

合することが明らかとなった。さらに Scatchard Analysis により、PPAR γ /RXR α ヘテロダイマーのDR1配列への親和性と、PPAR γ /PPAR γ ホモダイマーのPal3配列への親和性はほぼ同等であることが明らかとなった(表3)。

表3. PPAR γ /RXR α , PPAR γ /PPAR γ のDR1およびPal3に対する結合親和性の評価

Receptor	Kd (nM)	
	DR1	Pal3
PPAR γ /RXR α	2.0	7.9
PPAR γ /PPAR γ	—	2.4

2) PPAR γ を恒常的に発現する培養細胞の構築

PPAR γ の作用を解析する目的、およびPPAR γ に対する環境化学物質の影響を検討する目的で、PPAR γ を発現する細胞を構築した。細胞としては、通常条件下では脂肪細胞には分化しない、マウス NIH-3T3 細胞を使用した。この細胞にレトロウイルスベクターを用いて、PPAR γ を恒常的に発現する stable transformant を作製した。この細胞に PPAR γ のリガンドである、BRL49653 を添加すると、脂肪滴を有する脂肪細胞に分化した。このように、PPAR γ リガンドに依存して分化する安定細胞株を確立できた(図4)。

3) PPAR γ 発現細胞における、リガンドの有無による各種発現遺伝子の差異の検討

上記2)において作製した、PPAR γ 発現細胞を用いて、リガンド添加時に発現が変化する遺伝子群を、サブトラクション法により単離した。その結果、リガンド添加により発現が増加する遺伝子と減少する遺伝子を単離できた。いくつかの例を図5に示した。その中に

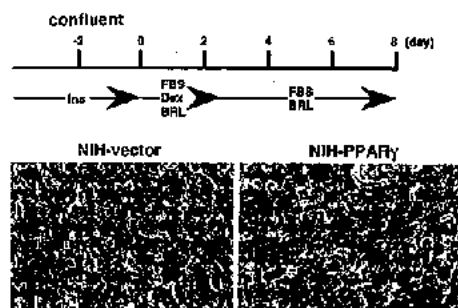


図4. PPAR γ を恒常的に発現するマウス NIH-3T3細胞の作製

リガンド存在下において、分化誘導剤の添加により、脂肪滴を蓄積した脂肪細胞へと分化した

(A) 発現が上昇する遺伝子群



(B) 発現が減少する遺伝子群



図5. PPAR γ 発現細胞における、リガンドの有無による遺伝子群の発現の差異

は未知遺伝子も複数含まれており、既知遺伝子においてもリガンド以外の誘導剤の影響など、発現の変化に与える影響については今後の課題である。

本法により、osteoblast specific factor 3 (OSF-3) が単離された。OSF-3 はリガンド依存的に発現量が増大し、さらにマウス 3T3-L1 細胞の、脂肪細胞への分化過程においても発現が増大するため非常に興味深く、今後の解析が待たれる。

また、上記 PPAR γ 発現細胞と PPAR γ 非発現細胞を用いて、2次元電気泳動法により発現タンパク質の違いについて検討したところ、複数のタンパク質において発現量に差が観察された。今後は差の見られたタンパク質(スポット)について、質量分析計を用いて同定を

