

- diabetes-induced embryonic malformations. *Diabetes*, 48; 1138-1144.
- Cho, S., Hazama, M., Urata, Y., Goto, S., Horiuchi, S., Sumikawa, K. and Kondo, T. (1999) Protective role of glutathione synthesis in response to oxidized low density lipoprotein in human vascular endothelial cells. *Free Rad. Biol. Med.*, 26; 589-602.
 - Yoshida, A. and Ueda, H. (1999) Activation of Gi1 by lysophosphatidic acid receptor without ligand in the baculovirus expression system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 259; 78-84.
 - Tokuyama, S., Hirata, K., Yoshida, A., Maruo, J., Matsuno, K., Mita, S. and Ueda, H. (1999) Selective coupling of mouse brain metabotropic sigma (s) receptor with recombinant Gi1. *Neurosci. Lett.*, 268; 85-88.
 - Maruo, J., Yoshida, A., Shimohira, I., Matsuno, K., Mita, S. and Ueda, H. (2000) Binding of [³⁵S]GTPγS stimulated by (+)-pentazocine, sigma receptor agonist, is abundant in the guinea pig spleen. *Life Sciences*, in press.
 - Inoue, M., Yamada, T. and Ueda, H. (1999) Low dose of kyotorphin (tyrosine-arginine) induces nociceptive responses through a substance P release from nociceptive endings. *Mol. Brain Res.*, 69; 302-305.
 - Renback, K., Inoue, M. and Ueda, H. (1999) Lysophosphatidic acid-induced, pertussis toxin-sensitive nociception through a substance P release from peripheral nerve endings in mice. *Neurosci. Lett.*, 270; 59-61.
 - Inoue, M., Shimohira, I., Yoshida, A., Zimmer, A., Takeshima, H., Sakurada, T. and Ueda, H. (1999) Dose-related opposite modulation by nociceptin/orphanin FQ of substance P-nociception in the nociceptors and spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291; 308-313.
 - Ueda, H. and Inoue, M. (2000) In vivo signal transduction of nociceptive response by kyotorphin (tyrosine-arginine) through Gai1 and inositol trisphosphate-mediated Ca²⁺ influx. *Mol. Pharmacol.*, 57; 108-115.
- ## 2) 学会発表
- Koji, T., Izumi, S., Shin, M., Hishikawa, Y. (1999) Localization in situ specific RNA by light and electron microscopy. XV Congress of the International Federation of Associations of Anatomists, Roma. (シンポジウム)
 - Ejima, K., Koji, T., Nanri, H., Kashimura, M., Ikeda, M. (1999) LPS induces the expression of thioredoxin, thioredoxin reductase, and protein disulfide isomerase in mouse placenta. XV Congress of the International Federation of Associations of Anatomists, Roma.
 - 江島邦彰、小路武彦、南里宏樹、柴田英治、柏村正道、池田正春。(1999) 炎症胎盤モデルにおける酸化ストレスと apoptosis。第 8 回アポトーシス研究会。
 - 鶴田大輔、小路武彦、小林裕美、寺前佳洋子、村上正基、石井正光。(1999) マウス毛再生モデルにおける毛包開口部ケラチノサイトアポトーシスの誘導機構。第 8 回アポトーシス研究会。
 - 小路武彦。(1999) RNA 検出への応用上考慮されるべき基礎条件。第 40 回日本組織細胞化学会総会。(ワークショップ)
 - 山本智美、柴田恭明、進正志、菱川善隆、山口朗、小林俊光、小路武彦。(1999) 硬組織への TUNEL 法の応用：マウス硬口蓋における脱灰操作の至適条件の検討。第 40 回日本組織細胞化学会総会。
 - 和泉伸一、仙波祐子、進正志、菱川善隆、小路武彦。(1999) プロラクチン遺伝子転写調節因子 Pit-1 のラット胎盤における細胞内局在と機能的分化の関連。第 40 回日本組織細胞化学会総会。
 - 菱川善隆、永末直文、小路武彦。(1999) 食道癌における metallothionein (MT) 発現の免疫組織化学的及び分子組織化学的検討。第 40 回日本組織細胞化学会総会。

- ・ 小路武彦。(1999) 組織化学的遺伝子発現解析法の最近の進歩。第 99 回九州医師会医学会第 3 分科会産婦人科学会。(特別講演)
- ・ 和泉伸一、進正志、菱川善隆、小路武彦。(2000) 胎盤におけるプロラクチン遺伝子転写調節因子の電顕レベルの組織化学による細胞内分布の解析。第 105 回日本解剖学会総会。
- ・ 進正志、和泉伸一、菱川善隆、小路武彦。(2000) ラット再生肝モデルにおける CREB 及び PCNA の発現検索。第 105 回日本解剖学会総会。
- ・ 菱川善隆、進正志、和泉伸一、井上聡、村松正実、小路武彦。(2000) マウス精巣における estrogen receptor (ER) $\alpha\beta$ 発現の免疫組織化学的及び分子組織化学的検討。第 105 回日本解剖学会総会。

