

平成11年度

内分泌攪乱化学物質等の影響等調査研究
報 告 書

平成12年3月

財団法人 日本公衆衛生協会

目 次

1. 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の分子生物学的機構の解明	
千葉大学医学部解剖学	湯浅 茂樹 …………… 1
2. 核内転写調節 (PPAR) を介した外因性内分泌攪乱化学物質の 生殖毒性作用の機構および安全性の研究	
信州大学医学部	那須 民江 …………… 24
3. マウス生殖細胞死への環境毒性物質の影響とその分子機構の解析に関する研究	
長崎大学医学部	小路 武彦 …………… 32
4. 生殖毒性の早期影響マーカーとしての神経内分泌動態と次世代影響に関する研究	
北海道大学医学部	岸 玲子 …………… 42
5. 生殖発達毒性に関する研究	
日本獣医畜産大学獣医畜産学部	鈴木 勝士 …………… 50
6. 塩素化芳香族による生殖機能への影響評価	
九州大学大学院医学研究院	大村 実 …………… 55
7. 環境生物の免疫影響に関する研究	
国立環境研究所環境健康部	小林 隆弘 …………… 81
8. 鳥類の内分泌攪乱化学物質影響調査	
東京医科歯科大学教養部	和田 勝 …………… 148
9. レポーター遺伝子を導入した細胞培養系の確立	
東京大学分子細胞生物学部研究所	加藤 茂明 …………… 156

10. 内分泌攪乱化学物質をはじめとする環境汚染物質の野生動物
に対する影響と環境評価
ーバイオマーカーを用いた新環境リスク評価システム確立に向けてー
北海道大学大学院獣医学研究科 藤田 正一 160
11. 絶滅が危惧される両生類の国内実態調査と情報ネットワークの作成
及び環境汚染モニター動物の作製に関する研究
広島大学理学部附属両生類研究施設 中村 正久 168
12. 内分泌攪乱化学物質等の試験に用いるメダカ系統の(d-rR改良型
および透明メダカの)開発に関する研究
名古屋大学生物分子応答研究センター 若松 佑子 215
13. 魚類を用いた内分泌攪乱化学物質評価法に関する研究
熊本県立大学環境共生学部 有蘭 幸司 217
14. メダカに対する内分泌攪乱物質の短期暴露に関する研究
東京都環境科学研究所基盤研究部 若林 明子 227

1. 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の分子生物学的機構の解明

研究者 湯浅 茂樹 (千葉大学医学部解剖学第二講座教授)

研究要旨

内分泌攪乱化学物質としてのエストロゲン化合物が精子形成障害を引き起こすことは確立されているが、障害作用の分子細胞生物学的レベルでのメカニズムは不明である。有害物質の検索、障害の予防にはエストロゲン化合物の精巣に対する作用機構を解明する必要がある。最近ではエストロゲン化合物はエストロゲン受容体に結合後、転写制御に関わるだけでなく、チロシンリン酸化酵素を介する細胞内情報伝達系にも作用する可能性が示されるようになった。

本研究では細胞内情報伝達に関わる *fyn* tyrosine kinase 遺伝子ノックアウトマウスにおける精子形成障害の機構と、代表的なエストロゲン化合物である β -estradiol 3-benzoate, diethylstilbestrol (DES) の精子形成障害作用の機構を生化学、形態学の両面から解析した。その結果、精巣発達過程における生殖細胞の形成障害には、支持細胞であるセルトリ細胞の接着構造 (ectoplasmic specialization) の形成異常が共通して関与しており、この過程には *fyn* tyrosine kinase による制御が必要であることが示唆された。また、成体の精巣に対してはエストロゲン化合物は生殖細胞のうち精子細胞の初期の発達段階に作用して精子の形態形成異常を引き起こすことが示唆された。これらの所見は、精巣内の細胞内情報伝達系と細胞接着構造—細胞骨格システムの接点が、新たにエストロゲン化合物作用の標的の一つとなりうることを示している。さらに、精子形成と神経発生における細胞間相互作用ならびに分子機構の類似性から、内分泌攪乱化学物質の脳形成過程への影響についても検討し考察を行った。

研究者協力者

外山 芳郎 (千葉大学医学部解剖学第二講座講師)
前川 眞見子 (千葉大学医学部解剖学第二講座助手)
古関 明彦 (千葉大学医学部発生生物学講座教授)
赤坂 武 (千葉大学医学部発生生物学講座助手)
八木 健 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所助教授)

