

DES 投与 1 回の予備実験では雄マウスを用いたが、低用量 (3mg/kg) と高用量 (15mg/kg) のどちらの場合も、胸腺、脾臓の軽度の重量増加と T 細胞、B 細胞の軽度の増加が認められた。

本実験では若齢の雄と雌マウスを用い、低用量と高用量を 5 日間連続投与し、最終投与の 2 日後に屠殺し検索に用いた。この場合には胸腺の明瞭な萎縮とその逆に脾臓の肥大を認め、どちらもその程度は雌の方に顕著であった。脾臓で見ると T 細胞、B 細胞共に減少し、抗 S R B C 抗体産生能の低下が認められた。しかし、N K 細胞には明瞭な数の変化はなく、活性で見ると雄では寧ろ亢進する傾向が見られた。以下にこの本実験で得られたデータについて詳しく紹介する。

1) 体重と免疫系以外の臓器重量。

体重は DES 投与後軽度増加する傾向が雌雄共に認められ、低用量での増加は統計的にも有為さがあった。副腎の重量も DES 投与後軽度増加する傾向が雌雄共に認められ、雄ではその増加は統計的に有意差のある増加であった。雄の精巣の重さには大きな変化はなかったが、雌の卵巣の増加は統計的に有為な増加であった。しかし、投与量による差は認められなかった。腎臓の重量も軽度の増加傾向を示し、雌の低用量投与では有意な増加であった。肝臓の重量も DES 投与後、雌雄共に有為に増加した。雌ではその増加は投与量に依存した増加であった。

また、雌において子宮の腫大が DES 投与群全例に認められた。

2) 胸腺と脾臓

DES 投与により胸腺の著しい萎縮が認められた。萎縮の程度はやや用量依存的であり、また、

雌の方に顕著であった。フローサイトメトリーで胸腺リンパ球の亜集団の変化を見ると、CD4+CD8+ (DP) 細胞に 85・65%の減少が認められ、その程度は雌の高用量で最も著明であった。それに反して、CD4-CD8- (DN) 細胞、CD4+と CD8+のシングルポジティブ細胞はいずれも比率において増加傾向を示した。

脾臓は胸腺とは逆に増加傾向を示し、その増加は雄では低用量で、雌では濃度依存的に有意な増加が認められた。

3) 脾臓における細胞亜集団

胸腺に萎縮が見られた如く、脾臓の T 細胞 (TCR $\alpha\beta$ 細胞) の減少が 66・81%の程度で DES 投与後に見られ、減少の程度は雌においてより顕著であったが、投与量による差は見られなかった。T 細胞の亜集団である CD4+T 細胞も雌雄ともに低用量で有意に減少し、減少の程度は雌においてより顕著であった。また、雌では高用量でも有意な低下が認められたが、投与量による差は見られなかった。CD4+T 細胞の中のナイーブ T 細胞 (CD45^{high}CD44^{low}) とメモリー T 細胞 (CD45^{low}CD44^{high}) の亜集団では DES 投与後の変化が異なり、ナイーブ T 細胞は増加傾向を示すのに対して、メモリー T 細胞は減少傾向を示した。

雄においては B 細胞の減少も見られたが、雌では有意な減少は見られなかった。

4) 脾臓 T 細胞の増殖能

脾細胞をコンカナバリン A で刺激し、in vitro における T 細胞の増殖能を検索した。雄では低用量で、雌では用量依存的に DES による T 細胞増殖の抑制が認められた。

5) 脾臓における免疫機能

DES 投与中に抗原として羊赤血球 (SRBC) で刺激し、それに対する抗体産生能を見た。

その結果、高用量の投与により抗 SRBC 抗体産生能が、雌雄に関わりなく 1/3 から 1/2 に減少した。

また、YAC-1 細胞を用いて、非特異的な NK 活性を調べた。NK 活性は抗体産生とは異なり雌雄いずれの場合も増加傾向を示したが、その増加は統計的に有意なものではなかった。

D. 考察

DES の投与は 1 回投与では免疫系をやや亢進させる作用がある。しかし、5 日間連続投与すると免疫機能を抑制する作用が雌雄を問わず認められた。免疫系の中でも亜集団や機能により DES に対する感受性は異なる。例えば、抗体産生能は抑制されるが、NK 活性は寧ろ亢進する傾向が認められた。

今回は、若齢マウスを用いて、DES 投与後の急性期の影響を見たが、さらに慢性期の影響および老化マウスにおける影響などを見る必要があると考えられた。

E. 結論

Diethylstilbesterol (DES) 用いて、低用量 (3 mg/kg) と高用量 (15 mg/kg) を雄マウスの腹腔内に投与し、胸腺、脾臓の重量および T 細胞、B 細胞の数の変化を検討した。その結果、大きな変化をもたらすことはなかったが、胸腺、脾臓の軽度の重量増加と T 細胞、B 細胞の軽度の増加が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hirokawa K. Age-related changes of signal transduction of T cells. *Exp. Gerontol.*, 34:7-18
2. Wakikawa A, Utsuyama M, Wakabayashi A, Kitagawa M and Hirokawa K. Age-related alteration of cytokine production profile by T cell subsets in mice: A flow cytometric study. *Exp. Gerontol.* in press.
3. Iizuka J, Katagiri Y, Tada N, Murakami M, Okada T, Sato M, Hirokawa K, Okada S, Hatano M, Tokuhisa T and Uede T. Introduction of an osteopontin gene confers the increase in B1 cell population and the production of anti-DNA autoantibodies. *Lab. Invest.* 78:1523-1533, 1998.
4. Ishiyama N, Kitagawa M, Kina I and Hirokawa K. Expression of truncated form of VCAM-1 in thymocytes and its role during the process of apoptosis. *Pathobiol.* 66:274-283-1998
5. Hirokawa K: Immunity and Ageing. In: Principle and Practice of Geriatric Medicine. (Pathy M. S. J. ed.) John Wiley & Son UK 1998 pp. 35-47
6. Hirokawa K, Utsuyama M and Kobayashi S. Hypothalamic control of development and aging of the thymus. *Mech. Age. Dev.* 100: 177-185, 1998

