

20000789

厚生科学研究費補助金

医薬安全総合研究事業

薬効成分を有する天然物の精子形成や次世代に対する
有害性評価法の確立に関する研究 (H10 医薬-027)

平成 12 年度 総括研究報告書

主任研究者 森 千里

平成 13 (2001) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書

薬効成分を有する天然物の精子形成や次世代に対する有害性評価法の 確立に関する研究	1
森 千里	
(資料 1) Neonatal exposure of genistein reduce an expression of estrogen receptor-alpha in the testis of adult mice.	7
(資料 2) 植物エストロゲンおよび内分泌攪乱物質の精子形成へ の影響評価に対する DNA マイクロアレイを用いた判定法	36
(資料 3) Endocrine disruptors and human health	44
(資料 4) 環境ホルモン ヒトへの影響と対策の方向性	54
(資料 5) ヒト胎児への内分泌攪乱化学物質曝露の状況	64
(資料 6) Possible effects of endocrine disruptors on male reproductive function	70
(資料 7) 妊孕性に関わる諸問題、環境因子と生殖	95
(資料 8)	
a) ヒトを含む霊長類における植物エストロゲンの胎児移行に関する検討	121
b) マウス新生仔期の Diethylstilbestrol (DES) 曝露により誘発される 精巣特異的遺伝子について	122
c) 内分泌攪乱物質曝露における精巣での遺伝子発現の変化について (DNA マイクロアレイ法を用いて)	123
d) 植物エストロゲン (Phytoestrogen) の胎児移行	124
e) マウス新生仔期の Diethylstilbestrol (DES) 曝露で起こる精巣での 遺伝子発現の変化	125
f) 日本人男性の思春期における精巣重量の変化	126
g) DNA マイクロアレイを用いたマウス精巣での遺伝子発現の解析 (シンポジウム)	127
h) 精巣毒性の新しい判定法の可能性について	128
i) 内分泌攪乱物質曝露におけるマウス精巣での遺伝子発現の評価	129
j) 霊長類をモデルとした植物エストロゲンの胎児移行に関する検討	130
k) Fetal exposure to phyto- estrogens in monkeys.	132

l) 新生仔期 Diethylstilbestrol 曝露における精巣で誘導される 遺伝子に関する検討	133
m) 新生仔期内分泌攪乱物質曝露で起こる精巣での遺伝子 発現変化の検討(DNA マイクロアレイ法を用いて)	134
n) 植物エストロゲンの胎児移行に関するヒトとサルでの検討	135
o) Analysis of Several Endocrine Disruptors Detected in Human Umbilical Cords and Cord Serum in Japan.	136
p) Transplacental transfer of phyto- estrogens in humans and monkeys.	137
q) A DNA microarray analysis for the effect of spermatogenesis to endocrine disruptors in mice.	138
r) Increasing Importance of Biological Markers and DNA Microarray Analysis for Assessing Fetal Exposure on Endocrine Disruptors.	139
s) 内分泌攪乱物質曝露の解析法	140
t) 母体から胎児への移行について	144
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	146

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

総括研究報告書

薬効成分を有する天然物を精子形成や次世代に対する有害性評価法の確立に関する研究

主任研究者 森 千里 千葉大学大学院医学研究院 教授

研究要旨

薬効成分を有する天然物の精子形成や次世代に対する有害性評価法の確立を行うことを目的として、本年度の研究では、薬効成分を有する天然物のなかで、植物エストロジェンの精子形成を含めた雄性生殖細胞に対する有害性評価法の確立に関する検討を行った（資料1、資料2及び資料8参照）。動物実験やヒトの疫学調査により、胎児や新生児への多量の植物エストロジェン曝露が、流産、先天異常、性分化異常を惹起することが報告され、植物エストロジェンの胎児・新生児に対する影響及び男性生殖への影響に関する検査・評価法の確立が急がれているためである（資料3～7参照）。

マウスを用いた陽性試験として、エストロジェン作用をもつジェチルスチルベストロール (DES)、タモキシフェンを新生仔期（生後1日目から5日間）に投与し、3、4ヶ月後の精子形成状態及び妊孕性を検討した。DESによる影響としては、精巣重量の低下、精巣上体内精子数の減少、精子運動能の低下、さらに組織学的判定で精子形成異常が認められた。また、タモキシフェンによる影響としては、精子運動能の低下が認められた。さらに、分子生物学的検討をした結果、DES及びタモキシフェン投与群において、estrogen receptor (ER)と androgen receptor (AR) の mRNA の発現の低下が認められた。前述の陽性試験をもとに、植物性エストロジェンであるゲニステインの新生仔期投与による精子形成状態、妊孕性及び、精巣での ER や AR の mRNA の発現状態への影響を検討した結果、精巣重量、精子数、精子運動能及び AR の mRNA の発現には影響がなかったが、精巣での ER の mRNA の発現において低下が認められた。また、タンパクレベルにおいても、精巣での ER の発現が低下していることを見出した（資料1及び資料8参照）。さらに、本年度の研究では、植物エストロジェンの精子形成への影響を、DNA microarray を用いて、DES やビスフェノール A の影響と比較した。DNA microarray を用いた遺伝子発現の変化に関する解析（クラスター解析）の結果、植物エストロジェンによって精巣で変化する遺伝子群（パターン）は、DES によるものに類似し、ビスフェノール A と違うことが判明した（資料2及び資料8参照）。また、次世代への影響を判定するために、植物エストロジェンの胎児移行について、サルにおいて検討した。その結果、ゲニステイン、ダイゼイン、イコールにおいて、高濃度の胎児移行があることが判明した（資料5及び資料8参照）。

