

連のフタル酸エステル類による PPAR α の誘導を検討し、フタル酸エステル類の PPAR 誘導に対する構造-活性相関を検討した。

2-(2) 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。雌雄の野生型 SV/129 マウス (Wild-type 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ながら飼育された。

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。

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 (三菱化学ビーシーエルに委託)。

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 を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 thiolases, 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 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。

2-(3) 研究結果

1) PPAR α 標的遺伝子発現の誘導に対する構造-活性相関

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 2-1 と図 2-1 (コントロール群における発現を 1.0 とした) 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(データ示さず)。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(データ示さず)。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。

2) フタル酸エステル類の血清テストステロン濃度への影響

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(図 2-2)。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-(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、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 PPAR α の誘導性は DEHP 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 DOA 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与していないことになる。

3. DEHP の uncoupling protein (UCP) への影響

DEHP 曝露による胎仔、新生仔の生存率の低下が UCP 誘導によるエネルギーの消費と関係があるかどうか検討した。117~19 日齢の胎仔と 2 日齢の新生仔の褐色脂肪を採取し、速やかに RNA を抽出した。定量リアルタイム PCR 法で、UCP1 mRNA の発現量を測定した(図 3-1)。新生仔の UCP1 の発現は DEHP 曝露の影響をうけることはなかったが、胎仔の UCP1 は 0.05%DEHP 投与によって発現量が増加する傾向があった。

4. 内分泌かく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-(1) 要旨

フタル酸ジブチル (DBP)、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) 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 と DEHA であった。DEHP と DEHA は CYP17-mRNA を抑制したが、DBP はほとんど影響

を与えなかった。DEHP,DEHA 曝露によるテストステロン濃度の低下には、CYP17 の遺伝子発現が関与しているかもしれない。

4-(2) 目的

外因性内分泌攪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。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、定量リアルタイム 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定量リアルタイム 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攪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。

4-(3) 方法

1) 実験動物

動物実験は名古屋大学大学院医学研究科附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、フタル酸ジブチル (DBP)、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 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 を定量リアルタイム 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), hyaluronidase (Sigma, 1mg/ml), BSA (Sigma, 1mg/ml)を含む 25mM HEPES buffer (Naquarai.; 20ml)にて震盪 (20min; 80cycle/min; 34°C)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 Solt 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、3β-hydroxysteroid dehydrogenase による組織染(Steinberger ;1966)を行ったところ、およそ

80% が 3 β -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 Ambion 社製 RNAlater に浸し、単離するまで-20°C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 technologies 社製 SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit を使い、Oligo(dT)₂₀ プライマーで合成した。

4) PPAR α -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 Perkin-Elmer 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 α 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 α 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 technologies 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'-GACCAGATACCAGTTCCTTCAA-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'-AGTTTCGTGGCACTGCATAAGC-3',
reverse primer: 5'-GCTGCCATTCTCTCCTCCTA-3';
- cytochrome P450scc (CYP11A): forward primer: 5'-CCATCAGATGCAGAGTTTCCAA-3',

- reverse primer: 5'-TGAGAAGAGTATCGACGCATCCT-3';
- 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase (3 β -HSD):
forward primer: 5'-GGAGGCCTGTGTTCAAGCAA-3',
reverse primer: 5'-GGCCCTGCAACATCAACTG-3';
 - cytochrome P450_{17 α} : 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 μ l 中に最終濃度 1 \times 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、50 $^{\circ}$ C で 2min, 95 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベーションをした。引き続き 95 $^{\circ}$ C で 15 sec、60 $^{\circ}$ C で 1 分間のサイクルを 40 回行った。

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トロン社 (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) 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、光顕下で観察した。

4-(4) 結果

1) 血清テストステロン濃度

DEHP、DEHA 曝露は有意に血清テストステロン濃度を減少させたが、DBP は影響を与えなかった (図 2-2 を参照)。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 (図 4-1)。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 処理によつ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。これらのプ

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。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。

4-(5) 考察

テストステロンはほとんどがライディッヒ細胞で産生され、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、DEHP と DEHA は CYP17 にのみ影響を与えていた。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)。

DEHP と DEHA 投与の場合、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。これらのプラスチック可塑剤は PPAR α のリガンドであるので、PPAR α 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。

