

内分泌攪乱化学物質による雄性生殖器への影響の分子細胞生物学的メカニズムの解明

研究者 森 千里 (千葉大学大学院医学研究院 環境生命医学 教授)

研究要旨

(1) 17β -estradiol 3-benzoate(E_2B)やflutamide(Flu)の単独投与では精子形成や造精サイクルの乱れなどが現れない低量であっても、これらを複合投与すると、その作用が見られるようになった。一方、化学物質の組み合わせによっては互いの作用を打ち消しあうこともわかった。今後さらにメカニズム研究を進めることにより、内分泌攪乱化学物質の影響を回避する方法の開発につながるものと考えられる。

(2) 17β -estradiol(E_2), E_2B , bisphenol A(BPA), Flu, diethylstilbestrol(DES)投与動物と不妊である2系統のノックアウトマウスおよび1系統の突然変異ラットとを微細形態的に比較した。 E_2 等を投与した動物は両ノックアウトマウスと同じような精子細胞の尖体と核およびセルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置に形態変化が見られた。アクチン結合蛋白の局在も同じようだった。突然変異ラットにこれら薬剤を投与しても表現型に変化はなかった。このことは E_2 等の作用点と突然変異ラットの表現型をもたらす要因は同じであることを示唆している。

(3) GFP(Green Fluorescent Protein)遺伝子組み込みマウスを用いた移植実験から、DESの影響は生殖細胞そのものというよりも精子形成を支える体細胞系に現れると考えられた。

(4) in-house cDNA マイクロアレイ解析により、新生仔マウスへのDESあるいは E_2 投与により精巣上体において発現変化した遺伝子が2、4、8週齢のすべてにおいて検出された。これらの遺伝子は、DESあるいは E_2 の新生仔期における投与による精巣上体機能の低下に関与していることが示唆された。

(5) *in vivo*の妊娠前からの慢性的低濃度イソフラボン摂取は、雄性新生仔の性発達に長期的な影響は及ぼさないが、一過的な影響がある可能性が示された。また、*in vitro*でのプロテオーム解析から、植物エストロゲンを含めた化学物質の精巣細胞への影響について、遺伝子発現および遺伝子産物の網羅的解析により、化学物質の分類分けができることが示された。

研究協力者

深田 秀樹 (千葉大学大学院医学研究院SRL 環境健康医学 助教授)

外山 芳郎 (千葉大学大学院医学研究院形態形成学 講師)

小宮山政敏 (千葉大学大学院医学研究院環境生命医学 講師)

前川眞見子 (千葉大学大学院医学研究院形態形成学 助手)

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影響は、人における精子数の減少や野生生物に様々な生殖異変が既に生じている点からも懸念されている。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、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。また、近年、内分泌攪乱化学物質の低用量影響を評価するにあたり、そのコントロール群のバックグラウンドが高く、評価の難しい系が存在することが明らかになってきているうえ、高いバックグラウンドを示す原因の1つである植物エストロゲンについても、アジア人は日常的に多量に摂取しており、欧米でも乳幼児に積極的に与えるようになってきているなど、その影響を調査しておく必要がある。本研究では内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムについて、雄性生殖器に対する影響の機序を対象とし、分子生物学、細胞生物学的手法を用いて解明し、さらに内分泌攪乱化学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化学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。

ホルモン様作用を有するdiethylstilbestrol(DES)、bisphenol A、flutamide (Flu)、di-(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP)、di-(n-butyl)phthalate(DBP)や17 β -estradiol(E₂)などの物質を対象とし、セルトリ細胞や精子形成における発達障害や細胞分化遅延の機構について分子・細胞レベルでの解析を行ってきた。本年度は、(1)前年度までにエストロゲン様作用が確認されたFluとエストロゲン物質E₂B、抗アンドロゲン化合物シプロテナーセテートおよび抗エストロゲン化合物ICI182,780(ICI)を混合投与し、形態レベル(電子顕微鏡)および分子レベルでの影響を解析する。(2)特に前年度、セルトリ細胞 精子細胞およびセルトリ細胞 セルトリ細胞の特殊接合装置の形成不全が起こることを発見したが、そのメカニズムを分子レベルで解明する。その方法としては、それら特殊接合装置に存在すると思われるタンパク質をコードする遺伝子のノックアウトマウスを使用し、特殊接合装置形成不全の発生メカニズムの解明を目指す。(3)また、GFP(Green Fluorescent Protein)マウスを用いた精子形成細胞移植技術を使用し、内分泌攪乱化学物質(DES)の精巣内の標的細胞種を特定する。(4)加えて、精子成熟に及ぼす化学物質の影響を解明するため、精巣上体の遺伝子発現のトキシコゲノミクス解析を行う。(5)さらに、生体への影響が明確でない植物エストロゲンが精巣へ及ぼす影響については、豆類の摂取が多いアジア人のモデルとして妊娠前から植物エストロゲンを投与したマウスの仔への影響について解析すると共に、精巣細胞株に植物エストロゲンを作用させてトランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析を行う。

以下具体的に、実施事項ごとの目的を示す。

1. 齧歯類新生仔期化学物質複合投与の雄性生殖器に及ぼす影響の形態学的解析および分子メカニズムの解明

前年度の報告から、抗アンドロゲン物質Fluが17 β -estradiol 3-benzoate(E₂B)、E₂およびエストロゲン作用をもつBPAと同様に、齧歯類の精巣において、精子細胞のアクロソームと核の変形、セルトリ細胞 - 精子細胞間の特殊接合装置(ES)の欠損を誘導することが明らかになった。これらの化学物質が精子形成へ与える影響をより詳しく調べるために、本年度では、Flu + E₂B(エストロゲン作用 + エストロゲン)、Flu + cyproterone acetate(CA)(抗アンドロゲン + 抗アンドロゲン)、Flu + ICI (エストロゲン作用 + 抗エストロゲン) をそれぞれ組み合わせてマウスに同時投与をおこない、作用点の解析を行う。

さらに、ヒト遺伝子導入されたトランスジェニックの一系統において、上述の化学物質投与で見られたものと同様な精巣の形態変化を認めたことから、このマウスと共通する遺伝子や蛋白の

