

B. 方法

E1 の投与に関しては昨年まで投与同様に、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。BPA の投与に関しては、発生ステージがステージ 10 近くで比較的よくそろった SPF 白色レグホン種の有精卵を日生研株式会社より購入した。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、実体顕微鏡下で鶏胚の形態学的観察を行った。

50pg、500pg または 5ng/embryo の E1 を鶏受精卵に投与し、48 時間孵卵して鶏胚の発生状況について対照と比較した。卵殻の一部を円鋸を用いて切開し、直視下で胚直下の卵黄内に $1 \mu\text{l}/10\text{g}$ 卵重の割合で E1 溶液または溶媒溶液(DMSO)を含む PBS)を投与した。投与後切開部位をサララップで閉鎖、シリコンゴム (KE3475T: 信越化学製) でシールし、上述の条件で孵卵した。胚盤葉下層の消失、胚の管様構造への変形、重複胚奇形、神経管形成の異常などの有無および胚発生の遅延 (体節数低下) を指標として形態学的に検討し、用量相関性の有無について検討した。

2.5、5.0、および $10.0 \mu\text{g}/\text{embryo}$ の BPA (和光純薬、分析用標準品) を DMSO の助けで水溶液とし、E1 の場合と同様に

鶏胚に処置し、同様の形態学的観察を行った。

(倫理面への配慮) 材料が鶏胚であるため、特に配慮しなかった。

C. 研究結果

E1 の鶏胚に対する作用

表 1 (別紙) に用量を変えて得られた発生異常の成績を示す。孵卵 48 時間で、対照群(n=42)には、異常胚は観察されず、体節数は平均 $11.8 \pm 3.7(\text{SD})$ で、7 から 18 の範囲に分布した。50pg/embryo 群(n=42)では、体節数は平均 $10.8 \pm 4.4(\text{SD})$ で、26.1%に何らかの異常が認められ、4 例(9.5%)に胚盤葉下層の欠落が認められた。昨年度と同じ濃度の 500pg/embryo 群(n=34)では、61.7%に何らかの発生異常が認められ、4 例(11.8%)に胚盤葉下層の欠落があった。体節数は平均 11.1 ± 4.3 で、0 から 18 の範囲に分布した。胚盤葉下層の欠落以外の異常は、重体奇形(3 例)、頭部のみあるいは心臓と神経管のみ発生(2 例)、神経管の未閉鎖(3 例)、神経管の変形、短縮、体節の配列異常など(9 例)であった。5ng/embryo 群(n=32)では、65.6%の胚に何らかの異常が見られ、体節数は平均 6.1 ± 4.1 で 0 から 12 の範囲に分布した。この群では、異常の内訳は、頭部の分裂、変形、神経管の蛇行や短縮(4 例)であった。代表的な事例を図 1~8 に示す。

体節数は用量相関的に減少しており、50pg/embryo では対照群と差がなかった。胚盤葉下層の脱落を除いた異常の重篤度

については投与群間で異なっているようには見えなかったが、頻度は 50、500pg および 5ng/embryo 群で、それぞれ 23.7、56.7 および 63.3%であり、明らかな用量相関関係が認められた。50pg/embryo 群ではなお、胚盤葉下層の脱落と形態異常が認められた。

BPA の鶏胚に対する作用

別紙表 2 に 3 用量群 (2.5、5、および 10 μ g/embryo) での成績を示す。対照群では体節数は 11 または 12 であり、発生ステージが良くそろっていると同時に、異常胚は認められなかった。投与群での平均体節数は低、中、高用量群で 12.0、10.8、および 12.8 であった。高用量群では 1 例体節数 18 という発生の進んだものが存在したために対照群と同等の数値になった。奇形胚の頻度は、同じく 20、100、および 100%であったが、E1 とは異なって胚盤葉下層の脱落したものや体軸の分裂したものはなかった。また、神経管に見られる異常は主として尾部であり、尾部の短縮、フェードアウトがほとんどであった(図 12~14)。

D. 考 察

E1 処理により初期鶏胚に発生攪乱が認められた。異常は 4 タイプに分類できると考えられる。(1) 胚盤葉下層の脱落とチューブ様構造の形成、(2) 体軸の分裂ないし重複奇形、(3) 神経管閉鎖不全および屈曲など、および(4) 体節形成遅延である。(1)に関しては、ステージ 10 の胚では胚盤葉は既に形成されているので、孵卵 48 時間の間は何らかの過程で消失したと考えられる。チューブ様の構造は外科的に胚盤葉下層を除去した際に生じる構造と酷似している。このような胚では体軸の決定ができなかったと推測される。(2)に関しては、辺縁葉の移植などの際にみられる体軸の偏倚、重複と酷似した異常であり、これらの重複胚では一部の胚盤葉下層が消失している例もあるので、体軸決定に重要な役割を果たしている辺縁部の分裂により、2 カ所で体軸誘導があった可能性がある。体軸の分裂には頭部で合体するもの、尾部で合体するもの、体部で合体するものなどのバリエーションが見られる。分裂した辺縁部の大きさの違いが体軸誘導に量的な影響を及ぼす可能性があると考えられる。(3)と(4)に関しては、胚盤葉下層には際だった影響は認められない。(3)に関しては神経管への影響である点から一部体軸への影響と類似する作用がある可能性がある。(4)は 48 時間孵卵の間の一時的減形成であるが、体軸方向への伸長が阻害されている可能性がある。発生学的に見て(1)から(4)の方向に向かって影響されている時

期が遅れていると考えられる。

昨年、ERmRNA がステージ 10 で既に発現し、24 で一旦減少し 48 時間で発現量が増加することを示した (図-9~11)。異常の発生頻度には用量相関性があったので、上述の胚の異常は E1 によって引き起こされたと考えられる。ER のタンパクレベルでの発現とその局在性が証明された場合、初期の ER 発現の多い時期に重篤な異常が生じるのか説明できる可能性がある。また、この異常発現が ER の活性化に起因するとすれば、既にできていた構造が破壊される過程が含まれるはずである。これらは、孵卵経過を追跡することによって細胞死の証拠を把握することができると考えられた。しかし、大別して 4 型の異常が生じるため効率よく追跡するのは困難と考えられた。これらの表現型の変動を来す要因には、入手時の胚発生のステージにばらつきがあること、胚に極めて限局性の感受性の高い部位があるため、局所への適用が難しいことなどが考えられた。

