

平成13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14年3月

財団法人日本公衆衛生協会

目 次

. 目 的 -----	1
. 内 容 -----	1
-1. 指定研究 -----	1
-2. 業務担当者一覧 -----	1
-3. 指定研究結果報告 -----	3
(1) 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の分子細胞生物学的 メカニズムの解明 -----	5
(2) フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの代謝の種差に関する検討 -----	23
(3) マウス生殖細胞死への環境毒性物質の影響とその分子機構 に関する研究 -----	39
(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 に関する研究 -----	59
(5) TBT によるラット妊娠初期胚の着床不全に関わるメカニズムの解明 ---	67
-4. 指定研究結果の評価 -----	81
-5. 公募研究の実施 -----	81
-5-1. 内分泌攪乱化学物質等研究推進専門委員会名簿 -----	81
-5-2. 公募採択結果 -----	81

．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。

．内 容

内分泌攪乱化学物質等の作用メカニズムに関する 分子生物学的機構の解明、バイオマーカーの開発・評価、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、各研究班毎に、以下 -1. の指定研究を実施するとともに、作用メカニズムに関する研究の公募を行った。また、研究終了後、指定研究及び公募研究の成果を評価した。

-1. 指定研究

- (1) 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の分子細胞生物学的メカニズムの解明
- (2) フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの代謝の種差に関する検討
- (3) マウス生殖細胞死への環境毒性物質の影響とその分子機構に関する研究
- (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に関する研究
- (5) TBT によるラット妊娠初期胚の着床不全に関わるメカニズムの解明

-2. 業務担当者一覧

- (1) 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の分子細胞生物学的メカニズムの解明
 - 研究者 湯浅 茂樹（千葉大学大学院医学研究院形態形成学教授）
 - 研究協力者 外山 芳郎（千葉大学大学院医学研究院形態形成学講師）
 - 前川真見子（千葉大学大学院医学研究院形態形成学助手）
 - 古関 明彦（千葉大学大学院医学研究院発生生物学教授）
 - 関 直彦（千葉大学大学院医学研究院機能ゲノム学講座助教授）
 - 八木 健（大阪大学細胞工学センター教授）

(2) フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの代謝の種差に関する検討

研究者 那須 民江 (信州大学医学部衛生学助教授)
研究協力者 青山 俊文 (信州大学医学部衛生学教授)
横田 博 (酪農学園大学獣医学部助教授)
王 瑞生 (独立行政法人産業医学総合研究所主任研究員)
山ノ下 理 (信州大学医学部研究生)

(3) マウス生殖細胞死への環境毒性物質の影響とその分子機構に関する研究

研究者 小路 武彦 (長崎大学医学部第三解剖学教授)
研究協力者 菱川 善隆 (長崎大学医学部第三解剖学講師)
進 正志 (長崎大学医学部第三解剖学助手)
和泉 伸一 (長崎大学医学部第三解剖学助手)
近藤 宇史 (長崎大学医学部病態生化学教授)
佐藤 浩 (長崎大学医学部附属動物実験施設教授)

(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に関する研究

研究者 岸 玲子 (北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野教授)
研究協力者 佐田 文宏 (北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野講師)
玉置 淳子 (北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野助手)
片倉 洋子 (北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野研究員)
近藤 朋子 (北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野研究員)
梅村 朋宏 (北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野大学院生)
倉橋 典絵 (北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野大学院生)

(5) TBT によるラット妊娠初期胚の着床不全に関わるメカニズムの解明

研究者 鈴木 勝士 (日本獣医畜産大学教授)
研究協力者 鈴木 浩悦 (日本獣医畜産大学講師)
斉藤 賢一 (日本獣医畜産大学助教授)
竹中 基郎 (日本獣医畜産大学大学院生)
八木 美央 (日本獣医畜産大学大学院生)

-3 . 指定研究結果報告

(1) 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の 分子細胞生物学的メカニズムの解明

研究者 湯浅 茂樹 (千葉大学大学院医学研究院 発生医学講座形態形成学 教授)

研究要旨

内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の機序として、精巣発達過程におけるエストロゲン様作用物質に対する曝露が関与することが示唆されているが、これまで精巣発達過程に対するエストロゲン自体の作用が明確にされていなかった。本研究では、まず、齧歯類新生仔期に β -estradiol 3-benzoate, 17β -estradiol を投与すると、精巣が発達して精子細胞が分化する段階になってはじめて造精細胞の中で精子細胞の特異的形態異常が起こることを明らかにした。形態異常の代表的なものとして、尖体顆粒の位置異常や尖体の変形、核の変形、精子細胞-セルトリ細胞間接着構造の異常が高率に認められた。このような異常精子細胞は精子まで発達せず死滅してしまうと思われる。これらのモデル化合物の精子形成阻害機構をもとに、内分泌攪乱作用が疑われる優先12物質中、エストロゲン受容体との親和性の高いアルキルフェノール(nonylphenol, 4-octylphenol)と親和性の低い tributyltin、さらにエストロゲン受容体との親和性が高いが精子形成に対する作用が明確でなかった bisphenol A について精巣発達過程における曝露が及ぼす影響を調べた。その結果、アルキルフェノール、tributyltin では精巣発達に対する障害作用を見いだせなかったが、bisphenol A は β -estradiol 3-benzoate, 17β -estradiol と同様に、精子細胞が分化する段階になってはじめて精子細胞の特異的形態異常を引き起こすことを明らかにした。

bisphenol A は基本的にエストラジオール投与と同様の精子細胞の形成障害を示し、エストロゲン受容体を介した効果であると考えられる。bisphenol A のエストロゲン受容体への結合能はエストラジオールの1,000分の1と言われているが、in vivo では予想されるよりはるかに強い障害作用を持っていた。さらに、この異常は生後5日から11日という特定の期間の曝露で引き起こされた。

β -estradiol 3-benzoate, 17β -estradiol と bisphenol A の作用は、強力なエストロゲン様作用物質と考えられる diethylstilbestrol (DES) による精子形成における減数分裂過程遅延作用(昨年度の本研究成果)とは全く異なる生殖細胞発達段階で検出された。いずれにおいてもセルトリ細胞の特殊接合装置の形成障害が見出され、両グループの化合物の共通な作用点の一つはセルトリ細胞にあると考えられた。また、tamoxifen はエストロゲン受容体の antagonist であるが弱い agonist の作用も持ち、精巣に対しては弱い DES 様の作用を示した。特筆すべき点は、それ自体では効果のない低濃度の DES と tamoxifen を同時に投与すると、DES の作用が相乗的に増強され Leydig cell の発達が著明に阻害されたことである。

セルトリ細胞株 TM4 に DES を作用させると、形態学的変化とともに分子量 38kDa の蛋白(p38)のチロシンリン酸化が特異的に亢進するが、DES を除去し形態学的変化が回復した後も p38 のチロシンリン酸化は持続した。また、上記 bisphenol A, β -estradiol 3-benzoate, 17β -estradiol、アルキルフェノール、tributyltin のいずれもが p38 のチロシンリン酸化を誘導した。

以上の結果から、内分泌攪乱作用が疑われる候補化合物の多くはセルトリ細胞に作用して生殖細胞の分化、発達に影響を及ぼすが、各物質はエストロゲン受容体との結合だけでなく、細胞内情報伝達系に多様な効果を及ぼして、場合によっては複数の作用の弱い化合物が相乗的に働いて特有の精巣機能障害作用を示すと考えられる。

研究協力者

外山芳郎 (千葉大学大学院医学研究院形態形成学・講師)
前川真見子 (千葉大学大学院医学研究院形態形成学・助手)
古関明彦 (千葉大学大学院医学研究院発生生物学・教授)
関直彦 (千葉大学大学院医学研究院機能ゲノム学講座・助教授)
八木健 (大阪大学細胞工学センター・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脅威が主に精子数の減少と環境生物の生殖機能の変異の観点から注目されている。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て、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物質の作用メカニズムについて、精子形成障害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、内分泌攪乱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。

平成13年度は、内分泌攪乱作用が疑われる優先12物質の中で、特にエストロジェン受容体との親和性が強いアルキルフェノールのノニルフェノール、オクチルフェノールと、エストロジェン受容体との親和性が低いにも関わらず内分泌攪乱作用の強いトリブチルスズを中心に、エストラジオールと内分泌攪乱化学物質のプロトタイプとも言える diethylstilbestrol (DES) を対照物質として、齧歯類新生仔期における曝露が精子形成に及ぼす影響を明らかにする。さらに、平成13年度にリスク評価の対象に加えられたビスフェノール A も検討の対象とする。これと共に、前年度に引き続いて、DES がセルトリ細胞発達を障害し生殖細胞分化を遅らせる分子・細胞レベルでの作用機構を解明し、内分泌攪乱化学物質による生殖障害の基本的メカニズムを明らかにする。

B. 研究方法

1. 齧歯類新生仔期におけるエストラジオール、ビスフェノール A、アルキルフェノール、トリブチルスズ曝露の精子形成に対する影響

優先12物質中、特にエストロジェン受容体との親和性が強いノニルフェノール、オクチルフェノールと、エストロジェン受容体との親和性が低いにも関わらず内分泌攪乱作用の強いトリブチルスズ、更に平成13年度にリスク評価の対象に加えられた bisphenol A について、 β -estradiol 3-benzoate, 17 β -estradiol, DES を対照物質として齧歯類新生仔期における曝露が精子形成に及ぼす影響を検討した。

特に、減数分裂過程を中心とした精巣機能発達に注目するとともに、分化した精子細胞 (spermatid) の形態、機能についても検討する。また、新生仔期にエストラジオール、ビスフェノール A に曝露された雄の齧歯類が成熟後に妊孕性において異常を示すかどうかも検討する。投与量に関しては、特に低濃度曝露を中心に解析を行う。これとともに、減数分裂進行に関わる血液-精巣関門の接着構造、特殊接合装置の発達について、電顕的解析、共焦点レーザー顕微鏡による細胞骨格系の変異について解析を行う。

材料

マウスはすべて ICR 系、ラットはすべて Wistar 系を用いた。

方法

投与量はすべて、/匹/回であらわす。新生仔への投与は原則的には生後1日(生まれた翌日)から生後11日までの隔日に合計6回投与した。生後1週、2週、3週、4週、5

週、6週、7週、8週、9週と、生後発達段階を追って1週齢毎に精巣を顕微鏡、顕微鏡で観察した。マウスは成長速度が速いので、場合によっては3, 4日毎に試料を取ったものもある。さらに、下記の各実験で新生仔期にエストラジオール、ビスフェノール A を投与したマウスの一部は成熟後の妊孕性についても検討した。

実験 I

- A) マウスへの β -estradiol 3-benzoate (Sigma, St.Louis, Mo.) 投与実験
6.25ng、12.5ng、125ng、625ng、1.25 μ g を生後1日より隔日で6回皮下投与した。
- B) ラットへの β -estradiol 3-benzoate 投与実験
500ng を A) と同様に生後1日より隔日で6回皮下投与した。
- C) ラットへの 17 β -estradiol (Sigma) 投与実験
500ng を A) と同様に生後1日より隔日で6回投与した。
- D) ラットへの bisphenol A (Aldrich, Milwaukee, Wis.) 投与実験
1 μ g、10 μ g、100 μ g、600 μ g を A) と同様に生後1日より隔日で6回投与した。ただし600 μ g 群は生後3日～生後25日までの間に全て死亡した。

実験 II

- A) ラットへの tributyltin (IV) chloride (和光純薬、大阪) 投与実験
0.72ng、72ng、0.24 μ g、0.72 μ g を生後1日から実験 I A) と同様に隔日で6回投与した。
0.24 μ g、0.72 μ g 投与群は初回注射後数日以内に死亡。
- B) ラットへの nonylphenol, tech. (Aldrich) 投与実験
0.56 μ g を A) と同様に隔日で6回投与した。
- C) ラットへの 4-octylphenol (Aldrich) 投与実験
600 μ g を A) と同様に隔日で6回投与した。

実験 III

- A) ラットへの tamoxifen (Sigma, St.Louis, Mo.) 単独投与実験
2 μ g、10 μ g、20 μ g、80 μ g を隔日で6回投与したグループと、連続3日(生後1～3日)投与したグループを調べた。
- B) ラットへの tamoxifen と DES (Sigma, St.Louis, Mo.) の混合投与実験
tamoxifen 2 μ g + DES 10 μ g、tamoxifen 10 μ g + DES 10 μ g、tamoxifen 20 μ g + DES 10 μ g を隔日で6回投与した。
- C) ラットの血液・精巣閉門形成後における tamoxifen または DES の単独投与実験。
tamoxifen 20 μ g または DES 10 μ g を生後20日から3日間それぞれ単独投与した。

実験 IV

- マウスの tamoxifen 単独投与および tamoxifen と DES の混合投与実験
tamoxifen 2 μ g の3日連続および隔日6回投与、tamoxifen 8 μ g の3日連続投与、tamoxifen 2 μ g + DES 1 μ g の隔日6回投与、tamoxifen 1 μ g + DES 0.5 μ g の隔日6回投与をおこなった。

2. in vitro における作用解析

これまでの我々の実験成績から、DES およびエストラジオールの一次作用点は精巣内の生殖細胞以外の体細胞側、特に Sertoli 細胞にあることが強く示唆されている。精巣組織全体を用いた in vivo の生化学的実験では Sertoli 細胞特異的な変化が検出されにくいと考えられる。そこで、内分泌攪乱化学物質の細胞内シグナル伝達系を介する作用機構をもとにした機能的スクリーニングの開発を念頭に置いて、Sertoli 細胞株、Leydig 細胞株における DES, エストラジオール、ビスフェノール A、アルキルフェノール、トリブチルスズ曝露による形態変化と、2次元電気泳動を用いたタンパク質チロシンリン酸化の解析を行う。

材料： 1) 培養細胞：マウス精巣セルトリ細胞由来株 TM4 およびライディッヒ細胞由来株 TM3 は ATCC から購入した。

2) 使用した薬剤：

diethylstilbestrol (DES): Sigma D4628, F.W. 268.4

tamoxifen (TAM): Sigma T9262, F.W. 563.6

17 β -estradiol (E2): Sigma E2758, F.W.272.4

β -estradiol 3-benzoate (E2B): Sigma E8515, F.W. 376.5

bisphenol A (BPA): Aldrich 23,965-8, F.W.228.29

nonylphenol (NOP): Aldrich 29,085-8, F.W. 220.36, d:0.937

4-octylphenol (OCP): Aldrich 38.444-5, F.W.206.33

tributyltin(IV) chloride (TBT): Wako 208-08983, F.W. 325.51, d:1.200

方法：

【細胞培養】

各薬剤を DMSO で溶解後、細胞培養液に添加して一定の期間培養した。DMSO のみを培地に加えたものを対照とした。培養液を PBS で数回洗浄後、二次元電気泳動用には IEF lysis buffer (8M urea, 2% CHAPS, 40mM Tris, 1mM PMSF, 1mM Na₃VO₄)を、一次元電気泳動用には SDS sample buffer (50mM Tris-HCl, pH6.8, 2% SDS, 10% glycerol)を加えて細胞を培養皿から回収後、ポリトロンで破碎して細胞抽出液とした。

【Western blot】

二次元電気泳動用には、まず Immobiline dry strip ゲル(pH3-10; Amersham) を用いて、得られた細胞抽出液をゲルあたり 40 μ g 添加し、等電点電気泳動を行った。二次元目を 10% ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE し、PVDF 膜にブロッティングした。1% BSA でブロッティング後、HRP 標識抗リン酸化チロシン抗体 (ECL チロシンリン酸化蛋白質検出システム; Amersham) と室温で一時間インキュベーションした。ECL Plus (Amersham)で化学発光させてチロシンリン酸化タンパクのスポットを検出した。一次元電気泳動用サンプルも SDS-PAGE 後同様にウェスタンブロットを行った。

【細胞分画】

i) Triton X-100 可溶分画および不溶分画の調製

TM4 細胞を 1% Triton X-100 を含む buffer で処理し、細胞抽出液を Triton 可溶分画と不溶分画とに分けた。p38 がどちらの分画に多く存在するか、一次元 Western Blot で調べた。

ii) 粗細胞質可溶分画、粗細胞質不溶分画および粗核分画の調製

TM4 細胞を等張液中でホモジェナイズし、2500g で 5 分間遠心し、粗細胞質分画と粗核分画とに分けた。前者をさらに 15,000g で 15 分間遠心し、上清を粗細胞質可溶分画、沈殿を粗細胞質不溶分画として、一次元 Western Blot で解析した。

(倫理面への配慮)

実験動物としてラット、マウスを用いるが、DES、エストラジオール、ビスフェノール A、アルキルフェノール、トリブチルスズの皮下投与は少量、短時間で行い動物の苦痛を軽減する。また、組織標本作製時の灌流固定にあたっては、ネンプタール、エーテルによる深麻酔下で操作を行い、動物の苦痛を可能な限り軽減する。

C. 研究結果

1. 齧歯類新生仔期におけるエストラジオール、ビスフェノールA、アルキルフェノール、トリブチルスズ曝露の精子形成に対する影響

実験 I

β -estradiol 3-benzoate, 17 β -estradiol による障害 (図 1) と bisphenol A による障害 (図 2, 3) には高い共通性、類似性が認められた。[A) B) C) D)] とともに精子細胞 (とくにステップ 8 精子細胞以降) に形態異常が認められた。これは first wave の精子細胞に高頻度に認められ、全精子細胞の 50% に達した。second wave、third wave と進むにつれ、精子細胞の奇形頻度は 30%、10% と低下したが、なお高率であった。生後 63 日齢でも精子細胞の形態異常はかなりの率で認められた。精子細胞が分化する以前の精巢 (マウスでは 19 日齢以前、ラットでは 22 日齢以前) では造精細胞を含めて、形態学的異常は認められなかった。

精子細胞に見られた異常は、(1) 尖体顆粒の位置異常、尖体の断裂や変形と (2) 核の変形、空胞化が最も頻繁に認められ、(3) 異常精子細胞に接するセルトリ細胞の特殊接合装置の一部または全部の欠失も高頻度に認められた (図 4)。

なお、A) では 6.25ng 以下、D) では 1 μ g 以下の投与量では上記の異常は殆ど見られなかった。

また、新生仔期に β -estradiol 3-benzoate, 17 β -estradiol, bisphenol A を投与された雄のマウスならびにラットは成熟後においては妊孕性に異常が認められなかった。

実験 II

tributyltin (IV) chloride、nonylphenol、octylphenol は今回の実験系においては精巢障害は認められなかった。精子形成は週齢に応じて進んでいた。ただし、tributyltin (IV) chloride の場合は精巢の発達が全体的に遅れていたが、これは tributyltin (IV) chloride 処理により、その強い毒性のために体重が対照群の約 1/2 と極端に低いことによると思われる。

実験 III

tamoxifen のラット新生仔への単独投与では 20 μ g 以上で約 2 週間の血液・精巢閉門の形成の遅れが認められたが、その後は遅れをある程度とりもどして、spermiation は 9 週齢であった (コントロール・ラットの spermiation は 8 週齢なので、1 週間の遅れに相当)。これは tamoxifen 6 回投与で見られ、3 日間の連続投与では見られなかった。tamoxifen は estrogen の agonist と antagonist の両面の作用があると言われているが、この実験系に限っては弱い DES 様作用、すなわち弱い agonist として作用するようである。tamoxifen 10 μ g 以下では精巢に対する変化は見られなかった。

tamoxifen と DES の混合投与実験では Leydig cells の分化が抑えられた。対照ラットでは Leydig cells は 18 日齢から徐々に増えるが、実験群では Leydig cells は 10 週齢でも殆ど見られなかった。精巢間質には未熟な Leydig cells と思われる線維芽細胞様の細胞が少数認められた。これは tamoxifen 投与量の一番少ない組み合わせ (tamoxifen 2 μ g + DES 10 μ g) でも認められた。

この混合投与の実験系では生後 3 週齢をピークとして精細管周囲の筋様細胞の水腫変性が見られた。この水腫変性が治まった頃 (4 週齢頃) には今度は肥満細胞が出現し、これは週齢を重ねるほど出現頻度が増してくる。肥満細胞内の顆粒も 5 週齢頃では Alcian blue で青く染まるが、8 週齢頃からは Safranin で赤く染まるようになる。この筋様細胞の水腫変性および肥満細胞の出現は DES の単独投与 (10 μ g、隔日 6 回投与) でも認められたが、tamoxifen が加わると、その効果が増強される傾向がある。

実験 IV

マウスへの tamoxifen 単独投与ではすべての実験群で精巢には異常は見られなかった。

tamoxifen と DES の混合投与では約 10 日の血液・精巣閉門の形成の遅延が認められた。また、Leydig cells の分化も、ラット同様に見られなかった。ラットの同様な実験群と異なる点は、マウスでは筋様細胞の水腫変性や肥満細胞の出現が見られないことであった。

2. in vitro における作用解析

1) DES の影響

TM4 に DES を 100ng/ml、7 日間添加したところ、添加していない control に比べ、分子量約 38kDa、pI 約 5.9 の蛋白質(p38)が顕著にチロシンリン酸化されていた(図 5A,B)。この蛋白質のリン酸化は TM3 を同様に DES 処理した場合にも見られた。このリン酸化した p38 は TM4 に 100ng/ml DES を 1 日間添加しても検出された。

2) DES および TAM の影響

p38 : TM3 と TM4 について DES 単独 (100ng/ml)、TAM 単独 (100ng/ml)、DES+TAM (100ng/ml+100ng/ml) を培地に 7 日間添加し、その影響を調べた。TM3、TM4 とともに DES 単独添加のときと同様、TAM 単独添加、DES + TAM 混合添加においてもリン酸化された p38 が検出された。

形態への影響 : 顕微鏡レベルでは DES 添加による差異は見られなかったが、電顕観察により、TM3、TM4 とともに DES 処理した細胞の粗面小胞体の内腔が、コントロールに比べ拡大していることがわかった(図 6)。DES および TAM の混合添加の場合も同様の形態変化が観察されたが、TAM 単独添加では control と大差なかった。

アクチンフィラメント : DES 単独、TAM 単独および DES+TAM 混合添加した TM3、TM4 を FITC 標識ファロイジンで染色し、共焦点顕微鏡で観察した。control と比較したが、アクチンフィラメントの配列等に顕著な差は認められなかった。

3) DES 処理の影響の可逆性

p38 : TM4 に DES を 100ng/ml、7 日間添加後、3 日間 DES を除いたところ、リン酸化した p38 の検出は DES 除去後も続いた。また DES を 100ng/ml、3 日間添加後、7 日間 DES を除いたが、このときもまだ p38 の検出は続いた。ただし、10 日間 DES を添加したものと比べると、そのスポットは小さかった。

形態への影響 : TM4 に DES を 100ng/ml、7 日間添加後、3 日間 DES を除いたとき、DES 連続処理で観察された粗面小胞体の内腔の拡大は見られなくなり、control と同様の形態を示した。

4) 他の薬剤の影響

17 β -estradiol (E2): 10ng/ml, 3 days

β -estradiol 3-benzoate (E2B): 10ng/ml, 3 days

bisphenol A (BPA): 0.5 μ g/ml, 7 days

4-octylphenol (OCP): 24 μ g/ml, 5 days

nonylphenol (NOP): 2.3ng/ml, 5 days (注: 22.5ng/ml 処理でほとんど死滅)

tributyltin(IV) chloride (TBT): 0.029ng/ml, 4 days (注: 28.8ng/ml 処理で死滅; 0.29ng/ml 処理で死滅)

上記の条件で TM4 を培養したところ、すべての場合において、二次元 Western Blot でチロシンリン酸化された p38 が検出された(図 5A,C)。

5) p38 の細胞内局在

DES を 100ng/ml、7 日間添加した TM4 について一次元 Western blot で調べた。その結果、Triton 可溶分画に比べ、Triton 不溶分画に多くの p38 が検出された。また粗細胞質可溶分画には p38 はほとんど見られず、粗細胞質不溶分画に弱いバンドを検出した。p38 の大部分

は粗核分画に存在した。

6) p38 と ERK1/2 との関係

エストロゲン受容体が Src/Shc/ERK シグナル伝達系を活性化することにより作用する可能性が示された (Koustei et al., Cell, 104:719-730, 2001)。このとき MAP キナーゼである ERK1 (分子量 44kDa)、ERK2 (分子量 42kDa) はリン酸化される。DES 投与により検出される p38 が ERK1/2 であるかどうか、抗 ERK1/2 抗体 (Santa Cruz; sc-93) を用いて調べた。一次元および二次元 Western Blot を行った結果、p38 は ERK1/2 とは一致しなかった。

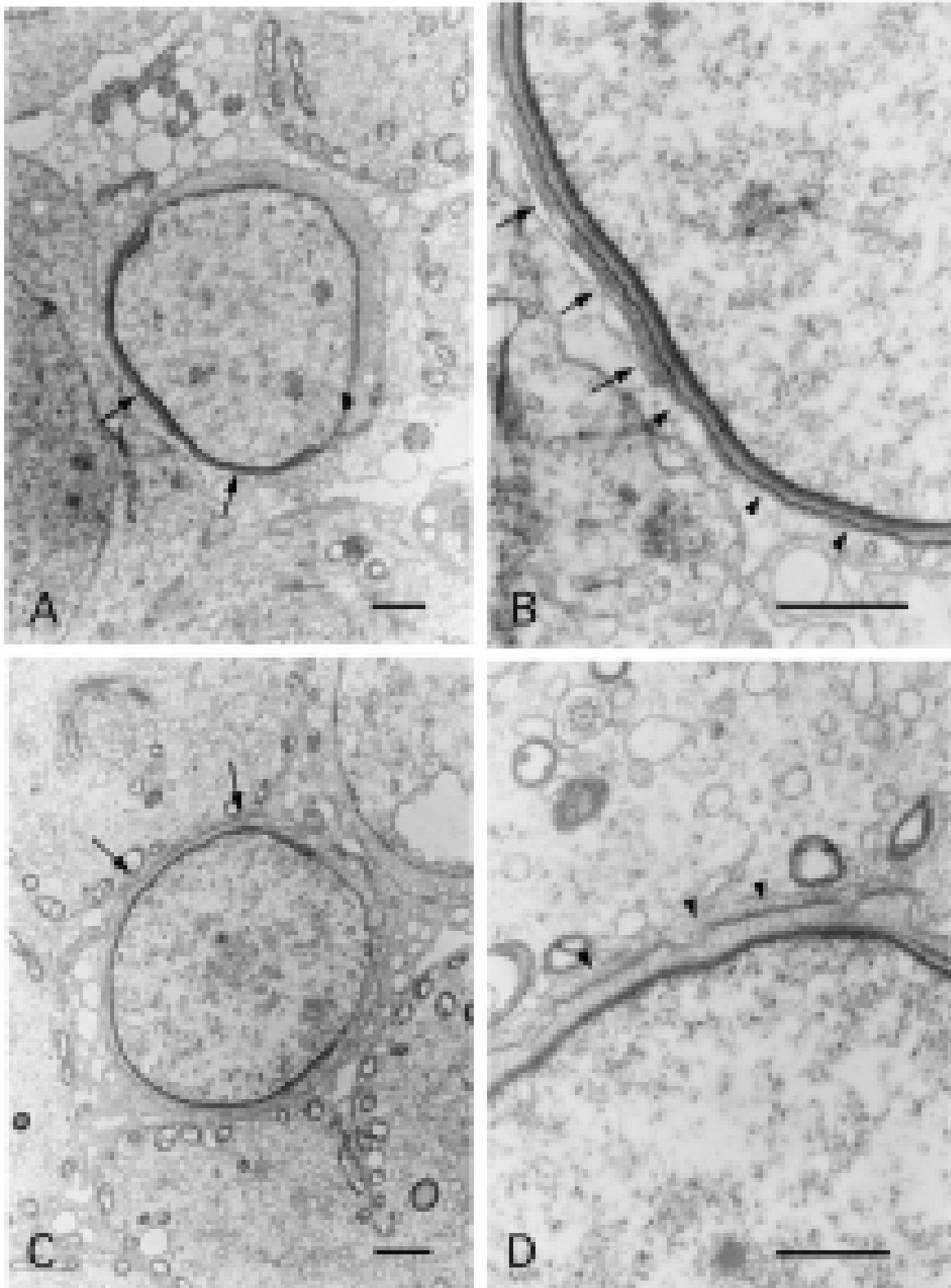


図1 . β -estradiol 3-benzoate 投与ラットの生後42日齢の精巣における形態学的異常を示す精子細胞 (step 8-9) の電子顕微鏡像。新生仔期に β -estradiol 3-benzoate を500ng/匹、隔日で6回投与したもの。A. 矢印で挟まれた領域の精子細胞 - セルトリ細胞間特殊接合装置が形成異常を示す。B. Aの矢印で挟まれた領域の強拡大。矢印で示す部分には特殊接合装置が認められるが、矢頭で示す部分では特殊接合装置が欠損している。C. 矢印で挟まれた領域の精子細胞 - セルトリ細胞間特殊接合装置が形成異常を示す。D. Cの矢印で挟まれた領域の強拡大。矢頭で示す部分では特殊接合装置が欠損している。Scale bars, 1 μ m.

