

というわれわれの研究室で最近示されたデータ (Maggard et al., 1996) から、可能性のある機序が示唆されており、さらにわれわれの研究室での研究が行われている。MIS 結合実験から示されているように、MIS は、ミューラー管ならびにミューラー管以外の MIS 応答構造上の独自の受容体に対して作用するというのがわれわれの提出した仮説である (Catlin et al., 1992, 1993; MacLaughlin et al., 1992b)。初期の反応は、チロシンホスファターゼを賦活化させて、EGF 活性をブロックすることである。その後の MIS 受容体の細胞質ゾルのタンパクとの下流での相互作用を調べることで、この分子に起因する無数の反応を生じさせる分子機序が明らかになりつつある。

最近、酵母で、タンパク相互作用トラップ技術を用いて、MIS のタイプ I 受容体と考えられるもの (R1) と相互作用する細胞質ゾルのタンパクが明らかにされ、ヒトの細胞で、免疫沈降法を用いて確認された。FKBP12 は、TGF- β ファミリーの全てのタイプ I 受容体と結合し (Wang et al., 1994)、リガンドが結合することで放出されることがわかった。このことは、結合していない状態では、成長抑制物質として機能することを示している (Wang et al., unpublished)。FK506 のようなマクロライド系抗生物質は、その誘導体が FKBP12 と、TGF- β 受容体のタイプ I 受容体とおそらくは共通の結合部位に結合するので、下流の経路の機能的意義を調べるのに用いられている。これらの化合物が FKBP12 と相互作用することで、リガンドの活性が増強され、FKBP12 の放出が、その他の下流トランスドューサの活性化に許可を与える (permissive) であることを示唆するものである。暫定的 MIS タイプ I 受容体の細胞質ゾル領域 (He et al., 1993) は、Myx と名付けられた新規の Myc 様のタンパクとも特異的に結合し、ミューラー管の退化に特徴的なアポトーシスに関係していることがわかっている。Myx 経路が、MIS の下流のシグナル伝達の機序の一部であろうと思われる。これらの分子イベントが、特定のホスファターゼを介して、EGF 受容体で観察された MIS 介在性の脱リン酸化とどのようにコーディネートしているのかを明らかにすることはやりがいのあることであろう。

まとめ

正常な雄性の表現型の発生は、アンドロゲン性の性腺ステロイドホルモンであるテストステロンと、その5- α 還元代謝産物であるジヒドロテストステロン、ならびに胎児セルトリ細胞が産生するミュラー管抑制物質のコーディネートされた活動によるものである。SRVによって精巣の構成が開始された後には、アンドロゲンがウォルフ管由来の構造の成熟と分化を指揮しており、一方でMISは、雌の生殖路の前駆体であるミュラー管がアブレーション（切断）されるようにする。この状況では、活性という用語は、十分な量のホルモンの時宜を得た合成ならびに分泌、標的組織への輸送、ホルモン特異受容体との適切な高親和性の相互作用ならびに下流での代謝イベントの実施が行われた最終結果のことを意味している。標的組織に存在しているはずのアンドロゲン受容体は、特定の遺伝子の発現を誘発（あるいは阻害）する核内のリガンド転写制御因子である。しかし、MIS活性の特異性については、あまり明確になっていない。MISが新たに分化したセルトリ細胞から産生され放出されること、ならびにMISが生理活性を有するようになるには、タンパク分解による開裂を受けなければならないことはわかっている。次にMISは細胞表面の巨大分子と結合し、EGF受容体のEGFにより誘導されるチロシンリン酸化の状態を減少させ、それによって、EGF受容体複合体のキナーゼ活性から生じるその後のシグナル伝達経路を低減させる。現在得られているエビデンスからは、MISの受容体もタンパクキナーゼであるが、セリンならびに（もしくは）スレオニンに対する特異性を有するものであることが示唆されているが、基質はまだ検出されていない。FPBP-12やMyxのような候補MISタイプI受容体との細胞質のタンパクインタラクターが発見されているのでMISは、単にEGF受容体のシグナル伝達を遮断する以上のことを行っている可能性がある。これらのMIS特異的下流シグナル伝達経路の分子的性質については、われわれの研究室で引き続き研究が進められている。

雄性生殖路の正常な表現型発生に必要なイベントの流れをまとめることで、MISリガン

ド結合から後の経路を変化させることになる病理を解明するための枠組みが得られる。特異的血清 MIS アッセイが可能であり、MIS、予想される I 型、II 型受容体、ならびに II 型受容体の細胞質ゾルのパートナーの分子プローブが存在しているので、ミューラー管構造を保持あるいは性器形成不全の患者では、MIS レベルの違いや、これらの経路に関係している遺伝子の突然変異で、疾病の原因を追求することも可能である。問題が多いのは、MIS の血中レベルが正常範囲内で、遺伝子解析で正常であるとわかった場合に、観察されている異常表現型をどのように説明するかである。おそらく、そのような場合には、MIS-受容体の相互作用よりも下流に欠損が生じていたり、MIS の蛋白分解処理が適切に行われないことによるものであろうと思われ、さらに下流での相互作用や制御遺伝子についてのヒントが得られる可能性がある。この遺伝的経路に対する環境毒物の作用については、今後調べる必要がある。とりわけ、周期的変動が、ストレスを受けた修復経路に欠損を生じさせる余地を残している卵巣や精巣の場合に、特に調べる必要がある。

