

D2Mgh2肝臟

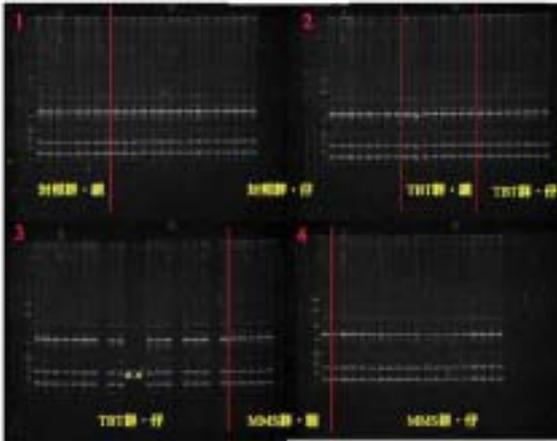


圖7

D2Mgh2精巢

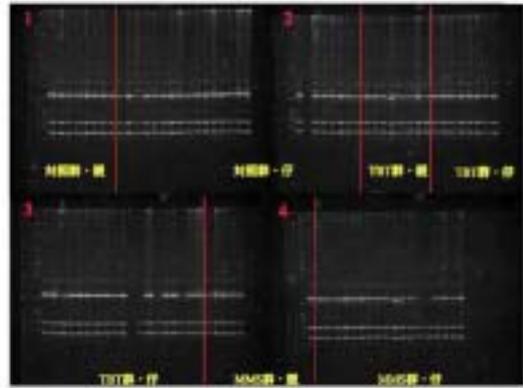


圖8

D5Mgh4肝臟

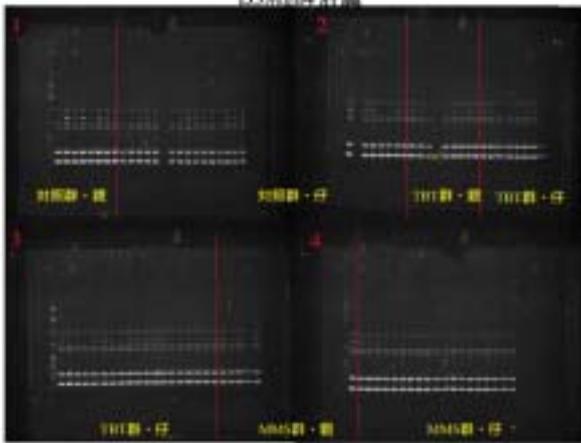


圖9

D5Mgh4精巢

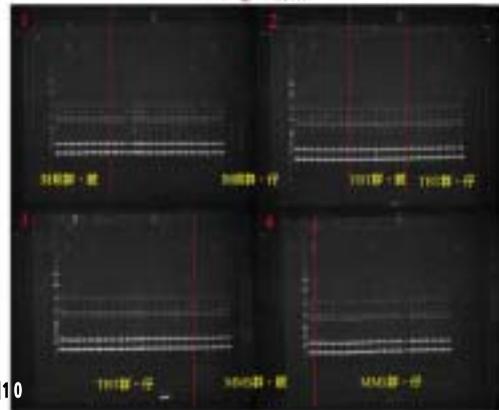


圖10

D6Mgh6肝臟

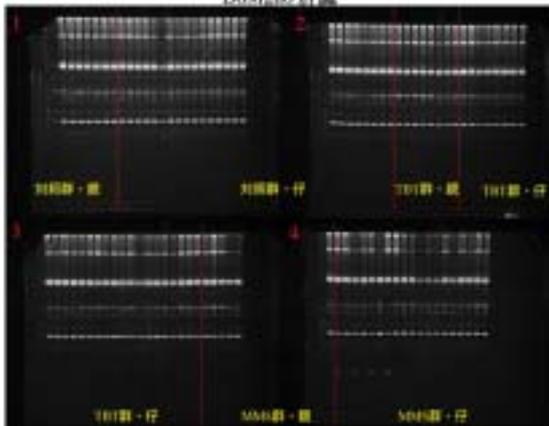
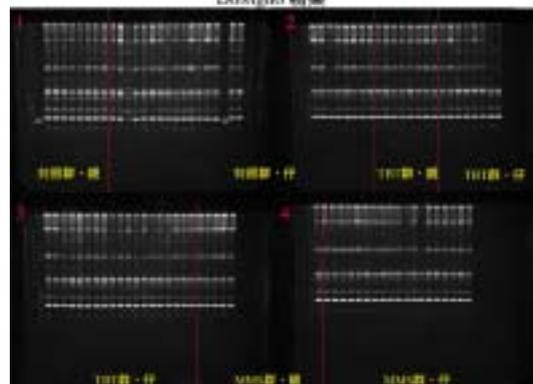


圖11

D6Mgh6精巢



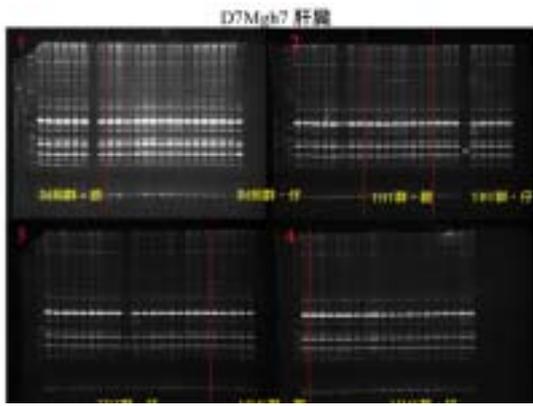


圖 13

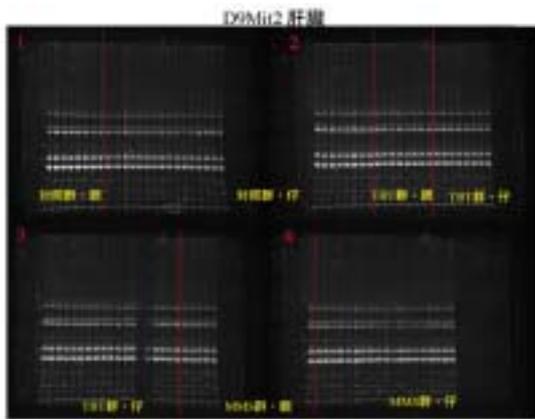
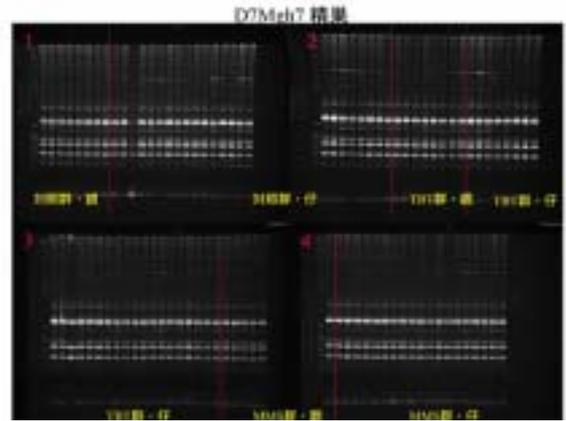


