

熟期に至るマウス発生・成長の様々な過程で環境毒性物質を投与し雌雄生殖細胞死特に精子形成過程への影響を検討すると共にその分子機構の解明を行うことを目的とする。

実際、我々はこれまでに哺乳類精子形成過程並びに卵子形成過程に於いて特にその生殖細胞死に関する詳細な検討を重ねてきた。それらの結果を基に、内分泌攪乱作用が疑われている DES をはじめポリ塩化ビフェニル、BPA、DDT 並びにアンドロゲン作用を攪乱する DDE 等のマウス生殖細胞死並びに生殖腺機能及び生殖器官への影響を発生初期より個体レベルで検討し、これら環境毒性物質の有害性を EB の影響と比較しながら個体レベルで判定できる評価系の確立を目指す。同時に本研究では、分子組織細胞化学的手法を駆使して形態学的知見と分子生物学の接点に於いて環境毒性物質の作用メカニズムを明らかにすることも目的としており、大きな社会的興味を喚起しているヒトでの精子数の半減や精巣がんの増大、子宮内膜症の誘発といった医学的事象に対する科学的洞察を試みる予定である。尚、平成 12 年 10 月に内分泌攪乱化学物質問題検討会により選定されたリスク評価優先物質 8 種に関しても鋭意検討を進める。

本年度の具体的な研究標的は以下のものであった。

1) 種々の環境毒性物質について、特に成熟雄マウスに広範囲の濃度領域で皮下投与を行い、生殖細胞死への影響を形態観察と分子組織化学的方法により検討する。同時に、細胞死誘導機構として関与の認められた Fas/Fas L 及び関連分子として Bcl-2 や Bax の発現を免疫組織化学的に検討する。2) 決定したプロトコルに従って、妊娠マウスへ環境毒性物質を腹腔内投与し、新生仔及び成熟期での生殖腺及

び生殖細胞動態(細胞死と増殖活性)を検討する。3) これら毒性物質の第一作用点として、エストロゲン受容体 α と β 、アンドロゲン受容体並びにプロゲステロン受容体の発現状態を 1)、2) の組織切片に於いて解析する。4) 環境毒性物質による活性酸素障害に対する生殖細胞防御機構への作用を検討するため、決定されたプロトコルに従って、上記処理組織での活性酸素代謝関連物質及び抗酸化酵素の発現を生化学的及び分子生物学的に検討する。5) 決定したプロトコルに従って、脳膜標品での $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合活性に対する種々の内分泌攪乱化学物質の影響を、上記組織について検討する。6) 本年度は、マウス子宮内膜症モデルを作製し、種々の環境毒性物質と共に特にダイオキシン類投与による異所性子宮内膜増殖への影響を検討する。

B. 研究方法

1) 成熟マウス並びに妊娠マウスへの生殖毒性物質投与プロトコル

特に本年度は成熟 ICR 雄マウス(6週令)へのこれら生殖毒性物質の広範囲の濃度での影響を検討するため、以下のような投与量(kg 体重あたり)で最終的に 5% エタノール/corn oil に溶解後、5日ごとに皮下投与した。最初の投与から 20 日に組織採取を行った。

EB: 1 ng - 100 μg , 2mg, 4 mg/kg 体重、DES: 1 mg, 10 mg, 20 mg, 100 mg/kg 体重、BPA: 4 μg - 40 mg, 200 mg/kg 体重、DDE: 10 mg, 50 mg/kg 体重。新たなリスク評価優先物質 8 種に関しては、4-*t*-オクチルフェノール(OP): 10 ng - 10 mg/kg 体重、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP): 1.2 mg - 1.2 g/kg 体重、オクタクロロスチレン(OCS): 0.12 mg - 120 mg/kg 体重、ベンゾフェノン(BP): 200 mg/kg

体重、4-ノニルフェノール(NP): 80 mg/kg 体重、トリブチルスズ(TBT): 32.6 mg/kg 体重、フタル酸ジ-n-ブチル(DBP): 1.25 g/kg 体重、フタル酸ジシクロヘキシル(DCHP): 1 g/kg 体重、で検討した。

