

### (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)

#### 研究要旨

哺乳類雄性生殖細胞に於ける細胞死への環境毒性物質の影響に関する知見は、未だ散発的である。我々は、確立したマウスの実験系を用いて種々の環境ホルモンの生殖細胞死への影響を検討してきた。平成 13 年度は、マウス精子形成細胞死誘導に対するエストラジオール-3-ベンゾエート (EB)、ジエチルスチルベストロール (DES)、ビスフェノール A (BPA) 及びジクロロジフェニルジクロロエテン (DDE) の影響をより低濃度領域から広範囲の濃度 (1 ng/kg 体重 - 1 mg/kg 体重) で検討し、その結果 DES では高濃度での細胞死誘導と共に 100 ng/kg 体重投与での有意な細胞死のピークを見出した。一方、BPA では高濃度での細胞死誘導の他に 4-40 µg/kg 体重で細胞死誘導阻害が認められた。今回エストロゲン対照として、エチニルエストラジオール (EE) の効果も検討したところ、EB とは異なり検討範囲内で全く生殖細胞死誘導活性を認めなかった。これらの結果は、EB もまた生殖毒性物質として作用することを示している。哺乳類雄性生殖細胞死の分子機構には不明な点が多々あるが、生殖細胞死誘導機構として Fas/Fas リガンド系の関与に注目して検討した所、EB、DES、BPA の高濃度では関与が認められたが、低濃度の DES や DDE でのアポトーシス細胞での Fas 発現は認められなかった。一方、何れの場合にも生殖細胞アポトーシス像にはミトコンドリア由来である Bax の顕著な分布変化を伴っており、生殖細胞死誘導へのミトコンドリアの関与が強く示唆された。更に低濃度の BPA による細胞死阻害は、Bax 機能を中和する Bcl-2 の発現増大によることが新たに見い出された。エストロゲン受容体である ER $\alpha$  と ER $\beta$  の発現を検討したところ、ER $\alpha$  は Leydig 細胞に特異的に発現していたが、これら環境ホルモンの影響は認められなかった。一方 ER $\beta$  は Leydig 細胞と共に精粗細胞及び精母細胞に発現しており、その発現動態がこれらの環境ホルモンにより影響を受けることから重要な作用点の一つと考えられた。ER $\beta$  ノックアウト (ERKO) マウスでの検討では、一般に生殖毒性の増大が観察されたが、正常精巢の場合と同様に DES 処理により精母細胞での ER $\beta$  の消失が認められるなど、生殖細胞死誘導への ER $\beta$  の関与が更に強く示唆された。

#### 研究協力者 (所属施設名及び所属施設における職名)

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 (長崎大学医学部実験動物施設教授)

#### A. 研究目的

「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」(環境庁)でも指摘されているように、内分泌攪乱化学物質或いは環境毒性物質の作用に関する多くの知見が、特に哺乳動物に関しては科学的な因果関係の直接的証明がないまま一つの可能性として語られている。既に約 70 種類以上の化学物質が危険物質として数え上げられており、特にこれらの物質が生殖細胞障害や生殖器系

異常を誘発する危険性から、人類に対し世代を越えた深刻な影響をもたらす恐れが強く、それらの危険性の科学的な評価は現在最も急務な内分泌学並びに生殖生物学上の問題と思われる。そこで本研究に於いては、成熟雄マウスに環境毒性物質を投与し精子形成過程への影響を検討すると共にその作用分子機構の解明を行うことを目的とした。

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基礎的な検討を重ねてきた。それらの結果を基に、内分泌攪乱化学物質として知られている DES、BPA 及び DDE を中心として、マウス生殖細胞死への影響を個体レベルで検討している。特に本年度では、EB、DES、BPA 及び DDE の精子形成過程への影響とその作用機構を環境ホルモンが作用すると思われる濃度領域で解析することを主な目的とし、以下の課題を設定した。

- 1) DES 及び BPA に関して更に低濃度領域での生殖細胞死誘導効果を TUNEL 法により検索し、EB 投与による誘導効果と比較検討する。また、エストロゲンとしてエチニルエストラジオール(EE)を EB と同様に投与し、エストロゲン対照物質間での異同も検討する。
- 2) 昨年度作製した BPA 試料並びに新たな低濃度領域での試料等に対し、Fas/Fas リガンド系及び Bcl-2/Bax 系の発現状態を免疫組織化学的に検討し、TUNEL 陽性細胞との関係を明らかにする。
- 3) 同様な試料に対し、ER $\alpha$  及び ER $\beta$  の発現検討を免疫組織化学並びに in situ hybridization により蛋白及び mRNA レベルで行い、これら内分泌攪乱化学物質の受容体発現への影響を明らかにすると共に、TUNEL 陽性細胞等との関係を検討する。
- 4) ER $\alpha$  及び ER $\beta$  のノックアウトマウスを同様に処理し、エストロゲン受容体間での生殖細胞死誘導効果への異同を検討し、関連遺伝子群の予測を試みる。

