

琵琶湖固有魚種ホンモロコの *in vitro* 精子分化系を用いた化学物質の影響とそのメカニズムの解析

立命館大学 薬学部 高田 達之

1. 背景

ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) はコイ科に属する代表的な小型の琵琶湖固有種であり、絶滅危惧ⅠA類（ごく近い将来における野生での絶滅の危険性が極めて高いもの）に指定されている。近年、琵琶湖に生息するその他の固有種においてもその生息数の急激な減少が報告され、固有魚類 15 種中 12 種が絶滅危惧種、絶滅危機増大種、希少種に指定されている（滋賀県自然環境保全課，2010）。この原因として、産卵期における琵琶湖の水位操作、護岸工事、内湖の埋め立てによる産卵場所の減少、外来魚の増加による生存競争の激化、内分泌かく乱物質汚染による繁殖能への影響などが指摘されている。

代表的な内分泌かく乱物質として知られているビスフェノール A (BPA) やノニルフェノール (NP) は、琵琶湖に流入する河川水中からそれぞれ ~130 pM, ~14 nM のレベルで検出されている。NP は界面活性剤やポリ塩化ビニルの原料として食品の包装材料などに用いられており、食品の包装やレンジによる再加熱によって食品に溶け出すことが報告されている (Inoue et al, 2001)。またヒトの尿や胎盤、母乳からも NP が検出されていることから、胎児や乳児も NP に曝露されていると考えられている (Li X et al, 2013; Balakrishnan B et al, 2011; Ademollo N et al, 2008)。特に NP はエストロゲンと化学的、物理的特性が類似しているため、エストロゲン受容体への結合能を有し、内分泌かく乱作用によってヒトを含む動物の生殖機能に影響を与える可能性が指摘され、実際に NP による卵巣の発達阻害や精子形成能の低下など、多数の報告がある (Harris CA et al, 2001; Fan Q et al, 2001)。しかしながら NP が生殖機能、生殖細胞分化に与える影響とそのメカニズムに関しては十分に解明されていない。

当研究室では NP をはじめとする内分泌かく乱物質 (EDCs) が琵琶湖固有魚の生殖細胞分化に与える影響を直接解析する事を目的とし、代表的な琵琶湖固有魚であるホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) 生殖巣を材料とした実験系の開発を行ってきた。その結果、これまでに、ホンモロコ精巣、卵巣、受精卵から細胞株を樹立し (Higaki S et al, 2013a, 2015)、また精巣由来セルトリ細胞株を用いて NP が抗アンドロジェン効果を有することを見出している (Higaki S et al, 2013b)。さらに独自にホンモロコ *in vitro* 精子分化系を確立し、化学物質評価系に応用可能である事、実際に NP がホンモロコ精子分化に影響する事をこれまでの助成により、明らかにしてきた。本研究では、このホンモロコ精子の *in vitro* 分化培養系を用いて、NP がホンモロコの精子形成に与える影響とそのメカニズム解明のため、NP の濃度影響、効率良い精子分化培養の検討、フローサイトメーターによる詳細な解析を試みた。

これまでの結果から、非繁殖期 (10 月) の精巣から得られた生殖細胞を用いた場合、培養 3 週目において NP は 1 倍体の割合を増加させることが示唆された (図 1)。また、

非繁殖期(11月)精巣細胞においても、培養3週目において1 μ M NPは1倍体の割合を増加させるという結果が得られた(図2)。しかし、繁殖期(3月)精巣細胞では、1 μ M NPは1倍体の割合を減少させるという非繁殖期精巣細胞を用いた場合とは異なる結果が得られた(図3)。

