェノールは、標準物質として使用した 5- $\beta$ -Pregnane-3,20-dione と同等か、それ以上の活性を示した。

表 1 - 1 試験化学物質の各種核内受容体へのアゴニスト活性

化学物質	ER <sub>α</sub>	ER <sub>β</sub>	AR	PR	GR	MR	RAR <sub>α</sub>	RAR <sub>β</sub>	RAR <sub>γ</sub>	TR <sub>α</sub>	TR <sub>β</sub>	VDR	RXR <sub>α</sub>	RXR <sub>β</sub>	RXR <sub>γ</sub>	FXR	CAR
ベンゾフェノン			×	×	×	×				×	×	×	×	×	×	×	
オクタクロロスチレン	×	×	×	×	×	×	×	×		×	×	×	×	×	×	×	
フタル酸ジエチル	×	×	×	×	×	×		×		×	×	×	×	×	×	×	
フタル酸ブチルベンジル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
(塩化)トリフェニルスズ	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×				×	×
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
フタル酸ジシクロヘキシル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
フタル酸ジ-n-ブチル	×	×	×	×	×	×		×	×	×	×	×	×	×	×	×	
(塩化)トリブチルスズ	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×				×	×

；標準リガンドと同等の活性、 ；標準リガンドと比較して 1 ~ 1/1000 の活性

；標準リガンドと比較して 1/1000 ~ 1/1000000 の活性、 × ；活性なし

表 1-2 試験化学物質の各種核内受容体へのアゴニスト活性

化学物質	ER α	ER β	AR	PR	GR	MR	RAR α	RAR β	RAR γ	TR α	TR β	VDR	RXR α	RXR β	RXR γ	FXR	CAR
4-ノニルフェノール			×	×	×	×				×	×	×			×	×	
p-t-オクチルフェノール			×	×	×	×				×	×	×	×		×	×	
ビスフェノールA			×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
2,4-ジクロロフェノール			×	×	×	×	×		×	×	×	×			×	×	×
4-ニトロトルエン	×	×	×	×	×	×			×	×	×	×	×	×	×	×	
フタル酸ジ-n-ペンチル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
フタル酸ジ-n-プロピル	×	×	×	×	×	×				×	×	×	×	×	×	×	
ペンタクロロフェノール	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
アミトロール	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
フタル酸ジ-n-ヘキシル	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	

；標準リガンドと同等の活性、 ；標準リガンドと比較して 1 ~ 1/1000 の活性

；標準リガンドと比較して 1/1000 ~ 1/1000000 の活性、 × ；活性なし

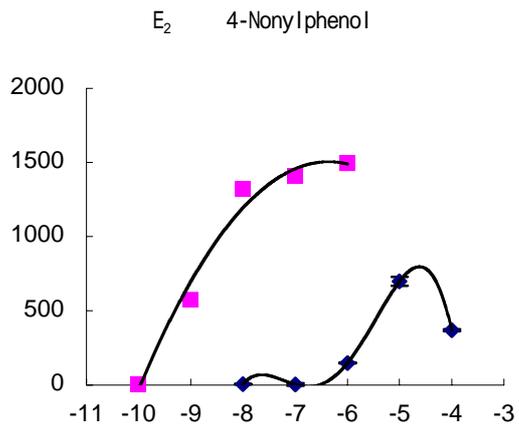


図 2 4 ノニルフェノールの ER $\alpha$  に対する影響

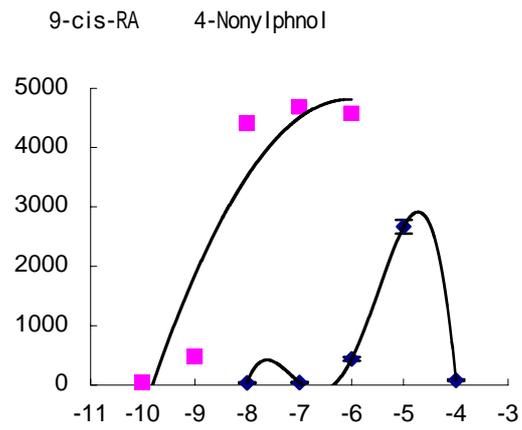


図 2 5 ノニルフェノールの RAR $\gamma$  に対する影響

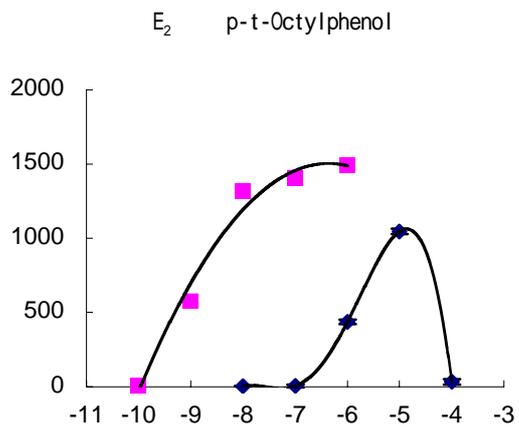


図 2 6 オクチルフェノールの ER $\alpha$  に対する影響

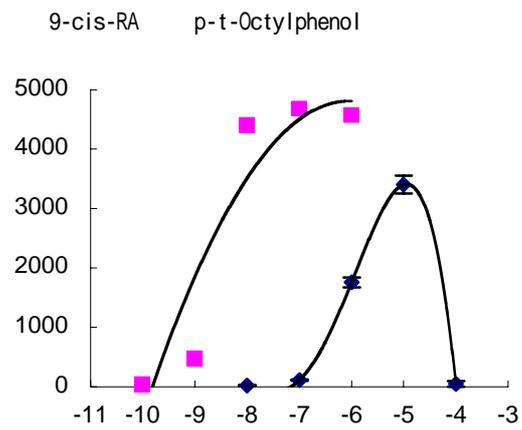


図 2 7 オクチルフェノールの RAR $\gamma$  に対する影響

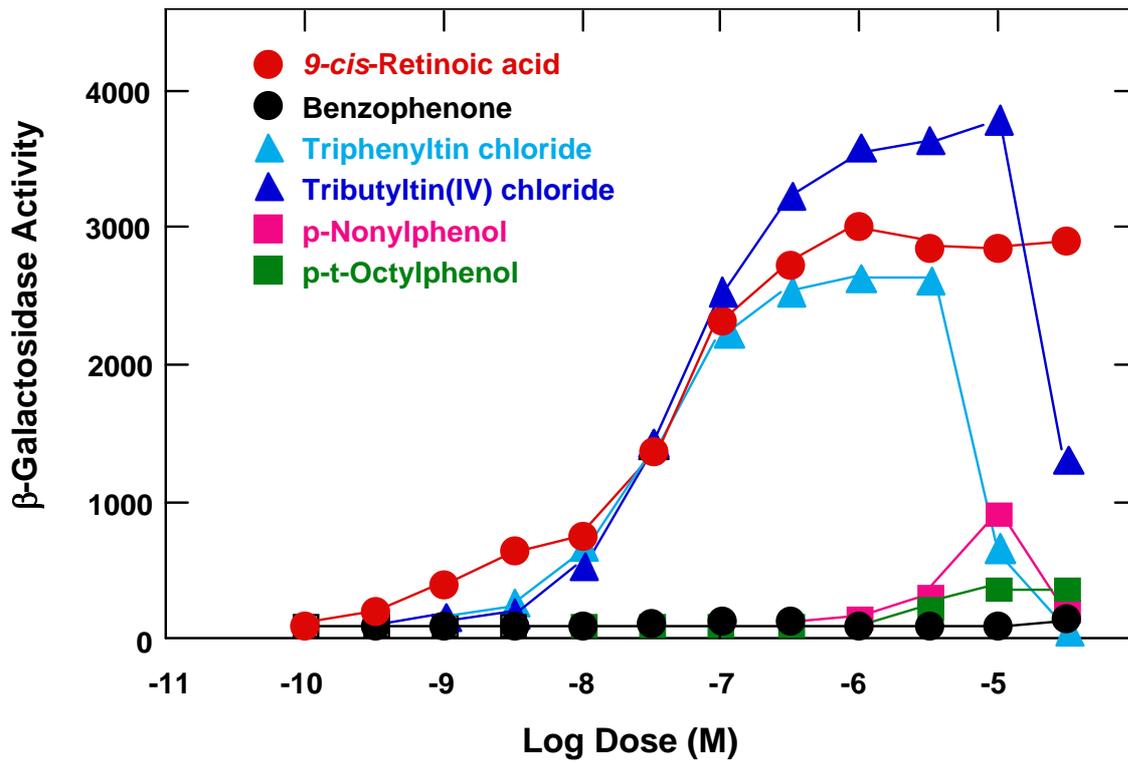


図 2 8 RXR $\beta$ に対する内分泌攪乱物質の影響

## D．考察

### 1．アッセイ系

今回、アッセイ系の確立が出来なかった PPAR や LXR は、もともとはオーファン受容体としてクローニングされ、後のリガンド探索から結合性のある化合物が同定されてきたものである。そのため、高親和性の内因性リガンドについては、現在においてもなお議論の多いところであり、本研究で用いたリガンドが間違いであった可能性も否定できない。また、これらの受容体は、低親和性ながら幅広い種類の脂肪酸に結合するといわれており、培地成分や酵母内にもともと存在する脂肪酸に应答して高いバックグラウンド値を示したのかもしれない。

また、ステロイドホルモン受容体や甲状腺ホルモン受容体などの古くからそのリガンドが良く知られている受容体は、試験管内での結合実験ではそれぞれのリガンドに対し高親和性 ( $K_d=0.1\sim 10$  nM) で結合する。しかし、今回作成した酵母 two-hybrid 系では GR、MR、TRs の感度はかなり悪い。これらの受容体も、哺乳動物細胞を用いたルシフェラーゼアッセイでは、酵母の系に較べ 1000 倍から 10000 倍の感度を得られることから、今回作成したアッセイ系の感度の悪さは、酵母の細胞壁や細胞膜の透過性に起因するものと考えられる。

### 2．アルキルフェノール類の RAR に対する影響

これまで、パラ位に疎水性側鎖を持つアルキルフェノール類は ER に結合して内分泌攪乱作用を發揮すると考えられてきた。しかし、本研究において 4-ノニルフェノールや p-t-オクチルフェノールは、ER だけではなく、RAR に対しても比較的高い活性を示すことがわかった。RAR のリガンドである全トランスレチノイン酸は、催奇形性試験の陽性コントロールとして使われるほど強い催奇形性作用を持ち、RAR に結合する物質が生殖や発生段階において毒性を示すことはよく知られている。今回、内分泌攪乱物質と疑われているアルキルフェノール類が RAR にアゴニスト活性を示したことは、これらの物質が ER との結合だけでなく、RAR を介して、場合によっては両者の複合作用として生体に悪影響を及ぼす可能性を強く示唆している。さらに、データには示していないが、パラ位以外に側鎖を持つアルキルフェノール類は ER には結合しないが RAR には結合した。このことは、今後、アルキルフェノール類について、さらに別の観点からその内分泌攪乱作用を検討しなければいけないことを示唆している。

### 3．有機スズ化合物の RXR に対する影響

RXR は、リガンド未同定のままクローニングされたオーファン受容体であったが、その後のリガンドスクリーニングにより 9-シスレチノイン酸が結合することが分かった。RXR と RAR はアミノ酸配列が非常に似ており、9-シスレチノイン酸は RXR と RAR の両方のリガンドとなることができる。しかし、RAR のリガンドである全トランスレチノイン酸は RXR のリガンドとなることができない。RXR は 9-シスレチノイン酸に結合して転写を活性化するリガンド依存性の転写活性化因子であるが、それ以外にも重要な機能を持つ。即ち、非ステロイド型の核内受容体とヘテロ 2 量体を形成して、DNA への結合親和性を飛躍的に上げる。核内受容体ファミリーのうち、ステロイドホルモン受容体はホモダイマーとしてパンドローム型の応答配列に結合するが、それ以外のほとんどの受容体は RXR とヘテロダイマーを形成してダイレクトレピート型の応答配列に結合する。RXR の遺伝子は、RXR $\alpha$ 、RXR $\beta$ 、RXR $\gamma$  の 3 種類存在するが、これらのサブタイプ間でリガンド依存的な転写活性化能や他の核内受容体とヘテロダイマーを形成して DNA に結合する能力には、さほど違いは見出せない。

しかし、ノックアウトマウスの表現型にはかなりの差異が認められる。RXR $\alpha$ のノックアウトマウスは胎生致死であり、心筋と目に奇形が認められる<sup>3)</sup>。RXR $\beta$ ノックアウトマウスの半数近くは出生前後に死亡するが、生き残ったマウスは、外見上、野生型マウスとの違いは認められない。しかし、オスにおいて生殖能の欠損が認められ、原因はセルトリ細胞における脂質代謝の異常と考えられている<sup>4)</sup>。RXR $\gamma$ のノックアウトマウスは正常に生まれ、成長においても異常は認められない<sup>5)</sup>。

一方、有機スズ化合物は毒性が強い化学物質であり、本研究においても $10^{-5}$  Mあたりから、酵母に対する細胞毒性が現れた。しかし、それよりも低濃度ではRXRに対し強いアゴニスト活性が認められた。これらの結果は、低濃度の有機スズ化合物によるイボニシのインポセックスの誘導とよく一致している。また、前述したようにRXR $\beta$ を欠損したマウスではオスの生殖能に欠損が認められるが、その逆の現象としてRXRアゴニストが過剰に作用することにより雄生殖器の過形成が起こったとの推測も成り立つ。

また、RXRはステロイドホルモン受容体と異なり、種差を越えてよく保存されている(表2)。RXRの相同遺伝子はハエや虫類においても存在し、DNAへの結合に関しては脊椎動物のRXRと同様の働きをするが、リガンド結合に関しては違いがある。つまり、ハエや虫由来のRXR(USPとも呼ばれる)は9-シスレチノイン酸に結合できないのである。しかし、興味あることに海産性の下等生物であるクラゲからクローニングされたRXRは、哺乳類のRXRより強い親和性で9-シスレチノイン酸に結合する<sup>6)</sup>。今後は、イボニシからRXRをクローニングし、有機スズ化合物による内分泌攪乱作用がRXRを介していることを証明していく予定である。

表2 各種生物RXRのDNA結合ドメインPボックス付近のアミノ酸配列

種	アミノ酸配列
ヒト	CAICGDRSSGKHYGVYSCEGCKGFFKR
アフリカツメガエル	CAICGDRSSGKHYGVYSCEGCKGFFKR
ゼブラフィッシュ	CAICGDRSSGKHYGVYSCEGCKGFFKR
クラゲ	CSVCSDKAYVKHYGVFACGCKGFFKR
ショウジョウバエ	CSICGDRASGKHYGVYSCEGCKGFFKR
回虫	CSICSDRASGKHYGVFSCEGCKGFFKR

#### 4. CARに対する内分泌攪乱候補物質の影響

CAR(構成的アンドロスタン受容体)は、発見当初、リガンド非存在下でも構成的に転写活性化状態にあり、アンドロスタンやアンドロステノールが構成的な転写活性化能を抑制することから、他の核内受容体とは異なる転写調節作用をもつ受容体と考えられていた。しかし、その後の研究により、CARはCYP2Bの強力な誘導剤であるTCPOBOPに結合し、転写を活性化することから、SXRと同様に外来異物に対するセンサーとしての役割が考えられる。CARとSXRに結合する化学物質は部分的に重なっているが、基本的にはCYP3Aの誘導剤にはSXRが、CYP2Bの誘導剤にはCARが対応している。

また、CARやSXRの誘導剤は、それによって誘導されるCYP系酵素に代謝されやすい。つまり、

本実験で CAR を誘導した化学物質は CAR により誘導される CYP2B により代謝されやすいと言える。このような理由から、CAR に結合する物質は、生体内では代謝されやすく、残留性が小さく危険度が少ないと言えるかもしれない。このような意味で、アルキルフェノール類は、ER や RAR に強い作用を持つが、体内に留まる時間が短く影響が軽微であるが、有機スズ化合物は全く CAR に結合性を示さない事から代謝を受け難く、体内に長く滞留してしまうために、重大な影響がでると言えるかもしれない。

しかしながら、このような外来異物により誘導された CYP 系酵素は、誘導剤の化学変化を触媒すると同時にステロイドホルモンの代謝をも活性化してしまい、その結果としてホルモンバランスを崩してしまうという二次的な内分泌攪乱作用を生む可能性は残されている。

## E . 結論

環境省が優先的にリスク評価に取り組む 20 物質について多種類の核内受容体への影響を調べたところ、多くの化学物質が複数の受容体に作用することがわかった。その中でも、特に、アルキルフェノール類の RAR への影響と有機スズ化合物の RXR への影響は重要であり、今後の検討を要する。

## F . 参考文献

1. Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M. and Magelsdorf. (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the x-files. *Science*, 294, 1866-1870
2. Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, F., Matsuo, M. and Nishihara, T. (1999) New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 154, 76-83
3. Kastner, P., Grondona, J. M., Mark, M., Gansmuller, A., LeMeur, M., Decimo, D., Vonesch, J. L., Dolle, P. and Chambon P. (1994) Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell*, 78, 987-1003.
4. Kastner, P., Mark, M., Leid, M., Gansmuller, A., Chin, W., Grondona, J. M., Decimo, D., Krezel, W., Dierich, A., and Chambon P. (1996) Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Genes Dev.*, 10, 80-92.
5. Krezel, W., Dupe, V., Mark, M., Dierich, A., Kastner, P. and Chambon, P. (1996) RXR $\gamma$  null mice are apparently normal and compound RXR $\alpha$ <sup>+/-</sup>/RXR $\beta$ <sup>-/-</sup>/RXR $\gamma$ <sup>-/-</sup> mutant mice are viable. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 9010-9014
6. Kostrouch, Z., Kostrouchova, M., Love, W., Jannini, E., Piatigorsky, J. and Rall, J. E. (1998) Retinoic acid X receptor in the diploblast, *Tripedalia cystophora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 13442-13447

# Effect of suspected endocrine disruptors on various kinds of human nuclear receptors

Jun-ichi Nishikawa

Laboratory of Environmental Biochemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

## Abstract

Characterization of human risk assessment resulting from exposure to man-made chemicals, which bind to hormone receptors, has emerged as a major public issue. While effect of chemicals on estrogen receptor has attracted much attention, other nuclear receptors also should be cared as targets of endocrine disruptors. Recently, the human genome is reported to contain 48 members of nuclear receptor family. This superfamily includes not only the classic endocrine receptors that mediate the action of steroid hormones, thyroid hormones, fat-soluble vitamins and prostanoids, but a large number of so-called orphan receptors, whose ligands are still unknown so far. In the present study, we have made assay systems for 23 kinds of ligand-known nuclear receptors and examined agonistic activity of suspected endocrine disruptors.

In order to assess the agonistic activity, we used yeast two hybrid system, which is based on the agonist dependent interaction between nuclear receptor and coactivator. At first, we cloned ligand-binding domain of nuclear receptors including ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, PR, GR, MR, RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , TR $\alpha$ , TR $\beta$ , VDR, RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$ , PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ , FXR, CAR and SXR. Second, we subcloned these genes into two-hybrid vector pGBT9 so that they were in the same translational reading frame as the vector's GAL4 DNA binding domain. At the same time, coactivator (TIF2) was amplified by RT-PCR and subcloned into pGAD424 for the production of fusion protein with GAL4 activation domain. Finally, the pGBT9-receptor and pGAD424-coactivator were introduced into yeast strain Y190, which contain  $\beta$ -galactosidase gene driven by GAL4 binding site.

Using these constructed systems, we tested the induction of  $\beta$ -galactosidase by adding known-ligands to yeasts. As results, we could see good dose-response curve in concerned with ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, PR, GR, MR, RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , TR $\alpha$ , TR $\beta$ , VDR, RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$ , FXR and CAR. However, PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , LXR $\beta$  and SXR could not work well due to the high background.

Next, the yeast two-hybrid systems were applied to 20 suspected endocrine disruptors. Nonylphenol and octylphenol showed agonist activity to RARs as well as ERs. Surprisingly, triphenyltin and tributyltin showed strong effectiveness on RXRs. These results suggest that industrial chemicals may disturb endocrine systems by targeting to various nuclear receptors.

### (3) 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

研究者 船江良彦 (大阪市立大学大学院医学研究科教授)

#### 研究要旨

胎児期・乳児期においてビスフェノール A (BPA) に暴露されたマウスの中枢神経系への影響について、脳内モノアミン量の変化を検討した。脳におけるモノアミンは、運動・感情・情動発現・脳報酬系に関与していると考えられている神経伝達物質である。暴露実験の結果、親マウスへの BPA 投与によって胎仔期・乳仔期に間接的に暴露を受けた仔マウスの脳では、ドパミン (DA) の減少が見られた。また、離乳後 3 週間、BPA の暴露を解除した後でも DA の減少は継続しており、この減少が何らかの不可逆的な変異によって引き起こされる可能性が示唆された。この様に、BPA は DA の減少を引き起こす事で中枢神経系に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた事から、脳神経細胞に BPA 結合タンパク質が存在すると考えた。脳シナプトソーム画分に BPA の結合活性が見られたので、この BPA の結合タンパク質の単離・精製を試みた。可溶化、イオン交換カラムクロマトグラフィー、BPA-Sepharose アフィニティーカラムクロマトグラフィーによって本タンパク質を SDS-PAGE 上でシングルバンドとして精製する事に成功した。N 末端アミノ酸配列の分析により、このタンパク質が protein disulfide isomerase (PDI) と相同性を示す事が明らかとなった。PDI は甲状腺ホルモン結合タンパク質としても知られている。大腸菌内で大量発現させたヒスチジン融合 PDI を用いて競合的結合実験を行ったところ、BPA は甲状腺ホルモンの結合を阻害する事が明らかとなった。

以上の結果より、BPA の中枢神経系への作用は PDI に結合する甲状腺ホルモンに影響を与えた結果起こる事が推察された。そこで、PDI への親和性を指標に、平成 12-13 年度にリストアップされた「優先してリスク評価に取り組む物質」の 20 種類の化合物についてスクリーニングを行った。その結果、4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、BPA、ペンタクロロフェノール、2,4-ジクロロフェノールが甲状腺ホルモンの結合を阻害する事が明らかとなった。これらの物質は、PDI を介して甲状腺ホルモンの働きを模倣する事によって、内分泌攪乱作用を示すことが示唆された。

#### 研究協力者

今岡 進 (関西学院大学理工学部教授)

廣井 豊子 (大阪市立大学大学院医学研究科講師)

#### A. 研究目的

##### 1. BPA の胎児期・乳児期暴露による、脳内モノアミン量に及ぼす影響

BPA はポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料であるほか、歯科用シーラント剤として用いられており、容易に経口的に摂取されうる化合物である。また BPA は、エストロゲン活性を有しており、内分泌攪乱化学物質 (EDCs) の一つとして注目されている化合物である。脳におけるモノアミンは、運動・感情・情動発現・脳報酬系に関与していると考えられており、躁鬱病や感情障害・行動障害といった多くの精神疾患、さらには近年問題となっている注意欠陥・多動性症候群 (ADHD) や学習障害 (LD) の発症に関与しているとの報告もある。

本研究では、BPA の胎仔期・乳仔期暴露による脳内モノアミン量の変動を調べる事を目的とした。

##### 2. BPA 結合タンパク質の精製

EDCs の中枢神経系への影響は、不明な点が多く、分子生物学的なメカニズムが明らかにされていない。前研究の結果より、BPA が中枢神経系へ影響を及ぼす事が明らかとなった事から、この BPA が結合するタンパク質 (レセプター様タンパク質) の単離・精製を試みた。

### 3. PDI に対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害試験

優先してリスク評価に取り組む物質は、内分泌攪乱作用を持つと断定されたものではなく、優先的に調査研究を行う対象として取り上げられたもので、生殖器系や免疫系への影響を指標とした評価法がほとんどであり、近年問題視されるようになった「中枢神経系への影響」をエンドポイントとした評価法は全くと言っていいほど行われていない。それには、EDCs の作用点が捕らえられていないからであると考えられる。

我々の研究の結果より、BPA の結合タンパク質の実体が明らかになった。このタンパク質は甲状腺ホルモンである  $T_3$  の結合タンパク質であった。BPA は甲状腺ホルモンである  $T_3$  の結合を阻害する事によりその働きを模倣・阻害している可能性が示唆された。本研究では H12-13 年度にリストアップされた、優先してリスク評価に取り組む物質の 20 種の化合物を  $T_3$  との競合的結合実験によりスクリーニングし、 $T_3$  の作用を攪乱しうる物質を選定する目的で検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. BPA の胎児期・乳児期暴露による、脳内モノアミン量に及ぼす影響

BPA を Sire および Dam ddy マウスに混餌で経口投与し、それら親マウスから生まれた offspring マウスを用いて検討を行った。BPA 投与群は、親の BPA 投与の量により、0.002, 0.5, 2, 8 mg / g of food の 4 種に分け、それら 4 種それぞれ、雄、雌各 7 匹の offspring を一群とした。コントロール群は、正常食を摂取させた。Offspring マウスは、離乳直後の 3 週齢と 6 週齢を用いた。摘出した脳は正中二等分し、液体窒素にて凍結後、使用するまで -80 °C にて保存した。

脳内モノアミンの定量には半脳を用いて行った。凍結脳組織に内部標準物質としてイソプロテレノールと、脳組織重量に合わせて過塩素酸を加えてヒスコトロンで懸濁し、タンパク質を変性させた後、遠心分離を行い変性タンパク質を除去した。上澄に酢酸ナトリウムを添加して pH を 3.0 付近に調節した後、HPLC 分析に供した。検出には多電極型電気化学検出器を用いた。脳内の主要なモノアミン系神経伝達物質として DA, ノルエピネフリン (NE), セロトニン (5-HT) を定量した。

(倫理面への配慮)

実験動物に対する動物愛護上の配慮として、マウスへの BPA の投与は、苦痛を伴わない混餌で行い、組織摘出は断頭法による安楽死後、速やかに行った。

### 2. BPA 結合タンパク質の精製

#### (1) BPA 結合実験

BPA の結合活性は、BPA の放射性同位体 ( $[^3H]$ -Bisphenol A) とタンパク質標品を 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 中で 4 °C にて 2 時間インキュベーションした後、遠沈法あるいは PEG 沈澱法により Bound/Free 分離を行い、沈澱に含まれる放射活性を測定する事により求めた。

【遠沈法】反応後の反応液を遠心分離 (14,500 rpm, 5 min, 4 °C) した後、上澄をアスピレーターにより除去した。沈澱を 1.0 mL の洗浄バッファー (150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.0) で 2 回、洗浄した。

【PEG 沈澱法】反応後の反応液に等量の 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 (12% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.2 M  $ZnCl_2$  を含む) を加えて攪拌した後、遠心分離 (14,500 rpm, 5 min, 4 °C) を行った。上澄をアスピレーターにより除去した後、1.5 mL の洗浄バッファー (6% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.1 M  $ZnCl_2$  を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.0) で 2 回洗浄した。

#### (2) ラット脳 P2 画分の調製

以下の操作は全て 4 °C にて行った。ラット脳をバッファー A (0.32 M sucrose / 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 0.05 % の protease inhibitor cocktail を含む) で 2 回洗浄した後、湿重量に対して 9 倍量のバッファー A を加え、テフロン-ガラスホモジナイザーにてホモジナイズ (900 - 1,000 rpm, 10 strokes) した。ホモジネートを遠心分離 (1,500 × g, 20 min) して得られた上澄を S1

画分とした。S1画分を遠心分離（17,000×g, 15 min）して得られた沈澱をバッファー A にて懸濁し、P2画分とした。P2画分をさらに遠心分離（17,000×g, 15 min）して得られた沈澱を P2'画分（粗シナプトゾーム画分）とした。P2'画分は実験に使用するまで-80℃にて保存した。

### (3) BPA 結合タンパク質の精製

以下の操作は「BPA-Sepharose 樹脂の作製」以外すべて 4℃にて行った。

【可溶化】P2'画分（10 mg / mL）250 mg-protein に終濃度 0.5 %となるように sucrose monolaurate を加え、スターラーを用いて 60 分間、穏やかに攪拌し、可溶化を行った。遠心分離（100,000×g, 60 min）して得られた上澄を可溶化画分とした。

【陰イオン交換カラムクロマトグラフィー】可溶化画分を Whatman DE52 カラム(25 mL-bed, 2.5 × 5 cm) に供した。NaCl によるステップワイズにてタンパク質を溶出し、BPA との結合活性の高い画分を採取した。

【BPA-Sepharose 樹脂の作製】BPA のメチル基を置換した BPA 誘導体（図 1）の合成は、神戸天然物化学株式会社に依頼した。BPA を CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia) とカップリング反応により結合させ、BPA アフィニティーカラムを作製した。

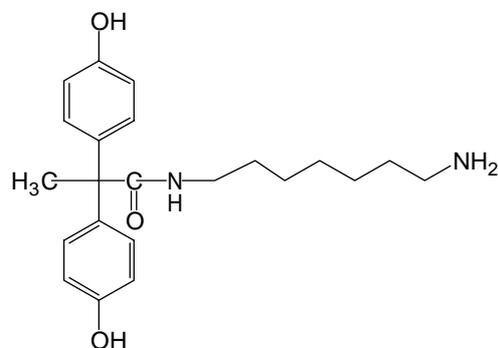


図 1 BPA誘導体の構造

【BPA アフィニティーカラムクロマトグラフィー】陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにおいて BPA との結合活性の高かった画分を BPA-Sepharose 樹脂(2.0 mL wet vol) と混合し、ローテーターを用いて 2 時間、穏やかに攪拌した。スラリーをカラム（ポリプレップ エンプティーカラム, BIO-RAD）に移し、8 mL の洗浄バッファー（バッファー A + 0.15 M NaCl）で洗浄した。5 mL の溶出バッファー（2 mM BPA を含むバッファー A + 0.15 M NaCl）を加え、スラリーを 1 時間、穏やかに攪拌した。スラリーをカラムに移し、溶出液を採取した後、さらに 5 mL の溶出バッファーにて溶出した。

### (4) ラット脳PDI遺伝子 (*rPDI*) のクローニングとHis-tag融合発現

ラットより脳を摘出し、ISOGEN (QIAGEN) を用いて mRNA を調製した。RT-PCR法により cDNA を調製し、ラット肝臓 PDI の塩基配列をもとに設計したプライマーを、二つの組み合わせを用いて PCR を行い、遺伝子の増幅を行った。

#### 組み合わせ A (全長 *PDI* 前半部分)

sense : 5'-GGG GGG ATC CTC CGA CAT GCT GAG CCG TGC-3'

antisense : 5'-AGC GAT GAC GAT ATT CTC AT-3'

#### 組み合わせ B (全長 *PDI* 後半部分)

sense : 5'-ACC TGA TGA GCC AGG AAC TG-3'

antisense : 5'-CCC TCG AGA GAT CTG GCT TCT GCA CTA C-3'

組み合わせ A で増幅された PCR 産物を *EcoR* と *BamH* により制限酵素消化し、pBluescript KS+ (TOYOBO) に組み込んだ。このプラスミドをコンピテント細胞 (DH5 COMPITENT high,

TOYOBO)に導入し、形質転換させた。Ampicillinを含むLB寒天培地上で培養し、コロニーの出現を確認した。アルカリ法によりプラスミドを調製し、*EcoR* と *Xho* により制限酵素消化した。これに組み合わせBで増幅されたPCR産物を *EcoR* と *Xho* により制限酵素消化したのち組み込んだ。このプラスミドをコンピテント細胞に導入し、形質転換させた。Ampicillinを含むLB寒天培地上で培養し、コロニーの出現を確認した。アルカリ法によりプラスミドを調製し、*Sac* と *Kpn* により制限酵素消化した。*rPDI*全長を含むDNA断片をpQE-80L(QIAGEN)に組み込んだ。このプラスミドをコンピテント細胞に導入し、形質転換させた。Ampicillinを含むLB寒天培地上で培養し、コロニーの出現を確認した。アルカリ法によりプラスミドを調製し、*rPDI*の全長が含まれている事を確認した。

#### (5) His-tag融合PDIの精製

上記(4)の方法によってられたクローンのグリセロールストックより2×YT培地に植菌し、一晚培養した。10 mLの培養液を500 mLの培養液に植菌し、OD<sub>600</sub>=6.0に達するまで振騰培養を行った。培養液にIPTGを1.0 mg/mLとなるように加え、さらに4時間、振騰培養を行った。遠心分離により細胞を回収し、PBSに再懸濁して遠心分離により洗浄菌体を得た。50 mLの溶菌バッファー (6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.5 % protease inhibitor cocktail, 1 mg/mL lysozyme, pH 8.0) で懸濁し、氷上に30分間おいた。氷中にて5分間の超音波処理を行った後、sucrose monolaurateを0.5%となるように加え、スターラーを用いて4 にて60分間、穏やかに攪拌した。遠心分離 (50000×g, 30min, 4 )により得られた上澄を可溶化画分とし、Ni-NTA agaroseカラム (1.0 mL, QIAGEN) に供した。5 mLの洗浄液 (溶菌バッファー + 0.1 % sucrose monolaurate+0.5 % protease inhibitor + 10 mM imidazole) でカラムを洗浄した後、imidazoleによるステップワイズにて溶出した。それぞれの画分をSDS-PAGE分析に供し、必要な画分を集めて50 mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 8.0) に対して透析を行った。得られた最終画分をHis-tag融合PDI精製標品とした。

### 3 . PDI に対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害試験

#### (1) 合的結合阻害実験

本実験に用いた試験物質は全て Wako 社より購入した。

T<sub>3</sub>の結合活性は、試験物質の存在下で、T<sub>3</sub>の放射性同位体 [<sup>125</sup>I]-3,5,3' -triiodothyronine, 1.0 nM) と His-tag 融合 PDI (0.1 mg/mL protein) とを 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 中で 3 時間、4 にてインキュベーションした後、PEG 沈澱法により Bound/Free 分離を行い、沈澱に含まれる放射活性を測定する事により求めた。T<sub>3</sub>の非特異的結合量を測定するために、過剰量 (30 μM) の T<sub>3</sub>を加えた系を用意した。また試験物質を溶解するためのエタノール濃度は、事前に試験を行い、T<sub>3</sub>の結合に影響を与えない濃度を検討した結果、終濃度 4 %とした。

T<sub>3</sub>の結合率 B / B<sub>0</sub> (%)は下式により求めた。

$$B / B_0 (\%) = (TB - NB) / (T_0B - NB) \times 100$$

TB : 試験物質存在下での T<sub>3</sub> の結合量  
T<sub>0</sub>B : 試験物質非存在下での T<sub>3</sub> の結合量  
NB : 非特異的結合量

#### (2) データ解析

得られたデータは、GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc.) により解析を行った。

## C. 実験結果

1. BPA の胎児期・乳児期暴露による、脳内モノアミン量に及ぼす影響 (図 2)  
BPA 投与による体重増減への影響は見られなかった。

(1) DA

3 週齢の投与群すべてにおいて減少傾向がみられた。特に 8 mg / g of food 群において有意に減少した。一方、6 週齢では投与群すべてにおいて有意な減少がみられた。

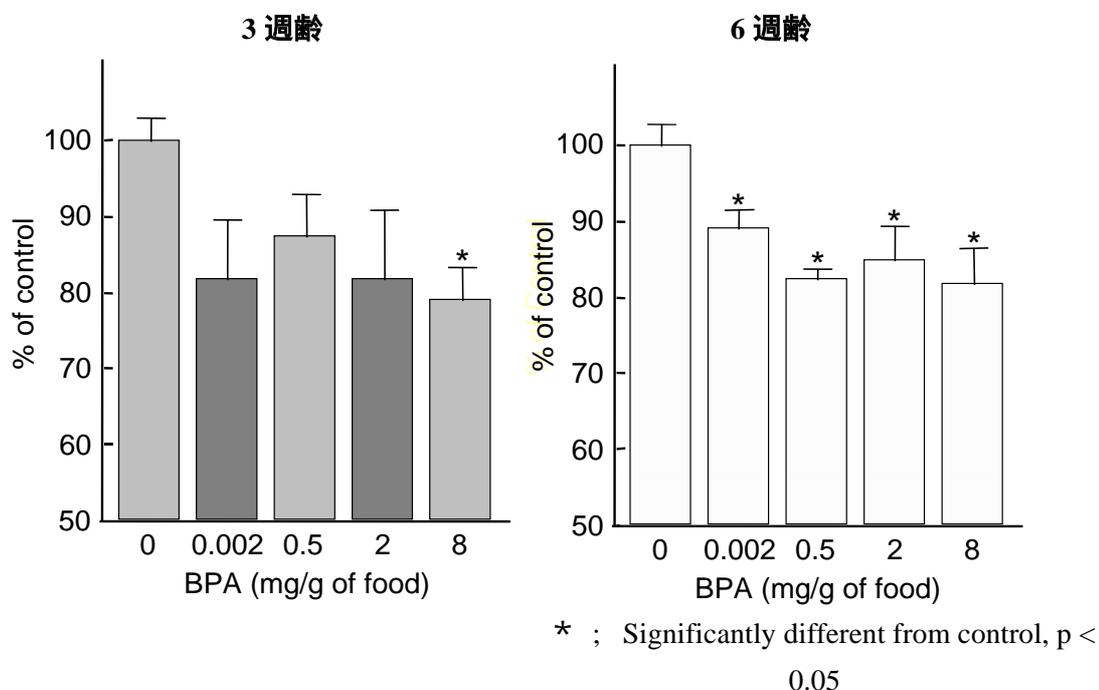


図 2 胎仔期・乳仔期に BPA の暴露を受けたマウスの脳内 DA 量の変化

(2) NE

いずれの投与群においても有意な差はみられなかった。

(3) 5-HT

いずれの投与群においても有意な差はみられなかった。

## 2. BPA 結合タンパク質の精製

(1) ビスフェノール A 結合実験

ラット脳 P2 画分に対する [ $^3\text{H}$ ]-BPA の結合の結果を図 3 に示す。

過剰量の BPA (1 mM) を加えたときの値を非特異的結合とし、特異的結合は、全結合から非特異的結合を差し引いた値で算出した。図 3 に示すように、[ $^3\text{H}$ ]-BPA の増加に従い、特異的結合量が増加する事が分かる。この事から、ラット脳 P2 画分には BPA が特異的に結合する部位が存在する事が明らかになった。