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

マウス生殖腺の分化および精子、卵形成への内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究

分担研究者 井口 泰泉 横浜市立大学・理学部・機能科学科教授

研究要旨

妊娠 10 日目から 9 日間、2 μ g のジエチルstilbestロール(DES)および 3 mg のビスフェノール-A (BA) を母親マウスにそれぞれ投与し、妊娠 19 日目の胎仔生殖器官を組織学的に解析したところ、雌マウスでは子宮、膣の上皮の丈の高さが DES、BA 投与群ともに有意に増加し、細胞分裂率は BA 投与群のみ有意に増加していた。雄マウスでの DES 投与により、潜伏精巣が発生し、精巣も小さく単位面積当たりの精細管の数も有意に減少していることが見いだされたが、BA による変化は、認められなかった。

A. 研究目的

マウス雌性生殖器官である子宮及び膣は、成熟後、性周期に伴う卵巣からの周期的なエストロゲン（女性ホルモン）分泌に依存した増殖・退行を示す。マウスやラットの性周期はそれぞれ発情前期、発情期、発情後期及び発情間期の 4 期に分けられる。発情期のマウス子宮は全体的に膨潤し、上皮細胞の丈が高くなると同時に上皮組織の一部である子宮腺が発達する。膣もエストロゲンに反応して上皮細胞が増殖・多層化し、最上層は角質化する。発情間期では最上層の角質化はなくなり、5～7 層の上皮細胞となる。さらに、卵巣を摘出して体内にエストロゲンがない状態にすれば、膣上皮は 2～3 層の萎縮した立方上皮となる。すなわち、子宮及び膣の上皮組織はエストロゲンに対して可逆的な反応を示す。しかし、周生期にエストロゲンや、合成エストロゲンであるジエチルstilbestロール (DES) を投与されたマウスでは、視床下部、下垂体系の恒久的変化により無排卵になるとともに、膣上皮が恒久的に増殖、角質化する。さらに、成熟後に卵巣を摘出しても上皮細胞は退縮せずに増殖を続け、加齢に伴い前癌病変から腫瘍化へと進行する。周生期の性ホルモン投与によるこのような卵巣非依存の膣上皮の増殖を、正常マウスの可逆的な増殖に対して不可逆的増殖と呼ぶ。不可逆的増殖に関しては、これまでは主に形態学的な研究のみであり、その誘導機構につ

いての研究はほとんど行われていない。また、周生期のマウスへのエストロゲン投与は、生殖腺および生殖腺附属器官の腫瘍化、発生異常、ホルモンに対する反応異常のみならず、筋肉・骨の形成不全、免疫力の低下を引き起こすことも明らかとなっている。他にも子宮の hypoplasia や上皮の異形成、腫瘍化、輸卵管の癌化や多卵性卵胞の多発など、雄では精子形成の減少や前立腺、凝固腺、貯精囊の異常が引き起こされることなどが報告されている。このような周生期性ホルモン投与によるさまざまな異常には、成体での可逆的な反応と異なり、新生仔、胎仔期に限って不可逆的に反応する臨界期が存在する。出生前後のマウスはヒトの妊娠 3-4 カ月に相当するため、周生期のマウスへの性ホルモン処理は、ヒト胎児に対する性ホルモンの影響のモデルともなりうる。

一方、細胞は増殖・分化した後にやがて死滅（細胞死）していくことが知られている。細胞死には、ネクロシスとアポトーシスの 2 種類があり、前者は受動的・事故的な細胞死であり、後者は能動的・生理的な細胞死というように分類されている。アポトーシスには、DNA の断片化及び細胞内小器官を含む細胞片（アポトーシス小体）が生じること、最終的には周囲の細胞に貪食されること等の特徴が挙げられる。従って、これらの特徴を観察することによってネクロシスカアポトーシスカを判断することができる。また、アポト

ーシスのシグナルとなる因子は現在までにいくつか同定されており、Transforming growth factor- β (TGF- β)、Tumor necrosis factor- α (TNF- α)、Fas ligandなどが挙げられる。そこでまず、出生直後のDES処理による膈上皮の不可逆的増殖を、細胞増殖制御の異常、あるいは、細胞死の異常という2つの面から捉え、それぞれ正常マウスでの反応と比較することにより、その生化学的特徴を明らかにし、DESによる不可逆化誘導機構を解析することを試みた。

また、環境中に放出された化学物質のうち、体内に入ってホルモンの産生・分泌を乱したり、ホルモン受容体に結合してホルモン様作用を示したり、あるいはホルモンの作用を阻害したりして、個体の生殖・発生・成長に影響を及ぼす化学物質（外因性内分泌かく乱物質）の存在が近年問題となっている。とりわけ、内分泌かく乱物質の大半はエストロゲン様作用を持っており、これまでの研究結果から、ヒトを含めた動物の生殖への影響が懸念されている。したがって、内分泌かく乱化学物質の生物影響として最も危惧されている生殖への影響を、発生学的な観点から調べる必要がある。そこで、発生中のマウス胎子の生殖腺に対するエストロゲン、および内分泌かく乱化学物質の影響を調べ、成体での精子・卵形成を評価することを試みた。

B. 研究方法

1) 出生直後のDES処理マウスの膈における、卵巣摘出後の細胞増殖と細胞死の変動の解析

卵巣摘出後の細胞死関連因子 [Fas ligandなど] のmRNAの発現変化を、準定量化RT-PCR法を用いて検討した。

2) 胎仔期のDES投与により膈上皮の不可逆的増殖の検討

マウスの妊娠10日目から9日間、体重30 gあたり2 μ gのDESおよび3 μ gのBPAをそれぞれ投与し、妊娠19日目に帝王切開により胎仔を取り出して生殖器官を組織学的に解析した。さらに、これらのマウスを生育し、30日齢における多卵性卵胞の発生頻度を検討した。

C. 研究結果

1) 出生直後のDES処理マウスの膈における、卵巣摘出後の細胞増殖と細胞死の変動の解析

出生直後のDES処理群のマウスの膈では、卵巣の有無に関わらずDNA断片化が認められた。細胞分裂率及びアポトーシス細胞の割合には卵巣を摘出して変化がなく、また膈の間質細胞においては正常マウスの発情期よりも高頻度にアポトーシス細胞が出現していた。Fas ligand及びTNF- α のmRNA発現に変化はなかった。周生期DES処理群のマウスでは、卵巣を摘出して膈上皮細胞のアポトーシスが増加せず、また、細胞分裂率の低下も見られなかった。このエストロゲン非依存の細胞増殖には、正常マウスに比べてmRNAの発現が増加していたEGF及びTGF- α が関与していると考えられる。出生直後のDES処理によりエストロゲンレセプター(ER)の発現が誘導されることが明らかとなっているため、DESによって発現誘導されたERを介して、多量のシグナルが伝達されてEGF及びTGF- α が恒久的に発現し、エストロゲン非依存的に膈上皮細胞の増殖が引き起こされていると考えられる。

