

# Studies on the molecular and cellular biological mechanisms on male reproductive system

affected by endocrine disruptors

Chisato MORI, Chiba University, Professor

## Key Word:

mouse, testis, spermatogenesis, cortactin, diethylstilbestrol, flutamide, 17 $\beta$ -estradiol,  $\beta$ -estradiol 3-benzoate, bisphenol A, cyproterone acetate, ICI182,780, Fas-FasL, caspase, Bcl-2

## Abstract:

After adult ICR mice were treated with flutamide (FLUT), 17 $\beta$ -estradiol (E2), bisphenol A (BPA), ICI182.780 (ICI) and diethylstilbestrol (DES) for 5 days, testes were dissected at 6th day. Cortactin protein, one of the actin binding proteins and involved in ectoplasmic specialization (ES), was decreased in the chemicals treated testes against control testes. It is suggested that there is relationship between cortactin level in the testes and abnormality of spermatogenesis.

With 20 mg/kg of DEHP treatment, bcl-2, key gene related to apoptosis, was increased. Up-regulation of bcl-2, inhibitor of Apaf-1/caspase-9/caspase-2 cascade of apoptosis, may be related to the fact that no morphological apoptotic change was induced after dosing of 20 mg/kg DEHP. With 2000 mg/kg of DEHP treatment, the apoptotic activator cascade, Fas/FasL, FADD/caspase-8/caspase-3 cascade, and Apaf-1/caspase-9/caspase-2 cascade were increased and bcl-2 was decreased. Thus, these gene regulations might lead the cells into apoptosis in the case of high exposure to DEHP. In contrast, FADD/caspase-10/caspase-6 cascade and caspase-11/caspase-3 cascade were not increased. These results indicate that the cascades of FADD/caspase-10/caspase-6 and caspase-11/caspase-3 are not related to apoptosis with DEHP treatment.

## 2. フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの生殖・発達毒性のメカニズムの解明 およびリスク評価に関わる研究

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

- 1) フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)はマウスの胎仔、新生仔の生存率を低下させた。これには PPAR $\alpha$ が関与していることが明らかとなった。
- 2) DEHP は雄の血清テストステロン濃度を低下させた。この要因として、DEHP 曝露による精巣ライディッヒ細胞の CYP17 の発現低下が考えられた。
- 3) 検討したフタル酸エステルの中で、DEHP は PPAR $\alpha$ の最も強いリガンドであった。
- 4) DEHP の代謝には大きな種差が認められた。第一に、リパーゼの活性（MEHP の生成速度から求めた）の種差が大きく、内因性のクリアランスを示す Vmax/Km は、マウスとマーモセットの差が 200 倍を超えていた。
- 5) DEHP 曝露による PPAR $\alpha$ 標的遺伝子発現の誘導は、ラット>マウス>>マーモセットであり、必ずしもリパーゼ活性の種差と平行ではないことが判明した。  
これらの結果は、DEHP のリスクを動物からヒトへ外挿する場合、不確実係数を慎重に決定すべきであることを示している。

### 研究協力者

山ノ下 理（名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学）  
伊藤 由起（名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学）  
柳場 由絵（名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学）  
張 淑芸（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）

### A. 研究目的

Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP、CAS-No. 117-81-7) は *o*-フタル酸のジエステル化合物（分子量=390.56）で、主にポリビニルクロライド（PVC）製品の可塑性や弾力性を増強するために 10~60%（w/w）程度使用されている。DEHP の疎水性、低揮発性の性質から、環境汚染は少ないとされているが、高温や脂溶性物質の存在化ではかなり流出するとみなされており、環境条件によって汚染の程度は広がる可能性がある。DEHP は電線被覆、建材、シート、塗料、塩ビ製品、ホース・ガスケット、履物等に使用されているため、これらの製品から蒸発した DEHP の曝露も考えられる。特殊な曝露として、医療行為（血液透析）による曝露がある。特別な曝露がない場合の DEHP の 1 日の曝露量は 0.1~55.4mg(1.5~790 $\mu$ g/kg・b.w.)である（Turnbull and Rodricks）。