BPA 処置では 2.5、5 および 10 μ g/embryo 群で E1 投与の際に認められるのと類似するが、若干異なる発生異常が用量相関的に認められた。異常は神経管尾部に現れるが、体節以降の分画が漠然とし存在しないように見えるタイプであり、E1 の分類では(3)の異常に類するものであった。体節の減少も用量相関を示す可能性があり、高用量群での 1 例の例外が今回の成績をゆがめている印象がある。今後、例数を増やす予定である。

この影響が、BPA に起因することは明白である。しかし、これが E1 と同じ機序によったのか否かははっきりしない。今回用いた化学物質の濃度は 500 μ g/ml ~2mg/ml に相当するが、これは DMSO を用いて水溶液にする際の上限であり、胚の大きさを考慮すると BPA の投与としては比較的高いと考えられる。概略で E1 の場合より 10⁴ オーダー高い濃度で影響が見られたことになる。ER との親和性から、この影響が E1 の場合と同じ機序で影響を及ぼした可能性も否定できない。E1 の対照群でも水溶液を用いたのでそれらの成績との比較もあり、他の溶媒は検討しなかった。

BPA に関しては入手時の発生ステージをそろえるために、受精卵の購入先を変更した。対照群の成績はいずれも体節数 11~12 であるあり、ロット間の変動が少なく、入手時に比較的発生ステージがそろっていたことを裏付けている。それにも関わらず、BPA の投与により胚盤葉下層の脱落など重篤な変化が検出できなかったのは、BPA の濃度が低すぎる、投与時期のステージが遅すぎる、等の理由が考えられる。

本来内因性のエストロゲンにさらされていない時期に、外因性のエストロゲンに暴露されると正常発生が攪乱され、生存できない方向に発生運命が変更され、これが、初期胚で発現している ER の活性化を介している可能性がある。しかも、この作用は ERmRNA 発現量が少ない初期の方が大きく、感受性にウィンドウ効

果があることを裏付けている。鶏胚は、母体の卵管内で既に発生が進行し、概ねステージ 10 で産卵されるが、産卵後集荷までの時間は制御しがたく、現在購入できる受精卵ではこの初期発生段階の厳密な規定は難しい。E1 で見られた(1)~(4)までの異常の出現機序に関してより厳密なステージングを実施して分析する必要がある。

全体として、電磁波、卵白内投与、卵黄内投与、胚下層への投与、E1 の用量相関、BPA の影響の探索と用量相関という方向で研究が進行した。現象が意外性に富んでいたため、このような手順となったが、最終的に壁となったのは受精卵の発生における個体差の制御であった。正常胚における発生ステージのばらつきに関して何らかの指標を設定する必要がある。

E. 結 論

ステージ 10 近くで初期発育鶏胚の胚盤下の卵黄内に 50、500pg/5 μ l/embryo、および 5ng/5 μ l/embryo の E1 を投与し、48 時間孵卵して、DMSO 含有 PBS 投与の対照群と比較した。異常は(1) 胚盤葉下層の脱落とチューブ様構造の形成、(2) 体軸の分裂ないし重複奇形、(3) 神経管閉鎖不全および屈曲など、および(4) 体節形成遅延であった。(2)~(4)には用量相関が認められた。(1)の影響が発生学的には最も早期で(4)に向かって影響される時期が遅いと考えられた。孵卵 0、時間で ERmRNA 発現が高く 24 時間で減少した後 8 時間で増加するとの昨年の成績と合

わせると、これらの異常が E1 による作用であり、ER の活性化を介する可能性が高いと考えられた。本来内因性のエストロゲン暴露のない時期に ER が発現し、その ER が外来性のエストロゲンにより活性化されると胚発生が攪乱され、最終的には生存不可な方向に発生運命が変更される。これらの分子機序と発生学的意義については、未解明のままである。

同様な ER 活性化が知られている BPA について 2.5、5、および 10 μ g/5 μ l/embryo を E1 に準じて投与したところ、神経管尾部を主体とした E1 の(3)に類似する異常に用量相関が認められた。BPA に関しても E1 と同様な機序で異常が発生する可能性がある。さらに詳細な機序を解明するためには、初期胚のステージ、投与部位の特定に関してより厳密な規定を行って、異常のパターンについて再現性を高め、孵卵経過をたどって体軸決定、パターン形成に関わる遺伝子発現の攪乱を証拠づける必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki, H., M. Kokado, K. Saito, T. Kunieda and K. Suzuki, A locus responsible for hypo-gonadism (hgn) is located on rat Chromosome 10. *Mammalian Genome* 10(11): 1106-1107, 1999
2. Akimoto, T., H. Suzuki, Y. Arai, K. Nakama and K. Suzuki, Locus of dominant hairless gene (Ht) causing abnormal hair and keratinization maps to rat chromosome 10. *Experimental Animal* 49(2): 137-140, 2000
3. Suzuki H., S. Fukaya, K. Saito and K. Suzuki A locus responsible for osteochondrodysplasia (ocd) is located on rat Chromosome 11. *Mamm. Genome*. 11 (6): 464-465, 2000
4. Uchibori, M., K. Saito, S. Yokoyama, T. Tsuji, H. Suzuki and K. Suzuki Monitoring and analysis of the EEG spikes frequency in El mice during sleep: A new application of wavelet transform. *Physiol. Behav.* (in submission), 2000
5. 鈴木勝士、他13名(著) XII. 遺伝性疾患、内藤喜久、浜名克己、元井霞子編、生産獣医療における牛の生産病の実際、p207-216、文永堂、東京(2000)
6. 鈴木勝士、他83名(訳) 第114章、膵臓内分泌部の外科的疾患、高橋貢、佐々木信雄監訳、スラッター小動物の外科手術：(Slatter, D: *Textbook of Small Animal Surgery* (2nd Ed.), WB Saunders Co., Philadelphia 1993)、文永堂、東京、p1667-1678. (2000)
7. 鈴木勝士、他 44 名 2.2.3.子宮内暴露試験、2.2.4.一世代繁殖試験、井上達監、今井清、長村義之、加藤正信、菅野純編、内分泌化学物質の生物試験研究法、シュプリンガー・フェアラーク東京、東京、p85-106. (2000)
8. 鈴木勝士ナイトセッション、Dose-response. 森田昌敏、緊急企画 内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム'99 -各座長による包括報告-

資源環境対策 36(2):156-157.