今回の結果から、植物エストロジェンなどのホルモン作用を持っている天然物の生殖への影響の判定として、ホルモンレセプターの発現レベルの検討が役立つ可能性が示唆された。また、本研究により、植物エストロジェンのような影響判定が従来からの評価方法では明確に出来ないものには、分子レベルの遺伝子の発現変化を考慮に入れた Toxicogenomic な評価法を従来型の評価法に加える必要があることがわかった。今後は、今回の研究結果をもとにし、DNA microarray 等の新規の分子生物学的手法を用いて様々な遺伝子発現の変化を検討し、バイオマーカーの開発とそれを用いた新規の検査・評価法を開発を試みる必要があると言える。また、植物エストロジェンの影響判定において、胎児移行に関する検討

をさらに進める必要があるといえる(資料1～8参照)。

A. 研究目的

本研究では、薬効成分を有する天然物の精子形成や次世代に対する有害性評価法の確立を行うことと目的とし、平成12年度は薬効成分を有する天然物のなかで、植物エストロジェンの精子形成を含めた雄性生殖細胞に対する有害性評価法の確立に関する検討を重点的に行った(資料1、資料2及び資料8参照)。我々が日常摂取している天然物には、植物エストロジェンなどのホルモン作用を持っているものを含んでいる。動物実験やヒトの疫学調査により、胎児や新生児への多量の植物エストロジェン曝露が、流産、先天異常、性分化異常を惹起することが報告されている(資料3～8参照)。よって、植物エストロジェンの胎児・新生児に対する影響及び男性生殖への影響に関する検査・評価法の確立が急がれている。特に、従来の安全基準に加えて、新規の検査法・評価法の開発が急務である。それには、分子生物学的手法を用いて様々な遺伝子発現の変化を検討し、バイオマーカーの開発とそれを用いたToxicogenomic評価法の開発を試みる必要がある(資料2参照)。また、次世代への影響評価には胎児移行に関する検討も必要なため、植物エストロジェンの経胎盤経路の胎児移行の動態について検討を行う(資料5及び資料8参照)。本研究の成果が、最終的に薬効成分を有する天然物や内分泌攪乱物質のヒトを含めた生態系全体のリスク評価となることを目的とする。

B. 研究方法

a) ヒトと実験動物で精巣に対する作用が報告されている化学物質をICR雄マウスに投与し、精子の数、運動率、形態などの精子をエンドポイントとした変化及び臓器重量、交尾率、受胎率を調べる。陽性試験として、生後1日目から5日間エストロジェン作用をもつジェ

チルスチルベストロール(DES)を0.5, 5, 50 microgram/mouse、タモキシフェンを1, 2, 20 microgram/mouse投与し、2, 3, 4ヶ月後の精子形成状態及び妊孕性を検討した。また、分子生物学的手法を用い、ホルモンレセプター(estrogen receptor, androgen receptor, FSH receptor, LH receptor)遺伝子の発現の変化の検討を行った。また、容器等のコーティング剤として用いられ、弱いながらエストロジェン活性を有するビスフェノールA(0.2 microgram/mouse)についても、DES同様の投与を行い、影響の検討を行った(資料1及び資料2参照)。

b) ヒトと実験動物で精巣に対する作用が報告されている天然物(薬効成分)をICR雄マウスに低濃度・長期投与し、精子の数、運動率、生存率、形態などの精子をエンドポイントとした変化及び臓器重量、交尾率、受胎率を調べる。今回は、植物性エストロジェンであるゲニステインの検討を開始し、生後1日目から5日間ゲニステインを10, 100, 1000 microgram/mouse(2, 20, 200mg/kg)投与し、精巣重量、精子数、精子運動能及びARやERのmRNAの発現の変化を検討した。また、タンパクレベルにおけるERの発現も検討した(資料1及び資料2参照)。

c) cDNA マイクロアレイ解析

ICR雄マウスに生後1日目から5日間、DES(50 microgram/mouse)、ビスフェノールA(0.2 microgram/mouse)、ゲニステイン(1 mg/mouse)、各対照群には溶媒だけ皮下投与した。飼育後3ヵ月目に、精巣摘出、RNAを調整し、cDNAを合成した。cDNA合成の際に個体差をなくするために、3匹分のRNAを混合して作製した。その後、cDNAマイクロアレイ(マウスcDNA約8800種 Mouse GEM 1: Incyte,

