

平成13年度
内分泌攪乱化学物質等の作用
メカニズムの解明等基礎的研究
研究報告書

平成14年3月

財団法人日本公衆衛生協会

目 次

. 目 的 -----	1
. 内 容 -----	1
-1. 指定研究 -----	1
-2. 業務担当者一覧 -----	1
-3. 指定研究結果報告 -----	3
(1) 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の分子細胞生物学的 メカニズムの解明 -----	5
(2) フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの代謝の種差に関する検討 -----	23
(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 に関する研究 -----	39
(4) フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価 に関する研究 -----	59
(5) TBT によるラット妊娠初期胚の着床不全に関わるメカニズムの解明 ---	67
-4. 指定研究結果の評価 -----	81
-5. 公募研究の実施 -----	81
-5-1. 内分泌攪乱化学物質等研究推進専門委員会名簿 -----	81
-5-2. 公募採択結果 -----	81

． 目 的

人や野生動物の内分泌作用を攪乱し、生殖機能障害、先天奇形等を引き起こす可能性のある内分泌攪乱化学物質による環境汚染は、科学的には未解明な点が多く残されているものの、生物生存の基本的条件に関わる問題であり、世代を越えた深刻な影響をもたらすおそれがあることから環境保全上の重要課題である。

今後、内分泌攪乱化学物質のリスク評価を実施するために、内分泌攪乱化学物質が人や野生動物に影響を及ぼすメカニズムについての知見の蓄積を急ぐ必要があるが、そのための調査研究はこれまでほとんど実施されていない。

そこで、本調査では、内分泌攪乱化学物質等の作用メカニズム等に関する実態を解明することを目的とした。

． 内 容

内分泌攪乱化学物質等の作用メカニズムに関する 分子生物学的機構の解明、バイオマーカーの開発・評価、胎児期の曝露による影響発現の解明等、各種調査研究及び評価解析について、各研究班毎に、以下 -1. の指定研究を実施するとともに、作用メカニズムに関する研究の公募を行った。また、研究終了後、指定研究及び公募研究の成果を評価した。

-1. 指定研究

- (1) 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の分子細胞生物学的メカニズムの解明
- (2) フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの代謝の種差に関する検討
- (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に関する研究
- (4) フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価に関する研究
- (5) TBT によるラット妊娠初期胚の着床不全に関わるメカニズムの解明

-2. 業務担当者一覧

- (1) 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の分子細胞生物学的メカニズムの解明
 - 研究者 湯浅 茂樹（千葉大学大学院医学研究院形態形成学教授）
 - 研究協力者 外山 芳郎（千葉大学大学院医学研究院形態形成学講師）
 - 前川真見子（千葉大学大学院医学研究院形態形成学助手）
 - 古関 明彦（千葉大学大学院医学研究院発生生物学教授）
 - 関 直彦（千葉大学大学院医学研究院機能ゲノム学講座助教授）
 - 八木 健（大阪大学細胞工学センター教授）

(2) フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの代謝の種差に関する検討

研究者 那須 民江 (信州大学医学部衛生学助教授)
研究協力者 青山 俊文 (信州大学医学部衛生学教授)
横田 博 (酪農学園大学獣医学部助教授)
王 瑞生 (独立行政法人産業医学総合研究所主任研究員)
山ノ下 理 (信州大学医学部研究生)

(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に関する研究

研究者 小路 武彦 (長崎大学医学部第三解剖学教授)
研究協力者 菱川 善隆 (長崎大学医学部第三解剖学講師)
進 正志 (長崎大学医学部第三解剖学助手)
和泉 伸一 (長崎大学医学部第三解剖学助手)
近藤 宇史 (長崎大学医学部病態生化学教授)
佐藤 浩 (長崎大学医学部附属動物実験施設教授)

(4) フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価に関する研究

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)
研究協力者 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)
玉置 淳子 (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員)
近藤 朋子 (北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野研究員)
梅村 朋宏 (北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野大学院生)
倉橋 典絵 (北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野大学院生)

(5) TBT によるラット妊娠初期胚の着床不全に関わるメカニズムの解明

研究者 鈴木 勝士 (日本獣医畜産大学教授)
研究協力者 鈴木 浩悦 (日本獣医畜産大学講師)
斉藤 賢一 (日本獣医畜産大学助教授)
竹中 基郎 (日本獣医畜産大学大学院生)
八木 美央 (日本獣医畜産大学大学院生)

-3 . 指定研究結果報告

(1) 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の 分子細胞生物学的メカニズムの解明

研究者 湯浅 茂樹 (千葉大学大学院医学研究院 発生医学講座形態形成学 教授)

