

平成16年度
内分泌攪乱化学物質等の作用
メカニズムの解明等基礎的研究
研究報告書

平成17年3月

財団法人日本公衆衛生協会

目 次

I. 目的	1
II. 内容	1
II-1. 指定研究	1
II-2. 業務担当者一覧	2
II-3. 指定研究結果報告	3
1. 内分泌攪乱化学物質による雄性生殖器への影響の分子細胞生物学的メカニズムの 説明	
千葉大学大学院医学研究院環境生命医学 森 千里	5
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説明および リスク評価に関わる研究	
名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学 那須 民江	19
3. フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価	
北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学 岸 玲子	51
4. ビスフェノールA結合蛋白質の分子生物学的検討と中枢神経系への作用機序の 説明に関する研究	
大阪市立大学大学院医学研究科生体機能解析学 船江良彦	71
5. 両生類の核内受容体についての情報収集	
大阪大学大学院薬学研究科生命情報環境科学 西川 淳一	85
II-4. 平成15年度研究結果の評価	93
II-4.1. 内分泌かく乱化学物質等研究推進専門委員会名簿	93
II-4.2. 平成15年度の10研究	93

I. 目的

人や野生動物の内分泌作用を攪乱し、生殖機能障害、先天奇形等を引き起こす可能性のある内分泌攪乱化学物質による環境汚染は、科学的には未解明な点が多く残されているものの、生物生存の基本的条件に関わる問題であり、世代を越えた深刻な影響をもたらすおそれがあることから環境保全上の重要課題である。

今後、内分泌攪乱化学物質のリスク評価を実施するために、内分泌攪乱化学物質が人や野生動物に影響を及ぼすメカニズムについての知見の蓄積を急ぐ必要があるが、そのための調査研究はこれまでほとんど実施されていない。

そこで、本調査研究では、内分泌攪乱化学物質等の作用メカニズム等に関する実態を解明することを目的とした。

II. 内容

内分泌攪乱化学物質等の作用メカニズムに関する①分子生物学的機構の解明、②バイオマーカーの開発・評価、③胎児期の曝露による影響発現の解明等、各種調査研究及び評価解析について実施するとともに、平成15年度実施課題であった10研究についての発表会を開催した。

II-1. 指定研究

- (1) 内分泌攪乱化学物質による雄性生殖器への影響の分子細胞生物学的メカニズムの解明
- (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
- (3) フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価
- (4) ビスフェノール A 結合蛋白質の分子生物学的検討と中枢神経系への作用機序の解明に関する研究
- (5) 両生類の核内受容体についての情報収集

II-2. 業務担当者一覧

(1) 内分泌攪乱化学物質による雄性生殖器への影響の分子細胞生物学的メカニズムの
解明

主任研究者 森 千里 千葉大学大学院教授
研究協力者 深田 秀樹 千葉大学大学院特任助教授

(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

主任研究者 那須 民江 名古屋大学大学院教授
研究協力者 山ノ下 理 名古屋大学大学院受託研究員
伊藤 由起 名古屋大学大学院大学院生
柳場 由絵 名古屋大学大学院大学院生
張 淑芸 名古屋大学大学院大学院生
古橋 功一 名古屋大学大学院大学院生

(3) フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価

主任研究者 岸 玲子 北海道大学大学院教授
研究協力者 佐田 文宏 北海道大学医学研究科助教授
西條 泰明 北海道大学医学研究科助手
近藤 朋子 北海道大学医学研究科研究員
森 ゆうこ 北海道大学医学研究科研究員
倉橋 典絵 北海道大学医学研究科大学院生
馬 明月 北海道大学医学研究科大学院生

(4) ビスフェノールA結合蛋白質の分子生物学的検討と中枢神経系への作用機序の解明に関
する研究

主任研究者 船江 良彦 大阪市立大学大学院教授
研究協力者 今岡 進 関西学院大学理工学部教授
廣井 豊子 大阪市立大学大学院医学研究科講師
長田真優子 大阪市立大学大学院医学研究科助手
吉田 徳之 大阪市立大学大学院医学研究科助手
岡田 和嗣 大阪市立大学大学院大学院生

(5) 両生類の核内受容体についての情報収集

主任研究者 西川 淳一 大阪大学大学院薬学研究科助教授
研究協力者 Bruce Blumberg University of California, Irvine

II-3. 指定研究結果報告

1. 内分泌攪乱化学物質による雄性生殖器への影響の分子細胞生物学的メカニズムの解明

研究者 森 千里 (千葉大学大学院医学研究院環境生命医学 教授)

研究要旨

(1) Flutamide (FLUT)、 17β -estradiol (E2)、bisphenol A (BPA)、ICI182.780 (ICI) と diethylstilbestrol (DES) を ICR マウス成獣に 5 日間連続投与後、6 日目に精巣を取り出し、ウェスタンブロット法、免疫抗体染色法、免疫電子顕微鏡抗体染色法でコートアクチン (アクチン結合タンパク質の一種) の精巣内での発現量を対照群と比較したところ、どの薬剤投与群でもコートアクチンタンパク質量が対照群に比し有意に減少していることがわかった。コートアクチンタンパク質の精巣内発現量は、内分泌攪乱化学物質を始めとする外因性化学物質の精巣に与え影響を解析する上で、注目すべき重要なタンパク質であることが示唆された。現時点ではどのような機構でコートアクチンの発現が制御されているのかは明確でないが、この機構を分子的に解明することは内分泌かく乱化学物質の作用点の解明に重要であると考えられる。

(2) マイクロアレイ技術を適用することで迅速に、DEHP による成獣ラット精巣細胞のアポトーシス制御に、その投与量が 2000 mg/kg の時には Fas-FasL、FADD/Caspase-8/Caspase-3 および Apaf-1/Caspase-9/Caspase-2 のカスケードが働きアポトーシスを誘導するが、その投与量が 20 mg/kg 時には Bcl-2 系カスケードが働きアポトーシスを抑制していることを明らかとした。

研究協力者

深田 秀樹 (千葉大学大学院医学研究院環境生命医学 助教授)

A. 研究目的

現在、環境中の内分泌攪乱作用を持つ化学物質による生物の生殖機能の障害が社会的に大きな問題となっており、生物環境ならびに人の健康に対する影響は、人における精子数の減少や野生生物に様々な生殖異変が既に生じている点からも懸念されている。これらの物質がなぜ有害であるのかを細胞、分子のレベルにおける作用機構の点から明らかにするとともに、有害性の予想される物質の作用を検証し、さらなる汚染拡大の合理的予防策を講ずる努力が、国民の不安に対処し安全な生活の確保を図る上で必要である。本研究では内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムについて、雄性生殖器に対する影響の機序を対象とし、分子生物学、細胞生物学的手法を用いて解明し、さらに内分泌攪乱化学物質による健康障害の分子細胞生物学的マーカーを見出すことを目的とする。本研究による代表的な内分泌攪乱化学物質の作用機序解明の成果は、内分泌攪乱作用の疑われる物質の客観的な体系的検索法の開発に寄与することが期待できる。

以下具体的に、実施事項ごとの目的を示す。

1. 齧歯類の雄生生殖器に影響を与える化学物質の作用メカニズムの解析

昨年度実施した GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子組み込みマウスを用いた移植実験から、DES の影響は生殖細胞そのものというよりも精子形成を支える体細胞系に現れると考えられたが、

それは同じく昨年度に研究したアクチン結合タンパク質との関連をさらに詳細に調べることで、精子形成異常の分子機構を解明できるものと期待される。そこで、精巣の形態変化のうち、特に特殊接合装置 (ES) に影響する化学物質、flutamide (FLUT、抗アンドロゲン作用を有する物質)、17 β -estradiol (E₂、天然エストロゲン)、bisphenol A (BPA、弱いエストロゲン作用を有する物質)、ICI182.780 (ICI、エストロゲンレセプターに特異的に結合しエストロゲンレセプターの働きを阻害する物質) と diethylstilbestrol (DES、合成エストロゲン) をそれぞれ ICR マウス成獣に 5 日間連続投与後、6 日目に精巣を取り出し、ウエスタンブロット法により精巣中のアクチン結合タンパク質の発現量を定量的に解析する。そして、免疫抗体染色法と免疫電子顕微鏡抗体染色法でアクチン結合タンパク質の精巣内での発現量を対照群と比較する。さらに、変化がみられた精細管については、精細管ステージ決定も行う。

2. 齧歯類成獣への di-(2-ethylhexyl) phthalate 投与による雄性生殖器で生じるアポトーシス誘発メカニズムの解析

生殖毒性のある化学物質を齧歯類成獣へ投与するとしばしば雄性生殖器で生殖細胞がアポトーシスを起こすが、その分子メカニズムを解析するため、種々の濃度で di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) を齧歯類成獣に投与し、アポトーシスを促進する Fas-FasL、カスパーゼ系、およびアポトーシスを抑制する Bcl 系に着目し、アポトーシス制御メカニズムを明らかにする。

B. 材料と方法

実施項目ごとに項を分けて記載した。

共通事項として、本研究は千葉大学大学院医学研究院の動物倫理委員会の承認を受けている。実験動物への各化学物質の投与時および灌流固定時には動物の苦痛を最小限にとどめるよう努め、その他の処置は麻酔下で行った。

1. 齧歯類の雄生生殖器に影響を与える化学物質の作用メカニズムの解析

a) 実験デザイン

ICR マウス (日本エスエルシー) 12 週齢のオスを用い、物質 E₂、FLUT、ICI、BPA および DES を DMSO 500 μ L に溶解した後、corn oil を溶媒として、それぞれの濃度に希釈し、マウスの皮下より 0.1ml/day として 5 日間連続投与を行い、6 日目に精巣を取り出した。対照群には DMSO と corn oil を同様に投与した。投与濃度は、E₂: 0.0012 μ g/g/day、FLUT: 0.012 μ g/g/day、ICI: 0.012 μ g/g/day、BPA: 0.0024 μ g/g/day、DES: 0.025 μ g/g/day とした。取り出した精巣は、タンパク質発現解析、免疫抗体染色観察を行った。さらに、FLUT 投与のマウス精巣については免疫電子顕微鏡観察法を用い、コートアクチンタンパク質の発現を確認した。動物の取り扱いについては、「千葉大学亥鼻地区動物実験指針」に基づいておこなっている。

b) ウエスタンブロット

取り出した精巣は精巣白膜を除去後、Lysis buffer と共にホモゲナイズし、15000 \times g 4 $^{\circ}$ C で 20 分間遠心した後、タンパク質を抽出した。タンパク質は 10 % アクリルアミドゲルで SDS-PAGE し、PVDF 膜にトランスファーし、TBS スキムミルクでブロッキング後、抗コートアクチン抗体を

HRP 標識抗体発現法 (ECL Plus: Amersham) で解析した。

c) 免疫抗体染色法

取り出した精巣を 10% ホルマリンで固定し、パラフィン包埋して切片を作製した。切片は脱パラフィン後、正常山羊血清によりブロッキングを行った後、コートアクチンに抗マウスコートアクチン抗体を結合させ、ストレプト ABC ペルオキシダーゼキット (ナカライテスク) で検出した。

d) 免疫電子顕微鏡観察法

採取した精巣は、LR White により包埋後、超薄切片を作製し、正常山羊血清によりブロッキングを行い、コートアクチンに抗コートアクチン抗体を結合させ、金コロイド法で検出した。

2. 齧歯類成獣への di-(2-ethylhexyl) phthalate 投与による雄性生殖器で生じるアポトーシス誘発メカニズムの解析

6 週齢の Crj:CD(SD)IGS 系雄ラット(日本チャールス・リバー(株)) に DEHP (Aldrich Chemical Corp.) の 20 および 2000 mg/kg を単回強制経口投与し、投与後 3、6、24 および 72 時間に精巣を摘出した。左精巣は 4%パラホルムアルデヒド固定を行い、パラフィン包埋法により組織スライド標本を作製し、HE 染色ならびに TUNEL 解析を行った。右精巣は液体窒素を用いて凍結し、 -80°C で冷凍保存後、TRIZOL (Invitrogen Corp.) を用いて RNA の抽出を行った。抽出 RNA は cDNA の調製後、ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) を用いて、SYBR Green 法によるリアルタイム RT-PCR 解析を行い、アポトーシス関連遺伝子の発現量を定量した。

C. 結果

1. 齧歯類の雄生生殖器に影響を与える化学物質の作用メカニズムの解析

a) 投与マウス精巣中のコートアクチンタンパク質発現量の解析

E_2 、FLUT、ICI、BPA、DES をそれぞれ投与したマウス精巣中のコートアクチンタンパク質をウエスタンブロット法で定量したところ、全ての投与系 (E_2 、FLUT、ICI、BPA、DES) マウスで精巣中コートアクチンタンパク質量が対照群に比し有意に減少していることがわかった (図 1)。対照群のコートアクチンタンパク質発現量を 1 としてそれぞれの投与系の精巣での発現比 (発現比 \pm S.D.) をあらわすと、 E_2 で 0.6 ± 0.2 、FLUT で 0.4 ± 0.3 、ICI で 0.6 ± 0.1 、BPA で 0.6 ± 0.1 および DES で 0.8 ± 0.1 であった。

b) 免疫抗体染色法(光学顕微鏡)によるマウス精巣内コートアクチンタンパク質の発現部位と発現量の解析

コートアクチンタンパク質のマウス精巣内での発現部位と発現量を、抗コートアクチン抗体を用いた免疫抗体染色法を用い、光学顕微鏡で調べた。

対照群で、コートアクチンは apical ES、basal ES と精細管上皮細胞に存在しており (図 2A)、basal ES では精細管と隣接しているセルトリ細胞間に局在していた。apical ES では、精子頭部の背側に強い発現が認められた。 E_2 、FLUT、ICI、BPA 投与群では以前報告をした精子細胞の頭部形態異常に加え、apical ES が部分的欠損した精子細胞も観察された。また、コートアクチンの発

現量の変化は、特に精細管ステージ VI から IX においてよく観察された (図 2B から 2E)。DES 投与については、頭部異常などの精子細胞は認められず、basal ES でのコートアクチンの発現が弱いものがみられたが (図 2E)、その他の物質に比べると、発現量の変化が少なかった。

c) 免疫電子顕微鏡観察におけるコートアクチン発現部位と発現量の解析

Apical ES は、セルトリ細胞膜、アクチン層および滑面小胞体の三種類から構成されている。コートアクチンタンパク質の apical ES における発現を、免疫電子顕微鏡観察法を用い観察したところ、コートアクチンはアクチン層とセルトリ細胞の間に局在していた (図 3A のアローヘッド)。FLUT 投与マウスの精巣では、頭部異常が認められた部分と apical ES の欠損が認められた部分に、コートアクチンは認められなかった (図 3B の*部分で局在が認められない)。

2. 齧歯類成獣への di-(2-ethylhexyl) phthalate 投与による雄性生殖器で生じるアポトーシス誘発メカニズムの解析

HE 染色による病理組織像には DEHP 投与の影響はなかった。一方、DEHP の 2000 mg/kg 投与後 24 および 72 時間でアポトーシス細胞の有意な増加が TUNEL 法により観察された (図 4 および 図 5)。リアルタイム RT-PCR 解析においては (図 6)、DEHP の 20 mg/kg 投与において、投与後 6 時間に、アポトーシス抑制遺伝子 Bcl-2 の発現上昇 (1.3 倍程度) が見られたが、その他の変化は見られなかった。また、DEHP の 2000 mg/kg 投与において、Apoptosis の誘導因子である Caspase-2、-3、-8、-9、Bax、Fas および FasL の有意な発現上昇 (1.5~3.8 倍) が見られた。一方、Apoptosis 抑制因子である Bcl-2 は有意な発現低下 (0.5 倍程度) を示した。これらの遺伝子は DEHP 投与の 3 時間後ですでに発現変化を示しており、3~6 時間後に変化のピークを示し、その後、経時的にコントロールレベルに収束していく傾向が観察された。

D. 考察

1. 齧歯類の雄生生殖器に影響を与える化学物質の作用メカニズムの解析

コートアクチンはアクチン結合タンパク質の一種で、精細管中の細胞-細胞間接着に関係しているその他のタンパク質と複合し、apical ES においては精子細胞の核の整形や保持に関連しているのではないかと考えられる。昨年度までに報告してきた精子細胞-セルトリ細胞間の特殊接合装置の欠損や頭部形態異常の変化と、今回解析を行ったコートアクチンの減少との間には関連が示された。興味深いことに、性質の異なる薬剤投与系すべて (E₂、FLUT、ICI、BPA、DES) で apical ES の欠損およびコートアクチンの消失が観察された。さらに、コートアクチンタンパク質の発現変化が認められた精細管ステージが、特殊接合装置が形成される時期および精子が精巣上体へ放出される時期に特徴的に認められた。これらの結果より、apical ES の重要性が示唆される。

コートアクチンは、apical、basal ES の両装置に存在することが確認されているが、薬剤の性質にかかわらず、それらの外因性の物質に敏感に反応するのは apical ES のコートアクチンであった。さらに、ES の構成内容の違いからみると、basal ES ではタイトジャンクションが存在しており、それが存在しない apical ES よりもより強固な装置として形成されているため、個体発生後、精子形成のサイクルが正常に動きはじめてしまえば、apical ES ほど外因性物質の影響が認められないのではないかと考察される。このことは、新生仔 DES 投与と成獣 DES 投与の影響のちがいかからも

推測される。そして、basal ES 中細胞間接着関連タンパク質の構成は、apical ES と異なっていることから、両者に存在するコートアクチンの役割も異なっているのではないかと考えられる。それ故、今後は basal と apical ES のコートアクチンの作用メカニズムの違いについても検討し、細胞間接着関連タンパク質とコートアクチンがどのように特殊接合装置の形成や維持に関与しているのかを解析する必要がある。

2. 齧歯類成獣への di-(2-ethylhexyl) phthalate 投与による雄性生殖器で生じるアポトーシス誘発メカニズムの解析

DEHP の 2000 mg/kg 単回経口投与により、精巣のアポトーシス細胞の増加が観察された。このアポトーシスには、アポトーシス誘導系の Fas-FasL、FADD/Caspase-8/Caspase-3 および Apaf-1/Caspase-9/Caspase-2 の各カスケードの遺伝子発現上昇ならびにアポトーシス抑制系の Bcl-2 の発現低下が関与していることが示唆された (図 7A)。また、DEHP の 20 mg/kg 単回経口投与では、精巣のアポトーシス細胞の増加は観察されなかった。この時、アポトーシス抑制遺伝子 Bcl-2 の発現増加が観察され、抑制系遺伝子の優位発現によるアポトーシス誘発の抑制が示唆された (図 7B)。また、これら遺伝子の発現調節はアポトーシス細胞の出現より早期に観察され、精巣におけるアポトーシス誘発マーカーとしての可能性が示唆された。

E. 結論

Flutamide (FLUT)、 17β -estradiol (E_2)、bisphenol A (BPA)、ICI182.780 (ICI) と diethylstilbestrol (DES) を ICR マウス成獣に 5 日間連続投与後、6 日目に精巣を取り出し、ウエスタンブロット法、免疫抗体染色法、免疫電子顕微鏡抗体染色法でコートアクチン (アクチン結合タンパク質の一種) の精巣内での発現量を対照群と比較したところ、どの薬剤投与群でもコートアクチンタンパク質量が対照群に比し有意に減少していることがわかった。コートアクチンタンパク質の精巣内発現量は、内分泌攪乱化学物質を始めとする外因性化学物質の精巣に与え影響を解析する上で、注目すべき重要なタンパク質であることが示唆された。現時点ではどのような機構でコートアクチンの発現が制御されているのかは明確でないが、この機構を分子的に解明することは内分泌かく乱化学物質の作用点の解明に重要であると考えられる。

マイクロアレイ技術を適用することで迅速に、DEHP による成獣ラット精巣細胞のアポトーシス制御に、その投与量が 2000 mg/kg の時には Fas-FasL、FADD/Caspase-8/Caspase-3 および Apaf-1/Caspase-9/Caspase-2 のカスケードが働きアポトーシスを誘導するが、その投与量が 20 mg/kg 時には Bcl-2 系カスケードが働きアポトーシスを抑制していることを明らかとした。

F. 引用文献

Anahara R, Toyama Y and Mori C (2004) Flutamide induces ultrastructural changes in spermatids and the ectoplasmic specialization between the Sertoli cell and spermatids in mouse testes. *Reprod Toxicol* 18:589-596.

Toyama Y, Hosoi I, Ichikawa S, Maruoka M, Yashiro E, Ito H and Yuasa S (2001) β -estradiol 3-benzoate affects spermatogenesis in the adult mouse. *Mol Cell Endocrinol* 178:161-168.

Toyama Y, Maekawa M and Yuasa S (2003) Ectoplasmic specialization in the Sertoli cell: new vistas based on genetic defects and testicular toxicology. *Anat Sci Int* 78:1-16

穴原玲子、前川眞見子、外山芳郎、本間誠次郎、佐藤浩二、年森清隆、森千里. (2003) Flutamide 投与におけるマウス精巣内テストステロン濃度および核内受容体(AR、ER β)への影響. 第7回環境ホルモン学会研究発表会. 2003/12/14.

Toyama Y and Yuasa S (2004a) Effects of neonatal administration of 17 β -estradiol, β -estradiol 3-benzoate or bisphenol A on mouse and rat spermatogenesis *Reprod Toxicol* 19:181-188

Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Maekawa M, Ito C and Toshimori K (2004b) Adverse effects of bisphenol A to spermiogenesis in mice and rats. *Arch Histol Cytol* 67:373-381.

Anahara R, Toyama Y, Mori C. (2004) Combined effects of flutamide and β -estradiol 3-benzoate on adult mouse testes. Society of Toxicology 43rd Annual meeting & TOXEXPO, Baltimore (U.S.A) (March 21-25, 2004).

Anahara R, Toyama Y, Mori C (2004) Morphological abnormality of the ectoplasmic specialization induced by estrogen or estrogen&androgen antagonist in mouse testes. Teratology Society 44rd Annual Meeting, Vancouver (CA) (Jun 26- Jul 1, 2004).

Kijima K, Toyosawa K, Yasuda M, Matsuoka N, Adachi T, Komiyama M and Mori C (2004) Gene expression analysis of the rat testis after treatment with di(2-ethylhexyl) phthalate using cDNA microarray and real-time RT-PCR. *Toxicology and Applied Pharmacology* 200: 103-110.

穴原玲子、外山芳郎、前川眞見子、年森清隆、森千里 (2004) 抗アンドロゲン flutamide と抗エストロゲン ICI182.780 がマウス精子形成に及ぼす影響とその作用機構に関する考察. 日本アンドロロジー学会総会第23回学術大会, 2004/7/17.

