

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510082

研究課題名(和文)ラット尿道下裂形成における内分泌学的研究

研究課題名(英文)Endocrine back ground on flutamide-induced hypospadias in rats

研究代表者

太田 康彦(Ohta, YASUHIKO)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：60069078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗アンドロゲン剤のフルタミドによる尿道下裂ラットモデルを作製し、胎生期および出生後における外性器発達を追究した。尿道下裂は出生日には生じておらず、その形成は40日齢以降で、生後10日齢の去勢により抑制された。去勢後のテストステロン処理は外性器の雄化を引き起こし、尿道下裂を引き起こした。以上の結果からラットにおける妊娠中のフルタミド処理が胎生期の生殖突起の雌性化を誘導し、春期発動期以降に精巣から分泌される雄性ホルモンにより外部生殖器が雄化し、尿道下裂が生じることを示しており、ラットにおける妊娠中のフルタミド処理による尿道下裂発生に雄性ホルモンが重要な役割を持つことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Morphogenesis and endocrine back ground on flutamide-induced hypospadias were examined in male rats. Measurement of a major component of phallus revealed that males given flutamide mimicked a female type during fetal development, and showed no sign of hypospadias on the day of birth. Hypospadias was evident after 40 days of age. These abnormal developments were elicited in neonates, indicating that flutamide exposure in utero induces malformation of male type reproductive tract in addition to hypospadias in later ages. When the flutamide-treated rats were castrated on 10 days, hypospadias was no longer evident in adulthood, bearing female type of the genitalia. Those given testosterone after the castration exhibited hypospadias. Serum level of testosterone was not different between the flutamide-treated and control males. The present study reveals that androgen titer from testes after puberty play an important role on induction of hypospadias in male rats given flutamide in utero.

研究分野：実験形態学

キーワード：尿道下裂 内分泌かく乱 アンチアンドロゲン フルタミド 生殖器異常 ラット

1. 研究開始当初の背景

内分泌かく乱物質の多くは、女性ホルモン作用あるいは女性ホルモン作用を阻害する化学物質である。男性ホルモン作用を有する内分泌かく乱物質の報告は少ない。例えば製紙工場からの廃液や、牛の肥育を目的で用いられた合成アンドロゲンのトレンボロンは肉用牛肥育場からの排出液に含まれ、メスの魚類に雄性化や性転換を生じさせる。一方で、農薬として用いられるピンクロゾリンやリヌロンなどは、アンドロゲンと拮抗する内分泌かく乱物質として知られている。(Hotchkiss et al., 2003)。フルタミドは、ヒトにおいてアンドロゲン依存性の前立腺癌の治療に用いられる強力な非ステロイド系のアンドロゲン受容体拮抗物質として知られており、環境中への流失は報告されていないが、ラットにおいて妊娠後期の暴露はアンドロゲン依存性の生殖輸管系の発生をかく乱するため、オスの生殖輸管系の研究手段として有効とされている。

外生殖器形成異常は、ヒトにおいて比較的頻度が高く、中でも尿道下裂は頻度の高い先天性形態形成異常として知られ、症状の軽微なものを含めると、男児の 1/125 程度にも達するといわれている (Paulozzi et al., 1999)。ヨーロッパおよび米国においては、過去 30 年間に説明できない出現頻度増が生じていると報告されている。尿道下裂は尿生殖ヒダの不完全な癒合で、その原因は妊娠初期のオスの性分化期間におけるアンドロゲンの生成・作用(受容体機能異常)不全と考えられ、要因として内分泌かく乱物質と関与が示唆されている。フルタミドは、投与量、投与期間に依存して雄性外部生殖の雌性化および尿道下裂を引き起こすことが報告され、ヒトにおける尿道下裂解析のモデル実験として利用価値が高いと考えられている。

2. 研究の目的

ヒトにおける尿道下裂は内分泌かく乱物質との相関が高いとされているが、その明確な証拠はない。その意味で抗アンドロゲン剤フルタミドは、尿道下裂の原因と目されているアンドロゲン効果の低下を実験的に作り出すことが出来る上、類似の尿道下裂を高頻度に作質することが可能である。今回の申請は、用いる実験系の胎生期のフルタミド投与と実際に尿道下裂の生じる時期のズレを利用して、従来注目されなかった内分泌環境を考慮して、新生時期以降の尿道下裂形成機構を中心に形態学的手法による実験内分泌学的な実験を行い、尿道下裂の解析のみならず、正常外生殖器の分化・発達の知見を得ることを目的にしている。