## B. 研究方法

### 1) 成熟正常マウス及び ER $\alpha$ ノックアウト(ERKO)マウスへの内分泌攪乱化学物質投与プロトコル

本年度は、環境ホルモンの実際の作用領域と考えられる低濃度投与による効果を中心に検討した。具体的には、成熟 ICR 雄マウス(6週齢)にエストロゲンとして EE: 1 ng~1 mg/kg 体重、環境ホルモン物質として DES: 1 ng~100 mg/kg 体重、BPA: 4 ng~4 mg/kg 体重、DDE: 1 ng~1 mg/kg 体重の各投与量で 5%エタノール/コーンオイルに溶解後、5日毎に4回皮下注射し、最初の投与20日後に組織採取を行った。対照群としては、5%エタノール/コーンオイルを同様に投与した。各実験群では、最低3匹ずつのマウスを用いた。

ERKO マウス(雄;6~8週齢)については、昨年度及び本年度の結果を基に、EE: 1 ng 及び 1 mg/kg 体重、EB: 10 mg/kg 体重、DES: 100 ng、100  $\mu$ g 及び 20 mg/kg 体重、BPA 4 ng 及び 40 mg/kg 体重の各投与量で 5%エタノール/コーンオイルに溶解後、ICR マウスと同様に 5日毎に4回皮下注射し、最初の投与20日後に組織採取を行った。対照群としては、5%エタノール/コーンオイルを同様に投与した。各実験群は、3匹ずつのマウスを用いた。

ER $\alpha$  ノックアウトマウスの検討に関しては、米国を中心とした国際情勢の変化により入手が遅れている。代替方法としてアンチセンス合成オリゴ DNA を精巣の局所に in vivo エレクトロポレーションにより遺伝子導入し、本研究プロトコルで利用可能かどうかの検討を行っている。

採取した精巣組織は、一部は 4%パラホルムアルデヒド/PBS 固定しパラフィン切片とし、一部は凍結試料ならびに電顕材料として保存した。パラフィン切片(5  $\mu$ 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用いた。

## 2) アポトーシス生殖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 - 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ビオチン-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 リガンドの発現は、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

ER と ER 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り、昨年度までの検討結果に基づいた実験条件を施行した。免疫組織化学に関しては、抗 ER 抗体は市販のものを、ER に対する抗体は自作（埼玉医大・松村正實教授及び東大・井上聡講師等との共同研究）のものをを用いた。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。In situ hybridization に関しては、昨年度作製し有効性が確認されたマウス ER 並びに ER に対する合成オリゴ DNA を用いてそれぞれの mRNA の発現動態を解析した。

尚、これら本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) 成熟正常マウスに於けるエストロゲン並びに種々の環境ホルモン投与による精巣への影響

昨年度の検討では、エストロゲンとして EB を用い、濃度依存的な生殖細胞アポトーシス頻度の増大を見出ししていた。本年度、更にエストロゲンとして EE を投与し生殖細胞アポトーシス頻度への効果を検討したところ、対照群と比較して全く生殖細胞死頻度の増大を認めなかった（図 1）。DES の低濃度投与では、昨年度報告した高濃度投与（20 mg/kg 体重）でのアポトーシス細胞の増加（約 3.1 倍）だけでなく、100 ng/kg 体重でもアポトーシス細胞の有意な増加（約 2.1 倍）が認められ、2 層的効果が認められた。BPA 投与では 400 ng/kg 体重でアポトーシス細胞のわずかな増加が認められたが、逆に 4 µg、40 µg/kg 体重投与ではアポトーシス細胞の出現を抑制していた。DDE 投与では 1 mg/kg 体重でアポトーシス細胞の増加が認められたが、低濃度投与では影響は認められなかった（図 2）。

### 2) ERKO マウスに於けるエストロゲン並びに種々の環境ホルモン投与の生殖細胞死への効果

ノックアウトマウスでは、EB、DES、BPA 投与により、対照群と比較して一般的にアポトーシス細胞の増加が認められ、特に DES 100 µg/kg 体重、BPA 40 mg/kg 体重投与では、正常成熟マウスの場合よりアポトーシス細胞の発現頻度が増加し、対照群と比較して約 3 倍となった（図 3）。

### 3) 環境ホルモン投与によるアポトーシス関連遺伝子発現の変化

正常成熟マウス精巣では、Fas は Leydig 細胞に Fas リガンドは Sertoli 細胞に特異的に発現し生殖細胞死誘導とは無関係であるが、高濃度の EB や DES により生殖細胞での Fas 発現が誘導されアポトーシスの引き金となることが昨年度までの研究で明らかとなっている。しか

