

哺乳動物培養胚を用いた内分泌かく乱物質の中枢神経および生殖細胞に及ぼす影響

分担研究者 渡辺敏明 山形大学医学部衛生学教室助教授

研究要旨

培養胚の神経細胞および生殖細胞を利用して、内分泌かく乱化学物質の新しい試験法を確立する。本年度、estradiol benzoate および diethylstilbestrol によって、ラット培養胚に形態異常が誘発された。また培養胚の心臓、卵黄嚢膜、神経細胞においてエストロゲンレセプター（ER）が発現していることが確認された。培養胚の発育や形態による内分泌かく乱化学物質の検出は難しく、神経細胞における ER やアポトーシスなどを指標とした試験法について、さらに検討する。

A. 研究目的

本研究においては、哺乳動物全胚培養法を利用して、内分泌かく乱化学物質の新しい試験法を確立する。本年度は、エストロゲン作用をもつ estradiol benzoate (EB) および diethylstilbestrol (DES) の形態形成への影響を調べた。また培養胚におけるエストロゲンレセプター（ER）の発現の有無と局在について検討した。なお、エストロゲン作用は明らかではないが、内分泌-生殖系への影響が報告（Fujii et al. 1996 など）されている生活環境化学物質であるグルホシネート（GLA）についても検討した。

B. 研究方法

ラットの胎齢 12 日 (ED12) および ED13 胚を用いて、ウエスタンブロット法で ER の発現の有無を検討した。また、培養胚のパラフィン埋包切片を用いて、免疫組織化学染色で ER の局在を調べた。一次抗体として、抗 ER- α 抗体 (rabbit polyclonal IgG: MC-20, Santa Cruz Biotechnology) と抗 ER- β 抗体 (goat polyclonal IgG: Y-19) を用いた。

全胚培養によって、ED9.5 あるいは ED11.5 胚に対する EB (0.01-100 μ g/mL)、DES (0.05-100 μ g/mL) あるいは GLA (0-25 μ g/mL) の影響を、形態学および病理組

織学的に観察をした。

なお、これらの研究は動物の福祉に配慮し、すべての動物実験は山形大学医学部および（財）食品薬品安全センター秦野研究所の「動物実験指針」に従って、実施した。

C. 研究結果

ウエスタンブロット解析により、ラット胚の ED12 および ED13 において、ER- β の発現がタンパク質レベルで検出された (Fig. 1)。また、免疫組織化学染色により、ER- α および ER- β が、培養胚の心臓（内皮細胞）、卵黄嚢膜および卵黄嚢動脈（核や細胞質）において、強く発現していることが確認された (Figs. 2-4)。胚頭部の神経上皮細胞層においても、ER と疑われる陽性細胞がみられた (Fig. 5)。

EB および DES をラット ED9.5 培養胚に暴露すると、EB 暴露胚では発育の抑制はみられなかったが、心臓の腫大、臍帯および肢芽の浮腫などの形態異常が高率に観察された (Table 1) (Figs. 6, 7)。DES 暴露胚では、頭部の出血性変化や腹部の浮腫が特徴的に観察された (Fig. 8)。

GLA 暴露 ED9.5 胚においては、頭部の水疱や前脳の低形成などの顔面頭部の異常が観察された (Table 2) (Fig. 9)。ED11.5 胚に

においても、GLA 暴露によって、前脳や頭部の水疱、前脳の低形成が特異的にみられた（Table 3）（Fig. 10）。これらの胚頭部の神経上皮細胞には多数のアポトーシスが確認された（Fig. 11）。

D. 考察

ラット ED9.5 および ED11.5 胚において、EB および DES 暴露によって浮腫や出血性変化などの形態異常が誘発された。しかし、これらの異常は、胚が死亡する高濃度のみでみられ、EB や DES の毒性によるものと考えられる。このように、培養胚の発育や形態を指標した試験法は感度が低く、内分泌かく乱物質の検出は可能ではない。一方、これらの培養胚においては、ER- α および ER- β が心臓、卵黄嚢膜、卵黄嚢動脈に強く発現していた。また神経細胞においても ER 陽性と疑われる細胞が認められた。これらは、EB および DES 暴露によって形態異常がみられた部位である。

