

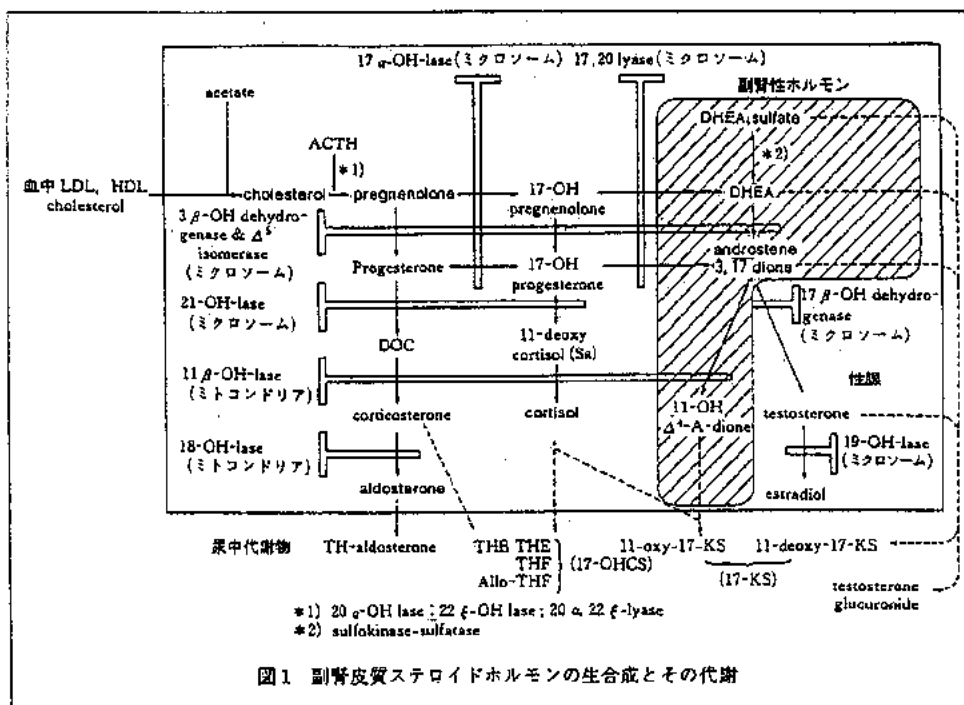


図 3

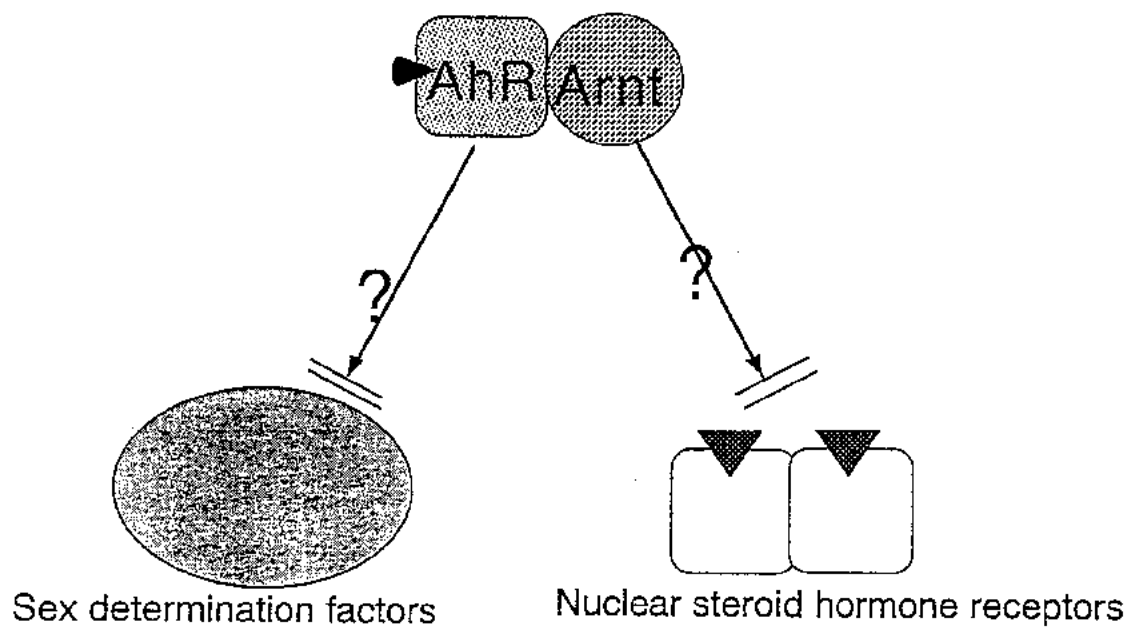


図 4

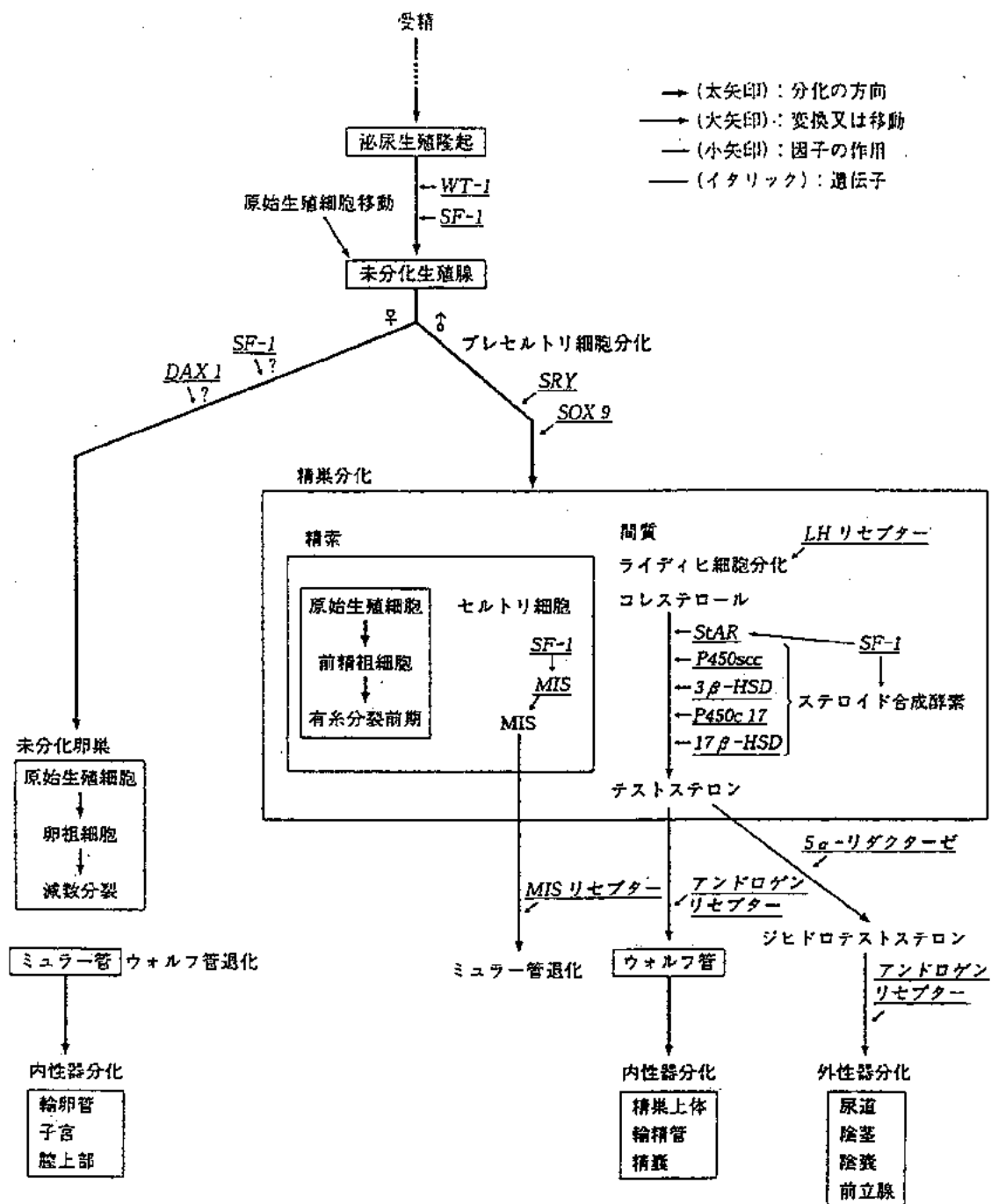


図 5

Table 1. A Proposed Nomenclature for Nuclear Receptors

Subfamily and Group	NR/Gene	Trivial Names	Accession Number
1A	NR1A1	TRa, c-erbA-1, THRA	M24748
	NR1A2	TRb, c-erbA-2, THRB	X04707
1B	NR1B1	RARB	X06536
	NR1B2	RARB, HAP	Y00281
	NR1B3	RARB, RARD	M57707
1C	NR1C1	PPARa	L02932
	NR1C2	PPARb, NUC1, PPARG, FAAR	L07592
	NR1C3	PPARg	L40904
1D	NR1D1	REVERBb, EAR1, EAR2	M24908
	NR1D2	REVERBb, EAR1b, B073, RVR, XZF2	L31785
	NR1D3	E75	X61648
1E	NR1E1	E78, DR-78	U01087
1F	NR1F1	RORa, RZRa	U04697
	NR1F2	RORb, RZRa	Y08839
	NR1F3	RORg, TOR	U18997
	NR1F4	HR3, DHR3, MHR3, GHR3, CNR3, CHR3	M08095
1G	NR1G1	CNR14	U13073
1H	NR1H1	ECR	M74078
	NR1H2	UR, OR-1, NER1, R1P75, LXRb	U07132
	NR1H3	RLD1, LXR, LXRa	U22862
	NR1H4	FXR, R1P4, HRR1	U08416