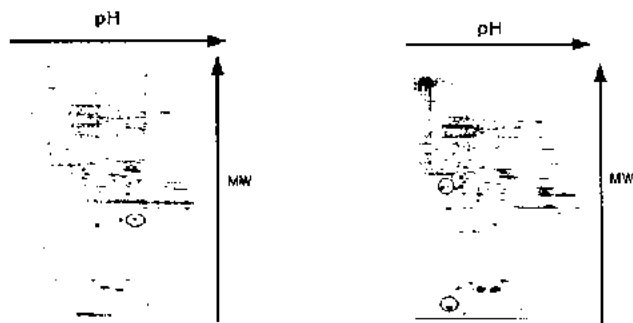
試みる予定である。

4) PPAR γ 発現細胞の脂肪細胞分化に及ぼす環境化学物質の影響および各種遺伝子発現の変化の検討

上記 2) において作製した、PPAR γ 発現細胞を用いて、リガンドの代わりに環境化学物質を添加し、脂肪細胞への分化の有無を観察した。化学物質として、トリブチルスズ、4-オクタフルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、ベンゾフェノン、オクタクロロスチレン、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、ノニルフェノールの 8 種類を用いた。その結果、PPAR γ のリガンドである BRL49653 と比較してはるかに弱いものの、ベンゾフェノン、ノニルフェノールにおいて、わずかながら脂肪細胞への分化が観察された。また、ベンゾフェノンを添加した時には、脂肪細胞分化のマーカである、aP2 の発現が培養の経過とともにわずかながら増加した。さらに、ノニルフェノール添加群と対照群から調製した核抽出液を用いて、2 次元電気泳動法によるタンパク質の発現パターンの変化を解析した。その結果、明確な差は見られないものの、いくつかのタンパク質において、発現の変動が観察された (図 6)。本稿で得られた結果は、差が僅差であることから、最終的な結論を得るためにはより詳細な解析が必要である。

D. 考察

PPAR γ は、通常 RXR α とヘテロダイマーを形成し、DR1 に結合するが、RXR α が少ない条件下では、PPAR γ /PPAR γ ホモダイマーが形成され、エストロゲン受容体 (ER) が認識する DNA 塩基配列と同じパリンドローム構造を認識することが明らかになった。RXR α は、他の核内受容体ファミリーの多くに共通して結合して機能しているため、RXR α が少なくなった状態



分化誘導後の核抽出液：化学物質濃度は 5×10^{-7} M

図6. 2次元電気泳動法によるタンパク質の発現パターンの変動

では、PPAR γ /PPAR γ ホモダイマーが ER と拮抗する可能性も予想された。すなわち、細胞内における RXR α の存在量によっては、PPAR γ が ER の機能に影響を与える可能性が示唆された。今回の検討では、コファクターの存在について全く考慮していないため、その存在比やコファクターの種類については今後検討する必要がある。

また、環境化学物質の PPAR γ を介した内分泌攪乱作用の有無を検討するため、通常条件では脂肪細胞に分化できないマウス NIH-3T3 細胞に PPAR γ 発現遺伝子を導入し、恒常的に PPAR γ を発現する安定細胞株を作製した。この細胞株に PPAR γ のリガンドである BRL49653 を添加すると脂肪細胞に分化した。本株を用いて、数種類の環境化学物質について、予備実験的に脂肪細胞分化への影響を検討したところ、ベンゾフェノン、ノニルフェノールにおいて、わずかながら脂肪細胞への分化誘導作用が観察された。また、ノニルフェノール添加群と対照群では、その核抽出液中のタンパク質群の発現が変動していることを示唆する結果が 2 次元泳動の結果より推察された。しかし、その作用は非常に弱いことから、今後さらに詳細な検討が必要と思われた。

E. 結論

- 1) RXR α の存在量により、PPAR γ の DNA への結合配列は変化し、ER と同じ配列を認識することが明らかとなった。
- 2) 恒常的に PPAR γ を発現するマウス安定細胞株を作製した。
- 3) PPAR γ 発現細胞を用いて脂肪細胞への分化に対する環境化学物質の影響を検討したところ、ベンゾフェノンおよびノニルフェノール添加により、わずかな分化誘導が観察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okuno, M., Arimoto, E., Ikenobu, Y., Nishihara, T., and Imagawa, M. (2001) Dual DNA-binding specificity of peroxisome proliferator-activated receptor γ controlled by heterodimer formation with retinoid X receptor α . *Biochem. J.*, 353: 193-198.

