

染色体上では、hgn 遺伝子座は、D11Mit364 (44cM) と Nos2 (NO 合成酵素) (45.6cM) の間に位置することが判明した。この領域にマップされたマウスの遺伝子の内、精巣で発現が確認されているもの (Ywhae および Supt6h など) に関して、ラットの遺伝子を単離するとともに、発症精巣での発現を確認した。

2) 突然変異ラットの生後初期精巣における病態解析:

発症精巣の病態解析では、生後初期精巣においてセルトリ細胞の増殖低下とアポトーシス、始原生殖細胞の異常分裂とネクロティックな細胞死が認められた。WT-1、AdBP/SF1、Sox9、および DAX-1 は、発症精巣において発現が認められた。

3) TCDD の生殖発達毒性に関する予備実験:

雄の出世仔において、精巣上体の部分欠損を含む生殖器の異常と成熟後の生殖器重量の用量相関的な減少、交尾行動の異常を伴う妊孕能の消失を認めた。

D. 考 察

突然変異ラットの遺伝解析では、今回の実験で病因遺伝子 hgn を同定するための条件を整備することに成功した。これまでの病態解析から hgn の正常アليلは、生殖腺の発生分化および生殖細胞の維持に関して重要な新規の分子をコードしている可能性が高い。従って、今後は、hgn 存在領域を網羅するコンテイングの作成と人およびマウスの染色体相同領域にマップされている候補遺伝子の検索を行う必要がある。内分泌攪乱物質等の雄に対するエストロゲン様作用は、胎生期および生後成熟期のセルトリ細胞の数の減少や機能低下を通じて、生殖細胞の減少を引き起こすことが示唆されている。しかし、それを直接証明した報告はほとんど見られず、胎生期のセルトリ細胞の増殖を制御する因子も、精巣内に存在することが示唆されているが未だ同定されていない。

この点では、今回本症ラットで、他の突然変異動物では報告されていないセルトリ細胞の増殖低下やアポトーシスが認められたことは、本症の精巣形成不全のモデルとしての有効性を証明している。今回の実験から、明らかに本症ラットはセルトリ細胞の増殖と機能維持にとって重要な因子を消失しており、そのことが減数分裂開始以前の本来細胞分裂休止時期にある始原生殖細胞 (前精祖細胞) の異常分裂とその後の細胞死を生じている可能性を示している。従って、今後本症ラットの原因遺伝子の同定とともに、本症ラットの精巣で発現が低下あるいは消失している分子を検索することにより、セルトリ細胞の増殖および機能維持に働く因子あるいはセルトリ細胞自体の機能マーカーを同定できる可能性がある。

TCDD の子宮内曝露実験では、2 μ g/kg 用量の1回投与が、雄の精巣と副生殖器の低形成だけでなく、雄の交尾行動の異常 (過剰) と精子運動性や数には異常がないのに妊孕能の消失を引き起こすことを明らかにした。Hgn の場合とは対照的に、精巣上体が精子の成熟過程で重要な役割を果たしていることが示唆された。これらの異常の成立のメカニズムについては、ミュータントラットの解析と同様に、形態学的手法のみならず、蛋白の2次元電気泳動法や、mRNA のサブトラクト、ディファレンシャルディスプレイによる新規分子の同定、マイクロアレイによる発現差異のある分子の検索を行うことが有効であろうと思われる。

E. 結 論

内分泌攪乱化学物質等の影響に関する調査研究として、その悪影響として懸念されるいくつかの生物作用のうち、特に発生過程そのものの遺伝子による制御と環境による修飾というテーマには、生殖過程での本来のプログラムが不可逆的に破壊される現象の解明以外に、生後の免疫系の発達、脳神経系の発達などにかかわる現象の解明も含まれる。今年は、特に生殖過程における異常について、遺伝子

突然変異に起因する異常と in utero TCDD 暴露により誘発される生殖器系の異常が、この分野での研究モデルになりうるかという観点から検討した。

その結果、hgn/hgn の原因遺伝子が BN 系との戻し交配とマイクロサテライトリンケージにより、第 10 染色体にマップされ、完全連鎖する複数のマイクロサテライトマーカが RH パネルにより比較的狭い範囲で配列決定された。マウスの相同な染色体からの情報に基づき精巣で発現している遺伝子について調査する必要が生じた。既知の精巣発生に重要な役割を果たしていると考えられる遺伝子発現が確認され、hgn の正常対立遺伝子が、セルトリ細胞の増殖や機能維持に重要な役割を果たしている可能性が高くなった。精巣発生に関わる遺伝子で環境により影響される遺伝子の探索がよりいっそう重要になると考えられる結果が得られた。

