

純度(99.5%)から、実質のDBTCI量が所定濃度となるように換算した。

投与経路および投与方法:強制経口投与した。投与量は5 mL/kgとし、個体別に投与日の体重に基づいて算出した。

試験および観察方法:雌を雄と1対1で夕方から同居させ、翌朝膣栓が認められた雌を交尾成立とみなし、その日を妊娠0日とした。各群12匹の雌マウスの妊娠0-3日または妊娠4-7日にDBTCIを7.6, 15.2, 30.4 mg/kg/dayあるいは媒体のみを投与し、妊娠18日に雌マウスを開腹し、胚/胎児への影響について調べた。

妊娠マウスの一般的症状は1日に2回観察した。妊娠マウスの体重及び摂餌量は妊娠0, 4, 8, 12及び18日に測定した。妊娠18日に妊娠マウスを麻酔下にてと殺した。子宮及び卵巣重量を測定し、黄体数、着床数、生存/死亡胎児数、吸収胚数を記録した。子宮は10%硫酸アンモニウムに浸して着床痕の有無を確認した。生存胎児については性別、体重及び外表奇形について調べた。また、胎盤重量を記録した。

胎児に関する指標については、一腹を単位として統計処理を行った。

(倫理面軸に配慮)

動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律(昭和48年、法律第105号)」及び「実験動物の飼養及び保管等に関する基準(昭和55年、総理府告示第6号)」を遵守して行った。

C. 研究結果

妊娠0-3日の投与の影響

Table 1に母体所見を示した。15.2 mg/kg/day投与群で1例の死亡がみられ、15.2及び30.4 mg/kg/day投与群のそれぞれ1例が瀕死状態のためと殺された。DBTCI投与の妊娠マウスにおいて膣からの出血、黄疸、自発運動低下、低体温または生殖器周囲の汚れがみられ、15.2 mg/kg/day以上で黄疸の発現頻度の有意な上昇が認められた。30.4 mg/kg/day群の妊娠0-4日の体重増加、7.6及び30.4 mg/kg/day群の妊娠0-4日の摂餌

量、30.4 mg/kg/day群の8-18日の摂餌量が有意に低下した。

生殖への影響をTable 2に示した。30.4 mg/kg/dayで妊娠率の有意の低下が認められ、この群の妊娠したマウスにおいても着床前胚死亡率の有意の上昇がみられた。妊娠18日まで生存した妊娠マウスにおいては黄体数、着床数、全胚死亡母体の頻度及び着床前胚死亡率にはDBTCI投与群と対照群との間に有意の差はみられなかった。着床後胚死亡率は15.2 mg/kg/day以上で有意の上昇が認められた。7.6 mg/kg/dayの雌胎児体重、15.2 mg/kg/day以上の雌雄の胎児体重は有意に低かった。15.2 mg/kg/dayで口蓋裂・曲尾を有する胎児1例が観察された。

妊娠4-7日の投与の影響

Table 3に母体所見を示した。15.2 mg/kg/day投与群で1例の死亡がみられ、30.4 mg/kg/dayの1例が瀕死状態のためと殺された。DBTCI投与の妊娠マウスに、膣からの出血、黄疸、自発運動低下または低体温がみられ、15.2 mg/kg/day以上で黄疸の発現頻度が有意に上昇した。15.2 mg/kg/day以上の妊娠4-8日の体重増加及び補正体重増加(妊娠子宮を除いた体重増加)、7.6 mg/kg/day以上の妊娠8-18日の体重増加が有意に抑制された。15.2 mg/kg/day以上の妊娠4-8日及び8-18日の摂餌量が有意に低下した。

生殖に対する影響をTable 4に示した。妊娠率にはDBTCI投与の影響は認められなかった。15.2 mg/kg/dayで着床数の有意の低下が観察された。妊娠18日まで生存したマウスにおいては15.2 mg/kg/dayで8/9例、30.4 mg/kg/dayで10/10例で全胚吸収が認められた。30.4 mg/kg/dayでは生存胎児は得られなかった。黄体数、着床数、着床前胚死亡率及び生存胎児の性比にはDBTCI投与群と対照群との間に有意な差はみられなかった。15.2 mg/kg/dayで雌雄の胎児体重の有意の低下がみられた。7.6 mg/kg/dayで臍帯ヘルニアを有する胎児1例、外脳症・開眼を有する胎児1例が観察された。DBTCI投与群の胎盤重量は有意に低

かった。

D. 考察

ラットにおいて生殖障害を惹起するDBTCIをマウスの妊娠初期に投与したときの生殖障害作用を検討し、DBTCIはマウスにおいても生殖障害を引き起こすことを示した。最も著しい影響は妊娠率の低下、全胚吸収等の生殖障害であった。

毒性症状は妊娠 0-3 日、4-7 日投与の 15.2 mg/kg/day 以上の投与で認められた。また、母体体重への影響は、妊娠 0-3 日投与の 30.4 mg/kg/day、妊娠 4-7 日投与の 7.6 mg/kg/day 以上の投与で観察された。妊娠 4-7 日の投与後には母体体重の妊娠末期までの回復も認められなかった。補正母体体重増加についても妊娠 4-7 日投与の 15.2 mg/kg/day 以上の投与で有意に低下していた。妊娠 4-7 日の DBTCI 投与後に観察された母体体重に対する強い影響は、妊娠 4-7 日の投与により胚/胎児生存に対する悪影響がより強く発現し、腹当たりの胎児数が減少したことがその一因と考えられる。

妊娠 0-3 日はマウスの着床前の時期、妊娠 4-7 日は着床中及び着床直後の時期に相当する。妊娠 0-3 日の投与では着床阻害(着床前胚死亡着)が、妊娠 4-7 日の投与では着床後胚死亡が DBTCI 投与により惹起されることが想定された。妊娠 0-3 日の DBTCI 投与では着床前胚死亡、着床後胚死亡、低胎児体重が認められ、着床前に投与した DBTCI は着床前及びその後の胚の生存に悪影響を及ぼし、その後の胚の成長にも悪影響を及ぼすことが示唆された。妊娠 4-7 日の DBTCI 投与では着床後胚死亡、低胎児体重が認められ、着床中及び直後に投与した DBTCI は着床後の胚の生存及び成長に悪影響を及ぼすことが示唆された。これらの所見は、DBTCI の生殖発生に及ぼす影響は投与時期によって異なることを示している。

我々は、前報においてトリブチルスズ、DBTCI をラットの妊娠初期に投与したとき着床前胚死亡及び着床後胚死亡を惹起することを報告している。今回は DBTCI を妊娠初期のマウスに投与したとき

ラットと同様に生殖障害を惹起することを明らかにした。化学物質による胚死亡は種々のメカニズムによって引き起こされる。すなわち、胚に対する直接作用または母体の恒常性に異常を引き起こして間接的に胚に悪影響を及ぼす可能性が考えられる。正常な雌の生殖機能は、正常な中枢神経系、卵巣・子宮の活動によって維持されており、これらの各部位における毒性影響が胚の生存に悪影響を及ぼす。子宮内膜は胚の生存にとって重要な役割を果たしており、DBTCI の子宮内膜に対する影響を検討することは毒性学的に重要である。現在、DBTCI のマウス子宮内膜に対する影響を検討するために、マウスの着床時期の子宮より RNA を調整し、子宮の遺伝子発現状況の検討を進めている。

E. 結論

DBTCI はラットにおけると同様、マウスにおいても生殖障害を惹起することが明らかとなった。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

Ena M, Kimura E, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Reproductive and developmental toxicity screening test of basic rubber accelerator, 1,3-di-*o*-tolylguanidine, in rats. *Reprod Toxicol* (in press)

Ena M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Evaluation of Developmental Toxicity of Ultraviolet Absorber 2-(3',5'-Di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in Rat. *Drug Chem Toxicol* (in press)

Takahashi M, Hirata-Koizumi M, Nishimura N, Ito Y, Sunaga M, Fujii S, Kamata E, Hasegawa R, Ena M. Susceptibility of newborn rats to 3-ethylphenol and 4-ethylphenol compared with that in young rats. *Congenit Anom Kyoto* (in press)

高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞、OECD 化学物質対策の動向 (第8報) - 第16回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2003年パリ)、化学生物総合管理学会誌 (印刷中)

松本真理子、高橋美加、平田睦子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第18回初期評価会議までの概要、化学生物総合管理学会誌 (印刷中)

Enma M, Hirose A. Reproductive and developmental toxicity of organotin compounds. Golub MS, Ed. Metals, Fertility, and Reproductive Toxicity, CRC Press, Boca Raton, 2006, pp. 23-64.