2. 学会発表

奥野正顕、有元絵美、池信由紀子、西原 力、今川正良、PPAR γ の活性化により発現が誘導される cDNA の単離、第 23 回日本分子生物学会年会、2000.12. 神戸

G. 参考文献

1. Tontonoz, P., et al., (1994) mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Develop.*, 8: 1224-1234.
2. MacDougald, O. A., and Lane, M. D., (1995) Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Ann. Rev. Biochem.*, 64: 345-373.
3. Mangelsdorf, D. J., et al., (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83: 835-839.
4. Rosen, E. D., et al., (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Develop.*, 14: 1293-1307.

5. Kersten, S., Desvergne, B., and Wahli, W., (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, 405: 421-424.

6. Juge-Aubry, C., et al., (1997) DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. *J. Biol. Chem.*, 272: 25252-25259.

Study on the effect of the endocrine disrupting chemicals on adipocyte differentiation through peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)

Masayoshi Imagawa

Department of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Nagoya City University

Professor

Key Word: nuclear receptor, peroxisome proliferator-activated receptor γ ,
adipocyte differentiation, DNA-binding specificity

Abstract:

The peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) is a member of the steroid/thyroid nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcription factor. PPAR γ forms heterodimer with the retinoid X receptor α (RXR α). By using the method of polymerase chain reaction-mediated random site selection, the DNA sequence preferences for PPAR γ binding were examined. Interestingly, we have demonstrated that PPAR γ has dual DNA-binding specificity; binding to both direct repeat of two hexanucleotides spaced by one nucleotide (DR1) motif and palindrome with three bases spacers (Pal3) motif. Pal3 sequence is a target sequence of estrogen receptor. Therefore, it seems that the DNA-binding specificity of PPAR γ could be altered by the heterodimer formation with RXR α and in some cases PPAR γ binds to estrogen receptor binding site and influences estrogen function.

We transformed PPAR γ to mouse NIH-3T3 cells, which does not differentiated to adipocyte, and established the stable transformant which constitutively expresses PPAR γ . This transformant differentiates to adipocyte in the existence of the ligand such as BRL49653. Using this transformant, the effect of endocrine disrupting chemicals on adipocyte differentiation was determined, and the differences of patterns of expressing protein were also studied by two-dimensional gel electrophoresis.

8. 生殖毒性の早期マーカーとしての神経内分泌動態と 次世代影響に関する研究

研究者 岸 玲子(北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野教授)
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)
片倉洋子(北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野)
梅村朋弘(北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野)
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)

研究要旨

近年内分泌攪乱化学物質問題が重要視されているため、環境化学物質暴露による神経内分泌物質の動態と、生殖毒性の発現について知見を得ることを目的とした。疫学調査で女性労働者の月経障害や低体重児出産などの報告もあることから、有機溶剤スチレンモノマーを使い、本年度はスチレンモノマー暴露による神経内分泌動態（ホルモン変化）について検討を行った。その結果、予備的データではあるが、比較的低濃度（100ppm）で短期間（2週間）の暴露でもラットのプロラクチンレベルを上昇させ、雌雄ともに LH に作用することが認められた。このことはプロラクチン、LH はスチレンモノマーによる健康影響の指標としても有効と考えられる。また、同時に生殖毒性を考える際に重要な基礎的な実験としてスチレンモノマー代謝酵素の妊娠時と非妊娠時の差、雌雄差、週令による差の検討を行った。スチレンモノマー代謝酵素活性は成熟ラットでは雌雄による性差、週令による差が見られ、スチレンモノマーの薬物代謝動態が妊娠中は非妊娠時より酵素活性が低くなっていた。幼若期の雄では酵素活性が全く認められなかった。今回の内分泌動態の変化、薬物代謝酵素活性の妊娠・非妊娠時の差についての実験結果から次世代影響を引き起こす要因となるメカニズムについての一端を明らかにした。

