

「内分泌かく乱物質」
平成11年度採択研究代表者

岩本 晃明

(聖マリアンナ医科大学泌尿器科 教授)

「内分泌かく乱物質のヒト生殖機能への影響に関する総合的研究」

1. 研究実施の概要

内分泌かく乱化学物質のヒト生殖機能に及ぼす影響についての本質的な問題は、内分泌かく乱物質の活性、作用さらに影響を評価する高感度かつ信頼性のある判定法が確立していないことにある。本研究では診療および疫学調査等によって収集したヒト試料を用いて、分析化学的、生物学的、分子生物学的、遺伝学的、形態学的、運動生理学的手法から新しい評価法の開発を目指すとともに、その基盤となる基礎研究を実施する。その目的のために、平成11年度に引き続き5つの研究グループが相互に交流しながら、(1)内分泌かく乱物質の精巣内ホルモン環境への影響と応答遺伝子に関する研究(新規)、(2)精子形成過程における精巣内各種細胞の相互作用と、精細管基底膜の役割について、(3)DJ-1タンパク質の造精機能マーカーとしての可能性に関する研究、(4)内分泌かく乱物質が与える遺伝子DNAへの損傷及びタンパク動態の解析、(5)遺伝的素因による環境影響に対する反応性の差異に関する研究、(6)精子の形態や運動性に関する内分泌かく乱物質の影響、(7)精巣内DNA断片およびアデニルプリンを指標とした新規造精機能評価モデルの開発、(8)内分泌かく乱物質の高感度測定法の開発の8課題を実施する。

2. 研究実施内容

(1) 内分泌かく乱物質の精巣内ホルモン環境への影響と応答遺伝子に関する研究

脳や生殖器の性分化は胎児精巣由来のテストステロンに依存している。ヒトでは胎齢8週頃、ラットでは胎齢15日頃から胎児精巣に形成されるライディヒ細胞から分泌されるテストステロンへの暴露によって雄型に誘導され、暴露されなければ雌型へ誘導される。またラット血清テストステロン濃度は出生直後にピークを示し、これは脳の性分化や生殖器の発達・分化に関わると考えられている。従って胎児期や新生仔期におけるホルモン環境、ことにテストステロン作用の乱れは性分化の異常を誘導し、また成熟後の生殖器に不可逆的な変化を引き起こすと考えられている。近年不安視されている精子の量的・質的低下も母体経路で暴露された内分泌かく乱物質による胎児期や新生仔期の精巣ホルモン環境の攪乱が原因となる可能性が考えられる。本研究は内分泌かく乱物質の母体経路暴露による精巣の

テストステロン産生とその関連調節因子への影響を検討することを目的とし、前年度までに高用量ビスフェノールAのラット胎児期暴露は出生日(出生2時間後)の血清テストステロン濃度を低下させ、性分化や生殖器系の発達・分化に重要な周産期の内分泌環境を攪乱する可能性を示唆した。さらにこの攪乱の機序を検討するためにステロイド代謝酵素やLH受容体などのmRNAの発現を検討したが、現在のところ高用量のビスフェノールA暴露による変化は得られていない。

今年度は11年度に引き続き高用量ビスフェノールAの胎児期暴露による周産期血清テストステロン濃度低下の機序を検討するために精巣mRNA発現の変化をディファレンシャル ディスプレイにより検討し変化のみられたバンド(mRNA)を現在までに10個得た。さらに今年度は内分泌攪乱物質の性分化や生殖器系の発達・分化および精子形成への影響を明らかとするための基礎データの蒐集を目的として、正常な出生後の生殖腺の発達・分化の過程および精子形成の各ステージで発現に変動のみられるmRNAの検索をディファレンシャル ディスプレイによりおこなった。その結果出生10日、18日、20日、32日から発現の現われる、あるいは強くなるバンド(mRNA)を得た。現在これらのシーケンシングをおこなうとともに、精巣における発現部位を同定するためにISHを進めている。さらに得られた変動に対する内分泌攪乱物質の影響を検討するために、胎児期および授乳期における母体経路ゼラノール暴露の影響を調べたが現在のところ変化は得られていない。

