

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。雌雄の野生型 SV/129 マウス (Wild-type mice,) と PPAR α -null mice (ノックアウトマウス) 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ながら飼育された。

実験 1

5 種のフタル酸エステル (ジエチルフタル酸, DEP、ジブチルフタル酸, DBP、ブチルベンジルフタル酸, BBP、ジシクロヘキシルフタル酸, DCP、ジエチルヘキシルフタル酸, DEHP) およびアジピン酸エステル (ジエチルヘキシルアジピン酸, DEHA) それぞれ 0.6mmol/kg を 16 週齢の雄 129/SV マウスに 1 日 1 回、14 日間投与した。最終投与から 16 時間後に解剖し、肝の PPAR α の誘導ならびに精巣の障害性、血清テストステロン濃度を検討した。

実験 2

12 週齢の ddY マウス (日本 SLC より購入) に、2,4-DA, (0.23, 0.45, 0.68mmol/kg)、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸エステル (2,4DE, 0.21, 0.43, 0.64mmol/kg)、NP, (0.23, 0.91, 1.36, 1.82mmol/kg) をそれぞれ 1 日 1 回、14 日間投与した。最終投与 16 時間後に解剖し、肝の PPAR α の誘導ならびに精巣の障害性、血清テストステロン濃度を検討した。

実験 3

国民栄養調査 (平成 9 年度、関東第 2 ブロック) 結果による「食品群別にみた食品摂取量」に基づき、長野県内の小売店等で購入した約 140 品目の食品を実際の食事形態に従って調理したものを 13 群に大別し、各食品群毎に均一に混合し分析用試料とした食事からのフタル酸エステル類 (DEP, DBP, BBP, DEHP 及びジブチルピルフタル酸, DPP) の摂取量を推定した。分析は外海らの方法に準拠した。

2) 病理的観察

採取された精巣はブアン固定し、所定の

方法で病理標本を作成し、化学物質処理による精巣障害性を顕微鏡下で検討した。

3) 血清性ホルモン

化学物質曝露による精巣障害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 (三菱化学ピーシーエルに委託)。

4) PPAR α の誘導

ペルオキシゾームの増殖および脂肪酸 β 酸化系酵素は PPAR α に強く制御されている。投与された化学物質による肝の PPAR α の誘導を確認するために、標的遺伝子産物であるペルオキシゾームおよびミトコンドリアの脂肪酸 β 酸化系酵素の誘導を Western blot 分析により行った。マウスの肝サンプルを電気泳動し、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 thiolase: PT; peroxisomal bifunctional protein: PH; D-type bifunctional protein: DBF に対する抗体、ミトコンドリア β -酸化系酵素抗体として極長鎖アシル CoA 脱水素酵素: VLCAD と trifunctional protein α subunit: TP α , long chain-specific 3-ketoacyl-CoA thiolase: TP β ; に対する抗体、フタル酸エステル類の代謝酵素である CYP4A に対する抗体) を用いて、それぞれの酵素の発現を調べ、脂質代謝と PPAR α の誘導の指標とした。同時に肝の RNA を抽出し、ABI7700 を用いて PPAR α -mRNA も測定した。

酸化ストレス消去系の指標として、カタラーゼの発現を western blot 分析で、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の活性を BIOXYTECH のキットを用いて測定した。

5) 肝および血清のトリグリセライドの測定

DEHP による PPAR α の誘導、これに伴う脂肪酸 β 酸化系酵素の誘導の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、血清は抽出操作なしに、和光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。