Effect of environmental toxic compounds including endocrine disruptors upon mouse spermatogenic cell death and its possible molecular mechanisms

Takehiko Koji · Department of Histology and Cell Biology, Nagasaki University School of Medicine · Professor and Chairman

Key word :

estrogen, diethylstilbestrol, spermatogenesis, germ cell death, Fas, Fas ligand, adult mouse

Abstract

For a better understanding of the effects of various environmental toxic compounds including endocrine disruptors on mammalian reproduction, the study on germ cell death in fetal, neonatal and adult animals would be required. In the project of this year, we addressed whether repetitive injections of excessive dose of estradiol-3-benzoate (EB; 30 - 120 μ g/head, every 5 days) and diethylstilbestrol (DES; 0.4 - 2 mg/head, every 5 days) may affect spermatogenic cell apoptosis in adult mice, and if so, the Fas/Fas ligand system can be involved in the induction of germ cell apoptosis. Consequently, those estrogenic compounds generally increased the frequency of TUNEL positive germ cells, especially at the stage of spermatocyte around meiosis and we found that the occurrence of germ cell apoptosis seemed to be temporally and spatially associated with the expression of Fas and Fas ligand, which were expressed in germ cells and Sertoli cells, respectively. Very surprisingly, however, DES at a high dose did not increase the occurrence of germ cell apoptosis, raising a possibility that the degree of toxic effects may not be always correlated with the concentrations of toxic compounds. In addition, we conducted preliminary experiments with these compounds and the other endocrine disruptors such as bisphenol A in pregnant mice to extend the similar approach to fetal and neonatal mice.

Effect of estrogen on adult testis (TUNEL staining)

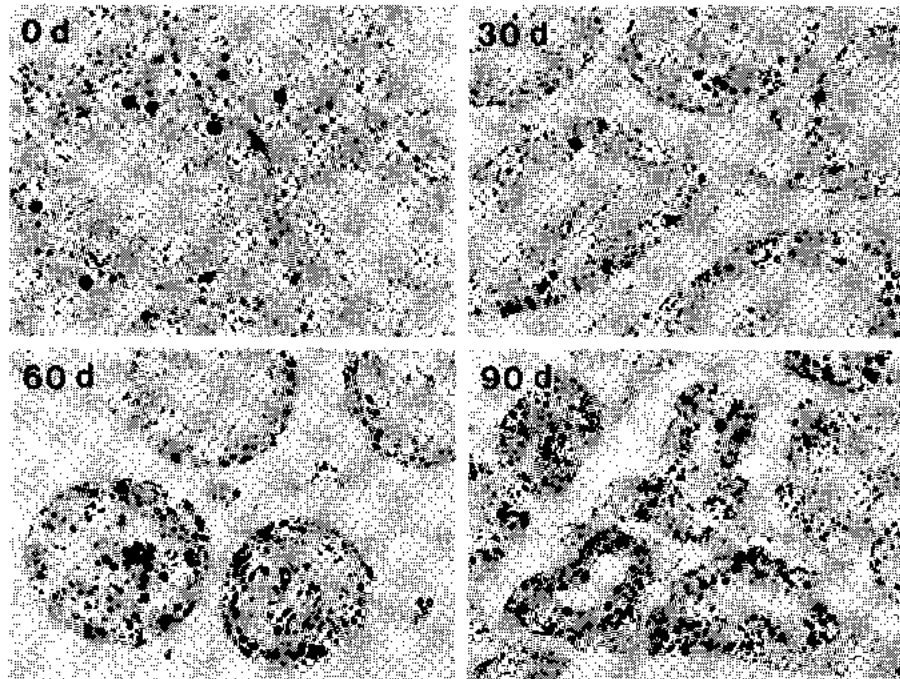


図1：成熟マウス精巣精子形成細胞アポトーシスへのEBの影響

A/J 成熟雄マウスに $30 \mu\text{g/head}$ の EB を 5 H 毎に皮下投与し、経時的 (0, 30, 60, 90 日後) に TUNEL 染色法によりアポトーシス細胞の出現を観察したもの (各群 3-4 匹)。黒色に呈色した核として、アポトーシス細胞が同定される。特に精母細胞でのアポトーシス頻度の増大を認め、精子細胞以降の精子形成細胞の消失が顕著であるが、精粗細胞の多くは健在であった。