(2) 精子形成過程における精巣内各種細胞の相互作用と、精細管基底膜の役割について

1) Spermatogenesisと精細管基底膜の肥厚について

精細管を構成する基底膜は、造精機能障害のある精索静脈瘤や停留精巣の患者の精巣において肥厚していることが知られている。しかし、このような基底膜の肥厚と造精機能障害の因果関係については未だ不明である。今回、我々はヒト精子形成過程における精細管基底膜の役割について明らかにするための第一歩として、精細管基底膜の肥厚が造精機能障害に先だって起こる現象であるかどうかについて詳細に検討した。さらに、基底膜の構成成分の肥厚にともなう変動についても検討した。

精細管基底膜の肥厚は、造精機能障害と平行して起こる変化ではなく、先立って起こる変化であることが示唆された。

基底膜の構成成分の変化は、基底膜の肥厚と平行して起こるものと造精機能障害と対応して起こるものの両方がみられた。

2) 精巣の各種細胞に対するマーカーの検討について

spermatogenesisの過程をin vitroで再現するためには、精巣における各種

細胞の純粋な細胞集団を単離し、相互関係を調べることに重要である。それぞれの段階の精細胞やSertoli、Leydig cellのみを示すマーカーがいままでなかったため、まず、細胞集団単離のためのマーカーの検討を行った。また、同時にそれらのマーカーを用いて正常な造精機能を示す精巣と造精機能障害を示す精巣の比較をヒトとマウスで行った。

ヒト、マウスの精巣内の全ての細胞のうちSertoli cellのみが、RCA、PNA lectin両方にnegativeであることが判明した。これはSertoli cellのマーカーとして有効であると思われる。また、マウスでは、正常な造精機能をもつ精巣においてVimentin抗体によるSertoli cellに対する染色性の違いが示され、異なる性質を持つSertoli cellが精細管内に存在することが示唆された。また、停留精巣マウスを作成し、造精機能障害を持つ精巣では、Sertoli、Leydig、myoid cellの性質が一部変化することがPNA-lectinによる染色領域の違いによって示唆された。

今回lectinの組み合わせでSertoli cellの細胞集団を、また、さらに抗体を組み合わせるにより、異なる性質のSertoli cellの細胞集団を認識することが可能になった。今後は他の細胞集団の特異的マーカーをさらにスクリーニングしていくことにより、精巣における各種細胞の純粋な細胞集団を単離し各種細胞の相互作用を調べていくこと、また、造精機能障害を起こしている精巣のなかで、各々の細胞の性質が正常の場合とどのように変化しているかについての情報を調べ、造精機能障害の「原因を探る手がかり」としていく必要があると思われる。

(3) DJ-1タンパク質の造精機能マーカーとしての可能性に関する研究

Ornidazoleなどの内分泌攪乱物質を経口投与したラット(精子数の減少と不妊)等で発現が減少することが知られているras関連癌遺伝子産物DJ-1タンパク質が、内分泌攪乱物質による精子形成異常に関与するのではないかと考え、造精機能マーカーとしての導入を目的としてヒト精子及び精漿におけるこのタンパク質の動態と性質を明らかにする。なお本研究は北海道大学有賀教授との「内分泌攪乱物質」プロジェクト間の共同研究である。

1) 抗DJ-1抗体を用いてヒト精漿をWestern blottingにて検討したところ分子量28kDaの単一バンドが検出され、この抗DJ-1抗体陽性バンドの定量をデンストメーターにより試みた。その結果を各種精液検査のデータと比較したが現在のところ相関のあるパラメーターは見つかっていない。また、イモビライズドストリップを用いた2次元電気泳動でもWestern blottingにより、精漿、精子ともに分子量28kDaで等電点の異なる4つのスポットを検出することができた。