3. 研究結果

1) PPAR α 誘導の構造-活性相関

昨年度の結果より DEHP によるマウスの繁殖の低下が PPAR α に関わっていることが明らかとなった。これは PPAR α の誘導の強さが繁殖への影響の一指標となることを示唆する。そこで、一連のフタル酸エステル類とアジピン酸エステルの PPAR α の誘導の強さの構造-活性相関を検討した。PPAR α の誘導は標的酵素蛋白の誘導でみた。表1に示す様に、使用した濃度での DEP による誘導は認められなかった。DBP は弱い誘導剤で、TP α と CYP4A1 の誘導のみが有意であった。誘導は、DBF と VLCAD を除いて、化学物質の分子量が大きくなるにつれ、また疎水性が高くなるにつれ強くなった。最も誘導が強かったのは DEHP であった。検討したアジピン酸エステル(DEHA)も PPAR α を誘導し、その程度は DEHP と同じか、あるいは若干弱かった。DEHA と DEHP はこのようなペルオキシゾーム酵素ばかりでなく、ミトコンドリアの脂肪酸 β 酸化系酵素も誘導した。このようなペルオキシゾーム系酵素、ミトコンドリア系酵素の誘導に対応して PPAR α -mRNA が誘導されており、PPAR α の転写活性化が一連のフタル酸エステルの分子量の増加に応じて起こっていることが推察された。一方、これらの誘導剤は酸化ストレス消去酵素である、カタラーゼや GPx を誘導する事はなく、むしろ低下させていた。これらの結果は使用した PPAR α 誘導剤処理により、肝はより強い酸化ストレスにさらされる可能性を示唆する。

DBP と BBP は血清のテストステロン濃度を低下させたが、他の誘導剤処理による低下は認められなかった。即ち、血清テストステロン濃度への影響は肝の PPAR α 誘導の強さとはあまり関係ないことが明らかとなった。使用した濃度のフタル酸エステル

類およびアジピン酸エステルはマウス精巣に顕微鏡下での明らかな病理的变化をもたらさなかった。使用したフタル酸エステル類およびアジピン酸エステル類はエストラジオール濃度には影響を与えなかった。

2) 2,4-DA, 2,4-DE および NP による PPAR α の誘導と生殖器障害

ddY 系雄マウスを用いて、2, 4-DA, 2,4-DE および NP の PPAR α の誘導と生殖器障害性について3つの投与量を用いて検討した。2, 4-DA と 2,4-DE は量-反応的に PPAR α 標的酵素 (PT, PH, DBF, CYP4A1) を誘導した (表2)。2,4-DA と 2,4-DE の誘導パターンは殆ど同じであった。これらの結果は 2,4-DA が PPAR α のリガンドであることを示すものである。2,4-DA は PPAR α ノックアウトマウス (129/SV) のこれらの酵素を誘導しないので (データ示さず)、2,4-DA は PPAR α のリガンドであることが証明された。これらの結果とは対称的に、NP は検討した酵素群にわずかな影響を与えたのみであり、PPAR α への結合は 2,4-DA や 2,4-DE に比べると、無視出来る程度に小さいことが明らかとなった。使用した化学物質はカタラーゼを誘導する事はなく、むしろこの酵素の発現を低下させる傾向であった。

2, 4DA と 2,4-DE は肝や血清のトリグリセライドに影響を与えなかった。NP の高投与群において肝のトリグリセライドの上昇が認められたが、これは全身状態の悪化が起因していたのかもしれない。

2,4-DE 群において、投与量が増大するにつれ、血清テストステロン濃度が減少したが、2,4-DA や NP 投与後は一定の量-反応関係が認められなかった。高および中程度濃度の 2,4-DE 投与後、マウス精巣において精細管異常が観察されたが、量-反応的な変化ではなかった。

3) フタル酸エステル類の食事からの摂取量

1997 年度国民栄養調査結果を基に、トータルダイエット方式による食品群別にフタル酸エステル類の濃度を測定した。一例で

はあるが、ほとんどの食品群で、測定した5種のフタル酸エステル類の中ではDEHP濃度が高かった。DEHP濃度を食品群別に比較すると、砂糖・菓子類、雑穀・芋類、魚介類で高く、米類及び果実類は検出下限値未満であった。

各食品群別の濃度と一日摂取重量からフタル酸エステル類の食品群別摂取量を算出した。濃度が検出下限値未満の場合、その物質が全く含まれていないとは言いきれないので、検出下限値の1/2の濃度があるものと仮定して摂取量を算出した。フタル酸エステル類の1日当たりの摂取量（各群の合計）はDEHPが他のフタル酸エステル類に比べ圧倒的に多かった。