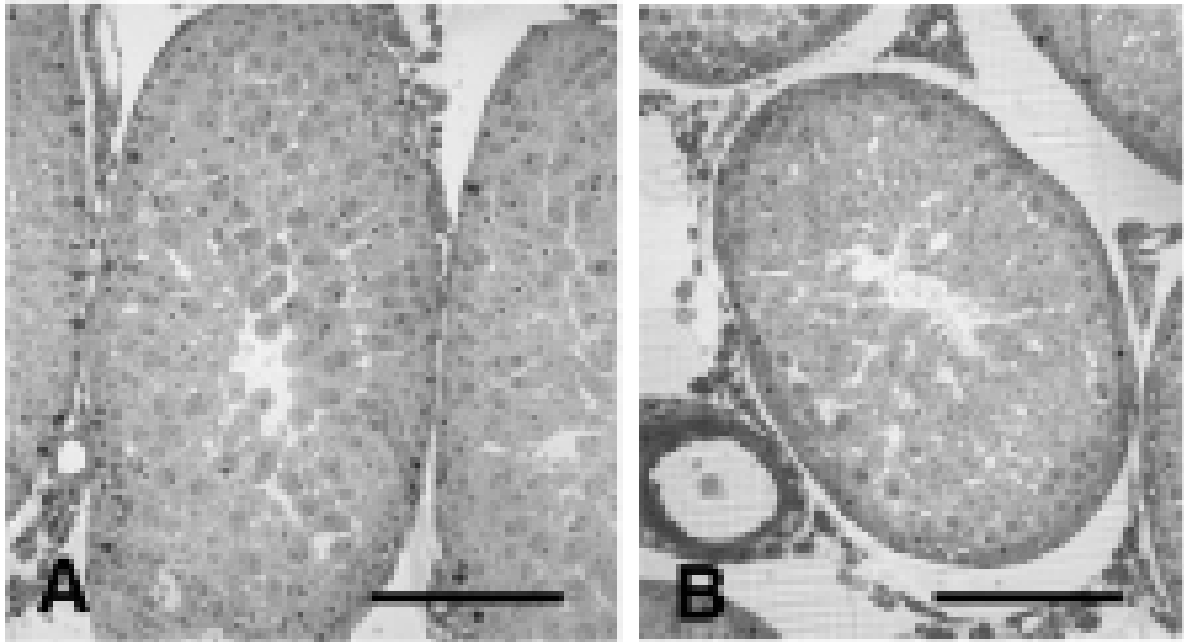


図2 . 生後35日ラット精細管のトルイジンブルー染色像。A. 対照ラット。B. 新生仔期に bisphenol A を 10 $\mu\text{g}/\text{匹}$ 、隔日で6回投与したもの。A, Bとも精子細胞が step 9まで分化し、光学顕微鏡上は明確な差異は認められない。Scale bars, 100 μm .

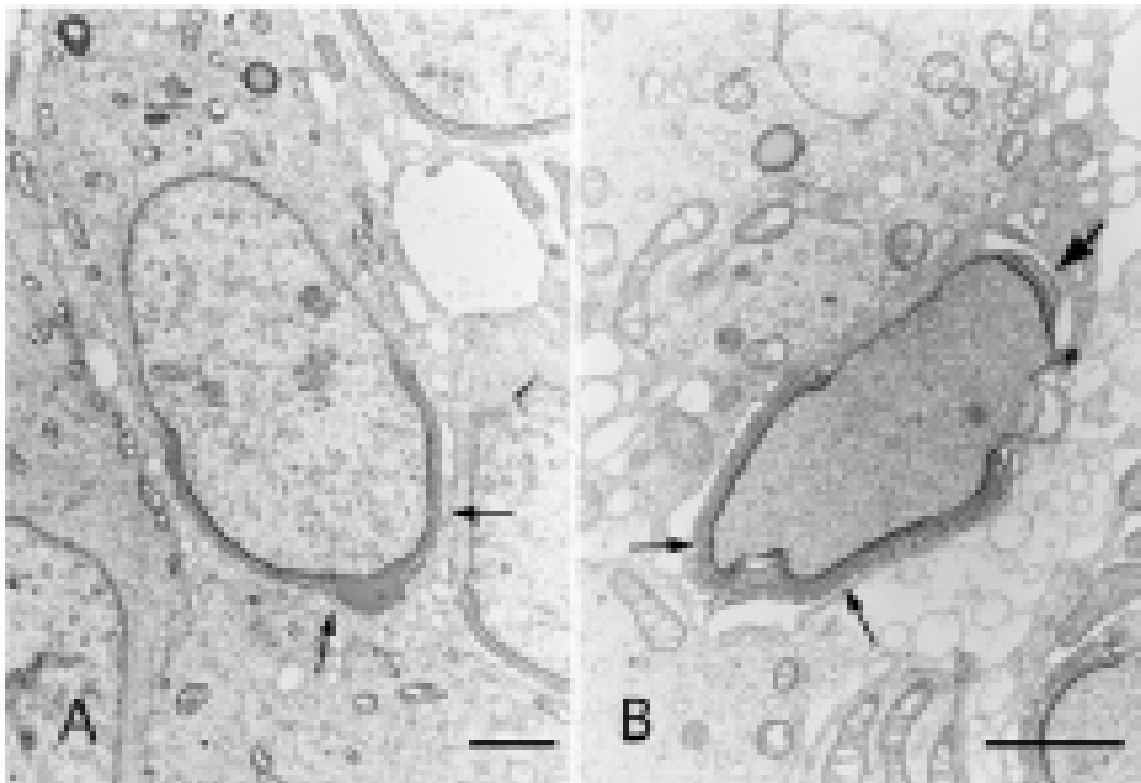


図3 . bisphenol A 投与ラットの生後63日齢の精巣の精子細胞(step 9)の電子顕微鏡像。新生仔期に bisphenol A を 10 $\mu\text{g}/\text{匹}$ 、隔日で6回投与したもの。Aは比較的正常な精子細胞で、小型矢印に挟まれた部分が正常な尖体を示す。Bは明らかに異常な精子細胞で、小型矢印に挟まれた部分は正常な尖体を示すが、大型矢印は尾部に異所的に形成された尖体を示す。Scale bars, 1 μm .

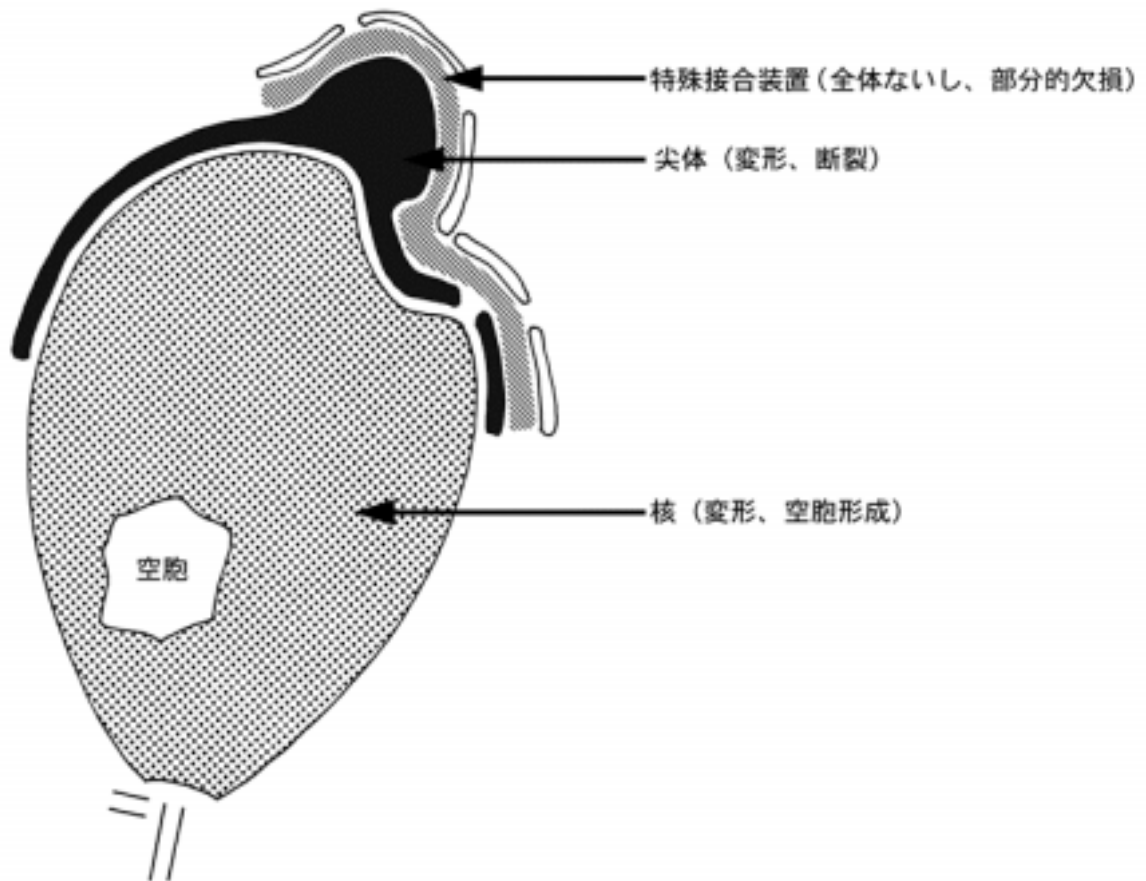


図4 . Bisphenol A および estradiol の新生仔期投与により遅発性に精子細胞に引き起こされる形態学的異常の模式図。

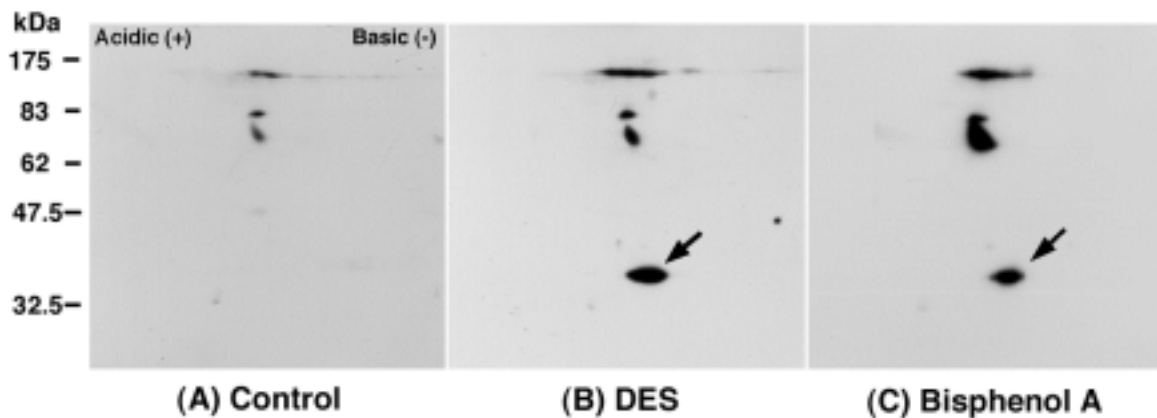


図5 . 培養セルトリ細胞株 TM4 に DES あるいは bisphenol A を添加することにより、二次元蛋白電気泳動像のチロシンリン酸化パターンに引き起こされる変化。矢印で示すように、DES あるいは bisphenol A により 38kD 蛋白のチロシンリン酸化が著明に亢進する。

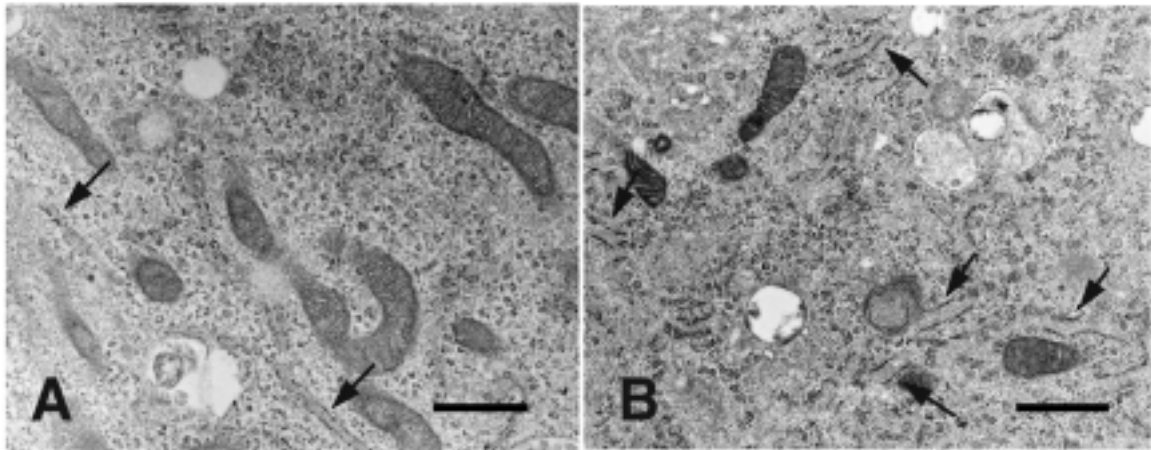


図6 . 培養セルトリ細胞株 TM4 に DES を 10 $\mu\text{g/L}$ 添加して 3 日間処理した場合の電子顕微鏡像。A. 対照、B. DES 添加。矢印で示すように、DES 添加により、粗面小胞体内腔の著明な拡大が引き起こされる。Scale bars, 1 μm .

D. 考察

1. 齧歯類新生仔期におけるエストラジオール、ビスフェノール A、アルキルフェノール、トリブチルスズ曝露の精子形成に対する影響

1) DES および β -estradiol 3-benzoate による精子形成障害の比較

我々は前年度の研究で、ラット新生仔に DES を投与した場合の作用の解析について報告した (Toyama et al., J. Andrology, 22:413-423, 2001)。DES 投与では血液・精巣関門の形成が遅延したのに対し、今回の β -estradiol 3-benzoate の新生仔に対する投与実験では主に精子細胞の発達に影響を受けた。精細管によってはステップ 8 精子細胞が精上皮から集団ではがれていたこともあったが、この場合はセルトリ細胞—精子細胞間の特殊接合装置が欠失していたためにセルトリ細胞が精子細胞を保持出来なかったためであろう。この特殊接合装置の機能はまだ解明されていないが、この装置は分化中の造精細胞 (ステップ 8 以降の精子細胞) を精上皮内に保持するという仮説がある。今回の実験では、この仮説を支持するような結果を得られた。この特殊接合装置に構造がよく似ているセルトリ細胞間の特殊接合装置 (機能的には血液・精巣関門を形成する) には形態異常はあったものの成熟精子細胞まで分化が進行していたことは血液・精巣関門が機能的には異常がなかったことを示唆する。

DES は強いエストロゲン作用があると言われているが、ラットの精巣発達に対する作用に関する限り β -estradiol 3-benzoate (17 β -estradiol も同様) と DES ではその効果の現れ方が異なっており、DES の精子形成阻害作用にエストロゲン作用が関与するという考え方は更なる検討を要する。DES と estradiol, bisphenol A の作用様式の相違の分子レベルでの解明は今後の課題である。最近、DES は少なくともその作用の一部はエストロゲン受容体と類似した別のオーファン受容体 ERR β (estrogen-receptor-related receptor β) を介して発現することが報告されていることから (Tremblay et al., Genes and Development, 15:833-838, 2001)、このような新規受容体の精巣内発現様式の検討が DES と estradiol, bisphenol A の作用様式の差違の機構解明の手がかりになると考えられる。

2) β -estradiol 3-benzoate による精子形成障害における標的細胞

我々は既に β -estradiol 3-benzoate を成熟雄マウスに投与して (20 μ g/Kg)、同じく精子細胞での尖体の断裂、変形、核の変形、セルトリ細胞の特殊接合装置の部分的欠損を報告した (Toyama et al., Molecular and Cellular Endocrinology, 178:161-168, 2001)。新生仔と成体とでは単位体重あたりの投与量は違うものの (新生仔では成体の 1/10 量で作用が現れた)、基本的には同様の効果が認められ、estradiol が新生仔期にセルトリ細胞に及ぼした効果が、生殖細胞の分化に対する影響として遅発性に発現して精子細胞形成障害として表れたと考えられる。ただし、estradiol が新生仔期に精祖細胞 (spermatogonia) に及ぼした効果が遅発性に精子細胞形成障害として発現した可能性も否定できない。

β -estradiol 3-benzoate に関してはその作用はラットでもマウスでも同じように現れるので、種を越えて同じ作用のあることがわかった。我々は DES についてもその作用はラットとマウスで同じように現れることを既に発表した (第 4 回環境ホルモン学会、2001 年 12 月)。また、ラットに関しては 17 β -estradiol も β -estradiol 3-benzoate も同様の作用を示すことがわかった。

3) 精子形成障害における bisphenol A と β -estradiol 3-benzoate の作用機構の類似性

bisphenol A はグッピーでは精子産生能を減少させるという報告があるが (Haubruge et al., Proceedings of Royal Society of London B, 267:2333-2337, 2000)、哺乳類精巣に関しては、精子形成障害を引き起こすという報告 (vom Saal et al., Toxicol Ind Health, 14:239-260, 1998) と、顕著な影響はないとする報告 (Fisher et al., Environmental Health Perspectives, 107:397-405, 1999; Cagen et al., Regulatory Toxicology and Pharmacology, 30:130-139, 1999; Atanassova et al., Endocrinology, 141:3898-3907, 2000) が対立している (Nature, news 395: 828, 1998)。特に、上記の vom Saal らの報告では、胎生期に

おける bisphenol A 曝露により出生後、精子形成能が対照にくらべて 20%低下することが報告されているが、精子形成過程のどの段階あるいはどの細胞群に障害があるのかという点については明確な知見が乏しかった。

本研究ではじめて、bisphenol A の新生仔期曝露で、ラットの成熟後の精子細胞に奇形が生じ、セルトリ細胞-精子細胞間の特殊接合装置に欠損が起こることが明らかになった。このような異常精子細胞は精子まで発達せず、死滅してしまうと思われる。実験期間をさらに延ばして、この精子細胞の運命を追うとともに、bisphenol A の作用を他の実験動物でも追試する必要がある。bisphenol A は人間が毎日摂取しているので、今回の実験のようにラットの精巣に少しでも悪影響が認められたからには、人類に対する影響を無視できない。

bisphenol A は基本的にエストラジオール投与と同様の精子細胞の形成障害を示し、エストロゲン受容体を介した効果であると考えられる。マウスでは 10ng 以上の β -estradiol 3-benzoate、ラットでは 10 μ g 以上の bisphenol A で上記の異常が出る。今までの我々の経験から、マウスの投与量はラットのその 1/10 とすると、in vivo では bisphenol A は β -estradiol 3-benzoate の 1/100 の強さと言える。bisphenol A のエストロゲン受容体への結合能は estradiol の 1,000 分の 1 から 10,000 分の 1 と言われているが、in vivo では予想されるよりはるかに強い障害作用を持っていた。

生後 5 日目から bisphenol A を投与し始めた実験の結果も他の群の結果と差が無かった。このことから、bisphenol A は生後 5 日以降から投与した時にその作用を現すのであろう。これらの実験結果を基礎データとして、これからは bisphenol A, β -estradiol 3-benzoate, 17 β -estradiol の投与期間を狭めていって、これらの薬剤が精子細胞に影響を及ぼす生後日齢を特定する必要がある。

4) 新生仔期にエストロゲン様作用物質を投与された齧歯類の成熟後の妊孕性

新生仔期に bisphenol A, β -estradiol 3-benzoate, 17 β -estradiol を投与したマウス、ラットにつき、成熟後の妊孕性につき検討した結果、いずれの場合も受精率は対照と有意な差が認められなかった。したがって、精子形成障害の程度は妊孕性自体に大きな異常を引き起こすには至らなかったと考えられる。精子数や精子運動性、次世代への影響については今後検討する予定であるが、上記化合物で特定の精子形成過程で形態異常が引き起こされる以上、実質的には安全であると判断するためには、より精細な生殖機能変化の検討が必要と考えられる。

また、上記エストロゲン様作用物質の投与時期は視床下部の性分化の時期に対応しており、今後、視床下部発達に対する機能形態学的影響、性行動の変化についても検討が必要である。

5) 精子形成障害物質の作用時期と複合作用

血液・精巣閉鎖形成後（生後 20 日）に tamoxifen または DES を投与しても、今回の実験系においては血液・精巣閉鎖には異常が見られなかった。tamoxifen または DES は血液・精巣閉鎖の形成に直接的または間接的に関与するが、一端形成された閉鎖を破壊する作用はないと考えられる。マウス、ラットいずれにおいても tamoxifen と DES の混合投与では Leydig cells の分化が著明に抑えられることは特異的な所見であり、今後更にメカニズムを追求する必要がある。

6) 精子形成障害物質による肥満細胞の遊走

肥満細胞の遊走は DES 投与と同様に 17 β -estradiol を投与したラットの精巣でも見られた。 β -estradiol 3-benzoate については生まれた日に 500 μ g を投与したラットで既に報告がある (Gaytan et al. J. Andrology, 10 :351-358. 1989)。肥満細胞が精子形成にどのような影響を及ぼしているかを今後明らかにしてゆく必要がある。

2. in vitro における作用解析

DES をマウス精巣セルトリ細胞株 TM4 およびマウス精巣ライディッヒ細胞株 TM3 に添加し、二次元 Western Blot 法で解析したところ、約 38kDa のタンパク質 (p38) のチロシンリン酸化が、対照群に較べ有意に増強していた。さらに、DES を添加した TM4 および TM3 細胞は、粗面小胞体の内腔が対照群に較べ拡大していた。これらの所見は、DES のセルトリ細胞ならびにライディッヒ細胞に対する特異的な障害作用のメカニズムとして、細胞内情報伝達のカスケードが関与し、その結果、細胞内の膜構造に変化が生じたと考えられる。特に、培養液から DES を除いても TM4 の p38 のチロシンリン酸化が持続することは、新生仔期における DES 曝露の影響が精巣成熟後も持続することと関連すると考えられる。

DES 以外の内分泌攪乱化学物質候補を TM4 に添加した場合も、p38 のチロシンリン酸化の亢進が検出された。in vivo における作用と TM4 細胞の p38 のチロシンリン酸化の亢進とは現時点では必ずしも対応していないので、今後、p38 のチロシンリン酸化に対する各物質の濃度依存性を検討する必要がある。p38 の同定に関しては、細胞内情報伝達のカスケードとの関連から p38 MAP kinase との関連性に重点をおいて検討する予定である。

E. 結論

平成 12 年度選定のリスク評価優先 12 物質中でアルキルフェノール、トリブチルスズについて、齧歯類新生仔期に曝露した場合の精子形成に対する影響を検討した結果、明確な障害作用は検出できなかった。これに対し、平成 13 年度に新たにリスク評価の対照となった物質のうちビスフェノール A について齧歯類新生仔期に曝露した場合の精子形成に対する影響を検討した結果、精巣成熟後に精子細胞の形成障害が高頻度に検出された。この精子細胞形成障害は新生仔期におけるエストラジオールに対する曝露により引き起こされたものと高い類似性を示し、エストロジェン受容体を介したセルトリ細胞に対する作用であることが推測される。ビスフェノール A の障害作用はエストロジェン受容体に対する結合能から推測されるよりはるかに高いものであった。

培養細胞を用いた内分泌攪乱化学物質候補の作用機構解析を行い、セルトリ細胞株 TM4 において 38kD の蛋白質のチロシンリン酸化が特異的に亢進することを明らかにし、今後、作用機構をもとにした内分泌攪乱化学物質の検出、分類の可能性が示された。

Study on the molecular and cell biological mechanisms of defective spermatogenesis caused by endocrine disruptors

Shigeki Yuasa

Professor, Chiba University, Graduate School of Medicine, Department of Anatomy and Developmental Biology

Key Words: endocrine disruptors, estradiol, bisphenol A, DES, spermatogenesis, Sertoli cells, tyrosine phosphorylation

Abstract:

It has been suggested that the exposure to estrogenic substances during the testicular development has been considered as one of the causes of the defective spermatogenesis related to endocrine disruptors. However, the effect of estrogens on the testicular development has little been elucidated. In the present study, we have made it clear that administration of β -estradiol 3-benzoate or 17β -estradiol at the neonatal stage of rodents frequently causes the specific morphological abnormalities of spermatids such as acrosomal deformity, nuclear deformity and the defects in the adhesive structures between spermatids and Sertoli cells later at the stage of spermatogenic cell maturation. Based on the mechanisms of spermatogenic defects by these model chemicals, alkylphenol (nonylphenol, 4-octylphenol) with high affinity for estrogen receptor, tributyltin with low affinity, and bisphenol A which shows high affinity but has little information about the effect on spermatogenesis, were extensively examined in regard to the effects on the testicular development following neonatal exposure. It became clear that neither alkylphenol nor tributyltin

showed clear effect on the testicular development. In contrast, bisphenol A caused clear defects such as morphological abnormalities in the spermatids and also in the adhesion structures between spermatids and Sertoli cells later at the stage of spermatogenic maturation, similarly as observed in the case of β -estradiol 3-benzoate or 17β -estradiol administration. The limited period of bisphenol A-administration between postnatal day 5 to 11 was critical to these defects.