DEHP の生殖・発達毒性を有し、内分泌攪乱作用（環境ホルモン作用）が疑われる化学物質でもある。そのため「SPEED' 98」において、リスク評価優先物質として取り上げられた。

化学物質のリスク評価はその安全性を考える上で必須である。しかしこれまでのリスク評価はエンドポイントを求めることのみ注目され、そのメカニズム解析はなおざりにされていた。また、リスク評価は動物実験結果をヒトに外挿することがほとんどであるが、種差にも注意が

払われることが少なかった。このような背景のもと、化学物質の過大評価あるいは過小評価を避けるためのリスク評価の高度化の必要性がクローズアップされている。リスク評価の高度化には、不確実係数を可能な限り小さくすることが必須であり、そのためにはメカニズムと種差の解明は必須である。

この研究では、1) DEHP の生殖・発達毒性の（胎仔・新生仔死亡率の増加、雄のテストステロンの低下）のメカニズムと、2) DEHP 代謝と遺伝子発現への影響の種差についてまとめた。1) の研究には、DEHP の代謝物の MEHP(フタル酸モノエチルヘキシル)が PPAR $\alpha$ に配位することから、PPAR $\alpha$ 遺伝子ノックアウトを用いて解析し、リスク評価に関わる知見の収集を行った。雄のテストステロン濃度の低下はライディッヒ細胞のテストステロン合成系への影響から考察した。2) の種差の研究に関しては、キネティクスとダイナミクスに分け、キネティクスは DEHP から MEHP への代謝を触媒するリパーゼの種差を、ダイナミクスに関しては PPAR $\alpha$ 標的遺伝子産発現の種差を考察した。これらの結果を総合して、リスク評価において、DEHP のキネティクス・ダイナミクス種差、生殖・発達毒性の種差をどのように考え、不確実係数を決定すべきか考察した。

## B. 研究内容

### 1. DEHP の発達・生殖毒性と核内転写調節 (PPAR $\alpha$ ) の役割

#### 1-(1) 要約

di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) によるマウス繁殖(fertility)の低下と peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR  $\alpha$ )の役割について、野生型 SV/129 マウスと PPAR  $\alpha$ -null マウスを用いて検討した。DEHP は市販の固形試料に混ぜ (0, 0.05%)、全実験期間自由摂食させた。4 週間 DEHP 食を食べさせた後、同じ曝露群の同遺伝子型の雄と雌 (F<sub>0</sub>) を交配させ、誕生した仔を F<sub>1</sub>とした。成熟した F<sub>1</sub>をさらに同じ曝露群の同遺伝子型を持つマウス間で交配し、誕生した仔を F<sub>2</sub>とした。F<sub>1</sub>および F<sub>2</sub>において、一腹当たりの誕生した仔 (litters) の数、2 日以上生存した仔 (pups) の数、及び性について検討した。全てのマウスにおいて、F<sub>0</sub>から F<sub>2</sub>までの雄の精巣、雌の卵巣と子宮には光顕レベルでの形態的異常は認められなかった。野生型マウスの 0.05%DEHP 群は雄雌ともに体重の増加の遅延と、PPAR  $\alpha$ の標的酵素蛋白 (脂肪酸  $\beta$ 酸化系酵素) の誘導が観察された。F<sub>1</sub>と F<sub>2</sub>において、一腹当たりの誕生仔の数と 2 日以上生存する仔の数の減少が認められた。一腹当たりの誕生仔の数の減少の一因は胚吸収 (resorption) の増加であった。New born pups の減少の原因は誕生 2 日以内の新生仔死亡率の増加であった。遺伝子型に関係なく、マウスの胎仔および 2 日齢マウス肝のトリグリセライドは DEHP 曝露の影響は受けなかった。しかし母親マウス血清のトリグリセライドは DEHP 曝露群において有意に低かった。この現象が野生型マウスにおける胎仔や新生仔死亡率の増加と関連しているかもしれない。一方、PPAR  $\alpha$ -null マウスにおいては 0.05% DEHP 曝露による litters の数の減少と pups 死亡率の増加はみられなかった。従って、野生型マウスにみられた 0.05%DEHP 曝露による fertility の低下は PPAR $\alpha$ に依存していることが推察される。