TCDD の発生影響については、予備実験ながら、精巣上体の部分欠損、精子数と運動のうちには異常なしという成績が再現されたが、交尾行動は過剰なのに射精障害があり、精子に受精能がないという新知見が得られた。精巣上体など副生殖器に関する機能異常を解明する必要と、組織特異的な転写調節にかかわる環境影響という新たなテーマが生じた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki H, Fukaya S, Saito K, and Suzuki K (2000) Mapping of a locus on rat chromosome 11 responsible for osteochondrodysplasia (ocd). Mammalian Genome (in submission)
2. Akimoto T, Suzuki H, Arai Y, Nakama K and Suzuki K (2000) A locus responsible for dominant hairless gene (Ht) is located on rat chromosome 10. Experimental Animal (accepted)
3. 鈴木勝士 (1999) エストロンの初期鶏胚の発生に及ぼす影響、内分泌攪乱物質学会ニュースレター、4: 2-3.

4. Suzuki H, Kokado M, Saito K, Kunieda T and Suzuki K (1999) A locus responsible for hypogonadism (hgn) Mammalian Genome 10 (11) :1106-1107.
5. 板垣昌志、阿部省吾、阿部榮、酒井 淳一、鈴木勝士 (1999) 乳牛の潜在性乳房炎と乳頭口異常の関連、日本獣医師会雑誌 52 (9) 561-564.
6. 鈴木勝士 (1999) 環境ホルモンと獣医師の役割、アニマリタリオン、vol.9:1.

2. 学会発表

1. 高須正規、高橋純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士 (2000) マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位 (第 2 報)、子情報通信学会、ME とバイオサイバネティクス研究会
2. 斉藤賢一、雑賀寿和、鈴木浩悦、鈴木勝士、横山修一 (1999) マイクロ波照射がウサギおよびサル之眼におよぼす影響、電気学会計測研究会 IM99-66 p39-42
3. 高橋純子、高須正規、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士、横山修一 (1999) EI および ddY マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発反応 (ABR) の解析、電気学会計測研究会 IM99-65 p.33-37
4. 斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士、内堀雅隆、横山修一、辻 隆之 (1999) 先天性癲癇モデル動物 (EI Mouse) の睡眠時脳波における加齢に伴う変化、第 31 回成長談話会大会 (抄録 p22)
5. 高須正規、高橋純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士 (1999) EI および ddY マウスの脳硬膜上からの短潜時聴覚脳幹誘発反応 (ABR) の解析、第 127 回日本獣医学会
6. 深谷幸代、鈴木浩悦、高橋純子、丸ひろみ、井山雅子、新井豊、斉藤賢一、鈴木勝士 (1999) 骨軟骨形成不全症 (ocd/ocd) ラットの原因遺伝子は第 11 染色体上に存在し D11Mgh3 と連鎖している、第 127 回日本獣医学会
7. 醍醐久美、鈴木浩悦、中宮英次郎、八木