研究要旨

内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の機序として、精巣発達過程におけるエストロゲン様作用物質に対する曝露が関与することが示唆されているが、これまで精巣発達過程に対するエストロゲン自体の作用が明確にされていなかった。本研究では、まず、齧歯類新生仔期に β -estradiol 3-benzoate, 17β -estradiol を投与すると、精巣が発達して精子細胞が分化する段階になってはじめて造精細胞の中で精子細胞の特異的形態異常が起こることを明らかにした。形態異常の代表的なものとして、尖体顆粒の位置異常や尖体の変形、核の変形、精子細胞-セルトリ細胞間接着構造の異常が高率に認められた。このような異常精子細胞は精子まで発達せず死滅してしまうと思われる。これらのモデル化合物の精子形成阻害機構をもとに、内分泌攪乱作用が疑われる優先12物質中、エストロゲン受容体との親和性の高いアルキルフェノール(nonylphenol, 4-octylphenol)と親和性の低い tributyltin、さらにエストロゲン受容体との親和性が高いが精子形成に対する作用が明確でなかった bisphenol A について精巣発達過程における曝露が及ぼす影響を調べた。その結果、アルキルフェノール、tributyltin では精巣発達に対する障害作用を見いだせなかったが、bisphenol A は β -estradiol 3-benzoate, 17β -estradiol と同様に、精子細胞が分化する段階になってはじめて精子細胞の特異的形態異常を引き起こすことを明らかにした。

bisphenol A は基本的にエストラジオール投与と同様の精子細胞の形成障害を示し、エストロゲン受容体を介した効果であると考えられる。bisphenol A のエストロゲン受容体への結合能はエストラジオールの1,000分の1と言われているが、in vivo では予想されるよりはるかに強い障害作用を持っていた。さらに、この異常は生後5日から11日という特定の期間の曝露で引き起こされた。

β -estradiol 3-benzoate, 17β -estradiol と bisphenol A の作用は、強力なエストロゲン様作用物質と考えられる diethylstilbestrol (DES) による精子形成における減数分裂過程遅延作用(昨年度の本研究成果)とは全く異なる生殖細胞発達段階で検出された。いずれにおいてもセルトリ細胞の特殊接合装置の形成障害が見出され、両グループの化合物の共通な作用点の一つはセルトリ細胞にあると考えられた。また、tamoxifen はエストロゲン受容体の antagonist であるが弱い agonist の作用も持ち、精巣に対しては弱い DES 様の作用を示した。特筆すべき点は、それ自体では効果のない低濃度の DES と tamoxifen を同時に投与すると、DES の作用が相乗的に増強され Leydig cell の発達が著明に阻害されたことである。

セルトリ細胞株 TM4 に DES を作用させると、形態学的変化とともに分子量 38kDa の蛋白(p38)のチロシンリン酸化が特異的に亢進するが、DES を除去し形態学的変化が回復した後も p38 のチロシンリン酸化は持続した。また、上記 bisphenol A, β -estradiol 3-benzoate, 17β -estradiol、アルキルフェノール、tributyltin のいずれもが p38 のチロシンリン酸化を誘導した。

以上の結果から、内分泌攪乱作用が疑われる候補化合物の多くはセルトリ細胞に作用して生殖細胞の分化、発達に影響を及ぼすが、各物質はエストロゲン受容体との結合だけでなく、細胞内情報伝達系に多様な効果を及ぼして、場合によっては複数の作用の弱い化合物が相乗的に働いて特有の精巣機能障害作用を示すと考えられる。

研究協力者

外山芳郎 (千葉大学大学院医学研究院形態形成学・講師)
前川真見子 (千葉大学大学院医学研究院形態形成学・助手)
古関明彦 (千葉大学大学院医学研究院発生生物学・教授)
関直彦 (千葉大学大学院医学研究院機能ゲノム学講座・助教授)
八木健 (大阪大学細胞工学センター・教授)

A. 研究目的

現在、環境中の内分泌攪乱作用を持つ化学物質による生物の生殖機能の障害が社会的に大きな問題となっており、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機能の変異の観点から注目されている。これらの物質がなぜ有害であるのかを細胞、分子のレベルにおける作用機構の点から明らかにするとともに、有害性の予想される物質の作用を検証して、さらなる汚染拡大の合理的予防策を講ずる努力が、国民の不安に対処し安全な生活の確保を図る上で必要である。

本研究では内分泌攪乱物質の作用メカニズムについて、精子形成障害の機序を対象とし分子生物学、細胞生物学的手法を用いて解明し、内分泌攪乱物質による健康障害の分子細胞生物学的マーカーを見出すことを目的とする。本研究による代表的な内分泌攪乱物質の作用機序解明の成果は、内分泌攪乱作用の疑われる物質の客観的な体系的検索法の開発に寄与することが期待できる。