しかしながら、これらの実験結果からNPは少なくとも1 μ Mの濃度で1倍体形成に影響することが明らかとなった(図2、図3)。

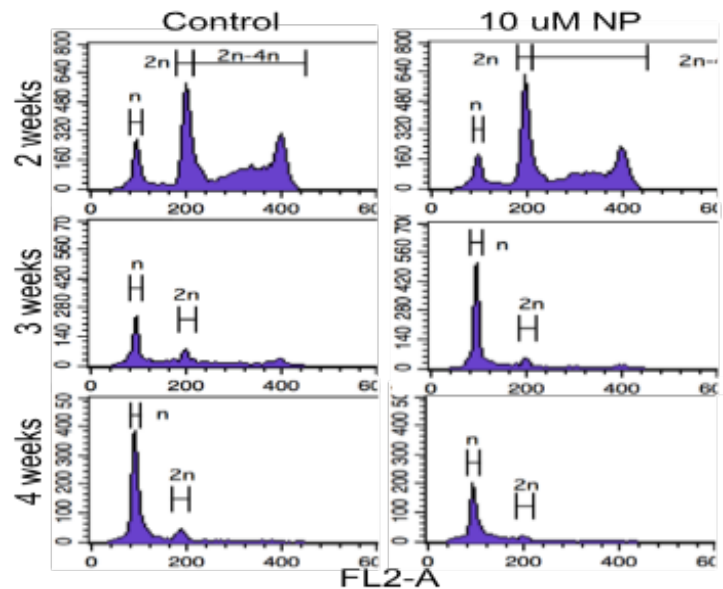


図1. *In vitro*精子形成におけるNPの影響 <非繁殖期精巣(10月)>

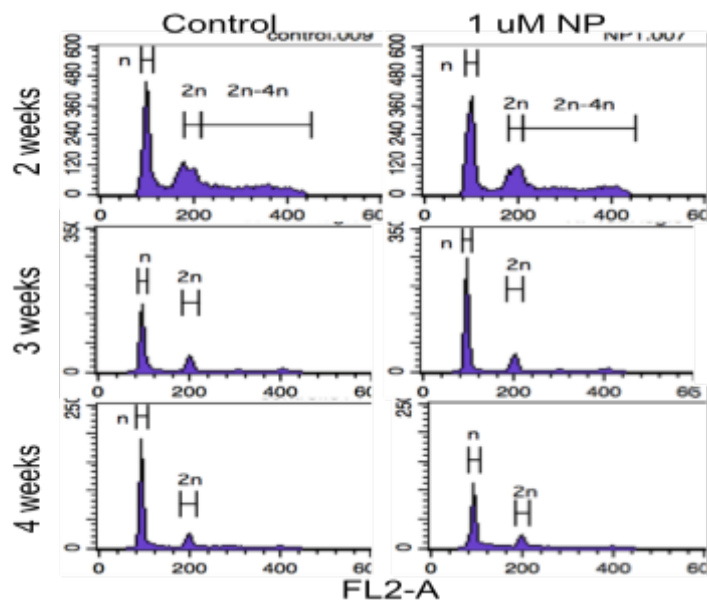


図2. *In vitro*精子形成におけるNPの影響 <非繁殖期精巣(11月)>

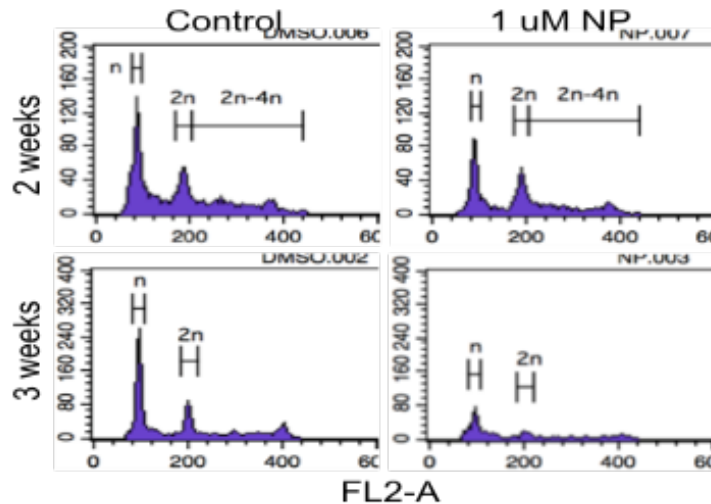


図 3. *In vitro* 精子形成における NP の影響 <繁殖期精巣（3 月）>

さらに、化学物質の精子分化過程への影響を明らかにするためには、最終的に受精・発生能を調べる必要がある。そのためには、再現性が高く、効率の良い精子分化培養系が必須となる。これまで我々が開発した培養法では、共培養状態にある体細胞の増殖をコントロールすることが困難なことから、体細胞の過剰な増殖が起こり、生殖細胞の増殖が抑制されるため、形成される精子数が少なくなるという問題があった。その結果、精子数の測定が困難となり、解析が困難となるのみならず再現性に問題が見られた。そこで、体細胞の過剰な増殖を抑制し、かつ精子分化を促進する培養法として、精巣細胞を接着させて培養するのではなく、浮遊状態での培養を試みた。

その結果、体細胞の増殖が抑制され、効率よく精子分化が進行するという予備的な結果が得られている（図 4）。

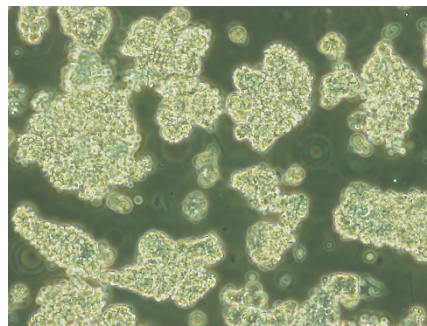


図 4. ホンモロコ精巣の浮遊培養

2. 目的

本研究では、我々が独自に開発した琵琶湖固有魚種ホンモロコの *in vitro* 精子分化系を用い、NP が精子形成に影響する低濃度限界を明らかにすることにより、科学的根拠に基づいた NP の安全基準の設定を試みる。さらに、解析方法としての浮遊培養の有効性を調べると共に、フローサイトメーターによる再現性の高い定量解析方法を確認するため、細胞培養、細胞回収作業、染色解析方法などの実験系の至適化、精緻化を行う。

3. 実験計画

3.1 低濃度の化学物質が精子分化に与える影響（接着培養）