圖 15

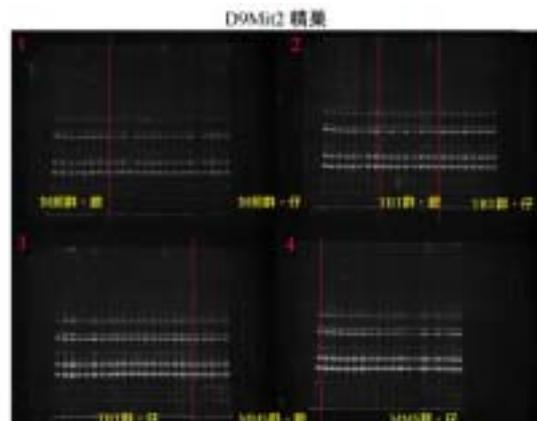


圖 16

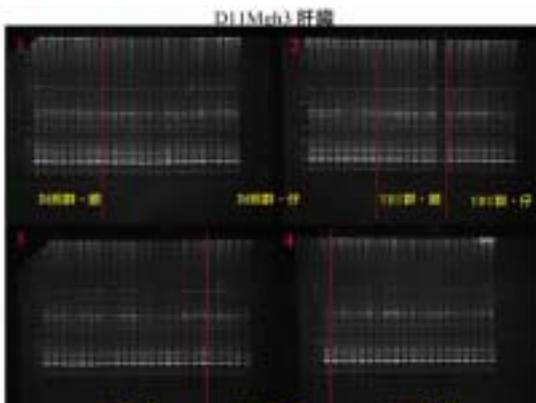


圖 17

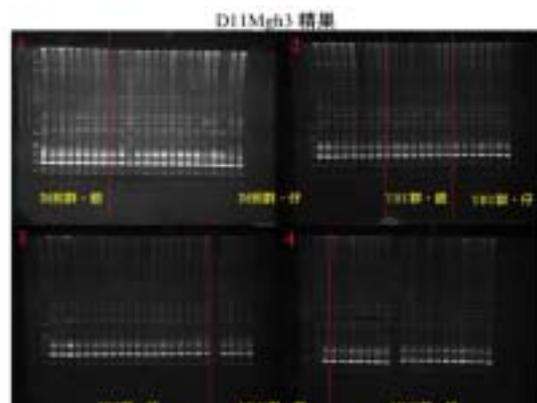


圖 18

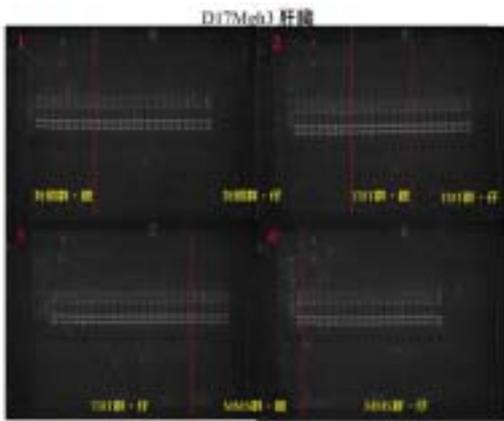


図19

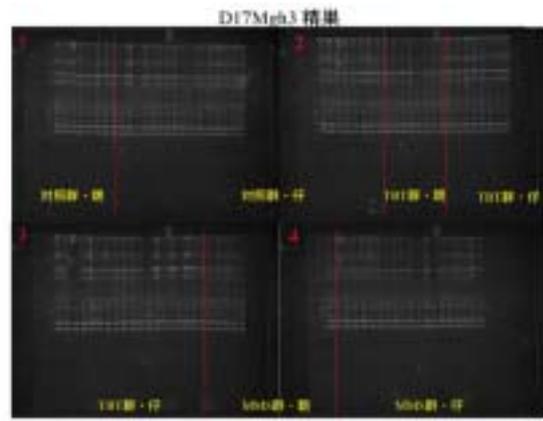


図20

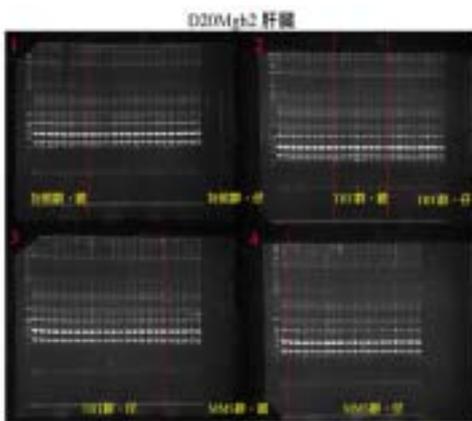


図21

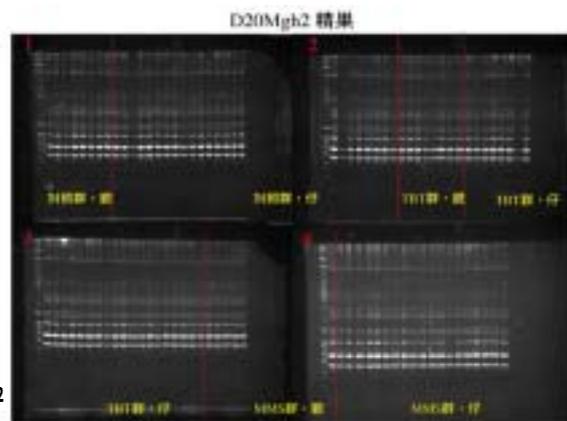


図22

全体として、今年度採取した DNA については、昨年「変異」が検出された 8 種類のマイクロサテライトマーカを用いて増幅したところ、TBT 投与群、MMS 投与群の肝臓および性腺の DNA に「変異」の認められたものは無かった。一部、サンプルに増幅がうまくいかなかったものがあり、それらについては再度 PCR と電気泳動を実施する必要がある。

D . 考察

TBT には、ミユ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、昨年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、昨年の実験では、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。その際、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いた。この物質はアルキル化剤であり至るところで 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。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についても変異が検出できなかったことから、昨年得られた泳動パターンの変異が何

らかの DNA の修飾を意味している可能性を否定できない。しかし、体細胞系列だけのサンプルではそうした変異が検出されず、生殖細胞を含む臓器でそのような変異が検出されたこと、総体的に見て、仮に DNA 塩基配列の変化というような変異が起きているとすれば、変異の起こる頻度が高すぎる印象があることなど結論には慎重さが必要である。

今回 TBT および MMS の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。少なくとも昨年の実験の内 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 も胚に達していたとしても不思議ではないことを裏付けるものである。

昨年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、極めて高かった。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。本来繰り返し回数などに多型が存在し、個体ごとに保存されているとされているが、PCR で増幅した場合、個体内でも複数のバンドが電気泳動で確認されるのがふつうである。本来の塩基数に相当するバンド以外のバンドが何らかの高次構造の変化によって移動度が変わっているとの指摘もあり、バンドパターンの変動が示されたサンプルについては詳細な検討が必要である。昨年得られたゲノムと今回得られたサンプルについて増幅、泳動等の条件設定と、父親、母親、子供に関して垂直的な伝搬に関連した分析を行う必要がある。

昨年度のサンプルについて、慎重にデータを吟味して、PCR 増幅産物の電気泳動像に対照のパターンと異なるものがなぜ現れたのか、真にそれは TBT または MMS の妊娠初期投与によって、胚に生じた突然変異を反映しているのか否か検討した。8 種類のマイクロサテライトマーカーが昨年「変異」を示した。これらのすべてのサンプルについて、慎重に再増幅し、電気泳動によって分析したところ、D9Mgh2 と D20Mgh2 以外のマーカーではいずれも「変異」は再現せず、対照と同様なバンドパターンを示した。D9Mgh2 と D20Mgh2 の事例では、昨年の「変異」パターンをすべての個体ではないが、一部の個体でそのパターンを再現した。その個体のデータをさかのぼると、生後 1 日で死亡したものであることが判明した。抽出が良好に行われていない可能性があるとして、吸光度分析をした結果、生後 6 日の事例より高い吸光度であることが判明した。6 日齢と同じ希釈条件で抽出を行った結果、塩類が相対的に多くなった可能性があると考え、脱塩処理をして吸光度分析をしたところ、どの波長でもほぼ同じ程度に吸光度が減少したため、何らかの塩類が混入したと考えられた。脱塩処理をほどこして DNA 増幅を行い、電気泳動を行うと

大部分のサンプルで対照と同じ泳動パターンを生じた。また、メインバンド以外に高分子領域に複数のバンドが生じる点について、メインバンド、その他のバンドを切り取って DNA を抽出し、2nd PCR により増幅すると、単一のメインバンドから、切り取る前に存在していたのと同じ複数のバンドが生じた。これらの複数のバンドはなぜか同じ分子量の部分に出現するが、メインバンドと同等のものであると考えられた。「変異」を起こしたバンドと当初考えられていたバンドは、この場合メインバンドの増幅では生じなかったため、特異的な配列を反映する可能性は完全には排除できなかったものの、実際に生じたバンドの濃さはきわめて薄く、そうした特異的な「変異」に相当する配列が実在する確率はきわめて低いと判定された。一方で、高分子バンドの一部からもメジャーバンドが増幅されたため、この高分子バンドはメジャーバンド由来であろうと推測された。高分子バンドから高分子バンドが増幅される場合増強される傾向があったが、その理由は明らかにはならなかった。

生後 10 日齢でのサンプルを用いたところ、対照とのバンドパターンの比較が確実に実施できると考えられたので、今年度得られた約 100 サンプルについて 8 種類のマーカーを用いて増幅産物の泳動パターンを分析した。今年度のサンプルについては「変異」と考えられる泳動パターンは得られなかった。父親と母親、児動物の肝臓と性腺から抽出された DNA から増幅された産物の電気泳動パターンはそれぞれのマーカーで特異的かつ同一のパターンを示し、用いた動物が近交系であることを裏付けていた。

昨年、仮に生殖細胞で劣性の突然変異が生じた場合を想定して、F3 まで兄妹交配で追跡する必要性を提唱した。すなわち、今年の電気泳動パターンの変化が DNA 塩基配列に関する何らかの突然変異を反映していると仮定すると、TBT の場合には出生児の外見に異常を生じていないため、その変異は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ー周辺のみが TBT に感受性がある可能性も否定できず、その場合には機能的な異常は伴わない可能性もある。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ることがないので、生殖細胞に劣性突然変異が生じる、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。これらの可能性については、TBT などの文献上さほど変異原性が強くないと考えられる化合物を用いて実験するよりは、別の変異原性が知られている環境物質をもちいて実験する方が検出される可能性が高いと考えられる。TBT については、現在保有しているゲノムサンプルと新規に採材したサンプルで慎重に検討した上でそのような実験の必要性について判断すればよいと考えられる。

