

表 1 4 スチレンの動物への生殖毒性 (1)

literature (country)	year	route	species	exposure		reproductive effects	neurobehavioral effects	neurochemical effects
				level	period			
Ragule (USSR)	1974	inhal.	rat	0-50 mg/m ³ (0-11.8 ppm)		↑:preimplantation death (not statistical) ↑:embryo mortality (11.8 ppm)	(-)	(-)
Vainio (Finland)	1977	incubation	chick	2.5 mg/kg	0-9 days	↑:malformation (7%)	(-)	(-)
Murray (USA)	1978	inhal.	rat	300-600 ppm/7h	6-15	↓:MBW gain, food consumption	(-)	(-)
		gavage	rat	180-300 mg/kg/day	8-15	NE:FBW, number of live fetuss, malformation		
		inhal.	rabbit	300-600 ppm/7h	8-18	NE:FBW, number of live fetuss, malformation		
Kankkasa (Finland)	1980	inhal.	mouse	250 ppm/8h	8-18	↑:resorbing fetus (no litter basis) ↑:malformation (no maternal toxicological data)	(-)	(-)
		inhal.	hamster	300-1000 ppm/6h	6-18	↑:resorbing fetus (no litter basis) NE:malformation (no maternal toxicological data)		
Beliles (USA)	1985	water	rat	0-250 ppm	throughout life time	↓:postnatal survival or growth (F2, F3) NE:malformation	(-)	(-)
Zaidi (India)	1985	gavage	rat	200 mg/kg	0-21 lactation period	NE:number of pups, FBW	↑:amphetamine-induced motor activity ↑:apomorphine-induced stereotypy	↑:number of dopamine receptor NE:affinity of dopamine receptor
Chernoff (USA)	1990	gavage	rat	1147 mg/kg/day	8-15	↓:MBW, anomalies (enlarged renal plexis) NE:resorption, fetal death	(-)	(-)
Khanna (India)	1991	oral	rat	100 mg/kg (low and normal protein)	8-PND22	↓:FBW, brain weight ↓:eye opening, Pinna detachment, fur growth, cliff avoidance, incisor eruption	↓:righting reflex, motor activity	↓:dopamine receptor level, 5HT receptor level ↓:monoamine oxidase, Ha ⁺ , K ⁺ -ATP ase, succinic dehydrogenase

表14 スチレンの動物への生殖毒性(2)

literature (country)	year	route	species	exposure		reproductive effects	neurobehavioral effects	neurochemical effects
				level	period			
Kishi and 1995	1992	inhal.	rat	0-300 ppm/8h	7-21	↓:FBW, PBW NE:MBW, length of gestation, number of offsprings, brain weight	↓:eye opening, incisor, auditory, righting reflex, pivoting, bar holding, rotarod, CRF (learning) ↑:open field, spontaneous activity (300ppm)	↓:5HT, 5HIAA DP, HVA NE:protein content
Brown- Woodman (Australia)	1994	In vitro	rat	1.00 mmol/ml	40h	↓:crownrump length	(-)	(-)
Katakura (M) (Japan)	1999	inhal.	rat	0-300 ppm/6h	8-21	↓:food intake, MBW, Gsp, brain weight (pc) ↑:neonatal death	↓:incisor, eye opening (pc), air righting reflex (pc, ac)	0 day ↓:5HT, HVA (pc, ac) 21st day ↓:5HIAA (cortex, hypo, 300 ppm), 5HIAA/5HT (hypo, 50 and 300 ppm) ↑:5HT (striatum, 50ppm), DA (300ppm)

(-): not studied, NE: no adverse effects

MBW: maternal body weight, FBW: fetal body weight, PBW: pups body weight, 5HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid, DP: dopamine, HVA: homovanillic acid,

