

平成15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16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	2
-3. 指定研究結果報告	5
1 . ラット生殖腺の器官培養系におけるトリブチルスズの影響の評価 日本獣医畜産大学獣医畜産学部獣医生理学 鈴木 勝士	7
2 . 内分泌攪乱化学物質による雄性生殖器への影響の分子細胞生物学的メカニズムの 解明 千葉大学大学院医学研究院環境生命医学 森 千里	2 1
3 . 内分泌かく乱化学物質の性腺ホルモン作用機構の解明に関する研究 名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学 那須 民江	5 3
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 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学 岸 玲子	6 9
5 . 核内受容体ファミリーを介する化学物質の生体影響に関する研究 大阪大学大学院薬学研究科生命情報環境科学 西川 淳一	8 3
6 . ビスフェノールA膜受容体の分子生物学的検討と作用機序の解明に関する研究 大阪市立大学大学院医学研究科生体機能解析学 船江 良彦	1 0 1
7 . 甲殻類（ミジンコ）におよぼす内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する研究 自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター 渡邊 肇	1 1 5

．目 的

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

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

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

．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、別紙 1 の各研究班毎に、以下の指定研究を実施するとともに、昨年度実施した作用メカニズムに関する研究発表会を開催した。なお、研究発表会終了後、内分泌攪乱化学物質等研究推進専門委員会において、研究成果の評価を行い、今後必要と思われる研究については、環境省へ指定研究の推薦を行うこととした。

また、実施に当たっては、請負先が必要に応じて技術的指導・支援を行うものとした。

-1．指定研究

- (1) ラット生殖腺の器官培養系におけるトリブチルスズの影響の評価
- (2) 内分泌攪乱化学物質による雄性生殖器への影響の分子細胞生物学的メカニズムの解明
- (3) 内分泌かく乱化学物質の性腺ホルモン作用機構の解明に関する研究
- (4) フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価
- (5) 核内受容体ファミリーを介する化学物質の生体影響に関する研究
- (6) ビスフェノールA膜受容体の分子生物学的検討と作用機序の解明に関する研究
- (7) 甲殻類（ミジンコ）におよぼす内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する研究

-2. 業務担当者一覧

(1) ラット生殖腺の器官培養系におけるトリブチルスズの影響の評価

主任研究者

鈴木 勝士 (日本獣医畜産大学 教授)

研究協力者

鈴木 浩悦 (日本獣医畜産大学獣医学部 講師)

斉藤 賢一 (日本獣医畜産大学獣医学部 助教授)

竹中 基郎 (日本獣医畜産大学獣医学部 大学院生)

八木 美央 (日本獣医畜産大学獣医学部 大学院生)

千葉 純子 (日本獣医畜産大学獣医学部 大学院生)

小山絵里子 (日本獣医畜産大学獣医学部 学部学生)

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

主任研究者

森 千里 (千葉大学大学院医学研究院 環境生命医学 教授)

研究協力者

深田 秀樹 (千葉大学大学院医学研究院SRL 環境健康医学 助教授)

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)

(3) 内分泌かく乱化学物質の性腺ホルモン作用機構の解明に関する研究

主任研究者

那須 民江 (名古屋大学大学院医学系研究科 教授)

研究協力者

市原 学 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)

上島 通浩 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)

山ノ下 理 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)

宮田麻衣子 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)

(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

主任研究者

岸 玲子 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 教授)

研究協力者

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

西條 泰明 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 助手)

近藤 朋子 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 研究員)

梅村 朋宏 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 大学院生)

倉橋 典絵 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 大学院生)

馬 明月（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 大学院生）
大村 実（九州大学大学院医学研究院 衛生学教室 助手）

（５）核内受容体ファミリーを介する化学物質の生体影響に関する研究

主任研究者

西川 淳一（大阪大学大学院薬学研究科 助教授）

研究協力者

今川 正良（名古屋市立大学薬学部 教授）

（６）ビスフェノールA膜受容体の分子生物学的検討と作用機序の解明に関する研究

主任研究者

船江 良彦（大阪市立大学大学院医学研究科 教授）

研究協力者

今岡 進（関西学院大学理工学部 教授）

長田真優子（大阪市立大学大学院医学研究科 助手）

吉田 徳之（大阪市立大学大学院医学研究科 助手）

岡田 和嗣（大阪市立大学大学院医学研究科 大学院生）

（７）甲殻類（ミジンコ）におよぼす内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する研究

主任研究者

渡邊 肇（岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター 助教授）

研究協力者

鑪迫 典久（国立環境研究所 研究員）

勝 義直（岡崎国立共同研究機構 助手）

-3 . 指定研究結果報告

ラット生殖腺の器官培養系におけるトリブチルスズの影響の評価

研究者 鈴木 勝士 (日本獣医畜産大学 教授)

研究要旨

トリブチルスズ(TBT)は、船底塗料として世界的に用いられ、その曝露によってイボニシなどの貝類にインポセックスを引き起こし、雌の産卵能力を障害すると言われている。作用機序に関してはアロマトラーゼの阻害が示唆されているが、哺乳動物の生殖器官形成に対して、どのような影響があるかは明らかにされていない。そこで本実験は、ラットの生殖腺-中腎器官培養系を用いてTBTの直接的な影響を調査した。動物は、Wistar Imamichi ラット近交系を用い、交配翌日を胎齢0.5日として、胎齢15.5日で帝王切開し、胎仔を摘出した。摘出した胎仔を実体顕微鏡下で解剖し、中腎と生殖腺を摘出し、CMRL 培地のフィルター上のドロップの中で培養した。TBT (0.05、0.2、0.5、1、および2 μ M)、テストステロン (T; 2 μ M)、およびアロマトラーゼ阻害剤 (塩酸フアドロゾール、F; 0.1、1、および10 μ M) をそれぞれ培地に加え、4日間培養しその影響を調べた。培養後、生殖腺-中腎組織を Bouin 液で固定し組織学的検索を行った。TBT 曝露によって、雄の精巣発達に対しては明らかな影響は見られなかったが、用量依存性に中腎ウォルフ管の先端が著しく膨化した。雌ではウォルフ管が後期まで残存した。T、Fの曝露では、ウォルフ管の膨化は見られなかったが、雌ではTBTと同様に後期までウォルフ管が残存していた。組織学的検索においても、雄においてはウォルフ管の膨化が確認され、雌では薬物処置した方の中腎でより頭側までウォルフ管が残存していた。以上の結果から、ラットの生殖腺-中腎培養系において、TBTがアロマトラーゼ阻害作用を示す可能性が示された。また、雄で見られたウォルフ管の膨化は、TBTに特異的な機序によって生じている可能性がある。

研究協力者

鈴木 浩悦 (日本獣医畜産大学獣医学部 講師)
斉藤 賢一 (日本獣医畜産大学獣医学部 助教授)
竹中 基郎 (日本獣医畜産大学獣医学部 大学院生)
八木 美央 (日本獣医畜産大学獣医学部 大学院生)
千葉 純子 (日本獣医畜産大学獣医学部 大学院生)
小山絵里子 (日本獣医畜産大学獣医学部 学部学生)

A. 研究目的

13年および14年度と、TBTによる初期胚の着床不全のメカニズムと生存胚における生殖細胞系列の突然変異誘発の可能性を調査するために、妊娠初期のラットにTBTを経口投与し、得られた産仔の形態異常およびゲノムDNAにおけるマイクロサテライトの変異を検出することを試みた。しかし、使用した用量では、産仔が十分量の精巣DNAを得られる日齢まで生育する腹が少なかったこと、さらにマイクロサテライト増幅時のマイナーなバンドのパターンが、サンプリングおよび抽出過程の様々な要因によりより変動しやすいなどの理由から当初の目的に対して明確な回

答が得られなかった。

一方、昨年度の本研究会で TBT が RXR と特異的に結合し、アゴニスト活性を有する可能性が報告された。TBT の内分泌攪乱作用に関しては、イボニシでのインボセックスが、アロマターゼ活性阻害により誘発されている可能性が報告されており、さらに、哺乳動物のいくつかの細胞培養系において、TBT によりアロマターゼの活性阻害や mRNA 発現の変化が引き起こされることが報告されている。しかし、TBT と RXR の直接的な関連を示唆する成績は、昨年の本研究会での西川らの本報告以外に知られていない。しかし、アロマターゼの発現が RXR 当の核内レセプターや転写調節因子により制御されていると言う報告は多数見られる。従って、一つの仮説として、アロマターゼ阻害が TBT の RXR に対する作用により仲介されている可能性がある。

イボニシのインボセックスに対してはアロマターゼ阻害説が知られているが、イボニシではアロマターゼを含むステロイド代謝酵素の動態や RXR などの核内受容体ファミリーに関する知見はほとんどない。一方、哺乳動物では TBT の時期特異的な投与により生殖腺や外部生殖器に対して、イボニシで見られる様な内分泌攪乱作用が有るか否かに関しては詳細な研究はなされていないが、アロマターゼが生殖腺や脳の性分化において重要なキーファクターであることは明らかとなっており、ステロイド代謝系酵素の動態、RXR を含む核内受容体とそれによる遺伝子発現調節のメカニズムに関しては現在、盛んに研究が進められている。

上記の現状を踏まえると、一つの仮説として TBT によるアロマターゼの阻害作用が存在するならば、それは哺乳動物の生殖腺発生過程において何らかの影響を及ぼす可能性があり、それが RXR を介する系で説明される可能性がある。13 年度および 14 年度の問題点を克服するために、まず、*in vitro* の器官培養系で TBT による影響、特に毒性作用以下のホルモン作用としての影響の是非を確認し、その上で *vivo* の系を検討する方策をとることにした。本研究では TBT の作用アッセイおよびその解析モデル系として、ラット胎仔から摘出した生殖腺-中腎器官培養系の開発を行った。性決定後（胎齢 15.5）の生殖腺-中腎組織をラットから摘出し、フィルター上で培養し、培養液に、TBT、テストステロン、アロマターゼ阻害剤等を添加して、培養系で生殖腺と-中腎の発生過程に対する影響を調査する。同時に摘出した対側側の器官は対照として溶媒を添加し、発生が正常に試行することを確認し、TBT の様な内分泌攪乱物質のアッセイおよび作用解析のための培養系モデルの開発を行う。

B. 研究方法

1. 動物

動物繁殖研究所から導入した Wistar Imamichi ラット近交系を用いた。交配翌日、プラグあるいはスミア中に精子が確認されたものを胎齢 0.5 日とした。胎齢 15.5 日の早朝に帝王切開し、胎仔を摘出した。なお、飼育管理はコンベンショナルな環境で行い、ライトコントロールは 8 時から 22 時まで明、22 時から 8 時まで暗とした。温度は 23 ± 2 、湿度は $55 \pm 5\%$ に制御され、餌 (CR-LPF, オリエンタル酵母, 東京) および水は自由摂取とした。

2. 器官培養

実体顕微鏡下で胎児の胎仔の生殖腺を中腎とともに摘出し、片側を対照、片側を薬物処置とした。器官は、ペニシリン-ストレプトマイシン、インスリン (10 μ g/ml)、トランスフェリン (10

μg/ml) および L-グルタミン (200mM) を添加した 500μl の CMRL-1066 培地 (Gibco) に浮遊させた Millicell CM filter (Millipore) 上のドロップの中に置かれた。培養は、5%CO₂、飽和湿度、37 の条件で行った。1 対の生殖腺の片側をコントロール (溶媒添加) として、対側の培地に、TBT (50nM-2μM)、テストステロン (2μM)、アロマトラーゼ阻害剤 (塩酸ファドロゾール、100nM-10 μM) を加え、4 日間培養した。培地は 2 日毎に置換した。

3. 顕微鏡観察と組織観察

培養中の組織は連日、実体顕微鏡 (OLYMPUS SZX) で観察した。経時変化を CCD カメラ (Digital Camera System, Pixera, CA, USA) で撮影し、記録した。培養 4 日目に、光学顕微鏡 (OLYMPUS BX50) で観察および撮影後、Bouin 液 (Sigma diagnostics) で 2 時間固定し、70%アルコールにて 4 に保存した。固定組織はアガロース中に包埋し、定法に従ってパラフィン包埋し、切片 (3μm) を作製した。ヘマトキシリン-エオジン染色後、光学顕微鏡を用いて切片の組織学的観察を行った。

4. アロマトラーゼとテストステロン受容体の発現部位の確認実験

胎齢 16.5 日齢の胎仔の中腎、精巣、腎臓、および副腎を摘出し、Trizol にて RNA を抽出した。RT-PCR high kit (東洋紡) にて、アロマトラーゼとテストステロン受容体の遺伝子断片を増幅した。使用したプライマーは、アンドロジェン受容体については上流配列が F-AAGACCTGCCTGATCTGTGGA、下流配列が R-GCTTTCATGCACAGGAATTCC であり、アロマトラーゼについては、上流配列が F-TTCCCATGGCAGATTCTTGTG、下流配列が R-TCCGATACTCTGCGATGAGA であった。

C. 研究結果

1. TBT 処置による影響率

0.05 ~ 2μM で生殖腺-中腎器官培養系を処置したところ、雄では 1 ~ 2μM の処置群すべてウォルフ管において先端が異常に拡張していた (表 1 および図 1)。0.2μM では、異常の程度がより軽度のものが見られた。一方、雌では、1 ~ 2μM でウォルフ管の残存を示したが、0.2μM で、その程度が軽度になり、0.05μM では見られなくなった (表 1 および図 2)。

2. テストステロン処置による影響率

2μM 濃度で、雄では 3 例、雌では 2 例を処置し、実体顕微鏡下で観察した。雄では TBT 処置の際に見られたようなウォルフ管の末端拡張という明らかな形態異常は特に認められなかった。雌では、TBT 処置と同様、ウォルフ管の残存が見られた (図 3)。

3. アロマトラーゼ阻害剤による影響率

塩酸ファドロゾールによる処置では、雄の TBT 処置の際に見られたものとは異なり、ウォルフ管の末端より中央における拡張を認めた (図 4 および表 2)。雌では、TBT 処置と同様、各用量でウォルフ管が後期まで残存していた (図 5 および表 2)。雌雄ともに、濃度を下げると、異常の程度が軽度になった (表 2)。

4. TBT 処置した中腎-生殖腺の組織学的検索

TBT 処置した雄の中腎-生殖腺では、組織学的検索においてもウォルフ管末端の異常な拡張が確認された。また、調査したすべてにおいて、中腎近傍の精索部分に広範囲なアポトーシスが見られたが、対照側でも 1 例において、同様の部位に極狭い範囲のアポトーシスが見られた (図 6)。雌においては、対照側で頭側のウォルフ管は退行しており、残存は確認できなかったが、1、0.5、

0.2 μ M の TBT 曝露で、頭端近くまでウォルフ管の残存が見られた。雌では雄と同様な異常なアポトーシス像は見られなかった (図 7)。

5. テストステロン処置した中腎-生殖腺の組織学的検索

テストステロン処置では、雄では TBT に見られたウォルフ管末端の拡張像は検出されなかったが、中腎近傍の精索部分に狭い範囲ではあるがアポトーシスが見られた。雌では、TBT 処置と同様にテストステロン処置側のウォルフ管が、より頭側にまで残存しているように見えた (データは示さず)。

6. アロマターゼ阻害剤処置した中腎-生殖腺の組織学的検索

塩酸フアドロゾールによる雌の 10 μ M、1 μ M、0.1 μ M 曝露では、ウォルフ管は対照側のものと比較して、頭側にまで長く残存しているのが確認できた。(図 7)。雄では、10 μ M 曝露の 1 例では TBT 処置と同様のウォルフ管末端の膨化は見られなかったが、ウォルフ管の途中が一部拡張しているのが認められた。(図 8)。

7. アロマターゼとアンドロジェン受容体の発現部位

RT-PCR 法により、アロマターゼが胎齢 16.5 日齢の精巣、副腎、および卵巣に存在し、その存在量は特に卵巣で多いことが確認された。一方アンドロジェン受容体は、精巣、卵巣、雌雄の中腎および副腎で発現していることが確認された。

D. 考察

イボニシにおけるインボセックスの発生機序として、TBT によるアロマターゼの阻害作用が示唆されているが、哺乳動物の生殖腺の発生過程に対して、TBT がどのような作用を有するかは検討されていなかった。本実験は、TBT がラットの中腎-生殖器官培養系において発生攪乱作用を有する可能性を示唆している。未分化生殖腺は、中腎の近傍に形成され、正常では Sry が発現すれば精巣に分化するが、その発現がなければ卵巣へと分化する。Sry の発現により生殖細胞を支持するセルトリ細胞が分化し、ミュラー管抑制ホルモン (MIH) を分泌することで、ミュラー管は退行する。この時、中腎に由来する体細胞からは胎児型ライディッヒ細胞が分化し、テストステロンを分泌する。テストステロンに反応してウォルフ管が発達し、雄の生殖道および副生殖腺が形成される。雌では、セルトリ細胞の分化は誘導されず、MIH が分泌されないためミュラー管は退行せず、テストステロンはアロマターゼにより代謝され、エストロジェンが産生されるため、ウォルフ管は退行し、ミュラー管が発達して雌性生殖道が形成される。これらの生殖腺の分化過程は、器官培養系を用いた *in vitro* の系でも再現することが、多数の研究者によって確認されている。未分化生殖腺からの精巣の分化は、マウスでは血清を含む培地を用いて、フィルター上に置かれたドロップ内で生殖腺を培養することで実施されており、この実験系は主に性索形成の分子機構を明らかにするために、中和抗体やアンチセンス oligo による機能分子の抑制実験において使用されているが、毒性実験の使用例はそれほど多くない。また、ラットの生殖腺を用いた生殖腺の器官培養系もいくつかの研究者から報告されている。ラットでは、マウスと異なり血清を含む場合に、性索形成が抑制されることが知られており、このために無血清培地が考案され使用されている。我々は、予備実験として、ラットの無血清培地を用いて、13.5 日齢の未分化生殖腺を摘出し、同様なフィルター培養により、TBT の性索形成に対する影響を評価した。しかし、2.5 μ M の

高濃度においても、胎齡 13.5 日性索形成等の性分化に対する TBT の明瞭な影響は観察されなかった（データは示さず）。

TBT にアロマターゼ阻害などのステロイド合成に対する影響が存在する可能性が指摘されており、その場合、影響が見られるのは、生殖腺の分化が開始し、雌雄に特異的なステロイド合成が行われる時期であると予想される。正常では、生殖腺の分化後に、精巣あるいは卵巣から分泌されるステロイドホルモンの影響により、副生殖器の分化が雄あるいは雌の方向に制御されている。そこで、我々は上述の培養系を用いて、生殖腺分化後（15.6-16.5 日）の中腎-生殖腺を摘出および培養し、それに対する TBT の影響を評価した。この培養系では対象側の生殖腺-中腎では、生殖腺の分化に応じて、雄ではウォルフ管の発達とミュラー管の退行が、雌ではウォルフ管の退行とミュラー管の発達が観察された。従って、我々は短期間ではあるが、ステロイドにセンシティブである副生殖器の分化過程を再現し、薬物の影響を評価できる培養系を開発したと言える。さらに、RT-PCR 法により、16.5 日の中腎において、テストステロン受容体の高い発現レベルを確認した。しかし、この培養系では 5 日間の培養期間を過ぎると、雌雄いずれの副生殖器も退行を開始するため、より長期間の培養系のためには、血清の添加等の方法の改善が必要であると考えられる。

我々の開発した、生殖腺分化後の副生殖器の分化過程を観察しえる培養系を用いて、我々は、雌の生殖腺-中腎培養系に対する TBT の曝露が、テストステロンおよびアロマターゼ阻害剤と同様な作用として、正常では退行すべきウォルフ管の胎生後期までの残存を生じることを観察した。組織学的検索では、対照培養系においてウォルフ管は頭部から徐々に消失する傾向があり、それは *in vivo* で報告されている状況と同じである。TBT 処置でも、ウォルフ管は、退行を始めていたが、頭部が長く残存していた。少なくとも現在のところ、ウォルフ管退行因子は同定されておらず、テストステロンの積極的な作用が存在しなければ、ウォルフ管は退行すると言われている。我々の用いた培養系においても、雄ではウォルフ管が維持されるが、雌では培養開始後に急速に退行することが観察された。また、RT-PCR 法では、この時期の卵巣で高い、アロマターゼの発現が確認され、同時に中腎において高いアンドロジェン受容体の発現が確認された。今回はアンドロジェン受容体作用の阻害や、直接的に培養液中のテストステロン濃度の測定を行っていないが、状況証拠は、仮説としての TBT によるアロマターゼ阻害の可能性を支持している用に見える。しかし、TBT が直接アンドロジェン受容体に作用した可能性や、アンドロジェン受容体以降の細胞内カスケードに影響している可能性も除外できない。

一方、雄では、ウォルフ管は退行せず（発達し）、ミュラー管が MIH により退行するが、その過程は我々の器官培養系においても、対照側で再現されていた。また、TBT 曝露によってミュラー管の退行が遅延するという減少は見られなかったことから、TBT はセルトリ細胞の MIH 合成に対しては直接明らかな影響を有さないと考えられる。しかし、精巣ではアロマターゼ活性はセルトリ細胞で認められており、TBT がセルトリ細胞のステロイド合成酵素に影響している可能性がある。TBT 曝露で観察された、ウォルフ管（頭端）の異常な拡張所見は、テストステロンおよびアンドロジェン阻害薬では認められなかった。従って、この影響は TBT に特異的な作用であると考えられる。RT-PCR 法によりこの時期の精巣においてアロマターゼが存在することが確認されたが、その発現量は卵巣に比較するとわずかであり、これが直接、器官培養系で見られた雄のウォルフ

管の異常を説明するとは考えづらい。しかし、ノックアウトマウスで示されている様に、雄におけるエストロジェンの作用は雄の造精および生殖器分化に対して重要であり、アロマターゼの抑制によるエストロジェン作用の低下が雄に与える影響も考えられる。組織学的検索では、中腎に近い部分の性索の一部で過剰なアポトーシスが TBT 曝露により認められたが、程度は少ないものの同様な異常が、対照側でも観察された。従って、これが真に TBT による影響か否かを判断するためには、さらなる実験が必要である。一般に器官培養系では、器官が大きくなるにつれて、その中心部では、酸素や栄養が枯渇する傾向がある。今回我々が用いた培養組織は、培養液の表面に浮遊させたフィルター上のドロップの中に置かれた。栄養は下部の培養液からフィルターの穴を通じて供給され、酸素はドロップの液層にたいして供給されと考えられる。しかし、それでも組織の成長に伴い、その中央部分は栄養および酸素の欠乏傾向にあるはずであり、この状況は周囲組織より薬物に対してセンシティブ（死にやすい）状況を生み出している可能性がある。

本実験では、同様な時期の *In vivo* の投与実験を行っていない。このため、*in vivo* で曝露したときに、同様な影響が生じるのか否かについては、我々は直接的な情報を持ち合わせていない。いくつかのグループは、齧歯類においてトリアルキルスズ化合物の *in vivo* での生殖毒性を報告している。しかし、トリアルキルスズ化合物の催奇形性は、それらが胎児に直接作用を及ぼすのか、あるいは胚毒性は母体への毒性に起因するののかという点に関しては、評価するのが困難なため、不明確なままである。今回の実験は *in vitro* ではあるが、培養液に投与した TBT が、摘出した中腎-生殖腺に直接影響を与える可能性を示唆している。今回の培養実験において、雌雄両方で影響の見られた TBT の 1 μ M は、それが約 333g のラット母子体内に均一に分布している状態を仮定すると、0.1mg の TBT が体内に一様に分布した状態ということになる。実際の投与では、生体への吸収率、生体内での代謝、解毒作用、胎仔への移行率などを考慮する必要があり、仮に 100 倍の濃度を投与する必要があると考え、ラット 1 匹あたり 10mg の TBT を投与することとなる。Harazono らの報告によると、妊娠 0-3 日目のラットへの TBTC 投与では、妊娠率の低下は 16.5mg/kg 群から観察され、4-7 日目投与群の生存胎仔数の減少は 32.5mg/kg 投与群から観察されている。今回器官培養系で行った TBT 濃度は、*in vivo* の投与でも再現できる可能性があり、今後の検討が必要であろう。

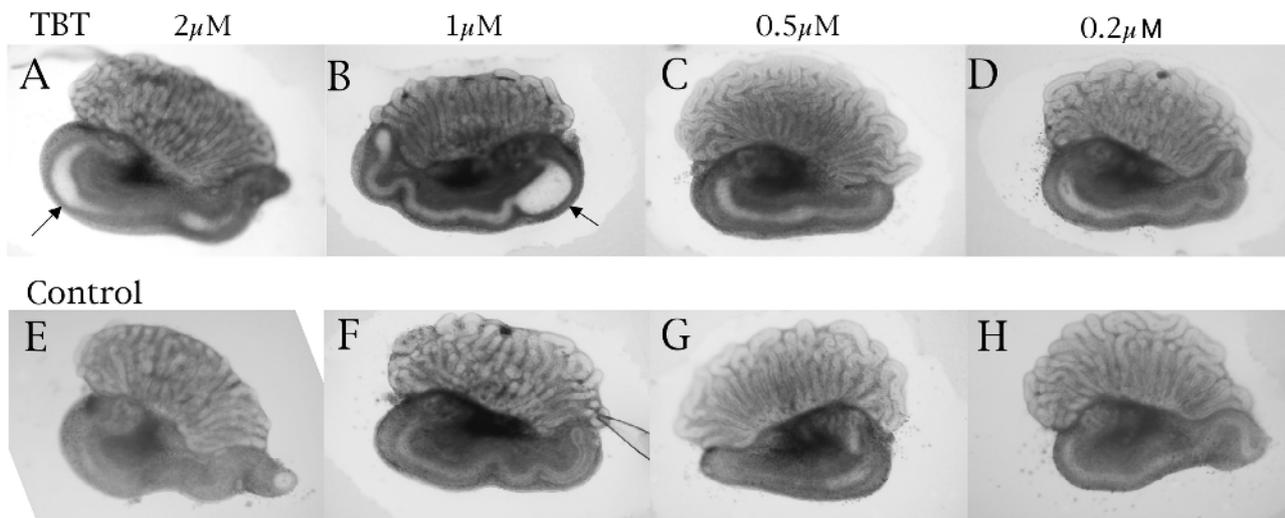
ステロイドや甲状腺ホルモンなどの脂溶性低分子ホルモンの受容体である核内受容体群は、多細胞生物の内分泌調節系の主要な部分を担っている。最近、内分泌攪乱物質は、この核内受容体を介して生体内システムを攪乱し、生物の発生や分化、恒常性の維持に影響を及ぼすことが指摘されている。内分泌攪乱物質作用が疑われる化学物質のヒトの各種核内受容体に対する影響を調べた報告によると、TBT はレチノイン酸 X レセプター (RXR) に対して、標準リガンドである 9-シスレチノイン酸とほぼ同等の活性を示した。一方、Yanase らの報告によると、RAR:RXR ヘテロダイマーによって構成される核内受容体は、アロマターゼ活性の調節に関与する。従って、今回の実験においても、アロマターゼ活性に対して RXR が関与している可能性がある。従って、今回の培養系において、RXR アゴニストにより、TBT と同様な影響が現れるのか、あるいは RXR アンタゴニストを用いて、TBT で見られた作用が阻害されるのかを調査することは意義があると考えられる。

Table.1 The influence of TBT on embryonic gonad and mesonephro culture

Conc. of TBT-C (μ M)	Expansion of Wolffian duct	male		Remnant of Wolffian duct	female	
		Control	TBT		Control	TBT
1-2 μ M	+	0/8(0)	8/8(100)	+	0/5(0)	5/5(100)
	\pm	1/8(0)	0/8(0)	\pm	1/5(20)	0/5(0)
	-	7/8(88)	0/8(0)	-	4/5(80)	0/5(0)
0.2 μ M	+	0/4(0)	1/4(25)	+	0/3(0)	0/3(0)
	\pm	1/4(25)	2/4(50)	\pm	0/3(0)	3/3(100)
	-	3/4(75)	1/4(25)	-	3/3(100)	0/3(0)
0.05 μ M				+	0/2(0)	0/2(0)
				\pm	0/2(0)	0/2(0)
				-	2/2(100)	2/2(100)
abnormal/total (%)						

Department of Veterinary Physiology, N. V. A. U.

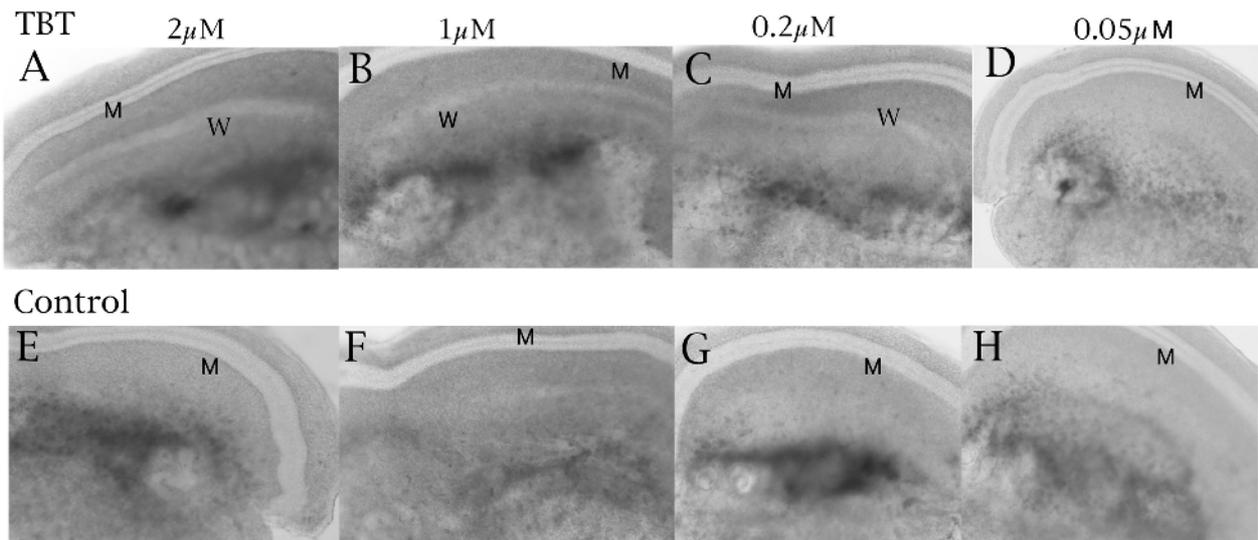
Fig.1. Effect of TBT on testis and mesonephron organ culture



A-D: TBT exposure at each dose represented. E-F: Contralateral gonads as controls treated with vehicle. Not the expansions of the edge of Wolffian duct in TBT-treated group (arrows).

Department of Veterinary Physiology, N. V. A. U.

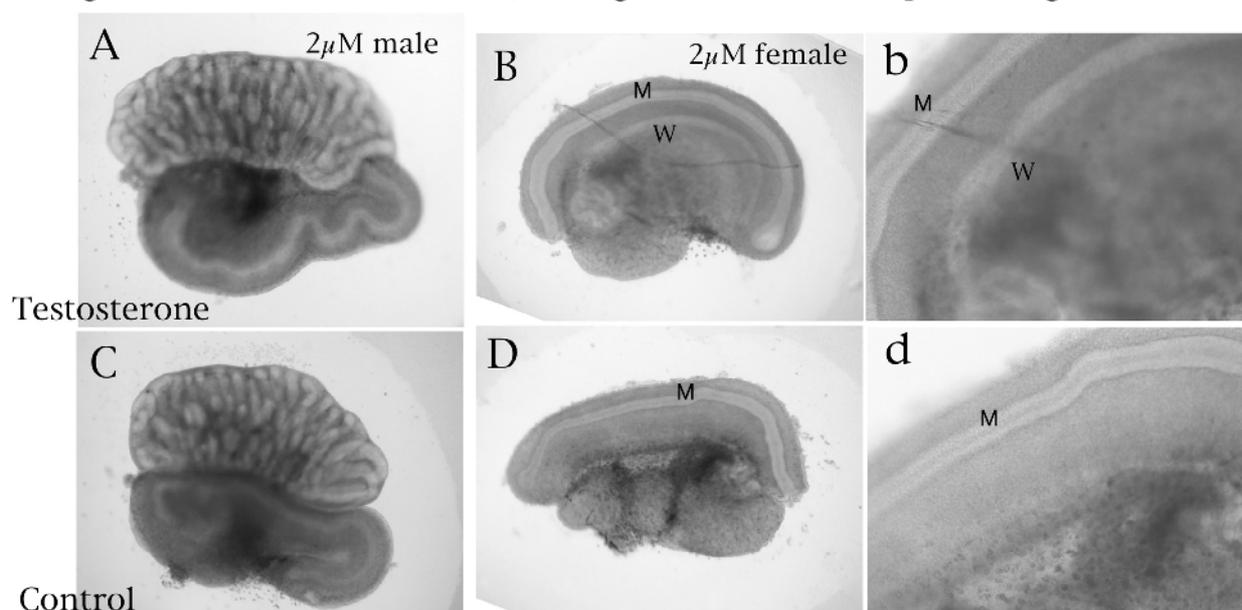
Fig.2. Effect of TBT on ovary and mesonephron organ culture



A-D: TBT exposure at each dose represented. E-F: Contralateral gonads as controls treated with vehicle. Not the remnant of Wolffian duct in TBT-treated group. W: Wolffian duct, M: Mullerian duct

Department of Veterinary Physiology, N. V. A. U.

Fig.3. Effect of Testosterone (T) on gonad and mesonephron organ culture



A: Male gonad treated with T. C: Contralateral gonads as controls treated with vehicle. B, b: Female gonad treated with T. D,d: Contralateral gonads as controls treated with vehicle. Not the remnant of Wolffian duct in TBT-treated group. W: Wolffian duct, M: Mullerian duct

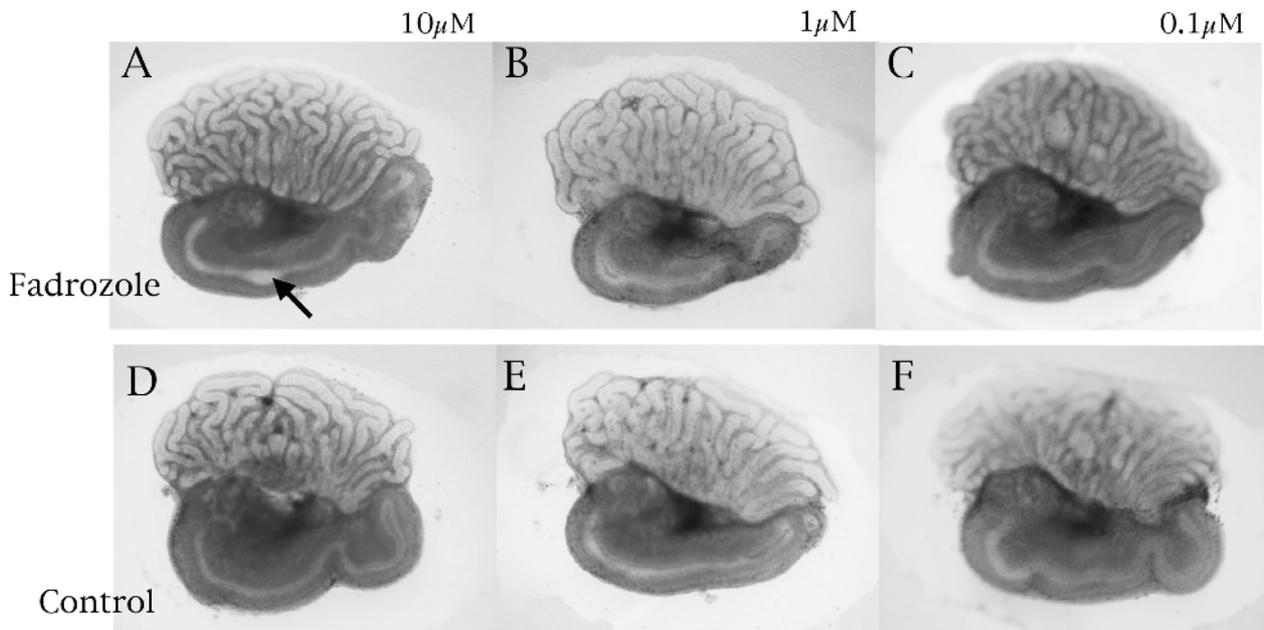
Department of Veterinary Physiology, N. V. A. U.

Table.2 The influence of Fadrozole on embryonic gonad and mesonephro culture

Conc. of Fadrozole	Expansion of Wolffian duct	male		Remnant of Wolffian duct	female	
		Control	Fadrozole		Control	Fadrozole
10µM	+	0/5(0)	0/5 (0)	+	0/4(0)	3/4(75)
	±	0/5(0)	4/5(80)	±	2/4(50)	1/4(25)
	-	5/5 (100)	1/5(20)	-	2/4(50)	0/4(0)
1µM	+	0/4(0)	0/4(0)	+	0/3(0)	2/3(66.6)
	±	0/4(0)	1/4(25)	±	1/3(33.3)	1/3(33.3)
	-	4/4(100)	3/4(75)	-	2/3(66.6)	0/3(0)
0.1µM	+	0/4(0)	1/3(33.3)	+	0/1(0)	0/1(0)
	±	1/4(25)	0/3(0)	±	1/1(100)	1/1(100)
	-	3/4(75)	2/3(66.6)	-	0/1(0)	0/1(0)

Department of Veterinary Physiology, N. V. A. U.

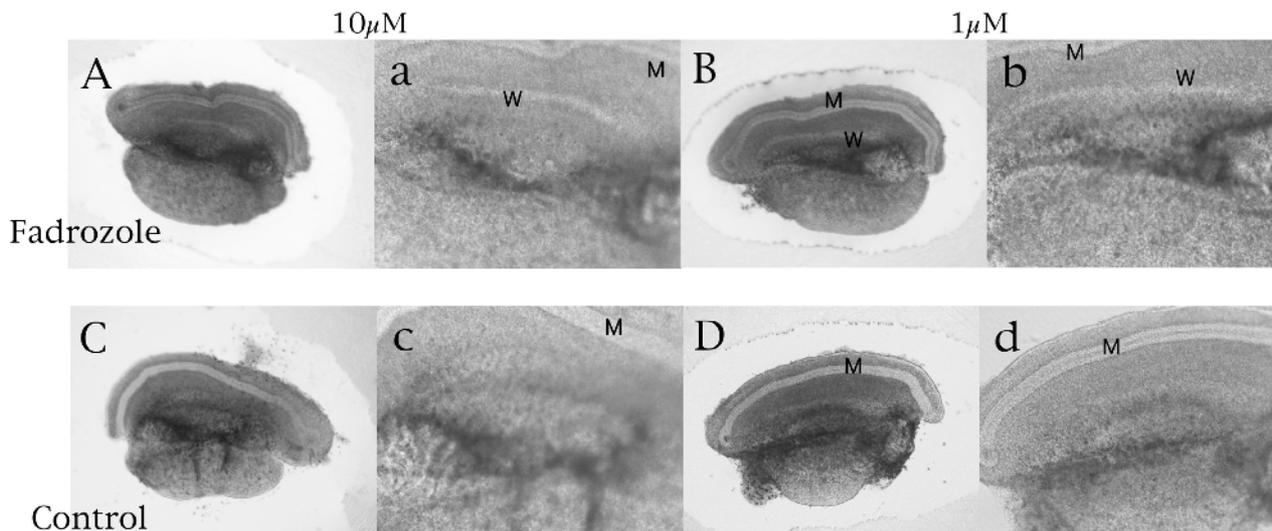
Fig.4. Effect of Fadrozole on testis and mesonephron organ culture



A-D: Fadrozole exposure at each dose represented. E-F: Contralateral gonads as controls treated with vehicle. Not the expansion of Wolffian duct in Fadrozole-treated group (arrow).

Department of Veterinary Physiology, N. V. A. U.

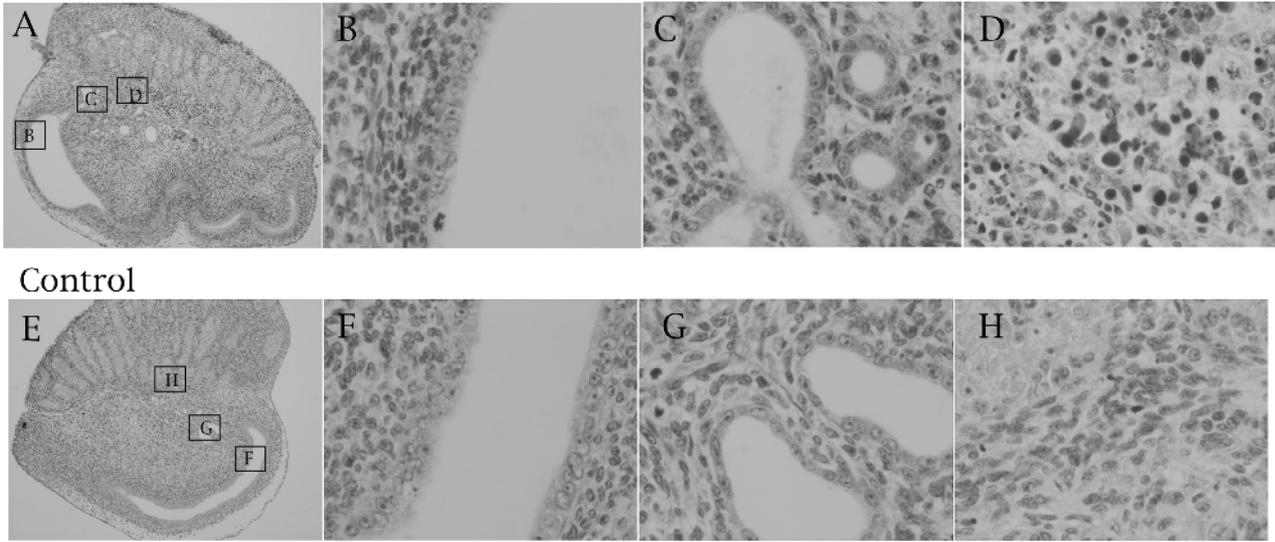
Fig.5. Effect of Fadrozole on ovary and mesonephron organ culture



A, B: Fadrozole exposure at each dose represented. C, D: Contralateral gonads as controls treated with vehicle. Not the remnant of Wolffian duct in Fadrozole-treated group.

Department of Veterinary Physiology, N. V. A. U.

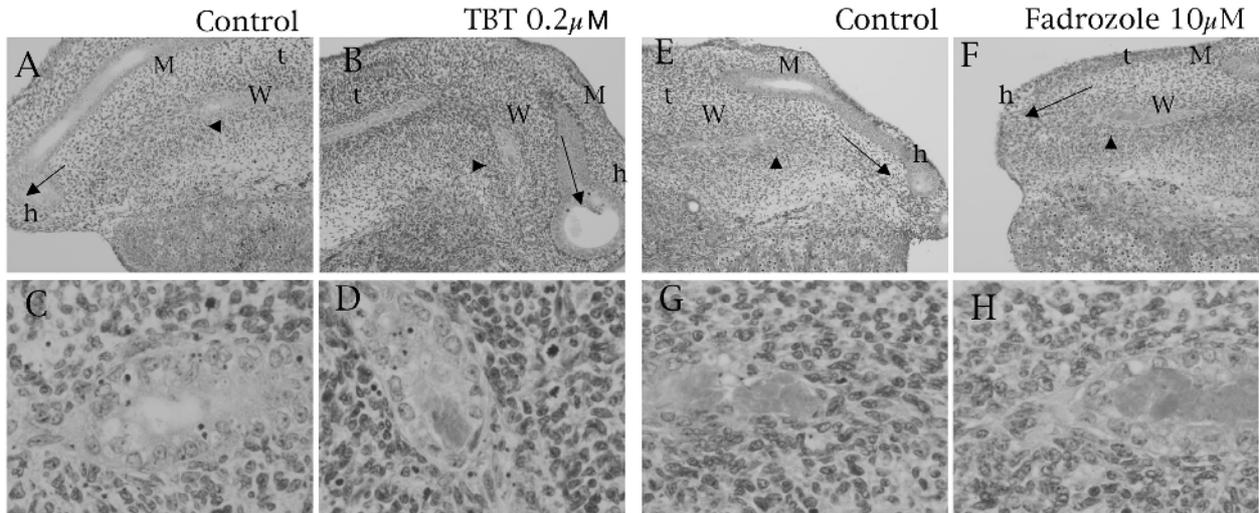
Fig.6. Histology of testis and mesonephro organ culture treated with TBT
TBT 1 μ M



A-D: Testis and mesonephros treated with TBT. E-F: Contralateral organ as vehicle control. A,E: Whole organs. B, F Epithelium of Wolffian duct. C, G: Efferent ducts of testis. D, H: Seminiferous cords close to mesonephros. Abnormal cell death was observed in TBT-treated gonad.

Department of Veterinary Physiology, N. V. A. U.

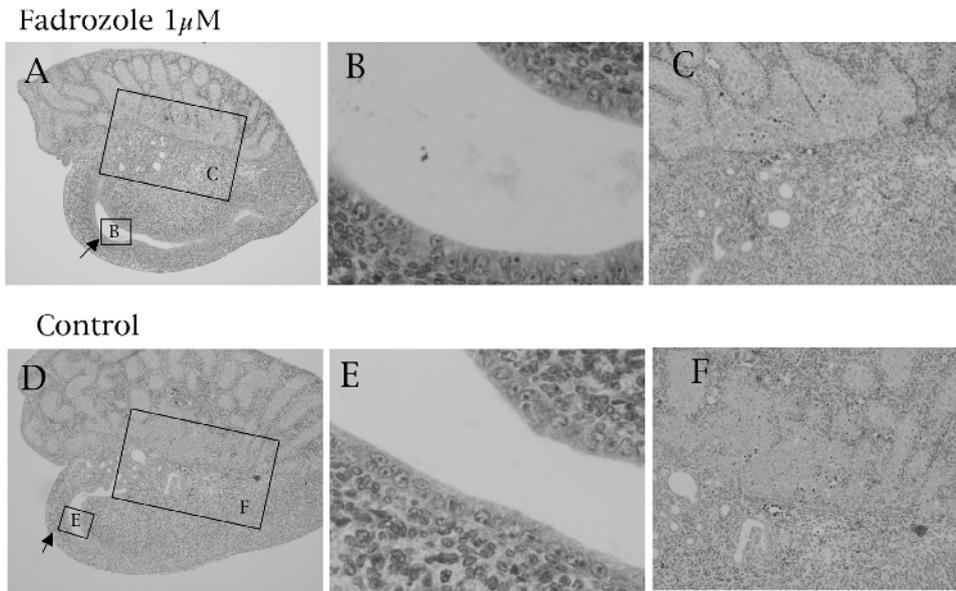
Fig. 7. Histology of female mesonephros culture with TBT and Fadrozole



A, B, E, F: Mesonephric tissue. C, D, G, H: Edge of Mullerian duct. Although the remnant of Mullerian duct was observed in control mesonephros treated with vehicle, the distance of the remnant remains appears longer in TBT and Fadrozole-treated than in contralateral mesonephros. M: Mullerian duct, W: Wolffian duct, h: head, t: tail, arrow: direction of tail to head, arrowhead: remnant of Mullerian duct.

Department of Veterinary Physiology, N. V. A. U.

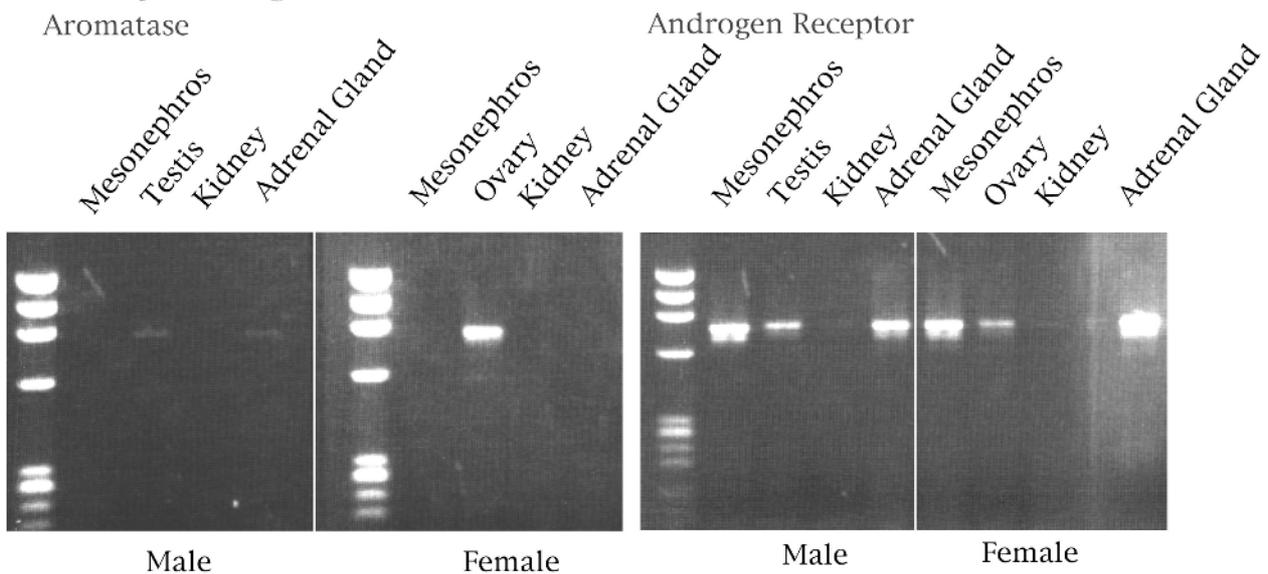
Fig.8. Testis and mesonephro organ culture treated with Fadrozole



A-C: Gonad and mesonephros treated with Fadrozole. D-F: Conrlateral gonad as vehicle control. B, F: Epithelium of Wolffian duct. C, D: Efferent ducts of testis. D, H: Seminiferous cords close to mesonephros.

Department of Veterinary Physiology, N. V. A. U.

Fig.9. mRNA expression of aromatase and androgen receptor in E16.5 embryonic organs



Aromatase is highly expressed in fetal ovary. The expression is also detected in fetal testis but the level is low. The expression of androgen receptor is detected in fetal gonad, mesonephros, and adrenal gland. The expression is high in mesonephros.

Department of Veterinary Physiology, N. V. A. U.

Evaluation of the influence of tributyltin on rat gonad organ culture.