A. 研究目的

現在、内分泌攪乱化学物質に関しては生物環境ならびに人の健康に対する脅威が、主に精子数の減少と環境生物の生殖障害の観点から注目されている。今後、これらの物質がなぜ有害であるのかをその作用機構の点から明らかにする努力が、国民の不安を解消し安全な生活の確保を図る上で必要である。

本研究では環境ホルモンの作用機序と遺伝子異常による精子形成障害の機序の接点から、環境ホルモンの健康障害に関する分子生物学的マーカーならびに障害の分子細胞生物学的

レベルでのメカニズムを解明することを目的とする。このために、遺伝子ノックアウトマウスの精子形成障害の分子生物学的機構の解析をおこなうとともに、内分泌攪乱化学物質の作用機序の細胞生物学的解析、遺伝子欠損マウスに対する環境ホルモン投与の影響を検討する。

また、精子形成と神経発生における細胞間相互作用の高い類似性から (図 1)、内分泌攪乱化学物質が精子形成障害を引き起こすメカニズムが共通して神経発生、ひいては高次脳機能に影響する可能性も念頭に置いて解析を進める。

内分泌攪乱化学物質は内分泌系のホメオスタシスを乱すとともに、精子形成過程で生殖細胞分化の種々の段階、支持細胞への直接的効果 (図 2) も考慮する必要がある。本研究は代表的な内分泌攪乱化学物質の作用の分子

レベルでの解明の糸口を作るものとして、作用の本態にもとづいた客観的な体系的検索方法の開発に貢献することが期待できる。

B. 研究方法

1) 遺伝子欠損マウスにおける生殖細胞の発達障害の解析

fyn tyrosine kinase 欠損マウス、presenilin-1 欠損マウス、mel-18 欠損マウスは各々の遺伝子の蛋白質のコード領域の相同組み換えにより作製した。fyn tyrosine kinase 欠損マウスに関しては、ホモ接合体と野生型について発達過程の精巣重量の変化、ならびに精巣のブアン固定による光学顕微鏡標本の検討を行なうとともに電子顕微鏡観察をおこなった。さらに、精巣蛋白のウエスタンブロットにより Fyn 蛋白の細胞内局在、チロシンリン酸化蛋白の変化について検討した。

presenilin-1 欠損マウスに関しては、ホモ接合体は出生後に死亡するため胎生期の精巣原基の光学顕微鏡標本による検討を行なった。また、正常成体マウス精巣における presenilin-1 の発現に関する検討も行なった。

mel-18 欠損マウスに関しては、成体のホモ接合体ならびに野生型について精巣ならびに卵巣のブアン固定による光学顕微鏡標本の検討を行なった。

2) 正常成体マウスの精子形成に対する β -estradiol 3-benzoate の障害作用の機序

β -estradiol 3-benzoate をオリーブ油に溶かし成体の雄 ICR マウスに腹腔内投与した。投与期間は 2 日、3 日、1 週間、2 週間、4 週間、8 週間で、投与量は各投与期間につき 10, 16, 20, 40, 80, 160 μ g/kg 体重とした。対照群にはオリーブ油のみを投与した。マウスはエーテルまたは Nembutal (Abbott Labs.) で深麻酔し、経心的に 10 mM ヘパス緩衝 3% グルタルアルデヒドを注入して灌流固定し、精巣を摘出し重量を計測した後、精巣を約 1mm 角に細切しさらに 2 時間グルタルアルデヒド固定を続けた。次にヘパス緩衝液で洗浄後、1%四酸化オスミウムで 1 時間固定

した。その後、脱水しエポンに包埋した。エポン試料はウルトラミクロームで、光学顕微鏡用には厚さ 1 μ m の準超薄切片を作製し、トルイジンブルーで染色した。また、電子顕微鏡用には厚さ約 70 nm の超薄切片を作製し、クエン酸鉛と酢酸ウランの二重染色をした。