変化を検索することにより、精子形成メカニズムの解明を進める。

2. ノックアウトマウスを用いた新生仔期化学物質投与の特殊接合装置に及ぼす影響の形態学的および分子メカニズムの解明

我々の今までの実験から、DESをラットおよびマウスの新生仔に投与するとその動物のセルトリ細胞間の特殊接合装置(血液・精巣閉門)の形成がラットでは約4週間、マウスでは約2週間遅れることがわかった。また、血液・精巣閉門の形成が遅延されている間は造精細胞が減数分裂を完了できないことがわかった。結局、新生仔へDESを投与すると、精子形成がラットでは約4週間、そしてマウスでは約2週間遅れることがわかった。しかしDESを成獣に投与しても血液・精巣閉門には影響を与えず、精子形成には異常のないこともわかった。このことからDESは幼弱なセルトリ細胞に影響して、血液・精巣閉門の形成を遅延させるが、成獣投与の場合のように、血液・精巣閉門が形成された後にDESを作用させてもその影響は出ないことがわかった。また、E₂B、E₂、BPA、Fluを新生仔ラット、マウスに投与すると、DES投与の場合と異なり、血液・精巣閉門の形成には異常は見られなかった。そして造精細胞は思春期になると減数分裂を始めたが、精子細胞の尖体および核に変形が見られた。そして成熟精子細胞ではこれらの異常はさらに続き、最終的には尖体、核の変形を示す精子が形成された。また、セルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置にも形成不全が見られた。これらの異常はラットでは生後15週齢で、マウスでは生後12週齢で回復し、これらの精巣には正常の精子形成が見られた。また、これら週齢での妊孕性も確認できた。成獣ラット、マウスにE₂B、E₂、BPAを投与しても新生仔投与の場合と同じ結果を得た。すなわち精子細胞の尖体および核に変形が見られた。この変形は精子でも見られた。また、セルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置も新生仔投与と同じように形成不全が見られた。

以上のことから、DES投与の系では形成期の血液・精巣閉門が影響を受けて造精細胞の減数分裂阻止が起こり、そしてE₂B、E₂、BPA投与の系ではセルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置が影響を受けて精子細胞の尖体と核が変形したと思われる。このことを確かめるために突然変異ラットおよび種々の遺伝子ノックアウトマウスで特殊接合装置の異常や精子細胞の頭部異常を示す動物についてDES、E₂B、E₂、BPA、Fluを投与し、正常動物のこれら薬剤の投与と比較することによりこれら薬剤の作用を推測することを本研究の目的とした。

3. 造精細胞移植技術を用いた標的細胞の解明

雄マウス新生仔を内分泌攪乱化学物質であるDESに曝露すると、精子形成に障害の起こることが知られている。しかし、その障害が生殖細胞の不具合によるのか、あるいは精子形成を支える体細胞系の不具合によるのかは明らかになっていない。そこで本研究では、DESの標的細胞が生殖細胞と体細胞のどちらであるのかを明らかにすることを目的とした。

そのため、Green Fluorescent Protein(GFP)遺伝子を組み込んだマウスを用いて2つの移植実験を行った。

移植実験1: GFP遺伝子を組み込んだ新生仔マウスにDESを投与し、成熟後精巣から生殖細胞を分離する。これをあらかじめbusulfanで内在の生殖細胞を除去した精巣内に移植する。

移植実験2: 新生仔マウスにDESを投与し、さらにbusulfanで内在の生殖細胞を除去しておく。そこにGFP遺伝子を組み込んだマウスの生殖細胞を移植する。

もしDESの標的が生殖細胞であれば、移植実験1では精子形成に何らかの影響が生じるが、移植実験2では正常な精子形成が確認できるはずである。一方、DESの標的が体細胞である場合、移植実験1では正常な精子形成は確認できるが、移植実験2では精子形成に何らかの影響が現れるはずである。これらの影響を検討するための指標としては、(1)移植した生殖細胞の精細管への定着とそこでの広がり(これはGFPの蛍光により確認する)、(2)移植した生殖細胞に由来する精子形成の状態(これは組織切片の観察により確認する)の2つに着目し、解析を行った。

4. 齧歯類新生仔期化学物質投与の雄性生殖器に及ぼす影響のトキシコゲノミクス解析

精巣上体は精子の授精能や運動能の獲得に重要な臓器である。合成エストロゲンDESはマウス新生仔への投与により、成獣時における精子の運動能や妊孕性の低下、精巣上体の組織形態的变化が報告されている(Atanassova *et al.* 2001; Goyal *et al.* 2003; Adachi *et al.* 2003)。しかし、新生仔へのDES投与による精巣上体における遺伝子の発現変化についてはあまり報告されていない。近年、多くの遺伝子の発現変化を解析することのできるマイクロアレイ法が開発されており、細胞内情報伝達経路での遺伝子発現解析など様々な分野で非常に有効な方法として注目されている。そこで、本研究ではマイクロアレイ法を用いて、新生仔マウスへのDES投与による精巣上体の遺伝子発現(特に精子成熟に関係する遺伝子)への影響を解析することを目的とした。

5. 齧歯類胎仔期・新生仔期植物エストロゲン投与の雄性生殖器に及ぼす影響

実験動物飼育用餌の中にエストロゲン活性を持つ成分が含まれていることから、近年、低濃度の内分泌攪乱化学物質の評価を実験動物で行うにあたり餌中のエストロゲン様物質による実験動物への影響が問題となっている。今後の諸研究を進める上でも、餌を介した植物エストロゲン曝露による影響を把握しておく必要がある。

また、遺伝子発現変化、遺伝子産物の変化の解析(プロテオミクス解析)を行うことにより、植物エストロゲンを含めた化学物質の影響について、精巣細胞株であるTM4を用いて網羅的に解析することを目的とした。

B. 材料と方法

実施項目ごとに項を分けて記載した。

共通事項として、本研究は千葉大学大学院医学研究院の動物倫理委員会の承認を受けている。実験動物への各化学物質の投与時および灌流固定時には動物の苦痛を最小限にとどめるよう努め、その他の処置は麻酔下で行った。

1. 齧歯類新生仔期化学物質複合投与の雄性生殖器に及ぼす影響の形態学的解析および分子メカニズムの解明

a) 化学物質

Flu、E₂B、CA(Sigma, St Louis)、ICI(TOCRIS)をdimethyl sulfoxide (DMSO)(Sigma)に溶かし、これをcorn oil(Sigma)で希釈した。

b) 動物

マウスはICR系(日本SLC)を用い、溶解させた化学物質を皮下から連続5日間投与し、6日目に評

価した。投与マウスとの比較に用いたトランスジェニックマウスは、東京医科歯科大学より寄贈していただいたものを使用した。

c) 化学物質の投与量

単体投与では、

Flu, ICI: 0.00012, 0.0012, 0.012, 0.12, 1.2 ($\mu\text{g/g/day}$)

CA: 0.0012, 0.012, 0.12, 1.2, 12 ($\mu\text{g/g/day}$)

E₂B: 0.002, 0.02, 0.2 ($\mu\text{g/g/day}$)

複合投与では、

Flu (0.00012, 0.0012, 0.012, 0.12, 1.2)+ E₂B (0.02=L0EL)

Flu (0.00012, 0.0012, 0.012, 0.12, 1.2)+ CA (0.12=L0EL)

Flu (0.00012, 0.0012, 0.012, 0.12, 1.2)+ ICI (0.012=L0EL)