平成13年度は、内分泌攪乱作用が疑われる優先12物質の中で、特にエストロジェン受容体との親和性が強いアルキルフェノールのノニルフェノール、オクチルフェノールと、エストロジェン受容体との親和性が低いにも関わらず内分泌攪乱作用の強いトリブチルスズを中心に、エストラジオールと内分泌攪乱化学物質のプロトタイプとも言える diethylstilbestrol (DES) を対照物質として、齧歯類新生仔期における曝露が精子形成に及ぼす影響を明らかにする。さらに、平成13年度にリスク評価の対象に加えられたビスフェノール A も検討の対象とする。これと共に、前年度に引き続いて、DES がセルトリ細胞発達を障害し生殖細胞分化を遅らせる分子・細胞レベルでの作用機構を解明し、内分泌攪乱化学物質による生殖障害の基本的メカニズムを明らかにする。

B. 研究方法

1. 齧歯類新生仔期におけるエストラジオール、ビスフェノール A、アルキルフェノール、トリブチルスズ曝露の精子形成に対する影響

優先12物質中、特にエストロジェン受容体との親和性が強いノニルフェノール、オクチルフェノールと、エストロジェン受容体との親和性が低いにも関わらず内分泌攪乱作用の強いトリブチルスズ、更に平成13年度にリスク評価の対象に加えられた bisphenol A について、 β -estradiol 3-benzoate, 17 β -estradiol, DES を対照物質として齧歯類新生仔期における曝露が精子形成に及ぼす影響を検討した。

特に、減数分裂過程を中心とした精巣機能発達に注目するとともに、分化した精子細胞 (spermatid) の形態、機能についても検討する。また、新生仔期にエストラジオール、ビスフェノール A に曝露された雄の齧歯類が成熟後に妊孕性において異常を示すかどうかも検討する。投与量に関しては、特に低濃度曝露を中心に解析を行う。これとともに、減数分裂進行に関わる血液-精巣関門の接着構造、特殊接合装置の発達について、電顕的解析、共焦点レーザー顕微鏡による細胞骨格系の変異について解析を行う。

材料

マウスはすべて ICR 系、ラットはすべて Wistar 系を用いた。

方法

投与量はすべて、/匹/回であらわす。新生仔への投与は原則的には生後1日(生まれた翌日)から生後11日までの隔日に合計6回投与した。生後1週、2週、3週、4週、5

週、6週、7週、8週、9週と、生後発達段階を追って1週齢毎に精巣を顕微鏡、電顕で観察した。マウスは成長速度が速いので、場合によっては3, 4日毎に試料を取ったものもある。さらに、下記の各実験で新生仔期にエストラジオール、ビスフェノール A を投与したマウスの一部は成熟後の妊孕性についても検討した。

実験 I

- A) マウスへの β -estradiol 3-benzoate (Sigma, St.Louis, Mo.) 投与実験
6.25ng、12.5ng、125ng、625ng、1.25 μ g を生後1日より隔日で6回皮下投与した。
- B) ラットへの β -estradiol 3-benzoate 投与実験
500ng を A) と同様に生後1日より隔日で6回皮下投与した。
- C) ラットへの 17 β -estradiol (Sigma) 投与実験
500ng を A) と同様に生後1日より隔日で6回投与した。
- D) ラットへの bisphenol A (Aldrich, Milwaukee, Wis.) 投与実験
1 μ g、10 μ g、100 μ g、600 μ g を A) と同様に生後1日より隔日で6回投与した。ただし600 μ g 群は生後3日～生後25日までの間に全て死亡した。

実験 II

- A) ラットへの tributyltin (IV) chloride (和光純薬、大阪) 投与実験
0.72ng、72ng、0.24 μ g、0.72 μ g を生後1日から実験 I A) と同様に隔日で6回投与した。
0.24 μ g、0.72 μ g 投与群は初回注射後数日以内に死亡。
- B) ラットへの nonylphenol, tech. (Aldrich) 投与実験
0.56 μ g を A) と同様に隔日で6回投与した。
- C) ラットへの 4-octylphenol (Aldrich) 投与実験
600 μ g を A) と同様に隔日で6回投与した。

実験 III

- A) ラットへの tamoxifen (Sigma, St.Louis, Mo.) 単独投与実験
2 μ g、10 μ g、20 μ g、80 μ g を隔日で6回投与したグループと、連続3日(生後1～3日)投与したグループを調べた。
- B) ラットへの tamoxifen と DES (Sigma, St.Louis, Mo.) の混合投与実験
tamoxifen 2 μ g + DES 10 μ g、tamoxifen 10 μ g + DES 10 μ g、tamoxifen 20 μ g + DES 10 μ g を隔日で6回投与した。
- C) ラットの血液・精巣閉門形成後における tamoxifen または DES の単独投与実験。
tamoxifen 20 μ g または DES 10 μ g を生後20日から3日間それぞれ単独投与した。