3. 研究の方法

本研究に使用した尿道下裂モデルラットは全て次の様に作製した。妊娠 T 系雌ラット

にフルタミド(45mg/kgBW)を、妊娠 12 日齢から出生日前日(妊娠 21 日齢)まで連日、1 日 1 回経口投与した。対照群は溶媒のみとした。全ての実験は鳥取大学動物委員会の承認を受けた(承認番号:09-T-35、12-T-1)。

(1) フルタミドの胎仔外生殖器に及ぼす影響

妊娠 16、18、20 日齢および BD において、胎子および新生児の採材を行なった。組織はブアン氏液で固定後、定法に従いパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオシン(H-E)染色を行なった。生殖突起は連続パラフィン切片とした。組織切片を用いて外生殖器中の尿道形成予定部位、尿道幅、包皮形成開始点および幅、尿道開口部位、glans lamellae(GL)、終点部位および幅、泌尿生殖管部位、外生殖器基底部位および幅などの測定を行った。

(2) 出生後の尿道下裂形成と付属腺異常

出生日(0 日齢)、10 日齢、20 日齢、30 日齢、40 日齢、50 日齢および 60 日齢に生殖付属腺、精尿管、外生殖器を採材し、ブアン氏液で固定後定法により H-E 染色標本を作製した。

(3) 血中性ホルモン濃度の測定

妊娠中にフルタミド処理および対照群の 60 日齢雄ラットの心臓より 0.5ml の血液を採取して測定用の血清を得た。テストステロンとエストラジオール濃度はそれぞれ市販の ELISA キット(コスモバイオ、免疫研究所)により測定した。採血時に組織観察用の精巢を摘出・固定した。

(4) 尿道下裂形成における性ホルモンの役割

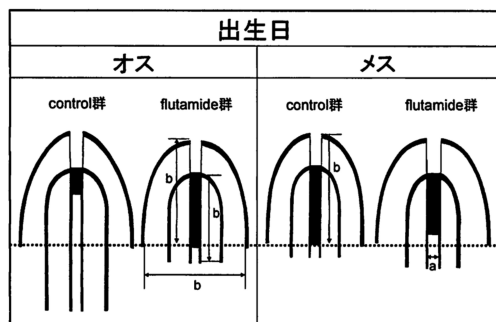
妊娠中にフルタミド処理および対照群の 60 日齢雄ラットの精巢を出生後 10 日齢除去した。去勢後の 20 日齢からプロピオン酸テストステロン(TP、50 μ g/100gBW)あるいは安息香酸エストラジオール(EB、1 μ g/100gBW)を 60 日齢まで 2 日に 1 回皮下投与した。去勢していないラットにも EB を同様に投与した。安楽殺後、外生殖器を含む生殖輸管系を摘出し、ブアン氏液あるいは緩衝ホルマリンで固定した。緩衝ホルマリン固定の組織は、アンドロゲン、エストロゲンおよびプロゲステロン受容体(AR、ER、PR)の免疫染色に供した。免疫染色は、抗アンドロゲン、抗エストロゲンおよび抗プロゲステロン抗体を使用して ABC 法により可視化した。

4. 研究成果

(1) フルタミドの胎仔外生殖器に及ぼす影響

妊娠 16 日齢には生殖突起を明瞭に観察できた。組織構成は、対照群と処理群との間で類似していた。亀頭が確認でき、その中に尿道形成予定領域である細胞の膨隆が見られた。尿道形成予定領域は次第に大きくなり、その中に管腔が形成されるようになる。管腔は徐々に大きさを増し、生殖突起腹側とつなが