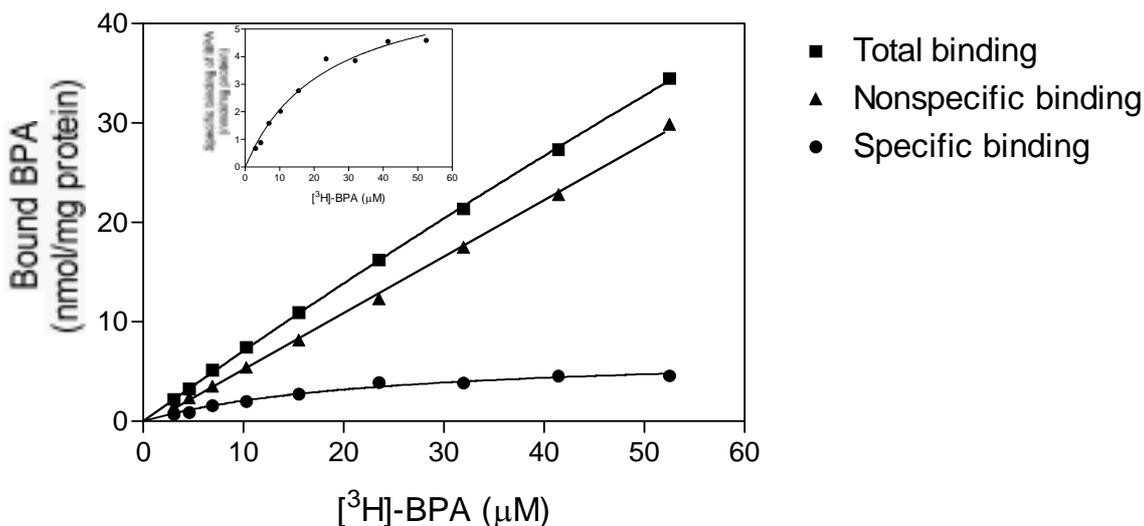


図3 ラット脳 P2 画分における<sup>3</sup>H]-BPA の結合性

(2) BPA 結合タンパク質の精製

a) 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

Whatman DE52 による陰イオン交換カラムクロマトグラフィーの結果を図4に示す。NaCl によって 0.1 M, 0.2 M, 0.5 M とステップワイズにて溶出した結果、0.2 M NaCl で溶出した画分においてタンパク質あたりの BPA の結合活性の最も高い値が得られた。そこでこの画分をさらに BPA アフィニティーカラムクロマトグラフィーに供した。

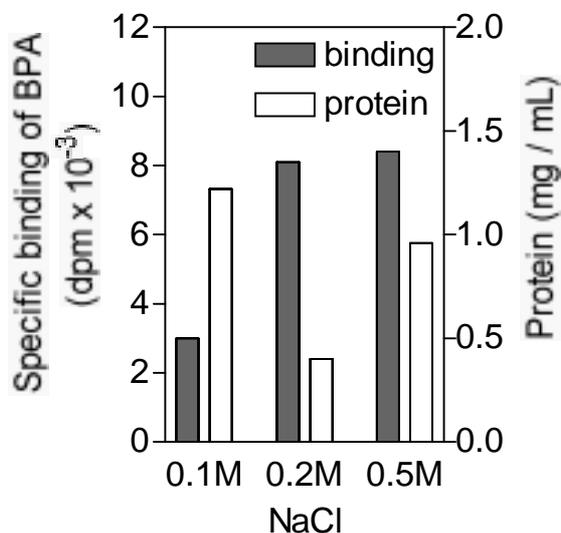


図4 Whatman DE52 による陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

b) BPA アフィニティーカラムクロマトグラフィー

SDS-PAGE の結果を図5に示す。レーン5に示すように、BPA-Sepharose アフィニティーカラムクロマトグラフィーによって本タンパク質を SDS-PAGE 上で単一にまで精製する事ができた。さらにこのタンパク質を PVDF メンブレンにトランスファーし、アミノ酸 N-末端配列の分析を行った結果、33 残基の配列 (DALEEEDNVLVLKKS NFAEALAAHNYLLVEFYA) が得られ

た。この配列をもとに Web 上のデータベース、BLAST によりホモロジー検索を行った結果、PDI と 100% の相同性を示した。

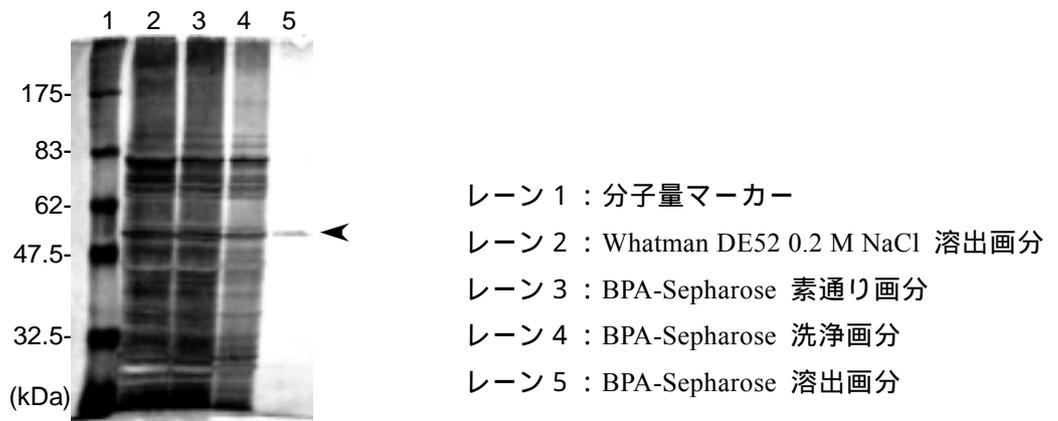


図 5 BPA-Sepharose アフィニティーカラムクロマトグラフィーによって精製されたタンパク質の SDS-PAGE 分析

### (3) His-tag 融合 PDI に対する $[^3\text{H}]$ -BPA の結合性

His-tag 融合 PDI に対する  $[^3\text{H}]$ -BPA の結合の結果を図 6 に示す。

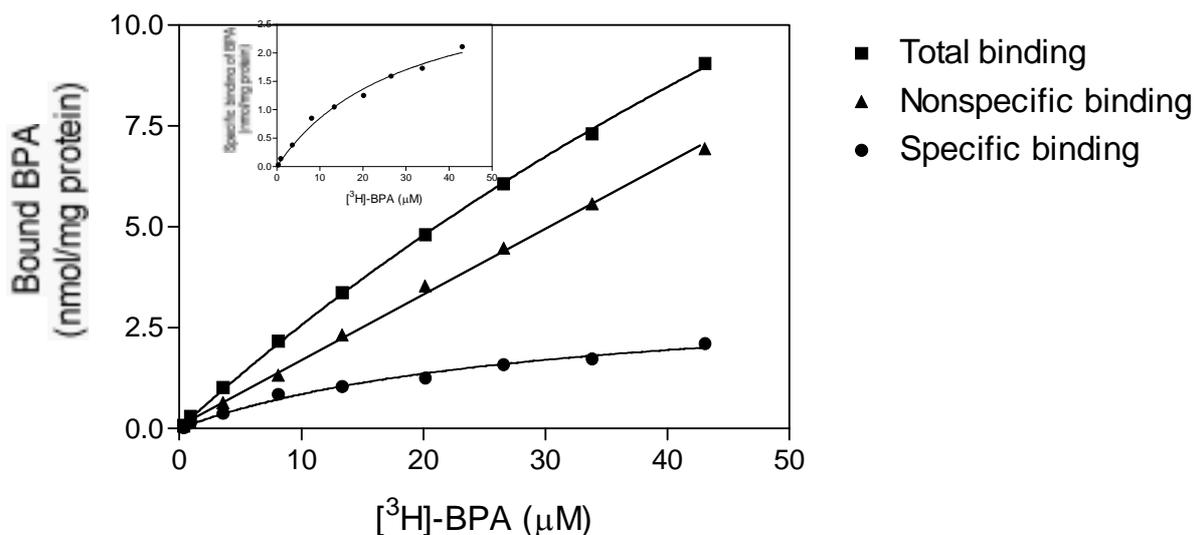


図 6 His-tag 融合 PDI に対する  $[^3\text{H}]$ -BPA の結合性

過剰量の BPA (1 mM) を加えたときの値を非特異的結合とし、特異的結合は、全結合から非特異的結合を差し引いた値で算出した。図に示すように、 $[^3\text{H}]$ -BPA の増加に従い、特異的結合量が増加する事が分かる。この事から、His-tag 融合 PDI には BPA が特異的に結合する部位が存在する事が明らかになった。また、PDI は甲状腺ホルモン結合タンパク質 ( $\text{T}_3$  結合タンパク質) と知られている事から、標準リガンドとして  $[^{125}\text{I}]\text{-T}_3$  に対する競合的結合阻害実験を行ったところ、BPA は  $\text{T}_3$  の約 1/20 の強さで  $[^{125}\text{I}]\text{-T}_3$  の結合を阻害した(図 7)。

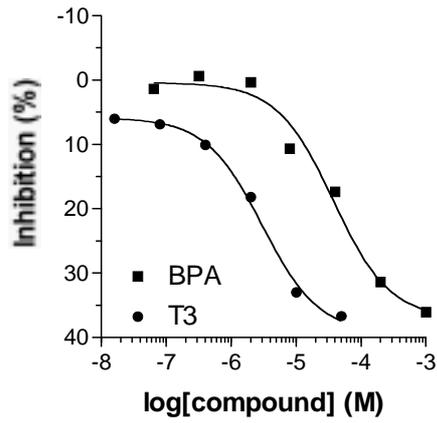
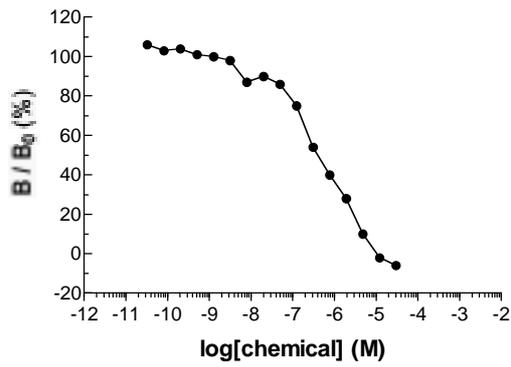


図7 His-tag 融合 PDI に対する [<sup>3</sup>H]-BPA の結合性

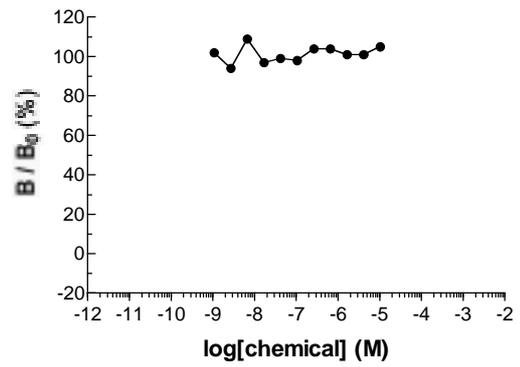
### 3 . PDI に対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害試験

20 種類の化合物の競合的結合阻害実験を行った結果を図 8 に示した。T<sub>3</sub> の結合阻害がみられた化合物は、4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、ペンタクロロフェノール、BPA、2,4-ジクロロフェノールの 5 種であった。

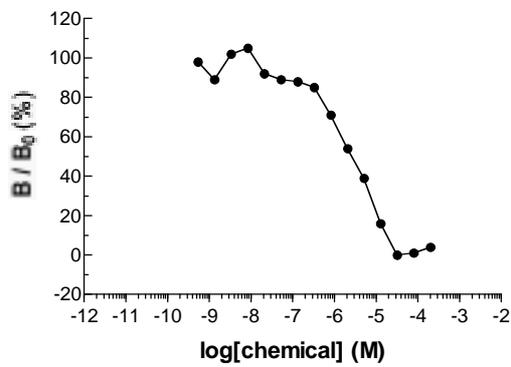
**3,5,3'-Triiodothyronine**



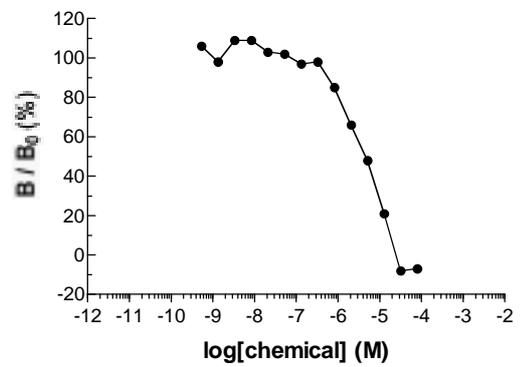
**Tributyltin**



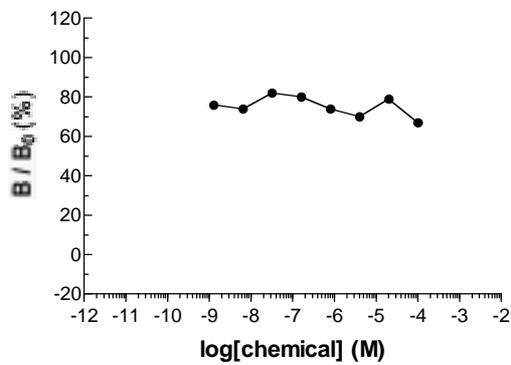
**4-Octylphenol**



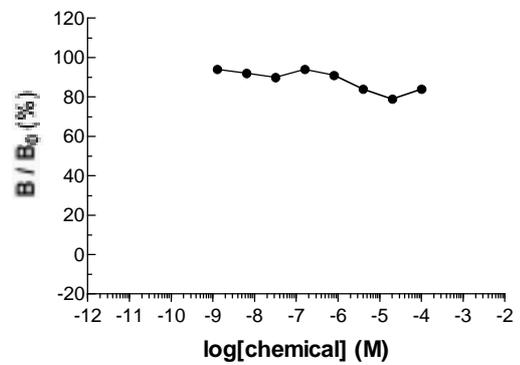
**Nonylphenol**



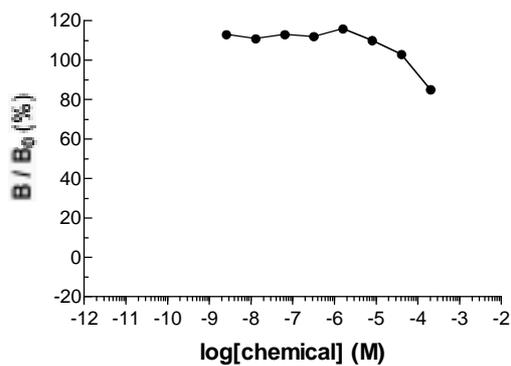
**Dibutyl phthalate**



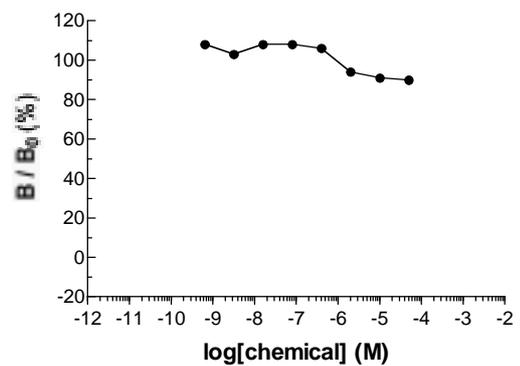
**Octachlorostyrene**



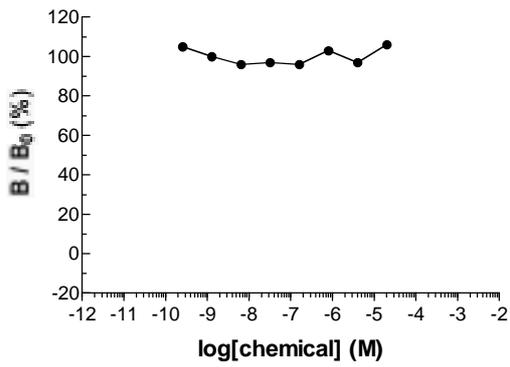
**Benzophenone**



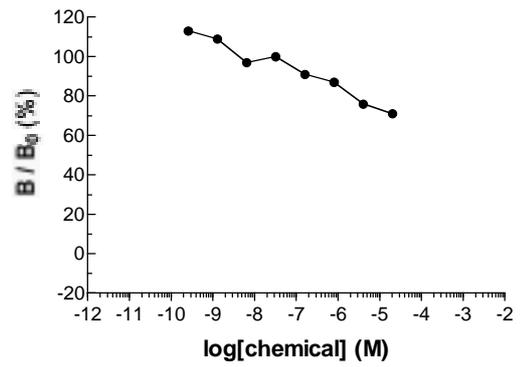
**Dicyclohexyl phthalate**



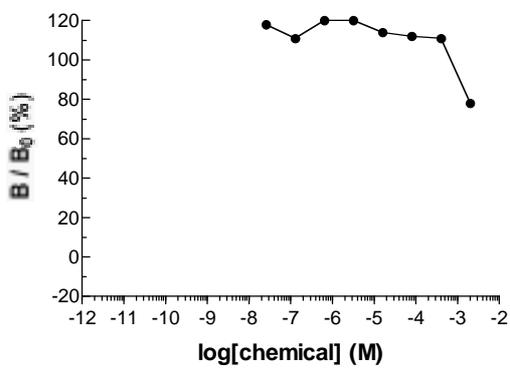
**Diethylhexyl phthalate**



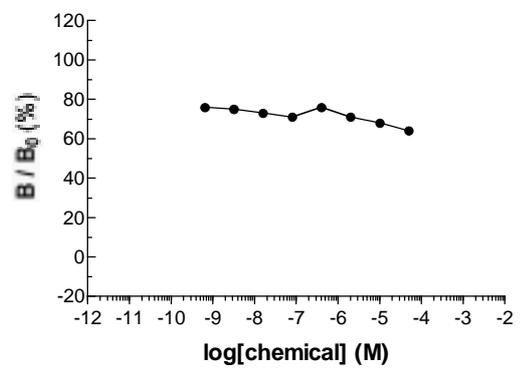
**Butyl benzyl phthalate**



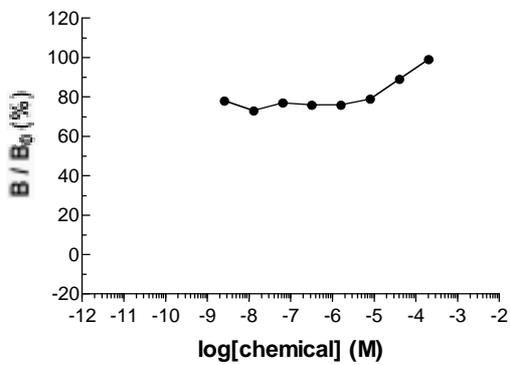
**Diethyl phthalate**



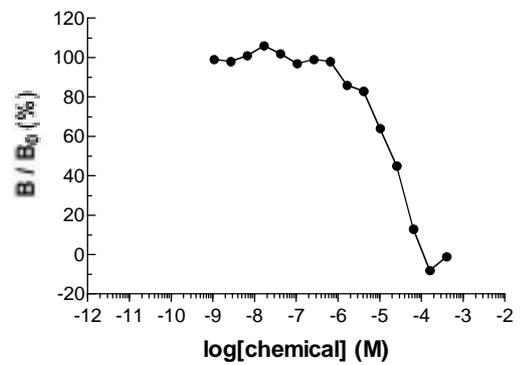
**Diethylhexyl adipate**



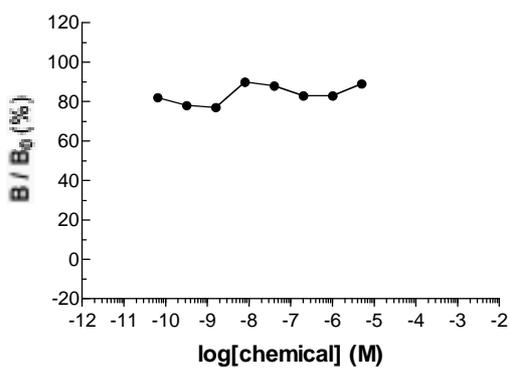
**Triphenyltin**



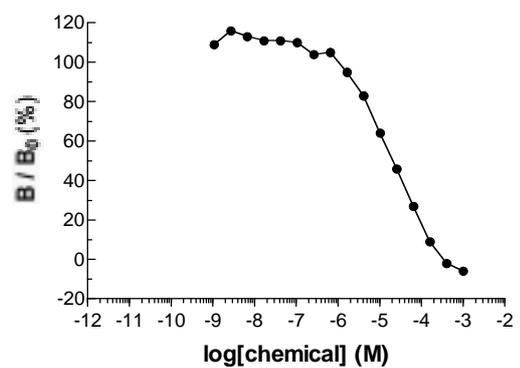
**Pentachlorophenol**



**AMITROL**



**Bisphenol A**



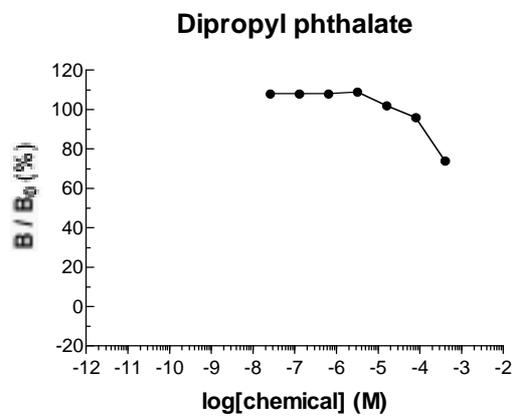
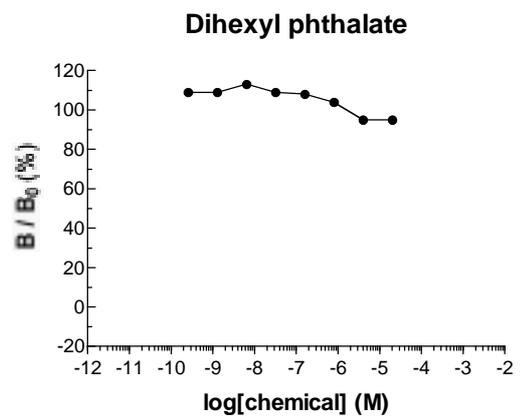
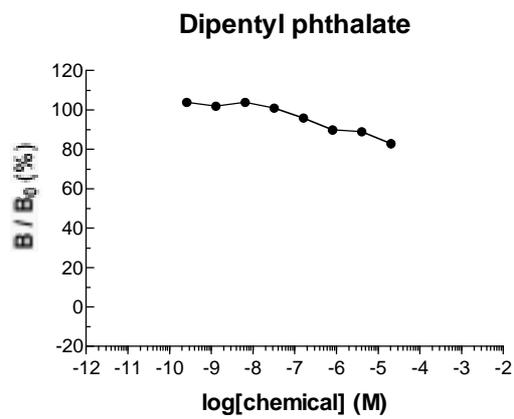
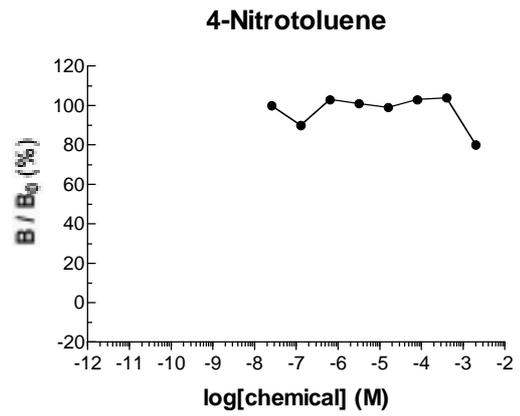
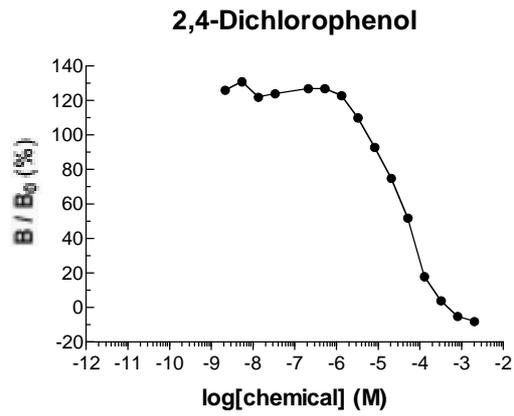
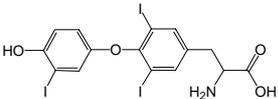
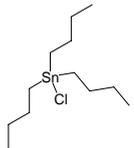
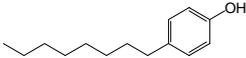
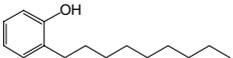
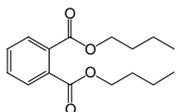
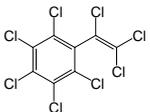
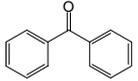
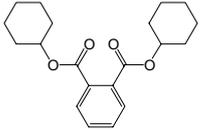
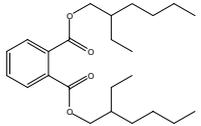
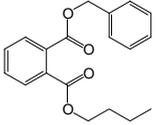
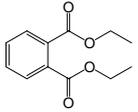
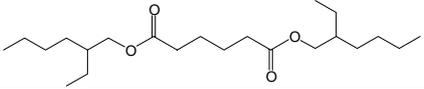
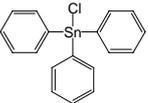
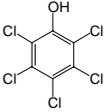
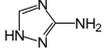
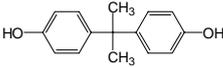
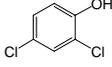
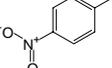
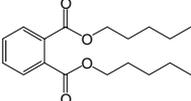
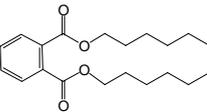
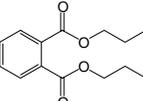


図8 His-tag 融合 PDI に対する T<sub>3</sub> の結合阻害性

試験した化合物の構造式、および 50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を表 1 に示した。

表 1 His-tag 融合 PDI に対する各種化合物による T<sub>3</sub> の結合阻害

化合物名	構造式	IC <sub>50</sub>
3,5,3'-Triiodo-L-thyronine		0.48 μM
Tributyltin (chloride)		N.D.
4-Octylphenol		2.82 μM
Nonylphenol		5.25 μM
Dibutyl phthalate		N.D.
Octachlorostyrene		N.D.
Benzophenone		N.D.
Dicyclohexyl phthalate		N.D.
Diethylhexyl phthalate		N.D.
Butyl benzyl phthalate		N.D.
Diethyl phthalate		N.D.
Diethylhexyl adipate		N.D.

Triphenyltin (chloride)		N.D.
Pentachlorophenol		22.3 μM
AMITROL		N.D.
Bisphenol A		17.3 μM
2,4-Dichlorophenol		34.8 μM
4-Nitrotoluene		N.D.
Dipentyl phthalate		N.D.
Dihexyl phthalate		N.D.
Dipropyl phthalate		N.D.

N.D. : Not detected

今回試験した化合物のうち、最も阻害効果の高かった化合物は、4-オクチルフェノールとノニルフェノールであり、 $T_3$ の約 1/10 程度であった。次いで BPA、ペンタクロロフェノール、2,4-ジクロロフェノールであり、 $T_3$ の数十分の一程度の結合力を示した。

## D . 考察

### 1 . BPA の胎児期・乳児期暴露による、脳内モノアミン量に及ぼす影響

BPA を親マウスへ暴露し、仔の脳内 DA, NE, 5-HT を測定した。その結果、BPA 投与群において DA 量が減少する結果が得られた。DA の脳内における機能を考えると、これらのマウスは運動、感情や情動発現、脳報酬系に異常を来している可能性が考えられた。また、この DA の減少は、3 週齢および 6 週齢の両週齢においてみられたことから、この異常が、母親を介して BPA の間接的な暴露を受けている時から生じ、さらにその後 BPA の暴露から解除されても持続している事が明らかとなった。この事は、BPA の胎仔期・乳仔期暴露による DA 量の減少が、不可逆的变化を伴っている可能性を示している。また、肉眼的にも実験的にも曝露群において行動学的変化がみられた。

本研究で用いた BPA 濃度と、実際のヒトでの曝露量との関連性については、ヒトでの曝露量について有用なデータが得られていないため、不明である。

## 2 . BPA 結合タンパク質の精製

ラット脳における BPA のレセプター様タンパク質の探索を行った結果、P2 画分に BPA が特異的に結合するタンパク質の存在が明らかになった。本タンパク質を精製し、アミノ酸の N 末端配列の分析を行った結果、N-末端の 33 残基は PDI と 100%の相同性を示した。

PDI は多機能タンパク質として知られており、細胞内でシャペロンとして働くイソメラーゼ活性を有する他、iodothyronine 5'-monodeiodinase, prolyl 4-hydroxylase のサブユニットとしての機能を有する事が知られている。その他、特に注目すべきは、本タンパク質が thyroid hormone binding protein として、甲状腺ホルモンである  $T_3$  の結合能をも有している事である。我々はこの点に着目し、 $T_3$  との競合結合実験を行った。その結果、BPA と  $T_3$  の結合は、PDI において同一の部位である事が明らかになり、BPA は生体内においても  $T_3$  の結合を阻害する事によりその働きを模倣・阻害する可能性が示唆された。

## 3 . PDI に対する甲状腺ホルモンの結合阻害試験

今回試験した 20 種類の化合物のうち、 $T_3$  の結合を阻害した化合物は 5 種類であった。これらの化合物は化学構造上の特徴を有しており、何れもフェノール基を有するものであった。今回用いた方法では、試験物質のアゴニスト / アンタゴニスト作用の識別を行う事はできないが、甲状腺ホルモンの作用を攪乱する可能性のある化合物のスクリーニング法としては有用なものである事が明らかとなった。これらの物質の生体への影響に関しては、精巣・精巣上体・前立腺・精囊・凝固腺・子宮重量の減少、精子産生の減少、精子形態の異常、胎児数・新生児数の減少、化骨遅延、早期死胚数の増加などが報告されている。ペンタクロロフェノールは血清中の甲状腺ホルモン濃度を低下させるとの報告があるが、PDI との相互作用を示した報告はない。

これまでに BPA の作用機序としては、核内エストロゲンレセプターを介したエストロゲン様作用による、生殖器系への影響が数多く報告されているが、PDI にはエストロゲンも結合することから、これらの影響が PDI を介した作用である可能性も考えられる。また他の物質の甲状腺ホルモン攪乱作用に関する研究は、circulate hormone の濃度を指標にしているが、外因性化合物の細胞内での作用に視点を置く事は、内分泌攪乱化学物質と疑われる化合物の新たな作用機構を明らかにする目的で非常に重要であると考えられる。

## E . 結論

EDCs の中枢神経系への影響は、行動異常・発達障害などとの関連性が示唆されているにもかかわらず作用メカニズムに関しては不明な点が多い。脳シナプトゾーム画分に存在する BPA 結合タンパク質である PDI は甲状腺ホルモン結合タンパク質としても知られており、本研究により BPA は甲状腺ホルモンの結合を阻害する事が明らかとなった。

PDI への親和性を指標にしたスクリーニング法により、4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、BPA、ペンタクロロフェノール、2,4-ジクロロフェノールが、甲状腺ホルモンの作用を攪乱する可能性のある化合物として挙げられた。

# Molecular biological investigations of bisphenol A receptor

Yoshihiko Funae  
Osaka City University Medical School, professor

**Key Word :** bisphenol A, central nervous system

## **Abstract:**

We studied the effect of prenatal and lactational exposure of bisphenol A (BPA) on monoaminergic neuron. The variation of monoamine contents in neonatal and lactational brain exposed indirectly to BPA were investigated. Monoamine is the neurotransmitter in the brain thought to be related to movement, emotion and reward. The result showed that reduced dopamine (DA) contents in the offsprings, which were indirectly exposed to BPA. Reduction of DA contents were continued until without BPA exposure after weaning. So, it has suggested that the reduced DA contents was caused by irreversible variation of dopaminergic system. Since BPA was suspected to affect central nervous system through dopaminergic neuron, we convinced that novel receptor of BPA present in synaptosomal membrane fraction. So, we tried to isolate and purify the BPA binding protein by solubilization, anion column chromatography and BPA-Sepharose affinity column chromatography. The purified protein was confirmed to be homogeneous by SDS-PAGE. N-terminal sequence of purified BPA binding protein was identical with protein disulfide isomerase (PDI), which was known as thyroid hormone binding protein. To elucidate possible molecular mechanism of the BPA action on central nervous system, competition binding assay with histidine tagged fusion PDI expressed in *E. coli* were performed. The results demonstrated that BPA displaced the binding of thyroid hormone to PDI.

Since BPA affected central nervous system via PDI, we examined and compared the thyroid hormone disrupting activity of twenty chemicals listed in "Chemicals to be Addressed in Prioritized Risk Assessments" selected 2000 and 2001 at ministry of environment as chemicals suspected of having endocrine disrupting effects. The results demonstrated the binding of thyroid hormone to PDI was inhibited by 4-octylphenol, nonylphenol, BPA, pentachlorophenol and 2, 4-dichlorophenol. These five chemicals may possible to interfere the function of thyroid hormo

## (4) 内分泌攪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

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

フタル酸ジエチル (DEP)、フタル酸ジブチル (DBP)、フタル酸ブチルベンジル (BBP)、フタル酸ジシクロヘキシル (DCHP)、フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP)、アジピン酸ジエチルヘキシル (DEHA) (それぞれ 2.25mmol/kg)、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)、ノニルフェノール (それぞれ 0.6mmol/kg) の精巣ライディッヒ細胞のテストステロン産生系に与える影響を検討した。これらのうち、血清のテストステロン濃度を低下させたのは、DEHP、DEHA、2,4-D であった。しかし、これらの3種の化学物質のライディッヒ細胞のテストステロン合成に与える影響は若干異なっていた。DEHP と DEHA は CYP17-mRNA を抑制したのみであったが、2,4-D は CYP17-mRNA に加えて、HMG-CoA synthase と reductase の mRNA も抑制し、内因性のコレステロール合成をも抑制していることが判明した。2,4-D、DEHP、DEHA はペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体のサブユニットのリガンドであるが、血清テストステロン合成系への作用機序は異なっているようである。

### 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)  
山田 哲也 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)  
系原誠一郎 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)  
古橋 功一 (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 (信州大学医学部社会予防医学)

### A. 研究の目的

外因性内分泌かく乱化学物質の代表的毒作用のひとつに性ホルモンレベルへの毒性影響がある。この機構を解明するために、多くの場合、テストステロン合成過程に焦点があてられ、この過程に与える影響が検討されている (Fig.1 参照)。しかしテストステロンの基質であるコレステロールの合成、輸送に関しては殆ど検討されていない。この一つの原因は、各ステップの酵素活性測定系が確立していないことにある。申請者らは、最近、リアルタイム PCR 法を用いることにより、微量の種々の酵素 RNA が定量できることを確認した。本年度は精巣におけるテストステロン合成に関わる8種の受容体や酵素の発現量をリアルタイム PCR 法を用いて測定し、種々の内分泌かく乱化学物質のテストステロンへの影響を検討することを計画した。内分泌攪乱化学物質の性腺ホルモンレベルへの影響の機構を解明するために、テストステロンの合成を、精巣ライディッヒ細胞へのコレステロールの取り込み、内因性コレステロール合成とミトコンドリアへの輸送、テストステロン合成にわけ、各ステップに関わる蛋白に対する種々の内分泌かく乱化学物質の影響を検討し、リスク評価の知見を収集することを目的として、実験を行った。

## B . 研究方法

1 . 動物実験は名古屋大学大学院医学研究科付属動物実験施設のガイドラインに沿って行った。10 週齢の雄 CD-1 マウス (1 群 12 匹) にフタル酸ジエチル (DEP)、フタル酸ジブチル (DBP)、フタル酸ブチルベンジル (BBP)、フタル酸ジシクロヘキシル (DCHP)、フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP)、アジピン酸ジエチルヘキシル (DEHA) をそれぞれ 2.25mmol/kg、2,4 - ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)、ノニルフェノールをそれぞれ 0.6mmol/kg を 2 週間、経口的に投与し、最終投与から 18 時間後に血液と精巣を採取した。投与量は著者らのこれまでの経験、あるいは他の研究者の報告を参考に、テストステロンへの影響が予想される量を設定した。精巣については、後述の様にライディッヒ細胞を濃縮分離し、RNA を抽出した。抽出した RNA サンプルを用いて、テストステロン合成に関わる (コレステロール合成系、コレステロールの輸送、テストステロン合成系) 蛋白の mRNA をリアルタイム PCR 法で解析した。コレステロールの取り込みおよび合成系に影響がみられた場合は、ライディッヒ細胞のコレステロール染色をすると同時にライディッヒ細胞の一部より脂質を抽出して、コレステロールの濃度を測定した。一方、血液は血清を分離し、テストステロン濃度を測定した。

### 2 . ライディッヒ細胞の分離と精製

マウスの精巣を摘出し、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)、hyaruronidase (Sigma, 1mg/ml)、BSA (Sigma, 1mg/ml) を含む 25mM HEPES buffer (Naqurai.; 20ml) にて震盪 (20min; 80cycle/min; 34C) 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巣を EBSS (Earle's Balanced Salt 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 -hydroxysteroid dehydrogenase による組織染 (Steinberger ; 1966) を行ったところ、およそ 80% が 3 -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、RNAlater 液で分析時まで保存した。

### 3 . RNA の単離、及び cDNA の合成

分離されたライディッヒ細胞は QIAGEN 社製 RNAlater に浸たし、単離するまで -20 で保存した。血清テストステロンに化学物質投与の影響がみられた場合のみ RNA を抽出した。RNA に関しては、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 (GIBCO BRL, Paisley, Scotland) を使い、Oligo(dT)<sub>12-18</sub> プライマーで合成した。

### 4 . 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、その配列を基にして PE Biosystems 社製 Primer Express version 1.0 で作成した。マウスの GAPDH は PE

Biosystems 社製を使用した。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。その他の mRNA は SYBR Green 法で測定した。

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 Rromega 社製 pGEM -T Easy vector 又は Invitrogen life technology 社製 pCR2.1 vector に組み込み、解析した数値は GAPDH に対する比として表した。