California, USA)にハイブリダイゼーションさせた。内部標準で標準化を行った後、データ処理を行った(資料1参照)。

- d) 次世代への影響評価のために、植物エストロジェンの胎児移行量について、サル(アカゲザル、ニホンザル、チンパンジー)における臍帯血と母体血における植物エストロジェン濃度を測定し検討した。検体は、グルクロニダーゼ処理した後、LC/MS/MSを用い、ゲニステイン、ダイゼイン、イコール、クメステロールを測定した。検体採取には、京都大学霊長類研究所の浅岡氏の協力を得た(資料5及び資料8参照)。

C. 研究結果

- a) DESの新生仔期投与による影響としては、精巣重量の低下、精巣上体内精子数の減少、精子運動能の低下、さらに組織学的判定で精子形成異常が認められた。また、タモキシフェンの新生仔期投与による影響としては、精子運動能の低下が認められた。さらに、分子生物学的検討をした結果、DES及びタモキシフェン投与群において、estrogen receptor (ER)とandrogen receptor (AR)のmRNAの発現の低下が認められた(資料1及び資料8参照)。
- b) DES等の陽性試験をもとに、植物性エストロジェンであるゲニステインの新生仔期投与による精子形成状態、妊孕性及びERやARのmRNAの発現状態への影響を検討した結果、精巣重量、精子数、精子運動能及びARのmRNAの発現には影響がなかったが、ERのmRNAの発現において低下が認められた。また、タンバクレベルにおいても、ERの発現が低下していることも見出した(資料1及び資料8参照)。
- c) 新規の検査法・評価法の開発として、何千という多数の遺伝子変化を一度に検討できるDNA microarrayの技術を用い、植物エストロジェンの精子形成への影響を検討した。その

結果、植物エストロジェンによって精巣で変化する遺伝子群(パターン)は、DESによるものに類似し、ビスフェノールAと少々違うことが判明した(資料2及び資料8参照)。

- d) 次世代への影響評価のために、植物エストロジェンの胎児移行量について、サルにおける臍帯血と母体血における植物エストロジェン濃度を測定し検討した。その結果、アカゲザル、ニホンザル、チンパンジーのいずれにおいても、クメステロールの胎児移行は検出されなかったが、アカゲザル、ニホンザル、チンパンジーのすべてにおいて、ゲニステイン、ダイゼイン、イコールの高濃度の胎児移行があることが判明した(資料5及び資料8参照)。

D. 考察

陽性試験であるDESとタモキシフェンの新生仔期投与による雄性生殖への影響の判定基準及び成績の評価法を確立した。その結果、植物性エストロジェンであるゲニステインの実験において、陽性試験ほどの影響は出ないことが判明してきている。しかし、天然物で植物性エストロジェンであるゲニステインは従来の雄性生殖を判定する評価法では、精巣重量、精子数、精子運動能ともコントロール群と差はなく、雄性生殖能は安全と判定されるが、分子生物学的手法により、ホルモンレセプターのmRNAと蛋白の発現レベルで検討すると影響があることが判明した(資料1及び資料8参照)。現在、ゲニステインの妊娠期投与による次世代の精子形成状態、妊孕性及びERやARの発現状態への影響を検討中である。

また、何千という多数の遺伝子変化を一度に検討できるDNA microarrayの技術を用いると、植物エストロジェンの精子形成への影響を精巣で発現が変化する遺伝子によるパターンで評価できることが判明した。植物エストロジェンによって発現が変化する遺伝子群(パターン)は、DESによるものに類似し、ビスフェノールAと少々違うこ

とが判明した。よって、DNA microarray の技術を用いた遺伝子発現パターン解析による Toxicogenomic 評価法が、新規の化学物質の評価も含め、必要といえる。特に、植物エストロジェンのような影響判定が今までの方法ではむずかしい物質には、従来型の評価法に加え、分子レベルの遺伝子の発現変化を考慮に入れた Toxicogenomic な評価法が必要である(資料 2 及び資料 7 参照)。

最後に、次世代への影響評価のために、植物エストロジェンの胎児移行量について、サルにおける臍帯血と母体血における植物エストロジェン濃度を測定し検討した。その結果、クメステロールの胎児移行は検出されなかったが、ゲニステイン、ダイゼイン、イコールの高濃度の胎児移行があることが判明した。活性型の植物エストロジェンの胎児移行に関する検討を含めた化学物質の胎児移行に関する動態は、今後のリスク評価において非常に重要であるといえる(資料 5 及び資料 8 参照)。

E. 結論

今回の結果から、植物エストロジェンなどのホルモン作用を持っている天然物の生殖への影響の判定として、ホルモンレセプターの発現レベルの検討が役立つ可能性が示唆された。また、本研究により、植物エストロジェンのような影響判定が従来からの評価方法では舞い核に出来ないものには、従来型の評価法に加え、分子レベルの遺伝子の発現変化を考慮に入れた Toxicogenomic な評価法が必要であるがわかった。今後は、今回の研究結果をもとにし、新規の検査法・評価法の開発として、更なる DNA microarray 等の新規の分子生物学的手法を用い様々な遺伝子発現の変化を検討し、バイオマーカーの開発とそれを用いた検査・評価法の開発を試みる必要があると言える。また、植物エストロジェンの影響判定において、胎児移行に関する検討をさらに進める必要があ