り亀裂が生じていた。腹側の亀裂が融合し尿道が完成した。生殖突起の長さには変化が見られ、対照群雄ラットよりも、フルタミド処理雄ラットおよびメスラットの方が大きい傾向にあった。この段階の胚での包皮形成は、どのラットでも観察されなかった。妊娠 18 日齢では、組織構成がどの群も似通っており大きな変化はなかった。亀頭の両側に包皮が確認でき、この包皮は亀頭を包み込み包皮腺が形成された。腹側の亀裂の長さは群により異なるが、対照群雄ラットの最短であった。包皮は陰茎の末端まで取り囲むのではなく未形成状態であった。妊娠日 20 日齢では対照群ラット、フルタミド処理群ラット共に包皮は陰茎の末端まで完全に取り囲んでいるために、組織構成は 18 日齢までとは大きく変化していた包皮が亀頭部の基部より先端まで完全に覆っていた。亀頭の先端には尿道板が残って基部に向かって尿道管腔を形成した。GL は亀頭部全周に認められた。泌尿生殖管の幅は、フルタミド処理群で長く、腹側の亀裂のも大であった。フルタミド処理を行うことで、亀頭の発達が悪くなる傾向がみられた。出生日では陰茎の包皮が亀頭部の先端で開いており、副側部には尿道口が開いていた。雌の尿道口は雄より広く、陰核基部まで達していた。フルタミド群の陰茎は、対照群雌の陰核と極めて類似していた。尿道口は陰茎基部に達していた。妊娠中のフルタミド処理は、胎仔および新生時期において尿道下裂ではなく、外性器の雌化を誘導した。



第 1 図 出生日における外性器の比較図

フルタミドを投与された雄の陰茎は、対照群雌の陰核と同様な構造であった。黒塗りは尿道口を示す。a: $p < 0.05$ vs 対照群雌、b: $p < 0.05$ vs 対照群雄

(2) 出生後の尿道下裂形成と付属腺異常の観察

尿道下裂の形成と陰茎構造の形成不全
フルタミド群の肉眼所見では、出生日のオスの外性器の形態はメスと同様であり、尿道下裂というよりはむしろメス化した状態といえる。生後 10 日齢から生後 60 日齢までのフルタミド処理群においても、対照群と比較して外性器の発達が悪く、外観は雌と同様かやや発達している程度であった。同処理群の 60 日齢では、1 例で包皮裂を形成していたが、

そのほかの個体においては、肉眼的観察では明らかな異常を確認できなかった。

一方、組織学的な検索では、出生日を含め観察したすべてのフルタミド群の日齢において陰茎亀頭腹側の形成不全が観察され、40 日齢以降では尿道下裂が確認された。尿道の構造に着目すると、20 日齢の対照群では、包皮からつながる管腔がそのまま尿道に接続していた。その周囲に亀頭部が形成され、陰茎構造を包み込んでいた。同日齢のフルタミド群では、亀頭部の形成が背部に留まり、腹側まで形成されなかった。しかしこの時期では陰茎と包皮が一体化しているため、亀頭腹側の形成不全を伴っていても、尿道は対照群と類似した管腔を形成していた。対照群 40 日齢では、尿生殖ヒダが腹側で癒合することによって亀頭部で尿道が形成されていることが組織上で確認された。先端部では陰茎亀頭には間隙があり、これは尿道形成部位よりも下部で消失した。同日齢のフルタミド群では、対照群と同部位で尿生殖ヒダが閉鎖せず、陰茎基部において包皮と癒合することによって尿道と類似の管腔が形成されていた。尿生殖ヒダが包皮と癒合していない部分では、陰茎 亀頭の間隙に尿道が開いたままの状態であった（尿道下裂）。対照群 50 日齢以降では、亀頭部と包皮の分離が完了していた。フルタミド投与群では 40 日齢と同様に、陰茎-亀頭部全周にわたって断続的な下裂が形成されていた。また、陰茎骨（軟骨）は、正常であれば 10 日齢ですでに形成が開始されているが、処理群では同日齢の対照群と比較して発達が弱く、成熟個体（60 日齢）においても低形成を示していた。