使用したプライマーあるいはプローブは以下の通りである。

- scavenger receptor, class B, type I (SR-BI):  
forward primer: 5'-CACCTTCAATGACAACGACACC-3',  
reverse primer: 5'-TCTCTGAGCCATGCGACTTG-3';
- low density lipoproteins receptor (LDLR):  
forward primer: 5'-CCACTTCCGCTGCAAATCAT-3',  
reverse primer: 5'-TCATGGGAGCCGTC AACAC-3';
- HMG-CoA synthase: forward primer: 5'-TGTGGCACCGGATGTCTTT-3',  
reverse primer: 5'-GACCAGATAACCACGTTCTTCAA-3';
- HMG-CoA reductase: forward primer: 5'-TGTGGTTTGTGAAGCCGTCAT-3',  
reverse primer: 5'-CGTCAACCATAGCTTCCGTAGTT-3';
- steroidogenic acute regulatory protein (StAR):  
forward primer: 5'-AAGGAAAGCCAGCAGGAGAAC-3',  
reverse primer: 5'-TCCATGCGGTCCACAAGTT-3';
- peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR):  
forward primer: 5'-AGTTCGTGGCACTGCATAAGC-3',  
reverse primer: 5'-GCTGCCCATTTCTCTCCTCCTA-3';
- cytochrome P450<sub>scc</sub> (CYP11A): forward primer: 5'-CCATCAGATGCAGAGTTTCCAA-3',  
reverse primer: 5'-TGAGAAGAGTATCGACGCATCCT-3';
- 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ 5 $\beta$ -4-isomerase (3 $\beta$ -HSD):  
forward primer: 5'-GGAGGCCTGTGTTCAAGCAA-3',  
reverse primer: 5'-GGCCCTGCAACATCAACTG-3';
- cytochrome P450<sub>17</sub> (17 $\alpha$ -hydroxylase/C<sub>17-20</sub> lyase CYP17):  
forward primer: 5'-CCATCCCGAAGGACACACAT-3',  
reverse primer: 5'-CTGGCTGGTCCCATTTCATTT-3';
- 17 $\beta$ -HSD: forward primer: 5'-CAACGATTCCTCCTGACACGAT-3',  
reverse primer: 5'-GCTGATGTTGCGTTTGAGGTAA-3';
- PPAR $\alpha$ : GI 7106384, forward primer: 5'-TTTCCCTGTTTGTGGCTGCTA-3',  
reverse primer: 5'-CCCTCCTGCAACTTCTCAATG-3'  
Taq Man probe, 5'-AATTTGCTGTGGAGATCGGCCTGG-3'

- ・ GAPDH: PE Biosystems 社製 TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents を使用  
Taq Man probe, 5'-CCCGTTCTCAGCCTTGACAGTGCC-3'

SYBR Green 反応は、25 µl 中に最終濃度 1× SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 400 nM プライマー, および 1 ng cDNA をテンプレートとして加え、95 °C で 10 分間インキュベーションをして Amplitaq Gold polymerase の活性化を行った。引き続き 95°C で 15 sec、40 cycles denaturation を、60 °C で 1 分間 annealing と extension を行った。

#### 5 . 血清テストステロンの測定

血清テストステロン濃度はヤترون社 ( Diagnostic Products Corporation 、 Los Angeles, USA)の DPC ・ トータルテストステロンキットを用いた。

#### 6 . Luteinizing hormone (LH) の測定.

マウスの LH のアミノ酸シーケンスは 98%ラットの LH と同じであるため、血清の LH 量はラット LH enzyme immunoassay (EIA) system (Amesham Pharmacia, Buckinghamshire, England)を用いて行った。

#### 7 . 病理的検索

摘出した精巣はブアン液で固定し、パラフィンで包埋し、切片を periodic acid-Schiff reagent (PAS) と hematoxylin で染色し、顕微鏡下で観察した。

#### 8 . コレステロールの測定

血清およびライディッヒ細胞中のフリーコレステロールとコレステロールエステルは和光純薬のコレステロール C-テストキットを用いて、酵素的に測定した。

### C . 研究結果

#### 1 . 血清テストステロン濃度

Fig.2 にマウス血清テストステロン濃度を示す。DEP、DCHP およびニルフェノールは血清テストステロン濃度には影響を与えなかった。DBP と BBP は血清テストステロン濃度を低下させる傾向を示したが、対照群との間に統計的な有意差は認められなかった。一方、DEHP、DEHA および 2,4-D 曝露は有意に血清テストステロン濃度を減少させた。これらの結果は精巣におけるテストステロン合成の機構を解析することが重要であることを示唆している。

#### 2 . ライディッヒ細胞における遺伝子発現の変化

ライディッヒ細胞におけるコレステロール代謝およびテストステロン合成に関わる様々な酵素および受容体の発現に対する 2,4-D の影響を Fig.3 に示す。測定は各々の蛋白の mRNA 発現量を real-time quantitative RT-PCR 法により測定し、結果は GAPDH-mRNA の比として示した。まず、2,4-D は PPAR -regulated proteins である lipoprotein lipase

(LPL) と medium-chain acyl- CoA dehydrogenase (MCAD) の mRNA 発現量を増大させたので、2,4-D により PPAR の機能が活性化されていることが推測された。2,4-D はコレステロールの取り込みにかかわる scavenger receptor, class B, type I (SR-BI) と low density lipoproteins receptor (LDLR) の発現には影響を与えず、このステップには影響を与えていない事が明らかとなった。次に内因性コレステロール合成に与える影響を検討した。2,4-D は HMG-CoA synthase と HMG-CoA reductase の mRNA の発現を低下させ、内因性のコレステロール合成を低下させていることが伺えた。一方、2,4-D はコレステロールのミトコンドリア内への輸送に関わる steroidogenic acute regulatory protein (StAR) と peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) の mRNA には殆ど影響を与えなかった。最後にテストステロン合成に関わる酵素に対する 2,4-D の影響を検討した。ミトコンドリアの膜蛋白である cytochrome P450<sub>sc</sub> (CYP11A), 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ 5 $\beta$ - 4-isomerase (3 $\beta$ -HSD Type I), cytochrome P450<sub>17</sub> · 17 $\beta$ -hydroxylase/C<sub>17-20</sub> lyase (CYP17), and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketoreductase (17 $\beta$ -HSD Type III) の mRNA 量を測定した。CYP11A, 3 $\beta$ -HSD, および 17 $\beta$ -HSD の mRNA 量は 2,4-D 処理により有意な変化を示さなかったが、CYP17 の mRNA 量は 2,4-D 処理により明らかに減少した。すなわち CYP17 の発現は、HMG-CoA synthase/reductase 同様に、2,4-D による PPAR の活性化を介して抑制されることを示している。以上の結果をまとめると、2,4-D による血清テストステロンの低下はライディッヒ細胞における内因性のコレステロール合成の低下とテストステロン合成過程における CYP17 の発現の低下によることが推測される。

次に 2,4-D の場合と同様の検討を、代表的なプラスチック可塑剤であるフタル酸エステル (DEHP, DBP) とアジピン酸エステル (DEHA) について検討した (Fig. 4)。DEHP は有意に PPAR $\alpha$  を誘導していることが判明した。DEHA は誘導する傾向を示したが、有意差はなく、DBP は発現量を増大させることはなかった。DEHP 処理により PPAR $\alpha$ -mRNA 量は有意に増大していた。DEHA 処理によっては増大する傾向がみられたが、有意差はなく、DBP 処理は殆ど影響を与えなかった。2,4-D と同様に、これらのプラスチック可塑剤は SR-BI と LDL の mRNA 量には影響を与えず、コレステロールの取り込みに対しては影響を与えなかった。次に内因性のコレステロール合成への影響を検討した。どのプラスチック可塑剤も HMG-CoA synthase と reductase の mRNA 量に影響を与えることはなかった。この結果は 2,4-D と大きく異なるものである。検討したプラスチック可塑剤は StAR と PBR の mRNA 量には影響を与えなかった。従って、ライディッヒ細胞中のコレステロールの輸送にも影響をあたえていないと思われる。一方、DEHP と DEHA は CYP11A, 3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD の mRNA 量には影響をあたえなかったが、CYP17 の mRNA を低下させた。DBP も CYP17 mRNA 量を低下させる傾向であったが、有意差はなかった。これらの結果の一部は 2,4-D と類似している。しかし 2,4-D と大きく違う点は、2,4-D は内因性のコレステロール合成にも影響を与えるが、DEHP, DEHA は CYP17 に影響を与えたのみであるという点であった。

### 3 . 2,4-D 曝露と血清およびライディッヒ細胞中のコレステロール

ライディッヒ細胞から脂質を抽出し、コレステロール濃度を測定した。同時に血清のコレステロール濃度も測定した。Fig.5 に示す様に、2,4-D は血清中コレステロール濃度を増

大させたが、ライディッチ細胞中のコレステロール濃度は低下させた。これらの結果は、血清中コレステロール濃度ではなく、ライディッチ細胞中のコレステロール濃度がテストステロン濃度を反映する可能性を示唆するものである。

#### 4 . 2,4-D の血清 LH 濃度への影響

精巣におけるテストステロン合成には LH も関与するので、2,4-D の血清 LH 濃度への影響も検討した。2,4-D 投与群の LH 濃度は対照群と殆ど変わらず、2,4-D は調べられた条件下ではほとんど有意な影響をあたえなかった。

#### 5 . 病理的变化

2,4-D 処理により精細管生殖細胞の変性と精細管上皮の破壊が観察された。2 匹のマウスにおいては精細管の萎縮も観察された。別の 3 匹には精子細胞の剥脱が目立っていた。一方、ライディッチ細胞には顕微鏡下での形態的变化は認められなかった。ライディッチ細胞のテストステロン合成に関わる蛋白の mRNA レベルと精巣の病理的变化の関連性については不明であった。

#### D . 考察

テストステロンはほとんどがライディッチ細胞で産生され、その後すみやかに、血清中に放出される。一方で精巣内の精細管にパラクラインされて、セルトリ細胞の機能維持や生殖細胞の成熟と分化に本質的な役割を果たす。従って、テストステロン合成への影響を明らかにすることは、精巣障害の機構を明らかにする上でも重要である。

今回観察されたのは、2,4-D は CYP17 に加えて、内因性コレステロール合成に関わる酵素の発現量をも抑制していたが、DEHP と DEHA は CYP17 にのみ影響を与えていた。この 3 化学物質は PPARalpha のリガンドとして知られているが、何故このような差異が観察されたのか、その原因は今のところ不明である。しかし、他の化学物質によっても CYP17 活性あるいは mRNA 発現の低下と血清テストステロン値の低下が観察されることが報告されている。例えば、肝臓毒として知られているノジュラリン（アオコ毒の 1 種）はラットの精巣と血清のテストステロンを低下させ、CYP17 の活性も低下させることが報告されている（Park et al., *Molecular Carcinogenesis* 2002）。

ライディッチ細胞内におけるコレステロールの大部分は de novo 合成されたコレステロールから供給され、血液リポ蛋白からの取り込み系からの供給はわずかであるといわれている。過剰なフリーのコレステロールはコレステロールエステルとして lipid droplets に貯蔵される。一方、コレステロールはミトコンドリア内に取り込まれた後にテストステロン合成経路に取り込まれていくことにより消費される。2,4-D 投与群においては HMG-CoA synthase および HMG-CoA reductase の発現は減少し、CYP17 の発現量も減少していた。従って、コレステロールの消耗が生じ、precursor の枯渇に加え、テストステロンの合成能も低下して、結果的にテストステロンレベルが低下したことが予想される。テストステロンレベルの低下は LH の増加をもたらす、そのことはテストステロンレベルの回復をもたらすという feedback 機構の存在が知られている。2,4-D 投与においては、LH

が有意に増加せず、かつ、SR-BI や LDLR など、LH に regulate されている蛋白の発現は増加しなかったため、feedback 機構はほとんど作動していないと判断された。その理由は不明であるが、ammonium perfluorooctanate 投与実験の場合と同様に、投与期間の短さに由来するのかもしれない。

他方、DEHP と DEHA 投与の場合、2,4-D の場合と異なり、CYP17 の発現を低下させることによってテストステロンの合成が低められていることが予想される。CYP17 の発現の低下は PPARalpha のリガンドである 2,4-D, DEHP, DEHA により抑制されているので、PPARalpha に関連した作用かもしれない。実際、別の実験で、PPARalpha ノックアウトマウスの CYP17 の発現が野生型マウスより有意に低いことを確認している。CYP17 は 2 種の酵素活性を有す。即ち、17 $\alpha$ -hydroxylase と C<sub>17-20</sub> lyase である。両方の活性が抑制されるのか、あるいは片方なのか、今回は活性を測定していないので不明である。今後の検討課題である。

今回はこの報告書にのせた化学物質以外に、フロン代替溶剤の 1-ブロモプロパン(1-BP, 0~1000ppm、12 週間)のテストステロンへの影響も検討した。800ppm 曝露濃度においては確実にテストステロン濃度の減少がみられ、200ppm 濃度では減少傾向がみられた。200ppm 曝露濃度では精嚢重量が減少していたので、テストステロンの量に影響を与えていた可能性がある。1-BP のテストステロンへの影響が今回検討した化学物質と同様に、ライディッヒ細胞に影響を与えているのか、興味深い。

今回の研究において、数種の内分泌かく乱化学物質が血清のテストステロン濃度の低下を招くことが明らかとなった。しかし、同じ PPARalpha のリガンド、あるいは内分泌かく乱化学物質と分類される化学物質の中であっても、ライディッヒ細胞のテストステロン合成系への作用機序が違ふことが明らかとなった。これはリスク評価に重要な知見をもたらす。今回の研究においては 2,4-D による病理的变化しか観察できなかったが、今後テストステロンへの影響の差異が精嚢の障害性の質的差異とどのような関連性をもつか検討し、リスク評価への知見としたい。また、今回の研究はテストステロン低下のメカニズム解明が主目的であったため、動物への投与量は実際の環境曝露レベルよりはるかに多いことを付記する。

## E . 結論

内分泌かく乱作用が疑われている化学物質のテストステロンレベルへの影響を検討し、低下したものに關しては、精嚢ライディッヒ細胞のコレステロール、テストステロン合成系への影響を検討した。2,4-D, DEHP, DEHA が有意にテストステロン濃度を減少させた。2,4-D は内因性コレステロール合成に關わる酵素の発現を抑制し、さらに CYP17 の発現を抑制してテストステロン濃度を低下させた可能性が示唆された。一方、DEHP と DEHA はコレステロールの代謝には影響を与えず、CYP17 の発現のみ抑制して、テストステロン合成に影響を与えることが、推察された。このように同じ PPARalpha のリガンドでも、テストステロン合成に影響を与える機序は異なっている可能性がある。

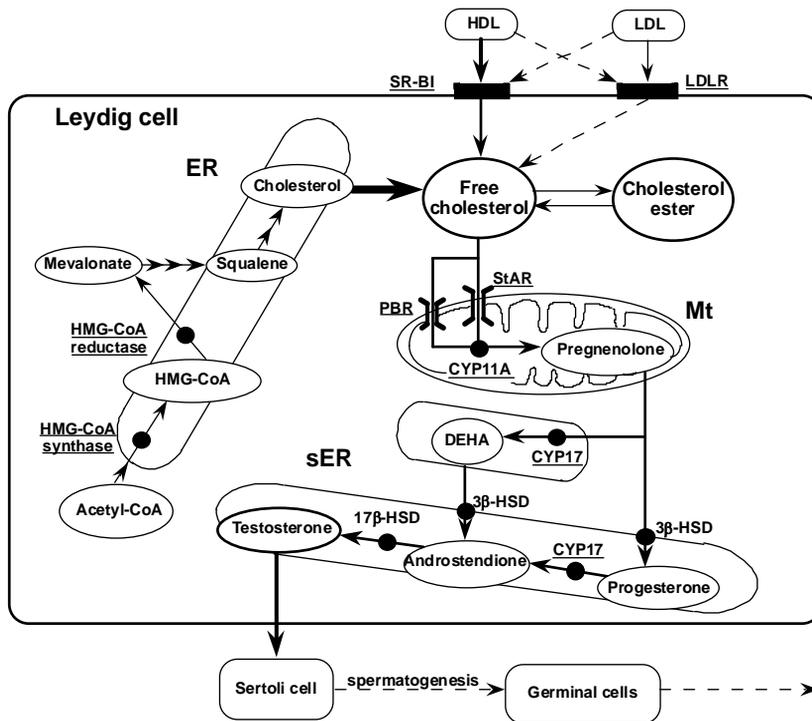


Fig.1 ライディッヒ細胞におけるテストステロン合成

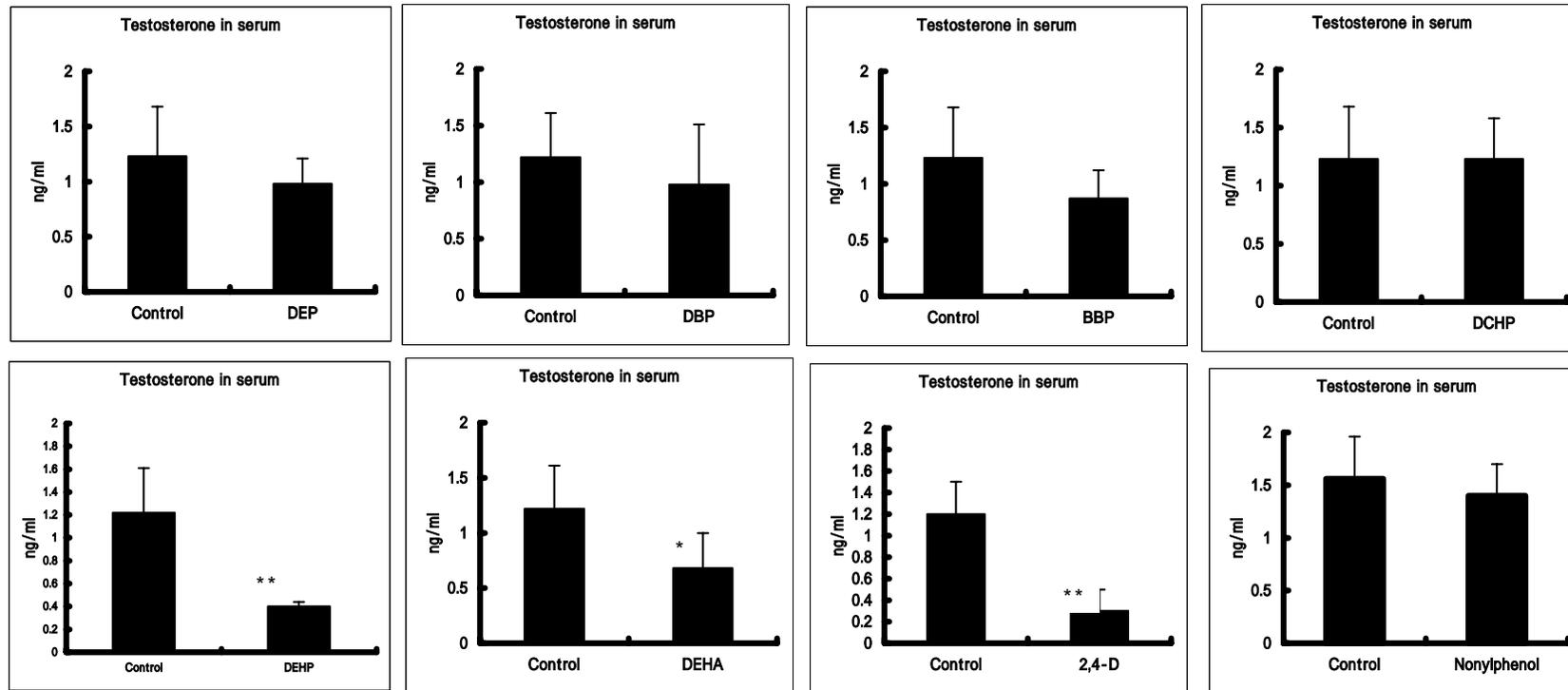


Fig.2 種々の化学物質の血清テストステロンへの影響

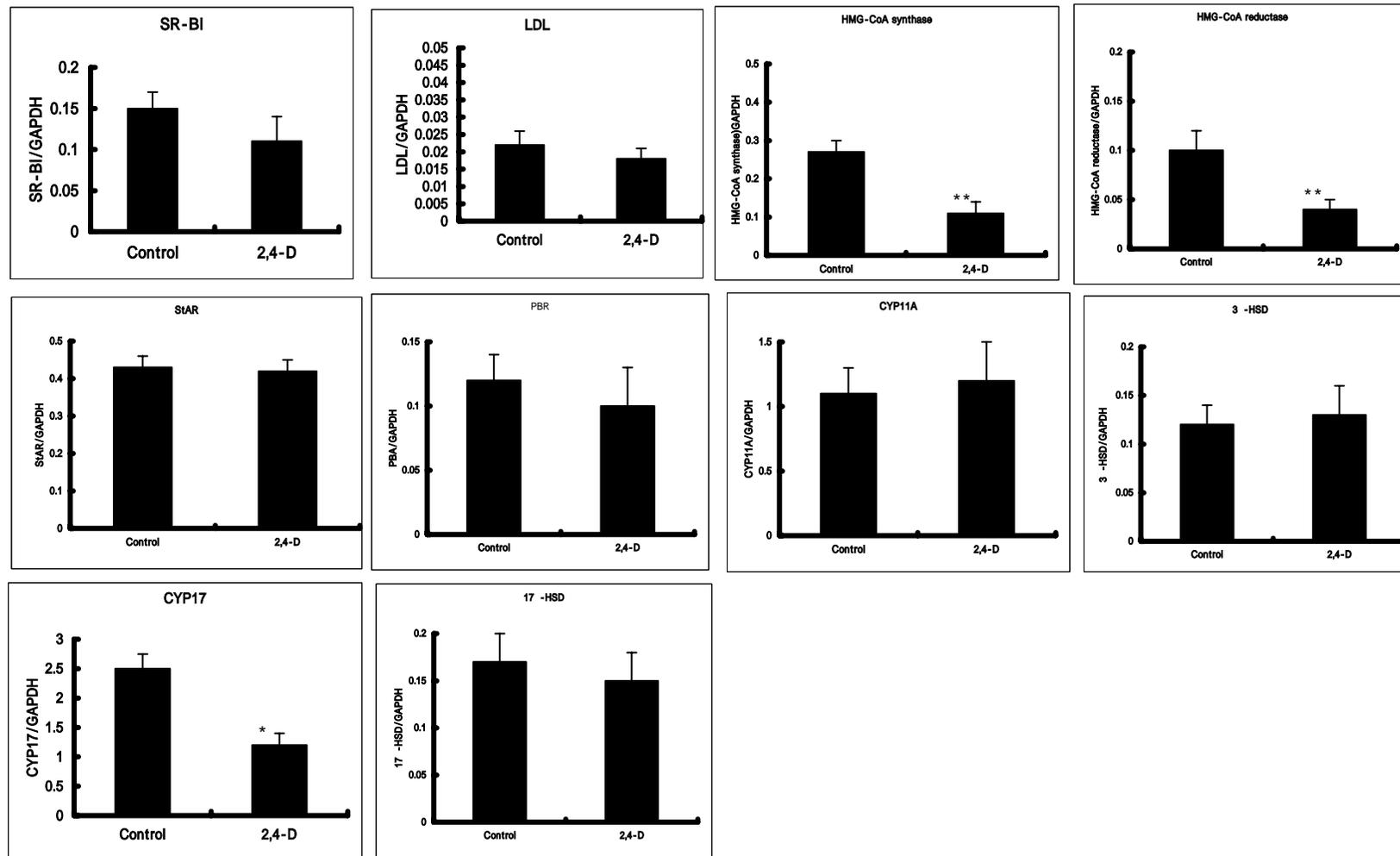


Fig.3 2,4-Dのコレステロール・テストステロン合成系への影響

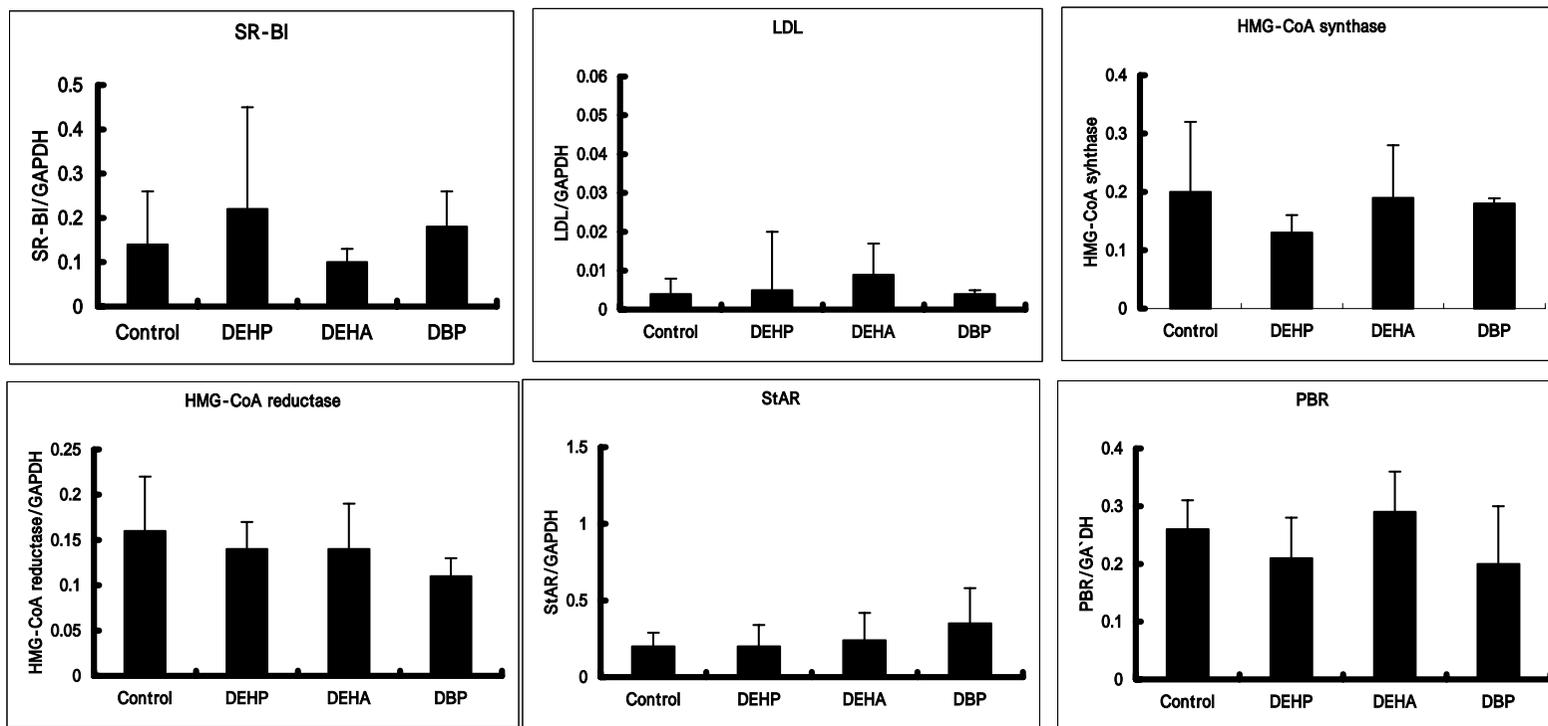


Fig.4 プラスチック可塑剤のコレステロール・テストステロン合成系への影響

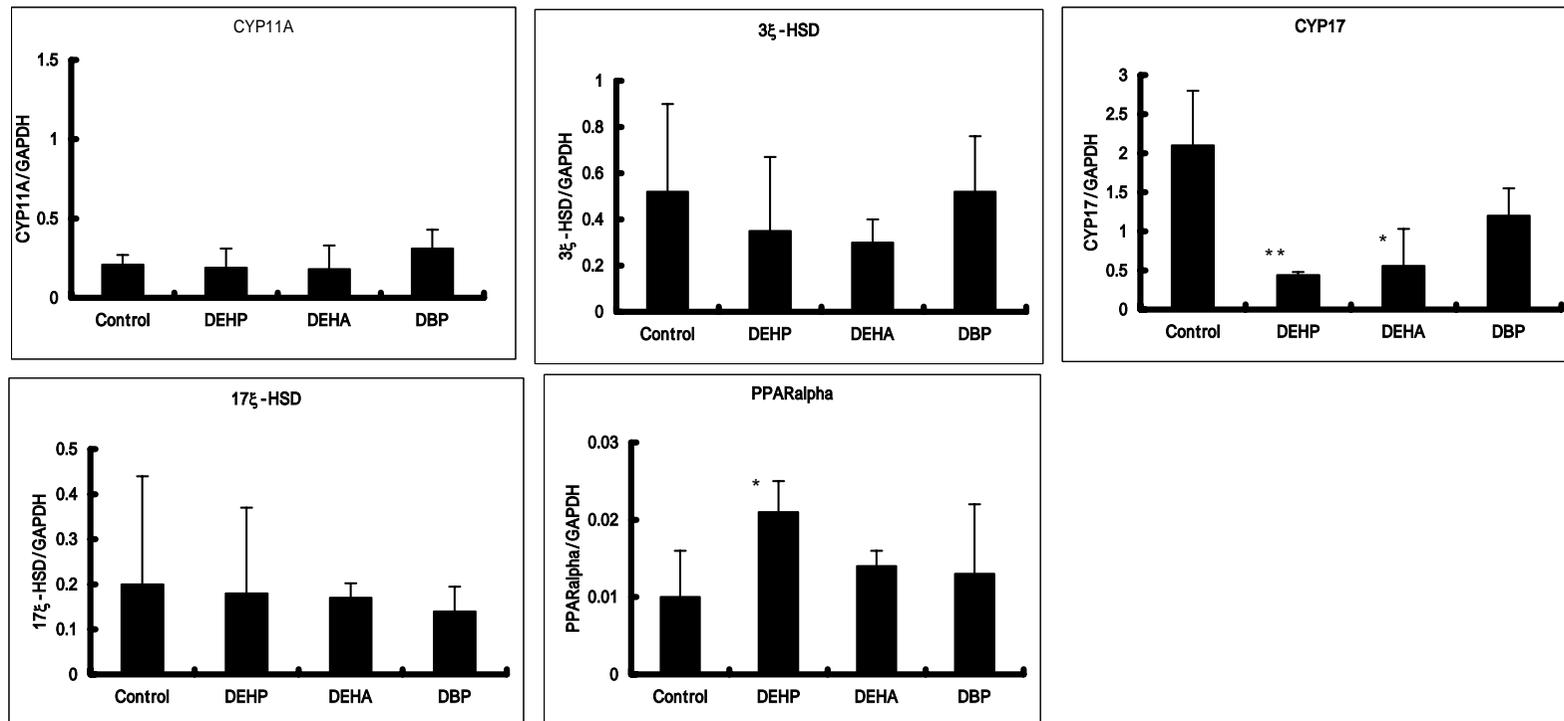


Fig.5 プラスチック可塑剤のコレステロール・テストステロン合成系への影響

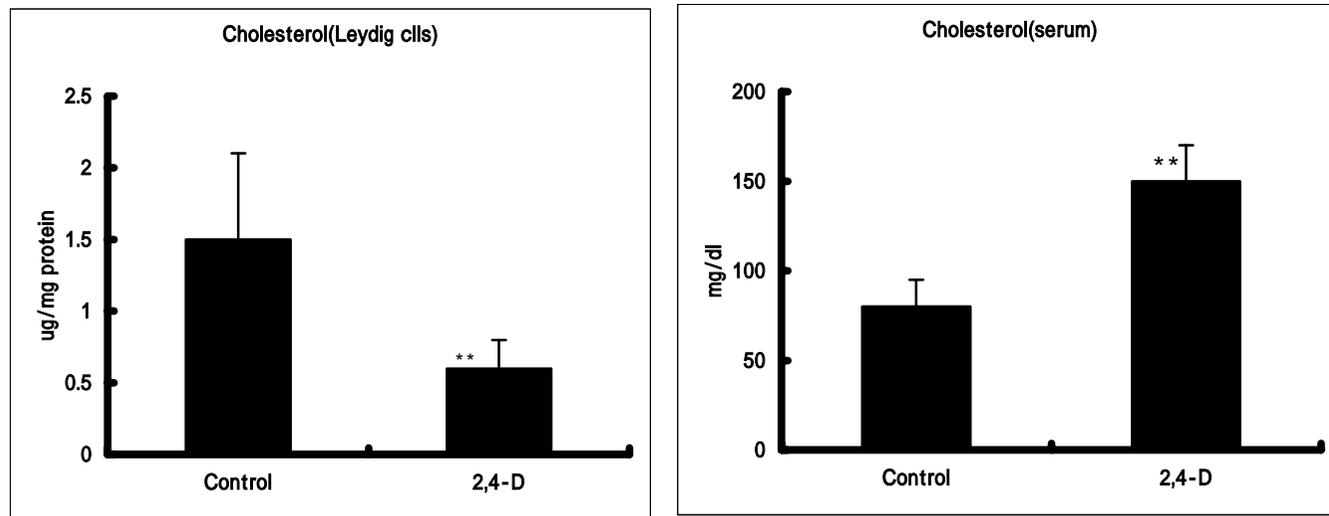


Fig.6 2,4-D の血清、ライディッヒ細胞のコレステロールへの影響

# Effects of probable endocrine disruptors on cholesterol and/or testosterone synthesis in Leydig cells

Nakajima T, Ichihara G, Kamijima M, Yamada T, Itohara S, Furuhashi K and Yamanoshita O.

Department of Occupational and Environmental Health,  
Nagoya University Graduate School of Medicine,

## **Abstract**

We investigated the effects of diethylphthalate, dibutylphthalate, butylbenzylphthalate, dicyclohexylphthalate, di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), and nonylphenol on serum testosterone levels and also on cholesterol and/or testosterone synthesis in Leydig cells. Of these disruptors, DEHP, DEHA and 2,4-D decreased the levels of serum testosterone. However, there were differences in the mechanism for influencing among them: 2,4-D decreased mRNA levels of HGM-CoA synthase, HGM-CoA reductase and cytochrome P450<sub>17 $\alpha$</sub> ·17 $\alpha$ -hydroxylase/C<sub>17-20</sub> lyase (CYP17) in Leydig cells, whereas DEHP and DEHA decreased only the level of CYP17-mRNA. These results suggest that the former may decrease serum testosterone level by affecting both cholesterol *de novo* synthesis and testosterone synthesis in Leydig cells, but the latter may decrease the level only by affecting testosterone synthesis. Although these three chemicals are grouped in ligands of peroxisome proliferators-activated receptor alpha, the mechanism of decreasing serum testosterone levels may be different from each other.

