

環境化学物質が鳥類の生殖細胞を減少させる危険性を発見

～鳥類を保全する総合毒性評価への貢献に期待～

ポイント

- ・ニホンウズラの雌雄の生殖細胞を区別するマーカー開発に成功。
- ・ジエチルスチルベストロールの卵黄内暴露は、オスの始原生殖細胞を減少させることを発見。
- ・生殖細胞に及ぼす環境ホルモンの総合的な毒性評価に貢献。

概要

北海道大学大学院理学研究院の水島秀成助教、黒岩麻里教授の研究グループは、ジエチルスチルベストロールと呼ばれる人工合成女性ホルモンの一種をニホンウズラの卵に投与すると、オスの生殖細胞が減少することを発見しました。

鳥類の始原生殖細胞（PGC、将来精子や卵子となる細胞）は、発生初期の胚に出現し、胚発生の進行に伴い形成される血管中を移動することで、将来精巣あるいは卵巣になる生殖腺という器官にたどり着きます。ニホンウズラの卵に、女性ホルモン様作用*1が報告されている化学物質ジエチルスチルベストロールを投与し、血管を移動する PGC の数をカウントしたところ、オスでは5分の1に減少しており、細胞増殖の指標となるタンパク質の発現も有意に減少していることが分かりました。一方、メスの PGC では毒性効果は一切見られませんでした。また、生殖腺に移動できる PGC 数が減少することで、後に精子となる生殖腺内の生殖細胞が減少することが分かりました。つまり、この化学物質の影響を受けたオスの鳥は、精子の数が少なくなり、不妊となる可能性が示唆されました。

ジエチルスチルベストロールは、切迫早産や前立腺癌等の治療薬としてヒトに使用されてきました。現在では、その使用は禁止されていますが、内分泌攪乱作用をもつその他類似の合成ホルモンが、今なお野生生物等に深刻な影響を及ぼしています。このような化学物質の毒性評価は、従来から魚類や哺乳類を中心に行われてきましたが、鳥類を対象とした毒性評価研究は例が少ないのが現状であることから、本研究成果は大変有用なものです。

さらに、今回の鳥類を用いた研究成果から、少なくとも鳥類の PGC には生まれ持った性差が存在することが見えてきました。合成ホルモンの多くには、魚類や哺乳類において、オスの精巣を卵巣に性転換するという作用が知られています。そして、このような生殖腺の性転換の副作用として、PGC の性にも影響を及ぼすことが知られています。

つまり、化学物質が PGC に対して直接的な影響を与えているのか、あるいは化学物質が体細胞を性転換させて、その副作用として PGC に間接的な影響を与えるのか、従来の研究からは両者を区別することは困難でした。本研究の成果から、鳥類オスの PGC は、女性ホルモン様化学物質の影響を直接的に受けることが明らかとなり、生殖腺のみ、生殖細胞のみ、あるいは両方の毒性効果を総合的に判断できる評価基準法の確立が、鳥類において大変重要であると提言するものです。また、SDGs 目標 15「緑の豊かさを守ろう」に貢献するものです。

なお、本研究成果は、2023年7月29日（土）に、Poultry Science 誌にオンライン掲載されました。

【背景】

男性ホルモンや女性ホルモンは、細胞の増殖や分化に働くだけでなく、性分化や性行動などの生理機能を担う重要なホルモンです。環境ホルモンの中でも、男性ホルモンや女性ホルモンに類似した作用を示す人工合成化学物質「内分泌攪乱物質*2」は、野生生物等に様々な影響を及ぼすことが報告されており、特に女性ホルモン様作用による魚類オスの生殖機能の低下は、種の絶滅が危惧されるほど深刻な問題となっています。

食物連鎖の上位に位置する鳥類においても、環境中に残存する農薬などの化学物質が生存や繁殖に影響を及ぼしていることが報告されています。化学物質の影響が一因となり、国内外における絶滅鳥種や絶滅危惧鳥種は急速に増加しています。日本では、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）のもと、難分解性・高蓄積性化学物質を第一種特定化学物質に指定する際に、鳥類繁殖毒性試験（OECD テストガイドライン 206：TG206）に基づく調査が行われてきました。

他方で、令和 2 年に改正農薬取締法が施行され、農薬の影響評価対象が、従来の水産動植物に加え陸域を含む生活環境動植物に拡大されました。しかし、日本の鳥類における評価は急性毒性試験のみで決められており、慢性的な毒性影響や繁殖に及ぼす影響は考慮されていません。加えて動物愛護の観点から、動物実験の削減も視野に入れた検討が必要になっています。

研究グループは、動物実験を削減しつつ毒性評価研究を行うために、ニホンウズラの卵や胚を使用して、将来に精子や卵子となる生殖細胞への有毒性を評価する指標（エンドポイント）の探索を開始しました。