副生殖腺・生殖管系の形成異常

フルタミド処理群では、前立腺や精囊腺等の副生殖腺、精巢上部等の生殖管系にも異常が認められた。前立腺は 60 日齢においても未発達であった。一方、精囊腺は対照群同様に発達していた。しかし、精囊腺の導管は精管と合一するが、尿道に開口せず、精尿管の形成不全となった。精巢上部は、10 日齢までは対照群とほぼ同様に形成されていたが、20 日齢以降で部分的形成不全を生じ、特に 30 日齢以降では上部、体部、尾部の欠如や低形成を示していた。脂肪組織と区別がつかず、存在の確認ができない個体もあった。

精管の形成異常

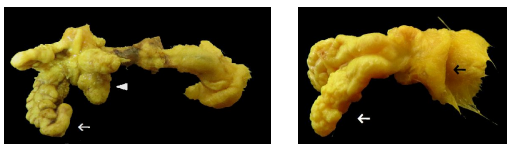
フルタミド処理を行った個体では、精管が膀胱下で尿道に開口せず、尿道腹側を併走した後、腔様嚢胞に接続した。これは出生日から 60 日齢まですべての日齢において観察された。0 日齢（出生日）の組織像では精管上皮と腔様嚢胞上皮の基底膜が一致していた。20 日齢の個体で腔様嚢胞内にアポトーシス生殖細胞や精囊腺由来の分泌物と思われる内容物が見られ、この時期に精管が腔様嚢胞に開口していることが確認された。また、左右精管の片側、両側に部分的な形成不全を生じているものや、組織学的検索でのみ精管と

思われる構造が確認できるものもあった。

腔様嚢胞の形成

観察したすべてのフルタミド処理群で、腔様嚢胞の形成が確認された。腔様嚢胞は外観が雌の腔と類似しており、壁は重層扁平上皮で構成されていた。出生日では、腔様嚢胞の前段階と思われる腺形成が認められた。この腺上皮基底膜は尿道上皮基底膜と連続していた。10日齢、20日齢でも尿道の腹側に嚢胞が形成されており、40日齢で陰茎腹側基部に開口した。この構造は生後50日齢以降でも観察でき、生後60日齢では腔様嚢胞開口部から精嚢腺由来の分泌物の排出がみられた。

本研究では、尿道下裂の形成時期が春期発動期以降であること明確になった。尿生殖洞の分化に雄生ホルモンが深く関与していることを示唆した。

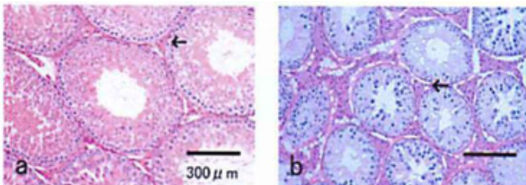


第2図 生殖付属腺の異常

a は対照群の肉眼像、b はフルタミド群の肉眼像（ともにブアン固定済）を示す。黒矢印は腔様嚢胞を、白矢印は精嚢腺を、白矢頭は前立腺を示す。a では精嚢腺、前立腺の発達認められる。b では前立腺未発達で、精嚢腺導管が腔様嚢胞付近まで形成されている。

(3) 血中性ホルモン濃度の測定

フルタミド処理群は片側あるいは両側性の停留を示し、それらの重量は著しく減少していた。停留側の精巣の生殖上皮は退化的で精細胞を欠落していた。しかし、ライディヒ細胞には対照群と差異が認められなかった。血中のテストステロン濃度は、フルタミド処理群と対照群の間に差異が認められなかった (0.45 ± 0.13 vs 0.57 ± 0.17 ng/ml)。一方、エストラジオールは、フルタミド処理群で有意に減少していた。 (1.39 ± 0.55 vs 7.77 ± 3.03 pg/ml)。血中のテストステロン濃度は、貯精嚢の大きさと同様と一致していた。