5. DEHP 代謝と PPAR α 標的遺伝子誘導の種差 (マウス、ラット、マーモセットの差)

5-(1) 研究要旨

フタル酸ジ 2-エチルヘキシル (DEHP) の代謝の種差を検討するために、ラット、マウス、マーモセットの肝、肺、腎、小腸、および精巣の代謝酵素の発現および DEHP 投与による誘導を検討した。

- 1) Lipase-mRNA はマーモセットの肝以外の臓器において検出された。即ち、Lipase-mRNA の量と DEHP による誘導に種差が認められた。マーモセットの肝の量は検出限界以下であり、DEHP による誘導が観察されたのはラット肝のみであった。
- 2) MEHP のグルクロン酸抱合活性は検討した動物種の肝ミクロソームで検出され、活性はマウス = ラット > マーモセットであった。しかしその差は小さく、マウスはマーモセットの 2 倍であった。

- 3) アルコール脱水素酵素 (ADH) とアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) 活性にも種差が認められた。ADH の活性はマーモセット肝において最も高かったが、DEHP による誘導はラット肝においてのみ観察された。ALDH の活性は基質により異なり、ラットあるいはマーモセットにおいて高かった。DEHP の影響を受けるのは低分子量のアルデヒドで、ラットとマウスの肝において観察された。
- 4) PPAR α -mRNA 量にも種差がみられ、マーモセットの検討したすべての臓器において低い値が得られた。ラットの腎と小腸では DEHP 投与により mRNA 量は明らかに減少していた。
- 5) PPAR α 標的遺伝子発現にも種差が見られた。DEHP 投与によりペルオキシゾームの脂肪酸参加酵素発現の誘導はラット>マウスであり、マーモセットでは誘導はほとんど見られなかった。

5-(2) 研究目的

DEHP は体内に吸収されると、まずリパーゼにより加水分解され、モノエステル体 (mono(2-ethylhexyl)phthalate、MEHP) となる。MEHP の一部はグルクロン酸抱合され、排泄するが、残りの部分は ω あるいは $\omega-1$ 酸化され、ジカルボン酸となり、 β -酸化系にはいっていく。一方、DEHP の加水分解により生成した 2 エチルヘキシルアルコール (2-EH) はアルコール脱水素酵素およびアルデヒド脱水素酵素の作用によりカルボン酸 (主として 2-エチルヘキサン酸、2-EHA) となる。これら代謝物のモノおよびジカルボン酸は PPAR α に配位し、その標的遺伝子発現にさまざまな影響を及ぼすことが、想定される。

過去に行われた研究において、DEHP の代謝に種差が認められることが明らかとなっている。例えば、霊長類では MEHP のグルクロン酸抱合体が主な代謝物であるが、ラットではこの代謝物の排泄はほとんど認められず、マウスは霊長類とラットの間接的な代謝物の排泄パターンを示す。また DEHP の毒性発現には PPAR α の関与が大きいとされているが、この転写活性化にも大きな種差がみられる。本研究においては、毒性発現と関わりの深い PPAR α の誘導が単に発現量の差に起因するのか、それとも代謝動態の種差が関与しているか明らかにするために行われた。

5-(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に関するガイドラインに従って行った。マーモセットの臓器は三菱化学安全科学研究所の倉田氏より供与された。3 ヶ月齢のマーモセットを未処理群 (コントロール) と DEHP 投与群 (100,500,2500mg/kg、経口投与) に分け、18 ヶ月齢において解剖した。肝、腎、肺、小腸、精巣を敵出し、一部は RNA 抽出用として RNAlater に保存し、残りは酵素活性測定のため使用まで -85°C 下で保存した。

マーモセット以外の実験動物に関しては、CD-1 マウス (8 週齢の雄) と SD ラット (8 週齢の雄) を使用した。12 匹のマウスと 10 匹のラットを 2 群に分け、コントロール (コーン油のみ投与)、DEHP (2.5mmol/kg) 投与群とした。コーン油および DEHP を毎日、14 日間投与し、最終投与から 16 時間後に解剖して、測定臓器 (肝、腎、肺、血清、精巣) を採取した。