Hayashi M, Kamata E, Hirose A, Takahashi M, Morita T, Enma M. In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals. Mutat Res, 588, 129-135, 2005.

Hirata-Koizumi, M., Hamamura M, Furukawa H, Fukuda N, Ito Y, Wako Y, Yamashita K, Takahashi M, Kamata E, Enma M, Hasegawa R. Elevated susceptibility of newborn as compared with young rats to 2-tert-butylphenol and 2,4-di-tert-butyl phenol toxicity. Congenit Anom Kyoto, 45, 146-153, 2005.

Hasegawa R, Hirata-Koizumi, M., Takahashi M, Kamata E, Enma M. Comparative susceptibility of newborn and young rats to six industrial chemicals. Congenit Anom Kyoto, 45, 137-145, 2005.

松本真理子、鈴木理子、川原和三、菅谷芳雄、江馬 眞、OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第20回初期評価会議概要、化学生物総合管理学会誌 1, 445-453, 2005.

高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD 化学物質対策の動向 (第7報) - 第15回 OECD

高生産量化学物質初期評価会議 (2002年ボストン)、衛研報告、123, 46-52, 2005.

松本真理子、田中里依、川原和三、菅谷芳雄、江馬 眞、OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第19回初期評価会議概要、化学生物総合管理学会誌 1, 280-288, 2005.

Hirata-Koizumi, M., Nishimura, N., Enami, T., Wada, H., Ogata, H., Yamamoto, Y., Ito, Y., Kamata, E., Enma M. and Hasegawa, R. Susceptibility of new born rats to the hepatotoxicity of 1,3-dibromopropane and 1,1,2,2-tetrabromoethane, compared with young rats. J. Toxicol. Sci., 30, 29-42, 2005.

Enma M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Evaluation of developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. Food Chem Toxicol, 43, 325-331, 2005.

高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD 化学物質対策の動向 (第6報) - 第14回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2002年パリ)、化学生物総合管理学会誌、1, 46-55, 2005.

高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD 化学物質対策の動向 (第5報) 衛研報告、122, 37-42, 2004.

広瀬明彦、江馬 眞、生殖発生毒性を指標としたダイオキシンの耐容1日摂取量 (TDI) 算定の考え方について、衛研報告、122, 56-61, 2004.

Hirose A, Hasegawa R, Nishikawa A, Takahashi M, Enma M. Revision and establishment of Japanese drinking water quality guidelines for di(2-ethylhexyl) phthalate, toluene and vinyl chloride-Differences from the latest WHO guideline drafts- J Toxicol Sci, 29, 535-539, 2004.

Takahashi M, Ogata H, Izumi H, Yamashita K, Takechi M, Hirata-Koizumi M, Kamata E,

Hasegawa R, Enma M. Comparative toxicity study of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid) in newborn and young rats. *Congenit Anom Kyoto*, 44, 204-214, 2004.

Fukui Y, Enma M, Fujiwara M, Higuchi H, Inouye M, Iwase T, Kihara T, Nishimura T, Oi A, Ooshima Y, Otani H, Shinomiya M, Sugioka K, Yamano T, Yamashita KH, Tanimura T.

Comments from the Behavioral Teratology Committee of the Japanese Teratology Society on OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Proposal for a New Guideline 426, Developmental Neurotoxicity Study, Draft Document (September 2003). *Congenit Anom Kyoto*, 44, 172-177, 2004.

Fukuda N, Ito Y, Yamaguchi M, Mitsumori K, Koizumi M, Hasegawa R, Kamata E, Enma M. Unexpected nephrotoxicity induced by tetrabromobisphenol A in newborn rats. *Toxicol Lett*, 150, 145-150, 2004.

Enma M, Harazono A, Fujii S, Kawashima K. Evaluation of developmental toxicity of β -thuyaplicin (hinokitiol) following oral administration during organogenesis in rats. *Food Chem Toxicol*, 42, 465-470, 2004.

Enma M, Miyawaki E, Hirose A, Kamata E. Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobenzyl phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate. *Reprod Toxicol*, 17, 407-412, 2003.

広瀬明彦, 江馬 眞, 鎌田栄一、小泉睦子、長谷川隆一、ビスフェノール A の内分泌かく乱作用のヒトへの影響評価、*日本食品化学会誌*, 10, 1-12, 2003.

Enma M, Harazono A, Hirose A and Kamata E: Protective effects of progesterone on implantation failure induced by dibutyltin dichloride in rats. *Toxicol Lett*, 143: 233-238, 2003.

Koizumi M, Noda A, Ito Y, Furukawa M, Fujii S,

Kamata E, Enma M, Hasegawa R. Higher susceptibility of newborn than young rats to 3-methylphenol. *J Toxicol Sci*, 28, 59-70, 2003.

Harazono A, Enma M. Suppression of decidual cell response induced by dibutyltin in pseudopregnant rats as a cause of early embryonic loss. *Reprod Toxicol*, 17: 393-399, 2003.

学会発表

江馬 眞、OECD 発生神経毒性試験ガイドラインについて、第 17 回神経行動毒性研究会、2005.

江馬 眞、藤井咲子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、有機スズ化合物の生殖発生毒性：ジブチルスズのマウスにおける胚致死作用、第 7 回環境ホルモン学会研究会、2005.

Enma M, Kimura E, Hirose A, Kamata E. Reproductive and developmental toxicity screening test of 1,3-di-o-tolylguanidine in rats. *EUROTOX* 2005.

Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Takahashi M, Kamata E, Enma M. Susceptibility of new born rats to six chemicals, compared with young rats. *EUROTOX* 2005

Hirose A, Aisaki H, Hara H, Takahashi M, Igarashi K, Kanno J, Enma M. DNA micro-array analysis of gene expressions in mice uterus exposed to dibutyltin dichloride during implantatio. The 25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2005).

江馬 眞、福西克弘、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、紫外線吸収剤 2-(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole のラットにおける発生毒性、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005.