5HT: 5-hydroxytryptamine

pc: pair feeding control, ac: ad lib feeding control

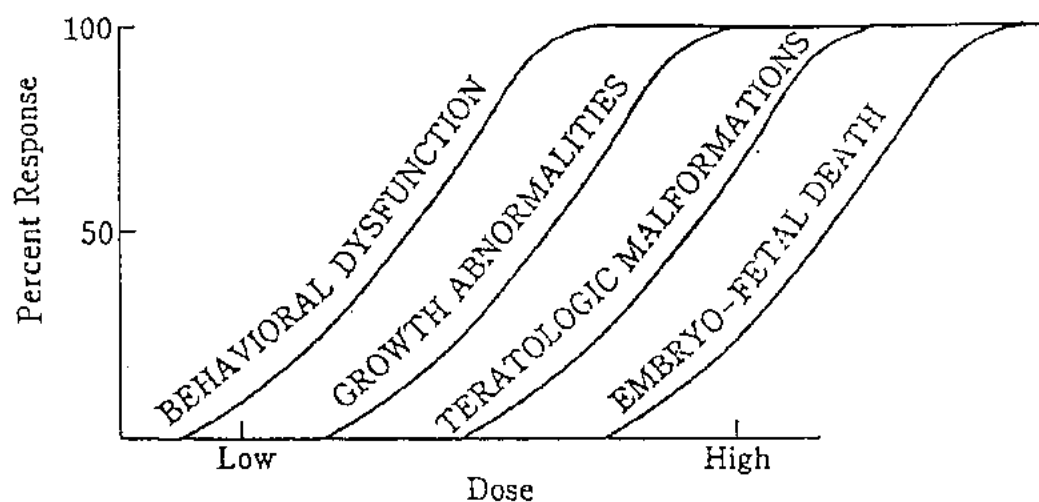


図1 化学物質の用量と各種の継世代的毒性発現の関係

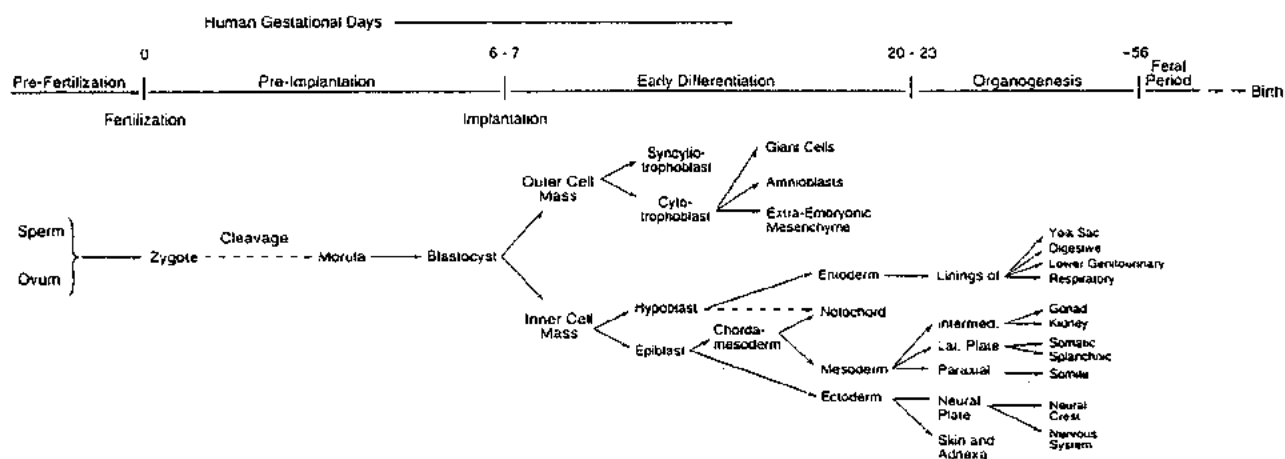


図2 ヒトの初期発生での器官形成

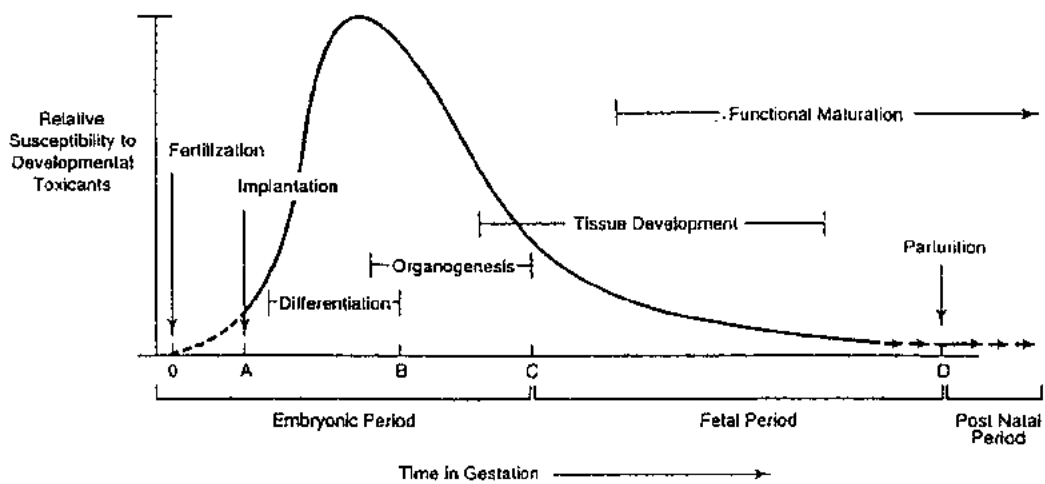


図3 発達毒性の感受性時期