食品群別にDEHPの摂取量を比較すると雑穀・芋類が最も高く、次いで魚介類群、砂糖・菓子類群の順であり、各群を合計した1日当たりの総摂取量は166 μ g/dayであった。DEP, DPP, DBP, BBPの一日摂取量はそれぞれ、0.94、2.4、8.6、4.2 μ g/dayであり、DEHPよりはるかに少なかった。

4. 考察

一連のフタル酸エステル類およびアジピン酸エステルのPPAR α の誘導と分子量あるいは疎水性との間には良い正の相関関係が得られた。即ち、フタル酸エステル類およびアジピン酸エステルのうち分子量の大きい化学物質ほど、また疎水性が高いほどPPAR α の誘導性が強いといえる。検討したフタル酸エステル類の中ではDEHPが誘導性が最も強く、従って、PPAR α 依存性の毒性はこの化学物質が最も強いかもしれない。DEHPとDEHAは芳香族ジカルボン酸エステルか脂肪族ジカルボン酸エステルの違いである。この2つの化学物質が類似した、あるいは分子量に依存したPPAR α 誘導作用を示すことに興味を持たれる。即ち、この2種の化学物質に関しては、芳香環と脂肪族の構造上の違いはPPAR α の誘導にはあまり関係していないことになる。

2,4-DAも内分泌攪乱作用の疑いがもたれている化学物質である。この物質もPPAR

α 誘導剤であることが判明した。この化学物質のPPAR α 誘導作用をフタル酸エステルやアジピン酸エステルと比較してみた。使用した動物種が異なるために、直接的な比較は出来ないが、PPAR α の誘導は強い印象を受ける。従って、DEHP投与後に見られたPPAR α を介した生殖毒性は2,4-DAにも見られるかもしれない。一方、NPによるPPAR α の誘導は殆どみられず、この化学物質によるPPAR α を介した生殖毒性はみられないであろう。

食品のフタル酸エステル類による汚染はこれらを可塑剤として使用しているプラスチック製品に由来すると考えられ、特にDEHPは塩化ビニル製の手袋、ラップ等との接触により濃度が上昇すると報告されている。本調査でDEHP濃度が高かった雑穀・芋類、砂糖・菓子類は小麦粉を原料とした麺類、パン類、各種和洋菓子等工場加工された食品類を多く含んでいる。これに対し、濃度が低かった米類、果実類は工場調理加工された食品の割合が少ない。このことは、食品中へのDEHPの混入は加工食品の製造工程において衛生管理上使用される手袋など、塩ビ製品に由来する割合が高いことを示唆していると考えられる。

今回のようなトータルダイエットスタディー的な方式によるフタル酸エステル類の摂取量評価の報告例は少ない。一例ではあるが、食品汚染が最も大きいのはDEHPであった。英国MAFFが行ったトータルダイエットスタディー的な方式による調査ではDEHPの推定一日摂取量は平均150 μ g、高濃度摂取者で300 μ gと報告されている。本測定結果は、この平均摂取量とほぼ同レベルであった。今後測定例数を重ねて、摂取量の推定を行う予定である。

5. 結論

一連のフタル酸エステル類およびアジピン酸エステルは分子量に比例してPPAR α を誘導する。2,4-DAもPPAR α 誘導剤である。食事中にはDEHPが含まれている。その他のフタル酸エステル類の含有量は少

ない。

6. 研究発表

論文発表

1) 中島民江 PPAR を介した環境ホルモンによる生殖器障害 細胞 31: 239-242, 1999

Nakajima T, Kamijo Y, Usuda N, Liang Y, Fukushima Y, Kametani K, Gonzalez FJ,

2) Aoyama T. Sex-dependent regulation of hepatic peroxisome proliferation in mice by trichloroethylene via peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). Carcinogenesis 21: 677-682, 2000.