平田睦子、楠岡 修、西村信雄、和田 肇、緒方英博、福田苗美、伊藤義彦、鎌田栄一、江馬 眞、長谷川隆一、化学物質に対する新

- 生児の感受性に関する研究：1,3-ジブロモプロパン及び1,1,2,2-テトラブロモエタン、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005。
- 江馬 眞、原 洋明、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、ブタノールのラットにおける発生毒性の検討、第45回日本先天異常学会学術集会、2005。
- 江馬 眞、OECD 神経発生毒性試験ガイドライン426（ドラフト）の進捗状況、第45回日本先天異常学会学術集会 BT シンポジウム、2005。
- Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. The 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2005.
- Tahara M, Kubota R, Nakazawa H, Hirose A, Ema M, Tokunaga H, Nishimura T. Evaluation for the additive toxic influence of organophosphorus pesticides The 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2005.
- Ema M, Fukunishi K, Nagata R, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Developmental toxicity study of ultra violet light absorber 2-(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chloro-2-H-benzotiazole in rats. The 25th Annual Meeting of the American College of Toxicology, 2004.
- 広瀬明彦、鎌田栄一、高橋美加、江馬 眞、有機スズの水生動物と実験動物における生殖発生毒性、環境ホルモン学会第7回研究発表会、2004
- Hirose A, Takagi A, Nishimura T, Kanno J, Ema M. Review of reproductive and developmental toxicity induced by organotins in aquatic and experimental animals. The 24th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2004).
- Ema M, Harazono A, Fujii S, Kawashima K. Developmental toxicity of β -thujaplicin (TP) in rats. The 43th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2004.
- Hirata-Koizumu M, Fukuda N, Ito Y, Yamaguchi M, Mitsumori K, Hasegawa R, Kamata E, Ema M. Unzpected nephrotoxicity induced by tetrabromobisphenol A in newborn rats. 10th International Congress of Toxicology, 2004.
- Hirose A, Takahashi M, Kamata E, Ema M, Hayashi M. Development of genotoxicity prediction QSAR system for resistered and existing industrial chemicals in Japan. 10th International Congress of Toxicology, 2004.
- Yamaguchi Y, Nishimura N, Yahara M, Edamoto H, Ikezaki S, Kasahara K, Tamura K, Kamata E, Hasegawa R, Ema M. Renal damage in newborn rats treated with p-Cumylphenol. International Federation of Societies of Toxicologic Pathology, 2004.
- 江馬 眞、原園 景、藤井咲子、川島邦夫、ヒノキチオールのラットにおける発生毒性の検討、第44回日本先天異常学会学術集会、2004。
- Ema M. Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobenzyl phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate. Congress of the 5th Royan International Research Award, 2004.
- 江馬 眞、可塑剤フタル酸エステルのラット次世代の発生に及ぼす影響、第5回生殖・発生毒性東京セミナー、2003。
- 江馬 眞、宮脇英美子、広瀬明彦、鎌田栄一、モノブチルフタレートによるラット雄胎児における肛門生殖突起間距離の短縮及び精巣下降不全、第43回日本先天異常学会学術年会2003。
- 江馬 眞、原園 景、広瀬明彦、鎌田栄一、ジブチルスズによるラットにおける着床阻害に対するプロゲステロンの効果、第30回日本トキシコロジー学会学術年会、2003。
- 原園 景、江馬 眞、ラット妊娠初期に投与

した塩化トリブチルスズの着床阻害作用、第30回日本トキシコロジー学会学術年会、2003。
広瀬明彦、江馬 眞、鎌田栄一、小泉睦子、長谷川隆一、ビスフェノールAによる内分泌かく乱作用のリスクアセスメント、第30回日本トキシコロジー学会学術年会、2003。
本田久美子、緒方英博、古川浩美、和泉宏幸、小泉睦子、鎌田栄一、江馬 眞、長谷川隆一、2-クロロフェノールの新生児および若齢ラットにおける発現毒性と無毒性量の比較検討、第30回日本トキシコロジー学会学術年会2003。

西村信雄、池谷政道、石田 茂、小泉睦子、鎌田栄一、江馬 眞、長谷川隆一、3-エチルフェノールの新生児反復投与毒性および若齢動物毒性試験との比較、第30回日本トキシコロジー学会学術年会2003。

Takagi A., Hirose A., Hirabayashi Y., Kaneko T., Ema M., Kannno J. Assessment of the cleft palate induction by seven PCDD/F congeners in the mouse fetus. 23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2003).

Sekizawa J., Miyairi S., Ema M. Possible modification of dioxin risk in the presence of endogenous ligands for arylhydrocarbone receptor. 23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2003).

Ema M., Miyawaki E. Decreased anogenital distance (AGD) and undescended testes in fetuses of rats given monobutyl phthalate (MBEP) during pregnancy. Society of Toxicology, 42th Annual Meeting, 2003.

Koizumi M., Nishida N., Enami T., Sunaga M., Horikawa H., Kamata E., Ema M., Hasegawa R. Comparative toxicity study of 3-aminophenol in newborn and young rats. Society of Toxicology, 42th Annual Meeting, 2003.

Hasegawa R., Koizumi M., Noda A., Ito Y.

Furukawa M., Fujii S., Kamata E., Ema M. Higher susceptibility of newborn rats to 3-methylphenol than young. Society of Toxicology, 42th Annual Meeting, 2003.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況
なし

Table 1. Maternal findings in mice given DBTCl by gastric intubation on days 0 to 3 of pregnancy

DBTCl (mg/kg)	0 (control)	7.6	15.2	30.4
No. of females successfully mated	12	12	12	12
No. of females shown clinical signs				
Dead	0	1	0	0
Moribund condition (euthanized)	0	1	1	1
Vaginal discharge	0	1	0	0
Jaundice	0	2	7*	10*
Decreased locomotor activity	0	2	1	1
Hypothermia	0	1	1	1
Soil of perigenital fur	0	0	1	0
Initial body weight (g) ^a	27.4 ± 2.0	27.2 ± 2.1	27.2 ± 2.4	27.2 ± 2.1
Body weight gain (g) ^a				
Days 0-4	1.7 ± 1.1	0.6 ± 1.2	1.2 ± 1.6	0.3 ± 0.9*
Days 4-8	2.9 ± 1.5	2.5 ± 2.6	2.1 ± 2.0	1.6 ± 1.5
Days 8-18	20.1 ± 9.1	21.3 ± 12.4	13.6 ± 12.2	8.6 ± 12.2
Adjusted weight gain ^b	8.9 ± 3.4	9.9 ± 3.8	7.9 ± 4.8	5.3 ± 5.0
Food consumption (g) ^a				
Days 0-4	18.2 ± 1.8	15.0 ± 1.9*	16.7 ± 3.2	14.8 ± 2.3*
Days 4-8	22.9 ± 4.9	22.0 ± 2.7	21.7 ± 3.5	20.9 ± 3.5
Days 8-18	71.7 ± 10.1	71.0 ± 12.5	64.6 ± 13.3	57.8 ± 13.4*

^a Values are given as mean ± SD.

^b Adjusted weight gain refers to body weight gain excluding the uterus.

* Significantly different from the control, $P < 0.05$.