## (5) 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

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)

### 研究要旨

フタル酸エステル類は動物実験で、内分泌攪乱作用、生殖毒性、発達毒性、組織障害などが報告されている。大気、水、土壌など様々な環境中から検出されることから、人への影響が懸念される。しかし、多くの研究報告には、経口摂取による生体影響であり、人におけるより自然な摂取経路である吸入曝露による影響についての報告は殆どないことから、吸入曝露実験とそれに基づくリスク評価が必要である。そこで、本研究ではフタル酸ジエチルヘキシル(DEHP) 吸入曝露を行い、(1)体内動態、(2)生殖毒性、(3)次世代影響の検討を行った。

(1) DEHP25 mg/m<sup>3</sup> 吸入曝露により、血清からは DEHP とその代謝物であるフタル酸モノエチルヘキシル (MEHP)は検出されなかった。DEHP が検出されたのは肺のみであった。その他の臓器では DEHP の代謝物である MEHP が検出された。特に DEHP の代謝器官とされる小腸、肝臓で検出されたが、同時に精巣でも検出された。また、対照群でも、肺、腎臓、小腸、脳でも検出された。MEHP の群間での差が認められたのは小腸、肝臓、精巣であった。

(2) DEHP 吸入曝露により、精巣重量 / 体重の増加、成熟した精巣組織像が見られた。また、血漿テストステロン濃度も有意に高かったが、精巣におけるテストステロン合成酵素 mRNA の発現量や、血漿 LH に差は見られなかった。幼若ラットへの DEHP 吸入曝露により、精巣へ影響を与えることが示唆された。

(3) 妊娠初期から後期までの DEHP 吸入曝露により、胎児の体重の有意な増加が認められた。また、メス胎児での胎盤重量、AGD / 体重の値の減少が見られた。その他の影響は母、胎児共に認められなかった。

今後、幼若ラットから精巣の形成が完成する時期まで吸入曝露期間を延長し、精巣成熟に与える影響を明らかにする。次世代影響に関しては、体重増加への影響、その影響の性差に繋がるメカニズムを明らかにするために、出生後の仔の内分泌系 (成長ホルモン、テストステロン、エストロゲン分泌) への影響を検討する。また、現在、胎児期 DEHP 曝露による精巣形成への影響として、胎児の精巣内テストステロン濃度とテストステロン合成酵素 mRNA 発現量の検討を開始している。

### 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講師)

玉置 淳子 (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)

## A．研究目的

フタル酸エステル類の用途は広範囲で、ポリ塩化ビニル、人工皮、ホース、機械器具部品、日用雑貨のほか、ラップやカップ麺などの食品包装材、医療器具などのプラスチック製品に添加される可塑剤として使用されている。また、農薬、化粧品、染料、印刷インキの溶媒や保留剤としても使用されている。

フタル酸エステル類は親油性があるので、油分を多く含む食品の梱包により、成分が溶出し食品中に移行し、経口的に摂取する可能性、輸液パックなどの医療器具を介して血液中に移行する可能性、プラスチック製品の低温焼却野、製品製造過程において、大気中へ放出され、呼吸器を介して体内に移行する可能性等が考えられる。

大気中にも、フタル酸ジエチルヘキシル DEHP で  $0.038\sim 0.79 \mu\text{m}^3$ 、フタル酸ジブチル DBP で  $0.017\sim 0.37 \mu\text{m}^3$  (環境庁 1997) 存在し、DEHP に関して、一般人口でも、1日の最大曝露量は  $2 \text{mg} / \text{m}^3$  であるという報告 (ATSDR 1993) もある。現在の産業現場における基準は、許容濃度が  $5 \text{mg} / \text{m}^3$  (日本産業衛生学会、ACGIH TLV) である。しかし、プラスチック工場周辺に住む妊娠した女性の血液中のフタル酸濃度を計測したところ、高濃度の女性に妊娠合併症が多く見られたと 1999 年の報告もあり、生体への悪影響が疑われる。

フタル酸エステル類の内分泌攪乱作用としては、*in vivo* において、弱いエストロゲン作用があることが報告されている。生体への影響としては、生殖毒性として、妊娠ラットへの曝露実験において、胎児の体重減少、胎児奇形、雄ラットへの曝露実験による精子濃度減少、精細管萎縮、前立腺重量減少をおこすといった報告がある。発達毒性としては、生育遅延が報告されている。また、その親油性から、神経障害も指摘している報告もある。しかし、フタル酸エステル類を扱う工場労働者の健康調査によると、多発性神経炎、知覚鈍麻、前庭機能の低下、嗅覚低下が認められている。臓器障害としては、肝重量増加、中葉壊死・炎症反応といった組織学的変化、肝酵素の低下が報告されている。

しかし、これらの報告は、フタル酸エステル類の経口摂取による影響であり、吸入曝露による報告はほとんどない。代謝経路は、肺または消化管から速やかに吸収され血液により広く生体内に分布し、主として腎臓から尿中へ排泄されるようであるが、フタル酸エステル類の体内蓄積の報告によると、吸入曝露において脳における蓄積がほかの臓器に比べて比較的高いことが指摘されている。また、経口投与により肝への障害が多く報告されているが、吸入曝露における肺と肝の cytochrome P450 への影響を検討すると、吸入曝露による主要標的臓器は肺である、という報告もある。このように、経口摂取と吸入曝露による差があるようであるが、詳しくわかっていないのが現状である。

本研究における目的は、今まで、ほとんど行われていないフタル酸エステル類の吸入曝露における生体への影響を検討することである。平成 13 年度は吸入曝露を行うための曝露装置を作成した。今年度は、DEHP の吸入曝露による DEHP とその代謝物の体内動態、経口投与で報告されている生殖毒性、さらに次世代影響についても検討する。

## B．研究方法

### 1．実験動物

実験動物は Wistar Rat を用いた。オスラットは北海道大学大学院医学研究科附属動物

実験施設より、妊娠ラットは三協ラボサービス(日本エスエルシー株式会社)より購入した。

## 2．空气中的 DEHP の測定

曝露チャンバー設置室内、ラットを曝露時間以外に飼育する部屋の大気中 DEHP 測定を行った。測定分析方法は、吸引ポンプ(ジーエルサイエンス KK SP208 1000Dual)に固相捕集管(SUPELCO、ORBO - 5020Tenax TA35/60 OVS Tubes)を床面より 1.5m になるように設置し、吸引流量 1 l/min で曝露装置稼働中の 3 時間、空気の吸引を行った。捕集管内のガラス繊維フィルターに 140 mg Tenax TA 4ml バイアル瓶に入れ、4 ml トルエン、4 µg サロゲートを加えて 30 分放置し、上澄みを 2ml 採取し、GC-MS 測定試料として測定し、内標準法により定量を行った。

## 3．DEHP 吸入曝露実験

### (1) 吸入曝露による DEHP、MEHP の体内動態の検討

吸入曝露：曝露濃度は 25 mg/m<sup>3</sup> に設定したが実測値は 20.1 ± 3.9 mg/m<sup>3</sup> であった。8 週齢 Wistar rat オス 16 匹をコントロール、25 mg/m<sup>3</sup> 吸入曝露群の 2 群に分け曝露を 1 日 6 時間、2 週間(5 日連続曝露後 2 日休みを 2 週間)行った。曝露中水は自由摂取できるようにしたが、餌への DEHP 吸着を避けるため餌は与えなかった。また、コントロール群は、曝露時間内は曝露群と同じステンレス製ケージに入れ、別室で飼育した。曝露最終日、曝露終了直後に解剖を行い血清、脳、肺、肝臓、腎臓、小腸、精巣の摘出を行いアセトンで洗浄、乾熱滅菌を行ったガラス瓶に入れ DEHP、MEHP 測定まで - 80 で保存した。

DEHP、MEHP 抽出：DEHP、MEHP 抽出はガラス製試験管を用いて行った。これらの器具は使用前にすべてアセトニトリルで洗浄後使用した。

血液からの抽出：- 80 で保存した血清を 50 µl に 1 M NaOH 200 µl を混和し、アセトニトリル 850 µl を加え、冷却しながら 5 分間超音波によりホモジナイズし、リン酸 10 µl を加え、1,500 rpm、4 、10 分間遠心分離後、上清を HPLC サンプルとし、ガラス瓶に入れ、測定まで - 20 で保存した。

臓器からの抽出：- 80 で保存した臓器は 150mg 秤量し、はさみで細分化してガラス管に移した。細分化した臓器に 1M NaOH 600 µl 加え冷却しながら組織が 5 分間超音波によるホモジナイズ後、アセトニトリル 2550 µl 加え更に 5 分間超音波でホモジナイズした。リン酸 30 µl を加え、1500 rpm、4 、10 分間遠心分離後、上清を HPLC サンプルとし、ガラス瓶に入れ、測定まで - 20 で保存した。

HPLC 分析条件は、カラム：SC-50DS(3.0mmID × 150mm, EICOMPAK)を用い、UV：230nm、Absorbance：0.1、流速：0.5ml/min で行った。

MEHP 検出：MEHP 検出はステップグラディエント法を用いた。移動相は、A 液：1 % リン酸 / 水 40%、アセトニトリル 60%、B 液：1 % リン酸 / 水 10%、アセトニトリル 90%で、A 液 10 分 B 液 20 分のグラディエントにより検出した。

DEHP 検出：DEHP 検出は B 液を移動相とした。

### (2) 生殖に及ぼす影響に関する検討

4 週齢のオス Wistar rat に、特殊吸入曝露装置を用いて、曝露濃度を 0mg / m<sup>3</sup> (コン

トロール)、 $5\text{mg}/\text{m}^3$ 、 $25\text{mg}/\text{m}^3$ の3点・各8匹ずつに、6時間/日(週5日)4週間曝露を行った。曝露終了後、エーテル麻酔を行い、心採血し、精巢摘出を行った。血液は、血漿分離され、EIAによるLH濃度測定まで、 $-80^\circ\text{C}$ で凍結保存した。また、左側精巢は、重量計測後、ブアン固定し、組織標本を作製した。右側精巢は、液体窒素により凍結し、RNA抽出まで $-80^\circ\text{C}$ で保存した。

結果は、一元配置分散分析(ANOVA)で検定し、有意差が見られたものには、Scheffeの多重比較を行った。

### (3) 次世代影響の検討

吸入曝露：曝露濃度は $25\text{mg}/\text{m}^3$ 、 $5\text{mg}/\text{m}^3$ に設定したが実測値は $19.7 \pm 3.2\text{mg}/\text{m}^3$ 、 $2.9 \pm 0.9\text{mg}/\text{m}^3$ であった。妊娠Wistar ratはプラグ確認日を0日として、妊娠1日目に購入した。30匹をコントロール、 $25\text{mg}/\text{m}^3$ (高濃度)、 $5\text{mg}/\text{m}^3$ (低濃度) DEHP吸入曝露群の3群に分け、DEHP曝露を妊娠2日目から妊娠19日目まで1日6時間連続して吸入曝露を行った。曝露最終日、曝露終了後、帝王切開を行い、母、胎児それぞれ以下の項目の検討を行った。

母：体重、妊娠黄体数、着床数、胚の生死、臓器の重量測定(卵巣、子宮、肝臓)

胎児：体重、外形観察(形状、大きさ、位置、数、色調)、雌雄確認、体長、尾長、AGD測定、DEHPの移行の検討(胎盤、肝臓)

結果は、一元配置分散分析(ANOVA)で検定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設の動物実験に関するガイドラインに従った。

## C. 研究結果

### 1. 空気中のDEHPの測定

空気中のDEHPの測定結果、曝露装置稼動中の実験室内のDEHP濃度は $0.18\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。一方、コントロールラットを飼育する動物実験施設内のDEHP濃度は検出下限以下であった。(検出下限は $0.04\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$ )

### 2. DEHP吸入曝露実験

#### (1) 体内動態の検討

DEHP吸入曝露による体内へのDEHP、MEHPの蓄積を、血清、精巢、肝臓、肺、腎臓、脳(大脳)、小腸で検討した。吸入曝露によるラットの体重増加率は、曝露群とコントロールで差は見られなかった。DEHP、MEHPは、血清中からは、DEHP、MEHP共に検出限界以下であった。DEHPが検出された臓器は肺のみで、曝露群が $18.8 \pm 2.6\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ 、コントロールは検出限界以下であった。MEHPに関しては、肺では $3.3 \pm 2.8\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ 、コントロールが $2.75 \pm 0.8\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ 、大脳では、曝露群が $1.4 \pm 1.6\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ 、コントロールが $1.6 \pm 0.8\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ と有意な差は見られなかった。一方、精巢では、曝露群が $4.5 \pm 1.4\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ 、コントロールが $2.7 \pm 1.8\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ 、肝臓は曝露群が $2.4 \pm 0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ に対し、コントロールは検出限界以下、小腸も曝露群は $4.1 \pm 3.5\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ 、コントロールは検出限界以下で有意な差があっ

た。(p<0.01、図1)

## (2) 生殖に及ぼす影響に関する検討

曝露濃度の実測値は、5mg/m<sup>3</sup>群で8.7±2.2mg/m<sup>3</sup>、25mg/m<sup>3</sup>群で21.2±2.9 mg/m<sup>3</sup>であった。曝露終了後の体重は、コントロール群と比較して、5mg/m<sup>3</sup>群、25mg/m<sup>3</sup>群で重い傾向が見られたが、有意ではなかった。(表1)。精巣重量と精巣重量/体重は、コントロールに比べて、5mg/m<sup>3</sup>・25mg/m<sup>3</sup>曝露群で有意に重かった(図2、図3)。血漿テストステロン濃度は、コントロールに比べて、5mg/m<sup>3</sup>・25mg/m<sup>3</sup>曝露群で、有意に高かった(図4)。精巣におけるテストステロン合成酵素である、P450scc、3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3HSD)、CYP17、及び、テストステロンからエストロゲンへの変換酵素であるCYP19のmRNA発現量に差はなかった(図5)。精巣組織においては、コントロール群に比べて、曝露群で成熟した精巣が見られた。血漿LH濃度に差は見られなかった(図6)。精巣重量/体重とテストステロン濃度に、有意な相関(R<sup>2</sup>=0.42 P>0.01)が見られた(図7)。

## (3) 次世代影響の検討

曝露濃度は25 mg/m<sup>3</sup>、5 mg/m<sup>3</sup>に設定をしていたが、曝露期間中のチャンパー内濃度は、平均19.8 mg/m<sup>3</sup>、2.9 mg/m<sup>3</sup>であった。

母ラットへの影響：妊娠ラットは、各群10匹ずつ曝露を行ったが、妊娠19日目解剖時に妊娠が確認されたラットは、コントロール群7匹、5 mg/m<sup>3</sup>群7匹、25 mg/m<sup>3</sup>群8匹であった。曝露中の母ラットの体重増加率は、曝露群とコントロールで差は見られなかった(図8)。また、その他の項目、肝臓重量、卵巣重量、子宮重量、黄体数、着床数、生児数についても影響は認められなかった(表2)。

胎児への影響：全胎児を比較すると、体重の増加(対照群2.25±0.17 g、5 mg/m<sup>3</sup>曝露群2.33±0.18 g、25 mg/m<sup>3</sup>曝露群2.44±0.16 g、p<0.01)と胎盤重量の減少(対照群0.56±0.08 g、5 mg/m<sup>3</sup>曝露群0.57±0.1 g、25 mg/m<sup>3</sup>曝露群0.53±0.09 g、p=0.02)が認められたが、その他の項目(体長、尾長)に関しては有意差はなかった。

また、胎児を雌雄に分けて分析をした場合、オス胎児では曝露群で有意な体重増加(対照群2.34±0.16 g、5 mg/m<sup>3</sup>曝露群2.37±0.16 g、25 mg/m<sup>3</sup>曝露群2.47±0.16 g、p<0.01)が認められたが、胎盤重量、体長、尾長、AGD、AGD/体重の各項目では有意な差は見られなかった。

メス胎児においても曝露群で体重の増加(対照群2.18±0.15 g、5 mg/m<sup>3</sup>曝露群2.27±0.2 g、25 mg/m<sup>3</sup>曝露群2.4±0.16 g、p<0.01)が認められたが、それに加え、胎盤重量(対照群0.56±0.08 g、5 mg/m<sup>3</sup>曝露群0.6±0.12 g、25 mg/m<sup>3</sup>曝露群0.54±0.07 g、p=0.02)とAGD/体重(対照群0.80±0.2 g、5 mg/m<sup>3</sup>曝露群0.73±0.19 g、25 mg/m<sup>3</sup>曝露群0.69±0.14 g、p=0.04)が減少していた。体長、尾長、AGDの各項目については有意差がなかった。

DEHP、MEHPの胎児への移行について胎盤、肝臓で調べた。その結果、胎盤でのDEHP、MEHPは共に検出限界以下であった。肝臓に関しては、現在測定中である。

## D. 考察

### 1. DEHP 吸入曝露による DEHP、MEHP の体内動態

経口投与の場合、DEHP は消化管においてすい臓リパーゼにより加水分解され、MEHP および 2 - エチルヘキサノールに代謝、吸収され、尿中、糞中で排泄される。体内に取り込まれてから排出されるまでの時間は非常に短く、ラットの場合ほぼ 1 週間であると言われている。これまでの DEHP の体内動態の報告としては、放射線ラベル DEHP で分布を見ると言うものが多く、各臓器の代謝物まで見ていると言う報告は少ない。放射線ラベルした DEHP をラットに経口投与することにより(1000 ppm) 肝臓、腎臓、肺、精巣、心臓、脂肪組織などから検出されるが、直ぐに活性は検出できなくなることから体内での蓄積はないといわれている。(D.T. Williams, 1974) 経口投与による DEHP と MEHP の蓄積は、血液、肝臓、精巣、心臓での MEHP の生物学的半減期は DEHP よりも長いことから、MEHP は DEHP よりも多く検出される(S.Onishi, 1982) などと報告されているが、全ての臓器中の代謝物までの検出は行われていない。

今回の結果では、血清中からは DEHP、MEHP が検出されなかった。過去に血清中の DEHP、MEHP を経口投与(2.8 g/kg)で調べた結果、DEHP:8.8  $\mu$ g/ml、MEHP:63.2  $\mu$ g/ml 検出されるという報告がある。(O.A. Teirlynck, 1999) この報告での投与量は、今回の吸入実験に比べて非常に高く、吸入実験の場合の 25 mg/m<sup>3</sup>では、1 日当たりの曝露量は約 50 mg/kg とであるため検出限界以下となったと考えられる。

また、MEHP に関して精巣、肺、腎臓、脳においてはコントロールでも検出され、肝臓、小腸においては殆ど検出されなかった。代謝された MEHP はグルクロン酸転移酵素によりグルクロン酸化 MEHP に代謝、または p450 により水酸化 MEHP に代謝される。これらの代謝酵素は肝臓、小腸で分泌されるということから、コントロールの臓器中での検出が他の臓器と比べて低かったと考えられる。

曝露群の MEHP の蓄積が有意に高かった器官は、精巣、肝臓、小腸であった。経口投与による MEHP の蓄積に関して小腸、肝臓で主に代謝されるということや、精巣での蓄積が報告されていることから、今回の結果から、摂取経路が異なるたことで、DEHP に関しては異なっていたが、MEHP に関しては今まで報告されていた経口投与と同様であるということが示唆された。

### 2. DEHP 吸入曝露による生殖に及ぼす影響に関する検討

DEHP は、in vitro でエストロゲン活性を持たず(CA.Harris 1997)、アンドロゲンレセプターとも結合しないが(Malgaard 2001)、in vivo で、発達期のアンドロゲン依存性の男性生殖器に影響を与える(LG.Parks 2000, LE.Gray 2000)ことから、抗アンドロゲン作用と考えられている。

DEHP 経口投与により、テストステロンレベルや酵素活性の低下(BT.Akingberr 2001)、精巣組織のアポトーシスの増加による精巣萎縮(JD.Park 2002, Malgaard 2001)、精巣重量の減少(E.Kasahara 2002)といった精巣毒性が報告されている。しかし、この報告のほとんどが、経口投与による実験であり、吸入曝露による影響は調べられていない。

今回の実験結果は、過去の DEHP 経口投与の報告に見られる、抗アンドロゲン作用とは異なる結果が得られた。DEHP 吸入曝露により、曝露開始前、終了後の体重に、コントロ

ールと曝露群の有意な差は見られなかったが、精巣重量 / 体重が曝露群で大きかったこと、組織像において、コントロール群と比較して、曝露群で成熟した精巣が見られたことから、幼若ラットへの DEHP 吸入曝露は、精巣の成熟を促すことが示唆された。

また、血漿テストステロン濃度は、コントロール群と比較して、曝露群で高かったが、血漿 LH の濃度に差が見られなかったこと、精巣重量 / 体重に有意な相関が見られることから、精巣重量の増加に伴う結果と考えられる。

今回の結果から、DEHP 吸入曝露は、幼若ラットの精巣へ影響を及ぼすことが示唆されたが、今回は、曝露後すぐに精巣を摘出したため、ラットの精巣が発達の途中段階である可能性もあり、この結果が、精巣の成熟に特異的に及ぼす影響なのか、身体の成長に伴う精巣の成熟であるのか、明らかではない。性成熟(第2次性徴)には、脂肪細胞中の leptin の影響があることが報告されている(CS.Mantzoros 1997)ので、精巣重量と身体の発達とは、密接な関連がある。

DEHP 吸入曝露が、精巣の成熟を促進するか否かは、幼若時に DEHP 吸入曝露を受けたラットが、完全に成長した時の生殖に与える影響に関して検討する必要がある。

### 3 . DEHP 吸入曝露による次世代影響

DEHP 曝露により胎児の体重が減少するという報告(Hellwig J, 2000)はいくつかみられるが、今回の我々の研究では過去の報告とは異なり、胎児の体重が雌雄ともに増加した。過去の報告では、経口投与による曝露が主であり本研究のように吸入曝露ではないために、母ラットにおける DEHP の体内動態が異なる事もその一因として考えられる。フタル酸を経口で曝露した場合は、主に小腸などの器官で代謝される。しかし、吸入曝露をした場合、まず肺に取り込まれそこから血中に DEHP が入り込み、そのまま DEHP が胎盤を通過してしまう。それゆえ、経口曝露と吸入曝露では胎盤を通過する DEHP の量が異なることが十分に考えられるので、胎児への影響も異なると考えられる。

また、本研究において、胎盤重量は減少した。一般的に、妊娠中毒症などで胎盤重量が減少するとそれに伴って胎児の体重も減少するように、胎盤重量と胎児体重は比例関係にある。しかし、今回の結果は胎児の体重は増加し、胎盤重量は減少した。この結果から胎盤重量の減少は DEHP 曝露による母体への影響によるものであり、胎児体重の増加は胎盤を通過した DEHP によるもので、それぞれ独立したメカニズムによって引き起こされると推察される。DEHP は脂溶性であるために、脳の神経内分泌器官に影響を与え、その結果として成長ホルモンなどの分泌に影響が生じた可能性もある。また、DEHP は胎盤を通過する際、胎盤増殖に関わるオートクリン、パラクリン因子の分泌を阻害することで胎盤の成長を妨げる可能性などが考えられるが、こういった DEHP の生殖毒性、特に、胎児や胎盤形成への影響は不明な点が多いために、今後さらなる研究が必要と考えられる。

曝露群のメス胎児において、AGD/胎児体重の値が小さくなった事は、胎盤を通過した DEHP による抗アンドロゲン作用によると考えられるが、オス胎児ではその影響はみられなかった。この事から、メス胎児の方が DEHP 曝露に鋭敏に反応すると考えられるが、このメカニズムに関しては、今後検討が必要である。

そのためには、成長や生殖系に関わる内分泌系(成長ホルモン、テストステロン、エストロゲンなど)について経時的に検討することが重要であると思われる。さらに、メス胎

児には AGD/体重に影響がみられたが、そのまま成長を続けた場合のメス胎児の生殖能や、見かけ上は AGD/体重には影響はなかったオス曝露群の胎児についても、その後成熟した時の生殖能も検討すべきであると思われる。

今後、幼若ラットから精巣の形成が完成する時期まで吸入曝露期間を延長し、精巣成熟に与える影響を明らかにする。次世代影響に関しては、体重増加への影響、その影響の性差に繋がるメカニズムを明らかにするために、出生後の仔の内分泌系(成長ホルモンなど)への影響を検討する。また、現在、胎児期 DEHP 曝露による精巣形成への影響として、精巣内テストステロン濃度とテストステロン合成酵素 mRNA 発現量の検討を開始している。

## E. 結論

今まで殆ど行われていないフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) の吸入曝露による生体への影響の検討を行った。

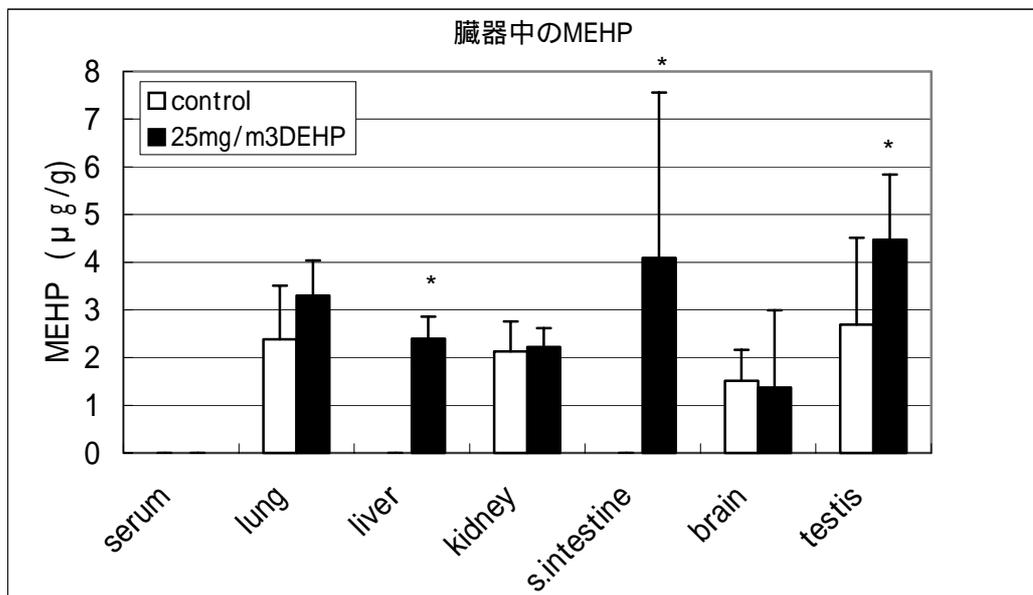
DEHP を 8 週令オスラットに 25 mg/m<sup>3</sup> 吸入曝露することにより、血清中の DEHP、MEHP に関しては検出限界以下であった。DEHP が検出されたのは肺のみであった。また、その代謝物であるフタル酸モノエチルヘキシル (MEHP) は、肝臓、小腸、精巣に認められた。DEHP に関しては摂取経路の違いにより検出される器官が異なるが、MEHP に関しては経口摂取によるものと同様であるということが示唆された。

DEHP 吸入曝露により、精巣重量 / 体重の増加、成熟した精巣組織像が見られた。また、血漿テストステロン濃度も有意に高かったが、精巣におけるテストステロン合成酵素 mRNA の発現量や、血漿 LH に有意な差は見られなかった。幼若ラットへの DEHP 吸入曝露により、精巣の成熟を促進する可能性が示唆された。

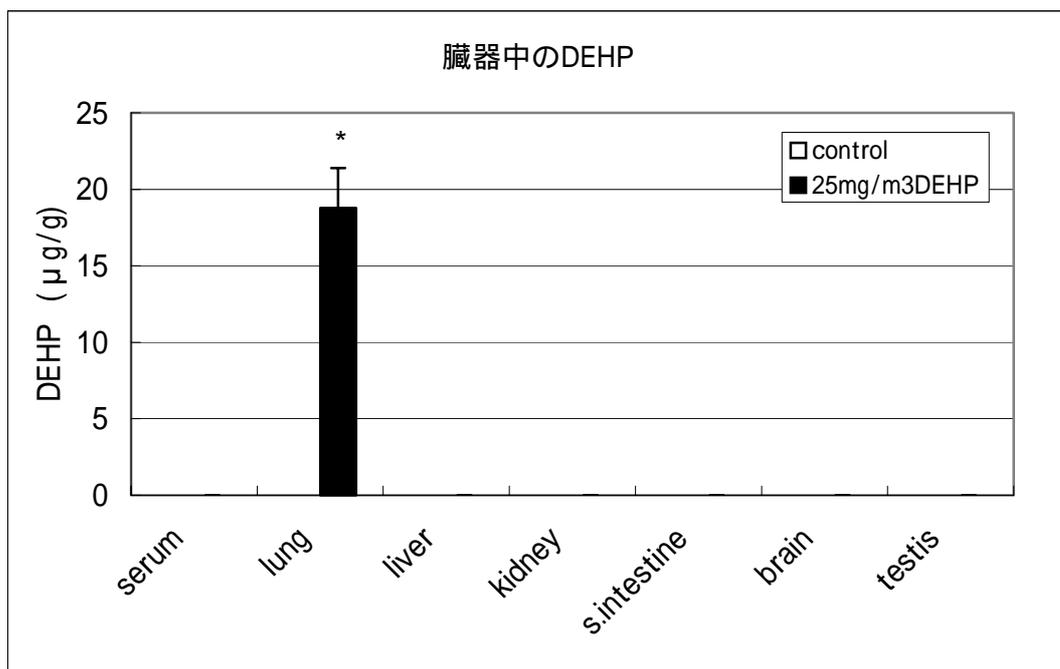
次世代影響の検討の結果、妊娠初期から後期にかけて 20 mg/m<sup>3</sup>、3 mg/m<sup>3</sup> 吸入曝露した際の胎児への影響は、高濃度群での体重増加のみであった。母の体重増加率に影響は見られなかった。また、胎盤での DEHP、MEHP の移行は見られなかった。

今後、精巣の成熟を促進するか否かは、幼若時に DEHP 吸入曝露をうけたラットが、完全に成長した時の生殖に与える影響に関して検討する必要がある。次世代影響に関しては、体重増加への影響、その影響の性差に繋がるメカニズムを明らかにするために、出生後の仔の内分泌系(成長ホルモンなど)への影響を検討する必要がある。また、現在、胎児期 DEHP 曝露による精巣形成への影響として、精巣内テストステロン濃度とテストステロン合成酵素 mRNA 発現量の検討を開始している。

図 1



\* :  $p < 0.01$



\* :  $p < 0.01$

表1

	control	5mg/m <sup>3</sup>	25mg/m <sup>3</sup>
曝露開始時体重(g)	65 ± 8	66 ± 5	69 ± 8
曝露終了後体重(g)	187 ± 17	205 ± 10	193 ± 13

図2

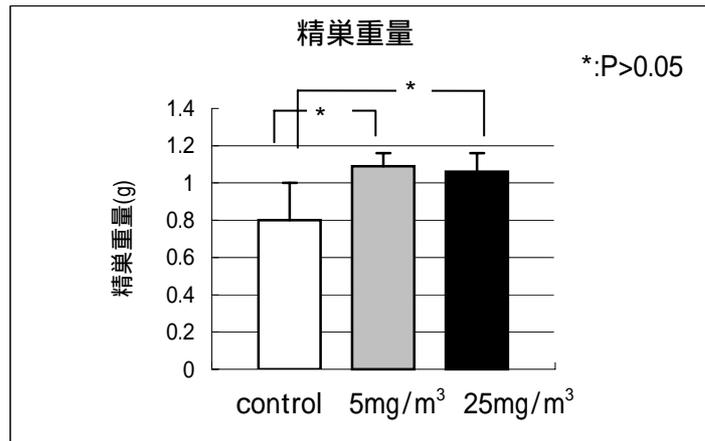


図3

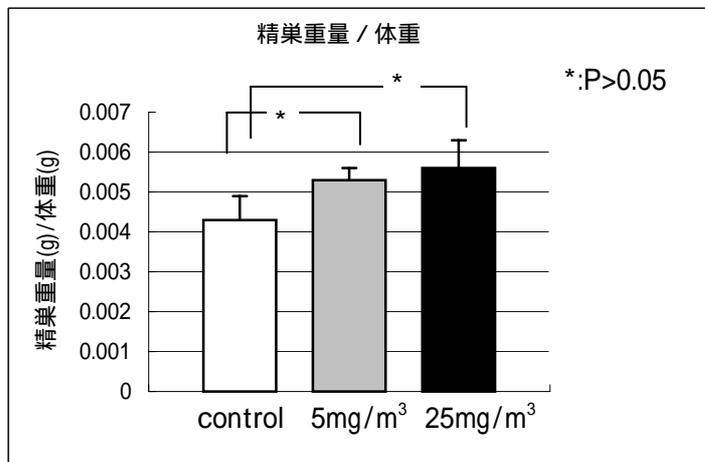


図4

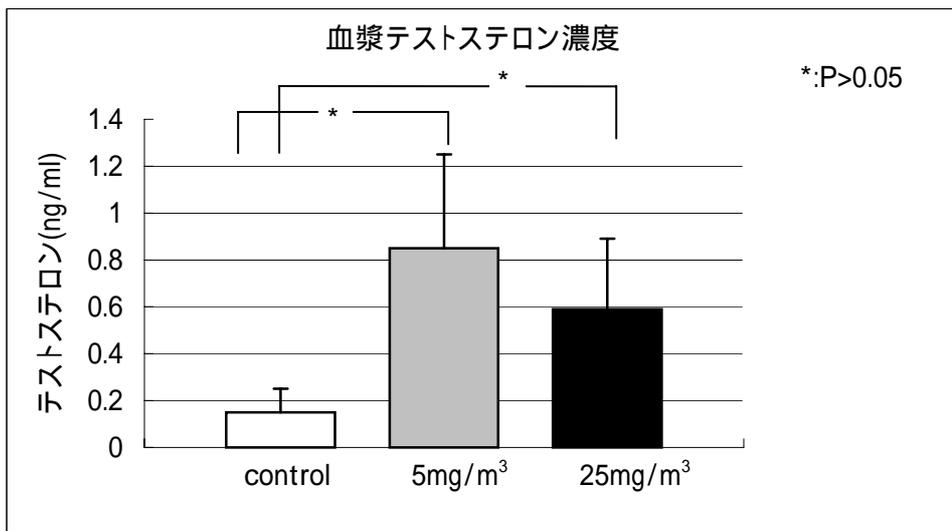


図5

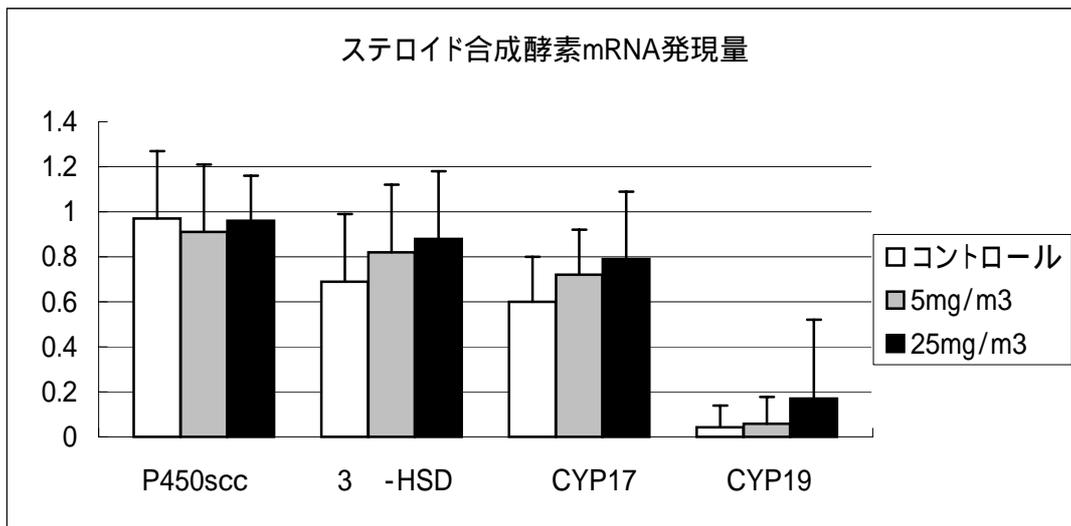


図6

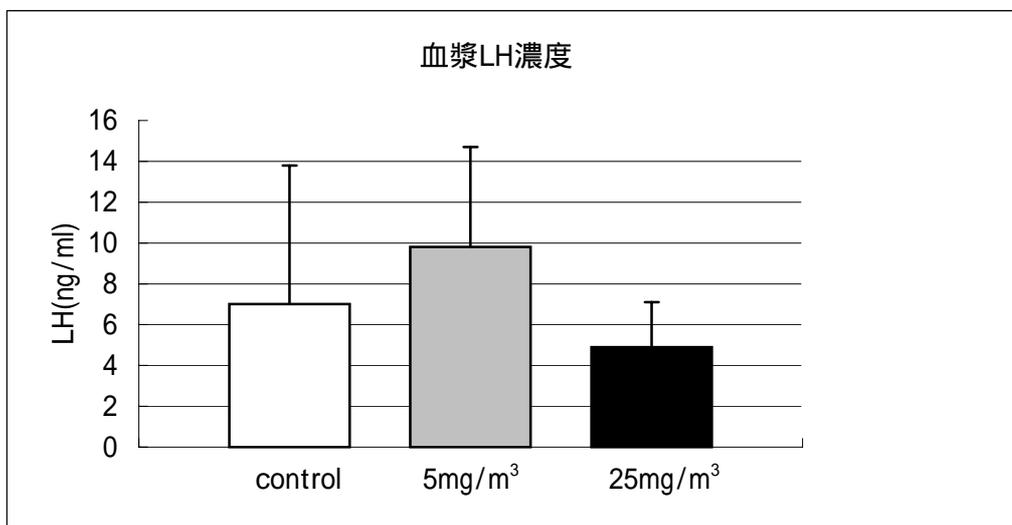


図7

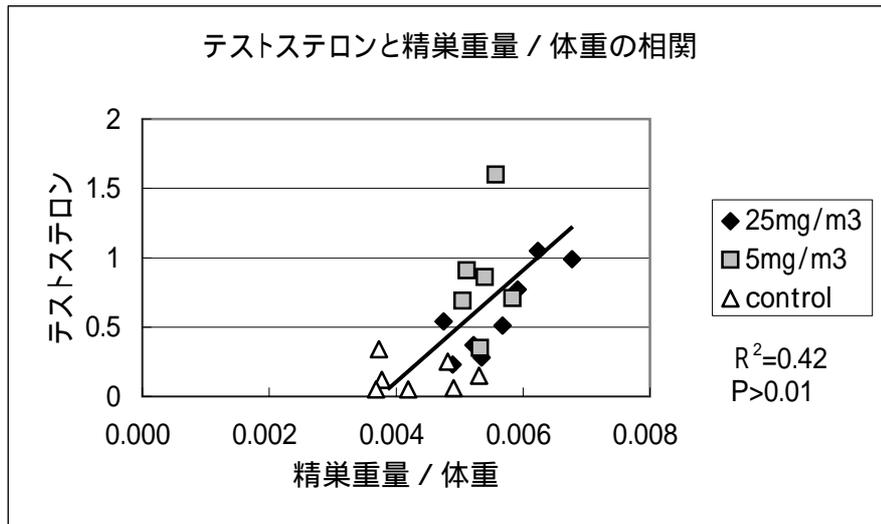


図 8

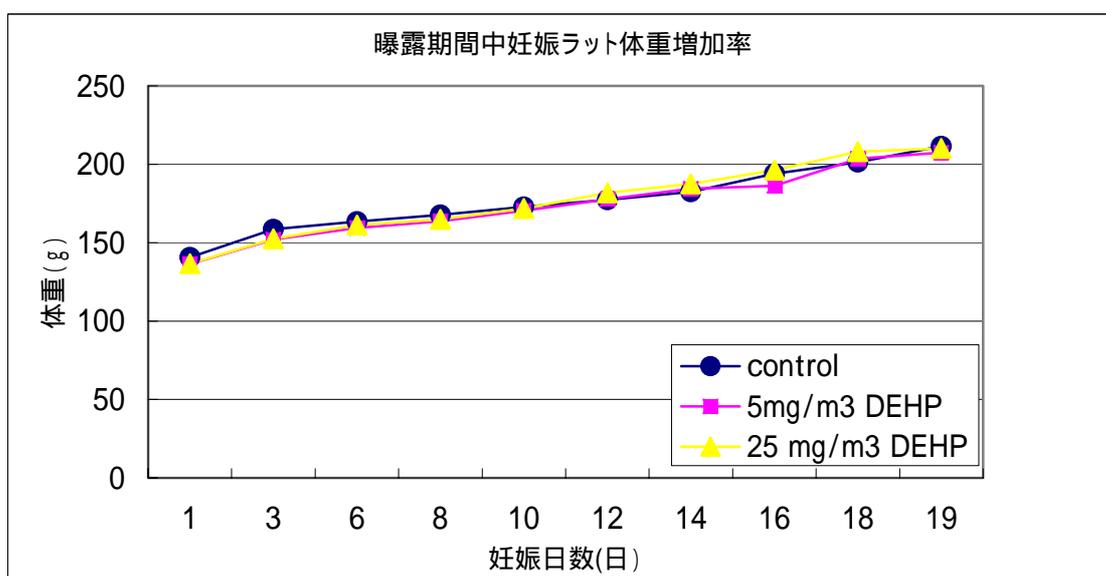


表 2

	コントロール	5 mg/m <sup>3</sup> DEHP	25 mg/m <sup>3</sup> DEHP
	n=7	n=7	n=8
体重 (g)	211.5 ± 32.7	207.5 ± 32.9	210.0 ± 32.0
肝臓重量 (g)	8.4 ± 0.8	8.0 ± 0.7	7.6 ± 0.5
卵巣重量 (g)	0.13 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.15 ± 0.04
子宮重量 (g)	38.3 ± 8.7	40.6 ± 5.5	40.3 ± 7.8
黄体数(計)	10.1 ± 2.2	10.9 ± 1.2	11.0 ± 1.5
着床数	10.0 ± 2.6	10.6 ± 1.5	10.6 ± 1.9
生児数	10.0 ± 2.6	10.6 ± 1.2	10.4 ± 2.1
死亡胎児数	0.0	0.0	0.3 ± 0.5

# Endocrine disrupting effect of the Di (2-ethylhexyl)phthalate inhalation toxicity in rat

Reiko Kishi

Department of Public Health Hokkaido University School of Medicine

Professor and Chair

**Key Word:** Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), inhalation, reproduction, metabolism, development, rat

## **Abstract:**

It has been reported phthalate esters (PAEs) have the potential of endocrine disrupting effect, reproductive toxicity, development toxicity and systemics toxicity in animal experiments. The adverse effects of PAEs on humans have been suspected because PAEs are found in many different environments, such as air, water and soil. Most papers focused on the adverse effects of PAEs by oral dosing, not by inhalation which enables stabler supply of low volatile PAEs. In this study, we investigated the following effects of inhaled Di (2-ethylhexyl) phthalate in rat: 1) distribution of DEHP and the metabolism in the organ, 2) the reproductive effects, and 3) the developmental effects.

1) We could not detect DEHP and its metabolite MEHP in the serum of DEHP inhaled rats. DEHP was detected only in the lung. High volume of MEHP was detected not only in small intestine and liver, which are the DEHP metabolic organs but also in testis. We could also detect MEHP in lung, kidney, small intestine and brain of control rats.

2) A small increase in body weight and testis weight/body weight was observed at DEHP inhaled young male rats, compared with controls. Inhaled rats had more matured testis than controls. Although the testosterone concentration of plasma was higher than controls, we could not observe the effects of inhalation in the expression of testosterone synthetase mRNA and the concentration of luteinizing hormone (LH). Therefore it was indicated that the DEHP inhalation to young male rats had a possibility to affect testes.

3) The embryonic effects of DEHP inhaled in pregnant rat were studied. The weight gain were observed in the pups of DEHP inhaled rat. In female pups, body weights were raised, placental weights were decreased, and AGD/body weights were also decreased. We could not see other effect not only in inhaled rats but also in their pups.