しながら、低濃度領域に注目した本年度の検討では、DESを始めEE、BPA、DDEのいずれの低濃度投与群においても、Fas及びFasリガンドの発現に変化は認められなかった。一方、ERKOマウス精巣では、アポトーシス陽性細胞が著明に増加したDES 100 µg/kg体重、BPA 40 mg/kg体重投与群においてFasはLeydig細胞のみならず精子形成細胞に陽性となり、また同時にFasリガンドのSertoli細胞での発現も増強していた(図4)。

正常成熟マウス精巣におけるBcl-2/Bax系については、Bcl-2は殆どの精子形成細胞に陽性であるが、各種環境ホルモン投与による発現の変化は基本的には認められなかった。しかし、生殖細胞死を阻害するBPA濃度においては、精母細胞及び精子細胞に顕著なBcl-2の発現が認められた(表1、図5)。一方、Baxは多くの正常な生殖細胞では細胞質の一部に限定的に局在したが、DES低濃度投与群においてアポトーシス細胞の増加(DES 100 ng/kg体重)に一致して、Baxが細胞全体に分布する強陽性細胞の増加を認めた。ミラー切片を用いた直接的検討でも、TUNEL陽性細胞はほぼBax陽性細胞と一致していた(図6)。この傾向は、正常精巣や他の毒性物質投与によるTUNEL陽性細胞でも認められ、生殖細胞アポトーシスに様な現象と考えられた。一方、ERKOマウス精巣でも基本的には、TUNEL陽性細胞とBax強陽性細胞は一致していた。ERノックアウトマウスの検討は今回遂行できなかった。代替方法としてER mRNAに対するアンチセンスオリゴDNAを作製し、in vivo エレクトロポレーションにより遺伝子発現抑制を試みているが、反応分布の不均一性により一貫した結果が得られていない。現在更に、基本的条件の検討が課題となって残っている。

#### 4) ER 並びに ER 発現の動態変化の関与

ER の蛋白並び mRNA は、正常成熟マウス精巣ではLeydig細胞に特異的に発現するが、EE、DES、BPA、DDE投与による発現の変化は認められなかった。一方、ER の蛋白並び mRNA については、正常成熟マウス精巣では、精粗細胞並びに精母細胞に発現するが、DES 20 mg/kg体重投与群でER 蛋白発現の著明な減少を認めた。In situ hybridizationを用いた mRNA レベルの検討では、ER mRNA は精粗細胞並びに精母細胞に検出され、DES 高濃度存在下でのER 蛋白の安定性(半減期)の変化の可能性が示唆された(図7)。しかしながらDESの低濃度ではER 蛋白の発現に有意な差異は得られなかった。一方、ERKOマウス精巣では、低濃度のDES投与によっても精母細胞からER 染色が消失した。

#### D. 考察

本年度は、昨年度以前の研究結果を踏まえ、環境ホルモンとしての作用濃度と考えられるkg体重当たりngのレベルで、EE、EB、DES、BPAやDDEをマウスに投与し、精子形成細胞への影響を検討した。昨年までエストロゲンの対照物質としてEBを用い1 µg/kg体重で有意な精子形成細胞死が検出され、その後濃度依存的なアポトーシス頻度の増大を見出ししていたが、環境省で対照物質としているEEでは本検討範囲で全く生殖細胞死を誘導しなかった。この結果は、EBもエストロゲンの代謝抵抗アナログとして生殖毒性物質活性をもっていることを示しており、以前の結果の解釈に注意を喚起された。

一方、DESでは生殖細胞死のピークが100 ng/kg体重と20 mg/kg体重の2点で観察され、またBPAの低濃度範囲(4-40 µg/kg体重)での生殖細胞死頻度の有意な低下が再確認された。この結果は、環境ホルモン各々の濃度依存的生殖毒性効果は多様であり広濃度範囲できめ細かく検討する必要性を再び示唆している。BPAによる生殖細胞死頻度の減少が、Baxの機能を中和・阻害するBcl-2の顕著な発現を伴っていることから、以下に述べるようにミトコ

ンドリアの関与が予想される。

環境ホルモンによる生殖細胞死誘導への分子機構を検討する目的で、Fas/Fas リガンド系と Bcl-2/Bax 系の関与を系統的に検討した結果、Fas 系は mg/kg 体重を越すような高濃度処理の場合には発現が明白であったが、DES の低濃度処理での細胞死誘導時には発現は認められず、むしろ劇的な精巣障害時に積極的に配偶子を死滅・除去させる機構として働いていることが示唆された。このことは、精巣が免疫特権臓器であり、精巣障害による配偶子の血流への流入による免疫反応の誘起を抑える機構として注目される。