Table 2 Reproductive findings in mice given DBTCI by gastric intubation on days 0 to 3 of pregnancy

DBTCI (mg/kg)	0 (control)	7.6	15.2	30.4
No. of females successfully mated	12	12	12	12
No. of nonpregnant females	1	3	4	7*
No. of pregnant females	11	9	8	5*
No. of implantations per female ^{ab}	9.5 ± 5.1	9.8 ± 7.1	8.3 ± 7.0	5.4 ± 6.7
Preimplantation loss per female (%) ^{ab}	9.7	29.7 ^g	34.0	58.3*
No. of pregnant females survived until scheduled sacrifice	11	8	7	4
No. of litters totally resorbed	0	0	1	1
No. of corpora lutea per litter ^{ac}	10.5 ± 4.3	13.1 ± 4.9	12.4 ± 4.4	13.3 ± 1.3
No. of implantations per litter ^{ac}	10.4 ± 4.3	12.6 ± 4.9	12.3 ± 4.4	13.3 ± 1.3
Preimplantation loss per litter (%) ^{cd}	1.5	3.3	1.1	0
No. of postimplantation loss per litter ^{ac}	1.0 ± 1.0	1.1 ± 1.5	4.1 ± 3.2	4.0 ± 5.4
Postimplantation loss per litter (%) ^{ce}	10.1	14.1	41.3*	32.2
No. of live fetuses per litter ^{ac}	9.4 ± 4.2	11.5 ± 5.3	8.1 ± 5.0	9.3 ± 6.2
Sex ratio of live fetuses (male / female)	50 / 53	47 / 45	30 / 27	21 / 16
Body weight of live fetuses (g) ^a				
Male	1.54 ± 0.19	1.30 ± 0.12*	1.14 ± 0.22*	1.12 ± 0.10*
Female	1.42 ± 0.15	1.28 ± 0.20	1.08 ± 0.26*	1.01 ± 0.11*
External examinations of fetuses				
No. of fetuses (litters) examined	103(11)	92(8)	57(6)	37(3)
No. of fetuses (litters) with anomalies	1(1)	0	1(1)	0
Cleft palate	1	0	1	0
Kinked tail	0	0	1	0
Placental weight (mg) ^a	125 ± 56	116 ± 15	120 ± 17	119 ± 16

^a Values are given as mean ± SD.

^b Values are obtained from females successfully mated.

^c Values are obtained from pregnant females survived until scheduled sacrifice.

^d [(No. of corpora lutea - no. of implantations)/no. of corpora lutea] x 100.

^e (No. of resorptions and dead fetuses/no. of implantations) x 100.

^g Value are obtained from 11 females because corpora lutea were indistinguishable in one female.

* Significantly different from the control, $P < 0.05$.

Table 3. Maternal findings in mice given DBTCI by gastric intubation on days 4 to 7 of pregnancy

DBTCI (mg/kg)	0 (control)	7.6	15.2	30.4
No. of females successfully mated	12	12	12	12
No. of females shown clinical signs				
Dead	0	0	1	0
Moribund condition (euthanized)	0	0	0	1
Vaginal discharge	0	0	4*	4*
Jaundice	0	0	2	6*
Decreased locomotor activity	0	0	0	1
Hypothermia	0	0	0	1
Initial body weight (g) ^a	28.1 ± 1.8	28.1 ± 1.8	28.1 ± 1.8	28.2 ± 1.7
Body weight gain (g) ^a				
Days 0-4	1.6 ± 1.0	1.9 ± 0.8	1.2 ± 1.2	1.6 ± 0.9
Days 4-8	3.1 ± 1.1	1.9 ± 1.6	0.5 ± 1.8*	-0.3 ± 2.1*
Days 8-18	24.9 ± 9.1	14.9 ± 8.9*	2.9 ± 6.3*	2.4 ± 2.4*
Adjusted weight gain ^b	8.3 ± 3.5	8.1 ± 4.3	3.2 ± 5.3*	3.8 ± 3.2*
Food consumption (g) ^a				
Days 0-4	18.5 ± 1.9	18.9 ± 2.4	18.4 ± 2.7	18.8 ± 1.3
Days 4-8	21.8 ± 1.9	19.2 ± 2.6	16.4 ± 3.3*	15.6 ± 3.5*
Days 8-18	74.5 ± 12.1	67.7 ± 9.9	55.2 ± 12.6*	57.2 ± 6.2*

^a Values are given as mean ± SD.

^b Adjusted weight gain refers to body weight gain excluding the uterus.

* Significantly different from the control, $P < 0.05$.

Table 4 Reproductive findings in mice given DBTCI by gastric intubation on days 4 to 7 of pregnancy

DBTCI (mg/kg)	0 (control)	7.6	15.2	30.4
No. of females successfully mated	12	12	12	12
No. of nonpregnant females	1	1	2	1
No. of pregnant females	11	11	10	11
No. of implantations per female ^{ab}	12.6 ± 4.4	13.2 ± 4.6	7.5 ± 5.7*	11.1 ± 5.4
Preimplantation loss per female (%) ^{ab}	8.9	8.9	24.7	18.3 ^g
No. of pregnant females survived until scheduled sacrifice	11	11	9	10
No. of litters totally resorbed	0	2	8*	10*
No. of corpora lutea per litter ^{ac}	13.8 ± 2.1	14.5 ± 2.3	10.6 ± 5.2	13.9 ± 2.8
No. of implantations per litter ^{ac}	13.7 ± 2.1	14.4 ± 2.2	9.4 ± 5.1	12.7 ± 4.1
Preimplantation loss per litter (%) ^{cd}	0.6	0.6	10.7	10.2
No. of postimplantation loss per litter ^{ac}	0.6 ± 1.0	7.2 ± 6.1*	8.7 ± 4.8*	12.7 ± 4.1*
Postimplantation loss per litter (%) ^{ce}	4.3	48.3*	94.4*	100*
No. of live fetuses per litter ^{ac}	13.1 ± 2.0	7.2 ± 5.6*	0.8 ± 2.3*	0
Sex ratio of live fetuses (male / female)	82 / 62	50 / 29	4 / 3	
Body weight of live fetuses (g) ^a				
Male	1.45 ± 0.10	1.23 ± 0.10*	1.27	
Female	1.39 ± 0.10	1.18 ± 0.14*	1.18	
External examinations of fetuses				
No. of fetuses (litters) examined	144(11)	79(9)	7(1)	
No. of fetuses (litters) with anomalies	0	2(2)	0	
Omphalocele	0	1	0	
Exencephaly and open eyelids	0	1	0	
Placental weight (mg) ^a	102 ± 10	99 ± 12	114	

^a Values are given as mean ± SD.

^b Values are obtained from females successfully mated.

^c Values are obtained from pregnant females survived until scheduled sacrifice.

^d [(No. of corpora lutea - no. of implantations)/no. of corpora lutea] x 100.

^e (No. of resorptions and dead fetuses/no. of implantations) x 100.

^g Value are obtained from 11 females because corpora lutea were indistinguishable in one female.

* Significantly different from the control, $P < 0.05$.

発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析

分担研究者 北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官

研究要旨

マウス胚におけるマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析手法の確立を目的として、1)モデル遺伝子改変マウス胚を用いた技術的な妥当性の検証、および 2)化学物質非投与野生型胚・全胚を用いた、発生に関わる遺伝子発現の経時変化の解析をデータベース化、さらには 3)モデル発生毒性物質投与による本手法の具体的な適用、以上3点を実施した。1)、2)については完了し、3)については、基本的部分を確立した。

A. 研究目的

本分担研究の目的は、毒性発現メカニズムに支えられた新たな発生毒性評価系を確立することにある。この実験動物の胎児トランスクリプトームを元に新たな系の確立を通して、ヒトにおける発生毒性を、より正確に詳細に、また迅速・高感度に予測評価できるシステムの構築を目指す。

今年度の目的は、これまで検討してきた、マウス胚におけるマイクロアレイを用いた本解析手法の完成を目的として、器官形成初期の、初期中胚葉誘導が活発なマウス胎生6.5-9.5日胚に焦点を絞り、以下の3点、すなわち、1)モデル遺伝子改変マウス胚を用いた技術的な妥当性の検証、および 2)化学物質非投与野生型胚・全胚における、発生に関わる遺伝子発現の経時変化の解析及びデータベース化(Time point 数: 12点)、さらには 3)モデル発生毒性物質を妊娠マウスに投与した際の胎児に対する本手法の具体的な適用を試みた。このような検討を通してはじめて、新たな発生毒性評価系の確立ができるものと考えられた。