## (6) TBTによるラット妊娠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での突然変異誘発の可能性に関する研究

研究者 鈴木勝士（日本獣医畜産大学教授）

### 研究要旨

昨年、塩化トリブチルスズ(TBT)0、4、8、16mg/kg およびメチルメタンスルホン酸 20mg/kg をウイスターイマミチラット近交系の妊娠動物に妊娠0日から3日までの4日間強制経口投与し、着床前の胚に子宮内暴露を行い、分娩保育させて、生後6日までの出生児から肝臓と性腺由来のDNAを抽出し、20個のマイクロサテライトマーカの電気泳動パターンに比較的高率で変異が検出された。今年度は16mg/kg TBTとMMSによるサンプルをさらに増やすとともに、昨年のゲノムサンプルを用いて、より詳細にマイクロサテライト電気泳動パターンの変化を調べた。個々のバンドパターンの変動、父親、母親、子供での垂直的伝搬のより詳細な比較を実施しているが、今までのところ妊娠初期の胚にTBTによって遺伝性の突然変異が生殖細胞に確実に生じるとの証拠が得られるに至っていない。この実験系が、もっと変異原性の強い環境物質により、初期胚の内部細胞塊に生じる可能性のある劣性の変異を効率的に検出できる可能性もっていることを示すことが、生物集団の遺伝性突然変異の起源を解明し、そうしたリスクを防ぐ上で重要である。

### 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学部学生）  
大村 彰（日本獣医畜産大学獣医学部大学学部学生）  
佐々木 哲（日本獣医畜産大学獣医学部大学学部学生）  
栗原 孝宏（日本獣医畜産大学獣医学部大学学部学生）  
安斉有希子（日本獣医畜産大学獣医学部大学学部学生）  
小山絵里子（日本獣医畜産大学獣医学部大学学部学生）  
甘粕 晃平（日本獣医畜産大学獣医学部大学学部学生）  
小笠 原慶（日本獣医畜産大学獣医学部大学学部学生）

### A. 研究目的

本研究は、平成13年度「TBTによるラット妊娠初期胚の着床不全のメカニズムの解明」として、ウイスターイマミチラット近交系で実施された研究を継続し、さらに深化させる目的で実施されたものである。TBTに関しては、イボニシ類でのインボセックスが低用量で引き起こされること、ラットなどで妊娠初期の喪失（妊娠不成立）や妊娠中期暴露での口蓋裂の発生など、アロマターゼ阻害による内分泌攪乱作用が疑われると報告されている。しかし、ラットでの妊娠初期の悪影響は、母親に妊娠を準備させるための内分泌的環境が

攪乱されるために生じるという可能性と、胚の側で着床を母胎に知らせる胚表面のシグナル分子などの変化が生じるために着床できないという可能性のいずれに起因するのか未解明のままである。体外受精卵を使用するか、受精卵を集めて、*in vitro* で TBT に暴露した後、偽妊娠子宮角内に移植して経過を調べる、あるいは偽妊娠処置動物を TBT に暴露し、その後体外受精卵をその動物に移植するなどの方法を採用できれば上述の謎を調べることができる可能性があるが、当初考えたが、技術的に困難な点があったため、別の方法を考案した。その作業仮説は以下のようなものである。すなわち、妊娠初期の胚喪失に関連して、着床前の胚に対して TBT の影響があるとすれば、胞胚期の内細胞塊で何らかの変化があるはずと考えられるが、実際には、これまでの実験計画では着床不全のため胚を追跡するのは不可能であった。着床不全の見られない用量では、表現型正常な胎児が得られているが、表現型正常であるため通常の場合、発生初期に何らかの影響があったとは考えられてはいない。そのためそうした胎児の分娩後の成長、器官分化、生殖能に関する情報はほとんど得られていない。初期胚に何らかの TBT に起因する変異が DNA レベルであるのであれば、生後において体細胞系列と生殖細胞系列の両方で検出できる可能性がある。もし、そのような変異が検出されれば、妊娠初期における TBT の悪影響は初期胚に対する影響に起因する部分があることを意味することになるし、そのような変異が発見できない場合には、母体の着床に関わる内分泌環境がかく乱されることに起因する部分が大きく貢献することを意味することになる。この仮説で問題になるのは TBT に何らかの変異原性があるという根拠はあるのかという点である。結論からいうと、疑いなきにしもあらずということになる。以下がその理由である。これまでの多くの *in vitro* の実験では TBT には変異原性はないとされているが、その強い細胞毒性のために検出できないという可能性はないわけではない。ムール貝の幼生で姉妹染色体分体交換が高まったという成績が報告されているほか、貝類でのインポセックスなどの変化は明らかに遺伝子発現に影響があることを示唆している。また、一般に *in vivo* での誘発突然変異試験では、初期胚で仮に突然変異が起きて劣性であれば、胎児の表現型は正常であるので検出できないので、優性致死突然変異試験が陰性だったから変異原性作用がないと完全否定はできない。DNA レベルでの変異以外にもエピジェネティックな現象が関与している可能性も否定はできない。

上述の仮説に基づいて、平成 13 年度に背景遺伝子が均一な近交系ラットを用い、クローズドコロニーラットでは区別できない処置以前に含まれていた遺伝的不均一性から誘発された異常を分離する試みが行われた。この際、着床前の胚発生の期間はラットでは交配翌日（妊娠 0 日）から 3 日までの 4 日間に相当すると考えられるので、この期間に母親に強制経口投与して初期胚に TBT 暴露を行った。誘発される可能性のある遺伝的異常については、各染色体に特異的なマイクロサテライトを用いて、PCR 増幅産物の電気泳動上、出現するバンドパターンの相違の有無として検出する。材料としては、処置母親を出産、保育させ、生後 6 日までの児動物の肝臓と性腺、および母親と父親の肝臓から抽出された DNA を用い増幅パターンの比較を行う。陽性対照物質としてはメチルメタンスルホン酸(MMS)を用いた。この結果、20 種類のマイクロサテライトのうち 8 種類で次世代の動物の性腺から採取した DNA サンプルの増幅パターンに変異が発見され、TBT の投与用量に関連した発生頻度があることが認められた。

平成 13 年度の実験成績は、一見、作業仮説に比較的適合するように見える結果ではあ

ったが、検出された電気泳動パターンの相違が突然変異を示すものであるとすれば、体細胞系列での結果に何ら相違するパターンが見られないことや、全体として変異パターンの頻度が高すぎることなどの点で、直ちに TBT にこうした変異原作用があるとは断定できないと考えられた。決定的な結論を得るためには、DNA の調整から増幅、電気泳動に関わる技術的な問題があるのではないかという問題、父親、母親、子供の間マイクロサテライトパターンをもっと丁寧に分析する必要があるという問題、全体として、サンプル数をもっと大きくする必要があるという問題を解決するのが本年度の研究の具体的な目的である。

## B．研究方法

### 1．被験物質

基本的に平成 13 年度と同じであるが、再掲する。

塩化トリブチルスズ（ ） 和光一級、Lot No. SEN340 を用いた（環境省 1 世代試験に用いた残りの剤を JANUS より分与）。純度 95%以上とされているが、化評研の分析値は 97.57%であった（JANUS よりの情報）。少量のエタノールで溶解し、局方ごま油（宮沢薬品株式会社）に溶解して投与液を調整した。

陰性対照には高用量群に含まれるのと同量のエタノールを含むごま油を用いた。

陽性対照にはメチルメタンスルホン酸(MMS)( Shigma Chemical Co., St. Louis, MO: 純度 99%; Lot No. 50K3647 ) を用いた。

### 2．用量

動物の体重 100 g あたり 1ml の投与液量とし、本年度は昨年 の 3 用量群のうち最高用量のみ、すなわち TBT 16mg/kg とし、その用量になるよう投与液を予め作成し、遮光保存した。MMS については昨年の用量が 50mg/kg と報告したが、その後調整記録をチェックしたところ 20mg/kg であったことが判明したため、50mg/kg と 20mg/kg の 2 群を設け、その用量になるよう投与液を上述のごま油に溶解して調整保存した。妊娠 0 日から 3 日まで、当日の体重に基づいて投与量を決定し、強制経口投与を実施した。各動物について決められたゾンデと注射筒を投与に用いた。陰性対照、TBT 投与群、MMS 投与群の成績については、昨年のデータと比較して同等と考えられればデータを統合することとする。TBT の用量設定根拠は昨年の成績と江馬らの報告から、若干の着床阻害が期待される用量として 16mg/kg を選んだものである。

### 3．動物

ウィスターイマミチラットの SPF 近交系を動物繁殖研究所から購入し実験に用いた。9 週齢の雌 20 匹と雄 10 匹のセットを 2 回導入し、いずれも 12 日以上当教室の動物舎内に設置したラミナフローラック内に収容し検疫した。検疫期間中に雌の膣垢検査を継続し、検疫期間終了後に発情前期の雌と雄を 1 番同居させ、翌朝膣栓と膣垢中の精子の確認できたものを妊娠成立とし（妊娠 0 日）、体重測定した上で各投与群に割り当てた。動物舎は温湿度および照明時間調節（温度  $22 \pm 1$ 、湿度  $55 \pm 1\%$ 、14L10D: 0800 on 2200 off）され、換気回数 10 回 / hr の空調施設で、クリーンコンベンショナルな環境に維持されて

いる。基礎飼料には低植物エストロゲン飼料の NIH-07PLD フォーミュラ（オリエンタル酵母工業株式会社製）を用いた。妊娠の確認された動物はポリカーボネート製ケージに個別に収容され、床敷きには木屑（千葉アニマル資材）を用いた。

妊娠動物はそのまま動物舎内で分娩保育させ、分娩 0 または 1 日に分娩児数、性別、体重を記録し、採材の実施される 6 日まで毎日観察を継続した。途中死亡した出生児、瀕死の出生児については発見後直ちに体重を測定するとともに、肝臓を無菌的に摘出し DNA 抽出の材料とした。本年は途中死亡動物については性腺からの DNA 抽出は断念した。母動物に関しては後日まとめてエーテル麻酔下で開腹し、後大静脈から採血後、肝臓を無菌的に摘出して一部を DNA 抽出の材料とした。その際、体長、尾長を記録し、陰核腺、卵巣、卵管、子宮、膀胱、副腎、脾臓、膵臓、腎臓、顎下腺、舌下腺、外涙腺、胸腺、甲状腺、心臓、肺、脳、下垂体、腓腹筋、眼球、および腎周囲脂肪を摘出秤量し、併せて子宮の着床痕数を記録した。雄については、雌および児動物からの採材終了後、上記の雌性生殖器官を除く臓器と雄性生殖器官（精巣、精巣上体、精管、精管腺、精嚢、凝固腺、前立腺、カウパー氏腺、尿道球、肛門拳筋、包皮腺、陰茎）を摘出秤量した。

最初の交配は平成 14 年 10 月末に実施され、2 回目の交配実験は平成 15 年 3 月中旬に実施された。従って実験は年度を越えて持ち越されることになった。DNA 抽出用の臓器は個別に番号が付けられ、液体窒素中で凍結ののち、抽出まで -80 で保存された。

#### 4 . DNA の抽出

昨年抽出された DNA のうち、実験条件の確立、親子関係のパターン分析に用いられるサンプルと今年度 1 回目の採材によるもの（+数字として表記）を以下の表に示す。これらのサンプルは常法に則ってフェノール法により抽出された。

#### サンプル内訳

	0	4	8	16	MMS20	MMS50	
母親	4+8	5+0	5+0	6+5	5+0	+0	25+13
父親							9+10
子肝臓							
雄	16+46	15+0	20+0	30+27	18+0	+0	99+73
雌	9+53	17+0	22+0	21+16	18+0		87+69
子生殖腺							
雄	15+46	13+0	20+0	30+27	23+0	+0	101+73
雌	7+35	13+0	13+0	16+13	15+0	+0	64+48

#### 5 . マイクロサテライトマーカー

ラットの常染色体 20 組について、各染色体について、既知のマイクロサテライトマーカーをランダムに 1 組選び、抽出した DNA を用いて、各プライマーにより PCR 増幅し、アクリルアミドゲル電気泳動により増幅された DNA を泳動し、泳動パターンを分析した。

以下に用いたマイクロサテライト一覧を示す。

- |                 |                 |
|-----------------|-----------------|
| 1 番染色体：D1Mgh6   | 11 番染色体：D11Mgh3 |
| 2 番染色体：D2Mgh2   | 12 番染色体：D12Mit2 |
| 3 番染色体：D3Mgh3   | 13 番染色体：D13Mgh5 |
| 4 番染色体：D4Mgh14  | 14 番染色体：D14Mgh2 |
| 5 番染色体：D5Mgh4   | 15 番染色体：D15Mgh2 |
| 6 番染色体：D6Mgh6   | 16 番染色体：D16Mgh2 |
| 7 番染色体：D7Mgh7   | 17 番染色体：D17Mgh3 |
| 8 番染色体：D8Mgh1   | 18 番染色体：D18Mgh1 |
| 9 番染色体：D9Mit2   | 19 番染色体：Eta     |
| 10 番染色体：D10Mgh3 | 20 番染色体：D20Mgh2 |

## 6. 統計学

群間の平均値の比較に際しては、Student の t 検定を用い、有意水準を  $p < 0.05$  とした。

(倫理面への配慮)

動物に関しては、動物愛護の精神に則り、無用な苦痛を与えることなく飼育、サクリファイスを実施するものとする。また、投与中の環境暴露と人員の暴露を避けるため、オールフレッシュエアーク調で陽圧の動物舎(準 SPF 環境)のなかでラミナフローラックの内部を陰圧に設定して動物を飼育する。

## C. 研究結果

### 1. 妊娠動物の体重に及ぼす TBT および MMS 妊娠初期投与の影響

各群の妊娠動物の体重変化は以下の表 1 に示されている。TBT 投与群においても対照群の各妊娠日の体重との間に有意差は認められなかった。MMS50mg/kg 投与群では投与期間中に母親の体重は減少し、出産に至らなかった。

表1 妊娠動物の体重変化

		妊娠0日	1日	2日	3日	14日	21日
control (5)	平均	245.4	246.6	250.0	252.2	314.8	365.0
	SD	16.9	16.5	17.9	13.6	17.6	19.0
TBT16mg/kg (4)	平均	246.5	238.0	242.5	248.0	319.0	367.0
	SD	15.0	20.3	15.2	15.6	28.4	34.4
MMS50mg/kg (2)	平均	239.5	234.0	228.0	217.5	273.5	291.0
	SD	6.4	2.8	1.4	4.9	3.5	5.7

( )内は腹数

### 2. TBT および MMS の出生児数、出生児体重および外表奇形出現に及ぼす影響

TBT および MMS は、以下の表 2 に示すように、用いられた用量の範囲では出生児数に統計学的に有意な低下を生じなかった。TBT に関しては出生児数の低下があるように見え

るが、腹数が少なかったことと、今回妊娠黄体数が調べられていないことから、過去の報告に見られるような着床阻害に関しては情報が得られなかった。

表2 TBT 0, 4, 8, 16mg/kgおよびMMS 50mg/kg投与群の出生児数と出生時体  
並びに外貌異常

	0mg/kg (5)	TBT16mg/kg (6)	MMS 50mg/kg (6)
産児数	14.00 ± 2.35	13.00 ± 1.41	- ±
着床痕	15.20 ± 1.90	14.00 ± 1.00	14.00 ± -
出生児体重			
雌(g)	5.79 ± 0.21	6.2 ± 0.12	±
雄(g)	6.25 ± 0.18	6.6 ± 0.08	±
外表奇形	0/70	0/52	

( )内は腹数

外表奇形の頻度は総出生児数あたりの出現数

### 3. マイクロサテライトマーカーの分析

(1) 13年度実験の際にマイクロサテライトパターンで変異が検出されたマーカーに関する詳細な検討

昨年度の報告書では、変異の検出について以下のように記載されている。

以下の表(この報告書では次ページ)に示されるように、20種類のマイクロサテライトマーカーのうち8種類のマーカーで泳動パターンに異常が認められた。陰性対照群では、母親、父親、児動物の肝臓、性腺のいずれのサンプルでも各マイクロサテライトマーカーに特有の斉一なパターンが観察され、近交系動物の特徴を示した。TBTのみに変異が認められたのは、5、6、9、17および20番染色体上の5種類のマーカーであり、MMSのみに変異が認められたのは7および11番染色体上の2種類のマーカーであり、TBTとMMSの両方で変異が認められたのは2番染色体上のマーカーであった。

変異が認められたサンプルは性腺由来のDNAに限られており、20番染色体上のマーカーの場合にはTBT4、8、16mg/kg群の順に雄雌を合計した変異の頻度は、

電気泳動上確認された増幅産物の泳動パターンの差異を昨年の報告書ではとりあえず変異としたが、本当にTBTあるいはMMSの母体投与により出生児の性腺のDNAに変異を起こしたのか否か、慎重に検討しないと正しい結論が得られない。そこで、まず増幅産物の泳動像に差異が見られた個体と差異を示したマイクロサテライトマーカーについて、残されたデータをさかのぼって、サンプルの採取、DNA抽出、PCR条件、泳動条件について再度チェックした。

その結果、一部に死亡した動物からサンプルを得た場合に増幅パターンに差があったものが見つかった。また、電気泳動にかける際DNA含量を可及的一定にしていたにもかかわらず増幅が良好に行われなかったものも見つかった。これらについて、サンプルが残っ

ていることが確認されたため、再度増幅から実施して昨年度検出された「変異」が再現的に検出されるかまず確認することにした。

表 変異の検出された染色体と変異の出現率

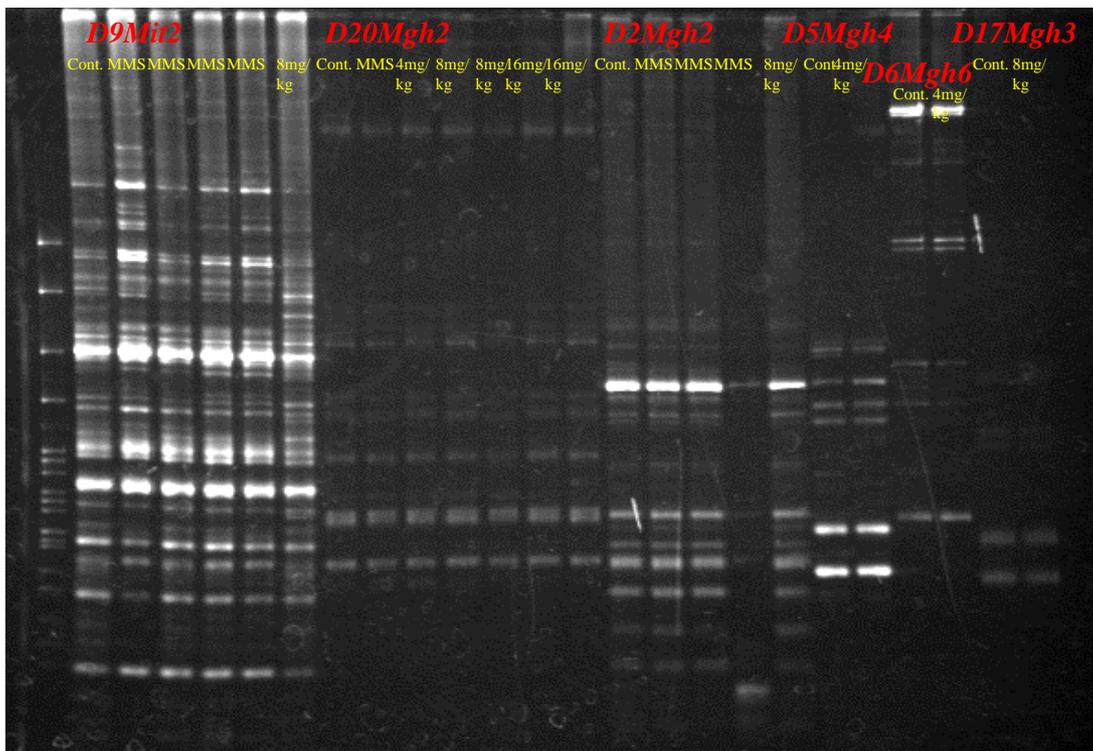
染色体	用量	母	父	雄子肝臓	雄子生殖腺	雌子肝臓	雌子生殖腺
2	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	1//20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	1//23	0/18	2//15
	total	0/25	0/9	0/99	2/101	0/87	2/64
5	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	1//13
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	1//30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	0/101	0/87	1/64
6	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/20	0/17	1//23
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	0/101	0/87	1/64
7	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	1//23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	1/101	0/87	0/64
9	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	1//20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	1/101	0/87	0/64
11	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	1//15
	total	0/25	0/9	0/99	0/101	0/87	1/64
17	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	1//13
	16	0/6		0/30	1//30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	1/101	0/87	1/64
20	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/20	0/17	1//13
	8	0/5		0/20	1//20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	5//30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	6/101	0/87	1/64

この表は昨年度の成績を再掲したものである。

## (2) 「変異」の再現性

D9Mit2、D20Mgh2、D2Mgh2、D5Mgh4、D6Mgh6、D17Mgh3 についていずれも対照と「変異」を示したサンプルについて、再度 DNA を PCR 増幅し電気泳動にかけたところ

る、以下の図 1 に示すように、D9Mit2 と D20Mgh2 の TBT8mg/kg 群のサンプル（同一個体）で昨年度報告した異常が再現された。他の昨年異常を検出した事例では、いずれも対照群と同様な増幅産物の泳動パターンが得られた。その結果、もし「変異」が起こったとするならば D9Mit2 と D20Mgh2 の TBT8mg/kg 群の動物について詳細な検討を加える必要があると判明した。D7Mgh7 と D11Mgh3 についても同様の検討をした結果、異常は検出されなかった（データは示さない）。



前回の発表で変異である可能性があると判定した個体の生殖器の泳動結果。前回変異である可能性があると判定したパターンを示す。

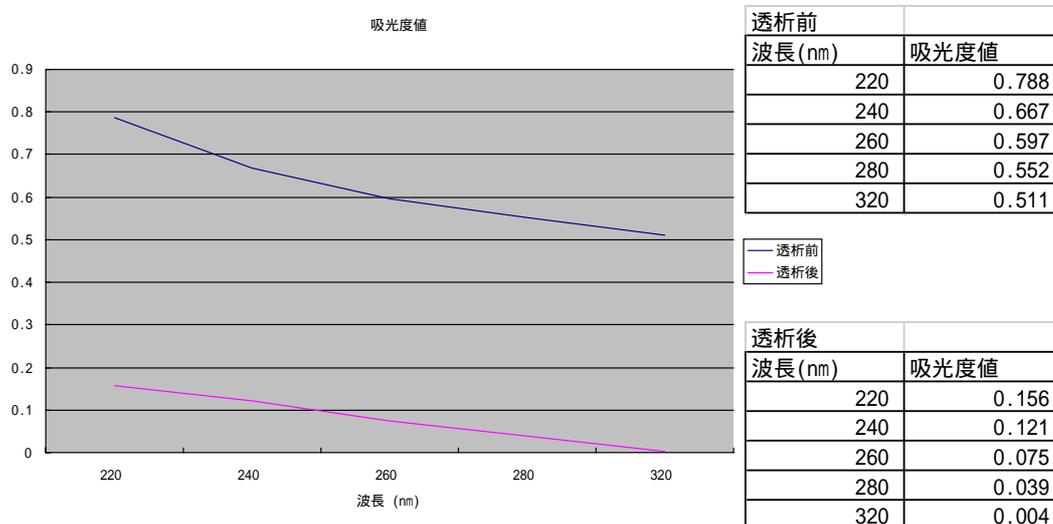
図 1 D9Mit2、D20Mgh2、D2Mgh2、D5Mgh4、D6Mgh6、D17Mgh3 の増幅パターン

### (3) D9Mit2 と D20Mgh2 の TBT8mg/kg 群のサンプルの特殊性 その 1

データをさかのぼって調べたところ、この二つのマイクロサテライトマーカーで異常が検出されたサンプルは同一個体のものであった。このサンプルは、死後発見された動物から得られていたことが判明した。採取時の判断で何とか DNA が抽出できると判定されてプロセスされていた。十分量のコンタミネーションのないサンプルが得られているか否かを確認するため、残っていたサンプルが吸光分析された。次ページの図 2 に示すように、220nm 近辺の吸光度が高かった。生後 1 日齢の死後サンプルされた精巢の DNA 値は 6 日齢のものより高い値を示した（280nm:蛋白も）。抽出用の試薬がもっと遅い日齢の重量に対しての希釈を考慮して作られているところから、抽出液に含まれた EDTA、SDS、Tris などの塩類が混入している可能性が考えられた。そこで抽出液を透析し、透析液について再度吸光度分析を行った。いずれの波長でもほぼ同じレベルの吸光度の減少があり、何ら

かの光学的密度の高かつこの波長域で同等な吸収のある物質が混入していたと考えられた。

残っているサンプルの透析後、再度 PCR と電気泳動を実施する必要が生じた。



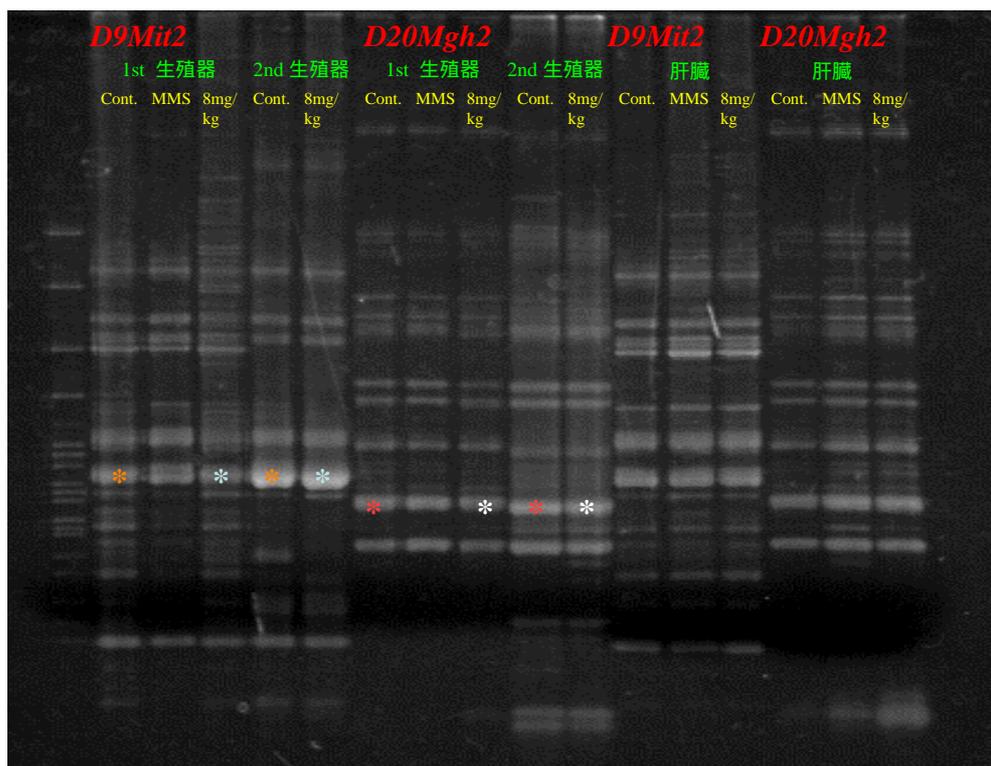
前回の発表で変異である可能性があると判定したサンプルの吸光度値。このサンプルは1日齢の死亡仔から抽出された精巢であり、6日齢の生存仔から抽出したサンプルよりもDNA濃度が高い値を示していた。吸光度値を再検討し、透析を行った。

図2 TBT8mg/kg の異常個体サンプルの透析前後の吸光度分析

#### (4) D9Mit2 と D20Mgh2 の TBT8mg/kg 群のサンプルの特殊性 その2

昨年来用いてきたマイクロサテライトマーカーによる DNA 増幅産物の電気泳動像では、通常の遺伝子増幅の場合のように想定される分子量（移動度）の単一バンドが得られる訳ではなく、想定分子量より大きな分子量の複数のバンドが増幅されている事例が多かった。増幅に際してマーカーと結合が何らかの理由でずれたりする、いわゆるミスマッチによって染色体の別の部位を増幅しているものと、増幅された産物が反応液に存在する塩類イオンと相互作用して高次構造が変わることによって、電気泳動の移動度が変わる可能性がある。複数のバンドが生じることには、そのほかにも未知の要因が関与している可能性があると考えられる。これらの複数のバンドについて別々に切り出してシーケンス分析を経験したことがあるが、メインバンドとサブバンドで同一配列であると確認された事例があった。

D9Mit2 と D20Mgh2 に関して、PCR 産物の一部を 2nd PCR にかけて、同じマイクロサテライトマーカーで増幅し、異なったパターンに由来するものが増えるか否か、バンドパターンを比較した。



前回の発表で変異である可能性があると判定した個体の肝臓および生殖器の1stおよび主要なバンドの2ndPCR。前回変異である可能性があると判定したパターンを \* で示す。

図3 D9Mit2 と D20Mgh2 による主要バンドの 2nd PCR

D9Mit2 と D20Mgh2 双方について、星印で示したように 1 回目の PCR では主要バンド以外に高分子領域に差異が認められる。高分子量領域のバンドの増幅をめざして、レーン全体を切り取り、2 回目の PCR 増幅を行ってその産物の電気泳動を行うと、対照と異常固体の増幅産物はともに同じパターンを示した。この結果、1 回目の PCR により増幅された高分子領域のバンドが消失し、バンドパターンは全体的に単純化した。高分子量領域で 2 回目の PCR では出現しなかったバンドについては、なんらかの誘発性の変異を示している可能性も捨てきれないので、メジャーバンドの外に高分子バンドについても切り出して 2 回目の PCR につけ、同様な分析をする必要があると考えられた。

#### (5) D9Mit2 と D20Mgh2 による主要バンド以外のバンドの 2nd PCR

レーン全体から 2nd PCR によって再現性良く複数の単純化されたバンドが、対照と TBT8mg/kg 群のかつて異常と判定された精巢の DNA サンプルで増幅されることが確認されたので、主要バンド以外のバンドから逆にメジャーバンド相当のバンドが 2nd PCR により増幅されるか否かを確認するとともに、図3の実験で増幅されなかったバンドが何に起因しているのか推測を試みることにした。

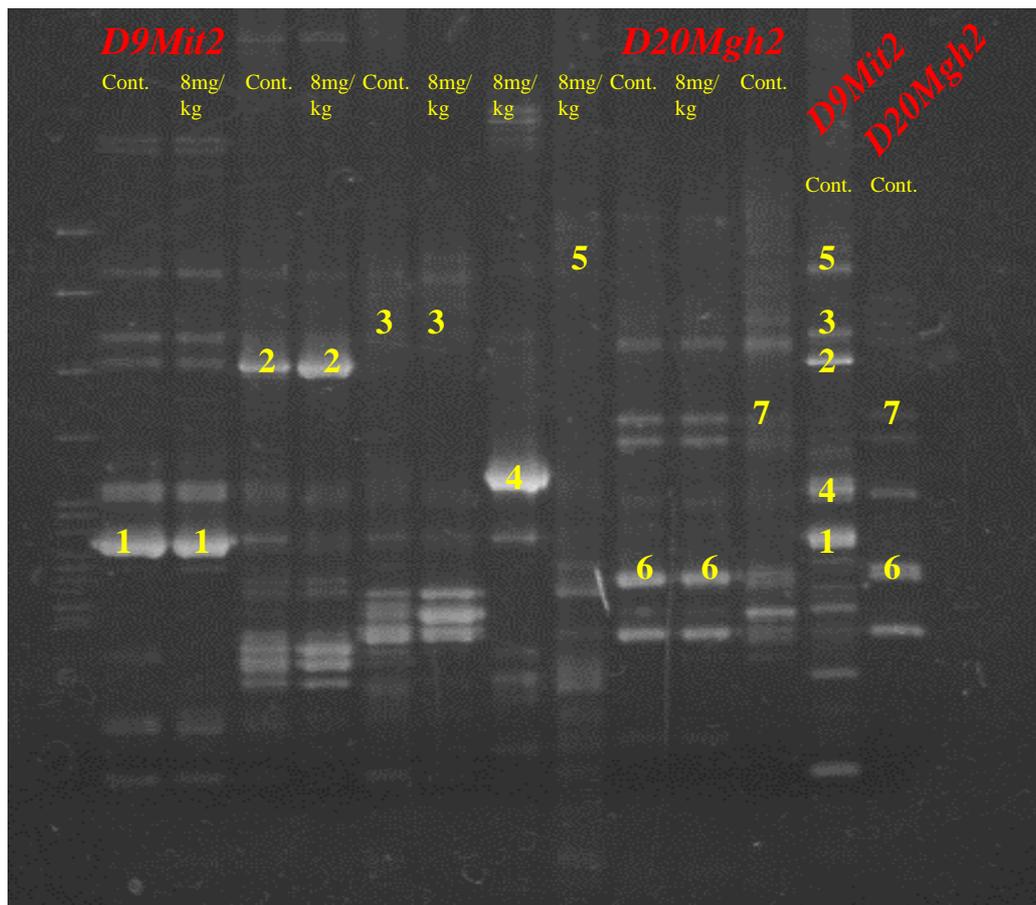


図4. アクリルアミドゲルから切り出したバンドの2nd PCR。

図中右の2つのレーンに D9Mit2 と D20Mgh3 での増幅の際出現するバンドに便宜的に付したナンバーが示してある。左から 2 レーンずつ (対照と 8mg/kg) の D9Mit2 の 1 番のバンド、2 番のバンド、3 番のバンド、次いで 1 レーンずつ 4 番と 5 番のバンドの増幅結果が示してある。本図に示した 8mg/kg の事例では 5 番のバンドが検出されなかったため、対照の位置と比較してそのバンドが存在するであろうと想定される部位を切り抜いて 2nd PCR 増幅をかけた。さらに D20Mgh3 については 6 番のバンドについて 2 レーン、7 番について 1 レーンが割り当てられている。D9Mit2 では 1 番からの 2nd PCR では 2~5 番のバンドも増幅された。2 番については 2 番のバンドが濃くなったほか、1 番についても増幅された。3 番については 3 番の増幅が悪かったほか 1 番も薄く、それより低分子領域で複数のバンドが増幅された。4 番については 2 番と同じような傾向があり 4 番がより多く増幅さ、1 番も少ないが増幅された。5 番については 5 番 1 番ともに増幅が悪く、必ずしも増幅されたと確認できるわけではないが、経験的には薄いバンドが存在していると解釈して良いようである。D20Mgh3 についても D9Mit2 と同様な傾向が確認された。

全体として、高分子領域に出現するバンドの場合、それを基準にして 2nd PCR を実施すると明瞭な増幅パターンが得られにくい傾向があった。何らかの理由でメジャーバンドと移動度の異なるバンドが生じ、そのバンドを元に再増幅するとそのバンドがより強く増幅される場合があることも判明した。使っているプライマーは同じであり、かつそのような場合にはメジャーバンドも増幅されてくるので、実際のシーケンスには差がない可能性もある。おそらく何らかの高次構造が変化するのであろうが、詳細に関してはそれぞれの増幅産物についてシーケンス分析を行わないと結論が出ないと考えられる。

図3で消えたバンドと表現したバンドについて、仮に真の変異で分子量が異なるバンドが存在していたのだとすると、そのバンド自体はもっと多量に増幅されるはずであると考えられる。配列分析などにより、異なったバンドであることが確認された場合でも、その増幅される鋳型になったサンプル DNA 上の配列が、本来増幅されるべき配列の位置に存在していることを更に確認する必要が生じる。

#### (6) D9Mit2 と D20Mgh2 による脱塩処理後の PCR

上述の分析に基づいて、昨年度の成績に関して再度検討するとすれば、脱塩処理を施して PCR を行い、それぞれの増幅結果を対照群と比較することが必要であると判断された。DNA サンプルの量が少ないことから、マイクロダイアライザーシステム（日本ジェネティクス社）を用いて脱塩処理を行った。その後の電気泳動の結果を図5に示す。

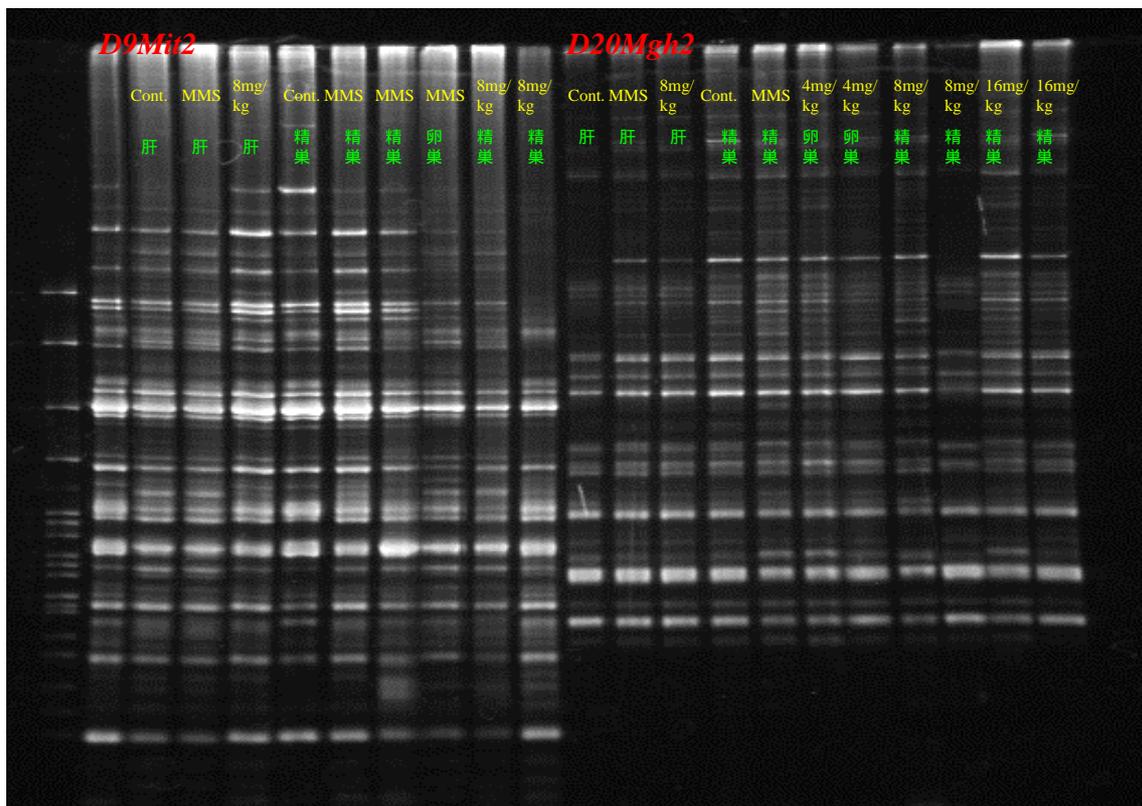


図5. 透析後の泳動結果。前回変異である可能性があると判定したパターンを、透析後のパターンを で示す。

この結果、昨年異常がある(「変異」とされた PCR 増幅産物の電気泳動パターンは、いずれも対照群で見られるパターンと同じパターンであることが確認された。生殖腺サンプルでの増幅産物の電気泳動パターンは肝臓での結果と変わらなかった。

