

学 位 論 文 要 旨

氏 名 マー マー ウィン

題 目 日本ウズラ(*Coturnix coturnix japonica*)の繁殖機能に及ぼす
Diethylstilbestrol 投与の影響
(Effects of Diethylstilbestrol on Reproductive Functions of Japanese Quail
(*Coturnix coturnix japonica*))

環境中に存在する天然および合成化学物質の中には、ヒトを含めた動物に対してホルモンと類似した働きをするものがあり、これらの物質が生殖やその他の異常を引き起こすことは良く知られている。これらの物質は内分泌攪乱物質といわれ、こういう物質の代表として日常生活用品として頻りに使用されている工場廃液、洗剤、塗料、殺虫剤、プラスチック製品などが挙げられている。しかし、このような物質の毒性を評価する適当な方法がまだ確立されてなく、現在多くの国の多くの研究所でその開発に取り組んでいる。

このようなことから、本実験では内分泌攪乱物質がウズラの生殖器官を含めた生殖機能に及ぼす影響を及ぼすかについて調べることにした。環境中の攪乱物質の濃度や汚染期間は工場の突発的な事故や自然災害などによって大きく変わることが予想されるので、給与量およびその投与方法はそれぞれ低量から多量および給水または筋肉注射によって行われた。

その結果、DESがウズラの発生日から成熟期に到達した10週間まで飲料水に溶解して連続的に給与した場合、体重、受精率および孵化率においてDES投与量による差は認められず、また、DESを投与しなかった区ともほとんど同様な値であった。一方、性成熟到来の所要日数はDES高処置区に若干の遅延が認められたが、しかし低投与区及び対照区との比較において差はなかった。

ウズラの受精に対するDES処置の影響を調べるため、試験管内培養実験を施した。その結果、受精時精子の卵子内貫通によって形成される孔数は、未処置と比べ著しく減少した。そのことはDESの受精に対する阻害作用を示すものであるが、しかし、その作用が精子あるいは卵子の阻害作用に起因するものかどうかは定かでない。それを明確にするため、正常精子とDES処置卵子の前培養を行った後、未処置卵子を同培養器に投入して共培養したところ、共培養した未処置卵子に有意に多数の貫通孔が観察された。もし、DES処置卵子の精子受容体において精子を特異的に取り込むという本来の機能に障害が起こってなければ、精子はそれと結合し、後から投入された卵子には結合せず、貫通も起こらないはずである。しかし、この実験系において後に投入した、すなわち共培養した卵子に多数の貫通が起こったことは、換言すれば、DES処置によって卵子における精子との結合に障害が生じたことを裏づけるものである。一方、DESによって精子のアクロシン活性は有意に低下した。これらのことから、DESは精子の酵素活性の低下と卵子の精子との結合力を弱めることによってウズラの受精障害を引き起こすと考えられた。

学 位 論 文 要 旨

氏 名

Mar Mar Win

題 目

Effects of Diethylstilbestrol on Reproductive Functions of Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*)
(日本ウズラ [*Coturnix coturnix japonica*] の繁殖機能に及ぼす Diethylstilbestrol 投与の影響)

It has been well established that there are numerous endocrine-disrupting chemicals in the environment. Recent reports have indicated that synthetic chemicals in the environment are capable of disrupting the endocrine system not only in a wide variety of animals, but also in human beings. Both human and animals may have been exposed to these chemicals through diet such as vegetables and soya, industrial and household products including detergents, drugs, lubricants, cosmetics, paints, pesticides and plastics. Furthermore, there is a growing body of evidence that exposure to these hormonally-active chemicals may result in detrimental effects on reproductive organs and functions of wildlife and human. However, laboratory data related to aves is very limited and thus the consequences of long-term exposure of these chemicals to quail are largely undetermined.

From this situation, the aim of this study was to determine the effects of diethylstilbestrol (DES) on reproductive functions of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). DES was used as a model endocrine disrupter in this experiment. Japanese quail were used as experimental animals because they have not only unique characteristics such as fast growth, early sexual maturity, high egg production and short generation interval but also they are similar to wild aves.

We examined the effects of DES on body weight, age of sexual maturation, egg weight, egg production, fertility and hatchability of Japanese quail by adding of DES (0.1, 1 mg/L) in the drinking water. There was no significant difference in body weight, egg weight and egg production between DES treated groups and control group. In contrast, age of sexual maturation in male and female was significantly delayed. Fertilizing ability and hatchability were less in DES-treated groups but differences were not statistically significant. We also examined effect of DES on reproductive organs by intramuscular injection of DES 1 mg / mL for 3, 6 and 9 days. The testicular weights of DES-treated group decreased in comparison with the control group. The result of histological examination showed a marked disintegration of spermatogenic cells in the seminiferous tubules and decrease in the number of sperm in the lumen of seminiferous tubules in treated group.