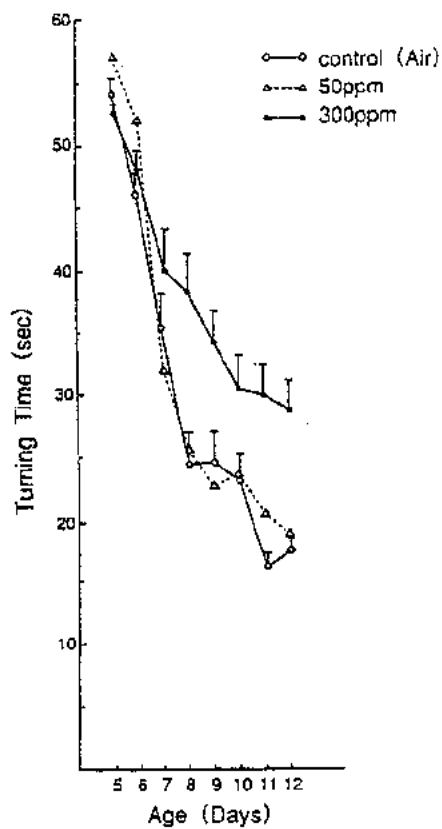


図4 出生5-12日目の仔の平均ヒボッティング時間

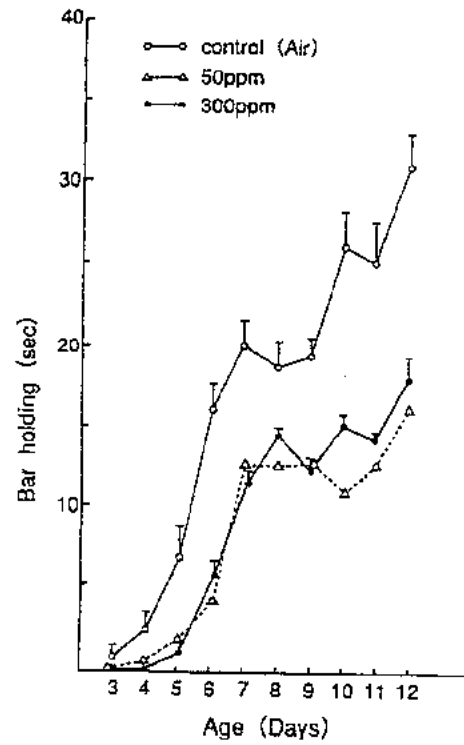


図5 出生3-12日目の仔の平均棒把握時間

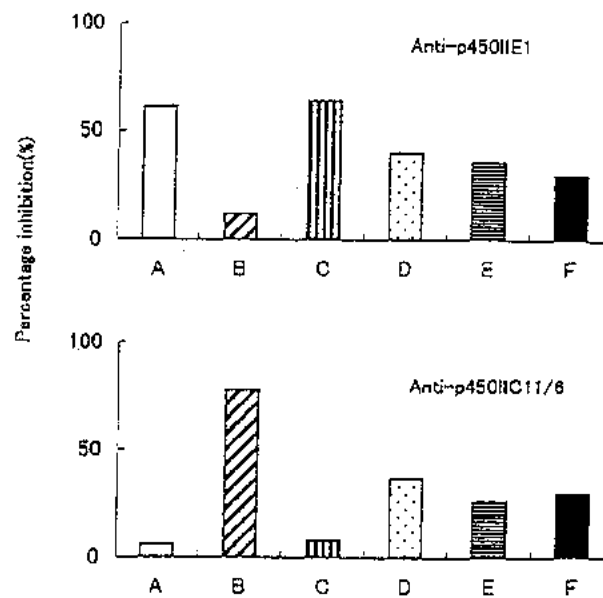


図6 モノクローナル抗体によるトルエン代謝活性阻害

6. 魚類の生殖と性ステロイドホルモン

(内分泌攪乱化学物質の生殖への影響を解析する研究モデル)