の組み合わせで同時投与を行った。

d) サンプルング法

動物はエーテルで深麻酔した。血液は、開胸して右心室穿刺により採取した。電子顕微鏡観察に用いる臓器は、左心室より3%グルタルアルデヒドで灌流固定した後に採取した。免疫抗体法に用いる臓器は、10%ホルム・アルデヒドで灌流固定した後に採取した。

e) チトクロームCによる血液・精巣関門の機能検査

チトクロームCをトランスジェニックマウスの精細管内腔に顕微注入し、それが精巣間質にまで到達するか否かを調べた。方法の詳細は本報告書の「2. ノックアウトマウスを用いた新生仔期化学物質投与の特殊接合装置に及ぼす影響の形態学および分子メカニズムの解明」の項に記した。

2. ノックアウトマウスを用いた新生仔期化学物質投与の特殊接合装置に及ぼす影響の形態学および分子メカニズムの解明

a) 実験動物

2系統のノックアウトマウスおよび1系統の突然変異ラットを使用した。2系統のノックアウトマウスは共に精子細胞と精子の尖体と核に形態異常があり(図9)、不妊を示す。突然変異ラットではas/as系を用いた。このラットは1992年にIkadaiらが偶然発見したもので、無精子症である(Ikadai *et al.* 1992)。ホモの雄だけが不妊であり、ホモの雌、およびヘテロの雄、雌は妊孕性があるのでこの系統の維持は容易である。

b) 薬剤および投与方法

雄ラット新生仔にDES(Sigma)、E₂B(Sigma)、E₂(Sigma)、BPA(Aldrich, Milwaukee)、Flu(Sigma)を出生翌日から隔日6回皮下投与し、生後5週、7週、9週にサンプルングした。投与量は以下の量とした; DES: 10 $\mu\text{g/匹/回}$ 、E₂B: 0.3 $\mu\text{g/匹/回}$ 、E₂: 0.3 $\mu\text{g/匹/回}$ 、BPA: 100 $\mu\text{g/匹/回}$ 、Flu: 0.8 $\mu\text{g/匹/回}$ 。DESとE₂Bはオリーブ油(和光、大阪)に直接溶かした。E₂とBPAはまずdimethyl sulfoxide(DMSO)(Sigma-Aldrich, Irvine, UK)に溶かし、次にこれをオリーブ油に溶かした。DESとE₂B群のコントロール群(各5匹ずつ)にはオリーブ油のみ、E₂とBPA群のコントロール群(各5匹ずつ)にはDMSOとオリーブ油の混液を投与した。

c) 組織学的解析

光学顕微鏡用切片にはトルイジンブルー染色を、そして電子顕微鏡用サンプルはエポン包埋し、

切片にはウランと鉛の二重染色を施した。

d) 免疫組織化学的解析

マウスの精巣は10%ホルマリンで固定し、常法通りのパラフィン切片を作り、ある種のアクチン結合タンパクに対する抗体で免疫組織化学的染色を施した。

e) チトクロームCによる血液・精巣関門の機能検査

血液・精巣関門の機能状態を調べるために細胞外トレーサーとしてチトクロームCをエーテルで深麻酔下に精細管内腔に顕微注射し、これが精巣間質に漏れるかどうかをDAB反応を利用して調べた。また、逆に、チトクロームCを左心室に注入し、血行性にチトクロームCを精巣に投与した。数分後に3%グルタルアルデヒドを左心室に注入し、灌流固定した。

3. 造精細胞移植技術を用いた標的細胞の解明

a) 実験動物

この実験では2種類のマウス、レシピエント用としてGFP遺伝子が組み込まれていない通常のC57BL/6と、ドナー用としてC57BL/6マウスにGFP遺伝子を組み込んだGFPマウス(Okabe *et al.*, 1997)を用いた。

b) 薬剤および投与方法

DES(ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, USA)はセサミオイル(Sigma-Aldrich Japan, 東京)に溶解させ、出生後1日から5日の連日0.5 µg/匹の量を皮下投与した。内在性の生殖細胞を枯渇させるためのbusulfan(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)は、出生後5週時にレシピエントマウスの腹腔内に50mg/kg B.W.を単回投与した。

c) 移植実験のデザイン

移植実験は下記の2つを行った(図12)。

移植実験1:DES投与を受けたマウスの生殖細胞を正常なマウスに移植。DES投与15例、コントロール12例を行った。

移植実験2:DES投与を受けたマウスに正常な生殖細胞を移植。DES投与16例、コントロール10例を行った。

また、ドナーのコントロールとして、新生仔期にDES(または溶媒のみ)を投与し、移植を行わずに飼育した系、レシピエントのコントロールとして、busulfan処理後に移植を行わずに飼育した系も用意した。

d) 移植の方法

移植は従来の方法(Brinster and Zimmermann 1994; Brinster and Averbach 1994; Morena *et al.* 1996; Ogawa *et al.* 1997)をもとに、いくらか改変を加え、下記のように行った。

(1) ドナーの準備

出生後10週以上(12週まで)飼育した後、精巣を摘出し、コラゲナーゼおよびトリプシンによる酵素処理を行い、精巣の細胞を解離した。パーコールによる密度勾配遠心(65%~20%)を行い、精祖細胞が豊富な画分(33%および36%)を取り出し 1×10^8 /mlに調整し、ドナー細胞とした。

(2) レシピエントの準備

出生後5週以上(6週まで)飼育した後、busulfanを投与し、その後5週間以上飼育した。

(3) 移植の方法

レシピエントマウスを麻酔した後、精巣を露出させ、輸精管よりドナー細胞を注入した。ドナー細胞にはトリパンブルーを添加しておき、その色素の広がり具合により注入の成否を確認した。

(4) 移植結果の検出

移植から10~12週後、レシピエントの精巣を摘出し、精細管をほぐして蛍光顕微鏡下で観察した。精細管に沿ったGFP蛍光の広がりや移植細胞の定着と増殖の程度を表す指標となるので、蛍光が確認できた範囲(GFP陽性部位)の長さを測定した。これは移植実験1のDES投与群、対照群でそれぞれ40箇所と19箇所、移植実験2のDES投与群、対照群でそれぞれ22箇所と10箇所を測定した。

次に、精子形成の有無を確認するために凍結切片を作製した後、GFP蛍光を蛍光顕微鏡で確認し、さらにその切片のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い、組織観察を行った。移植を行わなかったコントロール試料についてはブアン液で固定後、パラフィン切片を作製し、HE染色を行い観察した。

