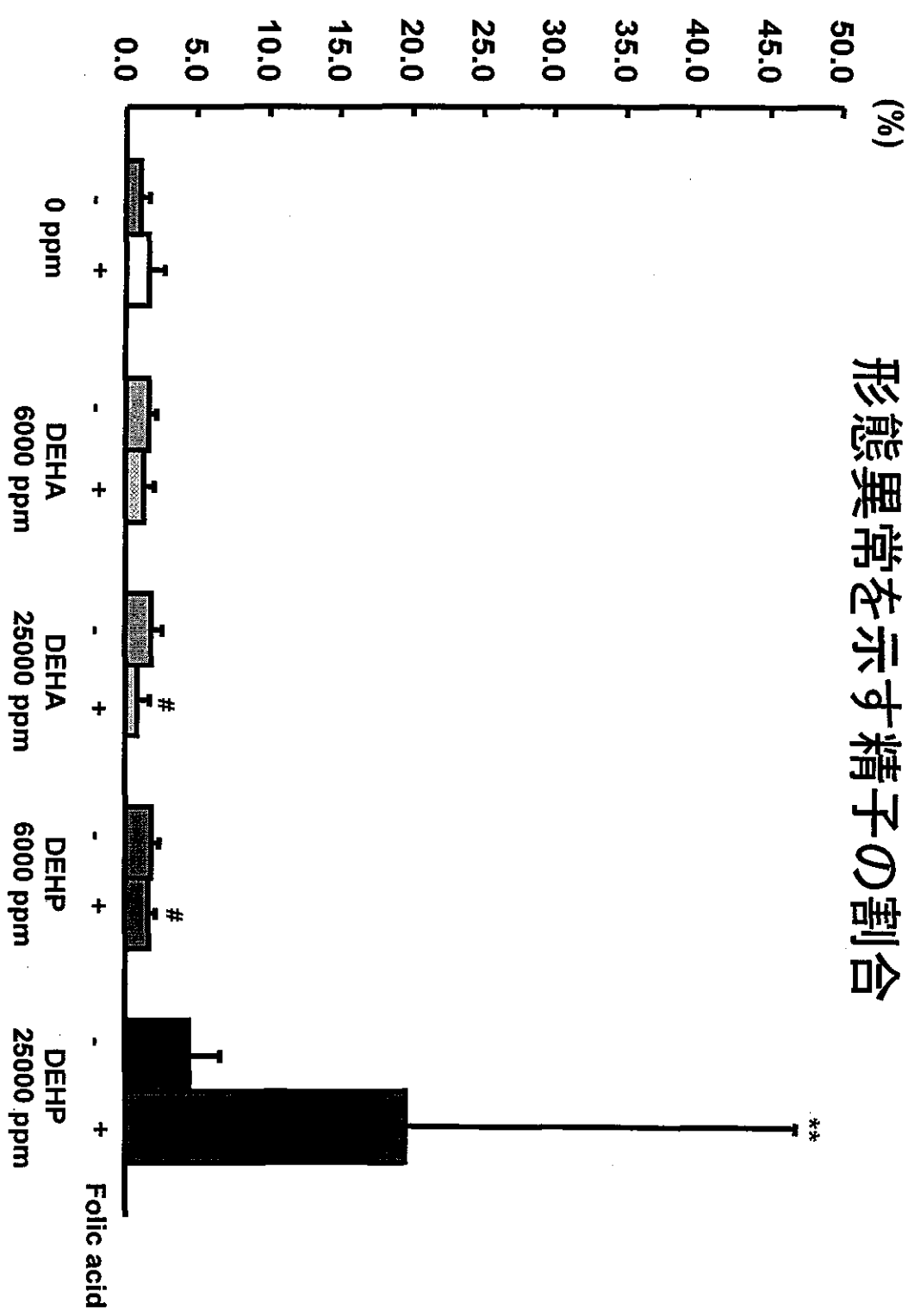


形態異常を示す精子の割合



** : Significantly different from control group at $P < 0.01$, respectively.
: Significantly different from initiating group at $P < 0.05$, respectively.

図6.

精子運動能(5分間値)

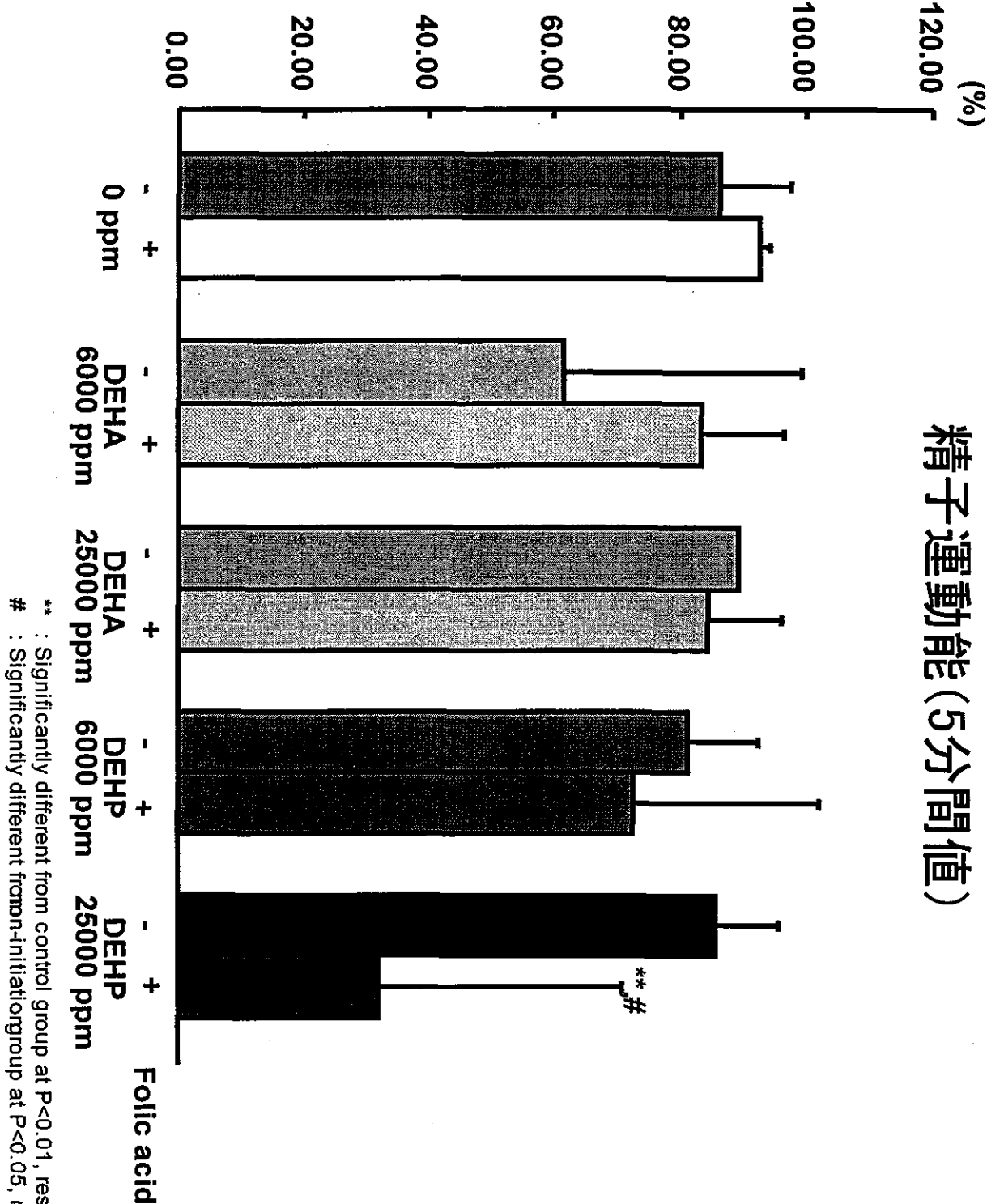
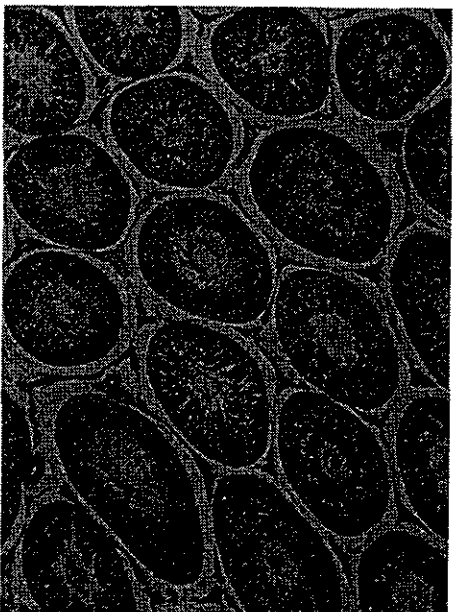
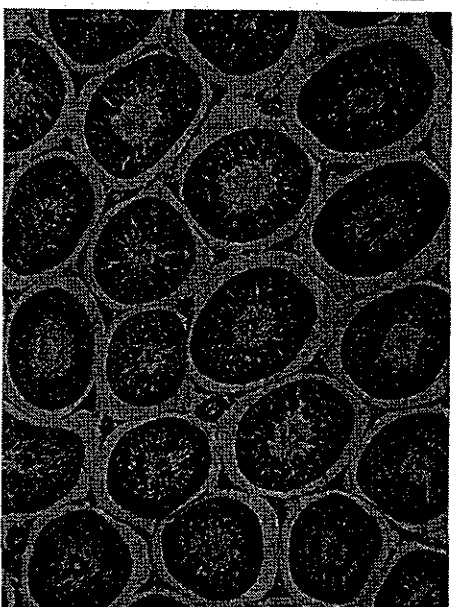


図7.