- 未央、岡田美香、新井豊、斉藤賢一、鈴木勝士（1999）ラット精巢形成不全症病因遺伝子の探索：hgn 遺伝子の雌表現型におよぼす影響の評価、第 127 回日本獣医学会
8. 太田千春、徳力剛、高須正規、平林美紀、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士（1999）腎低形成症の腎不全状態の基礎的評価、第 127 回日本獣医学会
 9. 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、新井豊、八木未央、竹中基郎（1999）鶏胚でのエストロンによる発生かく乱とエストロゲンレセプター mRNA の発現、第 127 回日本獣医学会
 10. 鈴木浩悦、中宮英次郎、醍醐久美、岡田美香、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士（1999）ラット精巢形成不全症病因遺伝子の探索：連鎖するマーカーの整列化とマウス 11 番染色体上での位置の推定、第 127 回日本獣医学会
 11. 尼崎肇、鷹栖雅峰、岩間良子、小川実幸、日比佐知子、鈴木浩悦、鈴木勝士（1999）マウス口蓋ヒダ形成過程におけるテネイシンと NCAM の発現分布、第 127 回日本獣医学会
 12. Saito, K., H. Suzuki and K. Suzuki (1999) Adverse developmental effects of low intensity radio frequency radiation at 428MHz on chick embryo. 2nd joint international symposium of Congenital Anomalies in Korea. (10/1~10/2: chunchon)
 13. 鈴木浩悦、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士（1999）ラット精巢形成不全症病因遺伝子の探索、日本アンドロロジー学会
 14. 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、竹中基郎、八木未央（1999）鶏胚でのエストロゲンレセプター mRNA の発現とエストロンによる発生かく乱、第 39 回日本先天異常学会
 15. 斉藤賢一、醍醐久美、横山修一、鈴木浩悦、鈴木勝士（1999）直流磁場照射のマウス胎子におよぼす影響、第 39 回日本先天異常学会
 16. 小川実幸、尼崎肇、鷹栖雅峰、岩間良子、日比佐知子、鈴木浩悦、鈴木勝士（1999）マウス口蓋ヒダ形成過程にみられる上皮細胞の増殖とアポトーシス、第 2 回日本組織工学会
 17. 鈴木浩悦、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士（1999）ラットの第 10 染色体上に存在する精巢形成不全症病因遺伝子の探索：高度に連鎖するマーカーの検索とマウス第 11 染色体上での位置の推定、第 46 回日本実験動物学会
 18. 中宮英次郎、鈴木浩悦、醍醐久美、八木未央、平林美紀、斉藤賢一、鈴木勝士（1999）ラット 10 番染色体上に存在する精巢形成不全症病因遺伝子の探索：病因遺伝子周辺のマップ作成、第 126 回日本獣医学会
 19. 松倉克仁、鷺巣 誠、倉繁裕美、尼崎 肇、中條真二郎、清水一政、浦川紀元、鈴木勝士（1999）犬糸状虫感染犬の肺動脈病変形成に対するアンギオテンシン変換酵素阻害薬およびアンギオテンシン・受容体拮抗薬の効果、第 126 回日本獣医学会
 20. 岩間良子、小川実幸、日比佐知子、尼崎 肇、鷹栖雅峰、福島正則、鈴木浩悦、鈴木勝士（1999）マウス口蓋ヒダ形成過程における上皮プラコード領域での上皮細胞の増殖と移動、第 126 回日本獣医学会
 21. 高橋純子、高須正規、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士（1999）マウスの脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位、ME とバイオサイバネティクス研究会、信学技報 Technical Report of IEICE, MEB98-126
- G. 知的所有権の取得状況**
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. 実用新案登録
なし。

6. 塩素化芳香族による生殖機能への影響評価

研究者 大村 実 (九州大学大学院医学研究院 助手)

研究要旨

廃棄物焼却の際にはダイオキシン以外にも様々な塩素化芳香族化合物が発生するが、そのうちの一つであるポリ塩化ナフタレン類が哺乳動物の生殖機能に与える影響を検討した。体重 1 kg あたり 1 μ g の 1,2,3,4,6,7-六塩化ナフタレン (1,2,3,4,6,7-HxCN) を妊娠 14 日目-16 日目のラットに投与した結果、オスの仔ラットでは精子発生開始時期の早期化が認められた。オスの仔ラットでは血清ゴナドトロピン濃度の上昇開始時期も早まっていたと考えられ、ゴナドトロピン分泌に対する影響が精子発生開始時期早期化の原因ではないかと推定された。

研究者協力者

増田 義人 (第一薬科大学物理分析学教授)
平田美由紀 (九州大学大学院医学研究院助手)
尾方 里香 (九州大学大学院医学研究院大学院生)
松浦 俊明 (九州大学大学院医学研究院大学院生)

Such remarkable changes in semen quality...is more probably due to environmental rather than genetic factors. Some common prenatal influences could be responsible both for the decline in sperm density...

A. 研究目的

「ヒトの精子が年々減少しており、私たちの身の回りにある様々な化学物質がその原因なのではないか？」

こういった危機感がここ数年、社会的に強まっている。いわゆる“環境ホルモン問題”に関連して、野生生物での生殖異変の事実や、ヒトでの生殖異変の可能性を示しているのかもしれない研究結果がマスコミによって大々的に取り上げられたことがその原因である。野生生物での生殖異変についてはここでは触れないが、ヒトでの生殖異変、特に精子の減少でその火付け役となったのが、1992 年に BMJ に発表された Skakkebaek らの論文である [1]。この論文の内容はこの 50 年間でヒトの精液中の精子濃度が半減したという衝撃的なものであり、研究者の間だけでなく社会的にも大きな反響を巻き起こした。また、著者らはこの論文の考察の部分で、