2) DEHP の代謝速度 (リパーゼの活性) の測定

DEHP の代謝速度は酵素源として、肝、小腸、肺、腎のミクロソーム分画を用いた。100 μ g のミクロソームに DEHP(最終濃度 1mM)と K/Na 緩衝液(pH=7.4)を加え、37 $^{\circ}$ Cで 10 分培養した。1M の塩酸 120 μ l を加えて反応を止め、生成した MEHP を 1ml の酢酸エチルで 2 回抽出した。得られた酢酸エチルを蒸発させ、残渣を 40 μ l の酢酸エチルに溶解させた。20 μ l の N-methyl-N-(tert-butyl-dimethylsilyl)trifluoroacetamide を加え、室温で 60 分間放置した。生成した MEHP 誘導体を GC-MS で測定した。活性はすでに存在する MEHP 濃度を差し引き、1 分間、1mg たんぱく当たりの MEHP 生成量で表した。

3) グルクロン酸抱合活性の測定

所定の方法でミクロソーム分画を調製し、酵素源として使用した。MEHP のグルクロン酸抱合活性は Sjoberg らの方法 (Biochem Pharmacol 1991, 41, 1493-1496) に基づき HPLC を用いて行った。

4) ADH と ALDH の測定

ミトコンドリアとポストミトコンドリアの分画： 肝臓組織に 4 倍容量の緩衝液(0.25 M sucrose-50 mM Tris, pH 7.40, 0.1 mM DTT) を加えてホモジネイトした。800g x 15 分間遠心して、核やデブリスを取り除いた後、さらに 12,000g x 15 分遠心し、ミトコンドリア分画を沈殿させた。上清を再度遠心し、残存のミトコンドリアを回収した。ミトコンドリア分画を緩衝液に再浮遊させ、遠心して再沈殿させた後、組織重量の 1 容量の緩衝液に浮遊させ、0 $^{\circ}$ Cにおいて 10 秒間、3 回超音波粉碎した。サンプルのタンパク質定量は Bradford 法を用いて行った。ミトコンドリアとポストミトコンドリア分画は使用するまで-80 $^{\circ}$ C下で保存した。

ADH 活性測定： 1ml の反応液に 180 mM グリシン-60 mM ピロリン酸緩衝液 (pH9.0)、1 mM semicarbazide、1 mM GSH、1 mM NAD⁺、および酵素源であるポストミトコンドリア分画 (約 100 mg のタンパク質) を入れて、37 $^{\circ}$ C、3 分間プレインキュベーションした。基質 (10mM 2-ethylhexanol (2-EH)、または 2-phenoxyethanol (2-POET)) を添加することによって反応を開始させた。340 nm における吸光度増加を 90 秒間記録し、 $e=6220\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて NADH の単位時間当たりの生成量を算出した。

ALDH 活性測定： 1ml の反応液に 70 mM ピロリン酸緩衝液 (pH8.5)、1 mM pyrazole、1 mM NAD⁺、および酵素源であるミトコンドリア、またはポストミトコンドリア分画 (約 100 mg のタンパク質) を入れ、3 分間プレインキュベーションした後、基質 (10 mM 2-ethylhexanal、または 3-phenylpropionaldehyde) を添加することによって反応を開始させた。340 nm における吸光度増加を 120 秒間記録し、 $e=6220\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ を用いて NADH の単位時間当たりの生成量を算出した。反応温度はミトコンドリア分画の場合 37 $^{\circ}$ C、ポストミトコンドリア分画の場合 25 $^{\circ}$ Cを用いた。

5-(4) 結果

1) ラット、マウスの体重・臓器重量

表 5-1 にラット、マウスおよびマーモセットの体重および臓器重量を示す。用いた実験動物において、DEHP 投与による体重の増加への影響は認められなかった。マーモセットにおいては、DEHP 投与による臓器重量の変化も認められなかった。ラットおよびマウスにおいて、

DEHP 投与は腎臓および精巣重量への影響を与えなかったが、肝重量および肝/体重比を増加させた。DEHP による肝重量の増加は、マウスの場合 1.30 倍、ラットの場合 1.53 倍で、マウスよりラットへの影響が強かった。