The effect of β -estradiol 3-benzoate, 17β -estradiol and bisphenol A was detected on the testicular developmental stage of germ cell maturation, and was different from the effect of diethylstilbestrol (DES) which has also strong estrogenic activity and cause the delay of the progression of meiosis. Specialized junctional complex of Sertoli cells was defective in all the cases of the administration of these chemicals, and at least one of the common point of action is considered to be directed to Sertoli cells, which support the overall process of spermatogenic cell differentiation. Furthermore, tamoxifen has both antagonistic and weak agonistic activity to estrogen receptor, and exhibited weak DES-like activity on the testicular development. Remarkably, combined administration of DES and tamoxifen at the low dose which shows little effect individually exhibited enhanced DES-like action and remarkably inhibited the development of Leydig cells.

A Sertoli cell line, TM4 exhibits morphological change and enhanced tyrosine phosphorylation of a specific protein with the molecular weight 38kD (p38) following the exposure to DES. Morphological change was recovered after withdrawal of DES, but the tyrosine phosphorylation of p38 continued even in the absence of DES. Furthermore, all of bisphenol A, estradiols, alkylphenol and tributyltin also enhanced tyrosine phosphorylation of p38.

Above findings suggested that many of the candidates of endocrine disruptors exert the influences on the development of spermatogenic cells through the action on the Sertoli cells. Each of these chemicals is considered to have specific harmful actions on the spermatogenic cells of various developmental stages according to various parameters such as estrogen receptor binding or actions on the various intracellular signal transduction systems in the downstream of receptor binding. It should be especially noticed that the combination of low dose of individual chemical occasionally exhibit cumulative effect and the harmful action is enhanced.

(2) フタル酸ジ 2 - エチルヘキシルの代謝の種差に関する検討

研究者 那須民江 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学教授)

研究要旨

フタル酸ジ 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臓器では検出できなかった。UDPglucuronyltransferase 1A, 2B ファミリーの代表としてそれぞれ 1 - ナフトールとビスフェノール A を基質として活性測定を行った。これらの活性、DEHP による誘導性にも種差がみられた。特にビスフェノール A の活性はマーモセットにおいて高いことが注目された。DEHP 投与によりラットとマウス肝およびマーモセット腎における 1 - ナフトールの抱合活性が誘導された。
- 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) PPARalpha-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。

研究協力者

青山 俊文(信州大学医学部教授)

横田 博(酪農学園大学獣医学部助教授)

王 瑞生(独立行政法人産業医学総合研究所主任研究員)

山ノ下 理(信州大学医学部研究生)

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。加工性、経済性から、全可塑剤生産の約 8 割を占めている。

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 あるいは -1 酸化され、ジカルボン酸となり、 -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 peroxisome proliferators-activated receptor alpha (PPARalpha)に配位し、その標的遺伝子発現にさまざまな影響を及ぼすことが、想定される。

過去に行われた研究において、DEHPの代謝に種差が認められることが明らかとなっている。例えば、霊長類では MEHPのグルクロン酸抱合体が主な代謝物であるが、ラットではこの代謝物の排泄はほとんど認められず、マウスは霊長類とラットの間期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 PPARalpha の関与が大きい、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 PPARalpha 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。

B. 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、2500 mg/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℃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) RNA の単離、及び cDNA の合成

肝、腎、肺、小腸の一部は QIAGEN 社製 RNAlater に浸たし、単離するまで-20℃で保存した。RNA は QIAGEN 社製 Rneasy Mini Kit に QIAGEN 社製 Rnase-Free Dnase set を付け加え、DNA free の RNA を単離した。cDNA の合成は Invitrogen life technology 社製 SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit を使い、Oligo(dT)₁₂₋₁₈ プライマーで合成した。

3) Lipase 及び PPARalpha mRNA の定量

プライマー、プローブの作成は下記 GI ナンバーの塩基配列を参考に、またマーモセットに関してはマウスとヒトの共通な配列から mRNA の一部分の配列を読みとり、その配列を基にして PE Biosystems 社製 Primer Express version 1.0 で作成した。ラットとマウスの GAPDH は PE Biosystems 社製を使用した。

Lipase は PE Biosystems 社製 SYBR green PCR Master Mix を使用し、SYBR Green I の蛍光で測定した。PPAR-alpha と GAPDH は PE Biosystems 社製 TaqMan Universal PCR Master Mix を使用し、TaqMan probe で測定した。プライマー濃度は 100nM、プローブ濃度は 200nM で PCR を行った。

PPAR-alpha の TaqMan probe は全て蛍光物質として FAM,消光剤として TAMURA を付けた。GAPDH の TaqMan probe は全て蛍光物質として VIC,消光剤として TAMURA を付けた。

Quantitative real time-PCRはPE Biosystems社製 ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systemで行った。各測定物質はそれぞれのアンプリコンを Romega社製 pGEM -T Easy vector 又は Invitrogen life technology社製 pCR2.1 vector に組み込み、標準品とした。使用したRNA量は、動物種を問わず、肝 2.6ng、小腸 8.6ng、腎臓 7.6ng、肺 3.0ng、精巣 2.0ngであった。解析した数値は GAPDH に対する比として表した。DEHP 投与の影響は、コントロール群の lipase または PPARalpha/GAPDH を 100 として、その比率で表した。

Lipase

ラット GI 6981167

CTGAAAGTGAGAACATTCCCTTCA
CCGTGTAAATCAAGAAGGAGTAGGTT

マウス GI 6678709

TGGATGAGCGACTCCTACTTCA
CGGATCCTCTCGATGACGAA

マーモセット

CCATGGCTGGACGGTAACA
AGCCAGTCCACCACGATGA

PPARalpha

ラット GI 6981381

ATGGAGTCCACGCATGTGAAG
ACGCCAGCTTTAGCCGAAT

Taq Man probe

CTGCAAGGGCTTCTTTCGGCGAAC

マウス GI 7106384

TTTCCCTGTTTGTGGCTGCTA
CCCTCCTGCAACTTCTCAATG

Taq Man probe

AATTTGCTGTGGAGATCGGCCTGG

マーモセット

CCTGAAAAGCCTGAGGAAACC
TGAACTTCATGGCAAAAAGCAA

Taq Man probe

TTCTGCGACATCATGGAGCCCAAG

GAPDH

ラット、マウス

PE Biosystems 社製 TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents を使用

マーモセット

TGGTGATGGGATTTCCATTGA
ATGATTCCACCCATGGCAAA

Taq Man probe

CCCGTTCTCAGCCTTGACAGTGCC

4) ライディッヒ細胞の分離と精製

マウスとラットから精巢を摘出し、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巢を EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) 5-50%の濃度付近 (density 1.050-1.070g/ml) に層状に分離された細胞を採取し、3- β -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、RNA later 液で分析時まで保存した。

5) グルクロン酸抱合活性の測定

所定の方法でマイ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 Sjöberg らの方法 (Biochem Pharmacol 1991, 41, 1493-1496) に基づき HPLC を用いて行った。UDPglucuronyltransferase 1A の基質として 1-ナフトール (1NA) を、UDPglucuronyltransferase 2B の基質としてビスフェノール A (BPA) を用い、グルクロン酸抱合活性は、標準グルクロナイドを用いて HPLC で測定した (Biochem. Journal 1999, 340, 405-409)。

6) 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 × 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 × 15 分間遠心し、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 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 °C 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 °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、ポストミトコンドリア分画の場合 25 を用いた。

C. 結果

1) ラット、マウスの体重・臓器重量

表 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

コントロール群の各臓器における lipase mRNA 量を 100% として DEHP 群の lipase-mRNA 量を算出した(図 1)。マウスの場合、肝において lipase-mRNA 量が増加する傾向を示したが、有意差は認められなかった。しかし DEHP 処理によりマウスの肝臓重量が著しく増加しているため、肝臓当たりでは増加していることが推測される。

ラットにおいては DEHP 投与により肝臓の lipase-mRNA 量は明らかに増加していた。ラットの肝臓重量もマウスと同様 DEHP 投与により増加したので、肝臓当たりの lipase-mRNA 量はさらなる増加していることが推測される。一方、腎臓における lipase-mRNA 量は DEHP 処理により減少した。肺、小腸の lipase-mRNA 量は DEHP 処理による影響は受けなかった。

マーモセットの場合、肝における lipase-mRNA 量はほとんど検出されず、DEHP 投与の影響も受けなかった。腎臓、肺、小腸では lipase-mRNA 量は検出された。DEHP 処理により 100mg/kg 投与群の肺のリパーゼ mRNA 量は増加したが、量-反応関係は認められなかった。腎および小腸の lipase-mRNA 量は DEHP 処理の影響を受けなかった。

3) MEHP のグルクロン酸抱合

すべての動物(ラット・マウス・マーモセット)臓器ミクロゾームにおいて、MEHP のグルクロン酸抱合活性は検出されなかった。

1NA を基質として用いた場合：

コントロールの動物におけるグルクロン酸抱合活性は、ラット>マーモセット=マウスであった(図 2、 $p < 0.05$)。マウスにおいては 1NA のグルクロン酸抱合活性は肝=肺>腎=小腸であった。ラットでは腎=肝>肺=小腸で、肺と腎における 1NA のグルクロン酸抱合酵素活性におおきな種差が存在することが推測された。マーモセットにおいては 1NA のグルクロン酸抱合活性は、肝>腎>小腸であり、ラットと類似していた。

ラットとマウスの肝臓においては DEHP 投与によりグルクロン酸抱合酵素の誘導が確認された(それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$)。しかしその他のラットおよびマウスの臓器(腎・肺・小腸)では、活性は検出されたが、活性変動は認められなかった。マーモセットの肝における 1NA のグルクロン酸抱合活性は、DEHP の投与の増加に従い低下する傾向が、腎においては上昇する傾向が認められた。一方、小腸における活性は DEHP 投与の影響を受けなかった。

BPA を基質として用いた場合：

ラットとマウスの肺、マーモセットの腎と肺では BPA のグルクロン酸抱合活性は検出されなかった。BPA のグルクロン酸抱合活性はマーモセットの肝が最も高く、次いでマウス、ラットの順であった。臓器別でみると、すべての動物種において肝臓における活性が高く、他の臓器での活性は低かった。1NA と異なり、BPA のグルクロン酸縫合活性は DEHP 処理の影響を受けなかった。

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 (Table 2)。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

Table 3 はミトコンドリアにおける ALDH の活性を示す。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。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)PPARalpha-mRNA

図 3 はラット、マウス、マーモセットの肝、腎、肺、小腸の PPARalpha-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 PPARalpha-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 PPARalpha-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 PPARalpha-mRNA は減少していた。マーモセットにおいては、肝と腎の PPARalpha-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)精巣ライディッヒ細胞の PPARalpha-mRNA

検討した 3 種の動物の精巣における PPARalpha-mRNA は DEHP 投与の影響は認められなかった。

D. 考察

1)リパーゼ

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。図 1 ではントロール群のリパーゼ mRNA を 100%として、DEHP 群の値を算出した。今、測定された lipase-mRNA/GAPDH 値が真の臓器における数値を反映すると仮定すると、マウス(0.2140)、ラット(0.1188)、マーモセット(0.0020)で、既報の結果と一致する。測定された lipase-mRNA 量は lipase の活性を反映するかもしれない。また同様の方法で臓器間の lipase-mRNA 量を比較すると、マウスの場合、肺(8.2108)、腎(7.4351)、肝(1.4752)、小腸(0.2140)、ラットの場合、肺(4.9841)、腎(0.2517)、肝(0.2407)、小腸(0.1188)、マーモセットの場合、肺(0.0033)、腎(0.0049)、肝(ほとんど検出されず)、小腸(0.0020)であり、肺と腎における lipase-mRNA 量が多いのが注目される。従って、検討したどの動物種においても吸収経路により加水分解される割合がかなり異なってくることが予想される。ラットやマウスの場合、経気道曝露の方が経口摂取された場合よりも加水分解されやすいかもしれない。しかしマーモセットの場合は両曝露経路の間に加水分解され易さの差は認められないかもしれない。DEHP 投与により、ラット肝の lipase-mRNA が約3倍に誘導されていたので、DEHP 投与ラットでは肝の lipase 活性も誘導されているかもしれない。これらの考察は、測定された lipase-mRNA 量が DEHP から MEHP への加水分解速度を反映する場合にのみ妥当となる。従って、今後 DEHP を基質として、in vitro で lipase 活性を測定することによって、加水分解の種差を論じる必要がある。これに関しては、現在進行中である。

2)MEHP のグルクロン酸抱合

MEHP のグルクロン酸抱合活性はいずれの動物種においても検出できなかった。これまでの経験から、測定条件等に問題はないと思われるので、検出感度以下の活性しかないと思われるが、in vitro の条件を無視できる肝灌流法(Drug Metb. Disp. 2001,29, 1084-1087)での臓器レベルでの抱合活性の測定を検討する必要がある。DBP のモノエステル体である MBP では活性がみられることが報告されているので、このような MEHP 以外のフタル酸モノエステルの活性測定で検討する必要もある。

一方、1NA や BPA を基質とした場合、多くの臓器で活性が認められた。1NA と BPA の抱合活性はそれぞれ UDPglucuronyltransferase 1A と 2B ファミリーのアイソザイムの発現量を反映する。マウスの肺を除けば、肺と小腸における UDPglucuronyltransferase 1A と 2Bf の発現は低いことが予想される。このことは経口的あるいは経気道的に吸収された DEHP がマウスの肺を除いたこれらの部位で lipase により加水分解されても、同じ部位でグルクロン酸抱合される割合は低いことを意味する。興味深いのは、マーモセット肝における UDPglucuronyltransferase 2B ファミリーの発現量がラットやマウスよりはるかに多いことが予想される点である。今回は確認することができなかったが、もし DEHP のグルクロン酸抱合がこの 2B ファミリーによる場合は、グルクロン酸抱合活性に大きな種差が認められることになる。

DEHP 投与でネズミ(ラット・マウス)では肝の UDPglucuronyltransferase 活性の誘導が観察されたが、マーモセットではその逆に抑制傾向が観察された。これは、種による影響の違いを示しており、特に抑制傾向は本当にあるのか再度検討する必要がある。なぜなら、UGT 全般の機能(両基質の活性は全体を代表している)の抑制は薬物の解毒機能の低下を意味しているからである。しかし、大量投与ではじめて顕著な差が出るので、少量投与の場合は問題ないと思われる。

3) ADH, ALDH

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。

4) PPARalpha

DEHP 自身は PPARalpha 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、PPARalpha 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 PPARalpha/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 PPARalpha-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 RNA 量は同程度であった。これは既報の研究結果と一致する。PPARalpha 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。PPARalpha 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 PPARalpha の転写活性化が生じていることは確かであろう。

E. 結論

DEHP の代謝には種差がみられる。DEHP の様々な毒性は核内受容体の PPARalpha 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。マーモセットの PPARalpha の発現はラットやマウスよりも遥かに少ないことが mRNA の解析から予想される。標的遺伝子の CYP4A からみると、誘導性はマウスとラットの肝において明らかに観察された。PPARalpha の誘導は DEHP ではなく、MEHP 等の代謝物による。従って、PPARalpha 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。ヒトの DEHP の代謝がマーモセットに類似している場合、ラットやマウスのデータからのリスク評価に注意が必要である。現在、DEHP の最初の代謝である lipase による加水分解速度の種差を検討しているので、最終的にこのデータも含めて、DEHP 代謝の種差を論じたい。

F. 研究発表

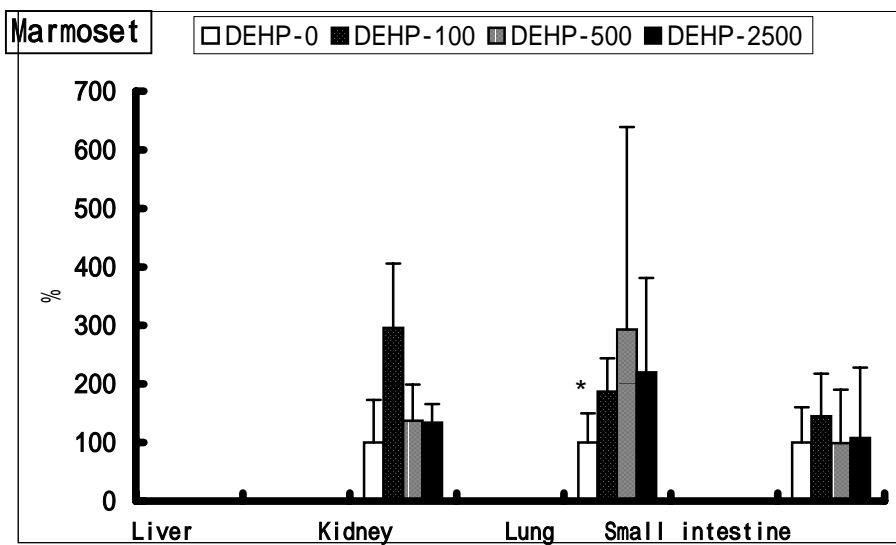
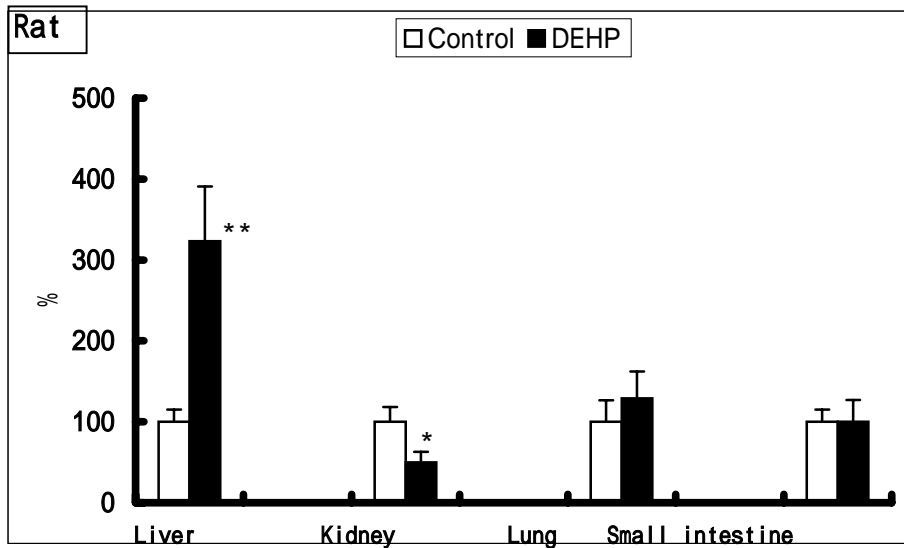
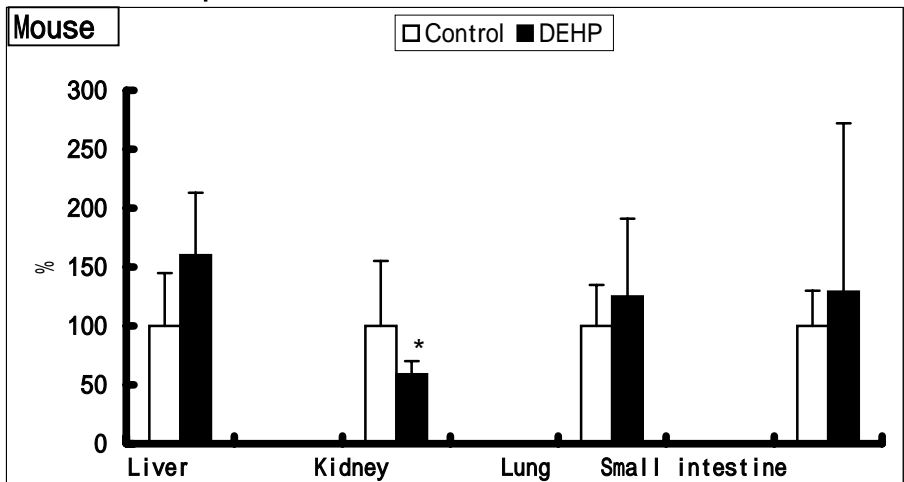
1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

Lipase-mRNA



☒ 1 lipase-mRN

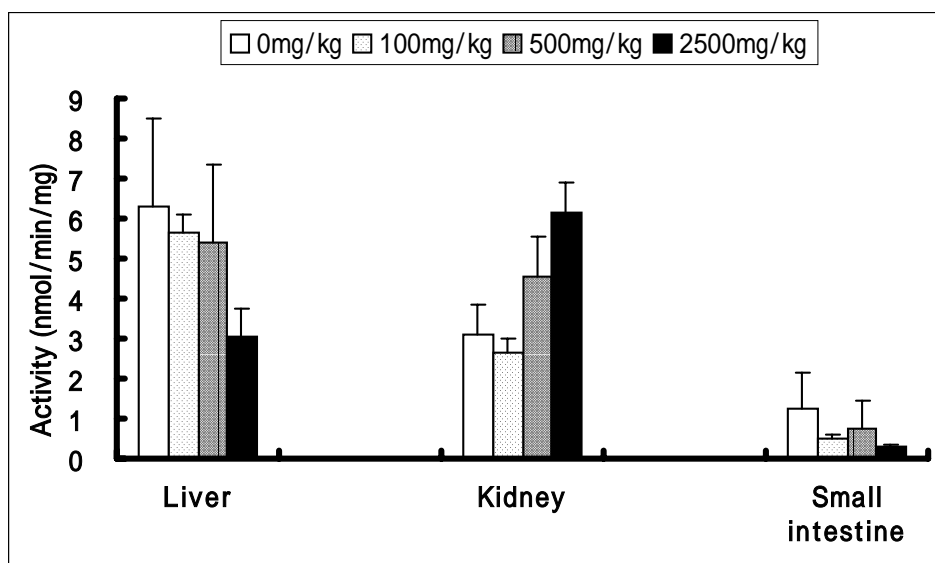
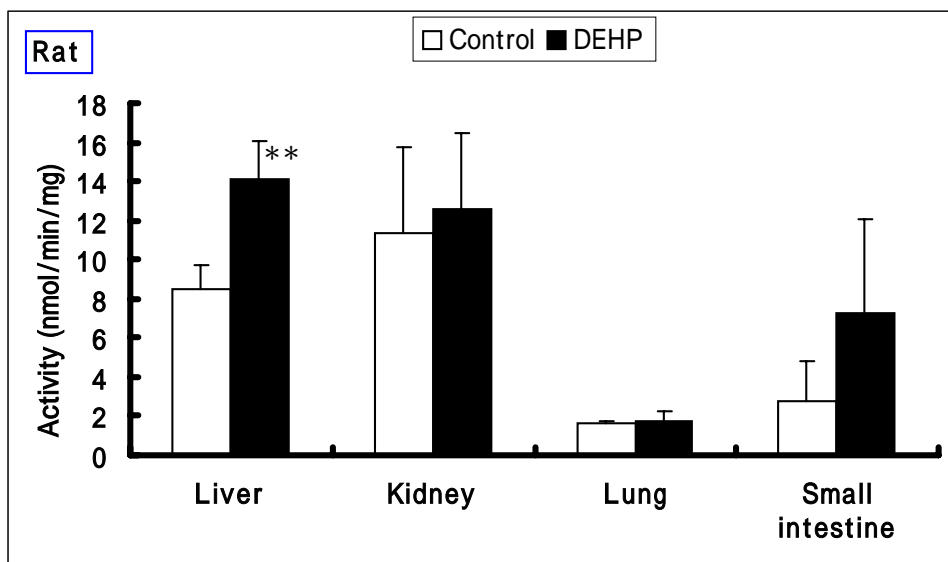
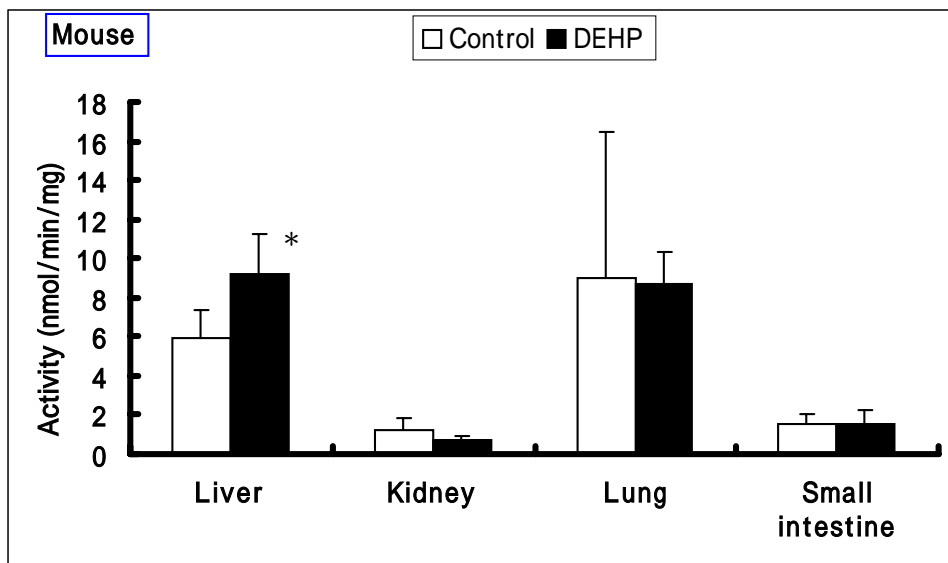