るといえる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- i. Shibayama T, Fukata H, Sakurai K, Adachi T, Komiyama M, Iguchi T and Mori C: Neonatal exposure to genistein reduces expression of estrogen receptor alpha and androgen receptor in testes of adult mice. *Endocrine J* 2001 (資料 1, in press)
- ii. 足達哲也、櫻井健一、深田秀樹、小宮山政敏、芝山孝子、井口泰泉、森 千里：植物エストロゲンおよび内分泌攪乱物質の精子形成への影響評価に対する DNA マイクロアレイを用いた判定法、*千葉医学* 77: 151-158, 2001 (資料 2)
- iii. Mori C: Endocrine disruptors and human health: a minireview. *千葉医学* 76: 209-218, 2000 (資料 3)
- iv. 森 千里：環境ホルモン ヒトへの影響と対策の方向性、*Journal of Endocrine Disruptor* 1: 203-212, 2001 (資料 4)
- v. 櫻井健一、森 千里：ヒト胎児への内分泌攪乱化学物質曝露の状況
日本臨床 58: 2508-2513, 2000 (資料 5)
- vi. Mori C: Possible effects of endocrine disruptors on male reproductive function. *Acta Anatomica Nipponica* 2001 (in press) (資料 6)
- vii. 森 千里、櫻井健一：妊孕性に関わる諸問題、環境因子と生殖、新女性医学体系プライマリ

- ケア部門リプロダクティブヘルス、武谷雄三編、中山書店、2001（資料7、印刷中）
2. 学会発表
- i. 櫻井建一、浅岡一雄、芝山孝子、寺岡雅之、井口泰泉、森千里：ヒトを含む霊長類における植物エストロゲンの胎児移行に関する検討。 *Acta Anatomica Nipponica* 76 (1): 80, 2001（資料8 a）
- ii. 芝山孝子、足達哲也、櫻井建一、高野海哉、高圭範、小野佑新、井口泰泉、森千里：マウス新生仔期の Diethylstilbestrol (DES) 曝露により誘発される精巣特異的遺伝子について。 *Acta Anatomica Nipponica* 76 (1): 154, 2001（資料8 b）
- iii. 足達哲也、櫻井健一、深田秀樹、芝山孝子、高野海哉、井口泰泉、森千里：内分泌攪乱物質曝露における精巣での遺伝子発現の変化について(DNA マイクロアレイ法を用いて)。 *Acta Anatomica Nipponica* 76 (1): 153, 2001（資料8 c）
- iv. 櫻井建一、浅岡一雄、寺岡雅之、宮川秀則、卯月昌子、井口泰泉、森千里：植物エストロゲン (Phytoestrogen) の胎児移行。第5回 Testis Workshop 精子形成・精巣毒性研究会抄録集：27, 2000（資料8 d）
- v. 芝山孝子、足達哲也、櫻井建一、井口泰泉、森千里：マウス新生仔期の Diethylstilbestrol (DES) 曝露で起こる精巣での遺伝子発現の変化。第5回 Testis Workshop 精子形成・精巣毒性研究会抄録集：22, 2000（資料8 e）
- vi. 高圭範、深田秀樹、濱松晶彦、森千里：日本人男性の思春期における精巣重量の変化。第5回 Testis Workshop 精子形成・精巣毒性研究会抄録集：19, 2000（資料8 f）
- vii. 足達哲也、櫻井健一、深田秀樹、芝山孝子、井口泰泉、森千里：DNA マイクロアレイを用いたマウス精巣での遺伝子発現の解析(シンポジウム) 第5回 Testis Workshop 精子形成・精巣毒性研究会抄録集：13, 2000（資料8 g）
- viii. 森千里：精巣毒性の新しい判定法の可能性について。第5回 Testis Workshop 精子形成・精巣毒性研究会抄録集：10, 2000（資料8 h）
- ix. 足達哲也、櫻井健一、深田秀樹、高圭範、井口泰泉、森千里：内分泌攪乱物質曝露におけるマウス精巣での遺伝子発現の評価(日本農芸化学会 2001 年度大会)：2001 年度年次大会(京都市) 2001 年 3 月(資料8 i)
- x. 櫻井建一：霊長類をモデルとした植物エストロゲンの胎児移行に関する検討。第一回植物エストロゲンシンポジウム抄録集：11-12, 2000（資料8 j）
- xi. Sakurai K, Adachi T, Shibayama T, Asaoka K, Iguchi T, Mori C: Fetal exposure to phytoestrogens in monkeys. *e. hormone*, 2000（資料8 k）
- xii. 芝山孝子、大熊麻衣子、佐々木恵美、足達哲也、櫻井建一、井口泰泉、森千里：新生仔期 Diethylstilbestrol 曝露における精巣で誘導される遺伝子に関する検討。