2) リパーゼの活性

リパーゼの活性 (MEHP の生成速度) はどの臓器においても、マウスが最も高く、ラット、マーモセットの順に低くなった。マウスとラット、ラットとマーモセットの間には約 10 倍の差がみられた。即ち、マウスとマーモセットの間には 100 倍以上の差が認められた(表 5-2)。

臓器別にみると、マウスは小腸の活性が最も高いが、ラットとマーモセットは肝が最も高かった。どの動物種においても、肺における活性は最も低く、マーモセットにおいては検出限界以下であった。

マウス、ラット、マーモセット肝のミクロソームを用いて、DEHP に対するリパーゼの K_m と V_{max} を測定した (表 5-3)。 K_m はマーモセット>マウス>ラットであったが、 V_{max} はマウス>ラット>マーモセットであった。その結果内因性のクリアランスを示す V_{max}/K_m はマウス>ラット>マーモセットとなり、マウスとマーモセットの間には 200 倍以上の種差が認められた。

3) MEHP のグルクロン酸抱合酵素 (UGT) 活性

MEHP のグルクロン酸抱合活性は肝ミクロソームでのみ観察された。活性はマウス=ラット>マーモセットであった(表 5-4)。マウスあるいはラットとマーモセットの差は約 2 倍で、リパーゼの様な大きな種差は認められなかった。

4) ADH の活性

DEHP の中間代謝物である 2-EH を基質とする ADH 活性は 3 種類の動物種の肝のミトコンドリアにおいて検出されたが、ラットにおいてのみ、DEHP 投与によって、有意に亢進した (表 5-5)。動物間で比較すると、その活性はマーモセット>マウス>ラットであった。2-POET を基質とした場合、マウスとラットでは、活性がほとんど検出されなかった。一方、マーモセットでは明らかに検出されたが、いずれの DEHP 投与量群においても有意な変動がなかった。

5) ALDH の活性

2-ethylhexanal を基質とした場合、活性はラット>マーモセット>マウスの順であった。DEHP 処理の影響を受けたのはマウスのみであった (表 5-6)。3-phenylpropionaldehyde を基質とした場合、活性はマーモセット>ラット>マウスの順であった。この気質の場合、どの動物種においても DEHP 処理の影響を受けなかった。

ポストミトコンドリアにおいては、2-ethylhexanal の ALDH 活性はマーモセット=ラット>マウスで、3-phenylpropionaldehyde の ALDH 活性はマーモセット>ラット>マウスであった。どちらの基質も用いた場合においても、DEHP の処理により活性の上昇がみられたのはマウスのみであった。

6) PPAR α -mRNA

図 5-1 はラット、マウス、マーモセットの肝、腎、肺、小腸の PPAR α -mRNA を示す。数値

はコントロール群の各臓器を 100%として示した。マウスとラット肝において、DEHP 投与により PPAR α -mRNA が増加傾向を示した。マウスとラットの肝重量が増加(ラットで 1.53 倍、マウスで 1.30 倍) しているので、肝当たりの PPAR α -mRNA はかなり増加しているかもしれない。ラットの腎と小腸においては、DEHP 処理により PPAR α -mRNA は減少していた。マーモセットにおいては、肝と腎の PPAR α -mRNA は DEHP 投与により増加する傾向がみられたのみであった。

7) lipase-mRNA

DEHP 曝露はマウス肝のリパーゼを誘導する経路が、ラット肝では明らかに誘導した。一方、腎においては、DEHP はマウスでもラットでも発現を低下させた(表 5-7)。DEHP 曝露は小腸と肺のリパーゼ遺伝子発現には影響を与えなかった。

8) PT と MCAD 遺伝子発現への影響

DEHP がミトコンドリアとペルオキシゾーム系の酵素発現に与える影響を、蛋白と mRNA レベルからみた。ミトコンドリア系の酵素 (MCAD, VLCAD) はラット、マウス両動物において若干上昇した(図 5-2) ペルオキシゾーム系の酵素 (PT, PH) はラット、マウス両動物において誘導されたが、両動物間の差は顕著ではなかった。マーモセットでは、これらの遺伝子群の発現上昇が観察されなかった。

一方、mRNA レベルで見ると、ペルオキシゾーム酵素の PT はラットにおいて著しく誘導されているがマウスでは高々 2 倍であった(図 5-3)。ミトコンドリア酵素の MCAD はマウス、ラットともに約 2 倍上昇していた。マーモセットにおいては発現も低く、誘導もされていなかった。

