

外因性化学物質曝露マウス精巣で見られた形態変化について

了徳寺大学健康科学部 穴原玲子

【キーワード】 マウス、精子形成、特殊接合装置、外因性化学物質、セルトリ細胞

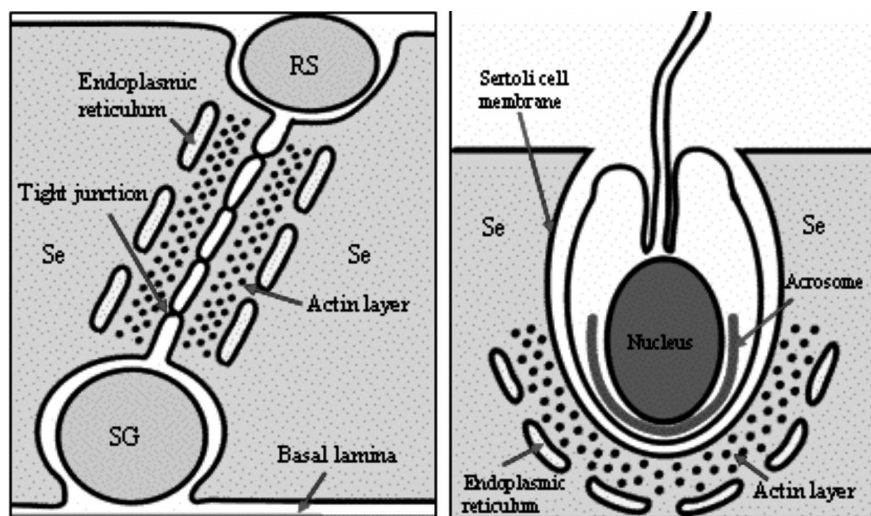
＜緒言＞

近年、産業が発達するに伴い、様々な化学物質が環境中に排出されている。また、それらの化学物質は工業生産過程の副産物として産生されることも多く、工業廃水や工業廃棄物として環境を汚染することも報告されている。このような化学物質は多数の種類が存在し、また、その濃度の程度も様々である。さらに、環境の化学物質汚染は生態系に悪影響を与えている。たとえば海鳥の産卵数の減少、極地に生息するほ乳類の繁殖異常、大量の工業廃液を垂れ流す工場近郊に生息する生物の雌雄同体などが例としてあげられる (1,2)。また、ヒトの成人男性の精子産生能の低下や子供の行動異常にも、それらの化学物質汚染が関係しているのではないかということも示唆されている (2)。化学物質の高濃度曝露では、直接生体に毒性影響が現れ、個体を死に導くことが多いが、今日、環境中を汚染している化学物質のほとんどは生体の生命に危険を与えない程度の濃度であると言われている。よって、これからは低濃度の化学物質がどのような影響を生態にあたえるのかについてあきらかにすることが必要とされる。さらに、生殖器系への影響は次世代（子孫）への影響に直接関係してくるので、早急な報告が望まれている。

本研究ではヒトや動物で見られる雄性生殖器（特に精子形成）への化学物質の影響に注目し、いくつかの化学物質を雄マウスに曝露し、その精巣について形態学的な解析を行った。

精子は精巣の精細管の中で成長する。精原細胞から減数分裂を経て、精子細胞としていくつかのステージを超え、成熟精子として成長する。この精子が形成される過程で重要な役割を示すのが「セルトリ細胞－セルトリ細胞間特殊接合装置（血液精巣関門も含む）」と「セルトリ細胞－精子細胞間特殊接合装置」である（図1）。セルトリ細胞－セルトリ細胞間特殊接合装置は、主に精原細胞から精子細胞に成長するまで細胞に栄養を与えたりする役割がある (3)。また、セルトリ細胞－精子細胞間の特殊接合装置は精子細胞が成熟精子になるために核濃縮や頭部形態を変形させ、一定期間精子が精細管の中に脱落しないように維持する役割を持っている (3)。本研究では、このセルトリ細胞－精子細胞間の特殊接合装置の形態と精子細胞の頭部形態（つまり spermiogenesis）に化学物質が与える影響について観察を行った。

図1 特殊接合装置



セルトリ細胞－セルトリ細胞間特殊接合装置

セルトリ細胞－精子細胞間特殊接合装置

SG: spermatogonia. RS: round spermatid. Se: the Sertoli cell.