実験 IV

- マウスの tamoxifen 単独投与および tamoxifen と DES の混合投与実験
tamoxifen 2 μ g の3日連続および隔日6回投与、tamoxifen 8 μ g の3日連続投与、tamoxifen 2 μ g + DES 1 μ g の隔日6回投与、tamoxifen 1 μ g + DES 0.5 μ g の隔日6回投与をおこなった。

2. in vitro における作用解析

これまでの我々の実験成績から、DES およびエストラジオールの一次作用点は精巣内の生殖細胞以外の体細胞側、特に Sertoli 細胞にあることが強く示唆されている。精巣組織全体を用いた in vivo の生化学的実験では Sertoli 細胞特異的な変化が検出されにくいと考えられる。そこで、内分泌攪乱化学物質の細胞内シグナル伝達系を介する作用機構をもとにした機能的スクリーニングの開発を念頭に置いて、Sertoli 細胞株、Leydig 細胞株における DES, エストラジオール、ビスフェノール A、アルキルフェノール、トリブチルスズ曝露による形態変化と、2次元電気泳動を用いたタンパク質チロシンリン酸化の解析を行う。

材料：1) 培養細胞：マウス精巣セルトリ細胞由来株 TM4 およびライディッヒ細胞由来株 TM3 は ATCC から購入した。

2) 使用した薬剤：

diethylstilbestrol (DES): Sigma D4628, F.W. 268.4

tamoxifen (TAM): Sigma T9262, F.W. 563.6

17 β -estradiol (E2): Sigma E2758, F.W.272.4

β -estradiol 3-benzoate (E2B): Sigma E8515, F.W. 376.5

bisphenol A (BPA): Aldrich 23,965-8, F.W.228.29

nonylphenol (NOP): Aldrich 29,085-8, F.W. 220.36, d:0.937

4-octylphenol (OCP): Aldrich 38.444-5, F.W.206.33

tributyltin(IV) chloride (TBT): Wako 208-08983, F.W. 325.51, d:1.200

方法：

【細胞培養】

各薬剤を DMSO で溶解後、細胞培養液に添加して一定の期間培養した。DMSO のみを培地に加えたものを対照とした。培養液を PBS で数回洗浄後、二次元電気泳動用には IEF lysis buffer (8M urea, 2% CHAPS, 40mM Tris, 1mM PMSF, 1mM Na₃VO₄)を、一次元電気泳動用には SDS sample buffer (50mM Tris-HCl, pH6.8, 2% SDS, 10% glycerol)を加えて細胞を培養皿から回収後、ポリトロンで破碎して細胞抽出液とした。

【Western blot】

二次元電気泳動用には、まず Immobiline dry strip ゲル(pH3-10; Amersham) を用いて、得られた細胞抽出液をゲルあたり 40 μ g 添加し、等電点電気泳動を行った。二次元目を 10% ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE し、PVDF 膜にブロッティングした。1% BSA でブロッティング後、HRP 標識抗リン酸化チロシン抗体 (ECL チロシンリン酸化蛋白質検出システム; Amersham) と室温で一時間インキュベーションした。ECL Plus (Amersham)で化学発光させてチロシンリン酸化タンパクのスポットを検出した。一次元電気泳動用サンプルも SDS-PAGE 後同様にウェスタンブロットを行った。

【細胞分画】

i) Triton X-100 可溶分画および不溶分画の調製

TM4 細胞を 1% Triton X-100 を含む buffer で処理し、細胞抽出液を Triton 可溶分画と不溶分画とに分けた。p38 がどちらの分画に多く存在するか、一次元 Western Blot で調べた。

ii) 粗細胞質可溶分画、粗細胞質不溶分画および粗核分画の調製

TM4 細胞を等張液中でホモジェナイズし、2500g で 5 分間遠心し、粗細胞質分画と粗核分画とに分けた。前者をさらに 15,000g で 15 分間遠心し、上清を粗細胞質可溶分画、沈殿を粗細胞質不溶分画として、一次元 Western Blot で解析した。

(倫理面への配慮)

実験動物としてラット、マウスを用いるが、DES、エストラジオール、ビスフェノール A、アルキルフェノール、トリブチルスズの皮下投与は少量、短時間で行い動物の苦痛を軽減する。また、組織標本作製時の灌流固定にあたっては、ネンプタール、エーテルによる深麻酔下で操作を行い、動物の苦痛を可能な限り軽減する。