Anahara R, Toyama Y, Maekawa M, Kai M, Ishino F, Toshimori K, Mori M. (2005) Analysis of cortactin expression in the ectoplasmic specialization of testes in flutamide treatment mouse. Society of Toxicology 44rd Annual meeting & TOXEXPO, New Orleans (U.S.A) (March 6-10, 2005)

G. 図表

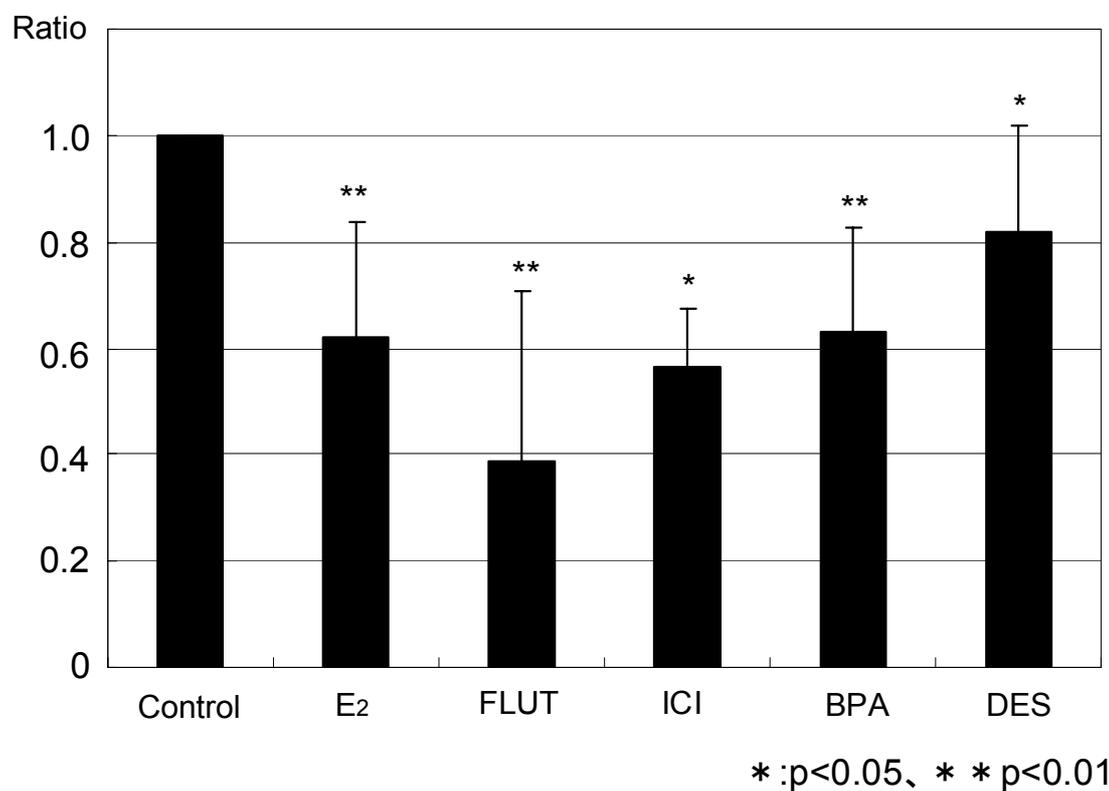
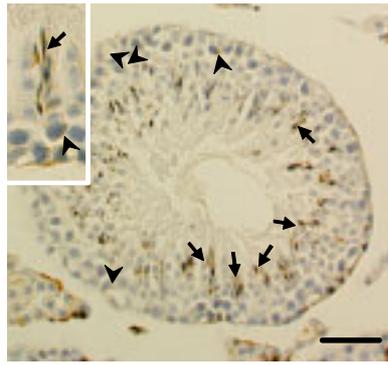
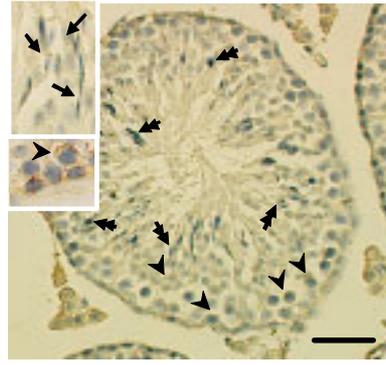


図 1 精巣内コートアクチンタンパク質発現量の比較

E₂、FLUT、ICI、BPA、DESをそれぞれ投与したマウス精巣中のコートアクチンタンパク質量をウエスタンブロット法で定量し、コントロールの値を1として表示した。



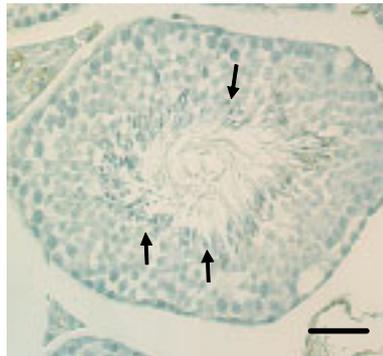
A: 対照群



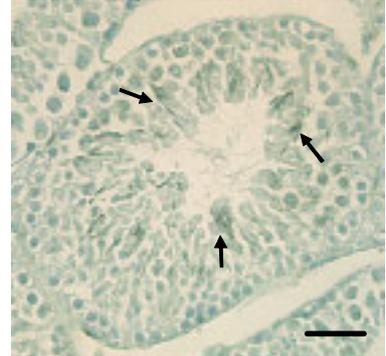
B: FLUT投与



C: E2投与



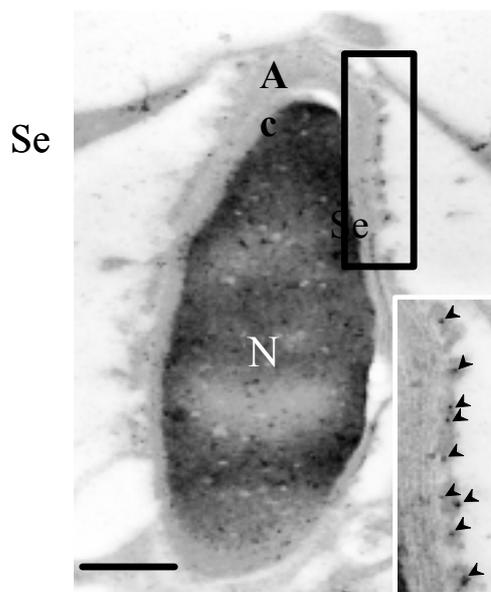
D: BPA投与



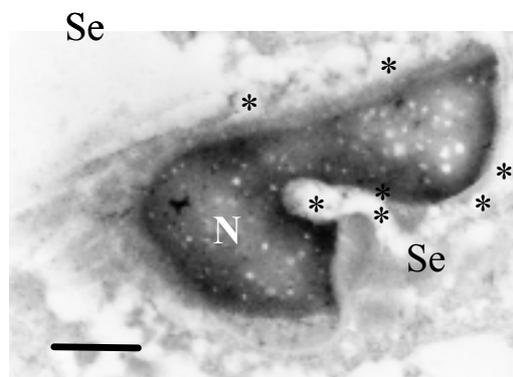
E: DES投与

図 2 精巣内コートアクチンタンパク質発現量の比較

対照群(A)および薬剤投与群 (B: FLUT, C: E₂, D: BPA, E: DES) の精細管を示す。矢印: apical ES、アローヘッド: basal ES、ダブルアロー: 頭部変形精子細胞、Bar: 50 μm。コートアクチンタンパク質の発現部位: 褐色、対比染色: 青色。



A: 対照群



B: FLUT投与

図 3 精巣内コートアクチンタンパク質発現量の比較

対照群 (A) のアローヘッド部分にコートアクチンが存在しているが、FLUT 投与群 (B)の*印部分ではコートアクチンの欠損が見られる。

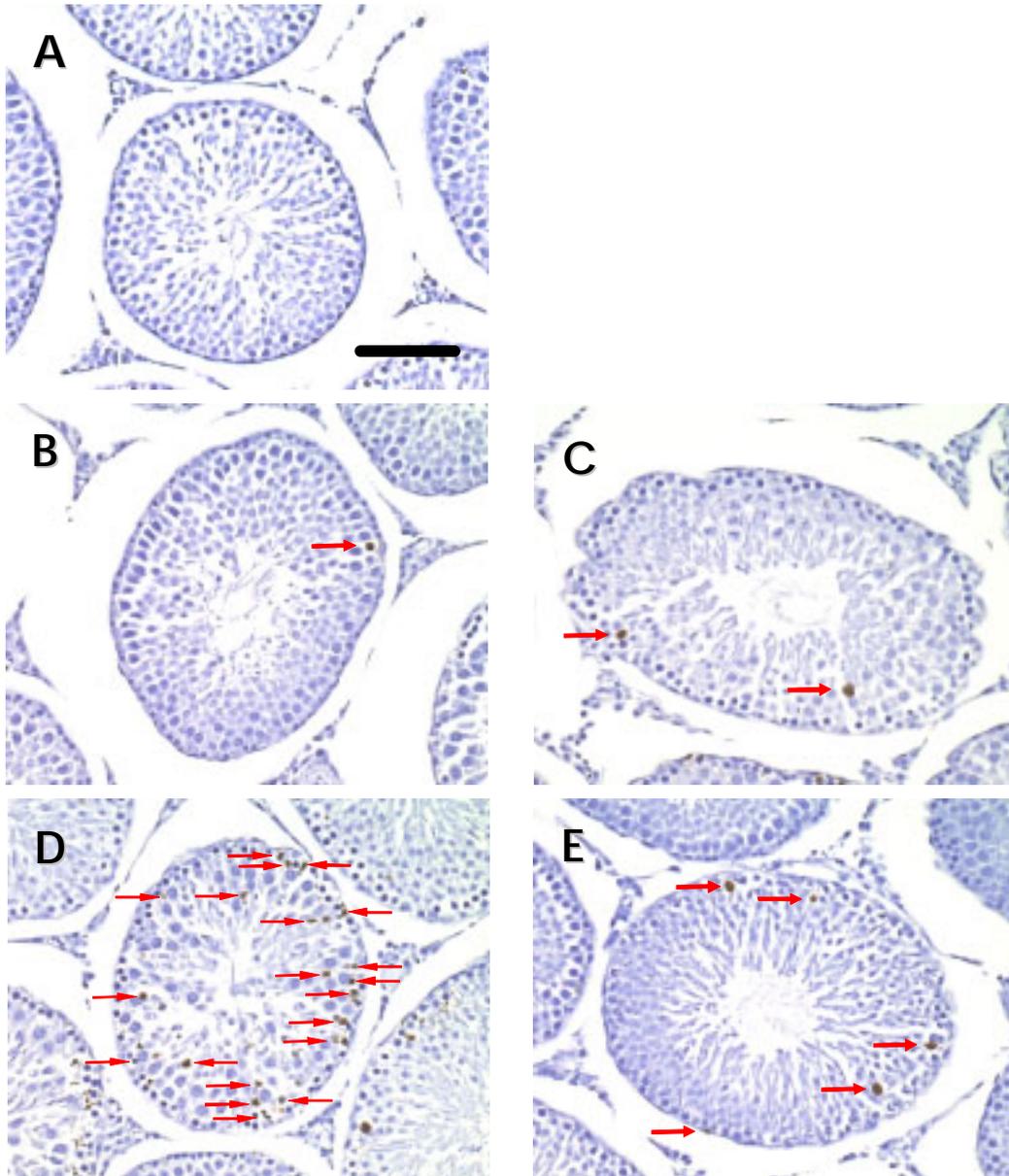


図 4 2000 mg/kg DEHP を投与したラット精細管で見られるアポトーシス細胞

ラット精細管中のアポトーシスを起こした細胞は 3-3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride で核を茶色
に染色した (赤矢印)。組織サンプルは 2000 mg/kg DEHP を単回投与後、3 h (B), 6h (C), 24h (D)
and 72h (E) に採取した。 A はコントロール。 Bar: 50 μ m。

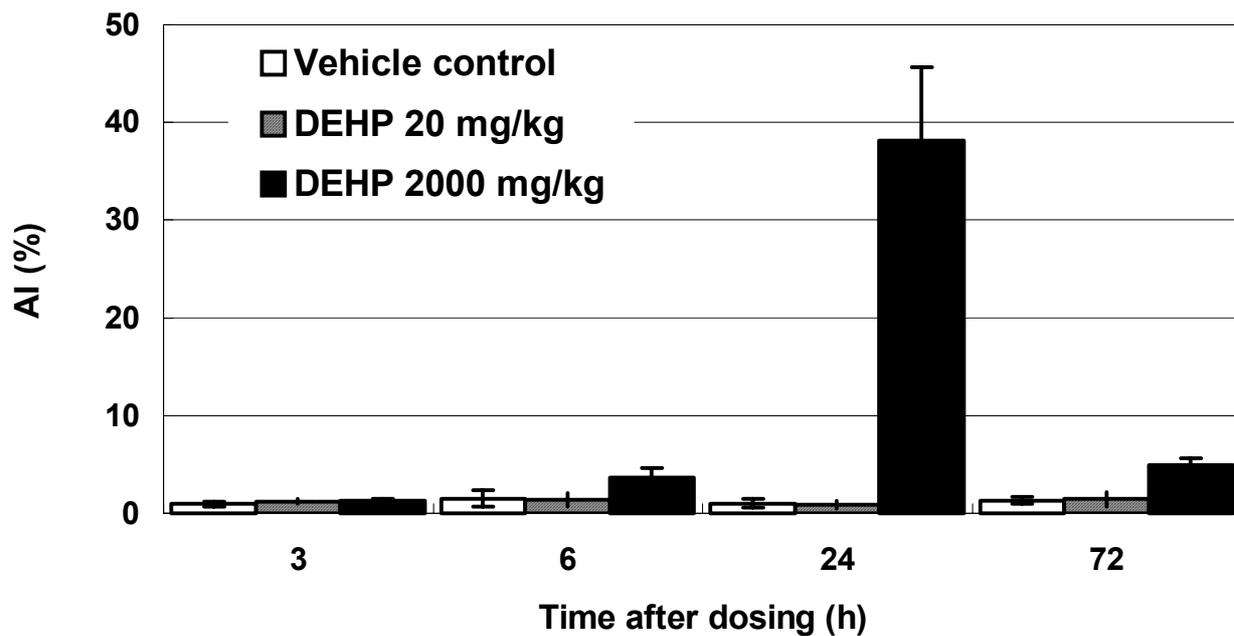


図 5 3 個以上 TUNEL 陽性細胞が含まれているラット精細管のパーセント (AI; apoptotic index) のタイムコース

20あるいは2000 mg/kg DEHPを単回投与した。AIの有意な増加は2000 mg/kg DEHP 投与群の24 h と 72 h で見られた。それぞれの棒は平均 ± SD (n=6) で示した。コントロールに対する有意差: **p<0.01。

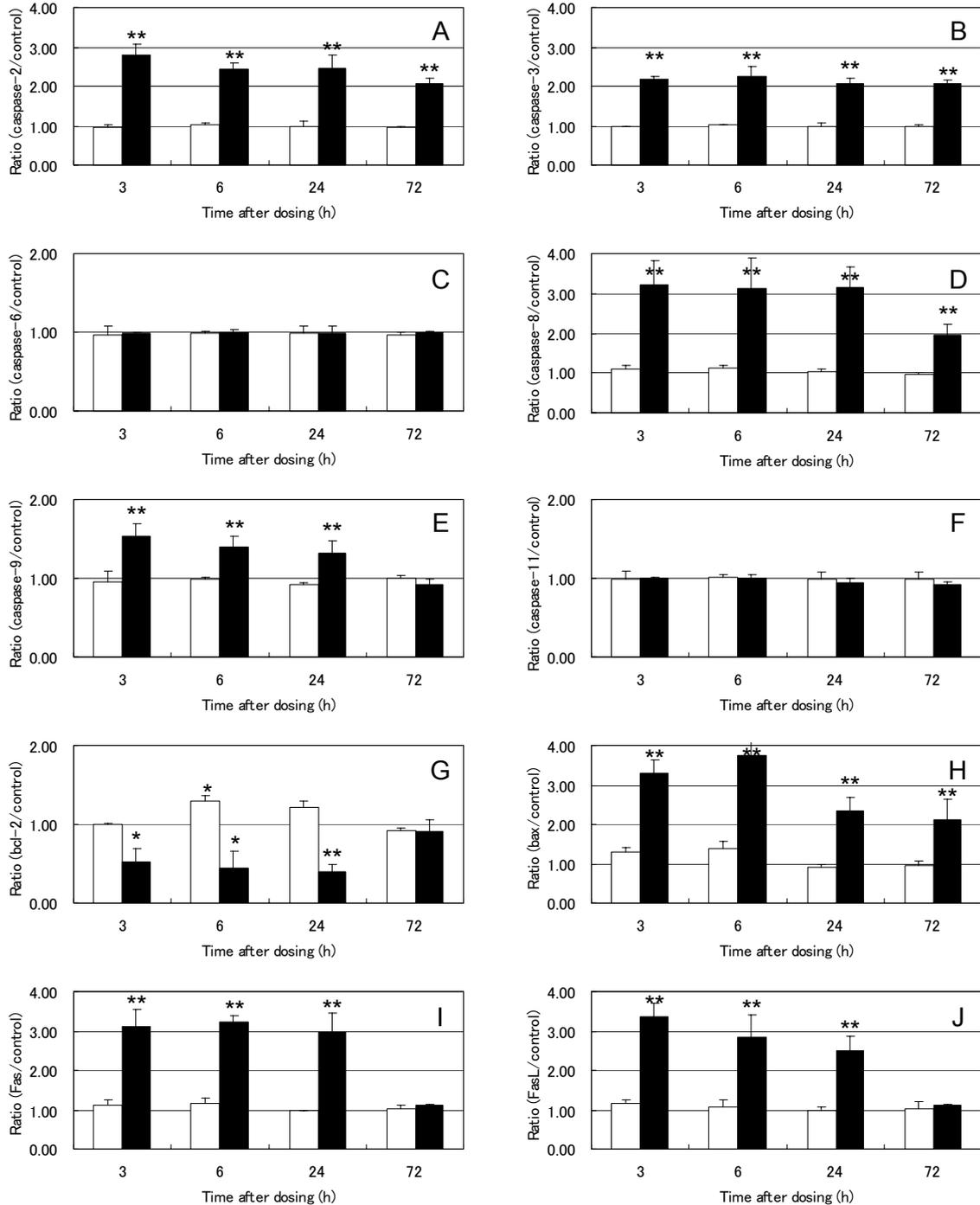


図 6 ラット精巣中のアポトーシス関連遺伝子の mRNA 発現のタイムコース

mRNA 発現量は real-time RT-PCR で定量し、caspase-2 (A), caspase-3 (B), caspase-6 (C), caspase-8 (D), caspase-9 (E), caspase-11 (F), bcl-2 (G), bax (H), Fas (I)および FasL (J) の結果を示した。それぞれの値はコントロールの同じ時間の発現量を 1 とした相対値で示した。それぞれの棒は平均 ± SD (n=6) で示したが、白抜き棒は 20 mg/kg of DEHP 投与群、塗りつぶした棒は 2000mg/kg DEHP 投与群を示す。コントロールに対する有意差: *p < 0.05, **p < 0.01。

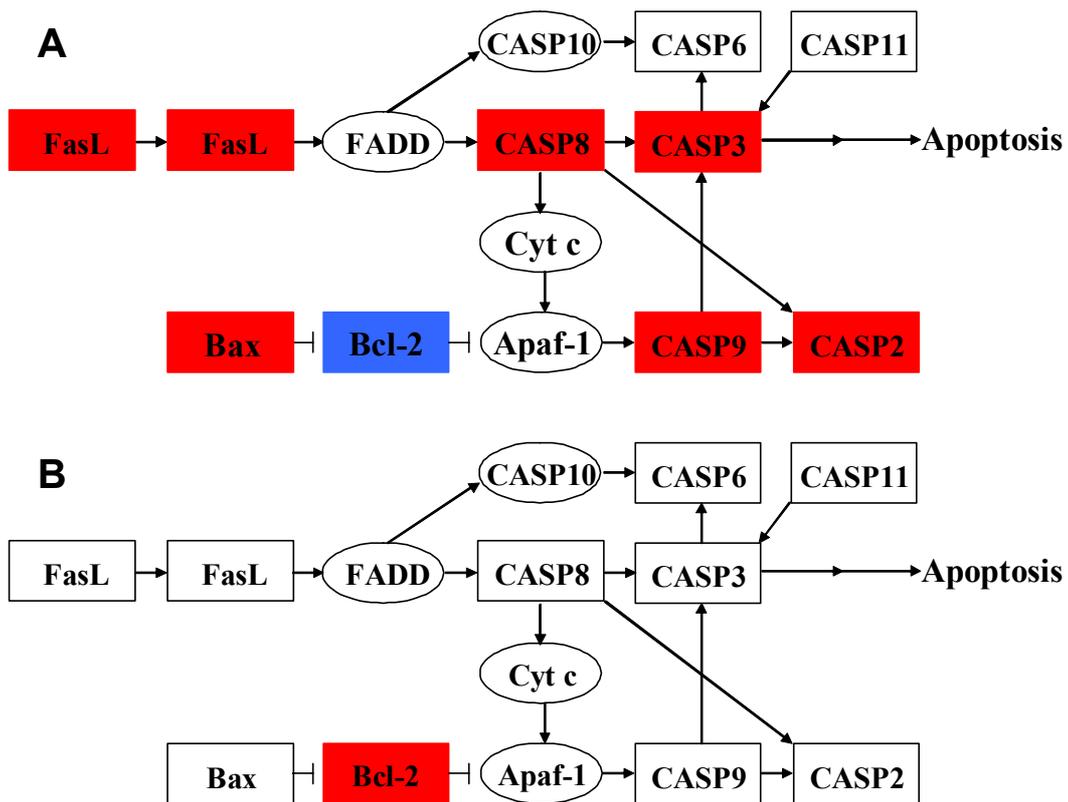


図 7 アポトーシスのパスウェイ上の遺伝子発現の要約

この図は KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.ad.jp/kegg/>) のパスウェイマップをモディファイし、それぞれ 2000 mg/kg (A) および 20 mg/kg (B) の場合を示した。四角で示した遺伝子は real-time RT-PCR で調べたもので、赤で塗りつぶしたで示した遺伝子は発現が上昇したもの、青で塗りつぶした遺伝子は発現が低下したものを示している。

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 β -estradiol, β -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 β -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 α 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 α 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 α 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 μ g/kg \cdot 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 α に配位することから、PPAR α 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チ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 α 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 α) 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 α (PPAR α)の役割について、野生型 SV/129 マウスと PPAR α -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 (F₀) を交配させ、誕生した仔を F₁とした。成熟した F₁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 F₂とした。F₁および F₂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、F₀から F₂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 α の標的酵素蛋白 (脂肪酸 β 酸化系酵素) の誘導が観察された。F₁と F₂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 α -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 α 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 α 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 (ω -1 酸化、脂肪酸 β -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 α -null mice が米国 NIH の Gonzalez 博士のグループによって開発され、PPAR α 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 α -null mice を用いて、DEHP による繁殖の低下が PPAR α 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 α -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 F₀ とした) を交配した。F₁ 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 F₂ とした。

F₁、F₂ 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。F₀ は 36 週齢で、F₁ と F₂ 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 α 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 F₂ 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 α 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 α 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 α 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 β 酸化系酵素を誘導しているかを評価するために、PPAR α 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 β -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 α 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 α の誘導と体重への影響

DEHP による肝の PPAR α の誘導を知るために PPAR α 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 α 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 β 酸化系の酵素の発現量に差は認められず、0.05%DEHP の PPAR α 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 α -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 F₁、F₂ 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%(F₁)、62.8%(F₂)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 α -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 α -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 α 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 α 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 α 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 α -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 α -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 α -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 α -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 α -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(F₀, F₁, F₂)においても、野生型、PPAR α -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 α -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 α 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 β 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 α 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 α -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 α 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 α に支配されているのか、今のところ不明である。

2. PPAR α 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 α 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 α 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

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'-CTGGCTGGTCCCATTCATTT-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中間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 の関与が大きいですが、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。

表1-1 Body weight at mating

	Body weight		
	n	Male	Female
<i>Control</i>			
Wild-type mice	12	29.6±0.9	24.6±3.7
PPAR α -null mice	12	29.7±2.6	22.7±0.8
<i>DEHP, F0</i>			
Wild-type mice	12	27.1±1.5 ^a	22.1±0.9 ^a
PPAR α -null mice	12	28.1±1.5	24.3±2.4
<i>DEHP, F1</i>			
Wild-type mice	12	27.3±3.7 ^a	21.3±2.1 ^a
PPAR α -null mice	12	28.8±2.2	22.7±1.3

Figures represent the mean±SD

^aSignificantly different from respective control (p<0.05)

表1- 2 Fertility and reproductive performance of mating mice

	Control	0.05% DEHP-F1	0.05% DEHP-F2
<i>Wild-type mice</i>			
No. Fertile/No. cohabited	12/12	12/12	12/12
Pups born per pair	6.8±1.9	4.8±1.6 ^b	4.3±2.2 ^b
Live pups per pair ^a	6.3±2.1	3.1±2.4 ^b	2.7±2.5 ^b
Percentage of live pups (%)	92.6	64.6	62.8
<i>PPARα-null mice</i>			
No. Fertile/No. cohabited	12/12	12/12	12/12
Pups born per pair	6.3±1.8	6.3±2.1	5.9±0.9
Live pups per pair ^a	5.3±2.1	5.6±2.9	4.8±1.6
Percentage of live pups (%)	86.9	88.9	81.4

Figures represent the mean±SD

^aPups surviving for 16 weeks

^bSignificantly different from control group (p<0.05)

