

琵琶湖固有魚種ホンモロコの *in vitro* 精子分化系による化学物質の定量的影響解析方法の確立

立命館大学 薬学部 高田 達之

1. 背景

代表的な内分泌かく乱物質(EDCs)として知られているノニルフェノール(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、食品の包装をレンジで再加熱すること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)。NPは、化学的、物理的特性がエストロゲンと類似しており、エストロゲン受容体への結合能も有する為、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ことが懸念されている。これまでも、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、NPの生殖機能、特に生殖細胞分化に対する影響、およびそのメカニズムについては十分に解明されていない。

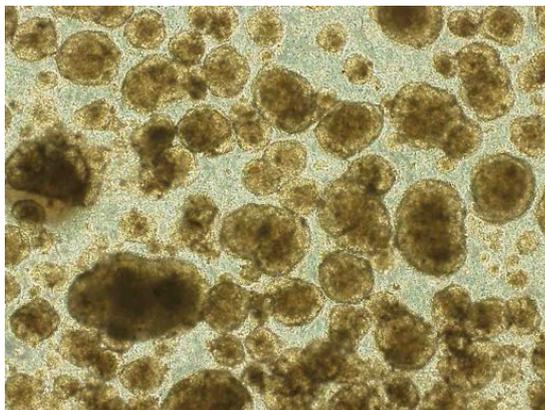
ホンモロコ(*Gnathopogon caerulescens*)はコイ科に属する代表的な小型の琵琶湖固有種であり、現在絶滅危惧IA類(ごく近い将来における野生での絶滅の危険性が極めて高いもの)に指定されている。近年、琵琶湖に生息する固有種においてもその生息数の減少が報告され、固有魚類15種中12種が絶滅危惧種、絶滅危機増大種、希少種に指定されている(滋賀県自然環境保全課, 2010)。この原因として、産卵期における琵琶湖の水位操作、護岸工事、内湖の埋め立てによる産卵場所の減少、外来魚の増加による生存競争の激化および化学物質の流入による繁殖能への影響が考えられている。

NPは、琵琶湖へ流入する河川中で~14 nMのオーダーで検出されていることから、当研究室ではNPをはじめとするEDCsが琵琶湖固有魚に与える影響を直接解析することを目的とし、代表的な琵琶湖固有魚であるホンモロコを材料として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, 2012, 2015)、精巣由来セルトリ細胞株を用いてNPが抗アンドロゲン効果を有することを見出している(Higaki S et al, 2013)。さらに独自に確立したホンモロコ *in vitro* 精子分化系(Higaki S et al, 2017)を用いて、化学物質のホンモロコ精子分化への影響とそのメカニズムを明らかにする研究を行っている。

しかし、ホンモロコは実験動物とは異なり、個体差が大きい為、従来の実験では安定した結果を得ることが困難であった。その要因の1つとして培養法が挙げられる。これまでの本研究室での培養法では、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い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1)。

再現性が高く、効率の良い精子分化培養系を確立することは、*in vitro* 培養により形成された精子の受精・発生能を調べるためにも、非常に重要である。

また、従来の解析系ではエタノール固定の直前に検鏡で細胞数を計測していたが、この方法では細胞とゴミの区別がつきにくく、測定者間による誤差が生じ、正確ではなかった。そこで、解析のサンプルにおける細胞数を正確に測定する為、Muse cell analyzer (Merck Millipore Corporation) を用いた実験系の構築を行った。



これまでの研究において、**図 1. ホンモロコ精巢の浮遊培養**で、精原細胞の割合が多い9月(非繁殖期)の精巢を用いて、全細胞に占める精子細胞および精子(1倍体細胞)の割合を解析した。その結果、接着培養により 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。また、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2、図3)。これらの実験結果から NP は少なくとも 10 nM 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)。