- 2) 上記1) では陽性バンドの定量性が一つの問題点であることと、大量のサンプルを処理するには適当ではない。そこで抗DJ-1抗体でのELISAを試みた。通常の方法では精漿中のDJ-1を測定することはできなかったが、MBL玉井博士らにより予め抗DJ-1抗体を固相化したプレートを用いることで組み換え DJ-1を測定できるようになったことを受けてこれを精漿に適用したところ精漿中DJ-1を測定できることが明らかになった。精漿は100倍希釈で測定可能であり、サンプルは極少量で測定できるため非常に感度の良い系と言える。妊婦パートナー精漿について70例、非選択正常男性100例について測定し、運動率、精子数、非選択正常男性についてはTUNEL陽性率についても比較検討したが現在のところこれらに相関は見いだしていない。今後例数を増やし、相関を示すパラメーターの有無について検討する。
- 3) ヒト精子細胞でのDJ-1の局在について間接蛍光抗体法により検討した。4%パラホルムアルデヒド固定でDJ-1は精子頭部後半と中片前半に局在していることが示された。メタノール固定により透徹を行った場合鞭毛に局在しているという報告もある(Whyard et al., Mol. Reprod. Dev., 55,189,2000) ので今後確認する必要があると考えている。
- (4) 内分泌攪乱物質が与えるDNAへの損傷及びタンパク動態の解析
- Two dimensional gene scanning(TDGS) による生殖関連遺伝子の解析
- 新規ゲノム解析技術であるTDGS法をウェルナー症候群(WRN)とロスモンド・トムソン症候群(RTS)の患者より得られたDNAに適応し、原因遺伝子の全てのエクソンを同時に2次元電気泳動ゲルで分離し、解析することを試みた。WRN及びRTS遺伝子は、それぞれゲノム修復に関与する重要なヘリカーゼをコードし、これらの遺伝子に変異をもつWRNやRTS患者では若年期に生殖器官が減退(hypogonadism)する症状が顕れるため、不妊関連遺伝子といえる。
- RTS遺伝子をTDGS解析したところ、期待したエキソンの分離は得られなかった。これはRTS遺伝子のGCコンテンツが高いため、PCR反応が全てのエクソンに働かなかったことに起因する。現在、この問題を解決するため、新規プライマーの作製を行っている。WRN遺伝子のTDGSは期待通りに働き、35コのエキソンが一画面上に分離でき、エキソン33にhomo-mutation(1/1)を持つ患者のゲノム解析が可能であることがわかった。
- 一方、男性不妊の症状が顕著なブルーム症候群(BLM)を始めとする、BLM、WRN、RTSヘリカーゼ遺伝子の発現調節についても調べている。健常人Bリンパ球細胞を用いて、遺伝子発現の調節機構をウェスタンブロットで測定したところ、PMA(Phorbol myristic acid)の添加により、WRN、BLM、RTSヘリカーゼ遺伝子の転写が休眠状態にあるB細胞では起こっていないが、PMA処理により急激に

転写が始まることを見い出した(Oncogene : 19 : 4764-4772, 2000)。PMA処理による転写開始効果はWRNとRTSでは早く、5時間以内に起こり、BLMでは16時間以降に起こることを見い出した。この転写促進の結果、WRNヘリカーゼのコピー数は、休眠状態の1200コピー / cellから、PMA刺激後の94000コピー / cellへと約80倍も増加することがわかった。RTS及びBLMヘリカーゼの変動も大きく、それぞれ120コピー / cell 1100コピー / cell、330コピー / cell 27000コピー / cellであり、それぞれ約10倍と80倍の増加となっている。このようなPMAによる転写及び蛋白質レベルの活性化現象は、それが非常に鋭敏であることから、今後「細胞に与える内分泌攪乱物質の作用を定量化」する一つの系として使えると評価している。実際、平成13年度の研究計画にはWRN, BLM, RTS遺伝子の転写に及ぼす内分泌攪乱物質の影響を測定する系の確立を盛り込んでいる。