2章 早期発生に対する環境化学物質の影響

Rama Dwinvedi and Philip M. Lannaccone

はじめに

妊娠女性とまだ生まれていない胎児が環境化学物質に暴露されることが、公衆衛生上の重大な関心事となっている。米国では、毎年 350 万件の出産があり (Conover, 1994)、出生時欠損の約 4-6%は、環境中の化学物質が原因であると推定されている (Wilson, 1977)。1988 年には、米国で約 25 万例の新生児が出生時欠損で生まれており、60 万例の女性が流産や胎児死亡を経験しており (Chelimsky, 1991)、多くの幼児が、21 世紀に必要な知的機能を発達させる能力を低下させるような化学物質に暴露されている。新生児期、周産期 (Mirkin and Singh, 1976) ならびに生後 (Hood, 1990; Schardein, 1993; Needleman and Bellinger, 1994; Sastry, 1995) の発達に対する環境化学物質の影響について得られている豊富な情報は別として、将来の発生に影響を及ぼす基本的な決定がなされる胚の着床前後の時期での化学物質への暴露に関しては、情報がほとんどない (Watson, 1992)。

着床前後に胚が毒性物質に暴露された場合のほとんどでは、毒による障害の影響を受けない。胚は、死滅してしまうか、回復して正常に発生するかのいずれかである。このような毒物による障害に体知る“全か無か”の応答は、胚に生存するためのユニークな制御能力があることによるものである。発生のこの時期の胚に全能性があることが、この適応応答に重要な役割を果たしている。このような状況では、有害な影響があれば、着床前の胚の細胞のほとんどあるいは全てに、同じ程度に障害を与えるであろうと考えられてきた。障害が非常に大きい場合には、胚は死滅するであろうし、そうでない場合には、障害から回復でき、損傷を受けた細胞は、正常に発生できる能力を持った他の細胞によって置き換えられるものと思われる。その後の発生過程で、胚は正常なサイズを取り戻すことができる。現在では、このような“全か無か”考えは、正しいものではないように思われる。発

生の胚盤胞期は、シクロホスファミド(Spielmann et al., 1982)や重金属、トリパンプルー(Lin and Monie, 1973)などの物質に対して感受性があることが示されたからである。われわれの研究室での研究(Iannaccone et al., 1982, 1987; Iannaccone, 1984; Bossert and Iannaccone, 1985)ならびに他の研究室での研究(Brunstrom, 1991; Kaufmann and Armant, 1992; Kholkute et al., 1994a, b)から、着床前の時期に毒物による障害を受けると胚の正常な発生に悪影響を及ぼし、胎児や新生児が死亡したり、異常形態発生したり、出生後のアウトカムが不良になり得ることのエビデンスが得られた。妊娠齧歯類に対するアルキルニトロソ尿素の毒性作用も、着床失敗や、胚の死滅ならびに出生率の低下を招くことが示されている(Napaklov et al., 1968)。

着床前の胚は、従って、発生時期に応じて、化学的障害に対して感受性が高いことが示された(Spielmann et al., 1982; Generoso et al., 1988)。胚盤胞期初期のマウスの胚(受胎から3日後)は、発生の他の段階よりも、アクチノマイシンDの有害作用に対してはるかに感受性が高いことが示されている。他の段階では、発生中の胚の卵割がアクチノマイシンDによって阻害される、これは細胞死によらない作用である(Epstein and Smith, 1978)。このような応答の違いは、化学物質の蓄積速度あるいは蓄積量の違いによるものではない。アクチノマイシンDは、感受性の高い胚盤胞期初期よりも、感受性の低い胚盤胞期後期のほうが迅速に高いレベルまで蓄積するからである(Iannoccone et al., 1987)。メチル水銀の影響も、胚発生の桑実胚期に対してよりも胚盤胞期に対する方が悪影響が大きいことも報告されている。高濃度のメチル水銀は、胚の着床を停止させることで急性作用を発揮するが、低濃度では内部細胞塊の発生を阻害する(Matsumoto and Spindle, 1982)。メチルニトロソ尿素に暴露されても、胚盤胞に機能障害をもたらす濃度では、桑実胚から胚盤胞への進行は止めない(Iannaccone, 1984)。

胚盤胞そのもの自体の中での化学的障害に対する応答に違いがあることが、内部細胞塊と栄養外胚葉細胞の間で認められている。内部細胞塊は全体として、ジエチルスチルベスト

ロールや抗有糸分裂薬、多官能基アルキレート薬、ならびにプリン体やピリミジンアナログなどの様々な物質を発生の早期に母体に与えると、より大きな影響を受けることがわかっている (Adams et al., 1961)。内部細胞塊と栄養外胚葉細胞の間で感受性に違いがあるのは、これらの組織での代謝過程のタイプと代謝速度に違いがあることによるものであると思われる。感受性の違いは、これら2種の組織での生存能力の違いを反映しているものであるとも思われる。本章では、着床前の時期の胚の発生に対する環境化学物質の有害作用と作用機序について検討することにする。