図2 1 - ナフトールの抱合活性

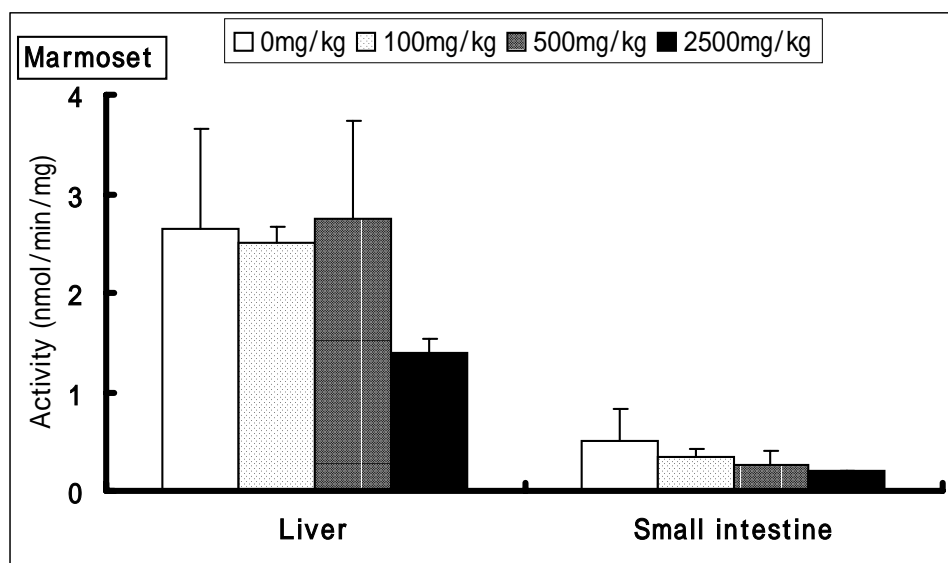
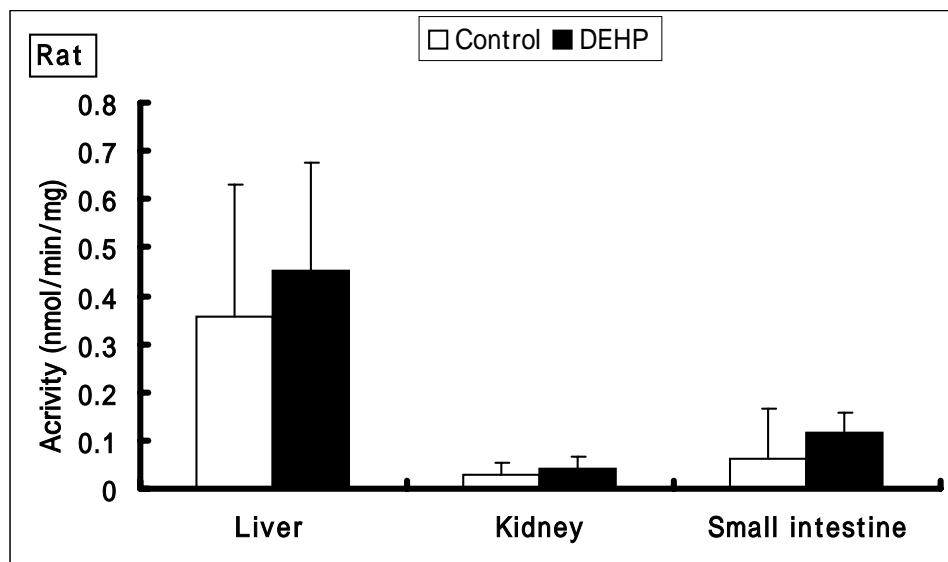
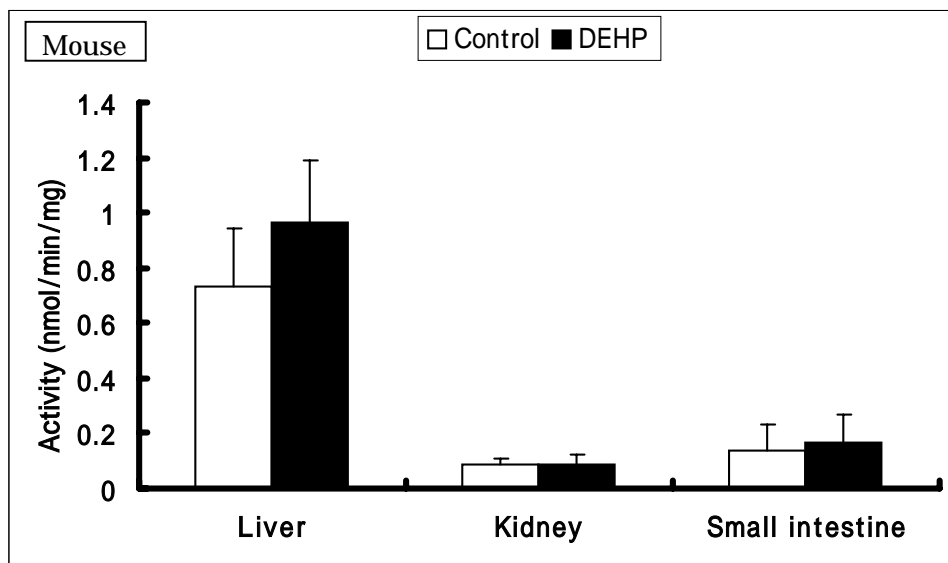
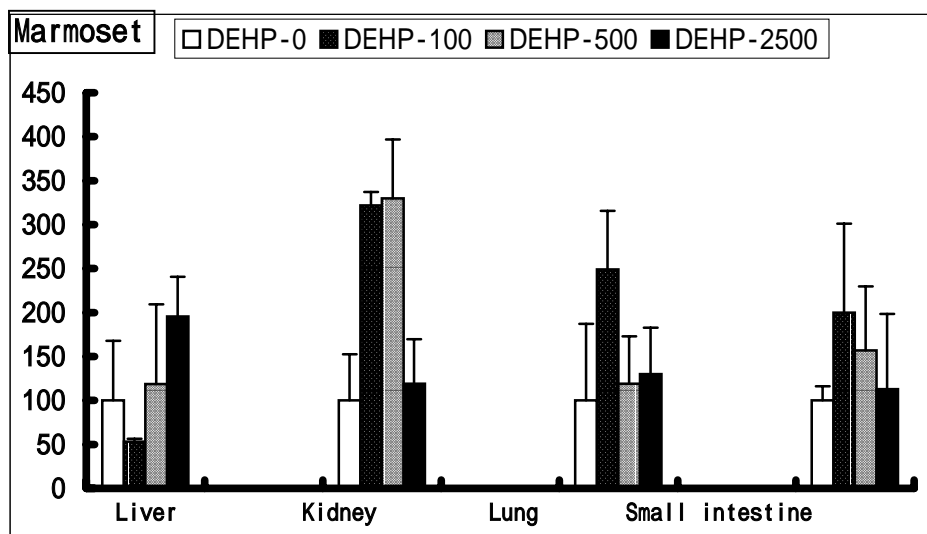
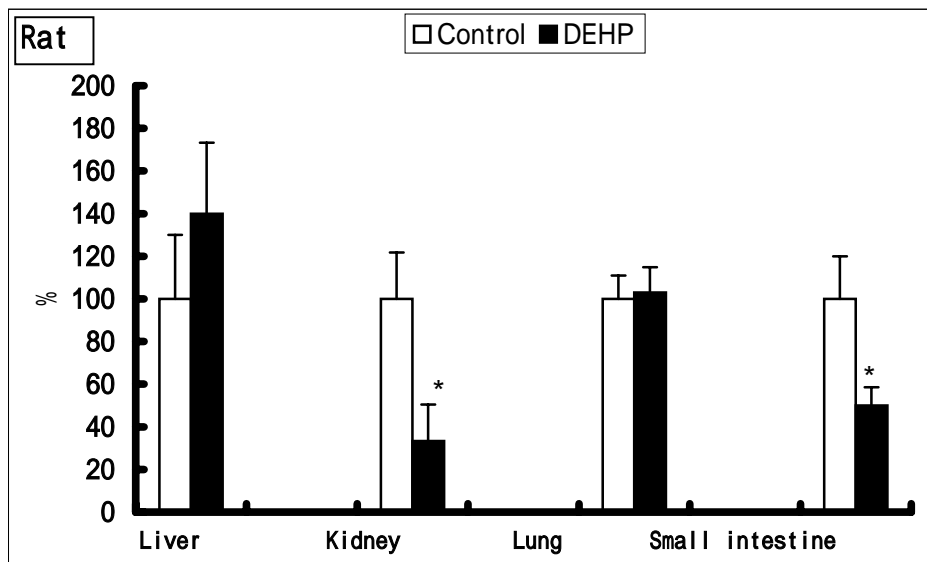
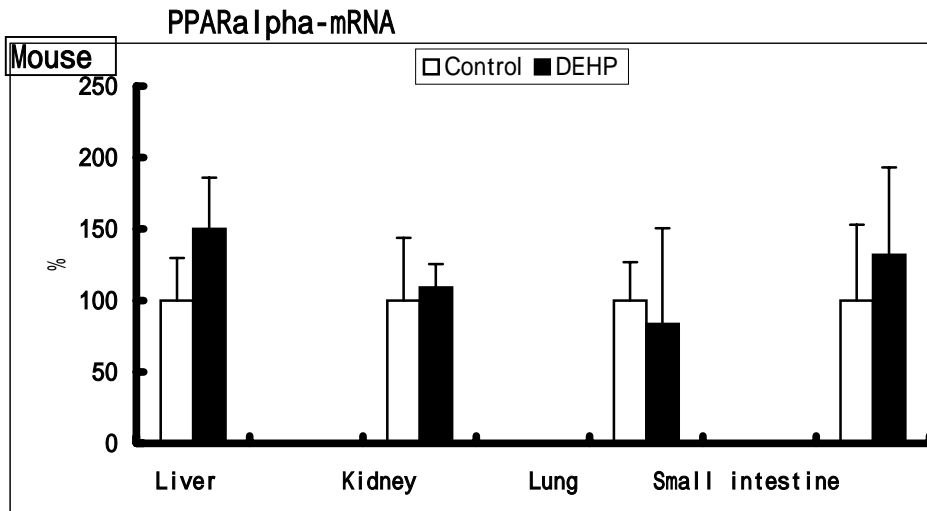


図3 ビスフェノールAの抱合活性



☒ 4 PPARalpha-mRNA

Differences among mouse, rat and marmoset in the metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate in several organs

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

Key words: di(2-ethylhexyl)phthalate, mouse, rat, marmoset, lipase, UDP-glucuronyltransferase, alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, PPARalpha

Abstract:

Differences among mouse, rat and marmoset in the metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate in liver, kidney, lung, small intestine or testis were investigated.

- 1) Lipase-mRNA was detected in all organs except in liver from marmoset: clear differences were seen in the content and induction by DEHP among species; the content in liver from marmoset was under detection limit; the induction by DEHP was seen only in the liver from rat.
- 2) The activity of UDP-glucuronyltransferases (UGT) were detected several organs when used 1-naphthol, model substrate of UGT 1A family, and bisphenol A, model substrate of UGT 2B family, but not mono(2-ethylhexyl)phthalate. Species differences were also seen in the activity and induction of UGT by DEHP. The activity of bisphenol A was highest in liver from marmoset. DEHP induced UGT activity for 1-naphthol only in liver from mouse and rat.
- 3) Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activities were also different among species. ADH activity was highest in liver from marmoset; the induction by DEHP was only seen in the liver from rat. Substrate-dependent species differences were seen in the activity of ALDH: ALDH activity was higher in liver from rat or marmoset than that from mouse; the induction by DEHP was seen in liver from rat and mouse when used low molecular aldehyde as a substrate.
- 4) Peroxisome proliferators-activated receptor alpha (PPARalpha) level was different among species: the content was lowest in all organs from marmoset. The induction by DEHP treatment was seen only in the liver from mice and rats.

(3) マウス生殖細胞死への環境毒性物質の影響とその分子機構に関する研究

研究者 小路武彦 (長崎大学医学部第三解剖学教授)

研究要旨

哺乳類雄性生殖細胞に於ける細胞死への環境毒性物質の影響に関する知見は、未だ散発的である。我々は、確立したマウスの実験系を用いて種々の環境ホルモンの生殖細胞死への影響を検討してきた。平成 13 年度は、マウス精子形成細胞死誘導に対するエストラジオール-3-ベンゾエート (EB)、ジエチルスチルベストロール (DES)、ビスフェノール A (BPA) 及びジクロロジフェニルジクロロエテン (DDE) の影響をより低濃度領域から広範囲の濃度 (1 ng/kg 体重 - 1 mg/kg 体重) で検討し、その結果 DES では高濃度での細胞死誘導と共に 100 ng/kg 体重投与での有意な細胞死のピークを見出した。一方、BPA では高濃度での細胞死誘導の他に 4-40 µg/kg 体重で細胞死誘導阻害が認められた。今回エストロゲン対照として、エチニルエストラジオール (EE) の効果も検討したところ、EB とは異なり検討範囲内で全く生殖細胞死誘導活性を認めなかった。これらの結果は、EB もまた生殖毒性物質として作用することを示している。哺乳類雄性生殖細胞死の分子機構には不明な点が多々あるが、生殖細胞死誘導機構として Fas/Fas リガンド系の関与に注目して検討した所、EB、DES、BPA の高濃度では関与が認められたが、低濃度の DES や DDE でのアポトーシス細胞での Fas 発現は認められなかった。一方、何れの場合にも生殖細胞アポトーシス像にはミトコンドリア由来である Bax の顕著な分布変化を伴っており、生殖細胞死誘導へのミトコンドリアの関与が強く示唆された。更に低濃度の BPA による細胞死阻害は、Bax 機能を中和する Bcl-2 の発現増大によることが新たに見い出された。エストロゲン受容体である ER α と ER β の発現を検討したところ、ER α は Leydig 細胞に特異的に発現していたが、これら環境ホルモンの影響は認められなかった。一方 ER β は Leydig 細胞と共に精粗細胞及び精母細胞に発現しており、その発現動態がこれらの環境ホルモンにより影響を受けることから重要な作用点の一つと考えられた。ER β ノックアウト (ERKO) マウスでの検討では、一般に生殖毒性の増大が観察されたが、正常精巢の場合と同様に DES 処理により精母細胞での ER β の消失が認められるなど、生殖細胞死誘導への ER β の関与が更に強く示唆された。

研究協力者 (所属施設名及び所属施設における職名)

菱川 善隆 (長崎大学医学部第三解剖学講師)
進 正志 (長崎大学医学部第三解剖学助手)
和泉 伸一 (長崎大学医学部第三解剖学助手)
近藤 宇史 (長崎大学医学部病態生化学教授)
佐藤 浩 (長崎大学医学部実験動物施設教授)

A. 研究目的

「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」(環境庁)でも指摘されているように、内分泌攪乱化学物質或いは環境毒性物質の作用に関する多くの知見が、特に哺乳動物に関しては科学的な因果関係の直接的証明がないまま一つの可能性として語られている。既に約 70 種類以上の化学物質が危険物質として数え上げられており、特にこれらの物質が生殖細胞障害や生殖器系

異常を誘発する危険性から、人類に対し世代を越えた深刻な影響をもたらす恐れが強く、それらの危険性の科学的な評価は現在最も急務な内分泌学並びに生殖生物学上の問題と思われる。そこで本研究に於いては、成熟雄マウスに環境毒性物質を投与し精子形成過程への影響を検討すると共にその作用分子機構の解明を行うことを目的とした。

実際、我々はこれまでに哺乳類精子形成過程並びに卵子形成過程に於いて特にその生殖細胞死に関する基礎的な検討を重ねてきた。それらの結果を基に、内分泌攪乱化学物質として知られている DES、BPA 及び DDE を中心として、マウス生殖細胞死への影響を個体レベルで検討している。特に本年度では、EB、DES、BPA 及び DDE の精子形成過程への影響とその作用機構を環境ホルモンが作用すると思われる濃度領域で解析することを主な目的とし、以下の課題を設定した。

- 1) DES 及び BPA に関して更に低濃度領域での生殖細胞死誘導効果を TUNEL 法により検索し、EB 投与による誘導効果と比較検討する。また、エストロゲンとしてエチニルエストラジオール(EE)を EB と同様に投与し、エストロゲン対照物質間での異同も検討する。
- 2) 昨年度作製した BPA 試料並びに新たな低濃度領域での試料等に対し、Fas/Fas リガンド系及び Bcl-2/Bax 系の発現状態を免疫組織化学的に検討し、TUNEL 陽性細胞との関係を明らかにする。
- 3) 同様な試料に対し、ER α 及び ER β の発現検討を免疫組織化学並びに in situ hybridization により蛋白及び mRNA レベルで行い、これら内分泌攪乱化学物質の受容体発現への影響を明らかにすると共に、TUNEL 陽性細胞等との関係を検討する。
- 4) ER α 及び ER β のノックアウトマウスを同様に処理し、エストロゲン受容体間での生殖細胞死誘導効果への異同を検討し、関連遺伝子群の予測を試みる。

B. 研究方法

1) 成熟正常マウス及び ER α ノックアウト(ERKO)マウスへの内分泌攪乱化学物質投与プロトコル

本年度は、環境ホルモンの実際の作用領域と考えられる低濃度投与による効果を中心に検討した。具体的には、成熟 ICR 雄マウス(6週齢)にエストロゲンとして EE: 1 ng~1 mg/kg 体重、環境ホルモン物質として DES: 1 ng~100 mg/kg 体重、BPA: 4 ng~4 mg/kg 体重、DDE: 1 ng~1 mg/kg 体重の各投与量で 5%エタノール/コーンオイルに溶解後、5日毎に4回皮下注射し、最初の投与20日後に組織採取を行った。対照群としては、5%エタノール/コーンオイルを同様に投与した。各実験群では、最低3匹ずつのマウスを用いた。

ERKO マウス(雄;6~8週齢)については、昨年度及び本年度の結果を基に、EE: 1 ng 及び 1 mg/kg 体重、EB: 10 mg/kg 体重、DES: 100 ng、100 μ g 及び 20 mg/kg 体重、BPA 4 ng 及び 40 mg/kg 体重の各投与量で 5%エタノール/コーンオイルに溶解後、ICR マウスと同様に 5日毎に4回皮下注射し、最初の投与20日後に組織採取を行った。対照群としては、5%エタノール/コーンオイルを同様に投与した。各実験群は、3匹ずつのマウスを用いた。

ER α ノックアウトマウスの検討に関しては、米国を中心とした国際情勢の変化により入手が遅れている。代替方法としてアンチセンス合成オリゴ DNA を精巢の局所に in vivo エレクトロポレーションにより遺伝子導入し、本研究プロトコルで利用可能かどうかの検討を行いつつある。

採取した精巢組織は、一部は 4%パラホルムアルデヒド/PBS 固定しパラフィン切片とし、一部は凍結試料ならびに電顕材料として保存した。パラフィン切片(5 μ m)はシラン処理ス

ライドグラスに拾い、ヘマトキシリン/エオシン染色並びに以下の種々の分子組織細胞化学的検索に用いた。

2) アポトーシス生殖細胞の同定と関連遺伝子産物の発現検討

昨年度の結果に基づき、アポト - シス細胞の同定には、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼによるビオチン-16-dUTP の取り込みにより DNA 二本鎖切断部位を視覚化する TUNEL 法を行った。マウス Fas 並びに Fas リガンドの発現は、これらに対するウサギポリクローナル抗体（自作）を用いて免疫組織化学により検討した。また Bcl-2 並びに Bax 発現は、市販抗体により同様に検索した。

3) ステロイドホルモン受容体の発現検討

ER と ER の発現動態の解析には、免疫組織化学と in situ hybridization 法を用いて検討する必要があり、昨年度までの検討結果に基づいた実験条件を施行した。免疫組織化学に関しては、抗 ER 抗体は市販のものを、ER に対する抗体は自作（埼玉医大・松村正實教授及び東大・井上聡講師等との共同研究）のものをを用いた。シグナルは最終的に、ペルオキダーゼ標識抗体を用いて視覚化した。In situ hybridization に関しては、昨年度作製し有効性が確認されたマウス ER 並びに ER に対する合成オリゴ DNA を用いてそれぞれの mRNA の発現動態を解析した。

尚、これら本研究の施行に当たり、長崎大学医学部動物実験施設動物実験委員会より安全面と倫理面での審査が行われ、専用飼育室の開設と共に本動物実験計画の実行許可を与えられている。

C. 研究結果

1) 成熟正常マウスに於けるエストロゲン並びに種々の環境ホルモン投与による精巣への影響

昨年度の検討では、エストロゲンとして EB を用い、濃度依存的な生殖細胞アポトーシス頻度の増大を見出ししていた。本年度、更にエストロゲンとして EE を投与し生殖細胞アポトーシス頻度への効果を検討したところ、対照群と比較して全く生殖細胞死頻度の増大を認めなかった（図 1）。DES の低濃度投与では、昨年度報告した高濃度投与（20 mg/kg 体重）でのアポトーシス細胞の増加（約 3.1 倍）だけでなく、100 ng/kg 体重でもアポトーシス細胞の有意な増加（約 2.1 倍）が認められ、2 層的效果が認められた。BPA 投与では 400 ng/kg 体重でアポトーシス細胞のわずかな増加が認められたが、逆に 4 µg、40 µg/kg 体重投与ではアポトーシス細胞の出現を抑制していた。DDE 投与では 1 mg/kg 体重でアポトーシス細胞の増加が認められたが、低濃度投与では影響は認められなかった（図 2）。

2) ERKO マウスに於けるエストロゲン並びに種々の環境ホルモン投与の生殖細胞死への効果

ノックアウトマウスでは、EB、DES、BPA 投与により、対照群に比較して一般的にアポトーシス細胞の増加が認められ、特に DES 100 µg/kg 体重、BPA 40 mg/kg 体重投与では、正常成熟マウスの場合よりアポトーシス細胞の発現頻度が増加し、対照群に比較して約 3 倍となった（図 3）。

3) 環境ホルモン投与によるアポトーシス関連遺伝子発現の変化

正常成熟マウス精巣では、Fas は Leydig 細胞に Fas リガンドは Sertoli 細胞に特異的に発現し生殖細胞死誘導とは無関係であるが、高濃度の EB や DES により生殖細胞での Fas 発現が誘導されアポトーシスの引き金となることが昨年度までの研究で明らかとなっている。しか

しながら、低濃度領域に注目した本年度の検討では、DESを始めEE、BPA、DDEのいずれの低濃度投与群においても、Fas及びFasリガンドの発現に変化は認められなかった。一方、ERKOマウス精巣では、アポトーシス陽性細胞が著明に増加したDES 100 µg/kg体重、BPA 40 mg/kg体重投与群においてFasはLeydig細胞のみならず精子形成細胞に陽性となり、また同時にFasリガンドのSertoli細胞での発現も増強していた(図4)。

正常成熟マウス精巣におけるBcl-2/Bax系については、Bcl-2は殆どの精子形成細胞に陽性であるが、各種環境ホルモン投与による発現の変化は基本的には認められなかった。しかし、生殖細胞死を阻害するBPA濃度においては、精母細胞及び精子細胞に顕著なBcl-2の発現が認められた(表1、図5)。一方、Baxは多くの正常な生殖細胞では細胞質の一部に限定的に局在したが、DES低濃度投与群においてアポトーシス細胞の増加(DES 100 ng/kg体重)に一致して、Baxが細胞全体に分布する強陽性細胞の増加を認めた。ミラー切片を用いた直接的検討でも、TUNEL陽性細胞はほぼBax陽性細胞と一致していた(図6)。この傾向は、正常精巣や他の毒性物質投与によるTUNEL陽性細胞でも認められ、生殖細胞アポトーシスに様な現象と考えられた。一方、ERKOマウス精巣でも基本的には、TUNEL陽性細胞とBax強陽性細胞は一致していた。ERノックアウトマウスの検討は今回遂行できなかった。代替方法としてER mRNAに対するアンチセンスオリゴDNAを作製し、in vivo エレクトロポレーションにより遺伝子発現抑制を試みているが、反応分布の不均一性により一貫した結果が得られていない。現在更に、基本的条件の検討が課題となって残っている。