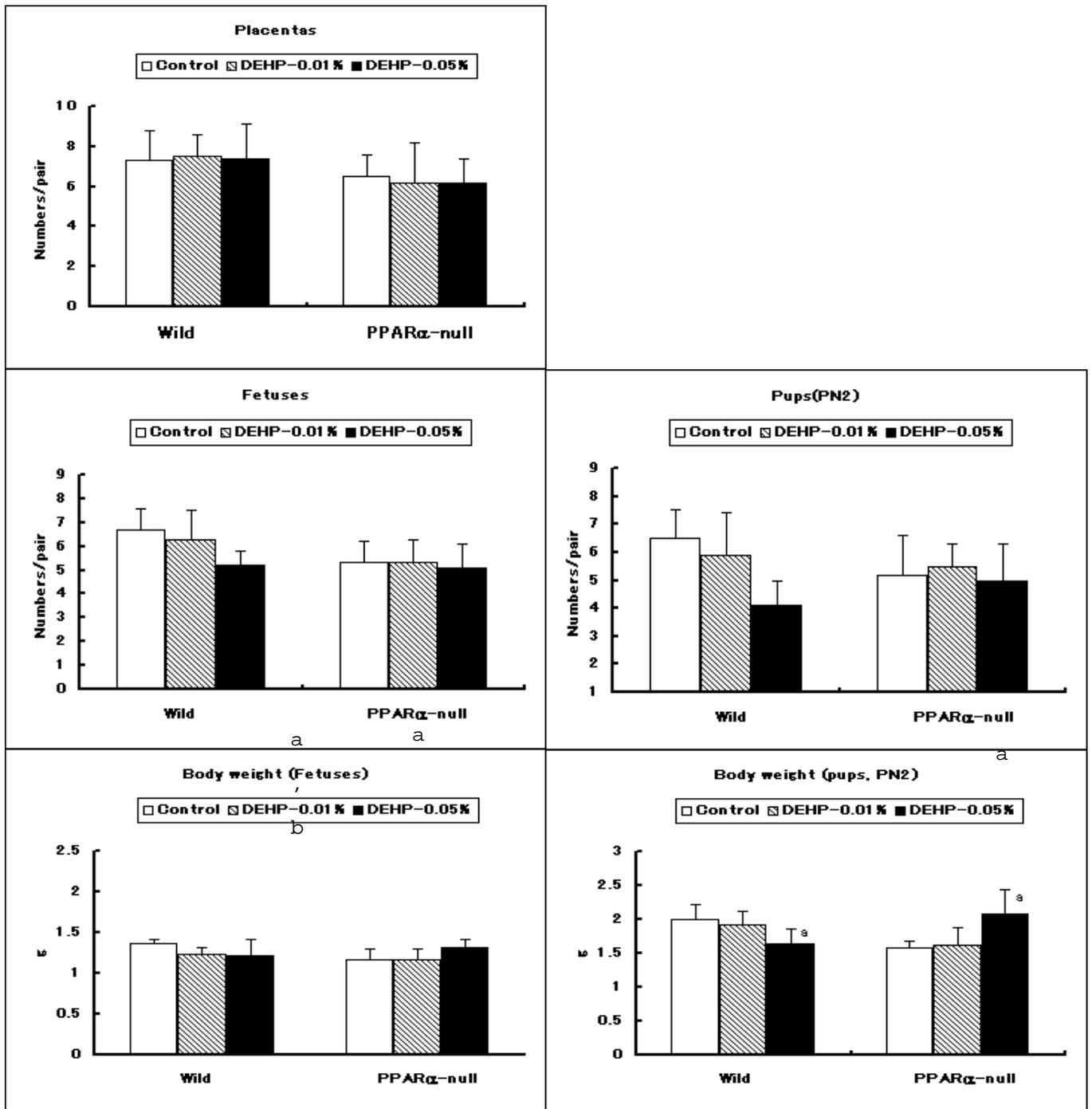


图 1-1 DEHP 处理对胎盘、胎儿和仔鼠数量的影响

表 1-3 胎儿和仔鼠肝脏中的甘油三酯 (mg/g)

	Fetuses		Pups	
	Male	Female	Male	Female
<i>Wild-type mice</i>				
Control	1.2±0.3	1.4±0.2	12.3±4.9	9.4±1.1
0.05% DEHP	1.3±0.4	1.9±1.1	12.2±4.6	7.9±2.1
<i>PPARα-null mice</i>				
Control	1.3±0.4	1.5±0.3	34.0±2.7	28.8±8.8
0.05% DEHP	1.4±0.3	1.8±1.1	31.2±6.2	25.6±6.9

Each group consisted of 6 samples

Figures represent the mean±SD

表1- 4 Triglyceride concentrations in maternal liver and serum

	Pregnant mice	Postpartum mice
	Liver (mg/g)	
<i>Wild-type mice</i>		
Control	11.2±0.1	12.6±2.9
0.05% DEHP	11.5±1.9	13.6±2.3
<i>PPARα-null mice</i>		
Control	12.8±1.1	15.5±2.0
0.05% DEHP	13.6±1.6	17.0±3.0
	Serum (mg/ml)	
<i>Wild-type mice</i>		
Control	1.51±0.33	1.09±0.31
0.05% DEHP	0.82±0.20 ^a	0.65±0.08 ^a
<i>PPARα-null mice</i>		
Control	1.88±0.47	1.30±0.21
0.05% DEHP	1.73±0.40	1.16±0.37

Each group consisted of 6 samples

^aSignificantly different from control (p<0.05)

表1- 5 Serum testosterone levels in male mice

		Testosterone
<i>Wild-type mice</i>		
	n	
F0, control	6	7.5±3.6
F0, DEHP	6	2.2±1.8 ^a
F1, control	6	7.0±3.0
F1, DEHP	6	2.2±1.8 ^a
F2, DEHP	6	1.4±0.7 ^a
<i>PPARα-null mice</i>		
F0, control	6	1.3±1.1
F0, DEHP	6	1.5±1.1
F1, control	6	0.8±0.4
F1, DEHP	6	0.8±0.2
F2, DEHP	6	0.9±0.1

^aSignificantly different from respective control (p<0.05)

表2-1 Effects of phthalates on the PPAR -related hepatic enzymes

Treatment	m. w	PT	PH	DBF	VLCAD	TP α	TP β	CYP4A
Control		1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.16	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.32	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.31
Diethylphthalate	222.24	0.98 \pm 0.16	1.02 \pm 0.01	1.63 \pm 0.40	1.04 \pm 0.03	1.32 \pm 0.47	1.18 \pm 0.18	1.08 \pm 0.28
Dibutylphthalate	278.34	1.04 \pm 0.26	1.20 \pm 0.04	0.92 \pm 0.05	0.92 \pm 0.07	1.64 \pm 0.19 ^a	1.17 \pm 0.07	1.51 \pm 0.27 ^a
Butylbenzylphthalate	312.37	1.44 \pm 0.04 ^a	1.16 \pm 0.06	1.43 \pm 0.36 ^a	0.95 \pm 0.05	1.90 \pm 0.18 ^a	1.32 \pm 0.06 ^a	1.82 \pm 0.11 ^a
Dicyclohexylphthalate	330.42	1.25 \pm 0.18	1.08 \pm 0.07	1.94 \pm 0.43 ^a	0.97 \pm 0.04	1.96 \pm 0.33 ^a	1.34 \pm 0.13 ^a	1.56 \pm 0.25 ^a
Diethylhexylphthalate	390.56	1.59 \pm 0.14 ^a	1.59 \pm 0.06 ^a	2.14 \pm 0.27 ^a	1.22 \pm 0.01 ^a	2.60 \pm 0.28 ^a	1.73 \pm 0.19 ^a	2.69 \pm 0.54 ^a
Diethylhexyl adipate	370.57	1.31 \pm 0.18 ^{a,t}	1.37 \pm 0.07 ^a	1.71 \pm 0.55 ^a	1.34 \pm 0.07 ^a	2.67 \pm 0.19 ^a	1.78 \pm 0.26 ^a	2.24 \pm 0.30 ^{a,b}
Correlation ^c		*	*	*	**	*	*	**

^aSignificantly different from control (p<0.05)

^bSignificant difference between diethylhexylphthalate and diethylhexyladipate treatments

^cCorrelation between molecular weight and induction of several enzymes

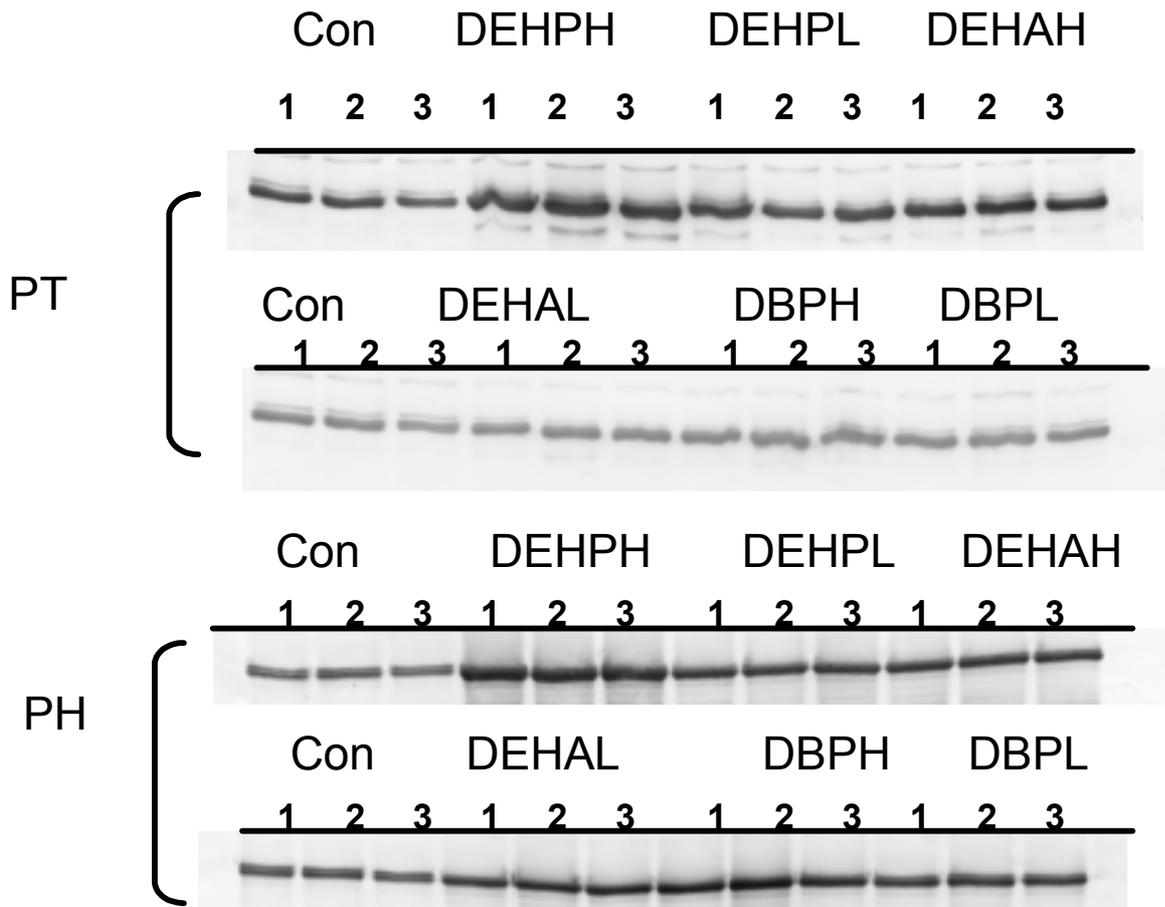


図 2-1 ペルオキシゼーム酵素の western blot 分析

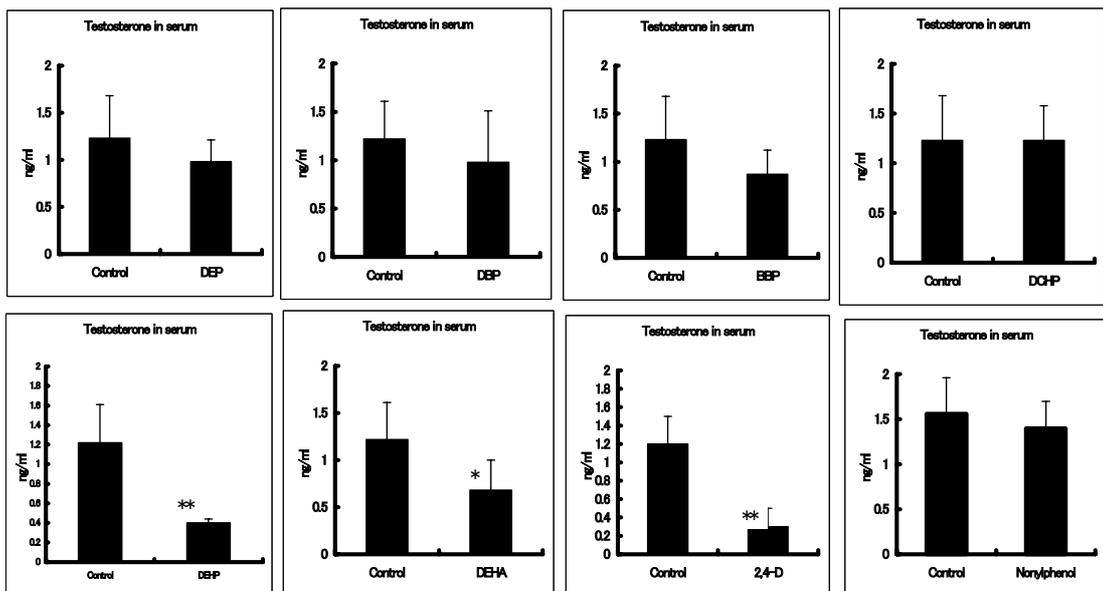


図 2-2 血清テストステロン濃度への影響

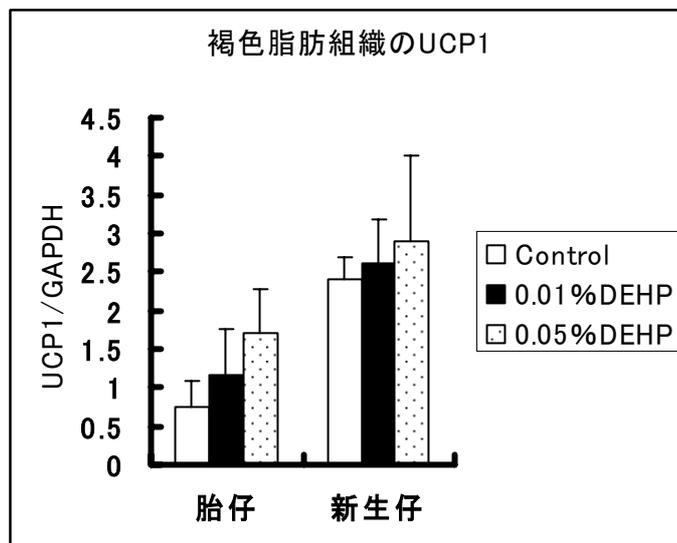


図 3-1 DEHP の UCP1 への影響

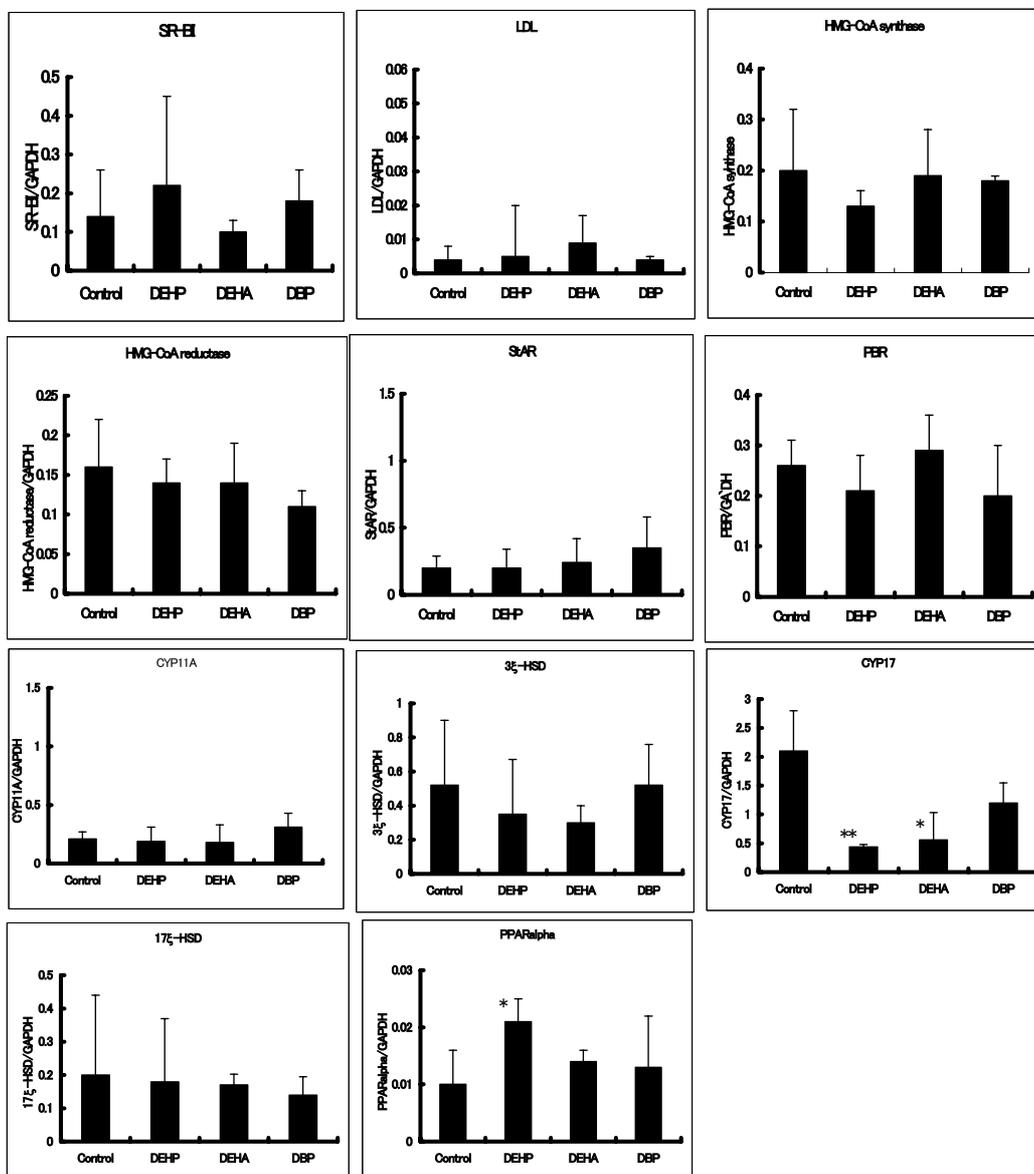


図 4-1 ライディッチ細胞における遺伝子発現への影響

表5-1 Body and organ weights

	Body weight	Liver weight	Liver/body(%)	Kidney weight	Kidney/body(%)	Testis weight	testis/body(%)
Mouse							
Control	35.6±0.9	1.99±0.12	5.57±0.34	0.54±0.07	1.53±0.21	0.25±0.02	0.70±0.06
DEHP	35.7±1.6	2.58±0.24***	7.24±0.55***	0.58±0.05	1.62±0.14	0.24±0.02	0.68±0.04
Rat							
Control	351±17	13.3±0.6	3.80±0.13	2.60±0.29	0.73±0.06	2.87±0.31	0.82±0.09
DEHP	351±21	20.3±2.2***	5.77±0.34***	2.77±0.27	0.79±0.03	2.84±0.09	0.81±0.04
Marmoset							
Control	264±20	9.9±2.0	3.93±0.55	1.52±0.31	0.61±0.11	0.83±0.14	0.33±0.07
DEHP 100	266±53	10.5±2.3	3.95±0.94	1.59±0.26	0.60±0.10	0.73±0.29	0.26±0.09
DEHP 500	258±32	9.6±1.8	3.85±0.42	1.70±0.25	0.69±0.06	0.66±0.25	0.26±0.08
DEHP 2500	267±30	9.1±1.1	3.67±0.26	1.75±0.21	0.71±0.05	0.75±0.41	0.29±0.16

***Significantly different from control (p<0.001)

表 5-2 Species differences in regard to lipase activities (pmol/mg protein/min)

	Microsomes	Homogenates			
	Liver	Liver	Small intestine	Kidney	Lung
Mouse	4445±577 ^a	1339±261 ^a	5764±1147 ^a	956±87 ^a	53±20
Rat	2232±298 ^b	718±152 ^b	428±146	105±31 ^b	57±19
Marmoset	108±16 ^c	62±11 ^c	39±17 ^c	21±7 ^c	ND

Values represent the mean ± standard deviations for each group.

^aSignificant difference between mice and rats ($p<0.05$)

^bSignificant difference between rats and marmosets ($p<0.05$)

^cSignificant difference between mice and marmosets ($p<0.05$)

表 5-3 Species differences in Km and $Vmax$ values of lipase activity for DEHP in hepatic microsomes from mouse, rat, and marmoset

	Mouse	Rat	Marmoset
Km (mM)	0.012	0.006	1.357
$Vmax$ (nmol/mg protein/min)	3.91	1.32	0.49
$Vmax/Km$	333	227	1.38

Values represent the mean of triplicate analyses for each group

表 5-4 Species differences in regard to hepatic UGT activity (nmol/mg protein/min)

Substrate	Mouse	Rat	Marmoset
<i>MEHP</i>			
Liver	0.66±0.10	0.51±0.12	0.25±0.04 ^{b,c}

^bSignificant difference between rats and marmosets ($p<0.05$)

^cSignificant difference between mice and marmosets ($p<0.05$)

表 5-5 Species differences in regard to ADH activities (nmol/mg protein/min) for 2-ethylhexanol and 2-phenoxyethanol

	Mouse	Rat	Marmoset
<i>2-EH (10μM)</i>			
Liver	32.7±4.4	26.3±6.2	43.3±6.2 ^{b,c}
Small intestine	3.55±2.37	10.72±1.36 ^a	13.78±7.26 ^c
Kidney	0.43±0.85	0.65±0.38	ND
Lung	2.21±2.48	3.47±1.47	4.72±0.29
<i>2-POET (10μM)</i>			
Liver	ND	ND	11.25±2.5
Small intestine	1.80±1.97	5.69±2.47	1.72±2.55
Kidney	ND	ND	ND
Lung	ND	ND	ND

Values represent the mean \pm standard deviations for each group.

^aSignificant difference between mice and rats ($p<0.05$)

^bSignificant difference between rats and marmosets ($p<0.05$)

^cSignificant difference between mice and marmosets ($p<0.05$)

表 5-6 Species differences in regard to ALDH activities (nmol/mg protein/min) for 3-phenylpropionaldehyde and 2-ethylhexanal

	Mouse	Rat	Marmoset
<i>2-Ethylhexanal (10μM)</i>			
Post-mitochondrial fraction			
Liver	7.7 \pm 2.9	14.0 \pm 2.4 ^a	12.9 \pm 2.7
Mitochondrial fraction			
Liver	5.4 \pm 1.9	32.8 \pm 10.8 ^a	14.4 \pm 7.6 ^b
Small intestine	2.56 \pm 1.38	6.68 \pm 2.77	7.86 \pm 4.89
Kidney	ND	4.74 \pm 0.81	22.11 \pm 1.71 ^{b,c}
Lung	2.68 \pm 0.93	5.14 \pm 1.60 ^a	4.64 \pm 0.72
<i>3-Phenyl propionaldehyde (10μM)</i>			
Post-mitochondrial fraction			
Liver	9.9 \pm 1.8	15.9 \pm 2.4 ^a	25.8 \pm 0.6 ^{b,c}
Mitochondrial fraction			
Liver	6.1 \pm 1.3	21.0 \pm 5.2 ^a	27.3 \pm 4.5 ^c
Small intestine	2.77 \pm 2.40	9.95 \pm 0.98 ^a	38.65 \pm 5.10 ^{b,c}
Kidney	ND	3.79 \pm 0.92	39.30 \pm 1.98 ^b
Lung	2.62 \pm 1.24	4.07 \pm 1.93	8.15 \pm 2.70 ^{b,c}

Values represent the mean \pm standard deviations for each group.