1I	NR1I1	VDR	J03258
	NR1I2	CNR1, PKR, SKR, BXR	X75183
	NR1I3	MR07, CAR1, CAR2	Z30426
	NR1I4	CAR3, CARb	AF00832
1J	NR1J1	DHAB9	U30792
1K	NR1K1	NHR1	U18360
2A	NR2A1	HNF4	X76930
	NR2A2	HNF4G	Z49928
	NR2A3	HNF4B	Z48827
	NR2A4	DMHF4, HNF4D	U70874
2B	NR2B1	RXRa	X62773
	NR2B2	RXRb, H-2RIBP, RCoR-1	M84820
	NR2B3	RXRg	X68225
	NR2B4	USP, Ultraspicula, ZC1, CF1	X62591
2C	NR2C1	TR2, TR2-11	M28960
	NR2C2	TR4, TAK1	L27588
2D	NR2D1	DIRT8	X36781
2E	NR2E1	TLL, TLX, XTLL	Z22779
	NR2E2	TLL, Tallless	M31639
2F	NR2F1	COUP-TF1, COUP-TFA, EAP3, SVP44	X12795
	NR2F2	COUP-TF1, COUP-TFb, ARP1, SVP40	M84487
	NR2F3	SVP, COUP-TF	M28863
	NR2F4	COUP-TFII, COUP-TFg	X63062
	NR2F5	SVP43	X70300
	NR2F6	EAH2	X12784
3A	NR3A1	EPa	X03835
	NR3A2	EPb	U57459
3B	NR3B1	ERR1, ERRa	M61416
	NR3B2	ERR2, ERRb	X51417
3C	NR3C1	GR	X03225
	NR3C2	MR	M18801
	NR3C3	PR	M15716
	NR3C4	AR	M20132