B. 研究方法

C57BL/6CrSlc マウス(日本エスエルシー)を実験に用いた(プラグが確認された日の15時を胎生0.5日とした)。基本的には本プロジェクトのデータベース生成研究に於いて用いられる研究方法に則したかたちで、経時的にサンプリングした各ステージのマウス胚(全胚、ただし卵黄嚢膜は除去した)をpoolしたRNAサンプルを用い、マイクロアレイ[Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]を用いて、網羅的遺伝子発現プロファイリングを検討した。マウス胚は、1%の2-メルカプトエタノール含有RLTバッファー(QIAGEN社)に変性・溶解させた。

モデル遺伝子欠損マウス胚の当該遺伝子は、解析の背景データがそろっている、bHLH型転写因子MesP1およびMesP2遺伝子とした。両遺伝子は、原腸陥入直後における中胚葉において一過性の発現を示す(胎生6.5-7.5日)。このホモ型胚(dKO胚)は、胎生10.5日には胎生致死となり胚性中胚葉を欠き、原腸陥入部位には未分化中胚葉が蓄積するという表現型を示す。尚、本分担研究者は、この遺伝子が、Cre-loxPシステムを用いた細胞系譜解析やキメラ解析の結果から心臓中胚葉形成に必須な遺伝子であることを明らかにしてきた。

経時変化ならびに機能面から、この遺伝子カスケードに注目し、胎生 6.5 日および 7.5 日の野生型ならびにホモ型胚の遺伝子発現を解析し比較・検討した。

モデル発生毒性物質としては、*Shh* シグナル伝達阻害物質であり、哺乳動物において単眼症を誘発することが報告されている「サイクロパミン」(LC laboratories 社)を使用した。本研究で得た野生型マウス胚全胚の遺伝子発現データベースにおける *Shh* シグナル関連遺伝子の経時変化ならびに、予備投与実験の結果を考慮し、50 mg/kg(0.5% CMC にメノウ鉢を使用して懸濁)(1 ml/100gBW)を、妊娠 7.25 日の妊娠動物に単回経口投与し、RNA 用、骨格標本用に、それぞれ妊娠 8.25 日および 17.25 日にサンプリングをおこなった。

胎児内における遺伝子発現部位の確認のための whole mount ISH は、ジゴキシゲニンでラベルした dNTP を用いて作製した RNA プローブを用いて、固定後プロテナーゼ K 処理したマウス胚とハイブリダイゼーションをおこない、検出は抗ジゴキシゲニン抗体、発色は BM purple でおこなった。

(倫理面への配慮)

当研究所の「動物実験に関する指針」に準拠しておこなった。

C. 研究結果

1) モデル胚を用いた検討として、経時変化ならびに機能の両面から、*Mesp1* 遺伝子カスケードに注目し、胎生 6.5 日および 7.5 日の野生型ならびに dKO 型胚の遺伝子発現を網羅的に解析し、比較・検討したところ、dKO 型胚で発現が減少している遺伝子群として、主として心筋細胞あるいは血管内皮細胞の発生に関与する遺伝子群がリストアップされた。実際に、このリスト中の *Fgf5* 遺伝子などつき、野生型胚ならびに dKO 型胚を whole mount ISH にて検討し遺伝子発現解析結果と同様な結果を得た。経時変化全体の動きの考慮など、さらに詳細な解析により、これまで不明であった *Mesp1* 遺伝子の標的遺伝子である可能性が示唆される遺伝子がいくつか新たに見いだされた。

2) 胎生 6.25 日から 9.75 日まで(0.25 日毎)、昨年度よりも細かく、計 12 点の time point につき、マウス胚 1 匹あたりの genomic DNA 量、total RNA 量の算出、ならびに GeneChip1 枚あたりに必要な胚数を算出した。例えば、GeneChip1 枚あたり、胎生 6.25 日、7.25 日、8.25 日では、それぞれ最低限 262 匹、42 匹、6 匹の胎児をプールする必要があることが明らかとなった。必要数をサンプリングし、マイクロアレイ解析を実施し、6.25~9.75 日までの全胚遺伝子発現データベースを得た。この解析例として、*Mesp1* ならびに *Shh* 遺伝子の発現変化に焦点を絞って検討した。

2-A) ピアソンの相関係数から、経時的に *Mesp1* と似た、あるいは、0.25 日分だけ *Mesp1* に先行するように人為的にシフトさせたパターンと似た発現パターンを示す遺伝子群をピックアップしたところ、前者では、*Lefty-2*、*Mesp2* など、後者では *T*、*Cer1* など、興味深い遺伝子群がリストアップされてきた。いくつかの興味深い遺伝子につき、その発現を、野生型胚ならびに dKO 胚の whole mount ISH にて検討し、遺伝子発現解析結果と整合性の高い結果を得た。

2-B) *Shh* シグナルカスケードに直接関係する遺伝子群である、*Smo*、*Gli*、*Ptch* の各遺伝子の発現の経時変化を *Shh* とともに解析し、それぞれ同様な発現パターンを示すことが明らかとなった。

3) 妊娠 7.5 日の妊娠動物に、サイクロパミン(50 mg/kg)を単回経口投与し、妊娠 17.5 日に帝王切開して得られた胎児の外表検査、胎児重量、胎児数を検討したところ、溶媒対照群に比べて有意に胎児数の減少、胎児重量の増加が認められた。なお、顕著な外表異常は認められなかった。妊娠 8.5 日に得られた胎児 RNA サンプルについては、マイクロアレイ解析を実施中である。

D. 考察

1) モデル遺伝子改変マウス胚を用い、胚を用いたマイクロアレイ解析の妥当性を検証することができた。留意点としては、経時的に発現が変化する遺伝子を対象とした場合、各時点での発現量の比

からのリストアップだけでは不正確な解析となり、あくまでも、経時変化全体の動きを考慮する必要性が強く示唆された。

2)本マウス初期野生型胚・全胚を用いた遺伝子発現データベースの利用は、各ステージ特異的な遺伝子群のリストアップなど、各種シグナルカスケードの探索上、有用となるだけでなく、催奇形性物質投与を考慮した場合、標的分子の遺伝子発現変化を考慮した投与のタイミングの設定、あるいは逆に、当該物質の標的分子の推定にも役立つものと考えられた。なお本実験では、全胚を用いて検討しており、少なくとも本実験でのステージ(胎生6.25-9.75日)を用いる限り、標的性が不明な催奇形性物質投与の場合でも、全胚にわたる解析が可能なものと考えられた。

3)50 mg/kg のサイクロパミンの単回経口投与(妊娠7.5日)により、妊娠17.5日における胎児数は明らかに減少したが、今回の検討結果では、胎盤遺残は認められたが浸軟胎児はみとめられず、サイクロパミン投与後かなり早期に一部の胎児が死亡した可能性が示唆された。なお、マウスにおけるサイクロパミンを用いた催奇形性実験の報告は、妊娠動物が、高頻度に死亡する投与用量(180 mg/kgBW)を用いたもののみであり(Keeler RF, Proc Soc Exp Biol Med 149: 302-306,1975)妊娠動物の死亡が認められない用量を用いた実験は、今回が初めてのものである。

E. 結論

以上の経時的な野生型胚のサンプリング、あるいはモデル胚を用いた検討結果から、発生毒性評価に向けた、マウス胚を用いた網羅的な遺伝子発現変化を解析する技術基盤の整備が出来たものと考えられた。現在、モデル催奇形性物質の経胎盤投与によるマウス胚を用いた遺伝子発現変動の解析中であるが、基本的には順調に推移しており、今後は、標的遺伝子が不明な催奇形性物質あるいは催奇形性上の種差が明らかな催奇形性物質投与実験などを考慮し、より一般化した系を樹立する予定である。また、マウス胚発生の *in vitro* モ

デル系である ES 細胞分化系への応用も検討中である。これらのことを通して、発生毒性評価を、より正確・迅速・鋭敏におこなえるようになることが期待される。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

1. Yasuhiko, Y, Haraguchi, S, Kitajima, S, Takahashi, Y, Kanno, J, Saga, Y., Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific *Mesp2* expression. Proc Natl Acad Sci U S A *in press*, 2006.