3) 正常ラットの精巣発達過程における diethylstilbestrol (DES) 曝露による精子形成障害の機構

Wistar 系の雄新生仔ラット 1 匹あたり、オリーブ油 40 μ l に溶かした diethylstilbestrol (DES, Sigma) 10 μ g を、生後 2, 4, 6, 8, 10, 12 日齢に皮下注射により投与した。対照群として、オリーブ油 40 μ l を同様に投与したラットを用いた。生後 5, 14, 18, 22, 24, 32, 35, 42, 49, 56 日齢の DES 投与ラットとそれに対応する対照群のラットの光学顕微鏡および電子顕微鏡用試料を上記のマウス精巣標本と同様の手順で作製した。光学顕微鏡用切片として、ブアン氏液による固定を行った精巣を脱水、透徹し、パラフィンに包埋し切片を作成した。また、一部の標本については、4%パラフォルムアルデヒド溶液で灌流固定後、凍結切片を作成し、蛍光標識ファロイジンを用いてアクチンフィラメントの標識を行ない、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4) 遺伝子ノックアウトマウスの精巣発達過程における diethylstilbestrol (DES) 曝露の影響の解析

fyn tyrosine kinase 欠損マウス、mel-18 欠損マウスのホモ接合体ならびに野生型の新生仔に上記のラット新生仔の実験と同様にオリーブ油 40 μ l に溶かした diethylstilbestrol (DES, Sigma) 10 μ g を、生後 2, 4, 6, 8, 10, 12 日齢に皮下注射により投与した。そして、生後 4-5 週でブアン固定により光学顕微鏡標本を作成し、精巣発達について検討した。これとともに、野生型マウスに新生仔期に DES を投与した場合と、オリーブ油のみを投与した場合について、生後 5 週に精巣の Fyn 蛋白、チ

ロシンリン酸化蛋白、特に p80 の発現についてウエスタンブロットにより検討した。

5) 倫理面への配慮

マウス、ラットを用いる動物実験で、灌流固定ならびに組織標本採取に際してはエーテルあるいはネンプタルによる深麻酔下で苦痛のない状態で、かつ短時間のうちに操作を行なった。なお、この動物実験手技は千葉大学亥鼻地区動物福祉特別委員会で承認されている。

C. 研究結果

1) 遺伝子欠損マウスにおける生殖細胞の発達障害の解析

Fyn 欠損マウス：Fyn は Src ファミリーに属する非受容体型チロシンリン酸化酵素で、受容体刺激によって細胞内情報伝達系のチロシンリン酸化の引き金を引き、細胞分化の制御に関与する（図 3）。Fyn 蛋白は精巣ではセルトリ細胞に局在し（図 4）、細胞骨格蛋白の actin filament の分布と特徴的な対応を示した。すなわち、成熟精子細胞の頭部とセルトリ細胞との接触部位で、セルトリ細胞側に形成される ectoplasmic specialization (junctional specialization) とよばれる細胞膜裏打ち構造（図 5）において、actin filament と Fyn との共存が認められた（図 6）。また、セルトリ細胞同士の間形成される同様の特殊接合装置の actin filament にも Fyn が共存することがわかった。生化学的解析により Fyn は Triton X-100 不溶性画分に回収され生後 3~4 週にもっとも発現が強いことが明らかになった。

Fyn 欠損マウスは雌雄ともに生殖能力があり、これまで精子形成には異常がないと考えられてきた。しかし、生後の精巣発達を詳しく調べた結果、Fyn 欠損マウスが一過性の精子形成障害を示すことが明らかになった。すなわち、生後 3 週前後の精巣内で精子細胞が成熟する時期に精巣重量の増加が正常マウスに比較して一過性に遅延し（図 7）、生殖細胞の一部に変性が起こることが明らかになっ

た（図 8）。さらに、電子顕微鏡的観察により、この時期にはセルトリ細胞-精子細胞間に形成される特殊接合装置（ectoplasmic specialization）の形成異常も認められた（図 9、10）。精巣のチロシンリン酸化蛋白をウエスタンブロットにより解析した結果、Fyn 欠損マウスでは Triton X-100 不溶性画分の 80kD 蛋白（p80）のリン酸化が野生型に比べて著しく低下していることが明らかになった（図 11）。このように、Fyn は精巣において生殖細胞とセルトリ細胞の間の相互作用に関わっており、セルトリ細胞の機能を介して生殖細胞の分化、生存に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

プレセニン-1 欠損マウス：プレセニン-1 は若年発症アルツハイマー病の病因遺伝子として単離され、細胞分化制御因子 Notch-1 の活性調節を行うことが明らかにされている（図 12）。胎生期精巣原基の幼若生殖細胞はホモ接合体のほうが野生型にくらべて数の増大が認められた。また、成体の精巣におけるプレセニン-1 の発現は精子細胞の細胞質に局限して認められ、これに対してプレセニン-1 によって活性化される分化制御因子 Notch-1 の発現は精母細胞から精子細胞の核に局在していた（図 13）。さらに、ウエスタンブロットにより、精巣には脳と同一分子量を示すものの他に、分子量の異なる精巣特異的な分子種が含まれることが明らかになった（図 14）。

mel-18 欠損マウス：精巣には異常が認められなかったが、成体の卵巣において減数分裂の異常が認められた。すなわち、卵母細胞は正常な卵巣内では減数分裂前期でとどまっているはずであるが、ホモ接合体では減数分裂中期まで進行した卵母細胞が多数認められた。