初期発生

われわれは、哺乳動物で受精から胚が支給に着床するまでの器官を初期胚発生と呼ぶことにする、着床前期間と呼ぶこともある。この期間は種によって異なり、ヒトでは約7日間、マウスでは4日、ラットでは5日である。多くの哺乳動物では、発生はこの段階では、胚は直径100 μm であり、2個の極体(極細胞)があり、透明帯と呼ばれている化学的に複雑な構造で囲まれている。透明帯は屈折率の高い、ムコ多糖体とシアリン酸(シアル酸)残基からなる細胞を含まないコートである。透明帯は、様々な理由で初期発生に重要であるが、透明帯を取り除いても、正常な発生は妨げられない。透明帯は卵割の際に胚を束縛させるものであり、卵割球が分裂しても、一緒に保たれ、適切な方向を保つようにさせる。透明帯は胚が卵管に付着するのを防ぐ働きもする。

着床前発生の3つの相について検討することにする。最も初期の相は、受精卵から2細胞接合体までの発生であり、主に母体のメッセージによって制御されている。第2番目の相は、2細胞期から胞胚腔(腔所)が形成されるまでの段階であり、桑実胚期を含み、胚のゲノム発現が始まる時期である。最後の相は、2つの異なる細胞集団 - 内部細胞塊と栄養外胚葉細胞 - を持った胚盤胞が形成される時期である(図1)。マウスの胚の初期発生の簡単な説明を以下に行う。

卵子形成

雌の原始生殖細胞は、妊娠 8 日目に出現し、背側腸間膜(dorsal mesentery)に沿って腸間膜ひだまで移動し、第 9、10 日までには胚堤(germinal ridge)に至る。卵巣の特徴が妊娠 11 日に見られ、第 13 日までに減数分裂を行うことで卵子が形成される。妊娠 14、15 日に、卵原細胞の分裂の開始と共に、レプトテンや合糸期は見られることがある。妊娠 16、17 日までには、無数のパキテン期が認められる。一部の原始卵は、濾胞細胞を出生時に獲得し、それからすぐに、全ての卵子が濾胞細胞を獲得する。一次卵母細胞は、サイズが比較して大きく、大きな球状の核を有することで他の細胞とは区別できる。出生から約 3 日後に、卵母細胞は、ディクチエート期として知られる静的状態を獲得し、生後 5 日で、すべての卵母細胞は第一減数分裂の前期のディプロテン期になる(Rugh, 1991)。

それぞれの卵母細胞は濾胞の中に入っており、何層もの濾胞細胞に取り囲まれている。濾胞細胞は、卵母細胞の成長と分化に重要な役割を果たしている。卵母細胞と濾胞細胞は透明帯が沈着することで次第に離れていく。透明帯は、成長する卵母細胞が合成し、沈着させた細胞外物質の層である。出生時にマウスの卵巣に存在していた原始濾胞の半数以上が、3-5 週齢までには変性する。雌マウスは、系統や環境因子にもよるが、6-8 週齢で性的に成熟する。この時点で、それぞれの卵巣には、約 1 万個の様々な成熟度の卵母細胞が存在している(Hogan et al., 1986)。卵子形成が開始されると、マウスの生殖期間を通じて、12-14 月齢まで 4.5 ないし 5 日の周期で、規則的に卵子形成が行われる。成熟した卵子は、予定背側部位に RNA の皮質ゾーンがあり、予定腹側部位に空胞がいくつか存在しているためにわずかに極性を有している。それぞれの排卵で、約 1000 個以上の卵が放出されるが、そのうち成熟しているのは 1%に過ぎない。つまり、2-12 カ月の生殖期間の中で、およそ 6 万個の卵子が生じるが、そのうち 500 個が成熟卵であり、およそ 100 個しか、子孫を生じるに至らないということである(Rugh, 1991)。

排卵

排卵は、それぞれの性周期での濾胞細胞と卵母細胞の協調のとれた応答によって成熟卵が濾胞から卵巣周囲空間に放出されることである。脳下垂体で産生される卵胞刺激ホルモン (FSH) レベルの上昇に対して、ごく一部の卵胞しか応答しない。刺激を受けた濾胞細胞は、卵子との接触を絶ち、高分子量プロテオグリカンと組織プラスミノゲン賦活物質 (TPA) の合成と分泌を増加させる。同時に、濾胞は液体を集積させ、膨潤し、卵巣周囲に移動し、最終成熟の準備ができたなら卵子を放出する。排卵は、脳下垂体で産生される黄体形成ホルモン (LH) のレベルの急激な上昇 (サージ) に応答して生じる。LH 刺激の後、卵母細胞は核の成熟と減数分裂を受ける。少量の細胞体で取り囲まれた 1 組の染色体が、第 1 局体として排出される。この段階で卵母細胞は、最終的に濾胞から放出される (Hogan et al., 1986)。

排卵した卵母細胞には、それぞれ透明体と濾胞細胞の塊 (卵丘塊) が取り囲んでいる。卵子は、上皮表面にある無数の繊毛の協調的働きによって卵管の開放端 (卵管漏斗) の方向に移動させられる。通常の排卵では、2-3 時間の間に 8-12 個の卵子が放出される。成熟前のマウスでは、ホルモン投与によって排卵を誘発することができ、過排卵では、最大 100 個の卵子が生じることがある。排卵後に、濾胞細胞はステロイド放出細胞に分化し、妊娠の維持を助ける。成熟卵は、直径約 $95 \mu\text{m}$ であり、体積は約 $200,000 \mu\text{m}^3$ である (Rugh, 1991)。