#### 1-(2) はじめに

DEHP はペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 (peroxisome proliferator -activated receptor, PPAR) の一つのサブタイプ PPAR  $\alpha$ に配位し、ペルオキシゾームを誘導するととも

に、PPAR 標的遺伝子の発現 ( $\omega$ -1 酸化、脂肪酸  $\beta$ -酸化などの酵素遺伝子) を制御し、多面的(pleiotropic)毒性発現に関与している。即ち、生殖器障害、肝障害、腎障害を誘発し、肝がんを発生させる。

DEHP の生殖・発達毒性は精巣、精巣上体、前立腺、卵巣の萎縮、精子数の減少、異常精子数の増加、性周期の乱れ、血清性ホルモンの減少、fertility の低下など、様々な形で現れる。しかしこれらの毒性発現の機構はほとんど明らかにされていない。最近、PPAR $\alpha$ -null mice が米国 NIH の Gonzalez 博士のグループによって開発され、PPAR $\alpha$  の核内受容体としての役割の解明に有効であることが証明された。本研究では、この PPAR $\alpha$ -null mice を用いて、DEHP による繁殖の低下が PPAR $\alpha$  に制御されていることを明らかにした。

### 1-(3) 研究方法

#### 1) 実験動物

動物実験はすべて信州大学中央実験動物施設の動物実験ガイドラインに沿って行われた。実験動物として雌雄の野生型 SV/129 マウス (Wild-type mice) と PPAR $\alpha$ -null mice を使用した。動物は温度、湿度、明暗が管理されたクリーンルームで市販の固形飼料と水を自由に与えられ、飼育された。それぞれの雄と雌を交配し、仔が 12 週齢に達したところで、Lamb らの方法で調製された 0 および 0.05%DEHP 含有固形飼料に切り替えられた。実験期間中、マウスはこれらの試験食で飼育された。この餌で 4 週間飼育したところで、雄、雌 (この群を F<sub>0</sub> とした) を交配した。F<sub>1</sub> が 16 週齢に達したところで、雄と雌を再び交配し、その仔を F<sub>2</sub> とした。

F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> の新生仔の誕生数と 3 日以上生存した数を数え、それぞれ一腹あたりの仔 (litters) と生存率 (生存数/出生数) とした。F<sub>0</sub> は 36 週齢で、F<sub>1</sub> と F<sub>2</sub> は 16 週齢で解剖した。生殖器の障害の情報を得るために、精巣、精巣上体、精のう腺 (雄)、卵巣、子宮 (雌) を、PPAR $\alpha$  の誘導とトリグリセライドを検索するために肝を、性ホルモンおよび脂質代謝 (トリグリセライド) の情報を得るために血清を採取した。

残りの F<sub>2</sub> の雄雌を交配し、18~19 日目の胎仔と胎盤数、生後 3 日目の新生仔マウスを解剖し、肝を採取してトリグリセライドと PPAR $\alpha$  の誘導を測定すると共に、DNA を抽出し、性の決定に使用した。

#### 2) 病理的観察

採取された精巣はブアン固定、他の臓器 (子宮、卵巣) は 10%緩衝ホルマリン固定をし、所定の方法で病理標本を作成し、0.05%DEHP の臓器障害性を顕微鏡下で検討した。

#### 3) 血清性ホルモン

0.05%DEHP 曝露による繁殖力の低下と性ホルモンレベルとの関係を明らかにするために、血清テストステロンおよびエストラジオールのレベルが測定された (三菱化学ビーシーエルに委託)。