内分泌かく乱化学物質の神経系の発生に対する影響は、これまでほとんど注目されておらず、適切なエンドポイントやバイオマーカーは確立していない。本研究においては、ラット培養胚において、頭部の神経上皮細胞に ER の陽性細胞やアポトーシスの誘発がみられている。そこで、培養胚の神経細胞における ER、アポトーシスやその他のマーカーを指標した内分泌攪乱物質の試験法について、さらに検討していく予定である。

E. 結論

ラット全胚培養法を用いて、EB および DES の胚発育および形態形成に及ぼす影響を検討した。培養胚の発育や形態を指標とした内分泌かく乱物質の検出は困難であり、神経細胞における ER やアポトーシスなどを指標とした試験法について今後検討する。

本研究は、（財）食品薬品安全センター秦野研究所の桑形麻樹子氏との共同で行ったものである。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. Kuwagata M, Watanabe C, Takashima H, Aoyama H, Watanabe T, Ono H. Evaluation of embryotoxicity of estradiol benzoate and diethylstilbestrol using whole embryo culture. Altern Ani Test Exp 1999;6. (in press)
2. Kato T, Watanabe T, Sakurada K, Wakabayashi I, Maeda K, Hachiya M, Akashi M. Mutagenic effects of heavy-ion beams on spermatogenesis in mice. Teratology 1999. (in press)
3. Watanabe T, Kato T, Sakurada K, Wakabayashi I, Kato M, Hachiya M, Akashi M. Effects of heavy-ion beams on sperm morphology and motility in mice. Teratology 1999. (in press)

厚生科学研究補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

Table 1. Effects of estradiol benzoate and diethylstilbestrol on embryonic development of rats in culture

Compounds doses ($\mu\text{g/mL}$)	Number of embryos cultured	Number of dead embryos	Number of live embryos	Viability index (%)	Crown-rump length (mm)	Head length (mm)	Number of embryos with morphological defects (%)
DMSO(Control)	20	3	17	85.0	8.0 ± 2.5^a	4.3 ± 2.4	0(0)
Estradiol benzoate							
100	9	8	1	11.1**	8.0	4.2	1(100)
80	10	10	0	0.0**	-	-	-
50	10	6	4	40.0*	7.6 ± 0.4	4.3 ± 0.2	3(75.0)**
1	9	4	5	55.6	7.5 ± 0.4	4.2 ± 0.2	3(60.0)**
0.01	8	0	8	100.0	7.6 ± 1.0	4.2 ± 0.7	0(0)
Diethylstilbestrol							
100	2	2	0	0.0*	-	-	-
50	10	5	5	50.0	$6.7 \pm 0.3^*$	3.7 ± 0.2	5(100)**
5	5	1	4	80.0	8.2 ± 1.3	4.5 ± 2.4	0(0)
0.5	5	0	5	100.0	7.9 ± 2.5	4.4 ± 1.9	0(0)
0.05	3	0	3	100.0	7.6 ± 1.4	4.4 ± 2.1	0(0)

^amean $\pm$ SD

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with the control.

^a $p < 0.1$, compared with the control.

Table 2. Effects of glufosinate on embryonic development of rats from ED 9.5 to 11.5 in culture