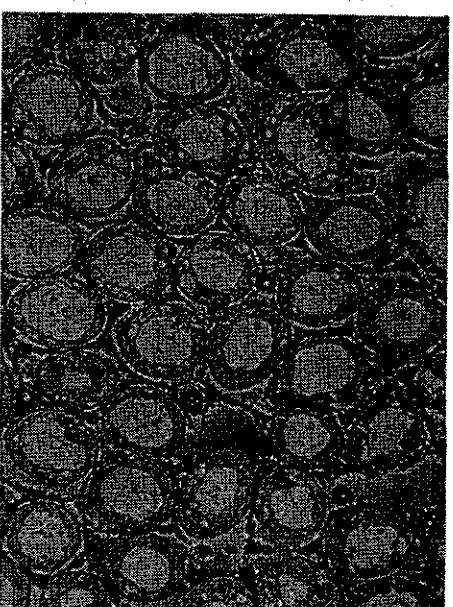
精細管の組織学的変化



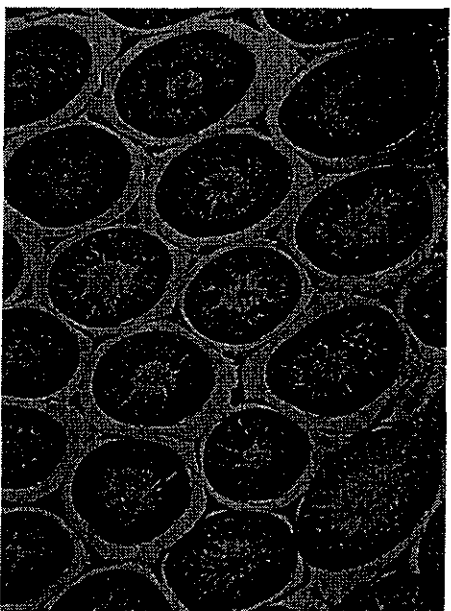
Folic acid + 0 ppm



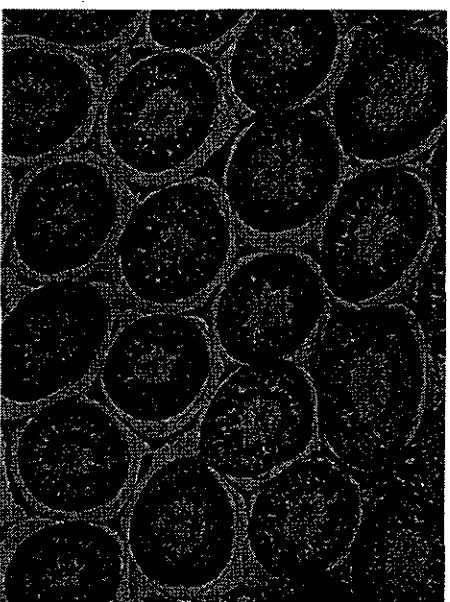
Folic acid + DEHA 25000 ppm



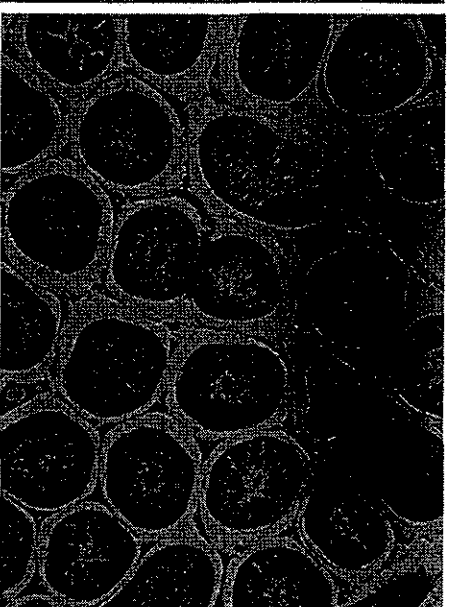
Folic acid + DEHP 25000 ppm



0 ppm



DEHA 25000 ppm



DEHP 25000 ppm

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
フタル酸／アジピン酸エステル類の生殖器障害に関する研究
—発達期ないし有病時暴露による影響評価—

分担研究報告書（16年度）

種差による影響評価

分担研究者 九郎丸 正道（東京大学大学院農学生命科学研究科教授）

研究要旨：若齢マウスへの MEHP 単回経口投与試験では、3 日目の高濃度投与群で高いアポトーシス細胞数を示したが、5 日目では投与群は対照群に比べ、アポトーシス細胞数が減少した。若齢マウス精巣器官培養系への MEHP 添加試験では、濃度依存的、時間依存的にアポトーシス細胞の増加が確認された。また FAS は精細胞に、Fas-L はセルトリ細胞に陽性反応を示した。成体ニホンザル精巣器官培養系への MEHP 添加試験でも、少数ながら濃度依存的、時間依存的にアポトーシス細胞数の増加が確認され、それは成体ヤギより高い値を示した。

A. 研究目的

プラスチック可塑剤として一般に広く利用されている DEHP [Di(2-ethylhexyl)phthalate] の加水分解代謝物であり、活性本体とされる MEHP [Mono(2-ethylhexyl)phthalate] の精巣に対する直接的な影響について種差という観点から検討するため、以下の経口投与試験ならびに精巣器官培養系への添加試験を試みた。

B. 研究方法

1) 若齢マウスへの MEHP 単回経口投与試験

28 日齢の C57B 雄マウスに 700 ~900mg/kg/day を単回経口投与し、3 日目ないし 5 日目に精巣を採材。4 %

パラフォルムアルデヒド固定を施し、通常の光顕観察および TUNEL 法によるアポトーシス細胞の観察を行った。

2) 若齢マウス精巣器官培養系への MEHP 添加試験

20 日齢の C57B 雄マウス精巣器官培養系に MEHP (100, 1, 1×10^3 , 1×10^6 , 0 nmol/ml) を添加し、添加 1, 3, 6, 9 時間後に採材。4 %パラフォルムアルデヒドで固定後、TUNEL 法によるアポトーシス細胞及び Fas, Fas-L 抗体を用いた陽性細胞の確認を行った。

3) 成体ニホンザル精巣器官培養系への MEHP 添加試験

10 才齢のニホンザル精巣器官培養系に MEHP (100, 1, 0 nmol/ml) を添加し、添加 3, 6, 9 時間後に採材。4 %パラフォルムアルデヒド固定標本は、通常の光顕

観察および TUNEL 法によるアポトーシス細胞の観察に。5%グルタルアルデヒド固定標本は電顕観察に用いた。

(倫理面への配慮)

精巣の採材に際しては、各動物にペントバルビタールによる深麻酔を施し、苦痛が全くない状態で行った。

C. 研究結果

1) 若齢マウスへの MEHP 単回経口投与試験

若齢マウスへの MEHP 単回経口投与試験では、投与後3日目の高濃度投与群(800, 900mg/kg)で高いアポトーシス細胞(TUNEL 陽性細胞)数を示したが、投与後5日目では投与群は対照群に比べ、アポトーシス細胞数は減少した(Fig.1)。

2) 若齢マウス精巣器官培養系への MEHP 添加試験

濃度依存的、時間依存的にアポトーシス細胞数の増加が確認された(Table 1)。1及び100nm/ml 投与群では、いずれの時間帯でも対照群に比べ、アポトーシス細胞数は有意に高い値を示した(Fig.2)。また、投与後9時間では、いずれの濃度でも有意かつ著明なアポトーシス細胞数の増加が見られた(Fig.3)。また、免疫組織化学の結果、Fas は精細胞に、Fas-L はセルトリ細胞に陽性反応が確認された(Fig.4)。