We have conducted *in vitro* penetration test to examine the effects of DES injection on sperm receptivity. The number of holes per mm² resulting from the sperm penetration was significantly decreased in DES-treated group compare to control group. In the *in vitro* competitive assay, the quail solubilized IPL from untreated group strongly blocked the sperm penetration into the intact IPL. However, the number of holes was increased following sperm treatment with quail solubilized IPL from DES-treated group. Effect of DES injection on the acrosomal proteolytic activity (APA) of quail sperm was also examined. The mean halo diameter as an indication of APA enzyme was less in DES-treated group compare to control group. It means that DES probably caused reduction of APA in quail sperm which is necessary for complete and successful fertilization.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	Mar Mar Win
審査委員	主査 琉球 大学 教授 仲田 正
	副査 琉球 大学 助教授 建本 秀樹
	副査 宮崎 大学 教授 芦澤 幸二
	副査 鹿児島大学 教授 吉田 光敏
	副査 鹿児島大学 教授 岡本 新
審査協力者	
題 目	Effects of Diethylstilbestrol on Reproductive Functions of Japanese Quail (<i>Coturnix coturnix japonica</i>) (日本ウズラ (<i>Coturnix coturnix japonica</i>) の繁殖機能に及ぼす Diethylstilbestrol 投与の影響)
<p>環境中に存在する天然および合成化学物質の中には、ヒトを含めた動物に対してホルモンと類似した働きをするものがあり、これらの物質が生殖やその他の異常を引き起こすことはよく知られている。これらの物質は内分泌攪乱物質といわれ、多くはエストロゲン様作用を示す。このような物質のマーカールとして合成発情ホルモンの一つである Diethylstilbestrol (DES) がよく用いられている。</p> <p>本研究では内分泌攪乱物質が鳥類の生殖機能に対し如何なる影響を及ぼすかについて、日本ウズラを用いて追究したものである。</p> <p>環境中の内分泌攪乱物質の濃度や汚染期間は工場の突発的な事故や自然災害などによって大きく変わることが予想されるので、投与量およびその投与方法はそれぞれ少量から多量をウズラに給水給与または筋肉注射し、その 1) 生産形質 (体重, 性成熟, 産卵率, 卵重, 受精率), 2) 雌雄の生殖器官, 3) 卵子に対する精子侵入, 卵子の精子との結合および精子のアクロシン反応などに対する影響から、内分泌攪乱物質がどのような機序で鳥類の生殖機能に関与しているかについて検討した。</p>	

得られた結果は次の通りである。

1) DES (0.01mg/ℓ 及び 1mg/ℓ) が実験期間中 (発生から 14 週齢) 飲料水を通して給与された場合, 体重, 産卵率, 卵重において無処理区との差は認めなかった。性成熟到来時期においては DES 処理区において有意な遅延が認められ, また, 受精率において有意差は認めなかったものの, DES 処理区に低下の傾向がみられた。

2) DES 1mg の筋注 (3日間, 6日間および9日間) の場合, 3日間投与を除く6日間および9日間における生殖腺およびその付属器官に雌雄とも著しい退行的変化が観察された。また, 組織的には6日間処理から精細管が縮小し, 管腔に精子は見られず, 9日間処理において, 全ての精細管が萎縮し, 管腔内の精細胞は消失した。

3) ニワトリ精子とウズラ卵子とを試験管内培養した場合, 異種にもかかわらずニワトリ精子がウズラ卵子内に貫通できることを明らかにし, しかも卵子貫通後に卵子膜 (IPL) に見られる孔数は同種同士の培養の場合と同様であった。

このことからウズラの受精過程の一つである精子の卵子貫通能を *in vitro* で調べる際, ウズラ精子の代わりに採取が同一個体から頻繁且つ容易にできるニワトリ精子を用いる *in vitro penetration technique* を確立した。続いて, ニワトリ精子と溶解化したウズラ卵子とを培養した場合, 両者の結合能は, 同種同種のそれとほぼ同様であることを利用し, ウズラの受精過程における精子と卵子との親和性が評価可能な *in vitro competitive assay* を確立した。さらに, ヒト精子のアクロシン活性測定に利用されている Gelatin substrate slide 法がウズラ精子のそれにも利用可能であることを明らかにした。