精子形成に影響を与えるNP濃度の下限値を明らかにするため、1 nM、10 nM、1 μ M NPの存在下で*in vitro*精子分化を従来の接着培養により行う。NPの影響は、フローサイトメトリーによる一倍体（精子細胞・精子）の形成率を用いて評価する。

これらの結果から固有種ホンモロコの精子分化を指標として、化学物質の影響を明らかにすると共に、安全基準値を求める。

3.2 低濃度の化学物質が精子分化に与える影響（浮遊培養）

精子形成の効率が良い浮遊培養法において、精子形成に影響を与えるNP濃度を明らかにするため、1 nM、10 nM、1 μ M NPの存在下で*in vitro*精子分化を行う。その影響評価は、フローサイトメトリーによる一倍体（精子細胞・精子）の形成率を用いて行う。

琵琶湖固有種ホンモロコの精子分化に影響する NP の限界濃度を明らかにするため、精巣細胞の接着培養と浮遊培養を比較し、培養方法により化学物質影響の違いが認められるか、またどちらの培養方法が化学物質の評価方法として適しているかを明らかにする。

3.3 精子分化過程特異的な NP の影響（精子分化と化学物質への反応性）

これまでの結果から、季節（繁殖期、非繁殖期）によって化学物質影響に違いが認められたことから、より近接した期間、すなわち非繁殖期（9月）と（1月）の精巣を用いて *in vitro* 精子分化を行い、精巣細胞の分化状態の違いにより、化学物質の影響が異なるかを調べた。

4. 試料と方法

4.1 ホンモロコ精巣の採材

ホンモロコ成魚は、山匠ホンモロコ養殖工房(滋賀県東近江市)で養殖している個体を使用した。採取した個体は、エアレーション下で立命館大学(滋賀県草津市)まで輸送し、到着後すぐに頭部叩打により安楽殺を行った。安楽殺したホンモロコを 70% エタノール噴霧により消毒し、腹壁切開後(図 5A)、精巣を無菌的に摘出した(図 5B)。摘出した精巣は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中へ回収した。一定数の精巣を回収した後、0.5% 漂白剤を含む PBS に 2 分間浸漬することで殺菌した。PBS へ 2 分間ずつ 3 回浸漬させ、洗浄した。