本研究では、1倍体(精子細胞、精子)の割合に加え、総細胞数、各分化段階における生殖細胞の割合、細胞数にも着目し、研究を行なった。

2. 目的

本研究では9月(非繁殖期)の精巢を用い、再現性の高い定量解析方法を確立し、NPが精子形成に与える影響を定量的に解析する為、琵琶湖固有魚種ホンモロコの *in vitro* 精子分化系を用い、その細胞培養、細胞回収、染色および解析方法に関し、至適化、精緻化を行う。

3. 実験計画

3.1 接着培養法を用いた精子分化過程の定量解析

化学物質の精子分化過程への影響解析を行い、最終的に受精・発生能を調べるためには、再現性が高く、効率の良い精子分化培養系が必須となる。その為、再現性の高い接着培養を用い、フローサイトメーター解析までの手順を極力簡素化することにより、形成された精子の回収率を上げるという改良を行い、高感度で精子形成の進行をモニターできる実験系を確立する。

3.2 簡易型フローサイトメーターを用いた影響解析の迅速、汎用化

高感度で精子形成の進行をモニターできる実験系を用いて、その解析に安価な簡易型フローサイトメーターを用い、何処でもでも誰でも容易に解析可能な実験系を確立する。

3.3 NPの総細胞数への影響（接着培養、浮遊培養）

NPによる総細胞数への影響を明らかにする為、1 nM、10 nM、1 μ M NPの存在下で *in vitro* 精子分化を接着培養、浮遊培養で行う。NPの影響は、セルアナライザーによる細胞濃度を用いて総細胞数を算出し評価する。

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。

3.4 NPが分化段階の生殖細胞数に与える影響（接着培養、浮遊培養）

NPが各分化段階における生殖細胞数に与える影響を明らかにする為、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1倍体（精子細胞・精子）、精原細胞、精母細胞、体細胞の割合を求め、総細胞数を用いてそれぞれの細胞数を算出し行う。

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。

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、到着翌日に安楽殺を行った。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 4A)、精巣を無菌的に摘出した(図 4B)。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。

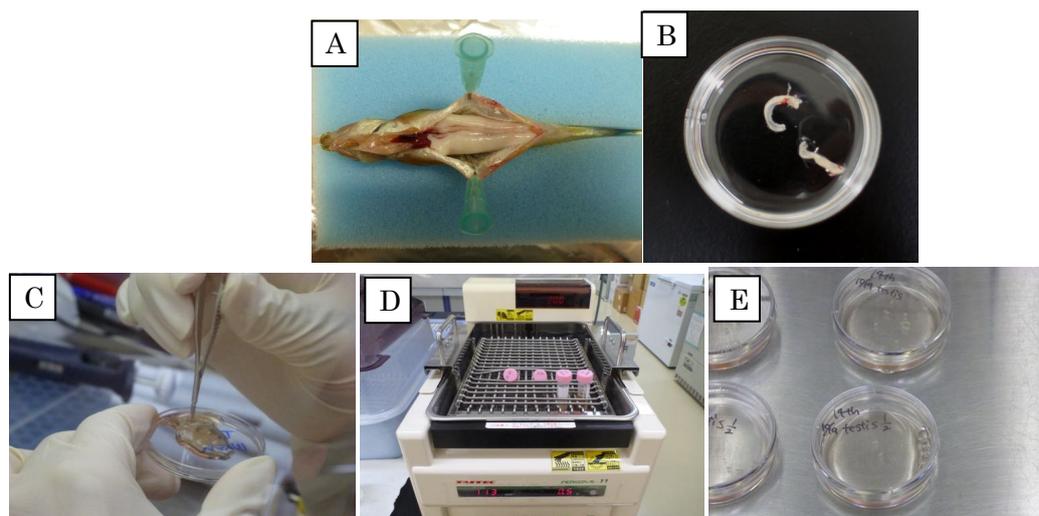


図 4. ホンモロコの精巢の採材

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細切し (図 4C)、28°C で 2 時間振盪した (図 4D)。また、振盪中は 20 分毎にピペティングを行い、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、40 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分離 (120g, 7 分間) 後、1tubeあたりモロコ精巢2匹と霊長類細胞凍結保存液 (ReproCell) 200 μ l と共に液体窒素で急速に冷却し、保存した。