Katsushi Suzuki, Hiroetsu Suzuki, Saito Kenichi, Eriko Oyama, Motoo Takenaka, Miou Yagi and Junko Chiba

Department of Veterinary Physiology, Nippon Veterinary and Animal Science University, Japan

[Purpose] We are anxious about the influence of endocrine disruptors on reproduction of human and animals in recent years. Tributyltin (TBT) is globally used as antifouling paint. The exposure for TBT causes imposex in snail, such as Ibonishi, and reduces egg production capability of it. Although it has been reported that the inhibition of aromatase activity is involved in the mechanism of the snail masculinization, it has not yet examined whether TBT has any influence on the formation of reproductive organs in mammals including human. In this study, therefore, the influence of TBT was investigated using organ culture system consisted of fetal gonad and mesonephron. [Method] Rats from Wistar Imamichi rat inbred strain was used. The day at which the sperm was appeared in smear was designated as embryonic day (ED) 0.5. The cesarean section was carried out at ED15.5, and the embryo was extracted. The embryos were dissected under the stereoscopic microscope, the gonads were extracted with mesonephros, and it was cultured on floating filters in CMRL culture medium. TBT (50nM-1 μ M), testosterone (2 μ M), and the aromatase inhibitor (100nM-10 μ M) were added to the culture medium, respectively. Gonads were cultured during 4 day, and the influence was investigated. After culture period, gonads were fixed in Bouin solution and processed with histological examination. [Result] Although TBT has no influence on testicular development, the tips of male Wolffian ducts were expanded with the dosage of TBT. In female culture, Wolffian ducts were remained until later stage. In testosterone and aromatase inhibitor, although dilations of male Wolffian ducts were not found, the ducts were remained until later stage in females as shown in TBT exposure. [Consideration] By this study, it is suggested that TBT has an influence like aromatase inhibitor in gonad organ culture. The dilations of Wolffian ducts found in male gonads may be caused by the other specific mechanism for TBT. The organ culture system developed in this experiment may become a useful tool for studying the direct influence of endocrine disruptors on the reproductive organ development of rats.

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

研究者 森 千里 (千葉大学大学院医学研究院 環境生命医学 教授)

研究要旨

(1) 17β -estradiol 3-benzoate(E_2B)やflutamide(Flu)の単独投与では精子形成や造精サイクルの乱れなどが現れない低量であっても、これらを複合投与すると、その作用が見られるようになった。一方、化学物質の組み合わせによっては互いの作用を打ち消しあうこともわかった。今後さらにメカニズム研究を進めることにより、内分泌攪乱化学物質の影響を回避する方法の開発につながるものと考えられる。

(2) 17β -estradiol(E_2), E_2B , bisphenol A(BPA), Flu, diethylstilbestrol(DES)投与動物と不妊である2系統のノックアウトマウスおよび1系統の突然変異ラットとを微細形態的に比較した。 E_2 等を投与した動物は両ノックアウトマウスと同じような精子細胞の尖体と核およびセルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置に形態変化が見られた。アクチン結合蛋白の局在も同じようだった。突然変異ラットにこれら薬剤を投与しても表現型に変化はなかった。このことは E_2 等の作用点と突然変異ラットの表現型をもたらす要因は同じであることを示唆している。

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

(4) in-house cDNA マイクロアレイ解析により、新生仔マウスへのDESあるいは E_2 投与により精巣上体において発現変化した遺伝子が2、4、8週齢のすべてにおいて検出された。これらの遺伝子は、DESあるいは E_2 の新生仔期における投与による精巣上体機能の低下に関与していることが示唆された。

(5) *in vivo*の妊娠前からの慢性的低濃度イソフラボン摂取は、雄性新生仔の性発達に長期的な影響は及ぼさないが、一過的な影響がある可能性が示された。また、*in vitro*でのプロテオーム解析から、植物エストロゲンを含めた化学物質の精巣細胞への影響について、遺伝子発現および遺伝子産物の網羅的解析により、化学物質の分類分けができることが示された。

研究協力者

深田 秀樹 (千葉大学大学院医学研究院SRL 環境健康医学 助教授)

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)

A. 研究目的

現在、環境中の内分泌攪乱作用を持つ化学物質による生物の生殖機能の障害が社会的に大きな問題となっており、生物環境ならびに人の健康に対する影響は、人における精子数の減少や野生生物に様々な生殖異変が既に生じている点からも懸念されている。これらの物質がなぜ有害であるのかを細胞、分子のレベルにおける作用機構の点から明らかにするとともに、有害性の予想さ

れる物質の作用を検証し、さらなる汚染拡大の合理的予防策を講ずる努力が、国民の不安に対処し安全な生活の確保を図る上で必要である。また、近年、内分泌攪乱化学物質の低用量影響を評価するにあたり、そのコントロール群のバックグラウンドが高く、評価の難しい系が存在することが明らかになってきているうえ、高いバックグラウンドを示す原因の1つである植物エストロゲンについても、アジア人は日常的に多量に摂取しており、欧米でも乳幼児に積極的に与えるようになってきているなど、その影響を調査しておく必要がある。本研究では内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムについて、雄性生殖器に対する影響の機序を対象とし、分子生物学、細胞生物学的手法を用いて解明し、さらに内分泌攪乱化学物質による健康障害の分子細胞生物学的マーカーを見出すことを目的とする。本研究による代表的な内分泌攪乱化学物質の作用機序解明の成果は、内分泌攪乱作用の疑われる物質の客観的な体系的検索法の開発に寄与することが期待できる。

ホルモン様作用を有するdiethylstilbestrol(DES)、bisphenol A、flutamide(Flu)、di-(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP)、di-(n-butyl)phthalate(DBP)や17 β -estradiol(E₂)などの物質を対象とし、セルトリ細胞や精子形成における発達障害や細胞分化遅延の機構について分子・細胞レベルでの解析を行ってきた。本年度は、(1)前年度までにエストロゲン様作用が確認されたFluとエストロゲン物質E₂B、抗アンドロゲン化合物シプロテナーセテートおよび抗エストロゲン化合物ICI182,780(ICI)を混合投与し、形態レベル(電子顕微鏡)および分子レベルでの影響を解析する。(2)特に前年度、セルトリ細胞 精子細胞およびセルトリ細胞 セルトリ細胞の特殊接合装置の形成不全が起こることを発見したが、そのメカニズムを分子レベルで解明する。その方法としては、それら特殊接合装置に存在すると思われるタンパク質をコードする遺伝子のノックアウトマウスを使用し、特殊接合装置形成不全の発生メカニズムの解明を目指す。(3)また、GFP(Green Fluorescent Protein)マウスを用いた精子形成細胞移植技術を使用し、内分泌攪乱化学物質(DES)の精巣内の標的細胞種を特定する。(4)加えて、精子成熟に及ぼす化学物質の影響を解明するため、精巣上体の遺伝子発現のトキシコゲノミクス解析を行う。(5)さらに、生体への影響が明確でない植物エストロゲンが精巣へ及ぼす影響については、豆類の摂取が多いアジア人のモデルとして妊娠前から植物エストロゲンを投与したマウスの仔への影響について解析すると共に、精巣細胞株に植物エストロゲンを作用させてトランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析を行う。

以下具体的に、実施事項ごとの目的を示す。

1. 齧歯類新生仔期化学物質複合投与の雄性生殖器に及ぼす影響の形態学的解析および分子メカニズムの解明

前年度の報告から、抗アンドロゲン物質Fluが17 β -estradiol 3-benzoate(E₂B)、E₂およびエストロゲン作用をもつBPAと同様に、齧歯類の精巣において、精子細胞のアクロソームと核の変形、セルトリ細胞 - 精子細胞間の特殊接合装置(ES)の欠損を誘導することが明らかになった。これらの化学物質が精子形成へ与える影響をより詳しく調べるために、本年度では、Flu + E₂B(エストロゲン作用 + エストロゲン)、Flu + cyproterone acetate(CA)(抗アンドロゲン + 抗アンドロゲン)、Flu + ICI(エストロゲン作用 + 抗エストロゲン)をそれぞれ組み合わせてマウスに同時投与をおこない、作用点の解析を行う。

さらに、ヒト遺伝子導入されたトランスジェニックの一系統において、上述の化学物質投与で見られたものと同様な精巣の形態変化を認めたことから、このマウスと共通する遺伝子や蛋白の

変化を検索することにより、精子形成メカニズムの解明を進める。

2. ノックアウトマウスを用いた新生仔期化学物質投与の特殊接合装置に及ぼす影響の形態学的および分子メカニズムの解明

我々の今までの実験から、DESをラットおよびマウスの新生仔に投与するとその動物のセルトリ細胞間の特殊接合装置(血液・精巣閉門)の形成がラットでは約4週間、マウスでは約2週間遅れることがわかった。また、血液・精巣閉門の形成が遅延されている間は造精細胞が減数分裂を完了できないことがわかった。結局、新生仔へDESを投与すると、精子形成がラットでは約4週間、そしてマウスでは約2週間遅れることがわかった。しかしDESを成獣に投与しても血液・精巣閉門には影響を与えず、精子形成には異常のないこともわかった。このことからDESは幼弱なセルトリ細胞に影響して、血液・精巣閉門の形成を遅延させるが、成獣投与の場合のように、血液・精巣閉門が形成された後にDESを作用させてもその影響は出ないことがわかった。また、 E_2B 、 E_2 、BPA、Fluを新生仔ラット、マウスに投与すると、DES投与の場合と異なり、血液・精巣閉門の形成には異常は見られなかった。そして造精細胞は思春期になると減数分裂を始めたが、精子細胞の尖体および核に変形が見られた。そして成熟精子細胞ではこれらの異常はさらに続き、最終的には尖体、核の変形を示す精子が形成された。また、セルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置にも形成不全が見られた。これらの異常はラットでは生後15週齢で、マウスでは生後12週齢で回復し、これらの精巣には正常の精子形成が見られた。また、これら週齢での妊孕性も確認できた。成獣ラット、マウスに E_2B 、 E_2 、BPAを投与しても新生仔投与の場合と同じ結果を得た。すなわち精子細胞の尖体および核に変形が見られた。この変形は精子でも見られた。また、セルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置も新生仔投与と同じように形成不全が見られた。

以上のことから、DES投与の系では形成期の血液・精巣閉門が影響を受けて造精細胞の減数分裂阻止が起こり、そして E_2B 、 E_2 、BPA投与の系ではセルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置が影響を受けて精子細胞の尖体と核が変形したと思われる。このことを確かめるために突然変異ラットおよび種々の遺伝子ノックアウトマウスで特殊接合装置の異常や精子細胞の頭部異常を示す動物についてDES、 E_2B 、 E_2 、BPA、Fluを投与し、正常動物のこれら薬剤の投与と比較することによりこれら薬剤の作用を推測することを本研究の目的とした。

3. 造精細胞移植技術を用いた標的細胞の解明

雄マウス新生仔を内分泌攪乱化学物質であるDESに曝露すると、精子形成に障害の起こることが知られている。しかし、その障害が生殖細胞の不具合によるのか、あるいは精子形成を支える体細胞系の不具合によるのかは明らかになっていない。そこで本研究では、DESの標的細胞が生殖細胞と体細胞のどちらであるのかを明らかにすることを目的とした。

そのため、Green Fluorescent Protein(GFP)遺伝子を組み込んだマウスを用いて2つの移植実験を行った。

移植実験1: GFP遺伝子を組み込んだ新生仔マウスにDESを投与し、成熟後精巣から生殖細胞を分離する。これをあらかじめbusulfanで内在の生殖細胞を除去した精巣内に移植する。

移植実験2: 新生仔マウスにDESを投与し、さらにbusulfanで内在の生殖細胞を除去しておく。そこにGFP遺伝子を組み込んだマウスの生殖細胞を移植する。

もしDESの標的が生殖細胞であれば、移植実験1では精子形成に何らかの影響が生じるが、移植実験2では正常な精子形成が確認できるはずである。一方、DESの標的が体細胞である場合、移植実験1では正常な精子形成は確認できるが、移植実験2では精子形成に何らかの影響が現れるはずである。これらの影響を検討するための指標としては、(1)移植した生殖細胞の精細管への定着とそこでの広がり(これはGFPの蛍光により確認する)、(2)移植した生殖細胞に由来する精子形成の状態(これは組織切片の観察により確認する)の2つに着目し、解析を行った。

4. 齧歯類新生仔期化学物質投与の雄性生殖器に及ぼす影響のトキシコゲノミクス解析

精巣上体は精子の授精能や運動能の獲得に重要な臓器である。合成エストロゲンDESはマウス新生仔への投与により、成獣時における精子の運動能や妊孕性の低下、精巣上体の組織形態的变化が報告されている(Atanassova *et al.* 2001; Goyal *et al.* 2003; Adachi *et al.* 2003)。しかし、新生仔へのDES投与による精巣上体における遺伝子の発現変化についてはあまり報告されていない。近年、多くの遺伝子の発現変化を解析することのできるマイクロアレイ法が開発されており、細胞内情報伝達経路での遺伝子発現解析など様々な分野で非常に有効な方法として注目されている。そこで、本研究ではマイクロアレイ法を用いて、新生仔マウスへのDES投与による精巣上体の遺伝子発現(特に精子成熟に関係する遺伝子)への影響を解析することを目的とした。

5. 齧歯類胎仔期・新生仔期植物エストロゲン投与の雄性生殖器に及ぼす影響

実験動物飼育用餌の中にエストロゲン活性を持つ成分が含まれていることから、近年、低濃度の内分泌攪乱化学物質の評価を実験動物で行うにあたり餌中のエストロゲン様物質による実験動物への影響が問題となっている。今後の諸研究を進める上でも、餌を介した植物エストロゲン曝露による影響を把握しておく必要がある。

また、遺伝子発現変化、遺伝子産物の変化の解析(プロテオミクス解析)を行うことにより、植物エストロゲンを含めた化学物質の影響について、精巣細胞株であるTM4を用いて網羅的に解析することを目的とした。

B. 材料と方法

実施項目ごとに項を分けて記載した。

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

1. 齧歯類新生仔期化学物質複合投与の雄性生殖器に及ぼす影響の形態学的解析および分子メカニズムの解明

a) 化学物質

Flu、E₂B、CA(Sigma, St Louis)、ICI(TOCRIS)をdimethyl sulfoxide(DMSO)(Sigma)に溶かし、これをcorn oil(Sigma)で希釈した。

b) 動物

マウスはICR系(日本SLC)を用い、溶解させた化学物質を皮下から連続5日間投与し、6日目に評

価した。投与マウスとの比較に用いたトランスジェニックマウスは、東京医科歯科大学より寄贈していただいたものを使用した。

c) 化学物質の投与量

単体投与では、

Flu, ICI: 0.00012, 0.0012, 0.012, 0.12, 1.2 (µg/g/day)

CA: 0.0012, 0.012, 0.12, 1.2, 12 (µg/g/day)

E₂B: 0.002, 0.02, 0.2 (µg/g/day)

複合投与では、

Flu (0.00012, 0.0012, 0.012, 0.12, 1.2)+ E₂B (0.02=L0EL)

Flu (0.00012, 0.0012, 0.012, 0.12, 1.2)+ CA (0.12=L0EL)

Flu (0.00012, 0.0012, 0.012, 0.12, 1.2)+ ICI (0.012=L0EL)

の組み合わせで同時投与を行った。

d) サンプルング法

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。電子顕微鏡観察に用いる臓器は、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。免疫抗体法に用いる臓器は、10%ホルム・アルデヒドで灌流固定した後に採取した。

e) チトクロームCによる血液・精巣関門の機能検査

チトクロームCをトランスジェニックマウスの精細管内腔に顕微注入し、それが精巣間質にまで到達するか否かを調べた。方法の詳細は本報告書の「2. ノックアウトマウスを用いた新生仔期化学物質投与の特殊接合装置に及ぼす影響の形態学および分子メカニズムの解明」の項に記した。

2. ノックアウトマウスを用いた新生仔期化学物質投与の特殊接合装置に及ぼす影響の形態学および分子メカニズムの解明

a) 実験動物

2系統のノックアウトマウスおよび1系統の突然変異ラットを使用した。2系統のノックアウトマウスは共に精子細胞と精子の尖体と核に形態異常があり(図9)、不妊を示す。突然変異ラットではas/as系を用いた。このラットは1992年にIkadaiらが偶然発見したもので、無精子症である(Ikadai *et al.* 1992)。ホモの雄だけが不妊であり、ホモの雌、およびヘテロの雄、雌は妊孕性があるのでこの系統の維持は容易である。

b) 薬剤および投与方法

雄ラット新生仔にDES(Sigma)、E₂B(Sigma)、E₂(Sigma)、BPA(Aldrich, Milwaukee)、Flu(Sigma)を出生翌日から隔日6回皮下投与し、生後5週、7週、9週にサンプルングした。投与量は以下の量とした; DES: 10µg/匹/回、E₂B: 0.3µg/匹/回、E₂: 0.3µg/匹/回、BPA: 100µg/匹/回、Flu: 0.8 µg/匹/回。DESとE₂Bはオリーブ油(和光、大阪)に直接溶かした。E₂とBPAはまずdimethyl sulfoxide(DMSO)(Sigma-Aldrich, Irvine, UK)に溶かし、次にこれをオリーブ油に溶かした。DESとE₂B群のコントロール群(各5匹ずつ)にはオリーブ油のみ、E₂とBPA群のコントロール群(各5匹ずつ)にはDMSOとオリーブ油の混液を投与した。

c) 組織学的解析

光学顕微鏡用切片にはトルイジンブルー染色を、そして電子顕微鏡用サンプルはエポン包埋し、

切片にはウランと鉛の二重染色を施した。

d) 免疫組織化学的解析

マウスの精巣は10%ホルマリンで固定し、常法通りのパラフィン切片を作り、ある種のアクチン結合タンパクに対する抗体で免疫組織化学的染色を施した。

e) チトクロームCによる血液・精巣関門の機能検査

血液・精巣関門の機能状態を調べるために細胞外トレーサーとしてチトクロームCをエーテルで深麻酔下に精細管内腔に顕微注射し、これが精巣間質に漏れるかどうかをDAB反応を利用して調べた。また、逆に、チトクロームCを左心室に注入し、血行性にチトクロームCを精巣に投与した。数分後に3%グルタルアルデヒドを左心室に注入し、灌流固定した。

3. 造精細胞移植技術を用いた標的細胞の解明

a) 実験動物

この実験では2種類のマウス、レシピエント用としてGFP遺伝子が組み込まれていない通常のC57BL/6と、ドナー用としてC57BL/6マウスにGFP遺伝子を組み込んだGFPマウス(Okabe *et al.* 1997)を用いた。

b) 薬剤および投与方法

DES(ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, USA)はセサミオイル(Sigma-Aldrich Japan, 東京)に溶解させ、出生後1日から5日の連日0.5 μ g/匹の量を皮下投与した。内在性の生殖細胞を枯渇させるためのbusulfan(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)は、出生後5週時にレシピエントマウスの腹腔内に50mg/kg B.W.を単回投与した。

c) 移植実験のデザイン

移植実験は下記の2つを行った(図12)。

移植実験1:DES投与を受けたマウスの生殖細胞を正常なマウスに移植. DES投与15例、コントロール12例を行った。

移植実験2:DES投与を受けたマウスに正常な生殖細胞を移植. DES投与16例、コントロール10例を行った。

また、ドナーのコントロールとして、新生仔期にDES(または溶媒のみ)を投与し、移植を行わずに飼育した系、レシピエントのコントロールとして、busulfan処理後に移植を行わずに飼育した系も用意した。

d) 移植の方法

移植は従来の方法(Brinster and Zimmermann 1994; Brinster and Averbach 1994; Morena *et al.* 1996; Ogawa *et al.* 1997)をもとに、いくらか改変を加え、下記のように行った。

(1) ドナーの準備

出生後10週以上(12週まで)飼育した後、精巣を摘出し、コラゲナーゼおよびトリプシンによる酵素処理を行い、精巣の細胞を解離した。パーコールによる密度勾配遠心(65%~20%)を行い、精祖細胞が豊富な画分(33%および36%)を取り出し 1×10^8 /mlに調整し、ドナー細胞とした。

(2) レシピエントの準備

出生後5週以上(6週まで)飼育した後、busulfanを投与し、その後5週間以上飼育した。

(3) 移植の方法

レシピエントマウスを麻酔した後、精巣を露出させ、輸精管よりドナー細胞を注入した。ドナー細胞にはトリパンブルーを添加しておき、その色素の広がり具合により注入の成否を確認した。

(4) 移植結果の検出

移植から10~12週後、レシピエントの精巣を摘出し、精細管をほぐして蛍光顕微鏡下で観察した。精細管に沿ったGFP蛍光の広がりや移植細胞の定着と増殖の程度を表す指標となるので、蛍光が確認できた範囲(GFP陽性部位)の長さを測定した。これは移植実験1のDES投与群、対照群でそれぞれ40箇所と19箇所、移植実験2のDES投与群、対照群でそれぞれ22箇所と10箇所を測定した。

次に、精子形成の有無を確認するために凍結切片を作製した後、GFP蛍光を蛍光顕微鏡で確認し、さらにその切片のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い、組織観察を行った。移植を行わなかったコントロール試料についてはブアン液で固定後、パラフィン切片を作製し、HE染色を行い観察した。

4. 齧歯類新生仔期化学物質投与の雄性生殖器に及ぼす影響のトキシコゲノミクス解析

a) 化学物質

実験にはDESあるいはE₂ (Sigma-Aldrich Japan)を用いた。DESはセサミ油(Sigma-Aldrich Japan)に溶かした。またE₂はdimethyl sulfoxideで溶かした後、セサミ油に溶かした。コントロールにはセサミ油のみを用いた。

b) 実験デザイン

妊娠メスICRマウス(日本SLC)を購入し、出生したオス新生仔を実験に用いた。出産した日を生後0日として、生後1日目から5日目までの5日間連続で、25μlのセサミ油に溶かしたDESあるいはE₂ (5μg/mouse/day)をマウスの皮下に注射した。DESの濃度は、我々が報告した相対精巣重量や一日精子産生量に影響がなく、精巣上体における精子の運動能の低下のみが見られた濃度を参考にした(Adachi *et al.* 2001)。サンプリングは2週齢、4週齢、8週齢で行った。精巣上体の採取は動物をエーテルで深麻酔した後行った。解析には、右側の精巣上体を組織学的解析に、左側の精巣上体を遺伝発現変化の解析に用いた。

c) 組織学的解析

右側の精巣上体を4%パラホルムアルデヒドで4、18時間固定後、定法に従って脱水し、パラフィンで包埋した。切片は5μmの厚さで切り、シランコ-ティングしたスライドガラス(Matsunami Glass, Osaka, Japan)に載せた。切片は50、18時間乾燥させた後、定法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

d) トータルRNAの抽出

左側の精巣上体から、RNeasy(Qiagen K. K., Tokyo, Japan)を用いてトータルRNAをプロトコールに従って抽出した。またトータルRNA中に混入してしまった微量なDNAの分解処理もRNase-FreeDNase Set(Qiagen K. K.)を用いて、RNAの抽出中に同時に行った。

e) マイクロアレイ法

マイクロアレイはNational Institute of Aging(NIA)でクローニングされたマウス胎仔あるいは母体の胎盤由来の遺伝子14、974種が載っているin-house cDNAマイクロアレイ(Asahi Techno Glass Corporation, Chiba, Japan)を用いた(Tanaka *et al.* 2000)。これらのクローンの詳しい

情報は下記のNIAのweb siteで見ることが可能である(<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/cDNA/15k.html>)。プローブcDNAへの蛍光色素(Cy3またはCy5)の標識はアミノアリル法を用いた。抽出したトータルRNA15µgに1µg Oligo dT_{12~18}を加え、70℃で10分加温した後、氷上で5分間急冷を行った。この溶液に1×Buffer、10mM DTT、Superscript III reverse transcriptase(Invitrogen, Tokyo, Japan)、0.2mMアミノアリル-dUTP、0.5mM dATP、0.5mM dGTP、0.5mM dCTP、0.3mM dTTP(Amersham-Pharmacia Biotech Japan, Tokyo, Japan)、RNase inhibitor(TOYOBO, Osaka, Japan)を加え、50℃で90分反応させ、cDNAを作製した。この溶液に0.2 M NaOHを加え、37℃で15分加温した後、0.6 M HEPESを加えた。作製したcDNAの精製をMinElute Reaction Cleanup kit(Qiagen K. K.)を用いて、プロトコールに従って行った。精製したcDNAに20mM sodium bicarbonate buffer、Cy3またはCy5 mono-Reactive Dye(Amersham-Pharmacia Biotech Japan)加え、40℃で90分間反応させ、Cy3またはCy5をcDNAに標識した。さらに標識したcDNAプローブをMinElute Reaction Cleanup kitを用いて、上記と同じ方法で精製した。精製したcDNAプローブに5×SSC、4×Denhart溶液、0.5% SDS、100 µg Salmon Sperm DNA(In vitrogen)を加え、95℃で2分間加温後、氷上で1分間急冷を行った。さらに1×Hybridization溶液(Hitachi Software Engineering, Yokohama, Japan)、10%formamideを加え、42℃で5分間加温した。加温したcDNAプローブをマイクロアレイ用カバーガラス(TAKARA, Tokyo, Japan)を載せたマイクロアレイに流し込み、65%の湿潤状態で18時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後の洗浄はSlide Washerを用いて行った。2×SSC、1% SDS(30℃)でカバーガラスをスライドガラスに傷がつかないように外した。次に2×SSC、1% SDS(30℃)で5分間洗浄した後、2×SSC(室温)洗浄し、さらに1×SSC(室温)で5分間洗浄し解析に用いた。アレイ実験は各実験群につき2回行った。

f) マイクロアレイデータの解析

洗浄したマイクロアレイをScanArray lite(GSI Lumonics, Tokyo, Japan)を用いてスキャンした後、QuantArray(GSI Lumonics)を用いてデータを定量化した。データの解析はGeneSpring5.0 software(Silicon Genetics, Redwood city, CA)を用いて行った。データのノーマライズはintensitydependent LOWESS法を用いて行った。遺伝子の発現変化は、コントロール群と比較して1.5倍以上あるいは0.67倍以下の発現変化を示した遺伝子を、それぞれ発現上昇あるいは発現低下した遺伝子とした。

次の条件に合うものをシグナルの有効値として採用した。

条件: (Signal intensity mean) - (Background mean) > 2 × (Background SD)

また、有意な発現上昇あるいは発現低下を示す指標として、以下のものを採用した。

発現上昇: $p < 0.1$ かつ

(投与群 intensity) > (コントロール群 intensity) + 2 × (コントロール群 intensity SD)

発現低下: $p < 0.1$ かつ

(投与群 intensity) > (コントロール群 intensity) + 2 × (コントロール群 intensity SD)

発現比は2回の実験データの発現比の平均値を採用した。

5. 齧歯類胎仔期・新生仔期植物エストロゲン投与の雄性生殖器に及ぼす影響

5.1 *in vivo* での研究

C57BL/6Cr SlcマウスにIsoflavone(IF)freeならびに0.05% IFに調整した精製飼料を妊娠前3週

間および5週間前より自由摂食させた。妊娠中、授乳中を通して各実験餌を与えて仔に経胎盤ならびに経母乳曝露を行い、仔については生後21日目に離乳後、生後31日目に屠殺するまで引き続き各実験餌を与えた。屠殺後生殖器官臓器を採材し、以下の実験的観察を行った。

- (1) 体重、肛門生殖突起間距離、開眼、毛生え、歯芽萌出および指趾等の外形的異常の有無についての観察
- (2) 精巢および精巢上体の組織重量を測定
- (3) 精巢からmRNAを抽出し、real-time RT-PCR法を用いて性ホルモン受容体遺伝子発現量を測定。尚、測定した性ホルモン受容体はestrogen receptor(ER)、ERおよびandrogen receptor(AR)の三種類である。
- (4) 精巢の光学顕微鏡による組織像観察。組織はBouin氏液にて固定しヘマトキシリン-エオシン染色を施した。

5.2 *in vitro* での研究

精巢細胞株はTM4を用いた。曝露化学物質は、植物エストロゲンのdaidzein (Dz)、エストロゲン活性を有するE₂、DESおよびチロシンキナーゼ阻害剤として知られるスタウロスポリン(Sta)とした。各細胞はコンフルエントになるまで培養の後、それぞれの化学物質に曝露させ、30分後にRNA抽出(Sepasol, Nacalai, Kyoto, Japan)を、1時間後にタンパク質抽出(PBSによるホモジナイズ)を行った。遺伝子発現(mRNA)解析にはin-house cDNAマイクロアレイ(3704遺伝子)を用い、常法に従い実験を行った。遺伝子産物(タンパク質)解析には二次元電気泳動により、タンパクスポットをスキニングし、各々において異なるスポットをピックアップした。統計学的解析はピアソン相関係数を用い、シングルリンケージクラスタリング法を用いてクラスター解析を行った。

C. 結果

1. 齧歯類新生仔期化学物質複合投与の雄性生殖器に及ぼす影響の形態学的解析および分子メカニズムの解明

a) 電子顕微鏡観察における形態学的な解析

(1) 低濃度エストロゲンE₂B付加におけるFluの精巢への影響

E₂BとFluを同時に投与されたマウスでは、Flu単独の投与と比べて、異常精子細胞の割合が増加していた。また、単独投与時では認められなかった造精サイクルの乱れが確認された(図1)。形態変化においては、E₂B、Fluそれぞれ単独に投与した場合と同じく尖体、核の変形や特殊接合装置(ES)の欠損が認められた(図2、図3、図4)。血液精巢関門、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞には特に形態学的な変化は認められなかった。

(2) 低濃度抗アンドロゲンCA付加におけるFluの精巢への影響

CA単独では、比較的尖体や核の変形は少なく、ESの広範囲にわたる欠損が電子顕微鏡において観察された(図2、図4)。Fluとの混合投与では、尖体や核の変形が少ないことから、光学顕微鏡下でのstep7以上の異常精子の割合で評価することが困難であったが、ESの欠損が一要因といわれる造精細胞の剥離が多くの精細管内で確認され、また、電子顕微鏡下においてもESの完全欠損が多数認められた。血液精巢関門、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞には特に形態学的な変化は認められなかった。

(3) 低濃度抗エストロゲンICI付加におけるFluの精巣への影響

ICI単独では、CAと同様に電子顕微鏡による観察で、ESの欠損が確認されたが、尖体や核の変形はあまり観察されなかった(図2、図4)。しかしながら、Fluと混合投与することによって、電子顕微鏡下での形態変化が比較的正常に回復する傾向が確認された、さらにFlu単独投与での異常精子細胞数も回復していた(図1)。血液精巣関門、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞には特に形態学的な変化は認められなかった。

b) トランスジェニック・マウスの精巣の微細構造の解析と投与群との比較

今回比較に用いたトランスジェニックマウス(Tg)は、あるアクチン結合蛋白質をコードする領域が欠損しており、これによって、ESや血液精巣関門のアクチン線維の構築を阻害する一要因と考えられ、電子顕微鏡下において、ESの部分的、または完全欠損が多数の精子細胞に認められ(図2、図4)、尖体や核が投与群と同様に变形し(図5)、また、血液精巣関門自体についても不完全なものも確認された(図6)。血行性に投与したチトクロームCは精巣間質に到達し、さらには精上皮の細胞間隙に浸入し、最終的には精細管内腔に達した(図7)。精細管内腔に顕微注入したチトクロームCは血液・精巣関門を素通りし、精巣間質に到達した(図8)。血液精巣関門が不完全なものについては、精子細胞は減数分裂期で停止しており、この現象は、前回のDES やTAM 投与で確認された現象に似ていた。光学顕微鏡下では、造精細胞の剥離が多数の精細管で認められ、精巣上体尾部ではほとんど成熟精子が確認されなかった。このことから、我々が解析している投与群でも、この蛋白質の発現量を、Western blotting法により確認したところ、Flu、CA、ICI、Flu+ E₂B、Flu+CAにおいて、減少傾向が観察された。

2. ノックアウトマウスを用いた新生仔期化学物質投与の特殊接合装置に及ぼす影響の形態学的および分子メカニズムの解明

2系統のノックアウトマウスは共に精子細胞の頭部の周囲にはアクチン結合蛋白質の局在は認められなかった。

as/asラットではDES、E₂B、E₂、BPA、Flu投与群ともに造精細胞の分化は第一次精母細胞の減数分裂中期で止まっていた(図10)。

チトクロームCの精細管内腔への顕微注入実験ではチトクロームCは精上皮の細胞間隙を満たし、精上皮基底部の血液・精巣関門(セルトリ細胞間の特殊接合装置)をすり抜け、精巣間質に到達していた(図10)。また、チトクロームCを血行性に投与した実験では精巣間質に到達したチトクロームCは精上皮の細胞間隙を満たし、精細管内腔に達していた(図11)。

3. 造精細胞移植技術を用いた標的細胞の解明

新生仔期にDES投与を受けたマウスの精子形成を確認するために、DESおよびセサミオイルを投与し、20週飼育した後、精巣の組織像を観察した(図13A,B)。セサミオイル投与群は正常な精子形成が確認されたが(図13A)、DES投与群では精細管内の管腔形成の不全や精子形成細胞の配列の異常が確認された(図13B)。

Busulfan 処理による内在性生殖細胞の消失を確認するために、5週齢時にbusulfanを投与しなかった個体と投与した個体の精巣を20週令時に確認した(図3C, D)。Busulfan非投与群では精細管内に精子形成細胞が確認されたが(図13C)、busulfan投与群では精細管内に精子形成細胞は確認で

きなかった(図13D)。

移植した生殖細胞がどの程度精細管に定着し、増殖して広がった程度を比較するため、精細管内でのGFP陽性部位の長さを計測した(図14)。移植実験1のドナー処理の系では、セサミオイルのみを投与したマウスの生殖細胞を移植した場合のGFP陽性部位の長さは 3.0 ± 0.29 mm (平均 \pm SEM)、DES投与したマウスの生殖細胞を移植した場合は 2.9 ± 0.21 mm と、両者の間に統計学的有意差は認められなかった。一方、移植実験2のレシピエント処理の系では、セサミオイルのみ投与したレシピエントに移植した場合のGFP陽性部位の長さは 2.9 ± 0.34 mmであったのに対し、DES投与したレシピエントに移植した場合は 1.7 ± 0.19 mmであり、対照群と比較してDES投与群ではGFP陽性部位の長さは有意に短かった。

移植後の精子形成像の観察を行った結果、移植実験1の系ではDES投与群、対照群ともに正常な精子形成(精細管の管腔の存在、精子形成細胞の正常な配列など)が確認された(図15)。一方、移植実験2の系では、セサミオイルのみ投与した対照群に移植を行った場合、正常な精子形成が観察されたが、DES投与したレシピエントに移植を行った場合、精細管の管腔形成の不全や精子形成細胞の配列の乱れが観察された(図16)。

4. 齧歯類新生仔期化学物質投与の雄性生殖器に及ぼす影響のトキシコゲノミクス解析

a) 組織学的解析

DES投与群では、2週齢の精巣上体のすべての部位において、管腔上皮細胞の高さの低下、間質の増加や管腔の拡張がコントロール群と比べて観察された(図17)。4、8週齢では精巣上体のinitial segmentにおいて2週齢でみられた変化と同様な変化が観察された。他の部位では明確な変化は観察されなかった。E₂投与群では2週齢の精巣上体のすべての部位において、管腔上皮細胞の高さの低下がコントロール群と比べて観察された。4週齢では精巣上体のinitial segmentにおいて2週齢でみられた変化と同様な変化が観察された。8週齢では明確な変化は見られなかった。DESあるいはE₂投与群の両群ともに、2週齢の精巣上体における組織形態的变化は4、8週齢と比べてとても大きかった。

b) マイクロアレイ法による解析

マイクロアレイ法によって、新生仔マウスへのDESあるいはE₂投与による精巣上体における遺伝子の発現変化を解析した。マイクロアレイ解析によってDES投与群において発現変化が検出された遺伝子は、2週齢では21種、4週齢では25種、8週齢では3種であった。その中で、発現上昇あるいは低下した遺伝子は2週齢では4種あるいは17種で、同様に4週齢では24種あるいは1種であった。8週齢においては3種すべての発現が上昇しており、発現低下が見られた遺伝子は検出されなかった。またE₂投与群において、発現変化が検出された遺伝子は、2週齢では37種、4週齢では3種、8週齢では9種であった。その中で、発現上昇あるいは低下した遺伝子は2週齢では26種あるいは9種で、同様に4週齢では2種あるいは1種であった。8週齢においては9種すべての発現が上昇しており、発現低下が見られた遺伝子は検出されなかった。またDESとE₂投与群の両群において発現変化した遺伝子は、2週齢で1種検出された。この遺伝子は両群において発現の上昇が見られ、NIA number (GenBank No.):H3099B09 (BG071454)のExpression Sequence Tag(EST)としてGenBank に登録されているものであった。

5. 齧歯類胎仔期・新生仔期植物エストロゲン投与の雄性生殖器に及ぼす影響

a) *in vivo* 実験

(1) 一般的発達指標について

妊娠前3週間摂食モデルの0.05%IF群雄において、生後1日目から14日目までの間の体重がIF free群と比べ有意に体重が増加していたが、その差は生後30日目には見られなくなっていた(表1)。その他、体重および肛門生殖突起間距離、開眼、毛生えおよび歯芽萌出に差はなく、指趾等の外形的異常も無かった。実験群間の差も見られなかった。

(2) 臓器重量

妊娠前3週間摂食モデルにおいて、0.05%IF群の精巣重量がIF free群のものとは有意に増加していた($P < 0.05$ 、表2)。

(3) 性ホルモン受容体遺伝子発現量の解析

IF free群と0.05%IF群とを比べた結果、性ホルモン受容体遺伝子の発現量に差はなかった(図18)。

(4) 組織像

IF free群と0.05%IF群とを比べた結果、光学顕微鏡レベルでは組織像に異常はなかった。

b) *in vitro* 実験

cDNAマイクロアレイ解析により、遺伝子発現解析を行った(図19)。またこれらの遺伝子発現についてクラスター解析を行ったところ、図20に示すような分類分けすることができた。

二次元電気泳動法により、遺伝子産物解析を行った(図21)。発現タンパク質のうち、化学物質投与によってスポットが出現したものあるいは消滅したものについてクラスター解析を行ったところ、図22に示すような分類分けをすることができた。

D. 考察

1. 齧歯類新生仔期化学物質複合投与の雄性生殖器に及ぼす影響の形態学的解析および分子メカニズムの解明

これまでの投与実験から、様々な化学物質やホルモンが精子形成に影響することが明らかになった。今回、齧歯類において、低濃度の化学物質の複合投与を行うことで、単独では認められなかったいくつかの影響が観察された。このことは、人体に影響を及ぼさないとされる低濃度であっても、二つ以上の物質が組み合わされた場合、予想以上のものになるかもしれないという可能性を示唆するとともに、組み合わせる物質によっては、個々の作用を相殺する結果も考えられる。また、精子形成のメカニズムにおいては、それぞれの物質が最終的に特殊接合装置(ES)へ影響するような機序をへて作用することが考えられる。今回調べた化学物質はエストロゲン様物質、抗アンドロゲン様物質または抗エストロゲン様物質に分類されるが、それらの単独投与においては、すべてESに作用していたことが興味深い。その理由として、体内のエストロゲンとアンドロゲンの量比はおおよそ決まっているが、体外から投与された化学物質によりホルモンバランスが崩された結果、最終的にESへの影響につながるのではないかとこの可能性や、それぞれの化学物質はその立体構造や結合部位が類似していることからESへの作用点あるいは作用経路が同じなのではないかという可能性などがあげられる。しかし、これらの仮説を検証するにはさらなる詳しい研究が必要である。

また、これまでの研究から、それぞれの物質は、形態学的にはセルトリ細胞やライディッヒ細胞の異常などを誘導しないことが、電子顕微鏡下で明らかになっている。さらに、新生仔期投与において、投与から21日以降ではないと、形態変化が認められないことや、移植実験の結果からもわかるように、投与による直接的な影響は、造精細胞ではなく、セルトリ細胞と精子細胞のような細胞間の相互作用といった部分ではないかと考察できる。これらは、アクチン結合蛋白の一つが阻害されたトランスジェニックマウスとの比較においても推測できるのかもしれない。このメカニズムについては、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

2. ノックアウトマウスを用いた新生仔期化学物質投与の特殊接合装置に及ぼす影響の形態学的および分子メカニズムの解明

当初は両系統のノックアウトマウスにもDES、E₂B、E₂、BPA、Fluを投与する予定であったが、供給されたノックアウトマウスの数が少なかったためにこれらの投与実験は延期せざるを得なかった。これらのノックアウトマウスの供給が充分になった段階で再開する予定である。

両ノックアウトマウスではセルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置にはアクチン結合蛋白が存在しなかった。これは、アクチン結合蛋白がこれらのノックアウトマウスでは発現していなかったのではなく、発現はしていたが元来の局在であるセルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置には局在していなかったことを示している。その理由は、これらノックアウトマウスにはE₂B、E₂、BPA、Flu投与マウスと同様にこの特殊接合装置に部分的な欠失があるためと思われる。同じような結果は本年度の本研究内容の「1. 齧歯類新生仔期化学物質複合投与の雄性生殖器に及ぼす影響の形態学的解析および分子メカニズムの解明」で用いたヒト遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの一系統の動物でも見られた。

as/asラットではその表現型として血液・精巣閉門が機能していない(Noguchi *et al.* 2002)ので予想通りの結果が得られた。すなわち、DESにより血液・精巣閉門の形成が遅延される以前にこのラットの表現型として血液・精巣閉門そのものが形成されないために、この動物にDESを投与してもその表現型には変化が見られなかった。また、この動物では減数分裂以降の造精細胞が分化しないので、これら造精細胞に作用するE₂B、E₂、BPA、Fluはその作用点を見いだせなかったと思われる。本研究の結果は今までの実験の結果を突然変異ラットやノックアウトマウスの観点から見直すという意義があるが、これら動物を用いた内分泌攪乱化学物質の研究はやっと端緒にいたばかりという感がある。

最近種々のノックアウトマウスが作られ、そのうちのごく一部に精巣や精子形成に異常のあるものがある。そのうちのまたごく一部に本研究で用いたノックアウトのように、E₂B、E₂、BPA、Flu投与動物と同じ現象が見られている。このようにいわゆる内分泌攪乱化学物質の研究と種々の遺伝子ノックアウトマウスの表現型を比較することにより今まで見えなかった現象が見えるようになってきた。

3. 造精細胞移植技術を用いた標的細胞の解明

従来からの報告にあるように、マウス新生仔をDESに曝露すると、成熟した段階で精子形成に障害の見られることが本研究でも確認された(図13)。しかしながら移植実験¹で示されたように、DESに曝露したマウスの生殖細胞をDES曝露していないマウスの精巣に移植してやれば、コントロ

ールマウスの生殖細胞を移植した場合と同じように移植先で定着・増殖し(図14)、同程度の精子形成が見られることが判明した(図15)。このとき移植先で見られた精子形成細胞は移植した生殖細胞に由来すると考えられる。なぜなら、それらはドナーとして用いたマウスに特有のGFPが発する蛍光を発しており(図15)、またbusulfan処理後に移植を行わなかった場合は精子形成が見られなかったからである(図12)。これらのことから、DESに曝露された生殖細胞であっても、DESに曝露されていない環境下では精子形成を正常に進めうるということが本研究で明らかになった。すなわち、生殖細胞(精祖細胞)そのものはDES曝露により傷害されていないと考えられた。

次に移植実験2の結果を見ると、レシピエントがDESに曝露された場合は、移植細胞の定着と増殖が有意に低下していた(図14)。また、新生仔期にDES曝露を受けそのまま放置された場合と同様に、精子形成の異常が観察された(図16)。レシピエントにセサミオイルのみを投与した場合はこれらの異常が観察されなかったことから、これらの異常はDES曝露に起因すると考えられる。これらのことから、正常な生殖細胞であっても、DES曝露を受けた環境下では精子形成を正常に進められないことが本研究により明らかになった。すなわち、DESの影響は精子形成を支える体細胞系に現れると考えられた。

4. 齧歯類新生仔期化学物質投与の雄性生殖器に及ぼす影響のトキシコゲノミクス解析

新生仔マウスへのDESの投与によって、精巣上体における管腔上皮細胞の高さの低下、間質の増加や管腔の拡張がコントロール群と比べて観察された。また、2週齢における精巣上体の組織形態的变化は、4、8週齢と比べてとても顕著であった。特に精巣上体の間質の増加は2週齢にのみ観察された特徴的な変化であった。新生仔マウスへのE₂投与でも、2、4週齢の精巣上体のinitial segmentに組織形態的变化が観察されたが、観察された変化は管腔上皮細胞の高さの低下のみであった。これらの組織形態的变化は、先の我々の報告(Adachi *et al.* 2003)や他のげっ歯類や様々な動物種の報告と一致していた(Goyal *et al.* 2003; Atanassova *et al.* 2001; Mckinnell *et al.* 2001; Limanowski *et al.* 1996; Veeramachaneni *et al.* 1988; Orgebin-Crist *et al.* 1983)。また、DES投与群とE₂投与群における精巣上体の組織像はすべての週齢で異なっていた。我々は新生仔マウスへのDESあるいはエストロゲン投与による成獣時における精巣組織形態へ影響は異なることを報告している(Hosoi *et al.* 2002; Adachiet *et al.* 2004)。また、新生仔ハムスターへのDESあるいはエストロゲンの単回投与によって、成獣時における精巣上体の組織形態への影響が異なることが報告されている(Khan *et al.* 1998)。よって、新生仔マウスへDESあるいはE₂投与による精巣上体の組織形態への影響は異なり、その影響は2、4、8週齢すべての週齢で起こっていることが示唆された。

次に我々は、cDNAマイクロアレイを用いて新生仔マウスへのDES投与による精巣上体における遺伝子発現への影響を解析した。マイクロアレイ解析の結果、DES投与後2、4、8週齢の精巣上体において、それぞれ、21種、25種、3種の遺伝子の発現変化が検出された。E₂投与群では2、4、8週齢の精巣上体においてそれぞれ37種、3種、9種の遺伝子の発現変化が検出された。マイクロアレイによって検出された遺伝子の多くがESTとしてGenBankに登録されているものであった。それらの遺伝子の機能は不明だが、これらの遺伝子は新生仔へのDESあるいはE₂投与による精巣上体機能の低下に関与している可能性があるので今後の解析が必要である。

5. 齧歯類胎仔期・新生仔期植物エストロゲン投与の雄性生殖器に及ぼす影響

a) *in vivo* 実験

一般に精巣重量はエストロゲン作用により減少するとされているが、本研究ではIF-free群に比べ0.05% IF群の精巣重量が有意に増加しているという結果が得られた。これは、生後早期に0.05% IF群の体重が増加していたことから、精巣の発育が早まった可能性が考えられ、エストロゲン様作用による影響ではないと考えられる。体重が増加したことは、他に報告がないことから妊娠前3w曝露特有の現象である可能性があるが今回のスケジュールでは再現性を取るに至らなかった。

一方、性ホルモン受容体遺伝子発現量に影響がなかったのは、本研究で使用したIF濃度は、IF含有食を多く摂っているアジア人の血中濃度として摂り得る量を想定しており、アジアにおける長い摂取の歴史において子孫に異常がないことを鑑みても今回のような低用量では雄性生殖器の性ホルモン受容体遺伝子発現量に影響を与えないことが示唆された。

b) *in vitro* 実験

本研究では、網羅的な遺伝子発現(mRNA)および遺伝子産物(タンパク)から、作用の異なる化学物質と植物エストロゲンのdaidzein(Dz)の精巣細胞における影響比較を行った。これらクラスター解析により、遺伝子発現プロファイルおよび遺伝子産物プロファイルがほぼ同様の分類分けができることが確認された(図20、図22)。この結果から、化学物質投与の遺伝子発現および遺伝子産物に対する影響が共通することが示唆された。またDzはエストロゲン活性物質(E_2 、DES)やチロシンキナーゼ阻害作用(Sta)とは異なることが示された(図20、図22)。現在これらのクラスターに関わる遺伝子発現および産物について詳細な解析を進めている。このような複合的な網羅的解析を用いることによって、化学物質のさらなる詳細な分類が可能になり、本プロジェクトではその先駆的研究ができたと考えている。今後このような研究は、作用機序を含めたデータベース構築に利用できるものと期待される。

E. 結論

内分泌攪乱化学物質は単独投与では作用が現れない低量であっても、複合投与するとその作用が著しく増大することがわかった。一方、化学物質の組み合わせによっては互いの作用をうち消すこともわかったので、内分泌攪乱化学物質の影響を回避する方法の開発につながると考えられる。

DES、 E_2 B、 E_2 、BPA、Flu投与動物で見られた造精細胞やセルトリ細胞の形態的变化と種々の遺伝子のノックアウトマウスや突然変異動物の表現型の類似性とを比較検討することにより、種々の内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムを類推できるようになったと思われる。

GFPマウスを用いた移植実験から、新生仔期DES曝露による精子形成障害の標的細胞は精子形成細胞でなく、それを支える体細胞系の細胞であることが明らかになった。

マイクロアレイを用いたトキシコゲノミクス解析から、マウス新生仔にDESを投与すると2, 4, 8週齢において精巣上体の組織形態変化が観察され、 E_2 の投与では2, 4週齢において組織形態変化が観察された。マイクロアレイによる解析によって、DES投与群の2, 4, 8週齢においてそれぞれ20種、25種、4種の遺伝子の発現変化が検出された。また、 E_2 投与群では2, 4, 8週齢の精巣上体において、それぞれ37種、3種、9種の遺伝子の発現変化が検出された。これらの遺伝子は新生仔へのDESあるいは E_2 投与による精巣上体機能の低下に関与している可能性があるで、今後の解析

が必要であると思われた。また、マイクロアレイの結果や組織学的解析から、DESとE₂の精巣上体への作用が異なることが示唆された。

植物エストロゲンは、妊娠前から慢性的低濃度摂取をすると、雄性新生仔の性発達に長期的な影響は及ぼさないが、一過的な影響がある可能性が示された。また、遺伝子発現および遺伝子産物の網羅的解析から、植物エストロゲンを含めた化学物質の精巣細胞への影響について、化学物質の分類分けができることが示された。

F. 引用文献

- 1) Adachi T, Koh KB, Tainaka H, Matsuno Y, Ono Y, Sakurai K, Fukata H, Iguchi T, Komiyama M, Mori C. Toxicogenomic difference between diethylstilbestrol and 17beta-estradiol in mouse testicular gene expression by neonatal exposure. *Mol Reprod Dev* 67: 19-25, 2004.
- 2) Adachi T, Matsuno Y, Sugimura A, Takano K, Koh KB, Sakurai K, Shibayama T, Iguchi T, Mori C, Komiyama M. ADAM7 (a disintegrin and metalloprotease 7) mRNA is suppressed in mouse epididymis by neonatal exposure to Diethylstilbestrol. *Mol Reprod Dev* 64: 414-421, 2003.
- 3) Adachi T, Sakurai K, Fukata H, Komiyama M, Shibayama T, Iguchi T, Mori C. A DNA microarray analysis for the effect of spermatogenesis to phytoestrogen and endocrine disruptors in mice. *Chiba Med J* 77: 151-158, 2001.
- 4) Anahara R, Toyama Y, Mori C. Flutamide induces ultrastructural changes in spermatids and the ectoplasmic specialization between the Sertoli cell and spermatids in mouse testes. *Reprod Toxicol* (in press) 2004.
- 5) Atanassova N, McKinnell C, Williams K, Turner KJ, Fisher JS, Saunders PT, Millar MR, Sharpe RM. Age- cell- and region-specific immunoexpression of estrogen receptor alpha (but not estrogen receptor beta) during postnatal development of the epididymis and vas deferens of the rat and disruption of this pattern by neonatal treatment with diethylstilbestrol. *Endocrinology* 142: 874-886, 2001.
- 6) Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11303-307.
- 7) Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11298-302.
- 8) Goyal HO, Robateau A, Braden TD, Williams CS, Srivastava KK, Ali K. Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. *Biol Reprod* 68: 2081-91, 2003.
- 9) Hosoi I, Toyama Y, Maekawa M, Ito H, Yuasa S. Development of the blood-testis barrier in the mouse is delayed by neonatally administered diethylstilbestrol but not by beta-estradiol 3-benzoate. *Andrologia* 34: 255-262, 2002.
- 10) Ikadai H, Noguchi J, Yoshida M, Imamichi T. An aspermia rat mutant (as/as) with spermatogenic failure at meiosis. *J Vet Med Sci.* 1992; 54: 745-749.