5-(5) 考察

これまでの研究によると、小腸における lipase 活性はマウス>ラット>マーモセットと報告されている。本研究によって、DEHP の代謝に対しリパーゼ活性も同様であることが明らかとなった。この要因として、DEHP の Km と Vmax の解析から、DEHP のリパーゼに対する親和性と酵素量が、マウス>ラット>マーモセットであることがあきらかとなった。このように、リパーゼの活性には極めて大きな種差が存在することが明らかとなった。一方、MEHP 以降の代謝酵素 (UGT, ADH, ALDH) の活性にも種差が認められたが、高々 10 倍程度であり、リパーゼの種差に比べると小さいことが明らかとなった。これらの事実は、DEHP の代謝の種差を考える場合、第一に最初のステップであるリパーゼ活性の種差を考慮すべきであることを示す。

DEHP の代謝において、ADH と ALDH は加水分解により生成した MEHP と 2-EH の両代謝経路の反応に関わっている。MEHP の中間代謝物のアルコール標準品がなかったため、2-POEH で代表させた。ADH の活性は脂肪族のアルコール (2-EH) が基質の場合も、芳香族アルコール (2-POEH) が基質の場合もマーモセットにおいて最も高かった。特に、後者の場合、ラットやマウスでは活性は検出されなかった。従って、生成したアルコール中間代謝物の代謝活性はネズミの様な小動物よりも霊長類の方が高いと思われる。

多くの ALDH 酵素分子種はミトコンドリアや細胞質などに存在して、それぞれ異なるアル

デヒドに対して、親和性を持っている。ミトコンドリアでは、DEHP の中間代謝物である 2-ethylhexanal に対して、いずれの動物種も活性を示したが、ラットにおいて、最も高く、マウスにおいては最も低く、マーモセットは中間であった。ADH の場合と同様に、MEHP からのアルデヒド中間代謝物の標準品がないため、2-phenoxyethanal で代表させた。この場合も 2-ethylhexanal に対する ALDH 活性と類似した傾向が見られた。以上をまとめると、DEHP 代謝経路における ADH,ALDH の活性はマウスにおいてはラットやマーモセットより低いといえよう。

DEHP 自身は PPAR α のリガンドとはならない。代謝物の MEHP やその代謝物のジカルボン酸、あるいは加水分解産物の 2EH の代謝物のカルボン酸 (2EHA) がリガンドとなるため、PPAR α の誘導はその発現量のみならず DEHP の代謝が深く関与していると思われる。Lipase の場合と同様に PPAR α /GAPDH の比が真の mRNA の値を反映すると仮定すると、ラットとマウスは肝において最も多く、ついで腎であった。しかしマーモセットにおける PPAR α -mRNA はラットやマウスよりはるかに低く、また、肝と腎における mRNA 量は同程度であった。これは既報の研究結果と一致する。PPAR α の誘導の傾向がマウスとラット肝においてのみ観察された。PPAR α の標的遺伝子の一つである CYP4A はラットとマウス肝において誘導されており、DEHP 投与による PPAR α の転写活性化が生じていることは確かであろう。

C. 結論

DEHP の代謝には種差がみられ、マウス>ラット>マーモセットである。ヒトのキネティクスの情報が乏しいので、結論はできないが、ヒトがマーモセットと同じと考えた場合、リパーゼ活性の種差に注意を払う必要がある。生殖・発達毒性の NOAEL は 0.01% (1 日の摂取量に換算すれば 16mg/kg/day) である。DEHP のリスク評価において、諸外国では 100~1000 の不確実係数をもちているが、このようなおおきな不確実係数を用いる必要があるか否か疑問である。DEHP の様々な毒性は核内受容体の PPAR α に依存している場合が多く、この誘導性が問題視されている。PPAR α の誘導は DEHP ではなく、MEHP 等の代謝物による。従って、PPAR α の誘導には、この発現量の差のみならず、lipase をはじめとする DEHP の代謝酵素の種差も関連しているかもしれない。このような種差を除外できる、MEHP 等の PPAR α リガンドの体内曝露量からリスク評価を行うことを推奨したい。