#### 4) 性の決定

マウスの胎仔、新生仔は、生殖器の発達が未熟なため、肉眼的に性別を判定することが困難である。そこで、胎仔、新生仔の組織から、DNA を抽出し、Y 染色体上の雄性決定遺伝子で

ある *Sry* gene を PCR 法で確認することで、胎仔、新生仔の性の決定とした。胎仔、新生仔の肝組織から QIA amp DNA Mini Kit(QIAGEN 社製)を用いて DNA の抽出を行った。Y-specific target sequence として *Sry* gene を、control sequence として muscle-specific regulatory factor である myogenin を使用し、Yano (1993) の方法に従いプライマーを設定した。次に、PCR system PE9700 (Perkin Elmer 社製)にて 35 回増幅した後、PCR product を、2.5%アクリルアミドゲルで電気泳動し確認した。即ち、*Sry* gene および myogenin が陽性の場合を雄、myogenin のみ陽性の場合を雌とした。

#### 5) PPAR $\alpha$ 標的遺伝子発現への影響

投与された DEHP が親、胎仔、新生仔マウス肝の PPAR $\alpha$  を誘導し、ペルオキシゾームおよびミトコンドリア脂肪酸  $\beta$  酸化系酵素を誘導しているかを評価するために、PPAR $\alpha$  の標的酵素発現を Western blot 法により解析した。親および胎仔、新生仔の肝蛋白を電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。各種抗体 (ペルオキシゾーム酵素抗体として、peroxisomal thiolasae, PT; peroxisomal bifunctional protein, PH; D-type bifunctional protein, DBF に対する抗体およびミトコンドリア  $\beta$ -酸化系酵素抗体として極長鎖アシル CoA 合成酵素、VLACS; ; 極長鎖アシル CoA 脱水素酵素、LVCAD; ; 長鎖アシル CoA 脱水素酵素 LCAD; ; 中鎖アシル CoA 脱水素酵素、MCAD; ; 短鎖アシル CoA 脱水素酵素、SCAD に対する抗体、) を用いて、それぞれの酵素の発現量を調べ、脂質代謝と PPAR $\alpha$  の誘導の指標とした。

#### 6) 肝および血清のトリグリセライドの測定

DEHP の脂質代謝に与える総合的な影響のエンドポイントとして、肝と血清のトリグリセライドレベルへの影響を評価した。肝のトリグリセライドは脂肪をクロロホルム-メタノールで抽出後、血清は直接、和光純薬 (大阪、日本) のトリグリセライド測定キット (トリグリセライド G テストワコー) を使用して測定した。

#### 7) 統計的検討

得られたデータは、2 元配置の分散分析を行った後、2 群間の差を t-test により検定した。

### 1-(4) 研究結果

#### 1) 0.05%DEHP による PPAR $\alpha$ の誘導と体重への影響

DEHP による肝の PPAR $\alpha$  の誘導を知るために PPAR $\alpha$  の標的酵素の発現を western blot 分析で解析した (データ示さず)。DEHP 投与により雄雌の野生型親マウスのペルオキシゾーム系酵素発現は誘導されていた。このことにより、0.05%DEHP が PPAR $\alpha$  転写活性化を促進していることが確認された。しかし、DEHP 群と対照群の間にはミトコンドリアの脂肪酸  $\beta$  酸化系の酵素の発現量に差は認められず、0.05%DEHP の PPAR $\alpha$  の転写活性化の促進は軽度であることが推察された。一方、0.05%DEHP は野生型胎仔および新生仔肝のペルオキシゾーム・ミトコンドリア系の酵素に影響を与えなかった。0.05%DEHP は PPAR $\alpha$ -null マウスにおいては親マウス肝のみならず胎仔肝・新生仔肝のペルオキシゾーム系酵素とミトコンドリア系酵素発現量に影響を与えなかった。以上の結果から、0.05%DEHP は野生型成熟マウスおよび親マウス (妊娠マウス、産褥マウス) および新生仔肝のペルオキシゾーム系酵素を誘導することが明らかとなった。これらの実験結果に対応して、0.05%DEHP は雌雄の体重の増加の遅延を