その後、37°C に温めた 10% FCS / L-15 10 ml で融解、洗浄を行った後、35 mm ディッシュ (又は 24 well) に精巢細胞用培養液を用いて細胞を播種し、18°C、大気下でインキュベートした (図 4E)。

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 CaCl₂ (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, CCB) 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)、コイ胚抽出物 (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 CaCl₂, 50 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 μm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 μmフィルターを用いて濾過滅菌して使用した。

上記の培養液を4日に 1 度交換、16日目の交換以降は5日間観察のみを行い、21日目に培養精巣細胞を0.125%トリプシン/2.65 mM EDTA処理により単離し、遠心分離(800g, 5 分間, ブレーキoff)しペレットを回収した後、D-PBS(-)で洗浄し、氷冷70%エタノールを用いて固定した。また、上清は遠心分離(2000g, 5分間, ブレーキoff)した後、氷冷70%エタノールを用いて固定した。

4.3 化学物質の処理

培養開始時よりNPを1 nM、10 nM、1 μMの濃度で細胞に曝露した。また、コントロールとして0.1%DMSOを用いた。培養液交換の際も、新たに同じ濃度の化学物質を加えた培養液を使用した。

4.4 精巣細胞の解析

氷冷 70%エタノール固定した精巣細胞の一部を 0.1% BSA/D-PBS(-)で洗浄し、4% NGS/D-PBS(-)を用い、30 分間室温でブロッキングを行った。ブロッキング後に 1 次抗体 (anti-rabbit Vasa homolog 1 : 100 希釈、GeneTex) を室温で 1 時間反応させた。次に 0.1% BSA/D-PBS(-)で洗浄後、2 次抗体 (Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG(H+L)、1:500 希釈、Life technologies) を遮光・室温で 45 分間反応させた。2 次抗体反応後に 0.1%BSA/D-PBS(-)で洗浄し、RNase (100 mg/ml:final conc 0.2 mg/ml、Nacalaitesque) 0.4 μl とプロピジウムイオダイド(PI : 1 mg/ml:final conc 20 μg/ml、Wako Pure chemistry industry) 4 μl を添加し、遮光・室温で 30 分間反応させた。染色後の細胞塊を取り除くために 40 μm ナイロンメッシュを通し、ラウンドチューブ (BD Falcon) に移し、1% BSA/D-PBS(-)で細胞懸濁液の量を調整した。

その後、簡易型フローサイトメーター Muse cell analyzer(Merck Millipore Corporation)を用いて細胞濃度を測定し総細胞数を算出した。細胞集団にゲートをかけノイズを除去し、ゲート内の細胞の測定個数を設定し、その測定に必要なとなった細胞懸濁液量から細胞濃度を測定した。細胞濃度測定に使用した 70%エタノール固定サンプル量から 1 dish に存在する全細胞数を算出した。なお、この測定は PI 染色のみを行った。

また、FACS calibur HG フローサイトメーター(Becton, Dickinson and Company)を用いて、PI 染色強度より 1 倍体(精子細胞、精子)、抗 Vasa 免疫染色強度より精原細胞、精母細胞、体細胞の細胞集団にゲートをかけ、それらの割合を求め、Muse cell analyzer により算出した総細胞数からそれぞれの細胞数を算出した。

なお、フローサイトメトリーによる解析は、当研究室において確立されたVasa+PI染色による精原細胞、精母細胞、1倍体(精子細胞、精子)、体細胞の集団のゲートを基準とし、状況に応じてゲートを調整した。