最終的に昨年度検出された可能性があるとした「変異」は実際には存在しないことが確認された。今年度、新たにサンプリングしたサンプルについては、昨年度「変異」が検出されたマイクロサテライトマーカーについてまず、「変異」の有無についてスクリーニングすることが必要であると考えられた。

(7) D9Mit2、D20Mgh2、D2Mgh2、D5Mgh4、D6Mgh6、D17Mgh3、D7Mgh7 と D11Mgh3 による今年度採取したサンプルでの PCR 増幅パターンの分析

以下 16 組の電気泳動像を示す。1 組に 4 枚の電気泳動結果が含まれているが、それらの配列は表 3 に示してある。また、表 4 に各実験群での動物の内訳が示してある。

なお、レーンに×が付してある部分があるが、この部分はサンプルのアプライが無かったことを意味している。今年度のサンプルについては、昨年度の抽出が死亡動物からのものや、生後 1 日から 6 日程度の幼弱で臓器の計量なものからサンプリングしたために、アーティファクトとして実際より高い DNA 含量が誤って得られたなどの経験から、10 日齢以上の動物のみからサンプリングすることにした。

表 3. 電気泳動のレーンにアプライした動物番号  
左から

レーン番号	1	レーン番号	2	レーン番号	3	レーン番号	4
	マーカー		マーカー		マーカー		マーカー
1	20F	25	C0529M	49	T0323M	73	12M
2	70F	26	C102M	50	T0324M	74	M102M
3	00F	27	C103M	51	T102M	75	M103M
4	33F	28	C104M	52	T103M	76	M104M
5	02M	29	C105M	53	T104M	77	M105M
6	03M	30	C106M	54	T105M	78	M106M
7	01M	31	C107M	55	T106M	79	M107M
8	12M	32	C108M	56	T306M	80	M108M
9	C0207M	33	13F	57	T307M	81	M109M
10	C0208M	34	23F	58	T308M	82	M201M
11	C0209M	35	35F	59	T309M	83	M202M
12	C0210M	36	34F	60	T401M	84	M203M
13	C0211M	37	31F	61	T402M	85	M204M
14	C0212M	38	05M	62	T403M	86	M205M
15	C0213M	39	11M	63	T404M	87	M206M
16	C0314M	40	14M	64	T405M	88	M301M
17	C0315M	41	T0102M	65	T406M	89	M302M
18	C0316M	42	T0104M	66	T407M	90	M303M
19	C0317M	43	T0105M	67	T408M	91	M304M
20	C0318M	44	T0106M	68	37F	92	M305M
21	C0330M	45	T0107M	69	30F		
22	C0526M	46	T0320M	70	32F		
23	C0527M	47	T0321M	71	13M		
24	C0528M	48	T0322M	72	15M		

表 4 . 各実験群での動物の内訳

	対照群				TBT投与群					MMS 投与群					
	親	20F 02M	70F 03M	00F 01M	33F 12M	13F 05M	23F 05M	35F 11M	34F 11M	31F 14M	37F 13M	30F 15M	32F 12M		
子供(10日齢)	C0207M	C0314M	C0526M	C102M	T0102M	T0320M	T102M	T306M	T401M	M102M	M201M	M301M			
	C0208M	C0315M	C0527M	C103M	T0104M	T0321M	T103M	T307M	T402M	M103M	M202M	M302M			
	C0209M	C0316M	C0528M	C104M	T0105M	T0322M	T104M	T308M	T403M	M104M	M203M	M303M			
	C0210M	C0317M	C0529M	C105M	T0106M	T0323M	T105M	T309M	T404M	M105M	M204M	M304M			
	C0211M	C0318M		C106M	T0107M	T0324M	T106M		T405M	M106M	M205M	M305M			
	C0212M	C0330M		C107M					T406M	M107M	M206M				
	C0213M			C108M					T407M	M108M					
				合計					T408M	合計		合計			
	7	6	4	7	24	5	5	5	4	8	27	8	6	5	19

D2Mgh2肝臟

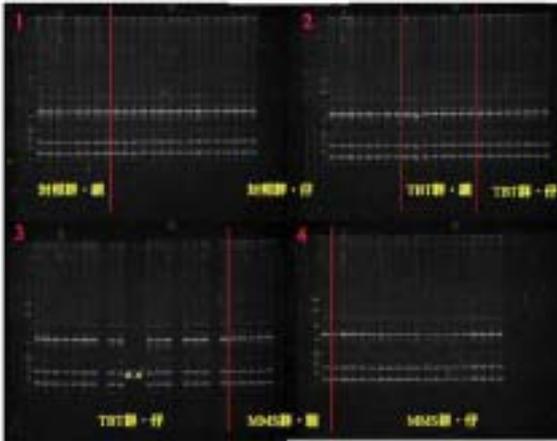


圖7

D2Mgh2精巢

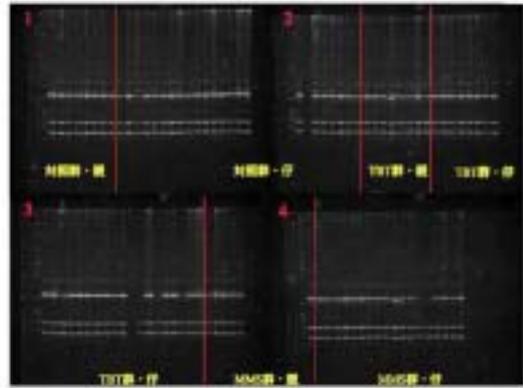


圖8

D5Mgh4肝臟

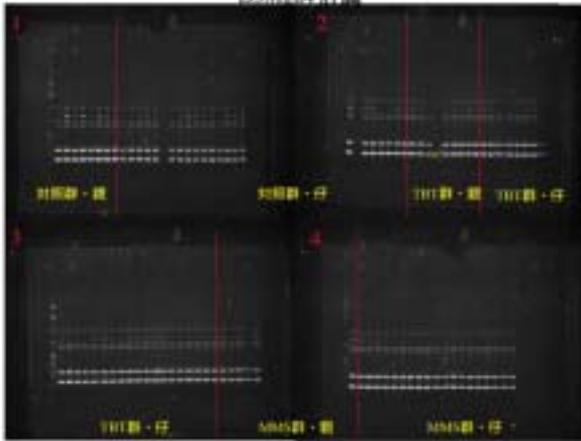


圖9

D5Mgh4精巢

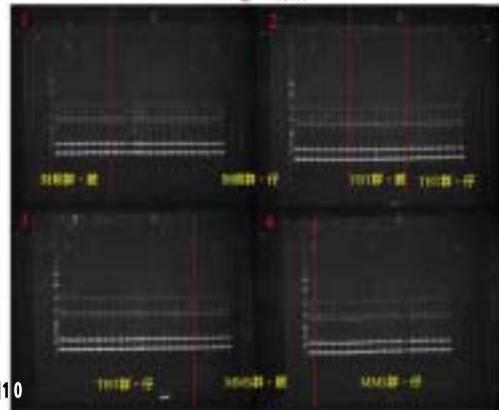


圖10

D6Mgh6肝臟

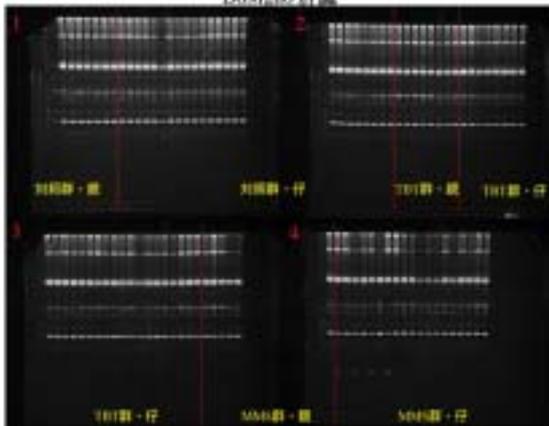
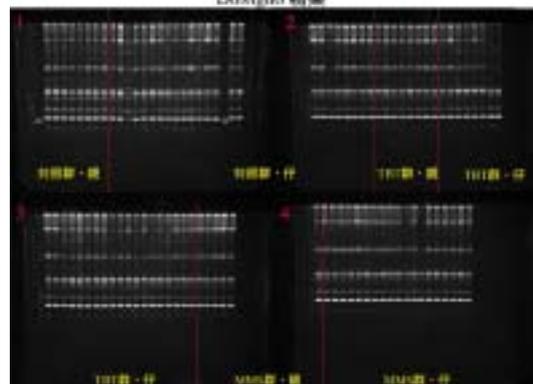


圖11

D6Mgh6精巢



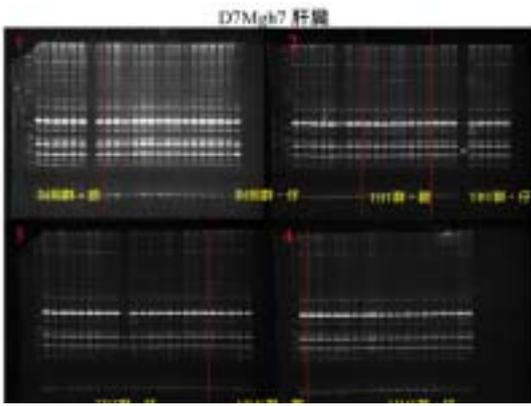


圖 13

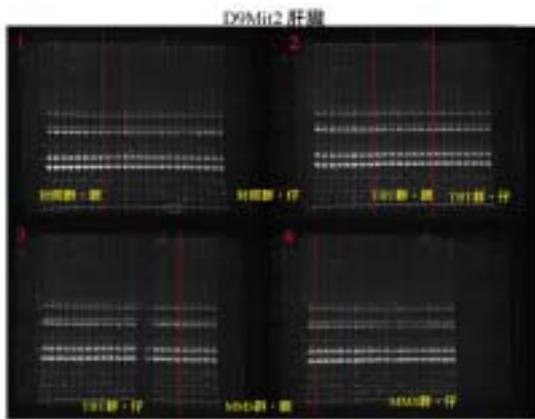
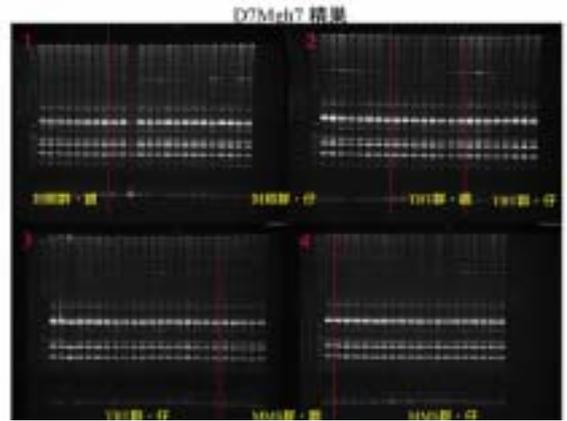


圖 15

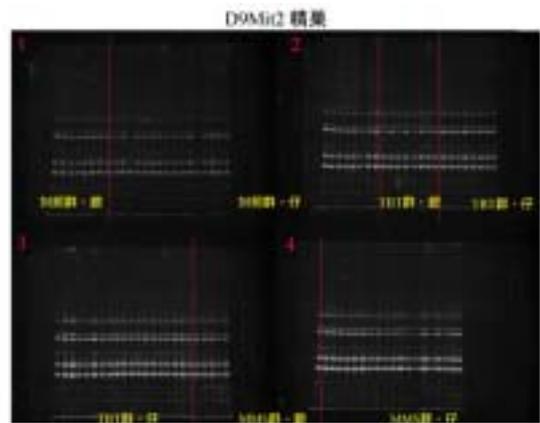


圖 16

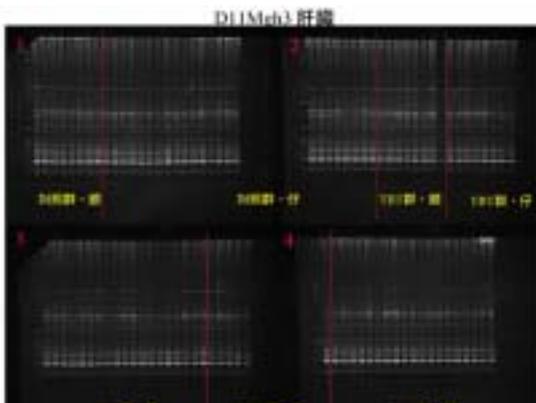


圖 17

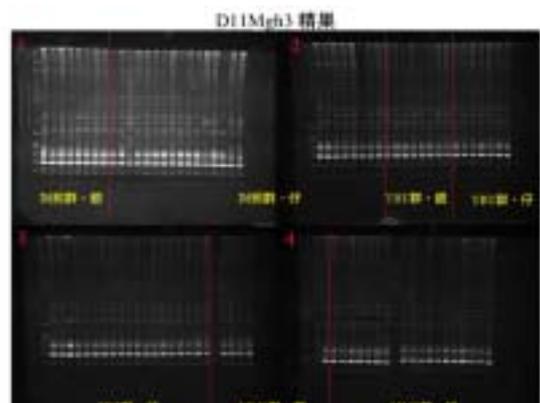


圖 18

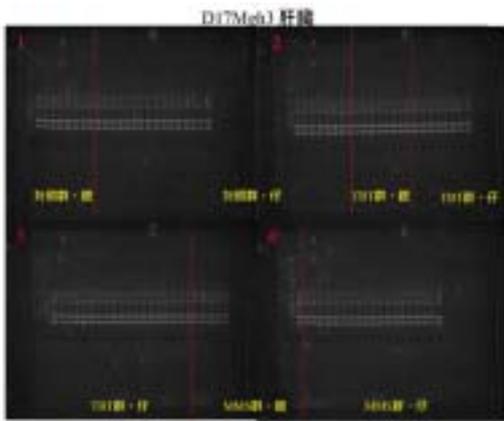


図19

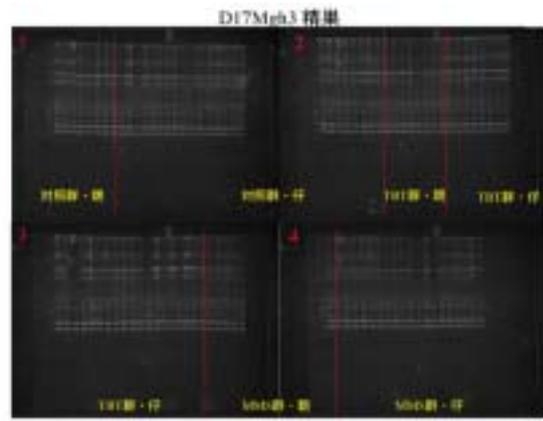


図20

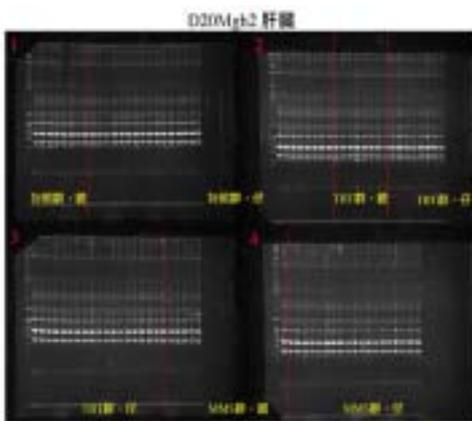


図21

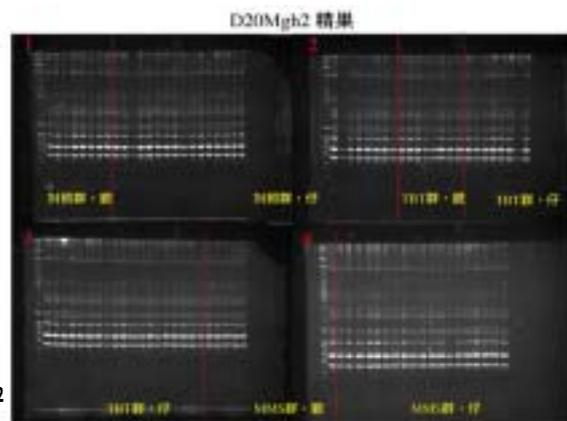


図22

全体として、今年度採取した DNA については、昨年「変異」が検出された 8 種類のマイクロサテライトマーカを用いて増幅したところ、TBT 投与群、MMS 投与群の肝臓および性腺の DNA に「変異」の認められたものは無かった。一部、サンプルに増幅がうまくいかなかったものがあり、それらについては再度 PCR と電気泳動を実施する必要がある。

#### D . 考察

TBT には、ミユール貝の胚において高率に姉妹染色体分体交換を引き起こすという報告以外に現存する変異原検出系で陽性の報告は存在していない。その意味で、昨年得られた妊娠初期胚での母体経由での暴露が、胎児の外観に何ら影響を及ぼさないのに胎児の性腺で突然変異を生じるという成績はにわかには信じがたい。陽性対照として用いた MMS では、妊娠初期投与による影響は知られていないが、昨年の実験では、変異原物質に時に見られる重篤な体軸形成に関わる異常が検出された。その際、MMS 投与群でも TBS と同様な変異が生殖腺でのみ検出され、かつ D2Mgh2 の場合には、個体によってバンドパターンが異なっていた。この物質はアルキル化剤であり至るところで DNA メチル化を引き起こしていると考えられるので、同一のマイクロサテライト座で異なる変異が生じても不思議はないと考えられる。陰性対照での全ての検体においていずれのマイクロサテライトマーカについても変異が検出できなかったことから、昨年得られた泳動パターンの変異が何

らかの DNA の修飾を意味している可能性を否定できない。しかし、体細胞系列だけのサンプルではそうした変異が検出されず、生殖細胞を含む臓器でそのような変異が検出されたこと、総体的に見て、仮に DNA 塩基配列の変化というような変異が起きているとすれば、変異の起こる頻度が高すぎる印象があることなど結論には慎重さが必要である。

今回 TBT および MMS の投与された妊娠時期は、受精後着床する前までの初期胚の発生期に相当する。着床前の胚盤胞の段階では、胚は内部細胞塊という一種の多能性の幹細胞の集合を形成している。古典的な催奇形性の学説では、この時期に何らかの外因の感作を受けた場合、悪影響が著しい場合には胚は死亡し影響を見ることができない、あるいは影響が内部細胞塊の一部であった場合にはその細胞が死んでも、他の細胞がその部分を置換するのでやはり影響を見ることができないとされていた。比較的最近になって、原腸胚期にメチルニトロソウレアなどの強い変異原、レチノイン酸等の影響を受けると、最大約 30% の胎児に重篤な体軸形成異常、顔面形成異常、浮腫などを伴う奇形が生じることが知られるようになった。しかし、これらの研究では、表現型正常だった同腹児については形態学的に異常がないとしか記載されておらず、分娩させてその後の発生、成長がどのような経緯をたどるのか全く知られていない。少なくとも昨年の実験の内 MMS で見られた外表奇形は、上述の変異原の範疇で生じる奇形であると考えられる。このことは、妊娠 0 日から 3 日迄の MMS が何らかの影響を初期胚に与えたことを意味しており、同時期に投与された TBT も胚に達していたとしても不思議ではないことを裏付けるものである。

昨年得られた突然変異の検出率は、その他の *in vivo* での検出系での検出率が 10000 匹に数匹と言った低頻度でしかないのに比べると、極めて高かった。マイクロサテライトはイントロンに存在する無意味な遺伝子配列である。本来繰り返し回数などに多型が存在し、個体ごとに保存されているとされているが、PCR で増幅した場合、個体内でも複数のバンドが電気泳動で確認されるのがふつうである。本来の塩基数に相当するバンド以外のバンドが何らかの高次構造の変化によって移動度が変わっているとの指摘もあり、バンドパターンの変動が示されたサンプルについては詳細な検討が必要である。昨年得られたゲノムと今回得られたサンプルについて増幅、泳動等の条件設定と、父親、母親、子供に関して垂直的な伝搬に関連した分析を行う必要がある。

昨年度のサンプルについて、慎重にデータを吟味して、PCR 増幅産物の電気泳動像に対照のパターンと異なるものがなぜ現れたのか、真にそれは TBT または MMS の妊娠初期投与によって、胚に生じた突然変異を反映しているのか否か検討した。8 種類のマイクロサテライトマーカーが昨年「変異」を示した。これらのすべてのサンプルについて、慎重に再増幅し、電気泳動によって分析したところ、D9Mgh2 と D20Mgh2 以外のマーカーではいずれも「変異」は再現せず、対照と同様なバンドパターンを示した。D9Mgh2 と D20Mgh2 の事例では、昨年の「変異」パターンをすべての個体ではないが、一部の個体でそのパターンを再現した。その個体のデータをさかのぼると、生後 1 日で死亡したものであることが判明した。抽出が良好に行われていない可能性があるとして、吸光度分析をした結果、生後 6 日の事例より高い吸光度であることが判明した。6 日齢と同じ希釈条件で抽出を行った結果、塩類が相対的に多くなった可能性があると考え、脱塩処理をして吸光度分析をしたところ、どの波長でもほぼ同じ程度に吸光度が減少したため、何らかの塩類が混入したと考えられた。脱塩処理をほどこして DNA 増幅を行い、電気泳動を行うと

大部分のサンプルで対照と同じ泳動パターンを生じた。また、メインバンド以外に高分子領域に複数のバンドが生じる点について、メインバンド、その他のバンドを切り取って DNA を抽出し、2<sup>nd</sup> PCR により増幅すると、単一のメインバンドから、切り取る前に存在していたのと同じ複数のバンドが生じた。これらの複数のバンドはなぜか同じ分子量の部分に出現するが、メインバンドと同等のものであると考えられた。「変異」を起こしたバンドと当初考えられていたバンドは、この場合メインバンドの増幅では生じなかったため、特異的な配列を反映する可能性は完全には排除できなかったものの、実際に生じたバンドの濃さはきわめて薄く、そうした特異的な「変異」に相当する配列が実在する確率はきわめて低いと判定された。一方で、高分子バンドの一部からもメジャーバンドが増幅されたため、この高分子バンドはメジャーバンド由来であろうと推測された。高分子バンドから高分子バンドが増幅される場合増強される傾向があったが、その理由は明らかにはならなかった。

生後 10 日齢でのサンプルを用いたところ、対照とのバンドパターンの比較が確実に実施できると考えられたので、今年度得られた約 100 サンプルについて 8 種類のマーカーを用いて増幅産物の泳動パターンを分析した。今年度のサンプルについては「変異」と考えられる泳動パターンは得られなかった。父親と母親、児動物の肝臓と性腺から抽出された DNA から増幅された産物の電気泳動パターンはそれぞれのマーカーで特異的かつ同一のパターンを示し、用いた動物が近交系であることを裏付けていた。

昨年、仮に生殖細胞で劣性の突然変異が生じた場合を想定して、F3 まで兄妹交配で追跡する必要性を提唱した。すなわち、今年の電気泳動パターンの変化が DNA 塩基配列に関する何らかの突然変異を反映していると仮定すると、TBT の場合には出生児の外見に異常を生じていないため、その変異は劣性の突然変異であると考えられる。マイクロサテライトマーカー周辺のみが TBT に感受性がある可能性も否定できず、その場合には機能的な異常は伴わない可能性もある。これらの可能性については、近交系動物に妊娠初期投与して F1 を得て、それらを兄妹交配して F3 まで追跡すれば、その変異についてのホモ接合体を得ることができるので、実際にどのような変異が生じたのかを検証することができる。こうした試みは全くされることがないので、生殖細胞に劣性突然変異が生じる、すなわち遺伝性の突然変異が生じる可能性があるとしても、現時点では断定できない。これらの機序が実際に存在するとすれば、人間で数千種類あることが知られている遺伝性疾患の生じた過程のひとつに何らかの化学物質に起因するものがあることを意味することになる。これらの可能性については、TBT などの文献上さほど変異原性が強くないと考えられる化合物を用いて実験するよりは、別の変異原性が知られている環境物質をもちいて実験する方が検出される可能性が高いと考えられる。TBT については、現在保有しているゲノムサンプルと新規に採材したサンプルで慎重に検討した上でそのような実験の必要性について判断すればよいと考えられる。

この実験系が生殖細胞での劣性の突然変異を検出できる可能性がもう少し強く示唆されると、発生学的には、胚盤胞の段階で既に生殖細胞系列に分化する細胞の運命決定がされていることなど興味深い知見を提供することになると考えられる。我々は既に発生学的には相同な時期の鶏胚がエストロゲン、ビスフェノール A、電磁波によって重篤な体軸形成

異常を含む発生かく乱を受けることを実証している。それらが生殖細胞系列のどのような影響を及ぼすのか不明であるが、ポディプランに関わる遺伝子の発現異常があることは、初期胚がこうした外因性の作因に著しく無防備である可能性を示唆している。生命が絶たれるほど重篤な異常や優性の異常の場合にはその変異が起きた個体が死亡することによって、その変異が失われるのでポピュレーションに大きな影響は生じないと考えられる。マイナーで劣性の変異については世代を経て発現することになるので、当面影響がないように見えても長い目で見ればかえって集団に及ぼす影響は大きいことになる。このような悪影響について効率的に検出できる実験系が必要とされるゆえんである。従来、催奇形性試験では排卵数（妊娠黄体数）から着床数を差し引き、それらを着床前の杯喪失と表現してきた。この実体は実際には不明である。人間でのこうした初期胚の喪失は極めて高いとの報告もあり、今後初期胚に対する化学物質や物理的要因の悪影響について、より詳細な調査と研究をする必要があると考えられる。

本来、この実験は TBT の初期胚に対する着床不全を起こすという影響が、TBT が胚に対して作用し致死なりその他の悪影響を起こすために生じるのか、母胎に対して着床を阻害するような何らかの内分泌的要因があるために生じるのか不明のままになっている点に決着を付けようとするのが目的であった。着床を起こす際、胚の表面抗原が重要な役割をするので、胚に TBT の直接的影響があるのであれば、そうした胚の側のファクターの変化によって着床が阻害される可能性も考えられる。そのような変化は何らかの遺伝子の変異を伴っている可能性が高いと考えられるので、軽度に着床阻害がおこる TBT の濃度に暴露された胎児を出生させ、ある時期まで保育して性腺と肝臓を材料に変異の有無をマイクロサテライトマーカーを用いて検出することができるであろう。その目的のためには遺伝的背景が均一と考えられる近交系の動物を用いて実験する必要がある。このような仮説で実験を行ったところ、昨年度「変異」の可能性のある変化を検出したが、あまりに高頻度であり、にわかに信じがたく、検出の諸条件の詳細な検討が必要であるとの認識に至った。本年度の検討の結果、今年の「変異」はいずれも真の「変異」ではないとして否定された。

この結果は、高々一つの染色体について一つのマーカーを用い、総数でも約 600 匹程度の動物からのサンプルで検討された結果である。より多数のマーカーと、多数の動物を用いて検証しないと、TBT あるいは MMS の突然変異誘発性が初期胚において認められる、あるいは認められないとの断定的な結論を得ることが難しい。多能性の幹細胞に対する変異原の影響を遺伝性の突然変異として検出するというアイデアは TBT とは無関係に重要な問題を解明する可能性がある。その際マイクロサテライトマーカー、既知の遺伝子、あるいはメチル化などについて精査する必要があると考えられる。それらのマーカーひとつひとつについて、きちんとした実験条件を確立する必要がある。

それらは今後の問題として、TBT に関して今回の実験がどのような示唆を与えているのか簡単に考察しておく。TBT の妊娠初期胚への影響は、生き残った胚の検索の結果としては、判定ができない。一部着床前に喪失した胚については今回の採材では入手不能である。しかし残った胚は着床できたことは明らかである。母胎のホルモンバランス、子宮の脱落膜形成反応、その他着床過程に関わる免疫的機序は生き残った胚と母親の関係については

正常に働いていたと考えられる。やはり、この問題を解決するためには、in vitro で初期胚に TBT を暴露し偽妊娠妊角に戻して妊娠の経過を観察するか、処置を逆にして偽妊娠動物に TBT 処置をして、インタクトな体外受精杯を子宮に戻して胚発生を観察する方法を実施する必要がある。突然変異検出を試みたのは、この方法が当教室としては実施困難なためであった。

TBT のアロマターゼ阻害作用が報告されている。哺乳動物でこの作用の有無のみ検証するのであれば、着床以後の妊娠動物で、性腺分化の時期をねらって TBT を投与し、胎児の性腺系の分化を調べる方法は有望な方法である。最近、腎臓、性腺、ウォルフ管、ミュラー管を胎児期に取り出し in vitro で培養して、それらに各種の化学物質を暴露させ副生殖器官の分化を調べる実験系が開発されつつある。共同実験者の鈴木浩悦は既にアロマターゼ阻害薬で明瞭な in vitro の影響を観察している。

## E . 結論

T B T がラットの初期胚に対して、貝類で報告されているような何らかの突然変異を誘発する可能性を示すのであれば、初期胚の着床不全が胚の側におきた悪影響に起因するとの結論が得られるとの仮説を立てて、妊娠初期ラットに TBT を投与し、分娩させた後生後 6 日までの保育児について肝臓と性腺を無菌的に摘出し、常法により DNA を抽出し、20 個の染色体の代表的なマイクロサテライトマーカーをそれぞれ 1 つ選択して増幅し、多型が生じるか否かを昨年に引き続き調べた。変異のパターンについてより詳細な分析を試みているが、まだ確定的に TBT が初期胚に遺伝性の突然変異を生じるとの証拠は得られていない。

## F . 研究発表

### 発表論文

1. Takanosu M., Amasaki, H., Iwama, Y., Ogawa, M., Hibi, S. and Suzuki, K. (2002) Epithelial cell proliferation and apoptosis in the developing murine palatal rugae. *Anat. Histol. Embryol.* 31 (1), 9-14.
2. 内堀雅隆、横山修一、斉藤賢一、鈴木浩悦、辻隆之、鈴木勝士(2002) 癲癇モデル動物の癲癇様睡眠時スパイク波の特徴解析(Analysis of the spike discharges on EEG during sleep in epileptic animal model.)、T. IEE Japan, 122-C(2): 194-200.
3. Uchibori M., K. Saito, S. Yokoyama, H. Suzuki, T. Tsuji and K. Suzuki (2002) Foci of spike discharges in sleeping EEG of El mice can be determined mathematically with wavelet transform of multiple monopolar derivations in individual animals based on the electric field model but not current dipole theory. *Journal of Neuroscience Method* 117(1): 51-63.
4. Inomata, A., I. Horii and K. Suzuki (2002) 5-Fluorouracil-induced intestinal toxicity: what determines the severity of damage to murine intestinal crypt epithelia? *Toxicol. Letters* 133: 231-240.
5. 鈴木勝士(2002) 化学物質の内分泌作用判定試験の現状と問題点、医学のあゆみ、

202 (2): 147-149.

6. 鈴木勝士(2002) 獣医学領域の遺伝性疾患 - 1、Small Animal Clinic 127: 14-18.

7. 鈴木勝士(2002) 獣医学領域の遺伝性疾患 - 2、Small Animal Clinic 128: 18-21.

8. 鈴木勝士(2003) 獣医学領域の遺伝性疾患 ( )、Small Animal Clinic 130: 13-18.

#### 国際シンポジウム

9. Aoyama, H. and K. Suzuki (2003) Enhanced one-generation reproductive toxicity study in rats for detecting endocrine disrupting effects of chemicals. Proc. Int. Symposium SCOPE/IUPAC (Yokohama 2002)

#### 口頭報告

10. 斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2002) マウス胎子に見られたマイクロ波照射の熱作用による催奇形、第21回宇宙エネルギーシンポジウム

11. 青山博昭、鈴木勝士(2002) トランスジェネレーションアッセイによるエチニルエストラジオールの低用量影響評価、第133回日本獣医学会

12. 竹中基郎、鈴木浩悦、甘粕晃平、斉藤賢一、鈴木勝士(2002) 神経症状を伴う矮小症ラット(Lethal dwarfism with epilepsy)の精巣病変の評価、第133回日本獣医学会

13. 八木美央、鈴木浩悦、小山絵里子、栗原孝宏、千葉純子、斉藤賢一、鈴木勝士(2002) 精巣形成不全症(hgn/hgn)ラットのセルトリ細胞機能の評価、第133回日本獣医学会

14. 鈴木勝士 (2002) 乳房炎の現状と課題、平成13年度家畜生産衛生向上対策事業(農水省)シンポジウム、第133回日本獣医学会

15. 板垣昌志、鈴木勝士(2002) 潜在性乳房炎と乳頭口の形態との関連、乳頭口の形態変化に及ぼす要因についての検討、平成13年度家畜生産衛生向上対策事業(農水省)シンポジウム、第133回日本獣医学会

16. 坂本幸俊、内堀雅隆、横山修一、斉藤賢一、鈴木勝士(2002) 癲癇モデル動物における睡眠時スパイク波の周波数解析、電気学会平成14年全国大会

17. 内堀雅隆、横山修一、斉藤賢一、鈴木浩悦、辻隆之、鈴木勝士(2002) EIマウスの睡眠時癲癇様スパイク波の焦点特定手法、電気学会平成14年全国大会

18. 斉藤賢一、内堀雅隆、横山修一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2002) 先天性癲癇モデル動物(EI Mouse)における睡眠時脳波に含まれるスパイク波の解析、第42回日本先天異常学会、PP.148

19. 青山博昭、荒木雅行、林宏一、小林まゆみ、武田真記夫、吉田敏則、北条仁、高橋研、清水直子、鈴木勝士、寺本昭二(2002) 改良型1世代繁殖試験によるエチニルエストラジオールの低用量影響評価：妊娠・保育期投与試験、第42回日本先天異常学会、p.157

20. 太田亮、渡辺千朗、丸茂秀樹、佐藤昌子、古谷真美、堀内伸二、稲田浩子、三枝克彦、武田真記夫、青山博昭、鈴木勝士(2002) 改良型1世代繁殖試験によるエチニルエストラジオールの低用量影響評価：周産期投与試験、第42回日本先天異常学会、p.158

21. 古川正敏、須永昌男、古川桂子、高橋智亜紀、笠原みゆき、川島邦夫、一花次夫、青山

- 博昭、鈴木勝士(2002) 改良型 1 世代繁殖試験によるエチニルエストラジオールの低用量影響評価：器官形成期投与試験、第42回日本先天異常学会、p.158
22. 鈴木勝士、斉藤賢一、椎名純子、竹中基郎、八木美央、鈴木浩悦(2002)ビスフェノールA 投与による鶏胚での発生攪乱(第2報)、第42回日本先天異常学会、p.163
23. 鈴木勝士、斉藤賢一、内堀雅隆\*、鈴木浩悦(2002)EI Mouse睡眠時脳波中のスパイク波の起源は旧皮質に存在する 第134回日本獣医学会
24. 甘粕晃平、小笠原慶、椎名純子、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士(2002)生殖器の形成異常を伴う左腎欠損ラットの遺伝的特性の評価 第134回日本獣医学会
25. 千葉純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2002)Wistar-Imamichiラットクローズドコロニー由来近交系から発見された矮小ラットの遺伝的特性の解析第134回日本獣医学会
26. 鈴木勝士、斉藤賢一、椎名純子、竹中基郎、八木美央、鈴木浩悦(2002)ビスフェノールA 投与による鶏胚での発生攪乱(第2報) 第134回日本獣医学会
27. 斉藤賢一、内堀雅隆、鈴木浩悦、鈴木勝士(2002)EI mouseの睡眠時脳波に含まれるスパイク波の加齢による変化と焦点解析。第34回成長談話会・第13回 AUXOLOGY(成長学)研究会 連合大会
28. 斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2003)高周波照射が鶏の主要臓器におよぼす影響、第22回宇宙エネルギーシンポジウム
29. 鈴木勝士(2003)化学物質の繁殖に対する影響解析、化学物質の内分泌かく乱作用に対する研究の現状と課題、日本農薬学会シンポジウム

**Abstract:**

As the last year's project, we have detected high incidence of TBT induced mutations in the gonad DNA but not liver DNA of the rat pups born from the mothers orally treated with TBT at 0, 4, 8, and 16mg/kg for 4 days from GD0 to GD4 or those treated with MMS at 50mg/kg for the same periods. Wistar Imamichi inbred strain was selected as the rat with even genetical background so that it may possible to detect induced mutations in the microsatellite marker assisted PCR amplification if existed. The detected mutation incidence was too high to confirm if it happened truly.

This year, we tried the same protocol in cases of control, TBT 16mg/kg and MMS 50mg/kg groups to obtain further DNA samples. This year and the last year samples were carefully analyzed on the electrophoresis patterns of the microsatellite assisted DNA amplification.

Improved experimental conditions included dialysis of the DNA sample prior to PCR and revealed no convinced mutations in the gonad DNA samples assessed by the selected microsatellite markers, which represented 1 marker per 1 chromosome basis and 20 markers in total.

In conclusion, definite evidence that maternally treated TBT caused genetically transmissible mutations in the gonad of the rat weanlings was not obtained. Further basic approaches on such possibility would be needed to detect the origin of the recessively inherited mutations in animal populations including humans.