(2000)

9. 高須正規、高橋純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位(第2報)、電子情報通信学会技術研究報告 MBE99-152:43-47. (2000)

2. 学会発表

1. 斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(2000)電磁場照射がマウスの繁殖と成長におよぼす影響について 第19回宇宙エネルギーシンポジウム (pp.75-79)
2. 高須正規、高橋純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士 (2000) マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位 (第2報)、電子情報通信学会、MEとバイオサイバネティックス研究会、 p.43
3. 小川実幸、岩間良子、日比佐知子、尼崎肇、鈴木浩悦、鈴木勝士、孫 偉勇、塩田邦郎 (2000) マウス口蓋ヒダ形成位置とプラコード形成・細胞増殖・アポトーシス・細胞周期関連因子の発現分布の関係、第52回日本動物学会、関東地方部会
4. 徳力 剛、太田千春、高須正規、鈴木浩悦、斎藤賢一、鈴木勝士(2000)腎低形成症ラットにおける慢性腎不全進行過程の基礎的評価、第129回日本獣医学会
5. 八木美央、鈴木浩悦、岡田美香、千純子、醍醐久美、中宮英次郎、尼崎 肇、斎藤賢一、鈴木勝士(2000)精巣形成不全症ラットの生後初期精巣の病理発生に関する調査：細胞の増殖と細胞死の観点から、第129回日本獣医学会
6. 田村 啓、三森国敏、小野寺博志、高木久宜、森安眞津子、鈴木勝士、広瀬雅雄(2000)ラット甲状腺二段階発癌における下垂体除去の影響と外来性TSHの修飾作用、第129回日本獣医学会
7. 日比佐知子、岩間良子、小川実幸、尼崎肇、鷹巣雅峰、鈴木浩悦、鈴木勝士、孫偉勇、塩田邦郎(2000)マウス口蓋ヒダ形成位置とプラコード形成・細胞増殖・アポトーシス・細胞周期関連因子の発現分布の関係、第129回日本獣医学会
8. 秋元敏雄、鈴木浩悦、仲間一雅、鈴木勝士(2000) WBN/ Ha-Ht ratのヘアレス遺伝子(Ht)のラッ

- ト第10染色体上へのマッピング
およびヌードラットとの相補性
試験、第47回日本実験動物学会
9. 鈴木勝士(2000)動物の疾患の遺
伝子、第26回日本比較臨床血液
学会
 10. 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、
竹中基郎、八木未央(2000)エス
トロン投与による鶏胚での発生
攪乱、第40回日本先天異常学会
 11. 斉藤賢一、内堀雅隆、横山修一、
辻 隆之、鈴木浩悦、鈴木勝士(2
000)先天性癲癇モデル動物(EI
Mouse)における睡眠時脳波の
解析、第40回日本先天異常学会
 12. 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、
竹中基郎、八木未央、岡田美香(2
000)エストロン投与による鶏胚
での発生攪乱について、第130
回日本獣医学会
 13. 秋元敏雄¹⁾、鈴木浩悦²⁾、
仲間一雅¹⁾、鈴木勝士(2000)
Hairless rat(WBN/ Ila-H1)の原
因遺伝子*H1*とヌードラットとの
相補性試験。(F1およびF2の表
現型について)、第130回日本獣
医学会
 14. 丸ひろみ、鈴木浩悦、高橋純子、
井出雅子、大村 彰、斉藤賢一、
鈴木勝士(2000)骨軟骨形成不全
症ラット病因遺伝子の探索：外
交配系での表型調査と病因遺伝
子座周辺の連鎖地図の作成、第
130回日本獣医学会
 15. 竹中基郎、鈴木浩悦、石坂みゆ
き、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)
Wistar-Imamichiラットクロ
ーズドコロニーで発見された神
経症状を伴う矮小ラット、第13
0回日本獣医学会
 16. 高橋純子、斉藤賢一、高須正規、
鈴木浩悦、鈴木勝士(2000)EIお
よびddYマウス脳硬膜上からの
聴覚脳幹誘発反応(ABR)の解析、
第130回日本獣医学会
 17. 鈴木浩悦、高橋純子、丸ひろみ、
斉藤賢一、鈴木勝士(2000)骨軟
骨形成不全症ラット病因遺伝子
の探索：RHパネルでの連鎖マ
ーカーの配列と系統内多型を用
いたファインマップの作成、第
130回日本獣医学会
 18. 千葉純子、中宮英二郎、鈴木浩
悦、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)
ウイスターイマミチラット由来
近交系統間でのocd遺伝子座周
辺の多型性、第130回日本獣医
学会

19. 尼崎 肇、小川美幸、口比佐知子、岩間良子、鈴木浩悦、鈴木勝士、孫 偉勇、塩田邦郎(2000)マウス口蓋ヒダ形成配列に関連するPAL31のmRNAの発現分布、第130回日本獣医学会
20. 岡田美香、鈴木浩悦、千葉純子、醍醐久美、中宮英二郎、八木未央、斉藤賢一、鈴木勝士(2000)ラット精巣形成不全症(hgn / hgn)の胎生期病態発生に関する検討、第130回日本獣医学会
21. 鈴木勝士(2000)期鶏胚に及ぼすエストロジェンの発生障害作用を中心にして、第130回日本獣医学会
22. 田村 啓、三森国敏、小野寺博志、那須昌弘、高木久宜、安原加壽雄、上田誠、鈴木勝士、広瀬雅雄(2000)ラット甲状腺二段階発癌モデルにおける麴酸イニシエーション期投与の影響、毒性病理学会

