

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。

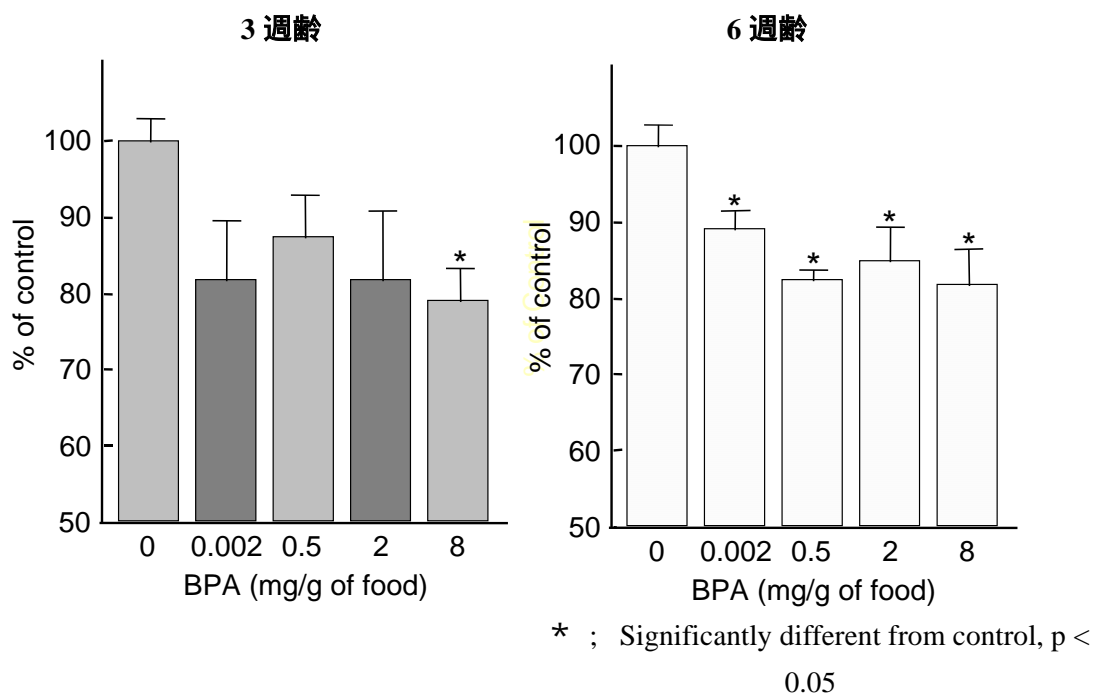


図 2 胎仔期・乳仔期に BPA の暴露を受けたマウスの脳内 DA 量の変化

(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 [^3H]-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、[^3H]-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。