(5) 遺伝的素因による環境影響に対する反応性の差異に関する研究

Y染色体多様性と精子形成能について

精子濃度は遺伝的背景、年齢、生活形態、環境要因などからの影響を受けると考えられる。我々のグループでは、主として遺伝的背景(体質)の解析に重点を置いている。Y染色体には精子形成に関与する遺伝子が複数存在するとされているので、特にY染色体の多様性から精子濃度の個体差にアプローチしている。ヒトのDNA多型は大別して2つのグループに分けることができる。一つは特定部位の塩基置換、欠失や挿入などであり、20万年における現代人の進化の中で一回だけ起きたと考えられるものである。これは、現在SNPとしてプロジェクト研究が行われているものに等しい。もう一つは、マイクロサテライトマーカーのような反復配列の反復数の違いによる多型で、比較的短い期間に変化し、同じ反復回数が別々の人類系統に独立に生じるような場合である。昨年の研究で、我々はY染色体上のSNPを使って、日本人男性を4つのハプロタイプ(=多型の組み合わせ)に分類、その精子数を検討し、男性のハプロタイプごとに精子数が異なることを示した。そこで、日本人男性のより細かい分類を目的として、本研究費で購入したdHPLCシステムを使ってSNPの探索を続ける一方、マイクロサテライト多型の検出を試みている。また、dHPLCシステムの利用法の一つとして短時間で鋭敏に行うことができる男女識別法を開発した(Shinka et al. J Hum Genet. in press)。以下に、開発、解析したY染色体多型と成果・進捗状況について述べる。dHPLCシステムを使ったY染色体上のSNPについて、ごく最近米国のPeter Underhillらが新しい多型を報告した。これらのうち、UTY遺伝子およびSMCY遺伝子内にみられる多型を解析し、日本人でも多型が存在すること、UTY intron17-intron11-intron4およびSMCY89が連鎖していることを確認、従来までタイプとしていた集団を2つ分けることができるという予備的結果を得ている。

DAZ遺伝子は複数コピー存在し、それぞれのコピーを見分ける方法が一応報告されてはいるが判定は難しい。報告者のPauline Yenよりプローブを入手し、各タイプごとにサザンハイブリダイゼーションを行った。タイプのみで欠損しているバンドが見られた（発表準備中）。

12f2アレルが欠失している多型がある。この欠失のPCR法による解析方法が英国のMatt Hurlesより得られたので、12f2の欠失が日本人に見られるかどうか解析した。欠失が見られたのは従来タイプとしていた集団だけで、タイプ、
では欠失している個体は見られなかった。しかし、12f2の欠失でタイプの集団を2つに分けることができる。12f2の欠失と精子濃度との相関を示唆する予備的データを得ている。

これまでに、日本人男性集団から3つのY染色体上のマイクロサテライト多型（DXYS265, DXYS266, DXYS241）を見出した。これらの多型を組み合わせると、日本人男性のY染色体は7種類に分類される。白人、黒人も加えると、9種類の組み合わせが観察された。それぞれの多型アレルの長さが162-212-227で表されるハプロタイプがどの集団でも一番頻度が高かった（Lee et al. J Hum. Genet. in press）。

福井医科大学法医学教室松木孝澄教授と開発したYfm1多型は、アレル間の長さの違いとコピー数の違いを同時に検出するユニークな多型である。Yfm1多型を示す少なくとも一つのアレルはDAZ遺伝子に極めて近い場所にあり、この多型に見られるコピー数の違いはDAZ遺伝子のコピー数と関連している可能性があるため、解析を行っている。

(6) 精子の形態や運動性に対する内分泌かく乱物質の影響

内分泌かく乱物質の生殖機能への影響を調べるための指標として精子数を用い、現在国際的な規模での調査が行われているが、生殖機能との関係がより明確な精子の形態や運動性を指標に調査することは、より重要な課題である。精子の形態や運動性を正確に解析する方法をまず確立し、次に、簡便な測定装置を開発する。

1) 精子形態の解析

基礎的なデータを集めるために、生殖能力のある男性と不妊症男性の精子の構造を、光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて調べ、典型的な形態と構造の解析とともに、異常精子の型、比率などを調査した。

不妊症男性のほとんどの精子は運動せず、80%以上の精子の頭部で大きすぎや小さすぎ、二つ頭などの異常が確認された。尾部についても、60%以上の精子鞭毛で短すぎたり、特定箇所が曲がったりなどの異常が認められた。生殖能力を有する男性の精子では、形態の異常率は頭部・尾部ともに低下するが、不