一方、Bax は DES の低濃度処理での細胞死誘導時にもアポトーシス細胞に強発現しており、分布変化も顕著であったことから、環境ホルモンによる生殖細胞死誘導機構として直接的な関与が示唆された。またこの事は、Bax の細胞内分布変化がミトコンドリアの機能変化と密接に関係していることから、環境ホルモンの作用点としてミトコンドリアを加えて考える必要を提起したい。昨年度の検討で、DES のような環境ホルモンが細胞の抗酸化機構を低下させることを明らかにしており、これら抗酸化機構がミトコンドリア機能と密接な関係を持っていることを考えると今後更に SOD 活性や GSH 量の変動に関する検討が必要になるものと思われる。更にこれらのミトコンドリア機能への影響の検討は、作用機構の解明と並ぶ重要な課題である環境毒性物質の作用を生体内で中和し障害を回避するための具体的方策の策定にも大きな期待を抱かせるものである。

ミトコンドリアはすべての真核細胞に存在するが、生物種間による機能の多様性についての検討は少ない。環境ホルモンによるミトコンドリア動態や機能への影響を検討することは、生物種間で見られる環境ホルモンへの感受性や障害の差異を明らかにできる可能性があり、新たな環境ホルモン効果の種を超えた定量的アセスメント法の開発へも繋がることが予想される。

環境ホルモンの作用がエストロゲン受容体を介するものなのか否かの検討は、根本的な重要性がある。本研究により、ER をノックアウトした ERKO マウスでも正常マウス精巣と基本的には同様な生殖細胞アポトーシス誘導が認められたことから、ER の直接的な重要性は低いと考えられる。ER に関しては、生殖細胞に発現しており、その半減期が作用物質によって変化することから生殖細胞死との関連性が示唆されるが、現在のところアポトーシス細胞と直接的な ER 発現動態変化との関連は明白でなく断定的な結論は難しい。この点に関しては、DES 処理による脳下垂体での顕著な ER 陽性細胞の増大を観察しており (data not shown)、むしろ下垂体ホルモン系の発現変異により二次的に生殖細胞のアポトーシスが誘導される可能性も否定できない。

本年度の検討で EB も環境ホルモンとして働く可能性が認められたが、昨年度の EB や DES への胎仔期暴露による出世後の雄性生殖腺機能への影響検討においても既に生後 2 週で明かな精子形成早熟効果を見出した。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の検討は中断しているが、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や卵巣機能変化についての検討も重要な検討課題であると思われる。

## E. 結論

- ・ 本研究において、エストロゲンアナログ (EB) やエストロゲン様活性を有す化学物質 (DES、BPA 等) が、マウス精子形成細胞に対し強力な生殖毒性物質として働き、更に「環境ホルモ