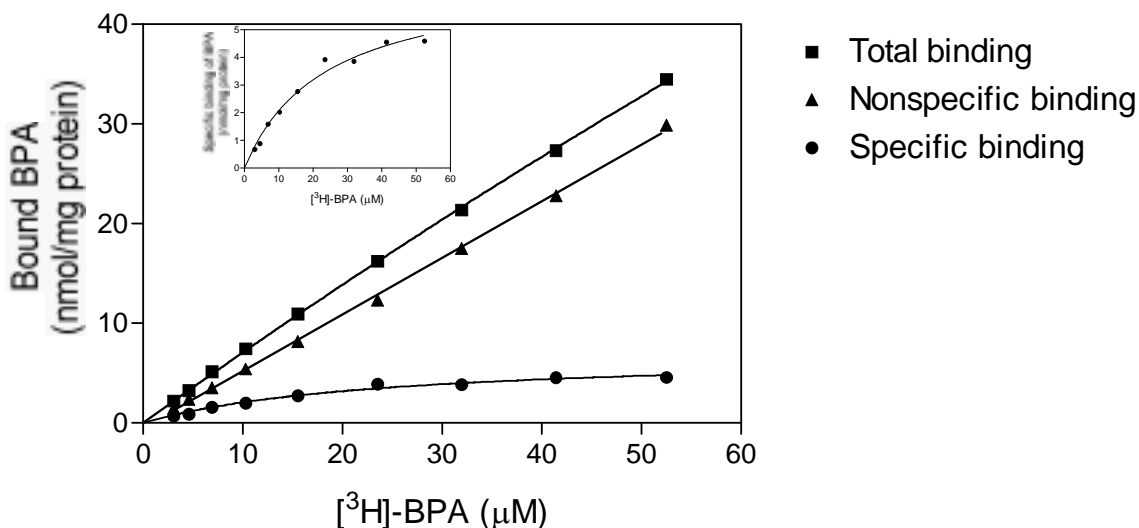


図3 ラット脳 P2 画分における³H]-BPA の結合性

(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。

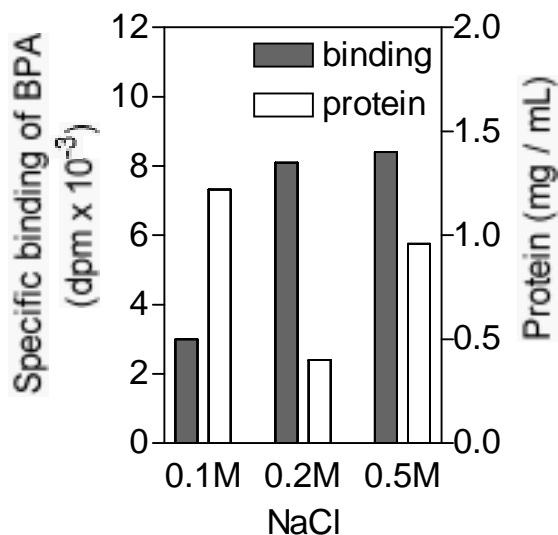


図4 Whatman DE52 による陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

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。

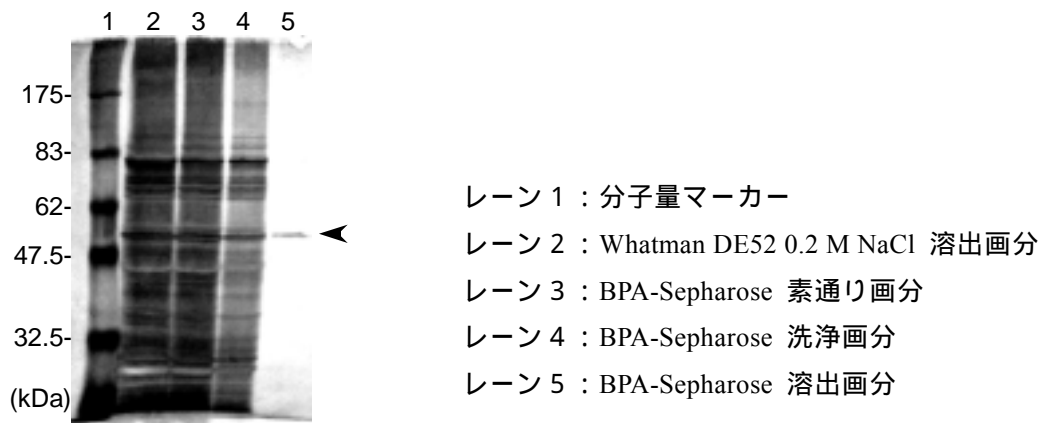


図 5 BPA-Sepharose アフィニティーカラムクロマトグラフィーによって精製されたタンパク質の SDS-PAGE 分析

(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。

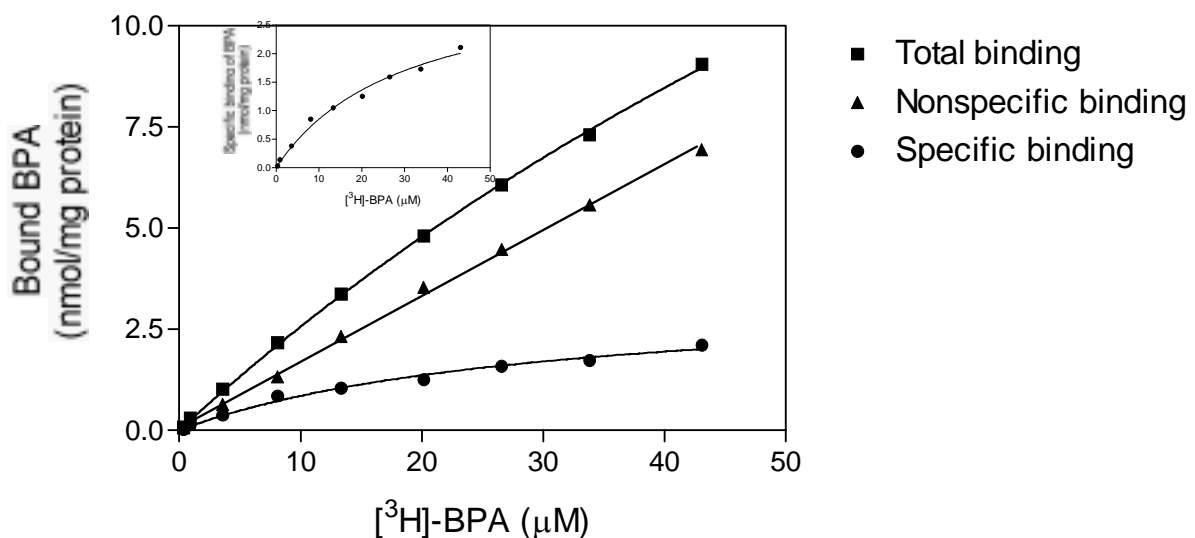