2) 胎仔期のDES投与により膈上皮の不可逆的増殖の検討

胎仔重量はDES投与により有意に減少し、BPA投与では対照群と差はなかった。雌マウスでは子宮、膈の上皮の丈の高さは対照群と差はなく、細胞分裂率は膈上皮においてBPA投与群では有意に増加し、DES投与群では有意に減少した。また、DES投与群の91%において子宮粘膜上皮の化生(metaplasia)が生じていた。30日齢における多卵性卵胞の発生頻度を調べたところ、対照群では10個体中2個体に見られたのに対し、DES投与群では9個体中5個体、BPA投与群では11個体中5個体で見られた。40日齢における膈上皮の層の数は、DES投与群では卵巣を摘出して対照群よりも有意に増加していたが、BPA投与群では有意な差はなかった。

このことから、胎仔期のDES投与により膈上皮の不可逆的増殖が誘導されるが、BPA投与では卵

巢依存の細胞増殖のみが誘導されていることが明らかとなった。しかし、母親マウスに重水素ラベルしたBPAを投与すると、少なくとも3時間後には胎仔組織へ移行していることが確認されたことから、胎盤を通してBPAが胎仔へ直接作用し、膈上皮の細胞分裂の促進、および多卵性卵胞の発生を引き起こしていると考えられる。

一方、雄マウスではDES投与により潜伏精巣が発生し、精巣も小さく単位面積当たりの精細管の数も有意に減少していた。また、生殖細胞数はBPA投与群で有意に減少しており、セルトリ細胞数はDES投与群で有意に減少していた。雌マウスの時と同様に、これらのマウスを生育し、60日齢における精子形成率を調べたところ、DES投与群のみ有意に減少していた。

D. 考察

エストロゲン非依存の細胞増殖には、正常マウスに比べてmRNAの発現が増加しており、EGF及びTGF- α が関与していると考えられる。出生直後のDES処理によりエストロゲンレセプター(ER)の発現が誘導されることが明らかとなっているため、DESによって発現誘導されたERを介して、多量のシグナルが伝達されてEGF及びTGF- α が恒久的に発現し、エストロゲン非依存的に膈上皮細胞の増殖が引き起こされていると考えられる。

以上の研究より、出生直後のDES投与による膈上皮の不可逆的増殖には、細胞死の制御機構の異常、および、細胞増殖の制御機構の異常、特に、EGF及びTGF- α の恒久的な高発現を伴っていることが示唆された。また、妊娠マウスへのBPA投与により、胎仔生殖器官においてDES投与群と類似の影響が見られることが明らかとなった。しかし、成熟後もこの影響が残るといえないいわゆる不可逆的な影響は、今回用いた濃度でのBPA投与では引き起こされなかった。

E. 結論

周生期DES処理群のマウスでは、卵巣を摘出しても膈上皮細胞のアポトーシスが增加せず、また、細胞分裂率の低下も見られなかった。

胎仔期のDES投与により膈上皮の不可逆的増殖が誘導されるが、BPA投与では卵巣依存の細胞増殖のみが誘導されていることが明らかとなった。胎仔期のDESおよびBPA投与は胎仔精巣に影響を及ぼすが、不可逆的な影響はDESのみであり、今回の濃度でのBPA投与では正常な精子形成が行われていることが明らかとなった。

F. 研究発表

論文発表

1. Hirabayashi, H., T. Sato, S. Kohno, M. Tanaka, S. Kobayashi, Y. Ohta and T. Iguchi: Apoptotic cell death in artificially induced deciduoma of pseudopregnant mice. *Anat. Rec.*, 254:205-213, 1999.
2. Fukazawa, Y., Y. Yamamura, T. Sato, T. Iguchi and Y. Ohta: Mode of cell death in the rat metrial gland during peripartum regression. *Anat. Rec.*, 252: 369-377, 1998.
3. Yoshimura, K., Y. Sakurai, D. Nishimura, Y. Tsuruo, M. Nomura, S. Kawato, C. Seiwa, T. Iguchi, K. Itoh and H. Asou: Monoclonal antibody 14F7, which recognizes a stage-specific immature oligodendrocyte surface molecule, inhibits oligodendrocyte differentiation mediated in co-culture with astrocytes. *J. Neurosci. Res.*, 54: 79-96, 1998.
4. Yamanaka, S., K. Arizono, Y. Matsuda, K. Soyano, H. Urushitani, T. Iguchi and R. Sakakibara: Development and application of an effective detection method for fish plasma vitellogenin induced by environmental estrogens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62: 1196-1200, 1998.

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

初期発育鶏卵に及ぼすエストロジェンの発生障害作用に関する研究

分担研究者 鈴木勝士 日本獣医畜産大学・獣医生理学教室 教授

研究要旨

微量の内分泌攪乱化学物質の発生過程に及ぼす影響を調べるため、初期発育鶏卵の卵黄内または卵白内にエストロジェンを投与し、鶏胚の胎軸決定、体節形成、神経管発生に注目し投与後 48 時間に対照胚と比較した。卵黄内投与により約 20%の胚で胚盤葉下層の消失、胚の管様構造への変形、重複胚奇形、神経管形成の異常が生じた。卵白内投与でも胚発生の遅延（体節数低下）などの軽度の影響があった。

A. 研究目的

初期発生過程では外来性異物（特に内分泌攪乱物質など）により未知のかく乱作用があり、これを一部で「ウインドウ効果」と称しているが、実体は不明である。発生初期過程での転写調節のかく乱による異常発生（遅発効果）がウインドウ効果であることを確認する必要がある。

初期発生（体軸決定）の遺伝的制御に関わる分子機序解明、特に、その時期に内在的には存在しないエストロジェンと、存在しているそのレセプターの関係、転写調節かく乱の後期発生への遅発効果などの新知見、野生鳥類の発生異常に関わる内分泌かく乱の機序に関わる作業仮説、新規のエストロジェン作用物質の検出系確立などが成果として期待される。