continued

Table 1. Continued

Subfamily and Group	NR/Gene	Trivial Names	Accession Number
4A	NR4A1	NR1B, TR3, N10, NUR77, NAK1	U13740
	NR4A2	NURR1, NOT, NR11, HZF-3, T10R	X75818
	NR4A3	NOR1, MINOR	U28630
	NR4A4	DHR38, NGR3	U36782
	NR4A1	CNR8, C4805	U13070
5A	NR5A1	SP1, ELP, FTZ-F1, AD4BP	D88155
	NR5A2	LHR1, XFF1A, XFF1B, FLR1, PHR, FTF	U93553
5B	NR6A3	FTZ-F1	M63711
	NR6B1	DHR38, FTZF1B	U66423
	NR6A1	GCNF1, ATR	U14888
	NR6A1	KM1, Knirps	X13331
	NR6A2	KNR1, Knirps related	X14153
6A	NR6A3	EGON, Embryonic gonad, EAGLE	X16831
7B	NR6A4	ODR7	U16708
	NR6A5	Trithorax	M31617
	NR6B1	CAX3, AHCN	574720
	NR6B2	SHF	U78571

Note: subfamilies and groups are defined in the text. The groups contain highly related genes with often paralogous relationship in vertebrates (e.g., RAFA, RARB, and RAR γ). The term isoform is reserved for different gene products originating from the same gene due to alternative promoter usage or splicing, or alternative initiation of translation.

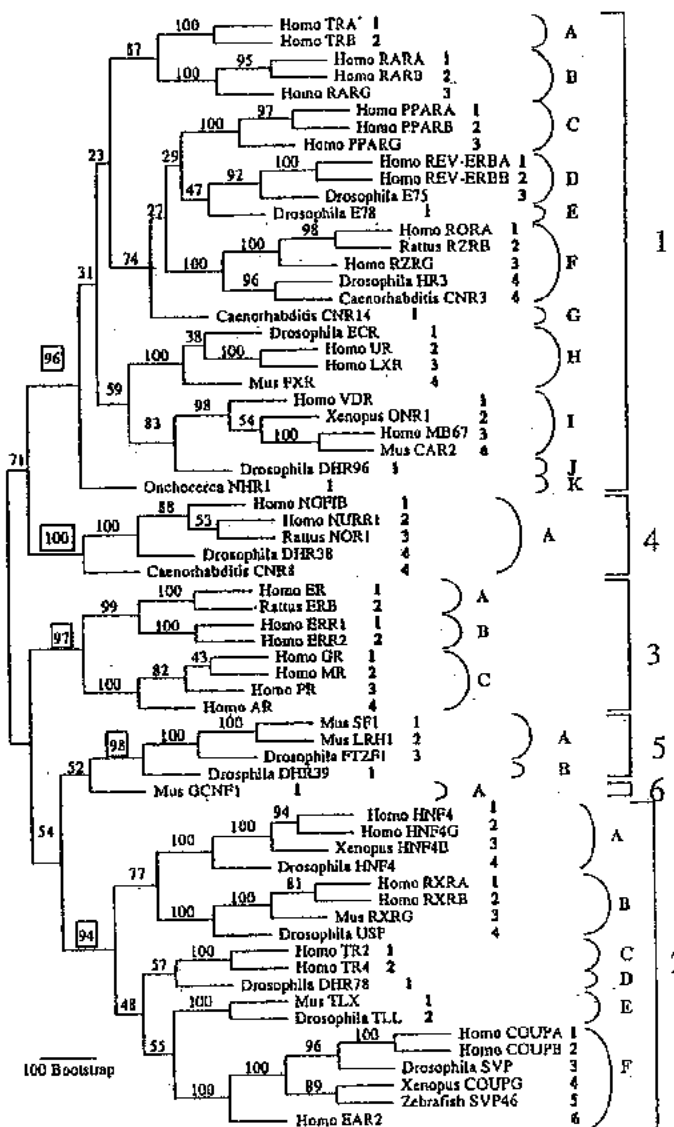
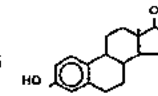
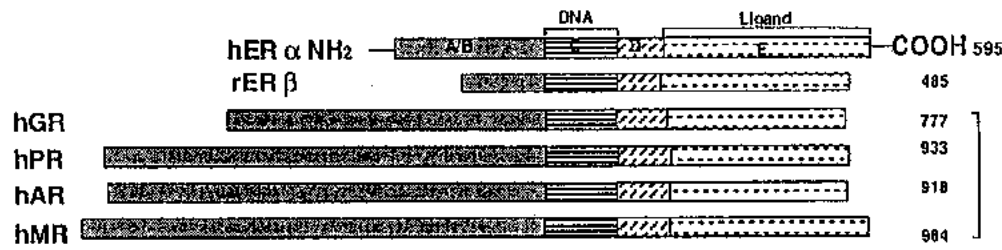


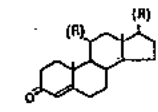
图 6 (A)

图 6 (B)

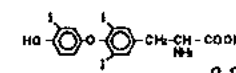
現在までに報告されている核内ステロイドホルモンレセプター群 (A) と分子進化系統樹 (B)



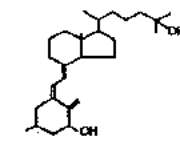
estradiol-17 β



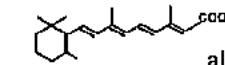
Steroid hormone
 (glucocorticoid, progesterone,
 androgen, mineralocorticoid)



