

第27回麻布環境科学研究会 一般講演9

新生児ラットを用いた内分泌攪乱物質暴露の早期指標としての組織学的所見と血清タンパクの動態

早川美奈子, 秋元美智子, 梅谷 依里, 永野 恭子, 畠中 渚, 本間麻友美,
村瀬 輝美, 吉田奈津紀, 角野 洋一, 曾川 一幸¹, 本田 政幸

麻布大学環境保健学部衛生技術学科衛生学研究室,

¹千葉大学医学部附属病院 疾患プロテオミクス研究センター

1. はじめに

現在までのところ、医薬品として使用された Diethylstilbestrol (DES) のような例を除き、内分泌かく乱物質によりヒトが有害な影響を受けたと確認された事例はなく、内分泌系の恒常性維持機能が完成した成人では、外来化学物質によるかく乱作用への抵抗性も期待できる。しかし内分泌系の未発達な胎児や未熟な幼・小児ではこの抵抗性が弱い可能性があり、特に、胎児においては、諸器官の形成の異常や遅滞による不可逆的な影響の可能性を意味する。このような観点から成人より子供への影響が危惧されるが、食生活や生活環境の影響を考慮した疫学調査による確認はいまだなく、その影響は現在のところ明らかでない。したがって実験動物を用いた研究等により、胎児や未熟な幼・小児で起こり得る影響の作業機序の解明と、その結果を安全性評価に役立てることが必要である。今回、我々はラットの新生児に DES を投与し、精巣の組織学的変化と血清タンパク動態を観察し、化学物質の安全性評価に役立つ内分泌かく乱の早期指標となる可能性を検討した。

2. 材料と方法

動物は経産妊娠 13 日目の SD 系ラット（日本エスエルシー株式会社）14 匹を駆化させ、産まれた新生児（オス 51 匹）を用いた。DES 群（28 匹）については、DES（1 $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$ ）コーン油/匹）を生後翌日から一日おきに計 6 回氷冷麻酔下に皮下接種した。コントロール群（23 匹）についてはコーン油 25 μl を同様

に接種した。体重と肛門・生殖結節間距離を生後 2 週までは 1 日間隔、その後は 1 週毎に測定した。5・7・9 w 齢時に、エーテル麻酔下で放血と殺し、パラフィルム上に滴下させた血液を採取した。

精巣の組織学的検索のために、左右の精巣を背腹側で 2 分割しそれぞれ 1 枚、精巣 1 個につき 4 枚の薄切片を作成した。HE 染色により①精子数（1 切片につき 5 個の精細管をランダムに選び、精細管 1 個当りの精子数を算定）②精細管直径（PIXERA. Instudio.1.0.0 (Pixera Corporation) で撮影した画像を Objective Micrometer (OLYMPUS) で校正し、1 切片につき 12 個の精細管の平均値) ③セルトリ細胞とライディッヒ細胞数（400 倍で 1 切片につき 1 個の精細管の全細胞数とそれぞれの細胞数）を算定し、④精巣上体管の閉塞状態（背側の 1 切片につき 40 倍で 1 視野域の全精巣上体管数、PAS 染色による閉塞像、HE 染色による閉塞管数）を観察し、⑤アポトーシスの発現率は DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega) を使用した酵素抗体法で測定した。

血清タンパクは、プロテインチップリーダー PBS-2c (サイファージェン・バイオシステムズ株式会社) を用い SELDI-TOF-MS によりプロテオーム分析を行った。

3. 結果及び考察

顕著な差が見られたのは精子数、精細管直径、ライディッヒ細胞数の割合、アポトーシスの発現率と血清タンパクであった。

精子数は、5wではDES群（5匹）・コントロール群（5匹）共に精子は観察されなかった（図1）。7wではコントロール群（5匹）の精細管の95%（57/60）に精子が観察されたのに対し、DES群（6匹）の精細管では精子は全く観察されなかった。9wではコントロール群（4匹）の精細管すべてに精子が観察されたのに対し、DES群（5匹）では精細管の51.6%（31/60）しか観察されなかった。