この実験系が生殖細胞での劣性の突然変異を検出できる可能性がもう少し強く示唆されると、発生学的には、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など興味深い知見を提供することになると考えられる。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。それらが生殖細胞系列のどのような影響を及ぼすのか不明であるが、ポディプランに関わる遺伝子の発現異常があることは、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。生命が絶たれるほど重篤な異常や優性の異常の場合にはその変異が起きた個体が死亡することによって、その変異が失われるのでポピュレーションに大きな影響は生じないと考えられる。マイナーで劣性の変異については世代を経て発現することになるので、当面影響がないように見えても長い目で見ればかえって集団に及ぼす影響は大きいことになる。このような悪影響について効率的に検出できる実験系が必要とされるゆえんである。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や物理的要因の悪影響について、より詳細な調査と研究をする必要があると考えられる。

本来、この実験は TBT の初期胚に対する着床不全を起こすという影響が、TBT が胚に対して作用し致死なりその他の悪影響を起こすために生じるのか、母胎に対して着床を阻害するような何らかの内分泌的要因があるために生じるのか不明のままになっている点に決着を付けようとするのが目的であった。着床を起こす際、胚の表面抗原が重要な役割をするので、胚に TBT の直接的影響があるのであれば、そうした胚の側のファクターの変化によって着床が阻害される可能性も考えられる。そのような変化は何らかの遺伝子の変異を伴っている可能性が高いと考えられるので、軽度に着床阻害がおこる TBT の濃度に暴露された胎児を出生させ、ある時期まで保育して性腺と肝臓を材料に変異の有無をマイクロサテライトマーカーを用いて検出することができるであろう。その目的のためには遺伝的背景が均一と考えられる近交系の動物を用いて実験する必要がある。このような仮説で実験を行ったところ、昨年度「変異」の可能性のある変化を検出したが、あまりに高頻度であり、にわかに信じがたく、検出の諸条件の詳細な検討が必要であるとの認識に至った。本年度の検討の結果、今年の「変異」はいずれも真の「変異」ではないとして否定された。

この結果は、高々一つの染色体について一つのマーカーを用い、総数でも約 600 匹程度の動物からのサンプルで検討された結果である。より多数のマーカーと、多数の動物を用いて検証しないと、TBT あるいは MMS の突然変異誘発性が初期胚において認められる、あるいは認められないとの断定的な結論を得ることが難しい。多能性の幹細胞に対する変異原の影響を遺伝性の突然変異として検出するというアイデアは TBT とは無関係に重要な問題を解明する可能性がある。その際マイクロサテライトマーカー、既知の遺伝子、あるいはメチル化などについて精査する必要があると考えられる。それらのマーカーひとつひとつについて、きちんとした実験条件を確立する必要がある。

それらは今後の問題として、TBT に関して今回の実験がどのような示唆を与えているのか簡単に考察しておく。TBT の妊娠初期胚への影響は、生き残った胚の検索の結果としては、判定ができない。一部着床前に喪失した胚については今回の採材では入手不能である。しかし残った胚は着床できたことは明らかである。母胎のホルモンバランス、子宮の脱落膜形成反応、その他着床過程に関わる免疫的機序は生き残った胚と母親の関係については

正常に働いていたと考えられる。やはり、この問題を解決するためには、in vitro で初期胚に TBT を暴露し偽妊娠妊角に戻して妊娠の経過を観察するか、処置を逆にして偽妊娠動物に TBT 処置をして、インタクトな体外受精杯を子宮に戻して胚発生を観察する方法を実施する必要がある。突然変異検出を試みたのは、この方法が当教室としては実施困難なためであった。

TBT のアロマターゼ阻害作用が報告されている。哺乳動物でこの作用の有無のみ検証するのであれば、着床以後の妊娠動物で、性腺分化の時期をねらって TBT を投与し、胎児の性腺系の分化を調べる方法は有望な方法である。最近、腎臓、性腺、ウォルフ管、ミュラー管を胎児期に取り出し in vitro で培養して、それらに各種の化学物質を暴露させ副生殖器官の分化を調べる実験系が開発されつつある。共同実験者の鈴木浩悦は既にアロマターゼ阻害薬で明瞭な in vitro の影響を観察している。

E . 結論

T B T 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ーをそれぞれ 1 つ選択して増幅し、多型が生じるか否かを昨年に引き続き調べた。変異のパターンについてより詳細な分析を試みているが、まだ確定的に TBT が初期胚に遺伝性の突然変異を生じるとの証拠は得られていない。

F . 研究発表

発表論文

1. Takanosu M., Amasaki, H., Iwama, Y., Ogawa, M., Hibi, S. and Suzuki, K. (2002) Epithelial cell proliferation and apoptosis in the developing murine palatal rugae. *Anat. Histol. Embryol.* 31 (1), 9-14.
2. 内堀雅隆、横山修一、斉藤賢一、鈴木浩悦、辻隆之、鈴木勝士(2002) 癲癇モデル動物の癲癇様睡眠時スパイク波の特徴解析(Analysis of the spike discharges on EEG during sleep in epileptic animal model.)、T. IEE Japan, 122-C(2): 194-200.
3. Uchibori M., K. Saito, S. Yokoyama, H. Suzuki, T. Tsuji and K. Suzuki (2002) Foci of spike discharges in sleeping EEG of El mice can be determined mathematically with wavelet transform of multiple monopolar derivations in individual animals based on the electric field model but not current dipole theory. *Journal of Neuroscience Method* 117(1): 51-63.
4. Inomata, A., I. Horii and K. Suzuki (2002) 5-Fluorouracil-induced intestinal toxicity: what determines the severity of damage to murine intestinal crypt epithelia? *Toxicol. Letters* 133: 231-240.
5. 鈴木勝士(2002) 化学物質の内分分泌作用判定試験の現状と問題点、医学のあゆみ、

202 (2): 147-149.

6. 鈴木勝士(2002) 獣医学領域の遺伝性疾患 - 1、Small Animal Clinic 127: 14-18.

7. 鈴木勝士(2002) 獣医学領域の遺伝性疾患 - 2、Small Animal Clinic 128: 18-21.

8. 鈴木勝士(2003) 獣医学領域の遺伝性疾患 ()、Small Animal Clinic 130: 13-18.

国際シンポジウム

9. Aoyama, H. and K. Suzuki (2003) Enhanced one-generation reproductive toxicity study in rats for detecting endocrine disrupting effects of chemicals. Proc. Int. Symposium SCOPE/IUPAC (Yokohama 2002)

口頭報告

10. 斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2002) マウス胎子に見られたマイクロ波照射の熱作用による催奇形、第21回宇宙エネルギーシンポジウム

11. 青山博昭、鈴木勝士(2002) トランスジェネレーションアッセイによるエチニルエストラジオールの低用量影響評価、第133回日本獣医学会

12. 竹中基郎、鈴木浩悦、甘粕晃平、斉藤賢一、鈴木勝士(2002) 神経症状を伴う矮小症ラット(Lethal dwarfism with epilepsy)の精巣病変の評価、第133回日本獣医学会

13. 八木美央、鈴木浩悦、小山絵里子、栗原孝宏、千葉純子、斉藤賢一、鈴木勝士(2002) 精巣形成不全症(hgn/hgn)ラットのセルトリ細胞機能の評価、第133回日本獣医学会

14. 鈴木勝士 (2002) 乳房炎の現状と課題、平成13年度家畜生産衛生向上対策事業(農水省)シンポジウム、第133回日本獣医学会

15. 板垣昌志、鈴木勝士(2002) 潜在性乳房炎と乳頭口の形態との関連、乳頭口の形態変化に及ぼす要因についての検討、平成13年度家畜生産衛生向上対策事業(農水省)シンポジウム、第133回日本獣医学会

16. 坂本幸俊、内堀雅隆、横山修一、斉藤賢一、鈴木勝士(2002) 癲癇モデル動物における睡眠時スパイク波の周波数解析、電気学会平成14年全国大会

17. 内堀雅隆、横山修一、斉藤賢一、鈴木浩悦、辻隆之、鈴木勝士(2002) EIマウスの睡眠時癲癇様スパイク波の焦点特定手法、電気学会平成14年全国大会

18. 斉藤賢一、内堀雅隆、横山修一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2002) 先天性癲癇モデル動物(EI Mouse)における睡眠時脳波に含まれるスパイク波の解析、第42回日本先天異常学会、PP.148

19. 青山博昭、荒木雅行、林宏一、小林まゆみ、武田真記夫、吉田敏則、北条仁、高橋研、清水直子、鈴木勝士、寺本昭二(2002) 改良型1世代繁殖試験によるエチニルエストラジオールの低用量影響評価：妊娠・保育期投与試験、第42回日本先天異常学会、p.157

20. 太田亮、渡辺千朗、丸茂秀樹、佐藤昌子、古谷真美、堀内伸二、稲田浩子、三枝克彦、武田真記夫、青山博昭、鈴木勝士(2002) 改良型1世代繁殖試験によるエチニルエストラジオールの低用量影響評価：周産期投与試験、第42回日本先天異常学会、p.158