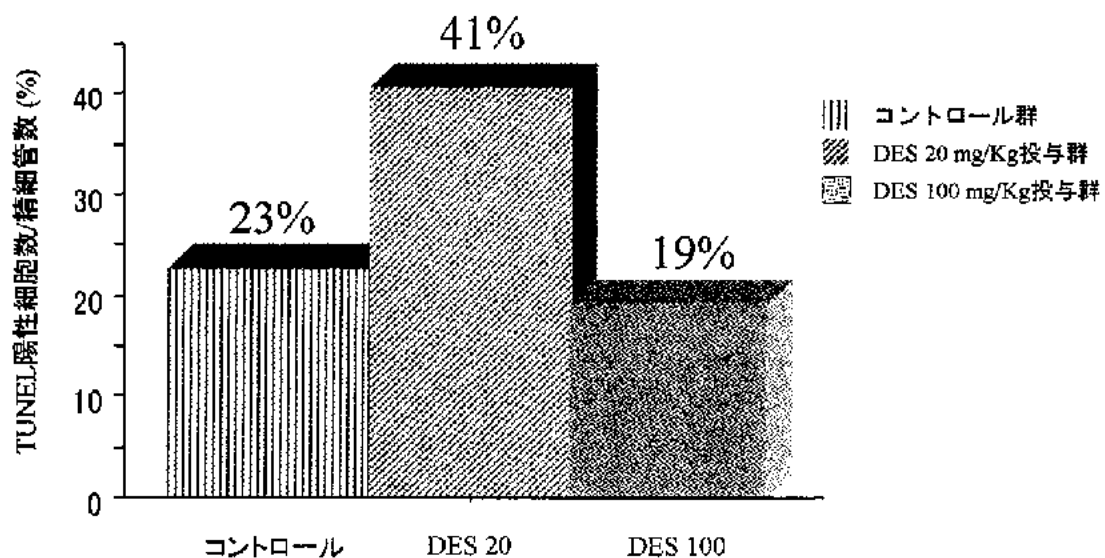


図2：成熟マウス精巣精子形成細胞アポトーシスへのDESの影響

ICR 成熟雄マウスに 20 mg/kg (low dose) 及び 100 mg/kg (high dose) の DES を 5 日毎に皮下投与し、対照としては corn oil のみを投与した (各群 3 匹)。投与後 20 日で組織を採集し、TUNEL 染色後、精細管断面数当たりの陽性細胞数を測定し%で表示した。その結果、low dose では有意な精子形成細胞アポトーシスの増大を認めたが、high dose 群ではむしろ減少傾向を示した。

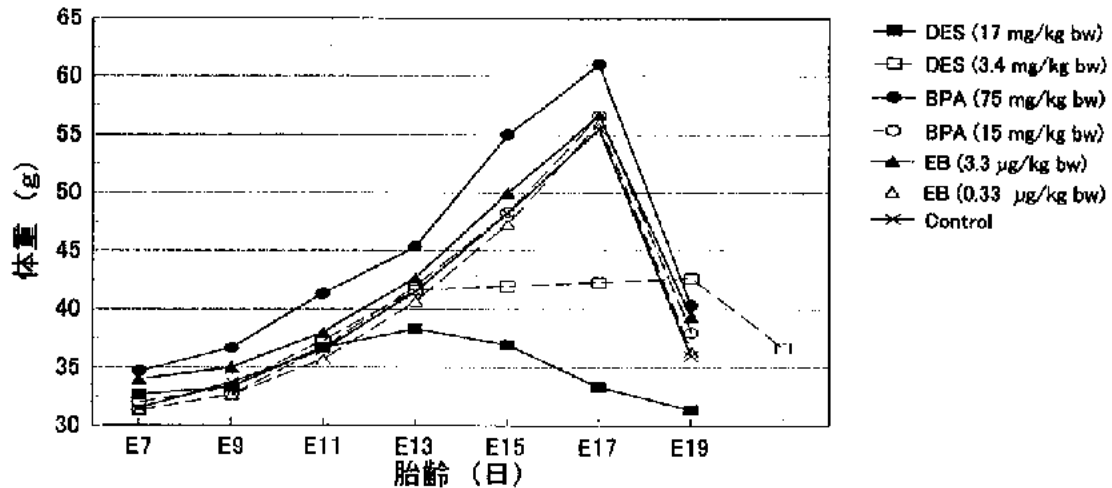


図3：環境毒性物質の妊娠マウス投与による母体の体重変化

ICR 妊娠マウスに、EB、DES、BPA を 5% ethanol/corn oil に溶解後、図に示した量で腹腔内に投与し、母体体重の変化を計測した。対照としては、5% ethanol/corn oil のみを同様に投与した（各群 3-4 匹）。その結果、高濃度の BPA では若干の体重増加を観察したが、EB 投与では対照群との差異は認められなかった。一方、DES は妊娠 13 日辺りから体重を低下させたが、これは胎仔の死亡・吸収を示しているものと思われる。