1. 抗アンドロゲン物質フルタミド flutamide (FLUT) のマウス精巣への影響

環境中を汚染している化学物質の中には、抗アンドロゲン作用を示すものがある。農薬の成分である DDT・DDE(4)や可塑剤の一種であるフタル酸類(5)は抗アンドロゲン作用をもち、内分泌攪乱物質としても疑われている。この影響は、男性ホルモンの影響を受ける器官に悪影響を与え、精子産生機能や副生殖腺の発育を阻害すると言われている。

<方法および材料>

まず本研究で使用した化学物質は、抗アンドロゲン物質 FLUT とした。FLUT は、前立腺ガンの治療薬にも使用されているアンドロゲン受容体拮抗物質で、今日では内分泌様物質のスクリーニングに用いられている(6)。高濃度の FLUT は雄性生殖器である前立腺重量を減少させ、胎児期曝露では尿道下裂などの先天奇形を誘導することが知られている(6)。FLUT はコーンオイルに溶解した。低濃度 0.012mg/kg/day を 12 週齢の ICR 雄マウス (n=5-7) に皮下より 5 日間連続投与を行った。投与期間終了後、1) マウスから精巣、精巣上体、精囊腺を採取し、それぞれ重量を計測した。2) 精巣上体は頭部、尾部に分け、精巣とともに光学・電子顕微鏡観察を行った。また、3) 精巣および血液中のテストステロン、エストロゲン量についても、それぞれ計測を行った。ホルモン濃度の統計解析は t 検定を用いた。

<結果>

得られた精巣、精巣上体、精嚢腺の器官重量は、対照群（溶媒：コーンオイルのみ投与）と比べ有意な変化は認められなかった。

FLUT 投与の組織学的解析では、1) セルトリ細胞－精子細胞間特殊接合装置の部分欠損（図2）、2) 精子細胞の核の変形（図2）、3) 精子細胞のアクロソームの変形が観察された（図2）。4) 減数分裂前の精原細胞、セルトリ細胞－セルトリ細胞間特殊接合装置の形態変化は認められなかった。

他方、対照群と比べ FLUT 投与マウスの血清中ホルモン濃度は、エストロゲン、テストステロンともに有意な差は認められなかった。また、精巣中のホルモン濃度では、エストロゲンレベルが対照群と比べ有意に増加（対照群平均：64.8 ± 6.7 pg/mg vs FLUT：99.5 ± 17.3 pg/mg $P<0.007$ ）し、テストステロンレベルは有意に減少（対照群平均：236.3 ± 22.8 vs FLUT：202.8 ± 51.6 pg/mg $P<0.0003$ ）していた（表1）。