21. 古川正敏、須永昌男、古川桂子、高橋智亜紀、笠原みゆき、川島邦夫、一花次夫、青山

- 博昭、鈴木勝士(2002) 改良型1世代繁殖試験によるエチニルエストラジオールの低用量影響評価：器官形成期投与試験、第42回日本先天異常学会、p.158
22. 鈴木勝士、斉藤賢一、椎名純子、竹中基郎、八木美央、鈴木浩悦(2002)ビスフェノールA投与による鶏胚での発生攪乱(第2報)、第42回日本先天異常学会、p.163
23. 鈴木勝士、斉藤賢一、内堀雅隆*、鈴木浩悦(2002)EI Mouse睡眠時脳波中のスパイク波の起源は旧皮質に存在する 第134回日本獣医学会
24. 甘粕晃平、小笠原慶、椎名純子、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士(2002)生殖器の形成異常を伴う左腎欠損ラットの遺伝的特性の評価 第134回日本獣医学会
25. 千葉純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2002)Wistar-Imamichiラットクローズドコロニー由来近交系から発見された矮小ラットの遺伝的特性の解析第134回日本獣医学会
26. 鈴木勝士、斉藤賢一、椎名純子、竹中基郎、八木美央、鈴木浩悦(2002)ビスフェノールA投与による鶏胚での発生攪乱(第2報) 第134回日本獣医学会
27. 斉藤賢一、内堀雅隆、鈴木浩悦、鈴木勝士(2002)EI mouseの睡眠時脳波に含まれるスパイク波の加齢による変化と焦点解析。第34回成長談話会・第13回 AUXOLOGY(成長学)研究会連合大会
28. 斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2003)高周波照射が鶏の主要臓器におよぼす影響、第22回宇宙エネルギーシンポジウム
29. 鈴木勝士(2003)化学物質の繁殖に対する影響解析、化学物質の内分泌かく乱作用に対する研究の現状と課題、日本農薬学会シンポジウム

Abstract:

As the last year's project, we have detected high incidence of TBT induced mutations in the gonad DNA but not liver DNA of the rat pups born from the mothers orally treated with TBT at 0, 4, 8, and 16mg/kg for 4 days from GD0 to GD4 or those treated with MMS at 50mg/kg for the same periods. Wistar Imamichi inbred strain was selected as the rat with even genetical background so that it may possible to detect induced mutations in the microsatellite marker assisted PCR amplification if existed. The detected mutation incidence was too high to confirm if it happened truly.

This year, we tried the same protocol in cases of control, TBT 16mg/kg and MMS 50mg/kg groups to obtain further DNA samples. This year and the last year samples were carefully analyzed on the electrophoresis patterns of the microsatellite assisted DNA amplification.

Improved experimental conditions included dialysis of the DNA sample prior to PCR and revealed no convinced mutations in the gonad DNA samples assessed by the selected microsatellite markers, which represented 1 marker per 1 chromosome basis and 20 markers in total.

In conclusion, definite evidence that maternally treated TBT caused genetically transmissible mutations in the gonad of the rat weanlings was not obtained. Further basic approaches on such possibility would be needed to detect the origin of the recessively inherited mutations in animal populations including humans.

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

研究者 森 千里 (千葉大学大学院医学研究院 環境生命医学 教授)

研究要旨

Bisphenol A (BPA)、flutamide (Flu) は新生仔マウスに投与すると、そのマウスが成長して精子形成を行なう過程で精子細胞の核、尖体に奇形を起こすことが判った。またこの精子細胞に接するセルトリ細胞の特殊接合装置にも形成不全、一部欠損などの異常が認められた。これらの異常は、動物種 (マウス、ラット) や投与時期 (新生仔投与、成獣投与) によらず認められた。BPA は、我々が日々曝露されているだけに、さらなる詳細な研究を必要とする。また、E₂、E₂B 投与でも同じ作用が見られたので、BPA、Flu は、ラット、マウスに対してエストロゲン作用あるいはエストロゲン作用の相対的増強作用があると思われる。一方、di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) はこれらとは作用が異なり、マウスにおいてはセルトリ細胞の早熟化を促していると考えられた。また、di-(n-butyl) phthalate (DBP) は精巣に何の変化も引き起こさなかった。

セルトリ細胞由来である細胞株 TM4 を用いた *in vitro* 実験において、特定のタンパク質のチロシンリン酸化が DEHP の代謝産物である mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) 投与で亢進することがわかった。またプロテオーム解析により、複数のタンパク質のスポットが化学物質投与により変化していることが明らかになった。今後これらのタンパク質について解析を進めることにより、内分泌攪乱作用が疑われる物質の作用機構の解明、また内分泌攪乱化学物質曝露の有用な指標となりうるバイオマーカーの検索が可能となると思われる。

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)

小宮山政敏 (千葉大学大学院医学研究院環境生命医学講師)

前川眞見子 (千葉大学大学院医学研究院形態形成学助手)

足達 哲也 (千葉大学大学院医学研究院環境生命医学助手)

深田 秀樹 (千葉大学大学院医学研究院環境生命医学助手)

A. 研究目的

前年度の後半から始めた bisphenol A (BPA) のラット、マウスの雄性生殖器に対する作用の研究で精子形成障害などの興味ある結果を得たので、今年度はこの BPA の作用をより詳しく調べる。特に BPA の作用を外因性エストロゲンの作用と比較した。また新たに、androgen receptor antagonist であると言われている flutamide (Flu) およびフタル酸エステル類 (PAEs) である di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), di-(n-butyl)phthalate (DBP) の新生仔マウスの雄性生殖器に対する作用も調べることを目的とした。

また、内分泌攪乱化学物質曝露による遺伝子産物変化の観点から、マウス精巣セルトリ

細胞由来株 TM4 を用いて、タンパク質レベルでの解析を行い、内分泌攪乱化学物質曝露のマーカーとなりうるタンパク質を検索する。本年度は、PAEs および Flu の曝露実験を行う。PAE としては、in vivo 実験で精巣セルトリ細胞に異常の見られた DEHP およびその代謝産物である mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) を用いた。すでに報告した p38 をさらに解析するとともに、それ以外のスポットも検索する。

本報告は in vivo 実験と in vitro 実験から成り、以後は「1. 精子形成に対する影響」と、「2. in vitro における作用解析」の二部にわけて報告する。

B. 材料と方法

1. 精子形成に対する影響

a) 実験デザイン

平成 14 年度に行なった実験は、以下の実験 I ~ 実験 V である (表 1)。

実験 I: ラット、マウスの新生仔 (実験 IA) および成獣 (実験 IB) への BPA の投与

実験 II: ラット、マウス成獣への 17 β -estradiol (E_2)、 β -estradiol 3-benzoate (E_2B) の投与

実験 III: マウス新生仔への Flu の投与

実験 IV: ラット新生仔への Tam と BPA の混合投与

実験 V: マウス新生仔への DBP、DEHP の投与

実験 I ~ 実験 V での各化学物質の投与量は表 2 ~ 表 6 に示した。

b) 化学物質

BPA (Aldrich, Milwaukee)、 E_2 (Sigma, St Louis)、Flu (Sigma, St Louis)、DEHP (Aldrich, Milwaukee)、DBP (東京化成、東京) はまず dimethyl sulphoxide (DMSO) (Sigma, St. Louis) に溶かし、これをオリーブ油 (和光純薬、大阪) (BPA および E_2) またはコーン油 (Sigma, St Louis) (DEHP、DBP、Flu) で希釈した。Tam (Sigma, St Louis) および E_2B (Sigma, St Louis) はオリーブ油に直接溶かした。コントロールはそれぞれ溶剤のみとした。

c) 動物への化学物質の投与方法および評価時期

ラットはウイスター系、マウスは ICR 系とし、各実験群とも計 10 匹ずつ用いた。新生仔 (実験 IA、実験 III、実験 IV、実験 V) へは、溶剤に溶かした化学物質を出生翌日から隔日に 6 回、背部に皮下注射した。評価は生後 1 週齢から原則として 1 週齢毎に行ったが、マウスは成長が早いので場合によっては各週齢の半ばでも評価をした。成獣 (実験 IB、実験 II) へは、連続 5 日間投与し、6 日目に評価した。

d) 化学物質の投与量

実験 IA では BPA をラット新生仔へは 0.1, 1, 10, 100, 600, マウス新生仔へは 0.05, 0.1, 1, 5, 10 (単位は μg / 匹 / 回) 投与した。

実験 IB では BPA をラット成獣へは 0.1, 1, 10, 100, 1000, マウス成獣へは 0.01, 0.1, 1,

10, 100 (単位は μg / 匹 / 回) 投与した。

実験 II では E_2 , E_2B をラット成獣へは 0.1, 1, 10, マウス成獣へは 0.4, 0.6, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 (単位は μg / 匹 / 回) 投与した。ただしマウス成獣への E_2B 投与は平成 11 年度に行なったもので、この時は皮下注射ではなく、腹腔内投与であった。

実験 III および実験 V では Flu, DBP, DEHP をそれぞれマウスの新生仔へ 0.5, 5, 50, 500, 5000 (単位は μg / 匹 / 回) 投与した。