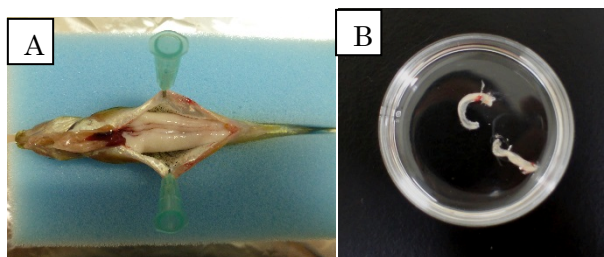




図 5. ホンモロコの精巢の採材

4.2 精巢細胞の培養

精巢細胞の培養は、Sakai の開発した、ゼブラフィッシュ精巢細胞培養法(Sakai, 2006) に準じて行った。すなわち、殺菌・洗浄を行った精巢は、500 U/mL コラゲナーゼ typeIV (和光純薬)を含む Leibovitz' s L-15 培養液中で眼科用ハサミを用いて精巢を細切し(図5C)、28° Cで 2 時間振盪した(図5D)。また、振盪中は 20分毎にピペッティングを行い、細胞を単離した。振盪後、10 倍量の 1% BSA を含む L-15 培養液を加え、100 μ m ナイロンメッシュを用いて濾過した。濾過した細胞懸濁液は遠心(120g, 7 分間)し、35 mm ディッシュ上で精巢細胞用培養液を用いて、18° C、大気下で 2~4 週間培養した(図5E)。

培養液は、ゼブラフィッシュ精巢細胞用培養液 Testicular cell culture medium(TCCM: (Sakai, 2006))を基に、ホンモロコ精巢細胞用培養液を調製した。すなわち、Leibovitz' s L-15 培養液へ、10 U/mL ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(HCG, あすか製薬)、10 U/mL 妊馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSG, あすか製薬)、2 mM L-グルタミン(ナカライテスク)、0.5% ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液(ナカライテスク)、100 μ g/mL カナマイシン硫酸塩(ナカライテスク)、10 mM HEPES(pH 7.9, ナカライテスク)、800 μ M CaCl_2 (和光純薬)、20% Milli-Q 水、0.5% 牛血清アルブミン(BSA, Sigma-Aldrich)、10% ウシ胎子血清(FBS, ニチレイ)を基本培養液として調製した。また、組換え上皮細胞成長因子(EGF, Peprotech)、組換え線維芽細胞成長因子(bFGF, Peprotech)、フォルスコリン(Sigma-Aldrich)、2-メルカプトエタノール(Sigma-Aldrich)、組換えインスリン様成長因子I(IGF, Peprotech)、エストラジオール(和光純薬)、11-ケトテストステロン(11-KT, コスモバイオ)、17 α ,20 β -ジヒドロキシプレグナ-4-エン-3-オン(DHP, Toronto Research Chemicals)、魚胚抽出物(FEE) コイ血清(CS)を使用直前に基本培養液に添加して、培養に用いた。

FEE はコイ(*Cyprinus carpio*)の孵化後 2-3 日の稚魚を 0.5%漂白剤に 2 分間浸漬することによって殺菌し、魚用リンゲル液(116 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES(pH7.2))で 2 回洗浄した。その後、稚魚をホモジナイズし、Leibovitz' s L-15 で希釈した。使用前に遠心分離(4° C, 6500g, 10 分間)し、上清を 0.2 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌して使用した。

CS はコイの血液を採取し、室温で 30 分~1 時間静置して凝固させ、遠心分離(4° C, 3000g, 10 分間)した。得られた上清を 0.2 μ m フィルターを用いて濾過滅菌して使用した。