ン作用濃度領域」と思われる低濃度範囲においては多様な反応性を示すことが判明した。

- 生殖毒性物質の生殖細胞誘導機構に関しては、その高濃度では Fas 及び Fas リガンド系の関与が強く示唆されたが、いわゆる環境ホルモン作用濃度では Fas 系の関与は認められず、むしろ Bax と Bcl-2 発現並びにそれらの細胞内分布変化が生殖細胞アポトーシス動態と一致しており、環境ホルモンの作用点としてミトコンドリアに注目する必要性を提案した。
- ER 並びに ER の関与に関しては、生殖細胞死への直接的関係は認められない。しかしながら、特に ER は細胞増殖や発癌或いは癌の転移と密接に関与する c-Fos/c-Jun 複合体との反応性が知られ、また生殖細胞でも発現が見られることから注目に値すると思われる。実際、下垂体での ER 発現が生殖毒性物質により顕著に増大すること等から、精巣及び卵巣のみならず全身的に発現動態を検討する必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Koji, T., Hishikawa, Y., Ando, H., Nakanishi, Y., and Kobayashi, N. (2001) Expression of Fas and Fas ligand in normal and ischemia-reperfusion testes: Involvement of the Fas system in the induction of germ cell apoptosis in the damaged mouse testis. **Biol. Reprod.**, 64; 946-954.
- 2) Koji, T. (2001) Male germ cell death in mouse testes: Possible involvement of Fas and Fas ligand (Review). **Medical Electron Microsc.**, 34; 213-222.
- 3) Goto, S., Ihara, Y., Urata, Y., Izumi, S., Abe, K., Koji, T., and Kondo, T. (2001) Doxorubicin-induced DNA intercalation and scavenging by nuclear glutathione S-transferase. **FASEB J.**, 15(Dec); 2702-2714.
- 4) Sawada, T., Koji, T., Hishikawa, Y., Kishimoto, K., Nagayasu, T., Takahashi, T., Oka, T., and Ayabe, H. (2001) Partial tolerance of subcutaneously transplanted xenogeneic tumour cell graft by Fas-mediated immunosuppression. **Immunology**, 103(1); 81-89.
- 5) Sera, N., Kawakami, A., Nakashima, T., Nakamura, H., Imaizumi, M., Koji, T., Abe, Y., Usa, T., Tominaga, T., Ejima, E., Ashizawa, K., Yokoyama, N., Ishikawa, N., Ito, K., and Eguchi, K. (2001) Fas/FasL mediated apoptosis of thyrocytes in Graves' disease. **Clin. Exp. Immunol.**, 124(2); 197-207.
- 6) Fukuzawa, K., Takahashi, K., Furuta, K., Tagaya, T., Ishikawa, T., Wada, K., Omoto, Y., Koji, T. and Kakumu, S. (2001) Expression of Fas/Fas ligand (FasL) and its involvement in infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma (HCC). **J. Gastroenterol.**, 36(10); 681-688.
- 7) Izumi, S., Shin, M., Hishikawa, Y. and Koji, T. (2001) Localization in situ of specific RNA by electron microscopy. **Italian J. Anat. Embryol.**, 106(Suppl. 1, No. 2); 45-50.
- 8) Sano, I., Takahashi, T., Koji, T., Uono, H., Yui, K., and Ayabe, H. (2001) Prolonged survival of rat cardiac allograft by proinflammatory cytokine inhibitor. **J. Heart Lung Transpl.**, 20(5); 583-589.
- 9) Hishikawa, Y., Kohno, H., Ueda, S., Kimoto, T., Kumar Dhar, D., Kubota, H., Tachibana, M., Koji, T., and Nagasue, N. (2001) Expression of metallothionein in colorectal cancers and synchronous liver metastases. **Oncology**, 61(2); 162-167.
- 10) Yamasaki, S., Kawakami, A., Nakashima, T., Nakamura, H., Kamachi, M., Honda, S., Hirai, Y., Hida, A., Ida, H., Migita, K., Kawabe, Y., Koji, T., Furuichi, I., Aoyagi, T., and Eguchi, K. (2001) Importance of NF-kappaB in rheumatoid synovial tissues: in situ NF-kappaB expression and in vitro study using cultured synovial cells. **Ann. Rheum. Dis.**, 60(7); 678-684.
- 11) Abe, K., Miyazaki, M., Koji, T., Furusu, A., Nakamura-Kurashige, T., Nishino, T., Ozono, Y., Harada, T., Sakai, H., and Kohno, K. (2001) Enhanced expression of complement C5a receptor mRNA in human diseased kidney assessed by in situ hybridization. **Kidney Int.**, 60(1); 137-146.
- 12) 菱川善隆、小路武彦 (2001) in situ PCR法. **細胞** 33(5); 196-199.

- 13) 小路武彦 (2001) サウスウェスタン組織化学-特異的転写因子の視覚的局在化法。医学のあゆみ 199(13); 850-855.
- 14) Urata, Y., Yamaguchi, M., Higashiyama, Y., Ihara, Y., Goto, S., Kuwano, M., Horiuchi, S., Sumikawa, K. and Kondo, T. (2001) Reactive oxygen species accelerate production of vascular endothelial growth factor by advanced glycation end products in RAW264.7 mouse macrophages. **Free Rad. Biol. Med.**, in press.
- 15) Iida, T., Kijima, H., Urata, Y., Goto, S., Ihara, Y., Oka, M., Kohno, S., Scanlon, K.J. and Kondo, T. (2001) Hammerhead ribozyme against glutathione synthetase sensitizes human colonic cancer cells to cisplatin by down-regulating both the glutathione synthesis and the expression of multidrug resistance proteins. **Cancer Gene Therapy.**, 8; 803-814.
- 16) Nagata, J., Kijima, H., Hatanaka, H., Asai, S., Miyachi, H., Takagi, A., Miwa, T., Mine, T., Yamazaki, H., Nakamura, M., Kondo, T., Scanlon, K.J., Ueyama, Y. (2001) Reversal of cisplatin and multidrug resistance by ribozyme-mediated glutathione suppression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 286; 406-413.
- 17) Doi, K., Sawada, F., Toda, G., Yamachika, S., Seto, S., Urata, Y., Sakata, N., Taniguchi, N., Kondo, T. and Yano, K. (2001) Alteration of antioxidants during the progression of heart disease in streptozotocin-induced diabetic rats. **Free Rad. Res.**, 34; 251-261.
- 18) 池田聡司、近藤宇史 (2001) Oxidant/antioxidant と COPD。The LUNG perspectives, 9;308-311.
- 19) 近藤宇史 (2001) -グルタミルシステインシンテターゼ遺伝子の発現調節と意義。In: 別冊・医学のあゆみ-酸化ストレス- (吉川敏一編), 医歯薬出版, pp. 56-60.
- 20) 井原義人、近藤宇史 (2001) ミトコンドリアとグルタチオン代謝。In: 新ミトコンドリア学 (内海耕三・井上正康監修), 共立出版, pp. 236-241.
- 21) 近藤宇史 (2001) 老化の進行におけるアンチオキシダントの役割。GERONTOLOGY NEW HORIZON, 14; 15-19.