妊男性の精子で見られた形態異常のほとんどの型が確認された。電子顕微鏡による観察から、不妊症男性精子の運動性の欠損は運動装置である鞭毛の形成不全が主な原因であることが明らかになった。一方、これまで光学顕微鏡では明らかにされることの少なかった頭部の異常として、核内の膜構造の存在や核質の空胞化などがかなり高い割合で観察された。

2) 精子の運動解析

生殖能力を有する男性精子と不妊症の男性精子を用いて、運動率や前進速度、精子を観察する容器の厚さや温度の影響などを調べた。これらの結果にもとづいて、簡便かつ精度の高い精子運動の解析法を確立するために、コンピュータ画像解析装置を開発・改良した。

不妊症男性の精子はほとんどのものが運動しなかったが、頭部が小さい精子では、正常精子よりも活発に運動する症例もあった。生殖能力を有する男性の精子の運動率は平均で約 55%であった。さらに、精子数が多い人では、運動率も高くなる傾向があった。

精子運動を評価のための最も基本的なパラメータは、運動率と平均前進速度である。これらを自動的に求めるために、精子頭部の動きを 1/60 秒毎にビデオカメラで撮影し、ビデオファイルとしてコンピュータのボード上のメモリに記録した。この画像で頭部の動きを追跡し、1/60秒毎の座標を読みとる。運動率については、動いた頭部と動かない頭部の比率から算出し、前進速度については、座標間の距離を要した時間で割るというアルゴリズムで求めた。顕微鏡の視野にある200匹程度の精子について、30秒ほどでこれらの値を測定することができるようになった。さらに、頭部の座標や軌跡から求めることのできる二次的な運動パラメータについても、短時間で計算結果を表示できるようになった。しかし、活発に運動するヒト精子の鞭毛はかなり大きな三次元運動をするため、観察する際の溶液の厚さがあつい場合には、精子は頭部と尾部を結ぶ軸のまわりを回転をしながら前進した。このため、頭の横振りの頻度と鞭毛の横方向の運動の頻度が等しいとして鞭毛の振動数を求めていたこれまでの方法は適用できなくなり、別の方法を利用しなければならない。現在プログラムを開発中である。

(7) 精漿内DNA断片およびアデニルプリンを指標とした新規造精機能評価モデルの開発 ヒト精液所見における新規検査項目の開発

新規ヒト精子機能検査の開発を目的として、精子頭部形態測定法の標準化ならびに精子染色体断片化の観察法の開発を行った。精子形態の観察に際しては、精子機能を考慮した新たな形態標準品の確立が不可欠であり、精子成熟性、運動能、精子密度を指標として精子を精製し、その形態を観察した。射精精液中の精子頭

部形態は多様であったが、精製の進行に伴い楕円形の頭部を有する精子比率が増加し、最終標品ではほぼ均一な形態となった。今後、画像解析による形態観察の標準化を図る予定である。

精子形成過程における精子染色体断片化をTUNEL法ならびに細胞電気泳動法により観察する手法を開発した。TUNEL法により種々の精液所見を有する129例の染色体断片化度を観察した結果、精液所見の低下に伴ないTUNEL陽性精子比率が上昇することを認めた。

(8) 内分泌かく乱物質の高感度測定法の開発

内分泌かく乱物質（EDs）のヒト生殖機能に及ぼす影響についての本質的な問題はEDsの作用さらに影響を評価する高感度かつ信頼性のある判定法が確立していないことにある。この研究ではヒト試料を用いて、分析化学的、生化学的、遺伝学的、形態学的、運動生理学的方法から新しいアッセイ法の開発を目指し、地球規模でのEDsの影響を評価可能にする。

内分泌かく乱物質の人体への暴露量とその影響を把握する目的で、蛍光プレラベル化剤2-(4-hydroxyphenyl)-5,6-dimethylbenzimidazole : CDB)を用いたビスフェノールA (BisA)、アルキルフェノール類の内分泌かく乱物質高感度HPLC法の開発を行ってきた。この方法を用いてマウスおよびラットの母体・胎児の移行を調べる目的で測定を行った。さらに今回は、聖マリアンナ大学泌尿器科岩本グループより送られたヒトの血清試料の分析を行った。尚これらの分析はブラインドで行い試料の詳細については知らされなかった。