C. 研究結果

1. 齧歯類新生仔期におけるエストラジオール、ビスフェノールA、アルキルフェノール、トリブチルスズ曝露の精子形成に対する影響

実験 I

β -estradiol 3-benzoate, 17 β -estradiol による障害 (図 1) と bisphenol A による障害 (図 2, 3) には高い共通性、類似性が認められた。[A) B) C) D)] とともに精子細胞 (とくにステップ 8 精子細胞以降) に形態異常が認められた。これは first wave の精子細胞に高頻度に認められ、全精子細胞の 50% に達した。second wave、third wave と進むにつれ、精子細胞の奇形頻度は 30%、10% と低下したが、なお高率であった。生後 63 日齢でも精子細胞の形態異常はかなりの率で認められた。精子細胞が分化する以前の精巢 (マウスでは 19 日齢以前、ラットでは 22 日齢以前) では造精細胞を含めて、形態学的異常は認められなかった。

精子細胞に見られた異常は、(1) 尖体顆粒の位置異常、尖体の断裂や変形と (2) 核の変形、空胞化が最も頻繁に認められ、(3) 異常精子細胞に接するセルトリ細胞の特殊接合装置の一部または全部の欠失も高頻度に認められた (図 4)。

なお、A) では 6.25ng 以下、D) では 1 μ g 以下の投与量では上記の異常は殆ど見られなかった。

また、新生仔期に β -estradiol 3-benzoate, 17 β -estradiol, bisphenol A を投与された雄のマウスならびにラットは成熟後においては妊孕性に異常が認められなかった。

実験 II

tributyltin (IV) chloride、nonylphenol、octylphenol は今回の実験系においては精巢障害は認められなかった。精子形成は週齢に応じて進んでいた。ただし、tributyltin (IV) chloride の場合は精巢の発達が全体的に遅れていたが、これは tributyltin (IV) chloride 処理により、その強い毒性のために体重が対照群の約 1/2 と極端に低いことによると思われる。

実験 III

tamoxifen のラット新生仔への単独投与では 20 μ g 以上で約 2 週間の血液・精巢閉門の形成の遅れが認められたが、その後は遅れをある程度とりもどして、spermiation は 9 週齢であった (コントロール・ラットの spermiation は 8 週齢なので、1 週間の遅れに相当)。これは tamoxifen 6 回投与で見られ、3 日間の連続投与では見られなかった。tamoxifen は estrogen の agonist と antagonist の両面の作用があると言われているが、この実験系に限っては弱い DES 様作用、すなわち弱い agonist として作用するようである。tamoxifen 10 μ g 以下では精巢に対する変化は見られなかった。

tamoxifen と DES の混合投与実験では Leydig cells の分化が抑えられた。対照ラットでは Leydig cells は 18 日齢から徐々に増えるが、実験群では Leydig cells は 10 週齢でも殆ど見られなかった。精巢間質には未熟な Leydig cells と思われる線維芽細胞様の細胞が少数認められた。これは tamoxifen 投与量の一番少ない組み合わせ (tamoxifen 2 μ g + DES 10 μ g) でも認められた。

この混合投与の実験系では生後 3 週齢をピークとして精細管周囲の筋様細胞の水腫変性が見られた。この水腫変性が治まった頃 (4 週齢頃) には今度は肥満細胞が出現し、これは週齢を重ねるほど出現頻度が増してくる。肥満細胞内の顆粒も 5 週齢頃では Alcian blue で青く染まるが、8 週齢頃からは Safranin で赤く染まるようになる。この筋様細胞の水腫変性および肥満細胞の出現は DES の単独投与 (10 μ g、隔日 6 回投与) でも認められたが、tamoxifen が加わると、その効果が増強される傾向がある。

実験 IV

マウスへの tamoxifen 単独投与ではすべての実験群で精巢には異常は見られなかった。

tamoxifen と DES の混合投与では約 10 日の血液・精巣閉門の形成の遅延が認められた。また、Leydig cells の分化も、ラット同様に見られなかった。ラットの同様な実験群と異なる点は、マウスでは筋様細胞の水腫変性や肥満細胞の出現が見られないことであった。

2. in vitro における作用解析

1) DES の影響

TM4 に DES を 100ng/ml、7 日間添加したところ、添加していない control に比べ、分子量約 38kDa、pI 約 5.9 の蛋白質(p38)が顕著にチロシンリン酸化されていた(図 5A,B)。この蛋白質のリン酸化は TM3 を同様に DES 処理した場合にも見られた。このリン酸化した p38 は TM4 に 100ng/ml DES を 1 日間添加しても検出された。

2) DES および TAM の影響

p38 : TM3 と TM4 について DES 単独 (100ng/ml)、TAM 単独 (100ng/ml)、DES+TAM (100ng/ml+100ng/ml) を培地に 7 日間添加し、その影響を調べた。TM3、TM4 とともに DES 単独添加のときと同様、TAM 単独添加、DES + TAM 混合添加においてもリン酸化された p38 が検出された。