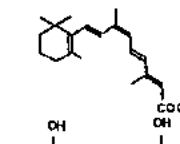
3,3',5-triiodothyronine



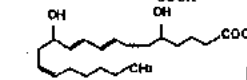
1.25(OH)₂VitaminD₃



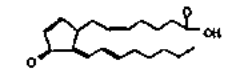
all-trans-retinoic acid



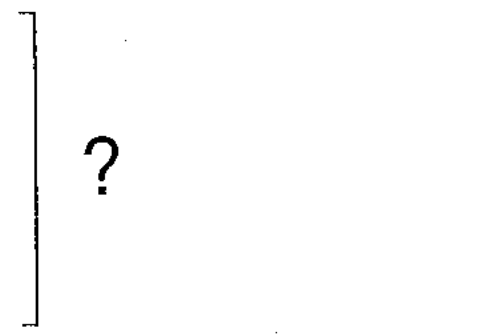
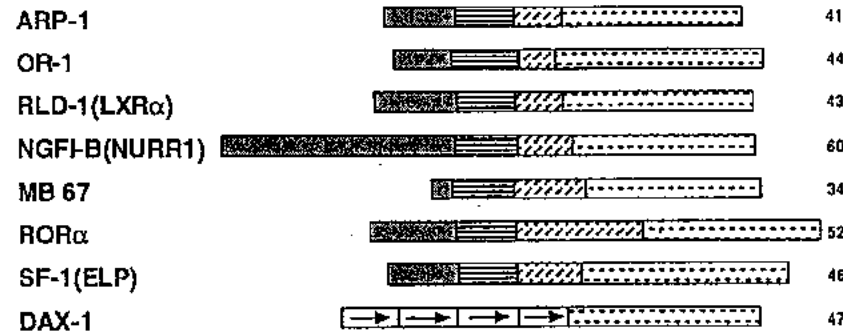
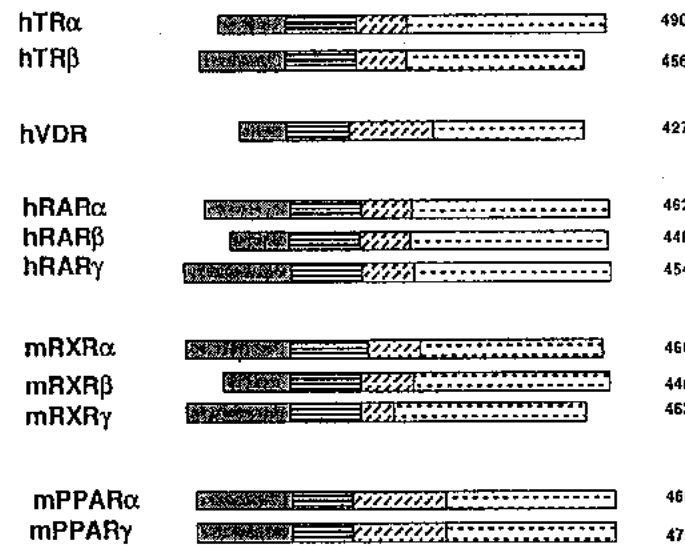
9-cis-retinoic acid