図 6 His-tag 融合 PDI に対する $[^3\text{H}]$ -BPA の結合性

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 (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 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)。

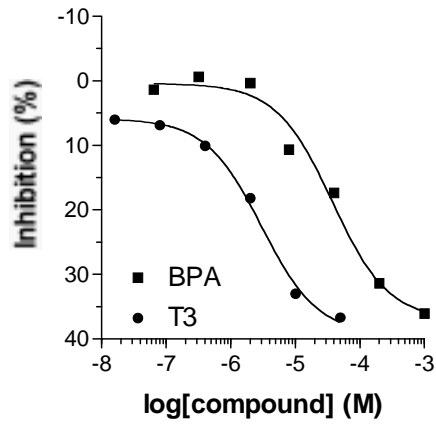
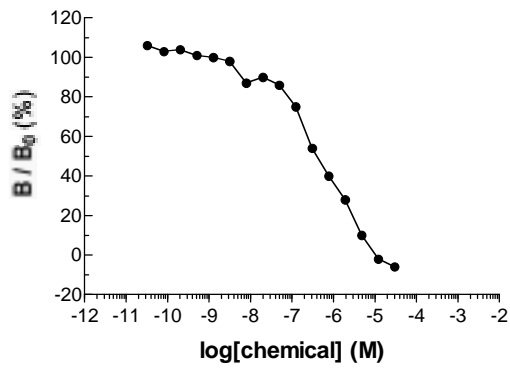


図7 His-tag 融合 PDI に対する [³H]-BPA の結合性

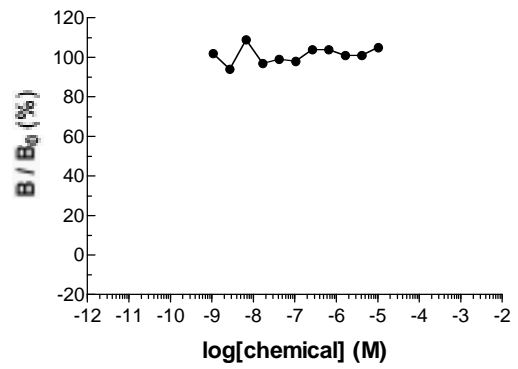
3 . PDI に対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害試験

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。T₃ 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。