## (7) 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

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)

### 研究要旨

Bisphenol A (BPA)、flutamide (Flu) は新生仔マウスに投与すると、そのマウスが成長して精子形成を行なう過程で精子細胞の核、尖体に奇形を起こすことが判った。またこの精子細胞に接するセルトリ細胞の特殊接合装置にも形成不全、一部欠損などの異常が認められた。これらの異常は、動物種 (マウス、ラット) や投与時期 (新生仔投与、成獣投与) によらず認められた。BPA は、我々が日々曝露されているだけに、さらなる詳細な研究を必要とする。また、E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B 投与でも同じ作用が見られたので、BPA、Flu は、ラット、マウスに対してエストロゲン作用あるいはエストロゲン作用の相対的増強作用があると思われる。一方、di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) はこれらとは作用が異なり、マウスにおいてはセルトリ細胞の早熟化を促していると考えられた。また、di-(n-butyl) phthalate (DBP) は精巣に何の変化も引き起こさなかった。

セルトリ細胞由来である細胞株 TM4 を用いた *in vitro* 実験において、特定のタンパク質のチロシンリン酸化が DEHP の代謝産物である mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) 投与で亢進することがわかった。またプロテオーム解析により、複数のタンパク質のスポットが化学物質投与により変化していることが明らかになった。今後これらのタンパク質について解析を進めることにより、内分泌攪乱作用が疑われる物質の作用機構の解明、また内分泌攪乱化学物質曝露の有用な指標となりうるバイオマーカーの検索が可能となると思われる。

### 研究協力者

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)

足達 哲也 (千葉大学大学院医学研究院環境生命医学助手)

深田 秀樹 (千葉大学大学院医学研究院環境生命医学助手)

### A. 研究目的

前年度の後半から始めた bisphenol A (BPA) のラット、マウスの雄性生殖器に対する作用の研究で精子形成障害などの興味ある結果を得たので、今年度はこの BPA の作用をより詳しく調べる。特に BPA の作用を外因性エストロゲンの作用と比較した。また新たに、androgen receptor antagonist であると言われている flutamide (Flu) およびフタル酸エステル類 (PAEs) である di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), di-(n-butyl)phthalate (DBP) の新生仔マウスの雄性生殖器に対する作用も調べることを目的とした。

また、内分泌攪乱化学物質曝露による遺伝子産物変化の観点から、マウス精巣セルトリ

細胞由来株 TM4 を用いて、タンパク質レベルでの解析を行い、内分泌攪乱化学物質曝露のマーカーとなりうるタンパク質を検索する。本年度は、PAEs および Flu の曝露実験を行う。PAE としては、in vivo 実験で精巣セルトリ細胞に異常の見られた DEHP およびその代謝産物である mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) を用いた。すでに報告した p38 をさらに解析するとともに、それ以外のスポットも検索する。

本報告は in vivo 実験と in vitro 実験から成り、以後は「1. 精子形成に対する影響」と、「2. in vitro における作用解析」の二部にわけて報告する。

## B. 材料と方法

### 1. 精子形成に対する影響

#### a) 実験デザイン

平成 14 年度に行なった実験は、以下の実験 I ~ 実験 V である (表 1)。

実験 I: ラット、マウスの新生仔 (実験 IA) および成獣 (実験 IB) への BPA の投与

実験 II: ラット、マウス成獣への 17  $\beta$ -estradiol ( $E_2$ )、 $\beta$ -estradiol 3-benzoate ( $E_2B$ ) の投与

実験 III: マウス新生仔への Flu の投与

実験 IV: ラット新生仔への Tam と BPA の混合投与

実験 V: マウス新生仔への DBP、DEHP の投与

実験 I ~ 実験 V での各化学物質の投与量は表 2 ~ 表 6 に示した。

#### b) 化学物質

BPA (Aldrich, Milwaukee)、 $E_2$  (Sigma, St Louis)、Flu (Sigma, St Louis)、DEHP (Aldrich, Milwaukee)、DBP (東京化成、東京) はまず dimethyl sulphoxide (DMSO) (Sigma, St. Louis) に溶かし、これをオリーブ油 (和光純薬、大阪) (BPA および  $E_2$ ) またはコーン油 (Sigma, St Louis) (DEHP、DBP、Flu) で希釈した。Tam (Sigma, St Louis) および  $E_2B$  (Sigma, St Louis) はオリーブ油に直接溶かした。コントロールはそれぞれ溶剤のみとした。

#### c) 動物への化学物質の投与方法および評価時期

ラットはウイスター系、マウスは ICR 系とし、各実験群とも計 10 匹ずつ用いた。新生仔 (実験 IA、実験 III、実験 IV、実験 V) へは、溶剤に溶かした化学物質を出生翌日から隔日に 6 回、背部に皮下注射した。評価は生後 1 週齢から原則として 1 週齢毎に行ったが、マウスは成長が早いので場合によっては各週齢の半ばでも評価をした。成獣 (実験 IB、実験 II) へは、連続 5 日間投与し、6 日目に評価した。

#### d) 化学物質の投与量

実験 IA では BPA をラット新生仔へは 0.1, 1, 10, 100, 600, マウス新生仔へは 0.05, 0.1, 1, 5, 10 (単位は  $\mu\text{g}$  / 匹 / 回) 投与した。

実験 IB では BPA をラット成獣へは 0.1, 1, 10, 100, 1000, マウス成獣へは 0.01, 0.1, 1,

10, 100 (単位は $\mu\text{g}$  / 匹 / 回) 投与した。

実験 II では  $E_2$ ,  $E_2B$  をラット成獣へは 0.1, 1, 10, マウス成獣へは 0.4, 0.6, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 (単位は $\mu\text{g}$  / 匹 / 回) 投与した。ただしマウス成獣への  $E_2B$  投与は平成 11 年度に行なったもので、この時は皮下注射ではなく、腹腔内投与であった。

実験 III および実験 V では Flu, DBP, DEHP をそれぞれマウスの新生仔へ 0.5, 5, 50, 500, 5000 (単位は $\mu\text{g}$  / 匹 / 回) 投与した。

実験 IV では Tam + BPA をラット新生仔へそれぞれ 20 + 20, 20 + 10, 10 + 10 (単位は $\mu\text{g}$  / 匹 / 回) 投与した。

各化学物質の投与量はそれぞれ表 2 ~ 表 6 にも示してある。また同表では判った範囲で No Observed Effect Levels (NOELs) を記した。

#### e) サンプリング法

動物はエーテルで深麻酔した。血液は、開胸して右心室穿刺により採取した。臓器は、左心室より 3 % グルタル・アルデヒドで灌流固定した後に採取した。なお、サンプリング時に体重、精巣重量、精嚢腺重量を測定した。精嚢腺重量は左右の葉を開口部から離断し、精嚢液を PBS で洗い流した後に測定した。

#### f) 臓器標本の作製

灌流固定した臓器は、常法に従い、脱水してエポキシ樹脂に包埋し、光学顕微鏡観察にはトルイジン・ブルー染色の準超薄切片、電子顕微鏡観察には酢酸ウラン・クエン酸鉛の二重染色超薄切片を用いた。臓器によってはグルタルアルデヒドの灌流固定後に 10 % ホルマリンで後固定した後、パラフィンに包埋し、切片はヘマトキシリン・エオシン染色した。実験 IV では精巣をブアン固定し、パラフィン切片を作り、これを抗ヒト・トリプターゼ抗体 (Dako, Denmark) で免疫染色、およびサフラニンとアリューシャン青の二重染色で肥満細胞を同定した。

#### g) ホルモンの測定

血清中の LH、FSH、インヒピン、テストステロン濃度は、時間分解蛍光免疫測定法の競合法 (TRFIA) で測定した。

#### h) 妊孕能試験

実験 I および実験 V では各実験群のラット、マウスがそれぞれ 15 週齢、12 週齢に達した時に正常な雌と夕刻数時間同居 (雄 1 匹: 雌 2 匹) させ、交尾、射精を観察した。雌はその日の朝 (午前 10 時 30 分) に発情前期であった。射精を確認してから常法により雄を灌流固定し、精巣の光顕、電顕試料を作った。普通、射精は数十回の挿入の後に行なった。交尾した雌はそのまま飼いつけ、妊娠、出産の確認に供した。

#### i) 倫理面への配慮

本研究は千葉大学大学院医学研究院の動物倫理委員会の承認を受けている。実験動物へ

の各化学物質の投与時および灌流固定時には動物の苦痛を最小限にとどめるよう努めた。

## 2. in vitro における作用解析

### a) 細胞培養

マウス精巣セルトリ細胞由来株 TM4 は American Type Culture Collection (ATCC) から購入した。化学物質(MEHP (東京化成), 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M; DEHP, 100  $\mu$ M; Flu, 50  $\mu$ M) は DMSO に溶解後、細胞培養液に添加し、2 日間培養した。DMSO のみを培地に加えたものをコントロールとした。

細胞を PBS で数回洗浄後、二次元電気泳動用には IEF lysis buffer (8 M urea, 2 % CHAPS, 40 mM Tris, 1 mM PMSF, 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) を、一次元電気泳動用には SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH6.8, 2 % SDS, 10 % glycerol) を加えて細胞を融解、ポリトロンで破碎した。15,000 rpm で 20 分間遠心し、その上清を細胞抽出液とした。一部を取り、DC プロテインアッセイキット (Bio-Rad) を用いてタンパク質濃度を測定した。

### b) 二次元電気泳動・ウェスタンブロット

Immobiline dry strip ゲル (pH 3-10; Amersham) を用いて、細胞抽出液をゲルあたり 40  $\mu$ g (ウェスタンブロットの場合)または 8  $\mu$ g (銀染色の場合) 添加し、等電点電気泳動を行った。二次元目を 10%ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE し、2D-銀染色試薬・II 「第一」キット (第一化学) を用いて銀染色を行った。またウェスタンブロットの場合は、二次元目電気泳動終了後 PVDF 膜にトランスファーした。1 % BSA でブロッキング後、HRP 標識抗リン酸化チロシン抗体(ECL チロシンリン酸化タンパク質検出システム; Amersham) と室温で 1 時間インキュベーションした。ECL Plus (Amersham) で化学発光させ、チロシンリン酸化タンパク質のスポットを検出した。

### c) 免疫沈降法、N 末端アミノ酸配列分析

p38 を解析するため、抗リン酸化チロシン抗体を用いて免疫沈降を行なった。前年度の研究結果によりリン酸化された p38 のスポットの存在がわかっている DES 処理した TM4 細胞からの抽出液を用い、抗リン酸化チロシン抗体、Protein G-Sepharose (Amersham) とともにインキュベートした。Protein G-Sepharose を回収・洗浄後、SDS-PAGE 用溶解緩衝液で免疫沈降されたタンパク質を溶出し、一次元電気泳動を行った。PVDF 膜にトランスファーした後、約 38 kDa の位置にあるバンドを切り出し、N 末端アミノ酸配列分析のための試料とした。

## C. 結果

### 1. 精子形成に対する影響

#### a) BPA、E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B または Flu の影響

##### (1) 影響の概要

BPA、E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B、Flu の投与は、ラットでもマウスでも、また新生仔投与でも成獣投与

でも、ある投与量（具体的な投与量は以下に詳述）を越えると、投与した化学物質の種類に関わらず、精巣に同じ形態異常をもたらした（よって、以下、特に断らない限り BPA、E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B、Flu の共通作用として記す）。一方、体重、精巣重量はコントロール動物と有意差はなかったが、精嚢腺重量はコントロールの約 4 分の 3 であった。実験 I ~ 実験 V とともに、精巣上体の組織学的変化は見られなかった（図 1 ~ 2）ので、以下、精巣の組織学的変化と各化学物質の投与量との関係について詳細を記す。また、E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B、BPA、Flu、Tam、DEHP、DES の各種ホルモン受容体活性と本研究の形態的变化の関係を表 7 に示した。

### (2) 成獣投与系で見られた影響

成獣では、化学物質（BPA、E<sub>2</sub> または E<sub>2</sub>B）の投与終了翌日から精巣における形態異常が見られた。これら化学物質による精子細胞の形態異常は特異的であり、ステップ 2・3 精子細胞の尖体顆粒の位置異常から始まり、ステップ 6 精子細胞の尖体の形態異常（図 3）、ステップ 8 以降の精子細胞の尖体、および核の変形、空胞形成であった（図 4 ~ 6, 8, 20）。これらの微細形態異常は BPA ではラットで 1 $\mu$ g / 匹 / 回、マウスで 0.1 $\mu$ g / 匹 / 回、E<sub>2</sub> および E<sub>2</sub>B ではラットで 1 $\mu$ g / 匹 / 回、マウスで 0.6 $\mu$ g / 匹 / 回以上の投与量で認められた。一度精子細胞の核および尖体の変形すると、精子になった後でも奇形が持続した（図 10）。そして顕微鏡、電顕共に切片で観察した範囲では、ステップ 2・3 以降の全ての精子細胞および精子が奇形になるのではなく、正常な形をした精子細胞や精子もあることが推察された。正常な形態のステップ 9 精子細胞は図 7、図 19 に、そして正常なステップ 14 精子細胞は図 9 に示した。ステップ 8 精子細胞が塊となって精上皮から剥離することもあった。この剥離については E<sub>2</sub>B の作用として Blanco-Rodríguez and Martínez-García (1996) も報告している。また、投与量をいろいろと変えてみたが、投与量が 2 倍、10 倍となっても奇形精子細胞および奇形精子の出現頻度が 2 倍、10 倍とはならないようである。これら化学物質のある閾値を越えると、奇形精子細胞がある頻度で出現するという印象であった。投与量と奇形細胞の出現頻度の関係はこれからの課題としたい。ひとつの方法として、精巣上体尾部内の精子の奇形率を光学顕微鏡で調べ、投与量との相関を調べるつもりである。

これら造精細胞の奇形の他に、セルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置にも無形成ないしは一部欠失などの特異的な異常が見られた（図 4, 6, 20）。しかしセルトリ細胞間の特殊接合装置（血液・精巣関門）には微細構造的に異常は見られなかった（図 11）。

### (3) 新生仔投与系で見られた影響

新生仔投与でも、成獣への投与時と同様の形態異常が精巣で見られた。しかし、これら薬剤の影響の見られた造精細胞はステップ 2・3 精子細胞以降だったので、これらの精子細胞が分化する以前の日齢（ラットでは 0 日齢から 24 日齢頃、マウスでは 0 日齢 ~ 20 日齢頃まで）では何ら精巣には異常は見られなかった。これらの新生仔における異常は BPA ではラットで 1 $\mu$ g / 匹 / 回、マウスで 0.1 $\mu$ g / 匹 / 回、Flu ではマウスで 0.5 $\mu$ g / 匹 / 回以上の投与量で認められた。これらの異常は新生仔投与の場合、生後 9 週齢でも出現頻度は少なかったが見られた。その後、ラットで生後 15 週齢、マウスで生後 12 週齢でこれらの異常は殆ど見られなくなった。新生仔投与でも体重、精巣重量はコントロール動物と有意差はなかったが、精嚢腺重量はコントロールの約 3/4 程度であった。

BPA、E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B、Flu の微細形態に与える影響を図 20 にまとめた。

実験 IA の BPA の新生仔投与では、生後 8 週齢の時点での血中テストステロンはコントロールの  $4470.120 \pm 424.227$  pg/ mL、実験群 (0.1  $\mu$ g / 匹 / 回投与群) の  $607.435 \pm 152.049$  pg/mL であり、 $P < 0.05$  で有意差があった。また、血中 FSH はコントロールの  $1.350 \pm 0.114$   $\mu$ g/mL、実験群の  $1.240 \pm 0.311$   $\mu$ g/mL であり、有意差は無かった。

#### (4) 妊孕能

新生仔投与動物 (ラットで生後 15 週齢、マウスで生後 12 週齢) と交配した正常雌は正常ないし、やや長い妊娠期間を経て健仔を出産した。交尾 (射精) から出産までの時間は最も長い例でラットでは 23 日と 13 時間であった。

これらの形態異常の出現および投与動物が十分に成熟してからの妊孕能の出現は昨年度に行なったラットおよびマウス新生仔への  $E_2$ 、 $E_2B$  投与の結果と同じであった。すなわちステップ 2・3 精子細胞の尖体顆粒の位置異常から始まって、それ以降の精子細胞の尖体および核の奇形が見られた。また、セルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置の形成不全や部分的欠損も認められた。これらの形態異常は  $E_2$ 、 $E_2B$  とともにラットでは 500 ng / 匹 / 回、マウスで 12.5 ng / 匹 / 回の投与で認められた。ラット、マウスともに十分に成熟した段階では妊孕能があり、健仔を得た。

#### b) Tam と BPA の混合投与の影響

ラット新生仔に対する Tam と BPA の混合投与 (実験 IV) では、Tam と BPA の作用はそれぞれ独自にみられた。すなわち Tam の作用として、昨年度にラットに Tam を単独投与した時と同様に、生後 2 週齢から 4 週齢にかけて精細管周囲の筋様細胞の水腫変性が見られた (図 12)。この水腫変性が治まった頃 (生後 4 週齢) から、精巣間質に肥満細胞が出現するようになった (図 13 ~ 15)。この肥満細胞の浸潤は生後 12 週齢まで続いた。また、コントロールに比べ、Tam と BPA の混合投与では血液精巣関門の完成が約 2 週間遅れたが、精子の完成は 1 週間の遅れ、すなわち生後 8 週齢で精子は完成した。これは Tam 単独投与と同じ結果であったので、ここまでは Tam の作用が強く出ているものと考えられた。一方これ以降の時期、すなわち実験動物が生後 5 週齢で血液精巣関門が完成した後は、精子細胞の核および尖体の変形、セルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置の形成不全および部分的な欠損が見られた。これは、BPA 単独投与と同じ結果であった。これらの結果から、BPA の作用と Tam の作用は独立的なものであると考えられた。これらは Tam 10  $\mu$ g / 匹 / 回 + BPA 10  $\mu$ g / 匹 / 回の組み合わせで認められた。

#### c) DBP、DEHP の影響

マウス新生仔に対する DBP または DEHP の投与実験 (実験 V) では、BPA、 $E_2$ 、 $E_2B$ 、Flu とは全く異なった結果を得た。すなわち、DEHP 投与ではセルトリ細胞間の特殊接合装置 (血液・精巣関門) がコントロール動物よりも 10 日ほど早く出現した (図 16)。また、生後 1 週齢でセルトリ細胞の板状突起が発達していた (図 17)。この板状突起の発達もコントロールに比べて約 10 日早かった。造精細胞の分化や精子形成には異常は見られなかった。精巣上体には何の変化も見られなかった (図 18)。DEHP 投与マウスは生後 7 週齢において妊孕性があった。DBP 投与では、今回の実験では精巣、精巣上体には何の変化も認

められなかった。

## 2 . in vitro における作用解析

### a) p38 の解析

38 kDa 近辺のバンドを切り出して N 末端アミノ酸配列分析したところ、7 残基解析できたため、データベース検索を行った。その結果、そのアミノ酸配列は、免疫グロブリンの一部と一致することがわかった。

### b) チロシンリン酸化タンパク質の変化

MEHP、DEHP を投与し、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロットで解析したところ、p38 はコントロールに比べ、MEHP、DEHP 投与によりリン酸化が亢進していた (図 22)。また分子量約 140 kDa のタンパク質 (図 22 の矢印) のリン酸化がコントロール、DEHP 投与に比べ、MEHP 投与において顕著に亢進していた。Flu 投与においても、MEHP 投与ほどの効果はなかったが、同様の傾向がみられた。

### c) 総発現タンパク質 (プロテオーム) の解析

化学物質投与により、発現タンパク質がどのように変化するかを、二次元電気泳動法を用いて調べた。図 23 に示すように、コントロール、MEHP 投与、Flu 投与を比較したとき、いくつかのスポットが量的に変動することがわかった。コントロールには存在するが、MEHP、Flu 投与には存在しない、もしくは量的に少ないスポット (a, b, d) や、MEHP 投与で減少しているスポット (c)、Flu 投与で減少しているスポット (e) などが見いだされた。

## D . 考察

### 1 . 精子形成に対する影響

平成 11 年度と平成 12 年度には、DES をラット新生仔に投与したところ、血液・精巣関門の分化が約 4 週間遅れ、このために造精細胞の分化も減数分裂前期で約 4 週間滞ったことを示した。また、マウス成獣に E<sub>2</sub>B を投与したところ、ステップ 7 以降の精子細胞および精子に尖体、核の奇形、そしてセルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置の部分的な欠損が見られた。平成 13 年度にはマウス、ラットの新生仔へ E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B を投与し、外因性 E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B の精巣に対する作用を示した。同時に、ラット新生仔に tributyltin chloride, nonylphenol, 4-octylphenol, Tam, BPA を投与し、これら化学物質の精巣に対する影響を DES 投与と同じ方法で調べたが、Tam, BPA 以外は精巣に著変は見られなかった。Tam は DES と同様に血液・精巣関門の分化を遅らせたが、DES の 4 週間遅延に対して、Tam では 2 週間の遅延であった。また、Tam は精細管の筋様細胞の水腫変性および精巣間質への肥満細胞の出現をもたらした。また、BPA は新生仔に投与すると E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B と同じような作用をすることが解った。この実験系では BPA をラット、マウスの新生仔に投与し、その個体が思春期になり精子形成が始まるようになるとその造精細胞は奇形になることが解り、BPA の環境ホルモン作用が明らかになった。危険ではない (Cagen et al, 1999a, b ;

Ashby et al, 1999)とされていた BPA にも新生仔期投与によりラット、マウスの思春期から青年期の一時期に精子に奇形の起こることが判った。また、BPA、E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B による精子、精子細胞の奇形は実験動物が十分に成熟すると回復し、その上、妊孕性も出ることが判った。また、DES のラット精巣に対する作用をマウスの精巣についても調べ、DES はラットにもマウスにも同様に作用することを示した。

平成 14 年度は、これらのことを踏まえ、BPA の作用に注目し、ラット新生仔への BPA の作用を確認すると共に、BPA のマウス新生仔、ラット、マウスの成獣に対する影響を調べることにした。また、BPA と E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B の作用を比較するためにラットおよびマウス成獣への E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B の投与を行った。なお、マウス成獣に対する E<sub>2</sub>B の作用については平成 11 年度に既に調べてある。

平成 13 年度の実験結果および今年度の実験 I、実験 II の結果より、BPA は外因性の E<sub>2</sub> および E<sub>2</sub>B と同じ作用を示したので、少なくともこの実験系に関して BPA はエストロゲン作用を持つことが確認された。

この作用がラット、マウスと、動物種を越えて、また、新生仔、成獣投与に関わらず同じであることも興味深い。BPA の弱いエストロゲン作用は古くから言われている (Dodds and Lawson, 1936; Bitman and Cecil, 1970; Krishnan et al, 1993; Gaido et al, 1997; Kuiper et al, 1997; Steinmetz et al, 1997, 1998; Ashby and Tinwell, 1998; Milligan et al, 1998; Berganon et al, 1999; Schafer et al, 1999; Papaconstantinou et al, 2000; Tinwell et al, 2000)。

今回の実験でラット、マウスの新生仔に BPA を投与し、その個体が充分成熟し、精巣上体尾部内に奇形精子が殆どなくなる頃 (ラットでは 15 週齢、マウスでは 12 週齢) には妊孕能のあることが証明された。今回は BPA 投与動物に妊孕能があるかないかを調べるための予備的実験であったので動物が充分に成熟した時点の 1 回しか妊孕性試験をしなかった。今後の課題としてはラット、マウスともに性成熟に到達した直後から経時的に妊孕能の有無を調べ、BPA による奇形精子出現割合と妊孕性の関係も調べたい。

実験 IA では生後 8 週齢の時点で実験群の血中テストステロン値はコントロールのそれの約 7 分の 1 であった。これは実験群では精囊腺の重量がコントロールのそれに比べて小さかった事と一致する。この実験群では血中 FSH がコントロールのそれと変わりがなかった。他の実験群の血中ホルモン値も現在測定中なので、これらの結果を待って考察をしたい。

また、実験 III の Flu の投与でも BPA、および E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B 投与と同じ結果が得られたので、この実験系に関する限り、Flu も外因性のエストロゲン作用と類似の作用を持つと言える。Flu は androgen receptor antagonist (Neri et al, 1979) として前立腺癌の治療薬として使われているが、今回の実験で精巣に外因性 E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B の作用を現すことが解ったので、Flu のこの作用機序の解明が必要である。Flu の作用については O'Connor et al (1998)、Miyata et al (2002) の報告があるが、微細構造についての報告はない。今回は Flu をマウス新生仔に投与したが、これからの課題として、これらが BPA のように動物種を越えて発現するのか、それともマウス新生仔に特有な現象なのかを調べる必要がある。また、Flu の NOEL を見つけ、E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B とのエストロゲン作用の強さの比較についても今後の課題としたい。

Flu は前立腺癌治療薬として適切な管理、投薬をされているので、一般の人々が曝露されることはない。しかし、BPA は歯科充填剤、缶詰のコーティング剤、食器として広く使われていた。ヒトが連続的に生涯曝露され続けても影響を受けない BPA の量は体重 1 kg につき 1 日あたり 50  $\mu\text{g}$  と言われている(ビスフェノール A 安全性 5 社研究会)。しかし本研究ではラット、マウスの成獣の BPA 投与実験であるが、1 日あたり体重 1 kg につき 3.3  $\mu\text{g}$  の、それもたったの 5 回投与で精子形成に異常が見られた(表 3)。ラット、マウスをヒトと一緒にできないとか、皮下投与と経口投与とではその効力には違いはあるといった考えはあるものの、本実験系で、それも成獣投与の場合も、新生仔投与の場合も精子形成異常をおこした事は、BPA はヒトの精子形成にも影響を与える可能性も考えられるので、BPA については乳幼児であろうと成人であろうと、さらに詳細な研究を必要とする。また、新生仔ラット、マウスに BPA を投与するとその個体が思春期に達すると上に述べたように精子形成障害をおこすが、その個体が十分に成熟すると妊孕能がある。最終的に次世代を作る能力が備わるのならば何も問題にすることはない、という考え方もあろうが、たとえ個体の成長の一時期であろうと精子形成異常がある期間連続的に起こることは次世代への影響の有無に関わらず、看過出来ない。

本研究の結果、たとえ実験動物にしる、BPA が精子形成異常を起こすことが明確に判ったので、ヒトへの影響も早急に調べる必要がある。BPA のヒトへの曝露量は住んでいた環境、食餌等により個々人で異なるだろうが、血清中 BPA 量は日本人では 0.32 ~ 2.4 ng / mL であると報告されている (Inoue et al, 2000; Ikezuki et al, 2002)。また、妊娠中期の羊水ではかなり高く、8.3 ng / mL であると報告されている (Ikezuki et al, 2002)。本研究により BPA 投与ラット、マウスに精子細胞および精子の奇形、セルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置の欠損が見られたが、この時の血清中 BPA 濃度を是非測定する必要がある。この測定は今後の課題として第一に取りあげられるべきである。

BPA、E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B、Flu とともにセルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置 (図 19) と精子細胞および精子に異常を起こす。この特殊接合装置の機能はまだ解らず、仮説の域を出ていない。この装置の推測される機能として、精子頭部を成形したり (Fawcett et al, 1971)、成熟精子細胞を spermiation まで精上皮に保持したり (Brökelmann, 1963; Nicander, 1967)、成熟精子細胞を精上皮に整列させたり (Russell et al, 1988; Vogl et al, 2000)、spermiation の時に成熟精子細胞(精子)を放出したり (Vitale-Calpe and Burgos, 1970)、という説がある。BPA、E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B、Flu とともにこの接合装置に形態異常を起こし、さらに精子細胞の尖体および核に形態異常を起こすので、Fawcett et al (1971) の言うように、この接合装置は精子頭部の形状をその動物種独特の形に成形する機能を持っているのかも知れない。またはそれとは関係なく、BPA、E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B、Flu は精子細胞の尖体および核に間接的に働いているのかも知れない。BPA、E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B、Flu とともに生後 11 日齢で投与を終了し、精子細胞に異常が初めて見られるのはラットで投与終了 20 日後、マウスで投与終了 10 日後なので、これら化学物質の直接作用として精子細胞が異常になるとは考えられない。BPA は体内で速やかに代謝されるので (Fung et al., 2000; Völkel et al., 2002)、投与終了後 10 日、20 日も経て十分な量が体内に残っているとは思えない。これからの課題として BPA の作用が発現する時の血中 BPA 濃度を測定してみたい。考えられることは、特殊接合装置が精子頭部の成形をするか否かは別として、これら化学物質がセルトリ細胞

に作用して、結果的に特殊接合装置に異常が起きたり、またセルトリ細胞が栄養を供給し支持している精子細胞に異常が起きたりしたのかもしれない。これら化学物質の作用機序解明も今後の課題である。

BPA、E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B、Flu は同じセルトリ細胞の特殊接合装置でもセルトリ細胞間の特殊接合装置（血液・精巣閉門、図 21）には何の影響を与えないのは興味深い。血液・精巣閉門は正常に分化し、そのために減数分裂もラットでは生後 3 週齢までに、マウスでは生後 18 日齢までに開始した。

しかし、同じく、エストロゲン作用があると言われている DES の場合は、同じように新生仔に投与しても血液・精巣閉門の分化遅延が起り、減数分裂の開始はラットでは約 4 週間、マウスでは約 1 週間遅れた。このように同じエストロゲン作用があると言われている DES と BPA とではその作用機序が異なることが解った。また、Tam と DES の混合投与実験、Tam と BPA の混合投与実験でも前者の実験では Tam は DES の作用を相乗的に増したが、後者の実験では Tam も BPA も独自に作用したので、やはり DES と BPA の作用機序は互いに異なることが推測される。DES も Tam も減数分裂の始まる以前のセルトリ細胞に作用するが、BPA は減数分裂開始以後のセルトリ細胞に作用すると思われるので、Tam と BPA の混合投与の場合、それらの作用の現れる時期が異なるため、それぞれの作用が独立して現れるのかもしれない。

DEHP のラットおよびマウスへの投与実験はいくつか報告されているが、全て食餌にまぜて経口投与したものである (Hazleton Biotechnology Co. 1992a, b; Poon et al. 1997)。我々の実験では、輸液等で用いられる塩化ビニール製医療器具による DEHP の曝露を念頭に置いて DEHP の皮下投与実験を行なった。その結果、経口投与よりも少ない投与量でセルトリ細胞の早熟化が見られた。この早熟化は微細形態(セルトリ細胞の板状突起の早期出現、セルトリ細胞間の特殊接合装置の早期出現)から判断したが、機能面からも判断する必要がある。このため、今後の課題としてセルトリ細胞間の特殊接合装置の血液・精巣閉門としての働きが、やはり早期に確立されるかどうかを調べる必要がある。そのためには細胞間のトレーサーとしてチトクローム C を精細管内腔にマイクロ・インジェクションし、それが精巣間質に漏れるか否かを電子顕微鏡的に調べるつもりである。

Flu、DEHP ではまだ判らないが、マウス新生仔に投与した BPA の NOEL は 50 ng ~ 100 ng / 匹 / 回の間であった (表 2)。昨年度のマウス新生仔への E<sub>2</sub>B の投与実験の結果、その NOEL は 6.25 ng ~ 12.5 ng / 匹 / 回の間であった。両実験系とも NOEL を確定しようとした実験系ではないので、正確さには疑問が残るが、この実験系に関しては BPA は E<sub>2</sub>B の約 10 分の 1 程の強さと言える。BPA は E<sub>2</sub> の 10000 ~ 15000 分の 1 と言われている (Gaido et al, 1997; Nagel et al, 1997; Milligan et al, 1998) が、マウス新生仔を用いたこの実験系では BPA のエストロゲン作用はこれらの報告より 3 桁も強かった。今回の実験系では生後 1 日、3 日と、生まれたばかりの仔マウスに皮下注射をする場合、1 割ぐらいの注射液が刺入口から漏れてしまうことが度々あったので、正確な NOEL とは言い難い。正確な NOEL および BPA および Flu の E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B に対する強さの程度の比較は今後の課題としたい。

このように BPA、E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B、Flu、DEHP、DES の環境ホルモンとしての生体への影響を解明するだけでなく、この作用を生物学的な研究手段としても用いることの出来ること

が解った。

## 2. in vitro における作用解析

DES 等の内分泌攪乱化学物質を投与することにより、分子量 38 kDa のタンパク質 (p38) のリン酸化が亢進することを昨年度報告した。そこで今年度は p38 のスポットをゲルから切り出し N 末端アミノ酸配列解析したところ、7 残基が解析できたが、そのアミノ酸配列は免疫グロブリンの一部に一致した。これはゲルから切り出したスポットに免疫沈降に使用した抗体の一部がコンタミしており、その配列を読んだ可能性が考えられた。p38 はウェスタンブロットでは認識されるが、総タンパク質の二次元電気泳動の銀染色ではそのスポットは特定できず、その存在量は極めて少量で単離が困難であると考えられる。また、図 22 に示したように、チロシンリン酸化された p38 はコントロールにおいて常に全く存在しないのではなく、実験群よりは少ないものの、検出されることがあるということがわかった。今年度の結果で新たに注目したいのは、分子量約 140 kDa のチロシンリン酸化タンパク質 (p140) である。DEHP の内分泌攪乱化学物質としての作用は in vitro では見られず、DEHP の代謝産物である MEHP が担うとされている。p140 は、DEHP 投与ではコントロールとあまり差は見られなかったが、MEHP 投与でチロシンリン酸化が顕著に亢進していた。この結果から、p140 が内分泌攪乱化学物質曝露のバイオマーカーの候補の一つと考えられる。昨年度行った DES および BPA 投与では、p140 のリン酸化の亢進はそれほど顕著ではなかった。内分泌攪乱化学物質の種類や濃度が p140 のチロシンリン酸化及ぼす影響について、今後詳細な検討を行う必要がある。

他の有用なマーカーを探索するため、プロテオーム解析を試みた。細胞抽出液を二次元電気泳動法で分離・展開し、銀染色することにより、各化学物質の投与前後のスポットのパターンを比較したところ、いくつかのスポットについて、実験群とコントロールとで差異が見いだされた。コントロールにしかないもの、MEHP 投与、もしくはフルタミド投与のときに減少するもの等、興味深いいくつかのスポットが観察された。セルトリ細胞株 TM4 におけるこれらの変化は、動物実験において見られたセルトリ細胞の異常と関連している可能性がある。近年プロテオミクス研究の進展により、二次元電気泳動法によって分離された多数の微量タンパク質を効率よく同定する分析技術が発達してきた。内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムを解明する上でも、プロテオーム解析が有用であることが示された。

## E. 結論

### 1. 精子形成に対する影響

BPA、Flu は新生仔マウスに投与すると、そのマウスが成長して精子形成を行なうようになると精子細胞の核、尖体に奇形をおこすことが判った。またこの精子細胞に接するセルトリ細胞の特殊接合装置にも形成不全、一部欠損などの異常をもたらした。これらの異常は BPA に関してはラットの新生仔、ラットの成獣投与でも、動物種を越えて見られた。また、E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B 投与でも同じ作用が見られたので、BPA、Flu はラット、マウスに対してエストロゲン作用あるいはエストロゲン作用の相対的増強作用を持つと思われる。一

方、DEHP はこれらとは作用が異なり、マウスにおいてはセルトリ細胞の早熟化を促すと思われる。特に、BPA の作用については、我々の身近なところに曝露源のある可能性があるので、さらなる詳細な研究を必要とする。

## 2. in vitro における作用解析

セルトリ細胞由来である細胞株 TM4 を用いた in vitro 実験において、特定のタンパク質のチロシンリン酸化が亢進することがわかった。またプロテオーム解析により、複数のタンパク質のスポットが化学物質投与により変化していることが明らかになった。今後これらのタンパク質について解析を進めることにより、内分泌攪乱作用が疑われる物質の作用機構の解明、また内分泌攪乱化学物質曝露の有用な指標となりうるバイオマーカーの検索が可能となろう。

## F . 文献

Ashby J, Tinwell H. Uterotropic activity of bisphenol A in the immature rat. *Environ Health Perspect* 106: 719-720, 1998.

Ashby J, Tinwell H, Haseman J. Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF1 mice exposed in utero. *Regul Toxicol Pharmacol* 30: 156-166, 1999.

Bergeron RM, Thompson TB, Leonard LS, Pluta L, Gaido KW. Estrogenicity of bisphenol A in a human endometrial carcinoma cell line. *Mol Cell Endocrinol* 150: 179-187, 1999.

Bitman J, Cecil HC. Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls. *J Agr Food Chem* 18: 1108-1112, 1970.

Blanco-Rodríguez J, Martínez-García C. Further observations on the early events that contribute to establishing the morphological pattern shown by the oestradiol suppressed testis. *Tiss Cell* 28: 387-399, 1996.

Brökelmann J. Fine structure of germ cells and Sertoli cells during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Z Zellforsch* 59: 820-850, 1963.

Cagen SZ, Waechter Jr JM, Dimond SS, Breslin WJ, Butala JH, Jekat FW, Joiner RL, Shiotsuka RN, Veenstra GE, Harris LR. Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. *Toxicol Sci* 50: 36-44, 1999a.

Cagen SZ, Waechter Jr JM, Dimond SS, Breslin WJ, Butala JH, Jekat FW, Joiner RL, Shiotsuka RN, Veenstra GE, Harris LR. Normal reproductive organ development in Wistar rats exposed to bisphenol A in the drinking water. *Regul Toxicol Pharmacol* 30: 130-139, 1999b.

Dodds EX, Lawson W. Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137: 996, 1936.

Fawcett DW, Anderson WA, Phillips DM. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. *Develop Biol* 26: 220-251, 1971.

Fung EYK, Ewoldsen NO, Germain Jr HA, Marx DB, Miaw C, Siew C, Chou H, Gruninger SE, Meyer DM. Pharmacokinetics of bisphenol A released from a dental sealant. *JADA* 133: 51-58.

Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Portier CJ, McDonnell DP. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol Appl Pharmacol* 143: 205-212, 1997.

Hazleton Biotechnologies Company. A subchronic (4-week) dietary oral toxicity study of di(2-ethylhexyl) phthalate in B6FC3F1 mice. Submitted to Office of Toxic Substances, US Environmental Protection Agency (Microfiche No. OTS0535433). 1992a.

Hazleton Biotechnologies Company. A subchronic (13-week) dietary oral toxicity study of di(2-ethylhexyl) phthalate in Fischer 344 rats. Submitted to Office of Toxic Substances, US Environmental Protection Agency (Microfiche No. OTS0535433). 1992b.

Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kanei Y, Taketani Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reprod* 17: 2839-2841, 2002.

Inoue K, Kato K, Yoshimura Y, Makino T, Nakazawa H. Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. *J Chromat B* 79: 17-23, 2000.

Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinol* 132: 2279-2286, 1993.

Kuiper GGJ, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson J-A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinol* 138: 863-870, 1997.

Milligan SR, Balasubramanian AV, Kalita JC. Relative potency of xenobiotic estrogens in an acute in vivo mammalian assay. *Environ Health Perspect* 106: 23-26, 1998.

Miyata K, Yabushita S, Sukata T, Sano M, Yoshino H, Nakanishi T, Okuno Y, Matsuno M. Effects of perinatal exposure to flutamide on sex hormones and androgen-dependent organs in F1 male rats. *J Toxicol Sci* 27: 19-33, 2002

Mylchreest E, Cattley RC, Foster PM. Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(n-butyl)phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicol Sci* 43: 7-60, 1998.

Mylchreest E, Sar M, Wallace DG, Foster PM. Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate. *Reprod Toxicol* 16: 19-28, 2002.

Nakahashi K, Matsuda M, Mori T. Vitamin A insufficiency accelerates the decrease in the number of sperm induced by an environmental disruptor, bisphenol A, in neonatal mice. *Zool Sci* 18: 819-821, 2001.

Neri R, Pees E, Watnick A. Anti-androgenicity of flutamide and its metabolite Sch 16423. *Biochem Soc Trans* 7: 565-569, 1979.

Nicander L. An electron microscopical study of cell contacts in the seminiferous tubules of some mammals. *Z Zellforsch* 83: 375-397, 1967.