岡崎国立共同研究機構・基礎生物学研究所・長濱嘉孝

I. はじめに

内分泌攪乱物質（環境ホルモン）は、ヒトを含むいろいろな動物の生体内の正常なホルモン作用を攪乱する物質であり、生殖系、免疫系、脳神経に影響を与えることが指摘されている。なかでも心配されているのが生殖への影響であり、ヒトでも男性における精子数の減少、女性における子宮内膜症の増加などが内分泌攪乱物質によるものではないかと考えられている。野生動物に関しても、鳥類にみられる生殖行動の異常、雄ワニでのペニスの矮小化、コイにおける雌雄同体化、巻貝でのインボセックス等、影響を受けていると考えられる生物種も広範に及んでいる。したがって、内分泌攪乱化学物質のスクリーニングが緊急に必要であり、そのための効果的な方法論の確立が各方面から強く期待されている。一方で、内分泌攪乱化学物質がヒトや野生動物に対して与える影響、さらにはその仕組みについても明らかにすることが大切なことである。しかし、野生動物は言うに及ばず最も研究が多くなされているヒトにおいてさえも、この問題を解決するために活用できる基礎的知見はきわめて少ないというのが現状である。内分泌攪乱化学物質の影響を明らかにするためには、まず「何が正常か」を知る必要があることは言うまでもないことである。

ここでは魚類を取り上げる。この生物群では、内分泌攪乱化学物質の影響を調べた先駆的な報告がイギリスやアメリカでなされてきたが、日本でも多摩川において見出された雌雄異体のコイを始めとして、いろいろな例が報告されている。また、最近にみつかったスウェーデンの例では、産業廃棄物処理場の近くに位置するある湖に生息するPerchの約70%に生殖腺を持たない個体が出現したとの報告もさなれており、その影響は益々深刻となってきている。魚類の生殖系にみられるこのような異常の原因としてある種の内分泌攪乱化学物質が疑われているが、スウェーデンの例を含め本当のところは皆目明らかにされてはいない。これは生殖現象が複雑で、いろいろな内因的、外因的要因が絡んでいるからであり、ある生殖系の異常を見て、直ぐにその発生原因を指摘することは困難なのである。内分泌攪乱化学物質の問題で忘れてならないことの一つは、その効果（影響）が生物の個体発生時期の違いで大きく異なることである。影響が不可逆的であったり、可逆的であったり、また影響濃度も異なるのである。

我々の研究室ではこれまで、サケ科魚類、ウナギ、ティラピア、メダカ、キンギョ、さらには性転換魚のオキナワベニハゼ、ハワイ産ベラなどを実験材料として、魚類の生殖、特に生殖腺の機能の調節に果たす性ステロイドホルモンの役割に関して分子、細胞レベルの研究を行ってきた。ここでは、これらの研究のうちで特に内分泌攪乱化学物質

の研究に有益な基礎的知見を提供すると考えられる研究成果について概説する。さらに、これらの知見から考えて内分泌攪乱化学物質の影響について直ぐに調べてみる必要があると思われる実験（特に、内分泌攪乱化学物質の性分化機構への影響）をいくつか挙げてみる。これらは内分泌攪乱化学物質の作用機構を明らかにするためのごく初歩的なスクリーニング実験と考えられるものであり、これらの予備的実験から得られる結果をもとに、次年度以降にはさらに本格的な細胞、分子レベルの研究プランを構築し、実行できるものと確信している。