2. Kitajima, S, Miyagawa-Tomita, S, Inoue, T, Kanno, J, Yumiko, S., *Mesp1*-non-expressing cells contribute to the ventricular cardiac conduction system. *Dev Dyn* 235: 395-402, 2006.

3. Takahashi Y, Kitajima S, Inoue T, Kanno J, Saga Y., Differential contributions of *Mesp1* and *Mesp2* to the epithelialization and rostro-caudal patterning of somites. *Development* 132: 787-796, 2005.

4. Ishikawa A, Kitajima S, Takahashi Y, Kokubo H, Kanno J, Inoue T, Saga Y., Mouse *Nkd1*, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling. *Mech Dev* 121: 1443-1453, 2004.

5. Nakazawa T, Kai S, Kawai M, Maki E, Sagami F, Onodera H, Kitajima S, Inoue T., "Points to consider" regarding safety assessment of biotechnology-derived pharmaceuticals in non-clinical studies (English translation). *J Toxicol*

Sci 29: 497-504, 2004.

6. Haraguchi S, Tsuda M, Kitajima S, Sasaoka Y, Nomura-Kitabayashi A, Kurokawa K, Saga Y., nanos1: a mouse nanos gene expressed in the central nervous system is dispensable for normal development. *Mech Dev* 120: 721-731, 2003.

2. 学会発表(発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入)

1. 北嶋 聡、Fishman G.I.、富田幸子、井上 達、菅野 純、相賀裕美子: 転写因子 Mesp1 非発現細胞はマウス刺激伝導系細胞に寄与する
「第 28 回日本分子生物学会」3P-0655-270 (2005.12.)

2. 高橋 雄、安彦行人、北嶋 聡、菅野 純、相賀裕美子: Dll3 ノックインマウス及び Mesp2 ノックアウトマウスにおける体節形成と前後パターン形成の表現型の再検討
「第 28 回日本分子生物学会」3P-0881-283 (2005.12.)

3. Kitajima, S, Aisaki, K, Igarashi, K, Nakatsu, N, Saga, Y, Kanno, J., Gene expression profiling of the Mesp1, Mesp2-double -knockout embryo to seek the responsible genes for the cardiac precursor development.
「15th International Society of Developmental Biologists Congress」02-P059 (2005.9.)

4. Takahashi, Y, Kitajima, S, Yasuhiko, Y, Kanno, J, Saga, Y., A notch modulator Dll3 partially substitutes for roles of Mesp2 in rostro-caudal patterning of somites.
「15th International Society of Developmental Biologists Congress」12-P001 (2005.9.)

5. 高橋 雄, 北嶋 聡, 菅野 純, 相賀裕美子:

体節形成におけるストライプパターンの形成には未分節中胚葉前方における Notch シグナルのネガティブフィードバックが本質的に重要である
「第 38 回日本発生生物学会」2P019-216 (2005.6.)

6. 北嶋 聡, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 中津則之, 相賀裕美子, 菅野 純: 分子発生毒性モデルとしての遺伝子欠失胚を用いた遺伝子発現変動の Percellome 手法を用いた解析
「第 32 回日本トキシコロジー学会」P55-224 (2005.6.)

7. 菅野 純, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 中津則之, 北嶋 聡, 小野 敦, 児玉幸夫: Percellome 手法を用いた化学物質トキシコゲノミクス・データベースの構築—分子毒性機序解析に向けた試み—
「第 32 回日本トキシコロジー学会」P52-222 (2005.6.)

8. 中津則之, 北嶋 聡, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 小野 敦, 児玉幸夫, 菅野 純: Ahr 作動性化学物質の初期遺伝子発現の Percellome 手法を用いた比較
「第 32 回日本トキシコロジー学会」P53-223 (2005.6.)

9. 五十嵐勝秀, 中津則之, 松島裕子, 相崎健一, 北嶋 聡, 菅野 純: 飼料中植物性エストロジェンが内分泌かく乱候補化学物質による遺伝子発現変動に及ぼす影響の Percellome 手法を用いた解析
「第 32 回日本トキシコロジー学会」P54-223 (2005.6.)

10. 小川幸男, 関田清司, 北嶋 聡, 松島裕子, 山本雅也, 斎藤 実, 児玉幸男, 井上 達, 菅野 純: ガルシニア抽出物の安全性に関する研究(3)—ヒドロキシクエン酸のマウス精巣毒性の検討—
「第 32 回日本トキシコロジー学会」P11-202 (2005.6.)

11. 北嶋 聡, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 中津則之, 井上 達, 菅野 純, 相賀裕美子: 転写因子 MesP1 および MesP2 はマウス心臓細胞の分化に必要である
「第 27 回日本分子生物学会」2PA-457 (2004. 12)
12. Kitajima S, Inoue T, Kanno J, Saga Y., MesP1 and MesP2 genes are essential for the cardiomyocyte-differentiation in mice.
「Cold Spring Harbor Meeting 2004- Mouse Molecular Genetics-」(2004.9)
13. Takahashi Y, Kitajima S, Kanno J, Saga Y., A Notch ligand Dll3 substitutes for roles of Mesp2 in establishing rostral half properties in somite segmentation.
「Cold Spring Harbor Meeting 2004- Mouse Molecular Genetics-」p166 (2004.9)
14. 喜井 勲, 網塚憲生, 李 敏哲, 竹内亀一, 前田健康, 北嶋 聡, 菅野 純, 井上 達, 相賀裕美子, 工藤 明: ペリオスチンノックアウトマウスではメカニカルストレスによる歯根膜リモデリングが破綻している
「第 22 回日本骨代謝学会」(2004. 8)
15. 高橋 雄, 北嶋 聡, 菅野 純, 相賀裕美子: Notch リガンド Dll3 は Mesp2 の欠損による体節形成の異常を回復する
「第 37 回日本発生生物学会」2A1500 (2004. 6)
16. 北嶋 聡, 富田幸子, 菅野 純, 井上 達, 相賀裕美子: シンポジウム「心臓大動脈を形づくる細胞の起源とその細胞分化」: マウス心臓中胚葉形成に必須な転写因子 MesP1, MesP2
「第 26 回日本分子生物学会」S1E-1(2003. 12)
17. 石川亜紀, 北嶋 聡, 小久保博樹, 相賀裕美子: マウス体節形成過程において機能する新規遺伝子の探索およびその発現解析
「第 26 回日本分子生物学会」3PB-108 (2003. 12)
18. 安彦行人, 原口清輝, 北嶋 聡, 菅野 純, 相賀裕美子: 体節形成に関わる転写因子 Mesp2 の発現制御機構の解析
「第 26 回日本分子生物学会」3PB-110(2003. 12)
19. 小川幸男, 関田清司, 北嶋 聡, 斉藤 実, 内田雄幸, 松島裕子, 川崎 靖, 井上 達, 菅野 純: ガルシニア抽出物の安全性に関する研究 I- ガルシニア抽出物のラットによる 52 週間投与毒性試験-
「第 30 回日本トキシコロジー学会」P-010 (2003.7)
20. 関田清司, 小川幸男, 北嶋 聡, 斉藤義明, 永田伴子, 井上 達, 菅野 純: ガルシニア抽出物の安全性に関する研究 II- 主成分ヒドロキシクエン酸のラットにおける精巣毒性の検討-
「第 30 回日本トキシコロジー学会」P-011 (2003.7)
21. 北嶋 聡, 富田幸子, 高橋 雄, 井上 達, 菅野 純, 相賀裕美子: 転写因子 MesP1 および MesP2 の心臓中胚葉における役割
「第 36 回日本発生生物学会」(2003. 6)
22. 高橋 雄, 北嶋 聡, 井上 達, 菅野 純, 相賀裕美子: 転写因子 Mesp1, Mesp2 は体節中胚葉の上皮化に細胞自律的に関与する
「第 36 回日本発生生物学会」(2003. 6)
23. Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Takahashi Y, Inoue T, Kanno J, Saga Y., MesP1 and MesP2 are essential for the cardiogenesis in mice.
「The 1st International Symposium on Developmental Biology and Tissue Engineering」(2003.3)
- H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)
1. 特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部