3) 成体ニホンザル精巣器官培養系への MEHP 添加試験

未成熟個体を用いた他種動物の実験結果に比べ(Fig.5)、かなり少数ながら濃度依存的、時間依存的なアポトーシス細胞

数の増加が確認され(Fig.6, Table 2)、それは成体ヤギより高い値を示した(Fig.6, Table 3)。

電顕像ではアポトーシスないしネクローシスを示すセルトリ細胞及び精細胞が認められた(Fig.7)。

D. 考察

若齢マウスの精巣器官培養系への MEHP 添加試験では、アポトーシス細胞数(TUNEL 陽性細胞)の変化を指標とした場合、若齢ラットやモルモットと同様、濃度依存的、時間依存的にアポトーシス細胞数の増加が確認された。しかし、その増加の程度には明らかな種差が認められた。また、成体ニホンザルの精巣器官培養系への MEHP 添加試験では、少数ながら濃度依存的、時間依存的なアポトーシス細胞数の増加が確認され、それは成体ヤギより高い値を示した。

E. 結論

これまでの実験結果から、種差の要因として、セルトリ細胞自身の MEHP に対する感受性の差異が関わっていることが推測された。同時に MEHP の代謝経路の種差も関わっている可能性が高い。

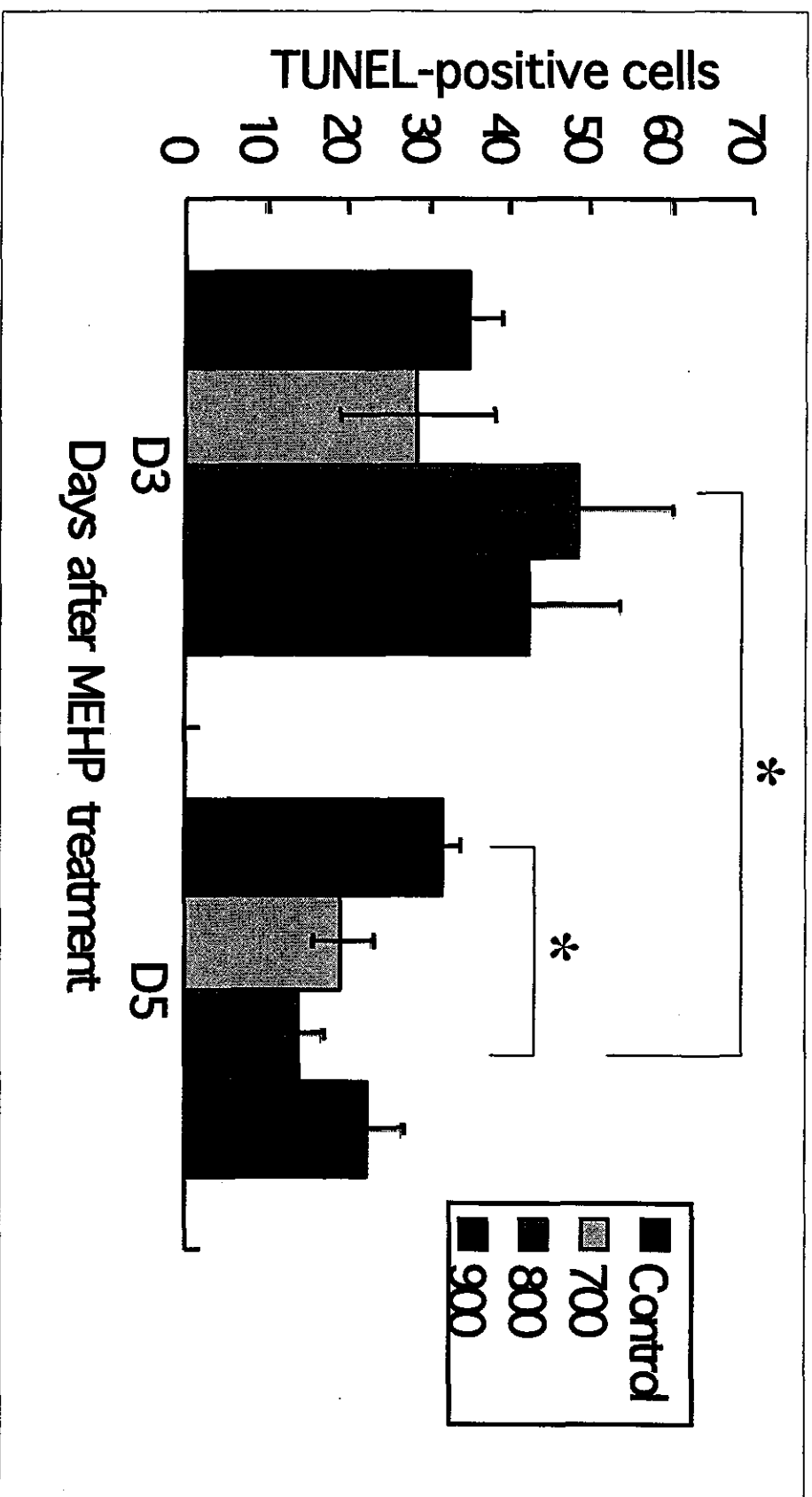
F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Andriana, B. B., Tay, T. W., Ishii, M., Awal, M. A., Kanai, Y., Kurohmaru, M. and Hayashi, Y. An ultrastructural study on cytotoxic effects of mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes

- in Shiba goats *in vitro*. J. Vet. Sci., 5 :235-240 (2004).
- 2) Awal, M. A., Kurohmaru, M., Ishii, M., Andriana, B. B., Kanai, Y. and Hayashi, Y. Mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) induces spermatogenic cell apoptosis in guinea pig testes at prepubertal stage *in vitro*. Int. J. Toxicol., 23 : 349-355 (2004).
 - 3) Awal, M. A., Kurohmaru, M., Kanai, Y. and Hayashi, Y. Mono- (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) induces testicular alterations in guinea pigs at prepubertal stage. Tissue & Cell, in press
- ## 2. 学会発表
- 1) Tay, T. W., Andriana, B. B., Ishii, M., Kanai, Y., Kurohmaru, M. and Hayashi, Y. Effects of mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) on testes in prepubertal mice. 7th National Biology Symposium, Genting Highlands, Malaysia, May, 2004
 - 2) Kurohmaru, M., Andriana, B. B., Tay, T. W., Awal, M. A., Ishii, M., Kanai, Y. and Hayashi, Y. Effects of mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes in some prepubertal laboratory animals *in vivo* and *in vitro*, Proceeding of the 20th meeting of the Korean Association for Laboratory Animal Science, Korea, June, 2004
 - 3) Tay, T. W., Andriana, B. B., Ishii, M., Kanai, Y., Kurohmaru, M. and Hayashi, Y. Mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) causes cell death in testes of prepubertal mice. 第138回日本獣医学学会学術集会、2004.9.11、札幌
 - 4) Andriana, B. B., Tay, T. W., Ishii, M., Choi, E. K., Kanai, Y., Suzuki, J. and Kurohmaru, M. Biochemical effects of mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on the testicular tissue culture from adult monkey. 第139回日本獣医学学会学術集会、2005.3.29、和光
 - 5) Tay, T. W., Andriana, B. B., Ishii, M., Choi, E. K., Kanai, Y. and Kurohmaru, M. Apoptosis in mono(2-ethylhexyl) phthalate-treated mice testes *in vitro*. 第139回日本獣医学学会学術集会、2005.3.29、和光
- ## G. 知的所有権の取得状況
- 特になし

Fig.1 TUNEL



TUNEL-positive cells per 100 seminiferous tubules.

