

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、神経管の閉鎖不全、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