学会発表

第 71 回日本衛生学会総会 (2001 年、福島市) で発表予定

表 1 Effects of phthalates on the PPAR α -related hepatic enzymes

Treatment	m.w	log Pow	PT	PH	DBF	VLCAD	TP α	TP β	CYP4A	PPAR α -mRNA
Control			1.00±0.11	1.00±0.16	1.00±0.08	1.00±0.08	1.00±0.32	1.00±0.11	1.00±0.31	0.80±0.10
Diethylphthalate	222.24	2.38	0.98±0.16	1.02±0.01	1.63±0.40	1.04±0.03	1.32±0.47	1.18±0.18	1.08±0.28	0.96±0.38
Dibutylphthalate	278.34	4.45	1.04±0.26	1.20±0.04	0.92±0.05	0.92±0.07	1.64±0.19 ^a	1.17±0.07	1.51±0.27 ^a	1.11±0.28
Butylbenzylphthalate	312.37	4.59	1.44±0.04 ^a	1.16±0.06	1.43±0.36 ^a	0.95±0.05	1.90±0.18 ^a	1.32±0.06 ^a	1.82±0.11 ^a	1.36±0.29 ^a
Dicyclohexylphthalate	330.42		1.25±0.18	1.08±0.07	1.94±0.43 ^a	0.97±0.04	1.96±0.33 ^a	1.34±0.13 ^a	1.56±0.25 ^a	1.47±0.24 ^a
Diethylhexylphthalate	390.56	7.5	1.59±0.14 ^a	1.59±0.06 ^a	2.14±0.27 ^a	1.22±0.01 ^a	2.60±0.28 ^a	1.73±0.19 ^a	2.69±0.54 ^a	1.54±0.33 ^a
Diethylhexyl adipate	370.57		1.31±0.18 ^{a,b}	1.37±0.07 ^{a,b}	1.71±0.55 ^a	1.34±0.07 ^a	2.67±0.19 ^a	1.78±0.26 ^a	2.24±0.30 ^{a,b}	1.70±0.06 ^{a,c,d}
Correlation ^c			*	*			**	*	**	**
Correlation ^f				*					*	*

^aSignificantly different from control(p<0.05)^bSignificant difference between diethylhexylphthalate and diethylhexyladipate treatments^cSignificantly different from diethylphthalate(p<0.05)^dSignificantly different from dibutylphthalate(p<0.05)^eCorrelation between molecular weight and induction of several enzymes^fCorrelation between log Pow and induction of several enzymes

表2 Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and nonylpheel on the PPAR α -related hepatic enzymes

	PT	PH	DBF	CYP4A	Catalase
2,4-dichlorophenoxyacetic acid					
0mmol/kg	1.00±0.15	1.00±0.06	1.00±0.13	1.00±0.78	1.00±0.03
0.23mmol/kg	1.55±0.15 ^a	1.00±0.18	1.44±0.17 ^a	1.35±0.30	1.05±0.03
0.45mmol/kg	2.42±1.00 ^a	1.38±0.36	1.27±0.17 ^a	3.99±0.71 ^{a,b}	1.14±0.06
0.68mmol/kg	4.40±0.70 ^{a,b,c}	3.14±0.30 ^{a,b,c}	2.03±0.29 ^{a,b,c}	17.61±5.38 ^{a,b,c}	1.16±0.04
2,4-dichlorophenoxyacetate					
0mmol/kg	1.00±0.11	1.00±0.25	1.00±0.28	1.00±0.28	1.00±0.07
0.21mmol/kg	2.66±0.82 ^a	1.08±0.02	1.33±0.23	2.38±0.60 ^a	0.92±0.03
0.43mmol/kg	3.63±0.91 ^a	1.49±0.23 ^{a,b}	1.62±0.17 ^a	3.77±0.95 ^{a,b}	0.87±0.03 ^a
0.64mmol/kg	5.53±0.44 ^{a,b,c}	1.58±0.11 ^{a,b}	2.44±0.32 ^{a,b}	7.21±0.68 ^{a,b,c}	0.98±0.09
Nonylphenol					
0mmol/kg	1.00±0.15	1.00±0.14	1.00±0.09	1.00±0.27	1.00±0.12
0.23mmol/kg	0.85±0.09	1.04±0.07	0.91±0.05	1.09±0.28	0.80±0.08
0.91mmol/kg	1.57±0.44	1.25±0.15	0.75±0.04 ^{a,b}	1.18±0.41	0.69±0.08
2.72mmol/kg	1.54±0.45	1.32±0.12 ^a	0.97±0.05	1.51±0.24 ^a	0.83±0.09