4.3 精巣細胞のフローサイトメトリー解析

精巣細胞または培養精巣細胞をトリプシン処理により、単離・回収した後、氷冷 70% エタノールを用いて固定した。固定した細胞は、0.2 mg/mL RNase 処理後、20 μ g/mL プロピジウムイオダイド(PI、和光純薬)で、室温、30 分間、DNA 染色を行った。40 μ m ナイロンメッシュで濾過した後、FACSCalibur HG フローサイトメーター(Becton, Dickinson and Company)を用いて核内 DNA 量を測定、解析した。

5. 結果と考察

5.1 低濃度の化学物質が精子分化に与える影響（接着培養）

精子形成に影響する NP 濃度の下限値を明らかにするため、*in vitro* 精子分化系において、精巣細胞培養開始時より 1 nM、10 nM、1 μ M の NP 存在下で接着培養を行った。精子分化培養開始後、day21 に培養細胞を回収し、全細胞に占める精子細胞および精子(1 倍体細胞)の形成割合を、フローサイトメーターを用いて解析した。なお、回収時は、体細胞を回収せず、生殖細胞のみを回収した。

その結果、NP 1 nM、10 nM、1 μ M の濃度において濃度依存的に精子形成を抑制する傾向が認められた。(図 6、図 7)

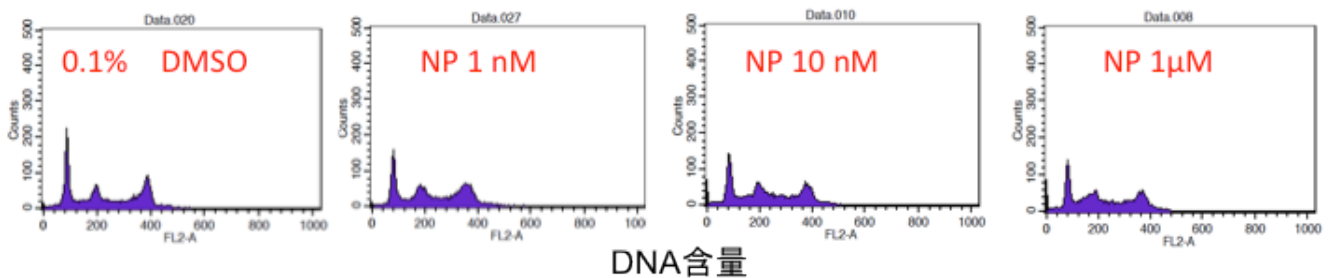


図 6. フローサイトメトリーによる 1 倍体の検出 <非繁殖期(9 月)精巣> (接着培養)

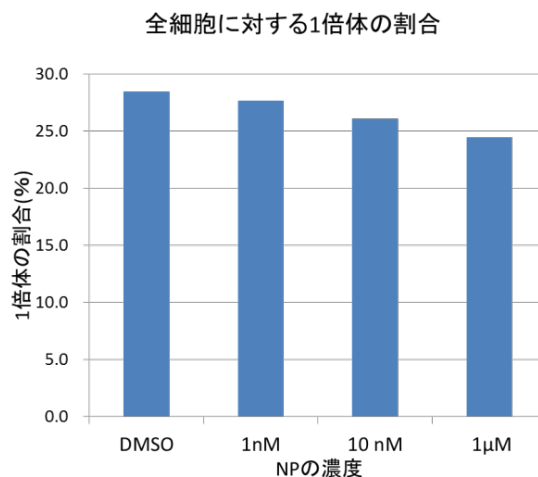


図 7. NP が精子形成に与える影響 <非繁殖期(9 月)精巣> (接着培養)

5.2 低濃度の化学物質が精子分化に与える影響（浮遊培養）

浮遊培養においても接着培養と同様に、低濃度(<1 μ M)のNPが精子形成に影響するかを調べる為、*in vitro* 精子分化系において、精巣細胞培養開始時よりNPを10 nM、1 μ Mの濃度で添加し培養を行った。精子分化培養開始後、day21に培養細胞を回収し、全細胞に占める精子細胞および精子(1倍体細胞)の形成割合を、フローサイトメーターを用いて解析した。なお、回収時は、ディッシュに接着した体細胞を回収せず、生殖細胞のみを回収した。