4) ER 並びに ER 発現の動態変化の関与

ERの蛋白並びにmRNAは、正常成熟マウス精巣ではLeydig細胞に特異的に発現するが、EE、DES、BPA、DDE投与による発現の変化は認められなかった。一方、ERの蛋白並びにmRNAについては、正常成熟マウス精巣では、精粗細胞並びに精母細胞に発現するが、DES 20 mg/kg体重投与群でER蛋白発現の著明な減少を認めた。In situ hybridizationを用いたmRNAレベルの検討では、ER mRNAは精粗細胞並びに精母細胞に検出され、DES高濃度存在下でのER蛋白の安定性(半減期)の変化の可能性が示唆された(図7)。しかしながらDESの低濃度ではER蛋白の発現に有意な差異は得られなかった。一方、ERKOマウス精巣では、低濃度のDES投与によっても精母細胞からER染色が消失した。

D. 考察

本年度は、昨年度以前の研究結果を踏まえ、環境ホルモンとしての作用濃度と考えられるkg体重当たりngのレベルで、EE、EB、DES、BPAやDDEをマウスに投与し、精子形成細胞への影響を検討した。昨年までエストロゲンの対照物質としてEBを用い1 µg/kg体重で有意な精子形成細胞死が検出され、その後濃度依存的なアポトーシス頻度の増大を見出ししていたが、環境省で対照物質としているEEでは本検討範囲で全く生殖細胞死を誘導しなかった。この結果は、EBもエストロゲンの代謝抵抗アナログとして生殖毒性物質活性をもっていることを示しており、以前の結果の解釈に注意を喚起された。

一方、DESでは生殖細胞死のピークが100 ng/kg体重と20 mg/kg体重の2点で観察され、またBPAの低濃度範囲(4-40 µg/kg体重)での生殖細胞死頻度の有意な低下が再確認された。この結果は、環境ホルモン各々の濃度依存的生殖毒性効果は多様であり広濃度範囲できめ細かく検討する必要性を再び示唆している。BPAによる生殖細胞死頻度の減少が、Baxの機能を中和・阻害するBcl-2の顕著な発現を伴っていることから、以下に述べるようにミトコ

ンドリアの関与が予想される。

環境ホルモンによる生殖細胞死誘導への分子機構を検討する目的で、Fas/Fas リガンド系と Bcl-2/Bax 系の関与を系統的に検討した結果、Fas 系は mg/kg 体重を越すような高濃度処理の場合には発現が明白であったが、DES の低濃度処理での細胞死誘導時には発現は認められず、むしろ劇的な精巣障害時に積極的に配偶子を死滅・除去させる機構として働いていることが示唆された。このことは、精巣が免疫特権臓器であり、精巣障害による配偶子の血流への流入による免疫反応の誘起を抑える機構として注目される。

一方、Bax は DES の低濃度処理での細胞死誘導時にもアポトーシス細胞に強発現しており、分布変化も顕著であったことから、環境ホルモンによる生殖細胞死誘導機構として直接的な関与が示唆された。またこの事は、Bax の細胞内分布変化がミトコンドリアの機能変化と密接に関係していることから、環境ホルモンの作用点としてミトコンドリアを加えて考える必要を提起したい。昨年度の検討で、DES のような環境ホルモンが細胞の抗酸化機構を低下させることを明らかにしており、これら抗酸化機構がミトコンドリア機能と密接な関係を持っていることを考えると今後更に SOD 活性や GSH 量の変動に関する検討が必要になるものと思われる。更にこれらのミトコンドリア機能への影響の検討は、作用機構の解明と並ぶ重要な課題である環境毒性物質の作用を生体内で中和し障害を回避するための具体的方策の策定にも大きな期待を抱かせるものである。

ミトコンドリアはすべての真核細胞に存在するが、生物種間による機能の多様性についての検討は少ない。環境ホルモンによるミトコンドリア動態や機能への影響を検討することは、生物種間で見られる環境ホルモンへの感受性や障害の差異を明らかにできる可能性があり、新たな環境ホルモン効果の種を超えた定量的アセスメント法の開発へも繋がることが予想される。

環境ホルモンの作用がエストロゲン受容体を介するものなのか否かの検討は、根本的な重要性がある。本研究により、ER をノックアウトした ERKO マウスでも正常マウス精巣と基本的には同様な生殖細胞アポトーシス誘導が認められたことから、ER の直接的な重要性は低いと考えられる。ER に関しては、生殖細胞に発現しており、その半減期が作用物質によって変化することから生殖細胞死との関連性が示唆されるが、現在のところアポトーシス細胞と直接的な ER 発現動態変化との関連は明白でなく断定的な結論は難しい。この点に関しては、DES 処理による脳下垂体での顕著な ER 陽性細胞の増大を観察しており (data not shown)、むしろ下垂体ホルモン系の発現変異により二次的に生殖細胞のアポトーシスが誘導される可能性も否定できない。

本年度の検討で EB も環境ホルモンとして働く可能性が認められたが、昨年度の EB や DES への胎仔期暴露による出世後の雄性生殖腺機能への影響検討においても既に生後 2 週で明かな精子形成早熟効果を見出した。現在この早熟現象が精子形成過程開始時期の若令化によるものか、或いは精子形成過程そのものの短縮によるものなのかの検討は中断しているが、次世代への影響を考える上で早急に解決される問題と考える。また雌マウスでの性早熟の有無や卵巣機能変化についての検討も重要な検討課題であると思われる。

E. 結論

- ・ 本研究において、エストロゲンアナログ (EB) やエストロゲン様活性を有す化学物質 (DES、BPA 等) が、マウス精子形成細胞に対し強力な生殖毒性物質として働き、更に「環境ホルモ

ン作用濃度領域」と思われる低濃度範囲においては多様な反応性を示すことが判明した。

- 生殖毒性物質の生殖細胞誘導機構に関しては、その高濃度では Fas 及び Fas リガンド系の関与が強く示唆されたが、いわゆる環境ホルモン作用濃度では Fas 系の関与は認められず、むしろ Bax と Bcl-2 発現並びにそれらの細胞内分布変化が生殖細胞アポトーシス動態と一致しており、環境ホルモンの作用点としてミトコンドリアに注目する必要性を提案した。
- ER 並びに ER の関与に関しては、生殖細胞死への直接的関係は認められない。しかしながら、特に ER は細胞増殖や発癌或いは癌の転移と密接に関与する c-Fos/c-Jun 複合体との反応性が知られ、また生殖細胞でも発現が見られることから注目に値すると思われる。実際、下垂体での ER 発現が生殖毒性物質により顕著に増大すること等から、精巣及び卵巣のみならず全身的に発現動態を検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koji, T., Hishikawa, Y., Ando, H., Nakanishi, Y., and Kobayashi, N. (2001) Expression of Fas and Fas ligand in normal and ischemia-reperfusion testes: Involvement of the Fas system in the induction of germ cell apoptosis in the damaged mouse testis. **Biol. Reprod.**, 64; 946-954.
- 2) Koji, T. (2001) Male germ cell death in mouse testes: Possible involvement of Fas and Fas ligand (Review). **Medical Electron Microsc.**, 34; 213-222.
- 3) Goto, S., Ihara, Y., Urata, Y., Izumi, S., Abe, K., Koji, T., and Kondo, T. (2001) Doxorubicin-induced DNA intercalation and scavenging by nuclear glutathione S-transferase. **FASEB J.**, 15(Dec); 2702-2714.
- 4) Sawada, T., Koji, T., Hishikawa, Y., Kishimoto, K., Nagayasu, T., Takahashi, T., Oka, T., and Ayabe, H. (2001) Partial tolerance of subcutaneously transplanted xenogeneic tumour cell graft by Fas-mediated immunosuppression. **Immunology**, 103(1); 81-89.
- 5) Sera, N., Kawakami, A., Nakashima, T., Nakamura, H., Imaizumi, M., Koji, T., Abe, Y., Usa, T., Tominaga, T., Ejima, E., Ashizawa, K., Yokoyama, N., Ishikawa, N., Ito, K., and Eguchi, K. (2001) Fas/FasL mediated apoptosis of thyrocytes in Graves' disease. **Clin. Exp. Immunol.**, 124(2); 197-207.
- 6) Fukuzawa, K., Takahashi, K., Furuta, K., Tagaya, T., Ishikawa, T., Wada, K., Omoto, Y., Koji, T. and Kakumu, S. (2001) Expression of Fas/Fas ligand (FasL) and its involvement in infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma (HCC). **J. Gastroenterol.**, 36(10); 681-688.
- 7) Izumi, S., Shin, M., Hishikawa, Y. and Koji, T. (2001) Localization in situ of specific RNA by electron microscopy. **Italian J. Anat. Embryol.**, 106(Suppl. 1, No. 2); 45-50.
- 8) Sano, I., Takahashi, T., Koji, T., Uono, H., Yui, K., and Ayabe, H. (2001) Prolonged survival of rat cardiac allograft by proinflammatory cytokine inhibitor. **J. Heart Lung Transpl.**, 20(5); 583-589.
- 9) Hishikawa, Y., Kohno, H., Ueda, S., Kimoto, T., Kumar Dhar, D., Kubota, H., Tachibana, M., Koji, T., and Nagasue, N. (2001) Expression of metallothionein in colorectal cancers and synchronous liver metastases. **Oncology**, 61(2); 162-167.
- 10) Yamasaki, S., Kawakami, A., Nakashima, T., Nakamura, H., Kamachi, M., Honda, S., Hirai, Y., Hida, A., Ida, H., Migita, K., Kawabe, Y., Koji, T., Furuichi, I., Aoyagi, T., and Eguchi, K. (2001) Importance of NF-kappaB in rheumatoid synovial tissues: in situ NF-kappaB expression and in vitro study using cultured synovial cells. **Ann. Rheum. Dis.**, 60(7); 678-684.
- 11) Abe, K., Miyazaki, M., Koji, T., Furusu, A., Nakamura-Kurashige, T., Nishino, T., Ozono, Y., Harada, T., Sakai, H., and Kohno, K. (2001) Enhanced expression of complement C5a receptor mRNA in human diseased kidney assessed by in situ hybridization. **Kidney Int.**, 60(1); 137-146.
- 12) 菱川善隆、小路武彦 (2001) in situ PCR法. **細胞** 33(5); 196-199.

- 13) 小路武彦 (2001) サウスウェスタン組織化学-特異的転写因子の視覚的局在化法。医学のあゆみ 199(13); 850-855.
- 14) Urata, Y., Yamaguchi, M., Higashiyama, Y., Ihara, Y., Goto, S., Kuwano, M., Horiuchi, S., Sumikawa, K. and Kondo, T. (2001) Reactive oxygen species accelerate production of vascular endothelial growth factor by advanced glycation end products in RAW264.7 mouse macrophages. **Free Rad. Biol. Med.**, in press.
- 15) Iida, T., Kijima, H., Urata, Y., Goto, S., Ihara, Y., Oka, M., Kohno, S., Scanlon, K.J. and Kondo, T. (2001) Hammerhead ribozyme against glutathione synthetase sensitizes human colonic cancer cells to cisplatin by down-regulating both the glutathione synthesis and the expression of multidrug resistance proteins. **Cancer Gene Therapy.**, 8; 803-814.
- 16) Nagata, J., Kijima, H., Hatanaka, H., Asai, S., Miyachi, H., Takagi, A., Miwa, T., Mine, T., Yamazaki, H., Nakamura, M., Kondo, T., Scanlon, KJ., Ueyama, Y. (2001) Reversal of cisplatin and multidrug resistance by ribozyme-mediated glutathione suppression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 286; 406-413.
- 17) Doi, K., Sawada, F., Toda, G., Yamachika, S., Seto, S., Urata, Y., Sakata, N., Taniguchi, N., Kondo, T. and Yano, K. (2001) Alteration of antioxidants during the progression of heart disease in streptozotocin-induced diabetic rats. **Free Rad. Res.**, 34; 251-261.
- 18) 池田聡司、近藤宇史 (2001) Oxidant/antioxidant と COPD。The LUNG perspectives, 9;308-311.
- 19) 近藤宇史 (2001) -グルタミルシステインシンターゼ遺伝子の発現調節と意義。In: 別冊・医学のあゆみ-酸化ストレス- (吉川敏一編), 医歯薬出版, pp. 56-60.
- 20) 井原義人、近藤宇史 (2001) ミトコンドリアとグルタチオン代謝。In: 新ミトコンドリア学 (内海耕三・井上正康監修), 共立出版, pp. 236-241.
- 21) 近藤宇史 (2001) 老化の進行におけるアンチオキシダントの役割。GERONTOLOGY NEW HORIZON, 14; 15-19.

2 . 学会発表

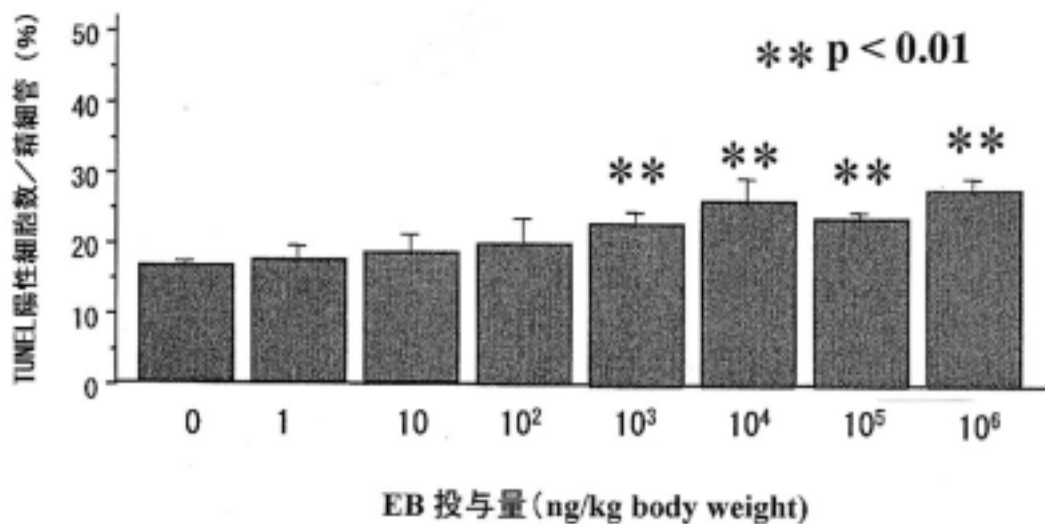
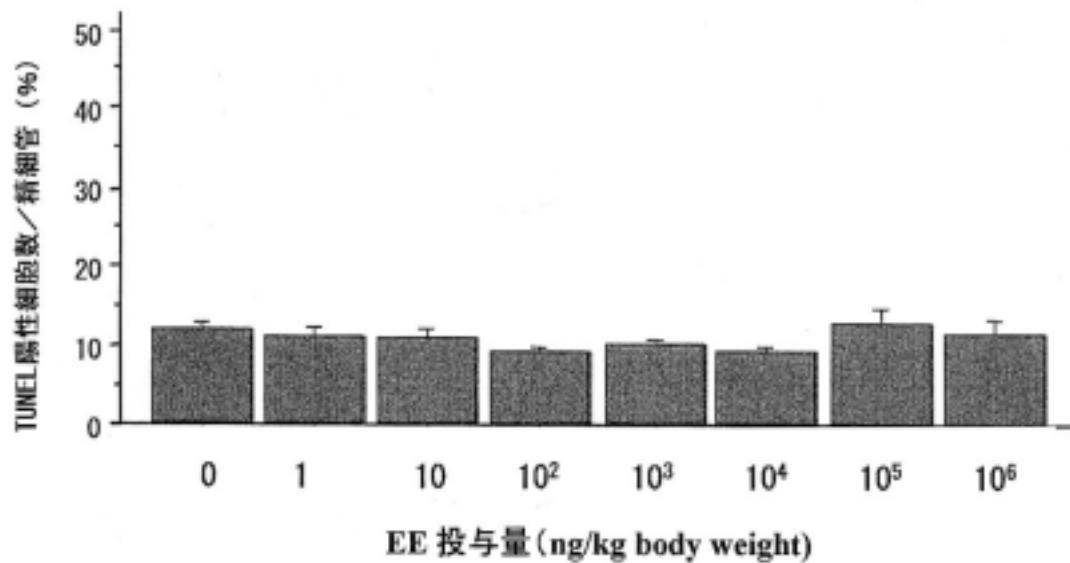
- 1) Koji, T. (2001) Involvement of Fas/Fas ligand in germ cell death. 14th International Symposium of the Japan Human Cell Society on Frontiers in Research on Apoptosis (Nagasaki); 11. (Symposium)
- 2) Koji, T. (2001) Molecular histochemistry of rRNAs by LM- and EM- in situ hybridization. International Symposium on New electron microscopic application in the biomedical fields; pp. 45-53 (Korea, Taegu). (Symposium)
- 3) Koji, T. (2001) Germ cell apoptosis in fetal, neonatal and adult mouse testes: Differential roles of Fas/Fas ligand and Bcl-2/Bax. 第 106 回日本解剖学会総会(高知), Acta Anat. Nippon., 76(1); 16. (シンポジウム)
- 4) 菱川善隆・小路武彦 (2001) マウス精巣における estrogen receptor の発現動態と精子形成過程への関与。第 106 回日本解剖学会総会(高知), Acta Anat. Nippon., 76(1); 47. (シンポジウム)

- 5) 和泉伸一・安倍邦子・進正志・菱川善隆・小路武彦 (2001) 副腎皮質刺激ホルモン受容体の妊娠期間におけるラット胎盤内分布の変化。第 106 回日本解剖学会総会(高知), Acta Anat. Nippon., 76(1); 152.
- 6) 小路武彦 (2001) 光顕・電顕 ISH による RNA の核内・細胞質内不均一分布証明。日本電子顕微鏡学会第 57 回学術講演会(福岡), 電子顕微鏡 36(suppl. 1); 98. (シンポジウム)
- 7) 山本智美・菱川善隆・進正志・和泉伸一・小林俊光・小路武彦 (2001) in situ PCR 法によるマウス卵巣での X 染色体特異的遺伝子検出の至適条件の検討。第 57 回日本解剖学会九州支部学術集会(佐賀)。
- 8) 小路武彦 (2001) RNA を観るための In situ hybridization 法: 偶然から必然への軌跡。第 33 回日本臨床電子顕微鏡学会総会(長崎), (教育講演)
- 9) 菱川善隆・小路武彦 (2001) サウスウエスタン組織化学の有用性とその応用。第 33 回日本臨床電子顕微鏡学会総会(長崎), (シンポジウム)
- 10) Damavandi, E., Hishikawa, Y., Izumi, S., Shin, M., Koji, T. (2001) Involvement of Bax redistribution in the induction of germ cell apoptosis in neonatal mouse testes. 第 33 回日本臨床電子顕微鏡学会総会(長崎)
- 11) 進正志・菱川善隆・和泉伸一・小路武彦 (2001) マウス雄性生殖細胞アポトーシスへの内分泌攪乱物質の影響。第 33 回日本臨床電子顕微鏡学会総会(長崎)
- 12) 和泉伸一・末松貴史・進正志・菱川善隆・小路武彦 (2001) マウス精細管細胞の核小体における 18S および 28S rRNA の電顕 in situ hybridization による半定量的局在解析。第 43 回日本電子顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会(大分)
- 13) 小路武彦 (2001) In situ hybridization によるゲノム転写産物の局在化と定量的評価系への試み。第 42 回日本組織細胞化学学会総会(東京), (シンポジウム)
- 14) 進正志・菱川善隆・和泉伸一・川勝美穂・小路武彦 (2001) マウス精子形成細胞死への低濃度 DES の影響。日本内分泌攪乱化学物質学会第 4 回研究発表会(茨城)
- 15) 浦田芳重・後藤信治・井原義人・近藤宇史 (2001) AGE-BSA 刺激による VEGF 発現とグルタチオンによる発現調節機構の解析。第 74 回日本生化学会。
- 16) 後藤信治・浦田芳重・井原義人・近藤宇史 (2001) 酸化ストレスによるグルタチオン S-トランスフェラーゼ π の細胞内局在の変化。第 74 回日本生化学会。
- 17) 陰山寛・井原義人・後藤信治・近藤宇史 (2001) カルレティキュリンと心筋細胞アポトーシス。第 74 回日本生化学会。
- 18) 近藤宇史・浦田芳重・井原義人 (2001) The role of Anti-oxidants in the Progress of Aging. 17th World Congress of the International Association of Gerontology, Vancouver.

表1 種々の濃度のBPA投与における生殖細胞Bcl-2発現の変化

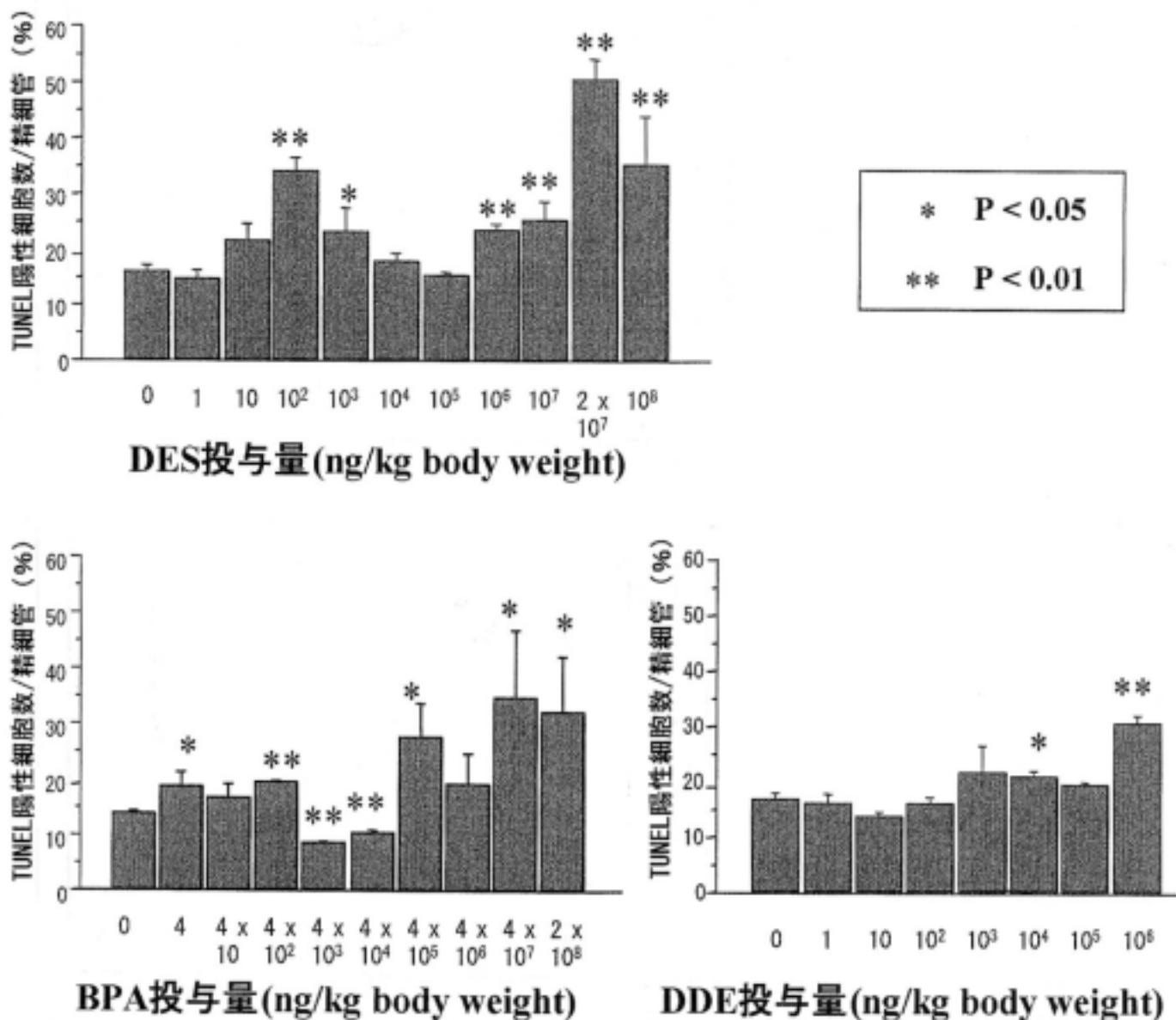
		BPA 投与量 (ng/kg 体重)									
		0	4	4×10	4×10 ¹	4×10 ²	4×10 ³	4×10 ⁴	4×10 ⁵	4×10 ⁷	2×10 ⁸
Expression of Bcl-2	spermatogonia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	spermatocytes	+	++	++	++	+++	+++	++	++	++	++
	spermatids	+	+	+	+	+++	+++	+	+	+	+

* -:陰性、+:弱陽性、++:陽性、+++:強陽性 ** (n=3)



**図1 EE並びにEB投与による
精巣でのTUNEL陽性細胞数の変化 (n=3)**

成熟雄マウスに種々の濃度でEE、EBを5日毎に皮下投与し、初回投与から20日目に精巣を採取し、そのパラフィン切片を用いてDNA二本鎖切断部位を検出するTUNEL染色を行い、アポトーシス細胞を検出したもの。アポトーシス頻度は、精細管円形断面当たりのTUNEL陽性細胞数を%として示した。対照としては、5%エタノール/コーンオイルを投与した。EE投与群ではアポトーシス頻度の増大は認めなかった。一方、EB投与群では1 μg/kg体重投与量以降に於いて濃度依存的な生殖細胞アポトーシス頻度の増大を認めた。



**図2 生殖毒性物質投与による
精巣でのTUNEL陽性細胞数の変化 (n=3)**

成熟雄マウスに種々の濃度でDES、BPA、DDEを5日毎に皮下投与し、初回投与から20日目に精巣を採取し、そのパラフィン切片を用いてDNA二本鎖切断部位を検出するTUNEL染色を行い、アポトーシス細胞を検出したもの。アポトーシス頻度は、精細管円形断面当たりのTUNEL陽性細胞数を%として示した。対照としては、5%エタノール/コーンオイルを投与した。DES投与群では低濃度でのアポトーシス細胞の有意な増加があり、2層的效果が認められた。一方、BPA投与では4μg、40μg/kg体重投与でアポトーシス細胞の有意な抑制が認められた。