4. 齧歯類新生仔期化学物質投与の雄性生殖器に及ぼす影響のトキシコゲノミクス解析

a) 化学物質

実験にはDESあるいはE₂ (Sigma-Aldrich Japan)を用いた。DESはセサミ油(Sigma-Aldrich Japan)に溶かした。またE₂はdimethyl sulfoxideで溶かした後、セサミ油に溶かした。コントロールにはセサミ油のみを用いた。

b) 実験デザイン

妊娠メスICRマウス(日本SLC)を購入し、出生したオス新生仔を実験に用いた。出産した日を生後0日として、生後1日目から5日目までの5日間連続で、25 µlのセサミ油に溶かしたDESあるいはE₂ (5 µg/mouse/day)をマウスの皮下に注射した。DESの濃度は、我々が報告した相対精巣重量や一日精子産生量に影響がなく、精巣上体における精子の運動能の低下のみが見られた濃度を参考にした(Adachi *et al.* 2001)。サンプリングは2週齢、4週齢、8週齢で行った。精巣上体の採取は動物をエーテルで深麻酔した後行った。解析には、右側の精巣上体を組織学的解析に、左側の精巣上体を遺伝発現変化の解析に用いた。

c) 組織学的解析

右側の精巣上体を4%パラホルムアルデヒドで4、18時間固定後、定法に従って脱水し、パラフィンで包埋した。切片は5 µmの厚さで切り、シランコ - ティングしたスライドガラス(Matsunami Glass, Osaka, Japan)に載せた。切片は50、18時間乾燥させた後、定法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

d) トータルRNAの抽出

左側の精巣上体から、RNeasy(Qiagen K. K., Tokyo, Japan)を用いてトータルRNAをプロトコールに従って抽出した。またトータルRNA中に混入してしまった微量なDNAの分解処理もRNase-FreeDNase Set(Qiagen K. K.)を用いて、RNAの抽出中に同時に行った。

e) マイクロアレイ法

マイクロアレイはNational Institute of Aging(NIA)でクローニングされたマウス胎仔あるいは母体の胎盤由来の遺伝子14、974種が載っているin-house cDNAマイクロアレイ(Asahi Techno Glass Corporation, Chiba, Japan)を用いた(Tanaka *et al.* 2000)。これらのクローンの詳しい

情報は下記のNIAのweb siteで見ることが可能である(<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/cDNA/15k.html>)。プローブcDNAへの蛍光色素(Cy3またはCy5)の標識はアミノアリル法を用いた。抽出したトータルRNA15 µgに1 µg Oligo dT₁₂₋₁₈ を加え、70 °Cで10分加温した後、氷上で5分間急冷を行った。この溶液に1×Buffer、10mM DTT、Superscript III reverse transcriptase(Invitrogen, Tokyo, Japan)、0.2mMアミノアリル-dUTP、0.5mM dATP、0.5mM dGTP、0.5mM dCTP、0.3mM dTTP(Amersham-Pharmacia Biotech Japan, Tokyo, Japan)、RNase inhibitor(TOYOBO, Osaka, Japan)を加え、50 °Cで90分反応させ、cDNAを作製した。この溶液に0.2 M NaOH を加え、37 °Cで15分加温した後、0.6 M HEPES を加えた。作製したcDNAの精製をMinElute Reaction Cleanup kit(Qiagen K. K.)を用いて、プロトコールに従って行った。精製したcDNAに20mM sodium bicarbonate buffer、Cy3またはCy5 mono-Reactive Dye(Amersham-Pharmacia Biotech Japan)加え、40 °Cで90分間反応させ、Cy3またはCy5をcDNAに標識した。さらに標識したcDNAプローブをMinElute Reaction Cleanup kitを用いて、上記と同じ方法で精製した。精製したcDNAプローブに5×SSC、4×Denhart溶液、0.5% SDS、100 µg Salmon Sperm DNA(Invitrogen)を加え、95 °Cで2分間加温後、氷上で1分間急冷を行った。さらに1×Hybridization溶液(Hitachi Software Engineering, Yokohama, Japan)、10%formamideを加え、42 °Cで5分間加温した。加温したcDNAプローブをマイクロアレイ用カバーガラス(TAKARA, Tokyo, Japan)を載せたマイクロアレイに流し込み、65 °Cの湿潤状態で18時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後の洗浄はSlide Washerを用いて行った。2×SSC、1% SDS(30 °C)でカバーガラスをスライドガラスに傷がつかないように外した。次に2×SSC、1% SDS(30 °C)で5分間洗浄した後、2×SSC(室温)洗浄し、さらに1×SSC(室温)で5分間洗浄し解析に用いた。アレイ実験は各実験群につき2回行った。

f) マイクロアレイデータの解析

洗浄したマイクロアレイをScanArray lite(GSI Lumonics, Tokyo, Japan)を用いてスキャンした後、QuantArray(GSI Lumonics)を用いてデータを定量化した。データの解析はGeneSpring5.0 software(Silicon Genetics, Redwood city, CA)を用いて行った。データのノーマライズはintensitydependent LOWESS 法を用いて行った。遺伝子の発現変化は、コントロール群と比較して1.5倍以上あるいは0.67倍以下の発現変化を示した遺伝子を、それぞれ発現上昇あるいは発現低下した遺伝子とした。

次の条件に合うものをシグナルの有効値として採用した。

条件: (Signal intensity mean) - (Background mean) > 2 × (Background SD)

また、有意な発現上昇あるいは発現低下を示す指標として、以下のものを採用した。

発現上昇: $p < 0.1$ かつ

(投与群 intensity) > (コントロール群 intensity) + 2 × (コントロール群 intensity SD)

発現低下: $p < 0.1$ かつ

(投与群 intensity) > (コントロール群 intensity) + 2 × (コントロール群 intensity SD)

発現比は2 回の実験データの発現比の平均値を採用した。

5. 齧歯類胎仔期・新生仔期植物エストロゲン投与の雄性生殖器に及ぼす影響

5.1 *in vivo* での研究

C57BL/6Cr SlcマウスにIsoflavone(IF)freeならびに0.05% IFに調整した精製飼料を妊娠前3週

間および5週間前より自由摂食させた。妊娠中、授乳中を通して各実験餌を与えて仔に経胎盤ならびに経母乳曝露を行い、仔については生後21日目に離乳後、生後31日目に屠殺するまで引き続き各実験餌を与えた。屠殺後生殖器官臓器を採材し、以下の実験的観察を行った。

- (1) 体重、肛門生殖突起間距離、開眼、毛生え、歯芽萌出および指趾等の外形的異常の有無についての観察
- (2) 精巢および精巢上体の組織重量を測定
- (3) 精巢からmRNAを抽出し、real-time RT-PCR法を用いて性ホルモン受容体遺伝子発現量を測定。尚、測定した性ホルモン受容体はestrogen receptor(ER)、ERおよびandrogen receptor(AR)の三種類である。
- (4) 精巢の光学顕微鏡による組織像観察。組織はBouin氏液にて固定しヘマトキシリン-エオシン染色を施した。

5.2 *in vitro* での研究

精巢細胞株はTM4を用いた。曝露化学物質は、植物エストロゲンのdaidzein (Dz)、エストロゲン活性を有するE₂、DESおよびチロシンキナーゼ阻害剤として知られるスタウロスポリン(Sta)とした。各細胞はコンフルエントになるまで培養の後、それぞれの化学物質に曝露させ、30分後にRNA抽出(Sepasol, Nacalai, Kyoto, Japan)を、1時間後にタンパク質抽出(PBSによるホモジナイズ)を行った。遺伝子発現(mRNA)解析にはin-house cDNAマイクロアレイ(3704遺伝子)を用い、常法に従い実験を行った。遺伝子産物(タンパク質)解析には二次元電気泳動により、タンパクスポットをスキニングし、各々において異なるスポットをピックアップした。統計学的解析はピアソン相関係数を用い、シングルリンケージクラスタリング法を用いてクラスター解析を行った。