受精

受精とは、雄性と雌性の前核が融合して、一連の細胞の形質転換が開始されることである (Ziomek, 1987)。雌の生殖路の中に精子が放出され、5 分以内に卵管膨大部に到着する。しかし、約 1 時間ほどの間にしか受精できない。この成熟過程は、受精能獲得として知られているものであり、hypermotility を誘発し、精子が先体反応を生じる準備を整える。活性化によって、卵子は、休止していた第二減数分裂を終了させ、この段階で一倍体となる。卵子の表面に到達するには、精子は、まず卵丘塊を通過して、透明帯と能動的に結合

する。透明帯から単離された分子量約 83kDa の糖タンパク ZP3 (Saling, 1989) が、精子細胞の 3 種の接着タンパクの助けを借りてマウスの精子と結合し、先体反応を開始させると考えられている。透明帯と精子がお互いを認識する分子機序については、明確にわかっていない。先体反応の後に精子頭部は、様々な加水分解酵素を精子の膜と精子の核の間の空間から放出させる。先体反応は、受精の非常に重要な引き金であると考えられている。別の精子が卵子と融合することは、おそらく、卵子表面の変化や、透明帯を他の精子が通過できる能力を低下させるような何らかの物質を放出することで抑えられているのであろう。もう一つの多精子進入を防ぐプロセスは、皮質顆粒の Ca^{2+} イオン依存性の放出である。

活発な精子は、卵管膨大部で、約 8 時間受精能を保持しており、一般的には、雌の全ての卵子が、交尾から 6 時間以内に受精する。受精後には、透明帯が拡大し、卵子が縮み、その結果、卵黄周囲腔が卵子と透明帯の間に生じる。第 1 極体がこの空間に認められる。雄性ならびに雌性の前核が、交尾から 8 時間後には認められるようになる。精子の後部が卵子の膜と融合することで、一連の反応の引き金となる。受精中に、精子の頭部、midpiece、ならびに尾部の大部分が、卵子の細胞質に取り込まれる。受精によって、第二の減数分裂が引き起こされ、第二極体が放出される。一倍体の雄性ならびに雌性の前角は、卵子の中央部に移動し、この移動中に DNA 複製が行われる。前核は融合せず、膜が壊れ染色体が紡錘体上に集まる。前核がほぼ連続し、最初の分裂紡錘体が形成されたら受精が完了したと見なす。

卵割

1 細胞接合体ならびに 2 細胞期に至る最初の卵割における DNA 複製は、マウスの胚では、母体ゲノムのコントロール下にあるように思われる (Telford et al., 1990)。胚のゲノムが活性化されていないか、あるいは活性化されていたとしても、次の発生段階とは関係ないかのいずれかである。実験から、母体によるコントロールから胚によるコントロールに

切り替わるのは、1細胞期段階においてであることが示された。RNAポリメラーゼIIの活性は1細胞接合体には認められなかったが、2細胞胚には存在していた(Moore, 1975)。他の動物では、コントロールの切り替えは8細胞ないし16細胞桑実胚期とばらつきがある。卵割中の胚は、透明帯によって保たれており、透明帯は、卵管壁に受精卵が付着するのを防いでいる。哺乳動物での卵割は、比較的ゆっくりしたプロセスであり、受精から12ないし24時間後に生じる(Gilbert, 1994)。2細胞を生じる最初の卵割は、ヒトを含むほとんどの哺乳動物では卵管膨大部で生じ、子宮に胚が移動するまで卵割が続く。卵管上皮の繊毛の運動と、方向性を持った神経筋の運動が複合して卵割中の胚が卵管を移動する。母体の因子が卵割に影響を及ぼすかも知れないが、卵割は、本質的には胚のコントロール下にある。

*in vitro*の実験では、卵管内の環境因子が、卵割の初期過程に重大な影響を及ぼしていることが示唆されている。受精卵の紡錘体と星状体が並び、その後受精卵が長大化することで初期の卵割へと向かう。2つの前核のクロマチン含有量は第1回目の卵割の前には混合していないが、分割直後に一緒になる。それぞれの核のDNA量が、分裂前に2倍になり、卵割中にRNAとタンパク合成が著しく増加する。精子が、近位中心小体にkinetic centerを与え、卵割時間に影響を及ぼすものと思われる。第一卵割から第二卵割までの時間にはばらつきがあり、マウスの系統に依存する(Rugh, 1991)。その後の卵割は、次第に短い間隔で生じるようになり、次第に同期がとれなくなる。4細胞を生じる第二卵割は、受精から約37時間後に生じ、8細胞を生じる第三卵割は、受精から約47時間後に生じる。

コンパクション

早期卵割の間に、胚は、コンパクション(胚細胞の緊密化)を受け、通常は8細胞後期の桑実胚に生じ、その結果、球状の胚になる。それぞれの割球は形状を変化させ、平らになってお互いに接触し、細胞-細胞間の接触を増す。コンパクションには以下に示す基本