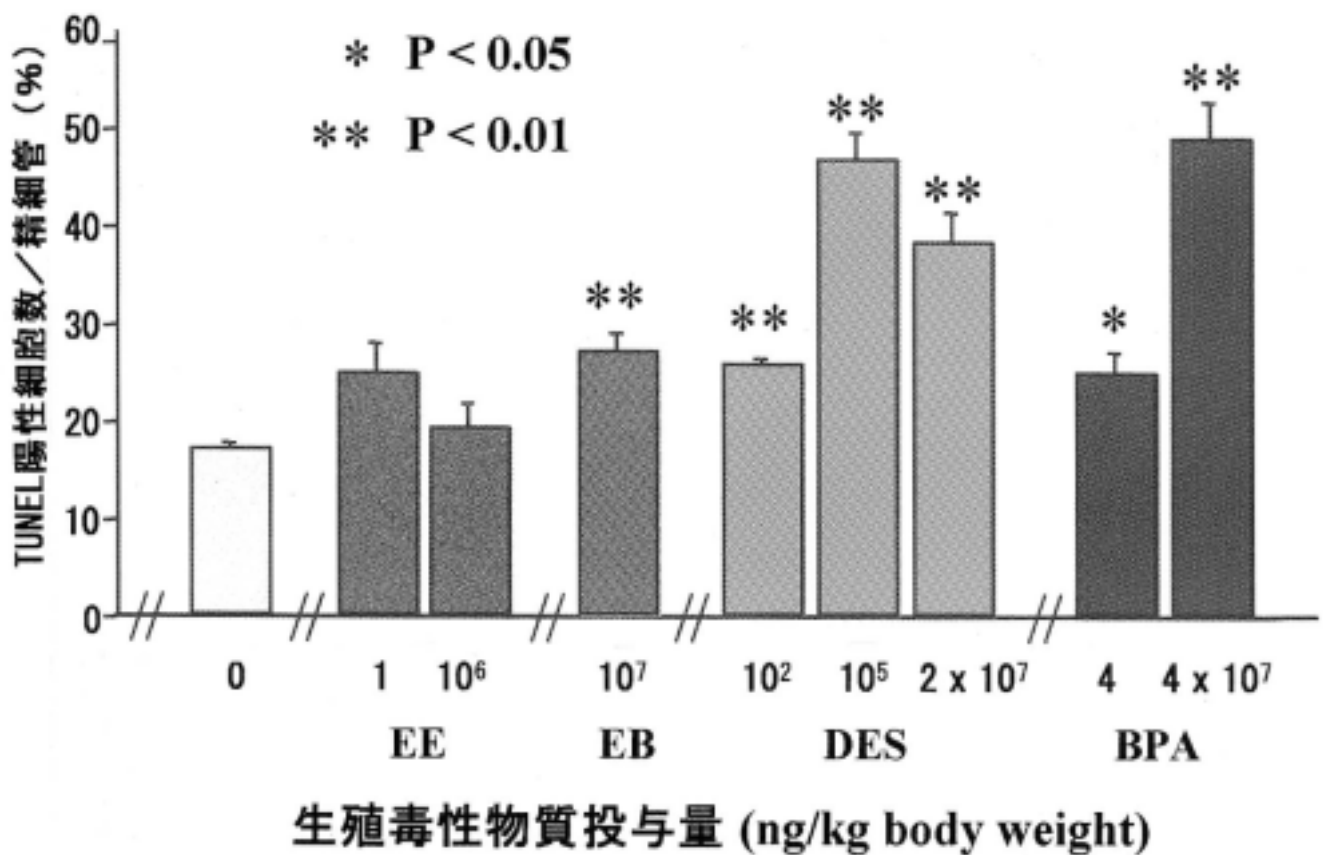


図3 ERKOマウスでの各種生殖毒性物質投与による精巣でのTUNEL陽性細胞数の変化 (n=3)

ERKO雄マウスにEE 1ng及び1 mg/kg体重、EB 10 mg/kg体重、DES 100 ng、100 µg、及び20 mg/kg体重、BPA 4 ng及び40 mg/kg体重を5日毎に皮下投与し、初回投与から20日目に精巣を採取し、そのパラフィン切片を用いてDNA二本鎖切断部位を検出するTUNEL染色を行い、アポトーシス細胞を検出したもの。アポトーシス頻度は、精細管円形断面当たりのTUNEL陽性細胞数を%として示した。対照としては、5%エタノール/コーンオイルを投与した。EB、DES、BPA投与によりアポトーシス細胞の増加が認められた。

Corn oil投与群

DES 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重投与群

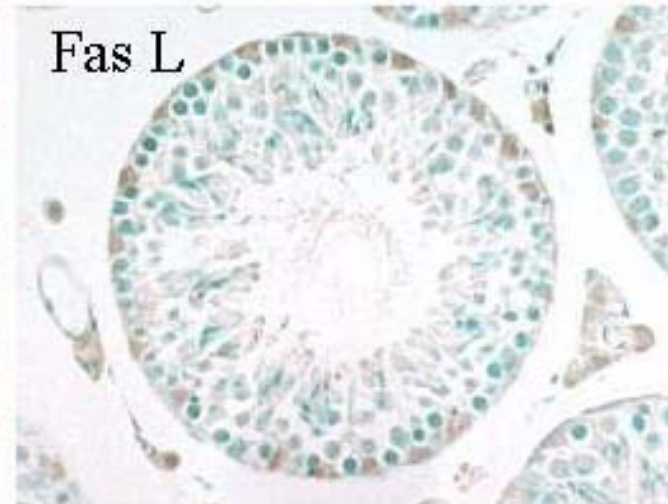
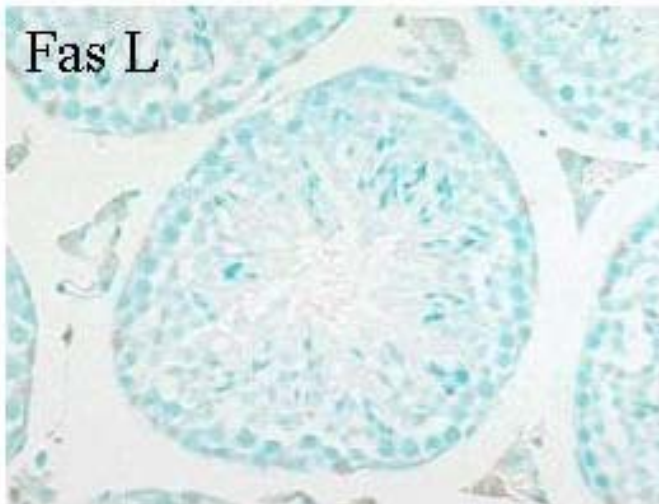
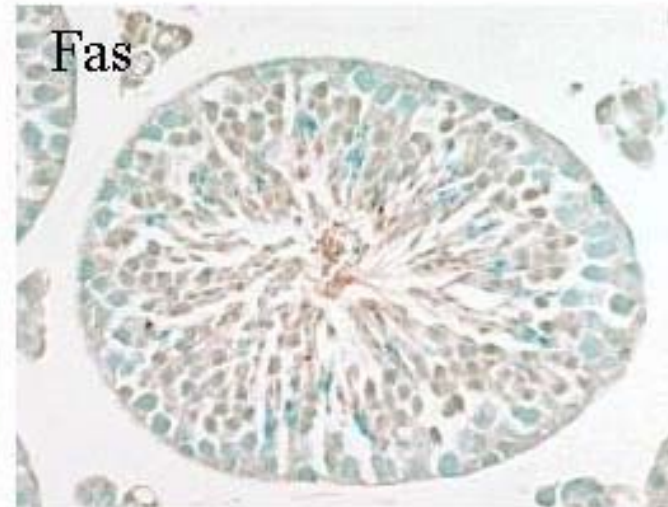
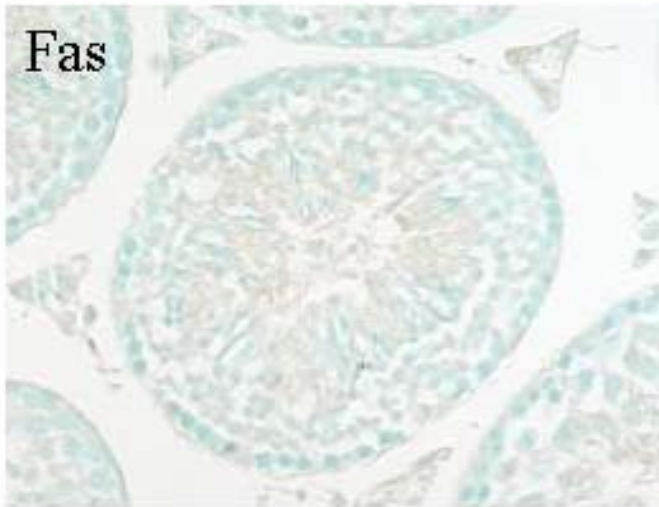


図4 ERKOマウス精巣でのFas及びFas Lの発現

ERKO マウス精巣において、アポトーシス細胞が著明に増加したDES 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重投与精巣でのFas 及び Fas リガンド (Fas L) の発現を示す。DES 投与精巣では Fas は Leydig 細胞並びに精子形成細胞に陽性であり、また Fas L の Sertoli 細胞での発現も増強した。

Corn oil投与群

BPA 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重投与群

BPA 40 mg/kg 体重投与群

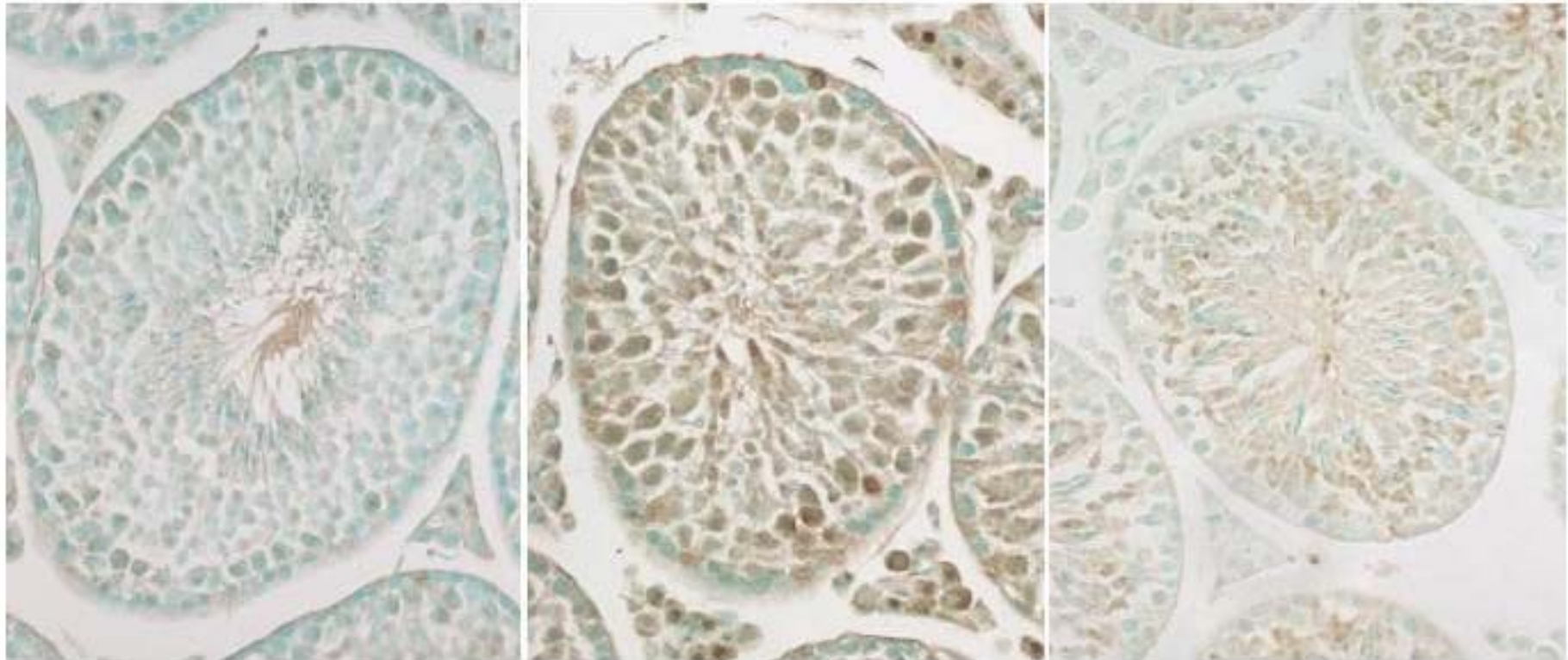


図5 BPA投与精巣におけるBcl-2の発現

BPA 投与精巣での Bcl-2 発現を免疫組織化学的に検討した。生殖細胞死阻害が認められた BPA 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重投与精巣において、精母細胞及び精子細胞に顕著な Bcl-2 の発現の増加が認められた。

TUNEL

Bax

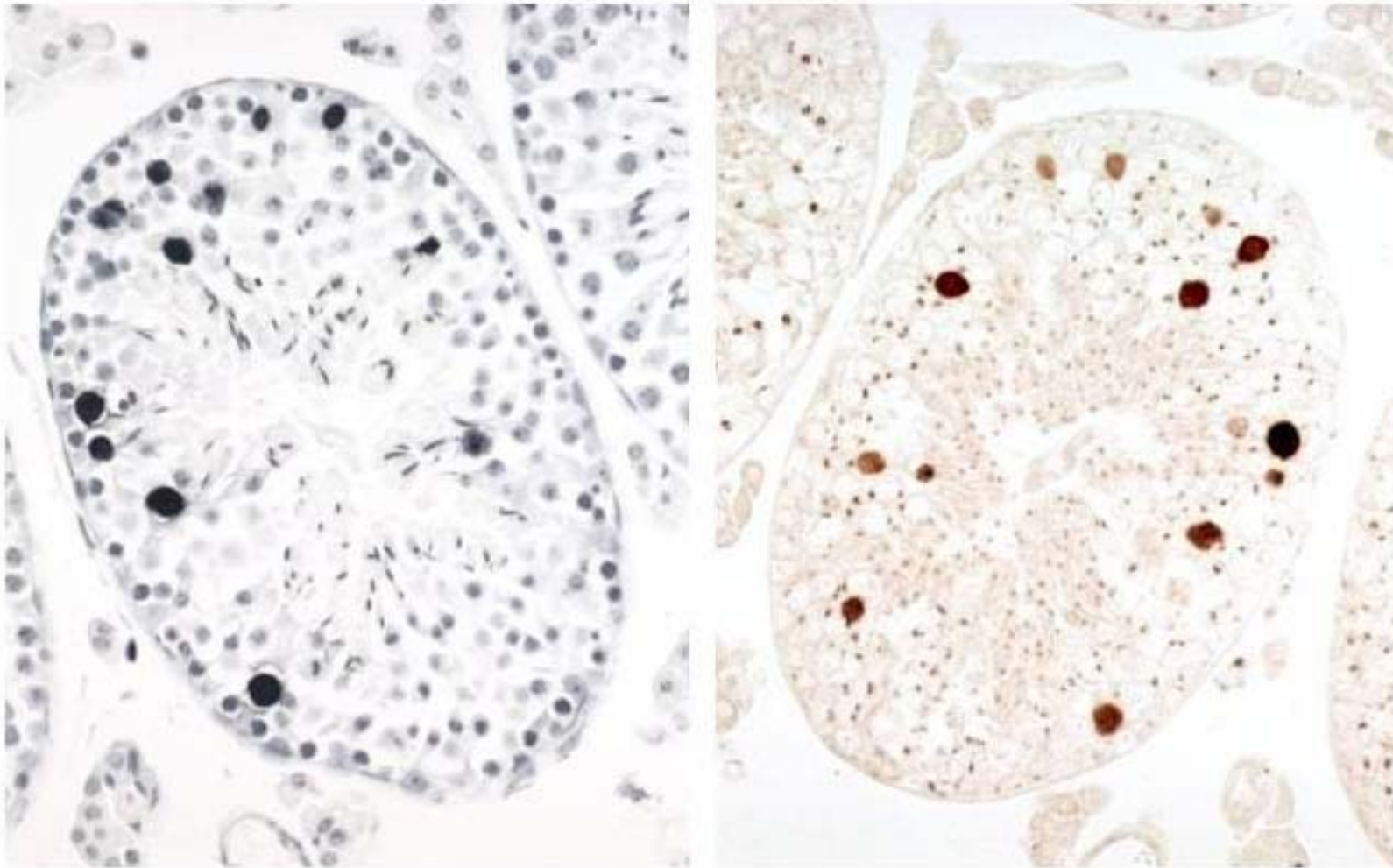
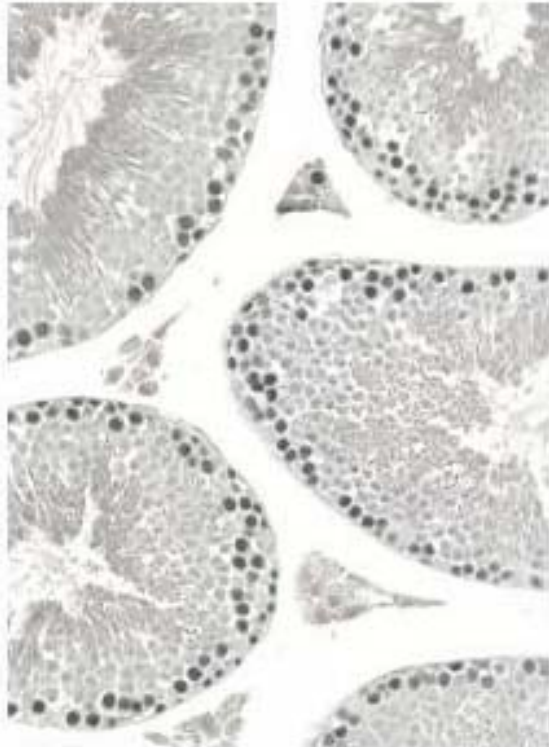


図6 DES 100 ng/kg体重投与でのTUNELとBaxの発現

ミラー切片を用いて、DES 100 ng/kg 体重投与に於けるアポトーシス細胞と Bax 陽性細胞の発現分布の直接的検討を行った。本投与量に於いては TUNEL 陽性細胞数の有意な増加が認められ、また TUNEL 陽性細胞はほぼ Bax 陽性細胞と一致していた。

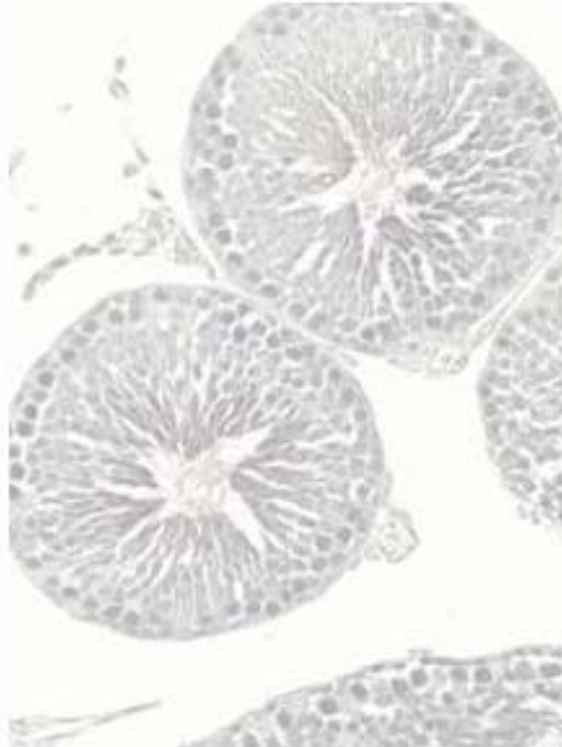
Corn oil投与群

ER β 蛋白



DES 20 mg/kg体重投与群

ER β 蛋白



ER β mRNA

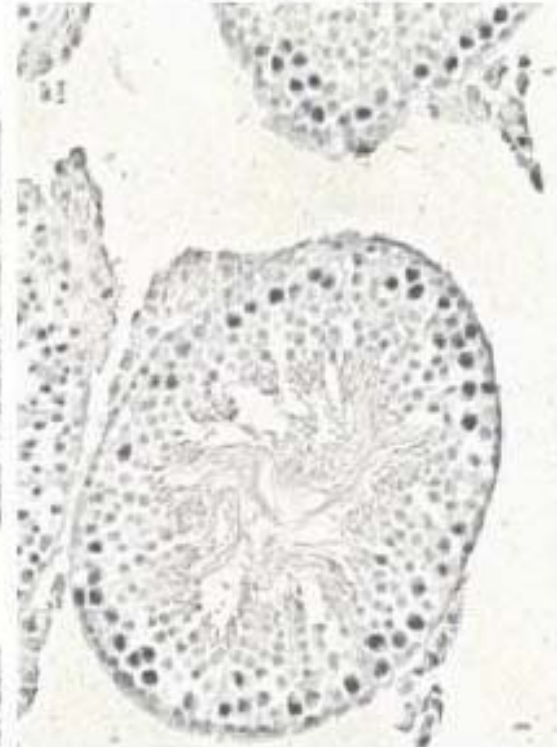


図7 DES投与精巣におけるER β の発現

成熟雄マウスに DES 20 mg/kg 体重投与した精巣に於ける ER の発現について蛋白並びに mRNA レベルでの検討を行った。ER 蛋白の発現は、対照群では精粗細胞並びに精母細胞に発現した。DES 高濃度投与により ER 蛋白発現の著明な減少を認めたが、in situ hybridization を用いた mRNA レベルの検討では ER mRNA は精粗細胞並びに精母細胞に検出された。

Effects of environmental endocrine disruptors upon mouse spermatogenic cell death and their possible molecular mechanisms

Takehiko Koji

Department of Histology and Cell Biology, Nagasaki University School of Medicine
Professor and Chairman

Key words: endocrine disruptors, germ cell death, Fas/Fas ligand, Bcl-2/Bax, estrogen receptors, mouse testis

Abstract:

For a better understanding of effects of various environmental endocrine disruptors (ED) on mammalian spermatogenesis, a systematic study with an experimental rodent model on germ cell death would be beneficial. In the project of this year, we focused on the effects of lower and wide-ranging concentrations (1 ng - 1 mg/kg BW) of ethynylestradiol (EE), estradiol-3-benzoate (EB), diethylstilbestrol (DES), bisphenol A (BPA) and dichlorodiphenyl dichloroethene (DDE) upon germ cell apoptosis in a short term protocol, where ICR male mice were injected subcutaneously with a compound dissolved in 5% ethanol/corn oil in every 5 days and killed on 20 days after the first injection. When germ cell apoptosis was examined by TUNEL, EE had no effect on the number of TUNEL positive cells at any dose investigated. On the other hand, germ cell apoptosis was increased in a dose-dependent fashion with EB and DDE. In the case of DES, the number of TUNEL positive cells had two peaks at doses of 100 ng/kg BW and 20 mg/kg BW. Very interestingly, BPA inhibited the autonomous germ cell apoptosis by 50-60% at doses of 4 – 40 µg/kg BW, while a significant increase in the number of TUNEL positive cells was found at lower and higher doses. These results indicate that ED have a wide variety of effects on germ cell apoptosis. To analyze the molecular mechanism underlying the induction of germ cell apoptosis by ED, we investigated the expression of Fas/Fas ligand and Bcl-2/Bax immunohistochemically. As a result, we found a close association between Fas expression in germ cells and TUNEL positive cells at high doses of ED, while at 100 ng/kg BW of DES no expression of Fas was detected in germ cells. Also, we found that the redistribution of Bax in germ cells was tightly associated with TUNEL positive cells in any cases. Moreover, a marked increase in Bcl-2 expression, which is supposed to protect cells from apoptosis, was detected at 4-40 µg/kg BW of BPA. These results strongly indicate that the roles of the Fas system in germ cell apoptosis may be limited to the case of severe and acute damages of testis by high doses of ED, and rather the Bcl-2 and Bax system can be more important in the induction of germ cell apoptosis by ED. Since estrogenic compounds are supposed to affect cells primarily through estrogen receptor (ER) and , we examined their expression by immunohistochemistry. Our results revealed that ER is expressed in only Leydig nuclei, while ER is in the nuclei of spermatogonia and

spermatocytes, suggesting the direct action of these compounds upon germ cells through ER . In accord with the findings, a similar apoptosis-inducing effect of ED was observed in ER knockout mice. Therefore, we propose that ED may act on mammalian male germ cells through ER , mimicking the expression and subcellular distribution of Bcl-2 and/or Bax at the relatively lower concentrations. Moreover, at the higher concentrations of ED, spermatogenic cell death may be induced by the activation of the Fas system in combination with the changes in Bax expression.