研究協力者

那須民江（信州大学医学部衛生学講座講師）

A 研究目的

スチレンモノマーの産業分野での用途の広さ、また日常的にも食品用容器とし

ての使用量の多さにともない、スチレンモノマーの取り扱い作業者の数も多い。最近では女性労働者の進出により、妊娠

中でも職場で働く女性も増加する傾向にある。スチレンモノマーは変異原性や催奇形性についての疑いもあり、疫学でも月経障害などの影響について検討されている。生殖への影響を考える上で生殖を司る上位の中樞である神経内分泌動態と血中ホルモンの変化、さらには雌雄による代謝能の差、妊娠・非妊娠時の差の変化を知ることは重要である。本年度は昨年度の次世代影響実験のデータを裏付ける基礎的検討として、スチレンモノマー曝露による血清中のホルモン動態の変化を観察するとともに、成熟ラットと同じような活性が低週齢でも認められるか、性差がみられるのか、また、妊娠中におけるスチレンモノマーの代謝酵素活性が非妊娠時と異なっているかについて *in vitro* で検討を行った。

B 研究方法

1) 内分泌動態の変化

動物は 8 週齢の雌系ラットを各群 8 匹ずつ用いた。スチール製の吸入暴露チャンバーを用い、100ppm スチレンモノマーを 9:00~17:00、8 時間/日、2 週間曝露した。餌、水は暴露中も自由摂取とした。2 週間の曝露後、直ちに採血し、血漿成分を分離して、血漿中のプロラクチン(PRL)、黄体形成ホルモン(LH)、成長ホルモン(GH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)レベルを、酵素結合免疫測定法(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)で測定した。

皮下投与群は 8 週齢雌雄ラットを用い、皮下連続投与 (Alzet 浸透圧ポンプ背中央部皮下埋め込み、10mg/kg) を 1 週間行

い、採血をした。吸入暴露群と同じように、PRL、LH、GH、TSH について ELISA で測定した。

2) スチレンモノマー代謝における性差、週令差、妊娠による代謝酵素活性の変化

新生仔として (0 日、誕生後 12 時間以内)、離乳直後 (誕生後 21 日目)、および 18 週目成熟ラットを使用した。妊娠ラットは、プラグ確認日を妊娠 0 日とし、各妊娠時期として妊娠中期は妊娠 10 日目、妊娠後期は妊娠 21 日目とした。各週齢と各妊娠日にそれぞれ雌雄共にと殺を行い、肝と肺を切除し液体窒素中で凍結し、ミクロソームの調整に用いるまで -80℃ で保存、各群 5 匹、または 7 匹を試料とした。肝臓は新生仔ラット以外は 1 固体ごとに肝重量の 3 倍 1.15% KCl 溶液中でホモジナイズし、10,000g×10 分で冷却遠心を行い、沈査を 105,000g×60 分で遠心をした。調整したミクロソーム画分は -85℃ で酵素アッセイまで凍結保存を行った。ミクロソーム蛋白は Lowry et al (1951) の方法で測定した。チトクローム P450 量の測定は (Omura & Sato 1964) の方法で行った。

酵素活性アッセイ：肝のスチレンモノマー代謝酵素活性はミクロソーム画分にスチレンモノマーを加えて、代謝物スチレングリコールの生成量の測定を行った。スチレンモノマー基質は 0.085mM (low-K_m 酵素用 P450IIE1)、1.85mM (high-K_m 酵素用 P450IIC11/6) 濃度を加えた。薬物代謝酵素活性の測定はバイアルー平衡法 (Sato & Nakajima 1979) でおこなった。

モノクロナール抗体反応：性、年齢、妊娠期間によるスチレンモノマー代謝変

化と薬物代謝酵素 P450 との関係はモノクロナール抗体を使用して行った。今回使用したのは anti-P450IIC11/6 MAb (clone 1-68-11)、anti-P450IIE1 MAb (clone 1-91-3)。

統計解析は ANNOVA、t-test、paired T-test を行った。

(札幌医大動物実験倫理委員会、北海道大学倫理委員会の指針に従って実験を行った)

C 研究結果

1) 内分泌動態の変化について

吸入暴露群では雌のみ曝露したが、PRL レベル、LH レベルともに有意な増加を示した。TSH、GH レベルでは有意差は見られなかった。

皮下投与群では、雄で LH レベルが有意に増加し、TSH が有意に減少した。一方、雌では、LH レベルと GH レベルが有意に増加した。雌雄ともに PRL の変化は見られなかった (表 1)。