II. 性決定と生殖腺の性分化

魚類でも多くの種で性は性染色体の組み合わせで決定され则认为られている。哺乳類と同様に XX は雌、XY は雄である。ヒトで発見された性決定遺伝子（精巢決定遺伝子）は、魚類を含む哺乳類以外の生物ではまだ見つかっていない。しかし、魚類でも性決定遺伝子の作用にしたがって生殖腺の性分化が起こると考えられているが、この遺伝子の下流に性ステロイドホルモンが重要な役割を果たすことがティラピアを用いた我々の最近の研究から明らかになってきた。我々が生殖腺の性分化の研究にティラピアを用いるのにはいくつか理由がある。性分化の研究では孵化した直後の個体が実験の対象となるので性ホルモン量などを測定するのはきわめて困難であり、したがって性ステロイドホルモンを産生する細胞を電子顕微鏡で観察するか、後述するステロイドホルモン代謝酵素の cDNA を用いた *in situ* hybridization、あるいはそれらの特異的抗体を用いた免疫細胞化学により性ステロイドホルモンの局在、産生量を推測する確かな方法が不可欠となる。ティラピアではこのステロイドホルモン産生細胞が非常に大きいので、生殖細胞や他の体細胞と明確に区別できる。この特徴は性分化における性ステロイドホルモンの役割を調べるには非常に有益である。また、後述するように遺伝的に全雌、全雄が作出されており、性決定・分化の研究には格好な材料となる。さらに、産卵周期は約 2 週間であるが、生殖孔の第二性徴の発達、生殖行動などにより卵成熟・排卵日を前日には正確に知ることができるので、生殖周期のホルモン制御機構の解析もし易い。人工授精が容易であり、胚は遠心管（80 ml）の中でエアレーションを施すことで孵化まで育てることができる（通常、この魚では雌が胚を口中で育てる）。また、飼育が容易で上手に育てると孵化後 3 - 4 ヶ月で次世代を得ることができる。

生殖腺の性分化が起こる前に性ホルモン処理することにより性転換を起こすことができる

未分化生殖腺を性ステロイドホルモン処理することにより、遺伝的性を転換させることができる。しかし、このホルモン処理は孵化後の短期間のみに限られる。

〈実験〉： 内分泌攪乱化学物質が性ステロイドホルモンと同様に孵化直後の未分化生殖腺に作用して性転換を起こさせることができるか？

ティラピアでは全雌、全雄個体が得られる

ティラピアではY Yの超雄個体が得られており、この個体と通常のX X雌個体を交配することにより全雌個体群を得ることができる。

〈実験〉： 全雌、全雄を用いることにより、性ステロイドホルモンや種々の内分泌攪乱化学物質の生殖腺や脳の性分化の影響をより正確に解析する。

生殖腺の性分化は孵化後23-25日に起こる

ティラピアでは卵巢と精巢への生殖腺の性分化は形態的には孵化後23-25日に起こる。この生殖腺の性分化は卵巢腔と輸精管の形成の開始によって明らかとなる。

性的未分化生殖腺を試験管内で培養して卵巢をつくらせる

孵化直後のティラピア未分化生殖腺を体外に取り出し、器官培養することができる。この器官培養系は、試験管の中で性的未分化生殖腺に性分化を起こさせ、卵巢と精巢を形成させることができる唯一の実験系である。

〈実験〉： 全雌、全雄個体の未分化生殖腺を生体外に取り出し、性ステロイドホルモンや内分泌攪乱化学物質の影響を試験管の中で詳しく調べる。このことにより、これらのホルモンや物質の直接的影響を明らかにすることが可能となる。

卵巢の形成にエストロゲンが不可欠である

遺伝的雌個体(X X)での卵巢の形成は、生殖腺で生成されるエストロゲンの作用でおこる。遺伝的雌個体に孵化後2週間までに芳香化酵素(テストステロンとエストロゲンに転換させる酵素)阻害剤(フェドロゾール等)を処理することによりエストロゲンの合成を阻害すると卵巢は形成されずに精巢が形成される。しかし、この阻害剤の処理が性分化期やそれ以後になされた場合には効果がみられず、したがって性転換は起こらない。この実験結果からも、ティラピアでは孵化後20日頃までは生殖腺は卵巢にも精巢にも性分化できることが明らかである。一方、それ以後は性ステロイドホルモンに反応して性転換を起こすことはできない。