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

初期発育鶏胚

受精卵として入手可能： Stage 10（産卵直後）

鶏胚は受精後卵管内で発生が進行

産卵後も外気温が高い場合には発生が進行

Stage10

胚盤葉下層：epiblast から脱落して、胚形成の支持を卵黄膜下で行う

外科的摘出により胚はチューブ様になる

辺縁部に体軸誘導能がある

移植等により軸のずれを形成できる

電磁場照射に感受性がある

硫酸エストロンに感受性がある（卵白側からではなく卵黄側からの接近）

エストロゲン投与に起因する4タイプの異常の発現

図1. 48時間孵卵後の正常胚

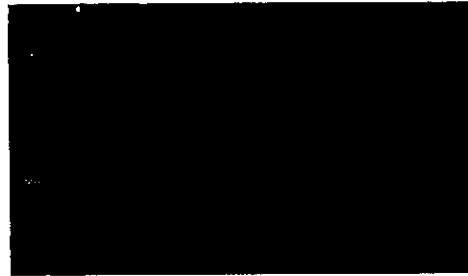


図2. 胚盤葉下層の脱落とチューブ状の胚の形成



図3. 体軸の分裂



図4. 体軸の分裂

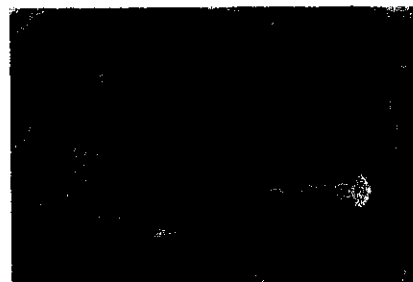


図 5. 神経管の閉鎖不全

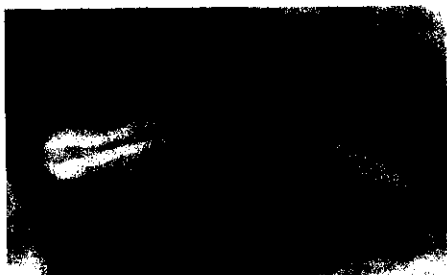


図 6. 神経管の閉鎖不全



図 7. 神経管蛇行と体節数減少

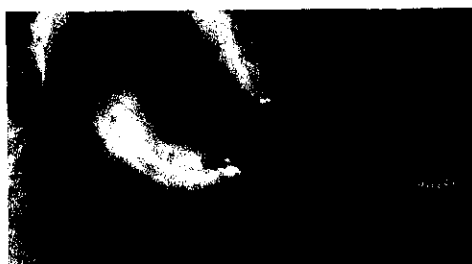
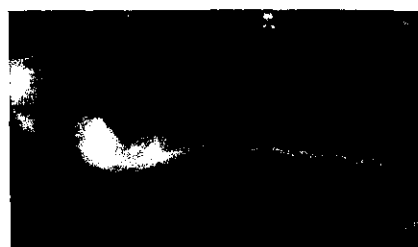


図 8. 神経管の蛇行



異常胚形成の原因となる事象の起こる時間経過

- (1) 胚盤葉下層の脱落に至る事象 ← 胚盤葉下層細胞の死 (Stage 10)
 ↓
 (2) 体軸の2分裂に至る事象 ← 辺縁部分裂 ← 分裂境界部細胞の死
 ↓
 (3) 神経管閉鎖不全に至る事象 ← 接着不全 ← 細胞移動困難 ← 細胞増殖不全
 ↓
 (4) 体節減形成、神経管蛇行に至る事象 ← 細胞移動困難 ← 細胞増殖不全

これらは、それぞれ別個の運命をたどって特異的な形態異常を形成している。すなわち(1)→(2)→(3)→(4)というような連続した経過で生じるものではない。初期に起こる障害ほど重篤な発生異常を示すという特徴がある。Stage 10以降でERmRNAの発現が検出されており(図9~11)、シグナルは当初強く24時間で減弱し48時間で再び増加する。これが翻訳され蛋白発現していれば、外因性に投与したE1がERを活性化し、細胞死あるいは増殖分裂不能に至るシグナルを誘発する可能性がある。鶏胚の胚下層卵黄内に投与したE1溶液は、胚下層全体と接触している範囲に広がるが、ERの局在性などによっては、必ずしも均一なE1-ERの結合が起こるとも限らない。胚発生の個体差もあり、発生の進

行したものと遅れたものでは ER の分布も異なる可能性がある。直視下で胚を観察しながら薬液を投与する方法を採っているが、生の状態で辺縁部を発見するのは困難であり、投与部位も必ずしも一定というわけではない。少なくとも、この異常が E1 に起因することは、表 1 に示すように、異常胚発生頻度に用量反応関係が認められたことから明らかであり、(1)を除いた異常の頻度でその傾向が著しい。また、体節数にも用量相関が認められたが、500pg/embryo 群と 5ng/embryo 群の間で著しく体節が減少し、50pg/embryo 群では対照群との間に差はなかった。購入時の胚発生にばらつきがあるとすると、発生の進んだものほど E1 の影響が少なくなると考えられ、ER メッセージの経時的経過と矛盾しない。

表 1. 硫酸エストロンの初期鶏胚に対する発生かく乱

	投与量: pg/embryo			
	0	50	500	5000
胚盤葉下層の脱落				
n=	42	42	34	32
脱落喪失	0	4	4	2
頻度(%)	0.00	9.50	11.80	6.30
異常				
n=	42	38	30	30
異常胚	0	9	17	19
頻度(%)	0.00	23.70	56.70	63.30
体節数				
平均	11.81	10.84	11.07	6.13
SD	3.74	4.36	4.19	4.05

胚盤葉下層脱落と異常胚の頻度はいずれの投与群も $p < 0.01$ (χ^2 検定)