## 2 . 学会発表

- 1) Koji, T. (2001) Involvement of Fas/Fas ligand in germ cell death. 14th International Symposium of the Japan Human Cell Society on Frontiers in Research on Apoptosis (Nagasaki); 11. (Symposium)
- 2) Koji, T. (2001) Molecular histochemistry of rRNAs by LM- and EM- in situ hybridization. International Symposium on New electron microscopic application in the biomedical fields; pp. 45-53 (Korea, Taegu). (Symposium)
- 3) Koji, T. (2001) Germ cell apoptosis in fetal, neonatal and adult mouse testes: Differential roles of Fas/Fas ligand and Bcl-2/Bax. 第 106 回日本解剖学会総会(高知), Acta Anat. Nippon., 76(1); 16. (シンポジウム)
- 4) 菱川善隆・小路武彦 (2001) マウス精巣における estrogen receptor の発現動態と精子形成過程への関与。第 106 回日本解剖学会総会(高知), Acta Anat. Nippon., 76(1); 47. (シンポジウム)

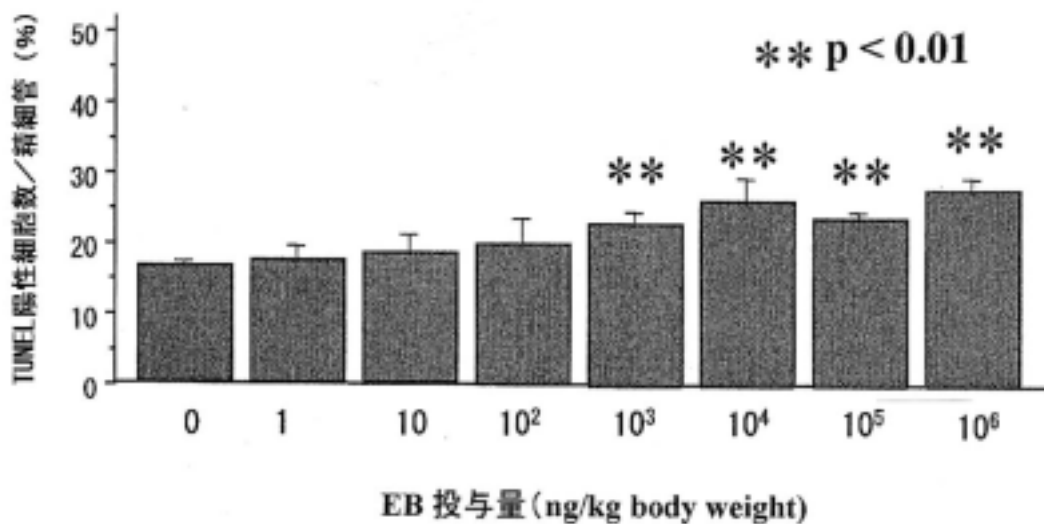
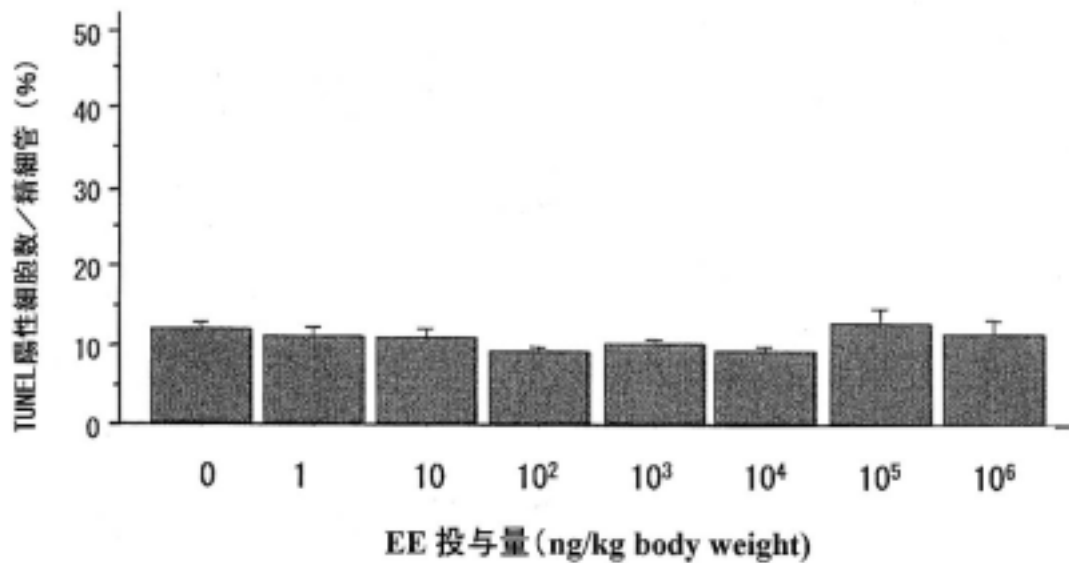