- 第3回日本内分泌攪乱化学物質学会抄録集：257,2000（資料8 l）
- The 45th International NIBB Conference: 74,2000（資料8 q）
- xiii. 足達哲也、櫻井健一、深田秀樹、芝山孝子、井口泰泉、森千里：新生仔期内分泌攪乱物質曝露で起こる精巣での遺伝子発現変化の検討(DNA マイクロアレイ法を用いて)。第3回日本内分泌攪乱化学物質学会抄録集：67,2000（資料8 m）
- xviii. Chisato Mori, Taisen Iguchi: Increasing Importance of Biological Markers and DNA Microarray Analysis for Assessing Fetal Exposure on Endocrine Disruptors. The 45th International NIBB Conference: 46,2000（資料8 r）
- xiv. 櫻井健一、浅岡一雄、寺岡雅之、宮川秀則、卯月昌子、井口泰泉、森千里：植物エストロゲンの胎児移行に関するヒトとサルでの検討。第3回日本内分泌攪乱化学物質学会抄録集：48,2000（資料8 n）
- xix. 足達哲也：内分泌攪乱物質曝露の解析法 千葉大学市民公開講座（千葉市） 2000年12月（資料8 s）
- xv. Chisato Mori, Kenichi Sakurai, Taisen Iguchi: Analysis of Several Endocrine Disruptors Detected in Human Umbilical Cords and Cord Serum in Japan. 第3回日本内分泌攪乱化学物質学会抄録集：47,2000（資料8 o）
- xx. 櫻井健一：母体から胎児への移行について 千葉大学市民公開講座（千葉市） 2000年12月（資料8 t）
- xvi. Kenichi SAKURAI, Kazuo ASAOKA, Masayuki TERAOKA, Hidenori MIYAKAWA, Masako UZUKI, Taisen IGUCHI, Chisato Mori: Transplacental transfer of phyto·estrogens in humans and monkeys. The 45th NIBB International Conference: 76,2000（資料8 p）
- xvii. Adachi T., Sakuirai K., Komiyama M., Seki N., Shibayama T., Iguchi T., Mori C.: A DNA microarray analysis for the effect of spermatogenesis to endocrine disruptors in mice.

19980789

以降 P.7-139は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
P.4-6の「1.論文発表」「2.学会発表」をご参照ください。

千葉大学市民公開講座（千葉市）2000年12月

植物エストロゲンおよび内分泌かく乱物質の 精子形成への影響に対する判定法

足達 哲也

（科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業〔内分泌かく乱物質研究グループ〕、
千葉大学医学部解剖学第一講座）

【はじめに】

近年体内のホルモン作用を乱す物質が多数報告されてきている。それらを内分泌かく乱物質と呼び、性ホルモン、特に女性ホルモン様（エストロゲニック）作用を有することが多い。この性ホルモンに関わるかく乱によって、動物の発生あるいは機能形成を阻害する現象があらわれてきている。

精巣は内分泌かく乱物質の影響を受けやすい器官のひとつであることが知られており、特に内分泌かく乱物質曝露が胎生期あるいは新生期であると精巣成熟の遅延や精子形成不全を引き起こすことが認められてきた。精巣および精子に対して、内分泌かく乱物質を含めた各種毒性を考える上で、組織学的には精巣重量、副生殖器重量および精巣組織像などが、また精子に関しては数、運動率や奇形率、さらには出生子数などの妊孕性が評価の基準となっていた。しかしながら、この判定法では評価結果をえるのに時間を要するとともに、結果が出てからでは対処が遅れる可能性が考えられる。このようなことから、これら評価方法に加え先行指標も必要となってきた。

近年、このような内分泌かく乱物質曝露など各種毒性の上流をとらえる手段として、ゲノム機能研究が盛んに行われるようになってきた（図1）。この中でトランスクリプトーム

(Transcriptome) に注目することによって毒性を評価することが重要と考えられてきている。トランスクリプトームはゲノムの配列から mRNA 発現プロファイルとして機能し、その後プロテオーム（タンパク質発現プロファイル）に情報が伝達されることから、トランスクリプトームがゲノム機能研究の中心に位置し、ゲノムネットワ

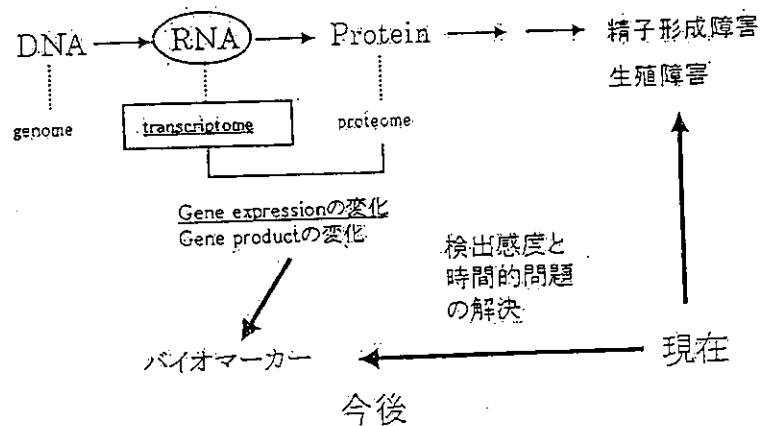


図1 精巣機能・精子形成評価のゲノム機能研究の流れ

ーク機能解析に適していると考えられている (図1)。

今回、植物エストロゲンおよび内分泌かく乱物質特に新生期における曝露の精子形成への影響を、トランスクリプトームの視点から判定法を開発していくことを目標とし、この技術として cDNA マイクロアレイ法を用いて、植物エストロゲ