- 11) Khan SA, Ball RB, Hendry WJ III. Effects of neonatal administration of diethylstilbestrol in male hamsters: disruption of reproductive function in adults after apparently normal pubertal development. *Biol Reprod* 58: 137-142, 1998.
- 12) Morena AR, Boitani C, Pesce M, De Felici M, Stefanini M. Isolation of highly purified type A spermatogonia from prepubertal rat testis. *J Androl* 1996; 17: 708-17.
- 13) Noguchi J, Toyama Y, Yuasa S, Kikuchi K, Kaneko H. Hereditary defects in both germ cells and the blood-testis barrier system in as-mutant rats: Evidence from spermatogonial transplantation and tracer-permeability analysis. *Biol. Reprod.* 2002; 67: 880-888.
- 14) Ogawa T, Arechaga JM, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol* 1997; 41: 111-22.
- 15) Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 1997; 407: 313-9.
- 16) Orgebin-Crist MC, Eller BC, Danzo BJ. The effects of estradiol tamoxifen and testosterone on the weights and histology of the epididymis and accessory sex organs of sexually immature rabbits. *Endocrinology* 113: 1703-1715, 1983.
- 17) Limanowski A, Miskowiak B, Otulakowski B. Effects of melatonin, testosterone and the two hormones administered in parallel on epididymis of the rat estrogenized with stilbestrol in the first day of life. *Histol Histopathol* 11: 993-998, 1996.
- 18) McKinnell C, Atanassova N, Williams K, Fisher JS, Walker M, Turner KJ, Saunders TK, Sharpe RM. Suppression of androgen action and the induction of gross abnormalities of the reproductive tract in male rats treated neonatally with diethylstilbestrol. *J Androl* 22: 323-338, 2001.
- 19) Tanaka TS, Jaradat SA, Lim MK, Kargul GJ, Wang X, Grahovac MJ, Pantano S, Sano Y, Piao Y, Nagaraja R, Doi H, Wood WH III, Becker KG, Ko MS. Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15000 mouse developmental cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9127-9132, 2000.
- 20) Toyama Y, Ohkawa M, Oku R, Maekawa M, Yuasa S. Neonatally administered diethylstilbestrol retards the development of the blood-testis barrier in the rat. *J Andrology* 22, 413-423, 2001.
- 21) Veeramachaneni DN, Sherman GB, Floyd JG, Ott RS, Hixon JE. Zeranol and estradiol induce similar lesions in the testes and epididymides of the prepubertal beef bull. *Fundam Appl Toxicol* 10: 73-81, 1988.

G. 図表

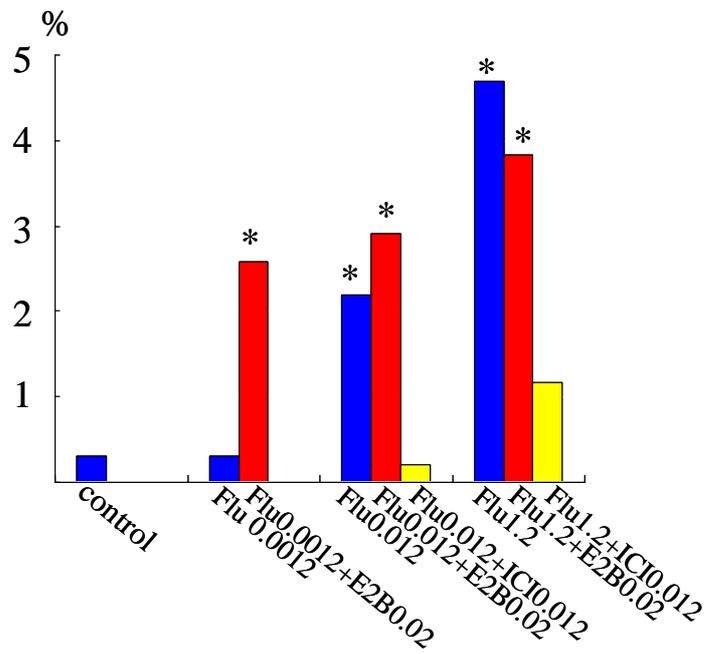


図 1 投与群 (Flu, E2B, ICI) での光学顕微鏡観察による step 7 以上の異常精子細胞数の比較

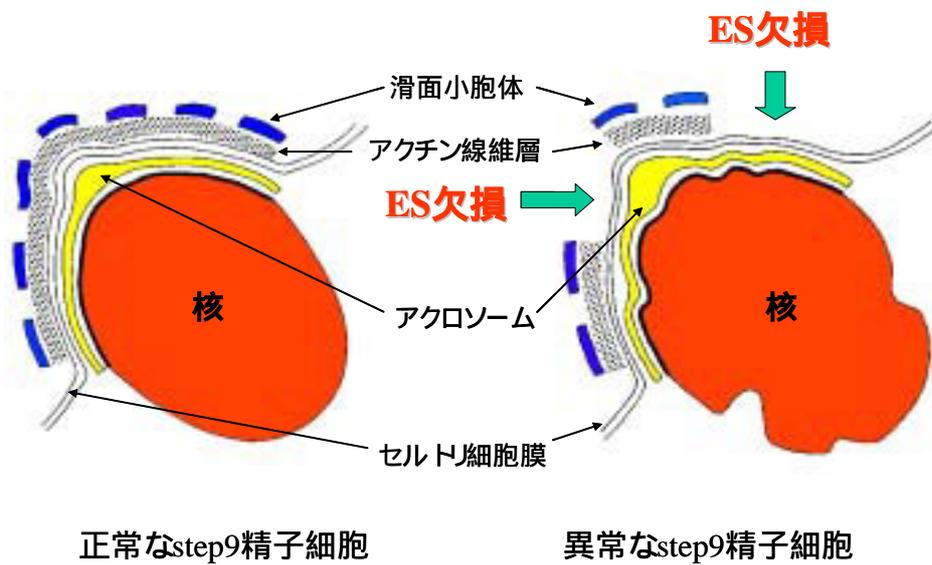


図 2 投与群およびトランスジェニックマウスで認められた変化
 ES: 特殊接合装置

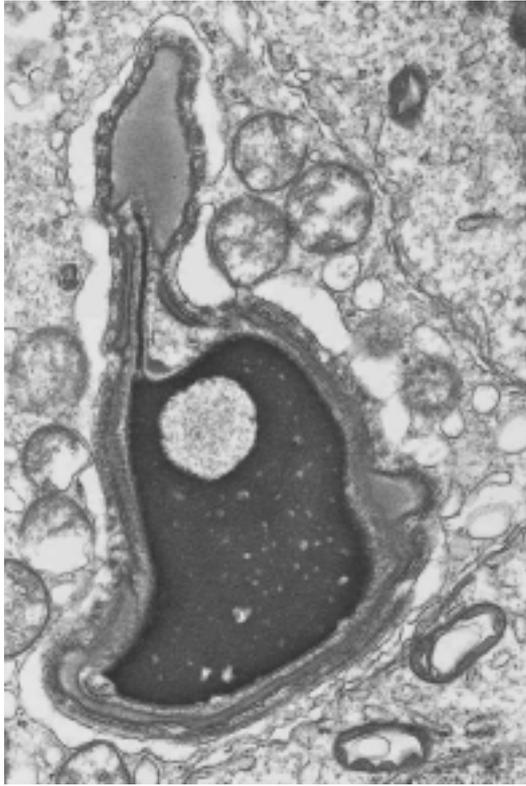


図 3 投与群でみられた異常精子細胞

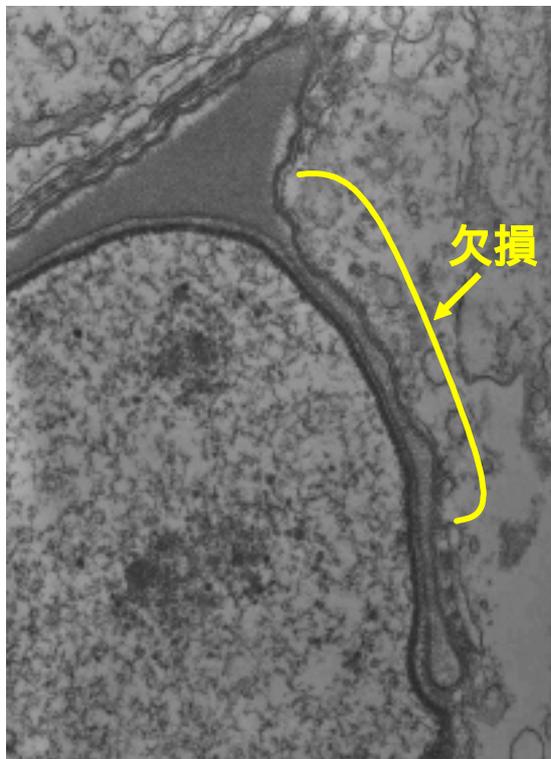


図 4 投与群およびトランスジェニックマウスで見られる特殊接合装置(ES)の欠損

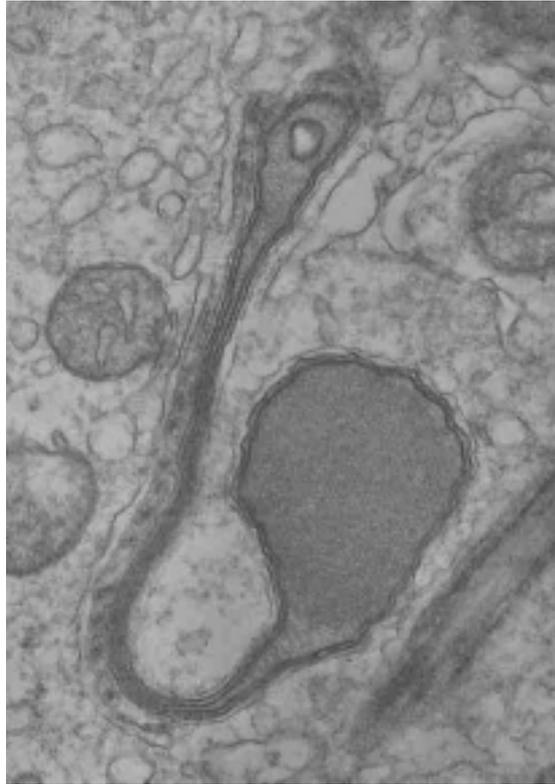


図 5 トランスジェニックマウスでみられる異常精子細胞

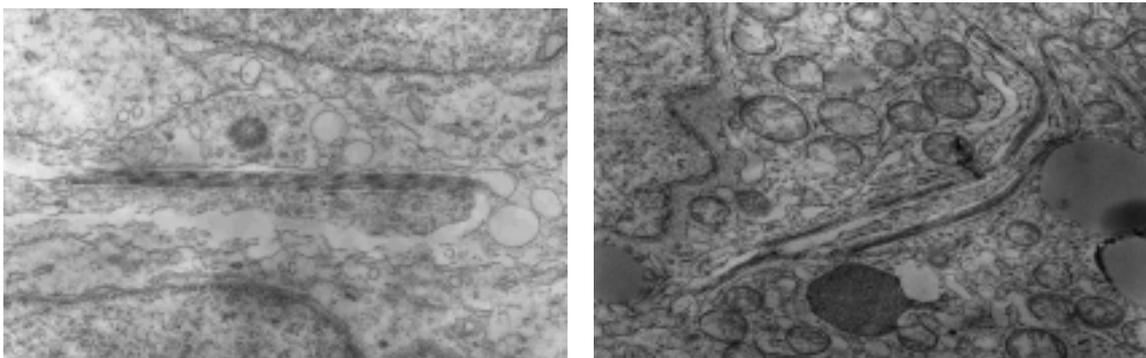


図 6 トランスジェニックマウスでみられる血液精巣関門のアクチン配列の乱れ

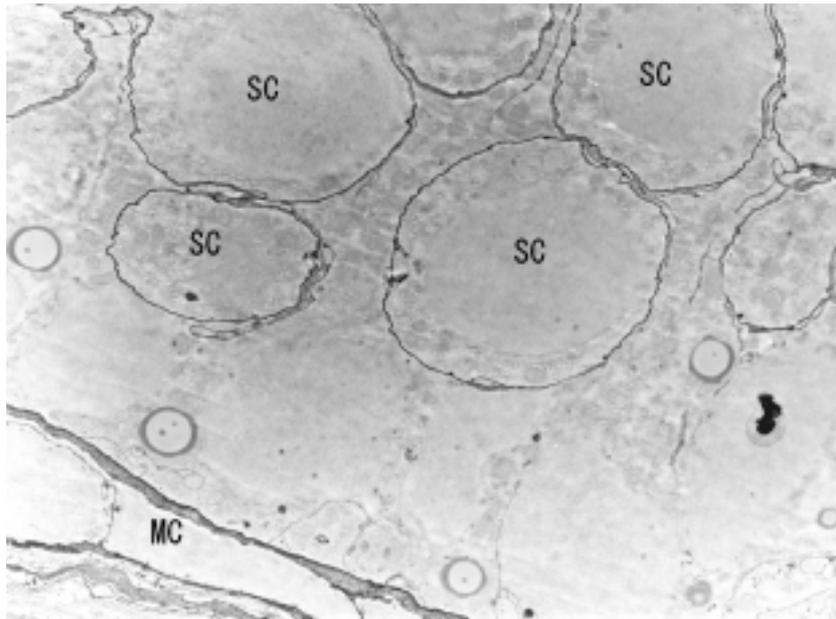


図 7 チクローム C の血行性投与

精細管周囲細胞 (MC) の周囲の間質に到達したチクローム C は、血液 精巣関門が機能していないために、さらに精上皮の細胞間に浸入した。電子密度の高い線が細胞間を満たしたチクローム C を表す。
SC:精母細胞

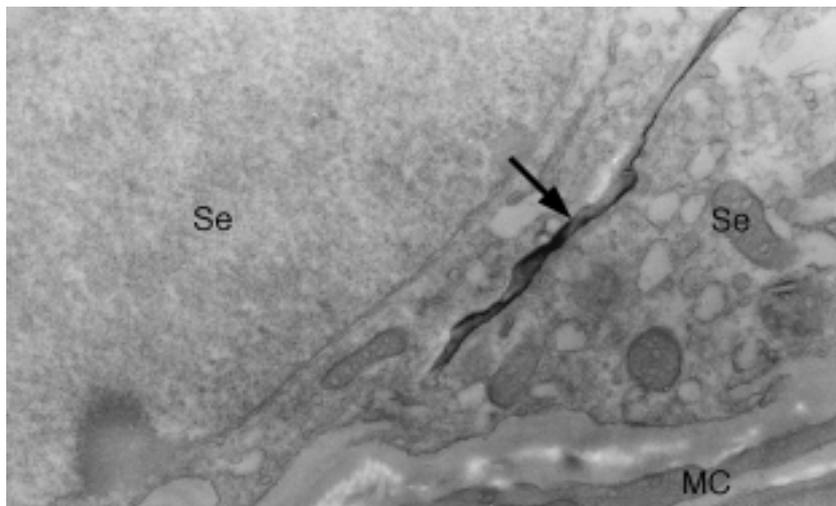


図 8 チクローム C の精細管内腔頭微注入

チクローム C はセルト細胞(Se)間を満たし、精巣間質に到達している(矢印)。MC: 精細管周囲細胞。

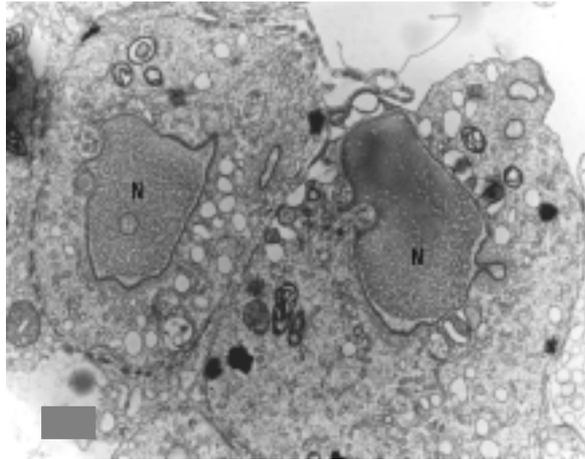


図 9 不妊を示すノックアウトマウスのステップ9精子細胞
核 (N) および尖体が変形している。

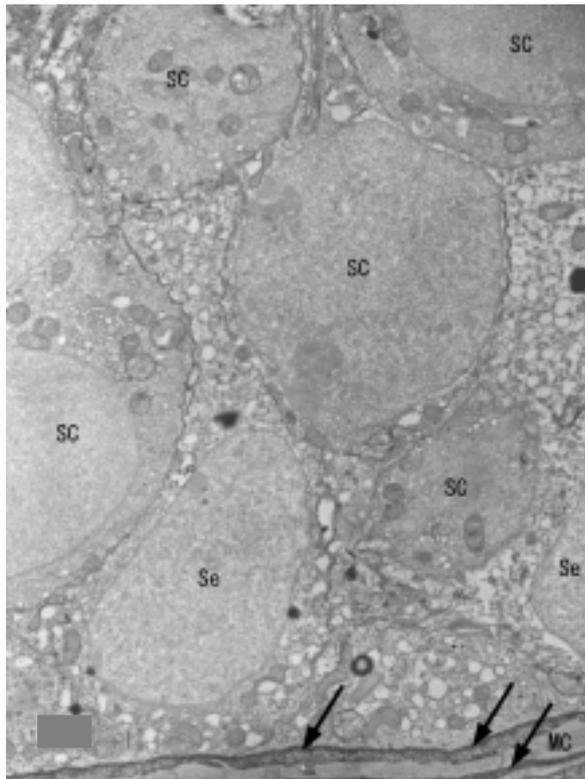


図 10 as/as ラットの精上皮
多くの精母細胞 (SC) が見られるがすべて減数分裂前期である。矢印は精細管内腔に顕微注入したチトクロームC が精巣間質に到達したもの。MC: 精細管周囲細胞、Se:セルト細胞。

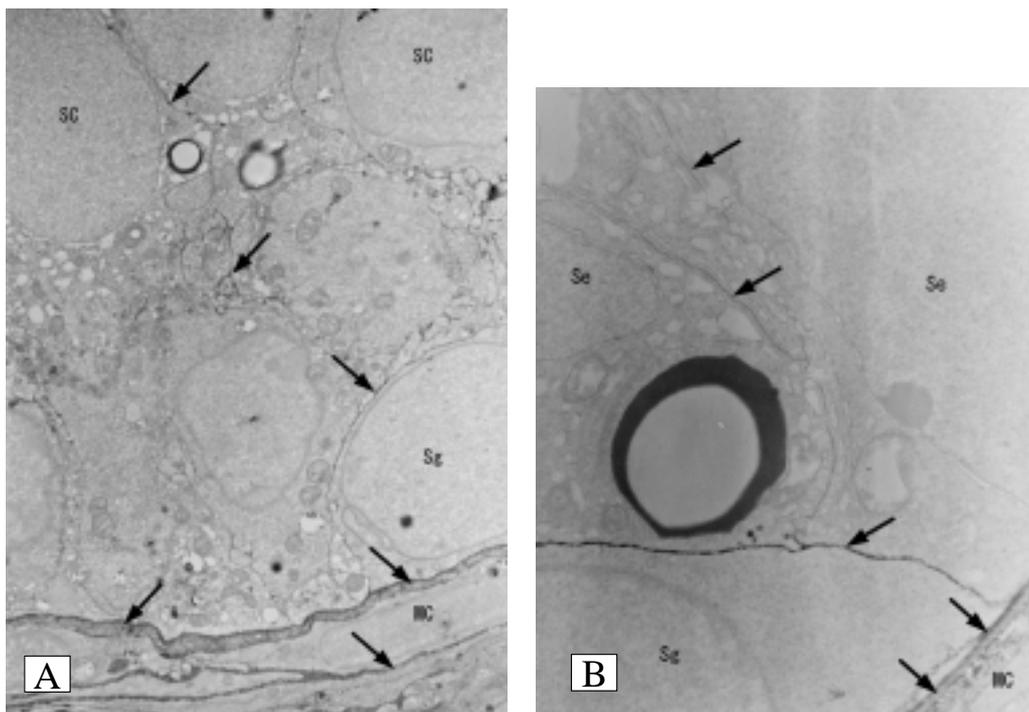


図 11 精巣間質に注入したチトクローム C

MC は精細管周囲細胞。この細胞の近くにあるチトクローム C (矢印) は精上皮の細胞の間を抜けて管腔に達していた。Sg: 精祖細胞、MC: 精細管周囲細胞、Se:セルト細胞。

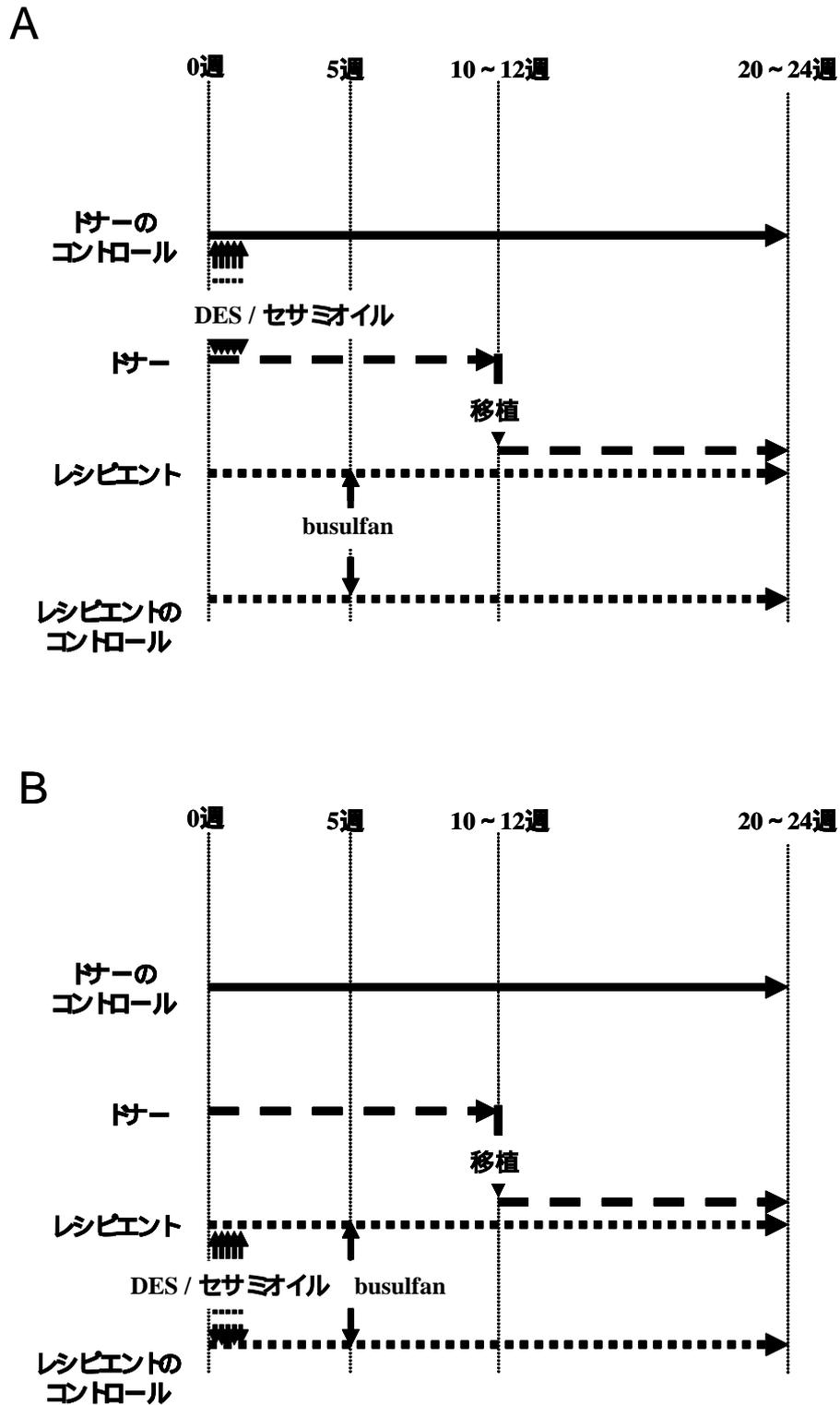


図 12 移植実験のデザイン

A: DES 投与を受けた生殖細胞を正常なマウスに移植した場合

B: DES 投与を受けたマウスに正常な生殖細胞に移植した場合

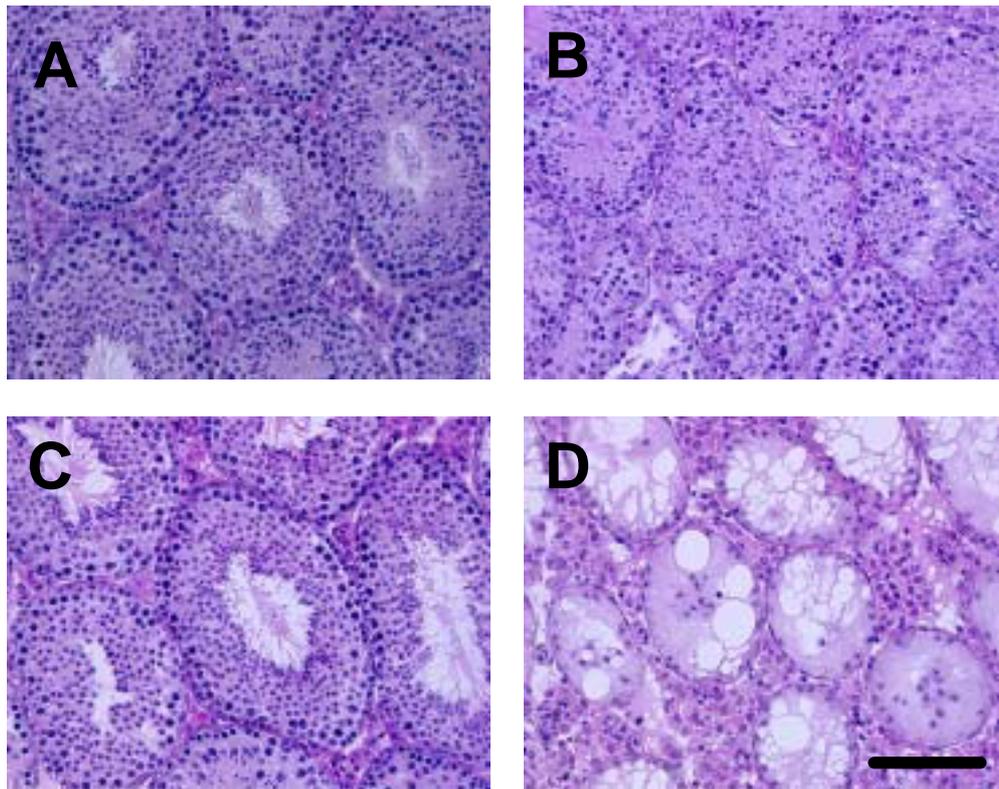


図 13 20 週齢におけるマウスの精巣の組織像

新生仔期 DES 曝露による精子形成への影響を確認した (A とB)。A は溶媒 (セサミオイル) のみの投与群、B は DES 0.5 µg/匹投与群。また 5 週齢時の busulfan 投与による精子形成細胞の消失を確認した (C とD)。C は busulfan 非投与群、D は busulfan 投与群。スケールバー: 100 µm。

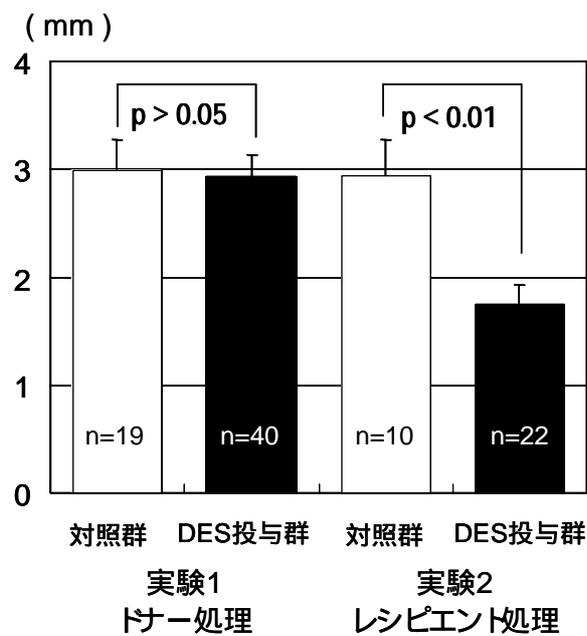


図 14 移植 10 ~ 12 週後の精細管での GFP 陽性部位の長さ

精巣を摘出後、精細管をほぐし、蛍光顕微鏡下で GFP 陽性部位の長さを測定した。

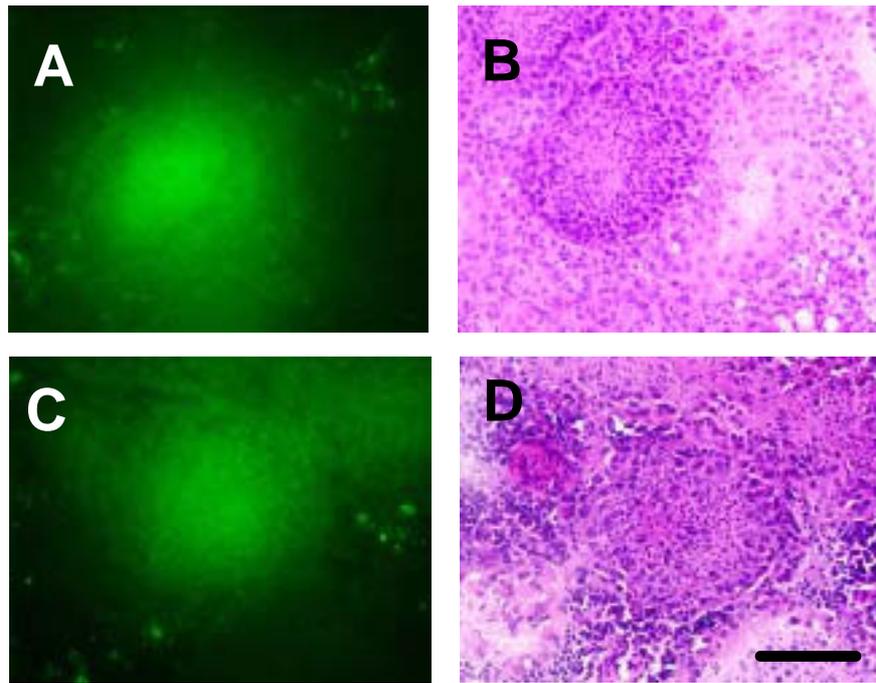


図 15 実験 1 : DES に曝露された生殖細胞を正常マウスに移植
 溶媒のセサミオイルのみを投与した対照群 (A とB) とDES 投与群 (C とD) の生殖細胞を移植した後の
 精巣 (20 週齢)。A とC は GFP の蛍光画像、B とD は HE 染色画像。スケールバー: 100 μm 。

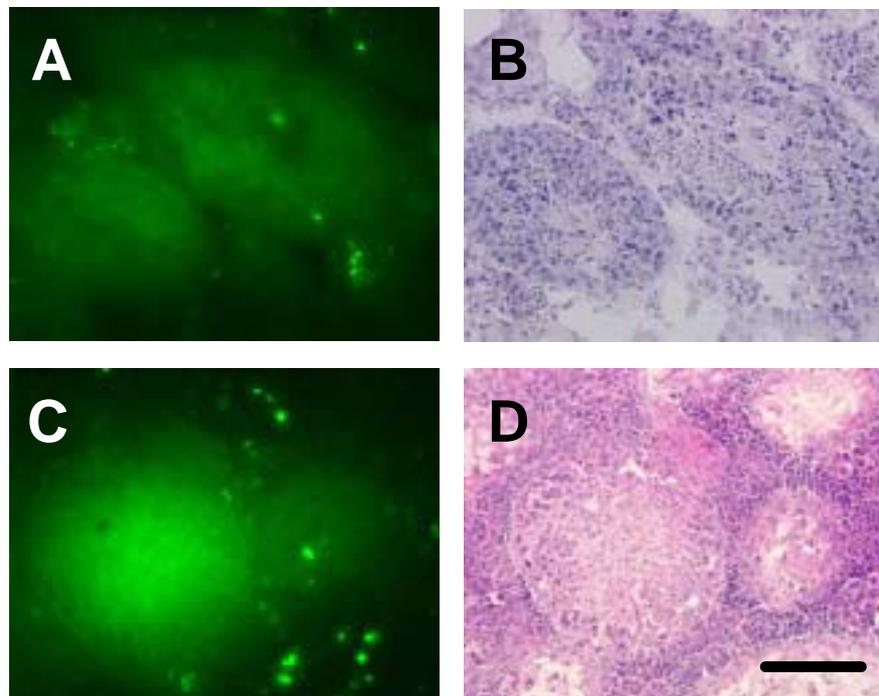


図 16 実験 2 : 正常な生殖細胞を DES に曝露された個体に移植
 溶媒のセサミオイルのみを投与した対照群 (A とB) とDES 投与群 (C とD) の個体をレシピエントとして、
 移植を行った後の精巣 (20 週齢)。A とC は GFP の蛍光画像、B とD は HE 染色画像。スケールバー:
 100 μm 。

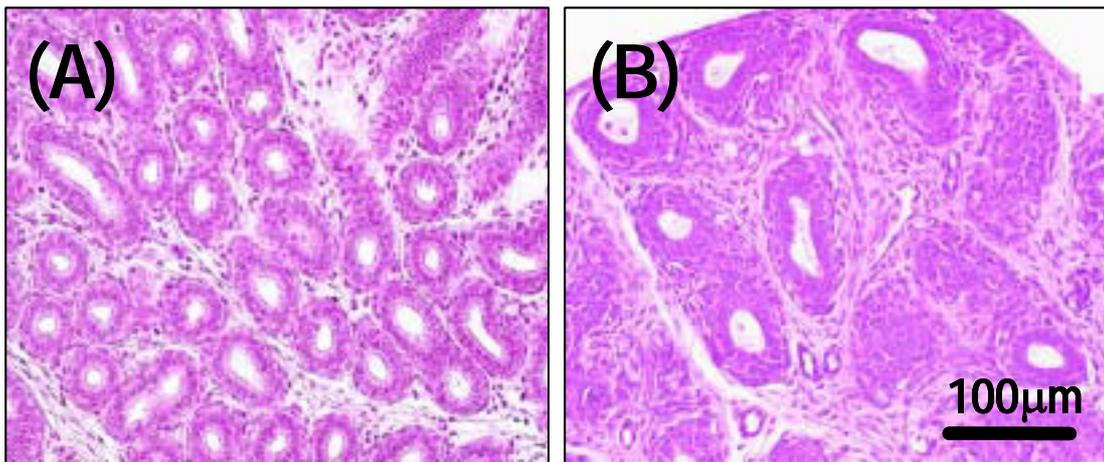


図 17 精巣上体の Caput の組織像(HE 染色)(2 週齢)
 コントロール群と比べ、DES 群において間質の増加、管腔の拡張や上皮高の低下が観察された。(A) コントロール群、(B) DES 投与群、バーは 100 μm を示す。

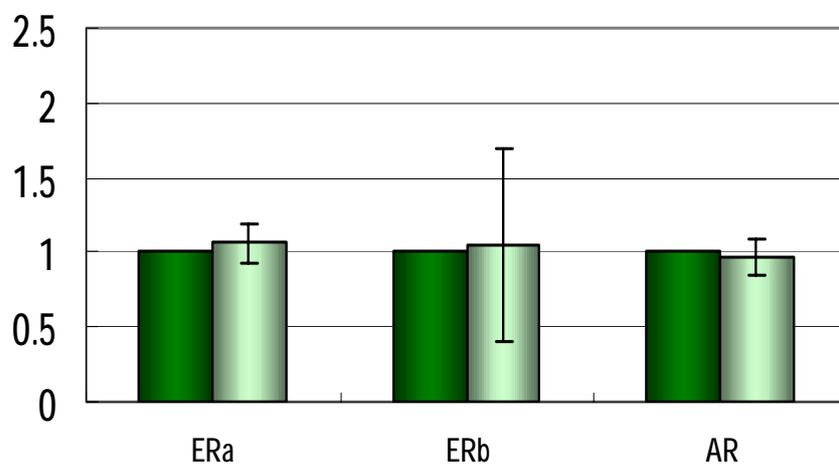


図 18 3 週曝露モデルにおける PND31 での仔の精巣での性ホルモン受容体遺伝子の mRNA 発現レベル

mRNA 発現レベルはリアルタイム RT-PCR で測定し、IF free 群 (左) を 1 とし、0.05% IF 群 (右) を相対値で示した。ER α : estrogen receptor α , ER β : estrogen receptor β , AR: androgen receptor

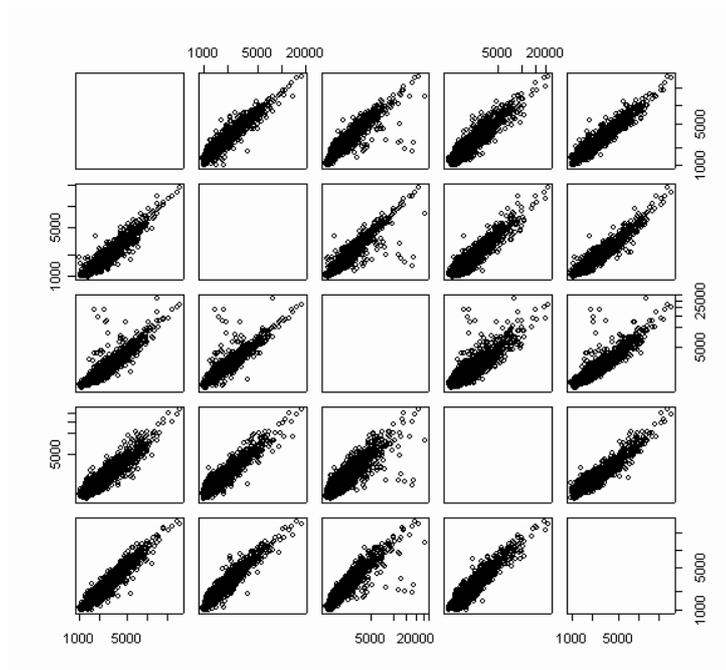


図 19 DNA マイクロアレイのプロット

In-house cDNA マイクロアレイ (3704 遺伝子) を用い、発現強度をグローバルノーマライゼーション後、それぞれについてプロットした。

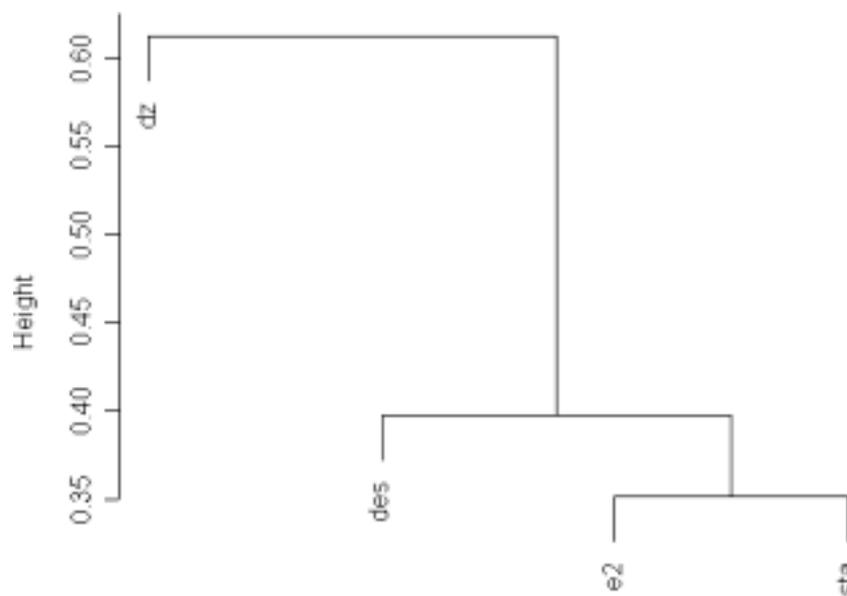


図 20 cDNA マイクロアレイの結果によるクラスター解析

統計学的解析はピアソン相関係数を用い、シングルリンケージクラスタリングを用いてクラスターリング解析を行った。

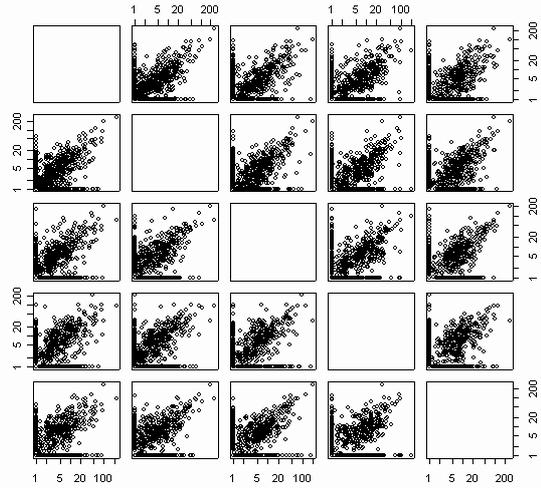
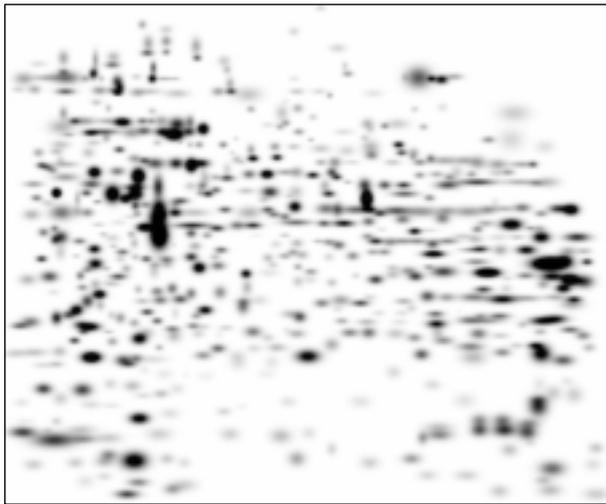


図 21 二次元電気泳動像(左)とタンパク質スポットのプロット(右)

スポットのタンパクの強度を数値化し、発現強度をグローバルノーマライゼーション後、それぞれについてプロットした。

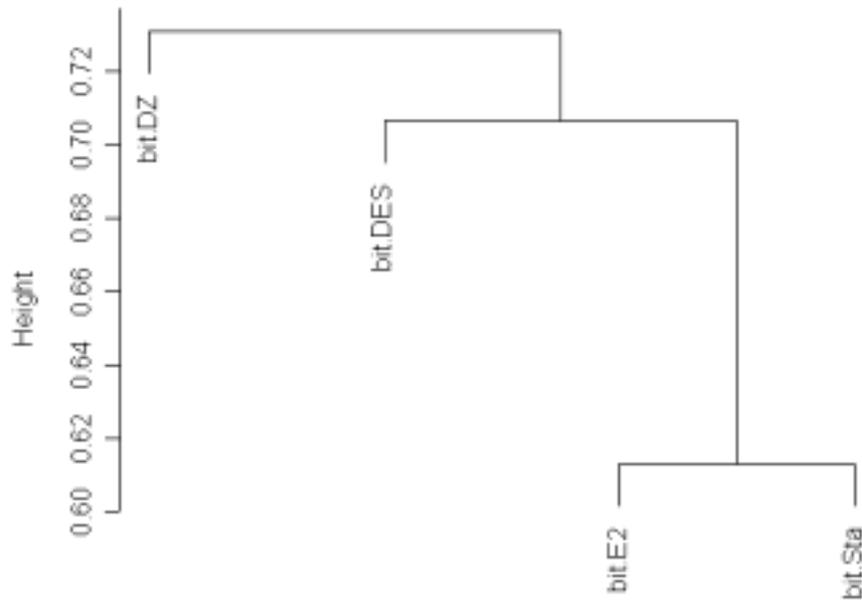


図 22 二次元電気泳動のスポットによるクラスター解析

化学物質投与によって出現あるいは消滅したスポットに解析を行った。統計学的解析はピアソン相関係数を用い、シングルリンケージクラスタリングを用いてクラスターリング解析を行った。

表 1 仔の発育ランドマーク

PND 1, 7, 14, 21, 30 における体重および肛門生殖突起間距離が IF-free 群に対して 0.05% IF 群が
 どうであったかを相対的に示した。 . : 0.05% IF 群 > IF-free 群, : 0.05% IF 群 < IF-free 群,
 : 両者に差がなかった 矢印 2 つは $p < 0.01$ (Student's *t*-test) であった。

PND	曝露モデル:		3w		5w	
	BW	AGD	BW	AGD	BW	AGD
1						
7						
14						
21						
30						

肛門生殖突起間距離 (AGD) は Gallavan R H *et al.* 1999 の方法で標準化した。

表 2 PND31 の仔の相対生殖器重量

臓器	相対生殖器重量 (mg/gBW)	
	IF-free	0.05% IF
3 週曝露モデル		
精巣	2.88 ± 0.21	3.14 ± 0.21*
精巣上体	0.70 ± 0.03	0.73 ± 0.16
(仔の数/リター)	(3/1)	(6/2)
5 週曝露モデル		
精巣	2.26 ± -	2.83 ± 0.21
精巣上体	0.71 ± -	0.66 ± 0.07
(仔の数/リター)	(1/1)	(4/2)

データは、平均 ± SD で示した。

*印: 0.05% IF 群は IF-free 群に対し有意差があった。 $p < 0.05$ (Student's *t*-test)

Studies on the molecular and cellular biological mechanisms on male reproductive system

affected by endocrine disruptors

Chisato MORI, Chiba University, Professor

Key Word:

mouse, testis, epididymis, TM4, spermatogenesis, ectoplasmic specializations, diethylstilbestrol, flutamide, 17 β -estradiol, 17 β -estradiol 3-benzoate, bisphenol A, cyproterone acetate, ICI 182,780, microarray, GFP mouse

Abstract: (1)

In this study, it is indicated that flutamide (Flu) has estrogen-like effect on mouse testes (Anahara R et al. 2004 in press), as previously reported (Toyama Y et al. 2001). The effects of Flu+17 β -estradiol 3-benzoate (E2B) and Flu+ cyproterone acetate (CA) were found to be more severe than those of the single Flu, and the Flu+ICI 182,780 (ICI) treatment tended to recover the damages. These results suggested that E2B and CA worsened the adverse effects of Flu on spermatogenesis. On the other hand, ICI repressed the effects of Flu. This study also suggests that the relative concentration of estrogens to androgens in spermatogenesis is fixed, and the exogenous chemicals disrupted the balance of the relative concentration. Our present study may be a key in preventing the endocrine disrupting chemical's effects.

(2) Testes of two lines of infertile knockout mice were observed by electron microscopy. The phenotype showed abnormalities in acrosomes and nuclei of spermatids in addition to abnormalities in ectoplasmic specialization. The phenotype was the same as that of E2-, E2B-, and bisphenol A (BPA)-treated mice. Specific localization of an actin binding protein in ectoplasmic specialization was not observed, as of these estrogenic chemical-treated mice. Mutant azoospermic rats, which show impaired blood-testis barrier, were treated with these estrogenic chemicals. No changes in phenotype were observed, suggesting that the chemicals act on the same point(s).

(3) Although it is thought that disturbance of spermatogenesis by diethylstilbestrol (DES) cause decrease of sperm counts disturbed, it is not clear which is damaged by DES, germ cells or Sertoli cells. Therefore, we adapted transplantation technique to the question. When germ cells prepared from GFP (Green Fluorescent Protein) mouse (donor) were transplanted into seminiferous tubules (recipient) of non-DES-treated mouse from which germ cells were eliminated by busulfan treatment before transplantation, the germ cells colonized in the recipient tubules and spermatogenesis was observed. While in the DES-treated recipient,

spermatogenesis was disordered. These suggested that DES disorders at least Sertoli cells rather germ cells.

(4) In in-house cDNA microarray analysis, we isolated some genes whose expression was altered in epididymis after neonatal treatment of mice with DES or E2 at 2, 4 and 8 weeks of age. These genes appear to be related with the deterioration of epididymal function by neonatal treatment with DES or E2.

(5) The results of chronic exposure to low-dose isoflavone, especially the period before gestation to the end of lactation and after weaning, dose not affect to male mice on reproductive development. On the other hand, transcriptome analysis and proteome analysis of in vitro exposure experiments using TM4 testicular cells to estrogenic/non-estrogenic compound including isoflavones revealed that chemicals were classified into some groups by the response of genes and proteins.