	Glufosinate($\mu\text{g/ml}$)					
	0(Control)	1.25	5	10	15	20
Number of embryos cultured	32	24	20	20	24	24
Yolk sac diameter (mm)	4.46 ± 0.24^a	4.46 ± 0.29	4.65 ± 0.33	4.60 ± 0.28	4.51 ± 0.27	4.48 ± 0.29
Placenta diameter (mm)	1.09 ± 0.19	0.97 ± 0.13	1.11 ± 0.17	1.10 ± 0.10	1.08 ± 0.10	1.09 ± 0.11
Crown-rump length (mm)	3.89 ± 0.29	3.74 ± 0.21	3.76 ± 0.32	$3.50 \pm 0.24^{**}$	$2.69 \pm 0.34^{**}$	$2.52 \pm 0.32^{**}$
Head length (mm)	1.98 ± 0.19	1.91 ± 0.15	1.91 ± 0.22	$1.68 \pm 0.16^{**}$	$1.30 \pm 0.16^{**}$	$1.12 \pm 0.17^{**}$
Number of somites paired	28.2 ± 1.20	28.1 ± 1.30	27.6 ± 1.73	$26.8 \pm 2.31^*$	$24.7 \pm 2.27^{**}$	$21.5 \pm 3.82^{**}$
Morphological score	39.2 ± 0.90	38.9 ± 0.88	39.2 ± 0.70	$39.1 \pm 0.99^{**}$	$27.6 \pm 4.92^{**}$	$22.7 \pm 3.42^{**}$
Number of embryos with						
morphological defects	0	1(4.2)	0	20(100)	24(100)	24(100)
non-turning in body axis	0	0	0	0	1(4.2)	8(33.3)**
prosencephalon hypoplasia	0	0	0	20(100)**	13(54.2)**	4(16.7)*
prosencephalon blister	0	0	0	0	3(12.5)	5(20.8)*
craniofacial cleft	0	0	0	0	10(41.7)**	20(83.3)**
craniofacial asymmetry	0	0	0	0	9(37.5)**	1(4.2)
lateral head blister	0	0	0	4(20.0)*	16(66.7)**	16(66.7)**
anterior neuropore open	0	0	0	0	1(4.2)	1(4.2)
caudal neuropore open	0	0	0	0	0	1(4.2)
heart tube dysmorphogenesis	0	0	0	0	0	2(8.3)
inverted hear tube	0	1(4.2)	0	0	2(8.3)	1(4.2)

^amean $\pm$ SD. (): %.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significant difference from the control.

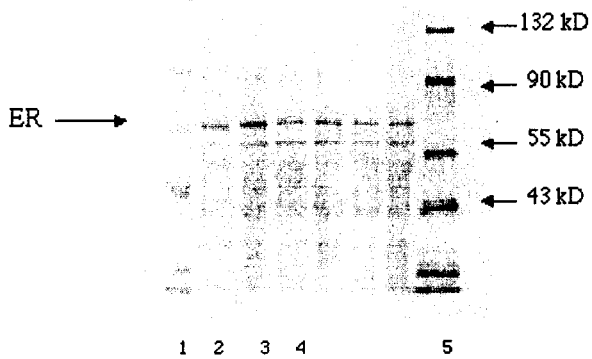
厚生科学研究補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

Table 3. Effects of glufosinate on embryonic development of rats from GD 11.5 to 13.5 in culture

	Glufosinate(μ g/ml)			
	0(Control)	1.25	5	20
Number of embryos cultured	18	18	18	18
Number of dead embryos	0	0	0	2(11.1)
Number of live embryos analyzed	18	18	18	16
Placenta diameter (mm)	2.8 $\pm$ 0.30 ^a	2.9 $\pm$ 0.36	2.8 $\pm$ 0.27	2.6 $\pm$ 0.27
Head length (mm)	4.1 $\pm$ 0.21	4.1 $\pm$ 0.14	4.0 $\pm$ 0.19	3.8 $\pm$ 0.18*
Crown-rump length (mm)	7.9 $\pm$ 0.47	7.7 $\pm$ 0.39	7.3 $\pm$ 0.33*	7.2 $\pm$ 0.40*
Number of somites paired	47.8 $\pm$ 0.94	47.8 $\pm$ 0.86	47.4 $\pm$ 1.04	47.3 $\pm$ 1.08
Number of embryos with				
morphological defects	0	0	18(100)*	16(100)*
yolk sac diffused white patch	0	0	9(50.0)*	16(100)*
primary palate blister	0	0	7(38.9)*	16(100)*
nasal processes hypoplasia	0	0	18(100)*	16(100)*
prosencephalon hypoplasia	0	0	18(100)*	16(100)*
prosencephalon blister	0	0	2(11.1)	8(50.0)*
lateral head blister	0	0	0	12(75.0)*
eye deformation	0	0	4(22.2)	16(100)*
forelimb bud hypoplasia	0	0	14(77.8)*	16(100)*
hindlimb bud hypoplasia	0	0	18(100)*	16(100)*

^amean $\pm$ SD. (): %.

*p<0.01, significant difference from the control.