対照群としては、5% エタノール/corn oil を同様に投与した。各実験群では、最低3匹ずつのマウスを用いた。

妊娠マウス処理に関しては、昨年度の結果を参考にしてEB並びにDESを妊娠第7日目から2日おきに第19日目まで腹腔投与し、出産後2週令、4週令及び6週令にて安楽死させ組織を採取した。投与量は、EBが3.3 μ g及び33 μ g/kg 体重、DESでは3.3 μ g、33 μ g及び330 μ g/kg 体重で検討した。対照群としては、5% エタノール/corn oil を用いた。

採取した組織は、一部は4%パラホルムアルデヒド/PBS固定後、パラフィンに包埋し、一部は凍結試料として保存した。パラフィン切片(5-6 μ m)は、シラン処理スライドグラスに拾い、ヘマトキシリン/エオシン染色並びに以下の種々の分子組織細胞化学的検索に使用した。

2) アポトーシス細胞の同定と関連遺伝子産物の発現検討

昨年度の結果に基づき、アポトーシス細胞の同定には、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼによるピオチン-16-dUTPの取り込みによりDNA二本鎖切断部位を視覚化するTUNEL法を行った。マウスFas並びにFas Lの発現は、これらに対するウサギポリクローナル抗体(自作)を用いて免疫組織化学により検討した。またBcl-2並びにBax発現は、市販抗体により同様に検索した。

3) ステロイドホルモン受容体の発現検討

エストロゲン受容体(ER) α と β 、アンドロ

ゲン受容体(AR)並びにプロゲステロン受容体(PR)の発現動態の解析には、免疫組織化学とin situ hybridization法を用いて検討する必要があるが、特に精巣での発現検討を有効に行うためには、実験条件の至適化が必要であった。免疫組織化学に関しては、ER β に対する抗体(埼玉医大・松村正實教授より供与)を除いて全て市販のものを利用し、抗原の賦活化を中心として至適化した。ARとPRについては、ヒト抗原に対する抗体であり、交差反応の検討を行った。シグナルは最終的に、ペルオキダーゼ標識抗体を用いて視覚化した。Insitu hybridizationに関しては、本年度は特にマウスER α 並びにER β に対する合成オリゴDNAを作成し、チミン二量体或いはジゴキシゲニン標識法にて非放射性プローブとし、前処理条件等の至適化を試みた。

4) 活性酸素代謝関連物質及び抗酸化酵素の発現の検討

マウス臓器の分離調整: 実験マウスの臓器を分離し、即時に液体窒素で凍結後生化学の実験まで-80℃で保存した。実験直前に凍結標本を湿重量約0.12gの小片に分けた。9倍量の融解緩衝液(10mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 0.137 M NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, pepstatin 2 μ g/ml, leupeptin 2 μ g/ml)に浸し融解した。その後4℃中でポリトロンホモゲナイザーを用いて30秒間処理した後15,000回転で10分間、4℃にて遠沈を行い上清を試料とした。

グルタチオン濃度の測定: 昨年度の結果に従って、DTNB酵素リサイクリング法で測定した。

抗酸化酵素の活性測定: グルタチオン過酸化酵素(GPX)、GST、Cu、Zn-SOD、Mn-SODらの酵素活性を昨年度記述の手法に則して測定し

た。検体液中の蛋白濃度をBCS法で分光光度計を用いて測定し、各活性はmg蛋白あたりで表現した。

5) G蛋白発現の検討

本年度は、特にDES処理した成熟雄マウス脳をcerebral cortex, hippocampus, hypothalamus, amygdalaに分離して採取し、昨年度決定した条件に従って $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合活性よりG蛋白の発現量の変化を検討すると共に、更に各G蛋白質の α サブユニット発現量を特異抗体を用いてのウェスタンブロット法にて検討した。ウェスタンブロット法は、12% SDS-PAGEにて抽出蛋白を分離後、セミドライブロットによりPVDF膜に転写し、各G蛋白質の α サブユニットに対する抗体を作用させた。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体反応後、化学発光法によりシグナルをX線フィルム上に検出した。バンドの定量は、NIH-Imageを用いて測定した。