^aSignificant difference between mice and rats ($p < 0.05$)

^bSignificant difference between rats and marmosets ($p < 0.05$)

^cSignificant difference between mice and marmosets ($p < 0.05$)

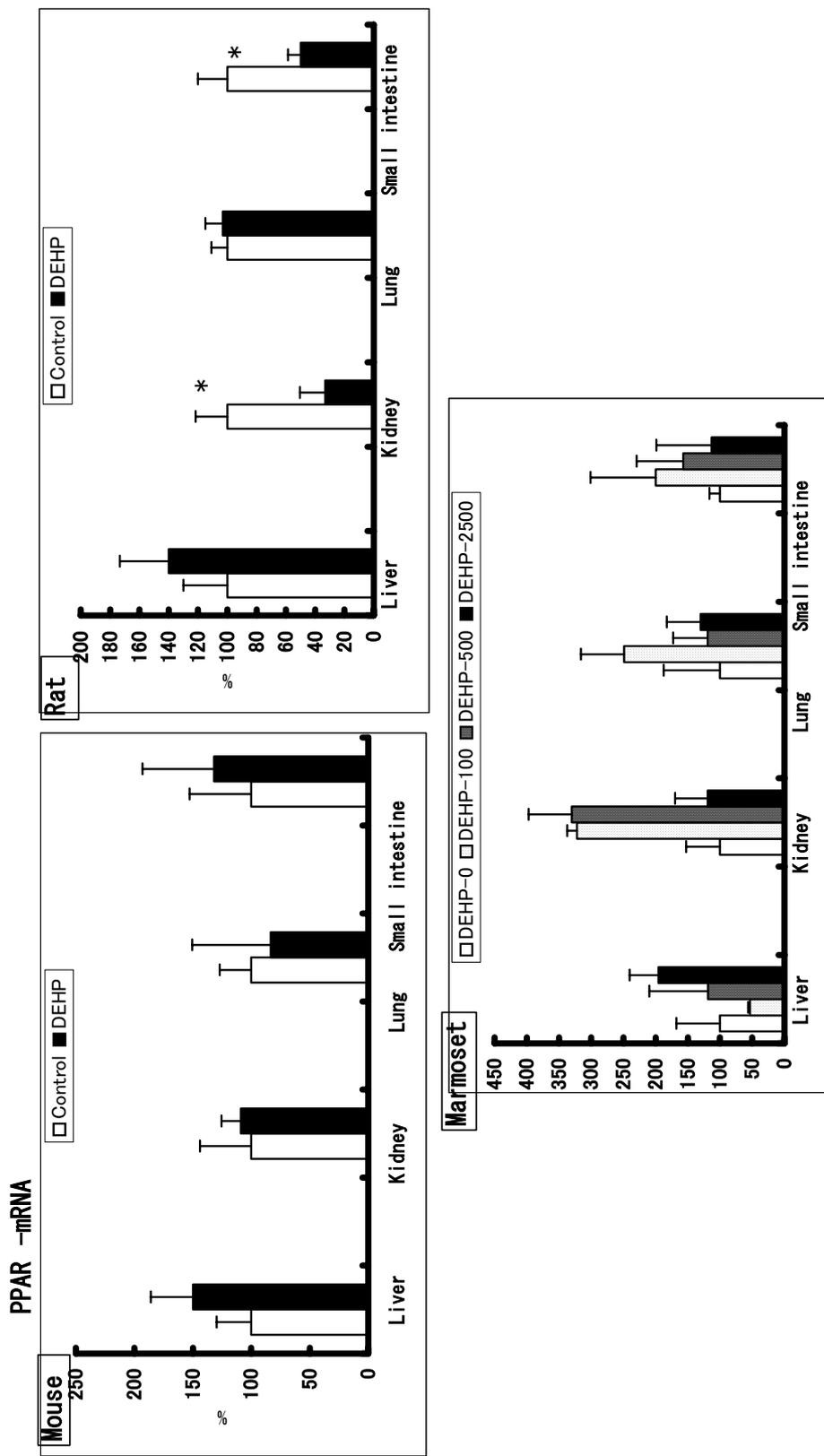


図 5-1 マウス、ラット、マーマセットの PPAR α 遺伝子発現

表 5-7 DEHP のリパーゼ遺伝子発現への影響
Lipase-mRNA/GAPDH-mRNA

	Liver	Kidney	Lung	Small intestine
Mouse				
Control	1.48±0.67	7.45±2.10	8.21±2.86	0.21±0.06
DEHP	2.36±0.93	4.38±0.84*	10.26±5.44	0.27±0.31
Rat				
Control	0.54±0.04	0.45±0.05	4.98±1.32	0.10±0.08
DEHP	0.99±0.20*	0.22±0.03*	6.43±1.65	0.08±0.03
Marmoset				
Control	ND	0.0049±0.0036*	0.0033±0.0016*	0.0028±0.0012*
DEHP 100	ND	0.0145±0.0054	0.0095±0.0019	0.0029±0.0005
DEHP 500	ND	0.0067±0.0030	0.0097±0.0114	0.0020±0.0018
DEHP 2500	ND	0.0066±0.0016	0.0073±0.0053	0.0022±0.0024

*p<0.05

Immunoblot analysis of PPAR α -target genes

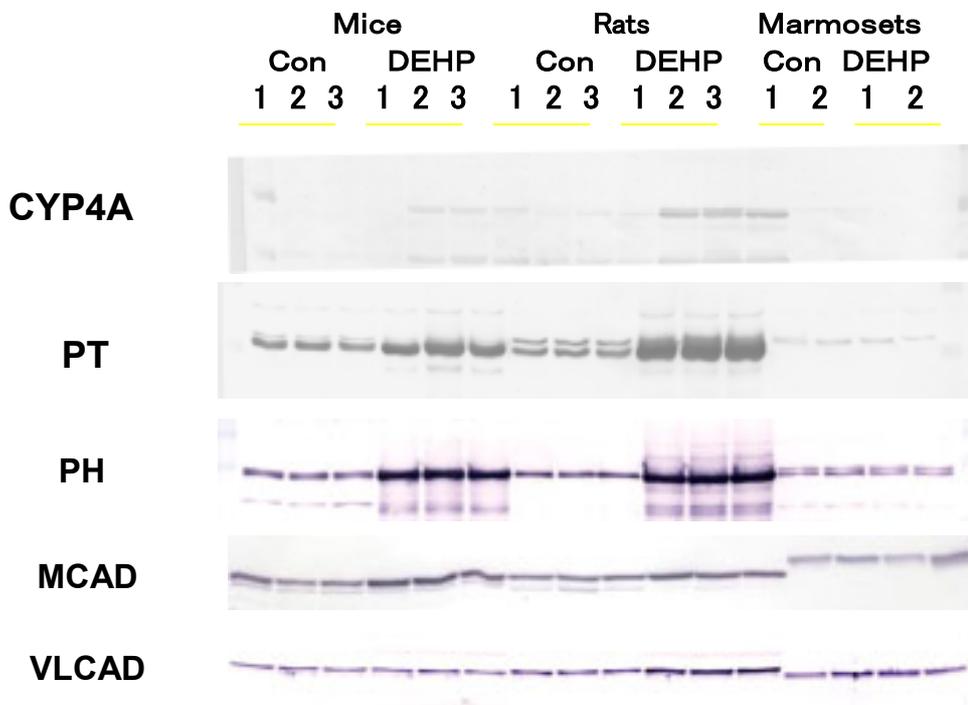


図 5-2 DEHP による遺伝子発

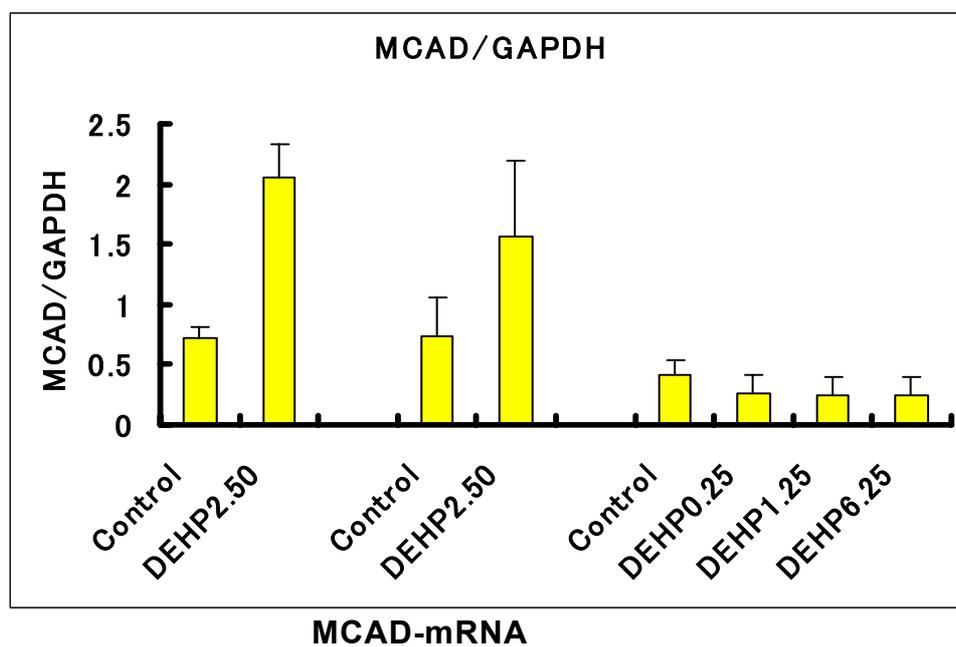
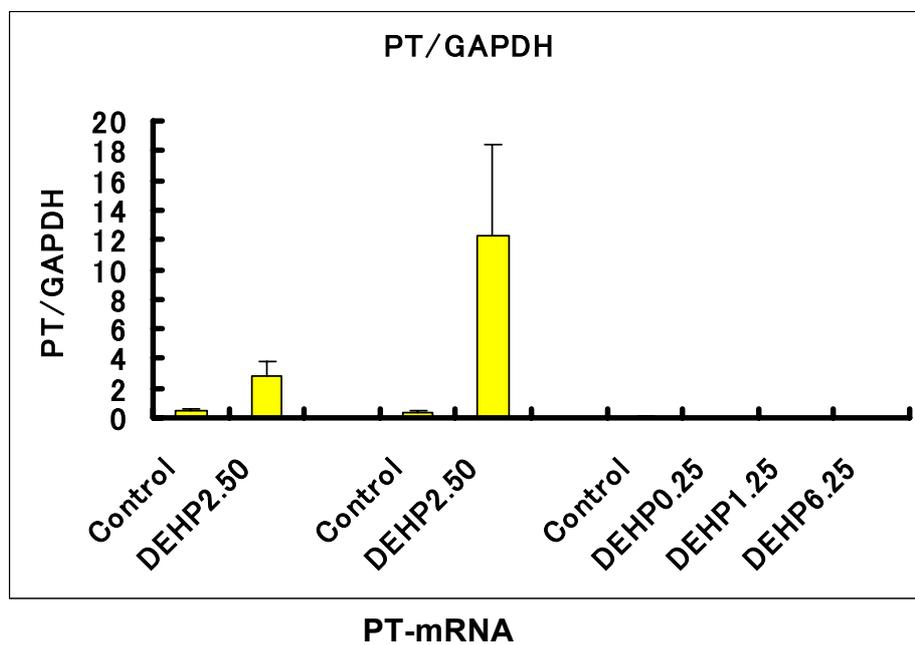


図 5-3 mRNAの発現
(マウス、ラット、マーモセットの順)

Mechanism of probable endocrine disruptor di(2-ethylhexyl)phthalate on reproductive or developmental toxicity and the risk assessment

Tamie Nasu-Nakajima, Nagoya University Graduate School of Medicine.

Abstract

- 1) Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) treatment (0.05%, feeding) decreased survival rates of fetuses and new born pups in wild-type mice, but not in PPAR α -null mice. Thus, the developmental toxicity of DEHP may be related to the PPAR α gene.
- 2) DEHP decreased serum testosterone levels in wild-type mice, which may be related to the decreased CYP17-mRNA in Leydig cells.
- 3) DEHP was the strongest ligand to PPAR α in the phthalic acids investigated.
- 4) There was a great species difference in lipase activity, measured by the rate of formation of mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) from DEHP, among mice, rats and marmosets: the activity was highest in the mice and lowest in the marmosets. This might be because of the significant differences between V_{max}/K_m values of lipase for DEHP among species.
- 5) There was also a species difference in the induction of PPAR α -target genes by DEHP: in the peroxisomal enzymes, the induction was most prominent in rats, followed by mice and marmosets. The differences were not related to PPAR α levels.

Thus, the results suggest the need for close attention to uncertainty when data are extrapolated from animal to human.

3. フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価

研究者 岸 玲子（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 教授）

研究要旨

フタル酸エステル類は動物実験において、内分泌攪乱作用、生殖毒性、発達毒性、組織障害などが報告されている。また、大気、水、土壌など様々な環境中から検出されることから、人への影響が懸念される。しかし、多くの研究報告は、経口摂取による生体影響について述べたものであり、人におけるより自然な摂取経路である吸入曝露による影響についての報告は殆どないため、吸入曝露実験とそれに基づくリスク評価が必要である。本研究ではフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) 吸入曝露を行い、(1) 次世代影響、(2) 幼若雌ラットの生殖内分泌系への影響、について検討を行った。

(1) 妊娠初期から後期までの DEHP 吸入曝露により、妊娠 19 日目での雄胎仔ラットの精巣組織テストステロン濃度は、有意ではないが、減少傾向が見られた。また、精巣合成酵素 mRNA 発現量は、DEHP 曝露濃度依存性に、有意に減少した。母ラットでは、DEHP 吸入曝露による有意な影響は見られなかった。さらに、妊娠ラットへの DEHP 吸入曝露による雄仔ラット生殖器の成熟への影響を調べたところ、8 週齢における精巣重量がコントロール群と比較して 5 mg/m³ DEHP 吸入曝露群で有意に高いこと、12 週齢における前立腺重量が 5 mg/m³ DEHP 吸入曝露群と比較して 25 mg/m³ DEHP 吸入曝露群で有意に低いことが認められた。

(2) 幼若雌ラットへの DEHP 吸入曝露によって、膻開口の日齢を早めることが明らかになった。また、性周期に関しても、コントロール群と比較して 25 mg/m³ DEHP 吸入曝露群では、異常性周期の割合が有意に増加しており、幼若期における DEHP の吸入曝露は性周期に影響を与えていると考えられる。さらに DEHP 吸入曝露によって、エストラジオールの産生に必要なアロマターゼ mRNA 発現量の有意な増加が見られたが、血清エストラジオール量には、DEHP 吸入曝露によって減少傾向はみられるものの、有意差は認められなかった。今後、エストラジオールの代謝に関わる 17β-HSD IV などへの DEHP 吸入曝露による影響を明らかにし、幼若雌ラットへの DEHP 吸入曝露が生殖内分泌系への影響の機構を検討していく必要がある。

研究協力者

佐田 文宏（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 助教授）
西條 泰明（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 助手）
近藤 朋子（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 研究員）
森 ゆうこ（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 研究員）
坂 晋（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 研究員）
倉橋 典絵（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 大学院生）
馬 明月（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 大学院生）

A. 研究目的

フタル酸エステル類の用途は広範囲で、ポリ塩化ビニル、人工皮、ホース、機械器具部品、日用雑貨のほか、ラップやカップ麺などの食品包装材、医療器具などのプラスチック製品に添加される可塑剤として使用されている。また、農薬、化粧品、染料、印刷インキの溶媒や保留剤としても使用されている。

フタル酸エステル類は親油性であるので、①油分を多く含む食品の梱包により、成分が食品中に溶出し、経口的に摂取する可能性、②輸液パックなどの医療器具を介して血液中に移行する可能性、③プラスチック製品の低温焼却や、製品製造過程において、大気中へ放出され、呼吸器を介して体内に移行する可能性等が考えられる。

大気中において、フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) は $0.038\sim 0.79 \mu/m^3$ 、フタル酸ジブチル (DBP) は $0.017\sim 0.37 \mu/m^3$ (環境庁 1997) 存在することや、一般人口において、DEHP の 1 日あたりの最大曝露量は $2 mg/m^3$ であるという報告 (ATSDR 1993) もある。また、現在の産業現場における基準として、許容濃度は $5 mg/m^3$ に設定 (日本産業衛生学会、ACGIH TLV) されている。しかし、プラスチック工場周辺に住む妊娠した女性の血液中のフタル酸濃度を計測したところ、高濃度の女性に妊娠合併症が多く見られたとの報告 (1999 年) もあり、フタル酸による生体への悪影響が疑われている。

フタル酸エステル類の内分泌攪乱作用としては、*in vivo* において、弱いエストロゲン作用があることが報告されている。生体への影響としては、生殖毒性に関して、妊娠ラットへの曝露実験における、胎児の体重減少、胎児奇形、雄ラットへの曝露実験による精子濃度減少、精細管萎縮、前立腺重量減少といった報告がある。また、発達毒性に関して、生育遅延も報告されている。さらに、その親油性から、神経障害を指摘する報告もある。実際、フタル酸エステル類を扱う工場労働者の健康調査によると、多発性神経炎、知覚鈍麻、前庭機能の低下、嗅覚低下が認められている。動物実験では、臓器障害として、肝重量増加、中葉壊死・炎症反応といった組織学的変化、肝酵素の低下が報告されている。

しかし、これらの報告は、フタル酸エステル類の経口摂取による影響であり、吸入曝露による報告はほとんどない。代謝経路は、肺または消化管から速やかに吸収され血液により広く生体内に分布し、主として腎臓から尿中へ排泄されるようであるが、フタル酸エステル類の体内蓄積の報告によると、吸入曝露において脳における蓄積がほかの臓器に比べて比較的高いことが指摘されている。また、経口投与による肝への障害が多く報告されている一方、吸入曝露における肺と肝の cytochrome P450 への影響を検討したところ、吸入曝露による主要標的臓器は肺であるという報告もある。このように、経口摂取と吸入曝露による差が存在するようであるが、詳しく分かっていないのが現状である。

そこで、本研究では、現在までほとんど行われてこなかったフタル酸エステル類の吸入曝露における生体への影響を検討することを目的とした。平成 13 年度は、吸入曝露を行うための曝露装置を作製し、平成 14 年度は、DEHP 吸入曝露による体内動態、生殖毒性、次世代影響についての検討を行い、平成 15 年度は、DEHP の吸入曝露による精巣毒性、次世代影響についての検討を行った。今年度は、次世代影響についての検討を昨年度に引き続いて行うとともに、幼若雌ラットへの DEHP 吸入曝露による内分泌系への影響について検討を行った。

B. 研究方法

1. 実験動物

妊娠ラットは、Wistar 系ラットを用いた。幼若雌ラットは、Wistar-imamichi ラット、日齢 21 日に離乳した雌ラットを用いた。妊娠ラット、幼若雌ラットはともに三協ラボサービス (日本エスエルシー株式会社) より購入した。

2. 妊娠ラットへの曝露による雄仔ラット精巣への影響

① 妊娠ラットへの曝露による母ならびに雄胎仔への影響

妊娠 Wistar 系ラットは、プラグ確認日を 0 日として妊娠 1 日目に購入した。妊娠ラットに特殊吸入曝露装置を用いて、0 mg/m³ (コントロール)、5 mg/m³ (低濃度)、25 mg/m³ (高濃度) の 3 点・各 10 匹ずつに、6 時間/日 (週 5 日) の条件で、DEHP 吸入曝露を妊娠 2 日目から 19 日目まで行った。曝露最終日に、曝露終了後、帝王切開を行い、胎仔を取り出した。胎仔は、精巣の確認によって、雌雄を確認した。精巣は、RIA によるテストステロン濃度測定、RNA 抽出に用いるまで -80°C で凍結保存した。母ラット、雄胎仔ラットはそれぞれ以下の項目について検討を行った。

- ・母 : 体重、妊娠黄体数、着床数、胚の生死および各組織 (卵巣、子宮、肝臓) 重量
- ・雄胎仔 : 体重、胎盤重量、体長、尾長、AGD 測定、精巣重量、精巣組織テストステロン濃度および精巣テストステロン合成酵素 mRNA

統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) によって検定した。

② 妊娠ラットへの曝露による雄仔ラットの生殖器成熟への影響

上記①と同様に、妊娠 Wistar 系ラットに特殊吸入曝露装置を用いて、0 mg/m³ (コントロール)、5 mg/m³ (低濃度)、25 mg/m³ (高濃度) の 3 点・各 10 匹ずつに、6 時間/日 (週 5 日) の条件で、DEHP 吸入曝露を妊娠 2 日目から 19 日目まで行った。曝露終了後、雄胎仔を 8 週齢ならびに 12 週齢まで飼育した後、体重、各組織 (精巣、精巣上体、精嚢、前立腺) の測定を行い、検討した。統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) によって検定し、有意差がみられたものについては、Scheffe の多重検定を行った。

3. 幼若雌ラットの思春期の発来と生殖機能への影響に関する検討

A) 日齢 22 日の雌 Wistar-imamichi ラットに特殊吸入曝露装置を用いて、0 mg/m³ (コントロール)、5 mg/m³ (低濃度)、25 mg/m³ (高濃度) の 3 点・各 10 匹ずつに、6 時間/日 (週 5 日) の条件で、DEHP 吸入曝露を日齢 84 日まで 9 週間行った。毎日午前 9 時から 10 時の間に体重、膈開口およびスメアを検査した。曝露終了後、発情終止期を認定した後、エーテル麻酔を行い、心採血し、各種臓器 (子宮、卵巣、肝臓、腎臓、肺) を摘出した。血液は、血漿分離され、FSH、LH、estradiol 濃度測定まで、-80°C で凍結保存した。卵巣は重量計測後、液体窒素により -80°C で凍結保存した。

検討項目は、体重変化、膈開口の日齢および体重、スメアの確認による一回目の発情期の日齢および体重、性周期の変化、各種臓器 (子宮、卵巣、肝臓、腎臓、肺) 重量、血清 FSH、LH、estradiol 濃度、卵巣中のテストステロン合成酵素 mRNA である。

統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) で検定し、有意差が見られたものには、Student-Newman-Keuls の多重比較を行った。また、共分散分析 (ANCOVA-GLM) で調整し、Bonferroni の多重比較を行ったものについては、表中に明記した。

B) 日齢 22 日の雌 Wistar-imamichi ラットを 30 匹 (遺伝的素因をできるだけ均一にするため、7 匹の母ラットから同腹仔 30 匹を用意した) を 0 mg/m³ (コントロール)、5 mg/m³ (低濃度)、25 mg/m³ (高濃度) の 3 点・各 10 匹ずつ分配した。ラットに特殊吸入曝露装置を用いて、それぞれの濃度で 6 時間/日の条件で、DEHP 吸入曝露を 6 時間/日 (週 5 日) の条件で、日齢 42 日まで 3 週間行った。毎日午前 9 時から 10 時の間に体重、膈開口、スメアおよび食餌量、飲水量 (曝露 1 日目から 2 日目の間の食餌量、飲水量を 1 日目とした) を検査した。曝露終了後、エーテル麻酔を行い、心採血し、各種臓器 (子宮、卵巣、肝臓、腎臓、肺) を摘出した。血液は、血漿分離され、FSH、LH、estradiol 濃度測定まで、

-80°Cで凍結保存した。左側卵巢は重量計測後、液体窒素により-80°Cで凍結保存し、子宮ならびに右側卵巢は、顕微鏡観察に用いるために、固定液（70%ピクリン酸飽和水溶液、25%ホルマリン、5%酢酸）で固定し組織標本を作製した。

（倫理面への配慮）

動物実験は、北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設の動物実験に関するガイドラインに従った。

C. 研究結果

1. 妊娠ラットへの曝露による雄仔ラット精巣への影響

DEHP曝露濃度の実測値は、5 mg/m³群で2.9±0.9 mg/m³、25 mg/m³群で19.7±3.2 mg/m³であった。

① 妊娠ラットへの曝露による母ならびに雄胎仔への影響

・母ラットへの影響

妊娠19日目のDEHP吸入曝露終了時の体重においては、コントロール群とDEHP吸入曝露群では有意差は認められなかった。また、コントロール群と比較してDEHP吸入曝露群において、肝臓重量では減少傾向、子宮重量では増加傾向がみられたが有意差は認められなかった（表1）。

・胎仔への影響

妊娠19日目のDEHP吸入曝露終了時における胎仔の体重、胎盤重量、体長、尾長およびAGD/体重の値においては、コントロール群とDEHP吸入曝露群で有意差は認められなかった（表2）。また、精巣重量においても、両者の間で有意差は認められなかった（表3）。精巣組織中のテストステロン濃度においては、DEHP吸入濃度依存的に減少傾向が見られたが、有意差は認められなかった（図1）。また、精巣テストステロン合成酵素 mRNA 発現量は、DEHP吸入曝露濃度依存的に有意に減少した（P<0.05）（図2）。

② 妊娠ラットへの曝露による雄仔ラットの生殖器成熟への影響

DEHP吸入曝露された妊娠ラットより産まれた雄仔ラットの体重については、8週齢において5 mg/m³ DEHP吸入曝露群と比較して25 mg/m³ DEHP吸入曝露群では有意に低かった（P<0.05）が、12週齢における体重差に有意差は認められなかった（図3）。各有性生殖器（精巣、精巣上体、精囊、前立腺）重量については、8週齢における精囊重量がコントロール群と比較して5 mg/m³ DEHP吸入曝露群で有意に高いこと（P<0.05）、12週齢における前立腺重量が5 mg/m³ DEHP吸入曝露群と比較して25 mg/m³ DEHP吸入曝露群で有意に低いことが認められた（P<0.05）（表4）。

2. 幼若雌ラットの思春期の発来と生殖機能への影響

A) DEHP曝露濃度の実測値は、5 mg/m³群で4.1±0.1 mg/m³、25 mg/m³群で19.8±0.4 mg/m³であった。

① 思春期発来への影響

DEHP吸入曝露群（5 mg/m³と25 mg/m³）における膣開口と1回目の発情期の日齢は、コントロール群と比較して有意に低かった（膣開口：P<0.05、1回目の発情期の日齢：P<0.05）。また、膣開口と

1 回目の発情期における体重においても、DEHP 吸入曝露群 (5 mg/m³ と 25 mg/m³) は、コントロール群と比較して有意に低かった (膣開口時の体重 : P<0.05、1 回目の発情期における体重 : P<0.05) (表 5)。