精細管直径の平均値は、コントロール群 193 μm 、DES群 132 μm となり、DES群は直径が短く、精細管の発育が不良であった（図2）。ライディッヒ細胞数の割合はコントロール群 33%、DES群 25%であった（図3）。アポトーシスの発現率は、コントロール群 9.7%、DES群 24.7%、DES群の方がアポトーシス発現率が高かった（図4）。

血清タンパクは、9045Daと12668Daのタンパク質でコントロール群とDES群との間に顕著な差異が認められ、二つの分画では動態が異なっていた。9045Daはコントロール群の5・7・9wでそれぞれ60%（3/5匹）、80%（4/5匹）、100%（4/4匹）と週

齢の経過と共に発現率は増加した（量的には5・7wから9wにかけて減少した）、一方、DES群ではそれぞれ20%（1/5匹）、33%（2/6匹）、20%（1/5匹）に認められたに過ぎず、DES投与によりタンパクの発現が減少した。12668DaはDES群で、5wでは0%（0/5匹）であったが、7・9wでは50%（3/6匹）、80%（4/5匹）と高率に発現し、経時的にも増加傾向が認められた。しかし、コントロール群では5・7wのいずれでも発現は認められず、9wで初めて25%（1/4匹）に認められた。つまり、DES投与によりタンパクが出現するという、9045Daのものと逆の差異が認められた。

以上のことから、精子数、精細管直径、アポトーシスの発現率、血清タンパク（9045Da、12668Da）は内分泌攪乱作用を早期に検出するための指標となり得ることが示唆された。また、今回見出された血清タンパクの簡便な定量システムが確立されれば、新生児ラットを用いた投与実験は内分泌攪乱物質を検出する有用な実験系となり得ると考えられる。

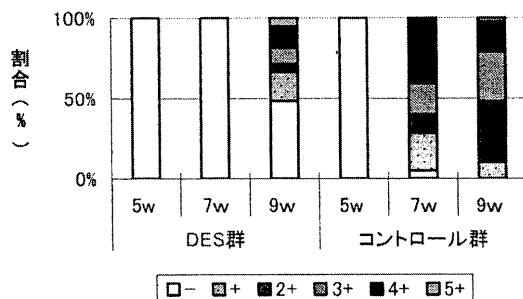


図1 精子数のDES群とコントロール群の比較

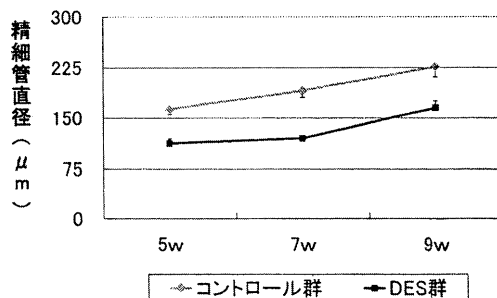


図2 精細管直径のDES群とコントロール群の比較

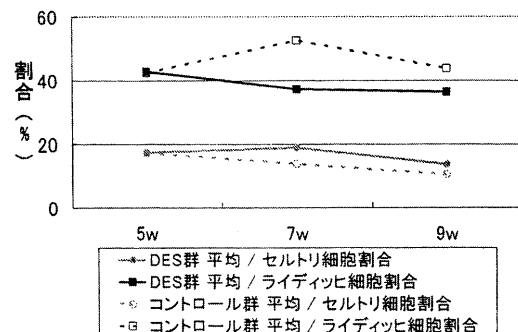


図3 セルトリ細胞とライディッヒ細胞の割合

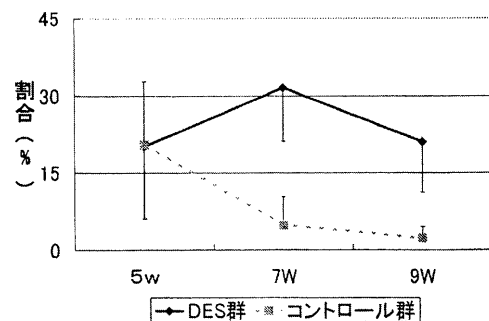


図4 アポトーシスのDES群とコントロール群の比較