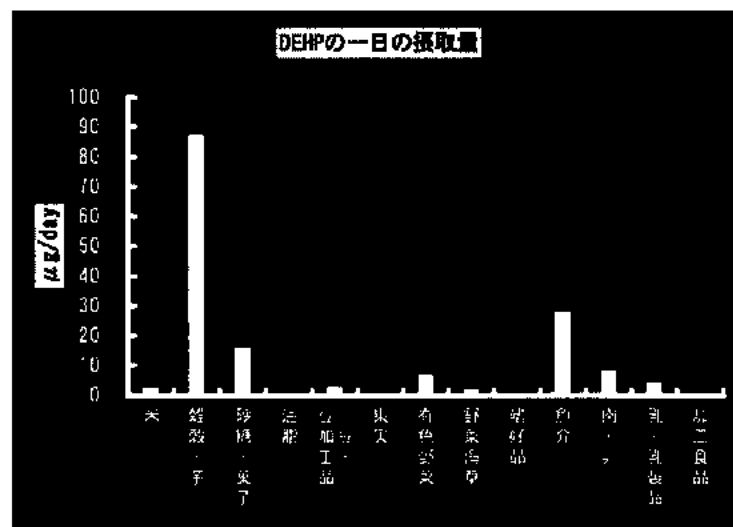
^aSignificantly different from control(p<0.05)^bSignificantly different from low-dose group(p<0.050)^cSignificantly different from medium-dose group(p<0.05)

表3 フタル酸エステル類の食品群別一日摂取量

単位: $\mu\text{g}/\text{day}$

	米	雑穀・芋	砂糖・菓子	油脂	豆・ 豆加工品	果実	有色野菜	野菜海藻	嗜好品	魚介	肉・卵	乳・乳製品	加工食品	総計
DEP	0.22	0.14	0.02	0.01	0.05	0.06	0.05	0.11	0.09	0.06	0.07	0.07	0.00	0.94
DPP	0.22	0.14	0.02	0.01	0.05	1.50	0.05	0.11	0.09	0.06	0.07	0.07	0.00	2.38
DBP	1.94	1.26	0.22	0.08	0.41	0.58	0.43	0.98	0.80	0.50	0.60	0.59	0.20	8.61
BBP	0.82	0.36	1.10	0.15	0.33	0.06	0.20	0.11	0.09	0.59	0.07	0.07	0.24	4.19
DEHP	3.02	87.78	15.42	1.27	3.29	0.91	7.23	2.34	0.93	28.55	8.53	4.66	0.89	165.79

注) 表2において濃度が検出下限値未満の場合は検出下限値の1/2の濃度と仮定して算出した



Reproductive toxicity of endocrine-disrupting chemicals and the mechanism via peroxisome proliferator-activating receptor in relation to the risk assessment
Tamie Nasu (Nakajima), Department of Hygiene, Shinshu University School of Medicine, Lecturer

Key words: phthalates, adipate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, nonylphenol, reproductive toxicity, testosterone, triglyceride, oxidative stress, food contamination

Abstract

- 1) The induction of hepatic PPAR α , a nuclear receptor, by phthalates (diethyl phthalate, DEP; dibutyl phthalate, DBP; butylbenzyl phthalate, BBP; dicyclohexyl phthalate, DCP; diethylhexyl phthalate, DEHP) and an adipate (diethylhexyl adipate, DEHA) was examined with the expression of the target gene products as well as the level of PPAR α -mRNA in SV/129 male mice. DEP dose used could not induce any gene product investigated and the mRNA. The other phthalates were shown to be the inducer of PPAR α , and the strength was dependent on their molecular weight; DEHP was the strongest inducer. DEHA also induced PPAR α , but not so much as DEHP.
- 2) The effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-DA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid methyl ester (2,4-DE) and nonylphenol (NP) treatment on the reproductive organ was examined in relation to the induction of hepatic PPAR α in ddY male mice. 2,4-DA and 2,4-DE induced the nuclear receptor dose-dependently, whereas the induction by NP could be disregarded in comparison to that by 2,4-DA or 2,4-DE. The highest dose of 2,4-DE decreased serum testosterone level. However, no dose-dependent morphological changes in testes were observed.
- 3) The PPAR α inducers used could not induce oxidative stress-scavenging enzymes such as catalase and glutathione peroxidase, but rather lowered, suggesting that mice are exposed to greater oxidative stress after treatment of PPAR α inducers.
- 4) The concentration of phthalates (DEP, DPP, DBP, BBP and DEHP) in the commercial foods was measured, and each daily intake was estimated using total diet study method. Of the phthalates, DEHP was contained most, and the other phthalates were detected with only a marginal content.