C. 結果

1. 齧歯類新生仔期化学物質複合投与の雄性生殖器に及ぼす影響の形態学的解析および分子メカニズムの解明

a) 電子顕微鏡観察における形態学的な解析

(1) 低濃度エストロゲンE₂B付加におけるFluの精巢への影響

E₂BとFluを同時に投与されたマウスでは、Flu単独の投与と比べて、異常精子細胞の割合が増加していた。また、単独投与時では認められなかった造精サイクルの乱れが確認された(図1)。形態変化においては、E₂B、Fluそれぞれ単独に投与した場合と同じく尖体、核の変形や特殊接合装置(ES)の欠損が認められた(図2、図3、図4)。血液精巢関門、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞には特に形態学的な変化は認められなかった。

(2) 低濃度抗アンドロゲンCA付加におけるFluの精巢への影響

CA単独では、比較的尖体や核の変形は少なく、ESの広範囲にわたる欠損が電子顕微鏡において観察された(図2、図4)。Fluとの混合投与では、尖体や核の変形が少ないことから、光学顕微鏡下でのstep7以上の異常精子の割合で評価することが困難であったが、ESの欠損が一要因といわれる造精細胞の剥離が多く、精細管内で確認され、また、電子顕微鏡下においてもESの完全欠損が多数認められた。血液精巢関門、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞には特に形態学的な変化は認められなかった。

(3) 低濃度抗エストロゲンICI付加におけるFluの精巣への影響

ICI単独では、CAと同様に電子顕微鏡による観察で、ESの欠損が確認されたが、尖体や核の変形はあまり観察されなかった(図2、図4)。しかしながら、Fluと混合投与することによって、電子顕微鏡下での形態変化が比較的正常に回復する傾向が確認された、さらにFlu単独投与での異常精子細胞数も回復していた(図1)。血液精巣関門、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞には特に形態学的な変化は認められなかった。

b) トランスジェニック・マウスの精巣の微細構造の解析と投与群との比較

今回比較に用いたトランスジェニックマウス(Tg)は、あるアクチン結合蛋白質をコードする領域が欠損しており、これによって、ESや血液精巣関門のアクチン線維の構築を阻害する一要因と考えられ、電子顕微鏡下において、ESの部分的、または完全欠損が多数の精子細胞に認められ(図2、図4)、尖体や核が投与群と同様に变形し(図5)、また、血液精巣関門自体についても不完全なものも確認された(図6)。血行性に投与したチトクロームCは精巣間質に到達し、さらには精上皮の細胞間隙に浸入し、最終的には精細管内腔に達した(図7)。精細管内腔に顕微注入したチトクロームCは血液・精巣関門を素通りし、精巣間質に到達した(図8)。血液精巣関門が不完全なものについては、精子細胞は減数分裂期で停止しており、この現象は、前回のDES やTAM 投与で確認された現象に似ていた。光学顕微鏡下では、造精細胞の剥離が多数の精細管で認められ、精巣上体尾部ではほとんど成熟精子が確認されなかった。このことから、我々が解析している投与群でも、この蛋白質の発現量を、Western blotting法により確認したところ、Flu、CA、ICI、Flu+ E₂B、Flu+CAにおいて、減少傾向が観察された。

2. ノックアウトマウスを用いた新生仔期化学物質投与の特殊接合装置に及ぼす影響の形態学的および分子メカニズムの解明

2系統のノックアウトマウスは共に精子細胞の頭部の周囲にはアクチン結合蛋白質の局在は認められなかった。

as/asラットではDES、E₂B、E₂、BPA、Flu投与群ともに造精細胞の分化は第一次精母細胞の減数分裂中期で止まっていた(図10)。

チトクロームCの精細管内腔への顕微注入実験ではチトクロームCは精上皮の細胞間隙を満たし、精上皮基底部の血液・精巣関門(セルトリ細胞間の特殊接合装置)をすり抜け、精巣間質に到達していた(図10)。また、チトクロームCを血行性に投与した実験では精巣間質に到達したチトクロームCは精上皮の細胞間隙を満たし、精細管内腔に達していた(図11)。

3. 造精細胞移植技術を用いた標的細胞の解明

新生仔期にDES投与を受けたマウスの精子形成を確認するために、DESおよびセサミオイルを投与し、20週飼育した後、精巣の組織像を観察した(図13A,B)。セサミオイル投与群は正常な精子形成が確認されたが(図13A)、DES投与群では精細管内の管腔形成の不全や精子形成細胞の配列の異常が確認された(図13B)。

Busulfan 処理による内在性生殖細胞の消失を確認するために、5週齢時にbusulfanを投与しなかった個体と投与した個体の精巣を20週令時に確認した(図3C, D)。Busulfan非投与群では精細管内に精子形成細胞が確認されたが(図13C)、busulfan投与群では精細管内に精子形成細胞は確認で

きなかった(図13D)。

移植した生殖細胞がどの程度精細管に定着し、増殖して広がった程度を比較するため、精細管内でのGFP陽性部位の長さを計測した(図14)。移植実験1のドナー処理の系では、セサミオイルのみを投与したマウスの生殖細胞を移植した場合のGFP陽性部位の長さは 3.0 ± 0.29 mm (平均 \pm SEM)、DES投与したマウスの生殖細胞を移植した場合は 2.9 ± 0.21 mm と、両者の間に統計学的有意差は認められなかった。一方、移植実験2のレシピエント処理の系では、セサミオイルのみ投与したレシピエントに移植した場合のGFP陽性部位の長さは 2.9 ± 0.34 mmであったのに対し、DES投与したレシピエントに移植した場合は 1.7 ± 0.19 mmであり、対照群と比較してDES投与群ではGFP陽性部位の長さは有意に短かった。

移植後の精子形成像の観察を行った結果、移植実験1の系ではDES投与群、対照群ともに正常な精子形成(精細管の管腔の存在、精子形成細胞の正常な配列など)が確認された(図15)。一方、移植実験2の系では、セサミオイルのみ投与した対照群に移植を行った場合、正常な精子形成が観察されたが、DES投与したレシピエントに移植を行った場合、精細管の管腔形成の不全や精子形成細胞の配列の乱れが観察された(図16)。