北嶋 聡

目的

毒性発現メカニズムに支えられた
新たな(高精度の)発生毒性評価系を確立すること

↓
催奇形性物質を投与したマウス胚における
マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析法の樹立

方法

1. モデル遺伝子改変マウス胚を用いた、本手法の技術的妥当性の検証
2. 化学物質非投与野生型胚・全胚における、発生に関わる遺伝子発現の経時変化の解析
[マウス胎生6.25-9.75日](TIME POINT: 12点)
3. モデル発生毒性物質を妊娠マウスに投与した際の、胎児に対する本手法の適用と解析

背景1 毒性発現メカニズムに基づいた、より正確な発生毒性評価系の必要性

- 1) 種差(I): 被験物質サイド
例) サリドマイド
⇒ 実験動物で催奇形性という所見が認められなくても、ヒトでの催奇形性を予見しなければならない。
- 2) 種差(II): 実験動物サイド
例) 出生期
⇒ ラットの出生期はヒトでの胎生中期に相当するなど、両者の乖離を埋めて評価しなければならない。
- 3) 検出感度ならびに客観性の問題
例1) 対照群での発生異常(変異・奇形)
例2) 同一母体内での胎児間の差
例3) 変異と奇形の差
例4) 見過ごされやすい異常(機能障害、免疫障害、腫瘍発生頻度の変化、短命等)
⇒ 検出が難しい変化を、より正確・詳細・迅速に、把握しなければならない。

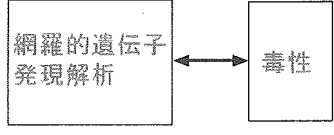
Figure 1: Heatmap showing gene expression changes across different developmental stages and treatments. The table lists various genes and their expression levels (log2 fold change) at different time points (E6.25, E7.25, E8.25, E9.25).

Gene	E6.25	E7.25	E8.25	E9.25
Alu	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu2	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu3	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu4	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu5	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu6	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu7	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu8	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu9	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu10	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu11	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu12	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu13	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu14	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu15	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu16	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu17	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu18	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu19	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu20	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu21	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu22	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu23	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu24	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu25	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu26	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu27	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu28	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu29	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu30	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu31	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu32	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu33	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu34	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu35	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu36	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu37	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu38	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu39	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu40	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu41	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu42	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu43	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu44	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu45	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu46	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu47	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu48	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu49	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu50	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu51	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu52	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu53	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu54	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu55	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu56	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu57	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu58	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu59	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu60	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu61	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu62	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu63	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu64	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu65	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu66	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu67	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu68	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu69	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu70	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu71	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu72	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu73	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu74	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu75	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu76	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu77	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu78	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu79	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu80	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu81	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu82	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu83	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu84	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu85	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu86	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu87	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu88	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu89	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu90	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu91	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu92	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu93	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu94	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu95	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu96	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu97	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu98	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu99	0.0	0.0	0.0	0.0
Alu100	0.0	0.0	0.0	0.0

より高精度な発生毒性評価系を構築するには

** より生命現象の本質に基づいた評価系へ **

化学物質投与 ⇒ 遺伝子発現変化 ⇒ 毒性発現

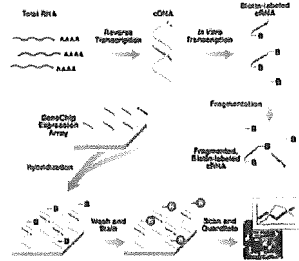


毒性発現に関わらず検出!!

GeneChip 解析

Features

- 1 One color analysis
- 2 Linear amplification of cRNA by *in vitro* transcription
- 3 Labeling of cRNA by biotin
- 4 Staining with streptavidin-phycoerythrin



Drawn by Dr. Igarashi

背景2

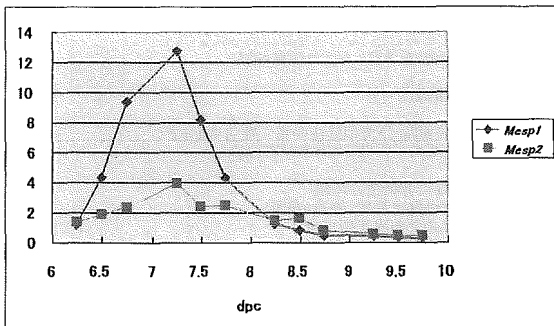
胎児を用いた遺伝子発現解析上の留意点

発生初期胚の遺伝子発現の特徴

adultとは異なり胎児では、発生に関与する遺伝子群は激しく経時的に変化することが容易に予想される。

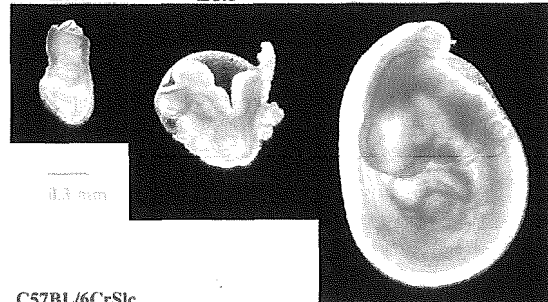
- 経時変化データにより、
- ・ シグナルカスケードを追跡しやすい可能性
- ・ 感受性期の同定が容易になる可能性

例: マウス全胚における *Mesp1*, *Mesp2* の遺伝子発現の経時変化



胎生7.5, 8.5, 9.5日のマウス胎児

E7.5 E8.5 E9.5



C57BL/6CrSlc

☆ プラグ確認日を0.5日とした。

[ステージおよびサンプリング選択理由]

本実験では、マウス胚は胎生6.25-9.75日の全胚を使用する

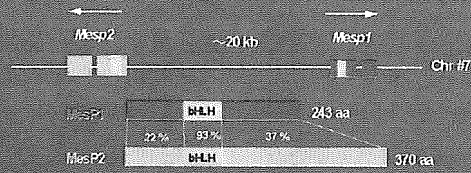
- a) 器官形成初期であり、初期中胚葉誘導が活発な時期であること、
- b) 毒性標的性が不明であるため全胚を検討したいこと、
- c) 現行の胚の変性・溶解プロトコル上、胎生9.5日付近が上限
- d) 遺伝子発現の確認のためのwhole mount ISHにおいても胎生9.5日付近が限界
- e) 6.25-9.75 で各種分子マーカーをwhole mount ISHで検討した経験がある