ンおよび内分泌かく乱物質の影響を曝露有無での mRNA の発現に差を認める遺伝子を検索した。

cDNA マイクロアレイ法とは、固相基盤 (スライドガラスなど) 上に多数の異なった cDNA プローブを高密度に固定 (8,000~10,000 種類の cDNA を固定) した後、標識したターゲットとなる核酸をハイブリダイズさせ、各々のプローブからのシグナルを自動検出器で検出して、そのデータをコンピュータで大量解析する方法である。mRNA 発現を評価する場合、図2に示すように、この mRNA から逆転写反応により蛍光標識を取り込ませたターゲット cDNA をハイブリダイズさせて蛍光イメージアナライザーにて2種類の蛍光の有無あるいは強度の違いから発現量を評価するものである。cDNA マイクロアレイ法はこのような原理であることから、数多くの遺伝子を同時にかつ迅速に解析できるシステムとして注目されている。今回の講演では、私の研究室で行っている研究を紹介する。

【実験モデル】

実験モデルとして ICR 雄性マウスを用いた。女性ホルモン様作用をもつ化学物質として、大豆に多く含まれる植物エストロゲンのゲニステイン (Genistein)、1960~1970 年代にかけてアメリカで流産防止薬として用いられた合成女性ホルモンのジエチルステルベストロール (Diethylstilbestrol: DES)、および容器のコーティング剤として用いられてきていたビスフェノール A (Bisphenol A) を用いた。生後すぐのマウスにこれら化学物質を5日間皮下投与した (ゲニステイン: 1 mg/mouse/day、DES: 50 µg/mouse/day、ビスフェノール A: 0.2 mg/mouse/day)。3か月後にこれらマウスの精子数、精子運動能を測定した。またこれらマウスから精巣を摘出し精巣重量を測定したのち、RNA を調製、cDNA を合成し、非投与群に対して発現に差のある遺伝子を cDNA マイクロアレイ法にて検索した。

○ 化学物質曝露における従来の評価法の結果

各化学物質曝露において従来の精巣機能および精子形成の評価法を行った。新生仔期 DES 曝露

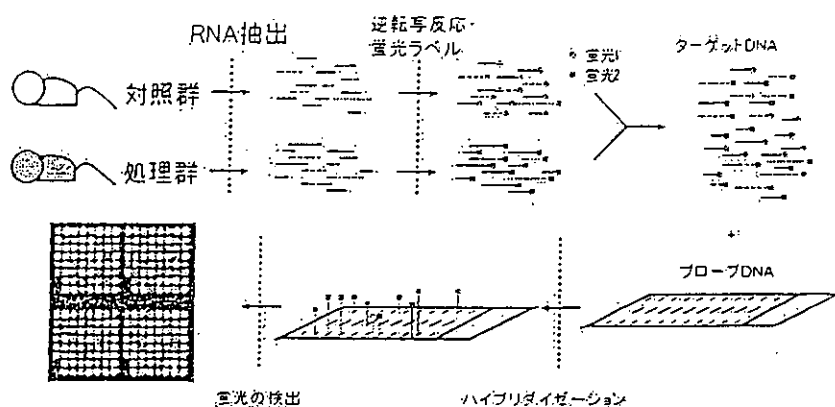


図2 DNAマイクロアレイによる遺伝子発現の解析

において3ヶ月後の精子数の減少、精子運動能の低下、精巣重量の低下を引き起こしたが、ゲニステインおよびビスフェノールA曝露ではこれらの評価で影響を認めなかった。

○ 化学物質曝露において発現変化する遺伝子の探索結果

cDNA マイクロアレイ法を用いた検討によって、発現変化した遺伝子はマウス cDNA クローン 8,800 種のうち、新生仔期ゲニステイン曝露で 388 種、DES 曝露で 635 種、ビスフェノールAでは 455 種が見い出された (表1)。

以上の結果から、新生仔期に化学物質を曝露することによって、生殖能を有する時期では従来の精巣機能および精子形成の評価法では影響を認めなかったが、今回 cDNA マイクロアレイ法を用いた検討によって多数の遺伝子発現変化が認められた。この発現変化による具体的な影響に関し

表1 ゲニステイン、DESおよびビスフェノールA曝露によって発現に影響を受けた遺伝子種数

	遺伝子数		
	ゲニステイン	DES	ビスフェノールA
発現の減少した遺伝子種	380	598	162
発現の増加した遺伝子種	8	37	293
発現に変化を認めなかった遺伝子種	8344	8097	8277