もたらした(表 1-1)。

## 2) 0.05%DEHP の fertility への影響

0.05%DEHP は野生型マウスの litter 数を減少させ、生存率も低下させた。これは F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> いずれにおいても観察された(表 1-2)。マウスの生存率は対照群の 96.2%に対して、64.6%(F<sub>1</sub>)、62.8%(F<sub>2</sub>)であった。新生仔の死亡は殆ど 3 日以内に観察された。一方、PPAR $\alpha$ -null マウスにおいては、0.05%DEHP 曝露は生まれた仔の数 (litters) や生存率への有意な影響を与えなかった。

野生型マウスにおいて観察された DEHP による litters 数と生存率の低下、特に雄の生存率の低下の原因を見出すために、妊娠 18~19 日目胎仔数と性、胎盤の数、および生後 3 日目の新生仔の数と性について検討した。図 1-1 に示すように、野生型マウスにおいて、0.05%DEHP は妊娠マウスの胎盤数に影響を与えなかった。DEHP は明らかに一腹当たりの胎仔数を減少させたが、性比には影響を与えなかった。即ち、野生型マウスにおいて、DEHP は胚吸収を加速させることが推察された。同様の現象は PPAR $\alpha$ -null マウスには観察されなかった。以上から、DEHP はマウスの fertility を低下させ、この一部は PPAR $\alpha$  に依存しているといえる。

## 3) 0.05%DEHP の肝および血清トリグリセライド濃度への影響について

血清のトリグリセライド濃度は総合的な脂質代謝の指標であり、PPAR $\alpha$  に調節されている。DEHP 曝露が胎仔と新生仔の肝(この場合血清が採取できなかったため、肝の TG 濃度を測定した)のトリグリセライド濃度に与える影響を検討した。遺伝子型に関係なく、DEHP は胎仔および新生仔肝の TG には影響を与えなかった(表 1-3)。

親マウスの PPAR $\alpha$  の誘導がトリグリセライド濃度に与える影響を検討した。0.05%DEHP は妊娠マウスのみならず授乳期母マウス(2 日目)血清のトリグリセライドを低下させた(表 1-4)。PPAR $\alpha$ -null マウスの肝トリグリセライドは野生型より高い傾向を示した。PPAR $\alpha$ -null マウスの血清トリグリセライド濃度は野生型より明らかに高かったが、DEHP 曝露の影響は認められなかった。

## 4) 0.05%DEHP の血清中性ホルモンへの影響

雄対照群において、いずれの週齢(16 週齢、36 週齢)においても PPAR $\alpha$ -null マウスのテストステロン濃度は野生型の 1/6 から 1/10 であり、エストラジオール濃度も低値を示す傾向であった(表 1-5)。DEHP は野生型雄マウスのテストステロン濃度を約 1/3 に低下させたが、エストラジオール濃度には影響を与えなかった。一方、DEHP は雄 PPAR $\alpha$ -null マウスのテストステロンやエストラジオール濃度に影響を与えなかった。

以上の結果から、次の結論が得られた。

- ①雄の PPAR $\alpha$ -null マウスのテストステロン濃度は野生型より低い。
- ②0.05%DEHP は野生型マウスにおいてのみテストステロン濃度を低下させる。

## 5) 0.05%DEHP の生殖器障害性について

DEHP 投与はいかなる世代(F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>)においても、野生型、PPAR $\alpha$ -null マウスの雄の生殖器(精巣、精巣上体、精のう腺)、雌の生殖器(卵巣、子宮)の体重当たりの重量比率に影響を与えなかった。同様に、DEHP 曝露による精巣、卵巣、子宮に光顕的变化も認められ