的イベントが関与しているように思われる：(1)細胞表面の認識と、側方の微絨毛のリングが隣接する割球に付着し、(2)その後、これらの微絨毛の微小管が短くなり；(3)コンパクトな極性のある状態を維持し、その結果それぞれの割球の微絨毛が先端に局在することになる。コンパクトは可逆性があり、再誘導が可能であるように思われる。しかし、微絨毛の極性形成は一度しか生じない(Johnson and Ziomek, 1981)。

コンパクト前に、マウス胚の娘割球はイオン結合を示し、細胞質架橋を有し、フルオレセインやホースラディッシュペルオキシダーゼが通過することができるが、分子量の大きな分子は、ギャップジャンクションを通過できない。異なる有糸分裂対の割球には細胞間経路が認められない。ギャップジャンクションによる細胞間コミュニケーションは、コンパクトの終了した8細胞のマウス胚で最初に検出される。この段階では、イオン結合が観察され、1つの細胞に注入したフルオレセインが、胚の8細胞全てに分布する。ギャップジャンクションの形成には、タンパク合成を必要としないように思われる。シクロヘキサミドでタンパク合成を阻害しても、ギャップジャンクションの形成が妨げられないからである。受精から60時間後の16細胞を生じる第四卵割の結果、細胞の硬いボールのようなものが形成される(Kalthoff, 1996)。8細胞から16細胞に細胞の数が増加するには、一部の細胞が桑実胚の内部を占めなければならなくなり、他の細胞によって、外部とは完全に隔離される。細胞は、内部と外部に異なる微小環境を作り(Ducibella and Anderson, 1975)、この環境に対して細胞は反応する。位置の違いによるこれらの微小環境の違いが、in side-out side 仮説による胚盤胞で内部細胞塊(ICM)と栄養外胚葉に分化する基礎である(Tarkowski and Wroblewska, 1967)。4細胞胚あるいは8細胞胚初期のそれぞれの細胞が、胚盤胞の栄養外胚葉とICMを形成する能力を有している。極性仮説によると(Johnson and Maro, 1986)、位置シグナルがコンパクトの時点で割球の間で出されており、その結果、カルシウム依存性細胞接着糖タンパク“ovomorulin”あるいはE-カドヘリンの関与する極性の軸が決定される(Winkel et al., 1990)。外側の極性細胞が栄養外胚葉とその派

生細胞を形成し、内側の無極性細胞が ICM と胎児を含むその派生細胞を形成することになる。

胚盤胞形成（空洞形成）

桑実胚後期には、偏心した位置に、スリット状の液体で満たされた構造、胞胚腔が生じる。

胚盤胞形成のプロセスは、16 ないし 32 細胞桑実胚から始まる。収縮と拡大のサイクルを繰り返した後に、小帯のタイトジャンクションが周辺の割球の間に形成され、その結果バリアが生じ、胚内に胞胚腔を生じさせることができる。このプロセスを説明するのに以下に示すモデルが提唱されている：

1. secretion cavitation モデル(Wiley and Eglitis, 1980) このモデルでは、外側の割球の基底外側縁に最初の胞胚腔液を含む小さな細胞質ドロップレットが現れることで空洞形成を説明する。
2. transporting cavitation モデル(Ducibella and Anderson, 1975) 外側の割球を通じてイオンと水が輸送されることが、最初の胞胚腔液が生じる起源であるとするモデル。しかし、このモデルでは、胚盤胞形成の初期段階に細胞質ドロップレットが現れることが説明できない。
3. metabolic activation モデル(Wiley, 1984) 先の 2 つのモデルを考慮に入れ、基底外側膜に存在しているミトコンドリアと脂質ドロップレットの近接、ならびに Na^+/K^+ ATPase が胞胚腔液の形成の原因であると説明する。 β 酸化により生じた ATP が、ATPase によって使われて、 Na^+ イオンを外部の細胞間腔にくみ出す。 Na^+ イオンが流出することにより生じた細胞間腔は、水の受動拡散により満たされる。空洞形成の終わりには、胞胚腔が約 64 細胞で形成される（マウス胚）

細胞がこの領域で変性すると胞胚腔は拡大し、最終的には胚は中空の球状になる。胞胚

腔は外側に栄養外胚葉、あるいは栄養膜（トロホブラスト）と呼ばれている大きな平坦な細胞の単一層と、内部細胞塊(ICM)として知られている偏心している凝集物から構成される。栄養外胚葉は、胎盤を含む胚外組織になり、着床を行うが、ICMのほうは、胎児になる。胚盤胞では、呼吸代謝レベルが高く、透明帯のハッチングとシェディングのプロセスが生じる。この作用には、拡大運動とリズムカルな波打ち運動が含まれている。胚盤胞が1回大きな収縮を行っただけで、ほぼ完全に透明帯が消失することがある。大規模な収縮は6-8時間ごとに生じ、その間に20-100分おきに小さな収縮を繰り返す。収縮の中にはゆっくりしたものもあれば(5-6分)、比較的速いものもある(15-20秒)。ハッチングの時点では、胚盤胞はもはや球状ではなく、わずかに卵形で、サイズがかなり異なる(96-108 μ m)。この段階で、胚盤胞は、着床の付着段階として、子宮表皮と接触することができる。胚盤胞期には、胚細胞の核の活動が活発になり、グアニン-シトシンを多く含むリボソームRNAを合成する。