2) スチレンモノマー代謝における性差、週令差、妊娠による代謝酵素活性の変化

①ミクロソーム蛋白量と P450 量の性差、週令差 (表 2、表 3)；3 週令 (21 日目) ではミクロソーム蛋白量は雄で雌に比較して有意に多かった。チトクローム P450 量に差は見られなかった。しかし成熟ラット (18 週令) ではミクロソーム蛋白量に雌雄間で差がなく、チトクローム P450 量が雄で多く有意であった。18 週令の成熟ラットでは明確にチトクローム P450 量に性差が現れた。

週令差について、雄では 3 週令 (21 日目) に比べ 18 週令 (成熟ラット) でミ

クロソーム蛋白量、チトクローム P450 量が有意に増加した。新生仔では全く検出できなかった。雌ではミクロソーム蛋白量は成熟ラット (18 週令) と若令ラット (新生仔、3 週令) の差は有意であった。チトクローム P450 量は 21 日目で成熟ラットと同じレベルであったが新生仔ラットでは少なかった。

妊娠に伴う変化を見るとミクロソーム蛋白量については妊娠各期で大きな変化は見られなかったが、チトクローム P450 量は妊娠後期 (妊娠 21 日目) は妊娠前期、妊娠中期 (妊娠 10 日目) と比べて有意に減少していた (表 4)。

②スチレンモノマーの P450 代謝酵素活性についてスチレングリコール生成量は 18 週令の成熟ラットで性差がみられ、雄のほうが有意に高い活性があり、成熟ラットは 3 週令ラットに比べ、倍近かった。雌では週令による差は見られなかった。しかし妊娠後期になると有意に非妊娠時より低い活性であった (表 5)。

③モノクロナール抗体によるスチレンモノマー代謝抑制 (表 6)；スチレングリコール生成抑制の割合について求めた。抗 P450IIC11/6 モノクロナール抗体で処理をした場合、P450IIC11/6 は、特に雄で影響を強く受け、成熟ラット (18 週令) で未熟ラットに比べ、有意に強く抑制された。また、雌では妊娠後期 (妊娠 21 日目) で有意に減少していた。P450IIE1 は 3 週令では雌雄とも同程度発現しており、雄 3 週令で 60%、雌 3 週令で 66% の抑制が見られた。その後雄では減少しているが雌では減少程度は小さく、妊娠後期で発現量は減少した。

D 考察

1) 内分泌動態の変化について

Bergamaschi (1996) らの疫学的な報告によると、スチレンモノマーを暴露された労働者では、プロラクチンレベルが有意に増加していた。Mutti (1998) からも同様の報告をしている。我々の動物実験で実際に 100ppm /日、2週間曝露でプロラクチンレベルが有意に増加し、過去の疫学的報告を裏付ける結果となった。また、全てのスチレンモノマー暴露群、雌雄の差なく、LH の増加が認められた。つまり、いわゆる、エストロゲン分泌を調整する LH (黄体形成ホルモン) に作用することで内分泌系に影響を及ぼす可能性が考えられる。

今後の課題として、

1. 今回は匹数が1群8匹と少なく予備的実験であったため、匹数を増やして検討する必要がある。暴露濃度も一点 (100ppm) のみの測定であったので、暴露濃度を変え、神経内分泌ホルモン系への影響を生じない閾値を推定するための用量反応関係も観察する。
2. プロラクチンや LH 上昇の機序やプロラクチン抑制作用があるといわれるドーパミン、GABA についても検討し、スチレンモノマーが神経細胞の構造や生化学的にどのような変化をおよぼしているかを明らかにする。具体的には海馬、視床下部、脳下垂体でのドーパミンなどの神経伝達物質の定量、ホルモン産生細胞、受容体の発現を細胞への抗体染色を行い MCID で定量的に検討を行う。
3. 生殖器官、機能そのものへの影響、特に、精巣重量、子宮重量、精子数、精