Leukotriene B₄



15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J₂



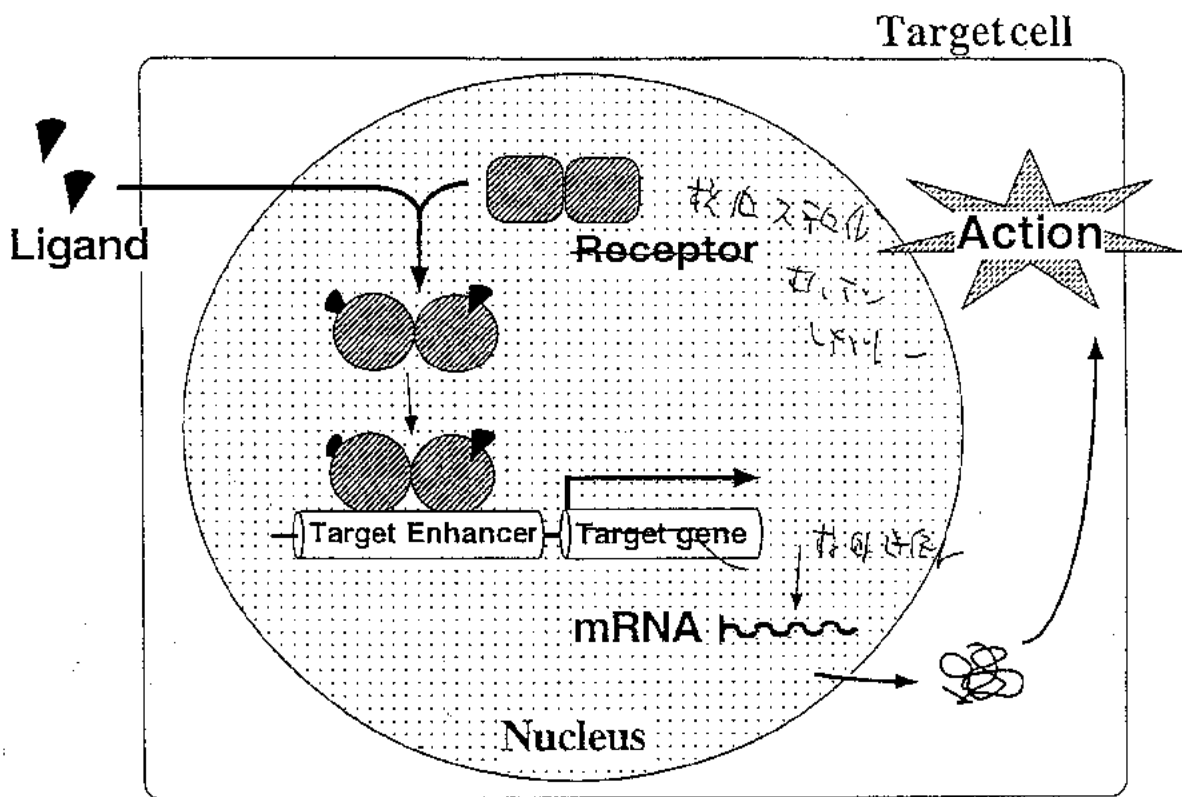


图 8

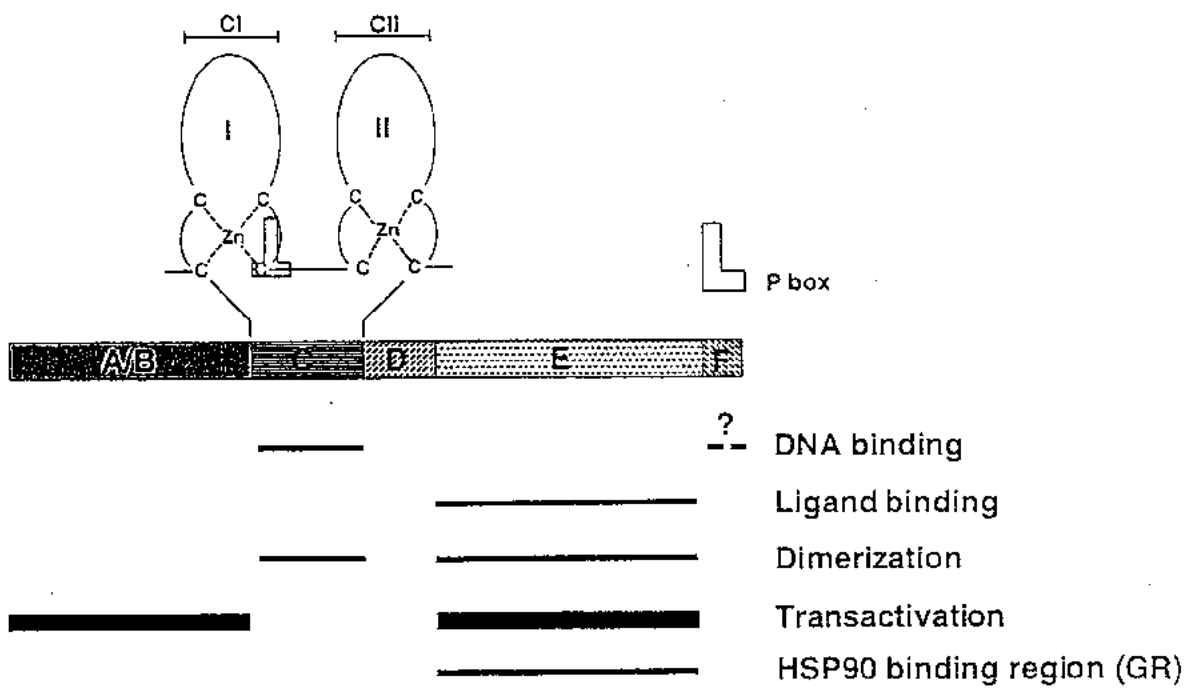


图 9

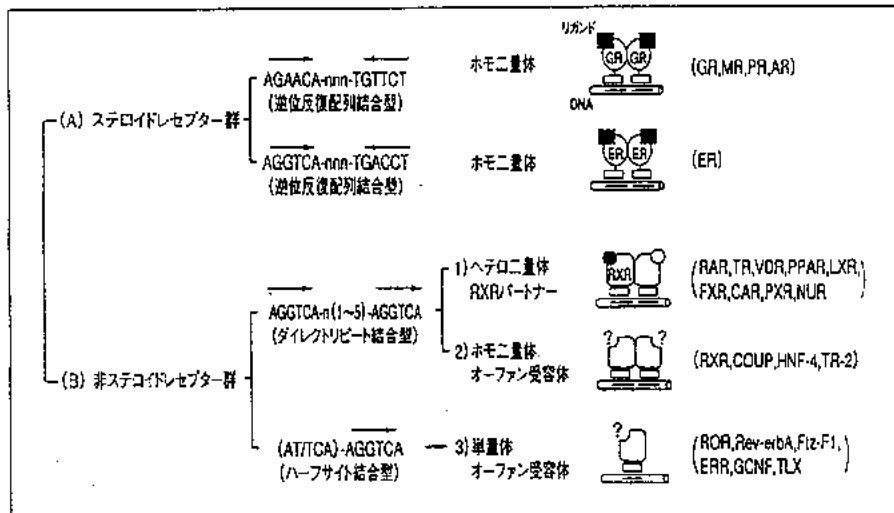


図 10

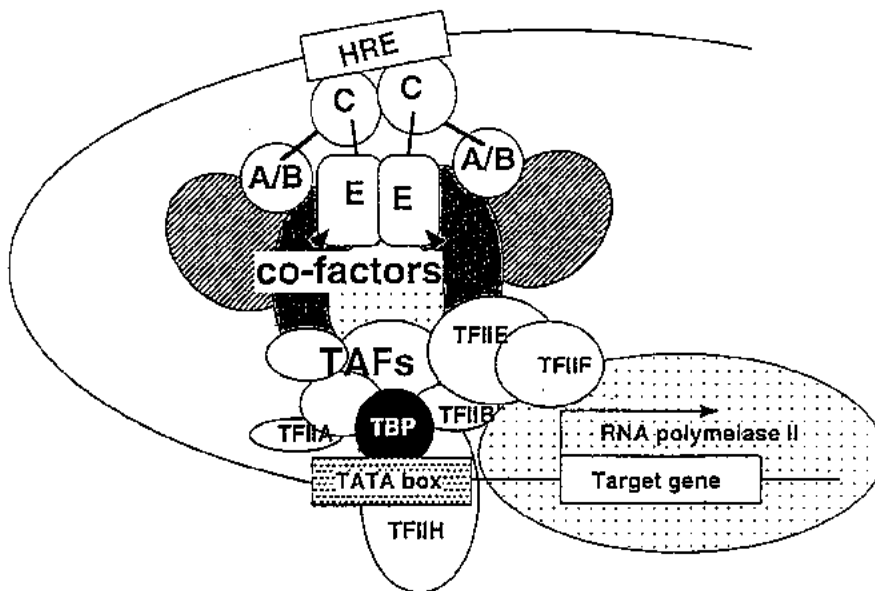


図 11

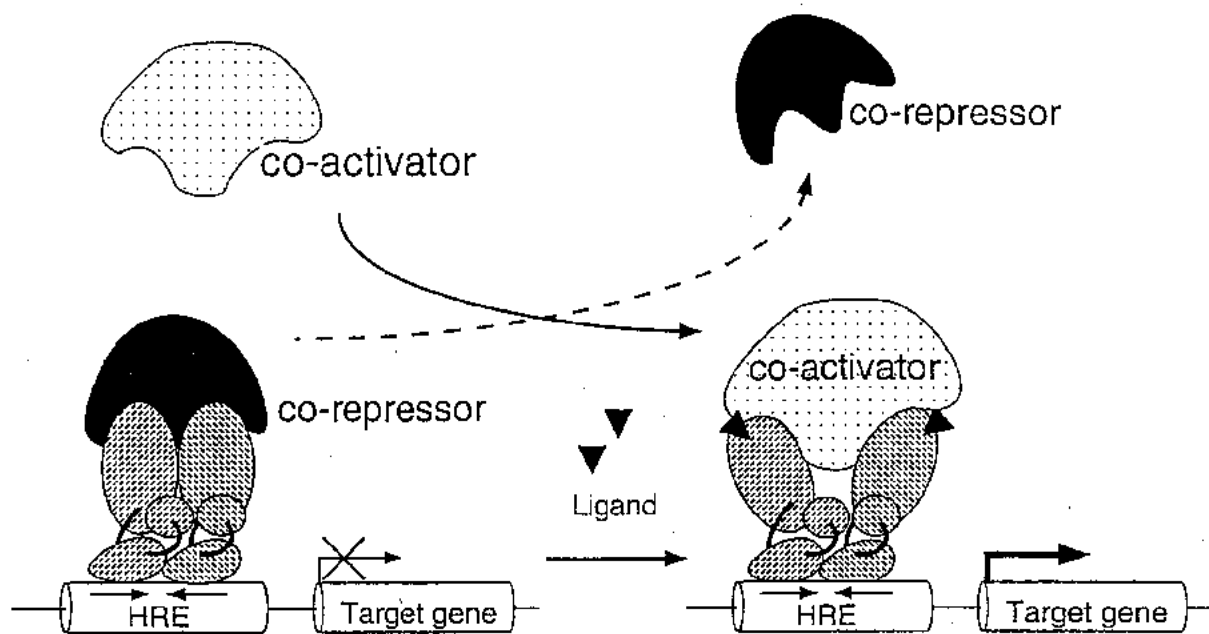


图 1 2