本研究では、初期発育鶏卵に極微量の

エストロンを投与し、胚盤葉下層の受容体の活性化と細胞死の誘導、発生かく乱の機序を解明する。

B. 研究方法

白色レグホン種の産卵後 24 時間以内の有精卵を（株）日本生物材料センターより購入した。有精卵を 1 回の実験で 10 個用い、孵卵器（ベビー孵卵器 A 型：昭和孵卵器製）内の所定の 10 カ所に置き、温度 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度 80%以上、1 時間に 1 回転卵の条件で 48 時間孵卵した。孵卵開始 48 時間後に鶏胚を摘出し 70%エタノールにて固定した。固定後常法により胚を実体顕微鏡下で鶏胚の形態学的観察および体節数を調べた。

硫酸エストロンを $0.1 \mu\text{gDMSO}/\text{ml}$ となるよう DMSO とともに滅菌生理食塩液に溶

解した。投与するエストロン溶液の濃度は0.01ng/g卵重となるように希釈調整した。対照には同用量のDMSO溶液のみを投与した。投与に際し、卵殻にドリルで直径1.5mmの小孔を開け、ハミルトンシリンジにて薬液を卵白内および卵黄内に投与した。投与後小孔をシリコンゴム (KE3475T:信越化学製) でシールし、孵卵器に収めた。本実験では卵白内投与群では対照43個、投与卵44個を用い、卵黄内投与群では対照57個、投与64個を用いた。統計検定には、体節数に関してはStudentのt検定、異常鶏胚の発生については χ^2 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意水準として対照群と比較した。

C. 研究結果

硫酸エストロン0.01ng/ μ l/gを鶏受精卵に、卵白内と卵黄内経路で投与し、48時間孵卵して鶏胚の発生状況につき対照と比較した。卵黄内投与により約20%の胚で胚盤葉下層の消失、胚の管様構造への変形、重複胚奇形、神経管形成の異常が生じた。卵白内投与でも胚発生の遅延(体節数低下)などの軽度の影響があった。

エストロン卵白内投与群では胚盤葉下層には影響は見られなかったが、エストロン卵黄内投与では胚盤葉下層の欠落が12例(18.8%)において生じた。12例中多くの場合に胚盤葉下層の欠落とともに胚自体も欠落し、透明無構造な孔が見られた。一部の例では胚盤葉下層欠落部に

白色のひも状の構造が見られた。体軸発生において頭部と尾部に発生の初期形態はあるが中央部に何らの構造も見られない事例があった。

鶏胚体節形成におよぼす影響については、エストロン卵白内投与群の体節数が 14.91 ± 4.58 と対照群に比較して有意に減少していた。エストロン卵白内投与群では、対照群に比べて有意な体節数の低下が観察され、体節数0のもの2例、5のもの1例が含まれており、対照群での最低体節数が8(1例のみ)であったこととは際だった対照をなしていた。同用量のエストロン卵黄内投与群では胚発生が進行していた場合には体節数は対照群に比較して減少傾向を示したが有意差は見られなかった。体節数が0のものは1例で確認された。

神経管におよぼす影響については、エストロン卵白内投与群での鶏胚を実体顕微鏡下で観察した結果、尾部神経管の変形が17例で確認された。それらの変形胚では神経管の肥厚ならびに屈曲が観察され、尾部の短縮も顕著であった。神経管の変形の頻度は、対照群0%に対してエストロジェン投与群で38.6%と有意に増加していた。一方、卵黄内投与群では65.4%に奇形胚が見られ、神経管の変形、神経管の開鎖不全、融合二重体、頭部の変形が見られた。対照群では軽度の神経管の変形が2個体(3.9%)見られた。

D. 考察

この実験は、当教室で実施発表してきている電磁場の鶏胚の発生におよぼす影響が、Zn-finger 蛋白などの金属蛋白の介在する遺伝子発現の転写過程に攪乱を生ずる結果であるとの推測に基づくものである。エストロゲンレセプターは Zn-finger 蛋白であり、その様な影響を仲介する候補分子として想定されたが、発生初期の鶏卵でエストロゲンレセプターが存在するか否かは報告がないため、まずエストロゲンに発育鶏卵が反応し、48 時間孵卵というような短時間の孵卵後に何らかの影響が認められるか否かを確認する必要があると考えた。予備実験の結果、胚盤葉下層の消失などの影響が観察されたため、より詳細に短時間処理での影響を調べる必要が生じた。

胚盤葉下層は固有胚体には分化せず、胚体外膜となることが知られている。また、古典的な発生学の実験で、胚盤葉下層の外科的摘出を行うと、胚は正常に発生せず中胚葉性の管様の構造となること、および、胚盤葉下層の軸をずらすことにより体軸の決定方向が変化することが示されている。これらの実験から、胚盤葉下層は初期胚の段階で胚の体軸決定に関与すると考えられている。今回見られた胚盤葉下層欠落例での管様の構造は、古典的な事例で見られた構造と極めて酷似している。エストロンの卵黄内投与により、エストロンは胚盤葉下層の細胞に卵黄の側から接近し胚盤葉下層を消失させた。その結果体軸決定が攪乱され、胚は

正常発生できず中胚葉性のひも状構造となったと考えられた。また、この結果は胚盤葉下層にエストロゲンレセプターが存在しており、そのレセプターがエストロンと結合して活性化されると胚盤葉下層が消失する、すなわち死亡してしまうことも示唆している。死亡した細胞の痕跡がないことから、この過程はかなり早く、恐らくアポトーシスであることを示唆している。この推測は卵白の側に投与されたエストロンの胚盤葉下層に対する作用が弱いことによっても裏付けられる。卵白の側からエストロンが胚盤葉に接近する際、その上面の胚体が障壁となり、作用が減弱された可能性がある。

今回の実験は、投与ルートにより、異常発生のパターンが若干異なることを示している。卵黄内投与の場合には胚盤葉下層に影響が強く現れ、胚盤葉下層の胎軸決定能力が消失もしくは物理的に分裂するために、二重体奇形が二次的に生じているが、エストロン卵白内投与群ではその様な影響は見られない。後者では体節数の減少という形で影響が見られるが、これは胚盤葉下層の機能異常を介する可能性とともに、胚体自体に直接エストロンが作用する可能性も示唆している。

今回見られた影響はエストロン投与に起因するものである。今回用いたエストロンの用量は、10ppt という濃度であり、これは 10^{-9} mole 程度に相当する。この濃度はエストロゲンレセプターの親和性の範囲内におさまると考えられ、今

回見られた結果がエストロゲンレセプターを介する反応であることを示唆するものである。

今回の実験は、極微量のエストロゲンが卵黄内投与されると、48時間という短時間で鶏胚の発生がゆがめられ、肉眼的にその異常が確認できることを実証した。その作用はエストロゲンレセプターを介し、活性化されたレセプターはアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。

