

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

発育鶏卵に極微量のエストロン(E1)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ため、投与法を改善し、卵殻切開後、直視下で孵卵時（ステージ10）の鶏胚に投与しより正確に投与部位を特定できる方法に変えた。異常発生が再現されたので、E1の多段階投与により用量反応相関を確認した。孵卵0、1、2日の胚からERmRNAの検出に成功し、発生に伴う発現増加が確認された。ホルマウント標本作製の準備が完了した。

A. 研究目的

初期発育鶏卵に極微量のエストロン(E1)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とともに、発生初期過程での転写調節のかく乱による異常発生がウィンドウ効果として発現していることを確認する必要がある。

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、実体顕微鏡下で鶏胚の形態学的観察を行った。

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き対照と比較した。投与部位をより正確にするため、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 $1 \mu\text{l/g}$ 卵重の割合でE1溶液または溶媒溶液を投与した。投与後切開部位をサランラップで閉鎖、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た。孵卵直前（ステージ10）、孵卵後24および48時間の無処置胚から総mRNAを抽出し、RTPCR法によりERmRNAを増幅し、2%アガロースゲル電気泳動後エチジウムブロマイド染色によってcERmRNAを確認した。

（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

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=27)には、異常胚は観察されず、体節数は平均 12.7 ± 3.5 (SD)で、7から18の範囲に分布した。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=11)では、45.5%の胚に何らかの異常が見られ、体節数は平均 7.5 ± 3.1 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1～2に示す。

体節数は用量相関的に減少していた。形態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。

孵卵0、24及び48時間後の胚からのmRNAのRTPCRによるcERmRNAの増幅により、いずれの発生時期にもcERmRNAが発現していることが確認された。定性的には、cERmRNAの発現量は発生の進行につれ増加するように見えた(図4)。

D. 考察

昨年度実施した、卵殻に小孔を開け、そこからハミルトンシリンジで卵黄中央に投与する方法では、投与液は胚盤葉下層の卵黄側に移動して接触することを確認したが、到達に要する時間、投与液の分布する範囲等が制御できない。したがって、今回は卵殻を円鋸で切開し、卵殻及び卵殻膜を一部除去して、直視下で胚を確認し、胚直下にハミルトンシリンジを刺入して投与を行った。今回の対照群の成績から、この方法で孵卵しても発生停止などの悪影響はないこと、48時間で達する通常の発生段階に到達することが確認された。

今回の500pg/embryoの投与は、昨年の投与と同等の量の投与に相当する。胚盤葉下層の欠落および異常胚の出現率は、昨年の場合と同じと考えられた(それぞれ $\chi^2=0.2427$ 、 0.2237)。したがって、昨年の成績が再現されたと考えられた。

今年の実験群では、10倍高い用量でも

同様な異常の発生が認められた。異常発生率は 500pg/embryo 群と差がなかった(胚盤葉下層の欠落 $\chi^2=0.4729$; 異常胚 $\chi^2=0.5734$)。これらの異常出現が E1 濃度に対して既に飽和しているのか否か確認するためさらに高濃度での実験が必要であると考えられた。

一方で、体節数の減少には、明らかな用量相関関係が認められた。術者の不注意によりデータとして扱うことのできなかった低用量群(500pg/embryo 群の約 1/20)の 200 例以上の成績では、少数の軽度な尾部の湾曲が見られたのみで、体節数には対照群との間に差はなかった。この実験については再度実施する必要があるが、E1 の胚発生攪乱作用には閾値がある可能性が示唆された。

マウスの初期胚では、Na/K ATPase、ラミン A、B、ラミニン、ウボモルリン、ギャップジャンクション蛋白、PDGF、TGF β ファミリーの nodal、チミジンキナーゼ、カタラーゼ、Cu Zn スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、MnSOD、グルタチオンペルオキシダーゼなどに加えて、アンテナペディアとバイソラックスクラスに属する多数の Hox 遺伝子が発現していることが報告されている。これまでに E1 で引き起こされた異常は、体軸の分裂、体節の配列異常、神経管閉鎖不全などボディプランに影響が及んだことを示唆している。

