

図 22. セルトリ細胞株 TM4 に MEHP、DEHP を投与したときのタンパク質チロシンリン酸化パターンの変化。p38 (矢頭) はコントロールに比べ、MEHP、DEHP 投与によりリン酸化が亢進していた。また分子量約 140kDa のタンパク質 (矢印) のリン酸化がコントロール、DEHP 投与に比べ、MEHP 投与において顕著に亢進していた。

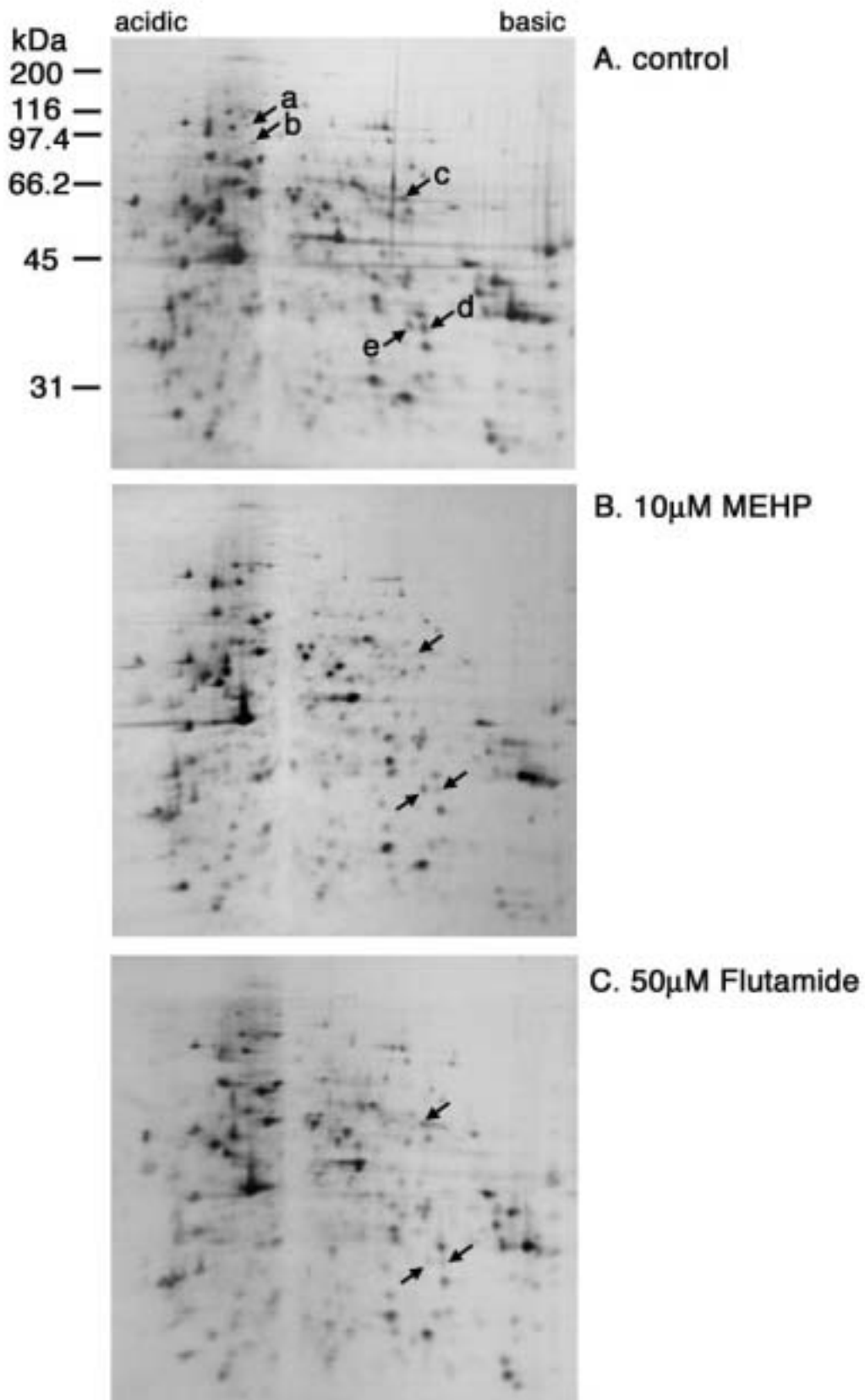


図 23. セルトリ細胞株 TM4 に MEHP、Flu を投与したときの抽出タンパク質の二次元電気泳動像。コントロールと比べ変化の見られたスポットを矢印 a ~ e で示した。a, b: コントロールには存在するが、MEHP、Flu 投与では存在しない。c: コントロール、Flu 投与では存在するが、MEHP 投与では極めて少ない。d: コントロールに比べ、MEHP、Flu 投与では少ない。e: コントロール、MEHP 投与に比べ、Flu 投与では少ない。

表 1 今年度の実験系

		投与薬剤	対象動物
実験 I	IA	BPA	*ラット・マウス新生仔
	IB	BPA	ラット・マウス成獣
実験 II		E2, E2B	ラット・マウス成獣
実験 III		Flu	マウス新生仔
実験 IV		Tam + BPA	ラット新生仔
実験 V		DBP, DEHP	マウス新生仔