図2 電子顕微鏡観察による FLUT 曝露マウス精巣微細構造の変化

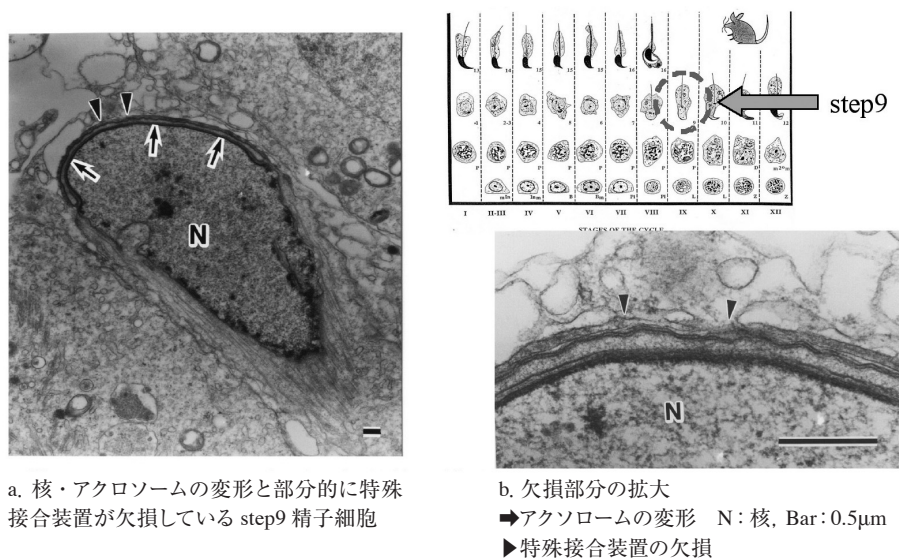


表1 血清中、精巣中のエストロゲン(E2)、テストステロン(T) 量

| | 血清 E2 (pg/ml) | 血清 T (ng/ml) | 精巣 E2 (pg/ml) | 精巣 T (ng/ml) |
|------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| 対照群 | 8.7±1.7 | 0.8±0.2 | 64.8±6.7 | 263.3±22.8 |
| FLUT | 10.7±1.6 | 1.2±0.2 | 99.5±17.3** | 202.8±51.6** |

** : $p<0.01$

2. FLUT とエストロゲン複合投与のマウス精巣への影響

環境中を汚染している化学物質は、単体で生体に影響を与えることはまれで、ほとんどが複合して作用していると考えられている。以前、エストロゲンは女性ホルモンであり男性生殖器の形成には必要がないと言われていたが、今日ではセルトリ細胞に影響し、精子の発育にも重要であることが広く知られている(7)。しかしながら、環境中を汚染している化学物質の性質は、女性ホルモンと類似した作用を持つことが多く、例をあげると、ポリカーボネート製品の副産物であるビスフェノール A や界面活性剤の一種であるノニルフェノールなどがある。

本研究では、抗アンドロゲン FLUT の精巣への影響がエストロゲン β -estradiol 3-benzoate (E2B) の複合曝露環境でどのように変化するのかを明らかにした。

<方法および材料>

FLUT 低濃度 0.012mg/kg/day、E2B 低濃度 0.02mg/kg/day をコーンオイルに溶かし、12 週齢の ICR 雄マウスに皮下より同時に 5 日間連続投与を行った。投与期間終了後、精巣について光学・電子顕微鏡的観察を行った。異常精子細胞数の統計処理は、二群比率の差の検定を行った。ホルモン濃度については、検体数の都合上行なかった。

<結果>

FLUT + E2B 投与の組織学的解析では、FLUT 単体投与で認められた 1) セルトリ細胞-精子細胞間特殊接合装置の部分欠損、2) 精子細胞の核の変形、3) 精子細胞のアクロソームの変形が観察された。FLUT 単体投与と FLUT+E2B の単体投与の影響を明らかにするために、光学顕微鏡下で確認できる 1 精細管あたりの異常精子細胞数をカウント（合計 2000 個以上）し、比較を行った。その結果、有意な差はみられなかったものの、FLUT 単体投与より FLUT+E2B 複合投与のほうが、異常精子数の割合が高くなった（表 2）。また、FLUT 単体投与で認められなかった精子形成サイクルの乱れが FLUT+E2B 複合投与精細管において生じ、より形態の異常変化が観察された（表 2）。

表 2 FLUT、FLUT+E2 曝露マウス精巣の形態変化まとめ

| | セルトリ細胞-精子細胞間特殊接合装置 | 精子細胞の頭部 | 異常精子細胞率 | 精子形成サイクル |
|----------|--------------------|-------------------|---------|----------|
| 対照群 | 正常 | 正常 | 0.3% | 正常 |
| FLUT | 欠損 | 核・アクソロームの変形 (+) | 2.1% | 正常 |
| FLUT+E2B | 欠損 | 核・アクソロームの変形 (+++) | 3.0% | 乱れあり |