【研究手法】

ニホンウズラの卵は、受精後に 24 時間かけて胚盤葉と呼ばれるステージまで発生が進行した状態で産卵されます。生殖細胞の元となる細胞は始原生殖細胞（PGC）と呼ばれ、メスが産んだ卵の中の胚盤葉には、PGC がすでに存在しています。PGC は、胚発生の進行に伴い形成される血管中を移動することで、孵卵開始後 2.5 日目には、将来精巣や卵巣になる生殖腺という器官に定着します。ニホンウズラは、孵卵開始後 17 日目に孵化しますが、その間、PGC はオスの生殖腺（精巣）では精原細胞まで、メスの生殖腺（卵巣）では卵原細胞まで分化します。

本研究では、まず、PGC の検出に使用できるマーカーを開発するために、孵卵 2.5 日胚から採取した血管中を移動している PGC（血液循環 PGC）に発現しているタンパク質を抽出し、LC-MS/MS 技術*3 を駆使した解析により、その種類を同定しました。そして、産卵直後のニホンウズラ卵内の卵黄に、女性ホルモン様の活性を示すことが示されているジエチルスチルベストロール（人工化合物）を投与し、開発したマーカーを利用して、孵卵 2.5 日胚における血液循環 PGC と、生殖腺に定着した PGC のそれぞれに与える影響を確認しました。

【研究成果】

マーカー開発において、約 30 種類の PGC に発現しているタンパク質を同定することができました。これらの中でも、脊椎動物の生殖細胞に発現することが知られている DDX4 タンパク質と、分裂中の細胞に強く発現する PCNA タンパク質に着目して、解析を進めました。化学物質を投与していない胚の血液循環 PGC は、雌雄を問わず DDX4 と PCNA タンパク質の両方の発現が認められたことから、血液循環 PGC は細胞分裂を行いながら生殖腺へ移動していることが分かりました。また、ジエチルスチルベストロールを投与した胚の血液循環 PGC の数は、オスでは 5 分の 1 に減少しており（図 1）、生き残った数少ない PGC では PCNA タンパク質の発現が減少していました。このことから、ジ

エチルスチルベストロールを投与すると、オスの PGC の細胞分裂が抑制されて数が増えなくなるだけでなく、細胞が死ぬようにプログラムされる毒性効果が起きることが分かりました（図 2）。

また、孵卵開始 7 日胚において生殖腺定着 PGC の数をカウントしたところ、オスでは血液循環 PGC の減少と一致して、生殖腺定着 PGC の数も著しく減少し（図 1）、PCNA タンパク質の発現も減少していることが分かりました。これらの結果から、ジエチルスチルベストロールは鳥類オスを不妊にする可能性が示唆されました。また、本来、動物が産生する女性ホルモンは、その受容体を介して効果を発揮されることが知られていますが、本研究に用いた血液循環 PGC は受容体を持っていないことから、受容体がなくても毒性効果が起きてしまう危険性が示唆されました。

【今後への期待】

従来から行われてきた魚類や哺乳類生殖細胞に対する環境ホルモンの評価は、生殖腺の定着後に実施されることが一般的でした。生殖腺には生殖細胞の成長をサポートする体細胞が存在し、精巣にはセルトリ細胞*⁴、卵巣には顆粒膜細胞*⁵ という体細胞が存在しています。生殖腺に定着した PGC は、セルトリ細胞のサポートにより精子に、顆粒膜細胞のサポートにより卵子となります。

しかし、女性ホルモン様の効果を発揮する化学物質は、セルトリ細胞を顆粒膜細胞に転換させることが知られています。つまり、生殖腺定着後の PGC を評価した場合、化学物質が PGC に対して直接的な影響を与えているのか、あるいは化学物質が体細胞を転換させて、その副作用として PGC に間接的な影響を与えるのか、従来の研究では両者を区別することが困難なものでした。

本研究の成果から、鳥類オスの PGC は女性ホルモン様化学物質の影響を直接的に受けることが明らかとなり、直接的及び間接的な影響を総合的に判断できる評価基準法の確立が大変重要であると提言するものです。

また古くから、PGC の特性に性差はないと考えられてきましたが、本研究の成果から、少なくとも鳥類の PGC には生まれ持った性差があることも明らかとなりました。これらの成果は、鳥類における初期発生や生殖細胞の特性を理解する上で、重要な足掛かりになると考えられます。

【謝辞】

本研究は、国立環境研究所、埼玉大学、北海道大学の 3 研究機関で構成された研究プロジェクト「化学物質の鳥類卵内投与による性分化異常評価手法の開発とテストガイドライン化に向けた提案」（令和 4 年度環境研究総合推進費、JPMEERF20225001）の支援を受け、実施しました。本学研究グループでは、鳥類の生殖細胞に及ぼす化学物質の毒性評価を行っています。

論文情報

論文名 Research Note: Diethylstilbestrol causes reduction of primordial germ cells in male Japanese quail (ジエチルスチルベストロールはニホンウズラの始原生殖細胞数を減少させる毒性作用がある)