内分泌かく乱化学物質の性腺ホルモン作用機構の解明に関する研究

研究者 那須 民江 (名古屋大学大学院医学系研究科 教授)

研究要旨

マウスライディッヒ腫瘍細胞を用いて、種々の化学物質のテストステロン合成に与える影響の機序の解明を行った。

- 1) 低濃度領域でプロゲステロンやテストステロンの合成を抑制した化学物質はなかった
- 2) 高濃度の化学物質曝露においては、すべての化学物質によりプロゲステロン濃度は上昇した。テストステロン濃度も上昇傾向を示したが、用いた最高濃度においては元のレベルに戻る場合が多かった
- 3) ビスフェノール A を除いて、曝露濃度の上昇に伴い、プロゲステロンに対するテストステロンの濃度が低下した。即ち、高濃度領域ではプロゲステロンに至る過程よりもプロゲステロンからテストステロンに至る過程の合成抑制が強いことが予想された
- 4) ビスフェノール A は 0.033mM の曝露濃度でプロゲステロンに対するテストステロンの合成を誘導していた
- 5) MEHP によるテストステロン合成には CYP11A、CYP17 および 3 β HSD の遺伝子発現が、ビスフェノール A 曝露によるテストステロン合成の誘導には StAR と 17 β HSD の遺伝子発現が関与していることが推測された
- 6) コレステロールの de novo 合成に関わる遺伝子は化学物質投与の影響を受けやすいが、テストステロン濃度には大きな影響を与えないことが推測された

研究協力者

市原 学 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)
上島 通浩 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)
山ノ下 理 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)
宮田麻衣子 (名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学)

A. 研究の目的

外因性内分泌かく乱化学物質の代表的毒作用のひとつに性ホルモンレベルへの影響がある。この機構を解明するために、多くの場合、テストステロン合成過程に焦点があてられ、この過程に与える影響が検討されている (Fig.1 参照)。しかしテストステロンの基質であるコレステロールの合成、輸送に関しては殆ど検討されていない。この一つの原因は、各ステップの酵素活性測定系が確立していないことにある。申請者らは、最近、定量リアルタイム PCR 法を用いることにより、テストステロン合成に関わる種々の遺伝子発現が定量できる方法を開発した。この方法を用いて、昨年度は種々の内分泌かく乱化学物質のマウス精巣におけるテストステロン合成に関わる遺伝子発現への影響を検討した。しかし、in vivo の実験においては、ライディッヒ細胞を分画する必要があるため、一群に多くの動物が必要であるため、投与量の検討が困難である。特にマウスを用いた場合、ライディッヒ細胞を分画するためには 3~4 匹の精巣をプールする必要があり、投与量の設定が限定され

てくる。そこで、本年度はマウスの培養細胞を用いた研究を計画した。

B . 研究方法

1) 細胞の培養と回収

1)-1 細胞の培養

細胞は MLTC-1 マウスライディッヒ腫瘍細胞 (ATCC:CRL-2065)を用いた。75cm² 培養フラスコで細胞を培養し、コンフルエントを 5ml の PBS(phosphate buffered saline pH7.4) で洗い、2×トリプシン 10μ l を加えて 37 10 分インキュベートした。その後、20%FBS、50μ g/ml アンピシリンを含んだ RPMI1640 培養液を 5ml の加え、50ml 遠心チューブに移し、1000g で 5 分間 (22) 遠心した。上清を捨て、フェノールレッド抜きの 0.45%グルコース、10mM HEPES、10%FBS を含んだ RPMI1640 培養液を加えた後、25cm² フラスコに 2ml ずつ分注した。各フラスコに 3ml の 0.45%グルコース、10mM HEPES、10%FBS を含んだ RPMI1640 培地をそれぞれ加えて 37 で 24 時間インキュベートした。

1)-2 化学物質処理

フタル酸モノエチルキシル (MEHP)、フタル酸ジ 2-エチルヘキシル(DEHP)、ビスフェノール A、2,4 - ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) および塩化トリメチルスズの最終濃度が 0M、10⁻⁶M、10⁻⁵M、3.3×10⁻⁵M、10⁻⁴M、3.3×10⁻⁴M、10⁻³M となるようにフラスコに添加した。MEHP、DEHP、ビスフェノール A、および塩化トリメチルスズは 0.5%エタノールに、2,4-D は水に溶解させたものを使用した。これらの化学物質添加後、細胞を 37 で 2 日間インキュベートした。

1)-3 細胞および細胞外液の回収

LDHを測定するために2mlの培養液を2mlチューブに入れて回収し、- 80 に保存した。残りの細胞および培地に 120μ l のトリパンプルー溶液を加え、方眼マイクロメーター (1.25cm×1.25cm)格子を備えた顕微鏡において細胞数を数えた。その後培地を廃棄し、フェノールレッドと血清抜きの 2ml の 0.45%グルコース、10mM HEPES を含んだ RPMI1640 培地で 2 回洗浄し、同じ組成の培地を 5ml 加えた。50μ l 、100nM の hCG を加え、37 で 2 時間インキュベートした。インキュベーション終了後培地を各 2ml ずつ 2 本回収し、テストステロンとプロゲステロン測定のため、- 80 で保存した。残りの培地を捨てて、2ml の 2×トリプシンを加え、37 10 分インキュベートした。これを 2ml チューブに移し、1500g で 5 分間 (22) 遠心した。上清を捨てて、- 80 で保存した。

2) テストステロン・プロゲステロンの測定

培養液中に放出されたテストステロンとプロゲステロンは EIA Kit(Cayman 社、USA) を用いて測定した。

3) RNA 抽出・cDNA 合成

回収した細胞に 70%エタノールを 400μl 入れてよく攪拌した。2ml collection tube に乗せた RNeasy mini spin column に混合液を注ぎ、12000rpm で 15 秒間 遠心した。廃液を捨て、collection tube を元に戻し、Buffer RW1(Wash buffer) 350ml を column に注ぎ、

12000rpm で15分間遠心した。Collection tube を新しいものと交換し、DnaseI 溶液と Buffer RDD を1:7の割合で混ぜた溶液 80 μ l を column のメンブランに注ぎ、20~25°C で15分間放置した。Buffer RW1 350 μ l を column に注いだ後、12000rpm で15分間遠心した。Collection tube を新しいものに交換し、Buffer RPE(Wash buffer) 500 μ l を column に注いだ。12000rpm で15分間遠心し、廃液を捨て、collection tube を元に戻して、Buffer RPE 500 μ l を column に注いだ。その後15000rpm で2分間遠心した。Collection tube を新しいものと交換し、再び15000rpm で1分間遠心した。1.5ml collection tube に交換し、RNase-free water 50 μ l を column のメンブランに注ぎ、30秒間放置した。15000rpm で1分間遠心し、RNA 抽出液を得た。

RNA の検定を電気泳動により行った。10 \times FA gel buffer(MOPS が200mM、sodium acetate が50mM、EDTA が10mM となり、pH が7.0 となるように10NのNaOHで調整)を作った。その後1.2% FA gel(0.24g アガロース、2ml 10 \times FA gel buffer、18ml RNase-free water)を100ml 三角フラスコに入れ、電子レンジで溶解し、37% formaldehyde を0.36ml 加え、エチジウムブロマイドを0.2 μ l 加えた。ゆっくり混ぜてプレートに流した後、4に30分ほど放置してゲルを固めた。5 \times RNA loading buffer(80 μ l saturated bromophenol blue solution、0.8 μ l 0.5M EDTA pH8.0、7.2 μ l 37% formaldehyde、100% glycerol、30.84 μ l formamide、40 μ l 10 \times FA gel buffer)を作り、RNA 抽出液1に対し、5 \times RNA loading buffer が4になるように加えて、RNA サンプルを調整した。その後65 5分間放置し、氷冷水につけた。次にマーカー(5 \times RNA loading buffer と saturated bromophenol blue solution の割合が1:4になるようにする)を作成した。さらに1 \times FA gel running buffer(40ml 10 \times FA gel buffer、8ml 37% formaldehyde、352ml RNase free water)を作り、Mupid(ミニゲル泳動槽)に流し、固めておいた1.2% FA gel を入れ、分子マーカーを端に3.25 μ l 乗せ、RNA サンプルを乗せて50V、1時間泳動した。

cDNA の合成は Super Script 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。

4) 定量リアルタイム PCR

プライマー、プローブの作成は下記 GI ナンバーの塩基配列を参考に、その配列を基にして PE Biosystems 社製 Primer Express version 1.0 で作成した。マウスの GAPDH は PE Biosystems 社製を使用した。PPAR-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。その他の mRNA は SYBR Green 法で測定した。

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 7000 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、解析した数値は GAPDH に対する比として表した。

使用したプライマーあるいはプローブは以下の通りである。

- HMG-CoA synthase (HS): forward primer: 5'-TGTGGCACCGGATGTCTTT-3',
reverse primer: 5'-GACCAGATACCACGTTCCCTCAA-3';

- HMG-CoA reductase (HR): forward primer: 5'-TGTGGTTTGTGAAGCCGTCAT-3', reverse primer: 5'-CGTCAACCATAGCTTCCGTAGTT-3';
- steroidogenic acute regulatory protein (StAR): forward primer: 5'-AAGGAAAGCCAGCAGGAGAAC-3', reverse primer: 5'-TCCATGCGGTCCACAAGTT-3';
- peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR): forward primer: 5'-AGTTCGTGGCACTGCATAAGC-3', reverse primer: 5'-GCTGCCATTCTCTCCTCCTA-3';
- cytochrome P450_{scc} (CYP11A): forward primer: 5'-CCATCAGATGCAGAGTTTCCAA-3', reverse primer: 5'-TGAGAAGAGTATCGACGCATCCT-3';
- 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ 5 β -4-isomerase (3 β -HSD): forward primer: 5'-GGAGGCCTGTGTTCAAGCAA-3', reverse primer: 5'-GGCCCTGCAACATCAACTG-3';
- cytochrome P450₁₇ (17 α -hydroxylase/C₁₇₋₂₀ lyase CYP17): forward primer: 5'-CCATCCCGAAGGACACACAT-3', reverse primer: 5'-CTGGCTGGTCCCATTCAATT-3';
- 17 β -HSD: forward primer: 5'-CAACGATTCCTCCTGACACGAT-3', reverse primer: 5'-GCTGATGTTGCGTTTGAGGTAA-3';
- PPAR α : GI 7106384, forward primer: 5'-TTTCCCTGTTTGTGGCTGCTA-3', reverse primer: 5'-CCCTCCTGCAACTTCTCAATG-3'
Taq Man probe, 5'-AATTTGCTGTGGAGATCGGCCTGG-3'
- GAPDH: PE Biosystems 社製 TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents を使用
Taq Man probe, 5'-CCCGTTCTCAGCCTTGACAGTGCC-3'

SYBR Green 反応は、25 μ l 中に最終濃度 1 \times SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 400 nM プライマー, および 1 ng cDNA をテンプレートとして加え、95 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベーションをして Amplitaq Gold polymerase の活性化を行った。引き続き 95 $^{\circ}$ C で 15 sec、40 cycles denaturation を、60 $^{\circ}$ C で 1 分間 annealing と extension を行った。

5) 統計学的検定

実験結果の有意差の検定には分散分析後 Dunnett の多重比較を使用した。

C . 研究結果

1) MEHP

Fig.2 に MEHP 添加後の細胞数の変化を示す。MEHP 0.18mM までは細胞数の変化は認められないが、0.33mM からは明らかに減少した。

Fig.3 にテストステロンとプロゲステロン濃度の変化、Fig. 4 にプロゲステロンに対するテストステロンの生成割合を示す。プロゲステロン濃度は MEHP 0.33mM から増加し、0.6mM で最大となり、1mM で 0.33mM と同レベルに戻った。一方、テストステロン濃度は MEHP 0.18mM

から上昇し、0.33mMで最大となった後、0mMと変わらないレベルまで減少した。MEHP添加後のプロゲステロン生成に対するテストステロンの割合をみると、0.33mM以上の濃度で明らかに減少していた。Fig. 5はMEHPのテストステロン合成関連遺伝子発現への影響を示す。統計的に有意差があったのはStARの1mMで、有意にmRNAの発現が上昇していた。PBRと17βHSDのmRNAの発現も1mMにおいて上昇傾向を示した。その他のテストステロン合成関連遺伝子はテストステロン濃度と類似した挙動を示した。即ち、0.18mMで最大となり、その後減少傾向を示した。特にCYP17と3βHSD-mRNAの発現の低下は著しく、1mMにおいては、それぞれ0mMの1%と6%にまで減少していた。1mMにおけるCYP11Aの低下もCYP17と3βHSD-mRNAの発現の低下に次いで著しく、0mMの17%まで低下していた。HR,HS,PPARαの挙動はお互いに類似していて、0.18mMの曝露により上昇傾向を示したが、1mMのMEHP曝露後は0mMと同レベルの遺伝子発現を示す傾向であり、この点がCYP17、3βHSDおよびCYP11Aの挙動と一致していなかった。これらの結果から、テストステロン濃度の上昇や低下の挙動と類似しているのはHR,HS,PPARα、CYP11A、CYP17、3βHSDであるといえる。特に高濃度領域におけるCYP17と3βHSDの著しい低下は、プロゲステロンに対してテストステロン生成の著しい低下に関連しているかもしれない。

Supplemental Figure

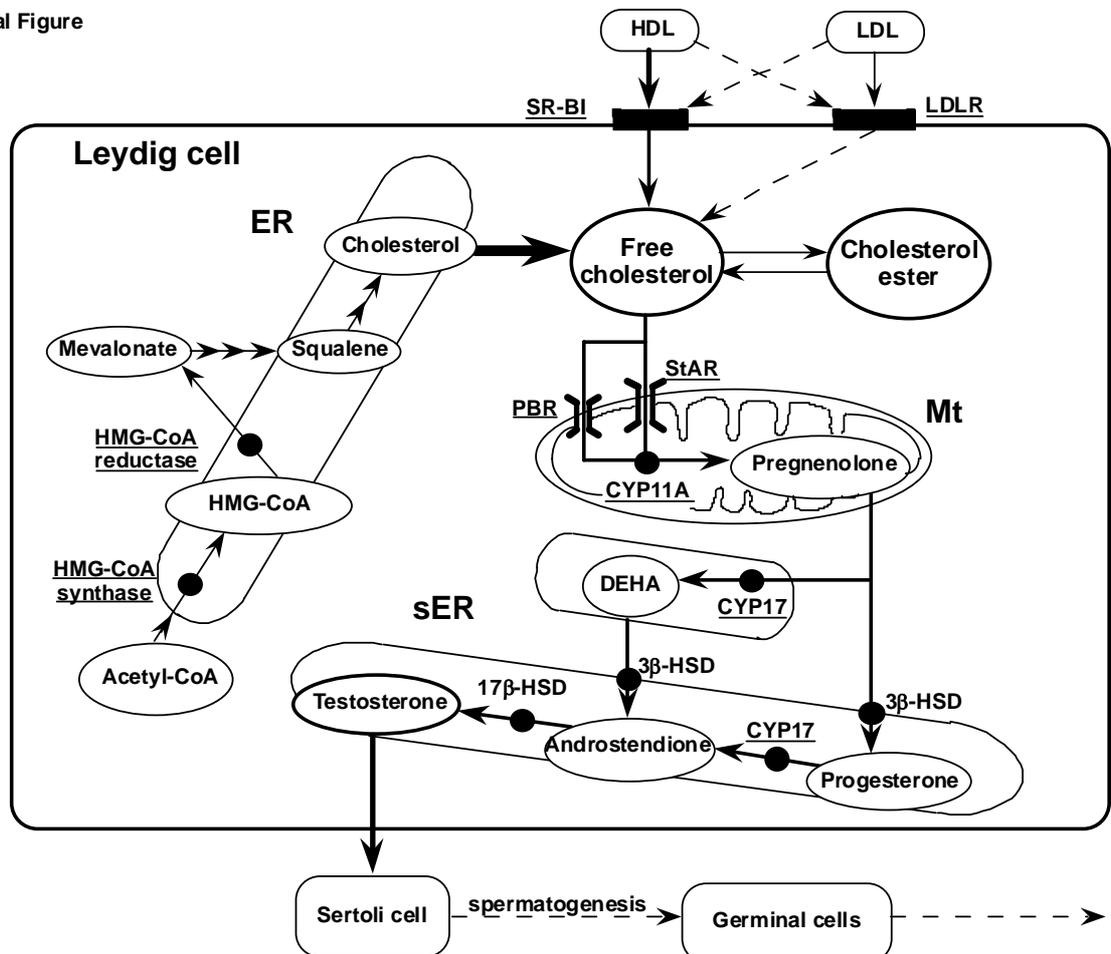


Fig.1 ライディッヒ細胞におけるテストステロン合成

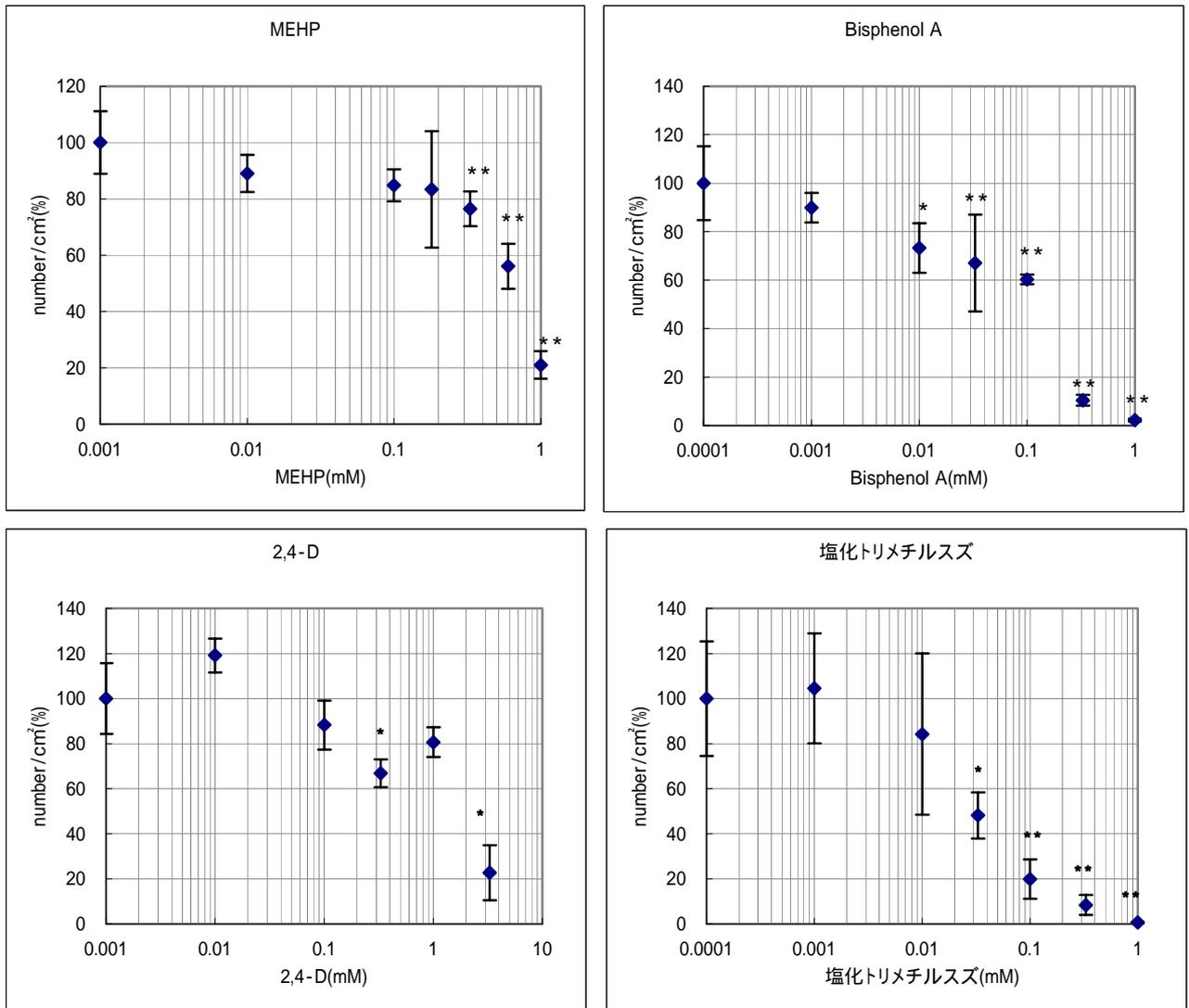


Fig.2 MEHP、ビスフェノール A、2,4-D および塩化トリメチルスズ添加後の細胞数の変化。0mMを100%とした。各点と棒は平均 (n = 3) と標準偏差を示す。

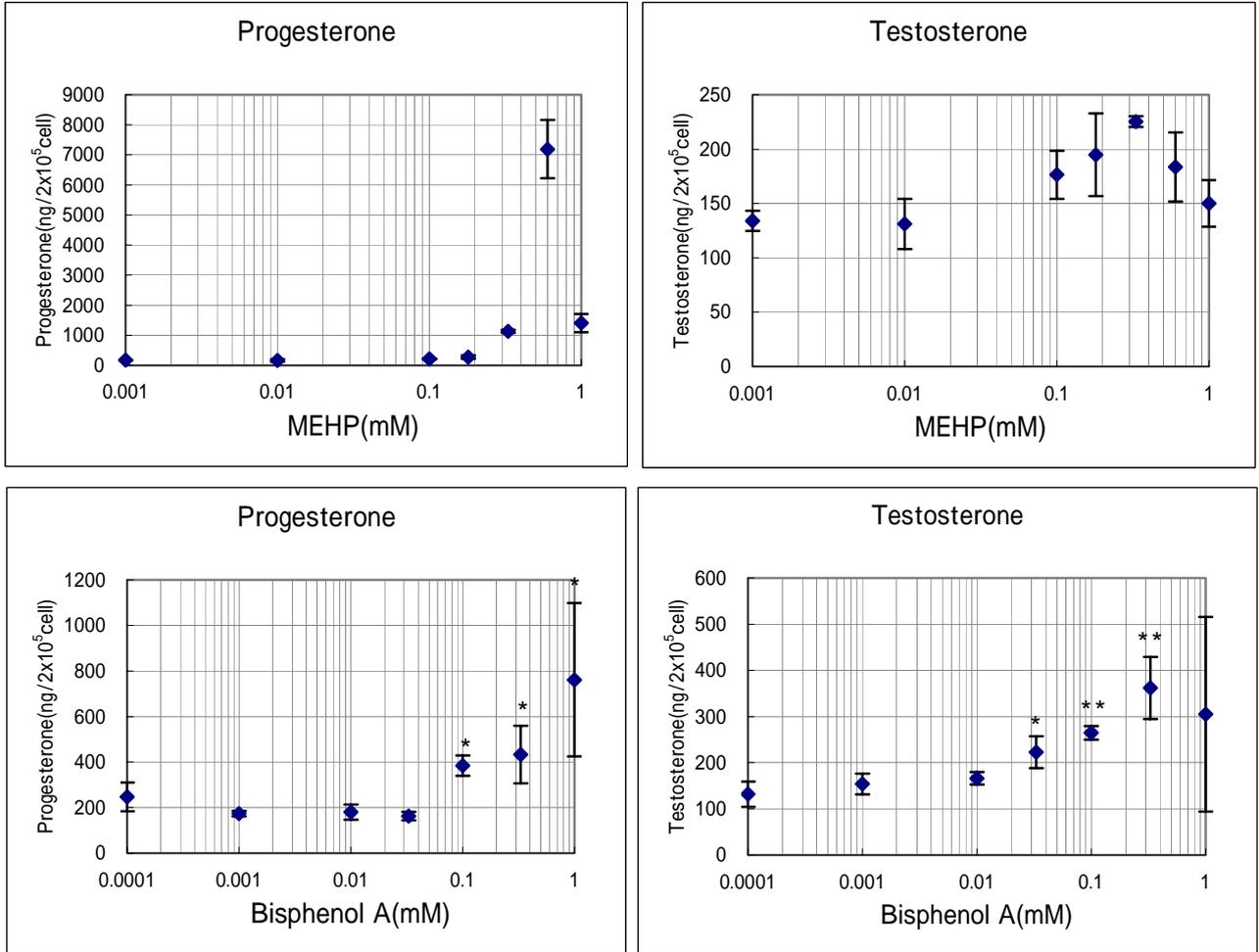


Fig.3a MEHP とビスフェノールA 添加後の培養液中のテストステロンとプロゲステロン濃度。

各点と棒は平均 (n = 3) と標準偏差を示す

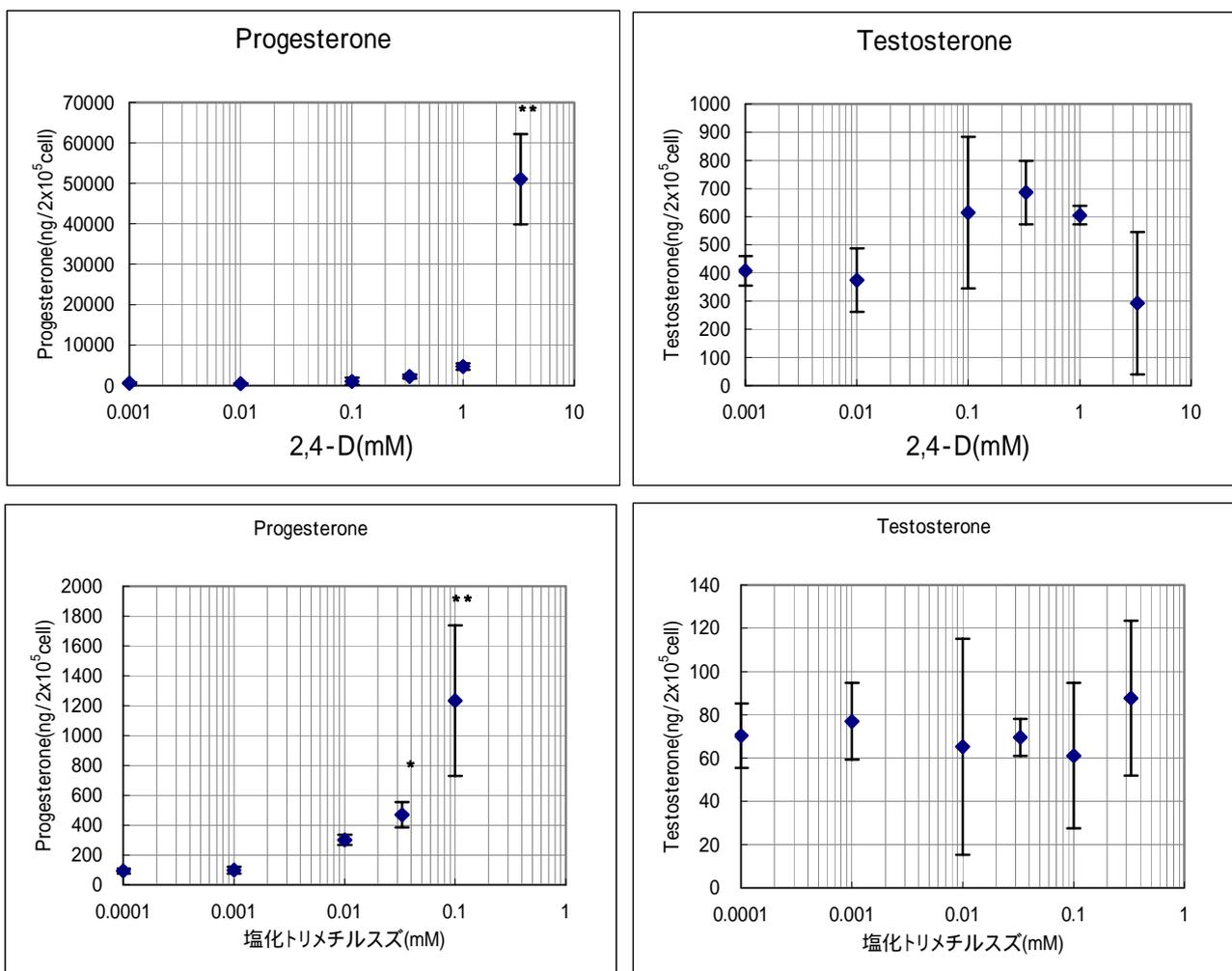


Fig.3b 2,4-D と塩化トリメチルスズ添加後の培養液中のテストステロンとプロゲステロン濃度。各点と棒は平均 (n = 3) と標準偏差を示す。

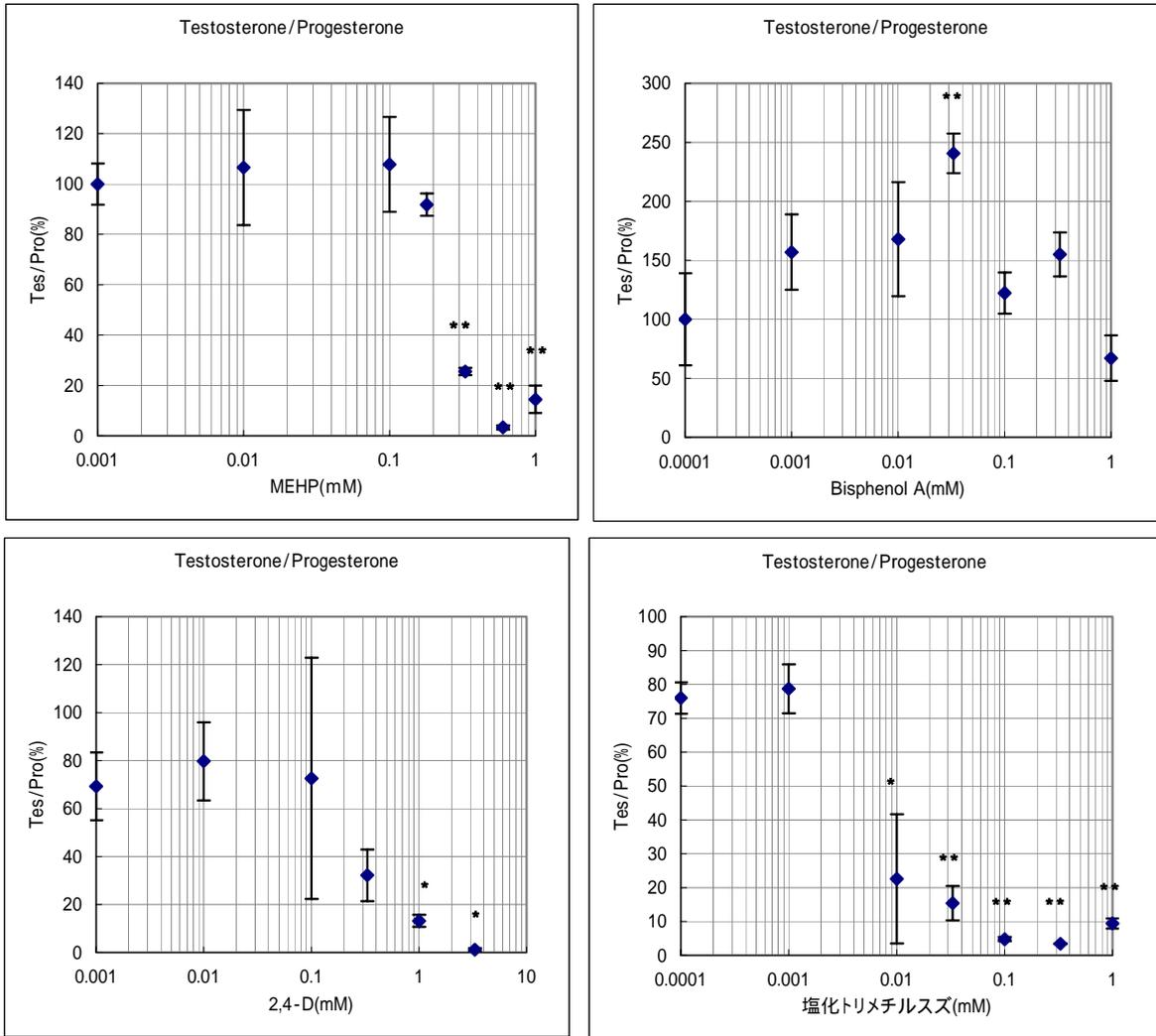


Fig.4 MEHP , ビスフェノール A、 2,4-D および塩化トリメチルスズ添加後のプロゲステロンに対するテストステロンの生成割合。各点と棒は平均 (n = 3) と標準偏差を示す。

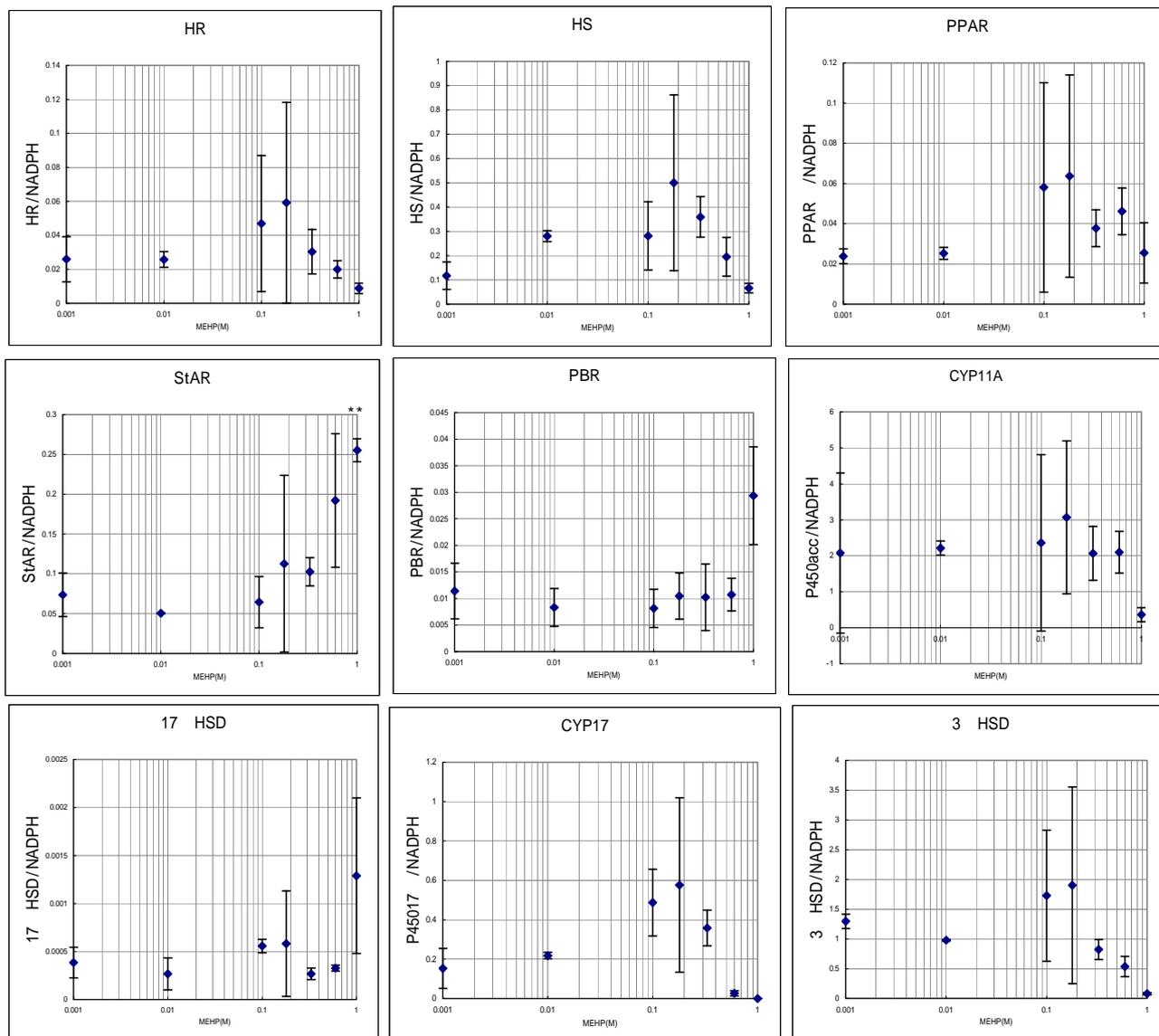


Fig.5 MEHP 添加後のテストステロン合成関連遺伝子発現の変化
各点と棒は平均 (n = 3) と標準偏差を示す。

2) DEHP

DEHP に関しては 0.5% エタノールに対して 0.033mM が最大溶解濃度であったので、この濃度以下で実験を行った。0.01mM 添加後プロゲステロンとテストステロン濃度は上昇傾向を示したが、有意差はなかった (Fig.6)。

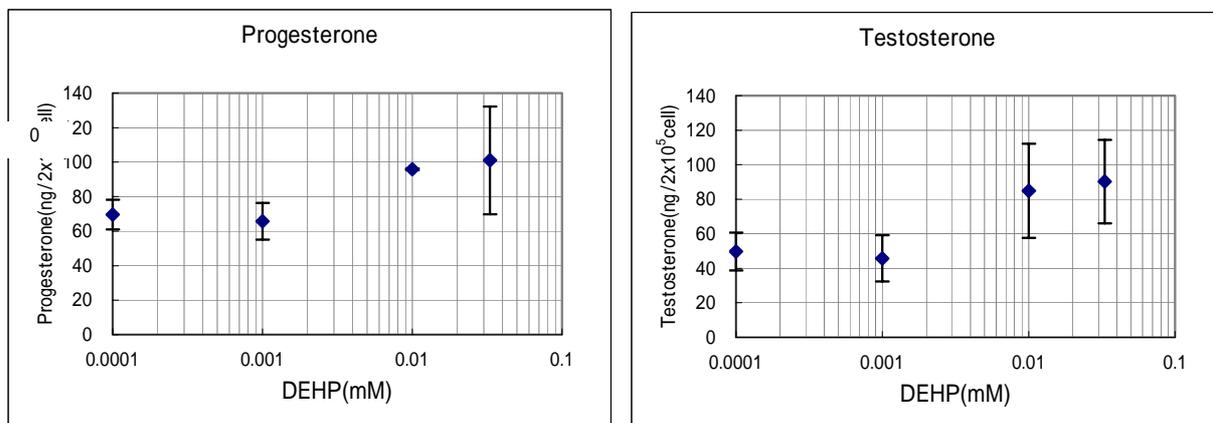


Fig.6 DEHP のプロゲステロンおよびテストステロン合成への影響
各点と棒は平均 (n = 3) と標準偏差を示す。

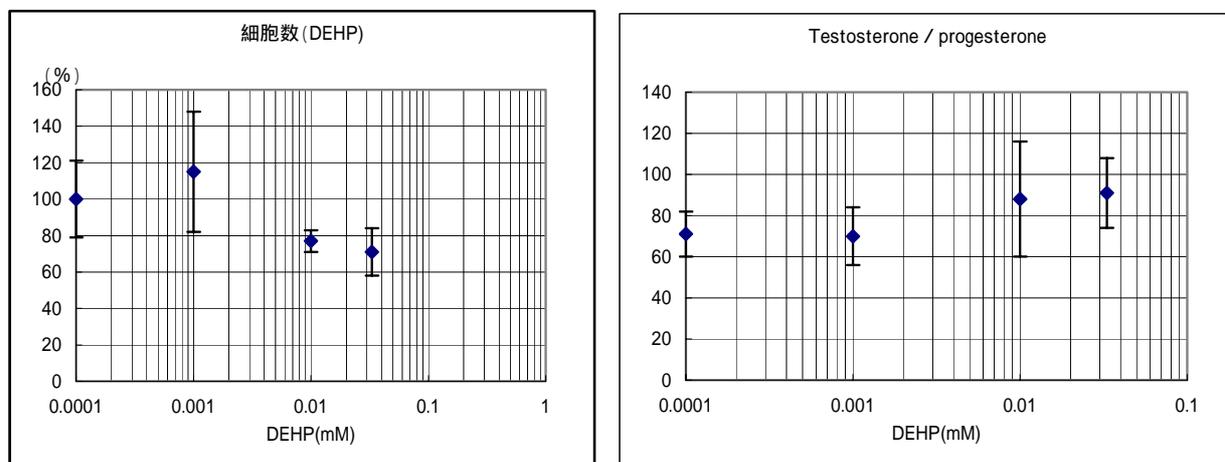


Fig.7 DEHP の細胞数、テストステロン/プロゲステロンに与える影響
各点と棒は平均 (n = 3) と標準偏差を示す。

3) ビスフェノール A

ビスフェノール A 添加後の細胞数は 0.01mM 添加後から減少し、0.33mM においては 0mM の約 10%にまで減少していた (Fig.2)。細胞数の減少が MEHP 添加した場合より低濃度で生じることが明らかである。

ビスフェノール A 添加後の培養液中のテストステロンとプロゲステロン濃度を Fig. 3 に示す。プロゲステロンは 0.1mM において、テストステロン濃度は 0.033mM 以上の濃度において上昇した。

プロゲステロンに対するテストステロンの生成割合は、0.033mM において明らかに上昇し、MEHP と異なった挙動を示した (Fig.4)。特に、0.033mM において、プロゲステロンの合成量に対してテストステロン合成量が 100%を超えており、このような現象は MEHP や DEHP 投与では観察されなかった点が注目される。これはプロゲステロン合成の増大よりテストステロン合成の増大が優先していたためであろう。

Fig.6 にビスフェノール A 添加後のテストステロン合成に関わる遺伝子発現の変化を示す。0.33mM 以上の濃度においては細胞数が少ないため、測定を省略した。HR, HS, PPAR α および CYP11A の mRNA 量はビスフェノール A 濃度の上昇に伴い減少し、また、プロゲステロンやテストステロン濃度の挙動と全く異なっていたことから、これらの遺伝子の関与は少ないと判断された。PBR, 3 β HSD、CYP17 の mRNA は殆ど変化しなかった。一方、17 β HSD と StAR の mRNA の発現はビスフェノール A が 0.1mM において明らかに上昇していた。これらの遺伝子発現の上昇はプロゲステロンやテストステロン濃度の上昇が確認された濃度とほぼ一致しており、ビスフェノール A を曝露した場合のステロイド合成に重要な作用をもたらすと考えられる。

4) 2,4-D

細胞数は 0.5mM 以上の 2,4-D 濃度において減少し、MEHP を添加した場合と類似していた (Fig.2)。プロゲステロンは一番高い濃度(5mM)でのみ上昇したが、テストステロン濃度に変化は認められなかった(Fig.3b)。プロゲステロンに対するテストステロンの生成割合をみると、1mM 以上の濃度において明らかに減少していた (Fig.4)。減少のパターンは MEHP に類似していたが、MEHP より高濃度において減少が観察された。

5) 塩化トリメチルスズ

塩化トリメチルスズを添加した場合、細胞数は 0.033mM から減少し、ビスフェノール A と同様に細胞毒性が強い物質であった (Fig.2)。0.1mM ではビスフェノール A を添加した場合細胞数は 60%残っていたのに対し、塩化トリメチルスズの場合は 20%残っていたのみであった。

プロゲステロン濃度は 0.033mM から上昇したが、テストステロン濃度に変化はみられなかった (Fig.3b)。しかし、プロゲステロンに対するテストステロンの精製割合をみると (Fig.4) 0.01M から著しく減少した。減少のパターンは MEHP や 2,4-D 添加後に類似していたが、これらの化学物質より低濃度から減少した。ビスフェノール A 添加後のパターンとは全く異なっていた。

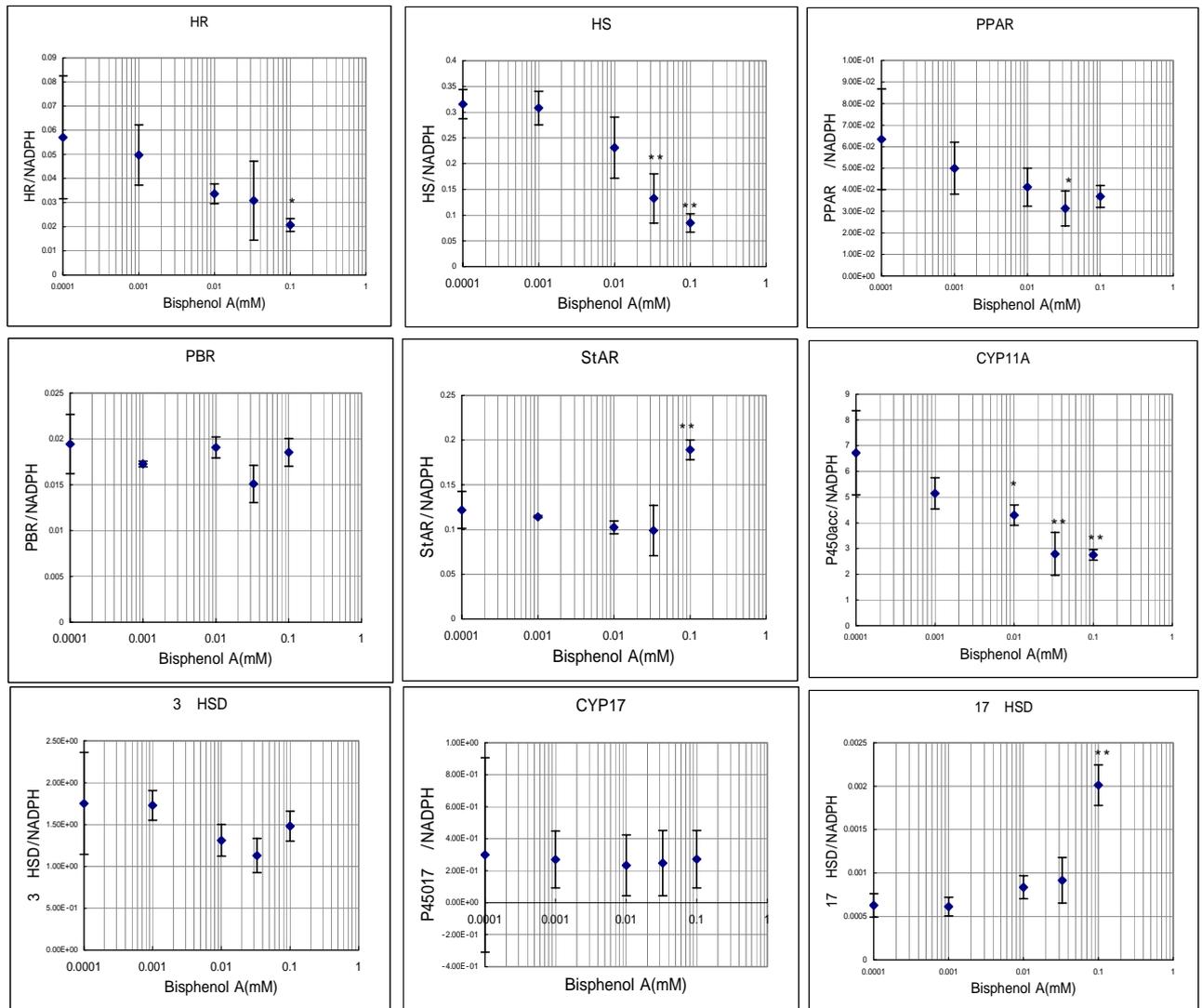


Fig.8 ビスフェノールA添加後のテストステロン合成関連遺伝子発現の変化
各点と棒は平均 (n = 3) と標準偏差を示す。

D . 考察

テストステロンはほとんどがライディッチ細胞で産生され、その後すみやかに、血清中に放出される。一方で精巣内の精細管にパラクラインされて、セルトリ細胞の機能維持や生殖細胞の成熟と分化に本質的な役割を果たす。従って、テストステロン合成への影響を明らかにすることは、精巣障害の機構を明らかにする上でも重要である。

今回観察されたのは、以下の通りである。

- 1) 細胞毒性は、塩化トリメチルスズ > ビスフェノールA > MEHP > 2,4-D であった
- 2) 低濃度領域でプロゲステロンやテストステロンの合成を抑制した化学物質はなかった
- 3) 高濃度の化学物質曝露においては、すべての化学物質によりプロゲステロン濃度は上昇した。テストステロン濃度も上昇傾向を示したが、用いた最高濃度においては元のレベルに戻る場合が多かった
- 4) ビスフェノール A を除いて、曝露濃度が上昇に伴い、プロゲステロンに対するテストステロンの濃度が減少した。即ち、高濃度領域ではプロゲステロンに至る過程よりもプロゲステロンからテストステロンに至る過程の合成抑制が強いことが予想された
- 5) ビスフェノールA は 0.033mM の曝露濃度でプロゲステロンに対するテストステロンの合成を誘導していた
- 6) MEHP によるテストステロン合成の低下には CYP11A、CYP17 および 3 β HSD の遺伝子発現が、ビスフェノール A 曝露によるテストステロン合成の誘導には StAR と 17 β HSD の遺伝子発現が関与していることが推測された
- 7) コレステロールの de novo 合成に関わる遺伝子は化学物質投与の影響を受けやすいが、テストステロン濃度には大きな影響を与えないことが推測された

私達は昨年度に DEHP の投与実験を行った。その結果、DEHP 投与はライディッチ細胞の CYP17 の発現を低下させることを報告した。この結果は今回の培養細胞を用いた結果とよく一致する。CYP17 の発現の低下は PPARalpha のリガンドである MEHP により抑制され、リガンドではないビスフェノール A 曝露による影響は受けていないので、PPARalpha に関連した作用かもしれない。実際、別の実験で、PPARalpha ノックアウトマウスの CYP17 の発現が野生型マウスより有意に低いことを確認している。他の化学物質によっても CYP17 活性あるいは mRNA 発現の低下と血清テストステロン値の低下が観察されることが報告されている。例えば、肝臓毒として知られているノジュラリン（アオコ毒の 1 種）はラットの精巣と血清のテストステロンを低下させ、CYP17 の活性も低下させることが報告されている（Park et al., *Molecular Carcinogenesis* 2002）。CYP17 は DEHP の様な化学物質の影響を受けやすいのかもしれない。

DEHP の血清テストステロン濃度への影響に関する報告は多く、殆どがその濃度を低下させるというものである。Akingbemi らはラットに DEHP を投与し、テストステロン合成への影響を検討した（*Biol Reproduction* 2001）。胎仔期に投与した場合 21 日と 35 日齢ラットにおいて有意に血清テストステロンレベルが低下したが、90 日齢ではコントロール群と差が認められなかった。21 日齢のラットに DEHP を 2 週間曝露すると、血清中のテストステロンレベルは変化しないが、ライディッチ細胞のテストステロン合成能は低下した。この場合、CYP11A, 3 β HSD, CYP17, 17 β HSD の活性が濃度依存的に低下していた。今回の実験において、17 β HSD を除くこれらの酵素の mRNA の発現は低下傾向を示していたので、活性の

低下は DEHP 曝露による遺伝子発現の低下によるかもしれない。

CYP17 は 2 種の酵素活性を有す。即ち、17 α -hydroxylase と C₁₇₋₂₀ lyase である。両方の活性が抑制されるのか、あるいは片方なのか、今回は活性を測定していないので不明である。今後の検討課題である。

ビスフェノール A 曝露によっては、テストステロンは変わらないとする報告 (Kawai et al., Environ Health Perspect 2003; Takahashi and Oishi Food Chem Toxicol 2003) と増加するという報告 (Williams et al., Human Repro Update 2001) がある。Williams らは生後 2 日のラットに 12 日間ビスフェノール A を与え、18 日目に血清テストステロン濃度を測定した。その結果テストステロン濃度が 2 倍上昇していることを確認した。このテストステロン上昇には StAR あるいは 17 β HSD の遺伝子発現が関与しているかもしれない。一方、Kawai らは胎仔期のマウスに母獣を経由で、Takahashi と Oishi は成熟ラットあるいはマウスにビスフェノール A を与えたが、血清のテストステロンには影響を与えないことを報告している。投与時期によって得られる結果が異なるのか、あるいは動物種の差異によるのか、さらに検討が必要であろう。このようにして、ビスフェノール A と MEHP ではテストステロン合成系に与える影響は異なる様である。

E . 結論

内分泌かく乱作用が疑われている化学物質のテストステロン合成に関わる遺伝子発現への影響をマウスライディヒ腫瘍細胞を用いて検討した。テストステロン合成の低下には CYP11A, CYP17, 3 β HSD が、誘導には StAR, 17 β H S D の遺伝子発現が関与しているかもしれない。内因性のコレステロール合成も影響を受けるが、テストステロンのレベルには大きな影響を与えないと思われる。

Effects of probable endocrine disruptors on cholesterol and/or testosterone synthesis in mouse Leydig tumor cells

Nakajima T, Ichihara G, Kamijima M, Yamanoshita O and Miyata M.