発現の減少した遺伝子種は対照との発現比0.67以下、増加した遺伝子種は対照との発現比1.5以上

ては今後の検討課題であるが、発現変化が認められる遺伝子が精巣機能や精子形成に何らかの影響を及ぼす場合には、従来の方法で見落としていた影響に関しても遺伝子発現レベルで見つけられる可能性が考えられる。このような新しい先行指標を見つけることができれば、化学物質曝露の診断も可能となり、曝露に対しての早期発見に役立つものと考えている。

【おわりに】

今回、cDNA マイクロアレイ法を用いることにより、植物エストロゲンや内分泌かく乱物質曝露によって発現変化を引き起こす遺伝子を一挙に多数見出すことができた。現在これら見い出された遺伝子に関してすべてが精巣機能および精子形成に影響しているかどうかは今後の研究を待たないといけないが、これら遺伝子が同定されることによって、内分泌かく乱物質曝露で発現変化の先行指標 (マーカー) として将来利用することができる。これら遺伝子を固定化し cDNA マイクロアレイとして用いることにより、内分泌かく乱物質曝露の有無あるいは程度について一挙に解析することが可能となる。人工合成を含めた生体内の生理作用が未知の化学物質が氾濫している現在において、この cDNA マイクロアレイ法を応用することが将来実際の化学物質曝露に対

しての診断材料として有効であると考えている。

【要 約】

従来の精巣機能および精子形成の評価に加え、先行指標を探索する目的で、内分泌かく乱物質で変化する遺伝子を見つける手段に、cDNA マイクロアレイ法を用い、植物エストロゲンである Genistein (Gen)、合成女性ホルモンである Diethylstilbestrol (DES)、または容器コーティング剤として用いられる Bisphenol A (BisA) をマウス新生仔期に投与することによって、生殖能を有する時期での精巣において発現が変化する遺伝子の探索を試みた。

DES (50 µg/mouse)、Gen (1 mg/mouse)、または BisA (0.2 mg/mouse) を ICR 雄性マウスに、生後すぐから 5 日間皮下投与を行った。3 か月後に精巣を摘出、RNA を調製し、cDNA マイクロアレイ法にて非投与群に対して発現に差のあるものを検索した。

精巣において各化学物質曝露によって発現に差の生じた遺伝子は、マウス cDNA クローン 8,800 種のうち、DES では 635 種、Gen では 388 種、BisA では 455 種が見い出された。今回、内分泌かく乱物質曝露によって発現変化を引き起こす遺伝子を、cDNA マイクロアレイ法を用いて一挙に多数見い出すことができた。これら変化した遺伝子について組織学的、分子生物学的な検討を行うことが必要であるが、発現変化するこれらの遺伝子を内分泌かく乱物質曝露のマーカー化として利用できると考えている。

千葉大学市民公開講座（千葉市）2000年12月

植物エストロゲンや内分泌攪乱物質のヒトへの影響とその判定法

— 母体から胎児への移行について —

櫻井 健一

(千葉大学大学院医学研究科)

近年、欧米諸国や日本において、内分泌攪乱物質（環境ホルモン）による生殖能力や次世代への影響は人類を含めた多くの生物の存在を危うくする大きな問題として扱われている。諸外国より発表された論文では、ヒトにおける精子数の減少や男性生殖器の発生異常の増加などの生殖異常の原因として内分泌攪乱物質をあげている。また、ヒトの疫学調査から内分泌攪乱物質の影響として精巣がん、乳がん、子宮内膜症、女性思春期の早期化、免疫系・神経系への影響、発達への影響が懸念されている。日本人の男性生殖機能に関しても近年変化がみられるとの報告もある。ただし、内分泌攪乱物質のヒトへの影響は現時点では明白でない。環境中に放出された化学物質の野生動物やヒトへの悪影響は従来から指摘されてきたが、主に急性毒性（致死作用）、発生生殖毒性、催奇形性、発ガン性を問題としてきた。現在の内分泌攪乱物質問題は、従来の概念とは違う低濃度による環境中の化学物質の内分泌攪乱作用が問題となっている。内分泌攪乱物質の影響を考える時、低濃度の影響という特徴と対をなすものに曝露の時期ということが問題となる。これは、ある主の物質に曝露された時、被曝者がある特定の時期にある時にその影響が出るということである。現在までの研究からその時期とは、胎児期及び出生まれて間もない時期であると考えられている。

内分泌攪乱物質のうち植物由来のエストロゲン活性物質は植物エストロゲンと呼ばれている。植物エストロゲンは、大豆やもやし等に多く含まれている。近年、成人においてはその健康に対する効用が認められている。例えば、大豆を多く摂取する女性では乳がんの発生率が低い傾向があり、また、日本人男性が欧米男性に比べ前立腺癌の頻度が低い一因に植物エストロゲンを多く含む大豆製品等を摂取することにあると考えられている。しかし、エストロゲン活性を持つ物質である以上、胎児への影響は否定できない。現にヒツジやラットにおいては胎児への大量の植物エストロゲン曝露が胎仔奇形や成長後の生殖器ガン発生に関係することが示されている。