4) これら 3) の方法によって, DES がウズラの受精に対し如何なる影響を及ぼしているかを検討した。その結果, 次のことが明らかになった。すなわち, (a) DES 処理精子は精子の卵子侵入が抑制される, (b) DES 処理卵子は精子との結合力が弱体化される, (c) DES 処理精子はアクロシン活性が減退する。

これらの結果から, 内分泌攪乱物質である DES は, 鳥類の生殖器官に対し, 退行的な作用をもたらすと共に, 受精に際し, 精子のアクロシン反応を弱め, 卵子内への貫通を阻害し, 一方の卵子においては, 精子受容体の精子との結合能を衰退させた。精子及び卵子に対する DES のこのような阻害作用によって, 受精率の低下が引き起こされる可能性を提起した。

以上のように, 本研究は Diethylstilbestrol の投与がウズラの生殖器官を含めた生殖機能に及ぼす影響を明らかにすると共に, このような内分泌攪乱物質が鳥類の生殖機構に対する作用機序に関して貴重な知見を提示したものであり, 審査員一同は本論文が学位論文として十分に価値があるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	Mar Mar Win
審査委員	主査 琉球 大学 教授 仲田 正
	副査 琉球 大学 助教授 建本 秀樹
	副査 宮崎 大学 教授 芦澤 幸二
	副査 鹿児島大学 教授 吉田 光敏
	副査 鹿児島大学 教授 岡本 新
審査協力者	
実施年月日	平成18年 1月14日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) (<input checked="" type="radio"/> 口答) ・ <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査, 副査の5名は, 平成18年1月14日の公開審査会において学位申請者に対して, 学位申請論文の内容について説明を求め, 関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑がなされ, いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から, 審査委員会は, 学位申請者が鹿児島大学大学院連合農学研究科博士課程修了者としての学力ならびに識見を有するものと認め, 博士(農学)の学位を与えるに十分な資質を有するものと判定した。</p>	

学位申請者
氏 名

Mar Mar Win

質問：Diethylstilbestrol (DES)の生殖器官及び性細胞（精子や卵子）に対する作用機序はどう考えているか？

回答：DESの作用機序については究明していないが、同物質を3～9日間過剰に投与した場合、生殖器官の退行ならびに精子形成障害が急激に起こることから、エストロゲン受容体を介した緩やかな変化だけとは考えられず、受容体と反応しない別の作用機序も存在しているのではないかと考えています。なお、インビトロ試験において、DES処理ウズラ由来の卵子から剥離した精子受容体と未処置精子との親和性が低下するという結果は、DESがエストロゲン受容体を介して作用した結果と推察しています。

質問：DESは環境中には存在していないが、それを環境ホルモンとして用いた理由は？

回答：内分泌攪乱物質、いわゆる環境ホルモンの中にはエストロゲン類似の物質が多いので、合成エストロゲンの生物に対する作用を調べることが、DESを含めた多くの環境ホルモンの生物への影響を理解する上で一つのモデルとして役立つと思っています。

質問：DESはエストロゲン様作用物質といわれているが、それ以外の特有の毒性作用はないのか？

回答：あると思います。たとえば、本研究で、過剰なDES投与後、精細管における精細胞の消失及び急激な生殖器官の退縮などが極めて短期間に発症することから考えて、DESのエストロゲン受容体を介さない別の直接的な毒性作用があるのではないかと考えています。

質問：DESを体内を通さずに直接精子に作用させた場合影響があると思うか？

回答：分子量が小さいDESは容易に精子内に浸透する為、細胞内での遺伝子の転写妨害や代謝系への悪影響、更にそれらから派生する障害が誘導されることも考えられます。

質問：DESがエストロゲン類似物質であるならば、天然のエストロゲンの作用についても調べる必要があったのでは？

回答：本研究の主旨は、環境ホルモンの作用機序ではなく、環境ホルモンとしての強いエストロゲン様作用を有するDESの生物に対するリスクについて主眼を置き、それ単独の影響を調べました。

質問：DES投与後に採取された精管内精子の運動性はどうなっているか？

回答：運動性はありました。インビトロ貫入試験によってその精子が卵子に貫通できることも明らかにされました。

質問：DES処理実験後のウズラの処理について

回答：本実験の遂行に当り、琉球大学動物実験委員会より安全面と倫理面の審査が行われ、処理方法を含めた本動物実験計画の実行許可が与えられました。処理は本学廃棄物処理センターで焼却処分されました。

要望：DES投与によって精細管の生殖細胞に退化現象が観察されたが、各生殖細胞の退化と投与量ならびに処理日数との関係についてもっと詳細に調べてもらいたい。

回答：貴重な御提言有難うございます。その面について、電頭的に調べることにします。