〈実験〉： 生殖腺の性分化が起こる孵化20以降に性ステロイドホルモンを処理しても性転換が起こらないのは何故か？

遺伝的雄個体（XY）での精巢の形成は、生殖腺でエストロゲンが生成されないことにより自動的に起こる？

エストロゲン受容体（ α 型、 β 型）遺伝子は遺伝的雌の未分化生殖腺ですでに発現している。

〈実験〉： 内分泌攪乱化学物質はこれらの受容体に結合するのか？ α 型、 β 型に対しての結合特性は同じなのか、あるいは異なるのか？ 性的未分化生殖腺の器官培養系にエストロゲンを添加し、これにより新しく発現してくる遺伝子をcDNAサブトラクション法により単離し、全塩基配列を決定する。さらに、In situ hybridizationにより当該遺伝子の発現細胞を決定する。

Vasa遺伝子は生殖細胞のみに発現する

始原生殖細胞（卵原細胞や精原細胞のもととなる細胞）は生殖腺原基に移行するのはティラピアでは孵化後3日である。この時の始原生殖細胞ですでにVasa遺伝子が発現しており、その発現は他のすべての体細胞ではみられない。即ち、Vasa遺伝子は生殖細胞のみで発現している。このVasaタンパク質を魚類の種を越えて検出することができる特異抗体を世界に先駆け作成することに成功した。

〈実験〉： 内分泌攪乱化学物質等で処理した親から産まれた胚や稚魚の始原生殖細胞の移動パターンやVasa抗体に対する反応を調べることにより、親に与えられた種々物質の影響が次世代、あるいは次々世代の生殖細胞に与える影響を解析することができる。また、同様な解析を汚染されている河川で生息する魚類の始原生殖細胞について実施することにより内分泌攪乱化学物質が始原生殖細胞に与える影響を調べることができる。

Vasa遺伝子を視覚化する

GFPで標識したVasa遺伝子をメダカ受精卵に微小注射により遺伝子導入することにより、生きたまま胚体における移動中の始原生殖細胞や稚魚や成体での生殖腺中の生殖細胞を外から観察するトランスジェニック系の作出に成功した。

〈実験〉： Vasa遺伝子をGFPで標識したトランスジェニックメダカを性ステロイドホルモンや種々の内分泌攪乱化学物質を含む飼育水で育て、正常魚と処理個体群との間の始原生殖細胞の移動や生殖細胞の分化、発生、成長、成熟の状態を比較する。このような実験から、内分泌攪乱化学物質のVasa遺伝子の発現に対する影響を明らかにすることができるばかりでなく、これらの物質が始原生殖細胞や生殖細胞（卵原細胞、卵母細胞、卵、精原細胞、精母細胞、精細胞、精子）に与える影響を同一個体で経時的に詳しく解析することができる。

性ステロイドホルモン代謝酵素の発現は性特異的である

エストロゲンの合成に必要な芳香化酵素を含むすべての性ステロイドホルモン代謝酵素遺伝子、タンパク質の発現が、卵巣の形成の10日以上も前に遺伝的雌個体の未分化生殖腺で発現している。一方、遺伝的雄では精巣が形成されて後にアンドロゲン生成が活発となる。

Ⅲ. 配偶子形成

生殖腺の中で生殖原細胞（卵原細胞、精原細胞）から配偶子（卵、精子）がつくられる過程を配偶子形成と呼ぶ。脊椎動物における配偶子形成の制御には、生殖腺刺激ホルモン（gonadotropin、GTH）（下垂体）-性ステロイドホルモン（生殖腺）系が重要な役割を果たす。哺乳類から魚類まで、2種類のGTH（濾胞刺激ホルモン、FSH；黄体形成ホルモン、LH）が下垂体から分泌され、配偶子形成ばかりではなく、種々の生殖活動を制御する。しかし多くの場合、このGTHは生殖細胞に直接的に働くのではなく、生殖腺にある体細胞に作用する。この結果、体細胞でつくられる性ステロイドホルモン（アンドロゲン、エストロゲン、プロゲステロン）が直接的、間接的に配偶子形成のいろいろな過程を制御する。