実験 IV では Tam + BPA をラット新生仔へそれぞれ 20 + 20, 20 + 10, 10 + 10 (単位は μg / 匹 / 回) 投与した。

各化学物質の投与量はそれぞれ表 2 ~ 表 6 にも示してある。また同表では判った範囲で No Observed Effect Levels (NOELs) を記した。

e) サンプリング法

動物はエーテルで深麻酔した。血液は、開胸して右心室穿刺により採取した。臓器は、左心室より 3 % グルタル・アルデヒドで灌流固定した後に採取した。なお、サンプリング時に体重、精巣重量、精嚢腺重量を測定した。精嚢腺重量は左右の葉を開口部から離断し、精嚢液を PBS で洗い流した後に測定した。

f) 臓器標本の作製

灌流固定した臓器は、常法に従い、脱水してエポキシ樹脂に包埋し、光学顕微鏡観察にはトルイジン・ブルー染色の準超薄切片、電子顕微鏡観察には酢酸ウラン・クエン酸鉛の二重染色超薄切片を用いた。臓器によってはグルタルアルデヒドの灌流固定後に 10 % ホルマリンで後固定した後、パラフィンに包埋し、切片はヘマトキシリン・エオシン染色した。実験 IV では精巣をブアン固定し、パラフィン切片を作り、これを抗ヒト・トリプターゼ抗体 (Dako, Denmark) で免疫染色、およびサフラニンとアリューシャン青の二重染色で肥満細胞を同定した。

g) ホルモンの測定

血清中の LH、FSH、インヒピン、テストステロン濃度は、時間分解蛍光免疫測定法の競合法 (TRFIA) で測定した。

h) 妊孕能試験

実験 I および実験 V では各実験群のラット、マウスがそれぞれ 15 週齢、12 週齢に達した時に正常な雌と夕刻数時間同居 (雄 1 匹: 雌 2 匹) させ、交尾、射精を観察した。雌はその日の朝 (午前 10 時 30 分) に発情前期であった。射精を確認してから常法により雄を灌流固定し、精巣の光顕、電顕試料を作った。普通、射精は数十回の挿入の後に行なった。交尾した雌はそのまま飼いつけ、妊娠、出産の確認に供した。

i) 倫理面への配慮

本研究は千葉大学大学院医学研究院の動物倫理委員会の承認を受けている。実験動物へ

の各化学物質の投与時および灌流固定時には動物の苦痛を最小限にとどめるよう努めた。

2. in vitro における作用解析

a) 細胞培養

マウス精巣セルトリ細胞由来株 TM4 は American Type Culture Collection (ATCC) から購入した。化学物質(MEHP (東京化成), 10 μ M, 100 μ M; DEHP, 100 μ M; Flu, 50 μ M) は DMSO に溶解後、細胞培養液に添加し、2 日間培養した。DMSO のみを培地に加えたものをコントロールとした。

細胞を PBS で数回洗浄後、二次元電気泳動用には IEF lysis buffer (8 M urea, 2 % CHAPS, 40 mM Tris, 1 mM PMSF, 1mM Na_3VO_4) を、一次元電気泳動用には SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH6.8, 2 % SDS, 10 % glycerol) を加えて細胞を融解、ポリトロンで破碎した。15,000 rpm で 20 分間遠心し、その上清を細胞抽出液とした。一部を取り、DC プロテインアッセイキット (Bio-Rad) を用いてタンパク質濃度を測定した。

b) 二次元電気泳動・ウェスタンブロット

Immobiline dry strip ゲル (pH 3-10; Amersham) を用いて、細胞抽出液をゲルあたり 40 μ g (ウェスタンブロットの場合)または 8 μ g (銀染色の場合) 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、2D-銀染色試薬・II 「第一」キット (第一化学) を用いて銀染色を行った。またウェスタンブロットの場合は、二次元目電気泳動終了後 PVDF 膜にトランスファーした。1 % BSA でブロッキング後、HRP 標識抗リン酸化チロシン抗体(ECL チロシンリン酸化タンパク質検出システム; Amersham) と室温で 1 時間インキュベーションした。ECL Plus (Amersham) で化学発光させ、チロシンリン酸化タンパク質のスポットを検出した。

c) 免疫沈降法、N 末端アミノ酸配列分析

p38 を解析するため、抗リン酸化チロシン抗体を用いて免疫沈降を行なった。前年度の研究結果によりリン酸化された p38 のスポットの存在がわかっている DES 処理した TM4 細胞からの抽出液を用い、抗リン酸化チロシン抗体、Protein G-Sepharose (Amersham) とともにインキュベートした。Protein G-Sepharose を回収・洗浄後、SDS-PAGE 用溶解緩衝液で免疫沈降されたタンパク質を溶出し、一次元電気泳動を行った。PVDF 膜にトランスファーした後、約 38 kDa の位置にあるバンドを切り出し、N 末端アミノ酸配列分析のための試料とした。

C. 結果

1. 精子形成に対する影響

a) BPA、E₂、E₂B または Flu の影響

(1) 影響の概要

BPA、E₂、E₂B、Flu の投与は、ラットでもマウスでも、また新生仔投与でも成獣投与

でも、ある投与量（具体的な投与量は以下に詳述）を越えると、投与した化学物質の種類に関わらず、精巣に同じ形態異常をもたらした（よって、以下、特に断らない限り BPA、E₂、E₂B、Flu の共通作用として記す）。一方、体重、精巣重量はコントロール動物と有意差はなかったが、精嚢腺重量はコントロールの約 4 分の 3 であった。実験 I ~ 実験 V とともに、精巣上体の組織学的変化は見られなかった（図 1 ~ 2）ので、以下、精巣の組織学的変化と各化学物質の投与量との関係について詳細を記す。また、E₂、E₂B、BPA、Flu、Tam、DEHP、DES の各種ホルモン受容体活性と本研究の形態的变化の関係を表 7 に示した。

(2) 成獣投与系で見られた影響

成獣では、化学物質（BPA、E₂ または E₂B）の投与終了翌日から精巣における形態異常が見られた。これら化学物質による精子細胞の形態異常は特異的であり、ステップ 2・3 精子細胞の尖体顆粒の位置異常から始まり、ステップ 6 精子細胞の尖体の形態異常（図 3）、ステップ 8 以降の精子細胞の尖体、および核の変形、空胞形成であった（図 4 ~ 6, 8, 20）。これらの微細形態異常は BPA ではラットで 1 μ g / 匹 / 回、マウスで 0.1 μ g / 匹 / 回、E₂ および E₂B ではラットで 1 μ g / 匹 / 回、マウスで 0.6 μ g / 匹 / 回以上の投与量で認められた。一度精子細胞の核および尖体の変形すると、精子になった後でも奇形が持続した（図 10）。そして顕微鏡、電顕共に切片で観察した範囲では、ステップ 2・3 以降の全ての精子細胞および精子が奇形になるのではなく、正常な形をした精子細胞や精子もあることが推察された。正常な形態のステップ 9 精子細胞は図 7、図 19 に、そして正常なステップ 14 精子細胞は図 9 に示した。ステップ 8 精子細胞が塊となって精上皮から剥離することもあった。この剥離については E₂B の作用として Blanco-Rodríguez and Martínez-García (1996) も報告している。また、投与量をいろいろと変えてみたが、投与量が 2 倍、10 倍となっても奇形精子細胞および奇形精子の出現頻度が 2 倍、10 倍とはならないようである。これら化学物質のある閾値を越えると、奇形精子細胞がある頻度で出現するという印象であった。投与量と奇形細胞の出現頻度の関係はこれからの課題としたい。ひとつの方法として、精巣上体尾部内の精子の奇形率を光学顕微鏡で調べ、投与量との相関を調べるつもりである。

これら造精細胞の奇形の他に、セルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置にも無形成ないしは一部欠失などの特異的な異常が見られた（図 4, 6, 20）。しかしセルトリ細胞間の特殊接合装置（血液・精巣関門）には微細構造的に異常は見られなかった（図 11）。

(3) 新生仔投与系で見られた影響

新生仔投与でも、成獣への投与時と同様の形態異常が精巣で見られた。しかし、これら薬剤の影響の見られた造精細胞はステップ 2・3 精子細胞以降だったので、これらの精子細胞が分化する以前の日齢（ラットでは 0 日齢から 24 日齢頃、マウスでは 0 日齢 ~ 20 日齢頃まで）では何ら精巣には異常は見られなかった。これらの新生仔における異常は BPA ではラットで 1 μ g / 匹 / 回、マウスで 0.1 μ g / 匹 / 回、Flu ではマウスで 0.5 μ g / 匹 / 回以上の投与量で認められた。これらの異常は新生仔投与の場合、生後 9 週齢でも出現頻度は少なかったが見られた。その後、ラットで生後 15 週齢、マウスで生後 12 週齢でこれらの異常は殆ど見られなくなった。新生仔投与でも体重、精巣重量はコントロール動物と有意差はなかったが、精嚢腺重量はコントロールの約 3/4 程度であった。

BPA、E₂、E₂B、Flu の微細形態に与える影響を図 20 にまとめた。

実験 IA の BPA の新生仔投与では、生後 8 週齢の時点での血中テストステロンはコントロールの 4470.120 ± 424.227 pg/ mL、実験群 (0.1 μ g / 匹 / 回投与群) の 607.435 ± 152.049 pg/mL であり、 $P < 0.05$ で有意差があった。また、血中 FSH はコントロールの 1.350 ± 0.114 μ g/mL、実験群の 1.240 ± 0.311 μ g/mL であり、有意差は無かった。