② 体重変化

DEHP 吸入曝露 24 日目以降において、25 mg/m³ DEHP 吸入曝露群の体重は、コントロール群の体重と比較して有意に低かった (P<0.05)。また、5 mg/m³ DEHP 吸入曝露群の体重は、コントロール群の体重と比較して有意な差は見られなかったが、低い傾向にあった (図 4)。

③ 性周期の変化

ラットは通常、1 サイクル 4 日間 (発情前期、発情期、発情後期、間期を各 1 日) の性周期を繰り返す。25 mg/m³ DEHP 吸入曝露群、5 mg/m³ DEHP 吸入曝露群およびコントロール群の性周期を比較したところ、25 mg/m³ DEHP 吸入曝露群では、異常性周期の割合が 25 mg/m³ DEHP 吸入曝露群やコントロール群と比較して有意に高かった (P<0.05) (表 6、図 5)。なお、ラットにおける異常性周期とは、1 サイクルが 5 日以上あるいは 3 日以内の場合、1 サイクル 4 日であってもサイクル中に異常が見られる場合である。

④ 各臓器重量の変化

各種臓器 (子宮、卵巣、肝臓、腎臓、肺) の重量を計測したところ、DEHP 吸入曝露群 (5 mg/m³ と 25 mg/m³) では、腎臓の重量がコントロール群と比較して有意に低かった (P<0.05)。腎臓以外の臓器に関しては、有意な変化は見られなかった。しかし、共分散分析 (ANCOVA-GLM) によって体重を調節したところ、腎臓においても DEHP 吸入曝露群 (5 mg/m³ と 25 mg/m³) とコントロール群では、有意な重量変化は見られなかった (表 7)。

⑤ 血清ホルモン値ならびに卵巣ステロイド合成酵素 mRNA 発現量の変化

血清エストラジオールは、コントロール群と比較して DEHP 吸入曝露群 (5 mg/m³ と 25 mg/m³) では減少傾向が見られたが、有意差は認められなかった。また、血清 FSH は、コントロール群と比較して DEHP 吸入曝露群では増加傾向が見られたが、有意差は認められなかった (P=0.065)。血清 LH については、コントロール群と DEHP 吸入曝露群において、有意な変化は認められなかった (図 6)。

卵巣ステロイド合成酵素 mRNA 発現量について調べたところ、アロマターゼ mRNA 発現量では、コントロール群、5 mg/m³ DEHP 吸入曝露群と比較して 25 mg/m³ DEHP 吸入曝露群では、それぞれ有意に増加していた (P<0.05) (図 7)。

B) DEHP 曝露濃度の実測値は、5 mg/m³ 群で 5.2±2.7 mg/m³、25 mg/m³ 群で 22.7±7.6 mg/m³ であった。

① 思春期発来への影響

DEHP 吸入曝露群 (5 mg/m³ と 25 mg/m³) における膣開口と 1 回目の発情期の日齢は、コントロール群と比較して有意に低かった (膣開口 : P<0.05、1 回目の発情期の日齢 : P<0.05)。また、1 回目の発情期における体重においても、DEHP 吸入曝露群 (5 mg/m³ と 25 mg/m³) は、コントロール群と比

較して有意に低かった ($P<0.05$)。さらに、膈開口における体重において、DEHP 吸入曝露群 (5 mg/m^3 と 25 mg/m^3) は、コントロール群と比較して低い傾向が見られた (表 8)。

② 食餌量ならびに飲水量への影響

2-A-①でみられた体重変化が DEHP 吸入曝露による生理学的影響か、あるいは食餌量、飲水量などによる 2 次的な影響かを判断するために、DEHP 吸入曝露中の食事量ならびに飲水量を群別に調べた。その結果、食事量ならびに飲水量について、群別に有意な差は見られないことから、DEHP 吸入曝露による幼若雌ラットの体重減少には、食餌量ならびに飲水量は影響していないことが明らかとなった (図 8-11、表 9)。

③ DEHP 吸入曝露による幼若雌ラット子宮ならびに卵巣への影響

DEHP 吸入曝露による幼若雌ラット子宮ならびに卵巣への影響を評価するために、子宮ならびに卵巣の組織標本を作製し、現在、組織像の観察を行っている。また、卵巣中の各性ホルモン値についても、現在測定中である。

D. 考察

1. 妊娠ラットへの曝露による雄仔ラット精巣への影響

本研究において、妊娠ラットへの DEHP 吸入曝露により、妊娠 19 日目における次世代雄性ラットの P450_{scc}、3-βHSD、CYP17 などの精巣テストステロン合成酵素 mRNA 発現量が有意に低下することが明らかになった。また、妊娠 19 日目における次世代雄性ラットの精巣組織テストステロン濃度においても DEHP 濃度依存的に減少傾向が見られた。これまで、妊娠ラットへの経口投与実験においては、出生した雄胎仔の血清 LH が低下することによる血清テストステロンの低下が報告されている (Benson, 2000) が、今回の実験では、血清 LH を測定していないため、in vivo における DEHP による血清テストステロンの低下が血清 LH の影響を受けていることについて、確認することはできなかった。今後、血清 LH を測定することによって明らかにする必要がある。さらに、今回、影響の見られた DEHP 吸入曝露による P450_{cc}、CYP17 などの mRNA 発現量は、 5 mg/m^3 DEHP 吸入曝露群においても有意な低下がみられた。 5 mg/m^3 DEHP 吸入曝露群の実測値は、 $2.9 \pm 0.9 \text{ mg/m}^3$ で、現在の労働現場の DEHP 許容濃度 (ACGIH、日本労働協会ともに 5 mg/m^3) よりも低いため、今後、さらに幼若ラット、妊娠ラットの次世代影響における L \ddot{O} AEL、N \ddot{O} AEL について詳細な検討を進める必要があると考えられる。

さらに、妊娠ラットへの DEHP 曝露による雄仔ラット生殖器の成熟への影響を調べたところ、8 週齢における精囊重量がコントロール群と比較して 5 mg/m^3 DEHP 吸入曝露群で有意に高いこと、12 週齢における前立腺重量が 5 mg/m^3 DEHP 吸入曝露群と比較して 25 mg/m^3 DEHP 吸入曝露群で有意に低いことが認められた。これらは、DEHP の経口投与実験 (750 mg/kg/day) で報告されてきたように、抗アンドロゲン作用の影響を受けているものと考えられる。このことは、妊娠ラットへの DEHP 吸入曝露により、比較的低濃度曝露でも、出生後の雄胎仔の生殖器の成熟に影響を与えることを示唆している。

2. 幼若雌ラットの思春期の発来と生殖機能への影響

DEHP の生殖機能への影響に関しては数多く報告されているが、その多くは雄性への影響を調べたものであり、雌性への影響を調べたものは数少ない。また、DEHP 曝露実験の多くは、経口投与によ

る影響を評価したものであり、吸入曝露による影響を評価した報告も少ない。そこで、本研究は、幼若雌ラットを対象とした DEHP 吸入曝露実験を行うことにより、思春期発来ならびに生殖機能への影響を調べるために、A)の実験を行った。

性周期発来検定は、内分泌攪乱物のスクリーニング試験として推薦されている。今回の性周期発来検定では、DEHP 吸入曝露により思春期発来ならびに膣開口の日齢を早めることが明らかになった。ただし、今回の実験においては、性周期の発来時ではなく、発情終止期認定時に生理学的検査を行っているために、思春期早期発来の原因を特定することはできなかった。また、性周期に関しても、コントロール群と比較して 25 mg/m³ DEHP 吸入曝露群では、異常性周期の割合が有意に増加していることから、幼若期における DEHP の吸入曝露は雌の性周期に影響を与えていると考えられる。しかし、通常の動物用餌自体には植物性エストロゲンが存在する可能性もあり、検討する必要があると考えられる。

DEHP 吸入曝露によって、曝露 24 日目以降において、25 mg/m³ DEHP 吸入曝露群の体重は、コントロール群の体重と比較して有意に低い結果が得られた。しかし、この原因として、DEHP 吸入曝露による生理学的影響ならびに食餌量、飲水量などを介した 2 次的な影響が考えられた。

そこで、思春期早期発来、膣開口などの原因を特定するために、生理学検査を曝露開始から 3 週間後に早めた B)の実験を行った。また、B)の実験では、体重変化の原因として食餌量、飲水量などが関係しているか調べるために、曝露期間中、群別に食事量ならびに飲水量を毎日検査した。その結果、曝露期間全体における食事量ならびに飲水量については、群別に有意な差は見られなかった。しかし、膣開口 (29-32 日齢) より前の時期においては、5 mg/m³ならびに 25 mg/m³ DEHP 吸入曝露群の飲水量はコントロール群と比較して多い傾向が見られたことから、DEHP の経口曝露で見られるような PPAR を介した脂肪酸酸化への影響が、膣開口前の未成熟な段階で見られたと考えられる。しかし、膣開口前の未成熟な段階であっても、各曝露群とコントロール群で食餌量には有意な差が見られないことから、A)の実験で認められたような DEHP 吸入曝露による体重の減少に食餌量と飲水量は関係していないと考えられる。そのため、DEHP 吸入曝露による幼弱雌ラットの体重変化は、脂肪酸によるものというよりも内分泌系などに影響を与えた結果である可能性が高い。また、体重で補正した場合、膣開口以後において、食餌量ならびに飲水量のばらつきが大きくなったが、この原因として、性周期が関与している疑いが挙げられる。B)の実験においても、DEHP 吸入曝露が思春期早期発来、膣開口へ有意に影響を与えていることを確認することができた。また、思春期早期発来、膣開口などの原因を特定するためのエストラジオール、FSH および LH などのホルモン値や卵巣中のステロイドホルモン合成酵素などの評価については、現在行っている段階である。さらに、卵巣、子宮への影響についても考慮する必要があると考え、卵巣、子宮については組織標本作製した。今後、これらの標本を顕微鏡で観察する予定である。

幼若ラットへの DEHP 経口投与実験においては、DEHP による血清エストラジオールの低下、性周期の延長が報告されている (Davis, 1994)。また、*in vitro* における実験より、DEHP の中間代謝物である MEHP が、DEHP とともに卵巣内の PPAR (peroxisome proliferators-activated receptor)を活性化することにより、ステロイド合成酵素であるアロマターゼの活性ならびに mRNA 発現量を抑制し、エストラジオールの産生を低下させている (Lovekamp, 2001, Lovekamp-Swan, 2003)。また、PPAR の活性化は、エストラジオールをエストロンに変換する酵素である 17 β -HSD IVの活性を上昇させて、エストラジオールの代謝を促進させる (Lovekamp-Swan, 2003)。しかし、今回の *in vivo* における幼若雌ラットへの DEHP 吸入曝露実験では、25 mg/m³ DEHP 吸入曝露群においては、*in vitro* で見られた結果と異なり、アロマターゼ mRNA 発現量の有意な増加が見られた。また、血清エストラジオール

量は、DEHP 吸入曝露によって減少傾向はみられるものの、有意差は認められなかった。これらの原因として、in vivo においては、アロマトラーゼ mRNA の発現量が亢進しているにもかかわらず、17 β -HSD IVの活性が上昇しているためにエストラジオールの代謝が促進されており、血清エストラジオール量に有意な変化が見られないことが考えられる。本研究では、PPAR、17 β -HSD IVについて調べることはできなかった。今後、DEHP 吸入曝露が PPAR から 17 β -HSD IVへの経路に与える影響を明らかにしていくことが重要である。

また、その他に、in vitro で見られたアロマトラーゼ mRNA 発現量の有意な増加の原因として、経口投与と吸入曝露による投与経路の違いが挙げられる。経口投与では、投与された DEHP の約 80%は、速やかに腭液、腸内粘膜、肝、肺で多く分泌されるリパーゼにより MEHP に変換されるが、経動脈、経腹腔内投与では、わずか1%が MEHP に変換される (Pollack, 1985)。現在のところ、吸入曝露による DEHP 代謝に関する報告はほとんどないが、吸入曝露も肺を経て直接血流に乗って代謝されることから、経口投与と比較して MEHP 濃度が低いことが予想されている。そのために、吸入曝露による少量の MEHP はアロマトラーゼの活性を低下させ、そのフィードバックとしてアロマトラーゼ mRNA の発現量を増加させているために、血清エストラジオール量に有意な変化が見られないことも考えられる。今後、これらのことを明らかにするための詳細な実験が必要である。

E. 結論

現在までほとんど行われてこなかった DEHP の吸入曝露により、妊娠ラットへの曝露による雄仔ラット精巣への影響ならびに幼若雌ラットの思春期の発来と生殖機能への影響について、検討を行った。

妊娠ラットへの 18 日間の吸入曝露によって、25 mg/m³ DEHP 吸入曝露群 (高濃度群) においても 5 mg/m³ DEHP 吸入曝露群 (低濃度群) においても、雄胎仔の精巣 mRNA 発現量を DEHP 濃度依存的に低下させた。また、精巣組織テストステロン濃度にも DEHP 濃度依存的に低下させることを示唆した。

幼若雌ラットへの DEHP 吸入曝露によって、思春期の発来を早めることが示唆された。また、性周期に関しても、コントロール群と比較して 25 mg/m³ DEHP 吸入曝露群では、異常性周期の割合が有意に増加しており、幼若期における DEHP の吸入曝露は雌の性周期に影響を与えていると考えられる。DEHP 吸入曝露によって、エストラジオールの産生に必要なアロマトラーゼ mRNA 発現量の有意な増加が見られた。今後、アロマトラーゼ mRNA の有意な増加が見られたにも関わらず、血清エストラジオール値の有意な変化が見られなかったことを踏まえて、17 β -HSD IVなどのエストラジオールの代謝に関与する因子について、DEHP 吸入曝露による変動を詳細に研究していく必要がある。

最近、フタル酸類によるヒトへの影響の可能性が報告された (Swan, S. H., 2005)。この報告では、DBP や DEP などのフタル酸の尿中代謝物である MBP、MEP の濃度と男児の AGD に有意差が見られるのに対して、DEHP の尿中代謝物である MEHP の濃度と AGD には有意差が見られなかったと述べている。この原因として、DEHP を MEHP に代謝するリパーゼには、ラットなどのげっ鼠類とヒトでは種差が存在するために、ヒトでは、ラットと比較して DEHP による影響を受けにくいことが予想される。また、DBP、DEP の環境中濃度は、DEHP の環境中濃度と比較して数倍高いことが報告されており、DBP や DEP と比較して DEHP を正しく評価するのが難しいと考えられる。さらに、環境中 DEHP 濃度と妊婦尿中代謝物濃度を測定した報告 (Jennifer, J. A., 2003) では、尿中代謝物 MEHP の濃度が MBP など他の尿中代謝物濃度と比較してばらつきがあることから、ヒトにおける DEHP の代謝には個体差が存在する可能性がある。このため、DEHP による生体影響にも個体によって差が現れ

ることも十分考えられることから、DEHP の曝露によるリスク評価を今後も継続し、曝露影響、機序をさらに解明していく必要がある。

表 1. 妊娠ラットへの DEHP 吸入曝露による母ラットへの影響

濃度	体重 (g)	肝臓重量 (g)	子宮重量 (g)	胎仔数	死亡胎仔数
0 mg/m ³	220.5±22.4	8.4±0.8	39.2±9.1	10.3±2.7	0
5 mg/m ³	209.7±14.5	7.8±0.7	40.1±5.8	10.5±1.6	0
25 mg/m ³	214.0±17.3	7.6±0.5	41.4±8.8	10.8±2.2	1

表 2. 妊娠ラットへの DEHP 吸入曝露による雄胎仔ラットへの影響

濃度	体重 (g)	胎盤重量 (g)	体長 (mm)	尾長 (mm)	AGD/体重
0 mg/m ³	2.3±0.3	0.6±0.1	31.2±1.1	11.4±0.8	1.1±0.2
5 mg/m ³	2.5±0.1	0.6±0.1	30.7±1.9	11.5±0.9	0.9±0.3
25 mg/m ³	2.5±0.2	0.5±0.2	32.5±0.7	11.5±0.8	1.0±0.1

表 3. 妊娠ラットへの DEHP 吸入曝露による雄胎仔ラット精巣重量の変化

濃度	精巣重量 (mg)	P 値
0 mg/m ³	1.5±0.08	n. s.
5 mg/m ³	1.3±0.60	n. s.
25 mg/m ³	1.5±0.42	n. s.

表 4. 妊娠ラットへの DEHP 吸入曝露による雄仔ラットの
8 週齢ならびに 12 週齢における生殖器重量の変化

	曝露濃度	精巣 (g)	精巣上体 (g/100 g 体重)	精囊 (g/100 g 体重)	前立腺 (g/100 g 体重)
	8週齢	0 mg/m ³	0.97±0.13	0.10±0.01	0.14±0.04
5 mg/m ³		1.07±0.04	0.10±0.01	0.20±0.02	0.08±0.02
25 mg/m ³		0.90±0.04	0.10±0.01	0.14±0.02	0.05±0.02
p-value		n. s.	n. s.	p<0.05	n. s.
12週齢		曝露濃度	精巣 (g)	精巣上体 (g/100 g 体重)	精囊 (g/100 g 体重)
	0 mg/m ³	1.45±0.06	0.15±0.02	0.35±0.07	0.10±0.02
	5 mg/m ³	1.44±0.07	0.15±0.01	0.31±0.02	0.11±0.01
	25 mg/m ³	1.42±0.03	0.14±0.01	0.36±0.01	0.08±0.01
	p-value	n. s.	n. s.	n. s.	p<0.05

表 5. 幼若雌ラットへの DEHP 吸入曝露による思春期発来への影響

(*: P<0.05、0 mg/m³群との比較において)

Parameter	0 mg/m ³ (n=10) Mean±SD	5 mg/m ³ (n=10) Mean±SD	25 mg/m ³ (n=10) Mean±SD
Age at vaginal opening (days)	32.0±2.0	30.3±1.3*	29.7±1.3*
Body weight (g) at vaginal opening	92.7±10.2	83.9±6.2*	79.5±5.9*
Age at first estrus (days)	32.7±2.3	30.6±1.3*	29.8±1.2*
Body weight (g) at first estrus	96.9±10.0	85.8±7.3	80.0±5.0*
The same occurrence rate of vaginal opening and first estrus (%)	80	90	80

表 6. 幼若雌ラットへの DEHP 吸入曝露による性周期への影響

	0 mg/m ³	5 mg/m ³	25 mg/m ³
Normal 4 days	72	73	61
Abnormal 4 days	5	2	3
≥5days	6	4	14
≤3days	1	4	8
Total	84	83	86

表 7. 幼若雌ラットへの DEHP 吸入曝露による臓器重量の変化

(*: P<0.05、0 mg/m³群との比較において)

Parameter	0 mg/m ³ (n=10)	5 mg/m ³ (n=10)	25 mg/m ³ (n=10)
Body weight (g)	274.2±16.9	261.4±17.5	256.0±13.5
Liver (g)	11.97±0.97	11.01±1.34	10.92±1.51
Liver (g) ^a	11.36±0.40	11.16±0.37	11.39±0.39
Kidney (g)	10.98±0.06	10.93±0.07*	10.92±0.05*
Kidney (g) ^a	10.96±0.02	10.93±0.01	10.93±0.02
Lung (g)	11.23±0.15	11.28±0.24	11.22±0.63
Lung (g) ^a	11.20±0.06	11.29±0.05	11.24±0.05
Ovary (mg)	69.63±13.58	69.00±9.88	66.36±13.73
Ovary (mg) ^a	67.19±4.58	69.57±3.86	68.22±4.01
Uterus (mg)	430.2±82.0	354.4±27.7	427.9±106.0
Uterus (mg) ^a	426.5±27.3	355.8±25.5	430.7±26.5

^a adjusted for body weight at necropsy using ANCOVA (GLM)

表 8. 幼若雌ラットへの DEHP 吸入曝露による思春期発来への影響
 (*: P<0.05、0 mg/m³ 群との比較において)

Parameter	0mg/m ³ (n=10)	5mg/m ³ (n=10)	25mg/m ³ (n=10)
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
Age at vaginal opening (days)	31.8±2.6	29.2±2.0*	29.5±2.8*
Body weight (g) at vaginal opening	85.9±10.8	75.0±12.7	77.1±13.1
Age at first estrus (days)	33.4±2.8	31.0±2.1*	30.6±2.7*
Body weight (g) at first estrus	97.1±11.3	83.5±12.9*	83.3±11.3*

表 9. 幼若雌ラットへの DEHP 吸入曝露による食餌量ならびに飲水量への影響

Parameter	0mg/m ³ (n=12)	5mg/m ³ (n=12)	25mg/m ³ (n=12)
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
Increase of body weight (g/day)	5.16±2.16	4.58±1.44	4.75±1.27
Food intake (g)	9.80±2.98	9.50±2.69	9.79±2.77
Food intake (g food/g B.W.) ^a	2.22±1.32	2.32±1.20	2.27±1.25
Water intake (ml)	16.42±5.32	17.56±4.10	17.82±4.31
Water intake (ml water/g B.W.) ^a	3.70±2.09	4.27±1.93	4.13±2.16

^a These data were standardized to body weight (B.W.)