と述べており、胎児期における（化学物質を含む）何らかの環境要因による影響が精子濃度低下の原因である可能性を指摘している。確かに多くの化学物質が実験動物では精子の減少を引き起こすことが報告されており、1,2-ジブロモ-3-クロロプロパン [2] や 2-ブロモプロパン [3] などのようにヒトでも精子の減少を引き起こすことが確認されている化学物質もいくつか存在する。特に近年大きな注目を集めているのが内分泌かく乱化学物質（いわゆる“環境ホルモン”）である。内分泌かく乱化学物質とは「生物の内分泌系をかく乱することによって生物やその子孫に何らかの悪影響を与える化学物質」のことであり、現在知られている内分泌かく乱化学物質のほとんどは女性ホルモン様の作用を有する可能性が指摘されている。胎児期に女性ホルモン様の作用を有する化学物質に曝された場合には、男性の生殖器系に不可逆的な悪影響が発生するという仮説があり ([4]、図 1)、このためヒトへの悪影響としては特に男性の生殖

器系への影響の可能性が指摘されている。

しかし、“化学物質に起因するヒト精子の減少”については、現時点では科学的なリスクアセスメントが為されないまま可能性だけが独り歩きしている状態である。まず、ヒトの精子が本当に減っているのかどうかについてだが、Skakkebaek らの論文以降、精子数の経年的推移を検討した同様の論文が数多く発表されたが、精子数の減少を認めたものはむしろ少数である [5]。ヒトの精子数については“現在の各国（各地域）の平均的な精子数はどのくらいか？”というような基礎的なことすら分かっていない状態であり、その減少の有無について云々できるような段階にはない。一方、精子の減少を認めた動物実験では体重 1 kg あたりで 1 日に数十 mg～数百 mg という極めて大量の化学物質が投与されている場合がほとんどである。この投与量をヒトに外挿すると 1 日に数 g から数十 g という摂取量になり、事故に巻き込まれるか自殺しようとしたのでもなければ、摂取することはまず考えられない量となる。このような動物実験のデータからは“その化学物質が精子を減少させるような作用を有するかどうか（ハザードアセスメント）”については判定できるが、“その化学物質に起因する精子の減少が現実には起きうるのか、起きうるとしたらその危険性はどの程度なのか（リスクアセスメント）”については判定できない。要するに、ヒトの精子の減少やそれに対する化学物質の関与について社会的にも非常に関心が高まっており、“科学的な”回答が切に求められているにもかかわらず、科学者はそれに応えきれていないというのが現状だと言える。我々のような toxicologist は、リスクアセスメントに結びつくような動物実験のデータを提供することが求められていると言って良いだろう。そこで本研究では (1) ヒトでの現実的な負荷量を考慮し、(2) 生殖器系への影響を考えた場合に最も影響を受けやすいと考えられる胎児期曝露を想定して、化学物質による生殖器系へ影響を検討する動物実験を行った。

数多くの化学物質の中で、ヒトでも起きうるような低い胎児期の負荷量で実験動物では精子の減少を引き起こすことが最もはっきりしているのが 2,3,7,8-TCDD である。2,3,7,8-TCDD を妊娠メスラットに投与し、オス仔ラットの生殖器系への影響を検討したこれまでの報告を表 1 にまとめた [6-12]。ラットの妊娠期間は 21 日だが、妊娠 15 日目のラットに体重 1 kg あたり数十 ng～1,000ng の 2,3,7,8-TCDD を 1 回投与するだけで仔ラットの精子は減少する。最も低い負荷量で精子の減少を認めたのは 1997 年に発表された Gray らの研究であり、体重 1 kg あたり 50 ng という投与量で射精精液中の精子の減少を認めている。なお、1998 年に WHO のダイオキシンの 1 日耐容摂取量の勧告値が体重 1 kg あたり 1-4 pg と改訂され、これに合わせて 1999 年には我が国の 1 日耐容摂取量も法律で定められたが、体重 1 kg あたり 1 pg という値はこの Gray らの研究結果が根拠となっている。我々が摂取するダイオキシン類の大部分は廃棄物の焼却過程で発生したものであると考えられている。そのため、廃棄物焼却排ガス中のダイオキシン類に対しては社会的にも大きな関心が払われており、詳細なリスクアセスメントも行われている。しかし、我々にとっては意外なのだが、廃棄物の焼却排ガス中にはダイオキシン類以外にも様々な塩素化芳香族化合物が含まれていることにはあまり関心が払われていない。Takasuga らの調査 [13] によると、定常状態で運転中の一般廃棄物焼却炉から発生する排ガス中の塩素化芳香族化合物のうち最も発生量の多いのはポリ塩化フェノール類であり、ついでポリ塩化ベンゼン類、ポリ塩化ナフタレン類、ポリ塩化ピレン類、ポリ塩化ダイベンゾフラン類、そしてダイオキシン類の順となり、上位 3 つの発生量はダイオキシン類よりも 10 倍～100 倍以上も多い。廃棄物焼却排ガスはダイオキシン類の発生源として重要であるが、排ガス中にはダイオキシン類以外にも様々な塩素化芳香族化合物が含まれており、その中にはダイオキシン類と同じ生体作用を有する物質も