(4) 妊孕能

新生仔投与動物 (ラットで生後 15 週齢、マウスで生後 12 週齢) と交配した正常雌は正常ないし、やや長い妊娠期間を経て健仔を出産した。交尾 (射精) から出産までの時間は最も長い例でラットでは 23 日と 13 時間であった。

これらの形態異常の出現および投与動物が十分に成熟してからの妊孕能の出現は昨年度に行なったラットおよびマウス新生仔への E_2 、 E_2B 投与の結果と同じであった。すなわちステップ 2・3 精子細胞の尖体顆粒の位置異常から始まって、それ以降の精子細胞の尖体および核の奇形が見られた。また、セルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置の形成不全や部分的欠損も認められた。これらの形態異常は E_2 、 E_2B とともにラットでは 500 ng / 匹 / 回、マウスで 12.5 ng / 匹 / 回の投与で認められた。ラット、マウスともに十分に成熟した段階では妊孕能があり、健仔を得た。

b) Tam と BPA の混合投与の影響

ラット新生仔に対する Tam と BPA の混合投与 (実験 IV) では、Tam と BPA の作用はそれぞれ独自にみられた。すなわち Tam の作用として、昨年度にラットに Tam を単独投与した時と同様に、生後 2 週齢から 4 週齢にかけて精細管周囲の筋様細胞の水腫変性が見られた (図 12)。この水腫変性が治まった頃 (生後 4 週齢) から、精巣間質に肥満細胞が出現するようになった (図 13 ~ 15)。この肥満細胞の浸潤は生後 12 週齢まで続いた。また、コントロールに比べ、Tam と BPA の混合投与では血液精巣関門の完成が約 2 週間遅れたが、精子の完成は 1 週間の遅れ、すなわち生後 8 週齢で精子は完成した。これは Tam 単独投与と同じ結果であったので、ここまでは Tam の作用が強く出ているものと考えられた。一方これ以降の時期、すなわち実験動物が生後 5 週齢で血液精巣関門が完成した後は、精子細胞の核および尖体の変形、セルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置の形成不全および部分的な欠損が見られた。これは、BPA 単独投与と同じ結果であった。これらの結果から、BPA の作用と Tam の作用は独立的なものであると考えられた。これらは Tam 10 μ g / 匹 / 回 + BPA 10 μ g / 匹 / 回の組み合わせで認められた。

c) DBP、DEHP の影響

マウス新生仔に対する DBP または DEHP の投与実験 (実験 V) では、BPA、 E_2 、 E_2B 、Flu とは全く異なった結果を得た。すなわち、DEHP 投与ではセルトリ細胞間の特殊接合装置 (血液・精巣関門) がコントロール動物よりも 10 日ほど早く出現した (図 16)。また、生後 1 週齢でセルトリ細胞の板状突起が発達していた (図 17)。この板状突起の発達もコントロールに比べて約 10 日早かった。造精細胞の分化や精子形成には異常は見られなかった。精巣上体には何の変化も見られなかった (図 18)。DEHP 投与マウスは生後 7 週齢において妊孕性があった。DBP 投与では、今回の実験では精巣、精巣上体には何の変化も認

められなかった。

2 . in vitro における作用解析

a) p38 の解析

38 kDa 近辺のバンドを切り出して N 末端アミノ酸配列分析したところ、7 残基解析できたため、データベース検索を行った。その結果、そのアミノ酸配列は、免疫グロブリンの一部と一致することがわかった。

b) チロシンリン酸化タンパク質の変化

MEHP、DEHP を投与し、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロットで解析したところ、p38 はコントロールに比べ、MEHP、DEHP 投与によりリン酸化が亢進していた (図 22)。また分子量約 140 kDa のタンパク質 (図 22 の矢印) のリン酸化がコントロール、DEHP 投与に比べ、MEHP 投与において顕著に亢進していた。Flu 投与においても、MEHP 投与ほどの効果はなかったが、同様の傾向がみられた。

c) 総発現タンパク質 (プロテオーム) の解析

化学物質投与により、発現タンパク質がどのように変化するかを、二次元電気泳動法を用いて調べた。図 23 に示すように、コントロール、MEHP 投与、Flu 投与を比較したとき、いくつかのスポットが量的に変動することがわかった。コントロールには存在するが、MEHP、Flu 投与には存在しない、もしくは量的に少ないスポット (a, b, d) や、MEHP 投与で減少しているスポット (c)、Flu 投与で減少しているスポット (e) などが見いだされた。

D . 考察

1 . 精子形成に対する影響

平成 11 年度と平成 12 年度には、DES をラット新生仔に投与したところ、血液・精巣関門の分化が約 4 週間遅れ、このために造精細胞の分化も減数分裂前期で約 4 週間滞ったことを示した。また、マウス成獣に E₂B を投与したところ、ステップ 7 以降の精子細胞および精子に尖体、核の奇形、そしてセルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置の部分的な欠損が見られた。平成 13 年度にはマウス、ラットの新生仔へ E₂、E₂B を投与し、外因性 E₂、E₂B の精巣に対する作用を示した。同時に、ラット新生仔に tributyltin chloride, nonylphenol, 4-octylphenol, Tam, BPA を投与し、これら化学物質の精巣に対する影響を DES 投与と同じ方法で調べたが、Tam, BPA 以外は精巣に著変は見られなかった。Tam は DES と同様に血液・精巣関門の分化を遅らせたが、DES の 4 週間遅延に対して、Tam では 2 週間の遅延であった。また、Tam は精細管の筋様細胞の水腫変性および精巣間質への肥満細胞の出現をもたらした。また、BPA は新生仔に投与すると E₂、E₂B と同じような作用をすることが解った。この実験系では BPA をラット、マウスの新生仔に投与し、その個体が思春期になり精子形成が始まるようになるとその造精細胞は奇形になることが解り、BPA の環境ホルモン作用が明らかになった。危険ではない (Cagen et al, 1999a, b ;

Ashby et al, 1999)とされていた BPA にも新生仔期投与によりラット、マウスの思春期から青年期の一時期に精子に奇形の起こることが判った。また、BPA、E₂、E₂B による精子、精子細胞の奇形は実験動物が十分に成熟すると回復し、その上、妊孕性も出ることが判った。また、DES のラット精巣に対する作用をマウスの精巣についても調べ、DES はラットにもマウスにも同様に作用することを示した。

平成 14 年度は、これらのことを踏まえ、BPA の作用に注目し、ラット新生仔への BPA の作用を確認すると共に、BPA のマウス新生仔、ラット、マウスの成獣に対する影響を調べることにした。また、BPA と E₂、E₂B の作用を比較するためにラットおよびマウス成獣への E₂、E₂B の投与を行った。なお、マウス成獣に対する E₂B の作用については平成 11 年度に既に調べてある。

平成 13 年度の実験結果および今年度の実験 I、実験 II の結果より、BPA は外因性の E₂ および E₂B と同じ作用を示したので、少なくともこの実験系に関して BPA はエストロゲン作用を持つことが確認された。

この作用がラット、マウスと、動物種を越えて、また、新生仔、成獣投与に関わらず同じであることも興味深い。BPA の弱いエストロゲン作用は古くから言われている (Dodds and Lawson, 1936; Bitman and Cecil, 1970; Krishnan et al, 1993; Gaido et al, 1997; Kuiper et al, 1997; Steinmetz et al, 1997, 1998; Ashby and Tinwell, 1998; Milligan et al, 1998; Berganon et al, 1999; Schafer et al, 1999; Papaconstantinou et al, 2000; Tinwell et al, 2000)。

今回の実験でラット、マウスの新生仔に BPA を投与し、その個体が充分成熟し、精巣上体尾部内に奇形精子が殆どなくなる頃 (ラットでは 15 週齢、マウスでは 12 週齢) には妊孕能のあることが証明された。今回は BPA 投与動物に妊孕能があるかないかを調べるための予備的実験であったので動物が充分に成熟した時点の 1 回しか妊孕性試験をしなかった。今後の課題としてはラット、マウスともに性成熟に到達した直後から経時的に妊孕能の有無を調べ、BPA による奇形精子出現割合と妊孕性の関係も調べたい。

実験 IA では生後 8 週齢の時点で実験群の血中テストステロン値はコントロールのそれの約 7 分の 1 であった。これは実験群では精嚢腺の重量がコントロールのそれに比べて小さかった事と一致する。この実験群では血中 FSH がコントロールのそれと変わりがなかった。他の実験群の血中ホルモン値も現在測定中なので、これらの結果を待って考察をしたい。

また、実験 III の Flu の投与でも BPA、および E₂、E₂B 投与と同じ結果が得られたので、この実験系に関する限り、Flu も外因性のエストロゲン作用と類似の作用を持つと言える。Flu は androgen receptor antagonist (Neri et al, 1979) として前立腺癌の治療薬として使われているが、今回の実験で精巣に外因性 E₂、E₂B の作用を現すことが解ったので、Flu のこの作用機序の解明が必要である。Flu の作用については O'Connor et al (1998)、Miyata et al (2002) の報告があるが、微細構造についての報告はない。今回は Flu をマウス新生仔に投与したが、これからの課題として、これらが BPA のように動物種を越えて発現するのか、それともマウス新生仔に特有な現象なのかを調べる必要がある。また、Flu の NOEL を見つけ、E₂、E₂B とのエストロゲン作用の強さの比較についても今後の課題としたい。