この実験と平行し、キャピラリー電気泳動（CE）による、BisAおよびアルキルフェノール類の一斉分析法の開発を続けて行った。CE法はHPLC法およびGC-MS比較し、異なる分離パターンを示し、さらに、上記の分析法のランニングコストの1/10以下であることから、新規の分離分析法として着目され、品質管理分析分野に応用が進んでいる。このことから、CE法によるBisAおよびアルキルフェノール類の血中濃度測定への応用を行った。

1) HPLCによるヒト血清中のBis Aおよびアルキルフェノール類の定量

これまでに、上述CDBプレラベル化HPLCによりマウスおよびラットにおける母体から胎児への移行（BisAは自由引水投与）を調査する試料について分析をおこなった。ヒト血清試料119検体について分析を行った結果、BisAは検出されなかった（検出限界:1pg/ml）。アルキルフェノールでは72件対中にアルキルフェノール（C6 - C9）は検出されておらず（検出限界:1 - 5pg/ml）さらに分析が行われている。全体にビスフェノールAおよびアルキルフェノールが検出されなかった理由として大きく2つの理由が考えられた。第1に、今回血清試料を得た提供者は実際にビスフェノールAおよびアルキルフェノールに対す

る被爆量が低いことが考えられた。第2に、微量ながら提供者は、ビスフェノール、アルキルフェノールの被爆を受けているが、各フェノールのクリアランスが高く、迅速に提供者の血中から代謝されることにより、今回検出されなかったことが考えられた。さらに今後、今回のデータと共に試料提供者の血液以外の試料（唾液、臓器等）についても分析を行っていくことが、BisAおよびアルキルフェノールに対する被爆について調査を行う場合に有用であることが示唆された。

2) CEによるBisAおよびアルキルフェノール類の一斉分析法の開発

UV検出CE法（MEKCモード）によりBisAおよびアルキルフェノール類11種20分で分析できる方法を開発した。従来のHPLC法に比較し分析時間を大幅に短縮できた。また、分離能においても10000段以上の理論段数が得られ。またCEの大きな特徴であるランニングコストの低下および廃液等の減少が確認でき、ヒト試料における大規模モニタリングへの応用が期待できた。

3) 血清試料への応用

開発したCE法を用いて、HPLCで用いた血清試料30検体について分析を行った。

この結果、CE法においても、BisAおよびアルキルフェノール（C6 - C9）は検出されなかった（検出限界0.6 - 1.0 μ g/ml）。

4) CE法における改良点

CE法における改良すべき点として、高感度化が挙げられる。このためには蛍光検出器の導入およびプレラベル化等について検討していく予定である。

今後はさらに、BisAおよびアルキルフェノール類の代謝物について調べていく予定である。LCで検出された各ピークのMSによる解析も必要になっていくと思われる。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

Tomomasa, H., Adachi, Y., Iwabuchi, M., Oshio, S., Umeda, T., Iino, Y., Takano, T., Nakahori, Y. : Pericentric inversion of the Y chromosome of infertile male. Archives of Andrology. 45:181-185,2000.

Lee, J.W., Kotliarova, S.E., Ewis, A.A., Hida, A., Shinka, T., Kuroki, Y., Tokunaga, K., Nakahori, Y. : Y-chromosome compound haplotypes with the microsatellite markers DXYS265, DXYS266 and DXYS241. J. Hum. Genet. 46 : 80-84,2001.

Ishijima, S., Mohri, H., and Suarez, S. S. Flagellar movements of hyperactivated and acrosome-reacted golden hamster spermatozoa. Int. J. Urology, 7, Suppl., S73, 2000.

Ishijima, S., Vines, C. A., Griffin, F. J., and Cherr G. N. Flagellar movements of

herring spermatozoa. Zool. Sci., 17, Suppl., 34, 2000.

Katayama, M., Sasaki, T., Matsuda, Y., Kaneko, S., Iwamoto, T., Tanaka, M. (2001) Sensitive determination of bisphenol A and alkylphenols by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization with 2-(4-carboxyphenyl)-5,6-dimethylbenzimidazole. Biomed. Chromatogr., 15(2), 1 - 5.