図 9. ERmRNA の検出

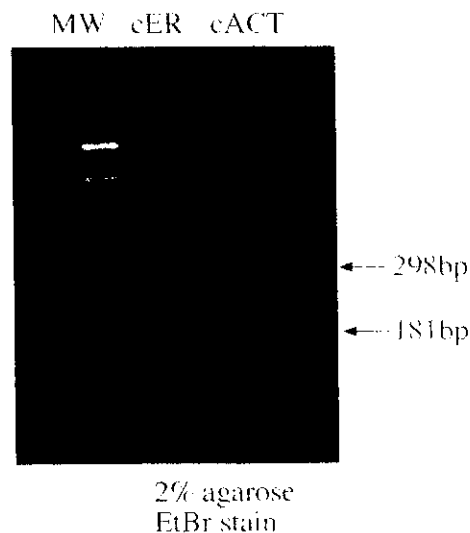


図 10. RT-PCR のデザイン

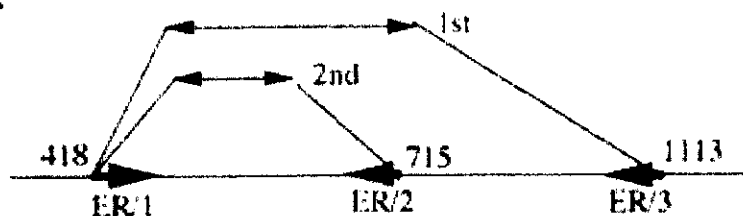
RT-PCR

RT : random primer

PCR : 94°C, 5min
 94°C, 30sec
 53°C, 30sec
 72°C, 90sec
 72°C, 5min
 4°C

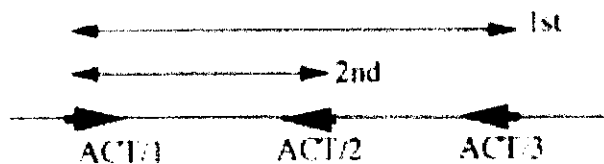
} 35cycles

cER



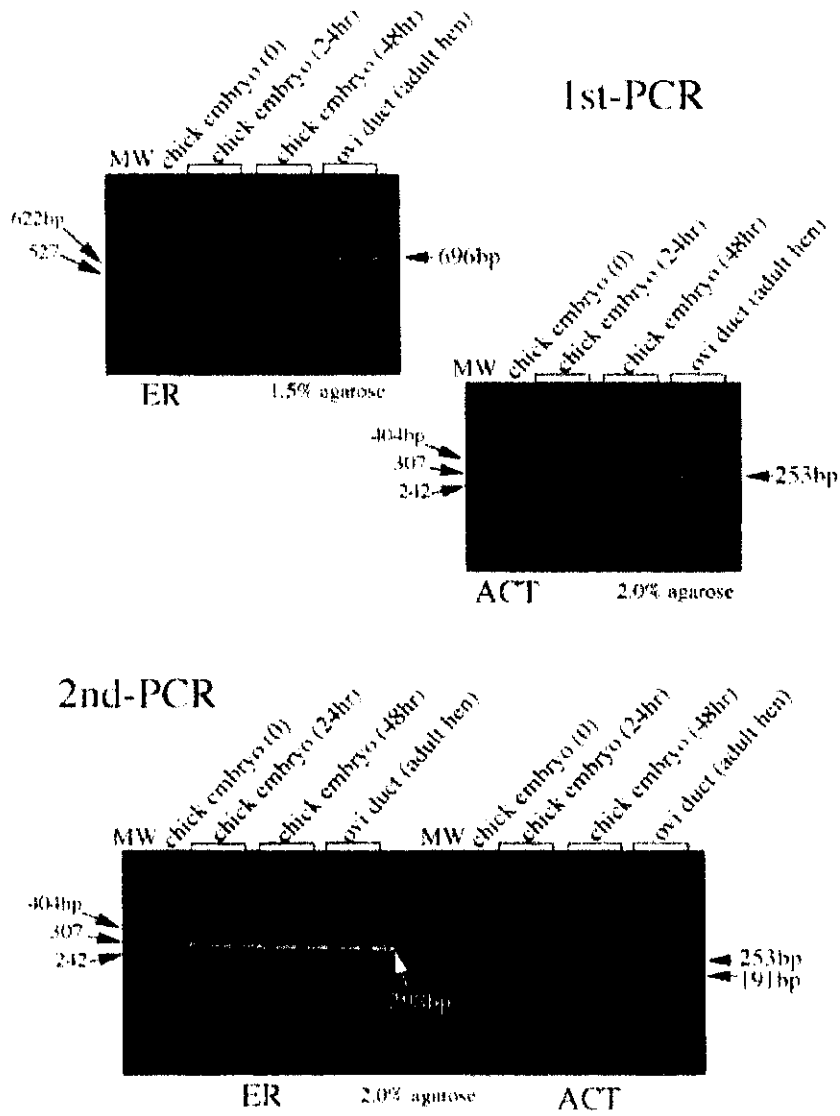
ER/1: 5'-TACGGCTCTACTACACTCAG-3' (418-435)
 ER/2: 5'-GGCTCCCTTTCTCATTGGTA-3' (696-715)
 ER/3: 5'-CGGACTGTTCTTCTTGTTAT-3' (1094-1113)

cACT



ACT/1: 5'-TGGATGATGATATTGCTGC-3'
 ACT/2: 5'-TTGCTCTGGGCTTCATCA-3'
 ACT/3: 5'-ATCTTCTCCATAACACC-3'

図 11. 0、24、48 時間孵卵時の ERmRNA の発現



BPA 投与に起因する初期鶏胚の発生異常

表 2. ビスフェノール A の初期発育鶏胚への影響

		用量: $\mu\text{g}/\text{embryo}$			
		0	2.5	5	10
異常	n=	4	5	5	4
	異常胚]	0	1	5	4
	頻度(%)	0	20	100	100
体節数	平均	12.8	12.0	10.8	12.8

BPA に関しては、E1 の鶏胚発生かく乱が ER を介したものであれば、BPA でも ER に親和性のある範囲内で同様な異常が発生するのであろうというのが作業仮説である。E1 の系と基本的に同じとするため、BPA を EDTA の補助により水に溶いて投与した。E1 の実験で孵卵開始時の発生ステージに個体差があると考えられたため、SPF 白色レグホンからの受精卵を購入して実験した。

対照群の体節数は 11 または 12 個で、発生の変動が少なく、孵卵開始時のステージが比較的斉一であることを示唆していた。

異常のタイプは E1 の場合の(4)に類似するが、全体として尾部に影響がある点で、E1 の場合とは微妙に異なっていた。

BPA の場合、胚盤葉下層の脱落や体軸の分裂は観察されなかった。しかし、これらの図に示したような異常の発生頻度は明白な用量相関を示していることから、これらの異常は BPA によって引き起こされたと考えられる。減形成を主体とした異常であり、E1 の影響と重なる部分もあるので、ER の活性化によってこれらの異常が生じる可能性も除外できない。