- ・ 本来は、胎生6.5日を入れたいがpool sample作製が現実的に不可能であることから、除去した。
- ・ また、この後のステージに関しても検討する必要があるが、まずはこの3日間データを収集する。

方法

1. モデル遺伝子改変マウス胚を用いた、本手法の技術的妥当性の検証

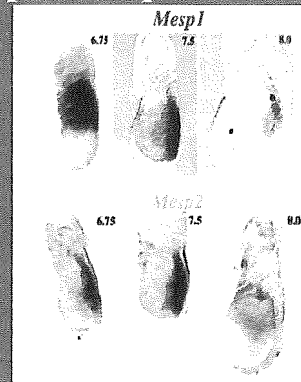
bHLH型転写因子 *Mesp1* および *Mesp2*



```

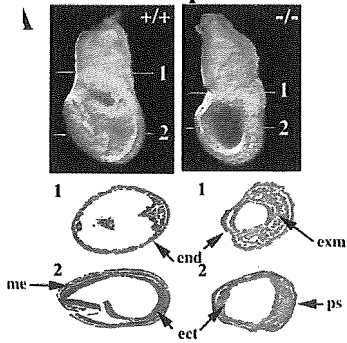
basic jnc Helix I loop Helix II
Mesp2 QRQS ASERKLR NRT LARALQLRRRELE PSVAPAQQLL KPTLRRLAIRYIGHLR
Mesp1 N-----N-----T-----N-----
Mesp1 R-----R-----Q-RRR-YY- RAL-----I-----S-----
Thylacine1 E-H-----M-----N-----N-----Y-----A-----V-----T-----S-----
M-TW141t --WI -HV--RQ- TQD -NE-FAA- KII- T- LKSD-K-S- Q-K-A- DFL
Paraxial ---A -HA--RD- TMS VHT-CTA- TII- T- RVDK-R-S- -----S-----A---
Mesp1 YEA- HMY--YE- YEA- ERLT-AM- KLS- T- LKSD-R-S- -----S-----S---
MyoD RKA- VM--RA- LSR VNE-FST- K-CTG DN- .PQR-R- V-I-N- EQL
    
```

*Mesp1*と*Mesp2*の発現の比較

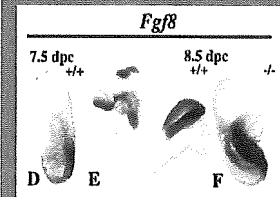
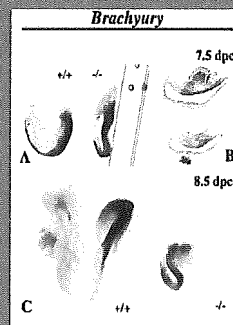


dKO 胚の表現型

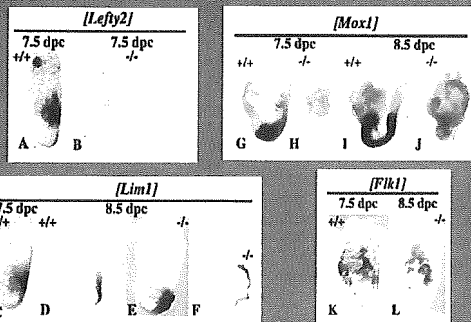
7.5 dpc



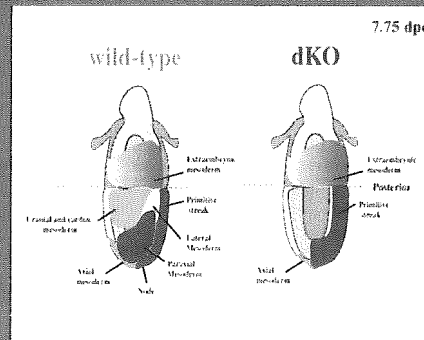
dKO 胚は胚性中胚葉形成不全である



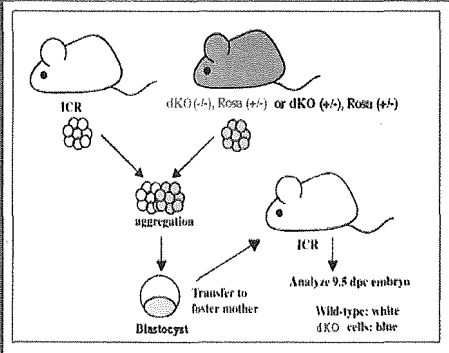
dKO 胚は胚性中胚葉形成不全である



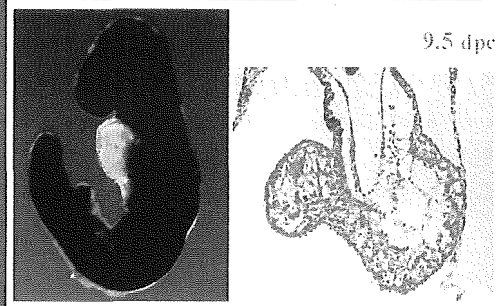
dKO 胚は胚性中胚葉形成不全を示す



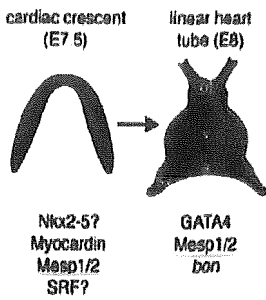
キメラ解析に向けたストラテジー



dKO 細胞は心臓形成に寄与できない



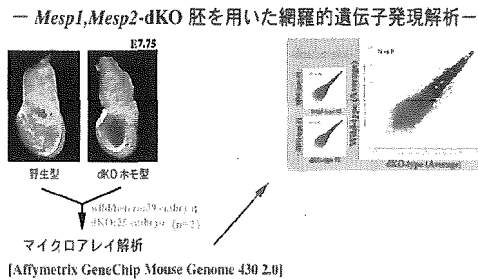
Mesp1, Mesp2は心臓中胚葉形成に必須な転写因子



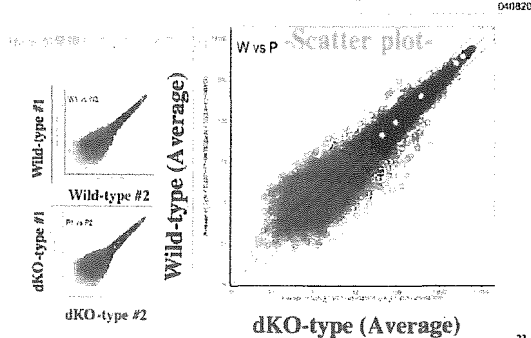
この遺伝子欠損胚を発生毒性モデル胚として使用する

Bruneau BG, *Circ Res* 90: 509-519, 2002

モデル遺伝子改変マウス胚を用いた GeneChip 解析の妥当性の検討



胎生7.75日の野生型および dKO胚を用いたGeneChip 解析



dKO胚で発現が減少している遺伝子群

胎生7.75日

-top ten-

Gene Title	Gene Symbol	Ratio	W average	発現部位
aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2	Aldh1a2	0.002	403.816	Myocardium
caudal type homeo box 1	Cdx1	0.003	279.158	Myocardium
troponin T2, cardiac	Tnnt2	0.027	76.5958	Myocardium
gastrulation brain homeobox 2	Gbx2	0.03	164.481	Brain
EST	---	0.037	18.6573	
SRY-box containing gene 11	Sox11	0.038	45.5636	Heart (OFT)
homeo box A1	Hoxa1	0.039	615.395	Brain
ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	Ankrd1	0.045	22.1695	Myocardium (IP3R)
EST	CO30002E06Rik	0.047	10.8268	
pleiotrophin	Pln	0.055	85.048	Brain