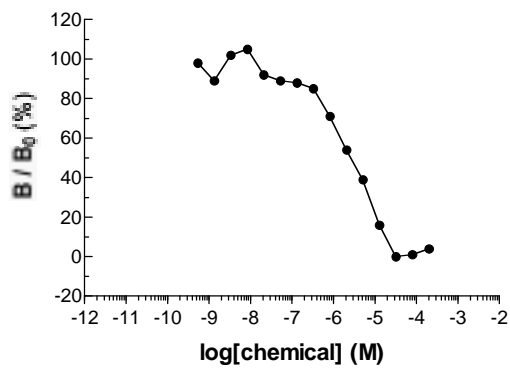
3,5,3'-Triiodothyronine



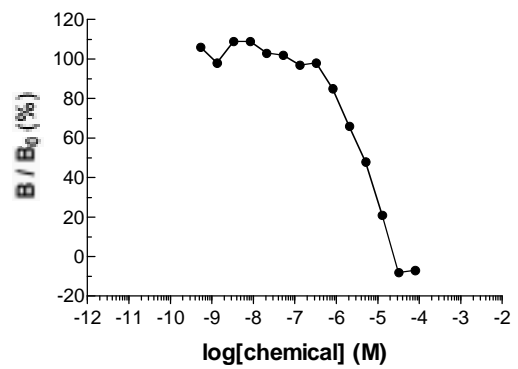
Tributyltin



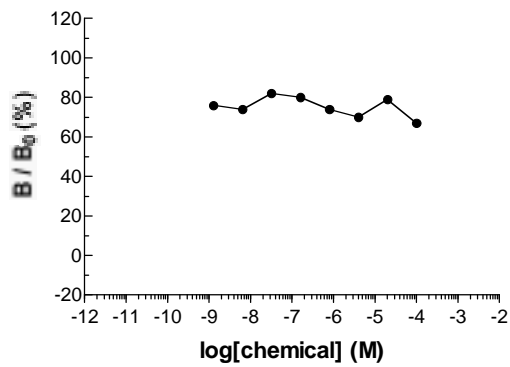
4-Octylphenol



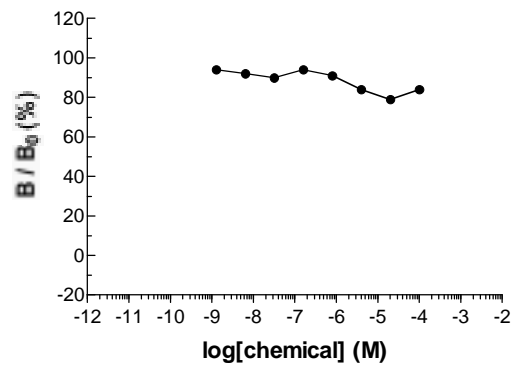
Nonylphenol



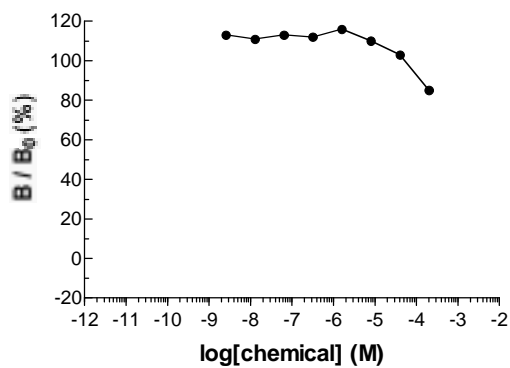
Dibutyl phthalate



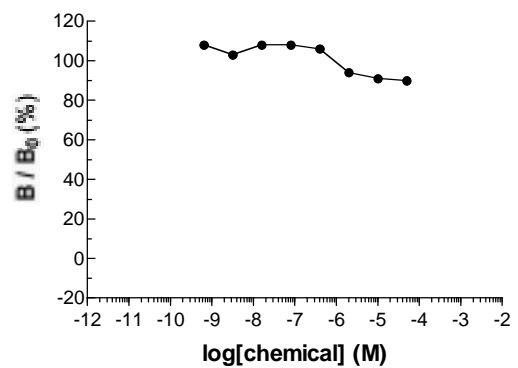
Octachlorostyrene



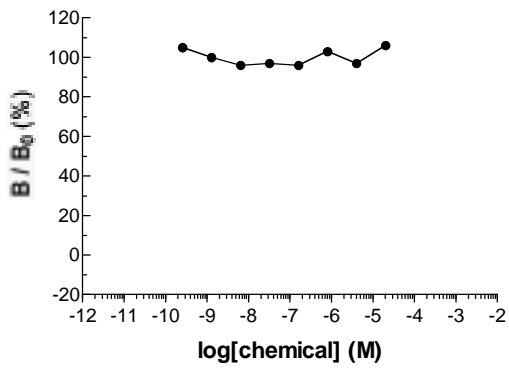
Benzophenone



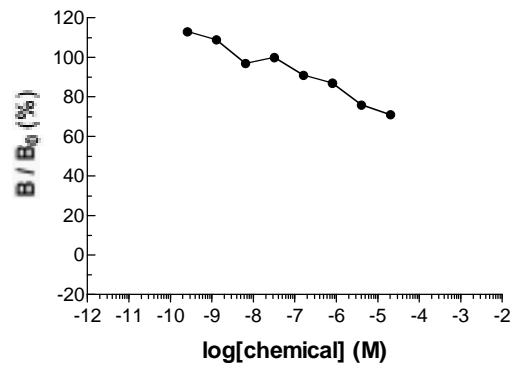
Dicyclohexyl phthalate



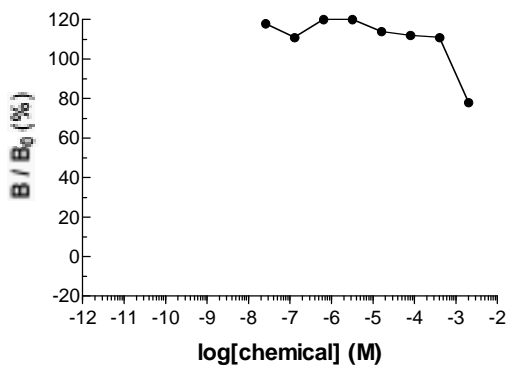
Diethylhexyl phthalate



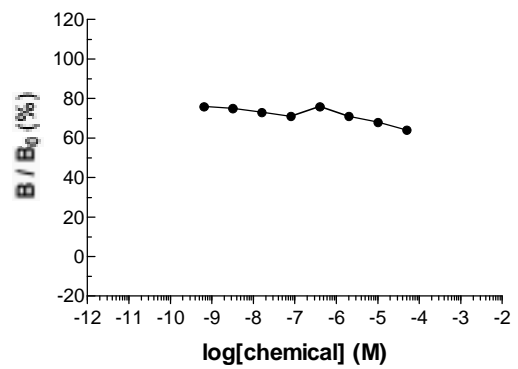
Butyl benzyl phthalate



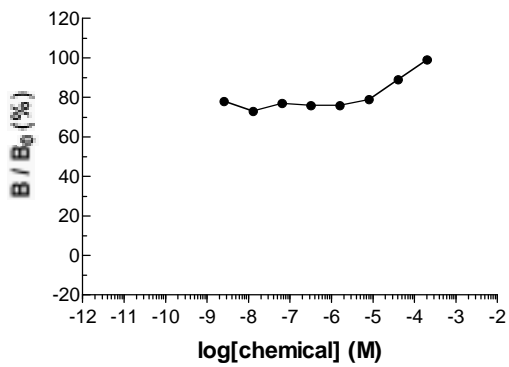