子形態、交尾率、着床率、妊娠率などの測定と各組織の形態学的変化を免疫組織染色を用いて、蛍光顕微鏡下で観察する。
4. 同時に重要なことは妊娠ラットに曝露した場合、母親の神経内分泌ホルモン系の変化が胎児にどのような組織学的、解剖学的 (停留精巣、尿道下裂など)、神経内分泌的な変化を生じさせるかについても検討しなければならない。

2) スチレンモノマー代謝の性差、週令差、妊娠による代謝酵素活性の変化

昨年度のスチレンモノマーの妊娠中暴露による生殖、胎仔への影響検討ではスチレンモノマー高濃度暴露で次世代影響を認めた。大抵の動物では肝ミクロソーム酵素活性のレベルは発達段階によって異なり未成熟な時期では活性は低い、しかし生後急速に増加し、外来性化学物質に対する代謝も行われる。チトクローム P450 はその isozyme によっては性特異性をもち、発達に伴って調整されている。スチレンモノマーの場合も酵素活性は未成熟ラットで低く、その後活性が高いのが認められた。今回の実験からこれは雄特異的チトクローム P450 IIC11/6 の発現によるものと見られる。18週齢では未熟期の数10倍の誘導がみられ、また雌では雄よりも18週令では低い発現量であった。今回スチレンモノマーで認めた性差は芳香族炭化物、トルエンで見られたが、トリクロールエチレンでは認められていない。(Nakajima 1992) このような性差は雄特異的チトクローム P450 IIC11/6 の分子種に対する親和性の違いによる体内分布によると考えられる。こ

の分子種は性ホルモンの代謝にも関連していることから、今後、性ホルモン動態との関連も検討する必要がある。

妊娠にともなう代謝酵素誘導への影響についてはまだそのメカニズムはよく解明されていない。また、P450IIE1は性差による影響はそれほど受けていなかった。しかし、妊娠後期では発現量が減少し、酵素活性が低かった。P450isozymes全体が妊娠にともなって減少するといわれているが、妊娠のような身体的要因が明らかにスチレンモノマーなどの炭化水素の代謝に影響を与えることから同じ環境濃度下の曝露でも雄と雌あるいは妊娠時・非妊娠時では異なる。従って、胎子への影響は成熟動物（雄・雌それぞれ）とは異なる影響、強さを考える必要があると思われる。このことは次世代影響を考える上で重要である。

E 結論

- ・スチレンモノマーは、比較的低濃度（100ppm）で短期間（2週間）の曝露でもラットのプロラクチンレベルを上昇させる。スチレンモノマー曝露は雌雄ともにLHに作用する。スチレンモノマーによる健康影響の指標としてプロラクチン、LHは有効と考えられる。
- ・スチレンモノマー代謝酵素活性は成熟ラットでは雌雄差が見られた。チトクローム P450IIC11/6 は成熟雄では雌より活性が高かった。
- ・スチレンモノマーの薬物代謝動態が妊娠中は非妊娠時とは異なり、酵素活性が減少していた。

参考文献

- Bergamaschi E. et. al Peripheral markers of neurochemical effects among styrene-exposed workers. Neurotoxicology: 753-9, 1996
- Mutti A. et. al Exposure to hydrocarbons and renal disease: an experimental animal model. Ren Fail :369-85, 1999
- Nakajima et.al Sex-, age- and pregnancy-induced changes in the metabolism of toluene and trichloroethylene in rat regulation of cytochrome P450IIE1 and P450IIC11 content. J.Pharm. Exp.Thera.: 869-74, 1992

F 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 片倉洋子；第71回日本衛生学会 総会ワークショップ「衛生学における生殖毒性研究の現状と展望」 2001年4月27～30日（福島）（予定）
- 2) 梅村朋弘、倉橋典絵、片倉洋子、佐田文宏、岸玲子；第4回環境ホルモン学会 2001年（予定）