このような初期胚にエストロゲンレセプターが存在する可能性を示した報告はまだない。今後、レセプターの存在を直接証明するとともに、それが活性化された場合胚盤葉下層細胞の死が生じる点について、アポトーシスに至るシグナルトランスダクションを証明する必要がある。

E. 結論

硫酸エストロン 0.01ng/ μ l/g を鶏受精卵に、卵白内と卵黄内経路で投与し、48時間孵卵して鶏胚の発生状況につき対照と比較した。卵黄内投与により約20%の胚で胚盤葉下層の消失、胚の管様構造への変形、重複胚奇形、神経管形成の異常が生じた。卵白内投与でも胚発生の遅延（体節数低下）などの軽度の影響があった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki, H. and K. Suzuki (1998) Rat hypoplastic kidney disease induces renal anemia, hyperparathyroidism, and osteodystrophy at the end stage of renal failure. *J. Vet. Med. Sci.* 60(10):1051-1058.
2. Inomata A., I. Horii and K. Suzuki (1998) Prolonged effect of 5-fluorouracil and its derivatives on apoptosis induction and mitotic inhibition in the intestinal epithelium of male BDF1 mice. *J. Toxicol. Pathol.* 11(3), 177-182.
3. Saito, K., T. Saiga and K. Suzuki (1998) Reversible irritative effect of acute 2.45GHz microwave exposure on rabbit eyes - A preliminary evaluation. *J. Toxicol. Sci.* 123 (3), 197-203.
4. Suzuki, H., M. Inaba, and K. Suzuki (1998) Temporal and spacial expression of alkaline phosphatase in male hypogonadic rat testis (hgn/hgn). *J. Vet. Med. Sci.* 60(6): 671-679.
5. Yamamoto A, Takagi H, Kimata D, Tatsuoka H, Nakano H, Kawano H, Kuroyanagi, Yahgi Y, Kobayashi S, Koizumi K, Sakai T, Saito K, Chiba T, Kawamura K, Suzuki K, Watanabe T, Mori H and Shirasawa T, Deficiency in protein L-iso-aspartyl methyltransferase results in a fatal progressive epilepsy. 1998 *J. Neurosci.* 18(6):2063-20

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱物質のホルモンレセプターを介する作用発現機構に関する研究

分担研究者 西原 力 大阪大学大学院・薬学研究科 教授

研究要旨

酵母 Two Hybrid System を用いて、コアクチベーターの介在するホルモンレセプターの転写活性化に及ぼす影響の検出系を樹立し、このプロセスにおける内分泌かく乱物質の影響を検討した。ほとんどの物質で SRC-2, TIF I, TIII, RIP140 などの コアクチベーターの違いによるレスポンスに大差はなかった。また、ER β の系を新たに作成したところ、一部の物質で ER α の系とレスポンスの程度に違いが示唆された。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質の主要な作用点の一つとして、化学物質のホルモンレセプターに対するアゴニストやアンタゴニストとしての作用が考えられる。エストロゲンははじめとするステロイドホルモンのレセプターは DNA 結合性の転写調節因子であり、ホルモン依存的に標的遺伝子の発現を誘導する。ホルモンはレセプターに結合したのち、レセプターの構造変化を引き起こし、これが引き金となり転写を活性化するが、その途中プロセスの詳細な分子メカニズムは不明である。そこで、本研究課題ではホルモンレセプターを介する転写活性化のプロセスを明らかにすることを目的とし、これらのプロセスに対する内分泌かく乱物質の影響を調べる。尚、ホルモンレセプターの中でも、

内分泌かく乱作用においては特にエストロゲンレセプター (ER) が重要であると考えられるので、本研究課題においては ER を中心に研究を行う。

B. 研究方法

コアクチベーターが ER にエストロゲン依存的に結合することに着目し、これを化学物質のエストロゲン様活性測定法に応用しようと考えた。タンパク質間相互作用の測定には酵母 Two-hybrid 法を用いた。これまでにクローニングされているコアクチベーターのうち CBP、P300、SRC1、RIP140、TIF1、TIF2 について ER α とのエストロゲン依存的な相互作用を調べ、次に、エストロゲン様活性を持つことが知られている既知の化学物質についても検討した。ER β についても同様のシステム

を構築し、一部の化学物質についてはER α とER β の差異について検討した。

C. 研究結果

1. 酵母細胞内でのエストロゲンレセプターとコアクチベーターの相互作用

ER α と転写共役因子の相互作用を酵母 two-hybrid 法で調べた。この方法は、酵母の転写因子である GAL4 の DNA 結合領域 (GAL4DBD) 及び転写活性化領域 (GAL4AD) に相互作用を調べたいタンパク質を繋ぎ、もし2つのタンパク質が相互作用すれば、 β -galactosidase 遺伝子が発現するという原理に基づいている。

この方法で ER α とコアクチベーターの相互作用に対する β -estradiol の影響を調べた。ER α の β -estradiol 依存的な相互作用は TIF2 が一番強く、次に SRC1、RIP140、TIF1 の順であり、CBP、P300 はほとんど相互作用しなかった。また、 β -estradiol の濃度を変化させてその応答を調べたところ、TIF2、SRC1、RIP140、TIF1 について 10^{-9} M から β -galactosidase 活性の上昇が認められ、 10^{-7} M で飽和し、それ以上濃度を上げて活性は変わらなかった。

2. 既知のエストロゲン様化合物によるアッセイ系の検証

次に、これまでにエストロゲン様活性を持つことが知られている化学物質について、用量依存曲線を作成した。用いた化合物は天然のエストロゲンである estrone と estriol、アンドロゲンの DHT

と testosterone、植物由来のエストロゲン様物質である genistein、同じ植物由来のステロイドである β -sitosterol、合成化学物質で β -estradiol と同等のエストロゲン様活性を持つことが知られている diethyl stilbestrol、プラスチックからの溶出や洗剤の分解物質でエストロゲン様活性を持つとして問題になっている p-nonylphenol と bisphenol A の10種類である。diethyl stilbestrol と estrone は β -estradiol と同等の活性を示し、ついで estriol、genistein、p-nonylphenol、DHT、bisphenol A の順でエストロゲン様活性を示した。また、他のステロイドの testosterone や β -sitosterol には 10^{-3} M まで全く応答性を示さなかった。