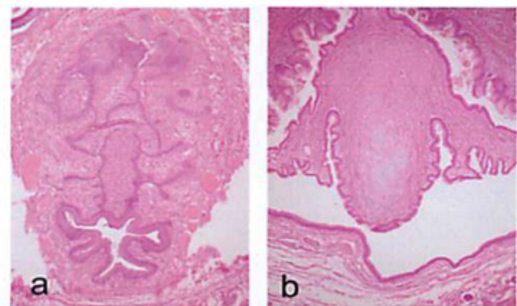
第3図 精巣の組織構造

a は対照群の精巣組織、b はフルタミド群の精巣組織（停留）を示す。矢印はライディヒ細胞を示す。ライディヒ細胞に明確な違いは確認できない。

(4) 尿道下裂形成における性ホルモンの役割

尿道下裂形成における性ホルモン投与の影響

去勢フルタミド処理群の外部生殖器は、正常雌ラットと非常に類似しており、生殖突起は陰核に近く、腔様の開口部が認められた。亀頭形成は極めて弱く、包皮分離も不完全であった。尿道下裂は生じておらず、組織切片からも雌の陰核に酷似した構造となっていた。陰茎骨の形成は認められた。TP投与により外部生殖器は明確なペニス構造となり、亀頭が形成され、包皮分離が起こった。尿道は亀頭部で下裂し、基部に向かって包皮の上皮と融合して管状を呈した。フルタミド処理のみの成体群と類似していた。腔様嚢胞上皮に対する影響は殆ど認められなかった。EB投与は、外部生殖器の構造に著しい影響を持たず、陰核構造のままであった。腔様嚢胞上皮の増殖・角質化が誘導された。非去勢フルタミド処理群へのEB投与は、外部生殖器の雌化を誘導した。亀頭形成や包皮分離を阻害し、尿道下裂の発生を抑制した。腔様嚢胞の上皮は増殖・角質化を示した。フルタミド処理群への去勢は、精嚢腺、前立腺上皮の退縮を起こした。この退縮は、TP投与により回復した。精子の排出経路は断続的で、輸精管は尿道と精尿管を形成していなかった。輸精管は前立腺と融合後、最終的に著精嚢と導管を形成した。この導管は陰茎近くまで下降して、腔様嚢胞と融合するか、その付近で開口することなく消失した。これらの輸管系は性ホルモン処理により大きく影響を受けなかった。

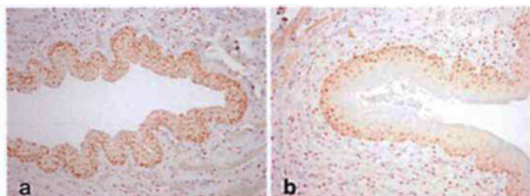


第4図 フルタミド処理後去勢された成体雄の亀頭部先端付近(a)とTP投与を受けたフルタミド処理成体雄の亀頭部(b)の組織像。Bは明らかな尿道下裂を示す。

付属生殖器官における性ホルモンの発現

フルタミド処理正常および去勢60日齢ラットにおける尿道、精嚢腺導管および腔様嚢胞上皮細胞の雄生ホルモン、発情ホルモンならびに黄体ホルモン受容体 (AR, ER, PR) の発現を免疫染色で検索した。ERは何れの上皮細胞で弱い陽性を示し、PRは陰性であった。ARは全ての上皮細胞で強い陽性を示した。10日齢の去勢により、AR発現が著しく減少した。フルタミド投与去勢ラットへのTP処理は、各受容体発現にほとんど影響を与えなかった。一方、EB処理は各上皮細胞のAR発現を

