

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成16年度博士課程 入学

氏名 崔 恩京

(Choi Ehn-Kyoung)

指導教員名 九郎丸 正道

論文題目 Transgenerational effect of *p,p'*-DDE on male reproductive organs
(有機塩素系殺虫剤(*p,p'*-DDE)が及ぼす次世代の雄性生殖器系への影響)

近年、世界中の各地域で、爬虫類における性の転換、繁殖不能な鳥類、著しく減少したヒトの精子数、子どもができない夫婦の増加、精巣癌及び乳癌の増加などが報告されている。このような現象の原因として DDT (Chlorodiphenyl trichloroethane) や PCB (polychlorinated biphenyls) などの内分泌かく乱物質（環境ホルモン）が取り上げられ、社会的にも深刻な問題となっている。こうした内分泌かく乱物質に関する研究は、この10年、主に受容体タンパク質の同定という分子レベルにおいて多くの進展をみせたが、最近になって DNA レベルのメチル化変動というエピジェネティックエフェクトについても報告がなされはじめた。しかし、そのメカニズムはいまだ明らかにされていない。

内分泌かく乱物質の一つである有機塩素系殺虫剤 DDT は、高い発癌性と神経系・生殖器系などに与える影響が大きいため、先進国では1971年から使用

禁止になっているが、多くの開発途上国で、今も主要な殺虫剤として使われている。また、使用・販売・製造を禁止した国においても、過去長年にわたり大量に使用していたことから、土壌や水は DDT に汚染されている。DDT は自然界で分解されず、高い脂溶性により食物連鎖を介して濃縮され、生命体へ影響を与えている。内分泌かく乱物質としての DDT の直接的メカニズムは、DDT がホルモンレセプターに結合して内分泌系を乱し、生殖機能低下や癌を誘発するものとされている。しかし、その具体的なメカニズムは現在でも明らかにされていない。さらに、DDT がエピジェネティックエフェクトを与えるか否かも知られていない。

本研究は、DDT の代謝産物である *p,p'*-DDE (以下 DDE) を胎仔期及び生後期のラットへ曝露し、その次世代の雄性生殖器系に生じた影響を検討するとともに、精子 DNA メチル化を用いてエピジェネティックエフェクトとの関連性を検討したものである。

第 1 章 胎仔期での DDE 曝露が次世代の雄性生殖器系へ及ぼす影響

胎仔における生殖腺の性分化と生殖腺の発達が起こる時期である胎仔期 10 日から 19 日まで 10 日間、DDE 20mg/kg と 100mg/kg を妊娠ラットへ 1 日 1 回経口投与し、生まれた雄産仔 (F1) を形態学的に解析した。また、その雄産仔を正常な雌と交配させ生まれた雄産仔 (F2) を同じく形態学的に解析した。その結果、高濃度 DDE (100mg/kg) 投与の F1 雄ラットで、成長体重は対照群と比較したところ、有意な減少を示し、肉眼的には外部生殖器の腫瘍が観察された。また、有意差は示さないが、一日精子産生数 (daily sperm production: DSP) が減少した。低濃度 DDE (20mg/kg) 投与では、尿生殖器複合体 (UGC) 重量と精子数の有意な減少を示した。DDE 100mg/kg 投与の F2 雄ラットでは、DSP は対照群に対して減少し、精巣、精巣上体、及び UGC の相対臓器重量の有意な減少が認められた。以上の結果より、胎仔期での DDE 曝露が次世代の雄性生殖器系へ影響し、その影響は雄のみでも次の世代 (F2) へ影響が及ぶことが示唆された。

第 2 章 生後期での DDE 曝露が次世代の雄性生殖器系へ及ぼす影響

出生後 14 日齢 (2 週齢) から 70 日齢 (10 週齢) までの雄ラット (F0) へ、DDE 20mg/kg と 200mg/kg を 2 日に 1 回経口投与し、正常な雌と交配させ生まれた雄産仔 (F1) を形態学的に解析した。その結果、DDE 200mg/kg 曝露による体重と生殖器重量 (特に UGC) の減少、及び精巣内アポトーシス細胞数の有意な増

加が観察された。その雄産仔(F1)では、肛門生殖突起間距離(anogenital distance; AGD)の短縮及び精巣上体重量の有意な増加が観察された。また、DSPの有意な減少と精巣内アポトーシス細胞数の有意な増加が認められた。以上の結果より、出生後にDDEに曝露されても、雄が受けた影響はその次世代(F1)の雄の生殖器へも影響を及ぼすことが示唆された。

第3章 DDEが次世代の雄性生殖器系へ及ぼすエピジェネティックエフェクト

胎仔期と生後期にDDEに曝露された雄産仔(103日齢)の精子DNAを用いてbisulfite法でLPLase gene (Chromosome 6q32)上のmethylation解析を行った。その結果、DSPの有意な減少が見られた生後期曝露のDDE 200mg/kg投与F1雄ラットで、そのメチル化パターンが変化していることが明らかとなった。これは、実際に人間が摂取する経路で、父系が次世代へエピジェネティックエフェクトを及ぼす可能性を示したことになる。このエピジェネティックエフェクトとは、現世代が曝露されなくても、前世代が曝露された経歴があると永久的にその影響が残ってしまうことを意味する。これは狭義では、一種の獲得形質の遺伝(ラマルキズム的現象)と捉えることができる。また、胎仔期曝露のDDE 100mg/kg投与のF2雄ラットでは変化がなかったものの、陽性対照群として行った、DDEと同じく抗アンドロゲン物質であるFlutamide 0.5mg/kg投与のF2雄ラットで、同じパターンでメチル化が変化してことが確認された。これは曝露時期が胎仔期であること、抗アンドロゲン作用により始原生殖細胞(PGCs)のステロイド受容体が障害を受けることを考慮すると、生殖細胞(germ cell)へのエピジェネティックな影響が、その個体の成熟後にも生殖細胞系列に残り、さらに次世代へも伝搬されたことを示唆している。

以上の結果から、DDEは胎仔期投与でも生後期投与でもその抗アンドロゲン作用により雄性生殖器へ精子数減少などの機能的な障害、及び重量変化などの形態学的な障害を起こし、その影響が父系を通じて次世代へエピジェネティックエフェクトとして伝わる可能性を示した。