これらの結果は、他の方法で調べたエストロゲン様活性の強さとよく相関していた。また、コアクチベーター間での化学物質による応答性に大差は認められなかった。

3. ER α と ER β の差異

ER α と ER β に対する、化学物質の結合特異性の差異を調べるために、ER α と ER β のリガンド結合領域を GAL4DBD に繋ぎ、コアクチベーターの TIF2 との相互作用を調べる系を作製した。ER α と ER β のいずれを用いた時にも、 β -estradiol への応答性は 10^{-9} M からみられ、ER α と ER β で本来のリガンドである β -estradiol への結合親和性は同程度であると考えられ

た。それに対し、植物エストロゲンである genistein で処理した時には、ER α への応答性は 10⁻⁷ M からしかみられなかったのに比べ、ER β では 10⁻⁹ M から応答性が見られた。同様のことが防腐剤として知られているパラベン類においても観察された。これらのことから、ER α と ER β で化学物質の構造によって結合特性が違うことが推察された。

D. 考察

ER α とコアクチベーターの相互作用の強さは、溶液中のエストロゲン濃度に依存しており、このアッセイ系がエストロゲン活性の定量に利用可能であると考えられた。また、コアクチベーター間で β -galactosidase 活性にかなりの違いが認められたが、この違いが何を意味するのかについては現在のところ不明である。

ER α とER β に関しては、内分泌かく乱物質がどちらのレセプターをターゲットにしているは全く判っておらず、現状としてはいずれのレセプターに対しても試験を進めていく必要がある。また、ER α とER β の生体内におけるそれぞれの役割に関してもまだよく分かっていない部分が多く、ER α とER β に特異的な化学物質の探索はこれらのレセプターの作用機構の解明にもつながると期待される。今後、ER α とER β の違いについて、培養細胞でのレポーター遺伝子アッセイによりさらに検討し、アゴニスト活性についても酵母Two-hybrid法と培養細胞でのレポーター

一遺伝子アッセイで検討する予定である。また、コアクチベーターのin vivoでの役割を明らかにすることを目的に、コアクチベーターのノックアウト細胞の作製を試み、ホルモンレセプターを介する転写活性化プロセスにおけるコアクチベーターの役割を検討していく。

E. 結論

酵母 Two Hybrid System において、ほとんどの物質では SRC-2, TIF I, TIII、RIP140 などのコアクチベーターの違いによりレスポンスの程度に少し違いがみられた。ER β の系を新たに作成したところ、一部の物質でER α の系とレスポンスの程度に違いが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishikawa J, Saito K, Goto J, Dateyama F, Matsuo M, and Nishihara T, New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivation. (1999) Toxicol. Appl. Pharmacol., 154:76-83
2. Yamada T, Tsuchiya T, Osada S, Nishihara T and Imagawa M, CCAAT/enhancer binding protein δ gene expression is mediated by autoregulation through downstream binding sites. (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun., 242:88-92

3. Nishihara T, Yano M, Kato K and Takasaki A, Neutralizing effect of sodium laurate on the bactericidal action of a quaternary ammonium disinfectant against *Staphylococcus aureus*. (1998) *Biocontl. Sci.*, 3:1-5
4. Sakoda K, Suzuki A, Arai S, Imagawa M, Nishikawa J and Nishihara T, Identification of a novel vitamin D response element from the rat genome. (1997) *J. Biochem.*, 121:89-94
5. Nishihara T, Hasebe S, Nishikawa J and Kondo M, Biodegradation of aniline, anthracene, chlornitrophen, fenitrothion and linear alkylbenzene sulphonate in pond water. (1997) *J. Appl. Microbiol.*, 82: 441-447
6. Xu M, Osada S, Imagawa M and Nishihara T, Genomic organization of the rat nuclear factor 1-A gene. (1997) *J. Biochem.*, 122:795-801

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

ステロイドホルモン受容体系における内分泌かく乱物質作用の検討に関する研究

分担研究者 藤本 成明 広島大学原爆放射能医学研究所 助教授

研究要旨

内分泌かく乱物質のうちでも、エストロゲン様物質は人への影響が早くから危惧されてきた。そこで、他の細胞内伝達物質及び転写因子との相互作用を明らかにするため、ER alpha 発現ベクターとレポーター遺伝子をコトランスフェクトした培養細胞で、ERE 部位と AP-1 部位を介するエストロゲン応答を比較した。今回検討した内分泌かく乱物質においては、それらによる ERE または AP-1 選択的な活性化はないと考えられた。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質は自然界にあるホルモンの細胞内での応答や結合様式を変えたり、ホルモンの合成や代謝に影響を与えたりすることで、内分泌系の機能を変化させる外来性の物質である。それらの多くは弱いエストロゲンまたは抗エストロゲンとして作用するため、ヒトおよび野生生物における生殖、発生等への影響が危惧されて多くの議論を呼んできた。

エストロゲン受容体を介したエストロゲン応答の機構には、よく知られるエストロゲン受容体が DNA の ERE に結合する事で転写を活性化する機構の他に、DNA の AP-1 部位を介して転写を活性化する系が知られる。このエストロゲン応答系の生理的意義やその作用メカニズムの詳細については十分理解されているとはい

えず、内分泌かく乱物質の作用を理解する上でも詳細な解析が必要である。エストロゲン反応性のある細胞株モデルとして MCF-7 や前立腺細胞株、また新たに樹立した下垂体細胞株を材料に、そのエストロゲンによる AP-1 応答を生理的なバックグラウンドで解析したい。さらに、AP-1 応答の再構成細胞モデル系を使って、その作用様式について詳細な解析をすすめ、内分泌かく乱物質の作用とその修飾について明らかにしたい。

このため、内分泌かく乱物質のエストロゲン作用、その相互作用および細胞内因子による修飾作用を、エストロゲン受容体を経て ERE および AP-1 を介した応答系において解析する。

B. 研究方法

1. エストロゲン反応性増殖細胞株における ERE および AP-1 を介した応答系の解析と内分泌かく乱物質の作用

1-A. エストロゲン反応性の増殖をする細胞株としてヒト乳癌細胞 MCF-7 がよく知られる。それとは全く別のモデル系としてエストロゲン応答性の増殖をするラット下垂体腫瘍株を樹立しそのホルモン応答について解析した。