図1. 妊娠ラットへのDEHP吸入曝露による雄胎仔ラット
精巣組織テストステロン濃度の変化

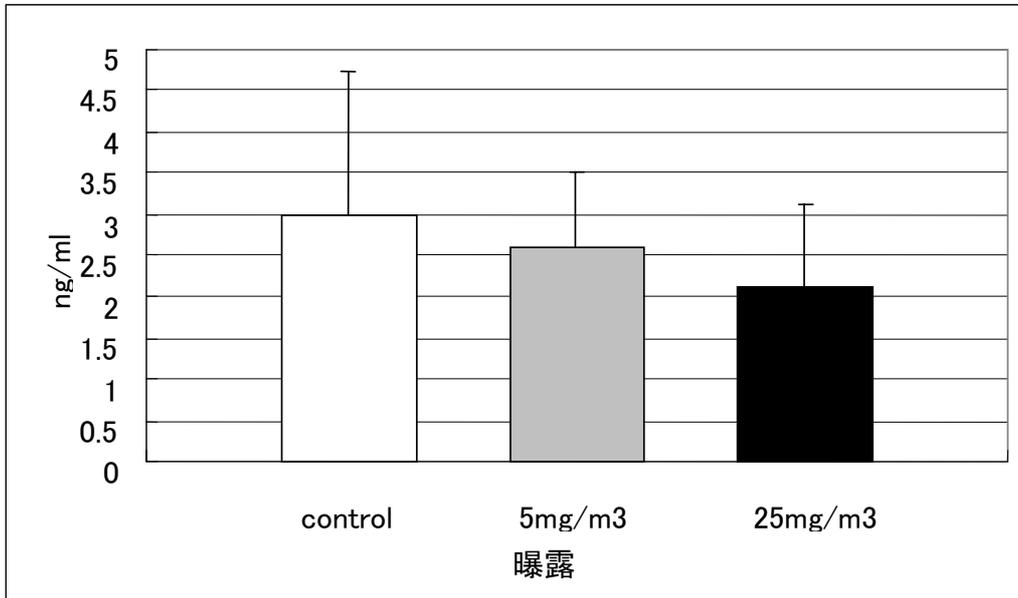


図2. 妊娠ラットへのDEHP吸入曝露による雄胎仔ラット
精巣テストステロン mRNA 発現量の変化 (*: P<0.05)

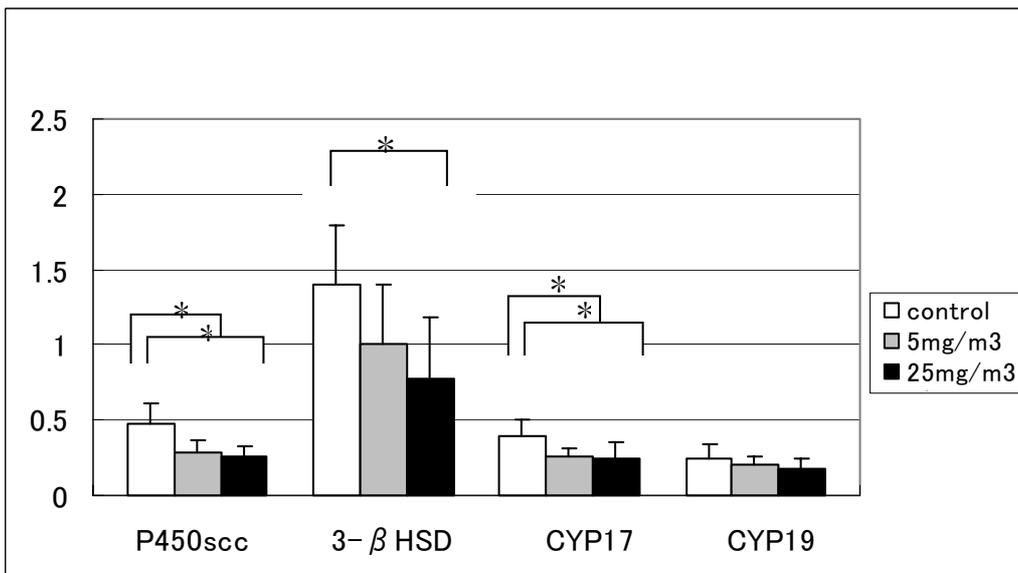


図3. 妊娠ラットへのDEHP吸入曝露による雄仔ラット
(8週齢、12週齢)の体重変化 (*: P<0.05)

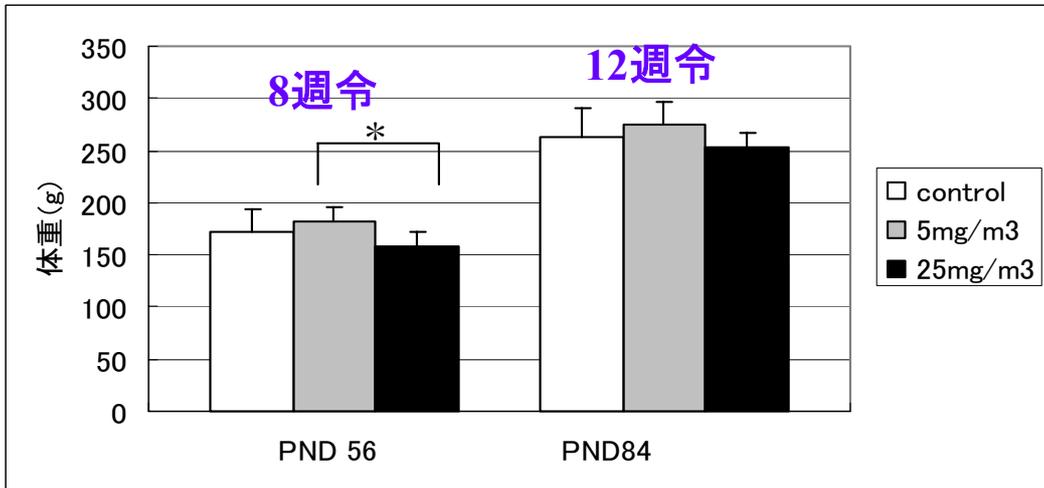


図4. 幼若雌ラットへのDEHP吸入曝露による体重の変化
(*: P<0.05、0 mg/m³群と25 mg/m³群の比較において)

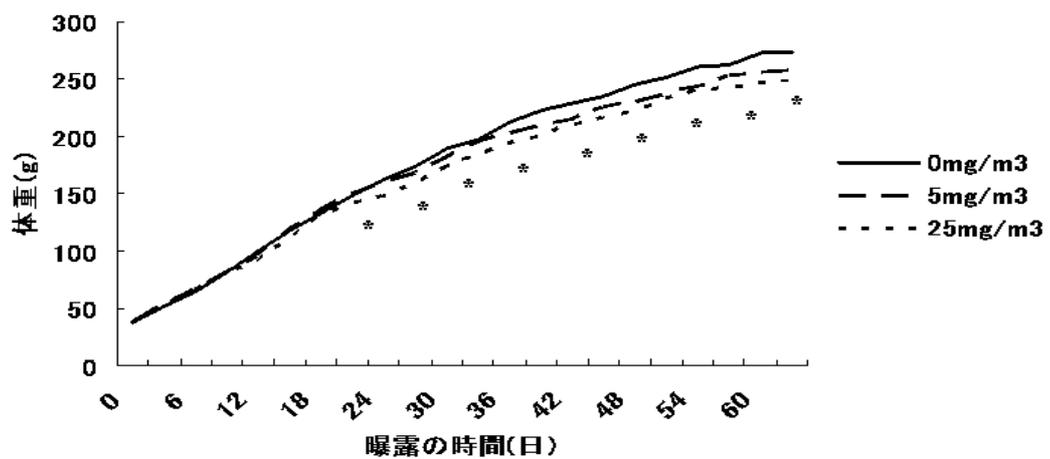


図5. 幼若雌ラットへのDEHP吸入曝露による性周期の変化 (*: P<0.05)

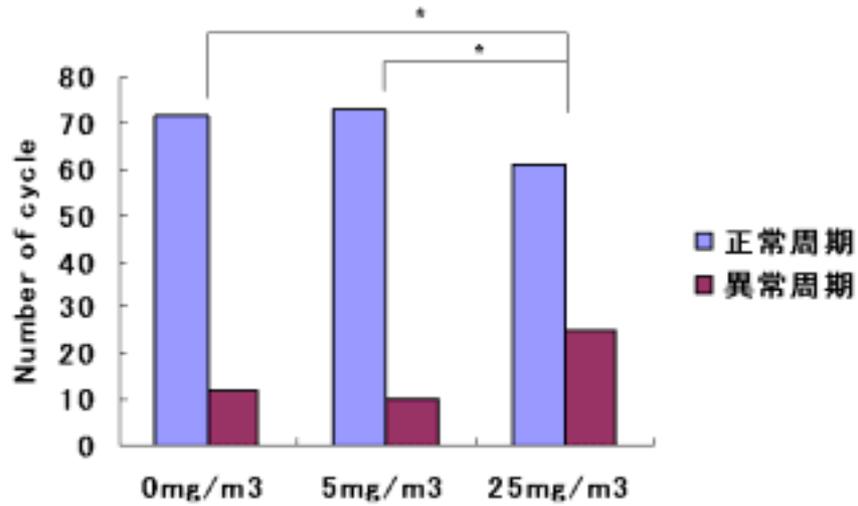


図6. 幼若雌ラットへのDEHP吸入曝露による血清ホルモン値の変化

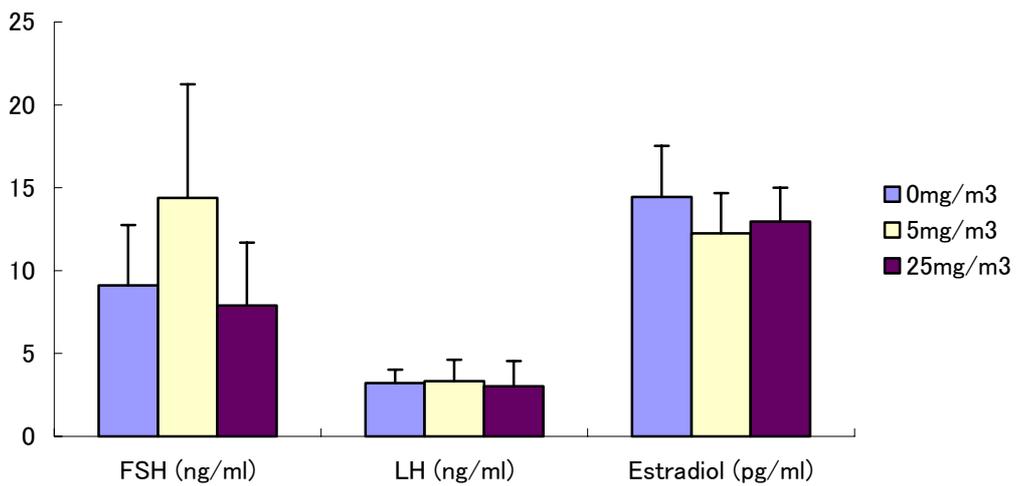


図7. 幼若雌ラットへのDEHP吸入曝露によるステロイド合成酵素 mRNA 発現量の変化 (*: P<0.05)

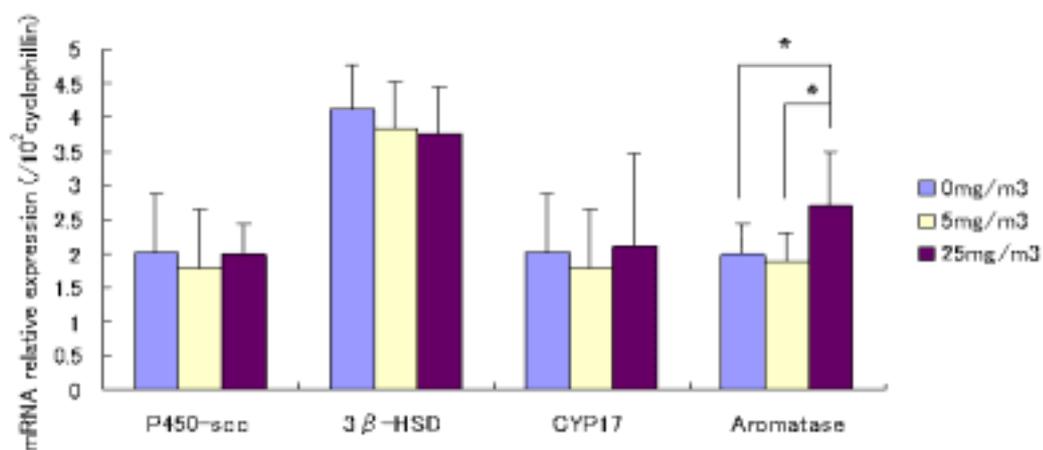


図8. 幼若雌ラットへのDEHP吸入曝露による食餌量の変化
(体重による調整を行っていないもの)

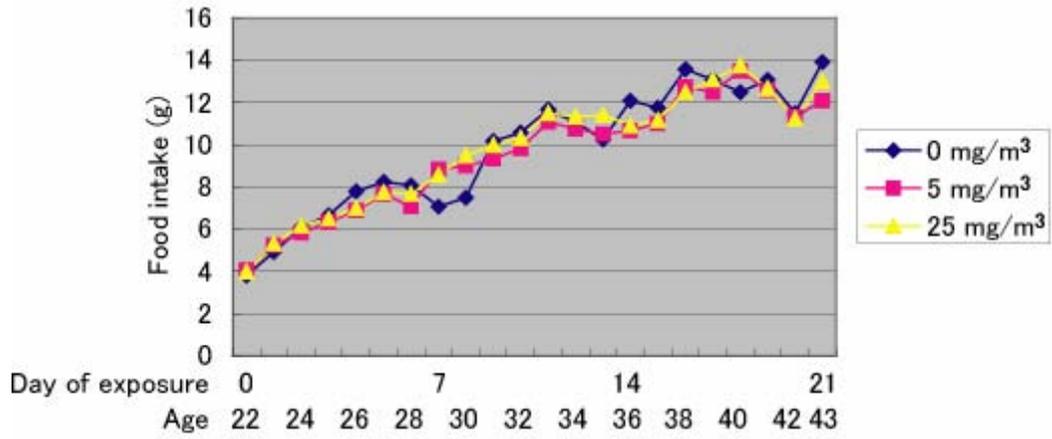


図9. 幼若雌ラットへのDEHP吸入曝露による食餌量の変化
(体重による調整を行ったもの)

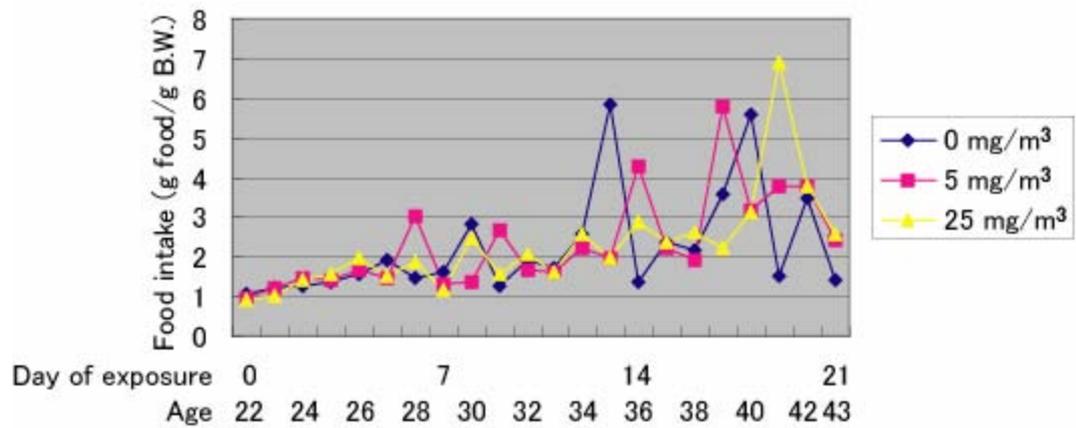


図 10. 幼若雌ラットへの DEHP 吸入曝露による飲水量の変化
(体重による調整を行っていないもの)

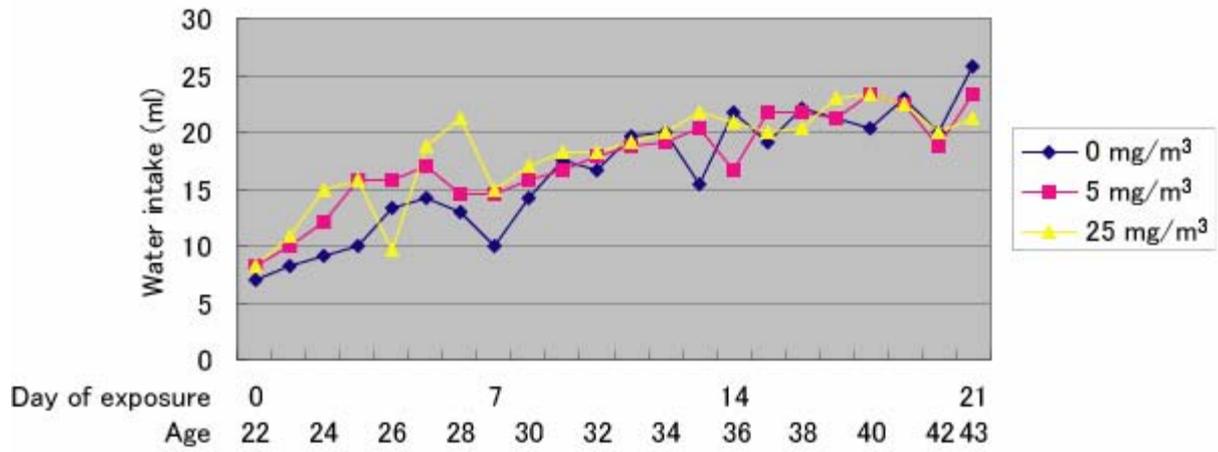
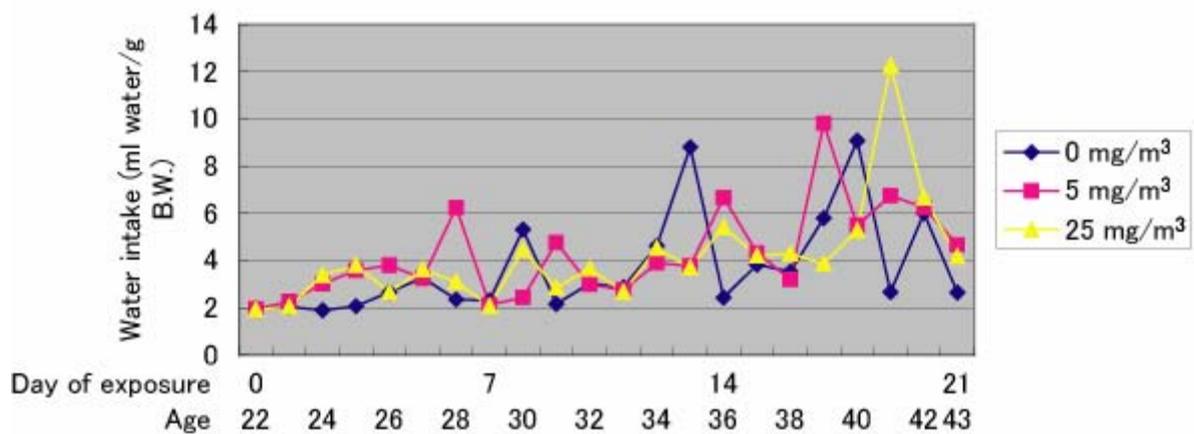


図 11. 幼若雌ラットへの DEHP 吸入曝露による飲水量の変化
(体重による調整を行ったもの)



Clarification and risk evaluation of Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the organism by inhalation exposure

Reiko Kishi

(Professor of Department of Public Health, Hokkaido University Graduate School of Medicine)

Humihiko Sata

(Assistant Professor of Department of Public Health, Hokkaido University Graduate School of Medicine)

Yasuaki Saijo

(Assistant of Department of Public Health, Hokkaido University Graduate School of Medicine)

Tomoko Kondo

(Research Worker of Department of Public Health, Hokkaido University Graduate School of Medicine)

Yuko Mori

(Research Worker of Department of Public Health, Hokkaido University Graduate School of Medicine)

Norie Kurahashi

(Graduate Student of Department of Public Health, Hokkaido University Graduate School of Medicine)

Myngyue Ma

(Graduate Student of Department of Public Health, Hokkaido University Graduate School of Medicine)

Key Word: DEHP, inhalation, developmental toxicity

Abstract

It is well known that phthalate esters could induce the endocrine-disrupting actions, the reproductive and developmental toxicity and the lesions of tissues in animal experiments. Because phthalate esters are widely found in air, water, soil and the other environment, it is concerned whether they may adversely affect the human. However, many studies provided adequate information to identify the effects of phthalate esters on the organism by the oral route. There is limited information about phthalate esters toxicity exposed by inhalation, as a natural route in human exposure, so it is necessary to clarify the risk of phthalate esters on the organism based on inhalation exposure. Utilizing inhalation exposure of Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), the purpose of this study was: (1) to clarify the developmental toxicity of DEHP exposure by inhalation; and (2) to examine the effects of reproductive endocrine system in prepubertal female rats to DEHP exposure.

(1) Pregnant rats were treated by inhalation exposure with DEHP from gestation day 1 to 19, and the fetal testes were isolated on gestation day 19. The concentration of testosterone in fetal testes was no significant change, but a decreased tendency was shown. The expressions of steroidogenesis enzyme mRNAs were significantly reduced with DEHP dose-dependent. In terms of maternal toxicity, no changes were seen. In addition, the maturity of reproductive organs in male pups was examined on postnatal week 8 and week 12. Seminal vesicle weights were significantly increased in 5 mg/m³ DEHP group comparing with the control group at postnatal 8 week. Prostate weights were significantly reduced in 5 mg/m³ DEHP group

comparing with the 25 mg/m³ DEHP group at postnatal 12 week.

(2) In the female pubertal onset assay, the age of vaginal opening (VO) was advanced following inhalation exposure to DEHP in prepubertal female rats. Estrous cyclicity was monitored from the day of VO to the day of necropsy. Irregular estrous cycles were significantly more observed in 25 mg/m³ DEHP group than the control group. Our data demonstrate that DEHP exposure can alter estrous cyclicity in female rats. We determine gene expression of steroidogenic enzyme in the ovary, the expression of mRNA for aromatase, a rate-limiting enzyme to change testosterone into estradiol, was raised by DEHP inhalation. However, estradiol in serum was no change, although a decreased tendency was seen. We will further investigate 17 β -HSD IV, a pathway of metabolism of estradiol, and make clear the mechanism of reproductive effects in prepubertal female rats to DEHP exposure by inhalation.

4. ビスフェノール A 結合蛋白質の分子生物学的検討と中枢神経系への作用機序の解明に関する研究

研究者 船江良彦（大阪市立大学大学院医学研究科 教授）

研究要旨

これまでの我々の研究結果から、ビスフェノール A (BPA) は、妊娠ラットに投与することで出生仔の脳でドパミンの減少を引き起こし、中枢神経系に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。さらに、ラット脳シナプトソーム画分に BPA の結合活性を見いだした。そこで、脳神経細胞に BPA 結合タンパク質が存在すると考え、この BPA 結合タンパク質の単離・精製を試みた。その結果得られた BPA 結合タンパク質の N 末端アミノ酸配列分析を行ったところ、このタンパク質が protein disulfide isomerase (PDI) と同一性を示す事が明らかとなった。PDI は甲状腺ホルモン(T3)結合タンパク質としても知られている。大腸菌で大量発現させたヒスチジンタグ融合ラットおよびヒト PDI を用いて T3 競合的結合実験を行ったところ、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。ヒトにおいては母親の甲状腺ホルモンの低下が、胎児の知能低下を引き起こすことが知られていることから、PDI を介した神経発達に注目して内分泌かく乱化学物質の影響をさらに検討すべく研究を進めた。まず、平成 12-13 年度にリストアップされた「優先してリスク評価に取り組む物質」のうちの 7 種類 [ビスフェノール A (BPA), *p*-ノニルフェノール(NP), トリブチルスズ(TBT), ベンゾフェノン(BP), ジブチルフタレート(DBP), ペンタクロロフェノール(PCP), アミトロール(AMI)] を用いて、1) PDI への結合実験(T3 結合阻害) 2) T3 応答性増殖細胞 GH3 増殖作用実験 3) アフリカツメガエル発生過程における影響 の 3 種類のスクリーニング系を用いて評価を行った。まず、PDI への T3 結合阻害実験では BPA, NP, PCP が顕著な阻害活性を示した。2 番目の GH3 を用いた実験では、BPA, NP が細胞増殖促進性を示した。次に 3 番目のアフリカツメガエルを用いた検討を行った。アフリカツメガエルの発生過程は容易に観察でき、またほぼ哺乳動物と共通の発生過程をとることからよく利用される。まず、アフリカツメガエルの PDI cDNA を単離して、それを大腸菌に発現させ T3 や BPA との結合を検討したところ、ヒトやラット PDI とほぼ同じ性質を示した。続いて各発生段階（受精卵、胞胚期、原腸胚期、神経胚期、尾芽胚期、幼生期）について、RNA レベル、タンパク質レベルでの PDI の発現量を検討した。PDI は原腸胚期で発現し神経胚期で低下し、尾芽胚期で再び上昇した。受精卵に 7 種類の化合物を添加して、最も PDI の発現量が高く影響が出ると考えられる原腸胚期から神経胚期にかけての表現形を観察したところ、BPA, NP で胚にアポトーシスが観察された。

研究協力者名

今岡進（関西学院大学理工学部 教授）

廣井豊子（大阪市立大学大学院医学研究科 講師）

長田真優子（大阪市立大学大学院医学研究科 助手）

吉田徳之（大阪市立大学大学院医学研究科 助手）

岡田和嗣（大阪市立大学大学院医学研究科 大学院生）

A. 研究目的

BPAはポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料であるほか、歯科用シーラント剤として用いられており、容易に経口的に摂取される化合物である。また BPA は、エストロゲン様活性を有しており、内分泌かく乱化学物質（EDCs）の一つとして注目されている化合物である。一方、脳におけるモノアミンは、運動・感情・情動発現・脳報酬系に関与している。さらに、躁鬱病や感情障害・行動障害といった多くの精神疾患、さらには近年問題となっている注意欠陥・多動性症候群（ADHD）や学習障害（LD）の発症に関与しているとの報告もある。我々はラットを用いた先行研究により、母親に暴露された BPA が生まれてきた仔のドーパミン濃度を低下させ、中枢神経系へ影響を及ぼす事を明らかにした。しかし、EDCs の中枢神経系への影響は、不明な点が多く、分子生物学的なメカニズムが明らかにされていない。ところで、平成 12-13 年度にリストアップされた優先してリスク評価に取り組む物質は、内分泌かく乱作用を持つと断定されたものではなく、優先的に調査研究を行う対象として取り上げられたもので、生殖器系や免疫系への影響を指標とした評価法がほとんどであり、近年問題視されるようになった「中枢神経系への影響」をエンドポイントとした評価法は全くと言っていいほど行われていない。それには、EDCs の作用点が捕らえられていないからであると考えられる。当該研究では、ラット脳において BPA が結合するタンパク質（レセプター様タンパク質）の存在を見だし、さらにこの BPA 結合因子の単離・精製を試みた。そしてこの研究の結果、BPA 結合タンパク質の実体が明らかになった。このタンパク質は甲状腺ホルモンである T3 の結合タンパク質であった。BPA は甲状腺ホルモンである T3 の結合を阻害する事によりその働きを模倣・阻害している可能性が示唆された。本研究では H12-13 年度にリストアップされた、優先してリスク評価に取り組む物質の 7 種の化合物について、T3 かく乱作用に重点を置いた 3 段階のスクリーニング法（大腸菌発現タンパク質を用いた *in vitro* での結合実験、T3 応答性増殖培養細胞を用いた実験、アフリカツメガエルを用いた *in vivo* でのスクリーニング法）を考案し、評価を行った。

B. 研究方法

1. PDI に対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害試験

(1) BPA 結合実験

BPA の結合活性は、BPA の放射性同位体 (^3H -Bisphenol A) とタンパク質標品を 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 中で 4°C にて 2 時間インキュベーションした後、遠沈法あるいは PEG 沈澱法により Bound/Free 分離を行い、沈澱に含まれる放射活性を測定する事により求めた。