4. 齧歯類新生仔期化学物質投与の雄性生殖器に及ぼす影響のトキシコゲノミクス解析

a) 組織学的解析

DES投与群では、2週齢の精巣上体のすべての部位において、管腔上皮細胞の高さの低下、間質の増加や管腔の拡張がコントロール群と比べて観察された(図17)。4、8週齢では精巣上体のinitial segmentにおいて2週齢でみられた変化と同様な変化が観察された。他の部位では明確な変化は観察されなかった。E₂投与群では2週齢の精巣上体のすべての部位において、管腔上皮細胞の高さの低下がコントロール群と比べて観察された。4週齢では精巣上体のinitial segmentにおいて2週齢でみられた変化と同様な変化が観察された。8週齢では明確な変化は見られなかった。DESあるいはE₂投与群の両群ともに、2週齢の精巣上体における組織形態的变化は4、8週齢と比べてとても大きかった。

b) マイクロアレイ法による解析

マイクロアレイ法によって、新生仔マウスへのDESあるいはE₂投与による精巣上体における遺伝子の発現変化を解析した。マイクロアレイ解析によってDES投与群において発現変化が検出された遺伝子は、2週齢では21種、4週齢では25種、8週齢では3種であった。その中で、発現上昇あるいは低下した遺伝子は2週齢では4種あるいは17種で、同様に4週齢では24種あるいは1種であった。8週齢においては3種すべての発現が上昇しており、発現低下が見られた遺伝子は検出されなかった。またE₂投与群において、発現変化が検出された遺伝子は、2週齢では37種、4週齢では3種、8週齢では9種であった。その中で、発現上昇あるいは低下した遺伝子は2週齢では26種あるいは9種で、同様に4週齢では2種あるいは1種であった。8週齢においては9種すべての発現が上昇しており、発現低下が見られた遺伝子は検出されなかった。またDESとE₂投与群の両群において発現変化した遺伝子は、2週齢で1種検出された。この遺伝子は両群において発現の上昇が見られ、NIA number (GenBank No.):H3099B09 (BG071454)のExpression Sequence Tag(EST)としてGenBank に登録されているものであった。

5. 齧歯類胎仔期・新生仔期植物エストロゲン投与の雄性生殖器に及ぼす影響

a) *in vivo* 実験

(1) 一般的発達指標について

妊娠前3週間摂食モデルの0.05%IF群雄において、生後1日目から14日目までの間の体重がIF free 群と比べ有意に体重が増加していたが、その差は生後30日目には見られなくなっていた(表1)。その他、体重および肛門生殖突起間距離、開眼、毛生えおよび歯芽萌出に差はなく、指趾等の外形的異常も無かった。実験群間の差も見られなかった。

(2) 臓器重量

妊娠前3週間摂食モデルにおいて、0.05%IF群の精巣重量がIF free 群のものとは有意に増加していた($P < 0.05$ 、表2)。

(3) 性ホルモン受容体遺伝子発現量の解析

IF free 群と0.05%IF 群とを比べた結果、性ホルモン受容体遺伝子の発現量に差はなかった(図18)。

(4) 組織像

IF free群と0.05%IF群とを比べた結果、光学顕微鏡レベルでは組織像に異常はなかった。

b) *in vitro* 実験

cDNAマイクロアレイ解析により、遺伝子発現解析を行った(図19)。またこれらの遺伝子発現についてクラスター解析を行ったところ、図20に示すような分類分けすることができた。

二次元電気泳動法により、遺伝子産物解析を行った(図21)。発現タンパク質のうち、化学物質投与によってスポットが出現したものあるいは消滅したものについてクラスター解析を行ったところ、図22に示すような分類分けをすることができた。

D. 考察

1. 齧歯類新生仔期化学物質複合投与の雄性生殖器に及ぼす影響の形態学的解析および分子メカニズムの解明

これまでの投与実験から、様々な化学物質やホルモンが精子形成に影響することが明らかになった。今回、齧歯類において、低濃度の化学物質の複合投与を行うことで、単独では認められなかったいくつかの影響が観察された。このことは、人体に影響を及ぼさないとされる低濃度であっても、二つ以上の物質が組み合わされた場合、予想以上のものになるかもしれないという可能性を示唆するとともに、組み合わせる物質によっては、個々の作用を相殺する結果も考えられる。また、精子形成のメカニズムにおいては、それぞれの物質が最終的に特殊接合装置(ES)へ影響するような機序をへて作用することが考えられる。今回調べた化学物質はエストロゲン様物質、抗アンドロゲン様物質または抗エストロゲン様物質に分類されるが、それらの単独投与においては、すべてESに作用していたことが興味深い。その理由として、体内のエストロゲンとアンドロゲンの量比はおおよそ決まっているが、体外から投与された化学物質によりホルモンバランスが崩された結果、最終的にESへの影響につながるのではないかという可能性や、それぞれの化学物質はその立体構造や結合部位が類似していることからESへの作用点あるいは作用経路が同じなのではないかという可能性などがあげられる。しかし、これらの仮説を検証するにはさらなる詳しい研究が必要である。

また、これまでの研究から、それぞれの物質は、形態学的にはセルトリ細胞やライディッヒ細胞の異常などを誘導しないことが、電子顕微鏡下で明らかになっている。さらに、新生仔期投与において、投与から21日以降ではないと、形態変化が認められないことや、移植実験の結果からもわかるように、投与による直接的な影響は、造精細胞ではなく、セルトリ細胞と精子細胞のような細胞間の相互作用といった部分ではないかと考察できる。これらは、アクチン結合蛋白の一つが阻害されたトランスジェニックマウスとの比較においても推測できるのかもしれない。このメカニズムについては、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

2. ノックアウトマウスを用いた新生仔期化学物質投与の特殊接合装置に及ぼす影響の形態学的および分子メカニズムの解明

当初は両系統のノックアウトマウスにもDES、E₂B、E₂、BPA、Fluを投与する予定であったが、供給されたノックアウトマウスの数が少なかったためにこれらの投与実験は延期せざるを得なかった。これらのノックアウトマウスの供給が充分になった段階で再開する予定である。

両ノックアウトマウスではセルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置にはアクチン結合蛋白が存在しなかった。これは、アクチン結合蛋白がこれらのノックアウトマウスでは発現していなかったのではなく、発現はしていたが元来の局在であるセルトリ細胞・精子細胞間の特殊接合装置には局在していなかったことを示している。その理由は、これらノックアウトマウスにはE₂B、E₂、BPA、Flu投与マウスと同様にこの特殊接合装置に部分的な欠失があるためと思われる。同じような結果は本年度の本研究内容の「1. 齧歯類新生仔期化学物質複合投与の雄性生殖器に及ぼす影響の形態学的解析および分子メカニズムの解明」で用いたヒト遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの一系統の動物でも見られた。

as/asラットではその表現型として血液・精巣閉門が機能していない(Noguchi *et al.* 2002)ので予想通りの結果が得られた。すなわち、DESにより血液・精巣閉門の形成が遅延される以前にこのラットの表現型として血液・精巣閉門そのものが形成されないために、この動物にDESを投与してもその表現型には変化が見られなかった。また、この動物では減数分裂以降の造精細胞が分化しないので、これら造精細胞に作用するE₂B、E₂、BPA、Fluはその作用点を見いだせなかったと思われる。本研究の結果は今までの実験の結果を突然変異ラットやノックアウトマウスの観点から見直すという意義があるが、これら動物を用いた内分泌攪乱化学物質の研究はやっと端緒にいたばかりという感がある。