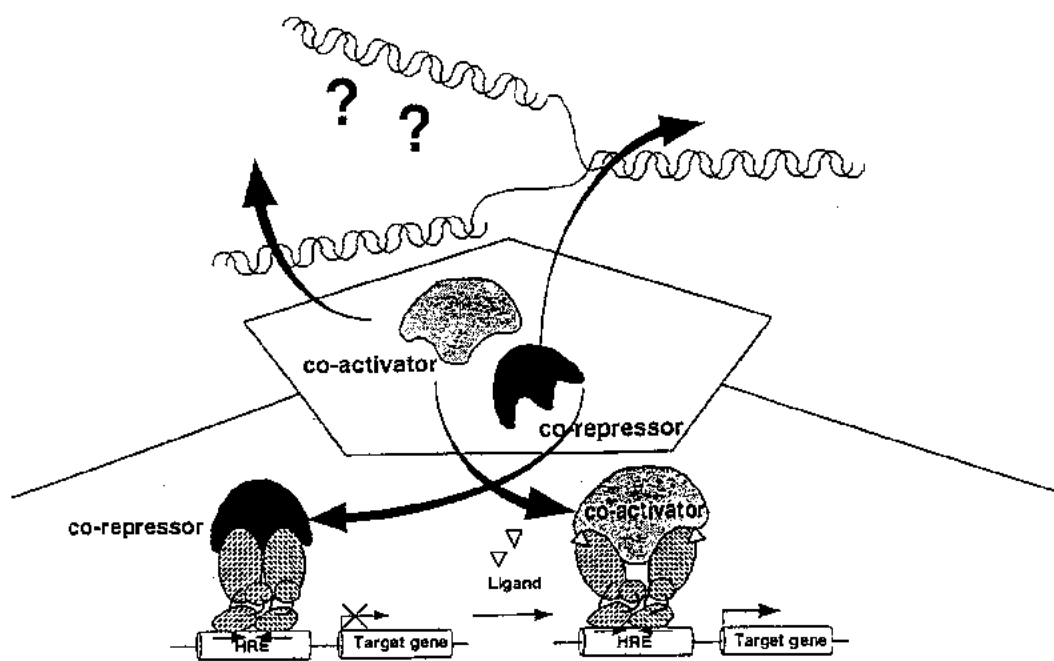
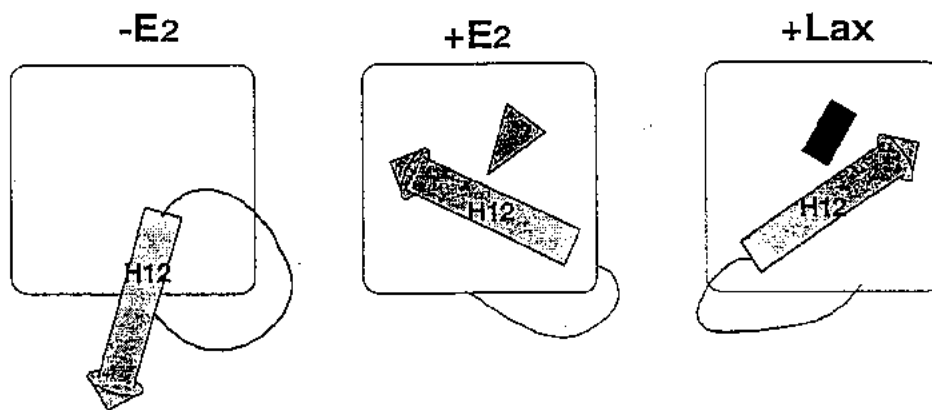
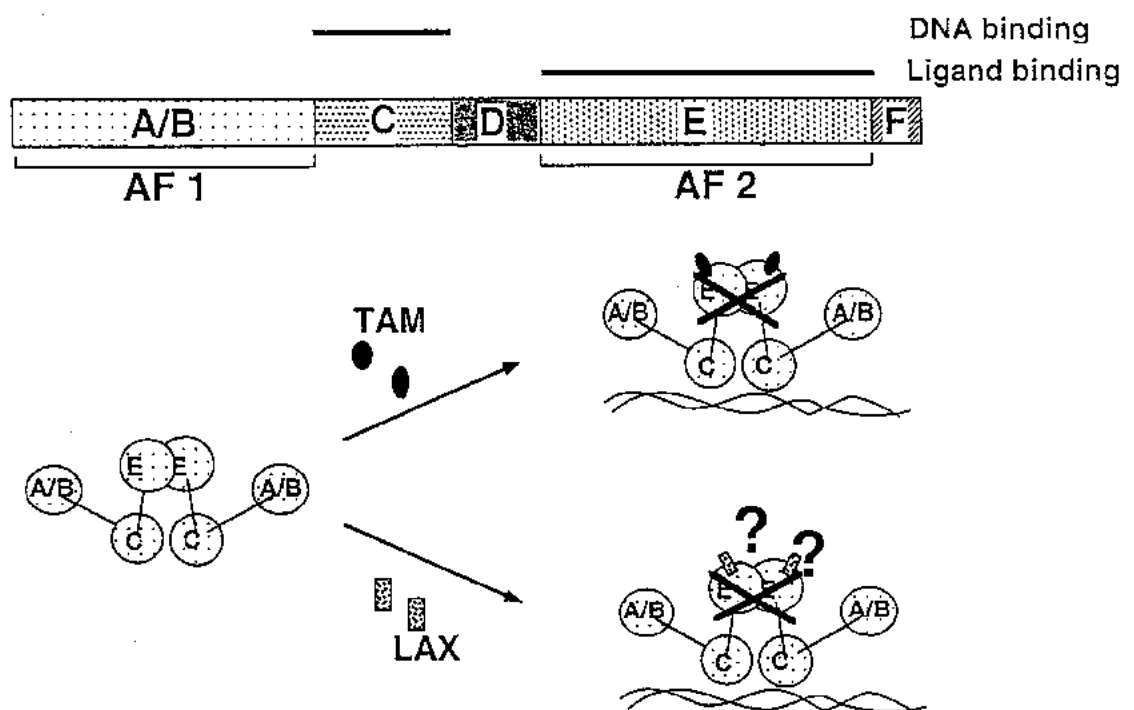


图 1 3



☒ 1 4

ER



☒ 1 5

2. 内分泌攪乱化学物質等の生殖毒性物質と精子形成障害との関連

－生殖細胞死を中心として

長崎大学医学部解剖学第三講座 教授 小路武彦

1. 緒言

環境中に人為的に放出される種々の化学物質が、ヒトを含めた生物の生命活動や生物生態系に深刻な影響を与え始めている。特に、それらの化学物質の多くがエストロゲン作用や抗アンドロゲン作用を有し内分泌生殖毒性を発揮するため種の維持に不可欠である生殖現象に悪影響を及ぼし種の存続に危機感をもたらし始めた。中でも Carlsen 等(92)1)による、最近50年間でヒト精子数が半減しているという報告、更には Sharpe と Skakkebaek(93)2)による、精子数の減少や精巣がんあるいは男性不妊症などの生殖異常の増加が環境中のエストロゲンによるという仮説の発表に伴い、精子形成過程へのそれら外因性内分泌攪乱化学物質の影響が大きく取り上げられるようになった。しかしながら、哺乳類精子形成過程へのそれらいわゆる環境ホルモン或いは種々の内分泌生殖毒性物質の作用機構に関しての細胞生物学的或いは分子細胞学的な詳細な検討は乏しく、多くの記載は現象論であったり多分に推論を含んだ結論となっており、今や因果関係の科学的根拠の提示が必要不可欠と思われる。