著者名 水島秀成¹、黒岩麻里¹ (¹北海道大学理学研究院)

雑誌名 Poultry Science (家禽を用いた科学研究の専門誌)

DOI 10.1016/j.psj.2023.102910

公表日 2023年7月29日(土)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院理学研究院 助教 水島秀成 (みずしましゅうせい)

T E L 011-706-3522 F A X 011-706-3522 メール smizus@sci.hokudai.ac.jp

U R L <https://www.avian-toxicology.jp/>

配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

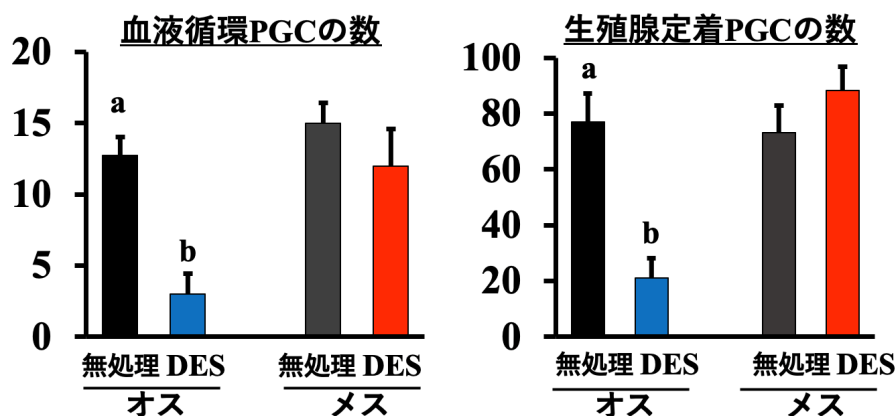
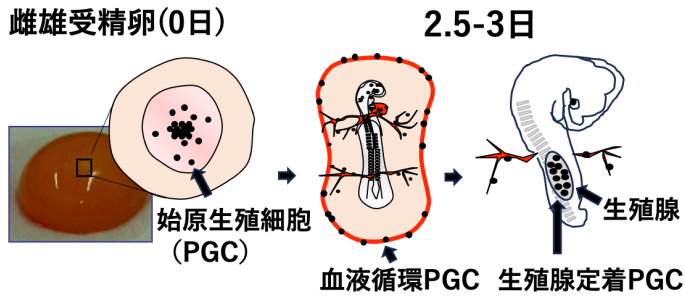


図1. 100 nmol ジエチルスチルベストロール (DES) 投与後の血液循環 PGC (1 μ l 血液) と生殖腺定着 PGC (1枚の横断切片上) の数

始原生殖細胞の移動



ジエチルスチルベストロールの暴露による影響 (オス)

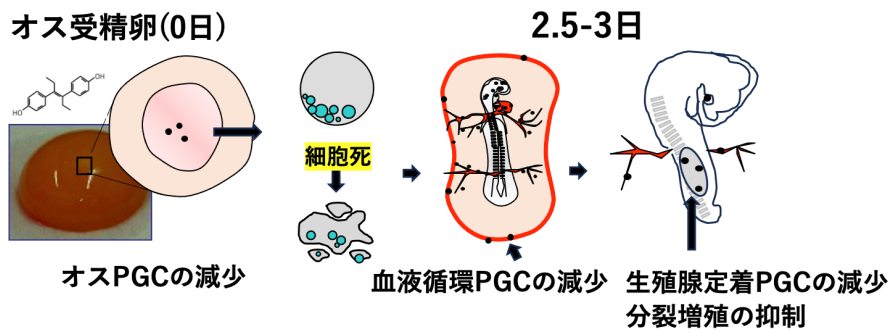


図 2. 始原生殖細胞 (PGC) の移動とジエチルスチルベストロールが PGC 与える影響

【用語解説】

- * 1 女性ホルモン様作用 … 女性ホルモンは、主に卵巣から分泌されるホルモンで、思春期の女性体型や生殖器官の発達を促すが、そのホルモンと似た働きを持つ物質を指す。
- * 2 内分泌攪乱物質 … ホルモンは、適切な細胞で適切なタイミングで合成・分泌され、生体の調節機能に関与するが、そのホルモンの合成や分泌を阻害する物質、あるいはホルモンと類似の作用を示す物質を指す。
- * 3 LC-MS/MS 技術 … 高速液体クロマトグラフ法的一种であり、液体中の成分を固定相との相互作用と及び移動相の差を利用して、質量検出器でタンパク質に含まれるアミノ酸を検出する方法のこと。
- * 4 セルトリ細胞 … 精巣内で生殖細胞をとり囲んで栄養を供給し、精子細胞までの成熟分化を促す細胞のこと。
- * 5 顆粒膜細胞 … 女性ホルモンの産生を行い、卵胞の発育や卵子の成熟分裂を助ける細胞のこと。