その結果、浮遊培養においても10 nMでNPが精子形成を抑制し、濃度依存的に精子形成に影響する傾向が認められ、接着培養と同様な結果が得られた(図8、図9)。接着培養と比較した場合、両培養法とも同様な結果が得られるが浮遊培養の方が抑制の程度が大きいという結果が得られた。すなわち評価方法としては感度を重視する場合浮遊培養が適しており、一方で効率良い評価系を目的とした場合は、少量の細胞で培養できる接着培養が適していると考えられた。

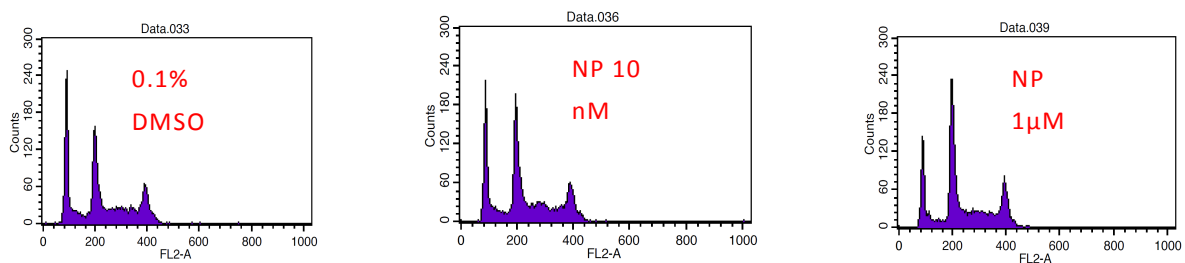


図8. フローサイトメトリーによる1倍体の検出 <非繁殖期(9月)精巣> (浮遊培養)

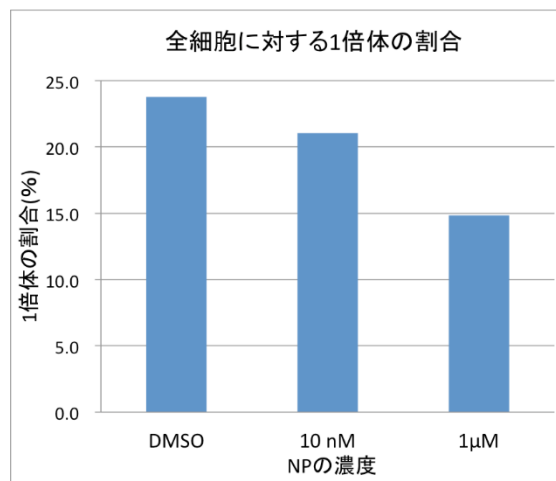


図9. NPが精子形成に与える影響 <非繁殖期(9月)精巣> (浮遊培養)

5.3 精子分化過程特異的な NP の影響（精子分化と化学物質への反応性）

非繁殖期（9月）の精巣細胞では、培養3週目においてNPは1倍体の割合を減少させ、昨年度の非繁殖期（10月）の精巣細胞とは異なる結果が得られた。そこでNPの精子形成への影響が精子分化程度に依存するかを調べるため、1月の精巣細胞を用いて異なるNP濃度で浮遊培養を3週間行った。すなわち精巣細胞培養開始時より1 nM、10 nM、1 μ MのNP存在下で*in vitro*精子分化培養を行った。培養開始後21日目に培養細胞を回収し、全細胞に占める精子細胞および精子（1倍体細胞）の割合を、フローサイトメーターを用いて解析した。なお、回収時は、接着した体細胞を回収せず、生殖細胞のみを回収した。その結果、1月の精巣細胞を用いた場合、培養3週目においてNPは、濃度依存的に1倍体の割合を増加させると言う結果が得られた（図10、図11）。9月の精巣細胞においてNPは、1倍体の割合を減少させるという逆の結果が得られている（図7、図9）。9月の精巣には主に精原細胞が存在し、1月の精巣は分化途中の精母細胞が多く存在することから、分化の進行により、NPの影響が変化する可能性が示唆された。一方で分化が進行している場合、精子形成までの期間が短いことから、細胞回収時までの培養期間が相対的に長くなり、その影響がこのような結果として現れている可能性も否定できない。