最近種々のノックアウトマウスが作られ、そのうちのごく一部に精巣や精子形成に異常のあるものがある。そのうちのまたごく一部に本研究で用いたノックアウトのように、E₂B、E₂、BPA、Flu投与動物と同じ現象が見られている。このようにいわゆる内分泌攪乱化学物質の研究と種々の遺伝子ノックアウトマウスの表現型を比較することにより今まで見えなかった現象が見えるようになってきた。

3. 造精細胞移植技術を用いた標的細胞の解明

従来からの報告にあるように、マウス新生仔をDESに曝露すると、成熟した段階で精子形成に障害の見られることが本研究でも確認された(図13)。しかしながら移植実験¹で示されたように、DESに曝露したマウスの生殖細胞をDES曝露していないマウスの精巣に移植してやれば、コントロ

ールマウスの生殖細胞を移植した場合と同じように移植先で定着・増殖し(図14)、同程度の精子形成が見られることが判明した(図15)。このとき移植先で見られた精子形成細胞は移植した生殖細胞に由来すると考えられる。なぜなら、それらはドナーとして用いたマウスに特有のGFPが発する蛍光を発しており(図15)、またbusulfan処理後に移植を行わなかった場合は精子形成が見られなかったからである(図12)。これらのことから、DESに曝露された生殖細胞であっても、DESに曝露されていない環境下では精子形成を正常に進めうるということが本研究で明らかになった。すなわち、生殖細胞(精祖細胞)そのものはDES曝露により傷害されていないと考えられた。

次に移植実験2の結果を見ると、レシピエントがDESに曝露された場合は、移植細胞の定着と増殖が有意に低下していた(図14)。また、新生仔期にDES曝露を受けそのまま放置された場合と同様に、精子形成の異常が観察された(図16)。レシピエントにセサミオイルのみを投与した場合はこれらの異常が観察されなかったことから、これらの異常はDES曝露に起因すると考えられる。これらのことから、正常な生殖細胞であっても、DES曝露を受けた環境下では精子形成を正常に進められないことが本研究により明らかになった。すなわち、DESの影響は精子形成を支える体細胞系に現れると考えられた。

4. 齧歯類新生仔期化学物質投与の雄性生殖器に及ぼす影響のトキシコゲノミクス解析

新生仔マウスへのDESの投与によって、精巣上体における管腔上皮細胞の高さの低下、間質の増加や管腔の拡張がコントロール群と比べて観察された。また、2週齢における精巣上体の組織形態的变化は、4、8週齢と比べてとても顕著であった。特に精巣上体の間質の増加は2週齢にのみ観察された特徴的な変化であった。新生仔マウスへのE₂投与でも、2、4週齢の精巣上体のinitial segmentに組織形態的变化が観察されたが、観察された変化は管腔上皮細胞の高さの低下のみであった。これらの組織形態的变化は、先の我々の報告(Adachi *et al.* 2003)や他のげっ歯類や様々な動物種の報告と一致していた(Goyal *et al.* 2003; Atanassova *et al.* 2001; Mckinnell *et al.* 2001; Limanowski *et al.* 1996; Veeramachaneni *et al.* 1988; Orgebin-Crist *et al.* 1983)。また、DES投与群とE₂投与群における精巣上体の組織像はすべての週齢で異なっていた。我々は新生仔マウスへのDESあるいはエストロゲン投与による成獣時における精巣組織形態へ影響は異なることを報告している(Hosoi *et al.* 2002; Adachiet *et al.* 2004)。また、新生仔ハムスターへのDESあるいはエストロゲンの単回投与によって、成獣時における精巣上体の組織形態への影響が異なることが報告されている(Khan *et al.* 1998)。よって、新生仔マウスへDESあるいはE₂投与による精巣上体の組織形態への影響は異なり、その影響は2、4、8週齢すべての週齢で起こっていることが示唆された。

次に我々は、cDNAマイクロアレイを用いて新生仔マウスへのDES投与による精巣上体における遺伝子発現への影響を解析した。マイクロアレイ解析の結果、DES投与後2、4、8週齢の精巣上体において、それぞれ、21種、25種、3種の遺伝子の発現変化が検出された。E₂投与群では2、4、8週齢の精巣上体においてそれぞれ37種、3種、9種の遺伝子の発現変化が検出された。マイクロアレイによって検出された遺伝子の多くがESTとしてGenBankに登録されているものであった。それらの遺伝子の機能は不明だが、これらの遺伝子は新生仔へのDESあるいはE₂投与による精巣上体機能の低下に関与している可能性があるため今後の解析が必要である。

5. 齧歯類胎仔期・新生仔期植物エストロゲン投与の雄性生殖器に及ぼす影響

a) *in vivo* 実験

一般に精巣重量はエストロゲン作用により減少するとされているが、本研究ではIF-free群に比べ0.05% IF群の精巣重量が有意に増加しているという結果が得られた。これは、生後早期に0.05% IF群の体重が増加していたことから、精巣の発育が早まった可能性が考えられ、エストロゲン様作用による影響ではないと考えられる。体重が増加したことは、他に報告がないことから妊娠前3w曝露特有の現象である可能性があるが今回のスケジュールでは再現性を取るに至らなかった。

一方、性ホルモン受容体遺伝子発現量に影響がなかったのは、本研究で使用したIF濃度は、IF含有食を多く摂っているアジア人の血中濃度として摂り得る量を想定しており、アジアにおける長い摂取の歴史において子孫に異常がないことを鑑みても今回のような低用量では雄性生殖器の性ホルモン受容体遺伝子発現量に影響を与えないことが示唆された。

b) *in vitro* 実験

本研究では、網羅的な遺伝子発現(mRNA)および遺伝子産物(タンパク)から、作用の異なる化学物質と植物エストロゲンのdaidzein(Dz)の精巣細胞における影響比較を行った。これらクラスター解析により、遺伝子発現プロファイルおよび遺伝子産物プロファイルがほぼ同様の分類分けができることが確認された(図20、図22)。この結果から、化学物質投与の遺伝子発現および遺伝子産物に対しての影響が共通することが示唆された。またDzはエストロゲン活性物質(E_2 、DES)やチロシンキナーゼ阻害作用(Sta)とは異なることが示された(図20、図22)。現在これらのクラスターに関わる遺伝子発現および産物について詳細な解析を進めている。このような複合的な網羅的解析を用いることによって、化学物質のさらなる詳細な分類が可能になり、本プロジェクトではその先駆的研究ができたと考えている。今後このような研究は、作用機序を含めたデータベース構築に利用できるものと期待される。