6) 異所性子宮内膜症モデルの作成

マウス腹腔内へ片側子宮細切片を移植し、マウス子宮内膜症モデルを作成した。一週後に、ダイオキシン活性を示す2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-furan (TCDF)を0, 1, 3, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重で一週間おきに1ヶ月間経口投与し、腹腔子宮片への影響を検討した。組織の増殖能については、PCNAの免疫染色により、またER α の発現に関しては上記と同様に特異抗体を用いた免疫組織化学によって検討した。

尚、これら環境毒性物質の研究の施行に当たり、長崎大学医学部動物実験施設動物実験委員会より安全面と倫理面での審査が行われ、専用飼育室の開設と共に本動物実験計画の実行許可を与えられている。

C. 研究結果

1) 成熟マウスに於けるエストロゲン並びに種々の生殖毒性物質投与による精巣への影響

EB投与により濃度依存的に生殖細胞アポトーシス頻度は増大し、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重で対照群との差が有意となり、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重投与群では対照群に対し約60%の増大を示した。2 mg - 4 mg/kg体重群では、更にアポトーシスを増大させたが精粗細胞への影響は顕著ではなかった。一方DESでは、20 mg/kg体重までは濃度依存的にアポトーシス頻度を増大(約1.9倍)させたが、100 mg/kg体重では逆に頻度を低下させる傾向のあることが判明した。DDE投与では、DESと同様にlow-dose effectが見られ、10 mg/kg体重投与でアポトーシス頻度は約2.2倍となったが、50 mg/kg体重投与では対照群レベルであった。BPAでは更に驚くべきことに、その低濃度は対照群で見られる恒常的な生殖細胞アポトーシスの出現を約50%まで抑制することが判明した(図1)。

2) 成熟マウス精巣に於けるEB並びにDESのアポトーシス関連遺伝子発現への作用

正常成熟マウス精巣では、FasはLeydig細胞にFas LはSertoli細胞に特異的に発現しており、恒常的に生じるアポトーシスとは無関係であった。Bcl-2は殆どの精子形成細胞に陽性であり、Baxは時折強く発現する細胞を認めるが、TUNEL陽性細胞とは必ずしも一致しなかった。一方、EBを投与すると明らかにTUNEL陽性細胞の増大と共にFas陽性生殖細胞が増大し、EBによるFas誘導とアポトーシス増大の因果関係が認められたが、Bcl-2/Baxの関与は明らかではなかった。DES投与に於いては、Fasの陽性頻度は20 mg/kg体重投与で最大となり、100 mg/kg体重群では逆に対照レベルに低下した。Fas LはSertoli

細胞のみに陽性であるが、20 mg/kg 体重群ではその染色強度が増大した。興味深いこと、Bax 発現の顕著な増大が DES 20 mg/kg 体重で観察され、低濃度及び高濃度では Bcl-2 発現の抑制が認められた (図 2)。

3) 成熟マウス精巣に於ける EB 並びに DES のステロイド受容体発現への作用

正常精巣では、ER α 発現は Leydig 細胞に、また ER β は精粗細胞並びに精母細胞に認められた。また用いた抗体群では AR と PR は、陰性であった。これらの発現の EB 並びに DES の明白な効果は現在の所認められていないが、リガンドの存在下でこれら蛋白の安定性 (半減期) が変化するので、mRNA レベルでの発現検討の必要性が生じた。In situ hybridization による ER α mRNA と ER β mRNA の発現検討には、前処理条件の至適化等予備的検討が必要であるので、マウス並びにラットで共通に利用できる 45 塩基の部位を複数選択し、各々合成後ハプテン化しマウス精巣並びに卵巣切片において前処理条件等の検討を行った。その結果、最もシグナル/ノイズ比が高いセンス及びアンチセンスプローブの組み合わせが決定され、プロトコルの至適化が行われた。