- 1; molecular marker
2; ラット子宮（陽性対照）
3; 胎齢12日胚
4; 胎齢13日胚
5; molecular marker

Fig. 1 ウェスタンブロット法による ER の検出



Fig. 2 ER- α の検出 (IHC 法、成獣子宮)



Fig. 3 培養胚の心臓 (ER- α)



Fig. 4 培養胚の卵黄嚢膜・卵黄嚢動脈(ER- β)



Fig. 5 培養胚の神経細胞(ER- α)

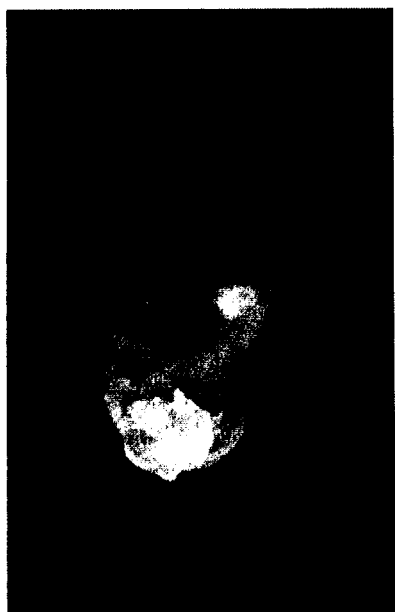


Fig. 6 対照胚

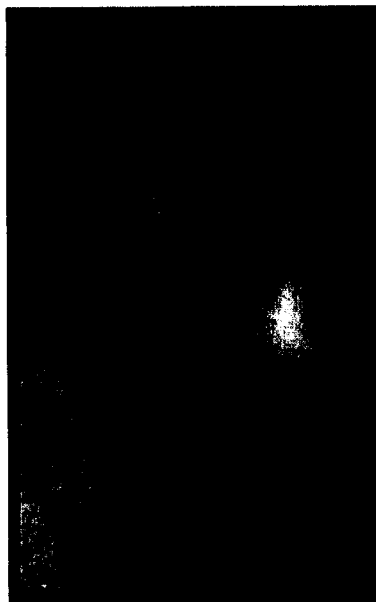


Fig. 7 EB 暴露培養胚



Fig. 8 DES 暴露培養胚

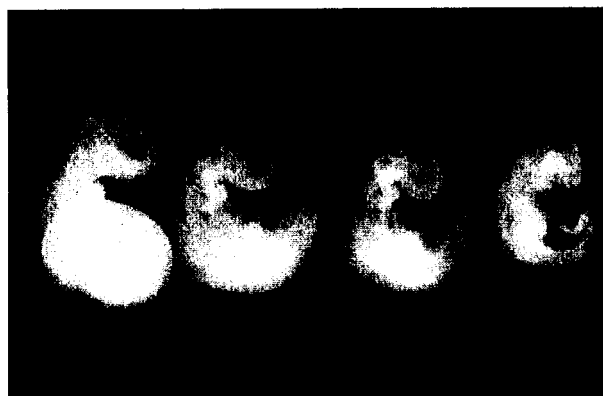


Fig. 9 GLA 暴露培養胚 (ED9.5)



Fig. 10 GLA 暴露培養胚 (ED11.5)

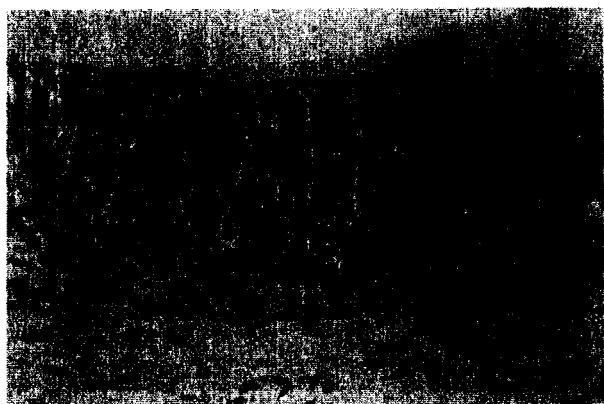


Fig. 11 GLA 暴露培養胚の神経細胞における
アポトーシス (Tunel 染色)