Department of Occupational and Environmental Health, Nagoya University
Graduate School of Medicine

We investigated the effects of monoethylhexyl phthalate (MEHP), di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), bisphenol A, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), and trimethyltin chloride on testosterone synthesis in mouse Leydig tumor cells. None of these endocrine disrupting chemicals decreased the levels of progesterone and testosterone at lower concentrations. In contrast, all increased progesterone level at higher concentrations. These chemicals also increased testosterone levels at higher concentrations, but testosterone returned to the control level at the highest concentration. All chemicals except bisphenol A decreased the rates of testosterone to progesterone production dose-dependently; bisphenol A increased the rate at the middle concentration. These results suggest that the chemicals other than bisphenol A suppress the process of progesterone to testosterone production more than that to progesterone production, whereas bisphenol A increases the process of the former. Quantitative real time PCR analyses showed that expression of CYP11A (cytochrome P450_{sc}), CYP17 (cytochrome P450_{17 α} : 17 α -hydroxylase/C₁₇₋₂₀ lyase) and 3 β HSD (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ 5 β -4-isomerase) genes may be involved in testosterone suppression by MEHP, whereas expression of StAR (steroidogenic acute regulatory protein) and 17 β HSD (17 β -hydroxysteroid dehydrogenase) genes is involved in the induction by bisphenol A. Genes involved in cholesterol *de novo* synthesis such as HGM-CoA synthase and HGM-CoA reductase were influenced by exposure to the endocrine disruptors, which might not play an important role in the synthesis of testosterone in Leydig cells.

フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価

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

研究要旨

フタル酸エステル類は動物実験で、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。大気、水、土壌など様々な環境中から検出されることから、人への影響が懸念される。しかし、多くの研究報告は、経口摂取による生体影響であり、人におけるより自然な摂取経路である吸入曝露による影響についての報告は殆どないため、吸入曝露実験とそれに基づくリスク評価が必要である。本研究ではフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) 吸入曝露を行い、(1) 精巣毒性、(2) 次世代影響の検討を行った。

(1) DEHP 吸入曝露により、コントロール群と曝露群で体重の差は見られなかったが、4週間曝露と8週間曝露で血漿テストステロン濃度も有意に高く、精巣重量は、4週間曝露では有意ではないが曝露群で重い傾向に、8週間曝露で有意に重かった。精巣におけるテストステロン合成酵素 mRNA の発現量や、血漿 LH に差は見られなかった。4週間曝露雄ラットの精巣組織像では、個体差が多く、明らかな差は見られなかったが、曝露群でも成熟増が観察された。8週間曝露ではコントロール群と曝露群で差は見られず、成熟した組織像が見られた。4週齢幼若ラットへの DEHP 吸入曝露により、内分泌への影響が示唆された。

(2) 妊娠初期から後期までの DEHP 吸入曝露により、妊娠 19 日目での雄仔ラットの精巣組織テストステロン濃度は、有意ではないが、減少傾向に、精巣合成酵素 mRNA 発現量は、曝露濃度依存性に、有意に減少した。母には有意な影響は見られなかった。

生後 2, 7, 14 日目の雄仔ラットの体重、AGD、AGD / 体重には、成長に伴う変化が認められた。この変化が成長に伴う変化なのか、DEHP による変化なのか、今後、成長後の精巣、テストステロン濃度などを検討し、評価する予定である。

研究協力者

佐田 文宏（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 助教授）
西條 泰明（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 助手）
近藤 朋子（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 研究員）
梅村 朋宏（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 大学院生）
倉橋 典絵（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 大学院生）
馬 明月（北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野 大学院生）
大村 実（九州大学大学院医学研究院 衛生学教室 助手）

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や、製品製造過程において、大気中へ放出され、呼吸器を介して体内に移行する可能性等が考えられる。

大気中にも、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、ACGIH TLV) である。一方、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 1999 年の報告もあり、生体への悪影響が疑われる。

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

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

本研究における目的は、今まで、ほとんど行われていないフタル酸エステル類の吸入曝露における生体への影響を検討することである。平成 13 年度は吸入曝露を行うための曝露装置を作成し、平成 14 年度は、DEHP 吸入曝露実験により、体内動態、生殖毒性、次世代影響について検討を行った。今年度は、DEHP の吸入曝露による影響として、経口投与で報告されている精巣毒性、さらに次世代影響についても検討を行った。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験動物は Wistar 系ラットを用いた。オスラットは北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設より、妊娠ラットは三協ラボサービス(日本エスエルシー株式会社)より購入した。

2. 幼若雄ラット精巣への影響に関する検討

4 週齢のオス Wistar 系ラットに、特殊吸入曝露装置を用いて、曝露濃度を $0 \text{mg} / \text{m}^3$ (コントロール) $5 \text{mg} / \text{m}^3$ 、 $25 \text{mg} / \text{m}^3$ の 3 点・各 6 匹ずつに、6 時間 / 日 (週 5 日) 4 週間曝露、8 週間曝露を行った。曝露終了後、エーテル麻酔を行い、心採血し、精巣を摘出した。血液は、血漿分離され、RIA によるテストステロン濃度測定、EIA による LH 濃度測定まで、 -80°C で凍結保存した。また、左側精巣は、重量計測後、ブアン固定し、組織標本を作製した。右側精巣は、液体窒素により凍結し、RNA 抽出まで -80°C で保存した。

検討項目は、雄ラット（8週令、12週令ともに）体重、精巣重量、精巣上体重量、精嚢重量、前立腺重量、精巣組織、血漿テストステロン濃度、血漿 LH、血漿 FSH、精巣テストステロン合成酵素 mRNA、である。

統計解析は、一元配置分散分析（ANOVA）で検定し、有意差が見られたものには、Scheffe の多重比較を行った。

3、妊娠ラットへの曝露による雄仔ラット精巣への影響

曝露（1）:

妊娠 Wistar 系ラットはプラグ確認日を 0 日として、妊娠 1 日目に購入した。30 匹をコントロール、25 mg/m³ (高濃度)、5 mg/m³ (低濃度) DEHP 吸入曝露群の 3 群に分け、DEHP 曝露を妊娠 2 日目から妊娠 19 日目まで 1 日 6 時間連続して吸入曝露を行った。曝露最終日、曝露終了後、帝王切開を行った。胎子は精巣の確認によって、雌雄を確認し、精巣は RIA によるテストステロン濃度測定、RNA 抽出まで -80 で保存した。母ラット、雄仔ラットはそれぞれ以下の項目の検討を行った。

母：体重、妊娠黄体数、着床数、胚の生死、臓器の重量測定（卵巣、子宮、肝臓）

雄胎子：体重、AGD 測定、精巣組織テストステロン濃度、精巣テストステロン合成酵素 mRNA

統計解析は、一元配置分散分析（ANOVA）で検定した。

曝露（2）:

吸入曝露（1）と同じ条件で、コントロール、25 mg/m³ (高濃度)、5 mg/m³ (低濃度) DEHP 吸入曝露群の 3 群に分け、DEHP 曝露を妊娠 2 日目から妊娠 19 日目まで 1 日 6 時間連続して吸入曝露を行った。曝露終了後、雄ラットを 12 週令まで飼育し、精巣への影響を検討する。現在は、生後 14 日(PND 14)で飼育中である。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

() 幼若雄ラット精巣への影響

曝露濃度の実測値は、5mg / m³群で 5.1 ± 1.3mg / m³、25mg / m³群で 24.6 ± 5.2 mg / m³であった。曝露終了後の体重は、コントロール群と比較して、5mg / m³群、25mg / m³群で有意な差はみられなかった。(表 1)

精巣重量、精巣上体重量、前立腺重量は 4 週間曝露群、8 週間曝露群ともに有意な差はみられなかったが、精嚢重量は、コントロールに比べて、4 週間曝露群では有意ではないが、精嚢重量が重い傾向にあり (P=0.06)、8 週間曝露群の 5mg / m³・25mg / m³曝露群で有意に重かった (P<0.001) (表 2)

血漿テストステロン濃度は、コントロールに比べて、4 週間曝露 5mg / m³曝露群で有意に高濃度、25mg / m³曝露群で有意ではないが高濃度、8 週間曝露 5mg / m³・25mg / m³曝露群で有意に高かった (図 1)

精巣におけるテストステロン合成酵素である、P450scc、3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3HSD)、CYP17、及び、テストステロンからエストロゲンへの変換酵素である CYP19 の mRNA 発現量は、4 週間曝露群、8 週間曝露群ともに差はなかった (図 2, 3)

精巣組織について、Society of Toxicologic Pathology が提唱している評価基準 (Toxicologic Pathology

2002;30:507-520)により分類した。サンプル数が少なく、個体差が大きいため生物学的に有意な変化であるかどうかについては断定できなかったが、曝露群で成熟した精巣もみられた(表3, 図4, 5)。8週間曝露群の精巣組織像には、コントロール群との差は見られず、成熟した組織像がみられた。

血漿 LH 濃度は、有意な差は見られなかったが、4週間、8週間曝露群でコントロールより高い傾向にあった($P=0.14$) (表4)。

() 妊娠ラットへの DEHP 吸入曝露による雄仔ラット精巣への影響

曝露濃度は 25 mg/m^3 、 5 mg/m^3 に設定をしていたが、曝露期間中実際のチャンバー内濃度は、平均 $19.7 \pm 3.2 \text{ mg/m}^3$ 、 $2.9 \pm 0.9 \text{ mg/m}^3$ であった。

吸入曝露(1)

母ラットへの影響:

妊娠 19 日目の曝露終了時の体重に、コントロール群と曝露群で有意な差は見られず、肝臓重量は減少傾向が、子宮重量は増加傾向があったが、有意差は認められなかった(表5)。

胎仔への影響:

妊娠 19 日目の胎仔の体重、胎盤重量、体長、尾長、AGD / 体重の値に有意な差はみとめられなかった(表6)。精巣重量にも有意な差はなかった(表7)。精巣組織中のテストステロン濃度は、曝露濃度依存性に減少傾向にあったが、有意差は無かった(図6)。精巣テストステロン合成酵素 mRNA 発現量は、曝露濃度依存性に有意差をもって減少した($P < 0.05$)(図7)。

吸入曝露(2)

雄ラットの体重、AGD を生後 1, 7, 14 日で、測定した(表8)。生後 1 日目の体重、AGD の長さでは有意な差はなかったが、AGD / 体重値が、 25 mg/m^3 曝露群で有意に大きかった($P < 0.05$)。生後 7 日目の体重、AGD の長さでは有意な差はなかったが、AGD / 体重が、 5 mg/m^3 曝露群で有意に大きかった($P < 0.01$)。生後 14 日目の体重、AGD は、濃度依存性に有意に小さかった($P < 0.05$)。AGD / 体重に有意な差は見られなかった。

D. 考察

() DEHP 吸入曝露による精巣に及ぼす影響に関する検討

DEHP は、in vitro でエストロゲン活性を持たず(CA.Harris 1997)、アンドロゲンレセプターとも結合しないが(Malgaard 2001)、in vivo で、発達期のアンドロゲン依存性の男性生殖器に影響を与える(LG.Parks 2000, LE.Gray 2000)ことから、抗アンドロゲン作用を有すると考えられている。

DEHP 経口投与により、テストステロンレベルや酵素活性の低下(BT.Akingberr 2001)や、精巣組織のアポトーシスの増加による精巣萎縮(JD.Park 2002, Malgaard 2001)、精巣重量の減少(E.Kasahara 2002)といった精巣毒性が報告されている。しかし、これらの報告のほとんどが、経口投与による実験であり、吸入曝露による影響は調べられていなかった。そこで、我々は、 5 mg/m^3 、 25 mg/m^3 の 2 点の濃度で吸入曝露実験を行い、幼若雄ラットの精巣への影響と、妊娠期曝露による雄仔ラットへの影響の検討を行った。

今回の実験では、過去の DEHP 経口投与の報告で見られた、抗アンドロゲン作用とは異なる結果が得られた。DEHP 吸入曝露により、4週間曝露終了後(8週齢)の体重にはコントロールと曝露群の有意な差は見られなかったが、血漿テストステロンは曝露群では有意に高濃度であり、精巣重量が重い傾向にあったこと、また、8週間曝露終了後(12週齢)も血漿テストステロン濃度が曝露群で

有意に高濃度であったこと、精囊の重量が有意に重かったことから、抗アンドロゲン作用とは逆の影響を与えることが示唆された。

今回の実験で、DEHP 経口投与での作用であると考えられている抗アンドロゲン作用と異なった結果が示唆されたことには、従来の報告とは曝露経路が異なることが一つの原因と考えられる。経口投与により、DEHP は消化管でリパーゼによって MEHP に代謝され、腸管から吸収される。一方、Pollack(1985)らは、経口投与と経動脈、経腹腔内投与による代謝の違いを検討した結果、経口投与の80%はすみやかに MEHP に変換されるが、経動脈、経腹腔内投与では、1%だけが MEHP に変換される、と報告している。現在級謬曝露での代謝の報告は無いが、吸入曝露も、肺を経て直接血流にのり、代謝されるので、経口投与と比較して体内の MEHP 濃度が低い (DEHP 濃度が高い) ことが予測される。精巣の影響は MEHP によるということが報告されているが、経口投与ではない場合には、DEHP そのものや、MEHP 以外の代謝物は、別の作用を持つ可能性があると考えられる。

血漿テストステロン濃度に差が見られた原因について今回の実験では、血漿 LH の濃度に差が見られず、精巣テストステロン合成酵素 mRNA 発現量に差が見られなかったことから、今回の実験では、明らかではない。曝露終了後の体重に差は見られなかったため、単なる体重など発育の差の結果とは考えづらいため、今後の検討課題である。

() DEHP 吸入曝露による次世代影響

妊娠ラットへの吸入曝露により、低濃度群 (実測値 $3\text{mg}/\text{m}^3$) でも、経胎盤性に胎仔に移行し、胎仔の精巣テストステロン合成酵素 mRNA 発現量を濃度依存性に減少させ、精巣組織のテストステロン濃度に影響を与えることが示唆された。また、その影響を受けた雄ラットの AGD に影響を及ぼすことが示唆された。

Benson(2000)らは、妊娠ラットへの妊娠 12 日～21 日までの経口投与 ($100\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$) では、出生した雄ラットの血清 LH 濃度が減少することにより、血清テストステロン濃度が減少すると報告している。今回の実験では、LH は測定していないので明らかではないが、LH の影響も受けている可能性も考えられる。

Gray(2000)らは、妊娠ラットへの妊娠 14 日から生後 3 日までの DEHP 経口投与 ($750\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$) を行ったところ、曝露群で、精巣重量の減少と、生後 2 日目での AGD の減少を報告している。今回の実験では、精巣重量に差は認められず、生後 1 日目の AGD は、 $5\text{mg}/\text{m}^3$ 群で有意に長く、生後 7 日目の AGD は、曝露群で有意に長かった。しかし、生後 14 日目になると、曝露群で体重の減少と、AGD の減少が見られ、成長に伴う変化が見られた。

経胎盤性の胎仔期曝露の精巣への影響は、経口投与による場合には、DEHP の抗アンドロゲン作用であると考えられているが、生後 1 日、7 日における AGD / 体重の結果が逆の作用を示唆された。生後 14 日目の AGD は、抗アンドロゲン作用の結果を示し、成長に伴う変化が見られた。AGD の増加が、一時的なものなのか、内分泌攪乱作用の結果なのか、現時点では不明であるが、可能性として経胎盤性による血液を介した曝露、胎内での羊水中に排泄された MEHP による曝露、出生後の経母乳性の曝露に違いがある可能性が考えられる。

胎仔期に DEHP を経胎盤性に曝露された結果、精巣組織中のテストステロンや、精巣テストステロン合成酵素 mRNA 発現量に変化が見られた。雄ラットの成長を追うために、曝露 (2) では、生後 21 日目での体重、AGD の測定を行い、さらに、成熟後の血清テストステロン濃度や、LH 濃度、精巣へ、どのような影響を及ぼすのか検討する計画で研究を進めている。

E. 結論

今まで殆ど行われていなかったフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) の吸入曝露による生体への影響の検討を行った。

4週齢の幼若雄ラットへのDEHP4週間吸入曝露により、テストステロン濃度を上昇させ、精嚢重量を増加させるという、従来の、経口投与による抗アンドロゲン作用とは異なる結果となった。今後、この内分泌攪乱のメカニズムの解明についての検討を行うことが課題である。

妊娠ラットへの18日間吸入曝露により、高濃度群(実測値 20mg/m³)でも、低濃度群(実測値 3mg/m³)でも、胎子の精巣テストステロン合成酵素 mRNA 発現量を濃度依存性に減少させた。精巣組織のテストステロン濃度に影響を与えた。また、雄ラットのAGDに影響した。

フタル酸ジエチルヘキシル(DEHP)の吸入曝露での現在の作業現場における許容濃度は5 mg/m³であるが、それよりも低い濃度(3 mg/m³)においても今回の検討で影響が見られた。今後、更に幼若ラット、妊娠ラットの次世代影響について検討を進める必要がある。

表 1 : 曝露終了時の雄ラット体重

曝露濃度	4 週間曝露群の体重(g) (8 週令 n=6)	8 週間曝露群の体重(g) (1 2 週令 n=6)
0mg/m ³	176.7 ± 18.7	272.0 ± 12.3
5mg/m ³	175.5 ± 9.5	283.7 ± 20.4
25mg/m ³	169.7 ± 13.2	273.3 ± 24.2
p-value	P=0.5	p=0.3

表 2 : 雄性生殖器重量

4 週間曝露群	精巣(g)	精巣上体 (g/100g 体重)	精囊 (g/100g 体重)	前立腺 (g/100g 体重)
0mg/m ³	0.81 ± 0.22	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.05	0.05 ± 0.02
5mg/m ³	0.95 ± 0.10	0.09 ± 0.01	0.17 ± 0.05	0.08 ± 0.02
25mg/m ³	0.94 ± 0.17	0.09 ± 0.02	0.17 ± 0.04	0.07 ± 0.01
p-value			p=0.06	
8 週間曝露群	精巣(g)	精巣上体 (g/100g 体重)	精囊 (g/100g 体重)	前立腺 (g/100g 体重)
0mg/m ³	1.3 ± 0.04	0.15 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.11 ± 0.02
5mg/m ³	1.4 ± 0.05	0.13 ± 0.01	0.43 ± 0.03	0.12 ± 0.01
25mg/m ³	1.3 ± 0.10	0.14 ± 0.02	0.43 ± 0.02	0.13 ± 0.02
p-value			p<0.001	

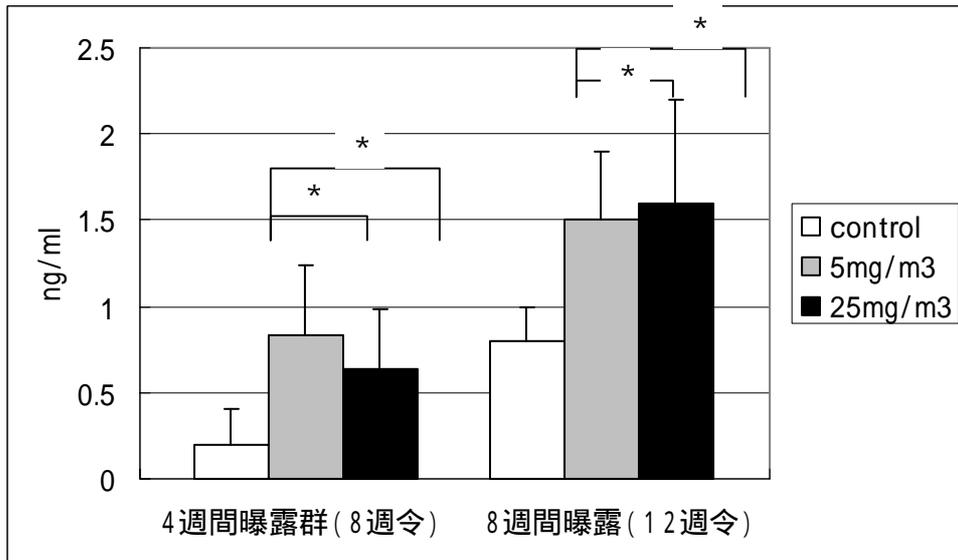


図 1 : 血漿テストステロン濃度

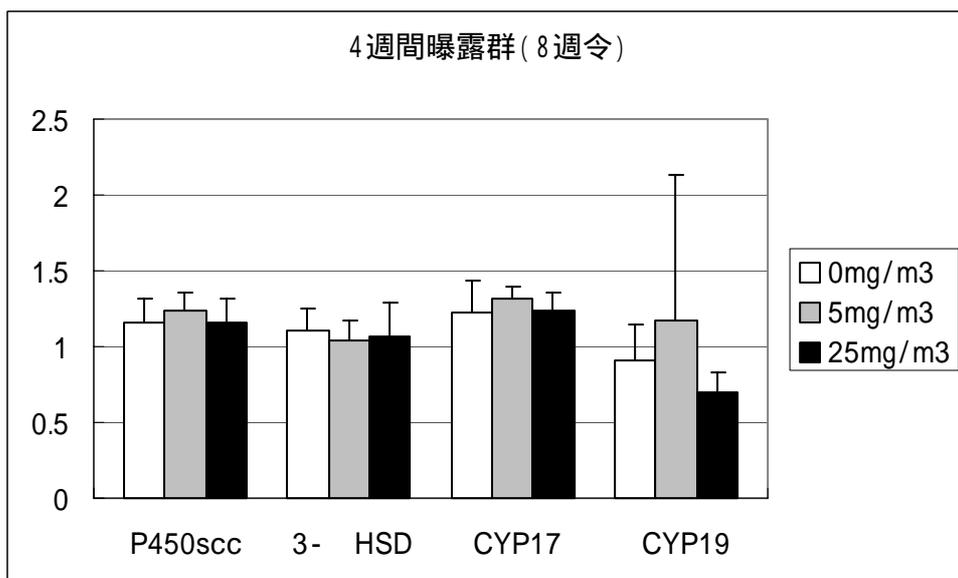


図 2 : 4 週間曝露群 (8 週令) 精巣テストステロン合成酵素 mRNA 発現量 (半定量)
 (縦軸は、スタンダードサンプルの mRNA 発現量を 1 とした際の値)

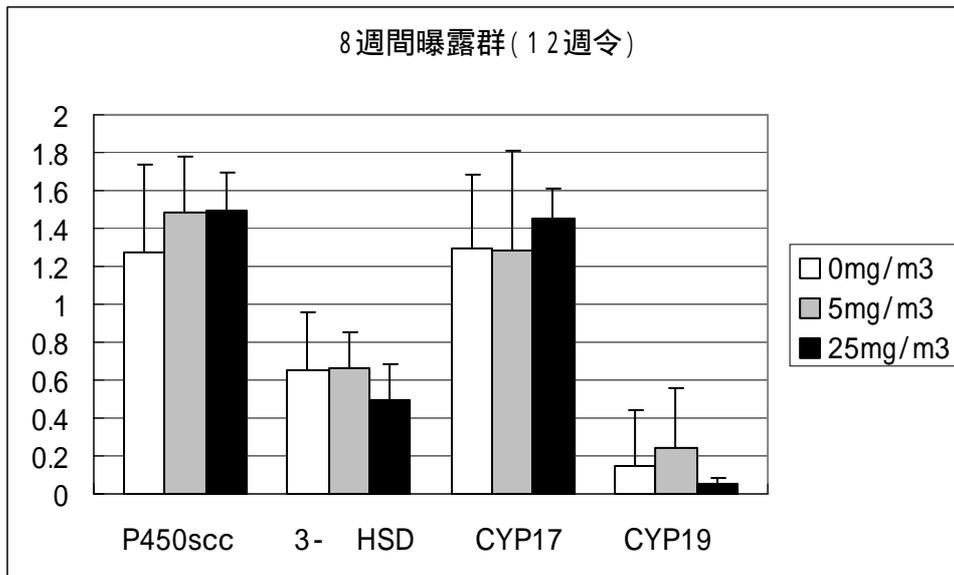


図3：8週間曝露群(12週令)精巣テストステロン合成酵素 mRNA 発現量(半定量)
(縦軸は、スタンダードサンプルの mRNA 発現量を 1 とした際の値)

表3：精巣における精子発生の成熟度の半定量的評価

8週齢(4週間曝露群)	分類された精巣組織の数		
	0mg/m ³	5mg/m ³	25mg/m ³
<5%の精細管で未成熟	3	5	3
5-25%の精細管で未成熟	2	0	2
25-50%の精細管で未成熟		1	1
50-75%の精細管で未成熟	1		
>75%の精細管で未成熟			

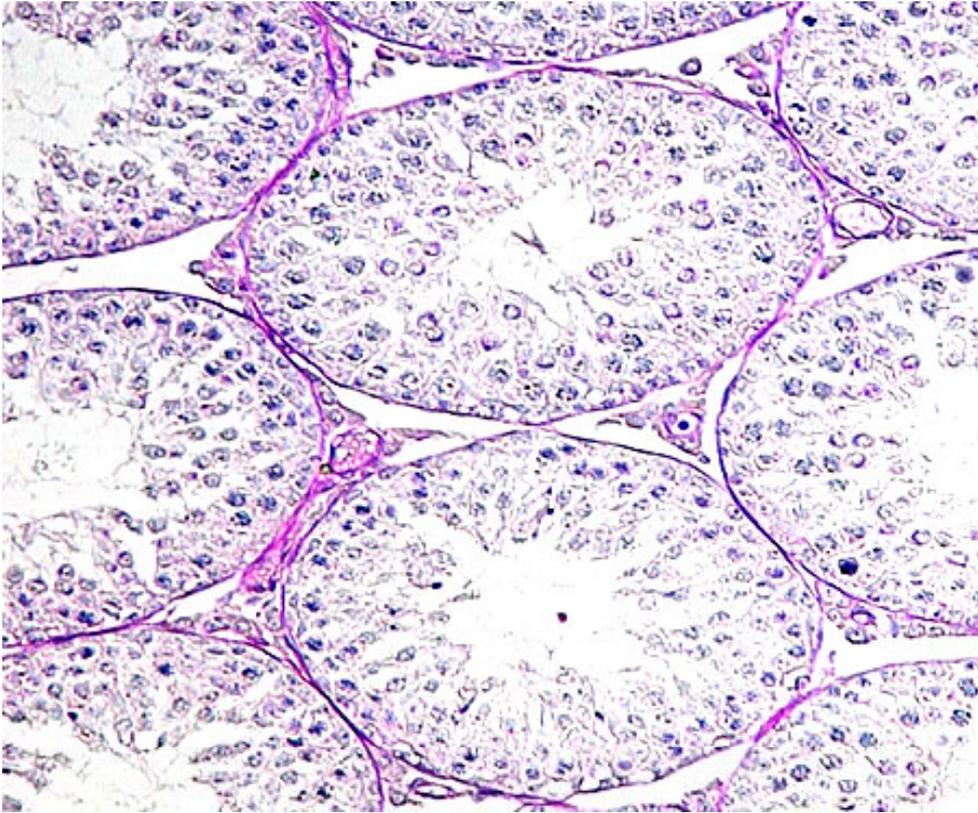


図 4 : step19 精細胞が見られない未成熟な stage 精細管 (4 週間曝露対照群)

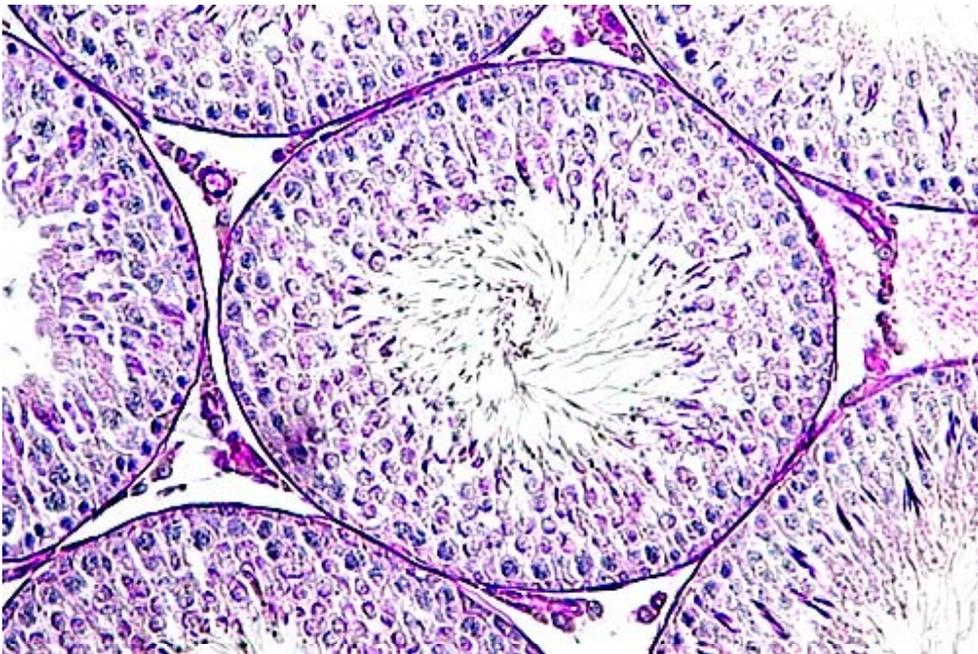


図 5 : step19 精細胞が見られる成熟した stage 精細管 (4 週間曝露 5mg/m³ 群)

表4：血漿 LH 濃度

曝露濃度	4 週間曝露群の LH(ng/ml) (8 週令 n=6)	8 週間曝露群の LH(ng/ml) (12 週令 n=6)
0mg/m ³	6.3 ± 1.9	6.7 ± 2.2
5mg/m ³	6.8 ± 0.9	9.4 ± 3.4
25mg/m ³	8.3 ± 1.6	6.7 ± 1.9
p-value	p=0.14	p=0.14

表5：母ラットへの影響

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

表6：雄ラットへの影響(GD19, n=6)

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

表7：雄ラット精巣重量(GD19, n=6)

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

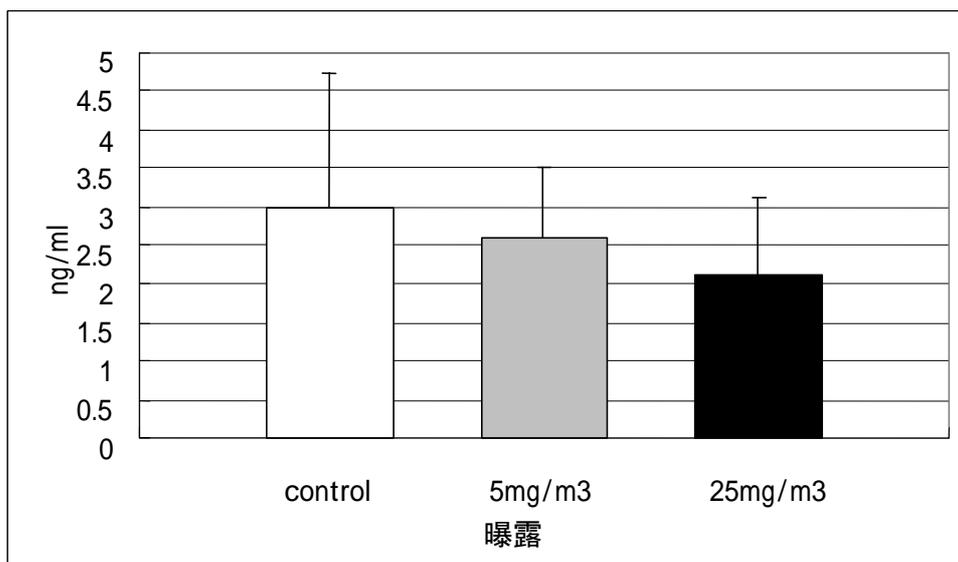


図6：精巣組織テストステロン濃度

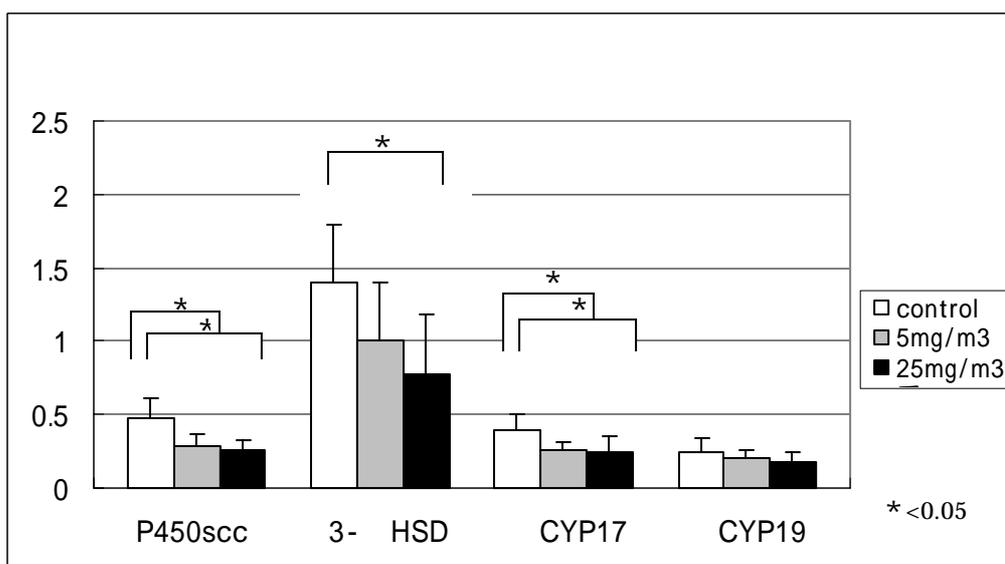


図7：精巣テストステロン合成酵素 mRNA 発現量

; 表 8 : 雄ラットの体重、AGD、AGD / 体重

濃度	PND1 体重(g)	PND1 AGD(mm)	PND1 AGD / 体重
0mg/m ³	5.6 ± 0.5	4.5 ± 0.5	0.8 ± 0.1
5 mg/m ³	5.6 ± 0.6	4.6 ± 0.4	0.8 ± 0.1
25 mg/m ³	5.4 ± 0.5	4.9 ± 0.3	0.9 ± 0.1
p-value			p<0.05
濃度	PND7 体重(g)	PND7 AGD(mm)	PND7 AGD / 体重
0mg/m ³	10.4 ± 1.2	6.4 ± 0.7	0.6 ± 0.1
5 mg/m ³	9.4 ± 1.9	6.5 ± 0.6	0.7 ± 0.1
25 mg/m ³	10.3 ± 0.5	6.5 ± 0.5	0.6 ± 0.1
p-value			p<0.01
濃度	PND14 体重(g)	PND14 AGD(mm)	PND7 AGD / 体重
0mg/m ³	17.7 ± 2.6	8.1 ± 1.3	2.2 ± 0.3
5 mg/m ³	15.4 ± 2.2	7.4 ± 0.8	2.1 ± 0.2
25 mg/m ³	15.2 ± 1.7	7.2 ± 0.7	2.1 ± 0.3
p-value	p<0.01	p<0.05	

核内受容体ファミリーを介する化学物質の生体影響に関する研究

西川淳一（大阪大学大学院薬学研究科 助教授）

研究要旨

近年のゲノムプロジェクトの進展によりヒトゲノムのほとんどの塩基配列が決定され、核内受容体ファミリーの遺伝子はヒトにおいては48種類存在することが明らかとなっている。核内受容体ファミリーの中で、これまで知られている内因性のリガンドは、ステロイドホルモンや脂溶性ビタミンなどの脂溶性で低分子の生理活性物質である。一方、内分泌攪乱物質と疑われている化学物質も、環境中に放出されやすく、残留性の高い脂溶性低分子物質であり、これらの物質が核内受容体に作用して、アゴニストやアンタゴニストとして働く可能性が考えられる。これまで、内分泌攪乱物質のターゲットとしてはエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体が注目されてきたが、その他の受容体も同様に内分泌攪乱物質の標的となる可能性が高い。本研究課題では、このような観点のもと、網羅的にヒト核内受容体ファミリーに対する内分泌攪乱化学物質の結合性を調べてきた。前年度までに、環境省が優先的にリスク評価に取り組む20物質について網羅的に核内受容体ファミリーに対する影響を調べたところ、ノニルフェノールやオクチルフェノール等のアルキルフェノール類はエストロゲン受容体だけでなくビタミンA受容体にも強いアゴニスト活性を持つこと、トリブチルスズやトリフェニルスズ等の有機スズ化合物はレチノイドX受容体に内因性リガンドの9-cis retinoic acidと同等かそれより強いアゴニスト活性を示すことを発見した。有機スズ化合物は、海産性巻貝類の雌の雄性化（インポセックス）を引き起こすとして大きな社会問題となっていることから、今年度はこれをさらに進め、海産性巻貝類からのレチノイドX受容体のクローニング、得られた受容体への有機スズ化合物の影響を中心に検討した。

研究協力者

今川 正良（名古屋市立大学薬学部 教授）

A. 研究目的

近年、環境中に存在する人工化学物質による生殖毒性やそれに伴う生態系の異変が大きな社会問題となっている。このような影響をもたらす化学物質は、一般に内分泌攪乱物質あるいは環境ホルモンと呼ばれている。内分泌攪乱物質は、生体の内分泌系に影響を与える可能性、すなわち内分泌攪乱作用を示す化学物質の総称と捉えることができるが、その

作用点や作用機構に関しては不明な点も多い。内分泌系は多細胞生物の全体的なバランスを調節する上でも重要なシステムであり、非常に精巧で複雑な系として成り立っている。化学物質がこのような複雑な系に対し影響を与える場合、そのエンドポイントは多岐にわたり、どのような物質を内分泌攪乱物質と定義するかについては議論の余地があると考えられる。

生体の内分泌系は、主にホルモンと呼ばれる微量の生理活性物質とその標的器官に存在する受容体によって構成されている。その中でも、低分子で脂溶性の生理活性物質の作用は、主に核内受容体と呼ばれる転写因子群によって仲介されている。核内受容体は、リガンド作動性の転写調節因子であり、各リガンドに対応した数多くの受容体が存在している。これらの受容体群は、遺伝子スーパーファミリーを形成しており、相互に機能、構造に類似点を持っている。核内受容体の転写活性化はリガンドとの結合、2量体化、DNA上の特定配列への結合、転写コアクチベーターのリクルートという流れで行われる。核内受容体のリガンドとなる物質には、ステロイドホルモンや甲状腺ホルモン、脂溶性ビタミンの活性化体などが含まれる。核内受容体は、これら生理活性物質のシグナルを伝達することにより、生体の様々な営み（細胞の増殖や分化、生殖、代謝、恒常性の維持等）を制御しており、重要な生物学的機能を担っている。

近年、ヒトゲノムの解析によりヒトのゲノム上には48種類の核内受容体が存在することが明らかになってきた。それらの中には、ステロイドホルモン受容体のようなリガンド既知の受容体だけでなく、オーファン受容体に分類される受容体も数多く存在している。リガンド既知の受容体のほとんどは、内分泌系の機能維持に重要な役割を果たしていることなど多くの事が分かっているが、オーファン受容体に関しては、リガンドとなる物質の存在やその機能、また転写活性化機構に関しても不明な点が多く、その全容の解明は未だなされていない。

これまでに、内分泌攪乱物質をはじめとして生体外物質が核内受容体を介し、生体内でホルモン様作用を示すとの報告は多くある。特に、環境中に残留する化学物質の野生生物に対する生殖影響から、核内受容体のなかでも性ホルモンの受容体であるエストロゲン受容体やアンドロゲン受容体が注目を集めてきた。しかしながら、前述したように核内受容体遺伝子はスーパーファミリーを形成し、数多くの関連受容体が存在し、これら全てが様々な化学物質の標的となりうる可能性を秘めていると考えられる。また、この受容体ファミリーの機能の多様性を考慮すれば、内分泌攪乱作用に限らず、化学物質がこれらの受容体を介して、様々な毒性を発現する危険性がある。以上のような観点から、我々は核内受容体ファミリーに対する化学物質の影響を調べ、化学物質の毒性発現機構を明らかにすることを目的に、研究を開始した。

B. 研究方法

1. 酵母 two-hybrid 系の構築

前年度までに単離したヒト由来核内受容体遺伝子を酵母 two-hybrid 用ベクター-pGBT9 (Clontech 社) に組み込み、コアクチベーター遺伝子 (TIF2) を組込んだ pGAD424 とともに酵母 Y190 に導入した。

得られた酵母を培養し、その懸濁液に被検物質を加え、30℃ で 4 時間反応させた。その後、酵母を遠心分離により集め、Zymolyase で酵母細胞壁を溶解後、被検試薬で誘導されたβ-galactosidase 活性を比色法にて定量した。試験はすべて n=3 で行った。

2. レポーター遺伝子試験

・ プラスミド

哺乳動物用発現ベクター-pBK-CMV (Stratagene 社) に、酵母由来転写因子 GAL4 の DNA 結合領域 (アミノ酸番号 1 ~ 94) を制限酵素 EcoRI と SalI を用いて挿入した。さらに、ヒト由来 RXR (Retinoid X Receptor) α の LBD (Ligand Binding Domain) を制限酵素 EcoRI と NotI を用いて挿入し、GAL4DBD と RXRαLBD が哺乳動物細胞内で融合タンパク質として発現するようなベクターを構築した。

レポーター遺伝子としては、GAL4 の結合配列 (UAS) を 4 個並べた配列の後に、tk プロモーターをつなげ、さらにその後にルシフェラーゼ遺伝子をつないだものを用いた。

また、遺伝子導入効率を補正するため、RSV プロモーターの下流にβ-ガラクトシダーゼ遺伝子をつないだものを作製し、内部標準として用いた。

・ 遺伝子導入

マウス由来胚性癌細胞 F9 を、 1×10^5 cells/ml になるよう希釈し、2 ml ずつ 35 mm ディッシュに播き、37℃、5% CO₂ 存在下で 24 hr 培養した。

GAL4DBD-RXRαLBD : UAS-tk-Luciferase : RSV-β-Galactosidase = 3 : 6 : 1 の割合になるよう混合し、1 枚のディッシュあたり 1 μg/10 μl のプラスミドを、FuGENE6 (Roche 社) を用いて、細胞に導入した。

遺伝子導入 24 hr 後、培地に各リガンドを添加し、さらに 24 hr 培養を続けた。その後、培地を除去し、PBS で洗浄後、細胞を回収した。

ルシフェラーゼ活性は、Lumant LB9501 (Berthold 社) を用いて測定した。

3. イボニシからの RXR ホモログの単離

・ cDNA ライブラリーの構築

茨城県ひたちなか市平磯で採取した雄のイボニシより精巣及び消化腺を単離し、液体窒素により急速凍結した後、-80℃にて保存した。臓器を解凍後、TRIzol 試薬 (Invitrogen 社) を使用し、Total RNA を調整した。得られた Total RNA より Oligotex-dT30 <Super> mRNA Purification Kit (宝バイオ社) を用いた 2 段精製法により、poly(A)⁺RNA を調整した。Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent 社) により、分解等が見られないことを確認した。

cDNA ライブラリーの作製は、基本的には cDNA Synthesis Kit (Staratgene 社) を用いて行った。概略は以下の通りである。Oligo (dT)₁₈Anchor Primer 及び逆転写酵素を用いて 5 µg の poly(A)⁺RNA を鋳型として 1st strand cDNA を合成した。1st strand 合成時には 5-methyl dCTP を使用した。DNA polymerase を用いて 2nd strand を合成後、末端を平滑化し、EcoRI アダプターをつないだ。末端をリン酸化処理し、制限酵素 XhoI で切断した後、スピнкаラム (Clontech 社 CHROMO SPIN TE-1000) を用いて低分子量 DNA を除去した。得られた 2 本鎖 DNA をフェノール/クロロホルム処理、エタノール沈澱後、λZAPII (EcoRI-XhoI 切断) ファージベクターに連結した。

得られたファージベクターを Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene 社) を使用した *In vitro* Packaging 反応後、SM 緩衝液を 500 µl 加えた。20 µl のクロロホルムを添加し混合後、水性画分に終濃度 7% となるよう DMSO を加え、cDNA ライブラリーとして -80℃にて保存した。

・ RT-PCR

哺乳類、鳥類、爬虫類、魚類の RXR のアミノ配列を比較し、相同性の高い部分を抽出し、その配列をもとに以下のプライマーを合成した。

Forward primer : 5'-TGYGARGGNTGYAARGGNTTYTTAARMG-3'

Reverse primer : 5'-RAAGTGNGGVABNMKYTTVGCCCAATC-3'

cDNA ライブラリーの項で精製した poly(A)⁺RNA を鋳型として逆転写酵素 (Reverta Ace、東洋紡) を用いて cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型とし、耐熱性 DNA ポリメラーゼ (Ampli Taq Gold、Applied Biosystems 社) を用いて PCR を行うことにより、イボニシ由来 RXR の部分配列をコードする DNA を増幅した。

・スクリーニング

RT-PCR により得られた DNA を ³²P 標識し、これをプローブとして cDNA ライブラリーに対しハイブリダイゼーションを行うことにより、イボニシ由来 RXR の cDNA をクローニングした。

・塩基配列の決定

スクリーニングにより得られた DNA 断片を pBluescript (Staratgene 社) にサブクロ

ーニングし、自動蛍光式 DNA シーケンサー-DSQ1000 (島津製作所) にて塩基配列を決定した。

4. 試薬

RXR のリガンドとしては、9-*cis*-Retinoic acid を SIGMA より購入して用いた。環境省が優先的にリスク評価に取り組む 20 物質は、日本エヌ・ユー・エス株式会社より供与して頂いた。

5. 被検試薬の調整

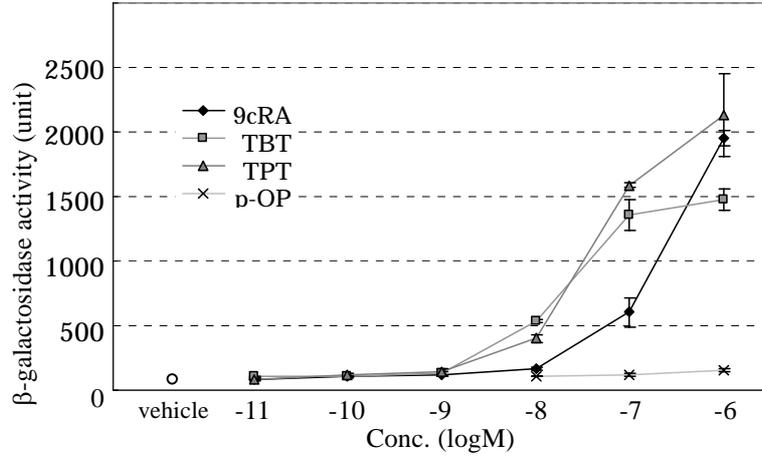
標準リガンドを含め全ての試薬は DMSO に溶解後-20 で保存し、使用前に DMSO で段階希釈して用いた。

C . 研究結果

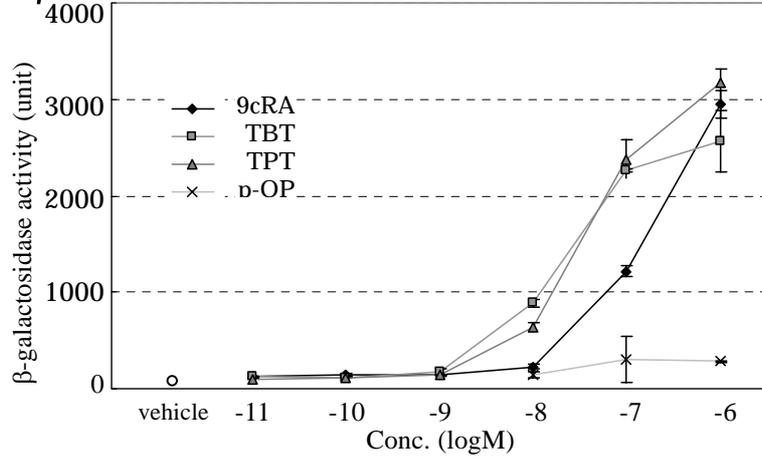
1. 有機スズ化合物の RXR に対する影響

前年度までに構築した酵母 two-hybrid 法による、ヒト RXR α 、 β 、 γ に対する有機スズ化合物の活性評価を図 1 に示した。これまで、環境省が優先的にリスク評価に取り組むべきとして指定した化学物質について、様々な核内受容体に対する影響を調べてきたが、トリブチルスズ (TBT) とトリフェニルスズ (TPT) の RXR に対するアゴニスト活性は例外的に強力なものであった。RXR 類の内因性リガンドとしてはレチノイドの代謝体である 9-*cis* Retinoic Acid (RA) が知られているが、酵母 two-hybrid 法で 9-*cis* RA が 10^{-7} M から活性を示したのに対し、TBT 及び TPT はそれより 10 倍低い 10^{-8} M の濃度から活性を示した。このように、受容体に対して、本来リガンドとなることを意図されていない合成化学物質が生理的リガンドに匹敵するような影響を示す例は非常に稀である。

A. hRXR α



B. hRXR β



C. hRXR γ

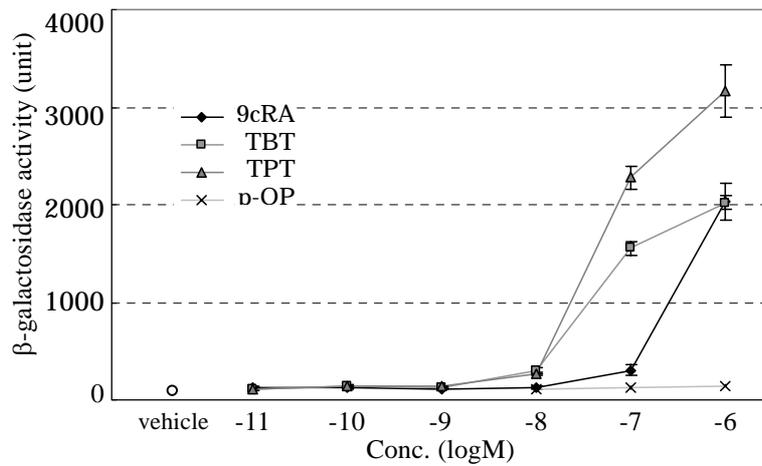


図1 ヒト RXR サブタイプに対する有機スズ化合物の影響 (酵母 two-hybrid 法)

酵母 two-hybrid 法において、有機スズ化合物が RXR とコアクチベーターの相互作用を強力に促進する事が分かったので、さらに哺乳動物細胞を用いたレポーター遺伝子試験を用いて、RXR を介する転写活性化への有機スズ化合物の影響を調べた。RXR は、普遍的にどの細胞においても存在することが知られているため、ここでは内因性の RXR の影響を排除する目的で、エフェクターとして GAL4 の DNA 結合領域にヒト由来 RXR のリガンド結合領域をつないだものを用い、レポーターとして GAL4 応答配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだものを使用した。エフェクター遺伝子とレポーター遺伝子をマウス胚性腫瘍細胞 F9 に遺伝子導入した後、9-cis RA、TBT、TPT を添加することにより濃度依存的なルシフェラーゼ活性の増強が認められた(図 2)。また、その活性の強さも 9-cis RA と TBT、TPT に大きな差は認められなかった。これらのことから、哺乳動物細胞内においても、有機スズ化合物が本来のリガンドである 9-cis RA と同様に RXR に結合し、受容体の転写活性化を強力に活性化させることが分かった。