Flu は前立腺癌治療薬として適切な管理、投薬をされているので、一般の人々が曝露されることはない。しかし、BPA は歯科充填剤、缶詰のコーティング剤、食器として広く使われていた。ヒトが連続的に生涯曝露され続けても影響を受けない BPA の量は体重 1 kg につき 1 日あたり 50 μg と言われている(ビスフェノール A 安全性 5 社研究会)。しかし本研究ではラット、マウスの成獣の BPA 投与実験であるが、1 日あたり体重 1 kg につき 3.3 μg の、それもたったの 5 回投与で精子形成に異常が見られた(表 3)。ラット、マウスをヒトと一緒にできないとか、皮下投与と経口投与とではその効力には違いはあるといった考えはあるものの、本実験系で、それも成獣投与の場合も、新生仔投与の場合も精子形成異常をおこした事は、BPA はヒトの精子形成にも影響を与える可能性も考えられるので、BPA については乳幼児であろうと成人であろうと、さらに詳細な研究を必要とする。また、新生仔ラット、マウスに BPA を投与するとその個体が思春期に達すると上に述べたように精子形成障害をおこすが、その個体が十分に成熟すると妊孕能がある。最終的に次世代を作る能力が備わるのならば何も問題にすることはない、という考え方もあろうが、たとえ個体の成長の一時期であろうと精子形成異常がある期間連続的に起こることは次世代への影響の有無に関わらず、看過出来ない。

本研究の結果、たとえ実験動物にしる、BPA が精子形成異常を起こすことが明確に判ったので、ヒトへの影響も早急に調べる必要がある。BPA のヒトへの曝露量は住んでいた環境、食餌等により個々人で異なるだろうが、血清中 BPA 量は日本人では 0.32 ~ 2.4 ng / mL であると報告されている (Inoue et al, 2000; Ikezuki et al, 2002)。また、妊娠中期の羊水ではかなり高く、8.3 ng / mL であると報告されている (Ikezuki et al, 2002)。本研究により BPA 投与ラット、マウスに精子細胞および精子の奇形、セルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置の欠損が見られたが、この時の血清中 BPA 濃度を是非測定する必要がある。この測定は今後の課題として第一に取りあげられるべきである。

BPA、E₂、E₂B、Flu とともにセルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置 (図 19) と精子細胞および精子に異常を起こす。この特殊接合装置の機能はまだ解らず、仮説の域を出ていない。この装置の推測される機能として、精子頭部を成形したり (Fawcett et al, 1971)、成熟精子細胞を spermiation まで精上皮に保持したり (Brökelmann, 1963; Nicander, 1967)、成熟精子細胞を精上皮に整列させたり (Russell et al, 1988; Vogl et al, 2000)、spermiation の時に成熟精子細胞(精子)を放出したり (Vitale-Calpe and Burgos, 1970)、という説がある。BPA、E₂、E₂B、Flu とともにこの接合装置に形態異常を起こし、さらに精子細胞の尖体および核に形態異常を起こすので、Fawcett et al (1971) の言うように、この接合装置は精子頭部の形状をその動物種独特の形に成形する機能を持っているのかも知れない。またはそれとは関係なく、BPA、E₂、E₂B、Flu は精子細胞の尖体および核に間接的に働いているのかも知れない。BPA、E₂、E₂B、Flu とともに生後 11 日齢で投与を終了し、精子細胞に異常が初めて見られるのはラットで投与終了 20 日後、マウスで投与終了 10 日後なので、これら化学物質の直接作用として精子細胞が異常になるとは考えられない。BPA は体内で速やかに代謝されるので (Fung et al., 2000; Völkel et al., 2002)、投与終了後 10 日、20 日も経て十分な量が体内に残っているとは思えない。これからの課題として BPA の作用が発現する時の血中 BPA 濃度を測定してみたい。考えられることは、特殊接合装置が精子頭部の成形をするか否かは別として、これら化学物質がセルトリ細胞

に作用して、結果的に特殊接合装置に異常が起きたり、またセルトリ細胞が栄養を供給し支持している精子細胞に異常が起きたりしたのかもしれない。これら化学物質の作用機序解明も今後の課題である。

BPA、E₂、E₂B、Flu は同じセルトリ細胞の特殊接合装置でもセルトリ細胞間の特殊接合装置（血液・精巣閉門、図 21）には何の影響を与えないのは興味深い。血液・精巣閉門は正常に分化し、そのために減数分裂もラットでは生後 3 週齢までに、マウスでは生後 18 日齢までに開始した。

しかし、同じく、エストロゲン作用があると言われている DES の場合は、同じように新生仔に投与しても血液・精巣閉門の分化遅延が起り、減数分裂の開始はラットでは約 4 週間、マウスでは約 1 週間遅れた。このように同じエストロゲン作用があると言われている DES と BPA とではその作用機序が異なることが解った。また、Tam と DES の混合投与実験、Tam と BPA の混合投与実験でも前者の実験では Tam は DES の作用を相乗的に増したが、後者の実験では Tam も BPA も独自に作用したので、やはり DES と BPA の作用機序は互いに異なることが推測される。DES も Tam も減数分裂の始まる以前のセルトリ細胞に作用するが、BPA は減数分裂開始以後のセルトリ細胞に作用すると思われるので、Tam と BPA の混合投与の場合、それらの作用の現れる時期が異なるため、それぞれの作用が独立して現れるのかもしれない。

DEHP のラットおよびマウスへの投与実験はいくつか報告されているが、全て食餌にまぜて経口投与したものである (Hazleton Biotechnology Co. 1992a, b; Poon et al. 1997)。我々の実験では、輸液等で用いられる塩化ビニール製医療器具による DEHP の曝露を念頭に置いて DEHP の皮下投与実験を行なった。その結果、経口投与よりも少ない投与量でセルトリ細胞の早熟化が見られた。この早熟化は微細形態(セルトリ細胞の板状突起の早期出現、セルトリ細胞間の特殊接合装置の早期出現)から判断したが、機能面からも判断する必要がある。このため、今後の課題としてセルトリ細胞間の特殊接合装置の血液・精巣閉門としての働きが、やはり早期に確立されるかどうかを調べる必要がある。そのためには細胞間のトレーサーとしてチトクローム C を精細管内腔にマイクロ・インジェクションし、それが精巣間質に漏れるか否かを電子顕微鏡的に調べるつもりである。

Flu、DEHP ではまだ判らないが、マウス新生仔に投与した BPA の NOEL は 50 ng ~ 100 ng / 匹 / 回の間であった (表 2)。昨年度のマウス新生仔への E₂B の投与実験の結果、その NOEL は 6.25 ng ~ 12.5 ng / 匹 / 回の間であった。両実験系とも NOEL を確定しようとした実験系ではないので、正確さには疑問が残るが、この実験系に関しては BPA は E₂B の約 10 分の 1 程の強さと言える。BPA は E₂ の 10000 ~ 15000 分の 1 と言われている (Gaido et al, 1997; Nagel et al, 1997; Milligan et al, 1998) が、マウス新生仔を用いたこの実験系では BPA のエストロゲン作用はこれらの報告より 3 桁も強かった。今回の実験系では生後 1 日、3 日と、生まれたばかりの仔マウスに皮下注射をする場合、1 割ぐらいの注射液が刺入口から漏れてしまうことが度々あったので、正確な NOEL とは言い難い。正確な NOEL および BPA および Flu の E₂、E₂B に対する強さの程度の比較は今後の課題としたい。

このように BPA、E₂、E₂B、Flu、DEHP、DES の環境ホルモンとしての生体への影響を解明するだけでなく、この作用を生物学的な研究手段としても用いることの出来ること

が解った。

2. in vitro における作用解析

DES 等の内分泌攪乱化学物質を投与することにより、分子量 38 kDa のタンパク質 (p38) のリン酸化が亢進することを昨年度報告した。そこで今年度は p38 のスポットをゲルから切り出し N 末端アミノ酸配列解析したところ、7 残基が解析できたが、そのアミノ酸配列は免疫グロブリンの一部に一致した。これはゲルから切り出したスポットに免疫沈降に使用した抗体の一部がコンタミしており、その配列を読んだ可能性が考えられた。p38 はウェスタンブロットでは認識されるが、総タンパク質の二次元電気泳動の銀染色ではそのスポットは特定できず、その存在量は極めて少量で単離が困難であると考えられる。また、図 22 に示したように、チロシンリン酸化された p38 はコントロールにおいて常に全く存在しないのではなく、実験群よりは少ないものの、検出されることがあるということがわかった。今年度の結果で新たに注目したいのは、分子量約 140 kDa のチロシンリン酸化タンパク質 (p140) である。DEHP の内分泌攪乱化学物質としての作用は in vitro では見られず、DEHP の代謝産物である MEHP が担うとされている。p140 は、DEHP 投与ではコントロールとあまり差は見られなかったが、MEHP 投与でチロシンリン酸化が顕著に亢進していた。この結果から、p140 が内分泌攪乱化学物質曝露のバイオマーカーの候補の一つと考えられる。昨年度行った DES および BPA 投与では、p140 のリン酸化の亢進はそれほど顕著ではなかった。内分泌攪乱化学物質の種類や濃度が p140 のチロシンリン酸化及ぼす影響について、今後詳細な検討を行う必要がある。