Table 1 MEHP-induced apoptotic spermatogenic cells per 10 round seminiferous tubules

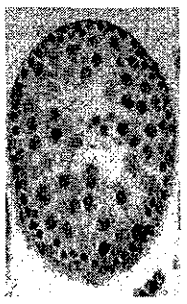
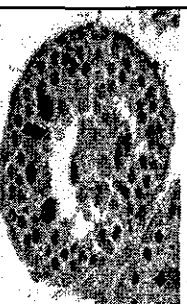
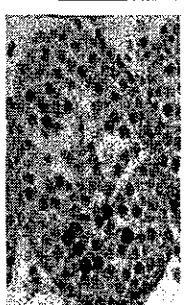
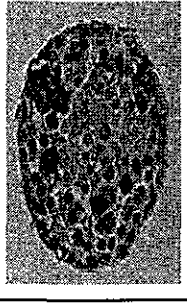
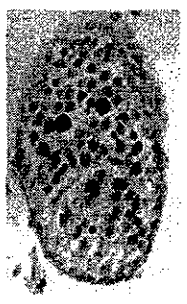
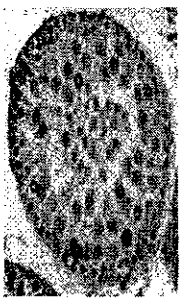
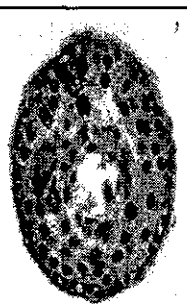
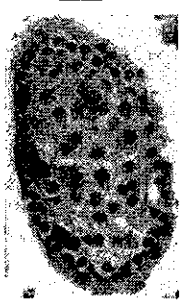
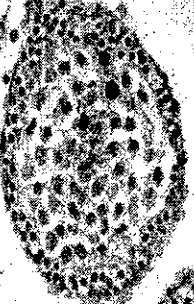
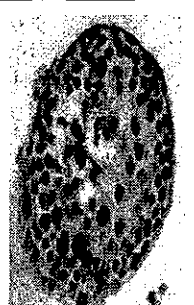
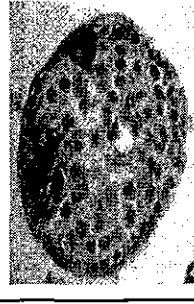
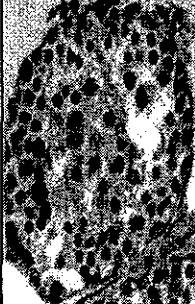
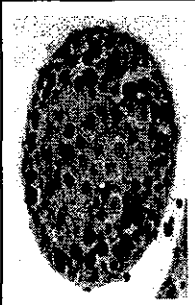
	Control	1x10 ⁻⁶ (nmol/ml)	1x10 ⁻³ (nmol/ml)	1	100 (nmol/ml)
1 hr	 6.3 ± 1.7	 9 ± 3.1	 12.3 ± 2.3	 15.7 ± 1.9	 19.7 ± 0.3
3 hr	 6.7 ± 0.9	 9.3 ± 1.2	 14.3 ± 0.9	 17 ± 0.6	 20.7 ± 1.9
6 hr	 11 ± 2.1	 11.3 ± 2.0	 15.3 ± 2.7	 20.3 ± 1.2	 22.7 ± 3.5
9 hr	 15 ± 3.2	 24 ± 1.5	 28 ± 0.6	 28.7 ± 3.5	 31.3 ± 0.3

Fig.2

C57 Black Mice Organ Culture Apoptotic cells per 10 seminiferous tubules

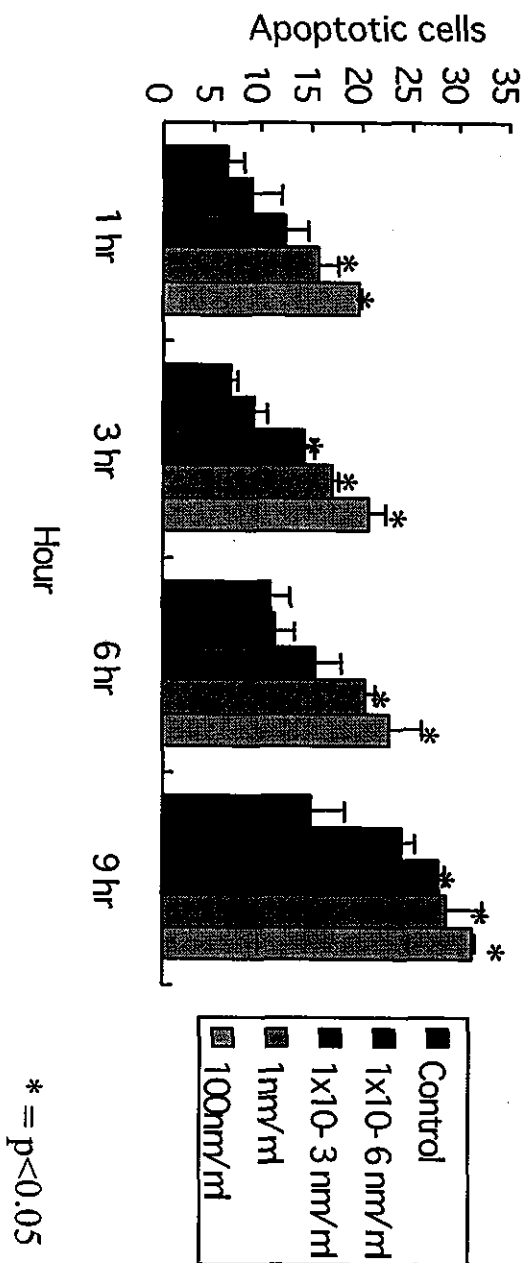
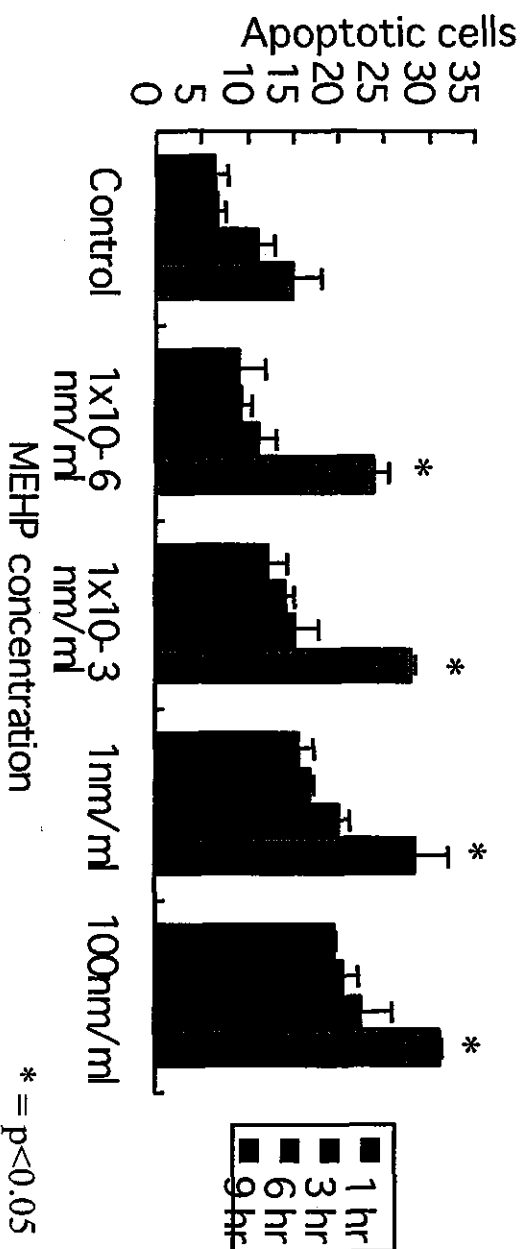