2) 正常成体マウスの精子形成に対する β -estradiol 3-benzoate の障害作用機序

β -estradiol 3-benzoate の投与により、精子形成の細胞周期が一部の精細管で障害されており、とくに分化の進んだ精子細胞で核やア

クロソームの形成異常が認められ（図 15, 16）、精子細胞とセルトリ細胞間の特殊接合装置の異常も認められた。しかし、幼若な精子細胞には形態学的異常が認められなかった。このような、特定の発達段階以降の精子細胞の形態異常は β -estradiol 3-benzoate の投与期間の長短にかかわらず認められ、投与期間の延長によって、より分化が進行した精子細胞にまで形態学的異常が認められた（表 1）。

3) 正常ラットの精巣発達過程における diethylstilbestrol (DES) 曝露による精子形成障害の機構

精巣は対照群のラットでは生後 35 日前後で陰嚢に下降するが、DES 投与ラットでは 56 日齢においても陰嚢までは下降せず、鼠径部に留まっていた。精巣重量は DES 投与ラットの 14 日齢以降で、各々の対照に比べて少なく、差が最も大きい時（35 日齢）では対照の 10%であった。

精子形成の異常：5 日から 22 日齢の DES 投与ラットと対照ラットの精上皮の発達段階は同じであった。すなわち 5 日齢では精巣索（精細管原基）には多数の未分化セルトリ細胞と少数の原始生殖細胞がみとめられた。14 日齢では生殖細胞としては原始生殖細胞に加えて A 型、中間型、B 型精祖細胞および前細糸期（preleptotene）精母細胞がみられた。18 日齢では厚糸期（pachytene）精母細胞まで発達した一次精母細胞がみられた。しかし、DES 投与ラットの精上皮には多くの変性した pachytene 精母細胞がみられた。24 日齢から 49 日齢の DES 投与ラットの精上皮では、生殖細胞の発達程度は 22 日齢の対照ラットと基本的には同じで、分化は pachytene 精母細胞まで進行した状態で停止していた（図 17）。この pachytene 精母細胞の多くは変性をおこしていた。また、32 日齢から 49 日齢ではこの精上皮の基底側には多数の B 型精祖細胞が重層していた。対照ラットでは 18 日齢で減数分裂像およびそれに続く step 1 精子細胞が現れたのに対し、DES 投与ラットでは 56 日齢になって初めて減数分裂像と step

5 までの精子細胞がみられた。

精細管内腔の異常：対照ラットでは 18 日齢以降で精細管の内腔が形成されているのに対し、DES 投与ラットでは 32 日齢以降で内腔が形成されていたが、その内腔には正常には認められない絨毛状の細胞性の突起が無数にみられた。電子顕微鏡観察により、この絨毛様構造はセルトリ細胞の板状の突起であった。

特殊接合装置（ectoplasmic specialization）

の異常：対照ラット 22 日齢では ectoplasmic specialization は未発達であるが、24 日齢以降では発達した接合装置がセルトリ細胞間でセルトリ細胞の核の高さに認められた。DES 投与ラット 24 日齢から 49 日齢では、対照ラット 22 日齢以前に対応するような未発達の ectoplasmic specialization が、セルトリ細胞間でセルトリ細胞の核の高さにみられた。すなわち、短いもの、片側だけが形成されたもの、actin filament のないものなどである（図 18, 19）。この未発達な ectoplasmic specialization が機能的に血液-精巣関門の機能を果たしているかどうかを、血管内投与されたチトクローム C の精細管内腔への移行の有無で調べたところ、血液-精巣関門の機能が破綻していることが明らかになった（図 20）。DES 投与ラット 32 日齢から 49 日齢では、未発達の ectoplasmic specialization は内腔を満たすセルトリ細胞の板状突起間で多数認められた。DES 投与ラットでは 56 日齢になると、対照ラットの 24 日齢以降に対応するような発達した ectoplasmic specialization が、セルトリ細胞間でセルトリ細胞の核の高さに多数認められるようになった。