(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に関する研究

研究者 岸 玲子 (北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野教授)

研究要旨

フタル酸エステル類は、動物実験で、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。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ている。しかし、多くの報告は、経口摂取による影響であり、人での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ほとんどない。本研究では、揮発性の低いフタル酸エステルを発生する曝露装置を完成させた。曝露チャンバー内での濃度の検討を行った結果、 $3.6\text{mg}/\text{m}^3$ から $18\text{mg}/\text{m}^3$ までの濃度の安定性が確認出来た。今後、動物への吸入曝露による生体への影響を検討し、リスク評価を行うことが可能になる。

研究協力者 佐田 文宏 (北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野講師)
玉置 淳子 (北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野助手)
片倉 洋子 (北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野研究員)
近藤 朋子 (北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野研究員)
梅村 朋宏 (北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野大学院生)
倉橋 典絵 (北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野大学院生)

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 親油性があるので、油分を多く含む食品の梱包により、成分が溶出し食品中に移行し、経口的に摂取する可能性、 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、 プラスチック製品の低温焼却野、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。

大気中にも、フタル酸ジエチルヘキシル DEHP で $0.038\sim 0.79\mu\text{m}^3$ 、フタル酸ジブチル DBP で $0.017\sim 0.37\mu\text{m}^3$ (環境庁 1997) 存在し、DEHP に関して、一般人口でも、1日の最大曝露量は $2\text{mg}/\text{m}^3$ であるという報告 (ATSDR 1993) もある。現在の産業現場における基準は、許容濃度が $5\text{mg}/\text{m}^3$ (日本産業衛生学会、米国産業衛生専門家会議) であるが、内分泌攪乱科学物質の問題が出現する前 (1995 年) に決められており、生殖毒性などが配慮された数値ではない。職域以外の一般環境については、より低い安全性のリスク評価を検討する必要がある。

これまでヒトでは、軽度の胃腸障害、実験動物での報告は、内分泌攪乱作用、生殖毒性、発達毒性、臓器障害などが報告されているが、そのほとんどが、経口投与による影響をみており、人での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研究はこれまで国際的にも

ほとんど行われていない。本研究では、吸入曝露による影響を明らかにするために、揮発性の低いフタル酸エステルの発生を安定供給できる曝露装置を完成させる。

B. 研究方法

. 発生器の作成

フタル酸エステルは、沸点が300以上と高く、蒸発法によって高濃度のガスを発生させることは技術的に容易ではない。しかも常温の環境中ではガスが凝縮しミストとなる。このため、低濃度(0.2 mg/m³)から高濃度(50 mg/m³)のガスを一元的に発生することは困難であると判断し高沸点発生装置を作成した。

高沸点発生装置

発生方法は低濃度発生用と同様、バブリング蒸発方式を採用した。但し高濃度領域のため、ガスはミスト状態となる。ミストを流量計に通すことは、ガス濃度の不安定化の原因となる。この状態を避けるため、吸入チャンバー毎に発生量をコントロールできるよう、発生部を個別に設けることにした。こうして発生量は、清浄空気を流量計により制御することにより変えることが可能となった。発生部の加熱媒体はオイルバスを採用し180℃までの発生が可能である。本装置での発生濃度は、おおよそ1 mg/m³ ~ 50 mg/m³の発生を目標とした。

. 発生器の安定性の検討

フタル酸エステルの各チャンバー内での濃度の安定性を、ガスクロマトグラフィーを用いて確認した。

デジタル粉塵計による存在の確認

完成後、まず、簡易的に、曝露チャンバー内のフタル酸エステルの存在をデジタル粉塵計で確認した。デジタル粉塵計で存在を確認できたことから、チャンバー内ではミスト状であることが確認された。

濾紙法による計測

ミスト状であることが確認されたので、ミストを吸引して濾紙に吸収させ、重量変化で評価する濾紙法により計測を試みた。その結果、温度・流量の変化による重量の変化がみられず、濾紙法では補修しきれない状態のフタル酸エステルの存在が示唆された。

ガスクロマトグラフィーによる計測

同時に、ガスクロマトグラフィーによる計測も行った。サンプリングは、以下の方法で行った。

) テドラーバックによるサンプリング

100ml/minの吸引ポンプで10分間吸引し、1lのテドラーバッグに捕集し、ガスタイトシリンジにてサンプリングを行った。その結果、ガスクロマトグラフィーにてピークを検出できなかった。これは、フタル酸2-エチルエステルが完全に拡散していなかったためと考えられる。

) ミゼットインピンジャーによるサンプリング

DEHPの捕集溶媒としてエタノール10mlを容器に入れ、吸引ポンプに接続し、SPC ミゼットインピンジャーG-1型により2.5 l/minで20分間吸引し、サンプリングを行った。こうして得られたサンプルをガスクロマトグラフィーに注入し、DEHPの濃度を求めた。

III．発生器の改良

高沸点曝露装置を用いて濃度を測定した結果、高濃度の安定性を確認することが出来なかった。その原因としてバブリング方式は、ミスト状態になるガスを安定化させるために、発生量をコントロールするための個別流量計をつけていたが、ミスト状になったフタル酸を曝露チャンバーに流す過程でミスト化が不完全であったため、また、テフロンチューブ内で、フタル酸エステルが液化してトラップされていたためであるということが、考えられた。

そこで、フタル酸エステルをミスト状に保つために、発生装置から曝露チャンバーへの間に希釈器を取り付けた。

C．研究結果

．発生器の製作

揮発性の低い高沸点のフタル酸エステルは、高濃度のガスを安定して発生させる発生器の設計、作成は、非常に難しい課題で、長い時間がかかった。柴田化学株式会社と共同で作成した。

フタル酸エステルガス発生器（改良前）



曝露チャンバー



・発生器の安定性の検討

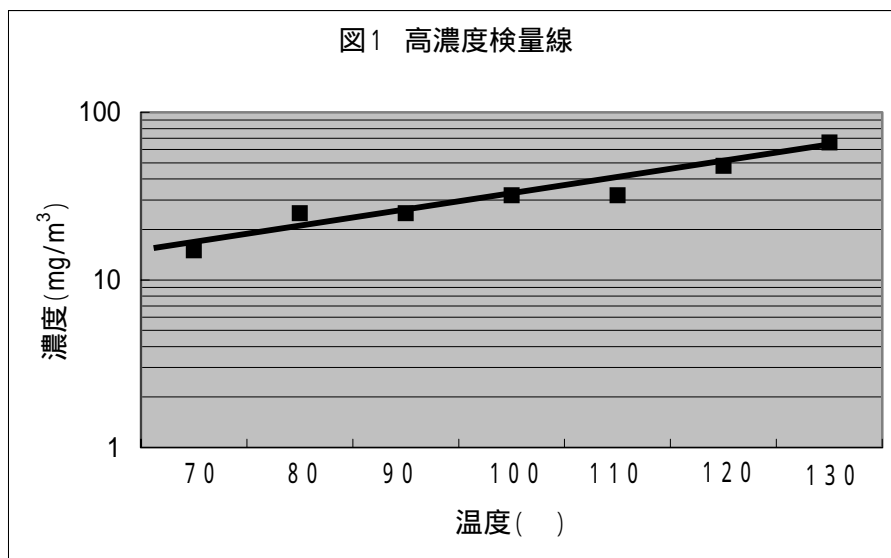
曝露量として、産業現場の許容濃度の 5 mg/m^3 と、10倍高濃度の 50 mg/m^3 、5分の1の濃度の 1 mg/m^3 を目標に、実際に曝露チャンバーに、発生させたフタル酸エステルを導入し、安定性の検討を行った。

発生器の温度による濃度変化

温度と濃度の高い相関性が得られた。(表1、図1)しかしながら、高濃度の時間経過に伴う曝露濃度の安定性についての確認はできていない。

表1

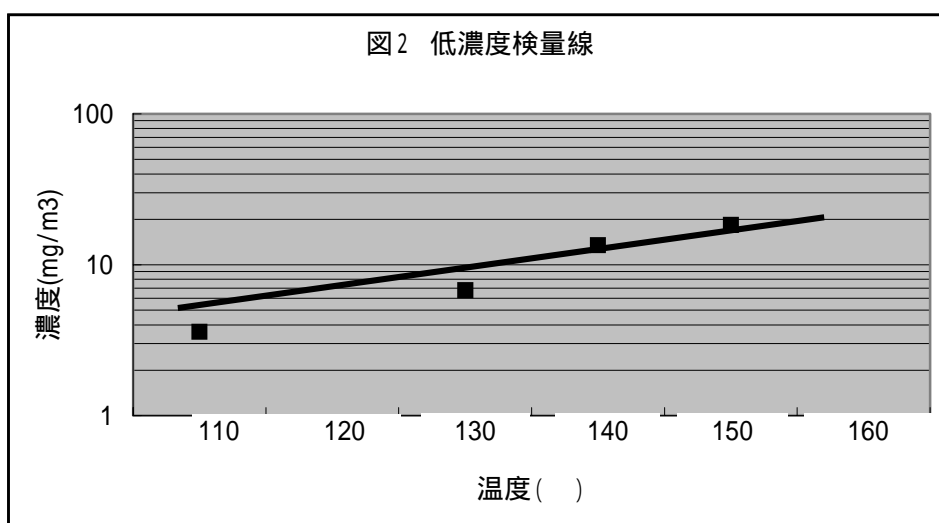
温度 ()	流量 (l/min)	濃度 (mg/m^3)
70	25	15
80	25	25
90	25	25
100	25	32
110	25	32
120	25	48
130	25	66



発生器改良後の温度による濃度変化
 温度と濃度の高い相関性が得られた。(表2、図2)また、改良することにより、フタル酸2-エチルエステルを安定して発生させることができた。また、この場合は時間経過に伴う濃度の安定性を確認することが出来た。

表2

温 度 ()	流 量 (l/min)	濃 度 (mg/m³)
1 1 0	5 + 希釈 20	3.6
1 3 0	5 + 希釈 20	6.8
1 4 0	5 + 希釈 20	13.5
1 5 0	5 + 希釈 20	18.4



III. 発生器の改良

発生装置から曝露チャンバーへの中に希釈器を取り付けることで、チューブ内で冷却されることでミスト化するフタル酸エステルが、空気と一気に混合され、ミスト化を促進することが出来るので安定したフタル酸エステルを発生させることが出来た。

フタル酸エステルガス発生装置（改良型）



D. 考察

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。さまざまな環境中から検出されていることから、ヒトへの影響が懸念されている。しかし、多くの報告は、経口摂取による影響であり、人手の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ほとんどない。大気中にも、フタル酸ジエチルヘキシル DEHP で $0.038\sim 0.79\mu\text{m}^3$ 、フタル酸ジブチル DBP で $0.017\sim 0.37\mu\text{m}^3$ （環境庁 1997）存在し、DEHP に関して、一般人口でも、1日の最大曝露量は $2\text{mg}/\text{m}^3$ であるという報告（ATSDR 1993）もある。現在の産業現場における基準は、許容濃度が $5\text{mg}/\text{m}^3$ （日本産業衛生学会、米国産業衛生専門家会議）である。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、と言う最近の報告(Tabacova 1999)があるように、生体への悪影響が疑われる。このことから、吸入曝露による影響を解明することが不可欠である。

本研究で作成した発生器は、バブリング蒸発方式を用いている。当初のバブリング方式は、ミスト状態になるガスを安定化させるために、発生量をコントロールするための個別流量計をつけていた。こうすることで発生量は、清浄空気を流量計により制御することで変えることが可能となるはずであった。しかしながら、流量計により調節したミスト状のフタル酸を曝露チャンバーへ流すまでの過程において、ミスト化が不完全であったため、また、テフロンチューブ内でフタル酸エステルが液化してトラップされていたために、曝露チャンバー内で安定したフタル酸エステルの濃度を得ることができなかったと考えられた。

そこで、フタル酸エステルをミスト状に保つために、発生装置から曝露チャンバーへの間に希釈器を取り付けた。この希釈器を取り付けることにより、チューブ内で冷却されることでミスト化されるフタル酸エステルが、空気と一気に混合されミスト化を促進することができるので安定したミスト状のフタル酸エステルを発生させることが出来る。実際に濃度を測定した結果、作業現場の許容濃度の2倍である10 mg/m³までの安定性を確認することが出来た。しかし、許容濃度の10倍である50 mg/m³の安定性の確認には至っておらず、今後更に改良を加えていく予定である。

E. 結論

フタル酸エステル類は、これまで内分泌攪乱作用、生殖毒性発達毒性等が報告されているが、経口投与、あるいはin vitroによるリスク評価であり、吸入曝露による影響についてはほとんど検討されていない。フタル酸エステル類は揮発性が低い、大気中に存在することが報告されているので、吸入曝露によるリスク評価を行い、毒性を解明することが不可欠である。

今年度は、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルをミスト状に低濃度で発生させるための発生器を作成し、その安定性を確認した。

参考文献

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Di-(2-ethylhexyl) Phthalate, Update. NTIS Publication Number PB/93/182400. Atlanta, GA.

研究要旨

フタル酸エステル類は、動物実験で、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。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ている。しかし、多くの報告は、経口摂取による影響であり、人での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ほとんどない。本研究では、揮発性の低いフタル酸エステルの発生を安定供給できる曝露装置を完成させ、現在、安定性を検討中である。今後、吸入曝露による生体への影響を検討することが可能となる。

Abstract

It has been reported phthalate esters(PAEs) have the potential of endocrine disrupting effect, reproductive toxicity, development toxicity and systemics toxicity in animal experiments. The adverse effects of PAEs on humans have been suspected because PAEs are found in many different environments. Most papers focused on the adverse effects of PAEs by oral dosing , not by inhalation which is more natural intaking for humans. In this study, we are aiming to make the exposure device which enables stable supply of low volatile PAEs. The stability of the device is still under consideration. This device will help us research the various effects of PAE inhalation on the living body in the future.

(5) TBTによるラット妊娠初期胚の着床不全に関わるメカニズムの解明

研究者 鈴木 勝士 (日本獣医畜産大学 教授)

研究要旨 塩化トリブチルスズ(TBT)0, 4, 8, 16mg/kg およびメチルメタンスルホン酸 50mg/kg をウイスターイマミチラット近交系の妊娠動物に妊娠0日から3日までの4日間強制経口投与し、着床前の胚に子宮内暴露を行い、分娩保育させて、生後6日までの出生児から肝臓と性腺由来のDNAを抽出し、20個のマイクロサテライトマーカーを用いて変異が生じるか否か検討した。その結果合計8個のマーカーにおいて、TBTとMMS投与群で、性腺由来のDNAに1/64~5/101程度の頻度で変異が検出された。MMS投与群では外表奇形が2/76で検出されたが、TBT群では奇形は検出されなかったため、これらの変異は劣性の突然変異であると結論された。母親、父親の肝臓、陰性対照群での肝臓と性腺からのDNAでは変異は検出されず、近交系として斉一な遺伝的背景をもっていることが確認された。今回性腺でのみ変異が検出された事に関して、その機序等は不明であるが、生殖細胞での劣性の突然変異が生じる可能性は否定できないと結論された。また、今回の結果から、従来知られていたTBTによる着床阻害には、初期胚の障害が関与している可能性があることが示唆された。

研究協力者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

鈴木浩悦	日本獣医畜産大学	獣医学部	講師
斉藤賢一	同上		助教授
竹中基郎	同上		大学院生
八木美央	同上		大学院生
千葉純子、大村 彰、佐々木哲、栗原孝宏、安斉有希子、 小山絵里子、甘粕晃平、椎名純子、小笠原慶			学部学生

A.研究目的

TBTについては、イボニシ類でのインポセックスが低用量で引き起こされること、ラットなどで妊娠初期の喪失(妊娠不成立)や妊娠中期暴露での口蓋裂の発生など、内分泌攪乱作用が疑われている。特にラットでの妊娠初期の悪影響は、母親に妊娠を準備させるための内分泌的環境が攪乱されるためなのか、胚の側で着床を母胎に知らせる胚表面のシグナル分子などの変化が生じるためなのか、依然として解明されていない。着床前の胚への影響があるとすれば、胞胚期の内細胞塊で何らかの変化があるはずであるが、着床不全の

ため追跡ができていない。着床不全の見られない最高用量で、表現型正常な胎児が得られているが、分娩後の情報が乏しい。多くの *in vitro* の実験では変異原性はないとされているが、貝類での変化には明らかに遺伝子発現に影響があることを示唆している。初期胚で仮に突然変異が起きて劣性であれば、胎児の表現型は正常であるので検出できない。遺伝子レベルで突然変異が検出できれば、着床不全のメカニズムが TBT による胚への影響に起因することになる。結果が陰性であれば、母体への影響に的を絞ることができる。

実験に用いるラットについては、背景遺伝子が均一な近交系を用いる。これはクローズドコロニーのラットを用いると、処置以前に含まれていた遺伝的不均一性と誘発された異常を区別できないからである。また、着床前の胚発生の期間はラットでは交配翌日（妊娠 0 日）から 3 日までの 4 日間に相当すると考えられるので、この期間に母親に強制経口投与する。誘発される可能性のある遺伝的異常については、各染色体に特異的なマイクロサテライトを用いて、PCR 増幅産物の電気泳動上、出現するバンドパターンの相違の有無として検出する。材料としては、処置母親を出産、保育させ、生後 6 日までの児動物の肝臓と性腺、および母親と父親の肝臓から抽出された DNA を用いる。

B. 研究方法

被験物質：

塩化トリブチルスズ（ ） 和光一級、Lot No. SEN340 を用いた（環境省 1 世代試験に用いた残りの剤を JANUS より分与）。純度 95%以上とされているが、化評研の分析値は 97.57%であった（JANUS よりの情報）。少量のエタノールで溶解し、局方ごま油（宮沢薬品株式会社）に溶解して投与液を調整した。

陰性対照には高用量群に含まれるのと同量のエタノールを含むごま油を用いた。

陽性対照にはメチルメタン sulfon 酸(MMS)（Shigma Chemical Co., St. Louis, MO: 純度 99%; Lot No. 50K3647）を用いた。

用量：

動物の体重 100 g あたり 1ml の投与液量とし、TBT 4、8、および 16mg/kg になるよう 3 種類の投与液を予め作成し、遮光保存した。MMS については 50mg/kg になるよう投与液を上述のごま油に溶解して調整保存した。妊娠 0 日から 3 日まで、当日の体重に基づいて投与量を決定し、強制経口投与を実施した。各動物について決められたゾンデと注射筒を投与に用いた。従って、用量群としては陰性対照(0mg/kg)、TBT 4 mg/kg、TBT8mg/kg、TBT16mg/kg および MMS50mg/kg の 5 群が設定され、各群 5 腹の妊娠動物で構成された。今回の TBT の用量設定には江馬らの報告を参考に、最高用量で若干の着床阻害が期待される用量として 16mg/kg を選んだ。

動物：

ウィスターイマミチラットの SPF 近交系を動物繁殖研究所から購入し実験に用いた。9 週齢の雌 50 匹と雄 10 匹を、12 日以上当教室の動物舎内に設置したラミナフローラック内に収容し検疫した。検疫期間中に雌の膣垢検査を継続し、検疫期間終了後に発情前期の雌と雄を 1 番同居させ、翌朝膣栓と膣垢中の精子の確認できたものを妊娠成立とし（妊娠 0 日）体重測定した上で各投与群に割り当てた。動物舎は温湿度および照明時間調節（温度 22 ± 1 、湿度 $55 \pm 1\%$ 、14L10D: 0800 on 2200 off）され、換気回数 10 回 / hr の空調施設で、クリーンコンベンショナルな環境に維持されている。基礎飼料には低植物エストロゲン飼料の NIH-07PLD フォーミュラ（オリエンタル酵母工業株式会社製）を用いた。妊娠の確認された動物はポリカーボネート製ケージに個別に収容され、床敷きには木屑（千葉アニマル資材）を用いた。

妊娠 18 日に動物をケージごと教室内に設置したラミナフローラックに移動し、分娩保育させた。急激な環境の変化等のために保育が芳しくなかったため、途中から動物舎内で分娩保育する方式に改めた。分娩 0 または 1 日に分娩児数、性別、体重を記録し、採材の実施される 6 日まで毎日観察を継続した。途中死亡した出生児、瀕死の出生児については発見後直ちに体重を測定するとともに、肝臓と性腺を無菌的に摘出し DNA 抽出の材料とした。母動物に関しても同日エーテル麻酔下で開腹し、後大静脈から採血後、肝臓を無菌的に摘出して一部を DNA 抽出の材料とした。その際、体長、尾長を記録し、陰核腺、卵巢、卵管、子宮、膀胱、副腎、脾臓、膵臓、腎臓、顎下腺、舌下腺、外涙腺、胸腺、甲状腺、心臓、肺、脳、下垂体、腓腹筋、眼球、および腎周囲脂肪を摘出秤量し、併せて子宮の着床痕数を記録した。雄については、雌および児動物からの採材終了後、上記の雌性生殖器を除く臓器と雄性生殖器（精巣、精巣上体、精管、精管腺、精囊、凝固腺、前立腺、カウパー氏腺、尿道球、肛門拳筋、包皮腺、陰茎）を摘出秤量した。

最初の交配は 2002 年 10 月 31 日、最終的な雌動物と児動物の採材は同年 12 月 8 日に実施された。

DNA 抽出用の臓器は個別に番号が付けられ、液体窒素中で凍結ののち、抽出まで -80 で保存された。

DNA の抽出：

最終的に DNA は以下の表に示すサンプルからフェノール法により抽出された。

サンプル内訳						
	0	4	8	16	MMS50	
母親	4	5	5	6	5	25
父親						9
子肝臓						
雄	16	15	20	30	18	99
雌	9	17	22	21	18	87
子生殖腺						
雄	15	13	20	30	23	101
雌	7	13	13	16	15	64
合計						385

マイクロサテライトマーカー：

ラットの常染色体 20 組について、各染色体について、既知のマイクロサテライトマーカーをランダムに 1 組選び、抽出した DNA を用いて、各プライマーにより PCR 増幅し、アクリルアミドゲル電気泳動により増幅された DNA を泳動し、泳動パターンを分析した。

以下に用いたマイクロサテライト一覧を示す。

1 番染色体：D1Mgh6	11 番染色体：D11Mgh3
2 番染色体：D2Mgh2	12 番染色体：D12Mit2
3 番染色体：D3Mgh3	13 番染色体：D13Mgh5
4 番染色体：D4Mgh14	14 番染色体：D14Mgh2
5 番染色体：D5Mgh4	15 番染色体：D15Mgh2
6 番染色体：D6Mgh6	16 番染色体：D16Mgh2
7 番染色体：D7Mgh7	17 番染色体：D17Mgh3
8 番染色体：D8Mgh1	18 番染色体：D18Mgh1
9 番染色体：D9Mit2	19 番染色体：Eta
10 番染色体：D10Mgh3	20 番染色体：D20Mgh2

統計学：

群間の平均値の比較に際しては、Student の t 検定を用い、有意水準を $p < 0.05$ とした。

(倫理面への配慮)

動物に関しては、動物愛護の精神に則り、無用な苦痛を与えることなく飼育、サクリファイスを実施するものとする。また、投与中の環境暴露と人員の暴露を避けるため、オールフレッシュエア-空調で陽圧の動物舎(準 SPF 環境)のなかでラミナフローラックの内部を陰圧に設定して動物を飼育する。

C. 研究結果

妊娠動物の体重に及ぼす TBT および MMS 妊娠初期投与の影響

各群の妊娠動物の体重変化は以下の表 1 に示されている。いずれの投与群においても対照群の各妊娠日の体重との間に有意差は認められなかった。

表1 妊娠動物の体重変化

		交配日	妊娠0日	1日	2日	3日	7日	11日	14日	21日
control (5)	平均	254.6	258.0	260.2	265.0	267.8	297.5	315.0	333.4	423.5
	SD	16.0	8.3	10.8	9.7	8.4	2.1	4.2	7.8	24.7
TBT4mg/kg (5)	平均	254.6	261.6	261.6	267.2	270.4	288.7	311.8	331.5	418.4
	SD	16.3	11.2	13.5	11.6	12.3	9.7	8.2	7.8	15.3
TBT8mg/kg (5)	平均	254.0	258.3	261.8	259.2	262.0	286.3	312.3	327.0	418.0
	SD	16.4	10.7	12.1	13.3	11.1	9.3	8.7	17.4	20.3
TBT16mg/kg (6)	平均	250.8	251.5	249.2	249.0	249.8	269.8	295.0	318.7	406.8
	SD	13.6	16.4	17.2	20.2	20.8	19.6	14.7	15.3	13.2
MMS50mg/kg (5)	平均	253.0	257.4	258.6	262.6	264.4	287.0	302.4	322.8	387.8
	SD	11.0	12.9	12.3	13.6	12.4	7.8	13.0	10.9	42.8

()内は腹数

TBT および MMS の出生児数、出生児体重および外表奇形出現に及ぼす影響

TBT および MMS は、以下の表 2 に示すように、用いられた用量の範囲では出生児数に統計学的に有意な低下を生じなかった。TBT に関しては一見用量に相関した出生児数の低下があるように見えるが、腹数が少なかったことと、今回妊娠黄体数が調べられていないことから、過去の報告に見られるような着床阻害に関しては情報が得られなかった。TBT 処置群では、16mg/kg 群の雄で有意な体重の高値が認められた以外、いずれの群でも出生時体重は対照群と差がなかった。MMS50mg/kg 群の出生児体重も対照群との間に差を示さなかった。

TBT 投与群では全ての出生児が外観では異常を示さず、過去の報告を再現した。MMS 投与群では 76 例の出生児のうち 2 例が奇形であった（頭部の異常 1 例、無尾 1 例）。

今回の報告では母動物の最終解剖成績は参考データとして巻末に示し、投与には関係の無かった雄親の解剖データについては割愛する。

表2 TBT 0, 4, 8, 16mg/kg および MMS 50mg/kg 投与群の出生児数と出生時体重並びに外貌異常

	0mg/kg (5)	TBT4mg/kg (5)	TBT8mg/kg (5)	TBT16mg/kg (6)	MMS 50mg/kg (6)
産児数	16.60 ± 1.67	16.00 ± 1.41	15.20 ± 1.79	14.83 ± 1.47	15.20 ± 2.05
着床痕	17.00 ± 0.82	16.80 ± 0.84	15.80 ± 2.28	15.80 ± 2.28	16.00 ± 2.24
出生児体重					
雌 (g)	5.24 ± 0.33	5.3 ± 0.80	5.66 ± 0.37	5.67 ± 0.34	5.54 ± 0.28
雄 (g)	5.66 ± 0.34	5.67 ± 0.46	5.99 ± 0.12	6.15 ± 0.19 *	5.88 ± 0.18
外表奇形	0/83	0/80	0/76	0/89	2/76