Fig.3

C57 Black Mice Organ Culture Apoptotic cells per 10 seminiferous tubules



FasL

Fas

Control 1hr

100 (nmol/ml) 9hr

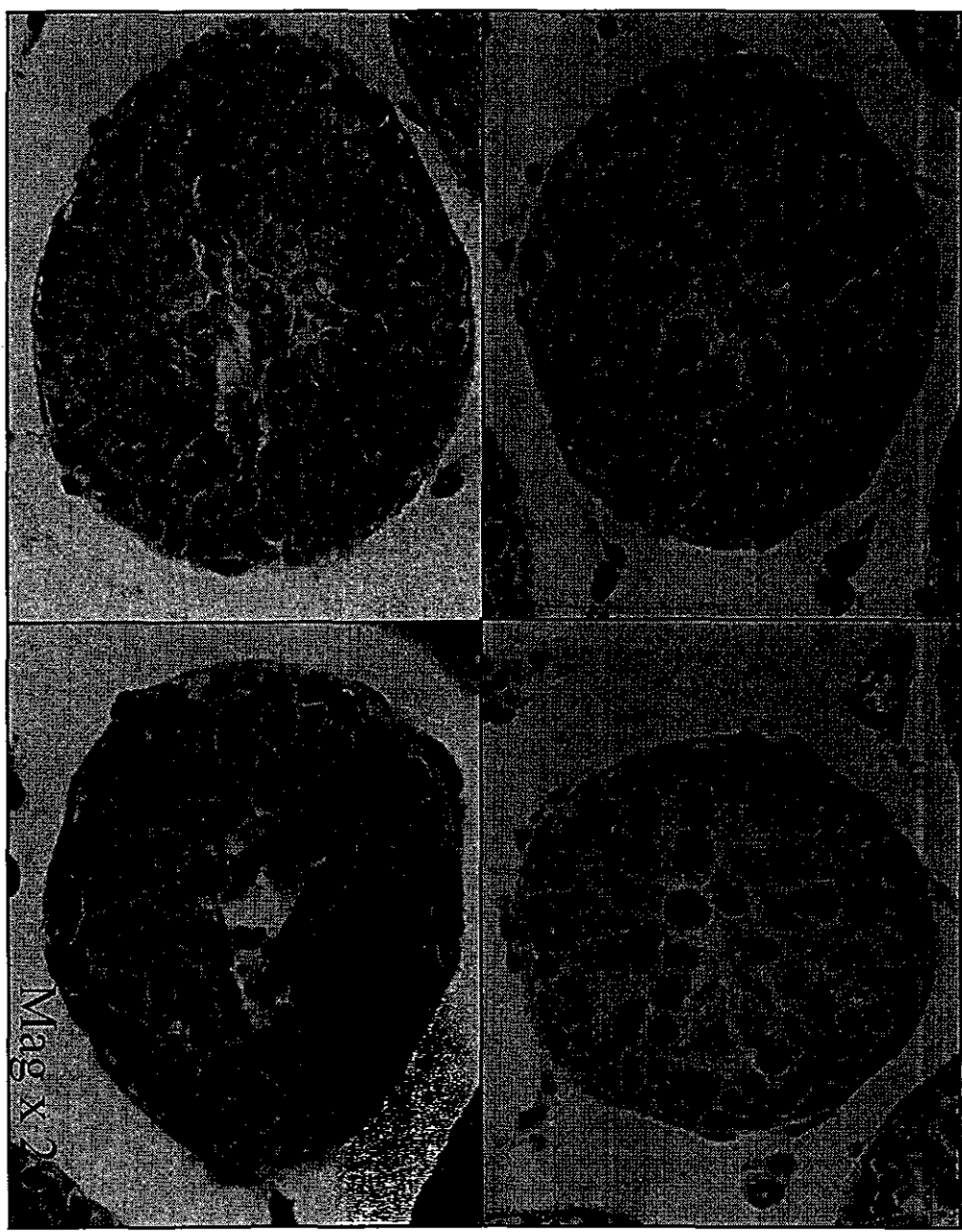


Fig.4.

Black and yellow arrows indicate presence of FasL and Fas, respectively.

Fig. 5
TUNEL staining of adult monkey, and immature and adult Shiba goat testicular tissue
cultures treated with MEHP (*in vitro*)

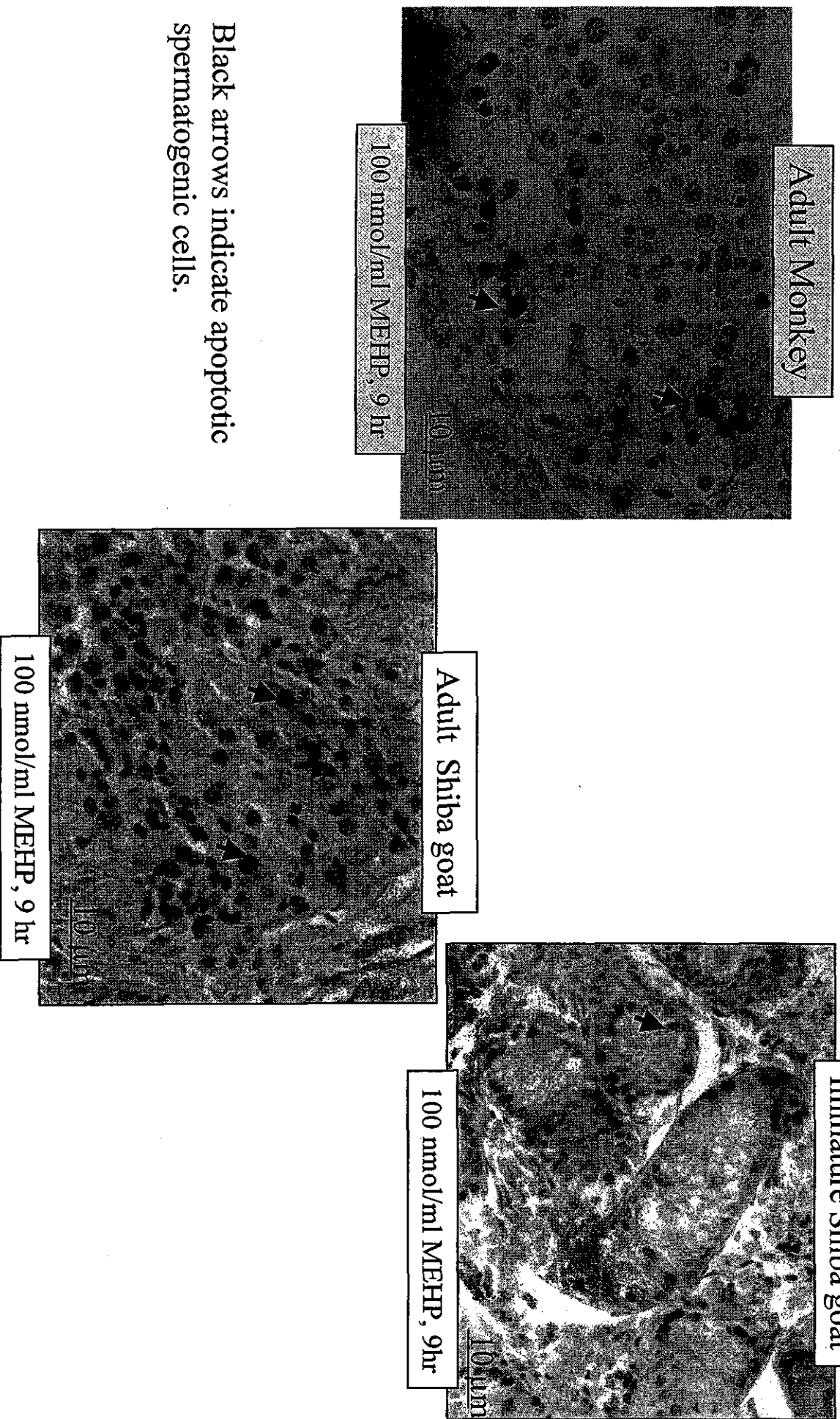


Table 2 Percentage of MEHP-induced apoptotic spermatogenic cells per total cells in adult monkey testis (*in vitro*). Arrows indicate apoptotic spermatogenic cell (TUNEL staining).