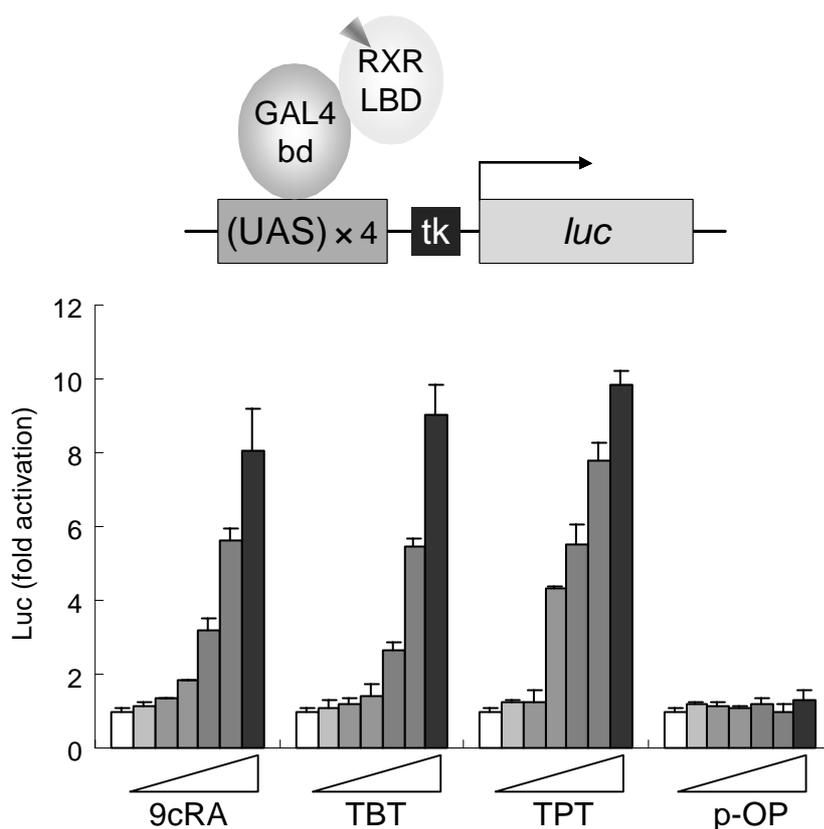


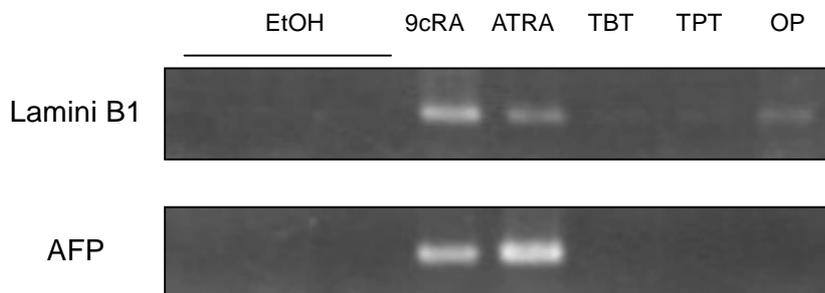
図 2 有機スズ化合物による hRXR α の転写活性化 (哺乳動物細胞)

用いた濃度は、それぞれの化合物共通で、左から 0、0.3、1、3、10、30、100 nM であり、試験は独立して 3 回繰返し行い、その平均値と標準偏差を示した。

6. 有機スズ化合物の分化誘導能に関する検討

哺乳動物細胞における、有機スズ化合物の RXR を介した影響を調べるため、引き続き F9 細胞を用いて、分化に対する影響について検討を行った。マウスの胚性細胞である F9 細胞は、分化能を保持した腫瘍細胞であり、初期胚の多分化能を持った細胞に類似した性質を持っている。この細胞は、レチノイドシグナル経路の活性化により分化が進行することが既に知られており、レチノイドを添加することにより胚体外内胚葉細胞、遠位内胚葉細胞へと分化し、ラミニンや α -フェトプロテイン (AFP) を誘導する。そこで、これらを分化マーカーとして、有機スズ化合物を添加した細胞を培養後、RNA を回収し、RT-PCR によってラミニン及び AFP の発現を調べた。その結果、レチノイドである all trans retinoic acid (ATRA) や 9cis RA を添加した場合は、ラミニンと AFP の発現が確認されたが、TBT 及び TPT を添加した培地においてはこれらの分化マーカーの発現増加は検出されなかった(図 3、A)。また、結果には示していないが、2 種類のレチノイドを添加した状態では、明らかな細胞の形態変化が観察されたのに対し、有機スズ化合物では形態変化が認められなかった。

A. 分化マーカー遺伝子の発現



B. RXR 標的遺伝子の発現

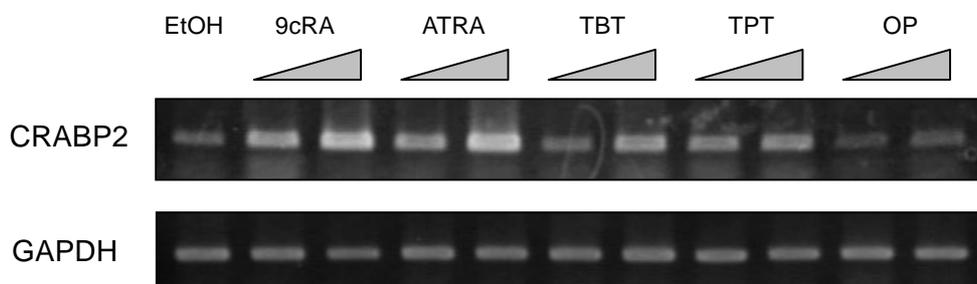


図 3 F9 細胞への有機スズ化合物の影響

以上の結果から、有機スズ化合物は F9 細胞における分化に対して顕著な影響を示さないと考えられる。レチノイドと有機スズ化合物の違いは、9-cis RA や ATRA は RXR だけでなくビタミン A 受容体 (RAR) も活性化できるのに対し、有機スズ化合物は RXR のみしか活性化することが出来ない。従って、F9 細胞の分化への影響を考えた場合、分化の進行には RAR の活性化が重要であり、有機スズ化合物は分化に必要なシグナル経路を活性化できなかつたと考えられる。

分化以外の影響を調べるため、他の因子の発現を検討したところ、有機スズ化合物により CRABP II の誘導が認められた (図 3、B)。細胞内でレチノイドに結合し、その輸送に関わる CRABP II は、レチノイドによって誘導されるレチノイド応答性の因子として知られているが、一方で、代表的な RXR 標的遺伝子でもある。つまり、内因性のレチノイドは、RAR と RXR の両方を活性化し、細胞の分化のような生物学的機能を持つが、有機スズ化合物のその一方しか活性化できないため哺乳動物細胞への影響が小さかつたと推察される。

7. 有機スズ化合物の海産性巻貝 RXR への影響

化学物質が生体に与える影響は種差が大きく、ある種の生物で観察された現象をそのままヒトに外挿することは出来ない。有機スズ化合物についても、巻貝類におけるインポセックスという現象は、哺乳動物においては認められない。しかしながら、有機スズ化合物が結合する RXR は、核内受容体ファミリーの中でも例外的に種を超えて保存されており、昆虫類においても USP と呼ばれるホモログの存在が知られている。このことから、RXR を介する有機スズ化合物の影響は種を超えて共通である可能性も考えられるため、ここでは海産性巻貝類の一種であるイボニシから RXR をクローニングし、それに対する TBT や TPT の影響を調べた。

イボニシから RXR をクローニングするため、まず GenBank に登録されている塩基配列情報を用いて広範な種の RXR のアミノ酸配列を見比べ、相同性が高い領域を抽出した。いくつかの候補からプライマーを設計し、イボニシより抽出した mRNA を鋳型として RT-PCR を行ったところ、特異的に増幅するバンドが見い出された。そこで、このバンドを切り出し、塩基配列を調べた後、これをプローブとして、イボニシ mRNA より作製したライブラリーに対してスクリーニングを行った。これにより、ストップコドンを含むイボニシ RXR が得られたが、開始コドンを含む 5' 端は含まれていなかった。そこで、さらに 5'-RACE を行うことにより、5' 端を PCR で増幅させ、塩基配列を決定することにより、完全長のイボニシ RXR の配列を明らかにした (図 4)。

A. ヒト、マウス、イボニシ由来 RXR のアミノ酸配列の比較

human.gpt	1	MDTKHFLPLDFSTQVNSS-LTSP	111	TRGSGMAAPSLHPSLGP	201	IGSP----	231	QLHSP	311	ISTLS	55
mouse.gpt	1	MDTKHFLPLDFSTQVNSSSLNSPTGRGSM	111	AVPSLHPSLGP	201	IGSP	231	QLHSP	311	ISTLS	60
rock shell.gpt	1	M-----	111	GHQVEACQVAMHMGVPGMG	201		231	MGGPHQ	311	PDIK	31
human.gpt	56	SPINGMGPPFSSVISSPMGPHSM	111	SVETPTTLGFST-GSPQLSSP-MNPVSS	201	SEDIK	311	PPPLGL	351		113
mouse.gpt	61	SPINGMGPPFSSVISSPMGPHSM	111	SVETPTTLGFST-GSPQLNSP-MNPVSS	201	TEDIK	311	PPPLGL	351		118
rock shell.gpt	32	PDISTLNPPSSSTHPGFSPYGGMEGMP	111	SSTQASPGGNMTSPQMHSPTSS	201	SLGSP	311	TMML	351		91
human.gpt	114	NGVLKVPAPHSNMA	148	SFTKHICAI	188	CGDRSSGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYTCRD	233		263		173
mouse.gpt	119	NGVLKVPAPHSNMA	148	SFTKHICAI	188	CGDRSSGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYTCRD	233		263		178
rock shell.gpt	92	SPT--GTSSP	148	GMPHSGLSKHICAI	188	CGDRASGKHYGVYSCEGCKGFFKRTVRKDLTYACRD	233		263		149
human.gpt	174	NKDCLIDKRQRNRCQYCRYQKCLAMG	210	MKREAVQ	240	EEERQRGKDRNENEVESTSSANEDMPVE	290		320		233
mouse.gpt	179	NKDCLIDKRQRNRCQYCRYQKCLAMG	210	MKREAVQ	240	EEERQRGKDRNENEVESTSSANEDMPVE	290		320		238
rock shell.gpt	150	DKNCMIDKRQRNRCQYCRYMKCLAQ	210	GGMKREAVQ	240	EEERQRGKDRNENEVESTSSANEDMPVE	290		320		209
human.gpt	234	KILEAEI	270	LAVEPKTE	300	TYVEANMGLNPSSPNDPVTNICQAADKQLFTLVEWAKRIPHFSELP	350		380		293
mouse.gpt	239	KILEAEI	270	LAVEPKTE	300	TYVEANMGLNPSSPNDPVTNICQAADKQLFTLVEWAKRIPHFSELP	350		380		298
rock shell.gpt	210	QILEAEI	270	LAVEPKIDTYIDAQ-----	300	KEPVTNICQAADKQLFTLVEWAKRIPHFVELP	350		380		261
human.gpt	294	LDDQVILLRAGWNE	330	LLIASFSHR	360	STAVKDGILLATGLHVHRNSAHSAGVGAIFDRVLTTEL	410		440		353
mouse.gpt	299	LDDQVILLRAGWNE	330	LLIASFSHR	360	STAVKDGILLATGLHVHRNSAHSAGVGAIFDRVLTTEL	410		440		358
rock shell.gpt	262	LEDQVILLRAGWNE	330	LLIGGFSHR	360	STAVKDGILLATGLHVHRNSAHSAGVGTIFDRVLTTEL	410		440		321
human.gpt	354	VSKMRDMQMDKTELGCLRAIVL	390	FNPDSKGLSNPAEVEALREK	420	VYASLEAYCKHKYFPEQPG	470		500		413
mouse.gpt	359	VSKMRDMQMDKTELGCLRAIVL	390	FNPDSKGLSNPAEVEALREK	420	VYASLEAYCKHKYFPEQPG	470		500		418
rock shell.gpt	322	VAKMREMKMDKTELGCLRAIVL	390	FNPDAKGLQSVQVEALREK	420	VYASLEAYCKQRYFDEPG	470		500		381
human.gpt	414	RFAKLLRLPALRSIGLKC	450	LEHLFFFK	486	LIGDTPIDTFLMEMLEAPHQMT-	536		566		462
mouse.gpt	419	RFAKLLRLPALRSIGLKC	450	LEHLFFFK	486	LIGDTPIDTFLMEMLEAPHQAT-	536		566		467
rock shell.gpt	382	RFAKLLRLPALRSIGLKC	450	LEHLFFFK	486	LIGDTPIDTFLMEMLES	536		566		431

B. イボニシ RXR に対するアミノ酸配列のホモロジー

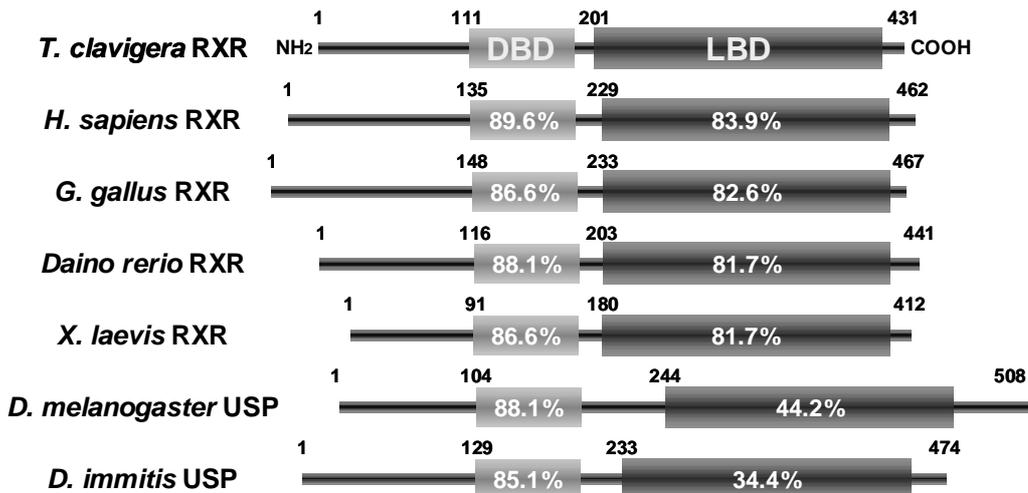


図4 イボニシからの RXR のクローニング

図4に示したように、イボニシ RXR も核内受容体ファミリーに特徴的な C2C2 タイプの亜鉛フィンガーを2つ持っており、DNA 結合領域の保存度はヒト、ニワトリ、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル、シヨウジョウバエ、フィラリアの RXR 及びその関連受容体と比較しても、非常に高い。また、リガンド結合領域に関しては、イボニシ由来 RXR は脊椎動物の RXR と非常に高いホモロジーを持つが、シヨウジョウバエやフィラリアの RXR とはあまり似ていない。USP は、無脊椎動物における RXR ホモログとされているが、9-cis RA は結合しない。イボニシは、脊椎動物ではないが、RXR の配列は脊椎動物タイプであり、9-cis RA が結合することが考えられた。

そこで、次に、クローニングしたイボニシ RXR を用いて、これを大腸菌で発現させ、得られたタンパク質に対する 9-cis RA 及び有機スズ化合物の結合性を検討した。イボニシ RXR のリガンド結合領域をコードする DNA を大腸菌用発現ベクター pGEX-4T に組み込み、Gluthathione S-Transferase (GST) との融合タンパク質として発現するようなプラスミドを構築した。これを大腸菌 BL21 に導入し、IPTG による発現誘導後、大腸菌を超音波破碎し、ここから Glutathione-Sepharose 4B を用いて精製した (図5)。

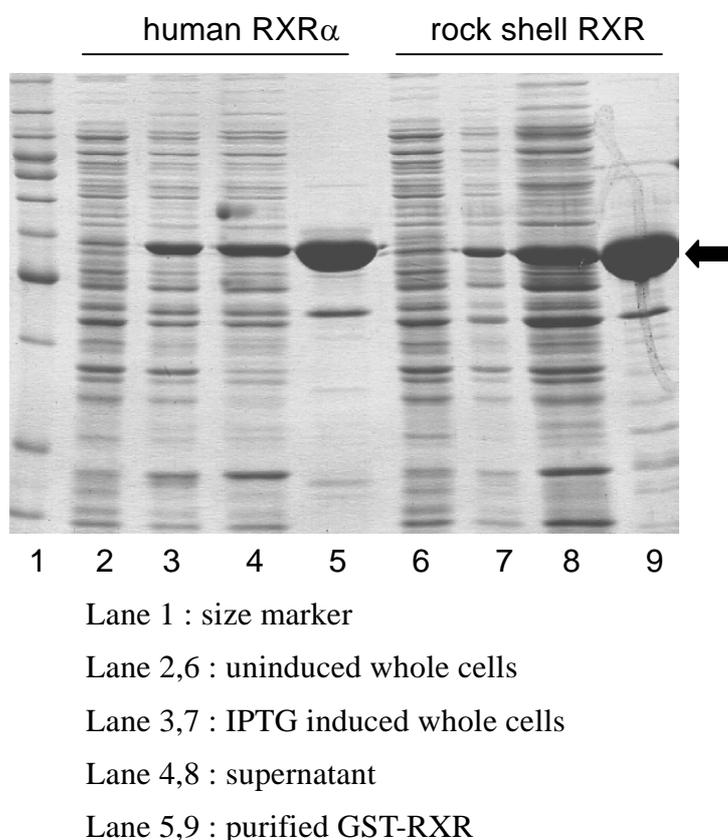


図5 RXR の大腸菌で大量発現と精製

精製したイボニシ RXR タンパク質に ^3H 標識した 9-cis RA を加え、RXR に結合した放射活性を測定したところ、図 6 (A) に示したような飽和曲線が得られた。これを Schtchard 解析により直線回帰することにより、イボニシ RXR に対する K_d 値が 5 nM と算出された (図 6、B)。ヒトの RXR に対する 9-cis RA は 1-10 nM と報告されており、イボニシ RXR はヒトと同等の親和性で 9-cis RA に結合することが分かった。

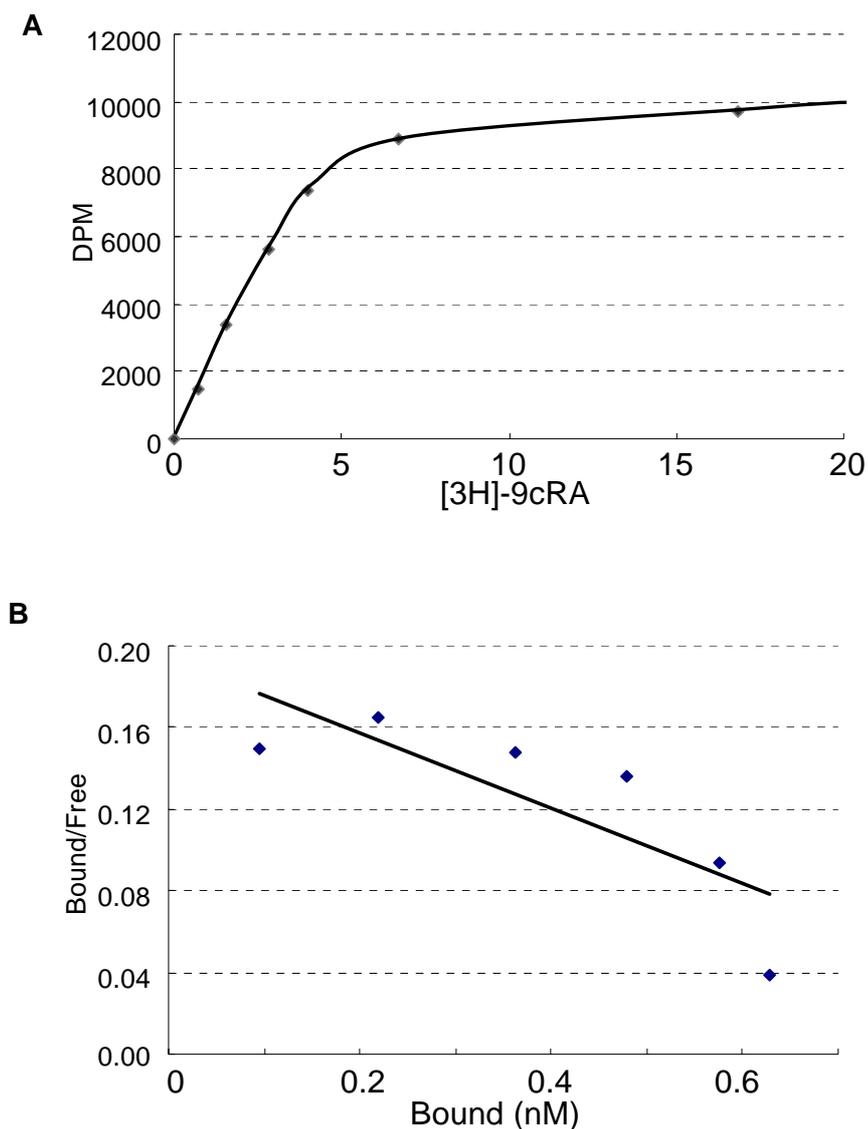
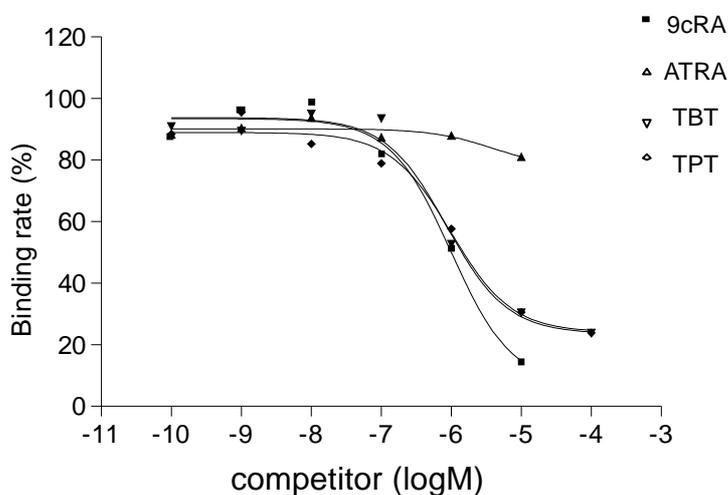


図 6 イボニシ RXR への 9-cis RA の結合性

A. 飽和曲線 B. Schtchard 解析

そこで、次に有機スズ化合物が RXR に結合するかどうかを、³H 標識した 9-cis RA に対する競合的受容体結合試験により確認した (図 7)。ヒト及びイボニシ由来 RXR ともに、TBT と TPT により [³H]-9-cis RA の結合阻害が認められた。その IC₅₀ 値は、ヒト RXR で 9-cis RA が 0.99 μM、TBT が 0.99 μM、TPT が 0.85 μM、イボニシ RXR では 9-cis RA が 0.81 μM、TBT が 8.16 μM、TPT が 6.49 μM であった。これらのことから、TBT や TPT はヒト RXR より 10 倍程度弱いながらイボニシ RXR にも結合することが明らかとなった。

A. human RXR



B. rock shell RXR

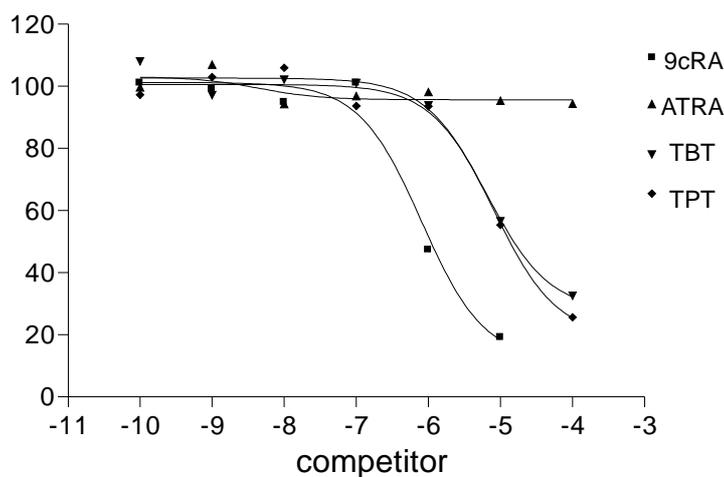


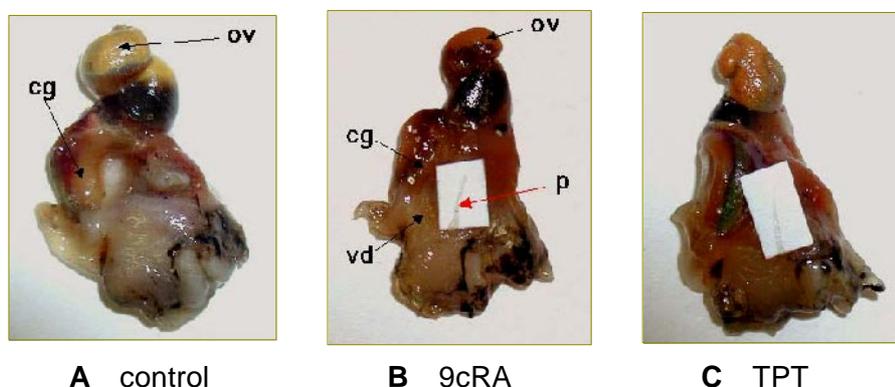
図 7 有機スズ化合物の RXR への結合性 (競合的結合阻害実験)

D. 考察

内分泌攪乱物質の候補としてもリストアップされている有機スズ化合物は、非常に毒性の強い物質である。哺乳動物に対する毒性としては、エネルギー代謝の低下、胸腺重量の低下、リンパ節の萎縮、TSH (Thyroid Stimulating Hormone) の減少、LH (Luteinizing hormone) の増加等、多岐にわたって報告がある。日本においては、その使用は1990年に化審法による規制が施されてはいるが、特にTBTやTPTは、その毒性の強さ、安定性、安価である等の利便性から殺菌剤や防汚剤として広く使用された経歴を持つ。特に、船底の塗料や魚網の防汚剤として用いられた有機スズ化合物は徐々に環境水中へと移行し、そこに住む生物に対し様々な弊害を引き起こしていることが問題となっている。特に、貝類への影響は深刻であり、牡蠣の生産量の減少等との因果関係が指摘されている。また、巻貝類において観察される、TBTやTPTによるインポセックスと呼ばれる雌の雄性化現象は、内分泌攪乱作用として有名である。この現象は、雌の貝に雄の生殖器官が形成されるものであり、結果として、産卵能力の低下や喪失が引き起こされる。この現象は古くから知られており、TBTやTPTの環境水中濃度および貝類の生体内濃度と生殖異常との因果関係から原因物質であることが特定されている。これまで、有機スズ化合物によるインポセックスの誘導メカニズムに関しては、アロマターゼ阻害説やテストステロン硫酸抱合酵素阻害説などが提唱されてきたが、雄性化という明確な現象が観察されるにも関わらず、その作用機構の詳細については不明な点が多かった。

我々は、環境省が内分泌攪乱作用が疑われるとしてリストアップした化学物質の、核内受容体への作用を網羅的にスクリーニングする過程で、TBTとTPTが顕著にRXRに対しアゴニスト活性を持つことを明らかにした。しかし、スクリーニングに用いた受容体はヒト由来であり、環境問題として特にクローズアップされている巻貝類において有機スズ化合物がRXRを介してインポセックスを誘導している証拠は無い。特に、核内受容体は、脊椎動物と無脊椎動物で大きくその性質が異なり、ERやAR等のステロイドホルモン受容体は、無脊椎動物においては存在が確認されていない。従って、インポセックスが問題となっている巻貝類にRXRが存在するかどうかは大きな疑問点であり、本年度の研究において巻貝類の一種であるイボニシからのRXRのクローニングを試みた。その結果、イボニシには脊椎動物のRXRに非常に相同性の高い遺伝子が存在した。また、イボニシから単離したRXRを用いて、脊椎動物RXRの内因性リガンドとされている9-cis RAや有機スズ化合物の結合性を検討した結果、イボニシRXRにもこれらの物質は結合性を示した。また、国立環境研究所の堀口敏宏氏との共同研究で、雌のイボニシに9-cis RAを筋肉注射する、インポセックスの特徴であるペニス、輸精管の形成が認められ、明らかに雄性化が観察された(参

考図)。これまでに、有機スズ化合物以外にインポセックスを誘導した物質の報告は無く、9-cis RAによっても有機スズ化合物と同様にインポセックスが引き起こされたという結果は非常に興味深い。イボニシにも RXR が存在し、その RXR は 9-cis RA や有機スズに結合し、さらに 9-cis RA によってインポセックスが誘導されたという結果は、巻貝類において観察される雌の雄性化現象が RXR を介した作用、すなわちレチノイドシグナルの活性化に原因があることを強く示唆している。一般に、9-cis RA は RXR の生理的リガンドとして知られているが、無脊椎動物である巻貝類においても 9-cis RA が生理的リガンドとして働き、生殖器官の形成に関与しているかどうかは、今後の検討を要する。



参考図 9-cis Retinoic Acid によるインポセックスの誘導

これまで述べてきたように、有機スズ化合物によるインポセックスの誘導はレチノイドシグナル経路の活性化が原因であると考えられる。しかし、巻貝類において雄性化という明確な現象が報告されているにも関わらず、哺乳類に対しては内分泌攪乱作用としての報告例はほとんど無い。そこで、マウスの胚性腫瘍細胞である F9 細胞を用いて、有機スズ化合物の影響を調べてみた。F9 細胞は、腫瘍細胞ではあるが、初期胚の多分化能を持った細胞に類似した性質を持っており、レチノイドシグナルの活性化により分化が進行する。この系を用い、哺乳動物細胞において有機スズ化合物が分化を起こさせるかどうかを検討したが、結果は否定的であった。有機スズ化合物は RXR に強いアゴニスト作用を示すが、9-cis RA や ATRA などの活性型レチノイドと違い、RAR (Retinoic Acid Receptor) には結合しない。哺乳動物において、RXR は RAR や TR、VDR 等、多くの核内受容体のヘテロダイマー・パートナーとして働くことが知られている。こういう RXR 機能の特殊性を考えれば、高等生物においておそらくレチノイドのシグナルは主に RAR によって伝達されていると考

えられる。遺伝子データベースを用いて核内受容体遺伝子を解析した結果、おそらく軟体動物門に属するイボニシには RAR は存在しない。従って、このような下等な種においては、レチノイドのシグナル伝達は RXR を通して行われていると思われる。そのため、RXR に作用する化学物質の作用が直接に表現系として現れやすいのではないかと考えられる。巻貝類においてインポセックスという特異な現象が観察される原因はこの辺りにあるのかもしれない。

有機スズのヒトに対する影響という観点からは、最近、臨床的に応用されている RXR 選択的な合成化学物質の副作用が参考になる。RXR アゴニストである bexarotene は、T 細胞リンパ腫の患者に重篤な甲状腺機能低下を引き起こす。また、RXR 選択的アゴニストである LG100268 をラットに投与したところ、やはり急性の甲状腺機能障害が見られ、その原因は脳下垂体からの TSH 分泌が減少していることであった。有機スズ化合物においても、リンパ節の萎縮や TSH の減少が認められることから、両者が同じ機構で作用している可能性が考えられる。レチノイドは、生体における重要なシグナル伝達物質であり、様々な生理作用に関わっている。特に胚の発生や分化、器官形成時にも働く生理活性物質であることが報告されている。前年度の研究成果として報告したように、ノニルフェノールやオクチルフェノールは ER だけでなく、レチノイドの受容体である RAR にもアゴニスト活性を持つ。このような事から、レチノイドのシグナル伝達経路に影響を及ぼすことが、内分泌攪乱物質の作用機構の一つであることが考えられる。さらに、哺乳類における RXR の機能が非常に広範囲の受容体に関与することを考えれば、RXR の関与するシグナル伝達機構を詳細に検討することにより、内分泌攪乱物質の作用発現機構がより明確になることが期待される。

E. 結論

1. 内分泌攪乱作用が疑われる物質について、様々なヒト核内受容体への作用を検討した結果、有機スズ化合物が RXR に対し強いアゴニスト作用を示すことが明らかとなった。
2. 有機スズ化合物は、マウス胚性腫瘍細胞に分化誘導作用は示さなかったが、RXR の標的遺伝子である CRABP II の発現を誘導した。
3. 海産性巻貝類の一種であるイボニシにも、哺乳類 RXR と非常に似た遺伝子が存在することを明らかにした。
4. イボニシ RXR にも、9-cis retinoic acid が強い親和性を持ち、有機スズ化合物も結合することを明らかにした。
5. イボニシにおける有機スズ化合物による内分泌攪乱作用が、RXR の活性化に起因することを明らかにした。

Imposex in marine gastropods is caused by binding of organotins to the retinoid X receptor

Jun-ichi Nishikawa

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

Organotin compounds have been used worldwide in antifouling paints for ships and fishing nets, and released into ocean since the mid-1960s. Most marine gastropods including rock shells (*Thais clavigera*) in organotin-polluted area have showed reproductive failure due to either oviduct blockage by vas deferens formation or ovarian spermatogenesis, resulting in population declines. This phenomenon is called imposex as an abbreviation of imposed sexual organs, because male genital tracts, such as penis and vas deferens, are imposed upon females by exposure to very low concentrations of organotins . Despite several hypotheses about imposex induction mechanisms, the exact pathway is still unclear.

Here, we show that TBT and TPT bind the retinoid X receptors (RXRs) with high affinity, and that injection of 9-cis retinoic acid (RA), the natural ligand of RXR, into females of the marine gastropod *Thais clavigera* (rock shells) induces substantial penis growth. Cloning of the RXR homologue from *Thais clavigera* revealed that the ligand-binding domain of rock shell RXR was very similar to vertebrate RXR and bound to both 9-cis RA and to organotin compounds. These results suggest that RXR is a key target of organotins and plays an important role in the induction and development of male genital tracts in female gastropods.

ビスフェノール A 膜受容体の分子生物学的検討と作用機序の解明に関する研究

研究者 船江 良彦（大阪市立大学大学院医学研究科 教授）

研究要旨

化学物質による内分泌攪乱作用は、生殖器系だけでなく中枢神経系へも影響を及ぼしている事が憂慮されており、この影響は甲状腺ホルモン作用を攪乱する事により引き起こされる事が報告されている。脳機能の正常な発達に必須な甲状腺ホルモンの作用が化学物質によって攪乱される機序を解明する事は、行動異常や学習障害との関連性を明らかにする上で重要な課題である。我々はこれまでに、ビスフェノール A (BPA) の標的タンパク質としてプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) を単離・精製し、PDI に対するトリヨードサイロニン (T_3) の結合が BPA をはじめとするフェノール基含有化合物によって阻害される事を明らかにしてきた。これらの化学物質は PDI を介して甲状腺ホルモン作用に影響を及ぼしている事が考えられた。

本年度は、PDI に対する結合性と甲状腺ホルモン作用への影響との関係を、ラット下垂体由来 GH3 細胞を用いて比較・検討した。GH3 細胞は甲状腺ホルモン応答性の細胞増殖及び成長ホルモン (GH) 産生が誘導される事から、これらの化学物質による甲状腺ホルモン依存的な反応への影響を評価する上でよいモデルになりうると考えた。その結果、BPA, 4-オクチルフェノール, *p*-ノニルフェノールが GH3 細胞の細胞増殖促進性を、また 4-オクチルフェノールは促進・阻害の両活性を示す事が明らかになった。一方、GH 産生への影響について検討したところ、BPA, 4-オクチルフェノール, *p*-ノニルフェノール, ペンタクロロフェノールが GH 産生阻害性を示した。

これらの事から、PDI に対して T_3 の結合阻害活性を示す化学物質は、 T_3 依存的な生体反応に影響をもたらしている事が明らかになった。従って、PDI に対する T_3 の結合阻害活性を指標にスクリーニングする事により、様々な甲状腺ホルモン作用への影響を網羅でき得ると考えられた。

研究協力者

今岡 進（関西学院大学理工学部 教授）
長田真優子（大阪市立大学大学院医学研究科 助手）
吉田 徳之（大阪市立大学大学院医学研究科 助手）
岡田 和嗣（大阪市立大学大学院医学研究科 大学院生）

A. 研究目的

平成 14 年度の研究において、我々は BPA の中枢神経系への作用メカニズムを明らかにするべく、標的タンパク質の単離・精製を行った。その結果、ラット脳シナプトゾーム画分に存在する BPA 結合タンパク質が PDI である事を同定した。PDI は甲状腺ホルモン結合タンパク質としての機能を有する。甲状腺ホルモンは脳の正常な発達において非常に重要な役割を果たしており、甲状腺ホルモン機能の障害は、重篤な悪影響をもたらす。BPA は PDI の T_3 結合部位に作用し、甲状腺ホルモン作用に影響を与えているのではないかと考え、競合的結合阻害試験を行ったところ、BPA は T_3 の結合を阻害する事が明らかになった。さらに、平成 12-13 年度に環境省においてリストアップされた「優先してリスク評価に取り組む物質」の 20 種類について同様の試験を行った結果、4-オクチルフェノール, *p*-ノニルフェノール, ペンタクロロフェノール, 2,4-ジクロロフェノールが T_3 の結合阻害活性を有する事が明らかになった。こ

これらの化学物質は、PDI に対して T_3 結合を阻害することで、甲状腺ホルモン作用に影響を与えている事が示唆された。そこで本年度の研究では、これらの化学物質の甲状腺ホルモン作用への影響を調べるために、ラット下垂体由来 GH3 細胞を用いた検討を行った。ラット下垂体由来 GH3 細胞は、甲状腺ホルモン応答性の細胞増殖、および GH 産生・放出を行う事が知られている。これらの生体応答への影響を指標に「優先してリスク評価に取り組む物質」が及ぼす作用について評価し、甲状腺ホルモン作用を攪乱しうる化学物質の選定を行う目的で検討を行った。

B. 研究方法

. GH3 細胞の増殖に及ぼす影響

(1) 細胞培養

GH3 細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手した。

細胞は 15 % ウマ血清, 2.5 % ウシ胎仔血清, 50 units / mL ペニシリン, 50 units / mL ストレプトマイシンを含む Ham ' s F-10 培地で、5 % CO_2 , 湿度 95 %, 37 °C にて培養した。

(2) 甲状腺ホルモン欠乏血清の作製

AG 1-X8 樹脂 (Bio-Rad) を蒸留水で 3 回洗浄した後、血清に 50mg 樹脂 / mL 血清となるように加え、ローテータを用いて 5 時間、室温にて穏やかに混合した。1,000 x g にて 10 分間の遠心分離を行った後、上澄に新しい AG 1-X8 樹脂を 50mg 樹脂 / mL 血清となるように加え、ローテータを用いて 18 時間、室温にて穏やかに混合した。1,000 x g にて 10 分間の遠心分離を行って得られた上澄をさらに 30,000 x g にて 20 分間遠心分離して微粒子を除去したものを甲状腺ホルモン欠乏血清とし、使用するまで -80 °C にて保存した。 T_3 の含量を DELFIA Triiodothyronine Reagents (Perkin Elmar) を用いた EIA 法により測定したところ、処理後の T_3 含量は検出限界濃度以下 (< 0.2 ng / mL) であった。

(3) GH3 細胞増殖試験 (Wst-1 法)

GH3 細胞を 1×10^4 cells / well となるように 24 ウェルマルチプレートに播種した。培養には通常の培養液 (T_n 培地) および甲状腺ホルモンを除去した血清を用いて作製した培地 (T_d 培地) を用いた。24 時間後、各ウェルに被検物質を添加し、7 日間培養した。培養液を除去し、各ウェルに 0.25 mM Wst-1, 0.01 mM 1-methoxy PMS, 1mM HEPES (pH 7.4) を含む T_d 培地を 200 μ L ずつ添加し、5 % CO_2 , 湿度 95 %, 37 °C にて 4 時間インキュベーションした。培地を回収し、690 nm を対照にして 450 nm の吸収を測定して細胞増殖度を算出した。

. GH3 細胞の GH 産生に及ぼす影響

GH3 細胞を 1×10^4 cells / well となるように 24 ウェルマルチプレートに播種した。培養には T_n 培地および T_d 培地を用いた。24 時間後、各ウェルに被検物質を添加し、48 時間培養した。培養液を回収して、3000 x g にて 5 分間の遠心分離を行った後、上澄に含まれる GH 含量を Rat growth hormone EIA (Amersham Bioscience) を用いて定量した。

C. 実験結果

. GH3 細胞の増殖に及ぼす影響

(1) GH3 細胞の増殖に及ぼす T_3 の影響

GH3 細胞を 1×10^4 cells / well となるように 24 ウェルマルチプレートに播種し、24 時間後に被検物質を添加したのち、細胞数を Wst-1 法にて定期的に定量した。その結果、 T_n 培地では 6 日後に最大値を示した (図 1A)。また T_d 培地に T_3 を添加した系では T_3 の濃度依存的な細胞増殖の誘導が見られた (図

1B)

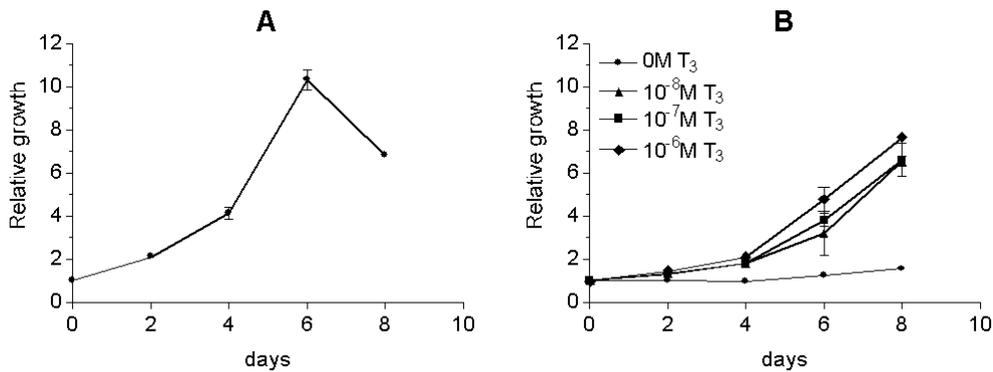


図1 GH3細胞増殖に及ぼすT₃の影響(経時的変化)

(2) GH3細胞の増殖に及ぼすBPAの影響

T_d培地にBPAを添加した系では10⁻⁵M以上の濃度において細胞増殖の誘導が見られた(図2A)。T_n培地にBPAを添加した系ではBPAによる影響は見られず(図2B)、したがって細胞増殖の阻害作用は認められなかった。

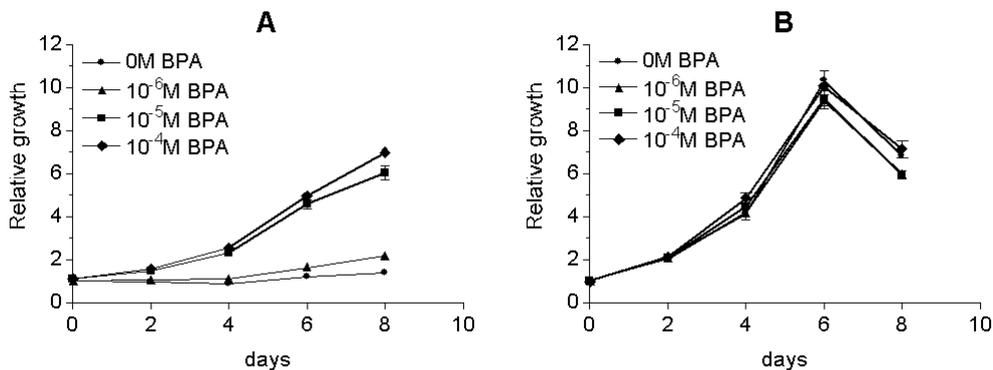


図2 GH3細胞増殖に及ぼすBPAの影響(経時的変化)

(3) GH3細胞増殖に及ぼす内分泌攪乱作用が疑われる化学物質の影響

内分泌攪乱性が疑われる化学物質について、GH3細胞の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。まず、細胞増殖の抑制作用について検討するため、T_n培地に各種化学物質を添加し、7日後に細胞数を定量した。なお、細胞増殖度は試験物質を加えない系での7日後の測定値を1とし、相対値で示した。その結果、4-オクチルフェノールにおいてのみ抑制作用が見られた(図3)。一方、トリブチルスズとトリフェニルスズにおいては24時間後に全細胞の死滅が観察されたため、これらは細胞毒性によるものと判断した。

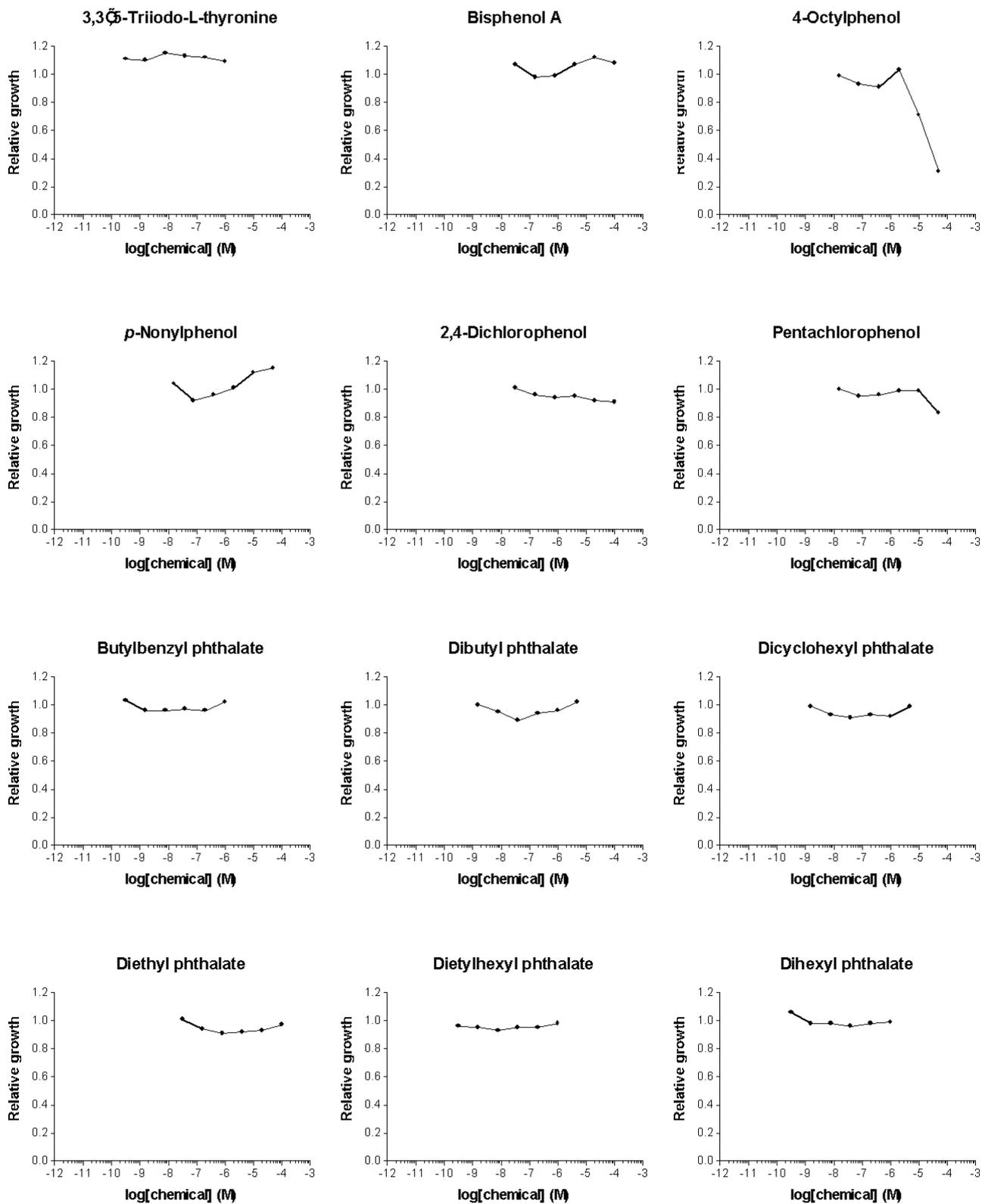


図3 化学物質のGH3細胞増殖抑制作用（その1）

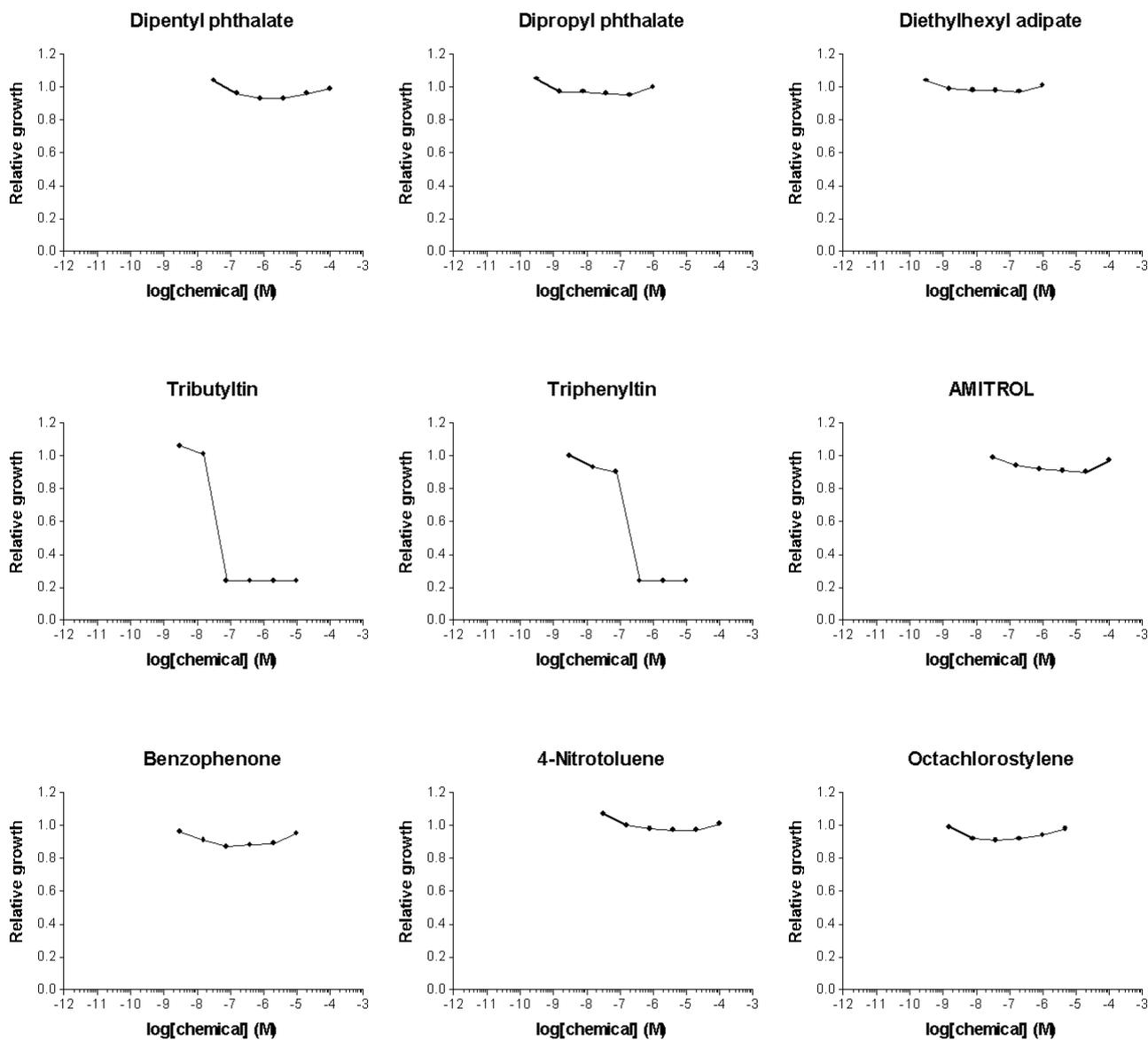


図3 化学物質のGH3細胞増殖抑制作用（その2）

次に、化学物質による細胞増殖の促進作用を検討するため、 T_0 培地に被検物質を添加し、7日後に細胞数を定量した。なお、細胞増殖度は被検物質を加えない系での7日後の測定値を1とし、相対値で示した。その結果、*p*-ノニルフェノール、BPAに明らかな増殖促進作用が見られた（図4）。また、4-オクチルフェノールにおいても弱いながらも促進作用が見られた。