ステージ 10 の鶏胚は哺乳類の肺胞の発生階と相同である。ERmRNA 発現につ

いては、ヒト受精卵で卵巣顆粒膜細胞から移動したのとして、鶏胚では孵卵 4、5 日で検出されたとの報告がある。孵卵 2 日以前に検出の報告はまだない。今後、上述のボディプラン関連遺伝子の発現と ER の関係を明らかにする必要がある。今回見られた異常は、途中経過が未解明ではあるが、ER が E1 によって活性化され、胚盤葉下層の消失、ボディプランの攪乱に関与している遺伝子群の遺伝子発現に影響を及ぼしていることを示唆するものである。

これまでのところ、投与群で 100% の胎児に発現する異常はまだとらえられていない。さらに高い用量でそのような現象が見られなかった場合には、反応の個体差の原因を確かめる必要が生じる。特に、胚盤葉下層の初期発生に対する制御的役割を調べるには、この現象が 100% 生じる条件を確立する必要がある。

E. 結論

500ng および 1ng/embryo の E1 をステージ 10 の鶏胚直下の卵黄に投与すると、約 10% の胚で胚盤葉下層の欠落、約 40~60% の胚に二重体、神経管閉鎖不全など体軸のゆがみを生じる。またステージ 10、孵卵後 24 及び 48 時間後の胚で、RTPCR 法により、ERmRNA の発現が確認され、発生の進行に伴って ERmRNA の発現増加が示唆された。これらの発生攪乱は外来性の E1 が ER を活性化させ、関係する遺伝子発現を変調するために生

じたと考えられた。

医師の役割、アニマリタリアン、
vol.9:1.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki H, Fukaya S, Saito K, and Suzuki K (2000) Mapping of a locus on rat chromosome 11 responsible for osteochondrodysplasia(ocd). Mammalian Genome (in submission)
2. Akimoto T, Suzuki H, Arai Y, Nakama K and Suzuki K (2000) A locus responsible for dominant hairless gene (Ht) is located on rat chromosome 10. Experimental Animal (accepted)
3. 鈴木勝士(1999) エストロンの初期鶏胚の発生に及ぼす影響、内分泌攪乱物質学会ニュースレター、4: 2-3.
4. Suzuki H, Kokado M, Saito K, Kunieda T and Suzuki K (1999) A locus responsible for hypogonadism (hgn) is located on rat Chromosome 10, Mammalian Genome 10(11):1106-1107.
5. 板垣昌志、阿部省吾、阿部栄、酒井淳一、鈴木勝士(1999) 乳牛の潜在性乳房炎と乳頭口異常の関連、日本獣医師会雑誌 52(9) 561-564.
6. 鈴木勝士(1999)環境ホルモンと獣

1. 学会発表

1. 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
2. 斉藤賢一、雑賀寿和、鈴木浩悦、鈴木勝士、横山修一(1999)マイクロ波照射がウサギおよびサルのおよぼす影響、電気学会計測研究会 IM99-66 p39-42
3. 高橋純子、高須正規、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士、横山修一(1999)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、電気学会計測研究会 IM99-65 p.33-37
4. 斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士、内堀雅隆、横山修一、辻 隆之(1999)先天性癲癇モデル動物(EI Mouse)の睡眠時脳波における加齢に伴う変化、第31回成長談話会大会 (抄録p22)
5. 高須正規、高橋純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)Ei および ddY マウスの脳硬膜上からの短潜時聴覚脳幹誘発反応(ABR)の解析、第127回日本獣医学会
6. 深谷幸代、鈴木浩悦、高橋純子、丸ひろみ、井出雅子、新井豊、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)骨軟骨形成不全症(ocd/ocd)ラットの原因遺伝子は