日本人は従来から豆類をよく食べるとされ、特に大豆は体によいとされてきた。しかし、内分泌攪乱物質という視点で見た場合、植物エストロゲンの胎児期での影響が問題になると考えられる。胎児に対する植物エストロゲンの影響を考える上で重要な点が2つ存在する。1) 植物エストロゲンは胎児に移行するのか？ 2) 植物エストロゲンは胎児の発生や発達、生殖能に影響を与えるのか？ の二点である。そこで、筆者らは、まず1) の点について検討した。

植物エストロゲンを含む内分泌攪乱物質の胎児への移行を調べる方法として、実験的には胎児の血中や組織に存在する化学物質を測定するのが理想的である。しかしながら、ヒトにおける胎児移行を調査する場合この方法は不可能である。そこで、母児ともに負担の少ない方法として、臍帯・臍帯血中の化学物質を測定する方法が試みられている。植物エストロゲンについては臍帯血の植物エストロゲン濃度の測定を試みた。植物エストロゲンは血中で遊離型と抱合型の2つのタイプとして存在する。また、抱合型には硫酸抱合型とグルクロン酸抱合型の二種類がある。活性を持つのはこのうち遊離型と硫酸抱合型であり、グルクロン酸抱合型は活性を持たないとされている。今回はそれらすべての総量として植物エストロゲンの濃度の検討を行った。その結果、臍帯血清中にゲニステイン (genistein) 等の植物エストロゲンが検出された。これらの濃度の植物エストロゲンが、ヒトに対して影響があるかどうかについては現在のところ不明である。しかし、上述の1) に関していえば胎児への移行が存在することが確認された。

イギリスの K. North らの尿道下裂の研究から、妊娠中にベジタリアンだった母親から生まれた男児には尿道下裂が多いとの報告がある。彼らはこの原因について果物や野菜に付着する農薬の影響と野菜特に大豆等に含まれる植物エストロゲンの影響について言及している。農薬の影響を調べるために有機野菜の摂取と尿道下裂との関連を検討しているが、常に有機野菜をとっていた母親は数が少なく統計上有意な差は認められなかった。時々有機野菜を摂取する母親と通常の野菜を摂取する母親の間には児の尿道下裂の頻度に差をみとめなかった。

これまで諸外国では PCB 類やダイオキシン類、有機塩素系農薬、重金属といった内分泌攪乱物質に関し胎児移行について調査されている。これらの検討は、出産時の臍帯血や臍帯を用いて各種物質を測定している。その結果ではこれらの複数の物質と一緒に胎児へ移行することが確認されている。日本においても臍帯や母乳を用いた検討で PCB 類やダイオキシン類、その他の内分泌攪乱物質が検出されており、臍帯中ではいくつか同時に存在することも確認されている。このような状態は複合曝露と呼ばれており、日本においても胎児期及び乳児期にこのような複合曝露の存在が示されている。ここで、複合曝露のリスクは単独物質の曝露によるリスクより高くなるのか、という疑問がうまれる。これに対する明確な答えは現在のところ存在しない。しかし、ラットの実験では一つ一つは尿道下裂の発生に影響を与えない濃度の2種類の内分泌攪乱物質を同時に投与した場合種類ずつ投与した場合にくらべ尿道下裂の出現率が高くなることが示されている。この結果から考えるとヒトにおいても複合曝露が存在する場合それぞれの物質が低濃度でも複数集まることにより悪影響が出てくる可能性は否定できない。日本人胎児における植物エストロゲンの移行はそれがたとえ単独には悪影響を及ぼさない量だとしても、複合曝露という視点から重要な意味をもつと考えられる。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
酒井伸一 森 千里 植田和弘 大塚 直	人工化学物質が もたらす健康影 響	酒井伸一	循環型社会～ 科学と政策	有斐閣	京 都	2000	印刷中

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shibayama T, Fukata H, Sakurai K, Adachi T, Komiyama M, Iguchi T, Mori C.	Neonatal exposure to genistein reduces expression of estrogen receptor alpha and androgen receptor in testes of adult mice.	日本臨床	58 卷 12 号	印刷中	2000
足達哲也、櫻井健一、 深田秀樹、 小宮山政敏、 芝山孝子、井口泰泉、 森 千里	植物エストロゲンおよび内分泌 攪乱物質の精子形成への影響評 価に対する DNA マイクロアレ イを用いた判定法	千葉医学	77	151-158	2001
Chisato Mori	Endocrine disruptors and human health: a minireview.	千葉医学	76	209-218	2000
森 千里	環境ホルモン ヒトへの影響と 対策の方向性	Journal of Endocrine Disruptor	1	203-212	2001
櫻井健一、森 千里	ヒト胎児への内分泌攪乱化学物 質曝露の状況	日本臨床	58	2508- 2513	2000
Chisato Mori	Possible effects of endocrine disruptors on male reproductive function.	Acta Anatomica Nipponica		(in press)	2001
森 千里、櫻井健一	妊孕性に関わる諸問題、環境因 子と生殖、新女性医学体系プラ イマリケア部門リプロダクティ ブヘルス、武谷雄三編	中山書店		印刷中	2001