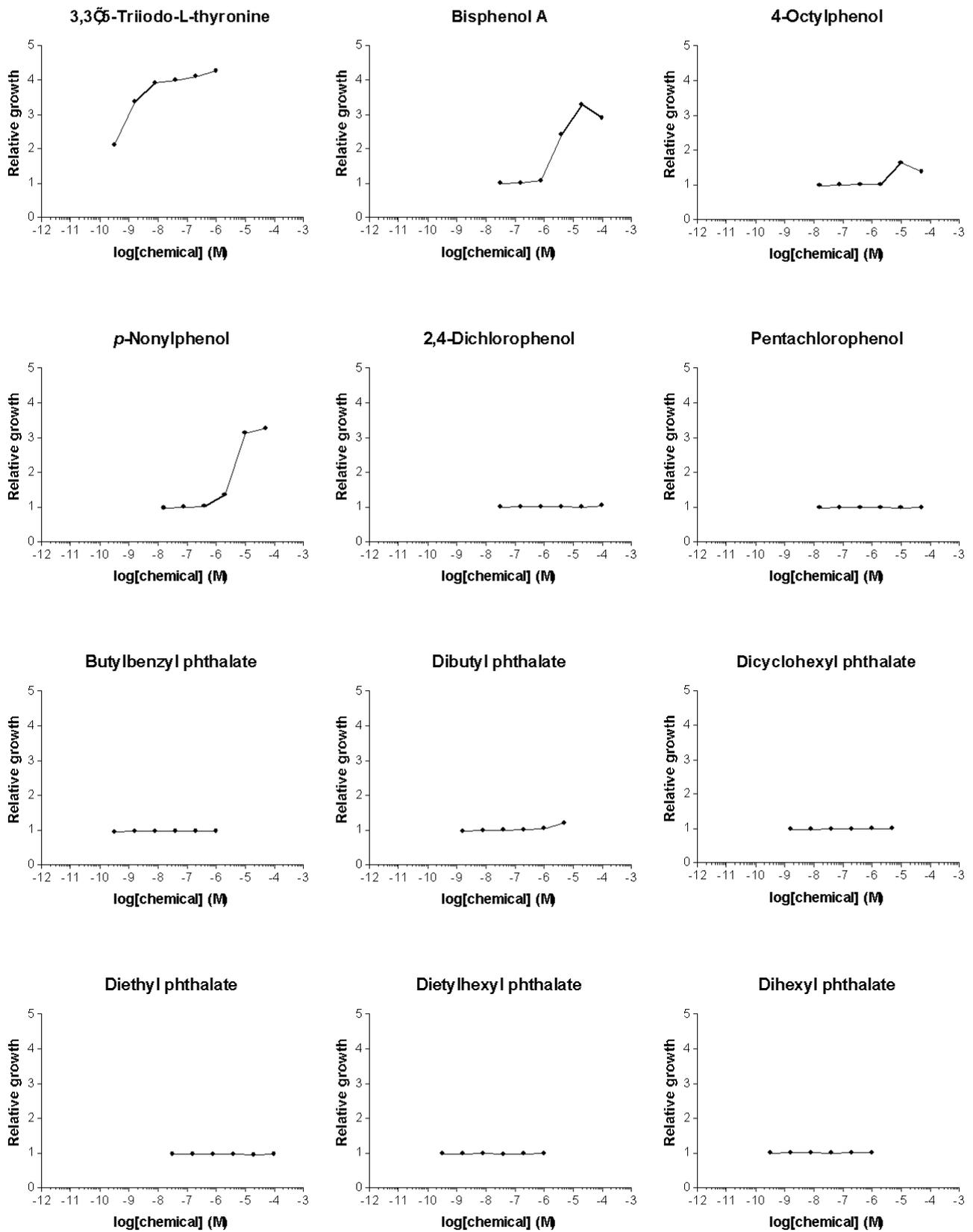


図4 化学物質のGH3細胞増殖促進作用(その1)

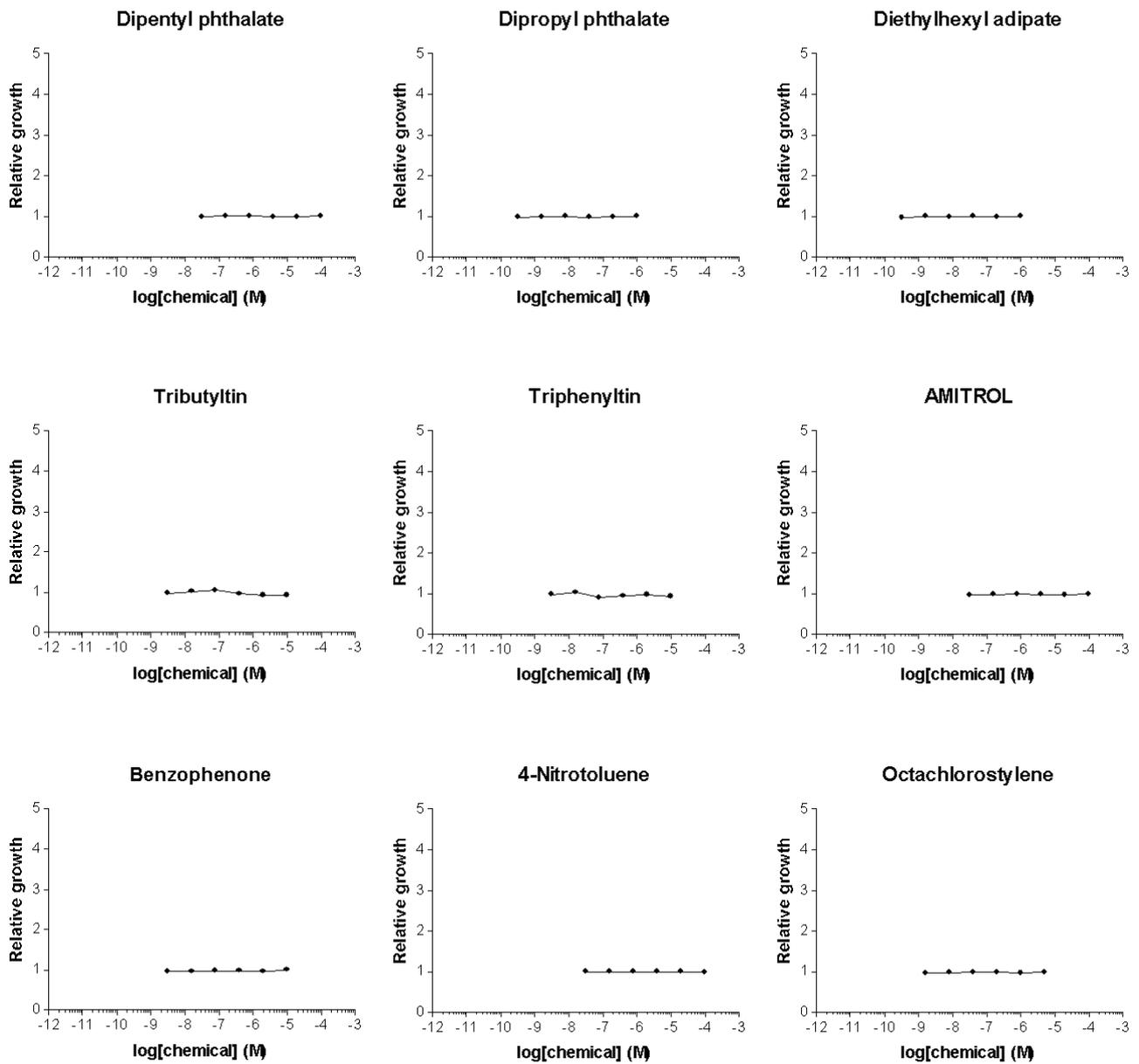


図4 化学物質のGH3細胞増殖促進作用(その2)

(4) GH3 細胞増殖に及ぼす 17 β -エストラジオールの影響

17 β -エストラジオール (E_2) の GH3 細胞の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。T₀培地に E_2 を添加し、7 日後に細胞増殖度を測定した。その結果、 E_2 の濃度依存的な細胞増殖の促進が見られた (図 5)。

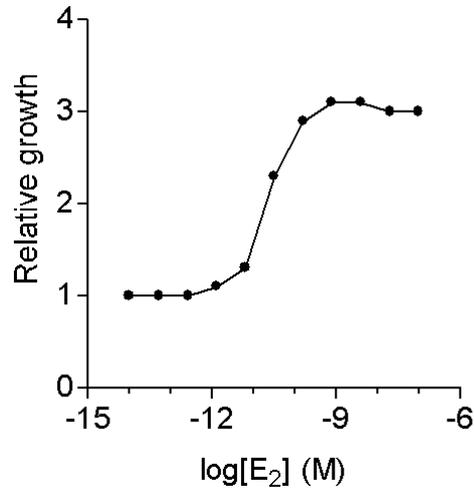


図 5 E_2 の GH3 細胞増殖促進作用

(5) GH3 細胞増殖誘導に及ぼす ICI 182,780 の影響

これまでの結果から、T₃ と E_2 がともに増殖促進作用を示したことから、 E_2 のアンタゴニストである ICI 182,780 による阻害性について検討を行った。

10 nM T₃, 10 nM E_2 , 10 μ M BPA を含む T₀培地に ICI 182,780 添加し、7 日後に細胞数を定量した。なお、細胞増殖度は ICI 182,780 を加えない系での 7 日後の測定値を 1 とし、相対値で示した。その結果、T₃, E_2 , BPA の全ての増殖促進作用が ICI 182,780 により濃度依存的に抑制された (図 6)。

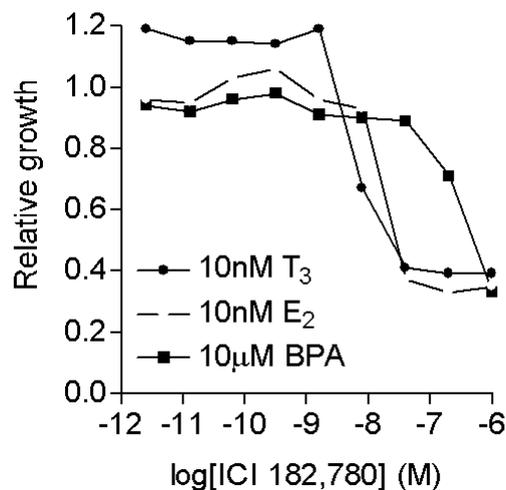


図 6 ICI 182,780 の GH3 細胞増殖抑制作用

GH3 細胞の成長ホルモン産生に及ぼす影響

T₀培地に被検物質を添加し、2日後のGH産生量を測定した。T₃は濃度依存的にGH産生を誘導し、10⁻⁸ M付近で最大となった(図7)。一方、E₂ではGH産生の誘導性はみられなかった事から、GH3細胞のGH産生誘導はE₂依存的ではない事が分かった。また、BPAについてもGH産生の誘導性は見られなかった。

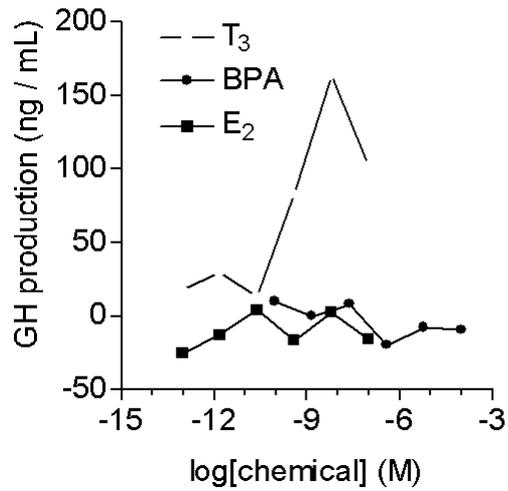


図7 GH3 細胞のGH産生に及ぼす影響

次に、4-オクチルフェノール、*p*-ノニルフェノール、ペンタクロロフェノール、2,4-ジクロロフェノールを対照に GH 産生の誘導性について検討したが、いずれの化学物質も GH 産生誘導への影響はみられなかった (図 8)。

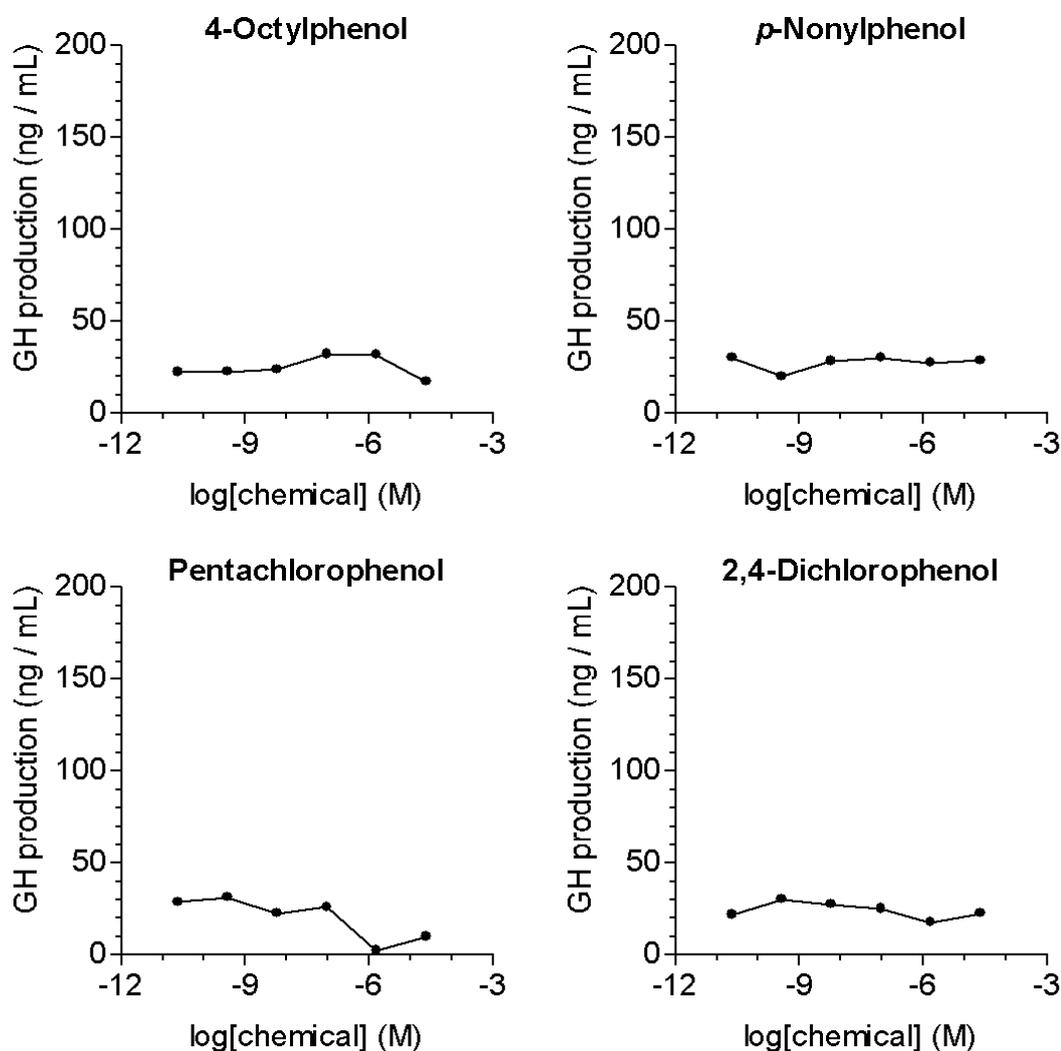


図 8 化学物質の GH 産生促進作用

次に、GH 産生の阻害性について調べるため T_d 培地に 10^{-8} M T_3 を添加した系に被検物質を加え、GH の定量を行った (図 8)。

T_3

10^{-10} - 10^{-8} M の範囲で GH 産生の誘導が見られたが、 10^{-7} M になると抑制が見られた。

4-Octylphenol

低濃度領域 (10^{-11} - 10^{-9} M) と高濃度領域 ($> 10^{-4}$ M) において GH 産生の抑制が見られた。

p-Nonylphenol

低濃度領域 ($< 10^{-11}$ M) と高濃度領域 ($> 10^{-4}$ M) において GH 産生の抑制が見られた。

Pentachlorophenol

低濃度領域 ($< 10^{-10}$ M) と高濃度領域 ($> 10^{-5}$ M) において GH 産生の弱い抑制傾向が見られた。

BPA

低濃度領域 (10^{-11} - 10^{-10} M) と高濃度領域 ($> 10^{-4}$ M) において GH 産生の抑制が見られた。

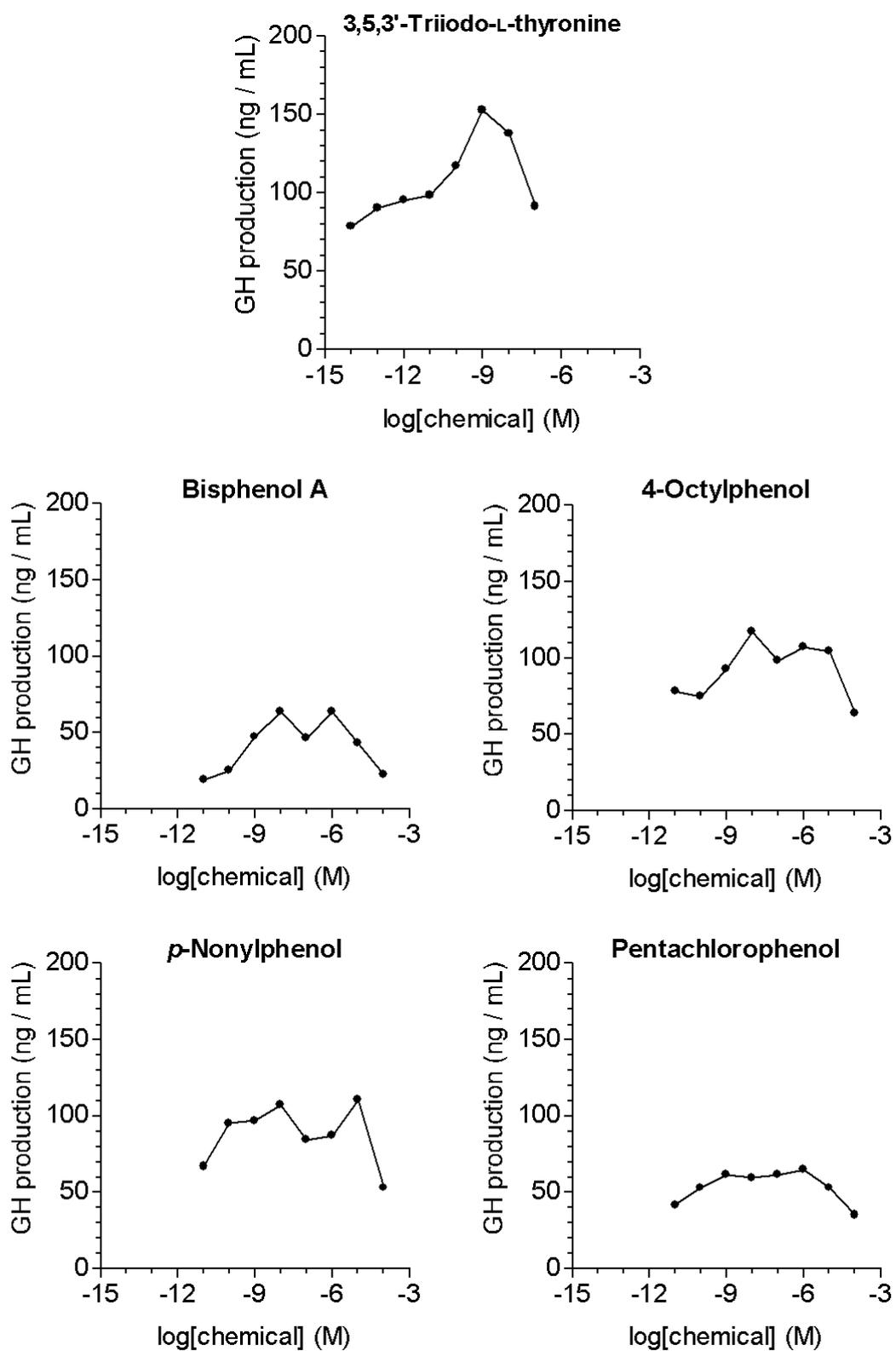


図9 化学物質のGH産生抑制作用

D. 考察

. GH3 細胞の増殖に及ぼす影響

平成 14 年度の研究成果において、BPA, 4-オクチルフェノール, *p*-ニルフェノール, ペンタクロロフェノール, 2,4-ジクロロフェノールが PDI に対する T_3 の結合阻害活性を有する事が明らかになったことから、これらの化学物質は T_3 依存的な作用に影響を及ぼしている事が示唆された。そこで本年度は、GH3 細胞の T_3 依存的な細胞増殖、及び GH 産生に及ぼす影響について検討した。

今回試験した化学物質のうち、4-オクチルフェノールのみが GH3 細胞の細胞増殖を阻害した。一方、誘導性を示したのは、BPA, 4-オクチルフェノール, *p*-ニルフェノールであった。4-オクチルフェノールは促進・阻害の両作用が見られたが、これは T_3 のアゴニスト・アンタゴニストの両活性を併せ持つためであると考えられる。これらの化学物質は GH3 細胞において T_3 の作用に影響を及ぼす事が明らかになった。しかし、GH3 細胞の細胞増殖は E_2 においても誘導された事から、GH3 細胞の細胞増殖には T_3 だけでなく E_2 も作用している事が明らかになった。従って、これらの化学物質が甲状腺ホルモン作用、あるいはエストロゲン作用のいずれを模倣 / 阻害するのかは明らかにする事ができなかった。さらに E_2 のアンタゴニストである ICI 182,780 による阻害性について検討したところ、ICI 182,780 は E_2 の作用だけでなく T_3 の作用をも阻害する事が明らかになった。従って、ICI 182,780 は E_2 のアンタゴニスト活性だけでなく、 T_3 のアンタゴニストとしての活性も有する、すなわち ICI 182,780 のアンタゴニスト活性は E_2 と T_3 とで重複している事が考えられる。これらの関係は今後、化学物質のホルモン作用への影響を検討する上でも明らかにするべきである。

また、PDI に対して T_3 の結合阻害活性が見られたが、細胞増殖には影響しない化学物質として、ペンタクロロフェノール, 2,4-ジクロロフェノールが挙げられた、これらの化学物質は他の T_3 作用に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

. GH3 細胞の成長ホルモン産生に及ぼす影響

BPA, 4-オクチルフェノール, *p*-ニルフェノール, ペンタクロロフェノール, 2,4-ジクロロフェノールについて GH3 細胞の T_3 依存的な GH 産生に及ぼす影響について検討した。今回試験した化学物質の中ではいずれの化学物質も GH 産生の促進作用は認められなかったが、BPA, 4-オクチルフェノール, *p*-ニルフェノール, ペンタクロロフェノールに阻害作用が認められた。さらにその用量反応は典型的なシグモイド曲線ではなく、二相性の反応を示した。 T_3 においても高濃度 (10^{-7} M) では抑制作用が見られた事から、GH3 細胞の GH 産生への作用には濃度の臨界域があると考えられる。

E. 結論

BPA, 4-オクチルフェノール, *p*-ニルフェノール, ペンタクロロフェノール, 2,4-ジクロロフェノールは PDI に対する T_3 の結合を阻害する。

4-オクチルフェノール, BPA, *p*-ニルフェノールは GH3 細胞の細胞増殖促進性を示した。4-オクチルフェノールは促進・阻害の両活性を示した。

BPA, 4-オクチルフェノール, *p*-ニルフェノール, ペンタクロロフェノールは GH3 細胞の GH 産生阻害性を示した。

これらの化学物質は PDI を介してホルモン攪乱作用を示す事が示唆された。

Effect of environmental chemicals on thyroid hormone action in GH3 cell

Yoshihiko Funae, Professor
Osaka City University Medical School,

Key Word : bisphenol A, protein disulfide isomerase, thyroid hormone, GH3 cell

Abstract :

Environmental chemicals have been known to affect not only reproduct systems but also central nervous systems, which is caused by disruption of thyroid hormone action. In order to clarify their relevance to behavior disorder or learning disorder, it is important to elucidate the mechanism of disrupting activity of environmental chemicals toward thyroid hormone action, essential for normal development of brain function. Previously, we isolated and purified the novel bisphenol A (BPA) binding protein, protein disulfide isomerase (PDI), and characterized that the triiodothyronine (T₃) binding was inhibited by phenolic compounds including BPA. These chemicals may interfere the function of thyroid hormone via PDI.

In this study, to compare their binding activity toward PDI with their effect on thyroid hormone action, we investigated the thyroid hormone disrupting activity using GH3 cells, a rat pituitary cell line which grow and produce growth hormone (GH) depending on physiological concentrations of thyroid hormone. The cell growth is induced by the treatment of BPA, 4-octylphenol, and *p*-nonylphenol. 4-Octylphenol have both facilitating and inhibition activity. The GH production was inhibited by BPA, 4-octylphenol, *p*-nonylphenol, and pentachlorophenol.

It was clarified that the chemicals which have displacing activity of T₃ toward PDI is affect T₃ dependent thyroid hormonal action.

甲殻類（ミジンコ）におよぼす内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムに関する研究

研究者 渡邊 肇（岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター 助教授）

研究要旨

甲殻類は地球上の生物において大部分を占めているにもかかわらず、その知見は限られている。内分泌攪乱化学物質影響を生態系全体で捉えた場合、甲殻類への影響を考慮する必要があるが、甲殻類の内分泌系は脊椎動物とは大きく異なっており現在までの知見から類推することは困難である。本研究では、生態系においても重要な位置を占めているミジンコをモデルとしてその内分泌攪乱物質の評価と作用メカニズムを解明することを目的としている。この目的のために、ミジンコの化学物質に対する感受性を増殖試験を中心に解析すると同時に、ほとんど知見のなかったミジンコの遺伝子の解析を行った。

研究者協力者

鑑迫 典久（国立環境研究所 研究員）

勝 義直（岡崎国立共同研究機構 助手）

A. 研究目的

地球上に生息する生物のうち95%が無脊椎動物と言われ、その中の大部分を甲殻類が占めていることから、甲殻類の研究とその保護は地球上の生命環境の維持と密接に結びついている。ところが、内分泌攪乱化学物質影響については、広範な生物種における影響が懸念されているにもかかわらず、甲殻類についてはほとんど研究がなされていないのが現状である。甲殻類の内分泌系は脊椎動物のそれと大きく異なることから、脊椎動物を対象としたリスク評価により影響が無いとされた化学物質が甲殻類において重篤な影響を及ぼし生態系を乱す可能性がある。従って、生態系全体を考慮した場合には脊椎動物に偏らない評価が必要であり、この点からも甲殻類を対象としたリスク評価系の確立とそのメカニズムの解明は急務である。特に水棲甲殻類の一つであるミジンコは食物連鎖の下位に位置することから、生態系全体を保護し環境を維持する観点から重要である。本研究では、ミジンコを用いた内分泌攪乱化学物質影響を評価する系を確立し、その作用メカニズムを遺伝子レベルから解明することを目的とする。

B. 研究方法

環境省が選定した優先してリスク評価に取り組む化学物質などについて内分泌攪乱の作用を解明するために、ミジンコをモデル動物とし主に遺伝子からの影響評価と解析を行う。これにより、最終的に遺伝子レベルからの内分泌攪乱作用の作用メカニズムの解明を目指す。

す。

1. 遺伝子からのアプローチ

GenBank に登録されているオオミジンコ (*Daphnia magna*) の遺伝子のうち、タンパク質をコードしているものはわずかに 6 種類にすぎない。そこで、まずホルモンレセプターや代謝メカニズム解明のための基盤とするためにミジンコで発現している遺伝子情報の取得を行う。

具体的には、下記の手順によりダフニアマグナで発現している遺伝子の mRNA の情報 (Expressed Sequence Tag) EST を取得した。ダフニアマグナから mRNA を調整し、cDNA ライブラリーを作製する。ライブラリー作製には、cDNA の方向をそろえるために、ファージ由来の ZAP II をベクターとして用いた。昨年度は、それぞれのクローンの 5' 末端からの配列を解析したが、これら取得した塩基配列のクラスタリング解析を行い、重複して解析した遺伝子のグループ分けを行った (コンティグの作製)。その結果それぞれが独立していると思われるグループ (コンティグ) から、代表的なクローンを選択し、その 3' 末端からの塩基配列の解析を行った。これにより基本的には、昨年度得られた遺伝子の両末端の塩基配列を得られることになる。

具体的な方法としては、昨年度に作製した EST クローンのグリセロールストックより、選択したクローンをピックアップし、TempliPhi DNA Sequencing Template Amplification Kit (アマシャム社) を用いてシーケンス用 DNA テンプレートを調製した。これを鋳型として M13 プライマーを用いてによりダイターミネータ法により (DYEnamic ET dye terminator kit (アマシャム社)) 解析を行った。塩基配列の読み取りは、MegaBASE4000 (アマシャム社) を用いた。

シーケンスデータは Phred 値を計算し、Phred Quality 値が 15 以上の塩基配列について、さらに解析を行った。Phred 値は、配列解析結果の信頼性の指標となるものであり、低い値の場合得られた塩基配列情報の信頼性が低くなる。

解析した遺伝子情報から、発現している遺伝子の概要を把握するとともに、近縁種との遺伝子配列の比較を行うことにより、遺伝子レベルでの解明の基盤となるだけでなく、3' 末端の配列は DNA マイクロアレイ設計のために利用できる。これらの情報は、ダフニアマグナのホルモンレセプターの解析や内分泌攪乱化学物質による遺伝子発現変化の解析のための基礎的な情報として利用する。

2. マイクロアレイ解析

得られた遺伝子情報をもとに、相同性や GC 含量をもとにマイクロアレイ用の適切なオリゴヌクレオチドを設計する。これをガラスアレイ上に固定化することにより、DNA マイクロアレイを作製する。この DNA マイクロアレイを用いて、ミジンコから抽出した RNA をもとに作製したプローブをハイブリダイズさせ解析する。これにより、ミジンコにおける遺伝

子発現状態を DNA マイクロアレイを用いて評価することの妥当性について検証する。

ミジンコにおける化学物質の曝露については、内分泌攪乱影響評価を繁殖阻害試験にもとづいて行った。研究材料としては、塩基配列解析に用いたのと同じ、ダフニアマグナ (*Daphnia magna*) の系列を用いた。試験温度 24 ± 1 または 21 ± 1 、 $1 \text{ pH}7 \pm 0.5$ 、半止水式、週 3 回換水の条件下で試験を行った。飼育水は活性炭でろ過したものを扱い、100m l の容器に 80m l の水を用いて飼育した。水の硬度は 80mg/L、溶存酸素濃度は 80-90%であった。エサはクロレラを用い、一日当りおよそ 2×10^7 のクロレラを与えた。曝露群については、発生後 24 時間以内から曝露を開始し、21 日間曝露した後に RNA を調整した。曝露には、生殖影響が知られているフェノキシカルブを 2ppb の濃度で用いた。

ミジンコからの total RNA の抽出・精製

DNA マイクロアレイを用いた解析を行うために、被験物質に一定時間曝露させたミジンコと未曝露のミジンコから total RNA の抽出、精製を行った。ミジンコを回収後、TRIzol (Invitrogen 社) 中でフィスコトロン (マイクロテック社) を用いてプロトコールに従い total RNA を回収した。これをさらに RNeasy (キアゲン社) を用いて再精製した。

ここで得られた total RNA の一部をとり、 OD_{260} と OD_{280} を測定することにより、純度と濃度を評価した $OD_{260/280}$ の比が、1.8 以上の total RNA を DNA マイクロアレイ解析に使用した。また、これと並行して RNA6000 Nano LabChip キットを用いて total RNA を解析する事によりリボソーマル RNA の定量を行い、調整した RNA が分解がしていないことを確認した。

ハイブリダイゼーション用プローブの調製

精製した total RNA から T7 プロモーターを融合した cDNA を合成し、T7RNA ポリメラーゼにより蛍光ラベルした cRNA プローブを合成した。この方法により RNA 量を数十倍から数百倍に増幅できる。この一連の反応については、基本的にアジレント社の Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (アジレント社) を用いた。

T7-based RNA 増幅

ミジンコから抽出、精製した total RNA 1 μ g に T7 プロモータ配列を付加した oligo(dT) プライマーを加え、65 で 10 分間熱処理した後に氷上で急冷した。その後、5 \times M-MLV buffer、dNTP mixture、Ribonuclease inhibitor、Reverse Transcriptase M-MLV を加えて 20 μ L とした後、40 で 2 時間の反応を行い cDNA を合成した。

合成した cDNA 溶液に 4 \times Transcription buffer, DTT, NTP, PEG, RNaseOUT, Inorganic Pyrophosphatase, T7 RNA polymerase, Cyanine3-CTP Cyanine5-CTP を加え全量を 80 μ l とし 40 で 2 時間インキュベートした。反応後、RNeasy で cRNA を精製した後に断片化しハイブリダイゼーションに用いた。

DNA マイクロアレイのハイブリダイゼーションおよび洗浄

Cy3、Cy5 でラベルされたそれぞれの RNA を 90 10 分間加熱し熱変性を行った後、両者を混合し、ハイブリダイゼーション溶液 (6xSSC、0.1%SDS、10% Denhardt's Solution、10% Formamide) と混合し DNA マイクロアレイ上でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは 42 °C で 16-20 時間行った。ハイブリダイゼーション終了後、カバーガラスを 2×SSC 溶液中で静かにはがし、2×SSC / 0.2% SDS 溶液中で 55 °C、5 分間の洗浄を 2 回、続いて 2×SSC / 0.2% SDS 溶液中で 65 °C、5 分間の洗浄を行った。そして、0.05×SSC 溶液中でリンスを行い、遠心 (1000 rpm、3 分間) により DNA マイクロアレイを乾燥させた。この DNA マイクロアレイを GenePix4000B Scanner (Axon 社) を用いてアレイ上の Cy3、Cy5 それぞれの蛍光強度を測定した。

GenePix4000B Scanner を用いて得られた 2 種類の画像 (Cy3 画像、Cy5 画像) を GenePixPro (Axon 社) により解析し、各遺伝子スポットの蛍光シグナル強度を数値化した。数値化には、蛍光強度の中央値からバックグラウンド値を引いたものを用いた。遺伝子発現レベルの比率を算出するための標準化 (normalization) に際しては、各スポットの蛍光強度比の中央値を 1 に換算する global normalization 法を適用した。換算後、各遺伝子の Cy3 と Cy5 のシグナル値の比率を算出した。

C. 研究結果

1. ミジンコの遺伝子情報の取得

従来の遺伝子情報が極端に少ないことから、昨年度はまずライブラリーから任意に選択したクローンの遺伝子配列を解析することにより、ダフニアマグナに関する遺伝子情報を取得した。昨年度には 5 2 1 2 クローンについて 5' 末端からの塩基配列を解読したが、さらに 5' 末端からの解析をすすめた。その結果およそ 8000 クローンについて、その 5' 末端からの塩基配列情報を取得できたが、これらの配列をクラスタリングにより整理し、独立と思われるクローン (遺伝子) 約 3159 クローンの 3' 末端の塩基配列の解析を行った。その結果、Phred 値を元に、2417 クローンの 3' 末端塩基配列を取得した。

また、これら一連の解析により得られた 5' 末端、3' 末端からの塩基配列とそのコンティグ解析、相同性検索の結果等については、Web 上にサイトを作り、Web 上でデータベースを閲覧できるようにした。

アドレスは、<http://ori.nibb.ac.jp:8093/> である。

図 1 にその代表的な画面を示す。これらのデータは、GeneBank に登録予定である。

なお、こうした多量の一連の解析に関しては、ライブラリーを作製する際に生じる実験的なアーティファクト、配列解析における不確定さが生じうるために、得られた配列の信頼性の検証を進めている。

2. マイクロアレイ化

DNA マイクロアレイの作製に当たっては、コストや時間がかかることから、まず遺伝子数

を絞り、プロトタイプのマイクロアレイを作製し、アレイの基盤、DNAの固定化法やプローブの調整法などの妥当性を検証することとした。

塩基配列の Blast 結果から、データベース上に類似配列が見つかった遺伝子を中心として、まず 176 遺伝子を選択した。遺伝子のリストを表 1 にまとめた。

遺伝子情報解析により得られた 3' 末端の塩基配列情報をもとにロングオリゴ DNA を合成し、ガラススライド上にスポットしたテストアレイを作製した。合成した DNA オリゴマーの長さは 60mer で、既に昨年度取得した *Daphnia* の EST 配列などと比較することにより、特異的な配列を選択した。

合成したロングオリゴは、表面をダイヤモンド処理したガラスアレイ（東洋鋼鈹）上にインクジェット方式を用いることによりプリントし（日本ガイシ）固定化した（図 2）。

3. マイクロアレイの評価

作製した DNA マイクロアレイを評価するために、まず同一試料を用いて、2 色蛍光の解析を行い評価を行った。図 4 に示したように、両者の相関は非常に高く（0.97~0.99）、色素を交換した反応においても、高い相関を示した（図 4）ことから、DNA マイクロアレイの基盤、スポット方法、試料の調整方法や解析方法においては、問題がないことがわかった。通常のスライドガラスタイプの DNA マイクロアレイでは不可能とされているアレイ間の蛍光強度の比較においても、比較的高い相関を示した（図 5）ことから、本研究で作製した DNA マイクロアレイは非常に再現性が高い系を構築できたことになる。

さらに遺伝子発現変化が適切に解析できるかを検討するために、幼若ミジンコ（発生後 48 時間以内）と成長したミジンコのそれぞれから RNA を調製し、遺伝子発現変化の解析を行った。この結果を図 6 に示したが、遺伝子発現変化が見られた遺伝子については、色素を交換しても基本的にその変化を検出できたことから、色素のとりこみによる誤差は極力おさえられているものと考えられた。また、発現が変化している遺伝子（表 3）について解析したところ、卵に必要なピテロジェニン遺伝子などは成長したミジンコに多く検出された。これは、ミジンコの生殖能の差を反映しているものと思われ、成熟度をマイクロアレイで検出できることが示唆された。

またマイクロアレイにより算出された倍率変化は、色素交換した場合にも検出されていることから、本研究課題で作製した DNA マイクロアレイはミジンコにおける遺伝子発現変化の検出に利用可能であることが示された。

4. DNA マイクロアレイに用いる塩基配列の影響

DNA マイクロアレイに用いるオリゴ DNA の塩基配列をどの様を選択するかは、そのアレイの特性を決める上で重要な要因である。本研究では、比較的発現量が多いヘモグロビン遺伝子をモデルとして、3 種類のオリゴ DNA を設計しアレイに搭載しその倍率変化を調べた。表に示したように、算出された倍率変化については、数値の差はみられるものの大きな差

は見られなかった。これは、3種類のヘモグロビンのオリゴ DNA が適切に設計されていることを示唆しているが、今後定量 PCR などを含めた詳細な検証が必要である。

- 7.43739 hemoglobin - Daphnia magna>gp:AB021134_1 [AB021134] gi:4589706 (oligoA)
- 6.57621 hemoglobin - Daphnia magna>gp:AB021134_3 [AB021134] gi:4589708 (oligoB)
- 6.30321 hemoglobin - Daphnia magna>gp:AB021134_3 [AB021134] gi:4589708 (oligoC)

5. 生殖毒性との比較

以上の結果をふまえて、実際に内分泌攪乱作用が疑われる化学物質について、DNA マイクロアレイでその遺伝子発現に及ぼす影響を検出できるかについて検討を行った。ほ

本研究では、昆虫における幼若ホルモンのアナログであるフェノキシカルブを用いて解析を行った。用いた 2ppb という濃度は、成虫自体にはほとんど影響がないものの、産子数が未処理の 10 パーセント程度にまで落ち込み、ほとんどがオスになる条件である（図 7 左下参照）。

この条件で飼育したミジンコから RNA を調製し DNA マイクロアレイを用いて解析した結果を図 7 に示した。実際に曝露により、遺伝子発現に変動がみられる遺伝子を検出することができた。倍率変化とその遺伝子の blast 検索の結果を表 3 にまとめた。今後、再現性や用量依存性などについて検討を加え、より確実な検出を可能にしていく必要がある。

D. 考察

EST 解析結果

ミジンコの総遺伝子数については未知であるが、今回の解析により一定量の遺伝子情報が取得できた。クローンされた遺伝子の両末端の塩基配列を解読することにより、タンパク質をコードしている領域の配列と、DNA マイクロアレイ解析に有用な 3' 末端の配列を結びつけることができた。これにより、DNA マイクロアレイで重要な DNA オリゴマーの設計の基盤ができた。

また EST 配列のクラスタリング解析により、ミジンコにおいて、多く発現している遺伝子についても情報を取得することができた。今回の EST 解析は、遺伝子の発現頻度の評価もかねているために、ライブラリー作製にあたってノーマライズなどの操作を行わなかったが、ミジンコ全体で発現量が多い遺伝子などについても情報を得ることができた。特に ATP 合成に関連した遺伝子の発現が非常に多い事が明らかになった。また、ピテロゲニンやヘモグロビンなど、すでに報告のある遺伝子についても、発現量が非常に高いことが推察された。

アレイ解析結果

これらの情報をもとに 176 遺伝子を選択し、DNA マイクロアレイのプロトタイプを作製し

た。いままで、ミジンコを用いた DNA マイクロアレイに関する報告はなかったために、まずプロトタイプを作製し、化学物質曝露による遺伝子発現変化を解析できるかについて検討することとした。

図3にマイクロアレイのスキャン画像の例を示したが、バックグラウンドの蛍光が低く、蛍光シグナルを明るくとらえることが可能になった。Cy3とCy5を交換して反応を行った場合、比較的良好に相関する(図3)ことから、RNAのラベリングから解析に至るまでのプロセスについては問題ないことが示された。

未処理のミジンコについて、2つのロットを用意し、それぞれCy3, Cy5でラベルして解析した場合、2つの実験間でばらつきが少ない事がわかった。このことから、ミジンコから比較的安定して、RNAを調製でき、解析を行う事が可能であることが示された。

またアレイ解析する際にステージを変え、ミジンコを幼若なミジンコと成虫のミジンコについて比較した場合、ピテロゲニンなどいくつかの遺伝子の発現状態が異なっている事が示された。ピテロゲニンは卵に蓄えられるタンパク質であり、幼若なミジンコで発現していないことが推察される。従って、このことから、DNA マイクロアレイのシステムが、期待通り機能していることが示された。また、同時に、DNA マイクロアレイ解析において、解析時のステージなどにも注意を払う必要性を示している。

このように機能する事が示された DNA マイクロアレイを用いて、実際に化学物質曝露を行ったミジンコについて、RNAを抽出し解析を行った。

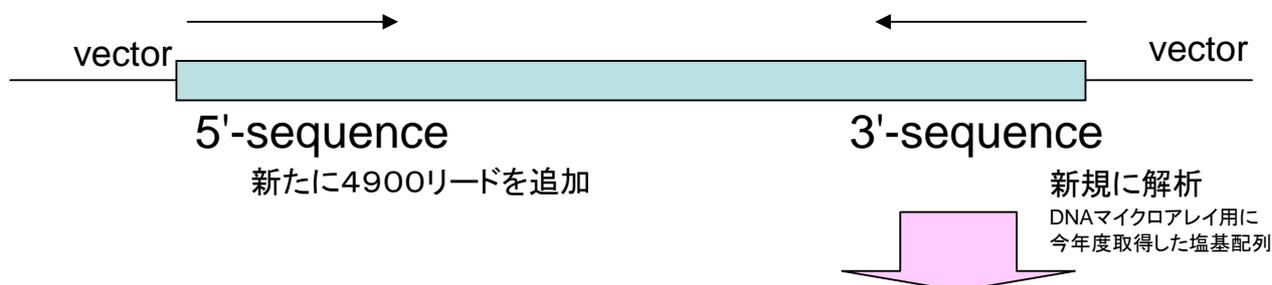
図7に示すように、未処理と処理で遺伝子発現の変動が見られた。変動が大きく見られた遺伝子についてのリストを表3にまとめたが、ヘモグロビンが大きく変動していることが示された。また発現が減少する遺伝子についても ARNT(Ah receptor nuclear translocator)などが変化することがわかった。

昨年度のハイスループット型のディファレンシャルディスプレイを用いた解析から、フェノキシカルブ曝露により、遺伝子発現が変動していることが推察されていたが、実際に DNA マイクロアレイ解析を行うことにより簡便に遺伝子発現変化を検出できることが確認できた。

今回の研究では、プロトタイプのマイクロアレイを評価する目的で遺伝子数を絞り込んだ解析を行ったため、発現変動が確認できた遺伝子数が限られていた。今後遺伝子数を増やし、網羅的に遺伝子発現の変化をとらえる必要がある。これにより、種々の化学物質曝露に対するマーカーとなる遺伝子の探索、曝露評価系の構築などが可能になると思われる。

図1

取得した遺伝子3'塩基配列情報のBlastサーチ結果(部分)



clone	5'-sequence				3'-sequence			
	length	BestHit	Eval ue	description	lengt h	BestHit	Ev alu e	description
WTH001_0005_A07	482	sp:R10A_SPQFR	2e-56	60S ribosomal protein L10a.>gp:AF391092_1 [AF391092] gi:14994666 ribosomal prot	551	sp:R10A_SPOFR	4e-65	60S ribosomal protein L10a.>gp:AF391092_1 [AF391092] gi:14994666 ribosomal prot
WTH001_0005_A08	675	gpcu:B055147_1	4e-35	[BC055147] gi:32766329 Unknown (protein for MGC:63583) [Danio rerio]	568	pir:B71445	2e-25	probable glycerol-3-phosphate permease - Arabidopsis thaliana>prf:2405340RK
WTH001_0005_A09	660	gp:AF359386_1	5e-25	[AF359386] gi:13751870 pancreatic lipase-related protein type 2 precursor [Equus]	534	gp:AE003805_38	8e-16	[AE003805] gi:7302862 CG6472-PA [Drosophila melanogaster]
WTH001_0005_A11	652	gp:AF123591_1	1e-38	[AF123591] gi:4567054 fertilization envelope outer layer protein [Cyprinus carp]	689	sp:HGDROME	4e-78	Homogentisate 1,2-dioxygenase (EC 1.13.11.5) (Homogentisicase) (Homogentisate ox
WTH001_0005_A14	593	gpcu:B046709_1	6e-40	[BC046709] gi:28302354 stip1-prov protein [Xenopus laevis]	590	gp:AE003590_70	7e-65	[AE003590] gi:7296220 CG2720-PA [Drosophila melanogaster]
WTH001_0005_A23	613	gp:BC034531_1_1	1e-58	[BC034531] gi:21961590 similar to hypothetical protein MGC19039 [Mus musculus]>	545	gp:AK045441_1	7e-55	[AK045441] gi:26337367 Mus musculus adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN
WTH001_0005_B02	580	gpcu:B045447_1	1e-76	[BC045447] gi:28374270 similar to G protein-binding protein CRFG [Danio rerio]	547	gp:BC005514_1	8e-11	[BC005514] gi:13529611 Unknown (protein for IMAGE:3493398) [Mus musculus]>gpcu:B
WTH001_0005_B03	193				472			
WTH001_0005_B04	615	spu:ADHX_OCTVU	2e-75	Alcohol dehydrogenase class III (EC 1.1.1.1) (Glutathione-dependent formaldehyde	611	spu:ADHX_SPAAU	8e-75	Alcohol dehydrogenase class III (EC 1.1.1.1) (Glutathione-dependent formaldehyde
WTH001_0005_B07	581	gp:AF125971_6	2e-31	[AF125971] gi:14916394 Hypothetical protein Y4C6B.6 [Caenorhabditis elegans]	686	prf:1411186B	1e-49	lactase phlorizin hydrolase - Oryctolagus cuniculus (domestic rabbit)
WTH001_0005_B09	381	gp:AE003704_21	6e-10	[AE003704] gi:10726524 CG3321-PA [Drosophila melanogaster]>gp:AE003704_22 [AE00	363	gpcu:AY232167_1	0.006	[AY232167] gi:38048575 similar to Drosophila melanogaster CG3321 [Drosophila ya
WTH001_0005_B11	643							
WTH001_0005_B12	112				594	gp:AF453501_1	6e-08	[AF453501] gi:21449383 unknown [Actinosynnema pretiosum subsp. auranticum]
WTH001_0005_B15	734	pir:T11351	1e-95	cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain I - Daphnia pulex mitochondrion>gp:AF117	508	pir:T11351	4e-74	cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain I - Daphnia pulex mitochondrion>gp:AF117
WTH001_0005_B17	485	gp:AK052476_1	2e-22	[AK052476] gi:26342705 Mus musculus 13 days embryo lung cDNA, RIKEN full-length	475			
WTH001_0005_B18	594	gp:AF400197_1	3e-40	[AF400197] gi:15213788 ribosomal protein L35A [Spodoptera frugiperda]	418	gp:AF400197_1	8e-41	[AF400197] gi:15213788 ribosomal protein L35A [Spodoptera frugiperda]
WTH001_		gp:DP	~				1e	