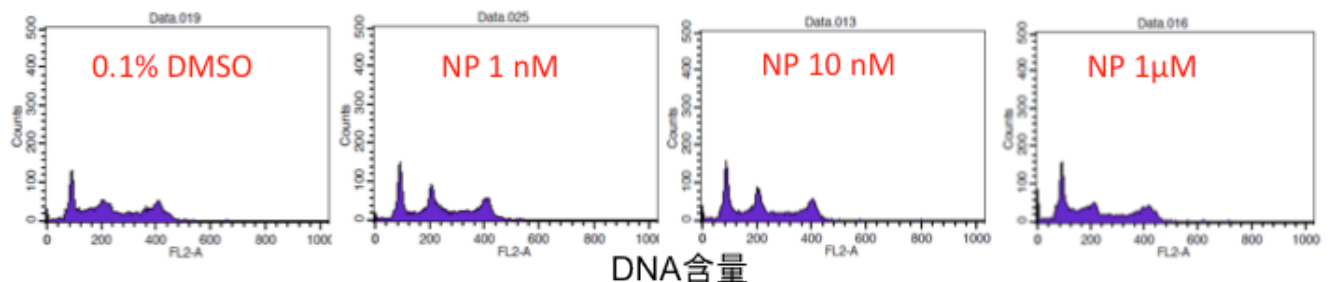


図 10. フローサイトメトリーによる 1 倍体の検出 <非繁殖期(1月)精巣>
(浮遊培養)

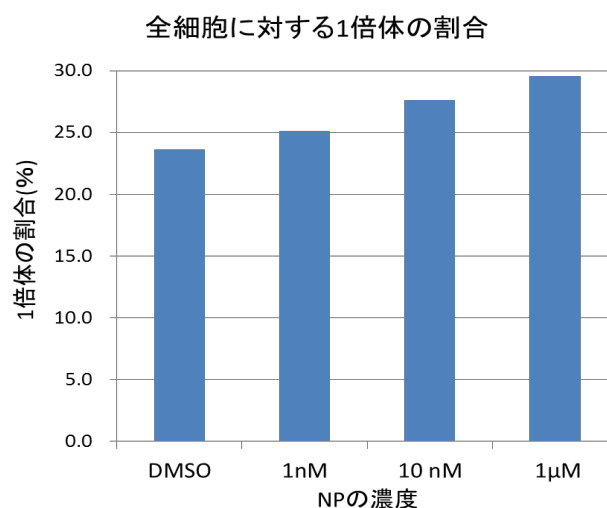


図 11. NP が精子形成に与える影響 <非繁殖期(1月)精巣>
(浮遊培養)

6. まとめと今後の課題

以上、本研究により、琵琶湖固有種ホンモロコ *in vitro* 精子分化系を利用し、NP が精子形成に影響することを示すことができた。またその影響は、NP 10 nM の濃度においても認められることが明らかとなった。この濃度は琵琶湖に流入する河川で検出されるレベルであるため、生体での濃縮を考慮すると実際に固有種の精子形成に影響している可能性を強く示唆するものである。

一方でその効果は非繁殖期 9 月の精巣細胞を使用した場合では抑制、1 月の精巣細胞では促進と逆の結果を示し、NP の精子形成への影響は精巣の時期（分化段階）により変わるという意外な可能性を示唆することとなった。

今後は、統計的有意差を論じるために実験を繰り返し、データ収集を行う予定である。またフローサイトメーター解析により、生殖細胞の分化状態と NP の影響との関係に注目して NP が精子形成に影響するメカニズムを明らかにすることにより、その危険性を正確に把握することが必要である。