形態への影響 : 顕微鏡レベルでは DES 添加による差異は見られなかったが、電顕観察により、TM3、TM4 とともに DES 処理した細胞の粗面小胞体の内腔が、コントロールに比べ拡大していることがわかった(図 6)。DES および TAM の混合添加の場合も同様の形態変化が観察されたが、TAM 単独添加では control と大差なかった。

アクチンフィラメント : DES 単独、TAM 単独および DES+TAM 混合添加した TM3、TM4 を FITC 標識ファロイジンで染色し、共焦点顕微鏡で観察した。control と比較したが、アクチンフィラメントの配列等に顕著な差は認められなかった。

3) DES 処理の影響の可逆性

p38 : TM4 に DES を 100ng/ml、7 日間添加後、3 日間 DES を除いたところ、リン酸化した p38 の検出は DES 除去後も続いた。また DES を 100ng/ml、3 日間添加後、7 日間 DES を除いたが、このときもまだ p38 の検出は続いた。ただし、10 日間 DES を添加したものと比べると、そのスポットは小さかった。

形態への影響 : TM4 に DES を 100ng/ml、7 日間添加後、3 日間 DES を除いたとき、DES 連続処理で観察された粗面小胞体の内腔の拡大は見られなくなり、control と同様の形態を示した。

4) 他の薬剤の影響

17 β -estradiol (E2): 10ng/ml, 3 days

β -estradiol 3-benzoate (E2B): 10ng/ml, 3 days

bisphenol A (BPA): 0.5 μ g/ml, 7 days

4-octylphenol (OCP): 24 μ g/ml, 5 days

nonylphenol (NOP): 2.3ng/ml, 5 days (注: 22.5ng/ml 処理でほとんど死滅)

tributyltin(IV) chloride (TBT): 0.029ng/ml, 4 days (注: 28.8ng/ml 処理で死滅; 0.29ng/ml 処理で死滅)

上記の条件で TM4 を培養したところ、すべての場合において、二次元 Western Blot でチロシンリン酸化された p38 が検出された(図 5A,C)。

5) p38 の細胞内局在

DES を 100ng/ml、7 日間添加した TM4 について一次元 Western blot で調べた。その結果、Triton 可溶分画に比べ、Triton 不溶分画に多くの p38 が検出された。また粗細胞質可溶分画には p38 はほとんど見られず、粗細胞質不溶分画に弱いバンドを検出した。p38 の大部分

は粗核分画に存在した。

6) p38 と ERK1/2 との関係

エストロゲン受容体が Src/Shc/ERK シグナル伝達系を活性化することにより作用する可能性が示された (Koustei et al., Cell, 104:719-730, 2001)。このとき MAP キナーゼである ERK1 (分子量 44kDa)、ERK2 (分子量 42kDa) はリン酸化される。DES 投与により検出される p38 が ERK1/2 であるかどうか、抗 ERK1/2 抗体 (Santa Cruz; sc-93) を用いて調べた。一次元および二次元 Western Blot を行った結果、p38 は ERK1/2 とは一致しなかった。