4) 妊娠マウスへの EB 並びに DES 投与に伴う次世代個体精巣での生殖細胞動態への影響

胎仔暴露を受けた生後 2 週令、4 週令、6 週令の雄マウスに関して、一見判別可能な形態変化は認められず体重並びに精巣重量等にも対照群と比較して有意な変化は見られなかった。しかしながら、精巣の組織学的検討を行ったところ、EB 及び DES 暴露 2 週令マウスに於いて明らかな精子形成早熟反応が認められた。

5) 成熟マウス肝並びに精巣に於ける抗酸化機

構への DES の影響

マウス肝に於いては、10 mg/kg 以上の DES 投与によってグルタチオン (GSH) の有意な増加が認められたが、GPX 活性には変化が認められなかった。また GST 活性は DES 投与によって有意に低下し、SOD 活性に関しては Cu, Zn-SOD 依存性に 20 mg/kg 以上の DES 投与で低下した (図 3)。

一方、マウス精巣では 100 mg/kg の DES 投与によって、GSH 並びに GPX 活性の低下が認められた。GST 活性と SOD 活性は、20 mg/kg 以上の DES 投与により低下していた (図 4)。

6) 成熟マウス脳組織での G 蛋白発現への DES の影響

DES 処理した成熟雄マウス脳の cerebral cortex, hippocampus, thalamus, amygdala 各部位に於ける G 蛋白質の発現への効果を検討したところ、cortex では Gi α サブユニットの DES 濃度依存的な増大が見い出された (図 5)。Hippocampus では、Gq α サブユニットの有意な減少と Gi α サブユニットの増加傾向が認められた (図 6)。Thalamus では Gq α サブユニットの有意な減少が、amygdala では Gi α サブユニットの減少傾向が見られた。一方、Gs 及び Go α サブユニットに関しては有意な変化を認めなかった。

7) 異所性子宮内膜症モデルでのダイオキシン類の影響

本モデルでは移植片は移植後 4-6 週間に渡って成長し、腸管膜上に内溶液を有する嚢胞性腫瘍を形成した。組織は、内膜腺上皮と間質からなり異所性内膜症と酷似した。この移植片で、細胞増殖への TCDF 投与の効果を検討したところ、TCDF の濃度依存的に管腔線上皮における PCNA 陽性細胞の増大を引き起こした。同時に、管腔線上皮における TUNEL 陽

性細胞数の濃度依存的低下も認められた。更に、ER α の発現を検討した所、10 μ g/kg 体重投与群で極大を示し、20 μ g/kg 体重投与群では逆に発現量の低下を引き起こした。

D. 考察

種々の内分泌攪乱化学物質の示す生殖毒性がしばしばそのエストロゲン類似作用によって引き起こされることから、我々はエストロゲンを示準物質とした生殖障害性の評価基準を設定することを目的として特に、マウス精子形成細胞死への効果に注目して検討を進めてきた。本年度は、精子形成細胞死誘導毒性の示準物質としてエストロゲンであるEBを1 ng/kg 体重という低濃度から順次高濃度まで投与し、生殖細胞アポトーシス頻度への影響を詳細に検討した。その結果、1 μ g/kg 体重 (1 ppb に相当) で既に有意な精子形成細胞死が検出されその後濃度依存的にアポトーシス頻度が増大した。この結果を基にして DES、DDE や BPA による精子形成細胞死への影響を比較検討した所、DES と DDE では最も障害程度が大きくなる投与量が存在し、それ以上では逆にアポトーシス頻度は減少することが明らかとなった。このような現象は子宮内膜症モデルでの ER α 発現へのダイオキシン類の影響でも見られたものであり、内分泌攪乱化学物質各々の濃度依存的毒性効果の変化を広範囲できめ細かく検討する必要性を示唆している。また BPA は高濃度では生殖細胞死を誘導するが、驚くべきことに低濃度では逆に恒常的に生じるアポトーシスを抑制した。これらの結果は、内分泌攪乱化学物質の作用は多様であり、その毒性評価には様々なパラメーターからの検索が必要であることも示している。