着床

着床は、胚盤胞後期(64細胞期)に始まる。透明帯からハッチングした後は、胚盤胞は着床の準備ができています。ハッチングは、トリプシン様の酵素(trypsin)によってもたらされる。この酵素は、桑実胚の栄養膜によって合成され、前述の胚盤胞の収縮拡大によって生じる。着床直前のこの時点でLHの分泌により開始されるエストロゲンサージがあるように思われる。黄体からのプロゲステロンで、着床の子宮内膜の準備が行われ、一方、プロゲステロンとエストロゲンは、着床の維持のためバランスがとれている(Rugh, 1991)。子宮の準備ができていなければ、胚は着床せず、移植した胚盤胞は、子宮内で生存できる期間は非常に短い。

着床は、以下の段階から構成されている：(1)胚盤胞が子宮粘膜に付着する。ここでは、栄養外胚葉の受容体が、子宮内膜上皮としっかり結合する役割を担っている；(2)胚コンボ

ーネットが粘膜内に侵入し広がる；(3)着床した胚に対する子宮内の応答。ヒトの場合には、栄養外胚葉細胞は子宮上皮の基底膜を通じて侵入し、子宮内膜の支質に着床部位を確立する。マウスやラットでは、胚は、透明帯から出て、次に胚盤胞が子宮内膜により取り囲まれ間質に着床する。真獣亜綱の一部の種（ヒト、霊長類、ネズミを含む）では、子宮支質細胞は脱落する。脱落膨張した細胞は、妊娠を支え、着床した胚の免疫拒絶を抑えるのに重要であろうと思われる。脱落膜のプロラクチンが、羊水の量の制御にも関与しており、脱落膜のルテオトロピン（ラットのプロラクチン様のホルモン）が、黄体の維持に関与しているとされている。

発生中の胚は、子宮腔の腹側もしくは antimesometrial 部位の子宮粘膜のくぼみに存在している。着床部位を決めるのは子宮であって胚盤胞ではない。子宮着床の位置を制御する因子についてはわかっていない。近くにある胚で変性変化が始まるのが、着床した胚盤胞の領域での血管が崩壊することと一致している。着床の始まりは粘膜に付着した栄養外胚葉からの分泌物の放出であるように思われる。子宮の白血球が、栄養外胚葉の部位に集まり、粘膜細胞がゆるみ、変性あるいは消化されるように思われる。

着床前の胚は、環境化学物質の影響を受けることは明白である。母胎の生殖液、卵管液あるいは子宮環境を会して暴露が生じる可能性があるからである (Agostini, 1993)。着床前の時期は、発生上の基本的な決定がなされ、その結果胚盤胞が形成され、さらに胚の発生が続いていく時期である。TGF- α や上皮増殖因子 (EGF) のような増殖因子、タイトジャンクションタンパク- Zol、 Na^+/K^+ ATPase の α 、 β サブユニット、ならびにウボモルリン (uvomorulin) のような重要な遺伝産物が初期胚の着床前段階の発生にすべて寄与しており、毒物による障害の標的となる。

原腸形成

原腸形成 (gastrulation:ギリシャ語 *gaster*、“胃”) とは、外胚葉、内胚葉、中胚葉の 3

つの一次胚葉が形成されることである。原腸形成には、離層、細胞分化、ならびに細胞移動が関与している。着床後に、組織の迅速な増殖と分化が続く。栄養外胚葉集団の数が拡大し、内胚葉の拡大が生じて、遠位では拡大している外胚葉を覆うようになる。発生のこの時点でも、非対称の主軸はまだ現れない。2つの組織、栄養外胚葉と内部細胞塊は、胚、ならびに胚外の外胚葉、胚、ならびに胚内の内臓内胚葉、壁側内胚葉ならびに栄養膜になる。胚は遠位方向に拡大し、胚の外胚葉は、全能性を保持している。マウスでは受精から約6日の時点で、背側-腹側の予定軸ならびに前-後方向の予定軸が確立する。原腸形成は、胚外胚葉の後面から始まる。ここでは、胚の外胚葉と内胚葉が、外胚葉からの中胚葉の突出によって輪郭(図2)が遺伝子 *nodal* の場合と同様に instructive induction によって形成される(Iannaccone et al., 1992; Zhou et al., 1993)。

マウスの胚の着床前後期の発生における遺伝子発現

マウスの接合体では、母体の mRNA から3種のリン酸タンパク複合体が初期に発現されることが示されている。Hsp 68などの熱ショックタンパクが、1細胞胚の初期の、接合体のゲノムの主な活性化が生じる時期に現れる(Bensaude et al., 1983)。HSP70.1が、マウスの2細胞期胚の初期に発現することが示された最も早期の遺伝子である(Thompson et al., 1995)。ラミン A、B、ラミニン、ウボモルリン、ならびにギャップジャンクションタンパクなどの他の多くのタンパクが胚の着床前発生の時期に発現することが示されている(Glover and Hames, 1989)。増殖している胚盤胞の *in vitro* 研究を行って、栄養外胚葉の表面にEGF受容体が存在することが示されている。しかしEGFは、マウスの胚では、妊娠中期あるいは発生の後期にならないと産生されない(Adamson and Meek, 1984)。PDGF (platelet-derived growth factor) A および B型の mRNA は原腸形成期の間中存在すると、報告されている(Mercola and Stiles, 1988)。