表1 妊娠マウスへの種々の環境毒性物質投与による出生仔数並びに体重への影響

処置	平均仔数(匹)	新生児平均体重(g)
DES (17 mg/kg bw)	0	—
DES (3.4 mg/kg bw)	1	—
BPA (75 mg/kg bw)	12	1.76
BPA (15 mg/kg bw)	12.7	1.62
EB (3.3 µg/kg bw)	11.7	1.71
EB (0.33 µg/kg bw)	10.7	1.71
Control	12.3	1.68

表2 グルタチオンの機能

グルタチオンはあらゆる細胞に高濃度に存在し、細胞内の反応物を還元することに役立っている。

その主な機能は

- (1) ミトコンドリア障害の防御
- (2) 肺の活性酸素障害の防御
- (3) 膜脂質の過酸化に対する防御
- (4) 親電位化合物による細胞障害の防御
- (5) 蛋白質の SH 基の保護
- (6) 免疫反応における役割
- (7) DNA 障害の保護
- (8) 細胞へのシステインの供給
- (9) 抗酸化酵素の基質

グルタチオン レダクターゼ (GSSG を GSH へ還元)

グルタチオン ペルオキシダーゼ (GSH を GSSG へ酸化し H_2O_2 を消去)

グルタチオン S-トランスフェラーゼ (薬物と GSH の抱合体を形成)

表3 SOD の性質

	Cu,Zn-SOD	Mn-SOD	EC-SOD
局在性	細胞質	ミトコンドリア	血漿
分子量 (ゲル濾過)	32,000	88,600	135,000
サブユニット構造	二量体	四量体	四量体
含有金属	Cu,Zn	Mn	Cu,Zn
KCN処理	失活	—	失活
H_2O_2 処理	失活	—	失活

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

研究者 岸 玲子（北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野教授）
本間研一（北海道大学医学部総合生理学講座時間生物学分野教授）
佐田文宏（北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野講師）
小橋 元（北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野助手）
片倉洋子（北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野）

研究要旨

近年内分泌攪乱物質問題が重要視され、その多くは生殖毒性に加え、催奇形性や神経発達異常など次世代影響が大きいのが特徴である。人では精子数減少、不妊、不育症、子宮内膜症、尿道下裂、停留睾丸などの先天性異常などさまざまな疾患の要因となる可能性もありうるとして検討、報告されている。しかし内分泌攪乱物質の実際の曝露と発症の関連性についてはその因果関係などを明らかにした報告はない。内分泌攪乱物質も含めた環境化学物質曝露による神経内分泌物質の動態と、生殖毒性の発現について知見を得ることが必要と考える。当教室では内分泌攪乱化学物質と生殖毒性について人での疫学的研究を行うと同時に血液などの生体試料中の内分泌攪乱物質の濃度測定、薬物代謝酵素遺伝子の遺伝子多型、NK細胞の活性などさまざまな方向から検討、研究を行っている。今年度の研究では因果関係をより明確にするために条件制限を設定しやすい動物実験での解明を試みた。有機溶剤スチレン類は産業的にも種々の用途に広範囲に使用され、日常生活でも食品トレー、ポリスチレン製食器など多量に使われている。そのため職業上でもスチレン類を取り扱い作業を行う者の数も多い。最近では女性労働者の多業種職場への進出や、妊娠中も職場で働く女性も増加する傾向にある。スチレン類は変異原性や催奇形成についての疑いもあり、人の疫学でも月経障害などへの影響について検討されている。実験的に発生の初期から、成長後までそれぞれの時期に対応した鋭敏な次世代影響の検出方法の開発、今まで毒性試験などでも扱われにくい神経行動学的評価にもつながるような次世代影響を引き起こすメカニズムについても考慮し、有機溶剤スチレンモノマーを妊娠ラットへ曝露をおこない、実験的に母ラットの生殖毒性、仔ラットの生理的発達毒性、神経化学物質動態、薬物代謝酵素の変化などの検討を行った。

研究者協力者

池田 聡子（札幌医科大学医学部公衆衛生学講座講師）
三宅 浩次（北海道医療大学看護福祉学部教授）

A. 研究目的

本研究は、近年の内分泌攪乱化学物質の問題における重要視性を考え、その多くが生殖毒性に加え、催奇形性や神経発達異常など次世代影響が大きいのが特徴である。人では精子数減少、不妊、不育症、子宮内膜症、尿

道下裂、停留睾丸などの先天性異常などさまざまな疾患の可能性もあり得るとして調査、報告されている。しかし内分泌攪乱物質の曝露と疾患の発症の関連性についてはその因果関係などを明らかにした報告はない。内分泌攪乱化学物質も含めた環境化学物質曝露による神経内分泌化学物質の生体内動態と、生殖毒性の発現について今まで以上により詳しい知見を得る必要があると考えられる。神経内分泌物質の動態と生殖毒性発現の関連性、