5. 結果

5.1 接着培養法を用いた精子分化過程の定量解析

フローサイトメーター解析までの手順を極力簡素化する為、様々な検討を行った。まず、チューブへの精子の吸着が考えられた為、染色に用いるチューブの検討を行った。また、ゴミを減らし、かつ精子の回収率を上げる為、フィルトレーションの有無、フィルトレーションに用いるメッシュ、遠心の回転数、遠心後の上清の残量、細胞懸濁液を入れていたチューブとメッシュの1% BSA in PBSでの洗い方の検討を行った。その結果、ゴミを極力減らし、形成された精子の回収率を上げる改良を行うことが出来た。(図5)

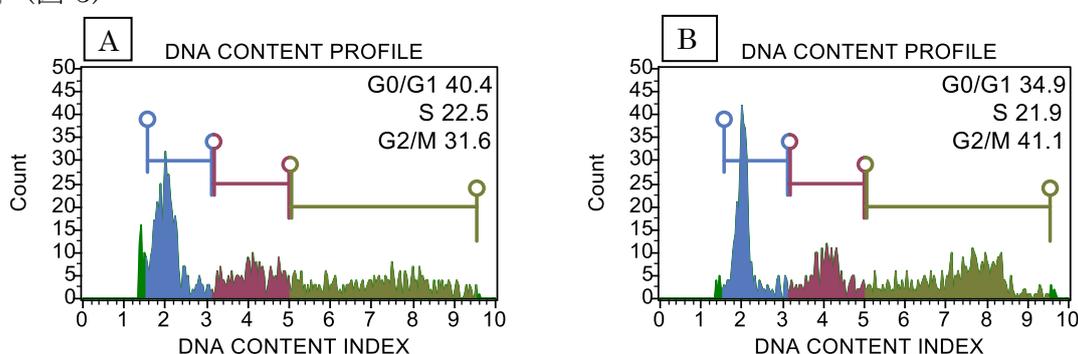


図5. 染色検討の結果(簡易型フローサイトメーター)
(A:検討前 B:検討後)

5.2 簡易型フローサイトメーターを用いた影響解析の迅速、汎用化

形成された精子の回収率を上げる改良を行った染色法で培養細胞を染色し、簡易型フローサイトメーターMuse cell analyzerで解析を行った。その結果、1 dishに存在する全細胞数を算出することが可能となった。また、FACS calibur HG フローサイトメーターと同様、1倍体の細胞集団を確認することが出来、1倍体の割合を算出することが可能となった(図6)。

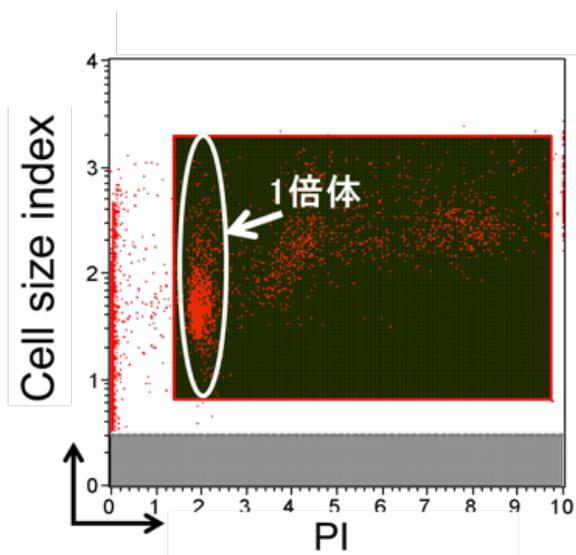


図 6. 簡易型フローサイトメーター解析
横軸:PI 染色強度、縦軸:Cell size index、細胞集団にゲートをかけ、ノイズを除去した

5.3 NP が総細胞数に与える影響

9月の精巢を用いた接着培養において、NP 添加群では対照群に比べ総細胞数が減少するという結果が得られた(図 7)。特に今回調べた最低濃度の NP(1 nM)においても、総細胞数の減少が認められた。(図 7)。また、浮遊培養においても同様の傾向が認められた(図 8)。