3. マウス生殖細胞死への環境毒性物質の影響とその分子機能の解析

研究者 小路 武彦 (長崎大学医学部第三解剖学教授)

研究要旨

平成12年度に於いては、昨年度の検討結果を踏まえ、マウス精子形成細胞アポトーシス誘導へのエストラジオール-3-ベンゾエート (EB)、ジエチルスチルベストロール (DES)、ビスフェノール A (BPA)、並びにジクロロジフェニルジクロロエテン (DDE) 皮下投与の影響をTUNEL法を中心として検索すると共に、アポトーシス誘導の分子機構としてFas/Fas リガンド (Fas L) 系及びBcl-2/Bax系の発現変動を検討した。その結果、EBは濃度依存的に精子形成細胞アポトーシスを誘導し、その際Fas発現の関与が認められた。一方、DES及びDDEはいずれも低濃度で精子形成細胞死を増大させたが、逆に高濃度ではアポトーシス誘導効果を低下させた。BPAは生殖細胞アポトーシスを高濃度で増大させたが、むしろ低濃度では正常に生じるアポトーシスを顕著に抑制した。DESのアポトーシス誘導には、FasばかりでなくBaxの発現の関与が明らかとなった。更に、平成12年10月に内分泌攪乱化学物質問題検討会により選定されたリスク評価優先物質8種に関しても同様の検討を押し進めつつある。妊娠期での環境毒性物質への暴露による胎仔マウスへの影響については、EBとDESを妊娠期投与後、生後2週、4週と6週の雄マウス精巣を検討したところ、生後2週に於いて明らかな精子形成早熟効果を認めた。特に顕著な催奇性と生殖障害を引き起こすDESに注目して、活性酸素障害に対する生殖細胞防御機構への作用をマウス精巣で検討した所、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 及びCu, Zn-スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 活性の顕著な低下を見出した。更に、生殖行動との接点を見出す意味で、マウス脳組織でのG蛋白質 α サブユニット発現へのDESの効果を検討した所、特に海馬で神経系に対し興奮方向へ作用するGq α サブユニットが有意に減少し、抑制方向に作用するGi α サブユニットの増大が認められた。

これらの結果は、各々の環境毒性物質の生殖細胞死誘導の多様な作用点並びに細胞死誘導の分子機構の多様性を示すと共に、毒性作用の違いによる環境毒性物質のグループ化を進める上でこれら分子メカニズム解明への多面的な解析の必要性を示している。

研究協力者 (所属施設名及び所属施設における職名)

菱川善隆 (長崎大学医学部第三解剖学講師)、
和泉伸一 (長崎大学医学部第三解剖学助手)、
石丸忠之 (長崎大学医学部産婦人科学教授)、
佐藤 浩 (長崎大学医学部実験動物施設教授)

進正志 (長崎大学医学部第三解剖学助手)、
近藤宇史 (長崎大学医学部病態生化学教授)、
植田弘師 (長崎大学薬学部分子薬理学教授)、

A. 研究目的

「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」(環境省)でも指摘されているように、内分泌攪乱物質或いは環境毒性物質の作用に関する多くの知見が、科学的な因果関係の直接的証明がないためしばしば一つの可能性として語られている。既に約70種類以上の化学物質が内分

泌攪乱作用が疑われる物質と指摘されており、特にこれらの物質が生殖細胞障害や生殖器系異常を誘発することから、人類に対し世代を越えた深刻な影響をもたらす可能性が高く、それらの危険性の科学的な評価は現在最も急務な内分泌学並びに生殖生物学上の問題である。そこで本研究に於いては、胎仔期から成