- 第 11 染色体上に存在し D11Mgh3 と連鎖している、第 127 回日本獣医学会
7. 醍醐久美、鈴木浩悦、中宮英次郎、八木未央、岡田美香、新井豊、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)ラット精巢形成不全症病因遺伝子の探索：hgn 遺伝子の雌表現型におよぼす影響の評価、第 127 回日本獣医学会
 8. 太田千春、徳力剛、高須正規、平林美紀、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士 (1999) 腎低形成症の腎不全状態の基礎的評価、第 127 回日本獣医学会
 9. 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、新井豊、八木未央、竹中基郎(1999) 鶏胚でのエストロンによる発生かく乱とエストロゲンレセプター mRNA の発現、第 127 回日本獣医学会
 10. 鈴木浩悦、中宮英次郎、醍醐久美、岡田美香、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士(1999)ラット精巢形成不全症病因遺伝子の探索：連鎖するマーカーの整列化とマウス 11 番染色体上での位置の推定、第 127 回日本獣医学会
 11. 尼崎肇、鷹栖雅峰、岩間良子、小川実幸、日比佐知子、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)マウス口蓋ヒダ形成過程におけるテネインと NCAM の発現分布、第 127 回日本獣医学会
 12. Saito, K., H. Suzuki and K. Suzuki (1999) Adverse developmental effects of low intensity radio frequency radiation at 428MHz on chick embryo. 2nd joint international symposium of Congenital Anomalies in Korea. (10/1~10/2: chunchon)
 13. 鈴木浩悦、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士(1999)ラット精巢形成不全症病因遺伝子の探索、日本アンドロロジー学会
 14. 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、竹中基郎、八木未央(1999)鶏胚でのエストロゲンレセプター mRNA の発現とエストロンによる発生かく乱、第 39 回日本先天異常学会
 15. 斉藤賢一、醍醐久美、横山修一、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)直流磁場照射のマウス胎子におよぼす影響、第 39 回日本先天異常学会
 16. 小川実幸、尼崎肇、鷹栖雅峰、岩間良子、日比佐知子、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999) マウス口蓋ヒダ形成過程にみられる上皮細胞の増殖とアポトーシス、第 2 回日本組織工学会
 17. 鈴木浩悦、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士(1999)ラットの第 10 染色体上に存在する精巢形成不全症病因遺伝子の探索：高度に連鎖するマーカーの検索とマウス第 11 染色体上での位置の推定、第 46 回日本実験動物学会
 18. 中宮英次郎、鈴木浩悦、醍醐久美、

八木美央、平林美紀、斉藤賢一、鈴木勝士(1999)ラット 10 番染色体上に存在する精巢形成不全症病因遺伝子の探索：病因遺伝子周辺のマップ作成、第 126 回日本獣医学会

なし

19. 松倉克仁、鷺巣 誠、倉繁裕美、尼崎 肇、中條真二郎、清水一政、浦川紀元、鈴木勝士(1999)犬糸状虫感染犬の肺動脈病変形成に対するアンギオテンシン変換酵素阻害薬およびアンギオテンシン・受容体拮抗薬の効果、第 126 回日本獣医学会

20. 岩間良子、小川実幸、日比佐知子、尼崎 肇、鷹栖雅峰、福島正則、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)マウス口蓋ヒダ形成過程における上皮プラコード領域での上皮細胞の増殖と移動、第 126 回日本獣医学会

21. 高橋純子、高須正規、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士(1999)マウスの脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位、ME とバイオサイバネティクス研究会、信学技報 Technical Report of IEICE, MEB98-126