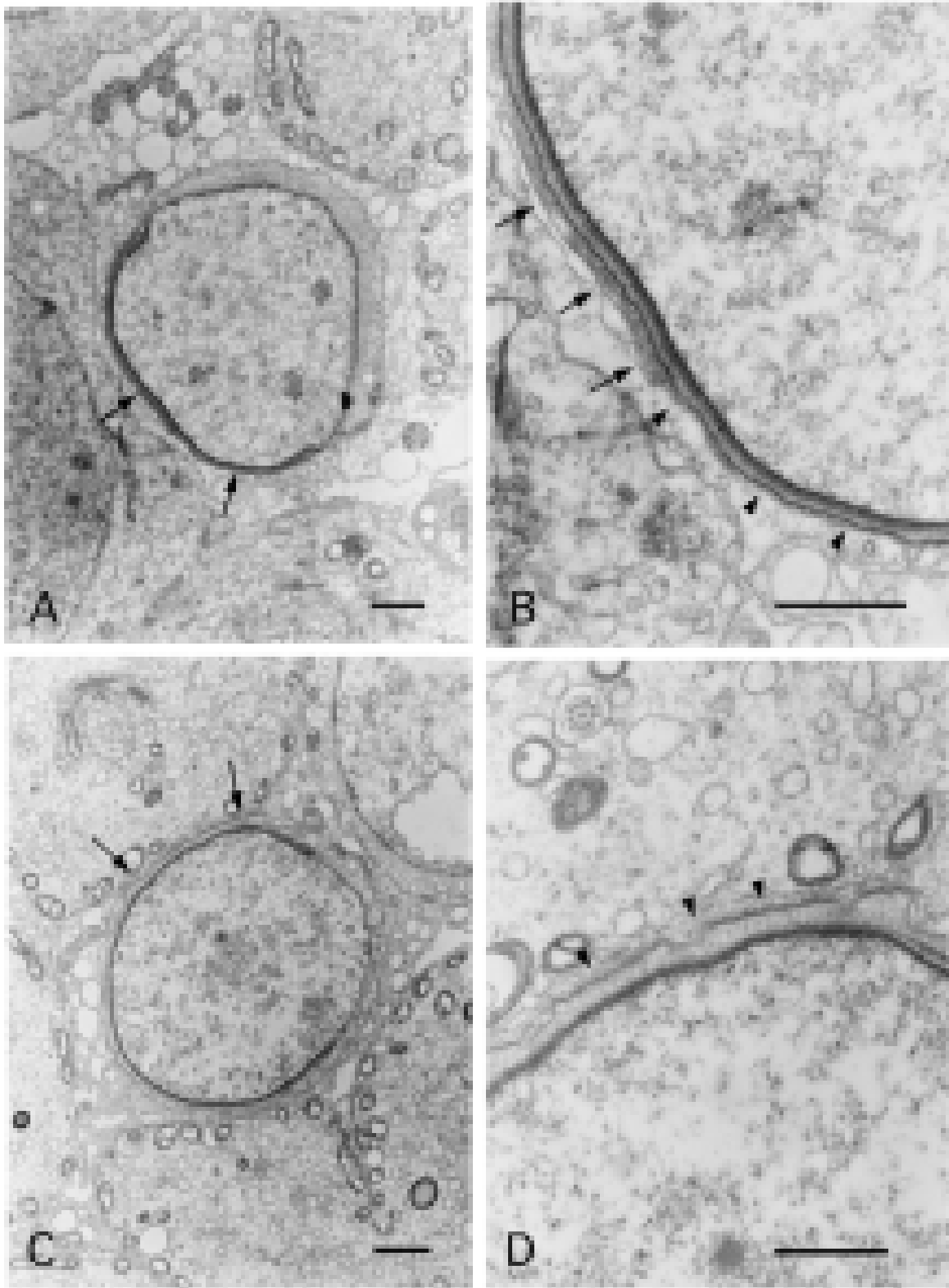


図1 . β -estradiol 3-benzoate 投与ラットの生後42日齢の精巣における形態学的異常を示す精子細胞 (step 8-9) の電子顕微鏡像。新生仔期に β -estradiol 3-benzoate を500ng/匹、隔日で6回投与したもの。A. 矢印で挟まれた領域の精子細胞 - セルトリ細胞間特殊接合装置が形成異常を示す。B. Aの矢印で挟まれた領域の強拡大。矢印で示す部分には特殊接合装置が認められるが、矢頭で示す部分では特殊接合装置が欠損している。C. 矢印で挟まれた領域の精子細胞 - セルトリ細胞間特殊接合装置が形成異常を示す。D. Cの矢印で挟まれた領域の強拡大。矢頭で示す部分では特殊接合装置が欠損している。Scale bars, 1 μ m.