Diethyl phthalate



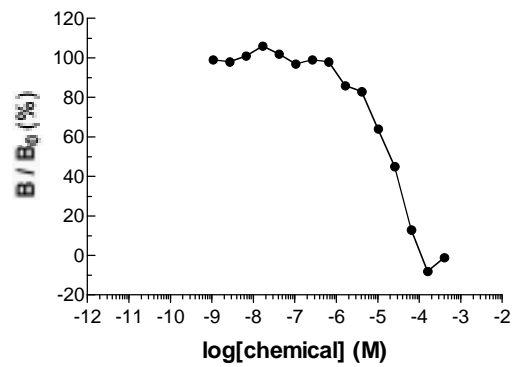
Diethylhexyl adipate



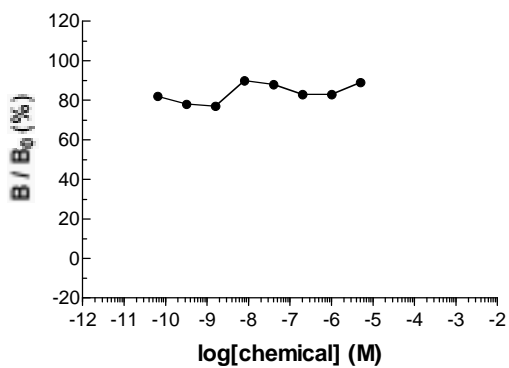
Triphenyltin



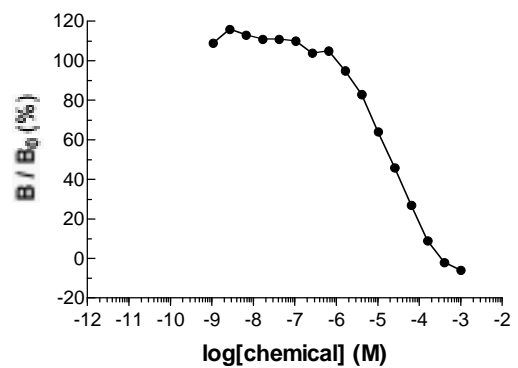
Pentachlorophenol



AMITROL



Bisphenol A



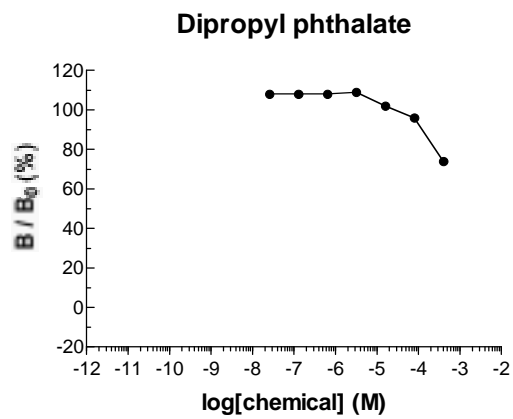
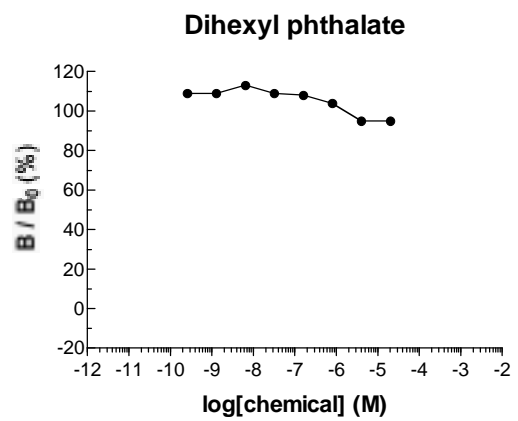
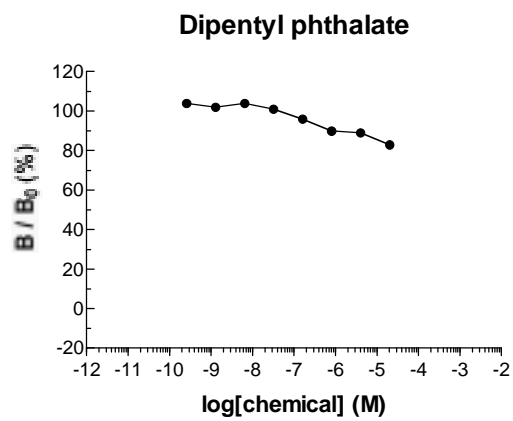
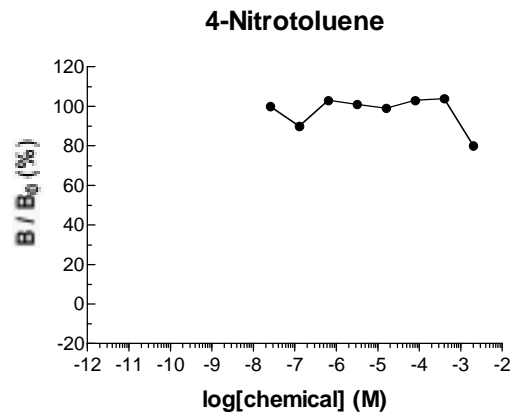
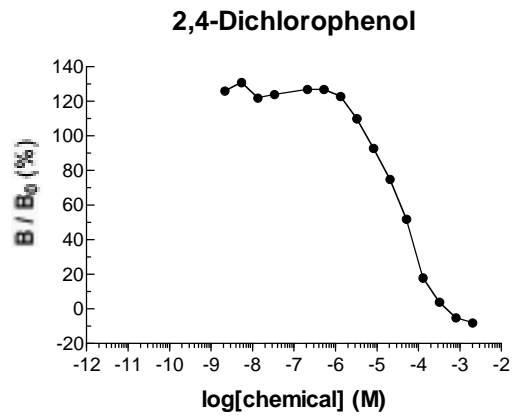
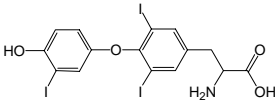
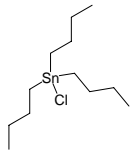
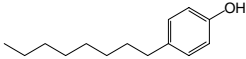
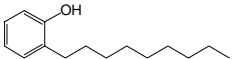
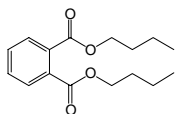
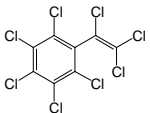
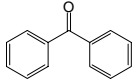
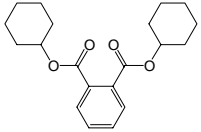
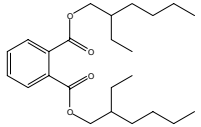
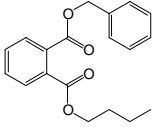
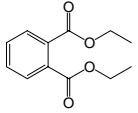
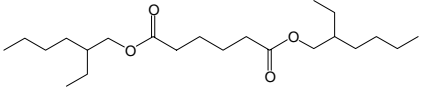
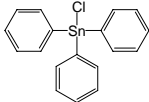
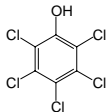
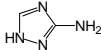
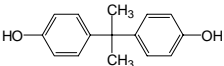
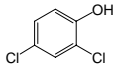
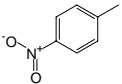
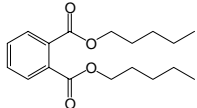
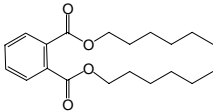
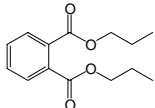