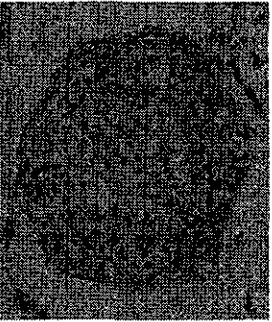
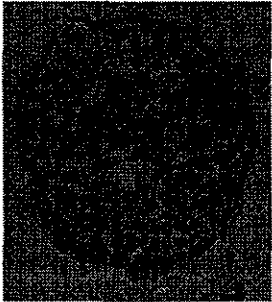
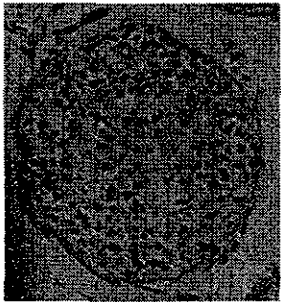
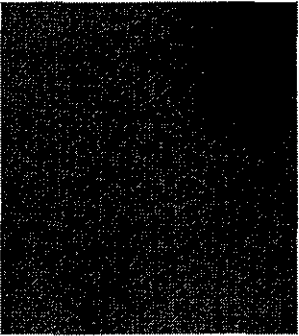
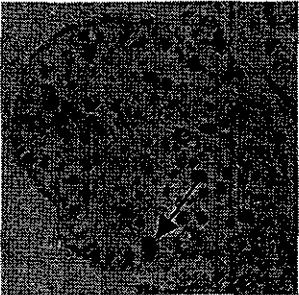
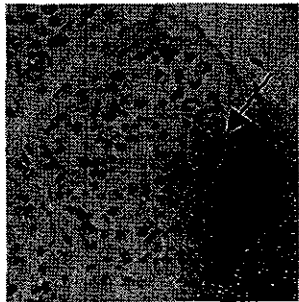
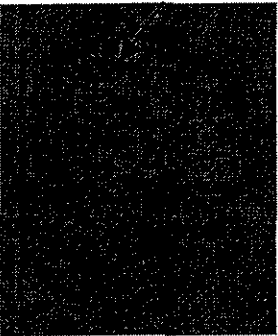
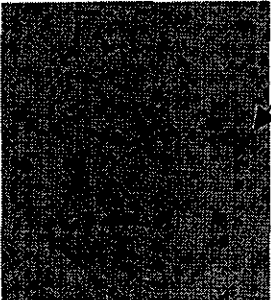
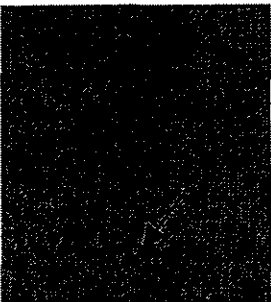
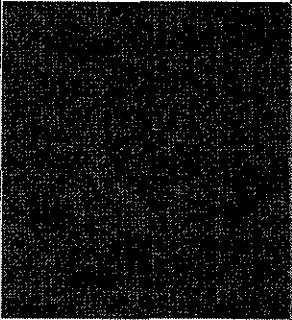
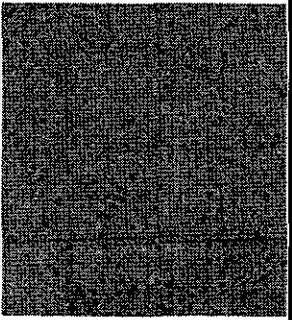
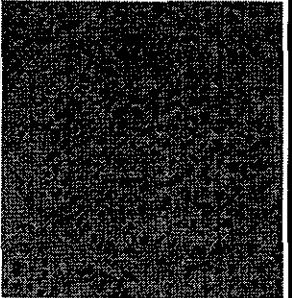
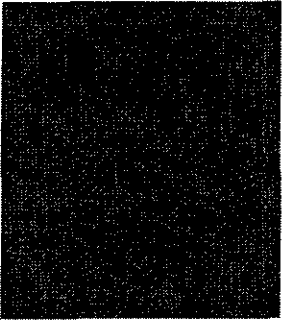
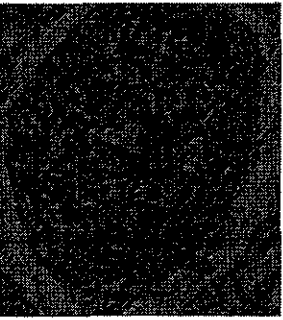
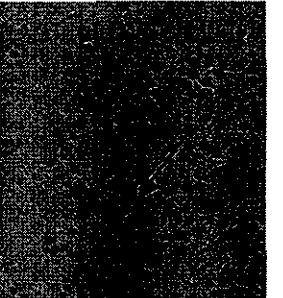
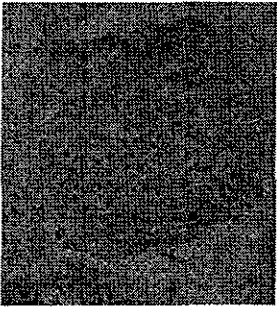
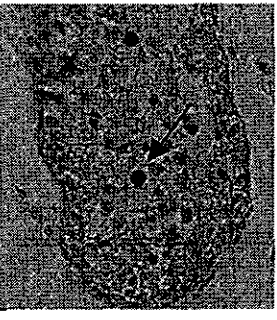
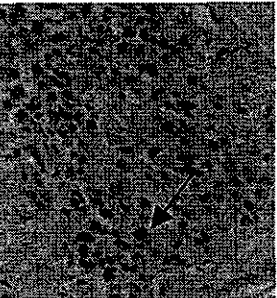
TIME	Concentration of MEHP (nmol/ml)		
	Control	1 nmol/ml	100 nmol/ml
3 hr	 0% ± 0%	 0% ± 0%	 0% ± 0%
6 hr	 0.05% ± 0.05%	 0.06%± 0.02%	 0.11% ± 0.06%
9 hr	 0.07% ± 0.03%	 0.19% ± 0.08%	 0.36% ± 0.13%

Table 3 Percentage of MEHP-induced apoptotic spermatogenic cells in adult Shiba goat testis (*in vitro*). Arrows indicate apoptotic spermatogenic cells (TUNEL staining).

TIME	Concentration of MEHP (nmol/ml)		
	Control	1 nmol/ml	100 nmol/ml
3 h	 0% ± 0%	 0% ± 0%	 0% ± 0%
6 h	 0% ± 0%	 0% ± 0%	 0.01% ± 0.02%
9 h	 0% ± 0%	 0.02% ± 0.02%	 0.04% ± 0.04%