ボディープランにつながる非対称性の発生には、多数の遺伝子の協調した発現が関与し

ているように思われ、それらの多くは、高度に保存されている。レトロウイルスによる突然変異実験で(Iannaccone et al., 1922)、細胞の増殖と分化の制御、とりわけ、マウスの卵筒胚 (egg cylinder embryo) 期には、ある種の遺伝子が関与することが示唆された。その後の実験(Zhou et al., 1993)によって、新規の遺伝子 *nodal* が同定された。これは、TGF- β スーパーファミリーの新しいメンバーをコードしているものであった。これは、中胚葉形成とその後のマウスの胚の軸構造の形成に重要な役割を果たしている (Zhou et al., 1993)。この遺伝子は、中胚葉の形成に不可欠であることがわかり、*nodal* 遺伝子座にレトロウイルスを挿入すると、マウスでの胚の中胚葉の形成が止まった (Iannaccone et al., 1992)。後には、*nodal* 遺伝子は、左右非対称のパターンを決めるのに重要であるように思われる。

いくつかの抗酸化酵素の遺伝子発現パターンについても、発生の着床前の段階で RT-PCR 法を用いて調べられた (Harvey et al., 1995)。最近の研究では、2 細胞期から胚盤胞後期までチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子の発現レベルが約 20 倍上昇していることが報告されている。TK-mRNA の RT-PCR 解析によって、1 細胞期と 2 細胞期には、TK-mRNA のレベルが非常に低く、5 日目には急速に上昇しており、発生の着床前の期間に転写レベルで TK 遺伝子の発現が制御されていることを示唆するものである (Lee et al., 1994)。同様に Na^+/K^+ ATPase (α サブユニット) 遺伝子の発現も、マウスの胚の着床前発生において、桑実胚後期と胚盤胞初期に存在することが報告されている (MacPhee et al., 1994)。カタラーゼ、CuZn スーパーオキシドジスムターゼ (CuZn-SOD)、Mn-SOD、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPX)、ならびにグルタミルシステインシンセターゼの転写が、in vitro と in vivo の両方で着床前発生のすべての段階のマウス胚で検出されている。これらの抗酸化酵素をコードしている遺伝子が、着床前の期間に発現されていることは、胚の初期発生の中に、酸化ストレスに対する防御機序が存在していることを示唆するものである。

ショウジョウバエの発生階層から高度に保存された遺伝子が、哺乳動物の発生に重要で

あることがわかっている。例えば、ホメオボックス (Hbox) 遺伝子の *Hox-1.3(a5)* ならびに *-2.1(b5)* が、RNA 解析で検出されており、*Hox-1.5(a3)* と *-3.1(c8)* が、交尾から約 7.5 ないし 8.5 日後の胚盤胞形成期に *in situ* ハイブリダイゼーション法で検出されている (Jackson et al., 1985)。ホメオボックスは 183 塩基対の配列であり、61 個のアミノ酸領域をコードしており、ショウジョウバエのいくつかのホメオティック遺伝子と共通である (Gehling, 1987)。最初のホメオボックス遺伝子は、2 つの主なホメオティック遺伝子クラスターに限局していた (*ANTP-C* ならびに *BX-C*)。しかし、多くの遺伝子を含むより多様なホメオボックスがネズミの胚発生時に記述されている (Rauskolb et al., 1993; Lints et al., 1996)。ほとんどのホメオボックスファミリーのメンバーは、ホメオドメインのアミノ酸がおよそ 70% 一致している。この領域がこれらの転写因子の DNA 結合領域である。

Hox-1.4(a4)、*Hox-2.6(b4)*、*Hox-4.2/5.1(d4)* のような 4 クラスターの 20 以上のマウス *Hox* 遺伝子が、単離され、*Antenapedia* 科に属している。転写物は、胚の外胚葉、中胚葉、ならびに尿膜に認められる。それぞれの遺伝子は、胚の前後 (A/P) 軸に沿って異なる領域で発現され、発現の前方への広がり厳格に制御されている。このタイプの発現パターンは、ショウジョウバエのホメオティック遺伝子の発現と非常に似ているものである。ショウジョウバエのホメオティック遺伝子の場合には、*ANTP-C* と *BX-C* の異なるメンバーが、外胚葉と内胚葉で、離散的であるいは重なり合いを持って発現されている。マウスの胚での *Hox* 遺伝子の発現の制御機序については、明らかにはなっていない。例えば、有効な DNA 結合を得るには、様々な遺伝子産物のヘテロダイマー化が必要なのであろうか？ショウジョウバエの *even skipped (eve)* 遺伝子ならびに *Hlx* 遺伝子の相同体であるネズミ *evx1* 遺伝子 (Spyröopoulos and Capecchi, 1994) の部位指定突然変異形成実験 (Lints et al., 1996) で、これらの遺伝子が、細胞-細胞シグナル伝達の機序を通じて、胚盤胞形成の開始や、パターン形成/成長の制御に重要な機能を有していることが示唆されている。