他の有用なマーカーを探索するため、プロテオーム解析を試みた。細胞抽出液を二次元電気泳動法で分離・展開し、銀染色することにより、各化学物質の投与前後のスポットのパターンを比較したところ、いくつかのスポットについて、実験群とコントロールとで差異が見いだされた。コントロールにしかないもの、MEHP 投与、もしくはフルタミド投与のときに減少するもの等、興味深いいくつかのスポットが観察された。セルトリ細胞株 TM4 におけるこれらの変化は、動物実験において見られたセルトリ細胞の異常と関連している可能性がある。近年プロテオミクス研究の進展により、二次元電気泳動法によって分離された多数の微量タンパク質を効率よく同定する分析技術が発達してきた。内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムを解明する上でも、プロテオーム解析が有用であることが示された。

E. 結論

1. 精子形成に対する影響

BPA、Flu は新生仔マウスに投与すると、そのマウスが成長して精子形成を行なうようになると精子細胞の核、尖体に奇形をおこすことが判った。またこの精子細胞に接するセルトリ細胞の特殊接合装置にも形成不全、一部欠損などの異常をもたらした。これらの異常は BPA に関してはラットの新生仔、ラットの成獣投与でも、動物種を越えて見られた。また、E₂、E₂B 投与でも同じ作用が見られたので、BPA、Flu はラット、マウスに対してエストロゲン作用あるいはエストロゲン作用の相対的増強作用を持つと思われる。一

方、DEHP はこれらとは作用が異なり、マウスにおいてはセルトリ細胞の早熟化を促すと思われる。特に、BPA の作用については、我々の身近なところに曝露源のある可能性があるので、さらなる詳細な研究を必要とする。

2. in vitro における作用解析

セルトリ細胞由来である細胞株 TM4 を用いた in vitro 実験において、特定のタンパク質のチロシンリン酸化が亢進することがわかった。またプロテオーム解析により、複数のタンパク質のスポットが化学物質投与により変化していることが明らかになった。今後これらのタンパク質について解析を進めることにより、内分泌攪乱作用が疑われる物質の作用機構の解明、また内分泌攪乱化学物質曝露の有用な指標となりうるバイオマーカーの検索が可能となろう。

F . 文献

Ashby J, Tinwell H. Uterotropic activity of bisphenol A in the immature rat. *Environ Health Perspect* 106: 719-720, 1998.

Ashby J, Tinwell H, Haseman J. Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF1 mice exposed in utero. *Regul Toxicol Pharmacol* 30: 156-166, 1999.

Bergeron RM, Thompson TB, Leonard LS, Pluta L, Gaido KW. Estrogenicity of bisphenol A in a human endometrial carcinoma cell line. *Mol Cell Endocrinol* 150: 179-187, 1999.

Bitman J, Cecil HC. Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls. *J Agr Food Chem* 18: 1108-1112, 1970.

Blanco-Rodríguez J, Martínez-García C. Further observations on the early events that contribute to establishing the morphological pattern shown by the oestradiol suppressed testis. *Tiss Cell* 28: 387-399, 1996.

Brökelmann J. Fine structure of germ cells and Sertoli cells during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Z Zellforsch* 59: 820-850, 1963.

Cagen SZ, Waechter Jr JM, Dimond SS, Breslin WJ, Butala JH, Jekat FW, Joiner RL, Shiotsuka RN, Veenstra GE, Harris LR. Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. *Toxicol Sci* 50: 36-44, 1999a.

Cagen SZ, Waechter Jr JM, Dimond SS, Breslin WJ, Butala JH, Jekat FW, Joiner RL, Shiotsuka RN, Veenstra GE, Harris LR. Normal reproductive organ development in Wistar rats exposed to bisphenol A in the drinking water. *Regul Toxicol Pharmacol* 30: 130-139, 1999b.

Dodds EX, Lawson W. Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137: 996, 1936.

Fawcett DW, Anderson WA, Phillips DM. Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. *Develop Biol* 26: 220-251, 1971.

Fung EYK, Ewoldsen NO, Germain Jr HA, Marx DB, Miaw C, Siew C, Chou H, Gruninger SE, Meyer DM. Pharmacokinetics of bisphenol A released from a dental sealant. *JADA* 133: 51-58.

Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Portier CJ, McDonnell DP. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol Appl Pharmacol* 143: 205-212, 1997.

Hazleton Biotechnologies Company. A subchronic (4-week) dietary oral toxicity study of di(2-ethylhexyl) phthalate in B6FC3F1 mice. Submitted to Office of Toxic Substances, US Environmental Protection Agency (Microfiche No. OTS0535433). 1992a.

Hazleton Biotechnologies Company. A subchronic (13-week) dietary oral toxicity study of di(2-ethylhexyl) phthalate in Fischer 344 rats. Submitted to Office of Toxic Substances, US Environmental Protection Agency (Microfiche No. OTS0535433). 1992b.

Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kanei Y, Taketani Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reprod* 17: 2839-2841, 2002.

Inoue K, Kato K, Yoshimura Y, Makino T, Nakazawa H. Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. *J Chromat B* 79: 17-23, 2000.

Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinol* 132: 2279-2286, 1993.

Kuiper GGJ, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson J-A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinol* 138: 863-870, 1997.

Milligan SR, Balasubramanian AV, Kalita JC. Relative potency of xenobiotic estrogens in an acute in vivo mammalian assay. *Environ Health Perspect* 106: 23-26, 1998.

Miyata K, Yabushita S, Sukata T, Sano M, Yoshino H, Nakanishi T, Okuno Y, Matsuno M. Effects of perinatal exposure to flutamide on sex hormones and androgen-dependent organs in F1 male rats. *J Toxicol Sci* 27: 19-33, 2002

Mylchreest E, Cattley RC, Foster PM. Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(n-butyl)phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicol Sci* 43: 7-60, 1998.

Mylchreest E, Sar M, Wallace DG, Foster PM. Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate. *Reprod Toxicol* 16: 19-28, 2002.

Nakahashi K, Matsuda M, Mori T. Vitamin A insufficiency accelerates the decrease in the number of sperm induced by an environmental disruptor, bisphenol A, in neonatal mice. *Zool Sci* 18: 819-821, 2001.

Neri R, Pees E, Watnick A. Anti-androgenicity of flutamide and its metabolite Sch 16423. *Biochem Soc Trans* 7: 565-569, 1979.

Nicander L. An electron microscopical study of cell contacts in the seminiferous tubules of some mammals. *Z Zellforsch* 83: 375-397, 1967.

O'Connor JC, Cook JC, Slone TW, Makovec GT, Frame SR, Davis LG. An ongoing validation of a Tier 1 screening battery for detecting endocrine-active compounds (EACs). *Toxicol Sci* 46: 45-60, 1998.

Papaconstantinou AD, Umbreit TH, Fisher BR, Goering PL, Lappas NT, Brown KM. Bisphenol-A induced increase in uterine weight and alterations in uterine morphology in ovariectomized B6C3F1 mice: role of the estrogen receptor. *Toxicol Sci* 56: 332-339, 2000.

Poon R, Lecavalier P, Mueller R, Valli VE, Procter BG, Chu I. Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-Ethylhexyl)phthalate in the rat. *Food Chem Toxicol* 35: 225-239, 1997.

Russell LD, Goh JC, Rashed RM, Vogl AW. The consequences of actin disruption at

- Sertoli ectoplasmic specialization sites facing spermatids after in vivo exposure of rat testis to cytochalasin D. *Biol Reprod* 39: 105-108, 1988.
- Schafer TE, Lapp CA, Hanes CM, Lewis JB, Wataha JC, Schuster GS. Estrogenicity of bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate in vitro. *J Biomed Mater Res* 45: 192-197, 1999.
- Steinmetz R, Brown NG, Allen DL, Gigsby RM, Ben-Jonathan N. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo. *Endocrinol* 138: 1780-1786, 1997.
- Takahashi O, Oishi S. Testicular toxicity of dietary 2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propane (bisphenol A) in F344 rats. *Arch Toxicol* 75: 42-51, 2001
- Tinwell H, Joiner R, Pate I, Soams A, Foster J, Ashby J. Uterotropic activity of bisphenol A in the immature mouse. *Regul Toxicol Pharmacol* 32: 118-126, 2000.
- Vitale-Calpe R, Burgos MH. The mechanism of spermiation in the hamster. I. Ultrastructure of spontaneous spermiation. *J Ultrastruct Res* 31: 381-393, 1970.
- Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res. Toxicol.* 15: 1281-1287, 2002.
- Vogl AW, Pfeiffer DC, Mulholland D, Kimel G, Guttman J. Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: Ectoplasmic specializations. *Arch Histol Cytol* 63: 1-15, 2000.