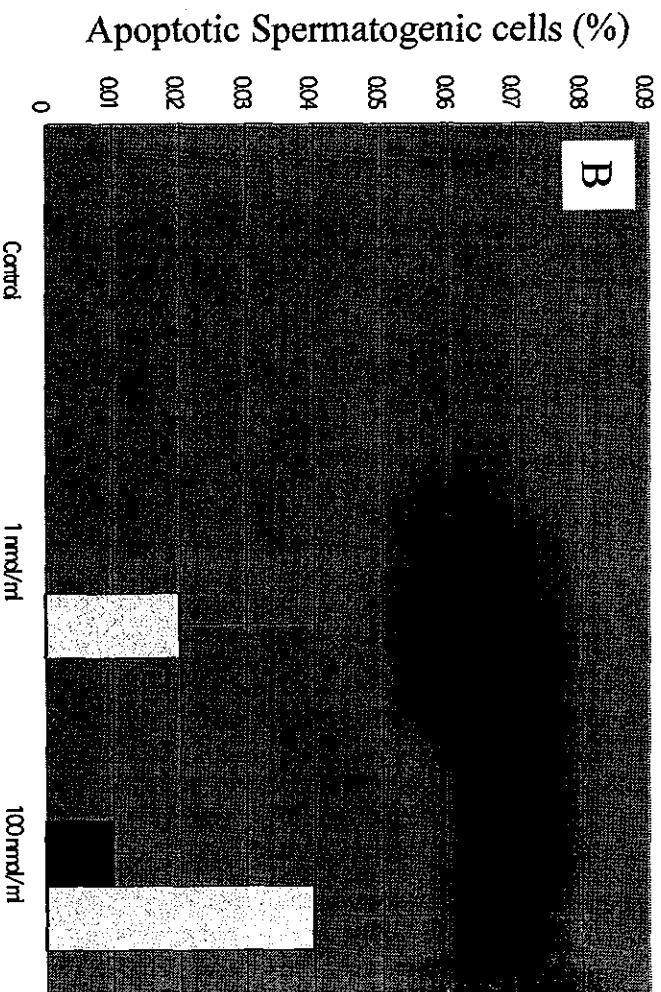
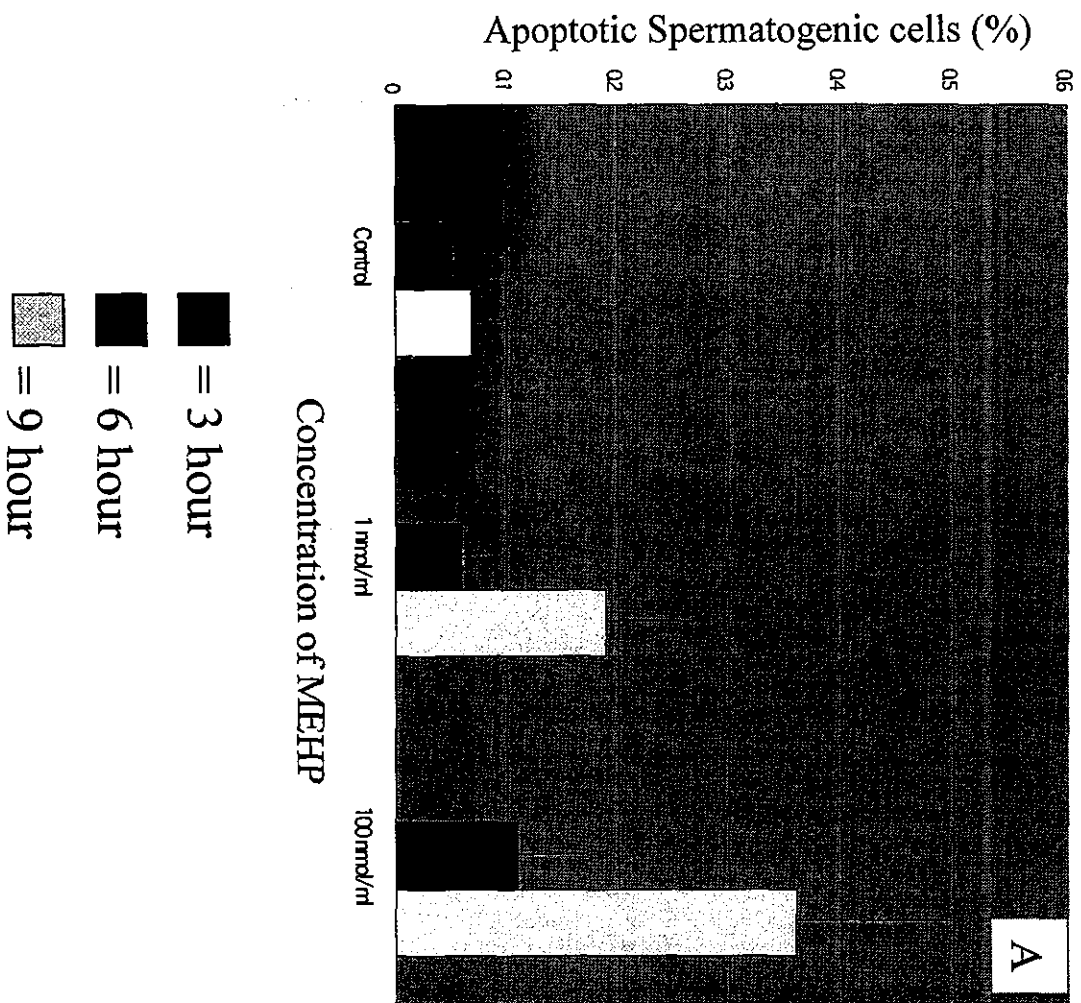
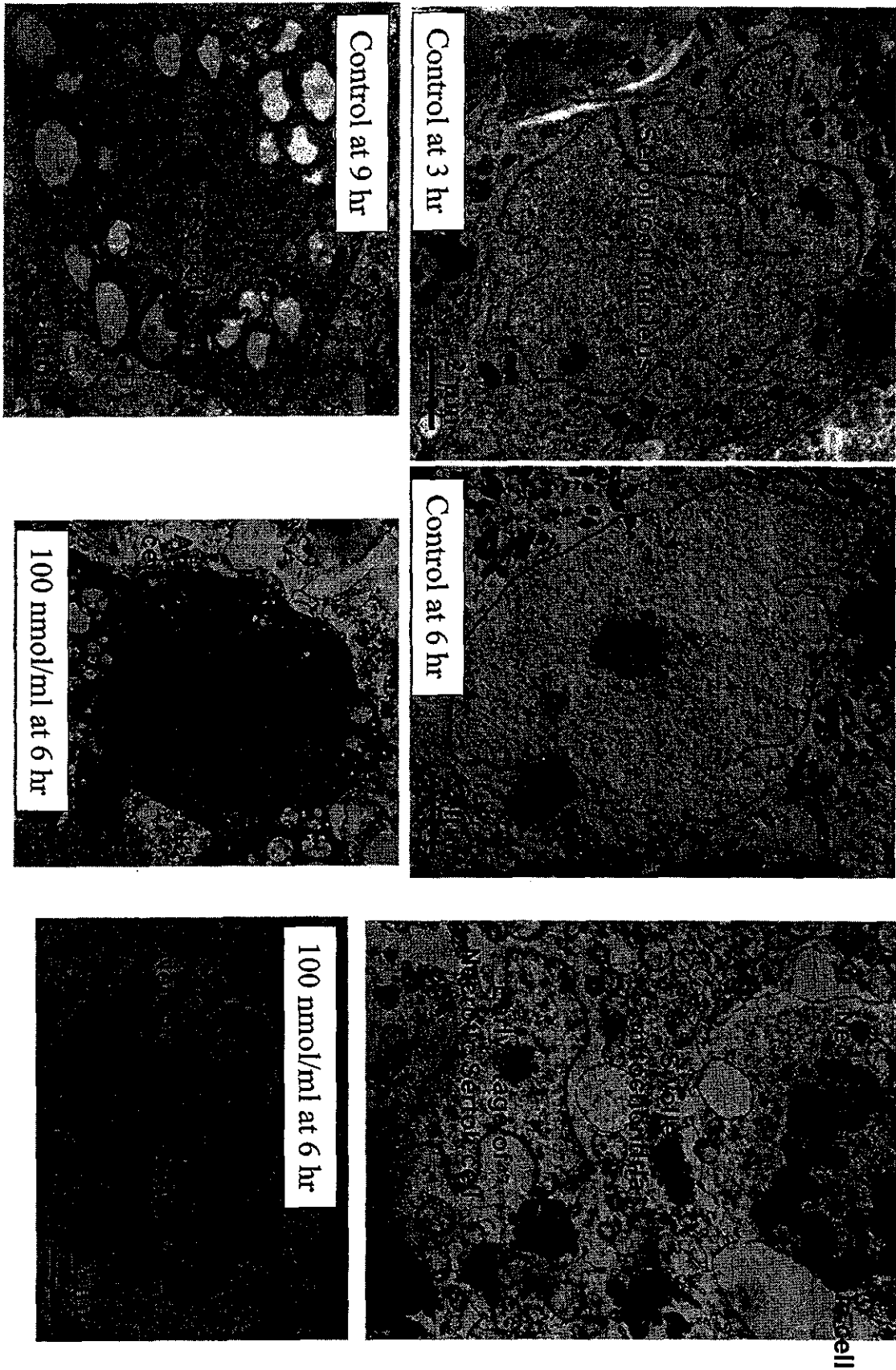


Fig.6 Percentage of apoptotic spermatogenic cells in control and treated groups.

A. MEHP-treatment in the adult monkey testicular tissue culture. Apoptotic spermatogenic cells increase in time-and dose-dependent manners.

B. MEHP-treatment in the adult Shiba goat testicular tissue culture.

Fig. 7 Transmission electron micrographs



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書（平成16年度）

フタル酸／アジピン酸エステル類の生殖器障害に関する調査研究

分担研究者 江崎 治 国立健康・栄養研究所生活習慣病研究部部長

研究協力者 山崎聖美 国立健康・栄養研究所生活習慣病研究部主任研究員

研究要旨

フタル酸（2-エチルヘキシル）の代謝産物であるフタル酸モノ-2-エチルヘキシル（MEHP）の精巣毒性について、その分子レベルにおけるメカニズムを解明する目的で、MEHPがマウスライディッチ細胞 MA-10 へ及ぼす影響について調べた。その結果、MEHPにより MA-10 細胞内で HMG CoA Synthase2 遺伝子の発現が増加することが、遺伝子チップ及び Northern Blot の解析により明らかになった。また、HMG CoA Synthase2 プロモーター領域をクローニングし、レポータージーンアッセイを行った結果、MEHPにより HMG CoA Synthase2 プロモーターが活性化されることが明らかになった。

A. 研究目的

フタル酸ジ（2-エチルヘキシル）（DEHP）による生殖器障害は、その活性代謝産物であるフタル酸モノ-2-エチルヘキシル（MEHP）によると考えられている。MEHPによる生殖器障害については、精巣毒性に関して報告されている。そのメカニズムについては、MEHPはPPARに結合することや、FasLを介してセルトリ細胞へ影響を及ぼすなどその毒性メカニズムが一部解明されつつあるが、その詳細についてはまだ明らかにされていない。

そこで、MEHPの精巣毒性についてその分子レベル、特に遺伝子レベルにおけ

るメカニズムを解明する目的で、マウスライディッチ細胞 MA-10 を用いて、MEHPの及ぼす影響について調べた。

B. 研究方法

1. RNA 調製

マウスライディッチ細胞 MA-10 を 6 穴プレートに 10%FCS-DMEM 中 2×10^5 個/ml になるようにまき、一晚、37℃、5%CO₂ 中でインキュベーションした後、FCS 無しの DMEM で細胞を洗った後、FCS 無し DMEM 中で MEHP を最終濃度 10^{-6} M 及び 10^{-5} M、及び 10^{-4} M になるよう添加、あるいはコントロールとして DMSO を添加し、さらに 24 時間インキュ

ベーションし PBS で細胞を洗浄後、Trizol にて RNA を調製した。

2. Gene Chip による解析

Affimetrix 社製 Mouse Expression 430A にて 1 で調製した RNA について解析を行った。

3. Northern Blotting による解析

1 で調製した RNA 20 μ g をアガロースゲルで電気泳動し Northern Blotting を行った。

4. レポータージーンアッセイ

遺伝子のプロモーター領域(2kb)をプロメガ社ホタルルシフェラーゼレポーターベクターにクローニングした。ルシフェラーゼ活性は、プロメガ社 Steady-Glo Luciferase Assay System を用いて測定した。

C. 研究結果

1. MA-10 細胞において MEHP により発現が変化する遺伝子の Gene Chip による解析及び Northern Blotting による解析

MA-10 細胞において 10^{-6} M 及び 10^{-5} M、 10^{-4} M MEHP により発現が変化する遺伝子の Gene Chip による解析を行った結果、発現が増加すると予想された P450,2c29、IL-10、Activin receptor 1 及び HMG CoA synthase2 について確認するために、MA-10 細胞を MEHP 処理して得られた