ホメオボックスも含む “paired box” が、多くのショウジョウバエ分節遺伝子に見つか

っており、126 アミノ酸領域をコードしており、マウスの遺伝子のこのファミリーのメンバー間では、80-90%配列が同じである。例えばマウスの *Pax-1* (Deutsch et al., 1998) では、ショウジョウバエのものと 70%一致しており、交尾から 9 日後に最初に現れ、制御機序には関与していない。*Pax-1* は、マウス初期発生では検出されない。同様に、*Krüppel* ならびに *hunchback* ファミリーの zinc finger コード遺伝子は、ショウジョウバエの発生を制御するが、マウスでは着床前の時期には検出されていない。最近の *in vitro* の実験で、標的突然変異で *GATA-4* 遺伝子 (zinc finger コード遺伝子のファミリー) を破壊させると、内臓内胚葉の形成が特異的にブロックされることがわかった (Soudais et al., 1995)。発生階層で保存されている遺伝子は、明らかに環境による突然変異の標的となり得るものであり、着床前発生の段階で遺伝子ネットワークが発見されるにつれて (例、*fgf* とその受容体)、環境ベースの損傷に対する感受性が、重要な研究目的となるであろう。

図 1 ラットならびにマウスの初期の胚。(A) 排卵直後のラットの卵管。卵子(o)は濾胞細胞(fc)に取り囲まれており、上皮ライニングとの相互作用を通じて、卵管（ファローピウス管）が卵子を獲得するのを助けている。卵子(o)は直径約 $100\mu\text{m}$ 。H+E 染色固定組織切片。(B) 受精から約 14 時間後のマウスの 1 細胞期。矢印は極体の一つを示している。透明帯(zp)で取り囲まれた卵黄周囲腔に存在している。前核が直径約 $100\mu\text{m}$ の受精卵の中央部に認められる。(C) 2 細胞期、4 細胞期 (D 上)、8 細胞期 (D、下) はすべて、直径約 $100\mu\text{m}$ 。(E) 胚盤胞期、胞胚腔(b)が形成されている。この段階の胚も、まだ直径約 $100\mu\text{m}$ の大きさであるが、胚盤胞後期(F)にはいくぶん大きくなる。この時期には、拡大し、内部細胞塊が小さくなり、認めるのが困難になる。F では栄養外胚葉が胚の中で最も良く見えるもので、上皮細胞で舗装されているように見える。B-F は生きた胚で、Hoffman 変調コントラスト光学系で写真撮影したもの。(Iannaccone, 1990 をもとにした図)

図 2 着床後のマウスの胚の顕微鏡写真 (左)。中胚葉(m)が、胚外胚葉(ee)から形成されており、内胚葉(en)で取り囲まれている。胚は、迅速に、特徴を持った胎児に発達する(右)。胎児は発生 12 日目に撮影した。バー=2.5mm (Iannaccone et al., 1992 を基に作成)。

13章 植物エストロゲンと生殖医学

Claude L. Hughes, Jr, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina
Ginger Tansey, Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, North Carolina

はじめに

用語および基本概念

植物由来の物質が生殖ホルモンに類似した働きをして、哺乳類の繁殖に影響を与えるのではないかという見解を考察するために、コンセンサスが得られなくとも明確に用語を定義することから始める。「植物エストロゲン」という用語は、(動物の体内で)「エストロゲン」のような働きをもつ植物由来の物質が存在することを意味する。辞書にある基本的な用語の定義が役立つと考えられる。発情期とは、「雌の動物の性周期の一時期で性交を好んで許すことを特徴とするいわゆるさかり」(*Stedman's Medical Dictionary*, 22nd ed., 1972)の時期である。発情は特別の行動パターンである。エストロゲンは、「エストラジオールのような発情ホルモンに特有な生物学的作用をもつ天然物質または合成物質の総称。下等哺乳類を発情させる効果に対して付けられた名称」(*Stedman's Medical Dictionary*, 22nd ed., 1972)である。一般にエストロゲンと考えられる物質には、わずかでも「下等哺乳類」を発情させる働きがあるはずである。この端的で簡単明瞭な説明によって、植物には実際に「エストロゲン活性を持つ」物質が含まれている可能性はほとんどないことが分かる。何故なら、発情を誘起することが明確に立証されている植物性物質は、典型的なエストロゲン活性を持つステロイドであるエストロン、エストラジオール、エストリオールに限られるからである。Farnsworth et al. (1975)が総合的に検討した結果、13種類の植物に植物性物質 1kg におよそ 0.1~0.3 mg の僅かなステロイドエストロゲンが含まれるにすぎないことが分かった (Jacobsohn et al., 1965)。

植物エストロゲンと呼ばれる物質に関する過去 50 年間の調査、文献、科学的関心の大部分は、哺乳類に対する植物由来のイソフラボノイドとクメスタンの影響を解明することに向けられてきたことは注目に値する。これらの物質は、家畜の餌や人間の食糧となる多数の植物中に大量に含まれ、その生物学的特性は興味深いものである。しかし、イソフラボノイドとクメスタンが、下等動物の発情を誘発するという報告は 1 件もないことから、エストロゲンではないと結論しなければならず、エストロゲンと考えたのは誤りであった。

したがって、「植物エストロゲン」は「本当の」エストロゲンより弱い物質または異なる物質であるという意味で確立された用語として使う。エストラジオールおよびその他のステロイドエストロゲンは、脳内の性行動を調節する部位(およびおそらくその他の複雑な統合的神経系機能)を除くいくつかの標的組織で特定の作用をもつことが分かっている。この標的組織でイソフラボノイドとクメスタンはエストラジオールに非常に類似した作用