5.4 NP が分化段階の生殖細胞数に与える影響

核染色、Vasa 染色の結果、NP が各分化段階の生殖細胞の割合に与える影響は接着培養、浮遊培養で異なり、接着培養では変化しないが(図 9)、浮遊培養では精母細胞が増加、1 倍体が減少する傾向が認められた(図 10)。各分化段階の生殖細胞数を比較すると NP により 1 倍体(精子細胞、精子)の細胞数が減少していることが明らかとなった(図 11, 12)。その傾向は接着培養より浮遊培養において顕著であり、浮遊培養では 1 倍体の細胞数が NP の濃度依存的に減少することが示唆された。

また、対照群と各 NP 添加群の総細胞数の差に占める割合の多くは 1 倍体であった

6. 考察と今後の課題

本研究では、サンプル調整からエタノール固定や染色段階での精子の回収(使用チューブ、遠心方法、フィルトレーションなど)および Muse cell analyzer による細胞数の測定、FACS calibur HG フローサイトメーターによる各分化過程における細胞集団のゲーティングの至適化を行い、再現性の高い解析方法が確立出来た。さらに、浮遊培養を 24 well で行う実験系を確立することにより、従来の 35 mm dish での培養と比

較し、使用細胞数を 1/4 に減少させることが可能となった。

一方で今回、細胞数と各分化過程における細胞の割合の算出を同一試料で測定していない。エタノール固定した試料から測定のため一定量をサンプリングする際に、誤差が生じる為、今後は Muse cell analyzer での細胞数の測定に Vasa+PI 染色したサンプルを用いれば各分化過程における細胞数のより正確な解析が行うことが出来ると考える。

本解析法を用いて接着培養と浮遊培養を比較すると、浮遊培養の方がデータの変動が小さく、3次元での精子形成という観点から *in vivo* に近い条件である為、本解析に適していると考えられた。

浮遊培養の結果から NP は総細胞数を減少させるが、精原細胞、精母細胞の細胞数には大きな影響を与えず、1倍体(精子細胞、精子)の細胞数を減少させていることが明らかになった。このことから、NP は精母細胞までの分化過程および第 1 減数分裂には影響せず、第 2 減数分裂以降に影響すると考えられた。すなわち、精母細胞から精子細胞への分化過程を抑制するか、その過程もしくは精子細胞から精子への分化過程においてアポトーシスを誘導する可能性が考えられる。

本研究では第 2 減数分裂以降に影響していることを解明したが、具体的にどの過程において影響しているか、その詳細は今後明らかにする必要がある。最終的には精子数、および精子の受精・発生能への影響を解析する必要があると考える。

また、本研究以前は 1倍体の割合に着目し、NP の影響を解析していたが、本研究において NP は 1倍体の割合よりも総細胞数に影響することが示された。精巣中に存在する生殖細胞は季節により大きく異なるため、今後様々な時期の精巣を用いることにより、季節の違いのみならず上に述べた NP の影響する分化段階に関する知見も得られると考えられる。

本研究により琵琶湖流入河川中で検出されている濃度域(～14 nM)以下の NP 濃度(1 nM)において総細胞数、特に 1倍体(精子細胞、精子)の細胞数が減少したことから、環境中の NP が琵琶湖に生息するホンモロコの精子形成に影響している可能性が示唆された。

以上、本研究により、環境中の化学物質が固有種の精子分化に与える影響を直接かつ定量的に評価出来る実験系を確立することができた。本解析法は、固有種保存、生態系や環境への影響解析に有用であると考えられる。

7. 謝辞

本研究は、平成 28 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

9. 参考文献

- 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.
- 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. 2013. 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., 2013a. 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
- Higaki S., Shimada M., Kawamoto K., Todo T., Kawasaki T., Tooyama I., Fujioka Y., Sakai N., Takada T. *In vitro* differentiation of fertile sperm from cryopreserved spermatogonia of the endangered endemic cyprinid honmoroko (*Gnathopogon caerulescens*) *Sci Rep.* 2017 Feb 17; 7, 42852, doi:10.1038/srep42852