低下させたが、PR 発現発現を誘導できなかった（間質細胞へは誘導した）。フルタミド処理正常ラットへの EB 処理は、膀胱嚢胞上皮細胞にのみ PR を誘導した。



第5図 AR と PR の免疫染色像

a はフルタミド処理成体雄の AR 局在、b は EB 投与を受けたフルタミド処理成体雄の膀胱嚢胞における PR 局在を示す。

本研究では、胎生期から新生時期までフルタミドによる尿道下裂は生じなかった。尿道の異常は春期発動期以降の 40 日齢で発現し、60 日齢では明確な尿道下裂が包皮下裂を伴って生じた。10 日齢に両精巣を除去したフルタミド処理個体は、成熟後も尿道下裂を示さず、外生殖器は雌に類似した組織形態を示した。血中の性ホルモン（アンドロゲン、エストロゲン）の計測により、停留精巣を伴った尿道下裂個体と対照群との間にアンドロゲン濃度の有意差が生じていなかったため、尿道下裂誘発にアンドロゲンの関与が示唆された。生後 10 日齢の去勢後投与したテストステロンは、フルタミド処理群の亀頭発達を誘導し尿道下裂を引き起こした。去勢を行わずエストロゲン投与を受けたフルタミド処理群は、組織学的にも雌様の外生殖器を示し、尿道下裂は認められなかった。以上の結果から妊娠中のフルタミド処理が尿道ならびに外部生殖器の雌性化を誘導し、出生以降に精巣から分泌される雄性ホルモンにより外部生殖器が雄化し、尿道下裂が生じることを示しており、ラットにおける妊娠中のフルタミド処理による尿道下裂発生に雄性ホルモンが重要な役割を持つことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Miyagawa, S., Lange, A., Hirakawa, I., Tohyama, S., Ogino, Y., Nizutani, T., Kagami, Y., Kusano, T., Ihara, M., Tanaka, H., Tatarazako, N., Ohta, Y., Katsu, Y., Tylar., C.R. and Iguchi, T. Differing species responsiveness of estrogenic contaminants in fish is conferred by the ligand binding domain of the estrogen receptor. Environ. Sci. Tech., 48:5254-5263, 2014. 査読有 DOI:10.1021/es5002659

Horiguchi, T., Ohta, Y., Hamada, F., Urushitani, H., Cho, H-S. and Shiraiishi,

H. Development of reproductive organs in the ivory shell *Babylonia japonica*: Observations from wild populations and laboratory-reared juveniles. Marine Environ. Res., 93:4-14, 2014. 査読有 DOI:10.1016/j.marenvres.2013.07.003

Oka T., Mitsui-Watanabe, N., Tatarazako, N., Onishi, Y., Katsu, Y., Miyagawa, S., Ogino, Y., Yatsu, R., Kohno, S., Takase, M., Kawashima, Y., Ohta, Y., Aoki, Y., Guillette, L. J. Jr., and Iguchi, T. Establishment of transactivation assay systems using fish, amphibian, reptilian and human thyroid hormone receptors. J Appl. Toxicol., 33:991-1000, 2013. 査読有 DOI:10.1002/jat.2825

Yasunga, Y., Takeuchi, T., Shimokawa, T., Asano, A., Nabeta, M. and Ohta, Y.

Sugar expression in the mucosae of the canine uterus and vagina during the oestrous cycle and with pyometra. Vet. J., 196:116-118, 2013. 査読有 DOI:10.1016/j.tvjl.2112.08.008

Nakamura, T., Miyagawa, S., Katsu, Y., Watanabe, H., Mizutani, T., Sato, T., Morohashi, K-I., Takeuchi, T., Iguchi, T. and Ohta, Y. Wnt family genes and their modulation in the ovary-independent and persistent vaginal epithelial cell proliferation and keratinization induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice. Toxicology, 296:13-19, 2012. 査読有 DOI:10.1016/j.tox.2012.02.010

〔学会発表〕(計 4 件)

Ohta, Y., Miyagawa, S. and Iguchi, T. Malformation of reproductive tracts in male rats given flutamide in utero. SETAC Europe 2014, 2014 年 5 月 11 日, Basel (Switzerland)

太田康彦・村田清香・宮川信一・井口泰泉 妊娠中に投与したフルタミドの雄ラット生殖輸管系への影響, 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会, 2013 年 12 月 12 日, 東京大学山上会館 (東京都)

Ohta, Y., and Miyagawa, S. and Iguchi, T. External genitalia development in male and female rats given flutamide in utero. SETAC Europe 2013, 2013 年 5 月 12 日, Glasgow (United Kingdom)

村田清香・竹内崇師・太田康彦・平川育美・保永洋平・宮川信一・井口泰泉 妊娠中にフルタミドを投与した雄ラットの生殖器異常について, 環境ホルモン学会第 15 回研究発表会, 2012 年 12 月 18 日, 東京大学山上会館 (東京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 康彦 (OHTA, Yasuhiko)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：60069087

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

井口 泰泉 (IGUCHI, Taisen)

大学共同利用機関法人自然科学研究機

構・岡崎統合バイオサイエンスセンタ

ー・教授

研究者番号：90128588