含まれていることは無視すべきではない。そこで本研究では廃棄物焼却排ガス中の様々な塩素化芳香族化合物のうち(1)ダイオキシン類よりも10倍あまり発生量が多く、(2)ダイオキシン類と同じ生体作用を有するポリ塩化ナフタレン類を検討対象とした。

ポリ塩化ナフタレン類(以下、PCNsと省略する)とは、図2に示したようにナフタレン環に2-8個の塩素が結合した塩素化芳香族化合物である。PCNsはかつてはHalowaxという商品名で、ケーブルの絶縁被覆材・木材保護剤(シロアリ防除)・潤滑油・可塑剤などに利用するため大量に生産されたが[14]、職業性曝露による塩素性座瘡の多発[14]などが問題となり、現在は生産されていない。ただ、PCNsもダイオキシン類と同様に廃棄物の焼却などに際して非意図的に生成されるため[15]、現在でも環境中に放出されていると考えられる。PCNsは自然環境中に幅広く存在しており[16-18]、最高では河川水中で数ppt、下水中で数ppb、河川堆積物中で数百ppb、下水堆積物中で数ppmというオーダーで検出されている。また、魚肉中からも数十ppt~数千ppt(脂肪あたりに換算すると数ppb~数十ppb)というオーダーで検出されている。また、PCNsは一般人の体内からも検出される。これまでに報告されているヒトの脂肪組織中のPCNsの分析結果を表2に示す[19-21]。だいたいにおいてヒトの脂肪組織中からも数ppbのオーダーでPCNsは検出されている。なお、PCNsはその他の組織と比較して脂肪組織への残留性が特に高く[22-25]、なかでも1,2,3,4,6,7-六塩化ナフタレンは極めて高い残留性を示すことがヒトでも[21]実験動物でも[25]報告されている。

PCNsに曝露された場合にはダイオキシンと同じく塩素性座瘡や肝障害などが発生する[14, 27-29]。また、ダイオキシンはAh受容体を介して様々な酵素活性を誘導し、特にP4501A1の作用によるAryl Hydrocarbon Hydroxylase(AHH)やEthoxyresorufin O-deethylase(EROD)といった酵素活性はダイ

オキシンによって誘導される代表的な酵素活性として知られているが、これらはPCNsによっても誘導される[30-33]。以上の点から、PCNsへの胎児期曝露によっても2,3,7,8-TCDDの場合と同様に仔ラットの生殖器系が影響を受ける可能性が考えられるが、これについては現在までのところ報告がない(正確に言うと、PCNsに成獣が曝露した場合の生殖器系への影響についてさえ全く報告がない)。

B. 研究方法

1. 被験物質

PCNsの異性体のうち、1,2,3,4,6,7-六塩化ナフタレン(以下、1,2,3,4,6,7-HxCNと省略する)を被験物質とした。これは、1,2,3,4,6,7-HxCNがAHH活性やEROD活性を最も強く誘導するPCNsの一つであり[33]、また、PCNsの中でも飛び抜けて生体残留性が高いためである[20, 21, 25]。なお、実験に用いた1,2,3,4,6,7-HxCNはCambridge Isotope Laboratoriesより購入した。

2. 実験動物

妊娠12日目のWistar系ラット(Kud:Wistar)14匹を購入し、ランダムに7匹ずつ対照群と1,2,3,4,6,7-HxCN群に分けた。動物は1匹ずつアルミ製ケージに入れ、室温20-24℃、湿度30-60%に保持した部屋で飼育した。飲料水(水道水)および飼料(CE-2、日本クレア)は自由摂取とした。なお、飼料そのものが1,2,3,4,6,7-HxCNやその他の内分泌かく乱化学物質で汚染されている可能性が考えられたので、ランダムに抜き取った飼料について1,2,3,4,6,7-HxCN, DDE, PCBsの分析を後述する方法によって計6回行った。その分析結果を表3に示す。飼料中からは約200pptの濃度でDDEやPCBsが検出されたが、いずれの試料についても1,2,3,4,6,7-HxCNの濃度は検出限界以下であった。

3. 1,2,3,4,6,7-HxCNの投与スケジュール

1,2,3,4,6,7-HxCNはコーンオイルに溶解し、