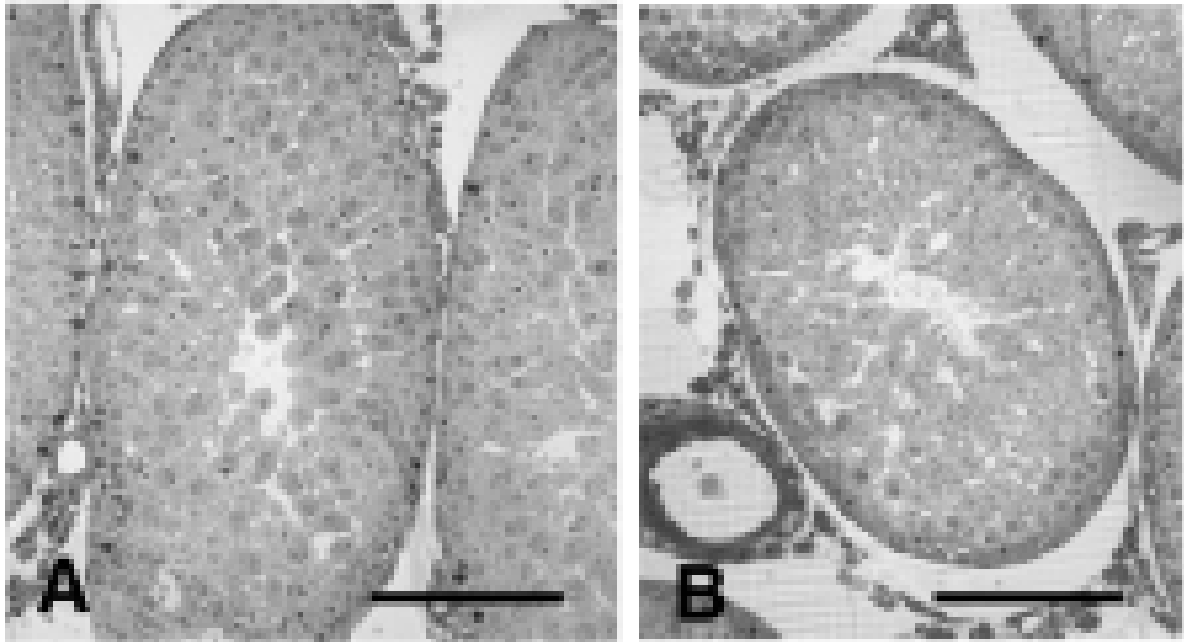


図2 . 生後35日ラット精細管のトルイジンブルー染色像。A. 対照ラット。B. 新生仔期に bisphenol A を 10 $\mu\text{g}/\text{匹}$ 、隔日で6回投与したもの。A, Bとも精子細胞が step 9まで分化し、光学顕微鏡上は明確な差異は認められない。Scale bars, 100 μm .

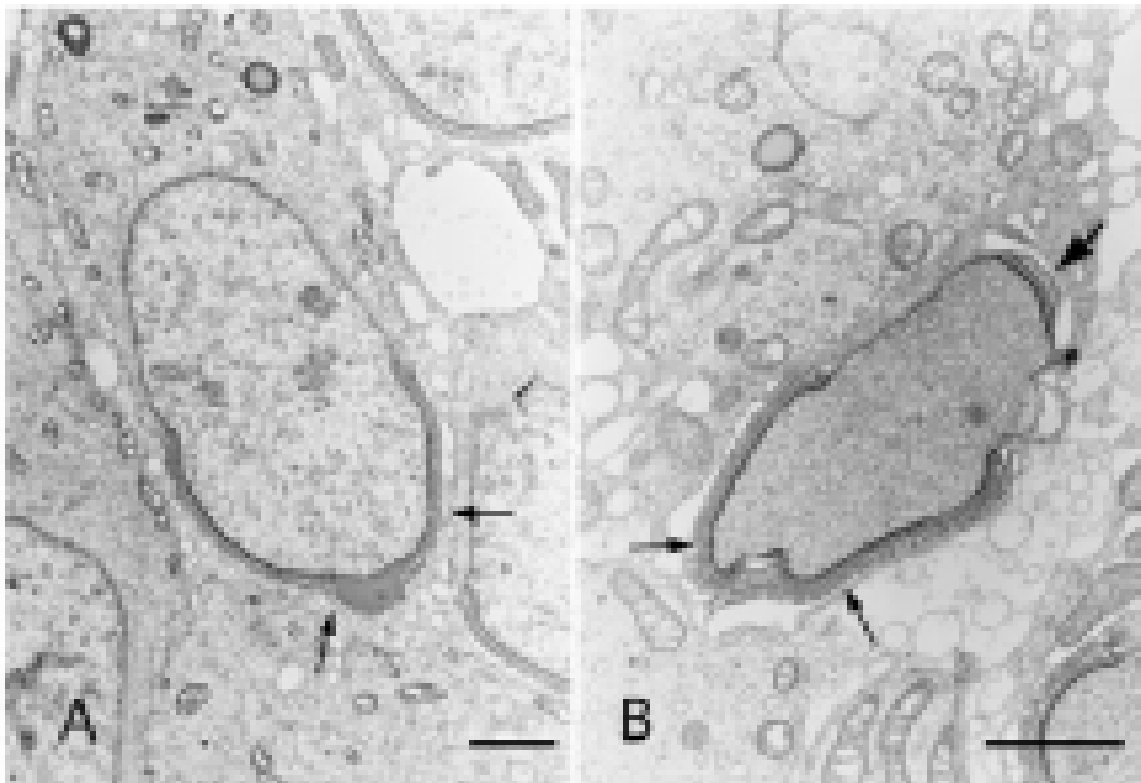


図3 . bisphenol A 投与ラットの生後63日齢の精巣の精子細胞(step 9)の電子顕微鏡像。新生仔期に bisphenol A を 10 $\mu\text{g}/\text{匹}$ 、隔日で6回投与したもの。Aは比較的正常な精子細胞で、小型矢印に挟まれた部分が正常な尖体を示す。Bは明らかに異常な精子細胞で、小型矢印に挟まれた部分は正常な尖体を示すが、大型矢印は尾部に異所的に形成された尖体を示す。Scale bars, 1 μm .