【遠沈法】反応後の反応液を遠心分離（14,500 rpm, 5 min, 4°C）した後、上澄をアスピレーターにより除去した。沈澱を 1.0 mL の洗浄バッファー（150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.0）で 2 回、洗浄した。

【PEG 沈澱法】反応後の反応液に等量の 50mM Tris-HCl, pH 7.0 (12% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.2M ZnCl₂を含む) を加えて攪拌した後、遠心分離 (14,500 rpm, 5 min, 4 °C) を行った。上澄をアスピレーターにより除去した後、1.5 mL の洗浄バッファー (6% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.1M ZnCl₂を含む 50mM Tris-HCl, pH 7.0) で 2 回洗浄した。

(2) 競合的結合阻害実験

T3 の結合活性は、試験物質の存在下で、T3 の放射性同位体 ([¹²⁵I]-3,5,3'-triiodothyronine, 1.0 nM) と His-tag 融合 PDI (0.1 mg/mL protein) とを 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 中で 3 時間、4°C にてインキュベーションした後、PEG 沈澱法により Bound/Free 分離を行い、沈澱に含まれる放射活性を測定する事により求めた。T3 の非特異的結合量を測定するために、過剰量 (30µM) の T3 を加えた系を用意した。また試験物質を溶解するためのエタノール濃度は、事前に試験を行い、T3 の結合に影響を与えない濃度を検討した結果、終濃度 4 % とした。

T3 の結合率 B / B_0 (%) は下式により求めた。

$$B / B_0 (\%) = (TB - NB) / (T_0B - NB) \times 100$$

TB : 試験物質存在下での T3 の結合量

T₀B : 試験物質非存在下での T3 の結合量

NB : 非特異的結合量

2. GH3 細胞の増殖に及ぼす影響

(1) 細胞培養

GH3 細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手した。細胞は 15 % ウマ血清, 2.5 % ウシ胎仔血清, 50 units / mL ペニシリン, 50 units / mL ストレプトマイシンを含む Ham's F-10 培地で、5 % CO₂, 湿度 95 %, 37 °C にて培養した。

(2) 甲状腺ホルモン欠乏血清の作製

AG 1-X8 樹脂 (Bio-Rad) を蒸留水で 3 回洗浄した後、血清に 50mg 樹脂 / mL 血清となるように加え、ローテータを用いて 5 時間、室温にて穏やかに混合した。1,000 x g にて 10 分間の遠心分離を行った後、上澄に新しい AG 1-X8 樹脂を 50mg 樹脂 / mL 血清となるように加え、ローテータを用いて 18 時間、室温にて穏やかに混合した。1,000 x g にて 10 分間の遠心分離を行って得られた上澄をさらに 30,000 x g にて 20 分間遠心分離して微粒子を除去したものを甲状腺ホルモン欠乏血清とし、使用するまで -80 °C にて保存した。T3 の含量を DELFIA Triiodothyronine Reagents (Perkin Elmer) を用いた EIA 法により測定したところ、処理後の T3 含量は検出限界濃度以下 (< 0.2 ng / mL) であった。

(3) GH3 細胞増殖試験 (Wst-1 法)

GH3 細胞を 1×10^4 cells / well となるように 24 ウェルマルチプレートに播種した。培養には通常の培養液 (T_n 培地)、および甲状腺ホルモンを除去した血清を用いて作製した培地 (T_a 培地) を用いた。24 時間後、各ウェルに被検物質を添加し、7 日間培養した。培養液を除去し、各ウェルに 0.25 mM Wst-1, 0.01 mM 1-methoxy PMS, 1mM HEPES (pH 7.4) を含む T_a 培地を 200 μ L ずつ添加し、5 % CO₂, 湿度 95 %, 37 °C にて 4 時間インキュベーションした。培地を回収し、690 nm を対照にして 450 nm の吸収を測定して細胞増殖度を算出した。

3. アフリカツメガエル胚を用いた試験法

(1) 産卵のためのホルモン誘導と人工授精

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の成体雌に胎盤性性腺刺激ホルモン 200 units を背中に皮下注射し、保温器により 18 °C 7-13 h, 24 °C 6 h で飼育した後、産卵させた。雄の腹部から摘出した精巣を一部切り取り、0.1×MBS (pH7.5, 100 μ M KCl, 240 μ M NaHCO₃, 1mM HEPES, 82 μ M MgSO₄, 33 μ M Ca(NO₃), 40 μ M CaCl₂) で懸濁した後、産卵させた未受精卵に懸濁液をかけて人工授精させた。

(2) 胚の試験化合物処理法

人工授精後、室温で 15~20 分飼育して表層回転が起きるのを確認し、0.1×MBS で浸した後 14 °C の保温器へと移した。受精後 45 分経過したら胚を 1% チオグリコール酸ナトリウム溶液で除ゼリーし、0.1×MBS で希釈した Bisphenol A などの試験化合物溶液 (1・10・25・50 μ M) 中で 24 °C の保温器で表現型に変化が現れるか観察した。

(3) Xenopus PDI の単離と大腸菌での発現

ISOGEN を用いて *Xenopus* 尾芽胚(st.35)10 胚から total RNA を抽出し、RT-PCR によりその cDNA を単離した。この cDNA をテンプレートにして xPDI cDNA 全長(1518bp)を前半(909bp)及び後半(756bp)をそれぞれ増幅し、pBluescript II に全長を組み込んだ。pBluescript II に組み込んだ xPDI 全長を、5'-*Sac* I, 3'-*Kpn* I で制限酵素処理し、同様の制限酵素で処理した pQE80 ベクターに組み替えた。xPDI 全長 cDNA をインサートとする pQE80 プラスミドを導入した大腸菌を一晩培養した。培養液 5ml を 100ml の 2×YT medium に植菌し、37°C で振盪培養した。OD₆₀₀=0.6 になった時点で 100mM IPTG 1ml を添加し、さらに 4 時間振盪培養した。遠心分離により菌体を回収し、1×PBS(-) で洗浄した。回収した菌体を Lysis buffer 20ml に懸濁し、超音波破碎した。そこへ 10% Sucrose monolaurate 0.4ml を加え、4°C で 1 時間攪拌し可溶化させた。50,000×g, 4°C で 30 分間超遠心分離し、可溶化画分を調製した。これを Ni-NTA カラムに供し、イミダゾールで溶出して精製アフリカツメガエル PDI を得た。

(4) *Xenopus* の発生過程における PDI mRNA およびタンパク質の発現解析

発生段階にある *Xenopus* 胚 10 胚から total RNA を単離し逆転写の後、PCR によって PDI mRNA の発現を検討した。また胚発生段階にある *Xenopus* 胚 60 胚の質量を測定し、5 倍量の Homogenize buffer を加え Homogenize し、10,000×g, 4°C, 30 分遠心分離した。上清を 100,000×g, 4°C, 60 分遠心分離し、得られた沈殿物を Microsomes 分画とし、50µl の PBS(-)(×1) に溶解し懸濁した。タンパク質量を測定した後 40µl 分を SDS-PAGE に供し、作成したラット PDI 抗血清を用いて Western blot を行った。

C. 実験結果

1. PDI に対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害試験

今回使用した化合物はポジティブコントロールとしての甲状腺ホルモン 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3) そして BPA、*p*-ノニルフェノール、トリブチルスズ、ベンゾフェノン、ジブチルフタレート、ペンタクロロフェノール、アミトロールの 7 種類であった。これらを用いた競合的結合阻害実験を行った結果を図 1 に示した。T3 に対する結合阻害がみられた化合物は、BPA の他、*p*-ノニルフェノール、ペンタクロロフェノールであった。これらの化合物はいずれもフェノール構造を持ち、構造的に T3 と類似しており、PDI 上の T3 と共通の部分に結合することが推測された。フェノール構造を有しない他の化合物は、PDI と T3 結合部位を介した相互作用は見られなかった。

2. T3 応答性増殖細胞 GH3 に増殖促進効果試験

T3 に依存して増殖する細胞であるラット下垂体由来 GH3 細胞を用い、7 種類の化合物について増殖促進効果を検討した。結果を図 2 に示した。なお、GH3 細胞は、PDI を多量に発現していることを Western blotting で確認している。また、PDI をノックダウンすると細胞の増殖能は顕著に低下し、PDI がこの細胞の増殖に関わっている可能性を明らかにしている。この試験系において、BPA およびノニルフェノールが GH3 の増殖促進効果を示した。その効果は T3 の濃度と比較すると 1/10000 程度であった。BPA や *p*-ノニルフェノールとともに PDI に結合したペンタクロロフェノールは GH3 細胞に対しては効果を示さなかった。

3. アフリカツメガエル PDI の単離と性質

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の発生過程を利用して、化学物質の影響評価をするためにまず、アフリカツメガエルの PDI(xPDI) cDNA をクローニングした。ラット PDI とのアミノ酸配列における相同性は 78.3% であった。さらに、我々の作製したラット PDI に対する抗体は xPDI も認識した。続いて xPDI を大腸菌に発現させ精製した。これを用いてラット PDI と同じように BPA による T3 との結合阻害実験を行った (図 3)。その結果 xPDI はラット PDI と BPA の結合に関してはほぼ同じであることが明らかとなった。

4. アフリカツメガエル PDI の発生過程における発現

RT-PCR および Western blotting によって xPDI の mRNA およびタンパク質発現を受精

卵、胞胚期、原腸胚期、神経胚期、尾芽胚期、幼生期について調べた（図 4）。受精卵、胞胚期には発現が見られなかったが、原腸胚期になり、mRNA タンパク質両方において PDI の発現が見られた。この発現は、神経胚期で一度低下したが、尾芽胚期で再び上昇した。幼生期では消失した。

5. アフリカツメガエル初期発生過程における影響

ビスフェノールA(BPA), *p*-ノニルフェノール(NP), トリブチルスズ(TBT), ベンゾフェノン(BP), ジブチルフタレート(DBP), ペンタクロロフェノール(PCP), アミトロール(AMI)についてそれぞれ 10 μ M, 25 μ M をアフリカツメガエル受精卵に添加して、PDI が誘導されてくる原腸胚付近での発生変化を調べた。トリブチルスズおよびペンタクロロフェノールに関しては、細胞毒性が強く 25 μ M では胚が完全に死亡した。BPA, ノニルフェノールについては 10 μ M の濃度ではほとんど影響が見られなかったが、25 μ M において動物極側にアポトーシスが観察された。さらに原腸陥入に遅れが観察された。他の化合物については 25 μ M の濃度においても、ほとんど変化は見られなかった。

D. 考察

平成 12-13 年度にリストアップされた「優先してリスク評価に取り組む物質」のうちの 7 種類 [ビスフェノールA(BPA), *p*-ノニルフェノール, トリブチルスズ, ベンゾフェノン, ジブチルフタレート, ペンタクロロフェノール, アミトロール] を用いて、1) PDI への結合実験 (T3 結合阻害) 2) T3 応答性増殖細胞 GH3 増殖作用実験 3) アフリカツメガエル発生過程における影響 の 3 種類のスクリーニング系を用いて評価を行った。今回試験した化合物のうち、PDI における T3 の結合を阻害した化合物は BPA, *p*-ノニルフェノール, ペンタクロロフェノールであった。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かく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かく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。BPA, *p*-ノニルフェノール, ペンタクロロフェノールが PDI に対する T3 の結合阻害活性を有する事が明らかになったことから、これらの化学物質は T3 依存的な作用に影響を及ぼしている事が示唆

された。そこでさらに第 2 の実験系である GH3 細胞の T3 依存的な細胞増殖及ぼす影響について検討した。GH3 細胞には PDI が顕著に発現していることを明らかにしている。PDI が GH3 の T3 依存性増殖に関わっている可能性は十分に考えられる。試験した化合物の中で GH3 増殖促進性を示したのは、BPA, *p*-ノニルフェノールで PDI における T3 結合阻害と共通していた。また、PDI に対して T3 の結合阻害活性が見られたが、細胞増殖には影響しない化学物質として、ペンタクロロフェノールが挙げられた、これらの化学物質は他の T3 作用に影響を及ぼしている可能性が考えられる。しかし、GH3 細胞はエストロゲンによる増殖作用も知られており、PDI ノックダウン細胞を用いるなど、これらの化合物の影響が PDI を介しているかどうか詳細に検討する必要がある。

第 3 の試験系として発生過程での *in vivo* での影響においても、BPA と *p*-ノニルフェノールがアフリカツメガエル胚に対して顕著な影響を及ぼした。原腸胚期においてこれらの化合物によって動物極側にアポトーシスが誘導された。アフリカツメガエル PDI については今回当該研究で初めてクローニングし、その性質がラットやヒトとほぼ同じであることを明らかにした。さらに発生過程では、原腸胚において顕著な発現が見られた。カエルにおいては T3 がオタマジャクシのシッポのアポトーシス誘導に必要な因子である。今回のこれらの化合物による胚へのアポトーシス誘導が T3 様の作用を介したものであるかどうかはわからないが、PDI がこれらの現象に関わっている可能性が示唆された。しかし、PDI の発生過程における役割は十分明らかでなく、従って今回明らかにしたこれらの化合物の初期発生過程における影響が PDI を介したものであるかどうか、今後証明する必要がある。

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。さらに、1) PDI への結合実験(T3 結合阻害) 2) T3 応答性増殖細胞 GH3 増殖作用実験 3) アフリカツメガエル発生過程における影響 の 3 種類のスクリーニング系を確立して、いくつかの化合物についてスクリーニングを行った結果、BPA と *p*-ノニルフェノールが PDI を介した発達障害に影響を与える可能性のある化合物として挙げてきた。しかし、これらの詳細なメカニズムは明らかでなく、PDI の機能解析とあわせて、PDI を介したこれらの化合物の作用のメカニズムを解明していく必要があると考えられる。

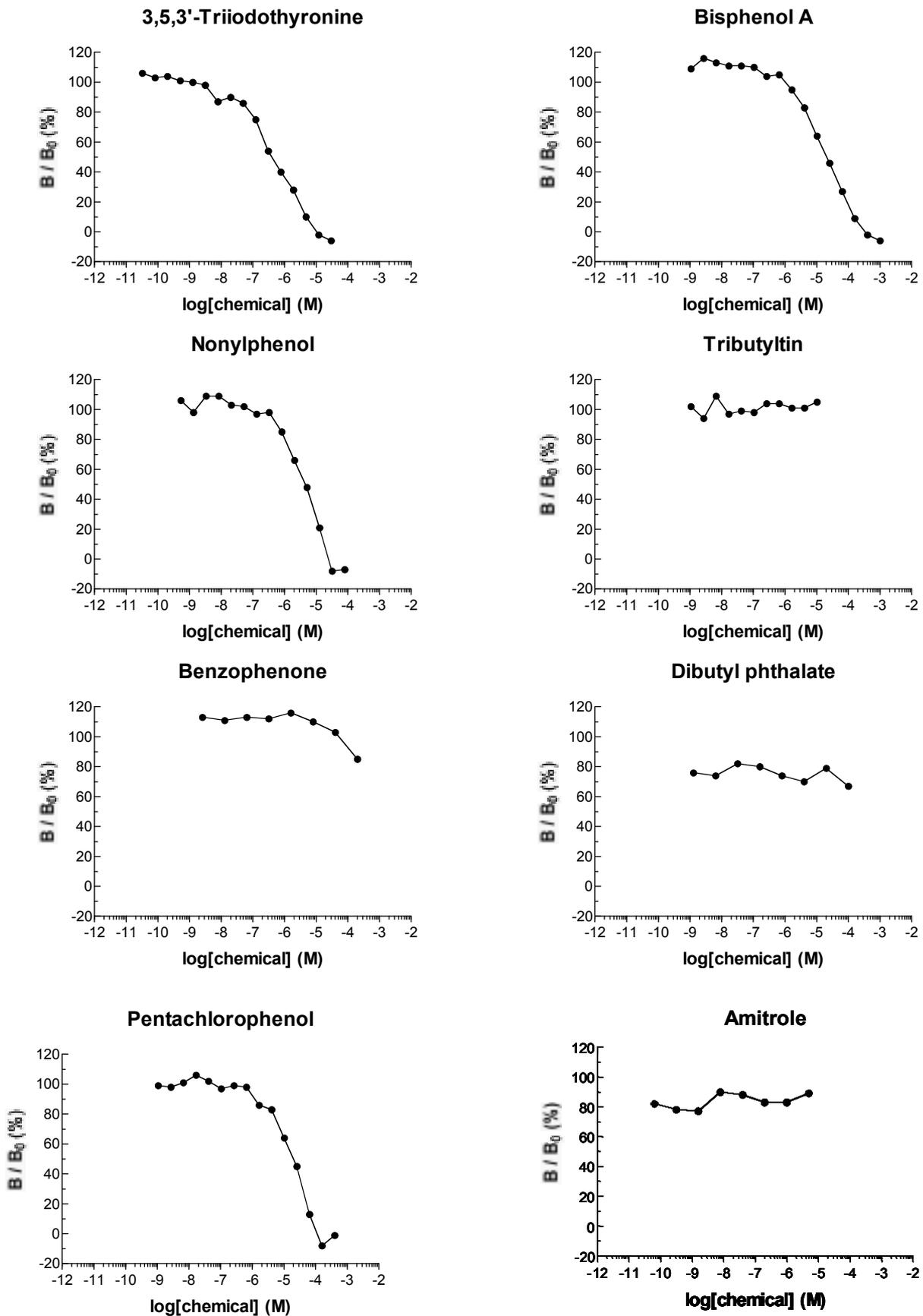


図1 精製リコンビナントラット PDI に対する T3 の結合阻害性

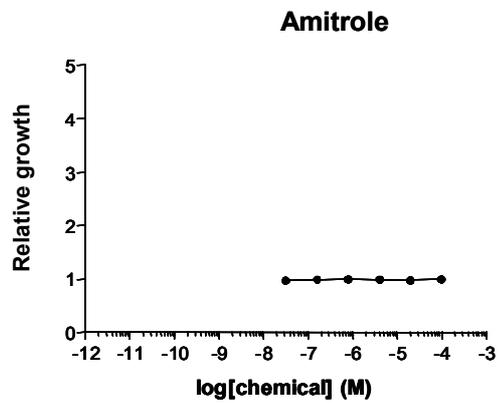
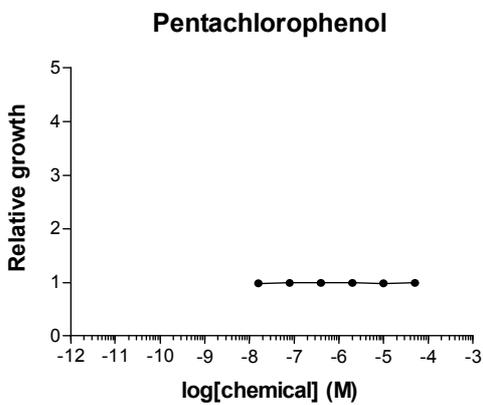
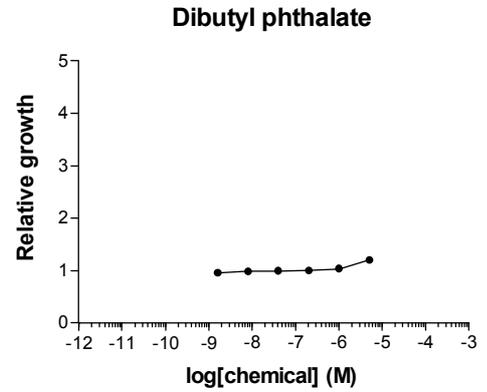
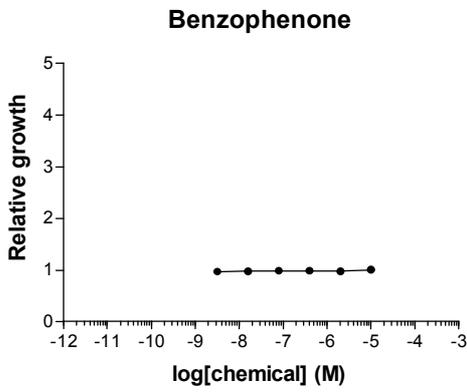
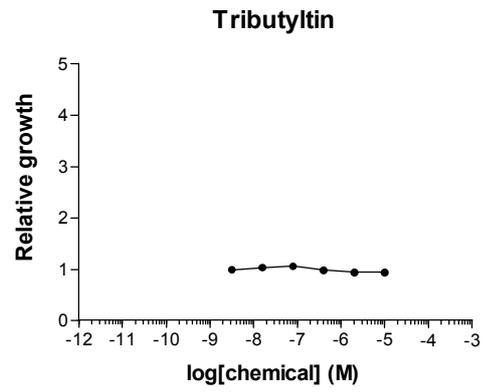
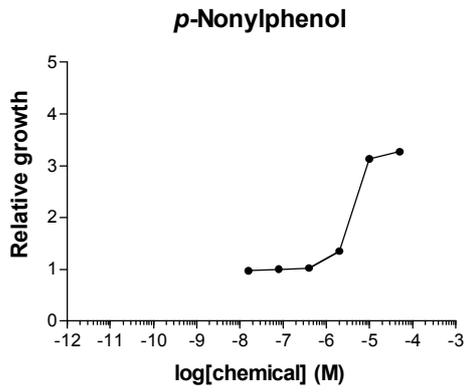
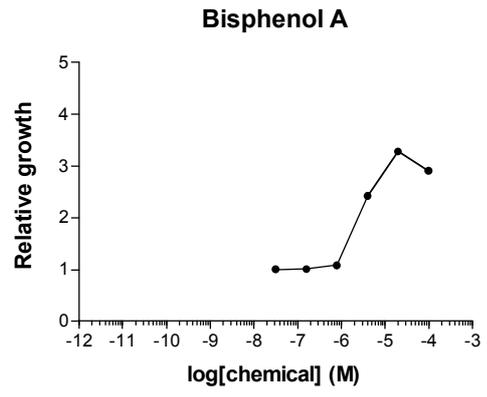
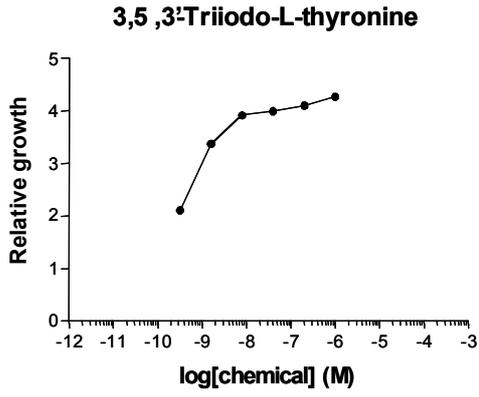


図2 GH3細胞に対する増殖促進作用

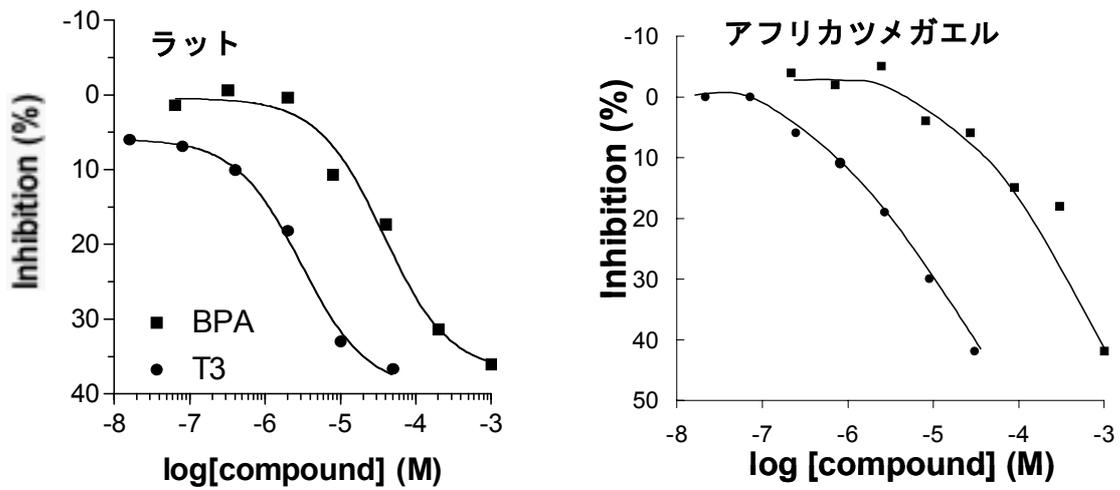


図3 ラットおよびアフリカツメガエルリコンビナントPDIに対するT3結合阻害実験

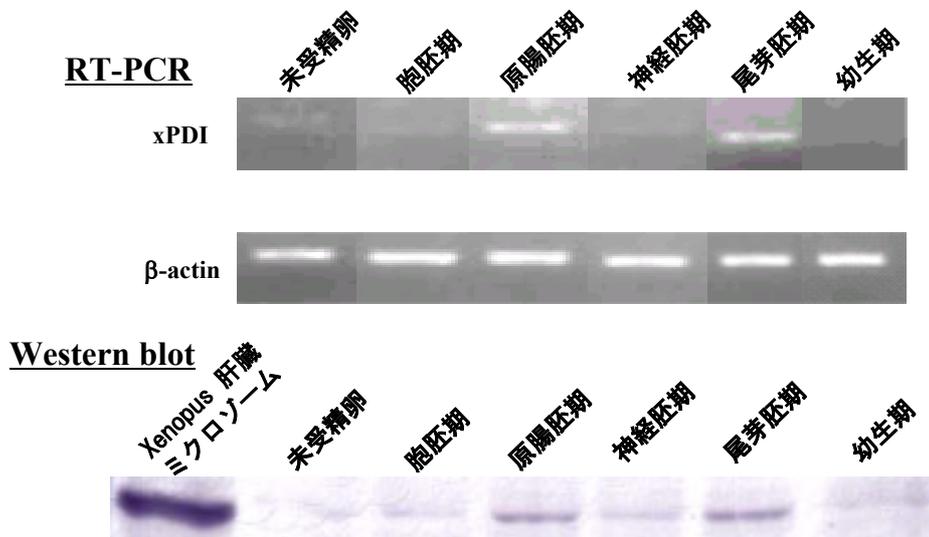


図4 発生過程におけるXenopus PDIの発現量変化

	Control	BPA	NP	TBT	BP	DBP	PCP	AMI
10 μ M								
25 μ M				Dead 			Dead 	

図5 アフリカツメガエル発生過程に及ぼす影響

Molecular biological investigations of bisphenol A receptor.