脊椎動物でこれまでに報告されている生殖系への内分泌攪乱化学物質の影響はこの配偶子形成の過程に悪影響を与える例が多い。また、内分泌攪乱化学物質の作用が性ステロイドホルモン、特にエストロゲン、との関連で問題にされる。したがって、内分泌攪乱化学物質の影響を調べるにあたりまず必要となるのは、正常な個体での性ステロイドホルモンによる配偶子形成の制御機構に関する細胞、分子、遺伝子での詳しい情報である。しかし、脊椎動物における配偶子形成のホルモン制御機構が分子、遺伝子レベルで詳しく調べられている生物種はきわめて少なく、一部の実験モデル動物についての研究に限定される。したがって、ある生物種の生殖系への内分泌攪乱化学物質の影響を解析するためには、このところから調査、研究を開始する必要がある。

我々はこの十年余りの間、主に魚類を材料にして配偶子形成のホルモン制御機構を細胞、分子レベルで詳しく研究してきた。特に、配偶子形成のそれぞれの過程を制御する性ステロイドホルモンを単離し、生化学的に同定するとともに、それらステロイドの生殖腺体細胞での生成の機構、生殖細胞での作用の機構を分子、遺伝子レベルで研究してきた。ここでは、精子形成、精子成熟、卵形成、および卵成熟の機構に絞り、我々の魚類を用いた研究成果を項目ごとに要点のみ記述するとともに、それらを基盤として考えられる実験プランについても触れる。

1. 精子形成

脊椎動物の精子形成は生殖腺の中で精原細胞が体細胞群（主にセルトリ細胞やライディ

ッヒ細胞)の助けをかりながら、精母細胞、精細胞を経て精子に分化する過程である。精原細胞より精子ができるまでの期間は、マウスでは約35日、ヒトでは約64日である。精原細胞は分化段階の違いによりいくつかに分けられる。哺乳類では、A型精原細胞、B型精原細胞が区別され、AとBの中間型が存在する種もある。A型精原細胞は分裂して、一部はA型として残り(幹細胞)、他方はB型精原細胞となる。一般にB型精原細胞はA型精原細胞よりやや小型で、その数も多い。このB型精原細胞はすべて分裂して第一次精母細胞となる。第一次精母細胞へ分化する前の精原細胞での分裂回数は種によって決まっており、イモリでは7回、ウナギでは10回とされる。精細胞までの精子形成過程では、ほぼ通常の細胞の形態を保っているが、精細胞から精子になるところで、著しい形態の変化が起こる。この過程は、とくに精子変態と呼ばれている。哺乳類の精子形成は精細管の中で進行する。一方、魚類や両生類では1個の精原細胞から生じた精母細胞、精細胞、精子が、1個のシストと呼ばれる袋状の構造に包まれている。

ウナギの精巣は脊椎動物における精子形成の研究の優れたモデルになる

養殖ウナギ雄の精巣にみられる生殖細胞はA型精原細胞のみである。また、体細胞(ライディッシュ細胞、セルトリ細胞)も不活性である。養殖ウナギ雄の生殖腺が未成熟な状態にあるのは、下垂体に生殖腺刺激ホルモン産生細胞がきわめて少なく、生殖腺刺激ホルモンが分泌されていないためである。このような状態にある養殖ウナギ雄にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(HCG)を一回腹腔内注射することで3週間以内に精巣に精子が見られるようになる。したがって、HCGはA型精原細胞をB型精原細胞、第1精母細胞、第2精母細胞、精細胞を経て精子まで精子形成過程のすべてを誘起させることができる。

試験管の中での精子形成のすべての過程が誘導できる

養殖ウナギの精巣片(1mm)を取り出し、無血清培地で器官培養すると少なくとも一ヶ月間は正常な状態で維持することができ、この期間はA型精原細胞のままで維持される。この器官培養系にHCGを添加すると、個体に注射した場合と同様に約3週間で精子が出現する。以下に述べる11-кетテストステロンの場合と共に、上記のHCGを用いた実験はA型精原細胞から精子までの精子形成の全過程を試験管の中で起こさせた世界で最初の例である。

ウナギの精子形成誘起ホルモンは11-кетテストステロンである

HCGの精子形成誘起作用は直接ではなく、精巣での性ステロイドホルモンの合成を介すると考えられたので、精巣をHCGとともに器官培養することで培養液中に放出された性ステロイドホルモンを薄相クロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などの生化学的手法により20の分画に集めた。次に、これら20の分画のそれぞれを別々に精巣の器官培養系に添加し、精原細胞の体細胞分裂の誘起能を指標