図 12. 尾部神経管の異常



図 13. 尾部神経管の蛇行



図 14. 尾部神経管閉鎖不全



2. マウス生殖腺の分化および精子、卵形性への 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 岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター教授

研究要旨

妊娠マウスとニホンザルを用いて、ビスフェノール A (BPA) の胎盤透過性を検討した結果、マウスでは投与 30 分、ニホンザルでは投与 1 時間で、胎仔の組織から BPA が検出された。マウスの胎仔期に、合成エストロゲン (DES) 及び BPA を投与し、低用量影響を検討した。DES 0.02, 0.2, 2 µg/kg と BPA 20 µg/kg の投与で膣開口が有意に早まった。胎仔マウスのミューラー管では部域特異的に Hoxa9, 10, 11, 13 が発現するが、DES 投与により発現が変化した。

A. 研究目的

エストロゲン様作用を有する内分泌かく乱化学物質の作用メカニズムを明らかにするための基礎データを得ることを目的とした。新生仔期と胎仔期の生殖器官および視床下部・下垂体系の反応性の違いを、ジエチルスチルベストロール

(DES) とビスフェノール A (BPA) を用いて検討するとともに、BPA の胎盤透過性をマウスとニホンザルを用いて検討した。さらに、DES および BPA の低用量影響、卵巣非依存の膣上皮の不可逆的増殖の誘導、Hoxa 遺伝子群のミューラー管での発現を調べた。DES による雌マウスの尿道下裂の臨界期を検討した。エストロゲンに依存して発現増加あるいは発現の低下する遺伝子をマウスの生殖腺附属器官を用いて探索した。

B. 研究方法

(1) 妊娠 17 日目のマウスに 3000 µg/30 g BW の BPA を皮下に単回投与し、30, 1, 2, 3, 6, 12 時間後に胎児組織を摘出した。妊娠 150 日目のニホンザルに 50 mg/kg BPA を単回投与し、1 時間後に胎児組織を摘出した。GC-MS により胎児組織中の BPA を測定した。

(2) 妊娠 11-17 日のマウスに DES 0.02, 0.2, 2 µg/kg と BPA 2, 20 µg/kg を投与し、低用量効果の有無を検討した。

(3) 妊娠 10-18 日に 0.0002~2 µg DES/30 g BW あるいは 300, 3000 µg BPA/30 g BW を暴露したマウスで、卵巣非依存の膣の不可逆化および生殖を検討した。

(4) 出生直後に BPA 150 µg/pup, DES 0.3, 3 µg/pup を 5 日間投与し、卵巣非依存の膣の不可逆化を検討した。

(5) マウス胎児のミューラー管の Hoxa-9, 10, 11, 13 の発現および、DES の影響を

whole mount in situ hybridization 法を用いて検討した。

(6) 出生直後 (0 日齢) , 3, 5, 7 日齢の雌マウスに DES 3 μg を投与し尿道下裂の臨界期を調べるとともに、DES を 0.3 μg 、0.03 μg 、0.003 μg 、0.0003 μg を出生直後から 5 日間投与し、臨界濃度を調べた。

(7) Differential Display 法を用いて、エストロゲンで増加あるいは減少する遺伝子を子宮で探索した。

C. 研究結果

(1) 妊娠 17 日目のマウスに 3000 $\mu\text{g}/30$ g BW の BPA を投与すると、30 分後には胎盤、胎仔の血清、肝臓、脳、子宮、精巣に BPA が到達していることが確認され、妊娠 150 日目のニホンザルに 50 mg/kg BPA を投与すると、一時間後には胎仔の体内に到達していることが確認された。

(2) 低用量効果の検証のために、妊娠 11-17 日に DES 0.02, 0.2, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と BPA 2, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与し(vom Saal によれば、2.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ がヒトの曝露に相当)、子に対する影響を見たところ、雌においては、2 μg BPA を除いて、膣開口が有意に早くなり、その時点の体重は有意に軽くなった。また、DES 0.02-2 μg と BPA 2 μg において 22 日齢 (離乳日) の体重は有意に軽くなった。雄においては、22 日齢の体重は全ての実験群において有意に軽くなった。Anogenital distance (生

殖器から肛門までの長さ) は雌雄ともに差はみられなかった。

(3) 妊娠 10-18 日、0.0002 $\mu\text{g}\sim 2$ μg DES/30 g BW あるいは 300、3000 μg BPA/30 g BW を暴露したマウスでは、DES 2 μg 投与群のみ無排卵、卵巣非依存の不可逆的膣の異常が誘起された。

BPA および 2 μg 以外の DES 処理では正常雄と交配後は、正常な出産が行われ、産児数にも性比にも差がなかった。

(4) 出生直後の BPA 150 $\mu\text{g}/\text{pup}$ 、DES 0.3, 3 $\mu\text{g}/\text{pup}$ 投与により、卵巣非依存の不可逆的膣上皮の増殖が起こった。

(5) DES 投与により、ミューラー管の Hoxa-9, 10, 13 の発現減少。

(6) 出生直後 (0 日齢) の雌マウスに DES 3 μg を投与したところ、DES 投与 2 日目から 3 日目にかけて尿道腔から膣への癒合が起きた。尿道上皮と sinus cord ではアポトーシス細胞が増加し、膣と尿道の癒合部分でもアポトーシス細胞がみられた。さらに、DES 投与開始日を 3 日齢、5 日齢、7 日齢とずらしていくと膣と尿道の癒合部位が下に下がっていき、7 日齢では 1 匹を除いて尿道下裂は認められなくなった。また尿道下裂の臨界濃度は、DES 0.003 μg であった。一方、エストロゲン活性を持つビスフェノール A では 300 μg でも尿道下裂は起きなかった。

(7) Differential Display 法でエストロゲンで増加あるいは減少する遺伝子を子宮で探索し、発現減少が起こる遺伝子とし

て、Timp3(メタロプロテアーゼインヒビター)、Requiem, Decorin 等が、発現増加する遺伝子も 10 程度とれているが、さらに多くの遺伝子発現変動が見られており、順次解析を進めている。DNA Microarray 法もあわせて用いている。