- 5) 和泉伸一・安倍邦子・進正志・菱川善隆・小路武彦 (2001) 副腎皮質刺激ホルモン受容体の妊娠期間におけるラット胎盤内分布の変化。第 106 回日本解剖学会総会(高知), Acta Anat. Nippon., 76(1); 152.
- 6) 小路武彦 (2001) 光顕・電顕 ISH による RNA の核内・細胞質内不均一分布証明。日本電子顕微鏡学会第 57 回学術講演会(福岡), 電子顕微鏡 36(suppl. 1); 98. (シンポジウム)
- 7) 山本智美・菱川善隆・進正志・和泉伸一・小林俊光・小路武彦 (2001) in situ PCR 法によるマウス卵巣での X 染色体特異的遺伝子検出の至適条件の検討。第 57 回日本解剖学会九州支部学術集会(佐賀)。
- 8) 小路武彦 (2001) RNA を観るための In situ hybridization 法: 偶然から必然への軌跡。第 33 回日本臨床電子顕微鏡学会総会(長崎), (教育講演)
- 9) 菱川善隆・小路武彦 (2001) サウスウエスタン組織化学の有用性とその応用。第 33 回日本臨床電子顕微鏡学会総会(長崎), (シンポジウム)
- 10) Damavandi, E., Hishikawa, Y., Izumi, S., Shin, M., Koji, T. (2001) Involvement of Bax redistribution in the induction of germ cell apoptosis in neonatal mouse testes. 第 33 回日本臨床電子顕微鏡学会総会(長崎)
- 11) 進正志・菱川善隆・和泉伸一・小路武彦 (2001) マウス雄性生殖細胞アポトーシスへの内分泌攪乱物質の影響。第 33 回日本臨床電子顕微鏡学会総会(長崎)
- 12) 和泉伸一・末松貴史・進正志・菱川善隆・小路武彦 (2001) マウス精細管細胞の核小体における 18S および 28S rRNA の電顕 in situ hybridization による半定量的局在解析。第 43 回日本電子顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会(大分)
- 13) 小路武彦 (2001) In situ hybridization によるゲノム転写産物の局在化と定量的評価系への試み。第 42 回日本組織細胞化学学会総会(東京), (シンポジウム)
- 14) 進正志・菱川善隆・和泉伸一・川勝美穂・小路武彦 (2001) マウス精子形成細胞死への低濃度 DES の影響。日本内分泌攪乱化学物質学会第 4 回研究発表会(茨城)
- 15) 浦田芳重・後藤信治・井原義人・近藤宇史 (2001) AGE-BSA 刺激による VEGF 発現とグルタチオンによる発現調節機構の解析。第 74 回日本生化学会。
- 16) 後藤信治・浦田芳重・井原義人・近藤宇史 (2001) 酸化ストレスによるグルタチオン S-トランスフェラーゼの細胞内局在の変化。第 74 回日本生化学会。
- 17) 陰山寛・井原義人・後藤信治・近藤宇史 (2001) カルレティキュリンと心筋細胞アポトーシス。第 74 回日本生化学会。
- 18) 近藤宇史・浦田芳重・井原義人 (2001) The role of Anti-oxidants in the Progress of Aging. 17th World Congress of the International Association of Gerontology, Vancouver.

表1 種々の濃度のBPA投与における生殖細胞Bcl-2発現の変化

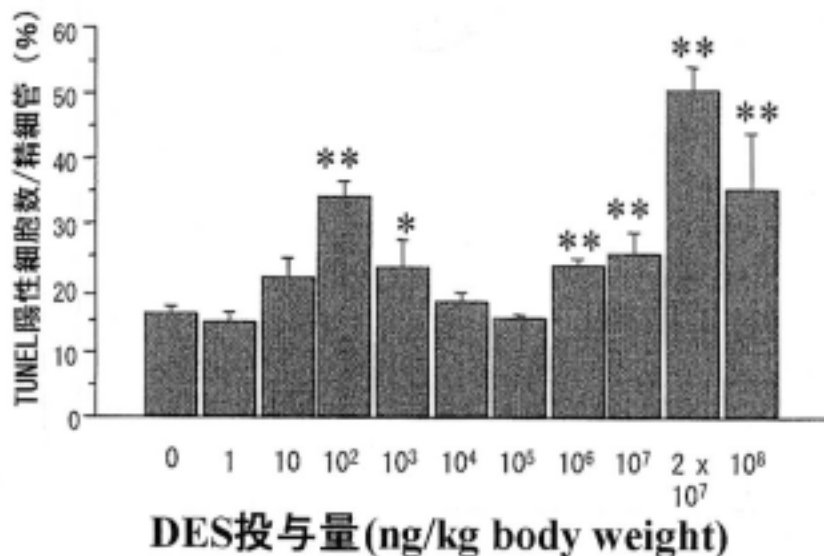
		BPA 投与量 (ng/kg 体重)									
		0	4	4×10	4×10 <sup>1</sup>	4×10 <sup>2</sup>	4×10 <sup>3</sup>	4×10 <sup>4</sup>	4×10 <sup>5</sup>	4×10 <sup>7</sup>	2×10 <sup>8</sup>
Expression of Bcl-2	spermatogonia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	spermatocytes	+	++	++	++	+++	+++	++	++	++	++
	spermatids	+	+	+	+	+++	+++	+	+	+	+