1-B. 生理的にエストロゲン受容体を発現している細胞モデルとして上記の下垂体細胞、ヒト乳癌細胞 MCF-7 およびヒト前立腺細胞 PC-3、LNCaP を材料とし、本来持っているエストロゲン受容体を介して起こるエストロゲンによる ERE 応答および AP-1 応答をするレポーター系を確立した。これらの系を利用して代表的な内分泌かく乱物質の作用を解析した。

2. 再構成モデル系での ERE および AP-1 を介した応答への内分泌かく乱物質の作用

上記1ではもともとエストロゲン応答している細胞系に対してレポーターを導入することで、生理的な条件下で、2つのエストロゲン応答の様式である ERE と AP-1 の応答を解析した。AP-1 応答に関してより詳細な検討をするため、エストロゲン受容体(-)のモデル細胞を材料に、エストロゲン受容体発現ベクター、fos/jun 発現ベクター等の導入により、受容体の型や発現量、また、他の転写因子(特に受容体コファクター)との相互の様式を解析し、内分泌かく乱物質の作

用点およびその相互作用の可能性を検討した。

C. 研究結果

1. エストロゲン(E2)に反応性の増殖をするラット下垂体腫瘍株 MtT/E-2 のエストロゲン応答性の増殖について解析したところ、(1)下垂体腫瘍遺伝子 PTTG の mRNA 発現は、ラットの正常下垂体では検出されず、MtT/E-2 細胞においてのみ発現していた。(2)E2 投与後、c-myc、cyclin D の上昇がみられたが、そのとき PTTG 発現の増加は観察されず、E2 の反応性との関わりは低いと考えられた。この細胞は下垂体組織と同様に a 型のエストロゲン受容体(ER)を発現もしていた。(3)この細胞株は E2 様の内分泌かく乱物質に対してもよい増殖活性を示し、それ自体よいアッセイ系になると考えられた。

2. エストロゲン受容体を持ち生理的な応答をしている細胞モデルとして、ヒト乳ガン細胞 MCF-7、上記 MtT/E-2 および前立腺細胞 PC-3 をとり、ERE-luc および AP-1-luc レポーターをトランスフェクトしてその ERE および AP-1 を介した応答の解析を試みた。さらに、ER alpha 発現ベクターをコトランスフェクトした NIH/3T3 での解析を行った。(1)エストロゲン受容体の発現は、PC-3 で beta 型が主で他は a 型がドミナントであった。(2)MtT/E-2、MCF-7 では、ERE を介した転写活性化は確認できたが、いずれの

株でも AP-1 を介した応答は観察できなかった。(3) NIH/3T3+ER の系では、E2 により ERE 応答および AP-1 応答が見られた。ER の AF-1 アゴニストであるタモキシフェンやナフォキシジンでは、AP-1 応答のみが観察された。E2 作用を持つ内分泌かく乱物質について検討した結果、ERE、AP-1 応答に有意な差はなかった。

D. 考察

エストロゲン応答において、ERE を介する系での内分泌かく乱物質の作用や転写コファクターとの相互作用については詳細に検討されている。しかし、他の転写開始ターゲットを介したレスポンスについて、内分泌かく乱物質作用の検討は報告がなく、我々の研究の独創的な点である。

今後は、

1. AP-1 応答系で、ER beta 型での検討。
2. AP-1 の系と他の細胞内伝達物質の相互作用の検討
3. AP-1 の系での、受容体コファクターの相互作用と内分泌かく乱物質の作用の検討する。

E. 結論

ER alpha 発現ベクターとレポーター遺伝子をコトランスフェクトした培養細胞で、ERE 部位と AP-1 部位を介するエストロゲン応答を比較した。今回検討した内分泌かく乱物質においては、それらによ

る ERE または AP-1 選択的な活性化はないと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Maruyama, S., Fujimoto, N., Ito A. Growth stimulation of a rat pituitary cell line MtT/E-2 by environmental estrogens in vitro and in vivo, *Endocrine J.* 46, In press (1999).
2. Fujimoto, N., Maruyama, S., Ito A. Establishment of an estrogen responsive rat pituitary cell sub-line MtT/E-2. *Endocrine J.* 46, In press (1999).
3. Fujimoto N., Watanabe H., Nakatani T., Roy G., Ito A. Induction of thyroid tumours in (C57BL/6N x C3H/N)F1 mice by oral administration of kojic acid. *Food Chem. Toxicol.* 36, 697-703 (1998).
4. Yamamoto, O., Seyama, T. Ito, A., Fujimoto, N. Oral administration of tritiated water (HTO) in mouse. III: Low dose-rate irradiation and threshold dose-rate for radiation risk. *Int. J. Radiat. Biol.* 73, 535-541 (1998).
5. Watanabe H., Fujimoto, N., Masaoka,

Y., Kurosumi, M., Oguri, T., Takahashi,
T., Kido, S, Hirata S., Kuramoto, K.,
Shoji S., Katoh O. Effects of
azoxymethane on
X-ray induced intestinal metaplasia in
Donryu rats. Oncol. Rep. 5, 837-40
(1998)

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

ヒト組織における性ステロイド代謝酵素と受容体の検索に関する研究

分担研究者 笹野公伸 東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理学講座

病理診断学分野 教授

研究要旨

外因性のエストロゲン様作用物質についてのヒトにおける代謝機構は殆ど解明されていない。今回、 17β -HSD1 はアロマターゼによりアンドロゲンから E1 が産生される場所と同じ絨毛の syncytiotrophoblasts で発現が見られ、 17β -HSD2 は妊娠 1 2 週以降の絨毛内の毛細血管の内皮細胞で発現が見られ、 17β -HSD1, 2 は同じ絨毛内でも異なる分布を示す事が示された。このことは、胎盤の絨毛内の毛細血管の内皮細胞に認められる 17β -HSD2 が、生物学的活性の高いエストロゲンを分解する事により胎児を過剰なエストロゲンの曝露から守っている極めて重要な生体防御機構である事が考えら、今後種々の内分泌攪乱物質のヒト胎児に対する影響を考えるにあたって、極めて重要な知見を提供したと考えられる。

A. 研究目的

内分泌攪乱物質のヒトの健康への影響を考えるにあたっては、これらの内分泌攪乱物質が生体でどのように代謝されて不活化あるいは逆に活性化されるのかという事を検討していく必要がある。すなはち内分泌攪乱物質の *in vitro* での作用を検索しただけでは、これらの物質が実際のヒトの健康に対する影響を正確に把握する事は極めて困難である。又副腎皮質、卵巣のステロイド合成や性ステロイド代謝に見られるように、ヒトと種々の実験動物の間ではステロイド産生及び代謝動態がかなり異なる事