*: ラット新生仔への BPA 投与実験は平成 13 年度に行なった。

: マウス成獣への E₂B 投与実験は平成 11 年度に行なった。

表 2 実験 IA (ラット・マウス新生仔への BPA 投与)の投与量

単位: µg/匹/回

ラット ^{注)}	マウス
0.1	0.05
1	0.1
10	1
100	5
600 [†]	10

: NOEL

†: 投与後数日 ~ 20 日以内に死亡。

注) 一部は平成 13 年度に行なった。

表 3 実験 IB (ラット・マウス成獣への BPA 投与)の投与量

単位: µg/匹/回

ラット	マウス
0.1	0.01
1	0.1
10	1
100	10
1000	100

: NOEL

表 4 実験 II (ラット・マウス成獣への E₂, E₂B 投与)の投与量

単位: µg/匹/回

ラット	マウス ^{注)}
0.1	0.4
1	0.6
10	0.8
	1.6
	3.2
	6.4

: NOEL

注) 平成 11 年度の実験(腹腔内投与)

表 5 実験 III および実験 V (マウスへの新生仔への Flu, DBP, DEHP 投与)の投与量

単位: µg/匹/回

Flu, DBP, DEHP
0.5
5
50
500
5000 [†]

†: Flu 投与群のみ、投与後 2 日以内に全て死亡。

表 6 実験 IV (ラット新生仔への Tam + BPA 投与)の投与量の組み合わせ

単位: µg/匹/回

Tam	BPA
20	20
20	10
10	10

表 7 本研究で見られた形態変化と報告されているホルモン受容体活性との比較

	Receptor assay*				形態変化				
	E	Anti E	A	Anti A	精子細胞		特殊接合装置		精巣間質
					尖体、核異常	減数分裂の停滞	血液精巣関門	セルトリ細胞・精子細胞	
E ₂		-		-		-	-		-
E ₂ B		-		-		-	-		-
BPA		-	-			-	-		-
Flu		-	-			-	-		-
DBP		-	-	-	-	-	-	-	-
DEHP	-	-	-	-	-	-	早期出現		-
DES		-		-	-		4週遅延	-	
TAM	-				-		2週遅延	-	

注 1: 受容体活性が強い順に 、 、 、 全く見られないものは - と表している

注 2: 形態では、変化がある場合 、 変化が無い場合は - と表している

*: Harris CA et al. Environ Health Perspect 105: 802-811, 1997, Sohoni Pand Sumpter JP. Soc Endocrinol 158:327-339,1998, Charles S. et al. Mol Cell Endocrinol 178: 99-105, 2001 より引用

Studies on the molecular and cellular biological mechanisms on male reproductive system affected by endocrine disruptors

Chisato MORI, Chiba University, Professor

Key Word:

mouse, TM4, testis, epididymis, spermatogenesis, ectoplasmic specializations, bisphenol A, flutamide, 17 β -estradiol, β -estradiol 3-benzoate, tamoxifen, di-(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP), di-(n-butyl)phthalate(DBP), mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP)

Abstract:

Actions of bisphenol A (BPA), flutamide (Flu), 17 β -estradiol (E_2), β -estradiol 3-benzoate (E_2B), di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), di-(n-butyl)phthalate (DBP), and tamoxifen (Tam) on the male reproductive system in the rat and mouse were evaluated. Neonatally administered BPA and Flu caused morphological anomalies in spermatids and in spermatozoa in the mouse and rat. The anomalies were observed in the nucleus and acrosome. The agents also affected differentiation of the ectoplasmic specialization between the Sertoli cell and spermatids. When BPA was administered into the adult rat and mouse, the same effects were observed. E_2 and E_2B also showed the same anomalies. Therefore, BPA and Flu have estrogenic effects or estrogenic effects-enhancement effects on the rat and mouse. The present report implies that BPA, widely distributed in our environment, cause anomalies in spermatogenesis in humans. Neonatally administered DEHP seemed to promote growth of the Sertoli cell in the mouse. DBP had no effects on the male reproductive system in this study. Influence of Flu, DEHP, and mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) at levels of protein constitution were evaluated on cultured TM4 cells which derived from mouse Sertoli cells. Two-dimensional (2D) Western blot assay showed that tyrosine phosphorylation of some proteins was increased in MEHP-treated TM4 cells compared with the control. Proteome analyses by a 2D electrophoresis method showed that several protein spots were changed in quantity in MEHP-, and Flu-treated TM4 cells. These proteins might be a clue to elucidate the action mechanism of endocrine disruptors. In addition, they could be useful bio-markers for evaluation of endocrine disruptors.

-4. 平成 13 年度研究結果の評価

平成 13 年度に実施した作用メカニズムに関する研究(指定研究 7 研究、公募により採用された 4 研究の 11 研究)の研究発表会を開催し、内分泌攪乱化学物質等研究推進専門委員会にて研究成果の評価を行い、評価を踏まえ今後も必要と思われる 8 研究については指定研究として環境省へ推薦した。

-4-1. 内分泌攪乱化学物質等研究推進専門委員会名簿

委員長 高杉 暉(横浜市教育委員会委員長)

委員 有菌 孝司(熊本県立大学教授)

井口 泰和(岡崎国立共同研究機構教授)

堤 治(東京大学教授)

長濱 嘉孝(岡崎国立共同研究機構教授)

-4-2. 指定研究として推薦を行った研究

1. 前鰓類(海産巻貝類)の性及び生殖に関わる内分泌機構の解明に関する基礎的研究
2. 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
3. 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
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
6. エストロゲン様物質曝露によるメダカ精巣卵発現の精子形成に及ぼす影響の解明
7. 内分泌攪乱化学物質のアンタゴニスト活性の評価とその作用メカニズムに関する研究
8. 脳及び生殖腺の性分化に対する内分泌攪乱作用評価法に関する研究