E. 結論

内分泌攪乱化学物質は単独投与では作用が現れない低量であっても、複合投与するとその作用が著しく増大することがわかった。一方、化学物質の組み合わせによっては互いの作用をうち消すこともわかったので、内分泌攪乱化学物質の影響を回避する方法の開発につながると考えられる。

DES、 E_2 B、 E_2 、BPA、Flu投与動物で見られた造精細胞やセルトリ細胞の形態的变化と種々の遺伝子のノックアウトマウスや突然変異動物の表現型の類似性とを比較検討することにより、種々の内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムを類推できるようになったと思われる。

GFPマウスを用いた移植実験から、新生仔期DES曝露による精子形成障害の標的細胞は精子形成細胞でなく、それを支える体細胞系の細胞であることが明らかになった。

マイクロアレイを用いたトキシコゲノミクス解析から、マウス新生仔にDESを投与すると2, 4, 8週齢において精巣上体の組織形態変化が観察され、 E_2 の投与では2, 4週齢において組織形態変化が観察された。マイクロアレイによる解析によって、DES投与群の2, 4, 8週齢においてそれぞれ20種、25種、4種の遺伝子の発現変化が検出された。また、 E_2 投与群では2, 4, 8週齢の精巣上体において、それぞれ37種、3種、9種の遺伝子の発現変化が検出された。これらの遺伝子は新生仔へのDESあるいは E_2 投与による精巣上体機能の低下に関与している可能性があるで、今後の解析

が必要であると思われた。また、マイクロアレイの結果や組織学的解析から、DESとE₂の精巣上体への作用が異なることが示唆された。

植物エストロゲンは、妊娠前から慢性的低濃度摂取をすると、雄性新生仔の性発達に長期的な影響は及ぼさないが、一過的な影響がある可能性が示された。また、遺伝子発現および遺伝子産物の網羅的解析から、植物エストロゲンを含めた化学物質の精巣細胞への影響について、化学物質の分類分けができることが示された。

F. 引用文献

- 1) Adachi T, Koh KB, Tainaka H, Matsuno Y, Ono Y, Sakurai K, Fukata H, Iguchi T, Komiyama M, Mori C. Toxicogenomic difference between diethylstilbestrol and 17beta-estradiol in mouse testicular gene expression by neonatal exposure. *Mol Reprod Dev* 67: 19-25, 2004.
- 2) Adachi T, Matsuno Y, Sugimura A, Takano K, Koh KB, Sakurai K, Shibayama T, Iguchi T, Mori C, Komiyama M. ADAM7 (a disintegrin and metalloprotease 7) mRNA is suppressed in mouse epididymis by neonatal exposure to Diethylstilbestrol. *Mol Reprod Dev* 64: 414-421, 2003.
- 3) Adachi T, Sakurai K, Fukata H, Komiyama M, Shibayama T, Iguchi T, Mori C. A DNA microarray analysis for the effect of spermatogenesis to phytoestrogen and endocrine disruptors in mice. *Chiba Med J* 77: 151-158, 2001.
- 4) Anahara R, Toyama Y, Mori C. Flutamide induces ultrastructural changes in spermatids and the ectoplasmic specialization between the Sertoli cell and spermatids in mouse testes. *Reprod Toxicol* (in press) 2004.
- 5) Atanassova N, McKinnell C, Williams K, Turner KJ, Fisher JS, Saunders PT, Millar MR, Sharpe RM. Age- cell- and region-specific immunoexpression of estrogen receptor alpha (but not estrogen receptor beta) during postnatal development of the epididymis and vas deferens of the rat and disruption of this pattern by neonatal treatment with diethylstilbestrol. *Endocrinology* 142: 874-886, 2001.
- 6) Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11303-307.
- 7) Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11298-302.
- 8) Goyal HO, Robateau A, Braden TD, Williams CS, Srivastava KK, Ali K. Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. *Biol Reprod* 68: 2081-91, 2003.
- 9) Hosoi I, Toyama Y, Maekawa M, Ito H, Yuasa S. Development of the blood-testis barrier in the mouse is delayed by neonatally administered diethylstilbestrol but not by beta-estradiol 3-benzoate. *Andrologia* 34: 255-262, 2002.
- 10) Ikadai H, Noguchi J, Yoshida M, Imamichi T. An aspermia rat mutant (as/as) with spermatogenic failure at meiosis. *J Vet Med Sci.* 1992; 54: 745-749.

- 11) Khan SA, Ball RB, Hendry WJ III. Effects of neonatal administration of diethylstilbestrol in male hamsters: disruption of reproductive function in adults after apparently normal pubertal development. *Biol Reprod* 58: 137-142, 1998.
- 12) Morena AR, Boitani C, Pesce M, De Felici M, Stefanini M. Isolation of highly purified type A spermatogonia from prepubertal rat testis. *J Androl* 1996; 17: 708-17.
- 13) Noguchi J, Toyama Y, Yuasa S, Kikuchi K, Kaneko H. Hereditary defects in both germ cells and the blood-testis barrier system in as-mutant rats: Evidence from spermatogonial transplantation and tracer-permeability analysis. *Biol. Reprod.* 2002; 67: 880-888.
- 14) Ogawa T, Arechaga JM, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol* 1997; 41: 111-22.
- 15) Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 1997; 407: 313-9.
- 16) Orgebin-Crist MC, Eller BC, Danzo BJ. The effects of estradiol tamoxifen and testosterone on the weights and histology of the epididymis and accessory sex organs of sexually immature rabbits. *Endocrinology* 113: 1703-1715, 1983.
- 17) Limanowski A, Miskowiak B, Otulakowski B. Effects of melatonin, testosterone and the two hormones administered in parallel on epididymis of the rat estrogenized with stilbestrol in the first day of life. *Histol Histopathol* 11: 993-998, 1996.
- 18) McKinnell C, Atanassova N, Williams K, Fisher JS, Walker M, Turner KJ, Saunders TK, Sharpe RM. Suppression of androgen action and the induction of gross abnormalities of the reproductive tract in male rats treated neonatally with diethylstilbestrol. *J Androl* 22: 323-338, 2001.
- 19) Tanaka TS, Jaradat SA, Lim MK, Kargul GJ, Wang X, Grahovac MJ, Pantano S, Sano Y, Piao Y, Nagaraja R, Doi H, Wood WH III, Becker KG, Ko MS. Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15000 mouse developmental cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9127-9132, 2000.
- 20) Toyama Y, Ohkawa M, Oku R, Maekawa M, Yuasa S. Neonatally administered diethylstilbestrol retards the development of the blood-testis barrier in the rat. *J Andrology* 22, 413-423, 2001.
- 21) Veeramachaneni DN, Sherman GB, Floyd JG, Ott RS, Hixon JE. Zeranol and estradiol induce similar lesions in the testes and epididymides of the prepubertal beef bull. *Fundam Appl Toxicol* 10: 73-81, 1988.