なかった。以上の結果より、0.05%DEHPは雄、雌の生殖器に対する障害性を示さないといえる。

#### 1-(5) 考察

0.05%DEHPは雄雌マウスの生殖器に病理的变化を伴わず、繁殖に影響を与えることが明らかとなった。この現象は主として、野生型マウスに観察され、胎盤形成以降の胎仔期と新生仔期(殆どが2日以内)の死亡率の増加に起因し、受精から胎盤形成への影響は少ないと推察された。このような現象は、PPAR $\alpha$ -nullマウスでは観察されなかった。従って、DEHP投与による繁殖の低下にはPPAR $\alpha$ が関与しているものと思われる。

DEHPによる生存胎仔や新生仔の減少のメカニズムとしていくつか考えられる。まず第一に母獣のDEHP曝露が亢トリグリセライド作用を誘発し、エネルギー平衡のアンバランスを引き起こしていると考えられる。この原因として、肝リパーゼの活性阻害低下、遊離脂肪酸取り込み促進、血中TG分解促進、脂肪酸 $\beta$ 酸化系酵素の誘導による脂肪酸消費の促進、uncoupling protein誘導によるエネルギーの浪費などである。これらはいずれもPPAR $\alpha$ の標的遺伝子である。これらのどの標的遺伝子が原因かいまのところ不明である。

LaBordeらは妊娠マウスの血清生化学的検討を行った。その結果、母ラットの血清TGは出産直前に上昇し、出産直後速やかにもとのレベルに戻ることを発見した。表1-4からも明らかな様に、野生型のDEHP曝露群を除いたマウス血清のTGレベルは出産直後減少しているが、野生型のDEHP曝露マウスのTGは出産前後と変化なかった。即ち、野生型のDEHP曝露群においては出産直前の血清TGの増加が見られず、母獣の血清TGは常に低い状態に保たれていた。このような現象がマウス新生仔死亡率の上昇に関係しているかもしれない。

Lambらはマウスに0.01%から0.3%のDEHPを餌に混ぜて与え、繁殖への影響および雄の生殖器への影響を検討した。DEHPは量-反応的に新生仔の数と生存率の減少を招き、繁殖を低下させた。この現象は0.1%のDEHP曝露濃度で観察された。高濃度のDEHPは精子濃度の低下や運動性を減少させ、異常精子の割合を増加させることも明らかとなった。さらに精巢の萎縮を誘発していた。興味深いことは、対照群の雄と0.3%DEHP曝露群の雌を交配しても仔は全く生まれないが、DEHP曝露群の雄と対照群の雌を交配すると20%のマウスが出産をしたことである。DEHPは確かに雄雌の生殖器障害性をもっているが、その影響レベルは雌の方が低いかもしれない。即ちこの場合、DEHPの繁殖への影響は雄よりも雌に起因する割合が高いと考えられる。

雄PPAR $\alpha$ -nullマウスの血清のテストステロン濃度は野生型の1/6から1/10であった。さらに、DEHP曝露は野生型雄マウスにおいてのみテストステロン濃度を低下させた。これらの結果は血清テストステロン濃度もPPAR $\alpha$ に強く支配されていることを示唆する。しかし、今回観察された新生仔雄マウスの死亡率の増加には直接関係ないと思われる。雄血清テストステロン濃度がどのような機構でPPAR $\alpha$ に支配されているのか、今のところ不明である。

## 2. PPAR $\alpha$ を介したフタル酸エステル類の構造-活性相関

### 2-(1) はじめに

昨年度の研究において、0.05%のDEHPは野生型マウスの繁殖を低下させるが、PPAR $\alpha$ ノックアウトマウスの繁殖には影響を与えないことを明らかにした。この結果はDEHPのマウス繁殖に与える影響がPPAR $\alpha$ に依存していることを示唆する。このよう結果を踏まえて、研究2では、一