D. 考察

マウスでもニホンザルでも、胎盤は BPA を阻止しなかった。今回用いた BPA は大量であるために透過した可能性も残されている。しかし、ヒトの臍帯でも BPA が検出されることから、BPA の胎盤透過性が確認されたと考えられる。新生仔期の BPA 投与では卵巢非依存の膈の不可逆的変化が誘起されたが、胎仔期の投与では影響を受けなかったことから、胎仔期の生殖腺附属器官は新生仔期のものよりも DES, BPA に対して反応性が悪いと考えられる。また、排卵を指標にしても、新生仔期が胎仔期の投与より無排卵が多いことから、視床下部・下垂体系も新生仔期が感受性が高いと考えられる。ヒトの曝露に相当する 2.4 µg/kg の約 10 倍の BPA で低用量影響を確認した。Hoxa 遺伝子群の発現低下と子宮上皮の扁平上皮化生が関連しているとの報告がある。DES による卵巢非依存の膈の不可逆的変化の誘導と Hoxa 遺伝子の発現変化が関連している可能性も考えられる。DES による雌マウスの尿道下裂にはアポトーシスが関与しており、臨界期は生後 7 日であることが明らかとなった。内

分泌かく乱物質の影響を分子レベルで明らかにするためにも、エストロゲンで発現が変化する遺伝子群を明らかにしておくことが重要と考えられる。Differential Display, DNA Microarray 法で解析を行っているが、発現の変動する幾つかの遺伝子を見出している。また、出生直後の DES 投与によって誘起されるマウス膈上皮の不可逆的増殖に関連する遺伝子の探索も行っている。

E. 結論

BPA はサルでもマウスでも速やかに胎盤を透過して胎仔に達する。ヒトの曝露に相当する 2.4 µg/kg の約 10 倍の BPA で、膈の開口日が有意に早くなり、低用量影響を確認した。卵巢非依存の膈上皮の不可逆的増殖をエンドポイントにした場合には、胎仔期の生殖腺附属器官は新生仔期のものよりも DES, BPA に対して反応性が悪い。胎仔のミューラー管では領域特異的に Hoxa 遺伝子群が発現するが、DES により発現が低下した。DES による雌マウスの尿道下裂の臨界期は生後 7 日であり、DES の臨界濃度は 0.003 µg である。Differential Display 法で、エストロゲンによって発現の変動する幾つかの遺伝子を見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hashimoto, S., Bessho, H., Hara, A., Nakamura, M., Iguchi, T. and

- Fujita, K.: Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Marine Environ. Res.*, 49: 37-53, 2000.
2. Iguchi, T.: Book review: *Hormonal Chaos*. *Nature Med.*, 6: 246-247, 2000.
 3. Yamamura, Y., K. Sayama, Y. Takeda, A. Matsuzawa, T. Iguchi and Y. Ohta: Further study of methallothionein expression in transplantable mouse mammary tumors. *Anticancer Res.*, 20: 379-384, 2000.
 4. Iguchi, T. and T. Sato: Endocrine disruption and developmental abnormalities of female reproduction. *Am. Zool.*, 40: 402-411, 2000.
 5. Iguchi, T.: Developmental effects of estrogenic agents on mice, fish and frogs. *Trabajos del Instituto Cajal*. Tomo LXXVII: 52-53, 2000.
 6. Iguchi, T.: In: *Environmental Endocrine Disruptors*. Eds. L. Guillette, Jr. and D.A. Crain, Taylor & Francis, New York, pp. 234-268, 2000.
2. 学会発表
1. 内田薫、鈴木敦子、小林良夫、鈴木樹理、浅岡一雄、井口泰泉：マウスとサルにおけるビスフェノールAの胎盤透過性。日本動物学会醍71回大会、9月21日、2000。
 2. 岡田晃宣、太田康彦、佐藤友美、井口泰泉：出生前の雌ラット生殖腺附属器官におけるエストロゲン受容体の発現について。日本動物学会醍71回大会、9月21-23日、2000。
 3. 鈴木敦子、佐藤友美、太田康彦、井口泰泉：合成エストロゲンによる胎仔雌マウス生殖器官でのHox遺伝子の発現変化。日本動物学会醍71回大会、9月21—23日、2000。
 4. 漆谷博志、野坂史恵、井口泰泉：マミチヨグのFTZ-F1遺伝子のクローニング及び、各器官における発現について。日本動物学会醍71回大会、9月21—23日、2000。
 5. 宮川信一、佐藤友美、仁科行雄、太田康彦、井口泰泉：新生仔期DES投与による雌マウスの尿道下裂誘導機構の解析。日本動物学会醍71回大会、9月21—23日、2000。
 6. 井口泰泉：動物学から見た内分泌攪乱物質（環境ホルモン）。日本動物学会醍71回大会、公開シンポジウム—1「社会と動物学—2

- 1世紀における社会と基礎科学の
関わり」9月21-23日、2000.
7. 漆谷博志、井口泰泉：マミチヨグ
(*Fundulus heteroclitus*) のエスト
ロゲン受容体 (ER) の単離およ
び発現解析. 第25回日本比較内
分泌学会、能登、11月2-4日、
2000年.
 8. 河野郷通、上島孝久、井口泰泉：
ニホンアマガエル腹側皮膚におけ
る水分吸収機構の性的二型. 第2
5回日本比較内分泌学会、能登、
11月2-4日、2000年.
 9. 井口泰泉：環境によって変わる性.
染色体学会第51回大会、横浜、
公開市民講座「性はいらぬ？ -
遺伝子で決まる性、決まらぬ性」
10月13-15日、2000.
 10. Kohno, S., Kamishima, Y.,
Watanabe, H. and Iguchi, T.:
Effects of estrogenic chemicals
on water absorption in skin of
Japanese Tree Frog, *Hyla*
arborea japonica. Gordon
Research Conference,
Environmental Endocrine
Disruptors, Plymouth State
College, New Hampshire, June
18-23, 2000.
 11. Watanabe, H., Shimizu, N.,
Sugimoto, K., Hatori, H.,
Kawauchi, H., Iguchi, T. and
Handa, H.: High performance
affinity beads designed for
target identification of
chemicals including endocrine
disruptors. Gordon Research
Conference, Environmental
Endocrine Disruptors,
Plymouth State College, New
Hampshire, June 18-23, 2000.
 12. Iguchi, T.: Developmental
effects of estrogenic agents on
mice, fish and frogs. Joint
Meeting of the Vth
International Conference on
Hormones, Brain and Behavior
and The Society for Behavioral
Neuroendocrinology, Madrid,
Spain, August 5-9, 2000.