O'Connor JC, Cook JC, Slone TW, Makovec GT, Frame SR, Davis LG. An ongoing validation of a Tier 1 screening battery for detecting endocrine-active compounds (EACs). *Toxicol Sci* 46: 45-60, 1998.

Papaconstantinou AD, Umbreit TH, Fisher BR, Goering PL, Lappas NT, Brown KM. Bisphenol-A induced increase in uterine weight and alterations in uterine morphology in ovariectomized B6C3F1 mice: role of the estrogen receptor. *Toxicol Sci* 56: 332-339, 2000.

Poon R, Lecavalier P, Mueller R, Valli VE, Procter BG, Chu I. Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-Ethylhexyl)phthalate in the rat. *Food Chem Toxicol* 35: 225-239, 1997.

Russell LD, Goh JC, Rashed RM, Vogl AW. The consequences of actin disruption at

- Sertoli ectoplasmic specialization sites facing spermatids after in vivo exposure of rat testis to cytochalasin D. *Biol Reprod* 39: 105-108, 1988.
- Schafer TE, Lapp CA, Hanes CM, Lewis JB, Wataha JC, Schuster GS. Estrogenicity of bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate in vitro. *J Biomed Mater Res* 45: 192-197, 1999.
- Steinmetz R, Brown NG, Allen DL, Gigsby RM, Ben-Jonathan N. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo. *Endocrinol* 138: 1780-1786, 1997.
- Takahashi O, Oishi S. Testicular toxicity of dietary 2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propane (bisphenol A) in F344 rats. *Arch Toxicol* 75: 42-51, 2001
- Tinwell H, Joiner R, Pate I, Soams A, Foster J, Ashby J. Uterotropic activity of bisphenol A in the immature mouse. *Regul Toxicol Pharmacol* 32: 118-126, 2000.
- Vitale-Calpe R, Burgos MH. The mechanism of spermiation in the hamster. I. Ultrastructure of spontaneous spermiation. *J Ultrastruct Res* 31: 381-393, 1970.
- Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res. Toxicol.* 15: 1281-1287, 2002.
- Vogl AW, Pfeiffer DC, Mulholland D, Kimel G, Guttman J. Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: Ectoplasmic specializations. *Arch Histol Cytol* 63: 1-15, 2000.

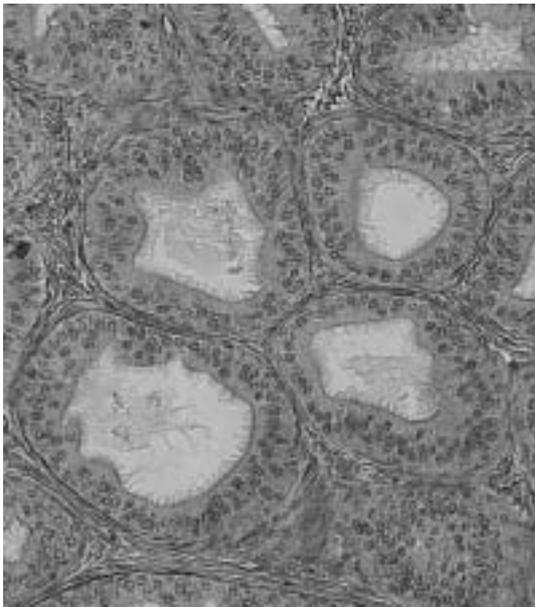


図1. BPA 投与マウス (4週齢) の精巣上体尾部。形態的变化は見られない。ヘマトキシリン・エオシン染色。

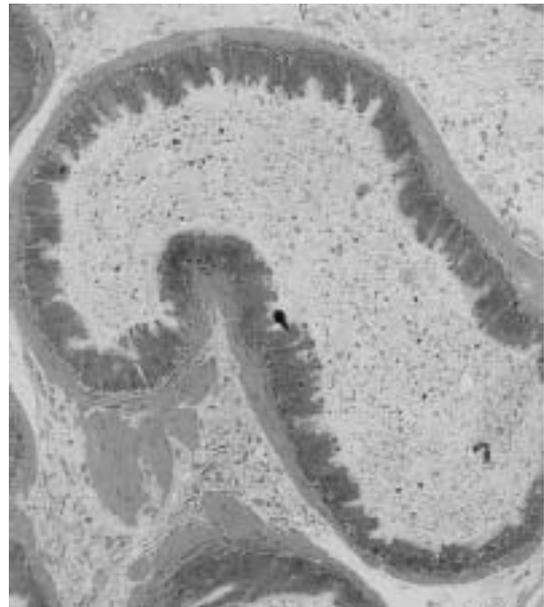


図 2. Flu 投与マウス (7週齢) の精巣上体尾部。形態的变化は見られない。内腔には多くの精子が見られる。その中のいくつかは奇形精子。トルイジン・ブルー染色。

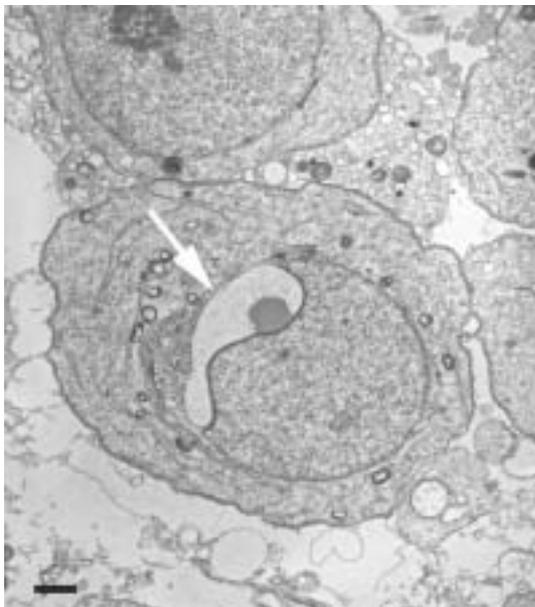


図 3. BPA 投与のマウス精子細胞 (ステップ 6)。尖体 (白い矢印) の形態異常が見られる。電子顕微鏡写真中のバーは全て 1  $\mu\text{m}$ 。

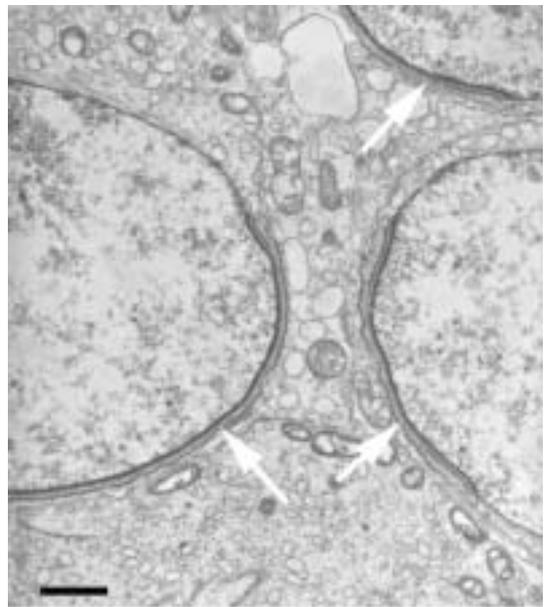


図 4. BPA 投与ラットのステップ 8 精子細胞。これらの精子細胞には尖体 (白い矢印) はあるが、セルトリ細胞の特殊接合装置は欠けている。正常像は図 7 および図 19 の略図参照。

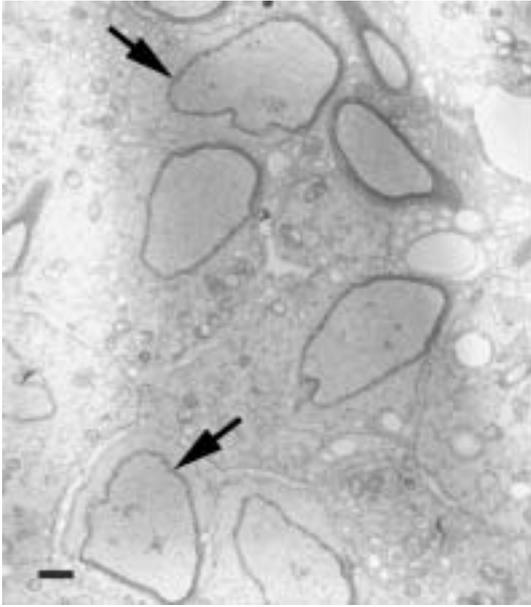


図5. Flu 投与マウスのステップ9精子細胞。黒い矢印は形態の異常な精子細胞を示す。正常像は図7および図19の略図を参照

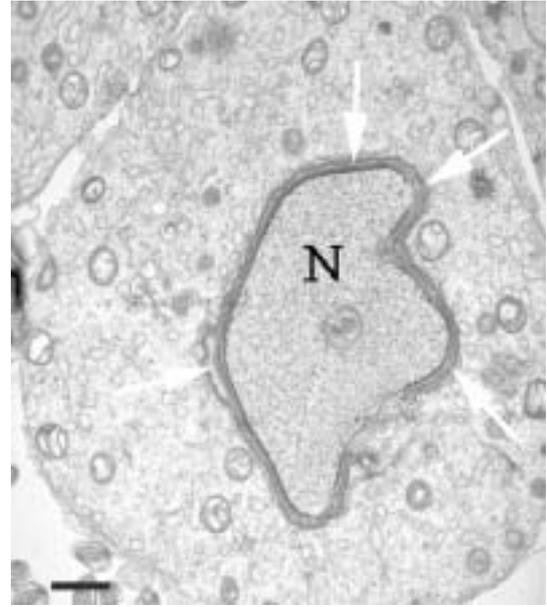


図6. BPA 投与ラットのステップ9精子細胞。尖体（白い矢印）と核（N）の形態異常が見られる。セルトリ細胞の特殊接合装置は欠損している。



図7. 正常ラットのステップ9精子細胞。セルトリ細胞の特殊接合装置（黒い矢頭）が尖体（白い矢印）に接している。この写真は図19に対応している。

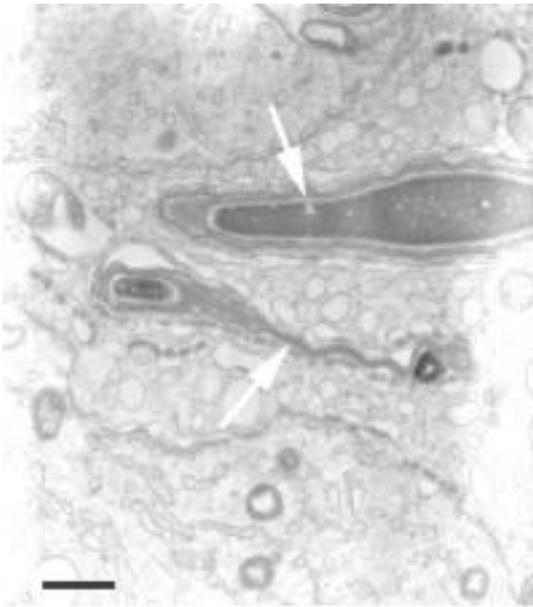


図 8. Flu 投与マウスのステップ 14 精子細胞。尖体 (白い矢印) の異常が顕著である。正常像は図 9 参照。

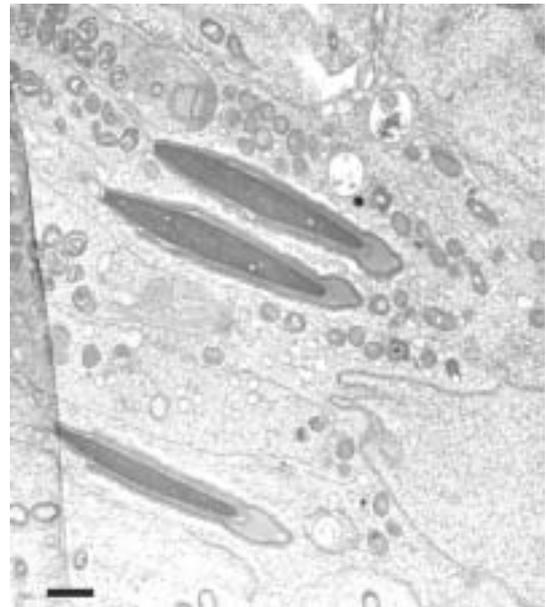


図 9. 正常マウスのステップ 14 精子細胞。

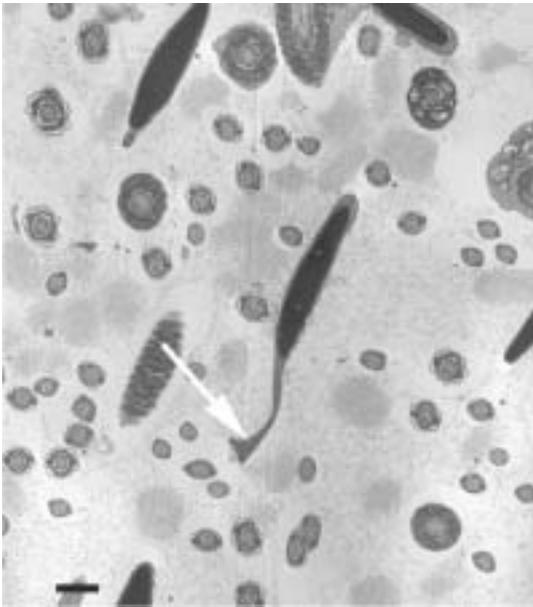


図 10. Flu 投与マウスの精巣上部尾部内に見られた異常精子。異常に伸びた尖体が見られる (白い矢印)。

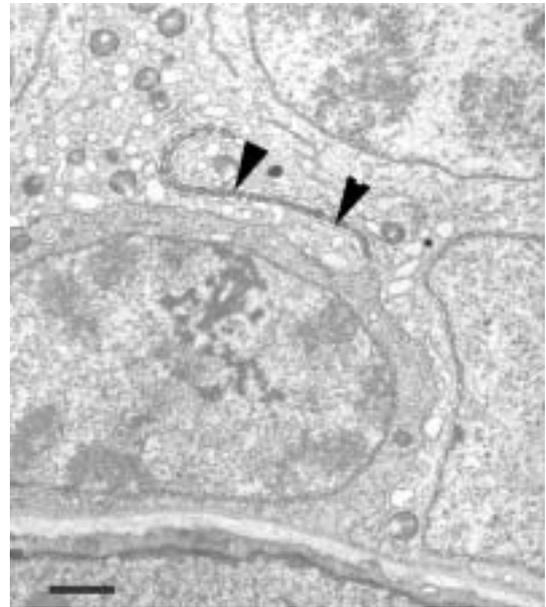


図 11. BPA 投与マウスのセルトリ細胞間の特殊接合装置 (黒い矢頭) には異常は認められなかった。図 19 の略図参照。

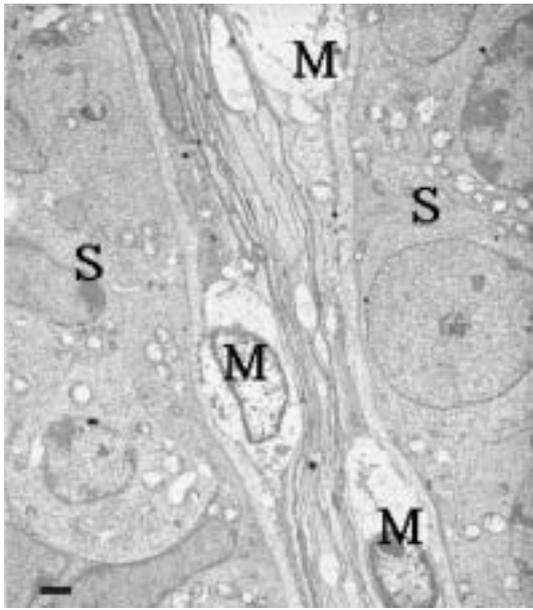


図 12. Tam と BPA の混合投与ラット。二本の精細管 (S) の間に水腫変性を起こした筋様細胞 (M) が見える。

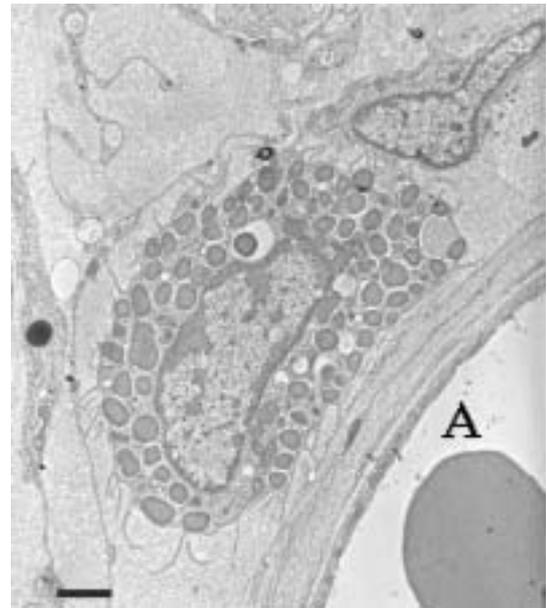


図 13. Tam と BPA の混合投与ラット。精巢間質に見られた肥満細胞を示す。A は細動脈。

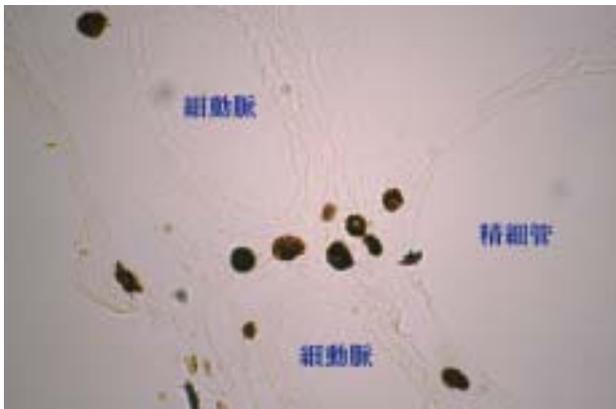


図 14. Tam と BPA の混合投与ラットの精巢間質に見られた肥満細胞。抗ヒト・トリプターゼ抗体の免疫染色。多数の肥満細胞が見られる。

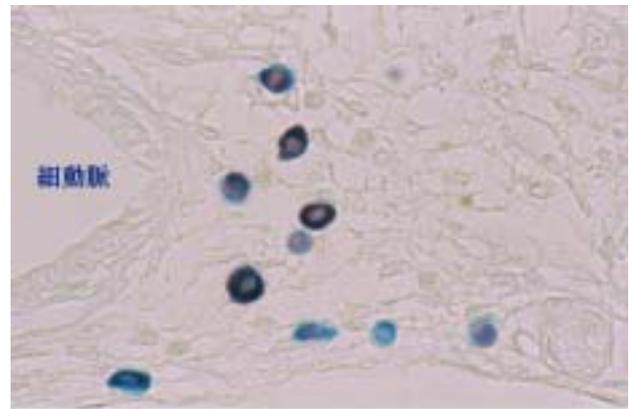


図 15. 同じく Tam と BPA の混合投与ラットの精巢間質に見られた肥満細胞。アリューシャン青とサフランニンの二重染色。

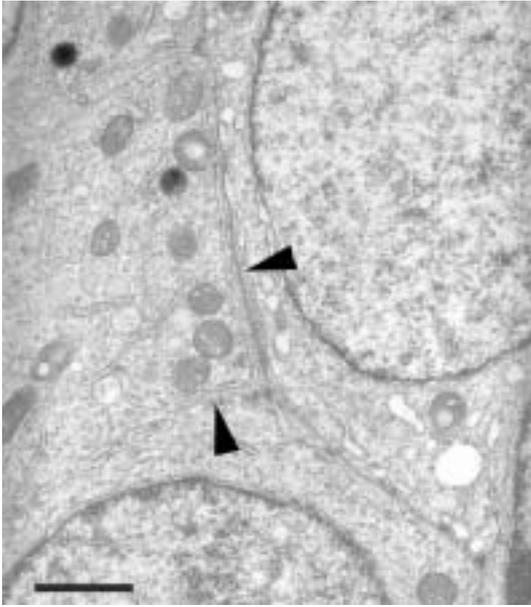


図 16. DEHP 投与マウス (1 週齢) の精上皮。幼弱なセルトリ細胞間の特殊接合装置 (黒い矢頭) が認められる。

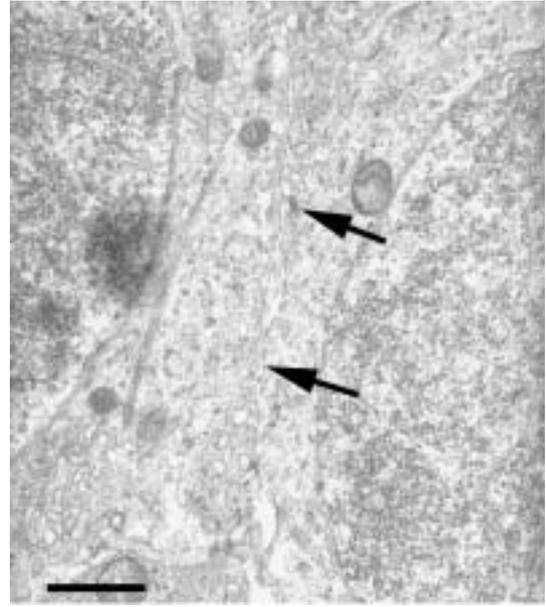


図 17. DEHP 投与マウス (1 週齢) の精上皮。セルトリ細胞の間には他のセルトリ細胞の板状突起 (矢印) が認められた。

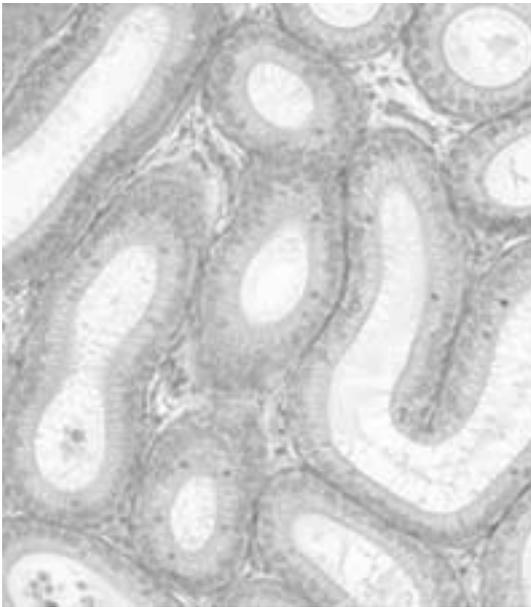


図 18. DEHP 投与マウス (4 週齢) の精巣上部尾部。形態的变化は見られない。ヘマトキシリン・エオシン染色



図 19. ステップ 9 精子細胞の略図。ピンクの核に尖体（黄緑色）が帽子状に接している。尖体に接するセルトリ細胞にはセルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置（赤色）が存在する。精子細胞、セルトリ細胞の細胞膜は省略してある。

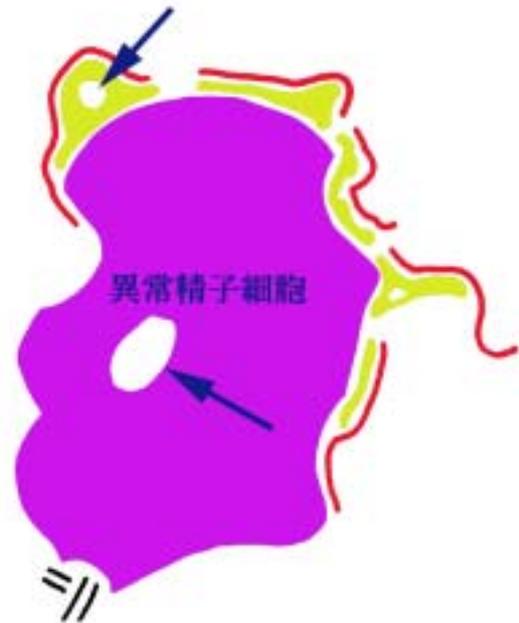


図 20. E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>B、BPA、Flu による造精細胞（例としてステップ 9 精子細胞）に見られた形態異常の略図。核および尖体には空胞形成（矢印）および形態異常が見られた。セルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置の無形成および部分的欠失も見られた。

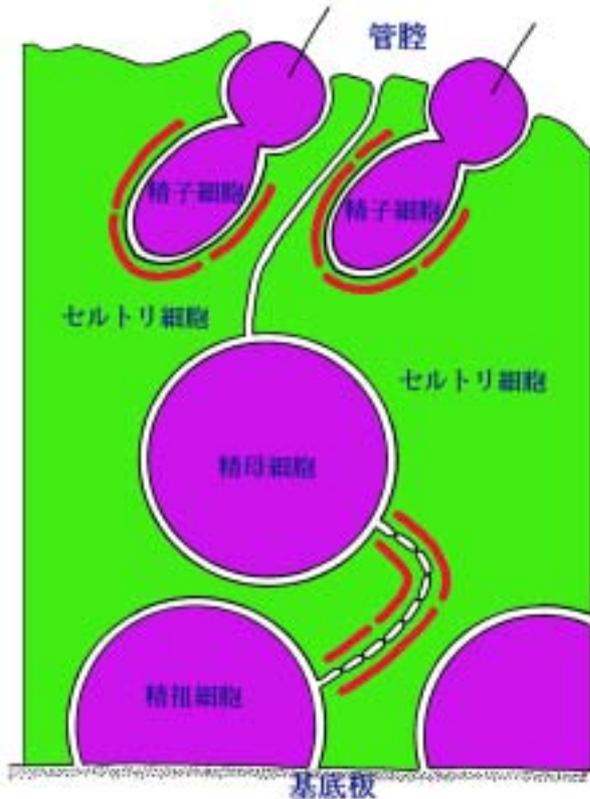


図 21. 哺乳類精上皮に見られるセルトリ細胞の特殊接合装置（赤色）を示す。精上皮はセルトリ細胞（緑色）のシートから出来ており、造精細胞（ピンク）はセルトリ細胞に抱きかかえられている。図の下方は上皮の基底側であり、図の上方は管腔である。セルトリ細胞の特殊接合装置は 2 カ所あり、一つは隣り合うセルトリ細胞間に存在し、血液・精巣関門を形成する。もう一つはセルトリ細胞が精子細胞（ステップ 8 以降）の頭部を取り囲む部分に見られる。

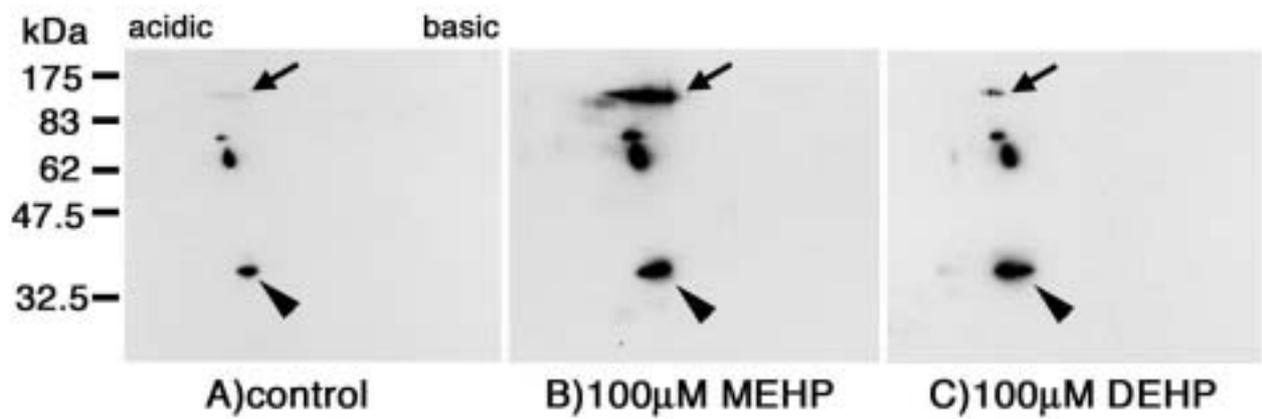


図 22. セルトリ細胞株 TM4 に MEHP、DEHP を投与したときのタンパク質チロシンリン酸化パターンの変化。p38 (矢頭) はコントロールに比べ、MEHP、DEHP 投与によりリン酸化が亢進していた。また分子量約 140kDa のタンパク質 (矢印) のリン酸化がコントロール、DEHP 投与に比べ、MEHP 投与において顕著に亢進していた。

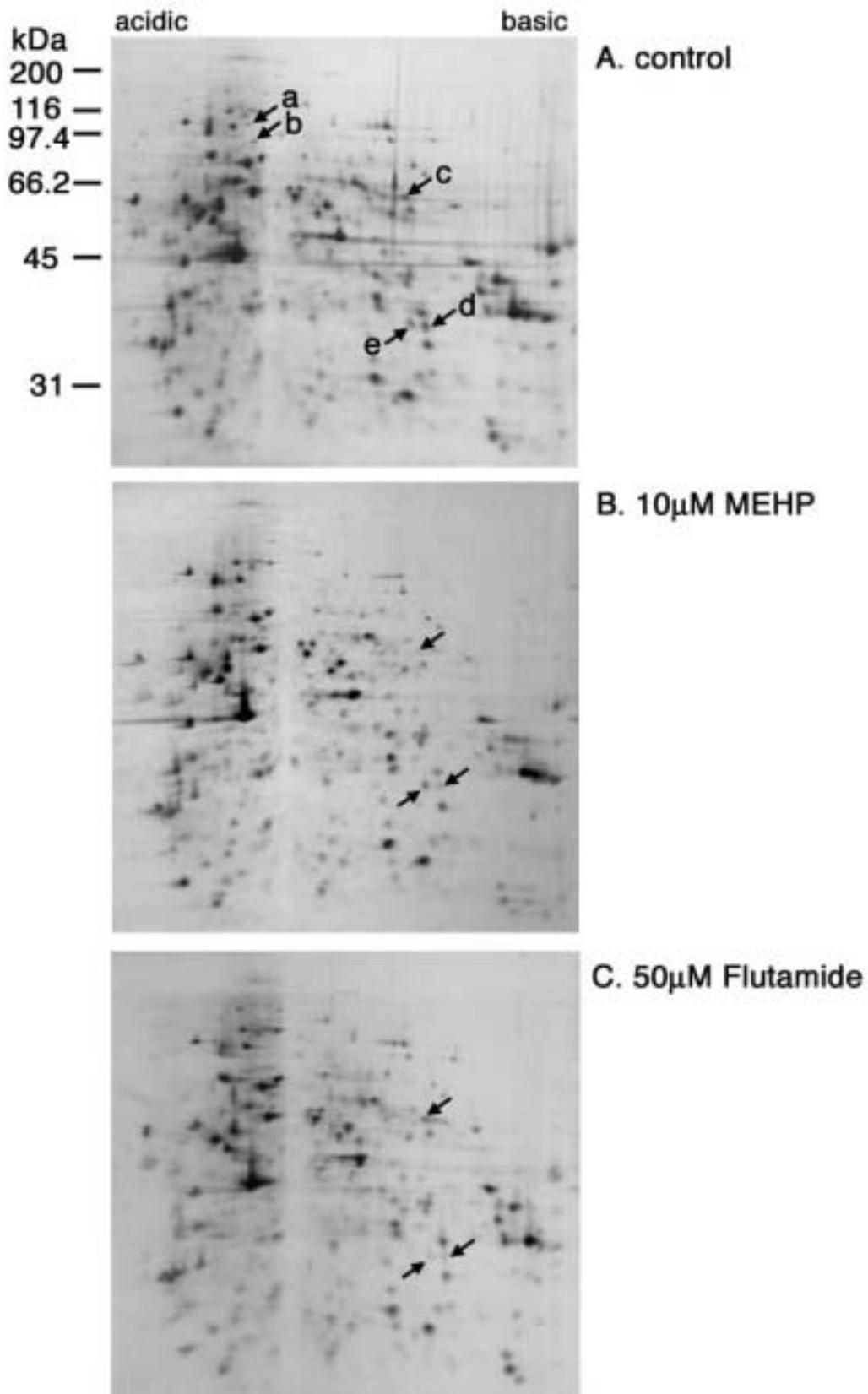


図 23. セルトリ細胞株 TM4 に MEHP、Flu を投与したときの抽出タンパク質の二次元電気泳動像。コントロールと比べ変化の見られたスポットを矢印 a ~ e で示した。a, b: コントロールには存在するが、MEHP、Flu 投与では存在しない。c: コントロール、Flu 投与では存在するが、MEHP 投与では極めて少ない。d: コントロールに比べ、MEHP、Flu 投与では少ない。e: コントロール、MEHP 投与に比べ、Flu 投与では少ない。

表 1 今年度の実験系

		投与薬剤	対象動物
実験 I	IA	BPA	*ラット・マウス新生仔
	IB	BPA	ラット・マウス成獣
実験 II		E2, E2B	ラット・マウス成獣
実験 III		Flu	マウス新生仔
実験 IV		Tam + BPA	ラット新生仔
実験 V		DBP, DEHP	マウス新生仔

\*: ラット新生仔への BPA 投与実験は平成 13 年度に行なった。

: マウス成獣への E<sub>2</sub>B 投与実験は平成 11 年度に行なった。

表 2 実験 IA (ラット・マウス新生仔への BPA 投与)の投与量

単位: µg/匹/回

ラット <sup>注)</sup>	マウス
0.1	0.05
1	0.1
10	1
100	5
600 <sup>†</sup>	10

: NOEL

†: 投与後数日 ~ 20 日以内に死亡。

注) 一部は平成 13 年度に行なった。

表 3 実験 IB (ラット・マウス成獣への BPA 投与)の投与量

単位: µg/匹/回

ラット	マウス
0.1	0.01
1	0.1
10	1
100	10
1000	100

: NOEL

表 4 実験 II (ラット・マウス成獣への E<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>B 投与)の投与量

単位: µg/匹/回

ラット	マウス <sup>注)</sup>
0.1	0.4
1	0.6
10	0.8
	1.6
	3.2
	6.4

: NOEL

注) 平成 11 年度の実験(腹腔内投与)

表 5 実験 III および実験 V (マウスへの新生仔への Flu, DBP, DEHP 投与)の投与量

単位: µg/匹/回

Flu, DBP, DEHP
0.5
5
50
500
5000 <sup>†</sup>

†: Flu 投与群のみ、投与後 2 日以内に全て死亡。

表 6 実験 IV (ラット新生仔への Tam + BPA 投与)の投与量の組み合わせ

単位: µg/匹/回

Tam	BPA
20	20
20	10
10	10

表 7 本研究で見られた形態変化と報告されているホルモン受容体活性との比較

	Receptor assay*				形態変化				
	E	Anti E	A	Anti A	精子細胞		特殊接合装置		精巣間質
					尖体、核異常	減数分裂の停滞	血液精巣関門	セルトリ細胞・精子細胞	
E <sub>2</sub>		-		-		-	-		-
E <sub>2</sub> B		-		-		-	-		-
BPA		-	-			-	-		-
Flu		-	-			-	-		-
DBP		-	-	-	-	-	-	-	-
DEHP	-	-	-	-	-	-	早期出現		-
DES		-		-	-		4週遅延	-	
TAM	-				-		2週遅延	-	

注 1: 受容体活性が強い順に 、 、 、 全く見られないものは - と表している

注 2: 形態では、変化がある場合 、 変化が無い場合は - と表している

\*: Harris CA et al. Environ Health Perspect 105: 802-811, 1997, Sohoni Pand Sumpter JP. Soc Endocrinol 158:327-339,1998, Charles S. et al. Mol Cell Endocrinol 178: 99-105, 2001 より引用

# Studies on the molecular and cellular biological mechanisms on male reproductive system affected by endocrine disruptors

Chisato MORI, Chiba University, Professor

## Key Word:

mouse, TM4, testis, epididymis, spermatogenesis, ectoplasmic specializations, bisphenol A, flutamide, 17  $\beta$ -estradiol,  $\beta$ -estradiol 3-benzoate, tamoxifen, di-(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP), di-(n-butyl)phthalate(DBP), mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP)

## Abstract:

Actions of bisphenol A (BPA), flutamide (Flu), 17  $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ),  $\beta$ -estradiol 3-benzoate ( $E_2B$ ), di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), di-(n-butyl)phthalate (DBP), and tamoxifen (Tam) on the male reproductive system in the rat and mouse were evaluated. Neonatally administered BPA and Flu caused morphological anomalies in spermatids and in spermatozoa in the mouse and rat. The anomalies were observed in the nucleus and acrosome. The agents also affected differentiation of the ectoplasmic specialization between the Sertoli cell and spermatids. When BPA was administered into the adult rat and mouse, the same effects were observed.  $E_2$  and  $E_2B$  also showed the same anomalies. Therefore, BPA and Flu have estrogenic effects or estrogenic effects-enhancement effects on the rat and mouse. The present report implies that BPA, widely distributed in our environment, cause anomalies in spermatogenesis in humans. Neonatally administered DEHP seemed to promote growth of the Sertoli cell in the mouse. DBP had no effects on the male reproductive system in this study. Influence of Flu, DEHP, and mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) at levels of protein constitution were evaluated on cultured TM4 cells which derived from mouse Sertoli cells. Two-dimensional (2D) Western blot assay showed that tyrosine phosphorylation of some proteins was increased in MEHP-treated TM4 cells compared with the control. Proteome analyses by a 2D electrophoresis method showed that several protein spots were changed in quantity in MEHP-, and Flu-treated TM4 cells. These proteins might be a clue to elucidate the action mechanism of endocrine disruptors. In addition, they could be useful bio-markers for evaluation of endocrine disruptors.

#### -4. 平成 13 年度研究結果の評価

平成 13 年度に実施した作用メカニズムに関する研究(指定研究 7 研究、公募により採用された 4 研究の 11 研究)の研究発表会を開催し、内分泌攪乱化学物質等研究推進専門委員会にて研究成果の評価を行い、評価を踏まえ今後も必要と思われる 8 研究については指定研究として環境省へ推薦した。

##### -4-1. 内分泌攪乱化学物質等研究推進専門委員会名簿

委員長 高杉 暉(横浜市教育委員会委員長)

委員 有菌 孝司(熊本県立大学教授)

井口 泰和(岡崎国立共同研究機構教授)

堤 治(東京大学教授)

長濱 嘉孝(岡崎国立共同研究機構教授)

##### -4-2. 指定研究として推薦を行った研究

1. 前鰓類(海産巻貝類)の性及び生殖に関わる内分泌機構の解明に関する基礎的研究
2. 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の分子細胞生物学的メカニズムの解明
3. 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
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に関する研究
5. TBT によるラット妊娠初期胚の着床不全に関わるメカニズムの解明
6. エストロゲン様物質曝露によるメダカ精巣卵発現の精子形成に及ぼす影響の解明
7. 内分泌攪乱化学物質のアンタゴニスト活性の評価とその作用メカニズムに関する研究
8. 脳及び生殖腺の性分化に対する内分泌攪乱作用評価法に関する研究