図2 オリゴDNAの固定化

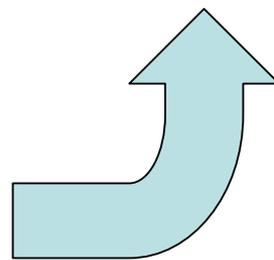
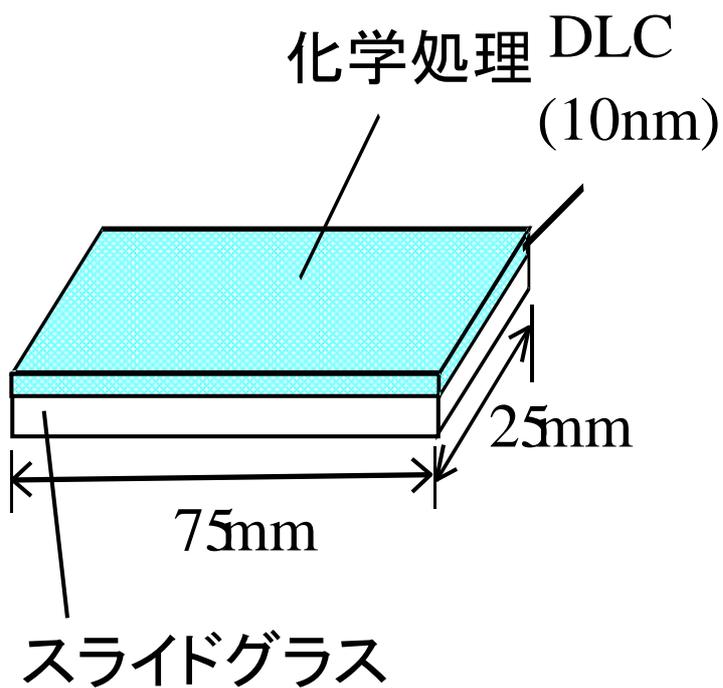
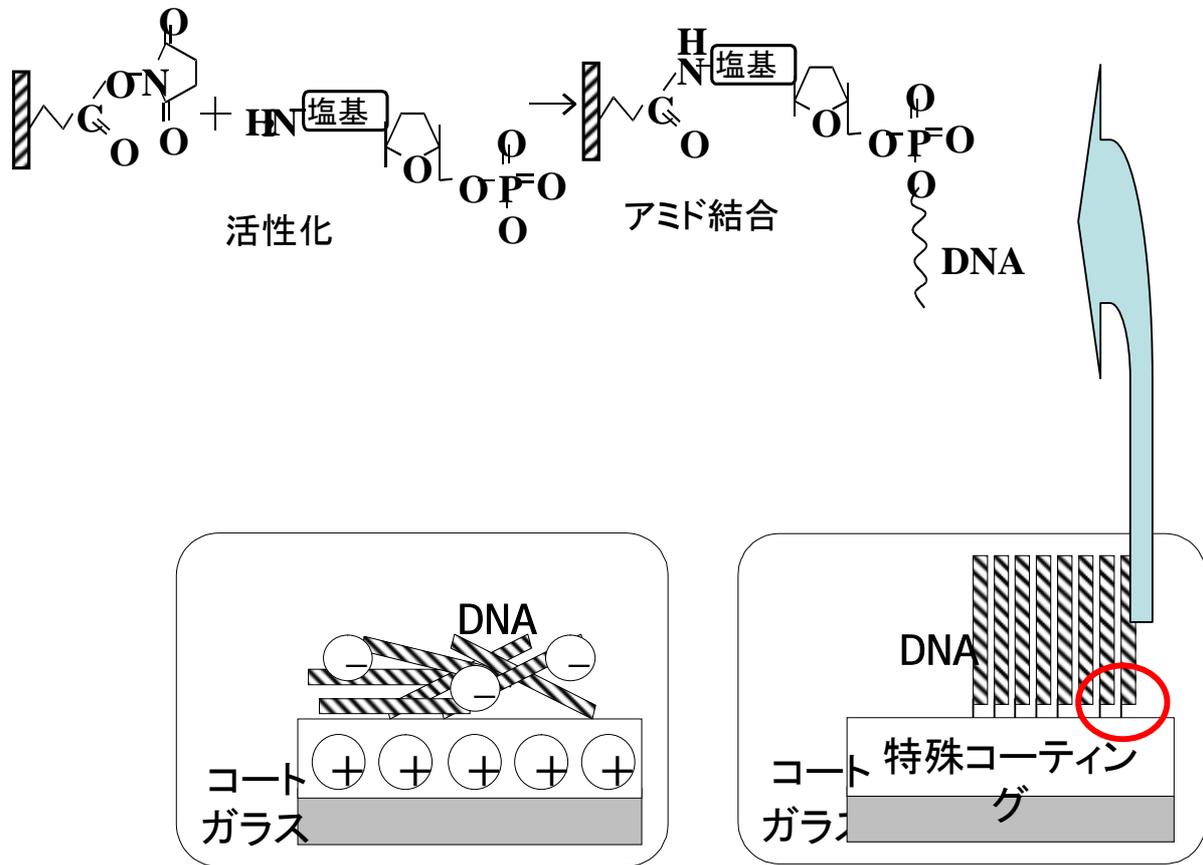
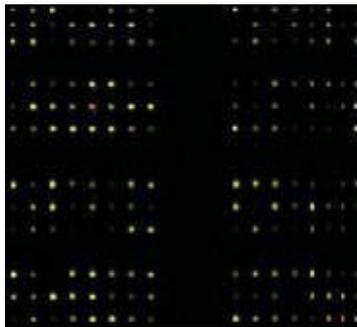
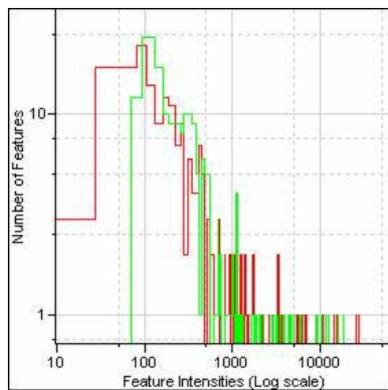


図3 試作したDNAマイクロアレイの評価



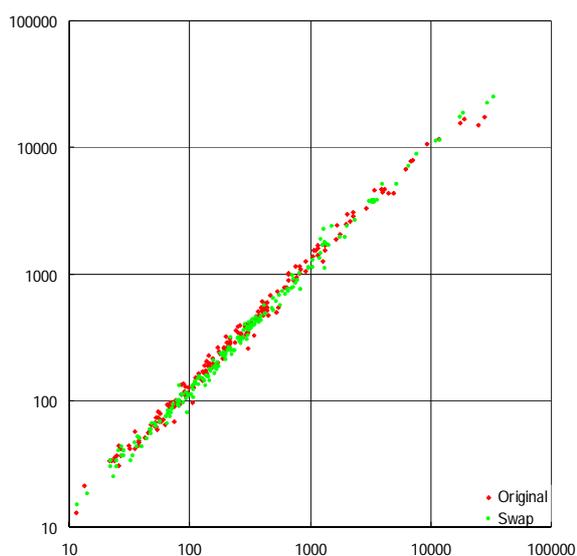
アレイスキャンイメージの例
(ここではフェノキシカルブ処理
した実験のスキャンデータを示
している。)
形状、明るさともに優れている



画像スキャン時のそれぞれの
蛍光強度の度数分布
バックは緑がやや高くなるものの、
実際の計測には問題ない。

図4 作製したDNAマイクロアレイの評価(1)
セルフハイブリダイゼーション

セルフハイブリダイゼーションの相関	exp1 (original)	exp2 (swap)	相関係数
SampleA	Cy3	Cy5	0.97
SampleB	Cy5	Cy3	0.99



同じRNAから独立にCy3,Cy5で標識したプローブを用いて、ハイブリダイゼーションを行った。増幅、標識においてバイアスがかかる場合、対角線上からはずれ、相関が低下するはずであるが、今回作製したアレイでは、非常に高い相関が示された。

図5 DNAマイクロアレイの再現性の確認

ミジンコから得られたRNAを別々に増幅、蛍光ラベルした。
 (AをCy3でラベルしたものとCy5でラベルしたもの、
 BをCy3でラベルしたものとCy5でラベルしたもの、計4サンプル)
 これらを2つのアレイ(exp1とexp2)で解析し、蛍光強度をプロットした。
 同じサンプルを別の色素でラベルし別のアレイで解析した場合でも、
 相互の比較可能な高い相関を示している(A,B)。
 また独立にラベルしたサンプルを別のアレイで解析した場合にも高い
 相関をしめしている(C,D)。

	exp1	exp2
SampleA	Cy3	Cy5
SampleB	Cy5	Cy3

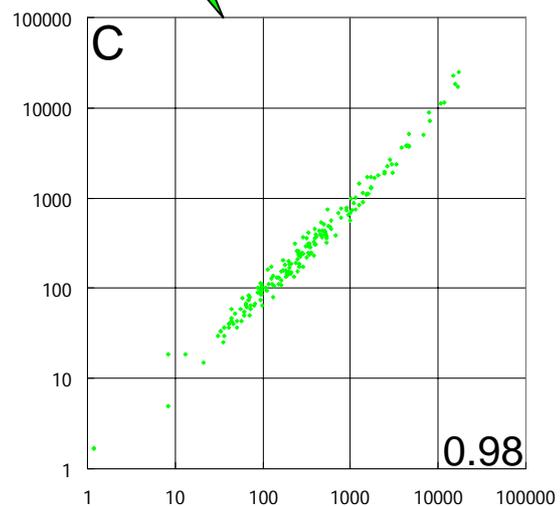
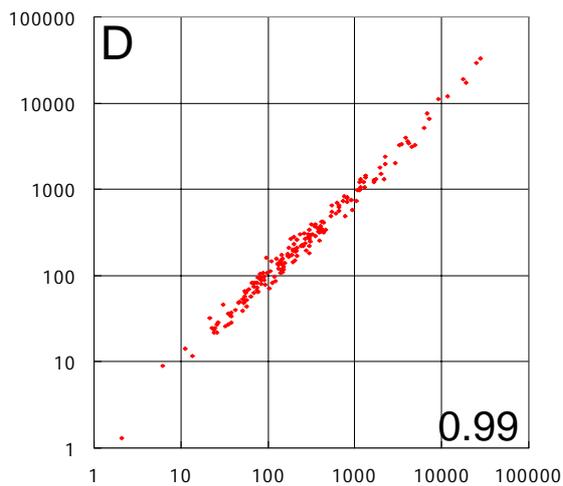
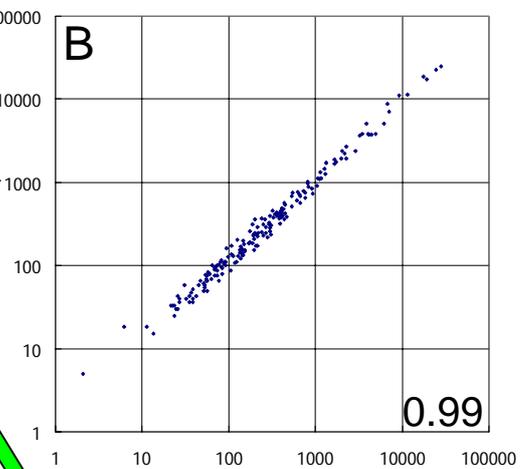
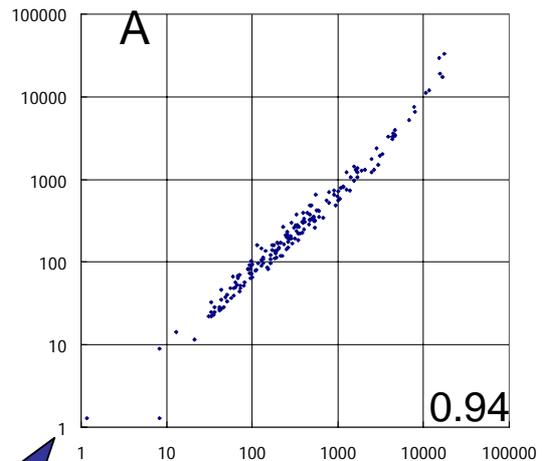


図6 ミジンコの成長における遺伝子発現の差異

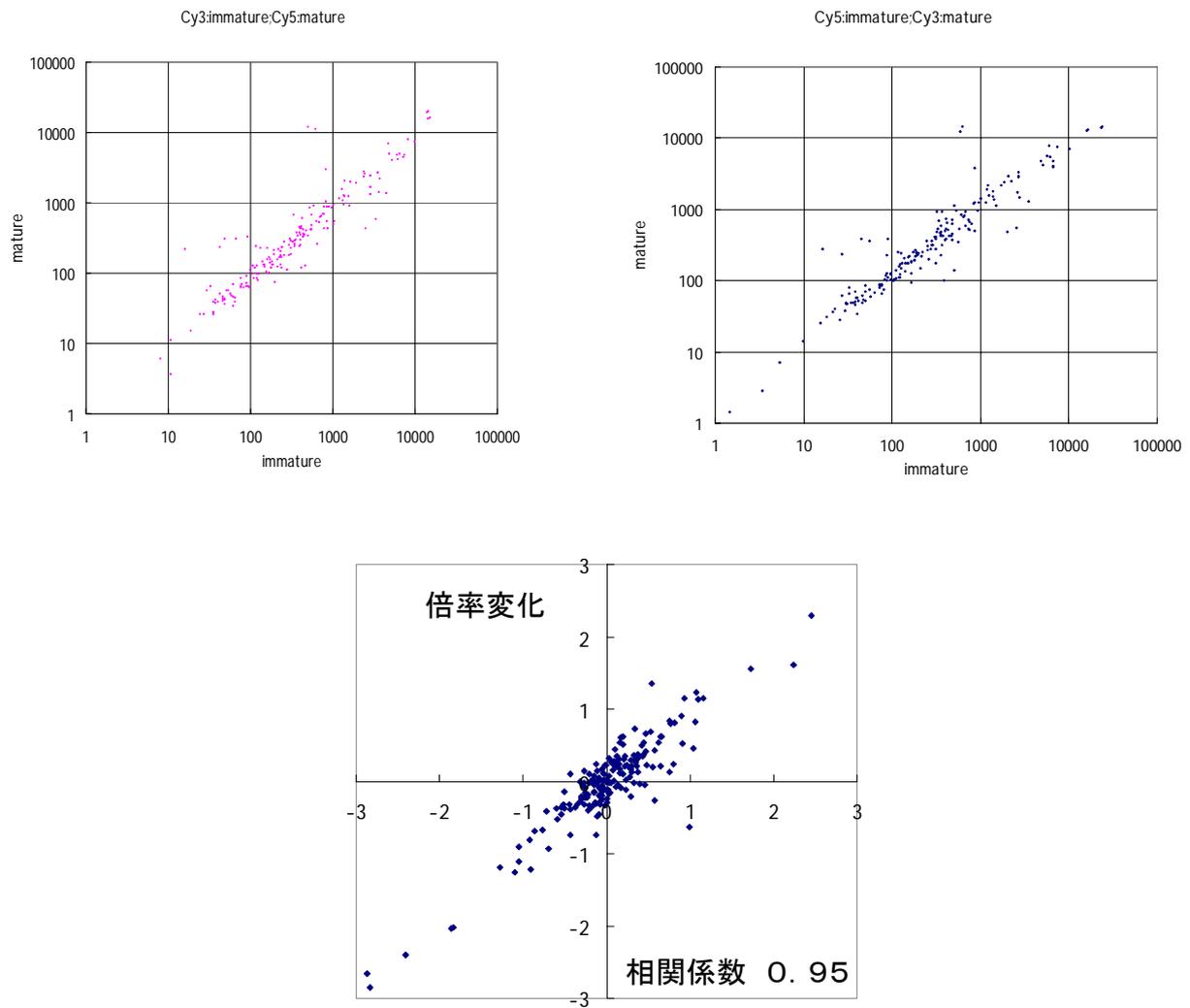


図7 フェノキシカルブ曝露時の遺伝子発現の変化

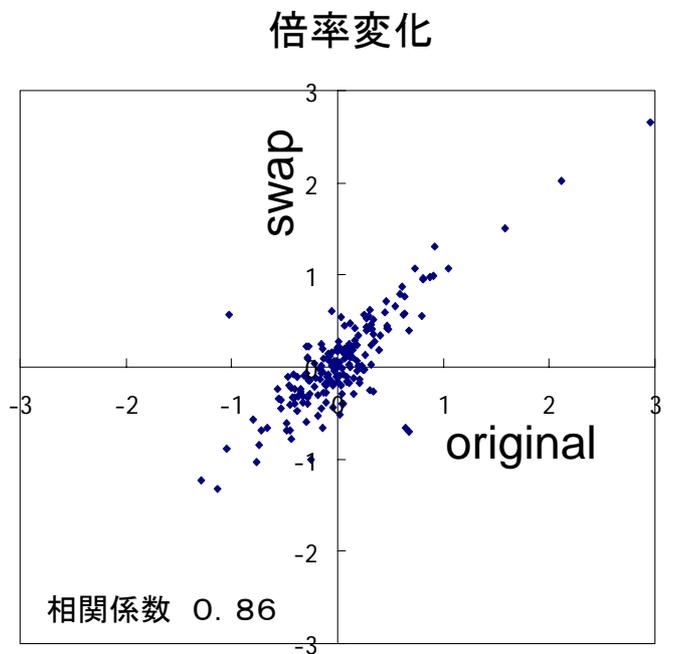
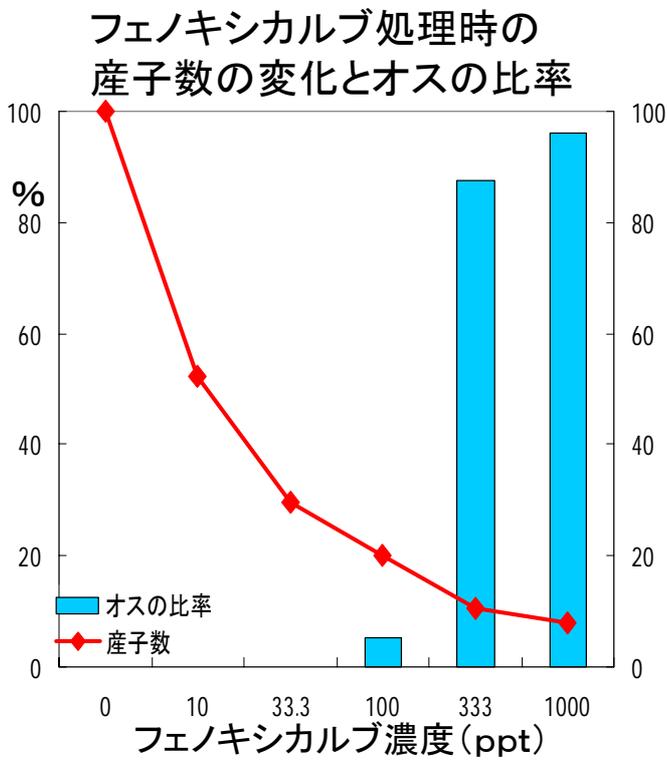
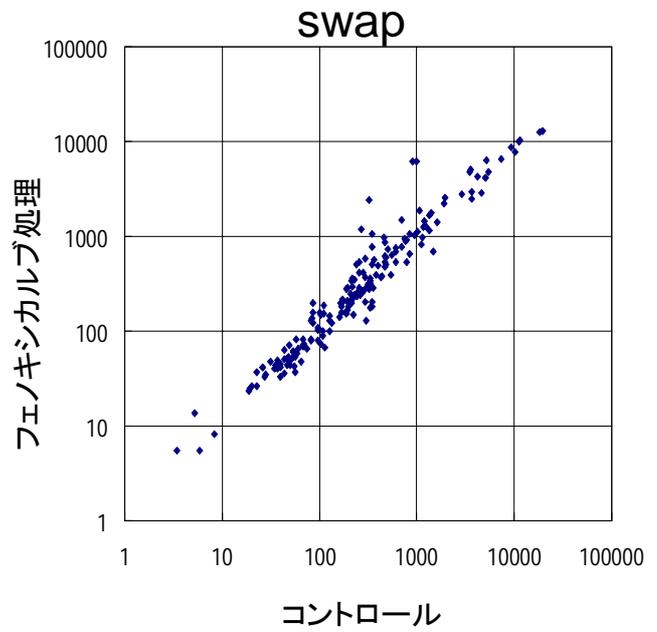
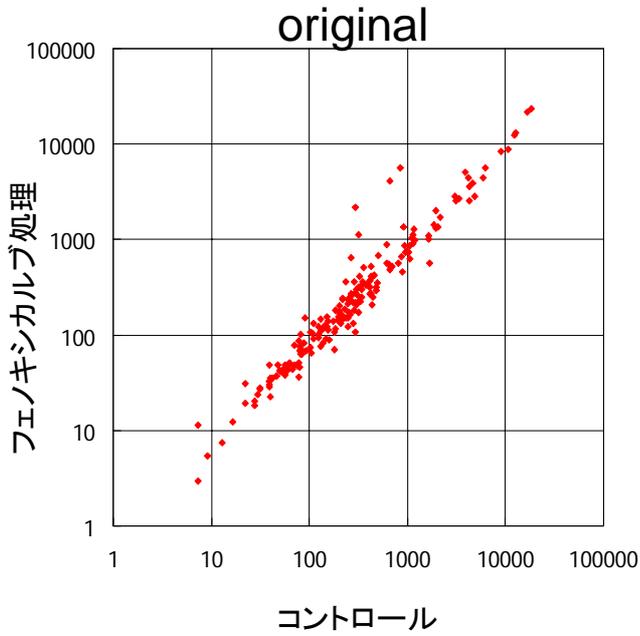


表1 DNAマイクロアレイ化したクローンのリスト

	Con. e-value	Definition
WTH001.0007.G07.r	1224	-
WTH001.0007.M18.r	155	2E-54 H ⁺ -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) protein 6 - <i>Daphnia pulex</i> mitochondrion>prf:2318218D ATPase:SUBUNIT=
WTH001.0005.B15.r	151	4E-74 cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain I - <i>Daphnia pulex</i> mitochondrion>gp:AF117817_2 [AF117817] gi:4927671 cytochrome
WTH001.0011.D09.r	128	-
WTH001.0009.H24.r	113	1E-81 cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain III - <i>Daphnia pulex</i> mitochondrion>prf:2318218E cytochrome oxidase:SUBUNIT=I
WTH001.0009.H15.r	85	2E-47 [AJ245734] gi:6946693 ferritin [<i>Daphnia pulex</i>]
WTH001.0005.G19.r	83	1E-45 ubiquinol-cytochrome-c reductase (EC 1.10.2.2) cytochrome b - <i>Daphnia pulex</i> mitochondrion>gp:AF117817_12 [AF117817] gi:4
WTH001.0001.B03.r	63	1E-29 Trypsin I (EC 3.4.21.4).>sp:TRYP.ASTFL Trypsin I (EC 3.4.21.4).>pir:TRCY1 trypsin (EC 3.4.21.4) I - broad-fingered crayf
WTH001.0009.D08.r	54	-
WTH001.0012.G21.r	47	4E-73 hemoglobin - <i>Daphnia magna</i> >gp:AB021134_1 [AB021134] gi:4589706 hemoglobin [<i>Daphnia magna</i>]>gp:AB021137_1 [AB021137] c
WTH001.0001.D14.r	44	6E-24 collagenase 1 - <i>Uca pugnator</i> (Atlantic sand fiddler crab)>gp:UPU49931_1 [U49931] gi:1314481 serine collagenase 1 precu
WTH001.0005.N13.r	41	1E-16 myosin light chain 2 - fruit fly (<i>Drosophila melanogaster</i>)>prf:1203346A myosin L2 - <i>Drosophila melanogaster</i> >prf:130
WTH001.0007.C17.r	40	5E-33 [AJ583519] gi:35208833 beta-1,3-glucan binding protein [<i>Homarus gammarus</i>]
WTH001.0007.C17.r	40	5E-33 [AJ583519] gi:35208833 beta-1,3-glucan binding protein [<i>Homarus gammarus</i>]
WTH001.0011.J13.r	39	7E-51 NADH2 dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain 4 - <i>Daphnia pulex</i> mitochondrion>gp:AF117817_9 [AF117817] gi:4927678
WTH001.0009.N09.r	34	5E-88 hemoglobin - <i>Daphnia magna</i> >gp:AB021134_3 [AB021134] gi:4589708 hemoglobin [<i>Daphnia magna</i>]>gp:AB021136_1 [AB021136] c
WTH001.0004.F12.r	34	3E-05 [AB051391] gi:25006237 GM2 activator protein [<i>Rattus norvegicus</i>]
WTH001.0007.L07.r	29	-
WTH001.0009.N05.r	26	2E-52 NADH2 dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain 1 - <i>Daphnia pulex</i> mitochondrion>gp:AF117817_13 [AF117817] gi:4927682
WTH001.0007.A20.r	24	2E-06 [BC061262] gi:38174689 Unknown (protein for MGC:75694) [Silurana tropicalis]
WTH001.0006.H08.r	11	2E-30 retinol dehydrogenase - <i>Spodoptera frugiperda</i> (fall armyworm)>gp:SFU28654_1 [U28654] gi:1403598 retinol dehydratase [Spo
WTH001.0001.F09.r	10	8E-51 [AF164152] gi:5690416 ribosomal protein L8 [<i>Anopheles gambiae</i>]
WTH001.0005.K19.r	10	3E-33 Carboxypeptidase A1 precursor (EC 3.4.17.1).>prf:2509364A carboxypeptidase A1 - <i>Sus scrofa domestica</i> (domestic pig)
WTH001.0006.G13.r	10	1E-25 [AF486488] gi:27373057 trypsin [<i>Aplysina fistularis</i>]
IGU001.0016.H07.r	7	-
WTH001.0003.P01.r	7	-
WTH001.0006.M17.r	7	2E-33 [AF077609] gi:4322274 glutathione S-transferase [<i>Boophilus microplus</i>]
WTH001.0007.D04.r	7	1E-18 ornithine decarboxylase antizyme - African clawed frog>prf:2113204A Orn decarboxylase antizyme - <i>Xenopus laevis</i> (Af
WTH001.0005.A09.r	7	8E-16 [AE003805] gi:7302862 CG6472-PA [<i>Drosophila melanogaster</i>]
WTH001.0007.G21.r	3	-
WTH001.0007.P07.r	3	-
WTH001.0012.F14.r	3	6E-25 diazepam-binding inhibitor - laughing frog>prf:2016506A diazepam-binding inhibitor - <i>Rana ridibunda</i> (laughing frog)>gp:
IGU001.0018.H04.r	2	-
WTH001.0013.D24.r	2	-
IGU001.0033.C01.r	2	-
WTH001.0006.B03.r	2	-
WTH001.0007.M07.r	2	1E-58 [AY278948] gi:37654720 proteasome alpha 4 subunit [<i>Branchiostoma belcheri</i> tsingtaunese]
WTH001.0009.M08.r	2	4E-19 NADPH-cytochrome P450 reductase (EC 1.6.2.4) (CPR) (P45OR).>sp:NCPR_MUSDO NADPH-cytochrome P450 reductase (EC 1.
IGU001.0006.A03.r	1	2E-66 [AF070548] gi:3387911 2-oxoglutarate carrier protein [<i>Homo sapiens</i>]>gp:BC006508_1 [BC006508] gi:13676350 Unknown (prote
IGU001.0007.F02.r	1	2E-15 [BC044152] gi:28278316 Similar to nucleosome assembly protein 1-like 1 [<i>Danio rerio</i>]>gpc:BC044152_1 [BC044152] gi:28278
IGU001.0007.F03.r	1	-
IGU001.0007.G07.r	1	-
IGU001.0008.F06.r	1	4E-22 [BC045516] gi:28278019 Similar to RIKEN cDNA 9930035G10 gene [<i>Danio rerio</i>]>gpc:BC045516_1 [BC045516] gi:28278019 Sim
IGU001.0009.B11.r	1	-
IGU001.0010.A04.r	1	1E-05 Guanine nucleotide-binding protein gamma-1 subunit.>sp:GBG1_DROME Guanine nucleotide-binding protein gamma-1 subunit.>p
IGU001.0010.A11.r	1	2E-21 [AL117345] gi:8218102 dJ416F21.1 (phosphodiesterase 10A) [<i>Homo sapiens</i>]
IGU001.0011.A03.r	1	1E-04 [AF435075] gi:16798648 cuticular protein [<i>Myzus persicae</i>]
IGU001.0012.A05.r	1	-
IGU001.0013.D04.r	1	-
IGU001.0017.D11.r	1	-
IGU001.0017.F10.r	1	2E-20 Ubiquitin-protein ligase E3A (EC 6.3.2.-) (Oncogenic protein- associated protein E6-AP).
IGU001.0018.C02.r	1	1E-27 [AF274877] gi:14578846 Ah receptor interacting protein [<i>Danio rerio</i>]
IGU001.0018.E07.r	1	-
IGU001.0018.F07.r	1	-
IGU001.0019.A04.r	1	-
IGU001.0021.B06.r	1	5E-04 [BC045936] gi:28278449 Similar to heme binding protein 2 [<i>Danio rerio</i>]>gpc:BC045936_1 [BC045936] gi:28278449 Similar t
IGU001.0022.A08.r	1	4E-75 calmodulin - <i>Drosophila melanogaster</i>
IGU001.0022.E05.r	1	-
IGU001.0024.G01.r	1	1E-25 Elongation factor 1-beta'.
IGU001.0026.B08.r	1	2E-05 [BC045894] gi:28279669 Similar to ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9) isofor
IGU001.0027.D09.r	1	1E-31 [AF077609] gi:4322274 glutathione S-transferase [<i>Boophilus microplus</i>]
IGU001.0028.D09.r	1	0.017 protein C45G9.11 [Imported] - <i>Caenorhabditis elegans</i>
IGU001.0028.H04.r	1	-
IGU001.0029.G02.r	1	3E-10 [AE003723] gi:23171661 CG7697-PA [<i>Drosophila melanogaster</i>]>gp:AF170082_1 [AF170082] gi:5713194 cleavage stimulation fac
IGU001.0030.E10.r	1	2E-25 chitinase (EC 3.2.1.14) - yellow fever mosquito>gp:AF026492_1 [AF026492] gi:2564721 chitinase [<i>Aedes aegypti</i>]
IGU001.0034.B12.r	1	7E-28 DNA-directed RNA polymerase II 7.6 kDa polypeptide (EC 2.7.7.6) (RPB10) (RPB7.6).>sp:RPBX_DROME DNA-directed RNA polymer
IGU001.0034.D01.r	1	0.003 Venom allergen 5 (Antigen 5) (Ag5) (Allergen Dol a 5) (Dol a V).>sp:VA5_DOLAR Venom allergen 5 (Antigen 5) (Ag5) (Allerg
IGU001.0034.D03.r	1	0.003 [AY231654] gi:38047549 similar to <i>Drosophila melanogaster</i> TpnC47D [<i>Drosophila yakuba</i>]
IGU001.0037.B03.r	1	9E-31 Vacuolar ATP synthase subunit E (EC 3.6.3.14) (V-ATPase E subunit) (Vacuolar proton pump E subunit) (V-ATPase 28 kDa sub
IGU001.0039.G12.r	1	1E-06 Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa (EC 6.3.2.19) (Ubiquitin-protein ligase) (Ubiquitin carrier protein) (Effete prot
IGU001.0040.G01.r	1	-
IGU001.0041.E03.r	1	2E-17 Selenoprotein M precursor (SelM protein).>sp:SELM_MOUSE Selenoprotein M precursor (SelM protein).
IGU001.0045.F09.r	1	4E-20 [AB081843] gi:19698255 cathepsin L-like [Engraulis japonicus]
IGU001.0046.C04.r	1	-
IGU001.0049.A12.r	1	2E-09 C-ETS-2 protein.>pir:TVCHE2 transcription factor ets-2 - chicken>prf:1405230A c-ets2 gene - <i>Gallus gallus</i> (chicken)
IGU001.0049.E03.r	1	2E-04 Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 precursor (Flamingo homolog 1) (hFmi1) (Multiple epidermal growth factor-I
IGU001.0049.F02.r	1	2E-22 [AF484414] gi:33320668 cytochrome P450 CYP314a1 [<i>Drosophila melanogaster</i>]
IGU001.0051.B08.r	1	-
IGU001.0051.C04.r	1	5E-18 protein kinase (EC 2.7.1.37), cAMP-dependent, type I regulatory chain - California sea hare>gp:ACN4PKA_1 [X62382] gi:558
IGU001.0051.F11.r	1	9E-17 [BC000004] gi:12652533 Unknown (protein for MGC:2637) [<i>Homo sapiens</i>]
IGU001.0051.H02.r	1	5E-11 [AY194225] gi:28195649 kynurenine monooxygenase [<i>Aedes aegypti</i>]
IGU001.0053.A11.r	1	-
IGU001.0054.B06.r	1	-
IGU001.0054.F11.r	1	7E-31 Lysosomal aspartic protease precursor (EC 3.4.23.-).>pir:A45117 aspartic proteinase (EC 3.4.23.-), lysosomal - yellow fe
WTH001.0001.A20.r	1	1E-49 [AF100743] gi:5138999 NADH-Ubiquinone reductase [<i>Homo sapiens</i>]
WTH001.0001.B04.r	1	2E-05 [AE003817] gi:7303275 CG6305-PA [<i>Drosophila melanogaster</i>]>gp:AY060758_1 [AY060758] gi:16768174 GH20904p [<i>Drosophila r</i>
WTH001.0001.D10.r	1	1E-44 [AE003585] gi:22945470 CG17654-PA [<i>Drosophila melanogaster</i>]
WTH001.0001.D22.r	1	-
WTH001.0001.E05.r	1	1E-16 Carboxypeptidase B (EC 3.4.17.2).>pir:CPCYB carboxypeptidase B (EC 3.4.17.2) - broad-fingered crayfish>prf:1004229A
WTH001.0001.F20.r	1	-
WTH001.0001.F20.r	1	-
WTH001.0001.I07.r	1	-
WTH001.0001.O03.r	1	-

WTH001.0001.P16.r 1 0.009 [AF277452] gi:11320978 Pkd1 [Rattus norvegicus]
WTH001.0002.E24.r 1 2E-13 [AY034137] gi:16073616 aldehyde dehydrogenase [Rattus norvegicus]
WTH001.0002.H24.r 1 -
WTH001.0002.K18.r 1 0.018 Putative extracellular sulfatase Sulf-1 homolog precursor (EC 3.1.6.-) (CeSulf-1)->pir:T16584 hypothetical protein K09C4
WTH001.0002.L17.r 1 0.003 alphaP integrin - sea urchin (Strongylocentrotus purpuratus)->gp:AF177914_1 [AF177914] gi:5911264 alphaP integrin precu
WTH001.0003.C16.r 1 3E-62 activated protein kinase C receptor RACK1 - rat-prf:2004461A protein kinase C receptor - Rattus norvegicus (Norway
WTH001.0003.F11.r 1 2E-24 collagenase 1 - Uca pugilator (Atlantic sand fiddler crab)->gp:UPU49931_1 [U49931] gi:1314481 serine collagenase 1 precu
WTH001.0003.F12.r 1 9E-10 [AF353357] gi:17252684 opsin [Skogsbergia lernerii]
WTH001.0003.M07.r 1 -
WTH001.0003.N02.r 1 -
WTH001.0004.C10.r 1 8E-45 [M61850] gi:187053 lactase phlorizinhydrolase [Homo sapiens]
WTH001.0004.D24.r 1 -
WTH001.0004.I16.r 1 1E-57 Tubulin alpha chain->pir:S52152 tubulin alpha chain - silkworm-prf:2408297A tubulin:SUBUNIT=alpha - Bombyx mori (si
WTH001.0004.I16.r 1 1E-57 Tubulin alpha chain->pir:S52152 tubulin alpha chain - silkworm-prf:2408297A tubulin:SUBUNIT=alpha - Bombyx mori (si
WTH001.0004.K15.r 1 -
WTH001.0004.M07.r 1 2E-80 Dihydropolipamide dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.8.1.4).>sp:DLDH_PIG Dihydropolipamide dehydrogenase, mitoch
WTH001.0004.M08.r 1 -
WTH001.0004.N12.r 1 2E-53 [AY032658] gi:15418786 iron regulatory protein 1 [Manduca sexta]
WTH001.0004.O05.r 1 -
WTH001.0004.O20.r 1 -
WTH001.0005.A17.r 1 -
WTH001.0005.G13.r 1 4E-48 [AE003839] gi:7304149 CG1548-PA [Drosophila melanogaster]->gp:AF220040_1 [AF220040] gi:6685167 cathepsin D precursor [D
WTH001.0005.H09.r 1 -
WTH001.0005.K15.r 1 -
WTH001.0005.N11.r 1 1E-41 [AY278950] gi:37654724 adenosylhomocysteinase [Branchiostoma belcheri tsingtaunense]
WTH001.0005.O07.r 1 2E-10 [AF137068] gi:6492289 cubilin [Canis familiaris]
WTH001.0005.O09.r 1 2E-72 Dihydropolipamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial precursor (EC 2.3.
WTH001.0005.O18.r 1 6E-20 Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A)->gp:AF109730_1 [AF109730] gi:6469515 translation initiation factor
WTH001.0005.O23.r 1 -
WTH001.0005.P19.r 1 -
WTH001.0006.B07.r 1 5E-43 ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14) (Protein bellwether)->sp:ATPA_DROME ATP synthase alpha c
WTH001.0006.B13.r 1 -
WTH001.0006.C18.r 1 2E-71 [AY342000] gi:37498964 receptor for activated protein kinase C [Oreochromis mossambicus]
WTH001.0006.H19.r 1 6E-05 [D50464] gi:1747306 SDR2 gene product [Mus musculus]
WTH001.0006.I19.r 1 -
WTH001.0006.J17.r 1 -
WTH001.0006.K07.r 1 5E-53 Probable acyl-CoA dehydrogenase, medium-chain specific, mitochondrial precursor (EC 1.3.99.3) (MCAD)->sp:ACDM_DROME Pro
WTH001.0006.M08.r 1 3E-42 [AB087268] gi:23503514 Cu,Zn-superoxide dismutase [Hylobates lar]
WTH001.0006.M15.r 1 -
WTH001.0006.N05.r 1 2E-08 G2/mitotic-specific cyclin B->gp:CVRNACYCB 1 [X90984] gi:984661 cyclin B gene product [Chlorohydra viridissima]
WTH001.0006.N23.r 1 7E-04 [BC015368] gi:34782981 DCP1B protein [Homo sapiens]
WTH001.0007.A07.r 1 9E-12 [AE003542] gi:7294614 CG6811-PA [Drosophila melanogaster]->gp:AY069311_1 [AY069311] gi:17861958 LD02491p [Drosophila n
WTH001.0007.B03.r 1 4E-45 [AE003464] gi:21626770 CG3683-PA [Drosophila melanogaster]->gp:AE003464_68 [AE003464] gi:21626771 CG3683-PB [Drosopi
WTH001.0007.F03.r 1 -
WTH001.0007.G13.r 1 1E-06 post-ecdysial adult protein - Tenebrio molitor (yellow mealworm)->gp:TMLPCP29_1 [AJ000044] gi:2275132 cuticular protein [T
WTH001.0007.G16.r 1 4E-11 Cystathionine beta-synthase (EC 4.2.1.22) (Serine sulphydrase) (Beta-thionase)->sp:CBS_HUMAN Cystathionine beta-synthase
WTH001.0007.G17.r 1 4E-05 CUB and sushi multiple domains protein 3 precursor.
WTH001.0007.I01.r 1 -
WTH001.0007.I16.r 1 1E-12 [AF453743] gi:21908024 proton/amino acid transporter 1 [Mus musculus]
WTH001.0007.J05.r 1 -
WTH001.0007.J18.r 1 -
WTH001.0007.K13.r 1 8E-38 [Y11314] gi:1854503 glutamate dehydrogenase (NAD(P)+) [Drosophila melanogaster]
WTH001.0007.M05.r 1 -
WTH001.0007.M06.r 1 1E-04 [U61948] gi:14550353 Hypothetical protein C46A5.4 [Caenorhabditis elegans]
WTH001.0007.M17.r 1 -
WTH001.0007.N14.r 1 1E-30 MCM7 gene - Drosophila melanogaster->gp:AE003554_43 [AE003554] gi:7295030 CG4978-PA [Drosophila melanogaster]->gp:AF12
WTH001.0007.P18.r 1 -
WTH001.0009.A04.r 1 0.01 exoskeletal protein:ISOTYPE=HaCP18.8 - Homarus americanus (American lobster)
WTH001.0009.A20.r 1 2E-07 Putative ankyrin-repeat protein FVP115->gp:AF198100_115 [AF198100] gi:7271613 ORF FVP115 Ankyrin repeat gene family pro
WTH001.0009.B21.r 1 5E-16 CDK5 regulatory subunit associated protein 3 (CDK5 activator-binding protein C53) (HSF-27 protein) (MSTP016) (PP1553)->g
WTH001.0009.B24.r 1 3E-09 Transitional endoplasmic reticulum ATPase homolog 2 (p97/CDC48 homolog 2)->sp:TER2_CAEEL Transitional endoplasmic reticu
WTH001.0009.C07.r 1 1E-07 [AJ517411] gi:29329817 vitellogenin precursor [Apis mellifera]
WTH001.0009.C20.r 1 2E-58 [AE003451] gi:7291184 CG32672-PA [Drosophila melanogaster]->gp:AY122152_1 [AY122152] gi:21483378 LD05816p [Drosophila
WTH001.0009.F13.r 1 -
WTH001.0009.G21.r 1 1E-29 hypothetical protein C50B6.7 - Caenorhabditis elegans->gp:CEC50B6_7 [Z81050] gi:3875058 Hypothetical protein C50B6.7 [Ca
WTH001.0009.J15.r 1 3E-12 [AF284840] gi:15076929 gamma-interferon inducible lysosomal thiol reductase [Amblyomma americanum]
WTH001.0009.L17.r 1 -
WTH001.0009.L24.r 1 6E-08 [AK088267] gi:26353234 Mus musculus 2 days neonate thymus thymic cells cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:
WTH001.0009.M10.r 1 2E-07 [AY195856] gi:28274854 ankyrin repeat protein E4.8 [synthetic construct]->gpc:AY195856_1 [AY195856] gi:28274854 ankyrin
WTH001.0009.M15.r 1 1E-22 [AY391418] gi:37362204 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5 [Danio rerio]
WTH001.0009.P15.r 1 -
WTH001.0010.B11.r 1 3E-22 [AE003681] gi:7299110 CG11964-PA [Drosophila melanogaster]->gp:AY051943_1 [AY051943] gi:15292197 LD41978p [Drosophila
WTH001.0010.C05.r 1 -
WTH001.0010.D05.r 1 2E-20 Alcohol dehydrogenase class III (EC 1.1.1.1) (Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase) (EC 1.2.1.1) (FDH)->sp:A
WTH001.0010.D16.r 1 4E-16 Putative serine/threonine-protein kinase C41C4.4 in chromosome II precursor (EC 2.7.1.-)->pir:T19874 hypothetical protei
WTH001.0010.H08.r 1 2E-44 aldolase:ISOTYPE=A - Xenopus laevis (African clawed frog)->gp:AB002267_1 [AB002267] gi:1944025 aldolase [Xenopus laevis]>
WTH001.0010.I15.r 1 1E-26 [AB038695] gi:8176557 heart fatty acid binding protein [Anguilla japonica]->gp:AB039665S2_1 [AB039666] gi:8176561 heart
WTH001.0010.I20.r 1 5E-35 Cytochrome P450 17A1 (EC 1.14.99.9) (CYPXVII) (P450-C17) (P450c17) (Steroid 17-alpha-hydroxylase/17,20 lyase)->sp:CPT7_C
WTH001.0010.K22.r 1 4E-62 [AE003462] gi:21626717 CG3195-PA [Drosophila melanogaster]->gp:AE003462_115 [AE003462] gi:21626718 CG3195-PB [Drosopi
WTH001.0010.L17.r 1 -
WTH001.0010.M02.r 1 -
WTH001.0010.M23.r 1 4E-15 cellular nucleic acid-binding protein - Gallus gallus (chicken)->gp:AF035676_1 [AF035676] gi:2665788 cellular nucleic aci
WTH001.0010.O18.r 1 6E-26 [AJ010150] gi:5725367 carnitine palmitoyltransferase I [Drosophila melanogaster]
WTH001.0011.F03.r 1 9E-39 [AF165113] gi:6636407 membrane import protein [Drosophila melanogaster]
WTH001.0011.J24.r 1 -
WTH001.0012.B10.r 1 1E-16 cuticle structural protein PCP16.7, post-ecdysial - yellow mealworm-prf:2421326B cuticular protein:ISOTYPE=TmPCP16.
WTH001.0012.B10.r 1 1E-16 cuticle structural protein PCP16.7, post-ecdysial - yellow mealworm-prf:2421326B cuticular protein:ISOTYPE=TmPCP16.
WTH001.0012.B12.r 1 -
WTH001.0012.D08.r 1 -
WTH001.0012.E19.r 1 6E-22 [AJ271365] gi:18413497 endo-1,4-mannanase [Mytilus edulis]
WTH001.0012.F04.r 1 0.007 hypothetical protein T10E10.2 - Caenorhabditis elegans
WTH001.0012.F08.r 1 5E-19 [AF224720] gi:7021482 secretory carrier membrane protein [Drosophila melanogaster]
WTH001.0012.F10.r 1 -
WTH001.0012.J07.r 1 4E-18 SEC14-like protein 3 (Tocopherol-associated protein 2)->gp:AC004832_3 [AC004832] gi:6624132 WUGSC:H_DJ0539M06.3 gene p
WTH001.0012.O13.r 1 -

WTH001_0013_A20.r	1	6E-26	[AF353331] gi:17225632	opsin [Vargula hilgendorffii]
WTH001_0013_B03.r	1	-	-	-
WTH001_0013_B13.r	1	2E-28	[AJ303080] gi:13624645	arrestin [Ascalaphus macaronius]
WTH001_0013_E17.r	1	-	-	-
WTH001_0013_E21.r	1	1E-21	[AF195272] gi:6708213	serine/threonine kinase AIE1 [Mus musculus]
WTH001_0013_G13.r	1	-	-	-
WTH001_0013_G19.r	1	4E-13	[AE003563] gi:7295365	CG12330-PA [Drosophila melanogaster]
WTH001_0013_G22.r	1	8E-38	GABA aminotransferase - Sus scrofa domestica (domestic pig)	
WTH001_0013_H09.r	1	-	-	-
WTH001_0013_H24.r	1	7E-55	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator homolog (dARNT) (Tango protein) (Hypoxia-inducible factor 1 beta).>sp:ARN	
WTH001_0013_J15.r	1	-	-	-
WTH001_0013_J23.r	1	1E-13	cytoplasmic fatty acid-binding protein - Schistosoma japonicum>gp:SCMFABP_1 [L23322] gi:349804	fatty acid binding protei
WTH001_0013_L16.r	1	1E-81	TGF beta-inducible nuclear protein 1 (Hairy cell leukemia protein 1) (HUSSY-29).>gp:AF077615_1 [AF077615] gi:11999092	T
WTH001_0013_M19.r	1	-	-	-
WTH001_0014_B18.r	1	-	-	-
WTH001_0014_B24.r	1	7E-50	G1/S-specific cyclin C.>sp:CG1C_DROME G1/S-specific cyclin C.>pir:A40269	cyclin C - fruit fly (Drosophila melanogaster)>
WTH001_0014_G18.r	1	-	-	-
WTH001_0014_M05.r	1	2E-17	[AY398415] gi:37681941	serine proteinase inhibitor, clade B, member 1 [Danio rerio]
WTH001_0014_M12.r	1	2E-66	hemoglobin - Daphnia magna>gp:AB021134_1 [AB021134] gi:4589706	hemoglobin [Daphnia magna]>gp:AB021137_1 [AB021137] g
WTH001_0014_N03.r	1	-	-	-
WTH001_0014_P19.r	1	0.007	[AE003799] gi:7302614	CG17531-PA [Drosophila melanogaster]

ContigはEST解析におけるリード数(多いほうが発現頻度が高いことを示す。)
Blast検索の結果のe-valueと相同性を有する遺伝子(definition)を記した。

表2 ミジンコの成長と遺伝子発現変化

成長したミジンコで発現の高い遺伝子

倍率変化	E-value	Definition	Organism
23.34	4.00E-30	RE34950p	Drosophila melanogaster
17.80	1.00E-07	vitellogenin precursor	Apis mellifera
13.62	3.00E-03	cubilin	Rattus norvegicus
6.19	2.00E-65	Ras-related protein	Chlamydomonas reinhardtii
5.44	2.00E-11	probable protein kinase	Arabidopsis thaliana
4.54	1.00E-15	diazepam-binding inhibitor	laughing frog
3.52	3.00E-41	glutathione peroxidase	Homo sapiens
3.49	3.00E-11	cyclin B4	Xenopus laevis
2.06	3.00E-82	putative histone deacetylase	Drosophila melanogaster
2.01	7.00E-14	Similar to cyclin B3	Xenopus laevis

未成熟なミジンコで発現の高い遺伝子

倍率変化	E-value	Definition	Organism
5.82	0.003	Cylicin II	bovine
3.73	2.00E-27	P450 CYP4C39	Carcinus maenas
3.42	9.00E-10	opsin	Skogsbergia leneri
2.97	5.00E-05	AhR nuclear translocator-like	Drosophila melanogaster
2.71	3.00E-24	chitinase	yellow fever mosquito
2.56	4.00E-34	Compound eye opsin	Vargula hilgendorffii
2.56	2.00E-32	arrestin	Anopheles gambiae
2.56	8.00E-18	salivary peroxidase	Anopheles albimanus
2.18	4.00E-49	DEAD box polypeptide 5	Danio rerio
2.07	1.00E-16	post-ecdysial adult protein	Tenebrio molitor
2.06	2.00E-13	cytoplasmic fatty acid binding protein	Schistosoma japonicum
2.03	2.00E-15	troponin C	Drosophila melanogaster
2.01	2.00E-49	aspartic protease precursor	yellow fever mosquito

表3 フェノキシカルブで発現が変動する遺伝子

フェノキシカルブで発現が誘導される遺伝子

倍率変化	E-value	Definition	Organism
7.44	2.00E-66	hemoglobin	Daphnia magna
6.58	5.00E-88	hemoglobin	Daphnia magna
3.52	3.00E-24	deoxyribonuclease I	Marsupenaeus japonicus
2.42	1.00E-04	Hypothetical protein	Caenorhabditis elegans

フェノキシカルブで発現が抑制される遺伝子

倍率変化	E-value	Definition	Organism
3.01	-	Unknown	
2.70	1.00E-04	cuticular protein	Myzus persicae
2.56	1.00E-29	hypothetical protein	Caenorhabditis elegans
2.52	7.00E-55	AhR nuclear translocator homolog	Drosophila melanogaster
2.15	4.00E-18	SEC14-like protein 3	Homo sapiens
2.10	-	Unknown	
2.07	1.00E-13	cytoplasmic fatty acid-binding protein	Schistosoma japonicum
2.04	-	Unknown	