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. 実用新案登録



图-1 正常發生鶏胚

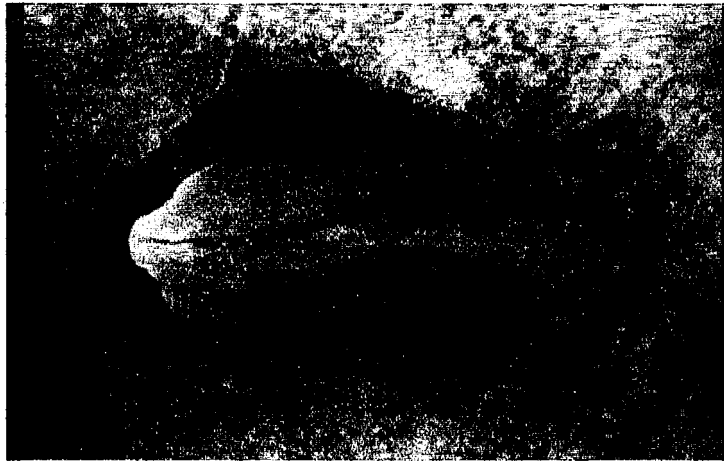


图-2 發生遲延鶏胚 I



图-3 發生遲延鶏胚 II

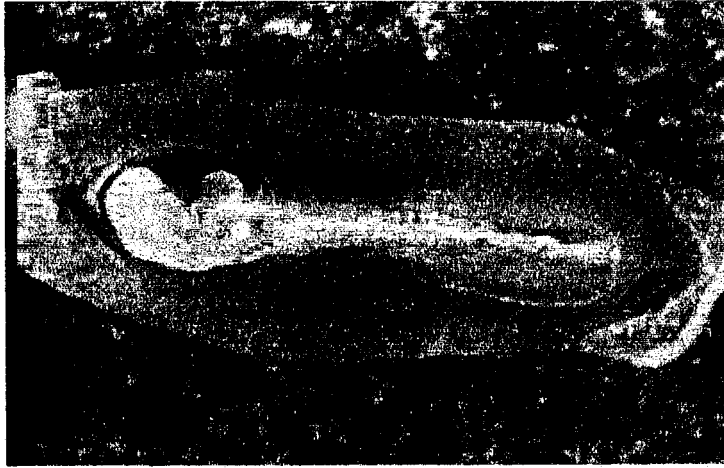


図-4 形態異常鶏胚I (神経管の蛇行)



図-5 形態異常鶏胚II (神経管の蛇行)

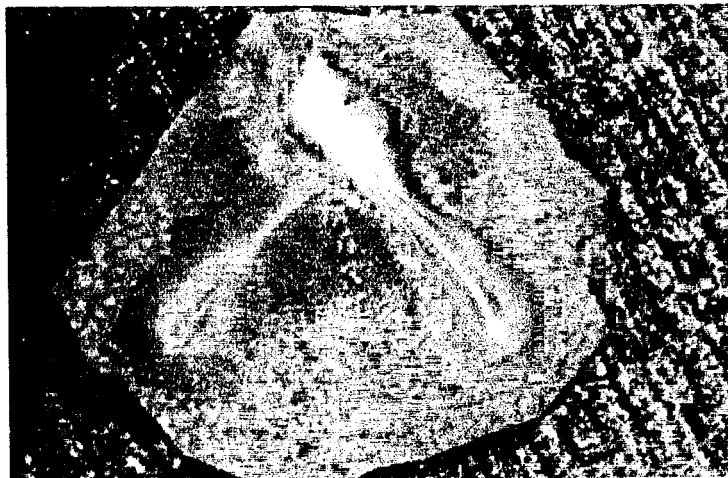


図-6 形態異常鶏胚III (二重鶏胚)



図-7 胚盤葉下層欠落

表1 48時間解卵で見られた体節数と異常の内訳

	卵数	体節数	S. D.	n=	正常胚数	異常胚数	異常率	胚盤葉下層
対照群 DMSO投与	27	12.70	3.45	27	27	0	0%	0
実験群 Estrone投与 500pg/embryo	34	11.07	4.27	30	13	17	57%	4
5ng/embryo	11	7.50	3.06	10	6	4	40%	1