これら生殖毒性物質による生殖細胞死誘導への分子機構を検討する目的で、昨年度は EB について、更に本年度はより低投与量での EB 及び DES 処理精巣での Fas/Fas L 系と Bcl-2/Bax 系の関与を検討した。これらの結果は、TUNEL 陽性細胞の出現頻度の増大と共に Fas 陽性生殖細胞の増大を示し、EB 並びに DES による生殖細胞死誘導への Fas 系の積極的な関与が示された。更に、DES 投与の場合特に、TUNEL 陽性細胞頻度の極大濃度で Bax の強発現が見られ、二重のシステムによって細胞死をより確実に誘導している現実が明らかとなった。今後 BPA 及び DDE の作用との関連を明らかにする必要がある。

昨年10月にリスク評価優先物質8種に選択された、OP、DEHP、OCS、BP、NP、TBT、DBP、DCHP に関しても同様の実験プロトコルによる生殖細胞毒性をマウス精巣にて検討し始めている。

既に示したように、多くの内分泌攪乱化学物質は、精子形成過程において生殖細胞死を積極的に誘発することにより生殖能力の低下をもたらす一因となっている可能性が明らかとなってきた。生殖細胞死が特定の遺伝子発現を介する能動的細胞死であるアポトーシスによるものであって、その際 Fas/Fas L 系並びに Bcl-2/Bax 系の遺伝子並びに細胞内シグナル伝達系が関与していることが判明した訳であるが、特にエストロゲン様作用を有する生殖毒性物質の精巣への直接的影響を解析する上で、作用点としてその受容体である ER α と ER β 発現動態を明かにすることが必要である。そのために、免疫組織化学並びに非放射性 in situ hybridization による検索を開始し、ER α は Leydig cells に ER β は精粗細胞並びに精母細胞等に発現することが明らか

となった。この事は、エストロゲンの精子形成細胞への作用は嘗てより知られていた下垂体を介した系と共に、ER β を受容体とする精子形成細胞への直接作用も存在することを示すもので興味深い結果と思われる。ER β は c-Jun/c-Fos 複合体と共に細胞増殖や癌化と関係する転写調節因子結合 DNA 部位である AP-1 site に結合し下流にある遺伝子発現に影響を与えることが知られていることから、今後これら生殖毒性物質との関係調査を詳細に進めていく必要がある。

今年度の研究では、胎仔期にこれら化学物質に暴露されたことによる成熟後の生殖腺機能への影響を検討するため、妊娠時に環境生殖毒性物質として EB と DES を投与し、特に雄性生殖腺に於ける生殖細胞の分化状態を形態的に評価した。昨年度の検討で、高濃度の DES 投与では胎仔奇形を頻発し高頻度で流産を生じることが判っているので、LD50 の 1/100 以下の濃度で検討した。その結果、これら物質の投与により生後 2 週で明かな精子形成早熟効果を見い出した。現在この早熟現象が精子形成過程開始時期の若令化によるものか、或いは精子形成過程そのものの短縮によるものなのかは明かではないが、次世代への影響を考える上で早急に解決される問題と考える。また雌マウスでの性早熟の有無も重要な来年度の検討課題であると思われる。

本研究では DES のような生殖毒性物質が細胞の抗酸化機構を低下させることを明らかにした。活性酸素障害を防御する抗酸化機構はストレスに暴露されると速やかに活性酸素を消去するばかりでなく恒常的に生理機能を維持しており、その機能低下は細胞障害を促進する。抗酸化分子の中では SOD と共に GSH が中心的役割を果たしているため、還元型の

GSH の変動は環境因子による障害の鋭敏な指標と考えられる。今回肝に於いては DES で GSH はむしろ増加し、抗酸化機構の活性化が認められたが、精巣では逆に DES 投与が GSH を低下させた。精巣における GSH の役割はまだ解明されていないが、GSH 濃度の低下によるレドックス制御の破綻が精子形成細胞死誘導に関与する可能性もあり、この観点からの検討も今後の課題と思われる。

本研究に於いて、hippocampus では Gq と Gi が逆方向への挙動を示すことが見い出された。この事は、神経系に対して Gq は興奮方向へ、Gi は抑制方向に作用する可能性を考慮すると、DES の 10mg/kg 体重処理マウスでは G 蛋白質レベルでは神経系に対して抑制方向にシフトしていることが考えられる。従って、今後 DES 投与に伴う行動異常の観察・評価が必要になるものと思われる。