対照群 vs FLUT: $p < 0.03$, 対照群 vs FLUT+E2B: $p < 0.03$

＜考察＞

以上の結果から、抗アンドロゲン FLUT 低濃度曝露のマウス精巣では、セルトリ細胞－精子細胞間特殊接合装置の欠損が顕著に観察された。この結果から、FLUT が精子細胞から成熟精子へ成長する時の特殊接合装置を変化させ精子細胞の核やアクロソームの変形が誘導されたのではないかと考えられた。また、ホルモン量の測定結果から、男性ホルモンと拮抗する FLUT が精巣内でテストステロンを減少させるのではなく、エストロゲンを増加させているということが明らかになった。これは、おそらくアンドロゲンと拮抗する作用に生体が反応し、負のフィードバックとしてエストロゲンのレベルを上昇する働きが見られたことによるものと考えられた。また、外因性の FLUT が作用することで精巣中に存在するエストロゲンとテストステロンの一定のバランスが崩され、形態変化にもつながったのではないかと考えられる。

他方、FLUT と E2B の複合投与結果から、FLUT はエストロゲンの低濃度存在下によって形態変化の影響がより悪化することが証明された。本研究では、今日様々な種類の化学物質が、環境中にあふれている状況において、たとえ単体では生体に影響を及ぼさない化学物質でも、その他の物質と複合して作用することで影響が現れるということに警鐘を鳴らす結果となった。

本研究の結果より、マウス精巣において低濃度 FLUT（抗アンドロゲン）は形態学的に悪影響を与えることが明らかになった。さらに、エストロゲン存在下の FLUT の影響は、単体の結果をさらに悪化させることが分かった。よって、今後は、化学物質単体では生体に影響を及ぼさない濃度であっても、その他の化学物質との複合による相加・相乗影響について確認する必要があると考えられた。尚、本研究の主な結果は、Reproductive Toxicology に掲載された(8)。

【References】

1. レイチェル・L. カーソン「沈黙の春」新潮社；改訂版（1974/02）ASIN: 4102074015.
2. シーア コルボーン, ジョン ピーターソン マイヤーズ, ダイアン ダマノスキ「奪われし未来」翔泳社；増補改訂版（2001/02）ASIN: 4881359851.
3. Toyama Y: Actin-like filaments in the Sertoli cell junctional specialization in the swine and mouse testis. Anat Rec 186: 477-92 (1976).
4. Kelce WR, Stone CR, Laws SC, Gray LE, Kemppainen JA, Wilson EM. "Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist" Nature. 1995 15;375(6532):581-5.
5. Sohoni P, Sumpter JP "Several environmental oestrogens are also anti-androgens" J Endocrinol. 1998 158(3):327-39.

6. Trump DL, Waldstreicher JA, Kolvenbag G, Wissel PS, Neubauer BL “Androgen antagonists: Potential role in prostate cancer prevention” *Urology*. 2001 57(4 Suppl 1):64-7.
7. O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER “Estrogen and spermatogenesis” *Endocr Rev*. 2001 22(3):289-318.
8. 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*, 2004 18:589-96.

Histological Study of the Exogenous Chemical Effects on Mouse Testis

【Abstract】

Several hormonal and hormone-like exogenous chemicals have been reported to induce the adverse effects of male-reproductive-tissue-development. The ectoplasmic specialization between the Sertoli cell and spermatids (apical ES) is a unique actin based on the junctional structure, which is located at the apical area in the seminiferous tubules. The present study reveals that the effects of anti-androgen flutamide (FLUT) on ICR mouse testes. FLUT induced the deletion of apical ES and the deformation of acrosome of spermatids in the mouse testes. The results suggest the relationship between the levels of testes and the histological changes of testes. Further, the effect of FLUT was seriously bad by the estrogen. The percentages of abnormal spermatids were increased in the FLUT + estrogen treatment rather than in the single treatment of FLUT. The present study may be a key to elucidate the exogenous chemical action of the testis.