7. 謝辞

本研究は、平成 27 年度財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構の「水質保全研究助成」による援助を受けて実施いたしました。本研究を遂行するにあたり、ホンモロコのサンプリング、血清の採取に関し、下村修一氏(草津ホンモロコ生産組合)、山本哲夫氏(山匠ホンモロコ養殖工房)ならびに山本太右エ門氏(山本養魚場)のご協力をいただきました。ホンモロコ精巣組織切片の作成には、滋賀医科大学 遠山育夫教授をはじめ、山元武文氏、森康博氏(滋賀医科大学実験実習支援センター)のご協力をいただきました。また、琵琶湖博物館藤岡康広博士ならびに国立遺伝学研究所酒井則良准教授には、ご専門の立場から、様々なご助言をいただきました。ご協力いただいた関係各位に心から感謝を申し上げます。

8. 関連業績

講演

1. 高田達之

幹細胞生物学を利用した固有魚種保存と環境科学研究 Application of stem cell biology to the conservation of endangered endemic fish and environmental science

鹿児島大学大学院連合農学研究科、分野別セミナー（農芸化学）、那覇、沖縄 琉球大学 50 周年記念会館 2016 (2/29)

学会発表

1. 高田達之, 手島黎子, 檜垣彰吾, 島田愛美, 酒井則良, 藤東貴昭: フローサイトメトリーによる琵琶湖固有種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) 精巣細胞の解析: 第 108 回日本繁殖生物学会, 宮崎・宮崎大学, 2015(9/17-9/20) 17 日
2. 檜垣彰吾, 藤東貴昭, 手島黎子, 島田愛美, 酒井則良, 高田達之: 琵琶湖固有種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) における全精巣ガラス化低温保存の試み: 第 108 回日本繁殖生物学会, 宮崎・宮崎大学, 2015(9/17-9/20) 17 日
3. Takaaki Todo, Shogo Higaki, Reiko Teshima, Ikuo Tooyama, Yasuhiro Fujioka, Noriyoshi Sakai, Tatsuyuki Takada: Flow Cytometric Analysis of Testicular Cells in Endangered Endemic Cyprinid Honmoroko (*Gnathopogon*

caerulescens):21st Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, Osaka, 2015(9/19-9/20) 19

9. 参考文献

- Harris CA, Santos EM, Janbakhsh A, Pottinger TG, Tyler CR, et al. 2001. Nonylphenol affects gonadotropin levels in the pituitary gland and plasma of female rainbow trout. *Environmental science & technology* 35 2909-2916
- Higaki S., Koyama Y., Shirai E., Yokota T., Fujioka Y., Sakai N., and Takada T. 2013a. Establishment of testicular and ovarian cell lines from Honmoroko (*Gnathopogon caerulescens*). *Fish Physiol. Biochem.* 39, 701-711
- Higaki S., Koyama, Y., Shimada, M., Ono, Y., Tooyama, I., Fujioka, Y., Sakai, N., Ikeuchi, T., Takada, T., 2013b. Response to fish specific reproductive hormones and endocrine disrupting chemicals of a Sertoli cell line expressing endogenous receptors from an endemic cyprinid *Gnathopogon caerulescens*. *General and comparative endocrinology*. 191, 65-73.
- Higaki S., Shimada M., Koyama Y., Fujioka Y., Sakai N., Takada T. 2015. Development and characterization of an embryonic cell line from endangered endemic cyprinid Honmoroko *Gnathopogon caerulescens* (Sauvage, 1883) *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 51, 763-768
- Inoue, K., Kondo, S., Yoshie, Y., Kato, K., Yoshimura, Y., Horie, M., Nakazawa, H., 2001. Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride food packaging films into food simulants and foods. *Food Additives & Contaminants*. 18, 157-164.
- Li, X., Ying, G.-G., Zhao, J.-L., Chen, Z.-F., Lai, H.-J., Su, H.-C., 2013. 4-Nonylphenol, bisphenol-A and triclosan levels in human urine of children and students in China, and the effects of drinking these bottled materials on the levels. *Environment international*. 52, 81-86.