RNA を用いて Northern blotting を行った。その結果、HMG CoA synthase2 遺伝子のみ MEHP により発現が増加した(図 1)。

2. MEHP による PPAR α の活性化

MEHP は PPAR α を活性化する。そこで、MA-10 細胞を用いたシステムでも MEHP による PPAR α の活性化がみられるかどうか調べるために、PPRE 配列の下流に tk プロモーター、ルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクトを pUC8 ベクターにクローニングした。コントロールベクターとしては tk プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクトを pUC8 ベクターにクローニングしたものを用いた。これらのベクターを用い、PPAR α 、PGC-1 α が入っているプラスミドを条件に応じて同時にトランスフェクションし、MEHP により PPAR α が活性化されるかどうかレポータージーンアッセイにより調べた。ポジティブコントロールとして Fenofibrate を用いた。その結果、図 2 に示すように MEHP は PPAR α を活性化した。

3. MEHP による HMG CoA synthase2 プロモーター領域の活性化

次に MEHP が HMG CoA synthase 2 プロモーターを活性化するかどうかレポータージーンアッセイにより調べた。まず、HMG CoA synthase 2 プロモーター領域の下流に SV40 プロモーター、ルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクトを

pGL2-promoter Vector にクローニングした。コントロールベクターとしては SV40 プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクトを pGL2-promoter Vector にクローニングしたものを用いた。これらのベクターを用い、PPAR α 、PGC-1 α が入っているプラスミドを条件に応じて同時にトランスフェクションし、MEHP により HMG CoA synthase 2 プロモーターが活性化されるかどうかレポータージーンアッセイにより調べた。その結果、MEHP が HMG CoA synthase 2 プロモーターを活性化することが明らかになった (図 3)。

D. 考察

MEHP が転写因子 PPAR α を活性化し、ターゲット遺伝子のプロモーター領域の PPRE に結合してその遺伝子の発現を増加させることが知られているが、本研究により MEHP が HMG CoA synthase 2 の遺伝子発現を増加させること及び HMG CoA synthase 2 のプロモーターを活性化することが明らかになった。このプロモーター領域における転写因子結合部位について検索したところ、PPAR α が結合する配列があることがわかった (図 4)。したがって、MA-10 細胞内で、MEHP は PPAR α に結合し、活性化された PPAR α がさらに HMG CoA synthase 2 のプロモーター領域中の PPRE に結合し、HMG CoA synthase 2 遺伝子の発現が増加したものと考えられる。しかし、ヒト HMG CoA

synthase 2 遺伝子のプロモーター領域についても同様に転写因子結合部位について検索したところ、PPRE が存在しなかった。このようなプロモーター領域の違いにより遺伝子発現変化に違いがみられ、MEHP による精巣への影響のヒトとマウスにおける種差が現れると考えられる。この結果はヒトへの影響を予測するうえで重要な情報になると考えられる。

ところで、MA-10 細胞を用いたレポータージーンアッセイの結果では、外来性由来の PPAR α がなければ MEHP による転写活性は上がり、MA-10 細胞における内因性の PPAR α の欠如が示されたが、マウスライディッヒ細胞には PPAR α の発現が報告されており、in vivo における MEHP による HMG CoA synthase 2 遺伝子の発現増加の可能性は十分にあると考えられる。

HMG CoA synthase 2 は、図 5 に示すように細胞内のコレステロール及びステロイドホルモン合成へとつながる経路で働いている (MA-10 細胞はコレステロールからステロイドホルモンを合成できない)。MEHP により MA-10 細胞内でコレステロールエステルが蓄積するので (本研究により一昨年に報告)、今後、HMG CoA synthase 2 を MA-10 細胞内でレトロウィルスを用いて過剰発現させ、同様にコレステロールエステルの蓄積が観察されるかどうか調べる必要がある。

E. 結論

マウスライディッヒ細胞 MA-10 を 10^{-6} M の MEHP で処理すると 24 時間後に HMG CoA synthase 2 遺伝子の発現が増加することが、遺伝子チップ及び Northern Blot の解析により明らかになった。また、HMG CoA synthase 2 プロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだコンストラクトを作成し、レポータージーンアッセイを行った結果、MEHP により HMG CoA synthase 2 のプロモーターが活性化されることが明らかになった。この遺伝子プロモーター領域を解析した結果、PPRE が存在することがわかった。したがって、MEHP が PPAR α を活性化して HMG CoA synthase 2 の遺伝子の発現が増加したものと考えられる。ヒト HMG CoA synthase 2 プロモーターについても同様に検索を行ったが、PPRE は存在しなかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yajima, H., Ikeshima, E., Shiraki, M., Kanaya, T., Fujiwara, D., Odai, H., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Oikawa, S., Kondo, K.: Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) and and reduce insulin resistance. J. Biol. Chem. 279 33456-33462, 2004.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

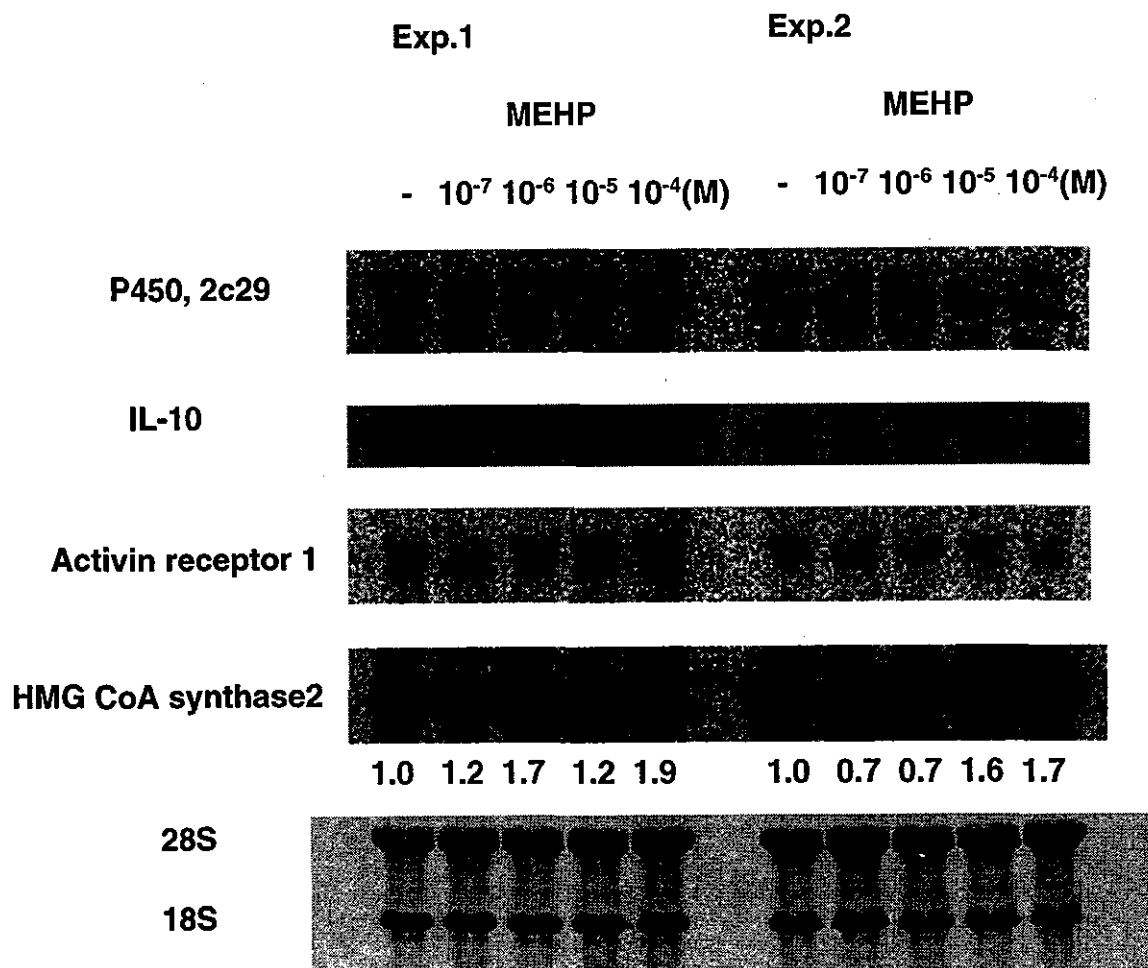


図1 Northern blotによる遺伝子発現変化の確認