*:t検定により対照群との間にP<0.05で有意差

()内は腹数

外表奇形の頻度は総出生児数あたりの出現数

マイクロサテライトマーカー泳動パターンにおける変異の検出

以下の表に示されるように、20種類のマイクロサテライトマーカーのうち8種類のマーカーで泳動パターンに異常が認められた。陰性対照群では、母親、父親、児動物の肝臓、性腺のいずれのサンプルでも各マイクロサテライトマーカーに特有の斉一なパターンが観察され、近交系動物の特徴を示した。TBT のみに変異が認められたのは、5、6、9、17 および 20 番染色体上の 5 種類のマーカーであり、MMS のみに変異が認められたのは 7 および 11 番染色体上の 2 種類のマーカーであり、TBT と MMS の両方で変異が認められたのは 2 番染色体上のマーカーであった。

変異が認められたサンプルは性腺由来の DNA に限られており、20 番染色体上のマーカーの場合には TBT4、8、16mg/kg 群の順に雄雌を合計した変異の頻度は、1/33、1/33 および 5/46 であり、高用量ほど変異を示す個体数が多かった。

児動物の肝臓に関しては、調べられた全てのマイクロサテライトマーカーについて変異は検出されなかった。

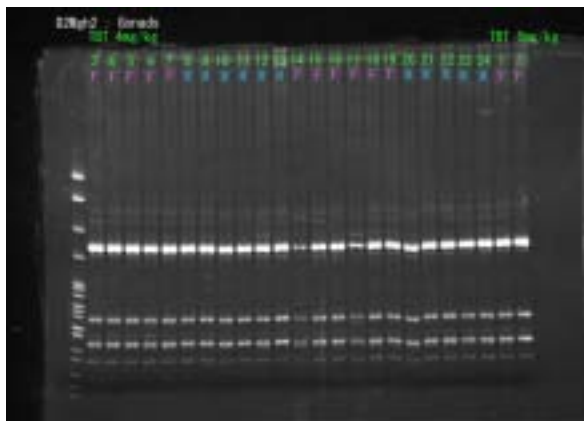
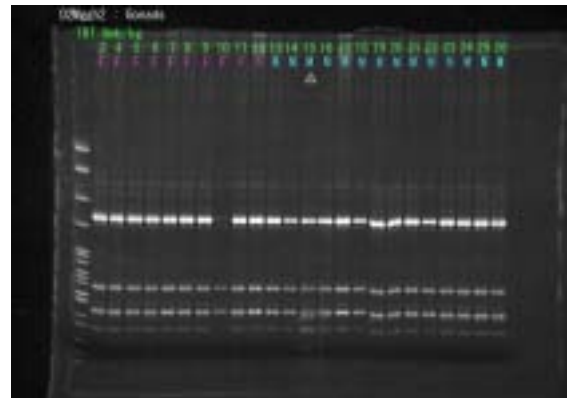
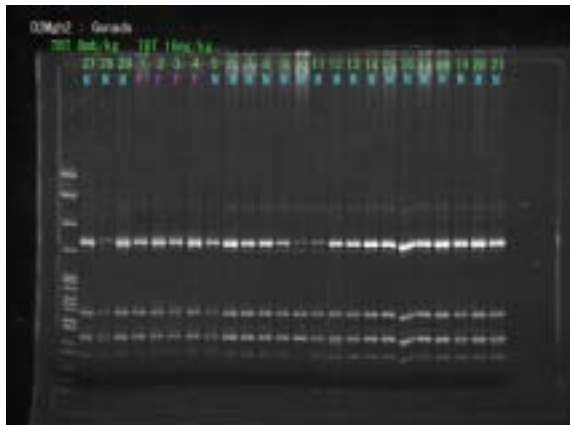
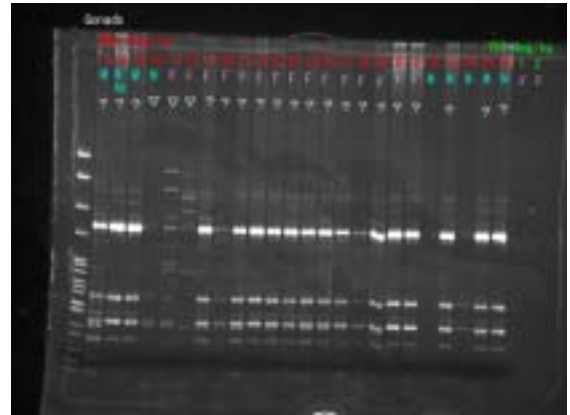
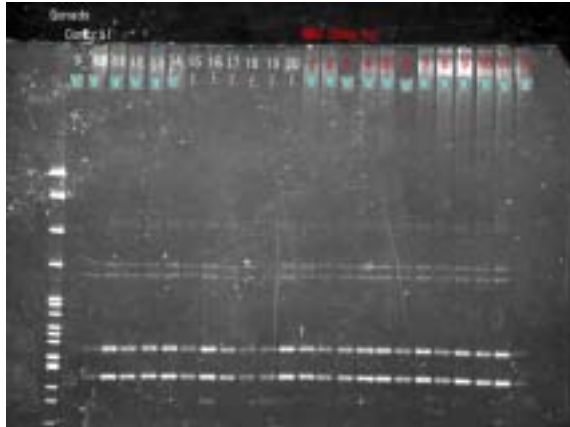
表 変異の検出された染色体と変異の出現率

染色体	用量	母	父	雄子肝臓	雄子生殖腺	雌子肝臓	雌子生殖腺
2	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	1//20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	1//23	0/18	2//15
	total	0/25	0/9	0/99	2/101	0/87	2/64
5	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	1//13
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	1//30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	0/101	0/87	1/64
6	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/20	0/17	1//23
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	0/101	0/87	1/64
7	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	1//23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	1/101	0/87	0/64
9	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	1//20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	1/101	0/87	0/64
11	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	1//15
	total	0/25	0/9	0/99	0/101	0/87	1/64
17	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	1//13
	16	0/6		0/30	1//30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	1/101	0/87	1/64
20	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/20	0/17	1//13
	8	0/5		0/20	1//20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	5//30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	6/101	0/87	1/64

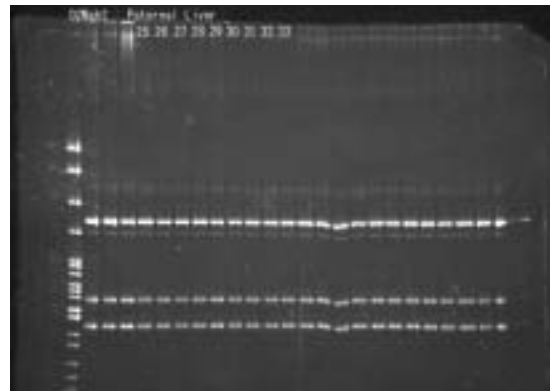
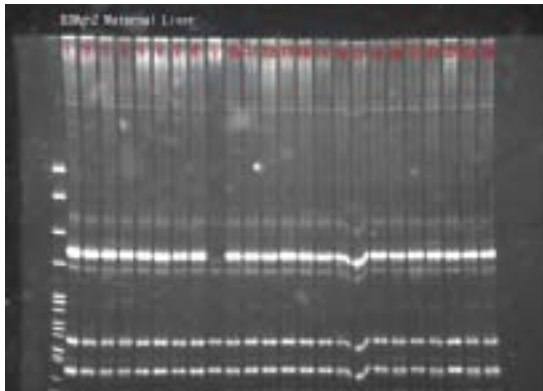
全ての電気泳動の像を示すのは煩雑になるので、本報告では TBT と MMS の両方に変異が認められた 2 番染色体上のマーカーについて例示することとする。図中、タイトルとしてサンプリングした臓器を示し、母親と父親に関しては肝臓の結果のみ、また各レーンの

上に各群での個体ナンバーを、その下に雌雄の別を示し、さらにその下に下向きの白で変異した個体を識別してある。一部の図に？が付されているのは、変異の可能性がないわけではないが、泳動条件が若干他のものと異なったため一見異常に見えるだけと判定された事例である。

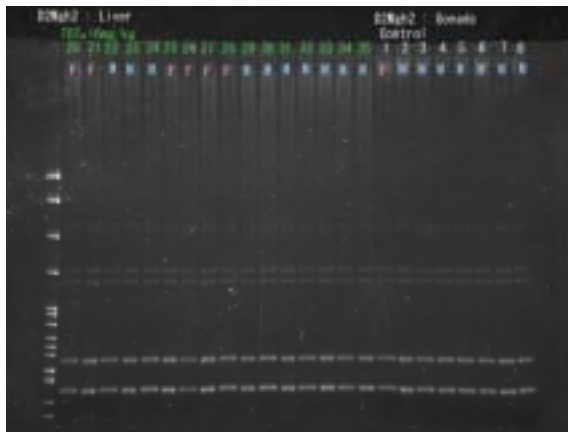
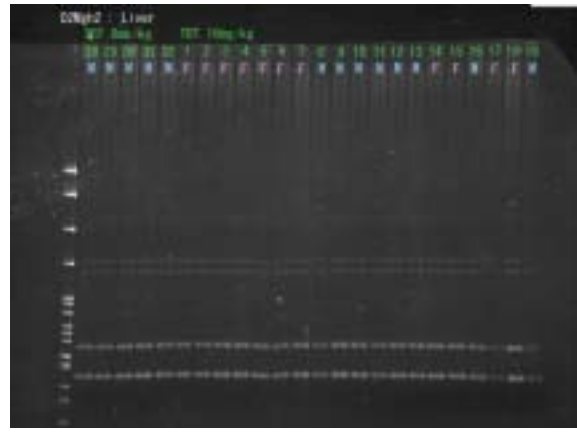
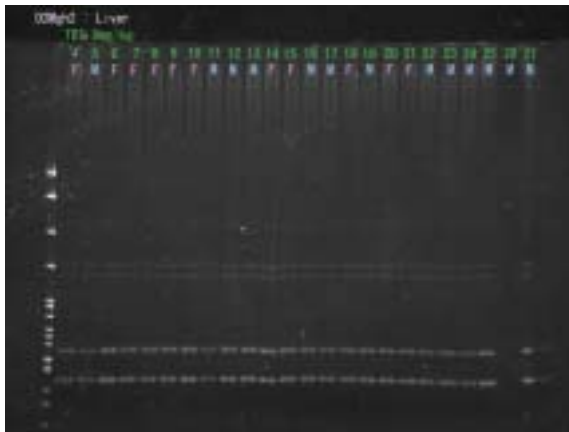
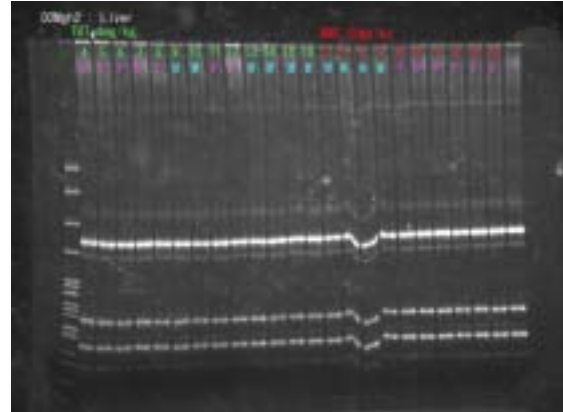
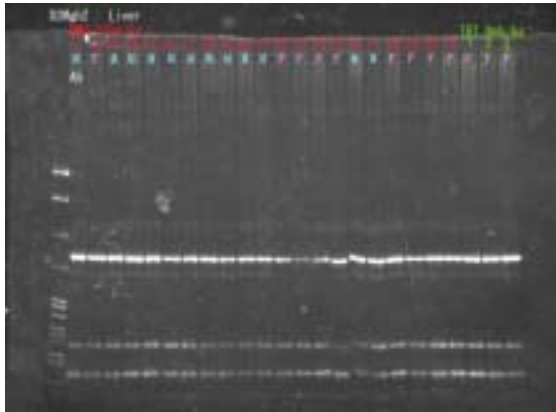
マイクロサテライトマーカー-D2Mgh2 を用いて検出された泳動パターンの多型（変異）



マイクロサテライトマーカー-D2Mgh2 を用いて検出された母親と父親の肝臓からの DNA サンプルにおける泳動パターン



マイクロサテライトマーカー-D2Mgh2を用いて検出されたF1児動物の肝臓からのDNAサンプルにおける電気泳動パターン



D.考察

TBT には、ミュール貝の胚において高率に姉妹染色体分体交換を引き起こすという報告以外に現存する変異原検出系で陽性の報告は存在していない。その意味で、今回得られた妊娠初期胚での母体経由での暴露が、胎児の外観に何ら影響を及ぼさないのに胎児の性腺で突然変異を生じるという成績はにわかには信じがたい。陽性対照として用いた MMS では、妊娠初期投与による影響は知られていないが、今回の実験では、変異原物質に時に見られる重篤な体軸形成に関わる異常が検出された。また、MMS 投与群でも TBS と同様な変異が生殖腺でのみ検出され、かつ D2Mgh2 の場合には、個体によってバンドパターンが異なっており、この物質が至るところで DNA メチル化を引き起こしていると考えられるので、同一のマイクロサテライト座で異なる変異が生じても不思議はないと考えられる。全体として今回のデータが何らかのアーティファクトではないことは、陰性対照での全ての検体においていずれのマイクロサテライトマーカーについても変異が検出できなかったと言う事実によって担保されている。

今回投与された妊娠時期は、受精後着床する前までの初期胚の発生期に相当する。着床前の胚盤胞の段階では、胚は内部細胞塊という一種の多能性の幹細胞の集合を形成している。古典的な催奇形性の学説では、この時期に何らかの外因の感作を受けた場合、悪影響が著しい場合には胚は死亡し影響を見ることができない、あるいは影響が内部細胞塊の一部であった場合にはその細胞が死んでも、他の細胞がその部分を置換するのでやはり影響を見ることができないとされていた。比較的最近になって、原腸胚期にメチルニトロソウレアなどの強い変異原、レチノイン酸等の影響を受けると、最大約 30%の胎児に重篤な体軸形成異常、顔面形成異常、浮腫などを伴う奇形が生じることが知られるようになった。しかし、これらの研究では、表現型正常だった同腹児については形態学的に異常がないとしか記載されておらず、分娩させてその後の発生、成長がどのような経緯をたどるのか全く知られていない。少なくとも今回の実験の内 MMS で見られた外表奇形は、上述の変異原の範疇で生じる奇形であると考えられる。このことは、妊娠 0 日から 3 日迄の MMS が何らかの影響を初期胚に与えたことを意味しており、同時期に投与された TBT も胚に達していたことを裏付けるものである。

今回得られた突然変異の検出率は、その他の in vivo での検出系での検出率が 10000 匹に数匹と言った低頻度でしかないのに比べると、極めて高い。マイクロサテライトはイントロンに存在する無意味な遺伝子配列である。今回検出された突然変異がどのような機序で、どのようなタイプの突然変異なのかについては今回は明らかになっておらず、今後の検討課題である。突然変異の起こる頻度についても各染色体に 1 つのマーカーしか用いていないので、より多数のマーカーを用いてより正確にその発生頻度を推計する必要がある。MMS についてはランダムヒットのメチル化が変異原作用の本体であるとされているが、TBT についてはミュール貝での SCE の頻度上昇から、何らかの機序で染色体と相互作用がある可能性はあるが、哺乳動物で波実証されていない。特定の DNA 配列に親和性があるのか否かなどの問題も未知のままである。したがって、実際の機能的な遺伝子にどの程度に影響を及ぼすのかについて、現時点では正確な推論はできない。

今回検出された突然変異は、TBT と MMS で妊娠初期に処置された出生児の卵巣と精巣

から採集された DNA でのみ検出され、体細胞の代表である肝臓からの DNA では検出されなかった。これらの体細胞由来の DNA のマイクロサテライトパターンは、親のパターンと変わらず、基本的に遺伝的な背景が斉一な近交系の特徴を良く表していた。出生児の性腺には体細胞と生殖細胞が混在しており、今回はそれらを分離できていないので、検出された変異が、体細胞で起きたのか、生殖細胞で起きたのかは確定できない。肝臓では変異が検出できなかったことを考えると生殖腺の体細胞にも変異は無かった可能性もあり、生殖細胞での突然変異が生じた可能性を否定できない。また、今回の実験で生じた突然変異は、TBT の場合には出生児の外見に異常を生じていないと考えられるところから、劣性の突然変異であると考えられる。マイクロサテライトマーカ－周辺のみが TBT に感受性がある可能性も否定できない。これらの可能性については、近交系動物に妊娠初期投与して F1 を得て、それらを兄妹交配して F3 まで追跡すれば、その変異についてのホモ接合体を得ることができるので、実際にどのような変異が生じたのかを検証することができる。こうした試みは全くされたことがないので、生殖細胞に劣性突然変が生じる、すなわち遺伝性の突然変異が生じる可能性があるとしても、現時点では断定できない。これらの機序が実際に存在するとすれば、人間で数千種類あることが知られている遺伝性疾患の生じた過程のひとつに何らかの化学物質に起因するものがあることを意味することになる。

今回の実験が生殖細胞での突然変異を否定できないとすると、このことは、胚盤胞の段階で既に生殖細胞系列に分化する細胞の運命決定がされていることを示唆することになる。我々は既に発生学的には相同な時期の鶏胚がエストロゲン、ビスフェノール A、電磁波によって重篤な体軸形成異常を含む発生かく乱を受けることを実証している。今回の成績は機序は不明ではあるが、ほ乳類の初期胚において性腺を構成する細胞で突然変異が生じることを示しており、初期胚がこうした外因性の作因に著しく無防備である可能性を示唆している。比較的高濃度の TBT の妊娠初期投与によって着床阻害、あるいは着床前の胚喪失がおこることについて、胚に対する影響なのか、母体に対する影響なのかについて、決着がついていない。今回の成績は、TBT の高濃度で初期胚に何らかの悪影響を及ぼす可能性があることを示唆している。

従来、催奇形性試験では排卵数（妊娠黄体数）から着床数を差し引き、それらを着床前の杯喪失と表現してきた。この実体は実際には不明である。人間でのこうした初期胚の喪失は極めて高いとの報告もあり、今後初期胚に対する化学物質の悪影響について、より詳細な調査と研究をする必要があることが今回の実験により明らかになったと言えよう。

E. 結論

TBT がラットの初期胚に対して、貝類で報告されているような何らかの突然変異を誘発する可能性を示すのであれば、初期胚の着床不全が胚の側におきた悪影響に起因するとの結論が得られるとの仮説を立てて、妊娠初期ラットに TBT を投与し、分娩させた後生後 6 日までの保育児について肝臓と性腺を無菌的に摘出し、常法により DNA を抽出し、20 個の染色体の代表的なマイクロサテライトマーカ－をそれぞれ 1 つ選択して増幅し、多型が生じるか否かを調べたところ、この仮説をサポートするような研究成果が得られた。

付表1 母親の臓器重量(分娩後6日で解剖)

	Control (5)	TBT 4m g/kg (5)	TBT 8m g/kg (5)	TBT 16m g/kg (6)	MMS 50m g/kg (5)
体重(g)	274.9 ± 41.0	283.7 ± 30.2	283.4 ± 22.1	269.7 ± 45.3	288.2 ± 35.7
体長(cm)	21.0 ± 1.0	21.3 ± 1.6	21.2 ± 0.5	21.7 ± 1.6	21.2 ± 0.6
尾長(cm)	16.4 ± 1.0	16.9 ± 0.2	16.7 ± 0.6	18.2 ± 4.3	16.4 ± 1.3
陰核腺(mg)	107.1 ± 15.2	108.1 ± 10.5	95.9 ± 14.8	127.8 ± 26.4	105.4 ± 27.9
卵巢(mg)	125.8 ± 6.9	119.6 ± 10.8	116.0 ± 4.3	115.1 ± 9.3	100.7 ± 11.7
卵管(mg)	23.5 ± 1.4	21.5 ± 3.8	20.9 ± 5.3	27.7 ± 4.4	21.7 ± 3.9
子宮(mg)	677.0 ± 408.9	438.8 ± 63.0	473.8 ± 98.3	487.7 ± 156.2	337.0 ± 82.2
膀胱(mg)	122.7 ± 14.7	130.0 ± 11.1	126.9 ± 10.6	120.6 ± 7.7	106.1 ± 21.2
副腎(mg)	85.4 ± 9.7	88.1 ± 9.3	83.3 ± 13.4	93.9 ± 6.7	84.5 ± 7.3
脾臓(mg)	1088.1 ± 329.0	1000.9 ± 149.8	997.0 ± 39.7	992.8 ± 123.7	1074.4 ± 159.9
膵臓(mg)	884.4 ± 155.0	1229.1 ± 276.7	1096.0 ± 197.4	1086.7 ± 362.7	990.8 ± 179.9
腎臓(mg)	2051.9 ± 184.7	2072.7 ± 196.6	2151.5 ± 162.2	2046.4 ± 154.6	2083.7 ± 124.8
顎下腺(mg)	503.4 ± 36.3	522.4 ± 25.9	527.6 ± 35.7	527.9 ± 27.0	507.9 ± 32.1
舌下腺(mg)	111.6 ± 29.3	101.4 ± 28.6	108.3 ± 9.5	132.2 ± 20.8	108.1 ± 22.9
外涙腺(mg)	199.6 ± 44.9	205.2 ± 34.0	209.7 ± 24.6	259.4 ± 51.8	199.1 ± 18.6
胸腺(mg)	272.6 ± 47.8	253.5 ± 24.4	281.5 ± 37.4	264.8 ± 57.8	287.4 ± 47.5
甲状腺(mg)	23.5 ± 2.8	25.8 ± 1.7	21.6 ± 5.0	25.9 ± 5.2	21.5 ± 4.3
心臓(mg)	920.8 ± 66.6	972.0 ± 98.3	952.2 ± 94.8	916.3 ± 58.2	835.7 ± 37.7
肺(mg)	1178.8 ± 197.1	1286.1 ± 156.3	1177.3 ± 62.6	1278.6 ± 136.3	1289.6 ± 208.9
脳(mg)	1784.7 ± 69.4	1759.1 ± 91.6	1812.0 ± 49.5	1846.2 ± 64.4	1749.9 ± 88.1
下垂体(mg)	10.6 ± 2.8	10.5 ± 1.2	10.6 ± 2.6	12.6 ± 1.5	9.4 ± 2.6
腓腹筋(mg)	1513.0 ± 70.6	1514.0 ± 288.0	1583.7 ± 83.9	1538.6 ± 127.2	1377.3 ± 187.7
眼球(mg)	257.7 ± 8.6	247.0 ± 31.7	239.4 ± 21.9	257.3 ± 18.3	237.3 ± 32.4
腎周囲脂肪(mg)	3447.1 ± 564.1	3301.5 ± 297.1	3362.2 ± 431.0	3068.9 ± 620.1	3267.9 ± 308.4
着床痕	17.0 ± 0.8	16.8 ± 0.8	15.8 ± 2.3	15.8 ± 2.3	16.0 ± 2.2

()内は腹数

着色した部分是对照群との間に有意差(p<0.05)

Studies on mechanisms of implantation loss induced by TBT treatment during early pregnancy in rats

Katsushi Suzuki, Professor, Nippon Veterinary and Animal Science University

Key word:

TBT, implantation loss, embryo toxicity, mutagenesis, MMS, rat

Abstract:

Tributyl tin chloride (TBT) was administered orally to pregnant rats at 0, 4, 8 or 16mg/kg/day for 4 days from day 0 to 3 of pregnancy to allow the preimplantation embryos to be exposed to TBT. As the positive control, methyl methane sulfonate at 50mg/kg/day was similarly treated to the pregnant rats. In order to warrant genetical homogeneity, inbred strain of Wistar Imamichi rat were used in this experiment. Mother rats were allowed to deliver the pups and nurse them by 6 days after parturition. On the day, the animals were sacrificed and the liver and gonad (testis for male and ovary for female) were excised for DNA extraction. Extracted DNA was amplified according to selected micro-satellite markers by PCR and possible variation in the marker pattern was checked. Twenty microsatellite markers were selected. Of these, 8 markers showed some degree of variations in DNA extracted from the gonads in TBT and MMS treated groups. The frequency was around 1/64 to 5/101. Two external malformations were detected in 76 pups in MMS treated group, although no abnormality was observed in TBT treated groups. Therefore, the variation in microsatellite patterns in TBT group was concluded to be recessive mutation. DNA samples from dam and sire rats, and those from negative control did not show any variations in the pattern of microsatellite markers examined, indicating homogeneous genetical back ground of the inbred strain of the rat. The fact that the variations were detected only in the DNA from the gonad could not omit the possibility that recessive mutation would occur in the germ cells, although the exact mechanisms was not known. The present result would also suggest that a known effect of TBT, the implantation loss may result from TBT's adverse effects on early embryos.

-4. 指定研究結果の評価

-3. 指定研究結果報告について内分泌攪乱化学物質等研究推進専門委員会の委員による評価を行った。

-5. 公募研究の実施

以下に定める委員からなる専門委員会を設置し、公募研究の募集を行い研究課題の選定（1回開催）と研究成果の確認（1回開催）を行った。

-5-1. 内分泌攪乱化学物質等研究推進専門委員会名簿

委員長 高杉 暹（横浜市教育委員会委員長）

委員 有蘭 孝司（熊本県立大学教授）

井口 泰泉（岡崎国立共同研究機構教授）

近藤 健文（慶應義塾大学医学部教授）

堤 治（東京大学教授）

長濱 嘉孝（岡崎国立共同研究機構教授）

（行政側は、臨時委員とした。）

-5-2. 公募採択結果

募集要領により公募研究の募集を行った結果、18課題の応募があり、内分泌攪乱化学物質等研究推進専門委員会にて研究課題の選定を行った結果、下記の4課題について採用した。

（1）内分泌攪乱化学物質のアンタゴニスト活性の評価とその作用メカニズムに関する研究

（2）化学物質のエストロゲン様作用における種間差の解明に関する研究

（3）エストロゲン様物質暴露によるメダカ精巣卵発現の精子形成に及ぼす影響の解明

（4）脳及び生殖腺の性分化に対する内分泌攪乱作用評価法に関する研究