\* -:陰性、+:弱陽性、++:陽性、+++:強陽性 \*\* (n=3)



**図1 EE並びにEB投与による  
精巣でのTUNEL陽性細胞数の変化 (n=3)**

成熟雄マウスに種々の濃度でEE、EBを5日毎に皮下投与し、初回投与から20日目に精巣を採取し、そのパラフィン切片を用いてDNA二本鎖切断部位を検出するTUNEL染色を行い、アポトーシス細胞を検出したもの。アポトーシス頻度は、精細管円形断面当たりのTUNEL陽性細胞数を%として示した。対照としては、5%エタノール/コーンオイルを投与した。EE投与群ではアポトーシス頻度の増大は認めなかった。一方、EB投与群では1 μg/kg体重投与量以降に於いて濃度依存的な生殖細胞アポトーシス頻度の増大を認めた。



\* P < 0.05  
\*\* P < 0.01

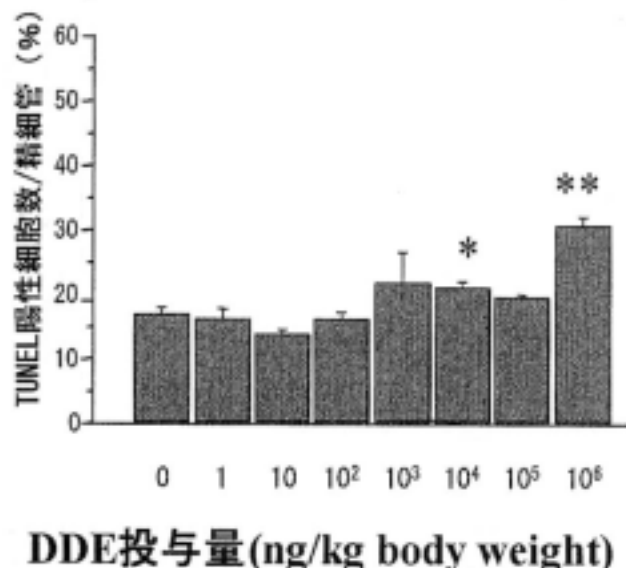
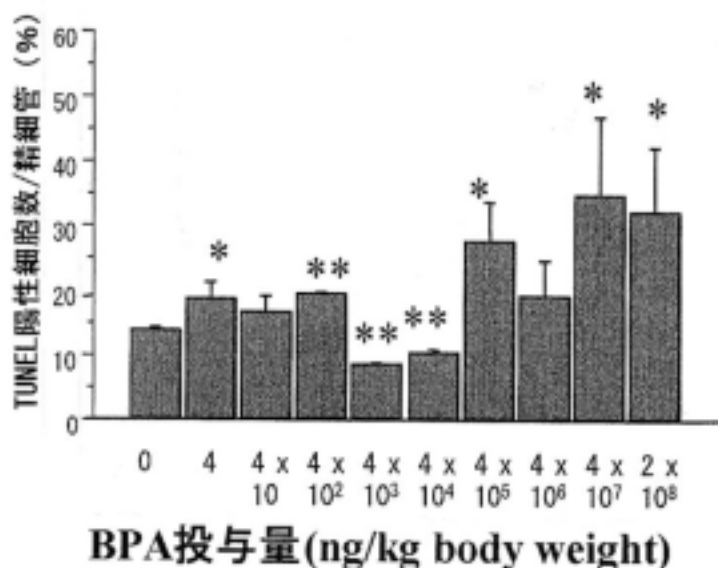


図2 生殖毒性物質投与による  
精巣でのTUNEL陽性細胞数の変化 (n=3)

成熟雄マウスに種々の濃度でDES、BPA、DDEを5日毎に皮下投与し、初回投与から20日目に精巣を採取し、そのパラフィン切片を用いてDNA二本鎖切断部位を検出するTUNEL染色を行い、アポトーシス細胞を検出したもの。アポトーシス頻度は、精細管円形断面当たりのTUNEL陽性細胞数を%として示した。対照としては、5%エタノール/コーンオイルを投与した。DES投与群では低濃度でのアポトーシス細胞の有意な増加があり、2層的效果が認められた。一方、BPA投与では4μg、40μg/kg体重投与でアポトーシス細胞の有意な抑制が認められた。