E. 結論

・本研究に於いて、内分泌攪乱作用が疑われている物質はしばしば強力な生殖毒性物質として働き、精子形成過程の様々の段階に於いて生殖細胞アポトーシスを誘導し、精子数の減少をもたらしている事が判明した。更にこれら種々の化学物質の生殖毒性の客観的な評価基準を策定する上で、マウス精巣は有効な哺乳類での検定システムを提供することも明らかとなった。

・今後更に、EB、DES、BPA 等の生殖毒性様式に差のあるものを示準物質としながらその作用メカニズムを明らかにするために、種々のステロイド受容体発現動態への影響並びにアポトーシス関連遺伝子群の発現検索を進める必要があり、新たに危険性の喚起された物質のリスク評価を広範囲に行い、包括的な生殖

毒性評価検定システムに発展させることが重要である。我々は、昨年10月に選定されたリスク評価優先8物質についても検定試料作成を行ってきたが、今後示準毒性物質で行った検討項目に関する詳細な検索が必須である。

・また ER β 発現と環境生殖毒性物質との関係は、増殖や発癌と密接に関与することが知られている遺伝子の転写調節領域へ作用するものとして注目に値するものであり、精巣及び卵巣のみならず雌雄付属生殖器官での発現動態を検討する必要がある。子宮内膜症モデルでのダイオキシン等の作用に関する検討も同様に受容体レベルからの更なる検討を要する。

・環境生殖毒性物質の作用機構解明と共に重要視されるべきは、如何にして毒性物質を生体内で中和し、生じた障害を最小限度に押さえられるかということであろう。生体防御機構としての抗酸化機構にDES等が影響を与えることは、これら機構を外部から支援することによる中和療法の開発の可能性を示唆するものであり、示準毒性物質並びにリスク評価優先8物質の抗酸化機構への影響の検討を更に邁進させる必要がある。

・生殖能力の低下は、生殖腺及び付属器官への障害ばかりでなく生殖行動の障害も視野に入れた解析が必要である。その点で、本研究によるG蛋白質の動態解析から、DESが行動や記憶の中枢である海馬で神経細胞興奮に対し抑制方向への反応を強めることが明らかとなり、今後これらの結果と実際の行動学的研究との協調の必要性が認識された。

F. 研究発表

1. 論文発表

・ Koji, T. Ed. (2000) Molecular Histochemical Techniques (Springer Lab Manuals), Springer-Verlag, Heidelberg.

・ He, C., Nonaka, M., Tada, T., Koji, T., Li, W., Okada, N. and Okada H. (2000) Decay accelerating factor (DAF) in guinea pig reproductive organs: significant expression on elongated spermatids and seminal vesicle epithelium as well as on cilia. Immunology, 100(1); 91-98.

・ Ejima, K., Nanri, H., Araki, M., Koji, T., Shibata, E., Kashimura, M. and Ikeda, M. (2000) Expression of mitochondria thioredoxin-dependent antioxidant protein, SP-22, in normal human and inflammatory mouse placentas. Placenta, 21(8); 847-852.

・ Matsumi, H., Yano, T., Osuga, Y., Kugu, K., Tang, X., Xu, J. P., Yano, N., Kurashima, Y., Ogura, T., Tsutsumi, O., Koji, T., Esumi, H. and Taketani, Y. (2000) Nitric oxide as a cytostatic factor in ovarian follicle development. Biol. Reprod., 63; 141-146.

・ Nakamura, H., Kawakami, A., Yamasaki, S., Nakashima, T., Kamachi, M., Nigita, K., Kawabe, Y., Nakamura, T., Koji, T., Hayashi, Y. and Eguchi, K. (2000) Expression and function of X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein in Sjogren's syndrome. Lab. Invest., 80(9); 1421-1427.

・ Ito, M., Izumi, S., Uemura, M., Baba, N., Suyama, K., Kuga, Y., Mizuno, A., Nakane, P.K. and Koji, T. (2000) Prevention of death of axotomised hypoglossal neurons and promotion of regeneration by chitin