Yoshihiko Funae•Osaka City University Medical School, professor

Key Word : bisphenol A, central nervous system

Abstract

Environmental chemicals have been known to affect not only reproduct systems but also central nervous systems, which is caused by disruption of thyroid hormone action. In order to clarify their relevance to behavior disorder or learning disorder, it is important to elucidate the mechanism of disrupting activity of environmental chemicals toward thyroid hormone action, essential for normal development of brain function. Previously, we isolated and purified the novel bisphenol A (BPA) binding protein and found that it is the protein disulfide isomerase (PDI). We characterized that the triiodothyronine (T3) binding was inhibited by BPA. BPA may interfere with the function of thyroid hormone via PDI. In this study, to investigate T3 disrupting effects on neuronal development via PDI, we established three assay methods, the competitive binding assay with PDI, the induction of T3-dependent growth of GH3 cells, and the evaluation of thyroid hormone disrupting effect on early development of *Xenopus* embryos. By using these assay methods, we examined and compared the thyroid hormone disrupting activity of seven 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.

In the first assay, the inhibition of T3-binding to PDI was investigated by using BPA, *p*-nonylphenol, tributyltin, benzophenone, dibutyl phthalate, pentachlorophenol, and amitrole. As the results, BPA, *p*-nonylphenol, and pentachlorophenol inhibited the T3 binding. These chemicals may possible to interfere with the function of thyroid hormone. We further investigated the thyroid hormone disrupting activity using GH3 cells, a rat pituitary cell line which grow and produce growth hormone (GH) depending on physiological concentrations of thyroid hormone. The cell growth is induced by the treatment of BPA and *p*-nonylphenol. Amphibians appeared in the course of vertebrate evolution between aquatic branchial respiration and quantic or terrestrial pulmonary respiration. *Xenopus laevis* has been studied extensively in developmental biology. First, *Xenopus* PDI (xPDI) cDNA was isolated and PDI protein was expressed in *E. coli*. xPDI interacted with T3 and BPA inhibited the binding of T3 to xPDI. xPDI revealed the similar properties with that of rat and human. xPDI was expressed at the stages of gastrula and tail

bud during the early development of *Xenopus*. In the third assay, we investigated effects of the chemicals on embryos during developmental stages from egg to gastrula. BPA and *p*-nonylphenol induced apoptosis at the stage of gastrula. These chemicals may possible to interfere with the function of thyroid hormone and then may affect the development of the embryos.

5. 両生類の核内受容体についての情報収集

西川淳一（大阪大学大学院薬学研究科 助教授）

研究要旨

アフリカツメガエルは古くから発生生物学のモデル生物として取り上げられ、その知見や実験手技の蓄積から内分泌攪乱作用のような胎生期における影響が懸念される事象の研究に適していると考えられる。また、世界中で見られるカエルや山椒魚等の両生類の減少と化学物質による環境汚染の因果関係を考える上でも、両生類を用いた内分泌攪乱作用の研究は必要である。すでに、日本においてもアフリカツメガエルを用いた内分泌攪乱物質のスクリーニング法は検討されており、甲状腺ホルモン様作用を検出する方法として変態アッセイが、エストロゲン様作用を検出する方法としてビテロジェニンアッセイや性転換試験が行われてきた。

一方、我々のグループではこれまでヒト核内受容体ファミリーに対する化学物質の影響を網羅的に調べるハイスループット型アッセイ法を構築し、内分泌攪乱性が疑われる20種類の化学物質について、多種類の核内受容体に対する影響を調べてきた。その結果、アルキルフェノール類の化学物質はエストロゲン受容体だけでなくレチノイン酸受容体に作用すること、有機スズ化合物がレチノイドX受容体とペルオキシソーム増殖剤活性化受容体に強力なアゴニスト活性を示すこと等を明らかにした。つまり、内分泌攪乱物質の作用点はこれまで重点的に研究が行われてきたエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体以外にも存在し、内分泌攪乱作用の分子機構を解明するためには多種類の核内受容体ファミリーに関する包括的な検討が必要であると考えられた。特に、調べた化合物の多くが結合性を示したレチノイドの受容体は、脊椎動物の発生・分化に重要な役割を果たす事が知られており、レチノイド受容体を介する発生毒性に関する研究が必要である。アフリカツメガエルをモデル生物として、レチノイドの発生における役割も盛んに研究されている。

そこで、これまでに得た知見をさらに生物学的分野、特に発生学的観点からの毒性研究に展開するため、今回、アフリカツメガエルに着目し、核内受容体を介する化学物質の毒性を研究する試験動物としての有用性を検討した。

研究協力者

Bruce Blumberg (University of California, Irvine)

A. これまでの研究経過

ステロイドホルモンをはじめとして様々な脂溶性生理活性物質の作用を仲介する核内受容体は、医療用薬剤のターゲット分子としてだけでなく、内分泌攪乱作用などの毒性発現の

観点からも注目されている。最近のゲノムプロジェクトの成果として、ヒトにはリガンド未同定の所謂オーファン受容体も含めて 48 種類の核内受容体が存在すると言われている。これらの受容体は、そのほとんどが生物の発生や分化、恒常性の維持に重要な役割を果たしていることから、潜在的にはすべての受容体が内分泌攪乱物質の標的分子と考えられる。そのため、化学物質の内分泌攪乱性を予測するためには、これらすべての受容体への結合性を調べる必要があるが、これまでの方法論では無理があった。そこで、本研究では、最初に簡便・迅速で経済性に優れたハイスループット型核内受容体リガンド検出系を開発し、それを用いて内分泌攪乱作用が疑われている化学物質について、多種類の核内受容体への結合性を網羅的に調べた。その結果、ノニルフェノールやオクチルフェノール等のアルキルフェノール類は、これまでに知られているエストロゲンレセプター (ER) への影響に加えて、レチノイン酸レセプター (RAR) にも作用すること、その他にも多くの化学物質が複数の受容体に活性を示し、内分泌攪乱物質の作用点の一つではないことを明らかにした。また、トリブチルスズ (TBT) やトリフェニルスズ (TPT) は、レチノイド X レセプター (RXR) やペルオキシソーム増殖剤活性化レセプター (PPAR) に非常に低濃度からアゴニスト作用を示すことが分かった。TBT や TPT 等の有機スズ化合物は、かつて船底塗料や魚網防汚剤として大量に使用され、その海洋汚染により海産性巻貝類にインポセックス (雌の雄性化現象) を誘起するとして問題になっている化合物である。これまで、巻貝類のインポセックス誘導メカニズムは長く不明のままであったが、我々は海産性巻貝の一種であるイボニシから RXR ホモログをクローニングし、有機スズ化合物がイボニシ RXR にも結合すること、RXR 内因性リガンドの 9-*cis* retinoic acid がメスのイボニシを雄性化させる事を示し、有機スズ化合物によるインポセックス誘導に RXR が関与している可能性を示した。今後、これらの研究を生物学的側面からさらに発展させるため、実験モデル生物として有名で、かつ野生生物に対する環境汚染問題を考える上で重要な両性類に着目し、情報収集を行った。

B. 実験モデル生物としてのアフリカツメガエル

発生研究のためのモデル生物として、過去においては他の両生類も用いられたこともあるが、近年はアフリカツメガエル *Xenopus laevis* が世界標準となっている。その理由は、維持や産卵誘発が容易であり、胚が大量に得られることにある。アフリカツメガエル胚を実験的に得るのは極めて単純で、雌と雄の両方に絨毛性ゴナドトロピンを注射し、一晚同居させれば翌朝には胚を得ることができるし、*in vitro* で受精させることも可能である。胚の大きさは直径約 1.4 mm と大きく、顕微操作を行うのが容易であることから、mRNA を胚に直接注入することにより遺伝子を強制発現させることができ、この方法は分子生物学分野における定法となっている。また、DNA を精子に導入し、これを卵に注入することによりトランスジェニックカエルを作製することも可能である。遺伝子を不活性化させる方法として最近繁用されている RNA 干渉 (RNAi) はあまり用いられていないが、morpholino 型アンチセンスオ

リゴヌクレオチドを用いることにより特定の遺伝子の発現を抑制することができる。アフリカツメガエルのモデル生物としての欠点はその生活環の長さであり、性成熟に達するには約1年を要する。しかしながら近縁の種である *Xenopus tropicalis* は4ヶ月で成熟するので、こちらを用いる方が良いのかもしれない。

アフリカツメガエルのゲノム解析も、EST とあわせて現在進行中である (<http://genome.wustl.edu/projects/xenopus/> に公開されている)。しかし、*Xenopus laevis* の染色体は2本ではなく、4倍体となっている。重複した遺伝子は、かなり似ており、機能も同じであるが、よりたくさんの塩基配列を決定しなければならず、ゲノム解析には適していない。これに対し、*Xenopus tropicalis* は真の2倍体であり、生活環の短さ、飼育のしやすさ、胚のサイズ、遺伝学への適応を合わせて考えると、理想的な実験動物となる可能性が高い。

C. アフリカツメガエルの核内受容体ファミリー

核内受容体は、リガンド作動性の転写調節因子であり、各リガンドに対応した数多くの受容体が存在している。核内受容体のリガンドとなる物質として、脊椎動物においては、ステロイドホルモンや甲状腺ホルモン、脂溶性ビタミンの活性化体などが知られている。これらの受容体群は、遺伝子スーパーファミリーを形成しており、相互に機能、構造に類似点を持っている。進化上、核内受容体は後生動物の初期に現れ、菌類や植物、単細胞真核生物には存在しない。これまでにゲノム解析が終了している生物で見ると、*Homo sapiens* には48種類、*Drosophila melanogaster* には21種類、*Caenorhabditis elegans* には220種類の核内受容体遺伝子が存在する。しかし、それぞれの種に存在する核内受容体ファミリー遺伝子のセットは脊椎動物と無脊椎動物の間で大きく異なっている。例えば、性ステロイドや副腎皮質ホルモンの受容体は、これまでゲノム解析が行われたどのような無脊椎動物種にも見つかっていない。最近、軟体動物からERにアミノ酸配列が類似した遺伝子のクローニングが報告されたが、この遺伝子にコードされているタンパク質はエストロゲンに結合しないし、エストロゲン依存的な転写活性化も起こらない。ステロイドホルモン受容体群に対し、ステロイド以外の脂溶性生理活性物質をリガンドとする甲状腺ホルモンレセプター (TR) やビタミンDレセプター (VDR)、RAR、PPAR等の受容体群は、半索動物あたりから見つかり、これらのサブグループは進化上、比較的早くから現れたと思われる。一方、RXRやオーファン受容体の相同遺伝子は、軟体動物や昆虫にも見られる (図1)。

さて、アフリカツメガエルの核内受容体ファミリー遺伝子であるが、アフリカツメガエルは脊椎動物であるので、ヒトで知られているほとんどの受容体が存在する。RAR β 、PPAR δ 、LXR α 、FXR、CARについては、現在のところデータベースに登録は無いが、今後のゲノム解析の進展によって見つかる可能性も考えられる。表1及び2に、これまでにクローニングされているアフリカツメガエル由来核内受容体のアミノ酸配列の、ヒト核内受容体アミノ酸

配列に対する類似性（一致したアミノ酸の割合）を示した。表には、DNA 結合領域とリガンド結合領域のみを示したが、これはその他の領域に多くのギャップが見られ、比較が困難であったためである。

表を見て分かるように、DNA 結合領域は哺乳類と両生類の間で非常に高度に保存されているが、リガンド結合領域にはかなりのアミノ酸の違いが見られる。従って、外来性の化学物質については、哺乳類と両生類の受容体について結合性の違いを検討する必要がある。また、外来異物の受容体である SXR については、マウスやラットのホモログですらそれほど類似性が高くなく、両生類のホモログ（アフリカツメガエルには BXR α と BXR β の2種類が存在する）では50%以上のアミノ酸が異なる。CAR や SXR は、外来異物に応答して薬物代謝酵素を誘導する受容体であり、これらの受容体の相同性が低い事は、種間の薬物代謝の違いを示唆している。従って、化学物質の代謝物が内分泌攪乱作用を示す場合、それぞれの種において薬物代謝を検討しなければならないと考えられる。

D. 有機スズ化合物のアフリカツメガエルへの影響

我々は、環境省が内分泌攪乱作用が疑われるとしてリストアップした化学物質の核内受容体への作用を網羅的にスクリーニングする過程で、有機スズ化合物の TBT や TPT が顕著に RXR と PPAR γ に対しアゴニスト活性を示すことを明らかにした。哺乳動物において、PPAR γ は脂肪細胞の分化に重要な役割を果たしており、そのリガンドは脂肪細胞への分化を顕著に促進することが知られている。また、PPAR γ は RXR とヘテロダイマーを形成して DNA に結合するが、PPAR γ /RXR は permissive 型のヘテロダイマーを形成することから、RXR リガンドも脂肪細胞の分化を促進する。有機スズ化合物は、この PPAR γ と RXR の両方のアゴニストとして機能することから、有機スズは哺乳動物において脂肪細胞を増加させることが予想された。そこで、我々はマウスの前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞を用いて、有機スズ化合物の脂肪細胞分化への影響を検討した。その結果、低濃度の TBT と TPT の暴露は、3T3-L1 細胞内に大量の脂肪滴を蓄積させ、脂肪細胞への分化を顕著に促進した (Kanayama, T *et al.* *Molecular Pharmacology*, 67: 766-774, 2005)。

同様の研究は、米国 University of California Irvine の Dr. Bruce Blumberg 等のグループも行っている。彼等はアフリカツメガエル由来の PPAR γ と RXR にも有機スズ化合物がアゴニスト活性を示すこと、アフリカツメガエルへの有機スズの暴露は生殖腺周辺の脂肪を増加させることを明らかにした (投稿中)。これらの結果は、我々が行った哺乳動物細胞での結果と良く一致しており、核内受容体を介する生体影響は、脊椎動物間ではある程度、共通していることを予想させる。

E. 結論

1. アフリカツメガエルは、既に確立された実験モデル生物であり、特に発生学の研究に適し

ている。

2. *Xenopus laevis* と *Xenopus tropicalis* を較べた場合、*Xenopus tropicalis* の方がその染色体構成や生活環の短さから、実験材料として適している。
3. 哺乳動物で知られている核内受容体のほとんどはアフリカツメガエルにも存在するが、薬物代謝酵素の誘導に関与する受容体には、アミノ酸配列に大きな違いがある。
4. 有機スズ化合物の生体影響において、哺乳動物とアフリカツメガエルは良く似た挙動を示す。

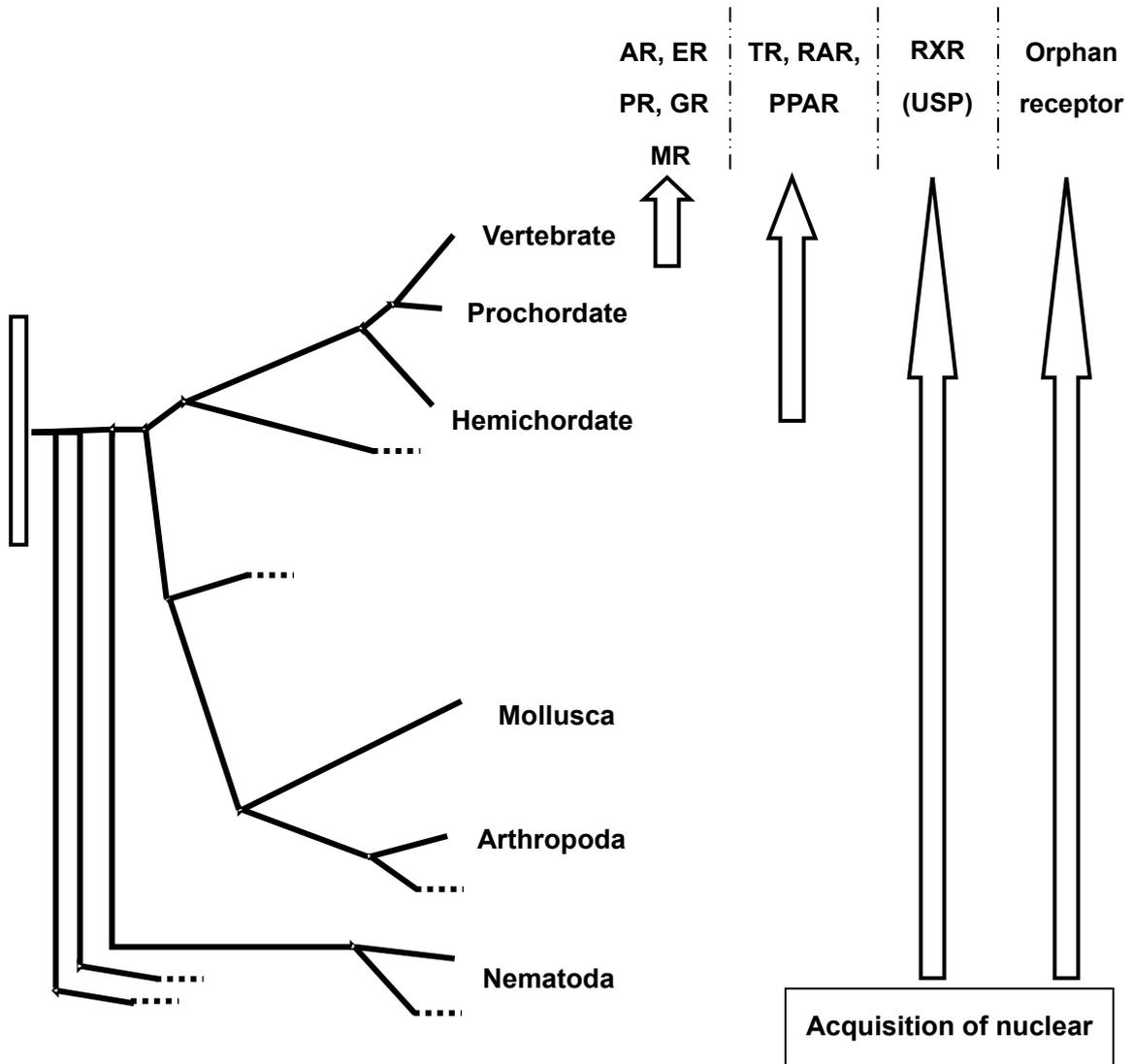


図1 核内受容体遺伝子の進化

表1 ヒトの核内受容体に対するマウス、ラット、カエルの類似性

(DNA 結合領域)

Receptor	mouse	rat	frog	Receptor	mouse	rat	frog
ER α	100%	100%	98%	RXR α	100%	100%	96%
ER β	100%	100%	98%	RXR β	100%	100%	95%
AR	100%	100%	100%	RXR γ	100%	100%	96%
GR	100%	100%	100%	PPAR α	100%	98%	90%
MR	100%	100%	98%	PPAR γ	100%	100%	96%
PR	100%	100%	96%	PPAR δ	96%	95%	N.D.
RAR α	100%	100%	100%	LXR α	96%	98%	N.D.
RAR β	100%	100%	N.D.	LXR β	92%	93%	85%
RAR γ	100%	100%	96%	FXR	100%	98%	N.D.
TR α	100%	100%	93%	CAR	90%	90%	N.D.
TR β	96%	96%	100%	SXR	95%	95%	74% (α)
VDR	100%	100%	95%				74% (β)

表2 ヒトの核内受容体に対するマウス、ラット、カエルの類似性

(リガンド結合領域)

Receptor	mouse	rat	frog	Receptor	mouse	rat	frog
ER α	91%	91%	75%	RXR α	99%	99%	95%
ER β	89%	90%	75%	RXR β	99%	99%	94%
AR	98%	98%	85%	RXR γ	99%	98%	91%
GR	94%	95%	73%	PPAR α	91%	92%	89%
MR	93%	93%	81%	PPAR γ	99%	99%	84%
PR	94%	94%	77%	PPAR δ	94%	92%	N.D.
RAR α	99%	98%	92%	LXR α	98%	98%	N.D.
RAR β	98%	98%	N.D.	LXR β	99%	99%	88%
RAR γ	99%	98%	89%	FXR	94%	93%	N.D.
TR α	98%	98%	88%	CAR	79%	73%	N.D.
TR β	99%	99%	93%	SXR	77%	76%	43% (α)
VDR	91%	92%	81%				44% (β)

Xenopus as model animal for endocrine disrupter research

Jun-ichi Nishikawa

Associate Professor, Laboratory of Environmental Biochemistry, Graduate School of
Pharmaceutical Sciences, Osaka University

Key Word: endocrine disrupter, nuclear receptor family, retinoids, amphibians, xenopus

Abstract:

Xenopus serves as an excellent model for the effects of endocrine disrupters on development and physiology because they afford an ideal combination of embryological and biochemical approaches to study the developmental biology. *Xenopus laevis* has led the way in identifying the mechanisms of early fate decisions, patterning of the basic vertebrate body plan, and early organogenesis. In addition, it has been reported that amphibian populations have declined significantly around the world in recent years. Therefore, the research on amphibians is necessary to elucidate the relationship between industrial chemicals and abnormalities observed in wild life. In this research project, we have developed *in vitro* detection method for potential endocrine disrupting chemicals and conducted comprehensive screening of suspected endocrine disrupters on many nuclear receptors. As a result, we found that several compounds possess agonistic activities for multiple nuclear receptors simultaneously. In particular, alkylphenols (e.g., nonylphenol and octylphenol) showed agonistic activity on retinoic acid receptor as well as estrogen receptor. Further, some organotin compounds (e.g., TBT and TPT) showed strong effects on retinoid X receptor or peroxisome proliferator-activated receptor γ . These results suggest that the toxicity of some endocrine disrupters came from their simultaneous effects on multiple nuclear receptors. To confirm our *in vitro* data in biological relevance, we have to carry out animal experiments, and chose *Xenopus* as a model animal for future study.

II-4. 平成 15 年度研究結果の評価

平成 15 年度に実施した研究（10 研究）の研究発表会を開催し、内分泌かく乱化学物質等研究推進専門委員会にて研究成果の評価を行い、平成 16 年度でこれまでの研究成果の総括を行うこととした。

II-4.1. 内分泌かく乱化学物質等研究推進専門委員会名簿

委員長	高杉 暹	横浜市立大学名誉教授
委員	有菌 幸司	熊本県立大学環境共生学部教授
	井口 泰泉	大学共同利用機関法人自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター教授
	堤 治	東京大学医学部教授
	長濱 嘉孝	大学共同利用機関法人基礎生物学研究所 発生生物学領域教授

II-4.2. 平成 15 年度の 10 研究

1. ラットの生殖腺の器官培養系におけるトリブチルスズの影響
2. 内分泌攪乱化学物質による雄性生殖器への影響の分子細胞生物学的メカニズムの解明
3. 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
4. フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価
5. 核内受容体ファミリーを介する化学物質の生体影響に関する研究
6. ビスフェノールA膜受容体の分子生物学的検討と作用機序の解明に関する研究
7. 甲殻類（ミジンコ）におよぼす内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する研究
8. 内分泌攪乱化学物質問題に係る遺伝子技術を用いた試験法開発
9. 無脊椎動物への内分泌攪乱作用に関するスクリーニング試験開発のための基礎的研究
10. 前鰓類（海産巻貝類）の性及び生殖に関わる内分泌機構の解明に関する基礎的研究