図8 His-tag 融合 PDI に対する T₃ の結合阻害性

試験した化合物の構造式、および 50% 阻害濃度 (IC₅₀) 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 T₃ の結合阻害

化合物名	構造式	IC ₅₀
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)₁₂₋₁₈ 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'-TCATGGGAGCCGTCAACAC-3';
- HMG-CoA synthase: forward primer: 5'-TGTGGCACCGGATGTCTTT-3',
reverse primer: 5'-GACCAGATAACCACGTTTCTTCAA-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_{scc} (CYP11A): forward primer: 5'-CCATCAGATGCAGAGTTTCCAA-3',
reverse primer: 5'-TGAGAAGAGTATCGACGCATCCT-3';
- 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ 5 β -4-isomerase (3 β -HSD):
forward primer: 5'-GGAGGCCTGTGTTCAAGCAA-3',
reverse primer: 5'-GGCCCTGCAACATCAACTG-3';
- cytochrome P450₁₇ (17 α -hydroxylase/C₁₇₋₂₀ lyase CYP17):
forward primer: 5'-CCATCCCGAAGGACACACAT-3',
reverse primer: 5'-CTGGCTGGTCCCATTTCATTT-3';
- 17 β -HSD: forward primer: 5'-CAACGATTCCTCCTGACACGAT-3',
reverse primer: 5'-GCTGATGTTGCGTTTGAGGTAA-3';
- PPAR α : 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_{sc} (CYP11A), 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ 5 α -4-isomerase (3 β -HSD Type I), cytochrome P450_{17 α} 17 α -hydroxylase/C₁₇₋₂₀ lyase (CYP17), and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketoreductase (17 β -HSD Type III)のmRNA 量を測定した。CYP11A, 3 β -HSD, および 17 β -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 α 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 α -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 β -HSD, 17 β -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 α -hydroxylase と C₁₇₋₂₀ 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関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。