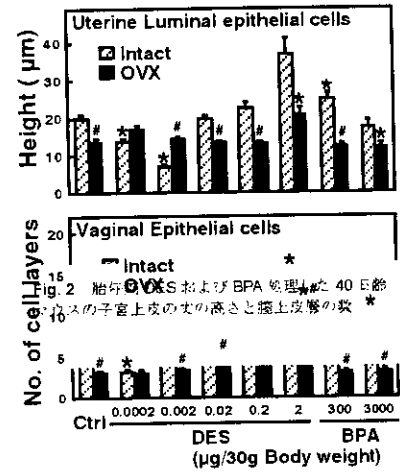
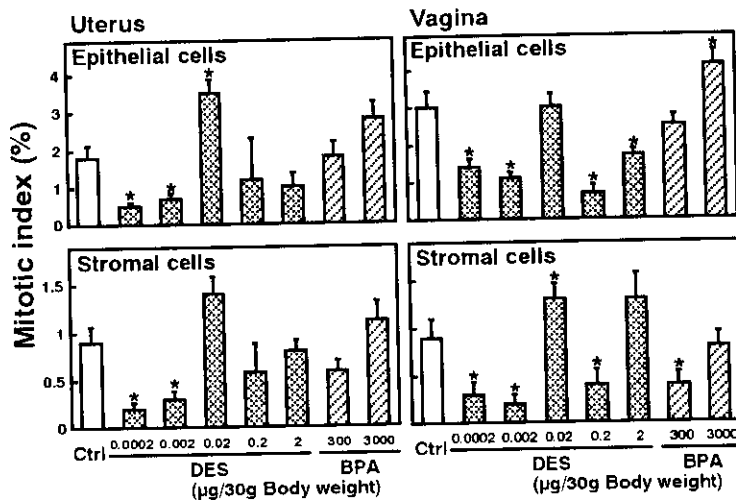


Fig. 1 妊娠 19 日胎仔の子宮と膣における細胞分裂率

Table 1 胎仔期 DES および BPA 処理した 40 日齢マウスの生殖器形成と卵巣非依存的多嚢化した卵・子宮未成熟数

Treatments	Number of examined / with CL	FSI	Ovary interstitial cell proliferation	Uterine involution
Control	9 / 7	77.3	0	0
DES 0.002	11 / 6	65.6	0	0
DES 0.02	5 / 4	80.0	0	0
DES 0.2	12 / 6	50.0	1	0
DES 2	7 / 2	23.0*	0	0
DES 2	8 / 0	0.0*	5	7
BPA 300	9 / 4	44.4*	0	0
BPA 3000	8 / 5	62.5	0	0

*p < 0.05 vs. respective controls (Fisher's exact probability test)

Table 2 41 日齢から 70 日齢までの 30 日間の性周期

Treatments	No. of mice examined	Length of estrus cycle	Diestrus	Estrus (days)
Control	11	5.6 ± 0.3	6.7 ± 0.6	6.8 ± 1.0
DES 0.02	17	7.9 ± 0.9*	15.6 ± 1.9***	6.0 ± 1.3
DES 2	2	7.4	5.8	11.2
BPA 300	11	7.7 ± 1.4	16.3 ± 3.2***	5.7 ± 1.6
BPA 3000	11	7.7 ± 1.1	12.7 ± 2.4***	7.7 ± 1.2

*p < 0.05 vs. Control; ***p < 0.001 vs. Control
Diestrus, 免情間期; Estrus, 免情期

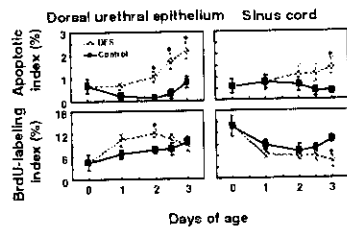


Fig. 3 背側尿道上皮と sinus cord におけるアポトーシスと細胞増殖

Table 3 胎仔期に DES および BPA 処理されたマウスが産んだ仔の数とその性別

Treatments	No. of mice gave birth / examined	No. of fetuses / mother	No. of females	No. of males
Control	10/11 (99.9%)	11.9 ± 0.8	6.0 ± 0.6	5.9 ± 0.7
DES 0.02	13/16 (81.3%)	11.4 ± 0.6	4.5 ± 0.4	6.5 ± 0.7
DES 2	0/2 (0.0%)	0	0	0
BPA 300	10/10 (100.0%)	10.7 ± 0.9	6.0 ± 1.0	4.7 ± 0.9
BPA 3000	9/11 (81.8%)	10.8 ± 1.0	6.1 ± 0.8	4.9 ± 0.8

*p < 0.05 vs. respective controls (Fisher's exact probability test)

Table 4 尿道下裂の発生率と尿道下裂の境界線 (DES 3 µg)

Period of DES injection* (daye of age)	No. of mice examined	No. of mice showing hypospadias	Vaginal opening	Position of connection from cervix between vagina and urethra (%)
0-5 DES	5	5	5	36.8 ± 1.6
3-8 DES	5	5	5	94.1 ± 2.2
5-10 DES	5	4	5	96.9 ± 4.0
7-12 DES	6	1	6	96.2
0-5 Oil	6	0	0	—

*全てのサンプルは12日齢で調べた

DES および BPA による尿道下裂の境界線

Treatment	No. of mice examined	No. of mice showing hypospadias	Vaginal opening
3 µg DES	6	6	6
0.3 µg DES	5	5	5
0.03 µg DES	6	6	6
0.003 µg DES	7	0	0
0.0003 mg DES	7	0	0
300 µg BPA	6	0	0
Oil	6	0	0