4) 遺伝子ノックアウトマウスの精巣発達過程における DES 曝露の影響の解析

Fyn 欠損マウスならびに野生型マウスの新生仔期から発達期に DES を投与して生後 4 週で精巣発達の進行を組織学的に比較したところ、野生型マウスではラットの場合と同様に精母細胞の段階で発達が停止しており、精細管の管腔形成も認められなかった。これに

対し、Fyn 欠損マウスでは生殖細胞の発達が精母細胞の段階で停止しているのは野生型と同様であったが管腔形成が認められ、DES 投与による発達障害の程度は野生型の場合と比べて軽度であった (図 21, 22)。また、野生型マウスの発達期に DES を投与し、生後 5 週で精巣内の Fyn ならびにチロシンリン酸化蛋白の発現をウエスタンブロットにより調べたところ、Fyn, p80 いずれもその発現が 1.5 倍に亢進していた。

5) 神経系の形成における fyn の機能と DES 曝露の影響

fyn は中枢神経発生過程において移動中の神経細胞の先導突起に強く局在する (図 23)。幼若神経細胞が放射状グリア突起にガイドされて移動する過程において、fyn は神経細胞移動を誘導する因子 Reelin の受容体からのシグナルを、チロシンリン酸化を介する細胞内情報伝達系によって細胞骨格蛋白、特に actin filament の配列をコントロールすることにより細胞移動を促進すると考えられる (図 24)。Fyn 遺伝子欠損マウスは、海馬においては歯状回ならびにアンモン角の形成異常 (図 25)、扁桃体では中心核の形成異常 (図 26) が calbindin 免疫染色で明らかになった。

このように、fyn 遺伝子欠損マウスでは大脳辺縁系の発生異常を示すため、チロシンキナーゼによる細胞内情報伝達系に影響を及ぼすと考えられる DES の脳発達期における投与は、fyn の関与する脳発生分化の過程にも影響を及ぼす可能性がある。そこで、新生仔期における DES 投与後に精子形成異常をきたしたマウスの脳を生後 5 週で調べたところ、扁桃体の全体の構築には著明な異常を見いだせなかったが (図 27)、calbindin 免疫染色で基底外側核の calbindin 陽性ニューロンの数の減少が認められた (図 28)。

D. 考察

1) 遺伝子欠損マウスにおける生殖細胞の発達障害の解析

fyn tyrosine kinase 欠損マウス：セルトリ細

胞における Fyn の機能が生殖細胞の分化、成熟に関与することが明らかになった。現時点ではその分子機構は不明であるが、Fyn によるチロシンリン酸化がセルトリ細胞の特殊接合装置の形成調節を介して生殖細胞の発達に関与することが強く示唆される。Fyn によって特異的にリン酸化される p80 はこの細胞内情報伝達の過程に関与すると考えられ、現在、この分子の同定、cDNA クローニングを行っている。また、セルトリ細胞による生殖細胞栄養因子の産生と分泌が Fyn によって制御されている可能性も考えられる。

presenilin-1 欠損マウス：ホモ接合体は出生直後に死亡するため成体の精子形成に関する解析はできない。しかし、成体精巣において presenilin-1 は精子細胞の細胞質に特異的に発現し、一方 presenilin-1 によって活性化される分化制御因子 Notch-1 は精母細胞から精子細胞の核に局限して発現しており、生殖細胞の特定段階における発現パターンは、エストロゲン化合物に対する生殖細胞の反応の指標となる可能性があり、現在検討中である。

mel-18 欠損マウス：生殖細胞のうち卵母細胞の減数分裂に異常を見出しており、今後、卵巣におけるエストロゲン化合物の影響の検討にマーカーとして使用できるか検討中である。

2) 正常成体マウスの精子形成に対する β -estradiol 3-benzoate の障害作用機構

エストロゲン化合物による精子形成の障害に関しては多数の報告があるが、外因性エストロゲンの生殖細胞に対する作用を明確に検討した報告はほとんどない。本研究で明らかとなった新たな知見は、成体マウスに β -estradiol 3-benzoate を投与した場合、投与期間の長短にかかわらず生殖細胞の異常は常にステップ 7 の精子細胞から認められ、核ならびにアクロゾームに形態学的異常が検出されたことである。しかも、この異常は投与期間が延長するほど、より分化の進んだ生殖細胞にまで拡張して認められるようになった。また β -estradiol 3-benzoate はステップ 7 精子細