我々は、内分泌生殖毒性物質による精子の減少が、生殖細胞死の異常誘導によるものと考え特に能動的・自発的細胞死であるアポトーシスとの関連で検討を進めている。本報告書では、発生過程も含めた齧歯類雄性生殖細胞の細胞死の特性とその検出方法の確立、内分泌系の人為変化に伴う細胞死の変化、種々の内分泌生殖毒性物質投与に伴う生殖細胞死の誘導並びにその分子機序などについて解説し、最終的に内分泌生殖毒性の信頼できる評価系の一つとしての利用法と更に卵子形成過程も取り込み精巣並びに卵巣に対する影響の包括的な評価系の開発への具体的な提言を行いたい。

2. 精子形成過程概要

精巣は、雄性生殖腺として雄性配偶子である精子を産生し、その細胞を丸ごと放出する全分泌型の外分泌腺であると同時に、sex steroidの一つとしてアンドロゲンを産生し分泌する内分泌腺でもある。両分泌腺としての機能は脳下垂体ホルモンとの密接な相互関係により維持されている。哺乳類に於いて精巣は、胎生期に始原生殖細胞(PGC)が精細管に漂着して器官として完成するが、実際に精子産生機能が活性化するのは春期発動期以降である。精子を産生する行程は精子形成過程と呼ばれ、大きく分けて3つの過程に分類される。即ち、出生後 PGC から分化した精原細胞の体細胞分裂による増殖分化過程、精母細胞の減数分裂過程、及び精子細胞の精子への変態過程である。面白いことに、精巣の発生初期段階も含めこれらの様々な過程で生殖細胞の退化消失が認められ、精子の最終生産数に換算すると相当数が失われていることが明らかとなった。例えば、マウスやラットでは精原細胞死等に伴い 25-75%もの精子を失っている計算になり、またヒトに関しても減数分裂前期以降の精母細胞死により約 45%もの精子が消滅している 3)。これらの生殖細胞消滅機構に関しては不明な点が多々あったが、最近になってアポトーシス 4)の関与が指摘されその誘導機構の分子的理解や人為的な操作の可能性が注目を集めている。

3. アポトーシス概要

アポトーシスとは、形態観察に基づいてネクローシスと区別される細胞死の一形態として Kerr 等 (72) (4) によって提案されたものである。歴史的には、ネクローシスは細胞死に伴う細胞形態の変化を意味したことから誤解を避けるため、ネクローシスの代りに 'oncosis' を使用すべきであるという議論もあるが、ここでは最近の慣例に従って以下に定義される細胞死の形態として用いる。ある種のアポトーシスでは、蛋白合成阻害剤シクロヘキシミドによってアポトーシスが阻止されたことから、細胞死に際し新たな蛋白質合成が必要とされたが、シクロヘキシミドでアポトーシスが誘導される場合も報告され一般化は難しい。アポトーシスは核情報に基づいて生じる積極的な能動的な細胞死であると理解されており、特定の遺伝子産物の関与からアポトーシスを定義付ける試みも為されている。しかし現在、細胞種やアポトーシスの誘導原因によって予想以上に多様なアポトーシス形態が存在することが明かとなり、アポトーシスの概念は混沌としている。現段階ではアポトーシスの関与の証明には客観的な多数の傍証を組み合わせることが必要で、最終的には分子基盤での理解と人為的操作の可能性を証明することが重要である 5)。

4. アポトーシス同定法 5)

1) 電顕観察：アポトーシスは、電子顕微鏡による形態学的観察結果から定義されたもので、以下のように特徴付けられる。(1)ネクローシスでは細胞膜の損傷から始まり、ミトコンドリアを始めとする細胞内小器官延いては細胞自身の膨化が生じるのに対し、アポトーシスでは細胞が退縮する。(2)アポトーシスでは核に於いて、クロマチンの凝縮並びに核膜周囲への偏在が生じる。(3)アポトーシスでは核断片や細胞内小器官を含むアポトーシス小体が生じ、周囲の細胞に貪食される。生殖細胞のアポトーシス形態も基本的にはこれらの定義に合致するが、後述するようにアポトーシス過程の中盤からはむしろネクローシスの形態を取るもので厄介である。特に精母細胞のアポトーシス像はユニークで、多くの場合減数分裂前期で生じることと関係しているようである 6)。

更にクロマチンの凝集形態がアポトーシスの誘導方法によって異なる点 7) が指摘されておりこの点も考慮されるべきであろう。

2) 分子組織細胞化学的方法：細胞死に伴う DNA 鎖切断様式に関して、ネクローシスでは一本鎖切断が、アポトーシスでは二本鎖切断が主として生じることが知られている。組織切片上で DNA の一本鎖切断並びに二本鎖切断を細胞個々のレベルで検出するため、DNA の一本鎖切断部位を検出するための *in situ* nick translation⁸⁾ と主として DNA の二本鎖切断部位を検出するための terminal nucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)⁹⁾ が利用されている。

特に、精巣切片では TUNEL がアポトーシス細胞の検出に頻用されており、原理的には TUNEL は一本鎖切断部位も検出し得る 10) ことも知られ、この染色性がアポトーシスの絶対的指標とはなり得ない訳であるが、我々の電子顕微鏡観察の結果と TUNEL 染色の比較結果から、精巣では基本的に TUNEL 陽性細胞はアポトーシスと考えてよさそうである。

3) 生化学的方法：アポトーシスの生化学的特徴として、DNA をアガロース電気泳動により解析すると、DNA の二本鎖切断により約 180-200 塩基対の倍数からなるバンド群 (apoptotic ladder) が出現することが知られる 11)。しかし正常精巣の場合、アポトーシスの頻度は全細胞数に比して極僅かで、更に減数分裂後の精子細胞 DNA には高頻度の一本鎖切断が存在するため 8)