も知られている。そこで胎児組織を含めて実際のヒト組織を用いてこれらの検討をすすめていく事が重要になってくる。そこで我々は手術及び剖検によって得られた実際の種々のヒト組織を用いて、性ステロイド代謝動態を検索する目的で以下のような研究計画をたてた。

1. すなはち内分泌攪乱物質を含む性ステロイド及びその類似物質の代謝動態の内でもこれらの不活化もしくは代謝動態に着目した。従来からヒト組織においては性ステロイドホルモンの合成動態の方はかなり詳細な検討が行われてきていたが、その

代謝もしくは不活化動態の方は必ずしも充分に検討されてきてはいない。しかし外因性も含めた性ステロイドの生体に対する作用を考えるにあたっては、この代謝もしくは不活化動態の検索は極めて重要であると考えられる。

2. そしてこれらの性ステロイドホルモンの代謝もしくは不活化に関与する酵素のうちでも生物学的に活性の高い estradiol (E2) を活性の低い estrone (E1) に転換する 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (17 β -HSD2) に着目して、この酵素の発現、活性を実際のヒト胎盤、胎児及び成人組織で検討していく計画をたてた。

3. そしてこの 17 β -HSD2 の発現動態とエストロゲン受容体 α 及び β の発現動態を比較検討して、エストロゲンの不活性化と実際のエストロゲン作用との関係を検討していく。

4. 次にこの 17 β -HSD2 が発現していた組織もしくは細胞由来の細胞株を用いてこの酵素の発現調節を検索していく。

5. 更にアンドロゲン作用を有する dehydroepiandrosterone (DHEA) を sulfatase する事により dehydro-epi-androsterone-sulfate (DHEA-S) に転換する dehydroepiandrosterone sulfotransferase (DHEA-ST) に関しても 17 β -HSD2 と同様の検討を手術、剖検で得られたヒト胎児、成人組織で行う。又この DHEA-ST の発現様式とアンドロゲン受容体の発現動態と比較検討していく。

以上の研究により従来あまり検討されて

いなかった実際のヒト組織における性ステロイドの代謝、分解動態が明らかになり、内分泌攪乱物質を含む性ステロイド及びその類似物質のヒトの健康に与える影響を明らかにしていく事が期待される。

B. 研究方法

妊娠中エストロゲンは妊娠の維持他に極めて重要な役割を果たしている事が知られている。妊娠経過を通して母体中のエストロゲンは連続的に増加していき事はよく知られているが、臍帯静脈における E2 濃度は必ずしも母体血中の E2 濃度と比例して増加していくわけではない事も知られている。これに対して生物学的活性の比較的低い E1 の臍帯静脈における血中濃度は母体血中の濃度と比例して増加する事が示されている。すなはち同じエストロゲンでありながら E1 と E2 の間で母体から胎児への移行動態が異なる事が臨床的に知られてきた。

ところで妊娠時の主なエストロゲンの産生細胞は胎盤の syncytiotrophoblasts である事は良く知られている。すなはち胎児及び母体双方に由来するアンドロゲンを含む C19 steroids から P450aromatase (アロマターゼ) により E1 にこの細胞で転換される事は良く知られてきた。そしてこの E1 が 17 β -HSD によって E2 に転換されるという事が想定されてきた。近年この 17 β -HSD に幾つかのサブタイプがある事が明らかになってきて、ヒトのエストロゲン代謝においては type 1 が主に E1 から E2 への転換を、type 2 が逆に E2 から E1 への

反応に関与する事が明らかになってきた。そしてこの 17β -HSD type 1 及び type 2 双方ともにヒト胎盤では豊富に活性及び発現が認められる事が知られていたが、胎盤の中のどの細胞で発現しているのかという事は不明のままであった。そこで我々はこの 17β -HSD2 がヒト臍帯静脈における E2 の濃度が母体血中との解離に関係していると考え、種々の妊娠週数の胎盤を用いて 17β -HSD 1 及び 2 の発現を検討した。

対象)

ヒト胎盤

4 週から 40 週までの総計 31 例のヒト胎盤組織を東北大学医学部附属病院及びその関連施設で採取し、10%中性ホルマリンで 24 から 48 時間室温で固定し、パラフィン包埋した。本研究プロトコールは東北大学医学部の倫理委員会の承認を得ている。

一次抗体)

一次抗体として 17β -HSD1 に対してはヒト胎盤から抽出した酵素蛋白を抗原として家兔で作成したポリクローナル抗体を (Int J Cancer 50, 386, 1992), 17β -HSD2 に対しては酵素蛋白の C 末端のアミノ酸配列 375-387 に相当するペプチドに対して作成した単クローン抗体 C2-12 (J Clin Endocrinol Metab 82:3872, 1997) を免疫組織化学に用いた。又ヒト胎盤の色々な細胞の生物学的性格を検索する目的で syncytiotrophoblasts のマーカーとして hCG を、血管内皮細胞のマーカーとして CD34, UEA-1 を用いた。

免疫組織化学)

免疫組織化学は streptavidin-biotin-complex 法を用いて、Histofine kit (Nichirei Co. Ltd., Tokyo, Japan) で施行した。発色は Vector Red (Vector Laboratories, CA, U.S.A.) もしくは 3,3'-diaminobenzidine を発色色素として用いた。同一細胞での異なる抗原の発現を見られる二重染色は alkaline-phosphatase 又は peroxidase で標識した streptavidin を用いて Envision 法 (Dako Co. Ltd., Denmark) で施行し、Vector blue 及び 3,3'-diaminobenzidine を発色色素として用いて検討した。すなはちこれらの発色色素に従い 2 つの異なる抗原が各々青色、茶色として一枚の標本上で観察されるわけである。陰性コントロールとしては一次抗体のかわりに正常の家兔またはマウスの血清を用い、これらの標本では特異的な反応は観察されなかった。

画像解析)

CD34 及び 17β -HSD2 の陽性面積をヒト胎盤組織の連続鏡面切片において CAS200 computer system (Beckton Dickinson CO. Ltd., Lincoln Park, NJ, U.S.A.) を用いて解析した。新たに開発された quantitative angiogenesis image program (version 1.0.03) を用いて解析した。すなはち 1 個の絨毛あたりの CD34 又は 17β -HSD2 陽性面積の割り合いを算出した。

C. 研究結果

1. 免疫組織化学